



DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Pharmakokinetik von Capecitabin in der
Dreifachkombinations-Chemotherapie mit Oxaliplatin
und Cetuximab“

verfasst von

Eva-Maria Klebermass

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2013

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von:

ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Martin Czejka

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt zuallererst ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Martin Czejka, für die großartige Unterstützung während meiner gesamten Zeit am Department, aber auch für die guten Ideen und die Hilfe mit dem Programm PK-Sim[®], sowie die allmorgendliche Tasse Tee.

Diese Arbeit wäre auch nicht möglich gewesen ohne Frau Mag. Veronika Schreiber, welche sich stets viel Zeit für meine Fragen genommen hat. Ihre offene Art hat wesentlich zum guten Arbeitsklima beigetragen und machte es mir leicht, mich in die Materie einzufinden.

Des Weiteren möchte ich mich bei Mag. Philipp Buchner und Mag. Azra Sahmanovic-Hrgovic bedanken, die ebenso eine Anlaufstelle bei Problemen waren.

Ein großes „Dankeschön“ gilt meiner Familie und besonders meinen Eltern, ohne deren finanzielle Unterstützung dieses Studium nicht ohne weiteres möglich gewesen wäre. Noch viel dankbarer bin ich ihnen jedoch dafür, dass sie immer hinter mir stehen und mich während des gesamten Studiums motiviert, bzw. in stressigeren Zeiten geerdet haben.

Zu guter Letzt ist es mir ein großes Anliegen, mich bei meinem Freund Martin zu bedanken, meinem Ruhepol, der während lernintensiven Phasen wie selbstverständlich alles um mich herum organisiert und immer an mich geglaubt hat.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch noch nicht veröffentlicht.

Wien, im Juli 2013

Inhaltsverzeichnis

1. Theoretischer Teil	- 1 -
1.1 Capecitabin	- 1 -
1.1.1 Eigenschaften und Wirkmechanismus.....	- 1 -
1.1.2 Pharmakokinetik	- 1 -
1.1.3 Nebenwirkungen, Kontraindikationen, Interaktionen	- 3 -
1.1.4 Indikation und Dosierung.....	- 4 -
1.2 Oxaliplatin	- 4 -
1.2.1 Eigenschaften und Wirkmechanismus.....	- 4 -
1.2.2 Pharmakokinetik	- 5 -
1.2.3 Indikation	- 6 -
1.3 Cetuximab	- 6 -
1.3.1 Eigenschaften und Wirkmechanismus.....	- 6 -
1.3.2 Das Protein RAS.....	- 7 -
1.3.3 Pharmakokinetik	- 8 -
1.3.4 Indikation	- 9 -
2. Rationale	- 10 -
3. Experimenteller Teil	- 11 -
3.1 Klinisches Setting und Studiendesign	- 11 -
3.2 Patientenprofile	- 12 -
3.3 Analytik	- 13 -
3.3.1 Laborausstattung	- 13 -
3.3.2 Verdünnungsreihen von CCB, DFCR und DFUR	- 15 -
3.3.3 Vorbereitung der Patientenproben	- 17 -

3.3.4 Quantifizierung von CCB, DFCR und DFUR	- 17 -
3.4 Berechnungen	- 18 -
3.4.1 Biometrie.....	- 18 -
3.4.2 Deskriptive Statistik	- 18 -
3.4.3 Induktive Statistik	- 19 -
3.4.4 Pharmakokinetische Parameter.....	- 19 -
3.5 Zusammenfassung der verwendeten Software	- 21 -
4. Ergebnisse und Diskussion	- 22 -
4.1 Eichgeraden von CCB und dessen Metaboliten	- 22 -
4.2 Validierung des HPLC-Systems	- 24 -
4.2.1 Robustheit.....	- 24 -
4.2.2 Linearität	- 26 -
4.2.3 Detektions- und Quantifizierungsgrenze	- 30 -
4.2.4 Richtigkeit, Wiederholpräzision, Laborpräzision	- 31 -
4.2.5 Selektivität	- 32 -
4.2.6 Stabilität	- 33 -
4.3 Zeitliche Verläufe von CCB und dessen Metaboliten im Blut von Chemotherapie-Patienten.....	- 36 -
4.3.1 Zeitlicher Verlauf von CCB im Blut	- 37 -
4.3.2 Zeitliche Verläufe von DFCR und DFUR im Blut	- 40 -
4.4 Daten und Plasmakonzentrations-Zeitkurven der Patienten	- 43 -
4.4.1 Patient 8.....	- 44 -
4.4.2 Patient 9.....	- 45 -
4.4.3 Patient 11	- 47 -
4.4.4 Patient 12.....	- 48 -
4.4.5 Zusammenfassung der Konzentrations-Zeitkurven aller vier Patienten ...	- 49 -

4.4.6 Vergleich der vier Patienten	- 51 -
4.5 Ergebnisse der Berechnungen	- 55 -
4.5.1 Biometrische Auswertung.....	- 55 -
4.5.2 Statistische Auswertung	- 56 -
4.5.2.1 T-Test über die biometrischen Parameter	- 56 -
4.5.2.2 T-Test über die Plasmakonzentrationen der Patienten	- 57 -
4.5.3 Pharmakokinetische Auswertung	- 58 -
4.6 Simulation der Verteilung von Capecitabin	- 60 -
5. Zusammenfassung.....	- 65 -
6. Summary	- 66 -
Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	VI
Literaturverzeichnis.....	VIII
Lebenslauf	XIII

1. Theoretischer Teil

1.1 Capecitabin

1.1.1 Eigenschaften und Wirkmechanismus

Capecitabin (Xeloda[®], Hersteller: Fa. Hoffmann – La Roche), ein Fluoropyrimidincarbamat, ist ein oral einzunehmendes, nicht-zytotoxisches Prodrug, welches über mehrere enzymatische Schritte in das zytotoxische 5-Fluorouracil (5-FU) umgewandelt wird [1].

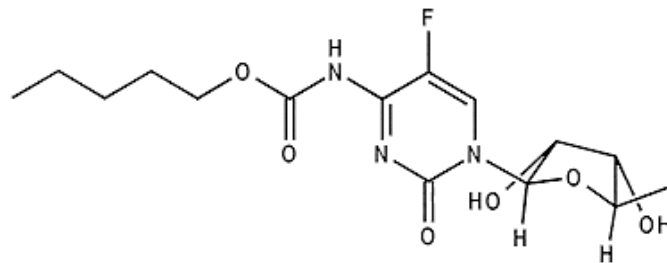


Abbildung 1: Capecitabin [2]

5-FU ist ein Thymin- bzw. Uracilantagonist, dessen Metaboliten 5-Fluordesoxyuridin-Monophosphat und 5-Fluordesoxyuridin-Triphosphat die Thymidilat-Synthase und dadurch die Synthese der DNA hemmen. Außerdem kommt es zum Einbau von dem Monophosphat in die RNA und dadurch zu deren Schädigung [3].

1.1.2 Pharmakokinetik

CCB wird gut resorbiert, die Bioverfügbarkeit liegt in etwa bei 70 % [4].

Bei Erhöhung der Dosis steigen die $c_{\max}$ und die AUC proportional dazu linear an. Die Plasmaproteinbindung des Prodrugs beträgt, konzentrationsunabhängig, 54 % [5].

Capecitabin wird nach der Resorption in der Leber durch die Carboxylesterase zu 5'-Desoxy-5-fluorocytidin (5'-DFCR) und anschließend durch die Cytidindesaminase zu 5'-Desoxy-5-fluorouridin (5'-DFUR) metabolisiert [1,6].

Die Thymidin-Phosphorylase (ThyPase) katalysiert schließlich die Umwandlung von 5'-DFUR zum eigentlichen Wirkprinzip 5-Fluorouracil (5-FU). Der Vorteil von Capecitabin besteht darin, dass die ThyPase zwar schon auch im gesunden Gewebe, vor allem aber im Tumorgewebe lokalisiert ist, wodurch diese Chemotherapie im Vergleich zu anderen Modellen nebenwirkungsärmer sein soll. Man konnte nachweisen, dass die Konzentration von 5-FU im Tumorgewebe 3,2-fach höher ist als im gesunden. Außerdem ist auch die Thymidin-Phosphorylase-Aktivität im Tumor vier Mal höher [1,7].

Das Enzym Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (DPD) baut 5-FU dann zum Dihydro-5-Fluorouracil (FUH₂) ab, welches weniger toxisch ist. Darauf folgt die Öffnung des Pyrimidin-Rings durch die Dihydropyrimidinase. Es entsteht die 5-Fluoroureidopropionsäure (FUPA), welche zum Schluss durch die β -Ureido-Propionase in α -Fluoro- β -alanin (FBAL) gespalten wird [8,9,10].

CCB und die Metaboliten werden hauptsächlich renal ausgeschieden; FBAL ist dabei der Hauptmetabolit [1].

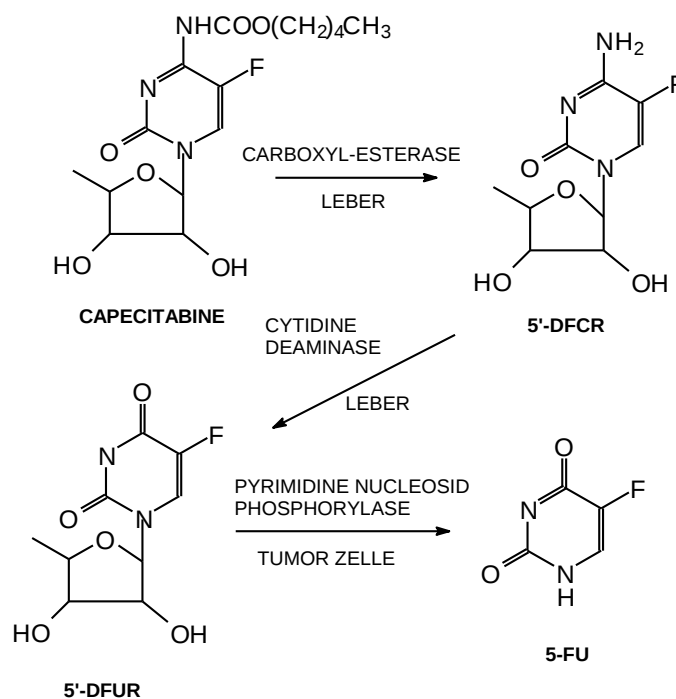


Abbildung 2: Schema der Metabolisierung

1.1.3 Nebenwirkungen, Kontraindikationen, Interaktionen

Die Nebenwirkungen betreffen besonders den Gastrointestinaltrakt und äußern sich in Diarrhö, Schmerzen, Übelkeit bzw. Erbrechen und Stomatitis. Sehr häufig tritt auch das sogenannte Hand-Fuß-Syndrom (HFS) auf [6].

Diese Hautveränderungen betreffen im Besonderen die Innenflächen der Hände und die Fußsohlen [11].

Zu Beginn äußert sich das Syndrom durch Rötungen, Dys- und Parästhesien und Kribbeln, im weiteren Verlauf kommt es zu starken Schmerzen, Rissen in der Haut, Ödemen, Blasen und Ulzerationen [11,12].

Grundsätzlich konnte man jedoch nachweisen, dass die orale Therapie gegenüber jener mit 5-FU intravenös sicherer ist. Nebenwirkungen wie Übelkeit, Stomatitis oder Diarrhö treten bei der Gabe von CCB seltener auf. Nur das HFS, welches oft einen Grund für den Abbruch der Behandlung darstellt, zeigt sich vergleichsweise häufiger unter der oralen Therapie [8,13,14].

Kontraindiziert ist CCB bei schwerer Nieren- oder Leberinsuffizienz, Überempfindlichkeit gegen CCB oder 5-FU, Schwangerschaft und Stillzeit, Mangel des Enzyms DPD, schwerwiegenden Reaktionen auf eine Behandlung mit Fluoropyrimidinen, schwerer Leuko-/Thrombozyto-/Neutropenie und bei der Therapie mit Sorivudin oder dessen Analoga [1].

Allopurinol setzt die Wirkung von 5-FU herab, während Sorivudin und dessen Analoga zu einer Verstärkung der Toxizität führen (sie hemmen das Enzym DPD). Auch Antazida bewirken einen geringen Anstieg der Plasmaspiegel von CCB und 5'-DFCR. Capecitabin verstärkt die Wirkung von Phenprocoumon und Analoga, wodurch das Blutungsrisiko erhöht wird und auch die Plasmakonzentrationen von Phenytoin können bei gleichzeitiger Gabe steigen. Folsäure, Interferon Alpha und eine Strahlentherapie vermindern die maximal verträgliche Dosis (MTD) von CCB [1,6].

1.1.4 Indikation und Dosierung

Capecitabin wird postoperativ zur adjuvanten Therapie des Kolonkarzinoms Stadium III (Dukes Stadium C) angewendet, ebenso bei metastasierendem Kolorektalkarzinom. Es ist außerdem First-line-Therapeutikum bei fortgeschrittenem Magenkarzinom kombiniert mit Platinderivaten. Eine weitere Indikation ist das metastasierende oder lokal fortgeschrittene Mammakarzinom, wenn eine zytotoxische Chemotherapie keine Wirkung gezeigt hat. Hierbei wird CCB meist in Kombination, jedoch in bestimmten Fällen auch als Monotherapie eingesetzt [1,15].

Xeloda® gibt es in Tablettenform zu 50 oder 150 mg; die Tabletten werden zweimal täglich bis zu einer halben Stunde nach dem Essen eingenommen. Die Dosierung richtet sich nach der Körperoberfläche. Die Standarddosis beträgt in der Monotherapie 1250 mg/m^2 , in der Kombinationstherapie bei Kolorektal-, Kolon-, oder Magenkarzinom sollte die Anfangsdosis auf $800\text{-}1000 \text{ mg/m}^2$ herabgesetzt werden. Einer zweiwöchigen Therapie folgen immer sieben Tage Einnahmepause [1].

1.2 Oxaliplatin

1.2.1 Eigenschaften und Wirkmechanismus

Es handelt sich um einen antineoplastischen, interkalierenden Wirkstoff, in welchem das zentrale Platin-Atom einen Komplex mit Oxalat und 1,2-Diaminocyclohexan (DACH) eingeht [16].

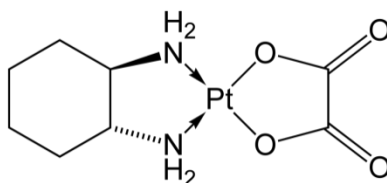


Abbildung 3: Oxaliplatin [17]

Studien konnten zeigen, dass sich Aquakomplexe, die durch die Biotransformation entstehen, an die DNA heften und Inter- und Intrastrang-Quervernetzungen bilden.

Man vermutet, dass die eigentliche Zytotoxizität von Intrastrang-Verbindungen zwischen dem Platinatom und einem Adenin-Guanin-Paar bzw. zwei nahe aneinander liegenden Guaninen ausgeht. Durch diesen Mechanismus kommt es zum Abbruch der DNA-Synthese und in weiterer Folge zur Apoptose der Zelle [18,19,20].

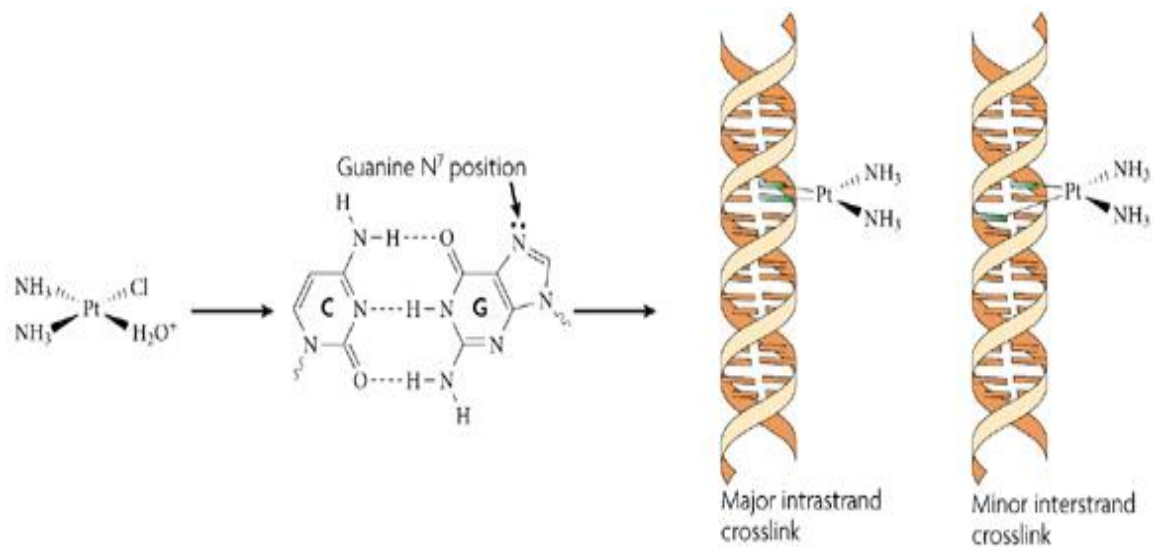


Abbildung 4: Inter- und Intrastrang Crosslinks am Beispiel von Cisplatin [21]

1.2.2 Pharmakokinetik

Da die Ausgangssubstanz sehr schnell biotransformiert wird, ist sie schon nach zwei Stunden nicht mehr im Plasma nachweisbar [22].

Man bestimmt deshalb die Pharmakokinetik des Platins. Dieses bindet jedoch wahrscheinlich irreversibel an Erythrozyten und Plasmaproteine, nimmt deren Kinetik an und wird dadurch inaktiv. Daher ist der für die antitumorale Wirkung wichtigste Anteil des Platins jener, der „frei“ ist und durch Ultrafiltration des Plasmas bestimmt werden kann [23]. Bei dessen Analyse zeigen sich eine schnelle Verteilungsphase (Zweikompartimentmodell) und eine langsame Elimination. Die Halbwertszeit beträgt ca. 24 Stunden [24].

Die Elimination erfolgt zu 95 % über die Niere, wodurch die Ausscheidung bei Patienten mit Niereninsuffizienz verzögert ist [25].

1.2.3 Indikation

Die zytotoxische Wirkung wurde für verschiedene Tumore, auch Cisplatin-resistente, in vitro und in vivo nachgewiesen, wobei man eine Synergie mit 5-FU beobachtet hat.

Oxaliplatin wird daher in Kombination mit 5-FU und Folinsäure bei metastasierendem Kolorektalkarzinom und bei Kolonkarzinom Stadium III (Dukes C) nach Resektion des Primärtumors eingesetzt [16].

1.3 Cetuximab

1.3.1 Eigenschaften und Wirkmechanismus

Cetuximab ist ein monoklonaler, chimärer IgG1-Antikörper, der an den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) bindet und ihn so blockiert. Er wird i.v. verabreicht [26,27].

Chimär bedeutet dabei, dass das Fab-Fragment des Rezeptors, welches das Antigen bindet, murin ist; der Fc-Teil, unter anderem verantwortlich für die Komplementaktivierung, ist aber humanen Ursprungs [28].

EGFR-Signalwege sind häufig in Tumorprozessen hinaufreguliert, weil sie unter anderem die Zellproliferation, sowie die Migration, Adhäsion und Angiogenese der bösartigen Zellen fördern und deren Apoptose hemmen [26,29,30].

Der Antikörper verhindert die Bindung von endogenen Liganden, führt zur Internalisierung der EGF-Rezeptoren, zur Komplement-abhängigen Zytotoxizität (CDC) und „markiert“ Tumorzellen für die Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) [26,27].

In vitro und in vivo werden dadurch die Tumorzellen im Wachstum gehemmt und deren Apoptose gefördert. In vivo wurde außerdem beobachtet, dass die Metastasierung von Tumoren reduziert wird, weil Cetuximab die Expression von Angiogenesefaktoren unterdrückt [26].

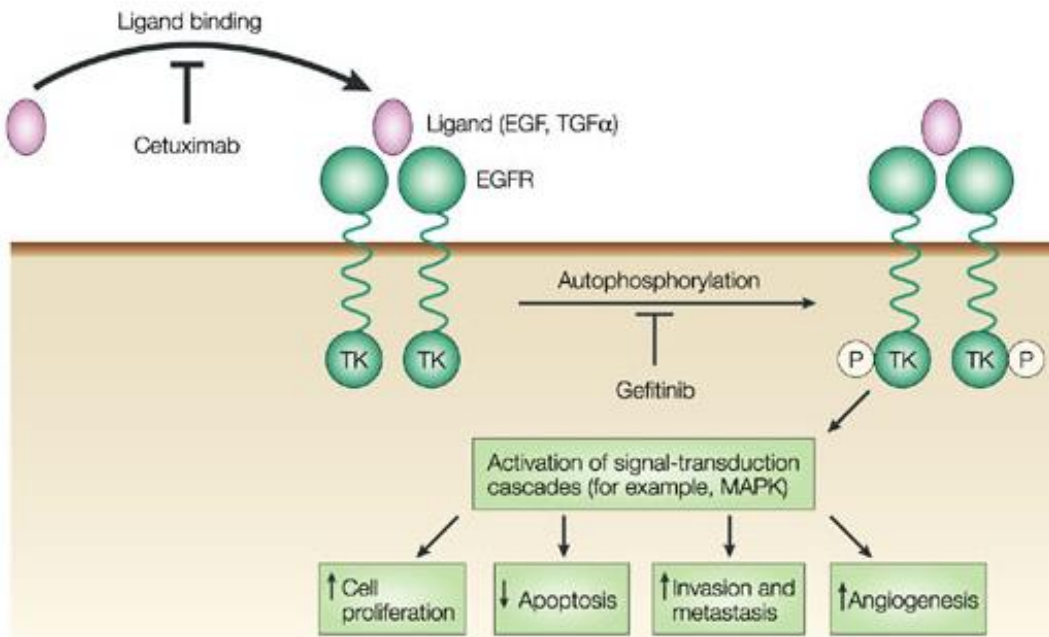


Abbildung 5: Wirkmechanismen von EGF und Cetuximab [31]

1.3.2 Das Protein RAS

Das Signalprotein RAS ist gemeinsam mit anderen dafür verantwortlich, dass das durch EGF ausgelöste Wachstumssignal in der Zelle zum Zellkern weitergeleitet wird. Seine Aktivierung ist abhängig von den Guaninnukleotiden GDP und GTP. An GDP gebunden ist RAS inaktiv, mit GTP kommt es zu einer Weiterleitung des Signals. Diese wird normalerweise von einer intrinsischen GTPase, einem Enzym, das GTP wieder spaltet, rasch wieder beendet [32].

Tritt jedoch eine Punktmutation im Protoonkogen KRAS (Kirsten Rat Sarcoma) auf, welches für das Signalprotein kodiert [33], kommt es zu einer Verminderung der GTPase-Aktivität und dem Vermögen an GAP (GTPase aktivierendes Protein) zu binden [34].

Dadurch bleibt das Signalprotein unabhängig von EGF „eingeschalten“ und die Therapie mit Cetuximab unwirksam.

Deshalb müssen Patienten, die an dieser Studie teilnehmen, einen „Wildtyp“ des Gens, also ein nicht mutiertes KRAS aufweisen.

1.3.3 Pharmakokinetik

Durch eine Initialdosis von 400 mg/m^2 ergibt sich ein mittleres Verteilungsvolumen von $2,9 \text{ l/m}^2$, welches ca. dem Blutvolumen entspricht [35,36].

Der Mittelwert der c_{max} beträgt hierbei 185 µg/ml [37].

Die Kinetik folgt einem Zweikompartmentmodell mit Michaelis-Menten-Elimination [35], ist dosisabhängig und nicht linear [36,38].

Erhöht man die Dosierung, steigt auch die AUC überproportional an und die Clearance wird verringert, bis ein Plateau entsteht [37].

Ab einer Dosis von 260 mg/m^2 tritt eine 90 prozentige Sättigung der Clearance auf [36,38].

Diese kann man durch den Wirkmechanismus erklären. Cetuximab bindet an den EGFR, welcher dann internalisiert wird so wird auch der Antikörper aus dem Blut entfernt. Dieser Vorgang, der höchstwahrscheinlich einen großen Teil der Clearance ausmacht, ist durch die Menge an EGFR limitiert und dadurch sättigbar [36,37].

Der Arzneistoff hat eine lange Eliminationshalbwertszeit von 70-100 Stunden und weist eine mittlere Clearance von $0,022 \text{ l/h/m}^2$ auf [37].

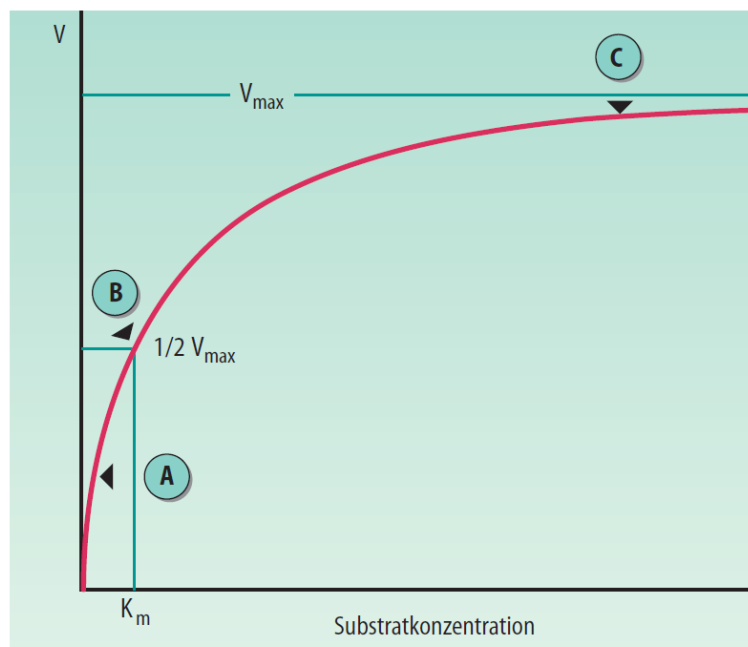


Abbildung 6: Veranschaulichung der Clearance von Cetuximab anhand der Michaelis-Menten-Kinetik [39]

Die Abbildung 6 zeigt den Sättigungsmechanismus der Clearance. Hierbei ist Cetuximab das Substrat (x-Achse) und V die Geschwindigkeit der Komplexbildung zwischen Cetuximab und EGFR (y-Achse), welche zur Internalisierung führt. Bei den Punkten A und B ist die Clearance noch proportional der Konzentration des Antikörpers; B markiert jene Menge des Substrats, bei der die Geschwindigkeit der Komplexbildung halbmaximal ist (Michaelis-Menten-Konstante). Bei Punkt C erreicht die Clearance dadurch, dass irgendwann alle EGF-Rezeptoren besetzt sind, schließlich ein Plateau und ist folglich nicht linear.

1.3.4 Indikation

Cetuximab wird eingesetzt bei EGFR-exprimierendem, metastasierendem Kolorektalkarzinom mit Wildtyp-KRAS-Gen entweder als First-line-Therapie kombiniert mit FOLFOX (Oxaliplatin + Folinsäure + 5-FU), in Kombination mit Irinotecan, oder als Monotherapie bei Versagen von Irinotecan und Oxaliplatin, sowie bei Unverträglichkeit von Irinotecan [26].

.

2. Rationale

Ziel der vorliegenden Diplomarbeit war es herauszufinden, ob die Pharmakokinetik und der Metabolismus von CCB durch die Co-Medikation mit anderen Medikamenten (OxPt, CTX) beeinflusst werden oder nicht.

Derartige Untersuchungen sind von sehr großem klinischem Interesse, da jede Art der Wechselwirkung auf pharmakokinetischer Ebene zu unerwünschter Pharmakodynamik oder Nebenwirkungen des Zytostatikums führen kann.

Darüber hinaus wurde die Methodik endgültig validiert und für weitere klinische Untersuchungen optimiert.

3. Experimenteller Teil

3.1 Klinisches Setting und Studiendesign

Die Plasmaproben wurden vom Kaiser-Franz-Josef-Krankenhaus im Rahmen einer klinischen Prüfung zur Verfügung gestellt. Die Tabelle 1 zeigt das Therapieschema der Patienten. Wir haben die Proben der Probanden bei -80°C gelagert und am Department für Klinische Pharmazie und Diagnostik analysiert.

Tabelle 1: Studiendesign

Zyklus	1			2			3		
Woche	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Arm A	CCB			CCB			CCB		
			CTX						
							OxPt		
Arm B	CCB			CCB			CCB		
	CTX						CTX		
							OxPt		

Die Studienteilnehmer werden in die Gruppen „Arm A“ und „Arm B“ unterteilt. Das Therapieschema besteht aus drei Zyklen, welche wiederum je drei Wochen umfassen.

Patienten der Gruppe „Arm A“ bekommen Capecitabin in den Wochen 1, 2, 4, 5, 7 und 8, Cetuximab von Woche 3 bis 9 und Oxaliplatin in der Woche 7.

Patienten der Gruppe „Arm B“ bekommen Capecitabin in den Wochen 1, 2, 4, 5, 7 und 8, Cetuximab in den Wochen 1, 8 und 9 und Oxaliplatin in der Woche 7.

Folgende Dosierung wurde verwendet:

- CCB: 1000 mg/m^2 , zwei Mal täglich für zwei Wochen, peroral
- CTX: zuerst 400 mg/m^2 , danach 250 mg/m^2 wöchentlich, intravenös
- OxPt: 130 mg/m^2 , intravenös

Tabelle 2: Blutabnahmeschema

Blutabnahmeschema in Minuten					
Woche 1 im Zyklus 1		Woche 4 im Zyklus 2		Woche 7 im Zyklus 3	
Tag 1	Tag 5	Tag 1	Tag 5	Tag 1	Tag 5
0	0	0	0	0	0
30	30	30	30	30	30
60	60	60	60	60	60
90	90	90	90	90	90
120	120	120	120	120	120
150		150		150	
180		180		180	
240		240		240	
300		300		300	
360		360		360	

3.2 Patientenprofile

Tabelle 3: Patientenprofile

Gruppe Arm A	Pat. 8	Pat. 9	Pat. 11	Pat. 12	MW
Geschlecht	♂	♀	♀	♀	
Alter	62	75	68	57	65.5
Größe (cm)	176	164	160	160.5	165.1
Gewicht (kg)	73	68	60.5	60	65.4
Diagnose	Fortgeschrittenes Kolorektalkarzinom mit Wildtyp-KRAS-Gen				

Patient 9 gehört eigentlich zur Gruppe Arm B. Da aber kein Unterschied in der Pharmakokinetik zu erwarten ist, haben wir ihn, um aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen, als Patient der Gruppe Arm A behandelt und gekennzeichnet.

3.3 Analytik

3.3.1 Laborausstattung

Tabelle 4: Daten des HPLC-Systems

VWR® HITACHI Chromaster HPLC-System		
	CCB: isokratisch	DFCR/DFUR: Gradient
Vorsäule	LiChroCART® 4-4 LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm)	LiChroCART® 4-4 LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm)
Trennsäule	EcoCART® 125-3 LiChrospher® 100 RP-18e (5 µm) (Merck KGaA)	Discovery® RP Amide C16 (15 cm x 4.6 mm, 5 µm) (SUPELCO® Analytical)
Säulentemperatur	36°C	36°C
Säulenofen	5310	5310
Eluenten	MeOH/Aqua bidest. (50/50 % Vol.)	A: Ammonacetat/MeOH (90/10 % Vol.) B: Ammonacetat/MeOH (10/90 % Vol.)
Druck	ca. 55-60 bar	ca. 55-60 bar
Flussrate	0.8 ml/min	0.8 ml/min
Injektionsvolumen	10 µl	30 µl
Analysenzeit	10 min	30 min
UV Detektor	5410	5410
Wellenlänge	240 nm	280 nm
Retentionszeiten	ca. 5.5 min	DFCR: ca. 5.1 min DFUR: ca. 5.7 min
Software	Chromaster	Chromaster
Pumpe	5110	5110
Auto Sampler	5210	5210



Abbildung 7: VWR® HITACHI Chromaster HPLC-Anlage

Tabelle 5: Reagentien, Chemikalien und Mischungen

Reagentien und Chemikalien	Hersteller
Ammonacetat	ALDRICH® Chemie
Methanol	Merck KGaA
Aqua bidest.	Department für Pharmakognosie Universität Wien
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck KGaA
Mischungen	
Aqua bidest./MeOH (50/50 % Vol.)	
Aqua bidest./MeOH (95/5 % Vol.)	
Eluent A: Ammonacetat in Aqua bidest./MeOH (90/10 % Vol.)	
Eluent B: Ammonacetat in Aqua bidest./MeOH (10/90 % Vol.)	
Phosphatpuffer: 10 mmol Na ₂ HPO ₄ * 2H ₂ O in 1l Aqua bidest., mit Phosphorsäure auf pH 7,4 eingestellt	

Tabelle 6: Materialien und Geräte

Materialien und Geräte	Bezeichnung	Hersteller
Heizblock	DRI-BLOCK® DB 2A	Techne
Analysenwaage	Sartorius handy H110	Sartorius Mechatronics Austria GmbH
Kartuschen	Oasis® HLB 1cc, 30 mg sorbent 30 µm particle size	Waters Corporation
Magnetrührer	MR 3001 K	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG
Mikropipetten	Eppendorf Research: 2-20 µl, 100-1000 µl	Eppendorf AG
Pipettenspitzen	Universal: gelb (2-200 µl), blau (50-1000 µl)	VWR® International
Schüttler	Vortex Mixer	VELP® Scientifica
Vakuumkammer	Vakuum-Festphasen-Extraktionseinheit	ALLTECH
Zentrifuge (klein)	Galaxy 16DH	VWR® International
Zentrifuge (groß)	Labofuge 400 FUNCTION Line	Heraeus Instruments GmbH
Vials	2-SV (A)	Chromacol®
Ultraschallbad	BANDELIN SONOREX RK 510	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG

3.3.2 Verdünnungsreihen von CCB, DFCR und DFUR

Alle drei Substanzen liegen als Pulver vor und werden einzeln mit Aqua bidest. so verdünnt, dass eine Lösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml entsteht. Diese drei Standardlösungen werden bei -80°C gelagert.

Nach dem Auftauen und Vortexen werden 20 µl CCB-Standardlösung mit 1980 µl Plasma, bzw. je 20 µl DFCR- und DFUR-Standardlösung gemeinsam mit 1960 µl Plasma gut gemischt. Dadurch erhält man in beiden Fällen 2 ml mit einer Ausgangskonzentration von 10 µg/ml. In je sechs Eproutetten legt man daraufhin 1 ml Plasma vor.

Ausgehend von den soeben hergestellten Stammlösungen (10 µg/ml) gibt man nun immer 1 ml Lösung zu 1 ml vorgelegtem Plasma, vortext und gibt wieder einen ml weiter. Dies macht man insgesamt sechs Mal. Aus der letzten Eproutette mit der Konzentration 0,156 µg/ml entnimmt man 1 ml und verwirft ihn, damit auch hier 1 ml überbleibt.

So entstehen folgende Konzentrationen:

- 10,000 µg/ml CCB bzw. DFCR/DFUR = Stammlösung
- 5,000 µg/ml CCB bzw. DFCR/DFUR
- 2,500 µg/ml CCB bzw. DFCR/DFUR
- 1,250 µg/ml CCB bzw. DFCR/DFUR
- 0,625 µg/ml CCB bzw. DFCR/DFUR
- 0,312 µg/ml CCB bzw. DFCR/DFUR
- 0,156 µg/ml CCB bzw. DFCR/DFUR

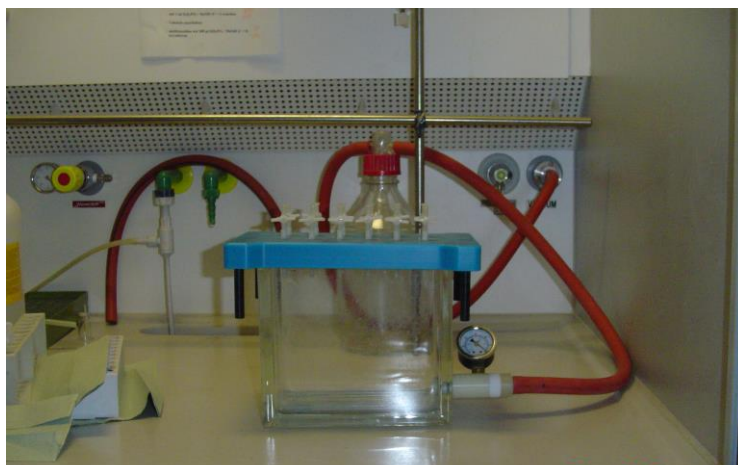


Abbildung 8: Vakuum-Festphasen-Extraktionseinheit

Die Kartuschen (für jede Konzentration eine) werden auf die Vakuum-Festphasen-Extraktionseinheit aufgebracht und ein Vakuum von etwa -300 mbar angelegt. Sowohl bei CCB als auch bei den Metaboliten DFCR und DFUR werden die Kartuschen zuerst mit 1 ml MeOH aktiviert und mit 1 ml Aqua bidest. vorkonditioniert. Danach wird 1 ml Probe jeder Konzentration aufgetragen, wobei bei den Metaboliten die Ausgangskonzentration (10 µg/ml) nicht verwendet wird.

Im Fall von CCB wäscht man die Kartuschen mit 1 ml Aqua bidest./MeOH (95/5 % Vol.) und eluiert abschließend mit 1 ml MeOH, das heißt man schaltet das Vakuum ab, verschließt die Kartuschen und fängt MeOH auf.

Bei den Metaboliten macht man einen Arbeitsschritt weniger, es wird bereits Aqua bidest./MeOH (95/5 % Vol.) aufgefangen. Die Kartuschen mit den Eluaten werden in Eprouvetten gestellt und für drei Minuten bei 1000 U/min zentrifugiert. Abschließend werden die Eluate in Vials überführt, analysiert und die Eichgeraden generiert.

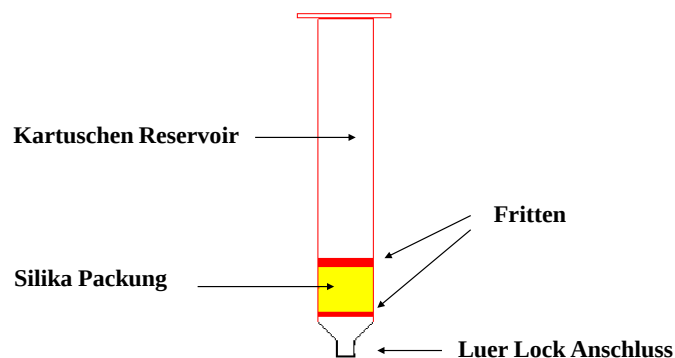


Abbildung 9: Aufbau einer SPE-Kartusche



Abbildung 10: Kartuschen, aufgesteckt über den Luer Lock Anschluss

3.3.3 Vorbereitung der Patientenproben

Die Festphasenextraktion der Patientenproben weist im Wesentlichen kaum Unterschiede auf. Die Proben werden wie die Standardlösungen im DRI-BLOCK® bei maximal 37°C aufgetaut, müssen aber im Gegensatz zu den Lösungen vor der Festphasenextraktion dreieinhalb Minuten bei 5000 U/min. zentrifugiert werden. Zudem trägt man statt 1 ml nur 0,9 ml der Proben auf und verwendet auch bei allen weiteren Schritten danach nur 0,9 ml.

3.3.4 Quantifizierung von CCB, DFCR und DFUR

Man braucht die Eichgeraden, um eine Aussage darüber treffen zu können, welche Konzentrationen von CCB, DFCR und DFUR der Patient im Plasma aufweist. Man verwendet dazu die Formel $y = kx + d$ und wandelt sie in $x = y/k$ um.

y = Peakfläche

x = Konzentration

k = Steigung der Geraden (= Slope)

d = Abschnitt auf der Y-Achse

Die HPLC-Analyse der Proben liefert die Peakfläche, die Eichgeraden das k.

3.4 Berechnungen

3.4.1 Biometrie

Mit Hilfe der Biometrie lässt sich bestimmen, wie stark CCB metabolisiert wird, das heißt wie viel wirksames Prinzip entsteht. Man verwendet dafür zwei Formeln:

$$R_{hCES} = AUC_{DFCR}/AUC_{CCB}$$

$$R_{CytDA} = AUC_{DFUR}/AUC_{DFCR}$$

Dabei steht hCES für humane Carboxylesterase, das Enzym das CCB zu 5'-DFCR metabolisiert, und CytDA für Cytidindesaminase, welche 5'-DFCR weiter in 5'-DFUR umwandelt. Dividiert man nun bei jedem Patient die AUC nach obigem Formelschema, bekommt man je zwei Zahlenwerte für R die ausdrücken, wie viel DFCR und DFUR entstanden ist. Umso höher R, umso mehr aktiver Wirkstoff hat sich im Körper gebildet.

Am Tag 5 wird den Patienten immer nur bis zur Minute 120 Blut abgenommen. Wir haben für die Berechnungen daher immer die AUC_{0-120} verwendet, um Tag 1 und Tag 5 vergleichen zu können. Die Analyse wurde mit Microsoft® Excel durchgeführt.

3.4.2 Deskriptive Statistik

Errechnet wurden Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (SD) und Korrelationskoeffizienten (CV). Letztere ergeben sich aus folgender Formel:

$$CV = (SD * 100)/MW$$

Die deskriptive Statistik ist im Ergebnisteil direkt bei den Patientendaten zu finden. Auch hier erfolgte die Berechnung mit Microsoft® Excel.

3.4.3 Induktive Statistik

Der T-Test wurde eingesetzt um herauszufinden, ob es einen signifikanten Unterschied zwischen einzelnen Werten am Tag 1 und 5 gibt. Einerseits wurden die biometrischen Parameter einem T-Test unterzogen, andererseits haben wir auch die CCB-, DFCR- und DFUR-Plasmakonzentrationen der Patienten in den Minuten 30-120 von Tag 1 jenen von Tag 5 gegenübergestellt.

Verwendet wurde der gepaarte, zweiseitige, homoskedastische Student's T-Test, mit einer maximalen Irrtumswahrscheinlichkeit α von 5 %.

Durch den Test erhalten wir Zahlenwerte, die die Wahrscheinlichkeit p ausdrücken, dass z.B. ein Unterschied zwischen den Gruppen nur zufällig gefunden wurde. Ergibt sich etwa ein p von 0.024, ist es nur zu 2,4 % wahrscheinlich, allein durch Zufall auf einen Unterschied gestoßen zu sein. Die Grenze von $\alpha = 5$ % bestimmt dabei, ob das Ergebnis signifikant oder nicht signifikant ist. Liegt die errechnete Wahrscheinlichkeit p unter 0.05, ist sie somit signifikant [40].

Daraus kann man schließen, dass die Nullhypothese bei einem p -Wert über 0.05 als erwiesen gilt; es lässt sich kein Unterschied zwischen den beiden untersuchten Gruppen feststellen. Ist p jedoch kleiner als 0.05, kann man von einem Unterschied ausgehen.

Der T-Test wurde mit Microsoft® Excel durchgeführt.

3.4.4 Pharmakokinetische Parameter

Die Daten wurden durch nichtkompartimentelle Analyse (NCA) mit extravaskulärem Input (Model 3) des Programms Phoenix™ WinNonlin® 6.1 ermittelt.

Folgende Parameter wurden für CCB Tag 1 errechnet:

- **Rsq:** 'goodness of fit'-Statistik, Anpassung an die terminale Eliminationsphase

- **Corr_XY:** Korrelation zwischen der Zeit (X) und dem Logarithmus der Konzentration (Y) für die Datenpunkte, die für λ_z verwendet wurden
- **No_points_λ_z:** Anzahl der Punkte, die für die Ermittlung von λ_z verwendet wurden
- **λ_z:** Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung, steht in Zusammenhang mit dem terminalen Teil der Kurve
- **HL_λ_z:** Eliminationshalbwertszeit
- **V_z_F_obs:** Verteilungsvolumen, das auf der terminalen Eliminationsphase basiert
- **Cl_F_obs:** Gesamtkörperclearance bei extravaskulärer Gabe
- **AUClast:** Fläche unter der Kurve vom Zeitpunkt der Gabe des Arzneimittels bis zur letzten messbaren Plasmakonzentration
- **AUCINF_obs:** Fläche unter der Kurve vom Zeitpunkt der Gabe des Arzneimittels extrapoliert gegen Unendlich
- **AUC₀₋₁₂₀:** Fläche unter der Kurve vom Zeitpunkt der Gabe des Arzneimittels bis Minute 120
- **MRT_last:** Mittlere Verweildauer vom Zeitpunkt der Gabe des Arzneimittels bis Tlast
- **C_{max}:** maximale beobachtete Plasmakonzentration
- **T_{max}:** Zeitpunkt der maximalen beobachteten Plasmakonzentration
- **Clast:** Letzte messbare Konzentration, bezogen auf Tlast
- **Tlast:** Zeitpunkt der letzten messbaren Konzentration

[41]

Für CCB Tag 5 wurden nur C_{max}, T_{max}, Clast, Tlast, und AUC₀₋₁₂₀ berechnet. Bei den Metaboliten wurden für Tag 1 C_{max}, T_{max}, AUClast und AUC₀₋₁₂₀ bestimmt, für Tag 5 C_{max}, T_{max} und AUC₀₋₁₂₀.

3.5 Zusammenfassung der verwendeten Software

- Microsoft® Office Word 2010: Erstellung der Diplomarbeit
- Microsoft® Office Excel 2010: Statistik, Berechnungen und Tabellen
- Microsoft® Office Paint 2010: Erstellung von farbigen Chromatogrammen
- HSM® Steuerungs- und Integrationssoftware: Software des HPLC-Systems
- GraphPad Prism® 6.0: Berechnungen, Erstellung von Kurven und Layouts
- Phoenix™ WinNonlin® 6.1: Ermittlung der pharmakokinetischen Parameter
- PK-Sim® 4.2.4, Bayer Technology Services: Simulierung der Organverteilung von CCB

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Eichgeraden von CCB und dessen Metaboliten

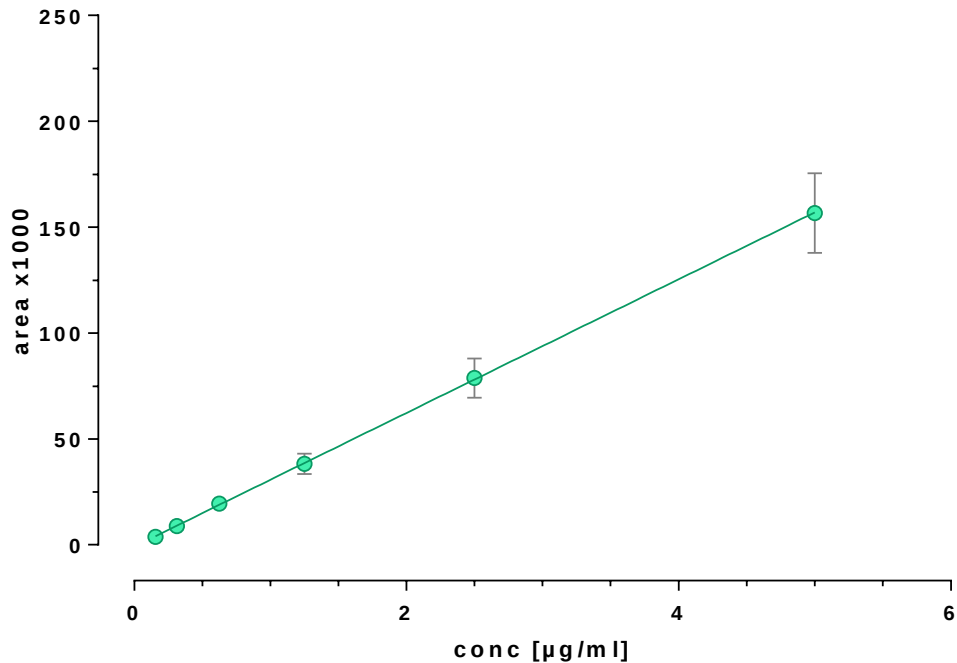


Abbildung 11: Eichgerade von Capecitabin

Tabelle 7: Wichtige statistische Parameter der Eichgerade von CCB

CCB	
Best-fit values	
Slope	31.56 ± 0.1242
Y-intercept when X=0.0	-0.8449 ± 0.2928
X-intercept when Y=0.0	0.02677
95% Confidence Intervals	
Slope	31.22 to 31.91
Y-intercept when X=0.0	-1.658 to -0.03219
X-intercept when Y=0.0	0.001028 to 0.05213
Goodness of Fit	
R square	0.9999
Data	
Number of X values	6

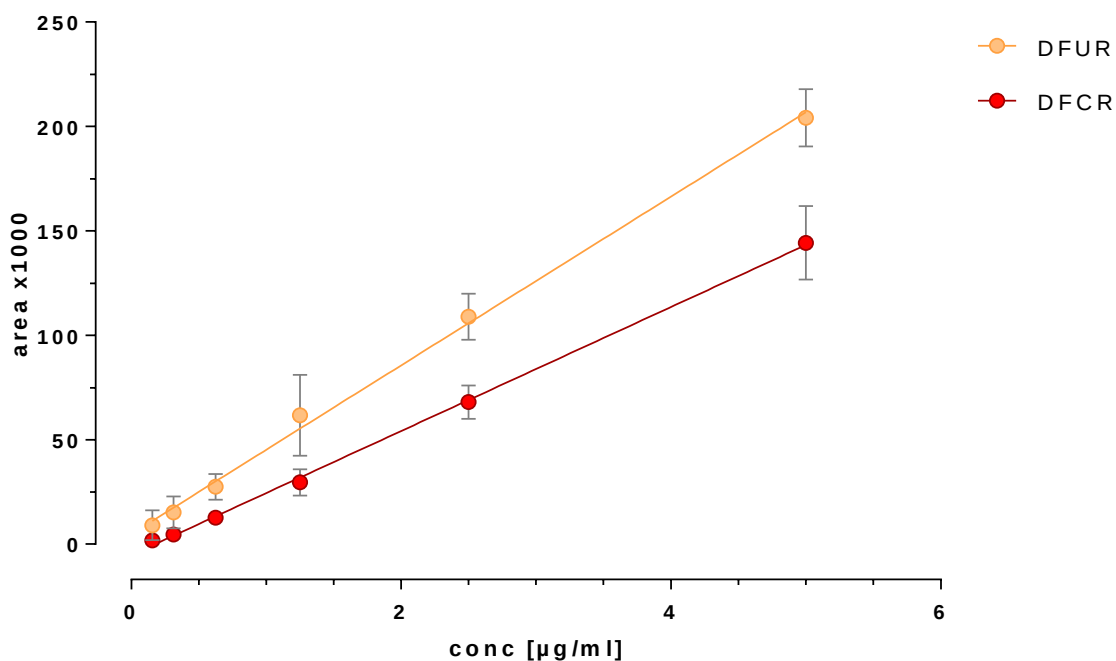


Abbildung 12: Eichgeraden von DFCR und DFUR

Tabelle 8: Wichtige statistische Parameter der Eichgeraden von DFCR und DFUR

DFCR		DFUR	
Best-fit values		Best-fit values	
Slope	29.70 ± 0.4447	Slope	40.40 ± 1.038
Y-intercept when X=0.0	-5.243 ± 1.048	Y-intercept when X=0.0	4.803 ± 2.446
X-intercept when Y=0.0	0.1765	X-intercept when Y=0.0	-0.1189
95% Confidence Intervals		95% Confidence Intervals	
Slope	28.46 to 30.93	Slope	37.52 to 43.28
Y-intercept when X=0.0	-8.152 to -2.333	Y-intercept when X=0.0	-1.987 to 11.59
X-intercept when Y=0.0	0.08088 to 0.2671	X-intercept when Y=0.0	-0.3026 to 0.04687
Goodness of Fit		Goodness of Fit	
R square	0.9991	R square	0.9974
Data		Data	
Number of X values	6	Number of X values	6

4.2 Validierung des HPLC-Systems

Unsere analytische Methode wurde gemäß den Richtlinien aus dem „Handbuch Validierung in der Analytik“ von Stavros Kromidas, sowie dem Artikel „Validation of Bioanalytical Methods“ aus dem Journal „Onkologie“ durch Ermittlung einzelner wichtiger Parameter erfolgreich validiert [42,43].

4.2.1 Robustheit

Dazu haben wir drei Verdünnungsreihen mit den Metaboliten DFCR und DFUR in Plasma verwendet (Herstellung siehe Seite 15-16). Folgende Konzentrationen ($\mu\text{g/ml}$) wurden verwendet: 0.156, 0.312, 0.625, 1.250, 2.500, 5.000. Zur Überprüfung der Robustheit haben wir verschiedene Parameter verändert:

- **Eluent A: Ammonacetat in Aqua bidest./MeOH 92.5/7.5 % Vol.** statt 90/10 % Vol.
- **Eluent B: Ammonacetat in Aqua bidest./MeOH 7.5/92.5 % Vol.** statt 10/90 % Vol.
- **Ofentemperatur 30°C** statt 36°C
- **Flussrate 0.6 ml/min** statt 0.8 ml/min

Tabelle 9: Veränderung der Eluenten

DFCR				DFUR			
conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Ret. Zeit 1 (min)	Ret. Zeit 2 (min)	Differenz (min)	conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Ret. Zeit 1 (min)	Ret. Zeit 2 (min)	Differenz (min)
0.156	5.367	6.200	0.833	0.156	6.020	6.973	0.953
0.312	5.360	6.193	0.833	0.312	6.020	6.973	0.953
0.625	5.353	6.180	0.827	0.625	6.020	6.960	0.940
1.250	5.347	6.187	0.840	1.250	6.013	6.967	0.954
2.500	5.347	6.187	0.840	2.500	6.013	6.967	0.954
5.000	5.380	6.180	0.800	5.000	6.047	6.960	0.913
MW	5.359	6.188	0.829	MW	6.022	6.967	0.945
SD	0.013	0.008	0.015	SD	0.013	0.006	0.016

Retentionszeit 1 ist dabei jene, die man unter den üblichen Eluenten (90/10 % Vol. und 10/90 % Vol.) beobachten kann, die Retentionszeit 2 ergibt sich durch die oben beschriebene Veränderung derselben.

Anhand der Tabellen erkennt man, dass sich durch die veränderte Zusammensetzung der Eluenten die Retentionszeit von DFCR im Mittel um 0.829 Minuten nach hinten verschiebt, bei DFUR sind es im Mittel 0.945 Minuten. Dies entspricht einer Änderung von ca. 15 % für beide Metaboliten.

Tabelle 10: Veränderung der Ofentemperatur

DFCR				DFUR			
conc. (µg/ml)	Ret. Zeit 1 (min)	Ret. Zeit 2 (min)	Differenz (min)	conc. (µg/ml)	Ret. Zeit 1 (min)	Ret. Zeit 2 (min)	Differenz (min)
0.156	5.367	5.527	0.160	0.156	6.020	6.253	0.233
0.312	5.360	5.527	0.167	0.312	6.020	6.260	0.240
0.625	5.353	5.533	0.180	0.625	6.020	6.253	0.233
1.250	5.347	5.533	0.186	1.250	6.013	6.253	0.240
2.500	5.347	5.533	0.186	2.500	6.013	6.253	0.240
5.000	5.380	5.527	0.147	5.000	6.047	6.247	0.200
MW	5.359	5.530	0.171	MW	6.022	6.253	0.231
SD	0.013	0.003	0.016	SD	0.013	0.004	0.016

Die Retentionszeit 1 ergibt sich bei der üblichen Ofentemperatur von 36°C, die Retentionszeit 2 bei 30°C.

Durch das Absenken der Ofentemperatur verschieben sich die Retentionszeiten im Vergleich zu den anderen beiden Experimenten nur geringfügig. Bei DFCR ändert sie sich durchschnittlich um 0.171 Minuten, bei DFUR um 0.231. Das sind in beiden Fällen nur etwa 3 %.

Tabelle 11: Veränderung der Flussrate

DFCR				DFUR			
conc. (µg/ml)	Ret. Zeit 1 (min)	Ret. Zeit 2 (min)	Differenz (min)	conc. (µg/ml)	Ret. Zeit 1 (min)	Ret. Zeit 2 (min)	Differenz (min)
0.156	5.367	7.000	1.633	0.156	6.020	7.793	1.773
0.312	5.360	7.013	1.653	0.312	6.020	7.831	1.811
0.625	5.353	7.020	1.667	0.625	6.020	7.827	1.807
1.250	5.347	7.040	1.693	1.250	6.013	7.847	1.834
2.500	5.347	7.067	1.720	2.500	6.013	7.880	1.867
5.000	5.380	7.113	1.733	5.000	6.047	7.927	1.880
MW	5.359	7.042	1.683	MW	6.022	7.851	1.829
SD	0.013	0.042	0.039	SD	0.013	0.047	0.040

Die Retentionszeit 1 ergibt sich aus einer Flussrate von 0.8 ml/min, die Retentionszeit 2 aus einer Senkung derselben auf 0.6 ml/min.

Wie erwartet verschieben sich die Retentionszeiten durch die Verminderung der Flussrate am stärksten. Jene von DFCR wandert im Schnitt um 1.683 Minuten nach hinten, die Retentionszeit von DFUR sogar um 1.829 Minuten. Dies ist umgerechnet eine zeitliche Verschiebung von ca. 30 % für DFCR und DFUR.

4.2.2 Linearität

Zur Überprüfung der Linearität haben wir den Mittelwert der Peakflächen dreier Verdünnungsreihen bei allen sechs verschiedenen Konzentrationen gebildet und eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt. Für die Erstellung der Geraden wird die Konzentration gegen die area x 1000 aufgetragen. Nachstehend wird diese Analyse tabellarisch und graphisch dargestellt.

Tabelle 12: Ergebnis der linearen Regression

DFCR					
conc. (µg/ml)	mean area	residuals area		slope	27.39 ± 0.3633
0.156	2.476	0.447		y-intercept	-2.244 ± 0.8562
0.312	5.681	-0.621		r	0,9996
0.625	14.565	-0.311			
1.250	30.885	-1.112			
2.500	68.751	2.512			
5.000	133.807	-0.914			

DFUR					
conc. (µg/ml)	mean area	residuals area		slope	40.26 ± 0.7831
0.156	6.632	-1.048		y-intercept	1.400 ± 1.846
0.312	11.830	-2.130		r	0,9992
0.625	25.823	-0.737			
1.250	53.152	1.431			
2.500	107.210	5.168			
5.000	200.001	-2.684			

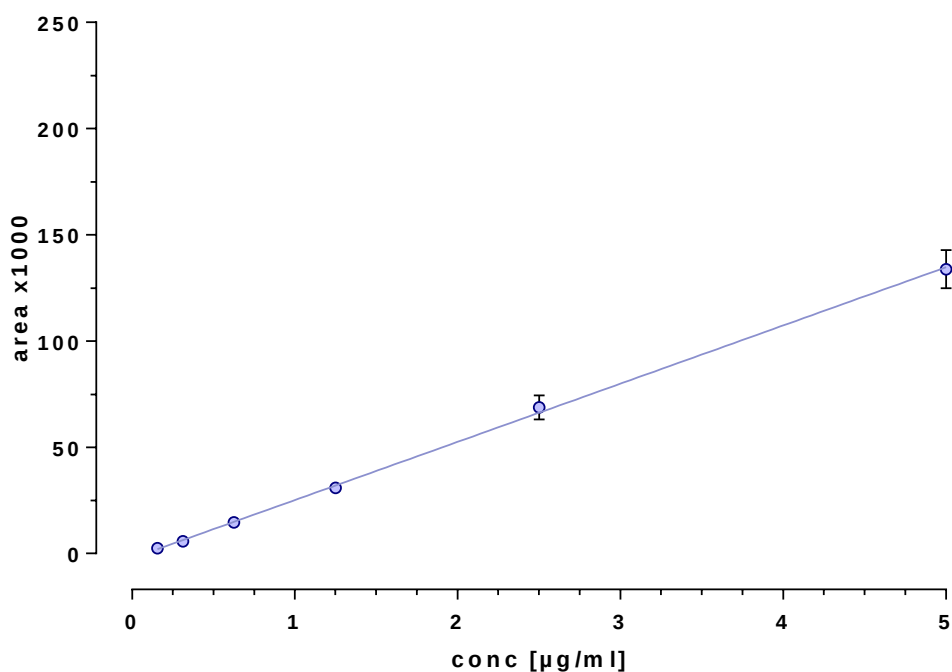


Abbildung 13: Linearität der Peakfläche von DFCR

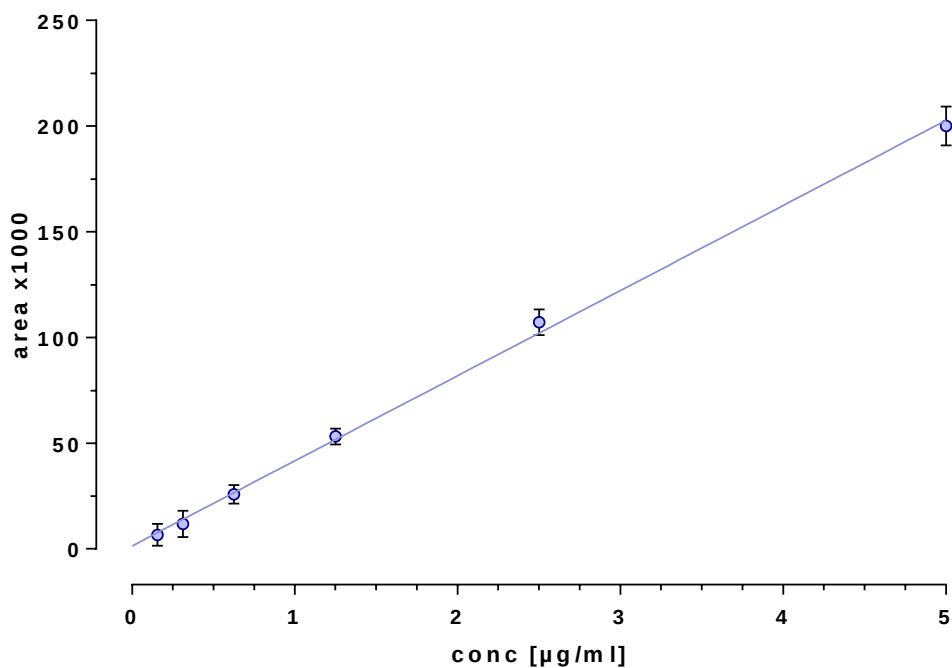


Abbildung 14: Linearität der Peakfläche von DFUR

Zusätzlich haben wir uns mit der Linearität des Injektionsvolumens im Auto Sampler beschäftigt. Dazu wurden drei Mal 1 µg DFCR und DFUR aus Plasma extrahiert, wodurch wir drei Mal 1 ml Lösung erhielten. Davon wurden je 20, 30, 40, 50 und 60 µl eingespritzt. Tabelle 13 und die Abbildungen 15-16 belegen, dass eine sehr strenge Abhängigkeit der Peakflächen vom Injektionsvolumen existiert.

Tabelle 13: Linearität des Injektionsvolumens

DFCR

Inj. Vol.	area 1	area 2	area 3	MW	SD
20 µl	41.14	40.20	40.37	40.57	0.501
30 µl	63.00	62.07	59.83	61.63	1.629
40 µl	82.96	81.68	79.03	81.22	2.004
50 µl	102.24	101.00	101.64	101.63	0.620
60 µl	120.52	119.88	119.51	119.97	0.511

DFUR

Inj. Vol.	area 1	area 2	area 3	MW	SD
20 µl	30.39	29.74	29.35	29.83	0.525
30 µl	45.62	45.89	43.89	45.13	1.085
40 µl	61.18	60.46	57.52	59.72	1.939
50 µl	75.85	74.41	75.15	75.14	0.720
60 µl	89.91	88.67	88.46	89.01	0.784

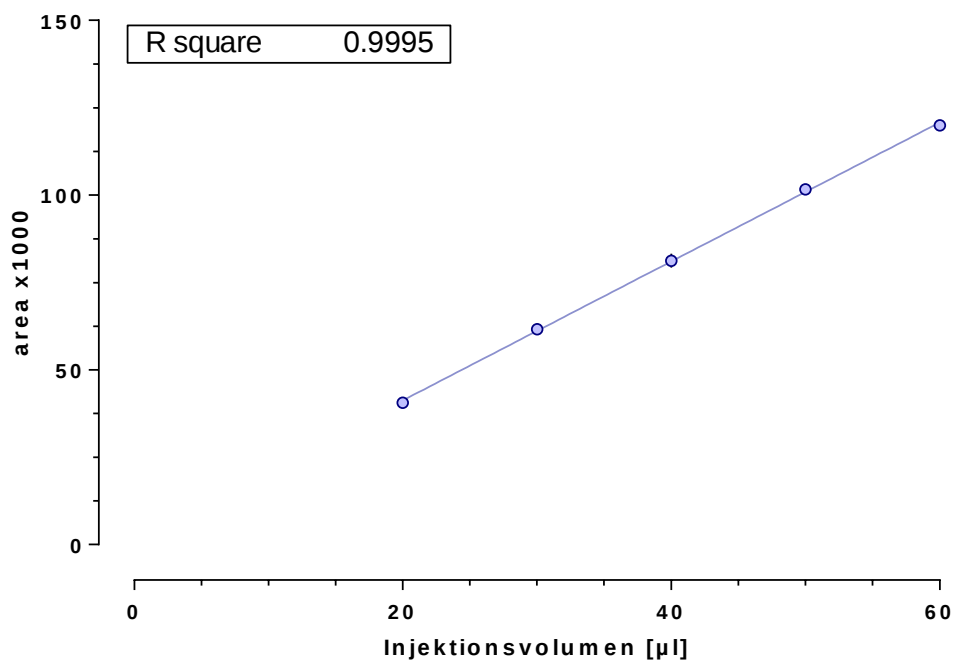


Abbildung 15: Linearität der Peakfläche von DFCR bei Veränderung des Injektionsvolumens

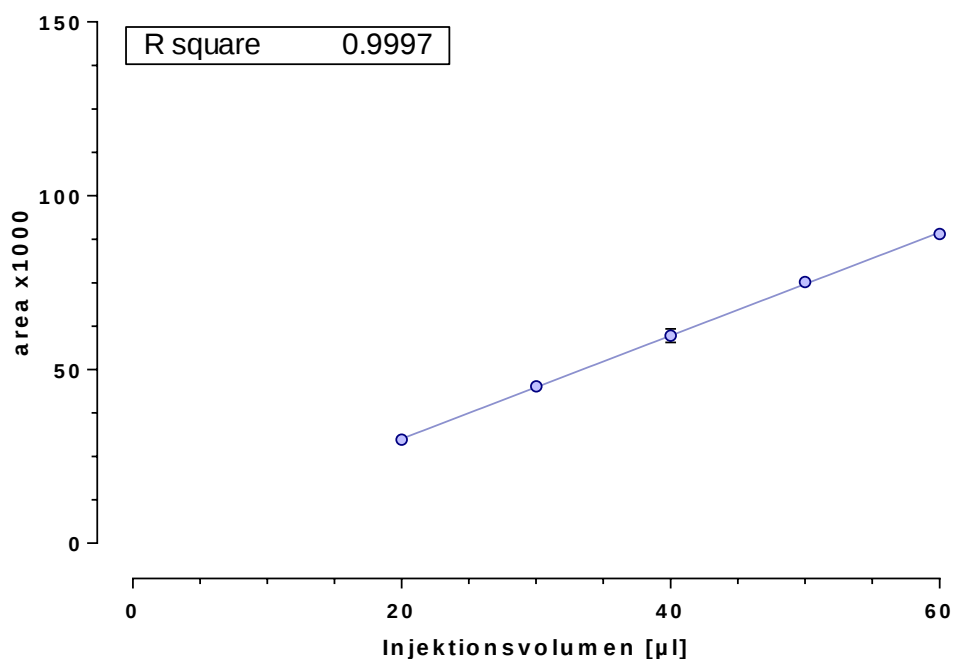


Abbildung 16: Linearität der Peakfläche von DFUR bei Veränderung des Injektionsvolumens

Es zeigt sich, dass die Linearität sowohl bezogen auf steigende Konzentrationen, als auch auf steigende Injektionsvolumina gegeben ist.

4.2.3 Detektions- und Quantifizierungsgrenze

Durch sukzessives Verdünnen der ursprünglichen Lösung in 1+1 Schritten gelangten wir zu den Werten für LOD und LOQ, welche für die vorliegende Methode bei den in Tabelle 14 aufgelisteten Konzentrationen liegen.

Tabelle 14: LOD und LOQ

	in Plasma		in Puffer pH 7.4	
	DFCR	DFUR	DFCR	DFUR
LOD (µg/ml)	0.039	0.039	0.039	0.039
LOQ (µg/ml)	0.156	0.156	0.039	0.039

Die Richtwerte sind hinsichtlich Signal-to-Noise Ratio (>5:1) in unserem Fall sowohl für LOD (Detektionsgrenze) als auch für LOQ (Quantifizierungsgrenze) erfüllt.

4.2.4 Richtigkeit, Wiederholpräzision, Laborpräzision

Die Richtigkeit (ausgedrückt durch die Wiederfindung) wurde durch wiederholte Injektion im gleichen Proben-Run (Intra-Assay = 1. und 2. Lauf) und die Wiederholpräzision durch den Vergleich zwischen verschiedenen Probenläufen an den Tagen 1, 7 und 14 analysiert (Inter-Assay).

Dazu haben wir die Konzentrationen 0.156, 1.250 und 5.000 µg/ml von drei verschiedenen Verdünnungsreihen herangezogen. Die Proben wurden zwischen den einzelnen Analysen bei -80°C eingefroren.

Tabelle 15: Richtigkeit und Wiederholpräzision

DFCR									
	0.156			1.250			5.000		
	MW (µg/ml)	SD	WF (%)	MW (µg/ml)	SD	WF (%)	MW (µg/ml)	SD	WF (%)
1. Lauf	0.14	0.020	90.36	1.24	0.095	99.22	4.99	0.110	99.89
2. Lauf	0.15	0.012	94.13	1.24	0.082	99.10	4.95	0.165	99.07
Tag 1	0.14	0.020	90.36	1.24	0.095	99.22	4.99	0.110	99.89
Tag 7	0.15	0.023	95.90	1.36	0.056	108.55	5.14	0.106	102.86
Tag 14	0.16	0.007	98.96	1.23	0.064	98.56	5.12	0.204	102.46

DFUR									
	0.156			1.250			5.000		
	MW (µg/ml)	SD	WF (%)	MW (µg/ml)	SD	WF (%)	MW (µg/ml)	SD	WF (%)
1. Lauf	0.13	0.023	84.72	1.18	0.177	94.27	4.96	0.205	99.28
2. Lauf	0.13	0.012	81.47	1.18	0.157	94.46	4.96	0.202	99.14
Tag 1	0.13	0.023	84.72	1.18	0.177	94.27	4.96	0.205	99.28
Tag 7	0.13	0.012	86.88	1.28	0.052	102.60	5.01	0.281	100.14
Tag 14	0.14	0.007	85.80	1.08	0.081	86.73	5.14	0.229	102.85

Wie aus obiger Tabelle ersichtlich, ist die Wiederfindungsrate (WF) sowohl für DFCR als auch für DFUR exzellent, lediglich bei sehr niedrigen Konzentrationen von DFUR (0.156 µg/ml) ist der Substanzverlust ausgeprägter (ca. 10 %).

Im Rahmen der Laborpräzision (Vergleichbarkeit der Analysenergebnisse) haben wir Eichgeraden aus einer anderen Diplomarbeit (Analyst 1) mit jenen von uns (Analyst 2) verglichen. Hierzu wurden die Konzentrationen 0.312, 1.250 und 5.000 µg/ml von je drei verschiedenen Verdünnungsreihen verwendet.

Tabelle 16: Laborpräzision

DFCR									
	0.312			1.250			5.000		
	MW (µg/ml)	SD	WF (%)	MW (µg/ml)	SD	WF (%)	MW (µg/ml)	SD	WF (%)
Analyst 1	0.22	0.100	70.51	1.06	0.100	85.12	4.86	0.610	97.18
Analyst 2	0.26	0.060	83.33	1.14	0.180	90.80	4.90	0.790	98.04
proz. Änderung 1			-29.49			-14.88			-2.82
proz. Änderung 2			-16.67			-9.20			-1.96

DFUR									
	0.312			1.250			5.000		
	MW (µg/ml)	SD	WF (%)	MW (µg/ml)	SD	WF (%)	MW (µg/ml)	SD	WF (%)
Analyst 1	0.33	0.150	105.45	1.33	0.100	106.48	5.02	0.180	100.30
Analyst 2	0.28	0.040	88.46	1.21	0.130	96.56	4.95	0.430	99.00
proz. Änderung 1			5.45			6.48			0.30
proz. Änderung 2			-11.54			-3.44			-1.00

Wie aus Tabelle 16 zu entnehmen, liegt die Präzision der erhaltenen Ergebnisse relativ eng beieinander, die Methode ist somit richtig und präzise.

4.2.5 Selektivität

Um die Selektivität der Quantifizierung von DFCR und DFUR zu überprüfen, wurden die Metaboliten aus unterschiedlicher Matrix bestimmt und mit Leerplasma verglichen. Die Abbildung 17 veranschaulicht anhand von vier Chromatogrammen die Selektivität der Methode.

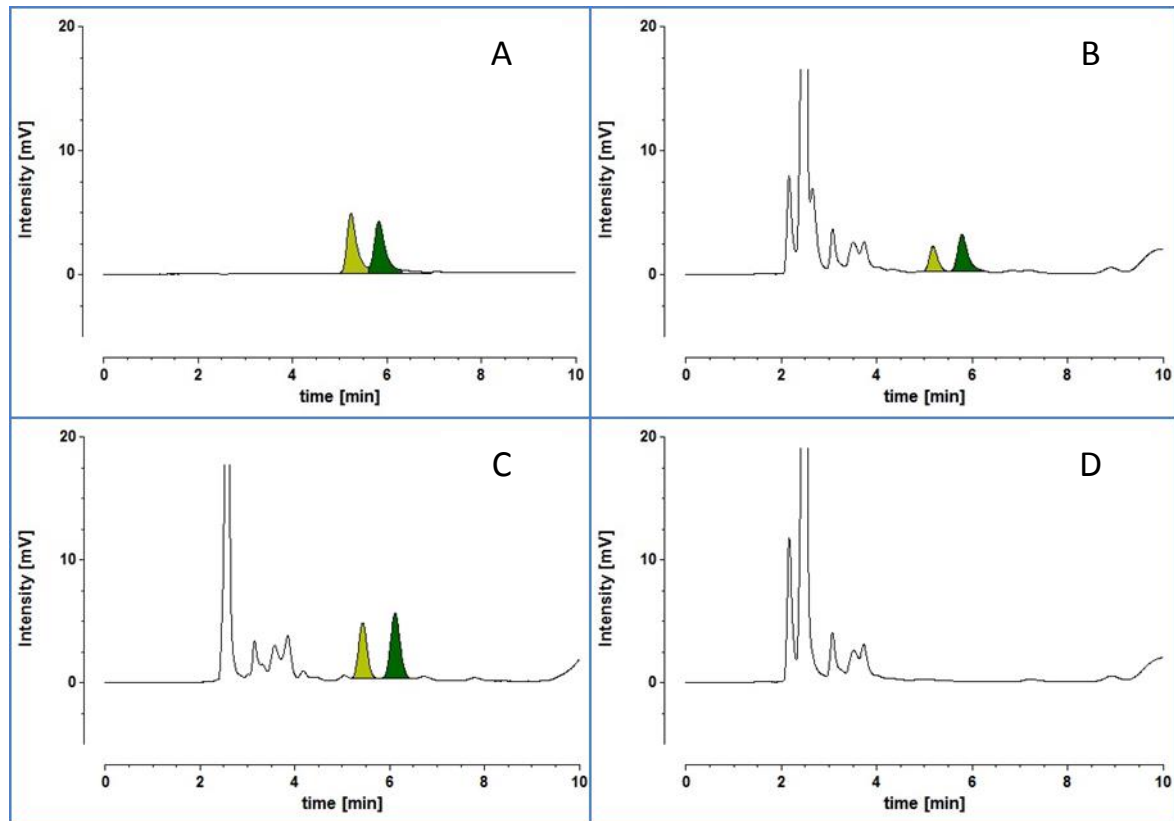


Abbildung 17: Vergleich von vier verschiedenen Chromatogrammen

- A = Eichgerade in Puffer
- B = Eichgerade in Plasma
- C = Beispiel einer Patientenprobe
- D = Leerplasma

Es kommt zu keiner Überlappung der Metaboliten-Peaks und Peaks der Matrix, die Methode ist selektiv.

4.2.6 Stabilität

Die Stabilität von DFCR und DFUR im Plasma wurde auf zwei verschiedene Arten ermittelt. Zum einen wurde eine Verdünnungsreihe immer wieder eingefroren und aufgetaut und an den Tagen 1, 7 und 14 analysiert.

Zum anderen haben wir eine zweite Verdünnungsreihe zwei Wochen im Auto Sampler Rack der HPLC-Anlage stehen lassen ('stability on the machine') und diese ebenfalls an den Tagen 1, 7 und 14 laufen lassen. Die Tabellen 17 und 18 fassen die Ergebnisse zusammen.

Tabelle 17: Stabilität durch Einfrieren und Auftauen

DFCR					
conc. (µg/ml)	WF Tag 1 (%)	WF Tag 7 (%)	WF Tag 14 (%)	MW	SD
0.156	81.58	93.44	106.51	93.84	12.470
0.312	77.59	78.68	93.81	83.36	9.066
0.625	92.27	87.37	95.53	91.72	4.107
1.250	88.94	90.09	91.75	90.26	1.413
2.500	95.80	95.86	101.60	97.75	3.331
5.000	99.12	100.05	105.14	101.44	3.241

DFUR					
conc. (µg/ml)	WF Tag 1 (%)	WF Tag 7 (%)	WF Tag 14 (%)	MW	SD
0.156	91.22	76.52	88.89	85.54	7.901
0.312	84.68	75.18	87.09	82.32	6.297
0.625	103.37	85.66	102.79	97.27	10.062
1.250	92.77	85.57	95.01	91.12	4.932
2.500	102.32	102.99	115.31	106.87	7.314
5.000	99.12	98.83	109.02	102.32	5.801

Tabelle 18: Stabilität 'on the machine'

DFCR					
conc. (µg/ml)	WF Tag 1 (%)	WF Tag 7 (%)	WF Tag 14 (%)	MW	SD
0.156	101.57	na	98.31	99.94	2.308
0.312	na	59.14	110.24	84.69	36.139
0.625	61.75	79.45	95.53	78.91	16.898
1.250	81.77	81.02	73.92	78.90	4.335
2.500	84.78	93.07	91.54	89.80	4.414
5.000	98.55	98.82	92.53	96.63	3.553

DFUR					
conc. (µg/ml)	WF Tag 1 (%)	WF Tag 7 (%)	WF Tag 14 (%)	MW	SD
0.156	94.78	na	71.51	83.15	16.459
0.312	na	57.48	48.80	53.14	6.137
0.625	71.53	84.08	102.79	86.13	15.731
1.250	90.28	81.19	81.64	84.37	5.124
2.500	83.86	82.14	91.49	85.83	4.975
5.000	99.48	89.79	95.75	95.01	4.889

Es zeigt sich, dass die Wiederfindung der Metaboliten durch Einfrieren und Auftauen immer über 75 % liegt. Anders ist es beim Stehenlassen im Auto Sampler Rack. Die Mittelwerte liegen deutlich unter jenen des Einfrier-Auftau-Zyklus, in Einzelfällen sinkt die Wiederfindung auf unter 60 %. Die Metaboliten erwiesen sich also bei beiden Überprüfungen als nicht stabil.

Da wir unsere Patientenproben aber nur einmal auftauen, nicht wiederverwenden und auch nie bei Raumtemperatur stehen lassen, beeinflusst diese Erkenntnis unsere Analytik nicht. Die Probenanalyse erfolgte immer sofort nach Erhalt.

Bei der Stabilität 'on the machine' sind bei manchen Konzentrationen, aus uns unerklärlichen Gründen, Überlappungen der Peaks aufgetreten, weshalb keine AUC und somit auch keine Wiederfindung ermittelt werden konnte (mit „na“ gekennzeichnete Felder in der Tabelle 18).

4.3 Zeitliche Verläufe von CCB und dessen Metaboliten im Blut von Chemotherapie-Patienten

Die nachfolgenden Abbildungen zeigen Chromatogramme von CCB am Tag 1 und 5 und anschließend von DFCR und DFUR am Tag 1 und 5.

Im Falle der Metaboliten wurden die Chromatogramme der besseren Übersicht wegen nach zehn Minuten abgeschnitten, obwohl die Laufzeit dreißig Minuten beträgt.

Anhand der nachstehenden Abbildung zeigt sich, dass dies zu keiner Veränderung des Chromatogramms an sich führt, die Grafik wird lediglich gestreckt und man kann die Peaks der Metaboliten wesentlich klarer darstellen.

Für diese Veranschaulichung wurde dasselbe Chromatogramm herangezogen, welches schon unter dem Punkt Selektivität als „Beispiel einer Patientenprobe“ angeführt wurde.

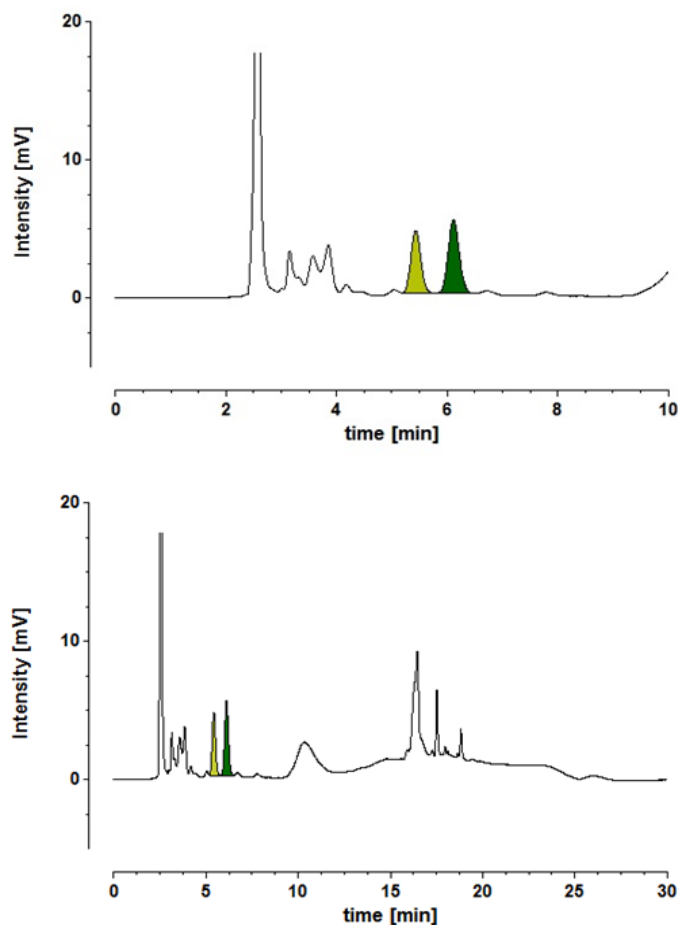


Abbildung 18: Vergleich desselben Chromatogramms mit unterschiedlichen x-Achsen

4.3.1 Zeitlicher Verlauf von CCB im Blut

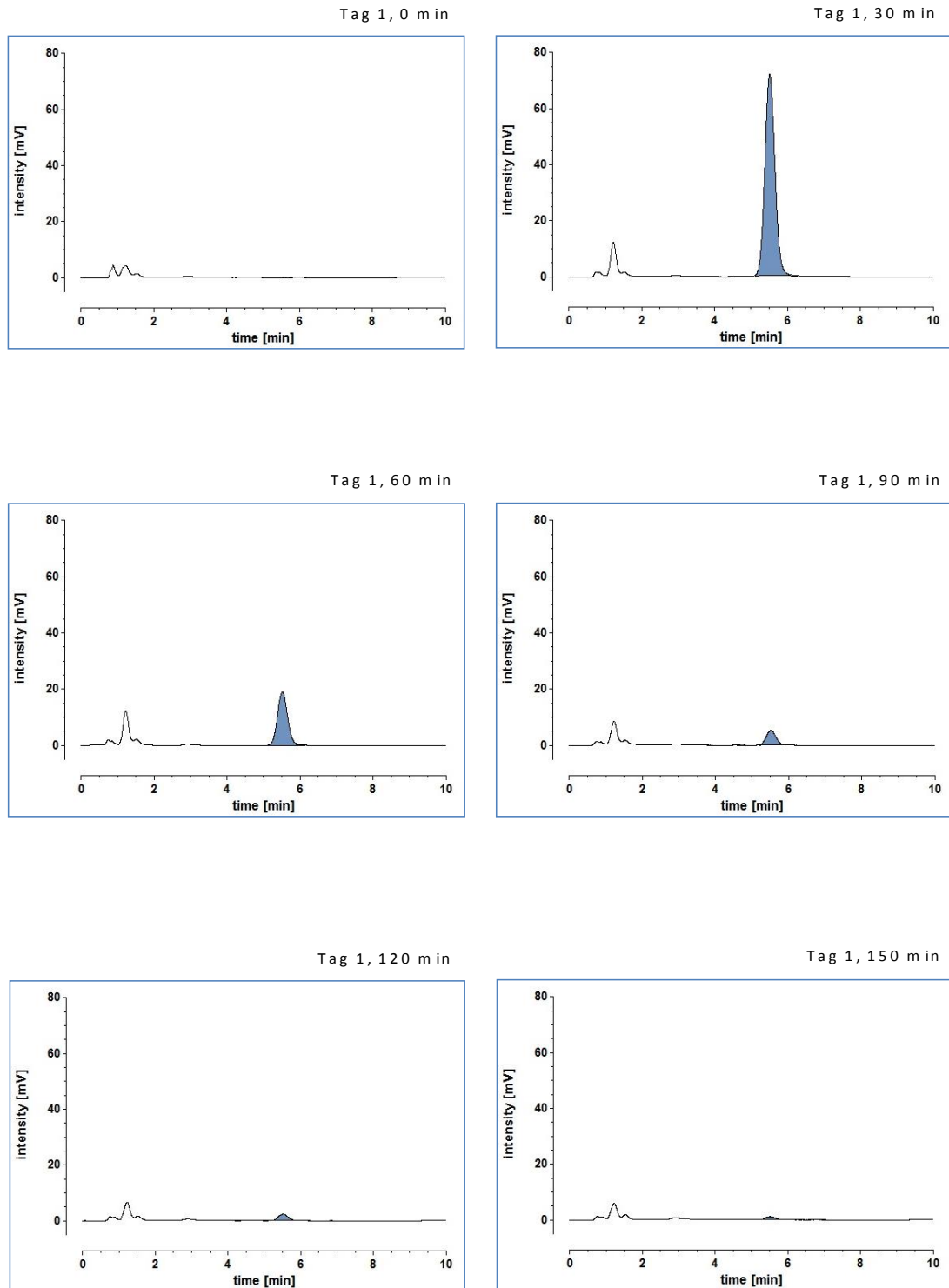


Abbildung 19: Zeitlicher Verlauf von CCB, Tag 1, 0-150 min

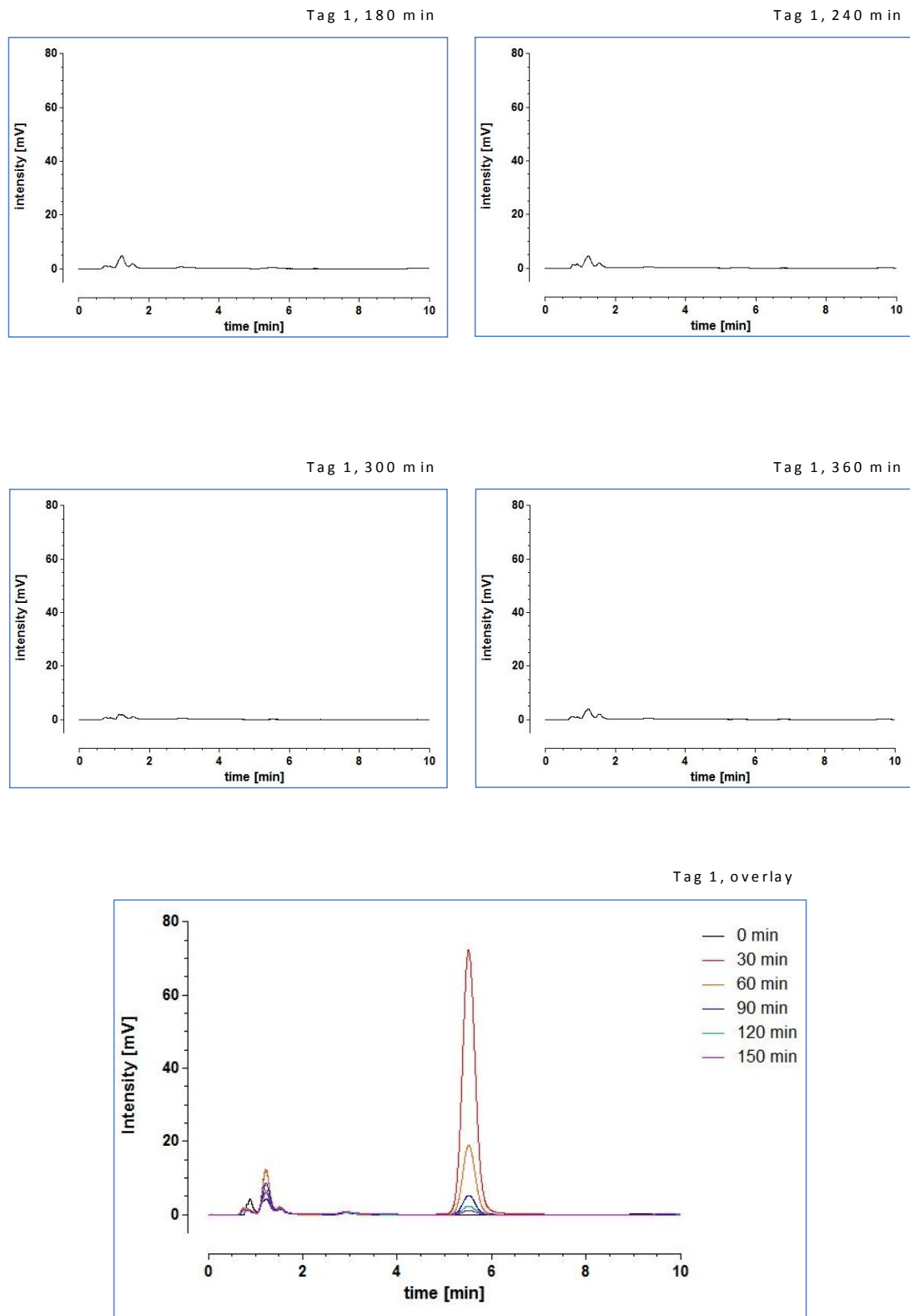


Abbildung 20: Zeitlicher Verlauf von CCB, Tag 1, 180-360 min

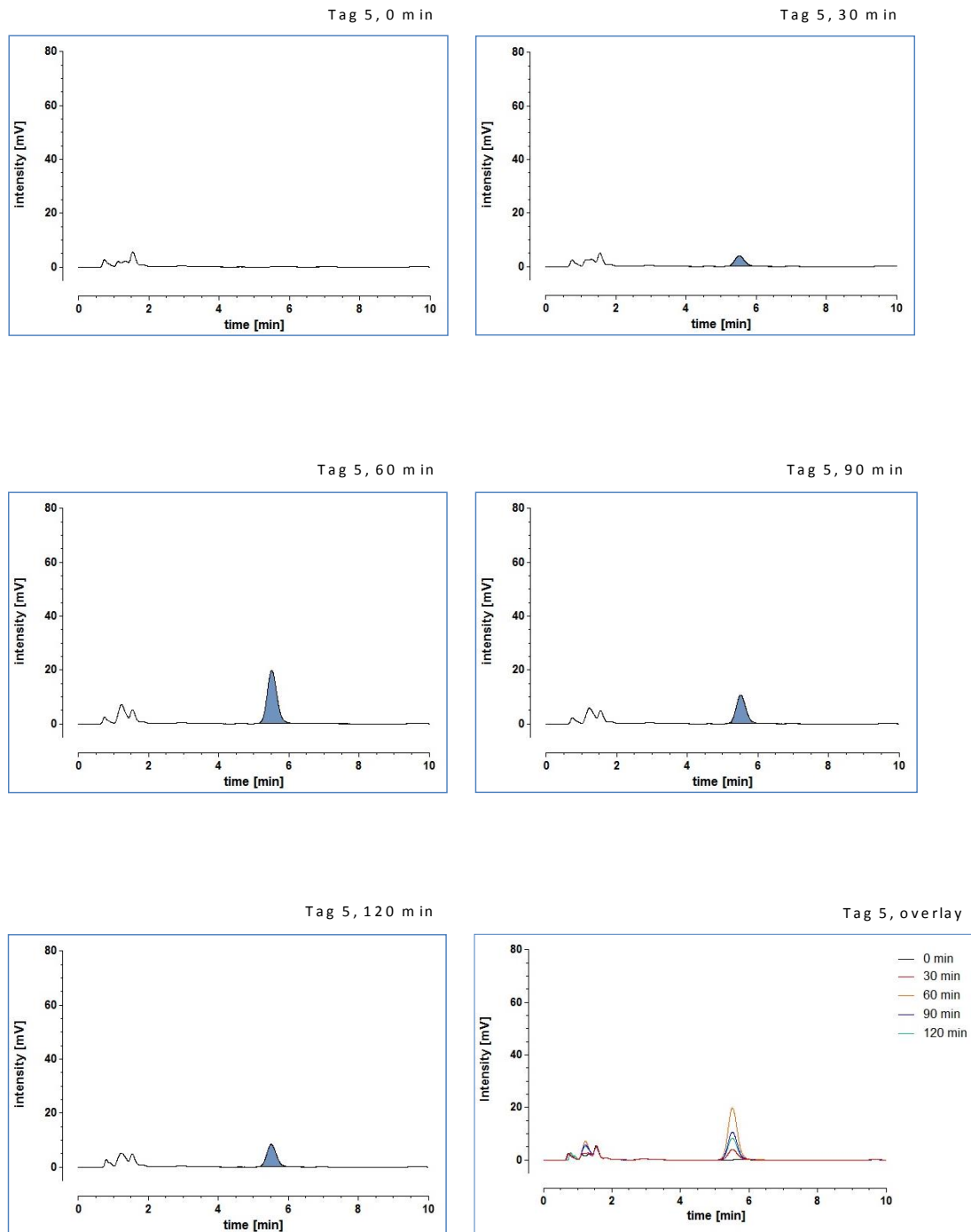


Abbildung 21: Zeitlicher Verlauf von CCB, Tag 5

4.3.2 Zeitliche Verläufe von DFCR und DFUR im Blut

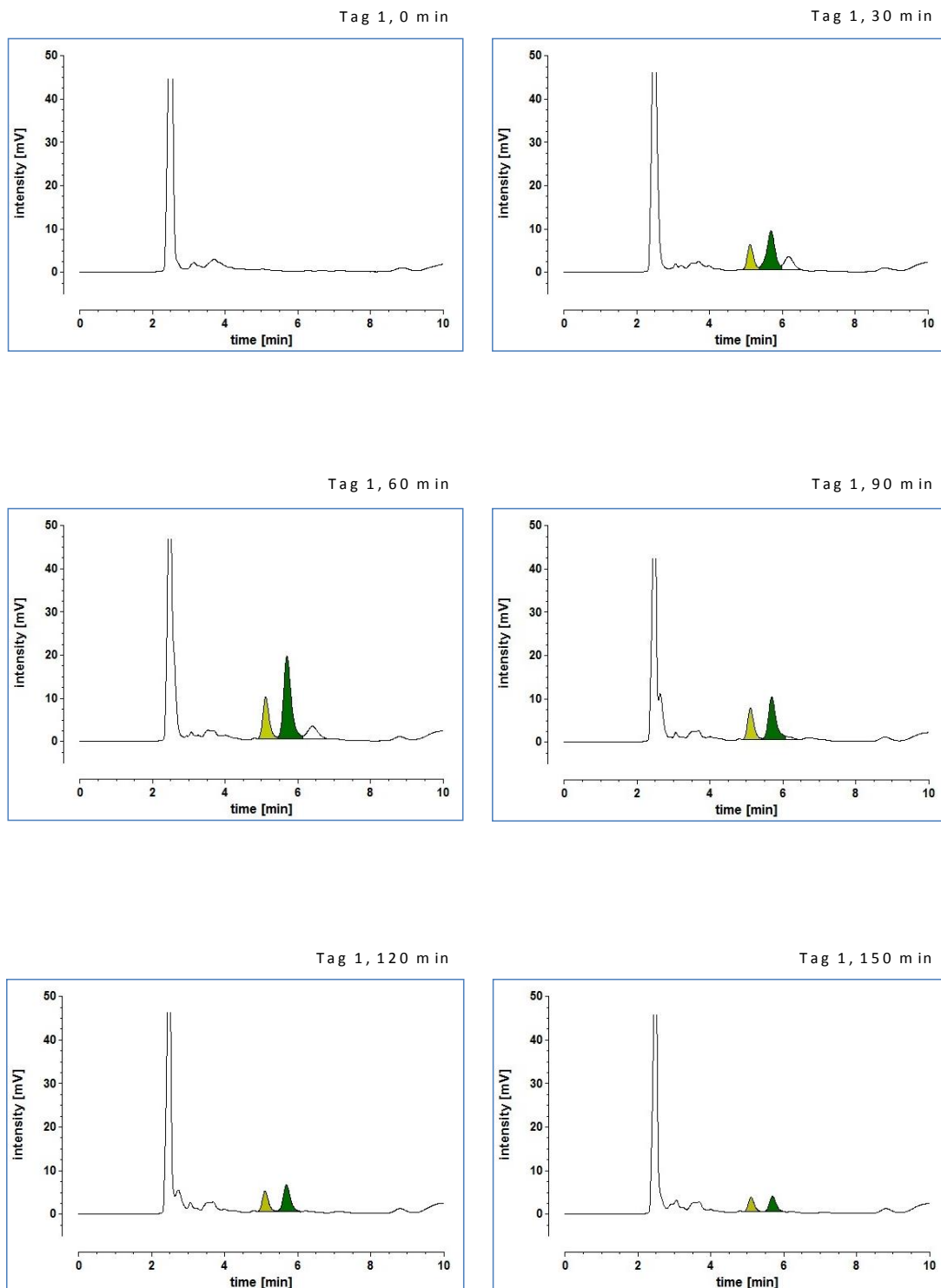


Abbildung 22: Zeitliche Verläufe von DFCR und DFUR, Tag 1, 0-150 min

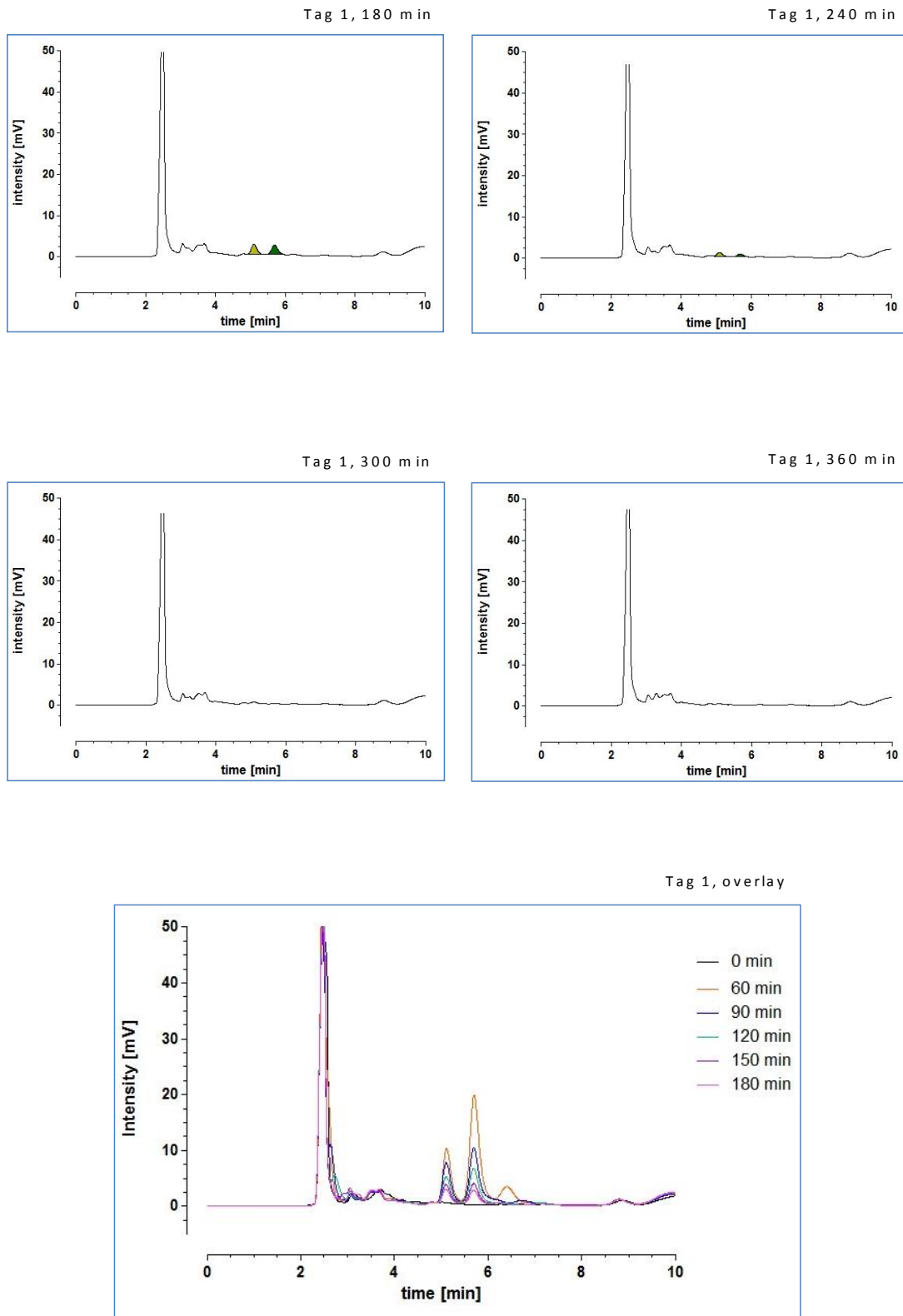


Abbildung 23: Zeitliche Verläufe von DFCR und DFUR, Tag 1, 180-360 min

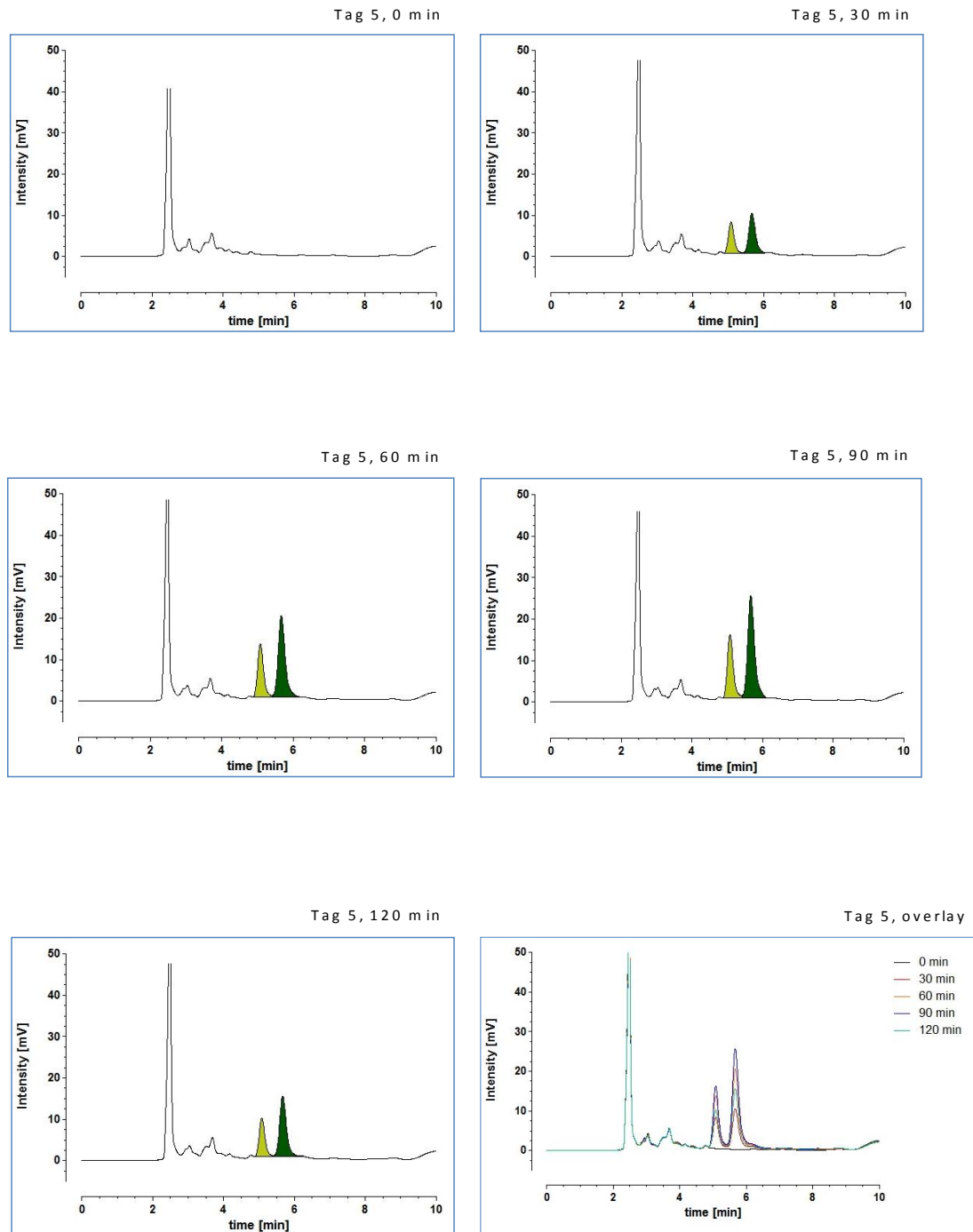


Abbildung 24: Zeitliche Verläufe von DFCR und DFUR, Tag 5

4.4 Daten und Plasmakonzentrations-Zeitkurven der Patienten

Insgesamt wurden für die vorliegende Diplomarbeit vier Patienten an den Tagen 1 und 5 in der Woche 7 der Xeloda®-Therapie analysiert. Diesen Studienteilnehmern wurde die Dreifach-Kombination mit Oxaliplatin und Cetuximab verabreicht.

Deren Plasmakonzentrationen und Konzentrations-Zeitkurven sind auf den folgenden Seiten dargestellt.

4.4.1 Patient 8

Tabelle 19: Patient 8, Woche 7, Plasmakonzentrationen von CCB, DFCR und DFUR,

Tag 1 und 5

	Zeit (min)	CCB ($\mu\text{g/ml}$)	DFCR ($\mu\text{g/ml}$)	DFUR ($\mu\text{g/ml}$)
Tag 1	0	0.000	0.000	0.000
	30	43.422	5.549	2.512
	60	11.397	7.859	5.460
	90	3.029	3.222	1.663
	120	1.315	1.269	0.611
	150	0.634	1.013	0.220
	180	0.225	0.572	0.196
	240	0.057	0.168	0.064
	300			
	360			
Tag 5	0	0.000	0.000	0.000
	30	0.038		
	60	0.054		
	90	0.111	0.057	0.072
	120	1.774	0.680	0.287

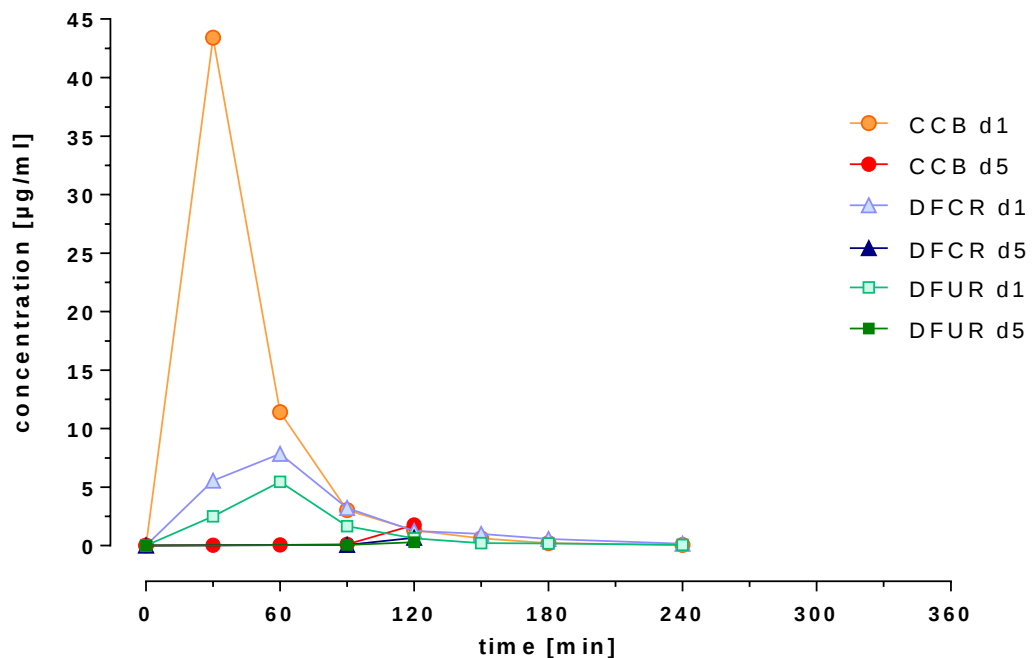


Abbildung 25: Patient 8, Woche 7, Konzentrations-Zeitkurven von CCB, DFCR und DFUR,

Tag 1 und 5

Die Plasmakonzentrationen von CCB am Tag 1 sind im Vergleich zu den anderen Patienten extrem hoch. Die $c_{\max}$ beträgt fast. 45 $\mu\text{g/ml}$ an Stelle von $< 10 \mu\text{g/ml}$. Im Gegensatz dazu ist CCB am Tag 5 kaum in den Blutproben messbar. Die Werte für DFCR und DFUR von Tag 1 sind durchaus mit jenen der anderen Patienten vergleichbar, am Tag 5 zeigen sich analog zu CCB jedoch äußerst geringe Konzentrationen. Dies bedeutet, dass Capecitabin kaum metabolisiert wurde.

4.4.2 Patient 9

Tabelle 20: Patient 9, Woche 7, Plasmakonzentrationen von CCB, DFCR und DFUR,
Tag 1 und 5

	Zeit (min)	CCB ($\mu\text{g/ml}$)	DFCR ($\mu\text{g/ml}$)	DFUR ($\mu\text{g/ml}$)
Tag 1	0	0.000	0.000	0.000
	30	8.470	2.145	3.267
	60	9.471	4.195	9.609
	90	3.064	2.152	4.094
	120	2.506	1.064	1.525
	150	1.534	0.542	0.661
	180	1.058	0.404	0.337
	240	0.488	0.246	0.104
	300	0.288		
	360	0.177		
Tag 5	0	0.000	0.000	0.000
	30	2.297	0.384	0.540
	60	11.996	3.098	7.233
	90	6.445	2.444	6.411
	120	4.987	1.838	5.099

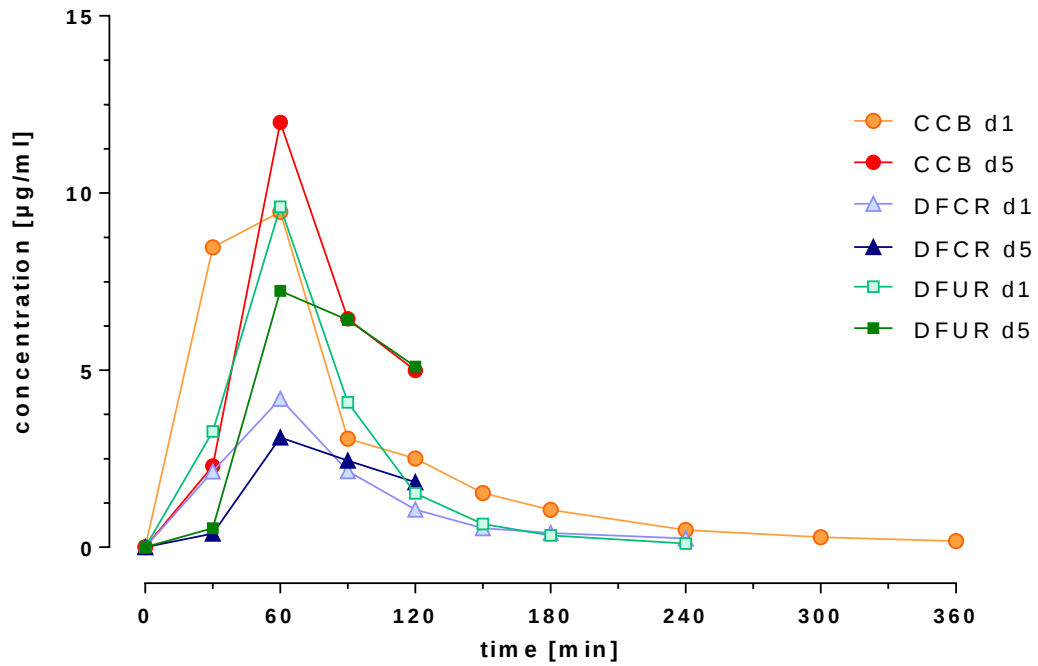


Abbildung 26: Patient 9, Woche 7, Konzentrations-Zeitkurven von CCB, DFCR und DFUR, Tag 1 und 5

Bei Patient 9 sind die Plasmakonzentrationen von CCB und den Metaboliten mit den Literaturdaten vergleichbar, wobei vor allem der Metabolismus hin zu DFUR stark ausgeprägt ist. Zwischen Tag 1 und Tag 5 ist kein nennenswerter Unterschied zu messen.

4.4.3 Patient 11

Tabelle 21: Patient 11, Woche 7, Plasmakonzentrationen von CCB, DFCR und DFUR,

Tag 1 und 5

	Zeit (min)	CCB ($\mu\text{g/ml}$)	DFCR ($\mu\text{g/ml}$)	DFUR ($\mu\text{g/ml}$)
Tag 1	0	0.000	0.000	0.000
	30	4.018	2.519	3.854
	60	5.935	4.333	7.403
	90	2.715	3.249	4.649
	120	1.907	2.148	2.688
	150	1.176	1.589	1.515
	180	0.672	1.273	0.978
	240		0.545	0.292
	300		0.242	0.094
	360			
Tag 5	0	0.000	0.000	0.000
	30	0.133	0.212	0.149
	60	0.741	0.933	0.668
	90	1.819	2.872	3.505
	120	3.422	0.869	8.715

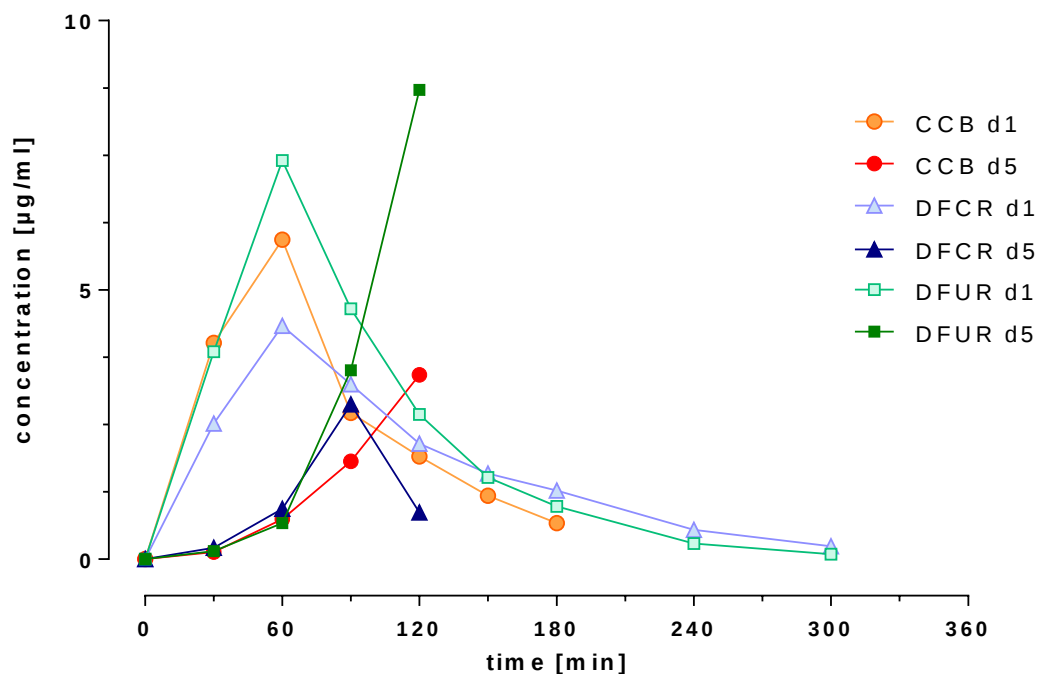


Abbildung 27: Patient 11, Woche 7, Konzentrations-Zeitkurven von CCB, DFCR und DFUR,

Tag 1 und 5

Für Patient 11 gilt dasselbe wie für Patient 9.

4.4.4 Patient 12

Tabelle 22: Patient 12, Woche 7, Plasmakonzentrationen von CCB, DFCR und DFUR,
Tag 1 und 5

	Zeit (min)	CCB ($\mu\text{g/ml}$)	DFCR ($\mu\text{g/ml}$)	DFUR ($\mu\text{g/ml}$)
Tag 1	0	0.000	0.000	0.000
	30			
	60	0.529	1.259	0.936
	90	3.026	8.044	9.473
	120	1.740	6.724	8.129
	150	0.428	4.037	5.485
	180	0.105	2.636	2.611
	240		0.970	0.983
	300		0.354	0.245
	360			
Tag 5	0	0.000	0.000	0.000
	30		3.286	3.829
	60	2.966	5.559	7.349
	90	2.243	6.556	9.245
	120	0.735	4.111	5.473

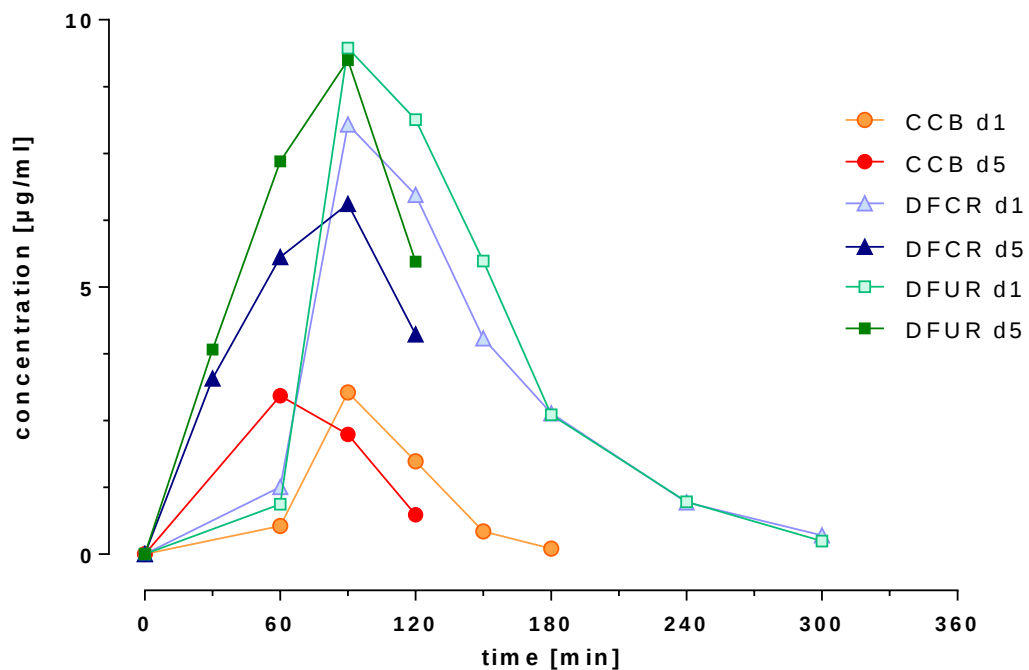


Abbildung 28: Patient 12, Woche 7, Konzentrations-Zeitkurven von CCB, DFCR und DFUR,
Tag 1 und 5

Auch bei Patient 12 entsprechen die Plasmakonzentrationen von CCB, DFCR und DFUR unseren Erfahrungswerten.

4.4.5 Zusammenfassung der Konzentrations-Zeitkurven aller vier Patienten

In diesem Kapitel sind die Konzentrations-Zeitkurven für das Prodrug und die zwei Metaboliten separat dargestellt. In jeder Grafik sind alle vier Patienten zusammengefasst.

Aus diesen drei Abbildungen ist mit Ausnahme von Tag 1 des Patienten 8 eine sehr homogene Verteilung ersichtlich, das heißt, es zeigt sich eine eher mäßige interindividuelle Variabilität.

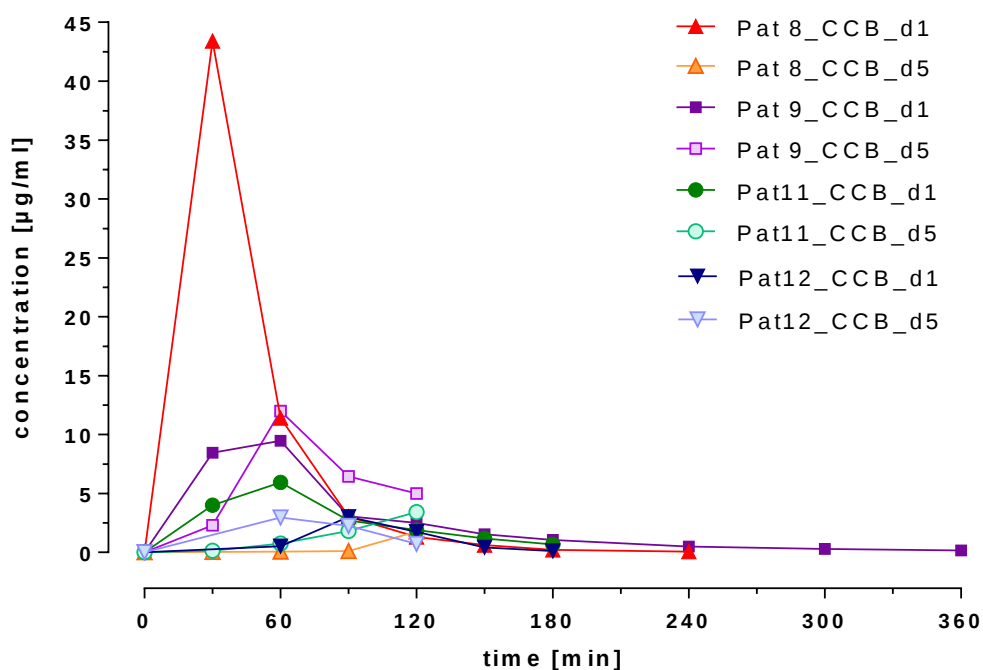


Abbildung 29: Konzentrations-Zeitkurven von CCB aller vier Patienten, Tag 1 und 5

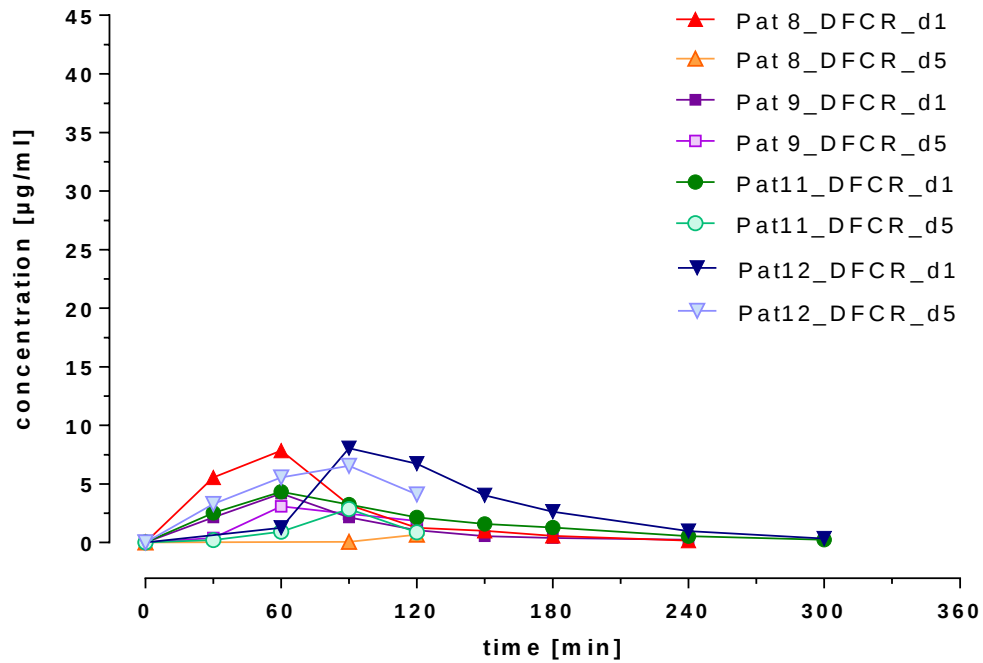


Abbildung 30: Konzentrations-Zeitkurven von DFCR aller vier Patienten, Tag 1 und 5

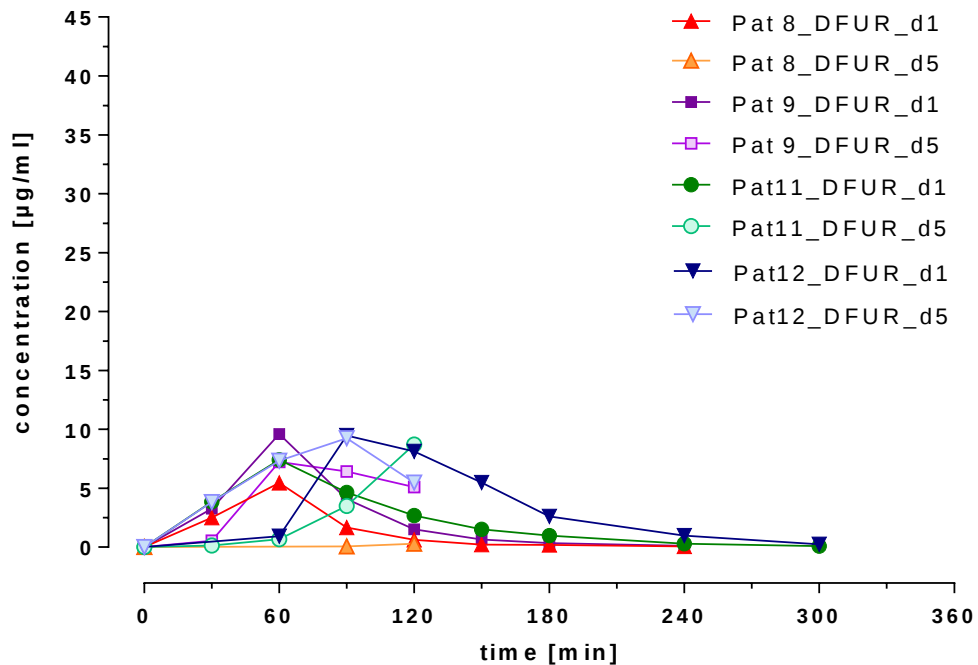


Abbildung 31: Konzentrations-Zeitkurven von DFUR aller vier Patienten, Tag 1 und 5

4.4.6 Vergleich der vier Patienten

Tabelle 23: Vergleich der CCB-Plasmakonzentrationen aller vier Patienten,
Tag 1 und 5

Arm A CCB ($\mu\text{g/ml}$)								
	Zeit (min)	Pat. 8	Pat. 9	Pat. 11	Pat. 12	MW	SD	CV
Tag 1	0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	30	43.422	8.470	4.018		18.636	21.580	115.795
	60	11.397	9.471	5.935	0.529	6.833	4.773	69.848
	90	3.029	3.064	2.715	3.026	2.959	0.163	5.511
	120	1.315	2.506	1.907	1.740	1.867	0.494	26.445
	150	0.634	1.534	1.176	0.428	0.943	0.505	53.535
	180	0.225	1.058	0.672	0.105	0.515	0.437	84.829
	240	0.057	0.488			0.272	0.305	111.822
	300		0.288			0.288		
	360		0.177			0.177		
Tag 5	0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	30	0.038	2.297	0.133		0.823	1.278	155.303
	60	0.054	11.996	0.741	2.966	3.939	5.513	139.952
	90	0.111	6.445	1.819	2.243	2.654	2.690	101.329
	120	1.774	4.987	3.422	0.735	2.730	1.868	68.428

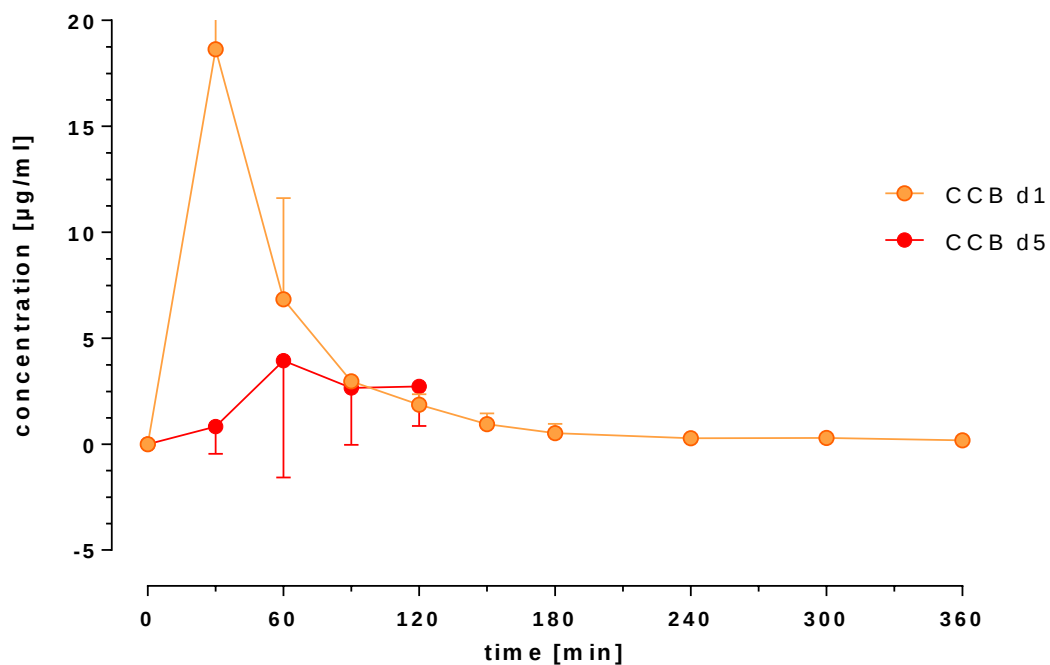


Abbildung 32: Mittlere Konzentrations-Zeitkurve von CCB, Tag 1 und 5

Tabelle 24: Vergleich der DFCR-Plasmakonzentrationen aller vier Patienten,
Tag 1 und 5

Arm A DFCR (µg/ml)								
	Zeit (min)	Pat. 8	Pat. 9	Pat. 11	Pat. 12	MW	SD	CV
Tag 1	0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	30	5.549	2.145	2.519		3.404	1.867	54.841
	60	7.859	4.195	4.333	1.259	4.412	2.700	61.205
	90	3.222	2.152	3.249	8.044	4.167	2.635	63.235
	120	1.269	1.064	2.148	6.724	2.801	2.657	94.846
	150	1.013	0.542	1.589	4.037	1.795	1.555	86.581
	180	0.572	0.404	1.273	2.636	1.221	1.016	83.148
	240	0.168	0.246	0.545	0.970	0.482	0.363	75.331
	300			0.242	0.354	0.298	0.079	26.367
	360							
Tag 5	0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	30		0.384	0.212	3.286	1.294	1.727	133.486
	60		3.098	0.933	5.559	3.196	2.315	72.416
	90	0.057	2.444	2.872	6.556	2.982	2.685	90.026
	120	0.680	1.838	0.869	4.111	1.875	1.575	84.019

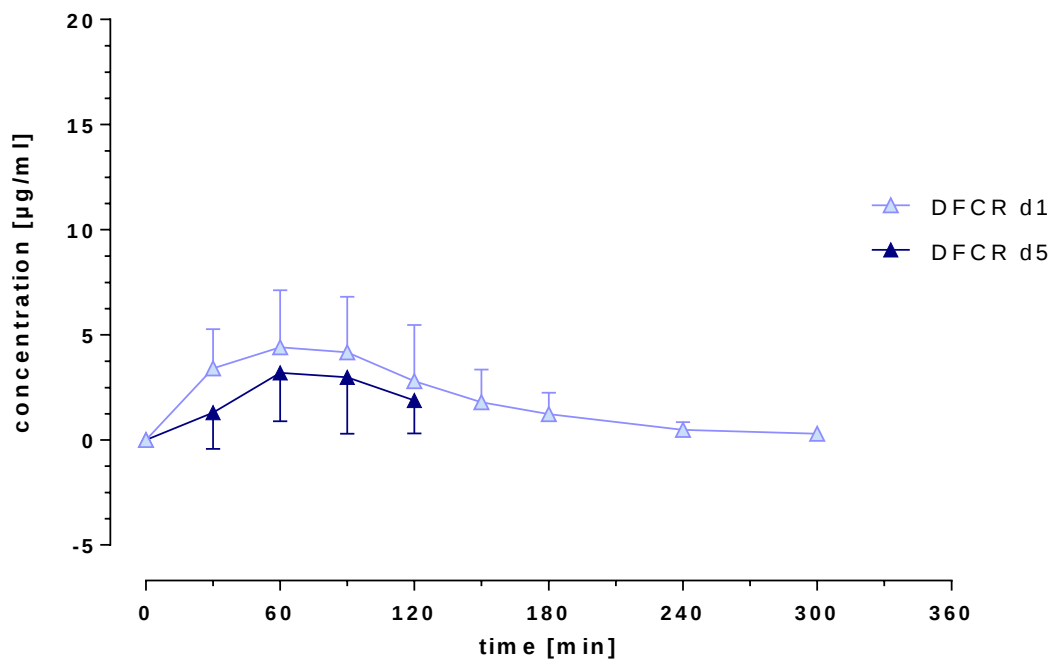


Abbildung 33: Mittlere Konzentrations-Zeitkurve von DFCR, Tag 1 und 5

Tabelle 25: Vergleich der DFUR-Plasmakonzentrationen aller vier Patienten,
Tag 1 und 5

Arm A DFUR (µg/ml)								
	Zeit (min)	Pat. 8	Pat. 9	Pat. 11	Pat. 12	MW	SD	CV
Tag 1	0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	30	2.512	3.267	3.854		3.211	0.673	20.944
	60	5.460	9.609	7.403	0.936	5.852	3.690	63.052
	90	1.663	4.094	4.649	9.473	4.970	3.270	65.800
	120	0.611	1.525	2.688	8.129	3.238	3.369	104.046
	150	0.220	0.661	1.515	5.485	1.970	2.404	122.016
	180	0.196	0.337	0.978	2.611	1.030	1.108	107.504
	240	0.064	0.104	0.292	0.983	0.361	0.426	118.176
	300			0.094	0.245	0.170	0.107	62.969
	360							
Tag 5	0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	30		0.540	0.149	3.829	1.506	2.022	134.258
	60		7.233	0.668	7.349	5.083	3.824	75.225
	90	0.072	6.411	3.505	9.245	4.808	3.932	81.781
	120	0.287	5.099	8.715	5.473	4.894	3.474	70.988

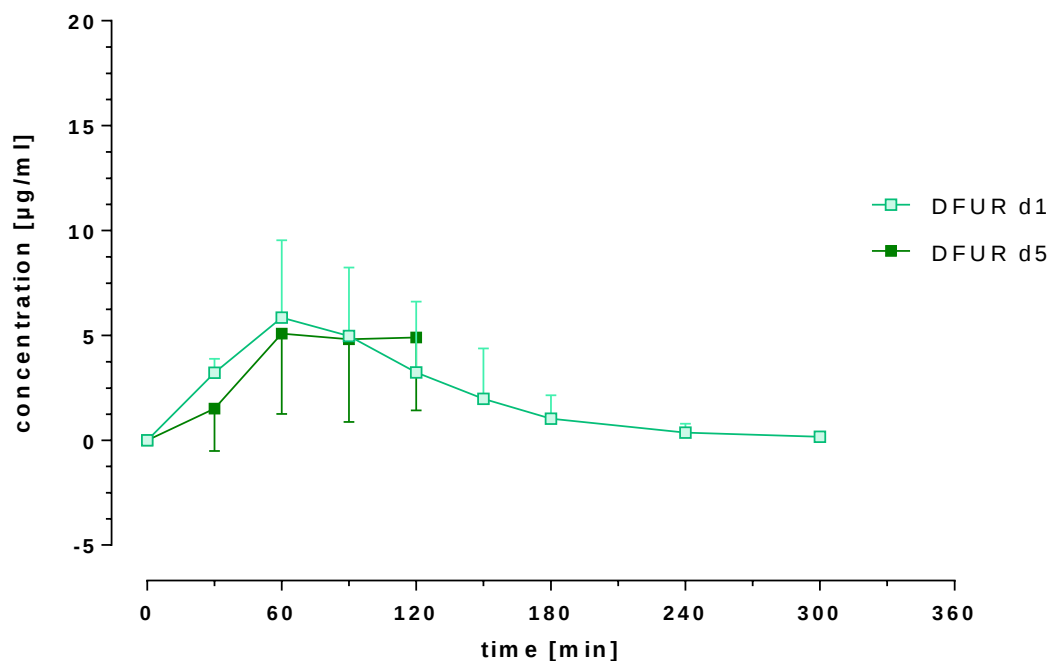


Abbildung 34: Mittlere Konzentrations-Zeitkurve von DFUR, Tag 1 und 5

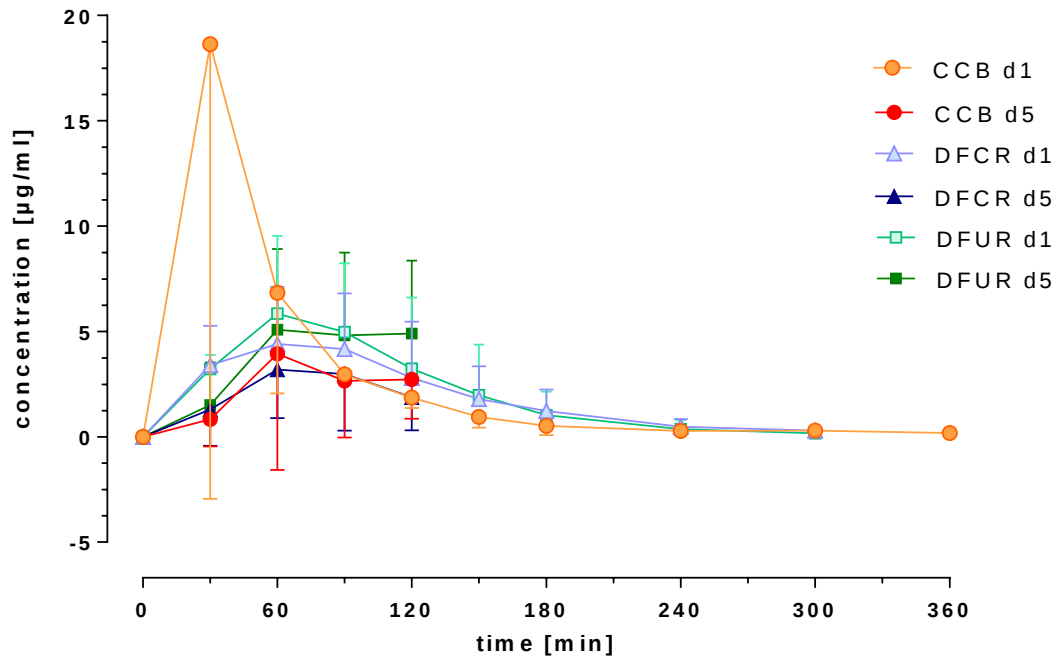


Abbildung 35: Zusammenfassung der mittleren Konzentrations-Zeitkurven von CCB, DFCR und DFUR aller vier Patienten

4.5 Ergebnisse der Berechnungen

4.5.1 Biometrische Auswertung

In diesem Kapitel wird die scheinbare Enzymaktivität abgehandelt.

Tabelle 26: AUC_{0-120} von CCB, DFCR und DFUR aller vier Patienten, Tag 1 und 5

		Pat. 8	Pat. 9	Pat. 11	Pat. 12
Tag 1	AUC_{0-120} CCB	1620.7	649.7	401.7	138.9
	AUC_{0-120} DFCR	517.9	270.7	335.3	398.8
	AUC_{0-120} DFUR	298.2	532.0	517.5	448.2
Tag 5	AUC_{0-120} CCB	32.7	687.5	132.1	207.2
	AUC_{0-120} DFCR	13.6	205.4	133.5	523.7
	AUC_{0-120} DFUR	8.6	502.0	260.4	694.8

Tabelle 27: Werte für R_{hCES} und R_{CytDA} aller vier Patienten, Tag 1 und 5

		Pat. 8	Pat. 9	Pat. 11	Pat. 12
Tag 1	R_{hCES}	0.32	0.42	0.83	2.87
	R_{CytDA}	0.58	1.97	1.54	1.12
Tag 5	R_{hCES}	0.42	0.30	1.01	2.53
	R_{CytDA}	0.63	2.44	1.95	1.33

R_{hCES} steht für das Enzym humane Carboxylesterase, welches 5'-DFCR bildet und R_{CytDA} für die Cytidindesaminase, welche 5'-DFCR in 5'-DFUR umwandelt.

Anhand der Tabelle 27 sieht man, dass der Patient 8 die geringste metabolische Aktivierung aufweist. Je höher R_{hCES} ist, desto mehr 5'-DFCR wird in der Reaktion gebildet. Patient 12 setzt ca. zehn Mal so viel CCB um wie Patient 8. Entscheidend für die Therapie ist jedoch der Wert für R_{CytDA} , denn durch die Cytidindesaminase wird der unmittelbare Precursor von 5-FU, nämlich 5'-DFUR, gebildet. Am meisten 5'-DFUR entsteht bei den Patienten 9 und 11. Dies sieht man an den hohen Werten für R_{CytDA} . Bei allen ist R_{CytDA} am Tag 5 geringfügig größer, was die Annahme nahe legt, dass die Aktivität dieses Enzyms am Tag 5 erhöht ist. Auch R_{hCES} steigt bei den Patienten 8 und 11 am Tag 5 an. Ob wirklich ein Unterschied vorliegt, wird auf der Seite 56 im T-Test abgehandelt.

4.5.2 Statistische Auswertung

4.5.2.1 T-Test über die biometrischen Parameter

Tabelle 28: T-Test über die R_{hCES} -Werte der Patienten 8, 9, 11 und 12,

Tag 1 gegen 5

T-Test R_{hCES}	
Tag 1	Tag 5
0.32	0.42
0.42	0.30
0.83	1.01
2.87	2.53
p = 0.714	

Vergleicht man die R_{hCES} -Werte von den Tagen 1 und 5 der Patienten 8, 9, 11 und 12, liegt die Wahrscheinlichkeit p mit 0.714 sehr deutlich über der maximalen Irrtumswahrscheinlichkeit α von 0.05. Es ist daher kein Unterschied zwischen der Enzymaktivität der humanen Carboxylesterase an den Tagen 1 und 5 nachweisbar.

Tabelle 29: T-Test über die R_{CytDA} -Werte der Patienten 8, 9, 11 und 12,

Tag 1 gegen 5

T-Test R_{CytDA}	
Tag 1	Tag 5
0.58	0.63
1.97	2.44
1.54	1.95
1.12	1.33
p = 0.059	

Macht man das Gleiche mit den R_{CytDA} -Werten aller Patienten, ergibt sich durch den T-Test eine Wahrscheinlichkeit p von 0.059. Dies impliziert zwar auch, dass kein Unterschied in der Umsetzung durch die Cytidindesaminase zu erwarten ist, aber der Wert liegt sehr knapp an der Grenze von 0.05. Wir vermuten jedoch, dass dieses nicht eindeutige Ergebnis durch die geringe Datenmenge zustande kommt.

4.5.2.2 T-Test über die Plasmakonzentrationen der Patienten

Tabelle 30: T-Test über die CCB-Konzentrationen aller vier Patienten zum Zeitpunkt 30-120, Tag 1 gegen 5

T-Test Arm A CCB ($\mu\text{g/ml}$)						
	Zeit (min)	Pat. 8	Pat. 9	Pat. 11	Pat. 12	p
Tag 1	30	43.422	8.470	4.018		0.299
Tag 5	30	0.038	2.297	0.133		
Tag 1	60	11.397	9.471	5.935	0.529	0.451
Tag 5	60	0.054	11.996	0.741	2.966	
Tag 1	90	3.029	3.064	2.715	3.026	0.833
Tag 5	90	0.111	6.445	1.819	2.243	
Tag 1	120	1.315	2.506	1.907	1.740	0.332
Tag 5	120	1.774	4.987	3.422	0.735	

Um die Wahrscheinlichkeit p zu berechnen, wurden immer die Plasmakonzentrationen aller vier Patienten zu einem bestimmten Zeitpunkt (z.B. 30 min) am Tag 1 mit denselben von Tag 5 verglichen. Die vier Wahrscheinlichkeiten sind alle deutlich größer als 0.05. Daher ist kein Unterschied zwischen den Plasmakonzentrationen an den Tagen 1 und 5 nachweisbar.

Tabelle 31: T-Test über die DFCR-Konzentrationen aller vier Patienten zum Zeitpunkt 30-120, Tag 1 gegen 5

T-Test Arm A DFCR ($\mu\text{g/ml}$)						
	Zeit (min)	Pat. 8	Pat. 9	Pat. 11	Pat. 12	p
Tag 1	30	5.549	2.145	2.519		0.085
Tag 5	30		0.384	0.212	3.286	
Tag 1	60	7.859	4.195	4.333	1.259	0.979
Tag 5	60		3.098	0.933	5.559	
Tag 1	90	3.222	2.152	3.249	8.044	0.215
Tag 5	90	0.057	2.444	2.872	6.556	
Tag 1	120	1.269	1.064	2.148	6.724	0.280
Tag 5	120	0.680	1.838	0.869	4.111	

Auch hinsichtlich der DFCR-Konzentrationen konnten wir keinen Unterschied zwischen Tag 1 und 5 feststellen. Das p von 0.979 bei 60 min ist der höchste Wert, der im Rahmen des T-Tests in dieser Diplomarbeit ermittelt wurde.

Tabelle 32: T-Test über die DFUR-Konzentrationen aller vier Patienten zum Zeitpunkt 30-120, Tag 1 gegen 5

T-Test Arm A DFUR (µg/ml)						
	Zeit (min)	Pat. 8	Pat. 9	Pat. 11	Pat. 12	p
Tag 1	30	2.512	3.267	3.854		0.096
Tag 5	30		0.540	0.149	3.829	
Tag 1	60	5.460	9.609	7.403	0.936	0.838
Tag 5	60		7.233	0.668	7.349	
Tag 1	90	1.663	4.094	4.649	9.473	0.865
Tag 5	90	0.072	6.411	3.505	9.245	
Tag 1	120	0.611	1.525	2.688	8.129	0.457
Tag 5	120	0.287	5.099	8.715	5.473	

Wie zu erwarten gilt die Nullhypothese auch bei den DFUR-Plasmakonzentrationen als erwiesen.

4.5.3 Pharmakokinetische Auswertung

In den abschließenden Tabellen ist die Nicht-Kompartiment-Auswertung der Plasmakonzentrationen aufgelistet.

Tabelle 33: Pharmakokinetische Parameter von CCB aller vier Patienten,
Tag 1 und 5

NCA: Arm A CCB Woche 7							
	Parameter	Pat. 8	Pat. 9	Pat. 11	Pat. 12	MW	SD
Tag 1	Rs _q	0.995	0.988	0.998	1.000	0.995	0.005
	Corr_XY	-0.997	-0.994	-0.999	-1.000	-0.998	0.003
	No_points_lambda_z	5	5	3	3	4	1.155
	Lambda_z (1/min)	0.024	0.009	0.018	0.047	0.024	0.016
	HL_Lambda_z (min)	28.9	77.3	38.9	14.8	39.9	26.769
	Vz_F_obs (l)	47.11	228.67	178.81	197.22	162.95	79.924
	Cl_F_obs (l/min)	1.13	2.05	3.18	9.26	3.91	3.665
	AUClast (min*µg/ml)	1667.9	828.3	474.1	173.8	786.0	645.879
	AUCINF_obs (min*µg/ml)	1670.2	848.0	511.8	176.1	801.5	640.819
	AUC0_120 (min*µg/ml)	1620.7	649.7	401.7	138.9	702.8	646.513
	MRTlast (min)	45.9	85.8	75.1	100.9	77.0	23.222
	Cmax (µg/ml)	43.422	9.471	5.935	3.026	15.463	18.824
	Tmax (min)	30	60	60	90	60	24.495
	Clast (µg/ml)	0.057	0.177	0.672	0.105	0.253	0.284
	Tlast (min)	240	360	180	180	240	84.853
Tag 5	Cmax (µg/ml)	1.774	11.996	3.422	2.966	5.040	4.689
	Tmax (min)	120	60	120	60	90	34.641
	Clast (µg/ml)	1.774	4.987	3.422	0.735	2.730	1.868
	Tlast (min)	120	120	120	120	120	0.000
	AUC0_120 (min*µg/ml)	32.7	687.5	132.1	207.2	264.9	290.651

Tabelle 34: Pharmakokinetische Parameter von DFCR und DFUR aller vier Patienten,
Tag 1 und 5

NCA: Arm A DFCR Woche 7							
	Parameter	Pat. 8	Pat. 9	Pat. 11	Pat. 12	MW	SD
Tag 1	Cmax (µg/ml)	7.859	4.195	4.333	8.044	6.108	2.131
	Tmax (min)	60	60	60	90	68	15.000
	AUC0_120 (min*µg/ml)	517.9	270.7	335.3	398.8	380.7	105.376
	AUClast (min*µg/ml)	603.2	328.5	519.6	800.0	562.8	195.498
Tag 5	Cmax (µg/ml)	0.680	3.098	2.872	6.556	3.302	2.428
	Tmax (min)	120	60	90	90	90	24.495
	AUC0_120 (min*µg/ml)	11.9	205.4	133.5	523.7	218.6	218.497
NCA: Arm A DFUR Woche 7							
	Parameter	Pat. 8	Pat. 9	Pat. 11	Pat. 12	MW	SD
Tag 1	Cmax (µg/ml)	5.460	9.609	7.403	9.473	7.986	1.963
	Tmax (min)	60	60	60	90	68	15.000
	AUC0_120 (min*µg/ml)	298.2	532.0	517.5	448.2	449.0	106.962
	AUClast (min*µg/ml)	326.6	593.0	670.4	911.9	625.5	241.135
Tag 5	Cmax (µg/ml)	0.287	7.233	8.715	9.245	6.370	4.144
	Tmax (min)	120	60	120	90	98	28.723
	AUC0_120 (min*µg/ml)	6.5	502.0	260.4	694.8	365.9	298.341

Capecitabin erscheint rasch im Blut und erreicht zwischen 30 und 90 min seine maximale Plasmakonzentration. Diese Werte stimmen mit Ergebnissen aus früheren Untersuchungen überein, nicht jedoch mit den im Austria Codex angeführten Daten: Dort wird $t_{\max}$ mit 120-180 min angegeben.

Die $c_{\max}$ ist einzig bei Patient 8 eindeutig überhöht. Würde man den Wert dieses Patienten exkludieren, läge die mittlere $c_{\max}$ bei 6.144 µg/ml anstatt bei 15.463 µg/ml.

Die Eliminationshalbwertszeit beträgt rund eine halbe Stunde, die MRT knapp über eine Stunde.

Das mittlere Verteilungsvolumen entspricht mit ca. 150 l ungefähr dem doppelten Körpergewicht. Diese Größenordnung weist entweder auf eine intensive Verteilung in tiefe Körperregionen oder auf eine exzessive Metabolisierung hin. Die durchschnittliche Gesamtkörperclearance beträgt rund 4 l/min.

Die pharmakokinetischen Parameter für CCB am Tag 5 unterscheiden sich nicht nennenswert von jenen am Tag 1, das heißt das Prodrug kumuliert nicht.

Für die Metaboliten DFCR und DFUR können weder Clearance noch Verteilungsvolumen berechnet werden, weil es keine Dosis gibt. Die mittlere $c_{\max}$ ist bei DFUR am höchsten, gefolgt von CCB und DFCR (wenn die $c_{\max}$ von Patient 8 am Tag 1 exkludiert wird). Dies gilt für beide Abnahmetage.

Der Wert für $t_{\max}$ ist am Tag 1 dem $t_{\max}$ von CCB ähnlich, am Tag 5 jedoch deutlich verzögert.

4.6 Simulation der Verteilung von Capecitabin

Als letzten Teil der vorliegenden Diplomarbeit wurden mit der neuen Software PK-Sim® Simulationskurven für CCB erstellt. Bei korrekter Einstellung der physikochemischen Parameter ermöglicht es diese Software, Konzentrations-Zeitkurven für verschiedene Kompartimente respektive Organe zu berechnen. Diese Zeitkurven repräsentieren aber nur bei exakter Einstellung der Parameter annähernd wahre Werte. Was jedoch eindeutig simuliert werden kann, ist die Relation der Konzentrationen in den einzelnen Organen zueinander und zum zentralen Kompartiment.

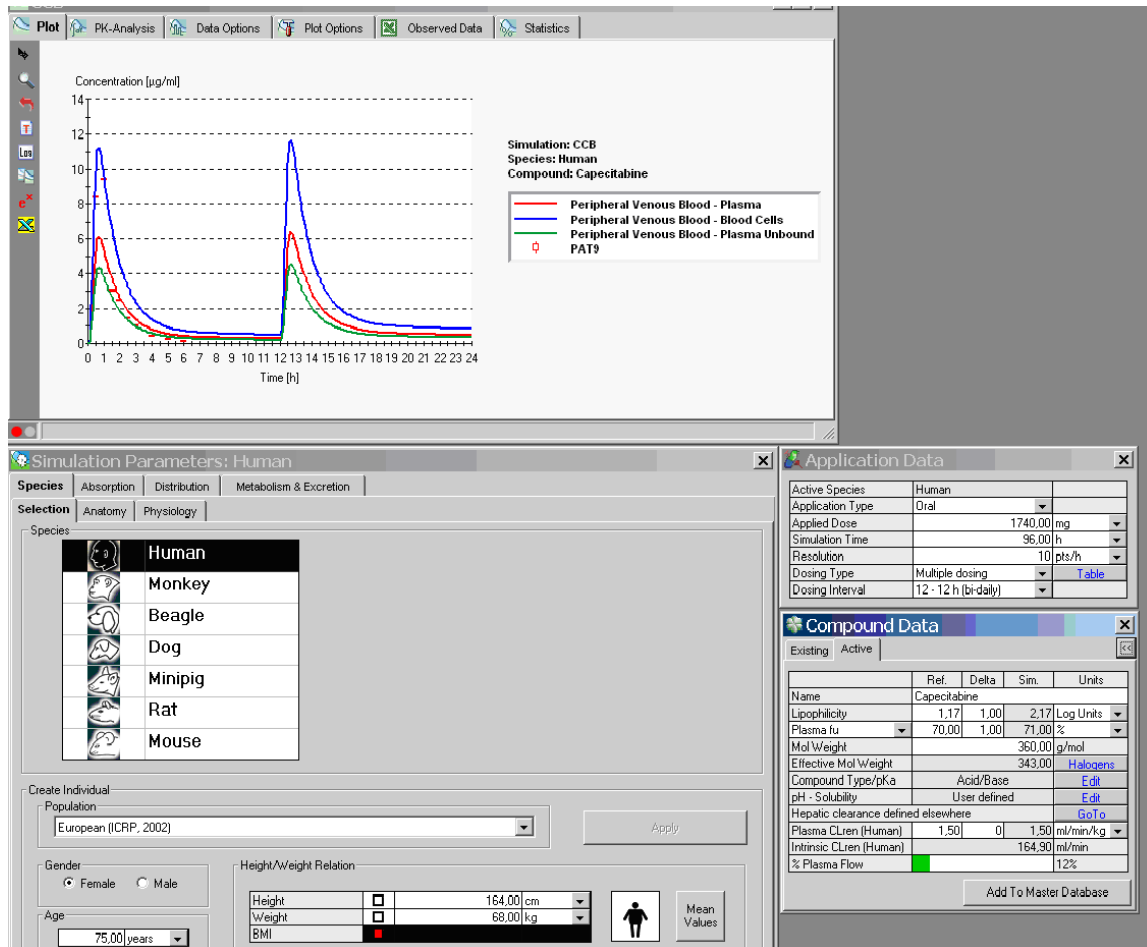


Abbildung 36: Screenshot der PK-Sim® Software

Die nachstehenden Abbildungen zeigen Beispiele für Plasma, Blutzellen, Niere, Leber, Lunge und Milz.

Derartige Konzentrations-Zeitkurven bieten einen guten Einblick in das komplette Geschehen der Verteilung eines Arzneistoffs im menschlichen Organismus, ohne eine einzige Gewebeprobe analysieren zu müssen.

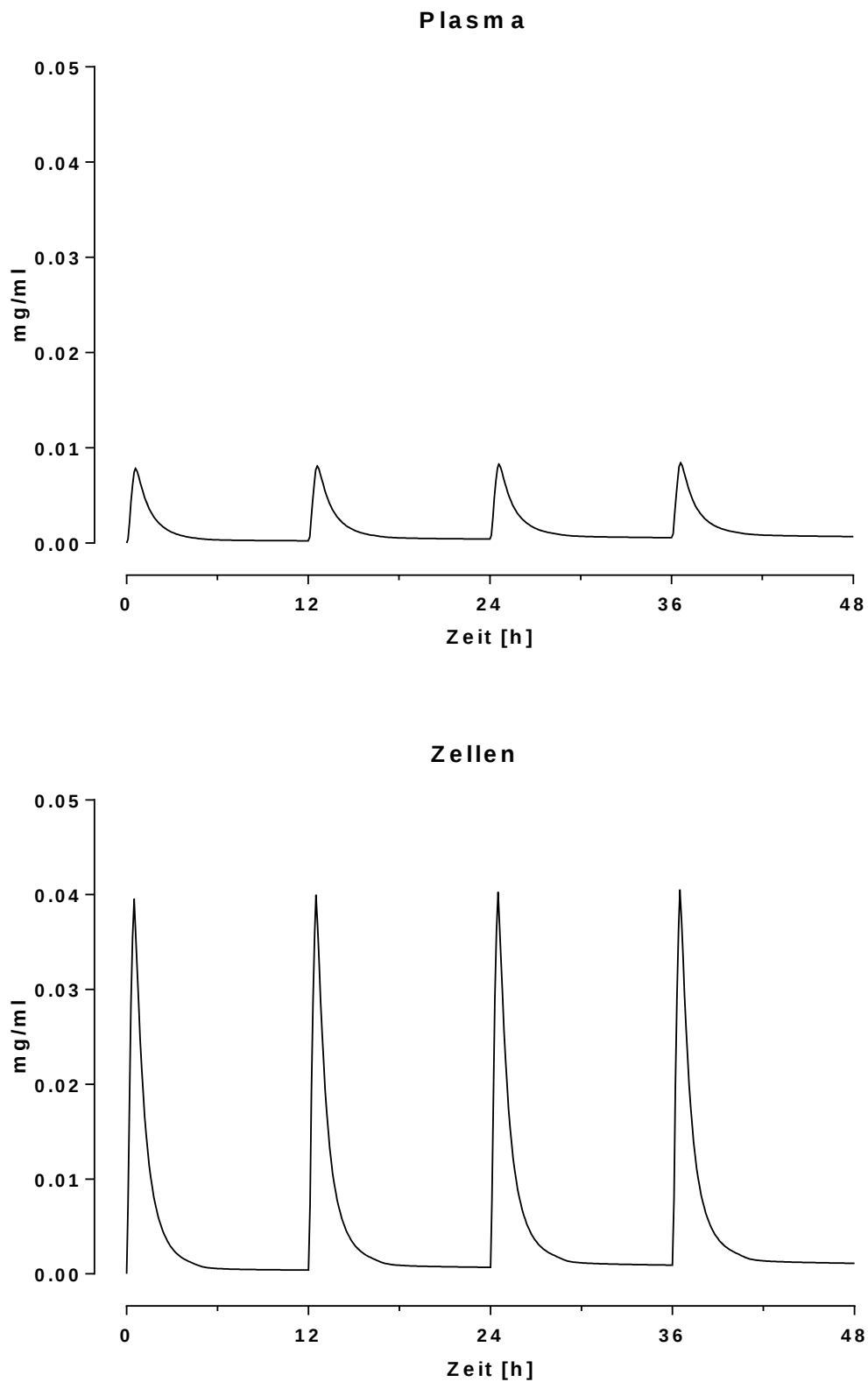


Abbildung 37: Konzentrations-Zeitkurven von CCB in Plasma und Blutzellen

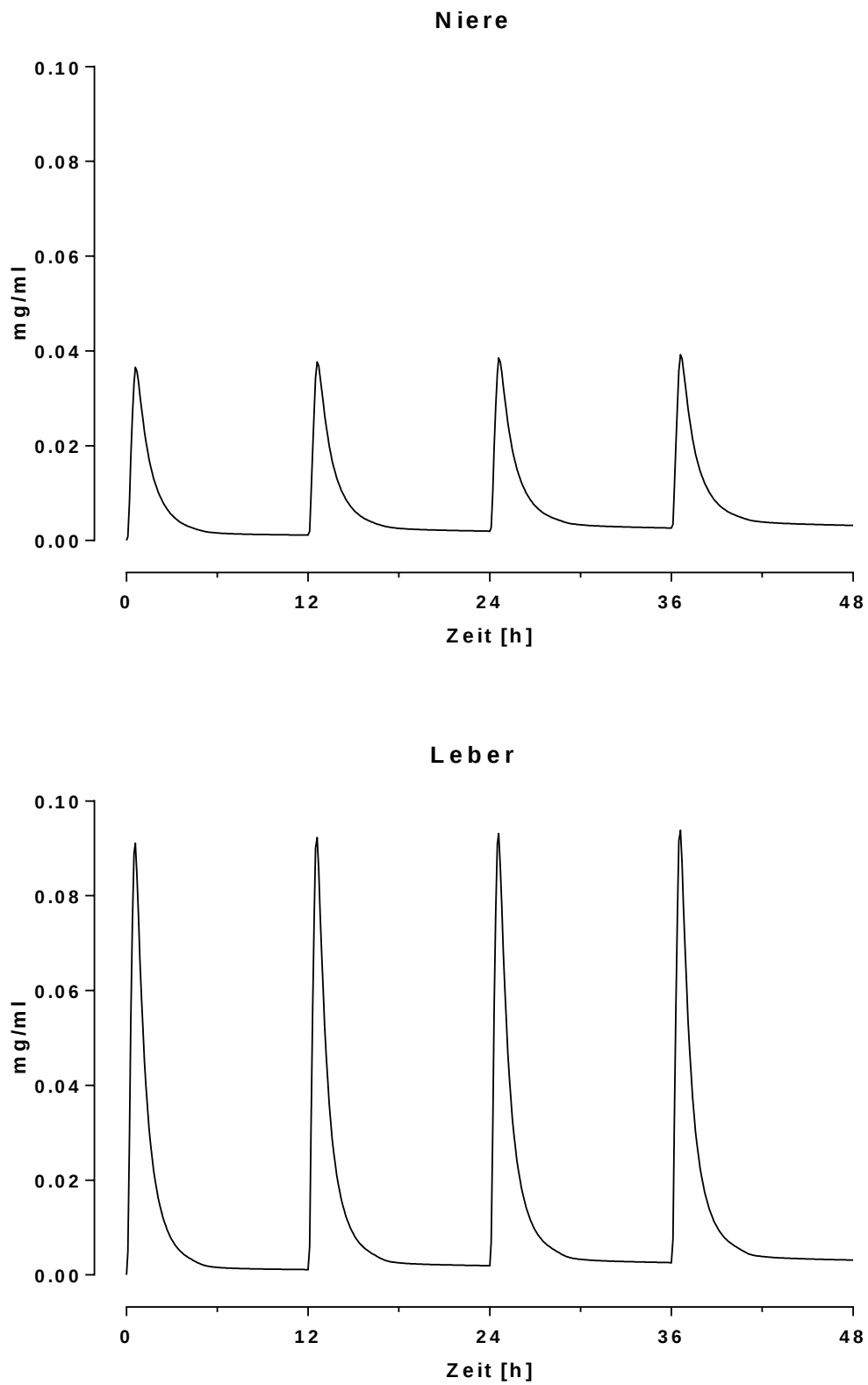


Abbildung 38: Konzentrations-Zeitkurven von CCB in Niere und Leber

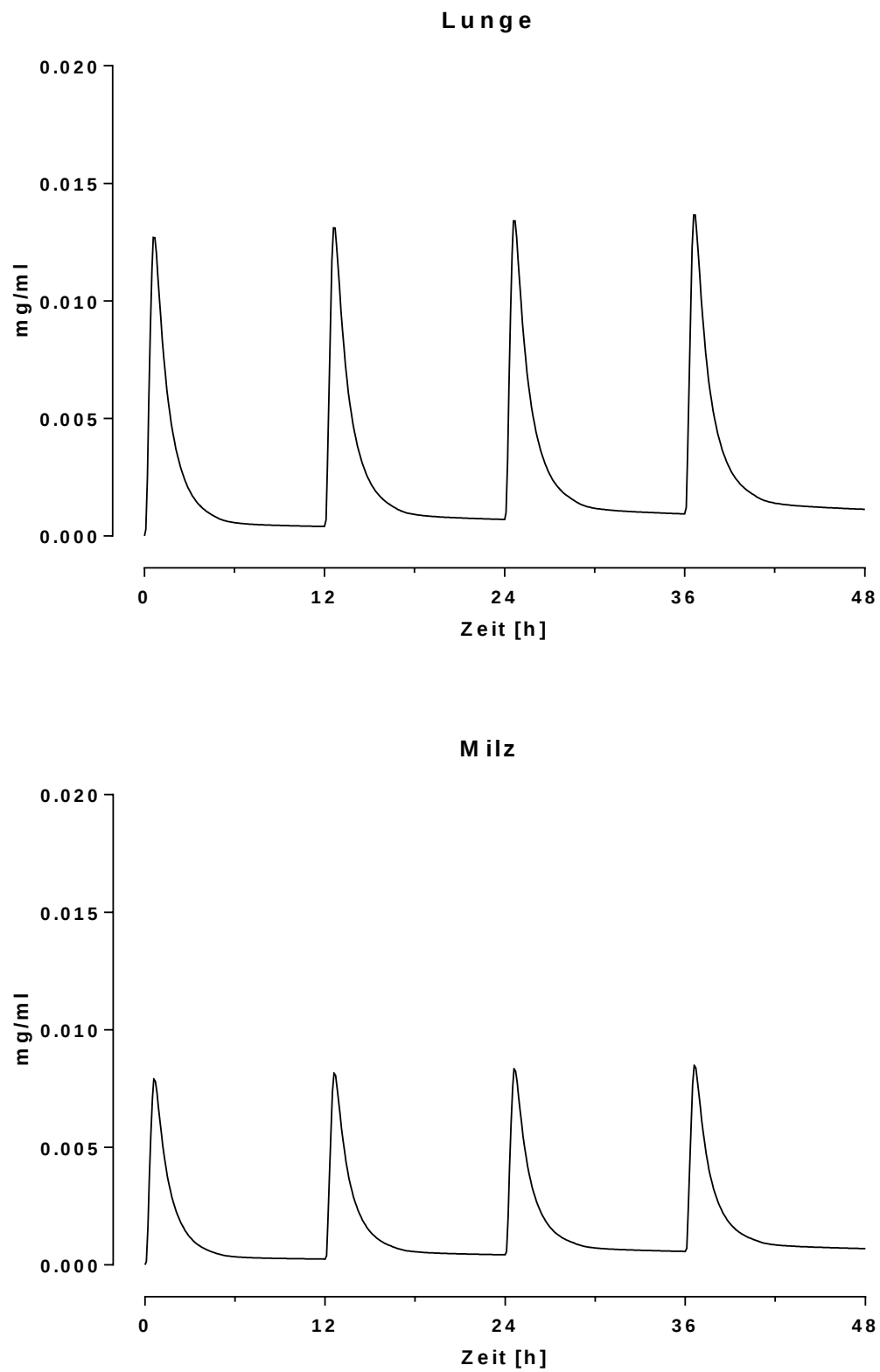


Abbildung 39: Konzentrations-Zeitkurven von CCB in Lunge und Milz

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Diplomarbeit analysierten wir Blutproben von Patienten, die aufgrund eines Kolorektalkarzinoms mit Xeloda® therapiert wurden.

Die Behandlung erfolgte mittels CCB, das in Kombination mit dem monoklonalen Antikörper Cetuximab und der Platinverbindung Oxaliplatin verabreicht wurde.

Hauptzielgröße dieser pharmakokinetischen Untersuchung war, ob und wenn ja in welcher Sequenz CTX und OxPT die Pharmakokinetik und den Metabolismus von CCB beeinflussen könnten. Hierzu wurden 24 Patienten in Subgruppen unterteilt und deren Proben analysiert. Die Auswertung der CCB- und Metabolitenkonzentrationen von vier Patienten erfolgte an den Tagen 1 und 5 in der Woche 7 des Behandlungsschemas (3. Zyklus der Therapie). Alle unsere analysierten Patienten, außer Patient 9, stammten aus der Gruppe „Arm A“. Um aussagekräftigere Ergebnisse zu erzielen, wurde letzterer jedoch auch zu „Arm A“ gezählt, da kein Unterschied zu erwarten war.

Unsere Untersuchungen zeigten, dass CCB nicht kumuliert und die Plasmakonzentrationen dieses Prodrugs am Tag 1 und 5 gleich sind. Das trifft auch auf die Metaboliten DFCR und DFUR zu.

Bei unseren Analysen konnten wir keinen Hinweis auf eine Beeinflussung der Pharmakokinetik von CCB durch CTX und OxPt finden. Auch die metabolische Aktivierung der Metaboliten wird durch diese Co-Medikation nicht verändert. Die pharmakokinetischen Ergebnisse stimmen mit der Literatur überein.

Es zeigte sich, dass die Plasmakonzentrationen stark vom Status des jeweiligen Patienten abhängig sind.

Derartige Untersuchungen sind für eine erfolgreiche Chemotherapie sehr wichtig, da man toxisch hohe oder subtherapeutische Konzentrationen des Arzneistoffes im Blut rasch verifizieren und entsprechende Maßnahmen setzen kann.

Über diese Analysen hinaus wurde auch eine Validierung unseres HPLC-Systems vorgenommen. Die Methode wurde für valide erklärt und für die weitere Verwendung freigegeben.

6. Summary

In this diploma thesis we analysed blood samples of patients that have been treated with Xeloda® because of colorectal cancer.

The medication consisted of Capecitabine in combination with the monoclonal antibody Cetuximab and the platinum compound Oxaliplatin.

The main aim of our pharmacokinetic analyses was to observe if CTX or OxPt in some way influence the pharmacokinetics or the metabolism of CCB. Therefore, 24 patients were divided into subgroups. The appraisal of the serum concentrations of CCB and its metabolites of four patients was carried out on day 1 and 5 during the seventh week of treatment (third bout of chemotherapy). All our patients, except for patient 9, were part of group 'Arm A'. As we expected there was no difference between group 'Arm A' and 'Arm B', so we treated patient 9 like he was also in group 'Arm A' in order to get a more significant outcome. We could prove that neither CCB nor its metabolites DFCR and DFUR cumulate and that their plasma concentrations are the same on day 1 and 5. Throughout our analyses we could not find any evidence that CTX or OxPt influence the pharmacokinetics or the metabolic activation of CCB. The pharmacokinetic results we got coincide with the ones stated in the literature.

It became apparent that plasma concentrations strongly depend on the status of each patient.

Such analyses are essential for an efficient chemotherapy, as toxic or subtherapeutic concentrations of the drug can quickly be verified and measures can be adopted.

Additionally, we validated our HPLC system. The method has been certified valid and has been approved for further analyses.

Abkürzungsverzeichnis

ADCC	Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
AUC	Area under the Curve
AUC ₀₋₁₂₀	Area under the Curve von Minute 0 bis 120
CCB	Capecitabin
CDC	Komplement-abhängige Zytotoxizität
C _{max}	maximal beobachtete Konzentration
conc.	Konzentration
CTX	Cetuximab
CV	Korrelationskoeffizient
CytDA	Cytidindesaminase
5'-DFCR	5'-Desoxy-5-fluorocytidin
5'-DFUR	5'-Desoxy-5-fluorouridin
d1/d5	Tag 1/ Tag 5
DACH	1,2-Diaminocyclohexan
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPD	Dihydropyrimidin-Dehydrogenase
EGF	epidermalen Wachstumsfaktor
EGFR	epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor
5-FU	5-Fluorouracil
FBAL	α -Fluoro- β -alanin
FUH ₂	Dihydro-5-fluorouracil
FUPA	5-Fluoroureidopropionsäure

Abkürzungsverzeichnis

GAP	GTPase aktivierendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
hCES	humane Carboxylesterase
HFS	Hand-Fuß-Syndrom
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatografie
Inj. Vol.	Injektionsvolumen
i.v.	intravenös
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma
LOD	Detektionsgrenze
LOQ	Quantifizierungsgrenze
MeOH	Methanol
min	Minuten
MRT	mittlere Verweildauer
MTD	maximal verträgliche Dosis
MW	Mittelwert
na	nicht analysiert
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat
NCA	nichtkompartimentelle Analyse
OxPt	Oxaliplatin
Pat.	Patient
proz. Änderung	prozentuelle Änderung

Ret. Zeit	Retentionszeit
RNA	Ribonukleinsäure
SD	Standardabweichung
SPE	Festphasenextraktion
ThyPase	Thymidin-Phosphorylase
$t_{\max}$	Zeitpunkt der maximalen beobachteten Konzentration
% Vol.	Volumsprozent
WF	Wiederfindungsrate

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Capecitabin [2]	- 1 -
Abbildung 2: Schema der Metabolisierung.....	- 2 -
Abbildung 3: Oxaliplatin [17].....	- 4 -
Abbildung 4: Inter- und Intrastrang Crosslinks am Beispiel von Cisplatin [21].....	- 5 -
Abbildung 5: Wirkmechanismen von EGF und Cetuximab [31]	- 7 -
Abbildung 6: Veranschaulichung der Clearance von Cetuximab anhand der Michaelis-Menten-Kinetik [39]	- 8 -
Abbildung 7: VWR® HITACHI Chromaster HPLC-Anlage	- 13 -
Abbildung 8: Vakuum-Festphasen-Extraktionseinheit	- 15 -
Abbildung 9: Aufbau einer SPE-Kartusche	- 16 -
Abbildung 10: Kartuschen, aufgesteckt über den Luer Lock Anschluss.....	- 16 -
Abbildung 11: Eichgerade von Capecitabin	- 22 -
Abbildung 12: Eichgeraden von DFCR und DFUR.....	- 23 -
Abbildung 13: Linearität der Peakfläche von DFCR.....	- 27 -
Abbildung 14: Linearität der Peakfläche von DFUR	- 28 -
Abbildung 15: Linearität der Peakfläche von DFCR bei Veränderung des Injektionsvolumens	- 29 -
Abbildung 16: Linearität der Peakfläche von DFUR bei Veränderung des Injektionsvolumens	- 30 -
Abbildung 17: Vergleich von vier verschiedenen Chromatogrammen.....	- 33 -
Abbildung 18: Vergleich desselben Chromatogramms mit unterschiedlichen x-Achsen	- 36 -
Abbildung 19: Zeitlicher Verlauf von CCB, Tag 1, 0-150 min	- 37 -
Abbildung 20: Zeitlicher Verlauf von CCB, Tag 1, 180-360 min	- 38 -
Abbildung 21: Zeitlicher Verlauf von CCB, Tag 5.....	- 39 -
Abbildung 22: Zeitliche Verläufe von DFCR und DFUR, Tag 1, 0-150 min	- 40 -
Abbildung 23: Zeitliche Verläufe von DFCR und DFUR, Tag 1, 180-360 min	- 41 -
Abbildung 24: Zeitliche Verläufe von DFCR und DFUR, Tag 5.....	- 42 -

Abbildung 25: Patient 8, Woche 7, Konzentrations-Zeitkurven von CCB, DFCR und DFUR, Tag 1 und 5	- 44 -
Abbildung 26: Patient 9, Woche 7, Konzentrations-Zeitkurven von CCB, DFCR und DFUR, Tag 1 und 5	- 46 -
Abbildung 27: Patient 11, Woche 7, Konzentrations-Zeitkurven von CCB, DFCR und DFUR, Tag 1 und 5	- 47 -
Abbildung 28: Patient 12, Woche 7, Konzentrations-Zeitkurven von CCB, DFCR und DFUR, Tag 1 und 5	- 48 -
Abbildung 29: Konzentrations-Zeitkurven von CCB aller vier Patienten, Tag 1 und 5	- 49 -
Abbildung 30: Konzentrations-Zeitkurven von DFCR aller vier Patienten, Tag 1 und 5	- 50 -
Abbildung 31: Konzentrations-Zeitkurven von DFUR aller vier Patienten, Tag 1 und 5	- 50 -
Abbildung 32: Mittlere Konzentrations-Zeitkurve von CCB, Tag 1 und 5	- 51 -
Abbildung 33: Mittlere Konzentrations-Zeitkurve von DFCR, Tag 1 und 5	- 52 -
Abbildung 34: Mittlere Konzentrations-Zeitkurve von DFUR, Tag 1 und 5.....	- 53 -
Abbildung 35: Zusammenfassung der mittleren Konzentrations-Zeitkurven von CCB, DFCR und DFUR aller vier Patienten	- 54 -
Abbildung 36: Screenshot der PK-Sim® Software	- 61 -
Abbildung 37: Konzentrations-Zeitkurven von CCB in Plasma und Blutzellen	- 62 -
Abbildung 38: Konzentrations-Zeitkurven von CCB in Niere und Leber	- 63 -
Abbildung 39: Konzentrations-Zeitkurven von CCB in Lunge und Milz	- 64 -

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Studiendesign	- 11 -
Tabelle 2: Blutabnahmeschema	- 12 -
Tabelle 3: Patientenprofile	- 12 -
Tabelle 4: Daten des HPLC-Systems	- 13 -
Tabelle 5: Reagentien, Chemikalien und Mischungen	- 14 -
Tabelle 6: Materialien und Geräte	- 14 -
Tabelle 7: Wichtige statistische Parameter der Eichgerade von CCB	- 22 -
Tabelle 8: Wichtige statistische Parameter der Eichgeraden von DFCR und DFUR.....	- 23 -
Tabelle 9: Veränderung der Eluenten	- 24 -
Tabelle 10: Veränderung der Ofentemperatur	- 25 -
Tabelle 11: Veränderung der Flussrate	- 26 -
Tabelle 12: Ergebnis der linearen Regression	- 27 -
Tabelle 13: Linearität des Injektionsvolumens	- 29 -
Tabelle 14: LOD und LOQ	- 30 -
Tabelle 15: Richtigkeit und Wiederholpräzision	- 31 -
Tabelle 16: Laborpräzision	- 32 -
Tabelle 17: Stabilität durch Einfrieren und Auftauen	- 34 -
Tabelle 18: Stabilität 'on the machine'	- 35 -
Tabelle 19: Patient 8, Woche 7, Plasmakonzentrationen von CCB, DFCR und DFUR, Tag 1 und 5	- 44 -
Tabelle 20: Patient 9, Woche 7, Plasmakonzentrationen von CCB, DFCR und DFUR, Tag 1 und 5	- 45 -
Tabelle 21: Patient 11, Woche 7, Plasmakonzentrationen von CCB, DFCR und DFUR, Tag 1 und 5	- 47 -
Tabelle 22: Patient 12, Woche 7, Plasmakonzentrationen von CCB, DFCR und DFUR, Tag 1 und 5	- 48 -
Tabelle 23: Vergleich der CCB-Plasmakonzentrationen aller vier Patienten, Tag 1 und 5	- 51 -

Tabelle 24: Vergleich der DFCR-Plasmakonzentrationen aller vier Patienten, Tag 1 und 5	- 52 -
Tabelle 25: Vergleich der DFUR-Plasmakonzentrationen aller vier Patienten, Tag 1 und 5	- 53 -
Tabelle 26: AUC_{0-120} von CCB, DFCR und DFUR aller vier Patienten, Tag 1 und 5	- 55 -
Tabelle 27: Werte für R_{hCES} und R_{CytDA} aller vier Patienten, Tag 1 und 5	- 55 -
Tabelle 28: T-Test über die R_{hCES} -Werte der Patienten 8, 9, 11 und 12, Tag 1 gegen 5.....	- 56 -
Tabelle 29: T-Test über die R_{CytDA} -Werte der Patienten 8, 9, 11 und 12, Tag 1 gegen 5.....	- 56 -
Tabelle 30: T-Test über die CCB-Konzentrationen aller vier Patienten zum Zeitpunkt 30-120, Tag 1 gegen 5	- 57 -
Tabelle 31: T-Test über die DFCR-Konzentrationen aller vier Patienten zum Zeitpunkt 30-120, Tag 1 gegen 5	- 57 -
Tabelle 32: T-Test über die DFUR-Konzentrationen aller vier Patienten zum Zeitpunkt 30-120, Tag 1 gegen 5	- 58 -
Tabelle 33: Pharmakokinetische Parameter von CCB aller vier Patienten, Tag 1 und 5	- 59 -
Tabelle 34: Pharmakokinetische Parameter von DFCR und DFUR aller vier Patienten, Tag 1 und 5	- 59 -

Literaturverzeichnis

[1] EMA (Zugriff am 5. Februar 2013):

[http://www.ema.europa.eu/docs/de_DE/document_library/EPAR -
Product_Information/human/000316/WC500058151.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/de_DE/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000316/WC500058151.pdf)

[2] Pharmazeutische Zeitung online (Zugriff am 5. Februar 2013):

<http://www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=2683>

[3] Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK et al. Mutschler Arzneimittelwirkungen. 10. Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 2013; Kapitel 22.1: Antimetaboliten: 880-885

[4] DrugBank: Open Data Drug & Drug Target Database (Zugriff am 18. April 2013):

<http://www.drugbank.ca/drugs/DB01101>

[5] Reigner B, Blesch K, Weidekamm E. Clinical pharmacokinetics of capecitabine. Clin Pharmacokinet 2001; 40: 85-104

[6] Frölich JC, Kirch W. Praktische Arzneitherapie. 3. Auflage. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York 2003; 567-568

[7] Pharmazeutische Zeitung online (Zugriff am 5. Februar 2013)

http://www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=pharm6_09_2001

[8] Walko CM, Lindley C. Capecitabine: A review. Clin Ther 2005; 27: 23-44

[9] Schellens JH. Capecitabine. Oncologist 2007; 12: 152-55

- [10] Cassidy J, Twelves C, Cameron D et al. Bioequivalence of two tablet formulations of capecitabine and exploration of age, gender, body surface area, and creatinine clearance as factors influencing systemic exposure in cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999; 44: 453-460
- [11] Nagore E, Insa A, Sanmartín O. Antineoplastic therapy-induced palmar plantar erythrodysesthesia ('hand-foot') syndrome. Incidence, recognition and management. *Am J Clin Dermatol* 2000; 1: 225-34
- [12] Webster-Gandy JD, How C, Harrold K. Palmar-plantar erythrodysesthesia (PPE): a literature review with commentary on experience in a cancer centre. *Eur J Oncol Nurs* 2007; 11: 238-246
- [13] Scheithauer W, Mc Kendrick J, Begbie S et al. Oral capecitabine as an alternative to i.v. 5-fluorouracil-based adjuvant therapy for colon cancer: safety results of a randomized, phase III trial. *Ann Oncol* 2003; 14: 1735-1743
- [14] Cassidy J, Twelves C, Van Cutsem E et al. First-line oral capecitabine therapy in metastatic colorectal cancer: a favorable safety profile compared with intravenous 5-fluorouracil/leucovorin. *Ann Oncol* 2002; 13: 566-575
- [15] Roche Registration Limited. Fachinformation Xeloda®. 3/2008. Welwyn Garden City, GB
- [16] Austria Codex Fachinformation 2008/2009, Österreichische Apotheker Verlagsgesellschaft m.b.H. Wien 2008
- [17] <http://www.arzneistoffe.net/Oxaliplatin.html>
(Zugriff am 19. April 2013)

- [18] Nordic Gastrointestinal Tumor Adjuvant Therapy Group. Expectancy or primary chemotherapy in patients with advanced asymptomatic colorectal cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol* 1992; 10: 904-911
- [19] Raymond E, Chaney SG, Taamma A et al. Oxaliplatin: a review of preclinical and clinical studies. *Ann Oncol* 1998; 9: 1053-1071
- [20] Saris CP, Van de Vaart PJ, 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
- [21] Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 573-584
- [22] Page JD, Husain I, Sancar A et al. Effect of the diaminocyclohexane carrier ligand on platinum adduct formation, repair and lethality. *Biochemistry* 1990; 29: 1016-1024
- [23] Strickmann DB, Kong A, Keppler BK. Application of capillary electrophoresis-mass spectrometry for the investigation of the binding behavior of Oxaliplatin to 5'-GMP in the presence of the sulfur-containing amino acid L-methionine. *Electrophoresis* 2002; 23: 74-80
- [24] Graham MA, Lockwood GF, Greenslade D et al. Clinical pharmacokinetics of oxaliplatin: a critical review. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 1205-1218
- [25] 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
- [26] EMA (Zugriff am 23. April 2013):
[http://www.emea.europa.eu/docs/de_DE/document_library/EPAR -
Product Information/human/000558/WC500029119.pdf](http://www.emea.europa.eu/docs/de_DE/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000558/WC500029119.pdf)

- [27] Aktories K, Förstermann U, Hofmann FB et al. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 10. Auflage. Urban & Fischer Verlag München 2009; Kapitel 37.16.1: Antikörper: 971-972
- [28] Adams GP, Weiner LM. Monoclonal antibody therapy of cancer. Nat Biotechnol 2005; 23: 1147-1157
- [29] Kumar A, Petri ET, Halmos B et al. Structure and clinical relevance of the epidermal growth factor receptor in human cancer. J Clin Oncol 2008; 26: 1742-1751
- [30] Ciardiello F, Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment. N Engl J Med 2008; 358: 1160-1174
- [31] Graham J, Muhsin M, Kirkpatrick P. Cetuximab. Nat Rev Drug Discovery 2004; 3: 549-550
- [32] Egan SE, Giddings BW, Brooks MW et al. Association of Sos Ras exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation. Nature 1993; 363: 45-51
- [33] Wittinghofer A, Pai EF. The structure of Ras protein: a model for a universal molecular switch. Trends Biochem Sci 1991; 16: 382-387
- [34] Fearon ER. K-ras gene mutation as a pathogenetic and diagnostic marker in human cancer. J Natl Cancer Inst 1993; 85: 1978-1980
- [35] Dirks NL, Nolting A, Kovar A et al. Population pharmacokinetics of Cetuximab in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. J Clin Pharmacol 2008; 48: 267-278
- [36] Fracasso PM, Burris H 3rd, Arquette MA et al. A phase 1 escalating single-dose and weekly fixed-dose study of Cetuximab: pharmacokinetic and pharmacodynamics rationale for dosing. Clin Cancer Res 2007; 13: 986-993

[37] ArzneimittelPROFIL Onkologie. Arzneimittelprofil Cetuximab. Medizin Medien Austria. Februar 2009 (Zugriff am 14. März 2013):

http://www.medizin-medien.at/mm/mm012/amp_Cetuximab.pdf

[38] Tan AR, Moore DF, Hidalgo M et al. Pharmacokinetics of Cetuximab after administration of escalating single dosing and weekly fixed dosing in patients with solid tumors. Clin Cancer Res 2006; 12: 6517-6522

[39] Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC. Biochemie und Pathobiochemie. 6. Auflage. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York 1998; Kapitel 3.2: Katalyse in biologischen Systemen: Abbildung 3.10

[40] Studien verstehen (2): Prüfen der Signifikanz. Woher kommt das kleine „p“? via medici Fachmagazin für junge Mediziner. Thieme Verlag 2007; Ausgabe 3: 55

[41] Phoenix™ WinNonlin® 4.1 (Certara, Inc., 9666 Olive Blvd., Suite 425, St. Louis, MO 63132, U.S.A.). User's Guide: Noncompartmental Analysis. Computational details for pharmacokinetic parameters

[42] Kromidas S. Handbuch Validierung in der Analytik. 2. überarbeitete und ergänzte Auflage. WILEY – VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 2011

[43] SOP 12: Validation of Bioanalytical Methods. Onkologie 2003; 26 Suppl 6: 52-55

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Eva-Maria Klebermass
Geburtsdatum: 23.05.1990
Geburtsort: 8750 Judenburg
Staatsbürgerschaft: Österreich

Ausbildung

1996-2000: Volksschule Fohnsdorf
2000-2008: BG-BRG Judenburg
Juni 2008: Matura mit ausgezeichnetem Erfolg
2008-2013: Studium der Pharmazie an der Universität Wien

Berufserfahrung

2005-2013: Einmonatige Feriapraktika in der Schutzengelapotheke Fohnsdorf, der Landschaftsapotheke Judenburg, der Sonnenapotheke Spielberg und im Heurigen-Kaffeehaus Klebermass, sowie Ferialarbeiten im Archiv und Altenheim der Gemeinde Fohnsdorf
2009-2013: Ordinationshilfe bei Dr. Ledermüller Herbert, Arzt für Allgemeinmedizin in 1200 Wien
SS 2013: Tutorin am Department für Klinische Pharmazie und Diagnostik der Universität Wien