



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

**QUANTIFIZIERUNG DES OXIDATIVEN STRESSES IN DER
KOMBINIERTEN CHEMOTHERAPIE DES PANKREASKARZI-
NOMS MIT ERLOTINIB, BEVACIZUMAB, CAPECITABIN IN-
KLUSIVE BIOMETRISCHEN BERECHNUNGEN**

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag. Pharm.)

Verfasser/in: Cornelia Feirer
Matrikelnummer: 0301549
Studienrichtung (lt. Studienblatt): Pharmazie (A449)
Begutachter: ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Martin Czejka

Wien, im 08. 2010

DANKSAGUNG

Diese Diplomarbeit wurde am Department für klinische Pharmazie und Diagnostik (Leiter: a. o. Univ.-Prof. Mag. Dr. Walter Jäger) an der Fakultät für Lebenswissenschaften der Universität Wien unter der Betreuung von Herrn a.o. Univ.-Prof. Mag. Dr. Martin Czejka verfasst. Für das interessante Thema, die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten, und für die freundliche Unterstützung beim Verfassen der Diplomarbeit, möchte ich mich an dieser Stelle herzlich bei Herrn a.o. Univ.-Prof. Mag. Dr. Martin Czejka bedanken.

Auch Herrn Mag. DDr. André Farkouh, Frau Mag. Verena Mattner und Frau Mag. Azra Sahmanovic möchte ich für die Hilfe sowie für die wertvollen Tipps während der praktischen Tätigkeiten der Diplomarbeit, die mir das Arbeiten wesentlich erleichtert haben, meinen Dank aussprechen.

Weiters danke ich Herrn a. o. Prof. Dr. Christian Dittrich sowie Frau a. o. Dr. Margit Gneist für die zur Verfügung gestellten Plasmaproben der Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Mutter, Irmgard Feirer. Nicht nur für die finanzielle Unterstützung, die mir das Pharmaziestudium erst ermöglicht hat, sondern auch dafür, dass sie stets an mich geglaubt hat, bin ich sehr dankbar.

Schließlich danke ich meinem Bruder, Daniel Feirer, der mich während des Studiums immer motiviert und unterstützt hat.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich, Cornelia Feirer, diese Diplomarbeit selbstständig verfasst habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde bisher weder in gleicher noch in ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und wurde auch noch nicht veröffentlicht.

Inhalt

1. EINLEITUNG	6
1.1 Pankreaskarzinom.....	6
1.2 Capecitabin	7
1.2.1 Beschreibung.....	7
1.2.2 Pharmakodynamik	7
1.2.3 Pharmakokinetik	8
1.2.4 Nebenwirkungen, Interaktionen.....	9
1.2.5 Indikationen, Dosierung.....	9
1.3 Erlotinib	10
1.3.1 Beschreibung.....	10
1.3.2 Pharmakodynamik	10
1.3.3 Pharmakokinetik	11
1.3.4 Nebenwirkungen, Interaktionen.....	13
1.3.5 Indikationen, Dosierung.....	13
1.4 Bevacizumab	14
1.4.1 Beschreibung.....	14
1.4.2 Pharmakodynamik	15
1.4.3 Pharmakokinetik	16
1.4.4 Nebenwirkungen, Interaktionen.....	16
1.4.5 Indikationen, Dosierung.....	16
1.5 Freie Radikale.....	17
1.5.1. Oxidativer Stress und Pankreaskarzinom	18
1.5.2. Oxidativer Stress und Chemotherapie	18
2. RATIONALE	19
3. EXPERIMENTELLER TEIL	20
3.1. Festphasenextraktion	20
3.2. Hochleistungs-Flüssigchromatographie	21
3.3. Quantifizierung von Capecitabin.....	22
3.4. Quantifizierung von DFCR und DFUR.....	25
3.5. Quantifizierung von Erlotinib.....	28
3.6. Messung des oxidativen Stresses.....	31

3.7. Messung der antioxidativen Kapazität	32
3.8. Biometrische Berechnungen	33
4. ERGEBNISSE.....	37
4.1. Patientencharakteristik.....	37
4.2. Chromatogramm im Verlauf der Therapie	38
4.3. Plasmakonzentrationszeitkurven	42
4.3.1. Capecitabin	42
4.3.2. Erlotinib	51
4.4. Pharmakokinetische Parameter.....	63
4.5. Oxidativer Stress.....	69
5. DISKUSSION	71
6. LITERATURVERZEICHNIS	81
7. ZUSAMMENFASSUNG.....	83
8. ABSTRACT	84
9. LEBENSLAUF	85

1. EINLEITUNG

1.1 Pankreaskarzinom

Das Pankreaskarzinom hat eine Inzidenz von 10 Neuerkrankungen pro 100 000 Einwohner und gehört somit zu den 5 häufigsten durch Krebs bedingten Todesfällen in Europa pro Jahr. Der Tumor ist in etwa 70% der Fälle im Pankreaskopf, zu 10% im Pankreaskörper und zu 5% im Pankreasschwanz anzutreffen. Dadurch, dass das Pankreaskarzinom in den meisten Fällen erst bei fortgeschrittenem Krankheitsverlauf diagnostiziert werden kann, ergibt sich auch eine sehr schlechte Prognose: Die 5-Jahres-Überlebenszeit liegt unter 5%. Faktoren, welche das Risiko an Pankreaskarzinom zu erkranken begünstigen sind: Rauchen, ungesunde Ernährung, chronische oder genetisch bedingte Pankreatitis, Alter, Geschlecht sowie eine positive Familienanamnese. In Verbindung mit diesem Tumor treten Mutationen des Onkogens K-ras und des Tumorsuppressorgens p53 auf. [1]

Diagnostik

Das frühe Krankheitsstadium ist durch ein uncharakteristisches bzw. fehlendes Beschwerdebild gekennzeichnet, wobei die Symptome im späteren Verlauf spezifischer und schwerwiegender sind. Zu den ersten Anzeichen eines Karzinoms im Pankreaskörper oder dem Schwanzbereich zählen Oberbauchschmerzen oder Druckgefühl, unspezifische Verdauungsprobleme wie etwa Völlegefühl, und Gewichtsverlust. Zu den ersten auftretenden Symptomen beim Pankreaskopfkarzinom gehört ein schmerzloser Ikterus, Gewichtsverlust sowie epigastrische Schmerzen. Weiters können akute Pankreatitis sowie unvermitteltes Auftreten eines Diabetes mellitus Hinweise für ein Pankreaskarzinom sein.

Labordiagnostische Parameter, die auf ein Pankreaskarzinom hinweisen können, sind erhöhte Werte des Serum-Bilirubins, der alkalischen Phosphatase, der γ -Glytanyl-Transferase, der Pankreas-Amylase und der Pankreas-Lipase. Weiters kommt es zu einer gesteigerten Konzentration des Tumormarkers CA 19-9. Die wichtigsten bildgebenden Verfahren bei der Tumordiagnostik sind die Endosonographie und die Computertomographie. [1][2]

Therapiemöglichkeiten

Die einzige kurative Maßnahme stellt die vollständige Resektion des Tumors dar, wobei dessen Durchführung nur bei <20% der Betroffenen möglich ist, da sich bei circa 80% der Patienten das Pankreaskarzinom zum Zeitpunkt der Diagnose bereits im fortgeschrittenem Stadium befindet. Ziele der Palliativtherapie sind auf der einen Seite eine Steigerung der Lebensqualität durch Aufrechterhaltung bzw. Wiederherstellung der Verdauungsfunktionen, sowie einer Schmerztherapie und einer speziellen Ernährung. Auf der anderen Seite versucht man mittels Chemotherapeutika ein weiteres Tumorwachstum zu verhindern bzw. eine Tumorremission zu erreichen. [2]

Chemotherapie

Als Standardchemotherapie gilt derzeit Gemcitabin, bei der die mediane Überlebenszeit etwa 6 Monate beträgt. Da die Überlebenschancen mittels derzeitiger Behandlungsmethoden äußerst gering sind, versucht man durch zusätzliche Gabe von Chemotherapeutika oder anderen Wirkstoffen hier eine Verbesserung zu erreichen. Große Hoffnungen setzt man in die „molecular targeted therapies“, zu denen Tyrosinkinasehemmer und monoklonale Antikörper

gehören. Diese Substanzen zielen auf eine Blockade der Tumorangiogenese oder des Tumorstwachstums durch Hemmung verschiedener Wachstumsfaktoren bzw. deren Signalwege ab. Die bisherigen Kombinationen von Gemcitabin mit anderen Wirksubstanzen zeigten zumeist keine signifikante Verbesserung der Gesamtüberlebenszeit. Nur geringe Vorteile konnten mit den Kombinationen von Gemcitabin mit Capecitabin bzw. mit Erlotinib erzielt werden. Aufgrund der bescheidenen Erfolge bisher, sind neue Kombinationsstrategien dringend erforderlich, um den Betroffenen höhere Überlebenschancen sowie eine Verbesserung der Lebensqualität zu bieten. Beispielsweise befindet sich eine neue Kombinationstherapie, bestehend aus dem Zytostatikum Capecitabin, dem Tyrosinkinasehemmer Erlotinib und dem monoklonalen Antikörper Bevacizumab, in klinischen Studien in der Phase-II. [3]

1.2 Capecitabin

Capecitabin ist ein Fluoropyrimidincarbamat, das nach oraler Applikation im Körper zu 5-Fluorouracil, einem Zytostatikum aus der Gruppe der Antimetabolite, umgewandelt wird.

1.2.1 Beschreibung

Die Summenformel von Capecitabin lautet $C_{15}H_{22}FN_3O_6$ und es besitzt ein Molekulargewicht von 359,35 Dalton. Es ist ein weißes bis cremefarbenes kristallines Pulver und seine Wasserlöslichkeit liegt bei 26 mg/ml bei 20°C. [4]

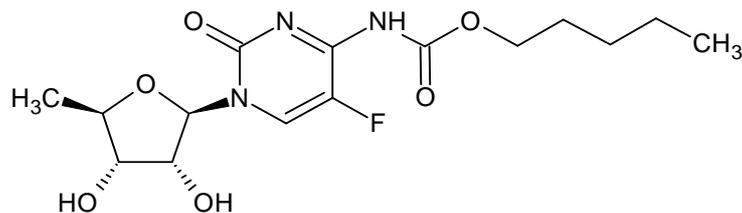


Abb. 1: Chemische Struktur von Capecitabin

1.2.2 Pharmakodynamik

Capecitabin ist eine Prodrug welche erst durch verschiedene enzymatische Schritte in seine aktive Form, das 5-Fluorouracil (5-FU), umgewandelt wird. Bei 5-FU handelt es sich um ein Pyrimidinanalogon welches sowohl in die DNA-Synthese als auch in die mRNA-Translation eingreift. Durch die Thymidin-Phosphorylase entsteht 5-Fluordesoxyuridin (5FdURD) aus 5-FU, dessen Bindung an die Thymidilatsynthetase und an Tetrahydrofolat die Bildung von Thymidin verhindert und somit die DNA-Synthese blockiert. Weiters können aus 5-FdUrd durch Thymidinkinase Fluorouridin-Mono- und Triphosphat (FdUMP, FdUTP) entstehen. Zum Einen führen sie durch deren direkten Einbau in die DNA zur DNA-Schädigung und zum Anderen kommt es durch deren Einbau in die mRNA zur Blockade der mRNA-Translation und somit zur gestörten Proteinsynthese. Beide Mechanismen führen in weiterer Folge zur Apoptose. [5]

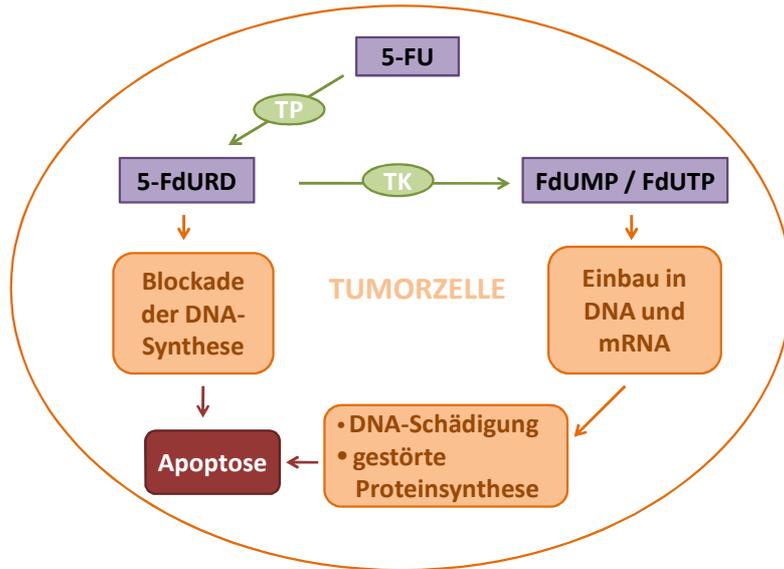


Abb. 2: Schematische Darstellung der Wirkungsweise von 5-FU

1.2.3 Pharmakokinetik

Die Aktivierung von Capecitabin erfolgt in drei Schritten. Nach oraler Applikation wird es unverändert im Darm resorbiert. In der Leber wird es durch Carboxylesterase in 5-Desoxy-S-fluorocytidin (5-DFCR) umgewandelt und anschließend mit Hilfe von Cytidin-Deaminase zu 5-Desoxy-S-Fluorouridin (5-DFUR) metabolisiert. Die Umwandlung zur aktiven Form erfolgt schließlich durch das Enzym Thymidin-Phosphorylase, welches den Metaboliten zu 5-FU verstoffwechselt. Dieses Enzym kommt sowohl in gesundem als auch im Tumorgewebe vor, wobei in letzterem eine wesentlich höhere Aktivität vorzufinden ist als im normalen Gewebe. [5]

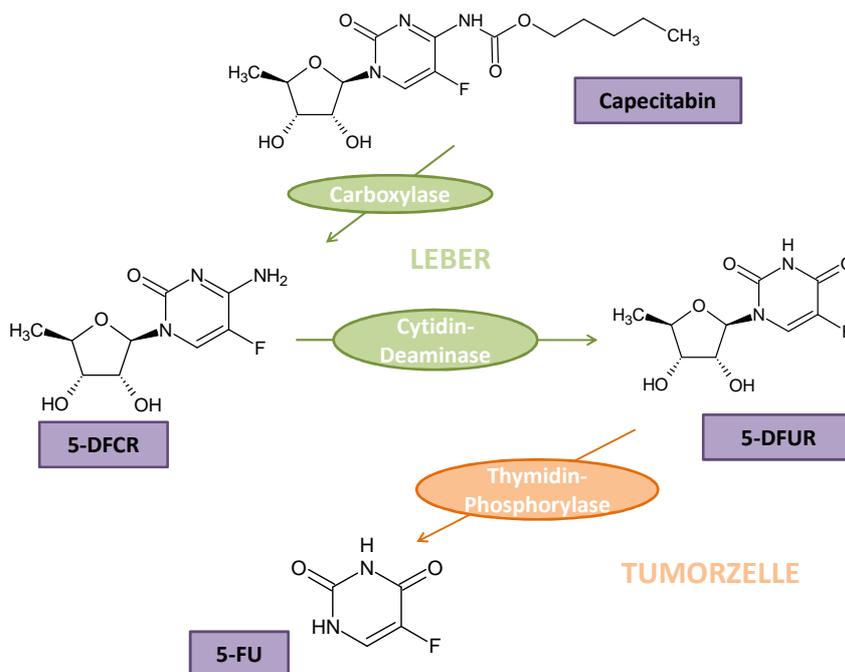


Abb. 3: 3-Schritte-Aktivierung von Capecitabin zu FU

5-FU wird durch das Enzym Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (DPD) in einen weit weniger toxischen Metaboliten umgewandelt und nach weiteren Transformationen wird es schließlich als α -Fluoro- β -alanin (FBAL) mit dem Urin ausgeschieden. Die Ausscheidung der gegebenen Dosis erfolgt in Form der Metaboliten, zu 95,5 % mit dem Urin, nur 3% werden unverändert, 2,6 % über den Faeces eliminiert. [6]

Tab. 1: Pharmakokinetische Parameter von Capecitabin und seiner Metaboliten

Parameter	Capecitabin	DFCR	DFUR	FU	FBAL
c_{\max} [$\mu\text{g/ml}$]	4,67	3,05	12,1	0,95	5,46
t_{\max} [h]	1,5	2	2	2	3,34
PPB	54%	10%	62%	10%	
$t_{1/2}$ [h]	0,85	1,11	0,66	0,76	3,23

1.2.4 Nebenwirkungen, Interaktionen

Bei Patienten mit fortgeschrittenem oder metastasiertem Pankreaskarzinom, denen Capecitabin als Monotherapie verabreicht wurde, zeigten sich vor allem unerwünschte Arzneimittelwirkungen im Gastrointestinaltrakt, wie zum Beispiel Übelkeit, Erbrechen und Diarrhö. Des Weiteren konnte auch das Hand-Fuß-Syndrom in unterschiedlichen Schweregraden beobachtet werden. [7]

Es gibt Hinweise darauf, dass Capecitabin das Isoenzym CYP450 2C9 hemmt. Bei gleichzeitiger Gabe von Kumin-Antikoagulantien kann deren Wirkung verstärkt sein, daher wird eine regelmäßige Überprüfung der Koagulationsparameter empfohlen. Zu vermindertem Abbau und damit zur erhöhten Toxizität von 5-FU kommt es durch die Hemmung der DPD bei gleichzeitiger Anwendung von Capecitabin mit Sorivudin oder seiner Analoga. [6]

1.2.5 Indikationen, Dosierung

Capecitabin findet Anwendung als Monotherapie bei der Behandlung des metastasierten Kolorektalkarzinoms, bei der adjuvanten Behandlung des Kolonkarzinoms, sowie bei der Behandlung des lokal fortgeschrittenen und metastasierten Mammakarzinoms. In Kombination mit anderen Chemotherapeutika wird es auch bei Kolorektal-, Magen-, und Mammakarzinom verabreicht. [6]

Tab. 2: Übersicht Anwendungsgebiete und Dosierung von Capecitabin

Indikation	Dosierung	Anwendungsdauer
Monotherapie: Kolon-/Kolorektal-/ Mammakarzinom	1250 mg/m ² 2x tägl	14 Tage Einnahme 7 Tage Pause
Kombinationstherapie: Kolon-/ Magenkarzinom	800-1000 mg/m ² 2x tägl	14 Tage Einnahme 7 Tage Pause
Kombinationstherapie: Mammakarzinom	1250 mg/m ² 2x tägl	14 Tage Einnahme 7 Tage Pause

1.3 Erlotinib

Erlotinib ist ein reversibler Tyrosinkinaseinhibitor mit einer hohen Affinität zum humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor vom Typ 1 (EGFR) und gehört zur Gruppe der 4-Anilinochinazolin-Derivate.

1.3.1 Beschreibung

Erlotinib Hydrochlorid mit der Summenformel C₂₂H₂₃N₃O₄xHCl besitzt ein Molekulargewicht von 429,9 Dalton und einen pKa-Wert von 5,42 bei 25°C. Es ist sehr leicht löslich in Wasser, leicht löslich in Methanol und fast unlöslich in Acetonitril, Aceton, Ethylacetat und Hexan. Die Wasserlöslichkeit von Erlotinib Hydrochlorid ist pH-Wert abhängig und steigt ab einem pH-Wert unter 5 aufgrund der Protonierung des sekundären Amin Stickstoffs. Bei einem pH-Wert von etwa 2 weist Erlotinib Hydrochlorid eine maximale Löslichkeit von 0,4 mg/ml auf. [8]

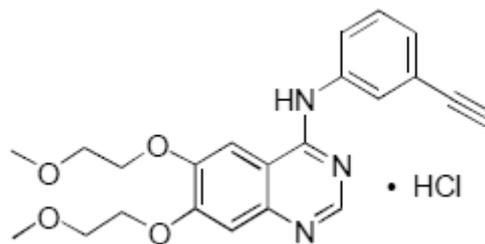


Abb. 4: Chemische Struktur von Erlotinib [8]

1.3.2 Pharmakodynamik

Erlotinib ist ein niedermolekularer reversibler Tyrosinkinaseinhibitor mit hoher Affinität zum humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR). Es sind vier Mitglieder der EGF-Rezeptoren Familie bekannt: EGFR, HER2/neu, HER3, HER4. Der Rezeptor besteht aus drei verschiedenen Domänen, der extrazellulären Liganden-Bindungs-Domäne, der hydrophoben transmembranären Domäne und der intrazellulären Domäne mit Tyrosinkinase-Aktivität. Die Bindung eines Liganden am extrazellulären Teil des Rezeptors führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors mit anschließender Homo- bzw. Heterodimerisierung und zur Internalisierung des Rezeptors. Durch die Dimerisierung kommt es zur Autophospho-

rylierung und somit zur Aktivierung der Tyrosinkinase, welche Protein- Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung katalysiert und intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert. Die durch den EGF-Rezeptor aktivierten Signalkaskaden sind wesentlich beteiligt an Zellproliferation, Differenzierung, Angiogenese, Zellmotilität und Zelltod. EGFR-Dysfunktion wie z.B. Rezeptor oder Liganden Überexpression, Rezeptormutationen, sowie zur vermehrten Heterodimerisierung führt zu einer verstärkten Rezeptor-Aktivität und somit zu verstärkter Zellproliferation, Differenzierung, Invasion, Angiogenese, Metastasierung sowie zur Apoptoseresistenz. EGFR Dysfunktion, vor allem Überexpression des Rezeptors und seiner Liganden geht beim Pankreaskarzinom meist mit einer erhöhten Tumoraggressivität sowie einer schlechteren Prognose einher. [9]

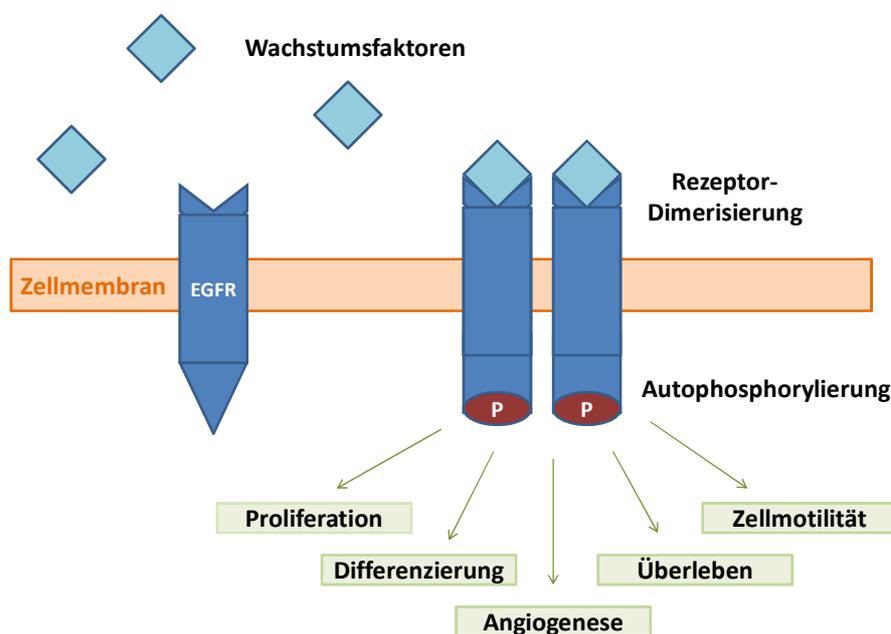


Abb. 5: Schematische Darstellung des EGF-Rezeptors und seiner Effekte

Der Wirkmechanismus von Erlotinib beruht auf der Blockade der ATP-Bindungsstelle in der intrazellulären Domäne des EGF-Rezeptors vom Typ1, wodurch die durch den Liganden induzierte Rezeptor-Phosphorylierung gehemmt wird. In weiterer Folge kommt es zu einer Blockade der Zellteilung in der G1-Phase sowie zur Einleitung der Apoptose durch Aktivierung von proapoptotischen Faktoren wie zum Beispiel der Caspase8. Erlotinib beeinflusst auch die Angiogenese indem es durch verminderte Produktion von Wachstumsfaktoren zu deren Hemmung führt. Durch Blockade von Matrixmetalloproteinasen kann die weitere Invasion und Metastasierung des Tumors unterbunden werden. [9]

1.3.3 Pharmakokinetik

Erlotinib wird oral eingenommen und erreicht nach etwa 4 Stunden seine maximale Plasmakonzentration. Die absolute Bioverfügbarkeit liegt bei 59%, wobei diese mit gleichzeitiger Nahrungsaufnahme gesteigert werden kann. Das scheinbare Verteilungsvolumen von Erlotinib beträgt 232 l und es diffundiert in Tumorgewebe. Erlotinib bindet zu 95% an Plasmaproteine, bevorzugt an Serumalbumin und α 1-saures Glykoprotein. Der Metabolismus von

Erlotinib erfolgt hauptsächlich in der Leber durch CYP3A4. Weiters wird es auch durch CYP1A2 in der Leber, CYP3A4 im Darm, CYP1A1 in der Lunge und CYP1B1 im Tumorgewebe verstoffwechselt. Die Biotransformation von Erlotinib lässt sich in 3 Hauptstoffwechselwege einteilen: O-Demethylierung einer oder beider Seitenketten mit anschließender Oxidation zu den Carbonsäuren (ca. 29%), Oxidation des Acetylenanteils gefolgt von der Hydrolyse zur Aryl-Carbonsäure (ca. 21%) sowie der aromatischen Hydroxylierung des Phenyl-Acetylenanteils (ca. 10%). Insgesamt konnten bisher 14 Metabolite identifiziert werden, wobei 2 von ihnen, OSI-420 und OSI-413, ähnliche pharmakologische Eigenschaften wie Erlotinib aufweisen.

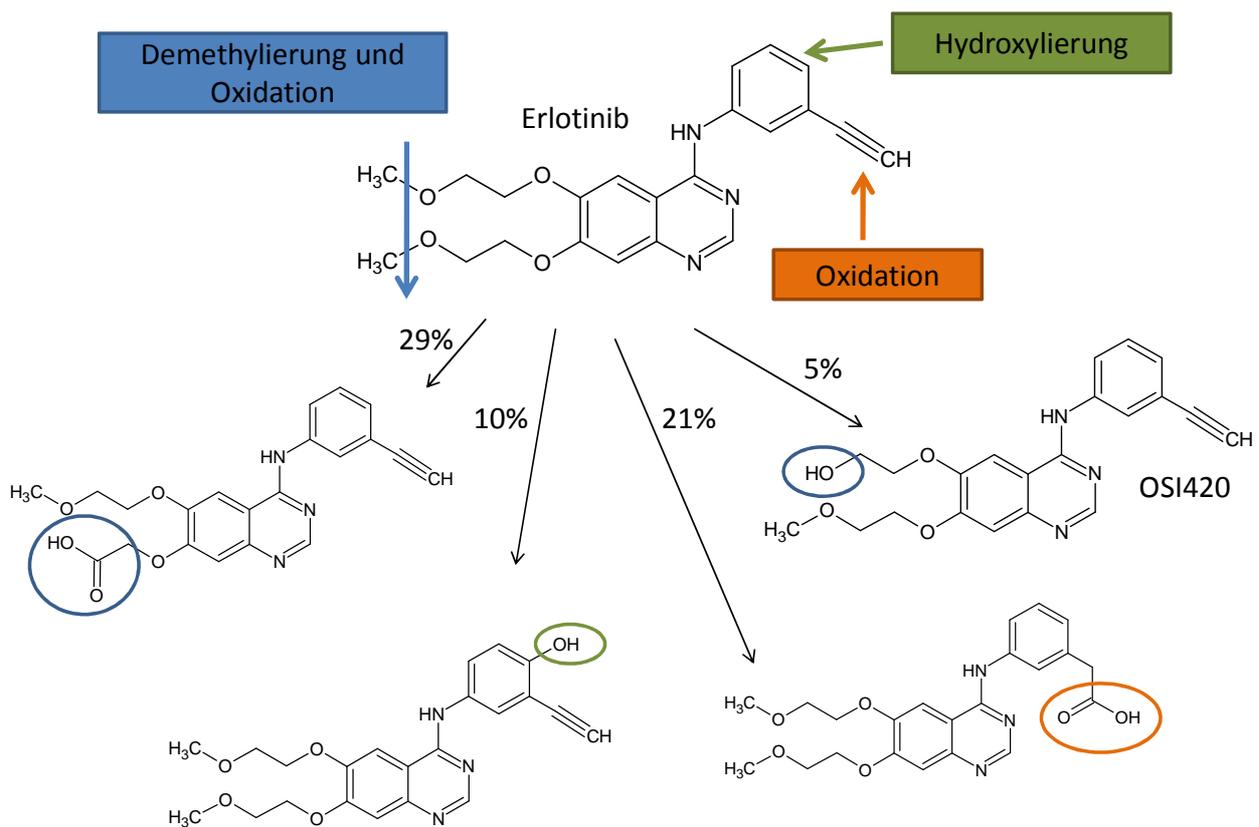


Abb. 6: Hauptstoffwechselwege von Erlotinib

Die Elimination der Metabolite erfolgt zu circa 90% über den Fäzes, renal werden etwa 9% ausgeschieden und weniger als 2% werden unverändert ausgeschieden. Erlotinib weist eine durchschnittliche scheinbare Clearance von 4,47l/h bei einer medianen Halbwertszeit von 36,2 Stunden auf. Es dauert ca. 7-8 Tage, bis die Plasmakonzentration im Steady State erreicht wird. [10][11]

Tab. 3: Pharmakokinetische Parameter von Erlotinib

Parameter	Literatur[10]	Literatur[11]	Literatur[12]
F	59%		59%
PPB	95%		95%
Vd	232 l		
t _{max}	4 h	1,4 ± 1,0 h	2-4 h
c _{max}	2 µg/ml	1,39 ± 0,39	
t _{ss}	7-8 d		
t _{1/2el}	36,2 h	8,1 ± 3,5 h	10-20 h
Cl _{tot}	4,47 l/h		

1.3.4 Nebenwirkungen, Interaktionen

Zu den häufigsten unerwünschten Arzneimittelwirkungen bei der Gabe von Erlotinib zählen akneähnlicher Hautausschlag vor allem im Gesicht sowie am Oberkörper, Diarrhö, und Müdigkeit. Des Weiteren kann es auch zu Kopfschmerzen, Übelkeit, Erbrechen, Dehydrierung und Schleimhautentzündungen kommen. [9]

Die Löslichkeit von Erlotinib ist pH-Wert abhängig. Arzneimittel wie Protonenpumpenhemmer, H₂-Antagonisten und Antazida beeinflussen den pH-Wert im oberen Gastrointestinaltrakt und können so die Bioverfügbarkeit von Erlotinib verändern. Da Erlotinib hauptsächlich durch CYP3A4 in der Leber verstoffwechselt wird können starke CYP3A4-Induktoren wie zum Beispiel Rifampicin oder Antiepileptika seine Wirksamkeit herabsetzen, starke CYP3A4-Inhibitoren wie zum Beispiel Azol-Antimykotika, Proteaseinhibitoren, Erythromycin und Clarythromycin können seine Toxizität erhöhen. Rauchen führt zu einer gesteigerten Erlotinib-Clearance und somit zu einer reduzierten Plasmakonzentration. [9][10]

Bezüglich der pharmakologischen Wechselwirkungen zwischen Erlotinib und Capecitabin finden sich in der Literatur widersprüchliche Angaben. Einerseits wurden keine Veränderungen des pharmakologischen Profils von Erlotinib bei gleichzeitiger Gabe von Capecitabin beobachtet, andererseits wurden erhöhte Plasmakonzentrationen von Erlotinib in Anwesenheit von Capecitabin beschrieben. [10][17]

1.3.5 Indikationen, Dosierung

Im Falle eines Nichtansprechens auf die Standardchemotherapie bei Nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom mit EGFR-Dysfunktion wird Erlotinib als second-line Therapie eingesetzt. Die Dosierung liegt bei 150 mg einmal täglich und sollte mindestens eine Stunde vor oder zwei Stunden nach einer Mahlzeit verabreicht werden. Weiters findet Erlotinib in Kombination mit Gemcitabin Anwendung bei der Behandlung von Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzi-

nom, wobei die Dosierung bei 100 mg einmal täglich liegt und auch hier sollte die Gabe von Erlotinib mindestens eine Stunde vor oder zwei Stunden nach einer Mahlzeit erfolgen. [10]

Tab.4: Übersicht Anwendungsgebiete und Dosierung von Erlotinib

Indikation	Dosierung	Art der Anwendung
Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom	150mg 1xtägl	1h vor oder 2h nach der Mahlzeit
Pankreaskarzinom	100mg 1xtägl	1h vor oder 2h nach der Mahlzeit

1.4 Bevacizumab

1.4.1 Beschreibung

Bevacizumab ist ein rekombinanter humanisierter monoklonaler Antikörper der VEGF (vascular endothelial growth factor) bindet. Das Biomolekül setzt sich aus je zwei schweren und zwei leichten Proteinketten zusammen, welche mittels Disulfidbrücken in Verbindung stehen. Weiters lässt sich der Antikörper in verschiedene Bereiche unterteilen, einen konstanten und einen variablen Bereich. Bei dem humanisierten Antikörper Bevacizumab sind sowohl die konstanten Regionen als auch Teile der variablen Region humanen Ursprungs, nur noch die hochvariablen Sequenzen stammen aus der Maus. Bevacizumab weist ein Molekulargewicht von circa 149 Kilodalton auf und wird in Form einer leicht opaleszenten, farblosen bis blassbraunen, sterilen Flüssigkeit mit einem pH-Wert von 6.2 angewendet und intravenös appliziert. [13]

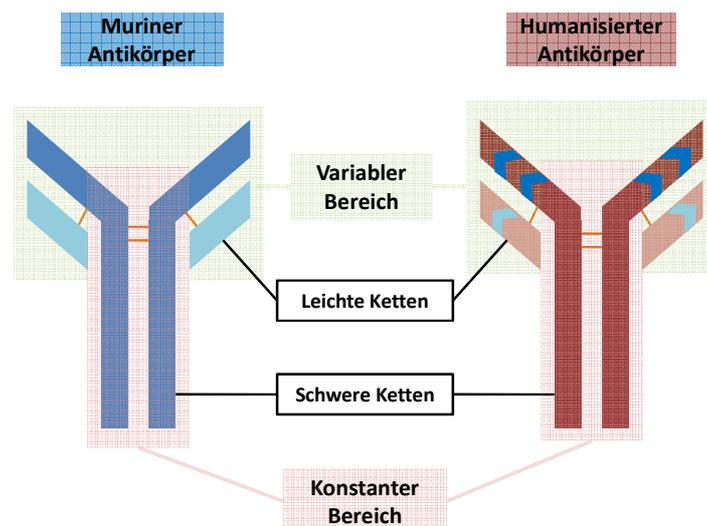


Abb. 7: Darstellung eines murinen und humanisierten Antikörpers

1.4.2 Pharmakodynamik

Die Bildung neuer Blutgefäße unterliegt komplexer Prozesse und wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Eine bedeutende Rolle in diesem Vorgang kommt VEGF zu. Es ist in der Lage Angiogenese sowohl über autokrine als auch über parakrine Wege zu stimulieren. Bisher konnten zwei verschiedenen VEGF-Rezeptoren bestimmt werden, der VEGF-Rezeptor1 und der VEGF-Rezeptor2. Beide Rezeptoren sind aus einer extrazellulären Ligandenbindungsstelle, einem transmembranären Bereich und einer intrazellulären Domäne mit Tyrosinkinase-Aktivität aufgebaut. VEGF bindet bevorzugt an Endothelzellen, kann aber auch mit Tumorzellen oder normalen Zellen interagieren. Die Bindung des Wachstumsfaktors an der extrazellulären Domäne des Rezeptors führt zur Rezeptor-Dimerisierung, zur Auto-phosphorylierung des Rezeptors und somit zur Aktivierung der Tyrosinkinase, welche weitere intrazelluläre Signalkaskaden einleitet. Wesentliche Effekte dieses Prozesses sind Zellproliferation, Zellmigration, Überleben der Zelle, Neubildung von Gefäßen sowie die vermehrte Produktion von Matrixmetalloproteinasen und dem Plasminogen-Aktivator Urokinase, welche beide am Abbau der extrazellulären Matrix beteiligt sind. [14]

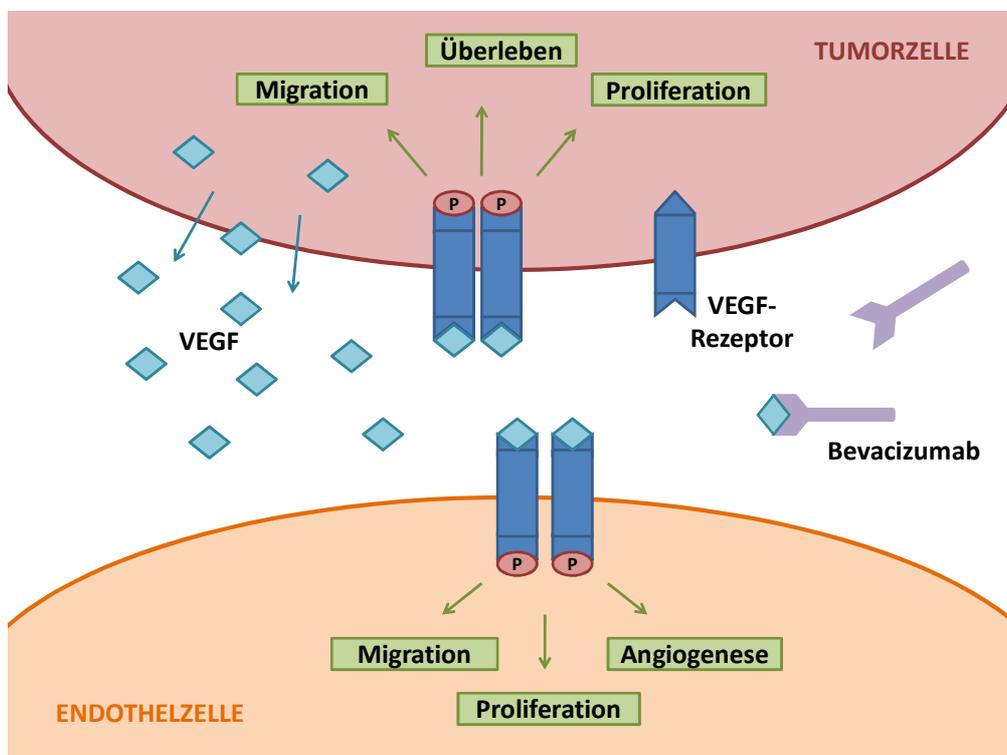


Abb. 8: VEGF und seine Effekte

Für das Wachstum eines Tumors ist die Ausbildung einer eigenen Gefäßversorgung essentiell, daher werden Angiogenese stimulierende Faktoren in vielen Tumoren vermehrt gebildet. Im Pankreaskarzinom konnte die Überexpression von VEGF und seiner Rezeptoren nachgewiesen werden. Eine starke VEGF Überexpression steht meist mit einer erhöhten Aggressivität dieses Tumors und einer schlechteren Prognose in Verbindung. Der Antikörper Bevacizumab kann freies VEGF binden und verhindert so die Bindung an den Rezeptor und damit auch dessen Effekte auf die Zelle. In weiterer Folge kann so durch die VEGF-Hemmung das Tumorstadium unterdrückt werden. [15]

1.4.3 Pharmakokinetik

Bevacizumab wird intravenös verabreicht, wobei die Infusionsdauer je nach Verträglichkeit variiert. Der Antikörper besitzt ein zentrales Verteilungsvolumen von 2,92 l und wird im ganzen Organismus proteolytisch abgebaut. Seine Clearance beträgt 0,231 Liter/Tag und seine Halbwertszeit liegt bei etwa 20 Tagen. Es dauert ca. 100 Tage bis die Plasmakonzentration im steady state erreicht wird. [16]

1.4.4 Nebenwirkungen, Interaktionen

Häufig auftretende Nebenwirkungen, die mit der Gabe von Bevacizumab in Verbindung gebracht werden, sind: Hypertonie, Proteinurie und leichte Blutungen. Des Weiteren kann es auch zu schwerwiegenderen unerwünschten Arzneimittelwirkungen, wie zum Beispiel Wundheilungsstörungen, Magen-Darm-Perforationen und arterielle Thromboembolien, kommen. [14]

Patienten, die niedrige Albuminwerte sowie eine erhöhte Aktivität der alkalische Phosphatase aufweisen, haben eine um ca. 20% verminderte Clearance. Weiters konnte ein Zusammenhang zwischen dem zentralen Verteilungsvolumen und dem Geschlecht festgestellt werden, wobei das Verteilungsvolumen männlicher Patienten um etwa 22% höher liegt. Die gleichzeitige Gabe der Infusionslösung mit einer Glucoselösung ist zu vermeiden, da Bevacizumab ein konzentrationsabhängiges Abbauprofil aufweist. In Kombination mit Chemotherapeutika zeigten sich keine klinisch relevanten Wechselwirkungen. [16]

1.4.5 Indikationen, Dosierung

Der Einsatz von Bevacizumab ist bereits in Kombination mit Chemotherapeutika bei metastasiertem Kolon- oder Rektalkarzinom, metastasiertem Mammakarzinom, rezidivierendem bzw. metastasiertem nichtkleinzelligem Bronchialkarzinom, und bei fortgeschrittenem Nierenkarzinom indiziert. Die erste Infusionsdauer sollte 90 Minuten betragen, bei guter Verträglichkeit wird die zweite Infusion über einem Zeitraum von 60 Minuten verabreicht und die dritte kann dann innerhalb von 30 Minuten gegeben werden. [16]

Tab. 5: Übersicht Anwendungsgebiete und Dosierung von Bevacizumab

Indikation	Dosierung	Art der Anwendung
Metastasiertes Kolorektalkarzinom	5,0 oder 10 mg/kg KG	1x alle 2 Wochen i.v.
	7,5 oder 15 mg/kg KG	1x alle 3 Wochen i.v.
Metastasiertes Mammakarzinom	10 mg/kg KG	1x alle 2 Wochen i.v.
	15 mg/kg KG	1x alle 3 Wochen i.v.
Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom	7,5 oder 15 mg/kg KG	1x alle 3 Wochen i.v.
Fortgeschrittenes, metastasierendes Nierenzellkarzinom	10 mg/kg KG	1x alle 2 Wochen i.v.

1.5 Freie Radikale

Freie Radikale

Unter einem freien Radikal versteht man ein Atom, eine Atomgruppe oder ein Molekül, das ein oder mehrere ungepaarte Elektronen in einem äußeren Orbital enthält. Zu den wichtigsten Radikalen im menschlichen Organismus zählen die reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und die reaktiven Stickstoffspezies (RNS). Die Entstehung der ROS kann enzymatisch durch Oxidasen, wie zum Beispiel Xanthin- oder NADPH-Oxidase, oder durch Eisen bzw. Kupfer katalysierte Reaktionen, oder bei der mitochondrialen Atmung erfolgen. Stickstoffmonoxid Radikale werden enzymatisch mittels NO-Synthase gebildet. [18]

Tab. 6: Übersicht freie Radikale mit potenziell zytotoxischer Reaktivität [18][19]

ROS		RNS	
Formel	Bezeichnung	Formel	Bezeichnung
OH [•]	Hydroxyl-Radikal	NO	Stickstoffmonoxid-Radikal
¹ O ₂	Singulett-Sauerstoff		
HO ₂ [•]	Hydroperoxyl-Radikal	NO ⁺	Nitrosyl-Kation
O ₂ ^{•-}	Superoxid-Radikal	NO ⁻	Nitroxyl-Anion
RO [•]	Alkoxy-Radikal	ONOO ⁻	Peroxynitrit
ROO [•]	Peroxy-Radikal		
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid		

Physiologische Funktionen

Sowohl RNS als auch ROS spielen eine wichtige Rolle in verschiedenen physiologischen Prozessen. Das von Endothelzellen gebildete NO führt via Aktivierung der Guanylatcyclase zur Relaxierung der glatten Gefäßmuskulatur. Aktivierte Makrophagen sind in der Lage über NADPH-Oxidase vermehrt ROS zu bilden und erfüllen so eine wichtige Aufgabe bei der Abwehr von Pathogenen. Die Bildung von ROS erfolgt, ebenfalls über NAD(P)H-Oxidase, auch in nicht-phagozytären Zellen wie zum Beispiel in Fibroblasten, Endothelzellen, Herzmuskelzellen, Schilddrüsengewebe oder in der glatten Muskulatur der Gefäße, wo sie an der Regulation intrazellulären Signalkaskaden beteiligt sind. Eine weitere regulatorische Funktion kommt ihnen bei verschiedenen Enzymreaktionen, wie bei der 5-Lipoxygenase und Cyclooxygenase, aber auch bei der Apoptose zu. [18]

Antioxidativer Schutz

ROS können durch oxidative Veränderungen an Proteinen oder Lipiden zur Beeinträchtigung in deren Funktionen führen und so Zell- bzw. Gewebeschäden verursachen. Um diesen Schäden entgegenzuwirken wurden vom Körper verschiedene Schutzmechanismen entwickelt. Wichtige Angriffspunkte sind hier das Abfangen von Radikalen, die Bindung von Faktoren, die die Radikalentstehung begünstigen, sowie das Unterbrechen von Kettenreaktionen. Zu den

wichtigsten intrazellulären enzymatischen Schutzmechanismen zählen die Superoxid-Dismutase, die Glutathion-Peroxidase und die Katalase. Die Superoxid-Dismutase begünstigt durch Verstärkung der spontanen Dismutation die Entgiftung des Superoxid-Radikals zu Wasserstoffperoxid und molekularem Sauerstoff. Die Glutathion-Peroxidase ist in der Lage Wasserstoffperoxide und Lipidhydroperoxide zu Wasser und dem korrespondierendem Alkohol umzuwandeln. Die Aufgabe der Katalase liegt in der Entgiftung von Wasserstoffperoxid. Tocopherole, Carotinoide, Ubiquinon gehören zu den lipophilen, Glutathion, Ascorbinsäure und Harnsäure zu den hydrophilen Antioxidantien.

Im Körper herrscht ein Gleichgewicht zwischen Radikalbildung und Radikalabwehr. Ist dieses Gleichgewicht zu Gunsten der Radikalentstehung verschoben so spricht man vom oxidativen Stress. [19]

1.5.1. Oxidativer Stress und Pankreaskarzinom

Zusätzlich dazu, dass das Pankreaskarzinom meist erst im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert wird, trägt auch die niedrige Ansprechrate auf eine Chemotherapie zur Aggressivität dieses Tumors bei. Eine der Ursachen für das Fehlschlagen der Chemotherapie ist die Apoptoseresistenz des Tumors. Anhand von humanen Pankreaskarzinomzellreihen (PaCa-2 und PANC-1) konnte gezeigt werden, dass ROS eine antiapoptotische Wirkung auf die Tumorzellen ausübt. Die erhöhte ROS Produktion in den Pankreastumorzellen erfolgt unter anderem durch membranständige nichtmitochondriale NAD(P)H-Oxidasen, den sogenannten NOX, welche vor allem in Tumorzellen exprimiert werden. Diese können durch Wachstumsfaktoren, wie IGF (insulin-like growth factor) und FGF (fibroblast growth factor), stimuliert werden. Durch Zugabe der Antioxidantien Tiron und N-Acetylcystein, sowie Diphenyleneiodonium (DPI), einem Inhibitor der NADPH-Oxidase, zu den Pankreastumorzelllinien, konnten die intrazellulären ROS-Konzentrationen gesenkt, und damit Apoptose eingeleitet werden. Die Hemmung der NOX und somit die Abschwächung der Apoptoseresistenz des Pankreaskarzinoms könnten einen weiteren Angriffspunkt in der zukünftigen Therapie darstellen. [20]

1.5.2. Oxidativer Stress und Chemotherapie

Die Auswirkungen der Dreifachkombination von Capecitabin, Erlotinib und Bevacizumab auf die Radikalwerte im Organismus bei Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom sind bisher noch nicht näher untersucht worden. Beobachtungen an der humanen Nicht-Kleinzelligen-Lungenkarzinom-Zelllinie H3255 konnten jedoch zeigen, dass Erlotinib keine Steigerung der ROS Produktion induziert. Die Zugabe von Antioxidantien hatte keinen Einfluss auf die Wirkstärke des Tyrosinkinaseinhibitors. [21]

2. RATIONALE

Ziel der vorliegenden Diplomarbeit ist die Ermittlung der Pharmakokinetik und Metabolismus von Capecitabin und Erlotinib, sowie deren Einfluss auf die oxidative Belastung des Organismus, im Rahmen einer neuen Chemotherapie zur Behandlung des fortgeschrittenen Pankreaskarzinoms.

3. EXPERIMENTELLER TEIL

3.1. Festphasenextraktion

In den Proben befinden sich nicht nur die zu analysierenden Substanzen, sondern auch Matrixbestandteile, welche eine weitere Quantifizierung der Analyten beeinflussen bzw. stören könnten. Mithilfe der Festphasenextraktion lassen sich die zu bestimmenden Substanzen und die störenden Begleitkomponenten einfach und rasch voneinander trennen. Durch Interaktionen der Analyten mit einem Sorbens können diese in einer Kartusche angereichert, die Matrixkomponenten ausgewaschen und anschließend durch ein geeignetes Lösungsmittel die zu quantifizierenden Substanzen eluiert werden. Um eine gute Aufnahmefähigkeit und einen gleichmäßigen Durchfluss zu gewährleisten wird das Sorbens vor dem Auftragen der Probenlösung noch konditioniert. Bei dem Sorbens der verwendeten Kartuschen handelt es sich um ein mit Wasser benetzbares Umkehrphasenmaterial mit hydrophiler-lipophiler Balance, das zusätzlich zur Abtrennung der Matrixkomponenten die Trennung von pharmazeutischen Wirkstoffen von seinen Metaboliten ermöglicht.

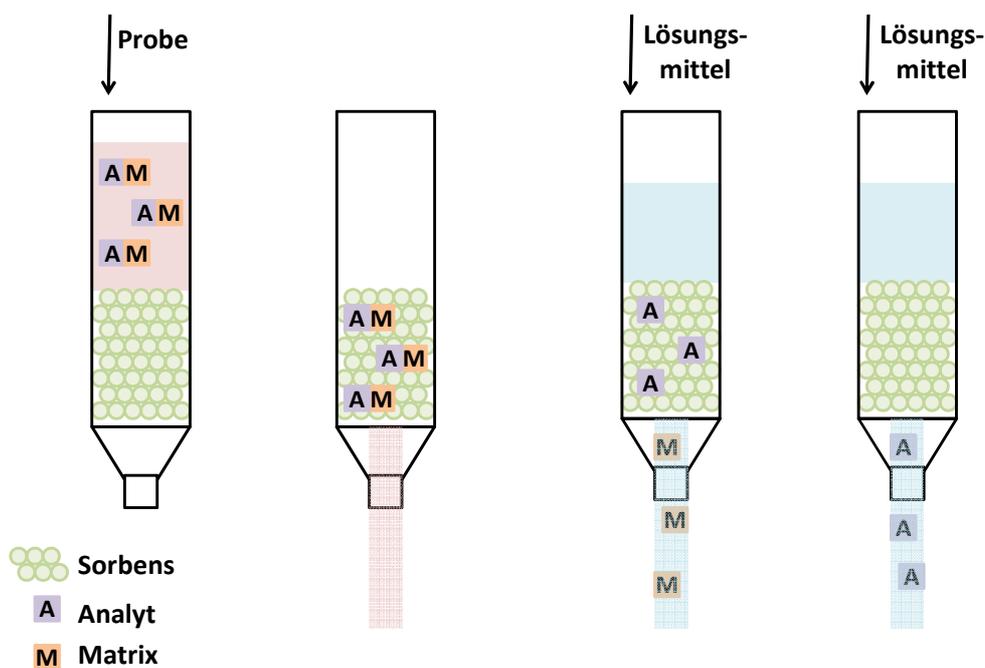


Abb. 9: Schematische Darstellung der Festphasenextraktion

3.2. Hochleistungs-Flüssigchromatographie

Bei der Hochleistungsflüssig-Chromatographie (HPLC) handelt es sich um eine Variante der Säulenchromatographie bei der mit geeigneten Pumpen das Elutionsmittel durch die Säule gedrückt wird. Die Trennung von Stoffgemischen wird durch die Wechselwirkungen der Substanzen zwischen mobiler und stationärer Phase, die sich möglichst gleichmäßig und dicht gepackt in der Trennsäule befindet, ermöglicht. Durch die Verwendung von Pumpen sind trotz der hohen Packungsdichte, die einerseits eine bessere Trennleistung ermöglicht, andererseits aber einen höheren Widerstand verursacht, gleichmäßige und ausreichende Strömungsgeschwindigkeiten zu erreichen. Bei der Umkehrphasenchromatographie (reversed phase; RP) wird durch Einfügen lipophiler Alkylgruppen (z.B. Octadecylgruppen = RP-18) die Oberfläche des Trägermaterials der stationären Phase größtenteils hydrophobisiert. Durch Endcapping werden auch die hydrophilen Silanolgruppen die sich in den Poren des Trägermaterials befinden durch den Einsatz von kleinen hydrophoben Molekülen zu lipophilen Gruppen umgewandelt. Die Trennung der Substanzen basiert bei der Umkehrphasenchromatographie sowohl auf Adsorptionsmechanismen als auch auf Verteilungsvorgängen. Die Detektion der aufgetrennten Stoffe erfolgt u.a. mittels Photodioden-Array-Detektor, welcher in der Lage ist die Lichtabsorption des Eluats bei mehreren Wellenlängen gleichzeitig zu messen. [22]

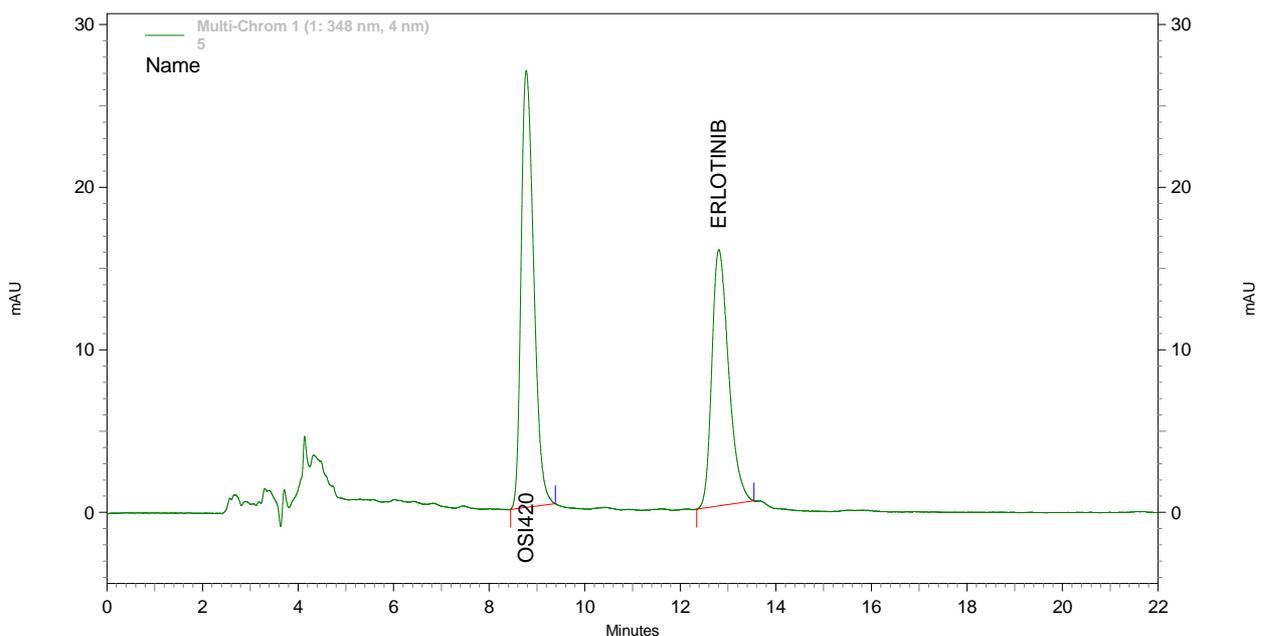


Abb. 10: Chromatogramm von Erlotinib und seinem Metabolit OSI420

Abbildung 10 zeigt das Chromatogramm einer Standardlösung von Erlotinib und seinem Hauptmetaboliten OSI420 (Konzentration der Standardlösung: 5 µg/ml). Da bei der Umkehrphasenchromatographie lipophile Substanzen intensivere Wechselwirkungen mit der stationären Phase aufweisen, erscheint der Erlotinib-Peak erst später im Chromatogramm, der Peak des hydrophileren Metaboliten erscheint früher im Chromatogramm.

3.3. Quantifizierung von Capecitabin

Festphasenextraktion:

Tab. 7: Geräte und Material

Vortex	Heidolph Polymax 2040
Kartusche	SPE cartridges Oasis, HLB 1 ml 30 mg Füllung, 1 ml Volumen
Vakuum-Fetsphasen-Extraktionseinheit	Analytichem International, USA
Lösungsmittel	Aqua bidest, Methanol, Aqua bidest.-Methanol (95 + 5 %, v/v); Firma MERCK
Zentrifuge	Labofuge 400 (SN 5100 2175, Heraeus)
Vials	Chromacol Braunglas 1,5 ml mit Teflonseptum

Praktische Durchführung:

- kurzes Mischen der Proben am Vortex
- Aufstecken der Kartuschen auf die Vakuumwanne
- Anlegen eines Vakuums von –100 mbar
- Aktivierung der Silikapackung mittels 1 ml Methanol
- Konditionierung mit 1 ml Aqua bidest.
- Auftragen von 0,8 ml Probenlösung
- Elution der Metabolite DFCR und DFUR mit 0,8 ml Wasser-Methanol (95 +5%, v/v) wobei das Eluat nach 1 min Zentrifugieren bei 1000 U in einer Epruvette gesammelt wird
- Abfüllen der Probelösung in Vials
- Elution von Capecitabin mit 0,8 ml Methanol, wobei das Eluat ebenfalls nach 1 min Zentrifugieren bei 1000 U in einer Epruvette gesammelt wird
- Abfüllen der Probelösung in Vials

Eluentenherstellung:

Wasser dest. und Methanol werden im Verhältnis 50 + 50% v/v gemischt und 45 min am Ultraschallbad entgast.

HPLC für Capecitabin:

Tab. 8: Analytische Parameter des HPLC-Systems für CCB

EZChrom Elite HPLC-System	
Vorsäule	LiChrospher® 100 RP-18 (5µm)
Trennsäule	NUCLEOSIL 100-5 C18
Kartuschensystem	LiChroCART® 4-4
Säulenofen	Jetstream 2
Säulentemperatur	37°C
Eluent	Methanol-Wasser (50+50 %, v/v)
Flussrate	0,5 ml/min
Druck	80 bar
Injektionsvolumen	10 µl

Detektor	Hitachi L-2450 Diode Array Detektor
Minimum	200 nm
Maximum	350 nm
Auswertung	240 nm
Analysenzeit	20 min
Retentionszeit	6,2 min
Pumpe	Hitachi L-2130 Pump
Autosampler	Hitachi L-2200 Auto-Sampler
Software	EZChrom Elite

Eichgerade:

Zur Herstellung einer Standardlösung wird eine 500mg Xeloda® Tablette in 100 ml Wasser dest. gelöst und je 10 ml dieser Lösung werden in Eprouvetten gefüllt. Diese werden bei 3500 Touren 3 min lang zentrifugiert. Anschließend werden je 1,5 ml in Eppendorfgefäße pipettiert und nochmals bei 13000 Touren 10 min lang zentrifugiert. Danach wird vorsichtig jeweils 1 ml des Überstandes in ein neues Eppendorfgefäß hineinpipettiert. Die Standardlösung besitzt eine Konzentration von 5 mg/ml. Die Konzentrationen für die Eichgerade sind so zu wählen, dass sie sowohl über als auch unter den Konzentrationen in den zu untersuchenden Proben liegen. 2 µl der Standardlösung werden nun mit 1998 µl Precinorm verdünnt (5µg/ml), gut gemischt und anschließend wird 1 ml der Lösung mit 1 ml Precinorm verdünnt. Dieser Vorgang wird sooft wiederholt bis eine Konzentration von 0,078 µg/ml erreicht ist.

Konzentrationen: 5,000 µg/ml CCB

2,500 µg/ml CCB (= 1 ml 5,000 mg/ml + 1ml Precinorm)

1,250 µg/ml CCB (= 1 ml 2,500 mg/ml + 1ml Precinorm)

0,625 µg/ml CCB (= 1 ml 1,250 mg/ml + 1ml Precinorm)

0,312 µg/ml CCB (= 1 ml 0,625 mg/ml + 1ml Precinorm)

0,156 µg/ml CCB (= 1 ml 0,312 mg/ml + 1ml Precinorm)

0,078 µg/ml CCB (= 1 ml 0,156 mg/ml + 1ml Precinorm)

Die Proben werden nun nach dem gleichen Schema wie die Patientenproben der Festphasenextraktion unterzogen und anschließend chromatographiert. Die graphische Darstellung zeigt den linearen Zusammenhang zwischen Konzentration und Peakfläche, es entsteht eine Gerade die der Gleichung $y = k * x + d$ entspricht. Die Variable y steht für die Peakfläche, k ist die Steigung ($k = \text{slope} = 243,1$), x entspricht der Konzentration und d gibt den Ordinatenabschnitt der Geraden wieder, wobei d Null entspricht wenn die Gerade durch den Nullpunkt verläuft. Mit Hilfe der Eichgerade kann die Konzentration von Capecitabin in den Patientenproben mit der Formel: $x = y / k$ errechnet werden.

Tab. 9: Peakflächen und Konzentrationen der Verdünnungsreihe der Capecitabin Standard-Lösung

conc [$\mu\text{g/ml}$]	0,039	0,078	0,156	0,312	0,612	1,250	2,500	5,000
CCB-area	12,3	23,3	49,8	113,2	220,9	433,8	855,5	1739

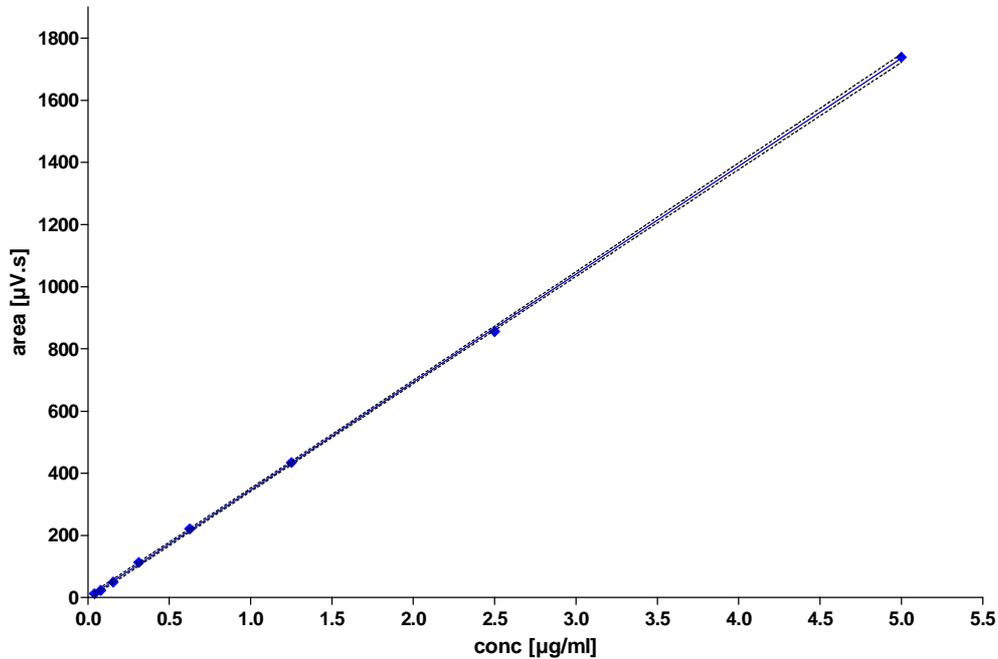


Abb. 11: Eichgerade CCB mit 95 % Konfidenzintervall

Tab.10: Statistische Parameter der Eichgerade für CCB

Best-fit values	
Slope	347.2 ± 1.341
Y-intercept when X=0.0	-1.246 ± 2.737
X-intercept when Y=0.0	0,003588
1/slope	0,002880
95% Confidence Intervals	
Slope	343.9 to 350.4
Y-intercept when X=0.0	-7.943 to 5.452
X-intercept when Y=0.0	-0.01580 to 0.02275
Goodness of Fit	
r^2	0,9999
$Sy.x$	6,135
Is slope significantly non-zero?	
F	67030
DFn, DFd	1.000, 6.000
P value	< 0.0001
Deviation from zero?	Significant
Data	
Number of X values	8
Maximum number of Y replicates	1
Total number of values	8
Number of missing values	0

3.4. Quantifizierung von DFCR und DFUR

Festphasenextraktion:

Tab. 11: Geräte und Material

Vortex	Heidolph Polymax 2040
Kartusche	SPE cartridges Oasis, HLB 1 ml 30 mg Füllung, 1 ml Volumen
Vakuum-Fetsphasen-Extraktionseinheit	Analytichem International, USA
Lösungsmittel	Aqua bidest, Methanol, Aqua bidest-Methanol (95 + 5 %, v/v)
Zentrifuge	Labofuge 400 (SN 5100 2175, Heraeus)
Vials	Chromacol Braunglas 1,5 ml mit Teflonseptum

Praktische Durchführung:

- kurzes Mischen der Proben am Vortex
- Aufstecken der Kartuschen auf die Vakuumwanne
- Anlegen eines Vakuums von –100 mbar
- Aktivierung der Silikapackung mittels 1 ml Methanol
- Konditionierung mit 1 ml Aqua bidest.
- Auftragen von 0,8 ml Probenlösung
- Elution der Metabolite DFCR und DFUR mit 0,8 ml Wasser-Methanol (95 +5%, v/v) wobei das Eluat nach 1 min Zentrifugieren bei 1000 U in einer Epruvette gesammelt wird
- Abfüllen der Probelösung in Vials

Eluentenherstellung:

Zuerst wird eine 5 mmol Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat-Lösung hergestellt und mit Hilfe von verdünnter Phosphorsäure auf einen pH-Wert von 8,0 eingestellt. Zur Herstellung des Eluenten A wird das gepufferte Wasser mit Methanol im Verhältnis 90 + 10% v/v gemischt, für den Eluenten B mischt man Methanol mit dem gepuffertem Wasser im Verhältnis 90 + 10% v/v. Die Eluenten werden 45 min am Ultraschallbad entgast.

HPLC für DFCR und DFUR

Tab.12 : Analytische Parameter des HPLC-Systems für DFCR und DFUR

EZChrom Elite HPLC-System	
Vorsäule	LiChrospher® 100 RP-18 (5µm)
Trennsäule	CC 250/4 NUCLEOSIL 100-5 C18
Kartuschensystem	LiChroCART® 4-4
Säulenofen	Jetstream 2
Säulentemperatur	37°C
Eluent A	Wasser-Methanol (9+1 %, v/v)
Eluent B	Methanol-Wasser (9+1 %, v/v)
Flussrate	0,5 ml/min
Gradient	
0 min	Eluent A: 100%, Eluent B: 0%

5 min	Eluent A: 95%, Eluent B: 5%
10 min	Eluent A: 90%, Eluent B: 10%
20 min	Eluent A: 80%, Eluent B: 20%
30 min	Eluent A: 50%, Eluent B: 50%
35 min	Eluent A: 60%, Eluent B: 40%
40 min	Eluent A: 100%, Eluent B: 0%
60 min	Eluent A: 100%, Eluent B: 0%
Druck	80 bar
Injektionsvolumen	30 µl
Detektor	Hitachi L-2450 Diode Array Detektor
Minimum	200 nm
Maximum	400 nm
Auswertung	275 nm
Retentionszeiten	DFUR: 6,25 min , DFCR: 11,90 min
Analysenzeit	60min
Pumpe	Hitachi L-2130 Pump
Autosampler	Hitachi L-2200 Auto-Sampler
Software	EZChrom Elite

Eichgerade:

Für die Standardlösung werden je 1,6 mg der Metaboliten DFCR und DFUR abgewogen und in 1,6 ml Methanol gelöst, das entspricht einer Konzentration von 1 mg/ml. Um eine Konzentration von 10 µg/ml zu erreichen werden 20 µl der DFUR-Standardlösung mit 20 µl der DFCR-Standardlösung und 1960 µl Precinorm verdünnt und gut gemischt. Zur Herstellung weiterer Verdünnungen werden die erhaltenen Lösungen wieder mit Precinorm verdünnt, bis eine Konzentration von 0,078 µg/ml erreicht ist.

Konzentrationen: 10,000 µg/ml DFCR + DFUR

5,000 µg/ml DFCR + DFUR (= 1 ml 10,000 mg/ml + 1 ml Precinorm)

2,500 µg/ml DFCR + DFUR (= 1 ml 5,000 mg/ml + 1 ml Precinorm)

1,250 µg/ml DFCR + DFUR (= 1 ml 2,500 mg/ml + 1 ml Precinorm)

0,625 µg/ml DFCR + DFUR (= 1 ml 1,250 mg/ml + 1 ml Precinorm)

0,312 µg/ml DFCR + DFUR (= 1 ml 0,625 mg/ml + 1 ml Precinorm)

0,156 µg/ml DFCR + DFUR (= 1 ml 0,312 mg/ml + 1 ml Precinorm)

0,078 µg/ml DFCR + DFUR (= 1 ml 0,156 mg/ml + 1 ml Precinorm)

Die erhaltenen Konzentrationen werden wie oben beschrieben der Festphasenextraktion unterzogen und nach genannten Bedingungen chromatographiert. Peakfläche und Konzentration verhalten sich direkt proportional und nach graphischer Darstellung kann eine Gerade mit der Gleichung $y = k \cdot x + d$ ermittelt werden. Y steht für die Peakfläche, k ist die Steigung, x entspricht der Konzentration und d gibt den Ordinaten-Abschnitt der Geraden wieder, wobei d Null ist wenn die Gerade durch den Nullpunkt verläuft. Die Steigung der Geraden für DFUR entspricht 154,2, für DFCR 133,2. Die Konzentrationen der Metabolite in den Patientenproben können nun mit der Umformung der Gleichung zu $x = y / k$ errechnet werden.

Tab. 13: Peakflächen und Konzentrationen der Verdünnungsreihen der DFUR bzw. der DFCR Standard-Lösungen

conc [$\mu\text{g/ml}$]	0,000	0,078	0,156	0,312	0,612	1,250	2,500	5,000	10,000
DFUR-area	0,000	LOQ	39,800	54,300	89,400	201,800	387,500	761,900	1551,600
DFCR-area	0,000	11,000	17,700	28,600	44,500	116,600	270,500	631,600	1328,400

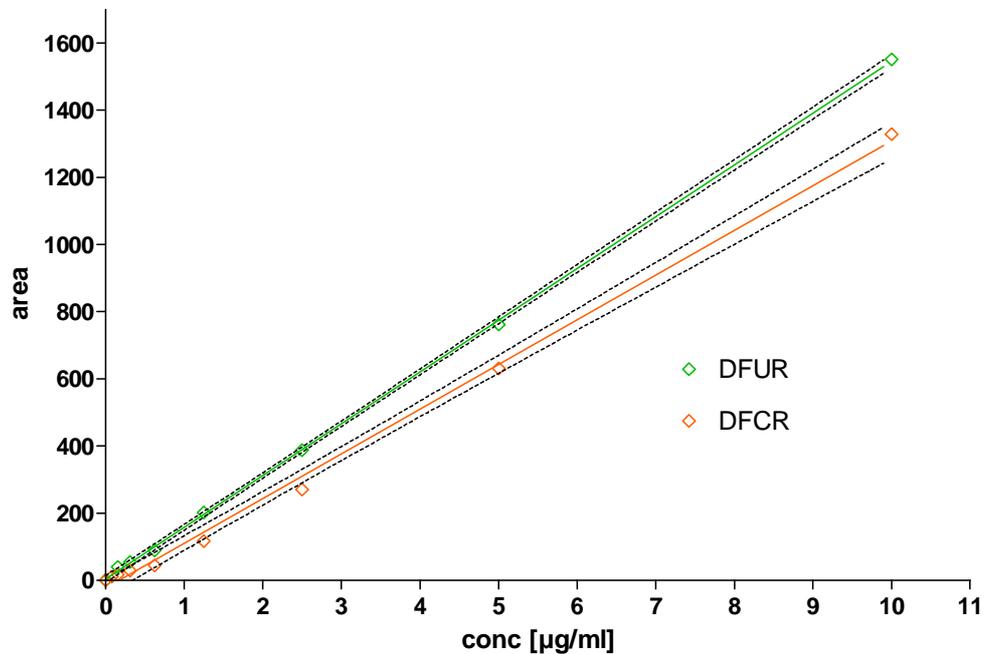


Abb. 12: Eichgerade DFUR und DFCR mit 95 % Konfidenzintervall

Tab. 14: Statistische Parameter der Eichgeraden für DFCR und DFUR

	DFUR	DFCR
Best-fit values		
Slope	154.2 ± 1.003	133.2 ± 2.720
Y-intercept when X=0.0	3.282 ± 4.095	-22.67 ± 10.47
X-intercept when Y=0.0	-0,02128	0,1702
1/slope	0,006485	0,007509
95% Confidence Intervals		
Slope	151.8 to 156.7	126.7 to 139.6
Y-intercept when X=0.0	-6.740 to 13.30	-47.43 to 2.091
X-intercept when Y=0.0	-0.08712 to 0.04329	-0.01615 to 0.3470
Goodness of Fit		
r^2	0,9997	0,9971
$S_{y.x}$	9,2	25,7
Is slope significantly non-zero?		
F	23630	2397
DFn, DFd	1.000, 6.000	1.000, 7.000
P value	< 0.0001	< 0.0001
Deviation from zero?	Significant	Significant
Data		
Number of X values	8	9
Maximum number of Y replicates	1	1
Total number of values	8	9
Number of missing values	1	0
Number of missing values	0	0

3.5. Quantifizierung von Erlotinib

Festphasenextraktion:

Tab. 15: Geräte und Material

Vortex	Heidolph Polymax 2040
Kartusche	SPE cartridges Oasis, HLB 1 ml 30 mg Füllung, 1 ml Volumen
Vakuum-Festphasen-Extraktionseinheit	Analytichem International, USA
Lösungsmittel	Methanol, Na ₂ HPO ₄ -Lösung (10 mmol), Na ₂ HPO ₄ -Lösung-Methanol (9 + 1%, v/v)
Zentrifuge	Labofuge 400 (SN 5100 2175, Heraeus)
Vials	Chromacol Braunglas 1,5 ml mit Teflonseptum

Praktische Durchführung:

- kurzes Mischen der Proben am Vortex
- Aufstecken der Kartuschen auf die Vakuumwanne
- Anlegen eines Vakuums von –100 mbar
- Aktivierung der Silikapackung mittels 1 ml Methanol
- Konditionierung mit 1 ml Na₂HPO₄-Lösung (10 mmol)
- Auftragen von 1,0 ml Probenlösung
- Waschen mit 1,0 ml Na₂HPO₄-Lösung (10 mmol)
- Elution von Erlotinib und OSI420 mit 1,0 ml Na₂HPO₄-Lösung-Methanol (9 + 1%, v/v), wobei das Eluat nach 1 min Zentrifugieren bei 1000 U in einer Epruvette gesammelt wird
- Abfüllen der Probelösung in Vials

Eluentenherstellung:

Acetonitril wird mit Wasser dest. im Verhältnis 55:45 % v/v gemischt und anschließend 45 min am Ultraschallbad entgast.

HPLC für Erlotinib

Tab. 16: Analytische Parameter des HPLC-Systems für Erlotinib

EZChrom Elite HPLC-System	
Vorsäule	LiChrospher® 100 RP-18 (5µm)
Trennsäule	CC 250/4 NUCLEOSIL 100-5 C18
Kartuschensystem	LiChroCART® 4-4
Säulenofen	Jetstream 2
Säulentemperatur	37°C
Eluent	Acetonitril-Wasser (55:45 %, v/v)
Flussrate	0,6 ml/min
Druck	120 bar
Injektionsvolumen	30 µl
Detektor	Hitachi L-2450 Diode Array Detektor
Minimum	250
Maximum	450

Auswertung	348
Retentionszeit	OSI420: , Erlotinib:
Analysenzeit	22 min
Pumpe	Hitachi L-2130 Pump
Autosampler	Hitachi L-2200 Auto-Sampler
Software	EZChrom Elite

Eichgerade:

Zuerst wird eine Standardlösung von Erlotinib und seinem Metaboliten OSI 420 hergestellt indem 4,12 mg Erlotinib bzw. 1,35 mg OSI 420 in 8,24 bzw. 2,7 ml Wasser-Methanol (1 + 1%, v/v) gelöst werden. Die Lösungen entsprechen einer Konzentration von 0,5 mg/ml. Um eine Konzentration von 10 µg/ml zu erreichen werden 40 µl der Erlotinib-Lösung bzw. der OSI 420-Lösung mit 1960 µl Plasma verdünnt und anschließend gut mischt. Dann werden 1 ml der Erlotinib-Lösung und 1 ml der OSI 420-Lösung in einer Eprovette vereint und gut gemischt. Dadurch erhält man eine 5,0 µg/ml Konzentration beider Substanzen. Für weitere Verdünnungen werden die erhaltenen Lösungen wieder mit Plasma verdünnt, bis eine Konzentration von 0,02 µg/ml erreicht ist.

Konzentrationen: 10,000 µg/ml Erlotinib bzw. OSI 420

5,000 µg/ml Erlotinib und OSI 420 (= 1 ml 10,000 µg/ml + 1 ml Plasma)

2,500 µg/ml Erlotinib und OSI 420 (= 1 ml 5,000 µg/ml + 1 ml Plasma)

1,250 µg/ml Erlotinib und OSI 420 (= 1 ml 2,500 µg/ml + 1 ml Plasma)

0,625 µg/ml Erlotinib und OSI 420 (= 1 ml 1,250 µg/ml + 1 ml Plasma)

0,312 µg/ml Erlotinib und OSI 420 (= 1 ml 0,625 µg/ml + 1 ml Plasma)

0,156 µg/ml Erlotinib und OSI 420 (= 1 ml 0,312 µg/ml + 1 ml Plasma)

0,078 µg/ml Erlotinib und OSI 420 (= 1 ml 0,156 µg/ml + 1 ml Plasma)

0,039 µg/ml Erlotinib und OSI 420 (= 1 ml 0,078 µg/ml + 1 ml Plasma)

0,020 µg/ml Erlotinib und OSI 420 (= 1 ml 0,039 µg/ml + 1 ml Plasma)

Die erhaltenen Konzentrationen werden wie oben beschrieben der Festphasenextraktion unterzogen und anschließend chromatographiert. Aufgrund des linearen Zusammenhangs zwischen Peakfläche und Konzentration lässt sich eine Gerade mit der Gleichung $y = k \cdot x + d$ bestimmen. Y steht für die Peakfläche, k ist die Steigung, x entspricht der Konzentration und d gibt den Ordinaten-Abschnitt der Geraden wieder, wobei d Null ist wenn die Gerade durch den Nullpunkt verläuft. Die Steigung der Gerade für Erlotinib beträgt 309,8, die der OSI 420-Gerade 391,7. Nach Umformung der oben genannten Gleichung ergibt sich $x = y / k$ zur Ermittlung der Konzentrationen in den Patientenproben.

Tab. 17: Konzentrationen und Peakflächen der Verdünnungsreihen der Erlotinib- bzw. OSI420- Standardlösungen

conc [$\mu\text{g/ml}$]	0,000	0,039	0,078	0,156	0,312	0,612	1,250	2,500	5,000
Erlotinib-area	0,000	LOQ	13,900	35,100	75,200	160,200	346,100	728,200	1546,800
OSI 420-area	0,000	14,700	25,620	53,020	109,500	222,700	480,200	952,600	1959,800

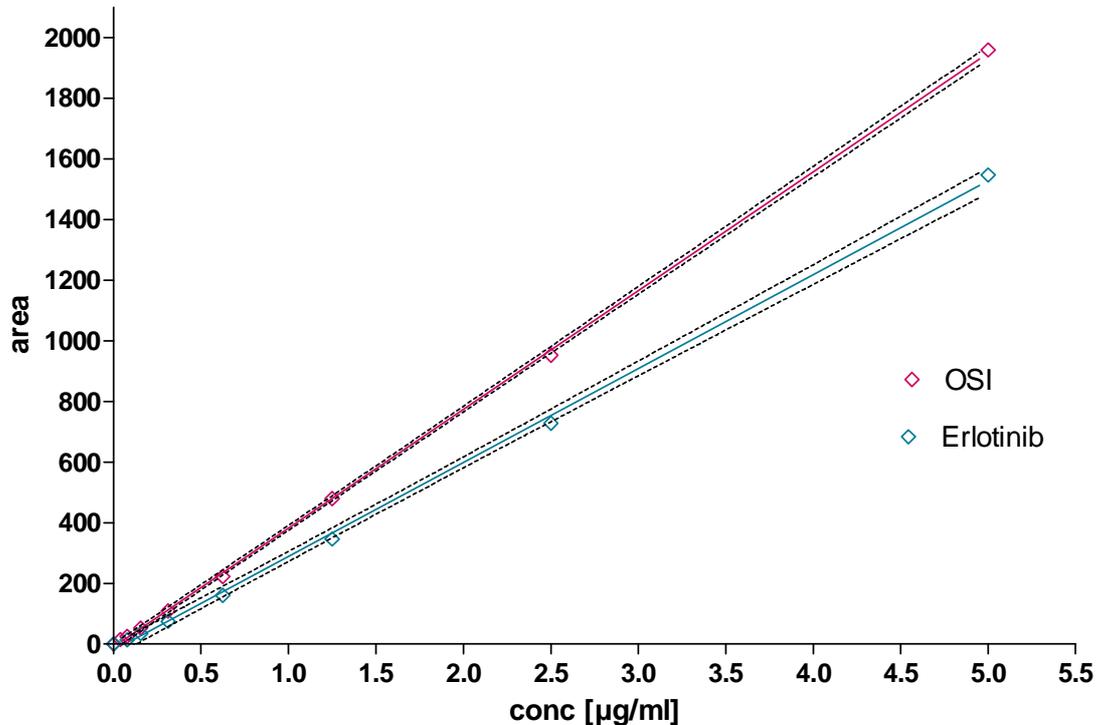


Abb. 13: Eichgerade Erlotinib und OSI 420 mit 95 % Konfidenzintervall

Tab. 18: Statistische Parameter der Eichgeraden für Erlotinib und OSI 420

	OSI	Erlotinib
Best-fit values		
Slope	391.7 ± 2.224	309.8 ± 4.148
Y-intercept when X=0.0	-9.279 ± 4.280	-20.99 ± 8.467
X-intercept when Y=0.0	0,02369	0,06775
1/slope	0,002553	0,003228
95% Confidence Intervals		
Slope	386.5 to 397.0	299.6 to 319.9
Y-intercept when X=0.0	-19.40 to 0.8427	-41.71 to -0.2695
X-intercept when Y=0.0	-0.002168 to 0.04915	0.0008877 to 0.1321
Goodness of Fit		
r^2	0,9998	0,9989
$S_{y,x}$	10,5	19,02
Is slope significantly non-zero?		
F	31030	5578
DFn, DFd	1.000, 7.000	1.000, 6.000
P value	< 0.0001	< 0.0001
Deviation from zero?	Significant	Significant
Data		
Number of X values	9	8
Maximum number of Y replicates	1	1
Total number of values	9	8
Number of missing values	0	1

3.6. Messung des oxidativen Stresses

FORT (Free Oxygen Radicals Test)

Die Quantifizierung des oxidativen Stresses erfolgt mithilfe einer kolorimetrischen Reaktion. Die Entstehung der freien Radikale aus Hydroperoxiden wird durch Übergangsmetalle wie zum Beispiel dem Eisen induziert. Die dabei gebildeten Hydroxylradikale werden nun von einem Chromogen, einem Chromamin (CrNH_2), abgefangen. Dabei entsteht ein gefärbtes Aminradikal das bei 505 nm photometrisch bestimmt werden kann, wobei sich die Intensität der Farbe direkt proportional zur Menge der Radikalverbindungen verhält. [23]

Tab. 19: Geräte und Material

Vortex	Heidolph Polymax 2040
R1	Lyophilisiertes Chromogen
R2	Puffer pH 5,0 + Konservierungsmittel + Stabilisator
Zentrifuge	Mini-Zentrifuge Modell 6000
Messgerät	FORMPlus Messgerät

Tab. 20: Technische Beschreibung des FORMPlus Messgeräts [24]

FORMPlus Messgerät	
Messprinzip	Lambert-Beer-Gesetz
Temperatur Lesefach	$37 \pm 0,2^\circ\text{C}$
Lichtquelle	LED, Light Emitting Diode, 505 nm
Optischer Weg	1 cm
Display	Touch Screen, 128x128 Pixel
Testanzahl	5
PC-Software	Easy Store
Interface	USB
Drucker	Thermographisch
Arbeitsbedingungen	$15-34^\circ\text{C}$
Zertifizierung	CE-Zeichen

Praktische Durchführung:

- 20 μl der Probenlösung in die Mikrovette R2 pipettieren
- kurzes Mischen der Mikrovette am Vortex
- Inhalt der Mikrovette in die quadratische Küvette (=R1) überführen
- Küvette solange vorsichtig schwenken bis sich das Reagenzlyophilisat aufgelöst hat
- 1 min zentrifugieren
- Küvette in den Küvettenschacht des Geräts mit dem Barcode-Etikett nach vorne einsetzen.

Auswertung:

Das Ergebnis der Messung wird in FORT Einheiten angegeben, wobei eine FORT Einheit ca. $7,6 \mu\text{mol/l}$ (= $0,26 \text{ mg/l}$) H_2O_2 entspricht. [y]

Die gemessenen Werte der Patientenproben überschreiten meist die Nachweisgrenze des FORMPlus-Testgeräts, die bei 600 FORT liegt. Daher wurden Verdünnungen vom Faktor 1:1

mit bidestilliertem Wasser hergestellt. Die erhaltenen FORT-Messwerte wurden dann mit 2 multipliziert. Da statt Vollblut Plasmaproben zur Analyse herangezogen wurden sind die erhaltenen Werte laut Literatur mit dem Faktor 1,25 zu dividieren. Da Plasma nicht durch die zellulären Bestandteile im Blut verdünnt wird sind auch höhere FORT-Werte im Vergleich zu Vollblutproben zu finden. [26]

Referenzwerte: bis 230 FORT: gut
 230-310 FORT: Grenzbereich
 310-400 FORT: oxidativer Stress
 über 400 FORT: starker oxidativer Stress

3.7. Messung der antioxidativen Kapazität

FORD (Free Oxygen Radicals Defence)

Zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität wird die Abnahme der Farbintensität eines gefärbten Radikals gemessen. Zuerst wird aus einem Chromogen, einem farblosen Aminoderivat, durch Zugabe einer Eisenlösung ein gefärbtes Radikalkation gebildet und bei 505 nm photometrisch vermessen. Anschließend wird die Probenlösung, in der sich oxidationshemmende Substanzen befinden, zugefügt. Diese verursachen eine Abnahme der Radikalmenge und dadurch eine Minderung der Farbintensität, die ebenfalls bei 505 nm bestimmt werden kann. Die Menge der antioxidativen Substanzen verhält sich direkt proportional zur Abnahme der Farbintensität. [25]

Tab. 21: Geräte und Material

Vortex	Heidolph Polymax 2040
C1	Chromogen
S2	Acetatpuffer pH 5,2
S3	Eisenlösung
S1	Hyperosmolarpuffer
Zentrifuge	Mini-Zentrifuge Modell 6000
Messgerät	FORMPlus Messgerät

Praktische Durchführung:

- Inhalt der Mikrovette S2 in die quadratische Küvette C1 überführen
- 50 µl des Reagenz S3 hinzufügen, kurz schwenken
- Küvette in den Küvettenschacht des Geräts mit dem Barcode-Etikett nach vorne einsetzen
- 50 µl der Probenlösung in die Mikrovette S1 pipettieren, kurz schwenken
- 1 min zentrifugieren
- Nach der ersten Messung die Küvette aus dem Gerät herausnehmen
- 100 µl aus der zentrifugierten Mikrovette S1 in die Küvette pipettieren, kurz schwenken
- Küvette in den Küvettenschacht des Geräts mit dem Barcode-Etikett nach vorne einsetzen

Auswertung:

Das Ergebnis der Messung wird in äquivalenten Konzentrationen (mmol/l) von Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-Tetramethylchroman-2-Carboxylsäure) umgewandelt. Trolox ist ein Derivat des Vitamin E das membrandurchgängig ist und oxidationshemmende Eigenschaften besitzt.

Referenzwerte: 1,07-1,53 mmol/l Trolox-Äquivalente

3.8. Biometrische Berechnungen

Zur Auswertung der erhaltenen Rohdaten wurden folgende Programme verwendet:

- Mithilfe von Microsoft Office Excel® 2007 wurden Tabellen erstellt und statistische Berechnungen durchgeführt.
- GraphPad Prism® 4 wurde zur graphischen Darstellung der Werte sowie zu weiteren statistischen Kalkulationen herangezogen.
- WinNonLin® 5.2.1 wurde zur Ermittlung der pharmakokinetischen Parameter verwendet.

Deskriptive statistische Parameter: arithmetisches Mittel, Median, Minimum, Maximum, Standardabweichung, Schiefe, Standarderror, Range, Variationskoeffizient

Zur Erfassung allfälliger signifikanter Unterschiede zwischen zwei Untersuchungsgruppen wurde der t-Test nach Student (homoskedastisch, zweiseitig, ungepaart) herangezogen. Als Qualitätskriterium wurde die Signifikanzgrenze mit $p \leq 0.05$ angesetzt, d.h. bei $p < 0.05$ ist die Wahrscheinlichkeit eines statistisch signifikanten Unterschieds zwischen 2 Gruppen bei $> 95\%$.

Tab. 22: Berechnete pharmakokinetischen Parameter [27]

Parameter	Einheit	Beschreibung
Rsq		Statistische Anpassung an die terminale Eliminationsphase
Rsq_adjusted		Statistische Anpassung an die terminale Eliminationsphase, abgestimmt auf die Anzahl der Punkte, welche in der Lambda z Schätzung verwendet wurden.
Corr_XY		Korrelation zwischen Zeit (X) und log Konzentration (Y) für jene Punkte, welche in der Lambda z Schätzung verwendet wurden.
No_points_lambda_z		Anzahl der Punkte die für die Berechnung von Lambda z verwendet wurden. Wenn Lambda z nicht geschätzt werden kann, wird es gleich Null gesetzt.
Lambda_z	1/min	Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung, die mit dem terminalen Teil der Kurve in Verbindung gebracht werden kann und wird geschätzt durch lineare Regression der Zeit vs. log Konzentration.
Lambda_z_lower	min	Unterer Zeitmesswert der in die Lambda z Kalkulation miteinbezogen wird.
Lambda_z_upper	min	Oberer Zeitmesswert der in die in die Lambda z Kalkulation miteinbezogen wird.
HL_Lambda_z	min	Eliminationshalbwertszeit im Non Compartment Modell= $\ln(2)/\lambda_z$
Tlag	min	Tlag ist die Verzögerungszeit ab der Applikation bis zum ersten messbaren Punkt.
Tmax	min	Zeit zu der die höchste Konzentration gemessen wurde.
Cmax	ug/mL	Maximalkonzentration im Plasma.
Cmax_D	ug/mL/mg	Cmax dosisbereinigt
Tlast	min	Zeit der zuletzt gemessenen Konzentration (nicht Null)
Clast	ug/mL	Zuletzt gemessene Konzentration .
AUClast	min*ug/mL	Fläche unter der Plasma-Konzentrations-Zeit-Kurve von der Dosisgabe bis zur letzten gemessenen Konzentration.
AUCall	min*ug/mL	Fläche unter der Plasma-Konzentrations-Zeit-Kurve von der Dosisgabe bis zum letzten Beobachtungszeitpunkt.
AUCINF_obs	min*ug/mL	Beobachtete Plasma-Konzentrations-Zeit-Kurve von der Dosisgabe, gegen unendlich interpoliert.
AUCINF_D_obs	min*ug/mL/mg	Beobachtete Plasma-Konzentrations-Zeit-Kurve von der Dosisgabe, gegen unendlich interpoliert und dosisbereinigt.

AUC_%Extrap_obs	%	Beobachteter Anteil an Restfläche ($AUC_{INF-LAST}$) in Bezug auf die infinitesimale Gesamtfläche unter der Kurve in Prozent.
Vz_F_obs	mL	Beobachtetes Verteilungsvolumen in Bezug auf die terminale Eliminationsphase.
Cl_F_obs	mL/min	Beobachtete Gesamtkörperclearance bezogen auf die extravasculäre Verabreichung.
AUCINF_pred	min*ug/mL	Vorhergesagte Plasma-Konzentrations-Zeit-Kurve von der Dosisgabe, gegen unendlich interpoliert.
AUCINF_D_pred	min*ug/mL/mg	Vorhergesagte Plasma-Konzentrations-Zeit-Kurve von der Dosisgabe, gegen unendlich interpoliert und dosisbereinigt.
AUC_%Extrap_pred	%	Vorhergesagter Anteil an Restfläche ($AUC_{INF-LAST}$) in Bezug auf die infinitesimale Gesamtfläche unter der Kurve in Prozent.
Vz_F_pred	mL	Vorhergesagtes Verteilungsvolumen in Bezug auf die terminale Eliminationsphase.
Cl_F_pred	mL/min	Vorhergesagtes Gesamtkörperclearance für extravasculäre Verabreichung.
AUMClast	min*min*ug/mL	Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Quadrat-Kurve bis zum letzten messbaren Punkt.
AUMCINF_obs	min*min*ug/mL	Beobachtete Plasma-Konzentrations-Zeit-Quadrat-Kurve von der Dosisgabe, gegen unendlich interpoliert.
AUMC_%Extrap_obs	%	Beobachteter Anteil an Restfläche ($AUMC_{INF-LAST}$) in Bezug auf die infinitesimale Gesamtfläche unter der Kurve in Prozent.
AUMCINF_pred	min*min*ug/mL	Vorhergesagte Plasma-Konzentrations-Zeit-Quadrat-Kurve von der Dosisgabe, gegen unendlich interpoliert.
AUMC_%Extrap_pred	%	Vorhergesagter Anteil an Restfläche ($AUMC_{INF-LAST}$) in Bezug auf die infinitesimale Gesamtfläche unter der Kurve in Prozent.
MRTlast	min	Zeit zu der 63,2 % der Dosis eliminiert wurden.
MRTINF_obs	min	Beobachtete Zeit zu der 63,2 % der Dosis eliminiert wurden, gegen unendlich interpoliert.
MRTINF_pred	min	Vorhergesagte Zeit zu der 63,2 % der Dosis eliminiert wurden, gegen unendlich interpoliert.

Die pharmakokinetische Auswertung der Metabolite von Capecitabin und Erlotinib wurde ebenfalls kompartmentunabhängig durchgeführt, wobei auf Grund der fehlenden Dosis nur folgende pharmakokinetische Parameter ermittelt werden konnten:

Tab. 23: Berechnete pharmakokinetische Parameter der Metaboliten [27]

Tmax	min	Zeit zu der die höchste Konzentration gemessen wurde.
Cmax	ug/mL	Maximalkonzentration im Plasma.
AUClast	min*ug/mL	Fläche unter der Plasma-Konzentrations-Zeit-Kurve von der Dosisgabe bis zur letzten gemessenen Konzentration.
HL_Lambda_z	min	Eliminationshalbwertszeit im Non Compartment Modell= $\ln(2)/\lambda_z$
MRTlast	min	Zeit zu der 63,2 % der Dosis eliminiert wurden.

Zusätzlich zu den o.a. Parametern wurde bei den Metaboliten eine scheinbare Enzymaktivität abgeschätzt (= apparent formation rate), die wie folgt berechnet wurde:

$$K_{app(hCE)} = \frac{AUC_{CCB}}{AUC_{DFCR}}$$

$$K_{app(CD)} = \frac{AUC_{DFCR}}{AUC_{DFUR}}$$

$K_{app(hCE)}$ beschreibt die scheinbare Enzymaktivität der humanen Carboxylesterase und die $K_{app(CD)}$ die der Cytidindesaminase.

$$K_{app(CYP3A4)} = \frac{AUC_{Erlotinib}}{AUC_{OSI}}$$

$K_{app(CYP3A4)}$ stellt die scheinbare Enzymaktivität des Cytochroms CYP3A4 dar.

4. ERGEBNISSE

4.1. Patientencharakteristik

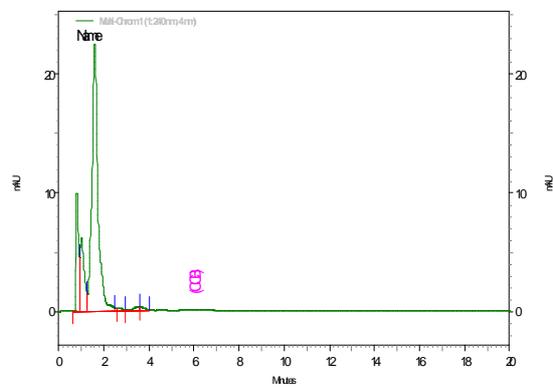
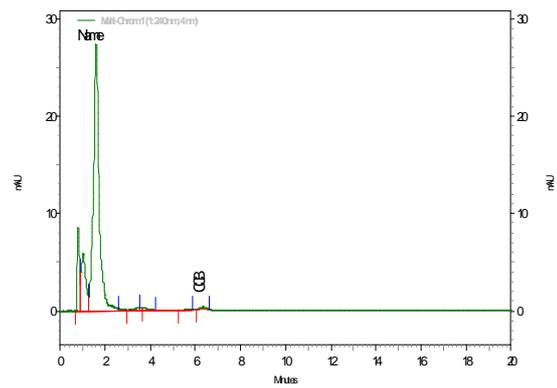
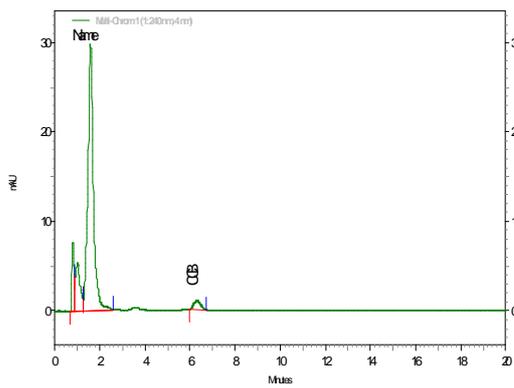
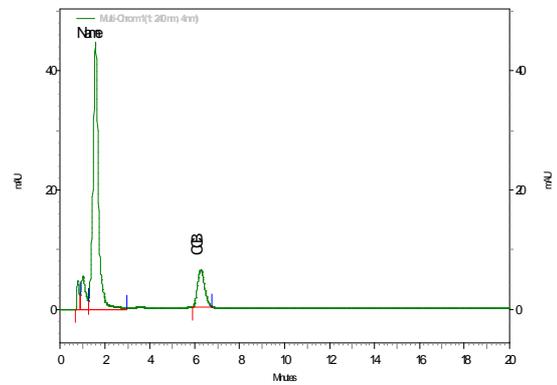
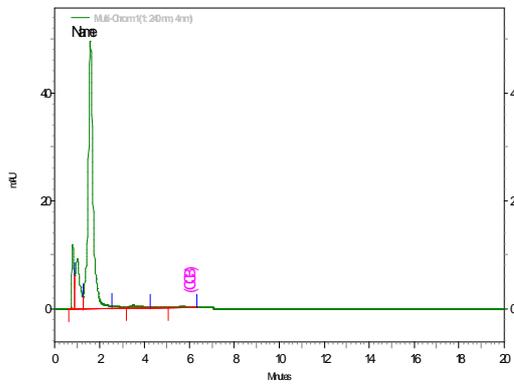
Tab. 24: Patientencharakteristik

	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4
Alter	50	48	67	47
Geschlecht	Weiblich	Weiblich	Weiblich	Weiblich
Ethnische Herkunft	Kaukasier	Kaukasier	Kaukasier	Kaukasier
Gewicht [kg]	67	70	81	58
Größe [cm]	166	175	167	164
Diagnose	Fortgeschrittenes Pankreaskarzinom	Fortgeschrittenes Pankreaskarzinom	Fortgeschrittenes Pankreaskarzinom	Fortgeschrittenes Pankreaskarzinom
Dosis Capecitabin [mg]	800	950	1000	800
Dosis Erlotinib [mg/day]	100	100	100	100
Dosis Bevacizumab [mg/kg]	5	5	5	5

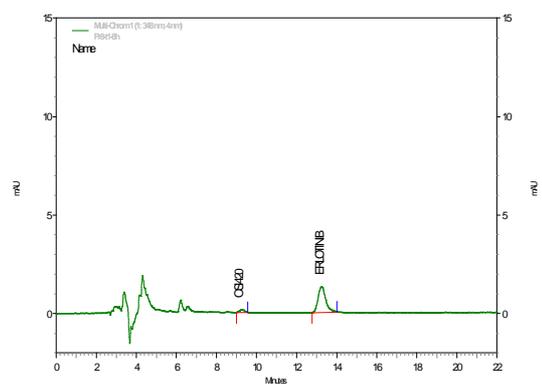
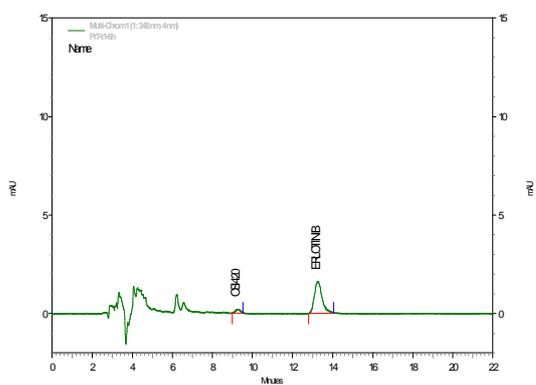
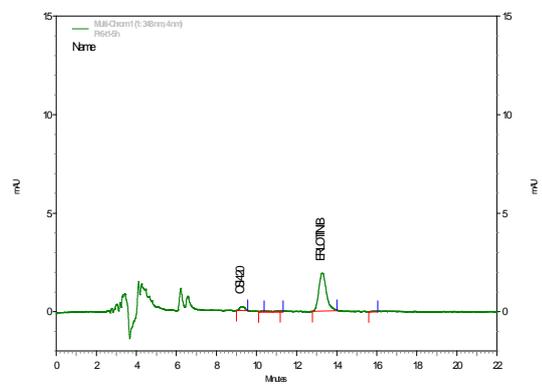
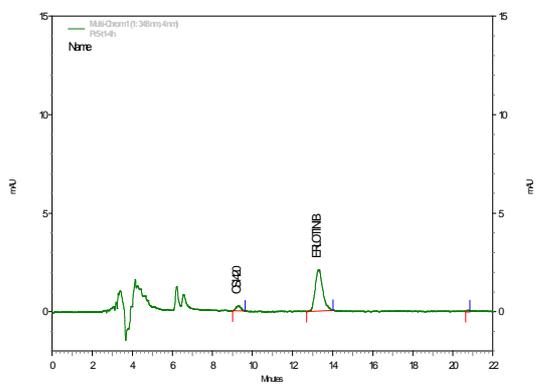
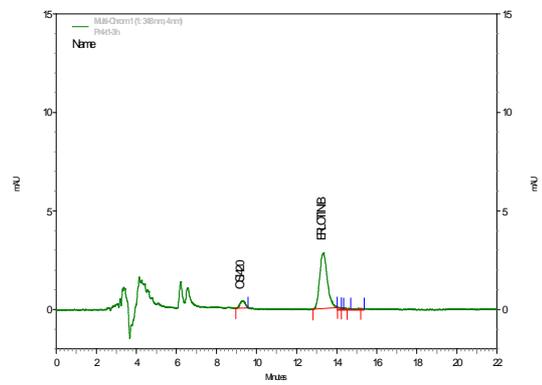
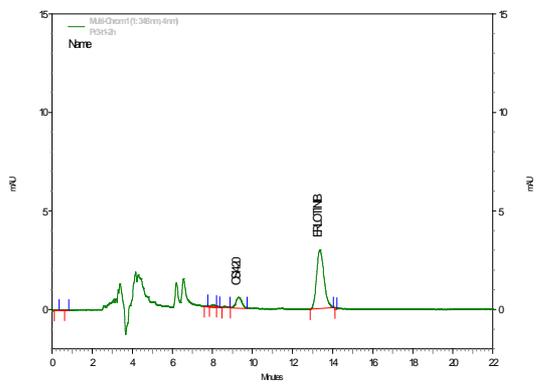
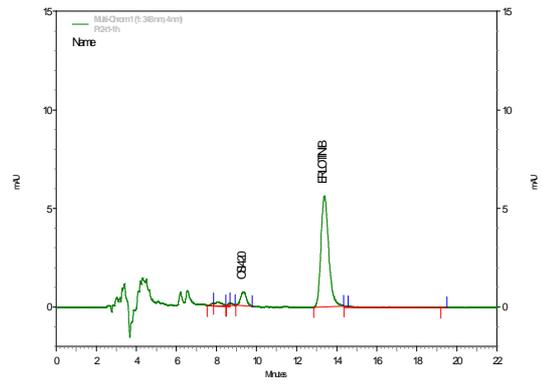
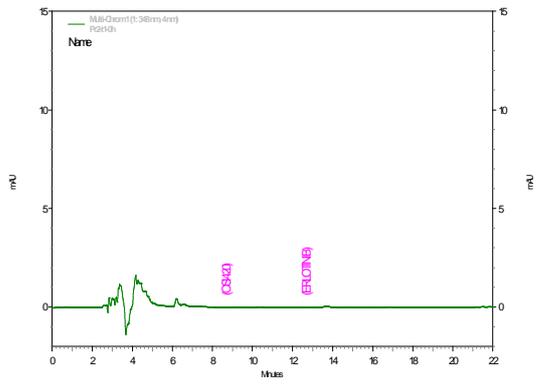
Die zu analysierenden Plasmaproben wurden im Kaiser-Franz-Joseph-Spital entnommen und anschließend am Institut für klinische Pharmazie und chemische Diagnostik der Universität Wien ausgewertet.

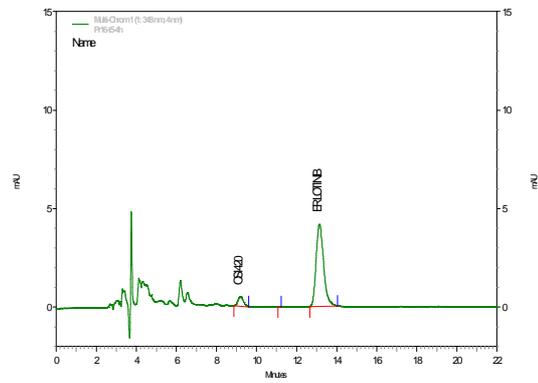
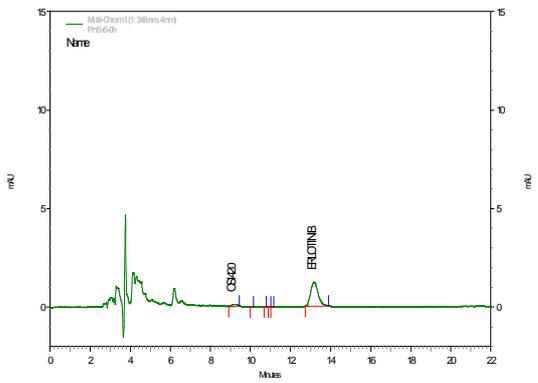
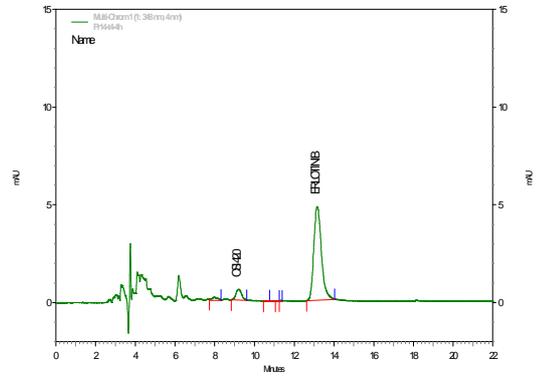
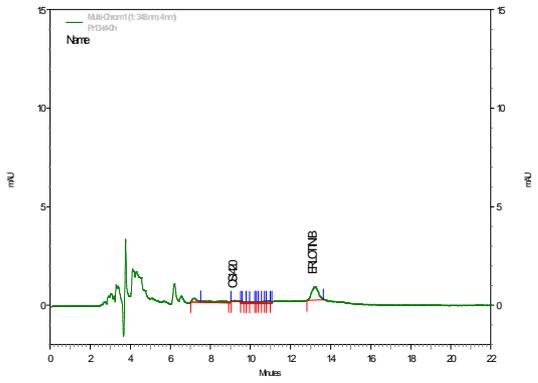
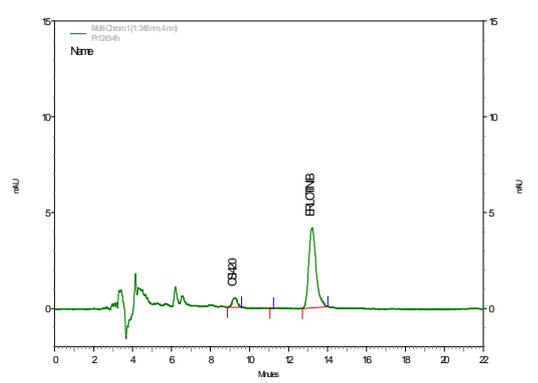
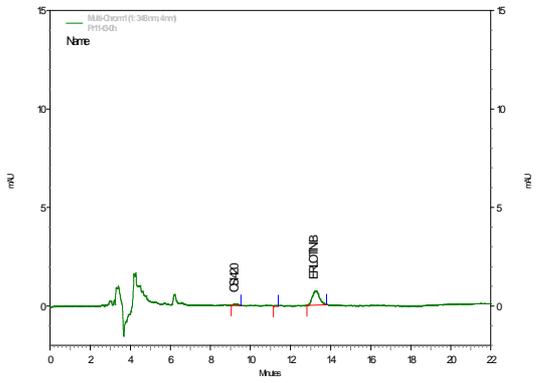
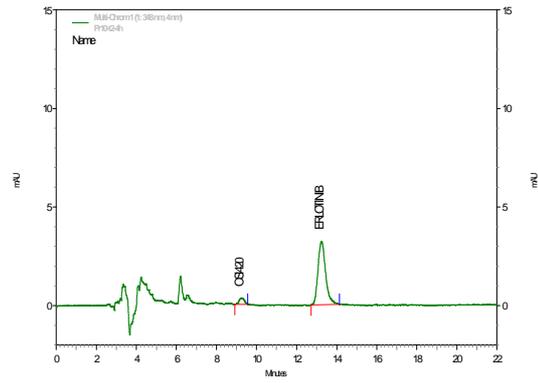
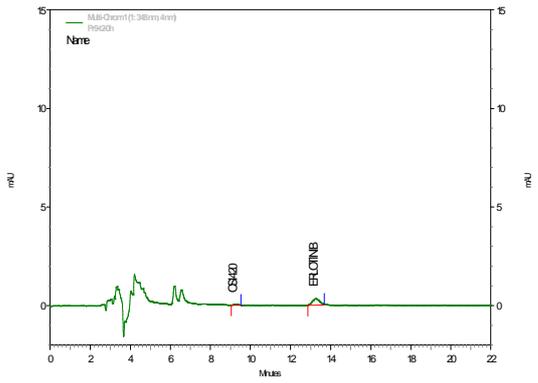
4.2. Chromatogramm im Verlauf der Therapie

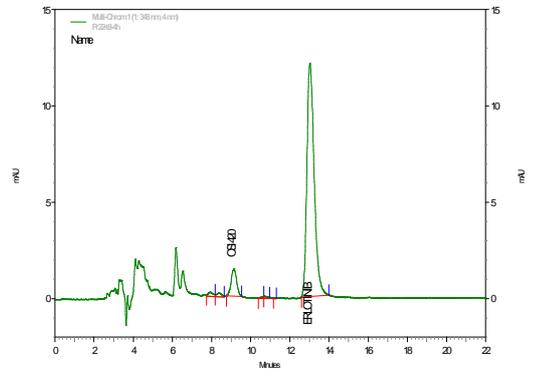
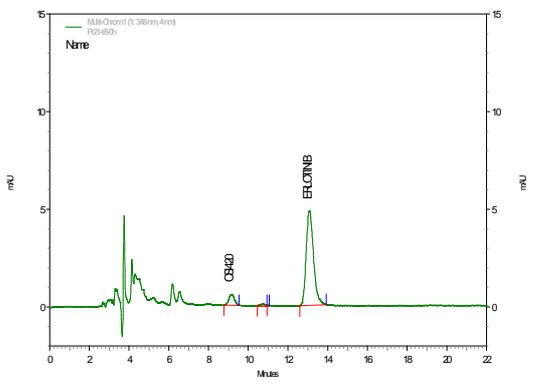
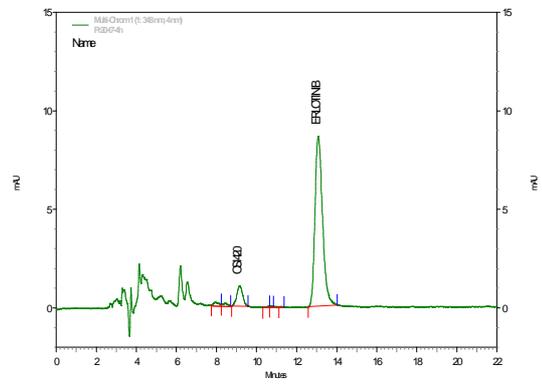
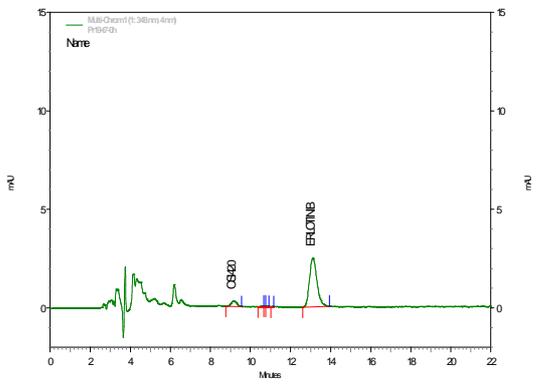
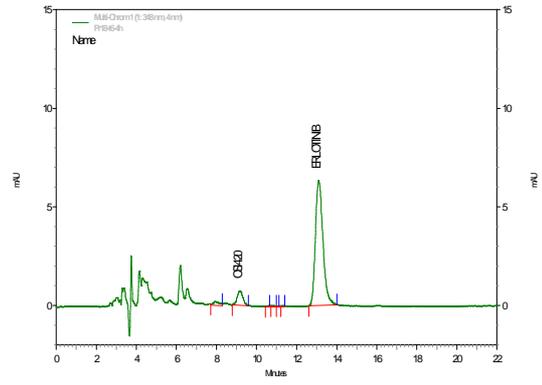
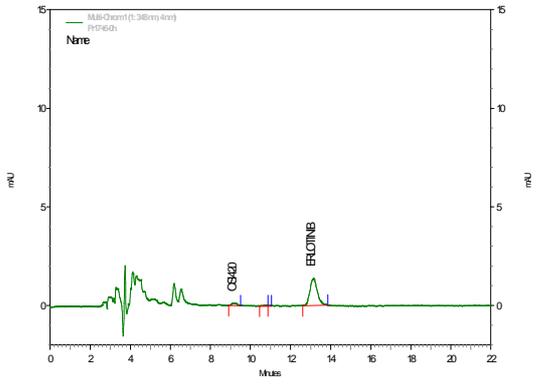
Capecitabin Chromatogramm im Verlauf der Therapie



Erlotinib Chromatogramm im Verlauf der Therapie







4.3. Plasmakonzentrationszeitkurven

4.3.1. Capecitabin

Tab. 25: Patient 1: Konzentrationen von Capecitabin und seiner Metaboliten

time [min]	CCB [$\mu\text{g/ml}$]	DFCR [$\mu\text{g/ml}$]	DFUR [$\mu\text{g/ml}$]	Summe [$\mu\text{g/ml}$]
0	0,00	0,00	0,00	0,00
30	1,60	6,20	9,72	17,52
60	0,23	2,60	4,35	7,18
90	0,05	1,26	1,90	3,21
120	0,00	0,51	1,53	2,04
150	0,00	0,27	0,94	1,21
180	0,00	0,14	0,00	0,14
240	0,00	0,00	0,00	0,00
300	0,00	0,00	0,00	0,00
360	0,00	0,00	0,00	0,00

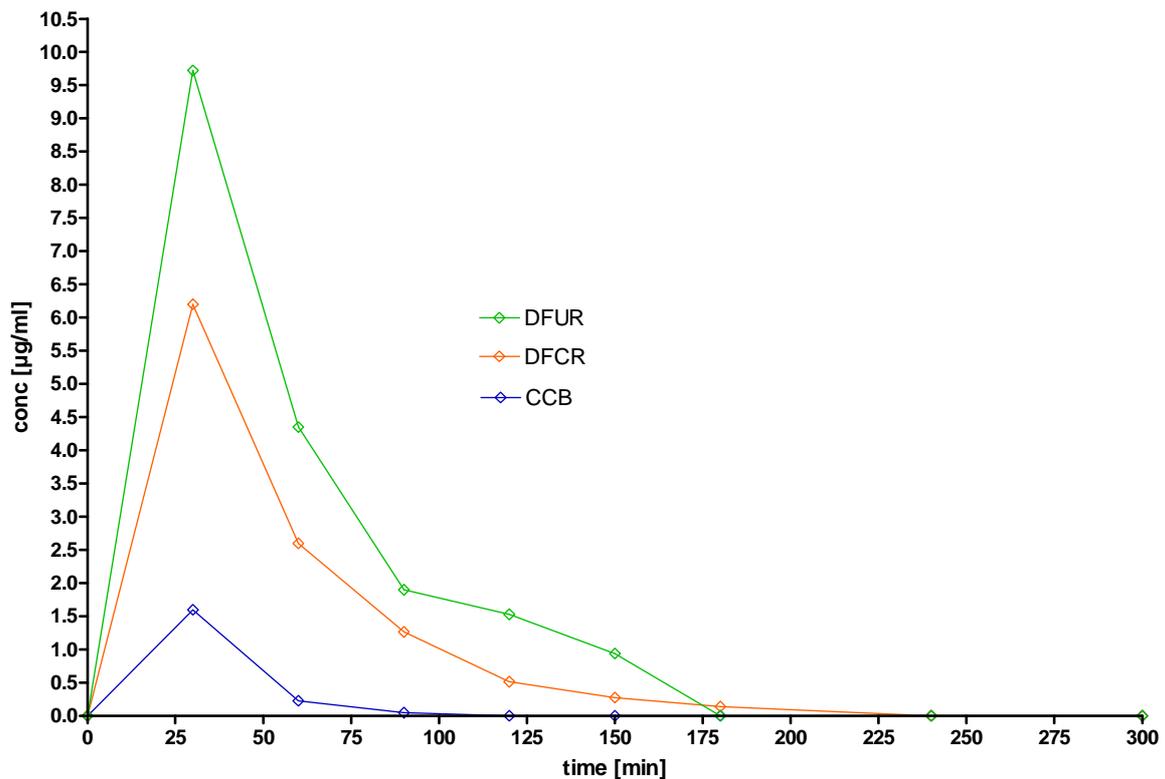


Abb. 14: Patient 1: Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve von Capecitabin und seiner Metabolite

Tab. 26: Patient 2: Konzentrationen von Capecitabin und seiner Metaboliten

time [min]	CCB [$\mu\text{g/ml}$]	DFCR [$\mu\text{g/ml}$]	DFUR [$\mu\text{g/ml}$]	Summe [$\mu\text{g/ml}$]
0	0,00	0,00	0,00	0,00
30	1,72	7,20	9,33	18,24
60	0,21	3,76	4,59	8,55
90	0,03	1,70	1,64	3,37
120	0,00	1,19	0,96	2,15
150	0,00	0,48	0,48	0,96
180	0,00	0,41	0,32	0,73
240	0,00	0,19	0,00	0,19
300	0,00	0,13	0,00	0,13
360	0,00	0,00	0,00	0,00

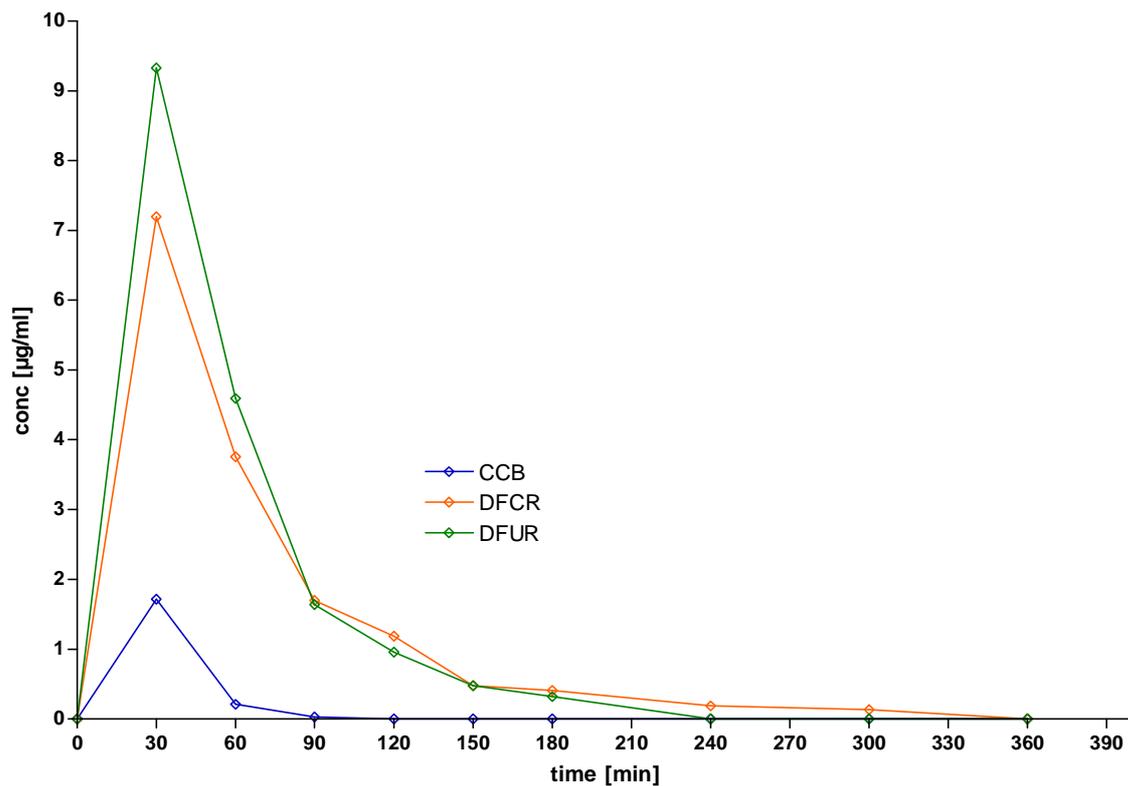


Abb. 15: Patient 2: Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve von Capecitabin und seiner Metabolite

Tab. 27: Patient 3: Konzentrationen von Capecitabin und seiner Metaboliten

time [min]	CCB [$\mu\text{g/ml}$]	DFCR [$\mu\text{g/ml}$]	DFUR [$\mu\text{g/ml}$]	Summe [$\mu\text{g/ml}$]
0	0,00	0,00	LOQ	0,00
30	3,46	3,79	LOQ	7,25
60	1,93	3,88	LOQ	5,81
90	0,77	4,07	LOQ	4,84
120	0,39	2,69	LOQ	3,08
150	0,15		LOQ	0,15
180	0,02		LOQ	0,02
240	0,00		LOQ	0,00
300	0,00		LOQ	0,00
360	0,00		LOQ	0,00

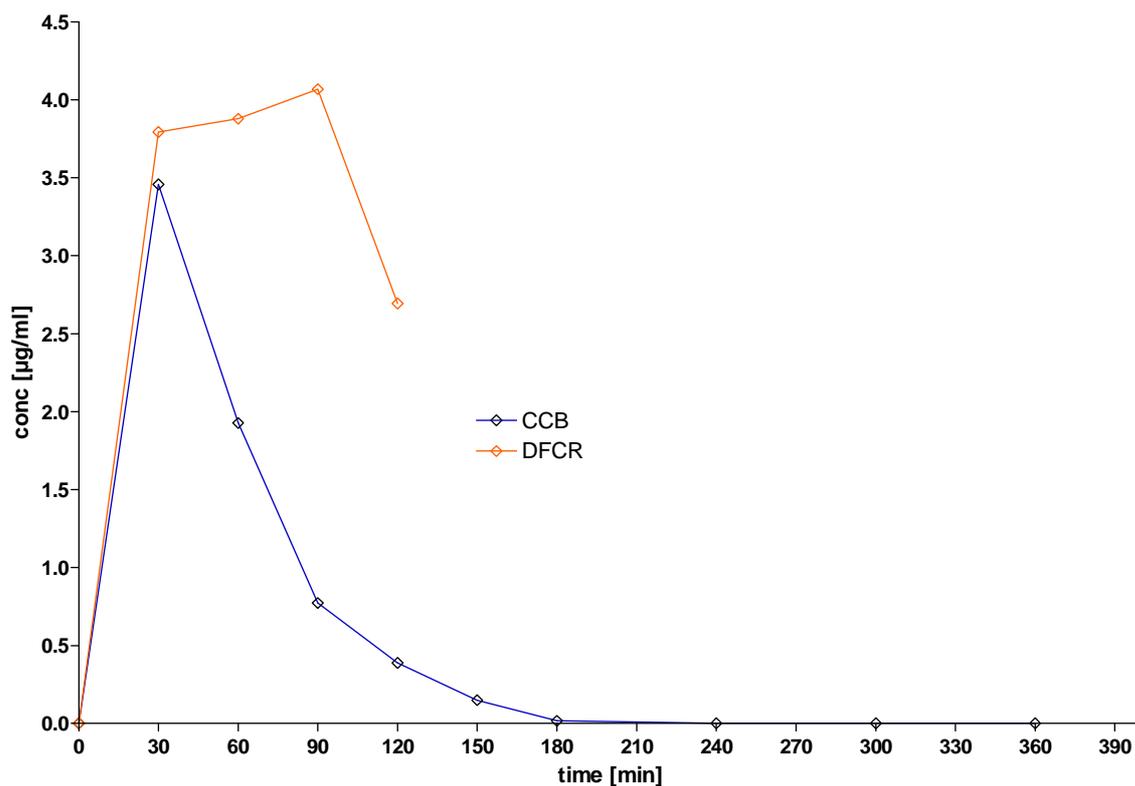


Abb. 16: Patient 3: Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve von Capecitabin und seiner Metabolite

Tab. 28: Patient 4: Konzentrationen von Capecitabin und seiner Metaboliten

time [min]	CCB [$\mu\text{g/ml}$]	DFCR [$\mu\text{g/ml}$]	DFUR [$\mu\text{g/ml}$]	Summe [$\mu\text{g/ml}$]
0	0,00	0,00	0,00	0,00
30	0,00	0,00	0,00	0,00
60	0,03	0,06	0,00	0,09
90	0,07	0,39	0,71	1,17
120	0,20	1,13	3,19	4,52
150	0,18	2,08	3,23	5,49
180	0,18	2,05	3,16	5,38
240	0,04	0,74	2,06	2,84
300	0,00	0,00	0,00	0,00
360	0,00	0,00	0,00	0,00

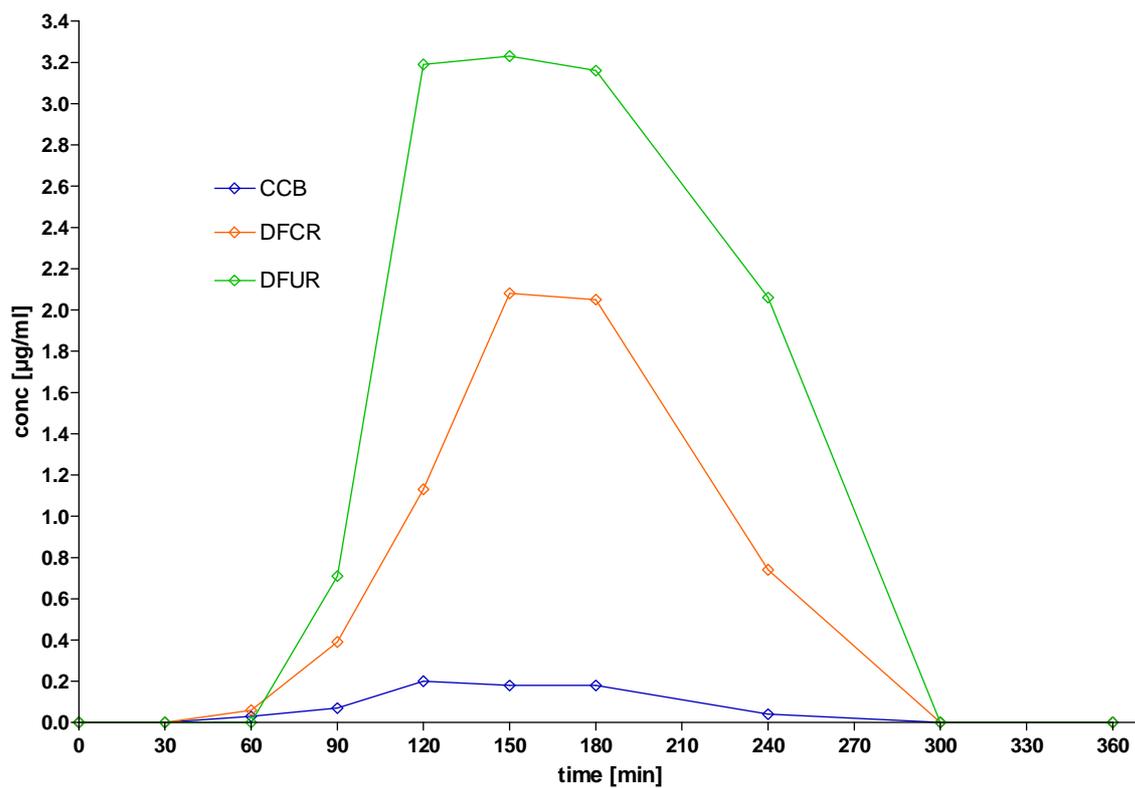


Abb. 17: Patient 4: Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve von Capecitabin und seiner Metabolite

Tab. 29: Capecitabin-Konzentrationen im Vergleich

CCB in µg/ml													
time [min]	Pat1	Pat2	Pat3	Pat4	MW	Median	Schiefe	SD	Error	Vk	Range	Min	Max
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00
30	1,60	1,72	3,46	0,00	1,69	1,66	0,03	1,41	0,71	83,41	3,46	0,00	3,46
60	0,23	0,21	1,93	0,03	0,60	0,22	0,38	0,89	0,45	148,66	1,90	0,03	1,93
90	0,05	0,03	0,77	0,07	0,23	0,06	0,17	0,36	0,18	157,46	0,74	0,03	0,77
120	0,00	0,00	0,39	0,20	0,15	0,10	0,05	0,19	0,09	126,72	0,39	0,00	0,39
150	0,00	0,00	0,15	0,18	0,08	0,07	0,01	0,10	0,05	116,55	0,18	0,00	0,18
180	0,00	0,00	0,02	0,18	0,05	0,01	0,04	0,09	0,04	177,14	0,18	0,00	0,18
240	0,00	0,00	0,00	0,04	0,01	0,00	0,01	0,02	0,01	200,00	0,04	0,00	0,04
300	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00
360	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00
AUC	56,40	58,80	201,60	24,40	85,30	57,60	27,70	79,10	39,55	92,74	177,20	24,40	201,60

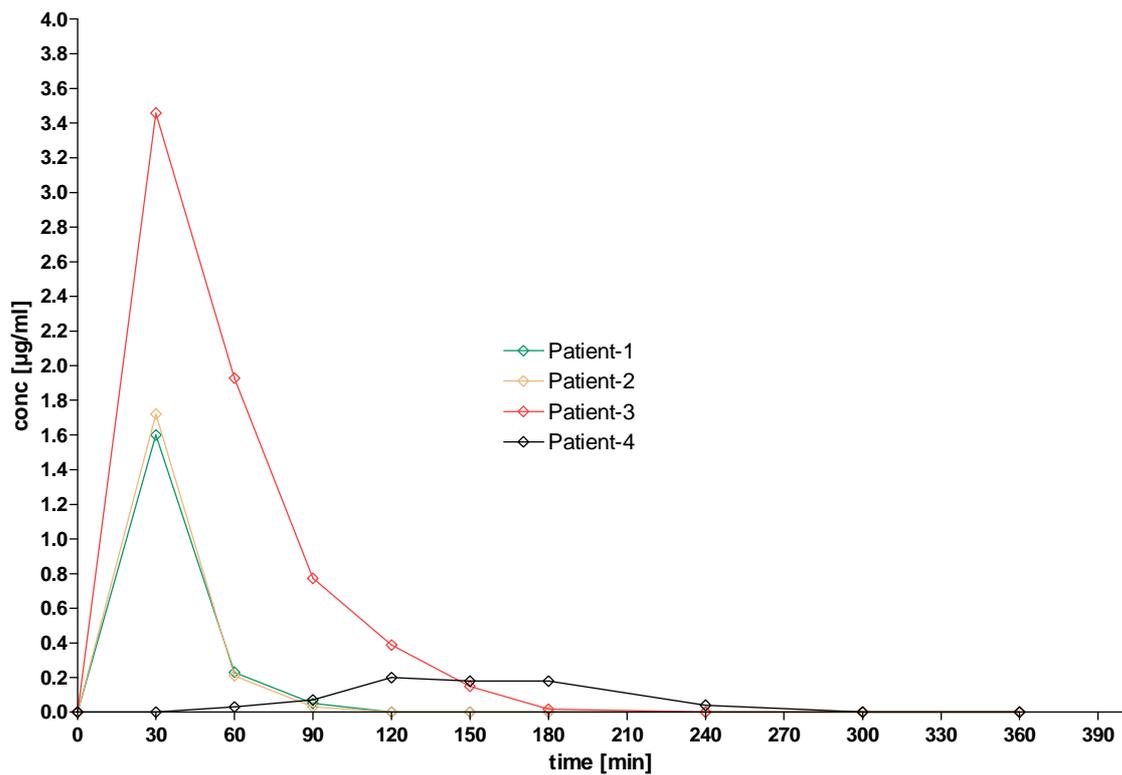


Abb. 18: Capecitabin Plasmakonzentrations-Zeit-Kurven im Vergleich

Tab. 30: DFCR-Konzentrationen im Vergleich

DFCR in µg/ml													
time [min]	Pat1	Pat2	Pat3	Pat4	MW	Median	Schiefe	SD	Error	Vk	Range	Min	Max
0	0,00	0,00	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00
30	6,20	7,20	3,79	0,00	4,30	5,00	-0,70	3,20	1,60	74,50	7,20	0,00	7,20
60	2,60	3,76	3,88	0,06	2,57	3,18	-0,60	1,77	0,89	68,90	3,82	0,06	3,88
90	1,26	1,70	4,07	0,39	1,85	1,48	0,37	1,57	0,79	84,91	3,68	0,39	4,07
120	0,51	1,19	2,69	1,13	1,38	1,16	0,22	0,93	0,46	67,08	2,18	0,51	2,69
150	0,27	0,48		2,08	0,95	0,48	0,47	0,99	0,49	104,70	1,81	0,27	2,08
180	0,14	0,41		2,05	0,87	0,41	0,46	1,03	0,51	118,84	1,90	0,14	2,05
240	0,00	0,19		0,74	0,31	0,19	0,12	0,39	0,19	124,39	0,74	0,00	0,74
300	0,00	0,13		0,00	0,04	0,00	0,04	0,08	0,04	173,21	0,13	0,00	0,13
360	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00
AUC	331,90	467,30	392,6	212,20	351,00	362,25	-11,25	107,84	53,92	30,72	255,10	212,20	467,30

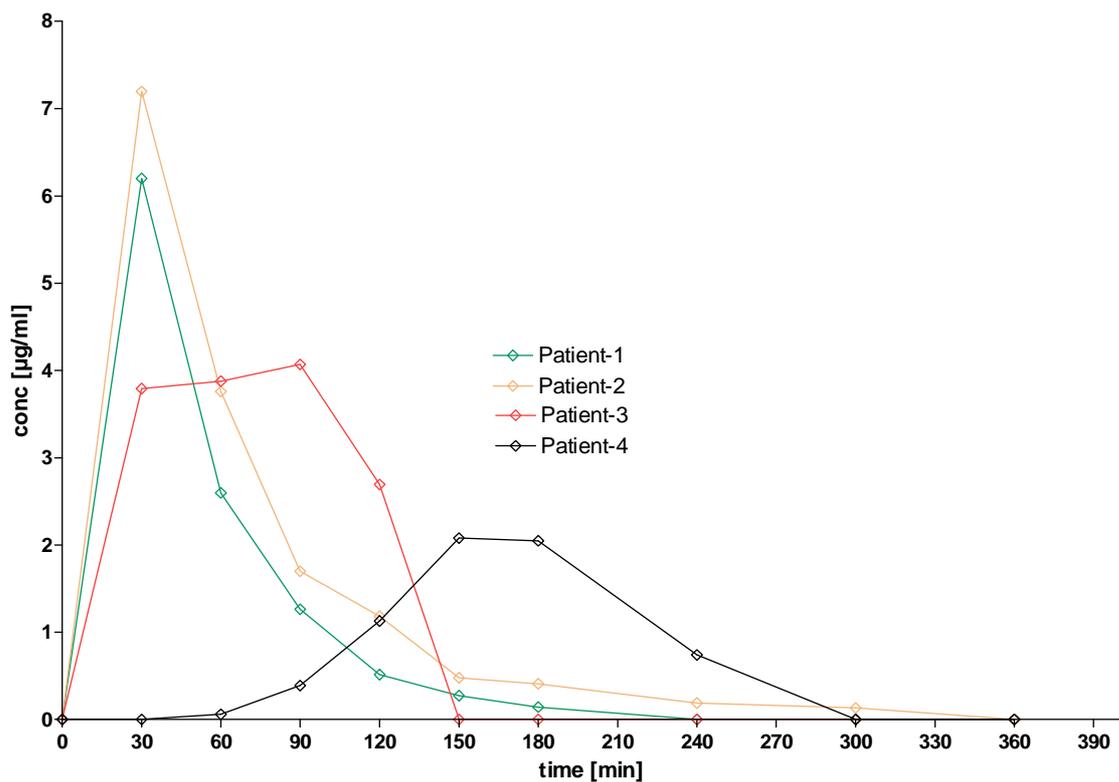


Abb. 19: DFCR-Plasmakonzentrations-Zeit-Kurven im Vergleich

Tab. 31: DFUR-Konzentrationen im Vergleich

DFUR in µg/ml													
time [min]	Pat1	Pat2	Pat3	Pat4	MW	Median	Schiefe	SD	Error	Vk	Range	Min	Max
0	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00
30	9,72	9,33		0,00	6,35	9,33	-2,98	5,50	2,75	86,65	9,72	0,00	9,72
60	4,35	4,59		0,00	2,98	4,35	-1,37	2,58	1,29	86,70	4,59	0,00	4,59
90	1,90	1,64		0,71	1,42	1,64	-0,22	0,63	0,31	44,04	1,19	0,71	1,90
120	1,53	0,96		3,19	1,89	1,53	0,36	1,16	0,58	61,17	2,23	0,96	3,19
150	0,94	0,48		3,23	1,55	0,94	0,61	1,47	0,74	94,98	2,75	0,48	3,23
180		0,32		3,16	1,74	1,74	0,00	2,01	1,00	115,63	2,84	0,32	3,16
240				2,06	2,06	2,06	0,00				0,00	2,06	2,06
300				0,00	0,00	0,00	0,00				0,00	0,00	0,00
360													
AUC	539,30	514,80		483,70	512,60	514,80	-2,20	27,87	13,93	5,44	55,60	483,70	539,30

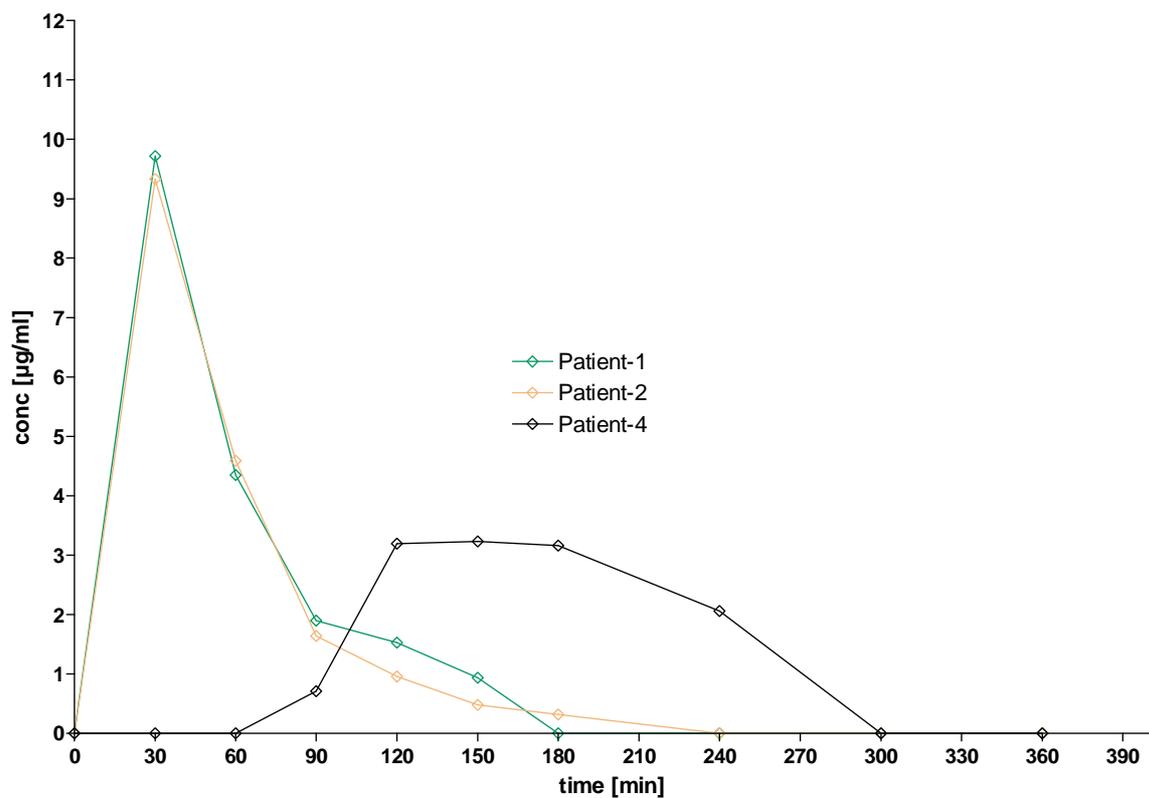


Abb. 20: DFUR-Plasmakonzentrations-Zeit-Kurven im Vergleich

Tab. 32: Konzentrationssummen im Vergleich

Summe CCB+DFUR+DFCR in µg/ml													
time [min]	Pat1	Pat2	Pat3	Pat4	MW	Median	Schiefe	SD	Error	Vk	Range	Min	Max
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00
30	17,52	18,25	7,25	0,00	10,75	12,38	-1,63	8,75	4,38	81,39	18,25	0,00	18,25
60	7,19	8,56	5,81	0,09	5,41	6,50	-1,09	3,72	1,86	68,82	8,47	0,09	8,56
90	3,21	3,37	4,84	1,17	3,15	3,29	-0,14	1,51	0,76	47,99	3,68	1,17	4,84
120	2,05	2,14	3,08	4,52	2,95	2,61	0,34	1,15	0,57	38,93	2,47	2,05	4,52
150	1,22	0,96	0,15	5,49	1,95	1,09	0,87	2,40	1,20	122,92	5,34	0,15	5,49
180	0,14	0,73	0,02	5,38	1,57	0,44	1,13	2,56	1,28	163,42	5,36	0,02	5,38
240	0,00	0,19	0,00	2,84	0,76	0,09	0,66	1,39	0,69	183,80	2,84	0,00	2,84
300	0,00	0,13	0,00	0,00	0,03	0,00	0,03	0,07	0,03	200,00	0,13	0,00	0,13
360	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00
AUC	927,60	1040,9	594,20	720,30	820,75	823,95	-3,20	201,08	100,54	24,50	446,70	594,20	1040,9

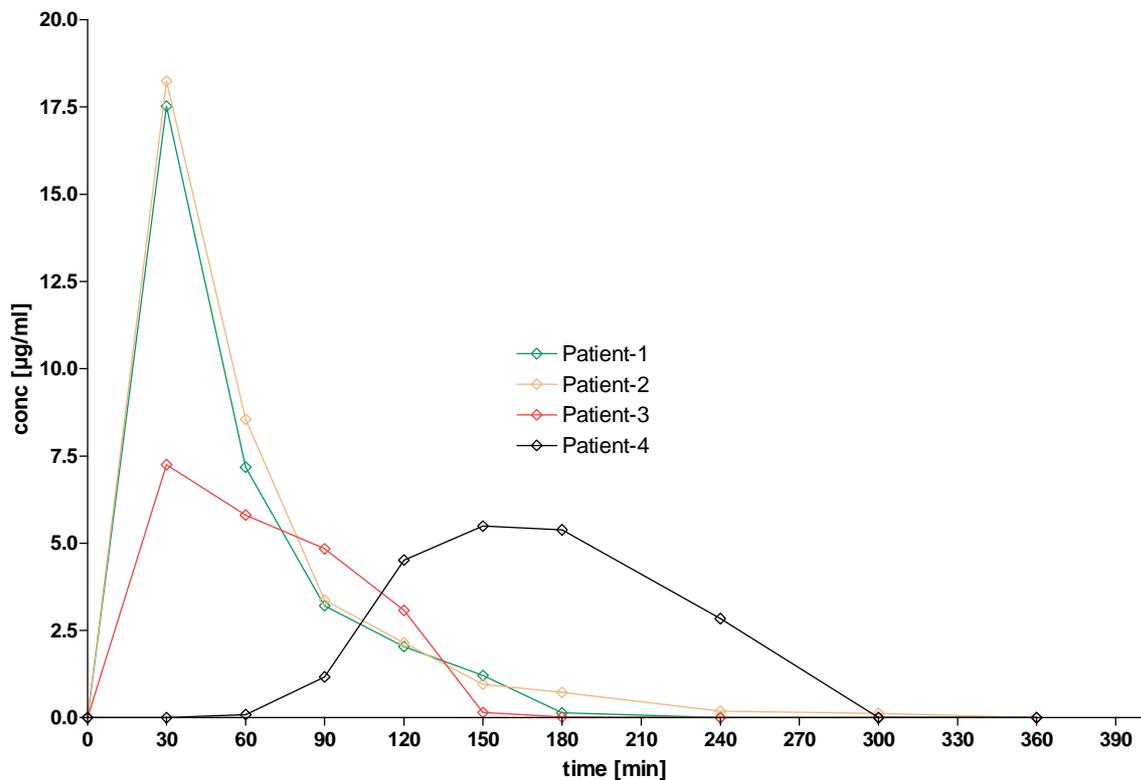


Abb. 21: Plasma-Konzentrationssummen-Zeit-Kurven im Vergleich

Apparent formation rate von Capecitabin

Tab. 33: AUC von Capecitabin und seiner Metabolite und die scheinbare Enzymaktivität

apparent formation rate													
	Pat1	Pat2	Pat3	Pat4	MW	Median	Schiefe	SD	Error	Vk	Range	Min	Max
AUC _{CCB}	56,40	58,80	201,6	24,40	85,30	57,60	27,70	79,10	39,55	92,74	177,20	24,40	201,60
AUC _{DFCR}	331,90	467,30	392,6	212,20	351,00	362,25	-11,25	107,84	53,92	30,72	255,10	212,20	467,30
AUC _{DFUR}	539,20	514,80		483,70	512,57	514,80	-2,23	27,82	13,91	5,43	55,50	483,70	539,20
K _{app-CE}	0,17	0,13	0,51	0,11	0,23	0,15	0,08	0,19	0,09	82,14	0,40	0,11	0,51
K _{app-CD}	0,62	0,91		0,44	0,65	0,62	0,04	0,24	0,12	36,22	0,47	0,44	0,91

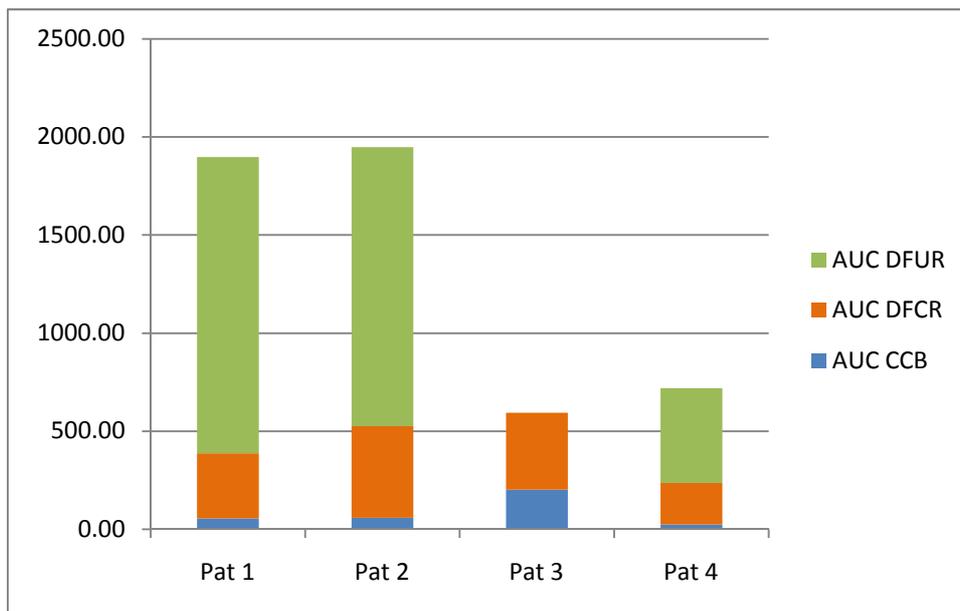


Abb. 22: AUC von Capecitabin und seiner Metaboliten im Patientenvergleich

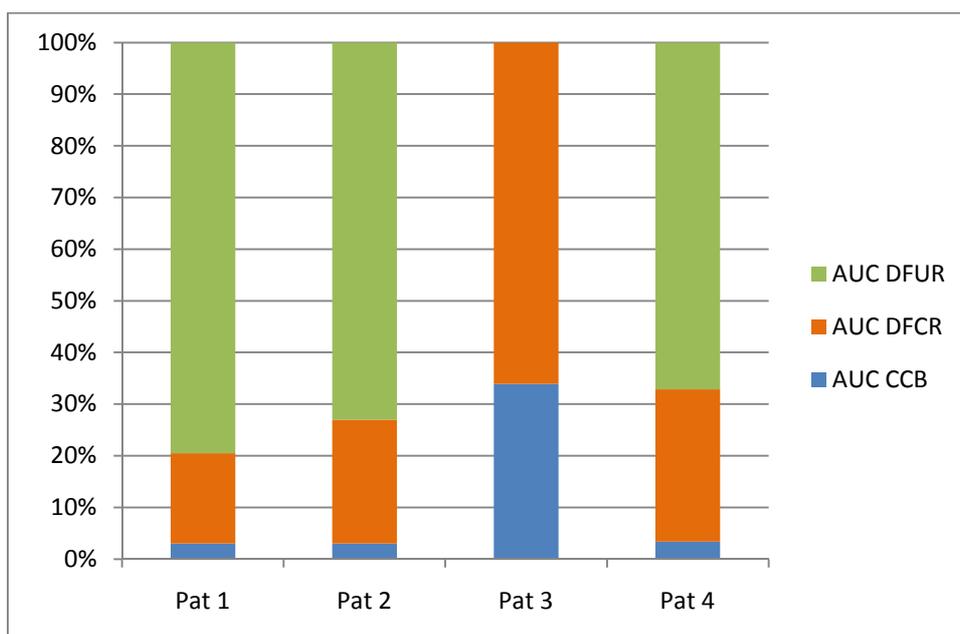


Abb. 23: Prozentuelle AUC von Capecitabin und seiner Metaboliten im Patientenvergleich

4.3.2. Erlotinib

Tab. 34: Patient 1: Plasmakonzentrationen von Erlotinib und seiner Metabolite

time [h]	Erlotinib [$\mu\text{g/ml}$]	OSI420 [$\mu\text{g/ml}$]	Summe [$\mu\text{g/ml}$]
0	0,00	0,00	0,00
1	1,93	0,14	2,08
2	0,97	0,12	1,09
3	0,96	0,07	1,03
4	0,71	0,05	0,75
5	0,65	0,04	0,69
6	0,55	0,03	0,58
8	0,44	0,02	0,47
24	0,11	0,01	0,11
28	1,08	0,06	1,14
48	0,24	0,01	0,25
52	1,40	0,09	1,49
72	0,20	0,01	0,21
76	1,64	0,11	1,75
96	0,40	0,02	0,42
100	1,40	0,09	1,49
120	0,45	0,02	0,47
124	2,11	0,15	2,26
144	0,83	0,06	0,89
148	2,89	0,21	3,10
168	1,59	0,11	1,70
172	4,01	0,28	4,29

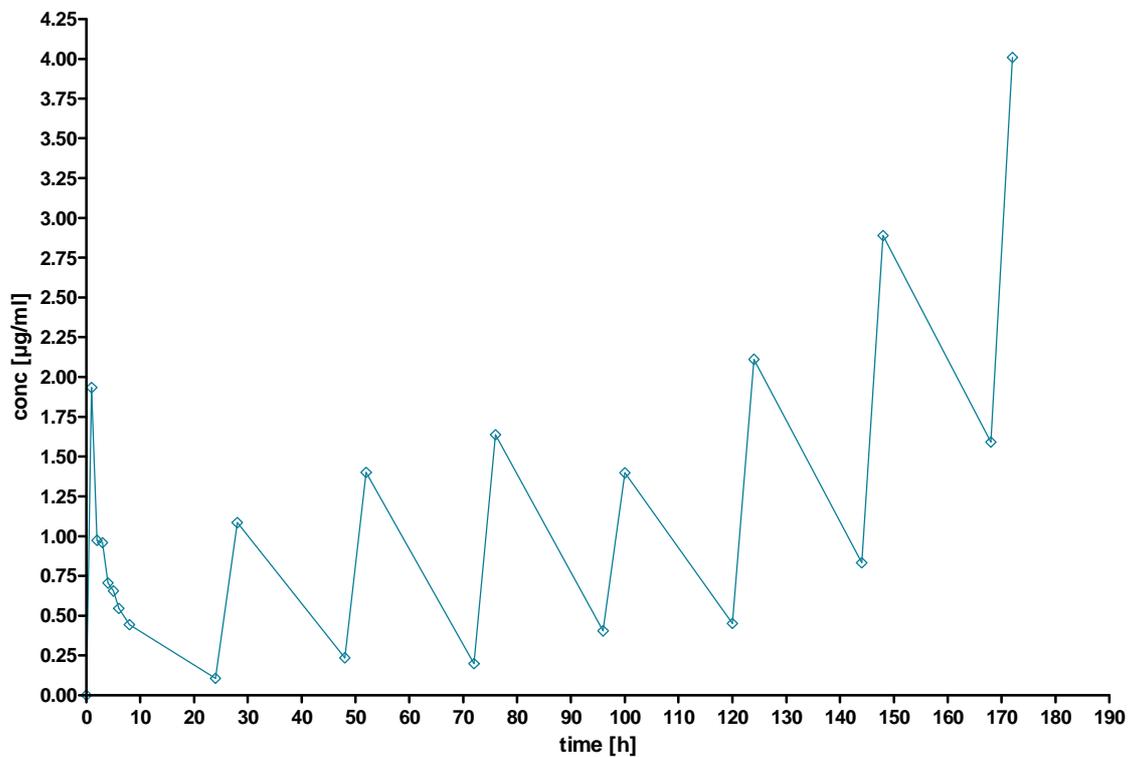


Abb. 24: Patient 1: Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve von Erlotinib

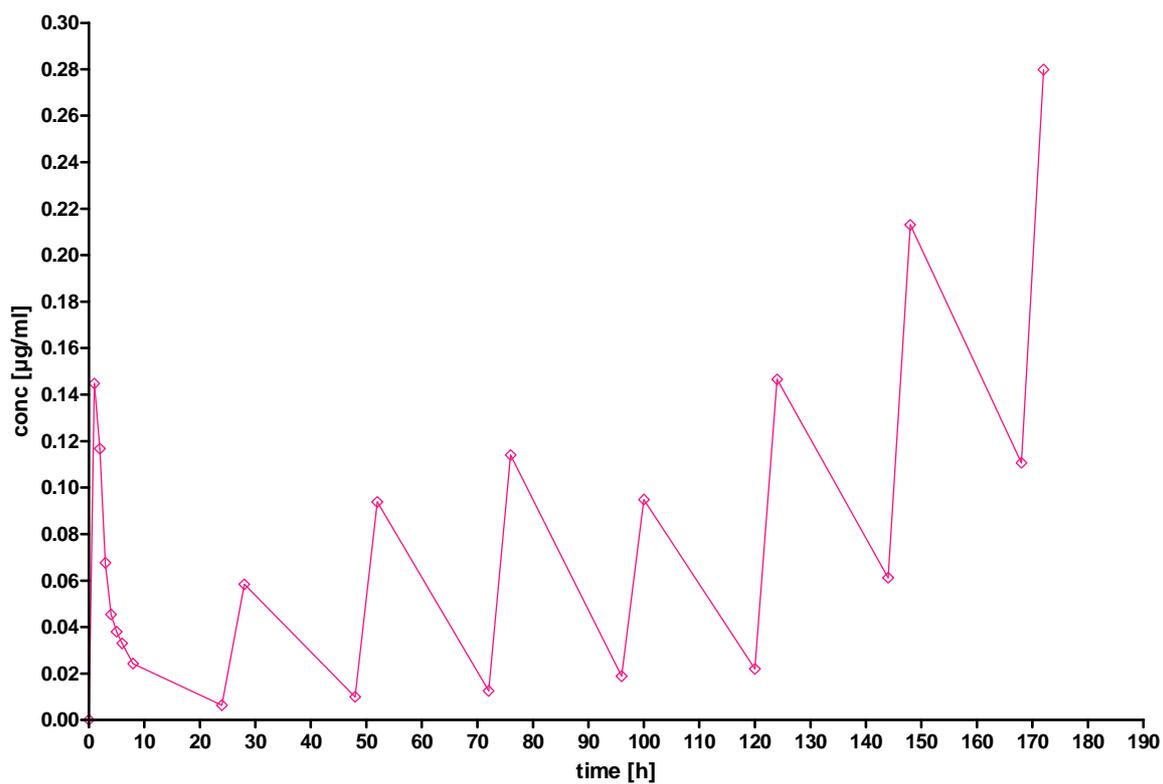


Abb. 25: Patient 1: Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve von OSI420

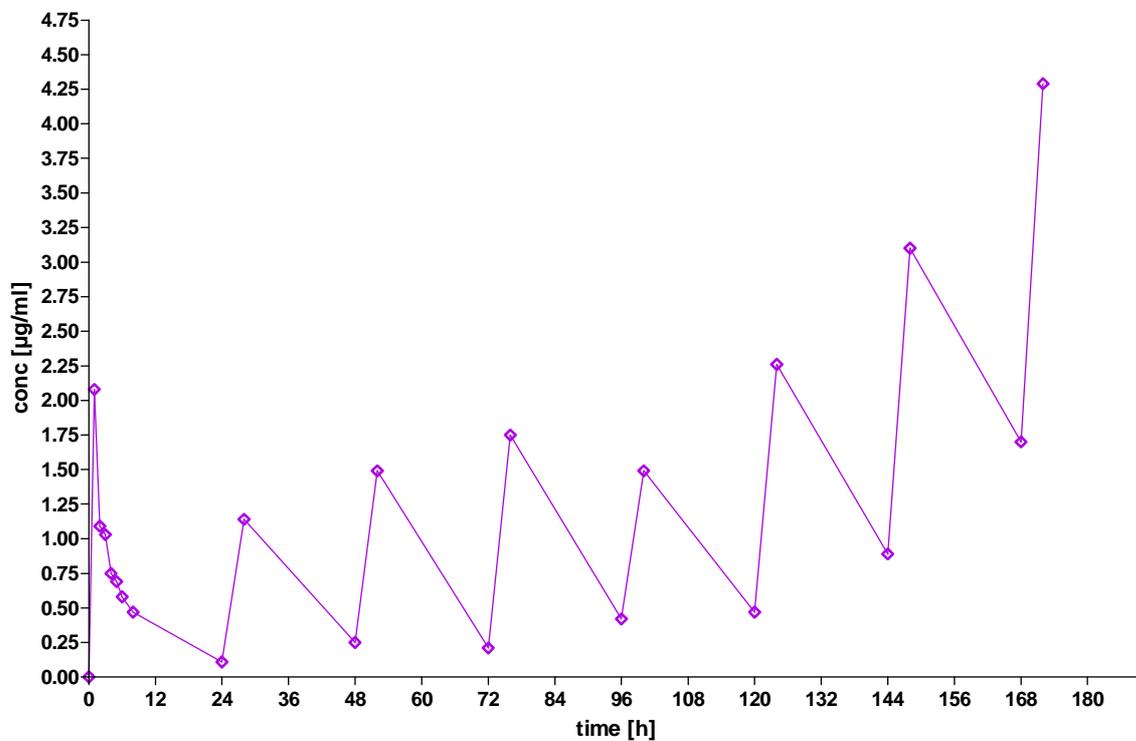


Abb. 26: Patient 1: Plasmakonzentrationssummen-Zeit-Kurve

Tab. 35: Patient 2: Plasmakonzentrationen von Erlotinib und seiner Metabolite

time [h]	Erlotinib [$\mu\text{g/ml}$]	OSI420 [$\mu\text{g/ml}$]	Summe [$\mu\text{g/ml}$]
0	0,00	0,00	0,00
1	3,28	0,11	3,39
2	4,76	0,23	4,99
3	3,21	0,15	3,37
4	2,87	0,15	3,02
5	2,47	0,12	2,59
6	2,60	0,12	2,72
8	2,85	0,14	2,99
24	0,63	0,02	0,66
28	2,48	0,09	2,58
48	0,35	0,01	0,36
52	0,93	0,03	0,96
72	0,38	0,01	0,40
76	1,78	0,07	1,85
96	0,71	0,03	0,74
100	3,12	0,13	3,25
120	1,24	0,05	1,30
124	2,80	0,10	2,90
144	2,35	0,09	2,44
148	6,00	0,25	6,25
168	4,97	0,22	5,19
172	5,35	0,22	5,57

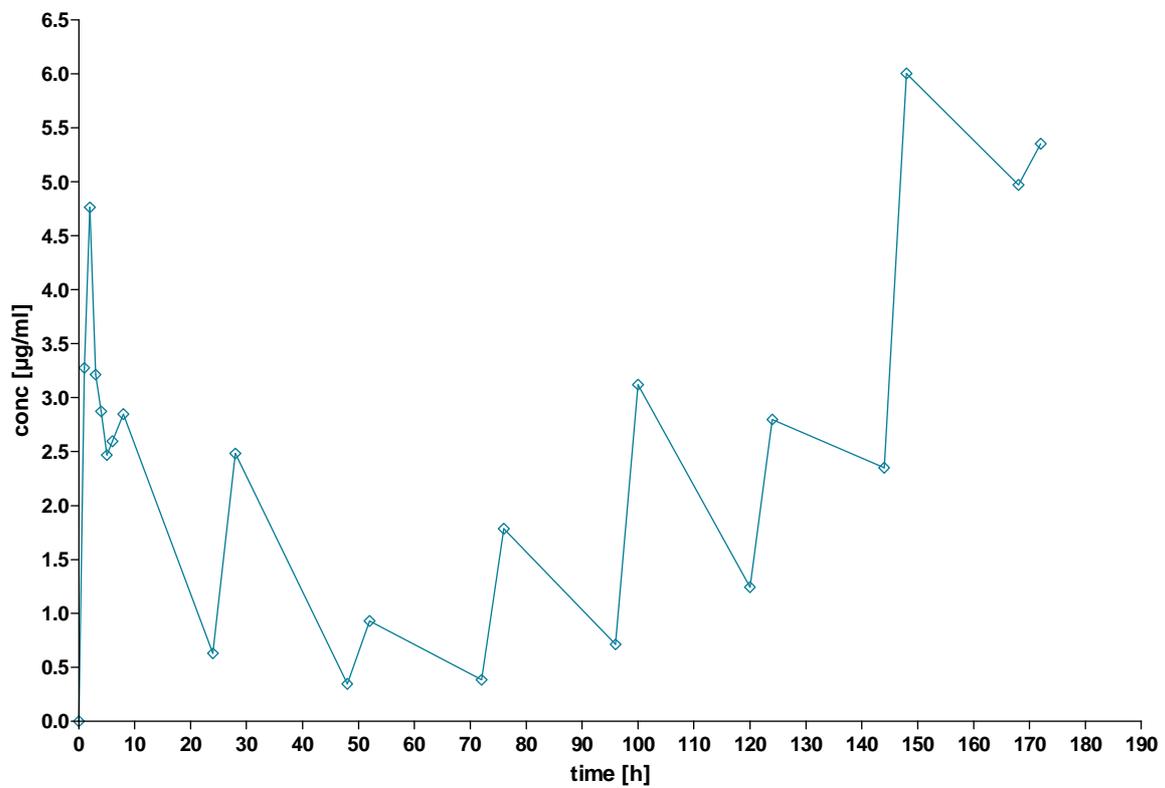


Abb. 27: Patient 2: Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve von Erlotinib

Tab. 36: Patient 3: Plasmakonzentrationen von Erlotinib und seiner Metabolite

time [h]	Erlotinib [$\mu\text{g/ml}$]	OSI420 [$\mu\text{g/ml}$]	Summe [$\mu\text{g/ml}$]
0	0,00	0,00	0,00
1	2,94	0,17	3,11
2	2,93	0,23	3,16
3	2,29	0,19	2,48
4	1,90	0,18	2,08
5	1,48	0,15	1,63
6	2,11	0,24	2,35
8	1,57	0,18	1,75
24	1,46	0,23	1,69
28	2,68	0,37	3,04
48	1,37	0,21	1,57
52	2,78	0,38	3,15
72	2,19	0,37	2,55
76	2,47	0,35	2,82
96	1,44	0,22	1,65
100	2,59	0,35	2,93
120	1,84	0,29	2,13
124	2,48	0,30	2,78
144	2,04	0,29	2,33
148	2,87	0,35	3,22
168	2,34	0,33	2,67
172	2,75	0,37	3,12

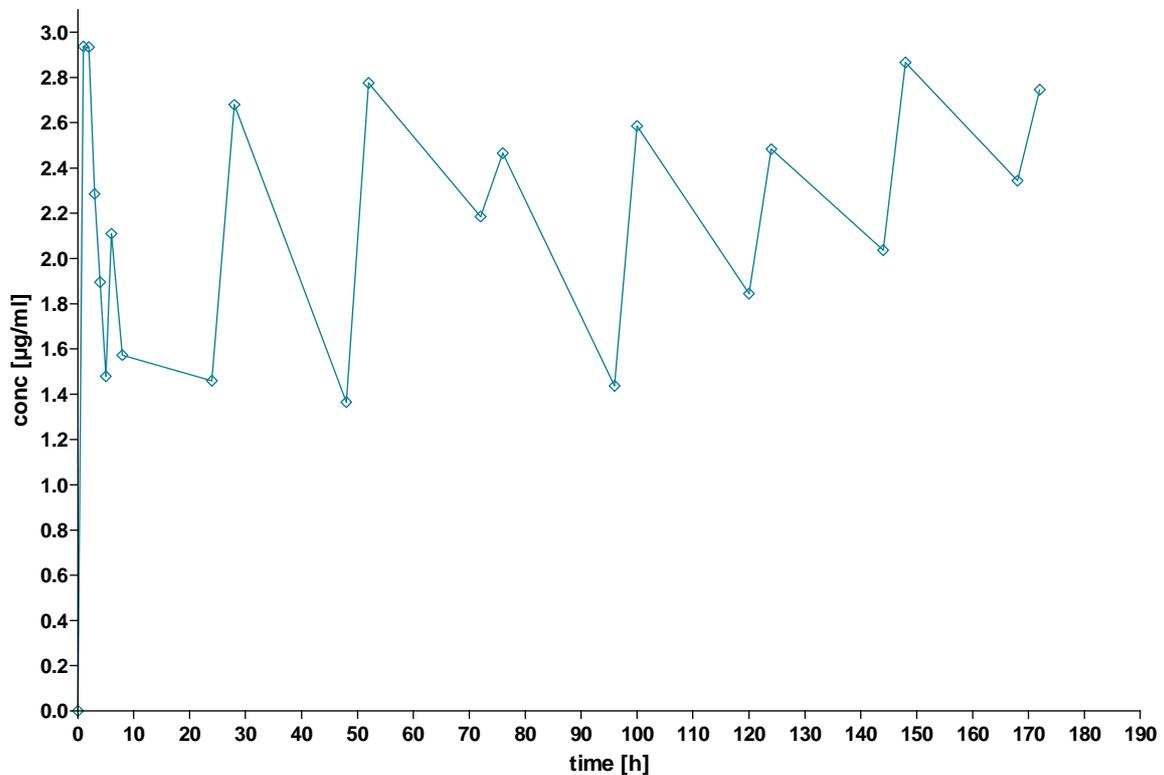


Abb. 30: Patient 3: Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve von Erlotinib

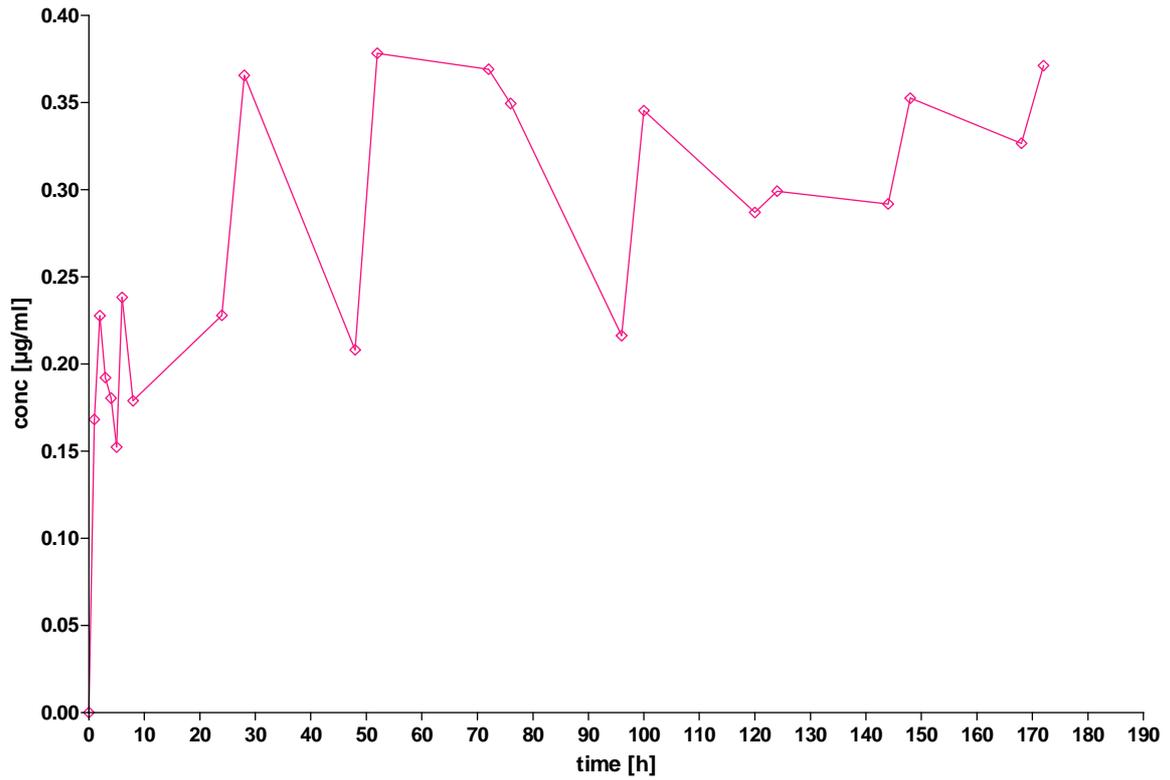


Abb. 31: Patient 3: Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve von OSI420

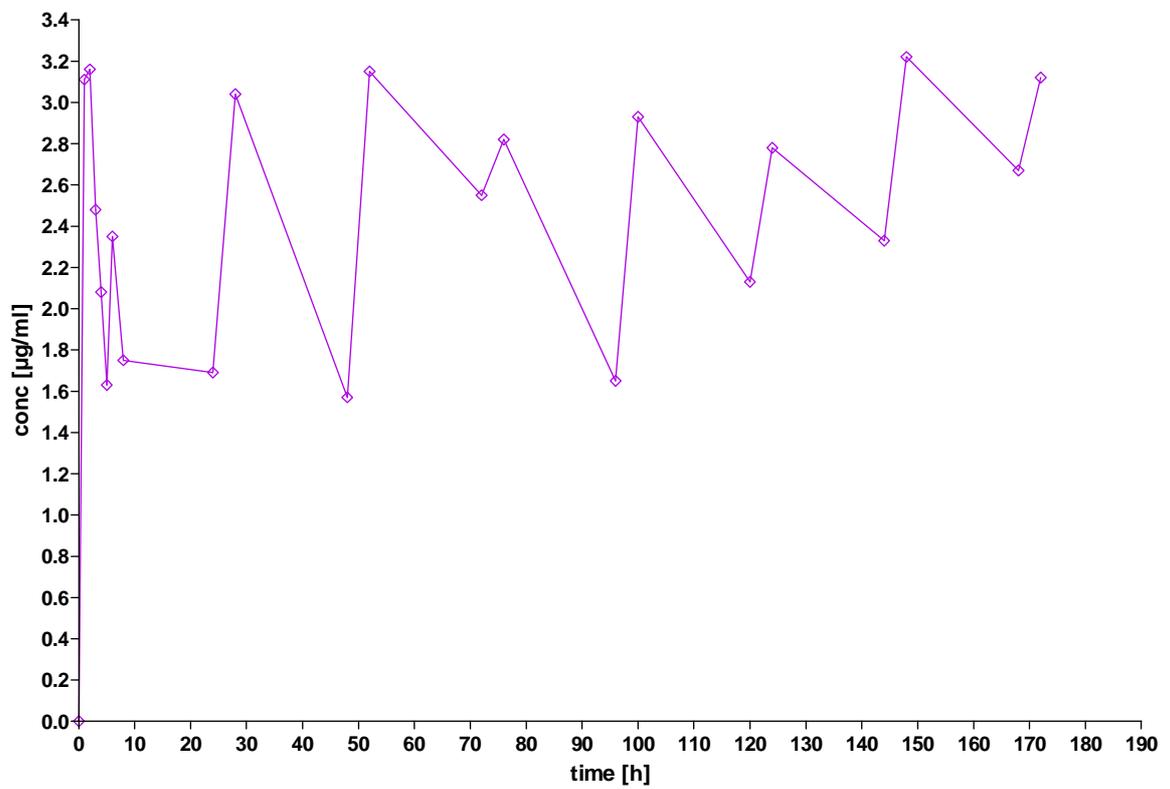


Abb. 32: Patient 3: Plasmakonzentrationssummen-Zeit-Kurve

Tab. 37: Patient 4: Plasmakonzentrationen von Erlotinib und seiner Metabolite

time [h]	Erlotinib [$\mu\text{g/ml}$]	OSI420 [$\mu\text{g/ml}$]	Summe [$\mu\text{g/ml}$]
0	0,00	0,00	0,00
1	0,03	0,00	0,03
2	0,96	0,05	1,02
3	1,28	0,06	1,34
4	1,09	0,06	1,16
5	0,91	0,05	0,96
6	0,80	0,04	0,84
8	0,65	0,03	0,68
24	0,18	0,00	0,18
28	1,11	0,07	1,17
48	0,31	0,01	0,32
52	1,29	0,07	1,37
72	0,34	0,01	0,35
76	1,50	0,11	1,60
96	0,29	0,01	0,30
100	0,86	0,05	0,91
120	0,25	0,01	0,27
124	1,19	0,07	1,26
144	0,34	0,01	0,35
148	1,38	0,07	1,45
168	0,33	0,02	0,35
172	0,76	0,03	0,80

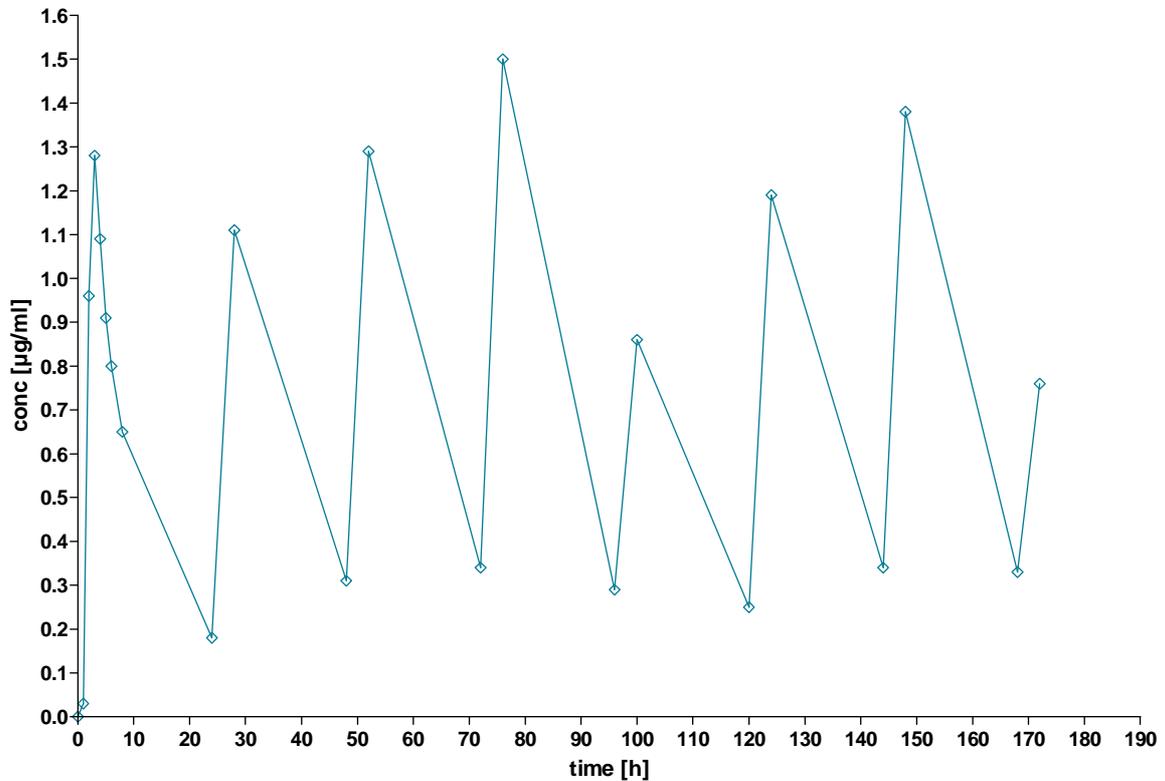


Abb. 33: Patient 4: Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve von Erlotinib

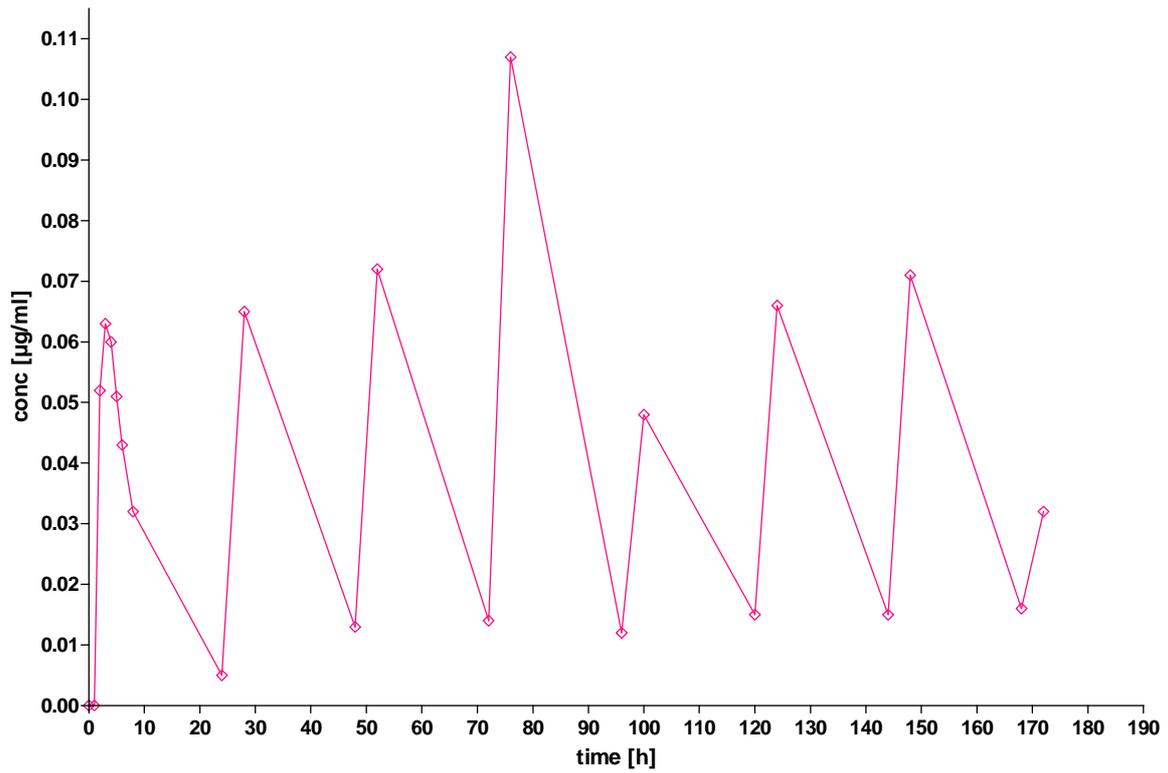


Abb. 34: Patient 4: Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve von OSI420

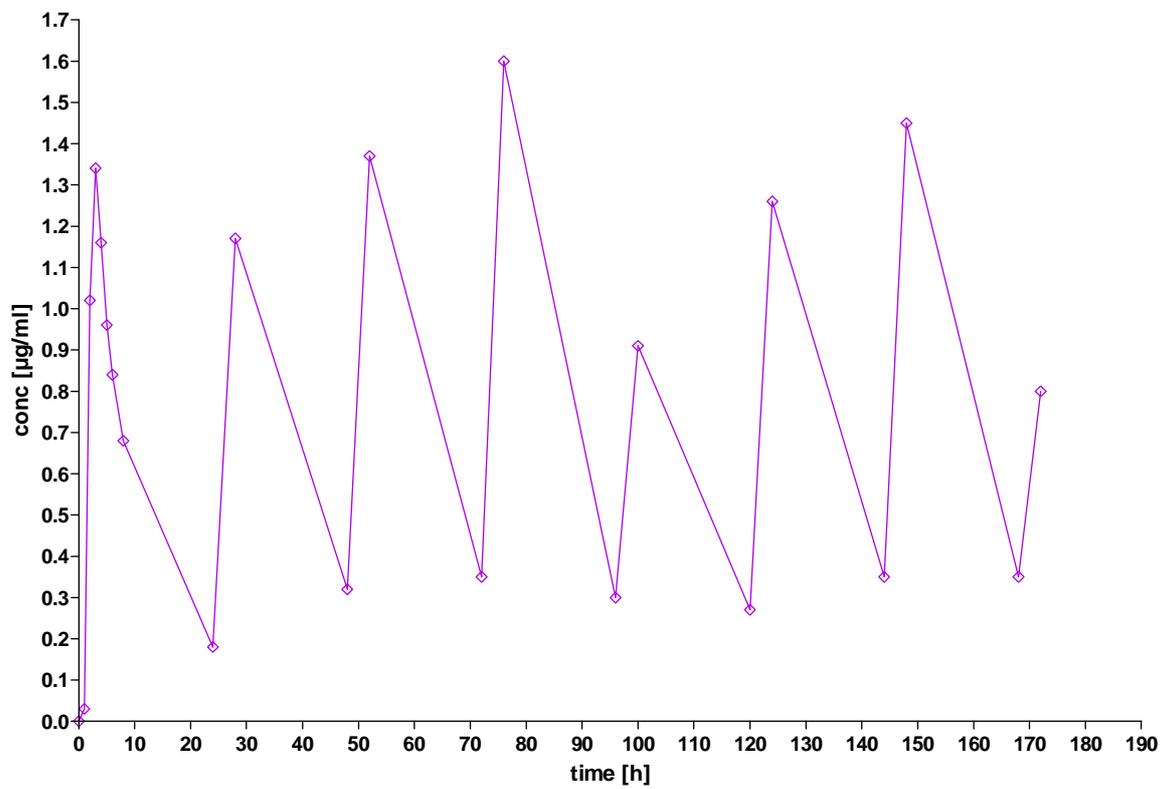


Abb. 35: Patient 4: Plasmakonzentrationssummen-Zeit-Kurve

Tab.38: Erlotinib Konzentrationen im Vergleich

Erlotinib in µg/ml					Erlotinib in µg/ml								
time [h]	Pat1	Pat2	Pat3	Pat4	MW	Median	Schiefe	SD	Error	Vk	Range	Min	Max
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00
1	1,94	3,29	2,94	0,03	2,05	2,44	-0,39	1,46	0,73	71,38	3,26	0,03	3,29
2	0,98	4,79	2,93	0,96	2,42	1,96	0,46	1,83	0,92	75,84	3,82	0,96	4,79
3	0,96	3,23	2,29	1,28	1,94	1,78	0,16	1,03	0,51	53,04	2,26	0,96	3,23
4	0,71	2,89	1,90	1,09	1,65	1,50	0,15	0,96	0,48	58,48	2,18	0,71	2,89
5	0,66	2,48	1,48	0,91	1,38	1,19	0,19	0,81	0,40	58,59	1,82	0,66	2,48
6	0,55	2,61	2,11	0,80	1,52	1,45	0,06	1,00	0,50	65,95	2,06	0,55	2,61
8	0,45	2,86	1,57	0,65	1,38	1,11	0,27	1,10	0,55	79,71	2,42	0,45	2,86
24	0,11	0,63	1,46	0,18	0,59	0,41	0,19	0,62	0,31	104,80	1,35	0,11	1,46
28	1,09	2,49	2,68	1,11	1,84	1,80	0,04	0,86	0,43	46,77	1,59	1,09	2,68
48	0,24	0,35	1,36	0,31	0,56	0,33	0,24	0,54	0,27	94,90	1,13	0,24	1,36
52	1,41	0,93	2,78	1,29	1,60	1,35	0,25	0,81	0,40	50,42	1,84	0,93	2,78
72	0,20	0,39	2,19	0,34	0,78	0,36	0,42	0,94	0,47	121,38	1,99	0,20	2,19
76	1,65	1,79	2,47	1,50	1,85	1,72	0,13	0,43	0,21	23,15	0,97	1,50	2,47
96	0,41	0,72	1,44	0,29	0,71	0,56	0,15	0,52	0,26	72,59	1,15	0,29	1,44
100	1,40	3,13	2,59	0,86	2,00	1,99	0,00	1,05	0,52	52,36	2,27	0,86	3,13
124	0,45	1,25	1,84	0,25	0,95	0,85	0,10	0,73	0,37	77,27	1,59	0,25	1,84
128	2,12	2,81	2,48	1,19	2,15	2,30	-0,15	0,70	0,35	32,51	1,62	1,19	2,81
148	0,84	2,36	2,04	0,34	1,39	1,44	-0,04	0,96	0,48	69,16	2,03	0,34	2,36
152	2,90	6,03	2,87	1,38	3,30	2,88	0,41	1,96	0,98	59,39	4,65	1,38	6,03
172	1,60	5,00	2,34	0,33	2,32	1,97	0,35	1,97	0,98	84,91	4,66	0,33	5,00
176	4,03	5,38	2,75	0,76	3,23	3,39	-0,16	1,96	0,98	60,84	4,62	0,76	5,38
AUC	193,6	397,4	382,60	127,00	275,15	288,10	-12,95	135,51	67,76	49,25	270,40	127,00	397,40

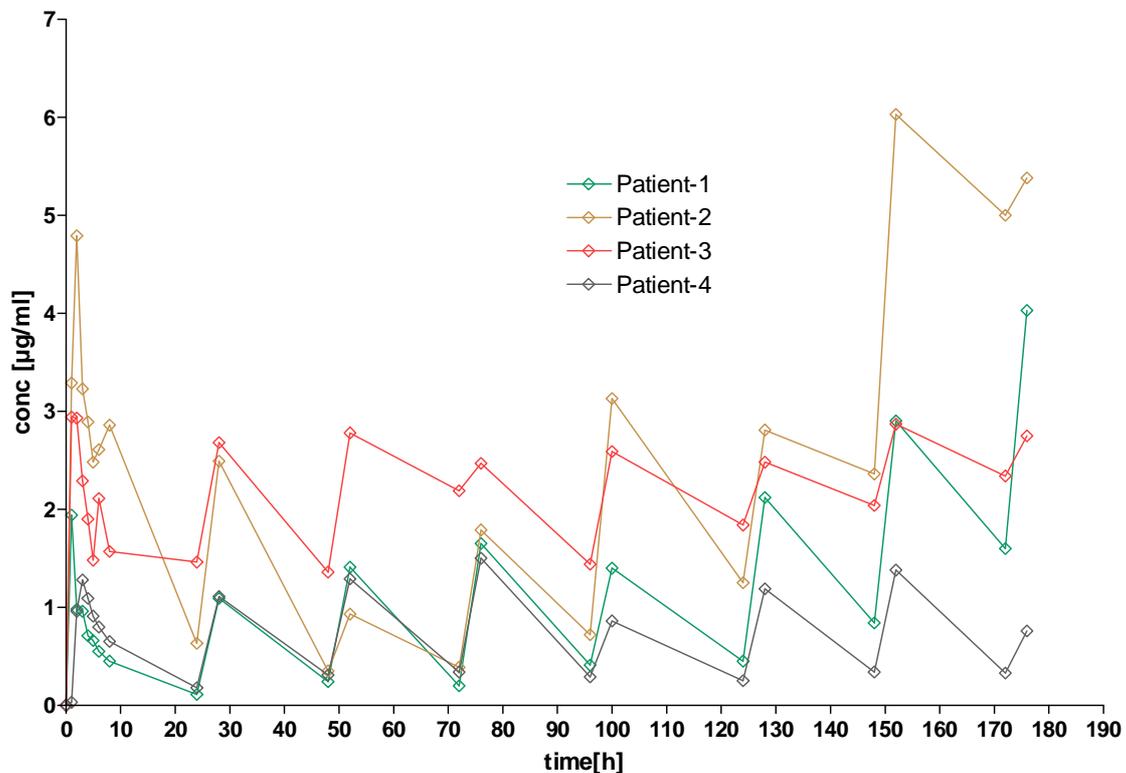


Abb. 36: Plasmakonzentrations-Zeit-Kurven von Erlotinib im Vergleich

Tab. 39: OSI420 Konzentrationen im Vergleich

OSI in µg/ml					OSI in µg/ml								
time [h]	Pat1	Pat2	Pat3	Pat4	MW	Median	Schiefe	SD	Error	Vk	Range	Min	Max
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00
1	0,15	0,11	0,17	0,00	0,11	0,13	-0,02	0,07	0,04	70,28	0,17	0,00	0,17
2	0,12	0,23	0,23	0,05	0,16	0,17	-0,02	0,09	0,04	55,84	0,18	0,05	0,23
3	0,07	0,15	0,19	0,06	0,12	0,11	0,01	0,06	0,03	53,73	0,13	0,06	0,19
4	0,05	0,15	0,18	0,06	0,11	0,10	0,00	0,07	0,03	60,83	0,14	0,05	0,18
5	0,04	0,12	0,15	0,05	0,09	0,09	0,00	0,06	0,03	61,02	0,11	0,04	0,15
6	0,03	0,13	0,24	0,04	0,11	0,08	0,03	0,09	0,05	86,38	0,21	0,03	0,24
8	0,02	0,14	0,18	0,03	0,09	0,09	0,01	0,08	0,04	82,59	0,15	0,02	0,18
24	0,01	0,02	0,23	0,00	0,07	0,02	0,05	0,11	0,05	164,42	0,22	0,00	0,23
28	0,06	0,09	0,37	0,07	0,15	0,08	0,07	0,15	0,07	101,33	0,31	0,06	0,37
48	0,01	0,01	0,21	0,01	0,06	0,01	0,05	0,10	0,05	160,22	0,20	0,01	0,21
52	0,09	0,03	0,38	0,07	0,14	0,08	0,06	0,16	0,08	109,36	0,35	0,03	0,38
72	0,01	0,01	0,37	0,01	0,10	0,01	0,09	0,18	0,09	174,18	0,36	0,01	0,37
76	0,11	0,07	0,35	0,11	0,16	0,11	0,05	0,13	0,06	79,40	0,28	0,07	0,35
96	0,02	0,03	0,22	0,01	0,07	0,02	0,05	0,10	0,05	145,06	0,20	0,01	0,22
100	0,09	0,13	0,35	0,05	0,15	0,11	0,04	0,13	0,07	85,61	0,30	0,05	0,35
124	0,02	0,05	0,29	0,01	0,09	0,04	0,06	0,13	0,06	138,03	0,27	0,01	0,29
128	0,15	0,10	0,30	0,07	0,15	0,13	0,03	0,10	0,05	66,40	0,23	0,07	0,30
148	0,06	0,09	0,29	0,01	0,12	0,08	0,04	0,12	0,06	105,92	0,28	0,01	0,29
152	0,21	0,25	0,35	0,07	0,22	0,23	-0,01	0,12	0,06	52,44	0,28	0,07	0,35
172	0,11	0,22	0,33	0,02	0,17	0,17	0,00	0,13	0,07	79,69	0,31	0,02	0,33
176	0,28	0,22	0,37	0,03	0,23	0,25	-0,02	0,14	0,07	63,49	0,34	0,03	0,37
AUC	13,00	16,42	52,65	7,00	22,27	14,71	7,56	20,63	10,31	92,63	45,65	7,00	52,65

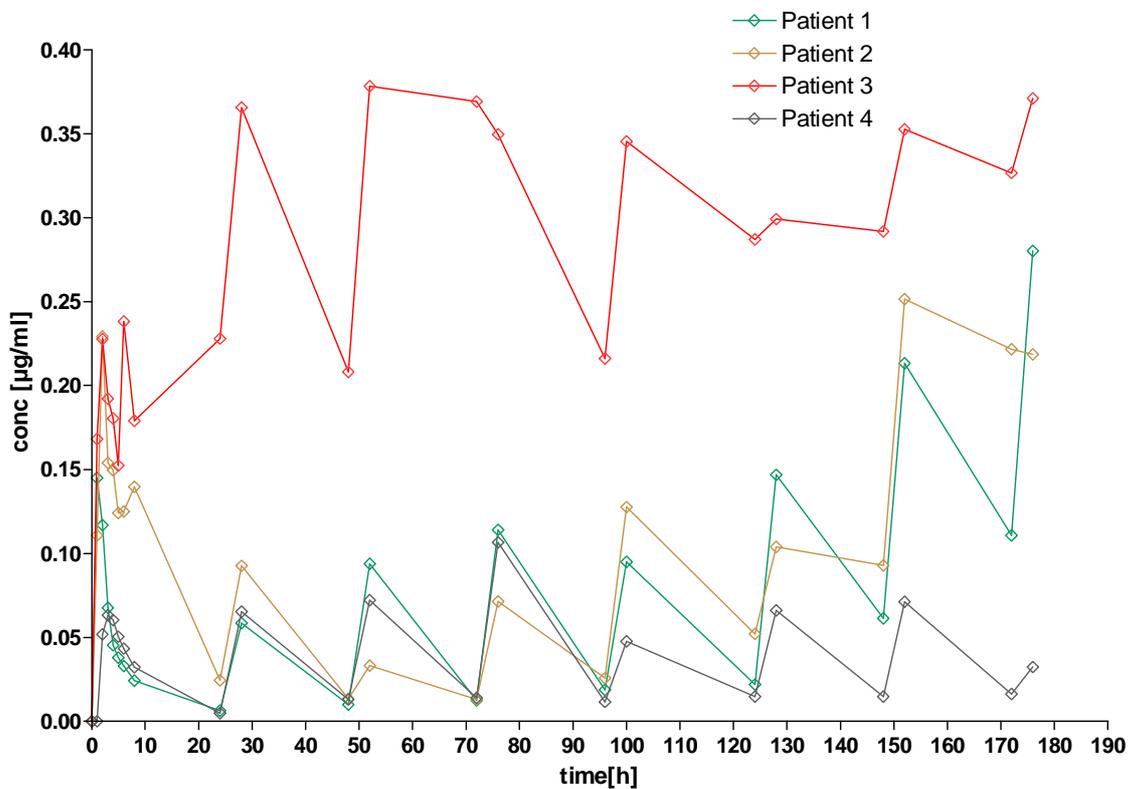


Abb. 37: Plasmakonzentrations-Zeit-Kurven von Erlotinib im Vergleich

Tab. 40: Konzentrationssummen im Vergleich

Summe Erlotinib + OSI													
time [h]	Pat1	Pat2	Pat3	Pat4	MW	Median	Schiefe	SD	Error	Vk	Range	Min	Max
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00
1	2,09	3,40	3,11	0,03	2,16	2,60	-0,44	1,53	0,76	70,77	3,37	0,03	3,40
2	1,09	5,02	3,16	1,02	2,57	2,13	0,44	1,91	0,95	74,21	4,00	1,02	5,02
3	1,03	3,38	2,48	1,34	2,06	1,91	0,15	1,08	0,54	52,48	2,35	1,03	3,38
4	0,75	3,04	2,08	1,16	1,76	1,62	0,14	1,02	0,51	57,94	2,28	0,75	3,04
5	0,70	2,60	1,63	0,96	1,47	1,29	0,18	0,85	0,43	57,81	1,91	0,70	2,60
6	0,58	2,73	2,35	0,84	1,63	1,59	0,03	1,07	0,54	66,01	2,15	0,58	2,73
8	0,47	3,00	1,75	0,68	1,48	1,22	0,26	1,16	0,58	78,71	2,53	0,47	3,00
24	0,11	0,66	1,69	0,18	0,66	0,42	0,24	0,73	0,36	110,11	1,57	0,11	1,69
28	1,15	2,59	3,04	1,17	1,99	1,88	0,11	0,97	0,49	48,94	1,90	1,15	3,04
48	0,25	0,36	1,57	0,32	0,63	0,34	0,28	0,63	0,32	101,25	1,33	0,25	1,57
52	1,50	0,97	3,15	1,37	1,75	1,43	0,31	0,97	0,48	55,26	2,19	0,97	3,15
72	0,21	0,40	2,55	0,35	0,88	0,37	0,50	1,12	0,56	127,47	2,34	0,21	2,55
76	1,76	1,86	2,82	1,60	2,01	1,81	0,20	0,55	0,27	27,23	1,21	1,60	2,82
96	0,43	0,74	1,65	0,30	0,78	0,58	0,20	0,61	0,31	78,44	1,36	0,30	1,65
100	1,50	3,26	2,93	0,91	2,15	2,22	-0,06	1,13	0,56	52,39	2,35	0,91	3,26
124	0,48	1,30	2,13	0,27	1,04	0,89	0,16	0,85	0,43	81,43	1,86	0,27	2,13
128	2,27	2,91	2,78	1,26	2,31	2,53	-0,22	0,75	0,38	32,64	1,66	1,26	2,91
148	0,90	2,45	2,33	0,35	1,51	1,61	-0,11	1,05	0,52	69,39	2,10	0,35	2,45
152	3,12	6,28	3,22	1,45	3,52	3,17	0,35	2,01	1,01	57,25	4,83	1,45	6,28
172	1,71	5,22	2,67	0,35	2,49	2,19	0,30	2,05	1,03	82,59	4,87	0,35	5,22
176	4,31	5,60	3,12	0,80	3,45	3,71	-0,26	2,04	1,02	59,11	4,80	0,80	5,60
AUC	206,60	413,82	435,25	134,00	297,42	310,21	-12,79	150,00	75,00	50,43	301,25	134,00	435,25

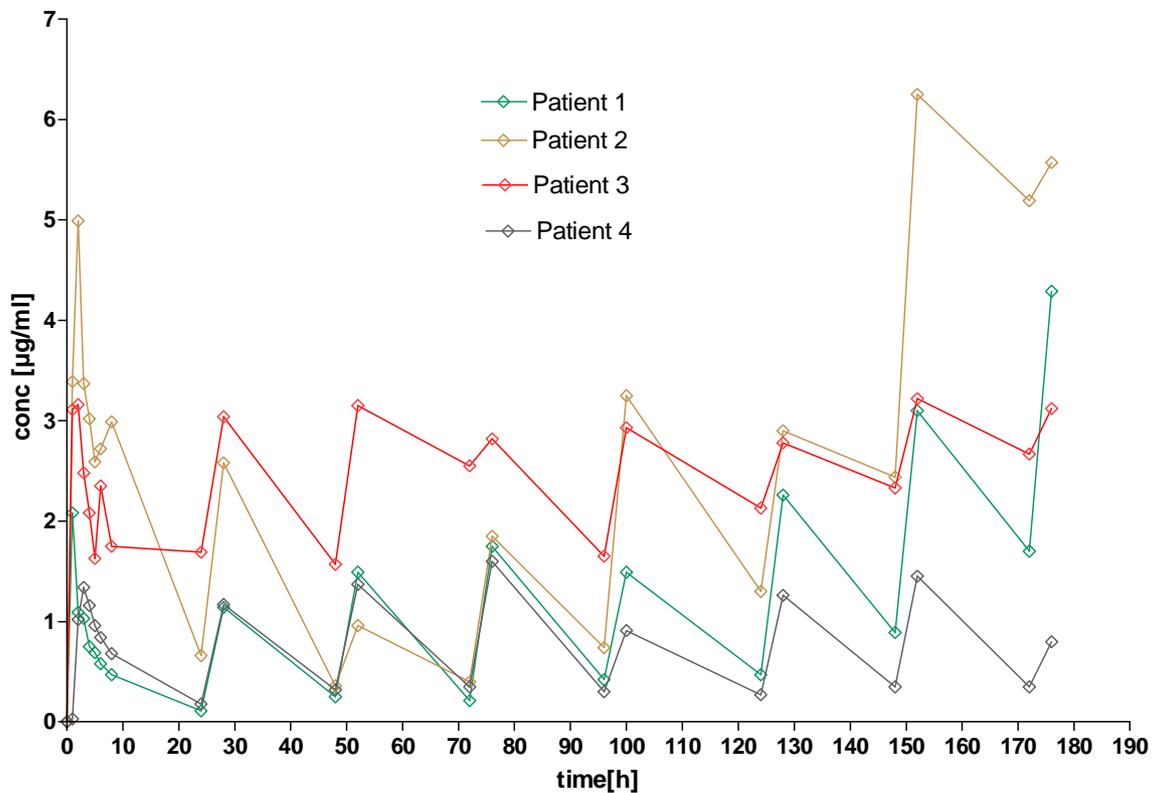


Abb. 38: Plasmakonzentrationssummen-Zeit-Kurven im Vergleich

Apparent formation rate von Erlotinib

Tab. 41: AUC von Erlotinib und OSI und die scheinbare Enzymaktivität

apparent formation rate													
time [h]	Pat1	Pat2	Pat3	Pat4	MW	Median	Schiefe	SD	Error	Vk	Range	Min	Max
AUC _{Erlotinib}	193,6	397,4	382,6	127	275,15	288,10	-12,95	135,51	67,76	49,25	270,40	127,00	397,40
AUC _{OSI}	13,00	16,42	52,65	7,00	22,27	14,71	7,56	20,63	10,31	92,63	45,65	7,00	52,65
K _{app(CYP3A4)}	14,892	24,202	7,267	18,143	16,13	16,52	-0,39	7,05	3,53	43,75	16,94	7,27	24,20

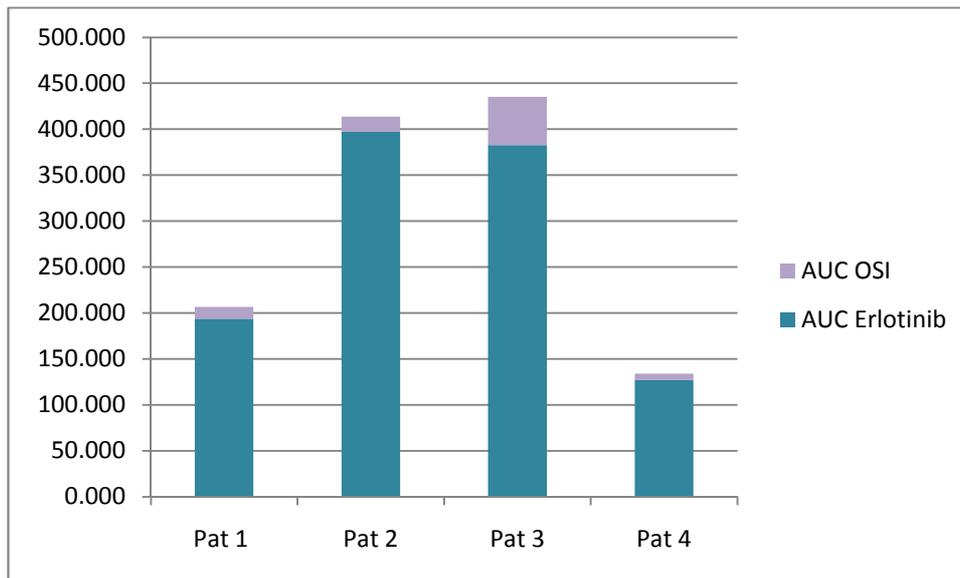


Abb. 39: AUC von Erlotinib und OSI im Patientenvergleich

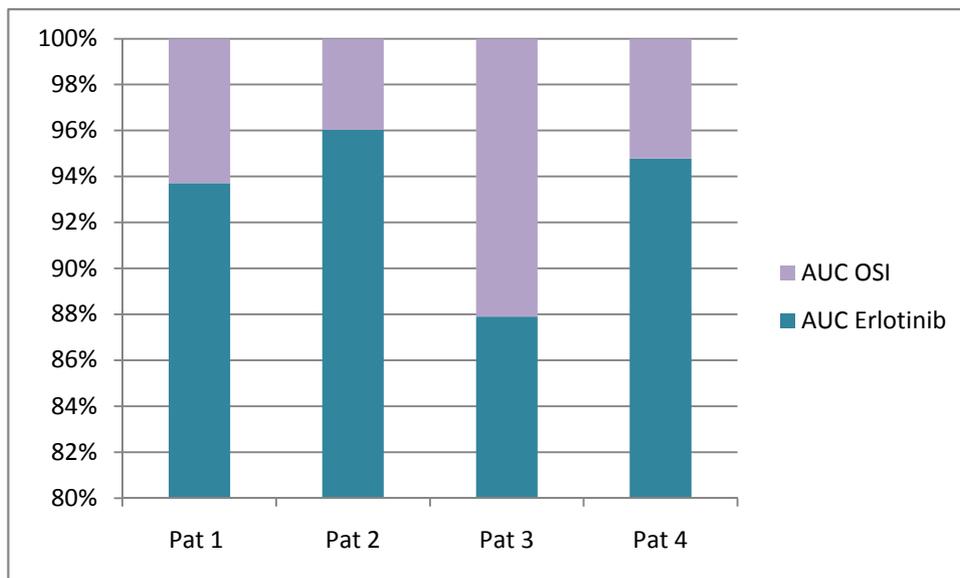


Abb. 40: Prozentuelle AUC von Erlotinib und OSI im Patientenvergleich

4.4. Pharmakokinetische Parameter

Tab. 42: Pharmakokinetische Parameter über Capecitabin im Vergleich

Pharmakokinetik - CCB														
		Pat1	Pat2	Pat3	Pat4	MW	Median	Schiefe	SD	Error	Vk	Range	Min	Max
Rsqr		1,00	1,00	0,94	0,82	0,94	0,97	-0,03	0,09	0,04	9,26	0,18	0,82	1,00
Rsqr_adjusted		1,00	1,00	0,91	0,72	0,91	0,95	-0,05	0,13	0,07	14,37	0,28	0,72	1,00
Corr_XY		-1,00	-1,00	-0,97	-0,90	-0,97	-0,98	0,02	0,05	0,02	-4,72	0,10	-1,00	-0,90
No_points_lambda_z		2,00	2,00	4,00	4,00	3,00	3,00	0,00	1,15	0,58	38,49	2,00	2,00	4,00
Lambda_z	l/min	0,05	0,06	0,04	0,01	0,04	0,05	0,00	0,02	0,01	51,38	0,05	0,01	0,06
Lambda_z_lower	min	60,00	60,00	90,00	120,00	82,50	75,00	7,50	28,72	14,36	34,82	60,00	60,00	120,00
Lambda_z_upper	min	120,00	150,00	360,00	300,00	232,50	225,00	7,50	115,87	57,93	49,83	240,00	120,00	360,00
HL_Lambda_z	min	13,63	10,69	17,46	50,99	23,19	15,54	7,65	18,74	9,37	80,80	40,30	10,69	50,99
Tlag	min	0,00	0,00	0,00	30,00	7,50	0,00	7,50	15,00	7,50	200,00	30,00	0,00	30,00
Tmax	min	30,00	30,00	30,00	120,00	52,50	30,00	22,50	45,00	22,50	85,71	90,00	30,00	120,00
Cmax	ug/mL	1,60	1,72	3,46	0,20	1,75	1,66	0,09	1,34	0,67	76,53	3,26	0,20	3,46
Cmax_D	ug/mL/mg	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	68,89	0,00	0,00	0,00
Tlast	min	90,00	90,00	180,00	240,00	150,00	135,00	15,00	73,48	36,74	48,99	150,00	90,00	240,00
Clast	ug/mL	0,05	0,03	0,02	0,04	0,04	0,04	0,00	0,01	0,01	36,89	0,03	0,02	0,05
AUClast	min*ug/mL	48,73	50,12	194,63	22,68	79,04	49,42	29,62	78,09	39,04	98,80	171,95	22,68	194,63
AUCall	min*ug/mL	49,48	50,57	195,23	23,88	79,79	50,02	29,77	77,94	38,97	97,69	171,35	23,88	195,23
AUCINF_obs	min*ug/mL	49,71	50,58	195,14	25,62	80,26	50,14	30,12	77,45	38,73	96,50	169,51	25,62	195,14
AUCINF_D_obs	min*ug/mL/mg	0,06	0,05	0,20	0,03	0,09	0,06	0,03	0,07	0,04	86,55	0,16	0,03	0,20
AUC_%Extrap_obs	%	1,98	0,91	0,26	11,48	3,66	1,45	2,21	5,26	2,63	143,91	11,23	0,26	11,48
Vz_F_obs	mL	316367,85	289571,70	129111,73	2296757,99	757952,32	302969,77	454982,54	1029197,20	514598,60	135,79	2167646,25	129111,73	2296757,99
Cl_F_obs	mL/min	16093,17	18782,68	5124,65	31223,27	17805,94	17437,93	368,02	10719,57	5359,78	60,20	26098,61	5124,65	31223,27
AUCINF_pred	min*ug/mL	49,71	50,58	195,36	26,41	80,51	50,14	30,37	77,38	38,69	96,11	168,95	26,41	195,36
AUCINF_D_pred	min*ug/mL/mg	0,06	0,05	0,20	0,03	0,09	0,06	0,03	0,07	0,04	86,11	0,16	0,03	0,20
AUC_%EXTRAP_pred	%	1,98	0,91	0,37	14,12	4,35	1,45	2,90	6,55	3,27	150,68	13,74	0,37	14,12
Vz_F_pred	mL	316367,85	289571,70	128961,25	2228393,41	740823,55	302969,77	437853,78	995160,03	497580,01	134,33	2099432,16	128961,25	2228393,41
Cl_F_pred	mL/min	16093,17	18782,68	5118,68	30293,88	17572,10	17437,93	134,18	10337,38	5168,69	58,83	25175,20	5118,68	30293,88
AUMClast	min*min*ug/mL	1829,06	1833,06	10776,96	3393,60	4458,17	2613,33	1844,84	4276,44	2138,22	95,92	8947,90	1829,06	10776,96
AUMCINF_obs	min*min*ug/mL	1936,85	1881,82	10880,36	4316,21	4753,81	3126,53	1627,28	4239,09	2119,55	89,17	8998,54	1881,82	10880,36
AUMC_%Extrap_obs	%	5,57	2,59	0,95	21,38	7,62	4,08	3,54	9,37	4,68	122,92	20,43	0,95	21,38
AUMCINF_pred	min*min*ug/mL	1936,85	1881,82	10927,08	4562,68	4827,11	3249,77	1577,34	4254,72	2127,36	88,14	9045,26	1881,82	10927,08
AUMC_%Extrap_pred	%	5,57	2,59	1,37	25,62	8,79	4,08	4,71	11,36	5,68	129,27	24,25	1,37	25,62
MRTlast	min	37,54	36,58	55,37	149,63	69,78	46,45	23,33	53,93	26,97	77,29	113,06	36,58	149,63
MRTINF_obs	min	38,96	37,21	55,76	168,46	75,10	47,36	27,74	62,80	31,40	83,63	131,25	37,21	168,46
MRTINF_pred	min	38,96	37,21	55,93	172,78	76,22	47,45	28,77	64,92	32,46	85,18	135,57	37,21	172,78

Tab. 43: Pharmakokinetische Parameter über DFCR im Vergleich

Pharmakokinetik - DFCR														
		Pat1	Pat2	Pat3	Pat4	MW	Median	Schiefe	SD	Error	Vk	Range	Min	Max
HL_Lambda_z	min	25,5325	31,8355	50,2157	144,2702	62,96	41,03	21,94	55,21	27,60	87,68	118,74	25,53	144,27
Tmax	min	30	30	90	150	75,00	60,00	15,00	57,45	28,72	76,59	120,00	30,00	150,00
Cmax	ug/mL	6,2	7,2	4,07	2,08	4,89	5,14	-0,25	2,28	1,14	46,69	5,12	2,08	7,20
AUClast	min*ug/mL	314,9054	451,0335	391,1254	217,6875	343,69	353,02	-9,33	100,79	50,40	29,33	233,35	217,69	451,03
MRTlast	min	54,6681	70,225	67,2002	165,1039	89,30	68,71	20,59	50,98	25,49	57,09	110,44	54,67	165,10

Tab. 44: Pharmakokinetische Parameter über DFUR im Vergleich

Pharmakokinetik - DFUR														
		Pat1	Pat2	Pat3	Pat4	MW	Median	Schiefe	SD	Error	Vk	Range	Min	Max
HL_Lambda_z	min	39,8014	28,4502	nb	182,743	83,66	39,80	43,86	85,99	43,00	102,78	154,29	28,45	182,74
Tmax	min	30	30	nb	150	70,00	30,00	40,00	69,28	34,64	98,97	120,00	30,00	150,00
Cmax	ug/mL	9,72	9,33	nb	3,23	7,43	9,33	-1,90	3,64	1,82	49,01	6,49	3,23	9,72
AUClast	min*ug/mL	522,4884	497,1113	nb	415,5501	478,38	497,11	-18,73	55,87	27,94	11,68	106,94	415,55	522,49
MRTlast	min	56,8053	55,8386	nb	164,9433	92,53	56,81	35,72	62,71	31,36	67,78	109,10	55,84	164,94

Tab. 45: Pharmakokinetische Parameter über die Summen von Capecitabin und seiner Metaboliten

Pharmakokinetik - SUMME														
		Pat1	Pat2	Pat3	Pat4	MW	Median	Schiefe	SD	Error	Vk	Range	Min	Max
Rsq		0,9746	0,9844	0,9382	1	0,97	0,98	-0,01	0,03	0,01	2,69	0,06	0,94	1,00
Rsq_adjusted		0,9492	0,9765	0,9073	1	0,96	0,96	0,00	0,04	0,02	4,15	0,09	0,91	1,00
Corr_XY		-0,9872	-0,9921	-0,9686	-1	-0,99	-0,99	0,00	0,01	0,01	-1,35	0,03	-1,00	-0,97
No_points_lambda_z		3	4	4	2	3,25	3,50	-0,25	0,96	0,48	29,46	2,00	2,00	4,00
Lambda_z	l/min	0,021	0,0234	0,065	0,0106	0,03	0,02	0,01	0,02	0,01	79,95	0,05	0,01	0,07
Lambda_z_lower	min	60	60	90	180	97,50	75,00	22,50	56,79	28,39	58,25	120,00	60,00	180,00
Lambda_z_upper	min	120	150	360	300	232,50	225,00	7,50	115,87	57,93	49,83	240,00	120,00	360,00
HL_Lambda_z	min	33,0503	29,6652	10,6699	65,096	34,62	31,36	3,26	22,58	11,29	65,22	54,43	10,67	65,10
Tlag	min	0	0	0	30	7,50	0,00	7,50	15,00	7,50	200,00	30,00	0,00	30,00
Tmax	min	30	30	30	150	60,00	30,00	30,00	60,00	30,00	100,00	120,00	30,00	150,00
Cmax	ug/mL	17,52	18,24	7,25	5,49	12,13	12,39	-0,26	6,69	3,35	55,18	12,75	5,49	18,24
Cmax_D	ug/mL/mg	0,0219	0,0192	0,0073	0,0069	0,01	0,01	0,00	0,01	0,00	56,74	0,02	0,01	0,02
Tlast	min	180	300	180	240	225,00	210,00	15,00	57,45	28,72	25,53	120,00	180,00	300,00
Clast	ug/mL	0,14	0,13	0,02	2,84	0,78	0,14	0,65	1,37	0,69	175,43	2,82	0,02	2,84
AUClast	min*ug/mL	898,4691	1008,643	611,0006	657,3353	793,86	777,90	15,96	190,75	95,37	24,03	397,64	611,00	1008,64
AUCall	min*ug/mL	902,6691	1012,543	611,6006	742,5353	817,34	822,60	-5,27	176,36	88,18	21,58	400,94	611,60	1012,54
AUCINF_obs	min*ug/mL	905,1445	1014,2068	611,3085	924,0502	863,68	914,60	-50,92	174,85	87,42	20,24	402,90	611,31	1014,21
AUCINF_D_obs	min*ug/mL/mg	1,1314	1,0676	0,6113	1,1551	0,99	1,10	-0,11	0,26	0,13	25,83	0,54	0,61	1,16
AUC_%Extrap_obs	%	0,7375	0,5486	0,0504	28,8637	7,55	0,64	6,91	14,21	7,11	188,24	28,81	0,05	28,86
Vz_F_obs	mL	42142,665	40088,392	25181,079	81306,157	47179,57	41115,53	6064,04	23973,69	11986,84	50,81	56125,08	25181,08	81306,16
Cl_F_obs	mL/min	883,8367	936,6926	1635,8353	865,7538	1080,53	910,26	170,26	371,43	185,71	34,37	770,08	865,75	1635,84
AUCINF_pred	min*ug/mL	924,5324	1009,8911	611,3811	924,0502	867,46	924,29	-56,83	175,43	87,71	20,22	398,51	611,38	1009,89
AUCINF_D_pred	min*ug/mL/mg	1,1557	1,063	0,6114	1,1551	1,00	1,11	-0,11	0,26	0,13	26,12	0,54	0,61	1,16
AUC_%EXTRAP_pred	%	2,8191	0,1236	0,0622	28,8637	7,97	1,47	6,50	13,99	7,00	175,60	28,80	0,06	28,86
Vz_F_pred	mL	41258,916	40259,707	25178,087	81306,157	47000,72	40759,31	6241,41	24024,29	12012,15	51,11	56128,07	25178,09	81306,16
Cl_F_pred	mL/min	865,3023	940,6955	1635,6409	865,7538	1076,85	903,22	173,62	374,21	187,10	34,75	770,34	865,30	1635,64
AUMClast	min*min*ug/mL	50365,552	62817,704	39988,558	108176,29	65337,03	56591,63	8745,40	30045,74	15022,87	45,99	68187,73	39988,56	108176,29
AUMCINF_obs	min*min*ug/mL	51885,42	64724,933	40048,714	197236,07	88473,78	58305,18	30168,61	73205,05	36602,53	82,74	157187,36	40048,71	197236,07
AUMC_%Extrap_obs	%	2,9293	2,9467	0,1502	45,1539	12,80	2,94	9,86	21,61	10,81	168,91	45,00	0,15	45,15
AUMCINF_pred	min*min*ug/mL	56299,67	63245,52	40062,91	197236,07	89211,04	59772,59	29438,45	72668,91	36334,46	81,46	157173,16	40062,91	197236,07
AUMC_%Extrap_pred	%	10,5402	0,6764	0,1856	45,1539	14,14	5,61	8,53	21,22	10,61	150,08	44,97	0,19	45,15
MRTlast	min	56,0571	62,2794	65,4477	164,5679	87,09	63,86	23,22	51,80	25,90	59,48	108,51	56,06	164,57
MRTINF_obs	min	57,3228	63,8183	65,5131	213,4474	100,03	64,67	35,36	75,70	37,85	75,68	156,12	57,32	213,45
MRTINF_pred	min	60,8953	62,6261	65,5285	213,4474	100,62	64,08	36,55	75,24	37,62	74,77	152,55	60,90	213,45

Tab. 46: Pharmakokinetische Parameter über Erlotinib im Vergleich

Pharmakokinetik-Erlotinib														
		Pat1	Pat2	Pat3	Pat4	MW	Median	Schiefe	SD	Error	Vk	Range	Min	Max
Rsq		0,9809	0,9512	0,348	0,9917	0,82	0,97	-0,15	0,31	0,16	38,36	0,64	0,35	0,99
Rsq_adjusted		0,9771	0,9268	0,185	0,989	0,77	0,95	-0,18	0,39	0,20	50,76	0,80	0,19	0,99
Corr_XY		-0,9904	-0,9753	-0,5899	-0,9959	-0,89	-0,98	0,09	0,20	0,10	-22,40	0,41	-1,00	-0,59
No_points_lambda_z		7	4	6	5	5,50	5,50	0,00	1,29	0,65	23,47	3,00	4,00	7,00
Lambda_z	l/min	0,0978	0,0785	0,0145	0,0862	0,07	0,08	-0,01	0,04	0,02	53,94	0,08	0,01	0,10
Lambda_z_lower	min	2	5	3	4	3,50	3,50	0,00	1,29	0,65	36,89	3,00	2,00	5,00
Lambda_z_upper	min	24	24	24	24	24,00	24,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	24,00	24,00
HL_Lambda_z	min	7,0851	8,8308	47,9575	8,0403	17,98	8,44	9,54	20,00	10,00	111,24	40,87	7,09	47,96
Tlag	min	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00
Tmax	min	1	2	1	3	1,75	1,50	0,25	0,96	0,48	54,71	2,00	1,00	3,00
Cmax	ug/mL	1,93	4,76	2,94	1,28	2,73	2,44	0,29	1,52	0,76	55,63	3,48	1,28	4,76
Cmax_D	ug/mL/mg	0,0193	0,0476	0,0294	0,0128	0,03	0,02	0,00	0,02	0,01	55,63	0,03	0,01	0,05
Tlast	min	24	24	24	24	24,00	24,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	24,00	24,00
Clast	ug/mL	0,11	0,63	1,46	0,18	0,60	0,41	0,19	0,62	0,31	104,37	1,35	0,11	1,46
AUClast	min*ug/mL	10,885	51,18	40,515	12,76	28,84	26,64	2,20	20,14	10,07	69,83	40,30	10,89	51,18
AUCall	min*ug/mL	10,885	51,18	40,515	12,76	28,84	26,64	2,20	20,14	10,07	69,83	40,30	10,89	51,18
AUCINF_obs	min*ug/mL	12,0094	59,2063	141,53	14,848	56,90	37,03	19,87	60,42	30,21	106,19	129,52	12,01	141,53
AUCINF_D_obs	min*ug/mL/mg	0,1201	0,5921	1,4153	0,1485	0,57	0,37	0,20	0,60	0,30	106,18	1,30	0,12	1,42
AUC_%Extrap_obs	%	9,3625	13,5564	71,3735	14,0622	27,09	13,81	13,28	29,60	14,80	109,26	62,01	9,36	71,37
Vz_F_obs	mL	85113,6	21518,2	48885,9	78123,5	58410,31	63504,72	-5094,40	29174,32	14587,16	49,95	63595,48	21518,17	85113,65
Cl_F_obs	mL/min	8326,83	1689,01	706,567	6734,93	4364,33	4211,97	152,36	3735,31	1867,66	85,59	7620,26	706,57	8326,83
AUCINF_pred	min*ug/mL	11,9518	59,4778	138,371	14,8082	56,15	37,14	19,01	58,97	29,49	105,03	126,42	11,95	138,37
AUCINF_D_pred	min*ug/mL/mg	0,1195	0,5948	1,3837	0,1481	0,56	0,37	0,19	0,59	0,29	105,02	1,26	0,12	1,38
AUC_%EXTRAP_pred	%	8,9256	13,951	70,7201	13,8315	26,86	13,89	12,97	29,34	14,67	109,23	61,79	8,93	70,72
Vz_F_pred	mL	85524	21420	50001,7	78333,2	58819,72	64167,48	-5347,76	29271,11	14635,55	49,76	64104,01	21419,95	85523,96
Cl_F_pred	mL/min	8366,97	1681,3	722,694	6753,01	4380,99	4217,16	163,84	3749,93	1874,97	85,60	7644,27	722,69	8366,97
AUMClast	min*min*ug/mL	70,59	395,82	443,02	103,26	253,17	249,54	3,63	193,39	96,70	76,39	372,43	70,59	443,02
AUMCINF_obs	min*min*ug/mL	109,068	690,706	9856,36	177,591	2708,43	434,15	2274,28	4772,35	2386,17	176,20	9747,29	109,07	9856,36
AUMC_%Extrap_obs	%	35,2789	42,6934	95,5052	41,855	53,83	42,27	11,56	27,98	13,99	51,97	60,23	35,28	95,51
AUMCINF_pred	min*min*ug/mL	107,096	700,681	9562,05	176,176	2636,50	438,43	2198,07	4624,63	2312,32	175,41	9454,95	107,10	9562,05
AUMC_%Extrap_pred	%	34,0874	43,5092	95,3669	41,388	53,59	42,45	11,14	28,14	14,07	52,52	61,28	34,09	95,37
MRTlast	min	6,4851	7,7339	10,9347	8,0925	8,31	7,91	0,40	1,88	0,94	22,61	4,45	6,49	10,93
MRTINF_obs	min	9,0819	11,6661	69,6417	11,9606	25,59	11,81	13,77	29,40	14,70	114,89	60,56	9,08	69,64
MRTINF_pred	min	8,9607	11,7805	69,1043	11,8972	25,44	11,84	13,60	29,14	14,57	114,58	60,14	8,96	69,10

Tab. 47: Pharmakokinetische Parameter über OSI420 im Vergleich

Pharmakokinetik-OSI														
		Pat1	Pat2	Pat3	Pat4	MW	Median	Schiefe	SD	Error	Vk	Range	Min	Max
HL_Lambda_z	min	7,4069	6,8484	4,8188	3,9791	5,76	5,83	-0,07	1,63	0,81	28,25	3,43	3,98	7,41
Tmax	min	1	2	6	3	3,00	2,50	0,50	2,16	1,08	72,01	5,00	1,00	6,00
Cmax	ug/mL	0,14	0,23	0,24	0,06	0,17	0,19	-0,02	0,08	0,04	50,51	0,18	0,06	0,24
AUClast	min*ug/mL	0,725	2,36	1,46	0,31	1,21	1,09	0,12	0,90	0,45	74,15	2,05	0,31	2,36
MRTlast	min	6,3724	7,2966	4,2945	4,4194	5,60	5,40	0,20	1,48	0,74	26,45	3,00	4,29	7,30

Tab. 48: Pharmakokinetische Parameter über Erlotinib und OSI420 im Vergleich

Pharmakokinetik-Summe														
		Pat1	Pat2	Pat3	Pat4	MW	Median	Schiefe	SD	Error	Vk	Range	Min	Max
Rsq		0,9801	0,9509	0,4364	0,9917	0,84	0,97	-0,13	0,27	0,13	32,09	0,56	0,44	0,99
Rsq_adjusted		0,9761	0,9264	-0,1273	0,9889	0,69	0,95	-0,26	0,55	0,27	79,04	1,12	-0,13	0,99
Corr_XY		-0,99	-0,9752	-0,6606	-0,9958	-0,91	-0,98	0,08	0,16	0,08	-18,05	0,34	-1,00	-0,66
No_points_lambda_z		7	4	3	5	4,75	4,50	0,25	1,71	0,85	35,95	4,00	3,00	7,00
Lambda_z	l/min	0,1017	0,0785	0,0121	0,0891	0,07	0,08	-0,01	0,04	0,02	56,82	0,09	0,01	0,10
Lambda_z_lower	min	2	5	6	4	4,25	4,50	-0,25	1,71	0,85	40,18	4,00	2,00	6,00
Lambda_z_upper	min	24	24	24	24	24,00	24,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	24,00	24,00
HL_Lambda_z	min	6,8182	8,8296	57,1574	7,7779	20,15	8,30	11,84	24,69	12,34	122,55	50,34	6,82	57,16
Tlag	min	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	#DIV/0!	0,00	0,00	0,00
Tmax	min	1	2	2	3	2,00	2,00	0,00	0,82	0,41	40,82	2,00	1,00	3,00
Cmax	ug/mL	2,08	4,99	3,16	1,34	2,89	2,62	0,27	1,59	0,79	54,81	3,65	1,34	4,99
Cmax_D	ug/mL/mg	0,0208	0,0499	0,0316	0,0134	0,03	0,03	0,00	0,02	0,01	54,81	0,04	0,01	0,05
Tlast	min	24	24	24	24	24,00	24,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	24,00	24,00
Clast	ug/mL	0,11	0,66	1,69	0,18	0,66	0,42	0,24	0,73	0,36	110,44	1,58	0,11	1,69
AUClast	min*ug/mL	11,62	53,63	45,255	13,33	30,96	29,29	1,67	21,63	10,81	69,86	42,01	11,62	53,63
AUCall	min*ug/mL	11,62	53,63	45,255	13,33	30,96	29,29	1,67	21,63	10,81	69,86	42,01	11,62	53,63
AUCINF_obs	min*ug/mL	12,702	62,0373	184,614	15,3498	68,68	38,69	29,98	80,54	40,27	117,28	171,91	12,70	184,61
AUCINF_D_obs	min*ug/mL/mg	0,127	0,6204	1,8461	0,1535	0,69	0,39	0,30	0,81	0,40	117,28	1,72	0,13	1,85
AUC_%Extrap_obs	%	8,5186	13,552	75,4866	13,1585	27,68	13,36	14,32	31,95	15,98	115,44	66,97	8,52	75,49
Vz_F_obs	mL	77441,6	20533,4	44666,7	73102,7	53936,08	58884,68	-4948,60	26592,81	13296,40	49,30	56908,22	20533,37	77441,59
Cl_F_obs	mL/min	7872,76	1611,93	541,672	6514,74	4135,28	4063,34	71,94	3601,47	1800,74	87,09	7331,08	541,67	7872,76
AUCINF_pred	min*ug/mL	12,6431	62,3225	182,413	15,3103	68,17	38,82	29,36	79,50	39,75	116,62	169,77	12,64	182,41
AUCINF_D_pred	min*ug/mL/mg	0,1264	0,6232	1,8241	0,1531	0,68	0,39	0,29	0,80	0,40	116,63	1,70	0,13	1,82
AUC_%EXTRAP_pred	%	8,0925	13,9476	75,191	12,9343	27,54	13,44	14,10	31,87	15,93	115,71	67,10	8,09	75,19
Vz_F_pred	mL	77802,3	20439,4	45205,4	73291,4	54184,64	59248,43	-5063,79	26722,22	13361,11	49,32	57362,90	20439,40	77802,30
Cl_F_pred	mL/min	7909,43	1604,56	548,205	6531,56	4148,44	4068,06	80,38	3617,43	1808,71	87,20	7361,22	548,21	7909,43
AUMClast	min*min*ug/mL	73,98	414,99	504,97	106,61	275,14	260,80	14,34	216,99	108,49	78,86	430,99	73,98	504,97
AUMCINF_obs	min*min*ug/mL	110,592	723,861	15341,2	177,75	4088,35	450,81	3637,54	7506,92	3753,46	183,62	15230,60	110,59	15341,20
AUMC_%Extrap_obs	%	33,1057	42,6699	96,7084	40,0224	53,13	41,35	11,78	29,33	14,67	55,21	63,60	33,11	96,71
AUMCINF_pred	min*min*ug/mL	108,6	734,339	15107	176,358	4031,56	455,35	3576,21	7388,92	3694,46	183,28	14998,36	108,60	15106,96
AUMC_%Extrap_pred	%	31,8783	43,4879	96,6574	39,549	52,89	41,52	11,37	29,57	14,79	55,91	64,78	31,88	96,66
MRTlast	min	6,3666	7,738	11,1583	7,9977	8,32	7,87	0,45	2,03	1,01	24,37	4,79	6,37	11,16
MRTINF_obs	min	8,7067	11,6682	83,0989	11,5799	28,76	11,62	17,14	36,25	18,12	126,03	74,39	8,71	83,10
MRTINF_pred	min	8,5896	11,7829	82,8171	11,5189	28,68	11,65	17,03	36,12	18,06	125,96	74,23	8,59	82,82

4.5. Oxidativer Stress

Tab. 49: Oxidativer Stress und Antioxidative Kapazität im Vergleich

	Patient 1		Patient 2		Patient 3		Patient 4	
AOK	0,25		0,25		0,66		0,95	
	CCB	Erlotinib	CCB	Erlotinib	CCB	Erlotinib	CCB	Erlotinib
t[h]	OS [FORT]	OS [FORT]						
0	481,6	646,4	660,8	646,4	827,2	942,4	510,4	489,6
0,5			792		878,4		459,2	
1		668,8		660,8		792		424
6	387,2	524,8	496	625,6	683,2	747,2	438,4	416
24		603,2		625,6		755,2		444,8
48		654,4		675,2		683,2		488
72				726,4		820,8		480
96		596,8		582,4		697,6		488
120		603,2						
144		625,6						
168		784						
Statistik								
Mittelwert	434,40	634,13	649,60	648,91	796,27	776,91	469,33	461,49
Median	434,40	625,60	660,80	646,40	827,20	755,20	459,20	480,00
Schiefe	0,00	8,53	-11,20	2,51	-30,93	21,71	10,13	-18,51
Standardabweichung	66,75	70,32	148,32	45,38	101,21	87,53	37,05	32,38
Standard Error	47,20	23,44	85,63	17,15	58,43	33,08	21,39	12,24
Variationskoeffizient	15,37	11,09	22,83	6,99	12,71	11,27	7,90	7,02
Range	94,40	259,20	296,00	144,00	195,20	259,20	72,00	73,60
Minimum	387,20	524,80	496,00	582,40	683,20	683,20	438,40	416,00
Maximum	481,60	784,00	792,00	726,40	878,40	942,40	510,40	489,60
t-test student	0,0000000018		0,0000000010		0,0000002103		0,0000000010	

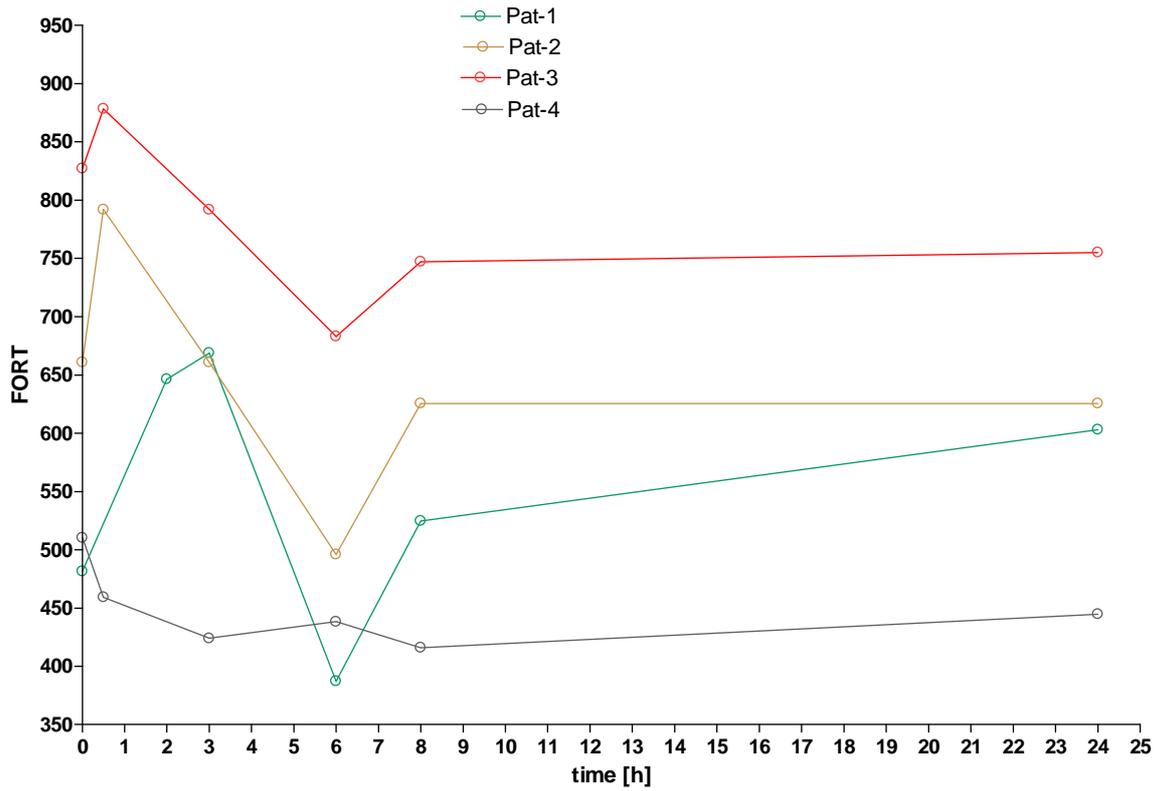


Abb. 41: Oxidativer Stress im Verlauf des ersten Tages im Patientenvergleich

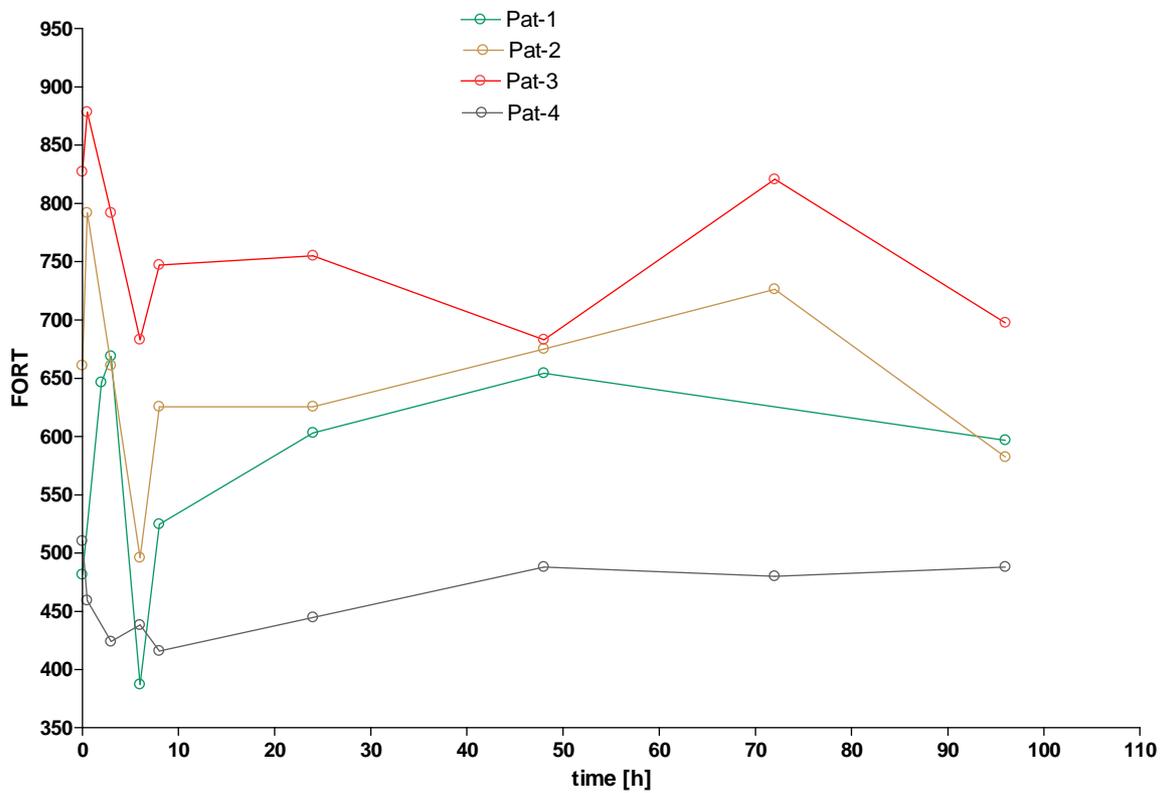


Abb. 42: Oxidativer Stress im Verlauf der Therapie im Patientenvergleich

5. DISKUSSION

In der vorliegenden Diplomarbeit wurden im Rahmen einer klinischen Prüfung die Daten von 4 Patienten mit metastasierendem Pankreaskarzinom ausgewertet. Mittels HPLC wurden Capecitabin sowie seine beiden Hauptmetaboliten DFCR und DFUR (die Präkursoren des zytotoxischen Agens 5-Fluorouracil) im Blut quantifiziert und die Pharmakokinetik mittels Nonkompartiment-Modell berechnet.

Gleichzeitig wurde die Plasmakonzentration von Erlotinib und seinem Hauptmetaboliten OSI420 erfasst und ebenfalls pharmakokinetisch ausgewertet.

Weiters wurde in den Blutproben der Patienten das Auftreten freier Hydroxylradikale (als R-OH*) sowie die Antioxidative Kapazität erfasst.

Dieses komplette Monitoring bietet einen sehr genauen Einblick in das pharmakokinetische Schicksal der verabreichten Arzneistoffe im Körper der Patienten.

Capecitabin und seine Metaboliten

Tab. 50: Wichtige pharmakokinetische Parameter von Capecitabin und seiner Metaboliten im Vergleich

	Capecitabin		DFCR		DFUR	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
t_{\max} [min]	52,50	45,00	75,00	57,45	70,00	69,28
c_{\max} [$\mu\text{g/ml}$]	1,75	1,34	4,89	2,28	7,43	3,64
AUC ₀₋₃₆₀ [min* $\mu\text{g/ml}$]	79,04	78,09	343,69	100,79	478,38	55,87
$t_{1/2 \lambda z}$ [min]	23,19	18,74	62,96	55,21	83,66	85,99
MRT _{last} [min]	69,78	53,93	89,30	50,98	92,53	62,71
Vd _{obs} [l]	757,95	1029,19	nc	nc	nc	nc
Cl _{tot obs} [l/min]	17,80	10,71	nc	nc	nc	nc

Capecitabin

Capecitabin wird ohne Verzögerungszeit (t-lag) rasch aus dem Darm resorbiert, die maximale Konzentration wird nach rund 50 Minuten erreicht, wobei aber eine Inhomogenität der Resorptionsrate zu beobachten ist: Range von 30 bis 120 Minuten. Patient 4 ist für diese große Streuung verantwortlich. Die Maximalkonzentration von 1,75 $\mu\text{g/ml}$ entspricht bei einer Dosis von 500 mg/m^2 den zur Verfügung

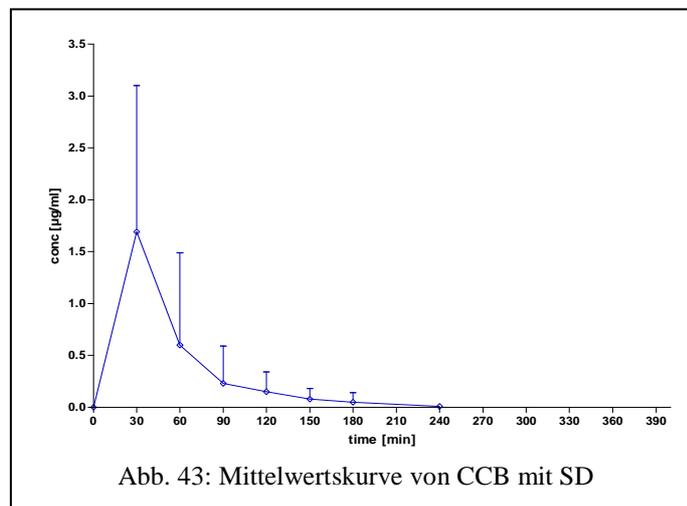


Abb. 43: Mittelwertskurve von CCB mit SD

stehenden Daten. Die Elimination von Capecitabin aus dem Blut verläuft mit einer mittleren $t_{1/2el}$ von 30 Minuten rasch, das unter anderem auf die intensive Metabolisierung von Capecitabin in DFCR zurückzuführen ist. Nach 300 Minuten wird das LOQ von Capecitabin erreicht, d.h. Capecitabin ist in den Blutproben nicht mehr quantifizierbar. Dies ist vor allem durch die niedrige Dosis bedingt.

Entsprechend hoch sind das Verteilungsvolumen mit 757 Litern und die Gesamtclearance von 18 l/min. Beide Parameter weisen auf einen exzessive Verteilung und Metabolisierung hin.

DFCR

Der erste Capecitabin-Metabolit DFCR wird durch die Carboxylesterase sehr rasch gebildet und liegt bereits innerhalb von durchschnittlich 75 Minuten in seiner Maximalkonzentration im Blut vor. Das c_{max} liegt bei etwa 5 $\mu\text{g/ml}$. Dies entspricht circa der zweieinhalbfachen der Maximalkonzentration von Capecitabin. Diese intensive Metabolisierungsrate von Capecitabin in DFCR erklärt das hohe Verteilungsvolumen des Arzneistoffs und ist weiters für die anschließende Biotransformation von DFCR in DFUR essentiell.

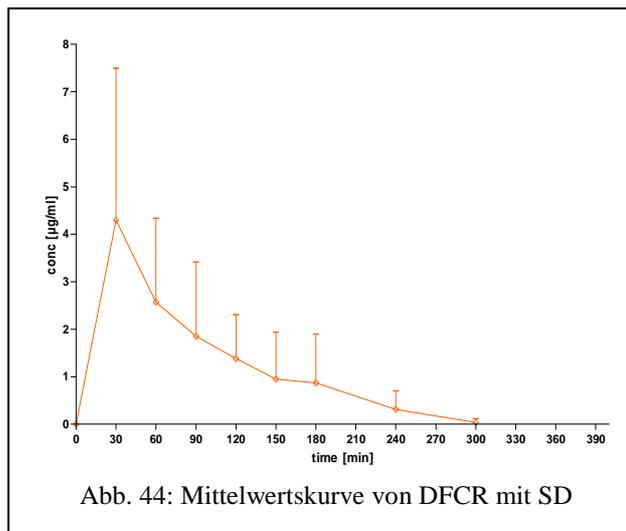


Abb. 44: Mittelwertskurve von DFCR mit SD

Bezogen auf die Verfügbarkeit beträgt die AUC_{0-360} von DFCR das über vierfache der AUC von Capecitabin – dies spricht für eine sehr intensive Metabolisierung. Die geringe Spezifität des hierfür verantwortlichen Enzyms Carboxylesterase (Isoenzym hCES2) ist für die exzessive Metabolisierungsrate von Capecitabin verantwortlich. DFCR wird aus dem Blut deutlich langsamer eliminiert als Capecitabin, seine durchschnittliche $t_{1/2el}$ beträgt etwa 65 Minuten. 5 Stunden nach Capecitabin Gabe sind in allen Blutproben noch deutliche DFCR Konzentrationen messbar.

DFUR

Der zweite sequentielle Capecitabin-Metabolit DFUR wird ebenfalls sehr rasch aus DFCR gebildet und erreicht seine Maximalkonzentration im Blut innerhalb von 75 Minuten. Das c_{max} liegt durchschnittlichen bei 7 $\mu\text{g/ml}$, das circa dem 1.5 fachen der c_{max} von DFCR und in etwa dem 4 fachen der c_{max} des Arzneistoff entspricht. Es liegt also deutlich über den Maximalkonzentrationen von Capecitabin und DFCR. Die AUC_{0-360} von DFUR beträgt rund das 1.4 fache

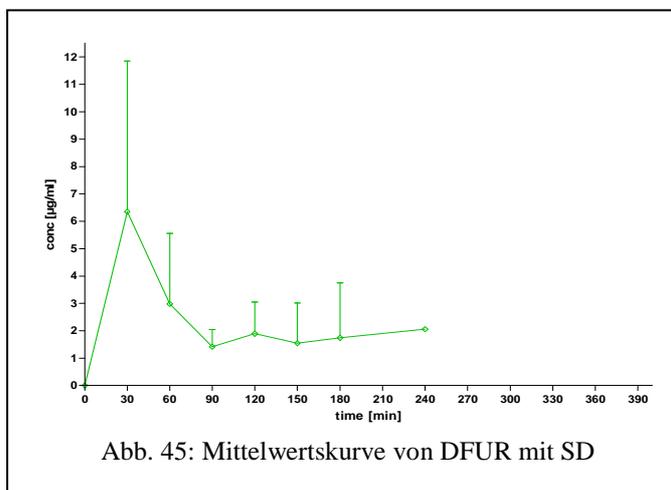


Abb. 45: Mittelwertskurve von DFUR mit SD

von DFUR und das 6 fache von Capecitabin. Die Elimination aus dem Blut (inklusive Gewebsverteilung und Metabolisierung) ist mit 80 Minuten langsamer als bei DFUR. Dies ist jedoch logisch, da ja DFUR erst aus DFUR gebildet werden muss.

Diese hohen Plasmakonzentrationen von DFUR stellen die Grundlage für eine Chemotherapie mit Capecitabin dar, denn nur eine ausreichend Metabolisierungsrate ist ein Garant dafür, dass intrazellulär entsprechend viel 5-Fluorouracil gebildet werden kann.

Wie aus der mittleren Konzentrationszeitkurve ersichtlich, verläuft die $t_{1/2el}$ zwischen 90 bis 240 Minuten eher atypisch, denn es ist eher ein Anstieg der Plasmakonzentration von DFUR ersichtlich als ein Abfall.

Generell sei angemerkt, dass das vorliegende Kollektiv organspezifisch bereits eingeschränkt funktionstüchtig ist (metastasierendes Pankreaskarzinom) und daher die Metabolisierung sowie Verteilungs- und Eliminationsprozesse variabel sind – daher resultiert auch eine größere Streuung der Daten.

Apparent formation rate

In der Tabelle rechts sind die „apparent formation rates“ von DFUR und DFUR angeführt. Sie beschreiben die scheinbare Enzymaktivität und stellen so ein Merkmal für die Metabolisierungskapazität der beteiligten Enzyme dar. Die Carboxylesterase weist eine hohe Aktivität auf, womit sich die rasche Metabolisierung von DFUR aus Capecitabin erklären lässt.

	MW	SD
K_{app-CE}	0,23	0,19
K_{app-CD}	0,65	0,24

Die große Streuung ist auf den Patienten 3 zurückzuführen, der sich mit einer scheinbaren Enzymaktivität von circa 0,5 weit über den Werten der anderen Patienten befindet. Weiters sei angemerkt, dass die Enzymaktivitäten bei Patient 4 besonders ausgeprägt sind. Die Metabolisierungskapazität der humanen Carboxylesterase beträgt in etwa das 3 fache der Cytidindesaminase-Kapazität.

Vergleich verschiedener Dosen

In Tabelle 52 sind die wichtigsten pharmakokinetische Parameter bei hoher Capecitabin Dosis (2500 mg/m²) einer niedrigen Dosierung des Arzneistoffs (1000 mg/m²) gegenübergestellt. Die unterschiedlichen c_{max} -Werte ergeben sich aus den unterschiedlichen Dosierungen, wobei allerdings auffällt, dass die Konzentrationsmaxima von CCB noch um den Faktor 5, bei DFUR nur mehr um den Faktor 2 differieren. Bis auf das t_{max} von DFUR, welches bedingt durch den Patien-

	CCB		DFUR		DFUR	
	Low	High	Low	High	Low	High
c_{max} [μ g/min]	1,75 (1,3)	8,68 (4,7)	4,89 (2,3)	7,05 (4,0)	7,43 (3,6)	14,12 (5,1)
t_{max} [min]	52 (45)	51 (31)	75 (57,5)	64 (33)	70 (69,3)	73 (44)
$t_{1/2\lambda z}$ [min]	23,19 (18,7)	28 (12)	62,96 (55,2)	61 (39)	83,66 (86,0)	49 (31)
V_z [l]	757,95 (1022,2)	259 (218)	nc	nc	nc	nc
Cl_{tot} [l/min]	17,8 (10,7)	6,24 (3,5)	nc	nc	nc	nc

ten 4 einen höheren Wert aufweist, werden die Maximalkonzentrationen im Blut in beiden Gruppen in etwa zur gleichen Zeit erreicht. Bei den Eliminationshalbwertszeiten lässt sich hingegen eine große Streuung erkennen, welche durch die unterschiedlichen Metabolisierungsraten der einzelnen Patienten verursacht wird. Für das fast dreimal so hohe Verteilungsvolumen in der Gruppe der niedrigen Dosierung ist der Patient 4 mit seiner hohen Metabolisierungsrate verantwortlich. Bezieht man den Patient 4 nicht in die Berechnung des mittleren Verteilungsvolumens ein, so erhält man ein mittleres Verteilungsvolumen von circa 245 l, welches mit dem Wert der Gruppe der hohen Dosierung vergleichbar ist. Die Clearance des niedrigeren Dosislevels ist in etwa um den Faktor 3 höher, dies deutet auf eine exzessivere Metabolisierung hin. Vergleicht man die apparent formation rate der beiden Gruppen miteinander erkennt man, dass im höheren Dosislevel weit höhere Werte zu finden sind, so ist die K_{app-CE} in etwa um das 6-fache und die K_{app-CD} circa um das 3-fache höher. Die

Tab. 53: apparent formation rate im Vergleich

	MW low	MW high
K_{app-CE}	0,23	1,4
K_{app-CD}	0,65	2,0

apparent formation rate verhält sich indirekt proportional zur Enzymaktivität, d.h.: Mit steigenden K_{app} -Werten nimmt die Metabolisierungsrate ab. Es fällt auf, dass die Kapazität der humanen Carboxylesterase die der Cytidineaminase übertrifft.

Erlotinib und OSI

Tab. 54: Wichtige pharmakokinetische Parameter von Erlotinib und seinem Hauptmetaboliten OSI420 im Vergleich

	Erlotinib		OSI420	
	MW	SD	MW	SD
t_{max} [h]	1,75	0,96	3,00	2,16
c_{max} [$\mu\text{g/ml}$]	2,73	1,52	0,17	0,08
AUC ₀₋₄₈₀ [$\text{h} \cdot \mu\text{g/ml}$]	28,84	20,14	1,21	0,90
$t_{1/2 \lambda z}$ [h]	17,98	20,00	5,76	1,63
MRT _{last} [h]	8,31	1,88	5,60	1,48
Vd _{obs} [l]	58,41	29,17		
Cl _{tot obs} [l/h]	4,36	3,73		

Erlotinib

Die Resorption von Erlotinib erfolgt ohne Verzögerungszeit aus dem Darm, wobei der Arzneistoff seine maximale Plasmakonzentration nach etwa 1,8 Stunden erreicht. Die Maximalkonzentration von durchschnittlich 2,73 $\mu\text{g/ml}$ liegt lediglich um 14 % über den Angaben in der Literatur, wobei Patient 2 mit einer c_{max} von 4,8 $\mu\text{g/ml}$ wesentlich zu dieser Abweichung beiträgt.

Die Eliminationshalbwertszeit von Erlotinib beträgt im Mittel 17,98 Stunden. Hier ist anzumerken, dass Patient 3 mit einer $t_{1/2\lambda z}$ von ungefähr 48 Stunden nicht nur die Werte der anderen Patienten, sondern auch jene Daten die in der Literatur angeführt werden weit übersteigt. Die generell eher langsamere Elimination von Erlotinib kann mit der hohen Plasmaproteinbindung von ca. 95% erklärt werden. Beim Verteilungsvolumen zeigt sich eine große Streuung, im Durchschnitt beträgt es rund 58,4 Liter. Die Clearance von 4,4 l/h entspricht den zur Verfügung stehenden Literatur-Daten.

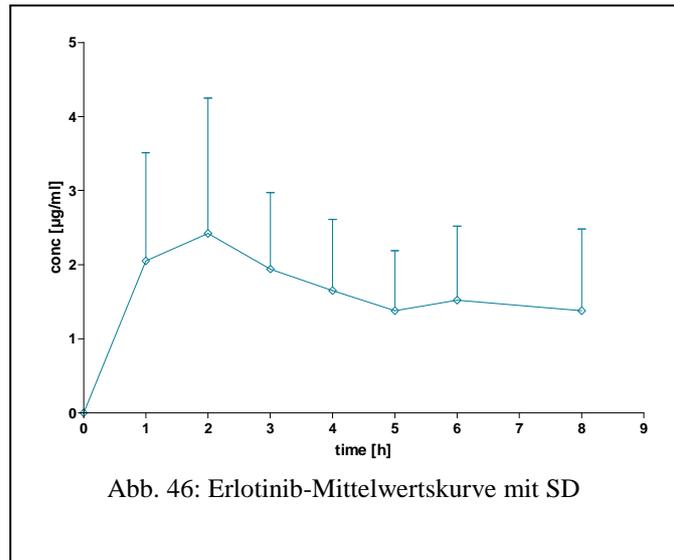


Abb. 46: Erlotinib-Mittelwertskurve mit SD

OSI420

Erlotinib unterliegt einer intensiven Metabolisierung, die hauptsächlich in der Leber stattfindet und maßgeblich von CYP3A4 bestimmt wird. Bisher konnten 14 verschiedene Metaboliten ausgemacht werden, wobei OSI420 durch Demetylierung entsteht und ähnliche pharmakologische Eigenschaften wie Erlotinib aufweist. Die maximale Plasmakonzentration wird nach etwa 3 Stunden erreicht und beträgt 0,17 µg/ml.

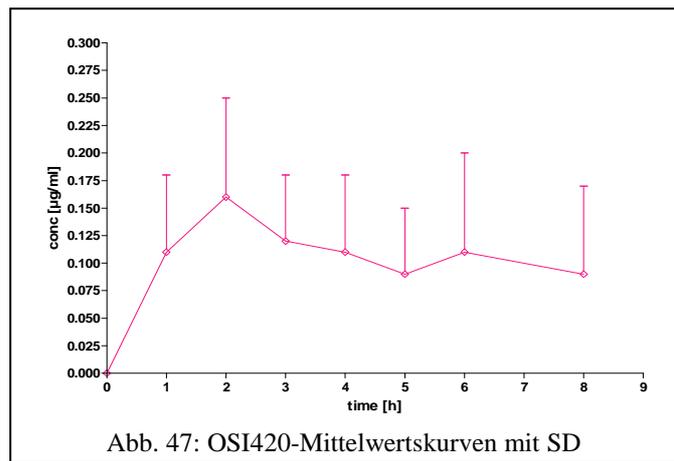


Abb. 47: OSI420-Mittelwertskurven mit SD

Die AUC_{0-480} von Erlotinib beträgt rund das 24 fache der AUC_{0-480} von OSI420. Der große Unterschied zwischen den beiden AUC_{0-480} Werten ergibt sich aus der Tatsache, dass lediglich 5 % des Arzneistoffs in den OSI420 umgewandelt werden und alle anderen Metaboliten nicht zu Auswertung herangezogen wurden. OSI420 weist eine durchschnittliche Eliminationshalbwertszeit von 5,8 Stunden auf, seine Elimination aus dem Blut erfolgt somit deutlich rascher als die von Erlotinib.

Apparent formation rate

In der Tabelle links ist die apparent formation rate von OSI420 angeführt. Sie beschreibt die scheinbare Enzymaktivität von CYP3A4 und stellt so ein Maß für die Metabolisierungskapazität des Enzyms dar. Wie erwartet weist CYP3A4 nur eine geringe Aktivität für die Metabolisierung zu OSI420 auf, welche auch in den niedrigen AUC_{0-480} von OSI420 zum Ausdruck kommt. Nur Patient 3 zeigt mit einer K_{app} von 7,3 eine deutlich höhere Metabolisierungsrate im Vergleich zu den anderen Patienten.

Tab. 55: „apparent formation rate“		
	MW	SD
K_{app}	16,13	7,05

Oxidativer Stress und Antioxidative Kapazität

Prinzipiell sind die Radikalwerte (als FORT = Wasserstoffperoxid-Äquivalente) bei allen Patienten sehr hoch. Als oberer Grenzwert gelten maximal 350 FORT bei einem gesunden jungen Menschen. Die gemessenen Werte liegen durchwegs über diesem Grenzwert und reichen bis über 800 FORT. Interessanter Weise gehen die FORT Werte mit der Einnahme von Erlotinib parallel.

Für diese hohen Werte gibt es prinzipiell verschiedene Ursachen:

- durch den Tumor bedingt – über Signalproteine und Hormone
- durch den Arzneistoff bedingt – bei hohem oxidativen Stoffwechsel (CYP450 System)
- durch andere Therapien wie Bestrahlung bedingt

Passend zu den hohen Radikalwerten weisen alle Patienten eine sehr geringe Antioxidative Kapazität auf. Die Werte der Patienten befinden sich außerhalb des Referenzbereichs von 1,07 - 1,53 mmol/l Trolox-Äquivalente, bei Patient 1 und 2 liegen sie sogar unterhalb der Nachweisgrenze des Geräts (LOQ).

Patient 1

Die Antioxidative Kapazität des Patienten 1 beträgt unter 0,25 mmol/l und liegt somit unter dem erfassbaren Bereich des Geräts. Vor Beginn der Kombinationstherapie, bestehend aus Capecitabin, Erlotinib und Bevacizumab, liegt der Radikalwert des Patienten bei 482 FORT. Nach Capecitabin Gabe lässt sich ein deutlicher Anstieg im Kurvenverlauf beobachten. Innerhalb der ersten 10 Stunden erreicht der oxidative Stress sein Maximum mit 669 FORT nach 3 Stunden, genau zu dem Zeitpunkt an dem die höchsten Erlotinib-Konzentrationen in den Plasmaproben ausgemacht werden können. Danach sinkt der Radikalwert auf sein Minimum von 387 FORT und liegt damit unterhalb des Ausgangswerts.

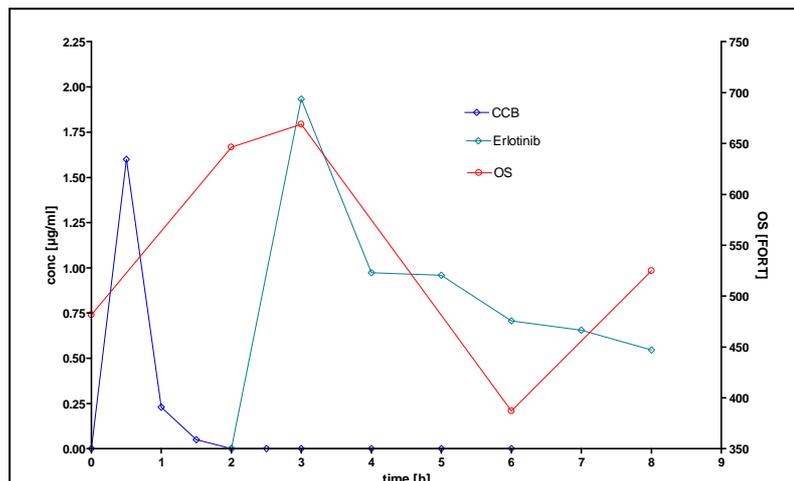


Abb. 48: Oxidativer Stress im Verlauf der Therapie (0-9 h)

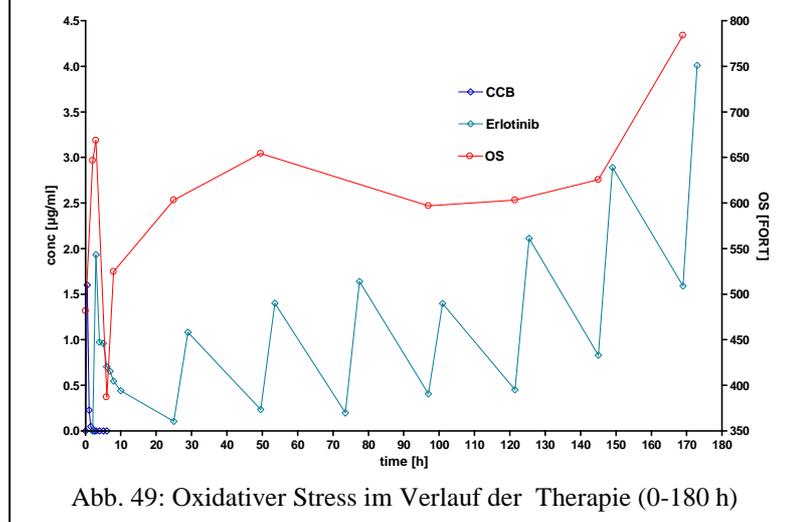


Abb. 49: Oxidativer Stress im Verlauf der Therapie (0-180 h)

Im weiteren Verlauf der Therapie lässt sich parallel zu der steigenden Erlotinib Konzentration auch ein Anstieg des Radikalwerts erkennen, der nach 169 Stunden den Höchstwert von 784 FORT erreicht. Dieser Wert liegt weit über dem Radikalwert, der vor Beginn der Therapie bestimmt wurde. Generell zeigt sich bei diesem Patienten ein direkt proportionaler Zusammenhang zwischen oxidativer Belastung und Erlotinib-Konzentration.

Patient 2

So wie Patient 1 weist auch Patient 2 eine äußerst geringe antioxidative Kapazität auf, sie befindet sich unter 0,25 mmol/l. Dementsprechend hoch ist auch der Radikalwert mit 661 FORT vor Therapiebeginn. Mit steigender Capecitabin-Konzentration im Blut erhöht sich auch der Radikalwert des Patienten und findet sein Maximum mit 792 FORT nach 30 Minuten. Anschließend lässt sich ein Abfall der Stress-Kurve beobachten, die ihr Minimum bei 496 FORT nach 6 Stunden erreicht. Dieser Senkung steht eine Erhöhung der Erlotinib-Konzentrationen in den Plasmaproben gegenüber. Nach Erlangen des Minimums wird die Kurve zuerst durch einen raschen Anstieg geprägt, der dann in eine langsamere, aber stetige Zunahme des Radikalwerts übergeht.

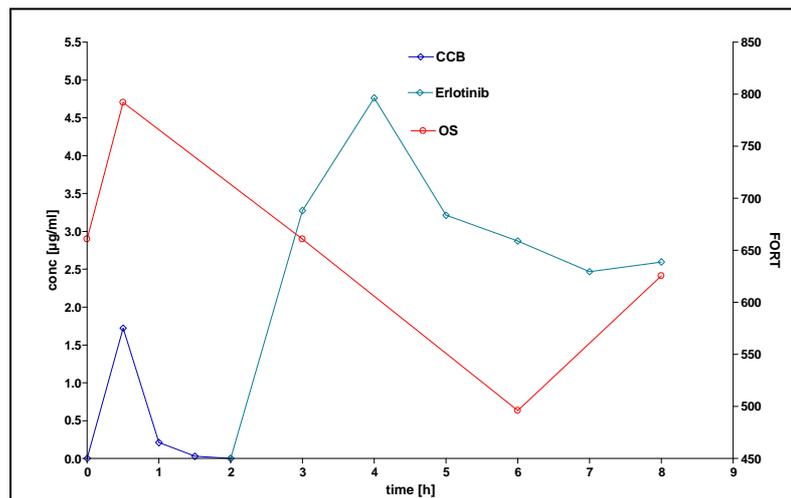


Abb. 50: Oxidativer Stress im Verlauf der Therapie (0-9 h)

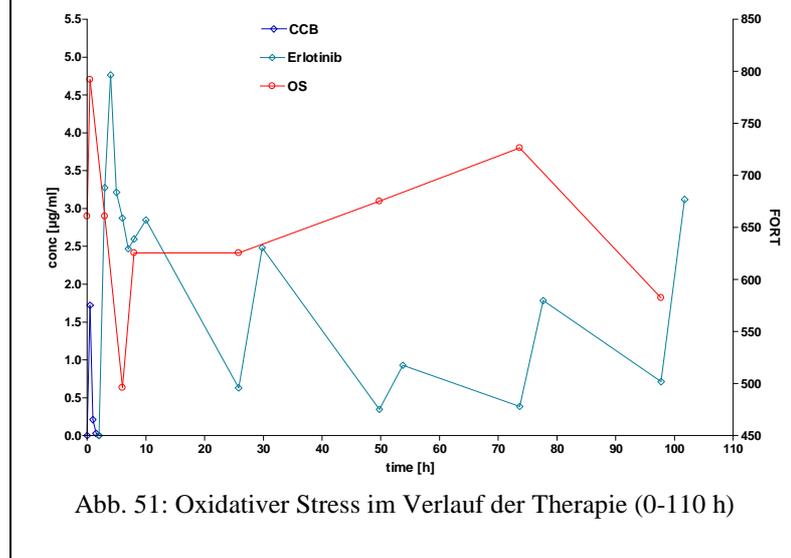


Abb. 51: Oxidativer Stress im Verlauf der Therapie (0-110 h)

Die zum jeweiligen gleichen Zeitpunkt gemessenen Erlotinib-Konzentrationen befinden sich interessanter Weise in dem relativ niedrigem Bereich von 0,3 - 0,6 µg/ml. Nach 96 Stunden kann man allerdings wieder einen deutlichen Abfall der Stress-Kurve erkennen, der nicht mit einem markanten Anstieg der Erlotinib-Konzentration einhergeht. Insgesamt betrachtet lässt sich bezogen auf den Radikalwert vor Beginn der Therapie eine leichte Abnahme der oxidativen Belastung des Organismus feststellen. Bei Patient 2 ist ein Zusammenhang zwischen der Senkung des oxidativen Stresses und einer steigenden Erlotinib-Konzentration erkennbar.

Patient 3

Mit einer Antioxidativen Kapazität von 0,66 mmol/l Trolox, besitzt Patient 3 im Vergleich zu den bisher besprochenen Patienten einen weit höheren Schutz gegen freie Radikale. Trotz dieses höheren Schutzpotentials wurde im Patientenvergleich hier die stärkste Belastung mit freien Radikalen gefunden. Bereits vor der Arzneimittelgabe liegt der oxidative Stress bei 827 FORT. Mit dem Anstieg der Capecitabin-Konzentration ist auch eine leichte Erhöhung des Radikalwertes feststellbar. Die Stress-Kurve erreicht ihr Maximum mit 878 FORT nach 30 Minuten. Anschließend fällt die Kurve auf einen Wert von 683 FORT ab, sie erreicht damit ihr Minimum nach 6 Stunden. Vergleicht man den Verlauf der Stress-Kurve mit dem Verlauf der

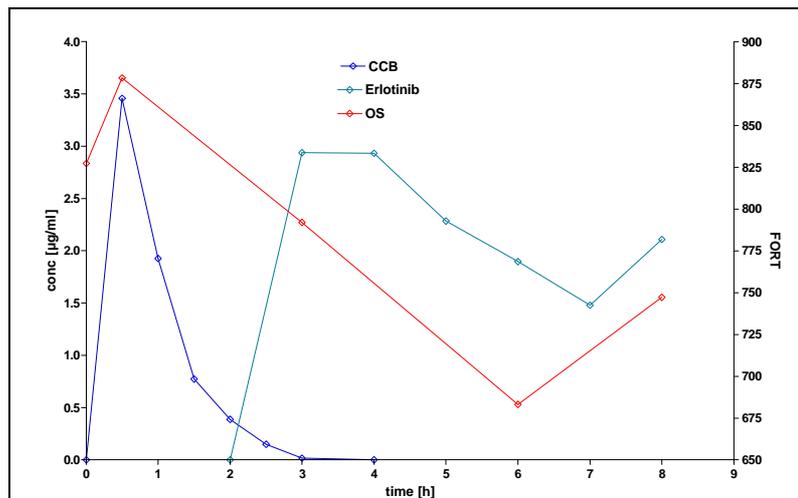


Abb. 52: Oxidativer Stress im Verlauf der Therapie (0-9h)

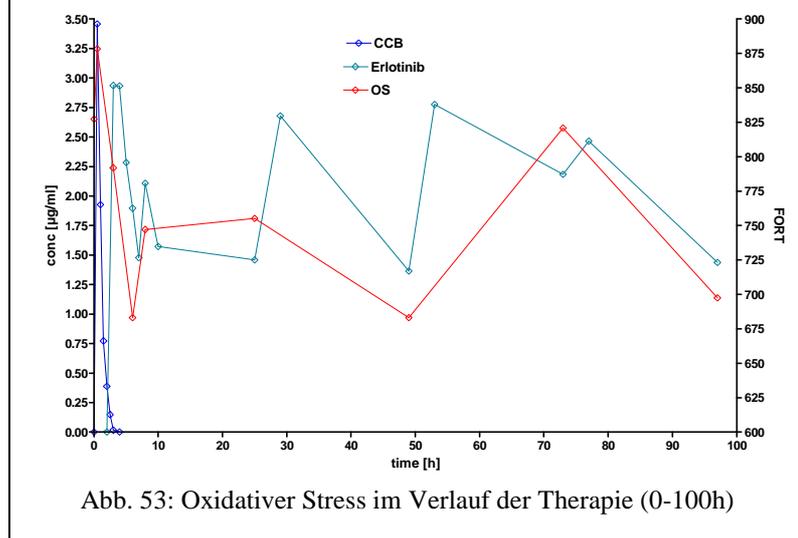


Abb. 53: Oxidativer Stress im Verlauf der Therapie (0-100h)

Erlotinib-Plasmakonzentrationskurve, so fällt auf, dass sich die Kurven direkt proportional zueinander verhalten. Obwohl mit steigenden Erlotinib-Konzentrationen im Blut auch eine Erhöhung der Stresswerte einhergeht, überschreiten sie jedoch nie den gemessenen Wert vor Therapiebeginn. Insgesamt gesehen ist so wie bei Patient 2 auch bei Patient 3 eine leichte Abnahme des oxidativen Stresses im Verlauf der Therapie zu erkennen.

Patient 4

Mit einer Antioxidativen Kapazität von 0,95 mmol/l Trolox ist bei Patient 4 der Schutz gegen freie Radikale im Vergleich zu den anderen Patienten am stärksten ausgeprägt. Passend dazu finden sich hier auch die niedrigsten Radikalwerte. Der oxidative Stress liegt vor Beginn der Therapie bei 510 FORT. Auffällig ist, dass bei Patient 4 der Radikalwert vor der Therapie das Maximum darstellt, und somit hier kein Anstieg nach Capecitabin-Gabe zu beobachten ist. Mögliche Ursache dafür könnte die sehr geringe Capecitabin-Konzentration im Blut darstellen, sie beträgt stets unter

0,2 µg/ml. Im Gegensatz zu allen anderen Patienten lässt sich hierbei Capecitabin Anwesenheit im Blut eine deutliche Senkung des oxidativen Stresses feststellen. Nach 8 Stunden erreicht die Kurve ihr Minimum mit 416 FORT. Zuvor kann man aber noch einen leichten Anstieg beobachten. Sowohl die Zunahme als auch die leichte Abnahme der Radikalwerte entsprechen dem Trend der Erlotinib-Konzentrationskurve. Danach steigt der oxidative Stress wieder an, wobei er sich allmählich auf einem Wert von circa 480 FORT einpendelt. Obwohl in den ersten Stunden der Therapie ein direkter Zusammenhang zwischen Radikalwerten und Erlotinib-Konzentrationen zu erkennen ist, sind im weiteren Verlauf der Therapie die höheren Radikalwerte bei den niedrigeren Arzneistoff-Konzentrationen zu finden. Insgesamt betrachtet kann man einen leichten Abfall des oxidativen Stresses beobachten.

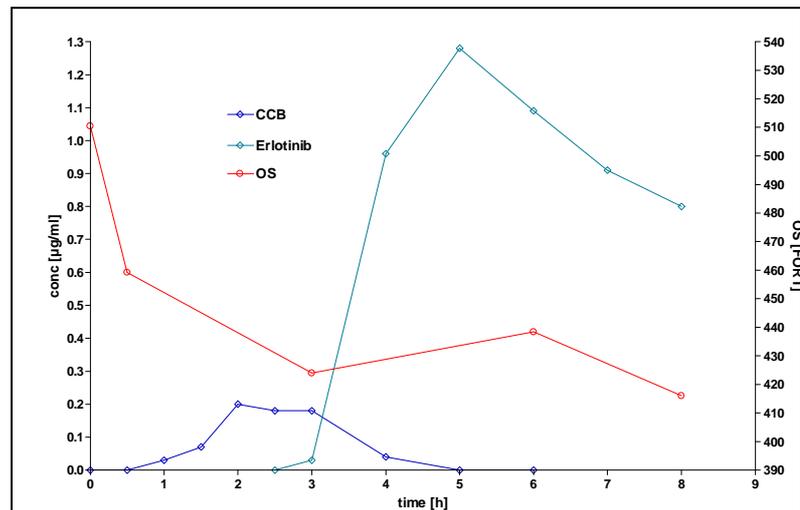


Abb. 54: Oxidativer Stress im Verlauf der Therapie (0-9h)

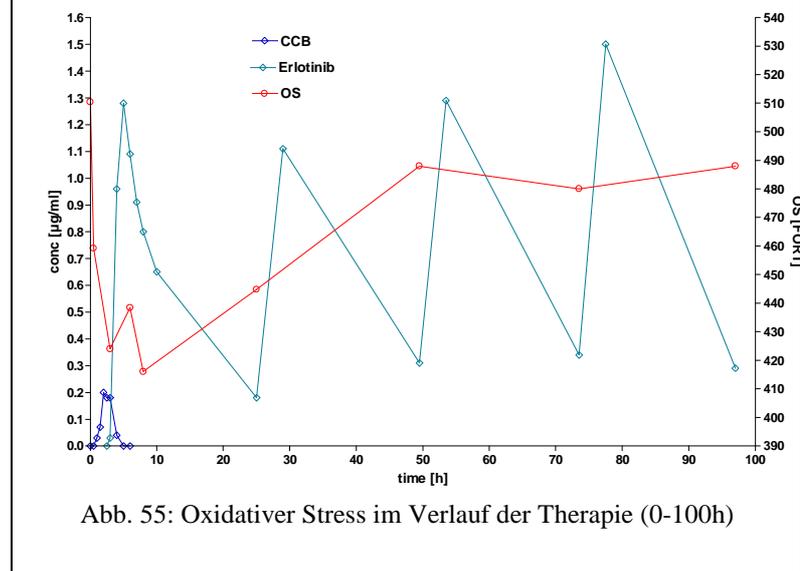


Abb. 55: Oxidativer Stress im Verlauf der Therapie (0-100h)

Patienten im Vergleich

Tab. 56: Prozentuelle Abweichung der Radikalwerte vom Ausgangswert

time [h]	Pat-1	Pat-2	Pat-3	Pat-4
0	100,0	100,0	100,0	100,0
0,5		+ 19,9	+ 6,2	- 10,0
2	+ 34,2			
3	+ 38,9	± 0,0	- 4,3	-16,9
6	-19,6	-24,9	-17,4	-14,1
8	+ 9,0	-5,3	-9,7	-18,5
24	+ 25,2	-5,3	-8,7	-12,8
48	+ 35,9	+ 2,2	-17,4	-4,4
72		+ 9,9	-0,8	-6,0
96	+ 23,9	-11,9	-15,7	-4,4

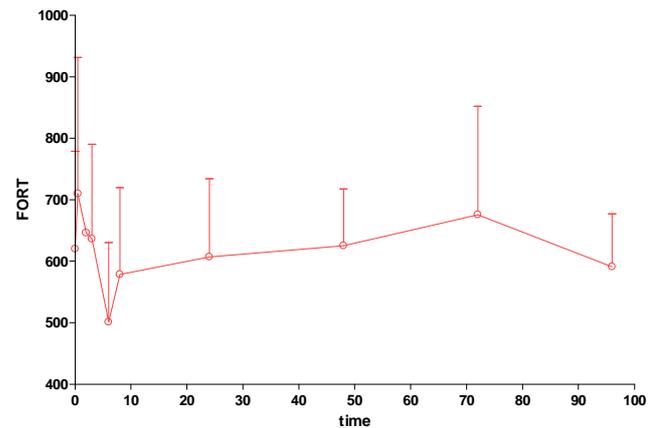


Abb. 56: Mittlerer oxidativer Stress mit Standardabweichung

Bei allen Patienten zeigt sich nach Therapiebeginn ein rascher Anstieg des oxidativen Stresses, der meist mit der höchsten Capecitabin-Konzentration im Blut sein Maximum findet. Danach folgt stets ein steiler Abfall der Kurve, gefolgt von einem weiteren jedoch flacheren Anstieg der Radikalwerte, welche die anfänglichen Werte meist aber nicht mehr überschreiten. Beim Großteil der Patienten lässt sich bei Anwesenheit von Erlotinib also eine Senkung des oxidativen Stresses beobachten.

In der vorliegenden Diplomarbeit wurde die Pharmakokinetik und der Metabolismus von Capecitabin als auch von Erlotinib beim fortschreitenden Pankreaskarzinom erfasst. Hierbei handelt es sich um die ersten Pharmakokinetik-Ergebnisse einer klinischen Phase 1b Prüfung mit der neuen Dreier-Kombination Avastin, Tarceva und Xeloda. Die zusätzliche Quantifizierung der Sauerstoff-Radikale und des antioxidativen Potentials zeigen völlig neue Einblicke in das Schicksal der untersuchten Arzneistoffe, sowie der Radikalbelastung im Körper der Patienten. Aus pharmakokinetischer Sicht kann dieses erste Dosislevel als therapeutisch effizient und sicher bewertet werden. Eine weitere Dosisescalation ist äußerst vorsichtig vorzunehmen, da die ermittelte Radikalbelastung der Patienten schon extrem hoch ist. Nur durch ein derartiges Monitoring kann dem Arzt ein Einblick in seine Therapiestrategie geboten werden. Derartig klinisch pharmazeutische Untersuchungen stellen für die Etablierung und Optimierung neuer Chemotherapien (Kombinationen!) eine *conditio sine qua non* dar.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Sahora K., Trenkwitz D., Akan B., Kühner I., Göttinger P., Gnant M.: Moderne Tumorthherapie des Pankreaskarzinoms. *Journal für Gastroenterologische und Hepatologische Erkrankungen*, 6(3), 17-24, (2008)
- [2] Renz-Polster H., Krautzig S., Braun J in: *Basislehrbuch Innere Medizin*; 3. Auflage. Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, München, Jena 2004, 721-723
- [3] Cartwright T, Richards D, Boehm K: Cancer of the Pancreas: Are We Making Progress? A Review of Studies in the US Oncology Research Network. *Cancer Control*, 15(4), 308-313, (2008)
- [4] Homepage: Rx-List – The Internet Drug Index for prescription drugs and medication; Monographie Capecitabine; Chapter 1-8; 2008 <http://www.rxlist.com/xeloda-drug.htm>
- [5] Koukourakis G., Kouloulis V., Koukourakis M.; Zacharias G., Zabatis H., Kouvaris J.: Efficacy of the Oral Fluorouracil Pro-drug Capecitabine in Cancer Treatment: a Review. *Molecules*, 13, 1897-1922, (2008)
- [6] Austria Codex Fachinformation; Monographie Xeloda 150mg Filmtabletten; Erscheinungsdatum 01.01.2009
- [7] Cartwright T., Cohn A., Varkey J., Chen Y., Szatrowski T., Cox J., Schulz J.: Phase II Study of Oral Capecitabine in Patients With Advanced or Metastatic Pancreatic Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 20, 160-164, (2002)
- [8] Homepage: Rx-List – The Internet Drug Index for prescription drugs and medication; Monographie Erlotinib; Chapter 1-8; 2008 <http://www.rxlist.com/tarceva-drug.htm>
- [9] Starling N., Neoptolemos J., Cunningham D.: Role of erlotinib in the management of pancreatic cancer. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 2(4), 435-445, (2006)
- [10] Austria Codex Fachinformation; Monographie Tarceva 100mg-Filmtabletten; Erscheinungsdatum 01.01.2009
- [11] Ling J., Johnson K., Miao Z., Rakhit A., Pantze M., Hamilton M., Lum B., Prakash C.: Metabolism and excretion of erlotinib, a small molecule inhibitor of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in healthy male volunteers. *Drug Metab. Dispos.*, 34, 420-426, (2006)
- [12] Siegl-Lakhai W., Beijnen J., Schellens J.: Current Knowledge and Future Directions of the Selective Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors Erlotinib (Tarcevar) and Gefitinib (Iressa). *The Oncologist*, 10, 579-589, (2005)
- [13] Homepage: Rx-List – The Internet Drug Index for prescription drugs and medication; Monographie Bevacizumab; Chapter 1-8; 2008 <http://www.rxlist.com/avastin-drug.htm>
- [14] Tabernero J.: The Role of VEGF and EGFR Inhibition: Implications for Combining Anti-VEGF and Anti-EGFR Agents. *Mol Cancer Res*, 5(3), 203-220, (2007)
- [15] Saif M.W.: Anti-Angiogenesis Therapy in Pancreatic Carcinoma. *Journal of the Pancreas*, 7(2), 163-173, (2006)
- [16] Austria Codex Fachinformation; Monographie Avastin 25mg/ml Konzentrat zur Herstellung einer Infusionslösung; Erscheinungsdatum 01.01.2009
- [17] Van Cutsem E., Verslype C., Beale P., Clarke S., Bugat R., Rakhit A., Fettner S.H., Brennschneid U., Feyereislova A., Delord J.-P.: A phase Ib dose-escalation study of

- Erlotinib, Capecitabin and oxaliplatin in metastatic colorectal cancer patients. *Annals of Oncology* 19, 332-339, (2007)
- [18] Dröge W.: Free Radicals in the Physiological Control of Cell Funktion. *Physiological Reviews* 82, 47-95 (2002)
- [19] Siems W., Krämer K., Grune T.: Oxidativer Stress und Pharmaka. *Pharmazeutische Zeitung-Schriftenreihe*, Band 15, 17-35, 2005
- [20] Vanquero E., Edderkaoui M., Pandol S., Gukovsky I., Gukovskaya A.: Reactive Oxygen Species Produced by NAD(P)H Oxidase Inhibit Apoptosis in Pancreatic Cancer Cells. *The Journal Of Biological Chemistry* Vol. 279, No 33, 34643-34654, (2004)
- [21] Ling YH., Lin R., Perez-Soler R.: Erlotinib induces mitochondrial-mediated apoptosis in human H3255 non-small-cell lung cancer cells with epidermal growth factor receptorL858R mutation through mitochondrial oxidative phosphorylation-dependent activation of BAX and BAK. *Mol Pharmacol.* 74(3), 793-806 (2008)
- [22] Rücker G., Neugebauer M., Willems G. in: *Instrumentelle pharmazeutische Analytik*; 3.Auflage; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 440-467, 2001
- [23] Firma Incomat Medizinische Geräte GmbH: *FORMPlus Bedienungshandbuch*; Version 1.0; 18-20 (2006)
- [24] *Ibidem*; Seite 7
- [25] *Ibidem*; Seite 21
- [26] Eisl M.: *Oxidative Stressmessung und antioxidative Kapazität: Untersuchungen an speziellen Kollektiven*. Diplomarbeit Universität Wien; 2007
- [27] *WinNonLin Version 5.0 Reference Guide*: Pharsight Corp. 94040 Mountain View, CA, USA (2008)
- [28] Farkouh A.: *Pharmakokinetik und Metabolismus von Capecitabin in Kombination mit Oxaliplatin*. Dissertation Universität Wien, Department für klinische Pharmazie und Diagnostik, Wien (2004)

7. ZUSAMMENFASSUNG

Quantifizierung des oxidativen Stresses in der kombinierten Chemotherapie des Pankreaskarzinoms mit Erlotinib, Bevacizumab, Capecitabin inklusive biometrischen Berechnungen.

Hintergrund: Das Pankreaskarzinom gehört zu den 5 häufigsten durch Krebs bedingten Todesfällen in Europa pro Jahr. Ursachen für die Aggressivität des Tumors sind zum einen das meist fortgeschrittene Stadium zum Zeitpunkt der Diagnose, zum anderen die niedrige Ansprechrate auf das derzeit gültige Chemotherapieschema, welches Gemcitabin als Monosubstanz vorsieht. Weiters konnten beim Pankreaskarzinom erhöhte Konzentrationen an Reaktive Oxygen Species (ROS) gefunden werden, welche in Verbindung mit der Apoptoseresistenz des Tumors gebracht werden können. Neue Therapiestrategien setzen meist auf Kombinationen mit „molecular targeted therapies“, zu denen Tyrosinkinasehemmer und monoklonale Antikörper zählen. Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Dreierkombination bestehend aus dem Zytostatikum Capecitabin, dem Tyrosinkinasehemmer Erlotinib und dem monoklonalen Antikörper Bevacizumab, sowie deren Auswirkung auf die Radikalbelastung im Körper der Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom.

Methode: Zur Abtrennung von störenden Matrixbestandteilen sowie Begleitsubstanzen wurden die Plasmaproben der Festphasenextraktion unterzogen. Mittels Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) wurden die Plasmakonzentrationen der beiden Arzneistoffe Capecitabin und Erlotinib, sowie deren Metabolite, zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Therapie bestimmt. Pharmakokinetische Parameter wurden mittels Nonkompartiment-Modell berechnet. Die Quantifizierung des oxidativen Stresses erfolgte mithilfe einer kolorimetrischen Reaktion, wobei sich die Intensität der Farbe direkt proportional zur Menge der Radikalverbindungen verhält. Die Antioxidative Kapazität wurde anhand der Abnahme der Farbintensität eines gefärbten Radikals gemessen.

Ergebnisse und Diskussion: Prinzipiell sind die Radikalwerte (als FORT = Wasserstoffperoxid-Äquivalente) bei allen Patienten sehr hoch, passend dazu weisen sie eine sehr geringe Antioxidative Kapazität auf. Generell konnte eine große Streuung innerhalb der Patienten bei den ermittelten Daten festgestellt werden, was auf die meist eingeschränkte Organfunktion, sowie unterschiedliche Metabolisierungsrate zurückzuführen ist. Allen Patienten gleich ist jedoch ein Anstieg des oxidativen Stresses bei steigender Capecitabin-Konzentration im Blut. Im Anschluss daran folgt eine rasche Senkung der FORT-Werte unter den Ausgangswert. Bei Erlotinib Anwesenheit im Blut steigt die Radikalbelastung zwar erneut, überschreitet aber den gemessenen Radikalwert vor Beginn der Therapie in der Regel nicht.

8. ABSTRACT

Quantification of oxidative stress in the combined chemotherapy with Erlotinib, Capecitabine and Bevacizumab against pancreatic cancer inclusive biometric calculations.

Background: Pancreatic cancer is the fifth leading cause of cancer death in the European Union. Causes of the aggressiveness of this cancer are on the one hand the advanced state of disease at the time of diagnosis, on the other hand the poor response rate to Gemcitabin-based chemotherapeutic regimes. Furthermore increased concentrations of reactive oxygen species (ROS) in pancreatic cancer cells are associated with its resistance to apoptosis. New studies focus on combined therapies consisting of tyrosinkinase-inhibitors and monoklonal antibodies. This diploma thesis investigated the combination schedule of the cytostatic drug Capecitabine, the thyrosinkinase-inhibitor Erlotinib and the humanized monoclonal antibody Bevacizumab and their effects on the oxidative stress levels in patients with advanced pancreatic cancer.

Method: Separation of drug molecules from plasma matrix compounds was performed by use of solid phase extraction. Subsequently Capecitabine, Erlotinib and its metabolites were quantified by high-performance-liquid-chromatography (HPLC). Pharmacokinetic parameters were calculated via noncompartment-model. Quantification of oxidative stress was based on a colorimetric reaction, whereby the intensity of colour is directly proportional to the amount of free radicals. Antioxidative capacity was determined by measuring the decrease of a coloured radical in present of plasma samples.

Results and discussion: Generally all patients showed high values of free radicals and a very low level of oxidative defense. High variation of detected values between the 4 patients could be observed. Causes of this high spreading rate can be the limited function of organs or the different rates of metabolism. At high Capecitabine concentrations in blood an increase of oxidative stress was measurable, followed by a fast decrease of free radicals in blood. In the presence of Erlotinib in blood a slow increase of free radicals could be determined, but without reaching the initial levels.

