

**PHARMAKOKINETISCHE/PHARMAKODYNAMISCHE ANSÄTZE ZUR  
DOSISOPTIMIERUNG ANTITUMORALER METALLKOMPLEXE**

Dissertation

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

Vorgelegt von  
ANNE DRESCHER  
aus Görlitz

Bonn 2010

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

1. Gutachter: Prof. Dr. U. Jaehde

2. Gutachter: Prof. Dr. Ch. Ritter

Tag der Promotion: 02.11.2010

Erscheinungsjahr: 2011

Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde am Pharmazeutischen Institut der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn unter der Leitung von Prof. Dr. Ulrich Jaehde angefertigt.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Ulrich Jaehde danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und das in mich gesetzte Vertrauen. Seine volle und fördernde Unterstützung und die mir gewährten Freiräume haben mich stets während meiner Promotion motiviert.

Ebenso gilt mein besonderer Dank Prof. Dr. Christoph Ritter für die Bereitschaft das Koreferat zu übernehmen

Den Kooperationspartnern in verschiedenen Kliniken Prof. Dr. C. Dittrich, Prof. Dr. A. Hochhaus, Prof. Dr. M. E. Scheulen, PD Dr. D Strumberg, Dr. R. A. Hilger sowie allen beteiligten Ärzten und technischen Assistenten danke ich für die Zusammenarbeit bei den gemeinsamen Projekten. Alle Patienten, die sich trotz ihrer nicht einfachen Situation zur Teilnahme an den pharmakokinetischen Untersuchungen bereiterklärt und damit zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben, gilt mein besonderer Dank.

Veronika Vokata, Choloud Salama, Sheila Schaad und Dr. Frederike Lentz danke ich für ihre tatkräftige Unterstützung und die gute Zusammenarbeit.

Ebenso danken möchte ich Andreas Lindauer für das Korrekturlesen meiner Arbeit und für seine Hilfsbereitschaft und Geduld bei allen Programmierungs- und Computerfragen.

Dr. Anya Kalayda, Carina Mohn, Hauke Rühls und Katja Vobiller danke ich ebenfalls sehr für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ganz besonders möchte ich mich bei Susanne Ringsdorf, Carina Mohn, Manrique Arias und Albia Consul für ihre Freundschaft bedanken und ihr stets offenes Ohr.

Bei allen Mitgliedern des Arbeitskreises Klinische Pharmazie der Universität Bonn bedanke ich mich für die freundschaftliche Aufnahme und Hilfsbereitschaft in jeder Situation.

Meiner Familie danke ich sehr für ihre Unterstützung und den seelischen Beistand. Nicht genug kann ich meinen Eltern danken, die mir meinen Werdegang ermöglicht haben und mir in allen Phasen meines Lebens stets unterstützend und motivierend zur Seite standen. Meinem Freund, Tobias Keunecke, danke ich besonders und von ganzem Herzen für sein Verständnis, seine Geduld und Unterstützung.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei allen meinen Freunden und Bekannten sowie bei Frau Prof. Dr. Charlotte Kloft und allen Mitarbeitern des Arbeitskreises Klinische Pharmazie der Universität Halle für ihre Geduld und ihr Verständnis bedanken .



---

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Platinkomplexe .....</b>	<b>1</b>
1.1.1	Überblick .....	1
1.1.2	Pharmakodynamische Eigenschaften.....	4
1.1.3	Reparatur und Resistenz .....	9
1.1.4	Pharmakokinetische Eigenschaften.....	13
1.1.5	Klinische Anwendung.....	15
<b>1.2</b>	<b>Neue tumorwirksame Metallkomplexe.....</b>	<b>18</b>
1.2.1	Überblick .....	19
1.2.2	Pharmakodynamische Eigenschaften.....	22
<b>1.3</b>	<b>Populationspharmakokinetische/pharmakodynamische Strategien der Therapieoptimierung in der Onkologie .....</b>	<b>28</b>
1.3.1	Pharmakokinetische Dosisindividualisierung.....	29
1.3.2	Pharmakodynamische Dosisindividualisierung.....	30
<b>2</b>	<b>ZIELSETZUNG.....</b>	<b>33</b>
<b>2.1</b>	<b>Quantifizierung und Pharmakokinetik neuer tumorwirksamer Metallkomplexe.....</b>	<b>33</b>
<b>2.2</b>	<b>Populations-PK/PD-Modell zur Beschreibung der Pharmakokinetik von Platin im Ultrafiltrat und zur Platin-DNA-Addukt-Bildung in Leukozyten.....</b>	<b>34</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>36</b>
<b>3.1</b>	<b>Material .....</b>	<b>36</b>
3.1.1	Chemikalien und Reagenzien .....	36
3.1.2	Hergestellte Puffer und Lösungen .....	37
3.1.3	Verbrauchsmaterialien .....	38

---

3.1.4	Geräte .....	38
3.1.5	Software .....	40
<b>3.2</b>	<b>Validierung analytischer Methoden .....</b>	<b>40</b>
3.2.1	Selektivität.....	41
3.2.2	Messbereich und Bestimmungsgrenze .....	41
3.2.3	Linearität.....	41
3.2.4	Wiederfindung .....	42
3.2.5	Richtigkeit und Präzision .....	43
3.2.6	Stabilität.....	44
3.2.7	Qualitätssicherung während der Messung.....	45
<b>3.3</b>	<b>Pharmakokinetische Datenanalyse.....</b>	<b>46</b>
3.3.1	Nicht-kompartimentelle Datenanalyse .....	46
3.3.2	Kompartimentelle Datenanalyse.....	48
3.3.3	Populationspharmakokinetische/pharmakodynamische Datenanalyse ....	49
<b>3.4</b>	<b>Projekt I: Methoden zur Bestimmung von Gallium in Vollblut, Plasma und Urin .....</b>	<b>59</b>
3.4.1	Geräteeinstellungen und Temperaturprogramm .....	59
3.4.2	Modifier .....	61
3.4.3	Probenaufarbeitung .....	62
3.4.4	Kalibrierung.....	63
3.4.5	Herstellung von Stamm- und Arbeitslösungen.....	64
3.4.6	Herstellung der Kalibratorlösungen .....	64
3.4.7	Konzentrationsberechnung.....	66
3.4.8	Qualitätssicherung während der Messung.....	66
<b>3.5</b>	<b>Projekt II: Methoden zur Bestimmung von Ruthenium in Plasma und Urin .....</b>	<b>67</b>
3.5.1	Geräteeinstellungen und Temperaturprogramm .....	68
3.5.2	Probenaufarbeitung .....	70

---

3.5.3	Kalibrierung .....	70
3.5.4	Herstellung von Stamm- und Arbeitslösungen .....	71
3.5.5	Herstellung der Kalibratorlösungen.....	71
3.5.6	Konzentrationsberechnung .....	72
3.5.7	Qualitätssicherung während der Messung .....	73
<b>3.6</b>	<b>Projekt III: Pharmakokinetik von KP46.....</b>	<b>74</b>
3.6.1	Klinische Studie .....	74
3.6.2	Probenentnahmen .....	77
3.6.3	Pharmakokinetische Datenanalyse.....	78
<b>3.7</b>	<b>Projekt IV: Pharmakokinetik von KP1019.....</b>	<b>79</b>
3.7.1	Klinische Studie .....	79
3.7.2	Probenentnahmen .....	81
3.7.3	Pharmakokinetische Datenanalyse.....	82
<b>3.8</b>	<b>Projekt V: Population-PK/PD-Analyse von Oxaliplatin .....</b>	<b>87</b>
3.8.1	Klinische Studien.....	87
3.8.2	Probenentnahmen .....	90
3.8.3	Erstellung des NONMEM®-Datensatzes .....	90
3.8.4	Modellierungsstrategien .....	93
3.8.5	Modellevaluation .....	99
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>102</b>
<b>4.1</b>	<b>Projekt I: Quantifizierung von Gallium in Vollblut, Plasma und .....</b>	<b>102</b>
	<b>Urin .....</b>	<b>102</b>
4.1.1	Messbedingungen und Temperaturprogramme .....	102
4.1.2	Probenaufarbeitung.....	104
4.1.3	Methodenvalidierung .....	105
<b>4.2</b>	<b>Projekt II: Quantifizierung von Ruthenium in Plasma und Urin .....</b>	<b>118</b>

---

4.2.1	Messbedingungen und Temperaturprogramme .....	118
4.2.2	Probenaufarbeitung .....	119
4.2.3	Methodenvalidierung.....	119
<b>4.3</b>	<b>Projekt III: Pharmakokinetik von KP46 .....</b>	<b>132</b>
4.3.1	Konzentrations-Zeit-Profile.....	133
4.3.2	Individuelle Pharmakokinetik .....	135
4.3.3	Dosislinearität .....	139
<b>4.4</b>	<b>Projekt IV: Pharmakokinetik von KP1019 .....</b>	<b>139</b>
4.4.1	Konzentrations-Zeit-Profile.....	140
4.4.2	Individuelle Pharmakokinetik .....	142
4.4.3	Dosislinearität .....	145
<b>4.5</b>	<b>Projekt V: Populations-PK/PD Modell zur Platin-DNA-Addukt- Bildung in Leukozyten.....</b>	<b>147</b>
4.5.1	Daten .....	147
4.5.2	Konzentrations-Zeit-Profile.....	149
4.5.3	Populationspharmakokinetisches Modell für Platin im ultrafiltrierten Plasma .....	151
4.5.4	Semimechanistisches PK/PD-Modell für Platin-DNA-Addukt-Bildung in Leukozyten .....	164
4.5.5	Einfluss der Platin-DNA-Addukt-Bildung auf das Tumoransprechen.....	169
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>175</b>
<b>5.1</b>	<b>Quantifizierung von Ruthenium bzw. Gallium in biologischen Matrizes.....</b>	<b>176</b>
5.1.1	Quantifizierung von Gallium in Vollblut, Plasma und Urin .....	176
5.1.2	Quantifizierung von Ruthenium in Plasma und Urin.....	184
5.1.3	GF-AAS und ICP-MS in der Bioanalytik von Metallkomplexen .....	188

---

<b>5.2</b>	<b>Individuelle Pharmakokinetik nach Applikation von KP46 und KP1019.....</b>	<b>190</b>
5.2.1	Individuelle Pharmakokinetik von Gallium nach Applikation von KP46...190	
5.2.2	Individuelle Pharmakokinetik von Ruthenium nach Applikation von KP1019 .....	194
5.2.3	Bedeutung der ermittelten pharmakokinetischen Parameter für eine rationale Dosisfindung in der klinischen Entwicklung .....	197
<b>5.3</b>	<b>Semimechanistisches PK/PD-Modell zur Platin-DNA-Addukt-Bildung in Leukozyten .....</b>	<b>199</b>
5.3.1	Modellstruktur.....	199
5.3.2	Kovariateneinflüsse .....	205
5.3.3	Modellevaluation .....	208
5.3.4	Bedeutung des PK/PD-Modells für die Dosisindividualisierung von Oxaliplatin.....	210
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>215</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>219</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>239</b>
	<b>Anhang A: Pharmakokinetik von KP46 .....</b>	<b>240</b>
	Ein- und Ausschlusskriterien KP46 Studie .....	241
	Patient 1 – Dosis 60 mg (entsprechen 8,33 mg Gallium) .....	242
	Patient 2 – Dosis 50 mg (entsprechen 6,94 mg Gallium) .....	244
	Patient 3 – Dosis 50 mg (entsprechen 6,94 mg Gallium) .....	246
	Patient 4 – Dosis 90 mg (entsprechen 12,495 mg Gallium) .....	249
	Patient 5 – Dosis 220 mg (entsprechen 30,54 mg Gallium) .....	252
	Patient 6 – Dosis 440 mg (entsprechen 61,09 mg Gallium) .....	254
	Patient 7 – Dosis 900 mg (entsprechen 124,95 mg Gallium) .....	256
	<b>Anhang B: Pharmakokinetik von KP1019 .....</b>	<b>259</b>

---

Ein- und Ausschlusskriterien der KP1019-Studie .....	260
Patient 1 – Dosis: 25 mg (entsprechen 5,032 mg Ruthenium).....	261
Patient 2 – Dosis: 50 mg (entsprechen 10,064 mg Ruthenium).....	264
Patient 3 – Dosis: 100 mg (entsprechen 20,127 mg Ruthenium).....	266
Patient 4 – Dosis: 200 mg (entsprechen 40,255 mg Ruthenium).....	269
Patient 5 – Dosis: 400 mg (entsprechen 80,510 mg Ruthenium).....	271
Patient 6 – Dosis: 600 mg (entsprechen 120,765 mg Ruthenium).....	273
Patient 7 – Dosis: 600 mg (entsprechen 120,765 mg Ruthenium).....	275
<b>Anhang C: Populations-PK/PD Modell zur Platin-DNA-Addukt-Bildung in Leukozyten.....</b>	<b>277</b>
Godness-of-Fit-Plots für das Modell BASE .....	279
Godness-of-Fit-Plots für das Modell BASE2RE .....	280
Godness-of-fit-Plots für das finalen Modell .....	281
Ergebnisse von 897 Bootstrap-Läufen basierend auf dem finalen Modell .....	282
Case-Deletion-Diagnostics – Szenario 1.....	283
Case-Deletion-Diagnostics – Szenario 2.....	283
Case-Deletion-Diagnostics – Szenario 2.....	284
Godness-of-fit-Plots für das finale PD-Modell.....	284
Godness-of-fit-Plots für das finale PD-Modell.....	285

**Abkürzungen**

A	Absorption
AAS	Atomabsorptionsspektrometrie
AIC	Akaike-Informationskriterium
AL	Arbeitslösung
$A_{0\text{ h}/4\text{ h}/24\text{ h}/48\text{ h}}$	Platin-Nukleotid-Verhältnis 0, 4, 24 oder 48 h nach Infusionsbeginn
$A_{\text{max}}$	Maximales Platin-Nukleotid-Verhältnis
AP	Alkalische Phosphatase
AUC	Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (Area under the curve)
$AUC_{\infty}$	Gesamtfläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve
$AUC_{0-24\text{ h}/0-48\text{ h}}$	Mit Hilfe der Trapezregel berechnete AUC von 0-24 h bzw. 0-48 h nach Infusionsbeginn
AUA	Fläche unter der Addukt-Zeit-Kurve
AV	Adsorptive Voltammetrie
BAX	Proapoptotisches Bcl-2-verwandtes Protein
C	Arzneistoffkonzentration
Ca	Karzinom
$C_{\text{max}}$	Maximalkonzentration
$C_{\text{nom}}$	Nominalkonzentration
CDD	Case deletion diagnostics
CL	Gesamtclearance
CLCR	Kreatininclearance
$CL_{\text{CR,CG}}$	Kreatininclearance berechnet nach Cockcroft und Gault
$CL_{\text{Pt,UF}}$	Platin-clearance aus dem Ultrafiltrat
CR	Komplette Remission
Cys	L-Cystein
D	Dosis
DACH	Diaminocyclohexan
df	Freiheitsgrad (degree of freedom)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNDP	Desoxyribonukleosid-Diphosphat
DLT	Dosislimitierende Toxizität
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group

---

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme linked immunosorbent Assay
ERY	Erythrozyten
EU	Europäische Union
FAAS	Flammenlose Atomabsorptionsspektrometrie
FFC11	siehe KP46
FFC14A	siehe KP1019
5-FU	Fluorouracil
f <sub>UF</sub>	Ultrafiltrierbare Fraktion
G	Guanin
Gallium	Gallium
GF-AAS	Graphitrohrfen-Atomabsorptionsspektrometrie
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
Glu	Glutaminsäure
GOT	Glutamatoxalacetattransaminase
GPT	Glutamatpyruvattransaminase
GSH	Reduziertes Glutathion
Hb	Hämoglobin
Hkt	Hämatokrit
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
ICP-AES	Induktiv-gekoppelte-Plasma-Atomemissionsspektrometrie
ICP-MS	Induktiv-gekoppelte-Plasma-Massenspektrometrie
IIV	Interindividuelle Variabilität
IKG	Ideales Körpergewicht
IPRE	Individuell abgeschätzte Konzentrationen
i.v.	intravenös
iWRES	Individuelle gewichtete Residuen
k <sub>e</sub>	Eliminationsgeschwindigkeitskonstante (1. Ordnung)
KG	Körpergewicht
KOF	Körperoberfläche
KP46	Tris(8-chinolinolato)gallium(III), auch FFC11
KP1019	Indazolium trans[tetrachlorobis(1H-indazol)ruthenat(III)], auch FFC14A
KP1339	Natrium trans[tetrachlorobis(1H-indazol)ruthenat(III)]
LC	Flüssigchromatographie (Liquid Chromatography)

---

LEU	Leukozyten
LS	Abweichungsquadrate (Least squares)
$\lambda_i$	Exponent des i-ten Exponentialterms einer Polyexponentialgleichung
$\lambda_z$	Terminale Eliminationsgeschwindigkeitskonstante
Met	L-Methionin
MTD	Maximal tolerierbare Dosis
MMR	Mismatch-Repair
MR	Minor Response
MRT	Mean Residence Time
MS	Massenspektrometrie
MW	Mittelwert
n.b.	Nicht benutzt; nicht bestimmt
NC	No change
NDP	Ribonukleosid-Diphosphat
NER	Nukleotid-Exzisionsreparatur
NSCLC	Nicht kleinzelliges Bronchialkarzinom
OXA	Oxaliplatin
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
p.o.	per os
PE	Polyethylen
PK	Pharmakokinetik
PL	Plasma
PNP	Polyneuropathie
PP	Polypropylen
PR	Partielle Remission
PRED	Abgeschätzte Konzentrationen (Population)
Pt	Platin
QC	Quality Control
r	Korrelationskoeffizient
RE	Relativer Fehler
RECIST	Response Evaluation Criteria in Solid Tumors
(r)RNA	(Ribosomale) Ribonukleinsäure
RSD	Relative Standardabweichung
RSE	Relativer Standardfehler

Ruthenium	Ruthenium
SD	Stable disease
S	Standardabweichung
SL	Stammlösung
SN	Nukleophile Substitution
t	Zeit nach Verabreichung eines Arzneistoffs
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
$t_{inf}$	Infusionsdauer
$t_{max}$	Zeit bis zur maximalen Konzentration
TS	Thymidilatsynthese
UF	Ultrafiltrat
UV	Ultraviolett
VB	Vollblut
VF	Verdünnungsfaktor
VPC	Visual Predictive Check
$V_{ss}$	Verteilungsvolumen im Steady-State
WFR	Wiederfindungsrate
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation)
WLS	Gewichtete Summe der Abweichungsquadrate
WRES	Gewichtete Residuen

# 1 Einleitung

## 1.1 Platinkomplexe

### 1.1.1 Überblick

*Barnett Rosenberg* führte in den sechziger Jahren Untersuchungen zum Einfluss des elektrischen Feldes auf das Wachstumsverhalten von *Escherichia coli* durch. Dafür tauchte er „inerte“ Platinelektroden in eine wässrige Ammoniumchloridlösung ein. Das von ihm beobachtete filamentöse Wachstum des Bakteriums sowie die fehlende Zellteilung ließen sich nicht mit der Einwirkung des elektrischen Feldes erklären<sup>1</sup>. Verantwortlich dafür war ein Elektrolyseprodukt, das bereits 1844 als *Peyrone's Chlorid* beschrieben wurde<sup>2</sup>. Dieser viel zitierte Zufall, der 1965 zu der Entdeckung der zytotoxischen Wirkung von Cisplatin (cis-Diammindichloroplatin(II), CDDP, Abb. 1.1) führte, stellte einen Meilenstein in der Onkologie dar und löste eine Renaissance der Koordinationschemie aus.

1971 wurde Cisplatin erstmals klinisch erprobt und schon 1978 für die Therapie maligner Erkrankungen zugelassen<sup>3</sup>. Bis heute ist Cisplatin wichtiger Bestandteil in zahlreichen Chemotherapieregimen zur Behandlung unter anderem von Hoden-, Ovarial-, Bronchial- und Plattenepithelkarzinomen. Doch sein Einsatz ist aufgrund schwerer unerwünschter Wirkungen (Nephrotoxizität, Ototoxizität und Emesis) und dem Auftreten von primärer oder erworbener Resistenz begrenzt<sup>4</sup>. Unerwünschten Wirkungen wie Nausea und Emesis kann durch eine adäquate Supportivtherapie vorgebeugt bzw. deren Ausmaß eingeschränkt werden. Das Risiko einer Nierenschädigung durch eine cisplatinhaltige Chemotherapie lässt sich durch eine Hydratation vor und nach der Applikation reduzieren. Durch diese Maßnahmen gilt für Cisplatin heute die Anreicherung in verschiedenen Nervengeweben und dadurch hervorgerufene Neurotoxizität als dosislimitierend<sup>5-8</sup>.

In den letzten Jahrzehnten wurde eine große Vielzahl an Cisplatin-Analoga synthetisiert, die vor allem als „me-too“ Substanzen betrachtet werden können. Die klinische Prüfung erreichte kaum eine dieser Verbindungen, bis 1989 Carboplatin [cis-Diammin(1,1-cyclobutandicarboxylato)platin(II)] für die Therapie des Ovarialkarzinoms zugelassen werden konnte. Bei Carboplatin, in Abb. 1.1 dargestellt, wurde durch den Austausch der Chloroliganden des Cisplatins gegen einen Cyclobutandicarboxylatliganden eine stabilere Abgangsgruppe eingeführt.

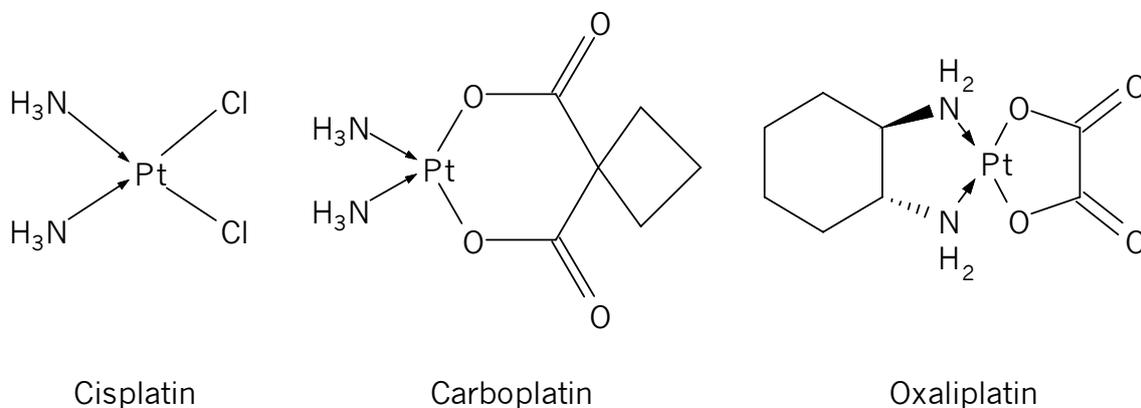


Abb. 1.1 Chemische Struktur von Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin

Die Reaktivität von Carboplatin ist als Folge dessen im Vergleich zu Cisplatin deutlich niedriger. Das macht für eine äquieffektive Wirkung höhere Dosierungen nötig. Klinisch zeichnet sich Carboplatin im Vergleich mit Cisplatin durch eine bessere Verträglichkeit und ein anderes Toxizitätsprofil aus. Die dosislimitierende Toxizität, eine Myelosuppression, die sich vorwiegend in Form einer Thrombozytopenie äußert sowie die Wirkung stehen in einem deutlichen Zusammenhang mit der Exposition (*area under the curve*, AUC)<sup>9,10</sup>. Eine Dosierung nach Ziel-AUC macht diese Nebenwirkungen gut kontrollierbar und führte zu einer einfacheren Handhabung der Substanz. Daraus resultierte, dass Carboplatin Cisplatin vor allem in der Therapie des Ovarialkarzinoms, aber auch des Bronchial- und Zervixkarzinoms ablöste<sup>4,11-13</sup>. Ein Wermutstropfen bleibt, da Carboplatin Kreuzresistenzen zu Cisplatin aufweist und somit das Wirkungsspektrum nicht erweitert.

*Kidani et al.* synthetisierten erstmalig 1978 *Oxaliplatin* [[[1R,2R)-1,2-Cyclohexandiamin-N,N']][oxalato(2-)-O,O']platin(II)], das als Platinkomplex der dritten Generation bezeichnet wird<sup>14-17</sup>. Die Einführung des Diaminocyclohexan(DACH)-Liganden (s. Abb. 1.1) führte zu einer Änderung des Wirkungsspektrums. In zahlreichen *In-vitro*-Untersuchungen an murinen und humanen Zelllinien wurde die antitumorale Wirkung von Oxaliplatin untersucht. Dabei kristallisierte sich heraus, dass Oxaliplatin an zum Teil gegen Cisplatin resistenten Leukämie-, Kolonkarzinom-, Ovarialkarzinom-, nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom-, Mammakarzinom- und Neuroblastomzelllinien eine antiproliferative Wirkung zeigte. Diese Beobachtungen konnten im murinen Tiermodell für Leukämie, Kolonkarzinom, Fibrosarkom, Lungen- und Mammakarzinom bestätigt werden<sup>18</sup>. Oxaliplatin wurde schließlich in der Hauptindikation für die Behandlung des metastasierenden Kolonkarzinoms in Kombination mit Fluorouracil (5-FU) und Calciumfolinat zugelassen.

Die Entwicklung der Platinkomplexe ging auch nach der Einführung von Oxaliplatin weiter. Zurzeit befinden sich zwei weitere viel versprechende Kandidaten in der klinischen Prüfung.

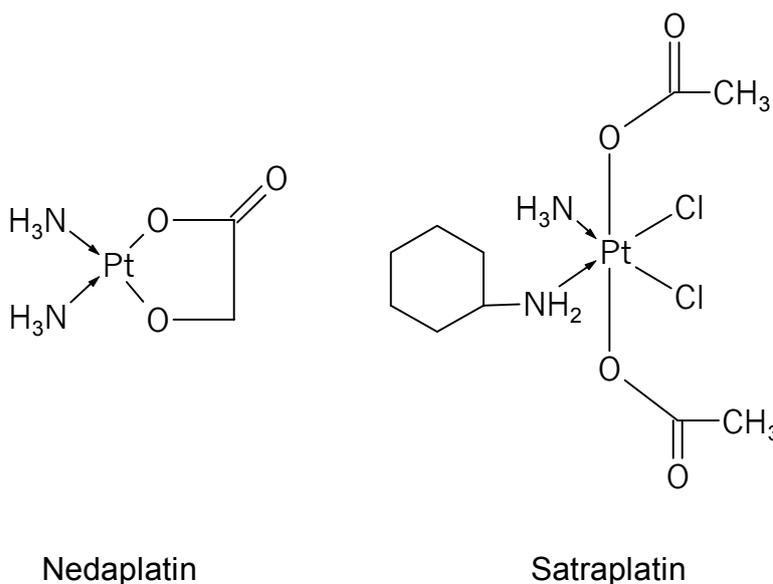


Abb. 1.2 Chemische Struktur von Nedaplatin und Satraplatin

*Nedaplatin* [cis-Diammin(glycolato-O,O')platin(II)] (s. Abb. 1.2) weist eine geringere Reaktivität als Cisplatin auf, ist jedoch reaktiver als Carboplatin. Nedaplatin soll ein etwas günstigeres Toxizitätsprofil als Cisplatin aufweisen, scheint aber hinsichtlich Tumoransprechen und Überlebenszeitrate keine Vorteile zu bieten<sup>19</sup>. In Japan wurde diese Verbindung für die Therapie gynäkologischer Tumoren zugelassen.

Ein Platinkomplex der besonderen Art ist *Satraplatin* [Bis-Acetatoamminodichloro-cyclohexylaminplatin(IV)] (s. Abb. 1.2). Es handelt sich um einen per oral applizierbaren Platin(IV)-Komplex. Das vierwertige Platin als Zentralatom bewirkt, dass Satraplatin metabolisch besonders stabil ist. Seine Aktivierung erfolgt intrazellulär durch die Reduktion zu Platin(II)<sup>19-21</sup>. Trotz viel versprechender Studien konnte die Substanz bislang nicht zugelassen werden.

Da Oxaliplatin als Vertreter der antitumoralen Platinkomplexe einen Schwerpunkt dieser Arbeit bildet, werden im Folgenden Wirkungs-, Reparatur- und Resistenzmechanismen sowie die Toxizität und Pharmakokinetik von Oxaliplatin im Detail erläutert. Auf entscheidende Unterschiede zu den anderen Vertretern dieser Gruppe wird hingewiesen.

### 1.1.2 Pharmakodynamische Eigenschaften

#### *Biotransformation*

Für die zytotoxische Wirkung ist die Platinierung der DNA von entscheidender Bedeutung. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* konnten verschiedenste Biotransformationsprodukte identifiziert werden, die den Schluss zulassen, dass zunächst eine spontane, nicht-enzymatische Abspaltung des Oxalatrestes stattfindet. Dieser wird gemäß einer S<sub>N</sub>2-Reaktion durch zwei Chloroliganden ersetzt<sup>22-25</sup>. Der so entstandene Dichlorokomplex wird in das Zellinnere aufgenommen und dort aktiviert. Hierbei werden die beiden Chloroliganden aufgrund der intrazellulär geringeren Chloridkonzentration im Sinne einer Hydrolyse durch

Aqualiganden ausgetauscht. Die Abb. 1.3 veranschaulicht den oben beschriebenen Prozess.

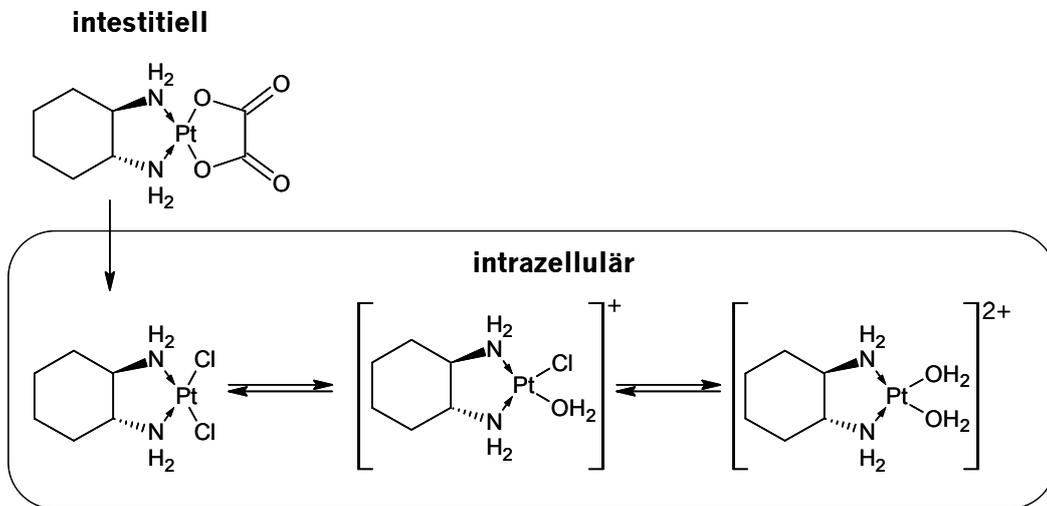


Abb. 1.3 Biotransformation von Oxaliplatin

Diese Aquakomplexe stellen die aktive Spezies dar und können mit den in der Zelle vorhandenen Nucleophilen, wie z.B. Nucleinsäuren, schwefelhaltigen Aminosäuren, Peptiden und Proteinen, reagieren.

#### *Platin-DNA-Addukt-Bildung*

Bis heute konnte der Wirkungsmechanismus nicht vollständig geklärt werden. Doch wie auch bei den anderen Vertretern dieser Wirkstoffgruppe, Cis- und Carboplatin, stellt die Bildung von bifunktionalen Platin-DNA-Addukten die Basis für die zytotoxische Wirkung dar.

Die im vorangegangenen Kapitel beschriebene Bioaktivierung ermöglicht die Platinierung der DNA. Theoretisch stehen für diese Reaktion mit der DNA alle vier Basen zur Verfügung. Als Bindungspartner dienen aufgrund der ausgeprägten Nucleophilie vornehmlich der N(7) am Imidazolring des Guanins (G) oder Adenins (A). Darüber hinaus sind Reaktionen mit dem N(1) von Adenin und N(3) des Cytosins (C) beschrieben (s. Abb. 1.4). Hinsichtlich der Bindungsstellen an der DNA unterscheiden sich die die therapeutisch eingesetzten Platinkomplexe nicht<sup>26,27</sup>.

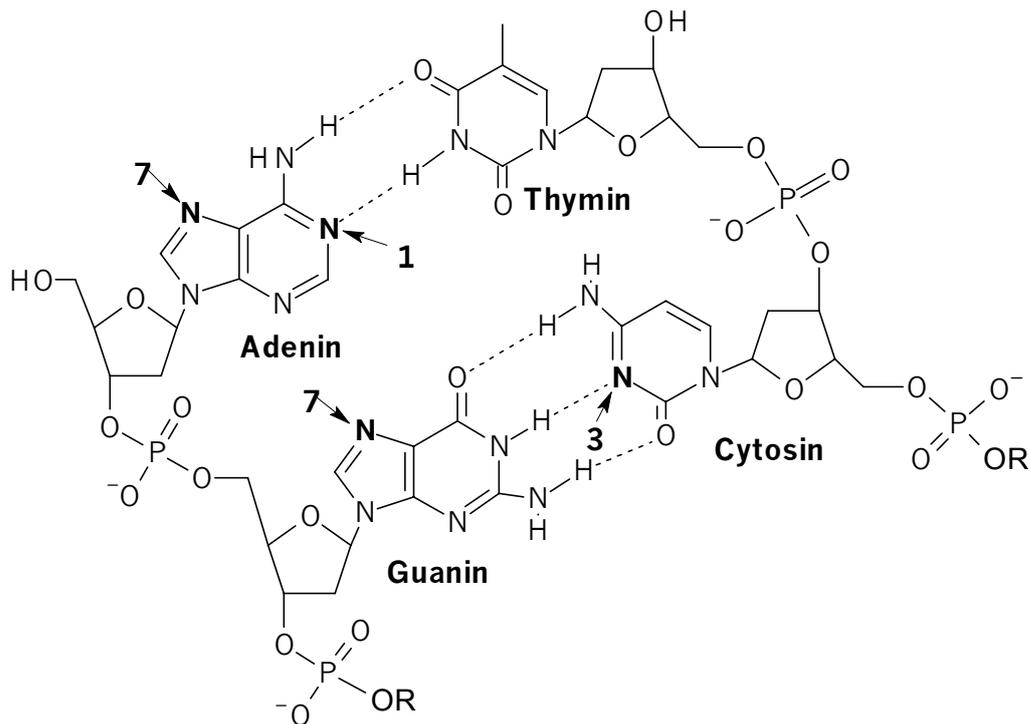


Abb. 1.4 Bevorzugte Bindungsstellen der Platinkomplexe an der DNA

Die bifunktionelle Struktur der Aquakomplexe ermöglicht nach einer zunächst monofunktionellen Bindung die Reaktion mit einem weiteren Nukleotid. Bifunktionelle Platin-DNA-Addukte lassen sich in zwei Formen unterteilen. Befinden sich beide Nukleotide auf komplementären DNA-Strängen, so spricht man von *Interstrand-crosslinks*. Unter *Intrastrand-crosslinks* versteht man Addukte, bei denen die jeweilig gebundenen Nukleotide auf dem gleichen DNA-Strang lokalisiert sind. Die Mehrheit der Vernetzung findet zwischen zwei benachbarten Guaninbasen (Pt-GG) auf demselben Strang statt. Eine Vernetzung von Guanin und Adenin (Pt-AG) findet in deutlich geringerem Ausmaß statt. Noch seltener bilden sich *Interstrand-crosslinks* oder *Intrastrand-crosslinks* zwischen zwei Guaninbasen, die durch ein oder mehrere Nukleotide (G-Pt-G) voneinander getrennt sind. In ihrer Lokalisation unterscheiden sich diese Inter- und Intra-Strangvernetzungen nur wenig von denen des Cisplatin. In Abb. 1.5 sind die möglichen Platin-DNA-Addukte noch einmal veranschaulicht dargestellt.

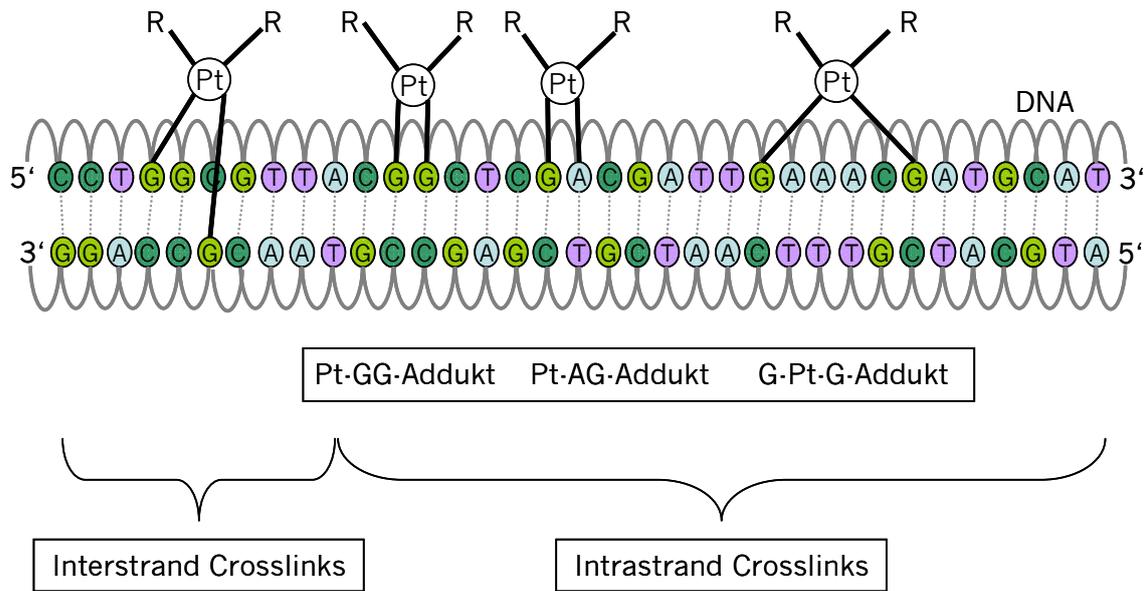


Abb. 1.5 Schematische Darstellung der verschiedenen Platin-DNA-Addukte

Als Folge der Platinierung kommt es zu einer Konformationsänderung der DNA. Hierbei entwindet sich die DNA und knickt in Richtung der großen Furche ab<sup>28</sup>. Die Sessel-Konformation des DACH-Liganden führt zu einem stärkeren Abknicken der DNA als es durch die Aminoliganden des Cisplatin hervorgerufen wird<sup>26,29,30</sup>. Die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basen werden abgeschwächt und somit verringert sich die thermische Stabilität der DNA. Strangbrüche sind die Folge. Oxaliplatin bildet zwar im Vergleich zu Cisplatin deutlich weniger Platin-DNA-Addukte, doch diese induzieren mehr Strangbrüche<sup>31,32</sup>.

#### *HMG-Proteine und Transkriptionsfaktoren*

An Platin-DNA-Addukte binden verschiedene zelluläre Proteine. Zu diesen sogenannten *Damage-Recognition-Proteinen* zählen die HMG-Proteine (*High Mobility Group-Proteine*), wie HMG1, HMG2 oder Ixr1, und die Nicht-HMG-Proteine, wie TBP, HistoneH1 oder p53. Diese Proteine binden an die DNA und rufen dadurch ein Abknicken der DNA hervor oder sie binden an bereits abgeknickte DNA. Es wird vermutet, dass die durch die Platin-DNA-Addukte

hervorgerufene Beugung der DNA die Bindung der HMG-Proteine begünstigt<sup>28</sup>. Dabei scheinen HMG-Proteine die Bindung an Platin-GG-*Intrastrand-crosslinks* zu bevorzugen<sup>33</sup>. Wie HMG-Proteine die zytotoxische Wirkung von Platinkomplexen verstärken, ist bislang nicht vollständig geklärt. Eine Möglichkeit ist, dass die Bindung der strukturspezifischen HMG-Domain-Proteine an Platin-Addukte zur Inhibition des *Nukleotid-Excision-Reparatur-Mechanismus* (s. Kap. 1.1.3) führt, was eine Erhöhung der „Lebensdauer“ von Platin-Addukten zur Folge haben kann<sup>34</sup>. Aber auch der Funktionsverlust der HMG-Proteine aufgrund der Interaktion mit den Platin-DNA-Addukten, könnte einen Erklärungsansatz darstellen. Da HMG-Proteine zum Teil auch Transkriptionsfaktoren sind, könnte es als Konsequenz zur Inhibition der Transkription kommen. Dieser Sachverhalt wird auch als *Transcription Factor Hijacking* bezeichnet<sup>28,35,36</sup>.

Wie zuvor bereits erwähnt, bindet eine ganze Reihe von Proteinen an Platin-DNA-Addukte. Viele dieser Proteine sind Transkriptionsfaktoren für RNA-Polymerasen. Platininduzierte Zytotoxizität beruht vermutlich darauf, dass Schäden auf der ribosomalen DNA (rDNA) schwerer zu reparieren sind als auf anderen Abschnitten der DNA. Unter rDNA sind Abschnitte auf der DNA im Zellkern oder in den Mitochondrien zu verstehen, die ribosomale RNA (rRNA) kodieren und damit einen Baustein der Ribosomen darstellen. Schäden auf diesen Abschnitten führen folglich zu einer starken Hemmung der Transkription ribosomaler RNA<sup>37</sup>.

### *Zellzyklusarrest und Apoptose*

Die Platinierung der DNA und die damit verbundenen strukturellen Veränderungen führen in der betroffenen Zelle zur Auslösung verschiedenster Prozesse. So kommt es zur Inhibierung der Replikation und Transkription, was zum Zellzyklus-Arrest bis hin zur Apoptose führen kann<sup>38,39</sup>. Oxaliplatin scheint an der Inhibition von *Survivin*, einem Apoptoseinhibitor, beteiligt zu sein. Diese Hypothese wird bestärkt durch die Beobachtung, dass die Expression von *Survivin* und dem Zellzyklusprotein *cdc2* unter der Behandlung mit Oxaliplatin erniedrigt ist<sup>40</sup>.

### 1.1.3 Reparatur und Resistenz

Etwa jeder zweite maligne Tumor spricht *a priori* nicht auf eine Chemotherapie an, d.h. er besitzt eine primäre oder intrinsische Resistenz. Von einer sekundären bzw. erworbenen Resistenz spricht man, wenn ein Tumor zunächst auf eine zytotoxische Therapie anspricht, jedoch im Verlauf dieser Therapie seine Sensitivität verliert. Eine Vielzahl von Mechanismen ist an der Entstehung sowohl der primären als auch der sekundären Resistenz beteiligt:

- Verringerte Aufnahme und gesteigerter Efflux der Platinkomplexe in die Zelle,
- Inaktivierung der aktiven Verbindungen (z.B. durch die Reaktion mit der Thiol-Gruppierung von Glutathion),
- Abfangen von DNA-Mono-Addukten durch Glutathion oder Metallothioneine,
- Gesteigerte Reparatur der DNA durch Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER),
- Gesteigerte Toleranz gegenüber platinierter DNA durch „Replikativen Bypass“ und/oder durch ein defektes Mismatch-Repair-System<sup>32,41</sup>.

#### *Akkumulation der Platinkomplexe in der Zelle*

Ein Hauptmerkmal der Resistenz gegenüber Platinkomplexen ist eine erniedrigte Konzentration der Substanzen in den Zellen. In resistenten Zellen wurden nach Cisplatinexposition 20 bis 70 % niedrigere Konzentrationen im Vergleich zu sensitiven Zellen gefunden<sup>42</sup>. Sowohl eine Verminderung des Influx als auch eine gesteigerte Ausschleusung (Efflux) oder eine Kombination aus beiden Phänomenen könnten hierbei die Ursache sein. Lange Zeit wurde die passive Diffusion als Hauptaufnahmeweg für Platinkomplexe diskutiert. Ein Reihe von weiteren Mechanismen wie der Transport durch Carrier, Kanäle oder auch endozytotische Prozesse standen ebenfalls zur Diskussion<sup>43,44</sup>. Neuere Untersuchungen konnten zeigen, dass auch eine

Reihe von Transportern, wie z.B. der organische Kationentransporter OCT1 oder Kupfertransporter beteiligt sind<sup>45-50</sup>.

*In-vitro*- und *In-vivo*-Studien identifizierten darüber hinaus, dass eine erhöhte Expression von ATP7A und ATP7B, ebenfalls Kupfertransporter, im Zusammenhang mit gesteigerter Resistenz gegenüber Platinkomplexen stehen<sup>51-55</sup>. Die beiden Kupfertransporter unterscheiden sich in ihrer Funktion. ATP7A scheint vor allem an der intrazellulären Sequestrierung von Platinkomplexen beteiligt zu sein<sup>52,56</sup>, während ATP7B durch den Transport in Vesikel und anschließender Ausschleusung den Platinefflux vermittelt<sup>57</sup>.

### *Detoxifikation*

Nicht nur die Akkumulation der Platinkomplexe kann verändert sein. Neben der DNA sind auch Proteine und Aminosäuren mit SH-Gruppen, wie das Tripeptid Glutathion (GSH) oder Metallothioneine, bevorzugte Bindungspartner. Die daraus resultierende Inaktivierung verhindert so die Bindung der Platinkomplexe an die DNA und wird somit als weiterer Resistenzmechanismus diskutiert. Grundlage hierfür ist die hohe Reaktivität der Platinkomplexe gegenüber nukleophilen Strukturen. Die Reaktion mit GSH erfolgt direkt oder enzymatisch katalysiert, vermittelt durch Glutathion-S-Transferase (GST). Der gebildete Platin-GSH-Komplex kann durch den Transporter MRP2 aus der Zelle transportiert werden. Auch die Reaktion mit Platin-DNA-Monoaddukten ist möglich. Letzteres wiederum verhindert die Bildung von zytotoxischen Crosslinks. *In vitro* aber auch *in vivo* wurden erhöhte Konzentrationen von GSH sowie eine gesteigerte Expression von  $\gamma$ -Glutamylcystein-Synthetase ( $\gamma$ -GCS),  $\gamma$ -Glutamyltransferase ( $\gamma$ -GT) und verschiedener Glutathion-S-Transferasen in resistenten Zellen beobachtet<sup>42</sup>. Zahlreiche Untersuchungen hinsichtlich der zellulären Wirkstoffaufnahme, des Wirkstoff-Efflux sowie der Inaktivierungs- und Aktivierungsmechanismen konnten bisher keine ausreichende Erklärung der unterschiedlichen Wirksamkeit zwischen Cisplatin und Oxaliplatin liefern. Der Grund für die Unterschiede wird daher vor allem in den unterschiedlichen Reparatur-

mechanismen bzw. in der unterschiedlichen Toleranz gegenüber den gebildeten DNA-Addukten gesehen.

#### *Nukleotid-Exsisionreparaturmechanismus*

Zellen besitzen verschiedene Mechanismen, um Schäden an der DNA zu reparieren. Der NER stellt den wichtigsten Prozess zur Reparatur von Platin-DNA-Addukten dar<sup>58</sup>. Hierbei handelt es sich um ein Reparatursystem der Zelle, das in der Lage ist, Schäden an der DNA zu erkennen und diese durch das Herausschneiden von Oligonukleotidsträngen mit einer Länge von 22 bis 32 Nukleotiden zu entfernen. Diese Lücken werden anschließend durch Neusynthese der DNA gefüllt und die Enden durch Ligasen verbunden. Zwar weisen cisplatinresistente Zellen eine gesteigerte Aktivität dieses Systems auf, doch unterscheidet sich das Ausmaß der Reparatur von Oxaliplatin-Addukten nicht von Cisplatin-Addukten. Darüber hinaus zeichnet den NER ein breites Aktivitätsspektrum aus, was die Reparatur unterschiedlicher DNA-Schäden ermöglicht. Daher wird vermutet, dass NER zwar an der Ausbildung von Resistenz gegenüber Platinverbindungen beteiligt ist, jedoch aufgrund der geringen Substratspezifität Cisplatin- und Oxaliplatin-DNA-Addukte gleichermaßen repariert<sup>28,32,35,41</sup>.

#### *Replikativer Bypass und Mismatch-Repair (MMR)*

Um die Unterschiede in der Effektivität der Platin-DNA-Addukte zwischen Oxaliplatin und Cisplatin zu erklären, müssen zwei weitere Mechanismen genauer beleuchtet werden - der replikative Bypass und das Mismatch-Repair-System (MMR).

Der *replikative Bypass* ist kein Reparaturmechanismus im eigentlichen Sinne. Vielmehr ermöglicht er der Zelle auch bei Anwesenheit von DNA-Schäden, wie z.B. UV-Schäden, eine DNA-Replikation durchzuführen. Die Replikation erfolgt über die Läsion auf dem elterlichen Strang hinweg. Der neue DNA-Strang weist keine Lücken auf, da diese unter Einbau falscher Basen aufgefüllt werden. Das wiederum kann zwar zu einer erhöhten Mutationsrate

führen, stellt für die Zelle jedoch eine Überlebenschance dar, da „Lücken“ im DNA-Strang oftmals letal wirken. Für die Funktion der Enzyme des replikativen Bypass scheinen die Aminliganden des Platinkomplexes von Bedeutung zu sein. Beobachtungen haben gezeigt, dass cisplatinresistente Zelllinien einen verstärkten replikativen Bypass aufwiesen, wohingegen über durch Oxaliplatin gebildete Addukte, vermutlich aufgrund des sperrigen DACH-Liganden, nicht oder nur im geringeren Ausmaß repliziert wurde<sup>35</sup>. Das vermehrte Auftreten von Strangbrüchen nach Oxaliplatinexposition könnte damit erklärt werden.

Das *Mismatch-Repair-System*, das paradoxerweise zur Zytotoxizität von Cisplatin beiträgt, kommt nach DNA-Adduktbildung durch Oxaliplatin nicht zum Tragen. Der MMR-Proteinkomplex kann aufgrund der sterischen Hinderung durch den DACH-Liganden nicht an die Oxaliplatin-DNA-Addukte binden<sup>35,59</sup>. Allgemein schließt sich ein MMR direkt an die DNA-Synthese an. Befinden sich auf dem elterlichen DNA-Strang, dem als Matrize verwendeten codogenen Strang, Platin-DNA-Addukte, können diese bei der DNA-Synthese durch den replikativen Bypass als falsche Basenpaarungen „geschrieben“ werden. Diese Basenfehlpaarungen werden direkt nach der Synthese durch MMR-Proteine erkannt und aus dem neu synthetisierten Strang herausgeschnitten, während der Fehler auf dem elterlichen Strang erhalten bleibt. Auf diese Weise induzieren die Reparaturversuche neue DNA-Lücken und damit Strangbrüche, die schließlich zum Zelltod führen. Durch erneutes „Überreplizieren“ des sich auf dem elterlichen Strang befindlichen Platin-DNA-Addukts und dem folgenden fehlerhaften Verschließen der „Lücke“ beginnt der Kreislauf von vorn. Dieser Vorgang der nutzlosen Reparatur ist auch als *Teufelskreis-Modell* nach *Goldmacher et al.* beschrieben<sup>35</sup>. MMR-defiziente Zellen zeigten eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber Cisplatin und Oxaliplatin. Die selektive Erkennung der Platin-DNA-Addukte scheint der Schlüssel für die Unterscheidung zwischen den zellulären Antworten auf beide Substanzen zu sein<sup>41</sup>.

#### 1.1.4 Pharmakokinetische Eigenschaften

Oxaliplatin wird intravenös meist über zwei Stunden als Mono- oder Kombinationstherapie (z.B. mit Fluorouracil/Folinat) appliziert. Nach der intravenösen Applikation findet eine rasche und irreversible Bindung an Plasmaproteine, aber auch an Erythrozyten statt. Ca. 33 bis 40 % des in einer zweistündigen Infusion verabreichten Oxaliplatins liegen irreversibel gebunden an Erythrozyten vor, ca. 40 % liegt gebunden an Plasmaproteinen vor<sup>18</sup>. Die Bindung an schwefelhaltige Verbindungen, wie Methionin und Glutathion im Plasma sowie an Makromoleküle, wie Albumin,  $\gamma$ -Globulin und Hämoglobin erfolgt im Blut extrem schnell. Die so gebildeten Komplexe gelten als inaktiv<sup>22,23</sup>. Oxaliplatin selbst lässt sich bereits zwei Stunden nach Infusionsende im ultrafiltrierbaren Plasma nicht mehr nachweisen. Die schnelle und irreversible Bindung von Oxaliplatin an Makromoleküle bzw. dessen rasche Biotransformation machen die Analyse in biologischen Matrices sehr umständlich und schwer zugänglich. In den letzten Jahren wurden daher nur sehr wenige Arbeiten veröffentlicht, die die Pharmakokinetik von Oxaliplatin nach einer zweistündigen Infusion am Menschen charakterisierten. In zwei Untersuchungen mit je 10 Patienten, die 85 mg/m<sup>2</sup> erhielten, wurde eine Halbwertszeit von 14 bis 19 min und eine sehr hohe Clearance von bis zu 200 L/h ermittelt<sup>60</sup>. Pfeiffer *et al.* beobachteten sogar nach Applikation von 130 mg/m<sup>2</sup> als 30-minütige Infusion eine erhöhte Gesamtclearance für Oxaliplatin, was sie einer sättigbaren renalen tubulären Rückabsorption zuschrieben<sup>61</sup>.

Da Oxaliplatin selbst nur schwer zu erfassen ist, beziehen sich die meisten erhobenen pharmakokinetischen Parameter auf das Gesamtplatin. Eine Unterscheidung der Pharmakokinetik der pharmakologisch aktiven und inaktiven Spezies ist somit unmöglich. Die Bindung an Erythrozyten und Plasmaproteine bedeutet eine pharmakologische Inaktivierung der Substanz. Darüber hinaus scheint einmal an Erythrozyten gebundenes Oxaliplatin nicht mehr ins Plasma zu gelangen<sup>25</sup>. Das so gebundene Platin steht daher für die antitumorale Wirkung nicht mehr zu Verfügung. Diese Hypothese wird durch

die Untersuchungen von *Peng et al.* und *Mandal et al.* unterstrichen. Sie beobachteten, dass eine zunehmende Bindung von Oxaliplatin an Hämoglobin mit einer Zunahme des Risikos einer Tumorprogression einhergeht<sup>62,63</sup>.

Die hohe Reaktivität bzw. die sehr rasche Bindung der verschiedenen Blutbestandteile spiegeln sich in den pharmakokinetischen Parametern wider. So beträgt das Verteilungsvolumen ( $V_{ss}$ ) im Ultrafiltrat zwischen 250 bis 550 L<sup>64-69</sup>. Im Ultrafiltrat befindet sich die ungebundene Fraktion, welche zugleich die antitumoral und toxisch wirksame Fraktion darstellt. Es ist jedoch nicht zu vernachlässigen, dass auch im Ultrafiltrat an niedere Moleküle, wie Aminosäuren, gebundenes und dadurch ultrafiltrierbares inaktives Platin vorliegt. Sowohl im Plasma als auch im Vollblut beläuft sich das Verteilungsvolumen ( $V_{ss}$ ) auf ca. 50 – 100 L<sup>64-66,70</sup>. Darüber hinaus ist die Gesamtclearance im Ultrafiltrat mit ca. 10 – 20 L/h zehnmal höher als im Plasma (0,6 – 2 L/h)<sup>64-69,71-73</sup>. Die terminale Halbwertszeit von 200 h im Plasma reflektiert mehr oder weniger den Abbau der platinbindenden Proteine. Für das in den Erythrozyten enthaltene Platin wurde eine Halbwertszeit von bis zu 50 Tagen beschrieben, was im Zusammenhang mit der Lebenszeit der Erythrozyten steht<sup>69</sup>.

Die platinhaltigen Biotransformationsprodukte werden zum Großteil real eliminiert. So finden sich nach 72 h ca. 50% der Oxaliplatindosis (130 mg/m<sup>2</sup>) vorwiegend als freies DACH oder gebunden an Glutathion wieder<sup>74</sup>. Nach 11 Tagen wurden 57 % der Dosis renal eliminiert<sup>38</sup>. Im Gegensatz dazu wurden im selben Zeitraum nur 5 % der Dosis in den Fäzes gefunden<sup>38</sup>. Vereinzelt beschreiben Publikationen das Auftreten von sekundären Peaks bzw. Wiederanstiegen der Platinkonzentration vier bis acht Stunden nach Ende der Infusion, was ein Hinweis auf einen möglichen enterohepatischen Kreislauf sein kann. *Bastian et al.* konnten durch die Integration eines solchen Prozesses in ihr populationspharmakokinetisches Modell eine signifikante Verbesserung der Anpassung an die Daten erreichen<sup>75</sup>.

Obwohl die Ausscheidung über die Nieren den Haupteliminationsweg darstellt, scheint eine Dosisanpassung bei eingeschränkter Nierenfunktion nicht erforderlich zu sein. Zwar wurde in verschiedenen Untersuchungen eine deutliche Korrelation zwischen der Kreatininclearance und der Platinclearance im Ultrafiltrat beobachtet, ein Zusammenhang zwischen einer renalen Dysfunktion und einer Zunahme oxaliplatinassoziierter Toxizität wurde jedoch nicht beobachtet<sup>66,67,76</sup>.

Auch eine Dosisanpassung aufgrund einer hepatischen Dysfunktion scheint nicht erforderlich zu sein, da Oxaliplatin vorwiegend nicht-enzymatisch metabolisiert wird. Zwei Arbeiten unterstreichen diese Hypothese. Zwar kamen sie zu unterschiedlichen Ergebnissen hinsichtlich des Einflusses der Einschränkung in der Leberfunktion auf die Platinclearance, doch konnte auch hier keine oxaliplatinassoziierte Toxizität beobachtet werden<sup>77,78</sup>.

In Abhängigkeit von der analytischen Methode, dem Beobachtungszeitraum sowie der untersuchten Matrix lässt sich die Pharmakokinetik von Platin nach der Applikation von Oxaliplatin mit einem Zwei- oder Drei-Kompartiment-Modell mit linearer Eliminationskinetik beschreiben<sup>69,75,79,80</sup>. Die Pharmakokinetik von Platin nach Oxaliplatinapplikation wurde darüber hinaus mit Hilfe von populationspharmakokinetischen Methoden untersucht.

### 1.1.5 Klinische Anwendung

#### *Anwendungs- und Wirkungsspektrum*

Wie in Kap. 1.1.1 bereits erwähnt, zeigte Oxaliplatin in verschiedenen humanen und murinen Tumorzelllinien eine zytotoxische Wirkung. In der klinischen Praxis wird es erfolgreich in der Therapie des fortgeschrittenen kolorektalen Karzinoms eingesetzt. In der Kombination mit anderen Chemotherapeutika zeigten sich synergistische bis supraadditive Effekte. So konnten Ansprechraten von bis zu 50 % für die Kombination mit Fluorouracil und Calciumfolinat in der Firstline-Therapie erzielt werden<sup>81,82</sup>. Darüber hinaus konnte die Remissionsrate von Patienten, die bereits unter Standardtherapie eine Progression zeigten, durch die zusätzliche Gabe von

Oxaliplatin verbessert werden<sup>83,84</sup>. Neben diesen Erfolgen in der First- und Secondline-Therapie wurde Oxaliplatin 2004 auch für die adjuvante Therapie des Kolonkarzinoms zugelassen. Die in der Praxis angewandten Therapieschemata unterscheiden sich hinsichtlich applizierter Dosen, dem Applikationsintervall und der Infusionsdauer. Auch werden außer Fluorouracil und Calciumfolinat weitere Substanzen, wie das per oral applizierbare Capecitabin, Irinotecan, Gemcitabin, und monoklonale Antikörper, wie Bevacizumab und Cetuximab, in Kombination mit Oxaliplatin angewendet. Ein weiteres Augenmerk der Untersuchungen bezüglich der Wirksamkeit von Oxaliplatin liegt in der Behandlung anderer Tumorentitäten, wie des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms, des refraktären Non-Hodgkin-Lymphoms oder des anthrazyklinresistenten Mammakarzinoms.

### *Toxizität*

Oxaliplatin zeichnet sich neben dem veränderten Wirkungsprofil durch eine bessere Verträglichkeit im Vergleich zu Cisplatin aus. So treten unter Oxaliplatintherapie keine Nephro- und Ototoxizität auf. Das emetogene Potential wird als moderat eingestuft<sup>85</sup>. Die in der Therapie mit Carboplatin dosislimitierende Myelosuppression tritt bei der Behandlung mit Oxaliplatin vereinzelt in Form von moderater Neutropenie und Thrombozytopenie auf<sup>86</sup>. Die dosislimitierende Toxizität von Oxaliplatin ist eine periphere sensorische Neuropathie. Sie tritt in zwei Formen auf:

- eine akute, zumeist mild ausgeprägte Neuropathie, die bei 85 – 95 % aller Patienten auftritt, sich während oder innerhalb der ersten Stunden nach der Infusion entwickelt und spätestens nach wenigen Tagen vollständig reversibel ist<sup>87</sup> sowie
- eine sich graduell entwickelnde, von der kumulativen Dosis abhängige Neuropathie, die bei ca. 10 – 15 % der Patienten zusätzlich zu den akuten neurotoxischen Effekten auftritt und sich nach kumulativen Oxaliplatindosen von 780 – 850 mg/m<sup>2</sup> zeigt<sup>87,88</sup>.

Die Symptome der *akuten*, aber reversiblen Form der Neuropathie äußern sich als Dysästhesien (unangenehme bis schmerzhafte Empfindungen der Haut, vor allem bei Berührungen; Taubheitsgefühle) und Parästhesien (Fehlempfindungen wie Kribbeln, „Ameisenlaufen“ oder „Pelzigsein“). Diese Symptomatik kann durch Kälteexposition induziert bzw. verstärkt werden. Die Symptome treten vor allem an Fingern, Händen, Zehen und Lippen auf. Häufig sind auch die Unterarme und der Hals-Rachenbereich betroffen. In ca. 1 – 2 % der Fälle kann es zu Kiefergelenkskontraktionen, vorübergehenden Laryngospasmen und Gefühlen von akuter Atemnot kommen<sup>87,88</sup>. Die chronische, kumulative Form der Neurotoxizität, die die dosis- und therapielimitierende Form darstellt, äußert sich in nicht-kälteassoziierten Missempfindungen, Sensibilitätsverlust sowie sensorischer Ataxie mit funktionellen Beeinträchtigungen. Meist kommt es auch zu Beeinträchtigungen feinmotorischer Fähigkeiten, wie Schreiben und Knöpfe schließen. Auch die Gehfähigkeit kann eingeschränkt sein<sup>88</sup>. Beide Formen der Neurotoxizität sind im Gegensatz zur Cisplatin-Toxizität fast immer reversibel. Drei bis fünf Monate nach Absetzen der Therapie war bei 75 % der untersuchten Patienten mindestens eine deutliche Verbesserung der Symptome feststellbar<sup>89,90</sup>.

Da sich die oxaliplatininduzierte Neuropathie im Wesentlichen in sensorischen Symptomen äußert und motorische Nerven offenbar nicht betroffen sind, geht man von einer Schädigung der somatischen sensorischen Nerven aus. Der genaue Mechanismus ist bislang nicht vollständig geklärt. Die freigesetzten Oxalationen könnten als Chelatbildner durch Komplexbildung von zweiwertigen Ionen zu einer Erniedrigung der Calciumkonzentrationen in den Nervenzellen führen und damit zu einer Überregbarkeit der spannungsabhängigen Natriumkanäle<sup>91</sup>. Direkt vor und nach der Oxaliplatinapplikation verabreichte Calciumgluconat- und Magnesiumsulfat-Infusionen führen zu einer deutlichen Reduktion der Symptomatik<sup>92-94</sup>. Bei der chronischen Neurotoxizität wird von einer direkten Schädigung der somatischen sensorischen Nerven ausgegangen. An einem Rattenmodell konnte die Schrumpfung und der Zerfall der Nukleoli

(Zellkörperchen) beobachtet werden, was eine Veränderung in der sensorischen Leitungsgeschwindigkeit zur Folge haben kann<sup>95</sup>. Die durch Oxaliplatin ausgelöste Schädigung der Myelinscheiden der Axone zieht Unterbrechungen oder Verzögerungen der Signalleitung nach sich. Die Beeinflussung der intrazellulären Signaltransduktionswege durch Oxaliplatin wird ebenfalls als Ursache diskutiert<sup>96</sup>.

## 1.2 Neue tumorwirksame Metallkomplexe

Platinkomplexe sind essentieller Bestandteil einer modernen antineoplastischen Kombinationschemotherapie einer Vielzahl von Tumoren. Doch wie in Kap. 1.1.1 angedeutet, sind der Einsetzbarkeit von Platin-komplexen aufgrund dosislimitierender Toxizität und des Vorhandenseins von primärer und sekundärer Resistenz Grenzen gesetzt.

Die Wirkungsweise der Platinkomplexe beruht vor allem auf deren kovalenter Bindung mit der DNA. Wie in 1.1.3 beschrieben, existieren in der Zelle eine Vielzahl von Mechanismen, die die Platinierung der DNA reparieren oder ganz verhindern können und somit für die Entstehung oder das Vorhandensein von Resistenz verantwortlich sind. Darüber hinaus stellen gesteigerte Detoxifikation und Efflux sowie ein verminderter Influx eine besondere Herausforderung bei der Überwindung der Resistenz dar.

Die systemische Toxizität der Platinkomplexe sieht man vor allem in deren fehlender Selektivität begründet. Die Verbindungen gelangen nicht nur in die Tumorzellen, sondern auch in Zellen gesunden Gewebes und reagieren dort mit den vorhandenen nukleophilen Strukturen, wie der DNA und RNA. Lediglich das unkontrollierte Wachstum der Tumorzellen ermöglicht eine, wenn auch eher statistische, Spezifität dieser Verbindungen. Eine verbesserte Selektivität sowie die Überwindung von Resistenz scheinen somit an folgende Kriterien gebunden zu sein:

- Gezielte und gesteigerte Kumulation im Tumor
- Gezielte und gesteigerte Aufnahme und Freisetzung in der Tumorzelle

- Abwendung von der DNA als vorrangige Zielstruktur
- Kombination mit Resistenzmodulatoren
- Kombination mit neuen zielgerichteten Substanzen, z.B. monoklonalen Antikörpern

### 1.2.1 Überblick

Die im Rahmen dieser Arbeit besprochenen neuen tumorwirksamen Metallkomplexe stellen einen ersten Erfolg der Umsetzung der Forschungsziele dar.

#### *Galliumsalze und Galliumkomplexe*

Die antitumoralen Eigenschaften von Galliumverbindungen wurden erstmals 1971 durch *Hart et al.* beschrieben<sup>97</sup>. Doch schon seit Beginn der fünfziger Jahre wurden die verschiedenen Radioisotope des Galliums (<sup>66,67,68</sup>Ga) aufgrund ihrer hohen Affinität zum Knochengewebe für die Diagnostik von Knochentumoren im Rahmen bildgebender Verfahren angewendet. Dabei stellte sich heraus, dass sich <sup>67</sup>Ga neben dem Knochengewebe auch in nicht-ossalen Tumoren anreichert<sup>98,99</sup>. Diese Entdeckung war der Beginn der Anwendung von Gallium in der Szintigraphie von Lymphomen. Seit Beginn der 80er Jahre ist <sup>67</sup>Ga-citrat-Imaging klinischer Standard für die Erkennung von Tumoren<sup>100,101</sup>. Der große Erfolg von Cisplatin und die Eigenschaften der Galliumradioisotope forcierten die Testung verschiedenster Salze und Verbindungen der Elemente der Gruppe 13 auf eine mögliche antitumorale Wirkung<sup>102</sup>. Schon Mitte der 70er Jahre wurde Galliumnitrat (Ga(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) im Rahmen klinischer Studien überprüft. Die intravenös verabreichte Verbindung schien viel versprechend für die Behandlung von Lymphomen und Blasenkrebs. 1991 wurde Galliumnitrat für die Therapie der tumorinduzierten Hypercalciämie zugelassen und zeigte sich in diesem Bereich als äußerst effektiv<sup>103,104</sup>. Jedoch wurde sowohl in den präklinischen als auch in den klinischen Untersuchungen mit zytotoxischen Dosen kumulative Nephrotoxizität als dosislimitierend beschrieben. Diese konnte

durch ausreichende Hydratation und Mannitolgabe abgeschwächt werden. Darüber hinaus schien die Verlängerung der Infusionsdauer auf mehrere Tage zunächst eine viel versprechende Option zu sein. Doch wurden auch hier mehrere Fälle von Blindheit und den Sehnerv betreffende Neuropathie beschrieben<sup>105-107</sup>.

Auch der Versuch, Galliumchlorid als per oral applizierbare Galliumverbindung zu etablieren, scheiterte. Nephrotoxische Effekte sowie eine hohe interindividuelle Variabilität der Galliumkonzentrationen im Plasma wurden aufgrund einer unzureichenden intestinalen Absorption in verschiedenen Studien beobachtet<sup>108,109</sup>.

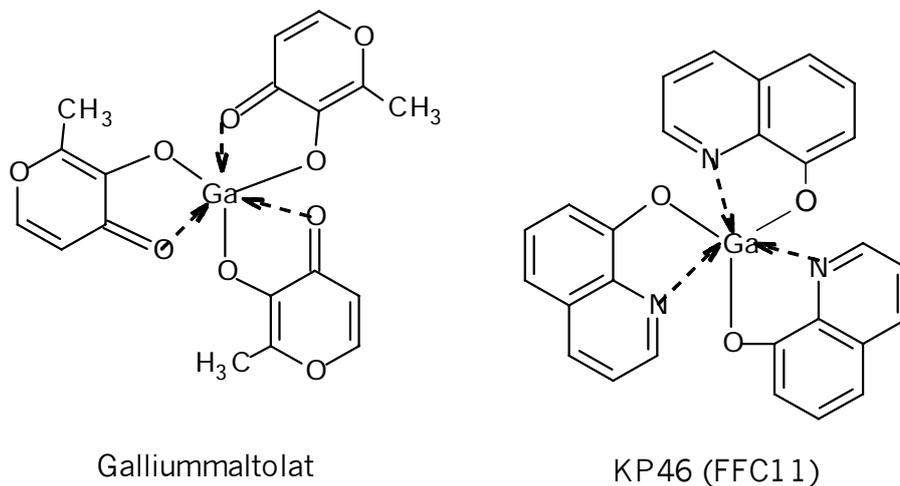


Abb. 1.6 Chemische Struktur von Galliummaltolat und KP46

Bislang wurden *Galliummaltolat* [Tris(3-hydroxy-2-methyl-4H-pyran-4-onato)gallium(III)] und *KP46* [Tris(8-quinolinolato)gallium(III), FFC11] als per oral applizierbare Galliumkomplexe in Phase I-Studien untersucht (s. Abb. 1.6). Patienten mit refraktären Prostatakarzinomen und multiplen Myeloma wurden mit Galliummaltolat behandelt. Zudem wurden in einer Phase I-Studie Patienten mit soliden Tumoren verschiedener Entitäten mit KP46 behandelt<sup>110</sup>.

### Rutheniumkomplexe

Mit den Rutheniumkomplexen hielt die dritte Gruppe Einzug in die Erforschung tumorwirksamer Metallkomplexe. Auch hier wurden in den letzten Jahren, ausgelöst durch die Entdeckung der zytotoxischen Wirkung von Cisplatin, eine Reihe viel versprechender Verbindungen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* getestet (s. Abb. 1.7)<sup>111-115</sup>.

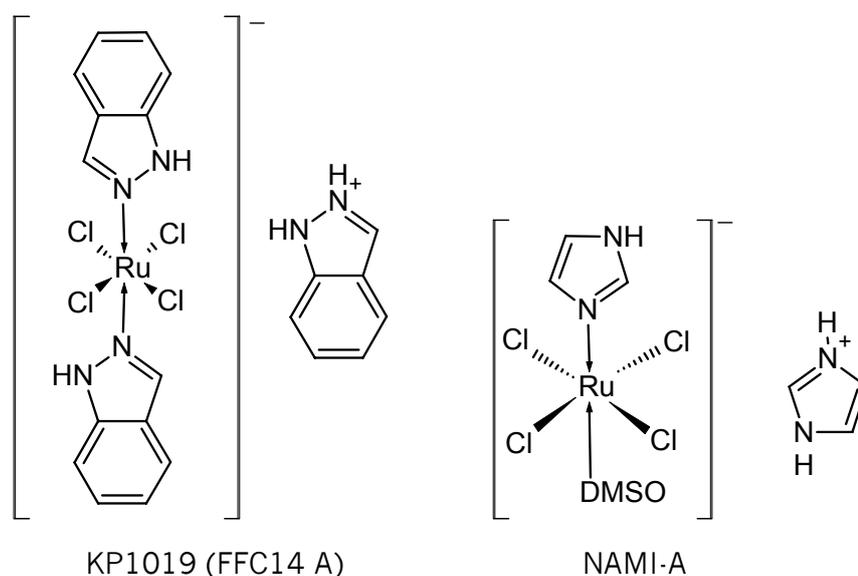


Abb. 1.7 Chemische Struktur von KP1019 (FFC14A) und NAMI-A

Mit *NAMI-A* (Imidazolium trans-[tetrachloro(DMSO)(imidazol)ruthenat(III)]) wurde 1999 erstmalig ein Rutheniumkomplex in einer Phase I-Studie zur Therapie maligner Erkrankungen untersucht. 2003 startete für einen zweiten Rutheniumkomplex, *KP1019* (Indazolium trans[tetrachlorobis(1H-indazol)ruthenat(III)], FFC14A) die erste Phase der klinischen Prüfung<sup>116</sup>. Beide Verbindungen zeichnen sich durch eine deutlich geringere Toxizität im Vergleich zu den Platinkomplexen aus. Während *NAMI-A* vor allem antimetastatisch wirksam zu sein scheint, wurde *KP1019* für die Therapie solider Tumoren entwickelt<sup>117,118</sup>. In *In-vitro*-Untersuchungen zeigte es eine hohe Aktivität gegenüber Kolonkarzinoma. Darüber hinaus lieferten präklinische Versuche mit weiteren Rutheniumverbindungen, wie z.B. mit

Arenliganden, verschiedenen Derivaten von NAMI-A, interessante Ergebnisse<sup>112, 119-121</sup>.

### 1.2.2 Pharmakodynamische Eigenschaften

Hinsichtlich ihrer Wirkungsmechanismen unterscheiden sich Ruthenium und Galliumkomplexe deutlich. Doch auch innerhalb der Substanzklassen, vor allem bei den Rutheniumkomplexen, bietet sich im Gegensatz zu den Platinkomplexen ein sehr heterogenes Bild. Doch lassen sich durchaus auch Gemeinsamkeiten finden, die zunächst erläutert werden sollen. Anschließend erfolgt eine differenzierte Betrachtung der Wirkungsmechanismen mit Schwerpunkt auf den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Verbindungen KP46 und KP1019.

#### *EPR-Effekt*

Tumore bis zu einer Größe von etwa einer Million Zellen (dies entspricht einem Durchmesser von ca. 2 mm) benötigen für ihre Versorgung keine eigenen Blutgefäße. Für ein intensives Wachstum ab dieser Größe ist aber eine zunehmende Vaskularisierung für den Tumor überlebenswichtig, da nur über die Ausbildung von Kapillaren eine ausreichende Versorgung mit Nährstoffen möglich ist. Die Tumorangio-genese wird durch die Ausschüttung verschiedenster Mediatoren induziert. Vor allem VEGF (*vascular endothelial growth factor*), Stickstoffmonooxid und Bradykinin spielen hierbei eine besondere Rolle. Die durch den Tumor gebildeten Blutgefäße unterscheiden sich jedoch in ihrer Anatomie deutlich von den unter physiologischen Bedingungen gewachsenen. So weisen die Gefäße in Tumoren deutliche Lücken in der Endothelschicht auf, was die Permeabilität für Makromoleküle, wie z.B. Serumalbumin (~ 67 kDa) und Transferrin (~ 90 kDa) begünstigt. Blutgefäße gesunden Gewebes besitzen dagegen in der Regel eine geschlossene Endothelschicht. Das passive Eindringen von makromolekularen Substanzen mit einem Molekulargewicht > 60 kDa, wie es im Tumorgewebe zu finden ist, wird im gesunden Gewebe somit

verhindert<sup>122-124</sup>. Kleinere Verbindungen gelangen zwar auch einfacher in das Tumorgewebe, doch werden sie durch die Fenestrierung auch sehr einfach wieder herausgespült. Makromoleküle dagegen kumulieren im Tumor, da auch das Lymphgefäß im Tumorgewebe nicht voll funktionsfähig ist. Dieses Phänomen des erleichterten Eindringens und der Kumulation von Makromolekülen ins Tumorgewebe wurde von *Matsumura et al.* als *enhanced permeability and retention* (EPR)-Effekt beschrieben<sup>125</sup>. Sowohl KP46 als auch KP1019 weisen eine hohe Affinität zu Plasmaproteinen, wie Serumalbumin und Transferrin, auf und werden somit unter Ausnutzung des EPR-Effekts mit deutlich erhöhter Selektivität im Vergleich zu Platinkomplexen im Tumor angereichert. Diese Beobachtung wird durch eine geringe Toxizität in präklinischen und klinischen Untersuchungen mit KP46 und KP1019 unterstrichen<sup>126,127</sup>.

#### *Eisentransport und Eisenimitation*

Sowohl  $\text{Ga}^{3+}$  als auch  $\text{Ru}^{3+}$  zeichnen sich durch eine ausgeprägte Eisenähnlichkeit aus. Neben der Ladung sind auch die Massen und Elektronenkonfigurationen vergleichbar. Ru(III) kann darüber hinaus (wie Fe(III) zu Fe(II)) zu Ru(II) reduziert werden. Die Eigenschaft, Eisen zu imitieren, begünstigt die im vorherigen Abschnitt beschriebene Affinität zu Transferrin (Tf) und die damit verbundene Kumulation im Tumorgewebe. Doch auch die Aufnahme in die Zelle scheint vornehmlich transferrinvermittelt stattzufinden. So konkurrieren sowohl der Ruthenium-Transferrin-Komplex als auch der Gallium-Transferrin-Komplex mit dem Eisen-Transferrin-Komplex um die Bindung an die Transferrin-Rezeptoren (TfR) auf der Zelloberfläche. Der Transferrin-Transferrin-Rezeptor-Komplex (Tf-TfR) wird endozytotisch internalisiert. Da Tumoren aufgrund ihrer massiven Proliferation einen erhöhten Eisenbedarf aufweisen, sind auch die Transferrin-Rezeptoren in den meisten Tumorzellen überexprimiert. *Tacchini et al.* postulierten außerdem, dass auch die im Tumorgewebe mögliche Hypoxie eine verstärkte Expression von Transferrin-Rezeptoren zur Folge haben kann<sup>128</sup>. In *In-vitro*-Untersuchungen mit  $^{67}\text{Ga}$  lassen vermuten, dass

aufgrund gesteigerter Transferrin-Rezeptoren-Expression Gallium verstärkt in die Zellen aufgenommen wird<sup>129</sup>. Da bis auf wenige Ausnahmen Transferrin-Rezeptoren an gesundem Gewebe nicht in dem Ausmaß zu finden sind wie auf Tumorzellen, wird somit über die zelluläre Aufnahme die Selektivität der Verbindungen erhöht<sup>126,127</sup>.

#### *Spezifische Effekte von KP46 – Tris(8-chinolinolato)gallium(III)*

Obwohl Galliumverbindungen sowohl in präklinischen als auch in klinischen Untersuchungen antitumorale Wirkung zeigten, konnte der genaue Mechanismus bislang nicht vollständig geklärt werden. Eine herausragende Bedeutung für die zytotoxischen Eigenschaften scheint die große Ähnlichkeit von  $\text{Ga}^{3+}$  und  $\text{Fe}^{3+}$  zu haben. Beide weisen nicht nur die gleiche Ladung auf, sondern sind auch hinsichtlich des Ionenradius und der Elektronenkonfiguration nahezu identisch. Zahlreiche Untersuchungen zeigten, dass Gallium im Blut rasch und vorzugsweise an das Eisen transportierende Protein Transferrin (Tf) bindet und einen Gallium-Transferrin-Komplex bildet. Durch die Transferrin-Rezeptor-vermittelte Endozytose gelangt Gallium schließlich in die Zelle<sup>130-132</sup>. Ob auch andere Transporter bei der Aufnahme von Gallium in die Zelle eine Rolle spielen oder gar ein Teil mittels passiver Diffusion in die Zelle gelangt, ist bislang nicht bekannt. Intrazellulär befinden sich die Transferrin-Rezeptoren in Endosomen. Durch Protonenpumpen wird die Azidität innerhalb der Endosomen erhöht. Im Falle von Eisen erfolgt aufgrund des erniedrigten pH-Wertes eine Freisetzung und Reduktion zu Fe(II), das schließlich aus den Endosomen entlassen wird. Der Transferrin-Rezeptor rezykliert zur Zellmembran. Ob die Freisetzung von Gallium aus den Endosomen ebenfalls auf diesem Weg erfolgt, ist noch offen. *Jakupec et al.* beobachteten, dass mit zunehmender Azidität die Stabilität des Gallium-Transferrin-Rezeptor-Komplexes gemindert wird<sup>133</sup>. Im Zytosol liegt Eisen in seiner Speicherform an Ferritin gebunden vor. Gallium scheint, wenn auch in deutlich geringerem Maße, ebenfalls an Ferritin zu binden<sup>134,135</sup>.

In Abb. 1.8 ist die Aufnahme in die Zelle sowie der Wirkungsmechanismus schematisch veranschaulicht.

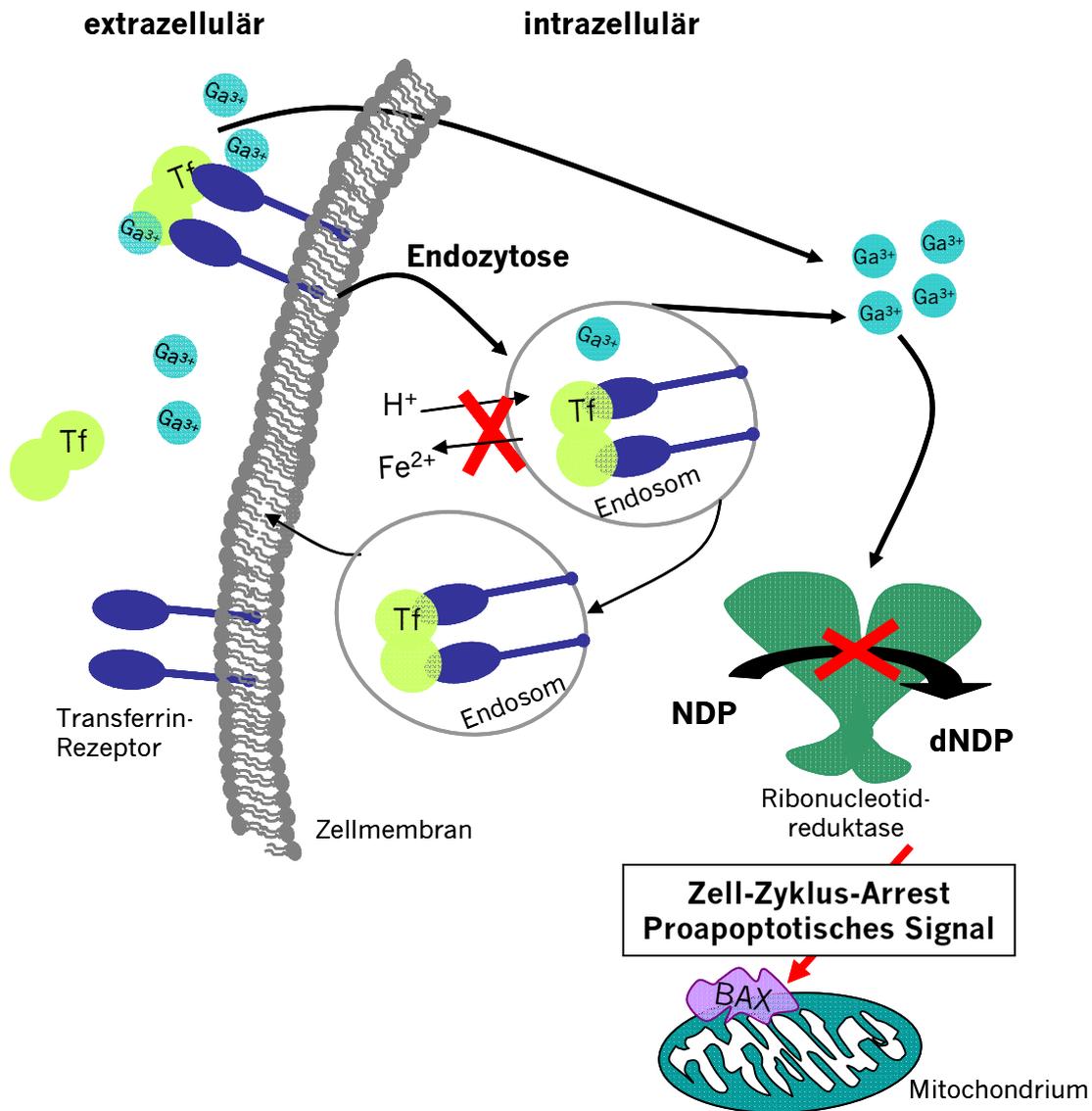


Abb. 1.8 Schematische Darstellung des Wirkungsmechanismus von Galliumverbindungen, modifiziert nach *Jakupec et al.*<sup>139</sup>; BAX - proapoptotisches Bcl-2-verwandtes Protein, Tf – Transferrin, NDP – Ribonucleosid-Diphosphat, dNDP – Desoxyribonucleosid-Diphosphat

Wie es nach der Freisetzung von Gallium in das Zytosol zum Zelltod kommt, ist ebenfalls bislang nicht geklärt. *In-vitro*-Untersuchungen lieferten verschiedenste Ansatzpunkte. Intrazellulär liegt Gallium vor allem gebunden an Phosphat in den Lysosomen vor<sup>136</sup>. Gallium bindet auch an die DNA, was

aber nicht zur Apoptose zu führen scheint, da vornehmlich eine Bindung an den Phosphatgruppen und nicht an die Basen stattfindet. *Chitambar et al.* zeigten, dass galliuminduzierter Eisenmangel zusammen mit dem direkten Effekt intrazellulärem Galliums auf die eisenabhängige R2-Untereinheit der Ribonukleotid-Reduktase eine Abnahme der Synthese von Desoxyribonukleotiden und folglich der DNA bewirkt<sup>137,138</sup>.

Ferner wurde in Juras und HT-29-Zelllinien eine Inhibition der membranären Tyrosinphosphatase beobachtet<sup>140</sup>. Auch die Beeinflussung der Tubulinpolymerisation wurde diskutiert<sup>141</sup>. Neueste Untersuchungen gaben Hinweise darauf, dass die galliuminduzierte Apoptose auf der Aktivierung des proapoptotischen Bcl-2-verwandten Proteins (BAX) und der Freisetzung von mitochondrialem Cytochrom C mit anschließender Caspase-3-Aktivierung beruht<sup>142</sup>.

#### *Spezifische Effekte von KP1019 – Indazolium trans[tetrachlorobis(1H-indazol)-ruthenat(III)]*

Wie einleitend beschrieben, sind gerade in der Gruppe der Rutheniumkomplexe die Wirkungsmechanismen sehr heterogen. Im Folgenden soll der Mechanismus der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Verbindung KP1019 näher erläutert werden.

Auch rutheniumhaltige Arzneistoffe wie KP1019 zeichnen sich durch eine deutlich verringerte Toxizität aus. Wie in den vorangegangenen Kapitel zum EPR-Effekt, zum Eisentransport und zur Eisenimitation bereits beschreiben, erfolgt die Aufnahme in die Zelle in Form von KP1019-Transferrin-Komplexen durch die Transferrin-Rezeptor-gekoppelte Endozytose<sup>143,144</sup>. Vorzugsweise reagieren zwei Moleküle KP1019 mit den Eisenbindungsstellen des Transferrin<sup>144</sup>. Dies hat jedoch zur Folge, dass der Ruthenium-Transferrin-Komplex überhaupt nicht in die Zelle aufgenommen wird, da es zu einer übermäßigen strukturellen Veränderung des Transferrins kommt, was die Bindung an den extrazellulären Transferrin-Rezeptoren verhindert. Für die Aufnahme in die Zelle ist daher die gleichzeitige Anwesenheit von

Eisen unabdingbar. Der KP1019-Eisen-Transferrin-Komplex wird nach Bindung an die Transferrin-Rezeptoren endozytotisch internalisiert. Intrazellulär erfolgt die Freisetzung vermutlich aufgrund des niedrigeren pH-Wertes in den Endosomen und in Anwesenheit biologischer Komplexbildner<sup>145</sup>. Im Allgemeinen führt Hypoxie eher zum Versagen einer Chemotherapie oder Radiotherapie, da die Proliferation gestoppt wird. Der niedrige pH-Wert und Sauerstoffgehalt begünstigen den so genannten *Activation-by-Reduction-Mechanismus* und scheinen somit zur zytotoxischen Wirkung der Ruthenium-Verbindungen beizutragen<sup>126,127</sup>.

Abb. 1.9 veranschaulicht den Wirkungsmechanismus von KP1019.

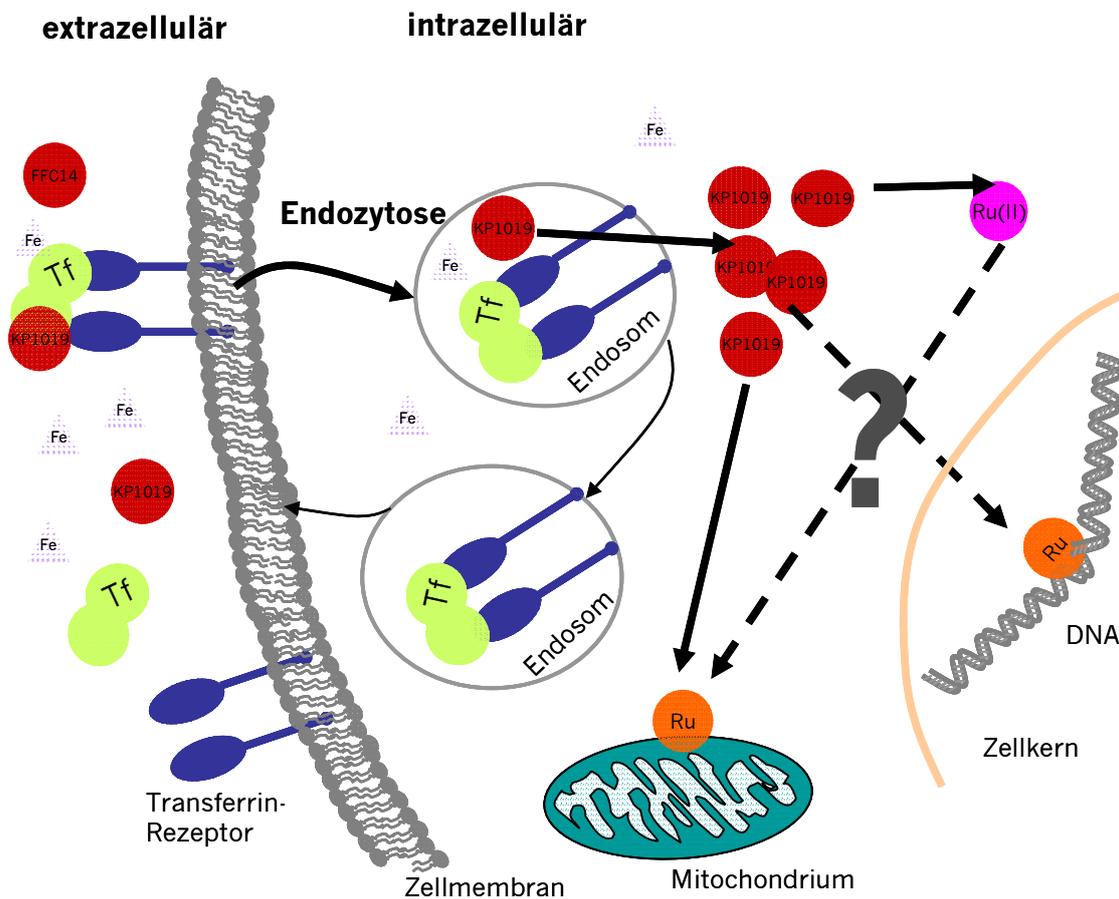


Abb. 1.9 Schematische Darstellung des Wirkungsmechanismus von KP1019 (KP1339), modifiziert nach *Jakupec et al.*<sup>139</sup>; Tf – Transferrin

KP1019 kann Apoptose induzieren. Der Mechanismus hierfür konnte bislang nicht vollständig geklärt werden. In verschiedenen Untersuchungen an Nukleotiden und DNA wurde die Adduktbildung, wie sie auch von Platin-komplexen bekannt ist, als wichtiger Schritt beschrieben. Diese Vermutung könnte durch die Beobachtung gestützt werden, dass Tumorzellen, welche mit Inhibitoren der DNA-Reparatur behandelt wurden, eine gesteigerte Sensitivität gegenüber KP1339, dem Natriumsalz von KP1019, aufweisen<sup>146</sup>. Darüber hinaus konnte in Zellversuchen gezeigt werden, dass KP1019 zur Depolarisation der Mitochondrienmembranen führt, was ebenfalls über den intrinsischen mitochondrialen Signalweg zur Apoptose führen kann<sup>147</sup>.

### **1.3 Populationspharmakokinetische/pharmakodynamische Strategien der Therapieoptimierung in der Onkologie**

Ziel jeder Arzneimitteltherapie und insbesondere der Tumorthherapie ist die effektive Behandlung bei möglichst geringen bzw. tolerablen unerwünschten Wirkungen.

Die Wirkung eines Arzneistoffs ist nicht allein durch die Dosis bestimmt. Physiologische und demographische Faktoren wie Alter, Geschlecht, Körpermasse, Organfunktion, aber auch genetische Polymorphismen und nicht zuletzt Faktoren wie Vorbehandlung oder Gesundheitszustand, haben einen entscheidenden Einfluss. Zu diesen interindividuellen Unterschieden können auch Veränderungen im Laufe der Therapie bei einem Patienten, wie die Ausbildung von Resistenzen des Tumors oder Änderungen des Gesundheitszustandes, einen Einfluss auf das Therapieergebnis haben. Diese Veränderungen werden als intraindividuelle Unterschiede bezeichnet. Die intra- und interindividuelle Variabilität kann sich zum einen als Variabilität in den pharmakokinetischen Prozessen wie Resorption, Verteilung, Metabolismus und Elimination, welche die Menge an Wirkstoff am Wirkort bestimmen, widerspiegeln. Diese Variabilität hat neben anderen Faktoren letztlich einen Einfluss auf die Variabilität der Pharmakodynamik des Arzneistoffes, dessen Wirksamkeit und schließlich auf das

Therapieergebnis. Das kann bedeuten, dass einige Patienten z.B. durch eine zu niedrige Dosierung keinen Behandlungserfolg erfahren, einen progredienten Krankheitsverlauf zeigen und somit unnötig mit dem Arzneimittel belastet wurden, während andere von massiven unerwünschten Wirkungen betroffen sein können, die vielleicht den Therapieabbruch zur Folge haben.

Das Verständnis für die Notwendigkeit der Dosisindividualisierung in der Onkologie ist weit verbreitet. Sie ist fest verankert, auch wenn über die Wahl der Mittel kontroverse Meinungen herrschen. Die meisten Zytostatika werden über die Körperoberfläche (*body surface area*, BSA) dosiert. Die empirische Beobachtung, dass die Körperoberfläche mit physiologischen Parametern wie Organgröße und Organleistung korreliert, bildet die Grundlage für diese Strategie. *Du Bois* und *Du Bois* entwickelten zu Beginn des letzten Jahrhunderts die noch heute bevorzugt verwendete Gleichung zur Berechnung der Körperoberfläche (siehe Gl. 3.35)<sup>148</sup>. Jedoch ist ein Zusammenhang zwischen KOF und der Pharmakokinetik für die meisten Zytostatika nicht gegeben. Die hohe interindividuelle Variabilität in Bezug auf die antitumorale Wirkung und Toxizität lässt sich durch diesen Ansatz nicht verringern. Nicht zuletzt die fehlende oder nicht direkt messbare Korrelation zwischen Dosis und Effekt machen eine effektbasierte Dosisanpassung nahezu unmöglich. Ein Zusammenhang zwischen Pharmakokinetik und Pharmakodynamik ermöglicht jedoch die Dosisindividualisierung, basierend auf pharmakokinetischen Zielgrößen.

### 1.3.1 Pharmakokinetische Dosisindividualisierung

Verschiedene klinische Studien zeigten, dass sich pharmakokinetische Parameter (z.B.  $C_{max}$ , AUC, Clearance) als Zielgrößen eignen und deren Einsatz sogar zu einer Verringerung der pharmakodynamischen Variabilität führen kann. Da bei der antineoplastischen Chemotherapie zahlreiche Faktoren, wie z.B. Resistenzmechanismen, Tumorzellheterogenität, Tumovaskularisation oder das Ausmaß der intrazellulären Arzneistoff-Aufnahme,

die Zusammenhänge zwischen pharmakokinetischen Parametern und der Antitumorwirkung beeinflussen können, ließ sich bisher nur für wenige ausgewählte Zytostatika bei bestimmten Tumorentitäten ein Zusammenhang feststellen. Zwischen pharmakokinetischen Parametern und der Toxizität sind für viele Zytostatika Korrelationen beschrieben.

Jedoch ist in der onkologischen Praxis eine Dosisindividualisierung, basierend auf pharmakokinetischen Parametern, kaum etabliert. Bisher wird Carboplatin als einziger Arzneistoff und Vertreter antitumoraler Metallkomplexe in der klinischen Routine nicht mehr konventionell über die Körperoberfläche dosiert. Für Carboplatin konnte ein Zusammenhang zwischen der Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (*area under the curve*, AUC) und pharmakodynamischen Effekten, wie der Myelosuppression (insbesondere der Thrombozytopenie), und der Wirksamkeit festgestellt werden. Darüber hinaus wurde eine Korrelation zwischen der Nierenfunktion und der AUC beschrieben. Das Risiko für das Auftreten einer Thrombozytopenie wird durch eine Vorbehandlung mit myelosuppressiven Zytostatika und Carboplatin in Kombination mit anderen Zytostatika erhöht. *Calvert et al.* entwickelten basierend auf diesen Erkenntnissen eine Gleichung zur Berechnung der individuellen Carboplatindosis (D), die sich aus der Ziel-AUC und der individuellen glomerulären Filtrationsrate ergibt<sup>149,150</sup>.

$$D[\text{mg}] = \text{Ziel-AUC}[\text{mg} \cdot \text{min} / \text{mL}] \cdot (\text{GFR}[\text{mL} / \text{min}] + 25) \quad \text{Gl. 1.1}$$

Durch die Anwendung dieses Zusammenhangs bei der Dosisindividualisierung von Carboplatin können hohe Dosen für einen maximalen antitumoralen Effekt bei vertretbarer Hämatotoxizität ermöglicht werden.

### 1.3.2 Pharmakodynamische Dosisindividualisierung

Bei der pharmakokinetischen Dosisindividualisierung wird auf pharmakokinetische Parameter als Surrogatparameter zurückgegriffen. Während für

andere Erkrankungen leicht messbare pharmakodynamische Größen, wie der Blutdruck oder die Blutglucosekonzentration, existieren, stehen diese im Bereich der Onkologie nicht zur Verfügung<sup>150</sup>.

Für die Therapie mit Platinkomplexen wäre die Messung der Platin-DNA-Addukte am Wirkort, das heißt im Tumorgewebe, für die Therapieoptimierung wünschenswert. Doch ist der Tumor für wiederholte Messungen nur schwer zugänglich und dadurch eine Umsetzung dieses Vorgehens nur wenig praxistauglich. Im Rahmen von Autopsiestudien konnte jedoch festgestellt werden, dass sich das Ausmaß der Platin-DNA-Addukt-Bildung im Tumorgewebe und im Knochenmark kaum unterscheidet<sup>151,152</sup>. Das Knochenmark ist der Bildungsort der Leukozyten. Diese sind in der klinischen Routine auch für wiederholte Messungen als Surrogatzellen leicht zugänglich. Dabei ist eine Trennung nach Art der Leukozyten in Monozyten, Granulozyten und Lymphozyten nicht notwendig, da die beobachteten Platin-Nukleotid-Verhältnisse vom relativen Anteil der einzelnen Zellfraktionen unabhängig sind<sup>153</sup>.

Für die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen DNA-Platinierung und dem Therapieansprechen wurden verschiedene Kenngrößen, wie z.B. die maximale Adduktkonzentration oder die Fläche unter der Adduktcurve (AUA) herangezogen. Für Cisplatin konnte gezeigt werden, dass Responder eine deutlich höhere Platinierung aufwiesen, als Non-Responder<sup>151-157</sup>. Jedoch finden sich auch Untersuchungen, die keinen oder sogar entgegen gesetzten Zusammenhang zwischen der DNA-Platinierung und dem Ansprechen zeigten<sup>158-160</sup>.

Für Oxaliplatin existieren bisher drei Arbeiten, die die Platin-DNA-Addukte untersuchten. Während von *Allain et al.* und *Liu et al.* anhand von relative kleinen Studienpopulationen lediglich vorläufige Ergebnisse zur DNA-Platinierung nach Applikation von Oxaliplatin berichtet wurden, untersuchten *Pieck et al.* auch den Zusammenhang zwischen DNA-Platinierung Tumor-

ansprechen. So konnten sie für Responder signifikant höhere AUA-Werte beobachten als für Non-Responder<sup>71,161,162</sup>.

Sowohl *Schellens et al.* für Cisplatin als auch *Pieck et al.* für Oxaliplatin ermittelten die individuellen AUA-Werte mit Hilfe der Trapezregel. Zwar untersuchten die Autoren den Zusammenhang zwischen Pharmakokinetik und Pharmakodynamik, weiterführende Auswertungen mit den Methoden des PK/PD-Modelling zur Ermittlung der AUA fanden bisher nicht statt<sup>156,162</sup>.

## 2 Zielsetzung

### 2.1 Quantifizierung und Pharmakokinetik neuer tumorwirksamer Metallkomplexe

KP1019 und KP46 zeigten sich in präklinischen Untersuchungen als viel versprechende Kandidaten für die antitumorale Therapie. Neben einem günstigen Toxizitätsprofil beruht ihre zytotoxische Wirkung nicht ausschließlich auf der Interaktion mit der DNA. Die Bindung an Transferrin erhöht nicht nur die selektive Anreicherung im Tumorgewebe unter Ausnutzung des EPR-Effekts, sondern ermöglicht eine gezielte Aufnahme in die Tumorzelle, ähnlich einem Trojanischen Pferd. Nach erfolgreich durchlaufenen präklinischen Prüfungen wurden KP46 und KP1019 erstmals am Menschen in einer Phase I-Studie der klinischen Prüfung getestet. Phase I-Prüfungen haben das Ziel, die Sicherheit des Wirkstoffs zu prüfen und die für den Menschen maximal tolerierbare Dosis zu bestimmen. Somit steht in diesen Studien keine therapeutische Zielsetzung primär im Vordergrund. Vielmehr liegt das Hauptaugenmerk auf der Charakterisierung der pharmakokinetischen Eigenschaften und der Evaluation der Toxizität. Ziel dieser Arbeit ist es, die pharmakokinetischen Eigenschaften von KP46 und KP1019 am Menschen erstmals zu charakterisieren und zu diskutieren.

Um dieses Ziel zu erreichen, wurden folgende Teilschritte festgelegt:

- Entwicklung und Validierung von GF-AAS-Methoden zur Bestimmung von Gallium in Plasma, Vollblut und Urin
- Entwicklung und Validierung von GF-AAS-Methoden zur Bestimmung von Ruthenium in Plasma und Urin
- Abschätzung der pharmakokinetischen Parameter von Gallium in Plasma, Vollblut und Urin von mit KP46 behandelten Tumorpatienten
- Abschätzung der pharmakokinetischen Parameter von Ruthenium in Plasma und Urin von mit KP1019 behandelten Tumorpatienten

## **2.2 Populations-PK/PD-Modell zur Beschreibung der Pharmakokinetik von Platin im Ultrafiltrat und zur Platin-DNA-Addukt-Bildung in Leukozyten**

Oxaliplatin wird wie viele Zytostatika auf die Körperoberfläche bezogen dosiert. Doch konnte bislang für Oxaliplatin kein Zusammenhang zwischen einer Variabilität in der Organleistung, welcher durch die Normierung der Dosis auf die Körperoberfläche Rechnung getragen werden soll, und der Variabilität der Platinkonzentrationen im Ultrafiltrat und schließlich der antitumoralen Wirkung gezeigt werden. Die ungebundene Fraktion im Plasma wird als die aktive Spezies verstanden. Wie auch bei den anderen Platinkomplexen wird darüber hinaus die Bildung von Platin-DNA-Addukten als Basis für die Wirkung von Oxaliplatin verstanden. Wie für Cisplatin scheint auch für Oxaliplatin das Ausmaß der Platin-DNA-Addukt-Bildung ein möglicher Indikator für das Tumoransprechen zu sein<sup>71,154-156</sup>. Ziel dieser Arbeit war es daher, ein Populations-PK/PD-Modell zur Beschreibung der Platin-DNA-Addukt-Bildung in den Leukozyten unter Berücksichtigung der Platinkonzentration im Ultrafiltrat zu entwickeln. Basierend auf dem entwickelten Modell sollte der zeitliche Verlauf der Platin-DNA-Addukt-Bildung beschrieben und auf einen möglichen Zusammenhang mit dem Tumoransprechen untersucht werden.

Dieses Ziel sollte durch folgendes Vorgehen erreicht werden:

- Entwicklung eines Populations-PK/PD Modells zur Beschreibung des typischen Platin-Konzentrations- bzw. Addukt-Zeit-Verlaufs im Ultrafiltrat bzw. in den Leukozyten und der pharmakokinetischen/pharmakodynamischen Variabilität
- Untersuchung des Einflusses von patienten- und studienspezifischen Charakteristika (Kovariaten) auf die Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von Oxaliplatin
- Evaluierung des entwickelten Populations-PK/PD-Modells mit Hilfe interner Evaluationsmethoden

- Untersuchungen zur Korrelation zwischen Pharmakodynamik und Tumoransprechen.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Ruthenium AAS-Standard 1000 mg/L Wässrige Lösung, „RuCl <sub>3</sub> “ Specpure <sup>®</sup> Lot.-No.: 07609085	Alfa Aesar, Johnson Matthey GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Gallium AAS-Standard 1000 mg/L Specpure <sup>®</sup> Lot.-No.: 17328065	Alfa Aesar, Johnson Matthey GmbH, Karlsruhe, Deutschland
KP1339 Natrium trans[tetrachlorobis- (1H-indazolo)]ruthenat(III) Lot.-No.: CC-33	Institut für Pharmazeutische Technologie, Universität Heidelberg, Heidelberg, Deutschland
KP46 Tris (8-chinolinolato) gallium(III) Lot.-No.: CC-321.0-5	Chemcon GmbH, Freiburg, Deutschland
Palladium-Matrix-Modifizier (10.0 g/L Pd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> in 15 % HNO <sub>3</sub> )	Merck, KGaA, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Organics, Geel, Belgien
Salpetersäure „Suprapur“ 65 % (V/V)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Triton <sup>®</sup> X-100	Serva, Heidelberg, Deutschland
Methanol (analytical grade)	J.T. Baker, Deventer, Niederlande

Purelab Plus® Wasser	USF Reinstwassersysteme Ransbach-Baumbach, Deutschland
Argon 4.6	Air Product, Hattingen, Deutschland
Leerplasma	Infusionsmedizin Venusberg, Universitätsklinikum Bonn, Bonn, Deutschland

### 3.1.2 Hergestellte Puffer und Lösungen

#### KP1339-Stammlösung(1 mg Ruthenium/mL)

KP1339	47,0 mg
Methanol 50 % (V/V)	9,46 mL

#### KP46-Stammlösung (1 mg Gallium/mL)

KP46	76,30 mg
DMSO	2,0 mL
Verdünnte Salpetersäure 1 % (V/V)	8,594 mg

#### Verdünnte Salpetersäure 1 % (V/V)

Salpetersäure „Suprapur“ 65 % (V/V)	15,4 mL
Purelab Plus® Wasser	984,6 mL

#### Verdünnte Salpetersäure 6,5 % (V/V)

Salpetersäure „Suprapur“ 65 % (V/V)	100 mL
Purelab Plus® Wasser	900 mL

#### Triton-X Lösung 1 % (V/V)

Triton X-100	2,5 mL
Purelab Plus® Wasser	247,5 mL

#### Methanol 50 % (V/V)

Methanol	5,0 mL
Purelab Plus® Wasser	5,0 mL

## Pd-Modifier-Lösung

Palladium-Matrix-Modifier	1,0 mL
Salpetersäure „Suprapur“ 65 % (V/V)	1,0 mL
Purelab Plus® Wasser	8,0 mL

## 3.1.3 Verbrauchsmaterialien

PP-Reaktionsgefäße (0,5, 1,5, 2,0 mL)	Greiner Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland
Cellstar® Reaktionsgefäße (15 mL)	Greiner Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen, diverse	Greiner Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland
Graphitrohrchen, pyrolytisch beschichtet	Varian, Darmstadt, Deutschland
PE-Probengefäße, konisch (2 mL)	Varian, Darmstadt, Deutschland
Ruthenium-Hohlkathodenlampe	Varian, Darmstadt, Deutschland
Gallium-Hohlkathodenlampe	Varian, Darmstadt, Deutschland

## 3.1.4 Geräte

Analysenwaage Kern 770	Gottlieb Kern & Sohn, Albstadt, Deutschland
Analysenwaage Mettler Toledo Classic AB135-S	Mettler Toledo GmbH, Gießen, Deutschland

---

Atomabsorptionsspektrometer Spektrometer SpectrAA® Zeeman 220 Graphitrohratomisator GTA 100 Autosampler PSD 100 Dell Computer: Software SpectrAA® 220, Version 5.10	Varian, Darmstadt, Deutschland
Einkanal-Pipetten (VoluMate®-Pipetten) (0,5-10 µl, 10-100 µL, 100-1000 µL)	Mettler-Toledo GmbH & Co, Gießen, Deutschland
Einkanal-Pipetten (Transferpette®) (0,5-10 µl, 10-100 µL, 100-1000 µL)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Heto Vakuumzentrifuge	Jouan Nordic, Allerød, Dänemark
Laminar-Air-Flow-Werkbank	Heraeus, Hanau, Deutschland
Membranvakuumpumpe	Vacuumbrand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Probenmixer	Gesellschaft für Laborbedarf, Würzburg, Deutschland
Reinstwasseranlage Purelab® Plus	USF, Ransbach-Baumbach, Deutschland
Ultraschallbad Sonorex Super RK 103H	Bandelin electronic, Berlin, Deutschland
Wasserbad Büchi 461	Büchi, Schweiz
Wasserbad MGW Lauda RM 6	Werk Lauda, Lauda- Königshofen, Deutschland
Zentrifuge Microfuge® Lite	Beckman Instruments, California, USA

### 3.1.5 Software

Die pharmakokinetische Datenanalyse wurde mit Hilfe von WinNonlin® Professional Version 4.0 (Pharsight Corporation, Version 5.0.1, 2005), die populationspharmakokinetische/pharmakodynamische Datenanalyse wurde mit NONMEM® (Icon Development Solutions, Version VI, 2008) durchgeführt. R® (The R Foundation for Statistical Computing, Version 2.7.2, 2008) <sup>163</sup> in Verbindung mit Xpose® (Niclas Jonsson and Mats Karlsson, Version 4.0.3, 2008) <sup>164</sup> wurde für die graphische Auswertung herangezogen. Simulationen wurden mit NONMEM® VI durchgeführt. Graphiken wurden mit GraphPad Prism® (Graphpad Software Inc., Version 4.02, 2004), Origin® (OriginLab Corporation, Version 7G SR2, 2002) und R® erzeugt. Der NONMEM®-Datensatz wurde mittels Microsoft Excel® (Microsoft Corporation, Version 2002 SP3, 2002) erstellt. Alle abgeleiteten Kovariaten wurden mit NONMEM® oder Excel® berechnet. Die statistischen Berechnungen erfolgten mit Excel® oder R®.

## 3.2 Validierung analytischer Methoden

Die in dieser Arbeit beschriebenen Methoden wurden anhand der Anforderungen der *Food and Drug Administration* (FDA) und mit Hilfe der Software MVA® (Novia GmbH, Version 2.0, 2001) validiert<sup>165</sup>. Folgende Kriterien wurden dabei untersucht:

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

### 3.2.1 Selektivität

Die Selektivität der Methode wurde durch Vergleich von Spektrogrammen der aufgearbeiteten Leermatrizes mit Spektrogrammen der Kalibratoren der jeweils niedrigsten Konzentration ermittelt. Es wurden stets gepoolte Leermatrizes verwendet.

### 3.2.2 Messbereich und Bestimmungsgrenze

Die zu bestimmenden Konzentrationen umfassten insgesamt einen Bereich von 1 – 1000 µg/L für Gallium und 3 – 24000 µg/L für Ruthenium. Da innerhalb derartiger Konzentrationsunterschiede keine proportionalen Beziehungen zwischen Absorption und Konzentration zu erwarten sind, wurde für jede Matrix der Messbereich in mindestens zwei Konzentrationsbereiche unterteilt und diese getrennt untersucht.

Als unterste Bestimmungsgrenze, auch *lower limit of quantification* (LLOQ), wurde die Konzentration ermittelt, die folgende Kriterien erfüllte:

- Die Konzentration sollte mit einem relativen Fehler (RE, Gl. 3.2) von höchstens 20 %
- Und einer relativen Standardabweichung (RSD, Gl. 3.3) von höchstens 20 % bestimmt werden können.

Hierfür wurden je Matrix Proben hergestellt, die der Konzentration des unteren Kalibrators entsprachen, und sechsmal unabhängig voneinander vermessen. Präzision und Richtigkeit wurden entsprechend den oben genannten Anforderungen geprüft.

### 3.2.3 Linearität

Die Linearität wurde anhand von mindestens sechs unabhängig voneinander erstellten Kalibriergeraden der jeweiligen Matrix untersucht. Der Zusammenhang zwischen Absorption und der entsprechenden Konzentration sollte

mittels linearer Regression beschrieben werden. Gemäß den Forderungen der FDA mussten dafür folgende Kriterien erfüllt werden:

- Der Korrelationskoeffizient der Regressionsgerade sollte  $\geq 0,99$  sein.
- Die erhaltenen Absorptionen wurden in die korrespondierenden Konzentrationen umgerechnet. Dabei sollten die Konzentrationen nicht mehr als 15 % von ihren Nominalwerten abweichen. Im Bereich der Bestimmungsgrenze wurden bis zu 20 % Abweichung akzeptiert. Vier von insgesamt sechs Kalibratoren sollten diese Kriterien erfüllen; dazu sollten in jedem Fall die Kalibratoren mit der niedrigsten und der höchsten Konzentration gehören.

Des Weiteren wurde untersucht, ob die Einbeziehung eines Wichtungsfaktors ( $1/x$  und  $1/x^2$ ) zu einer verbesserten Anpassung führt. Homoskedastizität, das heißt Varianzenhomogenität der Messwerte, ist in größeren Kalibrierbereichen ( $C_{\text{oberer Kalibrator}}/C_{\text{unterer Kalibrator}} > \text{Faktor } 10$ ) meist nicht gegeben. In diesem Fall empfiehlt sich die Verwendung von Wichtungsfaktoren, um eine zu starke Beeinflussung der Regression, bedingt durch größere absolute Abweichungen höherer Messwerte, zu vermeiden.

#### 3.2.4 Wiederfindung

Die Wiederfindung beschreibt das Verhältnis zwischen der Absorption (A) einer Probe, hergestellt in aufgearbeiteter Matrix, und der Absorption einer wässrigen, aber analog aufgearbeiteten Probe gleicher Konzentration. Für die Ermittlung der Wiederfindung wurden je Matrix drei Proben unterschiedlicher Konzentration hergestellt und vermessen. Außerdem wurden Proben in 1 %iger  $\text{HNO}_3$  oder wässriger Lösung hergestellt, die den oben genannten Proben in der Konzentration entsprachen. Die Wiederfindungsrate wurde nach Gl. 3.1 berechnet:

$$\text{Wiederfindungsrate } [\%] = \frac{A_{\text{Matrix, aufgearbeitet}}}{A_{\text{Wasser, aufgearbeitet}}} \cdot 100 \quad \text{Gl. 3.1}$$

### 3.2.5 Richtigkeit und Präzision

Die *Richtigkeit* einer analytischen Methode beschreibt die Übereinstimmung einer gemessenen Konzentration ( $C_{\text{gem}}$ ) mit der nominalen Konzentration ( $C_{\text{nom}}$ ). Als Maß für die Richtigkeit wurde der relative Fehler (*relative error*, RE) erhoben:

$$\text{RE} [\%] = \frac{(C_{\text{gem}} - C_{\text{nom}})}{C_{\text{nom}}} \cdot 100 \quad \text{Gl. 3.2}$$

RE	Relativer Fehler
$C_{\text{gem}}$	gemessene Konzentration
$C_{\text{nom}}$	Nominalkonzentration

Der relative Fehler sollte  $\pm 15 \%$ , im Bereich des LLOQ  $\pm 20 \%$  nicht übersteigen.

Die *Präzision* einer analytischen Methode beschreibt die Streuung der Messergebnisse bei wiederholter Bestimmung einer Probe und gibt somit Hinweise auf den zufälligen Fehler. Die Präzision wurde als relative Standardabweichung (*relative standard deviation*, RSD) wie folgt berechnet:

$$\text{RSD} [\%] = \frac{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}}{\bar{x}} \cdot 100 \quad \text{Gl. 3.3}$$

$\bar{x}$	Mittelwert aus n Einzelmessungen
RSD	relative Standardabweichung, Variationskoeffizient
$x_i$	Einzelmesswert
n	Anzahl der Einzelmessungen

Die relative Standardabweichung sollte  $15 \%$  nicht übersteigen, im Bereich des LLOQ wurden bis zu  $20 \%$  akzeptiert.

Im Rahmen der Validierung wurden die Within-day-Präzision und Richtigkeit, die Between-day-Präzision und Richtigkeit und die Injektionspräzision wie folgt bestimmt:

### *Within-day-Richtigkeit und Präzision*

Für die Bestimmung der Richtigkeit und Präzision der Methode wurden innerhalb einer Messreihe pro Matrix jeweils sechs Qualitätskontrollproben (*quality controls*, QC-Proben) drei verschiedener Konzentrationen unabhängig voneinander aufgearbeitet und vermessen. Anschließend wurden Richtigkeit (RE) und Präzision (RSD) ermittelt.

### *Between-day-Richtigkeit und Präzision*

Um die Präzision und Richtigkeit über einen längeren Zeitraum zu charakterisieren und damit zufällige Fehler, die z.B. durch den Faktor Zeit, verschiedene Bearbeiter und/oder Reagenzien auftreten können, abzuschätzen, wurde die so genannte Between-day-Richtigkeit und Präzision untersucht.

Es wurden jeweils an sechs Tagen pro Matrix QC-Proben mit drei verschiedenen Konzentrationen unabhängig voneinander aufgearbeitet und vermessen. Anschließend wurden Richtigkeit (RE) und Präzision (RSD) ermittelt.

### *Injektionspräzision*

Die Injektionspräzision, auch Wiederholpräzision genannt, charakterisiert die Präzision des analytischen Systems. Dazu wurden stabile Proben zehnmal hintereinander unter denselben Operationsbedingungen innerhalb eines kurzen Zeitraums analysiert.

## 3.2.6 Stabilität

Von der Blutentnahme bis zur Konzentrationsbestimmung durchläuft die Patientenprobe verschiedene Temperaturen. So erfolgte die Lagerung der Proben bei  $-80^{\circ}\text{C}$ , wohingegen die Analyse bei Raumtemperatur durchgeführt wurde.

Um die Stabilität unter den verschiedenen Bedingungen abzuschätzen, wurden folgende Experimente durchgeführt:

- Einfrier-/Auftaustabilität
- Stabilität der unaufgearbeiteten Probe bei Raumtemperatur
- Stabilität der aufgearbeiteten Probe bei Raumtemperatur (Autosampler-Stabilität).

### 3.2.7 Qualitätssicherung während der Messung

Die Qualitätssicherung während der Messung erfolgte mit Hilfe von QC-Proben. Pro Analysenlauf mussten insgesamt 10 % aller vermessenen Proben, aber mindestens sechs, QC-Proben sein. Für jeden Konzentrationsbereich und jede Matrix wurden QC-Proben mindestens drei verschiedener Konzentrationen durch Aufstocken von Vollblut, Urin bzw. Plasma mit dem entsprechenden Analyten hergestellt. Diese Mischungen wurden direkt vor der Messung in Analogie zu den jeweiligen Patientenproben aufgearbeitet.

Ein Analysenlauf wurde akzeptiert und zur Auswertung herangezogen, wenn folgende Kriterien erfüllt waren:

- Die relativen Fehler sollten 15 % (20 % im Bereich des LLOQ) nicht überschreiten.
- 67 % aller QC-Proben sollten diese Bedingung erfüllen; bei 33 % waren auch größere Abweichungen erlaubt. Allerdings sollte dies nicht mehr als 50 % der Replikate einer Konzentration betreffen.

Für die Kalibratoren wurden während des gesamten Messzeitraums die gleichen Qualitätskriterien angesetzt wie während der Validierung.

Sämtliche Kalibratoren, Qualitätskontrollproben und Patientenproben wurden im PROMT- (*precision optimized measurement time*)-Modus vermessen, d.h. sie wurden mindestens zweimal injiziert. Überschritt die Abweichung der beiden Signale 5 %, so wurde die Probe ein drittes Mal und nötigenfalls

ein viertes Mal vermessen. Konnte nach der vierten Injektion eine relative Standardabweichung (RSD) von 15 %, bzw. von 20 % an der Bestimmungsgrenze, nicht unterschritten werden, wurde die entsprechende Probe in einer weiteren Messreihe erneut aufgearbeitet und analysiert.

### 3.3 Pharmakokinetische Datenanalyse

#### 3.3.1 Nicht-kompartimentelle Datenanalyse

Die *nicht-kompartimentelle Datenanalyse* beschreibt die pharmakokinetischen Eigenschaften eines Arzneistoffes ohne die Annahme von Kompartimenten. Für die Durchführbarkeit dieser Methode ist jedoch eine lineare Pharmakokinetik der Substanz Grundvoraussetzung<sup>166</sup>. Die pharmakokinetischen Parameter werden direkt aus den gemessenen Daten ausgerechnet.

Folgende Parameter wurden im Rahmen dieser Arbeit mittels nicht-kompartimenteller Datenanalyse abgeschätzt:

*Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (Area under the concentration-time curve, AUC)*

$$AUC_{t_0-t_z} = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^z (c_i + c_{i+1}) \cdot (t_{i+1} - t_i) \quad \text{Gl. 3.4}$$

$AUC_{t_0-t_z}$  Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve im Zeitraum  $t_0 - t_z$   
 $z$  Anzahl der gemessenen Konzentrationen  
 $t_i$  und  $t_{i+1}$  Zwei aufeinander folgende Messzeitpunkte  
 $c_i$  und  $c_{i+1}$  Konzentration zum entsprechenden Zeitpunkt

$$AUC_{0-\infty} = AUC_{t_0-t_z} + \frac{c_z}{\lambda_z} \quad \text{Gl. 3.5}$$

$AUC_{0-\infty}$  Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve  $t_0$  bis  $t_\infty$  extrapoliert  
 $c_z$  Letzter Messwert  
 $\lambda_z$  Terminale Eliminationsgeschwindigkeitskonstante

*Clearance (CL)*

$$CL = \frac{F \cdot D}{AUC_{0-\infty}} \quad \text{Gl. 3.6}$$

F            Systemische verfügbare Fraktion  
D            Dosis

*Verteilungsvolumen ( $V_z$ ) in der terminalen Eliminationsphase*

$$V_z = \frac{CL}{\lambda_z} \quad \text{Gl. 3.7}$$

*Terminale Halbwertszeit*

$$t_{z1/2z} = \frac{\ln 2}{\lambda_z} \quad \text{Gl. 3.8}$$

Andere Parameter, wie die maximale Konzentration ( $C_{\max}$ ) und die Zeit bis zum Erreichen von  $C_{\max}$  ( $t_{\max}$ ), wurden direkt aus den Daten abgelesen.

Die oben genannten Parameter wurden mit WinNonlin<sup>®</sup> berechnet (s. Kap. 3.1.5). Darüber hinaus wurden folgende Parameter mit Hilfe von Excel<sup>®</sup> berechnet:

*Renale Clearance*

$$CL_{R(t_0-t_z)} = \frac{U_{\text{cum}(t_0-t_z)}}{AUC_{t_0-t_z}} \quad \text{Gl. 3.9}$$

$CL_R(t_0-t_z)$     Renale Clearance im Zeitraum  $t_0 - t_z$   
 $U_{\text{cum}}(t_0-t_z)$     Kumulative Arzneistoffmenge im Urin im Zeitraum  $t_0 - t_z$

$$CL_{R(t_i-t_{i-1})} = \frac{\frac{\Delta U}{\Delta t}}{C_{\text{av}}} \quad \text{Gl. 3.10}$$

$CL_{R(t_i-t_{i-1})}$     Renale Clearance in einem Sammlungsintervall  
 $\frac{\Delta U}{\Delta t}$             Renale Eliminationsgeschwindigkeit im Sammlungsintervall  
 $C_{\text{av}}$                 Mittlere Plasmakonzentration im entsprechenden Sammlungsintervall

### 3.3.2 Kompartimentelle Datenanalyse

Grundlage für die *Kompartimentelle Datenanalyse* bildet die Vorstellung, dass sich der Körper aus einem oder mehreren miteinander in Verbindung stehenden Kompartimenten zusammensetzt, in denen sich der Arzneistoff spontan und homogen verteilt. Diese Kompartimente sind jedoch nicht physiologischen oder anatomischen Räumen zuzuordnen, sondern lassen sich vielmehr als Gewebe oder Gruppen von Geweben mit gleichem Blutfluss und Arzneistoffaffinität verstehen. Der Massentransport in und aus den Kompartimenten lässt sich durch Geschwindigkeitskonstanten charakterisieren<sup>167</sup>. Diese Kompartimentmodelle sind als nichtlineare Regressionsmodelle durch folgende Gleichung allgemein darstellbar,

$$y_i = f(\theta, x_i) + \varepsilon_i \quad \text{Gl. 3.11}$$

wobei sich  $y$ , die abhängige Variable, in der Regel die Konzentrationen, zu jedem Zeitpunkt  $i$  aus dem entsprechenden Modell, der Funktion  $f$ , und der Varianz darstellen lässt.  $\theta$  sind die Modellparameter und  $x_i$  die unabhängigen Variablen. Letztere schließen die Dosierung und Zeit ein.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das *Ein- und Zwei-Kompartiment-Modell* zur Beschreibung der Konzentrations-Zeit-Verläufe herangezogen. Beide Modelle sind in Abb. 3.1 schematisch dargestellt.

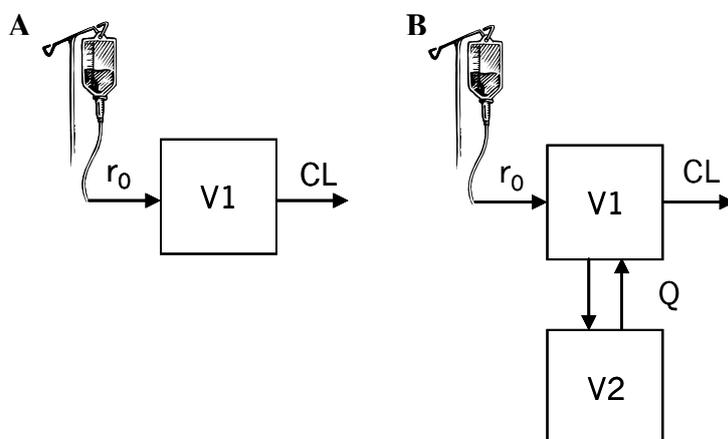


Abb. 3.1 Schematische Darstellung des Ein- und Zwei-Kompartiment-Modells nach Gabe einer Kurzinfusion

Das *Ein-Kompartiment-Modell* mit linearer Eliminationskinetik ist das einfachste pharmakokinetische Modell, da es den gesamten Körper als einen einzigen Verteilungsraum darstellt. Die gesamte Dosis verteilt sich gleichmäßig und augenblicklich im gesamten Organismus. Änderungen in der Konzentration treten an allen Orten im selben Ausmaß und derselben Geschwindigkeit auf. Für die Elimination des Arzneistoffes kann eine Kinetik erster Ordnung angenommen werden. Wie in Abb. 3.1 A erkennbar, wurde das Ein-Kompartiment-Modell mit  $V$  (Verteilungsvolumen) und  $CL$  (Clearance) parametrisiert.

Das im Rahmen dieser Arbeit angewandte Kompartiment-Modell, *das Zwei-Kompartiment-Modell*, weist in der Pharmakokinetik eine besondere Bedeutung auf. Nach Applikation des Arzneistoffes in die systemische Zirkulation fallen die Konzentrationen im Plasma zumeist sehr schnell ab, was neben der Elimination vor allem durch den vorherrschenden Prozess der Verteilung in „tiefer gelegene“ Kompartimente zu erklären ist. In der semilogarithmischen Darstellung des Konzentrations-Zeit-Verlaufs lassen sich daher zwei Phasen erkennen. Die unterschiedlichen Geschwindigkeitskonstanten, die den Stofftransport in und aus den Kompartimenten charakterisieren, lassen sich aus den Steigungen der einzelnen Phasen ableiten. Die Verteilung stellt in der Regel den Prozess mit der höheren Geschwindigkeit dar. Die Parametrisierung erfolgte, wie in Abb. 3.1 B erkennbar, mit  $V_1$  (Verteilungsvolumen des zentralen Kompartiments),  $V_2$  (Verteilungsvolumen des peripheren Kompartiment),  $CL$  (Clearance) und  $Q$  (Interkompartimentclearance).

### 3.3.3 Populationspharmakokinetische/pharmakodynamische Datenanalyse

Der Populationsansatz ermöglicht die Analyse pharmakokinetischer und/oder pharmakodynamischer Daten von Gruppen von Individuen. Dabei steht nicht allein die Abschätzung des typischen Wertes eines pharmakokinetischen oder pharmakodynamischen Parameters im Vordergrund. Die Charakterisierung der Variabilität der Parameter der Individuen in

der Population bildet einen zweiten Schwerpunkt. In der pharmakokinetischen/pharmakodynamischen-(PK/PD)-Datenanalyse werden verschiedene Methoden angewendet<sup>168</sup>.

Bei der *Naive-Pooled-Methodik* werden die Daten aller Patienten zusammengeführt und so ausgewertet, als ob sie von einem einzigen Patienten stammen würden. Diese Methode erlaubt somit die Abschätzung von Parametern, auch wenn nur wenige Messpunkte pro Individuum zur Verfügung stehen. Zwar lassen sich die Differenzen zwischen den beobachteten und den abgeschätzten Werten (Residuen) und damit die Restvariabilität ermitteln, jedoch gehen jegliche Informationen zu den einzelnen Individuen verloren<sup>169</sup>. Die interindividuelle Variabilität ist somit nicht ermittelbar. Im Gegensatz dazu steht die *Standard-Two-Stage-(STS)-Methode*<sup>170</sup>. Hierbei werden zunächst die PK/PD-Parameter für jedes Individuum separat abgeschätzt. Anschließend wird eine deskriptive statistische Analyse durchgeführt, mit der sich der Populationsmittelwert sowie Varianz und Kovarianz der Parameter ermitteln lassen. Diese Methode setzt jedoch eine ausführliche Probenammlung voraus.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine nichtlineare Regressionsmethode unter Berücksichtigung gemischter Effekte (*Nonlinear Mixed Effects Modelling*, NLME), welche erstmalig von *Beal* und *Sheiner* beschrieben wurde, angewendet<sup>171</sup>. NLME bietet verschiedene Vorzüge gegenüber der STS-Methode und ermöglicht eine genauere Abschätzung der Variabilität innerhalb der Population als Einschrittverfahren<sup>170</sup>. Darüber hinaus stellt sie eine Möglichkeit dar, Studien unterschiedlicher Art, Patienten- und Probenanzahl zusammengefasst auszuwerten. Man spricht bei dieser Methode von *mixed effects*, da so genannte *fixed effects*, welche die Populationsmittelwerte oder auch für die Population typischen Werte der pharmakokinetischen bzw. pharmakodynamischen Parameter darstellen, und *random effects*, die inter- und intraindividuelle Variabilität, in einem Schritt ermittelt werden. Wie im linken Teil der Abb. 3.2 graphisch

dargestellt, besteht ein solches Regressionsmodell, im Folgenden als Populationsmodell bezeichnet, in der Regel aus drei Submodellen:

- Strukturmodell
- Statistisches Modell
- Kovariatenmodell

Das Strukturmodell und das Kovariatenmodell liefern die *fixed effects*, und das statistische Modell dient der Charakterisierung der *random effects*.

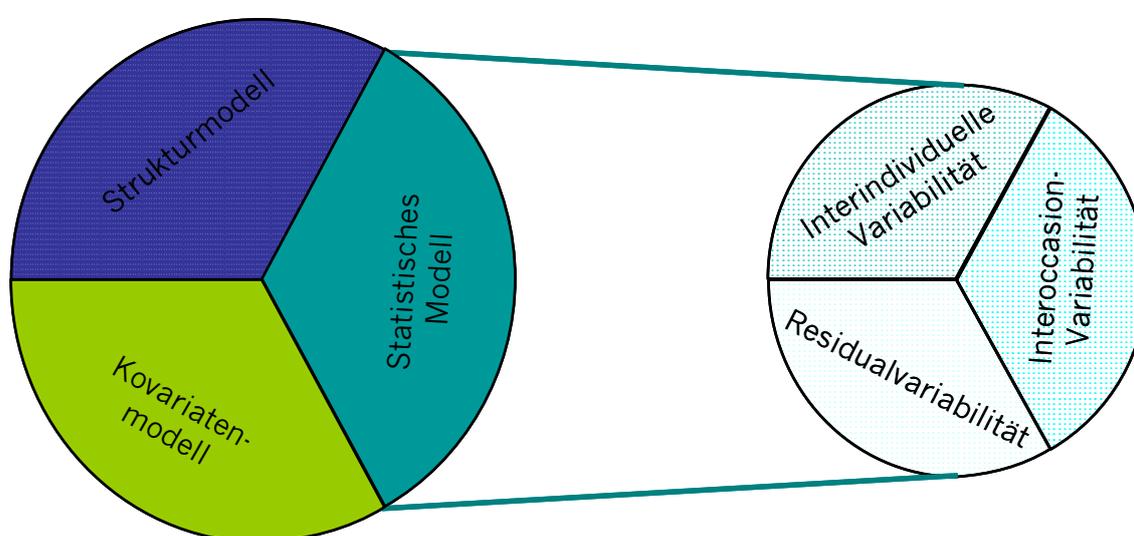


Abb. 3.2 Schematische Darstellung eines Populationsmodells

In den folgenden Abschnitten werden die drei Submodelle im Einzelnen beleuchtet.

### *Strukturmodell*

Im Strukturmodell wird das typische Profil der abhängigen Variablen (z.B. gemessene Konzentrationen) als Funktion der typischen Modellparameter (z.B. typische Clearance), dem Dosierungsschema und der Zeit beschrieben. Dieser Zusammenhang lässt sich als Funktion  $f$  wie folgt darstellen:

$$Y_{ij} = f(\theta_i, x_{ij})$$

Gl. 3.12

Die abhängige Variable  $Y_{ij}$  ergibt sich somit aus der Funktion  $f$ , welches die unabhängigen Variablen  $x_{ij}$  (z.B. Zeitpunkt  $j$ , Dosis) und den Vektor der Modellparameter  $\theta$  des  $i$ -ten Individuums beinhaltet.

### *Statistisches Modell*

Das statistische Modell beschreibt die zufällige Komponente der Populationsparametervariabilität (PPV). Somit charakterisiert diese die nicht messbaren und nicht kontrollierbaren Unterschiede zwischen und innerhalb von Individuen, also die *random effects*. NLME-Regressionsmodelle ermöglichen eine Differenzierung der *random effects* in die im rechten Teil der Abb. 3.2 dargestellte *interindividuelle Variabilität (IIV)*, Variabilität von Applikation zu Applikation (*Interoccasion-Variabilität, IOV*) und *intraindividuelle Variabilität (Residualvariabilität)*.

Die *interindividuelle Variabilität (IIV)*, auch als *Between-Subject-Variabilität (BSV)* bezeichnet, beschreibt den zufälligen, nicht erklärbaren Unterschied zwischen den Individuen. Diese Variabilität bezieht sich auf den Parameterraum und lässt sich unter anderem als *additives, proportionales* oder *exponentielles Fehlermodell* integrieren. Die Wahl des Fehlermodells ist abhängig vom Datentyp. Die Verteilung der pharmakokinetischen Parameter ist oft rechtsschief, folgt also annähernd einer Log-Normalverteilung. Das entspricht der Annahme über die Verteilung der Parameter, die durch das exponentielle Fehlermodell ausgedrückt wird. Durch die Verwendung des exponentiellen Fehlermodells wird außerdem vermieden, dass unphysiologische Werte, d.h.  $\leq 0$ , für die pharmakokinetischen Parameter abgeschätzt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das exponentielle Fehlermodell bevorzugt eingesetzt.

$$P_{ki} = \theta_k \cdot e^{\eta_{ki}}$$

Gl. 3.13

Es ergibt sich der individuelle Parameter  $P_k$  des  $i$ -ten Individuums aus dem typischen Parameter  $\theta_k$  und  $\eta_{ki}$ , der Differenz der natürlichen Logarithmen von  $P_{ki}$  und  $\theta_k$ , denn:

$$\eta_{ki} = \ln(P_{ki}) - \ln(\theta_k)$$

Gl. 3.14

Die Gesamtheit der  $\eta_{ki}$  wird als normalverteilt mit einem Mittelwert von 0 und der Varianz  $\omega_k^2$  angenommen. Die Varianz  $\omega_k^2$  ist der durch NONMEM® abgeschätzte *Random-effect*-Parameter und reflektiert das Ausmaß der IIV. Im Falle eines exponentiellen Fehlermodells entspricht  $\omega_k \cdot 100$  ungefähr dem Variationskoeffizient (VK) in %. Dabei erfolgt die Abschätzung des jeweiligen diagonalen Elements der Varianz-Kovarianz-Matrix  $\Omega$ . Eine mögliche Korrelation (= statistische Assoziation) zwischen zwei diagonalen Elementen lässt sich durch Abschätzung des entsprechenden nicht-diagonalen Elements der  $\Omega$ -Matrix  $\omega_{k,k+1}$  bestimmen. Die Kovarianz zwischen den diagonalen Elementen ist durch das nicht-diagonale Element charakterisiert.

Die Annahme, dass die Pharmakokinetik über einen längeren Zeitraum konstant ist, scheint nicht physiologisch zu sein. Zum Teil lassen sich diese Schwankungen anhand physiologischer Prozesse erklären und somit durch Kovariaten (z.B. Alter bei Neugeborenen, Kreatininclearance) vorhersagen. Oft jedoch sind die Ursachen nicht bekannt, und/oder es fehlen geeignete Surrogatparameter<sup>172</sup>. Wurde der Arzneistoff einem Individuum mehrmals appliziert, und für jede Applikation liegt mehr als ein Messwert vor, so kann die Variabilität von Applikation zu Applikation (*Interoccasion-Variabilität, IOV*) und damit eine zeitabhängige Komponente der Variabilität abgeschätzt werden<sup>172</sup>. Mathematisch wird die IOV in das exponentielle Fehlermodell folgendermaßen integriert:

$$P_{kiq} = \theta_k \cdot e^{\eta_{ki} + \kappa_{kiq}}$$

Gl. 3.15

Der in Gl. 3.15 dargestellte Zusammenhang beschreibt den  $k$ -ten Parameter des  $i$ -ten Individuums für die  $q$ -te Applikation. Die Varianz  $\pi^2$  der Verteilung (Normalverteilung, Mittelwert = 0) des hinzugefügten Parameter  $\kappa_{kiq}$  wird als *Random-effect*-Parameter abgeschätzt.

Analytische Fehler, Fehler in der Dokumentation von Dosierungs- und Probenentnahmezeitpunkten und Modellmisspezifikationen spiegeln sich im Ausmaß der Abweichung der gemessenen von den durch das Modell vorhergesagten Werten der abhängigen Variablen wider. Diese so genannte Residual- oder Restvariabilität kann ebenfalls durch verschiedene Modelle charakterisiert werden. Am häufigsten werden das *additive*, das *proportionale* und das *kombinierte additiv-proportionale* Fehlermodell eingesetzt.

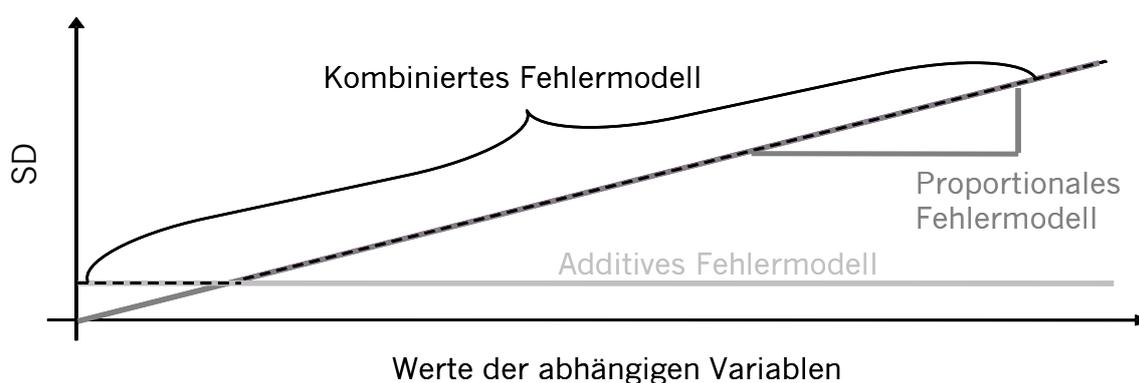


Abb. 3.3 Schematische Darstellung der Modelle der Residualvariabilität

Das einfachste Fehlermodell (s. Gl. 3.11), das additive Fehlermodell, findet dann Anwendung, wenn, wie Abb. 3.3 veranschaulicht, eine konstante Varianz über den gesamten Messbereich zu erwarten ist. Jeder gemessene Wert der abhängigen Variablen  $y$  des Individuums  $i$  zum Zeitpunkt  $j$  lässt sich aus der Funktion  $f$  (Strukturmodell, inklusive IIV und IOV) und der zufälligen Abweichung  $\varepsilon_{ij}$  ermitteln.

Proportional zu den Werten steigende Abweichungen der gemessenen von den vorhergesagten Werten der abhängigen Variablen lassen sich mit Hilfe des Proportionalen Fehlermodells integrieren.

$$y_{ij} = f(\theta_i, x_{ij}) \cdot (1 + \varepsilon_{ij}) \quad \text{Gl. 3.16}$$

Ein weiteres, in Populations-PK/PD-Modellen gängiges Fehlermodell ist das kombinierte Fehlermodell:

$$y_{ij} = f(\theta_i, x_{ij}) \cdot (1 + \varepsilon_{1,ij}) + \varepsilon_{2,ij} \quad \text{Gl. 3.17}$$

Wie in Gl. 3.17 erkennbar, beinhaltet dieses Modell sowohl einen additiven als auch einen proportionalen Fehleranteil.

Abb. 3.3 veranschaulicht, dass dieses Fehlermodell sich bei niedrigen Werten wie ein additives und bei höheren Beobachtungen wie ein proportionales Fehlermodell verhält. Die Wahl des geeigneten Fehlermodells ist abhängig von der Art der Daten. Als Grundannahme für jedes der Modelle gilt, dass die Parameter  $\varepsilon_{ij}$  einer Normalverteilung mit dem Mittelwert Null und der Varianz  $\sigma^2$  folgen. Durch das Populationsmodell wird die Varianz  $\sigma^2$  abgeschätzt und stellt das diagonale Element der  $\Sigma$ -Matrix dar. Sie reflektiert also das Ausmaß der Residualvariabilität.

#### *Kovariatenmodell*

Kovariaten sind spezifische, dokumentierte Patienten- und Studiencharakteristika, die einen Einfluss auf die Pharmakokinetik/Pharmakodynamik des Arzneistoffes haben. Ihr Einfluss wird als Kovariatenmodell in das Populationsmodell integriert. Dadurch ist es möglich, einen der beobachteten IIV zu erklären. Kovariaten werden als fehlerfreie Angaben angenommen und daher zu den *Fixed-effect*-Parametern gezählt.

#### *Gesamtpopulationsmodell*

Wie zu Beginn des Kap. 3.3.3 beschrieben, besteht ein Populationsmodell aus den in den vorigen Abschnitten beschriebenen Submodellen. Diese lassen sich wie folgt in der Gesamtmodellgleichung vereinigen.

$$y_{ij} = f(g(\Theta, z_i) + \eta_i + \kappa_{iq}, x_{ij}) + \varepsilon_{ij} \quad \text{Gl. 3.18}$$

Die einzelnen Arten der Variabilitäten werden in Gl. 3.18 exemplarisch durch das additive Fehlermodell beschrieben. Jeder Wert  $y$  des  $i$ -ten Individuums zum  $j$ -ten Zeitpunkt ergibt sich aus der Vorhersage durch Funktion  $f$  und dem Restfehler  $\varepsilon_{ij}$ . Die Funktion  $f$  beschreibt den Zusammenhang aller der Auswertung zu Grunde liegenden Daten. Sie beinhaltet die gemessenen und dokumentierten unabhängigen Variablen  $x_{ij}$  (z.B. Zeitpunkt  $j$ ) und  $z_i$  (Kovariaten, z.B. Alter) sowie den *Fixed-effect*-Parametervektor  $\Theta$  (PK/PD-Parameter, Parameter der Kovariateneffekte) und den Vektoren der *Random-effect*-Parameter  $\eta_i$ ,  $\kappa_{iq}$  und  $\varepsilon_{ij}$ .

#### *Algorithmen zur Abschätzung der Populationsparameter*

Die Abschätzung von Parametern mit Hilfe nichtlinearer Regressionsmodelle wurde in einer Vielzahl von Softwarepaketen durch verschiedenste Algorithmen implementiert<sup>173</sup>. Da für die Populationsanalysen in dieser Arbeit NONMEM® VI verwendet wurde, beschränken sich die Erläuterungen auf die in NONMEM® VI vorhandenen und im Rahmen dieser Arbeit angewandten Algorithmen. Wie in Kap. 3.3.2 beschrieben, ist auch bei NLME das Ziel, die Modellfunktion basierend auf den gemessenen Werten zu optimieren, dass Modellparameter gefunden werden, die die beobachteten Werte bestmöglich beschreiben. In NONMEM® VI wird das durch die Minimierung der *Extended Least Square Objective Function* ( $O_{\text{ELS}}$ ) erreicht, die unter Gauss-Bedingungen Maximum-Likelihood-Schätzwerte liefert. Die Gleichung zur Berechnung der  $O_{\text{ELS}}$ , auch als OFV (*Objective Function Value*) bezeichnet, lautet:

$$O_{\text{ELS}}(\theta) = \sum_{i=1}^N \left[ \frac{[Y_i - f(\theta, x_i)]^2}{v(\theta, \xi, x_i)} + \ln(v(\theta, \xi, x_i)) \right] \quad \text{Gl. 3.19}$$

Bei der *Extended-least-squares*(ELS)-Methode wird die Verteilung der Residualvariabilität  $v(\theta, \xi, x_i)$  als *A-priori*-Varianzmodell berücksichtigt. Somit erreicht man eine Wichtung der Daten, die dem Modell zugrunde liegen. In den meisten PK/PD-Analysen gibt es keine explizite algebraische Lösung

der oben genannten Funktion, die ermöglicht, das Funktionsminimum direkt zu berechnen. Daher werden Algorithmen benutzt, die, basierend auf dem Newton-Verfahren, iterativ das Minimum suchen. NONMEM® VI bietet verschiedene Ansätze um Parameter mittels NLME abzuschätzen. Die *First-Order*(FO) Methode stellt den ersten und einfachsten Algorithmus dar, der zu Beginn der 80er Jahre von *Beal und Sheiner* entwickelt wurde<sup>174</sup>. Hierbei wird die Linearisierung durch eine Taylorreihenentwicklung erster Ordnung (*first order taylor series expansion*) in Bezug auf die *Random-effect*-Parameter erreicht. Es wird angenommen, dass die *Random-effect*-Parameter unabhängig multivariat normal verteilt sind mit Mittelwerten von Null. Die *Fixed/random-effect*-Parameter werden in einem iterativen Prozess ermittelt. Individuelle Parameter werden *a-posteriori* aus den *Fixed-effect*-Parametern, den *Random-effect*-Parametern und den individuellen Beobachtungen als empirische Bayes-Parameter (*empirical bayesian estimates*, EBE) mittels der *Posthoc*-Option in NONMEM® VI berechnet<sup>175</sup>. Im Gegensatz dazu ermöglicht die *first order conditional estimation* (FOCE)-Methode die parallele Abschätzung der Populationsparameter und der dazugehörigen individuellen Parameter vor jeder Iteration. Die FOCE-Methode mit *Interaction* berücksichtigt die Abhängigkeit der Residualvariabilität von der interindividuellen Variabilität bei der Berechnung des OFV<sup>175</sup>.

#### *Statistische Methoden der Modellwahl*

Da unter Gauss-Bedingungen die OFV proportional zum Maximum-Likelihood-Schätzer ist, kann zum statistischen Vergleich zweier Modelle der Likelihood-Ratio-Test herangezogen werden. Um diesen Test jedoch tatsächlich anwenden zu können, muss eine weitere Bedingung erfüllt sein. Das komplexere der zu vergleichenden Modelle muss durch Fixierung eines oder mehrerer Parameter mit einem festen Wert zum einfacheren Modell reduzierbar sein (*Nested Models*). Die Differenz der durch die beiden Modelle erhaltenen OFV,  $\Delta\text{OFV}$ , ist annähernd  $\chi^2$ -verteilt. Somit entsprechen  $\Delta\text{OFV}$  von 3,84, 6,63, 7,88 und 10,83 jeweils den Signifikanzniveaus 0,05, 0,01,

0,005 und 0,001 (df=1). Es wurden folgende Signifikanzniveaus für die Modellentwicklung festgelegt:

- $p \leq 0,05$  für die Bildung des Struktur- und Statistikmodells und dem Vorwärtseinschlussverfahren der Kovariaten (s. Kap. 3.3.3)
- $p \leq 0,001$  für das Rückwärtsausschlussverfahren der Kovariaten (s. Kap. 3.3.3).

Darüber hinaus wurde der relative Standardfehler der abgeschätzten Parameter (*Relative standard error*, RSE) zur Bewertung der Güter der Modellvorhersagen herangezogen und wie folgt berechnet:

$$\text{RSE } [\%] = \frac{\text{SE}}{\text{Modellparameter}} \cdot 100 \quad \text{Gl. 3.20}$$

SE                      Standardfehler (*standard error*)

Der RSE sollte kleiner als 50 % sein, da sonst das 95 %-Konfidenzintervall den Wert Null einschließt.

#### *Graphische Methoden der Modellwahl*

Um die Güte der Anpassung sowie die Modellannahmen beurteilen zu können, wurden neben den statistischen Methoden auch graphische Analysen in allen Phasen der Modellentwicklung und -optimierung durchgeführt. Diese wurden mit Hilfe von Xpose® und R® verwirklicht. Es wurden folgende *Goodness-of-Fit(GOF)*-Graphiken begutachtet:

- vorhergesagte typische (Populations-, PRED) bzw. individuelle Werte (IPRE) gegen die Messwerte (DV)
- gewichtete Residuen (WRES) gegen PRED bzw. IPRE
- individuelle gewichtete Residuen (iWRES) gegen PRED bzw. IPRE

### 3.4 Projekt I: Methoden zur Bestimmung von Gallium in Vollblut, Plasma und Urin

Im Rahmen dieser Arbeit wurden GF-AAS-Methoden zur Bestimmung von Gallium in Vollblut, Plasma und Urin entwickelt und gemäß den Anforderungen der FDA validiert<sup>165</sup>. Die Konzentrationsangaben in diesem Kapitel beziehen sich stets auf Gallium.

#### 3.4.1 Geräteeinstellungen und Temperaturprogramm

Alle Untersuchungen wurden mit einem Varian GF-AAS-System mit Zeeman-Untergrundkorrektur durchgeführt. Das GF-AAS-System war ausgestattet mit:

- SpectrAA® Zeeman 220
- Graphite tube atomizer GTA 100
- Autosampler PSD 100
- Gallium-Hohlkathoden-Lampe

Die Proben wurden in pyrolytisch beschichteten Graphitröhrchen (*Partition Tubes*) vermessen. Es wurden folgende weitere Geräteeinstellungen gewählt:

- Wellenlänge: 294.4 nm
- Lampenstrom: 4.0 mA
- Monochromator: 0.5 nm Spaltweite mit reduzierter Spalthöhe
- Messmodus: PROMT-Height

Abhängig von der Probenmatrix wurden Temperaturprogramme verwendet, die sich in der Veraschungstemperatur und -dauer unterschieden (s. Tab. 3.1 bis Tab. 3.3). Das Temperaturprogramm durchlief fünf Phasen. Unter „Dauer“ wird die Zeitspanne angegeben, nach deren Ablauf die zugehörige Temperatur erreicht war. Wiederholungen einer Temperaturstufe bedeuten,

dass die Temperatur über die angegebene Zeitspanne konstant gehalten wurde.

Tab. 3.1 Temperaturprogramm zur Bestimmung von Gallium im Plasma

Schritt	Phase	Temperatur [°C]	Dauer [s]	Argonzufuhr [L/min]	Signal-aufnahme
1	Trocknung	95	5,0	3,0	Nein
2		110	60,0	3,0	Nein
3		120	10,0	3,0	Nein
4	Vorveraschung	400	15,0	3,0	Nein
5		400	10,0	3,0	Nein
6	Veraschung	1500	10,0	3,0	Nein
7		1500	5,0	3,0	Nein
8		1500	3,6	0	Nein
9	Atomisierung	2600	1,0	0	Ja
10		2600	2,0	0	Ja
11	Reinigung	2700	2,0	3,0	Nein

Tab. 3.2 Temperaturprogramm zur Bestimmung von Gallium im Urin

Schritt	Phase	Temperatur [°C]	Dauer [s]	Argonzufuhr [L/min]	Signal-aufnahme
1	Trocknung	95	5,0	3,0	Nein
2		110	60,0	3,0	Nein
3		120	10,0	3,0	Nein
4	Vorveraschung	400	15,0	3,0	Nein
5		400	10,0	3,0	Nein
6	Veraschung	1000 – 1300	10,0	3,0	Nein
7		1000 – 1300	5,0	3,0	Nein
8		1000 – 1300	3,6	0	Nein
9	Atomisierung	2600	1,0	0	Ja
10		2600	2,0	0	Ja
11	Reinigung	2700	2,0	3,0	Nein

Tab. 3.3 Temperaturprogramm zur Bestimmung von Gallium im Vollblut

Schritt	Phase	Temperatur [°C]	Dauer [s]	Argonzufuhr [L/min]	Signal-aufnahme
1	Trocknung	95	5,0	3,0	Nein
2		110	60,0	3,0	Nein
3		120	10,0	3,0	Nein
4	Vorveraschung	400	15,0	3,0	Nein
5		400	10,0	3,0	Nein
6	Veraschung	1450 – 1500	10,0	3,0	Nein
7		1450 – 1500	5,0	3,0	Nein
8		1450 – 1500	3,6	0	Nein
9	Atomisierung	2600	1,0	0	Ja
10		2600	2,0	0	Ja
11	Reinigung	2700	2,0	3,0	Nein

### 3.4.2 Modifier

Der Einsatz von chemischen Modifiern kann die Selektivität und Sensitivität einer GF-AAS-Methode deutlich beeinflussen. Chemische Modifier, wie Salpetersäure, fördern direkt den Aufschluss der Probenmatrix während der Veraschung und erhöhen so die Flüchtigkeit der Matrixbestandteile. Die so erzielte Trennung der Probenmatrix vom Analyten verhindert Interferenzen und minimiert die Untergrundabsorption. Im Gegensatz dazu modifiziert Magnesiumnitrat die Oberfläche des Graphitrohrs dahingehend, dass die Kohlenstoffauflagerung im Graphitrohr minimiert wird und somit die Lebensdauer des Graphitrohrs verlängern kann. Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete Modifier Palladiumnitrat, ein Vertreter aus der Gruppe der schwerflüchtigen Edelmetallsalze, führt durch Interaktion mit dem Analyten zur Verminderung von dessen Flüchtigkeit und dadurch zu einer Stabilisierung in der Probe. Durch den Einsatz von PdNO<sub>3</sub> lassen sich auch bei leichtflüchtigen Elementen, wie Gallium, ausreichend hohe Veraschungs- und Atomisierungstemperaturen erzielen. Der Mechanismus der einzelnen

Modifier konnte bislang jedoch nicht abschließend geklärt werden<sup>176</sup>. Gallium ist als Galliumchlorid, aber auch in Form von organischen Verbindungen leicht flüchtig. Aufgrund dieser Eigenschaft geht während des Aufheizens bei der GF-AAS-Analytik Gallium vor Erreichen der Atomisierungstemperatur verloren. Um den Analyten in der Probe zu stabilisieren und somit eine ausreichende Sensitivität zu erzielen, wurde ein kommerziell erhältlicher Matrix-Modifier (Palladium-Matrix-Modifier: 10,0 g/L Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> in 15 % HNO<sub>3</sub>) verwendet.

### 3.4.3 Probenaufarbeitung

Die Aufarbeitung der Proben für die Bestimmung von Gallium stellt ein zwei- bzw. für reinen Urin ein dreistufiges Verfahren dar. Nachdem die Proben bei Raumtemperatur aufgetaut und gemischt wurden, erfolgte ein Aufschluss mit Salpetersäure 65 % (V/V) im Wasser- oder Ultraschallbad. Aufgrund der komplexeren Zusammensetzung der Matrix wurden Vollblutproben im Ultraschallbad aufgeschlossen. Die Bedingungen für den Aufschluss der unterschiedlichen Matrices sind in Tab. 3.4 zusammengefasst.

Tab. 3.4 Aufschlussbedingungen für die Galliumanalytik

Matrix	Konzentrationsbereich [µg/L]	Temperatur [°C]	Aufschlusszeit [min]	Gerät
Plasma	5 – 100	80	50	Wasserbad
	10 – 200			
Urin	10 – 200	80	30	Wasserbad
	50 – 1000			
Vollblut	5 – 100	80	30	Ultraschallbad
	10 – 200			

Die so erhaltenen klaren Lösungen wurden auf Raumtemperatur abgekühlt und anschließend 2 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Abschließend wurden die Lösungen noch einmal gemischt und entsprechend dem in Tab. 3.5

aufgeführten Schema mit Purelab®-Plus-Wasser in den Kalibrierbereich verdünnt.

Tab. 3.5 Probenaufarbeitung für die Bestimmung von Gallium im Vollblut, Plasma und Urin

Matrix	Konzentrationsbereich [µg/L]		Proben- volumen [µL]	Trocknung	HNO <sub>3</sub> 65 % [µL]	Wasser [µL]	VF
Plasma	5	– 100	25	Nein	100	125	10
	10	– 200	25	Nein	100	375	20
Urin	1	– 20	250*	Ja	125	375	2
	10	– 200	25	Nein	100	125	10
	50	– 1000	25	Nein	100	125	100
			50		n.b.	450	
Vollblut	10	– 100	50	Nein	200	250	10
	100	– 1000	50	Nein	200	250	100
			50		n.b.	450	

\* zur Trockne eingedampft

n.b nicht benötigt

VF Verdünnungsfaktor

Die Urinproben für den Kalibrierbereich von 1 bis 20 µg/L Gallium wurden zunächst bis zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in konzentrierter Salpetersäure aufgenommen, 10 min im Ultraschallbad gelöst und aufgeschlossen. Das klare Lysat wurde 2 min bei 12000 rpm zentrifugiert und mit Purelab®-Plus-Wasser nach dem in Tab. 3.5 gezeigten Schema in den Kalibrierbereich hinein verdünnt.

#### 3.4.4 Kalibrierung

Die Kalibrierung für die Bestimmung der Galliumkonzentrationen in Vollblut-, Plasma- und Urinproben erfolgte matrixbasiert. Vor jeder Messung wurde eine Kalibrierkurve erzeugt.

### 3.4.5 Herstellung von Stamm- und Arbeitslösungen

Zur Herstellung der KP46-Stammlösung ( $SL_{KP46}$ ) wurden 76,3 mg KP46 auf der Analysenwaage eingewogen, in 2,0 mL DMSO gelöst und mit 1 %iger  $HNO_3$  (V/V) auf die Endkonzentration von 1 mg Gallium/mL gebracht. Nach der Herstellung wurde diese Lösung aliquotiert und bei  $-20^\circ C$  gelagert.

Als Gallium-Stammlösung ( $SL_{Ga}$ ) wurde die kommerziell erhältliche AAS-Gallium-Stammlösung (Gallium AAS-Standard, Specpure<sup>®</sup>, 1000  $\mu g$  Gallium/mL in 2 %iger  $HNO_3$ ) verwendet. Diese Lösung wurde bei  $4^\circ C$  gelagert.

Ausgehend von den beiden Stammlösungen wurden drei KP46-Arbeitslösungen, AL-1<sub>KP46</sub> (10  $\mu g$  Gallium/mL), AL-2<sub>KP46</sub> (1  $\mu g$  Gallium/mL) und AL-3<sub>KP46</sub> (0,1  $\mu g$  Gallium/mL) und drei Gallium-Arbeitslösungen, AL-1<sub>Ga</sub> (10  $\mu g$  Gallium/mL), AL-2<sub>Ga</sub> (1  $\mu g$  Gallium/mL) und AL-3<sub>Ga</sub> (0,1  $\mu g$  Gallium/mL), durch Verdünnen von  $SL_{KP46}$  und  $SL_{Ga}$  mit 1 %iger  $HNO_3$  hergestellt. Die Herstellung ist in Tab. 3.6 zusammengefasst.

Tab. 3.6 Herstellung von Arbeitslösungen (Volumenteile)

		<b><math>HNO_3</math>, 1 % (V/V)</b>	<b>Konzentration [<math>\mu g</math> Ga/mL]</b>	<b>VF</b>
AL-1 <sub>KP46</sub>	10 Teile $SL_{KP46}$	990 Teile	10	100
AL-2 <sub>KP46</sub>	100 Teile AL-1 <sub>KP46</sub>	900 Teile	1	10
AL-3 <sub>KP46</sub>	100 Teile AL-2 <sub>KP46</sub>	900 Teile	0,1	10
AL-1 <sub>Ga</sub>	10 Teile $SL_{Ga}$	990 Teile	10	100
AL-2 <sub>Ga</sub>	100 Teile AL-1 <sub>Ga</sub>	900 Teile	1	10
AL-3 <sub>Ga</sub>	100 Teile AL-2 <sub>Ga</sub>	900 Teile	0,1	10

VF Verdünnungsfaktor

### 3.4.6 Herstellung der Kalibratorlösungen

Für die matrixadaptierte Kalibrierung der Methoden zur Bestimmung von Gallium in Plasma und Urin wurden sämtliche Kalibratoren durch Aufstocken

von galliumfreier Matrix mit AL<sub>Ga</sub> hergestellt. Für die Bestimmung von Gallium in Vollblut wurde nur der höchsten Kalibrator durch Aufstocken von galliumfreier Matrix mit AL-1<sub>Ga</sub> hergestellt. Die Konzentrationen der einzelnen Kalibratoren sind in Tab. 3.7 zusammengefasst.

Tab. 3.7 Konzentrationen der Kalibratoren zur Bestimmung von Gallium in Vollblut, Plasma und Urin

	Konzentrationsbereich [ $\mu\text{g/L}$ ]			Konzentrationen der Kalibratoren [ $\mu\text{g/L}$ ]						
				1	2	3	4	5	6	7
<b>Plasma</b>	5	–	100	5	10	20	40	60	80	100
	10	–	200	10	20	40	80	120	160	200
<b>Urin</b>	1	–	20	1	2	4	8	12	16	20
	5	–	100	5	10	20	40	60	80	100
	50	–	1000	50	100	200	400	600	800	1000
<b>Vollblut</b>	10	–	100	10	20	40	60	80	100	-
	100	–	1000	100	200	400	600	800	1000	-

Die Aufarbeitung der galliumfreien Matrices Plasma, Urin und Vollblut, die von gesunden Probanden gewonnen wurden, entsprach der in Tab. 3.5 beschriebenen Probenaufarbeitung. Somit wurde gewährleistet, dass die Zusammensetzung der Kalibratoren hinsichtlich des Verhältnisses von Gallium zu den Begleitstoffen einer Probe bestmöglich übereinstimmte. Das Injektionsvolumen des Autosamplers für die Kalibratoren betrug 20  $\mu\text{L}$ .

Die automatische Kalibratoren generierung der Autosamplers kann aus technischen Gründen nur dann genutzt werden, wenn bei einem Injektionsvolumen von 20  $\mu\text{L}$  der Kalibrierbereich Konzentrationen einschließen, die sich maximal um den Faktor 10 unterscheiden. Hierfür wurden zunächst, manuell durch Mischen von Matrix und Arbeitslösungen und anschließendem Aufarbeiten, die Kalibratoren mit den höchsten Konzentrationen von 100 bzw. 1000  $\mu\text{g/L}$  hergestellt. Die übrigen fünf Kalibratoren wurden aus aufgearbeiteter Matrix und dem höchsten

Kalibrator durch den Autosampler nach dem in Tab. 3.8 gezeigten Schema hergestellt.

Tab. 3.8 Herstellung der Kalibratoren für die Bestimmung von Gallium im Vollblut durch den Autosampler des AAS-Systems

Standard	Galliumkonzentration [ $\mu\text{g/L}$ ]		Volumen Standard* [ $\mu\text{L}$ ]	Volumen Matrix# [ $\mu\text{L}$ ]
	10 – 100	100 – 1000		
1	10	100	2	18
2	20	200	4	16
3	40	400	8	12
4	60	600	12	8
5	80	800	16	4
6	100	1000	20	0

\* Standard mit der höchsten Konzentration (100 bzw. 1000  $\mu\text{g/L}$ )

# aufgearbeitete galliumfreie Matrix

### 3.4.7 Konzentrationsberechnung

Sämtliche Kalibratoren, QC-Proben und Patientenproben wurden, wie in Kap. 3.2.7 beschrieben, mindestens zweimal injiziert. Die so erhaltenen Signale wurden über die Peakhöhe ausgewertet. Das Signal der galliumfreien Matrix stellt den Nullwert dar und wurde von den Messsignalen subtrahiert. Aus den Mittelwerten der Absorptionen der Kalibratoren wurde eine Kalibriergerade mittels linearer Regression ermittelt. Anhand dieser Kalibriergeraden konnte die Galliumkonzentration der Patientenproben ermittelt werden.

### 3.4.8 Qualitätssicherung während der Messung

Die Qualitätssicherung während der Messung wurde durch die in Kap. 3.2.7 beschriebenen Maßnahmen gewährleistet.

Die verwendeten Qualitätskontrollen wurden durch Aufstocken von Vollblut,

Plasma oder Urin mit KP46-Arbeitslösung (AL-1<sub>KP46</sub> oder AL-2<sub>KP46</sub>) frisch vor jeder Messung hergestellt. Anschließend wurden sie analog zu den Patientenproben aufgearbeitet. Tab. 3.9 fasst die Konzentrationen der einzelnen Qualitätskontrollen pro Matrix zusammen:

Tab. 3.9 Konzentrationen der Qualitätskontrollproben für die Bestimmung von Gallium in Vollblut, Plasma und Urin

	Konzentrationsbereich [ $\mu\text{g/L}$ ]	Konzentrationen der QC-Proben [ $\mu\text{g/L}$ ]		
Plasma	5 – 100	15	50	80
	10 – 200	30	100	160
Urin	1 – 20	3	10	16
	5 – 100	15	50	80
	50 – 1000	150	500	800
Vollblut	10 – 100	30	50	90
	100 – 1000	300	500	900

In jeder Messreihe waren 10%, aber mindestens sechs, der vermessenen Proben Qualitätskontrollproben. Eine Messung wurde akzeptiert, wenn mindestens zwei Drittel aller QC-Proben den in Kap. 3.2.7 beschriebenen Kriterien hinsichtlich Richtigkeit und Präzision entsprachen.

### 3.5 Projekt II: Methoden zur Bestimmung von Ruthenium in Plasma und Urin

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Methoden zur Bestimmung von Ruthenium im Plasma und Urin entwickelt und gemäß den Anforderungen der FDA validiert<sup>165</sup>. Die Konzentrationsangaben in diesem Kapitel beziehen sich stets auf Ruthenium.

### 3.5.1 Geräteeinstellungen und Temperaturprogramm

Alle Untersuchungen wurden mit einem Varian GF-AAS System mit Zeeman-Untergrundkorrektur durchgeführt. Das GF-AAS System war ausgestattet mit:

- SpectrAA® Zeeman 220
- Graphite tube atomizer GTA 100
- Autosampler PSD 100
- Ruthenium-Hohlkathoden-Lampe

Die Proben wurden in pyrolytisch beschichteten Graphitröhrchen (Partition Tubes) vermessen. Es wurden folgende weitere Geräteeinstellungen gewählt:

- Wellenlänge: 349.9 nm
- Lampenstrom: 10 mA
- Monochromator: 0.5 nm Spaltweite mit reduzierter Spalthöhe
- Messmodus: PROMT-Height

Abhängig von der Probenmatrix wurden Temperaturprogramme verwendet, die sich in der Veraschungstemperatur und -dauer unterschieden (s. Tab. 3.10 und Tab. 3.11). Das Temperaturprogramm durchlief fünf Phasen. Unter „Dauer“ wird die Zeitspanne angegeben, nach deren Ablauf die zugehörige Temperatur erreicht war. Wiederholungen einer Temperaturstufe bedeuten, dass die Temperatur über die angegebene Zeitspanne konstant gehalten wurde.

Tab. 3.10 Temperaturprogramm zur Bestimmung von Ruthenium im Plasma

Schritt	Phase	Temperatur [°C]	Dauer [s]	Argonzufuhr [L/min]	Signal-Aufnahme
1	Trocknung	95	5,0	3,0	Nein
2		110	60,0	3,0	Nein
3		120	10,0	3,0	Nein
4	Vorveraschung	650	15,0	3,0	Nein
5		650	20,0	3,0	Nein
6	Veraschung	1500	10,0	3,0	Nein
7		1500	20,0	3,0	Nein
8		1500	2,0	0	Nein
9	Atomisierung	2700	0,7	0	Ja
10		2700	2,0	0	Ja
11	Reinigung	2700	2,0	3,0	Nein

Tab. 3.11 Temperaturprogramm zur Bestimmung von Ruthenium im Urin

Schritt	Phase	Temperatur [°C]	Dauer [s]	Argonzufuhr [L/min]	Signal-Aufnahme
1	Trocknung	95	5,0	3,0	Nein
2		110	60,0	3,0	Nein
3		120	10,0	3,0	Nein
4	Vorveraschung	650	15,0	3,0	Nein
5		650	20,0	3,0	Nein
6	Veraschung	1600	10,0	3,0	Nein
7		1600	20,0	3,0	Nein
8		1600	2,0	0	Nein
9	Atomisierung	2700	0,7	0	Ja
10		2700	2,0	0	Ja
11	Reinigung	2700	2,0	3,0	Nein

### 3.5.2 Probenaufarbeitung

Die Aufarbeitung der Plasma- und Urinproben stellt ein- bzw. zweistufiges Verdünnungsverfahren dar. Die Plasmaproben wurden gemischt und anschließend mit dem entsprechenden Volumen 1 %iger Triton-X Lösung in den Kalibrierbereich verdünnt.

Die Urinproben wurden ebenfalls gemischt, das entsprechende aufzuarbeitende Volumen wurde jedoch zunächst für 4 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Der so entstandene Überstand wurde mit 6,5 %iger HNO<sub>3</sub> (V/V) entsprechend dem in Tab. 3.12 aufgeführten Schema in den Kalibrierbereich verdünnt.

Tab. 3.12 Probenaufarbeitung für die Bestimmung von Ruthenium in Plasma und Urin

	Konzentrationsbereich [µg/L]	Probenvolumen [µL]	HNO <sub>3</sub> 6,5 % [µL]	Triton-X-Lsg. 1 % [µL]	VF
<b>Plasma</b>	30 – 300	100	n.b.	n.b.	1
	300 – 3000	100	n.b.	900	10
	3000 – 60000	10 100	n.b.	990 900	1000
<b>Urin</b>	3 – 60	25	n.b.	n.b.	1
	60 – 1200	50	950	n.b.	20
	1200 – 24000	50 50	950 950	n.b. n.b.	400

n.b. nicht benötigt

VF Verdünnungsfaktor

### 3.5.3 Kalibrierung

Die Kalibrierung für die Bestimmung der Rutheniumkonzentrationen in Plasma- und Urinproben erfolgte matrixbasiert. Vor jeder Messung wurde eine Kalibrierkurve erzeugt.

### 3.5.4 Herstellung von Stamm- und Arbeitslösungen

Es wurden zwei verschiedene Stammlösungen verwendet. Die kommerziell erhältliche Ruthenium-Standardlösung (Ruthenium AAS-Standard 1000 mg/L, wässrige Lösung, „RuCl<sub>3</sub>“ Specpure®), im Folgenden als SL<sub>Ru</sub> bezeichnet, wurde zur Herstellung der Kalibratoren verwendet. SL<sub>Ru</sub> wurde bei 4°C gelagert. Zur Herstellung der KP1019-Stammlösung SL<sub>KP1019</sub> wurden 47,00 mg KP1019 auf der Analysenwaage eingewogen und in 9,46 mL Methanol 50 % (V/V) gelöst. Die Konzentration der Stammlösung SL<sub>KP1019</sub> beträgt 1,0 mg Ruthenium/mL. Die Lösung wurde aliquotiert und bei -80°C gelagert. Durch Verdünnen wurden aus der SL<sub>KP1019</sub> vier Arbeitslösungen (AL-0<sub>KP1019</sub> 100 mg/L, AL-1<sub>KP1019</sub> 10 mg/L, AL-2<sub>KP1019</sub> 1 mg/L und AL-3<sub>KP1019</sub> 0,1 mg/L) und aus SL<sub>Ru</sub> drei Arbeitslösungen (AL-1<sub>Ru</sub> 10 mg/L, AL-2<sub>Ru</sub> 1 mg/L und AL-3<sub>Ru</sub> 0,1 mg/L) hergestellt (s. Tab. 3.13).

Tab. 3.13 Herstellung von Arbeitslösungen

		Methanol 50 % (V/V)	Konzentration [µg Ru/mL]	VF
<b>AL-1<sub>KP1019</sub></b>	10 Teile SL <sub>KP1019</sub>	990 Teile	10	100
<b>AL-2<sub>KP1019</sub></b>	100 Teile AL-1 <sub>KP1019</sub>	900 Teile	1	10
<b>AL-3<sub>KP1019</sub></b>	100 Teile AL-2 <sub>KP1019</sub>	900 Teile	0,1	10
<b>AL-1<sub>Ru</sub></b>	10 Teile SL <sub>Ru</sub>	990 Teile	10	100
<b>AL-2<sub>Ru</sub></b>	100 Teile AL-1 <sub>Ru</sub>	900 Teile	1	10
<b>AL-3<sub>Ru</sub></b>	100 Teile AL-2 <sub>Ru</sub>	900 Teile	0,1	10

VF Verdünnungsfaktor

### 3.5.5 Herstellung der Kalibratorlösungen

Für die matrixadaptierte Kalibrierung der Methoden zur Bestimmung von Ruthenium in Plasma und Urin wurden die Kalibratoren durch Aufstocken von rutheniumfreier Matrix mit AL<sub>Ru</sub> hergestellt (s. Tab. 3.14).

Tab. 3.14 Konzentrationen der Kalibratoren für die Bestimmung von Ruthenium in Plasma und Urin

	Konzentrationsbereich [µg/L]	Konzentrationen der Kalibratoren							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Plasma	30 – 300	30	60	120	180	240	300	-	-
	300 – 3000	300	600	1200	1800	2400	3000	n.b.	n.b.
	3* – 60*	3*	6*	12*	18*	24*	36*	48*	60*
Urin	3 – 60	3	6	12	24	36	48	60	-
	60 – 1200	60	120	240	480	360	600	1200	-
	1,2* – 24*	1,2*	2,4*	4,8*	9,6*	14,4*	19,2*	24,0*	-

\* Einheit mg/L

Um die Kalibratoren hinsichtlich ihrer Zusammensetzung den Patientenproben anzugleichen, wurden sie aus rutheniumfreien Plasma bzw. Urin hergestellt. Diese Matrizes wurden von gesunden Probanden gewonnen. Das Injektionsvolumen des Autosamplers für die Kalibratoren betrug 20 µL.

### 3.5.6 Konzentrationsberechnung

Alle Kalibratoren, QC-Proben und Patientenproben wurden, wie in Kap 3.2.7 beschrieben, mindestens zweimal injiziert. Die so erhaltenen Signale wurden über die Peakhöhe ausgewertet. Das Signal der rutheniumfreien Matrix stellt den Nullwert dar und wurde von den Messsignalen subtrahiert.

Aus den Mittelwerten der Absorptionen der Kalibratoren wurde eine Kalibriergerade mittels linearer Regression ermittelt. Der Einfluss verschiedener Wichtungsfaktoren auf die Güte der Beschreibung des Zusammenhangs der nominalen Konzentrationen und den dazugehörigen Absorptionen wurde mit Hilfe der Residuen überprüft. Anhand dieser Kalibriergeraden konnte die Konzentration der Patientenproben ermittelt werden.

### 3.5.7 Qualitätssicherung während der Messung

Die Qualitätssicherung während der Messung wurde durch die in Kap. 3.2.7 beschriebenen Maßnahmen gewährleistet.

Für jede Matrix und jeden Konzentrationsbereich wurden QC-Proben mindestens drei unterschiedlicher Konzentrationen, die den gesamten Kalibrierbereich abdeckten, hergestellt. Rutheniumfreie Leermatrix wurde mit dem entsprechenden Volumen an  $SL_{KP1019}$  oder der adäquaten Arbeitslösung so aufgestockt, dass der Anteil an Fremdmatrix 10 % nicht überstieg. Aufgrund der geringen Löslichkeit von KP1019 und um ein Ausfallen der Substanz in der Probe zu vermeiden, wurden die QC-Proben für den Kalibrierbereich 1200 – 24000  $\mu\text{g/L}$  durch Aufstocken von Urin mit  $SL_{Ru}$  erhalten. Die QC-Proben wurden direkt aliquotiert und bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

Tab. 3.15 Konzentrationen der Qualitätskontrollproben für die Bestimmung von Ruthenium in Plasma und Urin

	Konzentrationsbereich [ $\mu\text{g/L}$ ]	Konzentrationen der Qualitätskontrollen [ $\mu\text{g/L}$ ]				
<b>Plasma</b>	30 – 300	60	150	270	100	250
	300 – 3000	600	1500	2700	1000	2500
	3000 – 60000	8000	30000	54000	100000 <sup>1</sup>	-
<b>Urin</b>	3 – 60	9	30	50	-	-
	60 – 1200	180	600	1000	-	-
	1200 <sup>2</sup> – 24000 <sup>2</sup>	3600 <sup>2</sup>	12000 <sup>2</sup>	20000 <sup>2</sup>	-	-

1 wurde durch den Autosampler verdünnt, um eine Konzentration innerhalb des Kalibrierbereichs zu erhalten

2 Herstellung aus  $SL_{Ru}$

### 3.6 Projekt III: Pharmakokinetik von KP46

#### 3.6.1 Klinische Studie

In Zusammenarbeit mit der 3. Medizinischen Abteilung für Onkologie und dem Ludwig-Boltzmann-Institut für Angewandte Krebsforschung des Kaiser Franz-Josef-Spitals in Wien, Österreich (Leitung: Prof. Dr. C. Dittrich) und dem Onkologischen Zentrum der 3. Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Mannheims (Leitung: Prof. Dr. A. Hochhaus) wurde die Studie mit der Bezeichnung „*A Phase I Dose-escalation trial with oral Gallium(III) Complex FFC11 Tris (8-Quinolinolato) Gallium(III) – (Accelerated titration design)*“ durchgeführt<sup>177</sup>. Für diese Studie lagen ein positives Ethikvotum der zuständigen Ethikkommission sowie Einwilligungserklärungen der Patienten vor. Ziel war es, die maximal tolerierbare Dosis (MTD) zu ermitteln und eine optimale Dosis für eine weiterführende Phase-II-Studie festzulegen. Darüber hinaus sollten toxische Effekte von KP46 sowie deren Dauer, Schweregrad, Zeitpunkt des Auftretens, Reversibilität und Dosisabhängigkeit ermittelt werden. Die Bestimmung pharmakokinetischer Parameter bei verschiedenen Dosierungen stellte einen weiteren Schwerpunkt dar.

#### *Therapieplan und Studiendesign*

Es handelte sich um eine offene, multizentrische Studie mit Dosisescalation im akzelerierten Titrationsdesign. Der Therapieplan umfasste eine 14-tägige Behandlung mit KP46. Dieses wurde täglich peroral, in Form von überzogenen Tabletten, verabreicht. Es standen Tabletten in Dosierungen von 10, 20 und 30 mg zur Verfügung. Die Patienten sollten mindestens für die Dauer der Medikation und den ersten Tag der Nachbeobachtung (Tag 1 bis 15) stationär aufgenommen werden. Insgesamt wurden die Patienten 14 Tage nachbeobachtet.

### *Dosiseskalation*

Die Dosiseskalation erfolgte im akzelerierten Titrationsdesign. Es handelt sich hierbei um eine klassische Titrationsstudie. Es wurde zunächst nur ein Patient je Dosisstufe eingeschlossen. Beobachtete man keine Toxizität oder  $\geq$  Grad 2 NCI-CTC, so erfolgte eine Dosissteigerung um 100 %. Moderate Toxizität, d.h. Grad 2 und höher, ausgenommen Alopezie, machte dagegen eine Rekrutierung von bis zu zwei weiteren Patienten auf dem betreffenden Dosisniveau erforderlich. Blieb bei den neu eingeschlossenen Patienten Toxizität aus bzw. wurde maximal Toxizitätsgrad 1 beobachtet, wurde die Dosis wie zuvor um 100 % erhöht. Abb. 3.4 stellt das Vorgehen als Flussdiagramm dar.

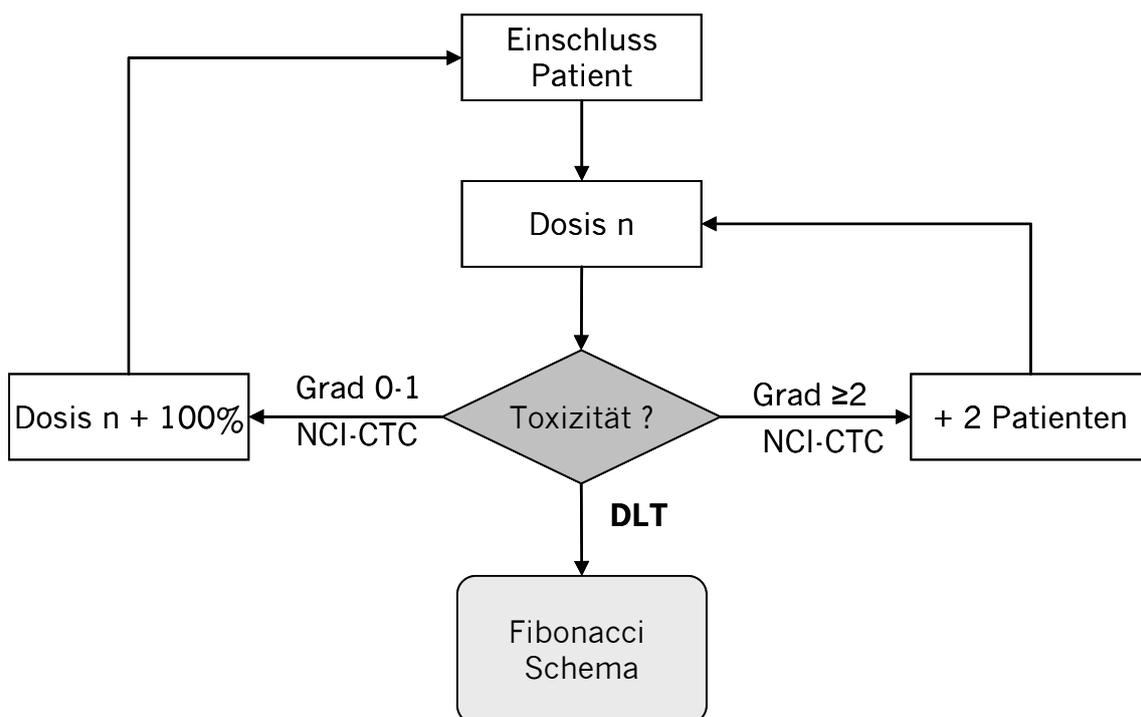


Abb. 3.4 Flussdiagramm – Dosiseskalation (*accelerated titration design*)

Wie aus dem Flussdiagramm hervorgeht, wurde beim Auftreten dosislimitierender Toxizität – die Kriterien für eine DLT sind im Studienprotokoll beschrieben – weiter nach dem modifizierten Fibonacci-Schema vorgegangen<sup>177</sup>. Das heißt, dass pro Dosisstufe nun mindestens drei Patienten behandelt wurden. Trat bei keinem der drei Patienten eine DLT

auf, wurde eine neue Kohorte von drei Patienten mit der in 50 bis 20 %-Schritten erhöhten Dosis behandelt. Wurde dagegen eine DLT bei einem der Patienten beobachtet, wurden drei weitere Patienten auf der betreffenden Dosisstufe behandelt. Erfuhren dagegen zwei und mehr der eingeschlossenen Patienten eine DLT, so ergab die entsprechende Dosis die maximal tolerierbare Dosis. Im Rahmen dieser Studie wurde die Dosis in einem Bereich von 30 – 480 mg KP46 eskaliert.

### *Patientenkollektiv*

Sämtliche Patienten, die im Rahmen dieser Studie behandelt wurden, litten an soliden Tumorentitäten, für welche entweder keine Standardtherapie vorhanden war oder diese ausgeschöpft war. Es wurden sowohl Männer als auch Frauen mit einem Mindestalter von 18 Jahren rekrutiert. Als Einschlusskriterium galt unter anderem, dass eine vorhergehende Chemotherapie mindestens vier Wochen zurückliegen musste und die Lebenserwartung noch mindestens drei Monate betrug. Eine ausreichende Nieren-, Leber- und Knochenmarksfunktion musste durch die entsprechenden Blutuntersuchungen nachgewiesen sein<sup>177</sup>. Eine detaillierte Aufstellung der Ein- und Ausschlusskriterien befindet sich in Anhang A. Die Charakteristika der einzelnen Patienten sind in Tab. 3.16 aufgeführt.

Tab. 3.16 Patientencharakteristika

<b>Patient</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Alter [Jahre]</b>	<b>Gewicht [kg]</b>	<b>Größe [cm]</b>	<b>D<sub>KP46</sub><sup>*</sup> [mg]</b>	<b>BSA<sup>#</sup> [m<sup>2</sup>]</b>	<b>Tumorentität</b>
1	m	45	90	190	30	2,20	Plattenepithelkarzinom
2	w	54	77,5	164	30	1,80	Adenokarzinom
3	w	65	55	159	30	1,55	Nephrom
4	w	62	56	158	60	1,56	Nephrom
5	m	46	72	173	120	1,84	Nierenzellkarzinom
6	w	67	73	170	240	1,80	Nephrom
7	w	57	80	165	480	1,87	Ovarialkarzinom

\* Dosis<sub>KP46</sub>

# Körperoberfläche, *body surface area*

### 3.6.2 Probenentnahmen

Den Patienten wurden während des ersten Behandlungszyklus Blutproben von je 8,0 mL entnommen. Dabei wurden jeweils nach der 1. und der 14. KP46-Gabe gemäß Studienprotokoll an folgenden Zeitpunkten Proben über 24 h genommen:

- unmittelbar vor der KP46-Gabe
- 20 und 40 min, 1, 1,5, 2, 4, 8, 16, 20 und 24 h nach Arzneistoffgabe

Zusätzlich wurden an folgenden Tagen Blutproben direkt vor der nächsten Arzneimittelgabe entnommen:

- 3, 5, 7, 9, 11 Tage nach Beginn der Therapie

In der Nachbeobachtungsphase wurden an Tag 18 und 28 je eine weitere Probe gesammelt. Die Gabe der Studienmedikation und die Blutentnahmen sind in Abb. 3.5 veranschaulicht.

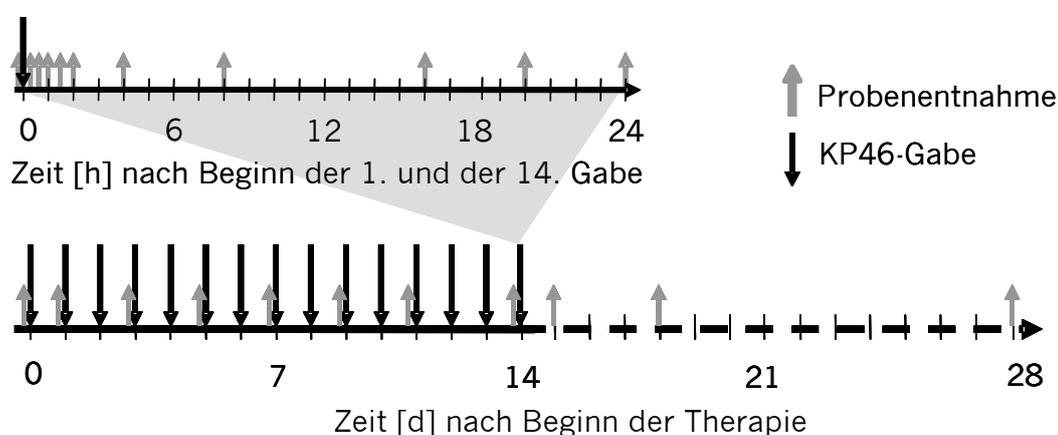


Abb. 3.5 Probenentnahmeschema nach KP46-Gabe

Die Blutproben wurden in heparinisierten Röhrchen gesammelt und sofort für 10 min bei 2000 g und 4°C zentrifugiert. Das so gewonnene Plasma wurde direkt eingefroren und bei mindestens –20°C gelagert. Der Transport erfolgte auf Trockeneis.

Um eine mögliche renale Ausscheidung charakterisieren zu können, wurde Urin wie folgt gesammelt:

- 24h-Sammelurin in 8h-Intervallen am ersten und letzten Tag der KP46-Gabe
- 2h-Nüchternurin direkt vor der KP46-Gabe an Tag 3, 5, 7, 9 und 11 der Therapie

Jeweils 15 mL der Urinproben wurden bei mindestens  $-20^{\circ}\text{C}$  bis zu ihrer Vermessung gelagert.

### 3.6.3 Pharmakokinetische Datenanalyse

Für die Berechnung der pharmakokinetischen Parameter wurde der nicht-kompartimentelle Ansatz (s. Kap. 3.3.1) gewählt. Es wurde dafür das Softwarepaket WinNonlin<sup>®</sup> herangezogen. Da sich die pharmakokinetischen Parameter auf Gallium beziehen, wurde im ersten Schritt die verabreichte Galliumdosis nach Gl. 3.21 berechnet.

$$D_{\text{Gallium}} \text{ [mg]} = \frac{D_{\text{KP46}} \text{ [mg]}}{M_r(\text{KP46})} \cdot A_r(\text{Gallium}) \quad \text{Gl. 3.21}$$

$$\begin{aligned} M_r(\text{KP46}) &= 501,99 \text{ [g/mol]} \\ A_r(\text{Gallium}) &= 69,72 \text{ [g/mol]} \end{aligned}$$

Für Plasma und Vollblut wurden die Parameter  $t_{\text{max}}$ ,  $C_{\text{max}}$ , AUC,  $V_z/F$ ,  $CL/F$ ,  $t_{1/2z}$  berechnet. Aus den im Urin bestimmten Galliumkonzentrationen wurde die kumulativ im Urin ausgeschiedene Menge absolut ( $U_{\text{cum}}$ ) und relativ (rel.  $U_{\text{cum}}$ ), bezogen auf die jeweilige Dosis, abgeschätzt. Außerdem wurden die nach Unendlich extrapolierte im Urin ausgeschiedene Menge absolut ( $U_{\infty}$ ) und in Relation zur ersten Dosis (rel.  $U_{\infty}$ ) sowie die renale Clearance ( $CL_R$ ) abgeschätzt. Die Formeln zur Berechnung der genannten Parameter werden in Kap. 3.3.1 beschrieben.

### 3.7 Projekt IV: Pharmakokinetik von KP1019

#### 3.7.1 Klinische Studie

Gemeinsam mit dem Kaiser-Franz-Josef-Spital in Wien, Österreich, und dem Westdeutschen Tumorzentrum in Essen wurde die Studie „*A Phase I dose-escalation trial with Sodium trans-[tetrachlorobis(1H-indazole)ruthenate(III)]/Indazol-hydrochloride (1:1.1) or KP1019/ Ind HCl (1:1.1) (accelerated titration design) in patients with solid tumors*“ durchgeführt<sup>178</sup>. Für diese Studie lagen ein positives Ethikvotum von der zuständigen Ethikkommission und Einwilligungserklärungen der Patienten vor. Da es sich hierbei um eine Phase-I-Studie handelte, war es auch hier das Ziel, die maximal tolerierbare Dosis (MTD) zu ermitteln. Darüber hinaus sollte die Pharmakokinetik von KP1019 A erstmalig beim Menschen charakterisiert und ein pharmakokinetisches Modell entwickelt werden, welches zur rationalen Dosisfindung für eine mögliche Phase-II-Studie herangezogen werden kann.

#### *Therapieplan und Studiendesign*

Die Studie war als offene, multizentrische Dosisescalationsstudie im akzelerierten Design konzipiert. Das Eskalationsschema entsprach dem in Kap. 3.6.1 beschriebenen. Der Therapieplan umfasste eine dreiwöchige Behandlung mit KP1019. Dabei wurde die Substanz zweimal wöchentlich (alle drei oder vier Tage) als Infusion appliziert. Aufgrund seiner geringen Wasserlöslichkeit musste KP1019 jeweils unmittelbar vor der intravenösen Applikation frisch hergestellt werden. Hierfür wurden 50 mg (Inhalt eines Vials) des Natriumsalzes von KP1019 in 13,33 mL isotonischer Kochsalzlösung gelöst und in einen sterilen Infusionsbeutel überführt. Anschließend wurde Indazolhydrochlorid in entsprechender Konzentration zugesetzt.

Die ablaufende Reaktion ist in Gl. 3.22 dargestellt:



Gl. 3.22

Dabei sollten beide Lösungen Raumtemperatur haben. Die klare Lösung mit KP1019 wurde sofort infundiert.

#### *Dosiseskalation*

Die Dosiseskalation wurde analog der Studie mit KP46 im akzelerierten Titrationsdesign bis zum Auftreten dosislimitierender Toxizität durchgeführt (Kriterien s. Studienprotokoll). Die Dosis wurde in einem Bereich von 25 bis 600 mg eskaliert.

#### *Patientenkollektiv*

Sämtliche in dieser Studie behandelten Patienten wiesen histologisch und zytologisch gesicherte, fortgeschrittene solide Tumoren unterschiedlicher Entität auf. Eine Standardtherapie war entweder nicht vorhanden oder die Therapiemöglichkeiten für diese Erkrankung ausgeschöpft. Weitere Einschlusskriterien bildeten ein Mindestalter von 18 Jahren und eine Lebenserwartung von mindestens drei Monaten. Die letzte Chemotherapie sollte mindestens vier Wochen zurückliegen und eine ausreichende Nieren-, Leber- und Knochenmarksfunktion anhand von Laborparametern belegt sein<sup>178</sup>. Die Ein- und Ausschlusskriterien sind im Anhang B aufgeführt. Insgesamt wurden sieben Patienten, deren demographische Daten in Tab. 3.17 dargestellt sind, im Rahmen dieser Studie behandelt.

Tab. 3.17 Patientencharakteristika

Patient	Geschlecht	Alter [Jahre]	Gewicht [kg]	Größe [cm]	$D_{KP1019}^*$ [mg]	$BSA^{\#}$ [m <sup>2</sup> ]	Tumorentität
1	w	57	82	164	25	1,89	Kolorektales Karzinom
2	m	38	80	178	50	1,98	Kolorektales Karzinom
3	m	62	93	164	100	1,99	Blasenkarzinom
4	w	76	62	166	200	1,69	Leberkarzinom
5	w	65	52	168	400	1,58	Endometriumkarzinom
6	m	57	70	167	600	1,79	Melanom (Auge)
7	m	58	62	178	600	1,77	Zungenkarzinom

\*  $D_{KP1019}$ # Körperoberfläche, *body surface area*

### 3.7.2 Probenentnahmen

Häufige Blutentnahmen wurden nach der ersten und fünften Infusion durchgeführt. Dabei wurden Blutproben zu folgenden Zeitpunkten gewonnen:

- direkt vor der Infusion
- 0,3; 0,7; 1; 2; 4; 8; 24; 32; 48; 56 h nach Ende der Infusion

Zudem wurden an Tag 4 und 18 der Therapie Proben zu folgenden Zeitpunkten entnommen:

- direkt vor der Infusion
- 0,3; 0,7; 1 h nach Ende der Infusion

Darüber hinaus wurden an den Tagen 7 und 11 der Therapie direkt vor Beginn der Infusion Proben entnommen. Die Blutproben wurden in heparinisierten Röhrchen abgenommen und direkt bei 2000 g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Das so gewonnene Plasma wurde bei mindestens -20°C bis zur Analyse gelagert. Die geplanten Entnahmezeitpunkte der Blutproben

sowie die Zeitpunkte der Arzneistoffapplikation sind in der Abb. 3.6 veranschaulicht.

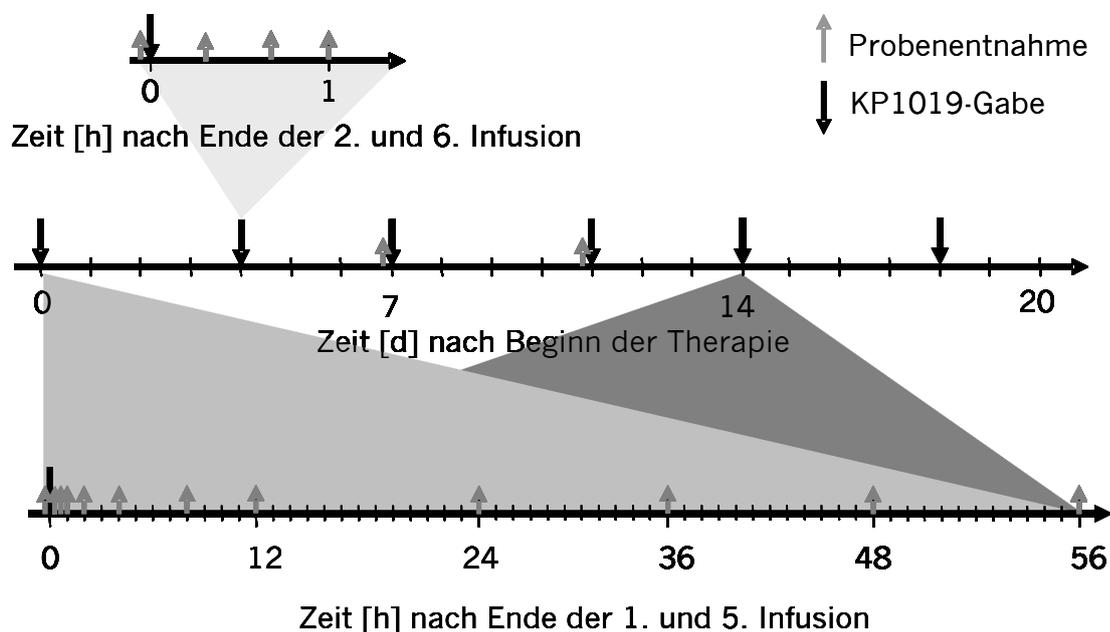


Abb. 3.6 Probenentnahmeschema nach KP1019-Gabe

An den Tagen 1, 4, 8, 11, 15 und 18 der Therapie wurde direkt vor jeder Infusion Urin gesammelt. Zusätzlich wurde am ersten und am fünften Tag der Therapie kontinuierlich Urin über 24 Stunden gesammelt. In der Nachbeobachtungsphase (8 – 10 Tage nach Ende der Therapie) wurden zusätzliche Proben gesammelt.

### 3.7.3 Pharmakokinetische Datenanalyse

Die Rutheniumkonzentrationen im Plasma wurden für eine kompartmentelle Datenanalyse mit Hilfe von WinNonlin® (Pharsight Corporation, Version 5.0.1) herangezogen. Es wurden dabei die in Kap 3.3.2 beschriebenen Modelle getestet. Die kompartmentelle Datenanalyse umfasste dabei folgende Schritte:

- Auswahl der adäquaten pharmakokinetischen Kompartiment-Modelle
- Abschätzung von Initialwerten
- Kurvenanpassung (*curve fitting*)

- Modellvergleich
- Berechnung der pharmakokinetischen Parameter

Da sich alle folgenden Parameter und Berechnungen auf Rutheniumkonzentrationen beziehen, wurde im ersten Schritt die Rutheniumdosis  $D_{Ru}$  errechnet.

$$D_{\text{Ruthenium}} [\text{mg}] = \frac{D_{\text{KP1019}} [\text{mg}]}{M_r(\text{KP1019})} \cdot A_r(\text{Ruthenium}) \quad \text{Gl. 3.23}$$

$$\begin{aligned} M_r(\text{KP1019}) &= 502,15 \text{ [g/mol]} \\ A_r(\text{Ruthenium}) &= 101,07 \text{ [g/mol]} \end{aligned}$$

#### *Auswahl des geeigneten pharmakokinetischen Kompartiment-Modells*

Zunächst wurden die Konzentrations-Zeit-Profile für Ruthenium im Plasma im halblogarithmischen Maßstab aufgetragen, um den Verlauf visuell zu beurteilen. Nach Auswahl eines Modells wurde eine Kurvenanpassung durchgeführt. Wenn mehrere Modelle in Frage kamen, wurde nach Berechnung der Modellparameter die Güte der Anpassung mit dem alternativen Modell verglichen und das am besten geeignete Modell für die weitere Auswertung verwendet.

#### *Abschätzung von Initialwerten und Kurvenanpassung (Curve Fitting)*

Bei der Kurvenanpassung (*curve fitting*) handelt es sich mathematisch um eine nichtlineare Regression. Dazu müssen zunächst Initialwerte für die Modellparameter ( $\theta$ ) abgeschätzt werden. Das Programm WinNonlin® bietet zwei Möglichkeiten zur Festlegung der Initialwerte. So können diese durch den Anwender vorgegeben oder durch das Programm mit Hilfe des Abschälverfahrens (*curve stripping*) berechnet werden. Für diese Untersuchung wurden die durch WinNonlin® berechneten Initialwerte eingesetzt und dann schrittweise optimiert. Hierbei wurde abhängig vom Minimierungsalgorithmus iterativ die Summe der Abweichungsquadrate (*least squares*, LS) minimiert. Die Summe der Abweichungsquadrate wurde

aus der Summe der quadrierten Differenzen zwischen gemessenen Konzentrationen ( $Y_i$ ) und den über die Modellgleichung  $f(\theta, x_i)$  berechneten Konzentrationen ermittelt:

$$LS = \sum_{i=1}^n (y_i - f(\theta, x_i)) \quad \text{Gl. 3.24}$$

Um die Abhängigkeit des absoluten analytischen Fehlers von der Konzentration zu berücksichtigen, wurde eine Wichtung vorgenommen. Es wurden die Wichtungsfaktoren  $W_i = 1/Y_i$  und  $W_i = 1/Y_i^2$  geprüft. Die Summe der gewichteten Abweichungsquadrate (*weighted least squares*, WLS) wurde wie folgt berechnet:

$$WLS = \sum_{i=1}^n W_i \cdot (y_i - f(\theta, x_i)) \quad \text{Gl. 3.25}$$

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Algorithmus nach *Gauss-Newton* (mod. nach *Levenberg* und *Hartley*) gewählt. Der Optimierungsprozess wurde so lange fortgesetzt, bis das Konvergenzkriterium (relative Veränderungen der WLS zwischen den einzelnen Iterationen  $< 0,01 \%$ ) erfüllt war<sup>179</sup>.

#### *Güte der Anpassung und Modellvergleich*

Die vorhandenen Datensätze wurden mit verschiedenen Modellen und Wichtungsfaktoren analysiert. Die Güte der Anpassung wurde anhand folgender Kriterien beurteilt:

- Visuelle Inspektion der *Godness-of-Fit-Plots* (s. Kap. 3.3)
- *Akaike-Informationskriterium* (AIC)<sup>180</sup> und *Schwarz-Kriterium* (SC)<sup>181</sup>
- Variationskoeffizienten der Parameterschätzung

Die Berechnung des Akaike-Informationskriteriums (AIC) erfolgte nach folgender Gleichung:

$$\text{AIC} = n \cdot \ln(\text{WLS}) + 2 \cdot k \quad \text{Gl. 3.26}$$

WLS	Summe der gewichteten Abweichungsquadrate
n	Anzahl der Messwerte
k	Anzahl der Modellparameter

Zur Berechnung des Schwarz-Kriteriums (SC) wurde folgende Gleichung herangezogen:

$$\text{SC} = n \cdot \ln(\text{WLS}) + \ln(n \cdot k) \quad \text{Gl. 3.27}$$

#### *Berechnung der pharmakokinetischen Parameter*

Im letzten Schritt wurden auf Basis der abgeschätzten Modellparameter und der verabreichten Rutheniumdosis (Gl. 3.23) die Sekundärparameter berechnet. Die Arzneistoffexposition wurde durch die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (*area under the curve*, AUC) charakterisiert. Als Maß für die Eliminationsleistung des Körpers wurde die *Gesamtkörperclearance* (CL) herangezogen. Sie beschreibt den Zusammenhang zwischen der Konzentration im Plasma und der Eliminationsgeschwindigkeit einer Substanz. Die Gesamtkörperclearance setzt sich additiv aus den Clearances der einzelnen Eliminationsorgane zusammen. Die Eliminationsgeschwindigkeit wurde durch die Bestimmung der Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ), der Zeitspanne, innerhalb der die Konzentration auf die Hälfte des Ausgangswerts abnimmt, charakterisiert.

Das Verteilungsvolumen (V) ist eine fiktive Größe, die in den seltensten Fällen mit dem tatsächlichen Volumen übereinstimmt. In dieser Arbeit wurde das Verteilungsvolumen im Steady-State ( $V_{ss}$ ) berechnet. Dieses beschreibt die Verteilung des Arzneistoffs, wenn sich die Konzentrationen zwischen den betrachteten Kompartimenten im Gleichgewichtszustand (*steady state*, ss) befinden. In die Berechnung des  $V_{ss}$  geht die mittlere

Verweildauer (*mean residence time*, MRT) eines intakten Arzneistoffmoleküls im Organismus ein. Die Gleichungen zur Berechnung der pharmakokinetischen Parameter sind in Tab. 3.18 zusammengefasst.

Tab. 3.18 Gleichungen zur Berechnung der pharmakokinetischen Parameter

Beschreibung	Abkürzung	Gleichung	
Fläche unter Kurve	AUC	$AUC_{\infty} = \sum_{i=1}^n \frac{C_i}{\lambda_i}$	Gl. 3.28
Clearance	CL	$CL = \frac{D}{AUC_{\infty}}$	Gl. 3.29
Mittlere Verweildauer	MRT	$MRT = \frac{\sum_{i=1}^n \frac{C_i}{\lambda_i^2}}{AUC_{\infty}}$	Gl. 3.30
Verteilungsvolumen im Steady State	$V_{ss}$	$V_{ss} = CL \cdot MRT$	Gl. 3.31
Terminale Halbwertszeit	$t_{1/2z}$	$t_{1/2z} = \frac{\ln 2}{\lambda_z}$	Gl. 3.32

Aus den im Urin bestimmten Rutheniumkonzentrationen wurde die kumulativ im Urin ausgeschiedene Menge absolut ( $U_{cum}$ ) und relativ (rel.  $U_{cum}$ ), bezogen auf die jeweilige Dosis, berechnet. Außerdem wurden die nach Unendlich extrapolierte, im Urin ausgeschiedene Menge absolut ( $U_{\infty}$ ) und in Relation zur ersten Dosis (rel.  $U_{\infty}$ ) sowie die renale Clearance ( $CL_R$ ) abgeschätzt. Die Gleichungen zur Berechnung der genannten Parameter sind in Kap. 3.3.1 beschrieben.

### 3.8 Projekt V: Population-PK/PD-Analyse von Oxaliplatin

Ziel dieses Projekts war es, ein Populationsmodell zu entwickeln mit welchem sowohl der zeitliche Verlauf der Platinkonzentration im Ultrafiltrat als auch die DNA-Addukt-Bildung in Leukozyten nach intravenöser Applikation von Oxaliplatin beschrieben werden kann.

#### 3.8.1 Klinische Studien

Für die Entwicklung des PK/PD-Modells wurden Daten von Patienten aus zwei Studien herangezogen. In beiden Studien wurden sowohl weibliche als auch männliche Patienten mit histologisch gesicherten, soliden Tumoren, die mit Oxaliplatin behandelt wurden, eingeschlossen. Die Studien wurden im *Westdeutschen Tumorzentrum des Universitätsklinikums Essens* (Studie 1) und im *Sana Klinikum Remscheid* (Studie 2) von 1999 bis 2003 durchgeführt. In Studie 1, einer Phase I-Studie, sollte das Sicherheitsprofil von Sorafenib untersucht werden<sup>182</sup>. In Studie 2 war das Ziel, pharmakokinetische Parameter und die Platin-DNA-Addukt-Bildung als pharmakodynamischen Parameter nach einer Behandlung mit Oxaliplatin in der Erst- und Zweitlinien-Therapie zu vergleichen<sup>183</sup>.

#### *Therapiepläne und Studiendesigns*

Beide Studien wurden im monozentrischen, offenen, nicht-kontrollierten und nicht-randomisierten Design durchgeführt. Für beide Studien lagen positive Voten der jeweiligen Ethikkommissionen, die Einwilligungsklärungen der Patienten sowie Patientenversicherungen vor. Insgesamt wurden 58 Patienten mit Oxaliplatin behandelt.

Der Therapieplan für Studie I sah eine Zyklusdauer von drei Wochen vor. Die Patienten erhielten zu Beginn jedes Zyklus 130 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin als zweistündige Infusion. Ab dem vierten Tag des ersten Zyklus erhielten die Patienten, die in Studie 1 behandelt wurden, zweimal täglich unterschiedliche Dosen Sorafenib.

Die Patienten der Studie II wurden mit einer Chemotherapie nach dem *Büchele-Schema* behandelt<sup>183</sup>. Sie erhielten eine Kombinationstherapie, bestehend aus 50 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin, 500 mg/m<sup>2</sup> Calciumfolinat und 500 mg/m<sup>2</sup> Fluorouracil, einmal wöchentlich über vier Wochen. Anschließend folgte ein zweiwöchiges therapiefreies Intervall. Die Untersuchungen wurden am ersten Tag im ersten und zweiten Zyklus durchgeführt. Zusätzlich erhielten die Patienten eine auf die jeweilige Therapie abgestimmte Supportivtherapie, z.B. intravenöse Hydratation und Nausea- und Emesis-Prophylaxe. Die verwendeten Therapieschemata in den beiden Zentren zeigten somit deutliche Unterschiede hinsichtlich Dosierung und Applikationsintervalle der verabreichten Substanzen und sind in Tab. 3.19 zusammengefasst.

Tab. 3.19 Übersicht Therapieplan und Dosierungsschema

		<b>Studie 1</b>	<b>Studie 2</b>
Dosis Oxaliplatin	[mg/m <sup>2</sup> ]	130	50
Dosierungsintervall	[Wochen]	3	1
Dauer eines Zyklus	[Wochen]	3	4
Oxaliplatin-Dosis/Zyklus	[mg/m <sup>2</sup> ]	130	200
Komedikation	Zyklus I	ab Tag 4 Sorafenib	5-FU, Ca-Folinat
	Zyklus II	Sorafenib	
Beobachtete Zyklen		2	2

*Patientenkollektiv*

Die Daten von insgesamt 58 Patienten wurden für die Entwicklung des Populationsmodells herangezogen. Das Mindestalter betrug 18 Jahre. Während alle Patienten in Studie 2 an metastasiertem kolorektalem Karzinom erkrankt waren, wurden in Studie 1 Patienten mit fortgeschrittenen, histologisch gesicherten, soliden Tumoren verschiedener Entitäten eingeschlossen. Die Lebenserwartung der Patienten sollte noch mindestens drei Monate betragen und die letzte Chemotherapie sollte mindestens vier Wochen zurückliegen, eine oxaliplatinhaltige Chemotherapie mindestens drei Monate. Eine ausreichende Nieren-, Leber- und Knochenmarksfunktion musste durch die entsprechenden Blutuntersuchungen belegt sein. Darüber hinaus war ein ECOG (*Eastern Cooperative Oncology Group*)-Performance-Status von 0, 1 und 2, in Studie 1, oder ein Karnofsky-Index von  $\geq 70\%$ , in Studie 2, erforderlich. In Tab. 3.20 sind die demographischen Charakteristika der Population zusammengefasst.

Tab. 3.20 Demographische Daten der Studienpopulation; (Median und Spannweite)

	<b>Studie I</b>	<b>Studie II</b>
Anzahl [w/m]	37 [26/11]	21 [14/7]
Alter [Jahre]	62,0 [32,0 – 80,0]	63,0 [45,0 – 82,0]
Gewicht [kg]	74,0 [55 – 106]	70,0 [48,6 – 134]
Größe [cm]	174 [159 – 190]	172 [158 – 185]
BSA [m <sup>2</sup> ]	1,8 [1,5 – 2,21]	1,8 [1,58 – 2,3]
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	24,9 [17,1 – 34,2]	23,0 [16,4 – 49,2]
CL <sub>CR</sub> [mL/min]	95,2 [59,6 – 186,5]	79,2 [48,4 – 103,6]

Die graphische Darstellung zur Verteilung der demographischen Daten findet sich im Anhang C.

### 3.8.2 Probenentnahmen

Innerhalb der ersten 48 h der beiden ersten Behandlungszyklen wurden bis zu 13 bzw. 6 Ultrafiltratproben generiert. Das Ultrafiltrat wurde dabei aus zuvor gewonnenen Plasmaproben durch Zentrifugation über 20 min bei 2000g und 4 °C in den Ultrazentrifugationssystemen Centirsart® (Cut-off 10.000) oder Centrifree® (Cut-off 30.000) gewonnen<sup>70,184</sup>. Darüber hinaus wurden zu den in Tab. 3.21 aufgeführten Zeitpunkten Leukozyten mittels Dichtegradientenzentrifugation mit Polymorphrep® aus Vollblut gewonnen<sup>70</sup>.

Tab. 3.21 Probenentnahmezeitpunkte

	Zeit [h] nach Beginn der Infusion	
	Plasma	Leukozyten
Studie 1	0; 1; 2; 2,25; 2,5; 2,75; 3; 4; 6; 8; 12; 24; 48	0; 4; 24; 48
Studie 2	0; 2; 2; 5; 3; 4; 24	0; 4; 24

### 3.8.3 Erstellung des NONMEM®-Datensatzes

Die Struktur des Datensatzes ist bei der Anwendung von NONMEM® vorgegeben<sup>175</sup>. Im Allgemeinen besteht er aus abhängigen Variablen (DV), z.B. gemessenen Konzentrationen und unabhängigen Variablen, wie Angaben zur Dosierung (Dosis, Infusionsgeschwindigkeit, etc.) und den Kovariaten, z.B. demographischen Daten, Laborparametern und/oder anderen individuellen Einflussfaktoren der Pharmakokinetik/-dynamik. Die Platinkonzentrationen im Ultrafiltrat wurden im Rahmen der Dissertation von *A. C. Pieck* mit validierten GF-AAS-Methoden erhoben<sup>70</sup>. Um die DNA-Platinierung in den Leukozyten quantifizieren zu können, wurde ein vierstufiges Verfahren modifiziert, nach *Kloft et al.*, bestehend aus Leukozytenisolation aus dem Vollblut mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation, Isolation der DNA aus den Leukozyten durch Festphasenextraktion, Quantifizierung der DNA und Quantifizierung des an die DNA gebundenen Platins, angewandt<sup>185</sup>. Die DNA-Quantifizierung erfolgte

mit Hilfe einer hinsichtlich Richtigkeit und Präzision validierten UV/VIS-Methode<sup>70</sup>. Das an die DNA gebundene Platin wurde mit einer validierten Methode der adsorptiven Voltammetrie quantitativ bestimmt<sup>70,186</sup>. Die Erstellung des NONMEM<sup>®</sup>-Datensatzes sowie die Berechnung einzelner Kovariaten erfolgte mit Excel<sup>®</sup>. Die im Datensatz beinhalteten Elemente sind in Anhang C zusammengefasst.

### *Berechnete Kovariaten*

Ein Teil der Kovariaten wurden mit Hilfe von Excel aus demographischen Daten oder Laborparametern anhand folgender Gleichungen berechnet:

- Body-Mass-Index (BMI)

$$\text{BMI} \left[ \text{kg}/\text{m}^2 \right] = \frac{\text{Körpergewicht}}{(\text{Größe})^2} \quad \text{Gl. 3.33}$$

- Kreatininclearance nach Cockcroft und Gault ( $\text{CL}_{\text{CR}}$ )<sup>187</sup>

$$\text{CL}_{\text{Cr,CG}} \left[ \text{mL}/\text{min} \right] = \begin{cases} \frac{(140 - \text{Alter}) \cdot \text{Körpergewicht}}{\text{Serumkreatininkonzentration} \cdot 72} & \text{für männliche Patienten} \\ \frac{(140 - \text{Alter}) \cdot \text{Körpergewicht}}{\text{Serumkreatininkonzentration} \cdot 72} \cdot 0,85 & \text{für weibliche Patienten} \end{cases}$$

Gl. 3.34

- Körperoberfläche (*body surface area*, BSA) nach *Du Bois* und *Du Bois*<sup>148</sup>:

$$\text{BSA} \left[ \text{m}^2 \right] = \text{Körpergewicht}^{0,425} \cdot \text{Körpergröße}^{0,725} \cdot 0,007148 \quad \text{Gl. 3.35}$$

- Fettfreie Masse (FFM) <sup>188</sup>

$$\text{FFM [kg]} = \begin{cases} \frac{30,93 \cdot \text{Körpergröße}^2 \cdot \text{Körpergewicht}}{\text{Körpergröße}^2 \cdot 42,92 + \text{Körpergewicht}} & \text{für männliche Patienten} \\ \frac{37,99 \cdot \text{Körpergröße}^2 \cdot \text{Körpergewicht}}{\text{Körpergröße}^2 \cdot (35,98 + \text{Körpergewicht})} & \text{für weibliche Patienten} \end{cases}$$

Gl. 3.36

### *Fehlende Messdaten*

Im Falle fehlender tatsächlicher Abnahmezeitpunkte wurde die theoretische bzw. laut Protokoll festgelegte Zeit für die entsprechenden Proben verwendet. Platinkonzentrationen unterhalb der Bestimmungsgrenze wurden *a priori* aus dem Datensatz entfernt.

### *Fehlende Kovariaten*

Waren Informationen zu den Kovariaten eines Individuums nicht vorhanden, so wurden diese durch den Populationsmedian (kontinuierliche Kovariaten) oder den Populationsmodus (kategoriale Kovariaten) ersetzt. Bei Fehlen einer Kovariaten innerhalb eines Individuums wurde das Ergebnis der letzten Messung bis zu einer neuen Messung verwendet. Der Einfluss der auf diese Weise ersetzen Kovariaten wurde eingehend untersucht.

### *Daten-Checkout*

Vor Beginn der Analyse wurde der Datensatz hinsichtlich Vollständigkeit, Richtigkeit und Plausibilität untersucht. Die erste Untersuchung erfolgte in Excel<sup>®</sup>. Hier wurden die einzelnen Spalten des Datensatzes hinsichtlich der Plausibilität der Minimal- und Maximalwerte geprüft. Darüber hinaus wurde kontrolliert, ob die Informationen innerhalb der einzelnen Spalten zueinander passten. Unterstützend wurden alle Daten in so genannten Index-

Abbildungen erstellt. Dabei wurde jedes Element des Datensatzes gegen die Bezeichnung des Individuums aufgetragen.

### 3.8.4 Modellierungsstrategien

Für die Entwicklung wurde ein dreistufiges Konzept gewählt. So wurde im ersten Schritt das Strukturmodell entwickelt. Anschließend erfolgte die Implementierung der IIV, IOV und Residualvariabilität. Nach diesen ersten beiden Schritten erhielt man das sogenannte Basismodell. Abschließend erfolgte die Identifizierung und Implementierung der Kovariaten und damit die Erstellung des finalen Modells.

Insgesamt wurde für die Entwicklung des PK/PD-Modells ein sequentielles Vorgehen gewählt. Die Modellierung bezog sich im ersten Schritt zunächst auf die Platinkonzentrationen im ultrafiltrierten Plasma. Basierend auf dem finalen PK-Modell wurden die abgeschätzten Parameter fixiert und die Adduktaten gemäß dem oben dargestellten Konzept sequentiell modelliert.

#### *Strukturmodell*

Für die Bildung des Strukturmodells zur Beschreibung des zeitlichen Verlaufs der Platinkonzentrationen wurde ein empirischer Ansatz gewählt. Das bedeutet, dass das zu entwickelnde Modell allein auf den ihm zugrunde liegenden Daten fußt. Kompartiment-Modelle sind empirische Modelle. Im Gegensatz zu physiologischen oder mechanistischen Modellen sind die Kompartimente und Prozesse nicht immer mit physiologischen Gegebenheiten zu erklären. In der Literatur wird die Pharmakokinetik von Platin nach der Applikation von Oxaliplatin anhand eines Zwei-Kompartiment-Modells beschrieben<sup>75,79,80</sup>. Auch die Arbeit von *Pieck et al.*, in welcher die enthaltene Studie 1 in einer *Standard-Two-Stage-Analyse* untersucht wurde, favorisiert das *Zwei-Kompartiment-Modell*<sup>71</sup>. Es finden sich jedoch auch Hinweise, dass ein *Drei-Kompartiment-Modell* zur Beschreibung der Platinkonzentrationen im Ultrafiltrat denkbar wäre<sup>69</sup>.

Ausgehend von dieser Modellvorauswahl und der visuellen Inspektion der

dezimalen und semilogarithmischen Darstellungen der Konzentrations-Zeit-Verläufe wurden *Zwei-* und *Drei-Kompartiment-Modelle* getestet. Die Parametrisierung der Modelle erfolgte in allen Fällen ausschließlich auf der Grundlage von Verteilungsvolumen und Elimination, also als Volumen und Clearance.

Die Platin-DNA-Addukt-Bildung in den Leukozyten wurde anhand verschiedener PD-Modelle untersucht. Neben den klassischen Modellen, wie dem  $E_{\max}$ Modell, wurde auch das *Target-Mediated-Drug-Disposition*-Modell, welches von *Mager et al.* zur Modellierung von Rezeptor-Bindungsprozessen entwickelt wurde, geprüft<sup>189</sup>. Die Entscheidung für ein Modell während der Entwicklung und Optimierung wurde, wie in Kap. 3.3.3 erläutert, anhand der Goodness-of-Fit-Abbildungen, der RSE der abgeschätzten Parameter und der  $\Delta$ OFV getroffen.

#### *Statistisches Modell*

Um ein statistisches Modell in NONMEM® VI zu entwickeln, sind zwei Herangehensweisen denkbar. Eine Möglichkeit besteht darin, das Modell ausgehend von der einfachsten vorstellbaren Struktur durch sukzessives Hinzufügen von Elementen bzw. Parametern aufzubauen. Das Modell wird dabei solange erweitert, bis keine signifikante Verbesserung, gemessen an  $\Delta$ OFV (s. Kap. 3.3.3), feststellbar ist. Auch der umgekehrte Fall wird bei der Entwicklung geeigneter Modelle herangezogen. Ausgehend von einem komplexen Modell mit vielen Parametern erfolgt eine Verfeinerung des Modells, indem schrittweise Parameter entfernt werden. Auch hier werden die in Kap. 3.3.3 beschriebenen Kriterien der Modellwahl angewendet und das Modell so lange reduziert, bis eine signifikante Verschlechterung der OFV festgestellt wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der zweite Ansatz gewählt. Zur Charakterisierung der IIV wurde für alle Parameter das exponentielle Fehlermodell gewählt. Eine mögliche Korrelation der Parameter untereinander wurde durch Abschätzung der entsprechenden Kovarianz in NONMEM® VI und durch die Bestimmung des Korrelationskoeffizienten geprüft. Da es sich um eine Mehrfachgabe von

Oxaliplatin handelte, wurde auch die Implementierung eines Modells zu Charakterisierung der IOV nach *Karlsson et al.* getestet<sup>172</sup>. Als Modelle für die Residualvariabilität wurden additive, proportionale und kombinierte Fehlermodelle geprüft. Die einzelnen Submodelle wurden anhand graphischer und statistischer Kriterien, wie in Kap. 3.3.3 beschrieben, evaluiert.

#### *Kovariatenmodell*

Zunächst wurden die durch das Basismodell (Strukturmodell und statistisches Modell) abgeschätzten individuellen *Fixed-effect*-Parameter bzw. *Random-effect*-Parameter gegen die individuellen Werte der zu untersuchenden Kovariaten graphisch aufgetragen. Dadurch war es möglich, potentielle Kovariateneinflüsse zu erkennen. Die Graphiken wurden mit dem in R<sup>®</sup> integrierbaren Softwarepaket Xpose<sup>®</sup> (Version 4\_4.0.3) erzeugt. Der generelle Trend der Datenpunkte in den Darstellungen wurde unter Verwendung der Loess-Funktion (Lokale Regression) kenntlich gemacht. Die Loess-Funktion ist eine nicht-parametrische Methode der Kurvenanpassung, man spricht auch von einer lokal gewichteten linearen Regression. Die visuelle Inspektion dieser Abbildungen, aber auch Überlegungen zu möglichen physiologischen Zusammenhängen (z.B. Kreatininclearance als möglicher Einflussfaktor auf die Platin-clearance) führten zu einer Vorauswahl der in Frage kommenden Kovariaten.

Im zweiten Schritt wurde eine GAM-Analyse durchgeführt. *Generalized-Additive-Modelling* (GAM) wurde von *Mandela et al.* zur *A-priori*-Identifikation möglicher wichtiger Kovariaten beschrieben<sup>190</sup>. Die GAM-Analyse ist mit einer schrittweise multiplen, linearen Regression vergleichbar, jedoch nicht beschränkt auf den linearen Modelltyp. Die GAM-Analyse wurde mit dem in R<sup>®</sup> integrierbaren Softwarepaket Xpose<sup>®</sup> (Version 4\_4.0.3) durchgeführt<sup>164</sup>. In Xpose<sup>®</sup> wird für die GAM-Analyse folgende allgemeine Form angenommen:

$$P_{ki} = \alpha_{k0} + \sum_{i=1}^n g_{ki}(X_{li}) \quad \text{Gl. 3.37}$$

$\alpha_{k0}$  bezeichnet den Interzept,  $X_{ij}$  die  $j$ -te Kovariate des  $i$ -ten Individuums, und  $g_{kl}$  ist die Funktion, die den Kovariateneinfluss auf den Parameter  $P_k$  spezifiziert. Die Suche wurde nach einer festgelegten Reihenfolge durch schrittweises Ein- und Ausschließen möglicher Parameter-Kovariaten-Zusammenhänge durchgeführt. Als Standard war dabei in Xpose<sup>®</sup> definiert: 1. kein Zusammenhang, 2. linearer Zusammenhang, 3. nicht-linearer Zusammenhang in Form einer natürlichen kubischen Splinefunktion mit internem Knoten (*Breakpoint*). Da bei dieser Methodik auch nicht-hierarchische Modelle miteinander verglichen wurden, konnte die  $\Delta$ OFV an dieser Stelle nicht als Kriterium für die Modellwahl herangezogen werden. Es wurde stattdessen das Akaike-Informationskriterium (AIC, s. Kap. 3.6.3) zur Modelldiskriminierung verwendet. Den Ausgangspunkt für den nächsten Schritt bildete jeweils das Modell, welches den niedrigsten AIC-Wert ergab. Die Suche war beendet, wenn das AIC nicht weiter minimiert werden konnte. Die anhand der graphischen Inspektion, der Vorüberlegungen und durch die GAM-Analyse identifizierten Kovariaten wurden im dritten Schritt mit dem *Vorwärtseinschluss-/Rückwärtsausschlussverfahren* (*forward selection / backward elimination*) direkt in NONMEM<sup>®</sup> VI getestet. Die Selektion der Kovariaten und alle Entscheidungskriterien sind im Abb. 3.7 veranschaulicht.

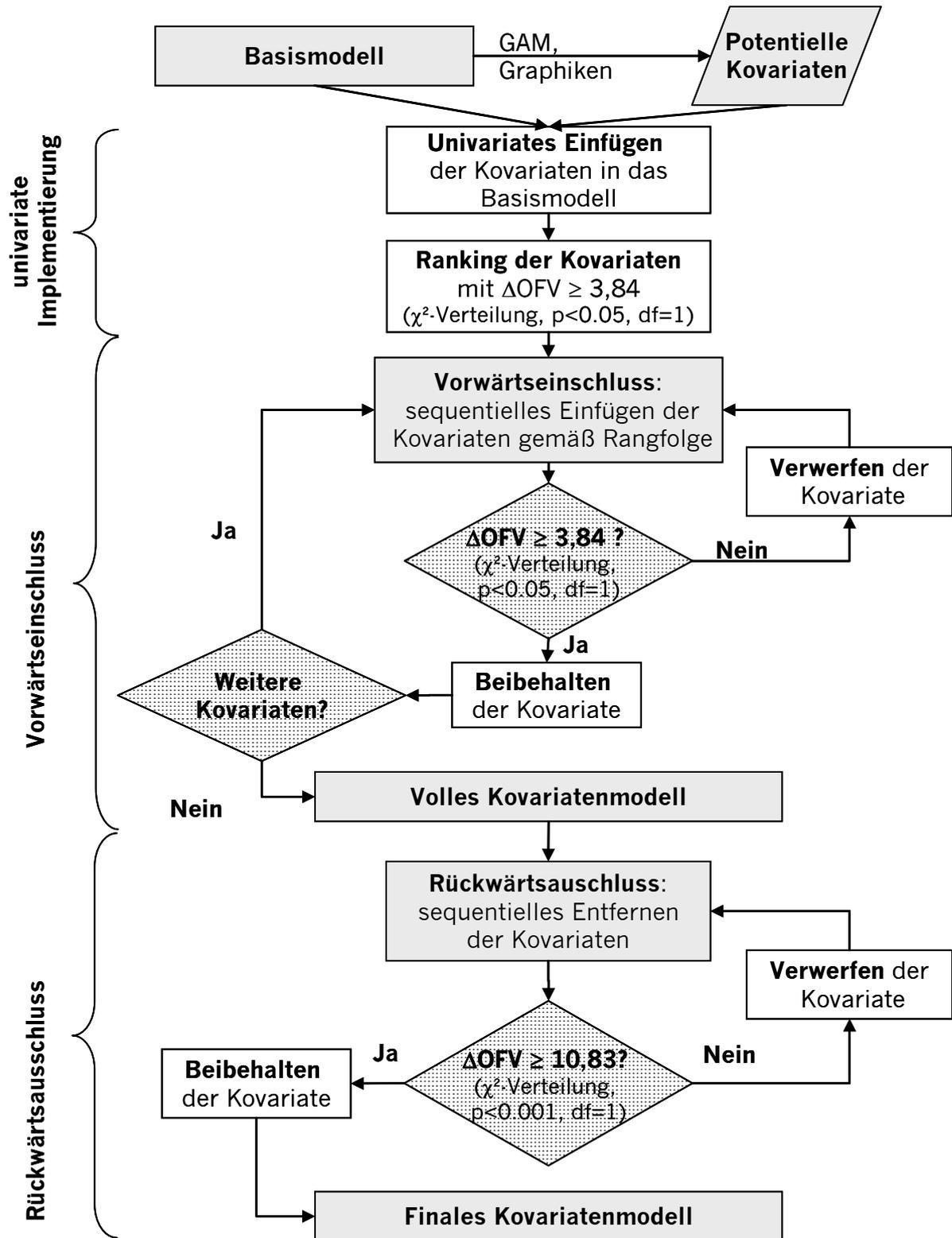


Abb. 3.7 Flussdiagramm zur Kovariatenselektion in NONMEM® mittels Vorwärtseinschluss-/Rückwärtsausschlussverfahren

Zunächst wurden alle identifizierten Kovariaten nacheinander in das Basismodell integriert. Die getesteten Kovariatenmodelle sind in Tab. 3.22 aufgeführt. Es wurde das Modelle gewählt, welche die stärkste und signifikante Erniedrigung der OFV ( $\Delta\text{OFV} \geq 3,84$ ,  $\text{df}=1$ ) aufwies, s. Kap. 3.3.3. Alle anderen Modelle werden verworfen.

Tab. 3.22 Kovariatenmodelle zur Selektion der Kovariaten in NONMEM®

<b>Kontinuierliche Kovariaten</b>		
1. Lineares Modell	$\text{TVPK} = \theta_p \cdot \left(1 + \theta_x \cdot (X_i - \tilde{X})\right)$	Gl. 3.38
2. Potenzmodell	$\text{TVPK} = \theta_p \cdot \left(\frac{X_i}{\tilde{X}}\right)^{\theta_x}$	Gl. 3.39
<b>Kategoriale Kovariaten</b>		
1.	$\text{TVPK} = \begin{cases} \theta_{xk} & \text{Kategorie} = k \\ \vdots & \vdots \\ \theta_{xk} \cdot \theta_{x(n-k)} & \text{Kategorie} = n - k \end{cases}$	Gl. 3.40

$\tilde{X}$	Median der Kovariate
$X_i$	Kovariate des i-ten Individuums
$\theta_p$	Typischer Wert der Population
$\theta_x$	Kovariateneinfluss
$\theta_{xk}$	Kovariateneinfluss der Kategorie k
$\theta_{x(n-k)}$	Fraktion des Kovariateneinfluss der Kategorie (n-k)
n	Anzahl der Kategorien

Dieser Prozess wurde solange fortgesetzt, bis keine signifikante Verbesserung des Modells durch weitere Kovariatenintegration erreicht werden konnte. Das so erhaltene Kovariatenmodell (*full covariate modell*) bildete den Ausgangspunkt für das *Rückwärtsausschlussverfahren*. Hierbei wurde das Modell nun wieder schrittweise reduziert, also Kovariaten-Parameter-Relationen entfernt. Dabei wurde jeweils das Modell beibehalten, welches nicht zu einer signifikanten, d.h.  $\Delta\text{OFV} \geq 10,83$  ( $\text{df}=1$ , s. Kap. 3.3.3), Verschlechterung des Modells führte. Es wurde hierbei ein Signifikanzniveau von  $p < 0.001$  gewählt. Alle anderen Modelle wurden verworfen. Auch dieses Vorgehen wurde so lange weitergeführt, bis das Entfernen von Kovariaten

stets zur signifikanten Verschlechterung des Modells führte. Das so erhaltene Modell stellte das finale Kovariatenmodell dar. Das *Vorwärtseinschluss-/Rückwärtsausschlussverfahren* wurde automatisiert mit dem Softwarepaket PSN<sup>®</sup> (*Lindbom et al.*, Version 2.3.1, 2008) durchgeführt<sup>191-193</sup>.

### 3.8.5 Modellevaluation

Evaluation und Diagnose stellten zentrale Punkte in der Entwicklung des Populationsmodells dar. Hierfür standen verschiedene Techniken der graphischen und statistischen Bewertung zur Verfügung. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die entwickelten Modelle hinsichtlich der

- Güte der Parameterschätzung,
- Robustheit der Parameterschätzung und
- Vorhersagekraft des Modells

überprüft.

#### *Bootstrapping*

Um Richtigkeit und Präzision des entwickelten Modells abschätzen zu können, wurde das Verfahren des *Bootstrappings* angewandt. Es handelt sich dabei um eine *Resampling*-Methode, mit der man die Verteilung in der Grundgesamtheit aus der vorliegenden Stichprobe „rekonstruieren“ kann<sup>194</sup>. Hierbei wurden zunächst neue 1000 Datensätze durch „Ziehen mit Zurücklegen“ aus dem Originaldatensatz gewonnen. Dabei entsprechen die neuen Datensätze hinsichtlich ihrer Größe dem Originaldatensatz. Die Bootstrap-Analyse wurde im Rahmen dieser Arbeit mit dem Programm PsN<sup>®</sup> (*Lindbom et al.*, Version 2.3.1, 2008) durchgeführt<sup>191,192</sup>. Für die neuen Datensätze wurden die Modellparameter unter dem finalen Modell ermittelt. Aus den Abschätzungen wurden der Bootstrap-Median, der Standardfehler SE, der relative Standardfehler (RSE) sowie das 95 %-Konfidenzintervall

berechnet. Letzteres wurde aus dem 2,5 und 97,5 %-Perzentil der Parameterverteilung bestimmt.

#### *Case-Deletion-Diagnostics (CDD)*

Um die Robustheit des entwickelten Modells zu überprüfen, wurde die Methodik *Case-Deletion-Diagnostics* (CDD) angewendet. Mit dieser Standardmethode lässt sich der Einfluss einzelner Individuen oder Gruppen von Individuen auf die Abschätzung der Modellparameter beurteilen<sup>195</sup>. Alle 58 Individuen wurden zufällig in elf Gruppen eingeteilt, sodass jede Gruppe etwa 10 % der Population enthielt. Anschließend wurden die Gruppen 1 bis 11 nacheinander aus dem Originaldatensatz entfernt. Für die elf neuen Datensätze wurden jeweils die Modellparameter mit dem finalen Modell ermittelt.

In einer weiteren Untersuchung wurde jeweils ein Individuum aus dem Originaldatensatz entfernt. Für die so erhaltenen 58 neuen Datensätze wurden die Modellparameter ebenfalls erneut abgeschätzt. Abschließend wurden die aus den reduzierten Datensätzen erhaltenen Modellparameter mit denen des vollständigen Datensatzes und den dazugehörigen 95 %-Konfidenzintervallen verglichen.

#### *Visual-Predictive-Check (VPC)*

Hinter dem *visual predictive check* (VPC) verbirgt sich eine Methode, mit welcher sich die Vorhersagekraft des entwickelten Modells abschätzen lässt. Hierbei werden graphisch die beobachteten Werte mit den korrespondierenden, simulierten Werten verglichen. Mit Hilfe des VPC lässt sich zeigen, ob das entwickelte Modell

- die Variabilität der beobachteten Werte, aus welchen es hervorgeht, wiedergibt und
- die zentrale Tendenz der beobachteten Werte simulieren kann.

Es wurden 1000 neue Datensätze, welche sich hinsichtlich der Datenanzahl, der Zeitpunkte und der Anzahl der Patienten nicht vom Originaldatensatz unterschieden, durch Simulationen, basierend auf den finalen Parameterabschätzungen des entwickelten Modells, generiert. Dies erfolgte mit Hilfe des Programms PsN<sup>®191,192</sup>. Anschließend wurden aus den simulierten Daten Median, das 5 und 95 %-Perzentil für jeden Zeitpunkt ermittelt und graphisch aufgetragen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Projekt I: Quantifizierung von Gallium in Vollblut, Plasma und Urin

#### 4.1.1 Messbedingungen und Temperaturprogramme

Die Analytik von Gallium mittels GF-AAS stellt eine besondere Herausforderung dar, da es in biologischen Matrices in Form leichtflüchtiger Galliumsalze vorliegt oder während der Analyse umgewandelt wird. Dadurch geht bereits vor Erreichen der Atomisierungstemperatur Gallium in den gasförmigen Zustand über und damit verloren. Eine quantitative Bestimmung von Gallium ist unter diesen Bedingungen nicht möglich. Um den Analyten in der Probe zu stabilisieren und somit ausreichend hohe Temperaturen für die Veraschung und die Atomisierung zu ermöglichen, wurde Palladiumnitrat als chemischer Modifier zusammen mit der Probe injiziert<sup>176</sup>.

Für die jeweiligen Methoden der einzelnen Matrices wurde zunächst die Veraschungstemperatur optimiert, um eine ausreichende Abtrennung der Matrixbestandteile vom Analyten (Gallium) zu erzielen. Als optimale Veraschungstemperatur wurde diejenige gewählt, die ein ausreichend hohes Absorptionssignal ergab. Die Untergrundabsorption sollte dabei so gering wie möglich sein.

In einem zweiten Schritt wurde die Atomisierungstemperatur optimiert. Hierfür wurde die vorher ermittelte Veraschungstemperatur fixiert und die Atomisierungstemperatur schrittweise variiert. Die ermittelten Elementabsorptionen sowie die Untergrundabsorptionen wurden in sogenannten Ash/Atomise-Plots graphisch gegen die entsprechende Veraschungs- bzw. Atomisierungstemperatur aufgetragen. Abb. 4.1 zeigt einen charakteristischen Ash/Atomise-Plot.

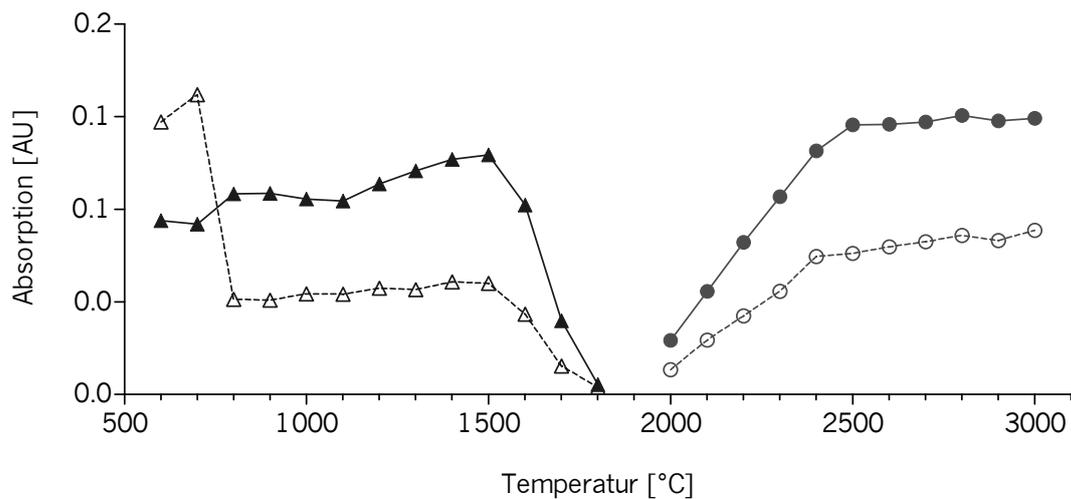


Abb. 4.1 Ash-/Atomise-Plot zur Optimierung des Temperaturprogramms für die Bestimmung von Gallium im Plasma (1+19)  
 ●— Veraschungskurve Gallium, ○— Veraschungskurve Untergrund  
 ●— Atomisierungskurve Gallium, ○— Atomisierungskurve Untergrund

Für Matrices mit einem höheren Anteil an Begleitstoffen, wie Plasma und Vollblut, waren Veraschungstemperaturen von 1450 – 1500°C erforderlich (s. Tab. 3.1 und Tab. 3.2). Aus Abb. 4.1 lässt sich für die Verdünnung 1+19 im Plasma als optimale Veraschungstemperatur 1500°C ablesen. Durch die starke Verdünnung der Urinproben mit höheren Galliumkonzentrationen konnte die Veraschungstemperatur im Vergleich um bis zu 500°C reduziert werden (s. Tab. 3.3). Als Atomisierungstemperatur wurde für alle Matrices 2600 °C bestätigt. Im Anschluss an die Optimierung des Temperaturprogramms wurde die Konzentration des eingesetzten Palladiummodifiziers überprüft. Dabei wurde der Einfluss verschiedener Palladiumkonzentrationen auf das Elementsignal sowie die Untergrundabsorption charakterisiert. Abb. 4.2 präsentiert exemplarisch die Ergebnisse einer solchen Untersuchung für Plasma in der Verdünnung 1+19.

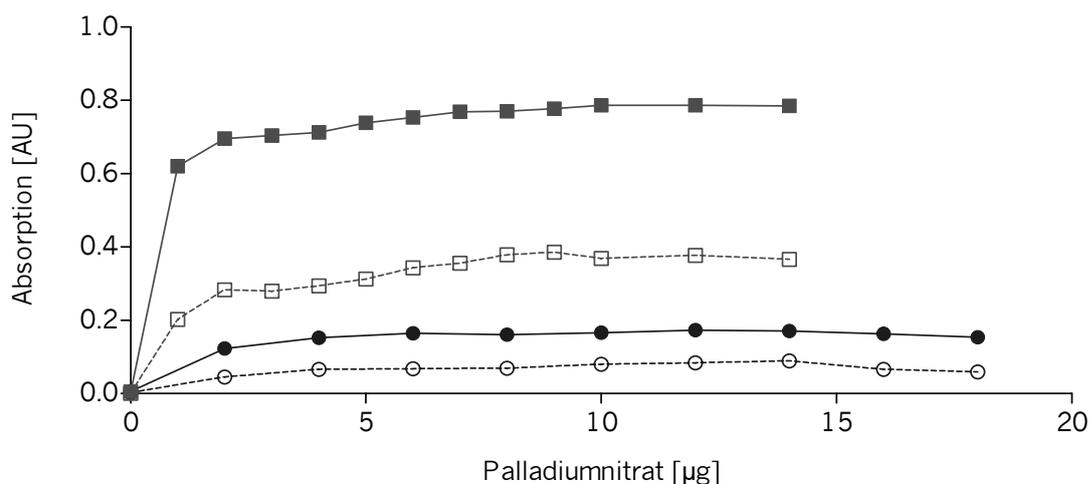


Abb. 4.2 Abhängigkeit der Galliumabsorption von der Palladiumnitratmenge; Absorptionssignale von 50 µg/L (●, ○) bzw. 200 µg/L (■, □) — Gallium-Absorption, --- Untergrund-Absorption

In der Graphik lässt sich zunächst ein leichter Anstieg der Absorptionen erkennen, der ab einer Palladiummenge von 10 µg/Injektion anschließend in ein Plateau übergeht. Die initial verwendete Menge an Palladiumnitrat von 10 µg/Injektion wurde für alle Matrices bestätigt.

#### 4.1.2 Probenaufarbeitung

Die Atomabsorptionsspektrometrie zeichnet sich durch eine hohe Selektivität aus. Eine Extraktion des Analyten ist durch die Verwendung spezifischer Temperaturprogramme nicht erforderlich. Aufgrund der komplexen Zusammensetzung sowie der hohen Viskosität und Oberflächenspannung biologischer Matrices ist deren Modifikation bzw. Aufschluss vor der Analyse unerlässlich. Um eine präzise und reproduzierbare Injektion durch den Probengeber zu gewährleisten sowie eine gleichmäßige Verteilung der Proben im Graphitrohr und damit ein optimales Trocknen der Probe zu erzielen, wurden sowohl Vollblut-, Plasma- als auch Urinproben durch Zugabe von Salpetersäure 65% (V/V) und anschließende Inkubation bei 80 °C aufgeschlossen. Dabei variierte die

Dauer der Inkubation je nach Matrix zwischen 30 min (Urin, Vollblut) und 50 min (Plasma). Die komplexere Matrix des Vollbluts, in der auch zelluläre Bestandteile vorhanden waren, machten diese drastischen Bedingungen erforderlich. Durch den Aufschluss im Ultraschallbad konnten, im Vergleich zur Aufarbeitung von Plasma, kürzere Aufschlusszeiten erreicht werden.

Aufgrund dieser Aufarbeitung der Proben konnten einerseits jeweils klare Lösungen erhalten werden, die mit Wasser in den entsprechenden Konzentrationsbereich verdünnt wurden. Andererseits wurden die Lösungen auf diese Weise direkt auf einen pH-Wert im sauren Bereich eingestellt, was zu einer zusätzlichen Stabilisierung der Probe führte. Die detaillierte Beschreibung der Probenaufarbeitung ist in Kap. 3.4.3 zu finden.

#### 4.1.3 Methodvalidierung

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methoden zur Bestimmung von Gallium in Vollblut, Plasma und Urin wurden gemäß internationaler Richtlinien validiert<sup>165</sup>.

##### *Selektivität*

Die folgenden Spektrogramme (Abb. 4.3 bis Abb. 4.9) zeigen den letzten Teil der Veraschungs- und die Atomisierungsphase. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die Darstellung der Untergrundsignale verzichtet.

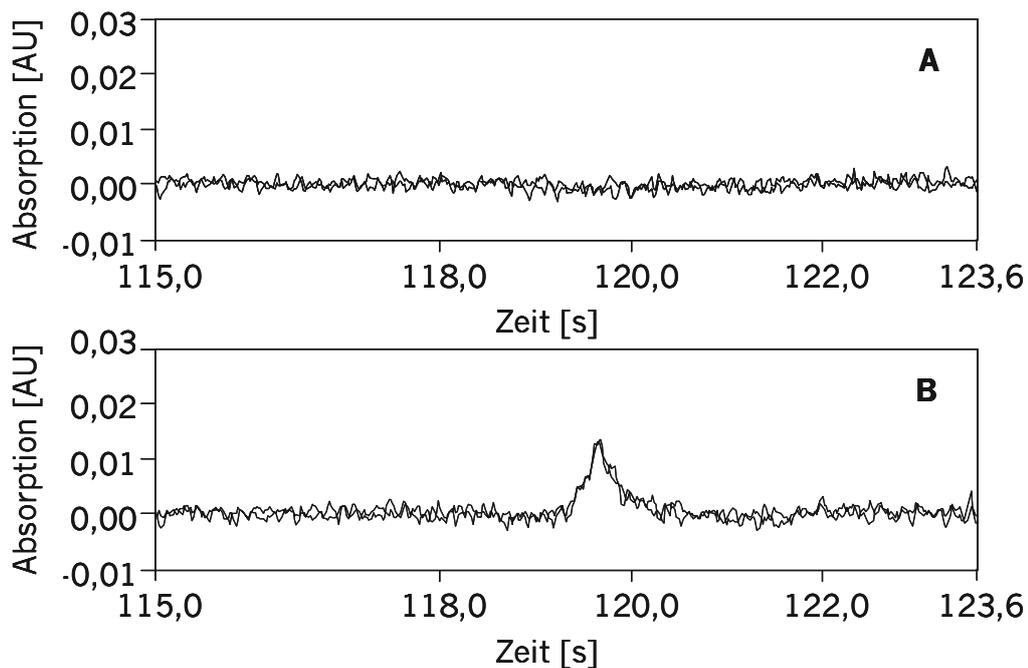


Abb. 4.3 Spektrogramme **Vollblut** für den Kalibrierbereich  
10 – 100 µg/L: **A** Galliumfreie Matrix, **B** Kalibrator 10 µg/L

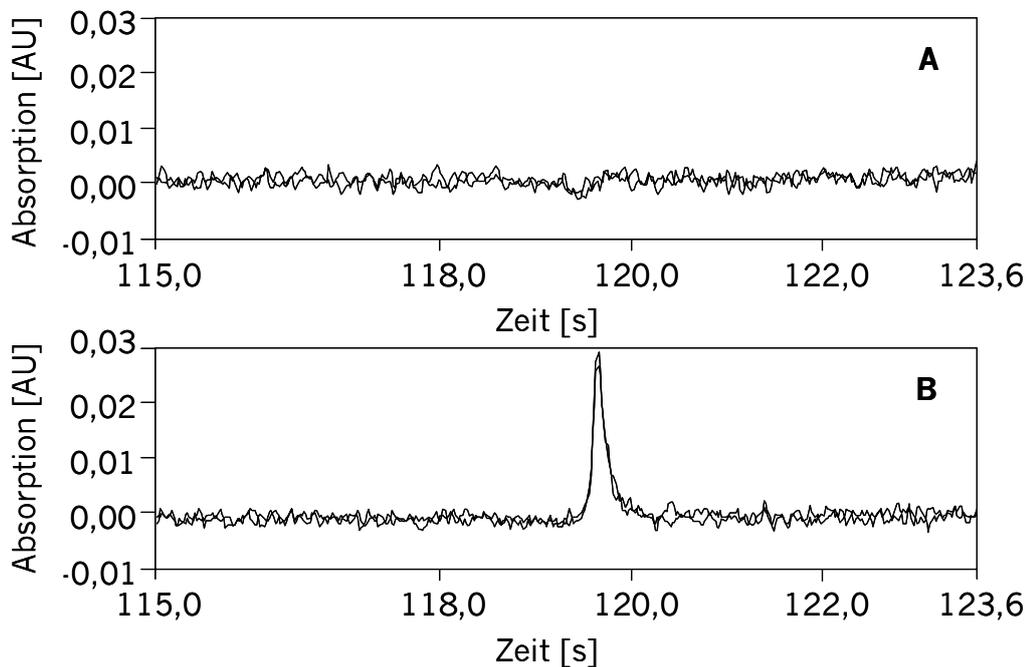


Abb. 4.4 Spektrogramme **Vollblut** für den Kalibrierbereich  
100 – 1000 µg/L: **A** Galliumfreie Matrix, **B** Kalibrator 100 µg/L

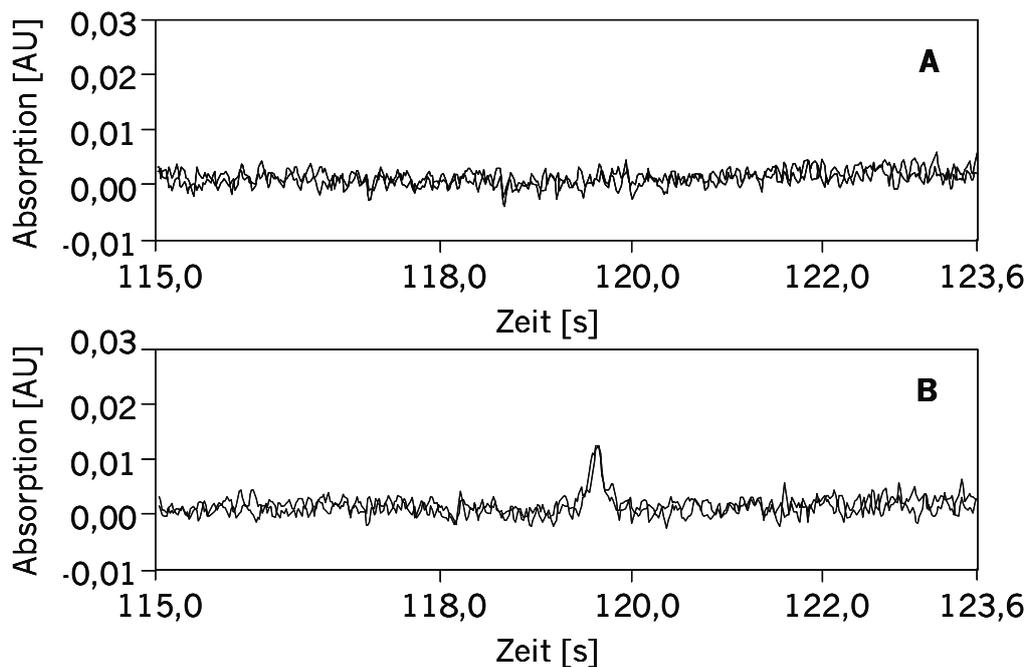


Abb. 4.5 Spektrogramme **Plasma** für den Kalibrierbereich 5 – 100 µg/L: **A** Galliumfreie Matrix, **B** Kalibrator 5 µg/L

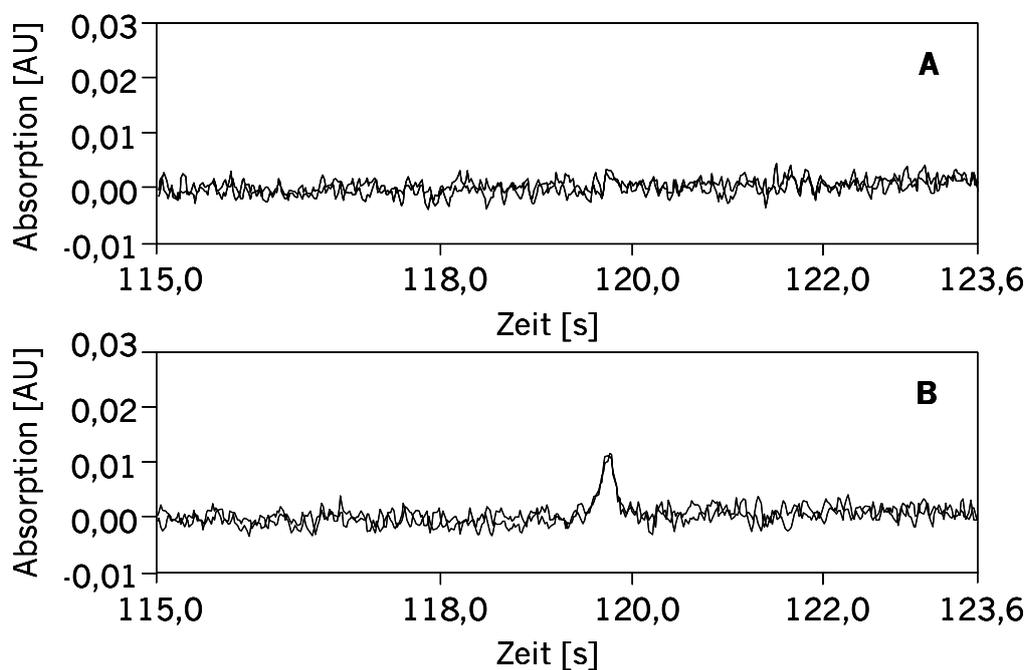


Abb. 4.6 Spektrogramme **Plasma** für den Kalibrierbereich 10 – 200 µg/L: **A** Galliumfreie Matrix, **B** Kalibrator 10 µg/L

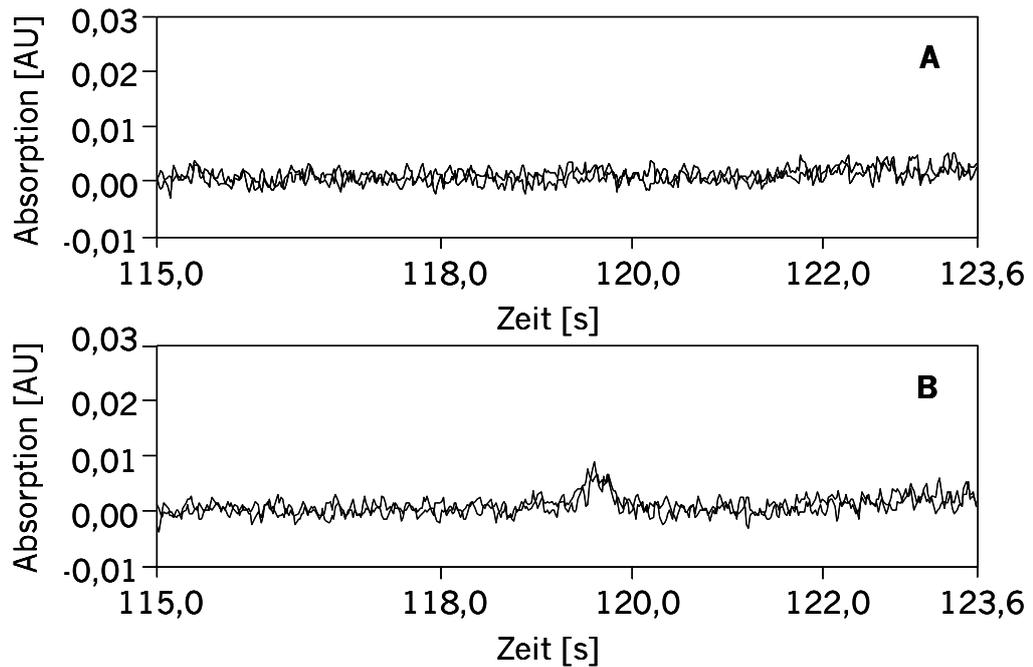


Abb. 4.7 Spektrogramme **Urin** für den Kalibrierbereich  
1 – 20 µg/L: **A** Galliumfreie Matrix, **B** Kalibrator 1 µg/L

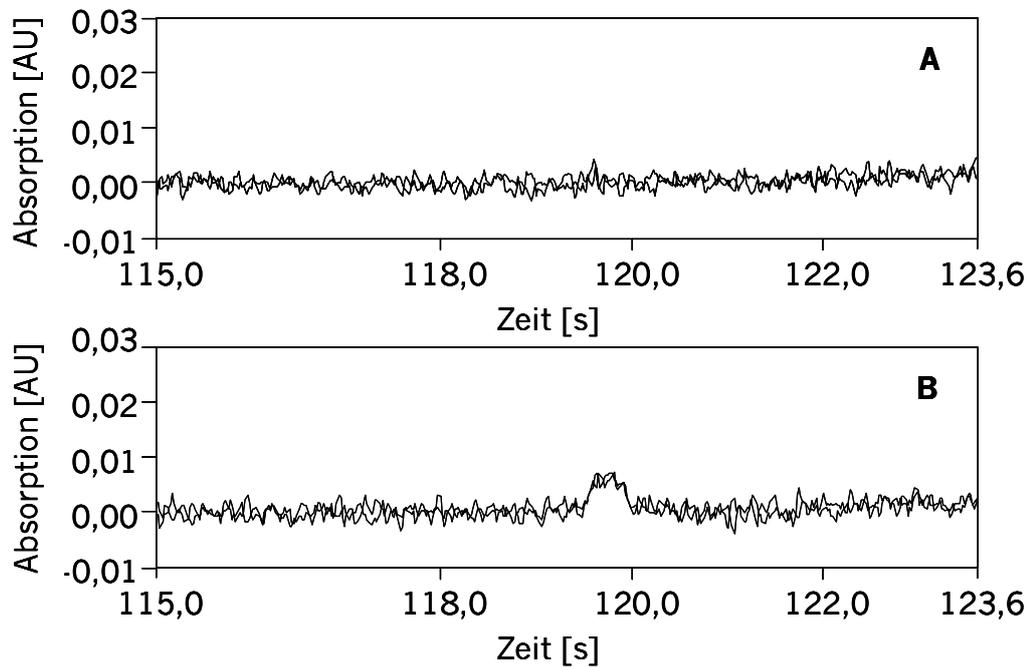


Abb. 4.8 Spektrogramme **Urin** für den Kalibrierbereich  
5 – 100 µg/L: **A** Galliumfreie Matrix, **B** Kalibrator 5 µg/L

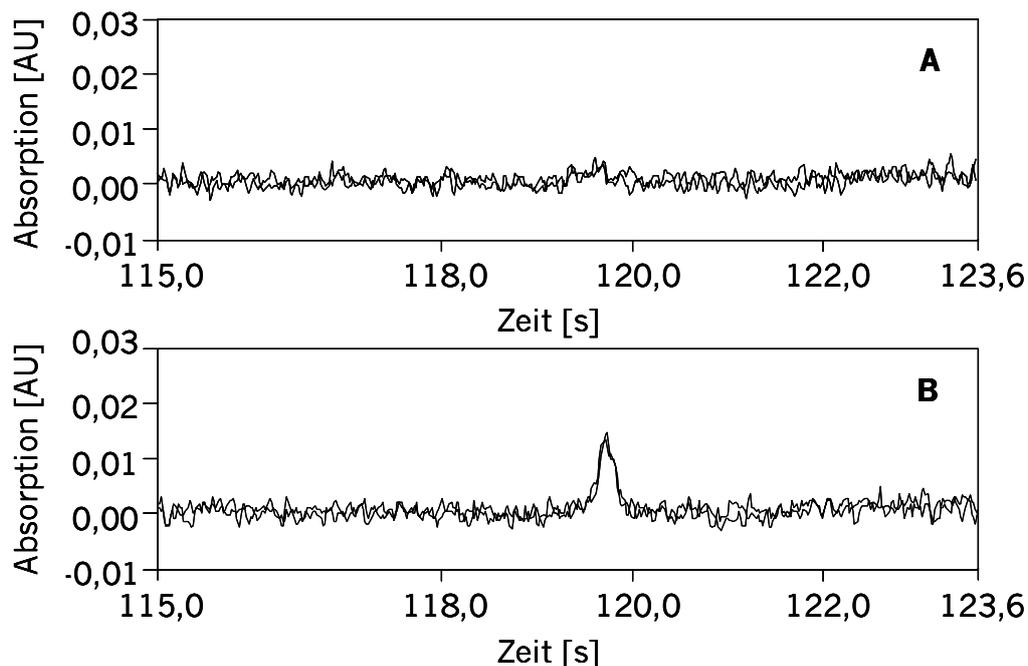


Abb. 4.9 Spektrogramme **Urin** für den Kalibrierbereich 50 – 1000 µg/L: **A** Galliumfreie Matrix, **B** Kalibrator 50 µg/L

Die Selektivität wurde durch den Vergleich der Spektrogramme der galliumfreien, aufgearbeiteten Matrices (Abbildungsteil **A**) mit denen der niedrigsten Kalibratoren (Abbildungsteil **B**) untersucht.

Das Fehlen eines Signals in den Spektrogrammen der galliumfreien, aufgearbeiteten Matrices verdeutlicht die Selektivität der entwickelten Methoden. Darüber hinaus war im Zeitraum der Signalaufnahme von (115,0 – 123,6 s) eine störungsfreie Signalaufzeichnung erkennbar.

#### *Stabilität*

Der Einfluss extremer Temperaturschwankungen von  $-80\text{ °C}$  (Tiefkühlung) bis  $+25\text{ °C}$  (Raumtemperatur) auf die Patientenproben der einzelnen Matrices sollte mit Hilfe dieser Untersuchung charakterisiert werden. Dazu wurden ein, zwei und drei Einfrier-/Auftauzyklen untersucht. Als Referenz wurde jeweils eine frisch aufgestockte und aufgearbeitete Lösung der zu untersuchenden Matrix verwendet. In Tab. 4.1 sind die Ergebnisse der Untersuchung der Einfrier-/Auftaustabilität zusammengefasst.

Tab. 4.1 Einfrier-/Auftaustabilität [%] der unaufgearbeiteten Proben über 3 Zyklen (MW, n=3)

<b>Matrix</b>	<b>Konzentration [µg/L]</b>	<b>Zyklus 1</b>	<b>Zyklus 2</b>	<b>Zyklus 3</b>
Vollblut	30	n.b.	108,2	110,4
	900	n.b.	95,8	96,6
Plasma	15	88,5	89,4	92,5
	160	99,2	94,7	101,9
Urin	3	n.b.	95,4	114,8
	50	100,5	101,2	101,7
	800	102,9	99,2	100,3

n.b. nicht bestimmt

Die mittlere Wiederfindung in den einzelnen Zyklen betrug zwischen 88,5 und 114,8 %. Es konnte gezeigt werden, dass der Einfrier-/Auftauprozess keinen nennenswerten Einfluss auf die Stabilität von Gallium in den unaufgearbeiteten Proben hat. Die Aufarbeitung der Proben sowie die Herstellung der Kalibratoren und QC-Proben erfolgten stets direkt vor der Bestimmung der Proben. Da diese Proben und Lösungen somit zu keinem Zeitpunkt unterhalb Raumtemperatur gelagert wurden, konnte auf die Bestimmung der Einfrier-/Auftaustabilität für diese Proben verzichtet werden.

Um die Stabilität der Patientenproben vom Beginn des Aufarbeitungsprozesses bis zur Vermessung zu charakterisieren, wurde deren Stabilität bei Raumtemperatur untersucht. Die Abweichungen vom Wert 100 % (maximale Stabilität) waren zufällig und wiesen keinerlei Tendenzen auf. Insgesamt lagen die Abweichungen im Rahmen der Methodenpräzision. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tab. 4.2 aufgeführt.

Tab. 4.2 Stabilität [%] von Gallium in unaufgearbeiteten Vollblut-, Plasma bzw. Urinproben, gelagert bei Raumtemperatur (MW, n=3)

Matrix	Konzentration [µg/L]	Zeit [h]			
		1	2	3	4
Vollblut	30	101,2	90,2	93,7	103,2
	900	107,5	101,4	104,5	98,9
Plasma	15	96,0	107,7	104,5	99,4
	80	94,3	95,1	96,0	97,9
Urin	3	100,2	115,1	104,5	131,1
	50	99,1	86,1	86,8	118,4
	800	n.b.	101,3	102,3	97,8

n.b. nicht bestimmt

Die Stabilität in der Messprobe, d.h. der aufgearbeiteten Probe, wurde über einen Zeitraum von sechs Stunden untersucht. Dieser Untersuchungszeitraum wurde gewählt, um das Verhalten der Proben bei vollbesetztem Autosampler zu simulieren.

Tab. 4.3 Stabilität [%] von Gallium in aufgearbeiteten Vollblut-, Plasma bzw. Urinproben, gelagert bei Raumtemperatur – Autosamplerstabilität (MW, n=3)

Matrix	Konzentration [µg/L]	Zeit [h]			
		1	2	4	6
Vollblut	30	90,2	93,7	103,2	n.b.
	900	91,9	93,8	90,5	103,5
Plasma	15	110,2	97,5	100,1	96,8
	80	101,4	104,9	n.b.	89,2
Urin	3	103,5	97,0	102,5	103,3
	50	101,3	98,1	115,4	110,4
	800	90,8	101,2	101,6	96,4

n.b. nicht bestimmt

Wie in Tab. 4.3 erkennbar, waren die Proben über den gesamten Untersuchungszeitraum stabil.

### *Wiederfindung*

Mit der Untersuchung der Wiederfindung sollte der Einfluss der Zusammensetzung der Matrix auf das Absorptionssignal untersucht werden. Dafür wurden mindestens zwei Proben, die den gesamten Konzentrationsbereich in jeder Matrix abdeckten, hergestellt, aufgearbeitet und vermessen. Als Referenz wurden Galliumlösungen äquivalenter Konzentration in 1 %iger HNO<sub>3</sub> (V/V) vermessen. Das nach Gl. 3.1 berechnete Verhältnis der Absorptionssignale ist in Tab. 4.4 zusammengestellt.

Tab. 4.4 Wiederfindung [%] in Vollblut, Plasma and Urin (MW ± SD, n=3)

<b>Konzentration [µg/L]</b>	<b>Vollblut</b>	<b>Plasma</b>	<b>Urin</b>
30	74,2 ± 3,1	n.b.	n.b.
900	98,8 ± 0,7	n.b.	n.b.
15	n.b.	100,6 ± 6,5	n.b.
80	n.b.	105,6 ± 10,0	n.b.
3	n.b.	n.b.	49,5 ± 0,6
50	n.b.	n.b.	44,1 ± 2,7
800	n.b.	n.b.	87,6 ± 0,8

n.b. nicht bestimmt

Die Ergebnisse zeigten erhebliche Abweichungen vor allem für hochkonzentrierte Matrizes wie Vollblut (1+9) und Urin (1+2) bzw. (1+9). Diese Abweichungen konnten jedoch reproduzierbar mit einer RSD von maximal 10 % bestimmt werden. Die Kalibrierung erfolgte daher stets matrixadaptiert.

*Messbereich und Bestimmungsgrenze*

Für die im Rahmen der Dosisescalationsstudie zu KP46 generierten Vollblut-, Plasma- und Urinproben war eine hohe Variabilität der Galliumkonzentrationen zu erwarten. Durch punktuelle Untersuchungen von Proben, die sehr niedrige bzw. sehr hohe Konzentrationen aufwiesen, wurde der Messbereich 1 bis 1000 µg/L Gallium definiert. Da bei der GF-AAS über einen solchen Konzentrationsbereich keine Linearität gegeben ist, wurden zwei Kalibrierbereiche definiert. Proben, die außerhalb dieser Konzentrationsbereiche lagen, wurden durch den automatischen Probengeber mit aufgearbeiteter Leermatrix verdünnt.

Richtigkeit und Präzision an der Bestimmungsgrenze wurden anhand von sechs unabhängig voneinander erstellten und an sechs verschiedenen Tagen vermessenen Kalibriergeraden ermittelt.

Tab. 4.5 Präzision (RSD) und Richtigkeit (RE) am LLOQ (MW, (n=6))

<b>Matrix</b>	<b>Konzentrationsbereich [µg/L]</b>	<b>LLOG [µg/L]</b>	<b>RE [%]</b>	<b>RSD [%]</b>
Vollblut	10 – 100	10	-8,4	7,5
	100 – 1000	100	+4,7	5,7
Plasma	5 – 100	5	-4,3	6,8
	10 – 200	10	-10,8	11,1
Urin	1 – 20	1	-4,5	6,2
	5 – 100	5	+7,8	8,0
	50 – 1000	50	+5,0	3,6

Wie in Tab. 4.5 zusammengefasst, konnte die Bestimmungsgrenze der sieben Kalibrierbereiche mit einer Richtigkeit (RE) von -10,8 bis +7,8 % und einer Präzision (RSD) von 3,6 bis 11,1 % bestimmt werden.

*Linearität*

Linearität in den einzelnen Kalibrierbereichen wurde anhand von jeweils sechs voneinander unabhängig hergestellten und vermessenen Kalibriergeraden überprüft. Der Zusammenhang zwischen nominaler Konzentration und der entsprechenden Absorption konnte durch eine lineare Regression beschrieben werden. Als statistische Größe zur Qualifizierung des linearen Zusammenhangs wurde der Korrelationskoeffizient  $r$  bestimmt sowie die Präzision, ausgedrückt als RSD, mit der die Korrelationskoeffizienten in den einzelnen Serien (sechs unabhängige Kalibriergeraden) ermittelt wurden. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Tab. 4.6 zusammengefasst.

Tab. 4.6 Linearitätskriterien der Kalibriergeraden für die Bestimmung von Gallium in Vollblut, Plasma und Urin (MW, n=6)

<b>Matrix</b>	<b>Konzentrationsbereich [<math>\mu\text{g/L}</math>]</b>			<b>Korrelationskoeffizient <math>r</math></b>	<b>RSD [%]</b>
Vollblut	10	–	100	0,9984	0,11
	100	–	1000	0,9992	0,08
Plasma	5	–	100	0,9986	0,13
	10	–	200	0,9991	0,08
Urin	1	–	20	0,9988	0,12
	5	–	100	0,9993	0,05
	50	–	1000	0,9993	0,04

Die Galliumbestimmung zeigte Linearität in den untersuchten Konzentrationsbereichen mit Korrelationskoeffizienten zwischen 0,9984 und 0,9993, die mit einer RSD von weniger als 0,15 % bestimmt werden konnten. Charakteristische Kalibriergerade mit 95 %-Prognosebereich für die einzelnen Methoden sind in Abb. 4.10 bis Abb. 4.12 dargestellt.

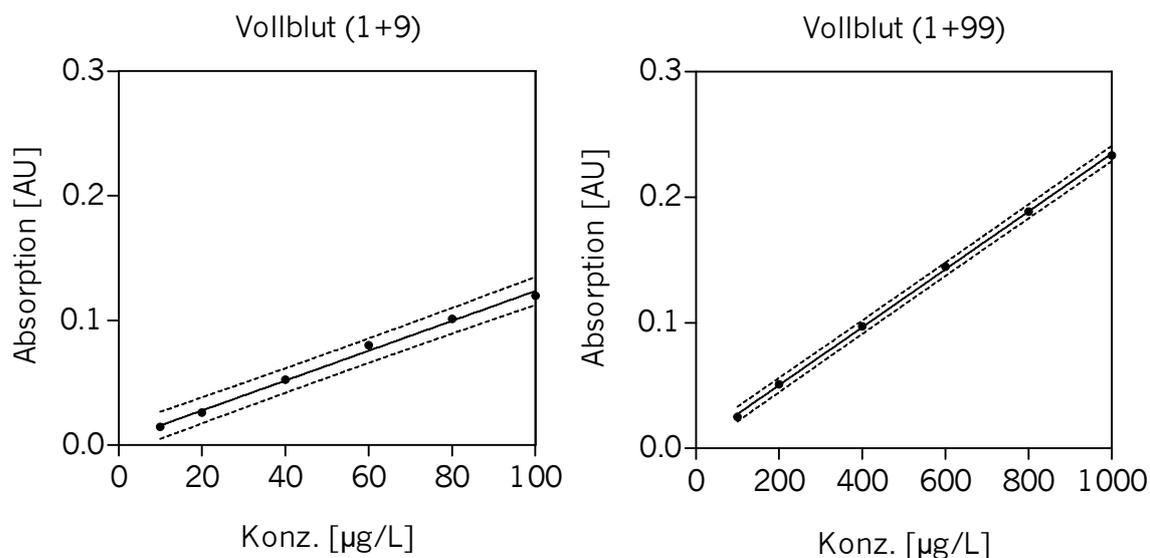


Abb. 4.10 Charakteristische Kalibriergeraden zur Bestimmung von Gallium im **Vollblut**

— berechnete Kalibriergerade, --- 95 % Prognosebereich

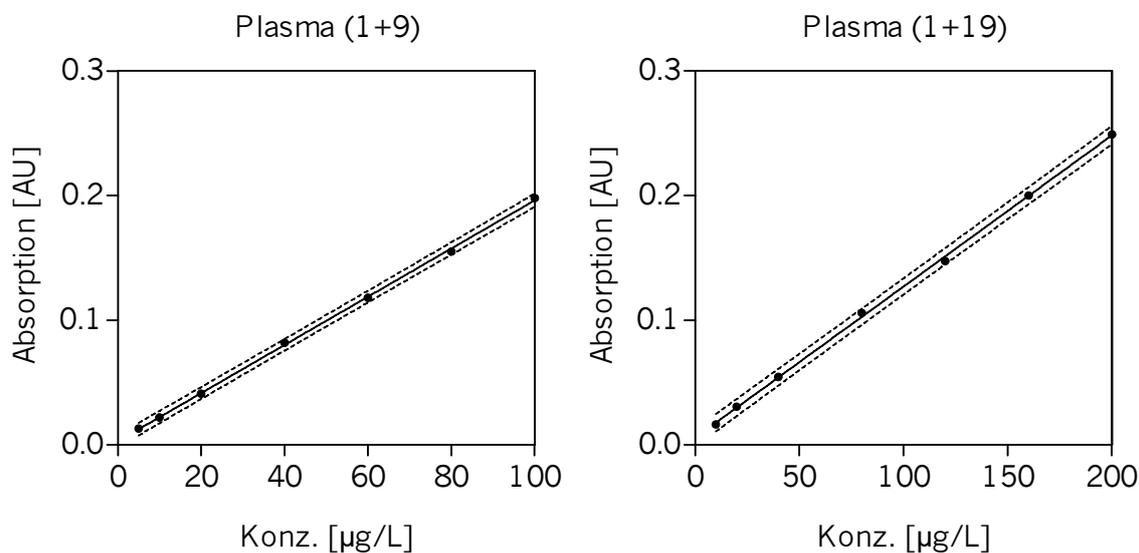


Abb. 4.11 Charakteristische Kalibriergeraden zur Bestimmung von Gallium im **Plasma**

— berechnete Kalibriergerade, --- 95 % Prognosebereich

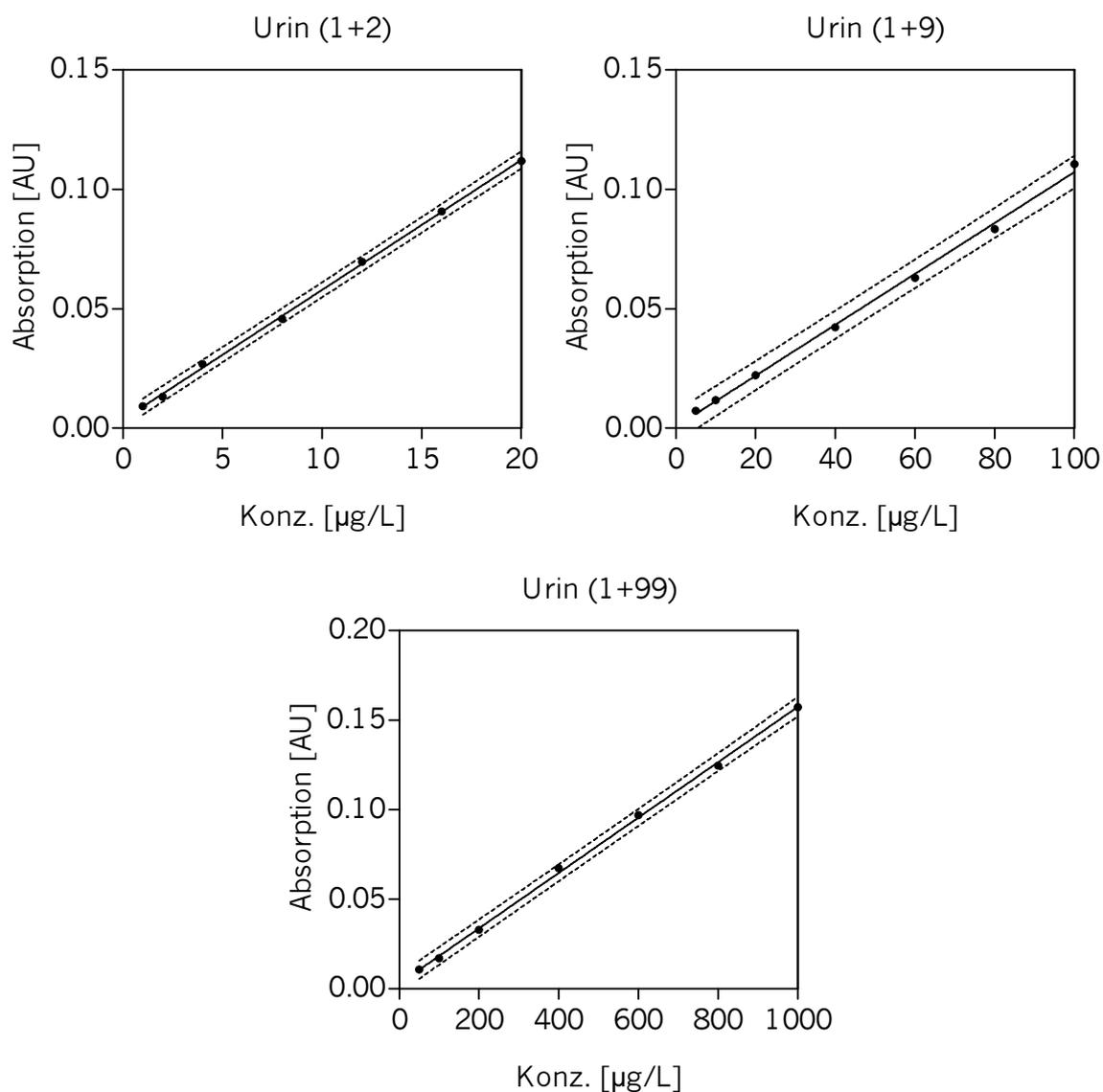


Abb. 4.12 Charakteristische Kalibriergeraden zur Bestimmung von Gallium im **Urin**

— berechnete Kalibriergerade, --- 95 % Prognosebereich

#### *Richtigkeit und Präzision*

Insgesamt konnten alle untersuchten QC-Proben mit einer RSD von maximal 5,8 % bestimmt werden. Die Abweichungen der ermittelten Konzentrationen von den Nominalkonzentrationen betragen zwischen  $-7,2$  und  $+11,1$  %. Die Ergebnisse der Untersuchung der *Within-day*-Richtigkeit und Präzision sind Tab. 4.7 zusammengestellt.

Tab. 4.7 *Within-day*-Richtigkeit (RE in %) und Präzision der Methoden zur Bestimmung von Gallium in Vollblut, Plasma and Urin (Spannweite)

	Konzentrationsbereich [ $\mu\text{g/L}$ ]	RE [%]	RSD [%]
Vollblut	10 – 100	-1,3 – +5,4	+2,7 – +4,7
	100 – 1000	+4,3 – +10,0	+2,1 – +4,8
Plasma	5 – 100	-2,3 – +1,0	+1,2 – +4,1
	10 – 200	-5,2 – -2,8	+3,3 – +4,3
Urin	1 – 20	+3,2 – +5,6	+2,4 – +4,8
	5 – 100	+7,4 – +11,1	+2,4 – +5,1
	50 – 1000	-7,2 – -1,9	+2,0 – +5,8

Mit Hilfe der *Between-day*-Präzision wird die Reproduzierbarkeit der Methoden über einen längeren Zeitraum charakterisiert. Tab. 4.8 und Tab. 4.9 zeigen die Ergebnisse zur Untersuchung der *Between-day*-Richtigkeit und -Präzision.

Tab. 4.8 *Between-day*-Richtigkeit (RE in %) der Methoden zur Bestimmung von Gallium in Vollblut, Plasma and Urin (Spannweite)

Matrix	Konzentrationsbereich [ $\mu\text{g/L}$ ]	Kalibratoren	QC-Proben
Vollblut	10 – 100	-9,6 – +3,9	+5,3 – +9,1
	100 – 1000	-14,4 – +2,6	+4,3 – +10,0
Plasma	5 – 100	-6,0 – +1,5	-5,9 – -3,9
	10 – 200	-6,6 – +4,1	-0,4 – +1,9
Urin	1 – 20	-4,2 – +4,3	-2,7 – +6,7
	5 – 100	-1,7 – +4,0	+5,7 – +6,7
	50 – 1000	-11,9 – +2,6	+2,0 – +7,6

Tab. 4.9 *Between-day*-Präzision (RSD) der Methoden zur Bestimmung von Gallium in Vollblut, Plasma und Urin (Spannweite)

Matrix	Konzentrationsbereich [ $\mu\text{g/L}$ ]	Kalibratoren	QC-Proben
Vollblut	10 – 100	1,3 – 4,7	3,3 – 4,9
	100 – 1000	0,8 – 5,1	4,6 – 5,7
Plasma	5 – 100	2,2 – 12,6	3,2 – 6,6
	10 – 200	0,5 – 8,4	3,9 – 6,9
	1 – 20	1,4 – 12,5	4,0 – 8,2
Urin	5 – 100	1,9 – 17,3	2,1 – 4,7
	50 – 1000	1,3 – 15,6	3,5 – 9,0

Die an sechs verschiedenen Tagen vermessenen Kalibrator- sowie QC-Proben konnten insgesamt mit einer RSD von 0,5 % bis 17,3 % bestimmt werden. Erwartungsgemäß wurde eine größere Streuung im Vergleich zu den *Within-day*-Untersuchungen festgestellt, wobei die Impräzisionen von 17,3 % und 15,6 % die Kalibratoren der niedrigsten Konzentration betrafen. Diese Konzentrationen entsprachen jeweils dem LLOQ der entsprechenden Methode. Die *Between-day*-Richtigkeit lag im Bereich der *Within-day*-Richtigkeit.

Insgesamt wurden die geforderten Kriterien der FDA hinsichtlich Präzision und Richtigkeit erfüllt<sup>165</sup>.

## 4.2 Projekt II: Quantifizierung von Ruthenium in Plasma und Urin

### 4.2.1 Messbedingungen und Temperaturprogramme

Analog dem Vorgehen zur Entwicklung der GF-AAS-Methoden zur Bestimmung von Gallium in Vollblut, Plasma und Urin (s. Kap. 4.1.1) wurden für die verschiedenen Matrizes spezifische Temperaturprogramme erarbeitet und schrittweise modifiziert. Als Atomisierungstemperatur wurde für alle Matrizes 2700 °C gefunden. Für die Bestimmung von Ruthenium im

Plasma erwies sich eine Veraschungstemperatur von 1500 °C als optimal. Die optimierte Veraschungstemperatur für die Bestimmung von Ruthenium im Urin betrug 1600 °C. Insgesamt dauerte ein Messvorgang 146,7 s. Detaillierte Aufstellungen der Temperaturprogramme sind den Tab. 3.10 und Tab. 3.11 zu entnehmen.

#### 4.2.2 Probenaufarbeitung

Im Gegensatz zu Gallium ist Ruthenium nicht leicht flüchtig und bedarf keiner Stabilisierung der Probe. Für die Bestimmung von Ruthenium war daher die Verwendung chemischer Modifier nicht notwendig. In Anlehnung an die Bestimmung von Platin in biologischen Matrices konnte durch Verdünnen der Plasmaproben mit 1 %iger Triton-X-Lösung eine gute Injizierbarkeit sowie Spreitung im Graphitrohr erreicht werden<sup>70</sup>.

Die Urinproben wurden zunächst zentrifugiert, um den Niederschlag, der in unterschiedlichem Ausmaß in den Patientenproben vorhanden war, zu entfernen. Das Abzentrifugieren dieses Niederschlages war erforderlich, da dieser einerseits die Pipettierbarkeit und Injizierbarkeit der Proben beeinflusste und sich andererseits auch im Injektor des Autosamplers ablagerte. Da im Niederschlag kein Ruthenium nachgewiesen wurde, konnte der Überstand zur Quantifizierung herangezogen werden. Dieser wurde dazu mit 6,5 %iger Salpetersäure in den entsprechenden Konzentrationsbereich verdünnt. Im Kap. 3.5.2 findet sich eine ausführliche Beschreibung der Probenaufarbeitung für die Quantifizierung von Ruthenium sowohl im Plasma als auch im Urin.

#### 4.2.3 Methodvalidierung

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methoden zur Bestimmung von Ruthenium in Plasma und Urin wurden gemäß internationalen Richtlinien validiert<sup>165</sup>.

*Selektivität*

Der Vergleich der Spektrogramme (Abb. 4.13 bis Abb. 4.18) nach rutheniumfreier aufgearbeiteter Matrices (Abbildungsteil **A**) und der jeweils niedrigsten Kalibratoren (Abbildungsteil **B**) spiegelt die hohe Selektivität der GF-AAS-Methoden wider.

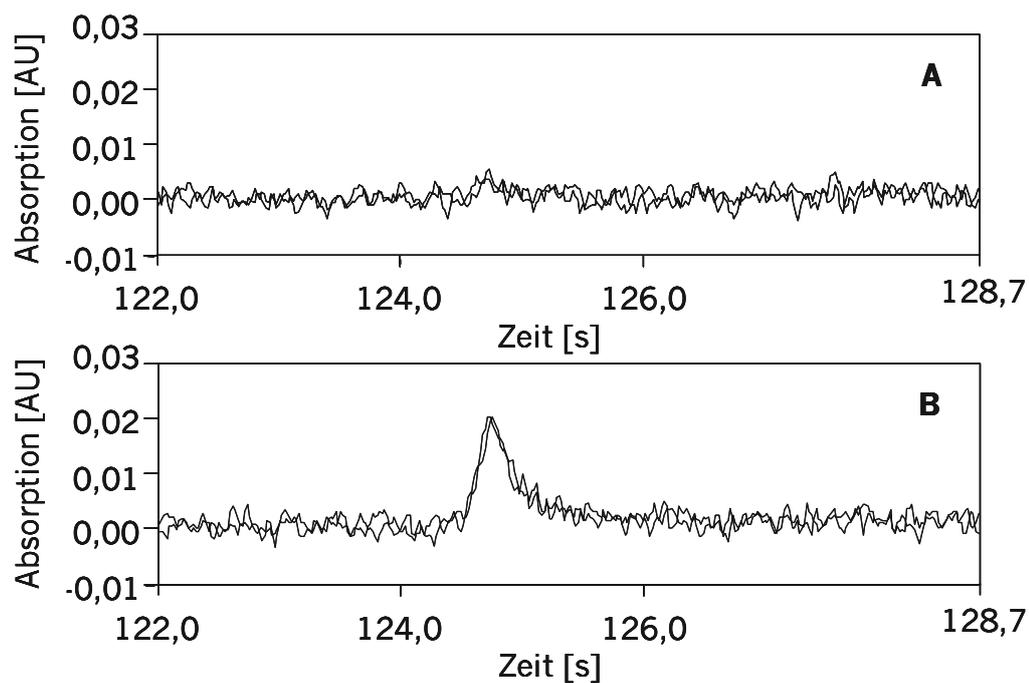


Abb. 4.13 Spektrogramme **Plasma** für den Kalibrierbereich 30 - 300  $\mu\text{g/L}$ : **A** Rutheniumfreie Matrix, **B** Kalibrator 30  $\mu\text{g/L}$

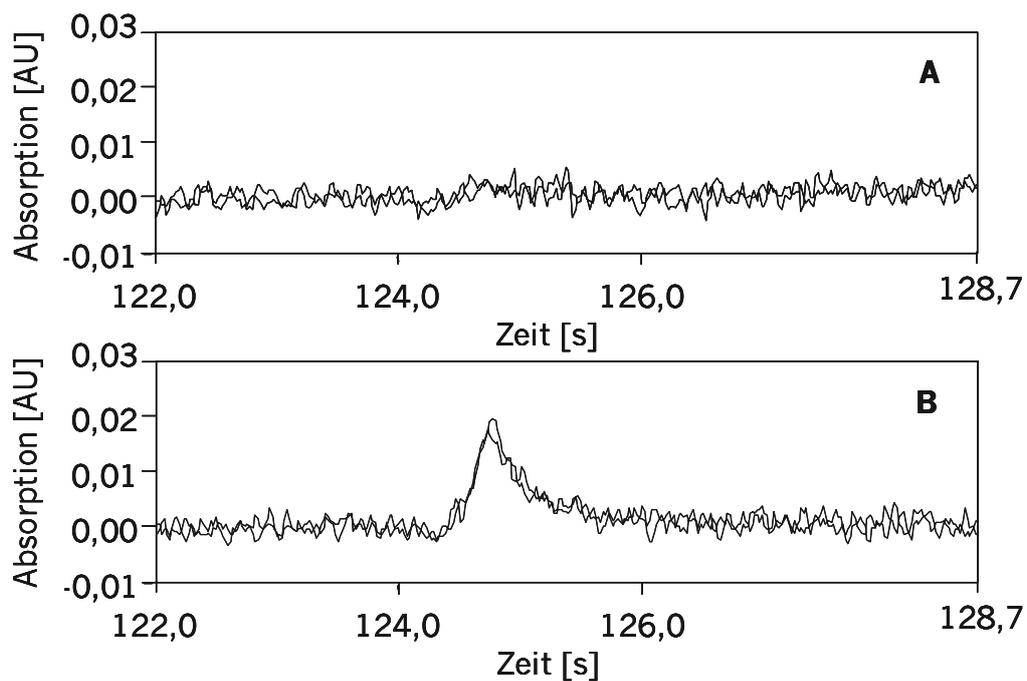


Abb. 4.14 Spektrogramme **Plasma** für den Kalibrierbereich 300 - 3000 µg/L: **A** Rutheniumfreie Matrix, **B** Kalibrator 300 µg/L

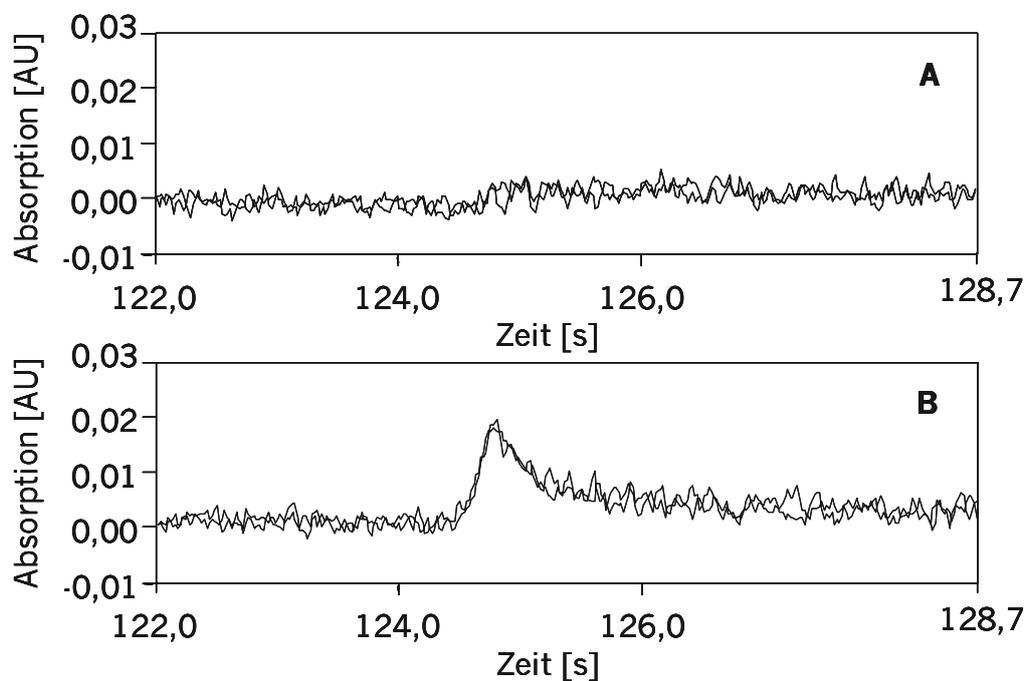


Abb. 4.15 Spektrogramme **Plasma** für den Kalibrierbereich 3000 - 60000 µg/L: **A** Rutheniumfreie Matrix, **B** Kalibrator 3000 µg/L

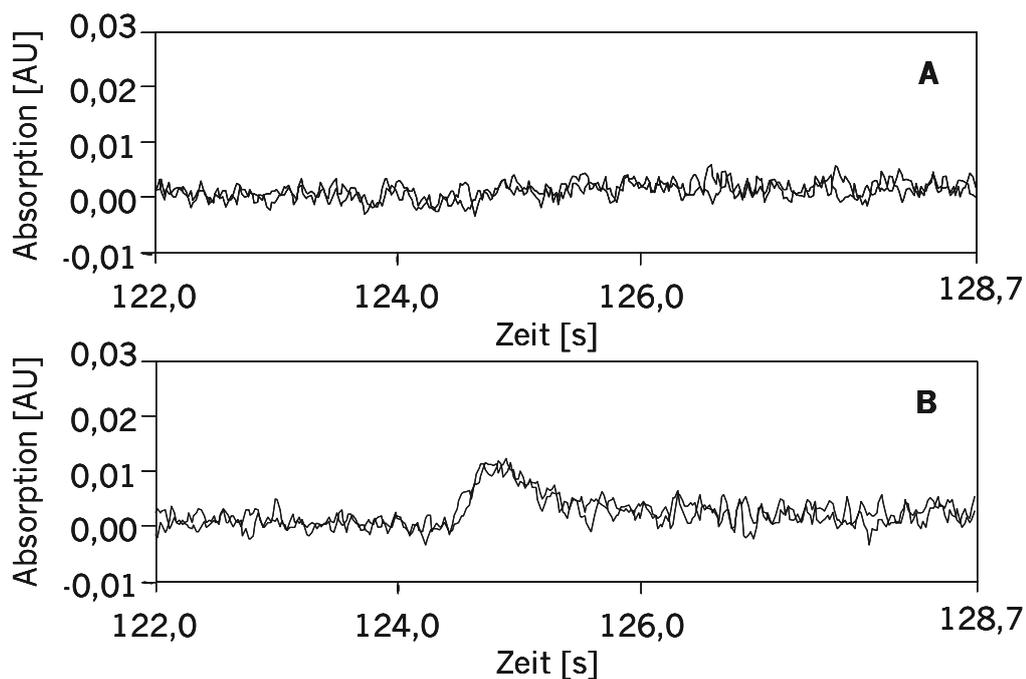


Abb. 4.16 Spektrogramme **Urin** für den Kalibrierbereich  
3 - 60  $\mu\text{g/L}$ : **A** Rutheniumfreie Matrix, **B** Kalibrator 3  $\mu\text{g/L}$

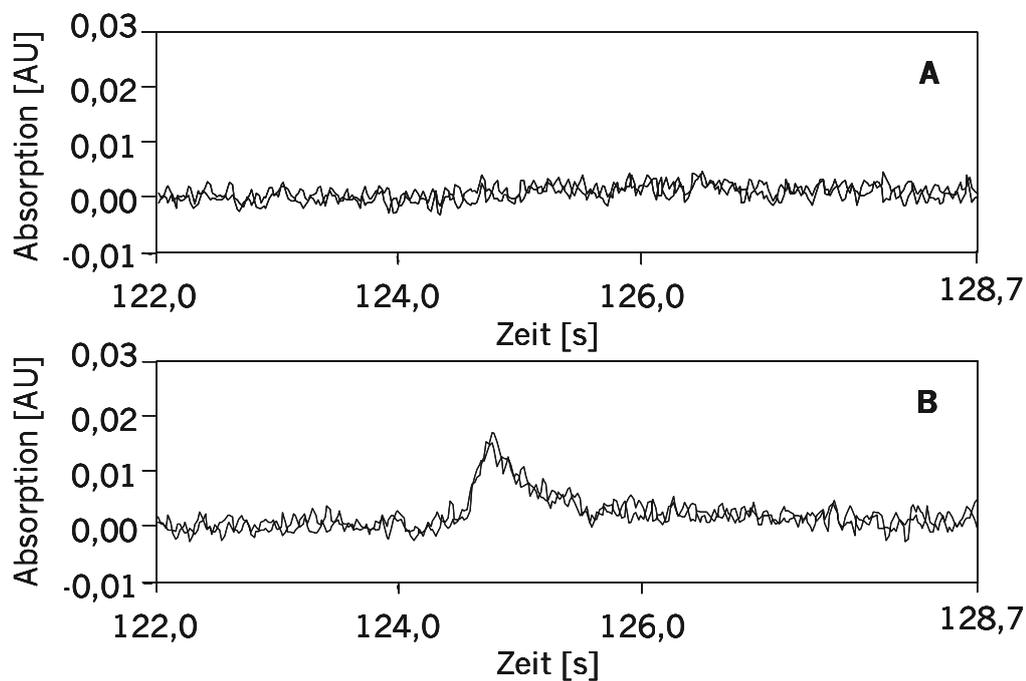


Abb. 4.17 Spektrogramme **Urin** für den Kalibrierbereich  
60 - 1200  $\mu\text{g/L}$ : **A** Ruthenium-freie Matrix, **B** Kalibrator 60  $\mu\text{g/L}$

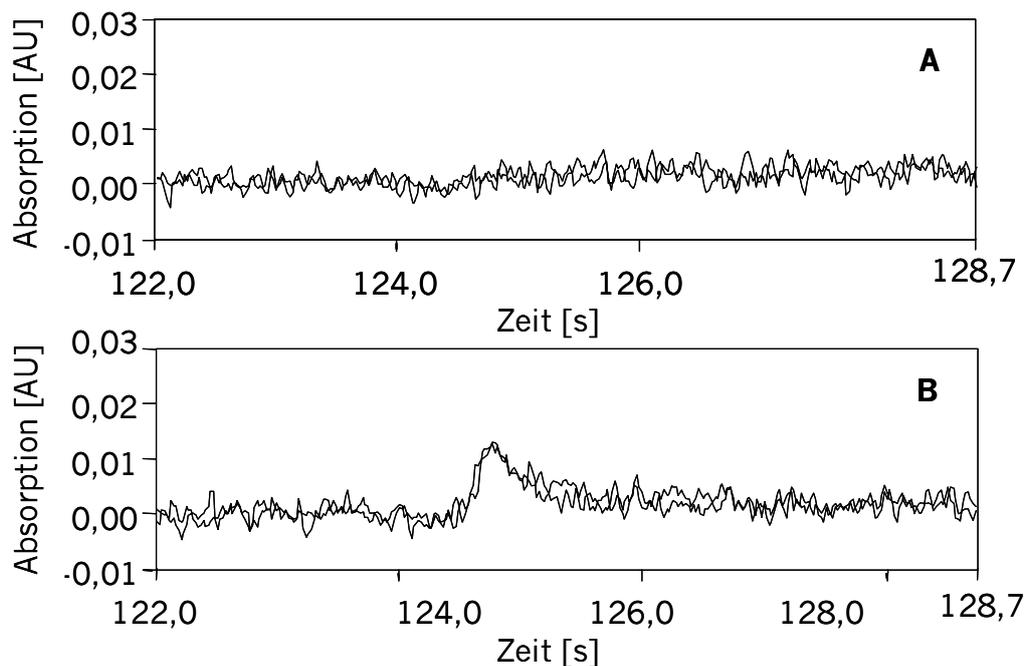


Abb. 4.18 Spektrogramme **Urin** für den Kalibrierbereich 1200 - 24000  $\mu\text{g/L}$ : **A** Rutheniumfreie Matrix, **B** Kalibrator 1200  $\mu\text{g/L}$

Während der Signalaufzeichnung im Zeitraum von der 122,0 bis 128,7 s waren keine Störsignale erkennbar.

#### *Stabilität*

Mit der Untersuchung der Einfrier-/Auftaustabilität der unaufgearbeiteten Proben sollte der Einfluss großer Temperaturschwankungen zwischen Lagerung ( $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) und Bestimmung ( $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ /Raumtemperatur) überprüft werden. Als Referenz diente jeweils eine frisch hergestellte Probe, die in der Zusammensetzung den zu untersuchenden Proben entsprach. Es wurden ein, zwei und drei Einfrier-/Auftauzyklen untersucht. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Tab. 4.10 zusammengefasst.

Tab. 4.10 Einfrier-/Auftaustabilität der beschriebenen Methoden (MW, n=3)

<b>Matrix</b>	<b>Konzentration [µg/L]</b>	<b>Zyklus 1</b>	<b>Zyklus 2</b>	<b>Zyklus 3</b>
Plasma	200	98,5	99,6	94,5
	50000	96,9	103,6	99,1
Urin	9	108,3	106,4	109,1
	20000	96,6	95,6	96,2

Es konnte kein nennenswerter Einfluss durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen auf die Stabilität des Analyten in den Proben beobachtet werden. Die Stabilität schwankte für alle Matrices im Bereich von 94,5 % und 109,1 %. Die Abweichungen lagen im Rahmen der Methodenpräzision.

Die Aufarbeitung der Proben sowie die Herstellung der Kalibratoren und QC-Proben erfolgten stets direkt vor deren Bestimmung. Da diese Proben und Lösungen somit zu keinem Zeitpunkt unterhalb der Raumtemperatur gelagert wurden, konnte auf die Bestimmung der Einfrier-/Auftaustabilität für diese Proben verzichtet werden.

Durch die Überprüfung der Stabilität von Ruthenium in unaufgearbeiteten Proben bei Raumtemperatur wurde der Zustand vom Auftauen bis zur Probenaufarbeitung charakterisiert.

Tab. 4.11 Stabilität [%] von Ruthenium in unaufgearbeiteten Plasma- bzw. Urinproben, gelagert bei Raumtemperatur (MW, n=3)

<b>Matrix</b>	<b>Konzentration [µg/L]</b>	<b>Zeit [h]</b>					
		<b>0,5</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>8</b>
Plasma	200	103,6	102,9	102,3	103,2	100,8	101,9
	50000	103,3	101,0	104,1	102,7	104,3	104,9
Urin	10	105,2	100,7	106,4	108,9	112,8	124,3
	20000	96,3	98,3	98,5	98,4	96,6	93,9

An den in Tab. 4.11 zusammengefassten Ergebnissen ist erkennbar, dass auch die Lagerung der unaufgearbeiteten Proben bei Raumtemperatur ohne Einfluss war. Die Abweichungen von -6,1 % bis 12,8 % lagen im Rahmen der Methodenpräzision.

Tab. 4.12 Stabilität [%] von Ruthenium in aufgearbeiteten Plasma- bzw. Urinproben, gelagert bei Raumtemperatur – Autosampler-Stabilität (MW, n=3)

Matrix	Konzentration [µg/L]	Zeit [h]					
		0,5	1	2	4	6	8
Plasma	100	100,2	100,9	98,6	101,0	102,4	103,3
	50000	92,8	98,5	108,7	112,2	111,1	103,7
Urin	10	102,9	101,7	109,1	104,0	104,8	108,8
	20000	101,3	99,7	101,4	103,5	108,2	104,2

In Tab. 4.12 finden sich die Ergebnisse der Untersuchung zur Stabilität der aufgearbeiteten Proben während des Messvorgangs, d.h. während ihrer Lagerung auf dem Autosampler. Für den Beobachtungszeitraum von acht Stunden ist ausreichende Stabilität gewährleistet.

*Wiederfindung*

Mit der Untersuchung der Wiederfindung wurde der Einfluss der Probenmatrix auf das Messsignal charakterisiert. Hierbei wurden aufgearbeitete Proben der einzelnen Matrices gegen wässrige Lösungen äquivalenter Rutheniumkonzentrationen vermessen. Tab. 4.13 fasst die Ergebnisse zusammen.

Tab. 4.13 Wiederfindung [%] in Plasma and Urin (MW  $\pm$  SD, n=3)

Konzentration [ $\mu\text{g/L}$ ]	Plasma	Urin
10	118,2 $\pm$ 3,1	n.b.
25	102,9 $\pm$ 2,3	n.b.
9	n.b.	166,6 $\pm$ 8,1
30	n.b.	170,4 $\pm$ 14,3
50	n.b.	176,9 $\pm$ 22,6

n.b. nicht bestimmt

Die Zusammensetzung der Matrix hat einen deutlichen Einfluss auf die Signalhöhe. So konnten mit steigendem Salpetersäureanteil höhere Signale beobachtet werden. Wiederfindungsraten zwischen 103 und 118 % im Plasma sowie zwischen 167 und 177 % im Urin machen eine matrixadaptierte Kalibrierung unerlässlich.

#### *Messbereich und Bestimmungsgrenze*

Im Rahmen der Studie zur Charakterisierung der Pharmakokinetik von KP1019 waren Rutheniumkonzentrationen zu erwarten, die sich über einen Bereich von 30 – 60000  $\mu\text{g/L}$  im Plasma und 3 – 24000  $\mu\text{g/L}$  im Urin erstreckten. Da für derart große Konzentrationsbereiche bei der GF-AAS keine Linearität zu erwarten war, wurden drei Arbeitsbereiche definiert. Der Zusammenhang zwischen den nominalen Konzentrationen und den entsprechenden Absorptionen wurde mittels linearer Regression beschrieben. Für Kalibrierbereiche, die einen Faktor von 20 umfassten, war Varianzenhomogenität nicht gegeben. Daher wurde für die Bestimmung von Ruthenium in den beschriebenen Matrices Plasma und Urin ein Wichtungsfaktor (1/Konzentration) angewendet.

Als LLOQ wurde für die einzelnen Matrices jeweils die untere Grenze der Arbeitsbereiche bestätigt. Tab. 4.14 zeigt die Ergebnisse hinsichtlich Richtigkeit und Präzision.

Tab. 4.14 Präzision (RSD) und Richtigkeit (RE) am LLOQ (MW+SD, n=6)]

Matrix	Konzentrationsbereich [ $\mu\text{g/L}$ ]	LLOQ [ $\mu\text{g/L}$ ]	RE [%]	RSD [%]
Plasma	30 – 300	30	-10,1	9,8
	300 – 3000	300	-3,9	3,5
	3000 – 60000	3000	-4,4	5,4
Urin	3 – 60	3	+16,6	3,2
	60 – 1200	60	+16,6	4,2
	1200 – 24000	1200	+19,9*	3,7

\*n=5

Es konnte gezeigt werden, dass das jeweilige LLOQ mit hinreichender Präzision und Richtigkeit erfasst werden konnte.

#### Linearität

Insgesamt wurden je sechs Kalibriergeraden in den einzelnen Matrizes und Arbeitsbereichen für die Begutachtung der Linearität ausgewertet. (s. Tab. 4.15)

Tab. 4.15 Linearitätskriterien der Kalibriergeraden für die Bestimmung von Ruthenium in Plasma und Urin (MW, n=6)

Matrix	Konzentrationsbereich [ $\mu\text{g/L}$ ]	Korrelationskoeffizient r	RSD [%]
Plasma	30 – 300	0,9996	0,02
	300 – 3000	0,9992	0,06
	3000 – 60000	0,9995	0,02
Urin	3 – 60	0,9991	0,15
	60 – 1200	0,9991	0,14
	1200 – 24000	0,9993	0,08

Die mittleren Korrelationskoeffizienten, die zwischen 0,9991 und 0,9996 lagen, konnten mit einer RSD von maximal 0,15 % reproduzierbar ermittelt werden. Die Abb. 4.19 und Abb. 4.20 zeigen charakteristische Kalibriergeraden mit 95 %-Prognosebereich für die einzelnen Matrices.

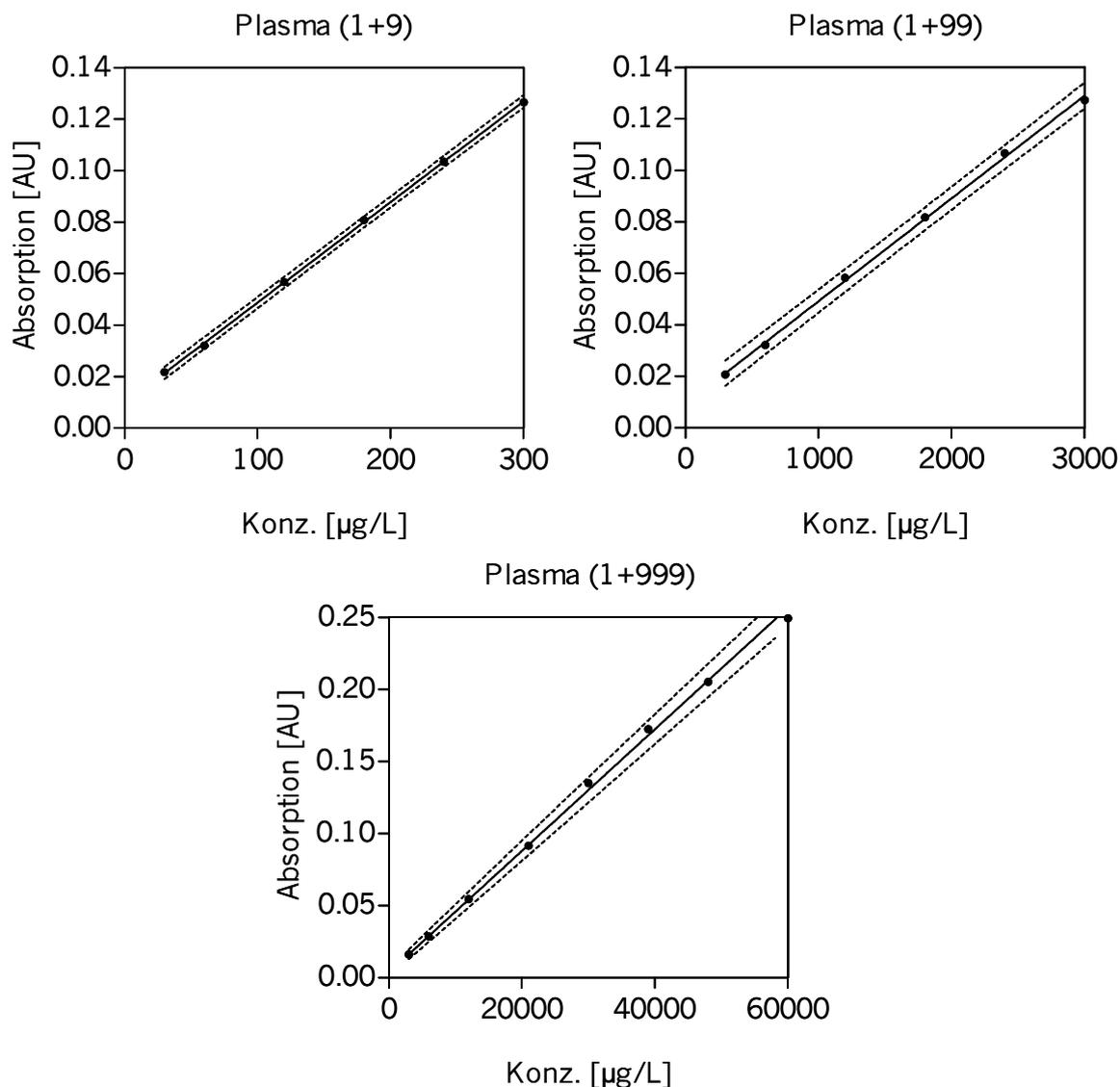


Abb. 4.19 Charakteristische Kalibriergeraden zur Bestimmung von Ruthenium im **Plasma** (Verdünnung 1+9 und 1+99 ungewichtet, Verdünnung 1+999 Wichtung 1/x)  
 — berechnete Kalibriergerade, --- 95 %-Prognosebereich

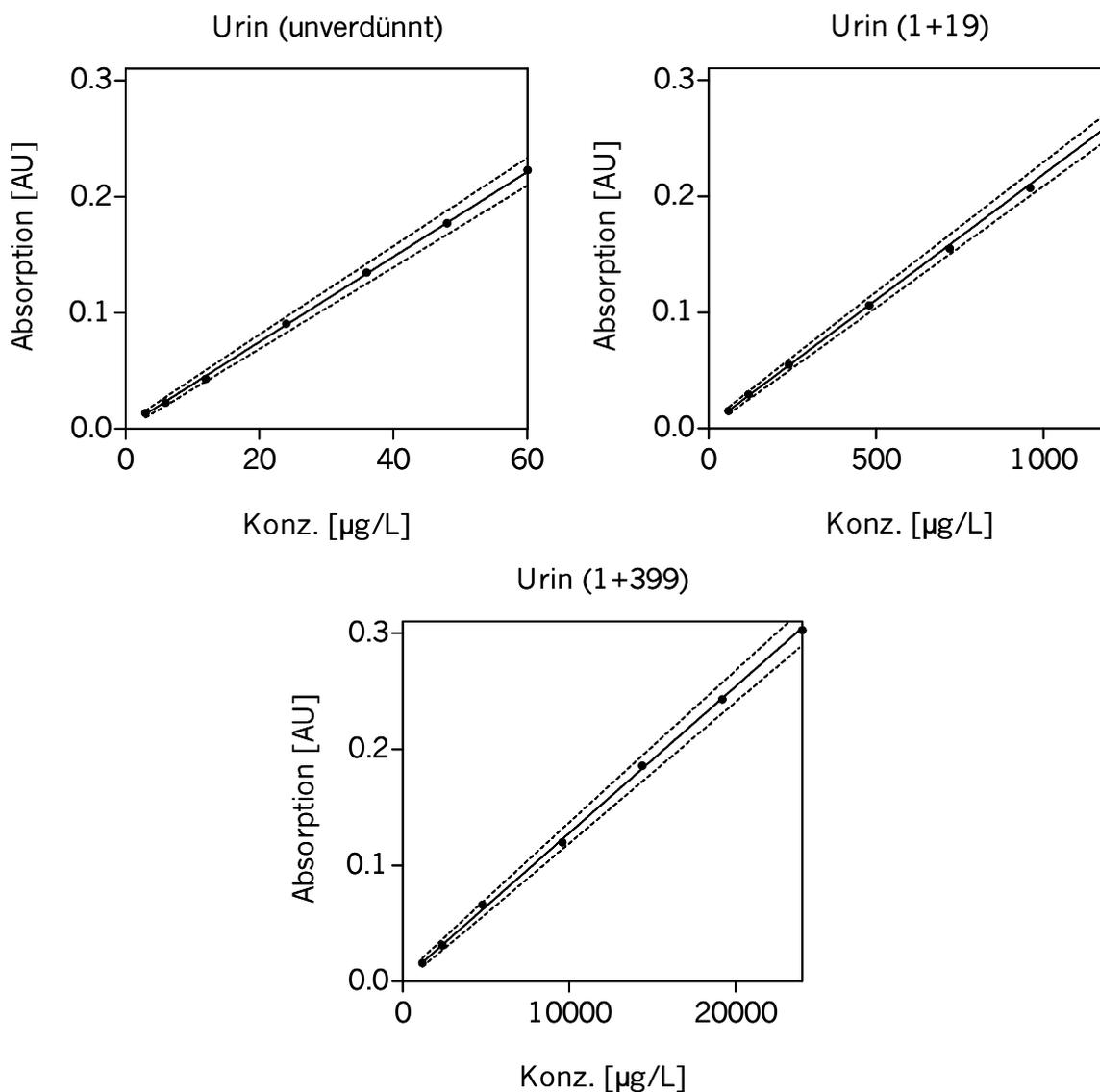


Abb. 4.20 Charakteristische Kalibriergeraden zur Bestimmung von Ruthenium im **Urin** (Wichtung 1/x)  
— berechnete Kalibriergerade, --- 95 %-Prognosebereich

#### *Richtigkeit und Präzision*

Die QC-Proben, die je Konzentration und Methode sechsmal unabhängig voneinander am selben Tag hergestellt und aufgearbeitet wurden, konnten mit einer Richtigkeit (RE) von -15,1 bis +10,0 % bestimmt werden. Die Impräzision (RSD) lag bei allen Experimenten unter 10,9 %. Auch die jeweiligen Kalibratoren konnten mit einer Richtigkeit bestimmt werden, die den Anforderungen der geltenden Richtlinien entsprach. Die Tab. 4.16 und

Tab. 4.17 fassen die Ergebnisse der Untersuchungen zur *Within-day*-Richtigkeit und -Präzision zusammen.

Tab. 4.16 *Within-day*-Richtigkeit (RE in %) der GF-AAS-Methoden zur Bestimmung von Ruthenium in Plasma and Urin (Spannweite)

Matrix	Konzentrationsbereich [ $\mu\text{g/L}$ ]	Kalibratoren	QC-Proben
Plasma	30 – 300	-11,4 – +6,0	-15,1 – -12,3
	300 – 3000	-5,4 – +2,0	-12,8 – +3,1
	3000 – 60000	-3,8 – +3,3	+0,4 – +10,0
Urin	3 – 60	-4,8 – +6,5	-5,4 – +2,2
	60 – 1200	-2,1 – +1,5	-8,0 – +3,7
	1200 – 24000	-1,3 – +0,8	-1,0 – +4,0

Tab. 4.17 *Within-day*-Präzision (RSD in %) der GF-AAS-Methoden zur Bestimmung von Ruthenium in Plasma and Urin (Spannweite)

Matrix	Konzentrationsbereich [ $\mu\text{g/L}$ ]	Kalibratoren	QC-Proben
Plasma	30 – 300	n.b.	7,2 – 9,1
	300 – 3000	n.b.	1,0 – 10,9
	3000 – 60000	n.b.	3,2 – 5,3
Urin	3 – 60	n.b.	3,3 – 6,7
	60 – 1200	n.b.	0,6 – 2,4
	1200 – 24000	n.b.	1,0 – 2,9

n.b. nicht bestimmt

Die Ergebnisse der Untersuchung zur *Between-day*-Richtigkeit und Präzision sind in den Tab. 4.18 und Tab. 4.19 zusammengestellt.

Tab. 4.18 *Between-day*-Richtigkeit (RE %) der GF-AAS-Methoden zur Bestimmung von Ruthenium in Plasma and Urin (Spannweite)

<b>Matrix</b>	<b>Konzentrationsbereich [<math>\mu\text{g/L}</math>]</b>	<b>Kalibratoren</b>	<b>QC-Proben</b>
Plasma	30 – 300	-1,8 – +0,9	-7,6 – +0,8
	300 – 3000	-7,3 – +3,1	-5,4 – +5,3
	3000 – 60000	-2,9 – +2,2	-7,0 – +1,3
Urin	3 – 60	-4,5 – +7,0	-4,2 – +0,6
	60 – 1200	-2,3 – +3,5	-2,9 – -0,8
	1200 – 24000	+2,3 – +2,1	+0,1 – +2,1

Tab. 4.19 *Between-day*-Präzision (RSD) der GF-AAS-Methoden zur Bestimmung von Ruthenium in Plasma and Urin (Spannweite)

<b>Matrix</b>	<b>Konzentrationsbereich [<math>\mu\text{g/L}</math>]</b>	<b>Kalibratoren</b>	<b>QC-Proben</b>
Plasma	30 – 300	0,7 – 4,2	1,7 – 6,9
	300 – 3000	0,7 – 5,9	3,5 – 6,8
	3000 – 60000	1,1 – 3,3	2,4 – 5,4
Urin	3 – 60	1,2 – 7,0	2,3 – 5,2
	60 – 1200	2,1 – 4,3	1,4 – 2,7
	1200 – 24000	2,0 – 5,9	2,9 – 7,1

Die Abweichung der zurückgerechneten Konzentrationen der Kalibratoren von ihren nominalen Konzentrationen betrug für alle Matrizes zwischen -7,3 % und +7,0 % (RE) und erfüllte somit die Anforderungen der FDA. Ein ähnliches Bild ergab sich für die QC-Proben, die mit RE zwischen -7,6 und +5,3 % innerhalb der geforderten  $\pm 15$  % lagen. Auch die Anforderungen in Bezug auf die Präzision wurden erfüllt. So wurden die QC-Proben mit maximal 7,1 % und die Kalibratoren mit maximal 7,0 % RSD bestimmt.

### 4.3 Projekt III: Pharmakokinetik von KP46

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die pharmakokinetischen Eigenschaften von KP46 in Plasma, Vollblut und in Urin untersucht. KP46 ist ein per oral applizierbarer Galliumkomplex und wurde bezogen auf die Körperoberfläche dosiert. Insgesamt wurden sieben Patienten in der in Kap 3.6 beschriebenen Dosiseskaltionsstudie behandelt und erhielten KP46 in Form überzogener Tabletten in den Stärken 10, 20 und 30 mg. Die Dosis wurde gemäß Protokoll im Bereich von 30 bis 480 mg/m<sup>2</sup> KP46 bzw. 4,17 bis 66,81 mg/m<sup>2</sup> Gallium eskaliert. Als Folge der Dosiseskaltation stieg die Anzahl der einzunehmenden Tabletten auf bis zu 35 Tabletten. Tab. 4.20 fasst die verabreichten Dosen und Tablettenanzahl zusammen.

Tab. 4.20 Individuelle Dosierungen von KP46 und Gallium der im Rahmen der Studie behandelten Patienten 1–7

Patient	Dosis KP46/BSA (mg/m <sup>2</sup> )	Dosis KP46 (mg)	Dosis <sub>Gallium</sub> (mg)	Anzahl der Tabletten
1	30	60	8,33	6
2	30	50	6,94	5
3	30	50	6,94	5
4	60	90	12,495	8
5	120	220	30,54	8
6	240	440	61,09	15
7	480	900	124,95	35

BSA Körperoberfläche (*body surface area*)

Die maximal tolerierbare Dosis, die den primären Endpunkt der in Kap. 3.6 beschriebenen Studie darstellte, konnte nicht ermittelt werden, da eine weitere Dosiseskaltation nicht praktikabel war. Für den sekundären Endpunkt, die Charakterisierung der Pharmakokinetik von KP46, wurden insgesamt 178 Plasmaproben, 95 Vollblutproben und 58 Urinproben gesammelt und mit Hilfe der in Kap. 3.4 beschriebenen, validierten GF-AAS-Methoden quantifiziert. Die Kriterien der Validierung konnten auch unter der

Routineanwendung eingehalten werden. Da mit Hilfe der GF-AAS eine Differenzierung der einzelnen galliumhaltigen Verbindungen bzw. Spezies nicht möglich ist und die ermittelten Konzentrationen daher den die Gesamtgalliumkonzentration darstellen, beziehen sich die im folgenden aufgeführten pharmakokinetischen Parameter immer auf das gesamt in der jeweiligen Matrix vorhandene Gallium.

### 4.3.1 Konzentrations-Zeit-Profile

Insgesamt wurden jedem Patienten 14 Dosen KP46 in einem Dosierungsintervall von 24 Stunden verabreicht. Das detaillierte Dosierungs- und Probenentnahmeschema wird in Kap. 3.6 beschrieben. Die Konzentrations-Zeit-Profile im Plasma nach der ersten und der letzten KP46-Gabe sind in Abb. 4.21 dargestellt.

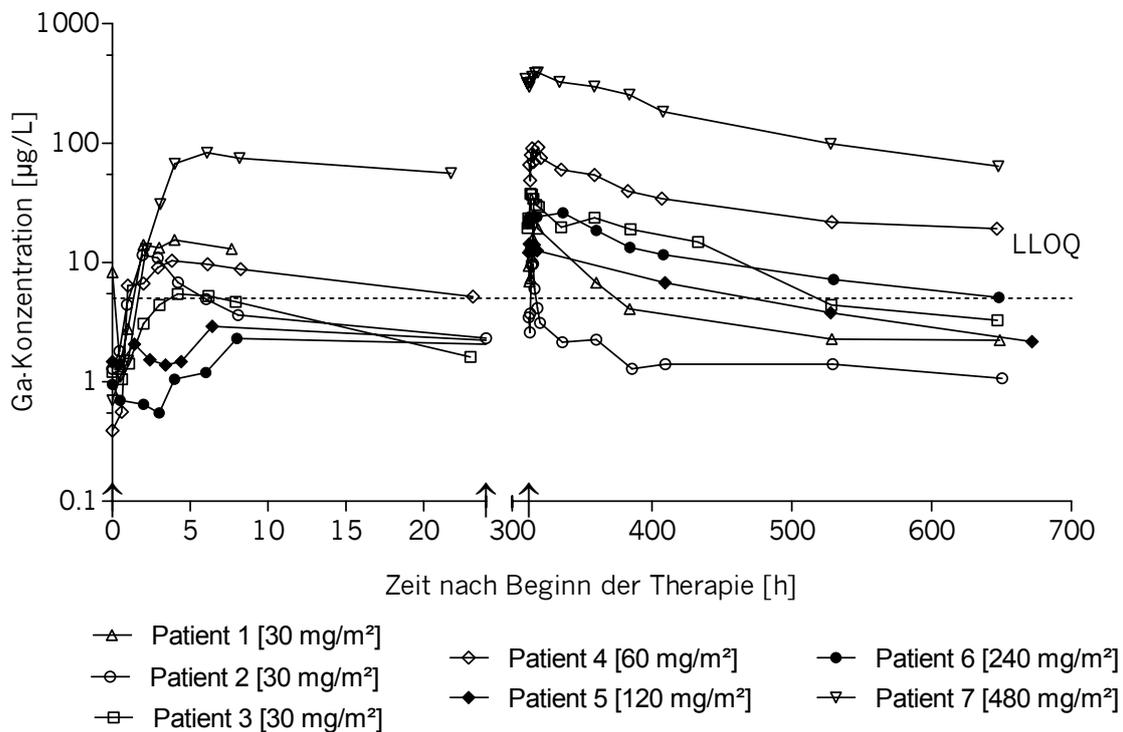


Abb. 4.21 Individuelle Galliumkonzentrations-Zeit-Verläufe im Plasma aller Patienten nach der ersten und letzten KP46-Gabe (↑ KP46-Gabe; LLOQ: Bestimmungsgrenze)

Die Punkte entsprechen den gemessenen Konzentrationen. Zusätzlich wurden die theoretischen Dosierungszeitpunkte als Pfeile sowie das LLOQ als gestrichelte Linie aufgetragen. Die individuellen graphischen Darstellungen befinden sich in Anhang A. Abb. 4.22 stellt exemplarisch den Galliumkonzentrations-Zeit-Verlauf im Plasma dem im Vollblut gegenüber.

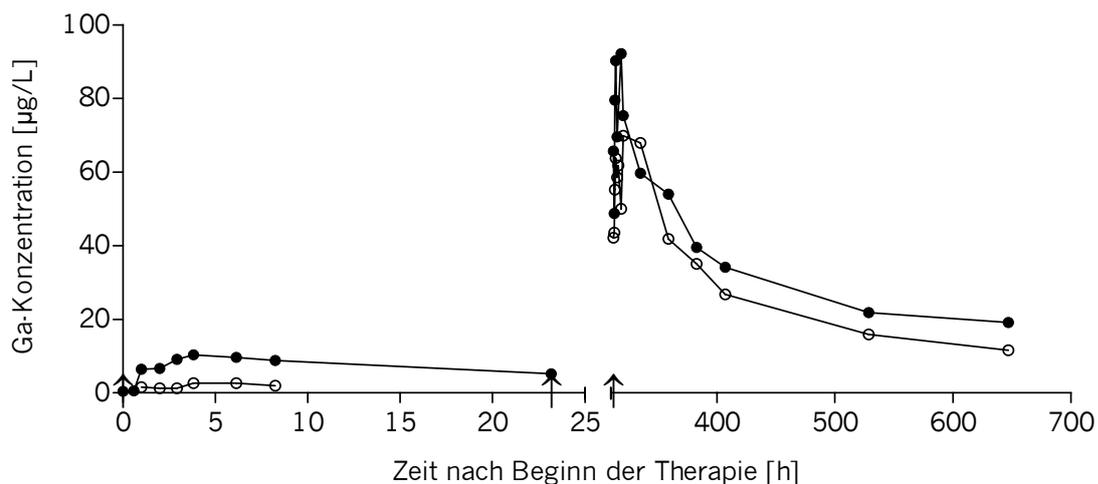


Abb. 4.22 Galliumkonzentrations-Zeit-Verlauf in Vollblut und Plasma nach der ersten und letzten Gabe von 60 mg/m<sup>2</sup> KP46

Aus Abb. 4.22 lässt sich erkennen, dass sich die Konzentrations-Zeit-Verläufe von Gallium in Vollblut und Plasma nur geringfügig unterscheiden. Die Konzentrationen im Vollblut sind geringer als im Plasma, was auf einer geringeren Verteilung von Gallium in die korpuskulären Bestandteile des Vollblutes hindeutet. In beiden Matrices traten in Abhängigkeit von der verabreichten Dosis Lag-Zeiten von bis zu 4 h auf. Die maximalen Konzentrationen ( $C_{max}$ ) in Plasma und Vollblut betragen zwischen 2,3 und 83,0 µg/L bzw. 1,02 und 62,2 µg/L nach der ersten Applikation. Der deutlich erkennbare flache Verlauf der Galliumkonzentration in Plasma und Vollblut lassen auf eine langsame Elimination von Gallium schließen, sodass die Kumulation nach Mehrfachgabe sehr ausgeprägt ist. Die  $C_{max}$ -Werte nach der 14. Applikation entsprechen teilweise dem Zehnfachen, verglichen mit denen der ersten Applikation. Nach Erreichen von  $C_{max}$  fallen die Konzentrationen sowohl im Plasma als auch im Vollblut langsam wieder ab,

dabei zeigen die Patienten ein sehr heterogenes Bild. Auffällig ist, dass die Patienten 5 und 6 nach der letzten Applikation  $C_{max}$ -Werte im Bereich der Patienten 1 bis 3 aufwiesen, obwohl sie die drei bzw. vierfache Dosis im Vergleich zu den Patienten 1 bis 3 erhielten.

Die Ausscheidung im Urin scheint eine untergeordnete Rolle bei der Elimination von Gallium zu spielen. Die kumulativ im ersten Dosierungsintervall ausgeschiedenen Galliummengen waren mit weniger als 1 % der applizierten Dosis verschwindend gering, wobei die fehlenden Kenntnisse bezüglich der KP46-Bioverfügbarkeit die Beurteilung dieser Daten limitieren.

#### 4.3.2 Individuelle Pharmakokinetik

Aufgrund der geringen Patientenzahl und den sehr heterogenen Konzentrations-Zeit-Verläufen wurden die pharmakokinetischen Parameter im Plasma und Vollblut mittels nicht-kompartimenteller Datenanalyse abgeschätzt. Diese wurde unter der Verwendung von WinNonlin® Professional (Pharsight Corporation, Version 5.0.1, 2005) durchgeführt. Die pharmakokinetischen Parameter in Plasma, Vollblut und Urin wurden jeweils für die erste und die letzte KP46-Gabe getrennt ermittelt. In Tab. 4.21 und Tab. 4.22 sind die ermittelten pharmakokinetischen Parameter im Plasma nach der ersten Gabe zusammengestellt. Darüber hinaus beinhaltet Tab. 4.21 die Ergebnisse zur renalen Elimination, die gemäß den in den Gleichungen Gl. 3.9 und Gl. 3.10 (s. Kap. 3.3.1) beschriebenen Zusammenhängen berechnet wurden. Da sich nach der ersten KP46-Gabe ein Teil der Galliumkonzentrationen im Plasma unterhalb des LLOQ befand, konnten die pharmakokinetischen Parameter nur für die Patienten 2, 3, 4 und 7 berechnet werden. Die terminale Halbwertszeit  $t_{1/2z}$  wurde unter Berücksichtigung von mindestens drei terminalen Zeitpunkten ermittelt. Jedoch wurde  $t_{1/2z}$  vermutlich deutlich unterschätzt, da wie aus der graphischen Darstellung (Abb. 4.21) zu erkennen ist, der Konzentrations-Zeit-Verlauf sehr durch die nächste Dosierung abgeschnitten wird.

Tab. 4.21 Pharmakokinetische Parameter von Gallium in Plasma und Urin nach der ersten Gabe von KP46

	30 mg/m <sup>2</sup>			60 mg/m <sup>2</sup>	120 <sup>#</sup> mg/m <sup>2</sup>	240 mg/m <sup>2</sup>	480 mg/m <sup>2</sup>
	Pat. 1	Pat. 2	Pat. 3	Pat. 4	Pat. 5	Pat. 6	Pat. 7
C <sub>max</sub> [µg/L]	15,5	11,5	5,5	10,4	13,5	2,3	83,0
AUC <sub>0-24h</sub> [µg·h/L] <sup>1</sup>	363,6	99,1	79,3	170,9	57,4	43,6	1283,0
AUC <sub>∞</sub> [µg·h/L] <sup>1</sup>	n.a.	162,1	102,5	315,0	n.a.	n.a.	3619,6
CL/F [L/h] <sup>1</sup>	n.a.	42,8	67,7	39,7	n.a.	n.a.	34,5
t <sub>1/2z</sub> [h] <sup>1</sup>	n.a.	18,8	9,9	19,3	n.a.	n.a.	29,0
V <sub>Z</sub> /F [L] <sup>1</sup>	n.a.	1163,5	966,1	1101,8	n.a.	n.a.	1444,4
CL <sub>R</sub> [L/h] <sup>*</sup>	n.b.	0,095	0,206	0,034	n.b.	n.b.	0,031
Rel. U <sub>∞</sub> [%] <sup>**</sup>	n.a.	0,222	0,304	0,086	n.a.	n.a.	0,090

<sup>1</sup> Galliumkonzentrationen im Plasma unterhalb des LLOQ wurden nicht herangezogen  
<sup>#</sup> unvollständige Urinsammlung

n.b. nicht berechnet, aufgrund fehlender Plasmakonzentrationen am Ende des Intervalls oder Galliumkonzentrationen im Urin waren unterhalb der Bestimmungsgrenze

n.a. nicht abgeschätzt, da λ<sub>z</sub> nicht ermittelt werden konnte

<sup>\*</sup> t<sub>0</sub> – t<sub>z</sub>, Intervall der kontinuierlichen Urinsammlung

<sup>\*\*</sup> relative ausgeschiedene kumulative Menge bezogen auf die erste Dosis

Das terminale Verteilungsvolumen V<sub>Z</sub>/F mit Werten zwischen 966,1 und 1444,4 L wies eine relativ geringe Variabilität (17 % RSD) auf. Auch die ermittelten Werte für CL/F zeigten unter Berücksichtigung des geringen Stichprobenumfangs mit 31 % RSD eine geringe bis moderate Variabilität. Die in Abb. 4.21 erkennbaren parallelen Verläufe der terminalen Phasen könnten auf lineare Eliminationsprozesse hinweisen. Dem stehen auf den ersten Blick die Ergebnisse der pharmakokinetischen Parameter, die nach der 14. Gabe von KP46 ermittelt wurden, entgegen. Sie sind in Tab. 4.22 zusammengefasst. Für V<sub>Z</sub>/F wurden Werte zwischen 1468 L bis 24300 L ermittelt. Für die Patienten 2, 3, 4 und 7, für die die pharmakokinetischen Parameter nach der ersten Applikation ermittelt werden konnten, wurden nach der 14. Applikation deutlich abweichende V<sub>Z</sub>/F- und CL/F-Werte ermittelt. Betrachtet man t<sub>1/2z</sub> nach der 14. Gabe, wurden bis zu 20mal höhere Werte bestimmt als nach der ersten Gabe. Durch den längeren

Beobachtungszeitraum ließ sich die Halbwertszeit mit einer größeren Sicherheit bestimmen. Die deutlich längere  $t_{1/2z}$  spiegelt sich in einer deutlich kleineren CL/F und einem höheren  $V_z/F$  wider.

Tab. 4.22 Pharmakokinetische Parameter von Gallium in Plasma und Urin nach der 14. Gabe von KP46

	30 mg/m <sup>2</sup>			60 mg/m <sup>2</sup>	120 mg/m <sup>2</sup>	240 mg/m <sup>2</sup>	480 mg/m <sup>2</sup>
	Pat. 1	Pat. 2	Pat. 3	Pat. 4	Pat. 5	Pat. 6	Pat. 7
$C_{max}$ [µg/L]	25,0	9,7	37,7	92,1	14,3	26,1	392,0
$AUC_{0-24h}$ [µg·h/L] <sup>1</sup>	384,3	87,1	638,6	1657,0	291,9	613,2	8553,1
CL/F [L/h] <sup>1</sup>	21,7	79,7	10,9	7,5	104,6	99,6	14,6
$t_{1/2z}$ [h] <sup>1</sup>	198,0	433,2	93,7	210,0	141,5	169,1	130,8
$V_z/F$ [L] <sup>1</sup>	6193	49821	1469	2285	21353	24300	2756
$CL_R$ [L/h] <sup>*</sup>	n.b.	0,145	0,033	0,098	n.b.	0,045	0,046

<sup>1</sup> Galliumkonzentrationen im Plasma unterhalb des LLOQ wurden nicht herangezogen

# unvollständige Urinsammlungen

n.b. nicht berechnet, aufgrund fehlender Plasmaproben am Ende des Urinsammlungsintervalls oder Galliumkonzentrationen < LLOQ

\*  $t_0 - t_z$ , Intervall der kontinuierlichen Urinsammlung

Insgesamt weisen die Parameter, die nach der 14. Gabe ermittelt wurden, eine größere Variabilität auf. Bei genauerer Betrachtung der Werte lassen sich zwei Gruppen erkennen, die in Tab. 4.22 verschieden farbig unterlegt sind. Mit einem Mann-Whitney-U-Test (Rangsummentest für ungepaarte Stichproben) wurde der Unterschied zwischen den beiden Gruppen hinsichtlich CL/F und  $V_z/F$  als signifikant (p=0,029) festgestellt.

Neben den Galliumkonzentrations-Zeit-Verläufen im Plasma standen auch Galliumkonzentrations-Zeit-Verläufe im Vollblut von drei Patienten zur pharmakokinetischen Datenanalyse zur Verfügung. Die Tab. 4.23 und Tab. 4.24 fassen die pharmakokinetischen Parameter analog zu der im Plasma für die erste und 14. Gabe getrennt zusammen.

Tab. 4.23 Pharmakokinetische Parameter in Vollblut nach der ersten Gabe von KP46

	<b>30 mg/m<sup>2</sup></b> (Pat. 3)	<b>60 mg/m<sup>2</sup></b> (Pat. 4)	<b>480 mg/m<sup>2</sup></b> (Pat. 7)
C <sub>max</sub> [µg/L]	1,02	2,63	62,2
t <sub>max</sub> [h]	7,92	6,13	6,08
AUC <sub>0-24h</sub> [µg·h/L]	n.b.	16,09	967,34
CL/F [L/h]	n.b.	262,50	42,01
t <sub>1/2z</sub> [h]	n.b.	10,57	31,63
V <sub>z</sub> /F [L]	n.b.	4002,41	1917,08

n.b. nicht berechnet

Tab. 4.24 Pharmakokinetische Parameter in Vollblut nach der 14. Gabe von KP46

	<b>30 mg/m<sup>2</sup></b> (Pat. 3)	<b>60 mg/m<sup>2</sup></b> (Pat. 4)	<b>480 mg/m<sup>2</sup></b> (Pat. 7)
C <sub>max</sub> [µg/L]	27,48	69,88	316,18
t <sub>max</sub> [h]	2,02	8,33	8,70
AUC <sub>0-24h</sub> [µg·h/L]	466,50	1472,13	6847,55
CL/F [L/h]	14,88	8,49	18,25
t <sub>1/2 λz</sub> [h]	151,23	197,86	116,59
V <sub>z</sub> /F [L]	3245,67	2422,84	3069,19

Es zeigte sich, dass sich V<sub>z</sub>/F, CL/F und t<sub>1/2 λz</sub> in etwa der im Plasma gefundenen Größenordnung bewegten. Das spricht für eine fehlende Kumulation von KP46 bzw. Gallium in den zellulären Bestandteilen des Blutes, wie den Erythrozyten.

### 4.3.3 Dosislinearität

Abb. 4.23 stellt den Zusammenhang zwischen der Dosis und der  $AUC_{0-24h}$  dar. Ausgehend von dieser graphischen Darstellung und den abgeschätzten pharmakokinetischen Parametern lassen sich keine Rückschlüsse auf eine mögliche lineare Pharmakokinetik von KP46 ziehen.

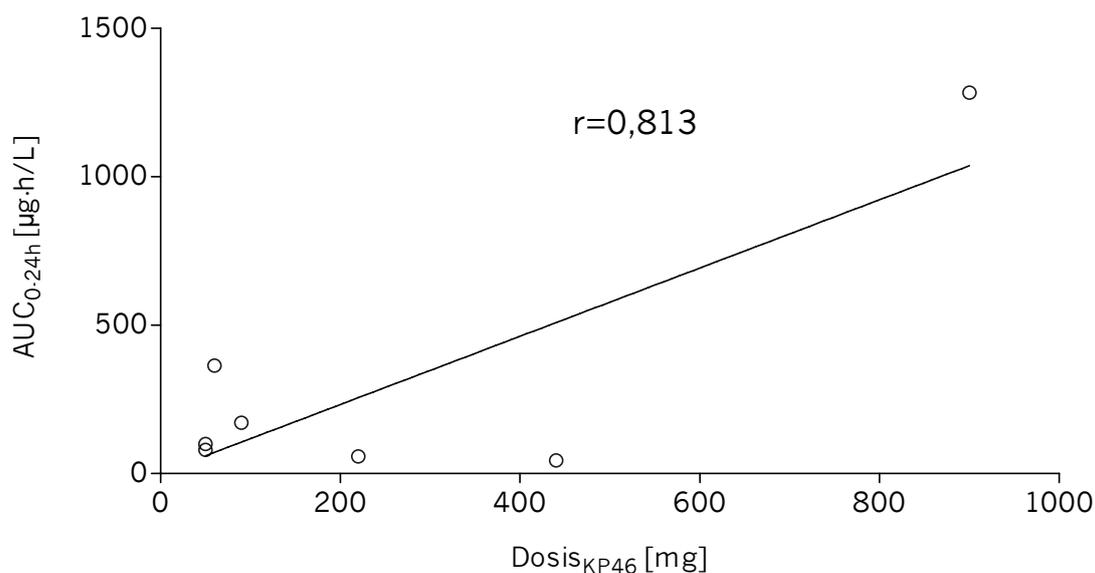


Abb. 4.23 Beziehung zwischen KP46-Dosis und der  $AUC_{0-24h}$  nach der ersten Gabe

## 4.4 Projekt IV: Pharmakokinetik von KP1019

Einen weiteren Schwerpunkt dieser Arbeit bildete die Charakterisierung der pharmakokinetischen Parameter von KP1019. Hierfür wurden zunächst insgesamt 248 Plasmaproben sowie 108 Urinproben von sieben Patienten, die im Rahmen der in Kap. 3.7 beschriebenen Phase I-Studie mit KP1019 behandelt wurden, untersucht. Die Rutheniumkonzentrationen in den beiden Matrices wurden mit Hilfe der in Kap. 3.5 beschriebenen und validierten GF-AAS-Methoden bestimmt. In allen Proben konnte Ruthenium mit der im Rahmen der Validierung ermittelten Richtigkeit und Präzision quantifiziert werden. Da GF-AAS-Analytik nur die Bestimmung des Gesamtrutheniums in den biologischen Matrices erlaubt, beziehen sich die im Folgenden

aufgeführten Parameter immer auf das gesamte in der jeweiligen Matrix vorhandene Ruthenium. Die Patienten wurden mit den in Tab. 4.26 aufgeführten KP1019- bzw. Ruthenium-Dosierungen behandelt.

Tab. 4.25 Individuelle Dosierungen von KP1019 und Ruthenium der im Rahmen der Studie behandelten Patienten

<b>Patient</b>	<b>Dosis<sub>KP1019</sub> (mg)</b>	<b>Dosis<sub>Ruthenium</sub> (mg)</b>
1	25	5,0
2	50	10,1
3	100	20,1
4	200	40,3
5	400	80,5
6	600	120,8
7	600	120,8

Die maximal tolerierbare Dosis konnte nicht beobachtet werden. Die Dosisescalation wurde bei 600 mg abgebrochen, da die Löslichkeit von KP1019 limitiert war. Bei einer weiteren Dosisescalation wäre das maximal infundierbare Infusionsvolumen überschritten worden.

#### 4.4.1 Konzentrations-Zeit-Profile

In Abb. 4.24 sind exemplarisch die Rutheniumkonzentrations-Zeit-Verläufe im Plasma von zwei Patienten im niedrigen Dosisbereich sowie von zwei Patienten im hohen Dosisbereich nach der fünften Applikation von KP1019 dargestellt.

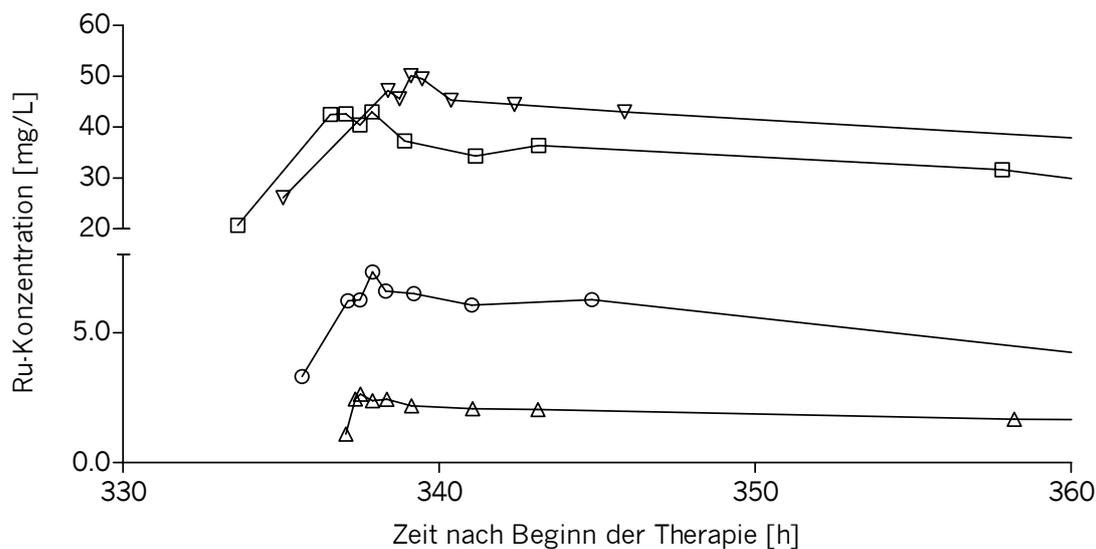


Abb. 4.24 Rutheniumkonzentrations-Zeit-Verläufe nach der fünften KP1019-Applikation,  $\triangle$  Patient 1 [25mg],  $\circ$  Patient 3 [100mg],  $\square$  Patient 5 [400mg] und  $\nabla$  Patient 7 [600 mg]

Die mittleren Konzentrationen vor Infusionsbeginn lagen alle erwartungsgemäß unterhalb der Bestimmungsgrenzen (LLOQ) von 0,03 mg/L. Die maximalen Konzentrationen ( $C_{max}$ ) wurden am Ende der Infusion beobachtet. In vereinzelt Fällen trat  $C_{max}$  bis zu einer Stunde nach Beendigung der Infusion auf. In Abhängigkeit vom Infusionsvolumen betrug die Infusionsdauer zwischen 0,1 und 4,25 h. Nach Erreichen von  $C_{max}$ , das zwischen 1,26 mg/L und 30,5 mg/L nach der ersten Arzneistoffapplikation lag, nahmen die Konzentrationen bioexponentiell ab. In der halb-logarithmischen Darstellung ist zunächst eine kurze schnelle Abnahme, gefolgt von einer sehr langsamen Abnahme der Rutheniumkonzentration, erkennbar. Die erste Phase (schnelle Konzentrationsabnahme) war bei den einzelnen Patienten unterschiedlich stark ausgeprägt. Ca. vier Stunden nach Infusionsende wurden noch etwa 80 % von  $C_{max}$  gemessen. Direkt vor der nächsten Applikation, das heißt 72 h nach Ende der Infusion, konnten noch 31 bis 40 % von  $C_{max}$  gefunden werden. Die langsame Elimination führte zu einer signifikanten Kumulation von Ruthenium im Plasma. Die  $C_{max}$  nach der fünften Applikation entsprachen etwa dem Doppelten der ersten Applikation.

Darüber hinaus waren in den meisten Konzentrations-Zeit-Profilen Wiederanstiege bzw. eine Plateaubildung der Rutheniumkonzentrationen im Zeitraum von fünf bis neun Stunden nach Infusionsende erkennbar (s. Abb. 4.24). Ein enterohepatischer Kreislauf könnte eine Erklärung hierfür sein. Insgesamt waren die ausgeschiedenen Ruthenium-Mengen sehr gering. Nur 0,79 bis maximal 5,90 % der ersten Dosis wurden kumulativ im ersten Dosierungsintervall ausgeschieden.

#### 4.4.2 Individuelle Pharmakokinetik

Die pharmakokinetischen Parameter wurden in zwei Szenarien ermittelt:

- Einmaldosierung: Einbeziehung der Rutheniumkonzentrationen der ersten bzw. fünften KP1019-Applikation
- Multiple Dosierung: Einbeziehung aller Rutheniumkonzentrationen aller KP1019-Applikationen

Die Auswertung erfolgte, wie in Kap. 3.7.3 beschrieben, mittels kompartmenteller Datenanalyse unter der Verwendung von WinNonlin® Professional (Pharsight Corporation, Version 5.0.1, 2005). Es zeigte sich, dass die Daten am besten mit einem offenen Zwei-Kompartiment-Modell beschrieben werden konnten. Die Modellgleichung zur Beschreibung der Konzentrationen ( $C_i$ ) in Abhängigkeit von der Zeit ( $t$ ) nach Gabe einer Infusion für dieses Modell lautete:

$$C_i = \frac{r_0}{V_1} \cdot \left( \frac{(1 - e^{-\lambda_1 \cdot T}) \cdot (k_{21} - \lambda_1)}{\lambda_1 \cdot (\lambda_1 - \lambda_2)} \cdot e^{-\lambda_1 \cdot t} + \frac{(1 - e^{-\lambda_2 \cdot T}) \cdot (k_{21} - \lambda_2)}{\lambda_2 \cdot (\lambda_2 - \lambda_1)} \cdot e^{-\lambda_2 \cdot t} \right) \quad \text{Gl. 4.1}$$

$T$	Infusionsdauer
$k_{21}$	Geschwindigkeitskonstante, Transport aus dem peripheren ins zentrale Kompartiment
$\lambda_i$	Hybridkonstanten
$r_0$	Infusionsgeschwindigkeit
$V_1$	Verteilungsvolumen des zentralen Kompartiments

Die Güte der Anpassung wurde anhand der GOF-Graphiken und der Variationskoeffizienten der Parameterschätzung beurteilt. Darüber hinaus

wurde das geeignete Modell unter Zuhilfenahme des Akaike- und Schwartz-Kriterien ausgewählt. Abb. 4.25 zeigt exemplarisch das Ergebnis der Anpassung des Zwei-Kompartiment-Modells für Patient 5 (400 mg KP1019). Die gemessenen Konzentrationen sind als blaue Punkte dargestellt. Die durchgezogene schwarze Linie beschreibt den anhand des Modells abgeschätzten Konzentrations-Zeit-Verlauf.

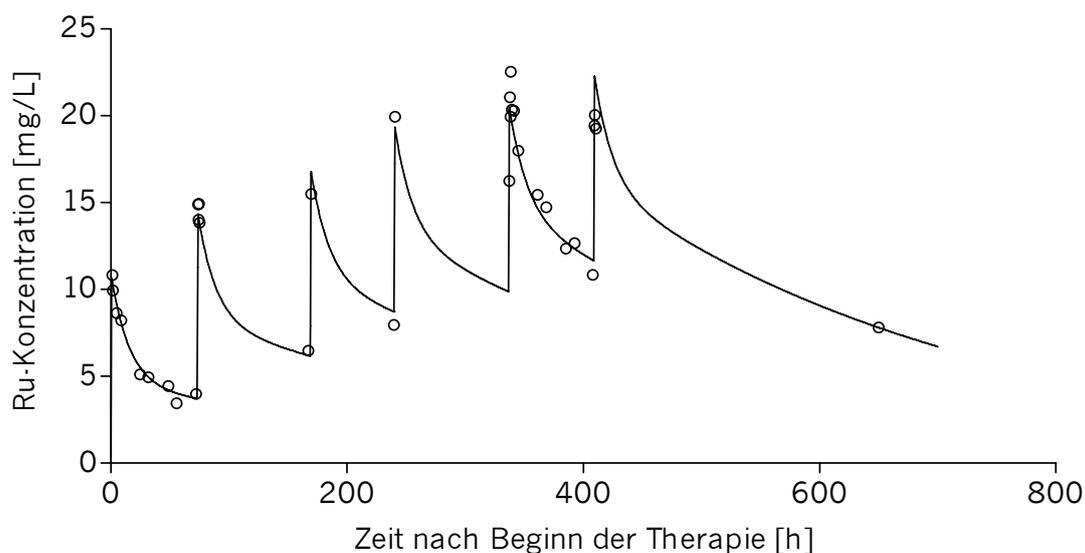


Abb. 4.25 Konzentrations-Zeit-Verlauf des Patienten 5; ○ gemessene Rutheniumkonzentrationen, — abgeschätzte Rutheniumkonzentrationen

Abb. 4.25 verdeutlicht, dass der Konzentrations-Zeit-Verlauf durch das gewählte Modell beschrieben werden konnte. Die gemessenen und abgeschätzten Konzentrations-Zeit-Verläufe sowie die individuellen pharmakokinetischen Parameter befinden sich im Anhang B. Die Tab. 4.26 bis Tab. 4.27 liefern eine Zusammenstellung der pharmakokinetischen Parameter nach der ersten und fünften Applikation sowie im gesamten Beobachtungszeitraum.

Tab. 4.26 Pharmakokinetische Parameter von Ruthenium nach der ersten Applikation von KP1019

	25 mg	50 mg	100 mg	200 mg	400 mg	600 mg	
	Pat. 1	Pat. 2	Pat. 3	Pat. 4	Pat. 5	Pat. 6	Pat. 7
$C_{max}$ [mg/L]	1,26	1,96	4,46	10,8	30,5	29,0	24,9
AUC [mg·h/L]	88,6	190	329	691	1442	2151	1566
$t_{1/2 \lambda 1}$ [h]	4,28	5,21	6,09	6,86	1,59	2,50	3,38
$t_{1/2 \lambda 2}$ [h]	80,6	117	90,5	69,0	51,2	68,1	54,9
CL [mL/min]	0,95	0,88	1,02	0,97	0,93	0,94	1,29
$V_{ss}$ [L]	6,41	8,67	7,63	5,46	3,96	5,43	6,00
$CL_R^*$ [mL/min]	0,031	0,046	0,033	0,008	0,020	0,026	0,023
Rel. $U_{\infty}^{**}$ [%]	3,23	5,20	3,23	0,79	2,15	2,75	1,79

\*  $t_0 - t_z$  Intervall der kontinuierlichen Urinsammlung

\*\* relative ausgeschiedene kumulative Menge bezogen auf die erste Dosis

Nach der ersten Applikation betrug die Gesamtclearance zwischen 0,88 und 1,29 mL/min. Das Verteilungsvolumen im Steady-State ( $V_{ss}$ ) betrug zwischen 3,96 und 6,00 L. Insgesamt zeichnet sich besonders die Gesamtclearance durch eine geringe Variabilität aus. Die in der graphischen Darstellung erkennbare langsame Abnahme der Rutheniumkonzentrationen spiegelt sich in der mit 51,2 bis 117 h langen terminalen Halbwertszeit wider.

Tab. 4.27 Pharmakokinetische Parameter von Ruthenium über den gesamten Beobachtungszeitraum

	25 mg	50 mg	100 mg	200 mg	400 mg	600 mg	
	Pat. 1	Pat. 2	Pat. 3	Pat. 4	Pat. 5	Pat. 6	Pat. 7
$C_{max}$ [mg/L]	2,63	4,67	7,96	22,5	43,0	n.b.	51,5
AUC [mg·h/L]	143	339	468	1605	2635	n.b.	4499
$t_{1/2 \lambda 1}$ [h]	4,14	7,71	10,6	10,6	11,9	n.b.	17,6
$t_{1/2 \lambda 2}$ [h]	151	254	161	229	157	n.b.	290
CL [mL/min]	0,59	0,49	0,72	0,42	0,51	n.b.	0,45
$V_{ss}$ [L]	7,46	10,5	9,37	7,83	6,32	n.b.	10,4

n.b. nicht berechnet aufgrund fehlender Informationen

Die Untersuchung der pharmakokinetischen Parameter unter Einbeziehung aller zur Verfügung stehenden Rutheniumkonzentrationen zeigte ein leicht unterschiedliches Bild im Vergleich zur ersten Applikation (s. Tab. 4.27). So wurden für deutlich längere, bis zu fünffach höhere  $t_{1/2z}$ -Werte ermittelt. In Analogie dazu wurden niedrige Clearance-Werte abgeschätzt.  $V_{ss}$  war dementsprechend etwa doppelt so groß. Insgesamt lässt sich sagen, dass die terminalen Halbwertszeiten eine hohe Variabilität aufzeigten. Sowohl die niedrige Clearance als auch das kleine Verteilungsvolumen lassen auf eine ausgeprägte Proteinbindung schließen.

Nach der ersten Applikation macht die renale Clearance in etwa zwei Prozent der Gesamtclearance aus. Die im Urin kumulativ ausgeschiedene Menge betrug zwischen 0,79 und 5,90 % der Dosis. Sowohl diese Beobachtung als auch die Werte der renalen Clearance legen die Schlussfolgerung nahe, dass die Ausscheidung über die Niere für die Elimination von Ruthenium eine untergeordnete Rolle spielt.

#### 4.4.3 Dosislinearität

Die ermittelten pharmakokinetischen Parameter von Ruthenium im Plasma lassen auf eine lineare Pharmakokinetik schließen. Abb. 4.26 zeigt, dass die AUC-Werte proportional zur Dosis ansteigen. Der Korrelationskoeffizient betrug 0,97 ( $p < 0,001$ ).

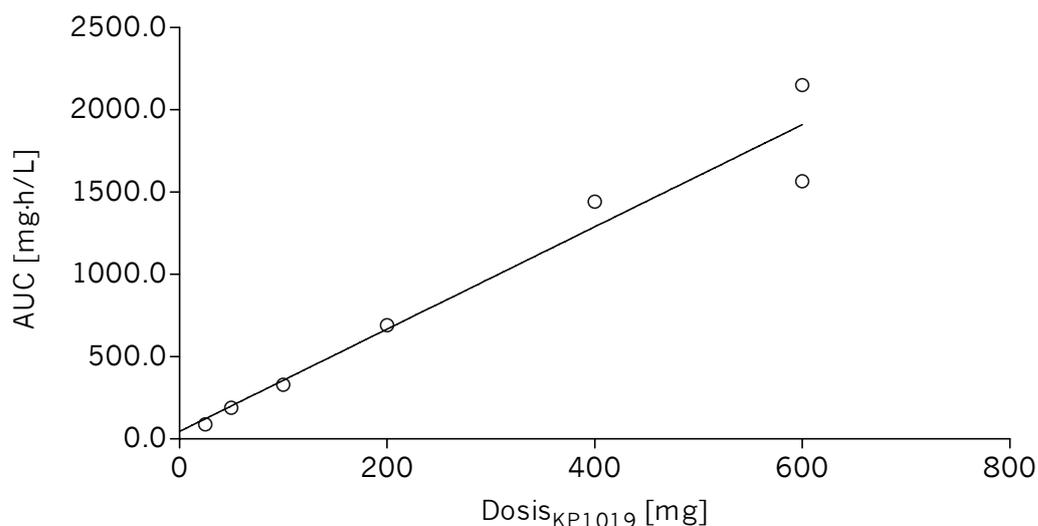


Abb. 4.26 Korrelation der KP1019 Dosis und der AUC ermittelt nach der ersten Applikation

Darüber hinaus wurde die Dosisproportionalität mit Hilfe eines Powermodells untersucht<sup>196</sup>. Der natürliche Logarithmus der AUC-Werte wurde zum natürlichen Logarithmus der Dosierung gemäß folgender Gleichung in Beziehung gesetzt:

$$\ln(\text{AUC}) = \beta_0 + \beta_1 \cdot \ln(\text{Dosis}_{\text{KP1019}}) \quad \text{Gl. 4.2}$$

Die Dosisproportionalität wurde schließlich anhand des folgenden Kriteriums überprüft.

$$1 + \frac{\ln(\theta_L)}{\ln(r)} < \beta_1 < 1 + \frac{\ln(\theta_H)}{\ln(r)} \quad \text{Gl. 4.3}$$

$$\theta_L = 0.80$$

$$\theta_H = 1.25$$

$r = \frac{\text{höchste Dosis}}{\text{niedrigste Dosis}}$

Die berechneten Werte für  $\beta_1$  betragen 0.96 und 1.00 unter Verwendung der Rutheniumkonzentrationen nach der ersten Applikation. Die ermittelten Werte lagen innerhalb der berechneten Grenzen von 0.93 und 1.07 und lassen somit auf Dosisproportionalität schließen. Das wird auch durch die

abgeschätzten Werte für CL und  $V_{ss}$ , die über den untersuchten Dosisbereich konstant waren, wiedergegeben.

#### **4.5 Projekt V: Populations-PK/PD Modell zur Platin-DNA-Addukt-Bildung in Leukozyten**

Ziel dieses Projektes war es, die Platin-DNA-Addukt-Bildung in den Leukozyten nach der Applikation von Oxaliplatin im Zusammenhang mit der Platinkonzentration in ultrafiltrierten Plasma zu beschreiben. Hierfür wurde ein sequentielles Design gewählt, was zunächst die Entwicklung eines populationspharmakokinetischen Modells zur Beschreibung des Konzentrations-Zeit-Verlaufes im ultrafiltrierten Plasma erforderte. In einem zweiten Schritt wurde ein semi-mechanistisches Modell zur Charakterisierung des zeitlichen Verlaufs der DNA-Platinierung in den Leukozyten in Abhängigkeit von der ungebundenen Platinkonzentration entwickelt. Dabei wurde die interindividuelle Variabilität und mögliche Kovariaten untersucht. Abschließend wurde der Zusammenhang zwischen Platin-DNA-Addukt-Exposition, d.h. der modellabgeschätzten Fläche unter der Addukt-Kurve (AUA), und dem Ansprechen auf die Therapie mit Oxaliplatin evaluiert. Die folgenden Kapitel beschreiben die Ergebnisse der Modellentwicklung und -evaluation.

##### 4.5.1 Daten

Die Daten zur Entwicklung des semimechanistischen Populations-PK/PD-Modells entstammen den in Kap. 3.8 beschriebenen Studien. Die Patientencharakteristika sind in Tab. 3.20 zusammengefasst.

Abb. 4.27 veranschaulicht die Verteilung der demographischen Daten in der Population.

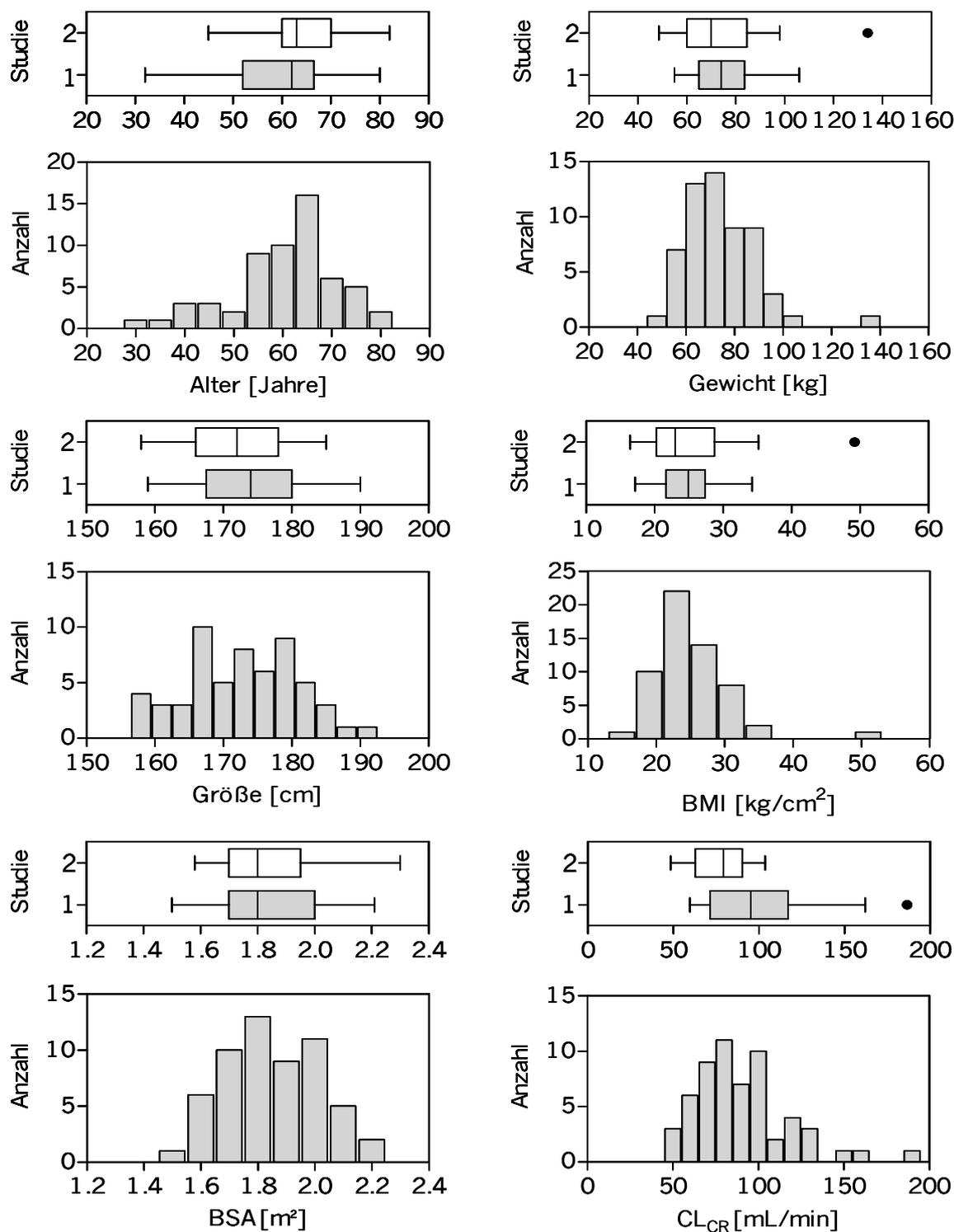


Abb. 4.27 Verteilung der Kovariaten in der gesamten Studienpopulation, dargestellt als Histogramme, und in den beiden Studien, dargestellt als Box-Whisker-Plots

Die Histogramme beinhalten stets die Gesamtheit aller zur Verfügung stehenden Daten. Die darüber angeordneten Box-Whisker-Plots verdeutlichen die Verteilung in den beiden Studien.

Insgesamt standen für die Erarbeitung des Populationsmodells 982 Platinkonzentrationen im ultrafiltrierten Plasma von 58 Patienten zur Verfügung. Die Erstellung des Modells zur Platin-DNA-Addukt-Bildung basiert auf 245 Datenpunkten der 37 Patienten aus Studie 1.

#### 4.5.2 Konzentrations-Zeit-Profile

##### *Ultrafiltrat*

Abb. 4.28 veranschaulicht den zeitlichen Verlauf der Platinkonzentrationen im Ultrafiltrat nach intravenöser Applikation von Oxaliplatin.

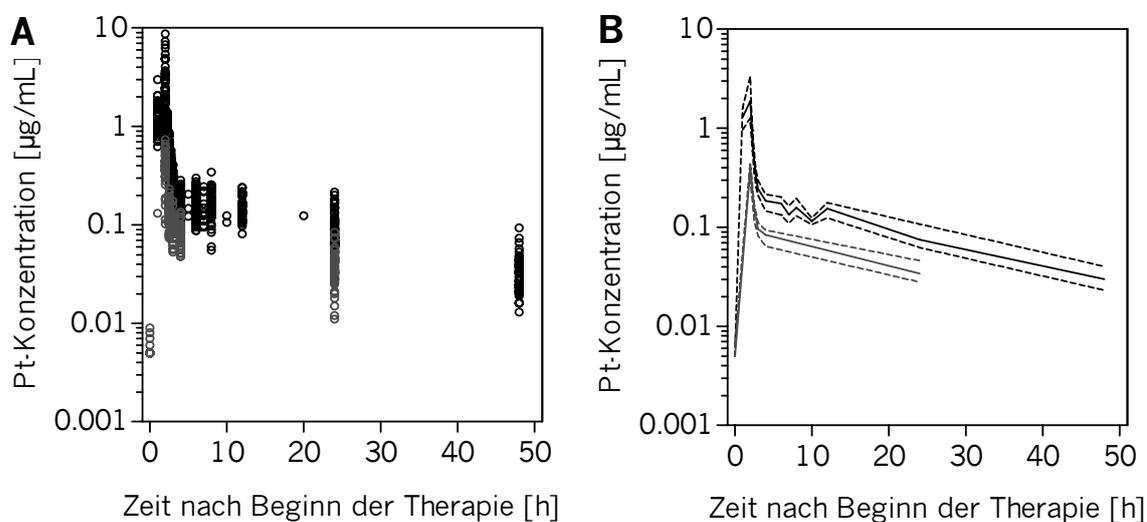


Abb. 4.28 Konzentrations-Zeit-Profile von Platin im Ultrafiltrat

**A:** Beobachtete Konzentrationen (○ Studie 1, ○ Studie 2)

**B:** — Median, -- 25 % und 75 % Perzentil der beobachteten Konzentrationen (- Studie 1, - Studie 2)

Teil A der Abb. 4.28 zeigt alle gemessenen Platinkonzentrationen im zeitlichen Verlauf in semilogarithmischer Auftragung, die vor, während und nach dem Ende einer 1- bis 2,5-stündigen Infusion von Oxaliplatin gewonnen

wurden. In Teil B der Abbildung sind die Mediane der gemessenen Konzentrationen jeweils als durchgezogene Linien und die 25 % und 75 % Perzentile als gestrichelte Linien dargestellt.

Die in Studie 1 applizierte Dosis war 2,6-mal höher als in Studie 2. Vergleicht man die Profile der beiden Studien, so ist in Studie 1 eine ausgeprägte Variabilität der Konzentrationen zu Beginn des Beobachtungszeitraums zu erkennen, das heißt unmittelbar vor und am Ende der Infusion. Gründe hierfür wurden im Rahmen der Dissertation von *A. Pieck* als Dosierungsungenauigkeiten bzw. nicht konstante Infusionsraten aufgrund der fehlenden Anwendung von Infusionspumpen diskutiert<sup>70</sup>. In beiden Studiengruppen wurden die höchsten Platinkonzentrationen zum Ende der Infusion beobachtet, wobei die maximalen Konzentrationen in der Studie 1 im Median etwa das Vierfache der maximalen Konzentrationen in Studie 2 erreichten. In der semilogarithmischen Darstellung des Konzentrations-Zeit-Verlaufes war die für Oxaliplatin bzw. Platin typische biexponentielle Abnahme der Platinkonzentrationen erkennbar. So war eine initial stark abfallende Kurve zu erkennen, die später in einen flacheren Verlauf überging. Der parallele Verlauf der terminalen Phasen der Konzentrations-Zeit-Profile der beiden verschiedenen Dosierungs- bzw. Studiengruppen legte eine lineare Eliminationskinetik nahe.

#### *Platin-DNA-Addukte*

Im Vergleich zum Ultrafiltrat wurden nur relativ wenige Platin-Addukt-Proben gewonnen. Im Schnitt waren es 3,3 pro Patient und Zyklus. Die Platin-DNA-Addukte weisen eine sehr große Variabilität auf. Im Median wurden auch hier die höheren maximalen Platin-DNA-Addukt-Werte in der Studie 1 beobachtet. An ein initiales Ansteigen der Platin-Addukt-Zeit-Profile schließt sich nach Erreichen der maximalen Platinierung ( $A_{\max}$ ), die zwischen 4 und 24 h nach Ende der Infusion beobachtet wurde, eine sehr langsame Abnahme der platinieren Nukleotide in den Leukozyten an. Abb. 4.29 veranschaulicht den zeitlichen Verlauf.

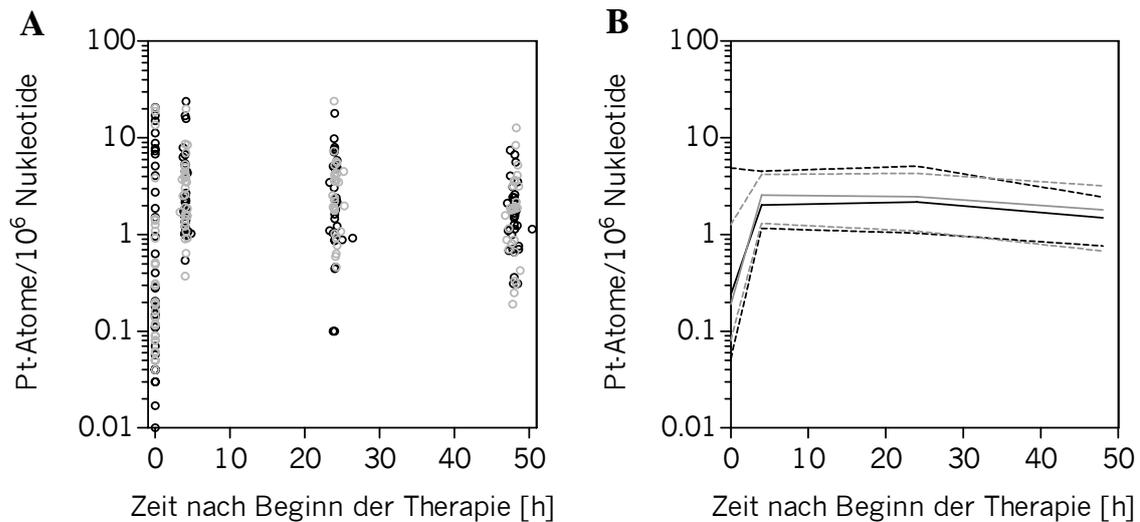


Abb. 4.29 Platin-DNA-Addukte in Leukozyten der Studie 1

**A:** Beobachtete Werte ( $\circ$  Zyklus 1,  $\circ$  Zyklus 2); **B:** — Median, --25 % und 75 % Perzentil der beobachteten Konzentrationen (- Zyklus 1, - Zyklus 2)

#### 4.5.3 Populationspharmakokinetisches Modell für Platin im ultrafiltrierten Plasma

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Entwicklung und Evaluation eines populationspharmakokinetischen Modells zur Beschreibung der Platin-Konzentrations-Zeit-Verläufe im ultrafiltrierten Plasma dargestellt.

##### *Struktur- und Statistisches Modell*

Die graphische Analyse des Datensatzes bestätigte, dass ein offenes Zwei-Kompartiment-Modell als Ausgang für die Modellentwicklung dienen sollte. Die Arzneistoffinvasion wurde, da es sich um eine Infusion handelte, mit einer Kinetik nullter Ordnung beschrieben. Wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben, deutete die graphische Analyse eine lineare Eliminationskinetik an. Diese wurde in der Form einer Kinetik erster Ordnung im Modell integriert. Somit ergaben sich folgende abzuschätzenden Parameter für das Basismodell (BASE): Gesamtclearance (CL), zentrales Verteilungsvolumen (V1), in welches auch die Dosis appliziert wurde, peripheres Verteilungsvolumen (V2) sowie interkompartimentelle Clearance (Q).

Eine signifikante interindividuelle Variabilität (IIV) wurde für alle vier Strukturparameter CL ( $\omega_{CL}$ ), V1 ( $\omega_{V1}$ ), Q ( $\omega_Q$ ) und V2 ( $\omega_{V2}$ ) in Form eines exponentiellen Fehlermodells implementiert. Wie Tab. 4.30 zu entnehmen ist, konnte eine moderate bis hohe IIV (34 bis 82 %) der Parameter ermittelt werden. Die IIV für alle vier Strukturparameter erwies sich als notwendig, da ihr Auslassen bei einzelnen Parametern keinen erfolgreichen Abschluss der Abschätzung der Modellparameter ermöglichte oder die Parameterschätzung nur mit hoher Ungenauigkeit möglich war. Für den Residualfehler wurde ein kombiniertes Fehlermodell gewählt. Der additive Fehler wurde mit 0,0040 mg/L abgeschätzt, und der proportionale Anteil des Restfehlers lag bei 28 %. Alle Parameter konnten mit relativen Standardfehlern (RSE) zwischen 7,1 und 31,4 % präzise abgeschätzt werden.

Abb. 4.30 zeigt jedoch eine deutliche Korrelation zwischen den individuellen *Random-effect*-Parametern.

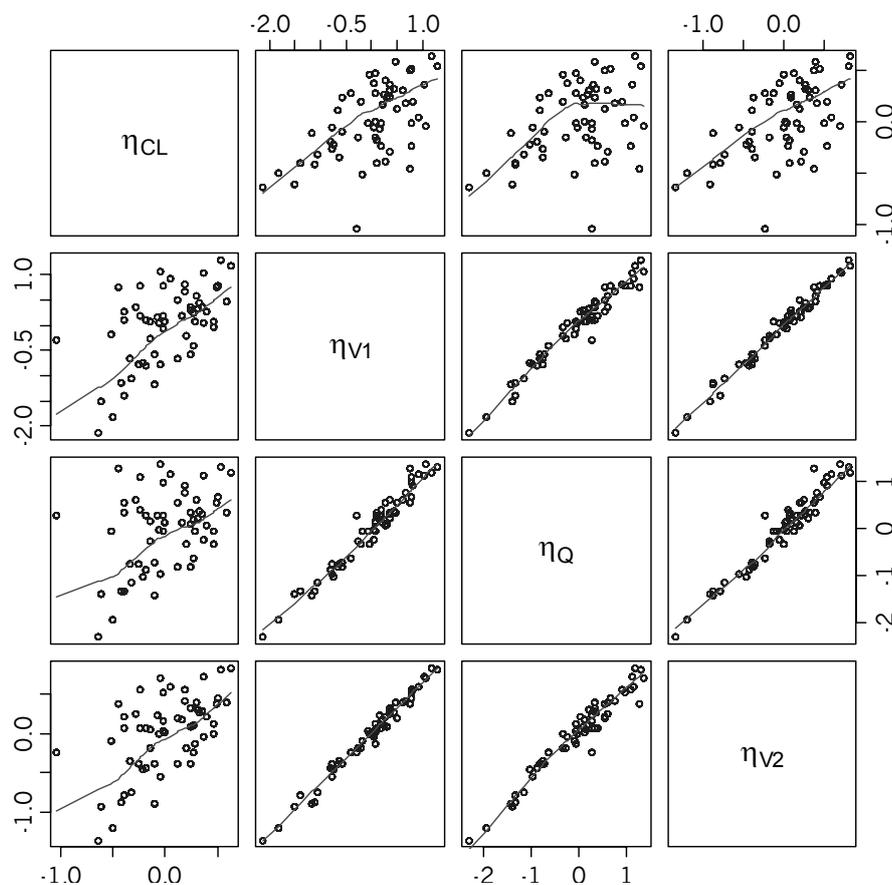


Abb. 4.30 Korrelationen zwischen den abgeschätzten *Random-effect*-Parametern  $\eta_{CL}$ ,  $\eta_{V1}$ ,  $\eta_Q$  und  $\eta_{V2}$

Zur Abschätzung der entsprechenden Kovarianz wurde die so genannte Omega-Block(4)-Codierung integriert, die in Abb. 4.31 gezeigt wird.

```

$OMEGA BLOCK(4)
0.066 ;omega_CL
0.126, 0.389 ;omega_V1
0.102, 0.361, 0.389 ;omega_Q
0.060, 0.196, 0.183, 0.114 ;omega_V2
    
```

Abb. 4.31 Omega block (4)-Codierung für die Kovarianz zwischen den *Random-effect*-Parametern  $\eta_{CL}, \eta_{V1}, \eta_Q$  und  $\eta_{V2}$

Die aufgeführte Codierung ermöglichte die Abschätzung der Korrelation zwischen CL und V1 (Korr- $\omega_{CL-V1}$ ), CL und V2 (Korr- $\omega_{CL-V2}$ ), CL und Q (Korr- $\omega_{CL-Q}$ ), V1 und V2 (Korr- $\omega_{V1-V2}$ ), V1 und Q (Korr- $\omega_{V1-Q}$ ) sowie V2 und Q (Korr- $\omega_{V2-Q}$ ). Durch die Inkorporation der Korrelationen konnte eine signifikante Reduktion ( $p < 0,005$ ) des OFV um 467,6 Punkte erreicht werden. Die Korrelationskoeffizienten wurden wie folgt berechnet:

$$r = \frac{\omega_{\theta 1-\theta 2}}{\sqrt{\omega_{\theta 1}} \cdot \sqrt{\omega_{\theta 2}}} \tag{Gl. 4.4}$$

Die ermittelten Korrelationskoeffizienten  $r$  sind in Tab. 4.28 zusammen gefasst.

Tab. 4.28 Korrelation zwischen den Strukturparametern ausgedrückt als  $r$

<b>r</b>	CL	V1	Q	V2
<b>CL</b>	1	.	.	.
<b>V1</b>	0,666	1	.	.
<b>Q</b>	0,509	0,967	1	.
<b>V2</b>	0,697	0,964	0,927	1

Die Godness-of-Fit-Plots für das BASE-Modell sind im Anhang C abgebildet. Die Inspektion der abgeschätzten Konzentrationen (Population) PRED gegen die beobachteten Konzentrationen (DV) verdeutlichte Missspezifikationen (s.

Anhang C). Zwar konnten die Konzentrationen  $< 2,0$  mg/L gut durch das zugrunde liegende Modell beschrieben werden, doch wurden die Konzentrationen im höheren Bereich deutlich unterschätzt. Betrachtete man die individuell abgeschätzten Konzentrationen, war eine Aufspaltung im höheren Konzentrationsbereich erkennbar. Folglich wurden einige Konzentrationen über- und wiederum andere unterschätzt. Die farbliche Unterscheidung der beiden Studien ergab, dass diese Missspezifikationen ausschließlich Konzentrationen der Studie 1 betrafen, in der Proben vor, unmittelbar am Ende der Infusion und in kurzen Intervallen (15 min) nach Beendigung der Oxaliplatin-Applikation entnommen wurden. Die Integration einer *Interstudy-Variabilität* (ISV) führte nicht zu einer stabilen Modellabschätzung und berücksichtigt nicht die zeitliche Komponente dieser Variabilität.

Um der Variation in Informationsgehalt und Reliabilität der Platinkonzentrationen im zeitlichen Verlauf Rechnung zu tragen, wurde in einem nächsten Schritt ein zeitabhängiges kombiniertes Residualfehlermodell geprüft. Die zeitliche Integration in Modell BASE2RE wurde durch die Festlegung eines expliziten Haltepunkts erreicht. So wurde ermöglicht, dass die bis zu diesem Zeitpunkt (Haltepunkt) gewonnenen Proben mit dem kombinierten Residualfehlermodell 1, danach mit dem kombinierten Residualfehlermodell 2, abgeschätzt wurden. Eine Abschätzung dieses Zeitpunktes mit Hilfe der NONMEM-Funktion *MTIME* lieferte keine stabilen und plausiblen Ergebnisse. Diese waren stark abhängig von den vorgegebenen Initialwerten und führten zu extrem hohen relativen Standardfehlern. Daher wurde die Suche des Haltepunkts manuelle und schrittweise durchgeführt, wobei jeweils die in den Studienprotokollen deklarierten theoretischen Entnahmezeitpunkte als mögliche Haltepunkte angenommen und geprüft wurden. In Tab. 4.29 sind die Ergebnisse dieser Untersuchung zusammengefasst.

Tab. 4.29 Ergebnisse der Untersuchung verschiedener Haltepunkte zur Integration eines zeitabhängigen Restfehlermodells in BASE2RE

Haltepunkt	OFV	$\Delta$ OFV	$\sigma_{\text{additiv-1}}$ [ $\mu\text{g/L}$ ]	$\sigma_{\text{proportional-1}}$ [%]	$\sigma_{\text{additiv-2}}$ [ $\mu\text{g/L}$ ]	$\sigma_{\text{proportional-2}}$ [%]
ohne	-4092,4		0,00404	28,0	-	-
1 h	-4149,4	-57,0	0,00436	48,8	0,00365	25,1
2 h	-4350,8	-258,4	0,00438	73,6	0,00455	19,7
2,25 h	-4344,4	-251,0	0,00440	54,6	0,00549	0,185

Durch die Einführung eines konditionellen Restfehlermodells konnte OFV signifikant ( $p < 0,005$ ) gesenkt werden. Die stärkste OFV-Reduktion wurde für den Haltepunkt  $t = 2$  h erreicht, was dem Ende der Infusion entsprach. Der additive Fehler entsprach sowohl vor als auch nach dem Haltepunkt in etwa dem LLOQ. Sehr deutlich ist der Einfluss in Bezug auf den proportionalen Anteil der Residualvariabilität erkennbar. Wurde dieser mit Hilfe des einfachen kombinierten Fehlermodells mit 28 % abgeschätzt, so zeigte sich mit Haltepunkt 2 h eine ausgeprägte Aufspaltung in 73,6 % für alle Konzentrationen, die bis einschließlich zwei Stunden nach Infusionsbeginn gewonnen wurden und 19 % für alle späteren. Die GOF-Plots sind in Anhang C zu finden. Datenpunkte verteilen sich um die Ursprungsgerade. Betrachtete man die Residuen, so streuten diese zufällig in positive und negative Richtung. Die Untersuchung anderer Residualfehlermodelle ergab keine weitere Verbesserung der Modellanpassung.

Die Ergebnisse der Schätzung der *Fixed/Random-effect*-Parameter sind in Tab. 4.30 zusammengefasst.

Tab. 4.30 Ergebnisse der Parameterschätzungen der Modelle BASE, BASE2RE und FINAL

Modell-Parameter	BASE		BASE2RE		FINAL		
	Schätzung	RSE# [%]	Schätzung	RSE# [%]	Schätzung	RSE# [%]	
<i>Fixed-effect-Parameter</i>							
CL	[L/h]	13,2	14,9	14,2	4,6	13,9	5,7
V1	[L]	12	7,3	16,3	12,0	14,7	17,8
Q	[L/h]	26,5	9,0	34,6	11,5	31,8	16,5
V2	[L]	216	11,4	251	5,0	242	8,6
<i>Kovariationseinfluss</i>							
$\theta_{CLCR}$		n.a.	–	n.a.	–	0,519	16,5
<i>Random-effect-Parameter</i>							
<i>Interindividuelle Variabilität</i>							
$\omega_{CL}$	[%]	34,4	17,2*	31,0	17,7*	28,9	20,2*
$\omega_{V1}$	[%]	75,6	26,4*	59,5	29,4*	64,0	25,4*
$\omega_Q$	[%]	82,3	20,7*	63,6	20,6*	65,7	17,3*
$\omega_{V2}$	[%]	47,2	28,0*	32,1	28,3*	36,9	22,4*
Korr- $\omega_{CL-V1}$		0,173	27,1§	0,106	34,8§	0,145	24,8§
Korr- $\omega_{CL-Q}$		0,144	31,4§	0,076	43,3§	0,128	22,8§
Korr- $\omega_{CL-V2}$		0,601	24,1§	0,358	24,6§	0,394	20,9§
Korr- $\omega_{V1-Q}$		0,113	25,0§	0,056	30,5§	0,073	23,6§
Korr- $\omega_{V1-V2}$		0,344	26,5§	0,171	29,8§	0,221	23,2§
Korr- $\omega_{Q-V2}$		0,360	25,3§	0,176	27,9§	0,218	20,7§
<i>Residualfehler</i>							
$\sigma_{additiv-1}$	[mg/L]	0,0040	16,5	0,0044	10,7	0,0044	10,7
$\sigma_{proportional-1}$	[%]	28,0	7,1	73,6	23,0	58,5	10,8
$\sigma_{additiv-2}$	[mg/L]	n.a.	–	0,0046	29,9	0,00384	40,1
$\sigma_{proportional-2}$	[%]	n.a.	–	19,7	5,7	19,2	5,0

# relativer Standardfehler

\* berechnet auf Varianz-Ebene

§ Standardfehler der Kovarianz-Schätzung

n.b. nicht abgeschätzt

Die CL wurde mit 14,2 L/h, V1 mit 16,3 L, Q mit 34,6 L/h und V2 mit 251 L abgeschätzt. Der IIV der einzelnen *Fixed-effect*-Parameter wurde insgesamt niedriger abgeschätzt und variierte zwischen 31,0 % und 63,6 %. Alle Parameter konnten mit guter Präzision (RSE < 43,3 %) abgeschätzt werden.

*Kovariatenmodell*

Die Kovariateneinflüsse, die für die individuellen pharmakokinetischen Parameter des Basismodells BASE2RE getestet wurden, wurden anhand der in Kap. 3.3.3 beschriebenen Methodik ausgewählt. Tab. 4.31 fasst alle untersuchten Kovariaten zusammen.

Tab. 4.31 Untersuchte Kovariaten, ausgewählt durch GAM-Analyse und aus Gründen der Plausibilität

Parameter	GAM-Analyse	Plausibilität
CL	M1F2, CLCR, AGE, KG	FFM
V1	STDY, PTDO	BW, FFM
Q	STDY, PTDO	
V2	STDY, PTDO	BW, FFM

AGE	Alter	BW	Gewicht
CLCR	Kreatininclearance [ml/min]	FFM	Fettfreie Masse
PTDO	Platindosis	STDY	Studie

Als einziger statistisch signifikanter (p < 0,005) und plausibler Kovariateneinfluss wurde der der Kreatininclearance auf CL gefunden. Die Parameter-Kovariaten-Relation wurde wie folgt integriert:

$$CL = \theta_{CL} \cdot (CLCR/86,95)^{\theta_{CLCR}} \cdot e^{\eta_{CL}} \tag{Gl. 4.5}$$

Die Integration des in Gl. 4.5 dargestellten Zusammenhangs führte zu einer signifikanten Reduktion des OFV von 109,437 Punkten (p < 0,005) im Vergleich zum BASE2RE-Modell. Für den Exponenten, der den Zusammenhang zwischen CLCR und CL charakterisierte, wurde ein Wert von

0,519 erhalten. Dieser Parameter wurde mit einem RSE von 16,5 % präzise abgeschätzt. Insgesamt betrachtet, veränderten sich die *Fixed-effect*-Parameter nur geringfügig. Eine Übersicht zu den Ergebnissen aller abgeschätzten Parameter liefert Tab. 4.30. Die IIV von V1, Q und V2 stieg leicht an. Die IIV war moderat bis hoch mit Werten 28,9 ( $\omega_{CL}$ ), 64,0 ( $\omega_{V1}$ ), 65,7 ( $\omega_Q$ ) und 36,9 % ( $\omega_{V2}$ ). Verglichen mit dem BASE2RE-Modell konnte die IIV der CL um 6,7 % (2,1 %-Punkte) gesenkt werden. Für die Strukturparameter V1, Q und V2 stieg die IIV leicht an. Abb. 4.32 verdeutlicht den Einfluss der Kreatininclearance auf den typischen Konzentrations-Zeit-Verlauf von Platin im ultrafiltrierten Plasma.

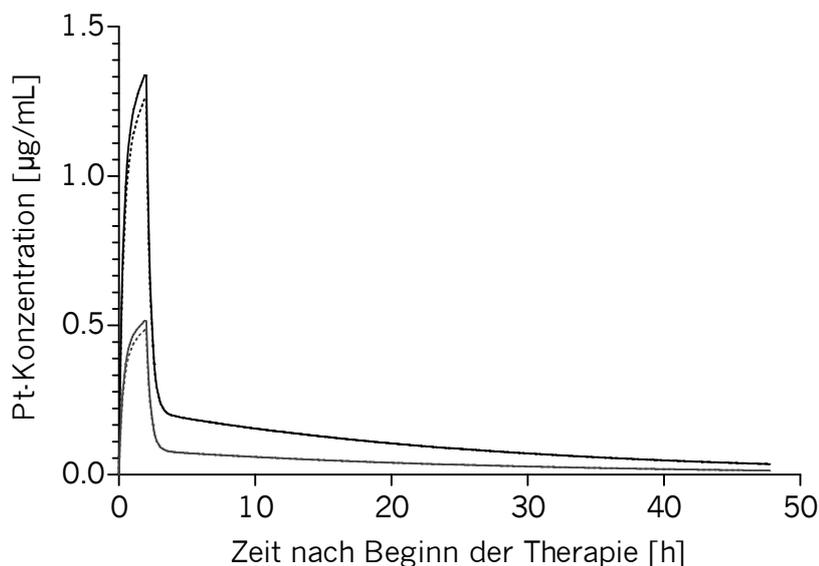


Abb. 4.32 Typischer Konzentration-Zeit-Verlauf nach Einmalapplikation von 130 mg/m<sup>2</sup> (—) und 50 mg/m<sup>2</sup> (---) Oxaliplatin berechnet auf Grundlage des finalen Modells mit (—) und ohne Kovariateneinbeziehung (---)

So unterschieden sich die typischen Platinkonzentrations-Zeit-Verläufe mit und ohne Berücksichtigung des  $CL_{CR}$ -Einflusses nur geringfügig. Lediglich die  $C_{max}$ -Werte wurden unter Einbeziehung des Kovariateneinflusses bei einer Dosierung von 130 bzw. 50 mg/m<sup>2</sup> 6,4 % bzw 9,5 % höher berechnet.

In Abb. 4.33 wird der Kovariateneinfluss auf den Platinkonzentrations-Zeit-Verlauf im ultrafiltrierten Plasma exemplarisch veranschaulicht. Gezeigt werden typische Verläufe für jeweils einen Patienten mit  $CL_{CR}$  von 52,7 und 150,8 mL/min.

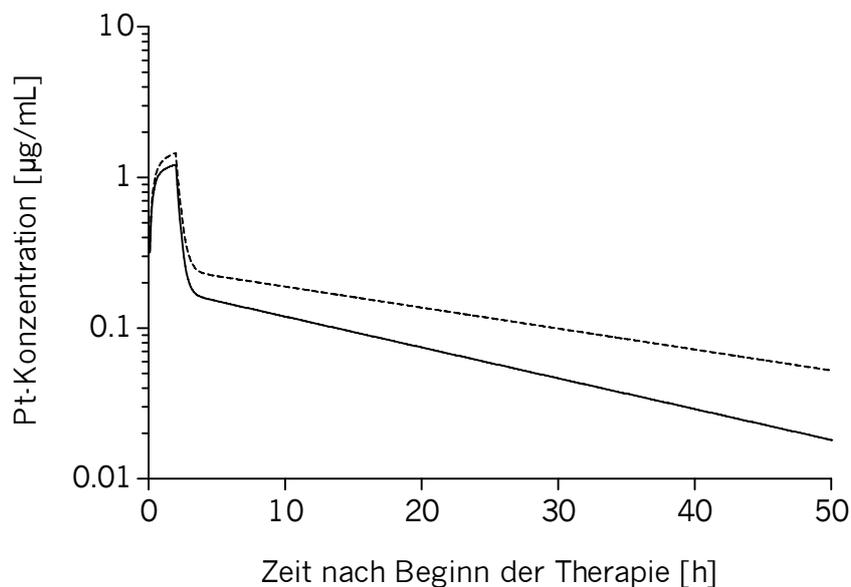


Abb. 4.33 Simulation zum Einfluss der Kreatininclearance auf die Konzentrations-Zeit-Verläufe im ultrafiltrierten Plasma. (130 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin, Infusionsdauer: 2 h, BSA: 1,73 m<sup>2</sup>, — Kreatininclearance 52,7 mL/min, --- Kreatininclearance 150,8 mL/min)

Gemäß dem beschriebenen mathematischen Zusammenhang in Gl. 4.5 stieg die Gesamtclearance um 72,5 % von 10,7 L/h auf 18,5/L/h für Kreatininclearance-Werte von 52,7 mL/min bis 150,8 mL/min.

#### *Modellevaluation*

Zur Evaluation des entwickelten Modells fanden die in Kap. 3.8.5 erläuterten Methoden Anwendung. Im Folgenden sollen die Ergebnisse des *bootstrappings*, des *visual predicitive checks* (VPC) sowie der *case deletion diagnostics* (CDD) vorgestellt werden.

Für die Untersuchungen wurden insgesamt 1000 *Bootstrap*-Datensätze aus dem Originaldatensatz generiert und mit dem finalen Modell analysiert. Von 1000 durchgeführten Modellierungsläufen wurden 897 erfolgreich abgeschlossen. Für jeden *Fixed*- bzw. *Random-effect*-Parameter wurde der *bootstrap*-Median ermittelt und anschließend der absolute Fehler (Bias) sowie der relative Fehler (RE) in Bezug auf die für den Originaldatensatz abgeschätzten Werte berechnet. Die Ergebnisse der *Bootstrap*-Analyse sind in Anhang C zusammengefasst.

Mit relativen Fehlern (RE) von  $< 0,193\%$  wichen die *Bootstrap*-Mediane der Strukturparameter kaum von den für den Originaldatensatz abgeschätzten Werten ab. Die Beschreibung durch das Strukturmodell konnte somit als richtig und präzise angesehen werden. Die *Bootstrap*-Mediane der *Random-effect*-Parameter waren ebenfalls den Parameterschätzungen des Originaldatensatzes sehr ähnlich. Die relativen Fehler waren mit Werten zwischen  $0,03\%$  und  $5,75\%$  niedrig. Parameterwerte, die mit Hilfe des finalen Modells abgeschätzt wurden, lagen innerhalb der  $95\%$ -Konfidenzintervalle, die aus den  $2,5\%$  und  $97,5\%$ -Perzentilen der 897 *Bootstrap*-Abschätzungen für jeden Modellparameter berechnet wurden.

Zur Überprüfung der Annahme, dass alle Parameter einer Normalverteilung folgten, wurden darüber hinaus alle durch den *Bootstrap* erhaltenen Parameter in Histogrammen aufgetragen und mit der Gauss-Normalverteilung ( $\mu = 0$ ,  $\sigma = 1$ ) visuell verglichen. Zusätzlich wurden Quantil-Quantil-Diagramme erstellt. Diese erlaubten einen explorativen Vergleich der Verteilung der *Bootstrap*-abgeschätzten Parameter mit einer Normalverteilung. Dafür wurden die theoretischen Quantile der Normalverteilung ( $\mu=0$ ,  $\sigma=1$ ) gegen die Quantile der *Bootstrap*-Werte der einzelnen Parameter aufgetragen. In Abb. 4.34 sind exemplarisch Histogramme und Quantil-Quantil-Diagramme für die *Fixed-effect*-Parameter dargestellt.

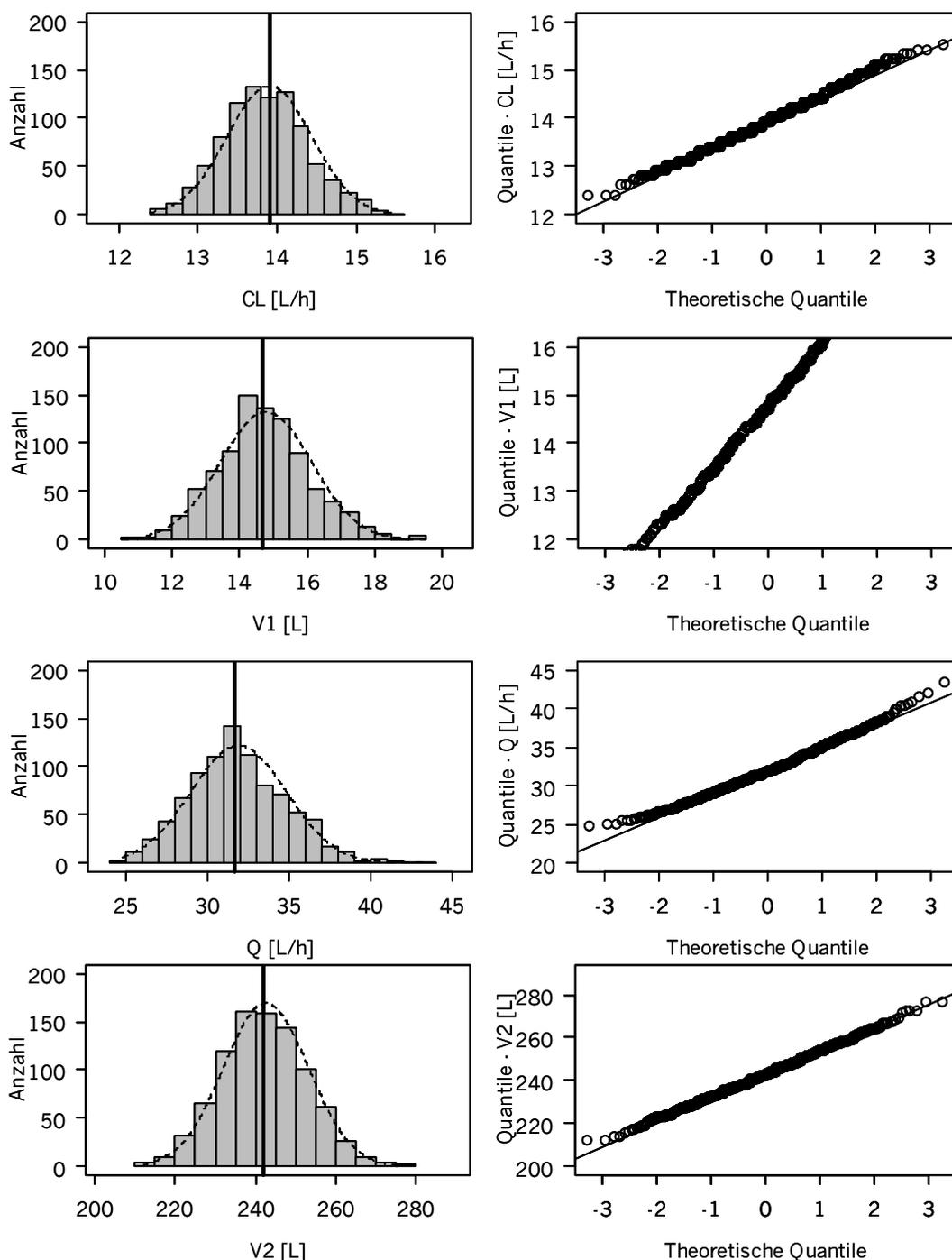


Abb. 4.34 Verteilung der *Fixed-effect*-Parameter aus 897 *Bootstrap*-Läufen;  
**Links:** Histogramme, — Median, -- Gauss-Verteilung;  
**Rechts:** Quantil-Quantil-Diagramm, — Ursprungsgerade

Im Quantil-Quantil-Diagramm befinden sich nahezu alle Beobachtungen einheitlich auf der Ursprungsgeraden. Die Verteilung der *Bootstrap*-Werte

scheint einer Normalverteilung zu folgen. Die in Abb. 4.34 ebenfalls dargestellten Histogramme unterstreichen diese Beobachtung.

Die Abb. 4.35 veranschaulicht die Ergebnisse des *visual predictive checks* für das finale Modell.

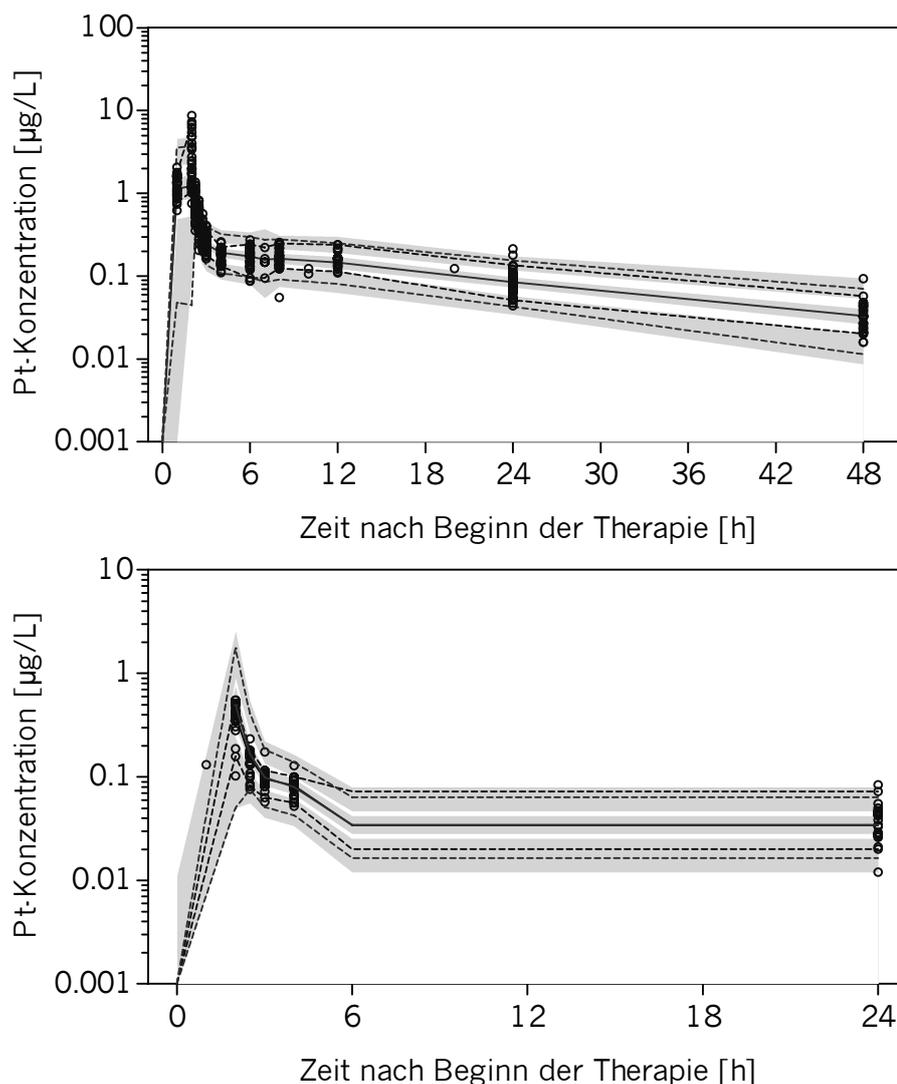


Abb. 4.35 *Visual predictive checks* für Modell **FINAL**; **A**: Studie 1, **B**: Studie 2 (○ beobachtete Konzentrationen, — Median, - - 5 und 95 %-Perzentil; Simulation: — Median, - - - 90 %-Prognoseintervalle, ■ 95 %-Konfidenzintervalle)

Zur besseren Veranschaulichung wurde die Simulation unter Stratifizierung nach Studien (Studie 1 und Studie 2) durchgeführt. Darüber hinaus erfolgte

eine Kategorisierung der Zeitachse, um gleichmäßige Stichprobengrößen zu den verschiedenen Zeitpunkten zu erhalten. In jeder Kategorie wurden jeweils für die simulierten und die beobachteten Konzentrationen der Median sowie das 5 % und 95 %-Perzentil ermittelt. Die grauen Bereiche in Abb. 4.35 kennzeichneten die 95 %-Konfidenzintervalle von Median sowie 5 und 95 %-Perzentil der simulierten Konzentrationen. Die Fläche zwischen dem 5 % und 95 %-Perzentil der simulierten Konzentrationen grenzt das 90 %-Prognoseintervall ein.

Für beide Studien war der Median des vorhergesagten Konzentrations-Zeit-Verlaufs in Übereinstimmung mit dem der gemessenen Konzentrationen. Die Variabilität in Studie 1 konnte über den gesamten Zeitraum durch das Modell gut wiedergegeben werden. Für Studie 2 wurde die Variabilität bis 4 h nach Beginn der Infusion jedoch leicht überschätzt. Insgesamt war das Vorhersagevermögen des Modells in Bezug auf die beobachteten Konzentrationen hoch, da die Mehrzahl der Beobachtungen innerhalb des Prognoseintervalls lag. Darüber hinaus befanden Median, 5 und 95 %-Perzentile innerhalb der 95 %-Konfidenzintervalle des jeweils durch die Simulation erhaltenen Median, 5 bzw. 95 % Perzentils.

Abschließend wurde zur Prüfung der Robustheit der Parameterschätzung das Verfahren der *Case-deletion-diagnostics* (CDD) durchgeführt. Die Ergebnisse der in Kap. 3.8.5 erläuterten Szenarien sind in Anhang C dargestellt. Die Punkte repräsentieren die jeweils nach Ausschluss der einzelnen Individuen bzw. Gruppen abgeschätzten Parameter. Die im finalen Modell mit vollständigem Datensatz abgeschätzten Parameter sind als durchgezogene Linie erkennbar. Zwei gestrichelte Linien grenzen die dazugehörigen 95 %-Konfidenzintervalle ein. Alle im Rahmen der CDD ermittelten Parameterschätzungen lagen innerhalb des 95 %-Konfidenzintervalls.

#### 4.5.4 Semimechanistisches PK/PD-Modell für Platin-DNA-Addukt-Bildung in Leukozyten

Im Folgenden soll die Entwicklung eines semi-mechanistischen PK/PD-Modells zur Beschreibung der DNA-Platinierung in den Leukozyten im Verhältnis zur Platinkonzentration im Ultrafiltrat dargestellt werden.

##### *Struktur- und Statistisches Modell*

Verschiedene PD-Modelle wurden diskutiert (s. Kap. 3.8.4). Den Ausgangspunkt für die weitere Entwicklung bildeten schließlich Rezeptor-Bindungsmodelle. Abb. 4.36 veranschaulicht das gewählte Modell.

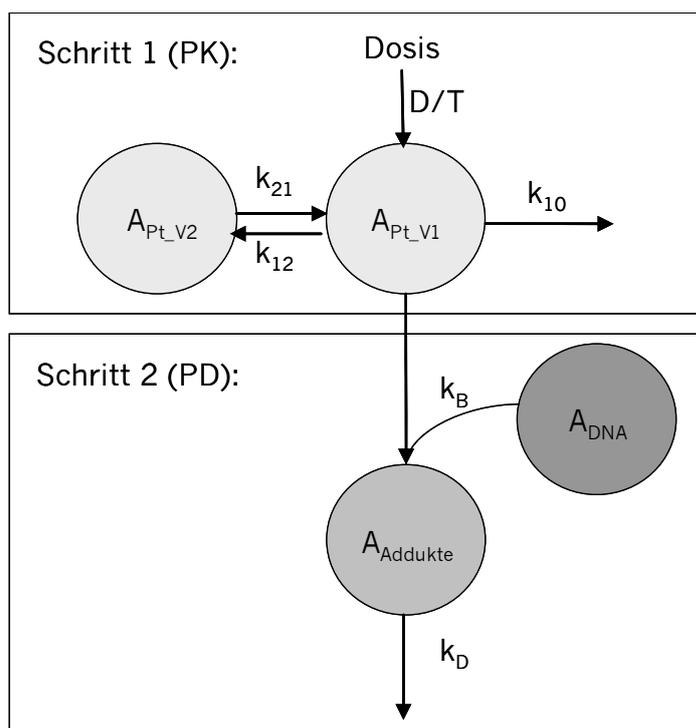


Abb. 4.36 Schematische Darstellung des gewählten PK/PD-Modells (Erläuterungen s. Text)

Die DNA in den Leukozyten stellt in diesem Fall den Rezeptor dar. Die Platinkonzentrationen im zentralen Kompartiment bilden die Ligandenkonzentrationen ab. Als Rezeptor-Ligand-Komplex wurden die in den Leukozyten gemessenen Platin-DNA-Addukte verstanden. Die Bindung

des Liganden an den Rezeptor kann durch eine Kinetik zweiter Ordnung beschrieben werden. Aufgrund der geringen Datenanzahl wurden verschiedene Annahmen getroffen. So wurde der DNA-Gehalt der Leukozyten als konstant angesehen, da diese im Überschuss zur Verfügung stehen. Darüber hinaus wurde für den Abbau der Platin-DNA-Addukte eine Kinetik erster Ordnung angenommen. Die Dissoziation des Platin-DNA-Komplexes wurde vernachlässigt.

Mathematisch lässt sich das oben abgebildete Modell durch die folgenden Differentialgleichungen entsprechend dem Massenwirkungsgesetz beschreiben.

$$\frac{dA_{\text{Pt}_V1}}{dt} = \frac{D}{T} - (k_{12} + k_{10})A_{\text{Pt}_V1} + k_{21}A_{\text{Pt}_V2} \quad \text{Gl. 4.6}$$

$$\frac{dA_{\text{Pt}_V2}}{dt} = k_{12}A_{\text{Pt}_V1} - k_{21}A_{\text{Pt}_V2} \quad \text{Gl. 4.7}$$

$$\frac{dA_{\text{DNA}}}{dt} = 0 \quad \text{Gl. 4.8}$$

$$\frac{dA_{\text{Addukte}}}{dt} = k_B \cdot A_{\text{Pt}} \cdot A_{\text{DNA}} - k_D \cdot A_{\text{Addukte}} \quad \text{Gl. 4.9}$$

Dabei bildeten  $A_{\text{Pt}_V1}$  und  $A_{\text{Pt}_V2}$  die Platin-Stoffmengen im zentralen ( $V_1$ ) bzw. peripheren Kompartiment ( $V_2$ ). Die Platinmengen im zentralen Kompartiment entsprechen den gemessenen Platinkonzentrationen im zentralen Kompartiment unter Berücksichtigung von  $V_1$  sowie der Molaren Masse von Platin von 195,1 g/mol.  $k_{12}$ ,  $k_{21}$  und  $k_{10}$  stellen Geschwindigkeitskonstanten erster Ordnung dar, die den Massentransport zwischen dem zentralen und peripheren Kompartiment sowie die Elimination aus dem zentralen Kompartiment beschreiben. Diese wurden jeweils aus den mit dem finalen PK-Modell abgeschätzten individuellen pharmakokinetischen Parametern gemäß folgender Gleichungen abgeleitet:

$$k_{12} = \frac{Q}{V_1} \quad \text{Gl. 4.10}$$

$$k_{21} = \frac{Q}{V_2} \quad \text{Gl. 4.11}$$

$$k_{10} = \frac{CL}{V_1} \quad \text{Gl. 4.12}$$

$A_{DNA}$  ist die Stoffmenge an DNA in den Leukozyten unter der Annahme, dass der DNA-Gehalt pro Zelle 6,6 pg betrug und während der Beobachtung konstant blieb<sup>197</sup>.  $A_{\text{Addukte}}$  stellt die Stoffmenge der Platin-DNA-Addukt dar.  $k_D$  und  $k_B$  bilden die Degrationskonstante bzw. Bindungskonstante. Da ein Großteil der Studienpopulation im Vorfeld der Untersuchung bereits mit platinhaltigen Chemotherapieregimen vorbehandelt worden war, wurde für diese Patienten ein Baseline-Wert  $A_{0,AD}$  als Ausgangswert für das Addukt-Kompartiment abgeschätzt. Für die Strukturparameter  $k_B$ ,  $k_D$  und  $A_{0,AD}$  konnten IIVs in Form exponentieller Fehlermodelle implementiert werden. Die gemessenen Platin-DNA-Addukte wurden in ihren natürlichen Logarithmus transformiert. Die Abschätzung der pharmakodynamischen Parameter im finalen populationspharmakodynamischen Modell erfolgte mit Hilfe der FOCE-Methode mit Interaktion. Für die Anpassung dieses Modells wurde ein OFV von 310,722 erhalten. Tab. 4.32 fasst die Ergebnisse der Parameterschätzung des finalen pharmakodynamischen Modells zusammen.

Tab. 4.32 Ergebnisse der Parameterschätzungen des pharmakodynamischen Modells

Modell-Parameter	FINAL <sub>PD</sub>	
	Schätzwert	RSE# [%]
<i>Fixed-effect-Parameter</i>		
$k_B$ [ $\mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ]	0,00371	12,1
$K_D$ [1/h]	0,00429	14,1
$A_{0,AD}$ pmol	0,0799	41,7
<i>Random-effect-Parameter</i>		
Interindividuelle Variabilität		
$\omega_{k_B}$ [%]	55,1	14,7*
$\omega_{k_D}$ [%]	48,3	30,0*
$\omega_{A_{0,AD}}$ [%]	197,2	9,2*
Residualfehler		
$\sigma_{\text{proportional}}$ [%]	90,5	7,2

# relativer Standardfehler  
\* berechnet auf Varianz-Ebene

Wie aus Tab. 4.32 ersichtlich, wurde  $k_B$  mit  $0,00371 \mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  und  $k_D$  mit  $0,00429 \text{ h}^{-1}$  abgeschätzt. Für den Baseline-Wert der mit Platin vorbehandelten Patienten wurde  $0,0799 \text{ pmol}$  ermittelt. Die IIV der Strukturparameter waren erwartungsgemäß hoch bis sehr hoch und variierte zwischen  $48,3$  und  $197,2 \%$ . Die sehr hohe IIV des Baseline-Wertes von  $197,2 \%$  korrespondiert mit der beobachteten Variabilität (s. Abb. 4.29) der gemessenen Werte vor Beginn der Infusion. Der Residualfehler des Modells ließ sich am besten mit Hilfe eines proportionalen Fehlermodells beschreiben, das aufgrund der Ln-Transformation der abhängigen Variablen als additives Fehlermodell kodiert wurde. Für diese *Random-effect-Parameter* wurde ein Wert von  $90,5 \%$  abgeschätzt. Sämtliche Parameter konnten mit guter Präzision abgeschätzt werden. Lediglich der Baseline-Wert wurde mit moderater Präzision abgeschätzt, was aufgrund der geringen Probenanzahl und der hohen Variabilität in den gemessenen Werten zu erwarten war.

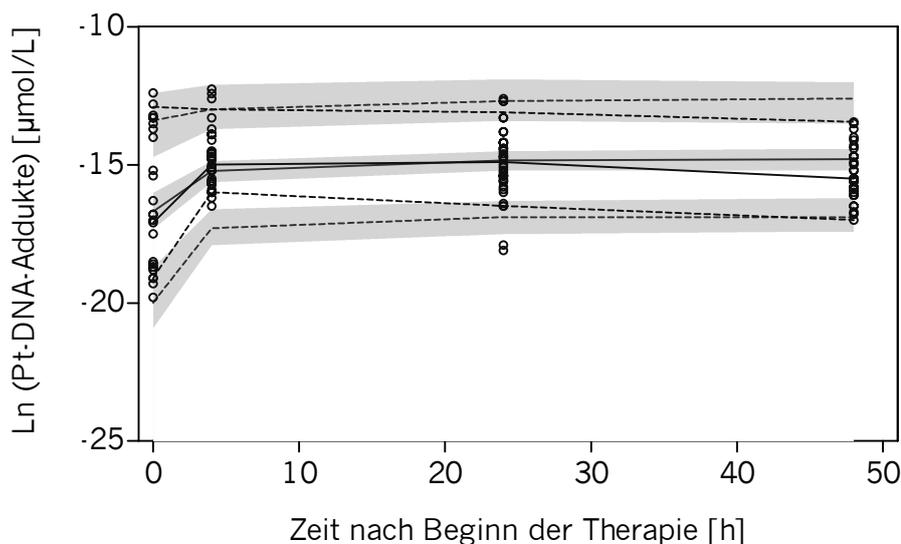
Die Qualität des entwickelten Modells wurde des Weiteren in den GOF-Abbildungen in Anhang C deutlich. In beiden Abbildungen ist erkennbar, dass die Daten zufällig und gleichmäßig um die Ursprungsgerade verteilt sind. Die Residuen verteilen sich zufällig in positiver und negativer Richtung.

#### *Kovariatenmodell*

Die Auswahl und Prüfung möglicher Kovariaten erfolgte analog zu der in Kap. 3.3.3 beschriebenen Methodik. Die visuelle Inspektion der Kovariaten-Parameter-Graphiken sowie die GAM-Analyse ergaben einen möglichen Einfluss der Platinvorbehandlung auf die  $k_B$ . Die Integration dieser Relation ergab eine Reduktion des OFV um 3,48 Punkte, was als nicht signifikant zu beurteilen war, und wurde daher verworfen.

#### *Modellevaluation*

Wie in Kap. 3.8.5 beschrieben, wurden für den in Abb. 4.37 dargestellten *visual predictive check* 1000 Datensätze auf der Basis des finalen PK/PD-



Modells simuliert.

Abb. 4.37 *Visual predictive checks* des finalen PK/PD-Modells;  
(○ beobachtete Konzentrationen, — Median, - - 5 und 95 %-

Perzentil; Simulation: — Median, --- 90 %-Prognoseintervalle,  
■ 95 %-Konfidenzintervalle)

Insgesamt betrachtet befinden sich die Mehrzahl der gemessenen Addukte innerhalb des 90 %-Prognoseintervall. Die zentrale Tendenz der gemessenen Werte kann durch das Modell bis 24 h nach der Infusion gut beschrieben werden. 48 h nach Infusionsbeginn wird die DNA-Platinierung vom Modell überschätzt. Die gemessenen Baseline-Werte sowie deren Variabilität werden durch das Modell abgebildet.

#### 4.5.5 Einfluss der Platin-DNA-Addukt-Bildung auf das Tumoransprechen

In einem weiteren Schritt wurde der Zusammenhang zwischen Platin-DNA-Addukt-Bildung und Tumoransprechen untersucht. Hierfür wurden die mit Hilfe des entwickelten PK/PD-Modells abgeschätzten individuellen Flächen unter der Platin-DNA-Adduktkurve mit dem Tumoransprechen der Patienten, die im Rahmen der Studie 1 therapiert wurden, in Beziehung gesetzt.

##### *Tumoransprechen*

Die Beurteilung des Tumoransprechens in der Studie erfolgte anhand der RECIST-Kriterien<sup>198</sup>. Die Kriterien ermöglichen eine Einteilung in folgende vier Kategorien:

- *Komplette Remission (CR)*  
Vollständige Rückbildung aller messbaren bzw. nicht messbaren, aber evaluablen Tumorbefunde, dokumentiert für zwei, mindestens vier Wochen auseinander liegende Kontrolluntersuchungen.
- *Partielle Remission (PR)*  
Größenabnahme sämtlicher evaluabler Tumorbefunde um  $\geq 50\%$  für mindestens vier Wochen, ohne Neuauftreten von Tumormanifestationen und ohne Progression irgendeines Tumorbefundes.

- „*No Change*“ (NC)  
Keine Größenänderung („stable disease“) der Tumorparameter für mindestens vier Wochen oder Tumorreduktion um weniger als 50 % oder Größenzunahme um  $\leq 25$  %. Der „No Chance“ (NC)-Status wird unterteilt in:
  - „*Minor response*“ (MR)  
Tumorrückbildung  $> 25$  % und  $< 50$  % des Ausgangsbefundes, d.h. die Kriterien einer partiellen Remission nicht erfüllend, und
  - „*Stable disease*“ (SD)  
Tumorrückbildung  $< 25$  %, gleich bleibender Befund oder Progression  $\leq 25$  %.
- „*Progressive Disease*“ (PD)  
Auftreten neuer Tumorkläsionen oder mehr als 25 %ige Größenzunahme der Tumorkläsionen in einem oder mehreren Herden.

33 Patienten waren in Bezug auf das Tumoransprechen auswertbar. Dabei hatte ein Patient eine partielle Remission, vier zeigten eine *minor response* (MR). Eine Stabilisierung (SD) erfuhren 13 der Patienten. Bei 15 Patienten wurde ein Fortschreiten der Erkrankung (PD) festgestellt.

#### *Abschätzung Platin-DNA-Addukt-Exposition*

Wie beschrieben, stellt die DNA-Adduktbildung die Basis der zytotoxischen Wirkung dar. Ausgehend von Untersuchungen von *Pieck et al.*, die auf den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Daten der Studie 1 basierten, sollte der Zusammenhang zwischen der Platin-DNA-Addukt-Exposition in den Leukozyten und dem Tumoransprechen evaluiert werden.

Die Platin-DNA-Addukt-Exposition, das heißt die Fläche unter der Addukt-kurve (*area under the adduct curve*, AUA) wurde durch die Implementierung einer weiteren Differentialgleichung abgeschätzt.

$$\frac{dAUA}{dt} = A_{AD} \tag{Gl. 4.13}$$

Für die folgenden Auswertungen wurde jeweils die AUA von Beginn der Infusion bis 48 h nach Beginn der Infusion herangezogen.

Die mediane  $AUA_{0-48h}$  im ersten Zyklus betrug 76,45 Pt-Atome/ $10^6$ Nukleotide·h und variierte zwischen 13,91 und 379,6 Pt-Atome/ $10^6$ Nukleotide·h. Im zweiten Zyklus zeigte sich ein ähnliches Bild. Im Median betrug die  $AUA_{0-48h}$  120,4 Pt-Atome/ $10^6$  Nukleotide·h (Spannweite 43,9 bis 721,6 Pt-Atome/ $10^6$ Nukleotide·h). Die Ergebnisse in den beiden Zyklen unterscheiden sich signifikant ( $p = 0,0022$ ) voneinander. Für diese Untersuchung wurde ein Wilcoxon-Test, ein nicht-parametrischer Test für gepaarte Stichproben, herangezogen. Im Folgenden wurden alle Untersuchungen nach Zyklen getrennt durchgeführt.

*Zusammenhang Tumoransprechen und Platin-DNA-Addukt-Exposition und Tumoransprechen*

Wie in Tab. 4.33 zusammengefasst, unterschieden sich die ermittelten  $AUA_{0-48 h}$ -Werte für Patienten mit SD oder PD signifikant in den beiden Behandlungszyklen, nicht aber die  $AUA_{0-48h}$ -Werte der Patienten mit MR.

Tab. 4.33 Vergleich der Fläche unter der Adduktkurve  $AUA_{0-48h}$  zwischen den beiden Behandlungszyklen (Median [Spannweite], p-Werte nach Wilcoxon-Test)

	<b><math>AUA_{0-48 h}</math> [Pt-Atome/<math>10^6</math>Nukleotide · h]</b>		<b>p-Wert</b>
	Zyklus 1	Zyklus 2	
SD	62,5 [24,9 – 163,4]	73,3 [43,9 – 196,9]	0,0210*
MR	192,8 [101,4 – 379,6]	246,8 [195,2 – 421,0]	0,6250
PR	171,4	189,0	n.e.
PD	87,9 [13,9 – 365,3]	128,9 [61,0 – 721,6]	0,0398*

\* kennzeichnet ein signifikantes Ergebnis  
n.e. nicht ermittelbar

Der Patient, der eine PR unter der Therapie mit Oxaliplatin erfuhr, wies eine in den beiden Zyklen vergleichbare  $AUA_{0-48h}$  auf. Die medianen  $AUA_{0-48h}$ -Werte der Patienten mit MR waren etwa zwei- bis dreimal höher als die der Patienten mit SD oder PD. Insgesamt betrachtet, waren die  $AUA_{0-48h}$  in allen Gruppen und Zyklen sehr variabel und schwankten um einen Faktor von 2 bis 12.

Abb. 4.38 veranschaulicht die in Tab. 4.33 aufgeführten Unterschiede in der  $AUA_{0-48h}$  in Abhängigkeit vom Tumoransprechen nach Zyklen getrennt.

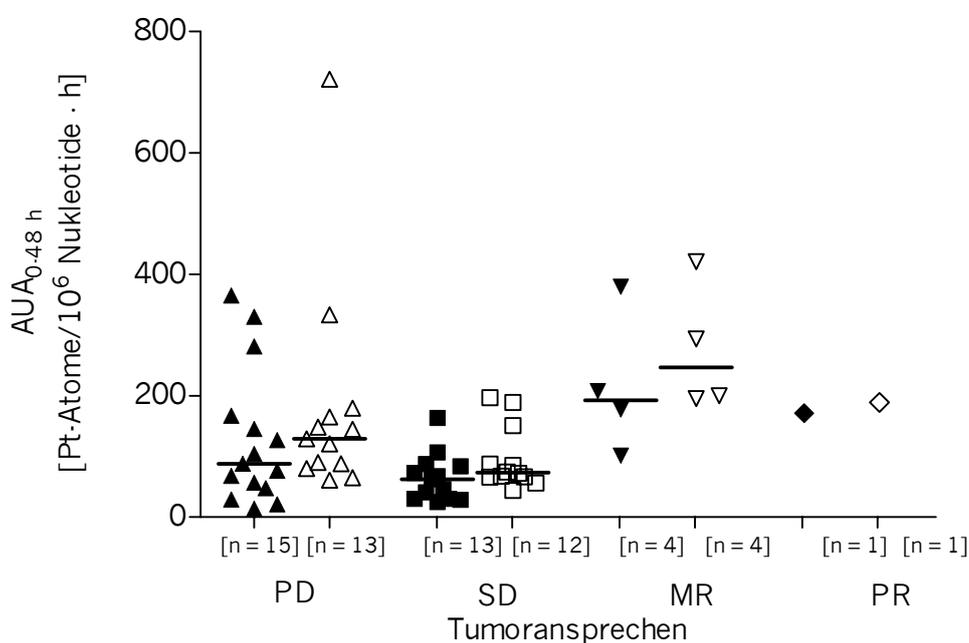


Abb. 4.38 Beziehung zwischen der Fläche unter der Adduktcurve  $AUA_{0-48h}$  und dem Tumoransprechen nach Behandlungszyklen getrennt; ■◆▲▼ Zyklus 1, □◇△▽ Zyklus 2, — Median

Für die weitere Evaluierung des Tumoransprechens wurde darüber hinaus eine Einteilung in zwei Gruppen vorgenommen:

- Gruppe 1 - Non-Responder: Patienten mit *progressive disease* und *stable disease*
- Gruppe 2 - Responder: Patienten mit *minor response* und partieller Remission

Anschließend wurde ein Vergleich der Platin-DNA-Addukt-Exposition zwischen den beiden Gruppen vorgenommen und mögliche Unterschiede mit Hilfe des nicht-parametrischen Rangsummentests nach *Mann und Whitney* auf ihre statistische Signifikanz geprüft. Die Abb. 4.39 veranschaulicht die Ergebnisse dieses Tests.

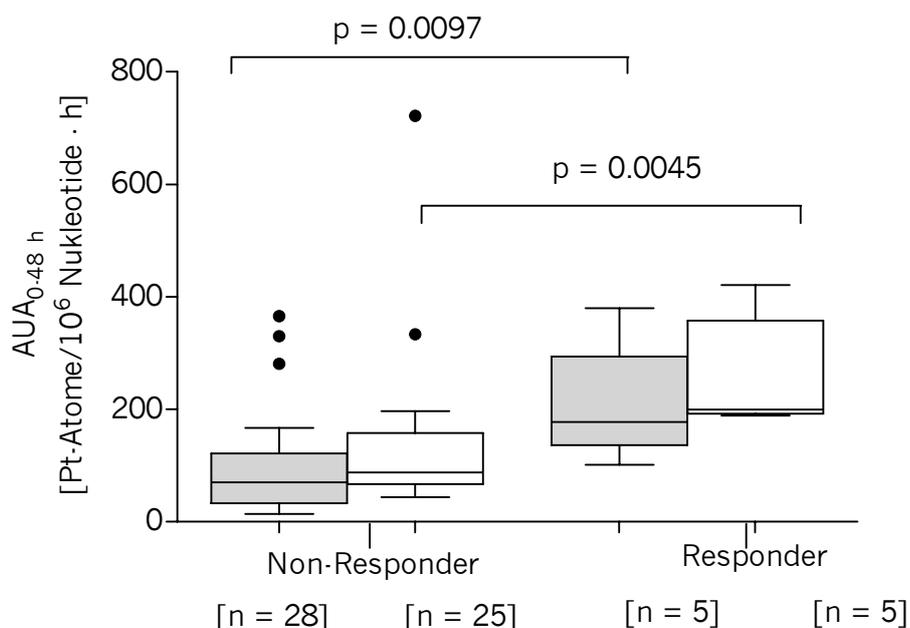


Abb. 4.39 Fläche unter der Adduktcurve (AUA<sub>0.48h</sub>) bei Non-Respondern und Respondern nach 130 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatin; ■ Zyklus 1, □ Zyklus 2

Es konnte gezeigt werden, dass sich die beiden Gruppen in den beiden Zyklen hinsichtlich der abgeschätzten AUA<sub>0.48h</sub>-Werte signifikant unterschieden. Die mediane AUA<sub>0.48h</sub> betrug für Non-Responder 70,3 Pt-Atome/10<sup>6</sup>Nukleotide·h im ersten und 67,1 Platin-Atome/10<sup>6</sup>Nukleotide·h im zweiten Zyklus. Für die Gruppe der Responder wurden im Median ca. dreifach höhere Werte (Zyklus 1: 177,6 Pt-Atome/10<sup>6</sup>Nukleotide·h; Zyklus 2: 199,8 Pt-Atome/10<sup>6</sup>Nukleotide·h) ermittelt.

*Beurteilung der Trennschärfe*

Aufgrund des insgesamt geringen Stichprobenumfangs in den beiden Gruppen wurde eine *receiver-operator-characteristic (ROC)*-Analyse durch-

geführt, um die Trennschärfe des angewandten diagnostischen Tests zu charakterisieren.

Abb. 4.40 zeigt eine ROC-Kurve. Zur Erstellung dieser Graphik wurden auf der Ordinate die Sensitivität und auf der Abszisse die Spezifität aufgetragen. Die Sensitivität spiegelt die relative Häufigkeit aller richtig positiven Testergebnisse wider. Die Spezifität ergibt sich im Gegensatz dazu aus den relativen Häufigkeiten falsch positiver Testergebnisse. Ein idealer Test würde eine hohe Spezifität und eine hohe Selektivität aufweisen die Fläche unter der in einer ROC-Graphik abgebildeten Kurve würde sich 1 annähern.

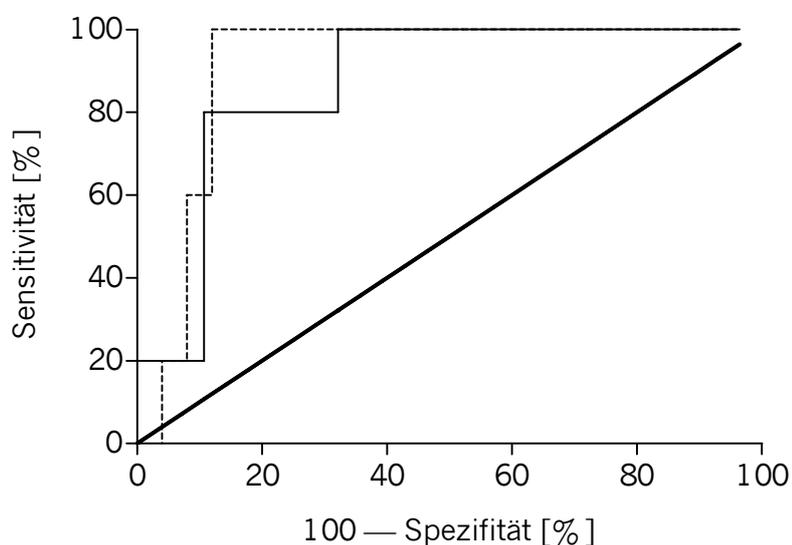


Abb. 4.40 ROC-Kurve für  $AUA_{0-48h}$ -Werten von Respondern und Non-Respondern nach  $130 \text{ mg/m}^2$  Oxaliplatin (—Zyklus 1, ...Zyklus 2)

Die ROC-Kurven beider Zyklen unterschieden sich deutlich von der Winkelhalbierenden. Darüber hinaus war die Fläche unter den ROC-Kurven mit Werten von 0,8714 im Zyklus 1 und 0,9120 hoch signifikant ( $p < 0,01$ ) verschieden von der Fläche unter der Winkelhalbierenden mit einem Wert von 0,5. Diese Ergebnisse bedeuten, dass, mit einer Wahrscheinlichkeit  $p = 0,8714$  bzw.  $p = 0,9120$  bei einem zufällig ausgewählten Responder, die  $AUA_{0-48h}$  einen höheren Wert annimmt als bei einem zufällig ausgewählten Non-Responder. Somit zeigt der durchgeführte Test eine gute Trennschärfe.

## 5 Diskussion

Die in dieser Arbeit entwickelten GF-AAS-Methoden ermöglichten die Quantifizierung von Ruthenium bzw. Gallium in Vollblut, Plasma und Urin nach der Applikation der neuen antitumoralen Metallkomplexe KP1019 bzw. KP46. Basierend auf den in den verschiedenen biologischen Matrices erhaltenen Konzentrationen, war es erstmals möglich, die pharmakokinetischen Eigenschaften von Ruthenium und Gallium nach Applikation der beiden genannten Zytostatika am Menschen zu charakterisieren. Darüber hinaus wurde erstmalig ein semimechanistisches Population-PK/PD-Modell für die Beschreibung des Zusammenhangs zwischen dem Platin-Konzentrations-Zeit-Verlauf im Ultrafiltrat und der Platin-DNA-Addukt-Bildung in Leukozyten nach intravenöser Applikation von Oxaliplatin entwickelt. Neben der Charakterisierung des zeitlichen Verlaufs der Platinkonzentrationen und der DNA-Platinierung konnte die Addukt-Exposition modellgestützt ermittelt und deren Bedeutung in Bezug auf das Tumoransprechen evaluiert werden. Die Ergebnisse werden nun unter den folgenden Gesichtspunkten diskutiert:

- Beurteilung der bioanalytischen Bestimmungsmethoden zur Quantifizierung von Ruthenium bzw. Gallium in verschiedenen biologischen Matrices
- Charakterisierung der Pharmakokinetik der neuen antitumoralen Metallkomplexe KP1019 und KP46 sowie deren Bedeutung für die Dosisfindung in der klinischen Entwicklung
- Beurteilung des entwickelten Populations-PK/PD-Modells für Oxaliplatin sowie Anwendungsmöglichkeiten des Modells in Bezug auf die Entwicklung rationaler Dosierungsstrategien für die Chemotherapie mit Oxaliplatin

## 5.1 Quantifizierung von Ruthenium bzw. Gallium in biologischen Matrices

Metallhaltige Zytostatika sind weit verbreitet in der Behandlung einer Vielzahl von Tumoren. Die Quantifizierung dieser antitumoralen Verbindungen in biologischen Proben ist unerlässlich für das Verständnis von Pharmakokinetik, Pharmakodynamik und Metabolismus.

### 5.1.1 Quantifizierung von Gallium in Vollblut, Plasma und Urin

Für die Bestimmung der nicht radioaktiven Verbindungen von Gallium wurden in den letzten Jahren eine Vielzahl verschiedener Techniken beschrieben<sup>199-202</sup>. Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzte GF-AAS ist aufgrund ihrer Selektivität und Sensitivität besonders für die Bestimmung von Spurenelementen in biologischen Matrices geeignet. Die Quantifizierung von Gallium mittels GF-AAS stellte jedoch stets eine besondere Herausforderung dar. Gallium liegt in biologischen Proben vornehmlich in der Form leichtflüchtiger Salze, wie Galliumchlorid, vor. Darüber hinaus beeinträchtigen Interferenzen mit in biologischen Proben in großen Mengen vorkommenden Magnesium- und Calciumverbindungen die Quantifizierung. In den letzten drei Jahrzehnten nahm die Erforschung geeigneter Aufschlusstechniken und Modifier eine zentrale Stellung in der Entwicklung neuer analytischer Methoden ein<sup>203-206</sup>. Anhand der vier zitierten Publikationen sollen im Folgenden die Probenaufarbeitung, die Verwendung von chemischen Modifiern, das Temperaturprogramm sowie die Bestimmungsgrenze (LLOQ) diskutiert werden.

*Temperaturprogramm*

In Tab. 5.1 sind die Temperaturprogramme dieser Arbeit sowie der zitierten Publikationen zusammengefasst.

Tab. 5.1 Temperaturprogramme zur Bestimmung von Gallium in biologischen Matrices

Referenz	Trocknung	Vorveraschung	Veraschung	Atomisierung
Diese Arbeit	95°C, 5 s 110°C, 60 s 120°C, 10 s	400°C, 25 s	1000 – 1500 °C, 18,6 s	2600°C, 3 s
<i>Ranisteano-Bourdon et al., 1977</i> <sup>206</sup>	100°C, 30 s	–	450°C, 30 s	2050°C, 1,5 s
<i>Newman, 1978</i> <sup>203</sup>	125°C, 30 s	–	900°C, 30 s	2500°C, 10 s
<i>Kelsen et al., 1980</i> <sup>205</sup>	100°C, 60 s	–	1000°C, 30 s	2500°C, 7 s
<i>Nakamura et al., 1982</i> <sup>204</sup>	100°C, 60 s	–	400°C, 45 s	2750°C, 6 s

Alle in Tab. 5.1 aufgeführten Temperaturprogramme beinhalten eine im Vergleich zur Gesamtanalysezeit lange Trocknungsphase zum Verdampfen der in das Graphitrohr eingebrachten Lösungsmittel. Die Konditionen dieser Trocknungsphase waren dabei jedoch sehr unterschiedlich. So wählten *Ranisteano-Bourdon et al.* als auch *Newman* eine im Vergleich kurze Trocknungsdauer von 30 s. Dieser Unterschied ist vor allem auf das niedrigere Injektionsvolumen von maximal 25 µL<sup>203</sup> bzw. 10 µL<sup>206</sup> pro Injektion zurückzuführen. Das Injektionsvolumen dieser Arbeit betrug 30 µL und setzte sich aus 20 µL Probe und 10 µL Modifier zusammen. *Nakamura et al.* injizierten mit 50 µL das im Vergleich größte Volumen und mussten aufgrund des somit größeren Lösungsmittelvolumens ebenfalls eine Dauer von 60 s wählen. Je größer das Injektionsvolumen, desto länger sollte die Trocknungsphase gewählt werden. Siedeverzüge, die zum Verlust von Teilen der Proben vor Erreichen der Messphase führen können, und damit zu hohen

Impräzisionen, werden so vermieden. Eine mehrstufige Trocknungsphase, wie sie im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde, verhinderte das Auftreten von Siedeverzügen noch zusätzlich.

Auf eine Vorveraschungsphase, wie sie in dieser Arbeit angewendet wurde, verzichteten die Autoren der zitierten Publikationen. Darüber hinaus lagen die Veraschungstemperaturen in dieser Arbeit deutlich über denen in der Literatur beschriebenen<sup>203–206</sup>. Temperaturen oberhalb von 1000°C sind für Matrices mit hohem Begleitstoffanteil (Plasma und Vollblut) notwendig. Um eine möglichst vollständige Abtrennung der Matrixbegleitstoffe vor der Messphase zu erreichen, wurden speziell an die verschiedenen Matrices angepasste Temperaturprogramme entwickelt. Die Verwendung des Matrix-Modifiers PdNO<sub>3</sub> begünstigte dabei einerseits die Verwendung der im Vergleich höheren Temperaturen, da der Analyt in den Proben stabilisiert wurde. Andererseits macht der zusätzliche Begleitstoffeintrag die höheren Temperaturen erforderlich. Es sei an dieser Stelle erwähnt, dass Gallium ohne Modifizierzusatz nur bis 800°C stabil ist<sup>176</sup>. Ein Grund für die deutlich niedrigeren Veraschungstemperaturen in den zitierten Publikationen sind wiederum die bereits beschriebenen unterschiedlichen Injektionsvolumina<sup>203,206</sup>. Wird ein geringeres Volumen injiziert, so ergibt sich auch ein geringerer Eintrag an zu veraschenden Matrixbestandteilen. *Nakamura et al.* wählten trotz des im Vergleich hohen Injektionsvolumens von 50 µL lediglich Veraschungstemperaturen von 400°C. Diese niedrige Veraschungstemperatur konnte jedoch, um eine ausreichende Abtrennung der störenden Matrixbestandteile zu erreichen, durch eine Verlängerung der Veraschungszeit auf 45 s kompensiert werden<sup>204</sup>.

Die niedrigste Atomisierungstemperatur wurde von *Ranisteano-Bourdon et al.* beschrieben, wobei sie eine schrittweise Steigerung der Temperatur um 400°C/s einbauten und somit am Ende der 1,5 s dauernden Atomisierungsphase 2650°C erreichten. Die höchste Atomisierungstemperatur von 2750°C fand sich in der Publikation von *Nakamura et al.* *Newman* und *Kelsen et al.* verwendeten Atomisierungstemperaturen von 2500°C; diese Arbeit 2600°C. Diese vergleichsweise geringen Unterschiede

sind vermutlich auf gerätespezifische Unterschiede zurückzuführen<sup>207</sup>.

Ausgehend von der unterschiedlichen Anzahl und Dauer der einzelnen Phasen ergaben sich unterschiedlich lange Analysenzeiten. Kurze Analysenzeiten begünstigen einerseits einen hohen Probendurchsatz und ermöglichen andererseits eine längere Lebenszeit der Graphitrohre, da diese nur kurzfristig hohen Temperaturen ausgesetzt werden können. Die Gesamtanalysenzeit pro Injektion betrug für diese Arbeit 123,6 s und war damit länger als die in den zitierten Arbeiten, was in dem höheren Injektionsvolumen und dem Modifiereinsatz begründet war.

### *Probenaufarbeitung*

Ziel der Probenaufarbeitung war es, einen vollständigen Aufschluss der Plasma-, Vollblut- und Urinproben zu erhalten. Für den Einsatz in der Routine war es darüber hinaus wichtig, ein Einfaches und wenig zeitaufwändiges Verfahren zu entwickeln. In verschiedenen Vorversuchen wurden daher in der Literatur beschriebene Methoden herangezogen und versucht, diese gemäß diesen Bedingungen anzupassen und zu optimieren. In der Literatur stehen für den Aufschluss biologischer Proben verschiedene Methoden zu Verfügung. Für die Bestimmung von Gallium fanden sich vor allem Methoden, die den Aufschluss im salpetersauren Milieu beinhalten<sup>203,206</sup>. Ausgehend von den drei zitierten Publikationen sowie den Erfahrungen aus der Bestimmung von Platin in biologischen Matrices in der Abteilung<sup>71</sup> wurde die Probenaufarbeitung mit 65 %iger HNO<sub>3</sub> untersucht und optimiert. In der Tab. 5.2 sind Verfahren der Probenaufarbeitung sowie die eingesetzten Lösungen und verwendeten Modifier in dieser Arbeit sowie aus den zitierten Publikationen zusammengestellt.

Tab. 5.2 Probenaufarbeitung und Modifier der GF-AAS-Methoden zur Quantifizierung von Gallium in biologischen Matrices

Referenz	Matrix	Modifier	Aufschlussbedingungen	
Diese Arbeit	Plasma	PdNO <sub>3</sub>	Konz. HNO <sub>3</sub> H <sub>2</sub> O	Wasserbad: 80°C Dauer: 50 min
	Vollblut			Ultraschallbad: 80°C Dauer: 30 min
	Urin			Wasserbad: 80°C Dauer: 30 min
<i>Ranisteano-Bourdon et al., 1977</i> <sup>206</sup>	Serum	n.a.	5 % Triton-X H <sub>2</sub> O	Raumtemperatur, Dauer: k.A.
	Vollblut			
	Gewebe (getrocknet)			
<i>Newman, 1978</i> <sup>203</sup>	Serum	0,5 mM EDTA	Konz. HNO <sub>3</sub> H <sub>2</sub> O	Reflux: 100°C Dauer: 24 h
<i>Kelsen et al., 1980</i> <sup>205</sup>	Plasma	n.a.	Plasma	n.a.
	Urin			
<i>Nakamura et al. 1982</i> <sup>204</sup>	Serum	0,5 mM EDTA	0,5 mM EDTA Phospatpuffer (pH 6,8) H <sub>2</sub> O	k.A.

k.A. keine Angaben

n.a. nicht angewendet

Der Probenaufschluss unter Zugabe von 65 %iger HNO<sub>3</sub> und anschließender Inkubation bei 80°C im Wasserbad bzw. Ultraschallbad erwies sich in dieser Arbeit für alle drei untersuchten Matrices als günstig. Anders als in der Dissertation von *A. Pieck*<sup>70</sup> konnte eine klare Lösung von Vollblut nur durch die Inkubation im Ultraschallbad erreicht werden. Als maximale Inkubationszeit wurde eine Stunde angestrebt. Auch Urinproben wurden unter Verwendung 65 %iger HNO<sub>3</sub> aufgeschlossen, da sich auf diese Weise der in den Patientenproben in unterschiedlichem Ausmaß auftretende Niederschlag in Lösung bringen ließ. Für urinhaltige Proben, die eine

Konzentration zwischen 1 und 20 µg/L Gallium aufwiesen, wurde vor dem Aufschluss ein Trocknungsschritt eingeführt. Die erhaltenen klaren Lösungen wurden anschließend mit destilliertem Wasser in den entsprechenden Konzentrationsbereich verdünnt.

Auch *Nakamura et al.*, *Newman* und *Ranisteano-Bourdon et al.* verwendeten salpetersaure Aufschlussverfahren. Während *Nakamura et al.* keine Angaben zu Temperatur und Dauer der Inkubation machten, zeichnen sich die Aufschlüsse der anderen Autoren durch relativ lange Aufschlusszeit von 12 bis 24 h aus<sup>203,204,206</sup>. Es bleibt dabei anzumerken, dass *Ranisteano-Bourdon et al.* dieses Verfahren für Gewebeproben etablierten und somit aufgrund der komplexen Matrix längere Aufschlusszeiten zu erwarten waren. Darüber hinaus fand die Lyse bei Raumtemperatur statt, was ebenfalls längere Inkubationszeiten erforderlich machte. *Newman* beschrieb dagegen ein komplexes mehrstufiges Verfahren, das, neben dem 24-stündigen Aufschluss unter Reflux, auch Filtrations- und Extraktions- sowie Waschschriffe beinhaltet. Viele Modifikationsschritte und Übertragungen in andere Gefäße erhöhen die Gefahr von Probenverlusten sowie Verunreinigungen und können somit zu einer Beeinträchtigung der Präzision zur Folge haben. *Kelsen et al.* führten dagegen keine Aufarbeitung der Plasmaproben durch. Die Urinproben wurden in einem Einschnitt-Verfahren mit 0,5 N-HNO<sub>3</sub> aufgearbeitet. Die Autoren beschrieben auch die neben dieser Arbeit höchsten Veraschungstemperaturen, die sich somit aus der Probenaufarbeitung erschließen.

Während der Vorversuche zeigte sich eine deutliche pH-Abhängigkeit der Gallium-Absorptionssignale (Ergebnisse nicht gezeigt), wobei mit abnehmendem pH-Wert ein Ansteigen der Absorptionssignale zu beobachten war. *Nakamura et al.* beschrieben ebenfalls eine pH-Abhängigkeit der Absorptionssignale. So konnten sie nachweisen, dass die Signale bei pH-Werten von 3,8 und 8,6 konstant waren, außerhalb dieses Bereiches aber abnahmen<sup>204</sup>. Nach dem Aufschluss mit 65 %iger HNO<sub>3</sub> stellten sie daher die Serumproben mit Hilfe von Phosphatpuffern auf einen pH-Wert von 6,8

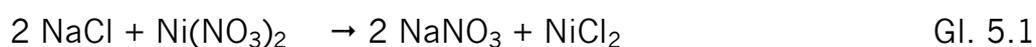
ein. Darüber hinaus prüften sie einen alternativen Aufschluss mit konzentrierter Salzsäure. In Anwesenheit von HCl oder im basischen Milieu bilden sich flüchtige Galliumverbindungen, z.B. Galliumchlorid, respektive Galliumhydroxid. Die Autoren stabilisierten daher ihre Proben zusätzlich mit 0,5 mM EDTA und konnten so das Entstehen leichtflüchtiger Galliumverbindungen durch den Einfluss der Säure minimieren und einen positiven Effekt auf die Galliumquantifizierung beobachten. Auch *Newman* verwendete EDTA als Modifier. Der Chelatbildner wurde den Proben zugesetzt, um Calcium- und Magnesiumionen, die in großem Ausmaß in Serumproben vorkommen und zu Interferenzen während der Galliumbestimmung führen, zu komplexieren. Die positive Wirkung von EDTA auf die Absorptionssignale von Gallium konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Als Begründung ist vor allem die unterschiedliche Instrumentierung zu sehen. So verfügte das in dieser Arbeit eingesetzte GF-AAS-System über eine Zeeman-Untergrundkorrektur. Der Zeeman-Effekt ermöglicht die Trennung des Signals des Analyten vom Untergrundsignal. Durch die Verwendung dieser Korrektur waren die Interferenzen von Calcium und Magnesium mit dem Analyten von geringer Bedeutung und somit der Einfluss von EDTA auf das Galliumsignal nicht erkennbar. Auf die Verwendung von EDTA wurde daher im Rahmen dieser Arbeit verzichtet.

### *Modifier*

Wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben, verwendeten verschiedene Autoren EDTA als chemischen Modifier für die Bestimmung von Gallium. Der positive Einfluss konnte in dieser Arbeit, wie bereits diskutiert, nicht bestätigt werden. Jedoch zeigte sich in den Voruntersuchungen, dass die Verwendung eines Matrix-Modifiers für die Bestimmung unerlässlich war. In der Literatur findet sich eine Vielzahl von Modifiern für die Bestimmung von Gallium in biologischen Matrices<sup>176,208</sup>. Die für Gallium empfohlenen Verbindungen führen allesamt zur Stabilisierung des Galliums, indem leichtflüchtige Verbindungen, wie Galliumchlorid, vornehmlich zu weniger flüchtigem Galliumnitrat umgesetzt werden. Die für den Aufschluss

verwendete konzentrierte Salpetersäure kann daher auch als Modifizier betrachtet werden, da durch ihren Einsatz Chlorid in Form von HCl aus der Probe eliminiert wird.

Darüber hinaus konnte unter der Verwendung von Palladiumnitrat in salpetersaurer Lösung eine Erhöhung der Absorptionssignale beobachtet werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Auch wenn der Mechanismus bislang nicht vollständig geklärt werden konnte, so scheint dieser analog zu den von *Volynskii* für Nickelnitrat-Modifizier beschriebenen folgenden Reaktionen zu sein<sup>208</sup>:



Da sich die Verwendung des Palladiumnitrat-Modifiziers als günstig erwies, wurde auf die Untersuchung weiterer Matrix-Modifizier, wie Nickelnitrat, verzichtet.

### *Validierung*

Die vorliegende Arbeit präsentiert eine nach internationalen Kriterien validierte Methode für die Bestimmung von Gallium in biologischen Matrices. In den zitierten Arbeiten wurden entweder keine oder nur ungenügende Angaben zu Prüfung der Richtigkeit und Präzision der gemessenen Galliumkonzentrationen gemacht<sup>203-206</sup>. Jedoch lassen sich die Methoden hinsichtlich der Empfindlichkeit diskutieren. Unter Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnungsfaktoren betragen die Messbereiche für Plasma und Urin 0,5 bis 10 µg/L und für Vollblut 1 bis 10 µg/L. Durch das Probenvolumen von 20 µL konnten somit am LLOQ 10 pg bzw. 20 pg Gallium

richtig und präzise bestimmt werden. *Nakamura et al.* beschrieben 120 pg Gallium, *Newman* in Abhängigkeit vom Injektionsvolumen zwischen 40 pg und 200 pg Gallium und *Ranisteano-Bourdon et al.* 50 pg als Bestimmungsgrenze. *Kelsen et al.* etablierten mit 20 ng Gallium die am wenigsten empfindliche Methode<sup>203-206</sup>. Neben dem Einsatz des Palladiumnitrat-Modifiers und der Zeeman-Untergrundkorrektur ist auch das Alter der zitierten Publikationen zu berücksichtigen. Weiterentwicklungen der GF-AAS-Systeme sowie der Graphitrohre und Hohlkathoden innerhalb der letzten Jahrzehnte begünstigten den deutlichen Unterschied in der Sensitivität.

### 5.1.2 Quantifizierung von Ruthenium in Plasma und Urin

Im Gegensatz zu Gallium wurden rutheniumhaltige Verbindungen bislang nur sehr selten in der Therapie von Tumorerkrankungen oder anderen Erkrankungen eingesetzt. Bis heute wurde lediglich NAMI-A, ein bereits in Kap. 1.2.1 vorgestellter antimetastatischer Rutheniumkomplex, klinisch angewandt. Aufgrund der limitierten klinischen Anwendung finden sich für Rutheniumverbindungen nur wenige Bestimmungsmethoden in biologischen Matrices<sup>209-211</sup>. Während zunächst vor allem GF-AAS-Methoden entwickelt wurden<sup>210</sup>, zeigte sich in den letzten Jahren eine verstärkte Anwendung der Induktiv-gekoppelten-Plasma-Massenspektrometrie in der Bioanalytik von Ruthenium<sup>209,211</sup>. Unabhängig von den angewandten Techniken wurden die neuen Verfahren und die Methoden dieser Arbeit gemäß den internationalen Anforderungen für Bioanalytik validiert<sup>209-211</sup>.

Im Folgenden sollen die in dieser Arbeit entwickelten Methoden mit der von *Crul et al.* entwickelten GF-AAS-Methode hinsichtlich Probenaufarbeitung, Temperaturprogramm, Bestimmungsgrenze sowie Richtigkeit und Präzision diskutiert werden. Die von *Crul et al.* vorgestellten Methoden erlauben die Bestimmung von Ruthenium in Plasma, Ultrafiltrat und Urin<sup>210</sup>.

### *Temperaturprogramm*

Die Temperaturprogramme der vorliegenden Arbeit und von *Crul et al.* wiesen im Hinblick auf die Gesamtanalysendauer ausgeprägte mehrstufige Trocknungsphasen auf. Für diese Arbeit dauerte die Trocknung 75 s und beinhaltete ein schrittweises Ansteigen der Trocknungstemperatur von 95 auf 120°C. *Crul et al.* verwendeten einen vierstufigen Temperaturverlauf der Trocknungsphase mit einer Gesamtdauer von 56 s. Der Unterschied in der Dauer lässt sich anhand der eingesetzten Injektionsvolumina erklären, die bei *Crul et al.* 10 µL und in dieser Arbeit 20 µL betragen. Das in beiden Arbeiten angewandte schrittweise Erhöhen der Trocknungstemperatur verhindert das Auftreten von Siedeverzügen und beugt somit Analytverlust vor der Messphase vor.

Ein weiterer deutlicher Unterschied zwischen den Methoden dieser Arbeit und der von *Crul et al.* zeigte sich in Bezug auf die Vorveraschung und die Veraschung. Die in dieser Arbeit entwickelten Temperaturprogramme beinhalten für urin- und plasmahaltige Proben eine Phase der Vorveraschung mit 650°C mit einer Dauer von 35 s. Eine Vorveraschungsphase wurde in der zitierten Publikation dagegen nicht etabliert. Die Veraschungstemperatur beträgt unabhängig von der analysierten Matrix 1200°C und dauert 29 s. Die Veraschungstemperaturen dieser Arbeit sind mit 1500°C für Plasma und 1600°C für urinhaltige Proben deutlich höher. Auch dieser Unterschied liegt vor allem in den verwendeten Injektionsvolumina begründet. Ein größeres Injektionsvolumen bedeutet auch ein größerer Eintrag von Matrixbegleitstoffen in das Graphitrohr. Um eine möglichst vollständige Abtrennung dieser Begleitstoffe zu erreichen, wurden neben einer längeren Veraschung auch höhere Temperaturen erforderlich. Da jedoch höhere Temperaturen auch gleichzeitig eine Beeinträchtigung der Lebensdauer zur Folge haben können, stellt die Einführung einer Vorveraschungsphase bei niedrigeren Temperaturen zur Abtrennung leichtflüchtiger Matrixbestandteile eine schonende Alternative dar.

*Crul et al.* wählten mit 2800°C eine etwas höhere Atomisierungstemperatur

als die im Rahmen dieser Arbeit (2700°C). Eine höhere Atomisierungstemperatur ist meist mit höheren Absorptionen verbunden, gleichzeitig aber auch mit einem vermehrten Graphitabtrag aufgrund der ab 2000 °C beginnenden Kohlenstoffsublimation.

Neben dem geringeren Probenvolumen könnten die Unterschiede in den Temperaturprogrammen auch gerätebedingt sein. Die Art der Temperaturkontrolle und die Unterschiede in der Leitfähigkeit zwischen Graphitrohr und Metallkontakten könnten für die Unterschiede in den Temperaturprogrammen dieser Arbeit und der von *Crul et al.* eine Erklärung sein. Eine Übertragung von Methoden von einem Gerät auf das andere ist daher nur mit einer Optimierung der einzelnen Phasen der Temperaturprogramme möglich.

Aus den Differenzen in der Dauer der einzelnen Phasen der vorgestellten Temperaturprogramme sowie der zusätzlichen Vorveraschungsphase resultiert in dieser Arbeit eine deutlich längere Gesamtanalysenzeit von 146,7 s pro Injektion. Die Analysenzeit der von *Crul et al.* präsentierten Methode beträgt 105,6s<sup>210</sup>. Insgesamt ermöglichen kurze Analysenzeiten einen hohen Probendurchsatz und eine längere Lebensdauer der Graphitrohre, da diese weniger lange hohen Temperaturen ausgesetzt sind. Das im Vergleich doppelte Injektionsvolumen der Methoden dieser Arbeiten machte, wie bereits erwähnt, die Verwendung einer ausgedehnten Veraschungsphase sowie einer Vorveraschungsphase unerlässlich.

### *Probenaufarbeitung*

Die Aufarbeitung der Proben erfolgte sowohl bei *Crul et al.* als auch in dieser Arbeit in der Form verschiedener Verdünnungsschritte. *Crul et al.* setzten für alle drei Matrices entweder einen Puffer, bestehend aus 0,9 %iger Kochsalzlösung, die 16 mL HCl (37%) in einem Liter enthielt, oder Puffer-Plasma-Mischungen in den Verhältnissen 1:5 und 1:10 ein. Die klinischen Plasma- und Urinproben wurden mindestens im Verhältnis 1:10, die Ultrafiltratproben im Verhältnis 1:2 verdünnt<sup>210</sup>.

Da bei der Quantifizierung mit Hilfe der GF-AAS die Matrix einen

entscheidenden Einfluss auf die Signalhöhe hat, wurden im Rahmen dieser Arbeit matrixspezifische Probenaufarbeitungsschemata entwickelt. So erfolgte die Probenaufarbeitung als Ein- oder Zwei-Schritt-Verfahren. Plasmahaltige Proben wurden mit einer 1 %igen Triton-X-Lösung (V/V) verdünnt, während die Verdünnung von Urinproben mit 6,5 %iger HNO<sub>3</sub> (V/V) erfolgte. Die Erstellung der QC-Proben sowie der Standards erfolgte matrixadaptiert. *Crul et al.* verwendeten für die Quantifizierung unabhängig von der Matrix der Proben hergestellte Standards, die auf Plasma, das 1:10 mit dem zuvor beschriebenen Puffer verdünnt wurde, basierten. Der Effekt der Matrix verringert sich jedoch, je kleiner deren Anteil in der späteren Analysenprobe wird. Da *Crul et al.* Matrices mit einem hohen Begleitstoffanteil, wie Urin, stets mindestens 1:10 mit Puffer bzw. Puffer-Plasma-Mischung verdünnten, betrug der Anteil an Matrix, der nicht der Kalibriermatrix entsprach, maximal 10 %. Der Matrix-Effekt auf die Absorptionssignale spielte somit eine untergeordnete Rolle<sup>210</sup>.

### *Validierung*

Vergleicht man nun die Bestimmungsgrenzen (LLOQ) der vorgestellten Methoden, so konnten in dieser Arbeit deutlich niedriger Rutheniumkonzentrationen richtig und präzise in den beiden Matrices bestimmt werden. Das LLOQ dieser Arbeit betrug Plasma 30,0 und 3,0 µg/L. In der Arbeit von *Crul et al.* lag das LLOQ im Plasma und im Urin bei 1,1 µM NAMI-A, was ca. 113,5 µg/L Ruthenium entspricht. Nach Korrektur der Bestimmungsgrenze durch das unterschiedliche Injektionsvolumen, zeichneten sich die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Methoden mit einer Ruthenium-Menge von 600 bzw. 60 pg am LLOQ im Vergleich zu 1135 pg am LLOQ bei *Crul et al.* durch eine bessere Empfindlichkeit aus. Auch die Messbereiche waren unterschiedlich. So betragen diese bei *Crul et al.* zwischen 1,1 und 220 µM NAMI-A, was ca. 22 bzw. 4400 µg/L Ruthenium entsprach. Deutlich breiter wurden die Messbereiche in der vorliegenden Arbeit gewählt und evaluiert. Die Messbereiche im Plasma betragen 30 bis 30000 µg/L Ruthenium im Plasma und 3,0 bis 24,000 µg/L im Urin.

Richtigkeit und Präzision der Methoden wurden anhand der *Between-day*-Richtigkeit und -Präzision geprüft. Für die Bestimmung im Plasma wurden bei gemeinsamer Betrachtung aller QC-Proben der drei Konzentrationsbereiche für die Richtigkeit mit Werten zwischen  $-7,6\%$  und  $+5,3\%$  (RE) bestimmt. Im Urin betrug der RE der QC-Proben im gesamten Konzentrationsbereich zwischen  $-4,2$  und  $+2,1\%$ . Die internationalen Anforderungen bezüglich der Richtigkeit konnten somit erfüllt werden. *Crul et al.* berichteten relative Fehler von  $-3\%$  bis  $+1\%$  im Plasma und  $-7\%$  bis  $-2\%$  im Urin. Im Plasma konnte sie demzufolge die QC-Proben mit einer größeren Richtigkeit bestimmen, als es mit den entwickelten Methoden im Rahmen dieser Arbeit möglich war. Jedoch ist zu berücksichtigen, dass in der vorliegenden Arbeit ein deutlich größerer Konzentrationsbereich abgedeckt wurde. In Bezug auf die Richtigkeit im Urin sind beide Methoden vergleichbar.

Die *Between-Day*-Präzision bzw. -Impräzision der QC-Proben der in dieser Arbeit vorgestellten Methoden wurden im Plasma mit Werten  $< 6,8\%$  und im Urin mit Werten  $< 7,1\%$  bestimmt. Auch in Bezug auf die Präzision wurden damit die international geltenden Anforderungen erfüllt<sup>165</sup>.

### 5.1.3 GF-AAS und ICP-MS in der Bioanalytik von Metallkomplexen

Geeignete Quantifizierungsmethoden bilden die Grundlage für die Charakterisierung pharmakokinetischer und -dynamischer Eigenschaften von Arzneistoffen. Im Hinblick auf die Routineanwendung dieser Methoden im Rahmen von z.B. therapeutischem Drug Monitoring, und somit zur Dosisindividualisierung, sollten sich diese Methoden durch eine einfache Probenaufarbeitung, geringe Analysenzeiten und vor allem durch eine ausreichende Empfindlichkeit auszeichnen, um auch geringe Mengen des Arzneistoffes richtig und präzise bestimmen zu können. Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit von biologischen Matrices und der zum Teil geringen Konzentrationen der Analyten in diesen Proben ist es unverzichtbar, sensitive und selektive Methoden zu entwickeln.

Insgesamt zeichnen sich die in dieser Arbeit beschriebenen Methoden durch eine einfache Probenaufarbeitung und hohe Empfindlichkeit aus und eignen sich somit für die routinemäßige Anwendung. Darüber hinaus konnte anhand der übrigen Validierungskriterien gezeigt werden, dass Methoden die internationalen Anforderungen erfüllten und somit eine richtige und präzise Quantifizierung von Gallium bzw. Ruthenium in den biologischen Matrices erlauben<sup>165</sup>. Jedoch weist die GF-AAS hinsichtlich ihrer Sensitivität deutliche Grenzen auf. So konnten *Henke et al.* und *Brouwers et al.* ICP-MS-Methoden für die Bestimmung von Ruthenium im Plasma, Ultrafiltrat und Urin entwickeln, deren LLOQ mit 5 pg/μL im Plasma etwa ein Tausendstel des LLOQ in dieser Arbeit betrug. Hinsichtlich Richtigkeit und Präzision unterscheiden sich die beiden Techniken kaum<sup>209,211</sup>.

Die GF-AAS erlaubt keine Differenzierung der gemessenen Ruthenium bzw. Gallium-Spezies. Ähnlich wie für die Platin-Komplexe scheint es auch für KP46 und KP1019 pharmakologisch relevantere Spezies zu geben. Im Gegensatz zu den Platin-Komplexen werden für KP1019 und KP46 vor allem die Transferrinaddukte als pharmakologisch aktiv beschrieben, da diese gezielt über den Transferrin-Rezeptor in die Zelle aufgenommen werden. In den letzten Jahren konnten Methoden, wie die ICP-MS in Kombination mit CE oder HPLC als Speziationssystem, für eine selektive Untersuchung der Konjugate von Ruthenium und Gallium mit z.B. Albumin, Transferrin oder der DNA entwickelt werden<sup>209,212–215</sup>. Hinsichtlich der Kompatibilität mit Separations-Techniken und damit verbundener Selektivität sowie der Sensitivität ist die IC-MS der GF-AAS daher deutlich überlegen.

## 5.2 Individuelle Pharmakokinetik nach Applikation von KP46 und KP1019

### 5.2.1 Individuelle Pharmakokinetik von Gallium nach Applikation von KP46

Erstmalig wurden im Rahmen dieser Arbeit die pharmakokinetischen Eigenschaften von Gallium nach peroraler Gabe von KP46 am Menschen untersucht. Verschiedene Autoren beschrieben ein Zwei-Kompartiment-Modell für die PK von Gallium nach Applikation sowohl des intravenös applizierten Galliumnitrats als auch des peroral verabreichten Galliummaltolats<sup>216,217</sup>. Die Gallium-Konzentrations-Zeit-Profile in Plasma und Vollblut waren individuell sehr verschieden. Zudem war die Anzahl der Patienten sehr gering, was die Wahl eines adäquaten pharmakokinetischen Modells erschwerte. Die im Folgenden diskutierten pharmakokinetischen Parameter wurden daher durch eine nicht-kompartimentelle Datenanalyse (NCA) unter Verwendung von WinNonlin® Professional Version 5.01 ermittelt. Die pharmakokinetischen Parameter wurden jeweils aus den Konzentrationen nach der ersten und letzten Gabe berechnet. Da aufgrund der deutlich längeren Sammlungszeit nach der letzten Gabe eine verlässlichere Abschätzung der für die NCA essentiellen  $t_{1/2z}$  möglich war, sollen im Folgenden vor allem die pharmakokinetischen Parameter nach der 14. Administration diskutiert werden.

Die absolute Bioverfügbarkeit von KP46 ist bislang nicht bekannt. Diese konnte in der Berechnung der pharmakokinetischen Parameter somit nicht berücksichtigt werden. Die relative Bioverfügbarkeit, bezogen auf den peroralen Gallium-Komplex Galliummaltolat, betrug weniger als 10 %. *Bernstein et al.* schätzten für Galliummaltolat eine Bioverfügbarkeit von 25 bis 57 % in Bezug auf das i.v. applizierte Galliumnitrat ab<sup>216</sup>. Für das ebenfalls peroral applizierbare Galliumchlorid wurde eine Bioverfügbarkeit von 2 % beschrieben<sup>218</sup>. Ausgehend von diesen Untersuchungen lässt sich vermuten, dass die Bioverfügbarkeit von KP46 etwa der Größenordnung von

$\text{GaCl}_3$  entspricht. Jedoch sei angemerkt, dass die Berechnungen sowohl für KP46 als auch für Galliummaltolat auf der Annahme beruhen, dass für alle drei Verbindungen eine lineare Kinetik vorlag und sich die Eliminationskinetik der Substanzen nicht unterscheidet. Unterschiede in der Bioverfügbarkeit könnten unter anderem auf den unterschiedlichen Darreichungsformen von KP46 und Galliummaltolat beruhen. So wurde die in dieser Arbeit untersuchte Substanz in Form magensaftresistent überzogener Tabletten, Galliummaltolat dagegen als nicht magensaftresistente Kapsel verabreicht. Außerdem ist KP46 deutlich lipophiler als Galliummaltolat mit *n*-Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten ( $K_{OW}$ ) von 1,15 bzw. 0,41<sup>216</sup>, was mit einer schlechteren Löslichkeit von KP46 im Gastrointestinaltrakt einhergeht.

Für Galliummaltolat wurde außerdem eine gute Löslichkeit in der intestinalen Flüssigkeit (pH 6,5 – 7,8) sowie eine Freisetzung von Gallium aus dem Komplex in diesem Milieu beschrieben<sup>216,219</sup>. Die freigesetzten Galliumionen werden vermutlich über das Eisentransportsystem der Darmmucosa in das Blut resorbiert<sup>216</sup>. Zudem wird vermutet, dass im GIT ein Gleichgewicht zwischen freien Galliumionen und Galliummaltolat vorliegt und somit auch die Resorption des intakten Komplexes möglich ist<sup>216,219</sup>. KP46 dagegen liegt im Intestitium vermutlich als stabiler Komplex vor<sup>220</sup>. Obwohl die Resorption von KP46 aus dem Intestitium bislang nicht untersucht wurde, scheint eine Aufnahme von Gallium über den  $\text{Fe}^{2+}$ - $\text{H}^+$ -Symportcarrier (DCT1) für KP46 eher unwahrscheinlich. Die beschriebene Lipophilie zeugt jedoch von einer guten Balance zwischen hydrophilen und lipophilen Eigenschaften von KP46 und sollte eine adäquate Membranpermeabilität ermöglichen<sup>221</sup>. Aus den beschriebenen Zusammenhängen resultiert vermutlich die für KP46 im Vergleich zu Galliummaltolat geringere Bioverfügbarkeit und folglich auch, wie in Tab. 5.3 ersichtlich, die niedrigeren  $C_{\max}$  und AUC-Werte.

Tab. 5.3 Pharmakokinetische Parameter von Gallium nach KP46-, Galliumnitrat-, Galliumchlorid und Galliummaltolat-Gabe [MW  $\pm$  SD]

Referenz	Dosis Gallium [mg]	C <sub>max</sub> [ng/mL]	AUC [ $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ ]	t <sub>1/2z</sub> [h]	CL* [L/h]	V <sub>z</sub> * [L]
KP46	8,3 bis 124,9	9,7 bis 392,0	0,09 bis 8,55	93,7 bis 433,2	7,5 bis 104,6	1469 bis 49821
Galliumnitrat, i.v.						
<i>Webster et al., 2000</i> <sup>222</sup>	234,9	15200 $\pm$ 3100	106,0 $\pm$ 14,0	63,0 $\pm$ 24,0	n.b.	1,3# $\pm$ 0,2
<i>Hall et al., 1979</i> <sup>223</sup>	100,6 bis 201,3	n.b.	n.b.	25,1	0,04#	1,2#
<i>Krakoff et al., 1979</i> <sup>224</sup>	251,7	n.b.	n.b.	24,0	n.b.	n.b.
<i>Kelsen et al., 1980</i> <sup>205</sup>	334,0	11300 $\pm$ 800	365,0 $\pm$ 506,0	106,3 $\pm$ 198,8	0,9 $\pm$ 1,3	29,6 $\pm$ 2,5
<i>Hughes und Hansen, 1992</i> <sup>225</sup>	167,8 bis 302,0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	1,3# $\pm$ 0,2
Galliumchlorid, p.o.						
<i>Collery et al., 1989</i> <sup>108</sup>	316,5	123,0 $\pm$ 61,0	6,3 $\pm$ 5,4	43,0 $\pm$ 19,0	n.b.	n.b.
Galliummaltolat, p.o.						
<i>Bernstein et al., 2000</i> <sup>216</sup>	15,7	115,0 $\pm$ 2,0	7,4 $\pm$ 1,0	104,0 $\pm$ 51,0	n.b.	107,1 $\pm$ 4,4
	78,4	569,0 $\pm$ 17,0	36,8 $\pm$ 10,9	115,0 $\pm$ 148,6	n.b.	116,4 $\pm$ 7,1
n.b. nicht bestimmt oder nicht angegeben						
# Angabe pro kg Körpergewicht						
* für perorale verabreichte Substanzen CL/F bzw. V <sub>z</sub> /F						

Die Pharmakokinetik von Gallium im Plasma und im Vollblut war durch ein extrem großes Verteilungsvolumen (V<sub>z</sub>/F) gekennzeichnet. So wurden V<sub>z</sub>/F Werte zwischen 1469 und 49821 L ermittelt. Das Verteilungsvolumen im Vollblut unterscheidet sich kaum von dem im Plasma. Eine Kumulation in

den korpuskulären Bestandteilen des Blutes scheint somit nicht stattzufinden. Eine Beurteilung des Verteilungsvolumens von Gallium ohne Kenntnis der Bioverfügbarkeit bleibt sehr spekulativ. Studien zur Bindung an Plasmaproteine lassen jedoch vermuten, dass eine Verteilung von Gallium in das Gewebe stattfindet. Im Gegensatz zu Ruthenium- oder Platin-Komplexen bindet KP46 nur in sehr geringem Ausmaß an Albumin. Die Bindung an Transferrin dagegen scheint die von KP1019 zu übersteigen<sup>226</sup>. Die Transferrinbindung spielt eine Schlüsselrolle bei der Aufnahme von Gallium in die Zelle und dessen pharmakologischer Wirkung. Darüber hinaus wurde für Gallium in verschiedenen Tierstudien eine Verteilung in verschiedene Gewebe, wie Leber, Milz, Niere und Knochen, beschrieben<sup>218</sup>.

Wie aus Tierstudien zu erwarten war, wurde auch am Menschen eine sehr lange Halbwertszeit von 93,7 bis 433,2 h, was etwa 4 bzw. 18 Tagen entspricht, beobachtet. Der *Steady-state*-Zustand wurde daher während der täglichen Applikation von KP46 über einen Zeitraum von 14 Tagen nicht erreicht. Diese terminalen Halbwertszeiten korrespondieren mit den Werten, die *Bernstein et al.* für Galliummaltolat ermittelten (s. Tab. 5.3)<sup>216</sup>. *Kelsen et al.* und *Webster et al.* beschrieben zwar für das i.v. applizierte Galliumnitrat ähnlich lange Halbwertszeiten, doch fanden sich auch deutlich kürzere Halbwertszeiten für Galliumnitrat. Galliumionen selbst scheinen nicht ohne Weiteres an Transferrin zu binden, da sie als anionische Gallat-Komplexe  $[\text{Ga}(\text{OH})_4]^-$  vorliegen<sup>216</sup>. Die rasche Elimination dieser Moleküle könnte, neben einer kürzeren Beobachtungszeit und damit einer möglichen Unterschätzung, eine Erklärung für die beschriebenen Unterschiede in der Halbwertszeit sein. Die Autoren berichten zudem von einer bevorzugt renalen Ausscheidung nach intravenöser Applikation. So fanden sie innerhalb von 24 h 49 bis 94 % des applizierten Galliums im Urin wieder<sup>205</sup>. Für KP46 und Galliummaltolat wurden mit 1 % innerhalb von 24 h bzw. 2 % innerhalb von 72 h deutlich geringere Anteile der Dosis im Urin gefunden. Insgesamt scheint die renale Elimination für KP46 eher eine untergeordnete Rolle zu spielen, da auch die renale Clearance mit Werten zwischen 0,52

und 3,43 mL/min deutlich geringer als die glomeruläre Filtrationsrate (ca. 120 mL/min) war. Eine abschließende Beurteilung der pharmakokinetischen Eigenschaften lässt sich allerdings nicht treffen.

### 5.2.2 Individuelle Pharmakokinetik von Ruthenium nach Applikation von KP1019

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmalig die pharmakokinetischen Eigenschaften von Ruthenium nach Applikation von KP1019 am Menschen charakterisiert. Die Rutheniumkonzentration in Plasma und Urin wurden mit den in dieser Arbeit entwickelten und validierten Methoden quantifiziert. Die pharmakokinetischen Parameter wurden sowohl für eine Einmalgabe als auch für multiple Gaben abgeschätzt.

Die pharmakokinetischen Parameter nach der ersten Applikation zeigten ein leicht unterschiedliches Bild im Vergleich zu den Parametern, die unter Berücksichtigung aller Rutheniumkonzentrationen ermittelt wurden. So wurde die Gesamtclearance ca. um ein Drittel niedriger abgeschätzt. Dieser Unterschied ergab sich aus der Tatsache, dass es sich nicht eine „Single-Dose-Untersuchung“ handelte, bei der üblicherweise ein ausgedehntes Sammlungsintervall die Extrapolation des Konzentrations-Zeit-Verlaufs nach Unendlich erlaubt. Die Gabe der nächsten Dosierung schneidet den Zeitverlauf praktisch ab: Die terminale Halbwertszeit wird daher unterschätzt. Dies wiederum hat zur Folge, dass im Vergleich höhere Gesamtkörperclearancewerte erhalten werden. Die terminale Halbwertszeit nach der fünften Applikation wurde mit 85,5 bis 200 h abgeschätzt, die nach der ersten Applikation mit 51,2 bis 117 h.

Im Folgenden sollen die pharmakokinetischen Parameter, die unter Verwendung aller zur Verfügung stehenden Konzentrationen (multiple Dosierung) erhalten wurden, diskutiert werden. Für die Charakterisierung der renalen Clearance wurden nur die Rutheniumkonzentrationen in Plasma und Urin nach der ersten Applikation berücksichtigt. Aufgrund der sehr langen

Halbwertszeit wurde der *Steady-State* während des gesamten Beobachtungszeitraums nicht erreicht.

Das relativ kleine Verteilungsvolumen ( $V_{SS}$ ) mit Werten zwischen 6,3 und 10,5 L entsprach nahezu dem Blutvolumen. Eine Verteilung ins Gewebe scheint nicht oder nur im geringen Ausmaß stattzufinden. Die Verteilung von Ruthenium war durch eine ausgeprägte Bindung an die Plasmaproteine Albumin und Transferrin gekennzeichnet. *Henke et al.* konnten mit Hilfe einer validierten ICP-MS Methode für die ungebundene Fraktion einen Wert von  $0.11 \pm 0.32 \%$  [MW  $\pm$  SD] ermitteln<sup>211</sup>. Außerdem zeigten die Autoren, dass mehr als 99 % des Rutheniums in den Plasmaproben an Albumin gebunden vorlag. Nur etwa 1 % des Rutheniums fanden sie an Apo-Transferrin gebunden vor, was sich vor allem auf den schnellen Turnover von Transferrin zurückführen lässt<sup>211</sup>. Diese Ergebnisse unterstrichen die Hypothese der Transferrin vermittelten Aufnahme von Ruthenium in die Zelle<sup>145,227</sup>. *Groessl et al.* erzielten in Inkubationsstudien mit humanem Serumalbumin ähnliche Ergebnisse<sup>226</sup>. In unserer klinischen Studie wurde zudem nur leichte Toxizität beobachtet. Diese Ergebnisse korrespondieren ebenfalls mit der Hypothese der Transferrin vermittelten Aufnahme und der ausgeprägten Plasmaproteinbindung, da die ungebundene Fraktion als relevant für das Auftreten möglicher toxischer Effekte angesehen wird.

Wie in Kap. 1.2 beschrieben, hat das Ausmaß der Bindung von Ruthenium an Transferrin einen Einfluss auf die zelluläre Aufnahme. Genauer gesagt hatte eine Überladung von Transferrin, das heißt mehr als zwei Rutheniumatome pro Transferrinmolekül, eine verminderte Aufnahme in die Zelle zur Folge<sup>144</sup>. Da die physiologische Transferrinkonzentration etwa 5 % der Albuminkonzentration ausmacht, ließ sich die Ruthenium-Beladung abschätzen. Etwa jedes dritten Transferrinmolekül lag in Form eines Ruthenium-Transferrin-Komplexes vor<sup>228</sup>. Somit lag, wie in den *In-vitro*-Untersuchungen gezeigt werden konnte, ein für die antitumorale Wirkung vorteilhaftes stöchiometrisches Verhältnis vor<sup>144</sup>.

Der Anteil der ersten verabreichten Dosis, der kumulativ im Urin

ausgeschieden wurde, und die abgeschätzte renal Clearance waren sehr gering. So betrug der kumulativ im Urin ausgeschiedene Dosisanteil nur maximal 5,2 %. Die renale Clearance von 0,008 bis 0,046 mL/min betrug weniger als ein Prozent der glomerulären Filtrationsrate. Die renale Elimination scheint somit für die Ausscheidung von Ruthenium eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Fast bei allen Patienten konnten sekundäre Peaks bzw. Wiederanstiege in den Ruthenium-Konzentrations-Zeit-Verläufen beobachtet werden. Die leichten Wiederanstiege der Rutheniumkonzentrationen im Plasma zwischen 5 und 9 h nach Beginn der Infusion legen eine biliäre Exkretion von Ruthenium und einen sich anschließenden enterohepatischen Kreislauf nahe. Diese Beobachtungen könnten einen Hinweis auf einen möglichen Eliminationsweg von KP1019 und seinen Metaboliten darstellen. Auch für verschiedene Platinkomplexe wurden sekundäre Peaks beschrieben<sup>24,68,162,229</sup>. *Bastian et al.* integrierten sogar eine enterohepatische Rezyklisierung von Platin in ihr Populations-PK-Modell zur Beschreibung des Platin-Konzentrations-Verlaufs nach der Applikation von Oxaliplatin und erreichten dadurch eine bessere Anpassung des Modells<sup>75</sup>. Das Auftreten sekundärer Peaks bzw. Wiederanstiege scheinen somit ein für Metallkomplexe typisches Phänomen zu sein.

Zurzeit befindet sich mit NAMI-A nur ein weiterer Ruthenium-Komplex in der klinischen Prüfung<sup>116</sup>. Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten pharmakokinetischen Parameter für Ruthenium im Plasma stimmen mit den für NAMI-A erhaltenen überein. So wurde für NAMI-A ebenfalls ein relativ kleines Verteilungsvolumen ( $V_{ss}$ ) von ca. 10 L berichtet<sup>116</sup>. Auch die Gesamtclearance von etwa 2,8 mL/min sowie die Halbwertszeit  $t_{1/2z}$  von 50 h lagen im Bereich der für KP1019 berechneten Parameter<sup>116</sup>. Auch NAMI-A zeichnet sich durch eine hohe Proteinbindung aus. *Groessl et al.* bestimmten eine ungebundene Fraktion von 1,4 bis 4,6 %<sup>230</sup>. Des Weiteren wurden in den Ruthenium-Konzentrations-Zeit-Profilen im Plasma ebenfalls Wiederanstiege identifiziert.

Doch wurden auch Unterschiede zwischen den beiden Ruthenium-

Komplexen festgestellt. So war der lineare Zusammenhang zwischen AUC und Dosis für NAMI-A deutlich schwächer ausgeprägt als für KP1019. Die kumulativ im Urin ausgeschiedene Fraktion der NAMI-A-Dosis von etwa 16 % war 16-mal höher als die für KP1019 ermittelte. Da eine Extrapolation der ausgeschiedenen Rutheniummenge im Urin, wie in dieser Arbeit, von den Autoren nicht durchgeführt wurde, kann die renale Ausscheidung für NAMI-A sogar noch höher sein. In jedem Fall scheint dieser Ausscheidungsweg für NAMI-A eine größere Bedeutung zu haben<sup>116</sup>.

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass die Plasma-Konzentrations-Zeit-Verläufe adäquat durch ein Zwei-Kompartiment-Modell beschrieben werden konnten. Jedoch sollte das entwickelte Modell mit einer größeren Anzahl an Patienten bestätigt werden. Darüber hinaus könnten die Untersuchungen im *Steady-state* die Aussagekraft des Modells erhöhen.

### 5.2.3 Bedeutung der ermittelten pharmakokinetischen Parameter für eine rationale Dosisfindung in der klinischen Entwicklung

Die abgeschätzten pharmakokinetischen Parameter wurden zur Untersuchung einer möglichen Dosisproportionalität herangezogen. Für den Rutheniumkomplex konnte eine mehr oder weniger ausgeprägte Korrelation zwischen der Dosis und der AUC beobachtet werden, was auf eine lineare Pharmakokinetik schließen lässt und damit eine Weiterentwicklung von KP1019 erleichtern dürfte.

Sowohl für Gallium als auch für Ruthenium wurden nach der ersten Dosis kürzere Halbwertszeiten, und damit höhere Clearance-Werte, ermittelt, als nach der letzten Gabe bzw. unter Berücksichtigung aller gemessenen Konzentrationen. Jedoch sind diese Unterschiede wohl vor allem in der begrenzten Beobachtungszeit nach der ersten Applikation durch die folgende zweite Applikation begründet, und eine Zeitabhängigkeit der Pharmakokinetik bei multipler Gabe eher unwahrscheinlich<sup>228</sup>. Jedoch sollte diese Hypothese anhand von Untersuchungen einer Einzeldosis sowie unter *Steady-state*-Bedingungen bestätigt werden.

Für KP46 konnte, ausgehend von den im Rahmen dieser Arbeit ermittelten pharmakokinetischen Parametern, keine abschließende Beurteilung des angewendeten Dosisregimes erfolgen. Die in Tab. 4.22 gekennzeichneten starken Unterschiede in den pharmakokinetischen Parametern ließen sich nicht anhand patientenspezifischer Eigenschaften erklären. Die um das 20fache höheren Verteilungsvolumina der Patienten 5 und 6 könnten durch eine mögliche Non-Compliance zustande gekommen sein, da diese Patienten die Studienmedikation als „Take-home“-Medikation erhalten hatten und somit die Einnahme nicht kontrolliert werden konnte. Diese Hypothese sowie eine ausgeprägte interindividuelle Variabilität in der Resorption bleiben spekulativ. Die lange Halbwertszeit von Gallium nach der Applikation könnte für eine Verlängerung des Dosierungsintervalls sprechen. Doch scheinen an erster Stelle die eingeschränkte Löslichkeit sowie die Darreichungsform als magensaftresistente Tablette in den Stärken 10, 20 und 30 mg ungeeignet. Die hohe Anzahl der Tabletten, die vor allem bei höherer Dosierung eingesetzt werden musste, ist für die Anwendung in der Praxis ungeeignet. Für KP1019 lässt sich anhand der ermittelten pharmakokinetischen Parameter schlussfolgern, dass ausgehend von der langen Halbwertszeit ein Dosierungsintervall von drei oder vier Tagen geeignet sein sollte. Doch sind gerade in diesem Zusammenhang Untersuchungen unter *Steady-state*-Bedingungen für die Ermittlung eines optimalen Dosierungsschemas notwendig.

Sowohl für KP1019 als auch für KP46 konnte in den höchsten Dosierungen 600 bzw. 900 mg keine dosislimitierende Toxizität beobachtet werden. Eine weitere Eskalation könnte daher möglich sein und zudem zu einer höheren Effektivität führen. Jedoch sollten hierfür zunächst für beide Arzneistoffe im Hinblick auf deren limitierte Löslichkeit optimierte Darreichungsformen entwickelt werden.

### 5.3 Semimechanistisches PK/PD-Modell zur Platin-DNA-Addukt-Bildung in Leukozyten

Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte PK/PD-Modell liefert neue Informationen zur Entwicklung optimierter Dosisstrategien und soll in den folgenden Kapiteln hinsichtlich Modellierungsstrategie, Modellstruktur, Kovariateneinflüsse und der Bedeutung in der Entwicklung von *Limited-Sampling*-Strategien, und damit verbunden für eine mögliche Dosis-individualisierung von Oxaliplatin, diskutiert werden.

#### 5.3.1 Modellstruktur

In der Literatur finden sich verschiedene Untersuchungen, die sich sowohl der Identifizierung möglicher Einflussfaktoren auf das Therapieergebnis als auch der Charakterisierung interindividueller Unterschiede in der Pharmakokinetik für Oxaliplatin widmen. In Übereinstimmung mit der Literatur konnte das pharmakokinetische Profil von Platin im Ultrafiltrat nach der Applikation von Oxaliplatin am besten mit einem Zwei-Kompartiment-Modell beschrieben werden<sup>64-67,71,75,76,79,80,231</sup>. Die ermittelten populationspharmakokinetischen Parameter entsprechen den in der Literatur veröffentlichten Werten<sup>64-67,71,75,76,79,80,231</sup>.

Bis heute finden sich drei Veröffentlichungen, die die Pharmakokinetik sowie deren interindividuelle Variabilität von Oxaliplatin mit Hilfe von NLME-Regressionsmodellen charakterisierten<sup>75,79,80</sup>. Die Ergebnisse der zitierten Publikationen sowie des in dieser Arbeit entwickelten finalen Modells sind in Tab. 5.4 zusammengefasst.

Tab. 5.4 Populationspharmakokinetische Parameter von Platin im Ultrafiltrat nach Gabe von Oxaliplatin [MW  $\pm$  SD]

Referenz	Dosis [mg/m <sup>2</sup> ]	CL [L/h]	V <sub>1</sub> [L]	Q [L/h]	V <sub>2</sub> [L]	Kovariaten
Diese Arbeit	130, 50	13,9 $\pm$ 4,0	14,7 $\pm$ 9,4	31,8 $\pm$ 20,9	242 $\pm$ 89,3	CL: CLCR
<i>Delord et al., 2002</i> <sup>80</sup>	100, 130	18,7 $\pm$ 8,0	40,8 $\pm$ 17,5	n.b.	21,0	CL: BSA, AGE, SEX, OCC, SCR
<i>Bastian et al., 2003</i> <sup>75</sup>	50, 65, 75, 85, 100, 130	14,1 $\pm$ 8,7	24,9 $\pm$ 16,2	34,8 $\pm$ 19,5	136 $\pm$ 89,8	CL: BW, SEX, SCR V <sub>1</sub> : BW Q: BW
<i>Kho et al., 2006</i> <sup>79</sup>	85	25,2 $\pm$ 6,25	41,6 $\pm$ 9,4	68 $\pm$ 24,8	452,5 $\pm$ 96,38	–

AGE Alter  
 BW Gewicht  
 OCC Zyklus  
 SCR Serumkreatininkonzentration [mg/dL]  
 n.b. nicht bestimmt  
 BSA Körperoberfläche [m<sup>2</sup>]  
 CLCR Kreatininclearance [ml/min]  
 SEX Geschlecht

Die Verwendung eines Drei-Kompartiment-Modells, wie es in der von *Graham et al.* publizierten, individuellen, kompartimentellen Analyse verwendet wurde, zeigte keine Vorteile gegenüber dem beschriebenen Zwei-Kompartiment-Modell<sup>69</sup>. Neben einem deutlich längeren Sammlungsintervall wäre dafür auch eine ausreichende Anzahl gemessener Platin-konzentrationen zu den späteren Zeitpunkten erforderlich, um die periphere Verteilung in ein flacheres und ein tieferes peripheres Kompartiment differenziert erfassen zu können.

*Bastian et al.* integrierten in ihr Populationsmodell eine zusätzliche Eliminations- und Speicherkomponente. Dieses Kompartiment beschreibt die zyklische Entleerung der Gallenblase und die damit verbundene entero-hepatische Rückresorption von Platin<sup>75</sup>. Auch andere Autoren beobachteten Wiederanstiegen der Platinkonzentrationen<sup>24,68,162</sup>. Das Auftreten sekundärer Peaks bzw. Wiederanstiege konnten auch bei einigen Patienten dieser Arbeit

beobachtet werden. Die Anzahl der Patienten war allerdings sehr gering und betraf zudem nur die in Studie 1 behandelten Patienten. In Studie 2 konnte das Phänomen nicht beobachtet werden, da von 4 bis 24 h nach Infusionsbeginn keine Ultrafiltratproben gewonnen wurden. Aufgrund der geringen Patienten- bzw. Probenanzahl, die eine Abschätzung der enterohepatischen Zirkulation unterstützen würden, wurde auf deren Integration in das Strukturmodell verzichtet. Als Konsequenz könnte die Beeinflussung der Kurvenanpassung durch den sekundären Anstieg zu einer Überschätzung des Verteilungsvolumens geführt haben<sup>79</sup>, was eine Begründung für die leichten Unterschiede der Volumina dieser Arbeit und der von *Bastian et al.*, wie in Tab. 5.4 erkennbar, darstellt. *Delord et al.* ermittelten ein typisches Verteilungsvolumen des peripheren Kompartiments von 21,0 L. Dieses war deutlich geringer als das im Rahmen dieser Arbeit mit einem typischen Wert von 242 L ermittelte Verteilungsvolumen. Die Autoren bezogen in ihre Untersuchungen nur die Platinkonzentrationen ein, die bis maximal acht Stunden nach Beginn der Infusion quantifiziert wurden<sup>80</sup>. Dies führte möglicherweise zu einer Unterschätzung des Verteilungsvolumens des peripheren Kompartiments. Sie vernachlässigten die 24 h nach Beginn der Infusion gemessenen Platinkonzentrationen im Ultrafiltrat mit der Begründung, dass Platin zu diesem Zeitpunkt vor allem in Form von Konjugaten mit Aminosäuren vorliegt. Die Aminosäurekonjugate werden als inaktiv und vermutlich ohne klinische Relevanz angesehen. Grundsätzlich erlaubt die Quantifizierung von Platin im Ultrafiltrat mittels GF-AAS keine Differenzierung der Platinspezies. Oxaliplatin bindet sehr rasch und in hohem Ausmaß an Plasma- und Gewebeproteine sowie an Aminosäuren<sup>22,23</sup>. *Alain et al.* beobachteten, dass bereits eine Stunde nach Ende der Infusion die überwiegende Mehrheit des sich im Ultrafiltrat befindlichen Platins als Aminosäurekonjugate vorlag<sup>23</sup>. Die Aussagekraft der von *Delord et al.* beschriebenen Parameter für die aktive Spezies ist jedoch fraglich, zumal die Autoren darauf hinwiesen, dass sich auch zu den früheren Zeitpunkten Gemische verschiedener Platinspezies im Ultrafiltrat befanden. Eine genaue Charakterisierung der Pharmakokinetik dieser

Verbindungen setzt die Verwendung selektiver Quantifizierungsmethoden voraus.

Durch die gewählten statistischen Modelle konnte die zufällige, nicht erklärbare Variabilität wie folgt differenziert werden:

- interindividuelle Variabilität, d.h. die Variabilität zwischen den Individuen
- Residualvariabilität

Interindividuelle Variabilität konnte für alle populationspharmakokinetischen Parameter ermittelt werden. Insgesamt wurde die interindividuelle Variabilität von Platin mit 28,9 bis 65,7 % (CV) als moderat eingestuft. Das bedeutet, dass sich bei gleicher Dosis die vorhergesagten Konzentrationen zwischen den Patienten nur mäßig unterscheiden.

Für eine Vielzahl von Arzneistoffen wurde eine höhere interindividuelle Variabilität in der Gesamtclearance beschrieben. Eine solche Variabilität ist in der Regel auf Polymorphismen zurückzuführen, die aus einer unterschiedlichen Expression und Aktivität von Transportern und Enzymen der Leber resultieren. Diese pharmakogenetischen Unterschiede führen somit zu einer hohen interindividuellen Variabilität in der Gesamteliminationsleistung<sup>232</sup>. Für Platin im Ultrafiltrat spielt dies jedoch eine untergeordnete Rolle, da sich die Gesamtclearance von Platin im Ultrafiltrat vor allem aus der Bindung an Plasma- und Gewebeproteine sowie der renalen Elimination der Aminosäurekonjugate zusammensetzt. Dies hat zur Folge, dass die IIV im Verteilungsvolumen auch gleichzeitig in der IIV der Gesamtclearance resultiert. Dieser in Abb. 4.30 graphisch dargestellten Korrelation wurde durch die Integration der Kovarianz aller *Random-effect*-Parameter Rechnung getragen. Die Autoren der drei zitierten Publikationen beschrieben dieses Vorgehen nicht. *Gobburu et al.* zeigten jedoch, dass eine fehlende Kovarianz-Codierung trotz ihrer Notwendigkeit zu einer deutlich stärkeren Verzerrung der Parameterschätzung führen kann als die aus einer irrtümlichen Integration resultierenden Überparametrisierung<sup>233</sup>.

Die Residualvariabilität konnte durch ein doppeltes kombiniertes Fehlermodell, bestehend aus additiven und proportionalen Fehlerkomponenten beschrieben werden. Das doppelte kombinierte Fehlermodell war erforderlich, um die Änderung der Residualvariabilität im zeitlichen Verlauf wiederzugeben. Der additive Anteil entsprach dabei in beiden Fällen in etwa der Bestimmungsgrenze der zur Quantifizierung von Platin im Ultrafiltrat verwendeten GF-AAS-Methode<sup>70</sup>. Der proportionale Fehler von 58,5 bzw. 19,2 % lag deutlich über der beschriebenen Methodenpräzision der in der Dissertation von A. Pieck entwickelten GF-AAS-Methode<sup>70</sup> und spiegelt somit nicht nur den analytischen Fehler wider. Weitere Faktoren, wie Fehler in der Dokumentation der Dosierungs- und Probenentnahmezeitpunkte, Missspezifikationen des Modells oder eine *Interoccasion*-Variabilität scheinen ebenfalls relevant zu sein. In Studie 1 wurden nicht, wie allgemein üblich, Infusionspumpen für die Applikation von Oxaliplatin eingesetzt. Der deutlich höhere proportionale Fehler von 58,5 % der für die Platinkonzentrationen, die bis einschließlich zum Ende der Infusion gemessen wurden, charakterisierte somit den Einfluss der nicht konstanten Infusionsgeschwindigkeit.

Wie in den GOF-Graphiken dargestellt, konnten die gemessenen Platinkonzentrationen gut beschrieben werden. Sämtliche Modell- und Variabilitätsparameter konnten mit guter Präzision abgeschätzt werden.

Die Beschreibung der DNA-Platinierung in den Leukozyten konnte am besten durch ein Arzneistoff-Rezeptor-Interaktions-Modell erreicht werden. Die Entwicklung dieses Modells bildete den zweiten Schritt des beschriebenen sequentiellen Vorgehens.

Intrazellulär bindet die aktivierte Spezies von Oxaliplatin an nukleophile Zentren der DNA. Dabei erfolgt die Bindung bevorzugt an N(7) am Imidazolring des Guanins (G) oder Adenins (A). Diese Bindung wird als irreversibel beschrieben<sup>26,27</sup>. Dissoziation des Platin-DNA-Komplexes spielt somit eine untergeordnete Rolle. Die Degradation der gebildeten Platin-DNA-Addukte durch die Reparaturmechanismen verläuft, verglichen mit der

Bindung an die DNA, sehr langsam. In den Leukozyten liegt die DNA als Bindungspartner in deutlichem Überschuss vor. Basierend auf diesen Überlegungen wurde ein pharmakodynamisches Modell erstellt. Mathematisch konnte das Modell gemäß dem Massenwirkungsgesetz durch Differentialgleichungen dargestellt werden. Die zusätzliche Integration eines Effekt-Kompartiments, um einer möglichen Verteilung zwischen Ultrafiltrat und Biophase Rechnung zu tragen<sup>234</sup>, zeigte keine Vorteile. Weitere in der Literatur beschriebene PD-Modelle, wie das *Indirect-Response*-Modell oder  $E_{max}$ -Modell, konnten die Prozesse der Platinierung adäquat beschreiben. Das im vorangegangenen Abschnitt diskutierte PK-Modell wurde gemäß dem sequentiellen Vorgehen zur Abschätzung der individuellen pharmakokinetischen Parameter herangezogen. Für die Bindung von Platin an die DNA, beschrieben durch die Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung, wurde ein Wert von  $0,00371 \mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  erhalten. Die Degradation, beschrieben durch  $k_D$ , wurde mit einem Wert von  $0,00429 \text{ h}^{-1}$ , was einer Halbwertszeit von  $(\ln 2/k_D)$  von ca. 7 Tagen entsprach, ermittelt. Für den Baseline-Wert der mit Platin vorbehandelten Patienten wurden  $0,0799 \text{ pmol}$  ermittelt. Das entspricht  $0,407$  bis  $1,25$  Platin-Atome/ $10^9$  Nukleotiden, bezogen auf einen Referenzbereich für die Leukozytenzahl beim Gesunden von  $3,2$  bis  $9,8 \cdot 10^9$  Zellen/L. In der Literatur finden sich nur wenige Untersuchungen, die die Bindungskinetik an die DNA untersuchen. Die ermittelte Halbwertszeit von 7 Tagen liegt deutlich über der in der Literatur beschriebenen Halbwertszeit von neutrophilen Granulozyten von ca.  $6 \text{ h}$ <sup>235</sup>. Das aufgrund der Degradation aus den Zellen entlassene Platin scheint somit zu einer erneuten Bindung an der DNA fähig. Auch das an Plasmaproteine, Erythrozyten und im Gewebe gebundene und wieder freigesetzte Platin könnte hierbei eine Rolle spielen. Die Langzeit-Untersuchungen von *Brouwers et al.* unterstreichen diese Hypothese. Die Autoren konnten zeigen, dass im Ultrafiltrat von Patienten, die zwischen 8 und 75 Monate zuvor eine cisplatin- oder oxaliplatinhaltige Chemotherapie erhalten hatten, Platin noch messbar war. Inkubation von Kalbsthymus-DNA mit *Ex-vivo*-Ultrafiltrat-Proben dieser Patienten ergab, dass die im Ultrafiltrat

befindlichen Platinspezies noch 10 bzw. 4,3% der Reaktivität der Muttersubstanzen aufwiesen<sup>236</sup>. Darüber hinaus finden sich in der Literatur vermehrt Berichte, wonach Patienten, die nach lang zurückliegender Oxaliplatin-Chemotherapie eine Hämolyse erlitten, wieder unter den für Oxaliplatin typischen Neuropathien litten<sup>237,238</sup>.

Abschließend betrachtet konnten erstmals diese substanzspezifischen pharmakodynamischen Parameter abgeschätzt werden. Die IIV sämtlicher pharmakodynamischer Strukturparameter wurde erwartungsgemäß hoch abgeschätzt. Die extrem hohe IIV des Baseline-Wertes von 197,2 % spiegelt vermutlich wider, dass die Patienten einerseits mit unterschiedlichen Platinanaloga in unterschiedlichen Regimen vorbehandelt wurden und andererseits der Zeitraum zwischen der letzten platinhaltigen Chemotherapie und der in dieser Arbeit beschriebenen Studie unterschiedlich lang war. Auf eine Prüfung möglicher Kovariatenzusammenhänge wurde aufgrund fehlender detaillierter Informationen sowie der geringen Patientenzahl verzichtet.

Auch die hohe Residualvariabilität liegt deutlich über der in der Dissertation von *A. Pieck* beschriebenen Methodenpräzision<sup>70</sup>. Neben Ungenauigkeiten in der Dokumentation der Probenentnahme und Applikationszeit sowie ungleichmäßiger Infusionsgeschwindigkeit könnten auch die Annahme der konstanten Leukozytenzahl und dem damit verbundenen konstanten DNA-Gehalt Gründe für die hohe Residualvariabilität darstellen.

### 5.3.2 Kovariateneinflüsse

In verschiedenen klinischen Studien wurde eine Korrelation zwischen Kreatininclearance ( $CL_{CR}$ ) und der Platin-Gesamtclearance im Ultrafiltrat gezeigt<sup>67,76,231</sup>. Auch *Bastian et al.* und *Delord et al.* konnten Kovariaten identifizieren<sup>75,80</sup>. *Delord et al.* Beschrieben für die Clearance folgenden Zusammenhang:

$$CL[L/h] = \theta_1 \cdot BSA + \frac{\theta_2 \cdot BSA \cdot (140 - AGE) \cdot (1 - 0,15 \cdot SEX)}{SCR} \quad \text{Gl. 5.5}$$

$\theta_1, \theta_2$	Koeffizienten der Kovariateneinflüsse
BSA	Körperoberfläche in m <sup>2</sup>
AGE	Alter in Jahren
SEX	Geschlecht, 0 = männlich, 1 = weiblich
SCR	Serumkreatininkonzentration in $\mu\text{M}$

Sie ermittelten für die Koeffizienten  $\theta_1$  5,49 L·h<sup>-1</sup>·m<sup>-2</sup> und  $\theta_2$  4,55  $\mu\text{M}$ ·m<sup>-2</sup>·h. Der Zusammenhang zwischen Körperoberfläche, Alter, Geschlecht, Körpergröße und Serumkreatininclearance wurde in Form der Abschätzung der Kreatininclearance nach *Cockcroft* und *Gault* eingeführt<sup>187</sup>. Dabei stellt die nach *DuBois* und *DuBois* berechnete Körperoberfläche eine abgeleitete Größe des Körpergewichts<sup>148</sup>. *Bastian et al.* beschrieben den Zusammenhang zwischen Körpergewicht CL, V1 und Q in Form von Powermodellen. Die von ihnen abgeschätzten Exponenten betragen jeweils 1,10; 1,29 und 1,01<sup>75</sup>. Die allometrische Skalierung von CL sowie des Verteilungsvolumens wurden im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls untersucht, doch war der Einfluss nicht statistisch signifikant. Außerdem beschrieben *Delord et al.* einen Zusammenhang zwischen der Serumkreatininkonzentration, dem Geschlecht und der Clearance. Der Einfluss der Serumkreatininkonzentration wurde ebenfalls als Powermodell berücksichtigt. Der ermittelte Exponent betrug -0,57<sup>80</sup>. Auch in dieser Arbeit wurde der Einfluss von CL<sub>CR</sub> auf CL als signifikant identifiziert. Dieser Zusammenhang wurde in Form eines Powermodells im Modell berücksichtigt. Der im Rahmen dieser Arbeit ermittelte Exponent des Kovariatenzusammenhanges betrug 0,519. Im Gegensatz zu den zitierten Publikationen konnte jedoch nur ein deutlich geringerer Teil der IIV der CL dadurch erklärt werden. Die IIV konnte lediglich um 2,1 %-Punkte reduziert werden. Die demographischen Parameter Alter, Geschlecht, Körpergröße und Körpergewicht sowie die daraus abgeleiteten Parameter des fettfreien Körpergewichts, der Körperoberfläche oder des Body-Mass-Indexes, zeigten keinen statistisch

signifikanten Einfluss. Auch die Zugehörigkeit zu einer Studie oder die Komedikation Sorafenib konnten zur Erklärung der IIV der pharmakokinetischen Parameter nicht herangezogen werden. Zwar zeigten zunächst das Körpergewicht, bzw. das fettfreie Körpergewicht, jeweils graphisch einen Zusammenhang mit den individuellen Parametern, bzw. den individuellen *Random-effect*-Parametern, doch führte ihre Integration in das Populationsmodell nicht zu einer statistisch signifikanten Reduktion des OFV, bzw. resultierte durch das anschließende Weglassen der entsprechenden Relation kein statistisch signifikantes Ansteigen des OFV. Zur Prüfung der klinischen Relevanz dieser Zusammenhänge wäre eine Überprüfung in einer Population mit breiterer Streuung der Kovariaten erforderlich.

Die mit Hilfe des finalen pharmakokinetischen Modells durchgeführten Simulationen zeigten eine Erhöhung von  $C_{max}$  bei verminderter Nierenfunktion sowie eine verlangsamte Abnahme der Platinkonzentrationen. Die klinische Relevanz dieses Kovariateneinflusses ist jedoch fraglich, nicht zuletzt weil nur ein sehr geringer Teil der IIV dadurch erklärt werden konnte. Zudem ist zu berücksichtigen, dass die Platinkonzentrationen im Ultrafiltrat nicht nur die aktive Spezies widerspiegeln, da durch die verwendeten GF-AAS-Methoden stets das Gesamtplatin im Ultrafiltrat bestimmt wurde. Zwar wird im Allgemeinen das sich im Ultrafiltrat befindliche Platin mit der pharmakologisch wirksamen Fraktion, die neben der antitumoralen Wirkung auch für die Toxizität verantwortlich ist, gleichgesetzt, doch zeichnet sich Oxaliplatin durch eine ausgeprägte Reaktivität gegenüber nukleophilen Verbindungen, wie Plasmaproteinen und Aminosäuren, aus<sup>22,23,22,239</sup>. Innerhalb der ersten Stunde nach Ende der Infusion bindet ein Großteil des Platins im Ultrafiltrat vermutlich irreversibel an Plasma- und Gewebeproteine, aber auch an kleine niedermolekulare Aminosäuren<sup>76</sup>. Somit liegt Platin im Ultrafiltrat innerhalb kurzer Zeit in Form inaktiver Aminosäurekonjugate vor<sup>67</sup>. Eine Dosisanpassung bei eingeschränkter Nierenfunktion scheint daher nicht erforderlich.

Für das pharmakodynamische Modell konnte lediglich die Vorbehandlung in Bezug auf den Baseline-Wert als Kovariate identifiziert werden. Dieses Ergebnis korrespondiert mit den in Kap. 5.3.1 diskutierten Beobachtungen von *Brouwers et al.*, wonach auch nach einer Jahre zurückliegenden platinhaltigen Chemotherapie aktive Spezies im Ultrafiltrat zu finden waren, die zur Bindung an die DNA fähig waren. Zwar konnten die Autoren selbst keine Platin-DNA-Addukte mehr in den Leukozyten der untersuchten Patienten quantifizieren, doch legten sie die Vermutung nahe, dass die Platinierung in so geringem Ausmaß vorhanden war, dass sie trotz der hoch empfindlichen ICP-MS-Methode nicht bestimmt werden konnte<sup>236</sup>. Ein Einfluss des ab dem vierten Tag der Chemotherapie verabreichten Sorafenibs konnte ebenso wenig gefunden werden wie ein Zusammenhang zwischen pharmakodynamischen Parametern und den Patientencharakteristika.

### 5.3.3 Modellevaluation

Die Abschätzung der Parameter zur Beschreibung des Platin-Konzentrations-Zeit-Verlaufes im Ultrafiltrat und der Platin-DNA-Addukt-Bildung in den Leukozyten erfolgte sequentiell. Prinzipiell führt dieser Ansatz zu einer Konditionierung der abgeschätzten Platin-DNA-Addukte durch die im Vorfeld ermittelten pharmakokinetischen Parameter für Platin im Ultrafiltrat. Das fehlende Feedback zwischen Abschätzung der pharmakokinetischen und der pharmadynamischen Parameter kann zu verzerrten pharmakokinetischen Modellen führen, die so nicht berücksichtigt werden<sup>240</sup>. Der simultane Ansatz ist dagegen bei unterschiedlichem Informationsgehalt der zugrunde liegenden PK und PD-Daten empfindlicher gegenüber Missspezifikationen des PD-Modells, was in der Konsequenz eine Verzerrung der pharmakokinetischen Parameter bedeuten kann<sup>240</sup>.

Da für die Erarbeitung des PD-Modells nur die Platin-DNA-Addukt-Daten der Studie 1 herangezogen wurden, diese im Vergleich zu den Platinkonzentrationen im Ultrafiltrat in geringer Anzahl erhoben wurden und

überdies eine starke Variabilität aufwiesen, wurde für die Entwicklung des Populations-PK/PD-Modells der sequentielle Ansatz als günstiger befunden. Ein zusätzlicher und nicht zu vernachlässigender positiver Effekt ist zudem, dass Run-Zeiten durch den sequentiellen Ansatz reduziert werden können.

Mit Hilfe der FOCE-Interaktions-Methode konnten alle Struktur- und Variabilitätsparameter der beiden im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Modelle zuverlässig mit geringeren Impräzisionen abgeschätzt werden. Die relativen Standardfehler betragen maximal 40,4 %. Sowohl die GOF-Abbildungen des PK- als auch des PD-Modells zeigten keine systematischen Abweichungen. Folglich ließen sich sowohl der Pf-Konzentrations-Verlauf im Ultrafiltrat als auch die DNA-Platinierung in den Leukozyten ausreichend gut beschreiben.

Eine externe Evaluation, das heißt die Evaluation der entwickelten Modelle anhand externer Datensätze, liefert wichtige Informationen zur Übertragbarkeit bzw. Allgemeingültigkeit des entwickelten Modells. Diese Methode stellt damit die stringenteste Evaluationsmethode<sup>241</sup>. Im Rahmen dieser Arbeit stand kein externer Datensatz zur Verfügung. Außerdem erlaubt die geringe Patienten- sowie Probenanzahl auch keine Teilung des Datensatzes in einen Entwicklungs- und Evaluationsdatensatz. Die Methode des *data-splitting* konnte somit nicht als Ersatz für die externe Evaluation herangezogen werden. Daher wurden Methoden der internen Evaluation (Bootstrap, VPC und CDD) angewandt. Für die Konzentrationen im Ultrafiltrat zeigten die Simulationen, dass die Variabilität der  $C_{\max}$ -Werte in Studie 2 leicht überschätzt wurde. Als Grund dafür ist an dieser Stelle das doppelte Residualfehlermodell zu nennen, das in das Modell eingeführt wurde, um die Variabilität der Konzentrationen zu diesen Zeitpunkten, resultierend aus der nicht konstanten Infusionsgeschwindigkeit, zu beschreiben. Insgesamt lässt sich aus den durchgeführten Evaluationen ableiten, dass die pharmakokinetischen Parameter richtig, präzise und robust abgeschätzt werden konnten.

Ein etwas anderes Bild ergab sich bei der Evaluation der pharmakodynamischen Parameter. Zwar konnten für die Parameterschätzung niedrige SE erhalten werden, doch zeigte sich in den Simulationen und dem daraus resultierenden VPC eine Überschätzung der Variabilität. Die Überschätzung der Variabilität kann aus einer Überparametrisierung resultieren<sup>242</sup>, die für dieses Modell aufgrund der geringen Datenanzahl möglich ist. Darüber hinaus zeigte sich eine Überschätzung der Platin-DNA-Addukte 48 h nach Infusionsbeginn. Wie bereits in den vorangegangenen Abschnitten diskutiert, ist Platin-DNA-Addukt-Bildung ein komplexerer Prozess, als durch das entwickelte Modell abgebildet. Neben der Verteilung in die Biophase, das heißt die Aufnahme in die Zelle sowie dem Einfluss der Vorbehandlung der Patienten könnte auch ein Turnover der Leukozyten bzw. der DNA sowie die Aktivität von wieder freigesetztem Platin entscheidend zur Vorhersagekraft eines solchen Modells beitragen. Da diese Prozesse nicht allein durch die Patientendaten beschrieben werden können und zurzeit Informationen dazu in der Literatur kaum zu finden sind, wäre die Durchführung gezielter *In-vitro*-Untersuchungen zur Beschreibung dieser Mechanismen wünschenswert.

#### 5.3.4 Bedeutung des PK/PD-Modells für die Dosisindividualisierung von Oxaliplatin

Die Dosierung von Zytostatika stellt häufig eine Gratwanderung dar. Oberhalb therapeutischer Konzentrationen tritt meist schwerwiegende und somit therapielimitierende Toxizität auf. Darüber hinaus zeigen Zytostatika in Bezug auf das Ansprechen und die unerwünschten Wirkungen eine interindividuelle Variabilität<sup>243</sup>. Um eine optimale Therapie von Tumorpatienten zu erreichen, ist es daher wichtig, dass mit der applizierten Dosis ein optimaler Effekt bei akzeptabler Toxizität erreicht wird<sup>244</sup>. PK/PD-Modelle können dazu einen entscheidenden Beitrag leisten. In den letzten zwanzig Jahren wurde der Populationsansatz nicht nur neuer Standard in der Arzneistoffentwicklung, sondern gewann auch zusehends an Bedeutung

in der Entwicklung neuer Therapieregime und der Dosisindividualisierung<sup>244,245</sup>.

Zwar konnten für die Effektivität der Oxaliplatintherapie Faktoren, wie der Allgemeinzustand, das Ausmaß der Erkrankung (Anzahl der betroffenen Organe) und die Anzahl der im Vorfeld verabreichten Chemotherapieprotokolle, als prädiktiv für das Ansprechen ermittelt werden, jedoch bieten diese Zusammenhänge keine Ansatzpunkte für eine Dosisindividualisierung<sup>246</sup>. Anders als für Carboplatin erfolgt die Dosierung von Oxaliplatin bislang weitgehend BSA-adaptiert, da die interindividuelle Variabilität der pharmakokinetischen Parameter im Plasma oder Ultrafiltrat keine Erklärung für die Variabilität im Tumoransprechen lieferte<sup>71,76–78</sup>.

Da für Platinkomplexe die Bildung von Platin-DNA-Addukten als Grundlage für die zytotoxische Wirkung verstanden wird, beschäftigten sich in den letzten Jahren verschiedene klinischer Studien mit dem Zusammenhang zwischen DNA-Platinierung und klinischen Effekten<sup>70,153,154,156,158–160,247–252</sup>. Dabei wurden verschiedene pharmakodynamische Kenngrößen, wie die maximale Adduktkonzentration ( $A_{max}$ ) oder Exposition, d.h. die Fläche unter der Addukt-Zeit-Kurve (AUA) untersucht. Die Platinierung wurde so wie in dieser Arbeit in den Leukozyten, welche als Surrogatzellen fungieren, untersucht, da der eigentliche Wirkort das Tumorgewebe, nur schwer zugänglich ist, und ein Einsatz dieser Strategie in der Routine wäre nicht realisierbar. Zwar konnte in Autopsiestudien gezeigt werden, dass das Ausmaß der Platinierung im Knochenmark und im Tumorgewebe vergleichbar war<sup>151,152</sup>. Jedoch war die Fallzahl in den Autopsiestudien so gering, dass man nicht davon ausgehen kann, dass dieser Zusammenhang für jede Tumorentität besteht. In der Literatur finden sich bisher nur wenige Untersuchungen, die sich mit der Bildung von Platin-DNA-Addukten nach Gabe von Oxaliplatin beschäftigen<sup>71,161,162</sup>. Während *Allain et al.* sowie *Liu et al.* den Zusammenhang zwischen Platinierung der DNA und dem Tumoransprechen nicht untersuchten, konnte *Pieck et al.* einen positiven Zusammenhang zwischen der AUA und dem Tumoransprechen

beschreiben<sup>71,161,162</sup>. Das entwickelte PK/PD-Modell ermöglichte erstmals eine modellgestützte Beschreibung der Platinierung und somit eine Abschätzung der AUA. Basierend auf den durch das PK/PD-Modell abgeschätzten individuellen  $AUA_{0-48h}$ -Werten konnte ein signifikanter Unterschied zwischen Respondern und Non-Respondern festgestellt werden. So wurden für Responder im Vergleich zu Non-Respondern im Median dreimal höhere  $AUA_{0-48h}$ -Werte erhalten. Diese Ergebnisse unterstreichen die von *Pieck et al.* für diese Population beschriebenen Beobachtungen. Die Autoren ermittelten die  $AUA_{0-48h}$ -Werte aus den gemessenen Platin-DNA-Addukten mit Hilfe der Trapezregel. Auch für Carboplatin und Cisplatin konnten in einigen Studien signifikante Unterschiede in der DNA-Platinierung zwischen Respondern und Non-Respondern gefunden werden<sup>152-154,252</sup>. *Schellens et al.* untersuchten darauf aufbauend die Anwendbarkeit der mittels Trapezregel ermittelten AUA zur intraindividuellen Dosisanpassung von Cisplatin bei verschiedenen fortgeschrittenen Tumoren<sup>155,156</sup>. Als Zielgröße für das Tumoransprechen wurde eine AUA von  $23 \text{ pg Platin} \cdot \text{h} \cdot \mu\text{g}^{-1} \text{ DNA}$  angestrebt. Um die dosislimitierende Toxizität der Cisplatin-Therapie zu minimieren, sollte jedoch eine AUC von  $3,4 \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$  nicht überschritten werden. Insgesamt konnte mit einer Dosisescalation aufgrund von Adduktmessungen eine Ansprechrate von 60 % bei Patienten mit nichtkleinzelligem Lungenkarzinom bei leichter bis moderater Toxizität im Vergleich zu 10 und 40 % ohne individuelle Dosisanpassung von Cisplatin erreicht werden<sup>253-255</sup>. Die Studie war geprägt von einem intensiven Probenentnahmeschema, was im experimentellen Setting einer klinischen Prüfung anwendbar war. Jedoch wiesen die Autoren daraufhin, dass im Rahmen der Routineanwendung eine Reduktion der Probenanzahl sowie die Entwicklung geeigneter Limited-Sampling-Strategien möglich wären. Für eine genaue Abschätzung der AUA anhand der Trapez-Regel werden jedoch, ähnlich der AUC, eine hohe Anzahl an Proben benötigt. Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte PK/PD-Modell könnte in diesem Punkt vorteilhaft sein. So könnten durch die Simulationen nicht nur geeignete Dosierungsschemata identifiziert werden, sondern mit Hilfe der Methoden des *optimal*

*designs* für ein Monitoring geeignete Probenentnahmezeitpunkte ermittelt werden, die, basierend auf dem Modell, eine möglichst genaue Abschätzung der individuellen AUA, aber auch der AUC im Ultrafiltrat erlauben. Trotz der geringen Patientenzahl in den beiden Gruppen konnte anhand einer *receiver-operator-characteristic (ROC)*-Kurve eine gute Trennschärfe zwischen Respondern und Non-Respondern gezeigt werden.

Jedoch sollten die aufgrund der Limitationen des Modells nicht überinterpretiert werden, da für das präsentierte Modell verschiedene Annahmen, wie ein konstanter DNA-Gehalt in den Leukozyten, eine konstante Leukozytenzahl während der Therapie sowie eine lineare Degradationskinetik gemacht wurden. Zudem ist zu beachten, dass Oxaliplatin in den diesem Modell zugrunde liegenden Studien nicht als Monotherapie verabreicht wurde. Eine pharmakokinetische Interaktion zwischen Fluorouracil und Oxaliplatin nach den Daten in der Literatur allerdings unwahrscheinlich<sup>69,73,74,256</sup>. Der Einfluss Fluorouracil auf die DNA-Addukt-Bildung kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Insgesamt konnten substanzspezifische Eigenschaften durch das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Rezeptor-Bindungsmodell abgeschätzt werden. Jedoch wurden verschiedene systemspezifische Eigenschaften, wie die Verteilung in die Biophase, Transportprozesse, der Turnover der Leukozyten sowie der Einfluss von Reparaturmechanismen in dem Modell nicht berücksichtigt. Daher ist dieses Modell als semimechanistisch einzustufen. Die Integration eines Leukozyten-Turnover-Modells, wie es von *Friberg et al.* beschrieben wurde<sup>257</sup> sowie Bindungskonstanten aus *In-vitro*-Bindungsstudien könnten der beschriebenen Überparametrisierung entgegenwirken, somit das Modell stützen und dessen Vorhersagekraft erhöhen.

Die erstellten Hypothesen basieren auf den Daten einer mit 37 Patienten kleinen Studienpopulation. Die Anwendung des entwickelten Modells in einer Studie mit einer größeren Studienpopulation bietet daher die Möglichkeit,

die Hypothesen zu prüfen. Es wäre nun interessant, das entwickelte Modell in einer größeren Studienpopulation zu überprüfen und weiterzuentwickeln.

## 6 Zusammenfassung

Metallkomplexe, insbesondere Platinkomplexe, wie Oxaliplatin, sind seit langem ein essentieller Bestandteil einer Vielzahl von Chemotherapie-regimen. Doch gerade die Dosierung von Zytostatika ist eine Gradwanderung zwischen dem Erreichen des bestmöglichen Effekts und tolerierbarer Toxizität. Im Fokus dieser Arbeit stand die Entwicklung und Untersuchung pharmakokinetischer/pharmakodynamischer Ansätze zur Dosisoptimierung antitumoraler Metallkomplexe.

Erstmalig wurden im Rahmen dieser Arbeit die pharmakokinetischen Eigenschaften der neuen Metallkomplexe, KP46 (Tris(8-chinolinolato)gallium(III)) und KP1019 (Indazolium *trans*[tetrachlorobis(1*H*-indazol)ruthenat(III)]) untersucht. Darüber hinaus wurde für Oxaliplatin, einem Platinkomplex der dritten Generation, ein Populations-PK/PD-Modell entwickelt.

Vorraussetzung für die pharmakokinetische und pharmakodynamischen Untersuchungen ist die Etablierung und Validierung von Quantifizierungsmethoden. Die Untersuchung der Gallium- und Rutheniumkonzentrationen der verschiedenen biologischen Matrices, Vollblut, Plasma und Urin, erfolgte mittels GF-AAS-Methoden, die gemäß internationalen Anforderungen an bioanalytische Verfahren validiert wurden. Die Anforderungen an die Parameter, wie z.B. Selektivität, Linearität, Richtigkeit und Präzision konnten erfüllt werden.

Im Rahmen von Kooperationen mit der Medizinischen Abteilung des Kaiser-Franz-Josef-Spitals in Wien, dem Onkologischen Zentrum des Universitätsklinikums in Mannheim sowie dem Westdeutschen Tumorzentrum in Essen wurden jeweils sieben Patienten in einer Phase I-Studie mit dem peroral applizierbaren KP46, Tris(8-chinolinolato)gallium(III) bzw. dem intravenös applizierten KP1019 therapiert. In den beiden Dosisescalationsstudien wurden die jeweiligen Patienten mit Dosen von 50 bis 900 mg KP46 bzw. 25 bis 600 mg KP1019 behandelt. Vor, während und nach der Arzneistoff-

applikation wurden für die pharmakokinetischen Untersuchungen neben Vollblut- und Plasmaproben auch Urinproben gewonnen.

Für die Analyse der Gallium-Konzentrations-Zeit-Profile im Plasma und im Vollblut konnte aufgrund deren Heterogenität und der geringen Patientenzahl kein pharmakokinetisches Modell etabliert werden. Die mit Hilfe der nicht-kompartimentellen Datenanalyse erhaltenen pharmakokinetischen Parameter deuten jedoch auf eine niedrige Clearance und eine lange Halbwertszeit hin. Das hohe Verteilungsvolumen ( $V/F$ ) lässt sich vermutlich auf die geringe Bioverfügbarkeit zurückführen, jedoch kann eine ausgeprägte Verteilung in tiefere periphere Kompartimente nicht ausgeschlossen werden. Eine renale Ausscheidung scheint für die Elimination von Gallium eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Die Ruthenium-Konzentrations-Zeit-Profile konnten am besten mit Hilfe eines Zwei-Kompartiment-Modells beschrieben werden. Die Pharmakokinetik von Ruthenium ist durch ein relativ kleines Verteilungsvolumen, eine niedrige Clearance und eine lange Halbwertszeit gekennzeichnet. Nur ein sehr geringer Anteil wird renal ausgeschieden. Darüber hinaus lässt das proportional zur Dosis ansteigende Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve auf eine lineare Pharmakokinetik schließen. Für KP1019 lässt sich anhand der ermittelten pharmakokinetischen Parameter schlussfolgern, dass, ausgehend von der langen Halbwertszeit, ein Dosierungsintervall von drei oder vier Tagen geeignet sein sollte.

Sowohl für KP46 als auch für KP1019 konnte in den höchsten Dosierungen 900 bzw. 600 mg keine dosislimitierende Toxizität beobachtet werden. Eine weitere Eskalation könnte daher möglich sein und zudem zu einer höheren Effektivität führen. Jedoch sollten hierfür zunächst für beide Arzneistoffe im Hinblick auf deren limitierte Löslichkeit optimierte Darreichungsformen entwickelt werden.

Neben der Kenntnis der pharmakokinetischen Parameter, ist für die Entwicklung optimaler individualisierter Dosierungsregime die Quantifizierung der Variabilität dieser Parameter von großer Bedeutung. Mit

Hilfe populationspharmakokinetischer/-pharmakodynamischer Methoden lässt sich diese nicht nur quantifizieren sondern auch Kovariaten identifizieren, die für diese Variabilität zumindest teilweise verantwortlich sind.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein Populations-PK/PD-Modell entwickelt, dass den Zusammenhang zwischen dem Platin-Konzentrations-Zeit-Verlauf und der Platinierung der DNA in den Leukozyten nach einer zweistündigen Infusion von Oxaliplatin beschreibt. Bei dem angewandten sequentiellen Vorgehen konnte der Konzentrations-Zeit-Verlauf im Ultrafiltrat am besten mit einem Zwei-Kompartiment-Modell beschrieben werden. Die interindividuelle Variabilität der Parameter konnte als moderat eingestuft werden. Als Kovariateneinfluss konnte ein positiver Zusammenhang zwischen Kreatininclearance und Gesamtclearance in das Modell integriert werden.

Der Zusammenhang zwischen Platinkonzentrationen im Ultrafiltrat und der Platin-DNA-Addukt-Bildung in den Leukozyten konnte in einem zweiten Schritt mit Hilfe eines Arzneistoff-Rezeptor-Interaktions-Modells beschrieben werden. Dabei wurde die Bindung von Platin an die DNA mit Hilfe einer Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung integriert. Die Degradation, beschrieben durch eine Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung, wurde mit einem Wert von  $0,00429 \text{ h}^{-1}$ , was einer langen Halbwertszeit von ca. 7 Tagen entsprach, ermittelt. Darüber hinaus konnte ein Baseline-Wert für mit platinhaltiger Chemotherapie vorbehandelte Patienten abgeschätzt werden. Die interindividuelle Variabilität war deutlich höher als für die pharmakokinetischen Parameter.

Basierend auf dem entwickelten Populationsmodell wurde der Zusammenhang zwischen der Platin-DNA-Addukt-Exposition in den Leukozyten und dem Tumoransprechen untersucht. Dabei zeigte sich, dass Responder im Vergleich zu Non-Respondern eine höhere Fläche unter der Addukt-Kurve 48 h nach Infusionsende aufwiesen.

Die Ergebnisse beider Teile dieser Arbeit können einen Beitrag zur Dosisfindung bzw. Dosisoptimierung von antitumoralen Metallkomplexen leisten. Die erstellten Hypothesen aller Untersuchungen dieser Arbeit basieren jedoch auf den Daten kleiner Studienpopulationen. Es wäre nun daher interessant, die entwickelten Modelle in weiteren Studienpopulationen zu überprüfen und weiterzuentwickeln.

## 7 Literaturverzeichnis

- [1] Rosenberg B. *Platinum complexes for the treatment of cancer: Why the search goes on*. In: Lippert B. *Cisplatin*. Helvetica Chimica Acta/VCH; Verl. Helvetica Chimica Acta [u.a.], Zürich 1999: 3–27.
- [2] Peyrone M. *Über die Einwirkung des Ammoniaks auf Platinchlorür*. Ann Chem Pharm 1844.
- [3] Kelland L. *The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy*. Nat Rev Cancer 2007; 7: 573–584.
- [4] Giaccone G. *Clinical perspectives on platinum resistance*. Drugs 2000; 59 Suppl 4: 9–17.
- [5] Gregg RW, Molepo JM, Monpetit VJ, et al. *Cisplatin neurotoxicity: the relationship between dosage, time, and platinum concentration in neurologic tissues, and morphologic evidence of toxicity*. J Clin Oncol 1992; 10: 795–803.
- [6] Holmes J, Stank J, Pachinko M, et al. *Comparative neurotoxicity of oxaliplatin, cisplatin, and ormaplatin in a Wistar rat model*. Toxicol Sci 1998; 46: 342–351.
- [7] Screnci D, McKeage MJ, Galettis P, et al. *Relationships between hydrophobicity, reactivity, accumulation and peripheral nerve toxicity of a series of platinum drugs*. Br J Cancer 2000; 82: 966–972.
- [8] Screnci D, Er HM, Hambley TW, et al. *Stereoselective peripheral sensory neurotoxicity of diamminocyclohexane platinum enantiomers related to ormaplatin and oxaliplatin*. Br J Cancer 1997; 76: 502–510.
- [9] Duffull SB, Robinson BA. *Clinical pharmacokinetics and dose optimisation of carboplatin*. Clin Pharmacokinet 1997; 33: 161–183.
- [10] O'Dwyer PJ, Stevenson JP, Johnson SW. *Clinical pharmacokinetics and administration of established platinum drugs*. Drugs 2000; 59 Suppl 4: 19–27.
- [11] O'Dwyer PJ, Stevenson JP, Johnson SW. *Clinical status of cisplatin, carboplatin and other platinum-based antitumor drugs*. In: Lippert B. *Cisplatin*. Helvetica Chimica Acta/VCH; Verl. Helvetica Chimica Acta [u.a.], Zürich 1999: 31–69.
- [12] Highley MS, Calvert AH. *Clinical experience with cisplatin and carboplatin*. In: Kelland LR, et al. *Platinum-based drugs in cancer therapy*. Humana Press Inc., U.S. 2000: 171–194.
- [13] Schmoll HJ, Höffken K, Possinger K. *Epitheliale Ovariakarzinome*. In: Schmoll HJ, et al. *Kompendium Internistische Onkologie. Standards in Diagnostik und Therapie*. Springer Berlin; Springer, Berlin 1999.

- [14] Mathe G, Kidani Y, Triana K, et al. *A Phase-I trial of trans-1-diamino-cyclohexane oxalato-platinum (L-Ohp)*. *Biomed Pharmacother* 1986; 40: 372–376.
- [15] Kidani Y, Noji M, Tsukagoshi S, et al. *Antitumor activity of water-soluble platinum(II) complexes of 1,2-cyclohexanediamine isomers*. *Gann* 1978; 69: 263–265.
- [16] Kidani Y, Noji M, Tashiro T. *Antitumor activity of platinum(II) complexes of 1,2-diamino-cyclohexane isomers*. *Gann* 1980; 71: 637–643.
- [17] Kidani Y, Okamoto K, Noji M, et al. *Antitumor activity of platinum (II) complexes of 1-amino-2-aminomethylcyclohexane isomers*. *Gann* 1978; 69: 863–864.
- [18] Mani S, Graham MA, Bregman DB, et al. *Oxaliplatin: a review of evolving concepts*. *Cancer Invest* 2002; 20: 246–263.
- [19] Ott I, Gust R. *Special qualities of inorganic cytostatics. Medicinal chemistry of platinum complexes*. *Pharm Unserer Zeit* 2006; 35: 124–133.
- [20] Choy H. *Satraplatin: an orally available platinum analog for the treatment of cancer*. *Expert Rev Anticancer Ther* 2006; 6: 973–982.
- [21] Choy H, Park C, Yao M. *Current Status and Future Prospects for Satraplatin, an Oral Platinum Analogue*. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 1633–1638.
- [22] Luo FR, Wyrick SD, Chaney SG. *Biotransformations of oxaliplatin in rat blood in vitro*. *J Biochem Mol Toxicol* 1999; 13: 159–169.
- [23] Allain P, Heudi O, Cailleux A, et al. *Early biotransformations of oxaliplatin after its intravenous administration to cancer patients*. *Drug Metab Dispos* 2000; 28: 1379–1384.
- [24] Gamelin E, LeBouil A, BoisdronCelle M, et al. *Cumulative pharmacokinetic study of oxaliplatin, administered every three weeks, combined with 5-fluorouracil in colorectal cancer patients*. *Clin Cancer Res* 1997; 3: 891–899.
- [25] Pendyala L, Creaven PJ. *In-vitro cytotoxicity, protein-binding, red-blood-cell partitioning, and biotransformation of oxaliplatin*. *Cancer Res* 1993; 53: 5970–5976.
- [26] Saris CP, vandeVaart PJM, Rietbroek RC, et al. *In vitro formation of DNA adducts by cisplatin, lobaplatin and oxaliplatin in calf thymus DNA in solution and in cultured human cells*. *Carcinogenesis* 1996; 17: 2763–2769.
- [27] Woynarowski JM, Chapman WG, Napier C, et al. *Sequence- and region-specificity of oxaliplatin adducts in naked and cellular DNA*. *Mol Pharmacol* 1998; 54: 770–777.

- [28] Chaney SG, Campbell SL, Bassett E, et al. *Recognition and processing of cisplatin- and oxaliplatin-DNA adducts*. Crit Rev Oncol Hematol 2005; 53: 3–11.
- [29] Spingler B, Whittington DA, Lippard SJ. *2.4 angstrom crystal structure of an oxaliplatin 1,2-d(GpG) intrastrand cross-link in a DNA dodecamer duplex*. Inorg Chem 2001; 40: 5596–5602.
- [30] Scheeff ED, Briggs JM, Howell SB. *Molecular modeling of the intrastrand guanine-guanine DNA adducts produced by cisplatin and oxaliplatin*. Mol Pharmacol 1999; 56: 633–643.
- [31] Faivre S, Chan D, Salinas R, et al. *DNA strand breaks and apoptosis induced by oxaliplatin in cancer cells*. Biochem Pharmacol 2003; 66: 225–237.
- [32] Raymond E, Faivre S, Chaney S, et al. *Cellular and molecular pharmacology of oxaliplatin*. Mol Cancer Ther 2002; 1: 227–235.
- [33] Ramachandran S, Temple BR, Chaney SG, et al. *Structural basis for the sequence-dependent effects of platinum-DNA adducts*. Nucleic Acids Res 2009; 37: 2434–2448.
- [34] Huang JC, Zamble DB, Reardon JT, et al. *HMG-domain proteins specifically inhibit the repair of the major DNA adduct of the anticancer drug cisplatin by human excision nuclease*. Proc Natl Acad Sci U S A 1994/10/25; 91: 10394–10398.
- [35] Chaney SG, Vaisman A. *Specificity of platinum-DNA adduct repair*. J Inorg Biochem 1999; 77: 71–81.
- [36] Zamble DB, Lippard SJ. *The response of cellulare proteins to cisplatin damaged DNA*. In: Lippert B. *Cisplatin*. Helvetica Chimica Acta/VCH; Verl. Helvetica Chimica Acta [u.a.], Zürich 1999: 73–110.
- [37] Jordan P, Carmo-Fonseca M. *Cisplatin inhibits synthesis of ribosomal RNA in vivo*. Nucleic Acids Res 1998; 26: 2831–2836.
- [38] Wiseman LR, Adkins JC, Plosker GL, et al. *Oxaliplatin - A review of its use in the management of metastatic colorectal cancer*. Drugs Aging 1999; 14: 459–475.
- [39] Woynarowski JM, Faivre S, Herzig MCS, et al. *Oxaliplatin-induced damage of cellular DNA*. Mol Pharmacol 2000; 58: 920–927.
- [40] Fujie Y, Yamamoto H, Ngan CY, et al. *Oxaliplatin, a potent inhibitor of survivin, enhances paclitaxel-induced apoptosis and mitotic catastrophe in colon cancer cells*. Jpn J Clin Oncol 2005; 35: 453–463.
- [41] Di Francesco AM, Ruggiero A, Riccardi R. *Cellular and molecular aspects of drugs of the future: oxaliplatin*. Cell Mol Life Sci 2002; 59: 1914–1927.

- [42] Siddik ZH. *Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance*. *Oncogene* 2003; 22: 7265–7279.
- [43] Andrews PA, Mann SC, Huynh HH, et al. *Role of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-Adenosine Triphosphatase in the Accumulation of cis-Diamminedichloroplatinum(II) in Human Ovarian Carcinoma Cells*. *Cancer Res* 1991; 51: 3677–3681.
- [44] Safaei R. *Role of copper transporters in the uptake and efflux of platinum containing drugs*. *Cancer Lett* 2006; 234: 34–39.
- [45] Yonezawa A, Masuda S, Nishihara K, et al. *Association between tubular toxicity of cisplatin and expression of organic cation transporter rOCT2 (Slc22a2) in the rat*. *Biochem Pharmacol* 2005; 70: 1823–1831.
- [46] Yonezawa A, Masuda S, Yokoo S, et al. *Cisplatin and oxaliplatin, but not carboplatin and nedaplatin, are substrates for human organic cation transporters (SLC22A1-3 and multidrug and toxin extrusion family)*. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 319: 879–886.
- [47] Lin X, Okuda T, Holzer A, et al. *The Copper Transporter CTR1 Regulates Cisplatin Uptake in Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Pharmacol* 2002; 62: 1154–1159.
- [48] Ishida S, Lee J, Thiele DJ, et al. *Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 14298–14302.
- [49] Safaei R, Holzer AK, Katano K, et al. *The role of copper transporters in the development of resistance to Pt drugs*. *J Inorg Biochem* 2004; 98: 1607–1613.
- [50] Beretta GL, Gatti L, Tinelli S, et al. *Cellular pharmacology of cisplatin in relation to the expression of human copper transporter CTR1 in different pairs of cisplatin-sensitive and -resistant cells*. *Biochem Pharmacol* 2004; 68: 283–291.
- [51] Martinez-Balibrea E, Martínez-Cardús A, Musulén E, et al. *Increased levels of copper efflux transporter ATP7B are associated with poor outcome in colorectal cancer patients receiving oxaliplatin-based chemotherapy*. *Clin Cancer Res* 2009; 124: 2905–2910.
- [52] Samimi G, Safaei R, Katano K, et al. *Increased expression of the copper efflux transporter ATP7A mediates resistance to cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin in ovarian cancer cells*. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 4661–4669.
- [53] Nakayama K, Kanzaki A, Ogawa K, et al. *Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) as a cisplatin based chemoresistance marker in ovarian carcinoma: comparative analysis with expression of MDR1, MRP1, MRP2, LRP and BCRP*. *Int J Cancer* 2002; 101: 488–495.

- [54] Kanzaki A, Nakayama K, Miyashita H, et al. *Mutation analysis of copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) in human solid carcinomas*. *Anticancer Res*; 23: 1913–1915.
- [55] Miyashita H, Nitta Y, Mori S, et al. *Expression of copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) as a chemoresistance marker in human oral squamous cell carcinoma treated with cisplatin*. *Oral Oncol* 2003; 39: 157–162.
- [56] Katano K, Safaei R, Samimi G, et al. *The copper export pump ATP7B modulates the cellular pharmacology of carboplatin in ovarian carcinoma cells*. *Mol Pharmacol* 2003; 64: 466–473.
- [57] Safaei R, Otani S, Larson BJ, et al. *Transport of Cisplatin by the Copper Efflux Transporter ATP7B*. *Mol Pharmacol* 2008; 73: 461–468.
- [58] Reardon JT, Vaisman A, Chaney SG, et al. *Efficient nucleotide excision repair of cisplatin, oxaliplatin, and Bis-aceto-ammine-dichloro-cyclohexylamine-platinum(IV) (JM216) platinum intrastrand DNA diadducts*. *Cancer Res* 1999; 59: 3968–3971.
- [59] Zdraveski ZZ, Mello JA, Farinelli CK, et al. *MutS preferentially recognizes cisplatin- over oxaliplatin-modified DNA*. *J Biol Chem* 2002; 277: 1255–1260.
- [60] Shord SS, Bernard SA, Lindley C, et al. *Oxaliplatin biotransformation and pharmacokinetics: A pilot study to determine the possible relationship to neurotoxicity*. *Anticancer Res* 2002; 22: 2301–2309.
- [61] Pfeiffer P, Sorbye H, Ehrsson H, et al. *Short-time infusion of oxaliplatin in combination with capecitabine (XELOX30) as second-line therapy in patients with advanced colorectal cancer after failure to irinotecan and 5-fluorouracil*. *Ann Oncol* 2006; 17: 252–258.
- [62] Mandal R, Sawyer MB, Li X. *Mass spectrometry study of hemoglobin-oxaliplatin complexes in colorectal cancer patients and potential association with chemotherapeutic responses*. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2006; 20: 2533–2538.
- [63] Peng J, Mandal R, Sawyer M, et al. *Characterization of intact hemoglobin and oxaliplatin interaction by nanoelectrospray ionization tandem mass spectrometry*. *Clin Chem* 2005; 51: 2274–2281.
- [64] Burz C, Berindan-Neagoe IB, Balacescu O, et al. *Clinical and pharmacokinetics study of oxaliplatin in colon cancer patients*. *J Gastrointestin Liver Dis* 2009; 18: 39–43.
- [65] Extra JM, Marty M, Brienza S, et al. *Pharmacokinetics and safety profile of oxaliplatin*. *Semin Oncol* 1998; 25: 13–22.
- [66] Massari C, Brienza S, Rotarski M, et al. *Pharmacokinetics of oxaliplatin in patients with normal versus impaired renal function*. *Cancer Chemother Pharmacol* 2000; 45: 157–164.

- [67] Takimoto CH, Remick SC, Sharma S, et al. *Dose-escalating and pharmacological study of oxaliplatin in adult cancer patients with impaired renal function: A National Cancer Institute Organ Dysfunction Working Group Study*. J Clin Oncol 2003; 21: 2664–2672.
- [68] Kern W, Braess J, Bottger B, et al. *Oxaliplatin pharmacokinetics during a four-hour infusion*. Clin Cancer Res 1999; 5: 761–765.
- [69] Graham MA, Lockwood GF, Greenslade D, et al. *Clinical pharmacokinetics of oxaliplatin: A critical review*. Clin Cancer Res 2000; 6: 1205–1218.
- [70] Pieck AC. *Pharmakokinetik und Platin-DNA-Adduktbildung von Oxaliplatin* – Dissertation. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn 2004.
- [71] Pieck AC, Drescher A, Wiesmann KG, et al. *Oxaliplatin-DNA adduct formation in white blood cells of cancer patients*. Br J Cancer 2008; 98: 1959–1965.
- [72] Wasserman E, Cuvier C, Lokiec F, et al. *Combination of oxaliplatin plus irinotecan in patients with gastrointestinal tumors: Results of two independent phase I studies with pharmacokinetics*. J Clin Oncol 1999; 17: 1751–1759.
- [73] Gross-Goupil M, Lokiec F, Lopez G, et al. *Topotecan preceded by oxaliplatin using a 3 week schedule: a phase I study in advanced cancer patients*. Eur J Cancer 2002; 38: 1888–1898.
- [74] Levi F, Metzger G, Massari C, et al. *Oxaliplatin - Pharmacokinetics and chronopharmacological aspects*. Clin Pharmacokinet 2000; 38: 1–21.
- [75] Bastian G, Barrail A, Urien S. *Population pharmacokinetics of oxaliplatin in patients with metastatic cancer*. Anticancer Drugs 2003; 14: 817–824.
- [76] Takimoto CH, Graham MA, Lockwood G, et al. *Oxaliplatin pharmacokinetics and pharmacodynamics in adult cancer patients with impaired renal function*. Clin Cancer Res 2007; 13: 4832–4839.
- [77] Baur M, Drescher A, Gneist M, et al. *Pharmacokinetics of oxaliplatin in patients with severe hepatic dysfunction*. Cancer Chemother Pharmacol 2008; 61: 97–104.
- [78] Doroshow JH, Synold TW, Gandara D, et al. *Pharmacology of oxaliplatin in solid tumor patients with hepatic dysfunction: a preliminary report of the National Cancer Institute Organ Dysfunction Working Group*. Semin Oncol 2003; 30: 14–19.
- [79] Kho Y, Jansman FG, Prins NH, et al. *Population pharmacokinetics of oxaliplatin (85 mg/m<sup>2</sup>) in combination with 5-fluorouracil in patients with advanced colorectal cancer*. Ther Drug Monit 2006; 28: 206–211.

- [80] Delord JP, Umlil A, Guimbaud R, et al. *Population pharmacokinetics of oxaliplatin*. *Cancer Chemother Pharmacol* 2003; 51: 127–131.
- [81] Díaz-Rubio E, Sastre J, Zaniboni A, et al. *Oxaliplatin as single agent in previously untreated colorectal carcinoma patients: a phase II multicentric study*. *Ann Oncol* 1998; 9: 105–108.
- [82] Becouarn Y, Ychou M, Ducreux M, et al. *Phase II trial of oxaliplatin as first-line chemotherapy in metastatic colorectal cancer patients. Digestive Group of French Federation of Cancer Centers*. *J Clin Oncol* 1998; 16: 2739–2744.
- [83] Köhne C. *Chemotherapie des Kolonkarzinoms*. *Arzneimitteltherapie* 19; 2001: 51–63.
- [84] Köhne C, Wils J, Lorenz M, et al. *Randomized phase III study of high-dose fluorouracil given as a weekly 24-hour infusion with or without leucovorin versus bolus fluorouracil plus leucovorin in advanced colorectal cancer: European organization of Research and Treatment of Cancer Gastrointestinal Group Study 40952*. *J Clin Oncol* 2003; 21: 3721–3728.
- [85] Grunberg SM, Osoba D, Hesketh PJ, et al. *Evaluation of new antiemetic agents and definition of antineoplastic agent emetogenicity—an update*. *Support Care Cancer* 2005; 13: 80–84.
- [86] Misset JL, Bleiberg H, Sutherland W, et al. *Oxaliplatin clinical activity: a review*. *Crit Rev Oncol Hematol* 2000; 35: 75–93.
- [87] Gamelin E, Gamelin L, Bossi L, et al. *Clinical aspects and molecular basis of oxaliplatin neurotoxicity: current management and development of preventive measures*. *Semin Oncol* 2002; 29: 21–33.
- [88] Grothey A. *Oxaliplatin-safety profile: Neurotoxicity*. *Semin Oncol* 2003; 30: 5–13.
- [89] De GA, Figer A, Seymour M, et al. *Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer*. *J Clin Oncol* 2000; 18: 2938–2947.
- [90] Andre T, Bensmaine MA, Louvet C, et al. *Multicenter phase II study of bimonthly high-dose leucovorin, fluorouracil infusion, and oxaliplatin for metastatic colorectal cancer resistant to the same leucovorin and fluorouracil regimen*. *J Clin Oncol* 1999; 17: 3560–3568.
- [91] Grolleau F, Gamelin L, Boisdron-Celle M, et al. *A possible explanation for a neurotoxic effect of the anticancer agent oxaliplatin on neuronal voltage-gated sodium channels*. *J Neurophysiol* 2001; 85: 2293–2297.
- [92] Hochster HS, Grothey A, Childs BH. *Use of calcium and magnesium salts to reduce oxaliplatin-related neurotoxicity*. *J Clin Oncol* 2007; 25: 4028–4029.

- [93] Gamelin L, Boisdron-Celle M, Delva R, et al. *Prevention of oxaliplatin-related neurotoxicity by calcium and magnesium infusions: a retrospective study of 161 patients receiving oxaliplatin combined with 5-Fluorouracil and leucovorin for advanced colorectal cancer.* Clin Cancer Res 2004; 10: 4055–4061.
- [94] Gamelin L, Boisdron-Celle M, Morel A, et al. *Oxaliplatin-related neurotoxicity: Interest of calcium-magnesium infusion and no impact on its efficacy.* J Clin Oncol 2008; 26: 1188–1189.
- [95] McKeage MJ, Hsu T, Screnci D, et al. *Nucleolar damage correlates with neurotoxicity induced by different platinum drugs.* Br J Cancer 2001; 85: 1219–1225.
- [96] Cavaletti G, Petruccioli MG, Marmiroli P, et al. *Circulating nerve growth factor level changes during oxaliplatin treatment-induced neurotoxicity in the rat.* Anticancer Res 2002; 22: 4199–4204.
- [97] Hart MM, Smith CF, Yancey ST, et al. *Toxicity and antitumor activity of gallium nitrate and periodically related metal salts.* J Natl Cancer Inst 1971; 47: 1121–1127.
- [98] Edwards CL, Hayes RL. *Scanning malignant neoplasms with gallium 67.* JAMA 1970; 212: 1182–1191.
- [99] Edwards CL, Hayes RL. *Tumor scanning with 67Ga citrate.* J Nucl Med 1969; 10: 103–105.
- [100] Hoffer P. *Gallium: mechanisms.* J Nucl Med 1980; 21: 282–285.
- [101] Hoffer P. *Status of gallium-67 in tumor detection.* J Nucl Med 1980; 21: 394–398.
- [102] Hart MM, Adamson RH. *Antitumor activity and toxicity of salts of inorganic group 3a metals: aluminum, gallium, indium, and thallium.* Proc Natl Acad Sci U S A 1971; 68: 1623–1626.
- [103] Warrell RPJ. *Clinical trials of gallium nitrate in patients with cancer-related hypercalcemia.* Semin Oncol 1991; 18: 26–31.
- [104] Warrell RPJ. *Gallium nitrate for the treatment of bone metastases.* Cancer 1997; 80: 1680–1685.
- [105] Warrell RPJ, Danieu L, Coonley CJ, et al. *Salvage chemotherapy of advanced lymphoma with investigational drugs: mitoguazone, gallium nitrate, and etoposide.* Cancer Treat Rep 1987; 71: 47–51.
- [106] Seidman AD, Scher HI, Heinemann MH, et al. *Continuous infusion gallium nitrate for patients with advanced refractory urothelial tract tumors.* Cancer 1991; 68: 2561–2565.
- [107] Senderowicz AM, Reid R, Headlee D, et al. *A phase II trial of gallium nitrate in patients with androgen-metastatic prostate cancer.* Urol Int 1999; 63: 120–125.

- [108] Collery P, Millart H, Lamiabile D, et al. *Clinical-pharmacology of gallium chloride after oral-administration in lung-cancer patients*. *Anticancer Res* 1988; 8: 1147–1148.
- [109] Collery P, Millart H, Kleisbauer JP, et al. *Dose optimization of gallium chloride, orally administered, in combination with platinum compounds*. *Anticancer Res* 1994; 14: 2299–2306.
- [110] Hofheinz RD, Dittrich C, Jakupec MA, et al. *Early results from a phase I study on orally administered tris(8-quinolinolato)gallium(III) (FFC11, KP46) in patients with solid tumors--a CESAR study (Central European Society for Anticancer Drug Research--EWIV)*. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2005; 43: 590–591.
- [111] Galanski M, Arion VB, Jakupec MA, et al. *Recent developments in the field of tumor-inhibiting metal complexes*. *Curr Pharm Des* 2003; 9: 2078–2089.
- [112] Kostova I. *Ruthenium complexes as anticancer agents*. *Curr Med Chem* 2006; 13: 1085–1107.
- [113] Alessio E, Mestroni G, Bergamo A, et al. *Ruthenium antimetastatic agents*. *Curr Top Med Chem* 2004; 4: 1525–1535.
- [114] Clarke MJ. *Ruthenium metallopharmaceuticals*. *Coord Chem Rev* 2002; 232: 69–93.
- [115] Habtemariam A, Melchart M, Fernandez R, et al. *Structure-activity relationships for cytotoxic ruthenium(II) arene complexes containing N,N-, N,O-, and O,O-chelating ligands*. *J Med Chem* 2006; 49: 6858–6868.
- [116] Rademaker-Lakhai JM, van den BD, Pluim D, et al. *A Phase I and pharmacological study with imidazolium-trans-DMSO-imidazole-tetrachlororuthenate, a novel ruthenium anticancer agent*. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 3717–3727.
- [117] Sava G, Pacor S, Bergamo A, et al. *Effects of ruthenium complexes on experimental tumors: irrelevance of cytotoxicity for metastasis inhibition*. *Chem Biol Interact* 1995; 95: 109–126.
- [118] Sava G, Bergamo A. *Drug control of solid tumour metastases: a critical view*. *Anticancer Res* 1999; 19: 1117–1124.
- [119] Bruijninx PCA, Sadler PJ. *New trends for metal complexes with anticancer activity*. *Curr Opin Chem Biol* 2008; 12: 197–206.
- [120] Dougan SJ, Sadler PJ. *The design of organometallic ruthenium arene anticancer agents*. *Chimia (Aarau)* 2007; 61: 704–715.
- [121] Scolaro C, Bergamo A, Brescacin L, et al. *In vitro and in vivo evaluation of ruthenium(II)-arene PTA complexes*. *J Med Chem* 2005; 48: 4161–4171.

- [122] Maeda H. *The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting*. Adv Enzyme Regul 2001; 41: 189–207.
- [123] Maeda H, Sawa T, Konno T. *Mechanism of tumor-targeted delivery of macromolecular drugs, including the EPR effect in solid tumor and clinical overview of the prototype polymeric drug SMANCS*. J Control Release 2001; 74: 47–61.
- [124] Maeda H, Wu J, Sawa T, et al. *Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review*. J Control Release 2000; 65: 271–284.
- [125] Matsumura Y, Maeda H. *A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: Mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent Smancs*. Cancer Res 1986; 46: 6387–6392.
- [126] Jakupec MA, Reisner E, Eichinger A, et al. *Redox-active antineoplastic ruthenium complexes with indazole: correlation of in vitro potency and reduction potential*. J Med Chem 2005; 48: 2831–2837.
- [127] Schluga P, Hartinger CG, Egger A, et al. *Redox behavior of tumor-inhibiting ruthenium(III) complexes and effects of physiological reductants on their binding to GMP*. Dalton Trans 2006: 1796–1802.
- [128] Tacchini L, Bianchi L, Bernelli-Zazzera A, et al. *Transferrin receptor induction by hypoxia. HIF-1-mediated transcriptional activation and cell-specific post transcriptional regulation*. J Biol Chem 1999; 274: 24142–24146.
- [129] Kinuya S, Li XF, Yokoyama K, et al. *Hypoxia as a factor for <sup>67</sup>Ga accumulation in tumour cells*. Nucl Med Commun 2004; 25: 49–53.
- [130] Bernstein LR. *Mechanisms of therapeutic activity for gallium*. Pharmacol Rev 1998; 50: 665–682.
- [131] Chitambar CR, Zivkovic-Gilgenbach Z, Narasimhan J, et al. *Development of drug resistance to gallium nitrate through modulation of cellular iron uptake*. Cancer Res 1990; 50: 4468–4472.
- [132] Hartman RE, Hayes RL. *The binding of gallium by blood serum*. J Pharmacol Exp Ther 1969; 168: 193–198.
- [133] Jakupec MA, Keppler BK. *Gallium and other main group metal compounds as antitumor agents*. Met Ions Biol Syst 2004; 42: 425–462.
- [134] Chitambar CR, Zivkovic Z. *Uptake of gallium-67 by human leukemic cells: demonstration of transferrin receptor-dependent and transferrin-independent mechanisms*. Cancer Res 1987; 47: 3929–3934.
- [135] Larson SM, Grunbaum Z, Rasey JS. *The role of transferrins in gallium uptake*. Int J Nucl Med Biol 1981; 8: 257–266.

- [136] Desoize B. *Metals and metal compounds in cancer treatment*. *Anticancer Res* 2004; 24: 1529–1544.
- [137] Chitambar CR, Narasimhan J, Guy J, et al. *Inhibition of ribonucleotide reductase by gallium in murine leukemic L1210 cells*. *Cancer Res* 1991; 51: 6199–6201.
- [138] Myette MS, Elford HL, Chitambar CR. *Interaction of gallium nitrate with other inhibitors of ribonucleotide reductase: effects on the proliferation of human leukemic cells*. *Cancer Lett* 1998; 129: 199–204.
- [139] Jakupec MA, Galanski M, Arion VB, et al. *Antitumour metal compounds: more than theme and variations*. *Dalton Trans* 2008: 183–194.
- [140] Berggren MM, Burns LA, Abraham RT, et al. *Inhibition of protein tyrosine phosphatase by the antitumor agent gallium nitrate*. *Cancer Res* 1993; 53: 1862–1866.
- [141] Perchellet EM, Ladesich JB, Collery P, et al. *Microtubule-disrupting effects of gallium chloride in vitro*. *Anticancer Drugs* 1999; 10: 477–488.
- [142] Chitambar CR, Wereley JP, Matsuyama S. *Gallium-induced cell death in lymphoma: role of transferrin receptor cycling, involvement of Bax and the mitochondria, and effects of proteasome inhibition*. *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 2834–2843.
- [143] Timerbaev AR, Rudnev AV, Semenova O, et al. *Comparative binding of antitumor indazolium [trans-tetrachlorobis(1H-indazole)ruthenate(III)] to serum transport proteins assayed by capillary zone electrophoresis*. *Anal Biochem* 2005; 341: 326–333.
- [144] Pongratz M, Schluga P, Jakupec MA, et al. *Transferrin binding and transferrin-mediated cellular uptake of the ruthenium coordination compound KP1019, studied by means of AAS, ESI-MS and CD spectroscopy*. *J Anal At Spectrom* 2004; 19: 46–51.
- [145] Kratz F, Hartmann M, Keppler B, et al. *The binding properties of two antitumor ruthenium(III) complexes to apotransferrin*. *J Biol Chem* 1994; 269: 2581–2588.
- [146] Hartinger CG, Zorbas-Seifried S, Jakupec MA, et al. *From bench to bedside--preclinical and early clinical development of the anticancer agent indazolium trans-[tetrachlorobis(1H-indazole)ruthenate(III)] (KP1019 or FFC14A)*. *J Inorg Biochem* 2006; 100: 891–904.
- [147] Kapitza S, Pongratz M, Jakupec MA, et al. *Heterocyclic complexes of ruthenium(III) induce apoptosis in colorectal carcinoma cells*. *J Cancer Res Clin Oncol* 2005; 131: 101–110.
- [148] Du Bois BD, Du Bois EF. *A formula to estimate the approximate surface area if height and weight be known*. 1916. *Nutrition* 1989; 5: 303–311.

- [149] Calvert AH, Newell DR, Gumbrell LA, et al. *Carboplatin dosage: prospective evaluation of a simple formula based on renal function*. J Clin Oncol 1989; 7: 1748–1756.
- [150] Kloft C, Jaehde U. *Dosisindividualisierung*. In: Jaehde U, et al. *Klinische Pharmazie*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart 2003: 201–224.
- [151] Poirier MC, Reed E, Litterst CL, et al. *Persistence of platinum-amine-DNA adducts in gonads and kidneys of rats and multiple tissues from cancer patients*. Cancer Res 1992; 52: 149–153.
- [152] Reed E, Ozols RF, Tarone R, et al. *The measurement of cisplatin-DNA adduct levels in testicular cancer patients*. Carcinogenesis 1988; 9: 1909–1911.
- [153] Reed E, Ozols RF, Tarone R, et al. *Platinum-DNA adducts in leukocyte DNA correlate with disease response in ovarian-cancer patients receiving platinum-based chemotherapy*. Proc Natl Acad Sci U S A 1987; 84: 5024–5028.
- [154] Schellens JH, Ma J, Planting AS, et al. *Relationship between the exposure to cisplatin, DNA-adduct formation in leucocytes and tumour response in patients with solid tumours*. Br J Cancer 1996; 73: 1569–1575.
- [155] Schellens JH, Planting AS, Ma J, et al. *Adaptive inpatient dose escalation of cisplatin in patients with advanced head and neck cancer*. Anticancer Drugs 2001; 12: 667–675.
- [156] Schellens JH, Planting AS, van ZN, et al. *Adaptive inpatient dose escalation of cisplatin in combination with low-dose vp16 in patients with nonsmall cell lung cancer*. Br J Cancer 2003; 88: 814–821.
- [157] Parker RJ, Gill I, Tarone R, et al. *Platinum-DNA damage in leukocyte DNA of patients receiving carboplatin and cisplatin chemotherapy, measured by atomic absorption spectrometry*. Carcinogenesis 1991; 12: 1253–1258.
- [158] Gupta-Burt S, Shamkhani H, Reed E, et al. *Relationship between patient response in ovarian and breast cancer and platinum drug-DNA adduct formation*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1993; 2: 229–234.
- [159] Bonetti A, Apostoli P, Zaninelli M, et al. *Inductively coupled plasma mass spectroscopy quantitation of platinum-DNA adducts in peripheral blood leukocytes of patients receiving cisplatin- or carboplatin-based chemotherapy*. Clin Cancer Res 1996; 2: 1829–1835.
- [160] Motzer RJ, Reed E, Perera F, et al. *Platinum-DNA adducts assayed in leukocytes of patients with germ cell tumors measured by atomic absorbance spectrometry and enzyme-linked immunosorbent assay*. Cancer 1994; 73: 2843–2852.

- [161] Allain P, Brienza S, Gamelin E, et al. *Oxaliplatin induced platinum DNA adducts in white blood cells of cancer patients*. Proc Annu Meet Am Assoc Cancer Res 1996; 37: 404.
- [162] Liu J, Kraut E, Bender J, et al. *Pharmacokinetics of oxaliplatin (NSC 266046) alone and in combination with paclitaxel in cancer patients*. Cancer Chemother Pharmacol 2002; 49: 367–374.
- [163] R Development Core Team . *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria 2005.
- [164] Jonsson EN, Karlsson MO. *Xpose--an S-PLUS based population pharmacokinetic/pharmacodynamic model building aid for NONMEM*. Comput Methods Programs Biomed 1999; 58: 51–64.
- [165] U. S. Department of Health and Human services FaC. *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*.
- [166] Derendorf H, Gramatté T, Schäfer HG, et al. *Pharmakokinetik*. 2. Aufl. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft., Stuttgart 2002.
- [167] Shargel L, Wu-Pong S, Yu ABC. *Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics*. McGraw Hill Medical, New York, Chicago, San Francisco, Lisbon, London, Madrid 2005.
- [168] Steimer JL, Mallet A, Golmard JL, et al. *Alternative approaches to estimation of population pharmacokinetic parameters: comparison with the nonlinear mixed-effect model*. Drug Metab Rev 1984; 15: 265–292.
- [169] Sheiner LB, Beal SL. *Evaluation of methods for estimating population pharmacokinetics parameters. I. Michaelis-Menten model: routine clinical pharmacokinetic data*. J Pharmacokinet Biopharm 1980; 8: 553–571.
- [170] Sheiner LB, Beal SL. *Evaluation of methods for estimating population pharmacokinetic parameters. II. Biexponential model and experimental pharmacokinetic data*. J Pharmacokinet Biopharm 1981; 9: 635–651.
- [171] Sheiner LB, Beal SL. *Bayesian individualization of pharmacokinetics: simple implementation and comparison with non-Bayesian methods*. J Pharm Sci 1982; 71: 1344–1348.
- [172] Karlsson MO, Sheiner LB. *The importance of modeling interoccasion variability in population pharmacokinetic analyses*. J Pharmacokinet Biopharm 1993; 21: 735–750.
- [173] Aarons L, Balant LP, Mentre F, et al. *Population approaches in drug development. Report on an expert meeting to discuss population pharmacokinetic/pharmacodynamic software*. Eur J Pharmacol 1994; 46: 389–391.

- [174] Beal SL, Sheiner LB. *The NONMEM system*. Am Stat 1980; 34: 118–119.
- [175] Beal SL, Scheiner LB. *NONMEM users guide-conditional estimation methods*, University of California, San Francisco 1998.
- [176] Welz B, Sperling M. *Atomabsorptionsspektrometrie*. Wiley-VCH, Weinheim 1997.
- [177] Dittrich C, Hochhaus A. *TRIAL PROTOCOL - A Phase-I dose-escalation trial with the oral gallium(III) complex FFC11 tris(8-quinolinolato)gallium(III) (Accelerated titration design)*. Faustus Forschungs-Compagnie, Leipzig 2003.
- [178] Unger C, Dittrich C, Scheulen M. *TRIAL PROTOCOL - A Phase-I dose-escalation trial with sodium trans-[tetrachlorobis(1H-indazole)ruthenate(III)]/Indazolhydrochloride(1:1.1) or FFC14/Ind HCl (1:1.1) (Accelerated Titration Design) in patients with solid tumors*. Faustus Forschungs Compagnie, Leipzig 2002.
- [179] Pharsight Corporation. *WinNonlin help guide*. Pharsight Corporation 2000.
- [180] Akaike H. *A new look at the statistical model identification*. IEEE Trans Automat Contr 1974; 19: 716–723.
- [181] Schwarz G. *Estimating the Dimension of a Model*. Ann Stat 1978; 6: 461–464.
- [182] Voliotis D, Voigt BU, Kuhlmann J. *Prüfplan der Studie: Single-center, open-label, nonplacebo-controlled, non-randomized, dose-escalating Phase I study to define the safety profile, pharmacokinetics, pharmacodynamics and tumour response profile of BAY 43-9006 in combination with oxaliplatin chemotherapy in patients with advanced, refractory solid tumours*. Bayer AG, Wuppertal 2002.
- [183] Junker A, Wehmeier A, Jaehde U. *Prüfplan der Studie: Pharmakologische Untersuchung zu pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Unterschieden von Oxaliplatin in der First- und Second-Line-Therapie bei Patienten mit kolorektalem Karzinom*, Sana Klinikum Remscheid 2001.
- [184] Junker A. *Klinische Untersuchungen zur Dosis-Konzentrations-Effektbeziehung von Oxaliplatin* - Dissertation. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn 2006.
- [185] Kloft C, Eickhoff C, Schulze-Forster K, et al. *Development and application of a simple assay to quantify cellular adducts of platinum complexes with DNA*. Pharm Res 1999; 16: 470–473.
- [186] Weber G, Messerschmidt J, Pieck AC, et al. *Ultrasensitive voltammetric determination of DNA-bound platinum in patients after administration of oxaliplatin*. Anal Bioanal Chem 2004; 380: 54–58.

- [187] Cockcroft DW, Gault MH. *Prediction of creatinine clearance from serum creatinine*. Nephron 1976; 16: 31–41.
- [188] Janmahasatian S, Duffull SB, Ash S, et al. *Quantification of lean bodyweight*. Clin Pharmacokinet 2005; 44: 1051–1065.
- [189] Mager DE, Jusko WJ. *General pharmacokinetic model for drugs exhibiting target-mediated drug disposition*. J Pharmacokinet Pharmacodyn 2001; 28: 507–532.
- [190] Mandema JW, Verotta D, Sheiner LB. *Building population pharmacokinetic--pharmacodynamic models. I. Models for covariate effects*. J Pharmacokinet Biopharm 1992; 20: 511–528.
- [191] Lindbom L, Ribbing J, Jonsson EN. *Perl-speaks-NONMEM (PsN) - A Perl module for NONMEM related programming*. Comput Methods Programs Biomed 2004; 75: 85–94.
- [192] Lindbom L, Pihlgren P, Jonsson EN. *PsN-Toolkit - A collection of computer intensive statistical methods for non-linear mixed effect modeling using NONMEM*. Comput Methods Programs Biomed 2005; 79: 241–257.
- [193] Jonsson EN, Karlsson MO. *Automated covariate model building within NONMEM*. Pharm Res 1998; 15: 1463–1468.
- [194] Efron B. *Bootstrap methods: another look at the jackknife*. Ann Stat 1979; 7: 1–26.
- [195] Wang HM, Jones MP, Storer BE. *Comparison of case-deletion diagnostic methods for Cox regression*. Stat Med 2006; 25: 669–683.
- [196] Smith BP, Vandenhende FR, DeSante KA, et al. *Confidence interval criteria for assessment of dose proportionality*. Pharm Res 2000; 17: 1278–1283.
- [197] Lo YM, Tein MS, Lau TK, et al. *Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis*. Am J Hum Genet 1998; 62: 768–775.
- [198] Schütte J. *Allgemeine Definitionen*. In: Seeber S, et al. *Therapiekonzepte Onkologie*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg 2003: 3–47.
- [199] Anthemidis AN, Zachariadis GA, Stratis JA. *Gallium trace on-line preconcentration/separation and determination using a polyurethane foam mini-column and flame atomic absorption spectrometry. Application in aluminum alloys, natural waters and urine*. Talanta 2003; 60: 929–936.
- [200] Kitazumi I, Nakashima Y, Himeno S. *Capillary electrophoretic determination of Ga(III) based on the formation of a heteropolyoxomolybdate complex*. J Chromatogr A 2003; 993: 211–215.

- [201] Singh VK, Agnihotri NK, Singh HB, et al. *Simultaneous determination of gallium(III) and indium(III) by derivative spectrophotometry*. Talanta 2001; 55: 799–806.
- [202] Satyanarayana K, Subramaniam K, Raghunath AV, et al. *Inductively coupled plasma atomic emission spectrometric determination of gallium, phosphorus and other oxo-anion forming elements in geological materials*. Analyst 1996; 121: 825–830.
- [203] Newman RA. *Flameless atomic absorption spectrometry determination of gallium in biological materials*. Clin Chim Acta 1978; 86: 195–200.
- [204] Nakamura K, Fujimori M, Tsuchiya H, et al. *Determination of gallium in biological materials by electrothermal atomic absorption spectrometry*. Anal Chim Acta 1982; 138: 129–136.
- [205] Kelsen DP, Alcock N, Yeh S, et al. *Pharmacokinetics of gallium nitrate in man*. Cancer 1980; 46: 2009–2013.
- [206] Ranisteano-Bourdon S, Prouillet F, Bourdon R. *Estimation of aluminium and gallium in biological fluids (author's transl)*. Ann Biol Clin (Paris) 1978; 36: 39–44.
- [207] Kloft C. *Klinisch-pharmakokinetische und pharmakodynamische Untersuchungen zur Dosisoptimierung von Platinkomplexen – Dissertation*. Freie Universität, Berlin 1997.
- [208] Volynskii AB. *Chemical modifiers in modern electrothermal atomic absorption spectrometry*. J Anal Chem 2003; 58: 905–921.
- [209] Brouwers EE, Tibben MM, Rosing H, et al. *Determination of ruthenium originating from the investigational anti-cancer drug NAMI-A in human plasma ultrafiltrate, plasma, and urine by inductively coupled plasma mass spectrometry*. Rapid Commun Mass Spectrom 2007; 21: 1521–1530.
- [210] Crul M, van den Bongard HJ, Tibben MM, et al. *Validated method for the determination of the novel organo-ruthenium anticancer drug NAMI-A in human biological fluids by Zeeman atomic absorption spectrometry*. Fresenius J Anal Chem 2001; 369: 442–445.
- [211] Henke MM, Richly H, Drescher A, et al. *Pharmacokinetic study of sodium trans[tetrachlorobis(1H-indazole)-ruthenate (III)]/-indazole hydrochloride (1:1.1) (FFC14A) in patients with solid tumors*. Int J Clin Pharmacol Ther 2009; 47: 58–60.
- [212] Polec-Pawlak K, Abramski JK, Semenova O, et al. *Platinum group metallodrug-protein binding studies by capillary electrophoresis - inductively coupled plasma-mass spectrometry: a further insight into the reactivity of a novel antitumor ruthenium(III) complex toward human serum proteins*. Electrophoresis 2006; 27: 1128–1135.
- [213] Michael Groessl, Christian G. Hartinger, Kasia Polec-Pawlak, et al. *Capillary electrophoresis hyphenated to inductively coupled plasma-*

- mass spectrometry: A novel approach for the analysis of anticancer metallodrugs in human serum and plasma.* Electrophoresis 2008; 29: 2224–2232.
- [214] Michael Groessl, Christian G. Hartinger, Kasia Połstrok, et al. *Elucidation of the interactions of an anticancer ruthenium complex in clinical trials with biomolecules utilizing capillary electrophoresis hyphenated to inductively coupled plasma-mass spectrometry. Short communication.* Chem Biodivers 2008; 5: 1609–1614.
- [215] Sulyok M, Hann S, Hartinger CG, et al. *Two dimensional separation schemes for investigation of the interaction of an anticancer ruthenium(III) compound with plasma proteins.* J Anal At Spectrom 2005; 20: 856–863.
- [216] Bernstein LR, Tanner T, Godfrey C, et al. *Chemistry and pharmacokinetics of gallium maltolate, a compound with high oral gallium bioavailability.* Met Based Drugs 2000; 7: 33–47.
- [217] David P. Kelsen, Nancy Alcock, Samuel Yeh, et al. *Pharmacokinetics of gallium nitrate in man.* Cancer 1980; 46: 2009–2013.
- [218] Collery P, Domingo JL, Keppler BK. *Preclinical toxicology and tissue gallium distribution of a novel antitumour gallium compound: tris (8-quinolinolato) gallium (III).* Anticancer Res 1996; 16: 687–691.
- [219] Jakupec MA, Keppler BK. *Gallium in cancer treatment.* Curr Top Med Chem 2004; 4: 1575–1583.
- [220] Rudnev AV, Foteeva LS, Kowol C, et al. *Preclinical characterization of anticancer gallium(III) complexes: Solubility, stability, lipophilicity and binding to serum proteins.* J Inorg Biochem 2006.
- [221] Timerbaev AR. *Advances in developing tris(8-quinolinolato) gallium(III) as an anticancer drug: critical appraisal and prospects.* Metallomics 2009; 1: 193–198.
- [222] Webster LK, Olver IN, Stokes KH, et al. *A pharmacokinetic and phase II study of gallium nitrate in patients with non-small cell lung cancer.* Cancer Chemother Pharmacol 2000; 45: 55–58.
- [223] Hall SW, Yeung K, Benjamin RS, et al. *Kinetics of gallium nitrate, a new anticancer agent.* Clin Pharmacol Ther 1979; 25: 82–87.
- [224] Irwin H. Krakoff, Robert A. Newman, Ronald S. Goldberg. *Clinical toxicologic and pharmacologic studies of gallium nitrate.* Cancer 1979; 44: 1722–1727.
- [225] Hughes TE, Hansen LA. *Gallium nitrate.* Ann Pharmacother 1992; 26: 354–362.
- [226] Groessl M, Bytzeck A, Hartinger CG. *The serum protein binding of pharmacologically active gallium(III) compounds assessed by*

- hyphenated CE-MS techniques*. Electrophoresis 2009; 30: 2720–2727.
- [227] Kratz F, Keppler BK, Hartmann M, et al. *Comparison of the antiproliferative activity of two antitumor ruthenium(III) complexes with their apotransferrin and transferrin-bound forms in a human colon cancer cell line*. Met Based Drugs 1996; 3: 15–24.
- [228] Lentz F, Drescher A, Lindauer A, et al. *Pharmacokinetics of a novel anticancer ruthenium complex (KP1019, FFC14A) in a phase I dose-escalation study*. Anticancer Drugs 2009; 20: 97–103.
- [229] Vermorken JB, van d, Klein I, et al. *Pharmacokinetics of free platinum species following rapid, 3-hr and 24-hr infusions of cis-diamminedichloroplatinum (II) and its therapeutic implications*. Eur J Cancer Clin Oncol 1982; 18: 1069–1074.
- [230] Groessl M, Reisner E, Hartinger CG, et al. *Structure-activity relationships for NAMI-A-type complexes (HL)[trans-RuCl<sub>4</sub>L(S-dmsO)ruthenate(III)] (L = imidazole, indazole, 1,2,4-triazole, 4-amino-1,2,4-triazole, and 1-methyl-1,2,4-triazole): aquation, redox properties, protein binding, and antiproliferative activity*. J Med Chem 2007; 50: 2185–2193.
- [231] Takimoto CH, Remick SC, Sharma S, et al. *Administration of oxaliplatin to patients with renal dysfunction: A preliminary report of the National Cancer Institute Organ Dysfunction Working Group*. Semin Oncol 2003; 30: 20–25.
- [232] Ma MK, Woo MH, McLeod HL. *Genetic basis of drug metabolism*. Am J Health Syst Pharm 2002; 59: 2061–2069.
- [233] Gobburu JV, Mould DR, Holford NH. *Implications of including and excluding correlation of random effects in hierarchical mixed effects pharmacokinetic (PK) models*. Clin Pharmacol Ther 2003; 73: P25–P25.
- [234] Sheiner LB, Stanski, Vozeh S, et al. *Simultaneous modeling of pharmacokinetic and pharmacodynamics – Application to D-Tubocurarine*. Clin Pharmacol Ther 1979; 25: 358–371.
- [235] Haslett C. *Granulocyte apoptosis and inflammatory disease*. Br Med Bull 1997; 53: 669–683.
- [236] Brouwers EEM, Huitema ADR, Beijnen JH, et al. *Long-term platinum retention after treatment with cisplatin and oxaliplatin*. BMC Clin Pharmacol 2008; 8: 7.
- [237] Gornet JM, Savier E, Lokiec F, et al. *Exacerbation of oxaliplatin neurosensory toxicity following surgery*. Ann Oncol 2002; 13: 1315–1318.
- [238] Cournede A, Ries P, Richard K, et al. *Oxaliplatin neurotoxicity: a report of three cases with post-operative exacerbation*. Gastroenterol Clin Biol 2005; 29: 461–464.

- [239] Luo FR, Wyrick SD, Chaney SG. *Pharmacokinetics and biotransformations of oxaliplatin in comparison with ormaplatin following a single bolus intravenous injection in rats*. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999; 44: 19–28.
- [240] Zhang L, Beal SL, Sheiner LB. *Simultaneous vs. sequential analysis for population PK/PD data I: best-case performance*. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 2003; 30: 387–404.
- [241] Vozech S, Steimer JL, Rowland M, et al. *The use of population pharmacokinetics in drug development*. *Clin Pharmacokinet* 1996; 30: 81–93.
- [242] Bonate P. *Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling and simulation*. Springer, Berlin 2005.
- [243] Loh GW, Ting LSL, Ensom MHH. *A systematic review of limited sampling strategies for platinum agents used in cancer chemotherapy*. *Clin Pharmacokinet* 2007; 46: 471–494.
- [244] Zandvliet AS, Schellens JHM, Ditttrich C, et al. *Population pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis to support treatment optimization of combination chemotherapy with indisulam and carboplatin*. *Br J Clin Pharmacol* 2008; 66: 485–497.
- [245] U. S. Department of Health and Human services FaC. *Guidance for Industry: Population Pharmacokinetics* 1999. Erhältlich unter: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM072137.pdf> [Letzter Zugriff: 13.08.2010].
- [246] Bensmaine MA, Gramont A de, Brienza S, et al. *Factors predicting for efficacy of oxaliplatin in combination with 5-fluorouracil (5-FU)+/-folinic acid (FA) in a compassionate-use cohort of 370 5-FU-resistant advanced colorectal cancer (CRC) patients*. *Eur J Cancer* 2000; 36: 2335–2343.
- [247] Poirier MC, Reed E, Shamkhani H, et al. *Platinum drug-DNA interactions in human tissues measured by cisplatin-DNA enzyme-linked immunosorbent assay and atomic absorbance spectroscopy*. *Environ Health Perspect* 1993; 99: 149–154.
- [248] Boffetta P, Fichtinger-Schepman AM, Weiderpass E, et al. *Cisplatin-DNA adducts and protein-bound platinum in blood of testicular cancer patients*. *Anticancer Drugs* 1998; 9: 125–129.
- [249] Fisch MJ, Howard KL, Einhorn LH, et al. *Relationship between platinum-DNA adducts in leukocytes of patients with advanced germ cell cancer and survival*. *Clin Cancer Res* 1996; 2: 1063–1066.
- [250] Poirier MC, Reed E, Ozols RF, et al. *DNA adducts of cisplatin in nucleated peripheral blood cells and tissues of cancer patients*. *Prog Exp Tumor Res* 1987; 31: 104–113.

- [251] Reed E, Parker RJ, Gill I, et al. *Platinum-DNA adduct in leukocyte DNA of a cohort of 49 patients with 24 different types of malignancies*. *Cancer Res* 1993; 53: 3694–3699.
- [252] Reed E, Yuspa SH, Zwelling LA, et al. *Quantitation of cis-diamminedichloroplatinum II (cisplatin)-DNA-intrastrand adducts in testicular and ovarian cancer patients receiving cisplatin chemotherapy*. *J Clin Invest* 1986; 77: 545–550.
- [253] Klastersky J, Sculier JP, Ravez P, et al. *A randomized study comparing a high and a standard dose of cisplatin in combination with etoposide in the treatment of advanced non-small-cell lung*. *J Clin Oncol* 1986; 4: 1780–1786.
- [254] Gralla RJ, Casper ES, Kelsen DP, et al. *Cisplatin and vindesine combination chemotherapy for advanced carcinoma of the*. *Ann Intern Med* 1981; 95: 414–420.
- [255] Gandara DR, Wold H, Perez EA, et al. *Cisplatin dose intensity in non-small cell lung cancer: phase II results of a day 1 and day 8 high-dose regimen*. *J Natl Cancer Inst* 1989; 81: 790–794.
- [256] Mavroudis D, Pappas P, Kouroussis C, et al. *A dose-escalation and pharmacokinetic study of gemcitabine and oxaliplatin in patients with advanced solid tumors*. *Ann Oncol* 2003; 14: 304–312.
- [257] Friberg LE, Henningsson A, Maas H, et al. *Model of chemotherapy-induced myelosuppression with parameter consistency across drugs*. *J Clin Oncol* 2002; 20: 4713–4721.

## **8 Anhang**

Anhang A: Pharmakokinetik von KP46

Anhang B: Pharmakokinetik von KP1019

Anhang C: Populations-PK/PD Modell zur Platin-DNA-Addukt-Bildung in  
Leukozyten

**Anhang A: Pharmakokinetik von KP46**

---

## Ein- und Ausschlusskriterien KP46 Studie

---

### Einschlusskriterien

---

- Männer und Frauen älter als 18 Jahre (19 Jahre in Österreich); Frauen im gebärfähigen Alter werden eingeschlossen, wenn:
  - Negativer Schwangerschaftstest vor der Voruntersuchung und innerhalb 48 h vor Beginn der Behandlungsperiode und
  - Routinemäßige Verwendung adäquater Verhütungsmethoden und
  - Einverständnis, während der Studie keine Schwangerschaft zu planen
- Histologisch und zytologisch gesicherter maligner Tumor; Therapiemöglichkeiten sind ausgeschöpft oder keine adäquate Therapie steht zur Verfügung
- Keine Therapie der Tumorerkrankung (Chemo-, Hormon-, Immun oder Radiotherapie) innerhalb der letzten vier Wochen
- Lebenserwartung von  $\geq$  drei Monaten
- ECOG-Performance-Status  $\leq$  2
- Darüber hinaus musste die Leber-, Nieren- und Knochenmarksfunktion durch folgende Parameter bestätigt sein:
  - Leukozyten  $\geq 3,0 \cdot 10^9/L$
  - Thrombozyten  $\geq 100 \cdot 10^9/L$
  - Hämoglobin  $\geq 10$  g/L
  - Serumkreatinin  $\leq 1,4$  mg/dL
  - Kreatininclearance  $\geq 60$  mL/min
  - Bilirubin  $\leq 2,5$  mg/dL
  - AST und ALT  $\leq 2,5 \times$  der oberen Grenze\* bei normaler Leberfunktion,
- Freiwillige unterzeichnete Einverständniserklärung

---

### Ausschlusskriterien

---

- Schwangerschaft und Stillzeit, unzureichende Methoden der Empfängnisverhütung
- Aktive Infektionen
- Schlecht kontrollierte Komedikation oder mit dem Studienprotokoll nicht vereinbare schwerwiegende maligne Erkrankungen
- Klinische bestätigte Hirnmetastasen oder Hirnhautkarzinose
- Alkohol- oder Drogenabhängigkeit
- Psychische oder emotionale Einschränkungen, die die Einverständniserklärung entkräften oder eine Einschränkung der Studienteilnahme bedeuten
- Fehlende Einverständniserklärung

---

\* Bei Patienten mit Lebermetastasen bis zum fünffachen der oberen Grenze der Normalwerte



## Pharmakokinetische Parameter (Nicht-kompartimentelle Analyse)

	1. Einnahme <sup>#</sup>	14. Einnahme
$C_{max}$ [ $\mu\text{g/L}$ ]	15,5 <sup>*</sup>	25,0
$AUC_{0-24h}$ [ $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ ]	363,6	384,3
$AUC_{\infty}$ [ $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ ]	n.e.	n.a.
CL/F [L/h]	n.e.	21,7
$t_{1/2z}$ [h]	n.e.	198,0
$V_z/F$ [L]	n.e.	6193,1

<sup>#</sup> Plasmakonzentrationen unterhalb LLOQ wurden in die Berechnung der PK-Parameter einbezogen

<sup>\*</sup> der Maximalwert (66,6  $\mu\text{g/L}$ ) wurde ausgeschlossen, da unplausibel

n.e. nicht ermittelt, da  $\lambda_z$  nicht abgeschätzt werden konnte

n.a. nicht anwendbar

## Ausscheidung im Urin

## Individuelle Sammlungsintervalle

Intervall [h] <sup>**</sup>	$\Delta t$ [h] <sup>**</sup>	$U_{cum}$ [ $\mu\text{g}$ ]
0 – 4	4,0	2,94
4 – 8	4,0	10,30
8 – 24	16,0	18,56
316 – 320	4,0	11,28 <sup>*</sup>
320 – 336	16,0	36,14 <sup>*</sup>

<sup>\*</sup> unvollständige Dokumentation und unvollständige Urinsammlung

<sup>\*\*</sup> theoretische Intervalle wurden verwandt, da Dokumentation fehlte

## 24 h-Sammelurin

Einnahme	$t_0-t_z$ [h]	$U_{cum}$ [ $\mu\text{g}$ ]	rel. $U_{cum}$ <sup>*</sup> [%]	$AUC_{t_0-t_z}$ [ $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ ]	$CL_R$ (L/h)	$U_{\infty}$ [ $\mu\text{g}$ ]	rel. $U_{\infty}$ <sup>**</sup> [%]
1.	23,4	18,56	0,22	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
14.	n.d.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.a.	n.a.

<sup>\*</sup> relative ausgeschiedene kumulative Menge bezogen auf  $U_{cum}/\text{Dosis}$

<sup>\*\*</sup> relative ausgeschiedene kumulative Menge bezogen auf die erste Dosis –  $U_{\infty}/\text{Dosis}$

n.a. nicht anwendbar

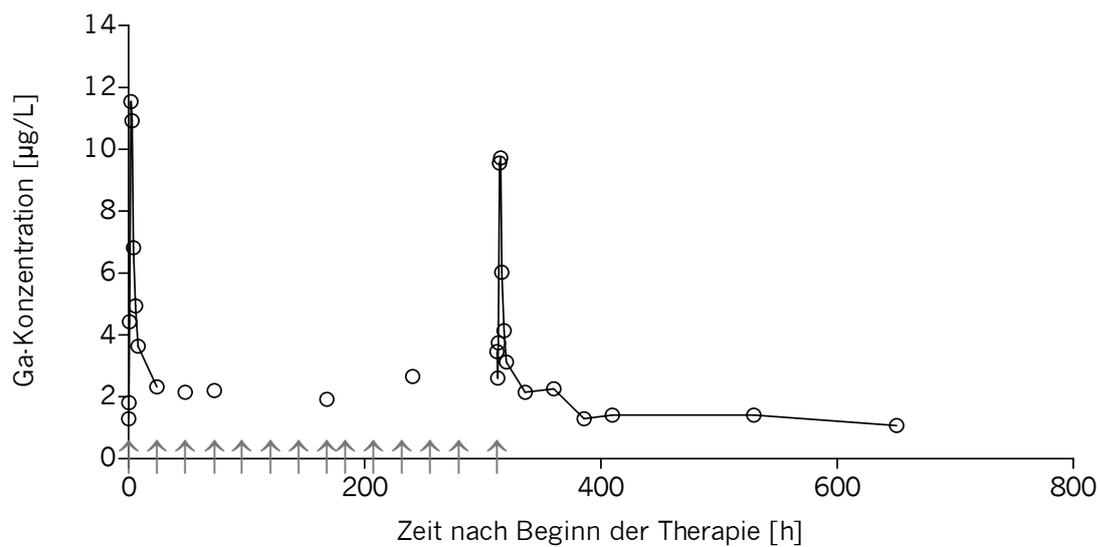
n.b. nicht berechnet aufgrund fehlender Informationen

n.d. nicht dokumentiert

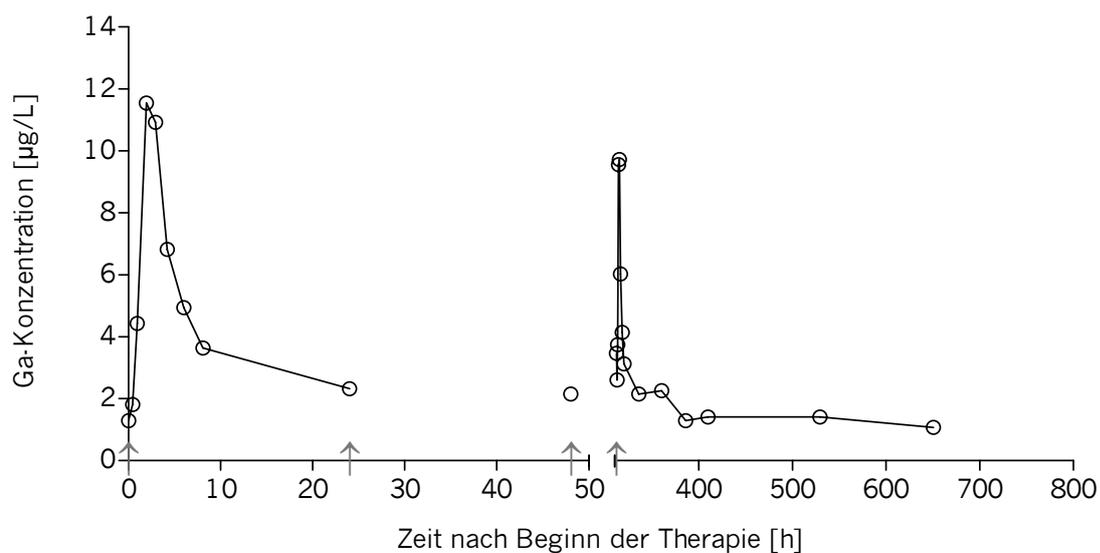
## Patient 2 – Dosis 50 mg (entsprechen 6,94 mg Gallium)

### Pharmakokinetik im Plasma

Gallium-Konzentrations-Zeit-Profil im Plasma nach 14 Einnahmen von KP46  
[↑ KP46-Gabe, ○ gemessene Galliumkonzentration]



Gallium-Konzentrations-Zeit-Profil im Plasma nach 1. (links) und 14. Einnahme (rechts) von KP46  
[↑ KP46-Gabe, ○ gemessene Galliumkonzentration]



## Pharmakokinetische Parameter (Nicht-kompartimentelle Analyse)

	1. Einnahme <sup>#</sup>	14. Einnahme <sup>#</sup>
C <sub>max</sub> [µg/L]	11,5	9,7
AUC <sub>0-24h</sub> [µg·h/L]	99,1	87,1
AUC <sub>∞</sub> [µg·h/L]	162,1	n.a.
CL/F [L/h]	42,8	79,7
t <sub>½z</sub> [h]	18,8	433,2
V <sub>z</sub> /F [L]	1163,5	49821,1

<sup>#</sup> Plasmakonzentrationen unterhalb LLOQ wurden in die Berechnung der PK-Parameter einbezogen  
n.a. nicht anwendbar

## Ausscheidung im Urin

## Individuelle Sammlungsintervalle

Intervall [h]	Δt [h]	U <sub>cum</sub> [µg]
0,0 – 4,0	4,0	0,91
4,0 – 8,0	4,0	2,30
8,0 – 24,0	16,0	9,42
312,0 – 316,1	4,1	0,50
316,1 – 320,0	3,9	6,42
320,0 – 336,0	16,0	12,92
336,0 – 360,2	24,2	20,44

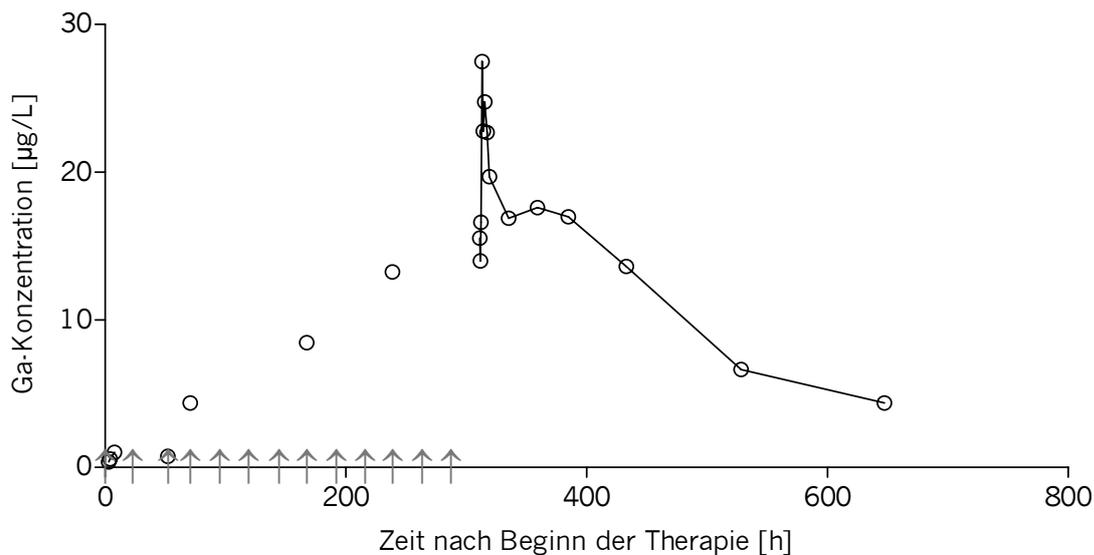
## 24 h-Sammelurin

Einnahme	t <sub>0</sub> -t <sub>z</sub> [h]	U <sub>cum</sub> [µg]	rel. U <sub>cum</sub> [%]	AUC <sub>t<sub>0</sub>-t<sub>z</sub></sub> [µg·h/L]	CL <sub>R</sub> (L/h)	U <sub>∞</sub> [µg]	rel. U <sub>∞</sub> [%]
1. <sup>#</sup>	23,95	9,42	0,14	99,1	0,095	15,40	0,222
14. <sup>#</sup>	48,12	20,44	0,29	140,5	0,145	n.a.	n.a.

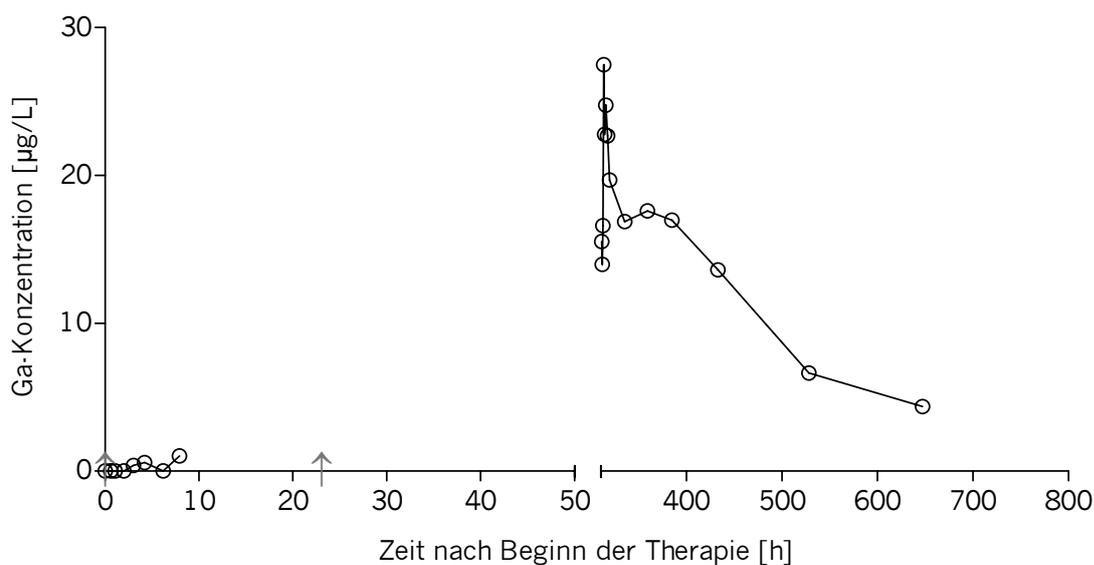
<sup>\*\*</sup> relative ausgeschiedene kumulative Menge bezogen auf die erste Dosis – U<sub>∞</sub>/Dosis  
n.a. nicht anwendbar

**Patient 3 – Dosis 50 mg (entsprechen 6,94 mg Gallium)***Pharmakokinetik im Vollblut*

Gallium-Konzentrations-Zeit-Profil im Vollblut nach 14 Einnahmen von KP46  
[↑ KP46-Gabe, ○ gemessene Gallium-Konzentration]

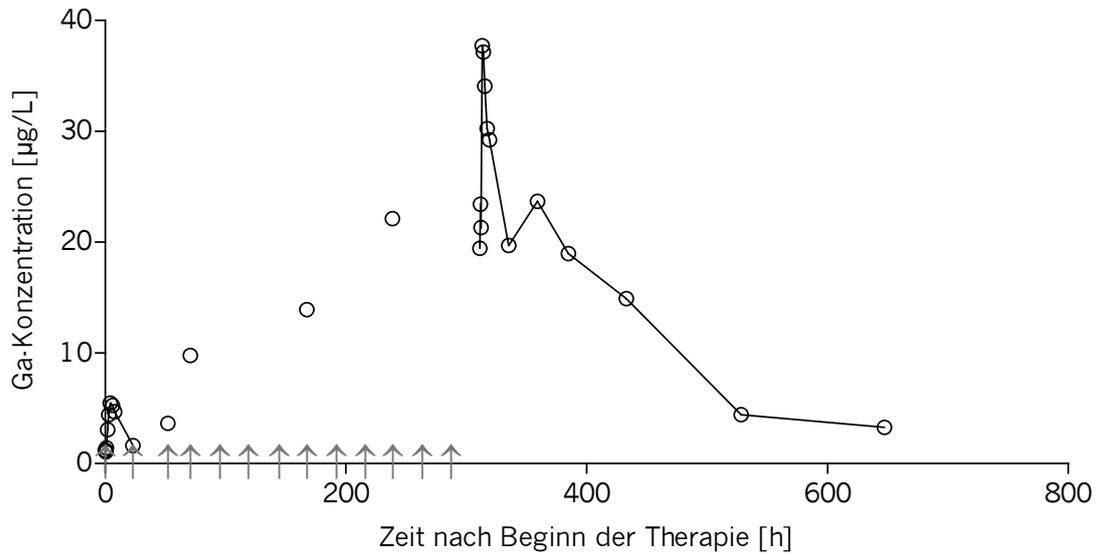


Gallium-Konzentrations-Zeit-Profil im Vollblut nach 1. (links) und 14. Einnahme (rechts) von KP46  
[↑ KP46-Gabe, ○ gemessene Galliumkonzentration]

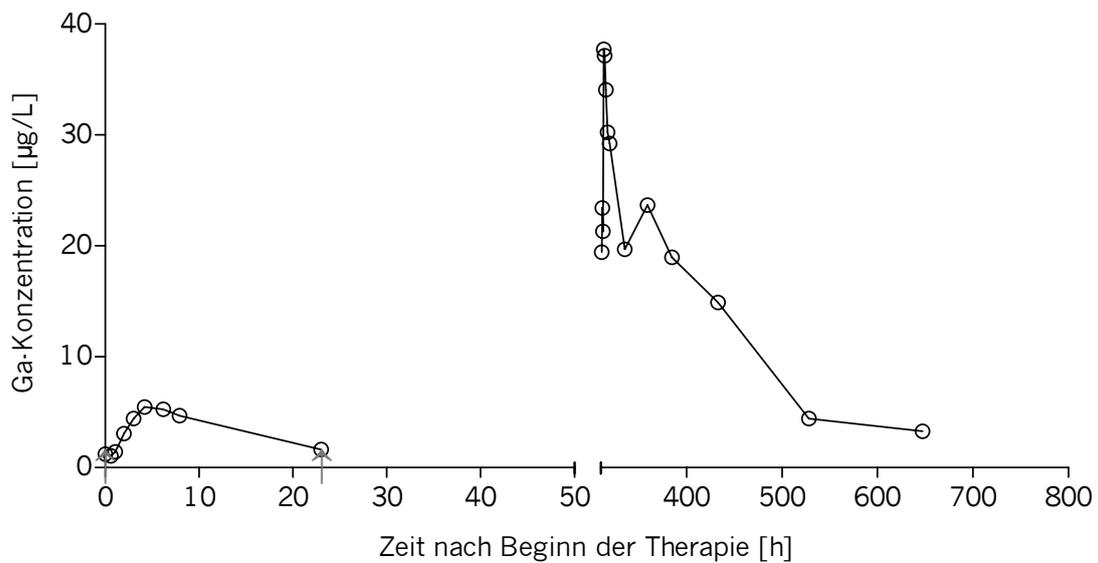


*Pharmakokinetik im Plasma*

Gallium-Konzentrations-Zeit-Profil im Plasma nach 14 Einnahmen von KP46  
 [↑ KP46-Gabe, ○ gemessene Galliumkonzentration]



Gallium-Konzentrations-Zeit-Profil im Plasma nach 1. (links) und 14. Einnahme (rechts) von KP46  
 [↑ KP46-Gabe, ○ gemessene Galliumkonzentration]



## Pharmakokinetische Parameter (Nicht-kompartimentelle Analyse)

	1. Einnahme <sup>#</sup>	14. Einnahme
C <sub>max</sub> [µg/L]	5,5	37,7
AUC <sub>0-24h</sub> [µg·h/L]	79,3	638,6
AUC <sub>∞</sub> [µg·h/L]	102,5	n.a.
CL/F [L/h]	67,7	10,9
t <sub>1/2z</sub> [h]	9,9	93,7
V <sub>Z</sub> /F [L]	966,1	1468,6

# Plasmakonzentrationen unterhalb LLOQ wurden in die Berechnung der PK-Parameter einbezogen  
n.a. nicht anwendbar

## Ausscheidung im Urin

## Individuelle Sammlungsintervalle

Intervall [h]	Δt [h]	U <sub>cum</sub> [µg]
0,0 – 4,7	4,7	0,29
4,7 – 8,0	3,3	0,61
8,0 – 23,0	15,0	16,34
311,6 – 315,5	3,9	4,33
315,5 – 319,4	3,9	9,56
319,4 – 335,4	16,0	23,34
335,4 – 359,4	24,0	37,78

## 24 h–Sammelurin

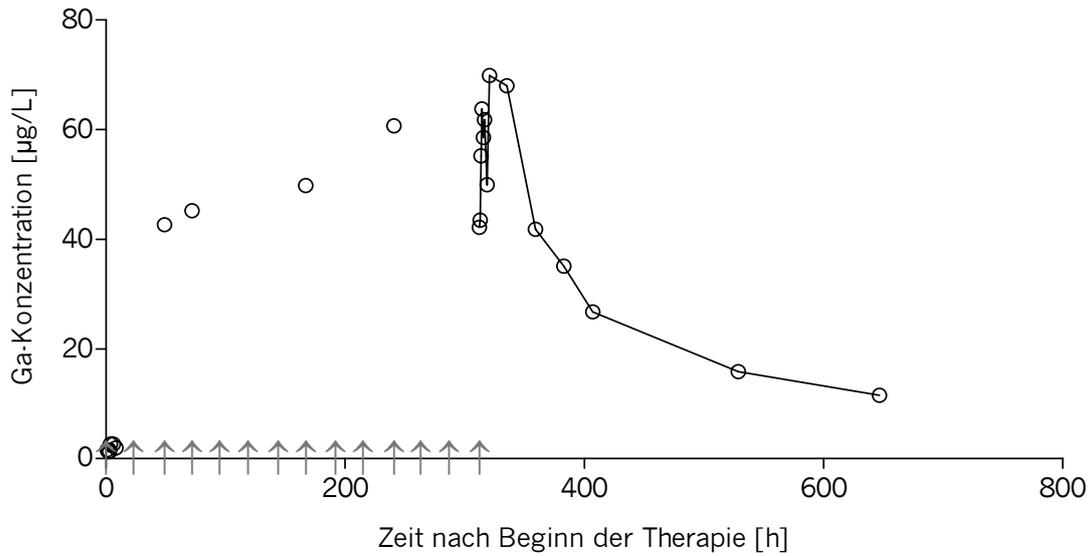
Einnahme	t <sub>0</sub> -t <sub>z</sub> [h]	U <sub>cum</sub> [µg]	rel. U <sub>cum</sub> [%]	AUC <sub>t<sub>0</sub>-t<sub>z</sub></sub> [µg·h/L]	CL <sub>R</sub> (L/h)	U <sub>∞</sub> [µg]	rel. U <sub>∞</sub> [%]
1. <sup>#</sup>	23,0	16,34	0,24	79,3	0,206	21,11	0,304
14.	47,8	37,78	0,54	1159,0	0,033	n.a.	n.a.

# Plasmakonzentrationen unterhalb LLOQ wurden in die Berechnung der PK-Parameter einbezogen  
n.a. nicht anwendbar

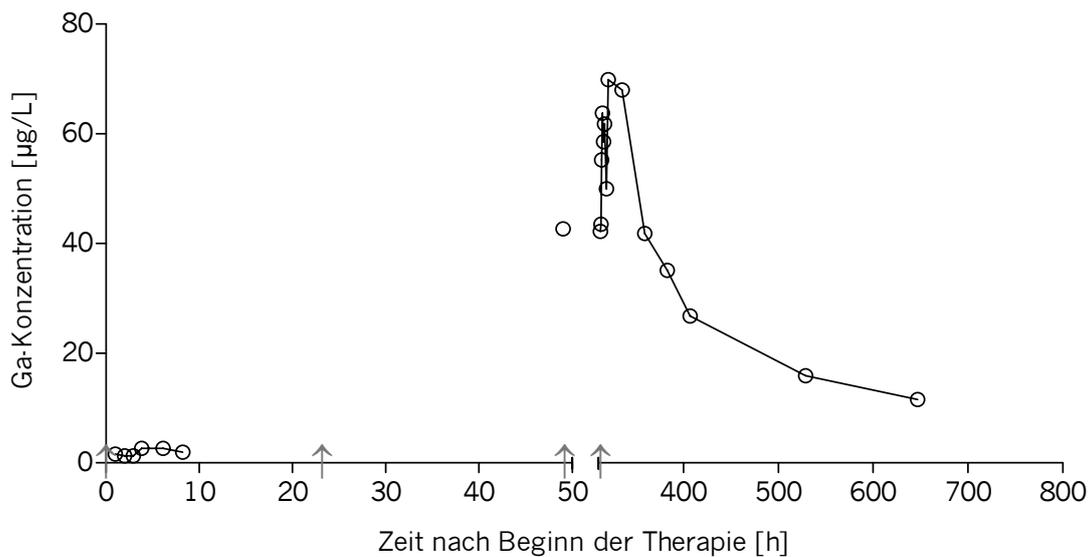
**Patient 4 – Dosis 90 mg (entsprechen 12,495 mg Gallium)**

*Pharmakokinetik im Vollblut*

Gallium-Konzentrations-Zeit-Profil im Vollblut nach 14 Einnahmen von KP46  
 [↑ KP46-Gabe, ○ gemessene Galliumkonzentration]

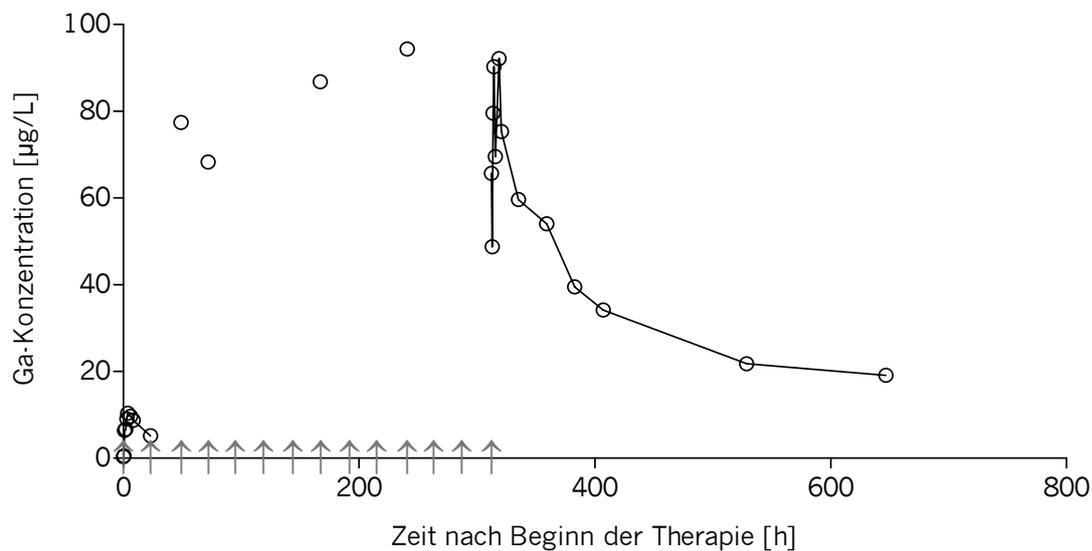


Gallium-Konzentrations-Zeit-Profil im Vollblut nach 1. (links) und 14. Einnahme (rechts) von KP46  
 [↑ KP46-Gabe, ○ gemessene Galliumkonzentration]

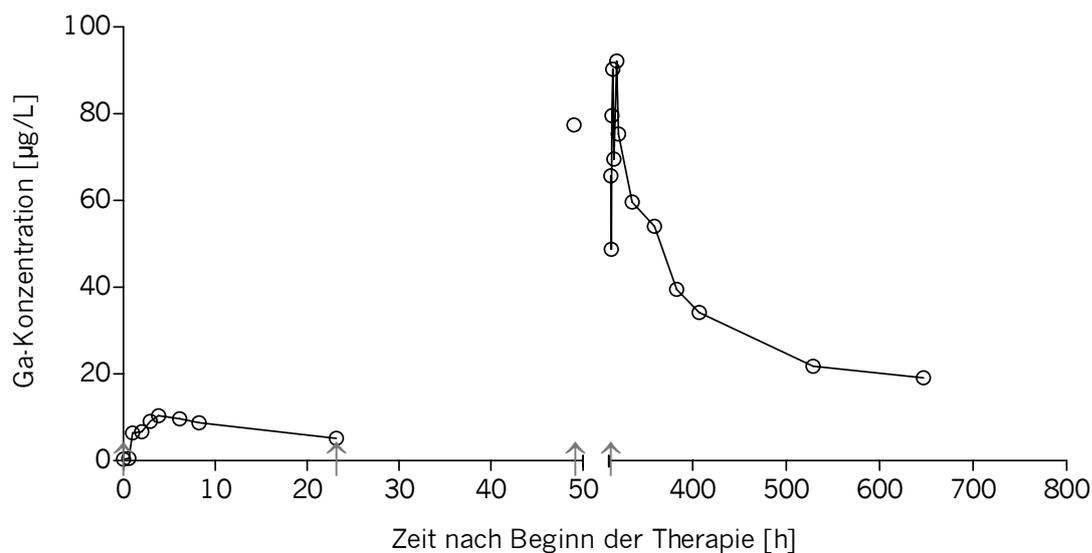


*Pharmakokinetik im Plasma*

Gallium-Konzentrations-Zeit-Profil im Plasma nach 14 Einnahmen von KP46  
[↑ KP46-Gabe, ○ gemessene Galliumkonzentration]



Gallium-Konzentrations-Zeit-Profil im Plasma nach 1. (links) und der 14. Einnahme (rechts) von KP46 [↑ KP46-Gabe, ○ gemessene Galliumkonzentration]



## Pharmakokinetische Parameter (Nicht-kompartimentelle Analyse)

	1. Einnahme <sup>#</sup>	14. Einnahme
$C_{max}$ [ $\mu\text{g/L}$ ]	10,4	92,1
$AUC_{0-24h}$ [ $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ ]	170,9	1657,0
$AUC_{\infty}$ [ $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ ]	315,0	n.a.
CL/F [L/h]	39,7	7,5
$t_{1/2z}$ [h]	19,3	210,0
$V_z / F$ [L]	1101,8	2285,1

<sup>#</sup> Plasmakonzentrationen unterhalb LLOQ wurden in die Berechnung der PK-Parameter einbezogen

n.a. nicht anwendbar

## Ausscheidung im Urin

## Individuelle Sammlungsintervalle

Intervall [h]	$\Delta t$ [h]	$U_{cum}$ [ $\mu\text{g}$ ]
0,0 – 4,7	4,7	0,79
4,7 – 8,0	3,3	3,37
8,0 – 23,0	15,0	5,77
312,3 – 316,3	4,0	9,53
316,3 – 320,4	4,1	43,09
320,4 – 335,0	14,6	80,76
335,0 – 359,1	24,1	294,60

## 24 h-Sammelurin

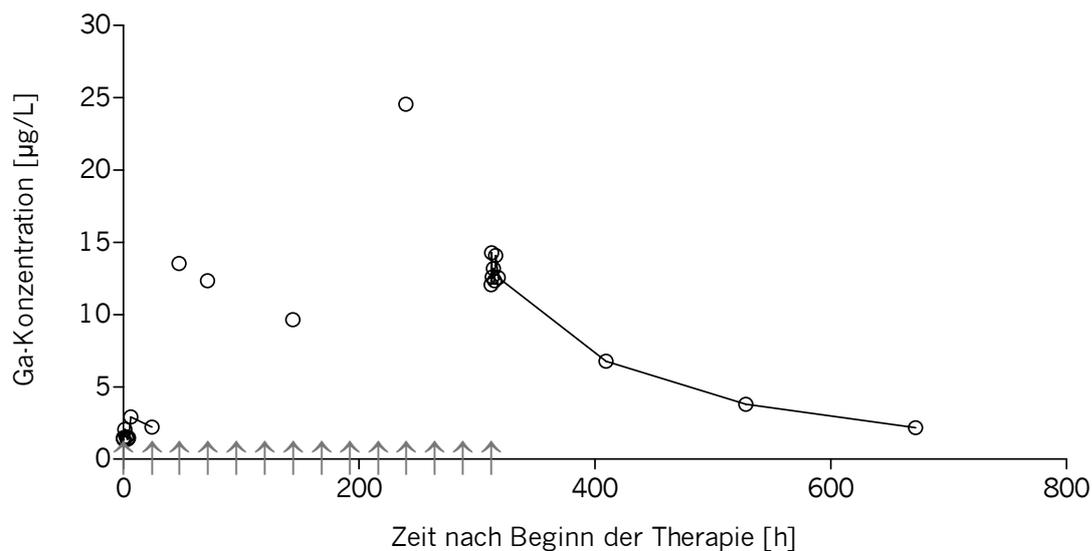
Einnahme	$t_0-t_z$ [h]	$U_{cum}$ [ $\mu\text{g}$ ]	rel. $U_{cum}$ [%]	$AUC_{t_0-t_z}$ [ $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ ]	$CL_R$ (L/h)	$U_{\infty}$ [ $\mu\text{g}$ ]	rel. $U_{\infty}$ [%]
1. <sup>#</sup>	23,0	5,77	0,05	170,9	0,034	10,71	0,086
14.	46,8	294,60	2,36	3016,4	0,098	n.a.	n.a.

<sup>#</sup> Plasmakonzentrationen unterhalb LLOQ wurden in die Berechnung der PK-Parameter einbezogen

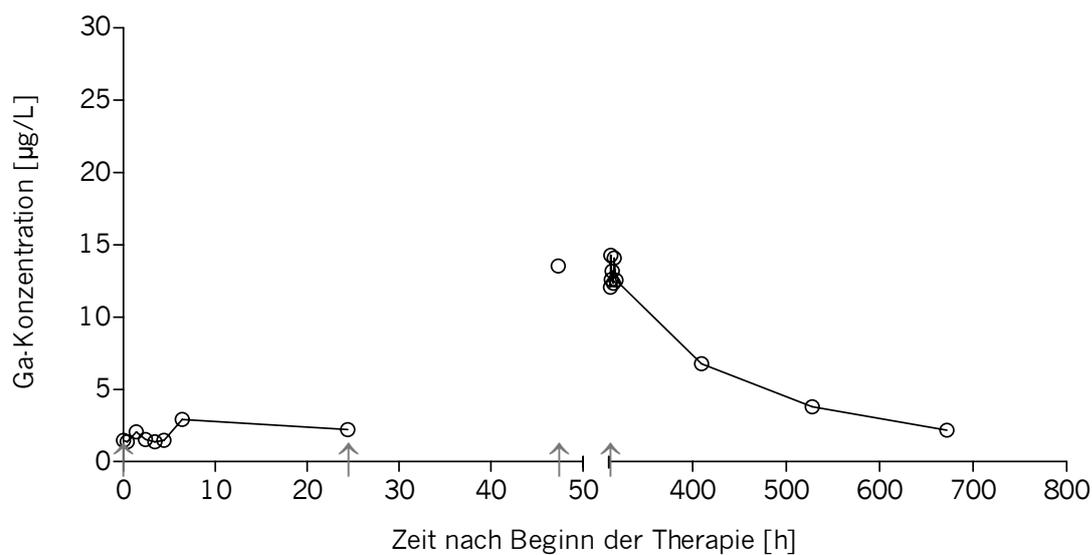
n.a. nicht anwendbar

**Patient 5 – Dosis 220 mg (entsprechen 30,54 mg Gallium)***Pharmakokinetik im Plasma*

Gallium-Konzentrations-Zeit-Profil im Plasma nach 14 Einnahmen von KP46  
[↑ KP46-Gabe, ○ gemessene Galliumkonzentration]



Gallium-Konzentrations-Zeit-Profil im Plasma nach 1. (links) und 14. Einnahme (rechts) von KP46  
[↑ KP46-Gabe, ○ gemessene Galliumkonzentration]



## Pharmakokinetische Parameter (Nicht-kompartimentelle Analyse)

	1. Einnahme <sup>#</sup>	14. Einnahme
$C_{\max}$ [ $\mu\text{g/L}$ ]	13,5	14,3
$AUC_{0-24\text{h}}$ [ $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ ]	57,4	291,9
$AUC_{\infty}$ [ $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ ]	n.e.	n.a.
CL/F [L/h]	n.e.	104,6
$t_{1/2z}$ [h]	n.e.	141,5
$V_z/F$ [L]	n.e.	21353,0

<sup>#</sup> Plasmakonzentrationen unterhalb LLOQ wurden in die Berechnung der PK-Parameter einbezogen

n.e. nicht ermittelt, da  $\lambda_z$  nicht abgeschätzt werden konnte

n.a. nicht anwendbar

*Ausscheidung im Urin*

## Individuelle Sammlungsintervalle

Intervall [h]	$\Delta t$ [h]	$U_{\text{cum}}$ [ $\mu\text{g}$ ]
0,0 – 4,0	4,0	n.b.
4,0 – 24,0	20,0	11,27*
311,4 – 315,9	4,5	4,66
315,9 – 319,9	4,0	17,05
319,9 – 335,9	16,9	30,01

\* unvollständige Urinsammlung

n.b. nicht berechnet, da Galliumkonzentration < LLOQ

## 24 h-Sammelurin

Einnahme	$t_0-t_z$ [h]	$U_{\text{cum}}$ [ $\mu\text{g}$ ]	rel. $U_{\text{cum}}$ [%]	$AUC_{t_0-t_z}$ [ $\mu\text{g},\text{h/L}$ ]	$CL_R$ (L/h)	$U_{\infty}$ [ $\mu\text{g}$ ]	rel. $U_{\infty}$ [%]
1. <sup>#</sup>	24,0	n.b.	n.b.	57,4	n.b.	n.b.	n.b.
14.	24,5	30,01	0,098	n.b.	n.b.	n.a.	n.a.

<sup>#</sup> Plasmakonzentrationen unterhalb LLOQ wurden in die Berechnung der PK-Parameter einbezogen

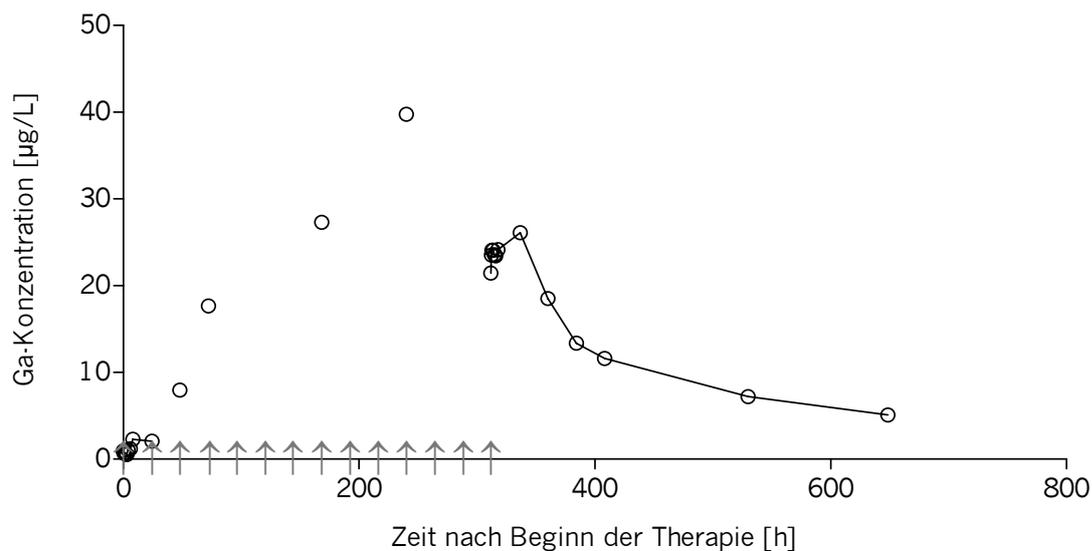
n.a. nicht anwendbar

n.b. nicht berechnet aufgrund fehlender Informationen

### Patient 6 – Dosis 440 mg (entsprechen 61,09 mg Gallium)

#### Pharmakokinetik im Plasma

Gallium-Konzentrations-Zeit-Profil im Plasma nach 14 Einnahmen von KP46  
 [↑ KP46-Gabe, ○ gemessene Galliumkonzentration]



## Pharmakokinetische Parameter (Nichtkompartimentelle Analyse)

	1. Einnahme <sup>#</sup>	14. Einnahme
$C_{\max}$ [ $\mu\text{g/L}$ ]	2,3	26,1
$AUC_{0-24\text{h}}$ [ $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ ]	43,6	613,2
$AUC_{\infty}$ [ $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ ]	n.e.	n.a.
CL/F [L/h]	n.e.	99,6
$t_{1/2z}$ [h]	n.e.	169,1
$V_z/F$ [L]	n.e.	24299,6

<sup>#</sup> Plasmakonzentrationen unterhalb LLOQ wurden in die Berechnung der PK-Parameter einbezogen

n.e. nicht ermittelt, da  $\lambda_z$  nicht abgeschätzt werden konnte

n.a. nicht anwendbar

*Ausscheidung im Urin*

## Individuelle Sammlungsintervalle

Intervall [h]	$\Delta t$ [h]	$U_{\text{cum}}$ [ $\mu\text{g}$ ]
0,0 – 4,0	4,0	n.b.
4,0 – 8,0	4,0	n.b.
8,0 – 24,0	16,0	1,72
311,3 – 315,8	4,5	6,02
315,8 – 319,8	4,0	8,31
319,8 – 335,8	14,0	27,63

n.b. nicht berechnet, da Galliumkonzentration < LLOQ

## 24 h-Sammelurin

Einnahme	$t_0-t_z$ [h]	$U_{\text{cum}}$ [ $\mu\text{g}$ ]	rel. $U_{\text{cum}}$ [%]	$AUC_{t_0-t_z}$ [ $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ ]	$CL_R$ (L/h)	$U_{\infty}$ [ $\mu\text{g}$ ]	rel. $U_{\infty}$ [%]
1.	24,0	n.b.	n.b.	43,6	n.b.	n.b.	n.b.
14.	24,4	27,63	0,045	613,2	0,045	n.a.	n.a.

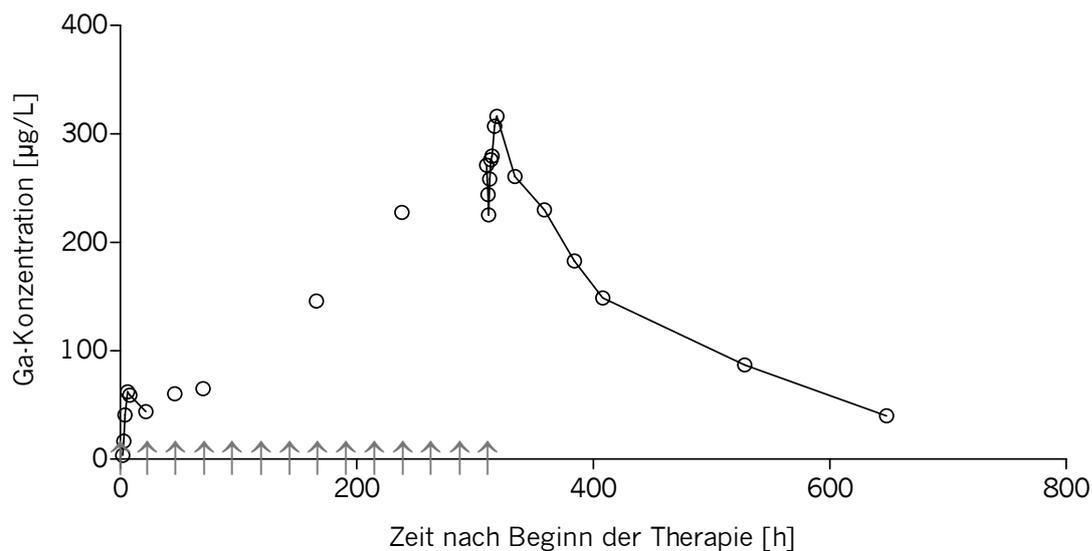
n.a. nicht anwendbar

n.b. nicht berechnet aufgrund fehlender Informationen

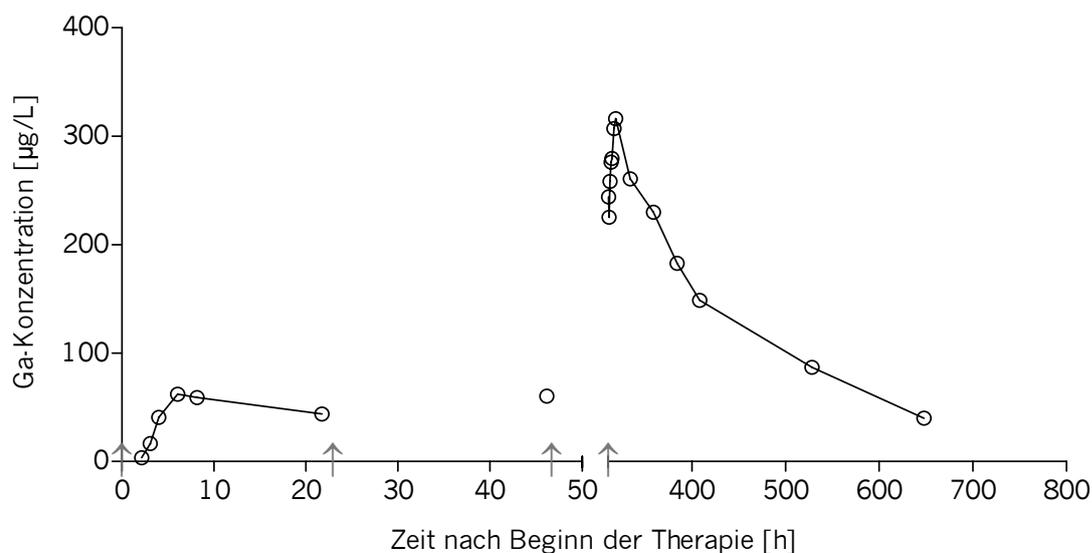
### Patient 7 – Dosis 900 mg (entsprechen 124,95 mg Gallium)

#### Pharmakokinetik im Vollblut

Gallium-Konzentrations-Zeit-Profil im Vollblut nach 14 Einnahmen von KP46  
[↑ KP46-Gabe, ○ gemessene Galliumkonzentration]

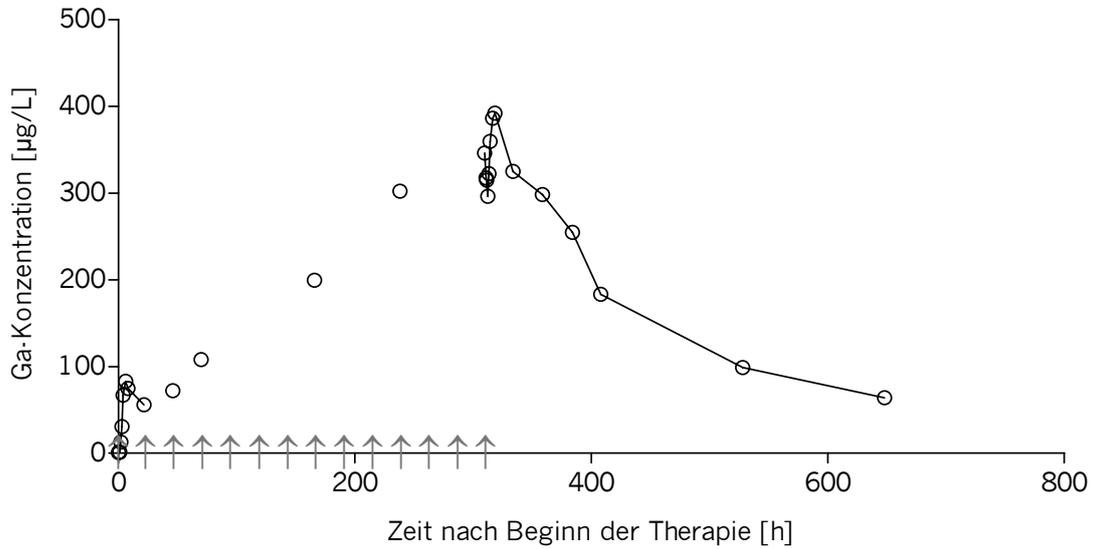


Gallium-Konzentrations-Zeit-Profil im Vollblut nach 1. (links) und 14. Einnahme (rechts) von KP46  
[↑ KP46-Gabe, ○ gemessene Galliumkonzentration]

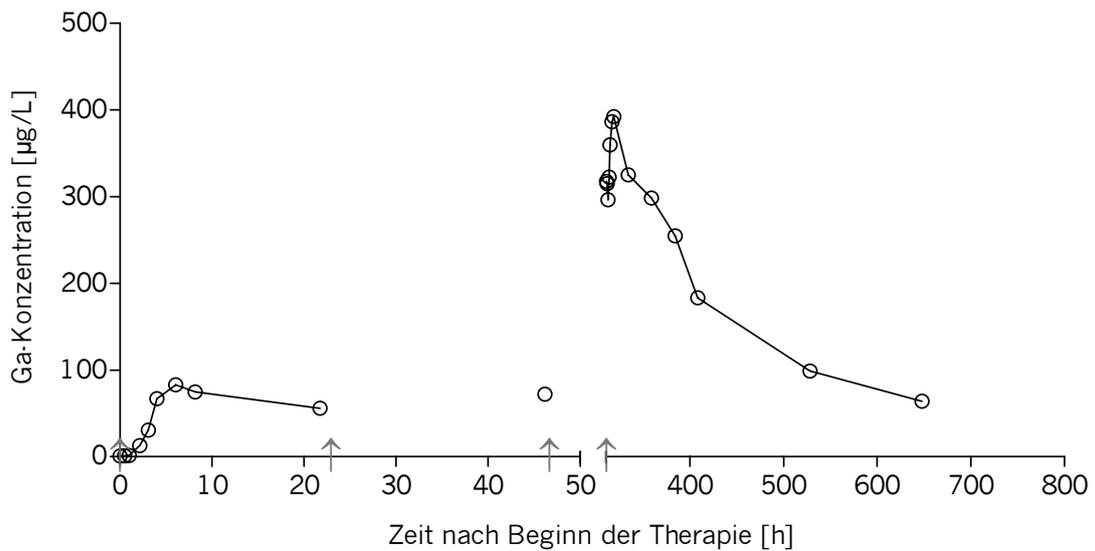


*Pharmakokinetik im Plasma*

Gallium-Konzentrations-Zeit-Profil im Plasma nach 14 Einnahmen von KP46  
 [↑ KP46-Gabe, ○ gemessene Galliumkonzentration]



Gallium-Konzentrations-Zeit-Profil im Plasma nach 1. (links) und 14. Einnahme (rechts) von KP46  
 [↑ KP46-Gabe, ○ gemessene Galliumkonzentration]



## Pharmakokinetische Parameter (Nichtkompartimentelle Analyse)

	1. Einnahme <sup>#</sup>	14. Einnahme
C <sub>max</sub> [µg/L]	83,0	392,0
AUC <sub>0-24h</sub> [µg·h/L]	1283,0	8553,1
AUC <sub>∞</sub> [µg·h/L]	3619,6	n.a.
CL/F [L/h]	34,5	14,6
t <sub>1/2z</sub> [h]	29,0	130,8
V <sub>Z</sub> /F [L]	1444,4	2756,4

# Plasmakonzentrationen unterhalb LLOQ wurden in die Berechnung der PK-Parameter einbezogen  
n.a. nicht anwendbar

*Ausscheidung im Urin*

## Individuelle Sammlungsintervalle

Intervall [h]	Δt [h]	U <sub>cum</sub> [µg]
0,0 – 3,9	3,9	0,69
3,9 – 8,0	4,1	13,16
8,0 – 21,9	13,9	39,88
310,0 – 314,2	4,2	89,02
314,2 – 318,3	4,1	137,71
318,3 – 334,5	16,2	301,69
334,5 – 359,0	24,5	731,65

## 24 h–Sammelurin

Einnahme	t <sub>0</sub> -t <sub>z</sub> [h]	U <sub>cum</sub> [µg]	rel. U <sub>cum</sub> [%]	AUC <sub>t0-tz</sub> [µg·h/L]	CL <sub>R</sub> (L/h)	U <sub>∞</sub> [µg]	rel. U <sub>∞</sub> [%]
1. <sup>#</sup>	21,92	39,88	0,03	1283,0	0,031	112,21	0,090
14.	49,00	731,65	0,59	15934,4	0,046	n.a.	n.a.

# Plasmakonzentrationen unterhalb LLOQ wurden in die Berechnung der PK-Parameter einbezogen  
n.a. nicht anwendbar

## **Anhang B: Pharmakokinetik von KP1019**

---

## Ein- und Ausschlusskriterien der KP1019-Studie

---

### Einschlusskriterien

---

- Männer und Frauen älter als 18 Jahre (19 Jahre in Österreich); Frauen im gebärfähigen Alter werden eingeschlossen, wenn:
  - Negativer Schwangerschaftstest vor der Voruntersuchung und innerhalb 48 h vor Beginn der Behandlungsperiode und
  - Routinemäßige Verwendung adäquater Verhütungsmethoden und
  - Einverständnis, während der Studie keine Schwangerschaft zu planen
- Histologisch und zytologisch gesicherter maligner Tumor; Therapiemöglichkeiten sind ausgeschöpft oder keine adäquate Therapie steht zur Verfügung
- Keine Therapie der Tumorerkrankung (Chemo-, Hormon-, Immun- oder Radiotherapie) innerhalb der letzten vier Wochen
- Lebenserwartung von  $\geq$  drei Monaten
- ECOG-Performance-Status  $\leq$  2
- Darüber hinaus musste die Leber-, Nieren- und Knochenmarksfunktion durch folgende Parameter bestätigt sein:
  - Leukozyten  $\geq 3,0 \cdot 10^9/L$
  - Thrombozyten  $\geq 100 \cdot 10^9/L$
  - Hämoglobin  $\geq 10$  g/L
  - Serumkreatinin  $\leq 1,4$  mg/dL
  - Kreatininclearance  $\geq 60$  mL/min
  - Bilirubin  $\leq 2,5$  mg/dL
  - AST und ALT  $\leq 2,5 \times$  der oberen Grenze\* bei normaler Leberfunktion
- Freiwillige unterzeichnete Einverständniserklärung

---

### Ausschlusskriterien

---

- Schwangerschaft und Stillzeit, unzureichende Methoden der Empfängnisverhütung
- Aktive Infektionen
- Schlecht kontrollierte Komedikation oder mit dem Studienprotokoll nicht vereinbare schwerwiegende maligne Erkrankungen
- Klinische bestätigte Hirnmetastasen oder Hirnhautkarzinose
- Alkohol- oder Drogenabhängigkeit
- Psychische oder emotionale Einschränkungen, die die Einverständniserklärung entkräften oder eine Einschränkung der Studienteilnahme bedeuten
- Fehlende Einverständniserklärung

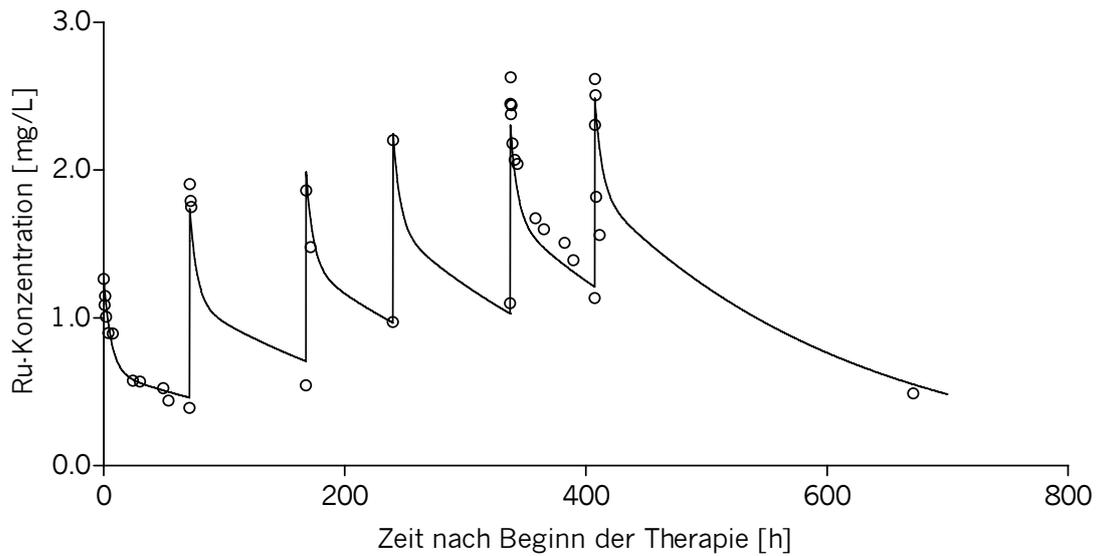
---

\* Bei Patienten mit Lebermetastasen bis zum fünffachen der oberen Grenze der Normalwerte

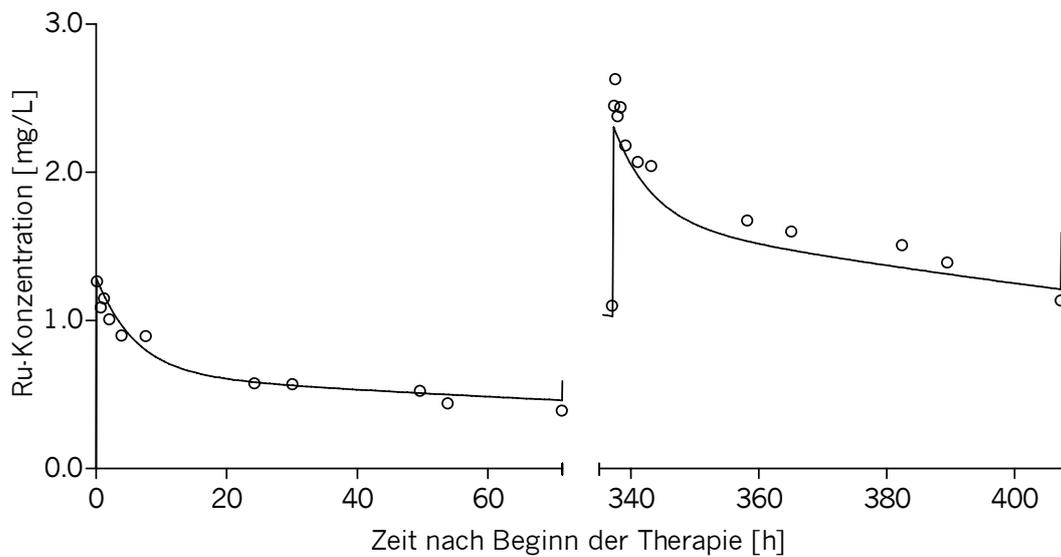
**Patient 1 – Dosis: 25 mg (entsprechen 5,032 mg Ruthenium)**

*Pharmakokinetik im Plasma*

Ruthenium-Konzentrations-Zeit-Profil im Plasma nach sechs Applikationen von KP1019 [○ gemessene Rutheniumkonzentration, — abgeschätzte Rutheniumkonzentration]



Ruthenium-Konzentrations-Zeit-Profil im Plasma nach der 1. (links) und 5. Applikation (rechts) von KP1019 [○ gemessene Rutheniumkonzentration, — abgeschätzte Rutheniumkonzentration]



## Pharmakokinetische Parameter im Plasma

	1. Applikation	5. Applikation	Alle Applikationen
$C_{max}$ [mg/L]	1,26	2,63	2,63
AUC [mg·h/L]	88,6	137	143
$t_{1/2\lambda 1}$ [h]	4,28	1,86	4,14
$t_{1/2\lambda z}$ [h]	80,6	90,3	151
CL [mL/min]	0,95	0,61	0,59
$V_{ss}$ [L]	6,41	4,75	7,46

*Ausscheidung im Urin*

## Individuelle Sammlungsintervalle

Sammlungs- Intervall[h]	$\Delta t$ [h]	$C_{av}$ [mg/L]	$U_{cum}$ [mg]	$CL_R$ ( $t_i - t_{i-1}$ ) [mL/min]
0,00 – 1,63	1,63	1,14	0,002	0,014
1,63 – 4,13	2,50	1,01	0,008	0,042
4,13 – 8,38	4,25	0,87	0,016	0,036
8,38 – 14,1	5,75	0,74	0,023	0,027
14,1 – 68,6		Keine quantitative Urinsammlung*		
68,6 – 71,3	2,63	0,40	-	0,172
71,3 – 166,6		Keine quantitative Urinsammlung*		
166,6 – 170,4	3,75	1,96	-	0,070
170,4 – 331,6		Unvollständige Dokumentation		
331,6 – 338,6	7,00	***	0,010**	***
338,6 – 342,6	4,00	2,12	0,113	0,202
342,6 – 352,6	10,0	1,88	0,227	0,100
352,6 – 356,9	4,25	1,77	0,260	0,074
356,9 – 403,9		Keine quantitative Urinsammlung*		
403,9 – 407,9	4,00	1,22	-	0,192
407,9 – 411,4	3,50	2,25	-	0,138
411,4 – 671,6		Keine quantitative Urinsammlung*		

\* Annahme ausgehend von geringem Urinvolumen

\*\* unvollständige Urinsammlung

\*\*\* nicht abgeschätzt, da Intervallmitte vor Ende der Infusion lag

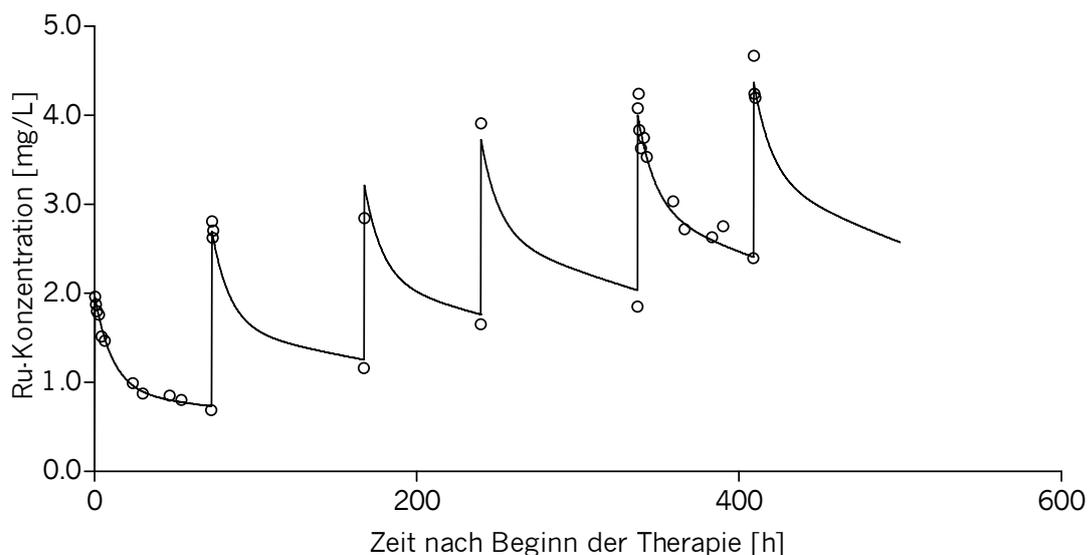
## 24 h-Sammelurin

<b>Applikation</b>	<b><math>t_0-t_z</math> [h]</b>	<b><math>U_{cum}</math> [<math>\mu\text{g}</math>]</b>	<b>rel. <math>U_{cum}</math> [%]</b>	<b><math>AUC_{t_0-t_z}</math> [<math>\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{L}</math>]</b>	<b><math>CL_R</math> (L/h)</b>	<b><math>U_\infty</math> [<math>\mu\text{g}</math>]</b>	<b>rel. <math>U_\infty</math> [%]</b>
1.	14,1	0,02	0,46	12,5	0,031	0,16	3,23
5.	19,8	0,26	n.a.	39,1	0,111	n.a.	n.a.

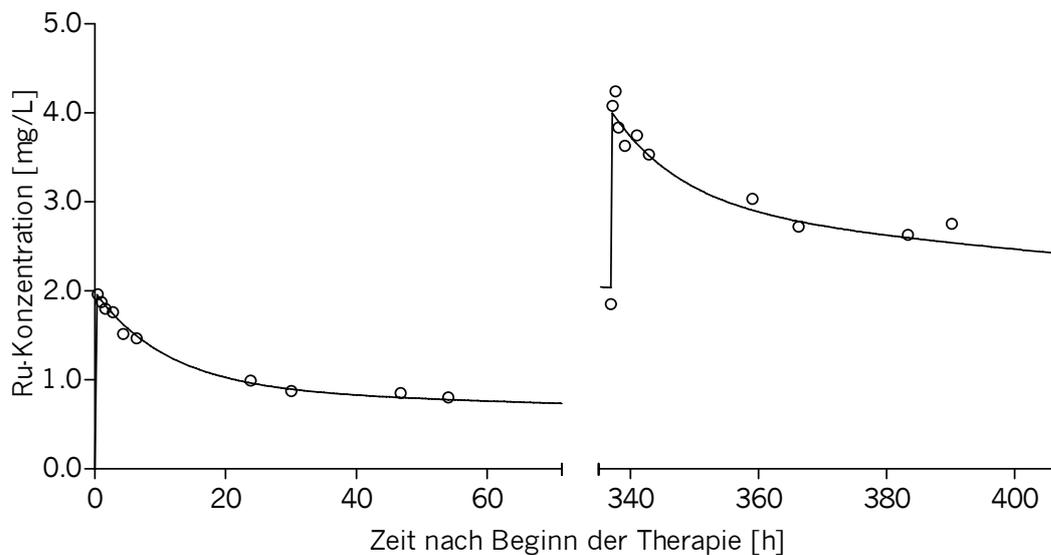
n.a. nicht anwendbar

**Patient 2 – Dosis: 50 mg (entsprechen 10,064 mg Ruthenium)***Pharmakokinetik im Plasma*

Ruthenium-Konzentrations-Zeit-Profil im Plasma nach sechs Applikationen von KP1019 [○ gemessene Rutheniumkonzentration, — abgeschätzte Rutheniumkonzentration]



Ruthenium-Konzentrations-Zeit-Profil im Plasma nach der 1. (links) und 5. Applikation (rechts) von KP1019 [○ gemessene Rutheniumkonzentration, — abgeschätzte Rutheniumkonzentration]



## Pharmakokinetische Parameter im Plasma

	1. Applikation	5. Applikation	Alle Applikationen
$C_{max}$ [mg/L]	1,96	4,24	4,67
AUC [mg·h/L]	190	308	339
$t_{1/2\lambda 1}$ [h]	5,21	5,00	7,71
$t_{1/2\lambda z}$ [h]	117	194	254
CL [mL/min]	0,88	0,55	0,49
$V_{ss}$ [L]	8,67	8,97	10,5

*Ausscheidung im Urin*

## Individuelle Sammlungsintervalle

Sammlungs- Intervall [h]	$\Delta t$ [h]	$C_{av}$ [mg/L]	$U_{cum}$ [mg]	$CL_R$ ( $t_i - t_{i-1}$ ) [mL/min]
0,00 – 5,30	5,30	1,72	0,019	0,035
5,30 – 10,5	5,18	1,36	0,039	0,045
10,5 – 20,1	9,57	1,11	0,076	0,058
20,1 – 239,7		Keine quantitative Urinsammlung*		
239,7 – 336,9		Keine quantitative Urinsammlung*		
336,9 – 341,1	4,22	3,86	0,108	0,111
341,1 – 347,5	6,38	3,42	0,197	0,068
347,5 – 354,8	7,32	3,14	0,315	0,086
354,8 – 357,3	2,55	3,02	0,379	0,138

\* Annahme ausgehend von geringem Urinvolumen

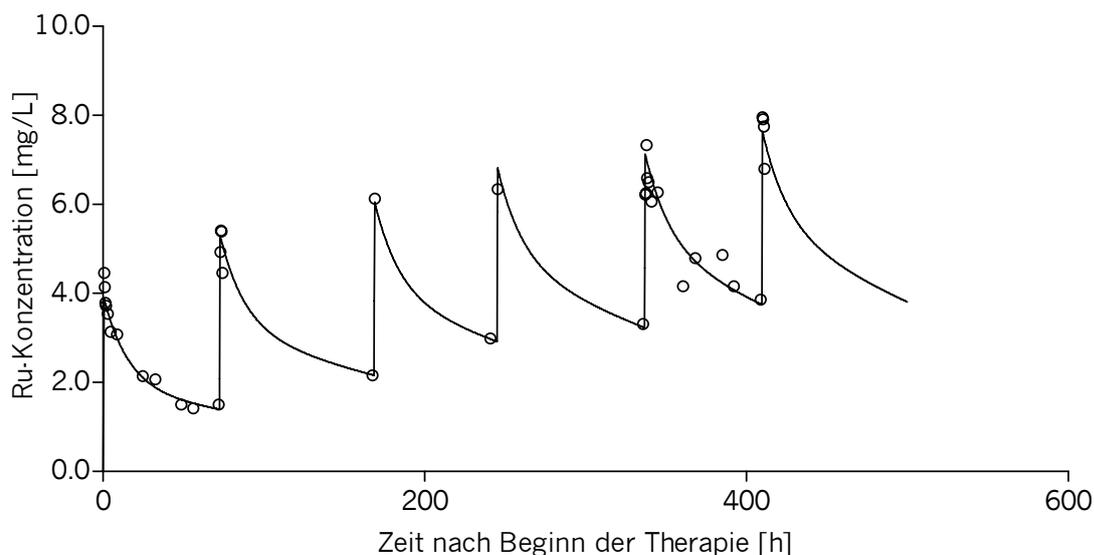
## 24 h-Sammelurin

Applikation	$t_0 - t_z$ [h]	$U_{cum}$ [µg]	rel. $U_{cum}$ [%]	$AUC_{t_0 - t_z}$ [µg·h/L]	$CL_R$ (L/h)	$U_\infty$ [µg]	rel. $U_\infty$ [%]
1.	20,1	0,08	0,75	27,4	0,046	0,52	5,20
5.	20,4	0,38	n.a.	69,2	0,091	n.a.	n.a.

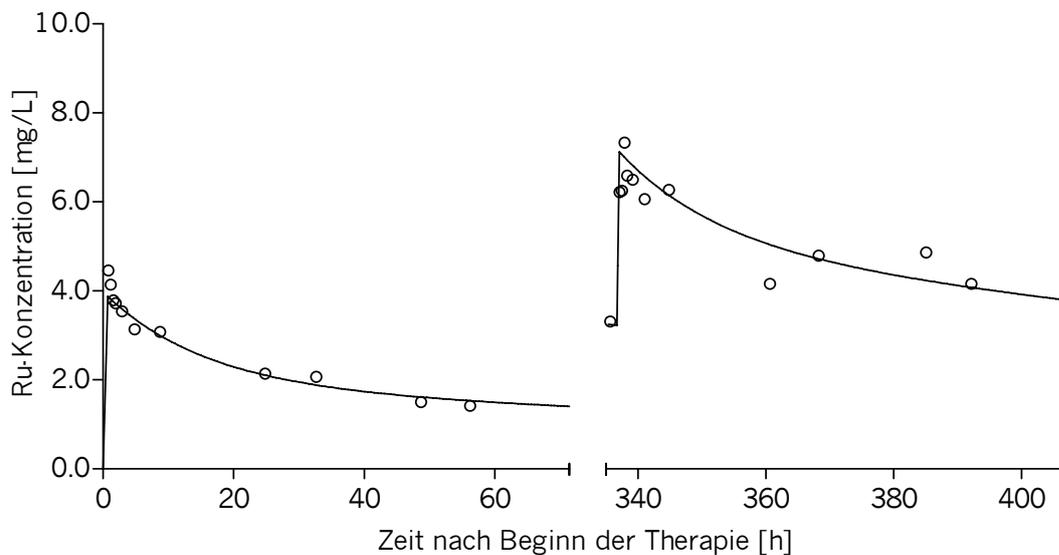
n.a. nicht anwendbar

**Patient 3 – Dosis: 100 mg (entsprechen 20,127 mg Ruthenium)***Pharmakokinetik im Plasma*

Ruthenium-Konzentrations-Zeit-Profil im Plasma nach sechs Applikationen KP1019 [○ gemessene Rutheniumkonzentration, — abgeschätzte Rutheniumkonzentration]



Ruthenium-Konzentrations-Zeit-Profil im Plasma nach der 1. (links) und 5. Applikation (rechts) [○ gemessene Rutheniumkonzentration, — abgeschätzte Rutheniumkonzentration]



## Pharmakokinetische Parameter im Plasma

	1. Applikation	5. Applikation	Alle Applikationen
$C_{max}$ [mg/L]	4,46	7,33	7,96
AUC [mg·h/L]	329	513	468
$t_{1/2\lambda 1}$ [h]	6,09	7,62	10,6
$t_{1/2\lambda z}$ [h]	90,5	200	161
CL [mL/min]	1,02	0,65	0,72
$V_{ss}$ [L]	7,63	10,9	9,37

*Ausscheidung im Urin*

## Individuelle Sammlungsintervalle

Sammlungs- Intervall [h]	$\Delta t$ [h]	$C_{av}$ [mg/L]	$U_{cum}$ [mg]	$CL_R (t_i - t_{i-1})$ [mL/min]
0,00 – 1,42	1,42	..**	0,007	..**
1,42 – 4,75	3,33	3,66	0,025	0,025
4,75 – 7,25	2,50	3,24	0,036	0,022
7,25 – 9,17	1,92	2,99	0,050	0,041
9,17 – 11,2	2,00	2,81	0,065	0,044
11,2 – 14,2	3,00	2,63	0,080	0,032
14,2 – 22,2	8,00	2,33	0,124	0,039
22,2 – 24,8	2,67	2,14	0,139	0,043
24,8 – 335,4		Keine quantitative Urinsammlung*		
335,4 – 337,7	2,25	..**	0,112	..**
337,7 – 340,2	2,50	6,47	0,207	0,098
340,2 – 343,7	3,50	6,09	0,285	0,061
343,7 – 345,6	1,92	5,82	0,356	0,107
345,6 – 349,2	3,58	5,59	0,518	0,135
349,2 – 351,7	2,50	5,39	0,620	0,125
351,7 – 358,6	6,92	5,14	0,917	0,139
358,6 – 359,6	1,03	4,98	0,951	0,109
359,6 – 408,4		Keine quantitative Urinsammlung*		
408,4 – 411,6	3,17	7,63	-	0,069

\* Annahme ausgehend von geringem Urinvolumen

\*\* nicht abgeschätzt, da das Mittel des Sammlungsintervalls vor Ende der Infusion lag

## 24 h-Sammelurin

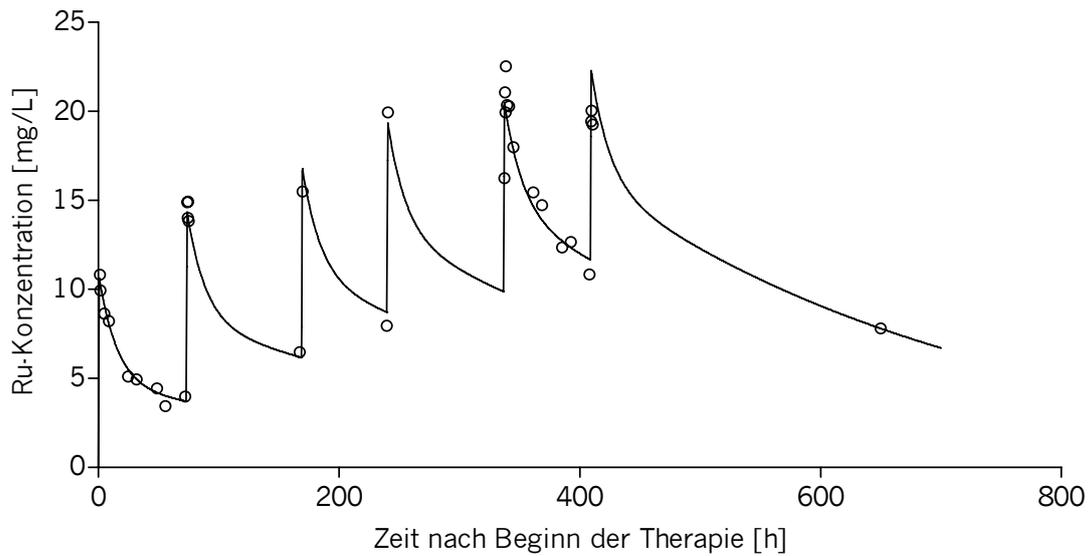
<b>Applikation</b>	<b>t<sub>0</sub>-t<sub>z</sub> [h]</b>	<b>U<sub>cum</sub> [µg]</b>	<b>rel. U<sub>cum</sub> [%]</b>	<b>AUC<sub>t<sub>0</sub>-t<sub>z</sub></sub> [µg·h/L]</b>	<b>CL<sub>R</sub> (L/h)</b>	<b>U<sub>∞</sub> [µg]</b>	<b>rel. U<sub>∞</sub> [%]</b>
1.	24,8	0,14	0,69	70,5	0,033	0,65	3,23
5.	22,9	0,95	n.a.	134	0,118	n.a.	n.a.

n.a. nicht anwendbar

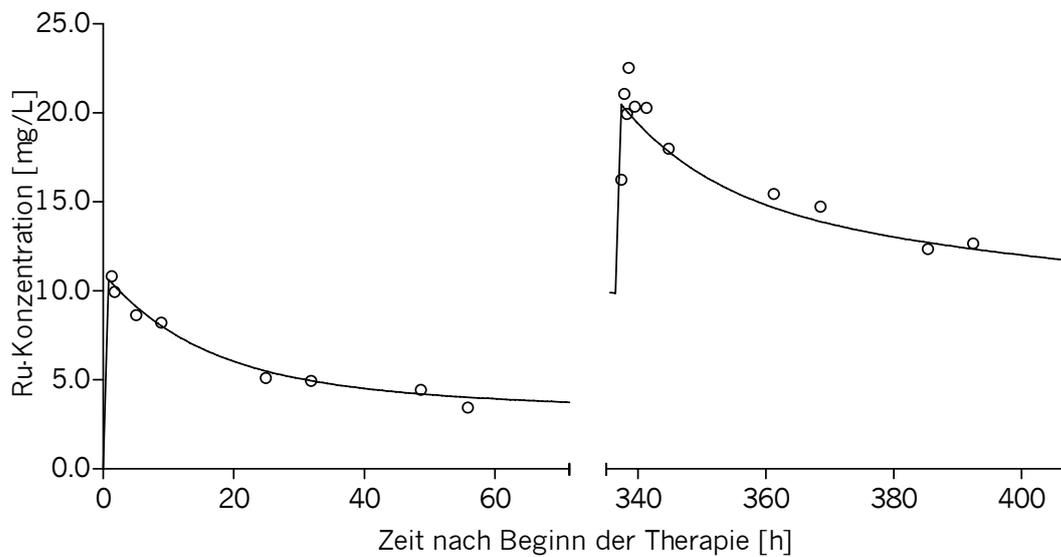
**Patient 4 – Dosis: 200 mg (entsprechen 40,255 mg Ruthenium)**

*Pharmakokinetik im Plasma*

Ruthenium-Konzentrations-Zeit-Profil im Plasma nach sechs Applikationen KP1019 [○ gemessene Rutheniumkonzentration, — abgeschätzte Rutheniumkonzentration]



Ruthenium-Konzentrations-Zeit-Profil im Plasma nach der 1. (links) und der 5. Applikation (rechts) [○ gemessene Rutheniumkonzentration, — abgeschätzte Rutheniumkonzentration]



## Pharmakokinetische Parameter im Plasma

	1. Applikation*	5. Applikation	Alle Applikationen**
$C_{max}$ [mg/L]	10,8	22,5	22,5
AUC [mg·h/L]	691	1273	1605
$t_{1/2\lambda 1}$ [h]	6,86	5,33	10,6
$t_{1/2\lambda z}$ [h]	69,0	97,4	229
CL [mL/min]	0,97	0,53	0,42
$V_{ss}$ [L]	5,46	4,35	7,83

\* Abschätzung ohne Konzentration von Tag 4, dbI (72,1 h),

\*\* Abschätzung ohne Konzentration von Tag 15,  $C_{max}$  (337,4 h)

## Ausscheidung im Urin

## Individuelle Sammlungsintervalle

Sammlungs- Intervall[h]	$\Delta t$ [h]	$C_{av}$ [mg/L]	$U_{cum}$ [mg]	$CL_R$ ( $t_i - t_{i-1}$ ) [mL/min]
0,00 – 2,98	2,98	10,52	0,025	0,014
2,98 – 7,40	4,42	9,02	0,067	0,018
7,40 – 23,8	16,4	6,56	0,084	0,003
23,8 – 336,4		Keine quantitative Urinsammlung*		
336,4 – 342,4	6,00	20,59	0,181	0,024
342,4 – 360,4	18,0	16,94	0,971	0,043
360,4 – 384,4	24,0	14,14	2,355	0,068
384,4 – n.d.	24,0	11,89	3,874	0,089
n.d. – 650,0		Keine quantitative Urinsammlung*		

n.d. nicht dokumentiert, Annahme: 408,4h

\* Annahme ausgehend von geringem Urinvolumen

## 24 h-Sammelurin

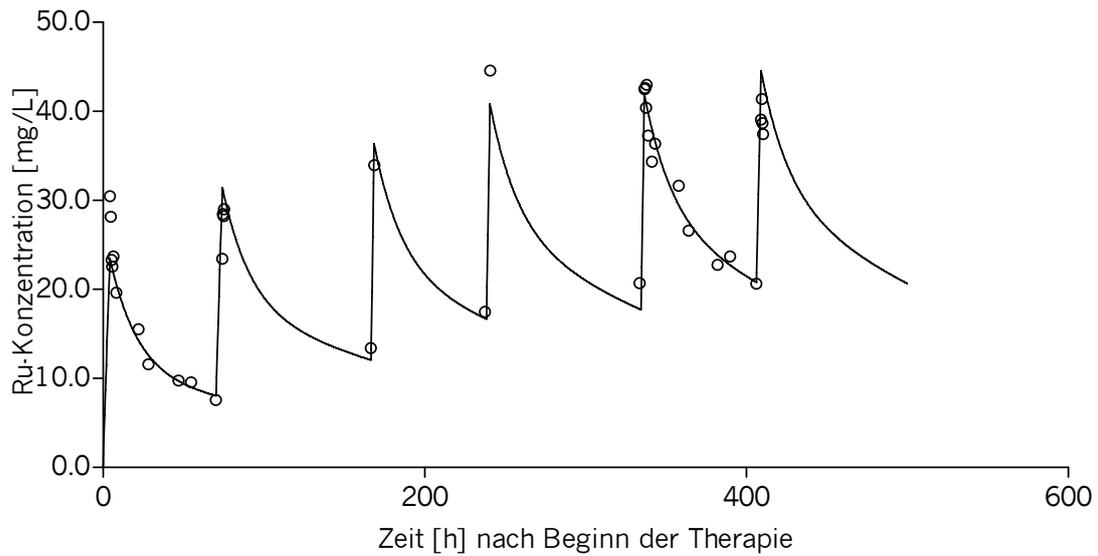
Applikation	$t_0 - t_z$ [h]	$U_{cum}$ [µg]	rel. $U_{cum}$ [%]	$AUC_{t_0 - t_z}$ [µg·h/L]	$CL_R$ (L/h)	$U_{\infty}$ [µg]	rel. $U_{\infty}$ [%]
1.	23,8	0,08	0,21	182	0,008	0,32	0,79
5.	71,9	3,87	n.a.	1048	0,062	n.a.	n.a.

n.a. nicht anwendbar

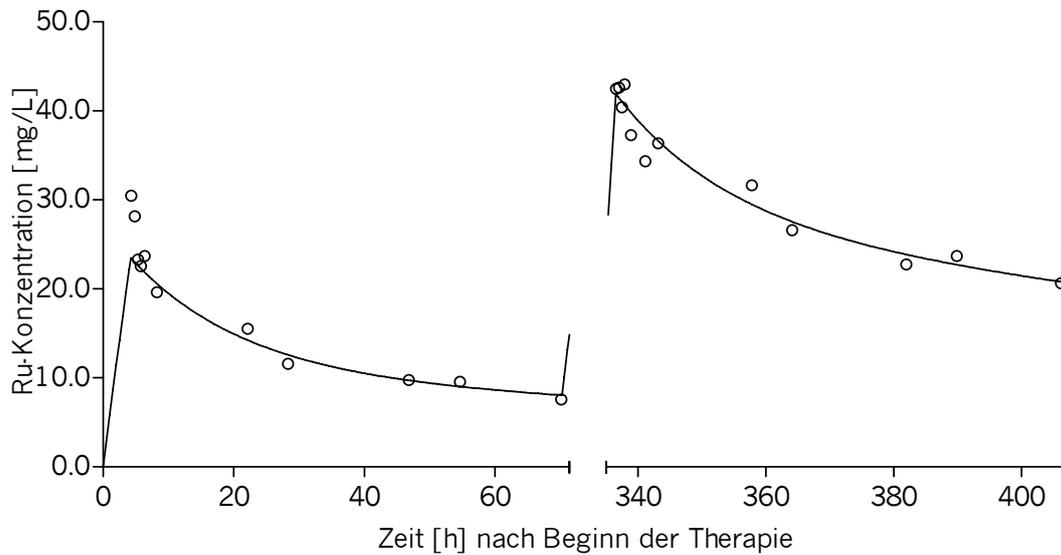
**Patient 5 – Dosis: 400 mg (entsprechen 80,510 mg Ruthenium)**

*Pharmakokinetik im Plasma*

Ruthenium-Konzentrations-Zeit-Profil im Plasma nach sechs Applikationen KP1019 [○ gemessene Rutheniumkonzentration, — abgeschätzte Rutheniumkonzentration]



Ruthenium-Konzentrations-Zeit-Profil im Plasma nach der 1. (links) und 5. Applikation (rechts) [○ gemessene Rutheniumkonzentration, — abgeschätzte Rutheniumkonzentration]



## Pharmakokinetische Parameter im Plasma

	1. Applikation	5. Applikation	Alle Applikationen
$C_{\max}$ [mg/L]	30,5	43,0	43,0
AUC [mg·h/L]	1442	2357	2635
$t_{1/2\lambda 1}$ [h]	1,59	2,29	11,9
$t_{1/2\lambda z}$ [h]	51,2	85,5	157
CL [mL/min]	0,93	0,57	0,51
$V_{ss}$ [L]	3,96	4,15	6,32

## Ausscheidung im Urin

## Individuelle Sammlungsintervalle

Sammlungs- Intervall[h]	$\Delta t$ [h]	$C_{av}$ [mg/L]	$U_{cum}$ [mg]	$CL_R (t_i - t_{i-1})$ [mL/min]
0,00 – 4,52	4,52	-**	0,057	-**
4,52 – 9,20	4,68	21,31	0,143	0,014
9,20 – 19,3	10,1	16,04	0,321	0,018
19,3 – 31,4	12,1	13,68	0,430	0,011
31,4 – 40,1	8,75	11,88	0,607	0,028
40,1 – 44,2	4,08	10,89	0,719	0,042
44,2 – 65,9	21,7	9,15	1,028	0,026
65,9 – 331,2		Keine quantitative Urinsammlung*		
331,2 – 338,1	6,92	-**	0,775	-**
338,1 – 354,0	15,9	33,29	1,379	0,019
354,0 – 378,8	24,8	27,83	2,765	0,034
378,8 – 398,1	19,3	23,28	3,945	0,044

\* Annahme ausgehend von geringem Urinvolumen

\*\* nicht abgeschätzt, da das Mittel des Sammlungsintervalls vor Ende der Infusion lag

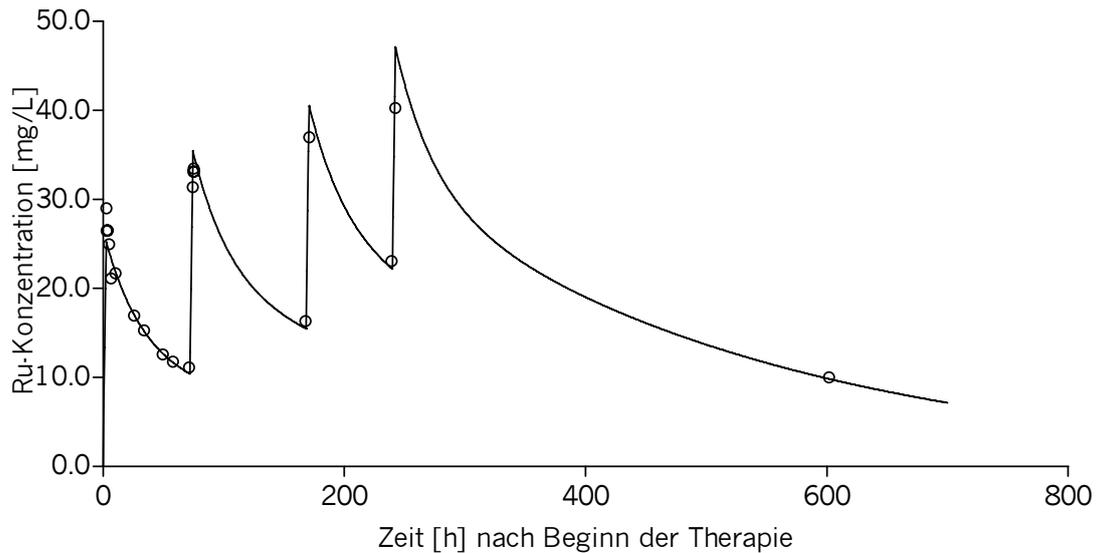
## 24 h-Sammelurin

Applikation	$t_0-t_z$ [h]	$U_{cum}$ [µg]	rel. $U_{cum}$ [%]	$AUC_{t_0-t_z}$ [µg·h/L]	$CL_R$ (L/h)	$U_{\infty}$ [µg]	rel. $U_{\infty}$ [%]
1.	65,9	857	1,03	1,28	0,020	1,73	2,15
5.	63,7	1802	3,94	n.a.	0,036	n.a.	n.a.

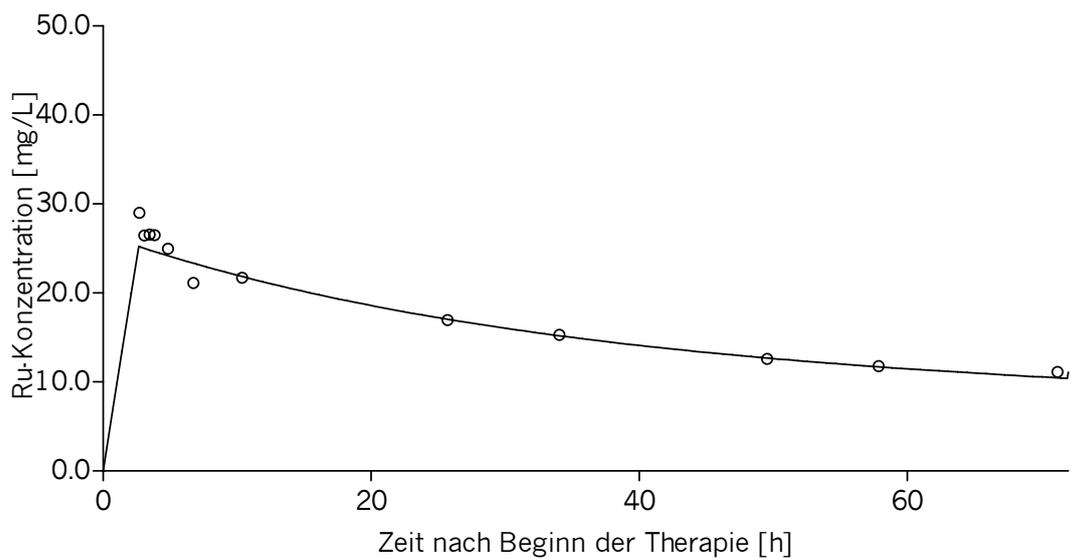
n.a. nicht anwendbar

**Patient 6 – Dosis: 600 mg (entsprechen 120,765 mg Ruthenium)***Pharmakokinetik im Plasma*

Ruthenium-Konzentrations-Zeit-Profil im Plasma nach sechs Applikationen von KP1019 [○ gemessene Rutheniumkonzentration, — abgeschätzte Rutheniumkonzentration]



Ruthenium-Konzentrations-Zeit-Profil im Plasma nach der 1. Applikation von KP1019 [○ gemessene Rutheniumkonzentration, — abgeschätzte Rutheniumkonzentration]



## Pharmakokinetische Parameter im Plasma

	1. Applikation	5. Applikation	Alle Applikationen
$C_{\max}$ [mg/L]	29,0	n.b.	n.b.
AUC [mg·h/L]	2151	n.b.	n.b.
$t_{1/2\lambda 1}$ [h]	2,50	n.b.	n.b.
$t_{1/2\lambda z}$ [h]	68,1	n.b.	n.b.
CL [mL/min]	0,94	n.b.	n.b.
$V_{ss}$ [L]	5,43	n.b.	n.b.

n.b. nicht bestimmt

## Ausscheidung im Urin

## Individuelle Sammlungsintervalle

Sammlungs- Intervall [h]	$\Delta t$ [h]	$C_{av}$ [mg/L]	$U_{cum}$ [mg]	$CL_R (t_i - t_{i-1})$ [mL/min]
0,00 – 2,45	2,45	-**	0,068	-**
2,45 – 6,37	3,92	25,21	0,206	0,023
6,37 – 22,2	15,8	19,16	0,694	0,027
22,2 – 601,7	Keine quantitative Urinsammlung*			

\* Annahme ausgehend von geringem Urinvolumen

\*\* nicht abgeschätzt, da das Mittel des Sammlungsintervalls vor Ende der Infusion lag

## 24 h-Sammelurin

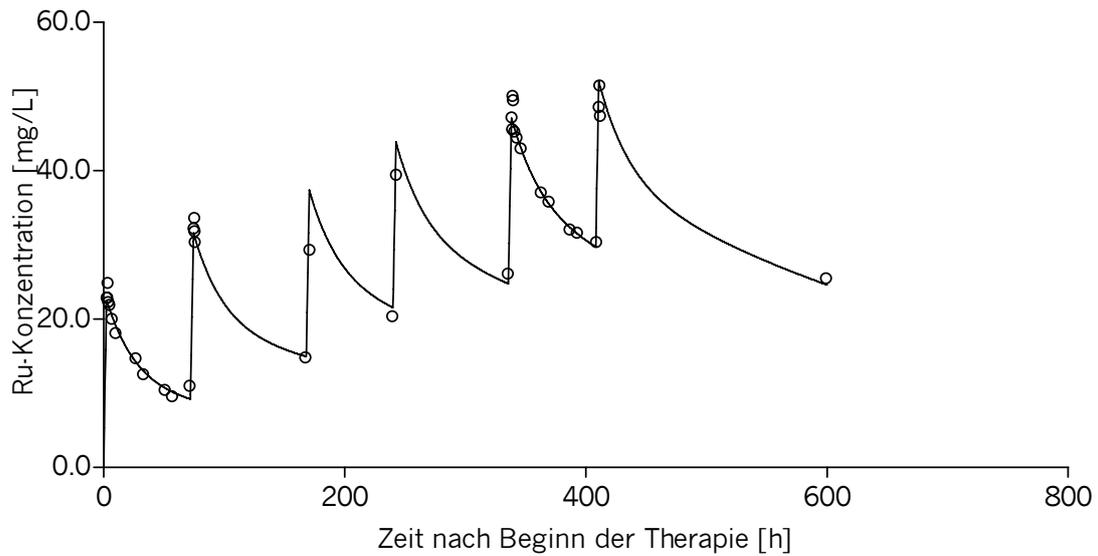
Applikation	$t_0 - t_z$ [h]	$U_{cum}$ [µg]	rel. $U_{cum}$ [%]	$AUC_{t_0 - t_z}$ [µg·h/L]	$CL_R$ (L/h)	$U_{\infty}$ [µg]	rel. $U_{\infty}$ [%]
1.	22,2	0,69	0,57	449	0,026	3,33	2,75
5.	.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.

n.b. nicht bestimmt

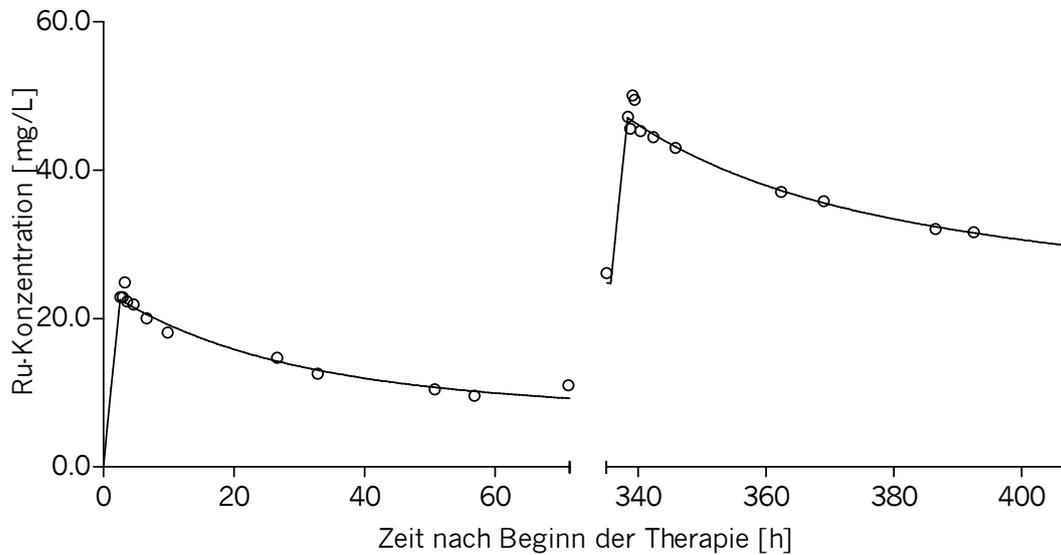
**Patient 7 – Dosis: 600 mg (entsprechen 120,765 mg Ruthenium)**

*Pharmakokinetik im Plasma*

Ruthenium Konzentrations-Zeit-Profil im Plasma nach sechs Applikationen von KP1019 [○ gemessene Rutheniumkonzentration, — abgeschätzte Rutheniumkonzentration]



Ruthenium Konzentrations-Zeit-Profil im Plasma nach der 1. (links) und 5. Applikation (rechts) von KP1019 [○ gemessene Rutheniumkonzentration, — abgeschätzte Rutheniumkonzentration]



## Pharmakokinetische Parameter im Plasma

	1. Applikation*	5. Applikation	Alle Applikationen
$C_{max}$ [mg/L]	24,9	50,1	51,5
AUC [mg·h/L]	1566	3244	4499
$t_{1/2\lambda 1}$ [h]	3,38	5,23	17,6
$t_{1/2\lambda z}$ [h]	54,9	118	290
CL [mL/min]	1,29	0,62	0,45
$V_{ss}$ [L]	6,00	6,26	10,4

\* Abschätzung ohne Konzentration von Tag 4, dbl (71,2 h)

## Ausscheidung im Urin

## Individuelle Sammlungsintervalle

Sammlungs- Intervall [h]	$\Delta t$ [h]	$C_{av}$ [mg/L]	$U_{cum}$ [mg]	$CL_R (t_i - t_{i-1})$ [mL/min]
0,00 – 8,00	8,00	22,28	0,100	0,009
8,00 – 24,0	16,0	16,42	0,567	0,030
24,0 – 335,3	Keine quantitative Urinsammlung*			
335,3 – 340,7	5,42	-**	1,014	-**
340,7 – 359,7	19,0	40,97	4,721	0,079
359,7 – 599,2	Keine quantitative Urinsammlung*			

\* Annahme ausgehend von geringem Urinvolumen

\*\* nicht abgeschätzt, da das Mittel des Sammlungsintervalls vor Ende der Infusion lag

## 24 h-Sammelurin

Applikation	$t_0-t_z$ [h]	$U_{cum}$ [µg]	rel. $U_{cum}$ [%]	$AUC_{t_0-t_z}$ [µg·h/L]	$CL_R$ (L/h)	$U_{\infty}$ [µg]	rel. $U_{\infty}$ [%]
1.	24,0	0,57	0,47	411	0,023	2,16	1,79
5.	24,0	4,72	n.a.	994	0,079	n.a.	n.a.

n.a. nicht anwendbar

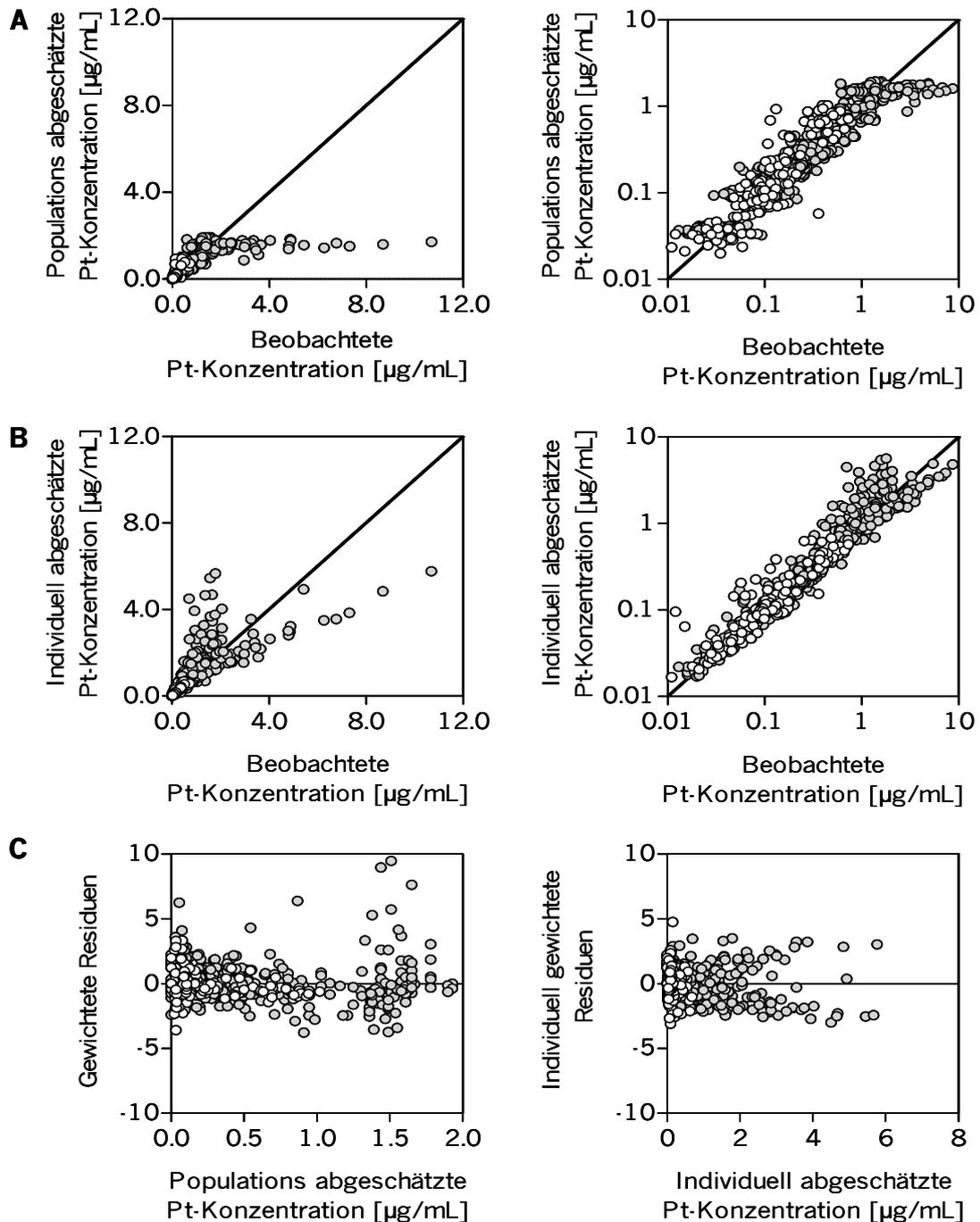
**Anhang C: Populations-PK/PD Modell zur Platin-DNA-Addukt-Bildung in Leukozyten**

## Erläuterung der Datensatz-Elemente des NONMEM®-Datensatzes

<b>Element</b>	<b>Einheit</b>	<b>Beschreibung</b>
ID		Identifikation des Individuums
TIME	[h]	Zeit nach Beginn der Therapie
TAD	[h]	Zeit nach letzter Dosis
PTAD	[h]	Zeit nach letzter Dosis gemäß Protokoll
DV	[µg/L]	abhängige Variable PK
	[mmol/L]	abhängige Variable PD
AMT	[mg] [mmol]	Dosis
RATE	[mg/h]	Infusionsgeschwindigkeit
CMT		Kompartiment
EVID		Ereignis Identifikation (z.B. Dosis, Beobachtung)
OCC		Zyklus, Therapiezyklus
M1F2		Geschlecht
CLCR	[mL/min]	Kreatininclearance, abgeschätzt nach Cockcroft und Gault
BSA	[m <sup>2</sup> ]	Körperoberfläche
BMI	[kg/m <sup>2</sup> ]	Body-Mass-Index
WT	[kg]	Gewicht
HGT	[cm]	Größe
STDY		Studie
FFM	[kg]	Fettfreie Masse
SCR	[mg/dL]	Serumkreatininkonzentration
AGE	[Jahre]	Alter
S1O2		Sorafenibgabe
LEUK	[mmol/L]	DNA in den Leukozyten

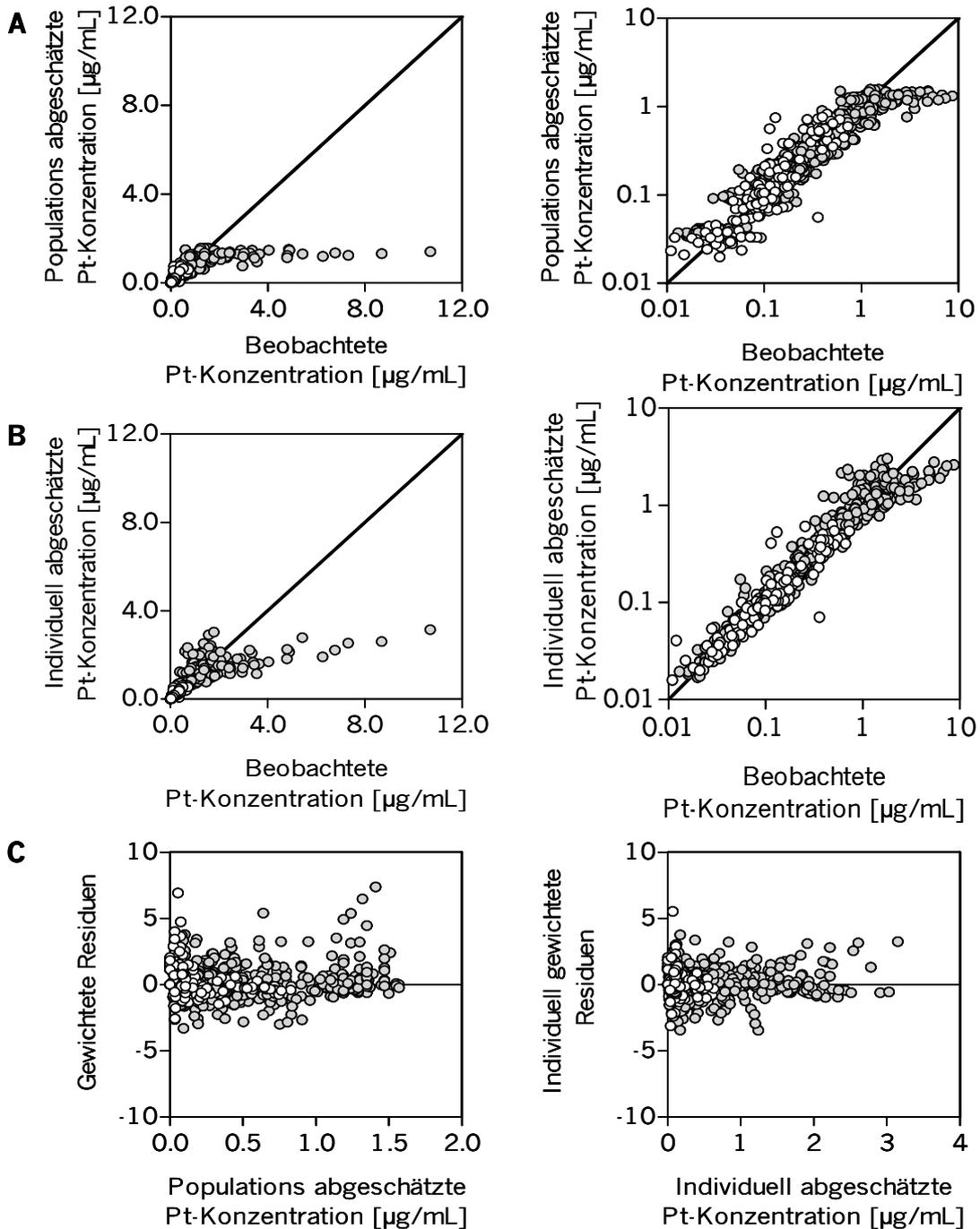
## Goodness-of-Fit-Plots für das Modell BASE

● Studie 1, ○ Studie 2; A: DV versus PRED, linear (links) und semi-logarithmisch (rechts); B: DV versus, IPRE linear (links) und semi-logarithmisch (rechts); C: WRES versus PRED (links) und IWRES versus IPRED (rechts)



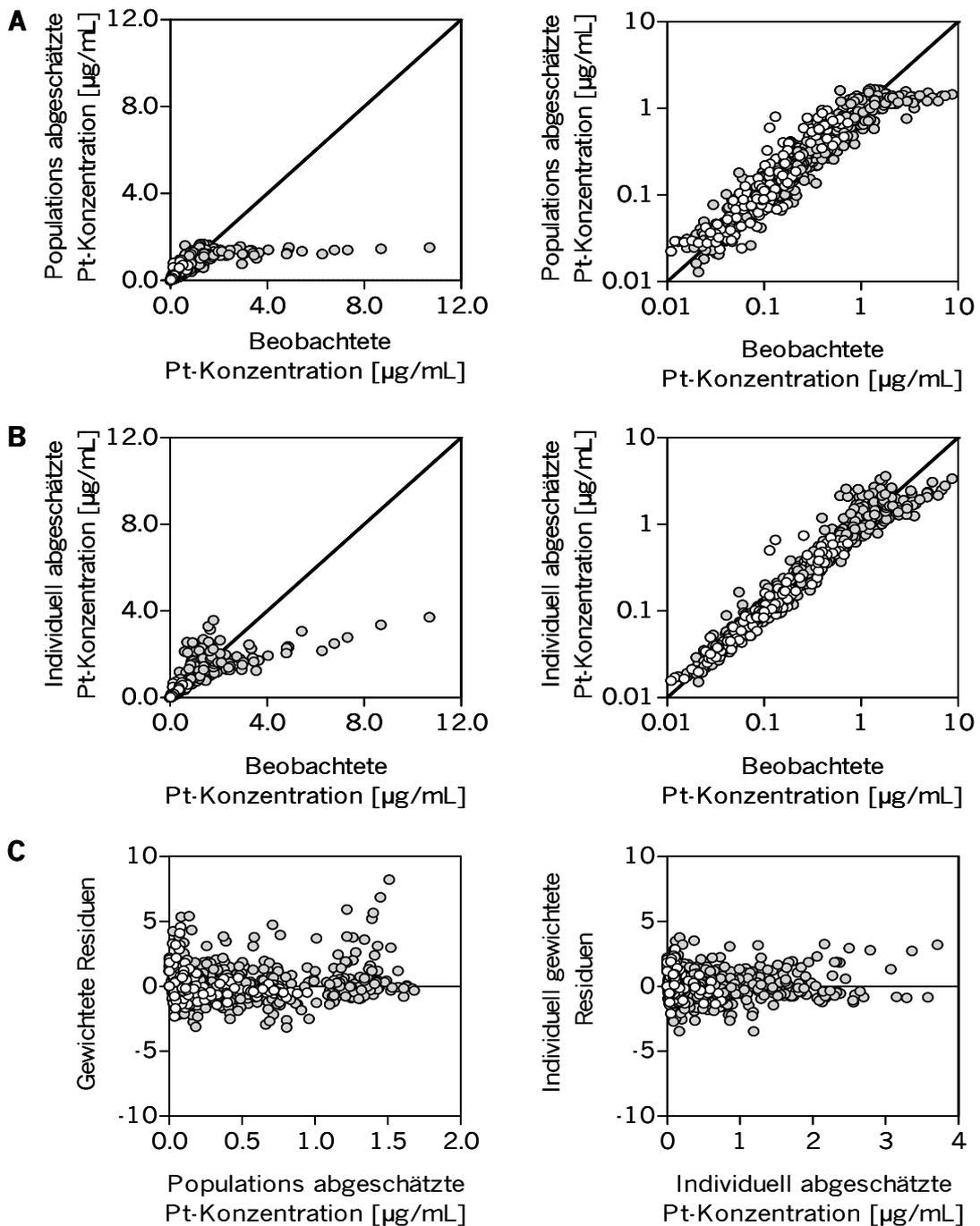
## Goodness-of-Fit-Plots für das Modell BASE2RE

● Studie 1, ○ Studie 2; **A:** DV versus PRED, linear (links) und semi-logarithmisch (rechts); **B:** DV versus, IPRE linear (links) und semi-logarithmisch (rechts); **C:** WRES versus PRED (links) und IWRES versus IPRED (rechts)



## Goodness-of-Fit-Plots für das finale Modell

● Studie 1, ○ Studie 2; **A:** DV versus PRED, linear (links) und semi-logarithmisch (rechts); **B:** DV versus, IPRE linear (links) und semi-logarithmisch (rechts); **C:** WRES versus PRED (links) und IWRES versus IPRED (rechts)



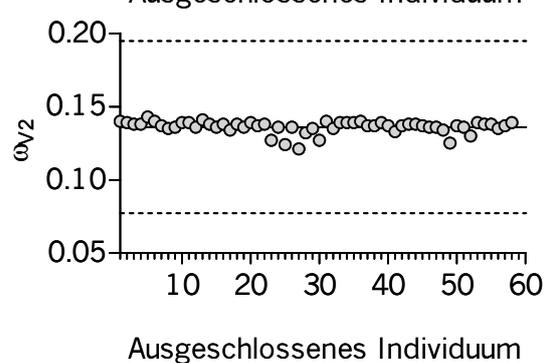
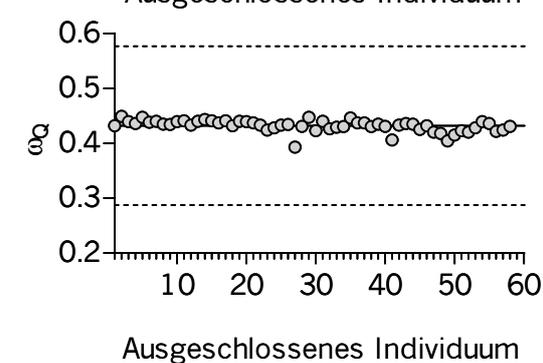
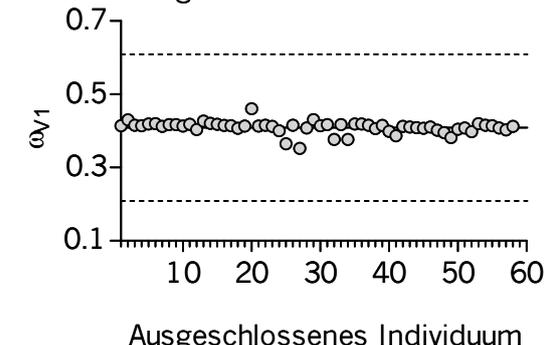
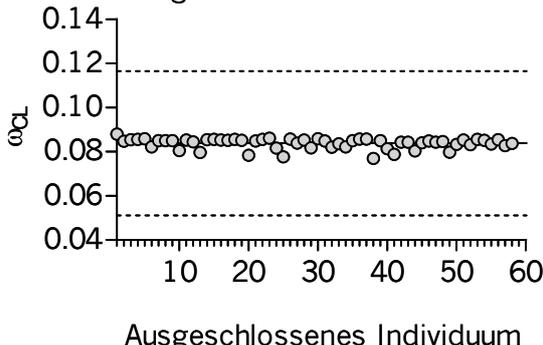
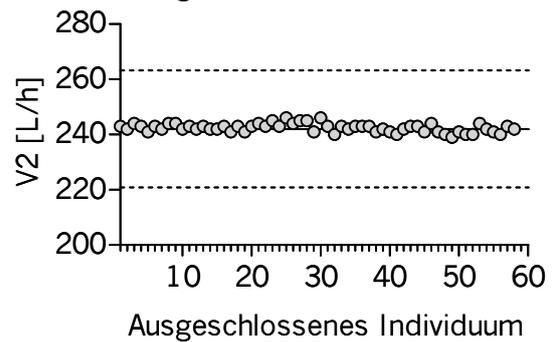
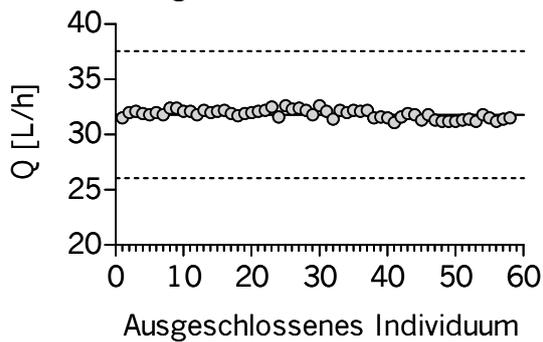
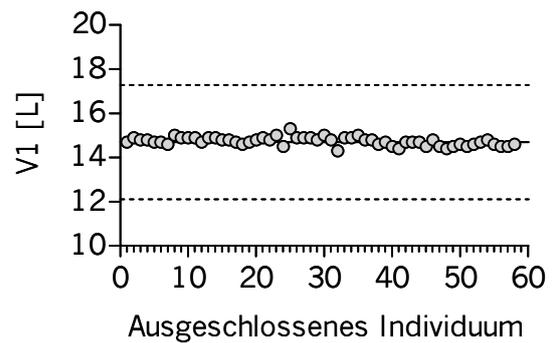
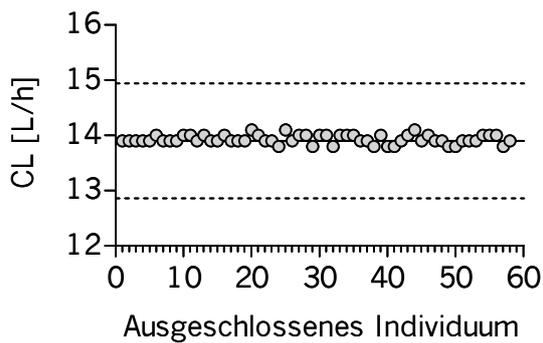
## Ergebnisse von 897 Bootstrap-Läufen basierend auf dem finalen Modell

Modell Parameter		FINAL	Median	Abs. Fehler	Rel. Fehler [%]	95 % Konfidenzintervall
<i>Fixed-effect-Parameter</i>						
CL	[L/h]	13,9	13,9	< 0,01	< 0,01	12,9 – 15,0
V1	[L]	14,7	14,7	< 0,01	< 0,01	12,3 – 17,6
Q	[L/h]	31,8	31,7	0,10	0,31	26,6 – 38,0
V2	[L]	242	242	< 0,01	< 0,01	223 – 264
<i>Kovariateneinfluss</i>						
$\theta_{\text{CLCR}}$		0,519	0,518	0,001	0,193	0,338 – 0,733
<i>Random-effect-Parameter</i>						
<i>Interindividuelle Variabilität</i>						
$\omega_{\text{CL}}$	[%]	28,9	28,7	0,30	0,01	22,7 – 34,2
$\omega_{\text{V1}}$	[%]	64,0	62,3	1,66	0,03	45,8 – 77,8
$\omega_{\text{Q}}$	[%]	65,7	64,9	0,84	0,01	52,6 – 75,6
$\omega_{\text{V2}}$	[%]	36,9	36,2	0,68	0,02	27,7 – 44,2
Korr- $\omega_{\text{CL-V1}}$		0,145	0,137	0,008	5,52	0,072 – 0,210
Korr- $\omega_{\text{CL-Q}}$		0,128	0,123	0,005	3,91	0,064 – 0,181
Korr- $\omega_{\text{CL-V2}}$		0,073	0,069	0,004	5,75	0,037 – 0,103
Korr- $\omega_{\text{V1-Q}}$		0,394	0,378	0,016	4,06	0,227 – 0,547
Korr- $\omega_{\text{V1-V2}}$		0,221	0,210	0,011	4,98	0,120 – 0,319
Korr- $\omega_{\text{Q-V2}}$		0,218	0,209	0,009	4,13	0,124 – 0,299
<i>Restfehler</i>						
$\sigma_{\text{additiv-1}}$	[%]	0,0044	0,0044	< 0,01	0,23	0,0032 – 0,0053
$\sigma_{\text{proportional-1}}$	[mg/L]	58,5	58,0	0,50	0,85	46,0 – 72,7
$\sigma_{\text{additiv-2}}$	[%]	0,0038	0,0037	0,0002	4,17	0,0000 – 0,0054
$\sigma_{\text{proportional-2}}$	[mg/L]	19,2	19,2	< 0,01	< 0,01	17,5 – 20,8

## Case-Deletion-Diagnostics – Szenario 1

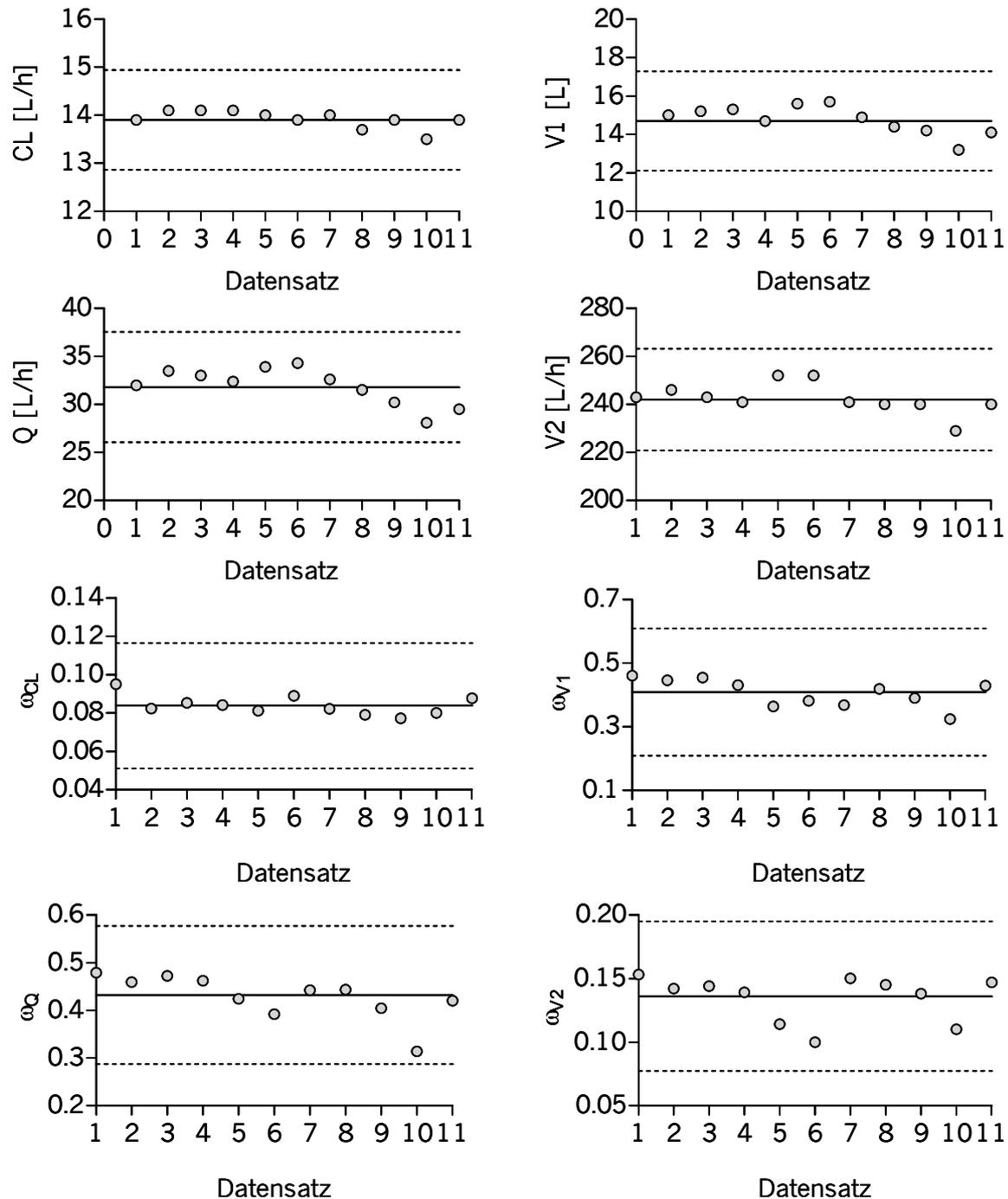
Ausschluss eines einzelnen Individuums aus dem Originaldatensatz;

— Original Parameterschätzung (vollständiger Datensatz), ○ Parameterschätzung des reduzierten Datensatzes, -- 95 % Konfidenzintervall der Parameterschätzung des vollständigen Datensatzes



## Case-Deletion-Diagnostics – Szenario 2

Ausschluss von 10 % der Individuen aus dem Originaldatensatz; — Original Parameterschätzung (vollständiger Datensatz), ○ Parameterschätzung des reduzierten Datensatzes, - - 95 % Konfidenzintervall der Parameterschätzung des vollständigen Datensatzes



## Goodness-of-Fit-Plots für das finale PD-Modell

FINALPD, A: DV versus PRED linear (links) und semi-logarithmisch (rechts);  
B DV versus IPRE linear (links) und semi-logarithmisch (rechts); C: WRES  
versus PRED (links) und iWRES versus IPRE (rechts)

