

***Quantitative Pharmakologie:
Simulation von virtuellen Kindern zur Optimierung
der antiviralen Pharmakotherapie***

Inaugural Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

André Breddemann

aus

Wuppertal

Dezember 2008

Aus der Klinischen Pharmazie und Pharmakotherapie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent:	Frau Prof. Dr. med. Stephanie Lær
Koreferent:	Herr Prof. Dr. Peter Kleinebudde
Tag der mündlichen Prüfung:	03.12.2008

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1. KLINISCHE STUDIEN FÜR PÄDIATRISCHE PATIENTEN	1
1.2. OPTIMIERUNG DER ANTIVIRALEN THERAPIE MIT VIRTUELLEN PATIENTEN	3
1.3. PHARMAKOKINETIK VON CIDOFOVIR	7
1.4. PHARMAKODYNAMIK VON CIDOFOVIR	8
1.5. ANWENDUNG VON CIDOFOVIR	10
1.6. NEPHROTOXIZITÄT VON CIDOFOVIR.....	11
1.7. KLINISCHER AUSGANGSPUNKT: LEBENSBEDROHLICHE VIRUSINFEKTION BEI EINEM 10 MONATE ALTEN KREBSPATIENTEN	12
1.8. SELEKTIVE QUANTIFIZIERUNG VON CIDOFOVIR IN HUMANEM SERUM.....	16
1.9. ZIELSETZUNG DER ARBEIT.....	18
2. METHODEN	19
2.1. HPLC-MS/MS-METHODE FÜR DIE QUANTIFIZIERUNG VON CIDOFOVIR IN HUMANEM SERUM... 19	
2.1.1. <i>Methodenentwicklung</i>	19
2.1.1.1. Atmosphärendruckionisation des Analyten und des internen Standards	19
2.1.1.2. Fluss- und substanzabhängige Parameter	21
2.1.1.3. HPLC Parameter	24
2.1.1.4. Herstellung der Standardlösungen und Vergleichstandards	25
2.1.1.5. Probenaufbereitung mittels Festphasenextraktion (SPE)	26
2.1.2. <i>Methodenvalidierung</i>	28
2.1.2.1. Untersuchungen zur Selektivität	28
2.1.2.2. Richtigkeit, Präzision und Kalibration.....	29
2.1.2.3. Untersuchungen zur Stabilität des Analyten und des internen Standards	30
2.1.2.4. Wiederfindung und Matrixeffekte	31
2.2. DURCHFÜHRUNG EINER KLINISCHEN STUDIE ZUR ERFORSCHUNG DER KLINISCHEN PHARMAKOKINETIK VON CIDOFOVIR BEI PÄDIATRISCHEN PATIENTEN.....	33
2.2.1. <i>Studiendesign</i>	33
2.2.2. <i>Einschlusskriterien</i>	34
2.2.3. <i>Ausschlusskriterien</i>	34
2.2.4. <i>Erhobene Patientenwerte</i>	34
2.2.5. <i>Blutentnahmeprotokoll</i>	35
2.2.6. <i>Genehmigung durch die Ethikkommission</i>	36
2.2.7. <i>Berücksichtigte gesetzliche Bestimmungen, Leitlinien und Normen</i>	36
2.2.8. <i>Untersuchungs-spezifische Komplikationen und/oder Risiken</i>	36
2.2.9. <i>Unerwünschtes Ereignis (AE)</i>	37

2.2.10. <i>Schwerwiegendes unerwünschtes Ereignis (SAE)</i>	37
2.2.11. <i>Auswertung der Studienergebnisse</i>	38
2.3. PHYSIOLOGIE-BASIERTE SIMULATION VIRTUELLER PATIENTEN	40
2.3.1. <i>Allgemeiner Hintergrund</i>	40
2.3.2. <i>Struktureller Aufbau des verwendeten Ganzkörpermodells</i>	41
2.3.3. <i>Individuelle Simulation mit virtuellen Patienten</i>	43
2.3.4. <i>Physiko-chemische Eigenschaften von Cidofovir als Simulationsparameter</i>	47
2.3.5. <i>Skalierung der Cidofovir-Clearance</i>	48
3. MATERIAL	50
3.1. HPLC-MS/MS-APPARATUR	50
3.2. CIDOFOVIR UND DER INTERNE STANDARD	51
3.3. LÖSUNGSMITTEL UND LÖSUNGEN	52
3.4. VERBRAUCHSMATERIALIEN	53
3.5. LABORGERÄTE	53
3.6. SOFTWARE	53
4. ERGEBNISSE	54
4.1. HPLC-MS/MS-METHODENENTWICKLUNG UND -VALIDIERUNG	54
4.1.1. <i>Ergebnisse zur Optimierung der fluss- und substanzabhängigen Parameter</i>	54
4.1.2. <i>Ergebnisse der Untersuchungen zur Selektivität</i>	56
4.1.3. <i>Ergebnisse der Untersuchungen zur Präzision, Richtigkeit und Kalibrierung</i>	57
4.1.4. <i>Ergebnisse zur Untersuchung der Wiederfindung und der Matrixeffekte</i>	61
4.1.5. <i>Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchungen</i>	64
4.2. ERGEBNISSE DER STUDIE ZUR ERFORSCHUNG DER KLINISCHEN PHARMAKOKINETIK VON CDV BEI PÄDIATRISCHEN PATIENTEN	66
4.2.1. <i>Patient ID Nr. 1</i>	67
4.2.2. <i>Patient ID Nr. 2</i>	68
4.2.3. <i>Patient ID Nr. 3</i>	70
4.2.4. <i>Patient ID Nr. 4</i>	71
4.2.5. <i>Patient ID Nr. 5</i>	72
4.2.6. <i>Patient ID Nr. 6</i>	73
4.2.7. <i>Patient ID Nr. 7</i>	75
4.2.8. <i>Patient ID Nr. 8</i>	76
4.2.9. <i>Patient ID Nr. 9</i>	77
4.2.10. <i>Patient ID Nr. 10</i>	80
4.3. ERGEBNISSE DER PHYSIOLOGIE-BASIERTEN SIMULATIONEN VIRTUELLER PATIENTEN	82
4.4. VERGLEICH DER SIMULATIONS- UND DER STUDIENERGEBNISSE	87

5. DISKUSSION	100
5.1. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE	100
5.2. ENTWICKLUNG UND ANWENDUNG EINER HPLC-MS/MS-METHODE	101
5.3. KLINISCHE PHARMAKOKINETIK VON CIDOFOVIR BEI PÄDIATRISCHEN PATIENTEN	105
5.4. PHYSIOLOGIE-BASIERTE SIMULATION VIRTUELLER PATIENTEN	109
6. SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK	115
7. ZUSAMMENFASSUNG	117
7.1. ZUSAMMENFASSUNG	117
7.2. SUMMARY	118
8. LITERATURVERZEICHNIS	119
9. ANHANG	124
9.1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	124
9.2. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	125
9.3. VERZEICHNIS DER TABELLEN	127
10. LEBENSLAUF	130
11. DANKSAGUNG	132
12. ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION	134

1. Einleitung

1.1. Klinische Studien für pädiatrische Patienten

Die Notwendigkeit für die Durchführung von pädiatrischen Studien beruht auf der Beobachtung, dass Arzneimittelwirkungen bei Erwachsenen nur bedingt auf Kinder übertragbar sind. Im Vergleich von Erwachsenen zu Kindern bestehen große Unterschiede zum einen auf der pharmakokinetischen (Absorption, Verteilung, Biotransformation und Elimination) und zum anderen auf der pharmakodynamischen Ebene (unterschiedliche Qualität und Quantität von Rezeptoren, Enzymen, etc.) (Kearns et al., 2003).

Diese altersabhängigen Unterschiede können unterschiedliche Dosierungen bei erwachsenen und pädiatrischen Patienten erforderlich machen. Inadäquate Dosierungsinformationen für pädiatrische Patienten erhöhen daher das Risiko von Nebenwirkungen bzw. können zu einer ineffektiven Arzneimitteltherapie führen. Aktuell sind etwa 50% der bei stationär behandelten Kindern eingesetzten Arzneimittel nicht an Kindern geprüft oder für Kinder zugelassen (Choonara et al., 2002, Conroy et al., 2000, Hsien et al., 2008). Gesundheitspolitisch wurde bereits auf das bestehende Problem reagiert: mit dem Inkrafttreten einer neuen EU-Verordnung im Januar 2007 (Verordnung (EG) Nr. 1901/2006) werden Studien für pädiatrische Patientenkollektive für die Neuzulassung von Fertigarzneimitteln verpflichtend gemacht. Darüber hinaus werden wirtschaftliche Anreize für die pharmazeutische Industrie geschaffen, auch für schon zugelassene Arzneimittel kinderspezifische Untersuchungen durchzuführen (Parlament der Europäischen Union, 2007).

Die Planung und Durchführung dieser Studien, insbesondere wenn die Pharmakokinetik in pädiatrischen Patienten erforscht werden soll, erfordert die Berücksichtigung kinderspezifischer Methoden (z.B. Analysenmethoden, die mit sehr geringen Blutvolumen arbeiten) und insbesondere auch die Berücksichtigung ethischer Aspekte (Caldwell et al., 2004, FDA Food and Drug Administration, 1998). So ist beispielsweise das Vorwissen über die Pharmakokinetik bei Erwachsenen zu nutzen, um Blutentnahmeschemata zu entwickeln, die ein Maximum an Informationsgewinn und ein Minimum an einzelnen Blutentnahmen gewährleisten.

Der Erfolg einer pädiatrischen Studie wird durch das Ausnutzen des vorhandenen Vorwissens wesentlich beeinflusst. Ein methodischer Zugang hierfür ist der Einsatz von Simulationen, wobei die Zielsetzung für Simulationen bei pädiatrischen Studien analog zu der bei Studien für Erwachsene ist: Simulationen sollen eine Reduktion der benötigten Studienpopulation bei gleicher oder besserer Aussagekraft der klinischen Studie erzielen. Darüber hinaus kann somit eine Einsparung von Zeit und Kosten ermöglicht werden.

Die Stärke von Simulationen liegt nicht nur darin, mögliche Ergebnisse im Vorhinein abzubilden, sondern sie ermöglichen auch die Durchführung von Sensitivitätsanalysen, d.h. man kann den Effekt von theoretischen Annahmen auf das Ergebnis bestimmen. Gerade weil die Anzahl der für die Pädiatrie durchgeführten Studien gering ist, hat man in den letzten Jahren begonnen, Simulationen auch für pädiatrische Altersgruppen zu entwickeln. Der Einsatz von Computersimulationen soll und kann die Durchführung von klinischen Studien derzeit nicht ersetzen. Simulationen können aber dazu beitragen, die „richtige“ Dosis oder den „richtigen“ Blutentnahmezeitpunkt für eine klinische Studie zu finden. Hierfür sind die pharmakokinetischen Parameter des Arzneimittels und die physiologischen Charakteristika der Kinder zu berücksichtigen.

Dabei existiert in der pädiatrischen Population eine große Variabilität, die von zwei Prozessen maßgeblich bestimmt wird: Reifung (von Organsystemen, Rezeptoren und Transportern) und Wachstum. Die „pädiatrische Population“ ist daher nicht als ein einheitliches Kollektiv zu verstehen: jede einzelne Entwicklungsstufe weist spezifische Besonderheiten auf. Deutlich wird diese Heterogenität beispielsweise bei der einfachen Betrachtung der Entwicklung des Körpergewichtes und der Körperoberfläche: so verdoppelt sich typischerweise das Körpergewicht von der Geburt bis zum 5. Lebensmonat und verdreifacht sich bis zum 1. Lebensjahr. Analog vergrößern sich Körperlänge und Körperoberfläche um 50% bis zum 5. Lebensmonat und um 200% bis zum 1. Lebensjahr (McCarver, 2004).

Neben dem Einsatz von Simulationen kann der Informationsgewinn von klinischen Studien auch durch moderne Verfahren wie der Populationspharmakokinetik noch erhöht werden. Die Populationspharmakokinetik (Populationskinetik) dient dabei der Bestimmung der mittleren pharmakokinetischen Parameter und deren Variabilität in einer Population. Die am weitesten verbreiteten Methoden sind die Zwei-Stufen-Methode (two-stage approach) und die nichtlineare Regression unter Berücksichtigung sogenannter fixer und zufälliger Effekte.

Bei der Zwei-Stufen-Methode werden zunächst individuelle pharmakokinetische Parameter ermittelt. In einem zweiten Schritt wird deren statistische Verteilung und Variabilität untersucht. Voraussetzung für diese Methode ist eine datenreiche Situation mit dem Vorliegen kompletter Plasmakonzentrations-Zeitprofile.

Die nichtlineare Regression unter Berücksichtigung gemischter Effekte ist dagegen auch auf eine datenarme Situation, im Extremfall eine Plasmakonzentration pro Patient, anwendbar. Auf der Grundlage der ermittelten pharmakokinetischen Parameter lassen sich dann Dosierungsregime für definierte Altersklassen von Patienten entwickeln (Laer et al., 2005).

Beiden Ansätzen ist jedoch gemein, dass die bestimmten mittleren pharmakokinetischen Parameter eine definierte Population (zum Beispiel Kinder einer Altersklasse) charakterisieren und nicht einen individuellen Patienten mit seinen spezifischen Merkmalen.

1.2. Optimierung der antiviralen Therapie mit virtuellen Patienten

Die allgemeinen Aussagen über die Notwendigkeit für die Durchführung von pädiatrischen Studien und die Möglichkeit des Einsatzes von Simulationen lassen sich konkret auf die klinische Fragestellung der vorliegenden Untersuchung, also ob die Simulation von „virtuellen“ Kindern zur Optimierung der antiviralen Pharmakotherapie beitragen kann, übertragen. Der Hintergrund dieser Fragestellung, ist die Tatsache, dass für die antivirale Therapie pädiatrischer Patienten die Kenntnis und die Berücksichtigung der altersabhängigen Unterschiede auf der pharmakokinetischen Ebene von klinischer Bedeutung ist (Eksborg, 2003). Der gewünschte therapeutische Effekt einer antiviralen Therapie (also eine Inhibition der viralen Replikation) aber auch das Auftreten von unerwünschten Nebenwirkungen (wie Nephrotoxizität) ist direkt konzentrationsabhängig bzw. dosisabhängig.

Da die Targets einer antiviralen Therapie körperfremde Strukturen sind (z.B. die virale DNA-Polymerase bei DNA-Viren oder die reverse Transkriptase bei RNA-Viren), spielen altersabhängige Unterschiede auf der pharmakodynamischen Ebene im Vergleich zu den Unterschieden auf der pharmakokinetischen Ebene eine untergeordnete Rolle. In der folgenden Abbildung sind die möglichen Beeinflussungen der Pharmakokinetik und Pharmakodynamik durch altersabhängige Unterschiede aufgezeigt.

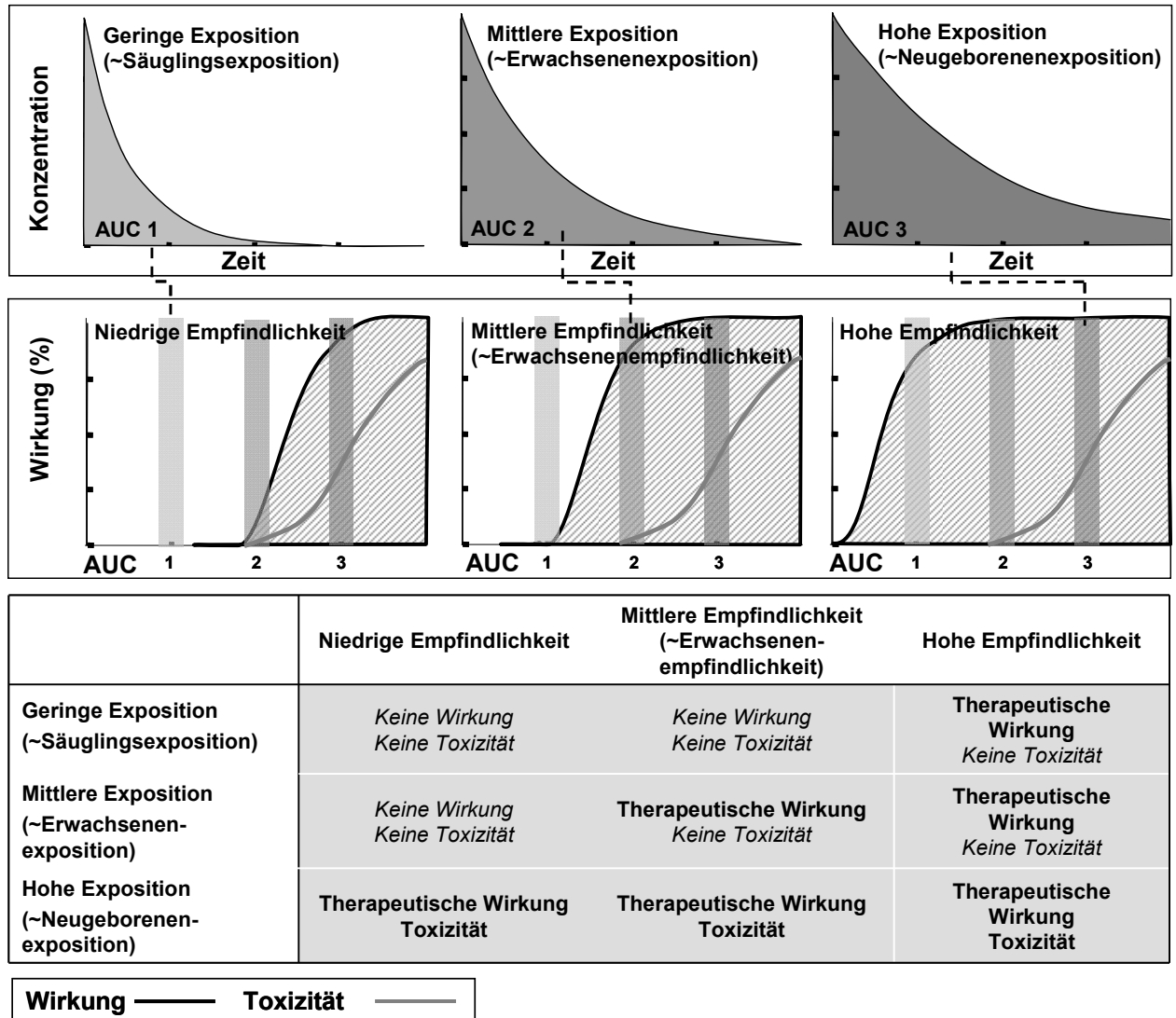


Abbildung 1. Mögliche Beeinflussung der Pharmakokinetik und der Pharmakodynamik durch altersabhängige Unterschiede (Abbildung modifiziert nach (Laer et al., 2008)). Die Abbildung zeigt in vereinfachter Weise die mögliche Beeinflussung der Pharmakokinetik und der Pharmakodynamik durch altersabhängige Unterschiede. So kann bei einer gegebenen Dosis bei Neugeborenen, Säuglingen und Erwachsenen eine unterschiedliche Exposition aufgrund einer unterschiedlichen Arzneistoffclearance resultieren. Darüber hinaus kann auch die Empfindlichkeit, also das pharmakodynamische Ansprechen, bei einer gegebenen Exposition variieren. In dem aufgeführten Beispiel zeigen die Säuglinge bei einer geringen Exposition auch eine geringe Empfindlichkeit gegenüber der Therapie. Daher ist in diesem Fall mit keiner therapeutischen Wirkung und keiner Toxizität zu rechnen. Im Gegensatz hierzu geht in dem Beispiel bei den Neugeborenen eine hohe Exposition mit einer hohen Empfindlichkeit einher. In diesen Fall ist mit einer therapeutischen Wirkung aber auch mit Toxizität zu rechnen. Nur bei den Erwachsenen führt eine mittlere Exposition und eine mittlere Empfindlichkeit auf das therapeutisch gewünschte Ziel: keine Toxizität bei gleichzeitiger therapeutischer Wirkung.

Insgesamt existieren neun verschiedene Beeinflussungsmöglichkeiten. So kann auf der pharmakokinetischen Ebene bei pädiatrischen Patienten eine im Vergleich zu einer mittleren Exposition bei Erwachsenen niedrigere (in der Regel bei Säuglingen und Kleinkindern), eine vergleichbare oder eine höhere Exposition (in der Regel bei Neugeborenen) nach der Applikation einer vergleichbaren Dosis resultieren.

Das Ausmaß der systemischen Exposition verhält sich dabei umgekehrt proportional zur Arzneistoffclearance: Säuglinge und Kleinkinder weisen in der Regel eine höhere körperl-gewichts-normalisierte Clearance auf, wohingegen Neugeborene aufgrund der Unreife von Eliminationsmechanismen (also einer Unreife der Nieren- und Leberfunktion) oft eine niedrigere körperl-gewichts-normalisierte Clearance aufweisen. Auf der pharmakodynamischen Ebene muss man zwischen dem erwünschten therapeutischen Effekt (also der Pharmakodynamik im eigentlichen Sinne) und dem unerwünschten toxischen Effekt (Toxikodynamik) unterscheiden. In beiden Fällen ist der dynamische Effekt eines Arzneistoffes abhängig von der Wechselwirkung zwischen Arzneistoff und Körperstrukturen. Dabei kann der dynamische Effekt intrazellulär (Wechselwirkung mit Rezeptoren, Enzymen, Ionenkanälen, Transportern, DNA und Strukturelementen, wie z.B. Membranlipide) oder extrazellulär (durch enzymatische, physikalische oder chemische Wirkung durch den Arzneistoff) hervorgerufen werden. Durch altersabhängig bedingte Unterschiede in der Körperzusammensetzung (z.B. aufgrund einer unterschiedlichen Expression von Rezeptoren oder einer unterschiedlichen Körperwasser/Fett-Zusammensetzung) kann der erwünschte dynamische Effekt eines Arzneistoffes bei pädiatrischen Patienten bei einer niedrigeren, vergleichbaren oder höheren Exposition im Vergleich zu Erwachsenen hervorgerufen werden. Ebenso altersabhängig verhalten sich auch die unerwünschten toxischen Effekte. Dies hat unmittelbare Konsequenzen für die Dosierungsstrategie bei pädiatrischen Patienten, da man nicht grundsätzlich bei einer vergleichbaren Exposition bei Erwachsenen und pädiatrischen Patienten von einem vergleichbaren dynamischen Effekt oder einer vergleichbaren Verträglichkeit der Therapie ausgehen kann (Kearns et al., 2003).

Im Gegensatz hierzu kann, wie im oberen Teil schon beschrieben, im Hinblick auf eine antivirale Therapie von einer vergleichbaren Wirkung bei einer vergleichbaren Exposition ausgegangen werden, da der pharmakodynamische Effekt durch Interaktion mit körperl-fremden Strukturen, die keiner Altersabhängigkeit unterliegen, hervorgerufen wird. Aus diesem Grund kommt der Berücksichtigung der altersabhängigen Unterschiede auf der pharmakokinetischen Ebene für die antivirale Therapie eine übergeordnete Bedeutung zu. Die Kenntnis der bei pädiatrischen Patienten vorliegenden Pharmakokinetik eines Virustatikums ist daher die Grundvoraussetzung für eine altersgerechte Dosierung.

Für das acyclische Nucleotidanalogon Cidofovir existieren jedoch keine pharmakokinetischen Informationen für pädiatrische Patienten, so dass die Dosierung des Arzneistoffs auf der Grundlage einer linearen Extrapolation der Parameter erwachsener Patienten, also der körperlsgewichts-bezogenen Clearance bzw. Dosis, erfolgt. Das heißt, dass pädiatrische Patienten bisher die gleiche körperlsgewichts-bezogene Dosis wie erwachsene Patienten erhalten, wobei potenziell bestehende altersabhängige Unterschiede keine Berücksichtigung finden. Die Fragestellung, ob es durch eine physiologie-basierte Simulation von virtuellen pädiatrischen Patienten möglich ist, die Pharmakokinetik des Virustatikums individuell vorherzusagen, hat also eine direkte klinische Relevanz, da die Simulation so zum Ausgangspunkt für eine im Vergleich zu Erwachsenen äqui-effektiven Dosierung würde. Dieses Konzept der physiologie-basierten Simulation von virtuellen pädiatrischen Patienten ist auch einem konventionellen therapeutischen Drug Monitoring (TDM) methodisch überlegen, da mithilfe einer validen Simulation im Vorhinein, also a priori, die „richtige“ Dosis bestimmt werden könnte, wohingegen beim TDM eine Anpassung der Dosis erst nach einer erfolgten Untersuchung der individuellen kinetischen Verhältnisse erfolgen kann.

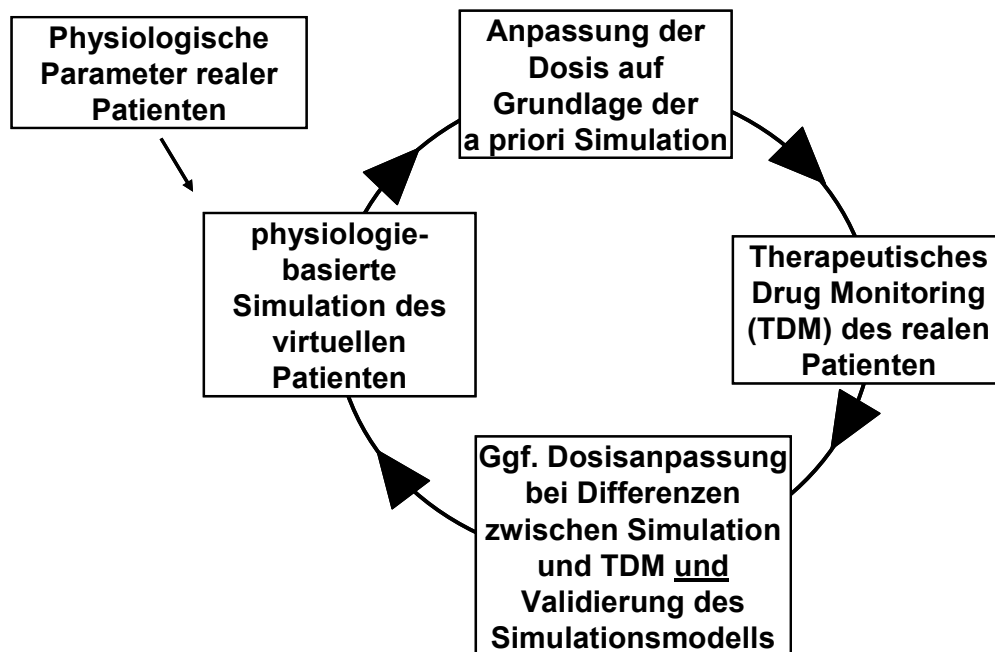


Abbildung 2. Konzept zur Optimierung der antiviralen Therapie durch Simulation virtueller Patienten. Die Abbildung zeigt den möglichen Ablauf der Cidofovir-Dosisfindung für pädiatrische Patienten auf der Grundlage einer physiologie-basierten Simulation. In einem ersten Schritt wird eine physiologie-basierte Simulation von einem virtuellen Patienten erstellt, der die gleichen physiologischen und pathophysiologischen Parameter wie ein realer Patient aufweist. Diese Simulation dient zur a priori Vorhersage der Dosis des realen Patienten. Während der Therapie wird ein therapeutisches Drug Monitoring (TDM) durchgeführt, um eine eventuell erforderliche Dosisanpassung vornehmen zu können, wenn es zu Differenzen zwischen der a priori Vorhersage und der Messung kommt und um das Simulationsmodell validieren zu können. Sollte das Simulationsmodell Defizite aufweisen, könnten zukünftige Patienten von einer Verbesserung des Modells profitieren.

Der Zielparameter für eine äqui-effektive Dosierung bei erwachsenen und pädiatrischen Patienten ist die systemische Exposition, wobei die Fläche unter der Konzentrationszeitkurve (AUC, „area under the curve“) als Maß für die systemische Exposition dient. Bei einer vergleichbaren systemischen Exposition kann von einer vergleichbaren antiviralen Wirkung ausgegangen werden. Unter Verwendung dieses Zielparameters wurde beispielsweise ein Dosis-Nomogramm für die Anwendung von Cidofovir bei erwachsenen Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion etabliert (Brody et al., 1999).

1.3. Pharmakokinetik von Cidofovir

Die Anzahl der verfügbaren Studien und Untersuchungen zur Pharmakokinetik von Cidofovir ist sehr begrenzt. Insbesondere fehlen Untersuchungen bei pädiatrischen Patienten (Eksborg, 2003). Die bisher ausschließlich bei Erwachsenen durchgeführten Untersuchungen wurden insbesondere im Hinblick auf den Einfluss der Ko-Medikation Probenecid, das obligat als Nephroprotektivum verabreicht werden muss, sowie den Einfluss der Nierenfunktion auf die Kinetik vorgenommen (Brody et al., 1999, Cundy, 1999, Cundy et al., 1995, Wolf et al., 2003).

Nach dieser Studienlage zeigt intravenös appliziertes Cidofovir eine reproduzierbare und lineare Kinetik, d.h. die systemische Aufnahme der Substanz verhält sich proportional zur applizierten i.v.-Dosis. Die durchschnittliche Serumkonzentration von Cidofovir am Ende einer einstündigen Infusion von 5 mg/kg (zusammen mit Probenecid) beträgt 19,6 ($\pm 7,18$) $\mu\text{g/ml}$. Die Durchschnittswerte der pharmakokinetischen Parameter, wobei die Standardabweichung jeweils in Klammern angegeben ist, betragen für die Serum-Clearance 138 (± 36) ml/h/kg, für das Steady-State-Verteilungsvolumen 388 (± 125) ml/kg und für die terminale Halbwertszeit 2,2 ($\pm 0,5$) h (Pfizer, Stand der Information 09/2004). Des Weiteren konnten die zeitlichen Veränderungen der Konzentration durch einen scheinbar biexponentiellen Verlauf beschrieben werden.

Bei einer wöchentlichen Applikation einer Einzelgabe zeigte sich kein Hinweis auf eine Akkumulation der Substanz. Der Arzneistoff wird über die Niere eliminiert und extensiv als unverändertes Cidofovir mit dem Urin ausgeschieden. Bei Patienten mit normaler Nierenfunktion werden innerhalb von 24 Stunden 80 bis 100 % der intravenösen Dosis als unverändertes Cidofovir im Urin wiedergefunden.

Da die mittlere Gesamtclearance bei den untersuchten Patienten höher war als die ermittelte Creatinin-Clearance scheint neben der glomerulären Filtration auch ein aktiver tubulärer Sekretionsmechanismus zur renalen Clearance beizutragen.

1.4. Pharmakodynamik von Cidofovir

Cidofovir (1-[(S)-3-hydroxy-2-(phosphonylmethoxy)propyl]cytosine) ist ein acyclisches Analogon des Desoxycytidin-Monophosphats. Die Phosphonomethylether-Teilstruktur ist dabei als Anknüpfungspunkt für Phosphorylierungen von wesentlicher Bedeutung: Cidofovir ist ein Prodrug, um seine antivirale Wirkung zu entfalten, muss es in das pharmakodynamisch aktive Cidofovir-Diphosphat überführt werden, welches zum einen die virale DNA-Polymerase inhibiert und zum anderen als alternatives Substrat der Polymerase durch Inkorporation zur Inhibition der viralen DNA-Elongation führt (Xiong et al., 1997). Die Cidofovir-Diphosphat-Konzentration, die für die Hemmung der viralen DNA-Polymerase erforderlich ist, liegt 8- bis 600-mal niedriger als die Konzentration, die zur Hemmung der humanen zellulären DNA-Polymerasen α , β und γ erforderlich ist. Im Gegensatz zu den Nucleosid-Analoga wie z.B. Aciclovir und Ganciclovir, die ebenfalls in der Therapie viraler Infektionen beim Menschen eingesetzt werden, erfordert die Aktivierung von Cidofovir keine initiale Phosphorylierung durch virale Nucleosidkinasen. Cidofovir wird nach intrazellulärer Aufnahme durch Flüssigphasen-Endocytose (Pinocytose) durch die körpereigene Pyrimidinnucleosidphosphokinase konsekutiv zum Cidofovir-Diphosphat phosphoryliert (Cihlar et al., 1996, Ho et al., 1992). Das Cidofovir-Diphosphat weist eine Halbwertszeit $t_{1/2}$ um 65 h auf. In einem weiteren Schritt kann, katalysiert durch die Phosphorylcholincytydyltransferase (CTP), das Cidofovirphosphocholin mit einer $t_{1/2}$ um 87 h entstehen.

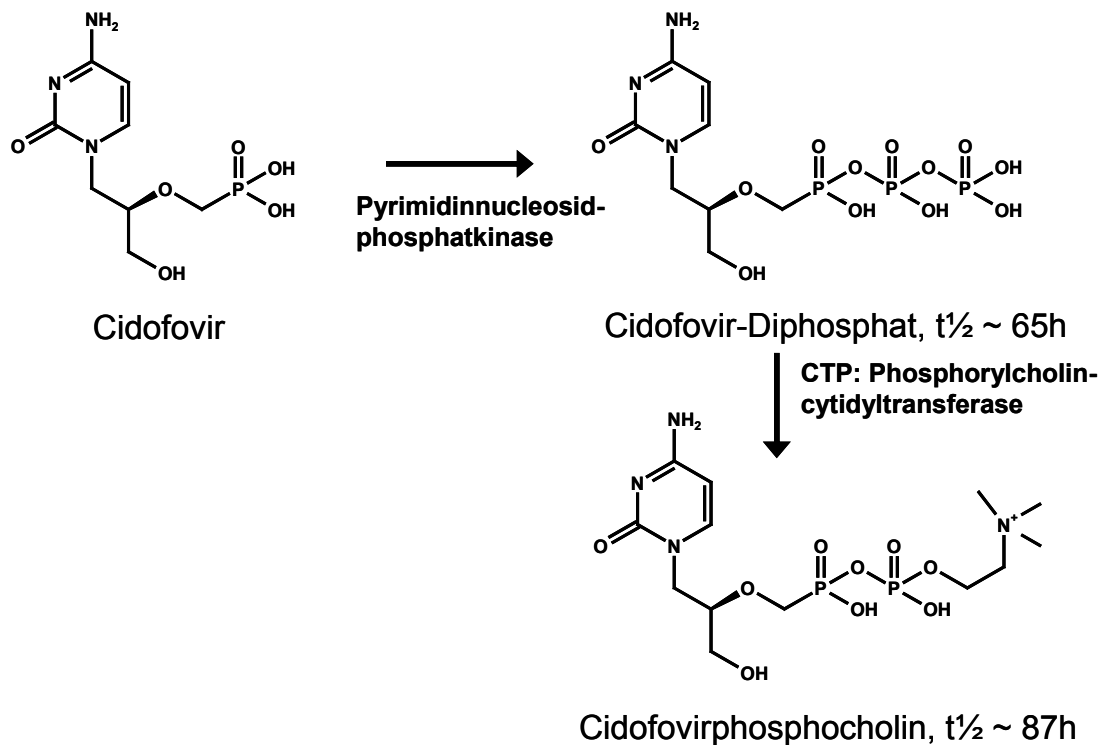


Abbildung 3. Intrazelluläre Phosphorylierung von Cidofovir

Die Dauer der antiviralen Wirkung des Cidofovirs korreliert nicht mit der aktuellen Konzentration im Serum. Um die antivirale Wirkung mit einem pharmakokinetischen Parameter charakterisieren zu können, wird die systemische Exposition herangezogen. Der Hintergrund hierfür ist die Annahme, dass sich die intrazelluläre Aufnahme von Cidofovir durch Flüssigphasen-Endocytose (Pinocytose) proportional zur systemischen Exposition verhält. Diese intrazelluläre Aufnahme und die sich anschließende intrazelluläre Phosphorylierung stellt eine Erklärung für die langdauernde antivirale Aktivität nach einmaliger Applikation von Cidofovir dar (Cundy, 1999). Im Gegensatz zu der kurzen Halbwertszeit von Cidofovir im Serum, weisen das pharmakodynamisch aktive Cidofovir-Diphosphat und das Cidofovirphosphocholin eine sehr lange (intrazelluläre) Halbwertszeit auf und bilden auf diese Art und Weise ein Depot. Hieraus resultiert die Möglichkeit für ein infrequentes Dosierungsschema.

Für die Initialbehandlung beträgt die empfohlene Cidofovir-Dosis 5 mg/kg Körpergewicht (als intravenöse Infusion über einen Zeitraum von einer Stunde bei konstanter Infusionsgeschwindigkeit) und wird zwei Wochen hintereinander jeweils einmal pro Woche verabreicht. Zwei Wochen nach beendeter Initialbehandlung beträgt die empfohlene Erhaltungsdosis von Cidofovir 5 mg/kg Körpergewicht (wiederum als intravenöse Infusion über einen Zeitraum von einer Stunde bei konstanter Infusionsgeschwindigkeit) und wird einmal alle zwei Wochen verabreicht. Die erforderliche Dosis ist dabei in 100 ml isotoner Kochsalzlösung zu verdünnen.

1.5. Anwendung von Cidofovir

Das zugelassene Anwendungsgebiet von Cidofovir (enthalten im Fertigarzneimittel Vistide®) umfasst nur die Behandlung der Cytomegalie-Retinitis (CMV-Retinitis) bei Patienten mit erworbenem Immundefekt-Syndrom (AIDS) und ohne renale Dysfunktion. Diesem sehr engen Anwendungsgebiet steht das weite antivirale Wirkspektrum von Cidofovir gegenüber. Die Substanz zeigt u.a. eine antivirale Wirkung gegen humanpathogene Polyomaviren (z.B. das BK-Polyomavirus), gegen verschiedene Typen des humanen Papillomavirus und des Adenovirus, gegen sämtliche humanpathogenen Herpesviridae (Herpes Simplex Typ 1 und Typ 2, Varizella zoster, Epstein-Barr-Virus, Cytomegalievirus (CMV), Humanes Herpesvirus Typ 6 und 7) sowie gegen das Pockenvirus (Poxviridae). Gegen das Humane Hepatitis B Virus (Hepnaviridae) ist Cidofovir hingegen nicht wirksam (De Clercq, 1997).

Aufgrund seines breiten Wirkspektrums dient Cidofovir daher als Reserve-Virustatikum und findet Anwendung außerhalb des zugelassenen Anwendungsgebietes (sog. off-label use) bei der Behandlung von schweren viralen Infektionen immunsupprimierter Patienten. In diesem Zusammenhang wird das Virustatikum insbesondere zur Behandlung von systemischen Cytomegalievirusinfektionen, aber auch zur Behandlung von Adenovirusinfektionen, sowie zur Behandlung von BK-Polyomavirusinfektionen (Hoffman et al., 2001, Kuypers et al., 2005, Ljungman et al., 2001, Ljungman et al., 2004) eingesetzt. Diese Virusinfektionen stellen bei Kindern mit onkologischen Grunderkrankungen und im Besonderen bei Stammzelltransplantierten schwere Komplikationen mit hoher Letalität dar, wobei die Cytomegalievirusinfektion die höchste klinische Relevanz aufweist. Dies liegt im Pathomechanismus der Infektion begründet: nach einer Primärinfektion mit CMV folgt, analog zu anderen lymphotropen Viren, eine Latenzphase, in der die Viren in verschiedenen Geweben, einschließlich der mononukleären Zellen, persistieren. Die Primärinfektion verläuft dabei bei immunkompetenten Personen meist subklinisch (d.h. ohne eine klinische Manifestation der Infektion). Bei Störungen der zellulären Immunfunktion kann es zur Reaktivierung der latenten Infektion kommen (Sekundärreaktivierung). Insbesondere aufgrund der Immunsuppression nach Chemotherapie oder Stammzelltransplantation sind die Patienten dann nicht in der Lage durch CMV-spezifische T-Lymphozyten die reaktivierte Infektion zu kontrollieren.

Als klinische Manifestationen (Symptome) der CMV-Erkrankung werden dabei interstitielle Pneumonien (CMV-Pneumonie) oder Enterokolitiden, aber auch Ösophagitiden, Hepatitiden, Enzephalitiden oder Retinitiden beobachtet. Die Inzidenz der CMV-Erkrankung nach Stammzelltransplantation liegt zwischen 20 und 35% (Razonable et al., 2004).

Die hohe klinische Relevanz dieser Erkrankungen wird am Beispiel der CMV-Pneumonie, die mit einer Letalitätsrate von 45-78% assoziiert ist, deutlich (Reusser, 1999).

1.6. Nephrotoxizität von Cidofovir

Die dosislimitierende Nebenwirkung von Cidofovir ist seine Nephrotoxizität, die durch eine Dysfunktion des proximalen Tubulus der Niere gekennzeichnet ist (Cundy, 1999). Der Pathomechanismus der renalen Toxizität von Cidofovir beruht auf der aktiven basolateralen Aufnahme durch den humanen, organischen Anionentransporter Typ 1 (hOAT1), welcher insbesondere im proximalen Tubulus exprimiert wird (Cihlar et al., 1999, Ho et al., 2000, Uwai et al., 2007).

Die basolaterale Aufnahme durch den hOAT1 verläuft dabei folgendermaßen: da das Zellinnere gegenüber dem Interstitium negativ geladen ist, benötigt der Transport negativ geladener Verbindungen in das Zellinnere gegen den elektrischen Gradienten Energie. Dafür wird in einem tertiär aktiven Transportprozess zunächst unter ATP-Verbrauch ein einwärts gerichteter Na^+ -Gradient durch die Na^+/K^+ -ATPase geschaffen. Angetrieben durch diesen Na^+ -Gradienten wird α -Ketoglutarat ($\alpha\text{-KG}^{2-}$) durch den Na^+ /Dicarboxylat-Ko-Transporter in der Zelle angereichert, wodurch zusammen mit dem im intrazellulären Stoffwechsel entstandenen α -Ketoglutarat ein auswärts gerichteter Gradient für das Dicarboxylat α -Ketoglutarat entsteht. Dieser Gradient wiederum unterhält den Dicarboxylat/Organische-Anionen-Austauscher, welcher verschiedene organische Anionen (OA), im besonderen para-Aminohippurat (PAH), in die Tubuluszelle transportieren kann (Wright et al., 2004).

Im Gegensatz zur tubulären Aufnahme ist über den Mechanismus der tubulären Sekretion auf die luminale Seite des Tubulus wenig bekannt. Offenbar ist die basolaterale Aufnahme effektiver als die luminale Sekretion, da es zu einer tubulären Akkumulation von Cidofovir kommt. Aufgrund des hohen nephrotoxischen Potenzials der Therapie, wird eine Prähydrierung der behandelten Patienten mit 0,9%-Kochsalzinfusionen durchgeführt. Darüber hinaus muss obligat ein Behandlungsregime mit oral verabreichtem Probenecid als Nephroprotektivum durchgeführt werden: drei Stunden vor der Cidofovir-Applikation erhält der (erwachsene) Patient zwei Gramm Probenecid, ein Gramm zwei Stunden vor der Applikation und ein weiteres Gramm acht Stunden nach der Applikation (insgesamt also vier Gramm Probenecid).

Die Rationale hierfür liegt im Wirkmechanismus des Probenecid begründet: der Arzneistoff inhibiert den hOAT1 an der basolateralen Seite der Zelle und soll auf diese Art und Weise die intrazelluläre Akkumulation von Cidofovir verringern. Analog erhalten pädiatrische Patienten ebenso ein Probenecid-Regime, wobei drei Stunden vor der Applikation 40 mg/kg Probenecid (max. zwei Gramm), zwei Stunden vor der Applikation 20 mg/kg (max.ein Gramm) und acht Stunden nach der Applikation wiederum 20 mg/kg (max.ein Gramm) Probenecid verabreicht werden.

1.7. Klinischer Ausgangspunkt: lebensbedrohliche Virusinfektion bei einem 10 Monate alten Krebspatienten

Der Ausgangspunkt für die Erforschung der klinischen Pharmakokinetik von Cidofovir ist ein realer Patientenfall: im Rahmen einer Fallstudie wurde ein 10 Monate alter männlicher Krebspatient über einen Zeitraum von 330 Tagen klinisch-pharmazeutisch begleitet (Breddemann et al., 2007). Der Patient, der aufgrund eines anaplastischen Astrocytoms zuvor eine kombinierte Zytostatikatherapie erhalten hatte, musste aufgrund von Gewichtsverlust und Gedeihstörung stationär aufgenommen werden. Am Tag der Aufnahme wog der Patient nur noch 7020 g (1 kg unter der 3. Gewichtsperzentile) und war mit einer Körpergröße von 64 cm (6 cm unter der 3. Größenperzentile) minderwüchsig. Als klinische Symptomatik zeigte sich das Bild einer lebensbedrohlichen, therapierefraktären Diarrhoe. Die Ergebnisse einer Gastro-, Duodeno- und Coloskopie zeigten eine Entzündung des gesamten gastrointestinalen Traktes auf, die mit einer Atrophie der Magen- und Darmmukosa einherging.

Nach der Entnahme von Darm-Biopsaten und von venösem Blut führten virologische Untersuchungen zur Diagnose einer akuten Infektion mit dem Humanen Herpesvirus Typ 6 (HHV-6) Variante B. Dieses Virus gehört zur Unterfamilie der β -Herpesviridae, der auch das humane Cytomegalievirus (CMV) und das Humane Herpesvirus Typ 7 angehören. Akute Infektionen mit HHV-6B verlaufen entweder subklinisch oder manifestieren sich bei immunkompetenten Menschen als Exanthema subitum (auch Roseola infantum oder Dreitagefieber genannt) und zählen zu den klassischen Kinderkrankheiten (Yamanishi et al., 1988). Daher ist die Diagnose einer HHV-6B Infektion als Auslöser für eine schwerwiegende Entzündung des gastrointestinalen Traktes sehr ungewöhnlich. Eine evidenzbasierte Leitlinie zur Behandlung von HHV-6 Infektionen existiert nicht, darüber hinaus sind keine Arzneimittel für diese Indikation zugelassen.

Es ist jedoch bekannt, dass die Sensitivität von HHV-6 gegenüber einer antiviralen Therapie der des humanen Cytomegalievirus entspricht (Mace et al., 2003, Manichanh et al., 2000). Die hier zur Verfügung stehenden Virustatika sind Ganciclovir, Foscarnet und Cidofovir.

Diese Virustatika haben neben einer in vitro auch eine in vivo Aktivität gegenüber HHV-6 gezeigt (Yoshida et al., 1998, Zerr et al., 2002). In Anlehnung an die Leitlinie zur Behandlung von Cytomegalievirusinfektionen bei Stammzelltransplantierten wurden daher Ganciclovir und Foscarnet als Mittel der Wahl und Cidofovir als Reservetherapeutikum bestimmt (Ljungman et al., 2004). Zur Überwachung des Therapieerfolges wurden die systemische und die lokale Viruslast mithilfe einer quantitativen Polymerasekettenreaktion (PCR) monitoriert.

Nach der initialen Therapie mit intravenös appliziertem Ganciclovir kam es zu einer signifikanten Reduktion der systemischen Viruslast und der Zustand des Patienten (52. Behandlungstag bis 77. Behandlungstag) verbesserte sich.

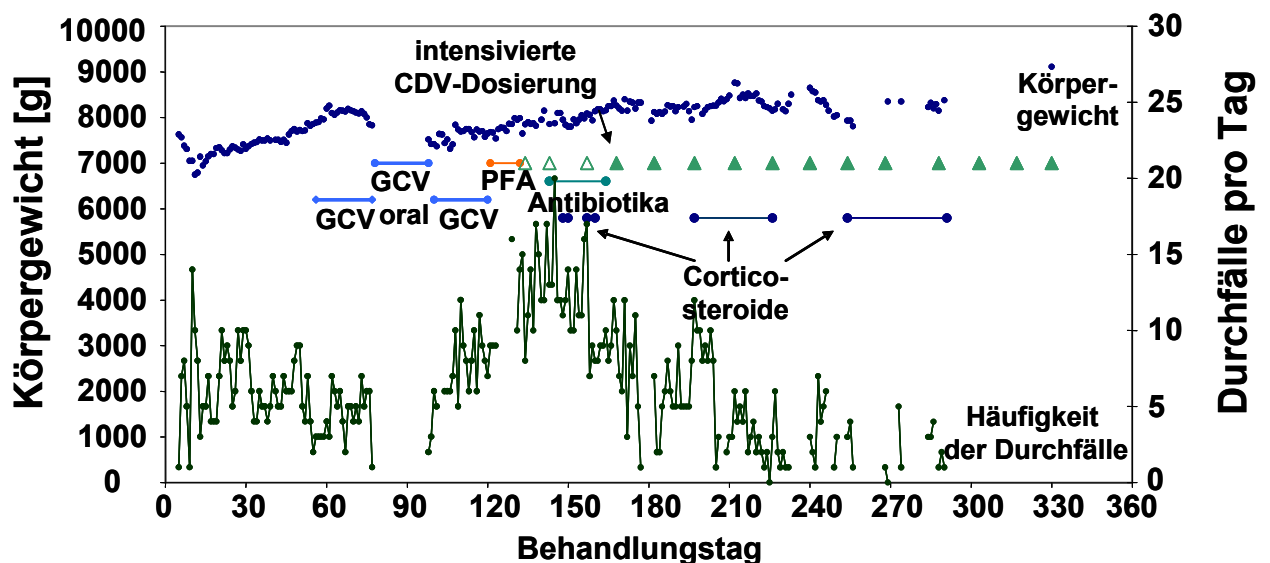


Abbildung 4. Entwicklung des Körpergewichts und der klinischen Symptome. Die Abbildung zeigt die Entwicklung des Körpergewichts und die Anzahl der Durchfälle pro Tag in Beziehung zur Pharmakotherapie des Patienten. Die Medikation des Patienten bestand im Verlauf der Therapie aus GCV (Ganciclovir intravenös); GCV oral (Ganciclovir oral), PFA (Foscarnet intravenös), Antibiotika (Metronidazol, Piperacillin und Tazobactam intravenös) und Corticosteroiden (Prednison intravenös). Die grünen Dreiecke stellen die intravenösen Cidofovir- und die ausgefüllten grünen Dreiecke die dosisintensivierten Cidofovirapplikationen dar.

In der Folge wurde die intravenöse auf eine orale Therapie mit Ganciclovir im Sinne einer Sequenztherapie umgestellt und der Patient konnte ambulant weiterbehandelt werden. Jedoch kam es unter dieser oralen Therapie wieder zu einer Verschlechterung der Symptome, obwohl eine systemische Viruslast nicht nachweisbar war.

Wiederholte endoskopische Untersuchungen zeigten wiederum schwere Entzündungen und Mukosaatrophien und eine persistierend hohe lokale Viruslast in den Darmbiopsien. Daher wurde das Ganciclovir wieder parenteral appliziert. Im weiteren Verlauf folgte eine weitere Verschlechterung der Symptome (Frequenzanstieg der Durchfälle) und ein Ansteigen der systemischen Viruslast, so dass Ganciclovir auf Foscarnet umgestellt wurde.

Diese Therapie musste aber wegen schwerer Nebenwirkungen (psychische Alteration und urethrale Mucositis) abgebrochen werden, so dass vom 134. Behandlungstag an Cidofovir als Reservetherapeutikum eingesetzt wurde.

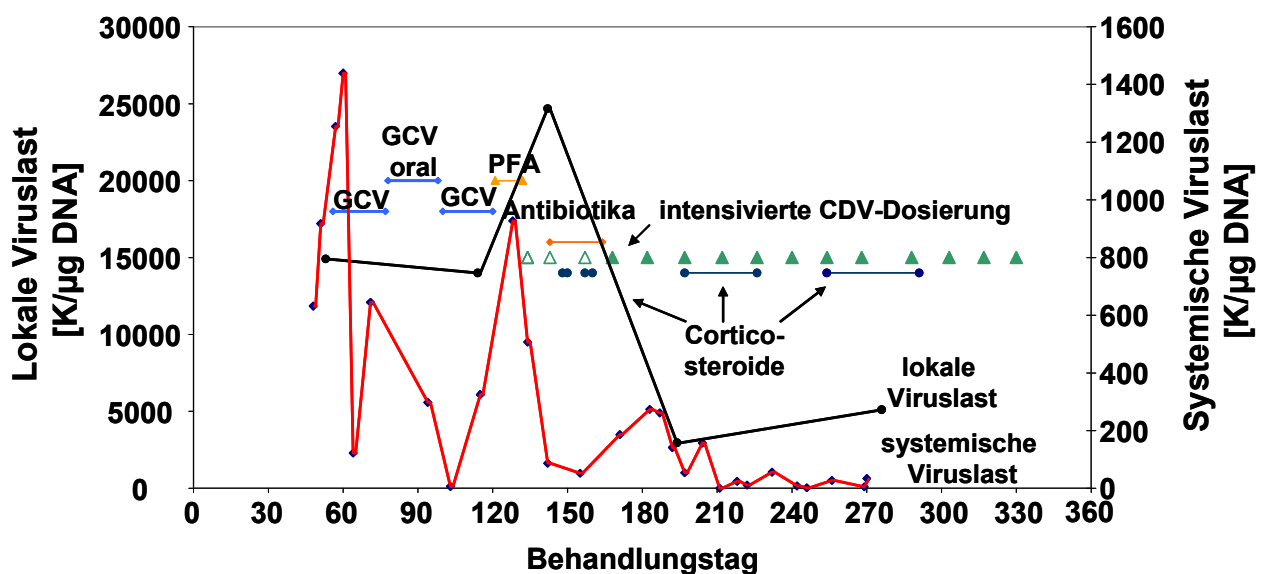


Abbildung 5. Entwicklung der systemischen und der lokalen HHV-6 Viruslast. Die Abbildung zeigt die Entwicklung der systemischen und der lokalen HHV-6 Viruslast in Beziehung zur Pharmakotherapie des Patienten. Die Medikation des Patienten bestand im Verlauf der Therapie aus GCV (Ganciclovir intravenös); GCV oral (Ganciclovir oral), PFA (Foscarnet intravenös), Antibiotika (Metronidazol, Piperacillin und Tazobactam intravenös) und Corticosteroiden (Prednison intravenös). Die grünen Dreiecke stellen die intravenösen Cidofovir- und die ausgefüllten grünen Dreiecke die dosisintensivierten Cidofovirapplikationen dar.

Im Hinblick auf das hohe nephrotoxische Potenzial dieser Therapie und in Anlehnung an ein Dosierungsregime zur Behandlung von Adenovirusinfektionen bei pädiatrischen Patienten, wurde mit einer wöchentlichen Dosis von 3 mg/kg, die aufgeteilt an drei aufeinander folgenden Therapietagen appliziert wurde, begonnen (Hoffman et al., 2001). Darüber hinaus wurden die empfohlenen Maßnahmen zur Prophylaxe der Nephrotoxizität (siehe Kapitel 1.3.4. Nephrotoxizität von Cidofovir) durchgeführt. Die eingeleitete Therapie wurde gut toleriert, die klinischen Symptome des Patienten persistierten jedoch. Daher wurde die Cidofovirtherapie intensiviert und begleitend hierzu eine antiinflammatorische Therapie mit Glucocorticoiden eingeleitet.

Die Cidofovir-Dosis wurde auf eine vierzehntägliche Dosis von 5 mg/kg Cidofovir, die aufgeteilt an zwei aufeinanderfolgenden Tagen appliziert wurde, erhöht.

Die Grundlage für die Erhöhung der Dosis war dabei die Hypothese, dass kleine Kinder für Cidofovir eine größere, körperlsgewichts-normalisierte Clearance als ältere Kinder und Erwachsene aufweisen. Diese Hypothese stützte sich zum einen auf die substanzspezifische Eigenschaft von Cidofovir unverändert über die Niere eliminiert zu werden und zum anderen auf die Besonderheit bei den Reifungs- und Wachstumsprozessen der renalen Funktionen und ihr Einfluss auf die Dosierung renal eliminiertes Arzneistoffe bei Kindern. So erreicht die körperlsgewichts-normalisierte glomeruläre Filtrationsleistung zwischen dem 2. und 4. Lebensjahr ein Maximum und geht im weiteren Verlauf der Entwicklung auf die Werte der Erwachsenen zurück (Hayton, 2000). Dies war im vorliegenden Fall bedeutsam, da Cidofovir körperlsgewichtsbezogen dosiert wird.

In der Folge dieser Dosisintensivierung und der begleitenden Glucocorticoidtherapie erfolgten eine signifikante Symptomenverbesserung und ein Rückgang der lokalen Viruslast. Insgesamt erhielt der Patient 15 Zyklen Cidofovir, wobei die Therapie insbesondere im Hinblick auf das hohe nephrotoxische Potenzial von Cidofovir gut toleriert wurde. Die antivirale Therapie konnte am 330. Behandlungstag abgeschlossen werden, nachdem sich die Stuhlfrequenz- und Konsistenz vollständig normalisiert hatten und das Gewicht des Patienten auf 9100 g angestiegen war.

1.8. Selektive Quantifizierung von Cidofovir in humanem Serum

Eine Schlussfolgerung aus der im vorhergehenden Kapitel beschriebenen Fallstudie ist, dass die Kenntnis der individuellen Pharmakokinetik von Cidofovir bei pädiatrischen Patienten dazu beitragen kann, die Effektivität der antiviralen Therapie zu sichern. Eine Grundvoraussetzung um die klinische Pharmakokinetik von Cidofovir bei pädiatrischen Patienten systematisch untersuchen zu können, ist die valide Quantifizierung des Analyten im Serum. Die hierfür geeigneten Analysemethoden müssen in Anbetracht der ausgeprägten Polymedikation (also der zeitgleichen Einnahme von mehreren Arzneimitteln) bei den zu untersuchenden, multimorbiden Patienten unbedingt eine hinreichende Selektivität aufweisen, so dass analytische Interferenzen mit anderen Arzneistoffen vermieden werden. Für die Quantifizierung von Cidofovir wurden in der wissenschaftlichen Literatur bisher vier HPLC-Methoden (Ba et al., 2001, Cundy et al., 1995, Eisenberg et al., 1996, Naiman et al., 2004, Yuan et al., 1996) beschrieben.

Für die Trennung im Rahmen dieser Methoden wurde dabei anfänglich die Ionenaustauschchromatographie in Verbindung mit einer UV-Detektion verwendet. Aufgrund der komplexen Matrix, aus der die Quantifizierung erfolgen muss, die eine Vielzahl von UV-absorbierenden Nucleotiden und Nucleosiden als endogene Serumbestandteile enthält, ist eine sensitive und selektive Detektion mit einer UV-Detektion jedoch schwer zu erzielen. Durch Cundy und Eisenberg wurde die HPLC-Methode zur Quantifizierung von Cidofovir 1996 entscheidend weiterentwickelt. Es war bekannt, dass sich Cytosin- und Adeninderivate mit Haloacetaldehyden (z.B. Bromoacetaldehyd) zu fluoreszenten 3,N⁴-Ethenocytosin- bzw. 2,N⁶-Ethenoadeninderivaten umsetzen lassen. Im Gegensatz zu den 2,N⁶-Ethenoadeninderivaten sind die 3,N⁴-Ethenocytosinderivate jedoch nur schwach fluoreszent, so dass eine Umsetzung mit Haloacetaldehyden keinen Vorteil gegenüber der herkömmlichen UV-Detektion zeigt. Dagegen entstehen durch eine Vorsäulen-Derivatisierung von Cidofovir mit Phenacylbromid (ω -Bromacetophenon) vor der chromatographischen Trennung hochfluoreszente 2-phenyl-substituierte 3,N⁴-Ethenocytosinderivate des Cidofovir, dessen Fluoreszenz bei einer Exzitationswellenlänge von 305 nm und einer Emissionswellenlänge von 370 nm vermessen werden kann (Eisenberg and Cundy, 1996). Die Reaktion des Cidofovirs mit Phenacylbromid ist jedoch nicht spezifisch: andere Cytosin- oder Adeninderivate (endogene Serumbestandteile) werden ebenfalls umgesetzt, so dass eine selektive Detektion nur durch eine anschließende Chromatographie erreicht werden kann.

Als Alternative zu den existierenden HPLC-Verfahren, insbesondere aber als moderne Alternative zur HPLC-Methode mit Vorsäulenderivatisierung, sollte für die Quantifizierung von Cidofovir im Serum eine neue selektive Methode entwickelt werden (Breddemann et al., 2008).

Hierfür bietet sich die HPLC-MS/MS-Methodologie idealerweise an: durch die Auswahl eines spezifischen Mutterions und die Optimierung der Fragmentierung auf ein spezifisches Tochterfragment werden hochselektive Detektionsbedingungen geschaffen, die analytische Interferenzen mit anderen Substanzen sehr unwahrscheinlich werden lassen. Darüber hinaus wird durch diese hohe Selektivität auch eine Maximierung des Signal-Rausch-Verhältnisses erzielt, was in einer hohen Empfindlichkeit der Methode resultiert. Die für die Methodenentwicklung gewählte HPLC-MS/MS-Methodologie eignet sich im Gegensatz zur HPLC-Methode mit Vorsäulenderivatisierung für eine Anwendung in der Routine-Analytik (z.B. im Rahmen eines therapeutischen Drug Monitorings), da zeitintensive, manuelle Arbeitsschritte (hiermit ist die Vorsäulenderivatisierung gemeint) entfallen und sich die Aufbereitung des Serums mittels einer Festphasenextraktion prinzipiell automatisieren lässt. Diese sogenannte „on-line“-Festphasenextraktion sollte aufgrund der hierfür erforderlichen apparativen Ausstattung nicht für die Methodenentwicklung im Rahmen dieser Arbeit angewendet werden, sondern die apparativ weniger aufwendige manuelle („off-line“) Festphasenextraktion.

1.9. Zielsetzung der Arbeit

Da Informationen über die Pharmakokinetik von Cidofovir in pädiatrischen Populationen nicht existieren, der antivirale Effekt und die Nebenwirkungen (Nephrotoxizität) aber konzentrationsabhängig bzw. dosisabhängig sind, ist es notwendig die Pharmakokinetik von Cidofovir bei dieser Patientengruppe zu untersuchen. Da der Arzneistoff ausschließlich renal eliminiert wird, ist es wahrscheinlich, dass Wachstums- und Reifungsprozesse der renalen Funktionen bei pädiatrischen Patienten einen signifikanten Einfluss auf die Pharmakokinetik haben (Hayton, 2000). Darüber hinaus konnte in Vorarbeiten des Arbeitskreises von Frau Professor Læer gezeigt werden, dass die Berücksichtigung dieser Reifungs- und Wachstumsprozesse für die Entwicklung eines altersgerechten Dosierungsschemas für die antiarrhythmische Therapie mit Sotalol, einem nicht selektivem β -Blocker, der ebenfalls renal eliminiert wird, erforderlich ist (Laer et al., 2005). Ausgehend von dieser allgemeinen Zielsetzung haben sich die konkreten Fragestellungen ausgehend von der Fallstudie „Case report: severe gastrointestinal inflammation and persistent HHV-6B infection in a paediatric cancer patient.“(Breddemann et al., 2007) entwickelt. Daher wurden die folgenden drei zentralen Frage- und Aufgabenstellungen im Rahmen dieser Arbeit berücksichtigt:

1. Entwicklung und Validierung einer selektiven Quantifizierungsmethode für Cidofovir als Grundlage für die systematische Untersuchung der klinischen Pharmakokinetik im Rahmen einer klinischen Studie.
2. Planung und Durchführung einer klinischen Studie mit dem Ziel der Erforschung der Pharmakokinetik von Cidofovir bei pädiatrischen Patienten.
3. Einsatz und Bewertung von physiologie-basierten Simulationen von virtuellen Kindern zur Optimierung der antiviralen Pharmakotherapie.

2. Methoden

2.1. HPLC-MS/MS-Methode für die Quantifizierung von Cidofovir in humanem Serum

2.1.1. Methodenentwicklung

2.1.1.1. Atmosphärendruckionisation des Analyten und des internen Standards

Das Grundprinzip der Massenspektrometrie besteht in der selektiven Detektion von Analyten nach ihrem Masse/Ladungsverhältnis (m/z). Hierfür muss der Analyt jedoch desolvatisiert und ionisiert in der Gasphase vorliegen. In der Kopplung der Gaschromatographie mit der Massenspektrometrie (GC-MS) findet für gasförmige oder verdampfbare Analyten die Elektronenstoßionisation (EI, „electron impact“) Anwendung, wohingegen in der Kopplung von HPLC und Massenspektrometrie vor allem die Elektrosprayionisation (ESI) als Verfahren zur Überführung von solvatisierten Ionen in die Gasphase dient. Dabei ist zu beachten, dass die technischen Voraussetzungen für den Betrieb eines Massenspektrometers denen der HPLC entgegengesetzt sind. Im Ionenpfad des Massenspektrometers befindet sich ein Hochvakuum, wobei sich die Analyt-Ionen bei hoher Temperatur in der Gasphase befinden. Im Gegensatz hierzu liegt der Analyt bei der HPLC solvatisiert vor und wird mit hohem Druck bei relativ niedrigen Temperaturen durch die chromatographische Säule transportiert. Zur Lösung dieses methodischen Problems wurden Ionisierungsverfahren, die bei Atmosphärendruck (Atmospheric Pressure Ionization) arbeiten, entwickelt (Niessen, 1998). Charakteristisch für die Ionisierung bei Atmosphärendruck ist die geringe Energie, die auf den Analyten übertragen wird. Hieraus resultiert eine geringe Fragmentierung und ein einfaches Massenspektrum, dessen Basispeak meist dem protonierten (im positiven Modus) $[M+H]^+$ bzw. dem deprotonierten (im negativen Modus) Analytmolekül $[M-H]^-$ entspricht. Darüber hinaus kann es zur Bildung von Addukten des Analyten mit Ammonium- und Natriumionen im positiven Modus oder Chloridionen im negativen Modus kommen. Bei den API-Verfahren unterscheidet man zwischen:

- ESI (Elektrosprayionisation)
- APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation)
- APPI (Atmospheric Pressure Photoionization)

Für niedermolekulare und polare Analyten kann die Elektrosprayionisation angewendet werden. Die ESI basiert auf der Überführung der Ionen, die in der flüssigen Phase vorgebildet wurden, in die Gasphase. Die Vernebelung der flüssigen Probe erfolgt durch eine Einlasskapillare, an der eine Hochspannung angelegt ist, mit Hilfe von Stickstoff, wobei kleine positiv (im positiven Modus) oder negativ (im negativen Modus) geladene Tröpfchen entstehen. Im weiteren Prozess erfolgt die Verdampfung des Lösungsmittels bei Temperaturen bis zu 450°C. Dadurch verkleinert sich der Tropfenradius und die Oberflächenspannung wird bis zu einer kritischen Größe erhöht. Die so verkleinerten Tropfen platzen in der sogenannten Coulomb-Explosion und es folgt ein Transfer der Ionen in die Gasphase. Am Ende des Prozesses liegen die zuvor solvatisierten Ionen gasförmig in der Ionenquelle vor (Bruins, 1998).

Insbesondere für die Ionisation von Neutralstoffen kann die Atmospheric Pressure Chemical Ionisation benutzt werden. Bei der APCI findet eine chemische Ionisierung statt, bei der die Ladung mittels eines Reaktands, in der Regel die verwendete mobile Phase, übertragen wird. Der Unterschied zwischen ESI und APCI besteht darin, dass bei der APCI keine Hochspannung an einer Einlasskapillare anliegt, sondern das Eluat zuerst durch verschiedene Gasflüsse zerstäubt, fokussiert und anschließend mit einem Heizer (bei Temperaturen bis zu 600°C) verdampft wird. Im Anschluss werden die im Überschuss vorhandenen Bestandteile der mobilen Phase wie z.B. Methanol oder Wasser protoniert bzw. deprotoniert, indem eine unter Spannung stehende Stahlnadel Entladungen erzeugt. Ausgehend von den ionisierten Reaktanden erfolgt ein Protonentransfer zu (positiver Modus) oder von (negativer Modus) den Analytmolekülen.

Für Substanzen, die einer Ionisation durch ESI oder APCI nicht zugänglich sind, kann die Atmospheric Pressure Photoionization verwendet werden. Die Ionisierung der Analyten bei der APPI erfolgt mit Hilfe einer Lampe, die energiereiches Licht ausstrahlt. Das Emissionsmaximum der Lampe ist so gewählt, dass die Analyten in der Gasphase photoionisiert werden, das Lösungsmittel und die Trägergaskomponenten jedoch nicht. Die Ionisierung wird hier durch Photonen anstelle von Elektronen erreicht, dadurch ist diese Ionisationstechnik im Gegensatz zur ESI oder APCI unabhängig von der Säure-Basen-Chemie. Von diesen drei Ionisierungsverfahren bietet sich die ESI für die niedermolekularen und polaren Substanzen Cidofovir und den für die Quantifizierung verwendeten internen Standard 9-((2-phosphonylmethoxy)ethyl)guanin (PMEG) in idealer Weise an.

2.1.1.2. Fluss- und substanzabhängige Parameter

Die MS/MS-Parameter mussten so eingestellt werden, dass das verwendete Massenspektrometer API 2000 (Applied Biosystems) den Übergang m/z 278.1 zu einem spezifischen Fragment für Cidofovir und den Übergang m/z 288.1 zu einem spezifischen Fragment für PMEG im sog. „multiple reaction monitoring“- (MRM) Modus bei negativer Elektrosprayionisation detektiert. Die negative Elektrosprayionisation wurde verwendet, da der Analyt Cidofovir und das als interner Standard verwendete PMEG als Phosphonsäure-Derivate schon bei physiologischen pH-Wert (7,4) als Di-Anionen vorliegen. Daher bietet sich der negative Modus in idealer Weise für die Ionisierung der beiden Verbindungen an. Der MRM-Modus ermöglicht dabei eine fragmentspezifische Detektion und umfasst drei Schritte:

- Selektion des Analyten (Precursor-Ion) nach m/z
- Fragmentation in der Kollisionskammer
- Selektion eines spezifischen Fragmentes (Produkt-Ion) nach m/z

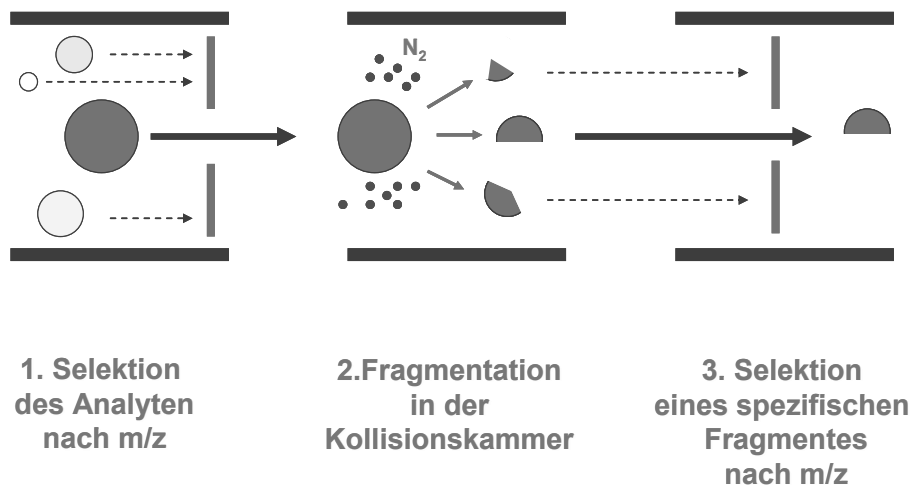


Abbildung 6. Schematische Darstellung der fragmentspezifischen Detektion im Tandem-MS (Abbildung modifiziert nach (Applied Biosystems, 2006)).

Zur Etablierung der erforderlichen MS/MS-Parameter im MRM-Modus wurden zwei Optimierungsroutinen der Analyst Software 1.4.1 (Steuerungssoftware des verwendeten Massenspektrometers) angewendet. In einem ersten Schritt erfolgte die sogenannte Infusionsanalyse („Infusion quantitative optimization“), die durch eine kontinuierliche Infusion von Standard-Lösungen mit der integrierten Spritzenpumpe des Massenspektrometers durchgeführt wird. Dabei wurde eine Stammlösung verwendet, die jeweils 1000 ng/ml des Analyten und des IS enthielt.

Als Mutterionen bzw. Precursor-Ionen $[M-H]^+$ wurden jeweils die korrespondierenden Molekülionen-Peaks m/z 278.1 (für Cidofovir) und m/z 288.1 (für den internen Standard PMEG) ausgewählt.

Die Infusionsanalyse dient der Optimierung der Spannungen im Vakuumteil des Massenspektrometers. Dabei werden die folgenden sechs verbindungs-spezifischen Parameter stufenweise variiert, um eine Optimierung der Signalintensität des Mutterions und der Produktionen zu erzielen:

- Declustering Potential DP
- Focussing Potential FP
- Entrance Potential EP

Diese Potentialdifferenzen werden benötigt, um Wasser- und Lösungsmittelcluster zu zerstören, die Ionen zu fokussieren und in die Vakuumkammer zu leiten. Um eine effektive Fragmentierung des Mutterions (also die Optimierung der Bildung eines charakteristischen Fragmentions) zu erreichen, müssen die folgenden Parameter optimiert werden:

- Cell Entrance Potential CEP
- Collision Energy CE
- Cell Exit Potential CXP

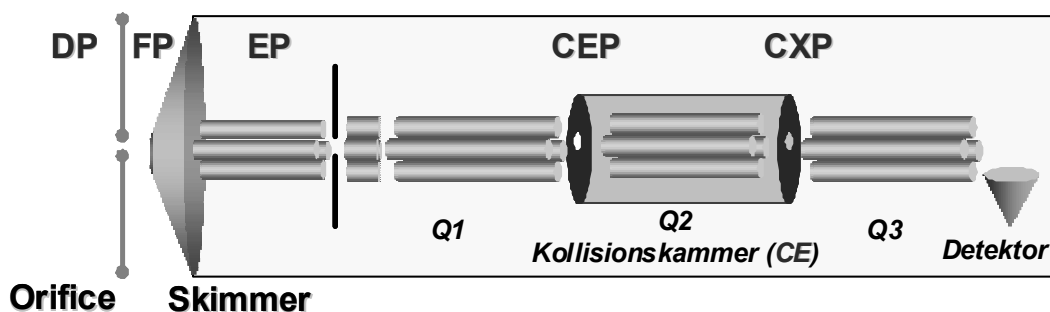


Abbildung 7. Schematischer Aufbau des Tripelquadrupol-Massenspektrometers (Abbildung modifiziert nach (Applied Biosystems, 2006)). Die Abbildung zeigt den schematischen Aufbau des Tripelquadrupol-Massenspektrometers und die in den jeweiligen Bereichen anliegenden Spannungen: im Eingangsbereich das declustering potential (DP), das focussing potential (FP) und das entrance potential (EP), sowie im Bereich des 2. Quadrupols (Q2) das cell entrance potential (CEP), die collision energy (CE) und das cell exit potential (CXP). Der 1. Quadrupol (Q1) und 3. Quadrupol (Q3) werden zur Selektion und zum Transport der Ionen mit dem Übergang m/z 278.1 \rightarrow 234.9 (dem spezifischen Fragment) für Cidofovir und dem Übergang m/z 288.1 \rightarrow 133.1 (dem spezifischen Fragment) für PMEG benötigt.

Die Einstellungen für die durchgeführte Injektionsanalyse zur Optimierung der substanz-abhängigen Parameter sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 1. Einstellungen für die Infusionsanalyse

Parameter	Start	Stop	Stufe
Declustering potential (DP)	-151	-1	5
Focusing potential (FP)	-350	-50	10
Entrance potential (EP)	-12	-1	0,5
Cell entrance potential (CEP)	-100	0	2
Collision energy (CE)	-130	-5	2
Cell exit potential (CXP)	-58	0	2

In einem anschließenden Schritt wurde die sogenannte Flußinjektionsanalyse, d.h. eine Injektionsanalyse mit einem konstanten Eluentenfluss (FIA, „flow injection analysis“), wobei allerdings noch keine chromatographische Säule verwendet wird, durchgeführt. Durch diese Analyse wurden die flussabhängigen Parameter bestimmt, zu diesen zählen:

- Curtain gas (CUR)
- Collision gas (CAD)
- Ion Source gas 1 (GS1)
- Ion Source gas 2 (GS2)
- Ionensprayspannung (IS)

Durch diese Optimierung wird die Differenzierung zwischen Signal und Untergrundrauschen (signal and background/noise) ermöglicht. Bei der FIA musste mit einer Konzentration gearbeitet werden, die einem 1/10 der Konzentration entspricht, die für die Infusionsanalyse verwendet wurde. Die Konzentration des Analyten und des IS entsprach daher 100 ng/ml. Ausgehend von der gewählten Flussgeschwindigkeit der mobilen Phase von 300 µl/min, wurde die Temperatur (TEM), die auch einen flußabhängigen Parameter darstellt, gemäß der Herstellerangaben (Applied Biosystems, 2006) auf 375°C eingestellt. Die Einstellungen für die Flussinjektionsanalyse zur Optimierung der flussabhängigen Parameter sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 2. Einstellungen für die Flussinjektionsanalyse

Parameter	Stufen
Curtain gas (CUR)	25, 30, 35, 40
Collision gas (CAD)	3, 4, 5, 6, 7, 8, 10
Ion source gas 1 (GS1)	30, 40, 50
Ion source gas 2(GS2)	30, 40, 50
Ionensprayspannung (IS)	-1500, -2000, -3000, -4000, -4500

2.1.1.3. HPLC Parameter

Für die HPLC wurde ein isokratisches Laufmittel, bestehend aus einer Methanol/Wasser-Mischung (50%/50% v/v) modifiziert mit 2% (v/v) Ammoniumhydroxidlösung, verwendet. Der Zusatz von Ammoniumhydroxid erfolgte im Rahmen der Herstellerempfehlungen, um die Ionisierung im negativen Modus zu verstärken (Applied Biosystems, 2006). Da der resultierende pH-Wert mit 10,5 stark alkalisch war, wurde eine C18-modifizierte Tetraalkoxysilan-Säule mit Endcapping verwendet, die zum einen eine hohe pH-Stabilität aufweist und zum anderen polare Wechselwirkungen, die ein peak-Tailing (asymmetrischer Verlauf der Peaks) durch residuale Silanolgruppen hervorrufen können, unterdrückt. Um die Reproduzierbarkeit der Methode (insbesondere der Retentionszeiten) zu erhöhen, wurde die Säule mithilfe eines Umluftsäulenofens auf 30°C thermostatiert. Um bei einem möglichst kleinem Fluss (der optimale Fluss für die verwendete TurbolonSpray®-Ionenquelle des API 2000 liegt um 400 µl/min (Applied Biosystems, 2006)) und einem geringen Injektionsvolumen eine große Signalintensität zu erhalten, wurde die oben genannte Säule mit einem geringen Innendurchmesser gewählt (Purospher® Star RP-18 endcapped 125mm Säulenlänge x 2mm Innendurchmesser, 5µm Partikelgröße, Merck KGaA, Darmstadt, D). Um ein Zusetzen der Säule durch biologische Matrix aus den Proben zu verhindern, wurde vor die Hauptsäule eine Vorsäule aus dem gleichen Material vorgeschaltet (Purospher® Star RP-18 endcapped 4 mm Säulenlänge x 4 mm Innendurchmesser, 5 µm Partikelgröße, Merck KGaA, Darmstadt, D). Durch den eingestellten Eluentenfluß von 300 µl/min resultierte ein Gegendruck um die 180 bar für das gesamte System.

2.1.1.4. Herstellung der Standardlösungen und Vergleichstandards

Für die Herstellung der Cidofovir-Standardlösung wurde die Referenzsubstanz (das Cidofovir-Dihydrat) auf einer Analysenwaage unter Berücksichtigung des Molekulargewichtes des Hydrates genau eingewogen. Die eingewogene Substanz wurde in einen Maßkolben überführt und mit Ringerlösung gelöst und verdünnt, so dass eine Stammlösung mit einer Konzentration von 100 µg/ml Cidofovir resultierte. Die eingesetzte Ringerlösung ist blutisoton, so dass die Stammlösung und alle hieraus hergestellten Verdünnungen die gleiche Ionenstärke wie das Serum der Patienten aufwiesen. Die Stammlösung wurde dann seriell mit Ringerlösung weiterverdünnt, um die sieben weiteren Verdünnungen zu erhalten: 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12.5 µg/ml, 6.25 µg/ml, 3.125 µg/ml, 1.563 µg/ml und 781.25 ng/ml. Insgesamt standen also acht Arbeitslösungen (acht verschiedene Konzentrationen) zur Verfügung. Alle Verdünnungen wurden mit Ausnahme der Stammlösung täglich frisch hergestellt. Die Stammlösung wurde nach der Herstellung bei 4°C dunkel im Kühlschrank aufbewahrt und für maximal einen Monat verwendet (dieser Zeitraum wurde im Rahmen der Stabilitätsuntersuchungen validiert). Vor dem Gebrauch wurde die Stammlösung auf Raumtemperatur gebracht.

Für die Herstellung von unabhängigen Qualitätskontrollen zur Untersuchung der Richtigkeit und der Präzision wurden separate Cidofovir-Stammlösungen in der gleichen Art und Weise hergestellt. Die Kalibrationsproben wurden dann hergestellt, indem 270 µl Leerserum (Blankserum) mit jeweils 30µl der Arbeitslösungen verdünnt wurde, so dass die finalen Konzentrationen für die Kalibrierung resultierten: 10.0 µg/ml, 5.0 µg/ml, 2.5 µg/ml, 1250 ng/ml, 625 ng/ml, 312.5 ng/ml, 156.25 ng/ml und 78.125 ng/ml. Analog zur Cidofovir Stammlösung wurde die Stammlösung des internen Standard (PMEG) hergestellt, wobei PMEG nicht als Hydrat vorlag, sondern als freie Säure. Außerdem erfolgte die Verdünnung mit Wasser für HPLC-Zwecke und nicht mit Ringerlösung. Für die Kalibrierung und Quantifizierung wurden 30µl der IS-Stammlösung (100 µg/ml PMEG) zu den 300 µl Serumproben mit der jeweiligen Cidofovirverdünnung hinzugefügt. Die so vorbereiteten Proben wurden dann abschließend mit 670 µl Wasser für HPLC-Zwecke verdünnt und durch intensives Schütteln auf einem Vortexer homogenisiert.

2.1.1.5. Probenaufbereitung mittels Festphasenextraktion (SPE)

Cidofovir und der interne Standard PMEG liegen schon bei einem physiologischen pH-Wert (7,4) anionisch vor; die Aufbereitung der Serumproben mittels Festphasenextraktion mit einem starken Anionenaustauscher (strong anion exchanger, SAX) bietet sich daher an. Anionenaustauscher (im Folgenden SAX-Säulen genannt) tragen quartäre Amingruppen und werden typischerweise zur Extraktion von Carbonsäuren eingesetzt. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Säule (Varian Bond Elut-SAX) trägt eine quartäre Trimethylaminopropylgruppe.

Die Probenaufbereitung mithilfe der Festphasenextraktion besteht dabei aus vier Grundoperationen:

- Konditionierung der Säule

Die Vorbereitung des Sorbens ermöglicht eine effektive Interaktion mit dem Analyten durch Solvatation oder Aktivierung der Liganden auf der chromatographischen Oberfläche. Im Anschluss folgt eine Equilibrierung mit einer mobilen Phase die der Probe/Matrix ähnlich ist. Darüber hinaus wird durch die Konditionierung die Reproduzierbarkeit der Extraktion erhöht.

- Proben/Matrix Aufbereitung und Auftragen auf die Säule

Im Rahmen der Probenaufbereitung wird die Analyt-Matrix-Zusammensetzung durch Verdünnung mit einem geeigneten Lösungsmittel (Wasser, Puffer oder organische Lösungsmittel ohne Elutionskraft in Bezug auf den Analyten) so eingestellt, dass der Analyt quantitativ am Sorbens zurückgehalten wird, während die Retention von Verunreinigungen minimiert wird.

- Waschen der Säule

Durch den Waschschrift werden Verunreinigungen, die im Vergleich zum Analyten weniger stark am Sorbens zurückgehalten werden, durch eine mobile Phase mit schwacher Elutionskraft entfernt.

- Elution des Analyten

Durch den Waschschrift mit einer mobilen Phase mit hoher Elutionskraft, soll der Analyt selektiv desorbiert und aufgefangen werden, um dann quantitativ bestimmt werden zu können.

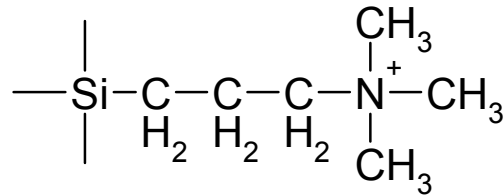


Abbildung 8. Struktur der quartären Trimethylaminopropyl-Gruppe des SPE-Anionenaustauschers

Diese allgemeinen Grundoperationen wurden für die Extraktion von Cidofovir und PMEG in der folgenden Art und Weise durchgeführt:

- Konditionierung der SAX-Säulen mit jeweils 2 ml Methanol und 2 ml Wasser (HPLC-Qualität)
- Reduktion der Ionenstärke der Serumproben durch Verdünnung mit 670 µl Wasser (HPLC-Qualität) auf ein Endvolumen von 1000 µl; nach dem Vortexen der Probe erfolgt das Auftragen auf die Säule
- langsames Absaugen der Probe unter Vakuum (Dauer >1 min pro 1000 µl); dabei ist darauf zu achten, dass das Säulenbett nicht trocken läuft
- zweimaliges Waschen mit jeweils 1000 µl Wasser (HPLC-Qualität), danach Trocknen des Säulenbettes unter Vakuum
- Elution der Analyten von der Säule durch langsames, zweimaliges Eluieren mit jeweils 1000 µl Methanol (modifiziert mit 3% HCl (v/v)) und Auffangen des Eluates
- Abdampfen des Eluates bei 40°C unter Stickstoffbegasung und Rekonstitution mit 300 µl Methanol/Wasser (50/50 v/v) mit einem Zusatz von 3% (v/v) Ammoniumhydroxidlösung

Der erhaltene Extrakt wurde abschließend über 20 min bei 4°C und 4000 rpm (entsprechend 3220 x g) mit der Zentrifuge Eppendorf 5810R (Eppendorf AG, Hamburg, D) von Schwebstoffen befreit. Ein 10 µl Aliquot des Überstandes dieses Extraktes wurde dann zur Analyse verwendet.

Für den Fall, dass die zu erwartende Cidofovir-Konzentration außerhalb des Kalibrierbereiches lag, wurde nach dem Abdampfen des Eluates die Rekonstitution mit 600 µl anstatt mit 300 µl Methanol/Wasser (50/50 v/v) mit einem Zusatz von 3% (v/v) Ammoniumhydroxidlösung durchgeführt. Dies entspricht also einer eins zu zwei Verdünnung, entsprechend wurden die analytischen Resultate mit zwei multipliziert.

2.1.2. Methodenvalidierung

Da die vorliegende Methode neu entwickelt wurde, war eine vollständige Validierung gemäß der allgemein anerkannten Richtlinie für Methodenvalidierung der amerikanischen Arzneimittelzulassungsbehörde FDA angezeigt (FDA Food and Drug Administration (USA), 2001). Diese Validierung umfasste dabei:

- Untersuchungen zur Selektivität
- die Bestimmung der Richtigkeit und Wiederholungspräzision
- Untersuchungen zur Kalibrationskurve
- Untersuchungen zur Stabilität des Analyten und des internen Standards
- Quantifizierung der Matrixeffekte und der Wiederfindung.

2.1.2.1. Untersuchungen zur Selektivität

Die Selektivität der Methode wurde untersucht, indem das Serum von sieben, pädiatrischen Krebspatienten, die keine Cidofovir-Therapie erhielten, analysiert wurde. Diese Patienten erhielten alle eine Polymedikation und waren mit dem für die Studie geplanten Patientenkollektiv vergleichbar. Das untersuchte Serum von Patienten der Kinderklinik der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf wurde im Rahmen von Routineuntersuchungen gewonnen. Die Blutentnahmen wurden ausdrücklich nicht extra für die Untersuchung der Selektivität entnommen. Eine analytische Interferenz durch endogene, körpereigene Blutbestandteile oder durch die applizierten Arzneistoffe wurde dabei angenommen, wenn innerhalb von 0,3 min vor oder nach der Retentionszeit des Analyten oder des IS ein Signal (Peak) detektiert wurde, dass möglicherweise zu einer Beeinflussung der Ionisation (Ionensuppression oder Ionenhancement) führt. Darüber hinaus wurden sog. „cross-talk“-Effekte zwischen dem Übergang m/z 278.1 \rightarrow 234.9 (für Cidofovir) und dem Übergang m/z 288.1 \rightarrow 133.1 (für PMEG) untersucht. Hierfür wurde nach der separaten Injektion der verdünnten Cidofovir-Stammlösung (10000 ng/ml) der Übergang m/z 288.1 \rightarrow 133.1 (für PMEG) bzw. nach Injektion einer Serumprobe ohne Cidofovir, die mit der PMEG-Stammlösung (resultierende Konzentration 10000 ng/ml) versetzt wurde, der Übergang m/z 278.1 \rightarrow 234.9 (für Cidofovir) monitoriert.

2.1.2.2. Richtigkeit, Präzision und Kalibration

Die Richtigkeit und Präzision der Methode wurden durch die Quantifizierung von Qualitätskontrollen an der unteren Grenze der möglichen Quantifizierung (lower limit of quantification (LLOQ-)), bei kleinen, mittleren und hohen Konzentrationen (wobei jeweils fünf Proben pro Konzentration vermessen wurden) an drei aufeinander folgenden Validierungstagen bestimmt. Die Richtigkeit wird in diesem Zusammenhang als Übereinstimmung des erhaltenen Analysenwertes (Mittelwertes) mit einem als richtig akzeptierten Wert (nominale Konzentration) definiert. Dagegen beschreibt die Präzision das Ausmaß der Übereinstimmung von Messwerten. Die Präzision stellt somit ein qualitatives Maß für die Streuung von Ergebnissen dar. Als Streuung und damit als Präzisionsmaß wird in der vorliegenden Untersuchung die relative Standardabweichung [%] verwendet. Um die Präzision unter Wiederholbedingungen zu testen, wurden (wie oben) beschrieben intra- und inter-assay Untersuchungen durchgeführt. Wiederholbedingungen sind Bedingungen, unter denen voneinander unabhängige Ergebnisse in kurzen Zeitabständen erhalten werden, und zwar mit demselben Verfahren, an identischen Objekten, in demselben Labor, durch denselben Bearbeiter und mit derselben Geräteausrüstung. Die Kriterien für die Bewertung der Richtigkeit und Präzision waren gemäß der FDA Leitlinie zur Validierung bioanalytischer Methoden definiert: die mittlere prozentuale Abweichung von der nominalen Konzentration als Maß für die Richtigkeit und die relative Standardabweichung als Maß für die Präzision sollte 15% nicht übersteigen (FDA Food and Drug Administration (USA), 2001). Für die Untersuchung der Kalibriergeraden wurden an drei Validierungstagen drei unabhängige Kalibrationssets untersucht. Jedes Kalibrationsset bestand aus acht Kalibrationspunkten, wobei jeweils für jede Konzentration drei Proben vermessen wurden. Die Ergebnisse der Kalibration wurden mithilfe der Analyst 1.4.1 Software (Applied Biosystems/MDS SCIEX, Concord, CAN) ausgewertet. Das Verhältnis der relativen Intensität eines Analytsignals zu dem Signal des internen Standards diente als analytischer Parameter. Dabei wurde die Kalibrationsgerade erhalten, indem das Verhältnis der Peakflächen von Cidofovir und den Peakflächen des IS (y-Achse) gegen das Verhältnis der Konzentration des zugesetzten Analyten und des IS (auf der x-Achse) aufgetragen wurde. Für die abschließende lineare Regression der Kalibrationspunkte wurde eine 1/x Wichtung verwendet.

2.1.2.3. Untersuchungen zur Stabilität des Analyten und des internen Standards

Die bisher einzigen Untersuchungen zur Stabilität von Cidofovir in Lösung wurden in 5% Dextrose bzw. 0,9% Kochsalzlösung über einen Zeitraum von 24 h durchgeführt (Yuan et al., 1996). Daten zur Haltbarkeit der Stammlösungen und der Haltbarkeit der Vergleichsstandards (Qualitätskontrollen) waren nicht verfügbar. Daher wurden die folgenden Stabilitätstests durchgeführt:

- Stabilität des Analyten und des internen Standards in der Stammlösung
- Stabilität der Qualitätskontrollen
- Stabilität der extrahierten Proben

Für die Untersuchung der Stabilität des Analyten und des internen Standards PMEG in der Stammlösung wurde die Peakfläche der jeweiligen, frisch hergestellten Stammlösung mit der Peakfläche der gleichen Stammlösung nach einer Lagerzeit von 1 Monat bei 4°C (im Kühlschrank) verglichen. Um die Stabilität der extrahierten Proben unter normalen Arbeitsbedingungen zu untersuchen, wurden die Ergebnisse der Quantifizierung von Qualitätskontrollen (vier verschiedene Konzentrationen und fünf Proben pro Konzentration) direkt nach der Extraktion mit den Ergebnissen der Quantifizierung dergleichen Qualitätskontrollen nach 24-stündiger Lagerung bei Raumtemperatur im Autosampler verglichen.

Zur Bestimmung der Stabilität der Qualitätskontrollen wurden jeweils fünf Proben pro Konzentration (bei drei verschiedenen Konzentration) für einen Monat bei -20°C im Tiefkühlschrank gelagert und die Ergebnisse der Quantifizierung mit den nominalen Konzentrationen verglichen. Ebenso wurde die Stabilität der Proben bei Gefrier-Tau-Zyklen („freeze/ thaw-cycles“) untersucht, wobei die Proben dreimal vollständig aufgetaut und wieder eingefroren wurden.

2.1.2.4. Wiederfindung und Matrixeffekte

Um das Ausmaß der absoluten Wiederfindung (auch Recovery genannt) des Analyten und des internen Standards zu untersuchen, wurde die von Matuszewski et al. (Matuszewski et al., 2003) beschriebene Methode angewendet. Die absolute Wiederfindung wird dabei durch den Vergleich der Peakflächen von Serumproben, die vor der Festphasenextraktion mit dem Analyten oder dem IS versetzt wurden, und der Peakflächen von Serumproben, die nach der Extraktion mit der gleichen Quantität des Analyten bzw. des IS versetzt wurden, ermittelt:

$$\text{Wiederfindung}(\%) = \frac{\text{Fläche}_{\text{Preextraktion}}}{\text{Fläche}_{\text{Postextraktion}}} \cdot 100 \quad (1)$$

Neben der Bestimmung der Wiederfindung ist die Untersuchung von Matrixeffekten von großer Bedeutung für die Validierung von HPLC-MS/MS-Methoden. Matrixeffekte sind Einflüsse, die durch nicht detektierte Probenbestandteile (also im vorliegenden Fall Serumbestandteile) hervorgerufen werden. Dabei interagieren diese ko-eluierenden Bestandteile mit den Analytionen in der Ionenquelle bzw. konkurrieren um die zur Verfügung stehende Ladung. Aus dieser Interaktion kann eine Reduktion der Ionisation des Analyten resultieren (eine sog. Ionensuppression), es kann aber auch eine Verstärkung der Ionisation des Analyten (ein sog. Ionenhancement) auftreten. Daher muss der potenziell negative Einfluss durch Matrixeffekte auf die Richtigkeit und Verlässlichkeit einer Quantifizierungsmethode untersucht werden (Annesley, 2003, Bonfiglio et al., 1999, Little et al., 2006, Matuszewski et al., 2003). Im Rahmen der Validierung wurde hierfür die sogenannte „postextraction addition technique“ verwendet (Taylor, 2005). Diese Untersuchungstechnik wird angewendet, um mögliche Matrixeffekte zum Zeitpunkt der Elution des Analyten zu untersuchen. Aufgrund der kurzen Retentionszeit des Analyten und des IS ist ein ausgeprägter Matrixeffekt wahrscheinlich, da endogene Serumbestandteile (z.B. saure Glykoproteine) erwartungsgemäß nicht auf der verwendeten Chromatographiesäule retiniert werden und daher ebenfalls eine sehr geringe Retentionszeit aufweisen. Für die Untersuchung werden Serumproben, die nach der Extraktion mit dem Analyten versetzt wurden (sog. Postextraktionsproben), untersucht und verglichen mit Lösungen des Analyten in der mobilen Phase (Laufmittel), die die gleichen Analytkonzentrationen wie die Serumproben aufweisen.

Die Matrixeffekte werden dadurch quantifiziert, indem die Differenz der resultierenden Peakflächen zwischen den Postextraktionsproben und den Proben im Laufmittel durch die Peakfläche der Probe im Laufmittel dividiert wird:

$$\text{Matrix Effekt (\%)} = \frac{\text{Fläche}_{\text{Postextraktion}} - \text{Fläche}_{\text{Laufmittel}}}{\text{Fläche}_{\text{Laufmittel}}} \cdot 100 \quad (2)$$

Ein negativer Prozentwert zeigt einen ionensuppressiven Matrixeffekt an, wohin gegen ein positiver Prozentwert ein sog. Ionenehancement aufzeigt.

2.2. Durchführung einer Klinischen Studie zur Erforschung der klinischen Pharmakokinetik von Cidofovir bei pädiatrischen Patienten

2.2.1. Studiendesign

Bei der durchgeführten Studie handelt es sich um eine pharmakokinetische Untersuchung, die begleitend zu einer individuell vom behandelnden Arzt verordneten Therapie mit Cidofovir bei pädiatrischen Patienten durchgeführt wurde. Es handelt sich ausdrücklich nicht um eine Studie gemäß dem Arzneimittelgesetz, sondern um medizinische Forschung in Verbindung mit ärztlicher Versorgung, wobei die ärztliche Berufsordnung maßgeblich ist. Die Intervention der Studie bestand ausschließlich aus der venösen Entnahme von insgesamt ca. 7,2 ml Vollblut gemäß eines zeitlich festgelegten Entnahmeprotokolls. Darüber hinaus fanden keine Interventionen statt. Um die Studienteilnehmer und ihre gesetzlichen Vertreter über die Studie zu informieren und um ihr schriftliches Einverständnis einzuholen, fanden Aufklärungsgespräche durch den behandelnden Arzt statt, wobei zwischen Aufklärungsgespräch und der Erklärung zum Einverständnis zur Studie mindestens 24 Stunden liegen sollten. Der zeitliche Ablauf der Studie ist in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 3. Zeitlicher Ablauf der Studie

Zeitlicher Ablauf	Tag 1	Tag 2	Weiterer Verlauf
Patientenaufklärung (Arzt)	X		
Einverständniserklärung (Arzt)		X	
Blutentnahme gemäß Protokoll (Arzt)		X	
Dokumentation Blutentnahmeprotokoll (Arzt)		X	
Dokumentation Untersuchungsbogen (Apotheker)		X	
Dokumentation Patientenbeobachtungen (Arzt)		X	
Analyse und Auswertung (Apotheker)			X

2.2.2. Einschlusskriterien

Männliche und weibliche Patienten konnten an der pharmakokinetischen Studie teilnehmen, wenn:

- sie im Rahmen der geplanten ärztlichen Behandlung Cidofovir als antivirales Therapeutikum erhalten sollten
- sie zwischen 0 und 18 Jahren alt waren
- ein freiwilliges Einverständnis zur Teilnahme an der Untersuchung von dem gesetzlichen Vertreter des Patienten erteilt wurde.

Darüber hinaus wurde, wenn dies aufgrund des Alters und des gesundheitlichen Zustandes möglich war, auch der Patient selbst über die Untersuchung informiert und sein Einverständnis eingeholt.

2.2.3. Ausschlusskriterien

Männliche und weibliche Patienten durften an der pharmakokinetischen Studie **nicht** teilnehmen, wenn:

- das Einverständnis zur Teilnahme an der Studie nicht erteilt oder entzogen wurde
- wenn medizinische Gründe gegen die Entnahme von 7,2 ml Vollblut innerhalb von 8 h sprachen.

2.2.4. Erhobene Patientenwerte

Um die gewonnenen pharmakokinetischen Informationen auswerten zu können, sollten die folgenden Patientenparameter erhoben werden:

- Name und Vorname des Patienten
- Geburtsdatum des Patienten
- Geschlecht des Patienten
- Körpergewicht [kg] und Körpergröße [cm]
- vollständiger Nierenfunktionsstatus, Serum-Creatinin [mg/dl] bzw. die resultierende Glomeruläre Filtrationsrate [ml/min/1.73 m²]*
- Haupt- und Nebendiagnosen
- vollständige Medikation des Patienten am Tag der Cidofovir-Applikation

- Ergebnisse der routinemäßig durchgeführten Blutuntersuchungen (relevanter Zeitraum: bis zu zwei Tage vor der Applikation von Cidofovir, das Datum der Ergebnisse ist auf dem Untersuchungsbogen zu vermerken). Die einzelnen Blutparameter (wie Hämoglobin, Leukozyten, Thrombozyten, Hämatokrit und weitere Parameter wie z.B. das C-reaktive Protein) sollten, je nach Umfang der routinemäßig durchgeführten Blutuntersuchungen vollständig dokumentiert werden. Es sollten jedoch für die Studie keine zusätzlichen Blutuntersuchungen durchgeführt werden.

*Anmerkung: die Glomeruläre Filtrationsrate [$\text{ml/min}/1,73\text{m}^2$] wurde, wenn dies möglich war, als resultierende Größe aus der Bestimmung des Serumkreatininwertes auf der Grundlage der für pädiatrische Patienten entwickelten Formel nach Schwartz berechnet (Schwartz et al., 1987):

$$GFR(\text{ml min}/1,73\text{m}^2) = k \cdot \text{Körpergröße}(\text{cm}) \cdot \text{Serumkreatinin}(\text{mg} / \text{dl}) \quad (3)$$

Der Proportionalitätsfaktor k berücksichtigt die Beziehung zwischen der Körpergröße und der renalen Kreatininausscheidung. Für Frühgeborene beträgt $k = 0,33$, für Kleinkinder unter einem Jahr beträgt $k = 0,45$. Für ältere Kinder und heranwachsende Mädchen nimmt k den Wert 0,55 und für heranwachsende Jungen 0,7 an.

2.2.5. Blutentnahmeprotokoll

Die Blutentnahme bei den Studienpatienten erfolgte (wenn dies unter klinischen Gesichtspunkten möglich war) zu sechs festgelegten Zeitpunkten nach einer Infusion mit Cidofovir (Infusionen mit dem Fertigarzneimittel Vistide[®]). Dabei wurden jeweils 1,2 ml venöses Blut über einen venösen Dauerverweilkatheter entnommen. Das Blut wurde in etikettierte Serumröhrchen (Sarstedt S-Monovette) aufgefangen und bis zur Zentrifugation gekühlt bei 4°C gelagert. Das Serum wurde abschließend bei 4000 rpm (entsprechend 3220 x g) über 20 min bei 4°C mit der Zentrifuge Eppendorf 5810R abzentrifugiert und Aliquote bei -20°C bis zur Analyse gelagert. Die sechs Blutentnahmezeitpunkte waren wie folgt festgelegt:

- Zeitpunkt (t1) = 1 h nach Beginn der Vistide[®]-Infusion
- Zeitpunkt (t2) = 2 h nach Beginn der Vistide[®]-Infusion
- Zeitpunkt (t3) = 3 h nach Beginn der Vistide[®]-Infusion
- Zeitpunkt (t4) = 4 h nach Beginn der Vistide[®]-Infusion
- Zeitpunkt (t5) = 6 h nach Beginn der Vistide[®]-Infusion
- Zeitpunkt (t6) = 8 h nach Beginn der Vistide[®]-Infusion.

Da die Infusion mit Vistide® als Kurzinfusion über eine Stunde appliziert wird (wobei die Cidofovir-Dosis in 100 ml 0,9% Kochsalzlösung verdünnt wird), fällt das Ende der Infusion mit der ersten Messung zusammen, so dass die Spitzenkonzentration im Konzentrationszeitprofil gemessen wird.

Da im Stationsalltag eine Blutentnahme zum genauen Zeitpunkt gemäß des Protokolls aus praktischen Gründen oft nicht möglich ist, sollte der genaue Zeitpunkt der Blutentnahme dokumentiert werden, um die exakte Auswertung der Ergebnisse zu ermöglichen.

2.2.6. Genehmigung durch die Ethikkommission

Da die vorliegende Studie multizentrisch in Düsseldorf und Essen durchgeführt wurde, war das positive Votum von beiden zuständigen Ethikkommissionen erforderlich, wobei die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine Universität die federführende Kommission war. Nach dem erfolgten positivem Votum (Studien-Nr. 2988 Düsseldorf am 13.12.2007) hat sich die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen diesem Votum angeschlossen (Studien-Nr. 08-3585 Essen am 23.01.2008). Damit wurde die rechtliche Grundlage für den Beginn und die Durchführung der Studie geschaffen.

2.2.7. Berücksichtigte gesetzliche Bestimmungen, Leitlinien und Normen

Die geltende Fassung der Deklaration von Helsinki ist die anerkannte ethische Grundlage für klinische Prüfungen und muss von allen, die an Forschungen am Menschen beteiligt sind, uneingeschränkt beachtet und respektiert werden. Die vorliegende Studie wurde daher in Übereinstimmung mit den Grundsätzen der Deklaration von Helsinki in der aktuellen Fassung (World Medical Association, 2004) durchgeführt. Darüber hinaus wurde die Studie in Übereinstimmung mit den internationalen Richtlinien und allen nationalen gesetzlichen Regelungen der Good Clinical Practice (GCP) durchgeführt. Die GCP ist eine Richtlinie für klinische Prüfungen, die verschiedene Aspekte (wie Design, Durchführung, Beendigung, Auswertung, Berichterstattung und Dokumentation) umfasst und sicherstellt, dass eine durchgeführte Untersuchung ethisch gerechtfertigt, wissenschaftlich fundiert und ordnungsgemäß dokumentiert wird.

2.2.8. Untersuchungs-spezifische Komplikationen und/oder Risiken

Die Gewinnung von insgesamt 7,2 ml Vollblut innerhalb von 8 Stunden, gemäß des zeitlich festgelegten Blutentnahmeprotokolls, liegt innerhalb von Empfehlungen zur Blutentnahme bei pädiatrischen Studienteilnehmern und gilt als unproblematisch (University of Michigan, 2007).

Darüber hinaus wurden alle Studienpatienten stationär behandelt, so dass eine adäquate ärztliche Betreuung für die Studienteilnehmer zu jeder Zeit gegeben war. Die Blutentnahmen erfolgten ausschließlich über bereits vorhandene venöse Dauerverweilkatheter, die im Rahmen der ärztlichen Vorbehandlung angelegt wurden, so dass keine zusätzlichen Zugänge für die Studienpatienten erforderlich wurden. Dadurch wurden die Risiken, die mit einer zusätzlichen Venenpunktion verbunden sind, vermieden. Außerdem war die Untersuchung für die Patienten nicht mit Schmerzen verbunden. Die Blutentnahmen wurden durch medizinisches Personal (der behandelnde Arzt oder dessen Vertreter) durchgeführt, so dass insgesamt betrachtet kein besonderes Risiko für die Studienteilnehmer bestand.

2.2.9. Unerwünschtes Ereignis (AE)

Im Rahmen der Studie wurde der Begriff wie folgt definiert: ein unerwünschtes Ereignis (AE, „adverse event“) ist jedes nachteilige Ereignis, das einem teilnehmenden Patienten im zeitlichen Zusammenhang mit der Untersuchung widerfährt. Dieses muss nicht ursächlich im Zusammenhang mit der Untersuchung (den Blutentnahmen) stehen. Der behandelnde Arzt des teilnehmenden Patienten (oder sein Vertreter) stellt fest, ob unerwünschte Ereignisse eingetreten sind und stuft diese wie folgt ein:

- **Leicht:** Klinisches Symptom oder Zeichen, das gut toleriert wird.
- **Mittel:** Klinisches Symptom oder Zeichen, das ausreichend ist, die normale Aktivität zu beeinträchtigen.
- **Schwer:** Klinisches Symptom oder Zeichen, das zu einer starken Beeinträchtigung der normalen Aktivität oder zur Arbeitsunfähigkeit oder der Unfähigkeit, alltägliche Verrichtungen durchzuführen, führt.

2.2.10. Schwerwiegendes unerwünschtes Ereignis (SAE)

Ein schwerwiegendes unerwünschtes Ereignis (SAE, „severe adverse event“) wurde definiert als jede Reaktion oder Nebenwirkung, die ein deutliches Risiko oder eine Gefahr für den Patienten darstellt. Dieses muss nicht ursächlich im Zusammenhang mit der Untersuchung stehen. Als SAE gilt jedes medizinische Ereignis, das

- zum Tode führt oder lebensbedrohlich ist
- zur Krankenhausaufnahme führt
- zu bleibenden oder erheblichen Schäden oder zu Invalidität führt
- jedes andere Ereignis, das ein vergleichbares Kriterium erfüllt.

Wenn ein unerwünschtes Ereignis durch den Leiter der Untersuchung als schwerwiegend eingestuft wird, dann muss dieses Ereignis ausführlich im Untersuchungsbogen des teilnehmenden Patienten dokumentiert werden. Darüber hinaus muss die zuständige Ethikkommission innerhalb von 24 Stunden nach diesem Ereignis informiert werden.

2.2.11. Auswertung der Studienergebnisse

Die gewonnenen Blutproben wurden mithilfe der entwickelten HPLC-MS/MS-Methode analysiert (Breddemann et al., 2008). Dabei erfolgte zu jedem Blutentnahmezeitpunkt eine Doppelbestimmung. Der resultierende Mittelwert beider Bestimmungen wurde als die gemessene Konzentration verwendet. Zur Berechnung der Fläche unter der Konzentrationszeitkurve (AUC, „area under the curve“) vom Zeitpunkt (t_0), dem Startzeitpunkt der Vistide[®]-Infusion, bis zum letzten gemessenen Konzentrationspunkt (t_6), also 8 h nach dem Beginn der Vistide[®]-Infusion, wurde die lineare Trapezregel verwendet. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit von Cidofovir im Serum und um eine patientenschonende Analyse der Pharmakokinetik zu ermöglichen, wurde auf eine Blutentnahme zum Zeitpunkt (t_0) verzichtet und diese Konzentration als 0 ng/ml angenommen. Die Berechnung der weiteren pharmakokinetischen Parameter erfolgte mithilfe einer nicht-kompartimentellen Analyse, die mit dem Programm Microsoft Excel 1997 durchgeführt und mit dem Programm Top-Fit:2.0 überprüft wurde. Im Folgenden sind die zu Grunde liegenden Formeln aufgeführt.

$$AUC_{0-t_{last}} = \sum_{i=0}^{i=6} ((c_{i+1} + c_i) / 2) \cdot (t_{i+1} - t_i) \quad (4)$$

Für die Extrapolation der Fläche über den letzten Meßpunkt hinaus ($AUC_{0-\infty}$) wurde die letzte gemessene Konzentration (t_6) durch die Eliminationskonstante k_e dividiert und zu der vorher berechneten Fläche $AUC_{0-t_{last}}$ dazu addiert:

$$AUC_{0-\infty} = AUC_{0-t_{last}} + \frac{c_{t_{last}}}{k_e} \quad (5)$$

Die Eliminationskonstante k_e wurde bestimmt, indem der natürliche Logarithmus der letzten drei Konzentrationen gegen die Zeit aufgetragen wurde und durch lineare Regression eine Ausgleichsgerade durch diese drei Punkte gelegt wurde. Die Steigung dieser Regressionsgeraden wurde als Eliminationskonstante k_e verwendet. Aufgrund der intravenösen Applikation wurde eine 100% systemische Verfügbarkeit angenommen, so dass für die weiteren Berechnungen die Bioverfügbarkeit $f = 1$ gesetzt wurde und daher entfällt.

Die Berechnung der resultierenden pharmakokinetischen Parameter Clearance (Cl), Verteilungsvolumen (Vd, „volume of distribution“) und Halbwertszeit ($t_{1/2}$) wurde wie folgt durchgeführt:

$$Cl = \frac{Dosis}{AUC_{0-\infty}} \quad (6)$$

$$V_d = \frac{Cl}{k_e} \quad (7)$$

$$t_{\frac{1}{2}} = \frac{\ln 2}{k_e} \quad (8)$$

2.3. Physiologie-basierte Simulation virtueller Patienten

2.3.1. Allgemeiner Hintergrund

Der Ausgangspunkt eines physiologie-basierten pharmakokinetischen Modells (PBPK-Modell) ist die möglichst genaue mathematische Beschreibung aller relevanten Vorgänge im Körper. Das Grundprinzip des PBPK-Modells ist dabei, den Körper in physiologisch relevante Kompartimente zu unterteilen. Häufig entsprechen diese Kompartimente einzelnen Organen wie der Leber, den Muskeln oder der Lunge. Diese Kompartimente sind durch physiologische Parameter wie z. B. Blutflussraten sowie Wasser-, Fett- und Proteinanteil charakterisiert. Um ein physiologie-basiertes Modell zu erhalten, werden diese Kompartimente entsprechend den anatomischen Vorgaben des Organismus rechnerisch durch Massenerhaltungsgleichungen miteinander verbunden, so dass ein System von gekoppelten Differentialgleichungen entsteht.

Neben den physiologischen Gegebenheiten des Organismus hängt die Verteilung eines Arzneistoffes aber auch von seinen physiko-chemischen bzw. biochemischen Eigenschaften ab, also insbesondere von der Lipophilie, der Löslichkeit, der Proteinbindung, der Molekülgröße, den pK_a -Werten im Falle von Säuren oder Basen, der metabolischen Degradierungsrate und den kinetischen Konstanten von aktiven Transportmechanismen. Die Besonderheit des PBPK-Modells ist daher, dass neben den physiologischen Parametern auch substanzspezifische Parameter für die Modellbildung Berücksichtigung finden (Willmann et al., 2007, Willmann et al., 2003). Das Modell ermöglicht so prinzipiell die Simulation der Pharmakokinetik eines Arzneistoffes für Populationen für die noch keine klinischen Studien durchgeführt worden sind. Eine wichtige Voraussetzung für die physiologische Skalierung der Pharmakokinetik für pädiatrische Populationen ist jedoch, dass die Pharmakokinetik in einer erwachsenen Population bekannt ist.

2.3.2. Struktureller Aufbau des verwendeten Ganzkörpermodells

Für die Simulation der pädiatrischen Patienten wurde das generische (allgemeine) Ganzkörpermodell der kommerziellen PK-Sim® Software 4.0 (Bayer Technology Services, Leverkusen, D) verwendet. Das Ganzkörpermodell umfasst 17 verschiedenen Organe bzw. Gewebe, wobei jedes Organ aus vier weiteren Sub-Kompartimenten besteht, nämlich dem Plasma und den roten Blutzellen (die zusammen den vaskulären Raum des Organs darstellen), sowie dem interstitiellen und dem zellulären Raum. Zur Veranschaulichung sind in den folgenden Abbildungen der strukturelle Aufbau sowie ein Modell für die Verteilung und Elimination dargestellt.

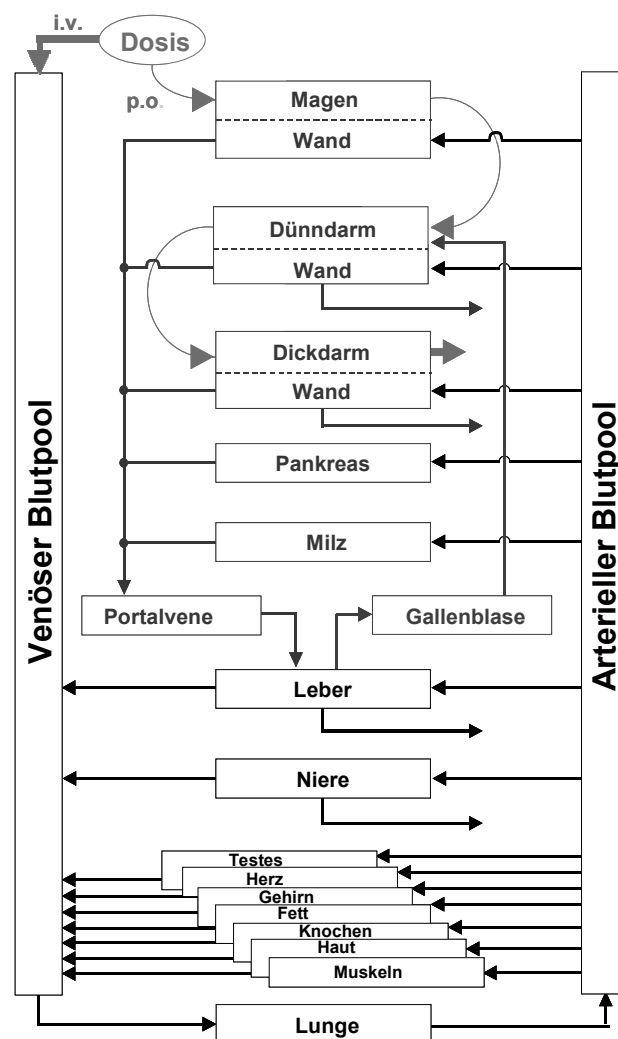


Abbildung 9. Struktureller Aufbau des Ganzkörpermodells von PK-Sim® (Abbildung modifiziert nach (Willmann et al., 2003)). Der strukturelle Aufbau des Ganzkörpermodells zeigt die Organe die parallel hintereinander verschaltet sind. Ausgehend vom arteriellen Blutpool werden die einzelnen Organe durchblutet, wobei der Blutfluß des Magens, des Dün- und Dickdarms, der Bauchspeicheldrüse sowie der Milz in die Portalvene mündet und über die Leber im venösen Blutpool. Der Blutfluß der anderen simulierten Organe mündet direkt in den venösen Blutpool.

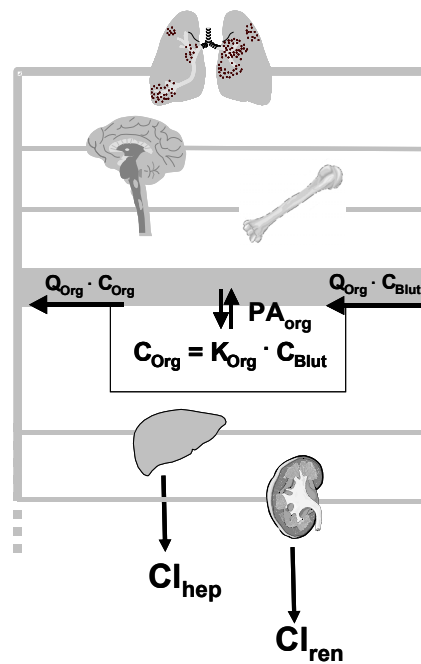


Abbildung 10. Schematische Darstellung der Verteilung und Elimination des PK-Sim® Modells (Abbildung modifiziert nach (Willmann et al., 2003)). Die Darstellung zeigt die (passive) Verteilung und die Elimination im verwendeten PK-Sim®-Modell. Dabei bedeuten C_{Blut} bzw. C_{Org} die Arzneistoffkonzentration im Blut bzw. im jeweiligen Organ, Q_{Org} die Blutflußrate des jeweiligen Organs, PA_{Org} die Organpermeabilität, K_{Org} der Organ/Plasmaverteilungskoeffizient unter steady state Bedingungen und CL_{hep} bzw. Cl_{ren} die hepatische bzw. renale Clearance.

Die schematische Darstellung zeigt die passive Verteilung innerhalb des PK-Sim®-Modells. Darüber hinaus können aber auch aktive Transportprozesse die Distribution eines Arzneistoffes beeinflussen. So können sättigbare, aktive Transportprozesse, die einer Michaelis-Menten-Kinetik unterliegen, auch mithilfe der PK-Sim® Software Berücksichtigung finden, wenn die Michaelis-Menten-Konstante K_m und die maximale Geschwindigkeit V_{max} für diesen Prozess bekannt sind. Für die Simulation des Cidofovirs sind keine aktiven Transportmechanismen berücksichtigt worden, obwohl mit dem hOAT1 im proximalen Tubulus der Niere ein bekannter aktiver Transportprozess existiert. Dieser aktive Prozess wird aber durch die obligate Gabe des Nephroprotektivums Probenecid inhibiert.

2.3.3. Individuelle Simulation mit virtuellen Patienten

Für die individuelle Simulation mit einem virtuellen Patienten müssen das Alter, das Geschlecht, die Zugehörigkeit zu einer Rasse, sowie zwei der folgenden drei Parameter bekannt sein:

- Körpergewicht („body weight“ , BW_{target})
- Körpergröße („height“ , H_{target})
- Body-Mass-Index („body mass index“, BMI_{target}).

Darüber hinaus benötigt man eine Datengrundlage, die alters-, geschlechts-, und rassenspezifische anthropometrische Informationen enthält. Die US-amerikanische NHANES III-Studie bildet hierfür die Grundlage: der Gesundheits- und Ernährungsstatus von ca. 30000 Individuen unterschiedlicher Rasse im Alter von 2 Monaten bis über 90 Jahre wurden systematisch erfasst und die individuellen Daten in 12 Altersgruppen zusammengefasst (National Center for Health Statistics, 1997). Dies ermöglichte die Erstellung von repräsentativen Verteilungskurven für die Körpergröße, das Körpergewicht und den Body-Mass-Index über das gesamte Altersspektrum für Kaukasier, Afro-Amerikaner und die lateinamerikanische Bevölkerung („white mexican american population“). Des Weiteren werden Informationen zu den Organvolumina und den Blutflussraten (Organdurchblutung) benötigt. Die Datengrundlage hierfür bildet der ICRP Report aus dem Jahr 2002 der detaillierte Angaben zu Mittelwerten von Organvolumina und Blutflussraten bei Erwachsenen macht (Valentin, 2002). Um von den Organvolumina auf das Organgewicht zu schließen, wird eine einheitliche Dichte von 1 g/ml angenommen. Auf der Grundlage dieser gesammelten anthropometrischen Daten lässt sich ein virtueller Patient simulieren. Der Ausgangspunkt für die individuelle Simulation ist dabei immer ein gemittelt Individuum („mean individual“) des gegebenen Alters und Geschlechts. In einem ersten Schritt wird ausgehend von diesem gemittelten Individuum ein sogenanntes intermediäres Individuum mit der Körpergröße des zu simulierenden Individuums (H_{target}) gebildet, wobei das Körpergewicht ($BW_{\text{intermediate}}$) durch den mittleren BMI_{mean} festgelegt wird. Man kann dieses intermediäre Individuum daher als das zu simulierende Individuum ansehen, das einen durchschnittlichen BMI und die Körpergröße H_{target} aufweist, allerdings noch nicht das Körpergewicht des zu simulierenden Individuums BW_{target} . Die Anpassung an das BW_{target} erfolgt, indem das Organgewicht und der Fettanteil des zu simulierenden Individuums bestimmt werden.

Hierfür wird auf der Grundlage der Körpergröße H_{target} das Organgewicht („organ weight“, OW_{target}) durch das mittlere Organgewicht OW_{mean} mithilfe einer allometrischen Skalierfunktion berechnet:

$$OW_{\text{target}} = \left(\frac{H_{\text{target}}}{H_{\text{mean}}} \right)^{0,75} \cdot OW_{\text{mean}} \quad (9)$$

Diese Gleichung wird mit Ausnahme des Gehirns, des Körperfetts und der Haut für die Berechnung von allen Organen zu Grunde gelegt. Da die anthropometrischen Daten des ICRP gezeigt haben, dass das Gewicht des Gehirns von der Körpergröße und vom Körpergewicht unabhängig ist, wird das Gewicht des Gehirns immer gleich dem durchschnittlichen Gehirngewicht bei gegebenen Alter und Geschlecht gesetzt. Zur Bestimmung des Körperfetts wird die Differenz des BW_{target} und der Summe aller berechneten Organgewichte gebildet. Da das Gewicht der Haut proportional zur Körperoberfläche ist und sich die Körperoberfläche proportional zum Körpergewicht verhält, wird abschließend das Gewicht der Haut durch eine weitere allometrische Skalierfunktion auf der Grundlage des Körpergewichtes BW_{target} bestimmt:

$$OW(\text{skin})_{\text{target}} = \left(\frac{BW_{\text{target}}}{BW_{\text{intermediate}}} \right)^{0,5} \cdot OW(\text{skin})_{\text{intermediate}} \quad (10)$$

Der abschließende Schritt ist die Skalierung des Herzminutenvolumens („total cardiac output“, CO). Das Herzminutenvolumen entspricht dem Blutfluß der Lunge und wird durch die allometrische Skalierfunktion auf der Grundlage der Körpergröße H_{target} berechnet:

$$CO_{\text{target}} = \left(\frac{H_{\text{target}}}{H_{\text{mean}}} \right)^{0,75} \cdot CO_{\text{mean}} \quad (11)$$

Zusammenfassend zeigt die folgende schematische Abbildung die Simulation eines individuellen virtuellen Patienten:

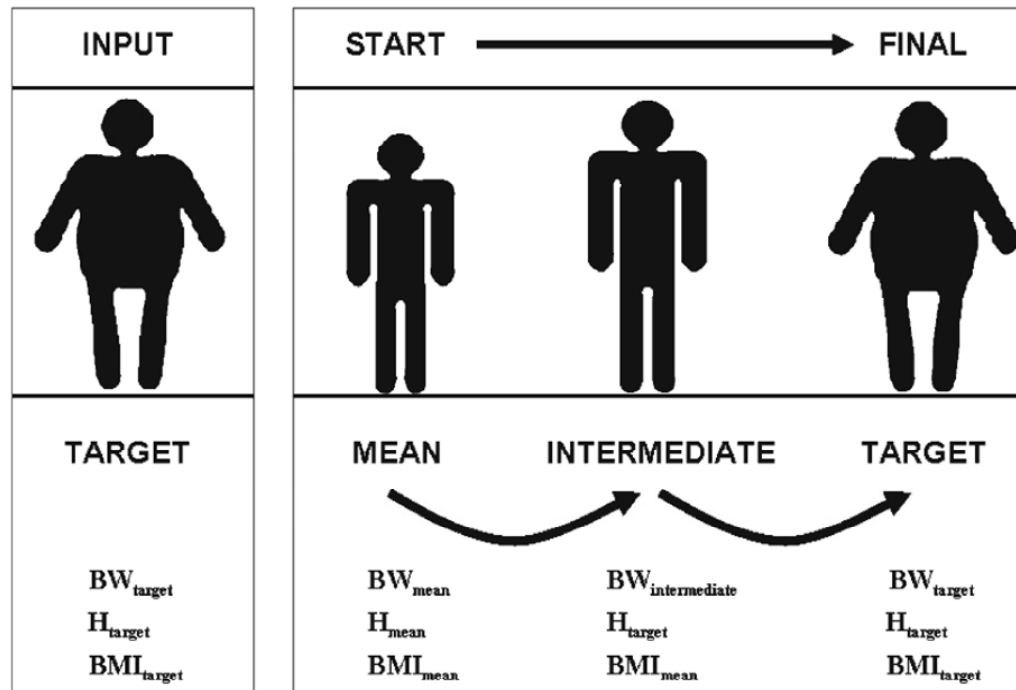


Abbildung 11. Schematische Darstellung des PK-Sim[®]-Algorithmus zur Simulation von individuellen, virtuellen Patienten (Abbildung nach (Willmann et al., 2007))

Der beschriebene Algorithmus für die individuelle Simulation virtueller Patienten ist in der PK-Sim[®] Software integriert. Nach der Eingabe der oben genannten, erforderlichen Parameter werden die korrespondierenden Organgewichte und Blutflußraten automatisch von dem Programm kalkuliert (Willmann et al., 2007).

In den zwei folgenden Tabellen sind die simulierten Organvolumina und Blutflüsse eines männlichen Erwachsenen und eines pädiatrischen Patienten aus der durchgeführten Studie (ID-Nr.5) zur Veranschaulichung dargestellt. Dabei entspricht physiologisch der Lungenblutfluß dem Herzminutenvolumen („total cardiac output“). Da sich das venöse und das arterielle Blutsystem (also die bluttransportierenden Gefäße) durch den Transport des Blutes selbst versorgen, ist eine organspezifische Blutflußbetrachtung hier nicht anwendbar.

Tabelle 4. Simulierte Organvolumina und Blutflüsse

a) Werte eines männl. Erwachsenen (39 Jahre, 70,6 kg, 176 cm)

Organ	Organvolumen [l]	Blutfluß [l/min]
venöses Blutsystem	0,68	n.a
arterielles Blutsystem	0,68	n.a
Magen	0,17	0,06
Dünndarm	0,72	0,62
Dickdarm	0,41	0,25
Bauchspeicheldrüse	0,19	0,06
Milz	0,24	0,19
Leber	2,33	0,42
Portalvene	1,03	1,48
Nieren	0,43	1,27
Lunge	1,28	5,95
Gehirn	1,51	0,76
Herz	0,41	0,25
Muskeln	31,99	1,11
Knochen	11,69	0,31
Haut	3,66	0,31
Körperfett	13,13	0,32
Gonaden	0,04	0,003

b) Werte eines pädiatrischen Patienten (ID-Nr.5) aus der durchgeführten Studie (6,46 Jahre, 21,3 kg, 118 cm)

Organ	Organvolumen [l]	Blutfluß [l/min]
venöses Blutsystem	0,23	n.a
arterielles Blutsystem	0,23	n.a
Magen	0,07	0,04
Dünndarm	0,31	0,4
Dickdarm	0,17	0,16
Bauchspeicheldrüse	0,06	0,04
Milz	0,1	0,12
Leber	0,88	0,26
Portalvene	0,35	0,75
Nieren	0,19	0,67
Lunge	0,36	3,52
Gehirn	1,25	0,86
Herz	0,13	0,16
Muskeln	8,16	0,27
Knochen	3,47	0,2
Haut	0,75	0,2
Körperfett	4,59	0,16
Gonaden	0,03	0,0008

n.a = nicht anwendbar

2.3.4. Physiko-chemische Eigenschaften von Cidofovir als Simulationsparameter

Die Besonderheit des PBPK-Modells ist, wie beschrieben, dass neben den physiologischen auch substanzspezifische Parameter für die Modellbildung Berücksichtigung finden. Hierfür ist die Kenntnis der folgenden substanzspezifischen Charakteristika erforderlich:

- das Molekulargewicht [g/mol]
- die Membranaffinität oder alternativ der Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizient [log P-Wert]
- die Säure- bzw. Basenkonstanten [pK_a – bzw. pK_b –Werte]
- die Plasmaproteinbindungskonstante oder alternativ die ungebundene Fraktion [f_u]
- Angaben zur in vivo Blutclearance oder alternativ Angaben zur intrinsischen Clearance, die aus in vitro Experimenten bestimmt wurde [ml/h/kg]

Die substanzspezifischen Parameter für die Simulation wurden auf der Grundlage der PubChem Compound-Datenbank gewählt, demnach beträgt das Molekulargewicht von Cidofovir 279,19 g/mol und der log P-Wert $-3,9$ (National Center for Biotechnology Information, 2008). Als Maß für das Verhältnis zwischen Lipophilie und Hydrophilie nimmt der log P-Wert für lipophile Substanzen positive und für hydrophile negative Werte an. Aufgrund der hohen Hydrophilie von Cidofovir findet keine Verteilung in tiefe Kompartimente statt, sondern nur eine Verteilung im Körperwasser. Die Säurekonstanten (pK_a –Werte) von Cidofovir betragen 1,7 und 6,9 (für die Phosphonsäure) und 4,7 (für das Cytosin) (Ba and Saux, 2001). Die ungebundene Fraktion f_u wurde als 1,0 angenommen, da Untersuchungen mit ^{14}C -markiertem Cidofovir in einem Konzentrationsbereich von 0,25 bis 25 $\mu\text{g/ml}$ eine Proteinbindung von $< 0,5\%$ ergaben (Cundy et al., 1995).

In Studien mit sechs adulten Patienten ergab sich bei einer Dosis von 5 mg/kg Körpergewicht eine mittlere körperlernormalisierte Serumclearance von 138 ml/h/kg \pm 36,2 ml/h/kg (Cundy, 1999). Diese Clearance wurde für alle Simulationen der pädiatrischen Studienpatienten zur Grundlage genommen, unabhängig davon welche körperlernormierte Dosis sie erhielten. Abweichend hiervon wurde für die Simulation des Patienten der Fallstudie eine Serumclearance von 154 ml/h/kg \pm 23 ml/h/kg angenommen. Dieser Clearancewert ergab sich in einer Studie an fünf adulten Patienten, die eine Dosis von 3 mg/kg Körpergewicht erhalten hatten und wurde für diesen einen Patienten gewählt, da er nach einer Dosisanpassung eine Dosis von 2,5 mg/kg Körpergewicht erhielt (Cundy et al., 1995).

Da für Cidofovir eine lineare Kinetik angenommen wird, ist eine Dosisabhängigkeit der Serumclearance nicht zu erwarten. Die Abweichungen in den Angaben der Clearancewerte sind daher vor dem Hintergrund der sehr kleinen Anzahl der Patienten zu bewerten.

Simulationsparameter für CDV	
Molekulargewicht [g/mol]	279,19
log P	-3,9
pK _a	1,7; 4,7; 6,9
ungebundene Fraktion f _u	1
Serumclearance [ml/h/kg]	138

Abbildung 12. Substanzspezifische Simulationsparameter von Cidofovir

2.3.5. Skalierung der Cidofovir-Clearance

Der im Kapitel 2.4.3 „Individuelle Simulation mit virtuellen Patienten“ beschriebene Algorithmus ermöglicht zwar die individuelle Simulation von Patienten auf der Grundlage von bekannten anthropometrischen Daten, er berücksichtigt jedoch nicht die mit dem Wachstums- und Reifungsprozessen der Eliminationsmechanismen einhergehende Beeinflussung der Arzneistoffclearance bei pädiatrischen Patienten. Daher ist in die PK-Sim[®] Software 4.0 ein sogenanntes Clearance-Scaling-Modul integriert, mit dessen Hilfe man die unbekannte Clearance von pädiatrischen Patienten ermitteln kann (Edginton et al., 2006, Edginton et al., 2006). Die Voraussetzung hierfür ist, dass die Clearance in einer erwachsenen Population und die Modalität der Clearance, d.h. zu welchen Proportionen ein Arzneistoff renal bzw. hepatisch eliminiert wird, bekannt ist. Darüber hinaus ist die Kenntnis der ungebundenen Fraktion des Arzneistoffes im Blut von Erwachsenen notwendig. Auf der Grundlage dieser bekannten Parameter wird dann die Erwachsenen-Clearance in den folgenden Schritten skaliert:

- Konversion der hepatischen und der renalen Clearance in eine intrinsische Clearance
- Aufteilung der intrinsischen renalen und hepatischen Clearance in die einzelnen Eliminationsprozesse
- Skalierung auf pädiatrische Verhältnisse.

In einem ersten Schritt werden die renale und die hepatische Clearance in eine intrinsische Clearance umgewandelt. Hierfür ist die Kenntnis des Leberblutflusses Q_{hep} und der ungebundenen Fraktion f_u des Arzneistoffes im Blut notwendig.

$$Cl_{\text{renal}}^{\text{int}} = Cl_{\text{renal}} \cdot \frac{1}{f_u} \quad (12)$$

$$Cl_{\text{hep}}^{\text{int}} = Cl_{\text{hep}} \cdot \frac{Q_{\text{hep}}}{Q_{\text{hep}} - Cl_{\text{hep}}} \cdot \frac{1}{f_u} \quad (13)$$

In dem folgenden zweiten Schritt werden die so berechneten intrinsischen Clearances in die einzelnen Eliminationsprozesse aufgeteilt. Bei den hepatischen Eliminationsprozessen werden die Elimination über Cytochrom P450-Isoenzyme (CYP1A2, CYP2E1 und CYP3A4.), die Elimination über Isoenzyme der Glucuronidierung aus der Gruppe der UDP-Glucuronyl-Transferasen (UGT1A1, UGT1A6, and UGT2B7) und die Elimination über Sulfatierung und biliäre Elimination unterschieden. Bei den renalen Eliminationsprozessen wird zwischen glomerulärer Filtration und tubulärer Sekretion unterschieden. Der abschließende dritte Schritt ist die Skalierung dieser Eliminationsprozesse auf pädiatrische Verhältnisse, wobei die alterabhängige Anpassung der hepatischen Prozesse auf in vivo und in vitro Studien zur Ontogenie der Leberenzyme beruht (Alcorn et al., 2002). Die Berücksichtigung der Reifungs- und Wachstumsprozesse der renalen Funktionen und ihr Einfluss auf die Dosierung renal eliminerter Arzneistoffe bei Kindern erfolgt gemäß einer allometrischen Formel nach Hayton, wobei das Alter und das Körpergewicht in die Formel einfließen. Ausgehend von dieser Formel erreicht die körperrgewichtsnormierte glomeruläre Filtrationsleistung zwischen dem 2. und 4. Lebensjahr ein Maximum und geht im weiteren Verlauf der Entwicklung auf die Werte der Erwachsenen zurück (Hayton, 2000):

$$RFP_{(\text{Alter}, \text{Gewicht})} = a \text{Gewicht}^b \cdot e^{-k_{\text{mat}} \cdot \text{Alter}} + c \text{Gewicht}^b \cdot (1 - e^{-k_{\text{mat}} \cdot \text{Alter}}) \quad (14)$$

Die Berechnung der glomerulären Filtrationsrate (renalere Funktionsparameter „RFP“) mittels der allometrischen Formel ist abhängig vom Alter und Gewicht des Patienten, darüber hinaus von einer Reifungskonstanten k_{mat} , dem Körpergewichtsexponenten b und den Körpergewichtskoeffizienten a und c . Nach Hayton wird bei der Berechnung der glomerulären Filtrationsrate für $k_{\text{mat}} = 0,0822$, für $a = 2,60$, für $b = 0,662$ und für $c = 8,14$ eingesetzt. Die Berechnung der ungebundenen Fraktion f_u des Arzneistoffes bei pädiatrischen Patienten erfolgt nach Arbeiten von McNamara und Alcorn (McNamara et al., 2002).

3. Material

3.1. HPLC-MS/MS-Apparatur

Das für die Analytik verwendete HPLC-System ist modular aufgebaut und besteht aus den folgenden Komponenten:

- Shimadzu Controller SCL10Avp
- Shimadzu Pump LC10Avp (Pumpe A)
- Shimadzu Pump LC10Avp (Pumpe B)
- Shimadzu Standard Mischkammer für Nieder- und Hochdruckgradienten
- Shimadzu SIL-10A Autoinjektor (alle Geräte der Fa. Shimadzu stammen von Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg, D)
- Vier-Wege online Degasser Knauer K-5004 (Knauer GmbH, Berlin, D)
- Säulenofen VWR/Hitachi Column Oven L-2300 (VWR International, Fontenay sous Bois, FR)

Das modulare HPLC-System war mit dem Tripelquadrupol-Massenspektrometer API 2000 (Applied Biosystems/MDS SCIEX, Concord, CAN) in Serie geschaltet und verbunden. Für die Elektrospray-Ionisation wurde die TurbolonSpray[®]-Ionenquelle verwendet.

Verwendete Chromatographie-Säulen:

Purospher[®] Star RP-18 endcapped Trennsäule, *125 mm Länge, 2 mm Innendurchmesser, 5 µm Partikelgröße* (Merck KGaA, Darmstadt, D)

Purospher[®] Star RP-18 endcapped Vorsäule, *4 mm Länge x 4 mm Innendurchmesser, 5 µm Partikelgröße* (Merck KGaA, Darmstadt, D)

3.2. Cidofovir und der interne Standard

Im Rahmen eines akademischen Vertrages mit dem Cidofovir-Originator Gilead Inc. (Foster City, USA), wurde der Analyt Cidofovir-Dihydrat (1-[(S)-3-hydroxy-2-(phosphonylmethoxy)propyl]cytosin*2H₂O) und das als interner Standard verwendete 9-((2-phosphonylmethoxy)ethyl)guanin (kurz „PMEG“ genannt) für wissenschaftliche Zwecke zur Verfügung gestellt. Der Umgang mit diesen Substanzen erfolgte auf der Grundlage der Sicherheitsdatenblätter des Herstellers.

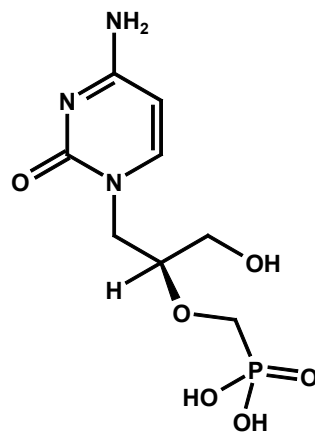


Abbildung 13. Strukturformel von Cidofovir (als freie Säure)

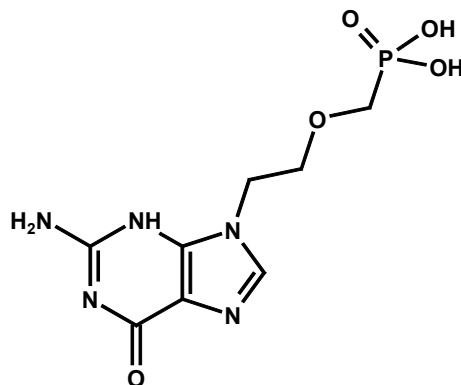


Abbildung 14. Strukturformel von PME

Die chemischen und physikalischen Eigenschaften des internen Standards sollen denen des Analyten so weit wie möglich ähneln, damit sich beide Substanzen während der Analyse gleich verhalten.

Der interne Standard PMEG wurde ausgewählt, weil er die erforderlichen Eigenschaften erfüllte:

- ähnliches Ansprechverhalten in der analytischen Methode
- kein ursprünglicher Probenbestandteil
- vergleichbare Stabilität wie der Analyt
- simultan bestimmbar mit der gleichen Methode wie der Analyt

Unter diesen Voraussetzungen wirken sich potenziell auftretende Schwankungen bei der Durchführung der Analyse auf den Analyt und internen Standard in gleicher Art und Weise aus (z.B. Schwankungen in der Wiederfindung bei der Festphasenextraktion oder der mögliche Einfluss durch Matrixeffekte).

3.3. Lösungsmittel und Lösungen

Alle Lösungen und Reagenzien wurden, wenn nicht anders angegeben, mit der höchsten im Handel befindlichen Reinheit verwendet. Für die Lösungsmittel sind die Gefahrenhinweise und Sicherheitsratschläge angegeben.

Tabelle 5. Lösungsmittel und Lösungen

Lösungsmittel/ Lösungen	Gefahrenhinweise	Sicherheitsratschläge
Methanol in HPLC-Qualität (VWR/ BDH Prolabo Chemikalien, Fontenay sous Bois, FR)	R 11-23/24/ 25-39	S 7-16-36/37-45
Wasser in HPLC-Qualität (VWR/ BDH Prolabo Chemikalien, Fontenay sous Bois, FR)	/	/
Ammoniumhydroxid-Lösung 25% (Riedel-de-Häen, Seelze, D)	R 34-50	S (1/2)-26-36/37/39-45-61
Salzsäure min.37% (Riedel-de- Häen, Seelze, D)	R 34-37	S(1/2)-26-36/37/39-45

3.4. Verbrauchsmaterialien

Sarstedt S-Monovette® für Serum (Sarstedt, Nümbrecht, D)

Monovette®-Adapter (Sarstedt, Nümbrecht, D)

Festphasenextraktionssäulen Varian Bond-Elut SAX, 100 mg Säulenmaterial, 1 ml Säulenvolumen (Varian, Harbor City, USA)

Pipettenspitzen für Pipetten Eppendorf Research 100 µl, 1 ml (VWR International, Fontenay sous Bois, FR)

3.5. Laborgeräte

Pipetten Eppendorf Research 100 µl und 1000 µl (Eppendorf AG, Hamburg, D)

Analysenwaage Shimadzu AUW 220D (Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg, D)

Zentrifuge Eppendorf 5810R (Eppendorf AG, Hamburg, D)

Tiefkühlschrank (-20°C) (Welabo Laborgeräte, Düsseldorf, D)

pH-Meter HANNA Instruments ph211 (HANNA Instruments Deutschland GmbH, Kehl am Rhein, D)

Vakuumkammer Vac-Elut (CS-Chromatographie, Langerwehe, D)

Vakuumpumpe (KNF Neuberger, Freiburg, D)

Vortexer VWR lab dancer (VWR International, Fontenay sous Bois, FR)

3.6. Software

Microsoft Excel, Version für Microsoft Office XP (Microsoft Corporation, Redmond, USA)

SPSS, Version 12.0 (SPSS Inc., Chicago, USA)

PK-Sim® Version 4.0 (Bayer Technologies Services, Leverkusen, D)

Analyst 1.4.1 (Applied Biosystems/MDS SCIEX, Concord, CAN)

Scan Data (Bayer Technologies Services, Leverkusen, D)

TopFit: Version 2.0 - Pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis system (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, D)

4. Ergebnisse

4.1. HPLC-MS/MS-Methodenentwicklung und -validierung

4.1.1. Ergebnisse zur Optimierung der fluss- und substanzabhängigen Parameter

Die folgende Tabelle stellt die substanzabhängigen Parameter dar, die aus der Infusionsanalyse resultierten.

Tabelle 6. Substanzabhängige Parameter der tandem-massenspektrometrischen Methode

Parameter	Cidofovir	PMEG
Declustering potential (DP)	-21	-21
Focusing potential (FP)	-340	-330
Entrance potential (EP)	-7	-7.5
Cell entrance potential (CEP)	-16	-14
Collision energy (CE)	-22	-42
Cell exit potential (CXP)	-10	-8

PMEG = interner Standard

Ausgehend von den fünf intensivsten Fragmenten (Produktionen), die jeweils aus dem Cidofovir- bzw. PMEG-Molekülion resultierten, wurde das jeweils intensivste Fragment-Ion bestimmt und für die Quantifizierung herangezogen. Die folgenden Massenspektren (Produktionen-Scans) von Cidofovir und PMEG zeigen die entstehenden Produktionen, d.h. das resultierende Fragmentationsmuster, nach der Optimierung durch die Infusionsanalyse.

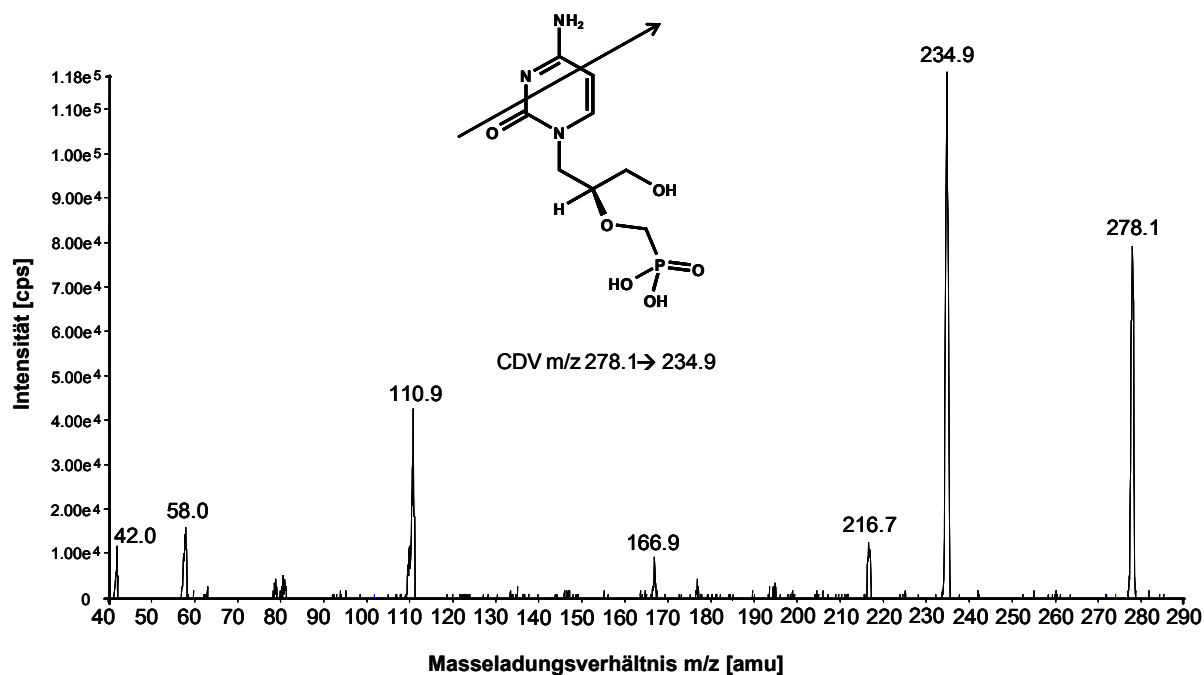


Abbildung 15. Produktionen-Scan Cidofovir. Die Abbildung zeigt das Massenspektrum bei negativer Ionisation, wobei das deprotonierte CDV m/z 278.1 als Precursor verwendet wurde. Das intensiv gebildete Fragment 234.9 dient zur selektiven Detektion von CDV im MRM-Modus (Breddemann et al., 2008).

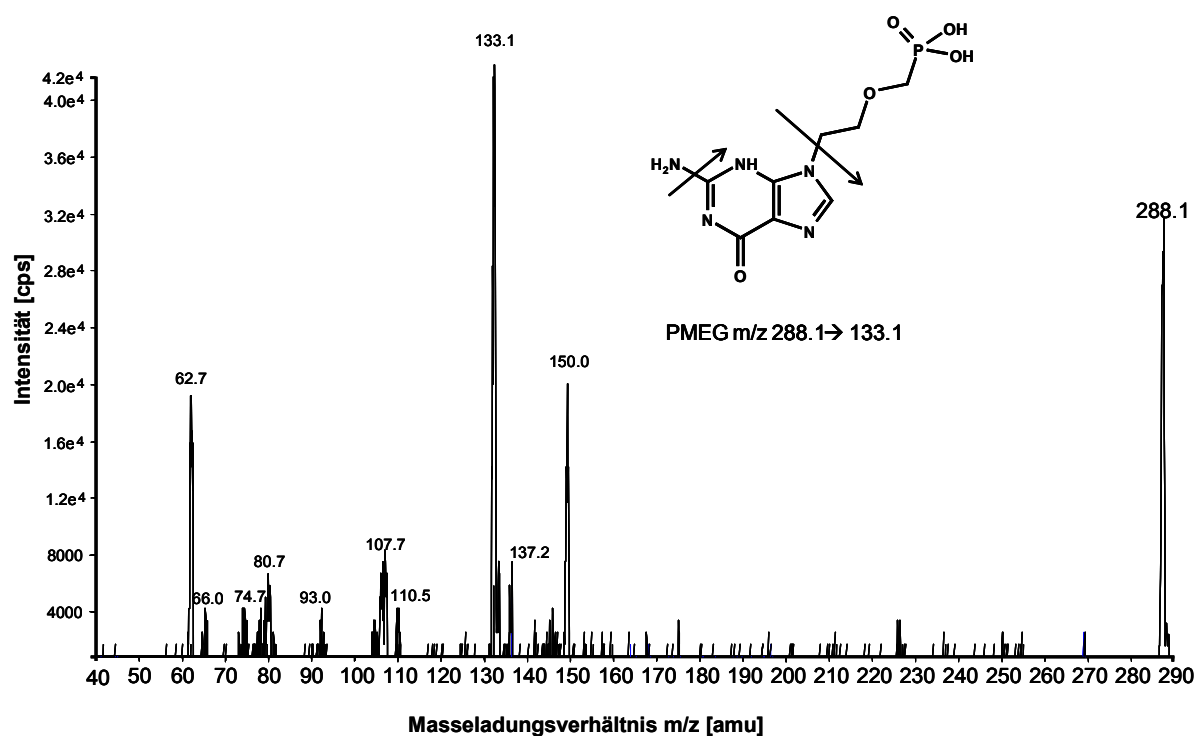
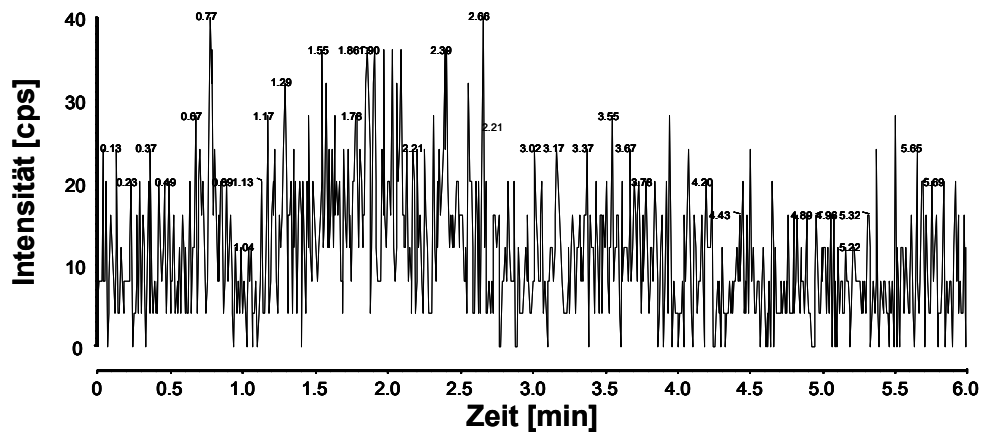


Abbildung 16. Produktionen-Scan PMEG (interner Standard). Die Abbildung zeigt das Massenspektrum bei negativer Ionisation, wobei das deprotonierte PMEG m/z 288.1 als Precursor verwendet wurde. Das intensiv gebildete Fragment 133.1 dient zur selektiven Detektion von PMEG im MRM-Modus (Breddemann et al., 2008).

a)



b)

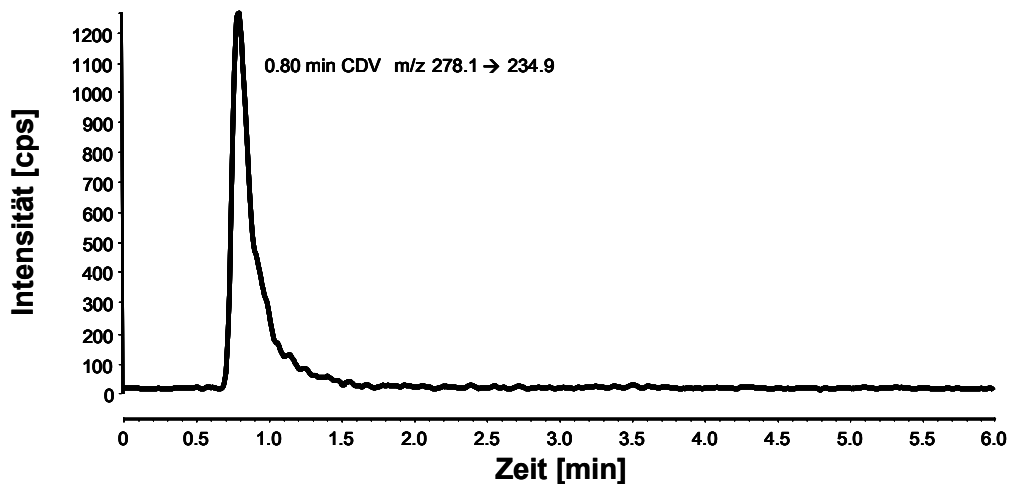


Abbildung 17. Ionenchromatogramm einer Leerprobe und einer Serumprobe mit 78 ng/ml CDV
Die Abbildungen a) und b) zeigen jeweils das Ionenchromatogramm über einen Zeitraum von 6 min. a) zeigt die charakteristisch niedrige Basislinie (das Grundrauschen) einer Leerprobe (Blankserum). b) Die Abbildung zeigt den Cidofovir-Peak bei einer Konzentration am unteren Ende der Quantifizierung (LLOQ). Die Konzentration entspricht 78 ng/ml CDV.

4.1.3. Ergebnisse der Untersuchungen zur Präzision, Richtigkeit und Kalibrierung

Die Untersuchungen zur intra- und inter-assay Präzision ergaben für den Analyten Cidofovir Abweichungen die über den ganzen Konzentrationsbereich kleiner als 7,8% (ausgedrückt als relative Standardabweichung [%]) waren. Die Abweichungen in der Richtigkeit der Methode (ausgedrückt als %-Abweichung von der nominalen Konzentration) lagen innerhalb von 12,1%. Die vollständigen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 8. Ergebnisse der Richtigkeits- und Präzisionsuntersuchungen

Validierungstag	Anzahl der Proben	Nominale Konz. [ng/ml]	mittlere gemessene Konz. [ng/ml]	Richtigkeit [%]	Präzision [%]
1	5	76,1	74,6	98,0	4,6
2	5	76,1	66,9	87,9	2,6
3	5	76,1	69,1	90,9	2,5
Inter-assay (1-3)	15	76,1	70,2	92,3	5,7
1	5	152,2	164,6	108,2	4,6
2	5	152,2	142,4	93,6	5,2
3	5	152,2	145,2	95,4	1,5
Inter-assay (1-3)	15	152,2	150,7	99,0	7,8
1	5	1217,0	1342,4	110,3	1,3
2	5	1217,0	1252,0	102,8	3,6
3	5	1217,0	1142,0	93,8	4,0
Inter-assay (1-3)	15	1217,0	1245,5	102,3	7,4
1	5	4870,0	5257,4	108,0	1,7
2	5	4870,0	5038,0	103,5	4,2
3	5	4870,0	4766,0	97,9	3,4
Inter-assay (1-3)	15	4870,0	5020,5	103,1	5,1

Im Folgenden ist beispielhaft die durchgeführte Achtpunkt-Kalibration dargestellt.

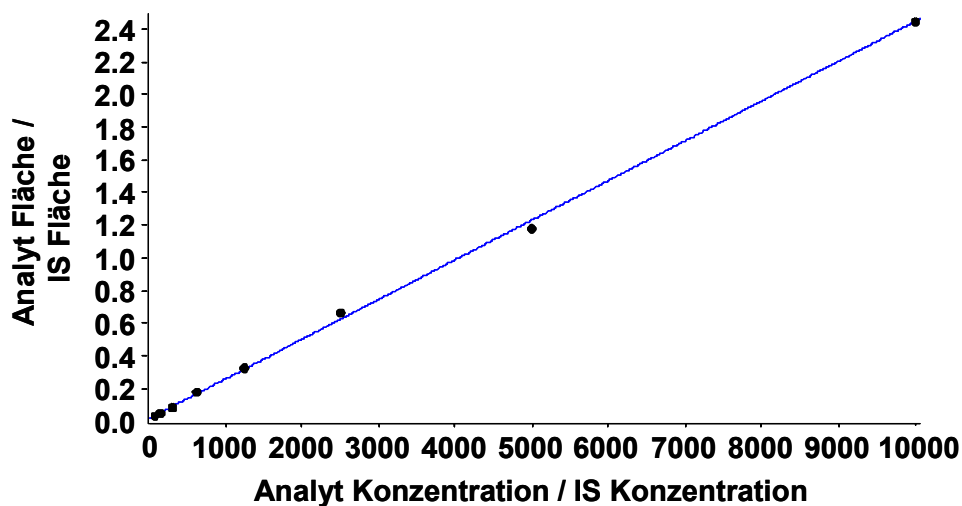


Abbildung 18. Lineare Darstellung der Cidofovir-Kalibrationsgerade. Die Abbildung zeigt die lineare Darstellung der Achtpunkt-Cidofovir-Kalibrationsgeraden im Konzentrationsbereich von 78 bis 10000 ng/ml.

Der gezeigte linear-dynamische Bereich der Kalibriergeraden liegt mit zwei 10er Potenzen (von 78 ng/ml bis 10000 ng/ml Cidofovir) im Rahmen der Erwartungen, die mit einer Detektion mit einem Dynodendetektor (dem verwendeten Detektor im Massenspektrometer) verbunden sind. Durch die Auftragung der Kalibrationspunkte wird mittels einer gewichteten linearen Regression (1/x Wichtung) eine Geradengleichung erhalten, mit der die Auswertung der Proben ermöglicht wird.

Um Abweichungen von der Linearität auch bei kleinen Konzentrationen zu untersuchen, ist insbesondere die halblogarithmische Auftragung (wie im Folgenden dargestellt) der Kalibriergeraden geeignet.

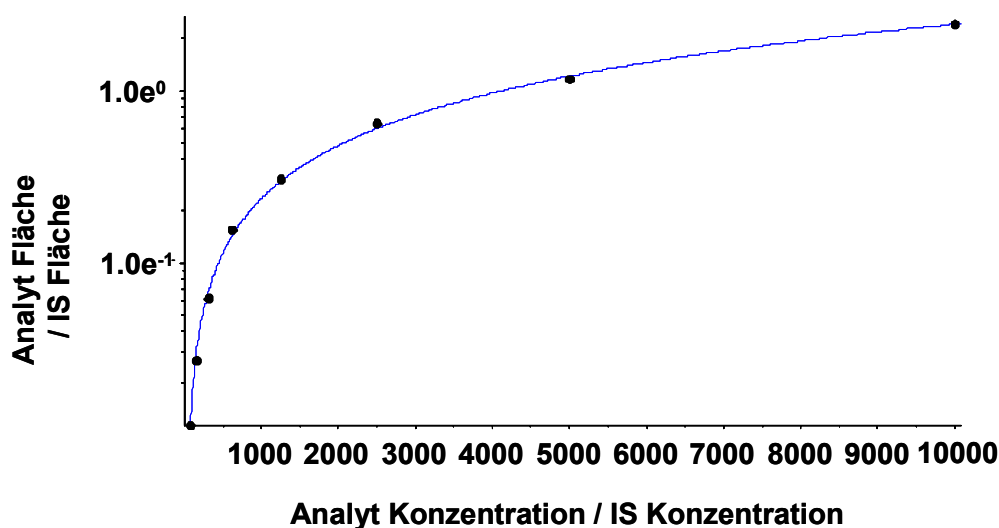


Abbildung 19. Halblogarithmische Darstellung der Cidofovir-Kalibrationsgeraden. Die Abbildung zeigt die halblogarithmische Darstellung der Achtpunkt-Cidofovir-Kalibrationsgeraden im Konzentrationsbereich von 78 bis 10000 ng/ml.

Die mittlere lineare Regressionsgleichung bei den Untersuchungen zur Linearität der Kalibrationsgeraden an drei aufeinander folgenden Validierungstagen mit drei unabhängig voneinander hergestellten Kalibrationssets war $y = 0,000234x (\pm 0,00002) + 0,00659 (\pm 0,00125)$, wobei die resultierenden Korrelationskoeffizienten (r) der Kalibrationsgeraden größer als 0,996 (Bestimmtheitsmaß $r^2 > 0,992$) waren. Die vollständigen Ergebnisse der Untersuchungen zur Linearität sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 9. Untersuchungen zur Kalibrationsgeraden

Set	Anzahl der Proben	Nominale Konz. [ng/ml]	mittlere gemessene Konz. [ng/ml]	Präzision [%]	Richtigkeit [%]
1	3	78,1	77,4	6,7	99,1
1	3	156,3	160,9	8,3	103,2
1	3	312,5	279,6	8,8	89,3
1	3	625,0	654,2	12,1	104,7
1	3	1250,0	1283,4	1,8	102,7
1	3	2500,0	2458,9	4,3	98,4
1	3	5000,0	5263,1	1,1	105,3
1	3	10000,0	9744,6	3,8	97,4
2	3	78,1	76,4	3,5	97,8
2	3	156,3	134,4	3,3	86,2
2	3	312,5	288,8	14,6	92,3
2	3	625,0	711,2	5,1	113,8
2	3	1250,0	1258,5	9,2	100,7
2	3	2500,0	2815,6	3,2	112,6
2	3	5000,0	5031,1	8,4	100,6
2	3	10000,0	9606,2	5,5	96,1
3	3	78,1	62,6	7,5	80,2
3	3	156,3	169,4	9,9	108,6
3	3	312,5	324,5	4,7	103,7
3	3	625,0	657,5	5,2	105,2
3	3	1250,0	1258,4	12,7	100,7
3	3	2500,0	2568,3	5,4	102,7
3	3	5000,0	5024,3	1,8	100,5
3	3	10000,0	9857,4	6,7	98,6

4.1.4. Ergebnisse zur Untersuchung der Wiederfindung und der Matrixeffekte

Die mittlere absolute Wiederfindung von Cidofovir, die bei drei Konzentrationen (mit jeweils fünf Proben pro Konzentration) bestimmt wurde, betrug 62,7% für 78 ng/ml CDV, 51,4% für 1250 ng/ml CDV und 52,5% für 10000 ng/ml CDV. Die mittlere absolute Wiederfindung für den IS betrug, bei der in der Methode verwendeten Konzentration von 10000 ng/ml PMEG, wobei 15 Proben dieser Konzentration gemessen wurden, 60,9%. Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Wiederfindung des Analyten und des internen Standards zeigen, dass die Wiederfindung von Cidofovir nicht konzentrationsabhängig ist und dass sich das Ausmaß der Wiederfindung für den Analyten und den IS auf vergleichbarem Niveau befindet.

Tabelle 10. Untersuchungen zur Wiederfindung

Analyt Konz. [ng/ml]	mittl. Fläche Preextraktion (n=5)	mittl. Fläche Postextraktion (n=5)	Wiederfindung
78	2460	3924	62,7%
1250	35360	68820	51,4%
10000	273800	522000	52,5%
IS Konz. [ng/ml]	mittl. Fläche Preextraktion (n=15)	mittl. Fläche Postextraktion (n=15)	Wiederfindung
10000	212267	348333	60,9%

IS= interner Standard

Neben der Wiederfindung wurden auch die Matrixeffekte untersucht. Die mittleren Matrixeffekte bei 78 ng/ml CDV entsprachen -72,9%, bei 1250 ng/ml CDV -72,1% und bei 10000 ng/ml CDV -75,0%, wobei fünf Proben je Konzentration vermessen wurden. In der gleichen Art und Weise wurden die Matrixeffekte für den IS bestimmt, wobei fünfzehn Proben bei einer Konzentration von 10000 ng/ml PMEG vermessen wurden. Der mittlere Matrixeffekt auf die Ionisation des IS betrug -69,7%. Die aufgezeigten Ergebnisse zeigen einen ausgeprägten ionensuppressiven Matrixeffekt an. Jedoch ist das Ausmaß der Matrixeffekte bei dem Analyten und dem IS auf einem vergleichbaren Niveau. Darüber hinaus zeigte sich keine Konzentrationsabhängigkeit der Matrixeffekte, was aufgrund der Untersuchungen zur Linearität der Kalibriergeraden auch in dieser Form zu erwarten war.

Ein negativer Einfluss der ausgeprägten Ionensuppression für eine verlässliche Quantifizierung des Analyten ist daher nicht feststellbar.

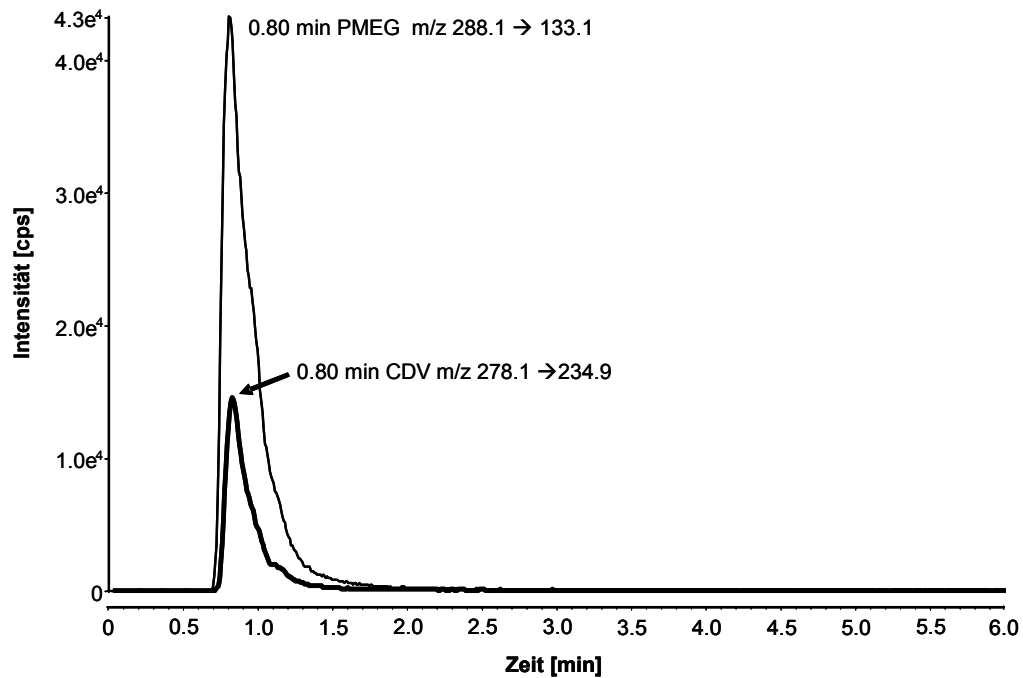
Tabelle 11. Untersuchungen zu den Matrixeffekten

Analyt Konz. [ng/ml]	mittl. Fläche Laufmittel (n=5)	mittl. Fläche Postextraktion (n=5)	Matrix Effekt
78	14500	3924	-72,9%
1250	247000	68820	-72,1%
10000	2085000	522000	-75,0%

IS Konz. [ng/ml]	mittl. Fläche Laufmittel (n=15)	mittl. Fläche Postextraktion (n=15)	Matrix Effekt
10000	1149000	348333	-69,7%

IS= interner Standard

a)



b)

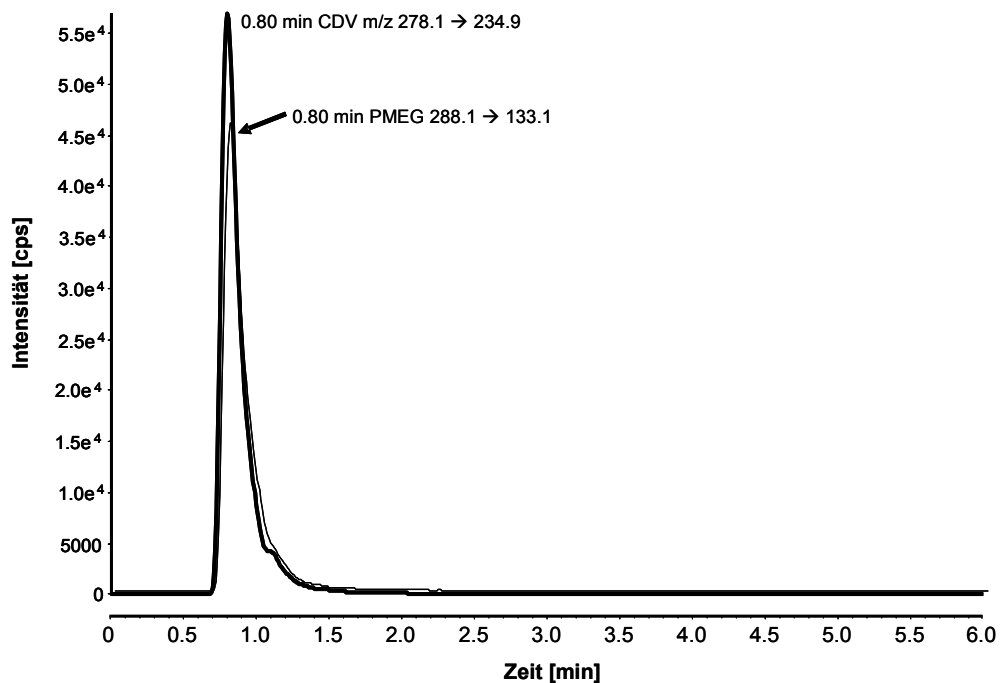


Abbildung 20. Ionenchromatogramme der ko-eluierenden Cidofovir- und PMEG-Peaks. Die Abbildungen a) und b) zeigen jeweils die beiden ko-eluierenden Peaks des Analyten und des IS bei einer Retentionszeit von 0,8 min. Die Abbildungen zeigen den linearen Anstieg der Intensität (angegeben in counts per second, cps) bei steigender Konzentration des Analyten: a) zeigt eine Cidofovir-Konzentration von 1250 ng/ml, in Abbildung b) entspricht die Cidofovir-Konzentration 5270 ng/ml, während die Intensität des internen Standards PMEG bei gleicher Konzentration nahezu unverändert ist.

4.1.5. Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchungen

Die Abweichungen der Peakflächen der frisch hergestellten Stammlösungen im Vergleich zu den Peakflächen der gleichen Stammlösung nach 1-monatiger Lagerung bei 4°C betragen -1,9% (für die Cidofovir-Stammlösung) und 0,1% (für die PMEG-Stammlösung), d.h. die Stammlösungen sind unter diesen Bedingungen stabil und können maximal für diese Zeitspanne zur Anwendung kommen. Die extrahierten Proben waren auch nach 24-stündiger Lagerung bei Raumtemperatur noch stabil: die mittlere Abweichung der Quantifizierung reichte von 11,5% (für die geringste Konzentration) bis 0,9% (für die höchste Konzentration). Die Ergebnisse der Gefrier-Tau-Zyklen und der 1-monatigen Lagerung bei -20°C sind in den folgenden Tabellen dargestellt.

Tabelle 12. Untersuchung der Stabilität nach drei Gefrier-Tau-Zyklen

Proben-Nr.	Qualitätskontrolle Konzentration [ng/ml]	Kalkulierte Konzentration [ng/ml]	Richtigkeit
1	156	165,0	105,8%
2	156	164,0	105,1%
3	156	164,0	105,1%
4	156	160,0	102,6%
5	156	175,0	112,2%
MW		165,6	106,2%
STD		5,6	n.a
relat.STD		3,4%	n.a
1	1250	1290,0	103,2%
2	1250	1500,0	120,0%
3	1250	1460,0	116,8%
4	1250	1370,0	109,6%
5	1250	1370,0	109,6%
MW		1398,0	111,8%
STD		82,9	n.a
relat.STD		5,9%	n.a
1	5000	6110,0	122,2%
2	5000	5650,0	113,0%
3	5000	5470,0	109,4%
4	5000	5310,0	106,2%
5	5000	5050,0	101,0%
MW		5518,0	110,4%
STD		397,6	n.a
relat.STD		7,2%	n.a

MW = Mittelwert, STD = Standardabweichung, relat.STD = relative Standardabweichung,
n.a = nicht anwendbar

Tabelle 13. Untersuchung der Stabilität nach 1-monatiger Lagerung bei -20°C

Proben-Nr.	Qualitätskontrolle Konzentration [ng/ml]	Kalkulierte Konzentration [ng/ml]	Richtigkeit
1	156	149,0	95,5%
2	156	154,0	98,7%
3	156	150,0	96,2%
4	156	134,0	85,9%
5	156	149,0	95,5%
MW		147,2	94,4%
STD		7,7	n.a
relat.STD		5,2%	n.a
1	1250	1270,0	101,6%
2	1250	1270,0	101,6%
3	1250	1130,0	90,4%
4	1250	1280,0	102,4%
5	1250	1220,0	97,6%
MW		1234,0	98,7%
STD		62,7	n.a
relat.STD		5,1%	n.a
1	5000	5070,0	101,4%
2	5000	4990,0	99,8%
3	5000	4760,0	95,2%
4	5000	4930,0	98,6%
5	5000	4930,0	98,6%
MW		4936,0	98,7%
STD		113,9	n.a
relat.STD		2,3%	n.a

MW = Mittelwert, STD = Standardabweichung, relat.STD = relative Standardabweichung,
n.a = nicht anwendbar

Die Abweichungen in den Ergebnissen der Richtigkeit (Abweichung des Mittelwerts der kalkulierten Konzentrationen von der Konzentration der Qualitätskontrolle) und der Präzision (relative Standardabweichung der kalkulierten Konzentrationen) für die Stabilitätsuntersuchung bei den Gefrier-Tau-Zyklen und der 1-monatigen Lagerung bei -20°C liegen im untersuchten Konzentrationsbereich unterhalb von 15%. Daher wird unter diesen Bedingungen eine ausreichende Stabilität der Proben erwartet.

4.2. Ergebnisse der Studie zur Erforschung der klinischen Pharmakokinetik von CDV bei pädiatrischen Patienten

Im Rahmen der klinischen Studie und der Fallstudie wurden von insgesamt neun verschiedenen Patienten zehn Konzentrationszeitprofile gewonnen und analysiert. Begleitend zu den Cidofovir-Applikationen wurden bei allen Patienten die erforderlichen nephroprotektiven Maßnahmen, wie in Kapitel 1.6. „Nephrotoxizität von Cidofovir“ beschrieben, durchgeführt. Die folgenden Tabellen zeigen eine Übersicht über die untersuchten Patienten, die applizierten Cidofovir-Dosen und die gemessenen pharmakokinetischen Parameter.

Tabelle 14. Übersicht über die untersuchten Patienten

ID	Geschlecht	Alter	Cidofovir-Dosis
Nr.		(Jahre)	(mg/kg)
1	weibl.	10,8	4,38
2	männl.	1,5	2,33
3	weibl.	0,6	5,00
4	männl.	16,0	0,92
5	weibl.	6,5	5,16
6	weibl.	2,3	4,62
7	weibl.	2,4	3,45
8	weibl.	8,3	4,88
9	männl.	9,3	5,00
10	weibl.	12,9	1,00
Bereich	n.a	0,6-16,0	0,92-5,16

n.a = nicht anwendbar

Der Median der körperlsgewichts-normalisierten Clearance bei den untersuchten Patienten liegt bei 207 ml/h/kg, bei einer medianen Halbwertszeit $t_{1/2}$ von 2,42 h. Die für die Bestimmung der Halbwertszeit notwendige Bestimmung der Eliminationskonstante k_e erfolgte durch Auftragung des natürlichen Logarithmus der Konzentration gegen die Zeit und anschließender linearer Regression der letzten drei Konzentrationen. Das mediane Verteilungsvolumen V_d beträgt 541 ml/kg. Eine Übersicht über die ermittelten pharmakokinetischen Parameter bei den Patienten ist in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 15. Übersicht über die ermittelten pharmakokinetischen Parameter bei den Patienten

ID	Clearance	AUC-∞	ke	t 1/2	Vd
Nr.	(ml/h/kg)	($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$)	(1/h)	(h)	(ml/kg)
1	303	14,5	0,43	1,62	709
2	257	9,1	0,46	1,51	560
3	162	30,9	0,24	2,87	669
4	111	8,2	0,21	3,25	521
5	263	19,6	0,51	1,35	514
6	262	17,6	0,33	2,11	799
7	125	27,6	0,25	2,72	491
8	253	19,3	0,23	2,96	1079
9	124	40,4	0,37	1,88	335
10	34	29,1	0,09	7,40	366
Median	207	19,5	0,29	2,42	541
Bereich	34-303	8,2-40,4	0,09-0,51	1,35-7,40	335-1079

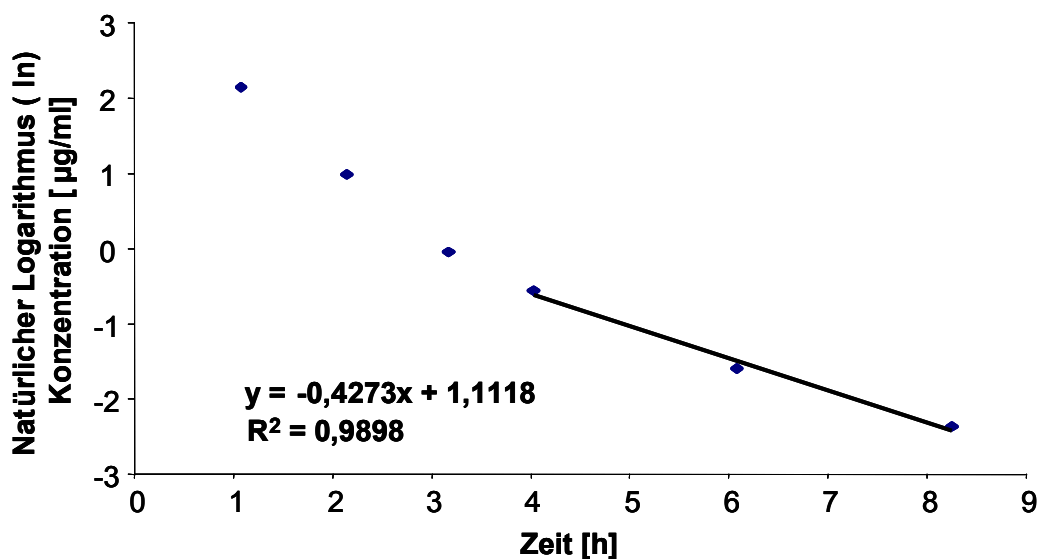
AUC = Fläche unter der Konzentrationszeitkurve („area under the curve“),
ke= Eliminationsgeschwindigkeitskonstante, t1/2 = Halbwertszeit,
Vd= Verteilungsvolumen („Volume of distribution“)

4.2.1. Patient ID Nr.1

Zur Behandlung einer chronisch akuten CMV-Retinitis auf der Grundlage eines kombinierten Immundefektes, der mit einer erhöhten Infektanfälligkeit und einer substituionspflichtige Hypogammaglobulinämie einherging, erhielt der Patient ID-Nr.1 eine Behandlung mit Cidofovir. Darüber hinaus bestanden die folgenden Nebendiagnosen: Morbus Addison, chronisch ekzematöse Dermatitis, Anämie bei gestörter Eisenresorption, Implantation eines Port-a-Carth, Z.n. (Zustand nach) kardiopulmonaler Reanimation und Z.n. Vitrektomie und Lentektomie. Als Dauermedikation (Substitutionstherapie) erhielt der Patient: Hydrocortison, Fludrocortison und Immunglobuline. Am Tag der Applikation war der Patient (weiblich) 10,8 Jahre alt und wog 24,00 kg bei einer Körpergröße von 128 cm. Die Nierenfunktion war mit einer GFR von 136 ml/min/1,73m² nicht eingeschränkt. Die Bestimmung der GFR erfolgte auf der Grundlage einer CystatinC-Bestimmung und nicht durch die Messung des Serumkreatinins. Eine Dosis von 105 mg Cidofovir (dies entspricht 4,38 mg Cidofovir/kg Körpergewicht) wurde über den Zeitraum von 60 Minuten appliziert. Hieraus resultierte der im Folgenden dargestellte Konzentrationszeitverlauf von Cidofovir:

Tabelle 16. Gemessener Konzentrationszeitverlauf von Patient ID-Nr.1

Zeit [h] nach Beginn der Infusion	gemessene Konzentration [ng/ml]
1,08	8530
2,15	2670
3,17	962
4,03	574
6,08	204
8,25	94

**Abbildung 21.** Bestimmung der Eliminationskonstanten bei Patient ID-Nr.1. Aus der Steigung von 0,4273 der linearen Regressionsgeraden durch die letzten drei Konzentrationspunkte resultiert eine Halbwertszeit von 1,62 h.

4.2.2. Patient ID Nr.2

Der Patient ID Nr.2 ist der bereits im Kapitel 1.7 beschriebene „Pädiatrischer Patientfall“. Die Fallstudie war der Ausgangspunkt für die Fragestellungen der vorliegenden Arbeit. Der Patient war wegen einer vorhergegangenen Zytostatikatherapie zur Behandlung eines anaplastischen Astrocytoms im Zustand nach subtotaler Resektion immunabwehrgeschwächt und musste aufgrund einer therapierefraktären und lebensbedrohlichen Diarrhoe stationär behandelt werden. Nach dem Nachweis einer akuten systemischen und lokalen (betroffen war der gesamte Gastrointestinaltrakt) HHV-6 Infektion wurde initial eine Behandlung mit Ganciclovir und später mit Foscarnet eingeleitet. Da diese Therapieversuche erfolglos blieben, wurde der Patient mit Cidofovir weiterbehandelt.

Darüber hinaus umfasste die Medikation des Patienten Carbamazepin, Racecadotril, Omeprazol, Granisetron, Dimenhydrinat und Enoxaparin. Am Tag der Applikation war der Patient (männlich) 1,5 Jahre alt und wog 8,57 kg bei einer Körpergröße von 82 cm. Die Nierenfunktion war mit einer GFR von 80 ml/min/1,73m² geringgradig eingeschränkt. Die für diesen Patienten angenommene GFR beruht nicht auf einer Berechnung nach der Schwartz-Formel, sondern auf einer Eintragung in der Krankenakte. Eine Dosis von 20 mg Cidofovir (dies entspricht 2,33 mg Cidofovir/kg Körpergewicht) wurde über den Zeitraum von 60 Minuten appliziert. Hieraus resultierte der im Folgenden dargestellte Konzentrationszeitverlauf von Cidofovir:

Tabelle 17. Gemessener Konzentrationszeitverlauf von Patient ID-Nr.2

Zeit [h] nach Beginn der Infusion	gemessene Konzentration [ng/ml]
1,17	4620
2,17	1960
3,17	850
4,08	475
6,08	190

Anmerkung zur Tabelle: Im Vergleich zu den anderen Patienten der Studie wurde bei dem Patienten der Fallstudie (ID-Nr.2) keine Blutentnahme beim Zeitpunkt t₆ (gemäß dem Blutentnahmeprotokoll der Studie 8 Stunden nach Beginn der Infusion) durchgeführt.

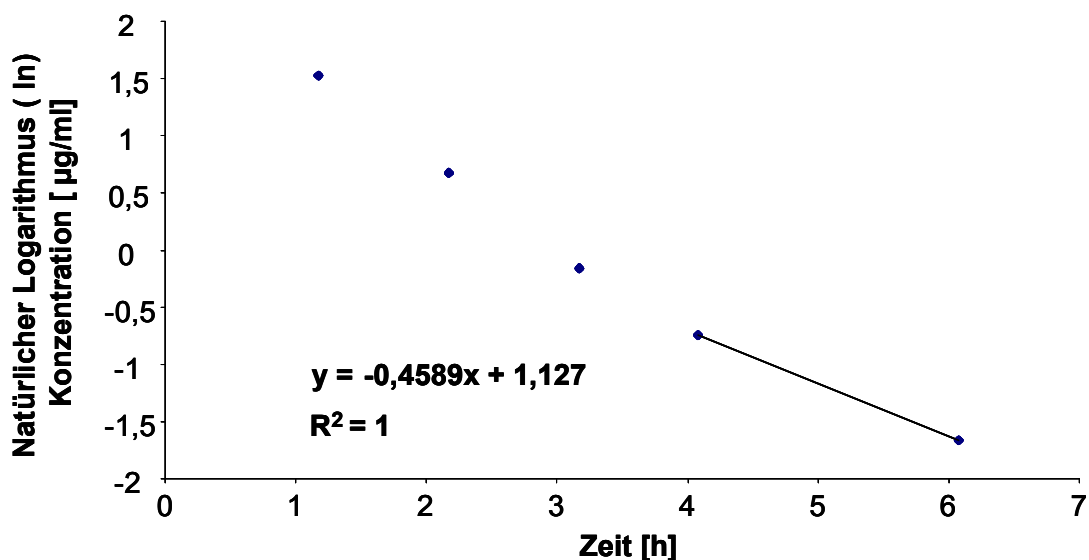


Abbildung 22. Bestimmung der Eliminationskonstanten bei Patient ID-Nr.2. Abweichend von den anderen Profilen erfolgte bei Patient ID-Nr.2 die Bestimmung der Eliminationskonstanten k_e nur durch lineare Regression der letzten zwei Konzentrationen. Bei diesem Profil standen fünf Konzentrationen zur Verfügung, wobei der scheinbar biexponentielle Abfall der Konzentration bei 4,08 h einen Knickpunkt aufweist. Aus der Steigung 0,4589 resultiert eine Halbwertszeit von 1,51 h.

4.2.3. Patient ID Nr.3

Der Patient ID-Nr. 3 musste aufgrund einer akut aufgetretenen Enzephalopathie intensivmedizinisch behandelt werden. Aufgrund des Verdachtes auf eine HHV-6 induzierte Enzephalitis als Grundlage für die Enzephalopathie wurde eine antivirale Therapie mit Cidofovir eingeleitet. Darüber hinaus umfasste die Medikation des Patienten Cefotaxim, Aciclovir und als Bedarfsmedikation Metamizol-Natrium. Am Tag der Applikation war der Patient (weiblich) 0,6 Jahre alt und wog 8,00 kg bei einer Körpergröße von 66 cm. Die Nierenfunktion war mit einer GFR von 59,4 ml/min/1,73m² geringgradig eingeschränkt. Die Berechnung der GFR beruht auf der Formel nach Schwartz bei einem Serumkreatinin von 0,5 mg/dl. Eine Dosis von 40 mg Cidofovir (dies entspricht 5,00 mg Cidofovir/kg Körpergewicht) wurde über den Zeitraum von 60 Minuten appliziert. Hieraus resultierte der im Folgenden dargestellte Konzentrationszeitverlauf von Cidofovir:

Tabelle 18. Gemessener Konzentrationszeitverlauf von Patient ID-Nr.3

Zeit [h] nach Beginn der Infusion	gemessene Konzentration [ng/ml]
1,03	10800
2,00	5070
3,00	3455
4,00	2540
6,00	1450
8,00	966

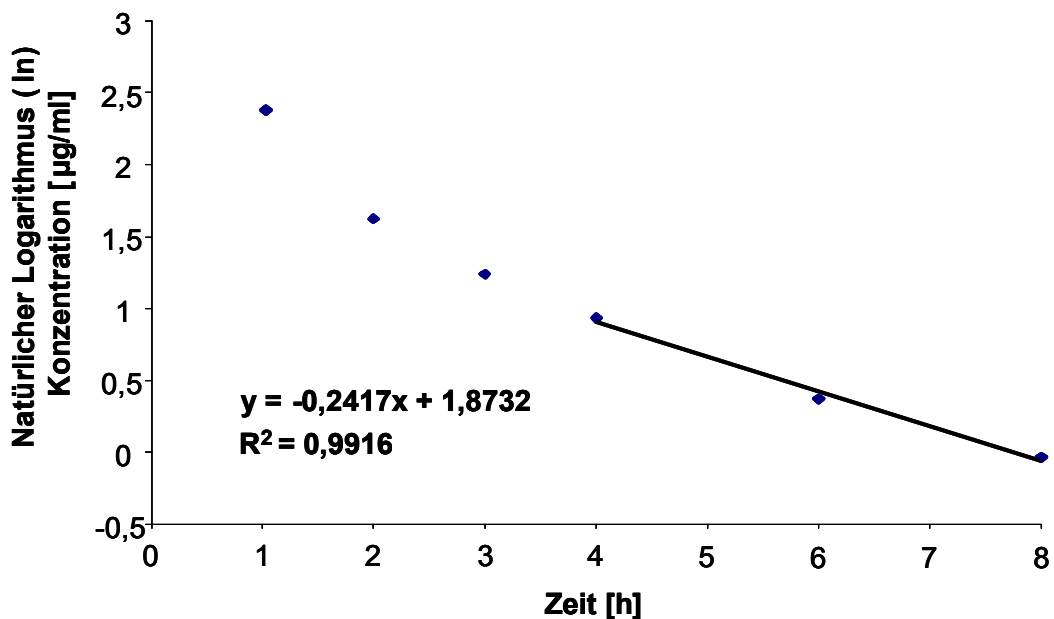


Abbildung 23. Bestimmung der Eliminationskonstanten bei Patient ID-Nr.3. Aus der Steigung von 0,2417 der linearen Regressionsgeraden durch die letzten drei Konzentrationspunkte resultiert eine Halbwertszeit von 2,87 h.

4.2.4. Patient ID Nr.4

Der Patient ID-Nr. 4 wurde nach einer rezidivierenden, akuten lymphoblastischen Leukämie einer allogenen Stammzelltransplantation unterzogen. In der Folge kam es zu einem Graft failure (Abstoßung des Transplantates) und der Entwicklung einer akuten GvHD (Graft versus Hoost Disease). Durch die langdauernde immunsuppressive Therapie mit Methylprednisolon entwickelte sich ein steroid-induzierter Diabetes mellitus und eine Hypertonie. Durch den Nachweis von Adenoviren im peripheren Blut wurde die Diagnose einer systemischen Adenovirusinfektion gestellt und eine Behandlung mit Cidofovir eingeleitet. Der Patient erhielt darüber hinaus Aciclovir, Ciclosporin A, Teicoplanin, Meropenem, Humanalbumin, Furosemid, Methylprednisolon, Mycophenolatmofetil, Voriconazol, Esomeprazol, Ciprofloxacin, Clemastin, Ranitidin und Infliximab (monoklonaler Antikörper gegen den Tumor-Nekrose-Faktor α). Am Tag der Applikation war der Patient (männlich) 16,0 Jahre alt und wog 71,00 kg bei einer Körpergröße von 180 cm. Die Nierenfunktion war mit einer GFR von 55,0 ml/min/1,73m² mittelgradig eingeschränkt. Die Bestimmung der GFR erfolgte auf der Grundlage einer CystatinC-Bestimmung und nicht durch die Messung des Serumkreatinins. Eine Dosis von 65 mg Cidofovir (dies entspricht 0,92 mg Cidofovir/kg Körpergewicht) wurde über den Zeitraum von 60 Minuten appliziert. Hieraus resultierte der im Folgenden dargestellte Konzentrationszeitverlauf von Cidofovir:

Tabelle 19. Gemessener Konzentrationszeitverlauf von Patient ID-Nr.4

Zeit [h] nach Beginn der Infusion	gemessene Konzentration [ng/ml]
1,25	2290
2,18	1475
3,23	934
4,43	611
6,20	403
8,23	271

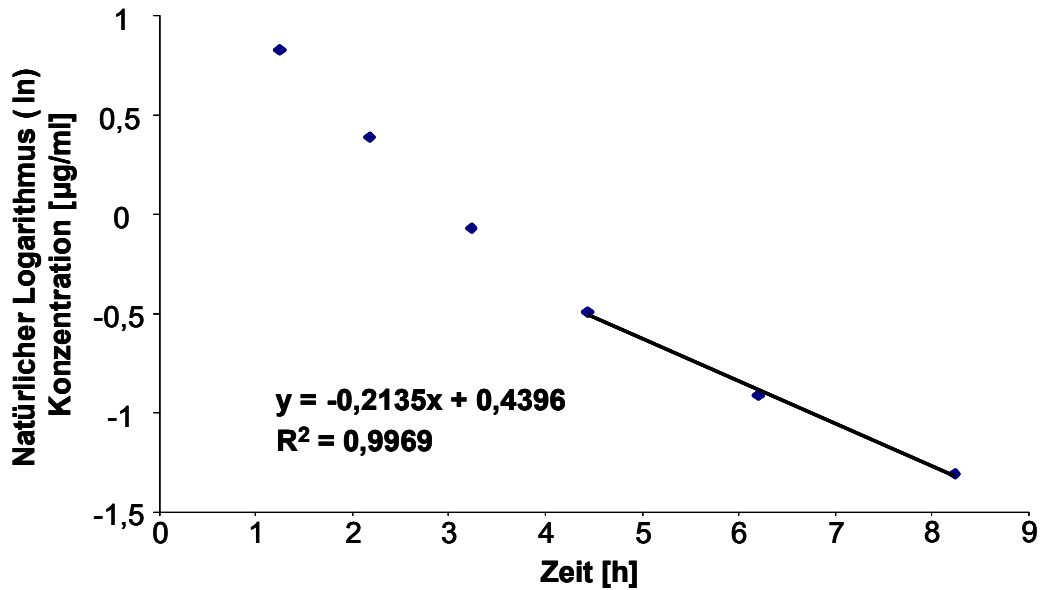


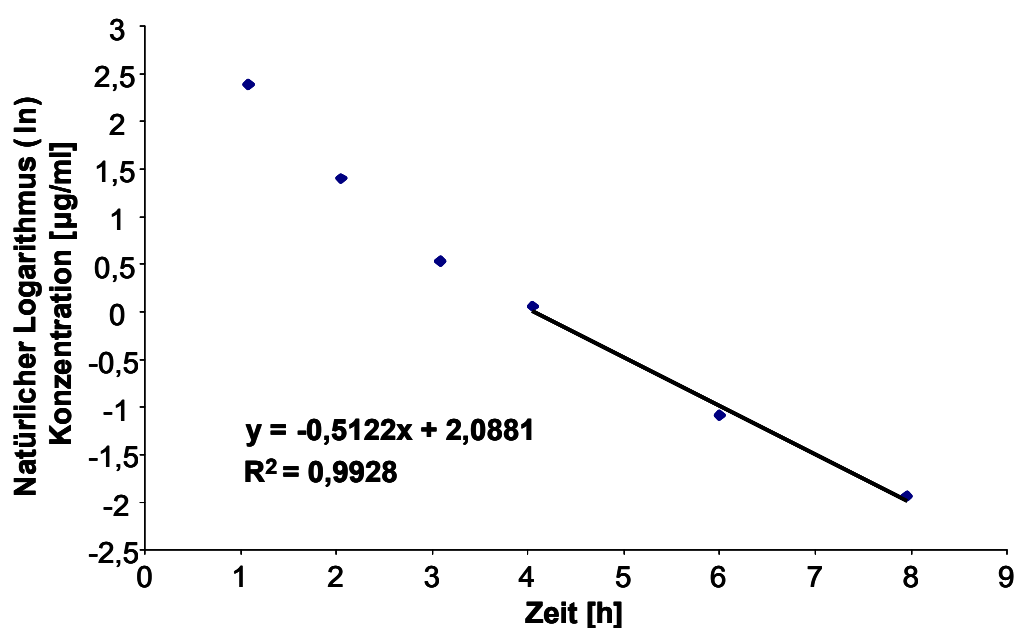
Abbildung 24. Bestimmung der Eliminationskonstanten bei Patient ID-Nr.4. Aus der Steigung von 0,2135 der linearen Regressionsgeraden durch die letzten drei Konzentrationspunkte resultiert eine Halbwertszeit von 3,25 h.

4.2.5. Patient ID Nr.5

Der Patient ID-Nr. 5 wurde nach einer rezidivierenden, akuten lymphoblastischen Leukämie einer allogenen Stammzelltransplantation unterzogen. Aktuell musste der Patient aufgrund eines paralytischen Ileus, einer GvHD der Leber und einer während des Aufenthaltes neu aufgetretenen Diarrhoe stationär behandelt werden. Nach dem Nachweis von Adenoviren in Blut- und Stuhlproben wurde eine Therapie mit Cidofovir eingeleitet. Der Patient erhielt darüber hinaus Prednison, Meropenem, Aciclovir, Fluconazol, Granisetron, Omeprazol, Mycophenolatmofetil, Metoclopramid, Budesonid, Cotrimoxazol und Vancomycin. Am Tag der Applikation war der Patient (weiblich) 6,5 Jahre alt und wog 21,30 kg bei einer Körpergröße von 118 cm. Die Nierenfunktion war mit einer GFR von 147,5 ml/min/1,73m² nicht eingeschränkt. Die Berechnung der GFR beruht auf der Formel nach Schwartz bei einem Serumkreatinin von 0,44 mg/dl. Eine Dosis von 110 mg Cidofovir (dies entspricht 5,16 mg Cidofovir/kg Körpergewicht) wurde über den Zeitraum von 60 Minuten appliziert. Hieraus resultierte der im Folgenden dargestellte Konzentrationszeitverlauf von Cidofovir:

Tabelle 20. Gemessener Konzentrationszeitverlauf von Patient ID-Nr.5

Zeit [h] nach Beginn der Infusion	gemessene Konzentration [ng/ml]
1,08	10950
2,05	4055
3,08	1705
4,05	1065
6,00	339
7,95	145

**Abbildung 25.** Bestimmung der Eliminationskonstanten bei Patient ID-Nr.5. Aus der Steigung von 0,5122 der linearen Regressionsgeraden durch die letzten drei Konzentrationspunkte resultiert eine Halbwertszeit von 1,35 h.

4.2.6. Patient ID Nr.6

Der Patient ID-Nr. 6 wurde nach einer Lebertransplantation intensiv-medizinisch behandelt. Im Verlauf entwickelte sich eine Organabstoßung, die mutmaßlich auf eine akute und primäre Infektion mit HHV-6 zurückzuführen war. Daher wurde eine Cidofovir-Therapie eingeleitet. Der Patient erhielt darüber hinaus Erythromycin, Ceftazidim, Cotrimoxazol, Humanalbumin, liposomales Amphotericin B, Ursodesoxycholsäure, Tacrolimus, Paracetamol, Fentanyl, Heparin-Natrium und Clonidin. Am Tag der Applikation war der Patient (weiblich) 2,3 Jahre alt und wog 13,00 kg bei einer Körpergröße von 78 cm.

Die Nierenfunktion war mit einer GFR von 82,5 ml/min/1,73m² geringgradig eingeschränkt. Die Berechnung der GFR beruht auf der Formel nach Schwartz bei einem Serumkreatinin von 0,52 mg/dl. Eine Dosis von 60 mg Cidofovir (dies entspricht 4,62 mg Cidofovir/kg Körpergewicht bei einem Körpergewicht von 13,00 kg) wurde über den Zeitraum von 60 Minuten appliziert. Hieraus resultierte der im Folgenden dargestellte Konzentrationszeitverlauf von Cidofovir:

Tabelle 21. Gemessener Konzentrationszeitverlauf von Patient ID-Nr.6

Zeit [h] nach Beginn der Infusion	gemessene Konzentration [ng/ml]
1,08	6300
2,05	3225
2,98	2065
4,00	1725
5,98	803
8,02	462

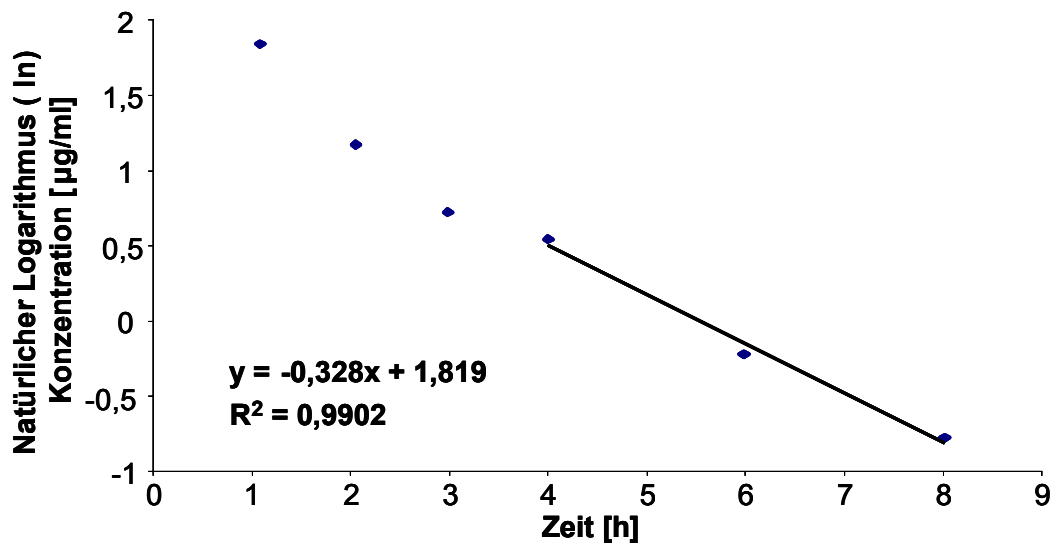


Abbildung 26. Bestimmung der Eliminationskonstanten bei Patient ID-Nr.6. Aus der Steigung von 0,328 der linearen Regressionsgeraden durch die letzten drei Konzentrationspunkte resultiert eine Halbwertszeit von 2,11 h.

4.2.7. Patient ID Nr.7

Der Patient ID-Nr. 7 ist identisch mit Patient ID-Nr. 6, jedoch erfolgte die Analyse zu einem späteren Zeitpunkt der Behandlung. Auf Anordnung des betreuenden Arztes wurde diese erneute Analyse durchgeführt, um ein therapeutisches Drug Monitoring nach einer Dosisanpassung durchzuführen. Dies geschah vor dem folgenden Hintergrund: im Verlaufe der Behandlung verbesserte sich der Zustand des Patienten signifikant nachdem eine Intensivierung der Cidofovir-Dosis vorgenommen wurde. Die Grundlage hierfür waren die Ergebnisse der vorhergegangenen Bestimmung der kinetischen Parameter bei dem Patienten, die eine im Vergleich zu Erwachsenen erhöhte körpertgewichtsnormalisierte Clearance aufwiesen. Hieraus resultierte bei der gegebenen Dosis von 4,62 mg Cidofovir /kg Körpergewicht eine im Vergleich zu Erwachsenen niedrige systemische Exposition. Da die antivirale Therapie zu diesem Zeitpunkt als ineffektiv beurteilt wurde, wurde die Dosis von einmal 60 mg Cidofovir im Abstand von zwei Wochen auf 50 mg Cidofovir an drei aufeinanderfolgenden Tagen im Abstand von zwei Wochen erhöht. Dies entspricht dem 2,5-fachen der ursprünglichen Dosis. Weiterhin erhielt der Patient eine begleitende Pharmakotherapie mit Linezolid, Cotrimoxazol und liposomalen Amphotericin B. Am Tag der Verlaufkontrolle war der Patient (weiblich) 2,4 Jahre alt und wog 14,50 kg bei einer Körpergröße von 78 cm. Die nach der Schwartz-Formel berechnete GFR unterschied sich nicht von der vorhergegangenen Bestimmung (unveränderter Serumkreatinin-Wert von 0,52 mg/dl) bei Patient-ID-Nr.6 mit 82,5 ml/min/1.73m², jedoch wich eine alternativ durchgeführte Bestimmung (Bestimmung der GFR über Sammelurinmessung mit 24 ml/min/1.73m²) stark von diesem Ergebnis ab, so dass für die Einschätzung der Nierenfunktion der Mittelwert beider Messungen zu Grunde gelegt wurde. Hieraus resultierte eine mit einer GFR von 53,3 ml/min/ 1,73m² mittelgradig eingeschränkte Nierenfunktion. Eine Dosis von 50 mg Cidofovir (dies entspricht 3,45 mg Cidofovir /kg Körpergewicht) wurde über den Zeitraum von 60 Minuten appliziert. Hieraus resultierte der im Folgenden dargestellte Konzentrationszeitverlauf von Cidofovir:

Tabelle 22. Gemessener Konzentrationszeitverlauf von Patient ID-Nr.7

Zeit [h] nach Beginn der Infusion	gemessene Konzentration [ng/ml]
1,00	8105
2,00	5385
3,00	3765
4,00	2475
6,00	1105
8,00	893

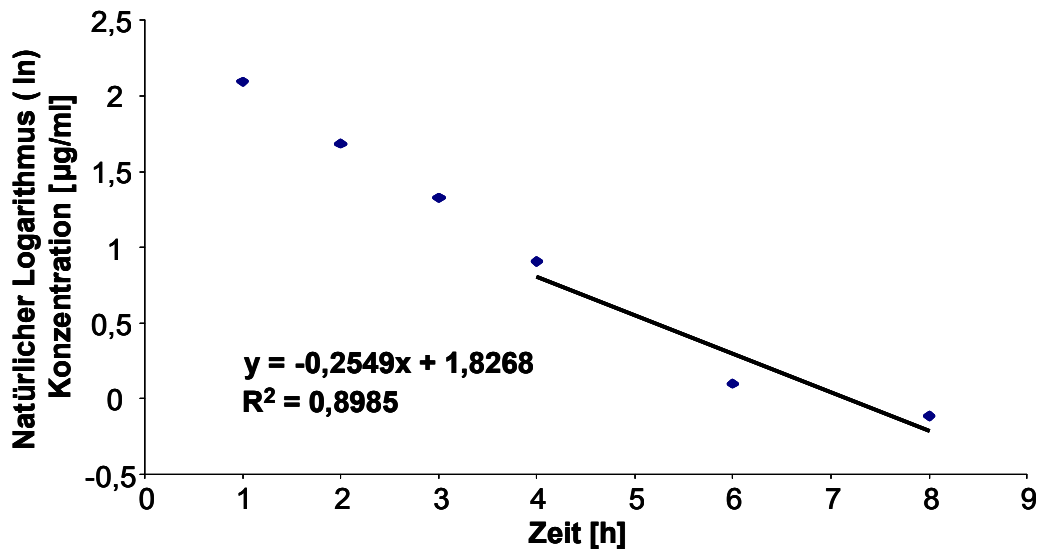


Abbildung 27. Bestimmung der Eliminationskonstanten bei Patient ID-Nr.7. Aus der Steigung von 0,2549 der linearen Regressionsgeraden durch die letzten drei Konzentrationspunkte resultiert eine Halbwertszeit von 2,72 h.

4.2.8. Patient ID Nr.8

Der Patient ID-Nr. 8 wurde nach einer rezidivierenden, akuten lymphoblastischen Leukämie einer allogenen Stammzelltransplantation unterzogen und musste aktuell aufgrund einer akuten GvHD der Haut und des Darms einer Mucositis bei bestehender Leukozytopenie, sowie einer Adenovirus-Enteritis stationär behandelt werden. Aufgrund der Mucositis musste der Patient parenteral ernährt werden. Zur Behandlung der viralen Enteritis wurde eine Behandlung mit Cidofovir eingeleitet. Darüber hinaus erhielt der Patient liposomales Amphotericin B, Metamizol-Natrium, Prednisolon, Acetazolamid, Cotrimoxazol, Omeprazol und Budesonid. Am Tag der Applikation war der Patient (weiblich) 8,3 Jahre alt und wog 20,50 kg bei einer Körpergröße von 131 cm. Unmittelbar vor der Cidofovir-Infusion musste sich der Patient erbrechen. Die Nierenfunktion war mit einer GFR von 100,0 ml/min/1,73m² nicht eingeschränkt. Die Bestimmung der GFR erfolgte auf der Grundlage einer CystatinC-Bestimmung und nicht durch die Messung des Serumkreatinins. Eine Dosis von 100 mg Cidofovir (dies entspricht 4,88 mg Cidofovir /kg Körpergewicht) wurde über den Zeitraum von 60 Minuten appliziert. Hieraus resultierte der im Folgenden dargestellte Konzentrationszeitverlauf von Cidofovir.

Tabelle 23. Gemessener Konzentrationszeitverlauf von Patient ID-Nr.8

Zeit [h] nach Beginn der Infusion	gemessene Konzentration [ng/ml]
1	8030
2,18	2185
3,17	1640
4,1	1350
8,15	515

Anmerkung zur Tabelle: Da der venöse Zugang des Patienten ID-Nr.8 beim geplanten Blutentnahmezeitpunkt t_5 (6 Stunden nach Beginn der Infusion) nicht rückläufig war, konnte keine Blutentnahme erfolgen.

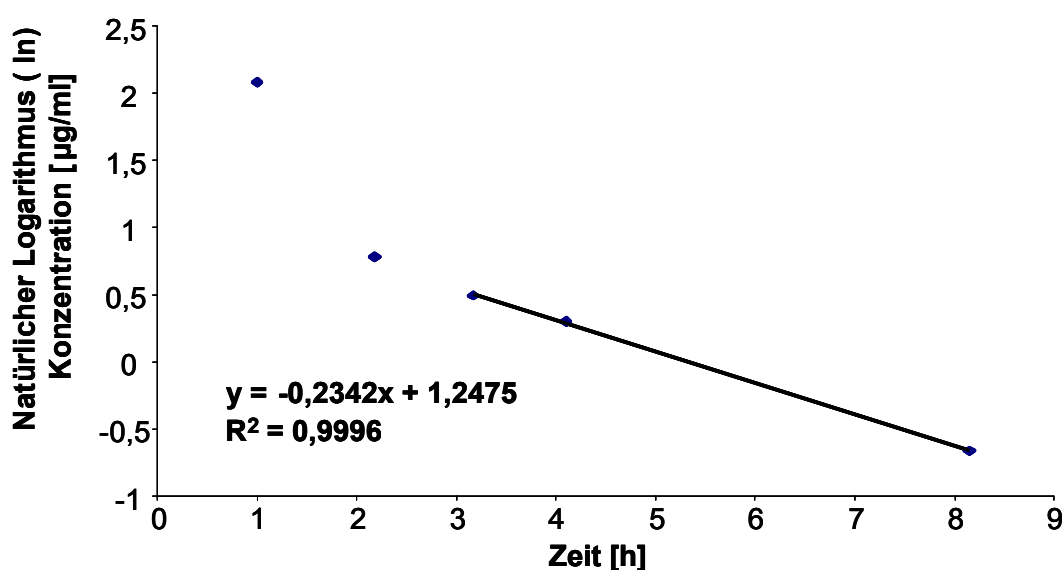


Abbildung 28. Bestimmung der Eliminationskonstanten bei Patient ID-Nr.8. Aus der Steigung von 0,2342 der linearen Regressionsgeraden durch die letzten drei Konzentrationspunkte resultiert eine Halbwertszeit von 2,96 h.

4.2.9. Patient ID Nr.9

Der Patient ID-Nr. 9 wurde nach einer rezidivierenden, akuten lymphoblastischen Leukämie (cALL) einer allogenen Stammzelltransplantation unterzogen und musste aktuell aufgrund einer akuten GvHD des Darms, sowie den Symptomen Bauchschmerzen und Durchfall stationär behandelt werden. Aufgrund des Nachweises von Adenoviren im Stuhl und der daraus resultierenden Verdachtsdiagnose einer Adenovirus-Enteritis wurde eine Behandlung mit Cidofovir eingeleitet.

Darüber hinaus erhielt der Patient Budesonid, Nifedipin, Phenobarbital, Folsäure, Prednison, Butylscopolamin, Fluconazol, Mycophenolatmofetil und Filgrastim (G-CSF, Granulozyten-Kolonien-Stimulierender-Faktor). Am Tag der Applikation war der Patient (männlich) 9,3 Jahre alt und wog 30,00 kg. Der Patient war für sein Alter überdurchschnittlich groß: mit einer Körpergröße von 152 cm lag der Patient ID-Nr. 9 oberhalb der 97. Wachstumsperzentile. Die sogenannten Perzentilkurven stellen ein Bewertungskriterium dar, um den Entwicklungszustand von Kindern zu beurteilen. Die Perzentilen zeigen dabei die oberen, mittleren und unteren Grenzen der statistischen Normalverteilung eines Körpermaßes (Länge, Gewicht, Kopfumfang) für die unterschiedlichen Altersstufen auf (wie im dargestellten Somatogramm für den Patienten ID-Nr.9 aufgeführt).

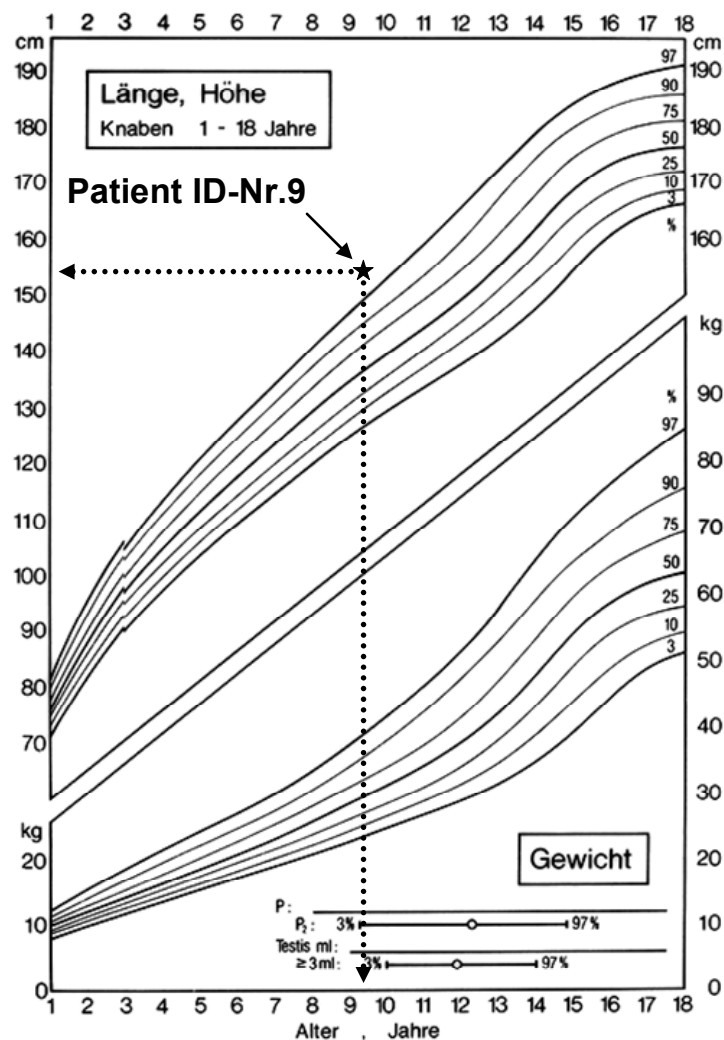


Abbildung 29. Somatogramm für den Patienten ID-Nr. 9 modifiziert nach (Eiholzer, 2001). Der 9,3 Jahre alte Patient ID-Nr. 9 liegt mit seiner Körpergröße von 152 cm oberhalb der 97. Wachstumsperzentile.

Die Nierenfunktion war mit einer GFR von 111,2 ml/min/1,73m² nicht eingeschränkt. Die Berechnung der GFR beruht auf der Formel nach Schwartz bei einem Serumkreatinin von 0,49 mg/dl. Eine Dosis von 150 mg Cidofovir (dies entspricht 5,00 mg Cidofovir /kg Körpergewicht) wurde über den Zeitraum von 60 Minuten appliziert. Hieraus resultierte der im Folgenden dargestellte Konzentrationszeitverlauf von Cidofovir:

Tabelle 24. Gemessener Konzentrationszeitverlauf von Patient ID-Nr.9

Zeit [h] nach Beginn der Infusion	gemessene Konzentration [ng/ml]
1,07	17150
2,17	7305
3,08	4310
5,13	2140
6,27	1410
7,82	793

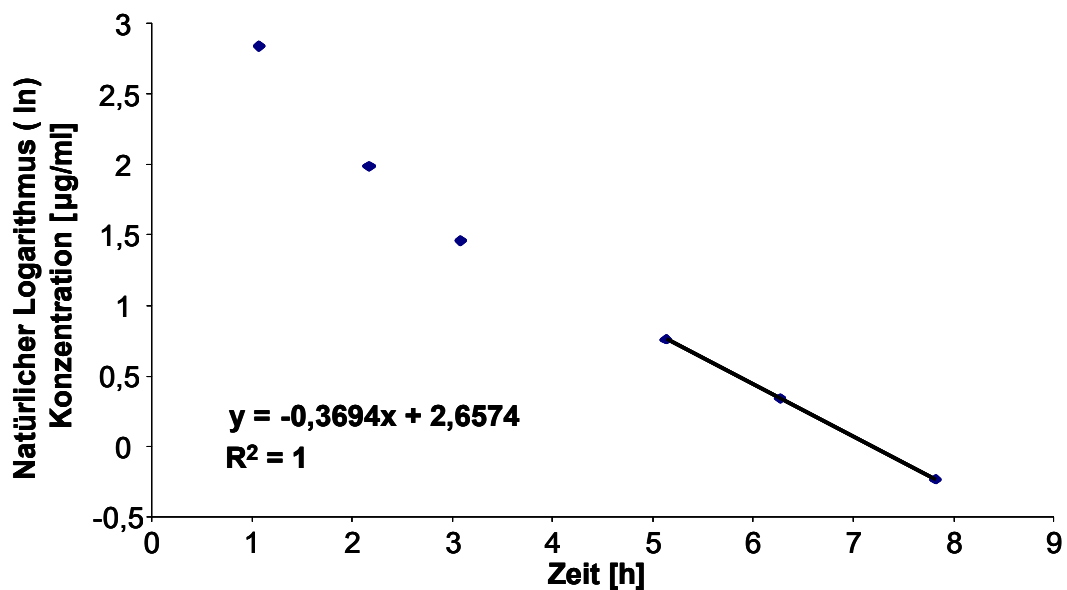


Abbildung 30. Bestimmung der Eliminationskonstanten bei Patient ID-Nr.9. Aus der Steigung von 0,3694 der linearen Regressionsgeraden durch die letzten drei Konzentrationspunkte resultiert eine Halbwertszeit von 1,88 h.

4.2.10. Patient ID Nr.10

Der Patient ID-Nr. 10 wurde aufgrund eines alveolären Rhabdomyosarkoms links inguinal (linker Bereich der Leistengegend) mit Lymphknoten-Metastasen links inguinal und im linken Knie intensiv-medizinisch behandelt. Auf der Grundlage dieser onkologischen Erkrankung entwickelte sich ein sog. systemisches Kapillarlecksyndrom (SKLS). Das SKLS ist gekennzeichnet durch eine massive Flüssigkeitsverschiebung vom Intravaskularraum zum Interstitium, ausgelöst durch einen Anstieg der Kapillarpermeabilität, was schließlich zu einem schweren generalisierten Ödemstatus bei gleichzeitiger Hypotension infolge des intravaskulären Flüssigkeitsmangels führt. Darüber hinaus war der Patient zwei Wochen vor der Behandlung mit Cidofovir aufgrund eines Nierenversagens dialysepflichtig. Nach dem Nachweis von Adenoviren im Stuhl und der daraus resultierenden Verdachtsdiagnose einer Adenovirus-Enteritis wurde dennoch eine Behandlung mit dem potenziell nephrotoxischem Cidofovir eingeleitet. Der Patient erhielt darüber hinaus Aciclovir, Caspofungin, Ciclosporin A, Teicoplanin, Meropenem, Ciprofloxacin, Esomeprazol, Paracetamol, Furosemid, Dopamin, Hydromorphon, Ondansetron, Theophyllin, Humaninsulin. Am Tag der Applikation war der Patient (weiblich) 12,9 Jahre alt und wog 50,00 kg bei einer Körpergröße von 157 cm. Die Nierenfunktion war mit einer GFR von 30,0 ml/min/ 1,73m² mittelgradig eingeschränkt. Die Bestimmung der GFR erfolgte auf der Grundlage einer CystatinC-Bestimmung und nicht durch die Messung des Serumkreatinins. Eine Dosis von 50 mg Cidofovir (dies entspricht 1,00 mg Cidofovir /kg Körpergewicht) wurde über den Zeitraum von 60 Minuten appliziert. Hieraus resultierte der im Folgenden dargestellte Konzentrationszeitverlauf von Cidofovir:

Tabelle 25. Gemessener Konzentrationszeitverlauf von Patient ID-Nr.10

Zeit [h] nach Beginn der Infusion	gemessene Konzentration [ng/ml]
1,05	3275
1,96	2370
2,98	2085
4,00	1920
6,00	1600
8,00	1320

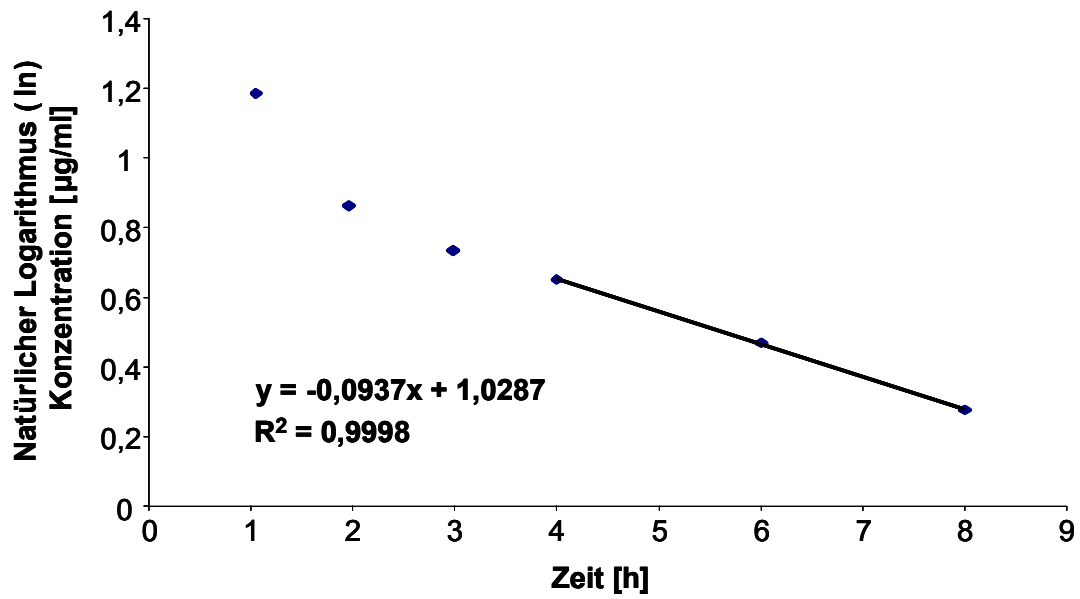


Abbildung 31. Bestimmung der Eliminationskonstanten bei Patient ID-Nr.10. Aus der Steigung von 0,0937 der linearen Regressionsgeraden durch die letzten drei Konzentrationspunkte resultiert eine Halbwertszeit von 7,40 h.

4.3. Ergebnisse der physiologie-basierten Simulationen virtueller Patienten

Neben der Analyse der zehn gemessenen Konzentrationszeitprofile erfolgte mithilfe des PBPK-Modells für Cidofovir die Simulation der individuellen Konzentrationszeitprofile. Für jeden virtuellen Patienten erfolgte die Skalierung der Clearance mithilfe des integrierten Clearance-Scaling-Moduls der PK-Sim[®] Software, wie in Kapitel 2.4.5 „Skalierung der Cidofovir-Clearance“ dargestellt. Da das PBPK-Modell auf der Grundlage der anthropometrischen Daten nur „gesunde“ Patienten simuliert, müssen pathologische Zustände, wie z.B. die Berücksichtigung des jeweiligen Nierenfunktionsstatus, manuell vorgenommen werden. Die erwachsenen Patienten, bei denen die zugrunde gelegte körperlernormalisierte Clearance von 138 ml/h/kg bestimmt wurde, wiesen eine normale Nierenfunktion auf. Die Creatinin-Clearance als Maß für die glomeruläre Filtrationsleistung betrug 106 ml/h/kg \pm 24,1 ml/h/kg (Cundy, 1999). Es wurde daher definiert, dass ab einem mittelgradigen Funktionsverlust der Niere (d.h. ein Unterschreiten der GFR unter 59 ml/min/1,73 m²) eine manuelle Anpassung der Cidofovir-Clearance erfolgen sollte, da sonst aufgrund der rein renalen Elimination des Arzneistoffes eine viel zu hohe Skalierung der Cidofovir-Clearance bei pädiatrischen Patienten mit Nierenfunktionseinschränkung erfolgen würde und die Simulation des individuellen Konzentrationszeitprofils daher unmöglich würde. Die Einteilung der Nierenfunktionsleistung anhand der glomerulären Filtrationsleistung erfolgte analog zu den Empfehlungen der US-amerikanischen Leitlinie zur Beurteilung der Nierenfunktion bei pädiatrischen Patienten (Kidney Disease Outcomes Quality Initiative) in die folgenden Stufen (Hogg et al., 2003):

- Stufe I : > 90 ml/min/1,73 m² bedeutet normaler oder erhöhte GFR
- Stufe II : 60-89 ml/min/1,73 m² bedeutet geringgradiger Funktionsverlust
- Stufe III: 30-59 ml/min/1,73 m² bedeutet mittelgradiger Funktionsverlust
- Stufe IV : 15-29 ml/min/1,73 m² bedeutet schwerer Funktionsverlust
- Stufe V : < 15 ml/min/1,73 m² bedeutet Nierenversagen.

Die Notwendigkeit für diese manuelle Anpassung wird bei der Betrachtung der gemessenen, dosisnormierten Exposition in Abhängigkeit zur glomerulären Filtrationsleistung sichtbar. Bei den drei Patienten mit mittelgradigem Nieren-Funktionsverlust (ID-Nr. 4, 7 und 10) steigt die dosisnormierte Exposition stark an. Ohne eine manuelle Anpassung würde bei diesen Patienten daher eine viel zu geringe simulierte Exposition resultieren.

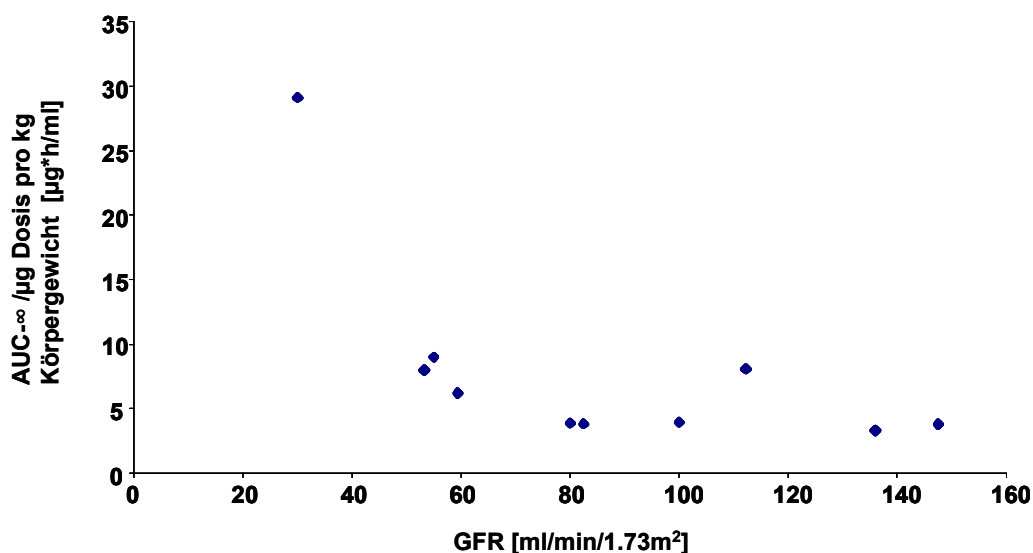


Abbildung 32. Dosisnormierte Exposition in Abhängigkeit von der glomerulären Filtrationsleistung. Um eine Vergleichbarkeit der resultierenden Exposition bei gegebener körperlagerungs-bezogener Dosis zu erzielen, wurde die AUC-∞ dosisnormiert (µg*h/ml) und in Abhängigkeit von der glomerulären Filtrationsleistung (ml/min/1.73 m²) aufgetragen.

Für die Simulation der individuellen Profile wurden die in den folgenden Tabellen aufgeführten Parameter berücksichtigt.

Tabelle 26. Übersicht über die Parameter für die Simulation der individuellen Patienten

ID Nr.	Geschlecht	Alter (Jahre)	Körpergewicht (kg)	Körpergröße (cm)	GFR (ml/min/ 1.73m ²)
1	weibl.	10,8	24,00	128	136,0
2	männl.	1,5	8,57	82	80,0
3	weibl.	0,6	8,00	66	59,4
4	männl.	16,0	71,00	180	55,0
5	weibl.	6,5	21,30	118	147,5
6	weibl.	2,3	13,00	78	82,5
7	weibl.	2,4	14,50	78	53,3
8	weibl.	8,3	20,50	131	100,0
9	männl.	9,3	30,00	152	111,2
10	weibl.	12,9	50,00	157	30,0

Anmerkung zur Tabelle: die Übersicht zeigt die für die individuelle Simulation erforderlichen Parameter Geschlecht, Alter, Körpergewicht und Körpergröße. Darüber hinaus ist die glomeruläre Filtrationsleistung (=GFR) aufgeführt, die zur Beurteilung der Nierenfunktion herangezogen wurde. Demnach weisen die Patienten ID-Nr. 4, 7 und 10 einen mittelgradigen Funktionsverlust der Nieren auf, Patient ID-Nr. 3 ist mit einer berechneten GFR von 59,4 ml/min/1.73m² ein Grenzfal.

Tabelle 27. Skalierung der Cidofovir-Clearance unter Berücksichtigung der Nierenfunktion

ID	Clearance Skalierung	Korrekturfaktor	resultierende Clearance
Nr.	(ml/h/kg)	(Niere)	(ml/h/kg)
1	200	keine Korrektur	200
2	230	keine Korrektur	230
3	200	keine Korrektur	200
4	160	0,55	88
5	220	keine Korrektur	220
6	240	keine Korrektur	240
7	240	0,5	120
8	210	keine Korrektur	210
9	200	keine Korrektur	200
10	180	0,3	54

Anmerkung zur Tabelle: bei drei Patienten (ID-Nr. 4, ID-Nr. 7 und ID-Nr. 10) wurden die Ergebnisse der Clearance-Skalierung des integrierten PK-Sim[®]-Moduls durch einen Korrekturfaktor manuell geändert, um die Nierenfunktionseinschränkung dieser Patienten zu berücksichtigen. Bei den anderen Patienten wurde keine Korrektur vorgenommen, da die Nierenfunktion nicht oder nur geringgradig eingeschränkt war (glomeruläre Filtrationsrate > 59ml/min/1,73m²). Patient ID-Nr. 3 ist mit einer berechneten GFR von 59,4 ml/min/1.73m² ein Grenzfall.

Die Auswertung der Simulationsergebnisse erfolgte analog zu dem im vorhergehenden Kapitel 4.2 „Ergebnisse der Studie zur Erforschung der klinischen Pharmakokinetik von CDV bei pädiatrischen Patienten“ für jeden individuellen Patienten ausführlich beschriebenen Vorgehen. Die Ergebnisse der Simulationen, d.h. die resultierenden Konzentrationen zu den entsprechenden Zeitpunkten der Blutentnahmen (insgesamt 58 Einzelkonzentrationen) und die resultierenden pharmakokinetischen Parameter sind daher an dieser Stelle nur tabellarisch aufgeführt.

Tabelle 28. Simulierte Cidofovir-Konzentrationen zu den Zeitpunkten der Blutentnahmen

ID Nr.	t 1 (h)	Konzentration (ng/ml)	t 2 (h)	Konzentration (ng/ml)	t 3 (h)	Konzentration (ng/ml)
1	1,08	9973	2	4112	3,17	1983
2	1,17	4589	2,17	2024	3,17	953
3	1,03	10977	2	4717	3,00	2816
4	1,25	3118	2,18	2070	3,23	1342
5	1,08	10354	2,05	4733	3,08	2292
6	1,08	7999	2,05	3241	2,98	1837
7	1,00	10411	2	5023	3,00	3540
8	1,00	12589	2,18	4320	3,17	2084
9	1,07	14469	2,17	7818	3,08	4947
10	1,05	3860	1,96	2882	2,98	2249
ID Nr.	t 4 (h)	Konzentration (ng/ml)	t 5 (h)	Konzentration (ng/ml)	t 6 (h)	Konzentration (ng/ml)
1	4,03	1091	6,08	288	8,25	87
2	4,08	490	6,08	127	k.A	k.A
3	4,00	1702	6,00	634	8,00	243
4	4,43	826	6,20	409	8,23	187
5	4,05	1180	6,00	329	7,95	104
6	4,00	1017	5,98	331	8,02	109
7	4,00	2515	6,00	1286	8,00	668
8	4,10	1069	k.A	k.A	8,15	83
9	5,13	1828	6,27	1075	7,82	535
10	4,00	1765	6,00	1110	8,00	707

Anmerkung zur Tabelle: die Tabelle zeigt die simulierten Konzentrationen zu den Zeitpunkten der jeweiligen Blutentnahmen bei den realen Patienten (Zeitpunkte t1 bis t6 gemäß dem Blutentnahmeprotokoll). Insgesamt sind 58 Konzentrationen aufgeführt. Für die Patienten ID-Nr. 2 (Zeitpunkt t6) und ID-Nr.8 (Zeitpunkt t5) sind keine simulierten Konzentrationen aufgeführt, da zu diesen Zeitpunkten bei den Patienten kein Blut gewonnen wurde. Auf der Grundlage dieser simulierten Konzentrationen wurden die resultierenden pharmakokinetischen Parameter durch eine nicht-kompartimentelle Analyse bestimmt.

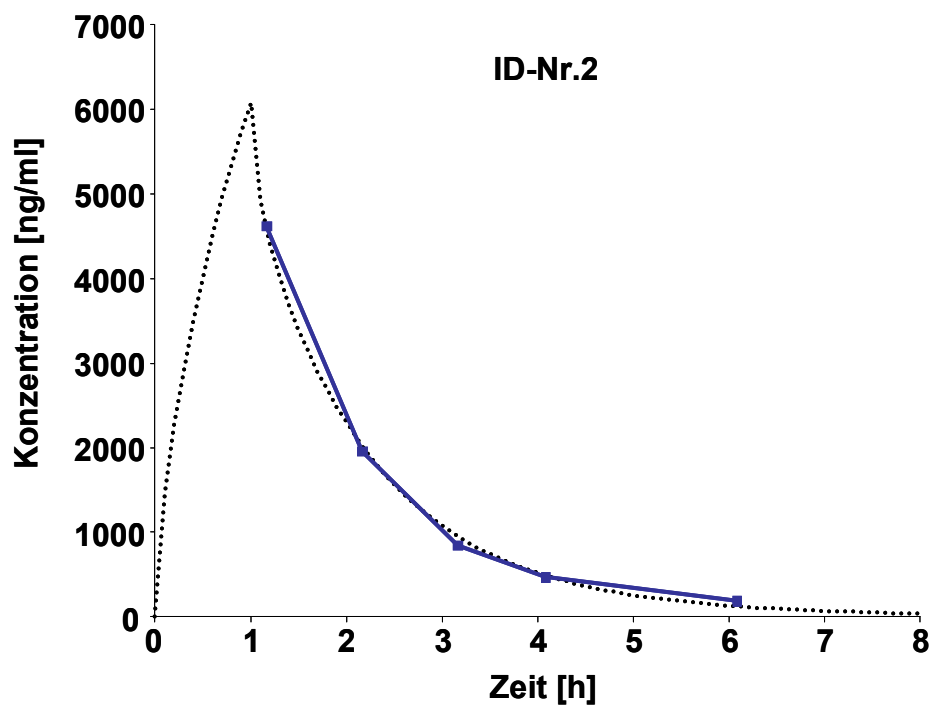
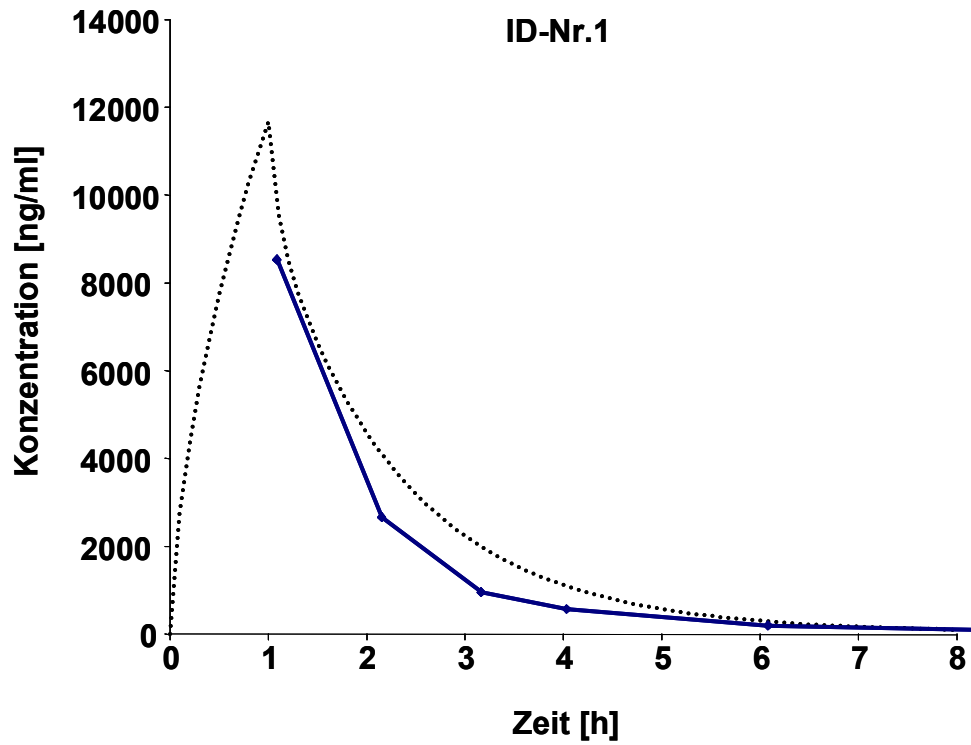
Aus den individuellen Simulationen resultierten die folgenden pharmakokinetischen Parameter: der Median der körpergewichtsnormalisierten Clearance bei den simulierten Patienten liegt bei 212 ml/h/kg, bei einer medianen Halbwertszeit $t_{1/2}$ von 1,34 h. Die für die Bestimmung der Halbwertszeit notwendige Bestimmung der Eliminationskonstante k_e erfolgte durch Auftragung des natürlichen Logarithmus der Konzentration gegen die Zeit und anschließender linearer Regression der letzten drei Konzentrationen. Das mediane Verteilungsvolumen V_d beträgt 375 ml/kg. Eine Übersicht über die simulierten pharmakokinetischen Parameter bei den Patienten ist in der folgenden Tabelle dargestellt.

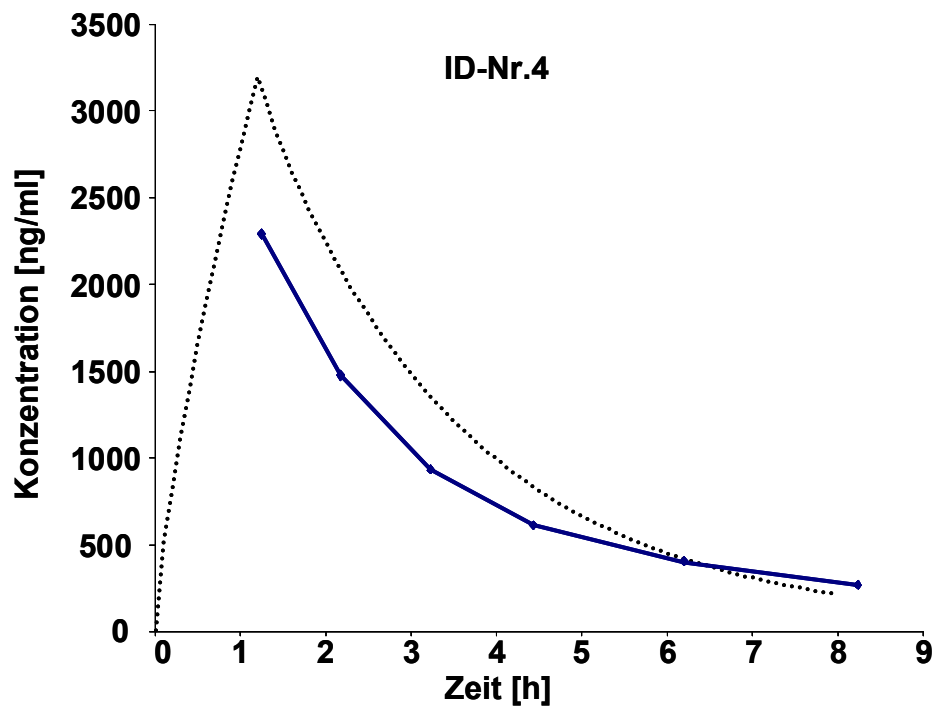
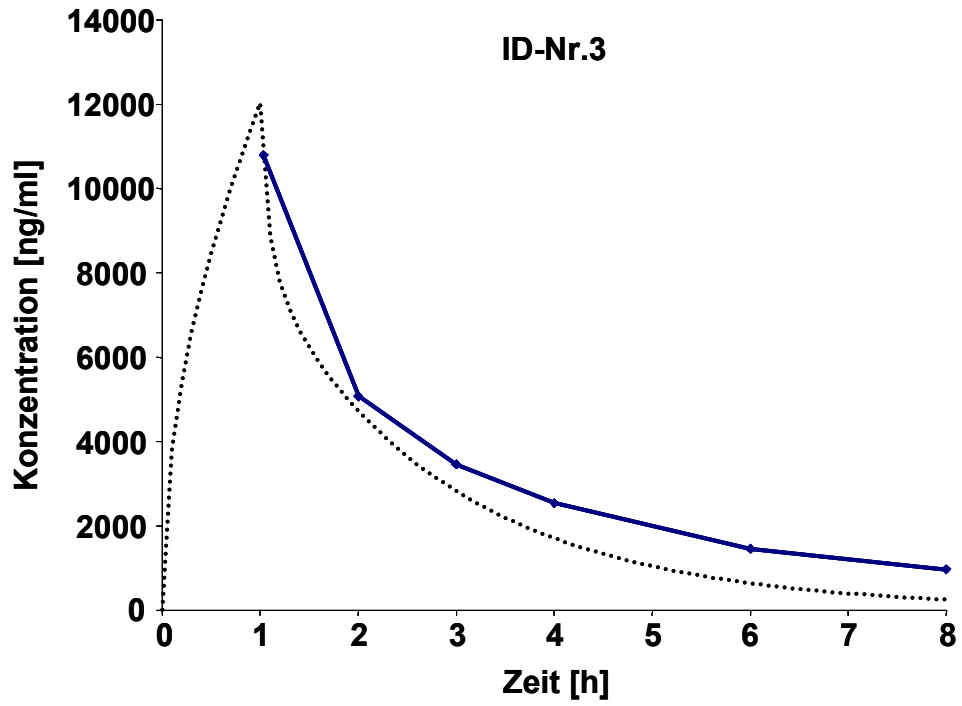
Tabelle 29. Übersicht über die simulierten pharmakokinetischen Parameter der Patienten

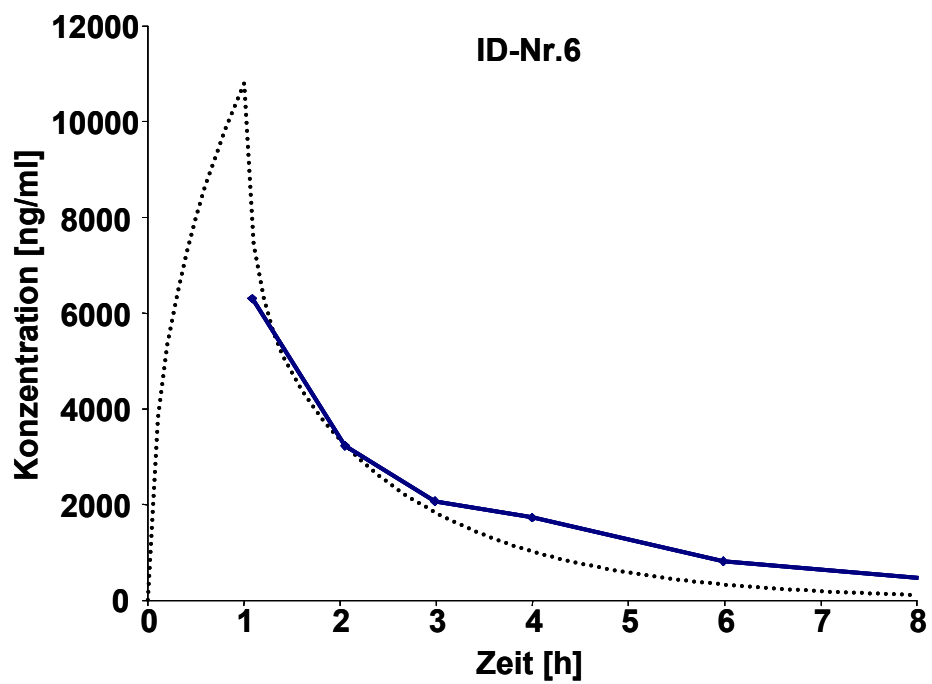
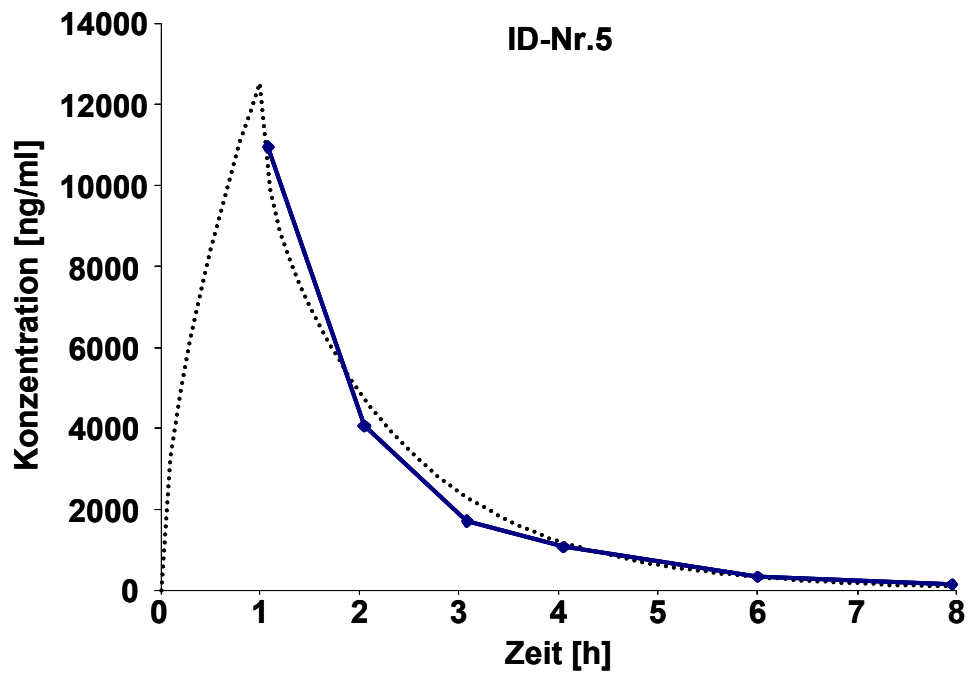
ID	Clearance	AUC-∞	ke	t 1/2	Vd
Nr.	(ml/h/kg)	($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$)	(1/h)	(h)	(ml/kg)
1	226	19,3	0,60	1,16	379
2	261	8,9	0,67	1,03	388
3	215	23,2	0,48	1,43	446
4	95	9,6	0,39	1,77	243
5	257	20,3	0,62	1,11	413
6	296	15,6	0,55	1,25	534
7	123	28,0	0,33	2,09	371
8	209	23,4	0,64	1,08	325
9	136	36,8	0,46	1,52	298
10	57	17,6	0,23	3,03	249
Median	212	19,8	0,52	1,34	375
Bereich	57-296	8,9-36,8	0,23-0,67	1,03-3,03	243-534

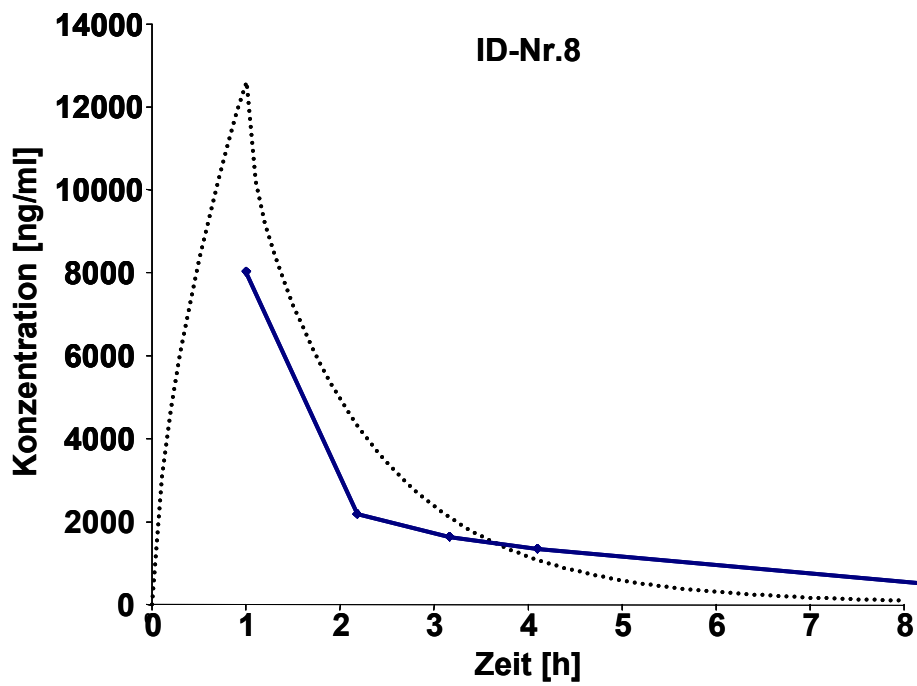
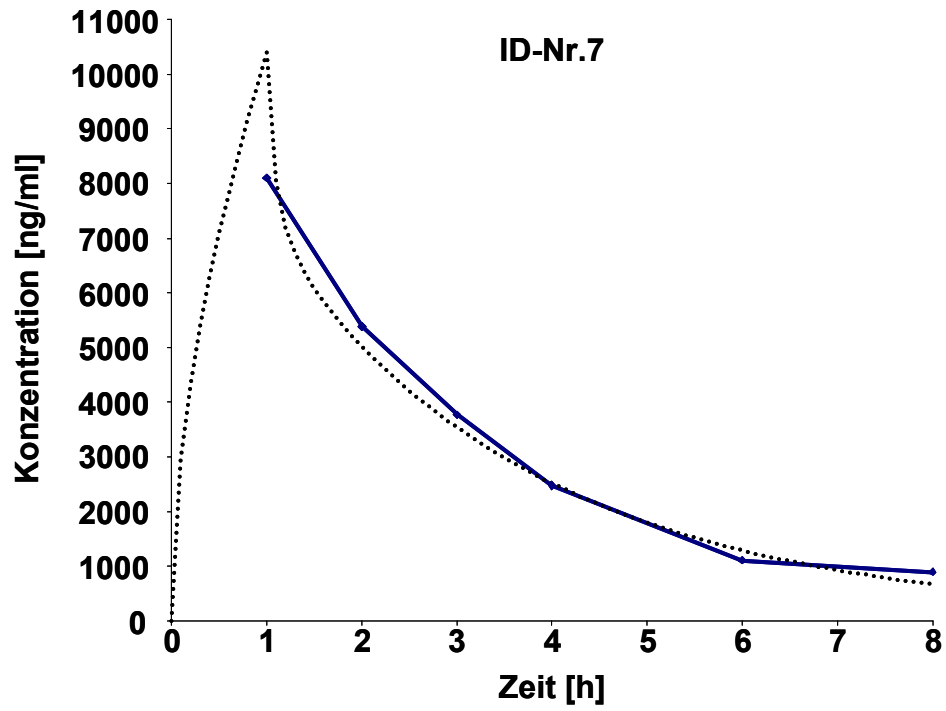
AUC = Fläche unter der Konzentrationszeitkurve („area under the curve“),
ke= Eliminationsgeschwindigkeitskonstante, t1/2 = Halbwertszeit,
Vd= Verteilungsvolumen („Volume of distribution“)

4.4. Vergleich der Simulations- und der Studienergebnisse









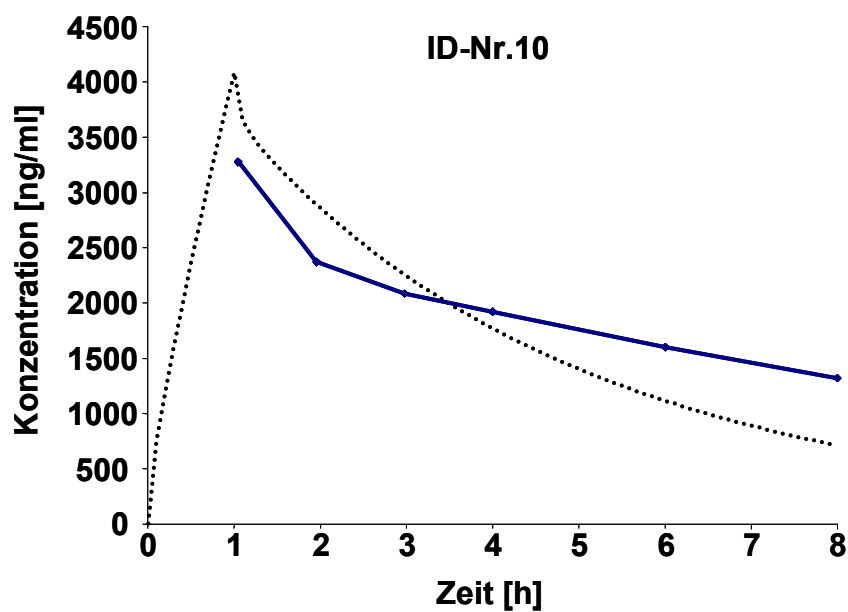
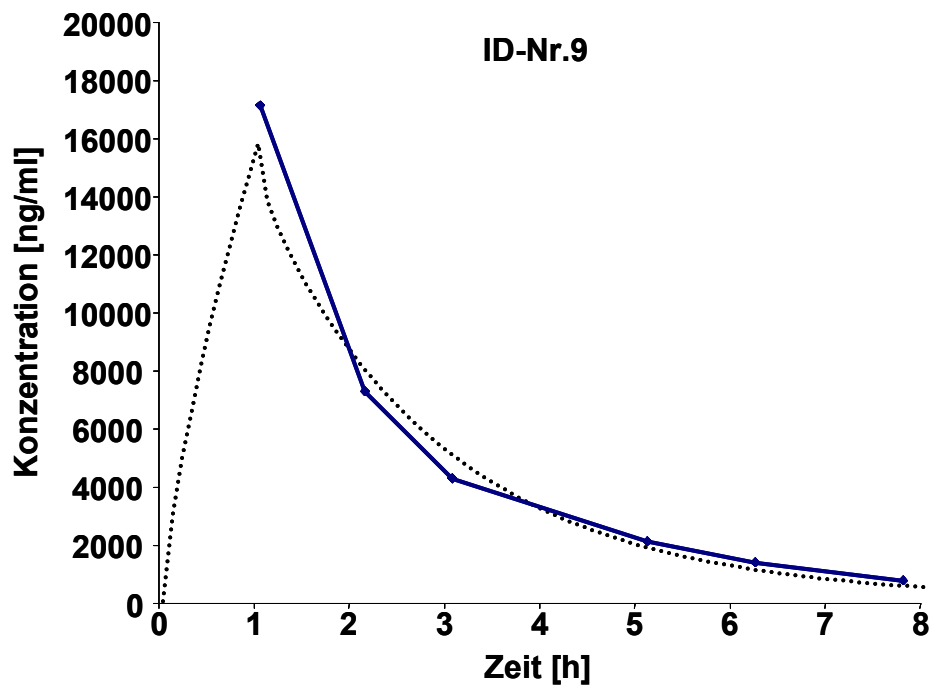


Abbildung 33. Vergleich der simulierten und der gemessenen Konzentrationszeitverläufe. Die Abbildung zeigt die zehn simulierten und gemessenen Konzentrationszeitprofile der Patienten. Der jeweils gepunktet dargestellte Konzentrationsverlauf resultiert aus der physiologie-basierten Simulation der virtuellen Patienten. Der Konzentrationsverlauf der realen Patienten basiert auf der linearen Interpolation der gemessenen Konzentrationspunkte (durchgezogene Linie).

Die pharmakokinetischen Parameter aus den Konzentrationszeitprofilen wurden durch eine nicht-kompartimentelle Analyse bestimmt. Dabei wurden zur Berechnung der $AUC_{-\infty}$ (für die gemessenen wie die simulierten Profile gleichermaßen) jeweils nur die zu den einzelnen Blutentnahmezeitpunkten korrespondierende Konzentration herangezogen. Insgesamt wurde zu 58 Zeitpunkten Blutproben gewonnen und die korrespondierende Cidofovir-Konzentration bestimmt. Den 58 gemessenen Konzentrationen stehen daher die jeweiligen simulierten Konzentrationen gegenüber.

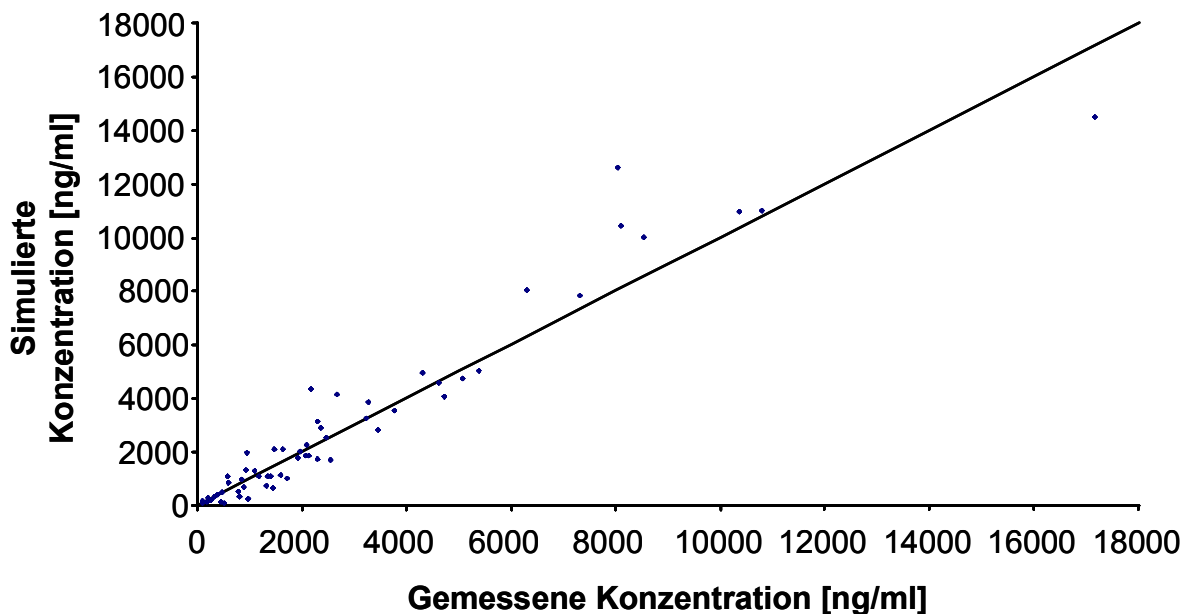


Abbildung 34. Vergleich der gemessenen und der simulierten Konzentrationen. Die Abbildung zeigt die Gegenüberstellung der insgesamt 58 einzelnen Konzentrationspunkte aus allen analysierten Profilen mit den dazugehörigen simulierten Konzentrationspunkten. Die diagonale Gerade stellt die Identitätslinie dar, die einzelnen Punkte die Konzentrationen, wobei auf der x-Achse die gemessene und auf der y-Achse die simulierte Konzentration aufgetragen wurde.

Bei der Betrachtung der höheren Konzentrationen (die Anfangskonzentrationen beim Zeitpunkt t_1) im Vergleich der gemessenen und der simulierten Konzentrationen ist auffällig, dass die Simulation den Trend zeigt, diese Konzentrationen zu überschätzen. Die Anfangskonzentrationen beim Zeitpunkt t_1 , also dem Zeitpunkt der Blutentnahme eine Stunde nach Beginn der Cidofovir-Infusion, fällt mit dem Ende der Infusion zusammen (die Infusionsdauer beträgt 60 min), daher werden zu diesem Zeitpunkt die maximalen Cidofovir-Konzentrationen (c_{max}) gemessen.

Bei dem Vergleich der gemessenen und der simulierten Halbwertszeit ist eine systematische Unterschätzung der simulierten Halbwertszeit zu erkennen: die mediane Abweichung beträgt 36%. Beim Vergleich der medianen Halbwertszeiten (gemessen 2,42 h gegenüber 1,34 h simuliert) resultiert eine Abweichung von 45%.

Tabelle 30. Vergleich zwischen gemessener und simulierter Halbwertszeit

ID	t1/2 gemessen	t1/2 simuliert	Abweichung
Nr.	(h)	(h)	(%)
1	1,62	1,16	28
2	1,51	1,03	32
3	2,87	1,43	50
4	3,25	1,77	45
5	1,35	1,11	18
6	2,11	1,25	41
7	2,72	2,09	23
8	2,96	1,08	64
9	1,88	1,52	19
10	7,40	3,03	59
Median	2,42	1,34	36
Bereich	1,35-7,40	1,03-3,03	18-64

t1/2= Halbwertszeit

Ebenso ist eine systematische Unterschätzung des simulierten Verteilungsvolumens im Vergleich zu den gemessenen Werten zu erkennen: die mediane Abweichung beträgt 33%. Beim Vergleich der medianen Verteilungsvolumina (gemessen 541 ml/kg gegenüber 375 ml/kg) resultiert eine Abweichung von 31%.

Tabelle 31. Vergleich zwischen gemessenen und simulierten Verteilungsvolumen

ID	Vd gemessen	Vd simuliert	Abweichung
Nr.	(ml/kg)	(ml/kg)	(%)
1	709	379	47
2	560	388	31
3	669	446	33
4	521	243	53
5	514	413	20
6	799	534	33
7	491	371	24
8	1079	325	70
9	335	298	11
10	366	249	32
Median	541	375	33
Bereich	335-1079	243-534	11-70

Vd = Verteilungsvolumen („Volume of distribution“)

Der wichtigste pharmakokinetische Parameter für den Vergleich zwischen den ermittelten und den simulierten Ergebnissen ist jedoch die systemische Exposition der Patienten, da die Exposition zur Therapiesteuerung pädiatrischer Patienten herangezogen werden kann. Daher hängt der Wert der Simulation entscheidend von der Möglichkeit ab, die individuelle AUC- ∞ präzise vorherzusagen.

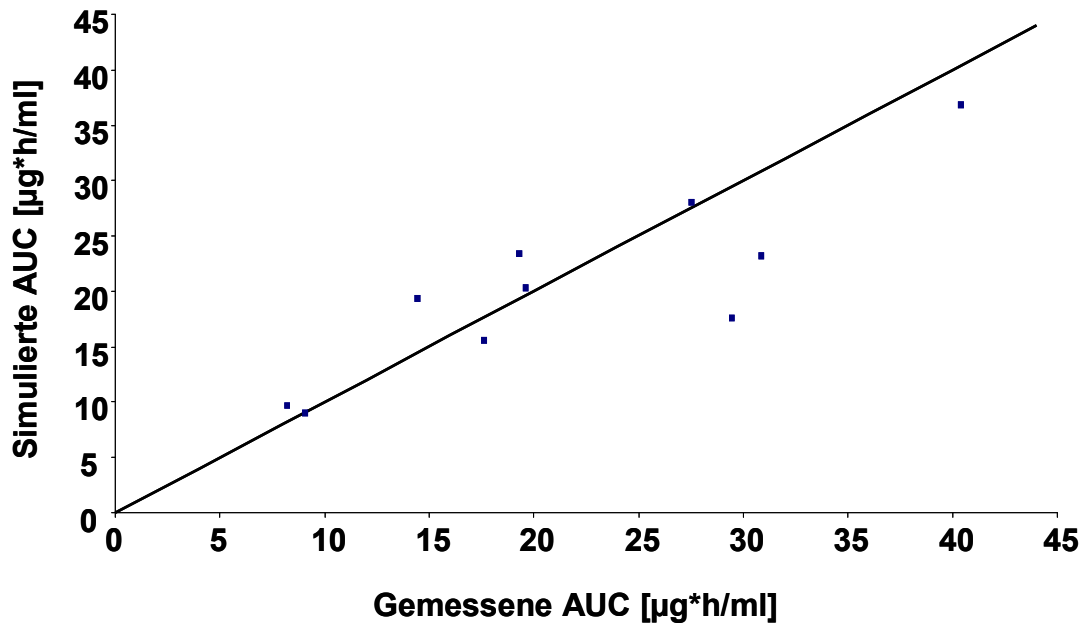


Abbildung 35. Vergleich der gemessenen und der simulierten AUCs. Die Abbildung zeigt die Gegenüberstellung der insgesamt 10 einzelnen AUCs aus allen analysierten Profilen mit den dazugehörigen simulierten AUCs. Die diagonale Gerade stellt die Identitätslinie dar, die einzelnen Punkte die AUCs, wobei auf der x-Achse die gemessene und auf der y-Achse die simulierte AUC aufgetragen wurde.

Bei der Betrachtung der gemessenen und der simulierten AUCs ist eine zufällige Verteilung um die Identitätslinie zu sehen, eine systematische Abweichung ist hingegen nicht erkennbar. Dabei beträgt die mediane Abweichung zwischen gemessener und simulierter AUC 14 %. In der folgenden Tabelle sind die entsprechenden Ausgangswerte dargestellt.

Tabelle 32. Abweichung zwischen gemessener und simulierter AUC

ID	AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$) gemessen	AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$) simuliert	Abweichung (%)
1	14,5	19,3	34
2	9,1	8,9	2
3	30,9	23,2	25
4	8,2	9,6	17
5	19,6	20,3	3
6	17,6	15,6	12
7	27,6	28,0	1
8	19,3	23,4	21
9	40,4	36,8	9
10	29,1	17,6	40
Median	19,5	19,8	14
Bereich	8,2-40,4	8,9-36,8	1-40

AUC = Fläche unter der Konzentrationszeitkurve („area under the curve“)

Auf die gleiche Art und Weise wie bei der AUC wurden die gemessenen und simulierten Clearances dargestellt. Von den zehn Punkten befinden sich zwei Punkte nahezu auf der Identitätslinie, vier darüber und vier darunter. Eine systematische Abweichung ist nicht erkennbar.

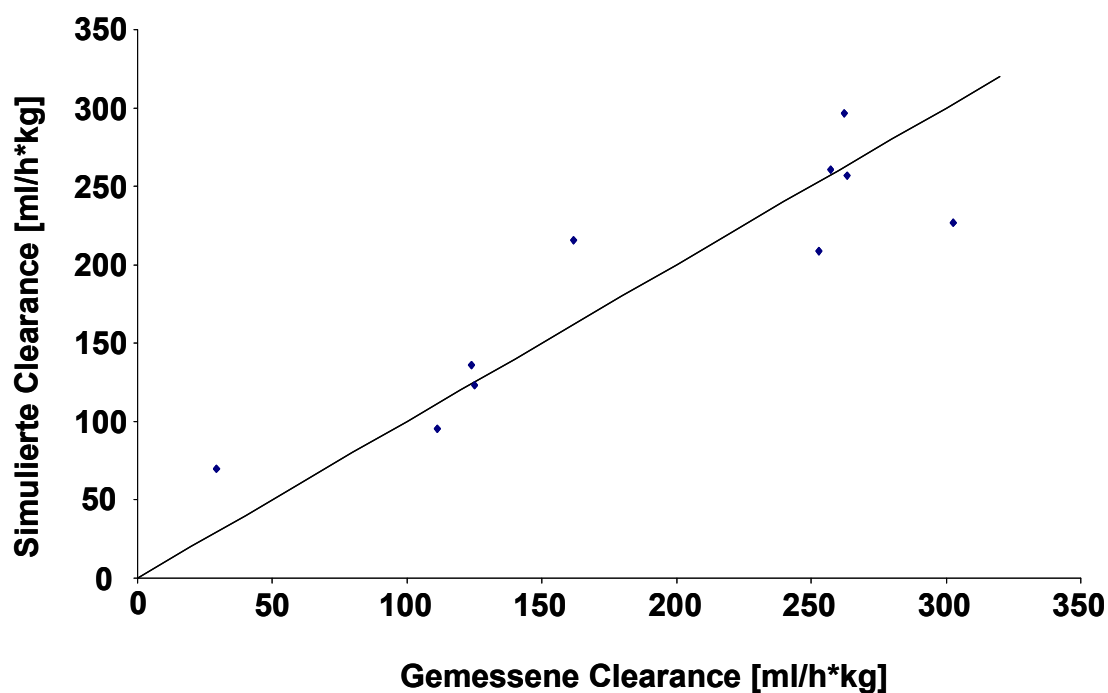


Abbildung 36. Vergleich der gemessenen und der simulierten Clearances. Die Abbildung zeigt die Gegenüberstellung der insgesamt 10 einzelnen Clearances aus allen analysierten Profilen mit den dazugehörigen simulierten Clearances. Die diagonale Gerade stellt die Identitätslinie dar, die einzelnen Punkte die Clearances, wobei auf der x-Achse die gemessene und auf der y-Achse die simulierte Clearance aufgetragen wurde.

Die mediane Abweichung zwischen gemessener und simulierter Clearance beträgt 14 %. Erwartungsgemäß sind die medianen Abweichungen zwischen gemessener und simulierter AUC (14%) bzw. zwischen gemessener und simulierter Clearance (14%) vergleichbar, da die Berechnung der Clearance auf der Grundlage der AUC erfolgt. In der folgenden Tabelle sind die entsprechenden Ausgangswerte dargestellt.

Tabelle 33. Abweichung zwischen gemessener und simulierter Clearance

ID	CI (ml/h/kg) gemessen	CI (ml/h/kg) simuliert	Abweichung (%)
1	303	226	25
2	257	261	2
3	162	215	33
4	111	95	15
5	263	257	2
6	262	296	13
7	125	123	2
8	253	209	17
9	124	136	10
10	34	57	66
Median	207	212	14
Bereich	34-303	57-296	2-66

CI= Clearance

Die Bedeutung der systemischen Exposition als Parameter zur Therapiesteuerung wird durch den Vergleich der bei den Patienten gemessenen und der bei Erwachsenen erwarteten systemischen Exposition deutlich. Da die untersuchten Patienten unterschiedliche körperlernormierte Dosen von Cidofovir erhalten haben, wurde die bei Erwachsenen nach Applikation von 5 mg Cidofovir/kg Körpergewicht erwartete systemische Exposition von 40,8 µg*h/ml auf die Dosis der Patienten normiert (Cundy, 1999).

Tabelle 34. Vergleich zwischen gemessener und erwarteter systemischer Exposition

ID Nr.	AUC-∞ (µg*h/ml)	dosis-normierte AUC bei Erw. (µg*h/ml)	(%) der dosis-normierten AUC bei Erw.
1	14,5	35,8	40
2	9,1	16,6	55
3	30,9	40,8	76
4	8,2	7,5	109
5	19,6	42,1	47
6	17,6	37,8	47
7	27,6	28,1	98
8	19,3	40,0	48
9	40,4	40,8	99
10	29,1	8,2	357

AUC = Fläche unter der Konzentrationszeitkurve („area under the curve“)

Bei drei Patienten (ID-Nr. 4, 7 und 9) entsprach die gemessene der erwarteten systemischen Exposition, daher ist in diesen Fällen von einer äqui-effektiven Dosierung im Vergleich zu Erwachsenen auszugehen. In sechs Fällen war die gemessene systemische Exposition deutlich kleiner als die bei Erwachsenen erwartete. In diesen Fällen ist eine Dosisintensivierung für eine äqui-effektive Dosierung erforderlich. Bei Patient ID-Nr. 3 entsprach die gemessene systemische Exposition 76% der erwarteten. Bei den Patienten ID-Nr. 1, 2, 5, 6 und 8 wäre sogar eine Verdoppelung der körpergewichtsnormalisierten Dosis erforderlich, da hier die gemessenen Expositionen nahezu nur der Hälfte der Erwachsenenexposition entsprechen (von 40 bis 55%).

Eine genau umgekehrte Situation liegt bei Patient ID-Nr. 10 vor: hier übersteigt die gemessene Exposition den erwarteten Wert bei Erwachsenen um über 350%. Um bei diesen Patienten eine vergleichbare Exposition wie bei Erwachsenen zu erzielen, muss die gegebene Dosis daher auf ein Drittel der Ausgangsdosis reduziert werden.

Um abschließend die Fragestellung, ob die Dosierung von Cidofovir für pädiatrische Patienten auf der Grundlage einer physiologie-basierten Simulation einer linearen Extrapolation der Dosis auf der Grundlage von Erwachsenenwerten überlegen ist, beantworten zu können, wurden zum einen die Differenz zwischen der gemessenen Clearance und der skalierten Clearance (also dem Input-Parameter für die Simulation) und zum anderen die Differenz zwischen der gemessenen Clearance und der Clearance auf der Grundlage einer linearen Extrapolation aufgetragen. An dieser Stelle muss noch angemerkt werden, dass sich die hier aufgeführte simulierte Clearance von der skalierten Clearance (erstellt mithilfe des Clearance-Scaling-Moduls des PK-Sim[®]-Programmes) unterscheidet. Um eine Vergleichbarkeit zwischen den gemessenen und den simulierten Ergebnissen zu erzielen, wurde die Berechnung in beiden Fällen mithilfe einer nicht-kompartimentellen Analyse durchgeführt, wobei zur Berechnung der $AUC_{0-t_{last}}$ bis zu sechs Konzentrationspunkte zur Verfügung standen. Die so erhaltenen Trapeze bilden daher relativ grob den kontinuierlich simulierten Verlauf der Konzentrationen ab. Außerdem fließt in die Bestimmung der $AUC_{last-\infty}$ noch die durch lineare Regression erhaltene Eliminationskonstante k_e in die Berechnung der $AUC_{0-\infty}$ mit ein. Diese methodenbedingten Fehler bedingen, dass es zu Abweichungen zwischen der skalierten Clearance (als sog. Inputparameter) und der aus den Simulationen bestimmten Clearance (also der „simulierten“ Clearance) kommt.

Tabelle 35. Vergleich von linearer Extrapolation und physiologie-basierter Skalierung der Cidofovir-Clearance

a) Differenz zwischen der physiologie-basierten Skalierung der Clearance und der gemessenen Clearance

ID Nr.	Clearance gemessen (ml/h/kg)	physiologie-basierte	
		Skalierung der Clearance (ml/h/kg)	absolute Differenz (ml/h/kg)
1	303	200	103
2	257	230	27
3	162	200	38
4	111	88	23
5	263	220	43
6	262	240	22
7	125	120	5
8	253	210	43
9	124	200	76
10	34	54	20
Median	207	200	33
Bereich	34-303	54-240	5-103

b) Differenz zwischen der linearen Extrapolation und der gemessenen Clearance

ID Nr.	Clearance gemessen (ml/h/kg)	Vorhersage der Clearance basierend auf linearer	
		Extrapolation (ml/h/kg)	absolute Differenz (ml/h/kg)
1	303	138	165
2	257	154	103
3	162	138	24
4	111	138	27
5	263	138	125
6	262	138	124
7	125	138	13
8	253	138	115
9	124	138	14
10	34	138	104
Median	207	138	103
Bereich	34-303	138-154	13-165

Anmerkung zu den Tabellen: die Tabellen a) und b) zeigen jeweils die absoluten Differenzen zwischen der gemessenen Clearance und der vorhergesagten Clearance. Tabelle a) zeigt dabei die Differenz zwischen der physiologie-basierten Skalierung der Clearance und der gemessenen Clearance. Tabelle b) zeigt die Differenz zwischen der Vorhersage der Clearance auf der Grundlage einer linearen Extrapolation von Erwachsenen (Literaturwerte) und der gemessenen Clearance. Ausgehend von diesen Differenzen kann ein statistischer Vergleich der medianen Differenzen zwischen der physiologie-basierten Skalierung und der auf einer linearen Extrapolation basierenden Clearancevorhersage mit dem Wilcoxon-Rangsummentest durchgeführt werden.

Die mediane Differenz zwischen der gemessenen und der physiologie-basierten Skalierung der Clearance beträgt 33 ml/h/kg (Mittelwert 40 ml/h/kg) mit einer Standardabweichung von 29. Im Vergleich hierzu beträgt die mediane Differenz zwischen der gemessenen und der auf einer linearen Extrapolation basierenden Vorhersage der Clearance 103 ml/h/kg (Mittelwert 81 ml/h/kg) mit einer Standardabweichung von 56. Die mediane Abweichung bei der Bestimmung der Cidofovir-Clearance bei pädiatrischen Patienten lässt sich durch den Einsatz der physiologie-basierten Simulation um 66% (bei Betrachtung der medianen Differenzen) reduzieren. Trotz der kleinen Studienpopulation mit nur zehn ausgewerteten Profilen ergibt sich ein statistisch nachweisbarer Unterschied zwischen der physiologie-basierten Skalierung und der linearen Extrapolation (Signifikanzniveau $p=0,047$; der Wilcoxon-Rangsummentest wurde ausgeführt mit dem Statistikprogramm SPSS Version 12.0). Ein statistisch signifikanter Unterschied wurde angenommen, wenn ein Signifikanzniveau $p < 0,05$ aus dem statistischen Test resultierte. Eine Abbildung zum Wilcoxon-Rangsummentest ist im Folgenden dargestellt.

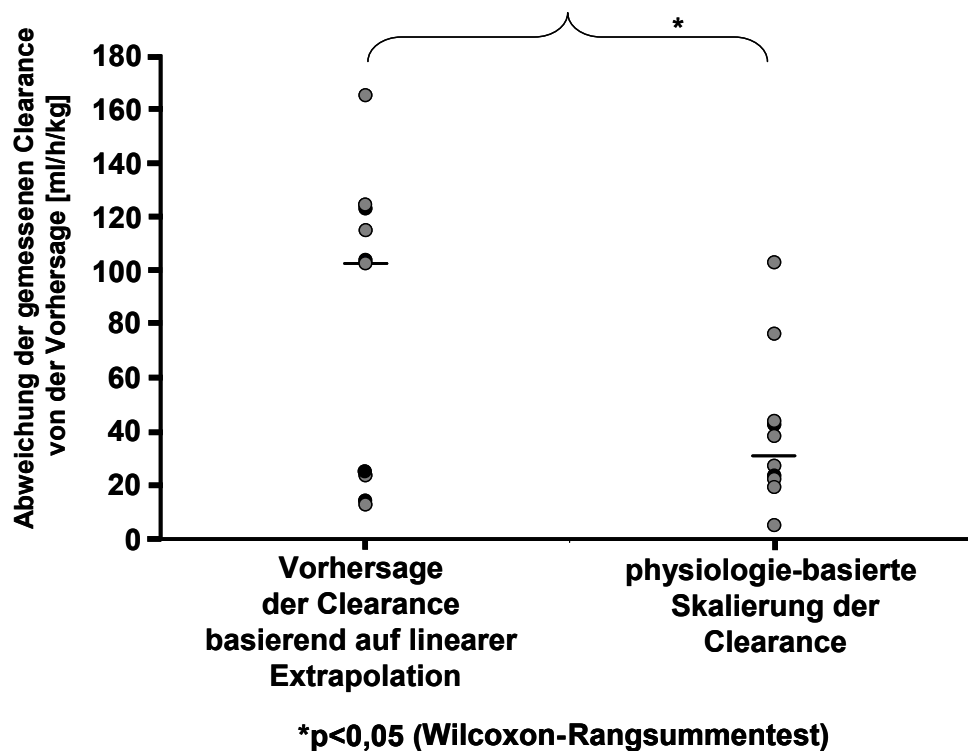


Abbildung 37. Darstellung zum Wilcoxon-Rangsummentest zur Differenz der Clearances. Die Abbildung zeigt die Abweichungen der gemessenen Clearance von der jeweils vorhergesagten Clearance. Bei der Vorhersage auf der Grundlage der linearen Extrapolation weichen die Patienten ID-Nr. 3, 4, 7 und 9 am geringsten von der Vorhersage ab, wobei die Patienten ID-Nr. 4 und 7 einen mittelgradigen Funktionsverlust der Nieren aufweisen. Patient ID-Nr. 3 ist mit einer berechneten GFR von $59,4 \text{ ml/min/1.73m}^2$ ein Grenzfall. Patient ID-Nr. 9 weicht trotz einer normalen Nierenfunktion nur gering von der Vorhersage ab. Die größte Abweichung von der Vorhersage zeigt Patient ID-Nr. 1 bei dem mit $136 \text{ ml/min/1.73 m}^2$ eine erhöhte GFR vorliegt. In der physiologie-basierten Skalierung weichen die Patient ID-Nr. 1 und 9 am weitesten von der Vorhersage ab.

5. Diskussion

5.1. Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden die pharmakokinetischen Eigenschaften von Cidofovir bei pädiatrischen Patienten im Rahmen einer klinischen Studie untersucht. Die Grundlage hierfür war die Entwicklung und Validierung einer Quantifizierungsmethode für Cidofovir im Serum von Patienten. Um in Zukunft eine individuelle und kindgerechte Dosierung von Cidofovir zu ermöglichen, wurde begleitend zu der Studie ein physiologie-basiertes Modell für die Simulation der Pharmakokinetik von Cidofovir in dieser Patientenpopulation angewendet. Abschließend wurden die virtuellen und die realen Patienten miteinander verglichen, um die physiologie-basierte Simulation zu validieren. Auf diese Art und Weise konnten die drei zentralen Frage- und Aufgabenstellungen im Rahmen dieser Arbeit bearbeitet bzw. beantwortet werden:

1. Die entwickelte und nach FDA-Kriterien validierte HPLC-MS/MS-Methode zur Bestimmung der Cidofovir-Konzentration im humanen Serum ermöglicht eine genaue und präzise Bestimmung im Konzentrationsbereich von 78 bis 10000 ng/ml.
2. Die pharmakokinetischen Parameter (systemische Exposition, körperrgewichtsnormalisierte Clearance, Verteilungsvolumen und Halbwertszeit) von Cidofovir bei pädiatrischen Patienten wurden im Rahmen einer klinischen Studie untersucht. Von neun verschiedenen Patienten im Alter von 0,6 bis 16,0 Jahren wurden zehn Konzentrationszeitprofile mithilfe einer nicht-kompartimentellen Analyse untersucht. Hieraus resultierte eine mediane körperrgewichtsnormalisierte Clearance von 207 ml/h/kg, bei einer medianen Halbwertszeit $t_{1/2}$ von 2,42 h und einem medianen Verteilungsvolumen von 541 ml/kg.
3. Physiologie-basierte Simulationen mit virtuellen Kindern können zur Optimierung der antiviralen Pharmakotherapie beitragen, indem sie die für die Dosierung kritischen pharmakokinetischen Parameter individuell vorhersagen können. Die mediane Differenz zwischen der in der Studie beobachteten und der simulierten systemischen Exposition der Patienten beträgt 14%. Die Dosierung von Cidofovir für pädiatrische Patienten auf der Grundlage einer physiologie-basierten Simulation ist einer linearen Extrapolation der Dosis auf der Grundlage des Körpergewichtes statistisch signifikant ($p= 0,047$) überlegen.

5.2. Entwicklung und Anwendung einer HPLC-MS/MS-Methode

Die Anzahl der applizierten Arzneistoffe bei den untersuchten Patienten reichte von drei (bei Patient ID-Nr. 1) bis zu vierzehn (bei den Patienten ID-Nr. 4 und 10.) Pharmaka zusätzlich zur Cidofovir- und Probenecid-Gabe. In Anbetracht dieser ausgeprägten Polymedikation der Patienten war die Entwicklung einer hochselektiven Analysenmethode, die analytische Interferenzen mit ko-administrierten Pharmaka unwahrscheinlich werden lässt, ein wesentlicher Baustein für die Durchführung der klinischen Studie. Die Entwicklung einer HPLC-MS/MS-Methode zur Detektion von Cidofovir im humanen Serum war aufgrund der physiko-chemischen Eigenschaften des Analyten (Cidofovir ist ein niedermolekulares und polares Nucleotidanalogen) und aufgrund der methodologischen Eigenschaft der Tandemmassenspektrometrie hochselektive Analysen aus einer komplexen Matrix zu ermöglichen nahe liegend. Für die Quantifizierung im Rahmen der Methode wurde 9-((2-phosphonylmethoxy)ethyl)guanin (PMEG) als interner Standard verwendet, da es aufgrund seiner physiko-chemischen Eigenschaften, insbesondere im Hinblick auf das Molekulargewicht und die Polarität, die durch die funktionelle Phosphonsäuregruppe hervorgerufen wird, dem Analyten ähnelte. Darüber hinaus erfüllte es die weiteren Anforderungen, die für einen internen Standard erforderlich sind:

- es war kein ursprünglicher Probenbestandteil
- es zeigte eine vergleichbare Stabilität wie der Analyt
- es konnte simultan mit dem Analyten bestimmt werden.

Die Besonderheit, dass der Analyt und der interne Standard ko-eluierende Peaks im Chromatogramm aufweisen, hat aufgrund der gewählten Methode der Tandemmassenspektrometrie keinen Einfluss auf die Genauigkeit der Messung. Die mögliche wechselseitige Beeinflussung des Analyten und des IS durch sog. „cross-talk“-Effekte wurde im Rahmen der Validierung der Methode untersucht und konnte ausgeschlossen werden. Diese „cross-talk“-Effekte waren aufgrund der großen Unterschiede im Masse/Ladungsverhältnis m/z 278.1 für Cidofovir und m/z 288.1 für PMEG, sowie für die charakteristischen Fragmentationen m/z 234.9 für Cidofovir und m/z 133.1 für PMEG auch nicht zu erwarten. Um valide Analysenergebnisse aus der klinischen Studie zu erhalten, wurde die entwickelte Quantifizierungsmethode gemäß den allgemein anerkannten Kriterien für die Validierung bioanalytischer Methoden der US-amerikanischen Arznei- und Lebensmittelbehörde FDA untersucht (FDA Food and Drug Administration, 2001).

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, dass die entwickelte Methode eine richtige und reproduzierbare Bestimmung von Cidofovir im menschlichen Serum ermöglicht.

Insbesondere die Untersuchungen zur intra- und inter-assay Präzision ergaben Abweichungen die über den ganzen Konzentrationsbereich kleiner als 7,8% (ausgedrückt als relative Standardabweichung [%]) waren. Die Abweichungen in der Richtigkeit der Methode (ausgedrückt als %-Abweichung von der nominalen Konzentration) lagen innerhalb von 12,1%. Als Validierungskriterium wurden Abweichungen von unter 15% für beide Parameter (Richtigkeit und Präzision) über den ganzen Konzentrationsbereich vorausgesetzt. Der kalibrierte Konzentrationsbereich der Methode liegt zwischen 78 bis 10000 ng/ml und damit im Bereich der erwarteten Konzentrationen bei den Patienten: von den insgesamt 58 Blutentnahmezeitpunkten waren nur drei Zeitpunkte (jeweils die Spitzenkonzentrationen) oberhalb des kalibrierten Konzentrationsbereiches: Zeitpunkt t1 bei Patienten ID-Nr.3 mit 10800 ng/ml, Zeitpunkt t1 bei Patient ID-Nr.5 mit 10950 ng/ml und Zeitpunkt t1 bei Patient ID-Nr.9 mit 17150 ng/ml.

Darüber hinaus wurden im Rahmen der Validierung die Wiederfindung des Analyten und des internen Standards von der Festphasenextraktion und die durch Serumbestandteile hervorgerufenen Matrixeffekte untersucht. Dabei muss gemäß den FDA-Validierungskriterien die Wiederfindung nicht 100% entsprechen, sie sollte jedoch über den gemessenen Konzentrationsbereich konstant sein. Die mittlere absolute Wiederfindung von Cidofovir betrug 62,7% bei einer Konzentration von 78 ng/ml CDV, 51,4% bei 1250 ng/ml CDV und 52,5% bei 10000 ng/ml CDV. Die mittlere absolute Wiederfindung für den IS betrug, bei der in der Methode verwendeten Konzentration von 10000 ng/ml PMEG 60,9%. Die Wiederfindung liegt mit einem Wert zwischen 50 und 60% auf einem akzeptablen Niveau, darüber hinaus ist die Wiederfindung bei den drei Konzentrationen vergleichbar hoch. Um eine mögliche Konzentrationsabhängigkeit der Matrixeffekte zu untersuchen, wurden niedrige, mittlere und hohe Konzentrationen mit Cidofovir untersucht. Die mittleren Matrixeffekte bei 78 ng/ml CDV entsprachen dabei -72,9%, bei 1250 ng/ml CDV -72,1% und bei 10000 ng/ml CDV -75,0%. Ebenso wurden die Matrixeffekte für den internen Standard untersucht, jedoch nur bei der Konzentration, die auch in der Methode zur Anwendung kam (der interne Standard wurde immer mit einer Konzentration von 10000 ng/ml verwendet). Der mittlere Matrixeffekt auf die Ionisation des IS betrug -69,7%. Auch die Matrixeffekte zeigten keine Konzentrationsabhängigkeit, darüber hinaus ist das Niveau der Matrixeffekte für den Analyten und den IS vergleichbar hoch. Daher ist trotz des stark ausgeprägten ionensuppressiven Matrixeffektes die Möglichkeit für eine Quantifizierung von Cidofovir nicht negativ beeinflusst.

Eine weitergehende Optimierung der Methode wäre jedoch erforderlich gewesen, wenn eine Bestimmung der Cidofovir-Konzentrationen über einen längeren Zeitraum als acht Stunden nach Beginn der Infusion hätte erfolgen sollen. Die niedrigste gemessene Kon-

zentration entsprach 94 ng/ml (bei Patient ID-Nr. 1, Blutentnahmezeitpunkt $t_6 = 8,25$ Stunden nach Beginn der Infusion), und damit nahe der unteren Grenze der Quantifizierung (LLOQ) von 78 ng/ml. Der stark ausgeprägte, ionensuppressive Effekt reduziert die Intensität der Ionisation des Analyten und des internen Standard wie oben aufgeführt um 70%. Eine Reduktion des Matrixeffektes würde daher direkt die Möglichkeit eröffnen, auch geringere Konzentration quantifizieren zu können. Eine denkbare Möglichkeit zur Reduktion der Matrixeffekte für zukünftige Methodenverbesserungen ist die Verringerung des eingesetzten Serumvolumens (in der Methode werden für eine Einzelanalyse 300 μ l Serum verwendet), da hierdurch auch die Konzentration der Matrixeffekt-induzierenden Serumbestandteile verringert würde. Die Reduktion des erforderliche Serumvolumen von 300 μ l (dies entspricht 600 μ l Vollblut) für eine Einzelanalyse würde auch dazu beitragen, dass die Belastung der Patienten durch das entnommene Blutvolumen weiter verringert wird. Dies ist von Bedeutung, da gerade bei kleinen Kindern das Volumen für Blutentnahmen limitiert ist. An dieser Stelle ist es aber wichtig zu erwähnen, dass auch das erforderliche Blutvolumen von 7,2 ml Vollblut (1,2 ml Vollblut zu sechs Blutentnahmezeitpunkten) für ein kinetisches Profil im Rahmen der durchgeführten Studie selbst für sehr kleine Kinder deutlich unter den Empfehlungen für das maximal zulässige Blutentnahmevervolumen liegt (University of Michigan, 2007). Demnach dürfen bei einem Kind mit einem Körpergewicht zwischen 6 und 10 kg max. 30 ml Vollblut entnommen werden. Bei dem jüngsten und gleichzeitig leichtesten Kind, das an der Studie teilgenommen hat (Patient ID-Nr.1, 0,6 Jahre alt und 8kg schwer), kann insgesamt ein Blutvolumen von etwa 690 ml angenommen werden (86 ml Blut pro kg Körpergewicht). In diesem Fall entspricht das über einen Zeitraum von 8 Stunden entnommene Blutvolumen nur etwas mehr als 1% des Gesamtblutvolumens.

Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Validierung war die Untersuchung der Stabilität des Analyten und des internen Standards. Die Untersuchungen der Stabilität nach 1-monatiger Lagerung bei 4°C der frisch hergestellten Stammlösungen ergab für den Analyten und den internen Standard eine ausreichende Stabilität: die Abweichungen der Peakflächen der frisch hergestellten Stammlösungen im Vergleich zu den Peakflächen der gleichen Stammlösung nach 1-monatiger Lagerung bei 4°C betragen -1,9% (für die Cidofovir-Stammlösung) und 0,1% (für die PMEG-Stammlösung), d.h. die Stammlösungen sind unter diesen Bedingungen stabil und können maximal für diese Zeitspanne zur Anwendung kommen. Dies war insofern von großer Bedeutung, da die beiden Reinstoffe nur sehr begrenzt zur Verfügung standen.

Beide Reinsubstanzen sind kommerziell nicht erhältlich und wurden von Gilead Inc., dem Originator von Cidofovir zur Verfügung gestellt. Für die extrahierten Proben wurde auch

nach 24-stündiger Lagerung bei Raumtemperatur eine ausreichende Stabilität nachgewiesen: die mittlere Abweichung der Quantifizierung reichte von 11,5% (für die geringste Konzentration) bis 0,9% (für die höchste Konzentration). Dieses Ergebnis hatte eine große praktische Bedeutung, da die Aufbereitung durch die manuelle Festphasenextraktion zeitintensiv ist. Auf diese Art und Weise konnten mehrere Einzelproben hintereinander extrahiert werden, um im Anschluss gesammelt analysiert zu werden, was den Ablauf der Analysen ökonomisch macht. Auch die Ergebnisse der durchgeführten Gefrier-Tau-Zyklen und der 1-monatigen Lagerung bei -20°C ergaben eine ausreichende Stabilität des Analyten, so dass gewonnene Proben nicht unmittelbar nach der Gewinnung analysiert werden mussten, sondern mit anderen Proben gesammelt analysiert werden konnten, was ebenfalls den Arbeitsablauf ökonomisiert. Abschließend kann man daher folgern, dass der Analyt und der IS gleichermaßen eine ausreichende Stabilität aufweisen, um mit der aufgeführten Methode analysiert werden zu können.

In einer abschließenden Bewertung kann man daher schließen, dass die entwickelte HPLC-MS/MS-Methode den Anforderungen entspricht, um im Rahmen einer klinischen Studie eingesetzt werden zu können. Darüber hinaus bietet sich die entwickelte Methode für eine Routineanalytik im Rahmen eines therapeutischen Drug Monitorings an. Mit einer technisch bedingten Laufzeit von sechs Minuten für eine aufbereitete Serumprobe (die Retentionszeit des Analyten und des IS beträgt zwar nur knapp eine Minute, jedoch wurde eine Gesamtlaufzeit von sechs Minuten für die Methode gewählt, um etwaige Verschleppungen zwischen zwei Analysen ausschließen zu können) ermöglicht die Methode innerhalb eines Arbeitstages von acht Stunden die Analyse von 80 Proben.

5.3. Klinische Pharmakokinetik von Cidofovir bei pädiatrischen Patienten

Bei der Angabe der pharmakokinetischen Parameter von Cidofovir in dieser Arbeit, aber auch bei den Vergleichen zwischen den Ergebnissen der Studie und der Simulation wird der Median und nicht das arithmetische Mittel dargestellt. Der Hintergrund hierfür ist das inhomogene Patientenkollektiv, das sich im Alter, in der Art und Schwere der Infektion, sowie im Besonderen in der Funktionsleistung der Niere extrem unterschiedet. So variierte die glomeruläre Filtrationsleistung bei den Patienten zwischen 30,0 bis zu 147,5 ml/min/1.73m², also von Nierengesunden bis hin zu Patienten mit einem mittelgradigen Funktionsverlust der Nieren. Die Verwendung des Median hat den Vorteil, dass die Angaben gegenüber extrem abweichenden Werten (sog. Ausreißer) robuster sind.

Die Bewertung der beobachteten pharmakokinetischen Parameter bei den Patienten muss vor dem Hintergrund erfolgen, dass sich das Patientenkollektiv im Hinblick auf das Alter, in der Art und Schwere der Infektion, sowie im Besonderen in der Funktionsleistung der Niere extrem unterschiedet. Diese extremen Unterschiede spiegeln sich in den gemessenen pharmakokinetischen Parametern wider: der Median der körpergewichtsnormalisierten Clearance bei den untersuchten Patienten liegt bei 207 ml/h/kg, wobei die geringste gemessene Clearance 34 ml/h/kg und die höchste 303 ml/h/kg beträgt. Die mediane Halbwertszeit $t_{1/2}$ beträgt 2,42 h, wobei die kürzeste gemessene Halbwertszeit 1,35 h und die längste Halbwertszeit 7,40 h beträgt. Das mediane Verteilungsvolumen V_d entspricht 541 ml/kg, wobei das kleinste gemessene Verteilungsvolumen 366 ml/kg und das größte Verteilungsvolumen 1079 ml/kg entspricht. Ein Vergleich der medianen Parameter mit den Durchschnittswerten erwachsener Patienten zeigt, dass sich die Halbwertszeit 2,2 ($\pm 0,5$) h der Erwachsenen (wobei die Standardabweichung in Klammern angegeben ist) auf einem vergleichbaren Niveau befinden. Im Gegensatz hierzu ist die bei den pädiatrischen Patienten bestimmte mediane Clearance und das mediane Verteilungsvolumen im Vergleich zu der Clearance mit 138 (± 36) ml/h/kg bzw. dem Verteilungsvolumen 388 (± 125) ml/kg von Erwachsenen erhöht (Cundy, 1999, Pfizer, Stand der Information 09/2004). Der beobachtete Unterschied von 40% im Vergleich des medianen Verteilungsvolumen der Patienten 541 ml/kg gegenüber dem mittleren Verteilungsvolumen 388 (± 125) ml/kg von Erwachsenen zeigt ein deutlich erhöhtes Verteilungsvolumen bei den pädiatrischen Patienten auf. Dieses Phänomen ist jedoch physiologisch erklärbar: pädiatrische Patienten weisen im Vergleich zu Erwachsenen (unter der Voraussetzung man betrachtet das körpergewichtsbezogene Verteilungsvolumen, wie in dem vorliegenden Fall) ein deutlich erhöhtes Verteilungsvolumen für hydrophile Arzneistoffe auf (Kearns et al., 2003).

Der relativ zu Erwachsenen höhere Körperwasseranteil und das größere Volumen an extrazellulärem Wasser führen dazu, dass sich für Cidofovir als hydrophilen Arzneistoff ein größeres Verteilungsvolumen bei pädiatrischen Patienten ergibt.

Dass die Patienten eine höhere körperlsgewichts-normalisierte Clearance bei einer mit Erwachsenen vergleichbaren Halbwertszeit aufweisen, ist auf den ersten Blick unverständlich, da eine höhere körperlsgewichts-normalisierte Clearance auch in einer verkürzten Halbwertszeit resultieren müsste. Dieses Ergebnis wird aber durch die extrem abweichenden Patienten ID-Nr. 4 und 10 mit einer gemessenen Halbwertszeit von 3,25 und 7,40h hervorgerufen. Die gemessenen Cidofovir-Clearances dieser Patienten betragen 34 bzw. 111 ml/h/kg und liegen damit deutlich unterhalb der anderen Patienten.

Die physiologische Erklärung hierfür ist ein mittelgradiger Funktionsverlust der Nieren, wobei die glomeruläre Filtrationsrate 30 bzw. 55 ml/min/1.73m² bei diesen Patienten beträgt. Da Cidofovir rein renal eliminiert wird, sind die gemessenen Clearances daher plausibel. Würde man diese beiden Patienten bei der Berechnung der medianen Halbwertszeit ausschließen, würde eine Halbwertszeit von 1,99 h resultieren. Dieses Ergebnis wäre dann mit einer im Median höheren körperlsgewichts-normalisierten Clearance in Einklang zu bringen.

Die großen gemessenen Unterschiede in der körperlsgewichts-normalisierten Clearance bei den Patienten erklären aber auch die individuellen Abweichungen zwischen der gemessenen und der bei Erwachsenen erwarteten systemischen Exposition bei den einzelnen Patienten, da sich die körperlsgewichts-normalisierte Clearance antiproportional zur systemischen Clearance verhält. Bei den drei Patienten ID-Nr. 4, 7 und 9 ergibt der Vergleich, dass die gemessene der erwarteten systemischen Exposition entspricht. In diesen drei Fällen ist von einer äqui-effektiven Dosierung im Vergleich zu Erwachsenen auszugehen. In sechs Fällen ist die gemessene systemische Exposition deutlich kleiner als die bei Erwachsenen erwartete. In diesen Fällen ist eine Dosisintensivierung für eine äqui-effektive Dosierung erforderlich. Bei Patient ID-Nr. 3 entspricht die gemessene systemische Exposition 76% der erwarteten, so dass eine Dosisintensivierung um ein Drittel erforderlich ist. Bei den Patienten ID-Nr. 1, 2, 5, 6 und 8 wäre sogar eine Verdoppelung der körperlsgewichts-normalisierten Dosis erforderlich, da hier die gemessenen Expositionen nahezu nur der Hälfte der Erwachsenenexposition entsprechen (von 40 bis 55%). Eine genau umgekehrte Situation liegt bei Patient ID-Nr. 10 vor: hier übersteigt die gemessene Exposition den erwarteten Wert bei Erwachsenen um über 350%. Um bei diesen Patienten eine äqui-effektive Dosierung zu erzielen, muss die gegebene Dosis daher auf ein Drittel der Ausgangsdosis reduziert werden.

Diese großen Unterschiede verdeutlichen zum einen die Bedeutung der systemischen Exposition als Parameter zur Therapiesteuerung und zum anderen auch die Notwendigkeit für eine individuelle a priori Simulation der Pharmakokinetik. Es ist weiterhin anzumerken, dass im Hinblick auf die potenzielle Nephrotoxizität von Cidofovir eine Dosisintensivierung nur dann klinisch begründet ist, wenn der antivirale Effekt bei dem individuellen Patienten als unzureichend angesehen wird. Es ist aufgrund der bei den Patienten ID-Nr. 1, 2, 5, 6 und 8 hohen körperlgegewichts-normalisierten Clearances (zwischen 253 und 303 ml/h/kg), die damit deutlich über der erwarteten Clearance von 138 ml/h/kg bei Erwachsenen liegen, auch von einer niedrigeren renalen Exposition auszugehen.

Hierfür existiert jedoch keine wissenschaftlich begründete Datenlage. Eine Messung der renalen Exposition im Rahmen einer Studie würde die Entnahme von Nierenbiopsaten erforderlich machen oder aber die Entwicklung einer Mikrodialysemethode, mit deren Hilfe man minimal-invasiv und kontinuierlich die Wirkstoffkonzentration im Organ detektieren könnte.

Aufgrund der Inhomogenität des Kollektivs und der geringen Anzahl an untersuchten Patienten kann ein statistischer Test, der mögliche Unterschiede zwischen Erwachsenen und pädiatrischen Patienten untersucht, nicht durchgeführt werden. Die Frage, ob die Pharmakokinetik von Cidofovir einer Altersabhängigkeit unterliegt, kann daher im Rahmen dieser Arbeit nicht beantwortet werden. Jedoch sollte der erkennbare Trend zu einer höheren körperlgegewichts-normalisierten Clearance bei pädiatrischen Patienten, der bei den Patienten ID-Nr. 1, 2, 5, 6 und 8 mit deutlich erhöhten körperlgegewichts-normalisierten Clearances zwischen 253 und 303 ml/h/kg und bei Patient ID-Nr. 3 mit einer Clearance von 162 ml/h/kg zu beobachten ist, in der Diskussion berücksichtigt werden. Das Alter dieser Patienten liegt zwischen 1,5 und 10,8 Jahren, darüber hinaus wiesen sie keinen mittelgradigen Funktionsverlust der Niere auf. Diese Werte stehen im Einklang mit der formalen Grundlage für die physiologie-basierte Skalierung der Clearance. Danach wird die Altersabhängigkeit der glomerulären Filtrationsrate, die maßgeblich die Clearance von Cidofovir beeinflusst, mit Hilfe der im Kapitel 2.4.5 „Skalierung der Cidofovir-Clearance“ vorgestellten Formel (Gleichung 14), die in das Clearance Scaling Modul der PK-Sim[®]-Software integriert ist, berechnet. Ausgehend von dieser Formel erreicht die körperlgegewichts-normalisierte glomeruläre Filtrationsleistung zwischen dem 2. und 4. Lebensjahr ein Maximum und geht im weiteren Verlauf der Entwicklung auf die Werte der Erwachsenen zurück (Hayton, 2000). Abweichend hiervon weisen die Patienten ID-Nr. 4 (111 ml/h/kg), 7 (125 ml/h/kg) und 10 (34 ml/h/kg) eine körperlgegewichts-normalisierte Clearance auf, die nicht größer als die bei Erwachsenen erwartete Clearance ist.

Bei diesen drei Patienten liegt jedoch mit einer glomerulären Filtrationsleistung unter 59 ml/min/1.73m² ein mittelgradiger Funktionsverlust der Niere vor, so dass diese Abweichungen erklärbar sind. Nur der 9,3 Jahre alte Patient ID-Nr.9 weicht mit einer beobachteten Clearance von 124 ml/h/kg und einer normalen Nierenfunktion von der physiologiebasierten Skalierung ab, indem er eine vergleichbare Clearance wie Erwachsene aufweist. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre die Annahme, dass die Nierenreifung und das Nierenwachstum bei diesem Patient schon weiter als dem Altersdurchschnitt entsprechend fortgeschritten sind und dass sich daher die körperlgegewichts-normalisierte Clearance dieses Patienten eher der Erwachsenen-clearance annähert.

Ein Kriterium, den Entwicklungszustand von Kindern zu beurteilen, ist die Anwendung von sogenannten Perzentilkurven, die die oberen, mittleren und unteren Grenzen der statistischen Normalverteilung eines Körpermaßes (Länge, Gewicht, Kopfumfang) für die unterschiedlichen Altersstufen aufzeigen. Mit einer Körpergröße von 152 cm liegt der Patient ID-Nr. 9 oberhalb der 97.Wachstumspertzenteile. Ausgehend von diesem Befund kann die Annahme einer überdurchschnittlichen Entwicklung der Niere, als eine mögliche Erklärung für die im Vergleich zu Erwachsenen nicht erhöhte körperlgegewichts-normalisierte Clearance, für diesen Patienten in Betracht gezogen werden.

Abschließend kann daher gefolgert werden, dass die beobachteten pharmakokinetischen Parameter bei den pädiatrischen Patienten die Hypothese einer Altersabhängigkeit der körperlgegewichts-normalisierten Cidofovir-Clearance unterstützen, jedoch nicht beweisen können. Unter der Berücksichtigung der individuellen Nierenfunktion, sowie des Entwicklungszustandes der Patienten, lassen sich die beobachteten Abweichungen von dieser Hypothese erklären. Darüber hinaus erscheint die Anwendung der formalen Grundlage des Clearance Scaling Moduls der PK-Sim[®]-Software, die für die physiologie-basierte Simulation der Pharmakokinetik verwendet wurde, im Hinblick auf die beobachteten Parameter plausibel. Eine weitere Schlussfolgerung ist aber auch, dass die Anwendung des Clearance Scaling Moduls nur unter der Berücksichtigung der individuellen Nierenfunktion erfolgen kann.

5.4. Physiologie-basierte Simulation virtueller Patienten

Für die physiologie-basierte Simulation der pharmakokinetischen Parameter von Cidofovir bei pädiatrischen Patienten mithilfe der Simulationssoftware PK-Sim[®] 4.0 (Bayer Technology Services) müssen physiologische und substanz-spezifische Parameter berücksichtigt werden. Bei der Berücksichtigung der physiologischen Parameter muss insbesondere eine altersabhängige Skalierung der körperrgewicht-normalisierten Clearance bei den Kindern erfolgen. Diese basiert auf dem Kenntnis der Pharmakokinetik (in diesem Fall einer bekannten in vivo Arzneistoffclearance) in einer erwachsenen Population und der Berücksichtigung der Wachstums- und Reifungsprozesse der Niere (Cundy, 1999, Edginton et al., 2006, Hayton, 2000). Mithilfe des Clearance Scaling Moduls der verwendeten PK-Sim[®]-Software lassen sich auf diesem Weg die physiologischen Besonderheiten der pädiatrischen Patienten vorhersagen. Die Begrenzung in der Anwendung des Clearance Scaling Moduls besteht darin, dass individuelle Nierenfunktionseinschränkungen nicht in der PK-Sim[®]-Software berücksichtigt werden können. Dies steht im Gegensatz zu der Schlussfolgerung aus Kapitel 5.3 „Klinische Pharmakokinetik von Cidofovir bei pädiatrischen Patienten“, die die Anwendung des Clearance Scaling Moduls nur unter der Berücksichtigung der individuellen Nierenfunktion als anwendbar betrachtet. Um trotzdem nierenfunktionseingeschränkte Patienten simulieren zu können, wurde daher die skalierte Clearance manuell korrigiert. Als Grundlage hierfür wurde die US-amerikanischen Leitlinie zur Beurteilung der Nierenfunktion bei pädiatrischen Patienten (Kidney Disease Outcomes Quality Initiative) (Hogg et al., 2003) verwendet.

Die Berücksichtigung der substanz-spezifischen Parameter erfolgt mithilfe des Ganzkörpermodells der PK-Sim[®]-Software, wobei die für die Berechnung der Verteilung des Arzneistoffes notwendigen Parameter (das Molekulargewicht, der Verteilungskoeffizient, die Säure- bzw. Basenkonstanten und die ungebundene Fraktion des Arzneistoffes) als sogenannte Input-Parameter in die Simulation einfließen. Auf diesem Weg konnten die individuell gemessenen Konzentrationszeitverläufe von Cidofovir durch virtuelle Patienten, die die gleichen physiologischen Parameter aufweisen wie die realen Patienten, simuliert werden. Aus den individuellen Simulationen resultierten die folgenden pharmakokinetischen Parameter: der Median der körperrgewicht-normalisierten Clearance bei den simulierten Patienten liegt bei 212 ml/h/kg, bei einer medianen Halbwertszeit $t_{1/2}$ von 1,34 h. Das mediane Verteilungsvolumen V_d beträgt 375 ml/kg.

Der Vergleich der realen mit den virtuellen Patienten zeigt, dass die simulierte mediane Halbwertszeit $t_{1/2}$ um 45% und das simulierte mediane Verteilungsvolumen V_d um 31% unterschätzt werden.

Die systematische Unterschätzung des simulierten Verteilungsvolumens beruht auf der systematischen Unterschätzung der simulierten Halbwertszeit, da die Halbwertszeit zur Berechnung (gemäß Gleichung 7) des Verteilungsvolumens herangezogen wurde. Eine offensichtliche, physiologische Erklärung für die systematische Unterschätzung der Halbwertszeit in den Simulationen ist nicht zu erkennen. Prinzipiell können Abweichungen zwischen den simulierten und den real gemessenen Parametern durch unpräzise Input-Parameter hervorgerufen werden. Insbesondere die Angaben der substanz-spezifischen Parameter, wie der Verteilungskoeffizient (logP-Wert) oder die ungebundene Fraktion des Arzneistoffs, können von den real vorliegenden Verhältnissen abweichen. So wurde der für die Simulation verwendete log P-Wert von $-3,9$ durch Quantitative Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (QSAR-Methoden) berechnet (National Center for Biotechnology Information, 2008). Würde die Angabe dieses Parameters in der Realität von der Berechnung abweichen, hätte dies unmittelbaren Einfluss auf die simulierte Verteilung und Elimination.

Neben diesen Abweichungen fällt bei der Betrachtung des Vergleichs der gemessenen und der simulierten Konzentrationen (Abbildung 35) auf, dass die Simulation den Trend zeigt, die Anfangskonzentrationen beim Zeitpunkt t_1 zu überschätzen. Die Anfangskonzentration beim Zeitpunkt t_1 entspricht dem Zeitpunkt der Blutentnahme eine Stunde nach Beginn der Cidofovir-Infusion und fällt mit dem Ende der Infusion zusammen, daher wird zu diesem Zeitpunkt die maximale Cidofovir-Konzentration c_{\max} gemessen. In dieser Phase ist die Änderung der Konzentrationen in Folge des exponentiellen Abfalls am größten. Als eine mögliche Erklärung kommen daher Abweichungen zwischen dem protokollierten und dem tatsächlichem Zeitpunkt der Blutentnahme in Frage. Ein ausgewähltes Beispiel hierfür ist der Patient ID-Nr. 6 bei dem die gemessene Spitzenkonzentration bei t_1 (protokolliert sind 1,08 h nach dem Beginn der Infusion) 6300 ng/ml beträgt, wohingegen die Simulation die Konzentration zu dem Zeitpunkt 1,08 h mit 7999 ng/ml berechnet. Wäre die Blutentnahme aber tatsächlich 1,2 h nach Beginn der Infusion erfolgt, hätte eine Konzentration von 6314 ng/ml in der Simulation resultiert. Das Beispiel soll aufzeigen, dass schon ein Unterschied von 0,12 h (7,2 min) in den protokollierten Zeitpunkten einen großen Einfluss auf die Genauigkeit der Simulation für den Zeitpunkt t_1 hat. Aufgrund des exponentiellen Abfalls der Konzentration sind spätere Zeitpunkte von diesem Problem weniger stark beeinflusst.

Der wichtigste pharmakokinetische Parameter für den Vergleich zwischen den ermittelten und den simulierten Ergebnissen ist jedoch die systemische Exposition der Patienten, da die Exposition zur Therapiesteuerung pädiatrischer Patienten herangezogen werden kann. Daher hängt der Wert der Simulation entscheidend von der Möglichkeit ab, die individuelle $AUC-\infty$ präzise vorherzusagen.

Die mediane Differenz zwischen der in der Studie beobachteten und der simulierten systemischen Exposition der Patienten beträgt 14%. Damit liegt die Genauigkeit der Simulation in einer vergleichbaren Größenordnung wie die maximale Abweichung der Richtigkeit der Cidofovir-Quantifizierungsmethode mit 12%. Analog hierzu verhält sich die mediane Differenz zwischen der in der Studie beobachteten und der simulierten körpertgewichtsnormierten Clearance mit 14%.

Die Beantwortung der Frage, bis zu welcher Abweichung eine Simulation noch als valide angesehen werden, kann an dieser Stelle nicht endgültig erfolgen, da bisher keine offiziellen Validierungsrichtlinien der Arzneimittelzulassungsbehörden existieren. In Anlehnung an die FDA-Kriterien zur Validierung bioanalytischer Methoden könnte man beispielsweise eine maximal tolerierbare Abweichung von 15% für die Richtigkeit der einzelnen simulierten pharmakokinetischen Parameter formulieren (FDA Food and Drug Administration, 2001). Auf der anderen Seite zeigt ein konkretes Beispiel aus der durchgeführten Untersuchung auf, dass Patienten selbst dann noch durch eine a priori Simulation der Pharmakokinetik profitieren können, wenn die Simulation eines Parameters um 40% abweicht. So übersteigt die gemessene systemische Exposition den erwarteten Wert bei Erwachsenen bei Patient ID-Nr. 10 um über 350%, wohingegen die Abweichung zwischen gemessener und simulierter systemischer Exposition 40% beträgt. Der Patient ID-Nr. 10 hätte trotz der großen Abweichung von der a priori Simulation seines Profils profitiert, da man seine Dosis besser als mit einer linearen Extrapolation hätte anpassen können. Die Genauigkeit der Vorhersage der systemischen Exposition muss also als zentrales Bewertungskriterium für die Validität der Simulation angenommen werden, um die Frage, ob physiologiebasierte Simulationen mit virtuellen Kindern zur Optimierung der antiviralen Pharmakotherapie beitragen, beantworten zu können. Von den zehn simulierten Profilen weichen die Patienten ID-Nr. 1, 3, 4, 8 und 10 um mehr als 14% (der medianen Abweichung) in der Vorhersage der systemischen Exposition ab. Daher müssen diese Patienten weitergehend diskutiert werden. Die Vorhersagen der systemischen Exposition bei den Patienten ID-Nr. 2, 5, 6, 7 und 9 weichen zwischen 1 und 12% von der gemessenen Exposition ab, so dass in diesen Fällen von einer validen Simulation ausgegangen werden kann.

Bei den abweichenden Patienten muss man zwischen einer Über- und einer Unterschätzung der simulierten systemischen Exposition unterscheiden. So wird bei den Patienten ID-Nr. 1, 4 und 8 die systemische Exposition überschätzt. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass die gemessene Clearance der Patienten größer als die simulierte ist. Im Fall des Patienten ID-Nr. 1 beträgt die gemessene Clearance 303 ml/h/kg und die simulierte 227 ml/h/kg. Hieraus resultiert eine Abweichung in der Vorhersage der AUC_{∞} von 34%.

Eine mögliche, physiologische Erklärung für diese Abweichung könnte in der glomerulären Filtrationsrate (GFR) des Patienten ID-Nr. 1 von 136 ml/min/1,73m² begründet sein. Dies bedeutet gemäß der Leitlinie „Kidney Disease Outcomes Quality Initiative“ eine normale oder erhöhte GFR (Hogg et al., 2003). Eine manuelle Korrektur der physiologiebasierten Skalierung der Clearance (wie im oberen Teil des Kapitels beschrieben) wurde aber nur für Patienten mit Nierenfunktionseinschränkung durchgeführt und nicht für Patienten mit einer überdurchschnittlich guten Nierenfunktion. In dem vorliegenden Fall hätte also die skalierte Clearance manuell vergrößert werden müssen, um die Vorhersage der AUC-∞ zu verbessern. Bei Patient ID-Nr. 4 beträgt die gemessene Clearance 111 ml/h/kg und die simulierte 95 ml/h/kg, wobei die mittelgradige Funktionseinschränkung der Niere (bei einer GFR von 55 ml/min/1,73m²) durch eine manuelle Korrektur der Clearance berücksichtigt wurde. In diesem Fall erfolgte also eine Überkorrektur der Clearance. Daher resultiert eine Abweichung in der Vorhersage der AUC-∞ um 17%. Der letzte Patient mit einer Überschätzung der simulierten AUC-∞ ist Patient ID-Nr. 8. Bei diesem Patienten beträgt die gemessene Clearance 253 ml/h/kg und die simulierte 209 ml/h/kg, hieraus ergibt sich eine Abweichung in der Vorhersage der AUC-∞ von 21%. Die GFR war mit 100 ml/min/1,73m² leicht erhöht. Auch diese Erhöhung der GFR wurde wie im Fall des Patienten ID-Nr. 1 nicht berücksichtigt. Inwiefern ein unmittelbar vor der Infusion aufgetretenes Erbrechen zusätzlich Einfluss auf die Kinetik genommen hat, kann nicht beurteilt werden.

Im Gegensatz hierzu wird bei den Patienten ID-Nr. 3 und 10 die systemische Exposition unterschätzt. Dies bedeutet, dass die gemessene Clearance kleiner als die simulierte ist. Bei Patient ID-Nr. 3 wird die systemische Exposition um 25% unterschätzt, die gemessene Clearance beträgt 162 ml/h/kg und die simulierte 215 ml/h/kg. Bei diesem Patienten lag mit einer GFR von 59 ml/min/1,73m² ein Grenzfall zwischen geringgradiger und mittelgradiger Funktionseinschränkung der Niere vor. Dieser Grenzfall wurde in der Simulation jedoch nicht berücksichtigt, da erst ab einer GFR unter 59 ml/min/1,73m² (also ab einer mittelgradigen Funktionseinschränkung der Niere) eine manuelle Korrektur der physiologiebasierten Skalierung der Clearance erfolgte. Im Fall des Patient ID-Nr. 10 wird die systemische Exposition um 40 % unterschätzt, wobei die gemessene Clearance 34 ml/h/kg und die simulierte 57 ml/h/kg beträgt. Auch bei diesem Patienten, von dem bekannt war, dass er aufgrund eines Nierenversagens bereits dialysepflichtig war, liegt mit einer GFR von 30 ml/min/1,73 m² ein Grenzfall vor, da ab einer GFR von 29 ml/min/1,73 m² von einem schweren Funktionsverlust der Niere auszugehen ist. Dies ist von Bedeutung da die resultierende AUC-∞ (wie in Abbildung 34 dargestellt) mit sinkender GFR überproportional stark ansteigt. Daher ist zu folgern, dass die durchgeführte manuelle

Korrektur der physiologie-basierten Skalierung der Clearance bei diesem Patienten unzureichend ist.

Bei der Betrachtung dieser abweichenden Patienten wird eine Limitation der Simulation erkennbar: in den Fällen, wo die Patienten nicht aufgrund der glomerulären Filtrationsrate einer normalen oder geringgradig eingeschränkten Nierenfunktion zugeordnet werden können, besteht die Möglichkeit für größere Abweichungen in der Vorhersage der systemischen Exposition. Dies beinhaltet sowohl die Unterschätzung der simulierten systemischen Exposition bei Nierenfunktionseinschränkungen, als auch die Überschätzung der simulierten systemischen Exposition bei einer erhöhten Nierenfunktion. Es ist jedoch anzumerken, dass trotz dieser großen Abweichungen zwischen gemessener und simulierter systemischer Exposition bei Patienten ID-Nr. 1, 3, 4, 8 und 10 die a priori Simulation einen therapeutischen Benefit für diese Patienten bedeuten würde. In Anbetracht der noch größeren Unterschiede zwischen der gemessenen und der bei Erwachsenen erwarteten systemischen Exposition würden die Dosisempfehlungen auf der Grundlage der a priori Simulation dazu beitragen, die Abweichungen von der erwarteten $AUC_{-\infty}$ bei Erwachsenen zu reduzieren. Ausgehend von der gemessenen $AUC_{-\infty}$ müsste bei den Patienten ID-Nr. 1, 3 und 4 eine Dosiserhöhung und bei den Patienten ID-Nr. 4 und 10 eine Dosisreduktion erfolgen. Würde man auf der Grundlage einer a priori Simulation (also ausgehend von der simulierten $AUC_{-\infty}$) die Therapie steuern, so würden qualitativ genau die gleichen Dosisanpassungen wie nach einer gemessenen $AUC_{-\infty}$ erfolgen.

Die Beantwortung der weitergehenden Frage, ob eine Therapiesteuerung auf der Grundlage einer a priori Simulation nicht nur qualitativ, sondern auch quantitativ besser ist, als eine lineare Extrapolation der Clearance, wurde durch den Vergleich der Differenz zwischen der gemessenen und der skalierten Clearance und der Differenz zwischen der gemessenen und der linearen Extrapolation der Clearance untersucht. Die mediane Differenz zwischen der gemessenen und der skalierten Clearance beträgt 33 ml/h/kg (Mittelwert 40 ml/h/kg) mit einer Standardabweichung von 29. Im Vergleich hierzu beträgt die mediane Differenz zwischen der gemessenen und der linearen Extrapolation der Clearance 103 ml/h/kg (Mittelwert 81 ml/h/kg) mit einer Standardabweichung von 56. Die Abweichung bei der Bestimmung der Cidofovir-Clearance bei pädiatrischen Patienten lässt sich durch den Einsatz der physiologie-basierten Simulation um über 60% (bei Betrachtung der medianen Differenzen) reduzieren. Trotz der kleinen Studienpopulation mit nur zehn ausgewerteten Profilen ergibt sich ein statistisch nachweisbarer Unterschied zwischen der Clearance Skalierung und der linearen Extrapolation (Signifikanzniveau $p=0,047$).

Abschließend lässt sich folgern, dass die physiologie-basierte Skalierung der Clearance einer linearen Extrapolation der Clearance statistisch signifikant überlegen ist. Die Vorhersage der systemischen Exposition mithilfe der physiologie-basierten Simulation trägt zu einer Optimierung der Pharmakotherapie bei, indem eine rationale Grundlage für eine a priori Dosisanpassungen bei pädiatrischen Patienten geschaffen wird. Die beobachteten Ungenauigkeiten dieser Vorhersagen unterstreichen allerdings die Notwendigkeit für ein therapiebegleitendes Monitoring der Pharmakokinetik.

6. Schlussfolgerungen und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit leisten einen wichtigen Beitrag, um die antivirale Therapie pädiatrischer Patienten mit dem Wirkstoff Cidofovir zu optimieren. Dabei unterstreicht die beobachtete hohe Variabilität der pharmakokinetischen Parameter von Cidofovir in dem untersuchten Kollektiv die Bedeutung physiologischer und pathophysiologischer Besonderheiten bei der Dosisfindung. In dem vorliegenden Beispiel des Cidofovirs müssen daher die Wachstums- und Reifungsprozesse der Niere (als physiologische Besonderheit) und insbesondere die bei den untersuchten Kindern teilweise eingeschränkte Nierenfunktion (als pathophysiologische Besonderheit) als Einflussfaktoren in eine individuelle Vorhersage einfließen. Mithilfe des physiologie-basierten Modells für Cidofovir können diese Besonderheiten berücksichtigt werden. Der Vergleich von realen und virtuellen Patienten zeigt, dass eine individuelle Vorhersage der systemischen Exposition möglich ist. Darüber hinaus ist die physiologie-basierte Skalierung der Clearance der bisher zur Anwendung kommenden linearen Extrapolation der Dosis statistisch signifikant überlegen.

Zukünftig kann daher durch eine a priori Simulation der erwarteten individuellen Pharmakokinetik von Cidofovir bei pädiatrischen Patienten im Vorhinein eine Dosis bestimmt werden, die zu einer vergleichbaren systemischen Exposition wie bei Erwachsenen und daher auch zu einer wahrscheinlich vergleichbaren antiviralen Effektivität führt. Das heißt, es können sub- oder supratherapeutische Dosierungen vermieden werden. Dies hat einen unmittelbaren Einfluss auf die Therapiesicherheit und –effektivität, da auf diesem Weg die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von toxischen Wirkungen durch Überdosierung oder die Entstehung viraler Resistenzen durch Unterdosierung reduziert wird.

Um mögliche Abweichungen in der Vorhersage im Nachhinein zu detektieren und um weitere erforderliche Dosisanpassungen vorzunehmen zu können, muss derzeit noch ein therapeutisches Drug Monitoring bei den Patienten durchgeführt werden. Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Methode für die Quantifizierung von Cidofovir im humanen Serum bietet sich für die hierfür erforderliche Routineanalytik an.

Der nächste Schritt in der Entwicklung ist, dass die Therapiesteuerung einer Cidofovirtherapie ausschließlich auf einer physiologie-basierten Simulation basieren wird. Hierfür sind eine weitergehende Verfeinerung des Simulationsmodells und die Identifizierung von weiteren Faktoren, womit insbesondere weitere pathophysiologische Besonderheiten bei den pädiatrischen Patienten gemeint sind, die die Genauigkeit der Simulation negativ beeinflussen können, erforderlich. Im Hinblick auf die pharmakokinetischen Eigenschaft von Cidofovir unverändert renal eliminiert zu werden, erscheint diese weitergehende Entwicklung für die Zukunft jedoch sehr realistisch, da sehr komplexe Faktoren, wie z.B. eine Al-

tersabhängigkeit der hepatischen Clearance oder die Induktion bzw. Inhibition hepatischer Enzyme durch ko-administrierte Pharmaka für die Simulation von Cidofovir nicht berücksichtigt werden müssen.

Ein weiterer, wichtiger Schritt ist die Entwicklung eines pharmakokinetischen-pharmakodynamischen Modells (PK-PD-Modell), mit dem man den pharmakodynamischen Effekt in Abhängigkeit von der Pharmakokinetik beschreiben kann. Durch die modulare Verknüpfung der beiden Modelle (also dem physiologie-basierten pharmakokinetischen Modell und einem pharmakodynamischen Modell) erhält man die Möglichkeit die antivirale in-vivo Aktivität nach gegebener Dosis des Wirkstoffes zu prognostizieren. Dies ist insbesondere im Hinblick auf virale Resistenzen von herausragender Bedeutung. In Abhängigkeit von der Sensitivität eines Virus könnte man auf diesem Weg die Dosis des Virustatikums im Vorhinein adaptieren.

Abschließend kann man folgern, dass der Einsatz von physiologie-basierten a priori Simulationen in Zukunft zum einen die Planung und Durchführung von neuen klinischen Studien mit pädiatrischen Patienten verbessern wird, indem z.B. optimale Blutentnahmezeitpunkte oder Dosierungsschemata bestimmt werden können. Zum anderen werden a priori Simulationen aber auch im klinischen Alltag helfen, die Therapie pädiatrischer Patienten auf eine rationale Grundlage zu stellen.

7. Zusammenfassung

7.1. Zusammenfassung

Obwohl bekannt ist, dass Reifungs- und Wachstumsprozesse die Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von Arzneistoffen bei pädiatrischen Patienten beeinflussen, existieren für eine Vielzahl von Therapien keine ausreichenden Untersuchungen. Die gesundheitspolitische Reaktion der Europäischen Union auf dieses Problem ist die Verpflichtung, pädiatrische Studien für die Neuzulassung von Arzneimitteln verpflichtend zu machen, um so die Grundvoraussetzung für eine sichere und effektive Therapie bei Kindern zu schaffen. Der Erfolg dieser pädiatrischen Studien wird jedoch wesentlich durch das optimale Ausnutzen des vorhandenen Vorwissens beeinflusst.

Der Einsatz von physiologie-basierten Simulationsmodellen stellt in diesem Zusammenhang einen modernen Ansatz dar, um a priori Vorhersagen über die Altersabhängigkeit der Pharmakokinetik zu machen. Derartige Simulationen bieten sich in besonderer Weise für die systematische Untersuchung antiviraler Therapien an, da hierfür die Kenntnis der Pharmakokinetik eine übergeordnete Bedeutung hat. Daher sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Möglichkeit untersucht werden, ob die antivirale Pharmakotherapie pädiatrischer Patienten mithilfe von Simulationen optimiert werden kann. Ausgehend von einer durchgeführten Fallstudie wurde das acyclische Nucleotidanalogen Cidofovir als klinisch relevanter Arzneistoff für diese Untersuchung ausgewählt.

In einem ersten Schritt wurde die Pharmakokinetik von Cidofovir bei pädiatrischen Patienten im Rahmen einer klinischen Studie untersucht. Hierfür wurde eine neue HPLC-MS/MS-Methode zur Quantifizierung von Cidofovir entwickelt und validiert. Insgesamt zehn Konzentrationszeitprofile von neun verschiedenen Patienten konnten gewonnen und analysiert werden. Begleitend zu dieser klinischen Studie wurde mithilfe eines physiologie-basierten Modells die individuell erwartete Pharmakokinetik von Cidofovir bei den untersuchten pädiatrischen Patienten simuliert. Auf diesem Weg konnten die ermittelten pharmakokinetischen Parameter der realen Patienten mit den simulierten Parametern der virtuellen Patienten verglichen werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass das physiologie-basierte pharmakokinetische Modell die individuelle systemische Exposition der Kinder vorhersagen kann. A priori Simulationen mithilfe des Modells ermöglichen auf diesem Weg eine altersgerechte Dosierung für zukünftige pädiatrische Patienten, die eine antivirale Therapie mit Cidofovir benötigen.

7.2. Summary

Although it is known that maturation- and growth processes may affect the pharmacokinetic and the pharmacodynamic characteristics of an administered drug in paediatric patients, sufficient information for a great number of pharmacotherapeutic treatments is still lacking. Therefore, the health care policy of the European Union has decided to obligate the pharmaceutical industry to conduct clinical trials with paediatric patients for the application of new marketing authorisations. However, the successful accomplishment of these clinical trials depends on the optimal use of prior knowledge.

In this regard, the introduction of physiologically-based pharmacokinetic modelling represents a modern approach for the a priori simulation of age-dependent pharmacokinetic properties. Especially for the antiviral pharmacotherapy the application of simulations appears to be appropriate, due to the fact that the cognition of pharmacokinetic parameters is of superior interest in this context. Thus, the research question whether the antiviral pharmacotherapy of paediatric patients can be optimised by means of physiologically-based pharmacokinetic modelling should be investigated within this thesis. On the basis of a conducted case study cidofovir, an acyclic nucleotide analogue with a broad antiviral spectrum was chosen as relevant example for clinically applied antiviral drugs.

The initial step was the investigation of the pharmacokinetic properties of cidofovir in paediatric patients within the framework of a clinical trial. For this purpose, a new HPLC-MS/MS-method for the quantification of cidofovir was developed and validated. In total ten concentration-time profiles from nine individual patients could be obtained and analysed. In addition the expected individual pharmacokinetic properties of these patients were simulated using a physiologically-based model for cidofovir. Subsequently, the pharmacokinetic parameters derived from the real patients could be compared with the simulated parameters from the virtual patients.

The presented results indicate that simulations based upon the physiologically-based pharmacokinetic model for cidofovir are adequate to predict the individual systemic exposure in children. Used for individual a priori simulations this model is dedicated to guide and to facilitate an age-appropriate dosing for future paediatric patients requiring an antiviral cidofovir therapy.

8. Literaturverzeichnis

- Alcorn J, McNamara PJ. Ontogeny of hepatic and renal systemic clearance pathways in infants: part I. *Clin Pharm* 2002;959-98.
- Annesley TM. Ion suppression in mass spectrometry. *Clin Chem* 2003;49:1041-4.
- Applied Biosystems, Applera Deutschland GmbH. Tutorial: Basic operator training course API 2000 LC/MS-MS System. 2006.
- Ba BB, Saux MC. Separation methods for antiviral phosphorus-containing drugs. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001;764:349-62.
- Bonfiglio R, King RC, Olah TV, Merkle K. The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1999;13:1175-85.
- Breddemann A, Hsien L, Tot E, Laer S. Quantification of cidofovir in human serum by LC-MS/MS for children. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2008;861:1-9.
- Breddemann A, Laer S, Schmidt KG, Harjes M, Adam R, Ludwig A, et al. Case report: severe gastrointestinal inflammation and persistent HHV-6B infection in a paediatric cancer patient. *Herpes* 2007;14:41-4.
- Brody SR, Humphreys MH, Gambertoglio JG, Schoenfeld P, Cundy KC, Aweeka FT. Pharmacokinetics of cidofovir in renal insufficiency and in continuous ambulatory peritoneal dialysis or high-flux hemodialysis. *Clin Pharmacol Ther* 1999;65:21-8.
- Bruins AP. Review: Mechanistic aspects of electrospray ionization. *J Chromatogr A* 1998;794:345-57.
- Caldwell PH, Murphy SB, Butow PN, Craig JC. Clinical trials in children. *Lancet* 2004;364:803-11.
- Choonara I, Conroy S. Unlicensed and off-label drug use in children: implications for safety. *Drug Saf* 2002;25:1-5.
- Cihlar T, Chen MS. Identification of enzymes catalyzing two-step phosphorylation of cidofovir and the effect of cytomegalovirus infection on their activities in host cells. *Mol Pharmacol* 1996;50:1502-10.
- Cihlar T, Lin DC, Pritchard JB, Fuller MD, Mendel DB, Sweet DH. The antiviral nucleotide analogs cidofovir and adefovir are novel substrates for human and rat renal organic anion transporter 1. *Mol Pharmacol* 1999;56:570-80.
- Conroy S, Choonara I, Impicciatore P, Mohn A, Arnell H, Rane A, et al. Survey of unlicensed and off label drug use in paediatric wards in European countries. European Network for Drug Investigation in Children. *Bmj* 2000;320:79-82.
- Cundy KC. Clinical pharmacokinetics of the antiviral nucleotide analogues cidofovir and adefovir. *Clin Pharmacokinet* 1999;36:127-43.
- Cundy KC, Petty BG, Flaherty J, Fisher PE, Polis MA, Wachsman M, et al. Clinical pharmacokinetics of cidofovir in human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:1247-52.

- De Clercq E. In search of a selective antiviral chemotherapy.
Clin Microbiol Rev 1997;10:674-93.
- Edginton AN, Schmitt W, Voith B, Willmann S. A mechanistic approach for the scaling of clearance in children. Clin Pharmacokinet 2006;45:683-704.
- Edginton AN, Schmitt W, Willmann S. Development and evaluation of a generic physiologically based pharmacokinetic model for children.
Clin Pharmacokinet 2006;45:1013-34.
- Eiholzer U. Klein- und Großwuchs in der pädiatrischen Praxis.
Schweiz Med Forum 2001;38:938-43.
- Eisenberg EJ, Cundy KC. High-performance liquid chromatographic determination of cytosine-containing compounds by precolumn fluorescence derivatization with phenacyl bromide: application to antiviral nucleosides and nucleotides. J Chromatogr B Biomed Appl 1996;679:119-27.
- Eksborg S. The pharmacokinetics of antiviral therapy in paediatric patients. Herpes 2003;10:66-71.
- FDA Food and Drug Administration. Guidance for industry: general considerations for pediatric pharmacokinetic studies for drugs and biological products.
<http://www.fda.gov/CDER/GUIDANCE/1970dft.pdf> (Letzte Aktualisierung 30.01.2008).
- FDA Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Guidance for Industry, Bioanalytical Methods Validation.
<http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.htm> (Letzte Aktualisierung 30.01.2008).
- Hayton WL. Maturation and growth of renal function: dosing renally cleared drugs in children. AAPS PharmSci 2000;2:E3.
- Ho ES, Lin DC, Mendel DB, Cihlar T. Cytotoxicity of antiviral nucleotides adefovir and cidofovir is induced by the expression of human renal organic anion transporter 1. J Am Soc Nephrol 2000;11:383-93.
- Ho HT, Woods KL, Bronson JJ, De Boeck H, Martin JC, Hitchcock MJ. Intracellular metabolism of the antiherpes agent (S)-1-[3-hydroxy-2-(phosphonylmethoxy)propyl]cytosine. Mol Pharmacol 1992;41:197-202.
- Hoffman JA, Shah AJ, Ross LA, Kapoor N. Adenoviral infections and a prospective trial of cidofovir in pediatric hematopoietic stem cell transplantation.
Biol Blood Marrow Transplant 2001;7:388-94.
- Hogg RJ, Furth S, Lemley KV, Portman R, Schwartz GJ, Coresh J, et al. National Kidney Foundation's Kidney Disease Outcomes Quality Initiative clinical practice guidelines for chronic kidney disease in children and adolescents: evaluation, classification, and stratification. Pediatrics 2003;111:1416-21.
- Hsien L, Breddemann A, Froebel AK, Heusch A, Schmidt KG, Laer S. Off-label drug use among hospitalised children: identifying areas with the highest need for research. Pharm World Sci 2008 (DOI 10.1007/s11096-008-9193-8).

- Kearns GL, Abdel-Rahman SM, Alander SW, Blowey DL, Leeder JS, Kauffman RE. Developmental pharmacology--drug disposition, action, and therapy in infants and children. *N Engl J Med* 2003;349:1157-67.
- Kuypers DR, Vandooren AK, Lerut E, Evenepoel P, Claes K, Snoeck R, et al. Adjuvant low-dose cidofovir therapy for BK polyomavirus interstitial nephritis in renal transplant recipients. *Am J Transplant* 2005;5:1997-2004.
- Laer S, Barrett J, Meibohm B. The in silico child: Using simulation to guide pediatric drug development and manage pediatric pharmacotherapy. *J Clin Pharmacol* 2008; (in preparation).
- Laer S, Elshoff JP, Meibohm B, Weil J, Mir TS, Zhang W, Hulpke-Wette M. Development of a safe and effective pediatric dosing regimen for sotalol based on population pharmacokinetics and pharmacodynamics in children with supraventricular tachycardia. *J Am Coll Cardiol* 2005;46:1322-30.
- Little JL, Wempe MF, Buchanan CM. Liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry method development for drug metabolism studies: Examining lipid matrix ionization effects in plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2006;833:219-30.
- Ljungman P, Deliliers GL, Platzbecker U, Matthes-Martin S, Bacigalupo A, Einsele H, et al. Cidofovir for cytomegalovirus infection and disease in allogeneic stem cell transplant recipients. The Infectious Diseases Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood* 2001;97:388-92.
- Ljungman P, Reusser P, de la Camara R, Einsele H, Engelhard D, Ribaud P, Ward K. Management of CMV infections: recommendations from the infectious diseases working party of the EBMT. *Bone Marrow Transplant* 2004;33:1075-81.
- Mace M, Manichanh C, Bonnafous P, Precigout S, Boutolleau D, Gautheret-Dejean A, Agut H. Real-time PCR as a versatile tool for investigating the susceptibility of human herpesvirus 6 to antiviral agents. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:3021-4.
- Manichanh C, Grenot P, Gautheret-Dejean A, Debre P, Huraux JM, Agut H. Susceptibility of human herpesvirus 6 to antiviral compounds by flow cytometry analysis. *Cytometry* 2000;40:135-40.
- Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal Chem* 2003;75:3019-30.
- McCarver DG. Applicability of the principles of developmental pharmacology to the study of environmental toxicants. *Pediatrics* 2004;113:969-72.
- McNamara PJ, Alcorn J. Protein binding predictions in infants. *AAPS PharmSci* 2002:1-8.
- Naiman AN, Roger G, Gagnieu MC, Bordenave J, Mathaut S, Ayari S, et al. Cidofovir plasma assays after local injection in respiratory papillomatosis. *Laryngoscope* 2004;114:1151-6.

- National Center for Biotechnology Information, NCBI. Cidofovir - Compound Summary (CID: 60613).
http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=60613&loc=ec_rcs
(Letzte Aktualisierung 27.08.2008).
- National Center for Health Statistics. Third national health and nutrition examination survey (NHANES III). <http://www.cdc.gov/nchs/nhanes.htm>. (Letzte Aktualisierung 25.August 2008).
- Niessen WM. Advances in instrumentation in liquid chromatography-mass spectrometry and related liquid-introduction techniques. *J Chromatogr A* 1998;794:407-35.
- Parlament der Europäischen Union. Verordnung (EG) Nr. 1901/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 12. Dezember 2006 über Kinderarzneimittel. http://ec.europa.eu/enterprise/pharmaceuticals/eudralex/vol-1/reg_2006_1901/reg_2006_1901_de.pdf (Letzte Aktualisierung 13.12.2007).
- Pfizer. Fachinformation des Fertigarzneimittels Vistide®.
<http://www.fachinfo.de/data/fi/jsearch?praep> (Stand der Information 09/2004).
- Razonable RR, Emery VC. Management of CMV infection and disease in transplant patients. *Herpes* 2004;11:77-86.
- Reusser P. Management of viral infections in: Klastersky J, Schimpff SC, Senn H-J, eds. Supportive care in cancer: a handbook for oncologists. 2nd ed:1999:87-112
- Schwartz GJ, Brion LP, Spitzer A. The use of plasma creatinine concentration for estimating glomerular filtration rate in infants, children, and adolescents. *Pediatr Clin North Am* 1987;34:571-90.
- Taylor PJ. Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Clin Biochem* 2005;38:328-34.
- University of Michigan, Institutional Review Boards of the University of Michigan Medical School (IRBMED). Blood Draw Guidelines.
http://www.med.umich.edu/irbmed/guidance/blood_draw.htm (Letzte Aktualisierung 17.12.2007).
- Uwai Y, Ida H, Tsuji Y, Katsura T, Inui K. Renal transport of adefovir, cidofovir, and tenofovir by SLC22A family members (hOAT1, hOAT3, and hOCT2). *Pharm Res* 2007;24:811-5.
- Valentin J. Basic anatomical and physiological data for use in radiological protection: reference values- ICRP Publication 89. *Annals of the ICRP* 2002;32:1-277.
- Willmann S, Hohn K, Edginton A, Sevestre M, Solodenko J, Weiss W, et al. Development of a physiology-based whole-body population model for assessing the influence of individual variability on the pharmacokinetics of drugs. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 2007;34:401-31.
- Willmann S, Lippert J, Sevestre M, Solodenko J, Fois F, Schmitt W. PK-Sim®: a physiologically based pharmacokinetic „whole-body“ model. *Biosilico* 2003;4:121-4.

- Wolf DL, Rodriguez CA, Mucci M, Ingrosso A, Duncan BA, Nickens DJ. Pharmacokinetics and renal effects of cidofovir with a reduced dose of probenecid in HIV-infected patients with cytomegalovirus retinitis. *J Clin Pharmacol* 2003;43:43-51.
- World Medical Association. Declaration of Helsinki (Tokyo 2004).
<http://www.wma.net/e/policy/b3.htm> (Letzte Aktualisierung 14.08.2008).
- Wright SH, Dantzer WH. Molecular and cellular physiology of renal organic cation and anion transport. *Physiol Rev* 2004;84:987-1049.
- Xiong X, Smith JL, Chen MS. Effect of incorporation of cidofovir into DNA by human cytomegalovirus DNA polymerase on DNA elongation. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:594-9.
- Yamanishi K, Okuno T, Shiraki K, Takahashi M, Kondo T, Asano Y, Kurata T. Identification of human herpesvirus-6 as a causal agent for exanthem subitum. *Lancet* 1988;1:1065-7.
- Yoshida M, Yamada M, Tsukazaki T, Chatterjee S, Lakeman FD, Nii S, Whitley RJ. Comparison of antiviral compounds against human herpesvirus 6 and 7. *Antiviral Res* 1998;40:73-84.
- Yuan LC, Samuels GJ, Visor GC. Stability of cidofovir in 0.9% sodium chloride injection and in 5% dextrose injection. *Am J Health Syst Pharm* 1996;53:1939-43.
- Zerr DM, Gupta D, Huang ML, Carter R, Corey L. Effect of antivirals on human herpesvirus 6 replication in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2002;34:309-17.

9. Anhang

9.1. Abkürzungsverzeichnis

AE	Engl.: adverse event = unerwünschtes Ereignis
ALL	akute lymphoblastische Leukämie
amu	Engl.: atomic mass unit = atomare Masseneinheit
AUC	Engl.: area under the curve = Fläche unter der Konzentrationszeitkurve
CDV, HPMPC	Cidofovir, 1-[(S)-3-hydroxy-2-(phosphonylmethoxy)propyl]cytosin
cps	Engl.: counts per second = Zählsschritte pro Sekunde
ESI	Elektrosprayionisation
FIA	Engl.: flow injection analysis = Flußinjektionsanalyse
FWHM	Engl.: full width at half maximum = Halbwertsbreite
GCP	Engl.: good clinical practise = Gute Klinischen Praxis
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GvHD	Engl.: Graft versus Hoost Disease = Abstoßungsreaktion nach einer Stammzelltransplantation
hOAT1	humaner organischer Anionentransporter Typ 1
i.v.	intravenös
IS	Interner Standard
LLOQ	Engl.: lower limit of quantification = untere Grenze für die Quantifizierung
m/z	Masse/Ladungsverhältnis
MRM	Engl.: multiple reaction monitoring = Scanmodus des Tandemmassenspektrometers
Pa	Druckeinheit (SI-Einheit) Pascal [N/m^2]
PB-	physiologie-basiert
PD	Pharmakodynamik
PK	Pharmakokinetik
PMEG	9-((2-phosphonylmethoxy)ethyl)guanin
Psi	Druckeinheit: pound force per square inch, 1 psi = 6894,76 Pa
RP-Chromatographie	Engl.: reversed phase- = Umkehrphasen-Chromatographie
SAE	Engl.: severe adverse event = schwerwiegendes unerwünschtes Ereignis
SAX	Engl.:strong anion exchanger = Anionenaustauscher
SPE	Engl.: solid phase extraction = Festphasenextraktion
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
Torr	Druckeinheit 1 Torr (mm Hg „Millimeter-Quecksilbersäule“) = 133,32 Pa

9.2. Abbildungsverzeichnis

Liste der in der Arbeit dargestellten Abbildungen:

Abbildung 1. Mögliche Beeinflussung der Pharmakokinetik und der Pharmakodynamik durch altersabhängige Unterschiede (Abbildung modifiziert nach (Laer et al., 2008)).....	4
Abbildung 2. Konzept zur Optimierung der antiviralen Therapie durch Simulation virtueller Patienten.....	6
Abbildung 3. Intrazelluläre Phosphorylierung von Cidofovir	9
Abbildung 4. Entwicklung des Körpergewichts und der klinischen Symptome	13
Abbildung 5. Entwicklung der systemischen und der lokalen HHV-6 Viruslast.....	14
Abbildung 6. Schematische Darstellung der fragmentspezifischen Detektion im Tandem-MS (Abbildung modifiziert nach (Applied Biosystems, 2006))	21
Abbildung 7. Schematischer Aufbau des Tripelquadrupol-Massenspektrometers	22
(Abbildung modifiziert nach (Applied Biosystems, 2006))	22
Abbildung 8. Struktur der quartären Trimethylaminopropyl-Gruppe des SPE-Anionenaustauschers.....	27
Abbildung 9. Struktureller Aufbau des Ganzkörpermodells von PK-Sim [®] (Abbildung modifiziert nach (Willmann et al., 2003))	41
Abbildung 10. Schematische Darstellung der Verteilung und Elimination des PK-Sim [®] -Modells (Abbildung modifiziert nach (Willmann et al., 2003)) ...	42
Abbildung 11. Schematische Darstellung des PK-Sim [®] -Algorithmus zur Simulation von individuellen, virtuellen Patienten (Abbildung nach (Willmann et al., 2007))	45
Abbildung 12. Substanzspezifische Simulationsparameter von Cidofovir	48
Abbildung 13. Strukturformel von Cidofovir (als freie Säure).....	51
Abbildung 14. Strukturformel von PMEG	51
Abbildung 15. Produktionen-Scan Cidofovir	55
Abbildung 16. Produktionen-Scan PMEG (interner Standard).....	55
Abbildung 17. Ionenchromatogramm einer Leerprobe und einer Serumprobe mit 78 ng/ml CDV.....	57
Abbildung 18. Lineare Darstellung der Cidofovir-Kalibrationsgerade	58
Abbildung 19. Halblogarithmische Darstellung der Cidofovir-Kalibrationsgerade.....	59
Abbildung 20. Ionenchromatogramme der ko-eluierenden Cidofovir- und PMEG-Peaks.....	63
Abbildung 21. Bestimmung der Eliminationskonstanten bei Patient ID-Nr.1.	68
Abbildung 22. Bestimmung der Eliminationskonstanten bei Patient ID-Nr.2	69
Abbildung 23. Bestimmung der Eliminationskonstanten bei Patient ID-Nr.3.	70
Abbildung 24. Bestimmung der Eliminationskonstanten bei Patient ID-Nr.4	72
Abbildung 25. Bestimmung der Eliminationskonstanten bei Patient ID-Nr.5	73
Abbildung 26. Bestimmung der Eliminationskonstanten bei Patient ID-Nr.6	74
Abbildung 27. Bestimmung der Eliminationskonstanten bei Patient ID-Nr.7.	76
Abbildung 28. Bestimmung der Eliminationskonstanten bei Patient ID-Nr.8	77
Abbildung 29. Somatogramm für den Patienten ID-Nr. 9 modifiziert nach (Eiholzer, 2001).....	78
Abbildung 30. Bestimmung der Eliminationskonstanten bei Patient ID-Nr.9	79

Abbildung 31. Bestimmung der Eliminationskonstanten bei Patient ID-Nr.10	81
Abbildung 32. Dosisnormierte Exposition in Abhängigkeit von der glomerulären Filtrationsleistung.....	83
Abbildung 33. Vergleich der simulierten und der gemessenen Konzentrationszeitverläufe	91
Abbildung 34. Vergleich der gemessenen und der simulierten Konzentrationen.	92
Abbildung 35. Vergleich der gemessenen und der simulierten AUCs.	94
Abbildung 36. Vergleich der gemessenen und der simulierten Clearances	95
Abbildung 37. Darstellung zum Wilcoxon-Rangsummentest zur Differenz der Clearances.....	99

9.3. Verzeichnis der Tabellen

Liste der in der Arbeit dargestellten Tabellen:

Tabelle 1. Einstellungen für die Infusionsanalyse	23
Tabelle 2. Einstellungen für die Flussinjektionsanalyse	24
Tabelle 3. Zeitlicher Ablauf der Studie	33
Tabelle 4. Simulierte Organvolumina und Blutflüsse	46
Tabelle 5. Lösungsmittel und Lösungen	52
Tabelle 6. Substanzabhängige Parameter der tandem-massenspektrometrischen Methode.....	54
Tabelle 7. Flussabhängige Parameter der tandem-massenspektrometrischen Methode.....	56
Tabelle 8. Ergebnisse der Richtigkeits- und Präzisionsuntersuchungen	58
Tabelle 9. Untersuchungen zur Kalibrationsgeraden	60
Tabelle 10. Untersuchungen zur Wiederfindung	61
Tabelle 11. Untersuchungen zu den Matrixeffekten.....	62
Tabelle 12. Untersuchung der Stabilität nach drei Gefrier-Tau-Zyklen	64
Tabelle 13. Untersuchung der Stabilität nach 1-monatiger Lagerung bei -20°C.....	65
Tabelle 14. Übersicht über die untersuchten Patienten	66
Tabelle 15. Übersicht über die ermittelten pharmakokinetischen Parameter bei den Patienten.....	67
Tabelle 16. Gemessener Konzentrationszeitverlauf von Patient ID-Nr.1	68
Tabelle 17. Gemessener Konzentrationszeitverlauf von Patient ID-Nr.2.....	69
Tabelle 18. Gemessener Konzentrationszeitverlauf von Patient ID-Nr.3.....	70
Tabelle 19. Gemessener Konzentrationszeitverlauf von Patient ID-Nr.4.....	71
Tabelle 20. Gemessener Konzentrationszeitverlauf von Patient ID-Nr.5.....	73
Tabelle 21. Gemessener Konzentrationszeitverlauf von Patient ID-Nr.6.....	74
Tabelle 22. Gemessener Konzentrationszeitverlauf von Patient ID-Nr.7	75
Tabelle 23. Gemessener Konzentrationszeitverlauf von Patient ID-Nr.8.....	77
Tabelle 24. Gemessener Konzentrationszeitverlauf von Patient ID-Nr.9.....	79
Tabelle 25. Gemessener Konzentrationszeitverlauf von Patient ID-Nr.10.....	80
Tabelle 26. Übersicht über die Parameter für die Simulation der individuellen Patienten	83
Tabelle 27. Skalierung der Cidofovir-Clearance unter Berücksichtigung der Nierenfunktion	84
Tabelle 28. Simulierte Cidofovir-Konzentrationen zu den Zeitpunkten der Blutentnahmen	85
Tabelle 29. Übersicht über die simulierten pharmakokinetischen Parameter der Patienten	86
Tabelle 30. Vergleich zwischen gemessener und simulierter Halbwertszeit.....	93
Tabelle 31. Vergleich zwischen gemessenen und simulierten Verteilungsvolumen	93
Tabelle 32. Abweichung zwischen gemessener und simulierter AUC	95
Tabelle 33. Abweichung zwischen gemessener und simulierter Clearance	96
Tabelle 34. Vergleich zwischen gemessener und erwarteter systemischer Exposition ...	96
Tabelle 35. Vergleich von linearer Extrapolation und physiologie-basierter Skalierung der Cidofovir- Clearance.....	98

Teile der vorliegenden Arbeit und weitere Forschungsprojekte wurden bereits wie folgt publiziert oder sind in Vorbereitung:

I. Originalarbeiten

Breddemann A, Laer S, Schmidt KG, Harjes M, Adam R, Ludwig A, et al. Case report: severe gastrointestinal inflammation and persistent HHV-6B infection in a paediatric cancer patient. *Herpes* 2007;14:41-4.

Breddemann A, Hsien L, Tot E, Laer S. Quantification of cidofovir in human serum by LC-MS/MS for children. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2008;861:1-9.

Hsien L, Breddemann A, Frobel AK, Heusch A, Schmidt KG, Laer S. Off-label drug use among hospitalised children: identifying areas with the highest need for research. *Pharm World Sci* 2008. (DOI 10.1007/s11096-008-9193-8)

Breddemann A, Laer S. Computer simulations for drug treatment in children. *Med Monatsschr Pharm.* 2008;31:429-433.

II. Vortrage und Poster mit publiziertem Abstract

Breddemann A, Laer S, Schmidt KG, Harjes M, Adam R, Ludwig A, Niehues T, Schneider DT. Case Report: Severe gastrointestinal inflammation related to persistent HHV-6B infection in a 10-month old cancer patient. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 375 Supplement, R 563 (2007).

Hsien L, Breddemann A, Frobel AK, Heusch A, Schmidt K, Laer S. High rate of off-label use in cardiovascular paediatric pharmacotherapy requires new focus in research. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 375 Supplement, R 564 (2007).

Breddemann A, Laws J, Buhrmann S, Tot E, Laer S. Combination of physiologically-based pharmacokinetic simulations with detection of paediatric cidofovir pharmacokinetics: Rationale of a multi centre clinical trial. In Proceedings of the 11th ESDP Congress Safe and effective medicines for children, Rotterdam, Netherlands, pp.37 (2008).

Hsien L, Breddemann A, Frobel A-K, Heusch A, Schmidt K G, Laer S. Off-label drug use among hospitalised children: Identifying areas with the highest need for research. In Proceedings of the 11th ESDP Congress Safe and effective medicines for children, Rotterdam, Netherlands, pp.115 (2008).

Breddemann A, Laws J, Buhrmann S, Tot E, Laer S. Physiologically-based pharmacokinetic modelling and clinical pharmacokinetics of cidofovir in paediatric patients. Abstractband der Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft Vortrag K33 (2008).

III. Buchbeiträge/Übersichtsarbeiten

Frobel AK, Hsien L, Breddemann A, Lär S. Arzneimitteltherapie von Kindern soll sicherer werden. Deutsche Apothekerzeitung 5, 50-60 (2007).

Breddemann A, Lär S. Colesevelam - ein neuer Gallensäuren-Komplexbildner mit LDL-senkender Wirkung. Arzneiverordnung in der Praxis 35, 55-57 (2008).

10. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: André Breddemann
Geboren: 20.08.1976 in Wuppertal
Eltern: Ursula Breddemann, geb. Wartorski
Alois Breddemann
Verheiratet mit: Vera Breddemann, geb.Söhnlein
Adresse: Eulerstraße 31, 40477 Düsseldorf

Schulbildung

1983-1987 Besuch der städt. Grundschule Liegnitzer Straße, Wuppertal
1987-1996 Besuch des städt. Carl-Duisberg-Gymnasiums, Wuppertal
05/1996 Erwerb der allgemeinen Hochschulreife

Zivildienst

08/1996-08/1997 Zivildienst im Bethesda Krankenhaus, Wuppertal

Studium und Praktika

10/1997-03/2002 Studium der Pharmazie an der Heinrich-Heine-Universität,
Düsseldorf
03/1998 Famulatur in der Krankenhausapotheke des Bethesda
Krankenhauses, Wuppertal
08/1998 Famulatur in der Kronen Apotheke, Wuppertal
08/1999 Erster Abschnitt der pharmazeutischen Prüfung, Ratingen
03/2002 Zweiter Abschnitt der pharmazeutischen Prüfung, Düsseldorf
05/2002-10/2002 Praktikum in der Kronen Apotheke, Wuppertal
11/2002-04/2003 Praktikum in der Zulassungsabteilung des Bundesinstitutes für
Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM), Bonn
06/2003 Dritter Abschnitt der pharmazeutischen Prüfung, Düsseldorf
07/2003 Approbation als Apotheker

Berufserfahrung

- 08/2003-10/2003 Vertretungstätigkeit als Apotheker in der Kronen Apotheke, Wuppertal
- 10/2003-06/2005 Anstellung als Apotheker in der Krankenhausapotheke des Helios Klinikums Wuppertal bzw. nach dem Umzug und der Fusion der Apotheke mit der Krankenhausapotheke Helios Klinikum Schwelm (seit März 2005) angestellter Apotheker in der Helios Apotheke Region West am Helios Klinikum Schwelm. Aufgabengebiete: Fachgebietsleitung der Zytostatikaabteilung, Mitarbeit in der Arzneimittelinformation und Arzneimittelausgabe.
- 06/2005-11/2008 wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Klinischen Pharmazie und Pharmakotherapie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Forschungsarbeit unter der Betreuung von Prof. Dr. med. S. Läer.
- seit 02/2006 Weiterbildung zum Fachapotheker für Klinische Pharmazie

11. Danksagung

Für das persönliche Vertrauen während der gesamten Anfertigung dieser Forschungsarbeit, insbesondere aber während der schwierigen Zeit der HPLC-MS/MS-Methodenentwicklung und der vielen technischen Defekte des Massenspektrometers, möchte ich mich sehr herzlich bei Frau Prof.Dr. Stephanie Läer bedanken.

Für die freundliche Übernahme des Koreferates möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Peter Kleinebudde sehr herzlich bedanken.

Dem Leiter der klinischen Studie, Herrn Dr. Hans-Jürgen Laws von der Kinderklinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, sowie den Prüfärzten Herrn Dr. Oliver Basu und Herrn Dr. Christian Dohna-Schwake von der Kinderklinik des Universitätsklinikums Duisburg-Essen und den weiteren beteiligten Ärzten und Pflegern möchte ich für die Ermöglichung der Durchführung der Studie auf den Stationen ebenfalls sehr herzlich „Danke“ sagen. Die kollegiale und professionelle Zusammenarbeit mit allen Beteiligten war eine unglaublich positive und motivierende Erfahrung. Insbesondere aber möchte ich auch Frau Dr. Sandra Bührmann von der Apotheke des Universitätsklinikums Duisburg-Essen für Ihre logistische Unterstützung bei der Durchführung der Studie in Essen danken.

Allen ehemaligen und derzeitigen Kolleginnen und Kollegen aus der Klinischen Pharmazie und Pharmakotherapie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf möchte ich ganz herzlich danken für die tolle Zusammenarbeit und die Unterstützung während der vergangenen Jahre. Insbesondere möchte ich mich bei Edith Tot bedanken, die mich während der Methodenentwicklung und dem Vermessen der Patientenproben unermüdlich unterstützt hat: vielen Dank!

Für die freundliche Unterstützung bei den vielfältigen Fragestellungen zum PK-Sim[®]-Programm möchte ich mich bei Herrn Dr. Stefan Willmann von Bayer Technology Services bedanken.

Insbesondere möchte ich mich auch für das Vertrauen der Kinder, ihrer Eltern und Erziehungsberechtigten bedanken und auch dafür, dass sie sich in einer für Sie so schwierigen

Lebenssituation entschieden haben, an der Studie teilzunehmen. Ich hoffe Sie finden, dass Ihr Vertrauen in meine Arbeit gerechtfertigt ist.

Meiner Familie und meinen Freunden, die mir jederzeit auf meinem ganzen bisherigen Lebensweg und insbesondere während der Zeit der Promotion ihre Unterstützung geschenkt haben, kann ich nicht genug danken.

Auch meiner Ehefrau Vera kann ich nicht genug danken, ohne sie wäre ich niemals so weit gekommen. Mit Ihrer Liebe, Geduld und Zuversicht hat sie mich durch alle Höhen und Tiefen während der letzten Jahre begleitet und mir das Vertrauen in mich gegeben, diese Arbeit erfolgreich beenden zu können.

12. Erklärung zur Dissertation

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den

Unterschrift