



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

In-vitro und in-vivo Untersuchungen mit dem Antiemetikum Aprepitant

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Verfasser:	Marie-Bernadette von Aretin
Matrikel-Nummer:	0105618
Studienrichtung (lt. Studienblatt):	Pharmazie A449
Betreuerin / Betreuer:	Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Martin Czejka

Wien, am

10. November 2008

Danksagung

Ich möchte mich bei all jenen herzlich bedanken, die mich während meines Studiums in allen Bereichen meines Lebens unterstützt haben.

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof.Czejka für die Betreuung dieser Diplomarbeit in fachlicher und organisatorischer Sicht.

Besonderer Dank gebührt meinen Lieben, die mich auch in den schwierigen Phasen meines Studiums mit aller Kraft voran gebracht und an mich geglaubt haben. Die auch alle Höhen und Tiefen mit mir gemeinsam miterlebt und tiefstes Verständnis für meine Launen und Stimmungen aufgebracht haben und so ein wertvoller Rückhalt gewesen sind.

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	5
Pharmakologische Grundlagen	5
Zytostatika Induzierte Übelkeit und Erbrechen (CINV)	5
Pathophysiologie des Erbrechens	5
Antiemetische Therapie	7
Aprepitant	9
Cytochrom P450	11
Analytik	12
Biologische Matrix	12
Probenvorbereitung	12
HPLC	13
Methode	15
Liste der verwendeten Geräte und Reagenzien	15
Herstellen der Stammlösungen	16
Eichgerade	16
Plasmaproben	17
Festphasenextraktion	17
HPLC	19
Enzymversuche	19
Versuchsansatz	19
Proteinfällung	20
HPLC	20
Auswertung	21
Ergebnisse und Diskussion	22
In-Vivo-Untersuchungen	22
Eichgerade	22
Patientenproben	24
Biometrische Berechnungen	47
In Vitro Untersuchung	58
Eichgerade	58
Enzymversuch	60
Interpretation	69
Abbildungsverzeichnis	73

Tabellenverzeichnis	75
Lebenslauf	76

Einleitung

Pharmakologische Grundlagen

Zytostatika Induzierte Übelkeit und Erbrechen (CINV)

Das bei der Therapie mit Zytostatika auftretende Erbrechen führt nicht nur zu einer deutlichen Minderung der Lebensqualität für die Patienten, sondern hat ohne adäquate Gegenmaßnahmen eine Reihe von Komplikationen zur Folge:

Gewichtsverlust, Dehydratation, Elektrolytverschiebung und die damit verbundenen Konsequenzen können dazu führen, dass Patienten hospitalisiert werden müssen. Depression und Angst führen im schlimmsten Fall zum Therapieabbruch.

Pathophysiologie des Erbrechens

Das Brechzentrum in der Medulla oblongata kann entweder durch vagale afferente Nervenbahnen, oder durch die chemorezeptorische Triggerzone (CTZ) in der Area postrema, wo die Blut-Hirn-Schranke besonders durchlässig ist, angesprochen werden. Aus dem Gastrointestinaltrakt erreichen emetogen Reize den Nucleus tractus solitarii über afferente Vagus-Bahnen.

Relevante Neurotransmitter sind:

- Serotonin (5-Hydroxytryptamin) , das vor allem aus den enterochromaffinen Zellen des Dünndarms freigesetzt wird; von den verschiedenen Rezeptoren spielen für die Entstehung eines Brechreizes vor allem die 5-HT₃-Rezeptoren in der Area postrema und dem Nucleus tractus solitarii eine Rolle.
- Substanz P (Neurokinin), Rezeptoren dafür findet man ebenfalls in der Area postrema und dem Nucleus tractus solitarii.
- Dopamin-D₂-Rezeptoren tragen auch zur Auslösung von Brechreizen bei, spielen aber beim Zytostatika induziertem Erbrechen nur eine untergeordnete Rolle.

Ebenfalls im Nucleus tractus solitarii lokalisierte Histamin-H₁- und Muscarin-Cholinrezeptoren sind vor allem bei der Entstehung von Kinetosen beteiligt.

Es wird zwischen 3 verschiedenen Formen der Emesis unterschieden:

Akute Nausea / Emesis: Tritt innerhalb der ersten 24 Stunden nach Beginn der Chemotherapie auf und wird vor allem über den Serotonin-Weg ausgelöst.

Verzögerte Nausea / Emesis: Tritt 24 Stunden bis 5 Tage nach Zytostatikagabe auf und wird in erster Linie durch Substanz P ausgelöst.

Antizipatorische Nausea / Emesis: tritt auf als Folge einer Konditionierung auf Erbrechen in vorangegangene Zytostatikagaben und ist medikamentös besonders schwer zu behandeln. Eine ausreichende antiemetische Prophylaxe sollte deshalb ab der ersten Chemotherapie angestrebt werden.

Das Risiko im Rahmen einer Chemotherapie Erbrechen oder Übelkeit zu erleiden ist nicht bei allen Patienten gleich.

Frauen und jüngere Patienten sind anfälliger als Männer, Angst und vorangegangene Emesiserfahrung (im Rahmen einer Chemotherapie, aber auch anderer Genese) wirken sich ebenfalls negativ aus. Dagegen verringern regelmäßiger Alkoholkonsum und höheres Alter das Risiko.

Ein wesentlicher Faktor bei der Entstehung des Chemotherapie-induziertem-Erbrechen ist das emetogene Potential des jeweiligen Zytostatikums.

Emetogenes Risiko	Applikation i.v.	Applikation peroral
hoch	Cisplatin Mechlorethamin Streptazocin Cyclophosphamid >1500mg/m ² Carmustin Dacarbazin	Hexamethylmelamin Procarbazin
moderat	Oxaliplatin Cytarabin >100mg/m ² Carboplatin Ifosfamid Cyclophosphamid <1500mg/m ² Doxorubicin Daunorubicin Epirubicin Idarubicin Irinotecan	Cyclophosphamid Etoposid Temozolomid Vinorelbin Imatinib
niedrig	Paclitaxel Docetaxel Mitoxantron Topotecan Etoposid Pemetrexed Methotrexat Mitomycin Gemcitabin Cytarabin <100mg/m ² 5-Fluorouracil Bortezomid Cetuximab Trastuzumab	Capecitabin 5-Fluorouracil
minimal	Bleomycin Busulfan Fludarabin Vinblastin Vincristin Vinorelbin Bevacizumab	Chlorambucil Hydroxyurea Methotrexat

Tabelle 1: Emetogenes Potential der gängigsten Zytostatika.

Antiemetische Therapie

In Abhängigkeit von der Art der Emesis stehen verschiedene Arzneistoffklassen zur Verfügung.

5-HT₃-Antagonisten (Setrone) wirken vor allem gegen die Übelkeit und das Erbrechen in der akuten Phase in dem sie selektiv die 5-HT₃-rezeptoren blockieren.

NK1-Rezeptor-Antagonisten blockieren selektiv die Angriffspunkte der Substanz P und werden zur Therapie der verzögerten Emesis eingesetzt.

Glucocorticoide – verwendet werden vor allem Dexamethason und Methylprednisolon- führen in Kombination mit anderen Antiemetika zu deren Wirkungssteigerung, wobei der genaue Wirkmechanismus noch nicht aufgeklärt ist.

Dopamin-D2-Antagonisten haben durch ihre selektive Blockade an D2-Rezeptoren auch eine antiemetische Wirkung, sind bei der Therapie des Zytostatika induziertem Erbrechens den Setronen und Aprepitant unterlegen und werden deshalb nur noch bei deren Unverträglichkeit angewendet.

Benzodiazepine werden aufgrund ihrer anxiolytischen Wirkung bei der Behandlung des antizipatorischen Erbrechens verwendet, obwohl sie primär keinen Effekt auf die Emesis haben.

Der Vollständigkeit halber sei noch auf Antihistaminika hingewiesen. Sie spielen in der Prophylaxe der CINV keine Rolle, werden aber bei Kinetosen erfolgreich eingesetzt. Die antiemetische Wirkung beruht auf der Blockade von H1-Rezeptoren.

In den wenigsten Fällen wird durch Monotherapie eine ausreichende Prophylaxe erreicht werden. Die aktuellen Richtlinien der MASCC (Multinational Association of Supportiv Care in Cancer) empfehlen eine Kombination aus drei verschiedenen Wirkstoffklassen:

An Tag 1 125 mg Aprepitant, 12 mg Dexamethason oral und 32 mg Ondansetron i.v. . Am zweiten Tag wird die Dosis von Aprepitant auf 80 mg, die von Dexamethason auf 8 mg reduziert. Die Ondansetrongabe bleibt aus. Tag 3 ist ident mit Tag 2, am vierten Tag wird auch Aprepitant abgesetzt und nur noch 8 mg Dexamethason oral gegeben.

Aprepitant

Der IUPAC-Name 5-[[[(2*R*,3*S*)-2-[(1*R*)-1-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl] ethoxy]-3-(4-fluorophenyl)-4-morpholinyl] methyl]-1,2-dihydro-3*H*-1,2,4-triazol-3-on beschreibt den von der Firma Merck, unter dem Namen Emend auf den Markt gebrachten NK1-Rezeptorantagonist-Aprepitant.

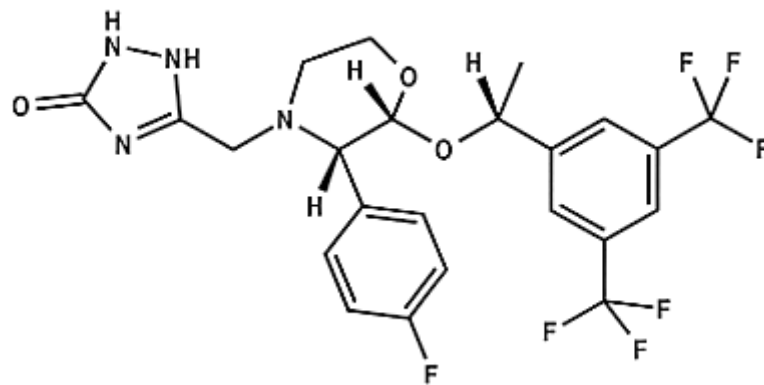


Abbildung 1: Struktur Aprepitant

Es handelt sich um einen weißen Feststoff der in Wasser praktisch unlöslich, in Ethanol und in Acetonitril wenig löslich ist.

Das Molekulargewicht beträgt 534,43.

Pharmakologische Eigenschaften

Aprepitant ist ein selektiver hochaffiner Human-Substanz-P-Neurokinin-1-Rezeptorantagonist der zur Therapie des CINV vom verzögerten Typ angewendet.

Die Pharmakokinetik ist nicht linear. Sowohl Clearance als auch absolute Bioverfügbarkeit nehmen mit steigender Dosis ab.

Die nahrungsunabhängige orale Bioverfügbarkeit beträgt ca. 67%.

Die maximale Plasmakonzentration wird nach etwa 4 Stunden erreicht.

Die Proteinbindung ist mit 97% sehr hoch.

Bei Frauen wurde eine Erhöhung von C_{max} um 16% bei einer gleichzeitig um ca. 25% kürzeren Halbwertszeit festgestellt. Eine geschlechtsspezifische Dosisanpassung erfolgt jedoch nicht, da dieser Tatsache keine klinische Relevanz beigemessen wird.

Aprepitant wird vor allem über CYP3A4 metabolisiert, zu geringen Teilen auch über CYP1A2 und CYP2C19.

Die Metaboliten werden sowohl renal als auch biliär ausgeschieden.

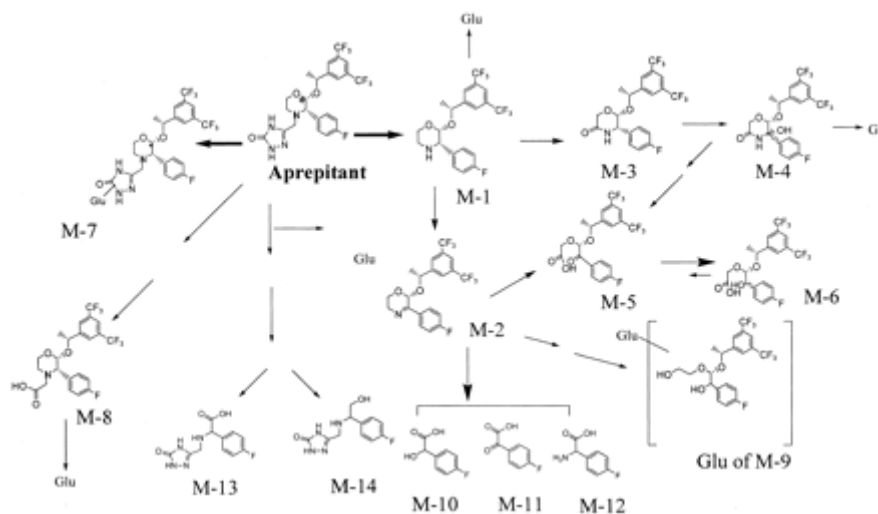


Abbildung 2: Metabolismus

Interaktionen:

Während der Therapie mit Emend wird CYP3A4 gehemmt, nach Beendigung der Therapie verursacht Aprepitant vorübergehend eine Induktion von CYP3A4 und CYP2C9. Dieser Effekt tritt 3 bis 5 Tage nach Therapieende auf.

Bei gleichzeitiger Anwendung von Substraten dieser beiden Enzyme ist Vorsicht geboten und eine eventuelle Dosisanpassung notwendig. Insbesondere gilt dies für die Anwendung von zytostatischen Chemotherapeutika wie zum Beispiel Irinotecan.

Die Plasmakonzentration der Kortikosteroide Dexamethason und Methylprednisolon wird erhöht, weshalb eine Verringerung der Dosis um 50% möglich wird.

Es wurden keine klinisch relevanten Interaktionen mit 5-HT₃-Antagonisten festgestellt.

Substanzen die eine starke Induktion von CYP3A4 bewirken, wie zum Beispiel Rifampicin, Phenytoin oder Carbamazepin sollten - wie auch Enzyminhibitoren (Ritonavir, Ketoconazol, u.a.) möglichst nicht gleichzeitig mit Aprepitant zur Anwendung kommen.

Absolut kontraindiziert ist die gleichzeitige Gabe von Pimozid, Terfenadin, Astemizol und Cisaprid.

Nebenwirkungen:

Häufig beobachtet wurden Appetitlosigkeit, Kopfschmerzen, Schwindel, Schluckauf und gastrointestinale Beschwerden wie Konstipation, Diarrhö und Dyspepsie.

Eventuell kann es zu einer vorübergehenden Erhöhung von ALT und AST kommen.

Emend wird ausschließlich im Rahmen einer Kombinationstherapie mit Ondansetron und Dexamethason eingesetzt.

An Tag 1 wird eine Stunde vor Beginn der Chemotherapie eine Kapsel mit 125 mg Aprepitant verabreicht, an Tag 2 und 3 jeweils eine Kapsel mit 80 mg.

Mit Fosaprepitant steht ein parenteral applizierbares Prodrug von Aprepitant zur Verfügung. Casopitant, ein weiterer NK1-Rezeptorantagonist befindet sich in der klinischen Prüfung.

Cytochrom P450

Die Cytochrom P450 Enzyme (CYP) gehören zur Kategorie der Hämproteine. Sie spielen eine wesentliche Rolle bei der Metabolisierung von lipophilen endogenen und körperfremden Stoffen. Durch Hydroxylierung, Desalkylierung, Oxidation, oder andere Abbaumechanismen wird die Hydrophilie erhöht, und damit die Ausscheidung ermöglicht. Das Hauptvorkommen ist in der Leber.

Die vielen Isoenzyme der CYP-Gruppe werden in Familien und Subfamilien eingeteilt. Das für den Metabolismus von Arzneistoffen wichtigste CYP-Enzym ist das CYP3A4.

Durch Einwirkung von Arzneistoffen kann die Enzymaktivität induziert oder gehemmt werden. Dieser Effekt ist reversibel, sollte aber bei der Dosierung von Arzneistoffen die über diesen Weg metabolisiert werden Berücksichtigung finden.

Analytik

Biologische Matrix

Die biologische Matrix die einen Arzneistoff umgibt muss vor dessen Analyse entfernt werden. Je nach Art der Matrix, es kann sich beispielsweise um Blut, Plasma, Harn, aber auch Sputum, Gewebeproben, Stuhl oder Punktat handeln, variieren die Probenvorbereitungen.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden ausschließlich Plasmaproben analysiert.

Plasma ist der flüssige, zellfreie Anteil des Blutes. Die Zusammensetzung pro Liter ist: 0,9 L Wasser, 9 g Elektrolyte und 65-80 g Proteine. Serum unterscheidet sich von Plasma nur durch das Fehlen des Gerinnungsfaktors Fibrinogen. Über die Kapillärwände der Blutgefäße könne Wasser und Elektrolyte leicht zwischen Plasma und Interstitialflüssigkeit ausgetauscht werden. Die Proteinfraction lässt sich elektrophoretisch auftrennen in. - Albumin, das den größten Anteil ausmacht, dient als Transportprotein für niedermolekulare Stoffe und trägt zur Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Druckes bei. – α -, β -, γ -Globuline denen sowohl Transportfunktionen als auch wesentliche Rollen in der Immunabwehr zukommen. – Fibrinogen ist eine Vorstufe des Fibrins das für die Blutgerinnung von Bedeutung ist. Die Elektrolyte halten die Isotonie des Plasmas aufrecht.

Probenvorbereitung

Da die Proteine bei nachfolgender Analyse stören, müssen sie abgetrennt werden. Folgende Methoden kommen dafür in Betracht:

Proteinfällung: Vorteilhaft bei dieser Methode ist, dass sie billig, schnell und einfach durchzuführen ist. Man versetzt die Probe mit organischem Lösungsmittel (z.B.: Methanol, Acetonitril, o.ä.) lässt die Proteine ausfallen, und erhält nach Zentrifugation einen klaren, proteinfreien Überstand. Nachteilig ist, dass einerseits die Proben durch das Zusatzten von Lösungsmittel verdünnt werden, und das Arzneistoffe die zu einem hohen Anteil an Proteine gebunden sind auch ausfallen.

Festphasenextraktion: Hierbei handelt es sich um eine Methode aus der Chromatographie. Die zu analysierende Probe wird auf eine Kartusche aufgebracht in der sich ein Sorbens befindet. Der Arzneistoff hat dabei eine höhere Affinität zu dem Sorbens als die Matrix, die mittels Vakuum aus der Kartusche gesaugt wird. Durch Wahl der Menge eines geeigneten Lösungsmittels hat man hier auch die Möglichkeit beim Herausholen des Arzneistoffs diesen auch gleich in einen bestimmten Konzentrationsbereich zu bringen. Da die Kartuschen nur einmal verwendet werden können ist diese Methode mit einem erheblich höheren finanziellen Aufwand verbunden.

Ultrafiltration: Verbindungen mit unterschiedlichem Molekulargewicht können getrennt werden. Die zu analysierende Probe wird dazu in speziellen Röhrchen welche aus zwei ineinanderstehenden Röhrchen besteht zentrifugiert. Die Flüssigkeit wird durch die Zentrifugalkraft nach außen durch die permeable Membran des inneren Röhrchens gedrückt, größere Partikel können die Membran nicht passieren.

Flüssig-flüssig Extraktion: Die Probe wird mehrmals zu gleichen Teilen mit einem organischen Lösungsmittel ausgeschüttelt, die organischen Phasen vereinigt und analysiert. Ähnlich wie bei der Proteinfällung ist hier die Probenverdünnung problematisch, außerdem kann durch Verdunstungseffekte die Genauigkeit nicht immer gewährleistet sein. Etwaige Metabolite des Arzneistoffs werden – so sie in dem Lösungsmittel unlöslich sind nicht mitquantifiziert.

Die beiden letztgenannten Methoden seien nur der Vollständigkeit halber erwähnt. Sie wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht angewendet.

HPLC

Die HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ist ein chromatographisches Verfahren das sich aufgrund seiner hohen Reproduzierbarkeit und Genauigkeit gut zur quantitativen und qualitativen Analyse von Arzneistoffen eignet. Die stationäre Phase befindet sich in einer Edelstahlröhre und stellt die Trennsäule dar. Die mobile Phase wird mittels Pumpen durch die Trennsäule bewegt. Der Druck und die Flussrate lassen sich relativ individuell einstellen. Bei Bedarf lässt sich die Trennsäule beheizen. Der Eluent kann entweder über die gesamte Zeit konstant gehalten werden, oder nach einem Gradientenverfahren verändert werden.

Auf einer HPLC- Anlage ist es auch möglich eine reversed phase Chromatographie zu machen: In diesem Fall ist die Stationäre Phase weniger polar als der Eluent, was dazu führt, dass apolare Substanzen eine länger Retentionszeit haben als polare. Dies ist vor allem dann von Vorteil wenn wässrige Probenlösungen analysiert werden wie es bei biologischem Material meistens der Fall ist.

Am Auslass der Trennsäule ist ein Detektor angeschlossen der je nach Methode ein der Substanzmenge entsprechendes Spektrum liefert.

Gängige Detektionsmöglichkeiten sind:

- UV/Vis Photometer
- Diodenarraydetektor
- Fluorimeter
- Brechungsindexdetektor
- Massenspektrometer

Methode

Liste der verwendeten Geräte und Reagenzien

Liste der verwendeten Geräte

- Analytische Waage, AC 121, Sartorius AG
- Vortex Mixer, Velp Scientifica, Stab Lab
- Zentrifuge, Galaxy 16 DH, VWR
- Labofuge 400, Heraeus Instruments
- Heizblock, Dri-Block DB 2A, Techne
- Ph-Meter Mikroprozessor, Wissenschaftl. Techn. Werkstätten
- Ultraschallbad, Transonic T 700, Elma
- Vakuumpumpe, Vakuumband GmbH u. Co.
- Absaugapparatur, Alltech
- HPLC Hitachi LaChrom Elite®, zur Verfügung gestellt vom Kaiser-Franz-Joseph-Spital
 - Hitachi L-2200 Autosampler
 - Hitachi L-2130 Pumpe
 - Hitachi L-2450 Diodenarray-Detektor
- HPLC Hitachi LaChrom®
 - Hitachi L-7200 Autosampler
 - Hitachi L-7100 Pumpe
 - Hitachi L-7400 UV/Vis-Detektor

Liste der verwendeten Reagenzien

- Destilliertes Wasser
- Methanol Baker Analysed HPLC Reagens
- Acetonitril Baker Analysed HPLC Reagens
- KH_2PO_4
- Precinorm® U, Universal Kontrollserum, Roche Diagnostics GmbH
- Aprepitant, Merck
- CYP3A4

Liste der Verbrauchsmaterialien

- Kartuschen, Oasis® HLB Extraction Cartridge
- Eppendorf-Gefäße 1,5 ml, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH
- Pipettenspitzen 1-100 µl, 100-1000 µl, 2-10 ml
- Microeinsätze 150 µl

Herstellen der Stammlösungen

Da im Rahmen dieser Diplomarbeit sowohl Proben von Patientenplasma analysiert wurden als auch in vivo Versuche mit einem Enzymsystem, mussten mehrere Stammlösungen hergestellt werden. Alle Lösungen wurden nur in kleinen Mengen hergestellt und konnten daher in Eppendorf-Gefäßen bereitet und aufbewahrt werden.

Die Konzentrationen der Stammlösungen, die im Kühlschrank bei ca. 8° C aufbewahrt wurden, sind im Laufe der Arbeit mehrmals kontrolliert worden und hatten konstante Werte behalten.

Eichgerade

Aprepitant als Reinsubstanz wurde unter zu Hilfeahme des Ultraschallbades in Methanol gelöst. Die Konzentration dieser Lösung war 109 µg/ml. Da die Eichgerade dazu dienen sollte den Gehalt an Aprepitant aus den Plasmaproben zu bestimmen war die erste vermessene Konzentration eine 1:10 Verdünnung der Stammlösung. Alle weiteren Werte wurden jeweils durch 1:1 Verdünnungsschritte aus der jeweils vorherigen Konzentration erhalten.

Um das Verhalten des Arzneistoffes in Plasma, und auch einen eventuellen Störeffekt bei der Vermessung desselben zu berücksichtigen wurde die gesamte Verdünnungsreihe mit Precinorm gemacht.

Aus jeder Konzentration wurde eine Probe von 800 µl genommen und analog zu den nachfolgenden Patientenproben festphasenextrahiert.

Da bei den Enzymversuchen das Methanol zur Inaktivierung des Enzyms führt wurde noch eine weitere Eichgerade erstellt, bei der Aprepitant im wässrigen Milieu vermessen wurde. Aufgrund der schlechten Löslichkeit der Substanz musste hier ein Kompromiss eingegangen

werden: die frisch aufgeschüttelte Flüssigkeit wurde direkt weiterverarbeitet. Um eine möglichst gut Dispergierung zu erhalten enthielt die Stammlösung 2% DMSO.

Die Konzentration der Stammlösung war 30 µg/ml. Hiervon wurden für die Eichgerade 2, 5, 10, 20, 40, und 60 µl entnommen und mit Pufferlösung jeweils auf 500 µl aufgefüllt. Die weitere Vorgehensweise entsprach der der Enzymproben.

Plasmaproben

Das Plasma der Patienten war in Eppendorf-Gefäßen und wurde bei -80°C aufbewahrt. Der Zeitpunkt der Blutabnahme war auf jedem Röhrchen markiert war allerdings nicht bei allen Patienten gleich. Bei allen Patienten handelte es sich um Personen die eine hochemetogene Zytostatikatherapie erhielten.

Bis auf einige Ausnahmen waren mir weder das Alter der Patienten, noch das Zytostatikum oder etwaige Begleitmedikationen bekannt. Weiters kann ich keinerlei Aussagen über die Plasmagewinnung und die Probenaufbereitung machen.

Vor der Analyse mussten das Plasma aufgetaut werden. Um die Belastung für die Proben möglichst gering zu halten geschah das bei Raumtemperatur. Danach wurden alle Proben bei 13000 U/min 3 Minuten zentrifugiert um Schwebstoffe zu entfernen.

Festphasenextraktion

Um die Plasmaproteine aus den Proben zu entfernen wurde diese Methode der Probenvorbereitung angewendet. Dazu wurden Kartuschen der Firma Oasis verwendet. Vor dem Aufbringen der Proben muss das Sorbens mit 1 ml Methanol aktiviert werden, den man anschließend mit 1 ml Wasser wieder auswäscht.

Dann wurden die Proben aufgetragen. Eine Menge zwischen 0,5 und 1 ml kann verwendet werden, wobei es sich herausstellte, dass es beim injizieren in die HPLC-Anlage durch den Autosampler zu vermehrter Fehleranfälligkeit kommt wenn das Volumen zu gering ist. Deshalb wurde bei allen Proben bei denen ausreichend Plasma vorhanden war immer mit 0,9 ml gearbeitet.

Nach dem Durchlaufen der Proben wurde mit einer 5%igen Methanol/Wasser Mischung nachgewaschen. Es ist darauf zu achten das hierfür und auch für den nachfolgenden Extraktionsschritt das gleiche Volumen aufgebracht wird wie Probe.

Mit reinem Methanol wird Aprepitant dann aus dem Sorbens und mittels Zentrifugation (3 min, 1000 U/min) aus der Kartusche gelöst.

HPLC

Zur Analyse der Patientenplasma-proben wurde eine HPLC-Anlage vom Typ Hitachi LaChrom Elite verwendet vom Kaiser-Franz-Josef-Spital zur Verfügung gestellt.

Es wurde mit einer binären Gradienten-Technik chromatographiert:

Die Säule war vom Typ Nucleosil 250 x 4,6 mm ID 5 µm.

Eluent A war eine Methanol-Puffer-Mischung die 75% Methanol (V/V) enthielt. Der Puffer war eine Lösung von 1,77 g Kaliumdihydrogenphosphat in einem Liter destilliertem Wasser.

Eluent B bestand aus 95% Methanol (V/V) und 5% reinem Wasser (V/V). Beide Eluenten wurden eine halbe Stunde im Ultraschallbad entgast.

Die gesamte Laufzeit der Chromatographie beträgt eine Stunde. Von Zeitpunkt 0 bis 25 Minuten wurde mit Laufmittel A eluiert, danach wurde auf Laufmittel B umgeschaltet so dass der Gradient entstand. Nach 45 Minuten wurde wieder auf Eluent A gewechselt, was aber nur den Zweck hatte die Säule für die nächste Chromatographie vor zu bereiten da Aprepitant eine Retentionszeit von circa 9 Minuten hat.

Der Druck betrug zwischen 80 und 115 bar.

Der Fluss war bei Eluent A 0,5 und Bei Eluent B 0,75 ml/min.

Das Injektionsvolumen des Autosamplers war auf 50 µl eingestellt.

Während der gesamten Laufzeit ist die Temperatur der Säule auf 36° C Grad gehalten worden.

Detektiert wurde mit einem Dioden-Array-Detektor bei 220 nm.

Enzymversuche

Es wurden Enzymversuche gemacht die den Abbau von Aprepitant durch CYP3A4 charakterisieren sollten.

Verwendet wurde für diese Untersuchung ein humanes Cytochrom P 450 Isoenzym des Subtyps 3A4. 0,5 nmol dieser Enzym-lösung entsprechen 27,5 units.

Versuchsansatz

Es wurden sechs Versuchsansätze gemacht bei denen die Menge an Aprepitant variiert wurde. Die Menge an Enzym und auch alle anderen Parameter blieben konstant.

Jeder Reaktionsansatz bestand insgesamt aus 500 µl wovon immer 30 µl Enzym waren. Die Aprepitant-Stammlösung hatte eine Konzentration von 30 mg/ml und enthielt 2% DMSO das zur besseren Dispergierung des Aprepitants im Wasser zugesetzt wurde. Von dieser Stammlösung wurden 2, 5, 10, 20, 40 und 60 µl zu den 30 µl Enzym pipettiert und mit Pufferlösung auf 500 µl aufgefüllt. Bei der Pufferlösung handelte es sich um eine K₂HPO₄ Lösung mit einer Konzentration von 17,4 g/100ml.

Während der gesamten Laufzeit des Versuchs wurden die Versuchsansätze im Heizblock bei 37° C Grad inkubiert.

Nach 0, 1, 2, 4, 6 und 24 Stunden wurden Proben gezogen, bei denen die Reaktion mittels Proteinfällung zum Stillstand gebracht wurde, und mittels HPLC analysiert.

Da sich bei der ersten Versuchsreihe bei der Auswertung der Chromatogramme einige Unklarheiten ergaben wurden um mögliche Fehlerquellen, zum Beispiel durch langes Stehen der einzelnen Proben im Autosampler, aus zu schalten bei der zweiten Versuchsreihe alle Proben nach der Proteinfällung bei -80° C grad tief gefroren um sie nach Auftauen bei Raumtemperatur in Serie chromatographieren zu können. Der Niederschlag wurde in diesem Fall erst nach dem Auftauen ab zentrifugiert.

Proteinfällung

Um die Enzymreaktion zu unterbrechen und gleichzeitig eine geeignete Probenvorbereitung zu erzielen wurde die Proteinfällung als Methode gewählt.

Dazu wurden 100 µl ein Gemisch von Wasser mit Acetonitril im Verhältnis 2:1 vorgelegt in die 50 µl der jeweiligen Probe pipettiert wurden.

Nach gründlichem Durchmischen am Vortex wurde zentrifugiert und der Überstand zur Analyse gebracht. Da es sich um relativ kleine Volumina handelte die in den Autosamplergefäßen von der Injektionsnadel nicht erfasst werden wurden die Proben in Microeinsätzen in den Autosampler gestellt.

HPLC

Die Proben des Enzymversuch wurden auf einer anderer HPLC-Anlage ausgewichen analysiert: Verwendet wurde der Typ Hitachi-LaChrom. Sie verfügte ebenfalls über einen Autosampler. Das Injektionsvolumen betrug 50 µl. Das Gradientenverfahren wurde beibehalten, ebenso die Eluenten und die Laufzeit. Lediglich bei der Detektion musste auf ein UV-Vis- Verfahren umgestiegen werden. Vermessen wurde bei 220 nm.

Auswertung

Für die Statistische Auswertung wurden Microsoft Excel 2003 und Prism, GraphPad Software Version 4.02 verwendet.

Alle aus den Chromatogrammen erhaltenen Peakflächen wurden der besseren Übersicht halber durch einen Faktor 10.000 dividiert.

Außer den im Rahmen dieser Diplomarbeit gewonnenen Daten wurde für die Patientendaten auch eine Berechnung erstellt die die Ergebnisse vorangegangener Diplomarbeiten miteinbezieht.

Für die pharmakokinetischen Berechnungen wurde WinNonlin 3.1 verwendet.

Ergebnisse und Diskussion

In-Vivo-Untersuchungen

Eichgerade

Zur Ermittlung des Aprepitant-Gehalts in den Plasmaproben wurde eine Eichgerade erstellt. Ausgehend von einer Stammlösung die Aprepitant in Precinorm in einer Konzentration von 109µg/ml enthielt, wurde eine Verdünnungsreihe gemacht. Der erste Schritt war eine 1:10 Verdünnung, alle weiterer 1:1 Verdünnungen. Als Verdünnungsmittel wurde bei allen Schritten Precinorm verwendet.

Vor der Analyse mittels HPLC wurden die Proben festphasenextrahiert.

In untenstehender Tabelle sind der Gehalt an Aprepitant der jeweils vermessenen Proben und die entsprechenden Peakflächen zusammengefasst.

	Konzentration Aprepitant (µg/ml)	Peakfläche
C1	10,9	3416284
C2	5,45	1843857
C3	2,725	930045
C4	1,362	681594
C5	0,681	604035
C6	0,341	454354

Tabelle 2: Eichgerade in Precinorm

Mit Hilfe des Programms Prisma wurde eine Eichgerade erstellt, deren Steigung 28,12 betrug. Dieser Wert wurde verwendet um aus den Peakflächen der Chromatogramme der Patientenproben die Aprepitant-Konzentration nach der Formel $Y=kX+d$ zu errechnen.

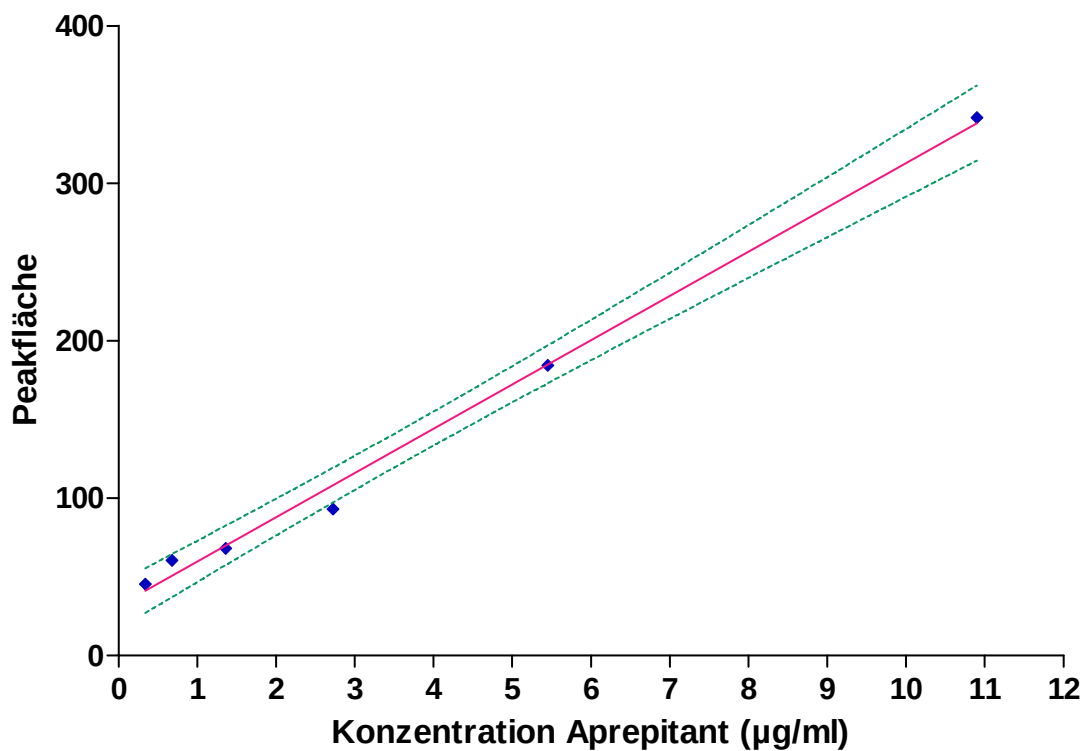


Abbildung 3: Eichgerade in Precinorm

Patientenproben

Die Patienten wurden mit Grossbuchstaben von A bis L bezeichnet, wobei die Daten der Patienten H bis K unvollständig sind da es sich hierbei um Proben handelt die teilweise schon verbraucht waren. Aus diesem Grund ist eine Berechnung mit und eine ohne diesen Ergebnissen erstellt worden.

Patient A

Die Blutabnahme war am 16. März 2007. Die erste Probe ist zum Zeitpunkt null genommen worden.

Zeitpunkt (h)	Konzentration Aprepitant ($\mu\text{g/ml}$)
0	0
2,5	0,808
6	0,688

Tabelle 3: Patient A

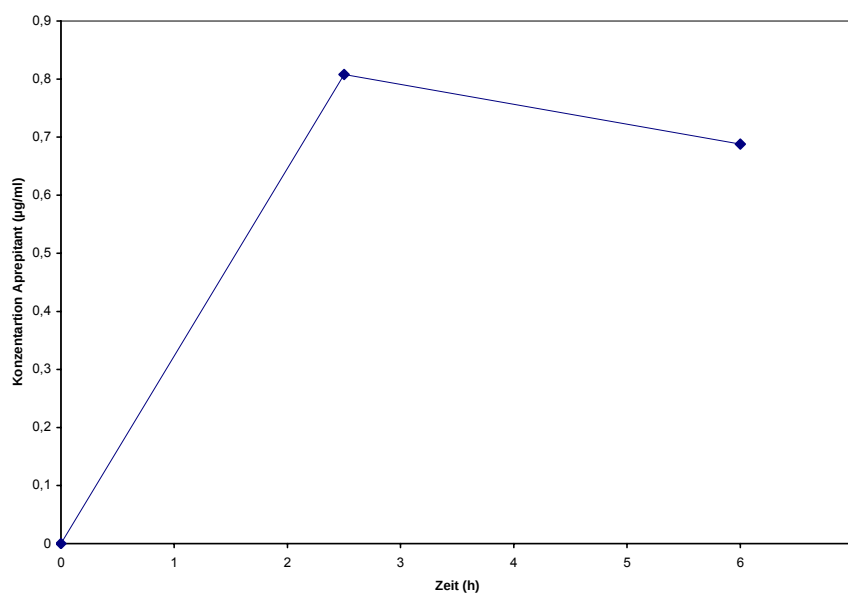


Abbildung 4: Patient A

Patient B

Dieser Patient war zum Zeitpunkt der Probennahme (13. Dezember 2006) 60 Jahre alt. Es standen zwei Proben zur Verfügung.

Zeitpunkt	Konzentration Aprepitant ($\mu\text{g/ml}$)
0	0
1	0,692

Tabelle 4: Patient B

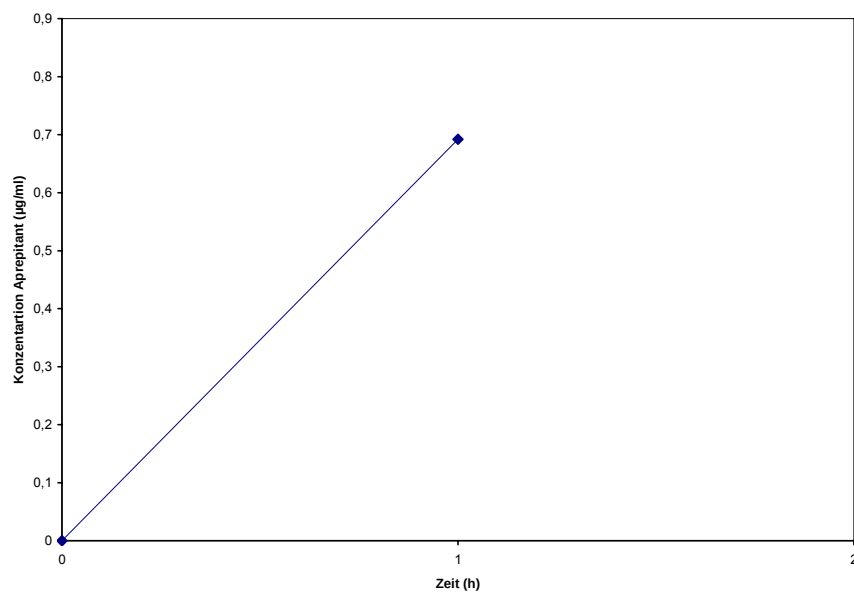


Abbildung 5: Patient B

Patient C

Das Abnahmedatum war der 23. Jänner 2007.

Zeitpunkt	Konzentration Aprepitant ($\mu\text{g/ml}$)
0	0,014
3	0,078
4	0,471

Tabelle 5: Patient C

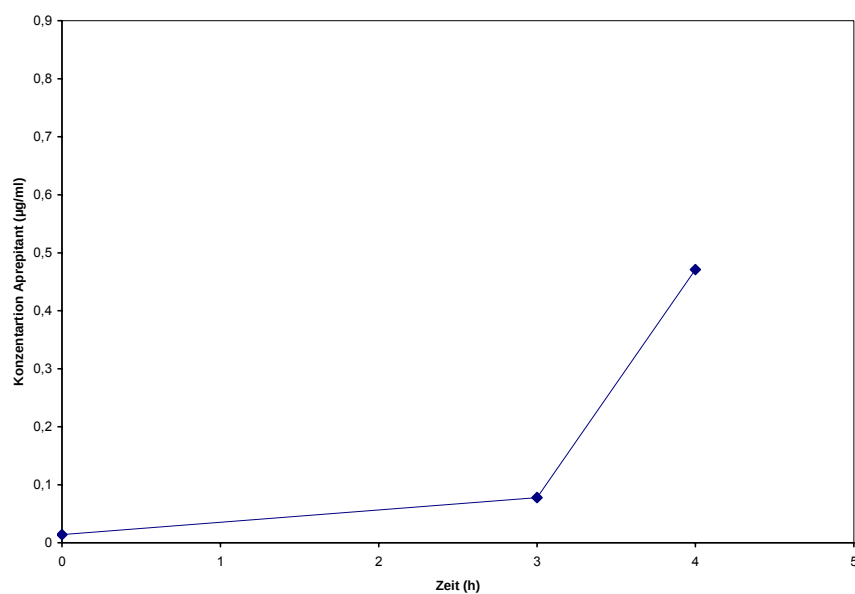


Abbildung 6: Patient C

Patient D

Bei diesem Patienten standen 5 Plasmaproben zu Verfügung, was die umfangreichste Menge an Werten darstellt. Der erste Abnahmetag war der 27. März 2007, es wurde auch ein 21-stunden-Wert aufgenommen.

Zeitpunkt	Konzentration Aprepitant (µg/ml)
0	0,33
1,5	< LOQ
4	0,006
5	0,437
21	< LOQ

Tabelle 6: Patient D

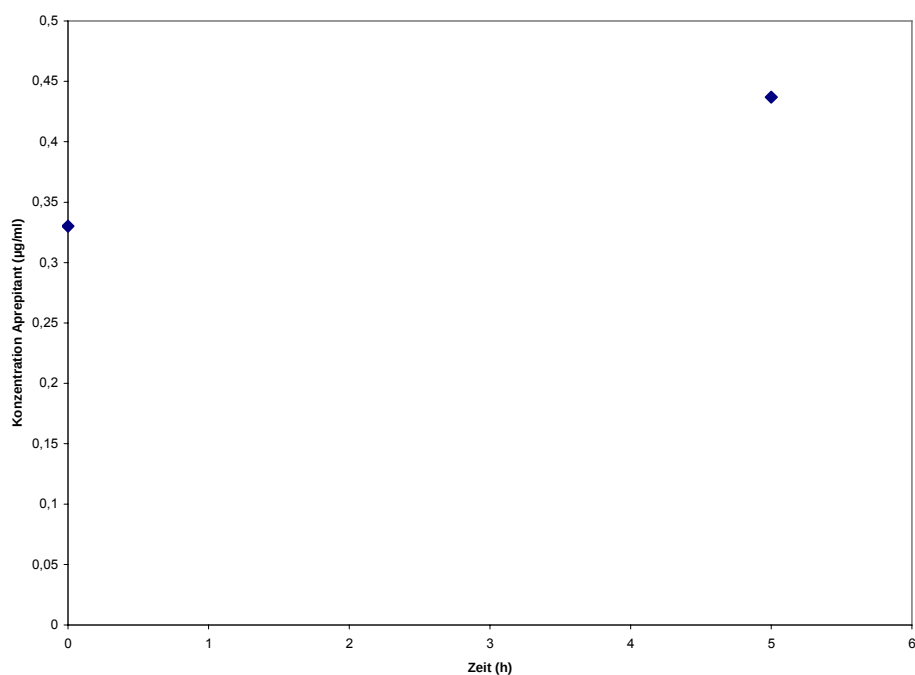


Abbildung 7: Patient D

Patient E

Die Blutabnahme war am 1. März 2007. Der Patient war zu diesem Zeitpunkt 55 Jahre alt.

Zeitpunkt	Konzentration Aprepitant ($\mu\text{g/ml}$)
0	0,014
2	0,591
3	0,354

Tabelle 7: Patient E

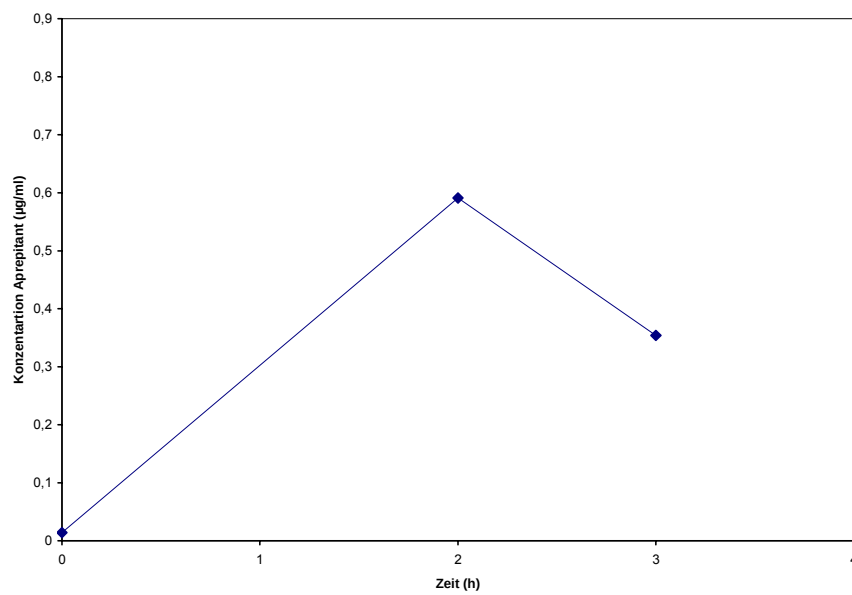


Abbildung 8: Patient E

Patient F

Ähnlich wie bei Patient D ist auch hier ein Langzeitwert verfügbar. Die erste Probe stammt vom 15. Mai 2007

Zeitpunkt	Konzentration Aprepitant (µg/ml)
0	0
2,5	< LOQ
6	0,354
24	0,029

Tabelle 8: Patient F

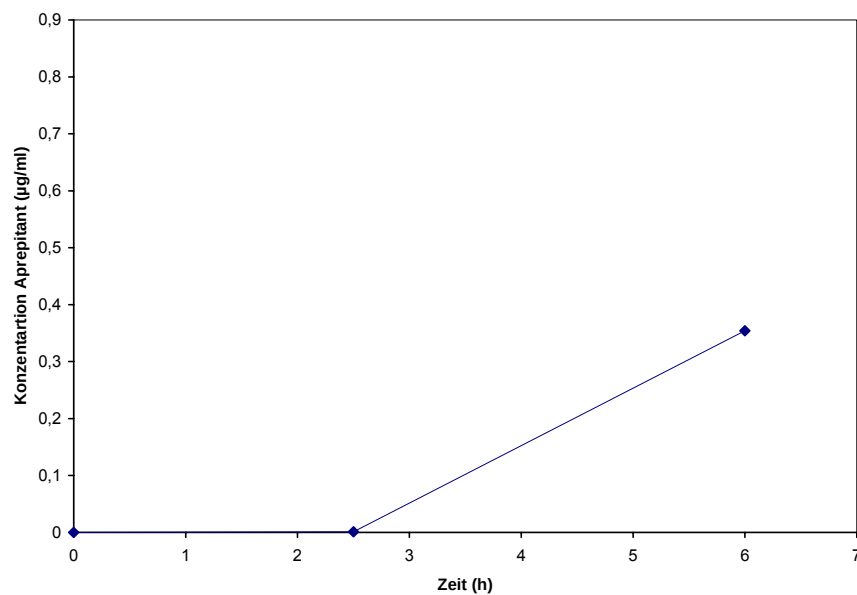


Abbildung 9: Patient F

Patient G

Es stehen 4 Proben zur Verfügung. Abnahmetag war der 19. Juli 2007.

Zeitpunkt	Konzentration Aprepitant (µg/ml)
0	0
4	0,454
5	0,488
6	0,84

Tabelle 9: Patient G

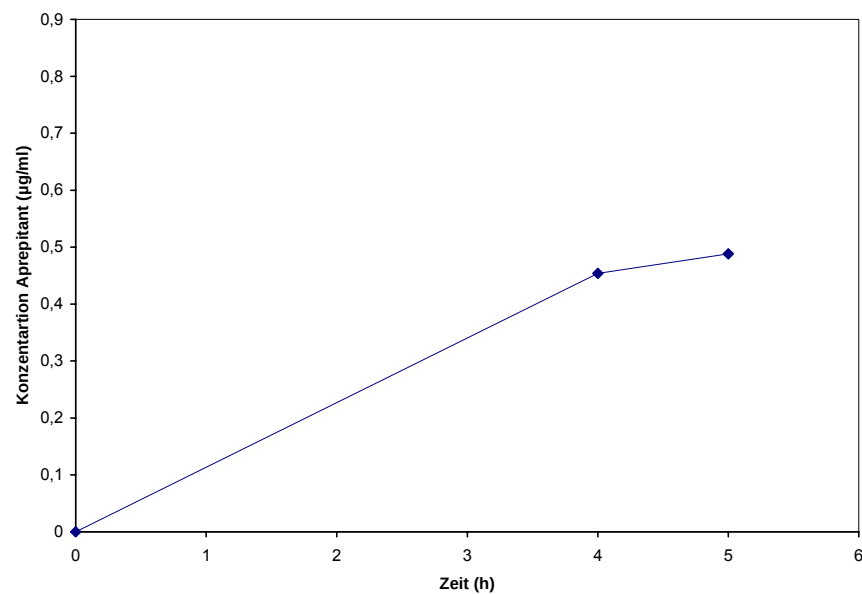


Abbildung 10: Patient G

Patient H

Die Blutproben sind am 10. und am 11. Oktober 2006 genommen worden. Der Patient war zu diesem Zeitpunkt 52 Jahre alt.

Zeitpunkt	Konzentration Aprepitant ($\mu\text{g/ml}$)
0	0
2	0,052
4	0,224
24	0,052

Tabelle 10: Patient H

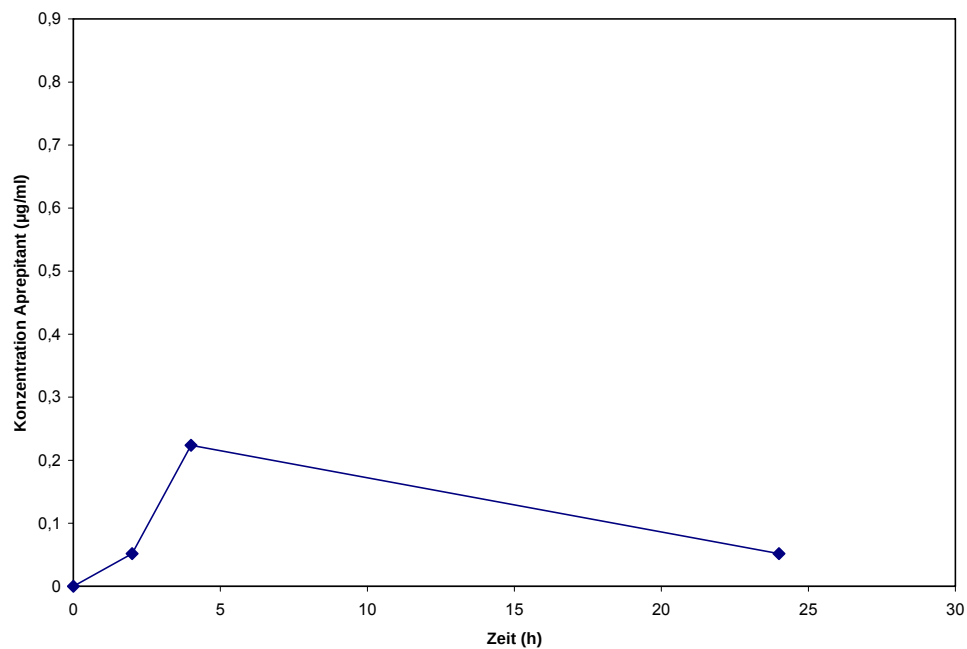


Abbildung 11: Patient H

Patient I

Es wurden fünf Proben am 4. September 2006 von diesem Patienten genommen. Zur Analyse konnten allerdings nur die Probe von Zeitpunkt 0 und die von $t = 3,5$ Stunden gebracht werden da von Zeitpunkt 1,5 und 2,5 Stunden nicht mehr genügend Probenmaterial zur Verfügung stand.

Zeitpunkt	Konzentration Aprepitant ($\mu\text{g/ml}$)
0	0,021
3,5	0,563

Tabelle 11: Patient I

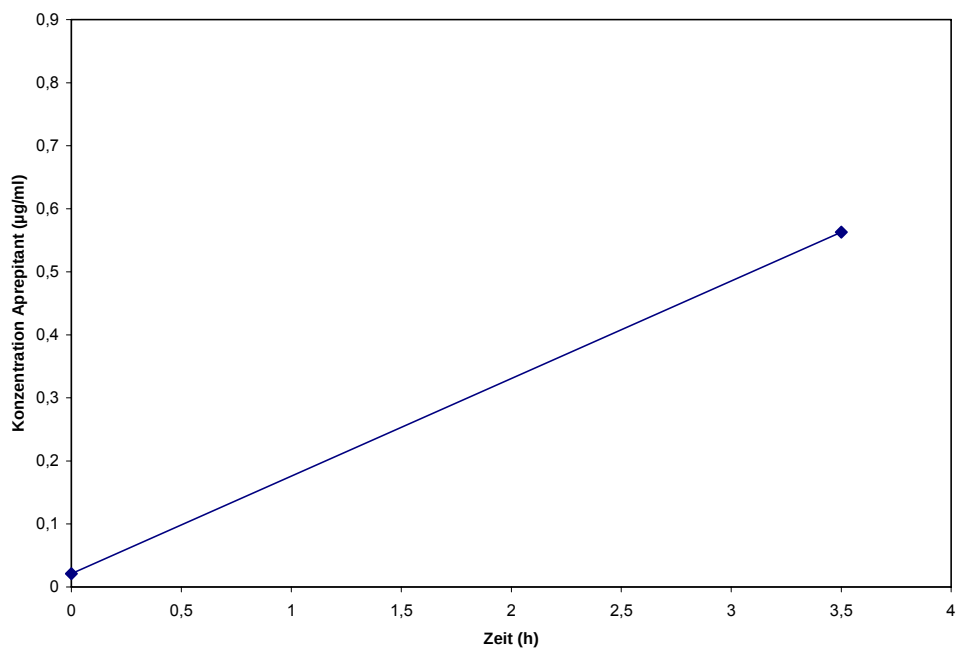


Abbildung 12: Patient H

Patient J

Dieser Patient ist ident mit Patient H. Die Probenabnahme erfolgte während eines anderen Chemotherapiezyklus am 29. August 2006

Zeitpunkt	Konzentration Aprepitant ($\mu\text{g/ml}$)
0	0,065
2	0,714
5	0,101

Tabelle 12: Patient J

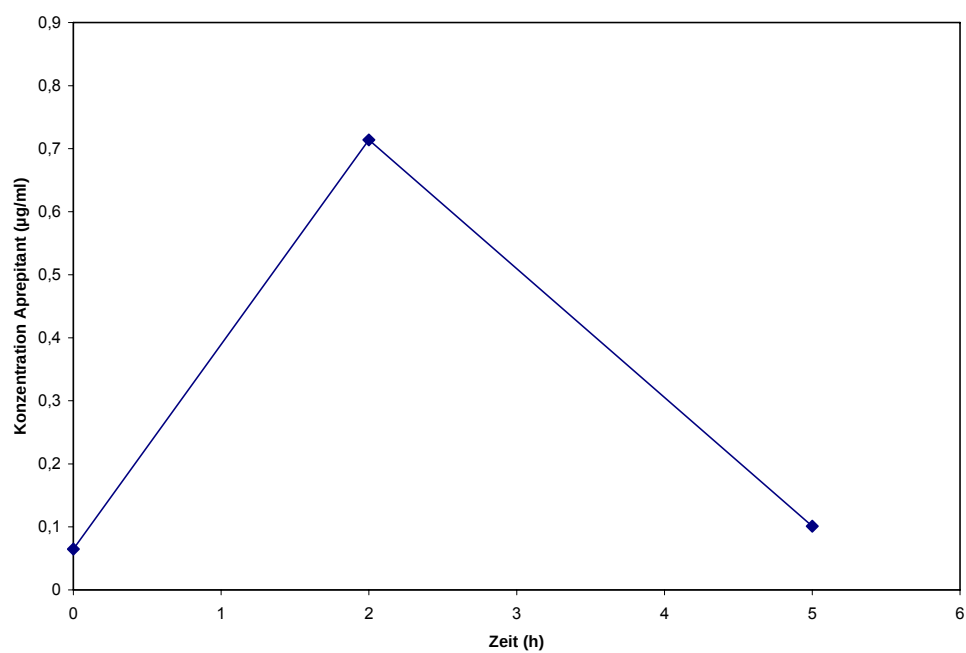


Abbildung 13: Patient J

Patient K

Die Blutabnahme war am 13. Juni 2006. Es standen 3 Werte zur Bestimmung zur Verfügung.

Zeitpunkt	Konzentration Aprepitant ($\mu\text{g/ml}$)
0	0
3	0,1
5	0,336

Tabelle 13: Patient K

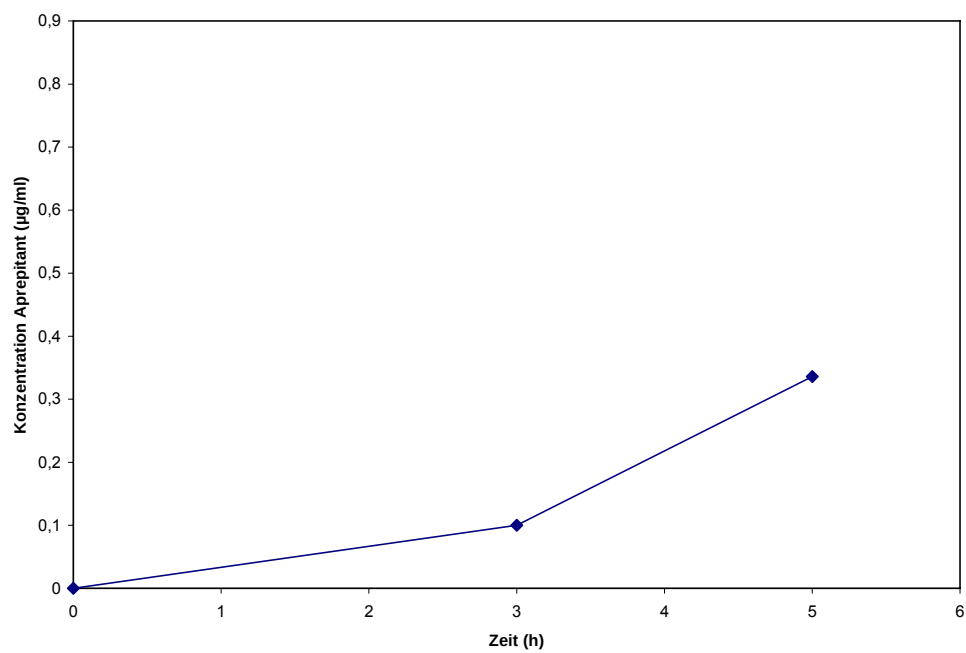


Abbildung 14: Patient K

In Abbildung 15 sind die Plasmakonzentrationen an Aprepitant von den Patienten A bis G zusammengefasst. Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient werden in Tabelle 14 gezeigt.

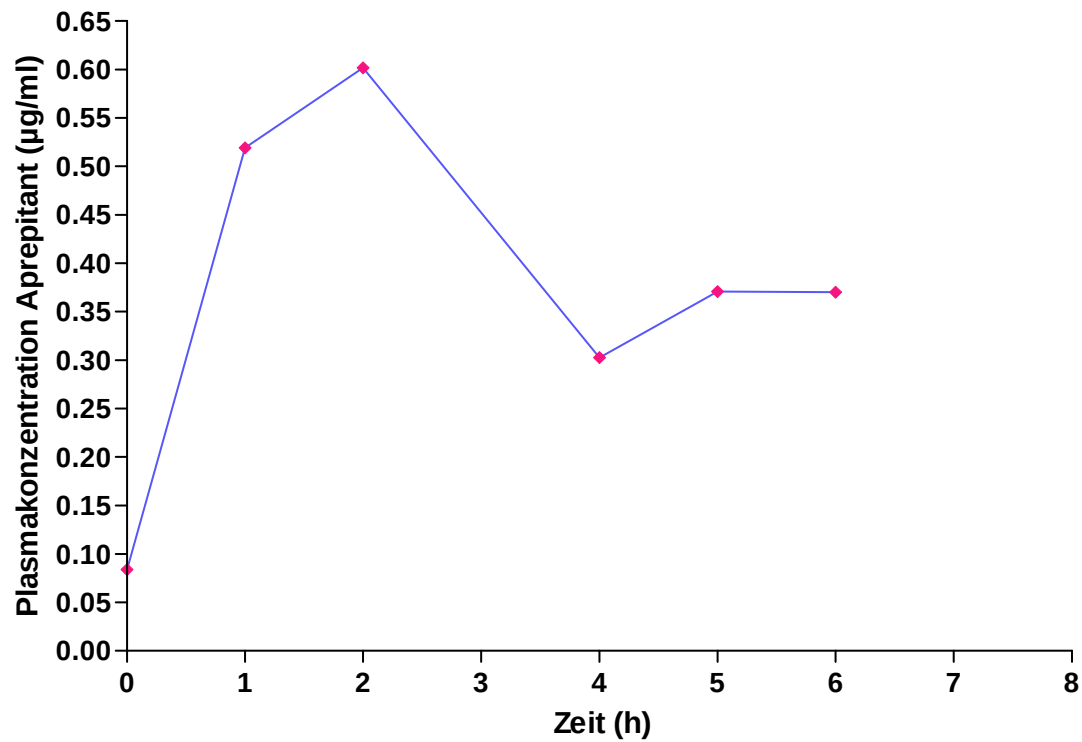


Abbildung 15: Patienten A bis G

Zeitpunkt (h)	0	1	2	3	4	5	6	24
Mittelwert (µg/ml)	0,084	0,519	0,601	0,260	0,303	0,371	0,370	0,020
Standardabweichung	0,123	0,356	0,352	0,158	0,217	0,240	0,353	0,008
Variationskoeffizient (%)	146,96	68,62	58,47	60,68	71,69	64,64	95,50	43,24

Tabelle 14: Patienten A bis G

Eine Zusammenfassung der Plasmakurven von den Patienten A bis L ist in Abbildung 16 dargestellt. Tabelle 15 zeigt Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient dieser Daten.

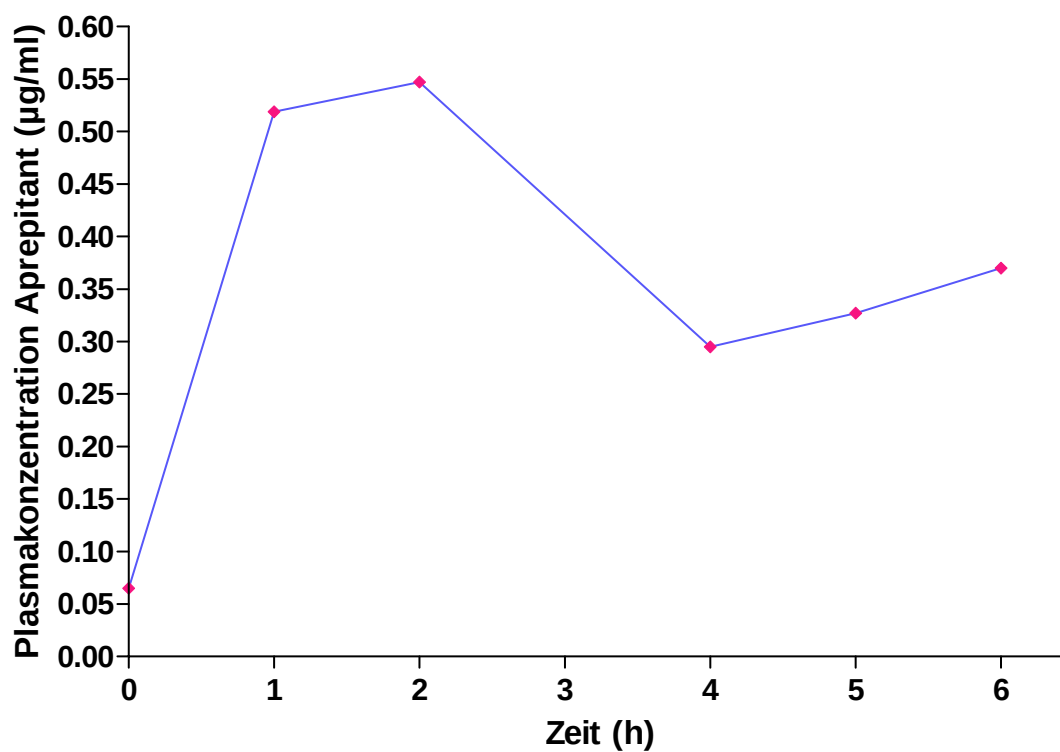


Abbildung 16: Patienten A bis K

Zeitpunkt (h)	0	1	2	3	4	5	6	24
Mittelwert (µg/ml)	0,065	0,519	0,547	0,289	0,295	0,327	0,370	0,028
Standardabweichung	0,106	0,356	0,360	0,202	0,206	0,220	0,353	0,018
Variationskoeffizient (%)	164,07	68,62	65,90	69,97	69,91	67,24	95,50	63,40

Tabelle 15: Patienten A bis K

Es wurde eine zusammenfassende Berechnung erstellt die neben den Daten der Patienten A bis L auch die Aprepitant-Plasmaspiegel von Proben die im Rahmen früherer Diplomarbeiten ermittelt wurden berücksichtigt. Die graphische Darstellung ist in Abbildung 17 zu sehen. Der Mittelwert, die Standardabweichung und der Variationskoeffizienten aus dem gesamten Patientenkollektiv sind aus Tabelle 16 ersichtlich.

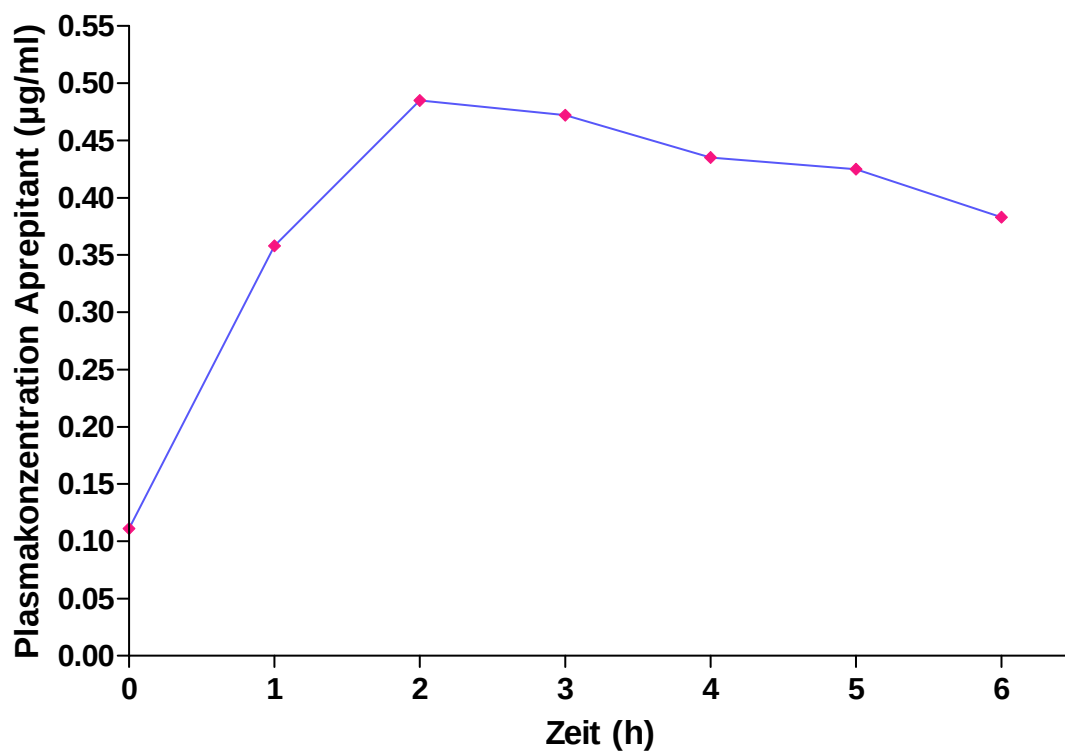
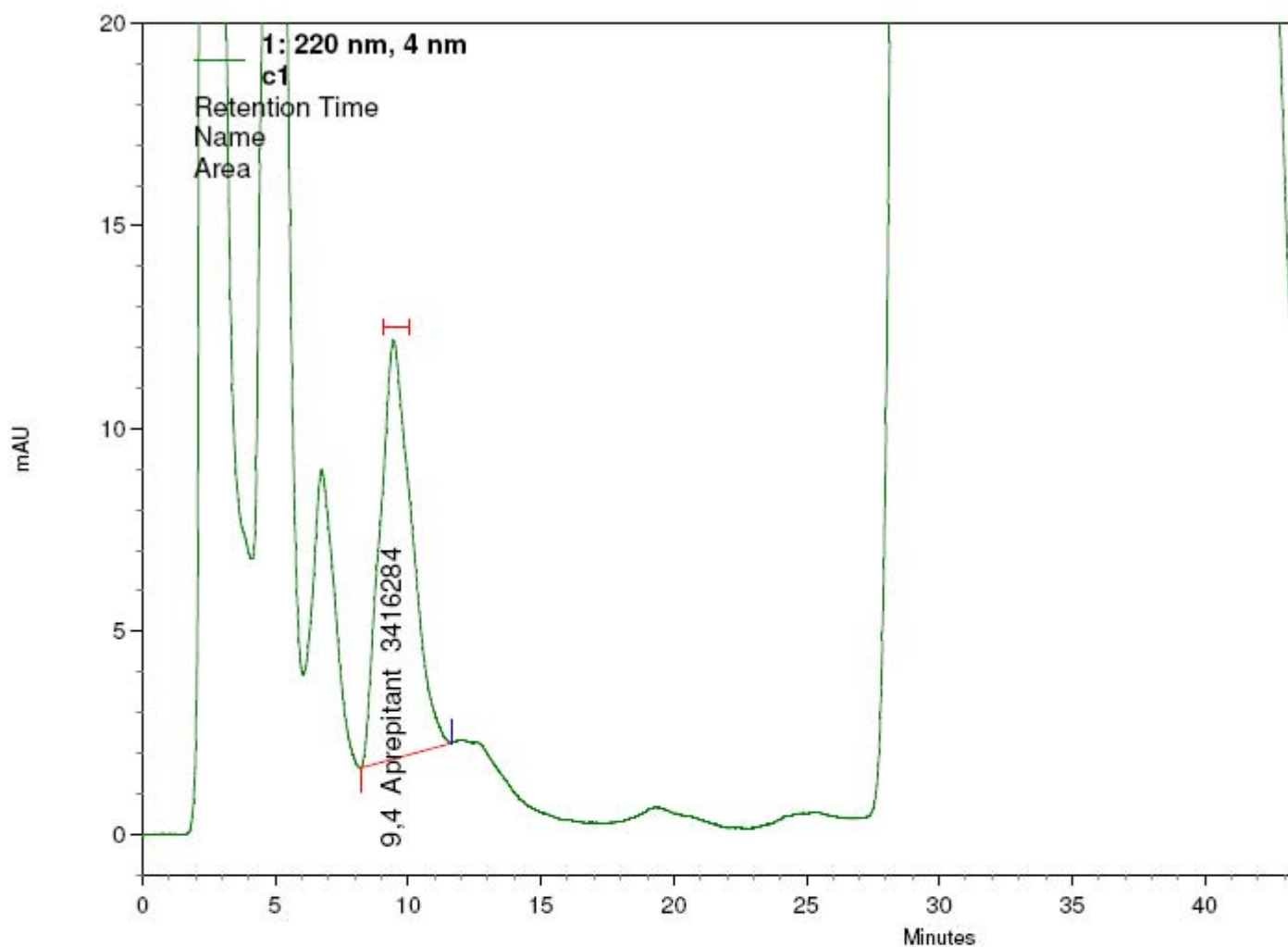


Abbildung 17: Gesamtkollektiv

Zeitpunkt (h)	0	1	2	3	4	5	6	24
Mittelwert (µg/ml)	0,111	0,358	0,485	0,472	0,435	0,425	0,383	0,028
Standardabweichung	0,137	0,271	0,320	0,324	0,295	0,263	0,333	0,018
Variationskoeffizient (%)	124,35	75,70	66,04	68,60	67,79	61,83	86,92	63,40

Tabelle 16: Gesamtkollektiv

Nachfolgend finden sich die Chromatogramme aus denen die Eichgerade erstellt wurde und drei Beispiele für Chromatogramme der Patientenproben.

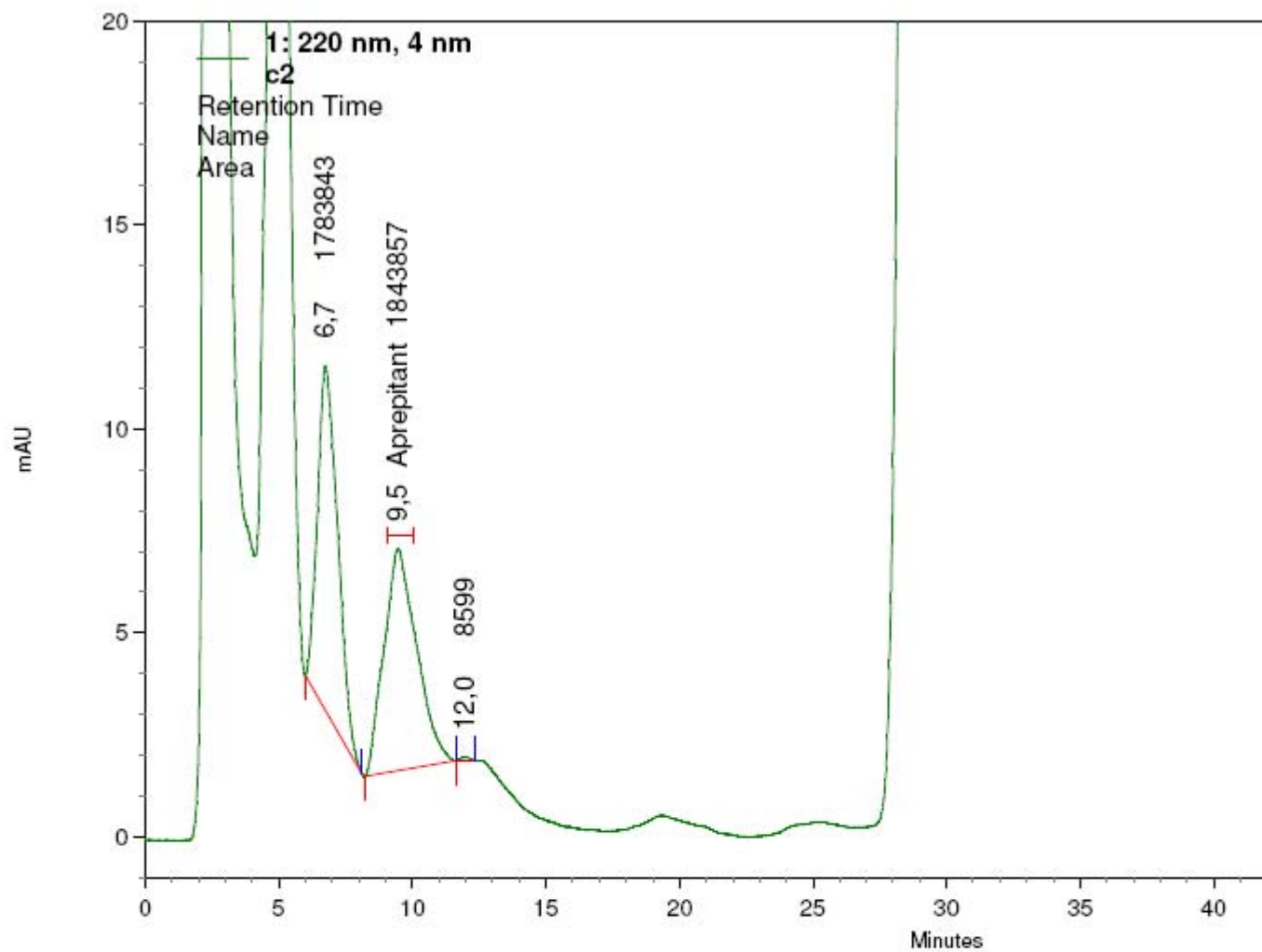


Channel A

1: 220 nm, 4 nm Results

Name	Time	Area	Height
Aprepitant	9,440	3416284	41285
Totals		3416284	41285

Abbildung 18: Chromatogramm C1

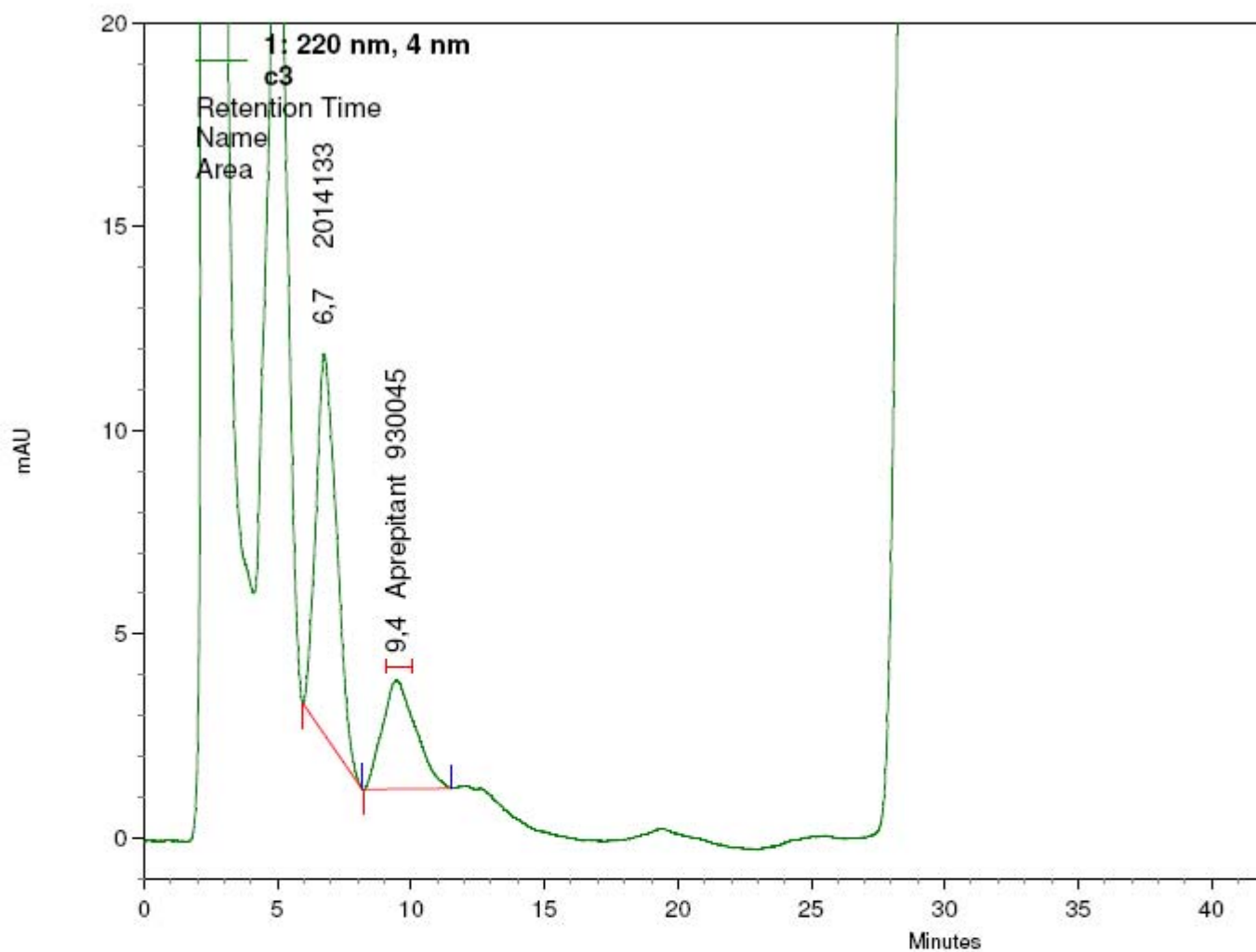


Channel A

1: 220 nm, 4 nm Results

Name	Time	Area	Height
Aprepitant	6,747	1783843	33803
	9,453	1843857	21760
	11,953	8599	333
Totals		3636299	55896

Abbildung 19: Chromatogramm C2

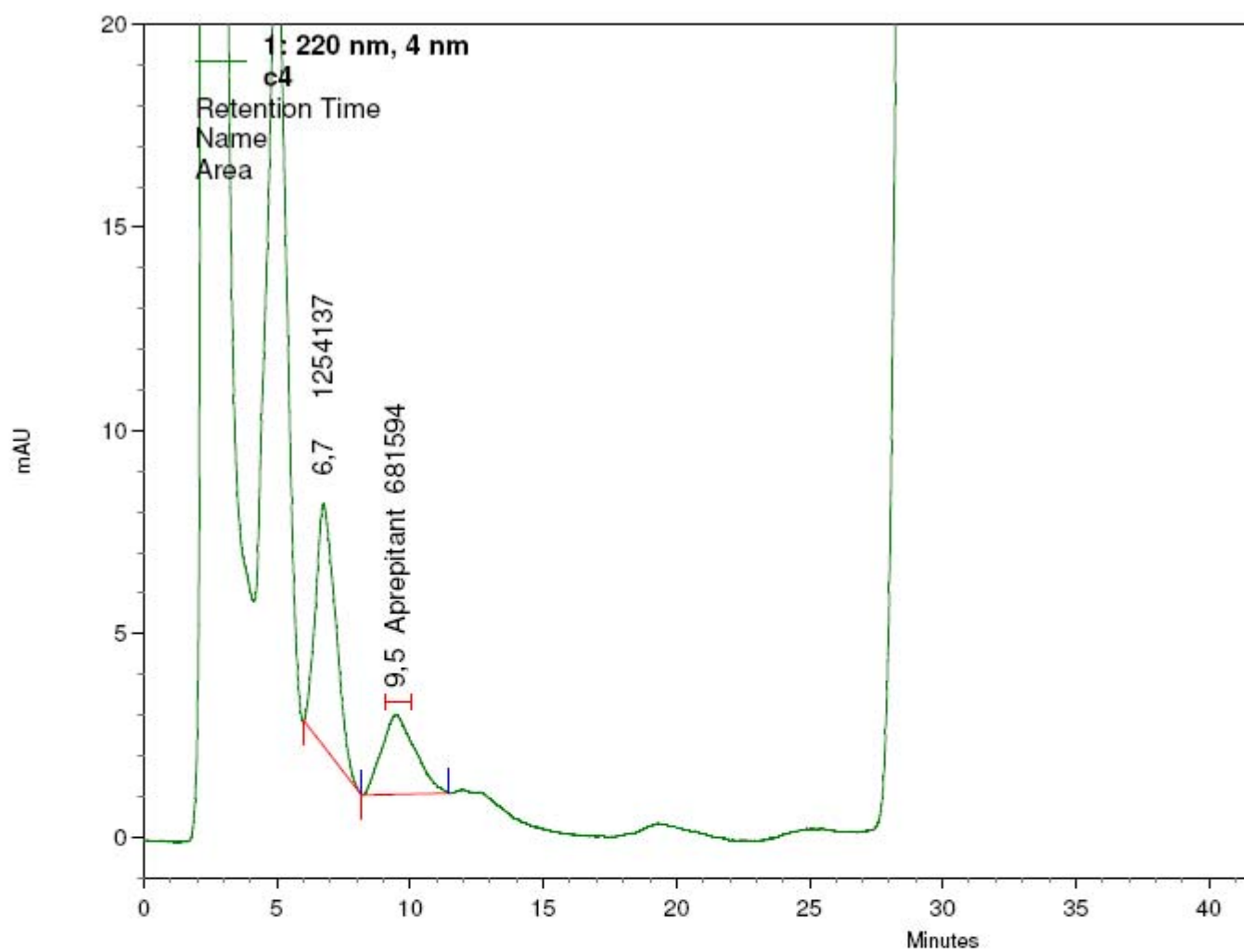


Channel A

1: 220 nm, 4 nm Results

Name	Time	Area	Height
	6,740	2014133	37323
Aprepitant	9,447	930045	10692
Totals		2944178	48015

Abbildung 20: Chromatogramm C3

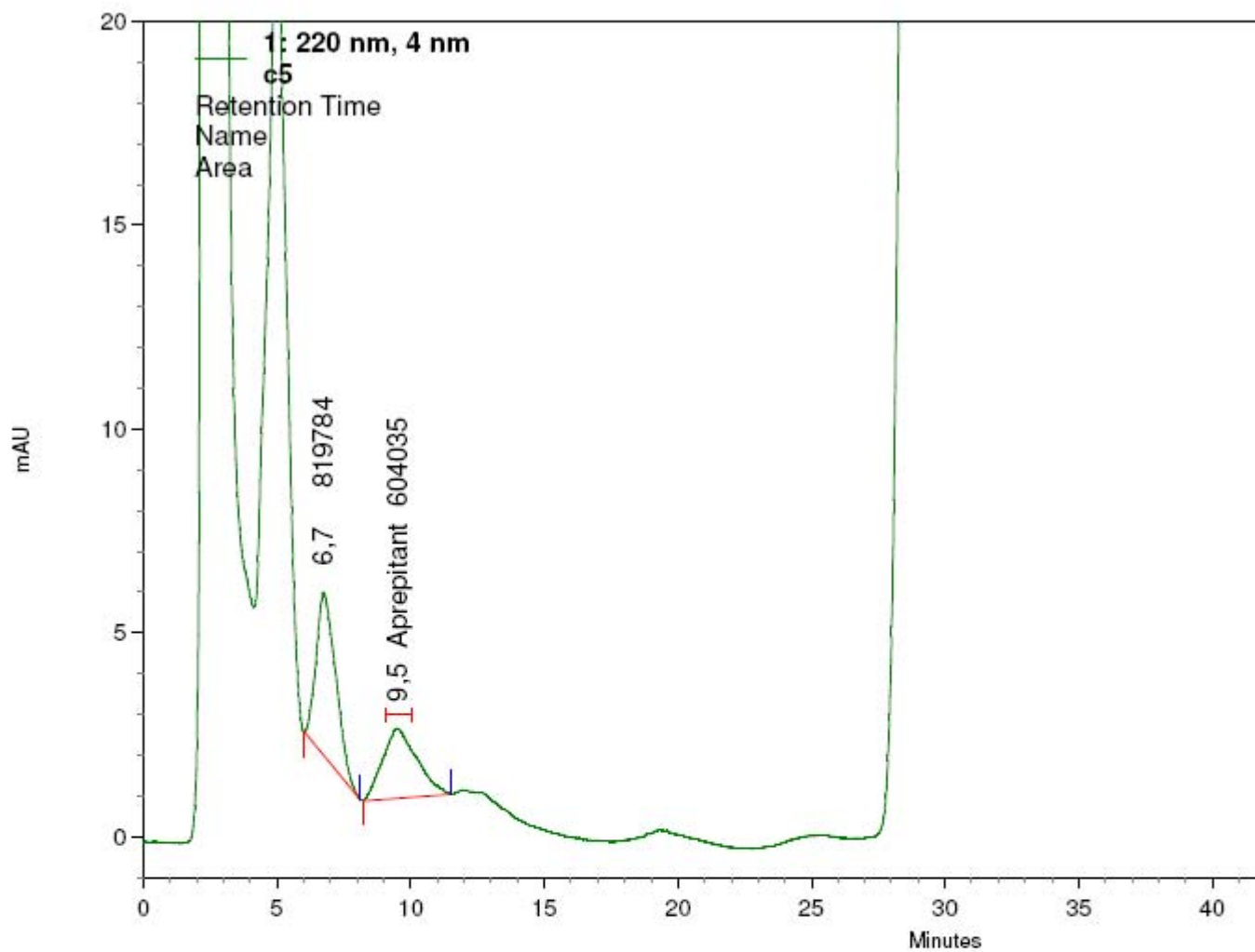


Channel A

1: 220 nm, 4 nm Results

Name	Time	Area	Height
	6,740	1254137	23810
Aprepitant	9,460	681594	7802
Totals		1935731	31612

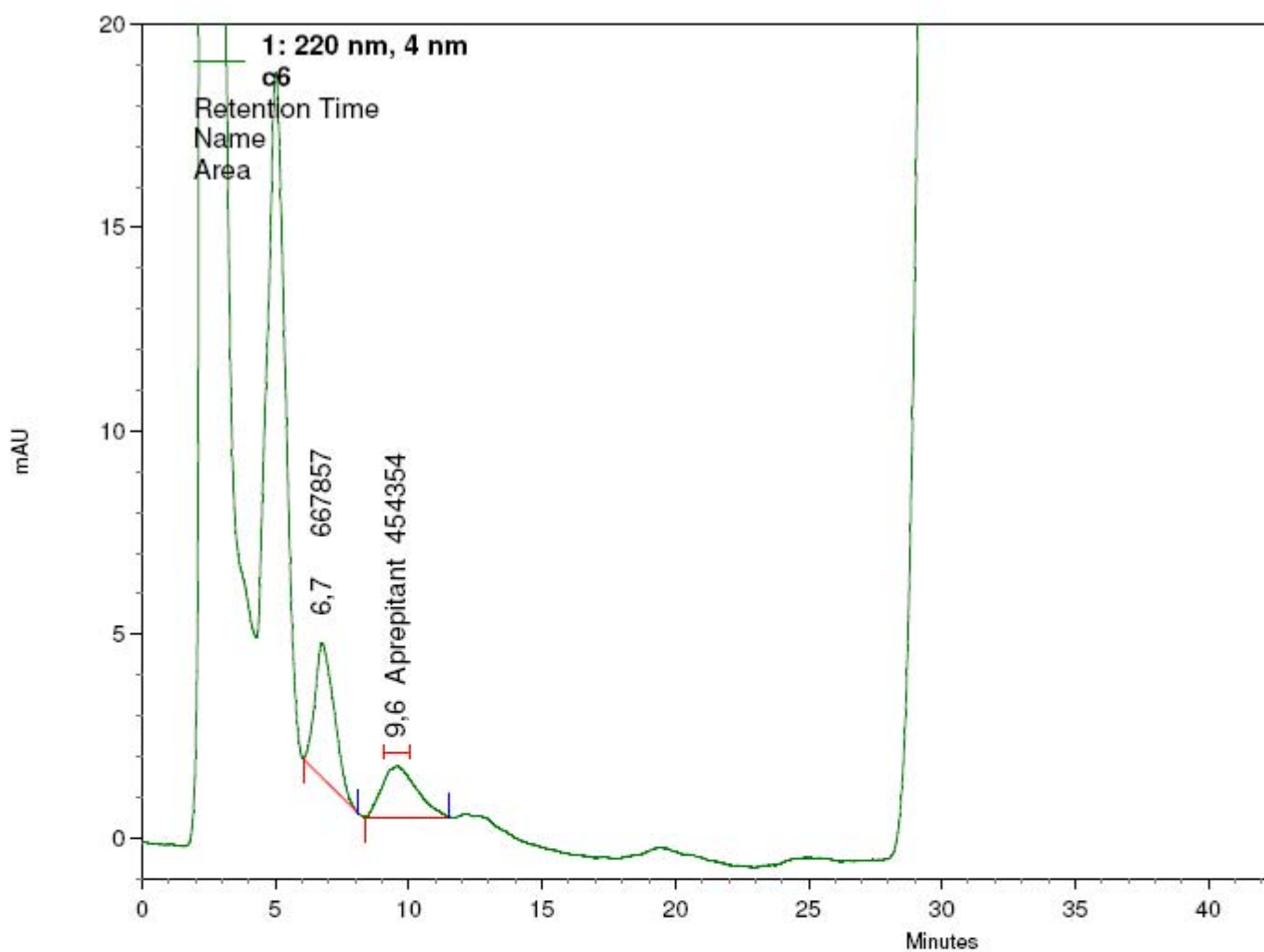
Abbildung 21: Chromatogramm C4



Channel A

1: 220 nm, 4 nm Results			
Name	Time	Area	Height
	6,740	819784	15960
Aprepitant	9,507	604035	6831
Totals		1423819	22791

Abbildung 22: Chromatogramm C5

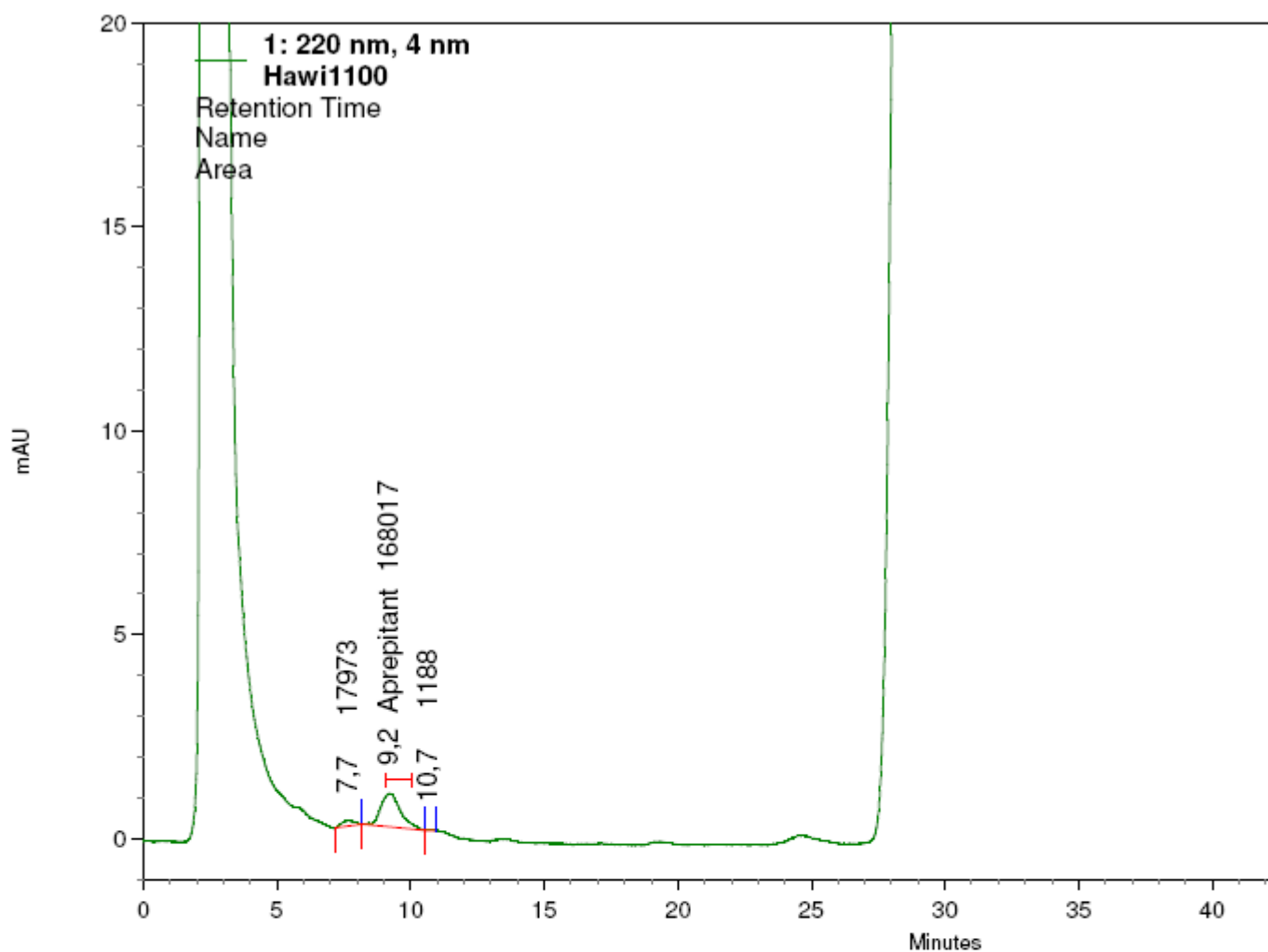


Channel A

1: 220 nm, 4 nm Results

Name	Time	Area	Height
	6,747	667857	13189
Aprepitant	9,567	454354	5024
Totals		1122211	18213

Abbildung 23: Chromatogramm C6

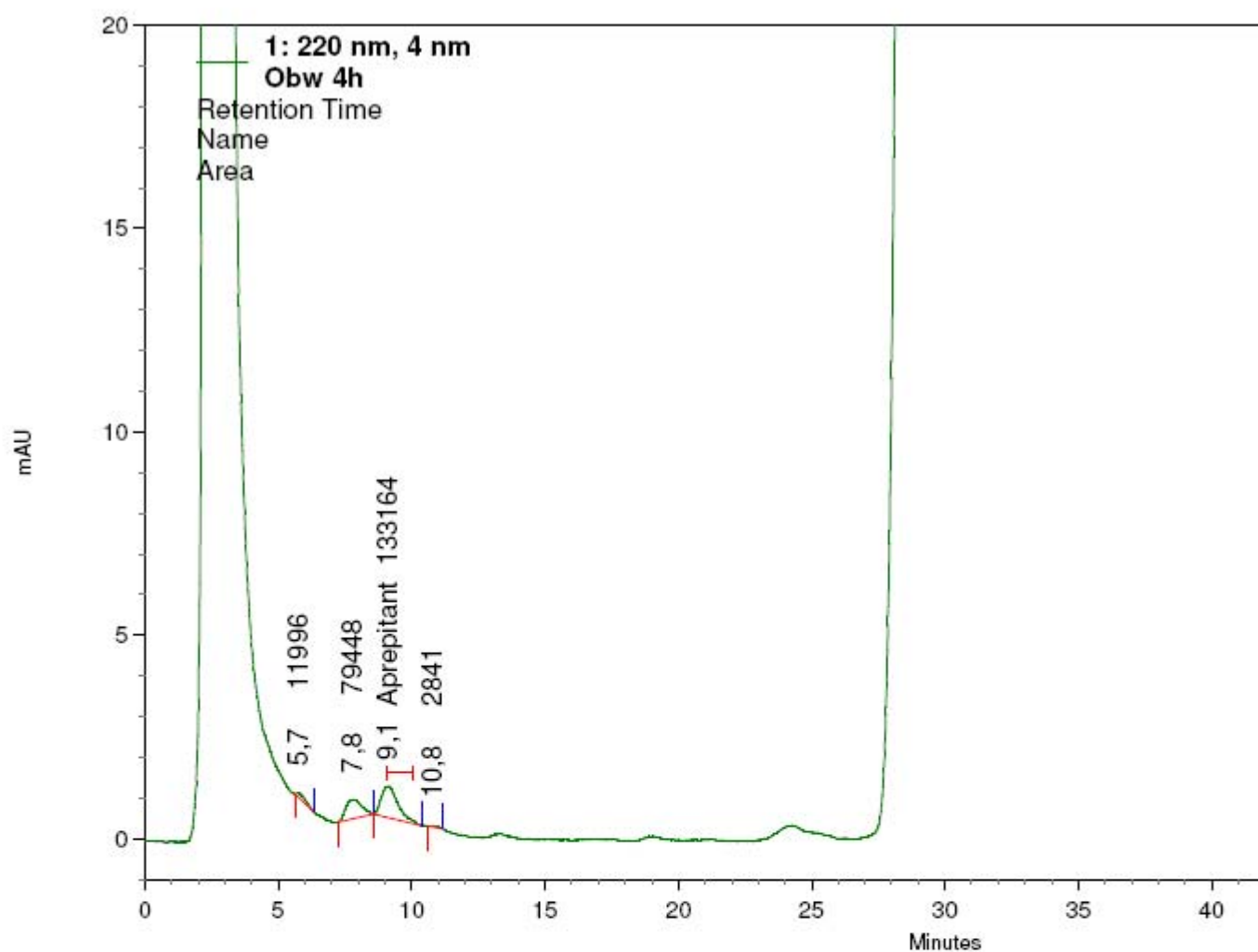


Channel A

1: 220 nm, 4 nm Results

Name	Time	Area	Height
	7,660	17973	529
Aprepitant	9,180	168017	3248
	10,653	1188	57
Totals		187178	3834

Abbildung 24: Chromatogramm Patientenprobe

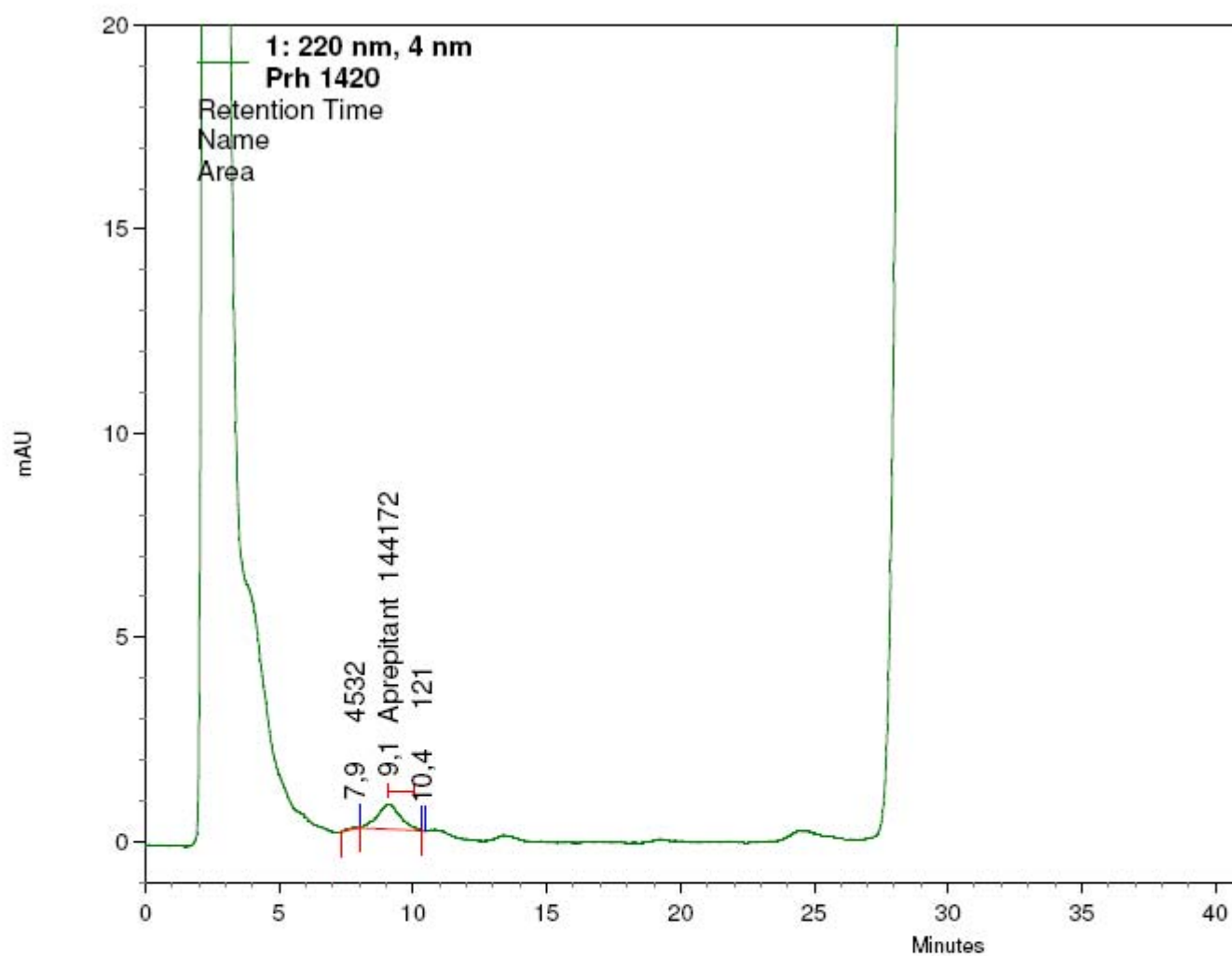


Channel A

1: 220 nm, 4 nm Results

Name	Time	Area	Height
Aprepitant	5,747	11996	362
	7,820	79448	1890
	9,100	133164	3051
	10,773	2841	156
Totals		227449	5459

Abbildung 25: Chromatogramm Patientenprobe



Channel A

1: 220 nm, 4 nm Results

Name	Time	Area	Height
Aprepitant	7,880	4532	131
	9,127	144172	2428
	10,367	121	30
Totals		148825	2589

Abbildung 26: Chromatogramm Patientenprobe

Biometrische Berechnungen

noncompartmental pharmacokinetics

WINNONLIN NONCOMPARTMENTAL ANALYSIS PROGRAM
Version 5.0.1 Build 200508151751
Core Version 25Apr2005

Settings

Model: Plasma Data, Extravascular Administration
Number of nonmissing observations: 8
Dose time: 0.00
Dose amount: 120.00
Calculation method: Linear Trapezoidal Rule for for Increasing Values,
Log Trapezoidal Rule for Decreasing Values
Weighting for lambda_z calculations: Uniform weighting
Lambda_z method: User-specified lambda_z range, Log regression
User's lambda_z bounds: 3.00, 24.00

Summary Table

Time hr	Conc. ug/mL	Pred. ug/mL	Residual ug/mL	AUC hr*ug/mL	AUMC hr*hr*ug/mL	Weight
0.0000	0.1110			0.0000	0.0000	
1.000	0.3580			0.2345	0.1790	
2.000	0.4850			0.6560	0.8430	
3.000 *	0.4720	0.5239	-0.05188	1.134	2.038	1.000
4.000 *	0.4350	0.4561	-0.02109	1.588	3.621	1.000
5.000 *	0.4250	0.3971	0.02793	2.018	5.555	1.000
6.000 *	0.3830	0.3457	0.03732	2.421	7.772	1.000
24.00 *	0.02800	0.02853	-0.0005332	4.864	35.77	1.000

*) Starred values were included in the estimation of Lambda_z.

Final Parameters

Rsqr		0.9952
Rsqr_adjusted		0.9936
Corr_XY		-0.9976
No_points_lambda_z		5
Lambda_z	1/hr	0.1386
Lambda_z_lower	hr	3.0000
Lambda_z_upper	hr	24.0000
HL_Lambda_z	hr	5.0018
Tlag	hr	0.0000
Tmax	hr	2.0000
Cmax	ug/mL	0.4850
Cmax_D	ug/mL/mg	0.0040
Tlast	hr	24.0000
Clast	ug/mL	0.0280
AUClast	hr*ug/mL	4.8642
AUCall	hr*ug/mL	4.8642
AUCINF_obs	hr*ug/mL	5.0662
AUCINF_D_obs	hr*ug/mL/mg	0.0422
AUC_%Extrap_obs	%	3.9882
Vz_F_obs	mL	170920.9997
Cl_F_obs	mL/hr	23686.3813
AUCINF_pred	hr*ug/mL	5.0701
AUCINF_D_pred	hr*ug/mL/mg	0.0423
AUC_%Extrap_pred	%	4.0610
Vz_F_pred	mL	170791.2852
Cl_F_pred	mL/hr	23668.4054
AUMClast	hr*hr*ug/mL	35.7702
AUMCINF_obs	hr*hr*ug/mL	42.0774
AUMC_%Extrap_obs	%	14.9894
AUMCINF_pred	hr*hr*ug/mL	42.1975
AUMC_%Extrap_pred	%	15.2313
MRTlast	hr	7.3538
MRTINF_obs	hr	8.3055
MRTINF_pred	hr	8.3229
AUC0_6	hr*ug/mL	2.4213

0.0000	0.1110	0.0000	0.0000	0.0000
1.0000	0.3580	0.2345	0.1790	0.0000
2.0000	0.4850	0.6560	0.8430	0.0000
3.0000 *	0.4720	0.5239	-0.0519	1.1345
4.0000 *	0.4350	0.4561	-0.0211	1.5877
5.0000 *	0.4250	0.3971	0.0279	2.0177
6.0000 *	0.3830	0.3457	0.0373	2.4213
24.0000	*	0.0280	0.0285	-0.0005

compartmental pharmacokinetics

nput File: Workbook - [Untitled1]

WINNONLIN NONLINEAR ESTIMATION PROGRAM
Version 5.0.1 Build 200508151751
Core Version 02May2005

Listing of input commands

```
MODEL 3
N VARIABLES 2
NPOINTS 1000
XNUMBER 1
YNUMBER 2
NCONSTANTS 3
CONSTANTS 1,120,0
METHOD 2 'Gauss-Newton (Levenberg and Hartley)'
ITERATIONS 50
MISSING 'Missing'
DATA 'WINNLIN.DAT'
BEGIN
```

Computation of initial estimates completed.

The following default parameter boundaries were generated.

Parameter	Lower Bound	Upper Bound
V_F	0.000	1606.
K01	0.000	6.753
K10	0.000	1.473

WINNONLIN NONLINEAR ESTIMATION PROGRAM

ITERATION	WEIGHTED_SS	V_F	K01	K10
0	0.143927E-01	160.6	0.6753	0.1473
			RANK = 3 CONDITION NO. = 17.72	
1	0.135020E-01	177.8	0.8266	0.1251
			RANK = 3 CONDITION NO. = 13.28	
2	0.134401E-01	176.5	0.8315	0.1253
			RANK = 3 CONDITION NO. = 13.32	
3	0.134330E-01	176.8	0.8354	0.1259
			RANK = 3 CONDITION NO. = 13.38	
4	0.134314E-01	176.6	0.8357	0.1258
			RANK = 3 CONDITION NO. = 13.37	
CONVERGENCE ACHIEVED				
RELATIVE CHANGE IN WEIGHTED SUM OF SQUARES LESS THAN 0.000100				
5	0.134303E-01	176.6	0.8378	0.1260

WINNONLIN NONLINEAR ESTIMATION PROGRAM

PARAMETER	UNITS	ESTIMATE		STANDARD_ERROR	CV%	
UNIVAR_CI_LOW	UNIVAR_CI_UPP	PLANAR_CI_LOW	PLANAR_CI_UPP			
V_F	mL	176638.319620	37685.785696		21.34	
79765.327536	273511.311703	19514.906582	333761.732657			
K01	1/hr	0.837829	0.331505	39.57	-	
0.014319	1.689977	-0.544315	2.219973			
K10	1/hr	0.126043	0.060983	48.38	-	
0.030716	0.282802	-0.128212	0.380298			

WINNONLIN NONLINEAR ESTIMATION PROGRAM

*** VARIANCE - COVARIANCE MATRIX OF THE ESTIMATES ***

PARAMETER	V_F	K01	K10
V_F	1420.22		
K01	11.1708	0.109895	
K10	-2.20360	-0.169725E-01	0.371889E-02

*** CORRELATION MATRIX OF THE ESTIMATES ***

PARAMETER	V_F	K01	K10
V_F	1.00000		
K01	0.894165	1.00000	
K10	-0.958845	-0.839554	1.00000

*** EIGENVALUES OF (Var - Cov) MATRIX ***

NUMBER	EIGENVALUE
1	9.141
2	0.1219
3	0.1891E-05

Condition_number= 2199.

WINNONLIN NONLINEAR ESTIMATION PROGRAM

*** SUMMARY OF NONLINEAR ESTIMATION ***

FUNCTION 1

X	OBSERVED Y	PREDICTED Y	RESIDUAL	WEIGHT	SE-PRED	STANDARDIZED RESIDUAL
0.000	0.1110	0.000	0.1110	1.000		
1.000	0.3580	0.3590	-0.9873E-03	1.000	0.4256E-01	-0.3338E-01
2.000	0.4850	0.4718	0.1321E-01	1.000	0.3083E-01	0.3171
3.000	0.4720	0.4831	-0.1112E-01	1.000	0.2781E-01	-0.2542
4.000	0.4350	0.4550	-0.1998E-01	1.000	0.2776E-01	-0.4565
5.000	0.4250	0.4137	0.1132E-01	1.000	0.2821E-01	0.2605
6.000	0.3830	0.3701	0.1287E-01	1.000	0.3283E-01	0.3210
24.00	0.2800E-01	0.3883E-01	-0.1083E-01	1.000	0.4334E-01	-0.3811

CORRECTED SUM OF SQUARED OBSERVATIONS = 0.206591
 WEIGHTED CORRECTED SUM OF SQUARED OBSERVATIONS = 0.206591
 SUM OF SQUARED RESIDUALS = 0.134303E-01
 SUM OF WEIGHTED SQUARED RESIDUALS = 0.134303E-01
 S = 0.518272E-01 WITH 5 DEGREES OF FREEDOM
 CORRELATION (OBSERVED,PREDICTED) = 0.9812
 WEIGHTED CORRELATION (OBSERVED,PREDICTED) = 0.9812

AIC criteria = -28.48194
 SBC criteria = -28.24362

AUC (0 to last time) computed by trapezoidal rule = 6.12100

WINNONLIN NONLINEAR ESTIMATION PROGRAM

SUMMARY OF ESTIMATED SECONDARY PARAMETERS

PARAMETER	UNITS	ESTIMATE	STANDARD_ERROR	CV%
AUC	hr*ug/mL	5.389864	1.538614	28.55
K01_HL	hr	0.827313	0.327017	39.53
K10_HL	hr	5.499294	2.658037	48.33
CL_F	mL/hr	22264.012359	6361.938826	28.57
Tmax	hr	2.661181	0.390579	14.68
Cmax	ug/mL	0.485762	0.027881	5.74

NORMAL ENDING

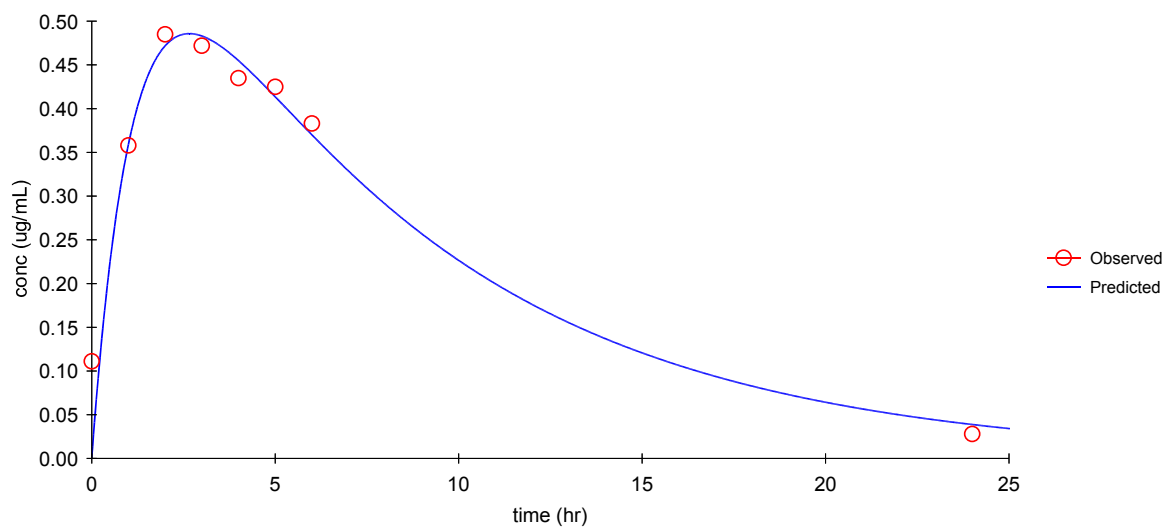


Abbildung 27: Beobachtete und erwartete Plasmakonzentration

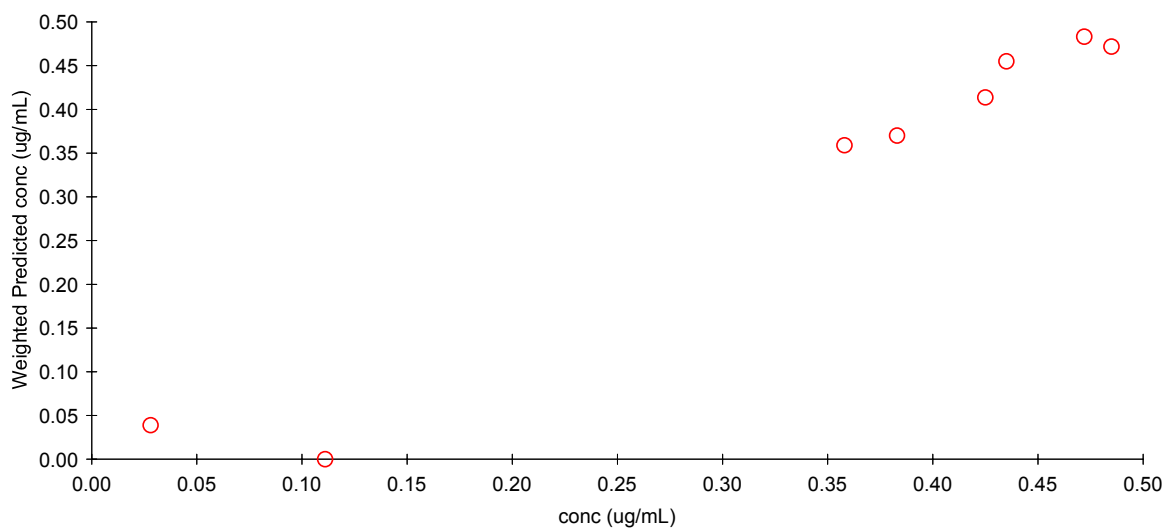


Abbildung 28: Beobachtete versus gewichtete erwartete Plasmakonzentration

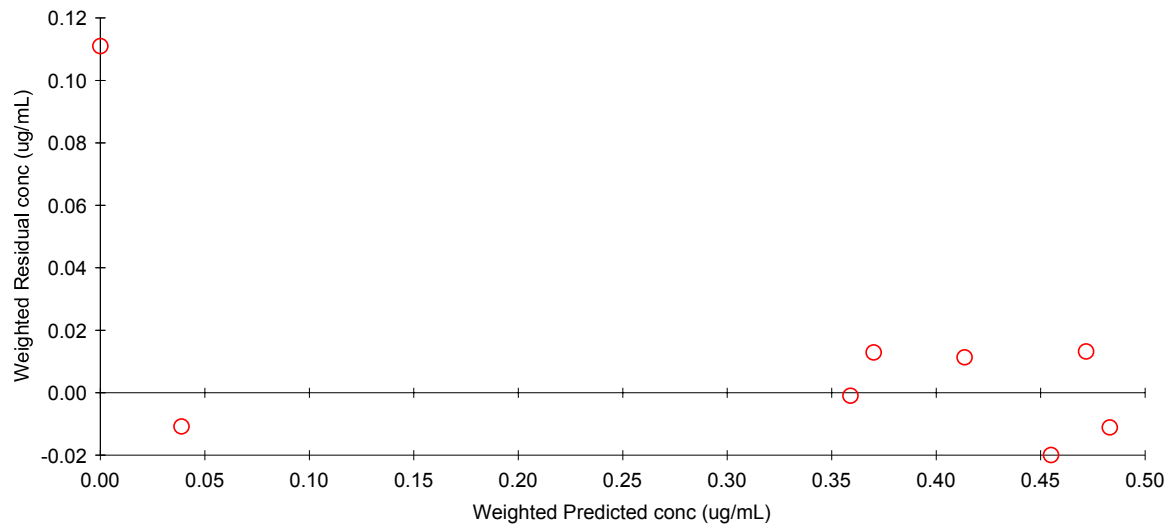


Abbildung 29: Gewichtete erwartete versus gewichtete verbleibende Plasmakonzentration

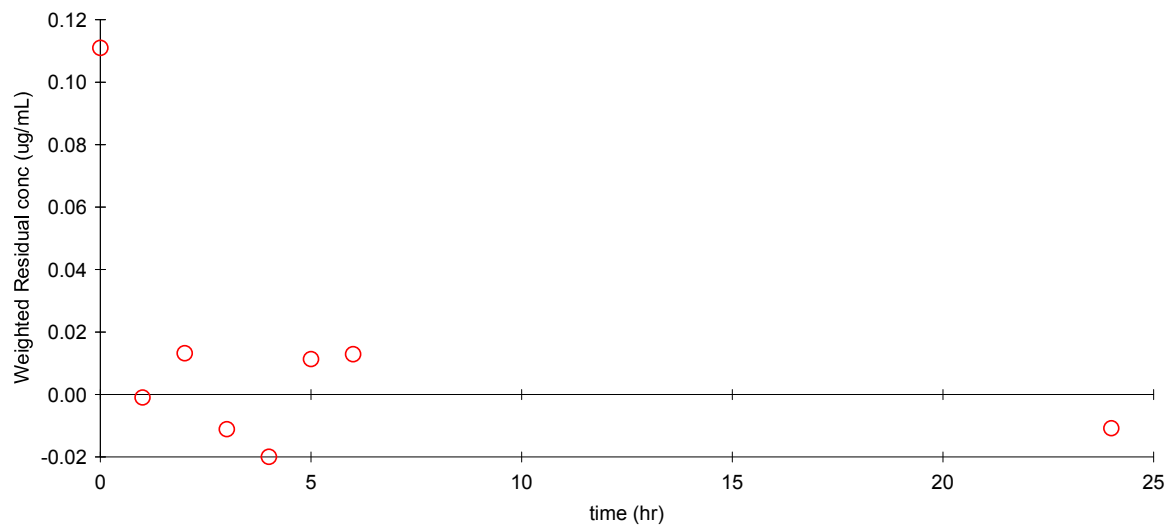


Abbildung 30: Gewichtete verbleibende Plasmakonzentration

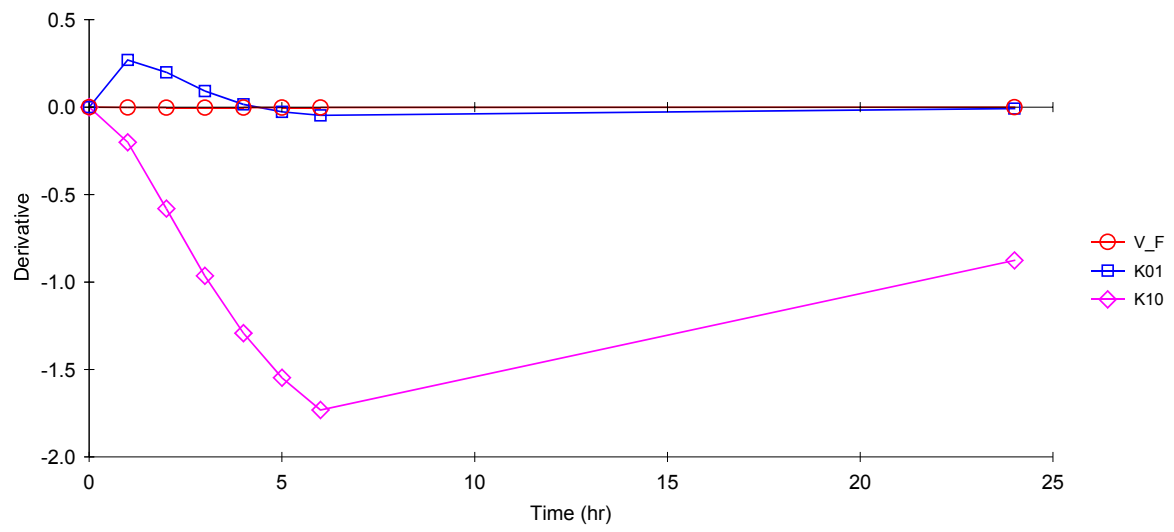


Abbildung 31: Partialableitungen der Parameter V_F , K und T_{lag} .

In Vitro Untersuchung

Eichgerade

Die Stammlösung die verwendet wurde um eine Eichgerade für die Beschreibung der Enzymversuche zu erstellen war eine Suspension von Aprepitant in Wasser. Zur besseren Dispergierung enthielt sie 2 % DMSO. Der Gehalt an Aprepitant war 30 mg/ml.

Von dieser Stammlösung ausgehend wurden sechs verschieden konzentrierte Verdünnungen hergestellt. Als Verdünnungsmittel wurde ein Puffer verwendet. Es handelt sich hierbei um eine Kaliumdihydrogenphosphat Lösung in Wasser mit der Konzentration 1,74 g/100 ml.

Um die Proben der Eichgerade analog zu den nachfolgenden Enzymproben zu behandeln wurde vor der Analyse durch die HPLC eine Proteinfällung mit Wasser/Acetonitril (2:1) gemacht.

Die Konzentration an Aprepitant der Proben und die dazugehörigen Peakflächen sind aus untenstehender Tabelle ersichtlich.

	Peakfläche	Konzentration Aprepitant ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
C1	363,4702	0,12
C2	1861,2046	0,3
C3	4858,3420	0,6
C4	8702,1331	1,2
C5	16570,0000	2,4
C6	12770,0000	3,6

Tabelle 17: Eichgerade in Wasser

Die Eichgerade die sich daraus ergab hatte eine Steigung von 7018. Anhand dieses Wertes wurden die Aprepitant-Konzentrationen in den Proben des Enzymversuchs bestimmt.

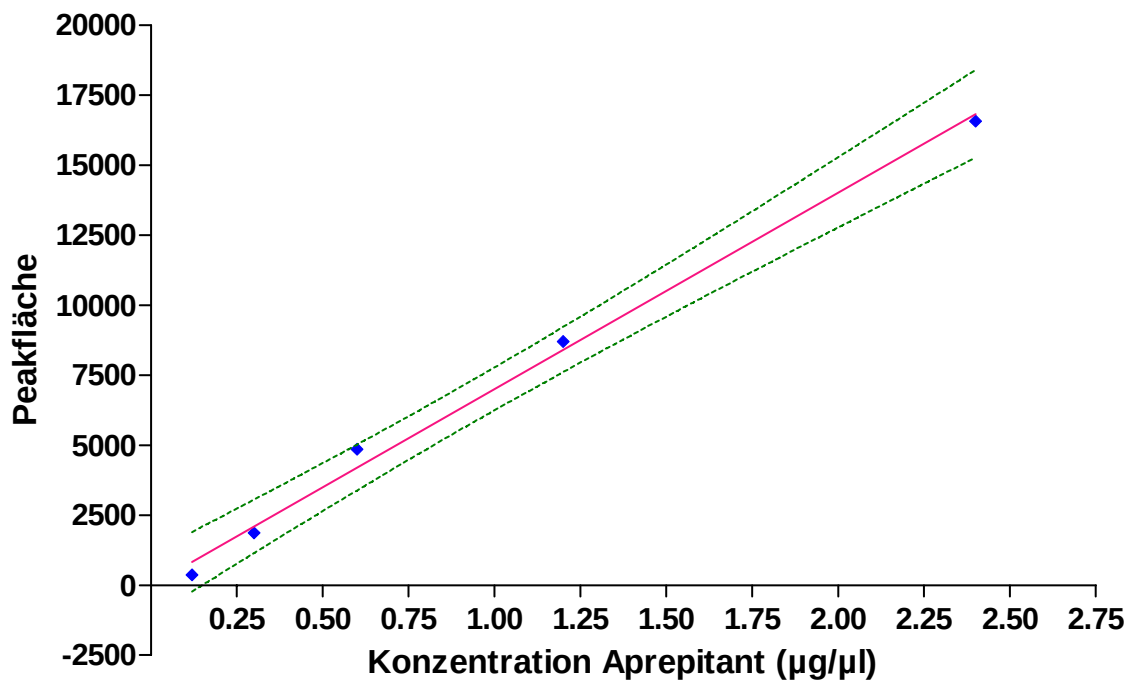


Abbildung 32: Eichgerade in Wasser

Enzymversuch

Es wurden sechs Versuchsansätze gemacht, die nachfolgend mit P_1 – P_6 bezeichnet werden.

Tabelle 18 beschreibt die Ausgangskonzentrationen an Aprepitant der Proben.

	Volumen Stammlösung (μ l)	Volumen Puffer (μ l)	Volumen Enzymlösung (μ l)	Konzentration Aprepitant (μ g/ μ l)
P_1	2	467	30	0,12
P_2	5	465	30	0,3
P_3	10	460	30	0,6
P_4	20	450	30	1,2
P_5	40	430	30	2,4
P_6	60	410	30	3,6

Tabelle 18: Ausgangsgehalt an Aprepitant

Der zeitliche Verlauf der Reaktionen der Ansätze P_1 bis P_6 ist aus untenstehenden Graphiken ersichtlich.

P₁

Zeit (h)	0	1	2	4	6	24
Konzentration Aprepitant (µg/ml)	120		426,37	669,18	721,38	923,16

Tabelle 19: Verlauf Probe 1

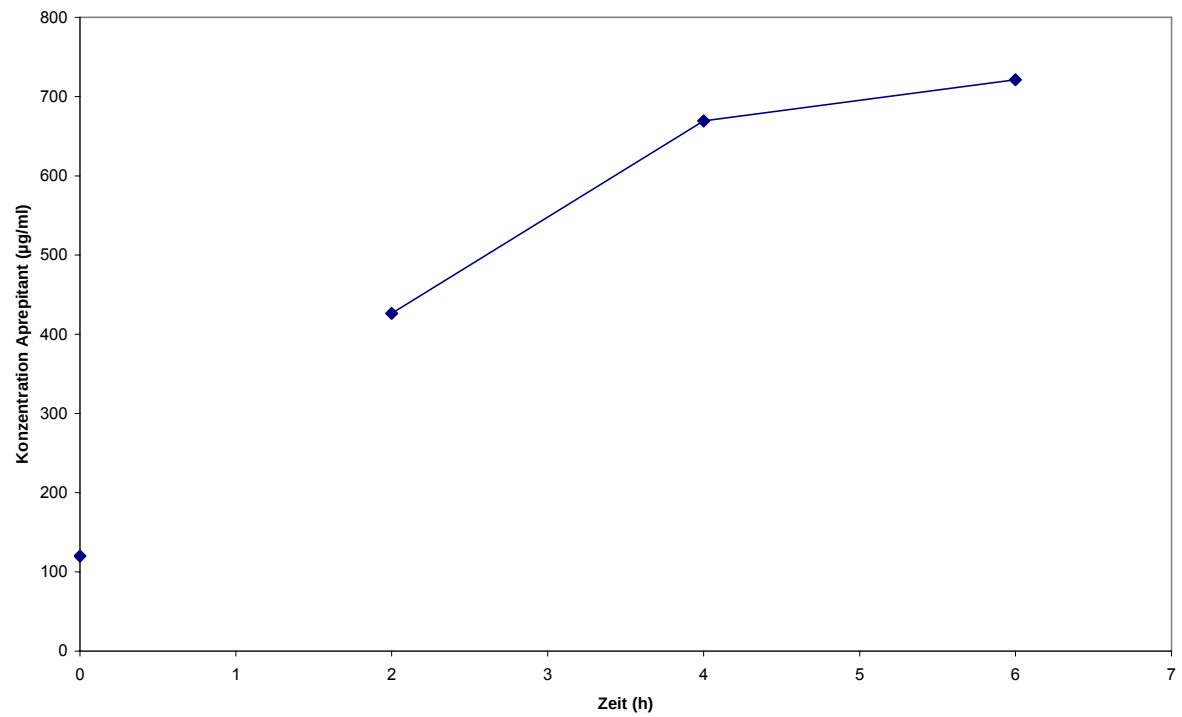


Abbildung 33: Verlauf Probe 1

P₂

Zeit (h)	0	1	2	4	6	24
Konzentration Aprepitant (µg/ml)	300		1774,32	2026,81	2085,55	1991,67

Tabelle 20: Verlauf Probe 2

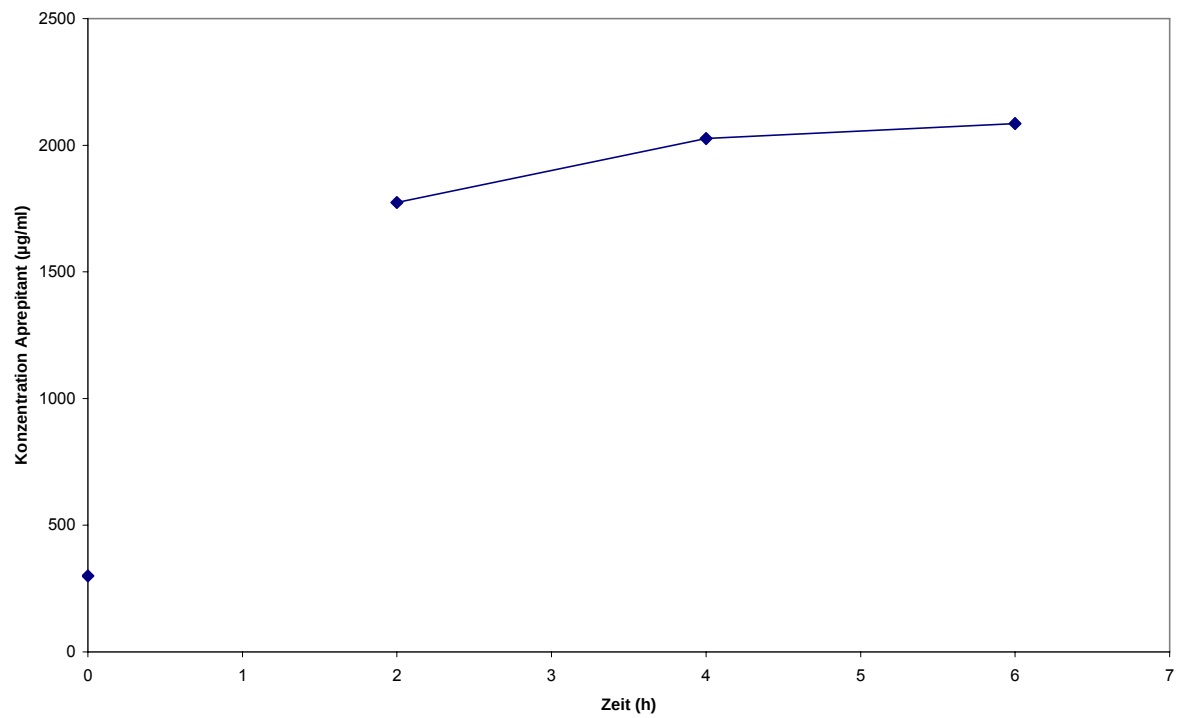


Abbildung 34: Verlauf Probe 2

P₃

Zeit (h)	0	1	2	4	6	24
Konzentration Aprepitant (µg/ml)	600		3489,95	3637,07	4518,15	4596,49

Tabelle 21: Verlauf Probe 3

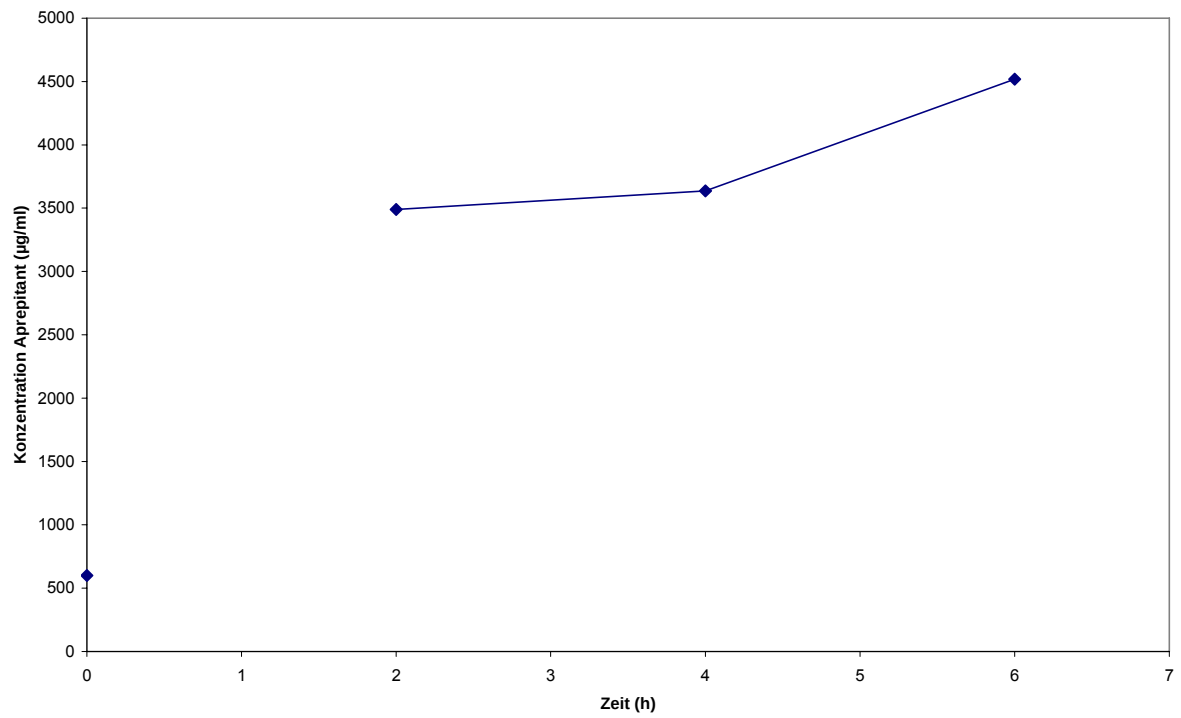


Abbildung 35: Verlauf Probe 3

P₄

Zeit (h)	0	1	2	4	6	24
Konzentration Aprepitant (µg/ml)	1200		7309,7	7411,18	8583,83	9225,11

Tabelle 22: Verlauf Probe 4

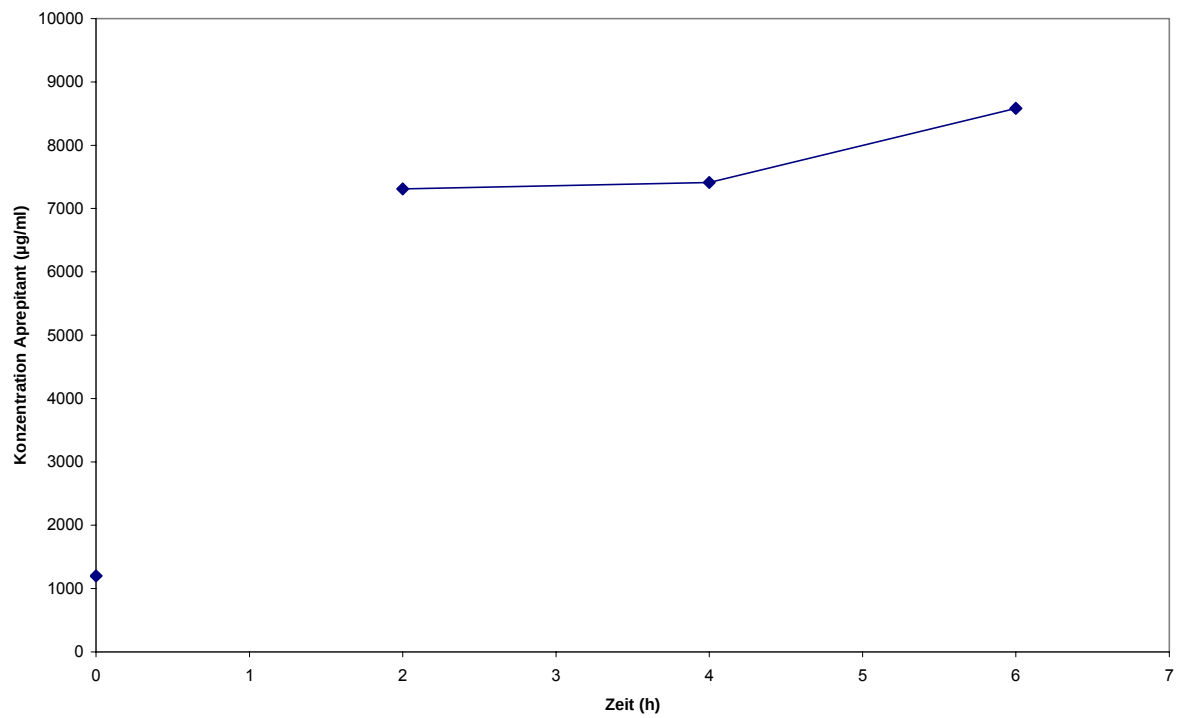


Abbildung 36: Verlauf Probe 4

P₅

Zeit (h)	0	1	2	4	6	24
Konzentration Aprepitant (µg/ml)	2400	12711,9	18227,11	12065,75	14114,53	14379,58

Tabelle 23: Verlauf Probe 5

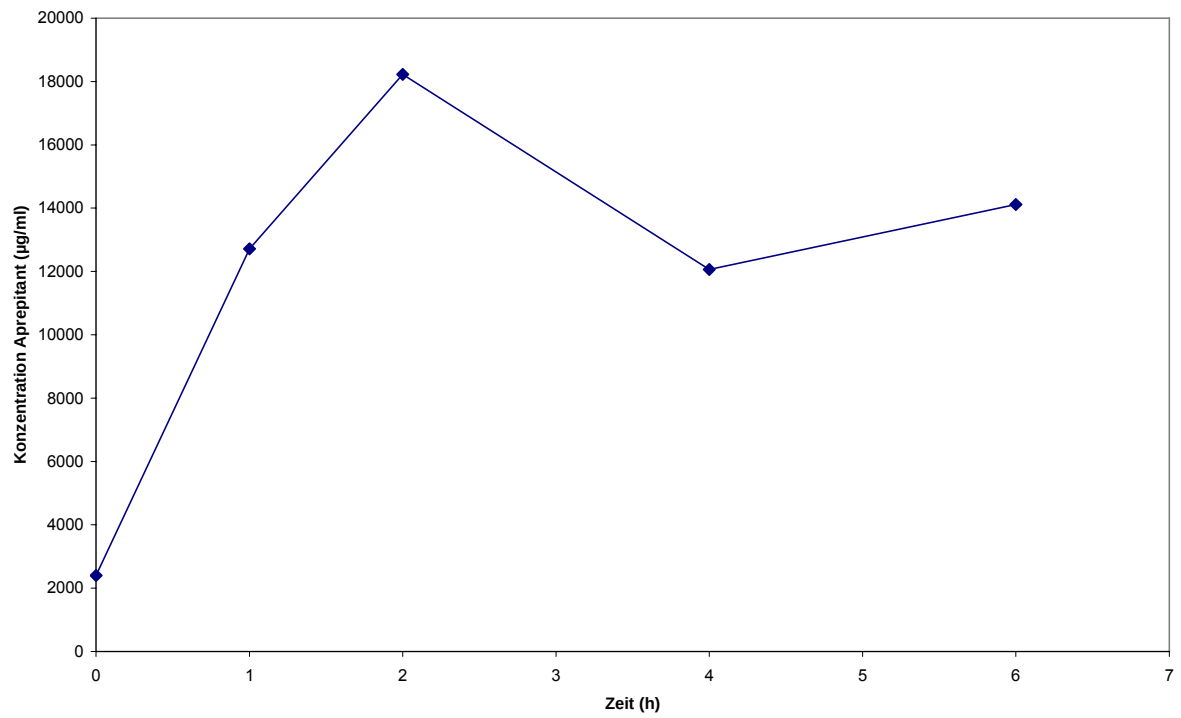


Abbildung 37: Verlauf Probe 5

P₆

Zeit (h)	0	1	2	4	6	24
Konzentration Aprepitant (µg/ml)	3600	18896,45	17743,32	20379,92	20327,44	21792,12

Tabelle 24: Verlauf Probe 6

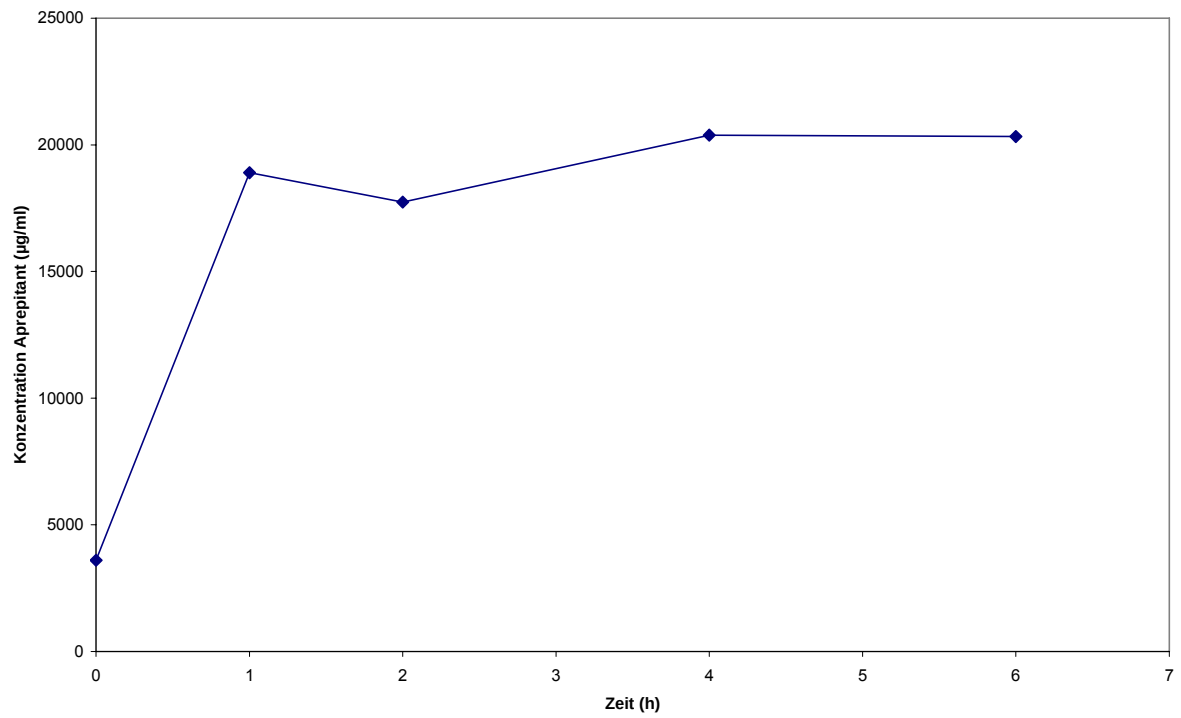


Abbildung 38: Verlauf Probe 6

In Abbildung 25 ist die Zusammenfassung der Proben P₁ bis P₆ zu sehen.

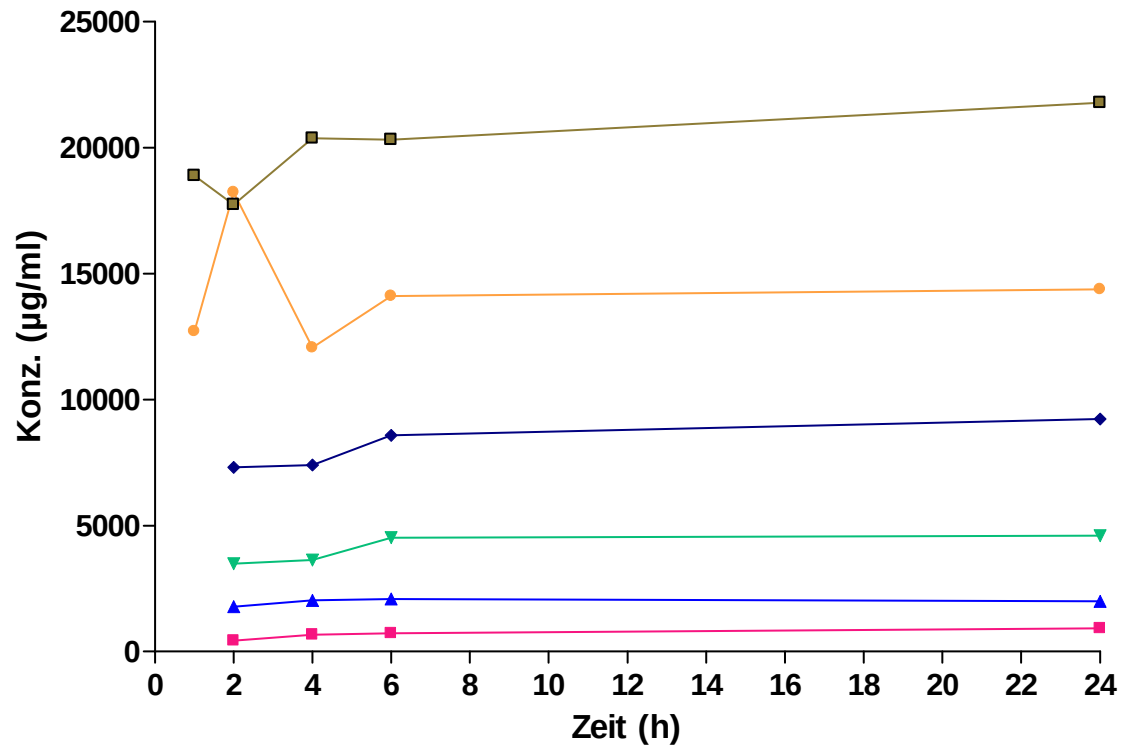


Abbildung 39: Verlauf Probe 1 bis 6

Als Beispiel für ein Chromatogramm ist von P_1 der 2 Stunden-Wert angeführt.

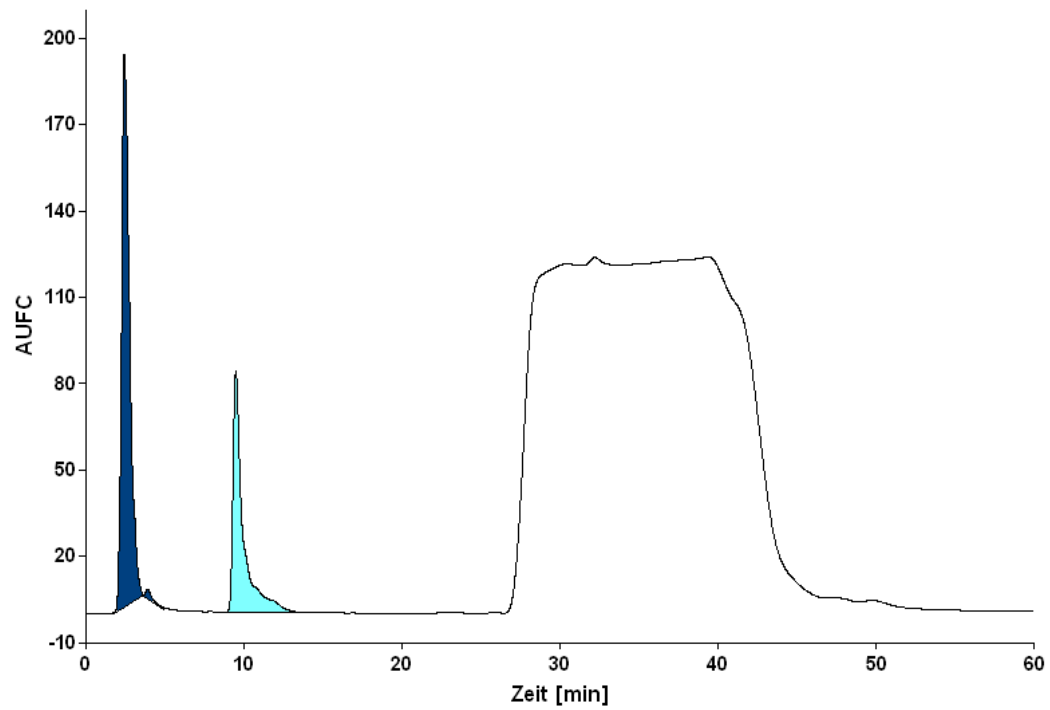


Abbildung 40: Chromatogramm P_1 Zeit=2h

Interpretation

Die Vorliegende Diplomarbeit befasst sich in einem ersten Teil mit der Analyse von Plasmaproben die von Patienten stammen, die mit Aprepitant behandelt wurden. Die erhaltenen Daten wurden mit bereits erhobenen vereint, um so eine genauere Statistik machen zu können.

Die daraus entstandenen Plasmaspiegelkurven variieren sehr stark untereinander je nachdem welche Populationen zusammengefasst wurden.

Bedingt durch die hohe Sensibilität der Analysenmethode kommt es eventuell zu Störungen oder Überlagerungen des Aprepitant-Peaks durch andere Arzneistoffe.

Da keine Dokumentation bezüglich der Medikation, des Alter und des Geschlecht der Patienten zur Verfügung stand, konnten Interferenzen im Chromatogramm nicht berücksichtigt werden.

Durch die bei der Analyse verwendete niedrige Wellenlänge besteht eine erhöhte Störanfälligkeit.

Aufgrund dieser Faktoren dürfen die erhaltenen Plasmaspiegelkurven nur als relativ angesehen werden.

In einem zweiten Teil der Arbeit ging es darum Aprepitant in einem in vitro Versuch durch ein humanes CYP3A4 Enzym umzusetzen um den Abbau zeitlich zu quantifizieren und eventuell dabei entstehende Metabolite zu bestimmen.

Bei allen Proben ist über die Dauer des Versuchs eine Konzentrationserhöhung von Aprepitant zu beobachten.

Eine mögliche Erklärung hierfür könnte einerseits der hohe Substratgehalt sein.

Möglicherweise handelt es sich um einen Sättigungseffekt des Enzyms.

Andererseits könnte eine mangelnde Löslichkeit des Aprepitants ein Grund sein. Da alle Proben des Enzymversuchs zur gleichen Zeit in den Autosampler gestellt wurden, könnte sich durch die lange Stehzeit der Anteil an gelöstem Aprepitant erhöht haben.

Auch ein eventueller Störeffekt des DMSO das als Lösungsvermittler eingesetzt wurde ist zu bedenken.

Abschließend sei noch erwähnt, dass während allen Untersuchungen die im Rahmen dieser Diplomarbeit gemacht wurden die hohe Lipophilie und die schlechte Löslichkeit des Aprepitants als äußerst problematisch erwiesen haben.

Literaturliste

- *Arzneimittelwirkungen*, E. Mutschler et al., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 8. Auflage 2001, S 22-37; S 321-323
- *Hunnius Pharmazeutisches Wörterbuch*, De Gruyter, 8. Auflage 1998, S 382-383
- *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*, De Gruyter, 295. Auflage, 2002, S 474-475
- *Medizinische Chemie*, Steinhilber Schubert-Zsilavecz Roth, Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart, S 90; S 437-439
- *Taschenatlas der Pathophysiologie*, Stefan Silbernagel Florian Lang, Georg Thieme Verlag KG, 2. Auflage 2005, S 140-141; S 356-357
- *Austria Codex Fachinformation 2006/2007*, Österreichische Apotheker-Verlagsgesellschaft mbH, S 2454-2459
- *Neurokinin-Rezeptor-Antagonisten*, Nemec Schubert-Zsilavecz, Österreichische Apotheker-Zeitung, Ausgabe 13/2004
- *Simultaneous determination of Aprepitant and two metabolites in human plasma by high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection*, Chavez-Eng CM et al., 2004
- *Cytochrom P450 3A4 is the major enzyme involved in the metabolism of the substance P receptor antagonist Aprepitant*, Sanchez RI et al., 2004
- *Evaluation of potential inductive effects of Aprepitant on cytochrome P450 3A4 and 2C9 activity*, Shadle CR et al., 2004
- *Pharmacokinetics of Aprepitant after single and multiple oral doses in healthy volunteers*, Majumdar AK et al., 2006
- *The metabolic disposition of Aprepitant, a substance P receptor antagonist, in rats and dogs*, Huskey SE et al., 2004

- *MASCC Antiemetic Guidelines*, 2008,
http://www.mascc.org/media/Resource_centers/MASCC_Guidelines_Update.pdf

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur Aprepitant (aus <i>Neurokinin-Rezeptor-Antagonisten</i> , Nemec Schubert-Zsilavec, ÖAZ 13/2004).....	9
Abbildung 2: Metabolismus (aus <i>The metabolic disposition of Aprepitant, a substance P receptor antagonist; in rats and dogs</i> , Huskey et al., 2004).....	10
Abbildung 3: Eichgerade in Precinorm	23
Abbildung 4: Patient A.....	24
Abbildung 5: Patient B.....	25
Abbildung 6: Patient C.....	26
Abbildung 7: Patient D.....	27
Abbildung 8: Patient E.....	28
Abbildung 9: Patient F	29
Abbildung 10: Patient G	30
Abbildung 11: Patient H.....	31
Abbildung 12: Patient H.....	32
Abbildung 13: Patient J	33
Abbildung 14: Patient K.....	34
Abbildung 15: Patienten A bis G	35
Abbildung 16: Patienten A bis K.....	36
Abbildung 17: Gesamtkollektiv	37
Abbildung 18: Chromatogramm C1	38
Abbildung 19: Chromatogramm C2.....	39
Abbildung 20: Chromatogramm C3.....	40
Abbildung 21: Chromatogramm C4.....	41
Abbildung 22: Chromatogramm C5.....	42
Abbildung 23: Chromatogramm C6.....	43
Abbildung 24: Chromatogramm Patientenprobe	44
Abbildung 25: Chromatogramm Patientenprobe	45
Abbildung 26: Chromatogramm Patientenprobe	46
Abbildung 27: Beobachtete und erwartete Plasmakonzentration.....	55
Abbildung 28: Beobachtete versus gewichtete erwartete Plasmakonzentration	55
Abbildung 29: Gewichtete erwartete versus gewichtete verbleibende Plasmakonzentration	56
Abbildung 30: Gewichtete verbleibende Plasmakonzentration	56
Abbildung 31: Partialableitungen der Parameter V_F , K und T_{lag}	57
Abbildung 32: Eichgerade in Wasser	59
Abbildung 33: Verlauf Probe 1	61

Abbildung 34: Verlauf Probe 2	62
Abbildung 35: Verlauf Probe 3	63
Abbildung 36: Verlauf Probe 4	64
Abbildung 37: Verlauf Probe 5	65
Abbildung 38: Verlauf Probe 6	66
Abbildung 39: Verlauf Probe 1 bis 6.....	67
Abbildung 40: Chromatogramm P ₁ Zeit=2h.....	68

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Emetogenes Potential der gängigsten Zytostatika.(modifiziert nach MASCC-guidelines 2008).....	7
Tabelle 2: Eichgerade in Precinorm	23
Tabelle 3: Patient A	24
Tabelle 4: Patient B	25
Tabelle 5: Patient C.....	26
Tabelle 6: Patient D	27
Tabelle 7: Patient E	28
Tabelle 8: Patient F	29
Tabelle 9: Patient G.....	30
Tabelle 10: Patient H.....	31
Tabelle 11: Patient I	32
Tabelle 12: Patient J.....	33
Tabelle 13: Patient K	34
Tabelle 14: Patienten A bis G.....	35
Tabelle 15: Patienten A bis K.....	36
Tabelle 16: Gesamtkollektiv	37
Tabelle 17: Eichgerade in Wasser	59
Tabelle 18: Ausgangsgehalt an Aprepitant	60
Tabelle 19: Verlauf Probe 1.....	61
Tabelle 20: Verlauf Probe 2.....	62
Tabelle 21: Verlauf Probe 3.....	63
Tabelle 22: Verlauf Probe 4.....	64
Tabelle 23: Verlauf Probe 5.....	65
Tabelle 24: Verlauf Probe 6.....	66

Lebenslauf

Marie-Bernadette Aretin

Paniglg. 16, 1040 Wien

+43 664 22 33 563

Geboren in Wien, 17. Februar 1983

Staatsbürgerschaft: Deutsch

Eltern: Carl-Pius Aretin (geb. 1955) Wirtschaftsberater

Franziska Aretin (geb. 1949) Sekretärin

Geschwister: Katharina (geb. 1984) Studentin- Jus

Carl-Philipp (geb. 1986) Student- Bauingenieurwesen

Felix (geb. 1990) HTL-Mödling

Schule: Volksschule und Gymnasium bis zur 5. Klasse: Lycée français de Vienne

Ab der 6. Klasse: Wiedner Gymnasium (Matura Mai 2001)

Seit Oktober 2001 PharmazieStudium an der Uni Wien

2. Abschnitt seit Oktober 2004

2002 bis 2008 Mitarbeiter der Tanzschule Elmayer (5 bis 25 Stunden/Woche)

In den Sommerferien 4 mal ein Monat Ferialpraktikum in der Maria-Treu-Apotheke, 1080 Wien.

Sommersemester 2006: Auslandspraktikum an der Uni Regensburg.

Juli 2006: einmonatiges Ferialpraktikum in der Anstaltsapotheke des Klinikum Kreuzschwestern in Wels.

Seit Oktober 2006 Beschäftigung in der Germania-Apotheke, 1150 Wien.