



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Pharmakokinetik von Erlotinib in der kombinierten
Chemotherapie und Ermittlung der Plasmaproteinbin-
dung“

Verfasserin

Pillhofer Elisabeth

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Pharmazie

Betreuer:

ao. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Martin Czejka

Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie meinem Betreuer Univ. Prof. Dr. Martin Czejka, der mir das Thema vorgeschlagen und mich bei der Diplomarbeit tatkräftig unterstützt hat. Außerdem hat er mir das Inventar zur Verfügung gestellt.

Weiters gilt mein Dank Mag. Azra Sahmanovic, die mir ebenfalls mit Rat und Tat zur Seite gestanden ist.

Ferner möchte ich mich hiermit bei meinem Vater bedanken, der mir durch die finanzielle Unterstützung das Studium erst ermöglicht hatte.

Mein spezieller Dank gilt ebenfalls meinem Lebensgefährten Roland Handler, sowie seinen Eltern Franz und Ida Handler, die mir finanziell unter die Arme gegriffen haben und in manchen schweren Stunden des Studiums seelisch aufgefangen haben.

Weiteres möchte ich mich bei Susanne Satzinger bedanken, die mir bei der literarischen Recherche geholfen hat.

Schlussendlich möchte ich mich noch bei allen Kollegen und Kolleginnen bedanken, die mich durch das Studium begleitet haben. Durch sie wäre der Labor- und Studienalltag nicht so erträglich geworden.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit Eides statt, dass ich, Elisabeth Pillhofer, diese Diplomarbeit selbstständig geschrieben habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde weder in gleicher noch in ähnlicher Weise einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis	1
2	Einleitung	2
	2.1 Pankreaskarzinom	2
	2.2 Therapiemöglichkeiten.....	4
3	Erlotinib.....	7
	3.1 Indikation.....	8
	3.2 Pharmakokinetik von Erlotinib	8
	3.3 Metabolismus von Erlotinib	9
4	Apparaturen.....	11
	4.1 Chromatographie	11
	4.2 High performance liquid chromatography (HPLC)	12
	4.3 Festphasenextraktion (SPE).....	14
	4.4 Ultrafiltration.....	17
5	Experimenteller Teil.....	18
	5.1 HPLC – Analyse	18
	5.2 Quantifizierung von Erlotinib	18
	5.3 Auswertung	27
	5.3.1 Programme	27
	5.3.2 Statistische Definitionen.....	27
6	Patientendaten	28
7	Ergebnisse und Diskussion.....	29
	7.1 Festphasenextraktion von Patient 22, 23 und 27	29
	7.2 Ultrafiltration mit Vivaspin.....	34
	7.3 Ultrafiltration mit Centrisart	45
9	Literaturverzeichnis	55
8	Abbildungsverzeichnis	57
	Lebenslauf	59
9	Abstract.....	60

2 Einleitung

Krebs ist eine Erkrankung, die durch unkontrolliertes Wachstum und die Verbreitung von abnormen Zellen, gekennzeichnet ist. Wird das Wachstum nicht gehemmt, kann es zum Tod des Patienten kommen. Ein Karzinom kann durch äußerliche Einflüsse, wie

- Tabak
- Infektiöse Organismen
- Chemikalien und
- Strahlung

sowie innerliche Einflüsse, wie

- vererbte Mutationen
- Hormone
- Immunzustand und
- Mutationen, die durch den Metabolismus verursacht werden,

ausgelöst werden[1].

2.1 Pankreaskarzinom

Das Pankreaskarzinom ist eine der bösartigsten gastrointestinalen Krebsarten, die im fortgeschrittenen Stadium für die meisten Patienten tödlich endet[2].

In der westlichen Welt ist das Pankreaskarzinom die fünfthäufigste Todesursache, die krebsbedingt verursacht wird. In Europa sterben ungefähr 32.500 Patienten pro Jahr an dieser Erkrankung.

Etwa 10 pro 100.000 Patienten erkranken jährlich an bösartigen Tumoren der Bauchspeicheldrüse. Dies entspricht 10 % aller malignen Tumore des Verdauungstrakts.

Das Pankreaskarzinom hat eine äußerst schlechte Prognose: Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt < 5 %. Trotz verbesserten Behandlungskriterien hat sich letztlich die Zahl an den jährlichen Todesfällen und neu diagnostizierte Patienten nicht wesentlich geändert.

Die häufigste maligne Neubildung des Pankreas ist mit 85% das duktale Adenokarzinom und betrifft in etwa 60–70% der Fälle den Pankreaskopf, in 10 % den Korpus und in 5 % die Kauda. In den übrigen 15–25 % der Fälle ist das Pankreas diffus oder multifokal betroffen.

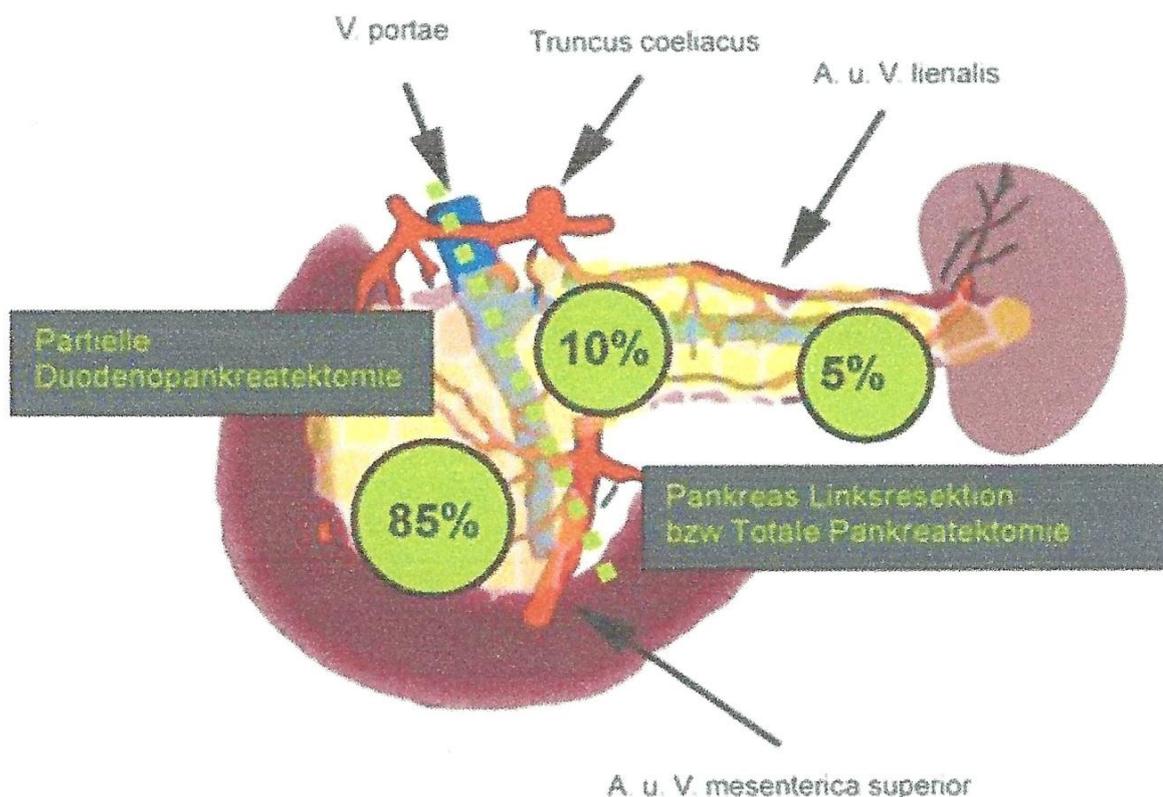


Abbildung 1 Resektionsgrenzen nach Tumorlokalisierung und Lokalisationsverteilung des Pankreaskarzinoms

Das Adenokarzinom des Pankreas ist lange frei von Symptomen und es besteht eine anatomische Nahebeziehung zu den Gefäßen des oberen Gastrointestinal Trakts. Deshalb haben über 80% der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ein fortgeschrittenes Tumorstadium[3].

2.2 Therapiemöglichkeiten[2,4]

Die Behandlung des metastasierenden Pankreaskarzinoms erfolgt entweder mittels einer

Monotherapie

- 5 – Fluoruracil
- Irinotecan
- Gemcitabin

oder mit einer Kombinationstherapie von

- Gemcitabin und Fluoropyrimidine oder Platinanaloga
- Gemcitabin in Kombination mit Capecitabin (= Prodrug von 5-Fluoruracil)
- Gemcitabin in Kombination mit Erlotinib
- Gemcitabin in Kombination mit monoklonalen Antikörpern
- Gemcitabin in Kombination mit Cetuximab
- Gemcitabin in Kombination mit Bevacizumab
- Folfirinox

Gemcitabin

Es ist ebenfalls ein Prodrug. Gemcitabin ist ein Nukleosid- Analogon. Es ist im extrazellulären Kompartiment inaktiv und bekommt seine zytotoxische Aktivität durch Erreichen einer kernhaltigen Zelle, in der es öfters phosphoryliert wird [5].

Gemcitabin hemmt das Tumorwachstum, in dem es Cytidin während der DNA-Replikation ersetzt und die Biosynthese von Desoxyribonukleotid durch Blockade der Ribonukleotidreduktase hemmt [6].

Cetuximab

Cetuximab ist ein therapeutischer Antikörper, welcher gegen Wachstumsfaktorrezeptoren gerichtet ist. Es ist ein chimärer monoklonaler Antikörper. Dieser blockiert den epidermalen Wachstumsfaktor (EGFR) und zwar an der HER1- Bindungsstelle (human epidermal growth factor receptor1).

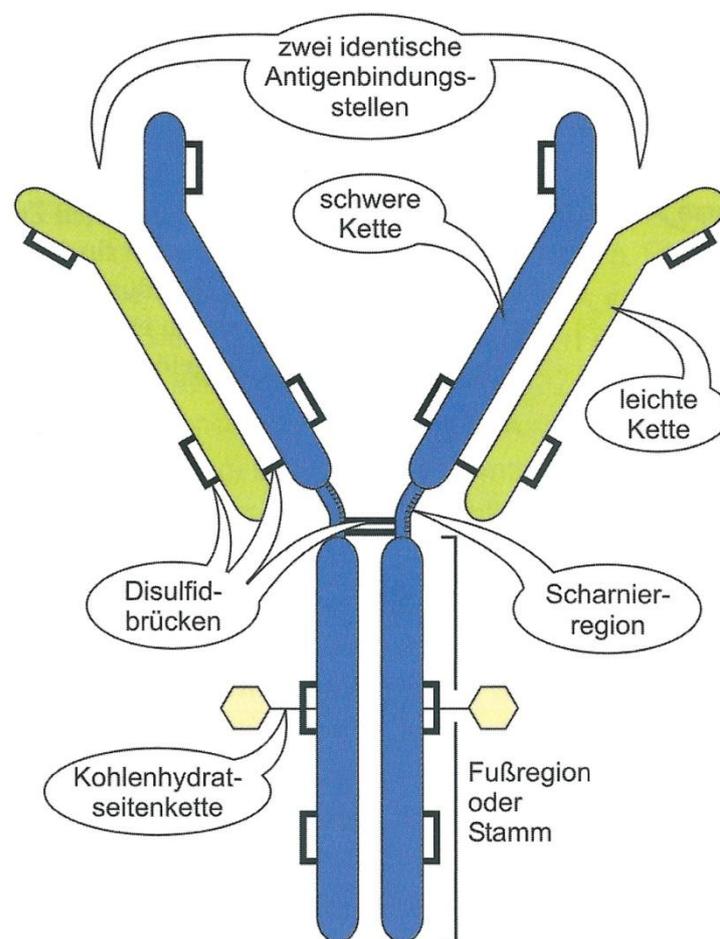


Abbildung 2 Grundstruktur eines Antikörpers

Bevacizumab

Ist ein monoklonaler Antikörper, der gegen den Endothelwachstumsfaktor VEGF (vascular endothelial growth factor) gerichtet ist. Er verhindert die Bindung von VEGF an seinen Rezeptor[7].

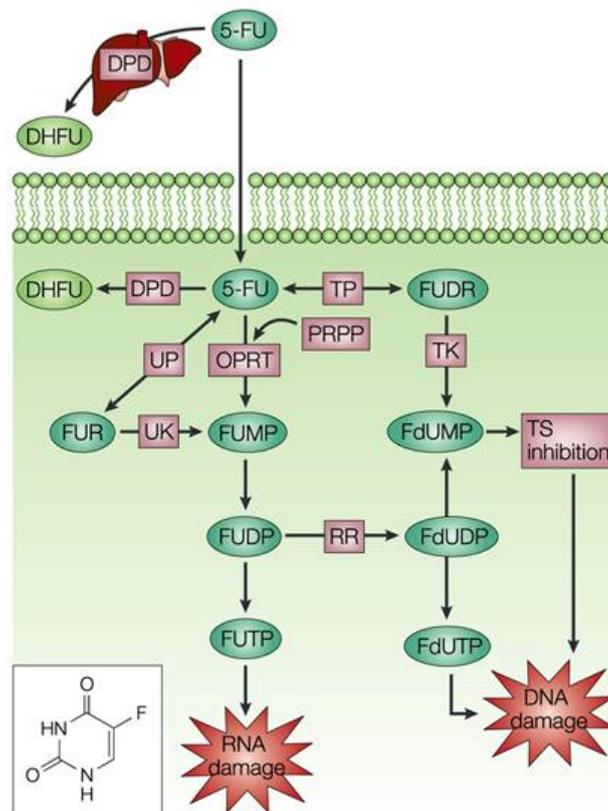
5-Fluoruracil

Es ist einer der wichtigsten Antimetaboliten und wird bei einer Vielzahl von Karzinomen verwendet. Es ist ein Pulver, welches kristallin und geruchlos ist. Die Bioverfügbarkeit ist schlecht, da es sehr hydrophil ist und eine geringe Lipophilie aufweist. In der Darmschleimhaut befindet sich das Enzym Dihydropyrimidindehydrogenase, welches 5-Fluoruracil abbaut und somit die Bioverfügbarkeit ebenfalls beeinflusst. Etwa 80-85% der Dosis wird abgebaut. Die Applikation erfolgt normalerweise intravenös, da die Adsorption aus dem Magen-Darm-Trakt sprunghaft und unvorhersehbar ist. Durch die intravenöse Verabreichung kann es aber zu schweren Nebenwirkungen kommen[8].

Antimetabolite wirken durch Inhibieren von wesentlichen biosynthetischen Verfahren oder von Makromoleküle, wie RNA bzw. DNA und hemmen somit ihre Funktion. 5-Fluoruracil bewirkt beides. 5-Fluoruracil entspricht der Base Uracil, bei der in Position 5 an Stelle des Wasserstoffes ein Fluoratom eingebaut ist. Es kommt durch den gleichen Mechanismus wie die Base Uracil in die Zelle. Wird dann intrazellulär zu mehreren aktiven Metaboliten umgewandelt, wie

- Fluorodeoxyuridinmonophosphat
- Fluorodeoxyuridintriphosphate
- Fluorouridintriphosphate

Durch diese aktiven Metabolite wird die DNA Synthese und die Thymidylat Synthese gestört. Das geschwindigkeitsbestimmende Enzym im 5-Fluoruracil Katabolismus ist Dihydropyrimidindehydrogenase, welches es zu Dihydrofluoruracil umwandelt [9].



Nature Reviews | Cancer

Abbildung 3 Metabolite von 5 - Flururacil

Irinotecan

Es ist ein synthetisch hergestelltes Analogon von Camptothecin, welches die DNA-Topoisomerase hemmt. Es ist ein Pro Drug, das wasserlöslich ist. Durch die Spaltung der Camptothecin Einheit und der Dipiperidin-Seitenkette durch das Enzym Carboxyesterase, wird der aktivere Metabolit SN 38 gebildet. Der Metabolit hemmt die Topoisomerase I 20 000 Mal stärker, als Irinotecan selbst [10].

3 Erlotinib

Erlotinib ist ein orales Cytostatikum, welches den Epidermal Growth Factor Rezeptor (EGFR) hemmt, dies führt dazu, dass die Zellproliferation, die Invasion, Metastasierung und die tumorinduzierte Angiogenese inhibiert ebenso wie der potentielle Anstieg der antitumor Wirksamkeit der Chemo- und Radiotherapie gefördert wird [11].

Die EGFR – Familie ist Teil eines Signaltransduktionsnetzwerk, welches für verschiedene wichtige zelluläre Prozesse von Relevanz ist [12].

3.1 Indikation

Erlotinib ist bei der Monotherapie des fortgeschrittenen oder metastasierenden Nicht-kleinzelligen Lungenkrebs, nach dem Versagen einer vorausgehenden Chemotherapie zugelassen, als aufrechterhaltende Behandlung von Patienten mit fortgeschrittenen oder metastasierenden Nicht – kleinzelligen Lungenkrebs bei denen der Fortschritt nach einer vier Säulen platinbasierten Ersttherapie in Kombination mit Gemcitabin nicht zum Erliegen gekommen war und für die Erstbehandlung von Patienten, die an einem lokal fortgeschrittenen und inoperablen Pankreaskrebs leiden[12,13].

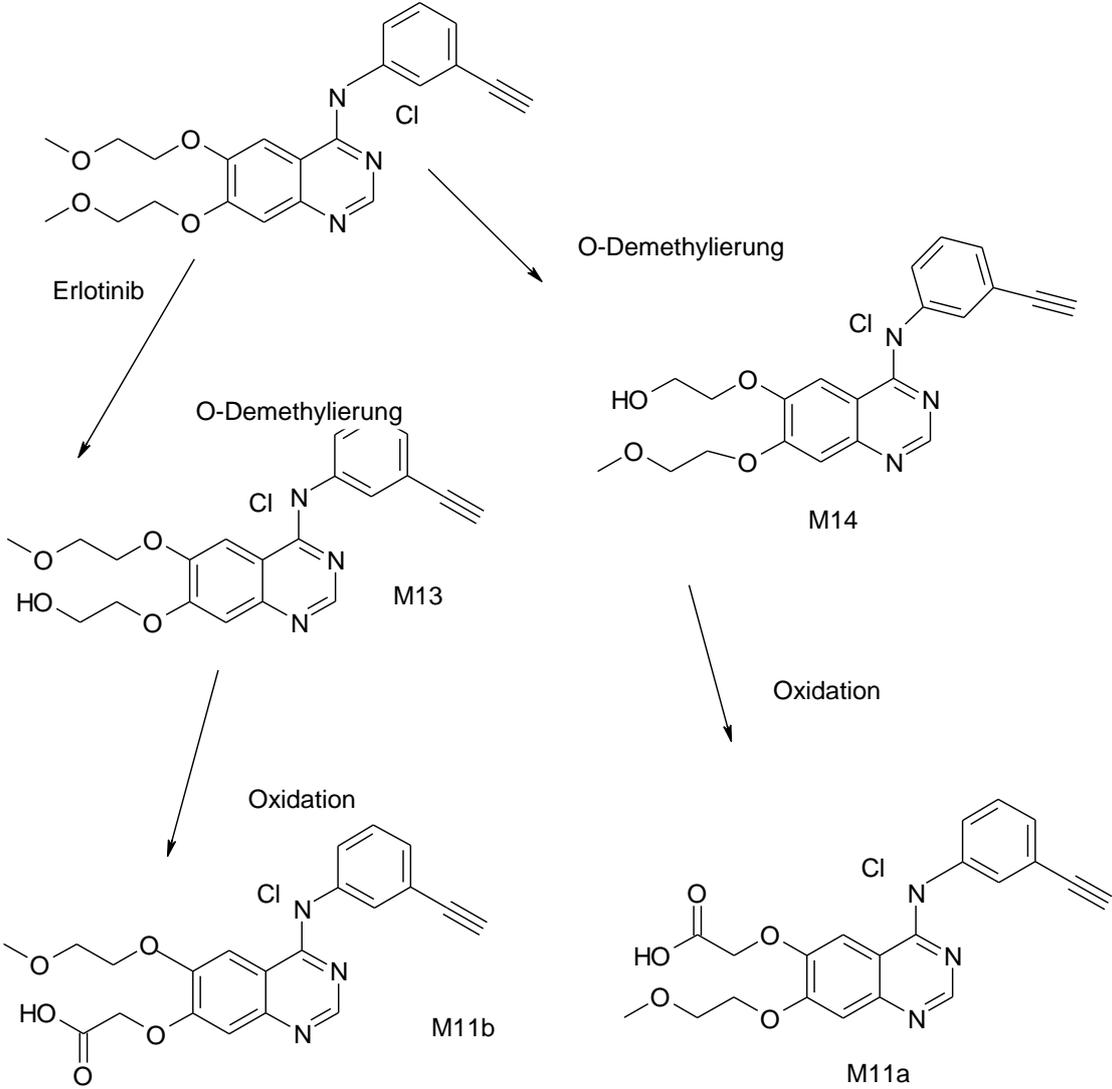
3.2 Pharmakokinetik von Erlotinib

Erlotinib wird nach oraler Applikation gut absorbiert (60%), die Bioverfügbarkeit liegt bei 100%, wenn es mit dem Essen verabreicht wird. 4h nach der Verabreichung wird der maximale Plasmaspiegel erreicht und die Halbwertszeit beträgt 36h.

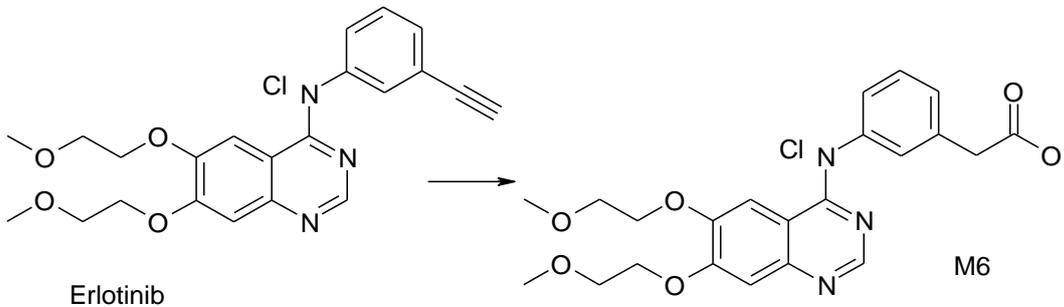
Das Chemotherapeutikum hat eine hohe Proteinbindung von 93%. Es bindet an Albumin und an das saure α – 1- Glykoprotein (AAG). [11].

3.3 Metabolismus von Erlotinib

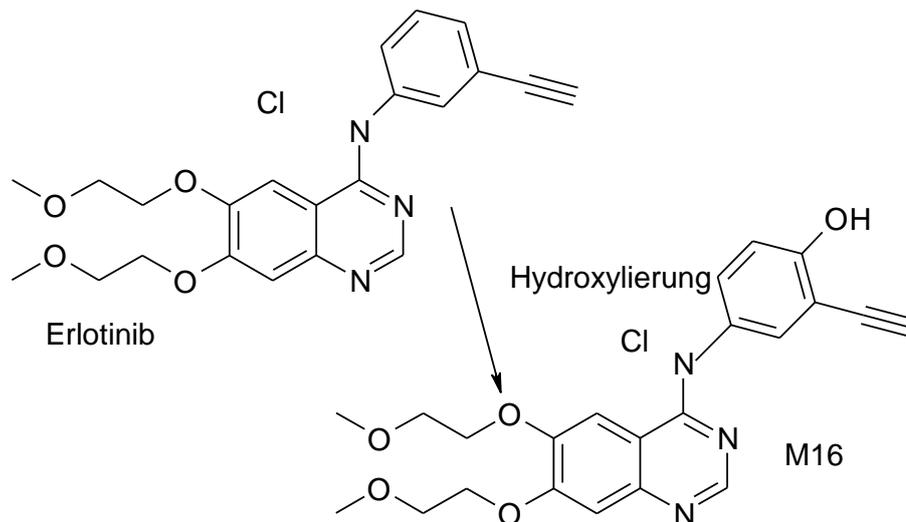
ad1)



ad2)



ad3)



Erlotinib wird vorwiegend hepatisch metabolisiert, hauptverantwortlich dafür ist (mit ~70%) das Enzym CYP3A4, und zu 30% auch von CYP1A2.

Hauptwirksam ist das unveränderte Erlotinib (Bioverfügbarkeit in etwa 60%), das selbst bis zu 2% unverändert ausgeschieden wird. Endausscheidung ist vorwiegend durch den Fäzes bzw. geringe Mengen im Urin.

Die Umwandlung der Hauptmetaboliten des Erlotinib erfolgt über 3 Arten:

- 1) O-Demethylierung der Seitenketten (M13 bzw M14) mit anschließender Oxidation zur Carbonsäure (M11). Ein weiterer häufig vorkommender Metabolit ist M12 bei diesem wurde bei M13 bzw M14 die zweite Seitenkette auch demethyliert.
- 2) Oxidation der Ethinylgruppe und anschließender Hydrolyse zur Arylcarbonsäure
- 3) Der Phenylring wird in ortho-Stellung zur Ethinylgruppe hydroxyliert[14,15].

4 Apparaturen

4.1 Chromatographie

Bei der Chromatographie handelt es sich um eine physikalische Trennmethode. Die Komponenten, die getrennt werden, verteilen sich zwischen zwei Phasen. Die stationäre Phase ruht, während sich die mobile Phase in eine definierte Richtung bewegt.

Die Trennung erfolgt auf Grund unterschiedlicher Verteilungskoeffizienten der Komponenten zwischen den beiden Phasen. Dazu teilt man die Säule in fiktive kleine Einheiten, die theoretischen Trennstufen, ein. In jeder Trennstufe stellt sich ein neues Verteilungsgleichgewicht ein. Je kleiner so eine Trennstufe ist, desto öfter kann in der Säule mit einer gegebenen Länge eine Gleichgewichtseinstellung erfolgen und desto komplizierter kann das zu trennende Problem sein.

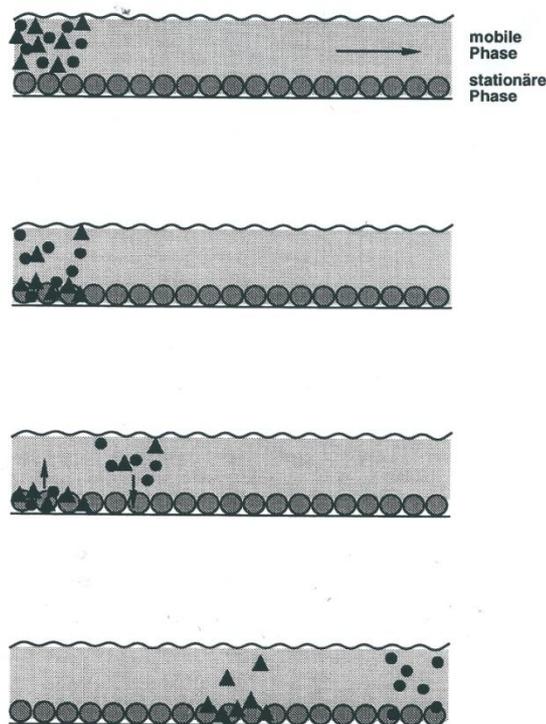


Abbildung 4 Trennung zwischen den Phasen

4.2 High performance liquid chromatography (HPLC)

Je feinkörniger die stationäre Phase ist, umso mehr Trennstufen pro Längeneinheit besitzt man und desto höher ist die günstige lineare Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase.

Deshalb hat die stationäre Phase bei der HPLC einen Durchmesser von 10µm oder weniger. Da diese feinkörnige Säulenpackungen aber einen hohen Strömungswiderstand ergeben, braucht man eine leistungsfähige Pumpe, um die mobile Phase durch die Säule zu pressen.

Um die eluierten Peaks erfassen zu können, benötigt man einen Detektor.

Einige Elemente der HPLC-Apparatur:

- **Pumpe:** Pulsationsfreie Förderung der mobilen Phase. Der Volumendruck soll konstant sein und nicht vom Gegendruck abhängig sein. Außerdem sollte dieser digital eingestellt werden.
- **Injektionsventil** soll gewährleisten, dass das Schlaufenvolumen richtig und präzise injiziert wird.
- **Detektor** soll ein geringes Rauschen und einen großen linearen Bereich aufweisen. Weder das Zellvolumen noch die Zeitkonstante dürfen einen merklichen Betrag zur Bandenverbreiterung beitragen.
- Mit den **Datensystemen** lässt sich die ganze HPLC-Apparatur steuern.

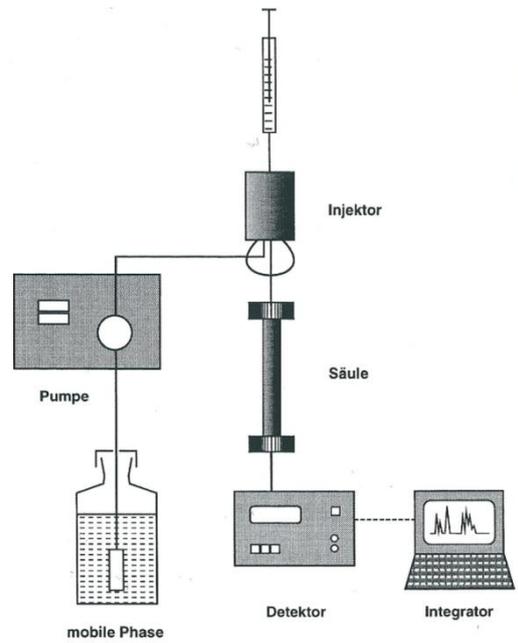


Abbildung 5 Schematische Darstellung einer HPLC - Apparatur

Zusätzliche Ausstattung für eine HPLC- Apparatur sind:

- Gradienten System
- Autosampler
- Säulenthermostatisierung[16].



Abbildung 6 HPLC - Anlage

4.3 Festphasenextraktion (SPE)



Abbildung 7 Festphasenkartusche

Die Festphasenextraktion wurde in den späten 1970ern erfunden. Sie ist schneller als die flüssig-flüssig Extraktion und man benötigt ein Zehntel weniger Lösungsmittel um eine vergleichbare Menge an Probe zu extrahieren.

Es gibt drei Arten der Festphasenextraktion:

- Festphasenplatten
- Festphasenkartuschen oder
- Festphasenspritzen.

Die SPE- Festplatten unterscheiden sich von den SPE-Kartuschen oder Spritzen dahingehend, dass der Datenträger eine Membran ist mit einem geladenen festen Sorbens, während die Kartusche oder Spritze das Sorptionsmittel enthält[17].

In den Proben der Patienten befindet sich nicht nur der zur analysierende Arzneistoff, sondern auch Begleitmaterial, welches abgetrennt werden muss. Diese Substanzen würden eine weitere Quantifizierung von Erlotinib beeinträchtigen bzw. stören. Eine Trennung zwischen dem Begleitmaterial und dem zu bestimmende Arzneistoff ist so möglich.

3. Probenvorbereitung: Trennung Matrix von Arzneistoff

Zuerst Zentrifugation, dann Festphasenextraktion

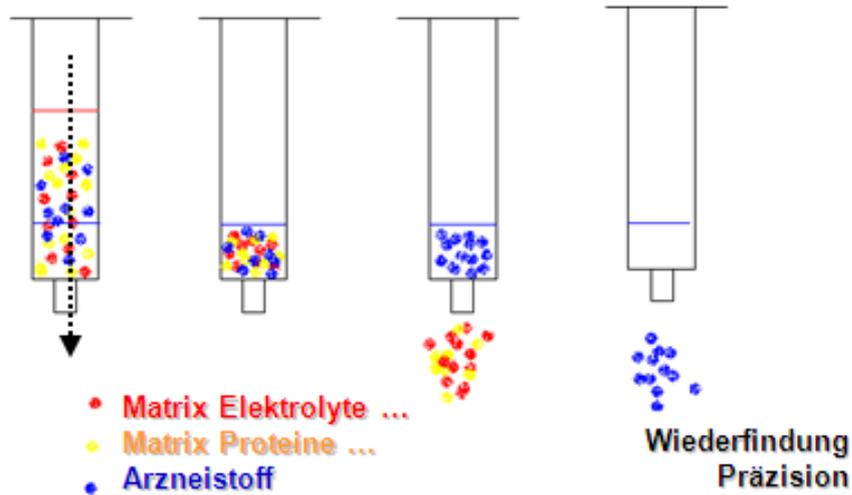
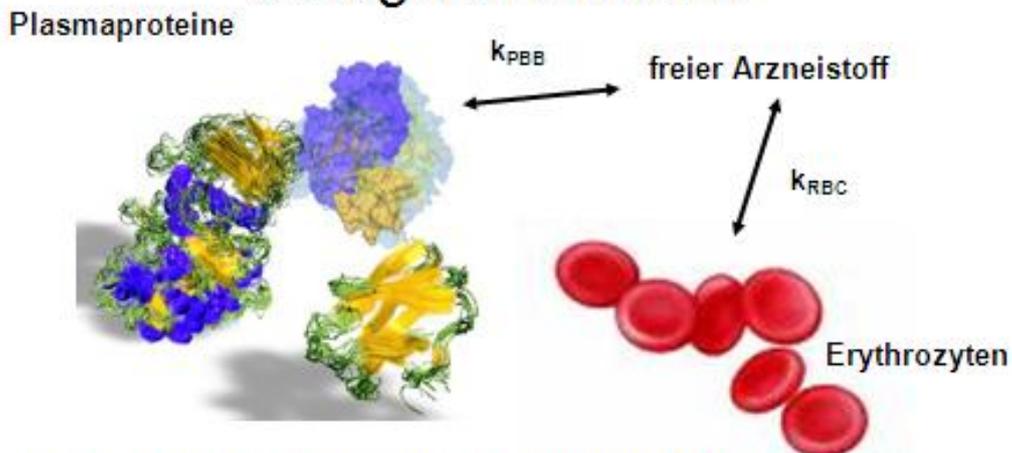


Abbildung 8 Trennung von Matrixproteinen und Arzneistoff

Probenvorbereitung: biologische Matrix



Durch die Probenvorbereitung wird die Proteinbindung
aufgebrochen: über 90 % bei Paclitaxel, SN-38, Erlotinib

Abbildung 9 Trennung von Matrixproteinen, Erythrozyten und Erlotinib

Solid phase extraction cartridges

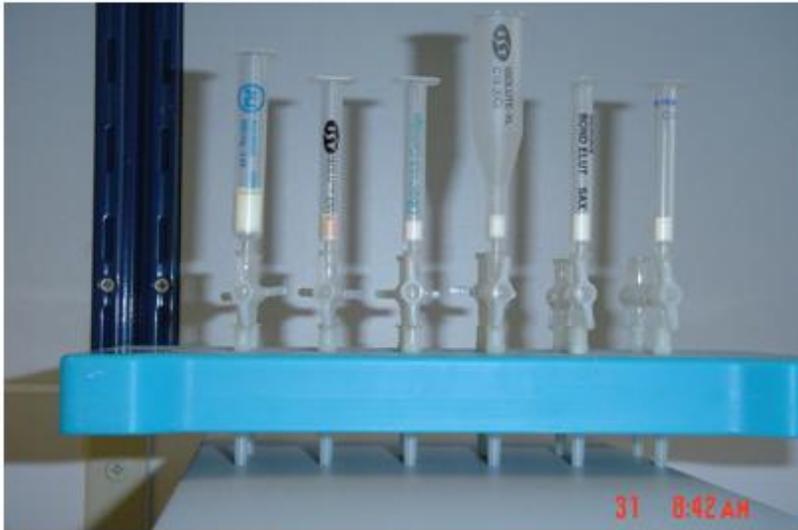


Abbildung 10 SPE – Apparatur

Vakuum Einheit zur SPE



Abbildung 11 Vakuum Einheit zur SPE

4.4 Ultrafiltration

Die Ultrafiltration ist ein schnelles und einfaches Verfahren, um eine Trennung von freien und proteingebundenen Anteil des Arzneistoffes zu erhalten. Die Zentrifugationskraft zwingt den freien Anteil durch die Poren der Membran, während der gebundene Anteil nicht durch die Membran kann[18].

Rationale:

Ziel der vorliegenden Diplomarbeit war es zu prüfen, ob Blutproben von Patienten, die eine Chemotherapie mit Erlotinib erhielten, ultrafiltrierbar waren oder nicht.

5 Experimenteller Teil

Das Kollektiv bestand aus tiefgefroren und auf Trockeneis transportierten Seren, die an Pankreaskarzinom erkrankt waren. Es beinhaltete 3 Patienten, die mit Erlotinib behandelt wurden. Die Proben wurden in der Tiefkühltruhe bei einer Temperatur von -80°C aufbewahrt und mit einem Heizblock (Techne Dri Block DB2A) aufgetaut

5.1 HPLC – Analyse

Um die Konzentration von Erlotinib feststellen zu können, wurde zunächst eine Festphasenextraktion oder eine Ultrafiltration durchgeführt. Die Trennung sowie die quantitative und qualitative Analyse erfolgte mittels des HPLC – Verfahrens.

5.2 Quantifizierung von Erlotinib

Festphasenextraktion:

Vortex	Heidolph Polymax 2040
Kartusche	SPE cartridges Oasis
Lösungsmittel	Methanol, Na_2HPO_4 -Lösung, Na_2HPO_4 - Methanol
Zentrifuge	Labofuge 400

Tabelle 1 Geräte und Material



Abbildung 12 Vortex

Durchführung

- am Vortex kurzes Mischen der Proben
- auf die Vakuumapparatur die Kartuschen aufstecken
- anlegen eines Vakuums
- mittels 1 ml Methanol die Silikapackung aktivieren
- Konditionierung mit 1 ml Na₂HPO₄-Lösung
- 1,0 ml Probenlösung auftragen
- waschen mit 1,0 ml Na₂HPO₄-Lösung
- Elution von Erlotinib mit 1,0 ml Na₂HPO₄-Lösung-Methanol (9 + 1%, v/v), wobei das Eluat nach 1 min Zentrifugieren bei 1000 U in einer Eprouvette gesammelt wird
- die Probelösung in Vials abfüllen

Herstellung des Eluenten:

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

EzChrom Elite HPLC System	
Vorsäule	LiChrospher®
Trennsäule	CC 250/4
Kartuschensystem	LiChroCART®
Säulenofen	Jeatstream 2
Säulentemperatur	37°C
Eluent	Acetonitril - Wasser
Detektor	Hitachi L-2450 Diode Array Detektor
Pumpe	Hitachi L-2130 Pumpe
Autosampler	Hitachi L-2200 Auto-Sampler
Software	EZChrom Elite

Tabelle 2 Analytische Parameter des HPLC-Gerätes

Eichgerade:

Als erstes erstellt man eine Standardlösung von Erlotinib, in dem man 4,12mg Erlotinib in 8,24ml Wasser – Methanol (1 + 1%v/v) löst. Man erhält eine Konzentration von 0,5 mg/ml. Es wird eine Konzentration von 10 mg/ml benötigt. Dazu muss man 40 µg/ml der Erlotinib Lösung mit 1960 µl Plasma verdünnen und anschließend am Vortex gut mischen. Anschließend wird eine Verdünnungsreihe hergestellt. Dazu wird die Erlotinib Lösung weiter mit Plasma verdünnt und gemischt bis man eine Konzentration von 0,02µg/ml erreicht.

Konzentrationen:

5,000 µg/ml	= 1ml 10,000 µg/ml + 1ml Plasma
2,500 µg/ml	= 1ml 5,000 µg/ml + 1ml Plasma
1,250 µg/ml	= 1ml 2,500 µg/ml + 1ml Plasma
0,6250 µg/ml	= 1ml 1,250 µg/ml + 1ml Plasma
0,3120 µg/ml	= 1ml 0,6250 µg/ml + 1ml Plasma
0,1560 µg/ml	= 1ml 0,3120 µg/ml + 1ml Plasma
0,0780 µg/ml	= 1ml 0,1560 µg/ml + 1ml Plasma
0,0390 µg/ml	= 1ml 0,0780 µg/ml + 1ml Plasma

Tabelle 3 Verdünnungsreihe Erlotinib für Konzentrationsgerade

Anschließend führt man wie oben beschrieben eine Festphasenextraktion durch und chromatographiert die erhaltenen Proben.

Die Peak Flächen und die Konzentrationen verhalten sich linear. Mittels der Gleichung $y = k * x + d$ wird eine Gerade ermittelt. Bei y handelt es sich um die Peak Fläche, mit k wird die Steigung ermittelt, x ergibt die Konzentration und d gibt den Ordinatenabschnitt der Geraden wieder. Die Gerade geht durch den Nullpunkt, somit ist d gleich Null. Durch umformen der obigen Gleichung, ergibt sich $x = y/k$. So lässt sich die Konzentration von Erlotinib im Plasma des Patienten bestimmen.

Conc. µg/ml	0,039	0,078	0,156	0,312	0,625	1,250	2,500	5,000
Erlotinib Fläche	2.800	5.000	10.000	23.800	50.900	99.100	223.000	455.000

Tabelle 4 Konzentrationen und Flächen der Verdünnungsreihen der Erlotinib - Standardlösungen

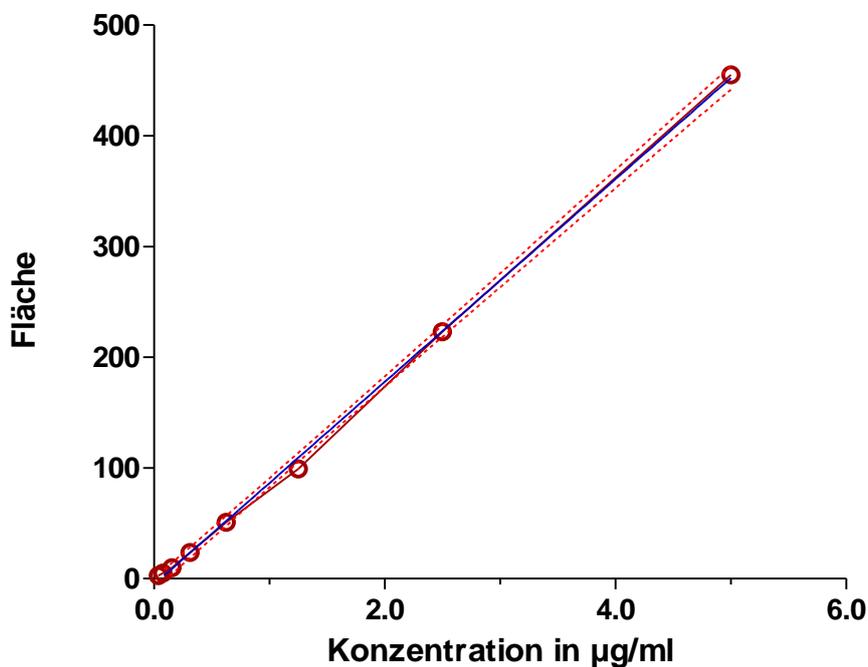


Abbildung 13 Eichgerade Erlotinib Festphasenextraktion

Best-fit values	
Slope	91.49 ± 1.057
Y-intercept when X=0.0	-5.201 ± 2.158
X-intercept when Y=0.0	0,05685
1/slope	0,01093
95% Confidence Intervals	
Slope	88.90 to 94.07
Y-intercept when X=0.0	-10.48 to 0.07923
X-intercept when Y=0.0	-0.0008813 to 0.1127
Goodness of Fit	
r ²	0,9992
Sy.x	4,837
Is slope significantly non-zero?	
F	7489
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

Tabelle 5 Statistische Parameter der Eichgerade

Ultrafiltration mit Vivaspin ohne Vorkonditionierung

Vortex	Heidolph Polymax 2040
Ultrafiltrationsröhrchen	Vivaspin mit einer Ausschlußgrenze von 5 kDa
Zentrifuge	VWR Galaxy 16 DH



Abbildung 14 Ultrafiltrationsröhrchen der Marke Vivaspin

Zu Beginn der Versuchsreihe wurde die Ultrafiltration mit den Ultrafiltrationsröhrchen der Marke Vivaspin, welche eine Ausschlußgrenze von 5000 kDa haben, durchgeführt.

Durchführung:

- Röhrchen mit Wasser waschen um die Glyzerinschicht zu entfernen
- Röhrchen zentrifugieren.
- Das Wasser wird verworfen.
- Das Blutplasma einer Patientenprobe auftragen und zentrifugieren.
- Abfüllen der Probelösung in Vials.

Ultrafiltration mit Vivaspin mit Vorkonditionierung

Vortex	Heidolph Polymax 2040
Ultrafiltrationsröhrchen	Vivaspin Ausschlußgrenze 10 kDa; 30 kDa
Zentrifuge	VWR Galaxy 16 DH



Abbildung 15 Zentrifuge

Herstellung einer Standardlösung von Erlotinib, um die Ultrafiltrationsröhrchen vor konditionieren zu können. Hierfür benötigt man die Standardlösung von der Eichgerade mit einer Konzentration von 0,5mg/ml. Diese Standardlösung wird mit Wasser 1:100 verdünnt.

Für 10ml Standardlösung werden 100µl Erlotinib(0,5mg/ml) mit 9900µl Wasser verdünnt. Anschließend muss die Lösung noch am Vortex gut vermengt werden, um eine homogene Standardlösung zu gewährleisten.

Um zu testen, ob mit den Ultrafiltrationsröhrchen der Marke Vivaspin, eine aussagekräftige Trennung möglich ist, benötigt man eine Plasmalösung. Dazu mischt man 40µl Erlotinib(0,5mg/ml) mit 3960µl Plasma. Dieses Gemisch muss noch am Vortex vermischt werden, um ein gleichmäßiges Gemisch herzustellen. So erhält man eine 4ml Erlotinib-Plasmalösung.

Durchführung der Ultrafiltration:

- die Röhren mit Wasser waschen um die Glyzerinschicht zu entfernen
- Röhren zentrifugieren
- das Wasser wird verworfen
- die Röhren werden mit einer Standardlösung von Erlotinib vor-konditioniert
- Röhren zentrifugieren
- die Probe in Vials füllen
- Vorgang des Konditionierens sechsmal wiederholen
- Plasma mit Erlotinib in die Röhren füllen
- Röhren zentrifugieren
- Probe in Vials füllen

Ultrafiltration mit Centrisart

Vortex	Heidolph Polymax 2040
Ultrafiltrationsröhrchen	Centrisart 5kDa, 10kDa
Zentrifuge	Labofuge 400



Abbildung 16 Ultrafiltrationsröhrchen der Marke Centrisart

- die Röhrchen mit Wasser waschen um die Glycerinschicht zu entfernen
- die Röhrchen zentrifugieren
- das Wasser wird verworfen
- die Röhrchen werden mit einer Standardlösung von Erlotinib vor-konditioniert
- die Probe in Vials füllen
- der Vorgang der Konditionierung wurde siebenmal wiederholt
- die Röhrchen mit Wasser spülen
- das Blutplasma eines Patienten auftragen
- das Filtrat in Vials füllen

Da die Konzentration von Erlotinib im Ultrafiltrat geringer ist, als nach einer Festphasenextraktion, muss man für die Ultrafiltration eine eigene Eichgerade erstellen.

Conc. µg/ml	0,0390	0,0780	0,1560	0,3120	0,6250
Erlotinib Fläche	2.800	5.000	10.000	23.800	50.900

Tabelle 6 Konzentration und Fläche der Erlotinib - Standardlösungen

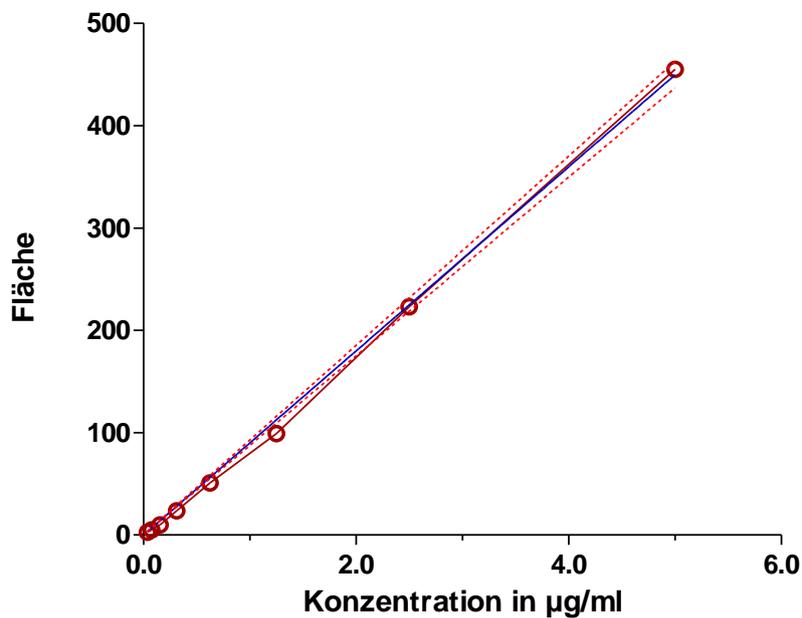


Abbildung 17 Konzentration der Eichgerade von Erlotinib UF

Goodness of Fit	
Sy.x	1,563
Is slope significantly non-zero?	
t	36,63
DF	4,000
P value	< 0.0001
Deviation from zero?	Significant
Data	
Number of X values	5
Maximum number of Y replicates	1
Total number of values	5
Number of missing values	0

Tabelle 7 Statistische Parameter der Eichgerade

Außerdem ist zu beachten, dass die maximale relative Zentrifugalbeschleunigung 2500g nicht überschreitet. Dazu benötigt man die Formel $F = 1.12 \times 10^{-5} \text{ rpm}^2 \times r$. Der Radius der Zentrifuge „Labofuge 400“ beträgt 160mm. Daraus ergibt sich, eine Drehzahl von 3500 U/min, die nicht überschritten werden darf.

5.3 Auswertung

5.3.1 Programme

GraphPad Prism 5.00

Dieses Programm wurde von der Firma GraphPad Software Inc. entwickelt. Es ist ein statistisches Programm, mit welchem man wissenschaftliche Daten analysieren und aufarbeiten kann.

MDL ISIS Draw

Es ist ein frei zugängliches Programm, welches speziell dazu entwickelt wurde, chemische Formeln zeichnen zu können.

Microsoft Exel

Microsoft Exel von der Firma Microsoft Corporation ist ein Tabellenkalkulationsprogramm, mit welchem Berechnungen mittels Formeln und Funktionen durchführbar sind. Die Ergebnisse können außerdem noch mittels ein oder mehrerer Graphen dargestellt werden.

5.3.2 Statistische Definitionen

Lagemaße

Lagemaße beschreiben die Position der Daten, welche beobachtet wurden, mittels eines aus den Daten berechneten Werts, und stellen das Maß der zentralen Tendenz dar. Mittels Lageparameter wird die Lage von Merkmalswerten gekennzeichnet, z.B. der kleinste oder größte Wert.

Der Mittelwert stellt einen Durchschnittswert der ermittelten Werte dar.

Streuungsmaße

Streuungsparameter sind Kennzahlen für das Ausmaß der Streuung. Sie geben die Intervallbreite der Merkmalswerte wieder. Mittels Varianz wird die mittlere quadratische Abweichung der einzelnen Beobachtungen vom arithmeti-

schen Mittel ermittelt. Die Standardabweichung ist die Quadratwurzel aus der Varianz.

t – Test

Der t – Test vergleicht den Mittelwert zweier Gruppen und bewertet den statistischen Unterschied. So kann man z. B. beurteilen, ob verschiedene unabhängige Messungen, einheitlich sind.

Wenn man gleich viele Stichprobenwerte miteinander vergleicht, spricht man von einem gepaarten t-Test, bei unterschiedlichen Werten muss man einen ungepaarten t-Test durchführen.

6 Patientendaten

Patient	22	23
Geschlecht	weiblich	Männlich
Herkunft		kaukasier
Gewicht	48,7kg	73kg
Größe	156,5	176cm ²
Körperfläche	1,47m ²	1,89 m ² berechnet nach Dubios formula
Metastasen	1 x Metastasen in Leber	Suspect Subpleural lesion
Tumore	4	

7 Ergebnisse und Diskussion

Es wurden Proben von Patienten, die mit Erlotinib gegen das Pankreskarzinom behandelt worden sind, eine Festphasenextraktion und anschließend eine Ultrafiltration durchgeführt. Ziel war es festzustellen, wie viel Erlotinib an Plasmaproteine gebunden ist. Dies sollte mittels der Ultrafiltration beantwortet werden.

Den Patienten wurden Blutproben abgenommen. Die erste Abnahme erfolgte vor der erstmaligen Gabe von Erlotinib (100mg peroral) zum Zeitpunkt Null. Es erfolgte dann in den ersten sechs Stunden eine stündliche Abnahme der Blutprobe. Eine weitere Abnahme erfolgte 8 Stunden nach der Erstapplikation von Erlotinib.

Anschließend wurde dem Patienten täglich einmal direkt nach der Applikation und 4h später über eine Woche Blut abgenommen.

7.1 Festphasenextraktion von Patient 22, 23 und 27

Um einen Vergleich zwischen den freien Anteil von Erlotinib und den an Plasmaproteine gebunden Anteil treffen zu können, musste zuerst eine Festphasenextraktion durchgeführt werden. Mittels der Festphasenextraktion wird Erlotinib von den Matrixbestandteilen des Blutplasmas getrennt.

Außerdem wird der Konzentrationsverlauf von Erlotinib während der Therapie sichtbar.

Zeit	Konzentration
0	0,000
1	0,620
2	1,570
3	1,186
4	0,637
5	0,854
6	0,762
8	0,551
24	0,136
28	1,348
48	0,124
52	1,258
72	0,098
76	1,072
96	0,106
100	1,053
120	0,092
124	0,971
144	0,098
148	0,907
168	0,060
172	0,986

Tabelle 8 Patient 22: Plasmakonzentration von Erlotinib nach SPE

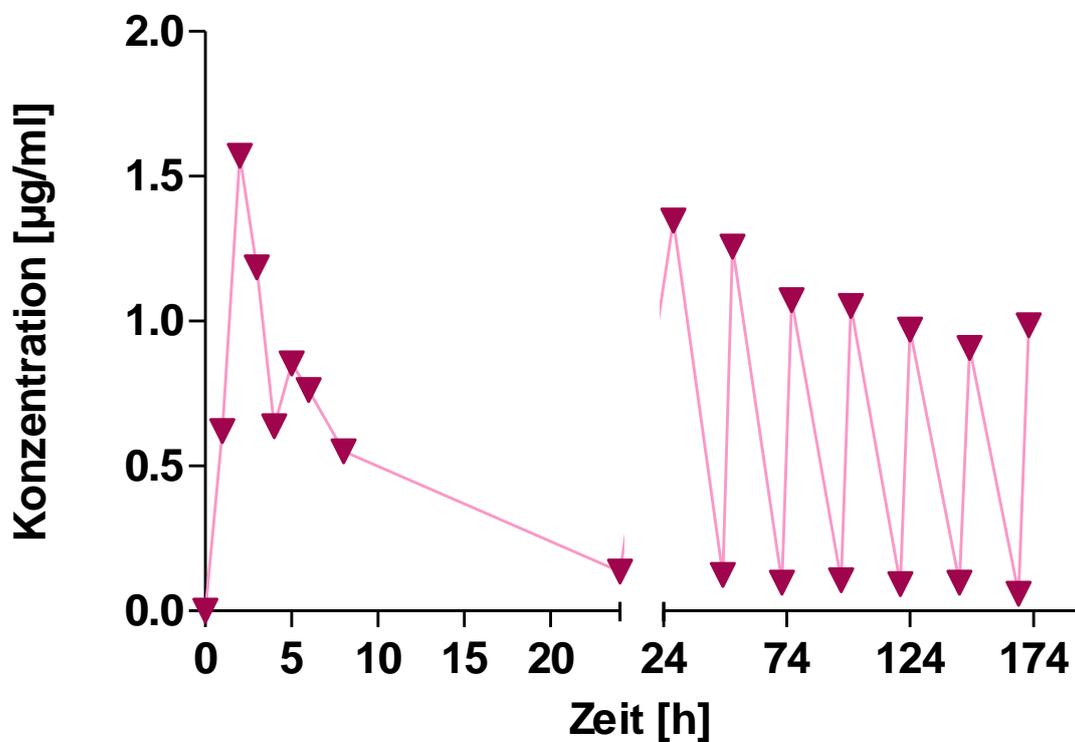


Abbildung 18 Patient 22: Konzentrations-Zeit-Kurve nach SPE

Zeit	Konzentration
0	0,000
1	0,405
2	0,548
3	0,530
4	0,659
5	0,763
6	0,647
8	0,759
24	0,451
28	1,667
48	0,790
52	1,949
72	0,852
76	2,086
96	0,604
100	0,511
120	0,623
124	1,690
144,	0,537
148	1,356
168	1,809
172	0,653

Tabelle 9 Patient 23: Plasmakonzentration von Erlotinib

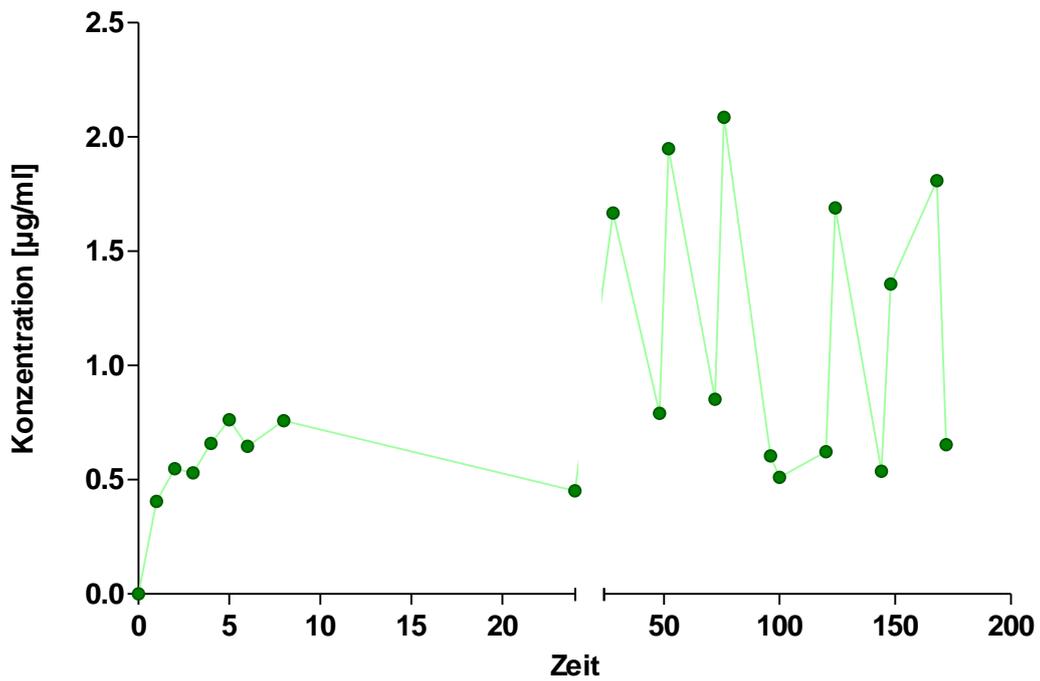


Abbildung 19 Patient 23: Konzentrations-Zeit-Kurve von Erlotinib nach SPE

Zeit	Konz
0	0,000000
1	2,295044
2	3,730533
3	3,146378
4	2,955733
5	3,231533
6	3,371233
8	2,855145
24	1,424356
28	5,364533
48	2,534078
52	5,927389
72	2,873356
76	7,638956
96	3,366822
100	7,975900
120	3,177822
124	7,612733
144	2,972622
148	6,806422
168	3,265711
172	7,358222

Tabelle 10 Patient 27: Konzentration von Erlotinib nach SPE

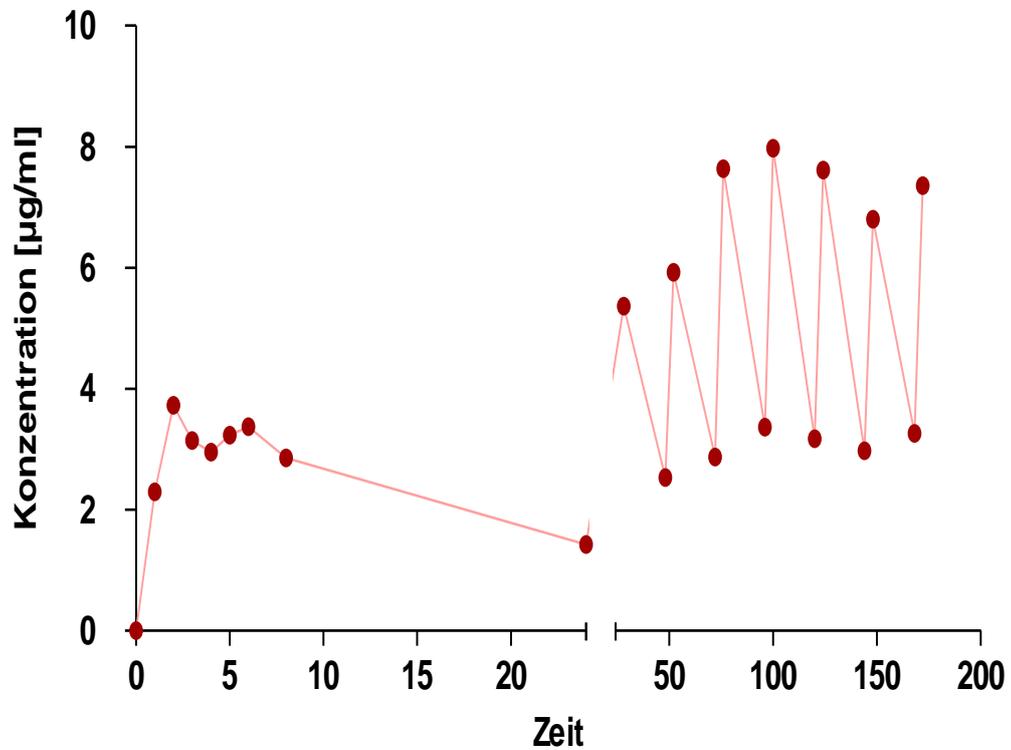


Abbildung 20 Patient 27: Konzentrations-Zeit-Kurve von Erlotinib

Zeit	Pat 22	Pat 23	Pat 27
0	0,000	0,000	0,000000
1	0,620	0,405	2,295044
2	1,570	0,548	3,730533
3	1,186	0,530	3,146378
4	0,637	0,659	2,955733
5	0,854	0,763	3,231533
6	0,762	0,647	3,371233
8	0,551	0,759	2,855145
24	0,136	0,451	1,424356
28	1,348	1,667	5,364533
48	0,124	0,790	2,534078
52	1,258	1,949	5,927389
72	0,098	0,852	2,873356
76	1,072	2,086	7,638956
96	0,106	0,604	3,366822
100	1,053	0,511	7,975900
120	0,092	0,623	3,177822
124	0,971	1,690	7,612733
144	0,098	0,537	2,972622
148	0,907	1,356	6,806422
168	0,060	1,809	3,265711
172	0,986	0,653	7,358222

Tabelle 11 Vergleich Konzentrationen von Patient 22, 23 und 27

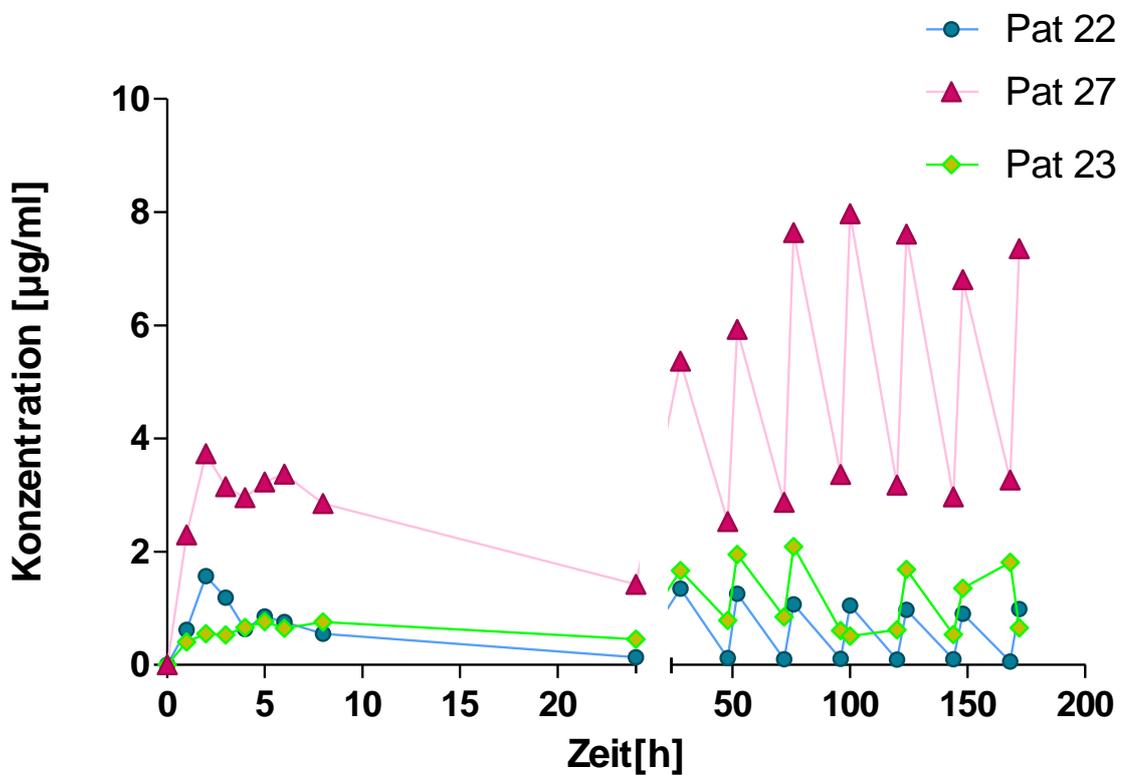


Abbildung 21 Vergleich der Konzentrations-Zeit-Kurve von Patient 22,23 und 27

Unmittelbar nach Verabreichung von Erlotinib steigt dessen Konzentration im Blut stark an, etwa vier - sechs Stunden nach der Verabreichung sinkt die Konzentration schließlich wieder. Das Konzentrationsmaximum wird also vier bis sechs Stunden nach der Gabe von Erlotinib erreicht. Nach weiterer täglicher Gabe von Erlotinib stellt sich ein Stady State ein, in dem die Konzentration immer zwischen einen Maximum und Minimum fluktuiert.

Wenn man die Konzentrations-Zeit-Kurven der Patienten 22, 23 und 27 miteinander vergleicht, erkennt man, dass Patient 27 die höchste Blutkonzentration von Erlotinib hat.

Die Blutkonzentrationen von Patient 22 und 23 sind annähernd gleich. Die Kurve an Tag 1 bei Patient 23 weist die geringste Steigung auf.

7.2 Ultrafiltration mit Vivaspin

Die erste Analyse erfolgte mit Ultrafiltrationsröhrchen der Marke Vivaspin mit einer Ausschlussgrenze von 5 kDa. Hier wurden die Röhrchen nicht vor-konditioniert. Nach der Auswertung der Chromatogramme der HPLC, musste festgestellt werden, dass die Ultrafiltrationsmembran unbedingt mit einer Erlotinib-Standardlösung abgesättigt werden muss. Es wurde im Chromatogramm des Ultrafiltrats der Patienten 22 und 23 kein Erlotinib gefunden, da die Membran der Ultrafiltrationsröhrchen nicht abgesättigt waren.

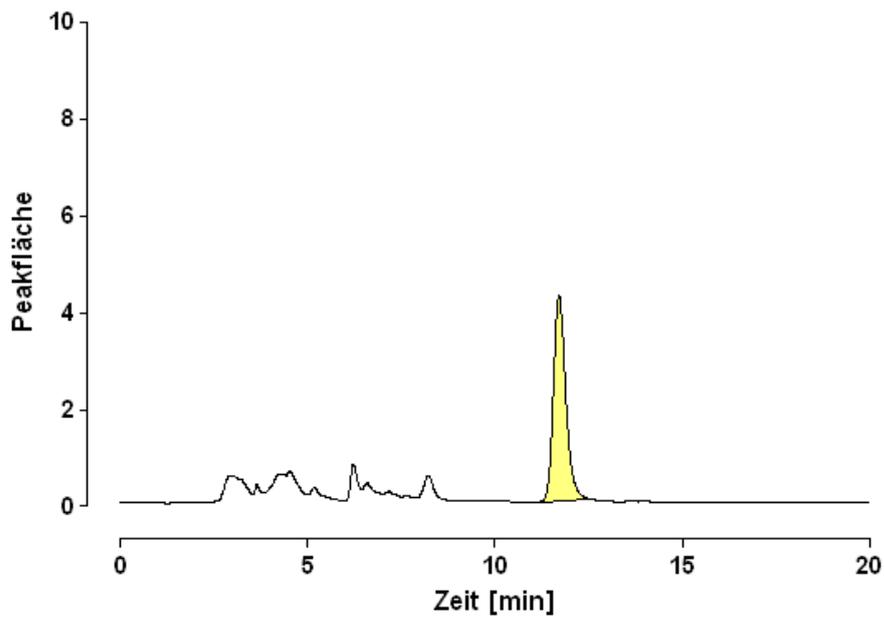


Abbildung 22 Patient 22: HPLC - Chromatogramm nach SPE

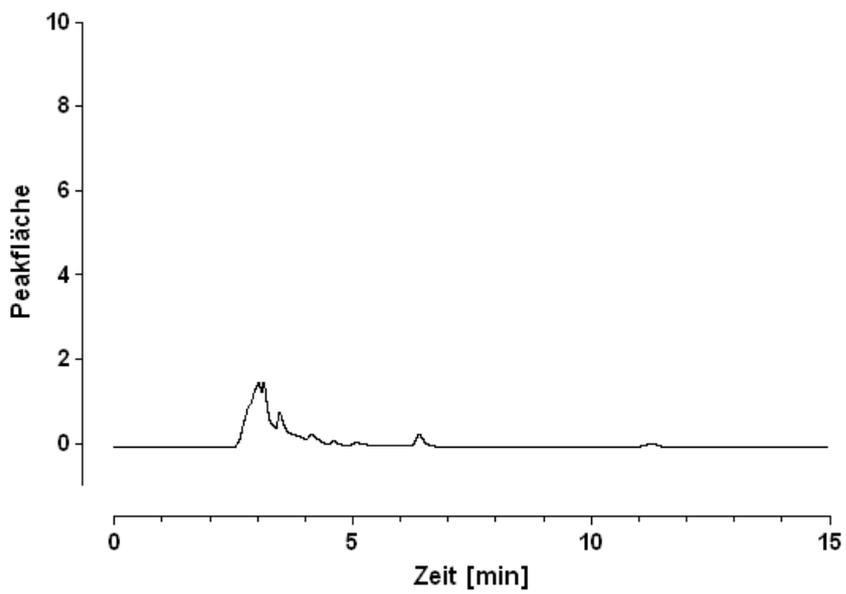


Abbildung 23 Patient 22: HPLC - Chromatogramm nach UF

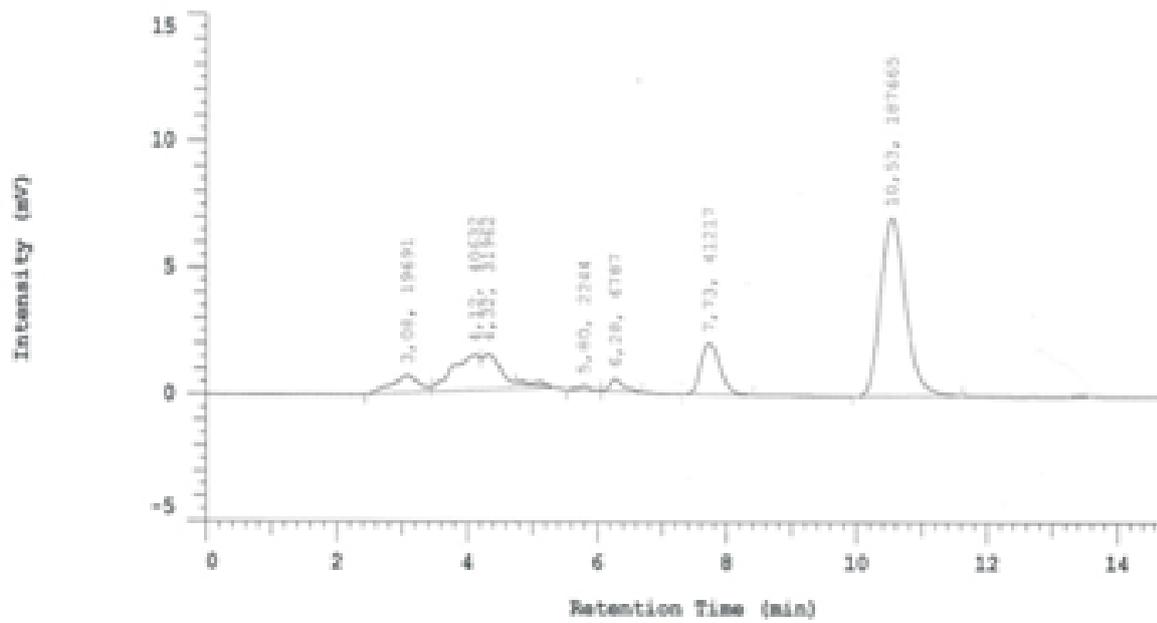


Abbildung 24 Patient 23: HPLC - Chromatogramm nach SPE

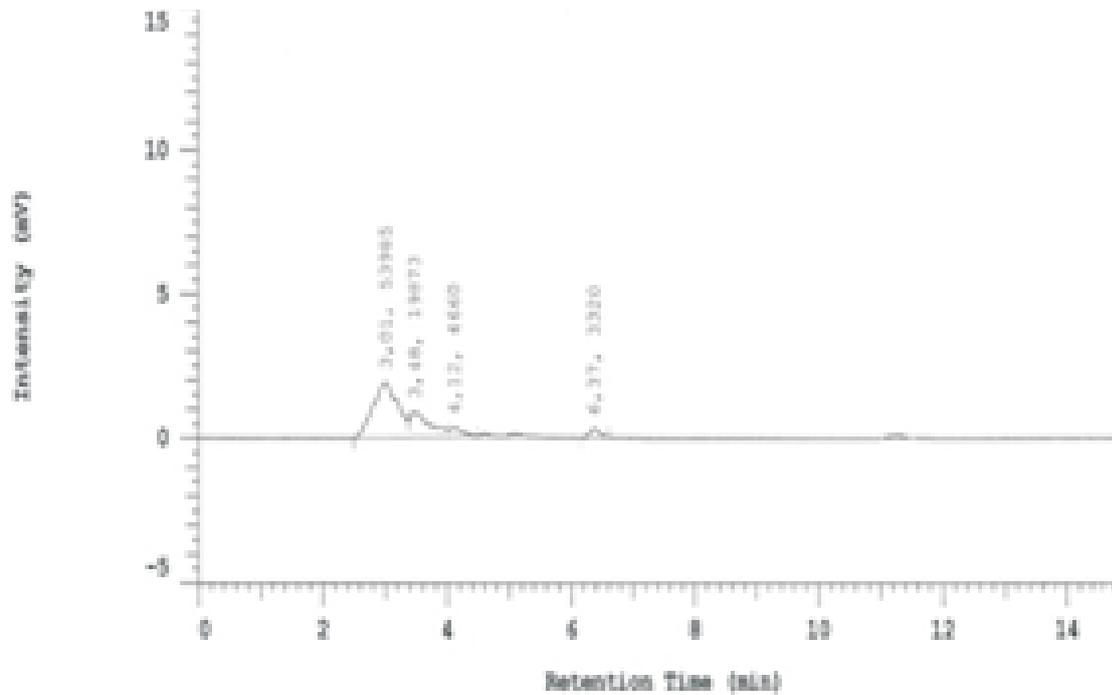


Abbildung 25 HPLC - Chromatogram nach UF

Im zweiten Schritt wurden die Ultrafiltrationsröhrchen mit einer Standardlösung, welche eine Konzentration von 5µg/ml hatte, abgesättigt. Ebenso wurden die Ultrafiltrationsröhrchen mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDa und 30 kDa miteinander verglichen.

Auswertung:

Konditionierung Vivaspin 10kDa	A	B	C	D
0				
1				
2				
3	0,79	0,62	0,33	0,086
4	1,18	1,22	0,56	0,45
5	1,45	1,29	0,74	0,63
6	3,25	2,59	1,18	0,71

Tabelle 12 Konzentration der Vorkonditionierung von Vivaspin 10 kDa

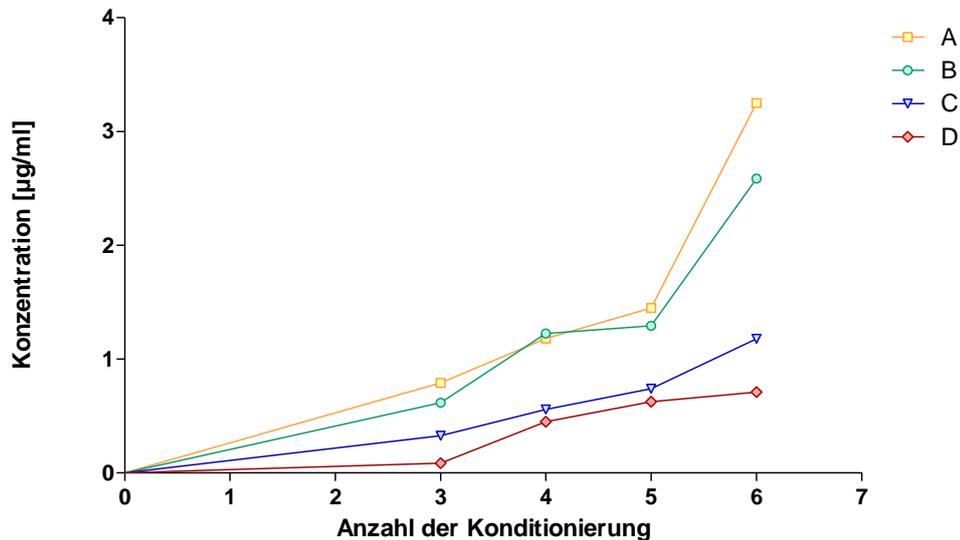


Abbildung 26 Sättigungskurve Vivaspin 10 kDa

Anhand der Sättigungskurve erkennt man, dass nach sechsmaligem Konditionieren der Membran, diese noch nicht vollständig abgesättigt ist. Weiters ist die unterschiedlich hohe Sättigung der verschiedenen Röhrchen erkenntlich. Ausschließlich Kurve D scheint sich einer Sättigung zu nähern. Augenscheinlich ähneln sich die Kurven A, B als auch die Kurven C, D.

Die Konditionierung der Ultrafiltrationsröhrchen der Marke Vivaspin erfolgte ebenfalls mit einer Standardlösung, welche eine Konzentration von 5µg/ml beträgt.

Im Vergleich zeigt die Konditionierung von Vivaspin 30 kDa folgendes:

Konditionierung Vivaspin 30 kDa	A	B	C	D
0				
1				
2				
3	2,05	1,27	1,57	1,41
4	3,20	4,55	3,15	4,17
5	2,98	5,21	4,34	5,21
6	4,11	5,94	4,91	5,83

Tabelle 13 Konzentrationen der Vorkonditionierung Vivaspin 30 kDa

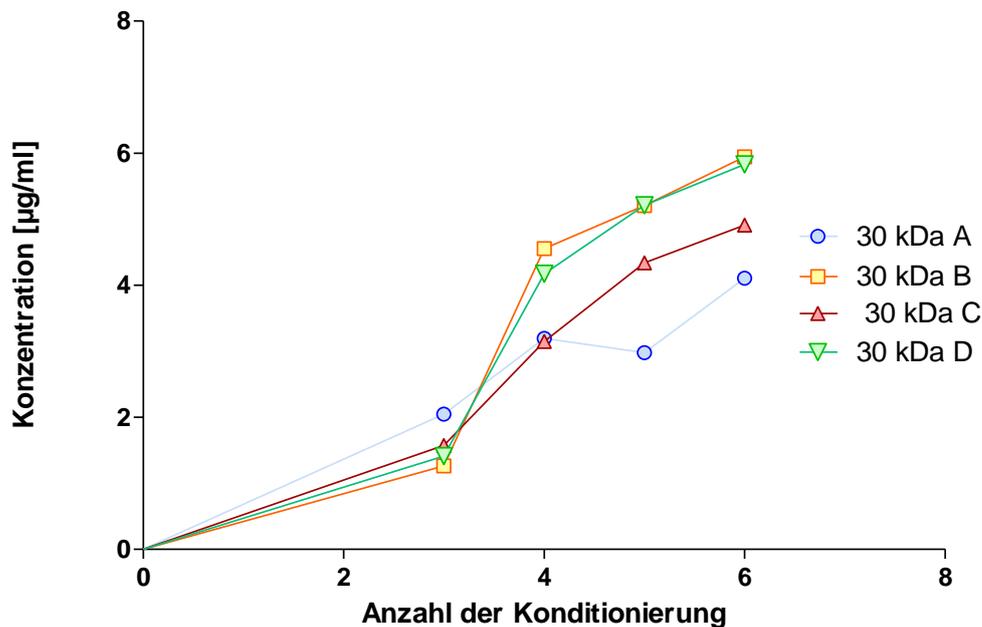


Abbildung 27 Sättigungskurve Vivaspin 30 kDa

Anhand Abbildung 21 erkennt man, dass die Ultrafiltrationsröhrchen nach sechsmaligem Konditionieren abgesättigt sind. Die Kurven sind sich ähnlicher als die Kurven der Abbildung 20. Die Kurven B, C und D sehen einer Sättigungskurve sehr ähnlich, während die Kurve A als Ausreißer gelten kann. Die Konzentration des Röhrchens bei der 5. Konditionierung weist eine geringe Konzentration auf als die Konzentration des Röhrchens während der 4. Konditionierung.

Um die Daten vergleichen zu können, werden Mittelwert und Standardabweichung nach unten genannten Formeln ermittelt:

$$x = \frac{x_1 + x_2 + x_3 + \dots + x_n}{n}$$

$$s = \frac{(x_1 - x)^2 + (x_2 - x)^2 + \dots + (x_n - x)^2}{n}$$

Aus obigen Daten wurden folgende Mittelwerte und Standardabweichungen gewonnen

Konditionierung	Ausschlußgrenze 10 kDa		Ausschlußgrenze 30 kDa	
	Mittelwert	Standardabweichung	Mittelwert	Standardabweichung
0				
1				
2				
3	1,822300	0,2701154	6,299250	0,2943439
4	3,410075	0,3511676	15,073500	0,6115248
5	4,114713	0,3515386	17,741590	0,9120004
6	7,728500	1,029034	20,792000	0,7466782

Tabelle 14 Mittelwert und Standardabweichung Vivaspin 10 kDa und 30 kDa

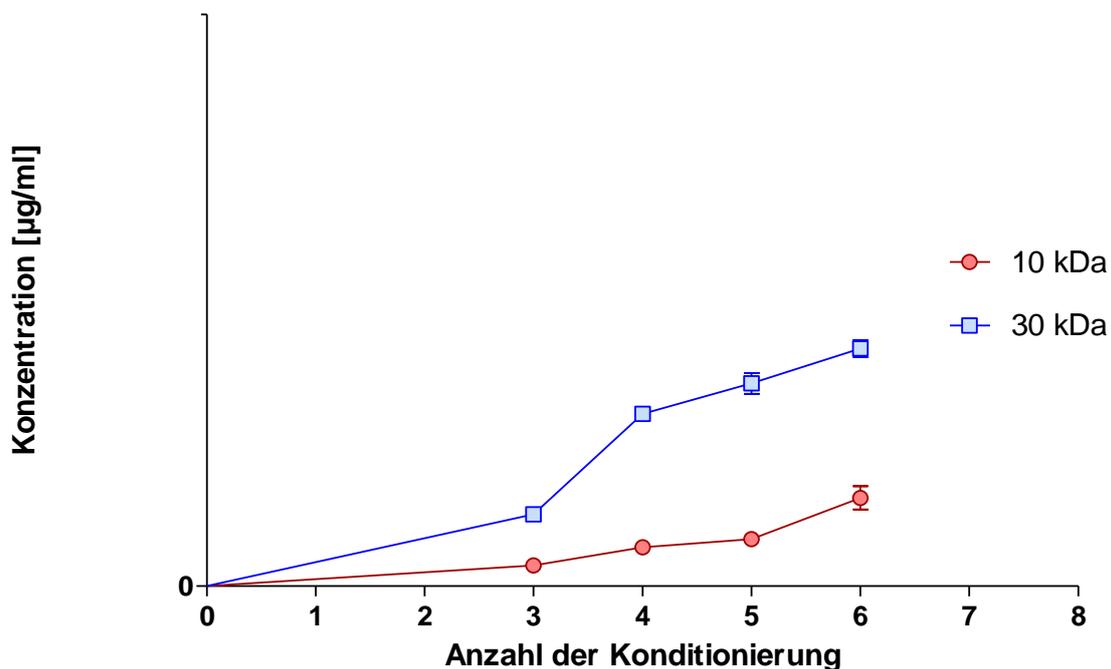


Abbildung 28 Mittelwert und Standardabweichung von Vivaspin 10kDa und 30kDa

Man sieht beim Vergleich der beiden Sättigungskurven, dass die 30 kDa Röhren abgesättigt sind. Außerdem ist die Kurve höher und zeigt dadurch eine höhere Konzentration.

Nachdem die Membran der Röhrrchen abgesättigt wurde, hat man eine Erlotinib-Plasmalösung zentrifugiert um eine Aussage darüber treffen zu können, ob eine Ultrafiltration mit diesen Röhrrchen möglich ist oder nicht.

	Plasmakonzentration	Plasmakonzentration
Anzahl der Röhrrchen	10kD	30kD
1	1,380250	1,664625
2	0,654500	2,979375
3	0,322625	1,871500
4	0,072000	2,824625

Tabelle 15 Vergleich Plasmakonzentration Vivaspin 10 kDa und 30 kDa

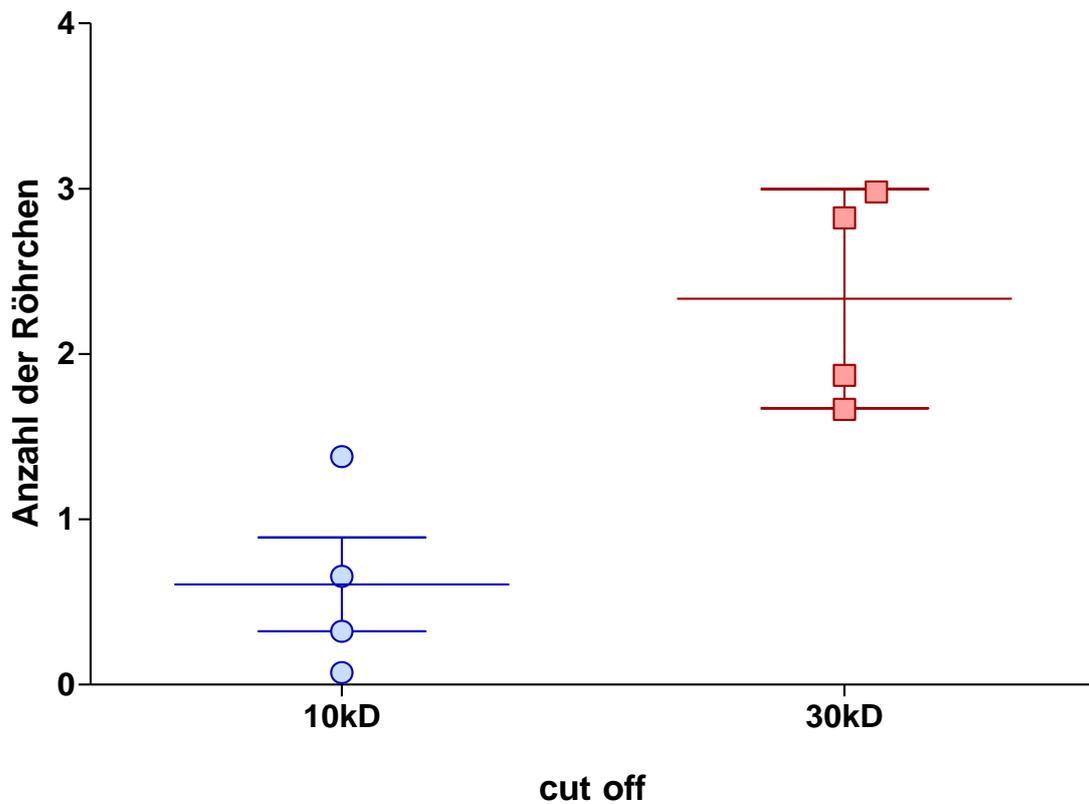


Abbildung 29 Scattergramm Plasmakonzentrationen von Vivaspin 10 kDa und 30 kDa

Table Analyzed	plasma
Column A	10kD
vs	vs
Column B	30kD
Paired t test	
P value	0,0249
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	One-tailed
t, df	t=3.189 df=3
Number of pairs	4
How big is the difference?	
Mean of differences	-1,728
95% confidence interval	-3.452 to -0.003756
R squared	0,7722
How effective was the pairing?	
Correlation coefficient (r)	-0,5470
P Value (one tailed)	0,2265
P value summary	ns
Was the pairing significantly effective?	No

Tabelle 16 Statistische Parameter des Scattergram

Anhand des Scattergramms von Abbildung 23 der Plasmakonzentrationen erkennt man, dass die Punkte weit auseinander liegen. Bei den Röhren mit einer Ausschlussgrenze 10kDa, liegen zwei Punkte außerhalb der Grenzen. Generell sind die Punkte stärker gestreut als die Röhren mit einer Ausschlussgrenze von 30kDa.

Auch die Röhren mit einer Ausschlussgrenze von 30 kDa liegen weit auseinander. Trotzdem liegen hier zumindest immer zwei Punkte beieinander. Die Bestimmung der Plasmaproteinbindung eines Arzneistoffes, hat hier besser funktioniert.

Der t-Test zeigt ebenfalls, dass ein signifikanter Unterschied herrscht.

Trotz allem sind aber beide Röhren nicht für eine Aussagekräftige Analyse der Plasmaproteinbindung geeignet.

Schlussendlich wurden noch die Retentionszeiten von der Erlotinib-Standardlösung und der Erlotinib-Plasmalösungen verglichen.

10a	10b	10c	10d	30e	30f	30g	30h	Plasma10kD	Plasma 30kD
9,2	9,3	9,30	9,3	9,3	9,30	9,3	9,3	9,97	10,04
9,3	9,3	9,40	9,4	9,3	9,34	9,4	9,4	10,30	10,07
9,4	9,4	9,37	9,4	9,4	9,37	9,4	9,4	9,94	10,10
9,4	9,4	9,40	9,4	9,4	9,40	9,4	9,4	10,03	10,05

Tabelle 17 Vergleich Retentionszeiten von den Erlotinib-Standardlösungen und Plasma von Vivaspin 10kDa und 30kDa

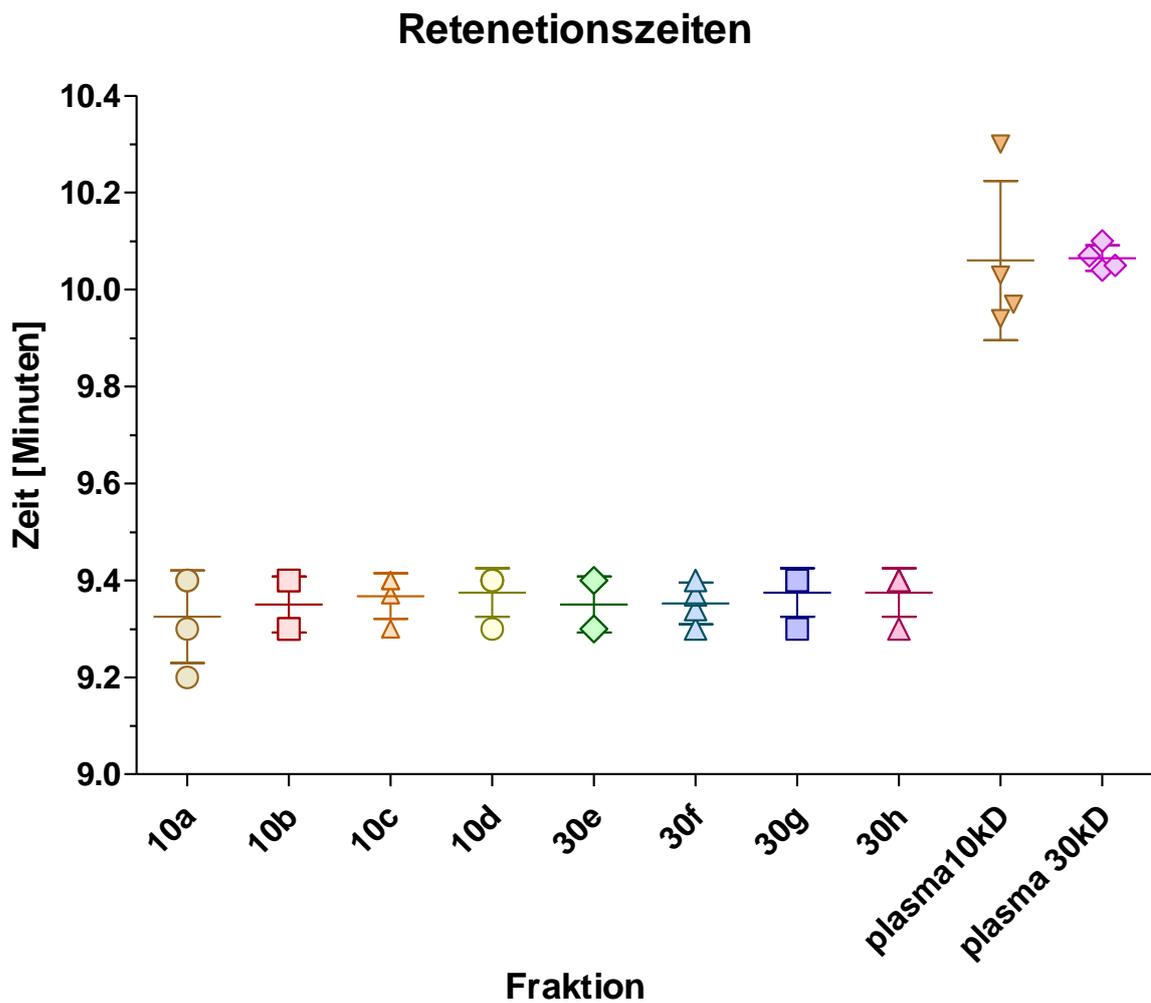


Abbildung 30 Vergleich der Retentionzeiten von Erlotinib-Standardlösung und Plasma von Vivaspin 10kDa und 30kDa

Erlotinib-Standard	Plasma
9,20	9,97
9,30	10,30
9,40	9,94
9,40	10,03
9,30	10,04
9,30	10,07
9,40	10,10
9,40	10,05
9,30	
9,40	
9,37	
9,40	
9,30	
9,40	
9,40	
9,30	
9,30	
9,40	
9,40	
9,30	
9,34	
9,37	
9,40	
9,30	
9,40	
9,40	
9,40	
9,30	
9,40	
9,40	
9,40	
9,30	
9,40	
9,40	
9,40	

Tabelle 18 Retentionszeiten von Erlotinib-Standardlösung und Plasma

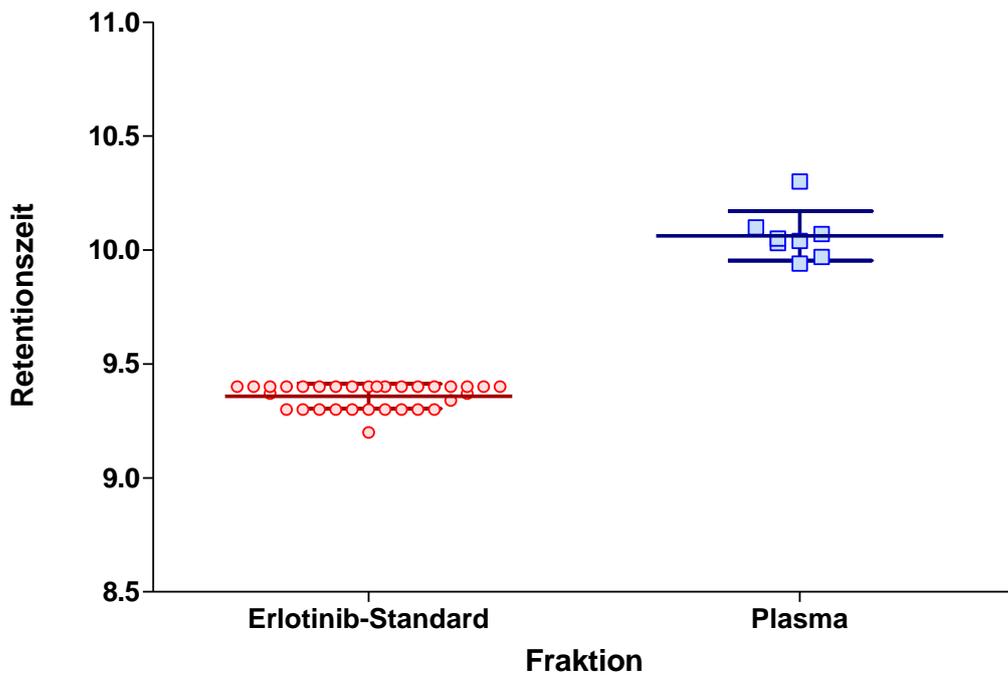


Abbildung 31 Scattergram von Retentionszeiten der Erlotinib-Standardlösung und Plasma

	Erlotinib-Standard	Plasma
Number of values	32	8
Minimum	9,20	9,94
25% Percentile	9,30	9,99
Median	9,40	10,0
75% Percentile	9,40	10,1
Maximum	9,40	10,3
10% Percentile	9,30	9,94
90% Percentile	9,40	10,3
Mean	9,36	10,1
Std. Deviation	0,0542	0,109
Std. Error	0,00958	0,0385
Lower 95% CI of mean	9,34	9,97
Upper 95% CI of mean	9,38	10,2
Coefficient of variation	0.58%	1.08%
Geometric mean	9,36	10,1
Lower 95% CI of geo. mean	9,34	9,97
Upper 95% CI of geo. mean	9,38	10,2
Sum	299	80,5
Unpaired t test		
P value	P<0.0001	
P value summary	***	
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes	
One- or two-tailed P value?	One-tailed	
t, df	t=26.3 df=38	
How big is the difference?		
Mean ± SEM of column A	9.36 ± 0.00958 N=32	
Mean ± SEM of column B	10.1 ± 0.0385 N=8	
Difference between means	-0.704 ± 0.0268	
95% confidence interval	-0.758 to -0.650	
R squared	0,948	
F test to compare variances		
F,DFn, Dfd	4.05, 7, 31	
P value	0,0059	
P value summary	**	
Are variances significantly different?	Yes	

Tabelle 19 Statistische Daten des Scattergrams der Retentionszeiten

Die Retentionszeiten von den Standardlösungen der Röhren mit 30kDa und mit 10kDa sind nahezu gleich. Allerdings erkennt man, dass die Plasmapeaks von den Röhren mit 10kDa und 30kDa um einige Sekunden später gebildet werden. Man kann darauf schließen, dass Erlotinib, welches an Plasma gebunden ist, strukturell verändert wird und dadurch hydrophiler wird.

7.3 Ultrafiltration mit Centrisart

Da die Ultrafiltration mit den Röhrcchen von Vivaspin nicht optimal funktionierte, wurden noch Ultrafiltrationsröhrcchen der Marke Centrisart verwendet.

Konditionierung	Röhrcchen 1	Röhrcchen 2
1	0,00000	0,000000
2	0,06425	0,000000
3	0,26600	0,166250
4	18,16375	0,473250
5	32,22500	0,946125

Tabelle 20 Konditionierung Ultrafiltrationsröhrcchen Centrisart 5 kDa

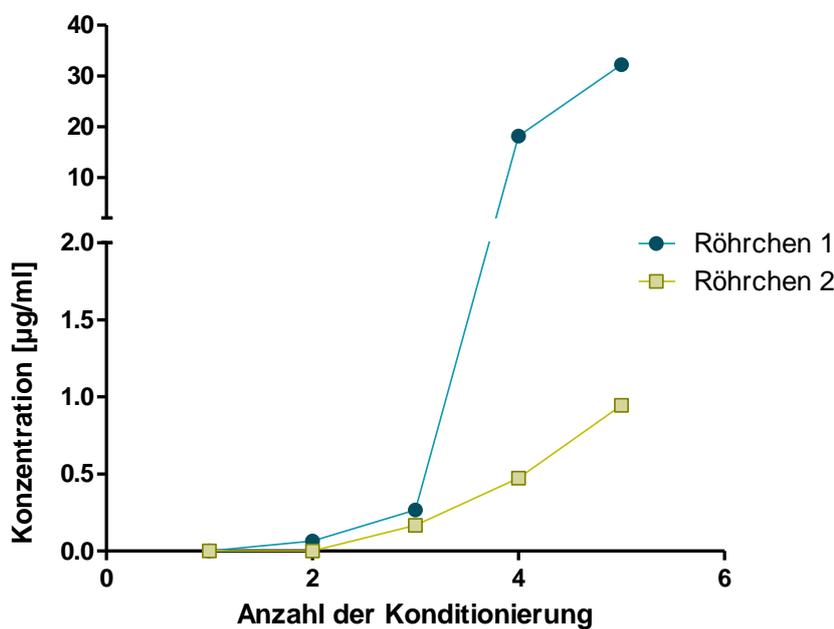


Abbildung 32 Sättigungskurve Centrisart 5kDa

Aus obiger Abbildung ist ersichtlich, dass die Sättigung der UF – Membran nach drei Schritten noch nicht abgeschlossen ist, erst ab dem 4. Konditionierungsschritt scheint die Membran abgesättigt zu sein. Die Röhrcchen 1 und Röhrcchen 2 sind bei unterschiedlichen Konzentrationen abgesättigt. Dies sollte nicht der Fall sein, da die Membran bei ähnlicher Konzentration gesättigt sein sollte. Ist dies nicht gegeben, kann man nie sicher sein, ob die Membran gesättigt ist.

Auch bei der Marke Centrisart hat man Röhrcchen mit unterschiedlicher Ausschlussgrenze verwendet.

Vorkonditionieren:

Konditionierung	Röhrchen A	Röhrchen B
1	0,000000	0,000000
2	0,157125	0,150375
3	1,587250	1,429750
4	4,562625	4,109750
5	0,804875	1,549750
6	2,615500	3,338875
7	3,930750	5,028125

Tabelle 21 Konditionierung Centrisart 10kDa

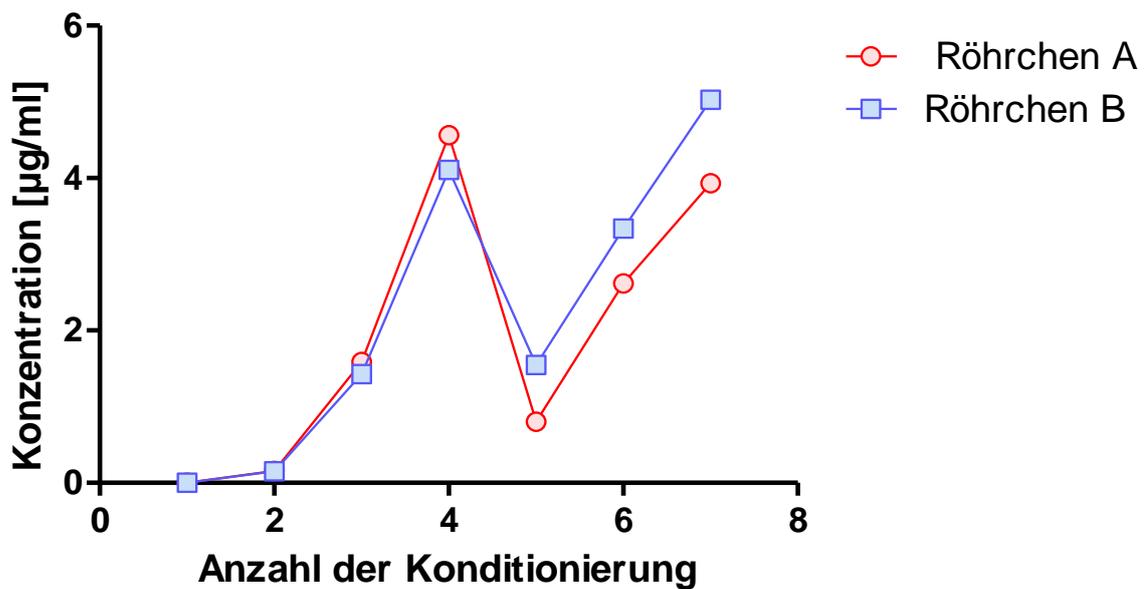


Abbildung 33 Sättigungskurve Centrisart 10kDa

Anhand der Sättigungskurve lässt sich feststellen, dass die Röhrchen schon nach der 4. Konditionierung abgesättigt gewesen wären, da beim fünften Schritt die Kurven wieder sinken und anschließend wieder steigen. Beide Kurven sind sich sehr ähnlich. Dies zeigt, dass die Membranen unterschiedlicher Röhrchen ähnliches Verhalten zeigen. Man kann sich sicher sein, dass man die Ergebnisse mit einander vergleichen kann.

Deshalb wurden für die Plasmaproben des Patienten 27 mit den Ultrafiltrationsröhrchen der Marke Centrisart und einer Ausschlussgrenze von 10kDa verwendet.

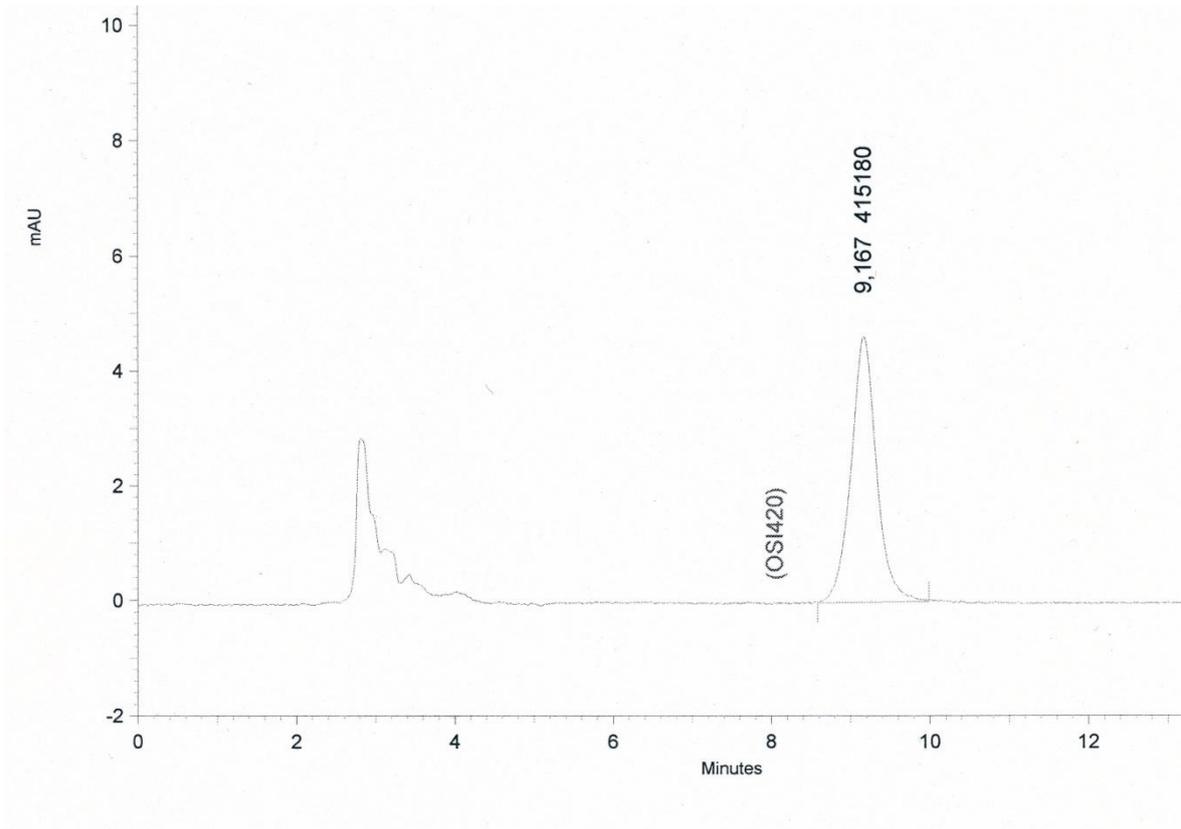


Abbildung 34 Patient 27: HPLC-Chromatogramm nach Ultrafiltration

Zeit	Konz - 5µg Standardlösung
0	0,000000
1	1,030000
2	1,070000
3	0,920000
4	1,040000
5	0,870000
6	0,000000
8	0,000000
24	0,460000
28	0,280000
48	3,780000* (Ausreißer)
52	0,060000
72	0,940000
76	0,190000
96	0,750000
100	0,000000
120	0,140000
124	0,000000
144	0,000000
148	1,590000
168	
172	0,590000

Tabelle 22 Patient 27: Konzentration nach der UF

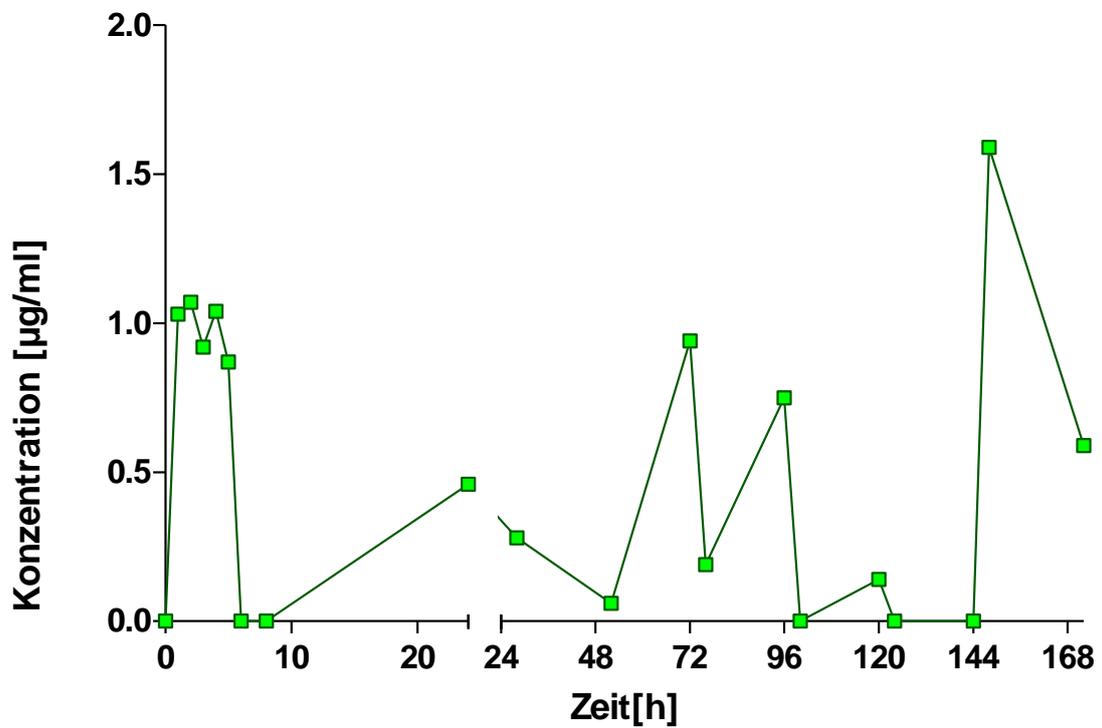


Abbildung 35 Patient 27: Konzentrations-Zeit-Kurve nach der UF

Bei der Ermittlung der Patientendaten der Patienten 22 und 23 wurde festgestellt, dass eine Ultrafiltration ohne Konditionierung der Ultrafiltrationsmembran nicht möglich ist. Deshalb wurde bei Patient 27 eine Ultrafiltration mittels Vorkonditionierung durchgeführt. Die wässrige Standardlösung hatte eine Konzentration von 5µg/ml. Mit dieser Lösung wurden die Ultrafiltrationsmembran 30 min zur Sättigung zentrifugiert.

Bei der Auswertung der Werte von Patient 27 wurde festgestellt, dass bei der Ultrafiltration der Patientenproben die Standardlösung wieder ins Ultrafiltrat gezogen wurde. Deshalb musste die Konzentration der Standardlösung (5µg/ml) für die Berechnung der Proteinbindung abgezogen werden. Diese Netto Werte stellen die richtigen Werte der Ultrafiltration dar und können somit zur Ermittlung der Proteinbindung herangezogen werden.

Konz UF - 5µg/ml Standard	Konz SPE
0,000000	0,000000
1,030000	2,295044
1,070000	3,730533
0,920000	3,146378
1,040000	2,955733
0,870000	3,231533
0,000000	3,371233
0,000000	2,855145
0,460000	1,424356
0,280000	5,364533
3,780000*	2,534078
0,060000	5,927389
0,940000	2,873356
0,190000	7,638956
0,750000	3,366822
0,000000	7,975900
0,140000	3,177822
0,000000	7,612733
0,000000	2,972622
1,590000	6,806422
	3,265711
0,590000	7,358222

Tabelle 23 Patient 27: Konzentrationen nach UF und SPE

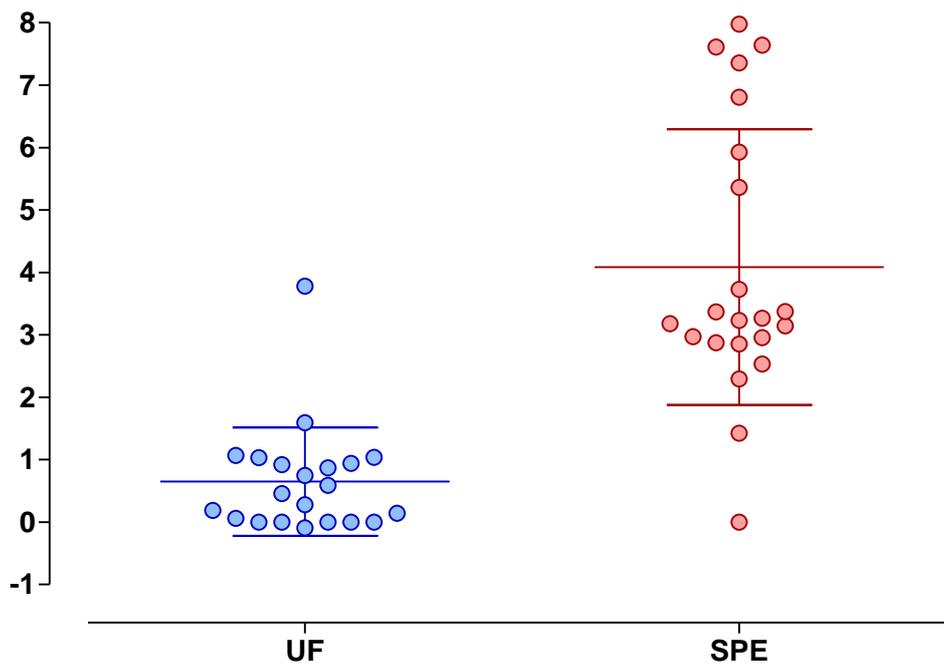


Abbildung 36 Patient 27: Scattergram der Konzentrationen UF und SPE

Table Analyzed	Scattergram UF/SPE
Column A	UF
vs	vs
Column B	SPE
Unpaired t test	
P value	P<0.0001
P value summary	***
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=6.655 df=41
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column A	0.6486 ± 0.1891 N=21
Mean ± SEM of column B	4.086 ± 0.4710 N=22
Difference between means	-3.437 ± 0.5165
95% confidence interval	-4.480 to -2.394
R squared	0,5193
F test to compare variances	
F,DFn, Dfd	6.496, 21, 20
P value	P<0.0001
P value summary	***
Are variances significantly different?	Yes

Tabelle 24 Statistische Parameter Patient 27

Beim Vergleich der Konzentrationen nach der Ultrafiltration und Festphasenextraktion, erkennt man, dass die Konzentrationen der Ultrafiltration ein Kollektiv bilden. Lediglich ein Punkt des Scattergramms von Abbildung 27 liegt weiter entfernt. Während die Konzentrationen der Festphasenextraktion zwei Gruppen bilden, die voneinander entfernt sind.

Zeit	Konz SPE	Konz UF
0	0,000000	0,000000
1	2,295044	1,030000
2	3,730533	1,070000
3	3,146378	0,920000
4	2,955733	1,040000
5	3,231533	0,870000
6	3,371233	0,000000
8	2,855145	0,000000
24	1,424356	0,460000
28	5,364533	0,280000
48	2,534078	3,780000*
52	5,927389	0,060000
72	2,873356	0,940000
76	7,638956	0,190000
96	3,366822	0,750000
100	7,975900	0,000000
120	3,177822	0,140000
124	7,612733	0,000000
144	2,972622	0,000000
148	6,806422	1,590000
168	3,265711	
172	7,358222	0,590000

Abbildung 37 Patient 27: Konzentrationen UF und SPE

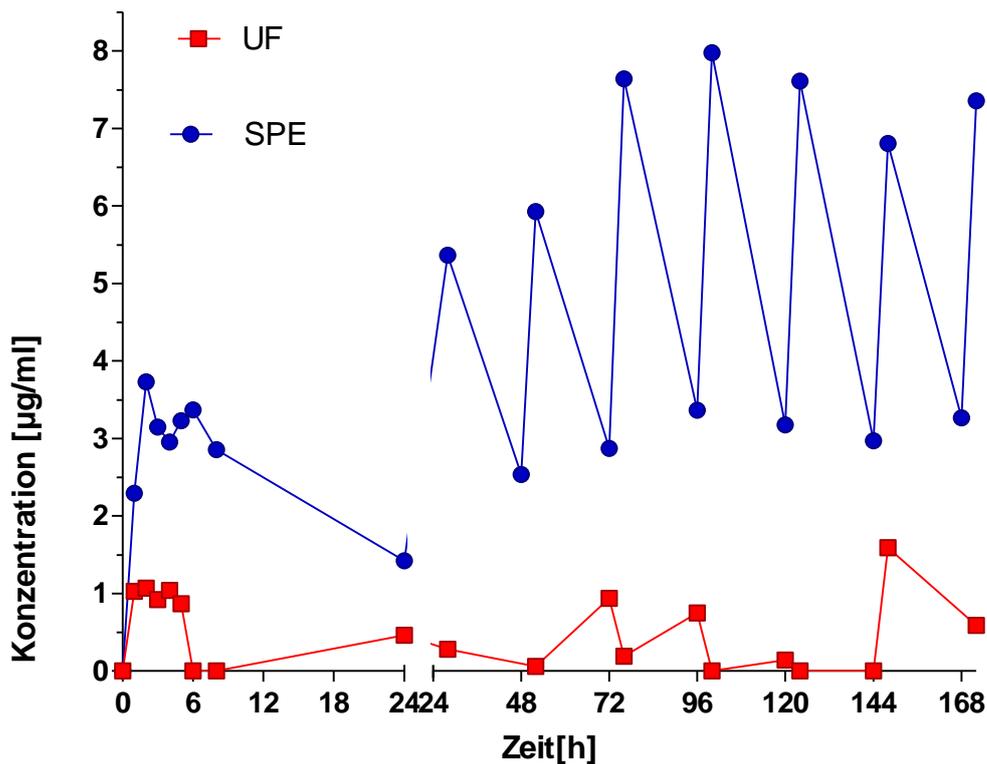


Abbildung 31 Patient 27: Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve im Vergleich UF und SPE

Beim Vergleich der beiden Plasmakonzentrations-Zeit-Kurven des Patienten 27 erkennt man die Konzentrationsunterschiede zwischen Festphasenextraktion und Ultrafiltration deutlich. Dieser Unterschied ist darauf zurückzuführen, dass bei der Festphasenextraktion die Plasmaproteine zerstört werden. Deshalb erhält man mittels Festphasenextraktion eine höhere Konzentration von Erlotinib. Bei der Ultrafiltration hingegen bleibt die Proteinbindung der Plasmaproteine mit Erlotinib intakt. Es wird nur jenes Erlotinib im Filtrat gefunden, welches von vornherein frei war.

Im Anschluss wurde die Proteinbindung berechnet mittels folgender Formel berechnet:

$$PPB \% = \frac{\text{Konzentration SPE} - \text{Konzentration UF} \times 100}{\text{Konzentration SPE}}$$

Zeit	Plasmaproteinbindung in %
0	0,000000
1	55,158820
2	71,234010
3	70,779890
4	64,771860
5	73,139690
6	115,090900
8	103,292300
24	67,783680
28	94,871410
48	-48,974320*(ausgeschlossen)
52	98,941350
72	67,307390
76	97,516020
96	77,809200
100	111,841900
120	95,720340
124	101,735600
144	243,471800*(ausgeschlossen)
148	76,656230
168	
172	91,976660

Tabelle 25 Patient 27: Plasmaproteinbindung in Prozent

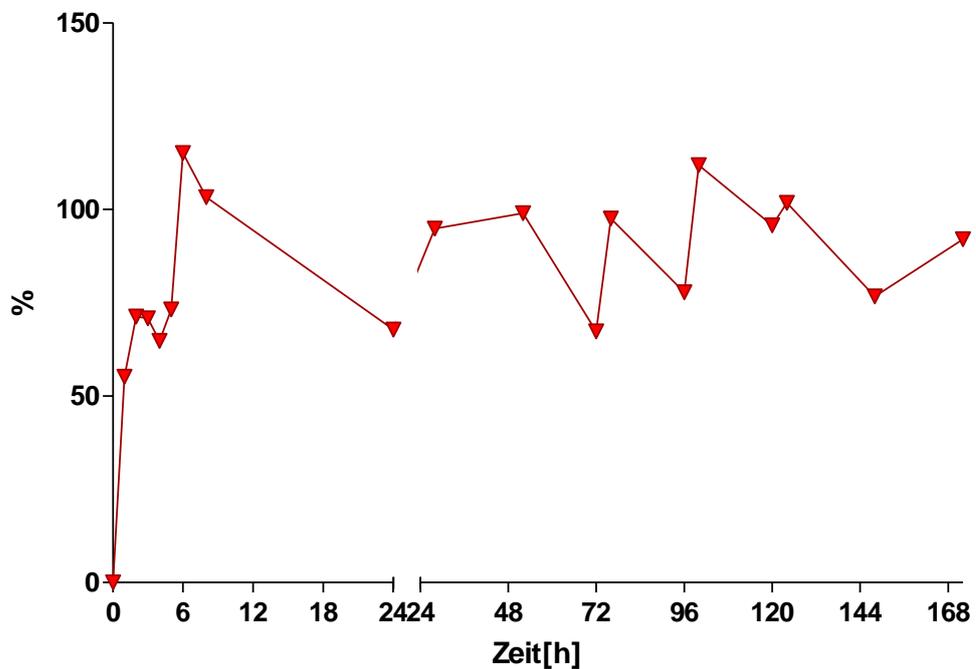


Abbildung 32 Patient 27: Plasmaproteinbindung

Abbildung 33 stellt die Plasmaproteinbindung in Prozent dar, wobei die Plasmaproteinbindung zwischen 55 und 100% schwankt. Nach Bestimmung des Mittelwertes erhält man eine Plasmaproteinbindung von etwa 86%.

8. Schlussfolgerung

Die Ultrafiltration ist ein einfaches Verfahren um die Plasmaproteinbindung von Arzneistoffen zu bestimmen. Die Durchführung ist weder technisch noch zeitlich sehr aufwendig. Allerdings ist es notwendig, die Membran der Ultrafiltrationsröhrchen abzusättigen, da sonst keine Quantifizierung von Erlotinib möglich ist. Die Vorbereitung der Ultrafiltrationsmembran, damit diese auch ein aussagekräftiges Ergebnis liefert, beansprucht die meiste Zeit.

9 Literaturverzeichnis

- 1 American Cancer Society, "Cancer Facts & Figures 2010," <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/documents/document/acspc-026238.pdf>.
- 2 Heinemann V, Haas M, Boeck S.; Systemic treatment of advanced pancreatic cancer; *Cancer Treat Rev.* doi: 10.1016/j.ctrv.2011. 12.004. Epub 2012 Jan 4 .
- 3 Sahara 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)
- 4 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)
- 5 Etienne Lemarie, M.D.,¹ Laurent Vecellio, Ph.D.,^{1,7} Jose Hureauux, M.D, Ph.D., et al, Aerosolized Gemcitabine in Patients with Carcinoma of the Lung: Feasibility and Safety Study, *JOURNAL OF AEROSOL MEDICINE AND PULMONARY DRUG DELIVERY* Volume 24, Number 6, 2011
- 6 Yi-Wen Chen,^a Jieh-Yuan Liu,^b Szu-Ting Lin,^a Ji-Min Li,^a Shun-Hong Huang, et al, Proteomic analysis of gemcitabine-induced drug resistance in pancreatic cancer cells, *Mol. BioSyst.*, 2011, **7**, 3065–3074
- 7 W. Forth, D. Henschler, W. Rummel; *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 10. Auflage, 2009, 971 – 973
- 8 Shishu, Kamalpreet, and Manjul Maheshwari: Development and evaluation of novel microemulsion based oral formulations of 5-fluorouracil using non-everted rat intestine sac model, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2012; 38(3): 294 –300
- 9 Daniel B. Longley, D. Paul Harkin & Patrick G. Johnston, 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies, *Nature Reviews Cancer* 3, 330-338, May 2003
- 10 Xiaohong Chena, Cody J. Peerb, Raul Alfaroc, Tian Tianb, Shawn D. Spencera, William D. Figgb, Quantification of irinotecan, SN38, and SN38G in human and porcine

plasma by ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry and its application to hepatic chemoembolization, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 62 (2012) 140– 148

- 11 Cindy L. O’Bryant, Paul Haluska, Lee Rosen et al, An open-label study to describe pharmacokinetic parameters of erlotinib in patients with advanced solid tumors with adequate and moderately impaired hepatic function, *Cancer Chemother Pharmacol* DOI 10.1007/s00280-011-1733-6, 2011
- 12 Shepherd FA, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T et al, Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 353:123–132, 2005
- 13 Moore MJ, Goldstein D, Hamm J et al , Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 25:1960–1966, 2007
- 14 Jie Ling, Kim A. Johnson, Zhuang Miao, Ashok Rakhit, Michael P. Pantze, Marta Hamilton, Bert L. Lum, and Chandra Prakash; Metabolism and Excretion of Erlotinib, a small molecule inhibitor of Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase, in healthy male volunteers; *Drug Metabolism and Disposition*(2006), 34(3), 420-426
- 15 Ashok Rakhit, Michael P. Pantze, Scott Fettner, Hannah M. Jones, Jean-Eric Charoin; Myriam Riek, Bert L. Lum, Marta Hamilton; The effects of CYP3A4 inhibition on erlotinib pharmacokinetics: computer-based simulation (SimCYPTM) predicts in vivo metabolic inhibition; *Eur J Clin. Pharmacol* (2008), 64:31-41
- 16 Veronika R. Meyer, Fallstricke und Fehlerquellen der HPLC in Bildern 2. erweiterte Auflage, 4; 32
- 17 E.M. Thurman*, Kirk Snavely, Advances in solid-phase extraction disks for environmental chemistry, *trends in analytical chemistry*, vol. 19, no. 1, 2000
- 18 Kyoung-Jin Lee et all; Modulation of Nonspecific Binding in Ultrafiltration Protein Binding Studies; *Pharmaceutical Research*, Vol. 20, No. 7, July 2003

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Resektionsgrenzen nach Tumorlokalisierung und Lokalisationsverteilung des Pankreaskarzinoms [3]	3
Abbildung 2 Grundstruktur eines Antikörpers [Werner Müller-Esterl; Biochemie; 1. Auflage; Elsevier Spektrum Akademischer Verlag; 2004].....	5
Abbildung 3 Metabolite von 5 – Flururacil [9]	7
Abbildung 4 Trennung zwischen den Phasen [16]	11
Abbildung 5 Schematische Darstellung einer HPLC – Apparatur [16].....	13
Abbildung 6 HPLC – Anlage (Verfasser).....	13
Abbildung 7 Festphasenkartusche [http://www.analytics-shop.com/de/oasisr-mcx-1cc-30mg-lp-cartridge-100-box].....	14
Abbildung 8 Trennung von Matrixproteinen und Arzneistoff (Verfasser)	15
Abbildung 9 Trennung von Matrixproteinen, Erythrozyten und Erlotinib (Verfasser)	15
Abbildung 10 SPE – Apparatur (Verfasser).....	16
Abbildung 11 Vakuum Einheit zur SPE (Verfasser).....	16
Abbildung 12 Vortex (Verfasser)	18
Abbildung 13 Eichgerade Erlotinib Festphasenextraktion (Verfasser).....	21
Abbildung 14 Ultrafiltrationsröhrchen der Marke Vivaspin [http://www.milian.com/Milian_Schweiz/de/Katalog/Filtration/Ultrafiltration_Sartorius/Ultrafiltrierungseinheit_Vivaspin_500]	22
Abbildung 15 Zentrifuge (Verfasser)	23
Abbildung 16 Ultrafiltrationsröhrchen der Marke Centrisart [http://www.milian.com/Milian_Schweiz/de/Katalog/Filtration/Ultrafiltration_Sartorius/Ultrafiltrierungseinheit_Vivaspin_500]	25
Abbildung 17 Konzentration der Eichgerade von Erlotinib UF (Verfasser)	26
Abbildung 18 Patient 22: Konzentrations-Zeit-Kurve nach SPE (Verfasser).....	30
Abbildung 19 Patient 23: Konzentrations-Zeit-Kurve von Erlotinib nach SPE (Verfasser)	31
Abbildung 20 Patient 27: Konzentrations-Zeit-Kurve von Erlotinib (Verfasser)	32
Abbildung 21 Vergleich der Konzentrations-Zeit-Kurve von Patient 22,23 und 27 (Verfasser).....	33
Abbildung 22 Patient 22: HPLC - Chromatogramm nach SPE (Verfasser).....	35
Abbildung 23 Patient 22: HPLC - Chromatogramm nach UF (Verfasser)	35
Abbildung 24 Patient 23: HPLC - Chromatogramm nach SPE (Verfasser).....	36
Abbildung 25 HPLC - Chromatogram nach UF (Verfasser)	36
Abbildung 26 Sättigungskurve Vivaspin 10 kDa (Verfasser).....	37
Abbildung 27 Sättigungskurve Vivaspin 30 kDa (Verfasser).....	38
Abbildung 28 Mittelwert und Standardabweichung von Vivaspin 10kDa und 30kDa (Verfasser)	39
Abbildung 29 Scattergramm Plasmakonzentrationen von Vivaspin 10 kDa und 30 kDa (Verfasser) ...	40
Abbildung 30 Vergleich der Retentionzeiten von Erlotinib-Standardlösung und Plasma von Vivaspin 10kDa und 30kDa (Verfasser).....	42
Abbildung 31 Scattergramm von Retentionszeiten der Erlotinib-Standardlösung und Plasma (Verfasser)	43
Abbildung 32 Sättigungskurve Centrisart 5kDa (Verfasser)	45
Abbildung 33 Sättigungskurve Centrisart 10kDa (Verfasser)	46
Abbildung 34 Patient 27: HPLC-Chromatogramm nach Ultrafiltration (Verfasser)	47
Abbildung 35 Patient 27: Konzentrations-Zeit-Kurve nach der UF (Verfasser).....	48

Abbildung 36 Patient 27: Scattergram der Konzentrationen UF und SPE (Verfasser)	50
Abbildung 37 Patient 27: Konzentrationen UF und SPE (Verfasser)	51

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Geräte und Material	18
Tabelle 2 Analytische Parameter des HPLC-Gerätes	19
Tabelle 3 Verdünnungsreihe Erlotinib für Konzentrationsgerade	20
Tabelle 4 Konzentrationen und Flächen der Verdünnungsreihen der Erlotinib - Standardlösungen ...	21
Tabelle 5 Statistische Parameter der Eichgerade	21
Tabelle 6 Konzentration und Fläche der Erlotinib - Standardlösungen	26
Tabelle 7 Statistische Parameter der Eichgerade	26
Tabelle 8 Patient 22: Plasmakonzentration von Erlotinib nach SPE	30
Tabelle 9 Patient 23: Plasmakonzentration von Erlotinib	31
Tabelle 10 Patient 27: Konzentration von Erlotinib nach SPE	32
Tabelle 11 Vergleich Konzentrationen von Patient 22, 23 und 27	33
Tabelle 12 Konzentration der Vorkonditionierung von Vivaspin 10 kDa	37
Tabelle 13 Konzentrationen der Vorkonditionierung Vivaspin 30 kDa	38
Tabelle 14 Mittelwert und Standardabweichung Vivaspin 10 kDa und 30 kDa	39
Tabelle 15 Vergleich Plasmakonzentration Vivaspin 10 kDa und 30 kDa	40
Tabelle 16 Statistische Parameter des Scattergram	41
Tabelle 17 Vergleich Retentionszeiten von den Erlotinib-Standardlösungen und Plasma von Vivaspin 10kDa und 30kDa	42
Tabelle 18 Retentionszeiten von Erlotinib-Standardlösung und Plasma	43
Tabelle 19 Statistische Daten des Scattergrams der Retentionszeiten	44
Tabelle 20 Konditionierung Ultrafiltrationsröhrchen Centriscart 5 kDa	45
Tabelle 21 Konditionierung Centriscart 10kDa	46
Tabelle 22 Patient 27: Konzentration nach der UF	48
Tabelle 23 Patient 27: Konzentrationen nach UF und SPE	49
Tabelle 24 Statistische Parameter Patient 27	50
Tabelle 25 Patient 27: Plasmaproteinbindung in Prozent	53

Lebenslauf

- Name:** Elisabeth Pillhofer
- Geburtsdatum und –ort:** Wien, 17.03.1983
- Ausbildung:** 1989 – 1990 Vorschule in Hard – Markt
1990 – 1994 Volksschule in Hard - Markt
1994 – 1998 Hauptschule Schwarzach mit technischem Schwerpunkt
1998 – 2001 Bundesoberstufenrealgymnasium Lauterach.
In diesem Jahr wechselte ich, auf Grund eines Umzuges, in das Bundesoberstufenrealgymnasium Wiener Neustadt (2001 – 2003).
2004 Matura
Seit 2004 Studium der Pharmazie an der Universität Wien
- Berufserfahrung:** 11. 2003 – 12. 2003 Toys „R“ Us in Wiener Neustadt
12. 2003 Cats und Pets in der SCS
Julie 2006 Landschaftsapotheke in Baden
04.2007-03.2011 Billa Leobersdorf
2011 – 2012 Übungen zur chemischen Diagnostik Universität Wien

9 Abstract

Hintergrund:

Das Pankreaskarzinom gehört zu der fünft häufigsten Todesursache, die durch Krebs verursacht wird. Der Grund dafür liegt in der späten Diagnose des Tumors. Als Therapie wird unteranderen Erlotinib, meist in Kombination mit anderen Chemotherapeutika, verabreicht.

Erlotinib hemmt den Epidermal Growth Faktor. Es hat eine Halbwertszeit von 36h, sein Konzentrationsmaximum wird nach 4h erreicht. Die Plasmaproteinbindung von Erlotinib beträgt 93%.

Die Diplomarbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob man mittels Ultrafiltration die Plasmaproteinbindung von Erlotinib feststellen kann.

Methode:

Zur Abtrennung von störendem Begleitmaterial wie zum Beispiel Matrixbestandteile wurden die Plasmaproben einer Festphasenextraktion unterzogen. Anschließend wurde die Konzentration zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Therapie mittels des HPLC-Verfahrens bestimmt. Die gleichen Plasmaproben wurden auch ultrafiltriert. Dabei kam nur der Anteil ins Filtrat, welcher nicht an Plasmaproteine gebunden ist. Auch diese Konzentrationen wurden mittels des HPLC-Verfahrens quantifiziert. Schließlich wurde die Plasmaproteinbindung von Erlotinib bestimmt.

Ergebnisse und Diskussion

Die Ultrafiltration ist eine schnelle und einfache Methode zur Bestimmung der Plasmaproteinbindung. Es ist wichtig, den Sättigungsprozess der Ultrafiltrationsmembran zu kennen, da man sonst kein repräsentatives Ergebnis erhält. In dieser Diplomarbeit wurde die Proteinbindung von Erlotinib während der Chemotherapie in Kombination mit Bevacizumab und Gemcitabin ermittelt. In dieser Kombination schwankt die Proteinbindung zwischen 55 und 100%. Das ist das erste Mal, dass der freie Anteil von Erlotinib mit dieser Kombination der Chemotherapie bestimmt wurde.

Background

Pancreatic cancer is the fifth leading cause for cancer death. One of the reasons is that the cancer is detected only in the late stage of disease. At this time the tumor grows excessively and such a progression of disease minimizes overall survival.

Chemotherapeutic treatment of pancreatic cancer comprises gemcitabine and other drugs.

New treatment schedules are under investigation, among them erlotinib, an EGFR inhibitor, represents a promising candidate. Erlotinib is highly protein bound (> 90 %) after daily doses of 100 or 150 and is eliminated from the body with a $t_{1/2el}$ of about 35 hours.

Method

We analyzed plasma samples from patients undergoing a triple chemotherapy consisting of erlotinib, capecitabine and bevacizumab against pancreatic cancer. Plasma samples were solid phase extracted to remove matrix compounds and quantitated by reversed phase HPLC using external standard method. Further these plasma samples were ultrafiltrated on Vivaspin units to obtain the protein bound amount of erlotinib. Only the free amount of drugs passes the vivaspin unit and can be analyzed also by HPLC. The difference between SPE amount and UF amount represents the protein bound fraction.

Results

Ultrafiltration is a rapid and easy method to obtain information about the protein binding of a drug. Yet it is important to know the saturation processes of the drug on the ultrafiltration membrane, otherwise non-representative data would result. In this diploma thesis data of erlotinib protein binding are represented when given together with bevacizumab and capecitabine. In this triple combination protein binding erlotinib ranges from 55 to 100%. This is the first time that the free amount of erlotinib is described in a new combination chemotherapeutic schedule.