

**Einflussfaktoren auf den Metabolismus
der Zytostatika Procarbazin und Cyclophosphamid
im Rahmen des BEACOPP-Polychemotherapieschemas
bei Morbus Hodgkin**

**Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln**

vorgelegt von

Dirk Kasel

aus

Aachen

Köln 2003

Berichtersteller:

Prof. Dr. J. Hahn

Prof. Dr. U. Fuhr

Prof. Dr. H.-G. Schmalz

Tag der mündlichen Prüfung:

06.06.2003

Die experimentellen Untersuchungen zu der vorliegenden Arbeit wurden in der Zeit von Oktober 1998 bis Januar 2003 im Institut für Pharmakologie der Universität zu Köln am Lehrstuhl von Herrn Prof. Dr. W. Klaus (1998-2000) und Herrn Prof. Dr. E. Schömig (2001-2003) unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. J. Hahn und Herrn Prof. Dr. U. Fuhr durchgeführt.

FÜR
ROMAN

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis		VIII
1	Einleitung	1
1.1	Das BEACOPP-Polychemotherapieschema	1
1.2	Das Cytochrom P450-Enzymsystem beim Menschen	2
1.2.1	Aufbau der Cytochrom P450-Enzyme	3
1.2.2	Reaktionsmechanismus	4
1.2.3	Substrate und Inhibitoren	5
1.3	Das Zytostatikum Procarbazin	8
1.3.1	Pharmakodynamik	9
1.3.2	Pharmakokinetik	9
1.4	Das Zytostatikum Cyclophosphamid	11
1.4.1	Pharmakodynamik	12
1.4.2	Pharmakokinetik	13
1.5	Interindividuelle Unterschiede in der Pharmakokinetik von Zytostatika	15
1.6	Möglichkeiten zur Dosisindividualisierung	15
1.6.1	Berücksichtigung von Arzneimittelinteraktionen	16
1.6.2	Berücksichtigung der individuellen Enzymaktivität durch Phänotypisierung	17
1.6.3	Phänotypisierung von CYP3A4 mit Midazolam	18
1.7	Arzneistoffanalytik in Körperflüssigkeiten	19
1.7.1	Analytische Verfahren	19
1.7.1.1	Hochdruckflüssigkeitschromatographie	19
1.7.1.2	LC-MS/MS	20
1.7.1.3	Kernresonanzspektroskopie	20

1.7.2	Analytik von Procarbazin und seinen Metaboliten	22
1.7.3	Analytik von Cyclophosphamid und seinen Metaboliten	22
1.7.4	Analytik von Midazolam und seinen Metaboliten	23
2	Fragestellung	24
3	Materialien und Methoden	25
3.1	Materialien	25
3.1.1	Referenzsubstanzen	25
3.1.2	Reagenzien	25
3.1.3	Geräte	26
3.1.4	Proben	29
3.2	Validierung analytischer Verfahren	30
3.2.1	Herstellung von Proben mit bekannten Konzentrationen der Analyten	30
3.2.2	Kalibrierung	31
3.2.3	Selektivität	31
3.2.4	Präzision und Richtigkeit	31
3.2.4.1	Definitionen	31
3.2.4.2	Variabilität innerhalb eines Tages (intra-day-assay)	32
3.2.4.3	Variabilität an verschiedenen Tagen (inter-day-assay)	32
3.2.4.4	Bewertung von Genauigkeit und Richtigkeit	32
3.2.5	Bestimmungsgrenze	33
3.2.6	Wiederfindung des Analyten (<i>recovery</i>)	33
3.2.7	Stabilität	33
3.2.7.1	Stabilität unbehandelter Proben (Processing-Stabilität)	34
3.2.7.2	Stabilität aufbereiteter Proben (Autosampler-Stabilität)	34
3.2.7.3	Stabilität nach dreimaligem Einfrieren und Auftauen	35
3.2.8	Sicherung der Validität einer Methode bei der Messung von Proben mit unbekanntem Konzentrationen	35
3.3	Bestimmung von Procarbazin-Metaboliten im Urin mittels HPLC	35

3.3.1	Darstellung der Metabolite und des internen Standards	36
3.3.1.1	Synthese von N-Isopropylterephthalsäure (TAC)	36
3.3.1.2	Synthese von N-Isopropyl-p-toluamid (MET)	38
3.3.1.3	Synthese des internen Standards Isopropylbenzamid	40
3.3.2	Methodenentwicklung	41
3.3.2.1	Probenaufarbeitung	41
3.3.2.2	Chromatographie	41
3.3.2.3	Detektion	43
3.3.3	Methodenvalidierung	46
3.3.3.1	Kalibrierung	46
3.3.3.2	Besonderheiten	46
3.3.4	Messung der Patientenproben aus der BEACOPP-Studie	47
3.4	Bestimmung von Cyclophosphamid und seinen Metaboliten im Urin	47
3.4.1	Quantifizierung unter Verwendung von ^{31}P -NMR	48
3.4.1.1	Interner Standard	48
3.4.1.2	Probenaufarbeitung	48
3.4.1.3	Methodenentwicklung	49
3.4.1.4	Wahl der endgültigen Aufnahmeparameter	49
3.4.2	Quantifizierung unter Verwendung von LC-MS/MS	51
3.4.2.1	Methodenentwicklung	51
3.4.2.2	Probenaufarbeitung	52
3.4.2.3	Chromatographie	52
3.4.2.4	MS/MS-Detektion	53
3.4.2.5	Peakintegration	54
3.4.3	Methodenvalidierung	55
3.4.3.1	Kalibrierung	55
3.4.3.2	Besonderheiten	56
3.4.4	Messung der Patientenproben aus der BEACOPP-Studie	57
3.5	Statistische Auswertung	57

3.5.1	Kovarianzanalysen	57
3.5.2	Populationspharmakokinetische Berechnungen für Cyclophosphamid	59
3.5.3	Pharmakokinetik-Pharmakodynamik-Analyse	63
3.6	Bestimmung der Autoinduktion des Cytochrom P450 Enzyms CYP3A4 durch Cyclophosphamid in Leberschnitten	64
3.6.1	Herstellung der Gewebeschnitte	64
3.6.2	Versuchsdurchführung	64
3.6.3	Bestimmung von 1'-Hydroxy-Midazolam im Inkubationsmedium	65
3.6.3.1	Methodenentwicklung	65
3.6.3.2	Probenaufarbeitung	66
3.6.3.3	Chromatographie	66
3.6.3.4	MS/MS-Detektion	67
3.6.3.5	Methodenvalidierung	67
3.6.4	Messung der Inkubationsproben aus dem Induktionsversuch	69
3.6.5	Evaluation der Daten	69
3.7	Bestimmung von Midazolam im Humanplasma	70
3.7.1	Methodenentwicklung	70
3.7.2	Probenaufarbeitung	71
3.7.3	Chromatographie	71
3.7.4	MS/MS-Detektion	71
3.7.5	Methodenvalidierung	72
3.7.5.1	Kalibrierung	72
3.7.5.2	Besonderheiten	73
4	Ergebnisse	74
4.1	Validierung der Methode zur Bestimmung von Procarbazin-Metaboliten im Urin mittels HPLC	74
4.1.1	Linearität und untere Quantifizierungsgrenze	74
4.1.2	Präzision und Richtigkeit	75
4.1.3	Stabilität	76

4.1.4	Gesamtergebnis der Validierung	76
4.2	Validierung der Methode zur Bestimmung von Cyclophosphamid und seinen Metaboliten im Urin mittels LC-MS/MS	76
4.2.1	Linearität und untere Quantifizierungsgrenze	76
4.2.2	Präzision und Richtigkeit	79
4.2.3	Wiederfindung	82
4.2.4	Stabilität	82
4.2.4.1	Freeze-Thaw-Stabilität	82
4.2.4.2	Processing-Stabilität	83
4.2.4.3	Autosampler-Stabilität	83
4.2.5	Gesamtergebnis der Validierung	84
4.3	Ergebnisse der Urinanalytik und der pharmakokinetischen Berechnungen	84
4.3.1	Urinpharmakokinetik von Procarbazin	85
4.3.2	Urinpharmakokinetik von Cyclophosphamid	87
4.3.3	Kovarianzanalysen	94
4.3.3.1	Procarbazin	94
4.3.3.2	Cyclophosphamid	95
4.3.4	Pharmakokinetik-Pharmakodynamik-Analyse	96
4.4	Bestimmung der Induktion des Cytochrom P450 3A4 durch Cyclophosphamid in Leberschnitten	97
4.4.1	Validierung der Methode zur Bestimmung von 1'OH-Midazolam im Inkubationsmedium	97
4.4.1.1	Linearität und untere Quantifizierungsgrenze	97
4.4.1.2	Präzision und Richtigkeit	98
4.4.1.3	Stabilität	99
4.4.1.4	Gesamtergebnis der Validierung	99
4.4.2	Ergebnisse der Inkubation von Midazolam mit Schweineleberschnitten	100

4.5	Validierung der Methode zur Bestimmung von Midazolam im Humanplasma	102
4.5.1	Linearität und untere Quantifizierungsgrenze	102
4.5.2	Präzision und Richtigkeit	103
4.5.3	Wiederfindung	104
4.5.4	Stabilität	104
4.5.5	Gesamtergebnis der Validierung	105
5	Diskussion	106
5.1	Messmethode zur Quantifizierung der Procarbazin-Metabolite im Urin	106
5.2	Urinpharmakokinetik von Procarbazin	107
5.3	Messmethoden zur Quantifizierung von Cyclophosphamid und seinen Metaboliten im Urin	109
5.4	Urinpharmakokinetik von Cyclophosphamid	110
5.5	Populationspharmakokinetik von Cyclophosphamid	112
5.6	Pharmakokinetik-Pharmakodynamik-Analyse	114
5.7	Induktion des Cytochrom P450 3A4 durch Cyclophosphamid in Leberschnitten	116
5.8	Bestimmung von Midazolam im Humanplasma	118
5.9	Ausblick	119
6	Zusammenfassung	120
7	Abstract	121
8	Literaturverzeichnis	122
9	Anhang	149
9.1	Messwerte der intra- und inter-day-Assays für TAC in angereichertem Urin	149

9.2	Messwerte der intra- und inter-day-Assays für CP in angereichertem Urin	150
9.3	Messwerte der intra- und inter-day-Assays für DCL-CP in angereichertem Urin	151
9.4	Messwerte der intra- und inter-day-Assays für 4KetoCP in angereichertem Urin	152
9.5	Messwerte der intra- und inter-day-Assays für CarboxyCP in angereichertem Urin	153
9.6	Demographische Daten der BEACOPP-Patienten	154
9.7	Messungen der Urinproben der BEACOPP-Patienten	158
9.8	Individuelle pharmakokinetische Parameter für Cyclophosphamid	163
9.9	Messwerte des intra-day-Assays für 1'OH-MID in angereichertem Williams' E Medium	166
9.10	Messung der Proben aus dem Induktionsversuch	166
9.11	Messwerte der intra- und inter-day-Assays für MID in angereichertem Plasma	167
9.12	INVRECX-Pulsprogramm zur Bestimmung der longitudinalen Relaxationszeit T_1	169

Abkürzungsverzeichnis

ABW _{rel}	relative Abweichung
ACN	Acetonitril
ALC	Alkohol-Metabolit des Procarbazins
ALD	Aldehyd-Metabolit des Procarbazins
AldoCP	Aldocyclophosphamid
APCI	chemischen Ionisierung bei Atmosphärendruck (engl.: atmospheric pressure chemical ionisation)
APPI	Photoionisation bei Atmosphärendruck (engl.: atmospheric pressure photoionization)
AU	adsorption units (Detektorsignal)
AUC	Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve
AUS _{PCZ}	prozentuale Procarbazin-Ausscheidung
AUSS _{CP}	Gesamtausscheidungsratekonstante für Cyclophosphamid
AZO	Azo-Metabolit des Procarbazins
AZOXY1	Benzylazoxy-Metabolit des Procarbazins
AZOXY2	Methylazoxy-Metabolit des Procarbazins
BMI	Body Mass Index
BQL	unterhalb der Quantifizierungsgrenze (engl.: below quantification limit)
C ₈ / C ₁₈	Phasen für die RP-Chromatographie
CarboxyCP	Carboxyphosphamid
CID	durch Kollision mit einem Gas induzierte Fragmentierung (engl.: collision-induced dissociation)
CL	Clearance
CL _{gesamt} (CP)	Gesamtkörperclearance für Cyclophosphamid
CL _{ren} (CP)	renale Clearance für Cyclophosphamid
Cl _{met} (DCL-CP)	metabolische Clearance für N-Dechloroethyl-Cyclophosphamid
CP	Cyclophosphamid
CV	Variationskoeffizient
CV _{Geo}	geometrischer Variationskoeffizient
CYP	Bezeichnung eines Cytochrom P450-Enzyms
DCL-CP	N-Dechloroethyl-Cyclophosphamid
DCL-CP _{ren}	renale DCL-CP-Ausscheidung
DNA	Desoxyribonucleic acid (engl. desoxyribonucleic acid)
d. Th.	der Theorie

EP	Eichprobe
eV	Elektronenvolt
FID	Free Induction Decay
g	Fallbeschleunigung
GC	Gaschromatographie
GC/MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HOForm	Ameisensäure
HT	Körpergröße
IS	interner Standard
i.v.	intravenös
4KetoCP	4-Ketocyclophosphamid
KF	Kofaktor
KG	Körpergewicht
KOF	Körperoberfläche
KreaCl	Kreatinin-Clearance
LB	Glättung (engl.: line broadening)
LC	Flüssigkeitschromatographie (engl.: liquid chromatography)
LC-MS/MS	Liquid Chromatography / Tandem Mass Spectrometry
LLOQ	untere Quantifizierungsgrenze (engl.: lower limit of quantification)
m	männlich
m.d.	keine Daten verfügbar (engl.: missing data)
MeOH	Methanol
MET	N-Isopropyl-p-toluamid , Methyl-Metabolit des Procarbazins
MID	Midazolam
1'OH-MID	1'-Hydroxy-Midazolam
1',4OH-MID	1',4-Dihydroxy-Midazolam
4OH-CP	4-Hydroxy-Cyclophosphamid
4OH-MID	4-Hydroxy-Midazolam
MS	Massenspektrometrie / Massenspektrometer
MW	Molekulargewicht (engl.: molecular weight)
n	Anzahl
n.a.	nicht verfügbar (engl.: not available)
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
n.d.	nicht durchgeführt
NMR	Kernspinresonanz (engl.: Nuclear Magnetic Resonance)
NOE	Nuclear Overhauser Effekt
p	p-Wert, Ergebnis eines statistischen Signifikanztests
PCZ	Procarbazin

PM	Phosphoramid-Mustard
PMG	N-Phosphonomethylglycin
ppm	parts per million
psi	pounds per square inch (Druckangabe, $1 \text{ psi} \cong 6,89 \cdot 10^3 \text{ Pascal}$)
QC	Qualitätskontrolle
r	Korrelationskoeffizient
RNA	Ribonukleinsäure (engl. ribonucleic acid)
RP	reversed phase
RSD	relative Standardabweichung
SD	Standardabweichung
S/N	Signal/Rauschen-Verhältnis (engl. signal to noise)
SRM	selected reaction monitoring mode
SW	Spektrenweite
TD	time domain
ThromboDiff	Veränderung der Thrombozytenzahl vom ersten zum achten Therapietag
UV	ultraviolett
UV/Vis	Spektrometrie im ultravioletten und sichtbaren Lichtbereich
V	Volt (Detektorsignal)
Vd	Verteilungsvolumen
w	weiblich
W	Wichtungsfaktor
\tilde{x}	Median einer Stichprobe
\bar{x}	arithmetischer Mittelwert einer Stichprobe
\bar{x}_{Geo}	geometrischer Mittelwert einer Stichprobe

1 Einleitung

1.1 Das BEACOPP-Polychemotherapieschema

In der Therapie maligner Neoplasien werden heutzutage üblicherweise Kombinationen von verschiedenen Zytostatika eingesetzt [1]. Durch diese Kombinations-schemata wird versucht, verschiedene Zielstrukturen in der Zelle zu erreichen und die malignen Zellen innerhalb des Zellzyklus zu synchronisieren, um so die Selektivität der Wirkstoffe für die Schädigung der malignen Zellen zu erhöhen sowie eine frühe Resistenzbildung zu verhindern. Aufgrund besserer Kenntnis und Möglichkeiten zur Prophylaxe und Behandlung von unerwünschten Wirkungen der Zytostatika konnte in den letzten Jahren eine Intensivierung der Therapie mit kürzeren Therapieintervallen und höheren Dosen vorgenommen werden [2-4]. Infolge dieser erweiterten Therapien wurden die Remissions- und Heilungsraten bei malignen Erkrankungen verbessert [5, 6].

Ein hinsichtlich der durch eine Zytostatikatherapie erreichten Remissionsraten herausragendes Beispiel ist die Therapie des Morbus Hodgkin. Hierbei handelt es sich um eine maligne Erkrankung des lymphatischen Systems mit etwa 2000 Neuerkrankungen/Jahr in Deutschland. Die Inzidenz liegt bei etwa 3/100.000 pro Jahr in Westeuropa und den USA [7]. Der Morbus Hodgkin wird in vier Stadien eingeteilt, wobei Stadium IV dem ausgeprägtesten Krankheitsbild entspricht. Diese Erkrankung hatte bis in die 60er Jahre im fortgeschrittenen Stadium in der Regel einen tödlichen Verlauf. Ein Durchbruch wurde 1964 durch das **MOPP**-Schema erzielt, das die Applikation von Stickstoff-Lost (**M**ustard), Vincristin (**O**ncovin), **P**rocarbazin und **P**rednison beinhaltet [8]. Später wurde statt Stickstoff-Lost das geringer toxische Prodrug Cyclophosphamid eingesetzt. Dies führte zur Namensänderung des Therapieschemas in **COPP** [9]. 1982 brachte die Einführung des **ABVD**-Schemas mit der Gabe von Doxorubicin (**A**driamycin), **B**leomycin, **V**inblastin und **D**acarbazin einen weiteren erheblichen Fortschritt [10]. Durch diese Polychemotherapie-Schemata wurde der Morbus Hodgkin in den fortgeschrittenen Stadien bei bis zu 60% der Patienten heilbar [11, 12].

Mit der Einführung des **BEACOPP**-Schemas gelang es dann der Deutschen Hodgkin-Studiengruppe (DHSG) Ende der 90er Jahre erstmals, die Überlebensrate dieser Patienten im Vergleich zur alten Standardtherapie (COPP/ABVD) bedeutsam zu verbessern [13, 14]. Die einzelnen Buchstaben bezeichnen hierbei die applizierten Substanzen: **B**leomycin, **E**toposid, **A**driamycin (Doxorubicin), **C**yclophosphamid, **O**nkovin (Vincristin), **P**rocarbazin und das Glukokortikoid **P**rednison. Die dem BEACOPP-Schema zugrunde liegenden Prinzipien sind eine zeitli-

che Intensivierung, die Einführung von Etoposid in die Therapie des Morbus Hodgkin sowie eine Dosisescalation. Durch dieses Polychemotherapieschema gelang es, hohe Remissionsraten in den fortgeschritteneren Stadien III / IV zu erzielen [2]. Das BEACOPP-Grundschemata wird in verschiedenen Studien der DHSG variiert, um eine individuelle Therapie zu finden [7, 15].

Bei der eskalierten Version des BEACOPP-Schemas [16] ist die Gefahr einer erhöhten Zahl an sekundären Leukämien, myelodysplastischer Syndrome sowie eine erhöhte Akuttoxizität (Hämatotoxizität) in Kauf zu nehmen. Ziel laufender und künftiger klinischer Studien für Patienten mit fortgeschrittenen Stadien ist daher die Reduktion der Toxizität dieses neuen Regimes bei Beibehaltung der Effektivität [7, 15, 17].

1.2 Das Cytochrom P450-Enzymsystem beim Menschen

Lipophile Substanzen können nicht renal ausgeschieden werden. Dadurch besteht die Gefahr, dass sie sich im Körper, insbesondere im Fettgewebe anreichern. Daher besitzt der Organismus Enzymsysteme, die lipophile Substanzen in hydrophilere Stoffe umwandeln, die so renal ausgeschieden werden können. Die Eliminationsgeschwindigkeit fettlöslicher Xenobiotika hängt im hohen Maße davon ab, wie schnell sie im Organismus zu wasserlöslichen Verbindungen metabolisiert werden. Die Biotransformation erfolgt vor allem in der Leber und untergeordnet in anderen Organen, z.B. Niere und Darm. Die an der Biotransformation beteiligten Enzyme sind häufig wenig substratspezifisch. Von besonderer Bedeutung für die Biotransformation sind die Phase I-Reaktionen, an denen Oxidasen, Monooxygenasen und Dioxygenasen beteiligt sind. Hierbei besitzen (mikrosomale) Monooxygenasen vom Typ des Cytochrom P450 die größte Bedeutung [18, 19]. Sie katalysieren Reaktionen des Phase-I-Metabolismus, wobei ihre Grundfunktion in der Einführung eines atomaren Sauerstoffs in das Zielmolekül besteht. Außer der Hydroxylierung werden weitere für den Fremdstoffmetabolismus wichtige Reaktionen, wie z.B. Epoxidierung, Desaminierung, N-, O- und S-Desalkylierung oder auch Dehalogenierung durch Cytochrom P450-Enzyme vermittelt [20].

Neben unwirksamen oder gut eliminierbaren Metaboliten können aus Xenobiotika durch die oxidative Katalyse der Cytochrom P450-Enzyme auch reaktive Verbindungen entstehen. Diese können im menschlichen Körper als Kanzerogene wirken [21-24]. Im Falle von pharmakologisch inaktiven Prodrugs können auch pharmakologisch aktive Verbindungen gebildet werden.

Die Konsequenzen des P450-abhängigen Stoffwechsels für die Wirksamkeit eines Moleküls gestalten sich sehr vielfältig, da es sich nicht um ein einzelnes Enzym

handelt, sondern um eine durch eine Supergenfamilie kodierte Gruppe von Enzymen. Diese sind zwar von der Grundfunktion her gleich, unterscheiden sich aber hinsichtlich ihrer Substratspezifität, ihrer variablen Expression, ihrer Induzier- und Hemmbarkeit sowie der Existenz von genetischen Polymorphismen erheblich [25].

Um die verschiedenen Enzyme der Cytochrom P450-Superfamilie entsprechend ihrer spezifischen Eigenschaften klassifizieren zu können, wurde eine einheitliche Nomenklatur eingeführt.

Auf der Basis von Homologien ihrer Aminosäuresequenz wurden die Enzyme in einzelne Genfamilien und Subfamilien untergliedert. Bei einer Homologie der Aminosäuresequenz von über 40 % werden Cytochrom P450-Enzyme einer Genfamilie zugeordnet, während die Übereinstimmung bei Enzymen einer Subfamilie mindestens 60 % beträgt. Derzeit (letzte veröffentlichte Zusammenstellung: 2003 [26, 27]) sind beim Menschen 18 Genfamilien mit 37 Subfamilien bekannt. Insgesamt sind bislang über 50 verschiedene Cytochrom P450-Enzyme für das menschliche Genom identifiziert [26, 28].

Als Grundsymbol wurde die Abkürzung CYP eingeführt. Die erste Ziffer nach dem Grundsymbol charakterisiert die Genfamilie. Diese bestehen aus mehreren, mit einem Buchstaben gekennzeichneten Subfamilien, die wiederum in einzelne, mit einer weiteren arabischen Ziffer gekennzeichnete Subfamilienmitglieder (individuelle Proteine) unterteilt werden. So trägt z.B. das Cytochrom P450 3A4 die Bezeichnung CYP3A4 und kennzeichnet das Enzym Nr. 4 der Subfamilie A aus der Familie 3.

1.2.1 Aufbau der Cytochrom P450-Enzyme

Die Cytochrom P450-Enzyme zählen zu den Hämoproteinen. Sie setzen sich aus einem Apoprotein, einer Polypeptidkette mit über 400 Aminosäuren und einer prosthetischen Hämgruppe, dem Fe-Protoporphyrin IX (siehe Abbildung 1), zusammen. Diese Hämgruppe besteht aus einem Porphyrinring, der als Chelatligand an ein Eisenatom mit der Oxidationsstufe +II (Ferroform) oder +III (Ferriform) gebunden ist, dessen fünfte (X) und sechste (Y) Koordinationsstelle durch eine Thiolatgruppe des Cysteins bzw. durch ein Wassermolekül besetzt sind. Dieses kann aber durch ein Substratmolekül verdrängt werden [29].

Während das Eisenatom im substratfreien Cytochrom P450 weitgehend im Low-Spin-Zustand vorliegt, befindet es sich in der substratbeladenen Form nahezu ausschließlich im High-Spin-Zustand [30].

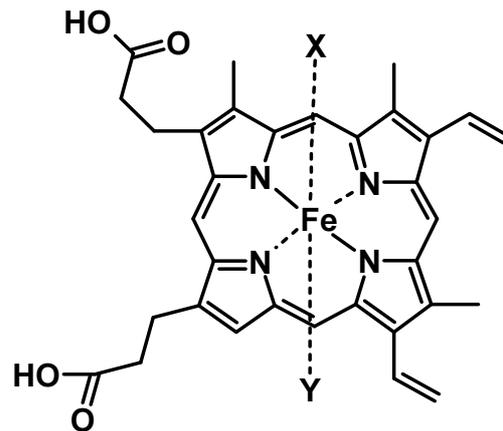


Abbildung 1: Die prosthetische Gruppe des Cytochrom P450

1.2.2 Reaktionsmechanismus

Die Cytochrom P450-Enzyme sind als Monooxygenasen in der Lage, molekularen Sauerstoff zu binden, auf reduktivem Wege zu spalten, ein Sauerstoffatom auf ihr Substrat zu übertragen und das zweite in Form von Wasser freizusetzen [30].

Bei der Oxidation durch Monooxygenasen müssen mehrere Komponenten zusammenwirken. Neben dem Cytochrom P450 sind ein Flavinenzym, die NADPH-Cytochrom P450-Reduktase sowie die Gegenwart von Phospholipiden erforderlich. Die NADPH-Cytochrom P450-Reduktase katalysiert die Oxidation von NADPH und überträgt die Reduktionsäquivalente auf das Cytochrom P450-Enzym [18].

Die Oxidation des Substrats erfolgt in einem mehrstufigen Zyklus (vgl. Abbildung 2). Während die Bindung von Substrat, molekularem Sauerstoff und NADPH-Cytochrom P450-Reduktase gut untersucht sind, konnten die eigentlichen Reaktionen der Veränderung des Substrats bislang noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Die heute angenommenen Einzelschritte bestehen aus folgenden Reaktionen:

- I Bindung des Substrats an die Fe^{+III} -Form des Enzyms
- II Reduktion des Fe^{+III} zu Fe^{+II} durch Elektronenübertragung
- III Bindung eines Sauerstoff-Moleküls an das Enzym
- IV Bindung eines Elektrons und eines Protons an das Eisenatom
- V Wasserabspaltung aus dem Enzymkomplex
- VI Direkte Oxidation des Substrates durch den Enzymkomplex
- VII Abspaltung des Substrates

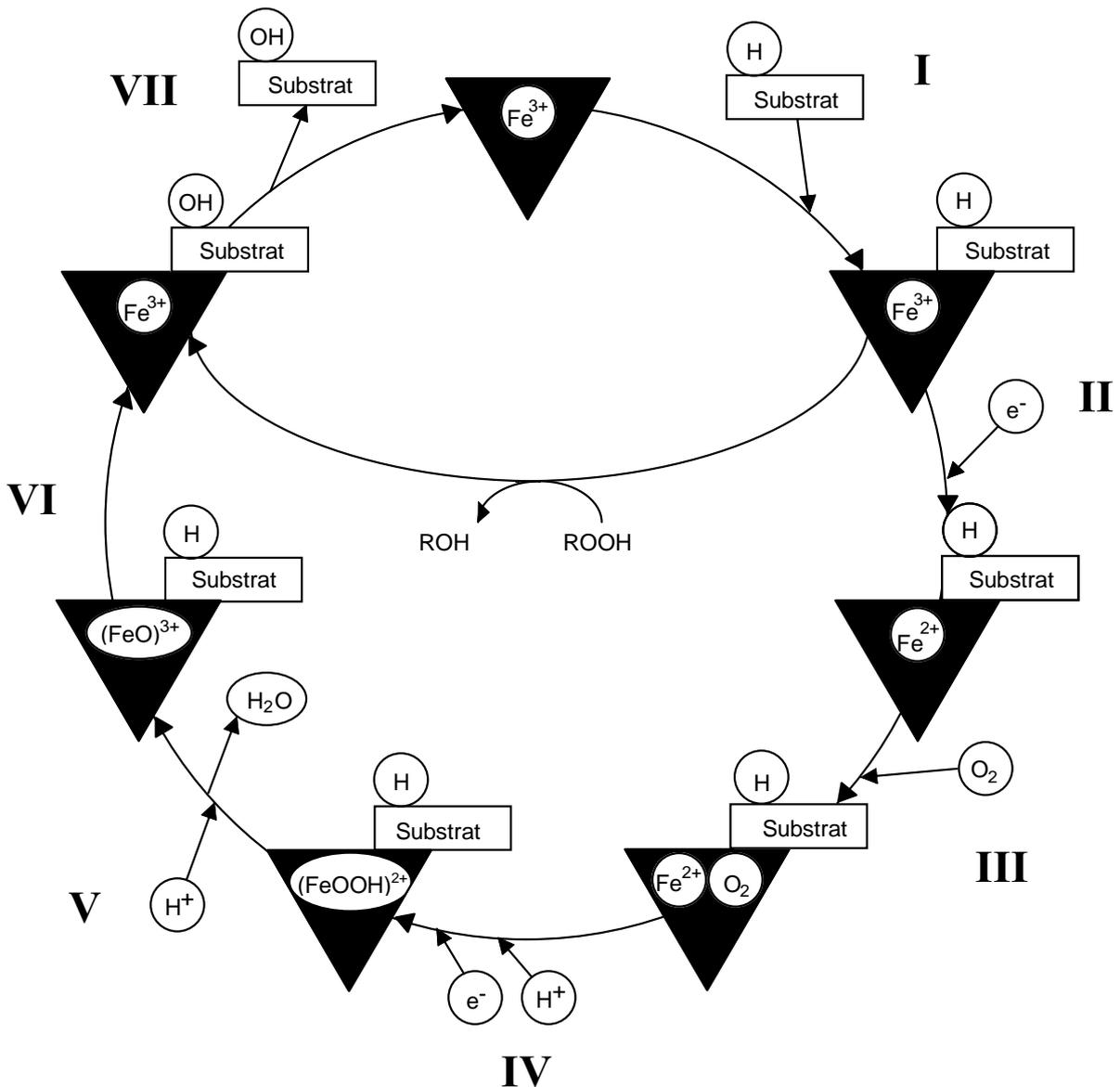


Abbildung 2: Mechanismus der Monooxygenase-Reaktion durch Cytochrom P450-Enzyme

1.2.3 Substrate und Inhibitoren

Die strukturelle und funktionelle Vielfalt der Cytochrom-P450-Enzyme erlaubt es, eine große Anzahl von Substraten mit einer nur begrenzten Zahl von Enzymen zu metabolisieren. Cytochrom P450-Enzyme des Menschen besitzen typischerweise eine breite Substratspezifität (siehe Tabelle 1).

Die Substratspezifität der Enzyme ist auch von der Substratkonzentration abhängig. Liegt ein Substrat in therapeutischer Konzentration vor, so wird es häufig nur von einem spezifischen P450-Enzym ab- oder umgebaut. Bei höheren Kon-

zentrationen wird das Substrat häufig unter Beteiligung mehrerer Enzyme biotransformiert.

Tabelle 1: Übersicht der wichtigsten am Stoffwechsel von Arzneimitteln beteiligten Cytochrom-P450-Enzyme des Menschen und ausgewählte, z.T. spezifische Substrate [25, 31-45]

Familie	Enzym	Substrate
CYP1	A1	Koffein, Benzo(a)pyren, Ethoxyresorufin
	A2	Koffein, Clozapin, Tacrin, Theophyllin, Melatonin
	B1	polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe
CYP2	A6	Coumarin, Nikotin
	B6	Cyclophosphamid, Bupropion
	C8	Paclitaxel
	C9	Warfarin, Tolbutamid, Verapamil
	C18	Verapamil
	C19	Mephenytoin, Omeprazol, Diazepam
	D6	Nortriptylin, Debrisoquin, Metoprolol, Spartein, Codein, Propafenon, Dextromethorphan
E1	Ethanol, Nitrosamine, Chlorzoxazon	
CYP3	A4 / A5	Aflatoxine, Nifedipin, Testosteron, Verapamil, Cyclosporin, Ifosfamid, Cyclophosphamid, Midazolam, Alprazolam, Indinavir, Lovastatin, Felodipin

Aufgrund der Vielfalt der Substrate, die über die Cytochrom P450-Enzyme abgebaut werden, ist es leicht vorstellbar, welche Auswirkungen eine Interaktion von Arzneimitteln und anderen Fremdstoffen mit Enzymen des P450-Systems nach sich ziehen kann. Hieraus kann eine Aktivitätsminderung wie auch eine Aktivitätserhöhung resultieren.

Eine beim intakten Organismus beobachtete Aktivitätserhöhung ("Induktion") von P450-Enzymen durch Fremdstoffe erfolgt bei veränderter Regulation durch vermehrte Synthese oder verlangsamten Abbau des Enzyms. Eine Induktion kann relativ unspezifisch sein, d.h. mehrere P450-Enzyme betreffen, oder enzyspezifisch erfolgen. Die Induktion stellt meist eine Nebenwirkung bei einer Behandlung mit Arzneimitteln oder bei einer Schadstoffexposition dar. Ein bekanntes Beispiel

einer Induktion ist die Aktivitätserhöhung von CYP1A2 durch im Tabakrauch enthaltene Substanzen [46, 47].

Eine reversible oder irreversible Hemmung von P450-Enzymen bewirkt eine Erniedrigung der Enzymaktivität. Dies kann durch einen verminderten Arzneimitelabbau über den Phase I-Metabolismus zu erhöhten Konzentrationen des Arzneimittels führen. Hieraus können unerwünschte Arzneimittelwirkungen bis hin zu Vergiftungserscheinungen resultieren [48]. Tabelle 2 zeigt eine Auswahl an enzymspezifischen Inhibitoren von wichtigen Cytochrom P450-Enzymen.

Tabelle 2: Übersicht über einige wichtige enzymspezifische Cytochrom P450-Inhibitoren [18, 49-51]

Familie	Subfamilie	Inhibitor	Hemmtyp
CYP1	A1	α -Naphthoflavon	Mischtyp
	A2	Furafyllin	“suicide Inhibition“
CYP2	A6	Pilocarpin, Coumarin	kompetitiv
	C9	Sulfaphenazol	kompetitiv
	C19	(+)-N-3-benzyl-nirvanol	kompetitiv
	D6	Chinidin	kompetitiv
	E1	Disulfiram	“suicide Inhibition“
CYP3	A4 / A5	Ketoconazol, Ritonavir	Mischtyp

Schließlich gibt es große quantitative Unterschiede im Beitrag einzelner Cytochrom P450-Enzyme zum gesamten P450-Gehalt eines Organs. So beträgt in der Leber der Anteil des CYP3A4 etwa 30 % des Gesamtgehalts an P450 [52]. Der Gehalt von CYP2B6, das vermutlich für die Aktivierung von CP verantwortlich ist, liegt in der Leber unter 1 % [25].

Eine weitere Ursache für die interindividuelle Variabilität besteht in pharmakogenetischen Unterschieden. So wird z.B. das polymorphe CYP2D6, welches am Stoffwechsel vieler Arzneimittel beteiligt ist, bei etwa 5 bis 10 % der Mitteleuropäer nicht funktionell exprimiert [25].

Zur Optimierung der individuellen Arzneimitteltherapie ist es daher wichtig, die enzymspezifische Metabolisierung von Arzneimitteln zu erforschen. Damit können Einflussfaktoren wie genetische Polymorphismen für einzelne Enzyme oder die Wirkung interagierender Substanzen in der Wahl von Arzneimitteln sowie deren Dosierung und insbesondere in der Kombinationstherapie berücksichtigt werden.

1.3 Das Zytostatikum Procarbazin

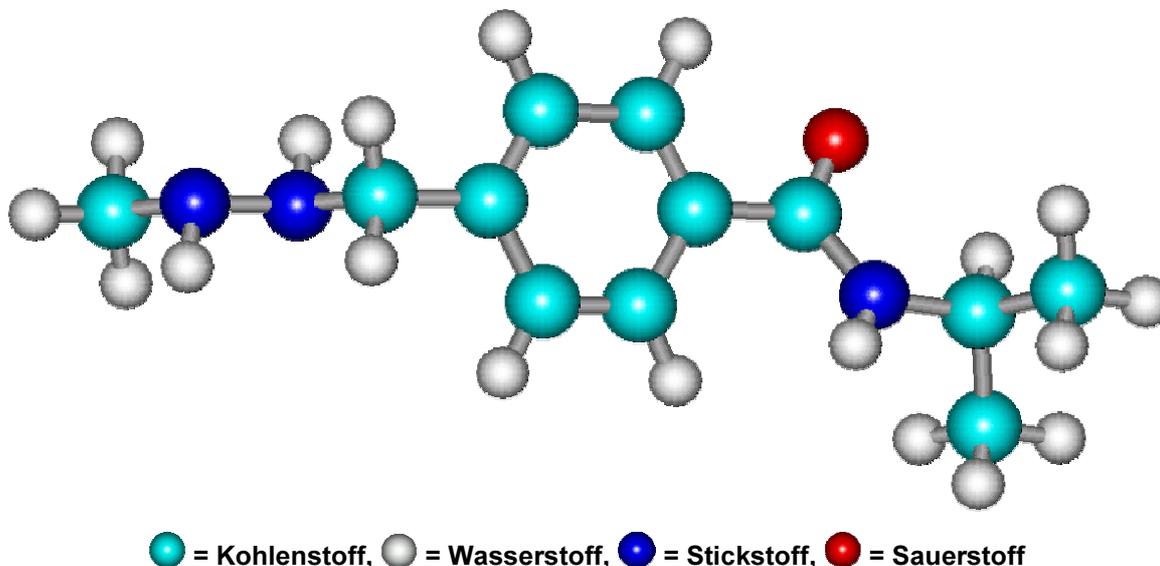


Abbildung 3: 3D-Struktur des Zytostatikums Procarbazin

Um 1960 wurden Hydrazin-Derivate unter einer Reihe von anderen chemischen Verbindungen in der Forschungsabteilung der Hoffmann-La Roche AG in Basel als potentiell wirkungsvolle Inhibitoren der Monoamin-Oxidase untersucht [53]. Spätere Untersuchungen zeigten, dass einige dieser Verbindungen, besonders die methylsubstituierten Hydrazine, eine tumorhemmende Wirkung aufweisen [54, 55]. Die daraufhin durchgeführte systematische Variation der Struktur dieser Substanzen stellte die N-Methylgruppe als absolute Voraussetzung für die Entfaltung der zytostatischen Wirkung heraus. Zusätzlich bewirkte die Einführung einer elektronenziehenden Gruppe in para-Stellung zur Methylhydrazin-Einheit eine verbesserte chemische Stabilität und reduzierte außerdem die toxischen Nebeneffekte der Verbindung [21].

Procarbazin (PCZ), N-Isopropyl- α -(2-methylhydrazino)-p-toluamid (Struktur siehe Abbildung 3), stellte sich als wirksamstes der getesteten Derivate heraus [54] und wurde 1963 erstmals von Martz *et al.* in klinischen Studien gegen maligne Lymphknotentumore eingesetzt [56].

Spätere Untersuchungen zeigten, dass die Oxidationsprodukte des PCZ (siehe auch Abbildung 4), d.h. das Azo-Derivat (AZO) und das Isomerengemisch der Azoxy-Derivate N-Isopropyl- α -(2-methyl-ONN-azoxy)-p-toluamid (AZOXY1) und N-Isopropyl- α -(2-methyl-NNO-azoxy)-p-toluamid (AZOXY2) einen der Muttersubstanz vergleichbaren zytostatischen Effekt besitzen [57].

Weinkam und Shiba [58] zeigten 1978 erstmals, dass diese Derivate die eigentlich wirksamen Metabolite des PCZ darstellen, wobei AZOXY2 ein fünf- bis achtmal stärkeres zytostatisches Potential als AZOXY1 [59] aufweist. Wie diese beiden aktiven Metabolite *in vivo* gebildet werden, ist noch umstritten. Während bis Anfang der 90er Jahre eine oxidative Biotransformation durch Cytochrom P450-Enzyme angenommen wurde [21, 60-62], zeigten spätere Untersuchungen eine nicht-enzymatische Aktivierung des PCZ durch Spontanzerfall [63, 64].

PCZ wird inzwischen seit etwa 25 Jahren mit Erfolg bei der Polychemotherapie maligner Erkrankungen wie Morbus Hodgkin, Nicht-Hodgkin-Lymphomen, kleinzelligen und nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen, Gehirntumoren und Melanomen eingesetzt [1, 55, 65, 66].

1.3.1 Pharmakodynamik

Für Procarbazin werden zwei Wirkungsmechanismen diskutiert:

Einerseits geht man von Autoxidation von PCZ mit Bildung von Wasserstoffperoxid [67] und einer daraus resultierenden Interaktion mit Hydroxylgruppen der DNA und der Polymerisierung der Nukleinsäuren aus.

Weiterhin wird aber auch eine durch ein aus PCZ gebildetes Methyldiazoniumion [58] verursachte Transmethylierung der Transfer-RNA diskutiert. Daraus resultiert eine Hemmung der DNA-, RNA- und Proteinsynthese [1, 55, 68, 69].

Insgesamt wird PCZ den alkylierenden Zytostatika zugeordnet, es zeigt jedoch keine Kreuzresistenz mit den anderen Vertretern dieser Gruppe [55].

1.3.2 Pharmakokinetik

PCZ wird nach oraler Gabe zuverlässig und annähernd vollständig resorbiert. Die orale Bioverfügbarkeit liegt bei 95 - 100 %. Nach 30 - 90 Minuten werden maximale Konzentrationen im cerebrospinalen Liquor nachweisbar [55]. Die Halbwertszeit im Plasma beträgt sieben Minuten [70, 71]. In der Leber erfolgt eine spontane Aktivierung und der Abbau zu inaktiven Substanzen. Die dabei in mehreren aufeinander folgenden Schritten entstehenden Metabolite sind aus Tierversuchen weitgehend bekannt [21]. Etwa 65-70 % der applizierten Dosis werden innerhalb der ersten 24 Stunden nach Gabe renal eliminiert [55, 71]. Untersuchungen mit radioaktiv markiertem PCZ zeigten ebenfalls ein Auftreten von Radioaktivität in der Atemluft in Form von Methan und Kohlendioxid [71]. Dies ist vermutlich auf eine in Lebermikrosomen beobachtete Demethylierung zurückzuführen [55].

Der Metabolismus von PCZ ist bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt. Abbildung 4 zeigt die wichtigsten, bis heute gesicherten Abbauewege.

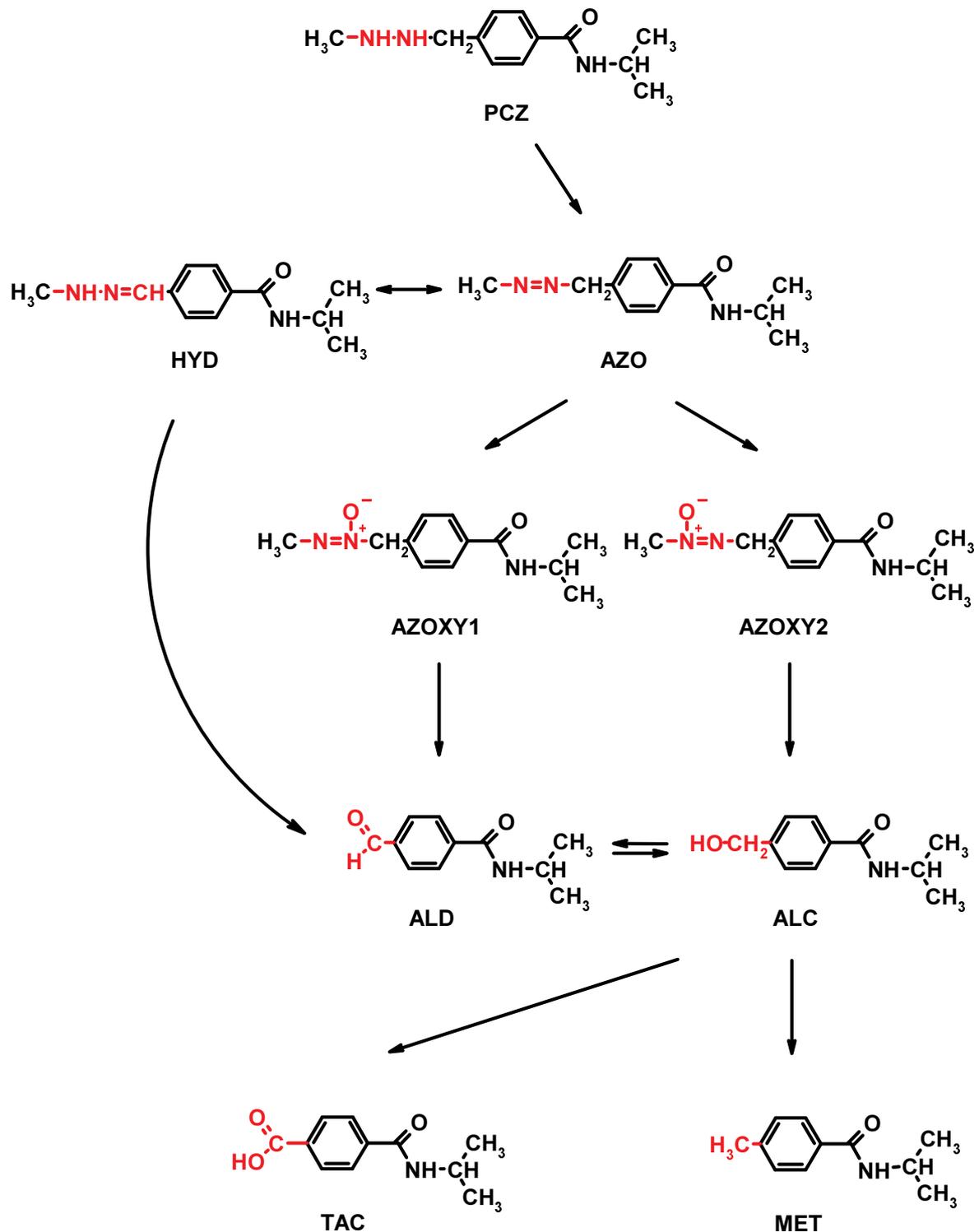


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Procarbazin-Metabolismus

Unter Freisetzung von Wasserstoffperoxid wird die Substanz zuerst spontan zu N-Isopropyl- α -(2-methylazo)-p-toluamid (AZO) oxidiert, das oxidativ weiter zu einem Isomerengemisch aus N-Isopropyl- α -(2-methyl-ONN-azoxy)-p-toluamid (AZOXY1) und N-Isopropyl- α -(2-methyl-NNO-azoxy)-p-toluamid (AZOXY2) [64, 72] zerfällt. AZO kann überdies auch zu einem Hydrazon-Derivat (HYD) tautomerisieren. AZOXY1 und AZOXY2 werden weiter zum Aldehyd- bzw. Alkohol-Metaboliten (ALD bzw. ALC) umgesetzt. Diese beiden Metabolite unterliegen einem Redox-Gleichgewicht, an dem vermutlich eine Aldehyddehydrogenase beteiligt ist [73]. ALD kann zusätzlich auch aus HYD durch Hydrolyse entstehen. Der Säure-Metabolit TAC ist ein Oxidationsprodukt von ALC und stellt den biologisch inaktiven Hauptausscheidungsmetaboliten dar [74, 75]. Die Bildung von TAC erfolgt enzymatisch vermittelt [64].

Der inaktive Metabolit MET wird ebenfalls enzymvermittelt aus ALC gebildet und war zunächst nur im Plasma bei *in vivo*-Untersuchungen an Ratten gefunden worden. 1998 gelang erstmalig der Nachweis *in vitro* bei Experimenten an Humanlebermikrosomen [64]. Da MET eine relativ stabile Verbindung darstellt, könnte dieser Metabolit somit möglicherweise auch mit dem Urin ausgeschieden werden.

1.4 Das Zytostatikum Cyclophosphamid

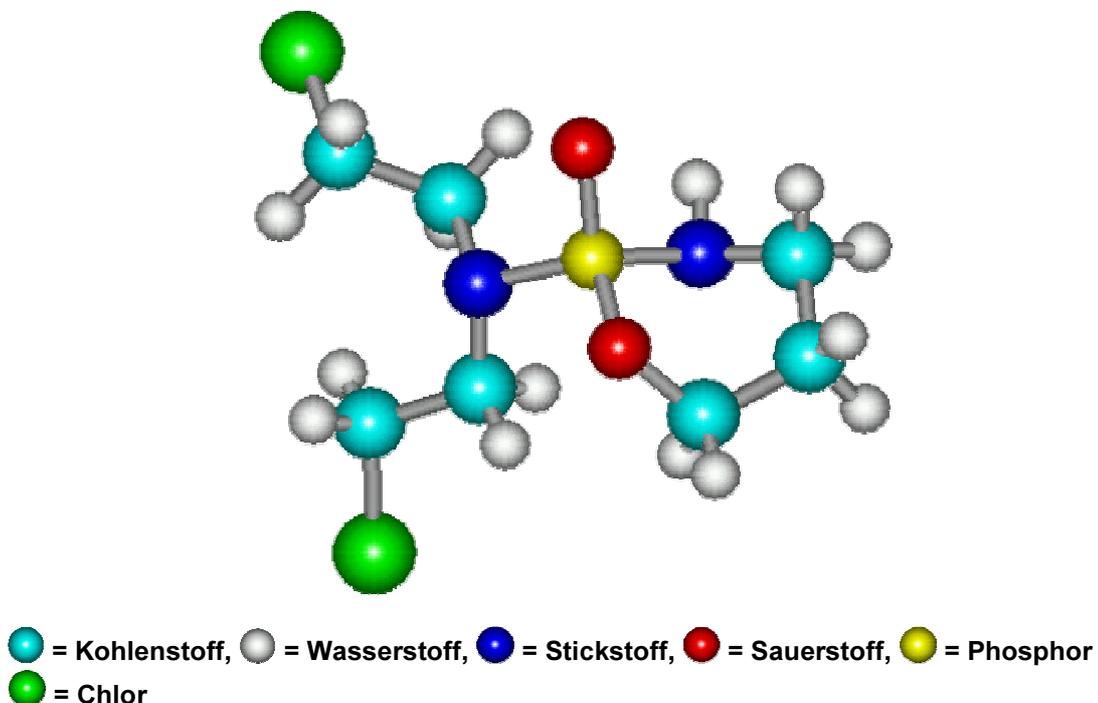


Abbildung 5: 3D-Struktur des Zytostatikums Cyclophosphamid

Das Stickstoff-Lost-Derivat Cyclophosphamid (CP), 2-[Bis(2-chloroethyl)amino]-tetrahydro-2H-1,3,2,-oxazaphosphorin-2-oxid-monohydrat (Struktur siehe Abbildung 5), leitet sich von dem im ersten Weltkrieg eingesetzten Kampfgas Lost (Dichlordiethylsulfid, Senfgas oder Mustard) ab, das hauptsächlich haut- und lungentoxisch wirkt. Zudem wurde damals entdeckt, dass stark proliferierendes Gewebe wie z.B. Knochenmark durch das Kampfgas bei kontaminierten Personen in besonderem Maße geschädigt worden war [76]. Diese Beobachtung initiierte in den 50er Jahren bei den Asta-Werken in Frankfurt am Main die Suche nach phosphorilierten Derivaten des Senfgases, die eine geringere Toxizität aufweisen und als Zytostatika geeignet sein sollten. Unter der Vielzahl der synthetisierten Substanzen stellte das Oxazaphosphorin CP den ersten erfolgreichen Vertreter dieser Klasse dar [77].

1958 wurde das Oxazaphosphorin CP erstmals klinisch eingesetzt und stellt mittlerweile einen der wichtigsten Wirkstoffe im Bereich der antineoplastischen Therapie dar. Auch die später in dieser Substanzklasse entwickelten Zytostatika Ifosfamid und Trofosfamid, die sich durch eine verringerte Toxizität vom CP unterscheiden, konnten den Wirkstoff nicht aus der Therapie verdrängen. Die Substanz findet Anwendung in der Behandlung des Morbus Hodgkin, beim Non-Hodgkin-Lymphom, Plasmozytom, Mamma-, Bronchial- und Ovarialkarzinom, sowie beim Neuroblastom, Ewing-Sarkom und bei Leukämien [1, 78].

1.4.1 Pharmakodynamik

Cyclophosphamid wird den bifunktionalen Alkylantien zugeordnet [79] und ist während des gesamten Zellzyklus zytotoxisch wirksam. Die Substanz ist ein Prodrug und bedarf einer oxidativen Biotransformation zur aktiven Wirkform Phosphoramid-Mustard (PM) [80] (siehe 1.4.2.1). Diese Substanz liegt bei einem physiologischen pH-Wert von 7,4 nahezu vollständig in deprotonierter und somit geladener Form vor und kann daher die Zellmembran schlecht passieren. Lediglich der intrazellulär gebildete Anteil des aktiven Metaboliten kann durch Alkylierung zweier DNA-Basen und die daraus entstehenden Quervernetzungen (cross-links) seine Wirksamkeit entfalten [81]. Das Crosslinking, das sowohl innerhalb eines DNA-Stranges als auch zwischen zwei komplementären Strängen erfolgen kann, bewirkt eine effektive Störung der DNA-Replikation und führt somit letztendlich zur Apoptose [79].

1.4.2 Pharmakokinetik

Oral verabreichtes Cyclophosphamid wird gut resorbiert [82-84]. Maximale Plasmakonzentrationen werden innerhalb einer Stunde erreicht. Aufgrund der prä-systemischen Metabolisierung in der Leber wird die Substanz jedoch in der Regel i.v. verabreicht. Die apparente Halbwertszeit im Plasma nach intravenöser Gabe liegt bei vier bis zehn Stunden, nach oraler Applikation zwischen zwei und sieben Stunden [85]. Die Substanz ist zu etwa 20 % an Plasmaproteinen gebunden [1]. Die CP-Metabolite sind noch stärker proteingebunden, höchstens aber zu 67 % [81]. Da Cyclophosphamid im menschlichen Organismus einem komplexen Metabolismus unterliegt (siehe Abbildung 6), bei dem auch drei Stoffwechselschritte beteiligt sind, die zu inaktiven Metaboliten führen, wird nach Gabe einer definierten Dosis nicht die gesamte Cyclophosphamidmenge metabolisch bioaktiviert [86]. Ein Teil der Muttersubstanz wird direkt zu inaktiven Metaboliten verstoffwechselt oder unverändert renal (bis zu 25 %) bzw. zum geringen Teil auch biliär ausgeschieden [87-89].

Die Elimination von Cyclophosphamid erfolgt hauptsächlich durch metabolische Transformation, die überwiegend in der Leber, daneben aber auch z.B. in Erythrozyten [90] sowie im Tumor selbst [91] stattfindet. Die heute bekannten wichtigen Metabolisierungsschritte des CP sind in Abbildung 6 schematisch dargestellt.

Eine Hydroxylierung in Ringposition 4 stellt den aktivierenden Metabolisierungsschritt dar und führt zum 4-Hydroxy-Cyclophosphamid (4OH-CP), welches im Gleichgewicht mit seinem ringoffenen Tautomer Aldocyclophosphamid (AldoCP) steht. Dieser erste Schritt wird beim Menschen überwiegend vom Cytochrom P450-Enzym CYP2B6, daneben auch von Mitgliedern der CYP2C-Subfamilie und CYP3A4 [92-95] vermittelt. Der größte Teil des Zwischenproduktes AldoCP unterliegt einer spontanen, nicht-enzymatischen β -Elimination. Durch Abspaltung von urotoxischem Acrolein entsteht der eigentlich aktive Metabolit Phosphoramid-Mustard (PM) [80], der eine intrazelluläre Halbwertszeit von 40-50 Minuten besitzt und dann spontan hydrolysiert wird. Hierbei entsteht ein reaktives Aziridium-Zwischenprodukt, das an nukleophilen Zentren alkylierend angreifen kann [96, 97].

Die Detoxifizierung der Muttersubstanz wird in Humanlebermikrosomen überwiegend durch CYP3A4 katalysiert [98]. Etwa 5 % des Cyclophosphamids werden hierbei durch Abspaltung des neurotoxischen Chloracetaldehyds zum inaktiven N-Dechloroethyl-Cyclophosphamid (DCL-CP) metabolisiert.

Zudem erfolgen z.T. konkurrierende Abbauschritte zu inaktiven Metaboliten. So kann der aktive Metabolit 4OH-CP über Alkoholdehydrogenasen zu 4-Ketocyclo-

phosphamid (4KetoCP) deaktiviert werden. Dieses wird ebenso wie Carboxyphosphamid (CarboxyCP), das aus AldoCP über Aldehyddehydrogenasen gebildet wird, renal ausgeschieden.

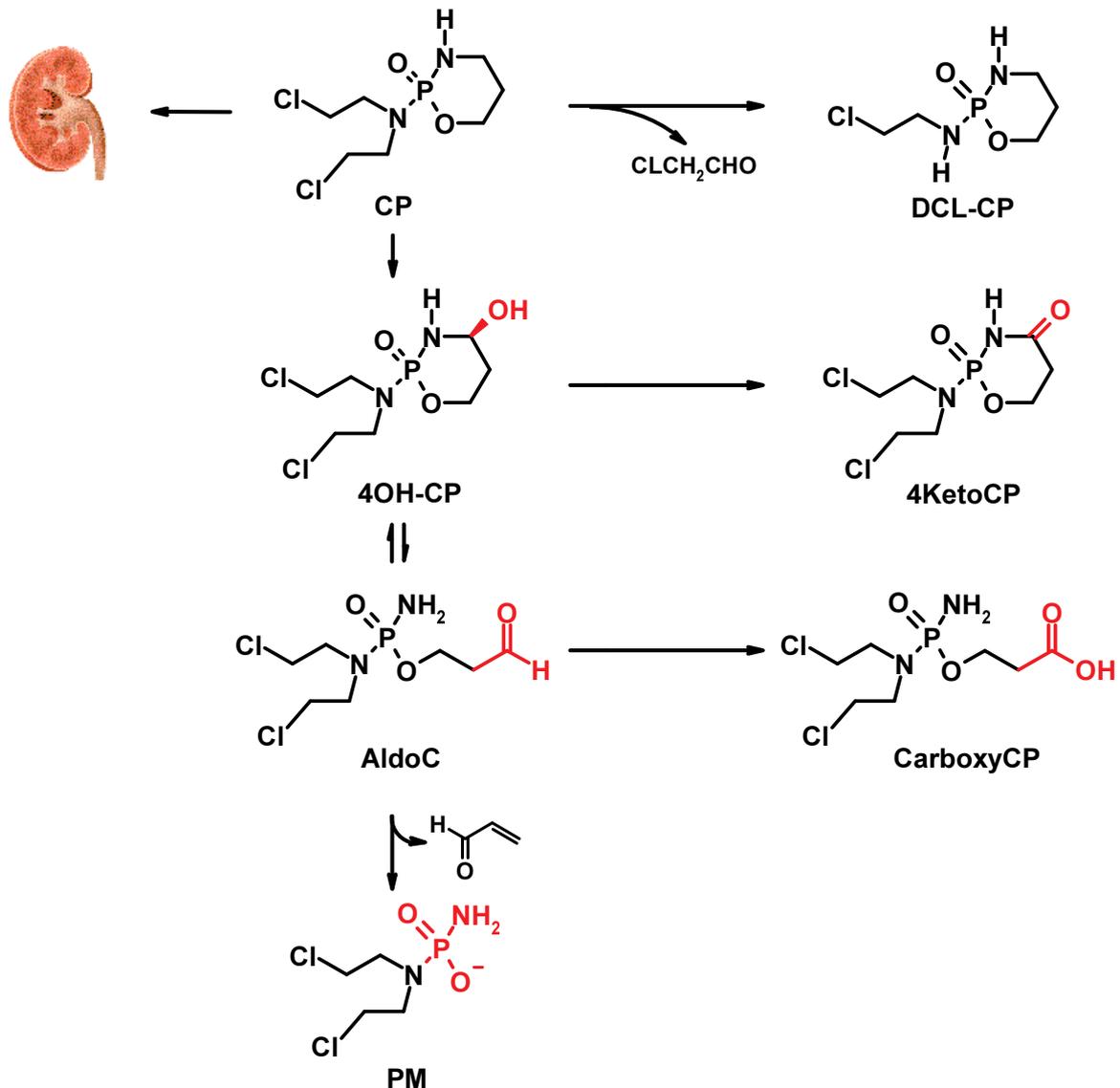


Abbildung 6: Metabolismus und Ausscheidung von Cyclophosphamid

Das Oxazaphosphorin besitzt ein chirales Zentrum am Phosphoratom, dessen Auswirkung auf die Pharmakokinetik und speziell auf den Metabolismus in klinischen Studien mit enantioselektiven Assays für die Muttersubstanz und die optisch-aktiven Stoffwechselprodukte untersucht wurde. Hierbei zeigten sich geringe Unterschiede in der Clearance, wobei das S-Enantiomer rascher eliminiert wurde [99, 100].

Die Pharmakokinetik von CP und seinen Metaboliten weist eine ausgeprägte inter- und intraindividuelle Variabilität auf. Diese ist u.a. bestimmt durch Unterschiede in

den Aktivitäten der beteiligten Enzyme. Die Aktivitäten fremdstoffmetabolisierender Enzyme variieren interindividuell auch bei Gesunden (siehe 1.6.1). Bei Patienten erhöht sich diese Variabilität durch Interaktionen mit anderen Arzneistoffen oder durch Autoinduktion. Daneben haben die Dosis und Darreichungsform Auswirkungen auf die pharmakokinetischen Parameter. Es ist zu erwarten, dass eine geänderte Pharmakokinetik auch Änderungen im Nutzen/Risiko-Profil des Zytostatikums bewirkt. Zu der konkreten Auswirkung möglicher Einflussfaktoren auf den CP-Metabolismus im Rahmen der Anwendung am Patienten, der ein Polychemotherapieschema durchläuft, ist jedoch nur sehr wenig bekannt.

1.5 Interindividuelle Unterschiede in der Pharmakokinetik von Zytostatika

Die Pharmakokinetik von Zytostatika bei der Anwendung in antineoplastischen Therapieprotokollen weist oftmals eine ausgeprägte interindividuelle Variabilität auf [101]. So schwanken die Plasmakonzentrationen der Wirkstoffe nach Verabreichung einer Standarddosis z.T. um das zwei- bis fünffache [102]. Inakzeptable Toxizitäten, verursacht durch erhöhte Plasmakonzentrationen, aber auch mangelnde Wirksamkeit aufgrund zu geringer Konzentrationen können die Folge sein.

Mögliche Ursachen für die interindividuelle Variabilität können sowohl in individuellen Einflussfaktoren, wie z. B. Körpergröße, Alter, Organfunktion (z.B. Leber, Niere), Ernährungszustand, als auch in äußeren Faktoren, wie z. B. Infusionsdauer oder Begleitmedikation liegen. Eine wesentliche Rolle spielt zudem die interindividuelle Variabilität des oxidativen Metabolismus vieler Zytostatika, wobei diese Variabilität vor allem auf unterschiedliche Expression von Cytochrom P450-Enzymen in der Leber, aber auch in extrahepatischem Gewebe zurückzuführen ist.

Es ist oftmals nicht bekannt, welche Auswirkung diese Unterschiede auf den Therapieerfolg haben. Die Individualisierung der zu verabreichenden Dosen zur Verringerung der Wirkstoffkonzentrationen, basierend auf den pharmakokinetischen Parametern der Substanzen, könnte damit sehr wichtig zur Optimierung der antineoplastischen Therapien sein [102].

1.6 Möglichkeiten zur Dosisindividualisierung

Bei der Chemotherapie maligner Erkrankungen mit Zytostatika erfolgt in der Regel im Gegensatz zu den meisten anderen Arzneimitteltherapieformen eine maximale Dosierung, die nur durch die Inzidenz toxischer Wirkungen begrenzt ist. Trotzdem

wird eine ausreichende Wirksamkeit nur bei einem Teil der Patienten erreicht. Polychemotherapieschemata werden in empirischen Studien an großen Kollektiven geprüft [2], wobei eine Einheitsdosis gegeben wird, die meist an das individuelle Körpergewicht oder die Körperoberfläche angepasst wird. Auch bei der Behandlung des Morbus Hodgkin mit dem BEACOPP-Therapieschema werden individuelle Unterschiede im Metabolismus der Wirkstoffe bisher nicht berücksichtigt.

Eine individuelle Dosisoptimierung und die damit verbundene Verbesserung des Nutzen/Risiko-Profiles der applizierten Substanzen setzt die Kenntnis der wichtigsten Einflussfaktoren auf die Metabolisierung der betreffenden Substanzen voraus. Zudem muss die Möglichkeit der Korrelation von Messparametern mit beobachteten unerwünschten Arzneimittelwirkungen gegeben sein. Erst dann ist es möglich, zu erwartende Arzneimittelinteraktionen sowie die individuelle Enzymaktivität bei der Behandlung zu berücksichtigen und zu kontrollieren.

1.6.1 Berücksichtigung von Arzneimittelinteraktionen

Arzneimittel sind nicht nur häufig Cytochrom P450-Substrate, sondern sie können die Aktivität des Enzymsystems hemmen oder induzieren. Da einzelne Enzyme (insbesondere die der Subfamilie 3A) für den Metabolismus ganz verschiedener Arzneimittel verantwortlich sind, ergeben sich aus Hemmung oder Induktion dieser Enzyme wichtige kinetische Konsequenzen für die Substrate. Bei Interaktionen wird zunehmend die Rolle weiterer Enzyme (Acetyltransferasen, Sulphotransferasen) und Transporterproteine (P-Glykoprotein, organische Anionen- und Kationentransportern) erkannt. Die Cytochrom P450-Enzyme sind aber diejenigen Enzyme, die heute am genauesten erforscht sind und deren Funktion regelmäßig auch bei neuen Arzneimitteln getestet wird [28].

Die Subfamilie CYP3A stellt nach heutigem Wissen die wichtigste Gruppe von klinisch bedeutsamen Cytochromen dar. CYP3A repräsentiert dabei ca. 30 % aller in der Leber vorkommenden Cytochrom P450-Enzyme. Etwa die Hälfte aller gebräuchlichen Arzneimittel werden über eines dieser Cytochrome metabolisiert [103]. Drei Enzyme dieser Subfamilie sind bekannt (CYP3A4, CYP3A5 und embryonales CYP3A7) [104], die sich in ihrer Substratspezifität und ihrer Expression unterscheiden [105]. Davon kommt CYP3A4 die größte Bedeutung zu; da die anderen Cytochrome aber sehr ähnlich sind (mehr als 80 % identische Aminosäuren), wird global von CYP3A-Enzymen gesprochen. Diese finden sich auch in der Wand des Dünndarms [106] und sind deshalb häufig für eine präsystemische Bio-transformation, den sog. intestinalen *first pass*-Metabolismus, verantwortlich. Fol-

ge ist dann oftmals eine Verringerung der oralen Bioverfügbarkeit von CYP3A4-Substraten [107].

Die Aktivität der CYP3A-Subfamilie weist auch beim Gesunden eine ausgeprägte intra- und interindividuelle Variabilität auf. Diese Schwankungen können in der Leber den Faktor 10 bis 100, im Dünndarm den Faktor 30 erreichen [104]. Seit einigen Jahren sind genetische Polymorphismen für die Enzyme der CYP3A-Subfamilie bekannt [108-112]. Ein Zusammenhang zur ausgeprägten interindividuellen Variabilität der CYP3A-Aktivität ist dabei bislang noch nicht gesichert [113]. Es scheint jedoch, dass für die via CYP3A metabolisierten Arzneimittel oft auch das polymorphe P-Glykoprotein von Bedeutung ist [104].

In vitro-Untersuchungen an Humanlebermikrosomen haben gezeigt, dass eine ganze Reihe von Zytostatika, speziell die Oxazaphosphorine Cyclophosphamid, Mafosfamid und Ifosfamid, aber auch Vinblastin, Vincristin, Daunorubicin, Doxorubicin, Teniposid und Docetaxel das CYP3A4 hemmen und somit zu Arzneimittelinteraktionen führen können [114]. Oxazaphosphorine sind zudem in der Lage, das an ihrer eigenen Eliminierung beteiligte CYP3A4 zu induzieren. Diese Autoinduktion hat *in vivo* eine gesteigerte Clearance und eine verkürzte Halbwertszeit, z.B. nach wiederholter Gabe in 24-Stunden-Intervallen, zur Folge [115-117].

1.6.2 Berücksichtigung der individuellen Enzymaktivität durch Phänotypisierung

Zur Bestimmung der aktuellen individuellen Aktivität eines Cytochrom P450-Enzyms besteht die Möglichkeit, ein spezifisches Testsubstrat zu geben und anschließend pharmakokinetische Parameter zu bestimmen. Jedoch fehlt für die meisten dieser Tests eine Validierung, ob die gemessenen Parameter tatsächlich die Enzymaktivität *in vivo* wiedergeben, oder ob andere Einflussfaktoren wie z.B. die Nierenfunktion wichtiger sind. Tabelle 3 zeigt eine Übersicht der bislang etablierten *in vivo*-Phänotypisierungsverfahren für fremdstoffmetabolisierende Enzyme. Probleme bei der Phänotypisierung ergeben sich oftmals jedoch aus der notwendigen Applikation einer therapeutisch nicht indizierten Substanz und der damit verbundenen zusätzlichen Belastung des Patienten. Ein Hauptziel bei der Entwicklung und Etablierung von Verfahren zur *in vivo*-Phänotypisierung ist daher die Gabe möglichst geringer Dosen der Testsubstanzen. Dies erfordert gleichzeitig sehr empfindliche und spezifische Messmethoden zur Bestimmung der Substrate bzw. deren Metabolite in Körperflüssigkeiten wie z.B. Plasma, Urin oder Speichel.

Tabelle 3: Besonders gut charakterisierte *in vivo*-Phänotypisierungsverfahren für fremdstoffmetabolisierende Enzyme

Enzym	Testsubstanzen	Literatur
CYP1A2	Koffein	[118, 119]
CYP2A6	Coumarin	[120, 121]
CYP2C9	Tolbutamid	[122]
CYP2C19	S-Mephenytoin	[123]
CYP2D6	Dextromethorphan, Spartein, Debrisoquin	[31, 124]
CYP2E1	Chlorzoxazon	[125, 126]
CYP3A4	Midazolam, Erythromycin, Nifedipin	[127]
NAT 2	Koffein	[118]

1.6.3 Phänotypisierung von CYP3A4 mit Midazolam

Zur Bestimmung der CYP3A-Aktivität *in vivo* wurden als mögliche Testsubstanzen für die Phänotypisierung mehrere spezifische Substrate getestet, darunter Alprazolam, Cortisol, Dextromethorphan, Erythromycin, Lidocain, Midazolam, Nifedipin, Triazolam und Verapamil [128-131]. Hierbei kommt Midazolam (MID, Struktur und Metabolismus siehe Abbildung 7) die größte Bedeutung zu, da diese Substanz oral appliziert werden kann und dabei schnell und vollständig resorbiert wird, aber auch *i.v.* verabreicht werden kann. [132]. Somit wird die gleichzeitige Bestimmung von hepatischer und intestinaler CYP3A-Aktivität möglich [133, 134]. Im Gegensatz zu vielen anderen CYP3A4-Testsubstanzen ist MID kein Substrat des ebenfalls im Dünndarm exprimierten Transporters P-Glykoprotein [135].

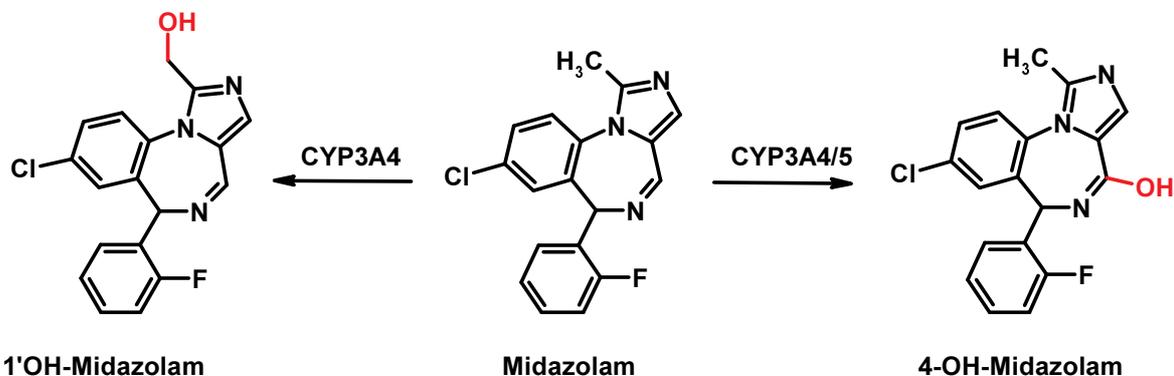


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Midazolam-Metabolismus

MID wird hauptsächlich zu 1'-Hydroxy-Midazolam (1'OH-MID) metabolisiert. Dieser Schritt wird überwiegend CYP3A4 vermittelt [136, 137]. Zudem erfolgt in untergeordnetem Maße auch die Bildung von 4-Hydroxy-Midazolam (4OH-MID) und 1',4-Dihydroxy-Midazolam (1',4OH-MID). An diesen Metabolisierungsschritten ist neben CYP3A4 auch CYP3A5 beteiligt.

Durch Ermittlung der hepatischen bzw. intestinalen Verfügbarkeit lässt sich die entsprechende CYP3A4-Aktivität gut bestimmen [132, 138, 139]. Seit kurzem ist es möglich, durch eine sequentielle Gabe von MID oral und i.v. die intestinale und hepatische CYP3A4-Aktivität gleichzeitig zu bestimmen [133, 134].

1.7 Arzneistoffanalytik in Körperflüssigkeiten

1.7.1 Analytische Verfahren

1.7.1.1 Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Seit der Entwicklung Mitte der 70er Jahre ist die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC, engl.: High Performance Liquid Chromatography) mittlerweile neben den bewährten chromatographischen Methoden wie der konventionellen (Niederdruck-) Säulen-Chromatographie, der Dünnschichtchromatographie und der Gaschromatographie zu einem leistungsstarken Standardverfahren in der modernen Analytik geworden. Die HPLC wird heute sowohl in der biomedizinischen, biochemischen und pharmazeutischen Forschung, als auch für Fragestellungen im Bereich der Kosmetik-, Energie- und Nahrungsmittelindustrie eingesetzt [140].

Die vergangenen zehn Jahre im Bereich der HPLC waren geprägt von der Entwicklung neuer modifizierter stationärer Phasen und kleinerer Trennsäulen. Sog. Mikro-Säulen besitzen nur noch einen Innendurchmesser zwischen 3 µm und 200 µm. Bei der sog. *Fast HPLC* kommen Säulen mit einer Länge von 3 mm und kleineren Partikelgrößen zum Einsatz.

Gegenwärtig stehen dem Anwender mehrere 1000 verschiedene Arten von Trennsäulen [141], aber auch eine ganze Reihe von unterschiedlichen Detektoren zur Verfügung. Neben den weit verbreiteten UV/Vis-, Diodenarray-, Fluoreszenz- und elektrochemischen Detektoren kommen zunehmend unterschiedliche Arten von Massenspektrometern (MS) zum Einsatz [142]. Hier sind in der letzten Dekade bedeutende Fortschritt in der Entwicklung entsprechender Interface-Systeme erzielt worden (siehe 1.7.1.2). MS als On-Line-HPLC-Detektor stellt zwar in der Regel das empfindlichste und gleichzeitig universellste Detektionsverfahren dar.

Die Kosten für ein solches Gerät übersteigen jedoch die für herkömmliche Detektoren derzeit noch um ein Vielfaches [143].

1.7.1.2 LC-MS/MS

Die On-Line-Kombination von Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie (LC-MS) findet seit über 25 Jahren Anwendung in der Analytik [144]. Die Verfügbarkeit von verlässlichen, immer leistungsfähigeren LC-MS-Geräten hat die LC-MS-Technik inzwischen zu einem immer attraktiveren Messverfahren gemacht [144]. Mittlerweile stellt die HPLC-Tandemmassenspektrometrie (LC-MS/MS) im sog. selected reaction monitoring (SRM)-Modus in der quantitativen Bioanalytik sogar die Methode der Wahl dar. Hierzu hat im Wesentlichen die Weiterentwicklung von bestehenden Interfaces zwischen HPLC und MS wie Elektrospray (ESI) oder der „aktiven“ chemischen Ionisierung bei Atmosphärendruck (APCI) entscheidend beigetragen [145]. Diese beiden Ionisierungsverfahren werden heute überwiegend eingesetzt. Eine vielversprechende Weiterentwicklung auf diesem Gebiet stellt die Photoionisation (APPI, atmospheric pressure photoionization) dar [146]. Die LC-MS/MS-Technik bietet die Möglichkeit, eine sehr sensitive High-Throughput-Analytik auch von Substanzgemischen durchzuführen. Hierbei sind mit den modernen Geräten Quantifizierungsgrenzen im Bereich von wenigen pg/ml je nach Analyt möglich.

1.7.1.3 Kernresonanzspektroskopie

Die hochauflösende Kernresonanzspektroskopie wird bei der Arzneistoffanalytik in Körperflüssigkeiten erst seit den späten 80er Jahren eingesetzt [147]. Der mögliche Einsatz von Hochfeldgeräten (800 MHz und höher) und die Entwicklung von 2 D- und 3 D-Experimenten ermöglichen mittlerweile eine verbesserte Sensitivität und Auflösung der Methode sowie eine Verkürzung der Messzeit [148]. Je nach Experiment sind mit diesen Hochfeldgeräten quantitative Analysen bis zu Konzentrationen von wenigen µg/ml möglich. Im Normalfall liegt das untere Quantifizierungslimit jedoch bei etwa 1-100 mg/ml [147]. Als NMR-Sonden werden hauptsächlich ^1H - und ^{31}P -Kerne sowie im untergeordneten Maße auch ^{13}C -Kerne eingesetzt, die aber aufgrund ihres kleineren magnetischen Moments im Verhältnis zu ^1H und ^{31}P sehr unempfindlich sind. Obwohl sich der Wasserstoff im Vergleich zum Phosphor durch eine größere Empfindlichkeit auszeichnet, erschwert die Tatsache, dass wasserstoffhaltige Verbindungen in allen Molekülen lebender Organismen vorkommen, den Spektrenaufbau erheblich. Die ^{31}P -NMR-Spektroskopie eignet sich hingegen gut zur Analytik phosphorhaltiger Verbindungen wie z.B. Cyclophosphamid und seiner Metabolite in Körperflüssigkeiten [149], da ^{31}P mit

einer natürlichen Häufigkeit von 100 % im Vergleich zu ^{13}C ein relativ empfindlicher Kern ist. Da hierbei wenige Störsignale auftreten, ermöglicht die ^{31}P -NMR-Spektroskopie oftmals eine direkte Analyse von unbehandelten Urinproben, ohne dass eine z.B. bei Verwendung der GC/MS-Technik z.T. unumgängliche, häufig mit Problemen behaftete und oftmals verlustreiche Probenaufarbeitung oder Derivatisierung erforderlich ist.

Gegenüber chromatographischen Methoden bietet die NMR-Technik entscheidende Vorteile. Die erhaltenen Peakflächen der NMR-Signale stehen bei ausrelaxierten Kernen im direkten Verhältnis zur Stoffmenge des detektierten Isotops, so dass allein die Zugabe eines internen Standards in bekannter Konzentration eine Quantifizierung ermöglicht und keiner zusätzlichen externen Kalibration bedarf. Zudem besteht während eines NMR-Experiments weder für die Probe noch für den Messkopf eine Kontaminationsgefahr, da Spektrometer und Probe nicht direkt miteinander in Kontakt kommen. Die Spektren stabiler Verbindungen zeigen über Jahre hinweg reproduzierbare Signalflächen mit einer Variabilität von weniger als 1 %. Somit kann der Aufwand einer Validierung bei Verwendung der NMR-Technik erheblich reduziert werden. Das Messverfahren eignet sich neben der Quantifizierung von Metaboliten in verschiedenen Körperflüssigkeiten wie Blut, Plasma, Urin und Gallenflüssigkeit auch zur Identifizierung unbekannter Metabolite.

Ein großer Nachteil der NMR-Spektroskopie liegt jedoch in der Tatsache, dass bei der Analytik von Körperflüssigkeiten die Analyten in einer Konzentration von mindestens 50 μM vorliegen müssen [147], da oftmals Signalüberlappungen aufgrund der komplexen Matrix vorliegen (z.B. durch Phospholipide bei der Untersuchung von Plasma mit ^{31}P -NMR). Um diese Probleme zu umgehen, wurden solche Proben bislang vor der Analyse oftmals durch Festphasenextraktion aufgearbeitet.

Seit wenigen Jahren wird versucht, durch spezielle Kopplungstechniken die Vorteile der HPLC (siehe 1.7.1.1) mit denen der NMR zu verbinden [150]. Im Gegensatz zu den üblichen HPLC-Detektoren (UV, Fluoreszenz) ist man nicht auf einen Chromophor angewiesen. Hierbei kommen neben den ursprünglich entwickelten Durchflusszellen auch zunehmend die sog. *Stopped-flow*-Methode zum Einsatz, bei der der HPLC-Fluss kurzzeitig zur Messung der Probe im stationären Zustand angehalten wird [151, 152]. Zur Zeit konkurriert die Kopplung von HPLC und NMR mit LC-MS/MS-Geräten hinsichtlich Sensitivität, Strukturaufklärung und Messzeit [147]. Vereinzelt werden aber auch bereits Kombinationen dieser beiden Techniken eingesetzt [153, 154].

1.7.2 Analytik von Procarbazin und seinen Metaboliten

Die publizierten Analysetechniken zur Quantifizierung von Procarbazin und seinen Metaboliten *in vivo* beschränken sich weitestgehend auf chromatographische Verfahren. Mittels HPLC lassen sich im Plasma neben der Muttersubstanz auch sämtliche in Abbildung 4 (siehe 1.3.2) dargestellten Metabolite bestimmen [58, 61, 64]. Die Verwendung der GC-MS-Technik erlaubt eine Quantifizierung dieser Substanzen im Plasma bis zu einer Konzentration von 10 ng/ml [155]. Diese Methode erfordert jedoch eine aufwendige Derivatisierung und Extraktion vor der Analyse. Rucki *et al.* gelang 1980 unter Verwendung eines elektrochemischen Detektors eine verglichen mit herkömmlichen HPLC-UV-Methoden sehr empfindliche Bestimmung von Procarbazin in unbehandelten menschlichen Urin- und Plasmaproben [156].

Zur Aufklärung des Metabolismus wurden weiterhin MS-Techniken eingesetzt, die die Analyse von isotopenmarkierten Metaboliten *in vivo* erlauben [61, 74].

1.7.3 Analytik von Cyclophosphamid und seinen Metaboliten

In der Literatur sind eine Reihe von Analyseverfahren zur Quantifizierung von Cyclophosphamid und seinen Metaboliten beschrieben. Die Gaschromatographie stellt eine sehr empfindliche Methode zur Detektion der Muttersubstanz [157, 158], DCL-CP [98] und 4KetoCP in biologischen Matrizen dar. Daneben wurden aber auch HPLC-Verfahren zur Bestimmung von CP-Konzentrationen *in vivo* eingesetzt [159, 160]. Diese Methoden haben sich jedoch aufgrund der bei der UV-Detektion erforderlichen niedrigen Wellenlänge (200 nm) als nicht sehr empfindlich erwiesen. Oftmals sind hier aufwendige Extraktionsverfahren notwendig [149, 161-163]. Auch für die reaktiveren Metabolite sind Assays beschrieben, die vor der Quantifizierung einer aufwendigen Derivatisierung zur Stabilisierung der Verbindungen bedürfen [164-166]. In den letzten Jahren wurden ebenfalls LC-MS-Methoden zur Quantifizierung von CP und seinen Metaboliten im Plasma publiziert, die einen hohen Probendurchsatz bei minimaler Störung der Analytik durch die Matrix erlauben [167, 168]. Die Bestimmung von Urinkonzentrationen wird seit etwa zehn Jahren mittels ^{31}P -NMR-Techniken durchgeführt. Hierbei ist jedoch die Quantifizierung instabiler Metabolite aufgrund der langen Messzeit nicht möglich [149, 169]. Zudem ist der Probendurchsatz mit diesen Methoden relativ gering.

Zur separaten Analyse der Stereoisomere von Cyclophosphamid wurden ebenfalls Verfahren entwickelt, die eine chirale Derivatisierung und chirale Chromatographie beinhalten [170-172].

1.7.4 Analytik von Midazolam und seinen Metaboliten

Publizierte Methoden zur Quantifizierung von Midazolam und seinen Metaboliten sind seit Anfang der 80er Jahre verfügbar. Dabei beschränken sich die beschriebenen Verfahren weitestgehend auf flüssigkeitschromatographische Techniken mit UV-Detektion im Wellenlängenbereich von 220-254 nm [173]. Die unteren Quantifizierungsgrenzen sind bei diesen Methoden jedoch selten besser als 50 ng/ml [174-177]. Zudem können bei der Analyse von Plasmaproben Störungen durch koeluiierende Substanzen bei einer zusätzlichen Medikation des Probanden bzw. des Patienten mit weiteren Wirkstoffen auftreten.

Weiterhin wurden gaschromatographische Verfahren mit Elektroneneinfangdetektion (ECD, engl.: electron capture detection) [178-180] und MS-Detektion [181-183] entwickelt. Diese Verfahren erfordern jedoch bei gleichzeitiger Messung der Metabolite 1'OH-MID und 4OH-MID eine aufwendige Derivatisierung der Analyten zum Schutz der Hydroxylgruppen. [173]. Die Nachweisgrenzen dieser Methoden liegen bei etwa 3-4 ng/ml [184] und sind für die Bestimmung im Rahmen von klinischen Studien zur CYP3A4-Phänotypisierung nur bedingt geeignet.

Durch den Einsatz von LC-MS- bzw. LC-MS/MS-Verfahren konnten die Quantifizierungsgrenzen für Midazolam und seine Metabolite erheblich gesenkt werden [185-187]. Diese Methoden ermöglichen die quantitative Bestimmung der Analyten in Plasmakonzentration von weniger als 500 pg/ml, erfordern jedoch oftmals eine aufwendige Probenvorbereitung. Ziel weiterer Entwicklungen ist es, die Empfindlichkeit der LC-MS/MS zu steigern, gleichzeitig die Analysenzeiten zu verkürzen und die Probenvorbereitung zu vereinfachen.

2 Fragestellung

Im Rahmen dieser Dissertation sollte die renale Elimination der Zytostatika Procarbazin und Cyclophosphamid bzw. ihrer Metabolite im Rahmen der BEACOPP-Polychemotherapie bei Patienten mit Morbus Hodgkin beschrieben und die individuellen pharmakokinetischen Parameter mit der Hämatoxizität korreliert werden.

Hierzu sollten einfache und verlässliche analytische Verfahren entwickelt werden, die es erlauben, die im Urin ausgeschiedenen Metabolite des Procarbazins und des Cyclophosphamids zu quantifizieren. Von Patienten, die nach dem BEACOPP-Therapieprotokoll behandelt wurden, sollte dann 24-Stunden-Sammelurin vom ersten Therapietag der ersten drei Zyklen untersucht werden.

In einer Kovarianzanalyse sollte der Einfluss von Kreatinin-Clearance, Alter, Geschlecht, Körpergröße und –gewicht, Körperoberfläche, Body-Mass-Index und Nummer des Therapiezyklus auf die in Form der Metabolite ausgeschiedenen Zytostatika bestimmt werden.

Eine anschließende Pharmakokinetik-Pharmakodynamik-Analyse sollte den Einfluss der Pharmakokinetik von Procarbazin und Cyclophosphamid auf die Hämatoxizität prüfen.

Da erwartet wurde, dass Cyclophosphamid seinen eigenen Abbau induziert, sollte ergänzend an Leberschnitten eine Induktion von Cytochrom P450 3A4 durch Cyclophosphamid unter Verwendung von Midazolam als CYP 3A4-Modellsubstrat geprüft werden. Dieses Enzym ist wesentlich am Metabolismus von Cyclophosphamid beteiligt. Ziel dieser Untersuchungen war es, das Verfahren der Phänotypisierung von CYP3A4 mit dem Modellsubstrat Midazolam für die Abschätzung des Ausmaßes der Autoinduktion durch Cyclophosphamid in diesem *in vitro*-Modell zu etablieren.

Zur Phänotypisierung der CYP3A4-Aktivität beim Menschen sollte anschließend ein robustes und sensibles analytisches Verfahren zur Quantifizierung von Midazolam im Plasma etabliert werden, das die Applikation sehr niedriger Midazolam-Dosen erlaubt.

Die Untersuchungen sollen dazu beitragen, unter Verwendung von Einflussfaktoren für das Toxizitätsrisiko und für pharmakokinetische Parameter sowie anhand von Messergebnissen zu Kinetik und Enzymaktivität eine individuelle Dosisoptimierung zu ermöglichen.

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Referenzsubstanzen

ALC	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel (Schweiz)
ALD	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel (Schweiz)
Carboxyphosphamid	ASTA Medica, Frankfurt am Main
Cyclophosphamid	ASTA Medica, Frankfurt am Main
D ₄ -Cyclophosphamid	ASTA Medica, Frankfurt am Main
N-Dechloroethyl-Cyclophosphamid	ASTA Medica, Frankfurt am Main
4-Ketocyclophosphamid	ASTA Medica, Frankfurt am Main
Midazolam Hydrochlorid	BUFA b.v. Pharmaceutical Products, Uitgeest (Niederlande)
1'-OH-Midazolam	Lipomed GmbH, Bad Säckingen
4-OH-Midazolam	Lipomed GmbH, Bad Säckingen
N-(Phosphonomethyl)glycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

3.1.2 Reagenzien

Acetonitril (HPLC Gradient Grade)	Roth, Karlsruhe
Ameisensäure	Merck, Darmstadt
Ammoniumformiat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Benzoylchlorid	Merck, Darmstadt
Chromium (III) acetylacetonat	ABCR GmbH, Karlsruhe
Cyclohexan p.A.	Merck, Darmstadt
1,4-Dioxan p.A.	Merck, Darmstadt
Ethanol, absolut p. A.	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Isopropylamin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

ITS Flüssigkeitsmedium Supplement	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kaliumpermanganat p.A.	Merck, Darmstadt
Methanol (HPLC Grade)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumsulfat, wasserfrei	Merck, Darmstadt
Penicillin-Streptomycin Lösung	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Phosphorsäure (0,1 mol/l)	Merck, Darmstadt
p-Tolylsäurechlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Salzsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Williams' E-Medium	Biochrom AG, Berlin

3.1.3 Geräte

Analysenwaage	Sartorius, Typ MC-1 Sartorius AG, Göttingen
Begasungsbrutschrank	B5060 EC/CO ₂ Heraeus GmbH, Hanau
GC/MS-System (Abt. Prof. Dr. Budzikiewicz)	<u>GC</u> : Varian 3400 Varian Analytical Instruments, Sunnyvale, CA (USA) <u>MS</u> : Finnigan Incos 500 Finnigan MAT, Bremen
GC/MS-System (Abt. Prof. Dr. Berkessel)	<u>GC</u> : HP GC-System 6890 Series <u>MS</u> : HP 5973 Mass selective Detector Agilent; Waldbronn
Gewebeschneider	Brendel/Vitron-Tissue Slicer Vitron Organ Slice Technologies, Tucson, AZ (USA)

HPLC	<u>Pumpe /</u> <u>Autosampler:</u> 2690 Alliance Separation Module <u>Detektor:</u> 996 PDA-Detektor Waters, Milford, MA (USA)
HPLC-Säulen	<u>Procarbazin-Urinalanalytik:</u> Ultrasphere® 5µ Spherical 80 Å (250 x 4,6 mm) mit entsprechender Vorsäule (45 x 4,6 mm) Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA (USA) <u>Cyclophosphamid-Urinalanalytik:</u> BetaBasic C ₈ 5µ (100 x 3 mm) mit entsprechen- der Vorsäule (10 x 3 mm) Thermo Hypersil-Keystone, Egelsbach <u>1'OH-Midazolam-Analytik:</u> BetaBasic C ₈ 5µ (100 x 3 mm) mit entsprechen- der Vorsäule (10 x 3 mm) Thermo Hypersil-Keystone, Egelsbach <u>Midazolam-Plasmaanalytik:</u> Kromasil C ₈ 5µ (100 x 3 mm) Thermo Hypersil-Keystone, Egelsbach
Kühlzentrifuge	Labofuge 400 R Hereaus Instruments, Düsseldorf
LC-MS/MS	<u>LC-Pumpe:</u> Surveyor MS Pump <u>Autosampler:</u> Surveyor Autosampler <u>Detektor:</u> TSQ® Quantum Mass Spectro- meter System Thermo Finnigan, San Jose, CA (USA)
NMR-Spektrometer	<u>Spektrometer:</u> WM 300 Messfrequenz: ¹ H: 300,13 MHz ³¹ P: 121,51 MHz <u>Messrechner:</u> ASPECT 2000 <u>Temperiereinheit:</u> B-VT1000 Bruker Analytik GmbH, Karlsruhe

pH-Meter	pH 323 WTW (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH), Weilheim
Rotationsverdampfer	<u>Zentrifugal-Verdampfer:</u> Jouan RC 10.22 Jouan GmbH, Unterhaching <u>Kältefalle:</u> RCT 90 Jouan GmbH, Unterhaching <u>Vakuumpumpe:</u> Pascal 2005 SD Alcatel, Velizy Cedex (Frankreich)
Schmelzpunktbestimmungs- apparatur nach Dr. Totoli	Büchi, Fabrikat-Nr. S 2751 Büchi Labortechnik AG (Flawil, Schweiz)
Steril-Werkbank	Herasafe, HSP 12 Kendro, Hanau
Tiefkühlschränke	Forma Bio-Freezer, Modell 8218 Forma Scientific Inc., Marietta, OH (USA) Deep Freezer VX 570 S Jouan S.A., St. Herblain Cedex (Frankreich) GSL 351./GS 35 K O Siemens-Electrogeräte GmbH, Essen
Titerplattenschüttler	Typ DSG 304 HEIDOLPH Instruments, Schwabach
Ultraschallbad	Senorex TK 30 Bandelin Electronic, Berlin
Vortex Mixer	Typ VF2 Janke und Kunkel GmbH & Co KG IKA-Labor- technik, Staufen

Vortex Mixer	MS1 Minishaker Typ T IKA WORKS, INC., Wilmington, NC (USA) Reagenzien-Mixer Apparatebau Eckli Electronic, Zürich (Schweiz)
Waage (bis 1kg)	Sartorius, Typ Nr. 2204 Sartorius AG, Göttingen
Wasseraufbereitungsanlage	Milli-Q® plus-Water Purification System Millipore, Eschborn
Zentrifugen	Centrifuge 5402 Rotor F-45-18-11 Eppendorf AG, Hamburg Labofuge 400 Rotor 8175 Heraeus Instruments GmbH, Hanau

3.1.4 Proben

Unter Leitung von Prof. Dr. med. V. Diehl (Direktor der Klinik I für Innere Medizin der Universität zu Köln) und Prof. Dr. med. Uwe Fuhr (Leiter der AG Klinische Pharmakologie im Institut für Pharmakologie der Universität zu Köln) wurde im Zeitraum von 1997 bis 2002 an der Universität zu Köln die Klinische Studie *Populationspharmakokinetik und Toxizität der Zytostatika des BEACOPP-Schemas beim Morbus Hodgkin* durchgeführt. In diese Studie wurden nach vorher festgelegten Kriterien [12] insgesamt 35 Patienten eingeschlossen, deren jeweils erste drei Therapiezyklen Bestandteil der Untersuchungen waren. Hierbei wurde jeweils am ersten Tag der Therapie über 24 Stunden Urin gesammelt, der nach Bestimmung der Urinmenge aliquotiert und bis zur Bestimmung der Kreatinin-Clearance und der Zytostatikakonzentrationen bei -20 °C eingefroren wurde. Zur Abschätzung weiterer Einflussfaktoren auf pharmakologische Parameter der einzelnen Substanzen wurden neben exakter Protokollierung der Infusions- bzw. Einnahmezeiten drei Blutentnahmen durchgeführt (direkt nach Ende der Infusionstherapie am ersten Therapietag, ungefähr eine Stunde später und unmittelbar vor Beginn der Infusionen an darauffolgenden Tag). Diese Proben dienten der Bestimmung der Plasmakonzentrationen der Zytostatika Cyclophosphamid, Doxorubicin und Etoposid. Aus der ersten verfügbaren Probe der ersten drei Zyklen wurden Kreatinin, Albumin und Bilirubin im Plasma bestimmt (Routinemethoden des Instituts für Kli-

nische Chemie der Universitätskliniken Köln). Die hämatologischen Nebenwirkungen wurden anhand der im Rahmen der Therapie durchgeführten Blutbildkontrollen (Hämoglobin, Leukozyten und Thrombozyten) erfasst.

3.2 Validierung analytischer Verfahren

Ein analytisches Messverfahren zur quantitativen Bestimmung von Wirkstoffen in Körperflüssigkeiten muss im Anschluss an die Entwicklung einer Validierung unterzogen werden, um verlässliche Analyseergebnisse sicherzustellen. Als Validierung wird der formale Nachweis der Eignung des gewählten Analyseverfahrens für den vorgesehenen Zweck bezeichnet. Für alle in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Quantifizierungsmethoden wurde jeweils eine Validierung durchgeführt. Als Grundlage dienten dazu die Anforderungen aktueller internationaler Richtlinien [188-192].

3.2.1 Herstellung von Proben mit bekannten Konzentrationen der Analyten

Zur Herstellung von Lösungen mit bekannter Konzentration (Kalibrierungs- und Qualitätskontrolllösungen) wurden die Reinsubstanzen unter Verwendung der Matrix, in der die zu analysierenden Proben vorlagen (Plasma, Urin, Medium), gelöst. Der Anteil an eventuell zum vollständigen Lösen der Substanz erforderlichen Lösungsmitteln wurde stets möglichst gering gehalten.

Für die Kalibrierungsproben wurden mindestens sechs Lösungen mit verschiedenen Konzentrationen sowie Proben ohne die zu quantifizierende Substanz hergestellt. Typischerweise sollten sich zwei Konzentrationen nicht mehr als um den Faktor $\sqrt{10}$ unterscheiden. Die höchste Konzentration der Kalibrierungsproben lag über der höchsten erwarteten Konzentration in den zu messenden Proben und über der höchsten Konzentration der Qualitätskontrollproben, die niedrigste Konzentration der Kalibrierungsproben unter der niedrigsten Konzentration der Qualitätskontrollproben.

Für die Qualitätskontrollproben wurden Lösungen der Analyten in Konzentrationen im Bereich der unteren Quantifizierungsgrenze (LLOQ), im mittleren Quantifizierungsbereich und an der oberen Quantifizierungsgrenze hergestellt.

Die Herstellung der Kalibrierungs- und Qualitätskontrolllösungen erfolgte stets unter Gewichtskontrolle, d.h. die Ist-Konzentration der jeweiligen Lösung wurde bei der Berechnung gewichtskorrigiert.

3.2.2 Kalibrierung

Zur Beschreibung der Beziehung zwischen dem erhaltenen Signal des Messinstruments (Response) und der bekannten Konzentration des Analyten in den Kalibrierungsproben wurde meist das einfachste geeignete Modell, also ein linearer Zusammenhang angewendet. Es erfolgte eine Wichtung der Datenpunkte mit $1/\text{Konzentration}$ oder $1/\text{Konzentration}^2$. Eine Kalibrierungskurve galt als geeignet, wenn für zumindest für zwei Drittel der Datenpunkte folgende Bedingungen erfüllt waren:

- Abweichung vom Sollwert nicht über 20 % an der Quantifizierungsgrenze
- Abweichung vom Sollwert nicht über 15 % für alle anderen Konzentrationen

Einzelne Datenpunkte, die diese Kriterien nicht erfüllten, konnten aus der Eichung ausgeschlossen werden.

Am Anfang und am Ende einer Messreihe wurde je ein vollständiger Satz (zumindest sechs verschiedene Konzentrationen) an Kalibrierungsproben sowie ein zusätzlicher Leerwert mitgeführt.

3.2.3 Selektivität

Unter Selektivität wird die Fähigkeit einer analytischen Methode verstanden, den Analyten in Gegenwart anderer Bestandteile in der Probe zu identifizieren und zu quantifizieren.

Spezifische Störungen der Messung können sowohl von originären Matrixbestandteilen als auch von weiteren eingesetzten Substanzen ausgehen. Dieses spielt eine besondere Rolle bei wenig selektiven Analysemethoden wie HPLC mit UV-Detektion, ist jedoch vernachlässigbar bei LC-MS/MS. Hier sind unspezifische Matrixeffekte eher zu berücksichtigen.

3.2.4 Präzision und Richtigkeit

3.2.4.1 Definitionen

Als Genauigkeit (engl. *precision*) bezeichnet man die Übereinstimmung zwischen unabhängigen Tests (= Messungen) unter gleichen Bedingungen. Das Maß wird angegeben als Variationskoeffizient CV. Dieser berechnet sich allgemein aus dem

Quotient der Standardabweichung SD und dem arithmetischen Mittelwert \bar{x} . Für die Genauigkeit einer Messreihe gilt Formel 1.

Formel 1: Berechnung der Genauigkeit (*precision*)

$$\text{Genauigkeit einer Messreihe} = \frac{\text{Standardabweichung der Ist-Konzentrationen}}{\text{mittlere Ist-Konzentration}} \cdot 100; \text{ in } [\%]$$

Mit Richtigkeit (engl. *accuracy*) wird die Übereinstimmung zwischen dem Messergebnis und dem tatsächlichen Gehalt bezeichnet, angegeben als mittlere Abweichung in Prozent, die sich nach Formel 2 berechnet.

Formel 2: Berechnung der Richtigkeit (*accuracy*)

$$\text{Richtigkeit einer Messreihe} = \frac{(\text{mittlere Ist-Konzentration}) - (\text{Soll-Konzentration})}{\text{Soll-Konzentration}} \cdot 100; \text{ in } [\%]$$

3.2.4.2 Variabilität innerhalb eines Tages (*intra-day-assay*)

Es wurden mindestens fünf Proben in den unter 3.2.1 angegebenen Konzentrationen gleichzeitig aufbereitet und in einem Messvorgang bestimmt und ausgewertet.

3.2.4.3 Variabilität an verschiedenen Tagen (*inter-day-assay*)

An mindestens fünf verschiedenen Tagen wurden drei bis fünf Proben in den unter 3.2.1 angegebenen Konzentrationen gemeinsam aufbereitet und mit einer gleich bleibenden Messvorrichtung und -methode bestimmt und ausgewertet.

3.2.4.4 Bewertung von Genauigkeit und Richtigkeit

Die Genauigkeit einer Messreihe gibt Aufschluss über die Reproduzierbarkeit der Probenaufbereitung und -messung. Für die Bewertung der Genauigkeit der Methode innerhalb eines Tages (*intra-day-precision*) wurde der Betrag des Medians der Werte herangezogen, die für die Genauigkeit innerhalb eines Tages jeweils an den verschiedenen Messtagen erhalten wurden. Entsprechendes galt für die Genauigkeit der Methode zwischen verschiedenen Tagen (*inter-day-precision*). Diese Werte sollten im Bereich von $\leq 15\%$ (CV) liegen. An der Quantifizierungsgrenze durften die Abweichungen maximal 20 % betragen.

Die Richtigkeit einer Messreihe gibt Aufschluss über mögliche systematische Fehler in der Probenaufbereitung und -messung. Für die Bewertung der Richtigkeit

der Methode innerhalb eines Tages (*intra-day-accuracy*) wurde der Median des Betrags der Einzelwerte für die jeweiligen Werte der Richtigkeit innerhalb eines Tages herangezogen. Entsprechendes galt für die Richtigkeit der Methode zwischen verschiedenen Tagen (*inter-day-accuracy*). Diese Werte sollten im Bereich von $\leq 15\%$ (CV) liegen. An der Quantifizierungsgrenze durften die Abweichungen maximal 20 % betragen.

3.2.5 Bestimmungsgrenze

Werte oberhalb der in 3.2.4.4 angegebenen Grenzen kennzeichneten die untere Quantifizierungsgrenze (LLOQ). Zusätzlich galt, dass das Detektorsignal an der unteren Quantifizierungsgrenze zumindest 5-fach höher sein sollte als das Rauschen eines Leerwertes.

3.2.6 Wiederfindung des Analyten (*recovery*)

Als Wiederfindung (engl. *recovery*) bezeichnet man das Detektorsignal durch eine der Matrix zugesetzten Substanzmenge nach Aufarbeitung der Probe im Vergleich zum Detektorsignal durch eine direkt aus einer (meist wässrigen) Standardlösung gemessenen Substanzmenge. Zur Ermittlung der Wiederfindung wurden je drei Messungen bei niedrigen, mittleren und hohen Konzentrationen durchgeführt und die mittleren Ist-Konzentrationen nach Formel 3 zueinander in Relation gesetzt.

Formel 3: Berechnung der Wiederfindung (*recovery*)

$$recovery = \frac{\text{mittlere Ist-Konzentration der Testmessung}}{\text{mittlere Ist-Konzentration der Referenzen}} \cdot 100; \text{ in } [\%]$$

3.2.7 Stabilität

Im Rahmen der Methodvalidierung wurde die Stabilität der Analyten unter den gewählten Messbedingungen überprüft. Hierzu wurden Proben mit bekannter Konzentration verschiedenen Stabilitätsprüfungsbedingungen unterworfen und im direkten Vergleich gegenüber Referenzproben gemessen. Hierbei gaben eventuelle Abweichungen in den gemessenen Konzentrationen der Untersuchungs-Proben gegenüber den Referenzproben Aufschluss über die Veränderung der Proben unter den Prüfungsbedingungen. Für die Bewertung der Stabilität wurde die relative Abweichung der mittleren Ist-Konzentration nach Prüfung der entsprechenden Be-

dingungen zur mittleren Ist-Konzentration der jeweilige Referenzproben (ABW_{rel} siehe Formel 4) herangezogen.

Formel 4: Berechnung der relativen Abweichung der mittleren Ist-Konzentration der Testproben zur mittleren Ist-Konzentration der jeweilige Referenzproben

$$ABW_{rel} = \frac{(\text{mittlere Ist-Konzentration der Testmessung}) - (\text{mittlere Ist-Konzentration der Referenzen})}{\text{mittlere Ist-Konzentration der Referenzen}} \cdot 100;$$

in [%]

Der obere Grenzwert hierfür lag bei 10 % in der oberen (und mittleren) Konzentration sowie bei 15 % im Bereich der Quantifizierungsgrenze. Traten einzelne Abweichungen oberhalb der gesetzten Grenzen bei nachgewiesen ausreichender Präzision und Richtigkeit der Methode ansonsten ausreichenden Stabilitätsergebnissen der restlichen geprüften Konzentrationen auf, so konnten diese toleriert werden, da vereinzelt Aufarbeitungs- oder Messungsfehler die mögliche Fehlerquelle waren. Bei unzureichendem Befund durfte eine Proben-Lagerung nicht unter den entsprechenden Bedingungen erfolgen.

Bei Verwendung chromatographischer Methoden deuten Änderungen im chromatographischen Profil, die eine reproduzierbare Integration der Peaks verhindern, auf eine unzureichende Proben-Stabilität (z.B. bzgl. Matrix-Bestandteilen) hin, selbst wenn die zu messende Substanz stabil ist. Daher wurde bei der Auswertung der Messergebnisse die Variabilität der Retentionszeiten und Peakformen geprüft.

3.2.7.1 Stabilität unbehandelter Proben (Processing-Stabilität)

Zur Bestimmung der Stabilität unbehandelter Proben während der Probenaufarbeitung wurden jeweils drei Proben in den unter 3.2.1 angegebenen (mindestens in den hohen und in den niedrigen) Konzentrationen für die Dauer der maximalen Probenbearbeitungszeit bei Raumtemperatur gelagert und dann im Vergleich zu frischen oder frisch aufgetauten Proben aufgearbeitet und analysiert.

3.2.7.2 Stabilität aufbereiteter Proben (Autosampler-Stabilität)

Um einen möglichen Zerfall der aufgearbeiteten Proben vor der Messung abzuschätzen, wurden jeweils drei Proben in den unter 3.2.1 angegebenen (mindestens in den hohen und in den niedrigen) Konzentrationen zur Messung aufbereitet, dann analysiert und nach Ablauf der maximalen erwarteten Lagerungsdauer von Proben im Autosampler nochmals gemessen.

3.2.7.3 Stabilität nach dreimaligem Einfrieren und Auftauen

Ein weiterer Bestandteil der Methodvalidierung war die Überprüfung der Stabilität von Proben, die bereits einmal zur Messung aufgetaut und anschließend für eine eventuelle Wiederholungsmessung wieder eingefroren wurden. Hierzu wurden jeweils drei Proben in den unter 3.2.1 angegebenen (mindestens in den hohen und in den niedrigen) Konzentrationen dreimal von der Lagerungstemperatur (-20 °C bzw. -65 °C) auf Raumtemperatur aufgetaut, ohne sie übermäßig zu erwärmen, und wieder eingefroren. Anschließend erfolgte die Aufarbeitung und Messung zusammen mit Referenzproben.

3.2.8 Sicherung der Validität einer Methode bei der Messung von Proben mit unbekanntem Konzentrationen

Bei erfolgreicher Validierung konnte eine Methode zur Konzentrationsbestimmung bei unbekanntem Proben herangezogen werden. Dabei wurde auch hier je ein vollständiger Satz an Kalibrierungsproben (einschließlich Leerproben) am Anfang und am Ende einer Messreihe mitgeführt. Zusätzlich wurden je Messreihe zumindest zwei vollständige Sätze an Qualitätskontrollproben, typischerweise etwa eine Qualitätskontrollprobe pro je zehn Proben mit unbekanntem Konzentrationen, mitgeführt.

Eine Messung galt als verwertbar, wenn die Kalibrierungskurve als geeignet gelten konnte (siehe 3.2.2) und wenn die gemessenen Konzentrationen zumindest bei zwei Drittel der Qualitätskontrollproben im Bereich der Quantifizierungsgrenze nicht mehr als 20 % und für alle anderen Konzentrationen nicht mehr als 15 % vom Sollwert abweichen. Zudem durften nicht mehr als 50 % der Qualitätskontrollproben einer Konzentration außerhalb der gesetzten Grenzen liegen. Bei Nichterfüllung dieser Kriterien wurde die ganze Messreihe wiederholt.

3.3 Bestimmung von Procarbazin-Metaboliten im Urin mittels HPLC

Sämtliche aktiven Metabolite des Procarbazin (AZO, HYD, AZOXY1 und AZOXY2) sowie die Muttersubstanz selbst stellen instabile Verbindungen dar und waren somit nicht in den zu untersuchenden Urinproben (siehe 3.1.4) zu erwarten. Daher beschränkte sich die Entwicklung der Methode zur Bestimmung von Procarbazin-Metaboliten im Urin auf den Hauptausscheidungsmetaboliten TAC sowie die Abbauprodukte ALC, ALD und MET (siehe Abbildung 4).

3.3.1 Darstellung der Metabolite und des internen Standards

Da nicht alle Metabolite verfügbar waren, mussten einige Substanzen synthetisiert werden. Die Reinheitsüberprüfungen der dargestellten Verbindungen erfolgten mittels GC/MS-Messungen in den Arbeitskreisen von Prof. Dr. H. Budzikiewicz und Prof. Dr. A. Berkessel im Institut für Organische Chemie der Universität zu Köln.

3.3.1.1 Synthese von N-Isopropylterephthalsäure (TAC)

Durch Oxidation von N-Isopropyl-p-formylbenzamid (1) mit Kaliumpermanganat in einer wässrigen Lösung (siehe Abbildung 8) konnte der Säure-Metabolit TAC (2) dargestellt werden.

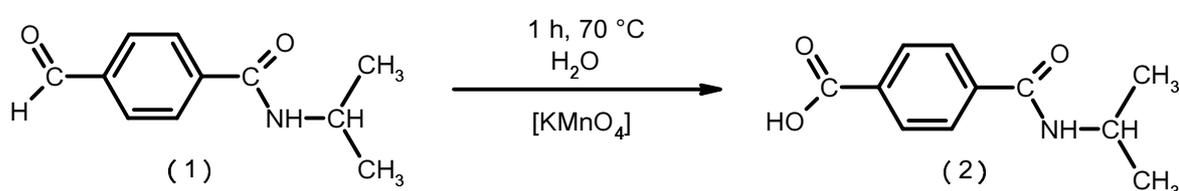


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Synthese von N-Isopropylterephthalsäure

Zu einer Suspension aus 1,05 g N-Isopropyl-p-formylbenzamid (5,49 mmol) in 28 ml Wasser wurde bei einer Temperatur von 70 °C unter kräftigem Rühren eine Lösung von 1,6 g Kaliumpermanganat (10,12 mmol) in 31,5 ml Wasser vorsichtig zugetropft. Nach zweistündigem Rühren bei 75 °C wurde die Reaktionsmischung mit 1M Kaliumhydroxid-Lösung auf pH 8-9 gebracht und heiß filtriert. Das abgekühlte Filtrat wurde mit Salzsäure angesäuert. Der ausgefallene Niederschlag wurde anschließend abfiltriert, mit kaltem Wasser und kaltem Diethylether gewaschen und im Exsikkator getrocknet [193].

Die Ausbeute betrug 135 mg (11,9 % d. Th.). Das Produkt hatte einen Schmelzpunkt von 227-228 °C (Lit. [58]: 228-231 °C). Der mittels GC/MS gemessene Reinheitsgrad betrug über 99 % (siehe Abbildung 9, Abbildung 10 und Tabelle 4).

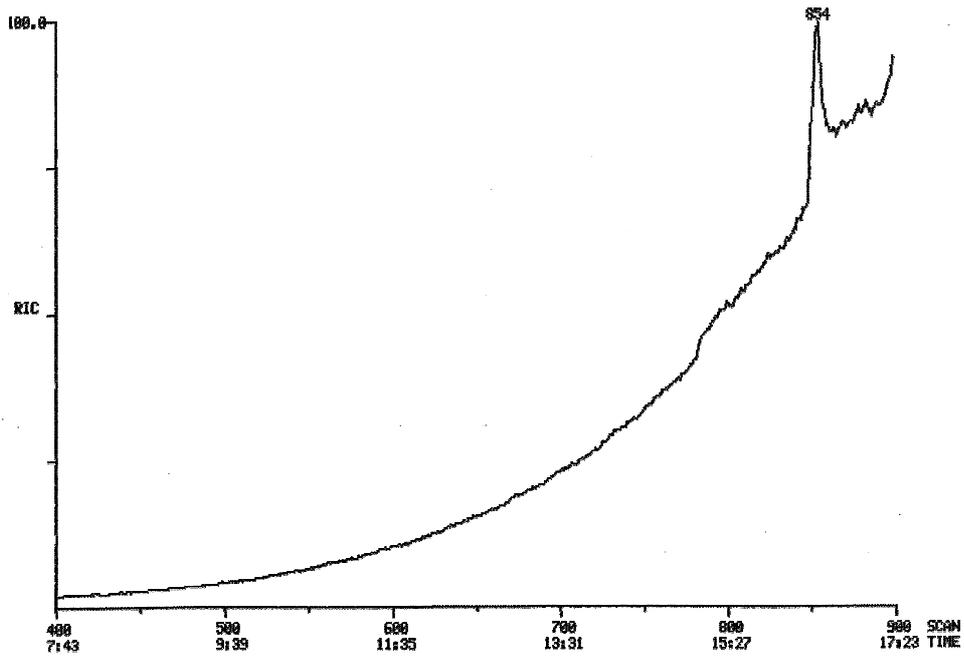


Abbildung 9: Gaschromatogramm der erhaltenen TAC-Substanzprobe

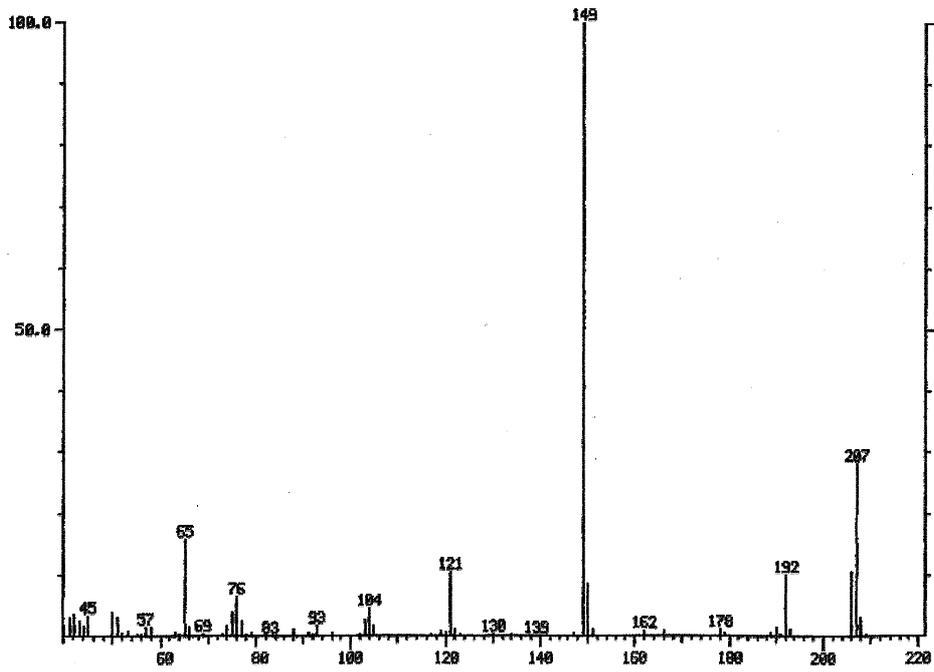


Abbildung 10: Massenspektrum der TAC-Substanzprobe

Tabelle 4: Zuordnung der wichtigen Peaks im TAC-Massenspektrum

Summenformel	Fragment	m/z	relative Häufigkeit
$[C_{11}H_{13}NO_3]^+$	$[M]^+$	207	18,5 %
$[C_{10}H_{10}NO_3]^+$	$[M-CH_3]^+$	192	7,1 %
$[C_8H_5O_3]^+$	$[M-NHCH(CH_3)_2]^+$	149	100,0 %
$[C_7H_5O_2]^+$	$[149-CO]^+$	121	12,3 %
$[C_6H_7]^+$	$[121-CO_2+H_2]^+$	65	16,9 %
$[C_3H_7N]^+$	$[M-149-H]^+$	57	11,7 %

3.3.1.2 Synthese von N-Isopropyl-p-toluamid (MET)

Die Darstellung des Methyl-Metaboliten (5) erfolgte durch Aminolyse von p-Tolylbenzoesäurechlorid (3) mit Isopropylamin (4) in wasserfreiem Dioxan (siehe Abbildung 11).

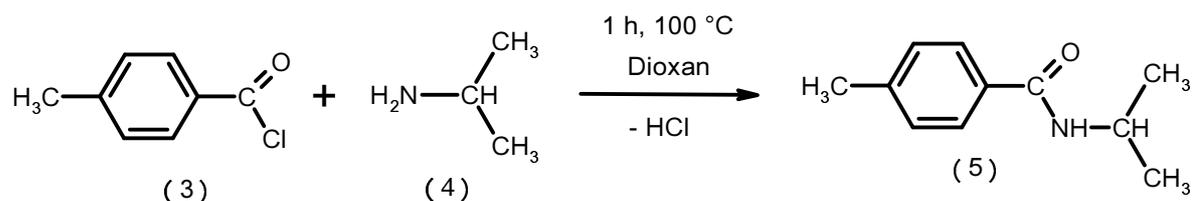


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Synthese von N-Isopropyl-p-toluamid

Zu einer Lösung von 780 mg p-Tolylbenzoesäurechlorid (5,05 mmol) in 7 ml wasserfreiem Dioxan wurde langsam unter Rühren eine Lösung von 3 ml Isopropylamin (35,02 mmol) in 6 ml Dioxan zugetropft. Anschließend wurde 1 h bei 100 °C gerührt und die Reaktionsmischung in 50 ml Eiswasser gegossen. Durch Ansäuern mit verdünnter Salzsäure wurde das Produkt ausgefällt. Dieses wurde anschließend abgesaugt, mit Wasser gewaschen und im Exsikkator getrocknet. Zur Aufreinigung des Rohprodukts erfolgte eine Umkristallisation aus 15 ml Cyclohexan [194].

Die Ausbeute betrug 380 mg (42,5 % d. Th.). Das Produkt hatte einen Schmelzpunkt von 132-133 °C (Lit. [194]: 131-131,5 °C). GC/MS-Messungen dieser Substanz zeigten eine Reinheit von über 99 % (siehe Abbildung 11, Abbildung 12 und Tabelle 5).

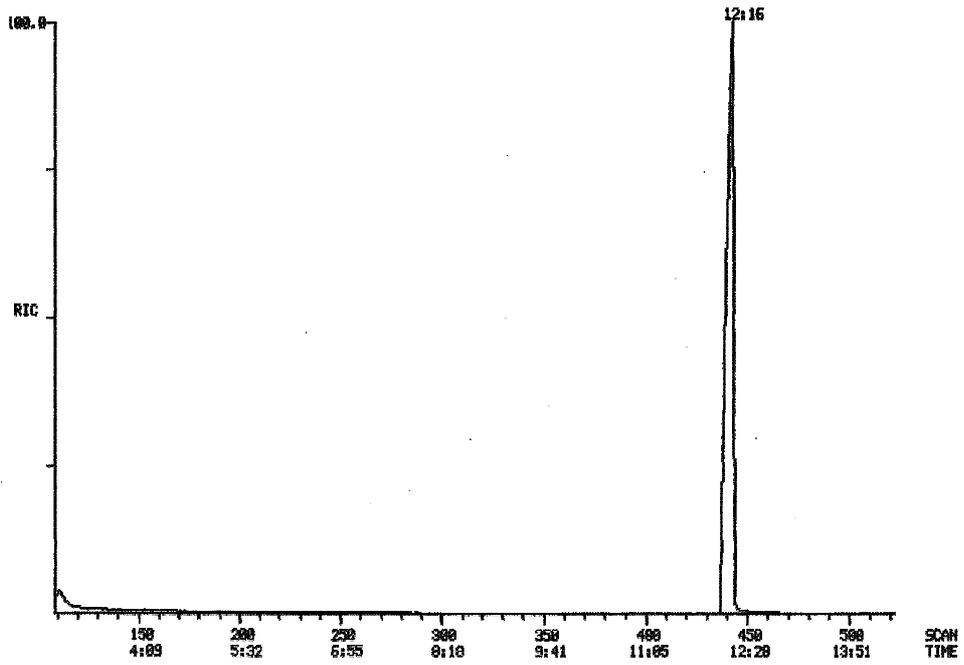


Abbildung 12: Gaschromatogramm der erhaltenen MET-Substanzprobe

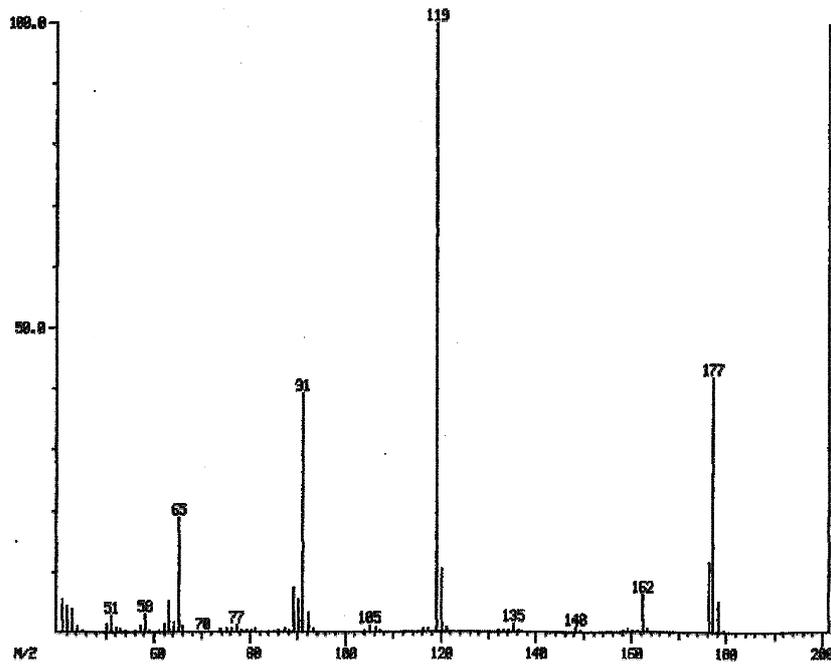


Abbildung 13: Massenspektrum der MET-Substanzprobe

Tabelle 5: Zuordnung der Signale im Massenspektrum von N-Isopropyl-p-toluamid

Summenformel	Fragment	m/z	relative Häufigkeit
$[C_{11}H_{15}NO]^+$	$[M]^+$	177	18,7 %
$[C_{10}H_{12}NO]^+$	$[M-CH_3]^+$	162	7,5 %
$[C_8H_9NO]^+$	$[M- H_2C=CH(CH_3)]^+$ (McLafferty)	135	2,0 %
$[C_8H_7O]^+$	$[M-NHCH(CH_3)_2]^+$	119	100,0 %
$[C_5H_5]^+$		65	19,5%
$[NHCH(CH_3)_2]^+$	$[M-H_3C(C_6 H_5)CO]^+$	58	3,3 %
$[C_7H_7]^+$	$[M-NHCH(CH_3)_2-CO]^+$	91	12,4 %

3.3.1.3 Synthese des internen Standards Isopropylbenzamid

Die Darstellung des internen Standards Isopropylbenzamid (7) erfolgte durch Aminolyse von Benzoylchlorid (6) mit Isopropylamin (4) in wasserfreiem Dioxan (siehe Abbildung 14).

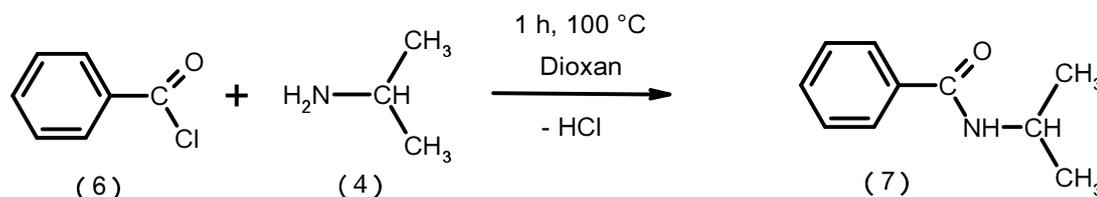


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Synthese von Isopropylbenzamid

10,9 ml Benzoylchlorid (93,93 mmol) wurden in 15 ml getrocknetem Dioxan vorgelegt. Nach Zutropfen einer Lösung von 8 ml Isopropylamin (93,39 mmol) in 20 ml Dioxan wurde 1 h bei 100 °C gerührt. Die Reaktionsmischung wurde anschließend in 100 ml Eiswasser gegossen und mit verdünnter Salzsäure auf pH 6 gebracht. Der ausgefallene Niederschlag wurde abfiltriert, mit kaltem Wasser neutral gewaschen und im Exsikkator getrocknet. Zur Aufreinigung des Rohproduktes wurde eine Umkristallisation aus Ethanol vorgenommen [194].

Die Ausbeute betrug 421,3 mg (2,8 % d. Th.). Das Produkt hatte einen Schmelzpunkt von 104-105 °C (Lit. [194]: 104-104,5 °C). Da der Schmelzpunkt mit dem Literaturwert kongruent war und bei der Untersuchung der Retentionszeit der Verbindung mittels HPLC (UV-Detektion bei 230 nm) keine Störpeaks auftraten, wurde auf eine Reinheitsüberprüfung mit GC/MS verzichtet.

3.3.2 Methodenentwicklung

Ausgehend von in der Literatur beschriebenen HPLC-Methoden [61, 64, 73] wurde ein auf die apparativen Gegebenheiten und die vorliegende Fragestellung angepasstes Verfahren entwickelt und optimiert. Als chromatographisches System wurde ein Waters 2690 Alliance[®] Separation Module, gekoppelt mit einem Waters 996 Photodiodearray-Detektor (Waters, Milford, MA (USA)) verwendet. Instrumentensteuerung und Datenaquisition erfolgte mit der Millennium32[®] Software, Version 4.0 (Waters, Milford, MA (USA)).

3.3.2.1 Probenaufarbeitung

Zur Verringerung des Einflusses der Probenmatrix auf die Chromatographie bei ausreichender Empfindlichkeit der Methode wurde ein Probenaufbereitungsverfahren entwickelt mit dem Ziel, auf ein aufwendiges, oftmals mit Verlusten behaftetes Extraktionsverfahren verzichten zu können.

Die Urinproben wurden aufgetaut; geschüttelt und anschließend 10 min bei 2000 g zentrifugiert. 100 µl des Überstands wurden nach Zusatz von 100 µl einer methanolischen Lösung des internen Standards N-Isopropyl-benzamid (2 mM) mit Wasser auf 1:75 verdünnt. Nach erneutem kräftigem Schütteln der Proben wurden jeweils 150 µl der Lösung in Probengefäße (*Probenvials*) zur Analyse abgefüllt.

3.3.2.2 Chromatographie

In Anlehnung an ein bereits zuvor entwickeltes Messverfahren zur quantitativen Bestimmung der PCZ-Metabolite bei der Umsetzung von PCZ durch Cytochrom-P450-Enzyme in Humanlebermikrosomen [64] wurde zur chromatographischen Trennung eine relativ lange HPLC-Säule (25 cm) verwendet. Es wurde unter reversed-phase-Bedingungen chromatographiert (Füllmaterial der Trennsäule: C₁₈ (Oktadecylsilan-ODS), Teilchengröße: 5 µm, Porengröße: 80 Å, Hersteller: Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA (USA)). Da bei den zu untersuchenden Proben eine starke Matrixbelastung zu erwarten war, wurde eine Vorsäule mit gleichem Füllmaterial zum Schutz der Hauptsäule verwendet.

Für die Methodenentwicklung wurden Stammlösungen der Procarbazin-Metabolite ALC, ALD, MET und TAC sowie des verwendeten internen Standards (IS) N-Isopropyl-benzamid im Konzentrationsbereich von 20 µM bis 1 mM durch Lösen der jeweiligen Substanzen in Methanol/Wasser [50:50] (V:V) hergestellt. Diese wurden zur Bestimmung der Retentionszeit und Identifizierung der einzelnen Verbindungen injiziert und vermessen. Die Detektion erfolgte über einen Wellenlängenbereich von 220 – 300 nm (siehe 3.3.2.3).

Die Optimierung der chromatographischen Bedingungen wurde hinsichtlich folgender Anforderungen an die Trennleistung der HPLC-Methode durchgeführt:

- möglichst gute Trennung der Analyten von der Probenmatrix
- möglichst scharfe und symmetrische Peaks (ohne Tailing und Fronting)
- Basislinientrennung der Peaks
- möglichst konstante Retentionszeiten von Analyten und internem Standard
- möglichst ruhige und stabile Basislinie bei möglichst geringem Grundrauschen

Hierzu wurden bei der Variierung der Laufmittelzusammensetzung unterschiedlicher Puffersysteme eingesetzt und der organische Anteil an Methanol (MeOH) bzw. Acetonitril (ACN) schrittweise verändert. Weiterhin wurde die Fließgeschwindigkeit in einem Bereich von 1,0 bis 1,4 ml/min variiert. Dabei wurde versucht, bei gegebener Trennung der Analyten von der Probenmatrix möglichst kurze Retentionszeiten zu erzielen. Hierbei stellte sich eine Flussrate von 1,25 ml/min als optimal heraus. Da die Retentionszeiten der Analyten und des internen Standards sehr unterschiedlich waren, wurden zur Verkürzung der Messzeit bei gleich bleibender Trennleistung mehrere Laufmittelgradienten getestet. Dabei erwies sich der in Abbildung 15 schematisch dargestellte Gradient als der geeignetste. Als Laufmittel wurden hierbei zwei Mischungen von 20 mM NaH_2PO_4 -Puffer, ACN und MeOH verwendet, die sich lediglich im ACN-Gehalt, Volumenanteil des NaH_2PO_4 -Puffers und pH-Wert voneinander unterschieden (siehe Tabelle 6).

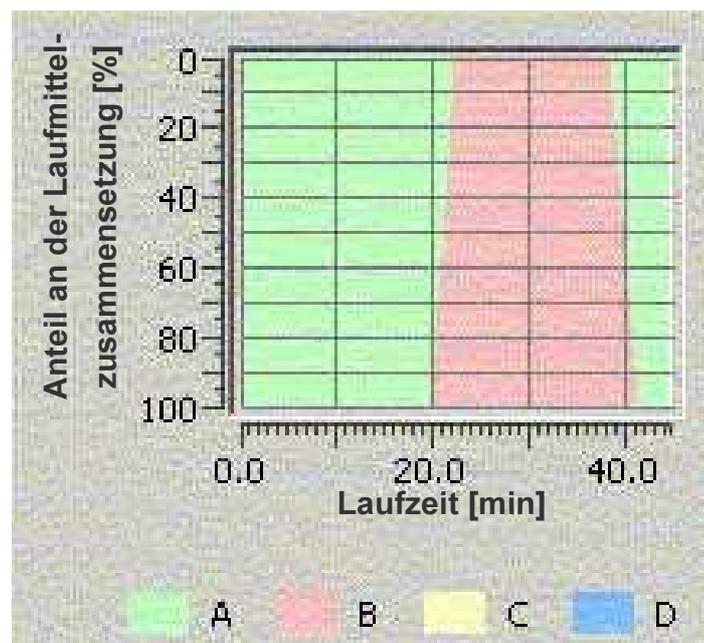


Abbildung 15: Schematische Darstellung des bei der HPLC-Methode zur Bestimmung von PCZ-Metaboliten verwendeten Laufmittelgradienten

Tabelle 6: Zusammensetzung der Laufmittel der HPLC-Methode zur Bestimmung der Pro-carbazin-Metabolite im Urin

Laufmittel	ACN [V/V]	MeOH [V/V]	20 mM NaH ₂ PO ₄ -Puffer	pH-Wert
A	7 %	8 %	85 %	4,36
B	18 %	8 %	74 %	5,11

Zur Vermeidung von umgebungsbedingtem Temperaturschwankungen wurde eine im HPLC-System implementierte Säulentemperiereinheit verwendet. Im Rahmen der Methodenentwicklung wurde die Säulentemperatur in einem Temperaturbereich von + 5 °C bis 30 °C variiert. Trotz kürzerer Retentionszeiten und einer damit verbundenen höheren Trennschärfe der Peaks bei höheren Temperaturen wurde im Hinblick auf die mögliche Instabilität der Analyten während der Messung eine Säulentemperatur von 8 °C gewählt. Für die Analyten ergaben sich die in Tabelle 7 aufgelisteten Retentionszeiten.

Tabelle 7: Retentionszeiten der PCZ-Metabolite TAC, ALC, ALD und MET sowie des internen Standards N-Isopropylbenzamid (IS)

Analyt	TAC	ALC	ALD	MET	IS
Retentionszeit [min]	16,9	18,4	21,5	44,2	36,4

Zur Wahrung der Stabilität der Proben erfolgte eine Kühlung des Probenraums im Autosampler des HPLC-Systems auf 5 °C.

3.3.2.3 Detektion

Die Verwendung eines Photodiodenarray-Detektors ermöglichte die Aufnahme von UV-Spektren im unter 3.3.2.2 genannten Wellenlängenbereich. Diese konnten in einer Datenbank abgespeichert und zur eindeutigen Identifizierung der Analyten bei der späteren Messung von Matrixproben herangezogen werden. Abbildungen 16-19 zeigen die für die einzelnen Verbindungen erhaltenen UV-Spektren mit den charakteristischen Intensitätsmaxima. Auf der Ordinate sind relative Absorptionseinheiten aufgetragen, während die Abszisse die Wellenlängen darstellt.

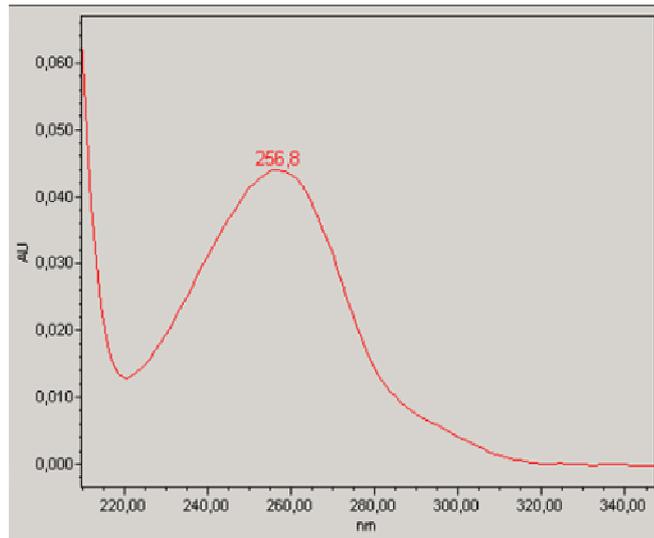


Abbildung 16: UV-Spektrum ALD [50 µM in Urin]

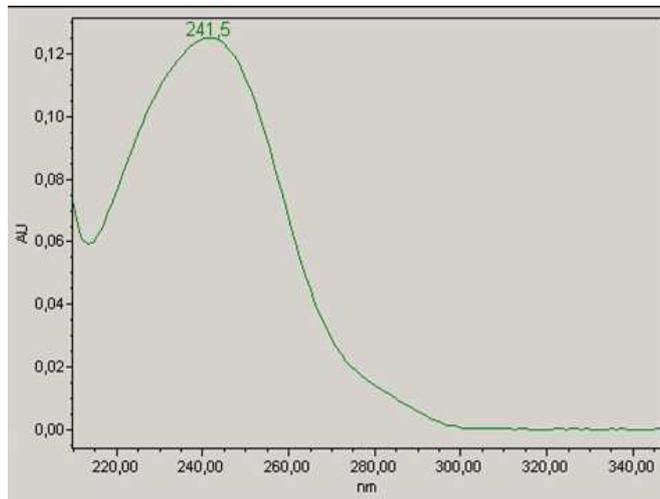


Abbildung 17: UV-Spektrum TAC [50 µM in Urin]

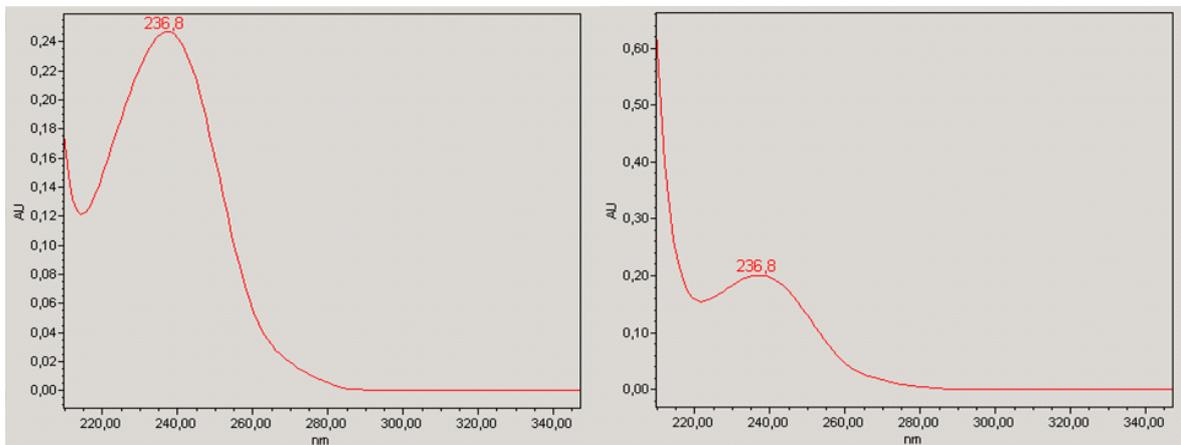


Abbildung 18: UV-Spektrum MET [50 µM bzw, 25 µM in Urin], Abhängigkeit der Intensität von Konzentration und Matrix

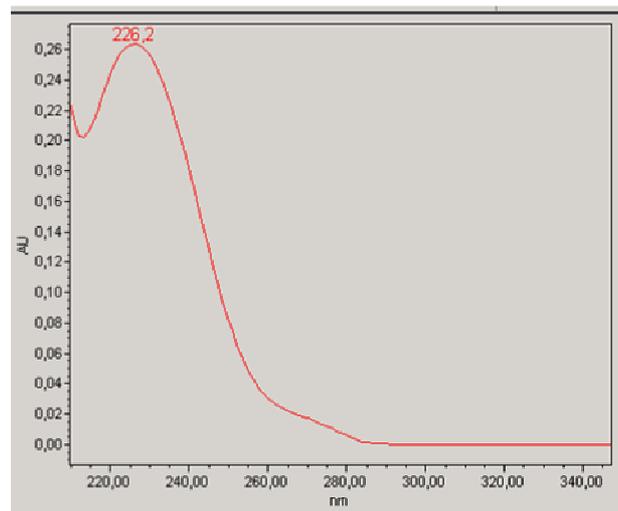


Abbildung 19: UV-Spektrum des internen Standards N-Isopropyl-benzamid [50 µM in Urin]

Die UV-Spektren der einzelnen Analyten zeigten eine starke Abhängigkeit der Signalintensität von der Konzentration und der Matrix, in der die Proben gemessen wurden. Abbildung 18 zeigt exemplarisch zwei UV-Spektren des Metaboliten MET, gemessen aus einer methanolischen Lösung (Abbildung 18 links) und aus angereichertem Urin nach Aufarbeitung (Abbildung 18 rechts).

Zur quantitativen Auswertung wurden aus dem aufgezeichneten Wellenlängenbereich (3.3.2.2) Chromatogramme bei 231 nm extrahiert. Abbildung 20 zeigt als Beispiel ein Chromatogramm der Messung einer Urinprobe mit einer TAC-Konzentration von 450 µM. Die HPLC-Messmethode bot eine ausreichende Trennung der Analyten von der Probenmatrix und weiteren Störpeaks. Die eindeutige Identifizierbarkeit der Analyten war somit auch in Urinproben gegeben.

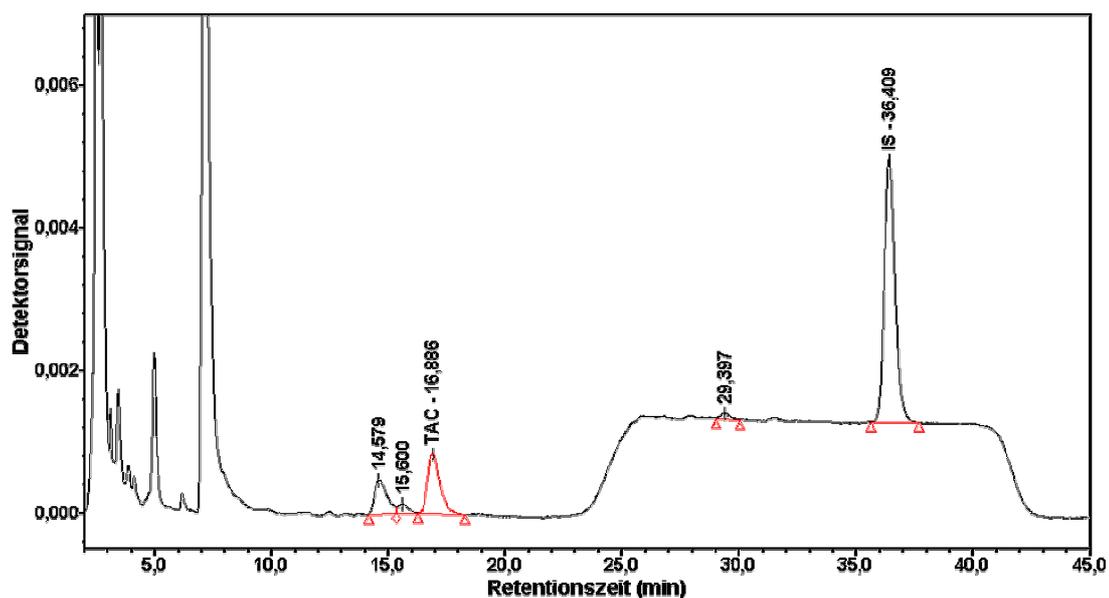


Abbildung 20: Chromatogramm einer Urinprobe mit einer TAC-Konzentration von 450 µM

3.3.3 Methodvalidierung

Die unter 3.3.2 beschriebene Methode zur Bestimmung von Procarbazin-Metaboliten im Urin des Menschen wurde gemäß internationaler Richtlinien [188-192] validiert. Da TAC den biologisch inaktiven Hauptmetaboliten darstellt [74], der im Wesentlichen in den zu untersuchenden Urinproben (siehe 3.1.4) zu erwarten war, wurde die Validierung nur bezüglich der quantitativen Bestimmung von TAC durchgeführt. Die Metabolite ALC, ALD und MET wurden qualitativ (durch UV-Spektenabgleich mit in einer Datenbank abgespeicherten Spektren, siehe 3.3.2.3) betrachtet. Die Bestimmungsgrenze für den qualitativen Nachweis der Metabolite ALC, ALD und MET lag bei 25 μM .

3.3.3.1 Kalibrierung

Die Kalibrierung erfolgte im Konzentrationsbereich von 20 μM bis 1000 μM . Dazu wurde Leerurin mit TAC versetzt und unter Gewichtskontrolle mit Leerurin zu einer Eichreihe verdünnt. Die Endkonzentrationen der hergestellten Eichproben sind in Tabelle 8 aufgelistet.

Tabelle 8: TAC-Konzentrationen der verwendeten Eichproben

Eichprobe	EP1	EP2	EP3	EP4	EP5	EP6	EP7
Konzentration[μM]	1011	505,9	202,3	102,1	80,78	51,38	20,28

Die Proben wurden gemäß Abschnitt 3.3.2.1 aufgearbeitet und anschließend mit der unter 3.3.2.2 und 3.3.2.3 beschriebenen HPLC-Methode gemessen.

Für die Berechnung der Kalibrationsgerade wurde die Peakhöhe des Analyten TAC durch Quotientenbildung in Relation zur Peakfläche des internen Standards gesetzt.

3.3.3.2 Besonderheiten

Zur Bestimmung der Präzision und Richtigkeit der Methode wurden gemäß Abschnitt 3.2.1 Urinproben hergestellt, die TAC in den Konzentrationen 900 μM (QC1), 452 μM (QC2) und 46,8 μM (QC3) enthielten.

Abweichend von Abschnitt 3.2.4.3 wurden an sechs verschiedenen Tagen die *inter-day-assay* Messungen durchgeführt. Eine Fünffachbestimmung erfolgte ledig-

lich an den ersten vier Tagen, während am fünften und sechsten Tag eine Bestimmung von jeweils drei Proben durchgeführt wurde.

Auf die Bestimmung der Wiederfindung des Analyten (Recovery) wurde verzichtet, da die Urinproben keinem Extraktionsverfahren unterworfen wurden, sondern bei der Probenaufarbeitung lediglich eine Verdünnung vorgenommen wurde (siehe 3.3.2.1).

Zur Prüfung der Stabilität der Analyten wurden aufgearbeitete Urinproben gemessen, die sich bis zu 20 Stunden bei konstanten 5 °C im Probenkarussell befanden, sowie Proben nach dreimaligen Auftauen und Einfrieren. Deren TAC-Konzentration wurde mit der von entsprechenden, unbehandelten Proben verglichen.

3.3.4 Messung der Patientenproben aus der BEACOPP-Studie

Im Rahmen der BEACOPP-Studie (siehe 3.1.4) konnten für die Messung der TAC-Konzentrationen insgesamt 81 24 h-Sammelurin-Proben von 35 Patienten gewonnen und vermessen werden. Die Messung der Proben erfolgte gemäß der in 3.3.2 beschriebenen Methode in Doppelbestimmung. Dabei bestand eine Probensequenz aus zweimal acht Eichproben (inkl. einem Leerwert) für die Kalibrierungskurve, 40 bis 50 Urinproben mit unbekannter TAC-Konzentration und zwischen fünf und sieben Qualitätskontrollproben (QCs).

Eine Sequenz konnte akzeptiert werden, wenn mindestens zwei Drittel der gemessenen Konzentrationen der QCs um nicht mehr als 15 % (20 % an der Quantifizierungsgrenze) von der tatsächlichen Konzentration abwichen. Wurde dieses Kriterium nicht erfüllt, musste die Messreihe wiederholt werden.

3.4 Bestimmung von Cyclophosphamid und seinen Metaboliten im Urin

Zur Quantifizierung von Cyclophosphamid und seinen Metaboliten im Urin wurden zwei Bestimmungsmethoden angewendet.

Ein in der Literatur beschriebenes ³¹P-kernresonanzspektroskopisches Verfahren [149, 169] wurden auf die Gegebenheiten eines NMR-Spektrometers am Max-Planck-Institut für neurologische Forschung in Köln angepasst. Weiterhin wurde eine LC-MS/MS-Methode entwickelt und gemäß Abschnitt 3.2 validiert.

3.4.1 Quantifizierung unter Verwendung von ^{31}P -NMR

Die eindimensionalen ^{31}P -NMR-Spektren wurden an einem WB-AM300 der Firma Bruker bei einer Messfrequenz (SFO1) von 121,51 MHz aufgenommen. Instrumentenkontrolle und Datenaquisition erfolgte mit einem ASPECT 2000-Rechner und der Software DISNMR, Version 89 (Bruker Analytik GmbH, Karlsruhe). Für die Messung der Proben wurde ein 10 mm ^{31}P -Messkopf verwendet, dessen Probenraum mittels einer Temperiereinheit bei 5 °C (278 K) konstant gehalten wurde. Als Locksubstanz wurde dem Urin über die Standardlösung (siehe 3.4.1.1) 20 % D_2O zugegeben. Zur Kalibrierung der chemischen Verschiebung erfolgten in regelmäßigen Abständen Messungen von 85 %iger Phosphorsäure, deren Signal auf 0 ppm gesetzt wurde. Die Spektren wurden zur Elimination von $^{31}\text{P}/^1\text{H}$ -Kopplungen breitbandentkoppelt aufgenommen. Die Homogenität des Magnetfeldes wurde auf maximale Intensität und Länge des freien Induktionsabfalls (FID) des Wassers in der Probe optimiert (= *geschimmt*).

3.4.1.1 Interner Standard

Als interner Standard wurde N-Phosphonomethylglycin (PMG) gewählt, da diese Substanz über eine ausreichend kurze T_1 -Zeit verfügt und die ^{31}P -chemische Verschiebung nahe am Bereich der Analyten liegt, ohne diese zu überlagern. Zudem ist die Verbindung in ausreichender Menge in D_2O löslich und bei Raumtemperatur stabil. Die in dieser Arbeit verwendete Standardlösung, die eine quantitative Auswertung der ^{31}P -NMR-Spektren ermöglichte, setzte sich zusammen aus 13,6 g (200 mmol) Imidazol (zur pH-Stabilisierung der Probe), 67,6 mg (400 μmol) PMG und 69,9 mg (200 μmol) Chrom(III)acetylacetonat gelöst in 10 ml DCI und 70 ml D_2O . Die Standardlösung wurde unmittelbar nach Herstellung aliquotiert und bis zur Vorbereitung der Proben (siehe 3.4.1.2) eingefroren.

3.4.1.2 Probenaufarbeitung

Die aufgetauten Urinproben wurden bei 4 °C zentrifugiert (10 min, 2000 g). Danach wurden je 2800 μl der Urinproben in einem NMR-Messröhrchen mit 700 μl der Lösung des internen Standards (PMG, siehe 3.4.1.1) versetzt. Die Proben wurden anschließend verschlossen und ca. 30 s auf einem Vortexer geschüttelt.

3.4.1.3 Methodenentwicklung

3.4.1.3.1 Pulswinkelbestimmung

Die Bestimmung des 180°-Pulses erfolgte durch Ermittlung des Nulldurchgangs des ³¹P-Signals unter sukzessiver Veränderung der Pulslänge. Dem 180°-Puls entsprach eine Pulslänge von 14,8 µs.

3.4.1.3.2 Bestimmung der longitudinalen Relaxationszeit T₁

Die T₁-Zeiten der Standardsubstanz und der Analyten wurden mit Hilfe einer Pulssequenz bestimmt, die die Methode des so genannten *inversion recovery* benutzt (Pulsprogramm siehe Anhang 9.9) [195]. Als T₁-Zeiten wurden 3,1 Sekunden für die Standardsubstanz und 2,5 - 3,3 Sekunden für die Analyten bestimmt. Zur Senkung der longitudinalen Relaxationszeit wurden die Proben ab diesem Punkt der Methodenentwicklung über die Lösung des internen Standards (siehe 3.4.1.1) mit dem paramagnetischen Reagenz Chromium(III)acetylacetonat versetzt.

3.4.1.3.3 Sättigungsmessungen

Zur Verkürzung der Messzeit wurde statt eines 90°-Pulses ein 30°-Puls verwendet, da hierbei die Magnetisierung früher ihren Gleichgewichtszustand erreicht und die Repetitionszeit und damit auch die Messzeit verkürzt werden kann. Zur Bestimmung der minimal erforderlichen Repetitionszeit, um bei Verwendung eines 30°-Pulses (siehe 3.4.1.4) quantitativ auswertbare Spektren zu erhalten, wurden Sättigungsmessungen durchgeführt. Hierbei wurde der Delay nach Akquisition ausgehend von einem Wert, der 5xT₁ entsprach, sukzessiv verringert und die Sättigung der Signale beobachtet.

Es zeigte sich, dass die Spektren ab einer Repetitionszeit von mindestens 3xT₁ keinen signifikanten Anstieg in den Peakflächen aufwiesen.

3.4.1.4 Wahl der endgültigen Aufnahmeparameter

Die verwendete Pulslänge betrug 2,5 µs. Dies entspricht einem Pulswinkel von 30°. Die Spektrenweite (SW) wurde zu 3906 Hz gewählt und die Time Domain (TD) zu 16k. Die Messung der Urinproben konnte mit einer Repetitionszeit erfolgen, die 3xT₁ entsprach. Da lediglich während der Akquisitionszeit breitbandentkoppelt wurde, und in den Analytenmolekülen keine Protonen direkt an ein Phosphoratom gebunden sind, konnte davon ausgegangen werden, dass der Nuclear Overhauser Effekt (NOE) keine Rolle spielen sollte.

Für ein Spektrum wurden in der Regel 4096 FIDs summiert. Die Gesamtmesszeit betrug daher pro Probe etwa 11,5 Stunden. Die Spektren wurden an einem PC mit der Software WIN-NMR 6.1 (Bruker Analytik GmbH, Karlsruhe) prozessiert. Hierbei erfolgte vor der Fourier Transformation ein Zero-Filling zu 32k Datenpunkten und eine anschließende Multiplikation der FIDs mit der Exponentialfunktion $e^{-(1\text{Hz} \cdot t)}$ (line broadening LB = 1 Hz). Die Basislinienkorrektur wurde manuell durchgeführt (Multiple-Points Methode).

Abbildung 21 zeigt ein im Rahmen der Methodenentwicklung aufgenommenes ^{31}P -NMR Spektrum einer angereicherten Urinprobe, die 400 μM CP, 70 μM DCL-CP, 80 μM 4KetoCP, 300 μM CarboxyCP und den Internen Standard PMG enthält. Die Signallagen (in ppm) der einzelnen Verbindungen sind ebenfalls aus Abbildung 21 ersichtlich.

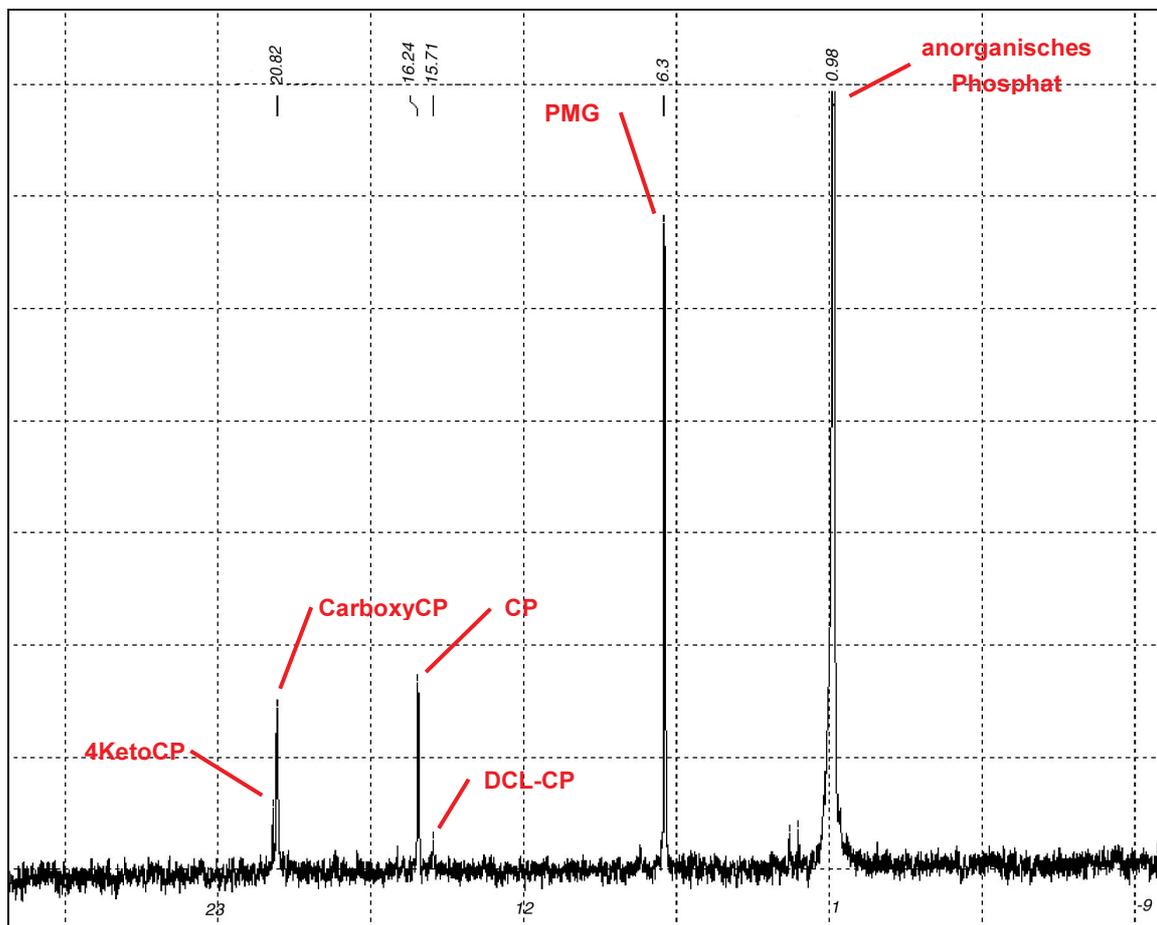


Abbildung 21: ^{31}P -NMR Spektrum einer mit CP, 4KetoCP, CarboxyCP, DCL-CP und PMG angereicherten Urinprobe

3.4.2 Quantifizierung unter Verwendung von LC-MS/MS

Nachdem die entwickelte NMR-Methode keine ausreichende Stabilität und Empfindlichkeit bieten konnte, wurde ein Verfahren zur Quantifizierung von CP und seinen Metaboliten 4KetoCP, CarboxyCP und DCL-CP mittels LC-MS/MS entwickelt. Hierzu wurde ein Thermo Finnigan LC-MS/MS-System (Thermo Finnigan, San Jose, CA (USA)) verwendet, bestehend aus einer Surveyor MS Pumpe, einem Surveyor Autosampler und einem TSQ[®] Quantum Triple-Stage-Quadrupol-Massenspektrometer. Instrumentenkontrolle und Datenaquisition erfolgte mit der Software Xcalibur (Thermo Finnigan, San Jose, USA).

3.4.2.1 Methodenentwicklung

Für die Methodenentwicklung wurden separate Stammlösungen der Analyten sowie des internen Standards D₄-Cyclophosphamid (D₄-CP) in Wasser/HOForm [99,9/0,1] (V/V) hergestellt. Die Konzentrationen der Lösungen betragen ca. 100 µg/ml für jeden Analyten. Hieraus erfolgte die Herstellung von Gesamtstammlösungen mit Endkonzentrationen der Analyten zwischen zehn und 10000 ng/ml.

Die MS/MS Bedingungen für die individuellen Analyten wurden zunächst durch Direktinfusion der Einzelstammlösungen, dann durch Injektion der Gesamtstammlösung (100 ng/ml je Analyt) unter Verwendung der Quantum Tune Master[®] Software (Thermo Finnigan, San Jose, CA (USA)) optimiert. Nach Wahl des optimalen SRM (selected reaction monitoring)-Übergangs für jeden Analyten wurden sequenziell folgende Parameter variiert:

- Ionisierungsquelle:
 - Ionisierungsenergie
 - Mantelgas (*sheath gas*)-Fluss (N₂)
 - Hilfgas (*aux gas*)-Fluss (N₂)
- Detektor:
 - Temperatur der Transferkapillare
 - Ionenpotentiale
 - Kollisionsgas-Fluss (Ar)

Die Feinabstimmung der Parameter erfolgte manuell anhand der Intensität der Signale nach Loop-Injektionen der Gesamtstammlösung. Tabelle 9 zeigt für jeden Analyten den ausgewählten SRM-Übergang und die Kollisionsenergie.

Tabelle 9: Molekulargewicht, Produkt- und Precursorion und verwendete Kollisionsenergien von CP, 4KetoCP, CarboxyCP und DCL-CP

Analyt	MW (g/mol)	Precursorion (m/z)	Produktion (m/z)	Kollisionsenergie (eV)
CP	261,09	261,00	140,04	28
4KetoCP	275,07	275,05	221,03	24
CarboxyCP	293,10	293,05	221,05	26
DCL-CP	198,60	199,15	171,05	20

Die chromatographischen Bedingungen wurden anschließend hinsichtlich der in Abschnitt 3.3.2.2 erwähnten Anforderungen durch Fluss-Injektionen der Stammlösungen und angereicherter Urinproben (nach Probenaufarbeitung) optimiert. Dies erfolgte durch Testung verschiedener Säulenmaterialien und Zusammensetzungen der mobilen Phase sowie Variation der Säulentemperatur und des Injektionsvolumens. Für die Analyten ergaben sich die in Tabelle 10 aufgeführten Retentionszeiten.

Tabelle 10: Retentionszeiten von CP und seinen Metaboliten 4KetoCP, CarboxyCP und DCL-CP sowie des verwendeten internen Standards D₄-CP

Analyt	CP	4KetoCP	CarboxyCP	DCL-CP	D ₄ -CP
Retentionszeit [min]	7,14	6,23	6,50	5,19	7,12

3.4.2.2 Probenaufarbeitung

Die aufgetauten Urinproben wurden geschüttelt und bei 4 °C zentrifugiert (10 min, 2000 g). Danach wurden je 100 µl der Urinproben mit 300 µl einer wässrigen Lösung des internen Standards (D₄-Cyclophosphamid, 100 ng/ml) und 9600 µl 10 %igem Methanol versetzt. Die Proben wurden anschließend 30 s auf einem Vortexer geschüttelt. Nach erneuter Zentrifugation (4 °C, 2000 g, 10 min) wurden jeweils 1,5 ml der Proben in Probengefäße aus Glas abgefüllt.

3.4.2.3 Chromatographie

Ein Volumen von 10 µl der jeweiligen Probe wurde auf eine Thermo Hypersil Keystone Beta Basic C₈-Säule (100 x 3,0 mm, 5 µm) mit passender Vorsäule (10 x 3,0 mm) injiziert. Zur Abtrennung der Probenmatrix von den Analyten erfolgte die Chromatographie unter Verwendung eines Laufmittelgradienten bei einer Flussrate von 300 µl/min (siehe Abbildung 22).

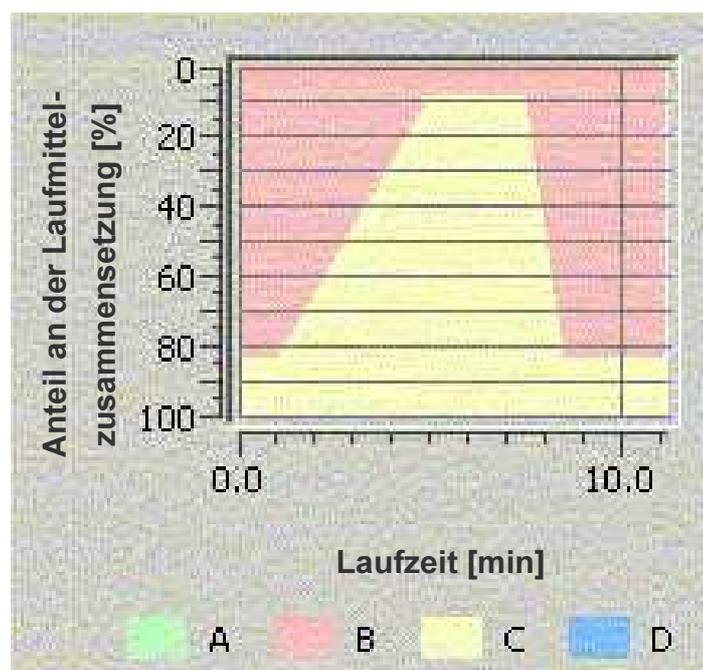


Abbildung 22: Schematische Darstellung des bei der LC-MS/MS-Methode zur Bestimmung von CP und Metaboliten verwendeten Laufmittelgradienten

Als Laufmittel wurde Wasser mit einem Zusatz von 0,1 % HOFom (Laufmittel B) bzw. MeOH (Laufmittel C) verwendet. Nach einem isokratischen Fluss von einer Minute wurde der organische Anteil des Laufmittels innerhalb von vier Minuten von 15 % auf 90 % gesteigert und blieb über 2,5 min konstant. Anschließend wurde die Ausgangszusammensetzung des Laufmittels innerhalb von 1 min wiederhergestellt und das System 3 min äquilibriert.

Eine Verstopfung der Ionisationskapillare durch Matrixbestandteile konnte durch die zusätzliche Verwendung eines steuerbaren Schaltventils (Divert valve) vermieden werden, wodurch die ersten 4,5 min jedes Probenlaufes in einen Auffangbehälter abgeleitet wurden.

Die Säulentemperatur wurde konstant bei 35 °C gehalten. Der Probenraum wurde auf 5 °C gekühlt. Die Gesamtdauer jeder Probenanalyse betrug 12 min, wobei nach jeder Probe automatisch die Injektionsnadel und –spritze mit ACN gespült wurde.

3.4.2.4 MS/MS-Detektion

Der Säulenfluss wurde im Anschluss an die Chromatographie zu einer Thermo Finnigan TSQ[®] Quantum Elektrospray Ionenquelle geleitet. Hier diente Stickstoff sowohl als Mantelgas (*sheath gas*) als auch als Hilfsgas (*aux gas*). Der Druck für das Mantelgas wurde auf 42 psi und der für das Hilfsgas auf 2 psi gesetzt. Die

Analyten wurden durch ESI (Elektrospray-Ionisierung) mit positiver Polarität (4900 V) ionisiert. Die Detektion erfolgte im SRM-Modus. Die Scanraten betragen für CP und D₄-CP jeweils 0,2 s/Scan, für 4KetoCP und CarboxyCP jeweils 0,15 s/Scan und für DCL-CP 0,35 s/Scan. Zur Erhöhung der Sensitivität wurden vier Mess-Segmente eingerichtet. Das erste Segment mit einer Laufzeit von 4,44 min diente der oben erwähnten Matrixumleitung zu einem Auffangbehälter. Im zweiten Segment mit einer Laufzeit von 1,55 min wurden lediglich DCL-CP, im dritten Segment mit einer Laufzeit von 1,01 min 4KetoCP und CarboxyCP detektiert. Die Aufnahme der Signale für die Muttersubstanz CP und den internen Standard D₄-CP erfolgte im vierten Segment, das sich über eine Laufzeit von 4,25 min erstreckte.

3.4.2.5 Peakintegration

Die Integration der SRM-Signale erfolgte mit dem Softwarepaket LCQuan (Thermo Finnigan, San Jose, CA (USA)), welches den ICIS (Interactive Chemical Information System) Peak-Detektions- und -Integrations-Algorithmus benutzt. ICIS verbessert die Effizienz der Peak-Detektion bei niedrigen MS-Signal-Niveaus. Der glättende Algorithmus wurde auf die Daten angewendet, um die graphische Darstellung der Daten durch Reduzierung des Rauschniveaus zu verbessern und somit eine bessere Peak-Detektion zu erreichen. Dieser glättende Algorithmus nimmt äquidistante Datenwerte an und wurde unter Verwendung dreier Glättungskoeffizienten angewendet.

Alle Chromatogramme wurden optisch überprüft und, falls notwendig, manuell nachintegriert. Dazu wurde die Peak-Integrations-Grundlinie manuell zwischen den sichtbaren Peakstart- und -endpunkt gesetzt. Dieses Vorgehen musste vereinzelt im Fall von durch chromatographische Unregelmäßigkeiten verursachte unruhigen Grundlinien oder an der Quantifizierungsgrenze durchgeführt werden.

Falls die manuelle Integration der Peaks nur zu einer geringfügigen Veränderung der Peakfläche im Vergleich zum automatisch kalkulierten Wert führte (< 5 %), wurde die Peakintegration auf die Methoden-Einstellungen zurückgesetzt.

Abbildung 23 zeigt als Beispiel die Chromatogramme der Messung einer Urinprobe, die 3,46 µg/ml CP, 497,7 ng/ml 4KetoCP sowie jeweils 166,7 ng/ml DCL-CP und CarboxyCP enthielt.

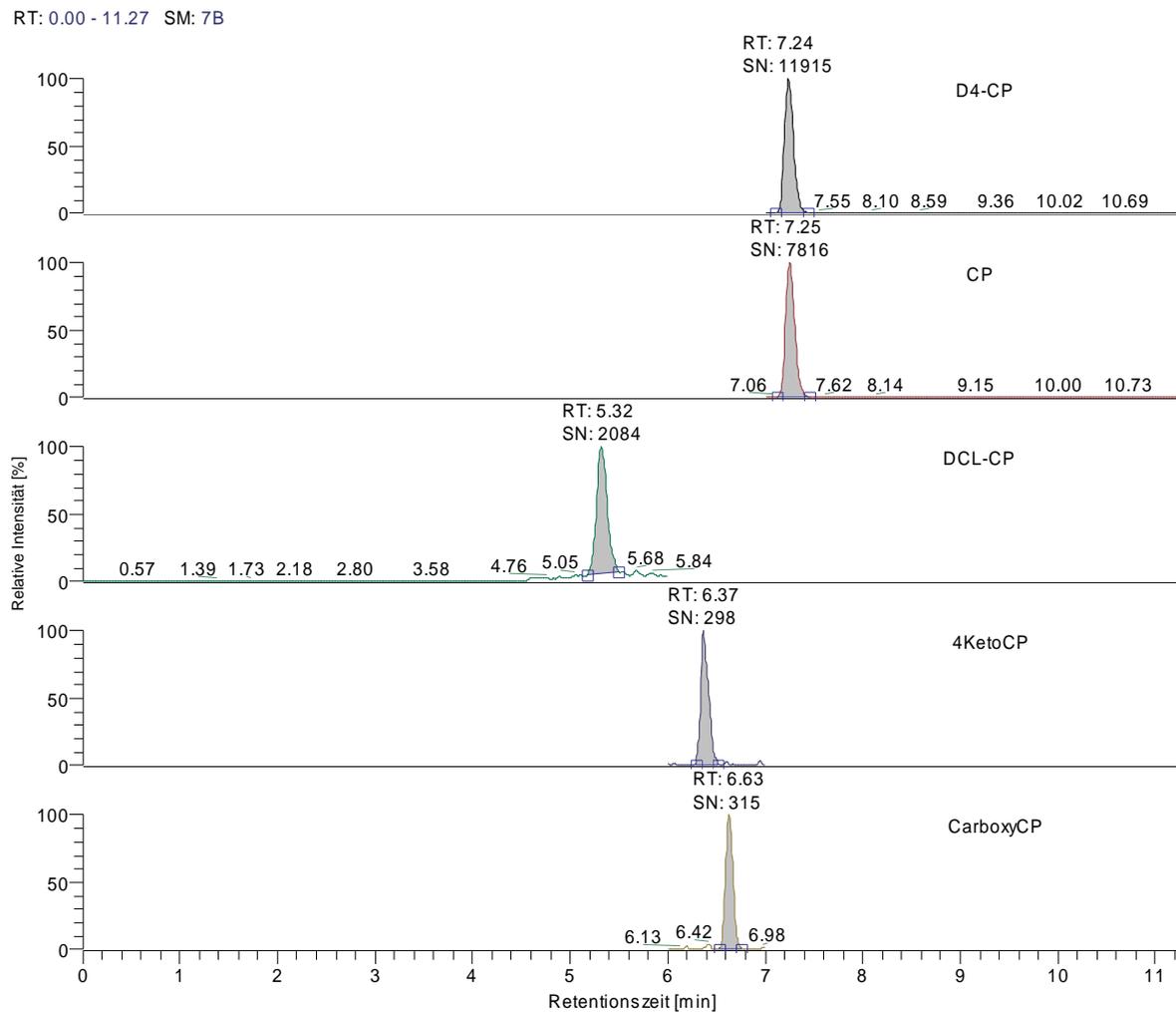


Abbildung 23: Chromatogramme einer Urinprobe mit CP, 4KetoCP, DCL-CP und CarboxyCP nach Aufarbeitung

3.4.3 Methodvalidierung

Vor der Analytik der Patientenurinproben aus der BEACOPP-Studie wurde das unter 3.4.2.1 bis 3.4.2.5 beschriebene analytische Messverfahren einer Validierung nach aktuellen internationalen Richtlinien unterzogen [188-192].

3.4.3.1 Kalibrierung

Für die Kalibrierung wurde Leerurin mit CP, 4KetoCP, CarboxyCP und DCL-CP versetzt. Dazu wurde die zuvor hergestellte GesamtstammLösung unter Gewichtskontrolle mit Leerurin zu einer Eichreihe verdünnt. Die Kalibrationsbereiche für die einzelnen Analyten sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

Die Proben wurden gemäß Abschnitt 3.4.1.2 aufgearbeitet und anschließend mit der entwickelten LC-MS/MS-Methode quantifiziert. Für die Berechnung der Eich-

kurve wurden die Peakflächen der einzelnen Analyten in Verhältnis zur Peakfläche des internen Standards verwendet.

Tabelle 11: Endkonzentrationen von CP, 4KetoCP, CarboxyCP und DCL-CP in den verwendeten Eichproben (EPs)

	CP [µg/ml]	4KetoCP [ng/ml]	CarboxyCP [ng/ml]	DCL-CP [ng/ml]
EP1	193,8	28815	9677	9627
EP2	98,00	14570	4893	4868
EP3	35,53	5282	1774	1764
EP4	18,22	2709	909,6	904,9
EP5	6,502	966,6	324,6	322,9
EP6	3,372	501,3	168,3	167,5
EP7	1,226	182,3	61,22	60,90

3.4.3.2 Besonderheiten

Zur Validierung der Methode wurden gemäß Abschnitt 3.2.1 Urinproben hergestellt, deren Konzentration der Analyten den aus Tabelle 12 ersichtlichen Werten entsprach. Dabei wurde eine Konzentration im Bereich der oberen Quantifizierungsgrenze (QC1), eine in der Nähe des mittleren Bereichs (QC2) und zwei nahe der unteren Quantifizierungsgrenze (QC3 und QC4) verwendet.

Tabelle 12: Konzentrationen von CP, 4KetoCP, CarboxyCP und DCL-CP in den Validierungs- und Qualitätskontrollproben (QCs)

	CP [µg/ml]	4KetoCP [ng/ml]	CarboxyCP [ng/ml]	DCL-CP [ng/ml]
QC1	174,7	26859	8997	8995
QC2	24,53	3772	1264	1263
QC3	3,845	591,1	198,0	198,0
QC4	3,237	497,7	166,7	166,7

Es wurden die Lagerungs- und Aufbewahrungsbedingungen untersucht, die für die Probensammlung und -aufarbeitung von Bedeutung waren.

Zur Prüfung der Stabilität der Proben im Autosampler wurden jeweils fünf Proben in den Konzentrationen QC1 bis QC4 entsprechend Abschnitt 3.4.2.2 aufgearbeitet und nach Aufteilung in zwei Aliquots direkt bzw. nach 18 stündiger Lagerung im auf 5 °C temperierten Autosampler gemessen.

Jeweils drei Proben aus Tabelle 12 wurden nach sechsstündiger Lagerung bei Raumtemperatur bzw. nach dreimaligem Einfrieren und Auftauen gemessen und deren Analytenkonzentration unbehandelten Proben verglichen.

3.4.4 Messung der Patientenproben aus der BEACOPP-Studie

Im Rahmen der BEACOPP-Studie (siehe 3.1.4) wurden die Konzentrationen von CP und seinen Metaboliten in insgesamt 87 24 h-Sammelurin-Proben von 29 Patienten bestimmt. Die Messung der Proben erfolgte gemäß dem in 3.4.2.2 bis 3.4.2.5 beschriebenen Verfahren. Dabei bestand eine Probensequenz aus zweimal acht Eichproben (inkl. einem Leerwert) für die Kalibrierungskurve, 40 bis 50 Urinproben mit unbekannter Konzentration und zwischen vier und sechs Qualitätskontrollproben (QCs).

3.5 Statistische Auswertung

Die statistischen Berechnungen wurden mit Microsoft® Excel 2002 (Microsoft Corporation, Seattle, WA (USA)) und mit SPSS für Windows (SPSS Inc., Version 11.0.1, Chicago, IL (USA)) durchgeführt. Für pharmakokinetische Parameter wurden geometrische Mittelwerte und geometrischen Variationskoeffizienten nach der Formel 5 berechnet.

Formel 5: Berechnung des geometrischen Mittelwerts und des geometrischen Variationskoeffizienten

$$\bar{x}_{\text{Geo}} = \sqrt[n]{x_1 \cdot x_2 \cdot \dots \cdot x_n} \quad \text{CV}_{\text{Geo}} = \sqrt{e^{s^2} - 1}$$

mit s = Standardabweichung der zur Basis e logarithmierten Parameter x_1, \dots, x_n

3.5.1 Kovarianzanalysen

Zu einer ersten Beurteilung des Zusammenhangs zwischen zwei Parametern wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson (r) herangezogen. Dieser Koeffizient ist dimensionslos mit dem Wertebereich $-1,0 \leq r \leq 1,0$ und überprüft, inwieweit zwei Datensätzen linearer zusammenhängen. Da jedoch zwischen Einflussfaktoren

ren auf pharmakokinetische Parameter oftmals multiple Zusammenhänge bestehen und hier eine fehlende linearere Korrelationen nicht darauf schließen lässt, dass kein Einfluss auf den entsprechenden Parameter besteht, diente dieses Vorgehen hauptsächlich der Hypothesenbildung.

Da eine Bestimmung der Plasmakonzentrationen von Procarbazin und seinen Metaboliten im Rahmen der Studie nicht vorgesehen war [12], wurden für diese Substanz die Urin-Daten für den Hauptausscheidungsmetaboliten TAC untersucht (siehe 3.3).

Im Rahmen der Kovarianzanalyse wurde der Einfluss der möglichen Kofaktoren Alter, Geschlecht, Körpergröße und –gewicht, Körperoberfläche (KOF)¹ [196], Body-Mass-Index (BMI)², Kreatinin-Clearance (KreaCl)³ und Nummer des Therapiezyklus auf die individuelle prozentuale PCZ-Ausscheidung (AUS_{PCZ}) geprüft. Diese wurde nach Formel 6 durch Quotientenbildung aus in Form von TAC ausgeschiedener und applizierter PCZ-Stoffmenge bestimmt.

Formel 6: Berechnung der prozentualen PCZ-Ausscheidung

$$\text{AUSS}_{\text{PCZ}} = \frac{n_{\text{Urin}}(\text{TAC})}{n_{\text{appl}}(\text{PCZ})} \cdot 100 \%, \text{ in } [\%]$$

mit $n_{\text{Urin}}(\text{TAC})$ = gemessene TAC-Stoffmenge im Urin
 $n_{\text{appl}}(\text{PCZ})$ = applizierte PCZ-Stoffmenge

Nach Einzelprüfung der linearen Zusammenhänge von AUS_{PCZ} mit den o.g. Kofaktoren (KF) wurde unter Verwendung des SPSS Moduls *Generelles univariates lineares Modell* versucht, ein Modell zu entwickeln, das der Formel 7 folgt.

Formel 7: Allgemeines lineares Modell für die PCZ-Ausscheidung

$$\text{AUSS}_{\text{PCZ}} = \text{konstanter Term} + x_1 \cdot \text{KF}_1 + x_2 \cdot \text{KF}_2 + \dots + x_n \cdot \text{KF}_n$$

mit $\text{KF}_1 \dots \text{KF}_n$ = signifikante Kofaktoren; $x_1 \dots x_n$ = Koeffizienten

¹ Die Berechnung erfolgte nach der *Du Bois*-Formel: $\text{KOF} = \text{KG}^{0,425} \cdot \text{HT}^{0,725} \cdot 71,84$
mit KG = Körpergewicht in kg und HT = Körpergröße in cm

² Die Berechnung erfolgte nach der Formel $\text{BMI} = \text{KG} / \text{HT}^2$
mit KG= Körpergewicht in kg und HT = Körpergröße in m

³ Die Berechnung erfolgte nach der Formel: $\text{KreaCl} = (\text{C}_{\text{Krea/Urin}} / \text{C}_{\text{Krea/Plasma}}) \cdot V_{\text{Urin}} \cdot t^{-1}$
mit $\text{C}_{\text{Krea/Urin}}$, $\text{C}_{\text{Krea/Plasma}}$ = Kreatinin im Urin bzw. im Plasma in mg/l, V_{Urin} = Urinmenge in ml und t = Urinsammelintervall in min

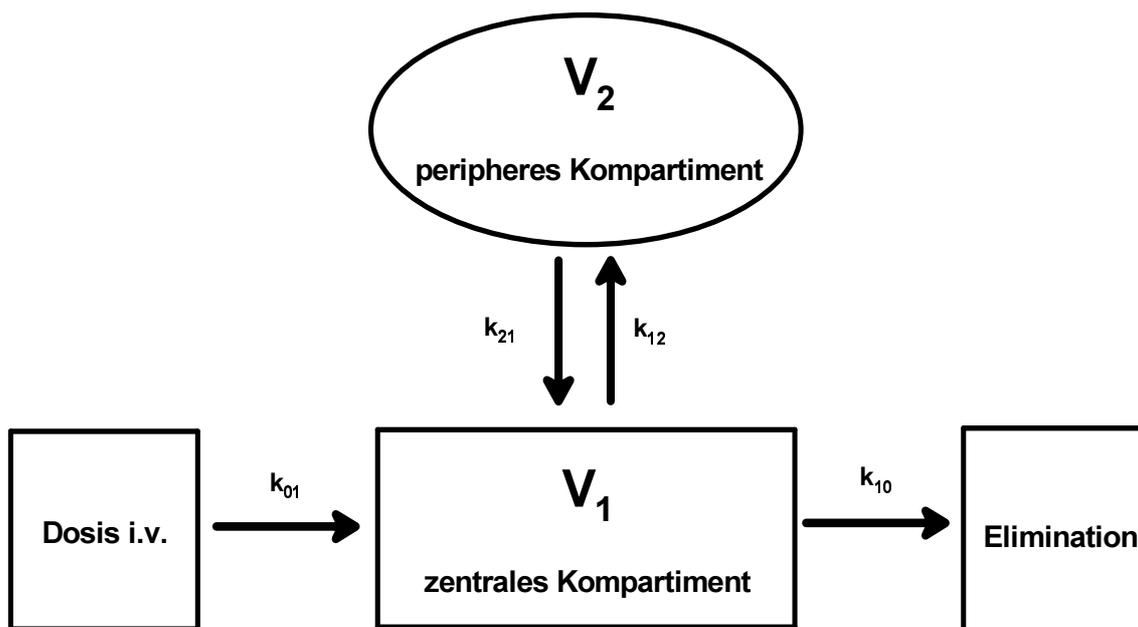
Bei der Berechnung wurde mit einem kompletten Modell begonnen, das alle möglichen Einflussfaktoren und wechselseitigen Interaktionen berücksichtigt. Anschließend wurden sukzessiv Kofaktoren ohne signifikanten Beitrag ($p \geq 0,05$) zur Gesamtvariabilität aus dem Modell entfernt. Von teilweise überlappenden Kofaktoren, wie z.B. BMI und Körpergröße, wurden die mit der ausgeprägteren Auswirkung auf die Variabilität der PCZ-Ausscheidung ausgewählt.

Für Cyclophosphamid lagen sowohl Plasma- als auch Urin-Daten vor. Die Bestimmung der Plasmakonzentrationen der Muttersubstanz CP erfolgte im Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für Klinische Pharmakologie (Stuttgart). Da der Einfluss der Kofaktoren bereits modellimmanent in der populationspharmakokinetischen Analyse untersucht wurde (siehe 3.5.2), war hier keine separate Kovarianzanalyse erforderlich.

3.5.2 Populationspharmakokinetische Berechnungen für Cyclophosphamid

Die gemessenen Konzentrationen von CP und seinen Metaboliten wurden am Institut für Pharmakologie der Universität zu Köln durch Herrn Stefan Wilde mit Hilfe eines populationspharmakokinetischen Ansatzes unter Verwendung der Pharmakokinetiksoftware NONMEM V (**Nonlinear Mixed Effects Modelling**, Globo Max LLC, Hanover, MD (USA)) ausgewertet. Diese Art der Auswertungen beruht auf Kompartiment-Modellen. Kompartimente sind hypothetische Verteilungsräume des Körpers, die physiologisch betrachtet verschiedene Körperflüssigkeits- oder Gewebsräume darstellen können. Abbildung 24 zeigt zur Veranschaulichung die schematische Darstellung eines Zwei-Kompartiment-Modells, bei dem der Organismus pharmakokinetisch in zwei Verteilungsräume eingeteilt ist:

- Zentrales Kompartiment V_1 (Blut und reich vaskularisierte Organe, wie z.B. Herz, Leber, Gehirn)
- Peripheres Kompartiment V_2 (z.B. Fettgewebe und schlecht vaskularisierte Gewebe)



k_{01} , k_{10} , k_{12} , k_{21} = Geschwindigkeitskonstanten, die die Invasion und Elimination des Arzneistoffs in bzw. aus dem zentralen Kompartiment und die Verteilung in bzw. aus dem peripheren Kompartiment beschreiben

Abbildung 24: Offenes Zwei-Kompartiment-Modell nach intravenöser Applikation und Elimination aus dem zentralen Kompartiment

Unter der Annahme, dass die Verteilung und Elimination von Substanzen einer entsprechenden Kinetik folgt, ist eine Auswertung der Pharmakokinetik und eine Berechnung individueller Kurvenverläufe auch mit einer geringen Menge an Messdaten pro Kurve möglich. Dieser Vorteil wird durch eine populationspharmakokinetische Berechnung noch verstärkt.

Mittels NONMEM wurden die Populationsparameter mit entsprechender interindividueller Variabilität geschätzt. Dies wurde durch die Annahme ermöglicht, dass die pharmakokinetischen Parameter jeder Einzelperson durch den individuellen Parameter P_i beschrieben werden, der aus der Verteilung der Parameter innerhalb der Population kommt. Hierfür gilt $P_i \equiv \vartheta \cdot e^{(\eta)}$, wobei ϑ für den Populationsmittelwert und η für die um Null symmetrisch verteilte Zufallsvariable (*random effect*) steht und der individuelle Einzelwert log-normal um den Populationsmittelwert verteilt ist.

Unter der Annahme, dass die Patienten einer typischen Population entsprechen, in der die pharmakokinetischen Kenngrößen einer definierten Verteilung um den Populationsmittelwert folgen, ist eine Berechnung der Populationsmittelwerte und damit einer Konzentrations-Zeit-Kurve für die Gesamtpopulation möglich. Dieses Populationsmittel und das Populationsstreuungsmaß erlauben dann, mögliche Abweichungen der individuellen Kenngrößen von der Population zu berechnen

und damit individuelle Kurvenverläufe zu erstellen, selbst wenn für das einzelne Individuum nur eine sehr geringe Datenmenge vorliegt (sog. *sparse-data-Situation*). Dieses Vorgehen war notwendig, da eine intensive Sammlung von Plasma- und Urinproben eine unzumutbare Belastung für die einzelnen Patienten bedeutet hätte.

Dabei wurde an den Pool der individuellen CP-Plasmakonzentrationen zunächst ein Ein-Kompartiment-Modell angepasst. Diese Berechnung diente als Grundlage für die Gesamtausscheidungsratenkonstante $AUSS_{CP}$ und das Verteilungsvolumen V_1 der Substanz im nachfolgend erstellten Mehrkompartiment-Modell. Hierbei stellt $AUSS_{CP}$ ein Maß für den Abfall der CP-Konzentration im zentralen Kompartiment dar.

Nach der Berechnung der Modellparameter wurde die Güte der Anpassung der jeweiligen Modelle untereinander verglichen und das am Besten geeignete Modell für die weitere Auswertung verwendet.

Auf der Grundlage der aus dem Ein-Kompartiment-Modell berechneten Populationsmittelwerte für $AUSS_{CP}$ und V_1 wurde ein Sechs-Kompartiment-Modell für die gemeinsame Anpassung der Konzentrationen der Plasma- und Urinkonzentrationen von CP und seinen Metaboliten 4KetoCP, CarboxyCP und DCL-CP entwickelt (siehe Abbildung 25). $AUSS_{CP}$ setzt sich dabei nach Formel 8 aus den Einzelparametern k_{10} , k_{12} , k_{13} und k_{14} zusammen.

Formel 8: Berechnung der CP-Gesamtausscheidungsratenkonstante $AUSS_{CP}$

$$AUSS_{CP} = k_{10} + k_{12} + k_{13} + k_{14}$$

Zunächst wurden sämtliche Einflussfaktoren und interindividuellen Variabilitäten ausgeschlossen. Lediglich die Residualvariabilität wurde als proportionaler Fehler, d.h. als einheitlicher Fehler für alle Messungen im Modell berücksichtigt.

Im nächsten Schritt wurde mittels der NONMEM-Software die interindividuelle Variabilität modelliert. Hierbei wurde nacheinander für jeden der Modellparameter ein *random effect* eingefügt, so dass individuelle Schätzwerte für den entsprechenden Parameter entstanden. Anhand des Abfalls der Residualvariabilität wurde das beste Modell ausgewählt. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt, d.h. insgesamt wurden drei *random effects* in das Modell eingearbeitet. Eine höhere Anzahl an *random effects* führt zu einer höheren Menge an Freiheitsgraden des Modells, wodurch die Anpassung der individuellen Kurven an die gemessenen Parameter steigt und die Restvariabilität sinkt. Eine zu hohe Anzahl an *random effects* führt jedoch zur Beliebigkeit der Kurvenverläufe und zur Überparameterisierung des

Modells. Von vornherein wurde in Anbetracht der Datenmenge eine Höchstgrenze von drei *random effects* festgelegt. Für die Residualvariabilität, d.h. die individuelle Abweichung der gemessenen von den errechneten Konzentrationen, wurde ein proportionales Fehlermodell verwendet.

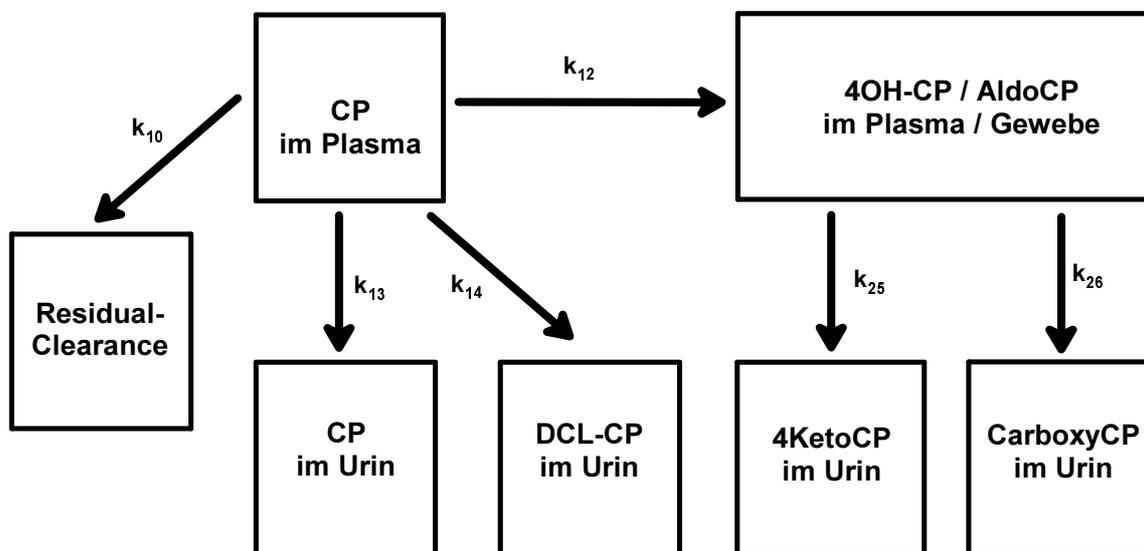


Abbildung 25: Sechs-Kompartiment-Modell für Cyclophosphamid

Bei der anschließenden Kofaktoranalyse wurden Alter, Geschlecht, Körpergröße und –gewicht, Körperoberfläche, Body-Mass-Index, Nummer des Therapiezyklus, Kreatinin-Clearance sowie Kreatinin und Albumin im Plasma als Einflussfaktoren für jeden Modellparameter eingefügt. Die Entscheidung, welches Modell die Rohdaten am besten widerspiegelte, wurde anhand der *log-likelihood*-Methode (95 %-Konfidenzintervall) getroffen.

Unter Anwendung des Modells lässt sich für jeden Zeitpunkt in jedem Kompartiment die theoretische individuelle CP-Konzentration $c(\text{CP})_i$ berechnen. Die tatsächliche Konzentration streut aufgrund der Residualvariabilität entsprechend einem proportionalen Fehlermodell um den theoretischen Konzentrations-Zeit-Verlauf.

Unter Einbeziehung der Residualvariabilität (ERR) lässt sich nach Formel 9 ein Schätzwert $c(\text{CP})_{\text{pred}}$ für die zu messende Konzentration vorhersagen. ERR ist um Null normalverteilt mit einer Varianz von 0,159 und spiegelt hier die intraindividuelle Variabilität der Daten wider.

Formel 9: Vorhersage der zu messenden CP-Konzentration

$$c(\text{CP})_{\text{pred}} = c(\text{CP})_i \cdot (1 + \text{ERR})$$

3.5.3 Pharmakokinetik-Pharmakodynamik-Analyse

Als Parameter für die Charakterisierung der Toxizität wurde die Veränderung der Thrombozytenzahl vom ersten zum achten Therapietag (ThromboDiff) gewählt, da hierfür in 72 % der in das Modell eingeflossenen 88 Therapiezyklen Daten vorlagen. Die Berechnung erfolgte nach Formel 10. Lagen statt der Thrombozytenzahl am achten Tag der Therapie lediglich Daten für den siebten und/oder den neunten Therapietag vor, so gingen die Mittelwerte bzw. die einzelnen Werte in die Berechnung ein.

Formel 10: Berechnung des prozentualen Abfalls der Thrombozytenzahl vom ersten zum achten Therapietag

$$\text{ThromboDiff} = \frac{n_{\text{Thrombozyten}}(\text{Tag 1}) - n_{\text{Thrombozyten}}(\text{Tag 8})}{n_{\text{Thrombozyten}}(\text{Tag 1})} \cdot 100, \text{ in } [\%]$$

mit $n_{\text{Thrombozyten}}(\text{Tag X}) = \text{Thrombozytenzahl pro } \mu\text{l Blut an Tag X}$

Im Rahmen der Kovarianzanalyse wurde geprüft, ob lineare Zusammenhänge zwischen der Toxizität und den möglichen Einflussfaktoren Alter, Geschlecht, Körpergröße und -gewicht, KOF, BMI, Nummer des Therapiezyklus, Kreatinin-Clearance, Kreatinin im Plasma, der AUS_{PCZ} , der individuellen CP-Dosis, der renal Ausscheidung von CP in unveränderter Form bzw. als Metabolite, dem apparenten zentralen Verteilungsvolumen V_1 , sowie den unterschiedlichen CP-Ausscheidungsratenkonstanten k_{10} , k_{12} , k_{14} , bestehen.

Nach Einzelprüfung der linearen Zusammenhänge der Toxizität mit den Kofaktoren wurde versucht, entsprechend der in 3.5.1 beschriebenen Vorgehensweise ein allgemeines lineares Modell zu entwickeln, das der Formel 11 folgt.

Formel 11: Allgemeines lineares Modell für den der Abfall der Thrombozytenzahl vom ersten zum achten Therapietag

$$\text{ThromboDiff} = \text{konstanter Term} + x_1 \cdot \text{KF}_1 + x_2 \cdot \text{KF}_2 + \dots + x_n \cdot \text{KF}_n$$

mit $\text{KF}_1 \dots \text{KF}_n = \text{signifikante Einflussfaktoren}; x_1 \dots x_n = \text{Koeffizienten}$

3.6 Bestimmung der Autoinduktion des Cytochrom P450 Enzyms CYP3A4 durch Cyclophosphamid in Leberschnitten

Im Rahmen dieser Arbeit sollte an Leberschnitten eine Induktion des Cytochrom P450-Enzyms CYP3A4 durch Cyclophosphamid unter Verwendung von Midazolam als CYP3A4-Modellsubstrat geprüft werden.

3.6.1 Herstellung der Gewebeschnitte

Für die Untersuchung der Induktion von CYP3A4 wurde Schweineleber verwendet. Hierzu wurde Leber von zwei Schweinen unmittelbar nach dem Schlachten entnommen (Fleischversorgung Köln GmbH) und auf Eis gekühlt transportiert. Die maximale Transportzeit betrug 20 Minuten. Mittels eines sterilen Metallkorkenbohrers wurden aus dem Lebergewebe Stanzzyylinder mit einem Durchmesser von 0,5 cm gewonnen. Aus diese Gewebezylinder wurden mittels eines Präzisions-Gewebeschneiders in gekühlter und oxygenierter physiologischer Kochsalzlösung Schnitte mit einer Dicke von 200 µm erhalten [197, 198]. Hierdurch konnte ein schonendes Schneiden garantiert und Artefakte vermieden werden. Die Leberschnitte wurden in 24-Loch-Titerplatten überführt, in denen 1 ml Kulturmedium (siehe 3.6.2) vorgelegt war.

3.6.2 Versuchsdurchführung

Die Gewebeschnitte wurden bei 37 °C in einem Begasungsbrutschrank in einer Atmosphäre von 95 % O₂ / 5 % CO₂ unter fortlaufender Kippbewegung der 24-Loch-Titerplatten kultiviert, um einen konstanten Gasaustausch des Kulturmediums mit der Umgebung zu gewährleisten. Das Kulturmedium setzte sich zusammen aus 50 ml Williams' E-Medium, 0,6 ml L-Glutamin, 0,5 ml Penicillin-Streptomycin-Lösung und 0,35 ml IST Flüssigkeitsmedium Supplement. Der Zusatz der Penicillin-Streptomycin-Lösung erfolgte zur Inhibierung von möglichen bakteriellen Kontaminationen. Nach einer einstündigen Äquilibration erfolgte ein Medienwechsel. Die 12 stündige Präinkubation der Leberschnitte erfolgte durch den Zusatz von 900 µl CP in Williams' E-Medium [Endkonzentration: 250 µM].

Zur Inkubation wurden 100 µl Substratlösung (Midazolam in Williams' E-Medium, Endkonzentration [50 µM]) zugesetzt und nach 30, 60, 90, 180, 360 und 600 min das Medium zur Analyse abgenommen. Dieses wurde unmittelbar nach Entnahme aliquotiert und bei -70 °C bis zur Analyse eingefroren.

Die Versuchsreihen beinhalteten neben den Testproben mit einer CP-Konzentration von 250 µM folgende Kontrollproben:

- ohne Zusatz von Midazolam – Bei diesen Proben wurde eine entsprechende Menge reines Williams' E-Medium zugesetzt.
- ohne Zusatz von Cyclophosphamid – Bei diesen Proben wurde eine entsprechende Menge reines Williams' E-Medium zugesetzt.
- ohne Präinkubation – Hier erfolgte die Zugabe von Cyclophosphamid zusammen mit Midazolam über die Substratlösung.
- ohne Zusatz von Cyclophosphamid und Midazolam – Bei diesen Proben wurde eine entsprechende Menge reines Williams' E-Medium zugesetzt.
- ohne Leberschnitte.
- ohne Leberschnitte und ohne Cyclophosphamid.

Zur Abschätzung des experimentellen Fehlers wurden Doppelinkubationen (außer bei den Kontrollproben) durchgeführt.

Nach Beendigung der Inkubationen wurden die Leberschnitte gewogen. Die Variabilität der Gewichte der Leberschnitte aus einer Leber (siehe Tabelle 91 im Anhang) betrug 26 % für Leber A bzw. 32 % für Leber B, die Gesamtvariabilität lag bei 29 %.

3.6.3 Bestimmung von 1'-Hydroxy-Midazolam im Inkubationsmedium

Die Bestimmung der Konzentration des exklusiv durch CYP3A4 gebildeten Midazolam-Metaboliten 1'-Hydroxy-Midazolam (1'OH-MID) erfolgte mittels LC-MS/MS.

3.6.3.1 Methodenentwicklung

Für die Methodenentwicklung wurden Stammlösungen von 1'OH-MID in Wasser/HOForm [99,9/0,1] (V/V) in Konzentrationen zwischen zehn und 10000 ng/ml hergestellt. Die Optimierung der MS/MS Bedingungen erfolgte entsprechend der in Abschnitt 3.4.2.1 beschriebenen Vorgehensweise. Für die SRM-Detektion wurde der Übergang vom Precursorion m/z 342,15 (entspricht $[M+H]^+$) zum Fragment m/z 324,1 (entspricht $[M+H-H_2O]^+$) gewählt. Die Kollisionsenergie wurde auf 24 eV optimiert.

Die chromatographischen Bedingungen wurden anschließend hinsichtlich der in Abschnitt 3.3.2.2 erwähnten Anforderungen durch Fluss-Injektionen der Stammlösungen und angereicherter Matrixproben (nach Probenaufarbeitung) entsprechend

der in Abschnitt 3.4.2.1 beschriebenen Vorgehensweise optimiert. Die Retentionszeit für 1'OH-MID betrug 4,12 Minuten.

3.6.3.2 Probenaufarbeitung

Je 200 µl der aufgetauten Inkubationsproben wurden zur Proteinfällung mit 600 µl ACN versetzt und 30 s auf einem Vortexer geschüttelt. Nach anschließender Zentrifugation (4 °C, 16000 g, 10 min) wurden jeweils 400 µl der Lösungen in Glasvials abgefüllt.

3.6.3.3 Chromatographie

Ein Volumen von 4 µl der jeweiligen Probe wurde auf eine Thermo Hypersil Keystone Beta Basic C₈-Säule (100 x 3 mm, 5 µm) mit passender Vorsäule (10 x 3,0 mm) injiziert. Zur Abtrennung der Probenmatrix vom Analyten erfolgte die Chromatographie unter Verwendung eines Laufmittelgradienten bei einer Flussrate von 350 µl/min (siehe Abbildung 26).

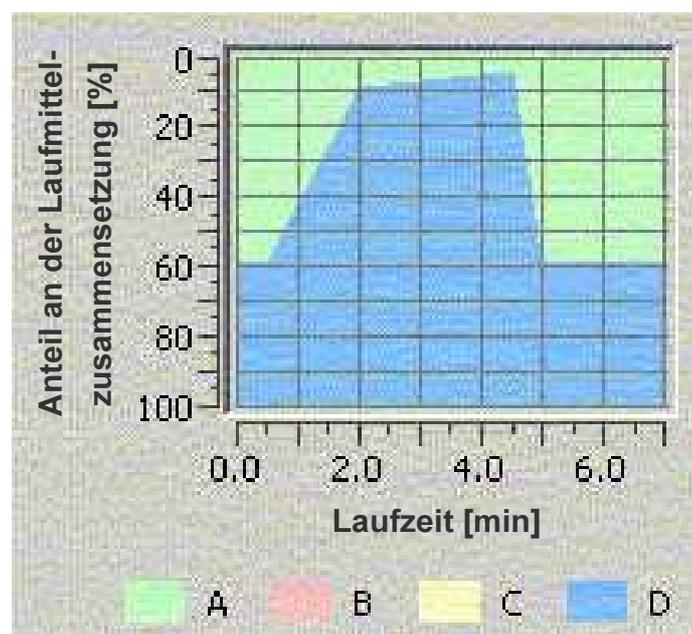


Abbildung 26: Schematische Darstellung des bei der LC-MS/MS-Methode zur Bestimmung von 1'OH-MID verwendeten Laufmittelgradienten

Als Laufmittel wurden Wasser mit einem Zusatz von 0,1 % HOFom (Laufmittel A) und MeOH (Laufmittel D) verwendet. Nach einem isokratischen Fluss von 30 s mit einem MeOH-Anteil von 40 % wurde der organische Anteil des Laufmittels innerhalb von 90 s auf 90 % und in den folgenden 2,5 min auf 95 % gesteigert. An-

schließlich wurde die Ausgangszusammensetzung des Laufmittels innerhalb von 30 s wiederhergestellt und das System 2 min äquilibriert.

Die Säulentemperatur wurde konstant bei 40 °C gehalten. Der Probenraum des Autosamplers wurde auf 5 °C gekühlt. Nach der Probeninjektion wurden die Injektionsnadel und -spritze des Autosamplers wiederholt mit ACN gespült. Die Gesamtdauer jeder Probenanalyse betrug 8 min.

3.6.3.4 MS/MS-Detektion

Die Ionisierung erfolgte mittels ESI mit positiver Polarität (4900 V). Der Druck für das Mantelgas betrug 42 psi und der für das Hilfsgas 2 psi. Die Detektion erfolgte im SRM-Modus. Die Scanrate betrug 0,5 s/Scan. Die Peakweiten für Q1 und Q3 wurden auf 0,3 u bzw. 0,7 u gesetzt. Als Scanbreite wurden 0,5 u gewählt.

Abbildung 27 zeigt als Beispiel ein Chromatogramm der Messung einer 1'OH-MID-Probe in Williams' E-Medium nach Aufarbeitung mit einer 1'OH-MID-Konzentration von 4,5 nM.

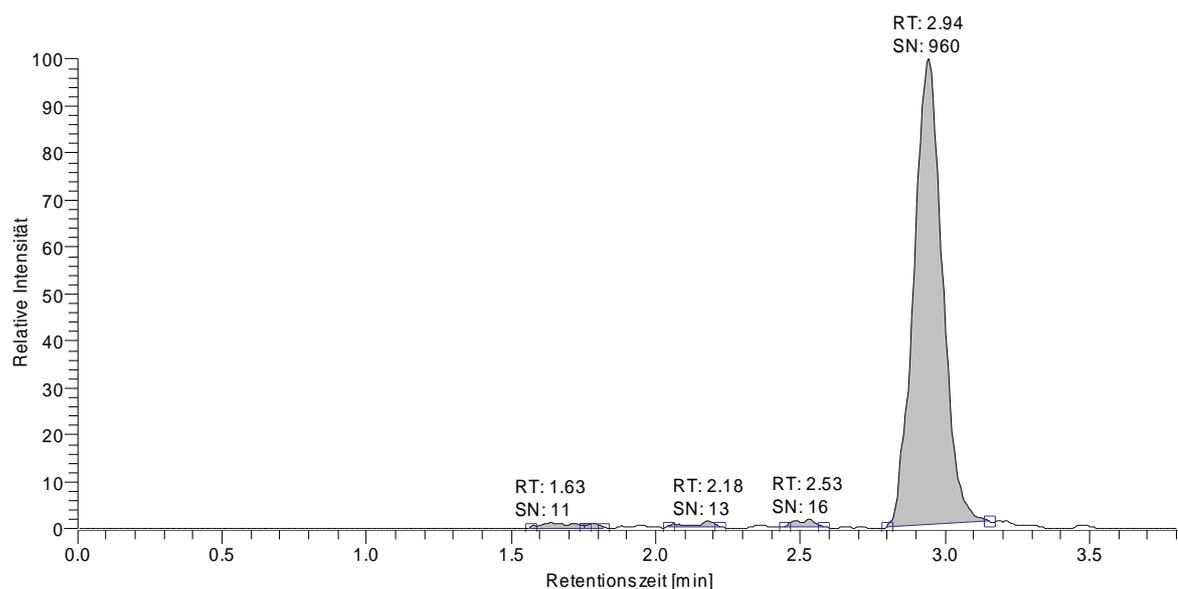


Abbildung 27: Chromatogramm einer 1'OH-MID-haltigen Probe in Williams' E-Medium nach Aufarbeitung

3.6.3.5 Methodvalidierung

Die beschriebene LC-MS/MS-Methode zur Bestimmung von 1'OH-MID im Inkubationsmedium wurde vor der Bestimmung der Inkubationsproben einer Validierung gemäß 3.2 unterzogen.

3.6.3.5.1 Kalibrierung

Die Kalibrierung erfolgte im Bereich von 1 nM bis 30 µM. Dazu wurde eine zuvor hergestellte Stammlösung von 1'OH-MID unter Gewichtskontrolle mit Williams' E-Medium zu einer Eichreihe verdünnt. Es wurden Eichproben (EPs) in den in Tabelle 13 aufgelisteten Konzentrationen hergestellt. Die Proben wurden gemäß Abschnitt 3.6.3.2 aufgearbeitet und anschließend mit der entwickelten LC-MS/MS-Methode quantifiziert. Für die Berechnung der Kalibrierungsgeraden wurde die Fläche des 1'OH-MID-Peaks verwendet.

Tabelle 13: 1'OH-MID-Konzentrationen der Eichproben

	Konzentration 1'OH-MID [nM]
EP1	30074
EP2	9608
EP3	2610
EP4	608,1
EP5	180,8
EP6	42,73
EP7	12,72
EP8	3,007
EP9	0,998

3.6.3.5.2 Besonderheiten

Zur Bestimmung der Präzision und Richtigkeit der Methode wurden gemäß Abschnitt 3.2.1 Matrixproben in Williams' E-Medium hergestellt, deren 1'OH-MID-Konzentration den aus Tabelle 14 ersichtlichen Werten entspricht.

Tabelle 14: 1'OH-MID-Konzentrationen der Validierungs- und Qualitätskontrollproben

	QC1	QC2	QC3	QC4
Konzentration 1'OH-MID [nM]	25426	296,6	4,504	1,030

Auf die Bestimmung der Variabilität der Messungen an verschiedenen Tagen wurde verzichtet, da die Messungen der Inkubationsproben an einem Tag durchgeführt werden konnten.

Bei der Prüfung der Stabilität der Proben wurden Messungen von aufgearbeiteten Matrixproben, die sich bis zu sechs Stunden bei konstanten 5 °C im Autosampler befanden, und Proben, die nach dreistündiger Lagerung bei Raumtemperatur aufgearbeitet wurden, durchgeführt. Deren Analytenkonzentrationen wurden mit der von unbehandelten Proben verglichen.

Auf die Bestimmung der Wiederfindung des Analyten (Recovery) wurde verzichtet, da die Inkubationsproben keinem Extraktionsverfahren unterworfen wurden. Die Zugabe von ACN bei der Probenaufarbeitung (siehe 3.6.3.2) diene lediglich der Fällung von evtl. vorhandenem Protein und nicht der Extraktion des Analyten.

3.6.4 Messung der Inkubationsproben aus dem Induktionsversuch

Die Messung der Inkubationsproben erfolgte gemäß dem in 3.6.3.2 bis 3.6.3.4 beschriebenen Verfahren. Die Messungen erfolgten an einem Tag. Dabei bestand die Probensequenz aus zweimal zehn Eichproben mit den aus Tabelle 13 ersichtlichen Konzentrationen (inkl. einem Leerwert) für die Kalibrierungskurve, den 96 Inkubationsproben mit unbekannter 1'OH-MID-Konzentration und zehn Qualitätskontrollproben (QCs). Die aus den Eichproben erstellte Kalibrierungskurve wurde zur Quantifizierung der Proben der Sequenz verwendet.

3.6.5 Evaluation der Daten

Um einen Vergleich der Ergebnisse der Einzelinkubationen zu ermöglichen, wurden für jede Probe die 1'OH-MID-Bildungsrate nach Formel 12 bestimmt:

Formel 12: Berechnung der 1'OH-MID-Bildungsrate

$$v = \frac{n_{1'OH-MID}}{t \cdot m_{Leber}}$$

mit v = Bildungsrate, $n_{1'OH-MID}$ = gemessene Stoffmenge 1'OH-MID in nM,
 t = Inkubationszeit in Stunden, m_{Leber} = Lebergewicht nach Inkubation in mg

3.7 Bestimmung von Midazolam im Humanplasma

Um Plasmaproben, die im Rahmen einer *in vivo*-Phänotypisierung von CYP3A4 mit Midazolam (siehe 1.6.3) gewonnen werden, bzgl. ihres Gehalts an Midazolam (MID) und seinen Metaboliten 1'-Hydroxy-Midazolam (1'OH-MID) und 4-Hydroxy-Midazolam (4OH-MID) quantifizieren zu können, wurde ein Messverfahren mittels LC-MS/MS entwickelt. Die Methode wurde anschließend jedoch lediglich für MID validiert.

3.7.1 Methodenentwicklung

Für die Methodenentwicklung wurden Stammlösungen von MID, 1'OH-MID und 4OH-MID¹ in Wasser/HOForm [99,9/0,1] (V/V) in Konzentrationen zwischen zehn und 10000 ng/ml hergestellt. Die Optimierung der MS/MS Bedingungen erfolgte entsprechend der in Abschnitt 3.4.2.1 beschriebenen Vorgehensweise. Tabelle 15 zeigt für jeden Analyten den ausgewählten SRM-Übergang und die verwendete Kollisionsenergie.

Tabelle 15: Molekulargewicht, Precursor- und Produktion sowie Kollisionsenergien von MID, 1'OH-MID, und 4OH-MID

Analyt	MW (g/mol)	Precursorion (m/z)	Produktion (m/z)	Kollisionsenergie (eV)
MID	325	326,15	291,10	32
1'OH-MID	341	342,15	324,10	26
4OH-MID	341	342,15	325,10	26

Anschließend erfolgte eine Optimierung der chromatographischen Bedingungen hinsichtlich der in Abschnitt 3.3.2.2 erwähnten Anforderungen. Dies wurde entsprechend der in Abschnitt 3.4.2.1 beschriebenen Vorgehensweise durch Flussinjektionen der Stammlösungen und angereicherter Plasmaproben (nach Probenaufarbeitung) durchgeführt. Für die Analyten ergaben sich die in Tabelle 16 aufgeführten Retentionszeiten.

¹ Im Rahmen der Methodenentwicklung zeigten die Peakflächen von 1'OH-MID und 4OH-MID eine hohe Variabilität, so dass die LC-MS/MS-Methode lediglich für die Muttersubstanz MID validiert wurde.

Tabelle 16: Retentionszeiten von MID, 1'OH-MID, und 4OH-MID

Analyt	MID	1'OH-MID	4OH-MID
Retentionszeit [min]	2,9	2,1	1,9

3.7.2 Probenaufarbeitung

Je 150 µl der Plasmaproben wurden mit 50 µl Wasser versetzt. Nach Schütteln der Proben wurden durch Zugabe von 350 µl ACN Plasmaproteine ausgefällt, die nach erneutem Vortexen (30 s) durch Zentrifugation (4 °C, 16000 g, 15 min) von der Lösung abgetrennt wurden. 450 µl des klaren Überstands wurden in ein 1,5 ml Schraubröhrchen überführt und 2,5 h in einem Rotationsverdampfer bei 30 °C bis zur Trockne eingengt. Das Pellet wurde in 100 µl einer Lösung aus 1 mM Ammoniumacetatpuffer (pH 3,6) und ACN [60:40] (V:V) gelöst. Nach erneuter Zentrifugation (4 °C, 16000 g, 15 min) wurden 85 µl des Überstandes in HPLC-Röhrchen aus Glas überführt.

3.7.3 Chromatographie

Ein Volumen von 10 µl der jeweiligen Probe wurde auf eine Thermo Hypersil Keystone Kromasil C₈- Säule (100 x 3 mm, 5 µm) mit passender Vorsäule (10 x 3,0 mm) injiziert. Die Analyten wurden mit isokratischem Fluss bei einer Flussrate von 500 µl/min chromatographiert. Die mobile Phase bestand aus 1 mM Ammoniumacetatpuffer (pH 3,6) / ACN [50:50] (V:V).

Die Säulentemperatur wurde konstant bei 40 °C gehalten. Der Probenraum wurde auf 5 °C gekühlt. Nach der Probeninjektion wurden die Injektionsnadel und -spritze des Autosamplers wiederholt mit ACN gespült. Die Gesamtdauer jeder Probenanalyse betrug 4,75 Minuten.

Durch die zusätzliche Verwendung eines über die Software steuerbaren Schaltventils (Divert Valve) wurde während der ersten 90 Sekunden und letzten 75 Sekunden jedes Probendurchlaufes der matrixbehaftete Teil des LC-Flusses zu einem Auffangbehälter umgeleitet.

3.7.4 MS/MS-Detektion

Die Ionisierung erfolgte mittels ESI mit positiver Polarität (3500 V). Der Druck für das Mantelgas betrug 60 psi und der für das Hilfsgas 2 psi. Sowohl das Injektionsvolumen als auch die mobile Phase bestand zum großen Teil aus ACN. Oftmals

wird aufgrund der Bildung von ACN-Clustern die Ionisierbarkeit eines Analyten und damit die Empfindlichkeit einer Methode verringert. Daher wurde zur Dec-lusterung an die Ionenquelle des Massenspektrometers eine zusätzliche Energie, die sog. *source CID*-Energie von 10 eV angelegt.

Die Detektion erfolgte im SRM-Modus. Die Scanrate betrug für alle Analyten 0,1 s/Scan. Die Peakweiten für Q1 und Q3 wurden auf 0,3 u bzw. 0,7 u gesetzt. Als Scanbreite wurden 0,5 u gewählt.

Abbildung 28 zeigt als Beispiel ein Chromatogramm der Messung einer MID-Probe in Humanplasma nach Aufarbeitung mit einer MID-Konzentration von 1 nM.

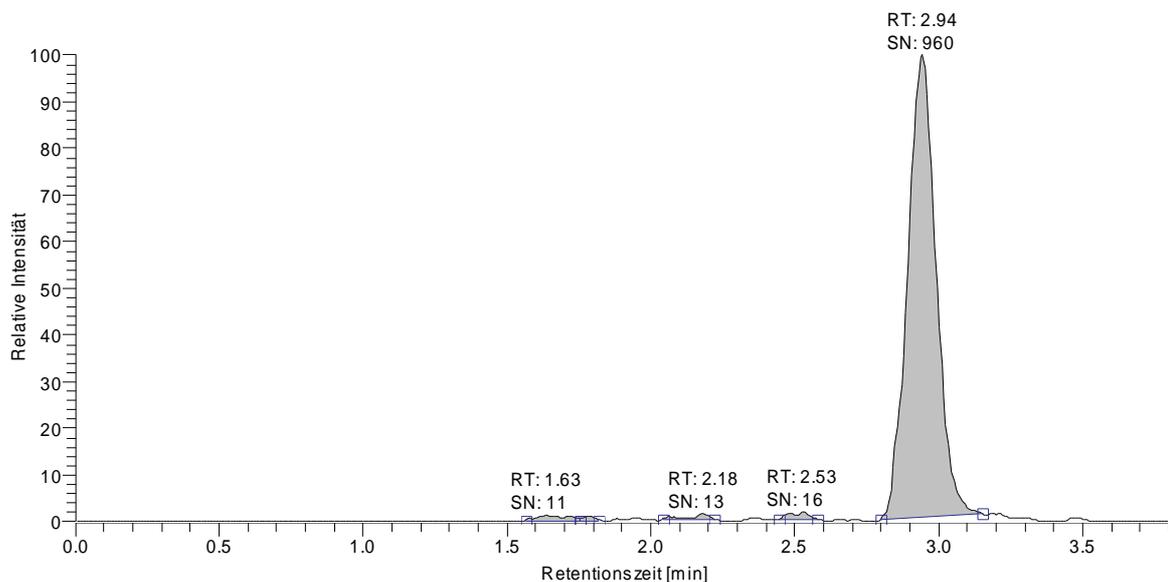


Abbildung 28: Chromatogramm einer MID-haltigen Plasmaprobe nach Aufarbeitung

3.7.5 Methodvalidierung

Im Anschluss an die Methodenentwicklung erfolgte eine Validierung gemäß der aktuellen internationalen Richtlinien [188-192].

3.7.5.1 Kalibrierung

Für die Kalibrierung wurde Leerplasma mit MID, 1'OH-MID und 4OH-MID durch Verdünnung einer zuvor hergestellte Gesamtstammlösung unter Gewichtskontrolle versetzt. Die Proben wurden gemäß Abschnitt 3.7.2 aufgearbeitet und anschließend mit der LC-MS/MS-Methode quantifiziert. Der Kalibrationsbereich erstreckte sich für MID von 0,09 – 186 ng/ml. Es wurden Eichproben (EPs) in den in Tabelle 17 aufgelisteten Konzentrationen hergestellt. Für die Berechnung der Kalibrierungskurve wurden die Peakflächen von MID verwendet.

Tabelle 17: MID-Konzentrationen der Eichproben

	Konzentration MID [ng/ml]
EP1	185,84
EP2	57,06
EP3	19,34
EP4	5,617
EP5	1,925
EP6	0,552
EP7	0,237
EP8	0,092

3.7.5.2 Besonderheiten

Zur Bestimmung der Präzision und Richtigkeit der Methode wurden gemäß Abschnitt 3.2.1 Plasmaproben hergestellt, deren MID-Konzentration den aus Tabelle 18 ersichtlichen Werten entsprach. Dabei wurde eine MID-Konzentration im Bereich der oberen Nachweisgrenze (QC1), eine in der Nähe des mittleren Bereichs (QC2) und zwei nahe der unteren Nachweisgrenze (QC3 und QC4) verwendet.

Tabelle 18: MID-Konzentrationen der Validierungs- und Qualitätskontrollproben

	QC1	QC2	QC3	QC4
Konzentration MID [ng/ml]	184	8,93	0,440	0,309

Zur Bestimmung der Wiederfindung des Analyten (Recovery) wurden Lösungen von MID mit Konzentrationen von 182 ng/ml und 0,420 ng/ml angesetzt. Als Lösungsmittel wurde 1 mM Ammoniumacetatpuffer, pH 3,6/ ACN [60:40] (V:V) verwendet.

Die Prüfung der Stabilität der Analyten beinhaltete die Messung von aufgearbeiteten Matrixproben, die sich bis zu 18 Stunden bei konstanten 5 °C im Autosampler befanden. Zusätzlich wurden Proben, die nach dreistündiger Lagerung bei Raumtemperatur aufgearbeitet wurden, Proben nach einmonatiger Lagerung bei -70 °C sowie Proben nach dreimaligem Auftauen und Einfrieren untersucht. Die mittleren gemessenen MID-Konzentrationen wurden jeweils mit denen von entsprechenden unbehandelten Proben verglichen.

4 Ergebnisse

4.1 Validierung der Methode zur Bestimmung von Procarbazin-Metaboliten im Urin mittels HPLC

4.1.1 Linearität und untere Quantifizierungsgrenze

Für den Procarbazin-Metaboliten TAC wurde bei den Urinproben im Bereich von 20 - 1000 μM ein linearer Zusammenhang der Form $y = a \cdot x + b$ zwischen Substanzgehalt (x) und Messwert (y) gefunden. Abbildung 29 zeigt exemplarisch eine Kalibrationskurve, die im Rahmen der Validierung erhalten wurde.

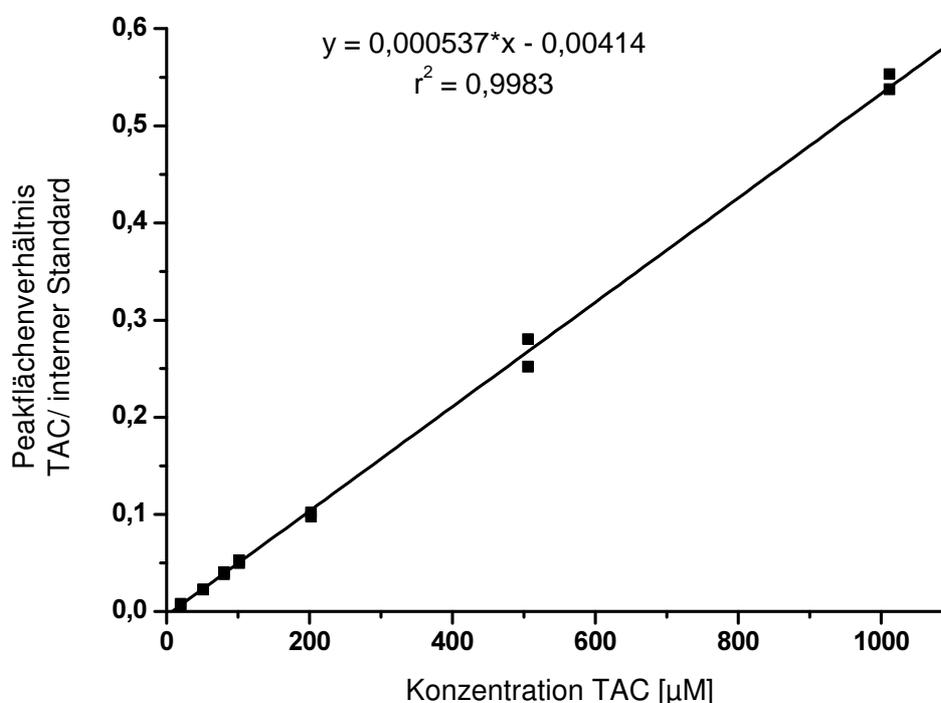


Abbildung 29: Kalibrationskurve für TAC

Die maximalen Abweichungen vom Sollwert lagen bei den gemessenen Validierungsproben (QC1 bis QC3) immer unter den geforderten 15 % bzw. 20 % an der Bestimmungsgrenze. Die Abweichungen sind in Kapitel 4.1.2 aufgeführt.

Die untere Quantifizierungsgrenze, an der TAC im Urin noch mit akzeptabler Präzision und Richtigkeit bestimmt werden konnte, lag bei 46,8 μM .

4.1.2 Präzision und Richtigkeit

Für jede Konzentration der Validierungsproben erfolgte die Bestimmung der Präzision und Richtigkeit der Methode durch Aufarbeitungen und Messungen von jeweils fünf Proben an vier Tagen und jeweils drei Proben an zwei weiteren Tagen. Somit wurden insgesamt sechs *inter-day assays* durchgeführt, die jeweils die Charakteristik eines *intra-day-assays* besaßen. Die Variabilitäten innerhalb eines Tages und an verschiedenen Tagen sowie deren Gesamtbewertung (siehe hierzu auch Abschnitt 3.2.4.4) zeigen die Daten in Tabelle 19 und Tabelle 20. Die Einzelmesswerte sind Tabelle 58 bis Tabelle 60 im Anhang zu entnehmen.

Tabelle 19: Richtigkeit und Präzision der Messungen von TAC-Konzentrationen in angereicherten Urinproben innerhalb eines Tages

	n	<i>intra-day-accuracy</i> [%]			<i>CV intra-day-precision</i> [%]		
		QC1	QC2	QC3	QC1	QC2	QC3
Tag 1	5	-2,7	-6,2	-4,7	1,9	3,6	9,9
Tag 2	5	11,6	7,7	9,9	4,8	1,9	4,5
Tag 3	5	6,7	-1,5	-18,6	3,7	7,3	7,2
Tag 4	5	-6,3	-1,1	-19,4	2,5	10,7	8,2
Tag 5	3	0,2	5,1	2,0	5,3	1,4	7,4
Tag 6	3	-9,5	-4,8	-4,8	3,9	5,3	3,1
Gesamtbewertung		6,3	5,1	9,9	3,7	3,6	7,4

Tabelle 20: Richtigkeit und Präzision der Messungen von TAC-Konzentrationen in angereicherten Urinproben an verschiedenen Tagen

	n	<i>inter-day-accuracy</i> [%]			<i>CV inter-day-precision</i> [%]		
		QC1	QC2	QC3	QC1	QC2	QC3
Probe A	6	1,1	2,7	-5,6	8,2	4,2	9,7
Probe B	6	-1,2	1,9	-6,3	5,4	6,7	13,5
Probe C	6	-1,3	-4,1	-0,6	10,0	7,8	13,2
Probe D	4	5,1	-3,4	-7,9	9,9	7,2	19,8
Probe E	4	1,4	1,5	-11,8	9,3	12,2	16,5
Gesamtbewertung		1,3	2,7	6,3	9,3	7,2	13,5

4.1.3 Stabilität

Bei der Überprüfung der Stabilität der Proben nach dreimaligem Einfrieren und Wiederauftauen zeigten sich im Vergleich zu Messungen von unbehandelten Proben Konzentrationsabnahmen von 2,5 – 7,5 % über den gesamten Validierungsbereich. Diese Veränderungen lagen innerhalb der nachgewiesenen Variabilität der Methode (siehe 4.1.2) und waren somit nicht signifikant.

Messungen von aufgearbeiteten Proben nach Lagerung im Autosampler bei 5 °C für 19 Stunden zeigten ebenfalls keine signifikanten Konzentrationsabnahmen (unter 3 %) gegenüber direkt gemessenen Proben.

4.1.4 Gesamtergebnis der Validierung

Insgesamt wurden im Rahmen der Validierung der Methode zur Bestimmung von Procarbazin-Metaboliten im Urin mittels HPLC die Anforderungen aktueller internationaler Richtlinien [188-192] erfüllt. Das Messverfahren konnte somit für die Quantifizierung der Patientenproben aus der BEACOPP-Studie verwendet werden.

4.2 Validierung der Methode zur Bestimmung von Cyclophosphamid und seinen Metaboliten im Urin mittels LC-MS/MS

4.2.1 Linearität und untere Quantifizierungsgrenze

Bei der Bestimmung von Cyclophosphamid und seinen Metaboliten CarboxyCP und DCL-CP ergab sich eine lineare Abhängigkeit der Form $y = a \cdot x + b$ zwischen Substanzgehalt (x) und den Peakflächenverhältnissen (y) über den gesamten untersuchten Bereich. Für 4KetoCP hingegen zeigte sich ein quadratischer Zusammenhang ($y = a \cdot x^2 + b \cdot x + c$).

Abbildung 30 bis Abbildung 33 zeigen exemplarisch Kalibrationskurven der Analyten, die im Rahmen der Validierung erhalten wurden. Hierbei stellen ausgefüllte Quadrate Datenpunkte dar, die in die Berechnung der Kalibrationskurve eingegangen sind, während ausgeschlossene Datenpunkte durch offene Quadrate gekennzeichnet sind.

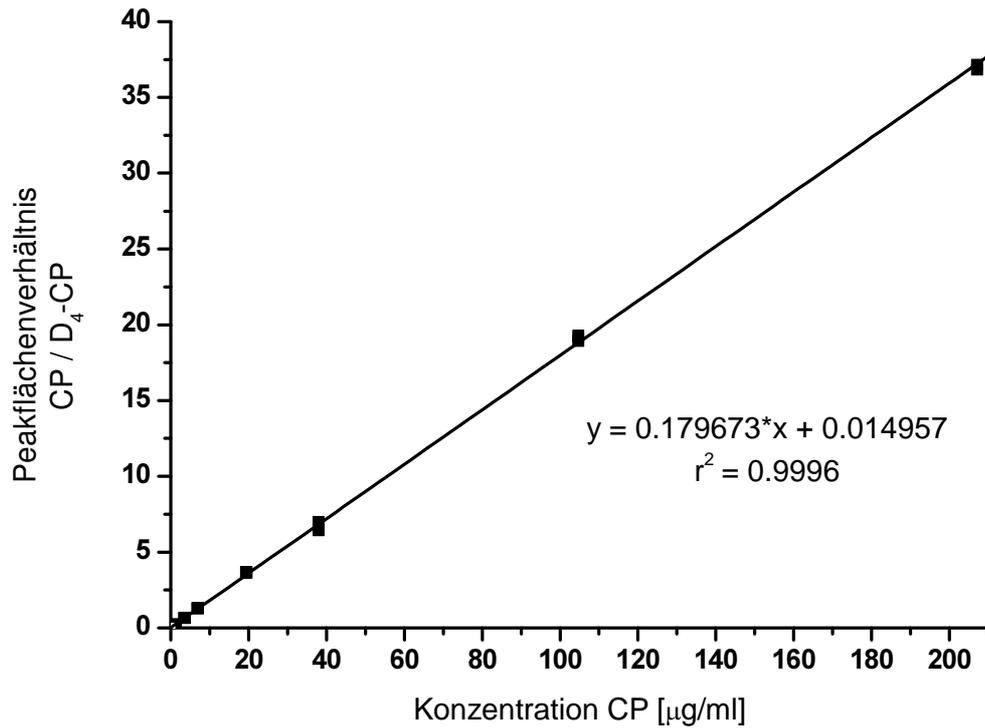


Abbildung 30: Kalibrationskurve für CP

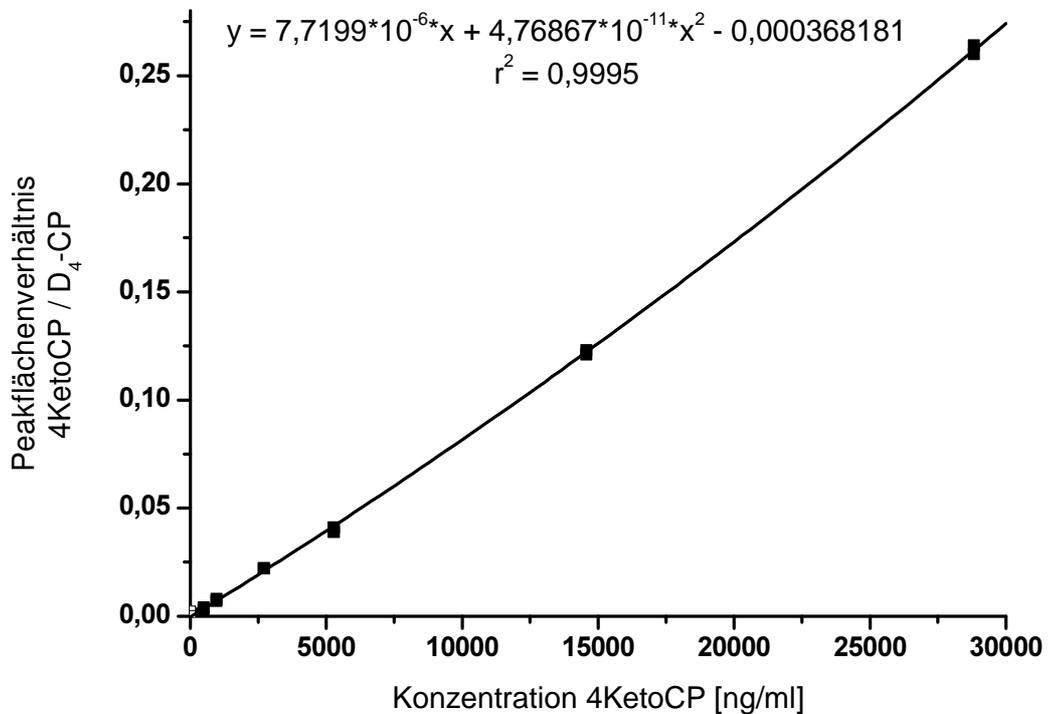


Abbildung 31: Kalibrationskurve für 4KetoCP

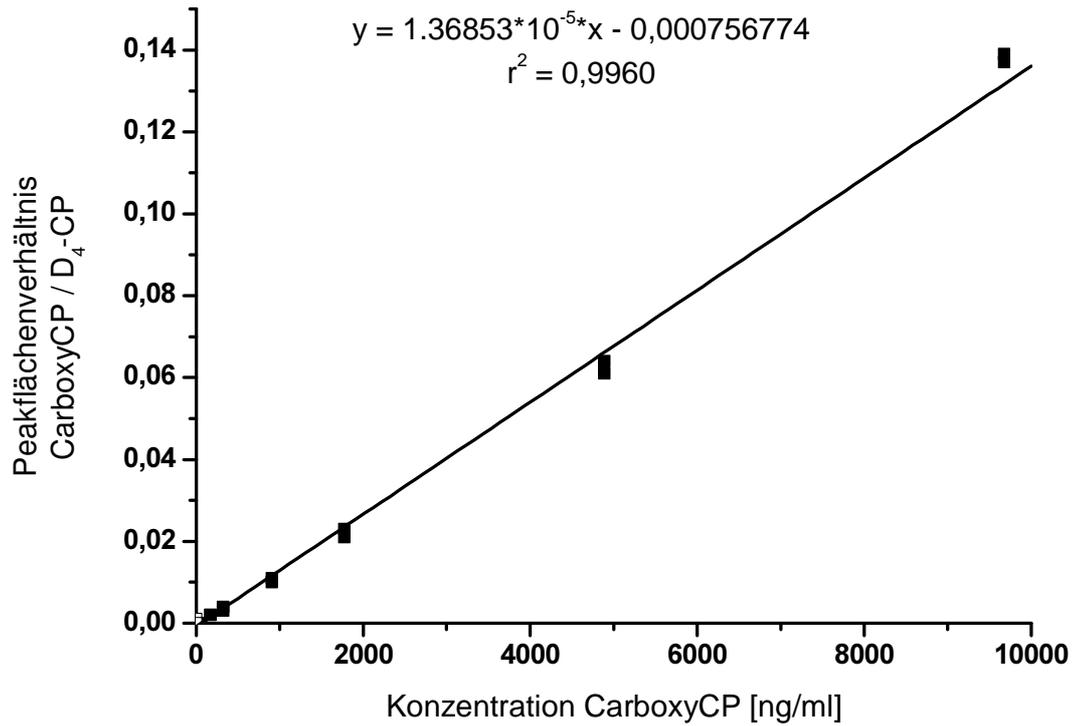


Abbildung 32: Kalibrationskurve für CarboxyCP

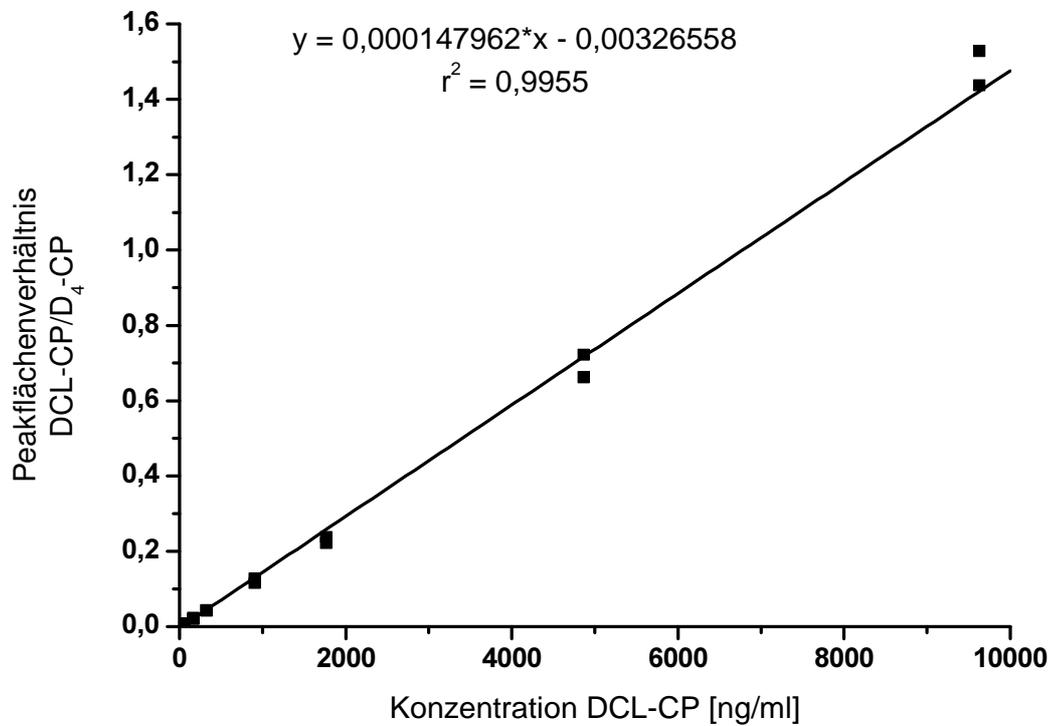


Abbildung 33: Kalibrationskurve für DCL-CP

Die maximalen Abweichungen vom Sollwert lagen bei den gemessenen Validierungsproben (QC1 bis QC4) immer unter den geforderten 15 % bzw. 20 % an der Bestimmungsgrenze. Die ermittelten Abweichungen sind in Kapitel 4.2.2 aufgeführt.

Für die einzelnen Analyten ergaben sich folgende untere Quantifizierungsgrenzen, an der eine Bestimmung der Konzentrationen noch mit akzeptabler Präzision und Richtigkeit erfolgen konnte:

Cyclophosphamid	3 µg/ml
4-Ketocyclophosphamid	480 ng/ml
Carboxyphosphamid	160 ng/ml
N-Dechloroethyl-Cyclophosphamid	160 ng/ml

4.2.2 Präzision und Richtigkeit

Die Bestimmung der Präzision und Richtigkeit der Methode erfolgte über den gesamten für die Patientenproben der BEACOPP-Studie zu erwartenden Konzentrationsbereich. Hierzu wurden an fünf verschiedenen Tagen jeweils fünf Proben aufgearbeitet und gemessen. Somit wurden insgesamt fünf *inter-day assays* durchgeführt, die jeweils die Charakteristik eines *intra-day-assays* besaßen. Die Variabilitäten innerhalb eines Tages und an verschiedenen Tagen zeigen die Daten in Tabelle 21 bis Tabelle 28. Die Einzelmesswerte sind Tabelle 61 bis Tabelle 76 im Anhang zu entnehmen.

Tabelle 21: Richtigkeit und Präzision der Messungen von CP-Konzentrationen in angereicherten Urinproben innerhalb eines Tages [n=5x5]

	<i>intra-day-accuracy</i> [%]				<i>CV intra-day-precision</i> [%]			
	QC1	QC2	QC3	QC4	QC1	QC2	QC3	QC4
Tag 1	2,9	2,8	2,7	3,0	4,7	6,3	5,3	4,4
Tag 2	7,2	8,9	7,5	4,0	5,6	6,1	4,8	4,8
Tag 3	6,2	8,9	5,9	4,4	4,7	6,8	5,9	4,6
Tag 4	3,5	4,2	6,2	5,2	5,3	6,5	6,7	4,8
Tag 5	5,1	6,7	6,7	6,1	4,6	5,8	6,3	4,1
Gesamt- bewertung	5,1	6,7	6,2	4,4	4,7	6,3	5,9	4,6

Tabelle 22: Richtigkeit und Präzision der Messungen von CP-Konzentrationen in angereicherten Urinproben an verschiedenen Tagen [n=5x5]

	<i>inter-day-accuracy</i> [%]				<i>CV inter-day-precision</i> [%]			
	QC1	QC2	QC3	QC4	QC1	QC2	QC3	QC4
Probe A	2,9	2,8	2,7	3,0	4,7	6,3	5,3	4,4
Probe B	7,2	8,9	7,5	4,0	5,6	6,1	4,8	4,8
Probe C	6,2	8,9	5,9	4,4	4,7	6,8	5,9	4,6
Probe D	3,5	4,2	6,2	5,2	5,3	6,5	6,7	4,8
Probe E	5,1	6,7	6,7	6,1	4,6	5,8	6,3	4,1
Gesamt- bewertung	5,1	6,7	6,2	4,4	4,7	6,3	5,9	4,6

Tabelle 23: Richtigkeit und Präzision der Messungen von DCL-CP-Konzentrationen in angereicherten Urinproben innerhalb eines Tages [n=5x5]

	<i>intra-day-accuracy</i> [%]				<i>CV intra-day-precision</i> [%]			
	QC1	QC2	QC3	QC4	QC1	QC2	QC3	QC4
Tag 1	1,6	-7,0	-1,7	-1,8	3,9	3,9	5,6	12,2
Tag 2	7,0	-6,5	-1,5	1,3	1,7	1,9	4,6	4,7
Tag 3	-2,2	-10,1	-1,2	-2,8	3,8	2,0	3,1	4,0
Tag 4	8,9	-4,9	-4,6	-7,6	2,1	2,8	3,1	8,2
Tag 5	8,2	-4,0	7,6	-9,1	1,9	2,8	2,5	13,7
Gesamt- bewertung	7,0	6,5	1,7	2,8	2,1	2,8	3,1	8,2

Tabelle 24: Richtigkeit und Präzision der Messungen von DCL-CP-Konzentrationen in angereicherten Urinproben an verschiedenen Tagen [n=5x5]

	<i>inter-day-accuracy</i> [%]				<i>CV inter-day-precision</i> [%]			
	QC1	QC2	QC3	QC4	QC1	QC2	QC3	QC4
Probe A	5,2	-5,7	-1,0	-5,5	4,6	4,3	6,6	13,3
Probe B	5,5	-8,5	-1,4	-3,4	6,2	3,3	6,6	8,9
Probe C	3,7	-7,3	2,3	-8,0	6,7	4,5	2,9	10,7
Probe D	3,3	-5,5	-2,0	-2,7	4,1	2,7	3,8	9,4
Probe E	5,9	-5,5	-1,1	-0,4	4,2	1,5	6,7	5,7
Gesamt- bewertung	5,2	5,7	1,4	3,4	4,6	3,3	6,6	9,4

Tabelle 25: Richtigkeit und Präzision der Messungen von 4KetoCP-Konzentrationen in angereicherten Urinproben innerhalb eines Tages [n=5x5]

	<i>intra-day-accuracy</i> [%]				<i>CV intra-day-precision</i> [%]			
	QC1	QC2	QC3	QC4	QC1	QC2	QC3	QC4
Tag 1	9,5	5,9	6,4	8,8	1,4	4,3	4,6	7,7
Tag 2	-0,5	1,9	-1,8	-3,2	2,1	6,0	7,5	8,4
Tag 3	2,1	3,4	-0,7	4,2	3,4	2,0	6,1	4,7
Tag 4	10,2	-6,4	-5,0	1,2	1,1	3,0	10,0	14,6
Tag 5	5,5	0,1	4,0	-4,2	1,9	2,6	8,6	6,4
Gesamt- bewertung	5,5	3,4	4,0	4,2	1,9	3,0	7,5	7,7

Tabelle 26: Richtigkeit und Präzision der Messungen von 4KetoCP-Konzentrationen in angereicherten Urinproben an verschiedenen Tagen [n=5x5]

	<i>inter-day-accuracy</i> [%]				<i>CV inter-day-precision</i> [%]			
	QC1	QC2	QC3	QC4	QC1	QC2	QC3	QC4
Probe A	5,5	0,5	-0,4	5,7	5,2	6,2	8,2	14,4
Probe B	6,2	2,4	1,4	1,5	2,4	6,4	8,8	11,2
Probe C	3,8	3,5	-0,6	-0,2	6,3	5,8	14,2	7,6
Probe D	5,9	0,4	1,3	2,1	4,5	4,6	6,2	8,7
Probe E	5,7	-0,6	-2,3	-1,7	4,9	3,5	7,3	5,1
Gesamt- bewertung	5,7	0,6	1,3	1,7	4,9	5,8	8,2	8,7

Tabelle 27: Richtigkeit und Präzision der Messungen von CarboxyCP-Konzentrationen in angereicherten Urinproben innerhalb eines Tages [n=5x5]

	<i>intra-day-accuracy</i> [%]				<i>CV intra-day-precision</i> [%]			
	QC1	QC2	QC3	QC4	QC1	QC2	QC3	QC4
Tag 1	9,2	4,6	6,9	8,9	1,1	6,1	7,0	8,5
Tag 2	13,4	5,4	0,1	5,5	1,2	5,7	10,7	5,6
Tag 3	11,5	6,9	5,6	4,7	2,4	1,6	2,5	1,7
Tag 4	15,6	3,4	0,0	1,1	1,4	4,7	14,3	8,3
Tag 5	14,8	2,5	8,8	7,7	0,4	4,1	5,0	8,4
Gesamt- bewertung	13,4	4,6	5,6	5,5	1,2	4,7	7,0	8,3

Tabelle 28: Richtigkeit und Präzision der Messungen von CarboxyCP-Konzentrationen in angereicherten Urinproben an verschiedenen Tagen [n=5x5]

	<i>inter-day-accuracy [%]</i>				<i>CV inter-day-precision [%]</i>			
	QC1	QC2	QC3	QC4	QC1	QC2	QC3	QC4
Probe A	13,4	2,5	5,0	5,8	2,8	4,7	8,9	5,6
Probe B	12,6	5,7	0,7	3,5	3,2	3,9	12,0	4,7
Probe C	12,2	6,7	6,6	2,1	3,3	1,6	7,2	3,3
Probe D	13,4	6,0	5,6	10,4	1,6	3,5	5,7	5,9
Probe E	13,0	1,9	4,0	5,5	2,0	7,2	9,9	11,4
Gesamt- bewertung	13,0	5,7	5,0	5,5	2,8	3,9	8,9	5,6

4.2.3 Wiederfindung

Zur Untersuchung, ob bei der Probenaufarbeitung Substanz verloren geht, wurden die Wiederfindungsraten der Analyten CP, DCL-CP, 4KetoCP und CarboxyCP bestimmt. Parallel zu angereicherten Urinproben (siehe 3.4.3.2) wurden Referenzlösungen der Analyten mit gleicher Konzentration in Elutionsmittel angesetzt und vermessen. Die Gesamtwiederfindung (*Recovery*) betrug im Mittel $99,9 \pm 6,4$ %. Die Ergebnisse für die einzelnen Analyte sind in Tabelle 29 aufgeführt.

Tabelle 29: Mittlere Recovery von CP, DCL-CP, 4KetoCP und CarboxyCP aus Urin (n=3)

	QC1	QC2	QC3	QC4
CP	100,5 %	97,9 %	93,3 %	94,7 %
DCL-CP	105,6 %	101,7 %	106,0 %	109,4 %
4KetoCP	97,0 %	92,0 %	95,6 %	103,5 %
CarboxyCP	97,7 %	94,3 %	94,3 %	114,1 %

4.2.4 Stabilität

4.2.4.1 Freeze-Thaw-Stabilität

Bei der Überprüfung der Stabilität der Proben nach dreimaligem Einfrieren und Auftauen zeigten sich im Vergleich zu Messungen von unbehandelten Proben die in Tabelle 30 angegebenen mittleren Konzentrationsveränderungen.

Tabelle 30: Untersuchung der Stabilität von CP, DCL-CP, 4KetoCP und CarboxyCP in Urinproben (n = 3) nach drei Einfrier- und Auftauzyklen

	QC1	QC2	QC3	QC4
mittlere Abweichung der CP-Konzentration im Vergleich zur Referenzmessung [%]	-1,6	-2,2	-3,1	0,7
mittlere Abweichung der DCL-CP-Konzentration im Vergleich zur Referenzmessung [%]	-2,1	-4,4	-9,1	-4,2
mittlere Abweichung der 4KetoCP-Konzentration im Vergleich zur Referenzmessung [%]	-1,3	2,7	-2,8	14,2
mittlere Abweichung der CarboxyCP-Konzentration im Vergleich zur Referenzmessung [%]	-0,8	0,3	0,7	-5,31

4.2.4.2 Processing-Stabilität

Die Überprüfung der Stabilität der Proben während der Aufarbeitung ergab die in Tabelle 31 angegebenen mittleren Konzentrationsveränderungen nach sechsstündiger Lagerung bei Raumtemperatur gegenüber direkter Probenaufarbeitung.

Tabelle 31: Untersuchung der Stabilität von CP, DCL-CP, 4KetoCP und CarboxyCP in Urinproben (n = 3) während der Probenaufarbeitung

	QC1	QC2	QC3	QC4
mittlere Abweichung der CP-Konzentration im Vergleich zur Referenzmessung [%]	1,6	4,1	5,7	4,2
mittlere Abweichung der DCL-CP-Konzentration im Vergleich zur Referenzmessung [%]	2,1	-7,9	-4,3	-1,1
mittlere Abweichung der 4KetoCP-Konzentration im Vergleich zur Referenzmessung [%]	4,6	4,3	14,1	9,9
mittlere Abweichung der CarboxyCP-Konzentration im Vergleich zur Referenzmessung [%]	-1,1	3,9	-0,3	-9,5

4.2.4.3 Autosampler-Stabilität

Messungen von aufgearbeiteten Proben nach Lagerung im Autosampler bei 5 °C für 18 Stunden zeigten die in Tabelle 32 aufgeführten mittleren Konzentrationsveränderungen gegenüber direkt gemessenen Proben.

Tabelle 32: Untersuchung der Stabilität von CP, DCL-CP, 4KetoCP und CarboxyCP in aufgearbeiteten Urinproben (n = 5) nach Lagerung im Autosampler (18 h) bei 5°C

	QC1	QC2	QC3	QC4
mittlere Abweichung der CP-Konzentration im Vergleich zur Referenzmessung [%]	0,6	0,8	0,1	1,5
mittlere Abweichung der DCL-CP-Konzentration im Vergleich zur Referenzmessung [%]	-6,3	-1,0	-0,3	3,7
mittlere Abweichung der 4KetoCP-Konzentration im Vergleich zur Referenzmessung [%]	-9,7	-3,1	-12,5	2,7
mittlere Abweichung der CarboxyCP-Konzentration im Vergleich zur Referenzmessung [%]	-10,6	-5,5	-9,0	1,5

Sämtliche unter 4.2.4.1 bis 4.2.4.3 gefundenen mittleren Konzentrationsveränderungen lagen innerhalb der Variabilität der Methode (siehe 4.2.2). Somit war die Stabilität der Proben unter den gewählten Bedingungen nachgewiesen.

4.2.5 Gesamtergebnis der Validierung

Insgesamt wurden im Rahmen der Validierung der Methode zur Bestimmung von Cyclophosphamid und seinen Metaboliten im Urin mittels LC-MS/MS die Anforderungen aktueller internationaler Richtlinien [188-192] erfüllt. Das Messverfahren konnte somit für die Quantifizierung der Patientenproben aus der BEACOPP-Studie verwendet werden.

4.3 Ergebnisse der Urinanalytik und der pharmakokinetischen Berechnungen

Die betrachteten Populationen der pharmakokinetischen Berechnungen für PCZ (siehe 4.3.1) und CP (siehe 4.3.2) unterschieden sich dahingehend, dass bei einigen Patienten kein PCZ appliziert wurde, oder in der Dokumentation der Therapie Daten wie z.B. Applikationszeit, Dosis oder Blutentnahmezeiten fehlten. Therapiezyklen mit unzureichender Dokumentation konnten in die jeweiligen Berechnungen nicht einfließen. Die gefundenen Stoffmengen für TAC, CP, 4KetoCP, CarboxyCP und DCL-CP im Urin der BEACOPP-Patienten sind im Anhang aus Tabelle 81 bis Tabelle 85 ersichtlich.

4.3.1 Urinpharmakokinetik von Procarbazin

In Tabelle 33 bis Tabelle 35 sind die demographischen Daten der BEACOPP-Patienten zusammengefasst, die in die pharmakokinetischen Berechnungen für PCZ eingeflossen sind. Angegeben sind neben den arithmetischen Mittelwerten die Mediane sowie die Standardabweichungen und Variationskoeffizienten (CV) als Maß für die Streuung der Werte. Grundlage der statistischen Auswertung waren die Daten von 31 Patienten (20 Männer, 11 Frauen) für den ersten Therapiezyklus, 34 Patienten (23 Männer, 11 Frauen) für den zweiten Zyklus und 26 Patienten (18 Männer, 8 Frauen) für den dritten Zyklus.

Tabelle 33: Demographische Daten der in die Berechnung der Urinpharmakokinetik von Procarbazin eingeschlossenen Patienten im ersten Therapiezyklus [n = 29]

	\bar{x}	\tilde{x}	SD	CV [%]
Alter [Jahre]	35,2	31,0	13,3	37,7
Körpergröße [cm]	176,1	174,0	8,7	4,9
Körpergewicht [kg]	73,1	72,0	14,5	19,9
KOF [m ²]	2,55	1,87	3,71	145,7
BMI [kg/m ²]	23,40	22,39	3,89	16,6
ThromboDiff [%]	-25,3	-23,9	27,1	107,0
Kreatinin (Plasma) [mg/dl]	0,67	0,66	0,13	18,9
KreaCl [ml/min]	125,6	116,0	48,6	38,7

Tabelle 34: Demographische Daten der in die Berechnung der Urinpharmakokinetik von Procarbazin eingeschlossenen Patienten im zweiten Therapiezyklus [n = 34]

	\bar{x}	\tilde{x}	SD	CV [%]
Alter [Jahre]	35,4	32,0	12,6	35,6
Körpergröße [cm]	176,1	175,0	7,5	4,2
Körpergewicht [kg]	72,5	70,4	13,1	18,1
KOF [m ²]	2,48	1,88	3,48	140,7
BMI [kg/m ²]	23,35	22,30	3,90	16,7
ThromboDiff [%]	-14,0	-13,7	35,6	255,2
Kreatinin (Plasma) [mg/dl]	0,73	0,74	0,12	16,9
KreaCl [ml/min]	116,7	117,9	39,2	33,6

Tabelle 35: Demographische Daten der in die Berechnung der Urinpharmakokinetik von Procarbazin eingeschlossenen Patienten im dritten Therapiezyklus [n = 26]

	\bar{x}	\tilde{x}	SD	CV [%]
Alter [Jahre]	34,0	32,0	11,5	33,8
Körpergröße [cm]	175,6	174,0	8,0	4,5
Körpergewicht [kg]	73,1	72,3	13,0	17,8
KOF [m ²]	2,65	1,88	3,96	149,4
BMI [kg/m ²]	23,67	22,89	3,87	16,4
ThromboDiff [%]	-10,0	-5,4	35,0	348,9
Kreatinin (Plasma) [mg/dl]	0,76	0,80	0,15	19,9
KreaCl [ml/min]	125,0	118,6	43,8	35,0

Bei der Bestimmung der prozentualen renalen Elimination von PCZ in Form von TAC ergaben sich für die untersuchten Therapiezyklen die in Tabelle 36 dargestellten prozentualen PCZ-Ausscheidung. Eine graphische Darstellung der prozentualen PCZ-Ausscheidung, gruppiert nach Geschlecht und Therapiezyklus, zeigt Abbildung 34. Die im Urin bestimmten TAC-Stoffmengen für die einzelnen Patienten sind in Tabelle 81 im Anhang aufgelistet.

Tabelle 36: Prozentuale PCZ-Ausscheidung während der untersuchten Therapiezyklen

	\bar{x}	\tilde{x}	SD	CV [%]
1.Zyklus	39,4	36,2	16,9	42,9
2.Zyklus	37,0	37,3	11,0	29,8
3.Zyklus	40,5	37,0	11,7	28,9

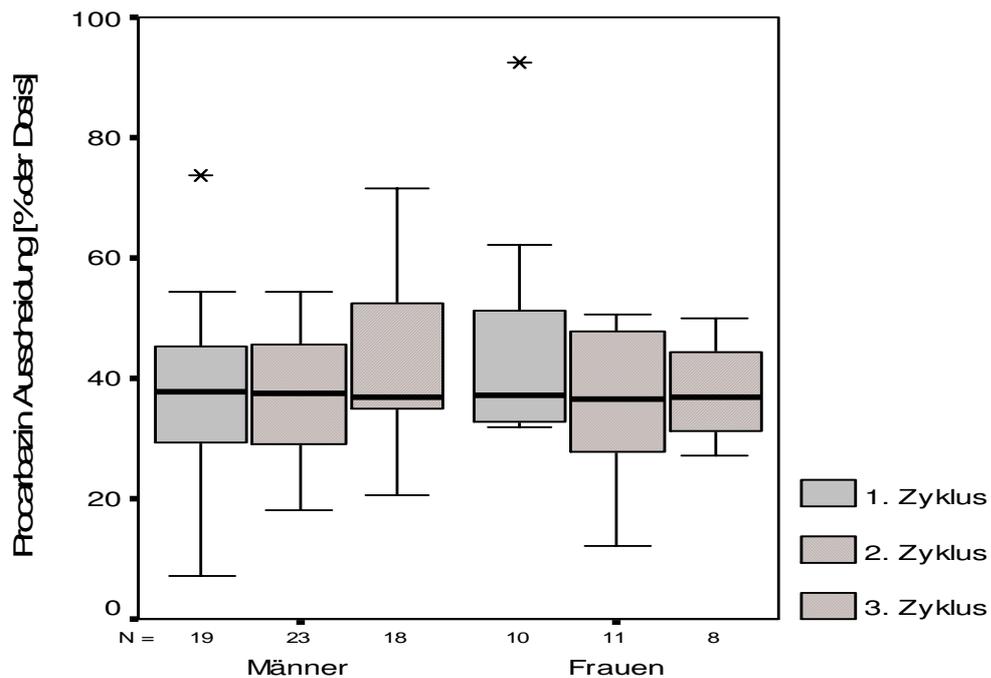


Abbildung 34: Procentuale PCZ-Ausscheidung AUS_{PCZ}, gruppiert nach Geschlecht und Therapiezyklus

4.3.2 Urinpharmakokinetik von Cyclophosphamid

Tabelle 37 bis Tabelle 39 zeigen zusammenfassend die demographischen Daten der BEACOPP-Patienten, die in die pharmakokinetischen Berechnungen für Cyclophosphamid eingeflossen sind. Insgesamt wurden 87 Therapiezyklen von 29 Patienten (21 Männer, 8 Frauen) berücksichtigt.

Tabelle 37: Demographische Daten der in die Berechnung der Urinpharmakokinetik von Cyclophosphamid eingeschlossenen 29 Patienten im ersten Therapiezyklus

	\bar{x}	\tilde{x}	SD	CV [%]
Alter [Jahre]	33,3	31,0	12,0	36,0
Körpergröße [cm]	177,1	177,0	7,2	4,0
Körpergewicht [kg]	74,4	72,4	13,0	17,5
KOF [m ²]	1,91	1,89	0,18	9,6
BMI [kg/m ²]	23,63	22,31	3,90	16,5
ThromboDiff [%]	-31,7	-29,7	29,5	93,0
Kreatinin (Plasma) [mg/dl]	0,68	0,68	0,1	17,1
KreaCl [ml/min]	134,7	120,7	47,2	35,0

Tabelle 38: Demographische Daten der in die Berechnung der Urinpharmakokinetik von Cyclophosphamid eingeschlossenen 29 Patienten im zweiten Therapiezyklus

	\bar{x}	\tilde{x}	SD	CV [%]
Alter [Jahre]	33,5	31,5	11,9	35,6
Körpergröße [cm]	177,6	179,0	7,0	4,0
Körpergewicht [kg]	74,5	73,4	12,6	16,9
KOF [m ²]	1,92	1,91	0,18	9,4
BMI [kg/m ²]	23,62	22,61	3,86	16,4
ThromboDiff [%]	-11,5	-13,4	37,4	326,8
Kreatinin (Plasma) [mg/dl]	0,75	0,77	0,1	15,9
KreaCl [ml/min]	118,2	123,5	39,1	33,1

Tabelle 39: Demographische Daten der in die Berechnung der Urinpharmakokinetik von Cyclophosphamid eingeschlossenen 29 Patienten im dritten Therapiezyklus

	\bar{x}	\tilde{x}	SD	CV [%]
Alter [Jahre]	33,3	31,0	11,8	35,3
Körpergröße [cm]	177,3	178,0	7,1	4,0
Körpergewicht [kg]	74,5	74,0	12,3	16,6
KOF [m ²]	1,92	1,92	0,18	9,4
BMI [kg/m ²]	23,69	22,94	3,69	15,6
ThromboDiff [%]	-10,1	-6,6	33,3	329,8
Kreatinin (Plasma) [mg/dl]	0,75	0,76	0,2	20,5
KreaCl [ml/min]	122,2	118,1	42,9	35,1

Bei der Bestimmung der renalen Ausscheidung von unverändertem CP bzw. in Form der Metabolite DCL-CP, 4KetoCP und CarboxyCP ergaben sich für die untersuchten Therapiezyklen die in Tabelle 40 bis Tabelle 43 dargestellten Werte für die partiellen prozentualen Ausscheidungen. Die im Urin bestimmten Stoffmengen für die einzelnen Patienten sind in Tabelle 81 im Anhang aufgelistet.

Tabelle 40: Prozentuale renale Ausscheidung von CP in unveränderter Form während der untersuchten Therapiezyklen

	\bar{x}	\tilde{x}	SD	CV [%]
1.Zyklus	21,8	21,8	8,4	38,3
2.Zyklus	21,6	20,0	9,3	42,9
3.Zyklus	21,0	19,3	6,9	32,9

Tabelle 41: Prozentuale renale Ausscheidung von CP in Form von DCL-CP während der untersuchten Therapiezyklen

	\bar{x}	\tilde{x}	SD	CV [%]
1.Zyklus	1,50	0,92	1,52	101,9
2.Zyklus	1,40	0,74	1,62	115,6
3.Zyklus	1,51	1,00	1,36	90,1

Tabelle 42: Prozentuale renale Ausscheidung von CP in Form von 4KetoCP während der untersuchten Therapiezyklen

	\bar{x}	\tilde{x}	SD	CV [%]
1.Zyklus	1,54	1,61	0,67	43,5
2.Zyklus	1,65	1,50	0,73	44,1
3.Zyklus	1,71	1,53	0,71	41,2

Tabelle 43: Prozentuale renale Ausscheidung von CP in Form von CarboxyCP während der untersuchten Therapiezyklen

	\bar{x}	\tilde{x}	SD	CV [%]
1.Zyklus	8,53	0,53	13,80	161,7
2.Zyklus	10,59	0,88	13,57	128,1
3.Zyklus	11,21	1,38	13,42	119,7

In Abbildung 35 bis Abbildung 39 sind die prozentuale Gesamtwiederfindung im Urin, sowie die partielle prozentuale renale Ausscheidung für CP, DCL-CP, 4KetoCP und CarboxyCP graphisch dargestellt. Hierbei kennzeichnen die Stern-Symbole einzelne Ausreisser.

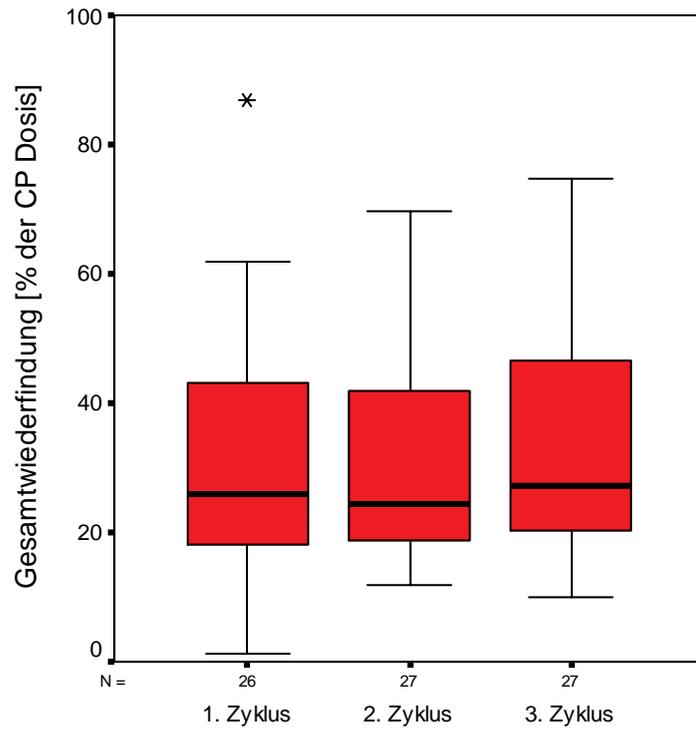


Abbildung 35: Gesamtwiederfindung von CP im Urin

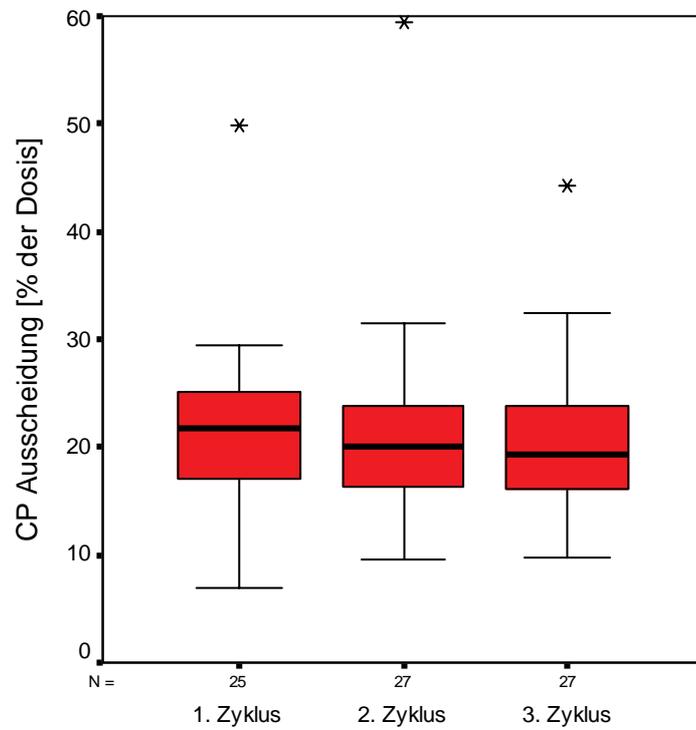


Abbildung 36: Prozentuale renale Ausscheidung von CP in unveränderter Form

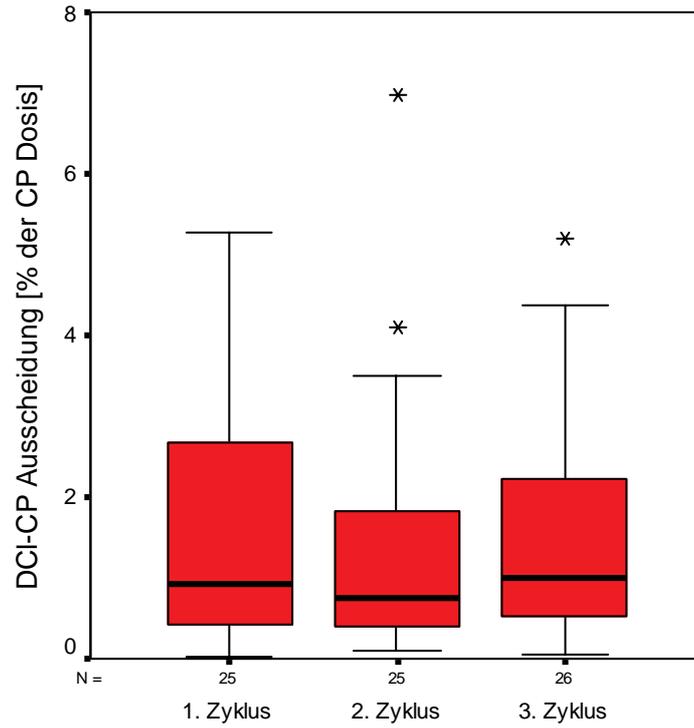


Abbildung 37: Prozentuale renale Ausscheidung von CP in Form von DCL-CP

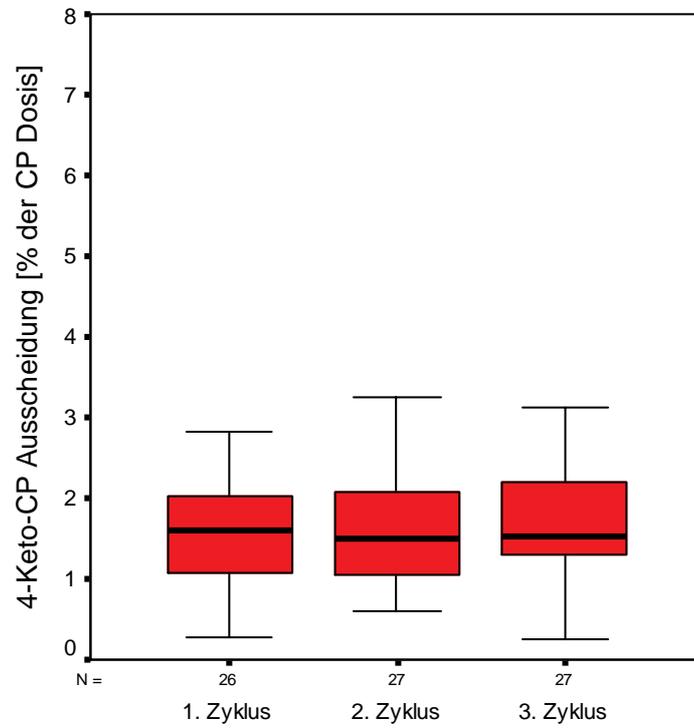


Abbildung 38: Prozentuale renale Ausscheidung von CP in Form von 4KetoCP

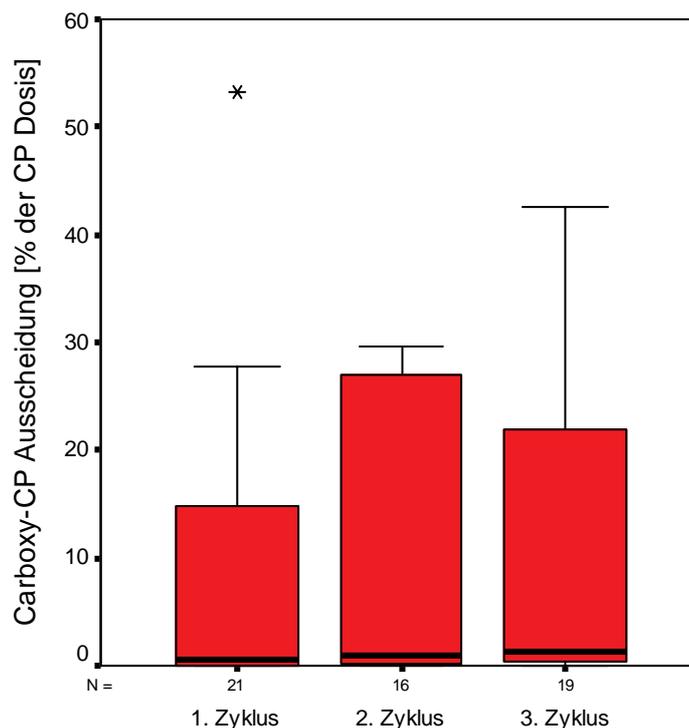


Abbildung 39: Prozentuale renale Ausscheidung von CP in Form von CarboxyCP

Die Beschreibung der experimentell ermittelten Daten gelang am besten durch ein Sechs-Kompartiment-Modell (siehe Abbildung 25 unter 3.5.2) mit gleichzeitiger Analyse von Plasma- und Urinpharmakokinetik mit interindividueller Variabilität für die Zwischenkompartiment-Clearance k_{12} (CP_{Plasma} zu AldoCP/4OH- CP_{Plasma}), die Ausscheidungsratekonstante k_{14} (CP_{Plasma} zu DCL- CP_{Urin}) und das apparente zentrale Verteilungsvolumen Vd_1 . Hierbei berechnen sich die individuellen pharmakokinetischen Parameter wie folgt:

$$AUSS_{CP} = 1,62 - (HT - 177) \cdot (0,0163) + (C_{\text{Albumin}} - 38,2) \cdot 0,0195 \quad [10^{-3} \text{ min}^{-1}]$$

$$k_{12} = 0,0667 \cdot e^{\eta(1)} \quad [10^{-3} \text{ min}^{-1}]$$

$$k_{13} = 0,384 \quad [10^{-3} \text{ min}^{-1}]$$

$$k_{14} = 0,0380 \cdot e^{\eta(2)} \quad [10^{-3} \text{ min}^{-1}]$$

$$k_{25} = 1,009 \quad [10^{-3} \text{ min}^{-1}]$$

$$k_{26} = 0,106 \quad [10^{-3} \text{ min}^{-1}]$$

$$K_{10} = AUSS_{CP} - k_{12} - k_{13} - k_{14} \quad [10^{-3} \text{ min}^{-1}]$$

$$Vd_1 = 42,6 \cdot e^{\eta(3)} \quad [l]$$

mit HT = Körpergröße in cm, C_{Albumin} = Albuminkonzentration im Serum in g/l

Dabei sind die dimensionslosen *random effects* $\eta(1)$, $\eta(2)$ und $\eta(3)$ um Null normalverteilt mit einer Varianz von 0,245, 0,407 bzw. 0,074. Sie spiegeln die individuelle Variabilität der pharmakokinetischen Parameter wider.

Tabelle 44 bis Tabelle 47 zeigen die mittels des Sechs-Kompartiment-Modells berechneten pharmakokinetischen Parameter für Cyclophosphamid. Angegeben sind neben geometrischen Mittelwerten die Mediane und die geometrischen Variationskoeffizienten CV_{Geo} als Streuungsmaß. In Tabelle 44 sind die ermittelten Werte für die Ausscheidungsratenkonstanten angegeben, die innerhalb des pharmakokinetischen Modells nicht variieren.

Tabelle 44: Während aller drei Therapiezyklen feste, pharmakokinetische Parameter für Cyclophosphamid

Parameter	k_{13}	k_{25}	k_{26}
ermittelter Wert [10^{-3} min^{-1}]	0,384	1,009	0,106

Tabelle 45: Pharmakokinetische Parameter für Cyclophosphamid im ersten Therapiezyklus [n = 29]

	\bar{x}_{Geo}	\tilde{x}	$CV_{Geo} [\%]$
$k_{10} [10^{-3} \text{ min}^{-1}]$	0,699	0,744	47,7
$k_{12} [10^{-3} \text{ min}^{-1}]$	0,496	0,458	36,1
$k_{14} [10^{-3} \text{ min}^{-1}]$	0,032	0,027	45,2
$Vd_1 [l]$	45,2	43,9	23,1
$AUSS_{CP} [10^{-3} \text{ min}^{-1}]$	1,610	1,606	8,9
$AUC_{normiert} [\text{mg}\cdot\text{h}/\text{l}\cdot\text{g CP}]^1$	236	231	23,5
$Cl_{gesamt} (CP) [\text{ml}/\text{min}]$	70,7	72,3	23,5
$Cl_{renal} (CP) [\text{ml}/\text{min}]$	16,9	16,9	23,1
$Cl_{metabol} (DCL-CP) [\text{ml}/\text{min}]$	1,27	1,21	49,4

¹ Die AUC wurde auf die applizierte Cyclophosphamid-Dosis normiert, da ein linearer Zusammenhang zwischen AUC und Dosis zu vermuten ist.

**Tabelle 46: Pharmakokinetische Parameter für Cyclophosphamid im zweiten Therapiezyklus
[n = 29]**

	\bar{x}_{Geo}	\tilde{x}	CV _{Geo} [%]
k_{10} [10^{-3} min ⁻¹]	0,728	0,780	36,0
k_{12} [10^{-3} min ⁻¹]	0,498	0,458	35,3
k_{14} [10^{-3} min ⁻¹]	0,032	0,027	44,8
Vd ₁ [l]	45,5	45,0	23,4
AUSS _{CP} [10^{-3} min ⁻¹]	1,642	1,660	7,3
AUC _{normiert} [mg·h/l·g CP]	229	227	21,9
Cl _{gesamt} (CP) [ml/min]	72,7	73,3	21,9
Cl _{renal} (CP) [ml/min]	17,0	17,3	23,4
Cl _{metabol} (DCL-CP) [ml/min]	1,28	1,21	48,2

**Tabelle 47: Pharmakokinetische Parameter für Cyclophosphamid im dritten Therapiezyklus
[n = 29]**

	\bar{x}_{Geo}	\tilde{x}	CV _{Geo} [%]
k_{10} [10^{-3} min ⁻¹]	0,647	0,713	59,2
k_{12} [10^{-3} min ⁻¹]	0,467	0,454	35,6
k_{14} [10^{-3} min ⁻¹]	0,029	0,026	45,2
Vd ₁ [l]	44,1	44,6	23,0
AUSS _{CP} [10^{-3} min ⁻¹]	1,604	1,627	9,3
AUC _{normiert} [mg·h/l·g CP]	234	230	23,8
Cl _{gesamt} (CP) [ml/min]	71,2	72,6	23,8
Cl _{renal} (CP) [ml/min]	17,0	17,1	23,0
Cl _{metabol} (DCL-CP) [ml/min]	1,25	1,17	48,7

4.3.3 Kovarianzanalysen

4.3.3.1 Procarbazin

Die Kovarianzanalyse für Procarbazin zeigte eine signifikante ($p < 0,001$) lineare Abhängigkeit der prozentualen PCZ-Ausscheidung AUS_{PCZ} von der Kreatinin-

Clearance KreaCl in Verbindung mit dem Geschlecht. Der Versuch, weitere Einflussfaktoren in das Modell einzubeziehen, brachte keine signifikante Verbesserung der Korrelation für ein Niveau von $p < 0,05$. Mittels eines allgemeinen linearen Modells (siehe Formel 13) ließ sich innerhalb der Studienpopulation 16 % der Variabilität von $AUSS_{PCZ}$ erklären. Die Ergebnisse der Kovarianzanalyse zeigen Tabelle 48 und Tabelle 49.

Formel 13: Abhängigkeit der prozentualen PCZ-Ausscheidung von Geschlecht und Kreatinin-Clearance

$$AUSS_{PCZ} [\%] = \text{konstanter Term} + x_{KreaCl/Geschlecht} \bullet \text{KreaCl}$$

Tabelle 48: Ergebnisse der Kovarianzanalyse für Procarbazin

Einflussfaktor	Freiheitsgrade	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
konstanter Term	1	4116,4	34,92	< 0,001
Geschlecht • KreaCl	2	931,4	7,90	< 0,001
Fehler	81	117,9	-	-

Tabelle 49: Parameterschätzer der Einflussfaktoren aus Kovarianzanalyse für Procarbazin

Einflussfaktor		Symbol in Formel 13	Schätzer	95 % Konfidenzintervall	
				Untergrenze	Obergrenze
		konstanter Term	23,98	15,90	32,05
Geschlecht • KreaCl (pro ml/min)	m	$X_{KreaCl/Geschlecht}$	0,114	0,057	0,172
	w		0,156	0,064	0,247

4.3.3.2 Cyclophosphamid

Bei der Entwicklung des Sechs-Kompartiment-Modells (siehe Abbildung 25) zeigte die Gesamtausscheidungsratekonstante von Cyclophosphamid ($AUSS_{CP}$) eine signifikante Abhängigkeit sowohl von der Körpergröße als auch von der Albumin-

Konzentration im Plasma. Weitere signifikante ($p < 0,05$) Einflussfaktoren konnten nicht ermittelt werden. Tabelle 50 zeigt das Ergebnis der Kovarianzanalyse.

Tabelle 50: Ergebnis der Kovarianzanalyse für Cyclophosphamid

Abhängige Variable	Einflussfaktor	Art der Korrelation	Signifikanz
AUSS _{CP}	Körpergröße	linear	$p < 0,0001$
AUSS _{CP}	Albumin im Plasma	linear	$p = 0,0135$

4.3.4 Pharmakokinetik-Pharmakodynamik-Analyse

Der Thrombozytenabfall vom ersten bis zum achten Therapietag zeigte im untersuchten Patientenkollektiv eine signifikante lineare Abhängigkeit sowohl von der applizierten CP-Dosis (CP_{appl}) in Verbindung mit dem Geschlecht als auch von der aus dem populationspharmakokinetischen Ansatz gefundenen Ausscheidungsratekonstante k_{14} .

Unter Einbeziehung der experimentell bestimmten prozentualen Wiederfindungsraten der untersuchten Zytostatika bzw. ihrer Metabolite im Urin konnte eine hochsignifikante lineare Abhängigkeit des Thrombozytenabfall von den Einflussfaktoren applizierte CP-Dosis (CP_{appl}) in Verbindung mit dem Geschlecht und der renalen Ausscheidung von CP in Form des Metaboliten DCL-CP ($DCL-CP_{ren}$) gefunden werden.

Mittels eines allgemeinen linearen Modells (siehe Formel 14) konnten innerhalb der Studienpopulation 43 % der Variabilität der Hämatotoxizität ($p < 0,000005$) erklärt werden. Die Ergebnisse der Pharmakokinetik-Pharmakodynamik-Analyse sind in Tabelle 51 zusammengefasst.

Tabelle 51: Ergebnisse der Pharmakokinetik-Pharmakodynamik-Analyse

Einflussfaktor	Freiheitsgrade	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
konstanter Term	1	8885	11,97	0,00108
Geschlecht • CP_{appl}	2	10756	14,49	0,00001
$DCL-CP_{ren}$	1	11067	14,91	0,00309
Fehler	53	742	-	-

Unter Anwendung der Formel 11 (siehe Seite 63) kann der Abfall der Thrombozytenzahl vom ersten bis zum achten Therapietag mittels der Formel 14 vorhergesagt werden. Hierbei ergeben sich je nach Geschlecht unterschiedliche Werte für $X_{\text{Dosis/Geschlecht}}$. Die Parameterschätzer aus der Pharmakokinetik-Pharmakodynamik-Analyse sind in Tabelle 52 aufgeführt.

Formel 14: Vorhersage des Thrombozytenabfalls vom ersten bis zum achten Therapietag

$$\text{ThromboDiff [\%]} = \text{konstanter Term} + X_{\text{Dosis/Geschlecht}} \cdot \text{CP}_{\text{appl}} + X_{\text{DCL-CP}} \cdot \text{DCL-CP}_{\text{ren}}$$

Tabelle 52: Parameterschätzer der Einflussfaktoren aus der Pharmakokinetik-Pharmakodynamik-Analyse

Einflussfaktor		Symbol in Formel 14	Schätzer	95 % Konfidenzintervall	
				Untergrenze	Obergrenze
		konstanter Term	49,83	20,95	78,72
Geschlecht • CP_{appl} (pro mg CP)	m	$X_{\text{Dosis/Geschlecht}}$	-0,0250	-0,0394	-0,0166
	w		-0,0473	-0,0656	-0,0291
DCL-CP _{ren}		$X_{\text{DCL-CP}}$	-8,98	-13,65	-4,32

4.4 Bestimmung der Induktion des Cytochrom P450 3A4 durch Cyclophosphamid in Leberschnitten

4.4.1 Validierung der Methode zur Bestimmung von 1'OH-Midazolam im Inkubationsmedium

4.4.1.1 Linearität und untere Quantifizierungsgrenze

Für den Midazolam-Metaboliten 1'OH-Midazolam (1'OH-MID) wurde über den gesamten Kalibrationsbereich (1 nM- 30 µM) eine lineare Abhängigkeit der Form $y = a \cdot x + b$ zwischen Substanzgehalt (x) und der Peakfläche (y) gefunden.

Die maximalen Abweichungen vom Sollwert lagen bei den gemessenen Validierungsproben (QC1 bis QC4) über den gesamten Kalibrationsbereich unter 15 %

(siehe 4.4.1.2). Die untere Quantifizierungsgrenze, an der 1'OH-MID im Inkubationsmedium noch mit akzeptabler Präzision und Richtigkeit bestimmt werden konnte, lag bei 1 nM.

Abbildung 40 zeigt exemplarisch eine Kalibrationsgerade für 1'OH-MID, die im Rahmen der Validierung erhalten wurde. Ausgefüllte Quadrate stellen hierbei Datenpunkte dar, die in die Berechnung der Kalibrationskurve eingegangen sind. Ausgeschlossene Datenpunkte sind durch offene Quadrate gekennzeichnet.

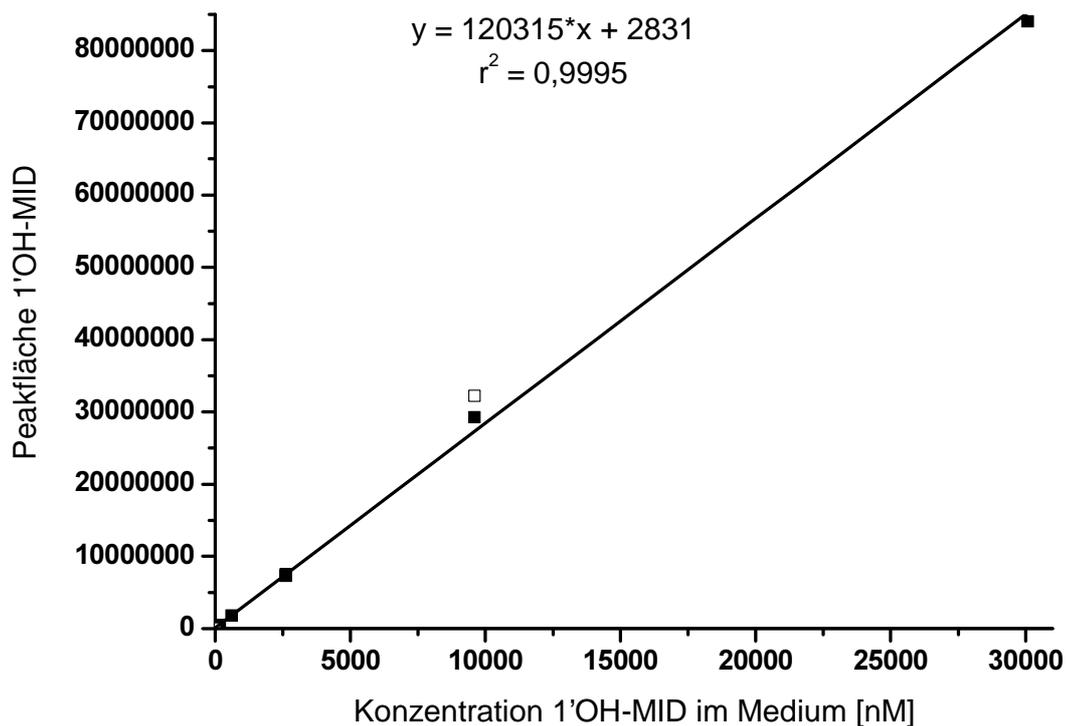


Abbildung 40: Kalibrierungskurve für 1'OH-MID

4.4.1.2 Präzision und Richtigkeit

Die Bestimmung der Präzision und Richtigkeit der Methode innerhalb eines Tages erfolgte über den gesamten für die Inkubationsproben (siehe 3.6.2) zu erwartenden Konzentrationsbereich. Hierzu wurden für alle Konzentrationsstufen der QCs jeweils fünf Proben aufgearbeitet und gemessen. Die Variabilität innerhalb eines Tages ist aus Tabelle 53 ersichtlich. Die Einzelmesswerte zeigt Tabelle 89 im Anhang.

Tabelle 53: Richtigkeit und Präzision der Messungen von 1'OH-MID-Konzentrationen in angereichertem Williams' E-Medium innerhalb eines Tages

	<i>intra-day-accuracy</i> [%]				<i>CV intra-day-precision</i> [%]			
	QC1	QC2	QC3	QC4	QC1	QC2	QC3	QC4
	-6,7	1,2	-7,3	-1,9	10,1	0,9	4,9	8,3

4.4.1.3 Stabilität

Die Überprüfung der Stabilität der Proben während der Aufarbeitung bzw. nach Lagerung im Autosampler bei 5 °C ergab die in Tabelle 54 angegebenen Konzentrationsveränderungen gegenüber den Referenzproben.

Tabelle 54: Untersuchung der Stabilität von 1'OH-MID-Konzentrationen in angereichertem Williams' E-Medium während der Probenaufarbeitung (n = 3) bzw. nach sechsstündiger Lagerung im Autosampler bei 5°C (n = 3)

	QC1	QC2	QC3	QC4
Veränderung der 1'OH-MID-Konzentration während der Probenaufarbeitung [%]	6,9	9,8	2,1	0,8
Veränderung der 1'OH-MID-Konzentration während der Lagerung im Autosampler [%]	-7,3	4,2	4,7	-7,6

Die nachgewiesenen Konzentrationsveränderungen liegen innerhalb der Variabilität der Methode (siehe 4.4.1.2). Somit ist die Stabilität der Proben unter den untersuchten Bedingungen gegeben.

4.4.1.4 Gesamtergebnis der Validierung

Die Anforderungen aktueller internationaler Richtlinien [188-192] wurden im Rahmen der Validierung der Methode zur Bestimmung von 1'OH-Midazolam im Inkubationsmedium mittels LC-MS/MS erfüllt. Das Messverfahren ist somit unter den getesteten Bedingungen als valide zu betrachten und konnte für die Quantifizierung der Inkubationsproben aus dem Induktionsversuch verwendet werden.

4.4.2 Ergebnisse der Inkubation von Midazolam mit Schweineleberschnitten

Die Konzentrationen des Midazolam-Metaboliten 1'OH-MID in den Inkubationsmedien aus dem Induktionsversuch (Messwerte siehe Tabelle 90 im Anhang) lagen für sämtliche Proben mit einer Inkubationszeit von weniger als sechs Stunden unterhalb der Quantifizierungsgrenze. Somit konnten für diese Proben keine 1'OH-MID-Bildungsraten bestimmt werden.

Abbildung 41 zeigt für Schweineleber A die Bildung von 1'OH-MID aus MID pro mg Leber nach Präinkubation mit und ohne CP, bzw. nach gleichzeitiger Gabe von CP und MID nach einer Inkubationszeit von sechs und zehn Stunden. Die entsprechenden Bildungsraten für Schweineleber B sind aus Abbildung 42 ersichtlich.

Im Wesentlichen wurden für beide Lebern vergleichbare Ergebnisse erhalten. Im Vergleich zu den Kontrollproben ohne vorherige Präinkubation mit CP ergaben sich bei den mit CP (250 μ M) für zwölf Stunden präinkubierten Proben von Leber A sechs Stunden Inkubation eine um 102 % bzw. nach zehn Stunden eine um 134 % gesteigerte Bildungsrate. Bei Verwendung von Leber B waren die Bildungsraten im Vergleich zu den Kontrollproben nach sechs Stunden Inkubation um 92 % und nach zehn Stunden um 24 % erhöht.

Bei zeitgleicher Zugabe von CP und MID (ohne Präinkubation) erfolgte im Vergleich zur Kontrollinkubation ebenfalls ein gesteigerter Umsatz des Substrats. Hier wurde die Bildung von 1'OH-MID in Leber A nach sechsständiger Inkubation um 93 % bzw. nach zehnstündiger Inkubation um 34 % verstärkt. Für Leber B lagen die entsprechenden Umsatzraten 27 % (sechs Stunden Inkubation) bzw. 9 % (zehn Stunden Inkubation) über denen der Kontrollproben.

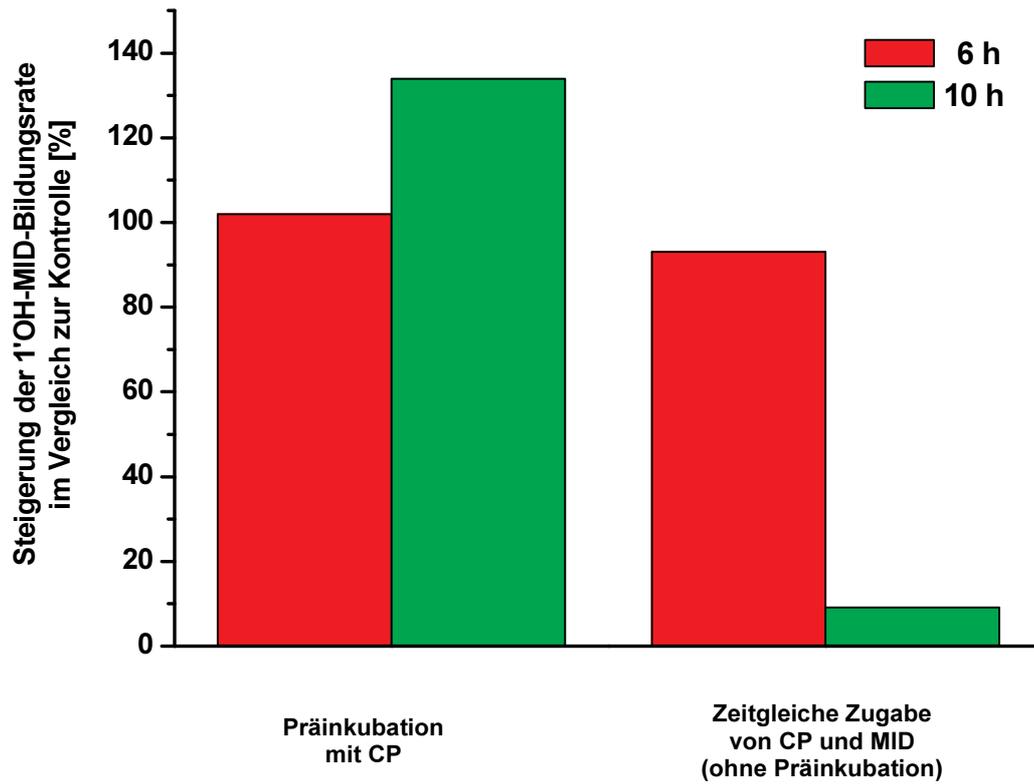


Abbildung 41: 1'OH-MID-Bildungsrate aus MID nach 6 h und 10 h Inkubation in Leber A

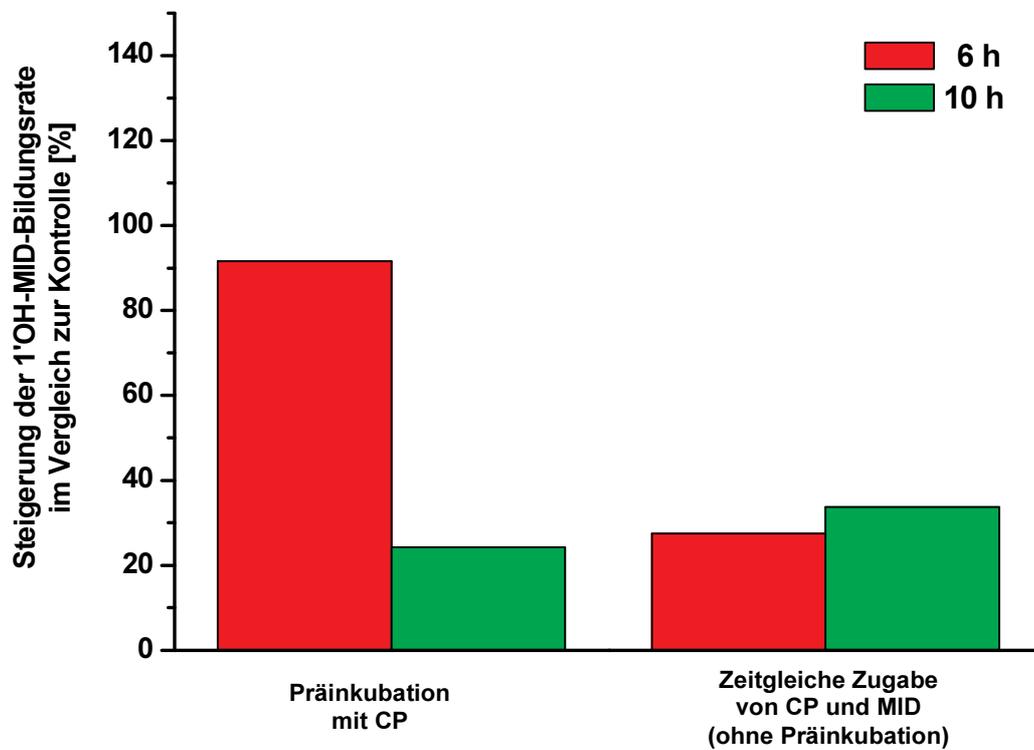


Abbildung 42: 1'OH-MID-Bildungsrate aus MID nach 6 h und 10 h Inkubation in Leber B

4.5 Validierung der Methode zur Bestimmung von Midazolam im Humanplasma

4.5.1 Linearität und untere Quantifizierungsgrenze

Linearität der Kalibrationskurve war bei der Bestimmung von Midazolam im Humanplasma lediglich im unteren und mittleren Kalibrationsbereich gegeben, da sich das Signal für die oberen Kalibrationsprobe (EP1) bereits im Sättigungsbereich des Detektors befand. Daher wurde an die experimentellen Daten eine gewichtete quadratische Kalibrierungskurve mit Wichtung auf $1/\text{Konzentration}^2$ angepasst, so dass sich ein Zusammenhang der Form $y = a \cdot x + b \cdot x^2 + c$ zwischen der Peakfläche (y) und dem Substanzgehalt (x) über den gesamten unter 3.7.5.1 angegebenen Kalibrationsbereich ergab. Abbildung 40 zeigt exemplarisch eine Kalibrationskurve für MID im Plasma, die im Rahmen der Validierung erhalten wurde. Ausgefüllte Quadrate kennzeichnen Datenpunkte, die in die Berechnung der Kalibrationskurve eingegangen sind, während ausgeschlossene Datenpunkte durch offene Quadrate dargestellt sind.

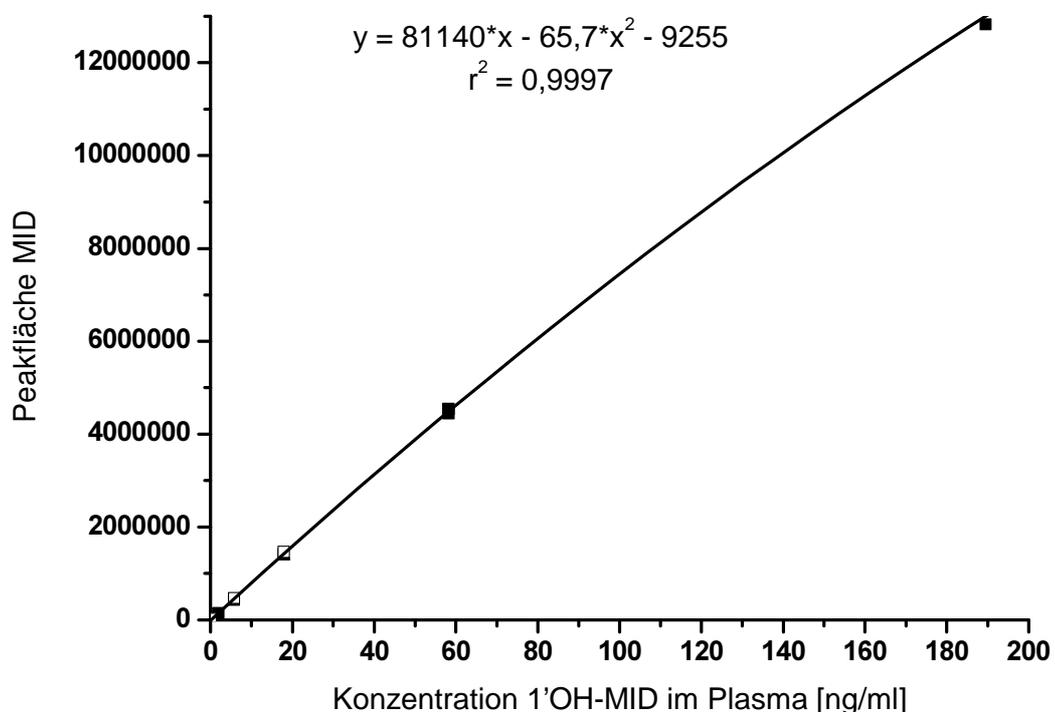


Abbildung 43: Kalibrationskurve für MID im Plasma

Die maximalen Abweichungen vom Sollwert lagen bei den gemessenen Validierungsproben der QC-Konzentrationsstufen QC1 bis QC2 immer unter den geforderten 15 %. Für QC3 überstieg die *inter-day-precision* zweimal und die *intra-day-accuracy* einmal die 15 %-Grenze, blieb jedoch unter der 20 %-Grenze. Die Ergebnisse für QC4 zeigten ähnliche Variabilitäten. Daher wurde die untere Quantifizierungsgrenze für MID zu 0,44 ng/ml bestimmt. Die gefundenen Abweichungen sind in Kapitel 4.5.2 aufgeführt. Die Einzelmesswerte zeigen Tabelle 92 bis Tabelle 95 im Anhang.

4.5.2 Präzision und Richtigkeit

Die Bestimmung der Präzision und Richtigkeit der Methode erfolgte über den gesamten Kalibrationsbereich. Hierzu wurden an fünf verschiedenen Tagen jeweils fünf Proben aufgearbeitet und gemessen. Somit wurden insgesamt fünf *inter-day assays* durchgeführt, die jeweils die Charakteristik eines *intra-day-assays* besaßen. Die Variabilitäten innerhalb eines Tages und zwischen verschiedenen Tagen zeigen die Daten in Tabelle 55 und Tabelle 56. Die Einzelmesswerte sind im Anhang in Tabelle 92 bis Tabelle 95 aufgeführt.

Tabelle 55: Richtigkeit und Präzision der Messungen von MID-Konzentrationen in angereicherten Plasmaproben innerhalb eines Tages [n = 5x5]

	<i>intra-day-accuracy</i> [%]				<i>CV intra-day-precision</i> [%]			
	QC1	QC2	QC3	QC4	QC1	QC2	QC3	QC4
Tag 1	2,99	3,44	15,63	1,21	3,53	5,00	6,63	7,60
Tag 2	0,77	1,49	-8,16	-10,20	4,13	6,64	11,51	7,14
Tag 3	1,46	-6,02	-11,43	-2,02	3,75	8,66	9,19	6,17
Tag 4	11,16	0,17	-5,22	1,96	8,69	10,97	5,80	9,63
Tag 5	6,23	6,69	-13,57	-16,00	5,21	8,51	10,06	12,39
Gesamt- bewertung	2,99	3,44	-11,43	-2,02	4,13	8,51	9,19	7,60

Tabelle 56: Richtigkeit und Präzision der Messungen von MID-Konzentrationen in angereicherten Plasmaproben an verschiedenen Tagen

	<i>inter-day-accuracy</i> [%]				<i>CV inter-day-precision</i> [%]			
	QC1	QC2	QC3	QC4	QC1	QC2	QC3	QC4
Probe A	5,73	7,73	-2,77	-3,73	1,14	4,32	17,76	11,02
Probe B	5,84	5,71	-7,25	-8,47	3,22	3,70	17,95	9,61
Probe C	8,49	2,01	-3,46	-0,39	8,69	9,62	12,67	14,12
Probe D	5,64	-1,88	0,16	-2,88	7,12	9,12	14,07	5,91
Probe E	-3,08	-7,70	-6,68	-9,59	2,10	8,48	9,19	13,55
Gesamt- bewertung	5,73	5,71	-3,46	-3,73	3,22	8,48	14,07	11,02

4.5.3 Wiederfindung

Die Wiederfindungsrate des Analyten MID aus Plasma wurde im Vergleich zu reinen Lösungen für eine hohe (182 ng/ml) und eine niedrige (0,420 ng/ml) MID-Konzentration bestimmt. Parallel zu angereicherten Plasmaproben (siehe 3.7.5.2) wurden Referenzlösungen der Analyten mit gleicher Konzentration in einer Lösung aus 1 mM Ammoniumacetatpuffer (pH 3,6) und ACN [60:40] (V:V) angesetzt und vermessen. Die Recovery betrug 87,5 % für die hohe und 91,5 % für die niedrige MID-Konzentration.

Da diese Werte im Bereich der Variabilität der Methode (siehe 4.5.2) liegen, ist ein Verlust des Analyten aufgrund von durch das Plasma verursachten Matrix-Effekte nicht nachweisbar.

4.5.4 Stabilität

Die Überprüfung der Stabilität der Proben während der Aufarbeitung, nach Lagerung für 18 Stunden im Autosampler bei 5 °C, nach drei Einfrier- und Auftauzyklen bzw. nach einmonatiger Lagerung bei -70 °C ergab die in Tabelle 57 angegebenen Konzentrationsveränderungen gegenüber den Referenzproben.

Tabelle 57: Untersuchung der Stabilität von MID-Konzentrationen in angereichertem Plasma während der Probenaufarbeitung [n = 3], nach Lagerung im Autosampler bei 5 °C [n = 3], nach drei Einfrier- und Auftauzyklen [n = 3] bzw. nach einmonatiger Lagerung bei -70 °C [n=4]

	QC1	QC2	QC3
mittlere Veränderung der MID-Konzentration während der Probenaufarbeitung [%]	4,08	3,13	1,69
mittlere Veränderung der MID-Konzentration während der Lagerung im Autosampler [%]	-8,80	-5,05	-9,37
mittlere Veränderung der MID-Konzentration nach drei Einfrier- und Auftauzyklen [%]	0,10	3,55	9,52
mittlere Veränderung der MID-Konzentration während der einmonatigen Lagerung bei -70 °C [%]	+2,00	n.d.	+15,66

Die gefundenen Konzentrationsveränderungen liegen innerhalb der Variabilität der Methode (siehe 4.5.2). Somit ist die Stabilität der Proben unter den untersuchten Bedingungen gegeben.

4.5.5 Gesamtergebnis der Validierung

Insgesamt wurden im Rahmen der Validierung der Methode zur Bestimmung von Midazolam im Humanplasma sämtliche Anforderungen aktueller internationaler Richtlinien [188-192] erfüllt. Das Messverfahren kann somit für die Quantifizierung von Plasmaproben aus klinischen Studien verwendet werden.

5 Diskussion

Die Pharmakokinetik vieler im Rahmen einer Polychemotherapie verabreichten Zytostatika unterscheidet sich deutlich zwischen einzelnen Patienten [101]. Dazu trägt neben tumor- und therapiespezifischen Faktoren oftmals die interindividuelle Variabilität im Metabolismus wesentlich bei. Die unterschiedliche Expression der am Arzneistoffwechsel beteiligten Cytochrom P450-Enzyme (CYP) in der Leber, aber auch in extrahepatischem Gewebe, bestimmt in vielen Fällen die Geschwindigkeit des Abbaus der Arzneistoffe [199].

Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es, anhand der renalen Elimination der beiden Zytostatika Procarbazin und Cyclophosphamid bzw. ihrer Metabolite im Rahmen der BEACOPP-Polychemotherapie bei Patienten mit Morbus Hodgkin individuelle pharmakokinetische Parameter zu ermitteln und diese zur Hämatotoxizität der Therapie in Beziehung zu setzen. Zu diesem Zweck sollten zuverlässige analytische Verfahren für die Bestimmung der Konzentrationen dieser Verbindungen bzw. ihrer Metabolite im Urin entwickelt werden.

Da Cyclophosphamid seinen eigenen, durch CYP3A4 vermittelten Abbau zum renal eliminierten Metaboliten N-Dechloroethyl-Cyclophosphamid (DCL-CP) induziert [93, 200], sollte anhand von Inkubationen mit Leberschnitten die Eignung des CYP3A4-Substrats Midazolam als Indikator für das Ausmaß der so genannten Autoinduktion geprüft werden.

Um die Aktivität von CYP3A4 auch am Patienten untersuchen zu können, beinhaltete die Zielstellung außerdem die Entwicklung einer sensitiven Quantifizierungsmethode des Testsubstrats Midazolam im Humanplasma.

5.1 Messmethode zur Quantifizierung der Procarbazin-Metabolite im Urin

Die Quantifizierung des Hauptausscheidungsmetaboliten N-Isopropylterephthalsäure (TAC) konnte mittels einer validierten HPLC-Messmethode im Konzentrationsbereich von 45-900 μM sehr präzise erfolgen. Es konnte gezeigt werden, dass das Verfahren den international anerkannten Richtlinien [188-192] der amerikanischen Nahrungs- und Arzneimittelbehörde FDA (Food and Drug Administration) und der *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH) entsprach.

Die Methode eignete sich darüber hinaus zur gleichzeitigen qualitativen Betrachtung der Metabolite N-Isopropyl-p-hydroxymethylbenzamid (ALC), N-Isopropyl-p-

formylbenzamid (ALD) und N-Isopropyl-p-toluamid (MET) oberhalb einer Konzentration von 25 µM (siehe 3.3.3). Diese Metabolite konnten jedoch in keiner der untersuchten Patientenproben nachgewiesen werden, was den Angaben in der Literatur [74, 75] entsprach. Ob die Metabolite ALC, ALD und MET renal eliminiert werden, ist weiterhin unklar, obwohl ihre physikochemischen Eigenschaften eine Ausscheidung im Harn möglich erscheinen lassen. Mit empfindlicheren Messverfahren, z.B. unter Verwendung der GC-MS-Technik, oder einer Aufkonzentrierung des Urins im Rahmen der Probenaufarbeitung wäre eine Ausscheidung dieser Verbindungen unter Umständen nachweisbar gewesen. Rucki *et al.* gelang 1980 die Entwicklung eines empfindlichen HPLC-Verfahrens unter Verwendung eines elektrochemischen Detektors. Mit dieser Methode war jedoch lediglich die Quantifizierung der Muttersubstanz und des Hydrazon-Metaboliten im Urin möglich [156]. Diese Methode wäre auch aufgrund der ausgeprägten Instabilität beider Verbindungen [201] zur Untersuchung der Urinproben aus der BEACOPP-Studie trotz Kühlung des Urins während der Sammlung über 24 Stunden bei 4 °C nicht geeignet gewesen.

5.2 Urinpharmakokinetik von Procarbazin

Die Studie zur *Populationspharmakokinetik und Toxizität der Zytostatika des BEACOPP-Schemas beim Morbus Hodgkin* [12] beinhaltete zur Charakterisierung der Pharmakokinetik von Procarbazin ausschließlich die Quantifizierung des inaktiven, stabilen Hauptausscheidungsmetaboliten TAC im Urin, da Procarbazin und seine aktiven Metabolite zu instabil sind [201]. Eine Quantifizierung dieser instabilen Moleküle wäre nur nach sofortiger Extraktion der Substanzen aus dem Plasma unmittelbar nach Probenentnahme und anschließender Derivatisierung möglich gewesen [202]. Dieses Vorgehen ließ sich bei der o.g. Multicenterstudie jedoch praktisch nicht durchführen.

Im Mittel wurden ca. 40 % der Procarbazin-Dosis im Urin in Form des Hauptausscheidungsmetaboliten TAC wiedergefunden. In der einzigen bislang publizierten Untersuchung zur quantitativen Bestimmung dieses Metaboliten im Urin nach Applikation der Substanz am Menschen [203] wurde über eine Wiederfindung von 42 % berichtet, was dem hier gewonnenen Ergebnis entspricht.

Der nicht gefundene Anteil der Dosis könnte das Resultat einer in der Literatur beschriebenen kovalenten Bindung der reaktiven Metabolite an Gewebemakromoleküle sein und mit der zytotoxischen Wirkung in Zusammenhang stehen [204]. Außerdem könnten nicht-renale Eliminationswege bei der Ausscheidung eine Rolle spielen. So konnten Schwartz und Gescher [71, 205] nach Gabe von

^{14}C -markiertem Procarbazin bis zu 20% der Dosis als $^{14}\text{CO}_2$ in der Atemluft innerhalb der ersten sechs Stunden nach Applikation nachweisen. Innerhalb der vier Tage der Studie wurden 4-12 % der applizierten Radioaktivität im Stuhl der Patienten gefunden.

Trotz der überwiegend nicht-enzymatischen Metabolisierung von Procarbazin [63, 64] variierte die renale Elimination des Hauptausscheidungsmetaboliten TAC interindividuell um bis zu 43 %. Demgegenüber änderte sich die Ausscheidung beim einzelnen Patienten im Verlauf der Therapie kaum. Daher ist davon auszugehen, dass die vorhergehenden Therapiezyklen sich auf das Ausscheidungsprofil des Zytostatikums nicht nennenswert auswirken, so dass die TAC-Ausscheidung im ersten Zyklus eine Vorhersage der TAC-Ausscheidung in den folgenden Therapiezyklen möglich erscheinen lässt.

In einer Kovarianzanalyse wurde der Einfluss von Kreatinin-Clearance, Alter, Geschlecht, Körpergröße und –gewicht, Körperoberfläche, Body-Mass-Index und Nummer des Therapiezyklus auf die Procarbazin-Pharmakokinetik anhand der TAC-Konzentrationen im Urin bestimmt. Hierbei zeigte sich lediglich ein quantitativ schwach ausgeprägter ($r^2 = 0,16$), aber statistisch hochsignifikanter ($p < 0,001$) Zusammenhang zwischen der prozentualen Procarbazin-Ausscheidung und der Kreatinin-Clearance in Verbindung mit dem Geschlecht. Die Hinzunahme weiterer Variablen verbesserte das hier verwendete lineare Kovarianzmodell nicht. Zwischen verschiedenen Einflussfaktoren auf pharmakokinetische Parameter bestehen oftmals multiple, nicht-lineare Zusammenhänge. Deshalb kann das hier gewählte allgemeine lineare Modell unter Umständen komplexere Zusammenhänge zwischen den untersuchten Einflussfaktoren und der Procarbazin-Ausscheidung nicht erklären. Die Verwendung eines komplexeren Modells hätte jedoch eine begründete Vorstellung über einen entsprechenden Zusammenhang vorausgesetzt, dazu fehlte im Fall von Procarbazin die Grundlage.

Bei der separaten Betrachtung der einzelnen Therapiezyklen zeigte sich, dass die signifikante Abhängigkeit der Procarbazin-Ausscheidung vom Geschlecht in Verbindung mit der Kreatinin-Clearance insbesondere auf den Zusammenhängen im zweiten und dritten Zyklus beruhte, während eine entsprechende Korrelation im ersten Therapiezyklus kein statistisch signifikantes Niveau erreichte. Im zweiten und dritten Therapiezyklus konnten hierdurch 21 % bzw. 30 % der Variabilität innerhalb der Studienpopulation erklärt werden. Dabei war der Einfluss der aus dem Patientenurin bestimmten Kreatinin-Clearance auf die Procarbazin-Ausscheidung bei Frauen stärker ausgeprägt als bei Männern. Dies erscheint sinnvoll, da für die Kreatinin-Clearance eine Geschlechtsabhängigkeit angenommen wird [206].

Ob im ersten Therapiezyklus tatsächlich kein Zusammenhang zwischen der Pharmakokinetik von Procarbazin und der geschlechtsspezifischen Kreatinin-Clearance besteht, oder ob in der vorliegenden Arbeit der Zusammenhang aufgrund statistischer Gegebenheiten nicht nachweisbar war, kann nur durch eine weitere Studie mit einer größeren Anzahl an Patienten geklärt werden. Möglicherweise wird die Nierenfunktion und damit die Procarbazin-Ausscheidung durch weitere im Rahmen des Therapieschemas applizierte Zytostatika oder deren Metabolite bei Männern und Frauen unterschiedlich beeinflusst. Denkbar wäre hier z.B. eine Schädigung der Niere durch Chloroacetaldehyd, das im Rahmen der Bio-transformation von Cyclophosphamid entsteht. Toxikologische Untersuchungen haben in den letzten Jahren neben der Urotoxizität auch eine nierenschädigende Wirkung von Chloroacetaldehyd gezeigt [207].

5.3 Messmethoden zur Quantifizierung von Cyclophosphamid und seinen Metaboliten im Urin

Zur quantitativen Bestimmung von Cyclophosphamid und seinen Metaboliten im Urin wurde eine publizierte ³¹P-NMR-Methode [149, 169] weiterentwickelt. Die Methodenentwicklung und -optimierung konnte zwar abgeschlossen, eine Validierung des Verfahrens jedoch aufgrund von irreparablen Gerätedefekten nicht durchgeführt werden.

Mittels einer LC-MS/MS-Methode konnte die Quantifizierung von Cyclophosphamid und seinen drei Metaboliten N-Dechloroethyl-Cyclophosphamid (DCL-CP), Carboxyphosphamid (CarboxyCP) und 4-Ketocyclophosphamid (4KetoCP) im Urin ausreichend empfindlich durchgeführt werden. Hierbei wurde der Kalibrierungsbereich an die zu erwartenden Urinkonzentrationen angepasst. Die anschließend durchgeführte Methodvalidierung zeigte die Verlässlichkeit der LC-MS/MS-Methode und die Erfüllung der internationalen Richtlinien der FDA und der ICH.

Das Signal / Rauschen-Verhältnis (S/N) lag selbst im unteren Quantifizierungsbereich für Cyclophosphamid noch über 7000:1. Für die Metaboliten war das S/N immer besser als 250:1 (siehe Abbildung 23). Prinzipiell eignet sich die Methode daher auch für die Bestimmung niedrigerer Konzentrationen unterhalb des im Rahmen der Methodvalidierung überprüften Quantifizierungsbereichs. Dies würde jedoch eine erneute Validierung mit entsprechend gering konzentrierten Proben erfordern. Unter Berücksichtigung dieser Tatsache zeigen die Ergebnisse, dass die hier beschriebene Methode bezüglich ihrer Sensitivität mit publizierten Verfahren [161-163] vergleichbar ist. Durch die chromatographische Abtrennung

der Probenmatrix von den Analyten konnte jedoch auf eine sonst erforderliche Extraktion oder Derivatisierung der Substanzen verzichtet werden.

Verglichen mit dem o.g. ^{31}P -NMR-Verfahren bedeutete die Verwendung der LC-MS/MS-Methode zur Quantifizierung der Urinproben eine erhebliche Zeitersparnis (zwölf Minuten im Vergleich zu über elf Stunden pro Probe) bei gesteigerter Sensitivität und gesicherter Präzision und Richtigkeit der Messungen.

5.4 Urinpharmakokinetik von Cyclophosphamid

Ungefähr ein Drittel der verabreichten Cyclophosphamid-Dosis wurden innerhalb der ersten 24 Stunden nach Applikation in unveränderter Form bzw. als Metabolite DCL-CP, 4KetoCP und CarboxyCP renal ausgeschieden. Die hierbei beobachtete hohe interindividuelle Variabilität von bis zu 62 % ist vermutlich auf die überwiegend enzymatisch vermittelte Biotransformation des Zytostatikums zurückzuführen. Vergleichbare Ausscheidungsraten und Variabilitäten wurden bereits in früheren Untersuchungen an anderen Patientenkollektiven und mit unterschiedlichen Komedikationen berichtet [87, 88, 157, 169, 208-211].

Auch der Wert für die mittlere Ausscheidung des Zytostatikums in unveränderter Form von etwa 20 % der Dosis sowie deren interindividuelle Variabilität von durchschnittlich 38 % entspricht bereits publizierten Daten [157, 210, 211].

Die renale Ausscheidung von Cyclophosphamid in Form des über CYP3A4 gebildeten Metaboliten DCL-CP lag im Mittel bei etwa 1,5 % und variierte von Patient zu Patient je nach Therapiezyklus etwa um den Faktor 70 – 250. Tasso und Mitarbeiter berichteten 1992 vergleichbare Werte [210], während in anderen Untersuchungen mit jeweils 3,4 % deutlich höhere Werte für die DCL-CP-Ausscheidung gefunden wurden, die aber stets mit einer ähnlichen interindividuellen Variabilität behaftet waren [169, 211]. Diese Daten wurden jedoch in Untersuchungen an Kindern erhoben und beruhen alle auf deutlich geringeren Fallzahlen als in der hier vorgestellten Studie. Ein weiterer Grund für die unterschiedlichen Werte für die prozentuale DCL-CP-Ausscheidung könnten Arzneimittelinteraktionen mit anderen im Rahmen des BEACOPP-Therapieschemas verabreichten Substanzen sein, z.B. mit dem ebenfalls über CYP3A4 metabolisierten Etoposid [212].

Der aktive Metabolit 4-Hydroxy-Cyclophosphamid (4OH-CP) wird durch Alkoholdehydrogenasen zu 4KetoCP biotransformiert [169]. Für 4KetoCP lagen die Wiederfindungsraten im Urin der untersuchten Patienten im Mittel bei etwa 1,6 % der applizierten Cyclophosphamid-Dosis. Die interindividuelle Variabilität in der Ausscheidung war mit 43 % etwas höher als die des Cyclophosphamids. In publizier-

ten Untersuchungen, die auf geringeren Fallzahlen basieren, wurden mit Ausscheidungsraten für 4KetoCP zwischen 0,4 % und 1,1 % meist niedrigere Werten gefunden [169, 209-211, 213]. Ein möglicher Grund für diesen Sachverhalt könnte in der Induktion der Alkoholdehydrogenase durch andere im BEACOPP-Schema verabreichte Substanzen liegen.

Die gefundene Stoffmenge von CarboxyCP im Urin variierte zwischen den einzelnen Patienten im ersten Zyklus um den Faktor 4000, im zweiten Zyklus um den Faktor 2000 und im dritten Therapiezyklus noch um den Faktor 1000. Im Urin einzelner Patienten konnte der Metabolit gar nicht nachgewiesen werden. Dies stimmt mit den Ergebnissen der Untersuchungen von Boddy [213] und Hadidi [209] überein. In diesen Studien wurde das Metabolisierungsprofil von Cyclophosphamid *in vivo* untersucht und postuliert, dass die mögliche Existenz eines Polymorphismus der Aldehyddehydrogenase einen Einfluss auf die Bildung von CarboxyCP hat [209, 213].

Das Metabolisierungsprofil von Cyclophosphamid wird maßgeblich durch das komplexe System von Bioaktivierung und Inaktivierung (siehe Abbildung 6) bestimmt. Sowohl die Bioaktivierung der Substanz als auch die inaktivierenden Schritte der Biotransformation werden durch eine Reihe von Enzymen vermittelt, deren individuelle Aktivität das Metabolisierungsprofil bestimmt. So weist das bei der hepatischen Aktivierung von Cyclophosphamid beteiligte CYP2B6 bezüglich seiner Expression in der Leber einen Variationskoeffizienten von über 100 % auf. Diese Variabilität wird unter anderem durch genetische Polymorphismen bestimmt [214]. Aber auch die Aktivität des CYP3A4, das die Inaktivierung von Cyclophosphamid zum renal eliminierten Metaboliten DCL-CP vermittelt, kann von Patient zu Patient um das zwanzigfache variieren [215, 216].

Zusätzlich spielen bei der Therapie mit Cyclophosphamid nicht nur genetische Unterschiede in der Enzymexpression eine Rolle, sondern auch Veränderungen in der individuellen Enzymaktivität z.B. durch Autoinduktion bzw. durch enzymhemmende oder -induzierende Begleitmedikamente [86]. Hierauf deuten die Daten aus früher publizierten Untersuchungen hin. So konnten z.B. Huitma *et al.* in einer Studie an 34 Patienten beim hauptsächlich durch CYP2B6-vermittelten Aktivierungsschritt zu 4-OH-CP eine Autoinduktion durch das Zytostatikum selbst und eine Hemmung durch das gleichzeitig applizierte Thiotepa zeigen [200]. Die Ergebnisse von Busse *et al.* lassen auf eine deutliche Steigerung der *in vivo*-Aktivität von CYP3A4 während der Behandlung mit Cyclophosphamid im Rahmen der Hochdosistherapie schliessen [149]. Desweiteren konnten Ren *et al.* bei der Untersuchung der Aldehyddehydrogenase-1, die an der Detoxifizierung des Zytostatikums beteiligt ist, im Rahmen einer Immunsuppressionstherapie an 18 Patienten

eine sinkende Aktivität des Enzyms bei wiederholter Gabe von Cyclophosphamid zeigen [217].

5.5 Populationspharmakokinetik von Cyclophosphamid

Die Analyse der individuellen pharmakokinetischen Daten für Cyclophosphamid erfolgte mittels eines populationspharmakokinetischen Ansatzes unter Verwendung der sog. **Nonlinear Mixed Effects Modelling**-Software (NONMEM). Dieses Programm wurde bereits mehrfach zur Berechnung der pharmakokinetischen Parameter von Zytostatika verwendet [218-220]. Populationspharmakokinetische Ansätze eignen sich insbesondere zur Datenanalyse in sog. *sparse-data-Situationen*. Wenn aus ethischen oder praktischen Gründen pro Patient nur eine sehr begrenzte Anzahl an Proben gewonnen werden kann, ist eine Berechnung der (zur Beschreibung des Verhaltens der untersuchten Substanz im menschlichen Körper erforderlichen) pharmakokinetischen Parameter nicht ohne Umwege möglich. Daher wurden für solche Fragestellungen populationspharmakokinetische Berechnungsmethoden entwickelt [221-223]. Unter der (ungeprüften) Annahme, dass alle Daten aus einer einheitlichen Gruppe von Patienten kommen, werden für diese Gruppe Populationsmittelwerte und Streuungsmaße berechnet. Aus diesen Populationswerten lassen sich individuelle pharmakokinetische Parameter unter Berücksichtigung der gemessenen Konzentrationen beim einzelnen Patienten bestimmen. Diese Art der Auswertungen aus wenigen Messwerten bringt jedoch besondere Probleme mit sich [221]. So beeinflussen die Anzahl und die Verteilung der Konzentrationsmesspunkte innerhalb der Patientengruppe und beim einzelnen Patienten direkt das am besten anpassbare pharmakokinetische Modell und damit die Restvariabilität [102, 224]. Ebenso ist die exakte Dokumentation aller Abnahmezeitpunkte, Sammelintervalle und Dosierungen essentiell zur Verminderung der nicht durch das Modell erklärten Restvariabilität [102]. Auch analytische Fehler wirken sich stärker, aber weniger offensichtlich, auf die Präzision des Modells aus, als dies bei individualpharmakokinetischen Berechnungen der Fall ist [102, 221].

Im Rahmen der Untersuchungen ist es erstmalig gelungen, ein Sechskompartiment-Modell zur Beschreibung der Pharmakokinetik von Cyclophosphamid im Plasma und Urin sowie seinen renal eliminierten Metaboliten DCL-CP, CarboxyCP und 4KetoCP zu entwickeln. Bei vergleichbaren Untersuchungen z. B. von Erlichman [225], Chen [117, 226] und Busse [149] wurde bislang stets auf Ein- oder Zwei-Kompartiment-Modelle zurückgegriffen, da die Fallzahlen dieser Studien mit 12-15 Patienten bzw. 12-48 untersuchten Therapiezyklen für die Erstellung eines komplexeren Modells nicht ausreichten.

Die in der untersuchten Studienpopulation für Cyclophosphamid gefundene Gesamtkörperclearance von durchschnittlich 73 ml/min variierte zwar interindividuell um 23 %, aber zwischen den ersten drei Therapiezyklen kaum. Während Busse *et al.* mit 78 ml/min bei Hochdosispatienten [149] und Erlichman *et al.* mit 67 ml/min bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom [225] vergleichbare Werte bei ähnlich ausgeprägter Variabilität erhielten, wurden von Chen *et al.* in verschiedenen Untersuchungen an Patientinnen mit Brustkrebs [117, 226] sowohl geringere (51 ml/min) als auch deutlich höhere (106 ml/min) Werte für die Gesamtkörperclearance beobachtet. Die gefundene, auf die Cyclophosphamid-Dosis normierte, Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (AUC/g CP) entspricht mit durchschnittlich $239 \text{ mg}\cdot\text{h}\cdot\text{l}^{-1}\cdot(\text{g CP})^{-1}$ den Ergebnissen der o.g. Untersuchungen. Hier lagen die Werte für die AUC/g CP zwischen $213\text{-}249 \text{ mg}\cdot\text{h}\cdot\text{l}^{-1}\cdot(\text{g CP})^{-1}$.

Das apparente Verteilungsvolumen wurde mit durchschnittlich 0,62 l/kg berechnet. Die Normierung auf das Körpergewicht erfolgte hier nur zur Vergleichbarkeit der Daten mit der Literatur, obwohl kein Einfluss des Körpergewichts auf das Verteilungsvolumens nachgewiesen werden konnte. Das ermittelte Verteilungsvolumen liegt etwa 20 % über den Werten der genannten Studien von Chen [117, 226] und Busse [149], stimmt aber mit den Ergebnissen von Erlichman [225], sowie denen aus Untersuchungen bei Kindern mit Lymphomen überein [80, 227]. Die interindividuelle Variabilität war mit 26 % deutlich ausgeprägter als die Variabilität zwischen den untersuchten Therapiezyklen (< 1 %).

Für die renale Clearance von Cyclophosphamid finden sich in der Literatur Angaben von 8 ml/min bei Kindern [210] und 15-29 ml/min bei erwachsenen Patienten [149, 208, 226]. Somit erscheinen die gefundenen Werte von durchschnittlich 17 ml/min sinnvoll. Auch hier veränderten sich die Werte im Verlauf der Therapie nicht merklich, während sie sich innerhalb der Population um durchschnittlich 21 % unterschieden.

Die ausgeprägteste interindividuelle Variabilität wurde für die metabolische Clearance des DCL-CP gefunden. Bei vernachlässigbaren intraindividuellen Unterschieden variierten die Werte von Patient zu Patient um durchschnittlich 48 %. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelte metabolische Clearance von durchschnittlich 1,4 ml/min liegt deutlich unter den Ergebnissen aus der Hochdosistherapie (4,2 ml/min) [149]. Dies ist vermutlich auf die Autoinduktion der Bildung von DCL-CP zurückzuführen.

Die geringe Zahl der verfügbaren Messpunkte für den einzelnen Patienten erlaubte keine individuelle Anpassung sämtlicher pharmakokinetischer Parameter. So konnten keine individuellen Angaben zur metabolischen Clearance der weiteren, im Urin gefundenen Metabolite 4KetoCP und CarboxyCP gemacht werden. Hierfür

wären deutlich mehr Messwerte pro Patient erforderlich gewesen, d.h. kürzere Urinsammelintervalle bzw. häufigere Blutentnahmen und die Bestimmung von Metaboliten im Plasma. Da jedoch eine häufigere Probenentnahme für die hier untersuchten, lebensbedrohlich erkrankten Patienten nicht zumutbar gewesen wäre, musste hierauf verzichtet werden. Ein weiterer Grund dafür, dass die Berechnung individueller Werte einzelner Modellparameter nicht möglich war, könnte aber auch in der z.T. nicht ausreichend ausgeprägten interindividuellen Variabilität der pharmakokinetischen Parameter oder der geringen Fallzahl bestehen.

Bei der hier durchgeführten, modellimmanenten Kofaktoranalyse konnten signifikante Einflussfaktoren bereits in das Modell integriert werden. Hier zeigte sich neben einer positiv-linearen Abhängigkeit der Gesamtausscheidungsratekonstante von Cyclophosphamid ($AUSS_{CP}$) von der Körpergröße ein umgekehrt proportionaler Zusammenhang zwischen $AUSS_{CP}$ und der Albumin-Konzentration im Plasma. Dies lässt möglicherweise auf eine Zunahme des freien Cyclophosphamids im Plasma aufgrund einer verringerten Bindung an Albumin und einer daraus resultierenden gesteigerten Metabolisierung bei niedrigen Albuminkonzentrationen schließen.

5.6 Pharmakokinetik-Pharmakodynamik-Analyse

Als pharmakodynamischer Endpunkt wurde hier die Toxizität auf das blutbildende Knochenmark gewählt. In vielen publizierten Arbeiten werden meist alle drei Zellarten des Bluts (Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten) zur Beschreibung der Toxizität verwendet [228]. Dies war in der hier untersuchten Population nicht möglich, da viele Patienten Transfusionen mit Erythrozyten-Konzentraten erhielten. Außerdem wurde im hochdosierten Teil der BEACOPP-Studie standardmäßig den Patienten der seit einigen Jahren erhältliche Wachstumsstimulationsfaktor für Leukozyten (G-CSF) verabreicht. Zudem erfolgt der Abfall der Erythrozyten in der Regel nur langsam und über mehrere Wochen hinweg, so dass der Einfluss der einzelnen Therapiezyklen nicht evaluierbar ist. So blieb als unbeeinflusstes Maß für diese „Hämatotoxizität“ nur die prozentuale Veränderung der Thrombozytenzahl vom ersten zum achten Tag des jeweiligen Therapiezyklus. Im Jahr 2000 veröffentlichte Untersuchungen von Engel *et al.* hatten zwar gezeigt, dass die Thrombozytenzahl unter der BEACOPP-Therapie ihren Tiefpunkt etwa am zwölften Therapietag erreicht, sich jedoch bereits am achten Tag ein deutlicher Abfall der Thrombozyten erkennen lässt [229]. Da an diesem Tag Blutentnahmen im Rahmen der Therapieüberwachung geplant waren und das Blutbild am zwölften Therapietag nur in einzelnen Fällen kontrolliert wurde, lagen für die meisten The-

rapiezyklen entsprechende Rohdaten vor. Die prozentuale Veränderung der Thrombozytenzahl zeigte eine hohe interindividuelle Variabilität von bis zu 349 %.

Im Rahmen der Pharmakokinetik-Pharmakodynamik-Analyse gelang die Erstellung eines einfachen linearen Modells, das im untersuchten Patientenkollektiv signifikante Zusammenhänge zwischen pharmakokinetischen Parametern und der Toxizität zeigte. Mittels des Modells konnten innerhalb der Studienpopulation über 43 % der Variabilität der Hämatotoxizität erklärt werden.

Es konnte eine geschlechtsspezifische, lineare Abhängigkeit des Thrombozytenabfalls vom ersten bis zum achten Therapietag von der applizierten Cyclophosphamid-Dosis nachgewiesen werden. Hierbei hatte die Dosis bei Frauen einen deutlich größeren Einfluss auf die Hämatotoxizität als bei männlichen Patienten. Auch andere publizierte Untersuchungen deuten auf eine positive Korrelation zwischen der Cyclophosphamid-Dosis und der Toxizität hin [230, 231]. Eine Abhängigkeit der Hämatotoxizität vom Geschlecht konnte bereits in einer früheren Studie des BEACOPP-Schemas nachgewiesen werden [12].

Das allgemeine lineare Modell zur Beschreibung des Thrombozytenabfalls beinhaltete als weiteren signifikanten Kofaktor die prozentuale renale Cyclophosphamid-Ausscheidung in Form des Metaboliten DCL-CP. Die positive Korrelation zwischen der renalen DCL-CP-Ausscheidung ($DCL-CP_{ren}$) und der Hämatotoxizität ist vermutlich auf das bei der Biotransformation von Cyclophosphamid zu DCL-CP gebildete Chloracetaldehyd zurückzuführen, das neben urotoxischen auch hämatotoxische Eigenschaften aufweist [207]. Da in vitro-Untersuchungen die Vermittlung dieses Metabolisierungsschritts durch CYP3A4 gezeigt haben [232], spiegelt $DCL-CP_{ren}$ möglicherweise auch die hepatische CYP3A4-Aktivität wider, über die andere im Rahmen der Therapie verabreichte Substanzen (z.B. Etoposid) aktiviert werden [212].

Der fehlende Einfluss der Körperoberfläche auf die pharmakokinetischen Parameter bzw. auf die untersuchte Hämatotoxizität wirft die Frage nach der Zweckmäßigkeit der derzeit üblichen Dosisanpassung anhand der Körperoberfläche auf. [233, 234]. In Studien mit einzelnen Zytostatika (z.B. Epirubicin [235]) und mit Polychemotherapien (z.B. Doxorubicin, Etoposid und Ifosfamid [236]), aber auch in Übersichtsarbeiten [228, 237, 238] wurde wiederholt auf den fehlenden Zusammenhang zwischen Körperoberfläche und pharmakokinetischen und/oder pharmakodynamischen Parametern hingewiesen. Trotzdem hat sich bislang nur für die wenigsten Substanzen ein anderes Vorgehen bei der individuellen Anpassung der Dosis durchsetzen können. So erfolgt z.B. die Dosierung des Zytostatikums Carboplatin anhand einer Formel, in die die gewünschte Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve und die Nierenfunktion eingehen [239]. Für die meisten Substan-

zen stehen allerdings bislang keine einfachen, klinisch brauchbaren Verfahren zur Dosisindividualisierung zur Verfügung.

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ließe sich spekulieren, dass eine Anpassung der Cyclophosphamid-Dosis an das Geschlecht und an den maximal tolerablen Abfall der Thrombozytenzahl am achten Therapietag eine bessere Möglichkeit zur Individualisierung der Therapie bietet als die derzeit verwendete Körperoberfläche. Diese Hypothese muss jedoch im Rahmen einer Gesamtauswertung der BEACOPP-Studie [12] überprüft und an weiteren Patienten validiert werden. Insbesondere ist zu untersuchen, ob eine Anpassung der Dosis an die zu erwartende Hämatotoxizität auch mit einer Verbesserung des Nutzen/Risiko-Profiles der Therapie einhergeht, oder ob die Verringerung der Toxizität eine Verminderung der Antitumorwirkung und eine höhere Rezidivrate zur Folge hat.

5.7 Induktion des Cytochrom P450 3A4 durch Cyclophosphamid in Leberschnitten

Für die Untersuchung des Metabolismus und der Toxizität von Xenobiotika sind eine Reihe von Leber-*in vitro*-Systemen verfügbar [240, 241]. Während die Hemmung von Cytochrom P450-Enzymen normalerweise anhand von Inkubationen mit Humanlebermikrosomen oder mit cDNA-exprimierten Enzymen getestet wird, kommen bei *in vitro*-Untersuchungen zur Enzyminduktion hauptsächlich Kulturen isolierter Hepatozyten zum Einsatz [242-244]. Eine Reihe von Ergebnissen publizierter Studien zum Fremdstoffmetabolismus zeigten, dass Präzisionsleberschnitte ein alternatives *in-vitro* Modellsystem darstellen [245-248]. In Leberschnitten ist im Gegensatz zu Mikrosomen oder Hepatozyten die Gewebearchitektur weitestgehend erhalten, so dass hier sämtliche Zellarten der Leber vorhanden sind. Trotzdem wurden bislang verhältnismäßig wenige Untersuchungen veröffentlicht, in denen die Induktion des Cytochrom P450-Enzymsystems anhand von Inkubationen mit Leberschnitten überprüft wurde [249-251].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte bei Inkubationen mit Leberschnitten die Induktion des Cytochrom P450-Enzyms CYP3A4 durch Cyclophosphamid gezeigt werden. Jedoch erfolgte im Gegensatz zu publizierten Verfahren [249-251] die Bewertung des Ausmaßes der Induktion erstmalig nicht durch Messung der Expression der mRNA oder des Apoproteins, sondern durch Bestimmung des Umsatzes des CYP3A4-Substrats Midazolam in physiologischer Konzentration. Entsprechende Untersuchungen wurden vermutlich bislang nicht durchgeführt, weil keine ausreichend empfindliche Analytik für das Umsatzprodukt 1'-Hydroxy-Midazolam verfügbar war.

Die Induktion der CYP3A4-Aktivität erfolgte durch eine Präinkubation mit Cyclophosphamid. Zur Etablierung des Verfahrens wurden Schweinelebern verwendet. Die quantitative Bestimmung des gebildeten 1'-Hydroxy-Midazolam konnte mittels einer neu entwickelten und validierten LC-MS/MS-Methode im Konzentrationsbereich von 1-30000 nM sehr präzise und robust erfolgen.

Trotz des empfindlichen Messverfahrens konnten erst nach einer Inkubationszeit von sechs Stunden quantifizierbare Substratumsätze bestimmt werden. Dabei wurden im Vergleich zu den Negativkontrollen (ohne Präinkubation) um bis zu 100 % gesteigerte Umsatzraten gefunden. Da Cyclophosphamid auch selbst CYP3A4-Substrat ist, wurden zur Überprüfung der kompetitiven Hemmung des CYP3A4 im gewählten *in vitro*-Testsystem zusätzliche Inkubationen mit Leberschnitten nach zeitgleicher Zugabe von Cyclophosphamid und Midazolam durchgeführt. Auch hier wurde im Vergleich zu den Negativkontrollen eine gesteigerte Bildung von 1'-Hydroxy-Midazolam nachgewiesen. Das Ausmaß der Umsatzsteigerung war hier jedoch deutlich geringer ausgeprägt als bei den präinkubierten Proben. Ein eindeutiger Einfluss der Inkubationszeit konnte bei allen Inkubationen aufgrund der geringen Zahl an Experimenten und der hohen Variabilität der Ergebnisse sowohl zwischen den verwendeten Lebern als auch zwischen den durchgeführten Doppelinkubationen nicht gezeigt werden.

Eine vergleichbar hohe Variabilität im Ausmaß der Induktion zwischen verschiedenen Leberproben wurde auch in früheren Untersuchungen bei der CYP3A4-Induktion durch Rifampicin sowohl bei der Verwendung von Humanleberschnitten [250] als auch in kultivierten Hepatozyten des Menschen [252, 253] gefunden. Da der Gehalt an CYP3A4 in der Leber des Menschen mit dem in Schweinelebern vergleichbar ist [254], ist die beobachtete Variabilität vermutlich auf interindividuelle Unterschiede in der CYP3A4-Expression zurückzuführen. Eine mögliche Ursache für die Unterschiede zwischen den durchgeführten Doppelinkubationen könnten nicht sichtbare Unterschiede in Form und Dicke der Leberschnitte sein. Hierauf deutet die Variabilität in den Gewichten der Schnitte hin. Um diese versuchsbedingten Einflüsse auf die Gesamtvariabilität abzuschätzen, müssten weitere Untersuchungen an deutlich mehr Lebern unterschiedlicher Herkunft durchgeführt werden, als dies im Rahmen dieser Arbeit möglich war.

Insgesamt konnte die prinzipielle Eignung von Leberschnitten als *in vitro*-Testsystem zur Untersuchung der Induktion des CYP3A4 anhand der Biotransformation von Midazolam zu 1'-Hydroxy-Midazolam gezeigt werden. Die Versuchsbedingungen könnten jedoch dahingehend optimiert werden, dass sowohl die Frequenz der Probenentnahmen als auch die maximale Inkubationszeit erhöht werden, um eine Ermittlung des zeitlichen Profils der Induktion zu ermöglichen.

5.8 Bestimmung von Midazolam im Humanplasma

Für die Quantifizierung von Midazolam im Plasma konnte eine sehr empfindliche und verlässliche LC-MS/MS-Methode entwickelt werden, die, wie die Ergebnisse der Validierung zeigten, den internationalen Anforderungen [188-192] entsprach.

Aufgrund der fehlenden chromatographischen Abtrennung der Matrix vom Analyten erforderte die Messung eine Probenaufarbeitung, die im Vergleich zu den beschriebenen Verfahren zur Quantifizierung der Zytostatika im Urin recht aufwendig war. Diese beinhaltete im Gegensatz zu publizierten Verfahren [183, 187, 255] keine (oftmals verlustreiche) Extraktion, sondern bestand im Wesentlichen in einer Fällung der Plasmaproteine.

Im Rahmen der Methodvalidierung zeigten vereinzelte Messwerte von Plasmaproben mit einer Midazolam-Konzentration von 0,43 ng/ml Abweichungen in der Präzision oder der Richtigkeit, die die 15 %-Grenze überschritten, jedoch unterhalb der 20 %-Grenze blieben. Somit wurde hier aufgrund der internationalen Vorschriften zur Methodvalidierung die untere Quantifizierungsgrenze gesetzt, obwohl das Verfahren für Proben mit einer Midazolam-Konzentration von 0,309 ng/ml eine vergleichbare Präzision und Richtigkeit zeigte. Da das Signal/Rauschen-Verhältnis selbst im unteren Kalibrationsbereich (0,1 ng/ml) für Midazolam noch über 30:1 lag, würde sich die Methode bei weiterer Optimierung der Chromatographie unter Umständen auch für die Bestimmung niedrigerer Plasmakonzentrationen eignen. Eine untere Quantifizierungsgrenze von 0,1 ng/ml sollte erreicht werden können.

Veröffentlichte Methoden zur Quantifizierung von Midazolam im Humanplasma nennen als untere Quantifizierungsgrenze Werte zwischen 0,5 ng/ml [133] und 0,65 ng/ml [187] und sind damit weniger sensitiv als das hier beschriebene Verfahren. Analytische Methoden mit einer niedrigeren Quantifizierungsgrenze waren in der Literatur nicht auffindbar.

Die Methode wurde bereits in einer Arzneimittel-Interaktions-Studie mit Midazolam als Testsubstanz zur Phänotypisierung der hepatischen und intestinalen CYP3A4-Aktivität verwendet und lieferte zuverlässige Ergebnisse [134]. Durch die Empfindlichkeit der Methode konnte die Midazolam-Dosis und die damit verbundene zusätzliche Belastung des Patienten im Vergleich zu früher publizierten Studien erheblich gesenkt werden [133]. Somit konnte die Voraussetzung für eine CYP3A4-Phänotypisierung im Rahmen einer Polychemotherapie als Grundlage einer Dosisindividualisierung geschaffen werden.

5.9 Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten über 43 % der bei der Behandlung des Morbus Hodgkin mit dem BEACOPP-Polychemotherapieschema auftretenden Hämatotoxizität mit der verabreichten Cyclophosphamid-Dosis, dem Geschlecht des Patienten und der renalen Ausscheidung von Cyclophosphamid in Form seines Metaboliten DCL-CP erklären. Da die Bildung dieses Metaboliten aus der Muttersubstanz vornehmlich durch das Cytochrom P450-Enzym CYP3A4 vermittelt wird, ließe sich das Ausmaß der Toxizität möglicherweise durch eine Phänotypisierung vor Beginn der Therapie abschätzen. Hierzu müsste in einer weiteren Studie an einem ausreichend großen Patientenkollektiv geprüft werden, ob mittels einer Phänotypisierung mit Midazolam als Testsubstrat die prozentuale Ausscheidung von DCL-CP vorhergesagt werden kann. Weiteres Ziel einer derartigen prospektiven Studie sollte es sein, die Vorhersagbarkeit der individuellen Toxizität anhand des Metabolitenprofils von CP oder des CYP3A4-Phänotyps zu untersuchen.

Nach der Gesamtauswertung der *Studie zur Populationspharmakokinetik und Toxizität des BEACOPP-Therapieschemas beim Morbus Hodgkin* sollte über den Vergleich der individuellen Pharmakokinetik der weiteren untersuchten Substanzen (Etoposid, Doxorubicin, Prednison) überprüft werden, für welche Substanzen neben Cyclophosphamid eine Dosisindividualisierung sinnvoll erscheint. Obwohl kein Zusammenhang zwischen der Ausscheidung von Procarbazin in Form von TAC und der Hämatotoxizität gefunden werden konnte, erscheint eine Dosisreduktion bei niereninsuffizienten Patienten sinnvoll, da ein positiver Zusammenhang mit der Kreatinin-Clearance bestand.

Letzter Schritt in der Entwicklung einer Dosisindividualisierung des BEACOPP-Therapieschemas wäre eine prospektive Analyse des Nutzen-Risiko-Profiles bei individuell angepasster Dosis im Vergleich zur bisher verwendeten Dosisnormierung auf die Körperoberfläche im Rahmen einer groß angelegten Therapiestudie an mehreren hundert Patienten. Hierbei sollte das Augenmerk vornehmlich auf der Überlebensrate liegen, da diese bei der Behandlung einer potentiell heilbaren Erkrankung das wichtigste, aber nur langfristig beurteilbare Kriterium darstellt.

6 Zusammenfassung

Das bei der Therapie des Morbus Hodgkin mit Erfolg eingesetzte BEACOPP-Polychemotherapieschema weist eine ausgeprägte interindividuelle Variabilität im Ausmaß der Hämatotoxizität auf. Dies ist teilweise in Unterschieden bezüglich der individuellen Pharmakokinetik der verabreichten Substanzen begründet.

In der vorliegenden Arbeit wurde die renale Elimination der Zytostatika Procarbazin (PCZ) und Cyclophosphamid (CP) im Rahmen dieses Therapieschemas untersucht. Zur Bestimmung der Urinkonzentrationen des PCZ-Hauptausscheidungsmetaboliten N-Isopropylterephthalsäure (TAC), von CP und seinen Metaboliten N-Dechloroethyl-Cyclophosphamid (DCL-CP), 4-Ketocyclophosphamid (4KetoCP) und Carboxyphosphamid (CarboxyCP) wurden analytische Verfahren unter Verwendung von HPLC und LC-MS/MS entwickelt und gemäß internationalen Richtlinien validiert. Mit diesen Methoden wurde 24-Stunden Sammelurin aus den ersten drei Therapiezyklen von Patienten untersucht, die nach dem BEACOPP-Therapieprotokoll behandelt wurden. Für CP und seine Metabolite wurde ein populationspharmakokinetisches Sechskompartiment-Modell entwickelt. In einer Kovarianzanalyse wurde der Einfluss demographischer Faktoren, der Konzentration von Albumin und Kreatinin im Blut sowie der Kreatinin-Clearance auf die individuellen pharmakokinetischen Parameter der beiden Zytostatika untersucht. Der Zusammenhang mit der Hämatotoxizität wurde im Rahmen einer Pharmakokinetik-Pharmakodynamik-Analyse überprüft. Als Maß für die Hämatotoxizität diente die Veränderung der Thrombozytenkonzentration am achten Therapietag im Vergleich zum Wert vor Beginn des jeweiligen Therapiezyklus.

Die Analyte variierten zwischen den Patienten z.T. um das bis zu Viertausendfache, während nur geringe Schwankungen zwischen den Therapiezyklen nachweisbar waren. Die Ausscheidung des PCZ-Metaboliten TAC korrelierte mit der Kreatinin-Clearance in Verbindung mit dem Geschlecht. Jedoch bestand kein Zusammenhang mit der Hämatotoxizität. In einem allgemeinen linearen Modell konnten über 43 % der interindividuellen Variabilität in der Hämatotoxizität mit der geschlechtsadaptierten CP-Dosis in Verbindung mit der renalen Ausscheidung des über CYP3A4 gebildeten Metaboliten DCL-CP erklärt werden.

An Schweineleberschnitten wurde gezeigt, dass sich das CYP3A4-Modellsubstrat Midazolam zum Nachweis der Autoinduktion dieses Metabolisierungsschritts durch CP *in vitro* eignet. Durch die Entwicklung eines hochempfindlichen LC-MS/MS-Verfahrens zur Quantifizierung von Midazolam im Humanplasma wurde die Voraussetzung für eine gering belastende Methode zur Phänotypisierung von CYP3A4 *in vivo* geschaffen. Somit steht ein Werkzeug zur Überprüfung einer möglichen Rolle der CYP3A4 Aktivität bei der Dosisindividualisierung für CP zur Verfügung.

Insgesamt können die hier vorgestellten Untersuchungen dazu beitragen, unter Berücksichtigung der individuellen Enzymaktivität *in vivo* und der ermittelten Einflussfaktoren auf das Toxizitätsrisiko die Dosis von Cyclophosphamid im Rahmen einer Polychemotherapie individuell zu optimieren.

7 Abstract

The BEACOPP polychemotherapy regimen, used as a highly effective treatment for advanced stage Hodgkin's disease, exhibits a pronounced inter-individual variability in the extent of the hematotoxicity. This is partly due to differences concerning the individual pharmacokinetics of the administered drugs.

In the present work, the renal elimination of the cytostatic agents procarbazine (PCZ) and cyclophosphamide (CP) within this regimen was studied. For the quantification of urinary concentrations of the elimination metabolite of PCZ, N-isopropylterephthalic acid (TAC), of CP and its metabolites N-dechloroethylcyclophosphamide (DCL-CP), 4-ketocyclophosphamide (4KetoCP), and carboxycyclophosphamide (CarboxyCP), analytical procedures using HPLC and LC-MS/MS were developed and validated according to international guidelines. Using these methods, 24-hour urine collections of the first three therapy cycles of patients treated with the BEACOPP regimen were analyzed. A population pharmacokinetic six-compartment model was developed for CP and its metabolites. The influence of demographic factors, of albumin and creatinine plasma concentrations, and of creatinine clearance on the individual pharmacokinetic parameters of the two cytostatics was evaluated using analysis of covariance. In a pharmacokinetic-pharmacodynamic-analysis the relationship to hematotoxicity was examined. Here, the difference in thrombocyte counts between the eighth day of therapy and before the start of the respective therapy cycle was used as a measure for toxicity.

The analytes varied between the patients partly by up to 4000-fold, while there were only minor variations between the therapy cycles in a given patient. The excretion of the PCZ-metabolite TAC correlated well with the gender-adjusted creatinine clearance. However, there was no relationship between TAC excretion and hematotoxicity. Using a general linear model, more than 43 % of the interindividual variability in hematotoxicity was explained by the gender-adjusted CP dose in combination with the renal elimination of the metabolite DCL-CP, whose formation is CYP3A4 mediated.

Experiments with porcine liver slices showed that the CYP3A4 model substrate midazolam can be used for investigations on the auto-induction of this metabolic step by CP *in vitro*. Developing a highly sensitive LC-MS/MS method for quantification of midazolam in human plasma allowed for a convenient low-dose procedure to determine CYP3A4 activity *in vivo*. This analytical method enables investigations on the possible role of CYP3A4 in dose individualization of CP.

In summary, the investigations presented here can add to the individual dose optimization for CP in the framework of a polychemotherapy regimen, taking into account the individual enzyme activity *in vivo* and the factors of influence on hematotoxicity.

8 Literaturverzeichnis

1. Huhn, D. und Herrmann, R.
Medikamentöse Therapie maligner Erkrankungen
4. Ausgabe. 2001, Gustav&Fischer: Stuttgart, Jena, New York.
2. Diehl, V., Sieber, M., Ruffer, U., Lathan, B., Hasenclever, D., Pfreundschuh, M., *et al.*
BEACOPP: an intensified chemotherapy regimen in advanced Hodgkin's disease. The German Hodgkin's Lymphoma Study Group.
Ann Oncol, 1997. **8**(2): S. 143-8.
3. Josting, A., Raemakers, J.M., Diehl, V. und Engert, A.
New concepts for relapsed Hodgkin's disease.
Ann Oncol, 2002. **13 Suppl 1**: S. 117-21.
4. Glossmann, J.P., Josting, A. und Diehl, V.
New treatments for Hodgkin's disease.
Curr Treat Options Oncol, 2002. **3**(4): S. 283-90.
5. Josting, A., Rueffer, U., Franklin, J., Sieber, M., Diehl, V. und Engert, A.
Prognostic factors and treatment outcome in primary progressive Hodgkin lymphoma: a report from the German Hodgkin Lymphoma Study Group.
Blood, 2000. **96**(4): S. 1280-6.
6. Sieber, M., Engert, A. und Diehl, V.
Treatment of Hodgkin's disease: results and current concepts of the German Hodgkin's Lymphoma Study Group.
Ann Oncol, 2000. **11 Suppl 1**: S. 81-5.
7. Diehl, V.
Therapie des Morbus Hodgkin.
Deutsches Ärzteblatt, 2002. **99**(25): S. A1760-A1768.
8. Moxley, J.H., 3rd, De Vita, V.T., Brace, K. und Frei, E., 3rd.
Intensive combination chemotherapy and X-irradiation in Hodgkin's disease.
Cancer Res, 1967. **27**(7): S. 1258-63.
9. Bagley, C.M., Jr., Devita, V.T., Jr., Berard, C.W. und Canellos, G.P.
Advanced lymphosarcoma: intensive cyclical combination chemotherapy with cyclophosphamide, vincristine, and prednisone.
Ann Intern Med, 1972. **76**(2): S. 227-34.
10. Bonadonna, G. und Santoro, A.
ABVD chemotherapy in the treatment of Hodgkin's disease.
Cancer Treat Rev, 1982. **9**(1): S. 21-35.
11. Wolf, J., Diehl, V. and Höffgen, K.
Editorial: Von Deutschland aus.
Onkologe, 2002. **6**: S. 1129–1130.

12. Diehl, V. und Fuhr, U.
Prüfplan: Populationspharmakokinetik und Toxizität der Zytostatika des BEACOPP-Therapieschemas beim Morbus Hodgkin.
1997, Köln
13. Diehl, V., Franklin, J., Hasenclever, D., Tesch, H., Pfreundschuh, M., Lathan, B., et al.
BEACOPP: a new regimen for advanced Hodgkin's disease. German Hodgkin's Lymphoma Study Group.
Ann Oncol, 1998. **9 Suppl 5**: S. S67-71.
14. Diehl, V., Franklin, J., Hasenclever, D., Tesch, H., Pfreundschuh, M., Lathan, B., et al.
BEACOPP, a new dose-escalated and accelerated regimen, is at least as effective as COPP/ABVD in patients with advanced-stage Hodgkin's lymphoma: interim report from a trial of the German Hodgkin's Lymphoma Study Group.
J Clin Oncol, 1998. **16**(12): S. 3810-21.
15. Franklin, J. und Diehl, V.
Current clinical trials for the treatment of advanced-stage Hodgkin's disease: BEACOPP.
Ann Oncol, 2002. **13 Suppl 1**: S. 98-101.
16. Tesch, H., Diehl, V., Lathan, B., Hasenclever, D., Sieber, M., Ruffer, U., et al.
Moderate dose escalation for advanced stage Hodgkin's disease using the bleomycin, etoposide, adriamycin, cyclophosphamide, vincristine, procarbazine, and prednisone scheme and adjuvant radiotherapy: a study of the German Hodgkin's Lymphoma Study Group.
Blood, 1998. **92**(12): S. 4560-7.
17. Diehl, V., Franklin, J., Paulus, U., Engert, A., Wolf, J. und Loeffler, M.
BEACOPP chemotherapy improves survival, and dose escalation Hodgkin's disease: GHSG HD9 results.
Leuk Lymphoma, 2001. **42**(Suppl 2): S. 16 (Abstr. I-47).
18. Mutschler, E., Geislinger, G., Kroemer, H.K. und Schäfer-Korting, M.
Arzneimittelwirkungen. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie
8. Ausgabe. 2001, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH: Stuttgart.
19. Rendic, S. und Di Carlo, F.J.
Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors.
Drug Metab Rev, 1997. **29**(1-2): S. 413-580.
20. Ortiz de Montellano, P.
in Cytochrome P-450: Structure, mechanism, and biochemistry
Ortiz de Montellano. 1995, Plenum Press: New York. S. 245-303.

21. Tweedie, D.J., Erikson, J.M. und Prough, R.A.
Metabolism of hydrazine anti-cancer agents.
Pharmacol Ther, 1987. **34**(1): S. 111-27.
22. Guengerich, F.P.
The 1992 Bernard B. Brodie Award Lecture. Bioactivation and detoxication of toxic and carcinogenic chemicals.
Drug Metab Dispos, 1993. **21**(1): S. 1-6.
23. Guengerich, F.P., Shimada, T., Bondon, A. und Macdonald, T.L.
Cytochrome P-450 oxidations and the generation of biologically reactive intermediates.
Adv Exp Med Biol, 1991. **283**: S. 1-11.
24. Guengerich, F.P. und Shimada, T.
Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P-450 enzymes.
Chem Res Toxicol, 1991. **4**(4): S. 391-407.
25. Kroemer, H.
Neues über Cytochrom-P450-Enzyme: Folgen für die Pharmakotherapie.
Pharmazeutische Zeitschrift, 1997. **142**(5): S. 11-17.
26. Nelson, D.R.
David Nelson's homepage for cytochrome P450 nomenclature.
28.01.2003: <http://drnelson.utmem.edu/human.P450.table.html>
27. Nelson, D.R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J.J., Feyereisen, R., Waxman, D.J., *et al.*
P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature.
Pharmacogenetics, 1996. **6**(1): S. 1-42.
28. Stoilov, I., Jansson, I., Sarfarazi, M. und Schenkman, J.B.
Roles of cytochrome p450 in development.
Drug Metabol Drug Interact, 2001. **18**(1): S. 33-55.
29. Champion, P.M., Stallard, B.R., Wagner, G.C. und Gunsalus, I.C.
Resonance raman detection of an Fe-S bond in cytochrome.
J Am Chem Soc, 1982. **104**: S. 5469-5473.
30. Ruckpaul, K.
Cytochrom P450 abhängige Enzyme - Targetenzyme für die Arzneistoffentwicklung?
Pharm Unserer Zeit, 1993. **22**(5-6): S. 296-304.
31. Streetman, D.S., Ellis, R.E., Nafziger, A.N., Leeder, J.S., Gaedigk, A., Gottschall, R., *et al.*
Dose dependency of dextromethorphan for cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) phenotyping.
Clin Pharmacol Ther, 1999. **66**(5): S. 535-41.

32. Ching, M.S., Blake, C.L., Malek, N.A., Angus, P.W. und Ghabrial, H.
Differential inhibition of human CYP1A1 and CYP1A2 by quinidine and quinine.
Xenobiotica, 2001. **31**(11): S. 757-67.
33. Facciola, G., Hidestrand, M., von Bahr, C. und Tybring, G.
Cytochrome P450 isoforms involved in melatonin metabolism in human liver microsomes.
Eur J Clin Pharmacol, 2001. **56**(12): S. 881-8.
34. Fang, J., Coutts, R.T., McKenna, K.F. und Baker, G.B.
Elucidation of individual cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of clozapine.
Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1998. **358**(5): S. 592-9.
35. Larsen, J.T., Hansen, L.L. und Brosen, K.
Tacrine is not an ideal probe drug for measuring CYP1A2 activity in vivo.
Br J Clin Pharmacol, 1999. **48**(5): S. 663-8.
36. Yamazaki, H., Inoue, K., Hashimoto, M. und Shimada, T.
Roles of CYP2A6 and CYP2B6 in nicotine C-oxidation by human liver microsomes.
Arch Toxicol, 1999. **73**(2): S. 65-70.
37. Faucette, S.R., Hawke, R.L., Lecluyse, E.L., Shord, S.S., Yan, B., Laethem, R.M., et al.
Validation of bupropion hydroxylation as a selective marker of human cytochrome P450 2B6 catalytic activity.
Drug Metab Dispos, 2000. **28**(10): S. 1222-30.
38. Dierks, E.A., Stams, K.R., Lim, H.K., Cornelius, G., Zhang, H. und Ball, S.E.
A method for the simultaneous evaluation of the activities of seven major human drug-metabolizing cytochrome P450s using an in vitro cocktail of probe substrates and fast gradient liquid chromatography tandem mass spectrometry.
Drug Metab Dispos, 2001. **29**(1): S. 23-9.
39. Venkatakrisnan, K., von Moltke, L.L. und Greenblatt, D.J.
Nortriptyline E-10-hydroxylation in vitro is mediated by human CYP2D6 (high affinity) and CYP3A4 (low affinity): implications for interactions with enzyme-inducing drugs.
J Clin Pharmacol, 1999. **39**(6): S. 567-77.
40. Lightfoot, T., Ellis, S.W., Mahling, J., Ackland, M.J., Blaney, F.E., Bijloo, G.J., et al.
Regioselective hydroxylation of debrisoquine by cytochrome P4502D6: implications for active site modelling.
Xenobiotica, 2000. **30**(3): S. 219-33.

41. Sheweita, S.A.
Drug-metabolizing enzymes: mechanisms and functions.
Curr Drug Metab, 2000. **1**(2): S. 107-32.
42. Hirota, N., Ito, K., Iwatsubo, T., Green, C.E., Tyson, C.A., Shimada, N., *et al.*
In vitro/in vivo scaling of alprazolam metabolism by CYP3A4 and CYP3A5 in humans.
Biopharm Drug Dispos, 2001. **22**(2): S. 53-71.
43. Koudriakova, T., Iatsimirskaia, E., Utkin, I., Gangl, E., Vouros, P., Storozhuk, E., *et al.*
Metabolism of the human immunodeficiency virus protease inhibitors indinavir and ritonavir by human intestinal microsomes and expressed cytochrome P4503A4/3A5: mechanism-based inactivation of cytochrome P4503A by ritonavir.
Drug Metab Dispos, 1998. **26**(6): S. 552-61.
44. Williams, J.A., Ring, B.J., Cantrell, V.E., Jones, D.R., Eckstein, J., Ruterbories, K., *et al.*
Comparative metabolic capabilities of CYP3A4, CYP3A5, and CYP3A7.
Drug Metab Dispos, 2002. **30**(8): S. 883-91.
45. Cummins, C.L., Jacobsen, W. und Benet, L.Z.
Unmasking the dynamic interplay between intestinal P-glycoprotein and CYP3A4.
J Pharmacol Exp Ther, 2002. **300**(3): S. 1036-45.
46. Tantcheva-Poor, I., Zaigler, M., Rietbrock, S. und Fuhr, U.
Estimation of cytochrome P-450 CYP1A2 activity in 863 healthy Caucasians using a saliva-based caffeine test.
Pharmacogenetics, 1999. **9**(2): S. 131-44.
47. Guengerich, F.P., Shimada, T., Yun, C.H., Yamazaki, H., Raney, K.D., Thier, R., *et al.*
Interactions of ingested food, beverage, and tobacco components involving human cytochrome P4501A2, 2A6, 2E1, and 3A4 enzymes.
Environ Health Perspect, 1994. **102 Suppl 9**: S. 49-53.
48. Fuhr, U., Weiss, M., Kroemer, H.K., Neugebauer, G., Rameis, H., Weber, W., *et al.*
Systematic screening for pharmacokinetic interactions during drug development.
Int J Clin Pharmacol Ther, 1996. **34**(4): S. 139-51.
49. Lin, J.H. und Lu, A.Y.
Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications.
Clin Pharmacokinet, 1998. **35**(5): S. 361-90.

50. Hsu, A., Granneman, G.R. und Bertz, R.J.
Ritonavir. Clinical pharmacokinetics and interactions with other anti-HIV agents.
Clin Pharmacokinet, 1998. **35**(4): S. 275-91.
51. Suzuki, H., Kneller, M.B., Haining, R.L., Trager, W.F. und Rettie, A.E.
(+)-N-3-Benzyl-nirvanol and (-)-N-3-benzyl-phenobarbital: new potent and selective in vitro inhibitors of CYP2C19.
Drug Metab Dispos, 2002. **30**(3): S. 235-9.
52. Shimada, T., Yamazaki, H., Mimura, M., Inui, Y. und Guengerich, F.P.
Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians.
J Pharmacol Exp Ther, 1994. **270**(1): S. 414-23.
53. Zeller, P., Guttman, H., Hegedus, B., Kaiser, A., Langemann, A. und Müller, M.
Methylhydrazine derivatives, a new class of cytotoxic agents.
Experientia (Basel), 1963. **19**: S. 129.
54. Bollag, W. und E., G.
Tumor inhibitory effects of a new class of cytotoxic agents: Methylhydrazin derivatives.
Experientia (Basel), 1963. **19**: S. 130-131.
55. Spivack, S.D.
Drugs 5 years later: procarbazine.
Ann Intern Med, 1974. **81**(6): S. 795-800.
56. Martz, G., D'Alessandri, A., Keel, H.J. und Bollag, W.
Preliminary clinical results with a new anti-tumor agent Ro 4-6467 (NSC-77213).
Cancer Chemother. Rep., 1963. **33**: S. 5-14.
57. Rutishauser, A. und Bollag, W.
Studies on the action mechanism of procarbazine.
Experientia (Basel), 1967. **23**(3): S. 222-223.
58. Weinkam, R.J. und Shiba, D.A.
Metabolic activation of procarbazine.
Life Sci, 1978. **22**: S. 937-946.
59. Erikson, J.M., Tweedie, D.J., Ducore, J.M. und Prough, R.A.
Cytotoxicity and DNA damage caused by the azoxy metabolites of procarbazine in L1210 tumor cells.
Cancer Res, 1989. **49**: S. 127-133.

60. Dunn, D.L., Lubet, R.A. und Prough, R.A.
Oxidative metabolism of N-isopropyl-alpha-(2-methylhydrazino)-p-toluamide hydrochloride (procarbazine) by rat liver microsomes.
Cancer Res, 1979. **39**(11): S. 4555-63.
61. Shiba, D.A. und Weinkam, R.J.
Quantitative analysis of procarbazine, procarbazine metabolites and chemical degradation products with application to pharmacokinetic studies.
J Chromatogr, 1982. **229**(2): S. 397-407.
62. Prough, R.A., Brown, M.I., Dannan, G.A. und Guengerich, F.P.
Major isozymes of rat liver microsomal cytochrome P-450 involved in the N-oxidation of N-isopropyl-alpha-(2-methylazo)-p-toluamide, the azo derivative of procarbazine.
Cancer Res, 1984. **44**(2): S. 543-8.
63. Swaffar, D.S., Pomerantz, S.C., Harker, W.G. und Yost, G.S.
Non-enzymatic activation of procarbazine to active cytotoxic species.
Oncol Res, 1992. **4**(2): S. 49-58.
64. Kasel, D., Baumhäkel, M. und Fuhr, U.
Biodegradation of Procarbazine by Human Liver Microsomes.
Int J Clin Pharmacol Ther, 2000. **38**(3): S. 153-155.
65. van Eys, J., Cangir, A., Pack, R. und Baram, T.
Phase I trial of procarbazine as a 5-day continuous infusion in children with central nervous system tumors.
Cancer Treat Rep, 1987. **71**(10): S. 973-4.
66. Vasantha Kumar, A.R., Renaudin, J., Wilson, C.B., Boldrey, E.B., Enot, K.J. und Levin, V.A.
Procarbazine hydrochloride in the treatment of brain tumors. Phase 2 study.
J Neurosurg, 1974. **40**(3): S. 365-71.
67. Bollag, W., Kaiser, A., Langemann, A. und Zeller, P.
Methylazo and methylazoxy compounds; new types of antitumour agents.
Experientia, 1964. **20**(9): S. 503.
68. Lawley, P.D. und Phillips, D.H.
DNA adducts from chemotherapeutic agents.
Mutat Res, 1996. **355**(1-2): S. 13-40.
69. Kreis, W.
Metabolism of an antineoplastic methylhydrazine derivative in a P815 mouse neoplasm.
Cancer Res, 1970. **30**(1): S. 82-9.
70. Berger, D.P., Engelhardt, R. und Mertelsmann, R.
Das Rote Buch: Hämatologie und Internistische Onkologie. 1997, ecomed: Landsberg/Lech.

71. Schwartz, D.E., Bollag, W. und Obrecht, P.
Distribution and excretion studies of procarbazine in animals and man.
Arzneimittelforschung, 1967. **17**(11): S. 1389-93.
72. Wiebkin, P. und Prough, R.A.
Oxidative metabolism of N-isopropyl-alpha-(2-methylazo)-p-toluamide (azo-procarbazine) by rodent liver microsomes.
Cancer Res, 1980. **40**(10): S. 3524-9.
73. Cummings, S.W., Guengerich, F.P. und Prough, R.A.
The characterization of N-isopropyl-p-hydroxymethylbenzamide formed during the oxidative metabolism of azo-procarbazine.
Drug Metab Dispos, 1982. **10**(5): S. 459-64.
74. Kuttab, S.H., Tanglertpaibul, S. und Vouros, P.
Studies on the metabolism of procarbazine by mass spectrometry.
Biomed Mass Spectrom, 1982. **9**(2): S. 78-84.
75. Baggiolini, M., Dewald, B. und Aebi, H.
Oxidation of p-(N1-methylhydrazino methyl)-N-isopropyl benzamide (procarbazine) to the methylazo derivative and oxidative cleavage of the N2-C bond in the isolated perfused rat liver.
Biochem Pharmacol, 1969. **18**(9): S. 2187-96.
76. Rhoads, C.P.
Nitrogen mustards in treatment of neoplastic disease.
J Am Med Assoc, 1946. **131**: S. 656.
77. Arnold, H. und Bourseaux, F.
Neuartige Krebs-Chemotherapeutika aus der Gruppe der zyklischen N-Lost-Phosphamidester.
F. Naturwissenschaften, 1958. **45**: S. 65.
78. Stryer, L.
Biochemie. 1996, Spektrum-Verlag: Heidelberg.
79. Boddy, A.V. und Yule, S.M.
Metabolism and pharmacokinetics of oxazaphosphorines.
Clin Pharmacokinet, 2000. **38**(4): S. 291-304.
80. Sladek, N.E.
Metabolism of oxazaphosphorines.
Pharmacol Ther, 1988. **37**(3): S. 301-55.
81. Moore, M.J.
Clinical pharmacokinetics of cyclophosphamide.
Clin Pharmacokinet, 1991. **20**(3): S. 194-208.

82. De Bruijn, E.A., Slee, P.H., Van Oosterom, A.T., Lameijer, D.W., Roozen-
daal, K.J. und Tjaden, U.R.
*Pharmacokinetics of intravenous and oral cyclophosphamide in the pres-
ence of methotrexate and fluorouracil.*
Pharm Weekbl Sci, 1988. **10**(5): S. 200-6.
83. Juma, F.D., Rogers, H.J. und Trounce, J.R.
*Pharmacokinetics of cyclophosphamide and alkylating activity in man after
intravenous and oral administration.*
Br J Clin Pharmacol, 1979. **8**(3): S. 209-17.
84. Struck, R.F., Alberts, D.S., Horne, K., Phillips, J.G., Peng, Y.M. und Roe,
D.J.
*Plasma pharmacokinetics of cyclophosphamide and its cytotoxic metabo-
lites after intravenous versus oral administration in a randomized, crossover
trial.*
Cancer Res, 1987. **47**(10): S. 2723-6.
85. Juma, F.D., Rogers, H.J. und Trounce, J.R.
First pass hepatic metabolism of cyclophosphamide [proceedings].
Br J Clin Pharmacol, 1979. **7**(4): S. 422P.
86. Busse, D., Kroemer, H.K., Sperker, B. und Murdter, T.E.
*Fortschritte in der Therapie von Tumorerkrankungen mit Zytostatika: Unter-
suchungen zur Hochdosistherapie mit Cyclophosphamid und zum Drug
Targeting von Doxorubicin.*
Pharm Unserer Zeit, 1998. **27**(5): S. 216-22.
87. Bailey, H., Mulcahy, R.T., Tutsch, K.D., Rozentel, J.M., Alberti, D., Arzoo-
manian, R.Z., *et al.*
*A phase I study of SR-2508 and cyclophosphamide administered by intra-
venous injection.*
Cancer Res, 1991. **51**(4): S. 1099-104.
88. Fasola, G., Lo Greco, P., Calori, E., Zilli, M., Verlicchi, F., Motta, M.R., *et al.*
*Pharmacokinetics of high-dose cyclophosphamide for bone marrow trans-
plantation.*
Haematologica, 1991. **76**(2): S. 120-5.
89. Grochow, L.B. und Colvin, M.
Clinical pharmacokinetics of cyclophosphamide.
Clin Pharmacokinet, 1979. **4**(5): S. 380-94.
90. Dockham, P.A., Sreerama, L. und Sladek, N.E.
*Relative contribution of human erythrocyte aldehyde dehydrogenase to the
systemic detoxification of the oxazaphosphorines.*
Drug Metab Dispos, 1997. **25**(12): S. 1436-41.

91. Chen, L. und Waxman, D.J.
Intratumoral activation and enhanced chemotherapeutic effect of oxazaphosphorines following cytochrome P-450 gene transfer: development of a combined chemotherapy/cancer gene therapy strategy.
Cancer Res, 1995. **55**(3): S. 581-9.
92. Chang, T.K., Weber, G.F., Crespi, C.L. und Waxman, D.J.
Differential activation of cyclophosphamide and ifosfamide by cytochromes P-450 2B and 3A in human liver microsomes.
Cancer Res, 1993. **53**(23): S. 5629-37.
93. Chang, T.K., Yu, L., Maurel, P. und Waxman, D.J.
Enhanced cyclophosphamide and ifosfamide activation in primary human hepatocyte cultures: response to cytochrome P-450 inducers and autoinduction by oxazaphosphorines.
Cancer Res, 1997. **57**(10): S. 1946-54.
94. Ren, S., Yang, J.S., Kalhorn, T.F. und Slattery, J.T.
Oxidation of cyclophosphamide to 4-hydroxycyclophosphamide and deschloroethylcyclophosphamide in human liver microsomes.
Cancer Res, 1997. **57**(19): S. 4229-35.
95. Roy, P., Yu, L.J., Crespi, C.L. und Waxman, D.J.
Development of a substrate-activity based approach to identify the major human liver P-450 catalysts of cyclophosphamide and ifosfamide activation based on cDNA-expressed activities and liver microsomal P-450 profiles.
Drug Metab Dispos, 1999. **27**(6): S. 655-66.
96. Boyd, V.L., Robbins, J.D., Egan, W. und Ludeman, S.M.
³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopic observation of the intracellular transformations of oncostatic cyclophosphamide metabolites.
J Med Chem, 1986. **29**(7): S. 1206-10.
97. Lorenz, C. und Jaehde, U.
Cyclophosphamid.
Dtsch Med Wochenschr, 2001. **126**(28-29): S. 815-8.
98. Bohnenstengel, F., Hofmann, U., Eichelbaum, M. und Kroemer, H.K.
Characterization of the cytochrome P450 involved in side-chain oxidation of cyclophosphamide in humans.
Eur J Clin Pharmacol, 1996. **51**(3-4): S. 297-301.
99. Holm, K.A., Kindberg, C.G., Stobaugh, J.F., Slavik, M. und Riley, C.M.
Stereoselective pharmacokinetics and metabolism of the enantiomers of cyclophosphamide. Preliminary results in humans and rabbits.
Biochem Pharmacol, 1990. **39**(8): S. 1375-84.

100. Williams, M.L., Wainer, I.W., Granvil, C.P., Gehrcke, B., Bernstein, M.L. und Ducharme, M.P.
Pharmacokinetics of (R)- and (S)-cyclophosphamide and their dechloroethylated metabolites in cancer patients.
Chirality, 1999. **11**(4): S. 301-8.
101. Kivisto, K.T., Kroemer, H.K. und Eichelbaum, M.
The role of human cytochrome P450 enzymes in the metabolism of anti-cancer agents: implications for drug interactions.
Br J Clin Pharmacol, 1995. **40**(6): S. 523-30.
102. Rousseau, A., Marquet, P., Debord, J., Sabot, C. und Lachatre, G.
Adaptive control methods for the dose individualisation of anticancer agents.
Clin Pharmacokinet, 2000. **38**(4): S. 315-53.
103. Bertz, R.J. und Granneman, G.R.
Use of in vitro and in vivo data to estimate the likelihood of metabolic pharmacokinetic interactions.
Clin Pharmacokinet, 1997. **32**(3): S. 210-58.
104. Wacher, V.J., Silverman, J.A., Zhang, Y. und Benet, L.Z.
Role of P-glycoprotein and cytochrome P450 3A in limiting oral absorption of peptides and peptidomimetics.
J Pharm Sci, 1998. **87**(11): S. 1322-30.
105. Wrighton, S.A. und Stevens, J.C.
The human hepatic cytochromes P450 involved in drug metabolism.
Crit Rev Toxicol, 1992. **22**(1): S. 1-21.
106. Watkins, P.B., Wrighton, S.A., Schuetz, E.G., Molowa, D.T. und Guzelian, P.S.
Identification of glucocorticoid-inducible cytochromes P-450 in the intestinal mucosa of rats and man.
J Clin Invest, 1987. **80**(4): S. 1029-36.
107. Kolars, J.C., Awni, W.M., Merion, R.M. und Watkins, P.B.
First-pass metabolism of cyclosporin by the gut.
Lancet, 1991. **338**(8781): S. 1488-90.
108. Lamba, J.K., Lin, Y.S., Schuetz, E.G. und Thummel, K.E.
Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism.
Adv Drug Deliv Rev, 2002. **54**(10): S. 1271-94.
109. Felix, C.A., Walker, A.H., Lange, B.J., Williams, T.M., Winick, N.J., Cheung, N.K., et al.
Association of CYP3A4 genotype with treatment-related leukemia.
Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(22): S. 13176-81.

110. van Schaik, R.H., de Wildt, S.N., van Iperen, N.M., Uitterlinden, A.G., van den Anker, J.N. und Lindemans, J.
CYP3A4-V polymorphism detection by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis and its allelic frequency among 199 Dutch Caucasians.
Clin Chem, 2000. **46**(11): S. 1834-6.
111. Wandel, C., Witte, J.S., Hall, J.M., Stein, C.M., Wood, A.J. und Wilkinson, G.R.
*CYP3A activity in African American and European American men: population differences and functional effect of the CYP3A4*1B5'-promoter region polymorphism.*
Clin Pharmacol Ther, 2000. **68**(1): S. 82-91.
112. Ball, S.E., Scatina, J., Kao, J., Ferron, G.M., Fruncillo, R., Mayer, P., et al.
Population distribution and effects on drug metabolism of a genetic variant in the 5' promoter region of CYP3A4.
Clin Pharmacol Ther, 1999. **66**(3): S. 288-94.
113. Lamba, J.K., Lin, Y.S., Thummel, K., Daly, A., Watkins, P.B., Strom, S., et al.
Common allelic variants of cytochrome P4503A4 and their prevalence in different populations.
Pharmacogenetics, 2002. **12**(2): S. 121-32.
114. Baumhäkel, M., Kasel, D., Rao-Schymanski, R.A., Bocker, R., Beckurts, K.T., Zaigler, M., et al.
Screening for inhibitory effects of antineoplastic agents on CYP3A4 in human liver microsomes.
Int J Clin Pharmacol Ther, 2001. **39**(12): S. 517-28.
115. D'Incalci, M., Bolis, G., Facchinetti, T., Mangioni, C., Morasca, L., Morazoni, P., et al.
Decreased half life of cyclophosphamide in patients under continual treatment.
Eur J Cancer, 1979. **15**(1): S. 7-10.
116. Schuler, U., Ehninger, G. und Wagner, T.
Repeated high-dose cyclophosphamide administration in bone marrow transplantation: exposure to activated metabolites.
Cancer Chemother Pharmacol, 1987. **20**(3): S. 248-52.
117. Chen, T.L., Passos-Coelho, J.L., Noe, D.A., Kennedy, M.J., Black, K.C., Colvin, O.M., et al.
Nonlinear pharmacokinetics of cyclophosphamide in patients with metastatic breast cancer receiving high-dose chemotherapy followed by autologous bone marrow transplantation.
Cancer Res, 1995. **55**(4): S. 810-6.

118. Fuhr, U., Rost, K.L., Engelhardt, R., Sachs, M., Liermann, D., Belloc, C., *et al.*
Evaluation of caffeine as a test drug for CYP1A2, NAT2 and CYP2E1 phenotyping in man by in vivo versus in vitro correlations.
Pharmacogenetics, 1996. **6**(2): S. 159-76.
119. Fuhr, U. und Rost, K.L.
Simple and reliable CYP1A2 phenotyping by the paraxanthine/caffeine ratio in plasma and in saliva.
Pharmacogenetics, 1994. **4**(3): S. 109-16.
120. Fernandez-Salguero, P., Hoffman, S.M., Cholerton, S., Mohrenweiser, H., Raunio, H., Rautio, A., *et al.*
A genetic polymorphism in coumarin 7-hydroxylation: sequence of the human CYP2A genes and identification of variant CYP2A6 alleles.
Am J Hum Genet, 1995. **57**(3): S. 651-60.
121. Fernandez-Salguero, P. und Gonzalez, F.J.
The CYP2A gene subfamily: species differences, regulation, catalytic activities and role in chemical carcinogenesis.
Pharmacogenetics, 1995. **5 Spec No**: S. S123-8.
122. Veronese, M.E., Miners, J.O., Randles, D., Gregov, D. und Birkett, D.J.
Validation of the tolbutamide metabolic ratio for population screening with use of sulfaphenazole to produce model phenotypic poor metabolizers.
Clin Pharmacol Ther, 1990. **47**(3): S. 403-11.
123. Brockmöller, J., Rost, K.L., Gross, D., Schenkel, A. und Roots, I.
Phenotyping of CYP2C19 with enantiospecific HPLC-quantification of R- and S-mephenytoin and comparison with the intron4/exon5 G-->A-splice site mutation.
Pharmacogenetics, 1995. **5**(2): S. 80-8.
124. Capon, D.A., Bochner, F., Kerry, N., Mikus, G., Danz, C. und Somogyi, A.A.
The influence of CYP2D6 polymorphism and quinidine on the disposition and antitussive effect of dextromethorphan in humans.
Clin Pharmacol Ther, 1996. **60**(3): S. 295-307.
125. Kharasch, E.D., Thummel, K.E., Mhyre, J. und Lillibridge, J.H.
Single-dose disulfiram inhibition of chlorzoxazone metabolism: a clinical probe for P450 2E1.
Clin Pharmacol Ther, 1993. **53**(6): S. 643-50.
126. O'Shea, D., Davis, S.N., Kim, R.B. und Wilkinson, G.R.
Effect of fasting and obesity in humans on the 6-hydroxylation of chlorzoxazone: a putative probe of CYP2E1 activity.
Clin Pharmacol Ther, 1994. **56**(4): S. 359-67.

127. Kim, J.S., Nafziger, A.N., Tsunoda, S.M., Choo, E.E., Streetman, D.S., Kashauba, A.D., *et al.*
Limited sampling strategy to predict AUC of the CYP3A phenotyping probe midazolam in adults: application to various assay techniques.
J Clin Pharmacol, 2002. **42**(4): S. 376-82.
128. Krecic-Shepard, M.E., Barnas, C.R., Slimko, J., Gorski, J.C., Wainer, I.W. und Schwartz, J.B.
In vivo comparison of putative probes of CYP3A4/5 activity: erythromycin, dextromethorphan, and verapamil.
Clin Pharmacol Ther, 1999. **66**(1): S. 40-50.
129. Watkins, P.B.
Noninvasive tests of CYP3A enzymes.
Pharmacogenetics, 1994. **4**(4): S. 171-84.
130. Kivisto, K.T. und Kroemer, H.K.
Use of probe drugs as predictors of drug metabolism in humans.
J Clin Pharmacol, 1997. **37**(1 Suppl): S. 40S-48S.
131. Kharasch, E.D., Russell, M., Mautz, D., Thummel, K.E., Kunze, K.L., Bowdle, A., *et al.*
The role of cytochrome P450 3A4 in alfentanil clearance. Implications for interindividual variability in disposition and perioperative drug interactions.
Anesthesiology, 1997. **87**(1): S. 36-50.
132. Gorski, J.C., Jones, D.R., Haehner-Daniels, B.D., Hamman, M.A., O'Mara, E.M., Jr. und Hall, S.D.
The contribution of intestinal and hepatic CYP3A to the interaction between midazolam and clarithromycin.
Clin Pharmacol Ther, 1998. **64**(2): S. 133-43.
133. Lee, J.I., Chaves-Gnecco, D., Amico, J.A., Kroboth, P.D., Wilson, J.W. und Frye, R.F.
Application of semisimultaneous midazolam administration for hepatic and intestinal cytochrome P450 3A phenotyping.
Clin Pharmacol Ther, 2002. **72**(6): S. 718-28.
134. Jetter, A., Kasel, D., Kinzig-Schippers, M., Harlfinger, S., Jabrane, W., Tomalik-Scharte, D., *et al.*
Comparison of two sequential i.v. and oral midazolam application schedules for CYP3A4 phenotyping.
Eur J Clin Pharmacol, 2002. **58**(7): S. S87.
135. Schmiedlin-Ren, P., Thummel, K.E., Fisher, J.M., Paine, M.F., Lown, K.S. und Watkins, P.B.
Expression of enzymatically active CYP3A4 by Caco-2 cells grown on extracellular matrix-coated permeable supports in the presence of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3.
Mol Pharmacol, 1997. **51**(5): S. 741-54.

136. Gorski, J.C., Hall, S.D., Jones, D.R., VandenBranden, M. und Wrighton, S.A.
Regioselective biotransformation of midazolam by members of the human cytochrome P450 3A (CYP3A) subfamily.
Biochem Pharmacol, 1994. **47**(9): S. 1643-53.
137. Wandel, C., Bocker, R., Bohrer, H., Browne, A., Rugheimer, E. und Martin, E.
Midazolam is metabolized by at least three different cytochrome P450 enzymes.
Br J Anaesth, 1994. **73**(5): S. 658-61.
138. Tsunoda, S.M., Velez, R.L., von Moltke, L.L. und Greenblatt, D.J.
Differentiation of intestinal and hepatic cytochrome P450 3A activity with use of midazolam as an in vivo probe: effect of ketoconazole.
Clin Pharmacol Ther, 1999. **66**(5): S. 461-71.
139. Thummel, K.E., O'Shea, D., Paine, M.F., Shen, D.D., Kunze, K.L., Perkins, J.D., *et al.*
Oral first-pass elimination of midazolam involves both gastrointestinal and hepatic CYP3A-mediated metabolism.
Clin Pharmacol Ther, 1996. **59**(5): S. 491-502.
140. Lodder, R.
High Performance Liquid Chromatography (HPLC): A Users Guide.
12.12.2002: <http://www.pharm.uky.edu/ASRG/HPLC/hplcmtry.html>
141. Lauter, S., 2003
Persönliche Mitteilungen
142. Scott, R.P.W.
Liquid Chromatography Detectors. 1987, Elsevier: Amsterdam.
143. Kazakevich, Y. und McNair, H.
Textbook on High Performance Liquid Chromatography (HPLC).
12.01.2003: http://hplc.chem.shu.edu/NEW/HPLC_Book/
144. Niessen, W.M.A. und Tinke, A.P.
Liquid chromatography-mass spectrometry. General principles and instrumentation.
J Chromatogr A, 1995. **703**(1-2): S. 37-57.
145. Cserhati, T.
Mass spectrometric detection in chromatography. Trends and perspectives.
Biomed Chromatogr, 2002. **16**(5): S. 303-10.
146. van Breemen, R.B.
Electrospray Liquid Chromatography-Mass Spectrometry of Carotenoids.
Anal Chem, 1995. **67**(13): S. 2004-2009.

147. Holzgrabe, U., Diehl, B.W. und Wawer, I.
NMR spectroscopy in pharmacy.
J Pharm Biomed Anal, 1998. **17**(4-5): S. 557-616.
148. Foxall, P.J., Spraul, M., Farrant, R.D., Lindon, L.C., Neild, G.H. und Nicholson, J.K.
750 MHz ¹H-NMR spectroscopy of human blood plasma.
J Pharm Biomed Anal, 1993. **11**(4-5): S. 267-76.
149. Busse, D., Busch, F.W., Bohnenstengel, F., Eichelbaum, M., Fischer, P., Opalinska, J., *et al.*
Dose escalation of cyclophosphamide in patients with breast cancer: consequences for pharmacokinetics and metabolism.
J Clin Oncol, 1997. **15**(5): S. 1885-96.
150. Lindon, J.C., Nicholson, J.K. und Wilson, I.D.
The development and application of coupled HPLC-NMR spectroscopy.
Adv Chromatogr, 1996. **36**: S. 315-82.
151. Seddon, M.J., Spraul, M., Wilson, I.D., Nicholson, J.K. und Lindon, J.C.
Improvement in the characterization of minor drug metabolites from HPLC-NMR studies through the use of quantified maximum entropy processing of NMR spectra.
J Pharm Biomed Anal, 1994. **12**(3): S. 419-24.
152. Spraul, M., Hofmann, M., Lindon, J.C., Farrant, R.D., Seddon, M.J., Nicholson, J.K., *et al.*
Evaluation of liquid chromatography coupled with high-field ¹H NMR spectroscopy for drug metabolite detection and characterization: the identification of paracetamol metabolites in urine and bile.
NMR Biomed, 1994. **7**(7): S. 295-303.
153. Shockcor, J.P., Unger, S.E., Wilson, I.D., Foxall, P.J., Nicholson, J.K. und Lindon, J.C.
Combined HPLC, NMR spectroscopy, and ion-trap mass spectrometry with application to the detection and characterization of xenobiotic and endogenous metabolites in human urine.
Anal Chem, 1996. **68**(24): S. 4431-5.
154. Mutlib, A.E., Strupczewski, J.T. und Chesson, S.M.
Application of hyphenated LC/NMR and LC/MS techniques in rapid identification of in vitro and in vivo metabolites of iloperidone.
Drug Metab Dispos, 1995. **23**(9): S. 951-64.
155. Gorsen, R.M., Weiss, A.J. und Manthei, R.W.
Analysis of procarbazine and metabolites by gas chromatography-mass spectrometry.
J Chromatogr, 1980. **221**(2): S. 309-18.

156. Rucki, R.J., Ross, A. und Moros, S.A.
Application of an electrochemical detector to the determination of procarbazine hydrochloride by high-performance liquid chromatography.
J Chromatogr, 1980. **190**(2): S. 359-65.
157. Jardine, I., Fenselau, C., Appler, M., Kan, M.N., Brundrett, R.B. und Colvin, M.
Quantitation by gas chromatography-chemical ionization mass spectrometry of cyclophosphamide, phosphoramidate mustard, and nornitrogen mustard in the plasma and urine of patients receiving cyclophosphamide therapy.
Cancer Res, 1978. **38**(2): S. 408-15.
158. Juma, F.D., Rogers, H.J., Trounce, J.R. und Bradbrook, I.D.
Pharmacokinetics of intravenous cyclophosphamide in man, estimated by gas-liquid chromatography.
Cancer Chemother Pharmacol, 1978. **1**(4): S. 229-31.
159. Momerency, G., Van Cauwenberghe, K., Slee, P.H., Van Oosterom, A.T. und De Bruijn, E.A.
The determination of cyclophosphamide and its metabolites in blood plasma as stable trifluoroacetyl derivatives by electron capture chemical ionization gas chromatography/mass spectrometry.
Biol Mass Spectrom, 1994. **23**(3): S. 149-58.
160. Motzer, R.J., Gulati, S.C., Tong, W.P., Menendez-Botet, C., Lyn, P., Mazumdar, M., et al.
Phase I trial with pharmacokinetic analyses of high-dose carboplatin, etoposide, and cyclophosphamide with autologous bone marrow transplantation in patients with refractory germ cell tumors.
Cancer Res, 1993. **53**(16): S. 3730-5.
161. Rustum, A.M. und Hoffman, N.E.
Determination of cyclophosphamide in whole blood and plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography.
J Chromatogr, 1987. **422**: S. 125-34.
162. Burton, L.C. und James, C.A.
Rapid method for the determination of ifosfamide and cyclophosphamide in plasma by high-performance liquid chromatography with solid-phase extraction.
J Chromatogr, 1988. **431**(2): S. 450-4.
163. Hardy, R.W., Erlichman, C. und Soldin, S.J.
High-performance liquid chromatographic measurement of cyclophosphamide in serum.
Ther Drug Monit, 1984. **6**(3): S. 313-8.

164. Slattery, J.T., Kalhorn, T.F., McDonald, G.B., Lambert, K., Buckner, C.D., Bensinger, W.I., *et al.*
Conditioning regimen-dependent disposition of cyclophosphamide and hydroxycyclophosphamide in human marrow transplantation patients.
J Clin Oncol, 1996. **14**(5): S. 1484-94.
165. Kerbusch, T., Huitema, A.D., Kettenes-van den Bosch, J.J., Keizer, H.J., Ouwerkerk, J., de Kraker, J., *et al.*
High-performance liquid chromatographic determination of stabilized 4-hydroxyifosfamide in human plasma and erythrocytes.
J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 1998. **716**(1-2): S. 275-84.
166. Ludeman, S.M., Shulman-Roskes, E.M., Wong, K.K., Han, S.Y., Anderson, L.W., Strong, J.M., *et al.*
Oxime derivatives of the intermediary oncostatic metabolites of cyclophosphamide and ifosfamide: synthesis and deuterium labeling for applications to metabolite quantification.
J Pharm Sci, 1995. **84**(4): S. 393-8.
167. Sadagopan, N., Cohen, L., Roberts, B., Collard, W. und Omer, C.
Liquid chromatography-tandem mass spectrometric quantitation of cyclophosphamide and its hydroxy metabolite in plasma and tissue for determination of tissue distribution.
J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 2001. **759**(2): S. 277-84.
168. Baumann, F., Lorenz, C., Jaehde, U. und Preiss, R.
Determination of cyclophosphamide and its metabolites in human plasma by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry.
J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 1999. **729**(1-2): S. 297-305.
169. Joqueviel, C., Martino, R., Gilard, V., Malet-Martino, M., Canal, P. und Niemeyer, U.
Urinary excretion of cyclophosphamide in humans, determined by phosphorus-31 nuclear magnetic resonance spectroscopy.
Drug Metab Dispos, 1998. **26**(5): S. 418-28.
170. Masurel, D. und Wainer, I.W.
Analytical and preparative high-performance liquid chromatographic separation of the enantiomers of ifosfamide, cyclophosphamide and trofosfamide and their determination in plasma.
J Chromatogr, 1989. **490**(1): S. 133-43.
171. Reid, J.M., Stobaugh, J.F. und Sternson, L.A.
Liquid chromatographic determination of cyclophosphamide enantiomers in plasma by precolumn chiral derivatization.
Anal Chem, 1989. **61**(5): S. 441-6.
172. Corlett, S.A. und Chrystyn, H.
High-performance liquid chromatographic determination of the enantiomers of cyclophosphamide in serum.
J Chromatogr B Biomed Appl, 1996. **682**(2): S. 337-42.

173. Ha, H.R., Rentsch, K.M., Kneer, J. und Vonderschmitt, D.J.
Determination of midazolam and its alpha-hydroxy metabolite in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography.
Ther Drug Monit, 1993. **15**(4): S. 338-43.
174. Vree, T.B., Baars, A.M., Booij, L.H. und Driessen, J.J.
Simultaneous determination and pharmacokinetics of midazolam and its hydroxymetabolites in plasma and urine of man and dog by means of high-performance liquid chromatography.
Arzneimittelforschung, 1981. **31**(12a): S. 2215-9.
175. Johnson, T.N., Rostami-Hodjegan, A., Goddard, J.M., Tanner, M.S. und Tucker, G.T.
Contribution of midazolam and its 1-hydroxy metabolite to preoperative sedation in children: a pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis.
Br J Anaesth, 2002. **89**(3): S. 428-37.
176. Carrillo, J.A., Ramos, S.I., Agundez, J.A., Martinez, C. und Benitez, J.
Analysis of midazolam and metabolites in plasma by high-performance liquid chromatography: probe of CYP3A.
Ther Drug Monit, 1998. **20**(3): S. 319-24.
177. Vasiliades, J. und Sahawneh, T.H.
Determination of midazolam by high-performance liquid chromatography.
J Chromatogr, 1981. **225**(1): S. 266-71.
178. Syracuse, C.D., Kuhnert, B.R., Kaine, C.J., Santos, A.C. und Finster, M.
Measurement of midazolam and alpha-hydroxymidazolam by gas chromatography with electron-capture detection.
J Chromatogr, 1986. **380**(1): S. 145-50.
179. Heizmann, P. und Ziegler, W.H.
Excretion and metabolism of ¹⁴C-midazolam in humans following oral dosing.
Arzneimittelforschung, 1981. **31**(12a): S. 2220-3.
180. Ha, H.R., Funk, B., Maitre, P.O., Zbinden, A.M., Follath, F. und Thomson, D.A.
Midazolam in plasma from hospitalized patients as measured by gas-liquid chromatography with electron-capture detection.
Clin Chem, 1988. **34**(4): S. 676-9.
181. Rubio, F., Miwa, B.J. und Garland, W.A.
Determination of midazolam and two metabolites of midazolam in human plasma by gas chromatography--negative chemical-ionization mass spectrometry.
J Chromatogr, 1982. **233**: S. 157-65.

182. Arendt, R.M., Greenblatt, D.J. und Garland, W.A.
Quantitation by gas chromatography of the 1- and 4-hydroxy metabolites of midazolam in human plasma.
Pharmacology, 1984. **29**(3): S. 158-64.
183. Villeneuve, J.P., L'Ecuyer, L., De Maeght, S. und Bannon, P.
Prediction of cyclosporine clearance in liver transplant recipients by the use of midazolam as a cytochrome P450 3A probe.
Clin Pharmacol Ther, 2000. **67**(3): S. 242-8.
184. Schütz, H.
Analytische Daten des neuen Benzodiazepinderivates Midazolam (Dormicum) und seiner Metaboliten.
Z Rechtsmed, 1985. **94**(3): S. 197-205.
185. Toyooka, T., Kumaki, Y., Kanbori, M., Kato, M. und Nakahara, Y.
Determination of hypnotic benzodiazepines (alprazolam, estazolam, and midazolam) and their metabolites in rat hair and plasma by reversed-phase liquid-chromatography with electrospray ionization mass spectrometry.
J Pharm Biomed Anal, 2003. **30**(6): S. 1773-87.
186. Kasel, D., Harlfinger, S., Kinzig-Schippers, M., Sörgel, F., Gebhardt, W. und Fuhr, U.
Determination of Midazolam in Human Plasma Using LC-MS/MS-Devices from two Different Manufacturers.
Eur J Clin Pharmacol, 2002. **58**(7): S. S87.
187. Shiran, M.R., Gregory, A., Rostami-Hodjegan, A., Tucker, G.T. und Leonard, M.S.
Determination of midazolam and 1'-hydroxymidazolam by liquid chromatography-mass spectrometry in plasma of patients undergoing methadone maintenance treatment.
J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2003. **783**(1): S. 303-7.
188. CPMP/ICH/381/95, EEC Note for Guidance on Validation of Analytical Procedures: Definitions and Terminology.
1994, London (UK)
189. CPMP/ICH/281/95, EEC Note for Guidance, Validation of Analytical Procedures: Methodology.
1996, London (UK)
190. U.S. Department of Health and Human Services
Food and Drug Administration, Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation.
2001, Beltsville, MD (USA)

191. Shah, V.P., Midha, K.K., Dighe, S., McGilveray, I.J., Skelly, J.P., Yacobi, A., *et al.*
Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. Conference report.
Eur J Drug Metab Pharmacokinet, 1991. **16**(4): S. 249-55.
192. Shah, V.P., Midha, K.K., Findlay, J.W., Hill, H.M., Hulse, J.D., McGilveray, I.J., *et al.*
Bioanalytical method validation--a revisit with a decade of progress.
Pharm Res, 2000. **17**(12): S. 1551-7.
193. Shriner, R.F. und Kleiderer.
in *Org. Syn. Coll.*
1943, Wiley J and Sons: New York. S. 538-539.
194. Vogel, A.
in *A Textbook of Practical Organic Chemistry*
1956, Longmans, Green and Co.: New York. S. 3611.
195. Vold, R.L., Waugh, J.S., Klein, M.P. und Phelps, D.E.
Measurement of Spin Relaxation in Complex Systems.
J. Chem. Phys., 1968. **48**: S. 3831-3832.
196. Du Bois, D. und Du Bois, E.F.
A formula to estimate the approximate surface area if height and weight be known.
Nutrition, 1989. **5**(5): S. 303-11; discussion 312-3.
197. Kasper, H., Dries, V., Drebber, U., zur Hausen, A., Stibbel, D., Schirmacher, P., *et al.*
Etablierung eines in-vivo-nahen Lebergewebeschnittkulturmodells zur Untersuchung der Apoptoseregulation.
Z Gastroenterol, 2003. **41**(1): S. 128.
198. Ebsen, M., Mogilevski, G., Anhenn, O., Maiworm, V., Theegarten, D., Schwarze, J., *et al.*
Infection of murine precision cut lung slices (PCLS) with respiratory syncytial virus (RSV) and chlamydomydia pneumoniae using the Krumdieck technique.
Pathol Res Pract, 2002. **198**(11): S. 747-53.
199. Evans, W.E. und Relling, M.V.
Clinical pharmacokinetics-pharmacodynamics of anticancer drugs.
Clin Pharmacokinet, 1989. **16**(6): S. 327-36.
200. Huitema, A.D., Mathot, R.A., Tibben, M.M., Rodenhuis, S. und Beijnen, J.H.
A mechanism-based pharmacokinetic model for the cytochrome P450 drug-drug interaction between cyclophosphamide and thioTEPA and the autoinduction of cyclophosphamide.
J Pharmacokinet Pharmacodyn, 2001. **28**(3): S. 211-30.

201. Kasel, D.
Metabolisierung des Zytostatikums Procarbazin durch Cytochrom P450-Enzyme des Menschen.
Diplomarbeit im Fachbereich Chemie der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, Universität zu Köln, 1998
202. Oliverio, V.T., Denham, C., DeVita, V.T. und Kelly, M.G.
Some pharmacological properties of a new antitumor agent, N-Isopropyl- α -(2-methylhydrazino)-p-toluamide, hydrochloride (NSC-77213).
Cancer Chemother Rep, 1964. **42**: S. 1-7.
203. Raaflaub, J. und Schwartz, D.E.
Über den Metabolismus eines cytostatisch wirksamen Methylhydrazin-Derivates (Natulan).
Experientia, 1964. **21**(1): S. 44-45.
204. Benedetti, M.S. und Tipton, K.F.
Monoamine oxidases and related amine oxidases as phase I enzymes in the metabolism of xenobiotics.
J Neual Transm, 1998. **52**(Suppl.): S. 149-171.
205. Gescher, A. und Raymont, C.
Studies of the metabolism of N-methyl containing anti-tumour agents: $^{14}\text{CO}_2$ breath analysis after administration of ^{14}C -labelled N-methyl drugs, formaldehyde and formate in mice.
Biochem Pharmacol, 1981. **30**(11): S. 1245-52.
206. Cockcroft, D.W. und Gault, M.H.
Prediction of creatinine clearance from serum creatinine.
Nephron, 1976. **16**(1): S. 31-41.
207. Woodland, C., Ito, S., Granvil, C.P., Wainer, I.W., Klein, J. und Koren, G.
Evidence of renal metabolism of ifosfamide to nephrotoxic metabolites.
Life Sci, 2000. **68**(1): S. 109-17.
208. Busse, D., Busch, F.W., Schweizer, E., Bohnenstengel, F., Eichelbaum, M., Fischer, P., *et al.*
Fractionated administration of high-dose cyclophosphamide: influence on dose-dependent changes in pharmacokinetics and metabolism.
Cancer Chemother Pharmacol, 1999. **43**(3): S. 263-8.
209. Hadidi, A.H., Coulter, C.E. und Idle, J.R.
Phenotypically deficient urinary elimination of carboxyphosphamide after cyclophosphamide administration to cancer patients.
Cancer Res, 1988. **48**(18): S. 5167-71.
210. Tasso, M.J., Boddy, A.V., Price, L., Wyllie, R.A., Pearson, A.D. und Idle, J.R.
Pharmacokinetics and metabolism of cyclophosphamide in paediatric patients.
Cancer Chemother Pharmacol, 1992. **30**(3): S. 207-11.

211. Yule, S.M., Boddy, A.V., Cole, M., Price, L., Wyllie, R., Tasso, M.J., *et al.*
Cyclophosphamide metabolism in children.
Cancer Res, 1995. **55**(4): S. 803-9.
212. Kawashiro, T., Yamashita, K., Zhao, X.J., Koyama, E., Tani, M., Chiba, K.,
et al.
A study on the metabolism of etoposide and possible interactions with anti-tumor or supporting agents by human liver microsomes.
J Pharmacol Exp Ther, 1998. **286**(3): S. 1294-300.
213. Boddy, A.V., Furtun, Y., Sardas, S., Sardas, O. und Idle, J.R.
Individual variation in the activation and inactivation of metabolic pathways of cyclophosphamide.
J Natl Cancer Inst, 1992. **84**(22): S. 1744-8.
214. Lang, T., Klein, K., Fischer, J., Nussler, A.K., Neuhaus, P., Hofmann, U., *et al.*
Extensive genetic polymorphism in the human CYP2B6 gene with impact on expression and function in human liver.
Pharmacogenetics, 2001. **11**(5): S. 399-415.
215. Özdemir, V., Kalow, W., Tang, B.K., Paterson, A.D., Walker, S.E., Endrenyi, L., *et al.*
Evaluation of the genetic component of variability in CYP3A4 activity: a repeated drug administration method.
Pharmacogenetics, 2000. **10**(5): S. 373-88.
216. Wilkinson, G.R.
Cytochrome P4503A (CYP3A) metabolism: prediction of in vivo activity in humans.
J Pharmacokinetic Biopharm, 1996. **24**(5): S. 475-90.
217. Ren, S., Kalhorn, T.F., McDonald, G.B., Anasetti, C., Appelbaum, F.R. und Slattery, J.T.
Pharmacokinetics of cyclophosphamide and its metabolites in bone marrow transplantation patients.
Clin Pharmacol Ther, 1998. **64**(3): S. 289-301.
218. Sandstrom, M., Freijs, A., Larsson, R., Nygren, P., Fjallskog, M.L., Bergh, J., *et al.*
Lack of relationship between systemic exposure for the component drug of the fluorouracil, epirubicin, and 4-hydroxycyclophosphamide regimen in breast cancer patients.
J Clin Oncol, 1996. **14**(5): S. 1581-8.
219. Launay-Iliadis, M.C., Bruno, R., Cosson, V., Vergniol, J.C., Oulid-Aissa, D., Marty, M., *et al.*
Population pharmacokinetics of docetaxel during phase I studies using nonlinear mixed-effect modeling and nonparametric maximum-likelihood estimation.
Cancer Chemother Pharmacol, 1995. **37**(1-2): S. 47-54.

220. Chatelut, E., Canal, P., Brunner, V., Chevreau, C., Pujol, A., Boneu, A., *et al.*
Prediction of carboplatin clearance from standard morphological and biological patient characteristics.
J Natl Cancer Inst, 1995. **87**(8): S. 573-80.
221. Sheiner, L.B. und Grasela, T.H.
An Introduction to Mixed Effect Modeling: Concepts, Definitions, and Justification.
J Pharmacokinet Biopharm, 1991. **19**(Suppl.): S. 11S-24S.
222. Aarons, L.
Population pharmacokinetics.
Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol, 1992. **30**(11): S. 520-2.
223. Sheiner, L.B. und Beal, S.L.
Evaluation of methods for estimating population pharmacokinetics parameters. I. Michaelis-Menten model: routine clinical pharmacokinetic data.
J Pharmacokinet Biopharm, 1980. **8**(6): S. 553-71.
224. Wade, J.R., Beal, S.L. und Sambol, N.C.
Interaction between structural, statistical, and covariate models in population pharmacokinetic analysis.
J Pharmacokinet Biopharm, 1994. **22**(2): S. 165-77.
225. Erlichman, C., Soldin, S.J., Hardy, R.W., Thiessen, J.J., Sturgeon, J.F., Fine, S., *et al.*
Disposition of cyclophosphamide on two consecutive cycles of treatment in patients with ovarian carcinoma.
Arzneimittelforschung, 1988. **38**(6): S. 839-42.
226. Chen, T.L., Kennedy, M.J., Anderson, L.W., Kiraly, S.B., Black, K.C., Colvin, O.M., *et al.*
Nonlinear pharmacokinetics of cyclophosphamide and 4-hydroxycyclophosphamide/aldophosphamide in patients with metastatic breast cancer receiving high-dose chemotherapy followed by autologous bone marrow transplantation.
Drug Metab Dispos, 1997. **25**(5): S. 544-51.
227. Juma, F.D., Koech, D.K., Kasili, E.G. und Ogada, T.
Pharmacokinetics of cyclophosphamide in Kenyan African children with lymphoma.
Br J Clin Pharmacol, 1984. **18**(1): S. 106-7.
228. Canal, P., Chatelut, E. und Guichard, S.
Practical treatment guide for dose individualisation in cancer chemotherapy.
Drugs, 1998. **56**(6): S. 1019-38.

229. Engel, C., Loeffler, M., Schmitz, S., Tesch, H. und Diehl, V.
Acute hematologic toxicity and practicability of dose-intensified BEACOPP chemotherapy for advanced stage Hodgkin's disease. German Hodgkin's Lymphoma Study Group (GHSG).
Ann Oncol, 2000. **11**(9): S. 1105-14.
230. Busse, D. und Kroemer, H.K.
Dose-dependency of oxazaphosphorine pharmacokinetics.
Int J Clin Pharmacol Ther, 1997. **35**(2): S. 71-2.
231. Haubitz, M., Bohnenstengel, F., Brunkhorst, R., Schwab, M., Hofmann, U. und Busse, D.
Cyclophosphamide pharmacokinetics and dose requirements in patients with renal insufficiency.
Kidney Int, 2002. **61**(4): S. 1495-501.
232. Huang, Z., Roy, P. und Waxman, D.J.
Role of human liver microsomal CYP3A4 and CYP2B6 in catalyzing N-dechloroethylation of cyclophosphamide and ifosfamide.
Biochem Pharmacol, 2000. **59**(8): S. 961-72.
233. Georgiadis, M.S., Steinberg, S.M., Hankins, L.A., Ihde, D.C. und Johnson, B.E.
Obesity and therapy-related toxicity in patients treated for small-cell lung cancer.
J Natl Cancer Inst, 1995. **87**(5): S. 361-6.
234. Wilde, S., Jetter, A., Menzel, H., Rietbrock, S., Zaigler, M., Sieber, M., et al.
Population pharmacokinetics of drugs in the BEACOPP chemotherapy regimen used in Hodgkin's disease.
Int J Clin Pharmacol Ther, 2000. **38**(3): S. 147-149.
235. Madarnas, Y., Sawka, C.A., Franssen, E. und Bjarnason, G.A.
Are medical oncologists biased in their treatment of the large woman with breast cancer?
Breast Cancer Res Treat, 2001. **66**(2): S. 123-33.
236. Freyer, G., Tranchand, B., Ligneau, B., Ardiet, C., Souquet, P.J., Court-Fortune, I., et al.
Population pharmacokinetics of doxorubicin, etoposide and ifosfamide in small cell lung cancer patients: results of a multicentre study.
Br J Clin Pharmacol, 2000. **50**(4): S. 315-24.
237. Felici, A., Verweij, J. und Sparreboom, A.
Dosing strategies for anticancer drugs: the good, the bad and body-surface area.
Eur J Cancer, 2002. **38**(13): S. 1677-84.
238. Sawyer, M. und Ratain, M.J.
Body surface area as a determinant of pharmacokinetics and drug dosing.
Invest New Drugs, 2001. **19**(2): S. 171-7.

239. Calvert, A.H., Newell, D.R., Gumbrell, L.A., O'Reilly, S., Burnell, M., Boxall, F.E., *et al.*
Carboplatin dosage: prospective evaluation of a simple formula based on renal function.
J Clin Oncol, 1989. **7**(11): S. 1748-56.
240. Wrighton, S.A., Vandenbranden, M., Stevens, J.C., Shipley, L.A., Ring, B.J., Rettie, A.E., *et al.*
In vitro methods for assessing human hepatic drug metabolism: their use in drug development.
Drug Metab Rev, 1993. **25**(4): S. 453-84.
241. Paine, A.J.
Validity and reliability of in vitro systems in safety evaluation.
Environmental Toxicology and Pharmacology, 1996. **2**(2-3): S. 207-212.
242. Li, A.P., Maurel, P., Gomez-Lechon, M.J., Cheng, L.C. und Jurima-Romet, M.
Preclinical evaluation of drug-drug interaction potential: present status of the application of primary human hepatocytes in the evaluation of cytochrome P450 induction.
Chem Biol Interact, 1997. **107**(1-2): S. 5-16.
243. Tucker, G.T., Houston, J.B. und Huang, S.M.
Optimizing drug development: strategies to assess drug metabolism/transporter interaction potential--towards a consensus.
Br J Clin Pharmacol, 2001. **52**(1): S. 107-17.
244. Maurel, P.
The use of adult human hepatocytes in primary culture and other in vitro systems to investigate drug metabolism in man.
Advanced Drug Delivery Reviews, 1996. **22**(1-2): S. 105-132.
245. Lerche-Langrand, C. und Toutain, H.J.
Precision-cut liver slices: characteristics and use for in vitro pharmacotoxicology.
Toxicology, 2000. **153**(1-3): S. 221-53.
246. Martin, H., Bournique, B., Sarsat, J.P., Albaladejo, V. und Lerche-Langrand, C.
Cryopreserved rat liver slices: a critical evaluation of cell viability, histological integrity, and drug-metabolizing enzymes.
Cryobiology, 2000. **41**(2): S. 135-44.
247. Parrish, A.R., Gandolfi, A.J. und Brendel, K.
Precision-cut tissue slices: applications in pharmacology and toxicology.
Life Sci, 1995. **57**(21): S. 1887-901.

248. Bach, P.H., Vickers, A.E.M., Fisher, R., Baumann, A., Brittebo, E., Carlile, D.J., *et al.*
The use of tissue slices for pharmacology studies. The report and recommendations of ECVAM Workshop 20.
Altern Lab Anim, 2001. **24**: S. 893-923.
249. Edwards, R.J., Price, R.J., Watts, P.S., Renwick, A.B., Tredger, J.M., Boobis, A.R., *et al.*
Induction of cytochrome P450 enzymes in cultured precision-cut human liver slices.
Drug Metab Dispos, 2003. **31**(3): S. 282-8.
250. Lake, B.G., Ball, S.E., Renwick, A.B., Tredger, J.M., Kao, J., Beamand, J.A., *et al.*
Induction of CYP3A isoforms in cultured precision-cut human liver slices.
Xenobiotica, 1997. **27**(11): S. 1165-73.
251. Martin, H., Sarsat, J.P., de Waziers, I., Housset, C., Ballardur, P., Beaune, P., *et al.*
Induction of cytochrome P450 2B6 and 3A4 expression by phenobarbital and cyclophosphamide in cultures human liver slices.
Toxicol Sci, 2002. **66**(Suppl. 1): S. 247.
252. Pichard, L., Fabre, I., Fabre, G., Domergue, J., Saint Aubert, B., Mourad, G., *et al.*
Cyclosporin A drug interactions. Screening for inducers and inhibitors of cytochrome P-450 (cyclosporin A oxidase) in primary cultures of human hepatocytes and in liver microsomes.
Drug Metab Dispos, 1990. **18**(5): S. 595-606.
253. Daujat, M., Pichard, L., Fabre, I., Pineau, T., Fabre, G., Bonfils, C., *et al.*
Induction protocols for cytochromes P450 IIIA in vivo and in primary cultures of animal and human hepatocytes.
Methods Enzymol, 1991. **206**: S. 345-53.
254. Monshouwer, M., van't Klooster, G.A.E., Nijmeijer, S.M., Witkamp, R.F. und van Miert, A.S.J.P.A.M.
Characterization of cytochrome P450 isoenzymes in primary cultures of pig hepatocytes.
Toxicology in Vitro, 1998. **12**(6): S. 715-723.
255. Chan, K. und Jones, R.D.
Simultaneous determination of flumazenil, midazolam and metabolites in human biological fluids by liquid chromatography.
J Chromatogr, 1993. **619**(1): S. 154-60.

9 Anhang

9.1 Messwerte der intra- und inter-day-Assays für TAC in angereichertem Urin

Tabelle 58: intra- und inter-day-Assays für TAC in angereichertem Urin bei QC Level 1

TAC_{soll}: 900,0 µM	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6
TAC _{ist} in Probe A [µM]	864,6	988,9	994,1	853,0	939,3	819,8
TAC _{ist} in Probe B [µM]	891,0	945,6	920,0	821,0	916,5	842,8
TAC _{ist} in Probe C [µM]	890,3	989,2	997,6	826,0	848,3	780,7
TAC _{ist} in Probe D [µM]	879,0	1073,2	957,9	872,8	n.d	n.d
TAC _{ist} in Probe E [µM]	852,6	1025,4	931,3	842,2	n.d	n.d

Tabelle 59: intra- und inter-day-Assays für TAC in angereichertem Urin bei QC Level 2

TAC_{soll}: 452,1 µM	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6
TAC _{ist} in Probe A [µM]	448,9	486,4	478,6	442,9	479,6	448,2
TAC _{ist} in Probe B [µM]	424,7	502,5	482,1	438,8	478,5	438,4
TAC _{ist} in Probe C [µM]	409,7	484,5	420,1	415,4	467,9	405,0
TAC _{ist} in Probe D [µM]	424,2	482,0	430,8	410,1	n.d	n.d
TAC _{ist} in Probe E [µM]	413,1	478,6	414,4	529,0	n.d	n.d

Tabelle 60: intra- und inter-day-Assays für TAC in angereichertem Urin bei QC Level 3

TAC_{soll}: 46,80 µM	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6
TAC _{ist} in Probe A [µM]	48,29	49,17	37,74	41,43	43,67	44,91
TAC _{ist} in Probe B [µM]	44,22	49,30	35,73	37,93	50,14	45,67
TAC _{ist} in Probe C [µM]	49,70	52,95	37,59	SE	49,43	43,03
TAC _{ist} in Probe D [µM]	41,35	54,44	42,76	33,82	n.d	n.d
TAC _{ist} in Probe E [µM]	39,40	51,37	36,68	37,65	n.d	n.d

9.2 Messwerte der intra- und inter-day-Assays für CP in angereichertem Urin

Tabelle 61: intra- und inter-day-Assays für CP in angereichertem Urin für QC 1

CP_{soll}: 174,7 µg/ml	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
CP _{ist} in Probe A [µg/ml]	179,6	184,4	185,3	182,1	183,3
CP _{ist} in Probe B [µg/ml]	179,1	187,0	190,4	180,4	185,5
CP _{ist} in Probe C [µg/ml]	181,1	189,4	170,8	181,4	184,4
CP _{ist} in Probe D [µg/ml]	179,6	186,9	189,8	180,1	183,0
CP _{ist} in Probe E [µg/ml]	179,3	188,5	183,9	180,2	181,7

Tabelle 62: intra- und inter-day-Assays für CP in angereichertem Urin für QC 2

CP_{soll}: 24,53 µg/ml	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
CP _{ist} in Probe A [µg/ml]	25,53	26,65	26,86	25,53	25,83
CP _{ist} in Probe B [µg/ml]	24,72	26,98	26,82	25,73	25,86
CP _{ist} in Probe C [µg/ml]	25,37	26,82	26,75	25,65	26,43
CP _{ist} in Probe D [µg/ml]	25,12	26,82	26,51	25,36	26,81
CP _{ist} in Probe E [µg/ml]	25,39	26,30	26,63	25,50	25,92

Tabelle 63: intra- und inter-day-Assays für CP in angereichertem Urin für QC 3

CP_{soll}: 3,845 µg/ml	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
CP _{ist} in Probe A [µg/ml]	3,974	4,021	4,105	4,066	4,078
CP _{ist} in Probe B [µg/ml]	3,708	3,981	4,028	4,055	4,100
CP _{ist} in Probe C [µg/ml]	3,927	4,061	4,054	4,063	4,247
CP _{ist} in Probe D [µg/ml]	3,766	4,405	4,037	4,110	4,039
CP _{ist} in Probe E [µg/ml]	3,933	4,200	4,133	4,127	4,041

Tabelle 64: intra- und inter-day-Assays für CP in angereichertem Urin für QC 4

CP_{soll}: 3,237 µg/ml	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
CP _{ist} in Probe A [µg/ml]	3,350	3,339	3,389	3,425	3,386
CP _{ist} in Probe B [µg/ml]	3,289	3,365	3,413	3,388	3,499
CP _{ist} in Probe C [µg/ml]	3,038	3,375	3,370	3,381	3,374
CP _{ist} in Probe D [µg/ml]	3,145	3,376	3,393	3,379	3,479
CP _{ist} in Probe E [µg/ml]	3,263	3,377	3,324	3,445	3,142

9.3 Messwerte der intra- und inter-day-Assays für DCL-CP in angereichertem Urin

Tabelle 65: intra- und inter-day-Assays für DCL-CP in angereichertem Urin bei QC Level 1

DCL-CP_{soll}: 8996 ng/ml	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
DCL-CP _{ist} in Probe A [ng/ml]	9442	9424	8781	9810	9874
DCL-CP _{ist} in Probe B [ng/ml]	8698	9833	9046	10042	9848
DCL-CP _{ist} in Probe C [ng/ml]	9505	9756	8231	9526	9618
DCL-CP _{ist} in Probe D [ng/ml]	8849	9531	8921	9690	9458
DCL-CP _{ist} in Probe E [ng/ml]	9222	9595	9007	9927	9879

Tabelle 66: intra- und inter-day-Assays für DCL-CP in angereichertem Urin für QC2

DCL-CP_{soll}: 1263 ng/ml	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
DCL-CP _{ist} in Probe A [ng/ml]	1226	1171	1122	1256	1180
DCL-CP _{ist} in Probe B [ng/ml]	1117	1187	1111	1181	1182
DCL-CP _{ist} in Probe C [ng/ml]	1142	1150	1131	1171	1261
DCL-CP _{ist} in Probe D [ng/ml]	1213	1193	1144	1190	1232
DCL-CP _{ist} in Probe E [ng/ml]	1179	1207	1169	1205	1207

Tabelle 67: intra- und inter-day-Assays für DCL-CP in angereichertem Urin für QC3

DCL-CP_{soll}: 198,0 ng/ml	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
DCL-CP _{ist} in Probe A [ng/ml]	191,9	181,2	196,3	194,1	216,5
DCL-CP _{ist} in Probe B [ng/ml]	205,1	191,6	185,7	181,3	211,8
DCL-CP _{ist} in Probe C [ng/ml]	206,9	203,8	198,7	194,3	208,6
DCL-CP _{ist} in Probe D [ng/ml]	186,0	197,8	201,7	190,4	203,5
DCL-CP _{ist} in Probe E [ng/ml]	183,5	200,3	195,2	184,5	215,3

Tabelle 68: intra- und inter-day-Assays für DCL-CP in angereichertem Urin für QC4

DCL-CP_{soll}: 166,7 ng/ml	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
DCL-CP _{ist} in Probe A [ng/ml]	188,9	165,8	152,3	146,0	134,5
DCL-CP _{ist} in Probe B [ng/ml]	170,8	158,0	170,6	168,8	137,1
DCL-CP _{ist} in Probe C [ng/ml]	134,5	173,9	162,7	156,3	139,2
DCL-CP _{ist} in Probe D [ng/ml]	167,2	178,7	162,9	137,3	164,9
DCL-CP _{ist} in Probe E [ng/ml]	156,8	167,9	161,6	162,0	181,4

9.4 Messwerte der intra- und inter-day-Assays für 4KetoCP in angereichertem Urin

Tabelle 69: intra- und inter-day-Assays für 4KetoCP in angereichertem Urin für QC1

4KetoCP_{soll}: 26859 ng/ml	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
4KetoCP _{ist} in Probe A [ng/ml]	29525	26091	27633	29404	29051
4KetoCP _{ist} in Probe B [ng/ml]	28789	27483	28393	29381	28572
4KetoCP _{ist} in Probe C [ng/ml]	29518	26499	25866	29830	27660
4KetoCP _{ist} in Probe D [ng/ml]	29394	27988	27616	30124	27965
4KetoCP _{ist} in Probe E [ng/ml]	29895	26493	27603	29524	28381

Tabelle 70: intra- und inter-day-Assays für 4KetoCP in angereichertem Urin für QC2

4KetoCP_{soll}: 3772 ng/ml	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
4KetoCP _{ist} in Probe A [ng/ml]	4083	3833	3897	3459	3676
4KetoCP _{ist} in Probe B [ng/ml]	3785	4244	3820	3562	3901
4KetoCP _{ist} in Probe C [ng/ml]	4231	3661	4016	3748	3857
4KetoCP _{ist} in Probe D [ng/ml]	3973	3751	3928	3535	3753
4KetoCP _{ist} in Probe E [ng/ml]	3903	3730	3848	3566	3699

Tabelle 71: intra- und inter-day-Assays für 4KetoCP in angereichertem Urin für QC3

4KetoCP_{soll}: 591,1 ng/ml	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
4KetoCP _{ist} in Probe A [ng/ml]	590,6	524,6	579,4	589,1	660,3
4KetoCP _{ist} in Probe B [ng/ml]	666,1	587,4	607,5	520,2	615,5
4KetoCP _{ist} in Probe C [ng/ml]	623,3	627,1	559,8	456,5	671,2
4KetoCP _{ist} in Probe D [ng/ml]	617,8	614,1	637,9	579,9	544,3
4KetoCP _{ist} in Probe E [ng/ml]	648,1	548,5	550,1	557,2	583,1

Tabelle 72: intra- und inter-day-Assays für 4KetoCP in angereichertem Urin für QC4

4KetoCP_{soll}: 497,7 ng/ml	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
4KetoCP _{ist} in Probe A [ng/ml]	567,6	432,2	536,8	622,0	471,0
4KetoCP _{ist} in Probe B [ng/ml]	562,9	539,7	525,0	420,3	477,3
4KetoCP _{ist} in Probe C [ng/ml]	511,9	490,9	528,7	518,7	433,6
4KetoCP _{ist} in Probe D [ng/ml]	580,5	488,2	475,7	476,1	519,4
4KetoCP _{ist} in Probe E [ng/ml]	483,8	458,5	526,9	495,6	481,4

9.5 Messwerte der intra- und inter-day-Assays für CarboxyCP in angereichertem Urin

Tabelle 73: intra- und inter-day-Assays für CarboxyCP in angereichertem Urin für QC1

CarboxyCP_{soll}: 8995 ng/ml	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
CarboxyCP _{ist} in Probe A [ng/ml]	9916	10100	9999	10606	10378
CarboxyCP _{ist} in Probe B [ng/ml]	9645	10057	10096	10505	10349
CarboxyCP _{ist} in Probe C [ng/ml]	9832	10324	9645	10323	10342
CarboxyCP _{ist} in Probe D [ng/ml]	9907	10245	10244	10322	10292
CarboxyCP _{ist} in Probe E [ng/ml]	9809	10289	10188	10240	10291

Tabelle 74: intra- und inter-day-Assays für CarboxyCP in angereichertem Urin für QC2

CarboxyCP_{soll}: 1263 ng/ml	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
CarboxyCP _{ist} in Probe A [ng/ml]	1282	1377	1327	1273	1217
CarboxyCP _{ist} in Probe B [ng/ml]	1351	1384	1380	1261	1304
CarboxyCP _{ist} in Probe C [ng/ml]	1380	1361	1330	1332	1334
CarboxyCP _{ist} in Probe D [ng/ml]	1395	1335	1355	1264	1349
CarboxyCP _{ist} in Probe E [ng/ml]	1201	1199	1361	1403	1273

Tabelle 75: intra- und inter-day-Assays für CarboxyCP in angereichertem Urin für QC3

CarboxyCP_{soll}: 198,0 ng/ml	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
CarboxyCP _{ist} in Probe A [ng/ml]	227,4	210,8	211,0	182,8	SE
CarboxyCP _{ist} in Probe B [ng/ml]	216,7	183,9	206,0	166,3	224,3
CarboxyCP _{ist} in Probe C [ng/ml]	194,7	223,3	201,5	SE	224,8
CarboxyCP _{ist} in Probe D [ng/ml]	197,4	202,3	214,2	227,5	204,0
CarboxyCP _{ist} in Probe E [ng/ml]	221,8	170,3	213,1	215,7	208,8

Tabelle 76: intra- und inter-day-Assays für CarboxyCP in angereichertem Urin für QC4

CarboxyCP_{soll}: 166,7 ng/ml	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
CarboxyCP _{ist} in Probe A [ng/ml]	SE	179,9	177,3	185,9	162,6
CarboxyCP _{ist} in Probe B [ng/ml]	171,6	162,8	173,3	169,6	185,3
CarboxyCP _{ist} in Probe C [ng/ml]	165,4	174,7	177,5	168,4	165,2
CarboxyCP _{ist} in Probe D [ng/ml]	197,9	189,4	174,1	171,8	187,2
CarboxyCP _{ist} in Probe E [ng/ml]	191,3	172,5	170,4	147,0	197,8

9.6 Demographische Daten der BEACOPP-Patienten

Tabelle 77: Demographische Daten der BEACOPP-Patienten im ersten Therapiezyklus

Patienten-ID	Geschlecht	Alter	Körpergröße	Körpergewicht	Albumin (Plasma) [g/l]	TromboDiff [%]	Kreatinin (Plasma) [mg/dl]	KreatCl [ml/min]
3	m	55	183	99,0	40,4	m.d.	0,78	39,8
9	w	32	173	74,0	33,7	-7,29	0,72	110,8
12	m	20	183	82,0	38,1	m.d.	0,84	133,4
13	m	32	180	81,0	48,9	m.d.	0,78	106,2
14	w	22	168	62,0	46,3	m.d.	0,62	103,7
16	m	34	182	86,0	52,8	-31,60	0,80	155,9
18	w	32	172	64,0	35,2	-15,40	0,54	126,6
19	m	30	183	68,0	m.d.	m.d.	0,72	m.d.
23	m	32	173	67,0	31,2	19,06	0,82	124,7
25	m	55	182	72,0	38,2	-29,63	0,66	143,6
31	m	23	196	86,0	34,4	-14,84	0,68	123,2
36	w	31	172	58,0	37,6	-51,97	0,66	95,3
38	m	31	180	71,0	40,2	-76,73	0,62	156,8
39	w	26	173	52,0	40,0	-10,11	0,48	121,8
46	w	31	169	60,0	39,2	16,88	0,60	43,4
47	m	28	180	66,0	44,0	-11,92	0,61	208,3
51	m	32	172	65,8	36,0	-26,03	0,65	212,0
53	m	27	171	81,0	41,4	m.d.	0,63	125,3
54	m	17	170	54,4	23,3	m.d.	0,37	116,0
56	w	59	168	94,0	34,7	-48,15	0,57	115,9
60	m	39	175	65,0	34,8	m.d.	0,60	221,6
61	m	39	176	75,0	m.d.	m.d.	0,72	m.d.
62	w	34	168	92,0	37,6	m.d.	0,74	m.d.
65	m	32	182	88,0	43,7	-29,86	0,96	91,0
66	w	20	178	58,0	m.d.	-68,67	0,72	m.d.
67	m	60	174	97,0	36,8	-68,67	0,78	113,8
68	m	29	180	74,0	37,7	-50,13	0,76	210,8
74	m	26	187	98,0	43,3	20,57	0,65	221,0
75	m	22	182	69,0	41,4	-61,82	0,63	133,5
76	m	51	187	91,0	30,1	m.d.	m.d.	112,1
80	w	27	166	55,0	31,5	-58,10	0,46	111,1
81	w	27	173	63,2	37,0	m.d.	0,79	118,2

Tabelle 78: Demographische Daten der BEACOPP-Patienten im zweiten Therapiezyklus

Patienten-ID	Geschlecht	Alter	Körpergröße	Körpergewicht	Albumin (Plasma) [g/l]	TromboDiff [%]	Kreatinin (Plasma) [mg/dl]	KreatCl [ml/min]
3	m	55	183	96,0	39,9	m.d.	0,74	89,4
9	w	32	173	74,0	38,5	-15,73	0,86	61,9
12	m	20	183	82,0	39,9	16,73	0,99	99,2
13	m	32	180	81,0	43,4	-7,29	0,72	m.d.
14	w	22	168	62,0	45,4	26,82	0,68	97,5
16	m	34	182	86,0	43,4	20,11	0,84	100,6
18	w	32	172	64,0	38,7	-4,83	0,61	78,2
19	m	30	183	66,0	35,7	m.d.	0,82	57,3
23	m	32	173	67,0	38,6	41,02	0,71	147,6
25	m	55	182	72,8	38,0	37,89	0,83	130,2
31	m	23	196	79,0	39,6	15,68	0,72	137,3
36	w	31	172	58,0	36,3	-37,10	0,65	95,4
38	m	31	180	71,0	44,0	63,31	0,63	140,3
39	w	26	173	52,0	38,6	24,89	0,59	90,7
46	w	31	169	60,0	34,0	-14,16	0,51	81,4
47	m	28	180	66,0	47,6	-4,55	0,78	106,9
51	m	32	172	69,8	40,8	-53,87	0,77	137,0
53	m	27	171	81,0	39,1	m.d.	0,77	136,1
54	m	17	170	54,0	34,2	-48,28	0,65	72,3
56	w	59	168	94,0	35,2	-22,99	0,53	118,6
57	m	33	170	57,0	37,8	m.d.	m.d.	134,0
60	m	39	175	65,0	42,9	-22,57	0,68	128,3
61	m	39	176	75,0	31,5	-24,46	0,83	233,7
62	w	34	168	92,0	38,3	-73,28	0,89	109,3
65	m	32	182	88,0	40,7	-11,11	0,90	117,1
66	w	20	178	58,0	37,1	-50,63	0,84	99,7
67	m	60	174	89,0	29,7	-13,29	0,61	183,8
68	m	29	180	74,0	38,8	-18,71	0,84	170,0
70	m	24	180	80,0	38,7	-65,92	0,94	79,3
71	m	59	175	68,0	33,2	-6,33	0,56	136,8
72	w	42	156	59,0	36,9	-5,41	0,78	116,1
73	m	63	181	81,0	m.d.	-0,98	m.d.	m.d.
74	m	26	187	98,0	45,5	31,45	0,90	129,3
75	m	22	182	69,0	37,7	-66,67	0,56	146,8
76	m	51	187	86,0	28,9	m.d.	m.d.	131,0
80	w	27	166	53,5	39,7	-64,26	0,59	36,6
81	w	27	173	60,7	m.d.	m.d.	0,72	m.d.

Tabelle 79: Demographische Daten der BEACOPP-Patienten im dritten Therapiezyklus

Patienten-ID	Geschlecht	Alter	Körpergröße	Körpergewicht	Albumin (Plasma) [g/l]	TromboDiff [%]	Kreatinin (Plasma) [mg/dl]	KreatCl [ml/min]
3	m	55	183	95	37,5	m.d.	0,81	43,0
9	w	32	173	74	40,2	24,88	0,86	94,8
12	m	20	183	82	41,9	-7,65	0,80	134,2
13	m	32	180	81	40,9	-2,46	0,71	114,4
14	w	22	168	62	40	-16,86	0,71	m.d.
16	m	34	182	86	38,5	56,05	0,64	164,7
19	m	30	183	70	24,6	m.d.	0,48	123,7
23	m	32	173	68	36,1	-36,57	0,76	118,6
25	m	55	182	76	36,8	20,74	0,85	141,1
31	m	23	196	81	37,2	-42,16	0,84	172,36
36	w	31	172	58	36,7	-60,13	0,71	98,0
38	m	31	181	73,5	42,3	-4,00	0,57	206,1
47	m	28	180	66	37,8	-0,27	0,51	194,1
51	m	32	172	69,8	39	m.d.	0,80	117,3
53	m	27	171	81	40	m.d.	0,70	119,0
54	m	17	170	54	35,1	-35,09	0,47	109,0
56	w	59	168	92	m.d.	m.d.	0,72	m.d.
57	m	33	170	61	35	m.d.	m.d.	122,83
60	m	39	175	65	41,9	-5,57	0,65	167,6
61	m	39	176	75	35,5	66,06	0,90	152,0
62	w	34	168	92	37,5	-37,62	1,01	117,5
65	m	32	182	89	41,6	-17,11	1,05	136,2
66	w	20	178	58	35,6	-23,03	0,82	83,8
68	m	29	180	74	35,8	-56,55	0,76	184,5
71	m	59	170	71	32,7	-3,88	1,00	35,0
72	w	42	156	59	39,1	-5,14	0,83	95,08
74	m	26	187	98	48,8	6,22	0,81	165,7
75	m	22	182	69	37	8,24	0,62	109,2
76	m	51	187	86	31,7	m.d.	m.d.	68,6
80	w	27	166	54	40,2	-55,43	0,54	74,2
81	w	27	173	60,7	41,4	m.d.	0,85	104,2

Tabelle 80: Applizierte Procarbazin- und Cyclophosphamid-Dosen

Patienten-ID	Procarbazin-Dosis [mg]			Cyclophosphamid-Dosis [mg]		
	1. Zyklus	2. Zyklus	3. Zyklus	1. Zyklus	2. Zyklus	3. Zyklus
3	200	200	200	1300	1300	1300
9	200	200	200	1230	1230	1230
12	0	0	0	1300	1300	1300
13	0	0	0	1300	1300	1300
14	0	0	0	1040	1040	1040
16	200	200	200	1335	1335	1335
18	150	150	m.d.	1155	1155	m.d.
19	m.d.	200	200	1200	1200	1200
23	200	200	200	1170	1170	1170
25	200	200	200	1235	1235	1235
31	200	200	200	1430	1430	1430
36	150	150	150	1105	1105	1105
38	200	200	200	2375	2375	2100
39	150	150	m.d.	1040	1040	m.d.
46	150	150	m.d.	1105	1105	m.d.
47	200	200	200	1170	1170	1170
51	200	200	200	2200	2200	2200
53	200	200	200	2375	2375	2375
54	150	150	150	2000	2000	2000
56	200	200	200	2500	2200	1300
57	m.d.	200	200	m.d.	2100	2100
60	200	200	200	2230	2230	2230
61	200	200	200	2388	2387	2102
62	200	200	200	2500	1250	2200
65	200	200	200	2600	2600	2600
66	150	150	150	2200	1900	1100
67	200	200	m.d.	2625	2255	m.d.
68	200	200	200	2375	2375	2090
70	200	200	m.d.	2500	2500	m.d.
71	200	200	200	2250	2000	2000
72	150	150	150	1000	1000	1000
73	200	200	m.d.	2525	2220	m.d.
74	200	200	200	1445	1445	1450
75	200	200	200	2400	2400	2400
76	250	200	200	2700	2300	2300
80	150	150	150	2025	2025	2025
81	175	200	175	2200	2200	2200

9.7 Messungen der Urinproben der BEACOPP-Patienten

Tabelle 81: TAC-Stoffmengen im Urin der untersuchten BEACOPP-Patienten [μmol]

Patienten-ID	1. Zyklus	2. Zyklus	3. Zyklus
3	153,0	201,6	198,2
9	253,5	257,9	264,3
16	323,2	289,3	289,0
18	185,1	70,8	keine Probe
19	keine Probe	223,0	keine Probe
23	55,4	219,0	246,5
25	235,1	298,4	271,5
31	381,8	208,3	976,1
36	362,6	282,2	261,1
38	BQL	273,0	278,8
39	298,3	291,1	keine Probe
46	243,6	254,3	keine Probe
47	421,6	395,3	363,8
51	391,0	264,1	373,9
53	315,9	323,7	298,1
54	209,9	131,1	180,5
56	262,6	253,6	220,8
57	keine Probe	304,8	426,7
58	43,3	keine Probe	keine Probe
59	272,4	keine Probe	keine Probe
60	267,6	350,0	462,1
61	keine Probe	422,3	285,2
62	keine Probe	282,6	388,3
65	293,1	140,7	423,9
66	537,9	294,9	209,0
67	572,4	355,6	keine Probe
68	311,9	289,8	271,8
70	217,4	228,6	keine Probe
71	313,9	386,5	160,3
72	210,5	273,2	253,8
73	219,2	213,5	keine Probe
74	410,5	347,5	406,8
75	275,5	266,7	270,8
76	242,1	358,0	301,0
80	189,1	133,9	158,4
81	258,8	120,7	255,8

Tabelle 82: CP-Stoffmengen im Urin der untersuchten BEACOPP-Patienten [mmol]

Patienten-ID	1. Zyklus	2. Zyklus	3. Zyklus
3	1,039	0,450	1,512
9	0,883	0,984	0,968
12	0,321	0,787	0,725
13	0,481	0,621	0,883
14	0,529	0,496	keine Probe
16	0,642	0,741	0,732
19	keine Probe	0,828	keine Probe
23	1,031	1,048	0,953
25	0,630	0,755	0,661
31	1,052	0,803	1,227
36	1,077	0,929	0,765
38	2,149	1,920	2,103
47	0,918	0,818	0,670
51	1,752	2,045	1,382
53	1,358	1,348	1,342
54	2,104	1,533	1,552
56	1,744	1,517	0,763
60	2,269	0,997	2,362
61	keine Probe	2,412	1,405
62	keine Probe	2,668	1,570
65	1,213	1,434	1,752
66	3,949	2,112	0,986
68	1,865	1,712	1,333
71	1,450	1,198	0,703
74	1,292	1,636	1,378
75	2,349	1,485	1,255
76	1,659	1,933	1,616
80	1,734	1,770	1,743
81	2,333	1,804	3,505

Tabelle 83: DCL-CP-Stoffmengen im Urin der untersuchten BEACOPP-Patienten [μmol]

Patienten-ID	1. Zyklus	2. Zyklus	3. Zyklus
3	19,408	34,649	162,463
9	40,506	18,548	59,823
12	26,601	40,914	40,589
13	16,936	8,854	19,274
14	18,517	5,628	keine Probe
16	3,835	BQL	30,508
19	keine Probe	44,848	keine Probe
23	3,659	47,833	60,231
25	44,600	23,801	33,784
31	208,587	180,414	266,800
36	209,225	163,396	173,662
38	353,699	249,799	256,365
47	62,413	45,410	114,518
51	90,308	245,230	70,282
53	95,730	56,484	89,819
54	228,500	156,989	197,531
56	BQL	BQL	BQL
60	215,356	32,996	30,565
61	keine Probe	48,505	12,787
62	keine Probe	313,228	40,711
65	67,189	169,878	41,292
66	9,516	24,496	55,218
68	306,221	76,051	70,916
71	14,411	18,205	5,103
74	34,663	20,287	60,712
75	252,450	49,592	81,729
76	1,896	8,601	4,040
80	35,664	17,582	124,981
81	134,016	72,966	175,125

Tabelle 84: 4KetoCP-Stoffmengen im Urin der untersuchten BEACOPP-Patienten [μmol]

Patienten-ID	1. Zyklus	2. Zyklus	3. Zyklus
3	12,4	32,761	90,8
9	71,0	73,5	103,3
12	34,2	66,5	71,6
13	75,6	128,1	120,7
14	23,4	27,0	keine Probe
16	101,3	57,5	100,0
19	keine Probe	88,3	keine Probe
23	50,7	80,9	55,7
25	66,6	59,5	50,6
31	83,4	103,6	157,444
36	73,0	83,4	81,4
38	205,2	171,7	164,9
47	114,4	85,3	131,2
51	132,5	220,0	102,8
53	177,7	219,0	205,3
54	85,3	157,5	160,4
56	145,1	113,3	58,1
60	205,9	120,3	150,3
61	keine Probe	173,8	110,9
62	keine Probe	146,6	54,4
65	100,7	111,7	140,5
66	125,0	68,9	36,6
68	240,5	210,8	182,1
71	45,7	50,5	17,6
74	71,3	55,8	77,6
75	174,5	86,4	117,2
76	84,1	75,8	54,4
80	118,8	52,1	120,4
81	68,3	47,7	111,7

Tabelle 85: CarboxyCP-Stoffmengen im Urin der untersuchten BEACOPP-Patienten [μmol]

Patienten-ID	1. Zyklus	2. Zyklus	3. Zyklus
3	251,65	34,899	497,26
9	23,55	1,79	534,77
12	1,66	84,77	18,94
13	17,13	2,68	3,09
14	2,56	0,95	keine Probe
16	0,96	BQL	3,70
19	keine Probe	1607,31	keine Probe
23	BQL	1224,06	1260,73
25	3,57	BQL	BQL
31	993,72	1524,56	2185,479
36	1103,75	1130,78	760,11
38	2262,80	2030,02	2080,76
47	57,53	42,82	1127,55
51	15,77	2231,17	73,47
53	120,98	8,55	98,40
54	3826,95	1842,74	1781,17
56	4,84	3,79	BQL
60	1410,49	15,33	9,46
61	keine Probe	BQL	BQL
62	keine Probe	2015,79	BQL
65	7,48	14,15	1,75
66	24,38	BQL	BQL
68	1263,11	16,97	38,39
71	BQL	6,24	BQL
74	BQL	BQL	71,87
75	854,70	BQL	1228,69
76	BQL	BQL	BQL
80	BQL	BQL	BQL
81	15,39	30,80	47,91

9.8 Individuelle pharmakokinetische Parameter für Cyclophosphamid

Tabelle 86: Individuelle pharmakokinetische Parameter für Cyclophosphamid im ersten Therapiezyklus

Patienten-ID	k_{10} [10^{-3} min^{-1}]	k_{12} [10^{-3} min^{-1}]	k_{14} [10^{-3} min^{-1}]	Vd_1 [l]	AUS_{CP} [10^{-3} min^{-1}]	AUC_{normiert} [mg·h/l·g CP]	$Cl_{\text{gesamt}} \text{ (CP)}$ [ml/min]	$Cl_{\text{renal}} \text{ (CP)}$ [ml/min]	$Cl_{\text{metabol}} \text{ (DCL-CP)}$ [ml/min]
3	0,765	0,383	0,033	56,9	1,565	187	89,0	21,8	1,87
9	0,730	0,461	0,022	42,1	1,598	248	67,3	16,2	0,93
12	0,432	0,667	0,038	60,7	1,520	181	92,3	23,3	2,31
13	0,691	0,667	0,038	48,0	1,780	195	85,5	18,4	1,82
14	0,836	0,667	0,038	32,7	1,925	265	62,9	12,5	1,24
19	0,329	0,782	0,026	39,0	1,520	281	59,3	15,0	1,02
23	0,564	0,579	0,022	24,3	1,549	443	37,7	9,3	0,53
25	0,808	0,327	0,020	35,7	1,539	303	55,0	13,7	0,72
31	0,177	0,622	0,054	44,6	1,236	302	55,1	17,1	2,40
36	0,510	0,717	0,079	30,8	1,690	320	52,1	11,8	2,43
38	0,456	0,718	0,053	37,3	1,610	277	60,1	14,3	1,97
47	0,683	0,585	0,032	40,6	1,684	243	68,4	15,6	1,30
51	0,758	0,485	0,032	33,5	1,659	300	55,5	12,8	1,07
53	0,926	0,448	0,023	39,8	1,780	235	70,8	15,3	0,90
54	0,181	0,834	0,045	51,5	1,444	224	74,4	19,8	2,33
56	0,969	0,331	0,015	37,8	1,698	260	64,2	14,5	0,56
60	0,725	0,454	0,024	42,2	1,586	249	66,9	16,2	1,02
61	0,861	0,371	0,019	59,0	1,634	173	96,5	22,7	1,11
62	0,615	0,691	0,066	45,3	1,755	209	79,6	17,4	2,99
65	0,918	0,322	0,023	63,8	1,646	159	105,0	24,5	1,45
66	0,896	0,303	0,019	46,2	1,602	225	74,0	17,7	0,88
68	0,629	0,517	0,032	55,4	1,561	193	86,6	21,3	1,78
71	1,047	0,259	0,016	43,3	1,705	226	73,7	16,6	0,68
74	0,832	0,321	0,020	58,2	1,557	184	90,6	22,3	1,17
75	0,797	0,393	0,027	52,6	1,601	198	84,2	20,2	1,44
76	0,592	0,306	0,017	42,5	1,299	302	55,2	16,3	0,72
80	0,903	0,360	0,022	53,6	1,669	186	89,5	20,6	1,17
81	0,940	0,307	0,031	46,8	1,662	214	77,7	17,9	1,46

Tabelle 87: Individuelle pharmakokinetische Parameter für Cyclophosphamid im zweiten Therapiezyklus

Patienten-ID	k_{10} [10^{-3} min^{-1}]	k_{12} [10^{-3} min^{-1}]	k_{14} [10^{-3} min^{-1}]	Vd_1 [l]	AUS_{CP} [10^{-3} min^{-1}]	AUC_{normiert} [mg·h/l·g CP]	$Cl_{\text{gesamt}} \text{ (CP)}$ [ml/min]	$Cl_{\text{renal}} \text{ (CP)}$ [ml/min]	$Cl_{\text{metabol}} \text{ (DCL-CP)}$ [ml/min]
3	0,756	0,383	0,033	56,9	1,555	188	88,5	21,8	1,87
9	0,824	0,461	0,022	42,1	1,691	234	71,2	16,2	0,93
12	0,467	0,667	0,038	60,7	1,555	177	94,4	23,3	2,31
13	0,584	0,667	0,038	48,0	1,673	208	80,3	18,4	1,82
14	0,819	0,667	0,038	32,7	1,907	267	62,3	12,5	1,24
16	0,855	0,382	0,019	52,7	1,640	193	86,4	20,2	0,98
19	0,282	0,782	0,026	39,0	1,474	290	57,5	15,0	1,02
23	0,708	0,579	0,022	24,3	1,693	405	41,2	9,3	0,53
25	0,804	0,327	0,020	35,7	1,535	304	54,8	13,7	0,72
31	0,278	0,622	0,054	44,6	1,338	279	59,7	17,1	2,40
36	0,484	0,717	0,079	30,8	1,664	325	51,3	11,8	2,43
38	0,530	0,718	0,053	37,3	1,684	265	62,8	14,3	1,97
47	0,753	0,585	0,032	40,6	1,754	234	71,3	15,6	1,30
51	0,851	0,485	0,032	33,5	1,752	284	58,7	12,8	1,07
53	0,881	0,448	0,023	39,8	1,735	241	69,1	15,3	0,90
54	0,393	0,834	0,045	51,5	1,656	195	85,4	19,8	2,33
56	0,979	0,331	0,015	37,8	1,708	258	64,5	14,5	0,56
60	0,883	0,454	0,024	42,2	1,744	227	73,5	16,2	1,02
61	0,732	0,371	0,019	59,0	1,506	188	88,9	22,7	1,11
62	0,628	0,691	0,066	45,3	1,769	208	80,2	17,4	2,99
65	0,859	0,322	0,023	63,8	1,587	165	101,3	24,5	1,45
66	0,876	0,303	0,019	46,2	1,582	228	73,1	17,7	0,88
68	0,650	0,517	0,032	55,4	1,583	190	87,7	21,3	1,78
71	0,897	0,259	0,016	43,3	1,555	248	67,3	16,6	0,68
74	0,875	0,321	0,020	58,2	1,599	179	93,1	22,3	1,17
75	0,724	0,393	0,027	52,6	1,529	207	80,4	20,2	1,44
80	1,063	0,360	0,022	53,6	1,829	170	98,0	20,6	1,17
81	0,961	0,307	0,031	46,8	1,683	212	78,7	17,9	1,46

Tabelle 88: Individuelle pharmakokinetische Parameter für Cyclophosphamid im dritten Therapiezyklus

Patienten-ID	k_{10} [10^{-3} min^{-1}]	k_{12} [10^{-3} min^{-1}]	k_{14} [10^{-3} min^{-1}]	Vd_1 [l]	AUS_{CP} [10^{-3} min^{-1}]	AUC_{normiert} [mg·h/l·g CP]	$Cl_{\text{gesamt}} (CP)$ [ml/min]	$Cl_{\text{renal}} (CP)$ [ml/min]	$Cl_{\text{metabol}} (DCL-CP)$ [ml/min]
3	0,709	0,383	0,033	56,9	1,509	194	85,8	21,8	1,87
9	0,857	0,461	0,022	42,1	1,724	230	72,6	16,2	0,93
12	0,506	0,667	0,038	60,7	1,594	172	96,7	23,3	2,31
13	0,535	0,667	0,038	48,0	1,624	214	78,0	18,4	1,82
14	0,713	0,667	0,038	32,7	1,802	283	58,9	12,5	1,24
16	0,760	0,382	0,019	52,7	1,544	205	81,4	20,2	0,98
19	0,066	0,782	0,026	39,0	1,257	340	49,1	15,0	1,02
23	0,659	0,579	0,022	24,3	1,644	417	40,0	9,3	0,53
25	0,781	0,327	0,020	35,7	1,511	309	54,0	13,7	0,72
31	0,231	0,622	0,054	44,6	1,291	289	57,6	17,1	2,40
36	0,492	0,717	0,079	30,8	1,672	323	51,6	11,8	2,43
38	0,480	0,718	0,053	37,3	1,635	273	61,0	14,3	1,97
47	0,562	0,585	0,032	40,6	1,563	262	63,5	15,6	1,30
51	0,816	0,485	0,032	33,5	1,717	290	57,5	12,8	1,07
53	0,899	0,448	0,023	39,8	1,753	239	69,7	15,3	0,90
54	0,411	0,834	0,045	51,5	1,674	193	86,3	19,8	2,33
56	1,036	0,331	0,015	37,8	1,765	250	66,7	14,5	0,56
60	0,863	0,454	0,024	42,2	1,725	229	72,7	16,2	1,02
61	0,810	0,371	0,019	59,0	1,584	178	93,5	22,7	1,11
62	0,613	0,691	0,066	45,3	1,753	210	79,5	17,4	2,99
65	0,877	0,322	0,023	63,8	1,605	163	102,4	24,5	1,45
66	0,847	0,303	0,019	46,2	1,553	232	71,8	17,7	0,88
68	0,592	0,517	0,032	55,4	1,524	197	84,5	21,3	1,78
71	0,969	0,259	0,016	43,3	1,627	237	70,4	16,6	0,68
74	0,939	0,321	0,020	58,2	1,664	172	96,9	22,3	1,17
75	0,711	0,393	0,027	52,6	1,515	209	79,6	20,2	1,44
76	0,623	0,306	0,017	42,5	1,330	295	56,5	16,3	0,72
80	1,073	0,360	0,022	53,6	1,838	169	98,6	20,6	1,17
81	1,026	0,307	0,031	46,8	1,748	204	81,7	17,9	1,46

Tabelle 91: Gewichte der Leberschnitte in mg

Inkubationsdauer		0,5 h	1,0 h	1,5 h	3,0 h	6,0 h	10,0 h
Leber	Probe	Gewichte der Leberschnitte [mg]					
A	A	23,00	29,89	22,21	25,19	18,72	19,07
	B	28,12	21,48	21,45	21,85	26,33	18,92
	C	22,89	37,87	34,15	28,73	49,04	19,80
	D	16,84	17,70	33,00	17,07	27,40	25,23
	E	17,64	17,01	27,63	17,84	15,30	22,51
	F	16,70	11,19	20,91	13,61	18,83	18,53
B	G	14,21	21,22	23,82	20,18	29,50	23,20
	H	21,45	15,31	20,46	32,72	10,75	29,65
	I	19,23	21,25	25,29	39,60	16,50	24,33
	J	31,19	18,23	23,48	18,72	27,17	24,17
	K	30,14	24,14	24,72	22,43	22,00	20,56
	L	27,97	14,95	27,75	18,79	15,11	16,52

9.11 Messwerte der intra- und inter-day-Assays für MID in angereichertem Plasma

Tabelle 92: intra- und inter-day-Assays für MID in angereichertem Plasma für QC1

MID_{soll}: 184,0 ng/ml	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
MID _{ist} in Probe A [ng/ml]	196,0	191,7	193,8	197,5	194,4
MID _{ist} in Probe B [ng/ml]	193,0	186,2	193,3	199,8	202,1
MID _{ist} in Probe C [ng/ml]	191,8	187,5	187,7	228,7	203,0
MID _{ist} in Probe D [ng/ml]	188,8	190,0	178,5	215,2	200,1
MID _{ist} in Probe E [ng/ml]	178,6	172,4	180,8	182,2	178,4

Tabelle 93: intra- und inter-day-Assays für MID in angereichertem Plasma für QC2

MID_{soll}: 8,93 ng/ml	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
MID _{ist} in Probe A [ng/ml]	9,89	9,11	9,26	9,80	10,07
MID _{ist} in Probe B [ng/ml]	9,41	9,69	8,96	9,30	9,86
MID _{ist} in Probe C [ng/ml]	9,02	SE	7,96	9,43	10,05
MID _{ist} in Probe D [ng/ml]	8,64	9,23	7,47	8,93	9,56
MID _{ist} in Probe E [ng/ml]	9,25	8,25	8,32	7,28	8,13

Tabelle 94: intra- und inter-day-Assays für MID in angereichertem Plasma für QC3

MID_{soll}: 0,440 ng/ml	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
MID _{ist} in Probe A [ng/ml]	0,548	0,364	0,443	0,424	0,361
MID _{ist} in Probe B [ng/ml]	0,534	0,394	0,382	0,390	0,342
MID _{ist} in Probe C [ng/ml]	0,497	0,434	0,357	0,447	0,389
MID _{ist} in Probe D [ng/ml]	0,505	0,469	0,360	0,430	SE
MID _{ist} in Probe E [ng/ml]	0,461	0,361	0,407	0,395	0,430

Tabelle 95: intra- und inter-day-Assays für MID in angereichertem Plasma für QC4

MID_{soll}: 0,309 ng/ml	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
MID _{ist} in Probe A [ng/ml]	0,307	0,301	0,316	0,325	0,241
MID _{ist} in Probe B [ng/ml]	0,275	0,264	0,324	0,296	0,256
MID _{ist} in Probe C [ng/ml]	0,337	0,252	0,291	0,364	0,297
MID _{ist} in Probe D [ng/ml]	0,325	0,281	0,307	0,303	0,286
MID _{ist} in Probe E [ng/ml]	0,322	0,291	0,278	0,289	0,218

9.12 INVRECX-Pulsprogramm zur Bestimmung der longitudinalen Relaxationszeit T_1

1	ZE	Datenspeicher löschen
2	WR #1	Abfrage Dateiname (ohne Extension)
3	IF #1	Vorbereitung eines leeren Datensatzes
4	LO TO 2 TIMES X	X = Anzahl der Experimente
5	RF # 1.001	File Extension löschen, Zyklus beginnen
6	RE #1	aktuellen FID lesen
7	D1 DO D3 S0	Gleichgewichts-Relaxations-Delay, Entkoppler aus, Delay, Dämpfung mit 15 H
8	P2	180°-Puls
9	VD	variabler Delay (erhalten von der aktuellen VD-Liste)
	D2 BB	Sicherheits-Delay, Breitbandentkoppler ein
	GO=7	Datenaufnahme nach 90°-Puls, Wechsel zu 7,
	D2 DO	
	WR #1	aktuellen FID speichern
	IF #1	File Extension erhöhen
	IN=6	Wechsel zu 6 und Wahl des nächsten VD der VD-Liste
	LO TO 5 TIMES C	Zyklus wiederholen (Delay-Liste durcharbeiten) C ist definiert in der Liste der variablen Schleifenzähler (VC-Liste)
	EXIT	

mit $D1 = 5 \cdot T_1$

$D2 = 2$ ms für die Änderung der Entkoppler-Power

$S0 =$ Entkoppler-Power 15H

$P2 =$ 180°-Puls

Verzeichnis der Teilpublikationen

Kasel D, Baumhäkel M, Fuhr U (1999)

Degradation of procarbazine by human liver microsomes to active cytotoxic species and to inactive metabolites.

Eur J Clin Pharmacol **55**, A17

Kasel D, Baumhäkel M, Fuhr U (2000)

Biodegradation of Procarbazine by Human Liver Microsomes.

Int J Clin Pharmacol Ther **38**, 153-155

Kasel D, Baumhäkel M, Hoppe C, Fuhr U (2000)

Metabolism of procarbazine in man.

In: De Matteis (ed.) 13th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, Final Programme and Abstracts, A-170

Kasel D, Jetter A, Wilde S, Fuhr U (2001)

Urinary procarbazine excretion during the BEACOPP polychemotherapy regimen in patients with Hodgkin's disease.

Eur J Clin Pharmacol **57**, A32

Kasel D, Harlfinger S, Kinzig-Schippers M, Sörgel F, Gebhardt W, Fuhr U (2002)

Determination of midazolam in human plasma using LC-MS/MS devices from two different manufacturers.

Eur J Clin Pharmacol **58**, S87

Jetter A, Kasel D, Kinzig-Schippers M, Harlfinger S, Jabrane W, Tomalik-Scharte D, Sörgel F, Fuhr U (2002)

Comparison of two i.v. and oral midazolam application schedules for CYP3A4 phenotyping.

Eur J Clin Pharmacol **58**, S87

Ich möchte ich mich ganz herzlich bedanken bei:

- Herrn Prof. Dr. med. Uwe Fuhr für die Überlassung des interessanten Themas, seine konstruktive Kritik, die Förderung meiner selbständigen Arbeit und den bei der Anfertigung der Arbeit jederzeit gewährten Rat.
- Herrn Prof. Dr. rer. nat. Josef Hahn für die freundliche Betreuung seine Unterstützung bei den Problemen mit der NMR, seine konstruktive Kritik und Unterstützung dieser Arbeit.
- Herrn Prof. Dr. phil. nat. H.-G. Schmalz für die Bereitschaft, das Koreferat zu übernehmen.
- dem Forschungsförderungsprogramm Köln Fortune, der Deutschen Krebshilfe und der Pinguin-Stiftung für die finanzielle Unterstützung der Arbeit.
- Herrn Dr. med. Alexander Jetter, der durch seine jederzeit gewährte freundliche Unterstützung, die vielen anregenden Fachgespräche und seine Freundschaft maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.
- Herrn Stefan Wilde für die Erstellung des populationspharmakokinetischen Modells und seine jederzeit gewährte freundliche Unterstützung.
- Herrn Dieter Barthold und Frau Steffi Harlfinger für die jederzeit gewährte praktische Unterstützung im Labor.
- Herrn Dr. rer. nat. Ulf Niemeyer, ASTA Medica AG, für die Bereitstellung der Cyclophosphamid-Metabolite.
- Herrn Dr. med. Hans-Udo Kasper für die Präparation der Schweineleberschnitte.
- Herrn Dr. rer. nat. Klaus Raffelt, Frau Dr. rer. nat. Frauke Süllentrop, Herrn Dr. rer. nat. Mathias Hoehn, Herrn Dr. rer. nat. Ekkehard Küstermann und Herrn Dipl.-Chem. Harald Scherer für die Unterstützung bei den vielen nervenraubenden Problemen mit der NMR.
- Frau Dipl.-Biol. Gundi Grimberg und Frau Kathi Krüsemann, die auch nach langen und harten Labortagen als Freunde immer für mich da waren und für gute Laune gesorgt haben, für ihre Motivation, ihre konstruktive Kritik und das Korrekturlesen der Arbeit.
- Herrn Dr. rer. nat. Ferdi Gröner für das Korrekturlesen der Arbeit.
- meinen Kollegen für das angenehme und offene Arbeitsklima.
- den Herren der Werkstatt für ihre Unterstützung auch nach Feierabend.

Vor allem danke ich meinen Eltern, die mich immer in jeglicher Hinsicht unterstützt haben.

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von den auf Seite 170 dieser Arbeit angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Prof. J. Hahn und Herrn Prof. U. Fuhr betreut worden.

Lebenslauf

Name	Dirk Kasel
Wohnort	Am Pistorhof 18, 50827 Köln
Geburtsdatum / -ort	03.09.1974 in Aachen
Eltern	Wolfgang Kasel, Lehrer Walfriede Kasel, geb. Assenmacher, Diplom- Sozialarbeiterin
Familienstand	geschieden, ein Sohn (Roman Kasel, geb. 17.07.1999)

Schulbildung

1981 - 1985	Grundschule St. Josef, Stadtkyll
1985 - 01/1991	Vinzenz-von Paul-Gymnasium, Niederprüm
01/1991 - 06/1993	Regino-Gymnasium, Prüm
	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung

10/1993	Beginn des Chemiestudiums an der Universität zu Köln
10/1995	Diplom-Chemiker-Vorprüfung
11/1997	Diplom-Chemiker-Hauptprüfung
12/1997 - 09/1998	Diplomarbeit am Institut für Pharmakologie der Universität zu Köln, Klinische Pharmakologie unter Betreuung von Prof. Dr. U. Fuhr und Prof. Dr. H. Budzikiewicz Abschluss: Diplom
seit 10/1998	Promotion an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln am Institut für Pharmakologie unter Betreuung von Prof. Dr. J. Hahn und Prof. Dr. U. Fuhr

Berufliche Tätigkeit

10/1998 - 01/2003	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmakologie der Universität zu Köln
-------------------	--