

Einsatz von Biomarkern und in-silico-Verfahren für klinische Arzneimittelstudien bei Kindern am Beispiel von NT-proBNP und Carvedilol

Inaugural Dissertation

zur

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

vorgelegt von

Stefanie Albers

aus Hamm

Dezember 2006

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: Prof. Dr. med. S. Lärer

Koreferent: Prof. Dr. J. Breitzkreutz

Tag der mündlichen Prüfung: 13.12.2006

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
1.1	Klinische Arzneimittelstudien bei Kindern	1
1.2	Biomarker	2
1.3	In-silico-Verfahren	3
1.4	Patienten mit angeborenen Herzfehlern	5
1.5	Der Biomarker NT-proBNP	6
1.5.1	Struktur, Entstehung und Bedeutung	6
1.5.2	NT-proBNP-Normalwerte	8
1.6	Der Beta-Rezeptorenblocker Carvedilol	9
1.6.1	Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von Carvedilol	9
1.6.2	Carvedilol in der Therapie der Herzinsuffizienz bei Kindern	11
1.7	NT-proBNP für das Monitoring einer Carvedilol-Therapie	12
1.8	Zielsetzung der Arbeit	13
2	Methoden	14
2.1	NT-proBNP-Studie und -Untersuchungen	14
2.1.1	Studiendesign und -protokoll	14
2.1.2	Einschlusskriterien	14
2.1.3	Ausschlusskriterien	14
2.1.4	NT-proBNP-Plasmakonzentrations-Bestimmung	15
2.1.4.1	Elektrochemilumineszenz-Immunoassay (ECLIA)	15
2.1.4.2	Enzymimmunoassay (EIA)	15
2.1.5	Multizentrischer NT-proBNP-Laborvergleich	17
2.1.6	Statistik	17
2.2	Populationsbasierte Analyse der Carvedilol-Studie	18
2.2.1	Studiendesign und -protokoll	18
2.2.2	Einschlusskriterien	18
2.2.3	Ausschlusskriterien	18
2.2.4	Kriterien für den Abbruch bei einzelnen Patienten	19
2.2.5	Kriterien für den Abbruch der gesamten Studie	19
2.2.6	Therapieschema	19
2.2.7	Plasmakonzentrations-Zeitprofile	20
2.2.8	Bestimmung der Plasmakonzentration von Carvedilol	20
2.2.9	Phänotypisierung für CYP2D6	21
2.2.10	NT-proBNP-Bestimmung	22
2.2.11	Populationskinetische Auswertung	23
2.2.11.1	Prinzip der populationskinetischen Analyse	24
2.2.11.2	Modellentwicklung mit NONMEM	25
2.2.11.3	Modellentwicklung für die Populationskinetik von Carvedilol	26
2.2.12	Evaluierung des Pop-PK-Modells	31
2.3	Dosis-Simulation auf Basis des Pop-PK-Modells	33
3	Material	35
3.1	NT-proBNP-Plasmakonzentrations-Bestimmung	35
3.2	HPLC	35
3.2.1	Arzneistoffe und Reagenzien	35
3.2.2	Lösungsmittel und Lösungen	36
3.2.3	HPLC-Apparatur	37
3.3	Verbrauchsmaterialien	37
3.4	Laborgeräte	37

3.5 Software.....	38
4 Ergebnisse	39
4.1 NT-proBNP-Studie und -Untersuchungen	39
4.1.1 NT-proBNP-Normalwerte bei Kindern	39
4.1.2 NT-proBNP-Methodenvergleich.....	42
4.1.3 Multizentrischer NT-proBNP-Laborvergleich	44
4.2 Populationsbasierte Analyse der Carvedilol-Studie	45
4.2.1 Charakteristik der Patienten	45
4.2.2 Das populationskinetische Modell	46
4.2.3 Evaluierung des Pop-PK-Modells	56
4.3 Dosis-Simulation auf Basis des Pop-PK-Modells	61
4.4 NT-proBNP in der Carvedilol-Studie.....	70
5 Diskussion.....	72
5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse	72
5.2 NT-proBNP-Studie und -Untersuchungen	74
5.2.1 Einfluss des Alters auf die NT-proBNP-Plasmakonzentration	74
5.2.2 Einfluss des Geschlechts auf die NT-proBNP-Plasmakonzentration.....	74
5.2.3 NT-proBNP-Normalwerte bei Kindern	75
5.2.4 NT-proBNP-Methodenvergleich und Präzision.....	77
5.3 Populationsbasierte Analyse der Carvedilol-Studie.....	78
5.3.1 Relevante Kovariaten für die Pharmakokinetik von Carvedilol	78
5.3.1.1 Gewicht	78
5.3.1.2 Alter	79
5.3.1.3 Enzymaktivität für CYP2D6	83
5.3.1.4 Sonstige Kovariaten	84
5.3.2 Evaluierung des Pop-PK-Modells	85
5.4 Altersabhängige systemische Verfügbarkeit und Dosierung für Carvedilol	88
5.5 NT-proBNP in der Carvedilol-Studie.....	91
6 Schlussfolgerung und Ausblick.....	93
7 Zusammenfassung	95
7.1 Zusammenfassung	95
7.2 Summary	96
8 Literaturverzeichnis.....	97
9 Anhang	108
9.1 Abkürzungsverzeichnis.....	108
9.2 Abbildungsverzeichnis	111
9.3 Verzeichnis der Tabellen	116
9.4 FORTRAN-Code des finalen Pop-PK-Modells	118
10 Lebenslauf.....	121
11 Danksagungen	123

1 Einleitung

1.1 Klinische Arzneimittelstudien bei Kindern

Klinische Arzneimittelstudien bei Kindern sind dringend erforderlich, damit diese sicher und effektiv mit modernen Arzneimitteln therapiert werden können. Der besondere Schutz pädiatrischer Patienten durch das Arzneimittelgesetz und das geringere ökonomische Potential im Vergleich zur Arzneimitteltherapie bei Erwachsenen haben pharmazeutische Unternehmer bislang nicht motiviert, klinische Studien bei diesen Patienten durchzuführen. Mitte des Jahres 2006 wurde vom europäischen Parlament eine neue Verordnung verabschiedet, die im Januar 2007 inkrafttritt. Diese Verordnung schreibt für die Zulassung neuer Arzneimittel bis auf wenige Ausnahmen klinische Studien bei pädiatrischen Patienten vor bzw. bietet pharmazeutischen Unternehmern bei bereits zugelassenen Arzneimitteln als Anreiz eine Patentverlängerung (Europäische Kommission 2004, Europäische Kommission 2005). Eine solche Regelung wurde in Amerika schon 1997 eingeführt und hat dort zu einem sprunghaften Anstieg der Zahl an Arzneimittelstudien mit pädiatrischen Patienten geführt (FDA 1997). Auch in Europa ist eine solch positive Entwicklung zu erwarten. Vor diesem Hintergrund hat der Einsatz von Biomarkern und in-silico-Verfahren in klinischen Studien bei Kindern eine große Bedeutung, da mit deren Hilfe Studien sicherer und effizienter durchgeführt werden können.

In klinischen Arzneimittelstudien wird unter anderem der Zusammenhang zwischen Arzneimitteldosis, Konzentration im Blut und Effekt des Arzneistoffes untersucht. Darauf basierend können adäquate Dosierungsregime entwickelt werden. Bei Kindern sind hierfür separate Studien notwendig, da die bei Erwachsenen gewonnenen Erkenntnisse nur bedingt auf Kinder übertragbar sind. Biomarker stehen oft enger in Zusammenhang mit der Arzneistoffwirkung als klinische Endpunkte und können deswegen in klinischen Studien alternativ zur Qualifizierung und Quantifizierung des Arzneistoffeffektes eingesetzt werden. Eine gute Charakterisierung des Biomarkers ist dabei eine notwendige Voraussetzung für dessen Einsatz. In-silico-Verfahren wie die populationspharmakokinetische Analyse oder die Dosis-Simulation können helfen, den Informationsgewinn aus vorhandenen Studiendaten so zu maximieren, dass weniger klinische Studien notwendig sind, um zu dem gleichen Ergebnis zu gelangen bzw. um in zukünftigen Studien eher effektive Dosierungen einsetzen zu können. In der vorliegenden Arbeit wurden der Biomarker Amino-terminales pro brain natriuretisches Peptid (NT-proBNP) und, mithilfe von in-silico-Verfahren, die Pharmakokinetik und das Dosierungsregime des Beta-Rezeptorenblockers Carvedilol untersucht, um beide zukünftig sicherer und effektiver in klinischen Arzneimittelstudien bei herzkranken Kindern einzusetzen.

Für NT-proBNP sollten in dieser Arbeit unter anderem Normalwerte bei Kindern erhoben werden. Mit einer populationskinetischen Analyse sollten Besonderheiten in der Pharmakokinetik von Carvedilol bei pädiatrischen Patienten untersucht werden, um in einer Dosis-Simulation zu prüfen, ob diese gegebenenfalls eine Anpassung des aktuellen Carvedilol-Dosierungsregimes erforderlich machen. Die Ergebnisse dieser Arbeit sind allgemein auf den Einsatz von NT-proBNP und Carvedilol bei herzkranken Kindern anzuwenden. Im Folgenden wird aber speziell auf Kinder mit einer Herzinsuffizienz infolge angeborener Herzfehler eingegangen, da hier eine adäquate Therapie von großer Bedeutung ist. Klinische Studien bei diesen Patienten sind dringend erforderlich. Der Nutzen von NT-proBNP und Carvedilol für Patienten mit angeborenen Herzfehlern ist noch nicht belegt und wird aktuell in einem Teilprojekt des Kompetenznetzes für Angeborene Herzfehler, ein vom Bundesministerium für Bildung und Forschung gefördertes Projekt, untersucht.

1.2 Biomarker

Biomarker sind definiert als objektiv zu messende Parameter, die Indikatoren für einen normalen biologischen Prozess, einen pathogenen Prozess oder eine pharmakologische Reaktion sind (Biomarker Definitions Working Group 2001). Unter dem Begriff Biomarker ist eine Vielzahl von Parametern zusammengefasst. Es existiert eine mechanistische Klassifizierung, die die Parameter nach ihrer Ereignisfolge einteilt, angefangen beim Genotyp einer Person bis hin zu einem messbaren klinischen Effekt; diese Klassifizierung wird allerdings noch nicht einheitlich verwendet (Rolan et al. 2003). Bekannte Biomarker sind zum Beispiel der Blutdruck oder auch die Blut-Glukosekonzentration. Biomarker können in der Arzneimittelforschung unter anderem für den Nachweis einer Arzneimittelwirkung, das Aufzeigen einer unerwünschten Wirkung oder für das generelle Ansprechen auf eine Therapie eingesetzt werden (Rolan et al. 2003). In der klinischen Anwendung hat auch die Diagnose- und Prognosestellung durch Biomarker eine große Bedeutung. Optimalerweise kann ein Biomarker einen klinischen Endpunkt ersetzen und wird dadurch zu einem Surrogatmarker, mit dem Vorteil, schneller und einfacher gemessen werden zu können als viele klinische Endpunkte. Biomarker haben außerdem die Vorteile, dass sie normalerweise enger in Zusammenhang mit der Arzneistoffwirkung stehen als klinische Endpunkte und sie mit validierten Methoden zu messen sind (Meibohm 2004). Abbildung 1 zeigt den Zusammenhang zwischen Arzneimitteldosis, Biomarker und klinischem Effekt.

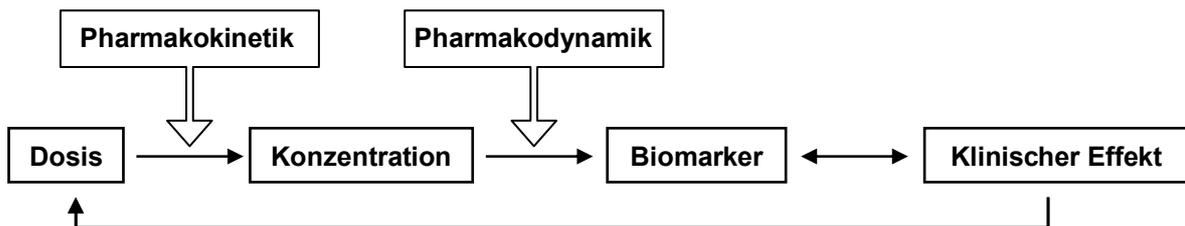


Abbildung 1: Zusammenhang zwischen Dosis, Biomarker und klinischem Effekt

Damit Biomarker als solche eingesetzt werden können, müssen einige Voraussetzungen erfüllt sein. Optimalerweise erfüllt zum Beispiel ein kardialer Biomarker folgende Anforderungen: Er ist gut charakterisiert, herzspezifisch, mit einfachen Methoden sicher und effektiv zu messen und stabil. Er sollte nicht physiologisch im Kreislauf vorkommen und eine eindeutig definierte klinische Rolle haben (Collinson et al. 2004). Für eine gute Charakterisierung eines Biomarkers ist es notwendig, alters- und geschlechtsentsprechende Normalwerte zu kennen. Diese unterscheiden sich bei Kindern häufig von den Werten von Erwachsenen. Zum Beispiel steigt der Blutdruck bei Kindern mit zunehmendem Alter auf die Erwachsenenwerte an (Schmaltz und Singer 1996). Ein Kind wird dann als hypertensiv bezeichnet, wenn der diastolische und der systolische Blutdruck über der 95ten altersentsprechenden Perzentile liegen; ein 10 Jahre altes Mädchen ist demnach ab einem Blutdruck von 130/85 mmHg als hyperten einzustufen (Schmaltz und Singer 1996). Dagegen wird bei Erwachsenen erst ab 140/90 mmHg von einer leichten Hypertonie gesprochen (Whitworth 2003). Auch die Blut-Glucosekonzentration ist bei kleinen Kindern geringer als bei Erwachsenen (ILP 2006). Ein fünf Tage bis ein Jahr altes Kind mit einer Blut-Glukose-Konzentration von 110 mg/dl würde demnach schon als hyperglykämisch bezeichnet werden, wohingegen bei Erwachsenen dieser Wert in den oberen Normalbereich fällt. Für den Biomarker NT-proBNP existieren bislang keine einheitlich verwendeten Normalwerte bei Kindern. Deswegen war es dringend erforderlich, diese zu untersuchen.

1.3 In-silico-Verfahren

Der Einsatz moderner in-silico-Verfahren wie die Populationspharmakokinetik (Populationskinetik) oder die Dosis- bzw. Studiensimulation kann dazu beitragen, dass in klinischen Arzneimittelstudien schneller sichere und effektive Dosierungen eingesetzt werden können, was besonders bei Kindern wünschenswert ist. Die Populationskinetik ist eine Methode, mithilfe derer die mittleren pharmakokinetischen Parameter und deren Variabilität in einer Population vorhergesagt werden können. Dabei beschreibt die Pharmakokinetik den Konzentrationsverlauf eines Arzneistoffes im Körper über die Zeit, welcher von Absorption, Verteilung, Biotransformation und Elimination abhängt (Derendorf et al. 2002).

Für die richtige Dosierung eines Arzneistoffes bei Kindern ist die Kenntnis seiner Pharmakokinetik in dieser Population von großer Bedeutung, da im Vergleich zu Erwachsenen eine Vielzahl von entwicklungsbedingten Veränderungen auf jeder pharmakokinetischen Ebene existieren (Kearns et al. 2003).

Die am weitesten verbreiteten Methoden für eine populationskinetische Analyse sind die Zwei-Stufen-Methode (two-stage-approach) und die nichtlineare Regression unter Berücksichtigung sogenannter fixer und zufälliger Effekte. (Derendorf et al. 2002). Fixe und zufällige Effekte werden auch zusammengefasst als gemischte Effekte bezeichnet. 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. Diese Methode wurde erstmals 1977 verwendet und zeigte, dass man auch mit wenigen Daten pro Patient gute Ergebnisse erzielen kann (Sheiner et al. 1977). Am Beispiel von Phenytoin konnte außerdem gezeigt werden, dass der neue Ansatz der Zwei-Stufen-Methode im Hinblick auf die Vorhersage der Variabilität der kinetischen Parameter sogar überlegen war (Sheiner und Beal 1980). Die Populationskinetik ist besonders bei Kindern geeignet und empfohlen, bei denen aus ethischen und/oder physiologischen Gründen (begrenzttes Blutentnahmevermögen) oft nur wenige Daten zur Verfügung stehen (FDA 1999).

Sie weist gegenüber der individuellen pharmakokinetischen Analyse einige Vorteile auf. So ist es möglich, sehr heterogene Kollektive gleichzeitig zu analysieren und dabei den Einfluss vieler Faktoren zu untersuchen. Bei der traditionellen pharmakokinetischen Analyse werden meist sehr homogene Kollektive auf den Einfluss eines Faktors untersucht; eine größere Variabilität innerhalb des Kollektivs erfordert höhere Fallzahlen, um statistische Signifikanz zu erreichen (Derendorf et al. 2002). Gerade bei Kindern sind höhere Fallzahlen nicht wünschenswert. Ein weiterer Vorteil der Populationskinetik ist die Zerlegung der Variabilität in eine interindividuelle und eine Rest-Variabilität. Beide Variabilitäten können im weiteren Verlauf analysiert und reduziert werden. Je niedriger die unerklärte Variabilität, desto sicherer können Dosierungen mit den entsprechenden Plasmakonzentrationen vorhergesagt werden.

Mit Simulationen versucht man ausgehend von einem mathematischen Modell, welches die Realität möglichst gut beschreibt, eine Situation zu beschreiben, zu erklären, zu untersuchen und vorherzusagen (Hoover und Perry 1989). Bei Arzneimittelstudien gibt es zahlreiche Einsatzmöglichkeiten für Simulationen. Zum Beispiel können für einen Arzneistoff nach Einmaldosierung basierend auf einem pharmakokinetischen Modell Konzentrationen

im Fließgleichgewicht simuliert werden, um so Vorhersagen für die Mehrfachapplikation zu machen. Ausgehend von einem populationskinetischen Modell können Simulationen durchgeführt werden, um für verschiedene Dosierungen und Dosierungsintervalle Vorhersagen zu machen. Auch die Simulation kompletter klinischer Studien, bei der im Gegensatz zu den vorherigen Simulationen auch die zu untersuchende Population simuliert wird, gewinnt zunehmend an Bedeutung (Bonate 2000).

Mithilfe von in-silico-Verfahren sollten in der vorliegenden Arbeit Besonderheiten in der Pharmakokinetik von Carvedilol und deren Relevanz für die Carvedilol-Dosierung bei Kindern untersucht werden. Hat zum Beispiel das Alter einen Einfluss auf die Pharmakokinetik und wird dieses in einer klinischen Arzneimittelstudie nicht berücksichtigt, dann können Studienergebnisse verzerrt werden. Dies muss aktuell für die vorläufigen Ergebnisse einer Studie mit Carvedilol zur Therapie der Herzinsuffizienz bei Kindern diskutiert werden (Shaddy et al. 2006).

1.4 Patienten mit angeborenen Herzfehlern

Unter den angeborenen Erkrankungen stellen die angeborenen Herzfehler mit 8 von 1000 Lebendgeburten die größte Untergruppe dar (Schmaltz und Singer 1996). Die Ätiologie der meisten Herzfehler ist unbekannt, bei einigen wird eine familiäre Belastung diskutiert. Durch den Fortschritt in der kardiovaskulären Diagnostik und der Herzchirurgie konnte die Letalität in den letzten zwei Jahrzehnten von 80% auf 20% gesenkt werden (Schmaltz und Singer 1996). Mit dem fortschrittsbedingten Wachsen dieses Patientenkollektivs von Kindern, Jugendlichen und Erwachsenen mit angeborenen Herzfehlern ist somit eine neue, sehr heterogene Patientengruppe entstanden, über deren Langzeittherapie wenig bekannt ist.

Unter einer Herzinsuffizienz wird normalerweise eine insuffiziente Leistungsfähigkeit des linken Ventrikels verstanden. Bei Patienten mit angeborenen Herzfehlern sind jedoch überwiegend der rechte Ventrikel, der rechte Vorhof und die Lungenstrombahnen morphologisch verändert. Deswegen entwickeln diese Patienten häufig eine rechtsventrikuläre Insuffizienz. Diese ist unter anderem eine Folge aus prä- und postoperativer Druck- und/oder Volumenbelastung, atrialen Rhythmusstörungen oder einer im Verlauf entstehenden Trikuspidalklappeninsuffizienz oder Pulmonalstenose (Murphy et al. 1993). Eine Rechtsherzinsuffizienz wird erst spät symptomatisch und besitzt dann bereits eine schlechte Prognose.

Die Therapie der Linksherzinsuffizienz mit Beta-Rezeptorenblockern ist mittlerweile ein etabliertes Therapieprinzip und beruht auf der Tatsache, dass die Erkrankung unter anderem mit einer neurohumoralen Aktivierung der sympathischen Neurohormone Noradrenalin und Adrenalin assoziiert ist (Packer et al. 1996, Bristow und Port 1998, CIBIS 1999,

Hjalmarson et al. 2000, Packer et al. 2002). Auch der Rechtsherzinsuffizienz liegt vermutlich eine neurohumorale Aktivierung zugrunde (Tulevski et al. 2001, Bolger et al. 2002, Neffke et al. 2002, Beck-da-Silva et al. 2004, Book et al. 2005, Norozi et al. 2005), welche die Rationale für den Einsatz von Beta-Rezeptorenblockern darstellt. Bis jetzt ist aber noch nicht bekannt, ob auch Patienten mit angeborenen Herzfehlern von dieser Therapie profitieren.

Für Patienten mit angeborenen Herzfehlern wäre es wünschenswert, einen Biomarker zu identifizieren, der den Beginn, die Anpassung oder den Erfolg einer Therapie anzeigt. Außerdem ist es notwendig, ein adäquates Therapieprinzip für die Rechtsherzinsuffizienz zu entwickeln. Vielversprechend ist der Einsatz des Biomarkers NT-proBNP und des Beta-Rezeptorenblockers Carvedilol. Diese werden aktuell in einem Teilprojekt des Kompetenznetzes für Angeborene Herzfehler untersucht. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sollen einen Beitrag für dieses Projekt und zukünftige klinische Studien bei herzkranken Kindern leisten.

1.5 Der Biomarker NT-proBNP

1.5.1 Struktur, Entstehung und Bedeutung

Das Amino-terminale pro brain natriuretische Peptid (NT-proBNP) gehört zur Familie der natriuretischen Peptide. Diese umfasst das atriale und brain natriuretische Peptid (ANP, BNP) als Wirksubstanzen, deren inaktiven Spaltprodukte N-terminales proANP und N-terminales proBNP (NT-proANP, NT-proBNP), das C-Typ natriuretische Peptid (CNP) und Urodilatin. CNP und Urodilatin haben als Biomarker einer Herzinsuffizienz keine Bedeutung, deswegen sind im Nachfolgenden unter dem Begriff natriuretische Peptide ANP, NT-proANP, BNP und NT-proBNP zu verstehen.

Die natriuretischen Peptide sind Peptidhormone und werden im Herzen produziert, wobei bei Gesunden ANP überwiegend im Vorhof und BNP überwiegend im linken Ventrikel gebildet wird (Yasue et al. 1994). Die Vermutung, dass das Herz eine endokrine Funktion besitzt, wurde vor ca. 25 Jahren durch die Injektion atrialer Kardiomyozyten bei Ratten und nachfolgend beobachteter Natriuresis und Diuresis erstmals bestätigt (de Bold et al. 1981). Ca. sieben Jahre später wurde im Gehirn von Schweinen eine dem atrialen natriuretischen Faktor ähnliche Substanz (BNP) entdeckt (Sudoh et al. 1988), welches bei Menschen hauptsächlich im Herzen gebildet wird. Bei erhöhter Volumen- und/oder Wandbelastung des Herzens werden die natriuretischen Peptide in das Blut abgegeben und wirken über natriuretische Peptid-Rezeptoren unter anderem vasodilatierend und natriuretisch. BNP (32 Aminosäuren) und NT-proBNP (76 Aminosäuren) entstehen gleichzeitig durch die enzymatische Spaltung mit Furin aus dem Vorläuferhormon proBNP (Abbildung 2). Der Abbau von ANP und BNP erfolgt sowohl enzymatisch als auch durch

rezeptor-gebundene Endozytose (Vanderheyden et al. 2004). Die inaktiven Spaltprodukte NT-proANP und NT-proBNP werden hauptsächlich renal eliminiert (Hall 2004).

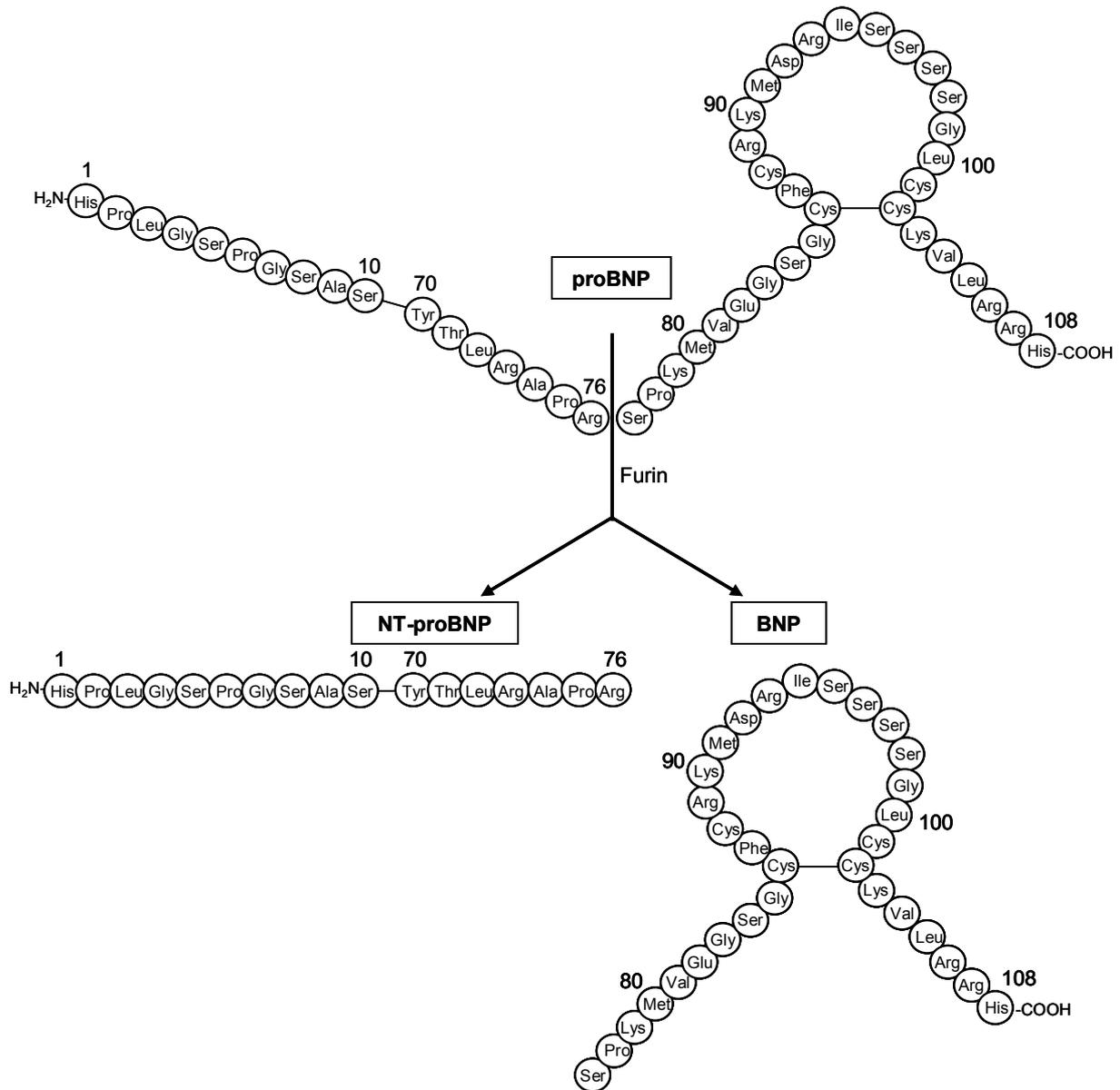


Abbildung 2: Entstehung von BNP und NT-proBNP

NT-proBNP und BNP entstehen gleichzeitig bei der enzymatischen Spaltung von proBNP. Folgende Aminosäuren sind am Aufbau der beiden Peptidhormone beteiligt: Ala = Alanin, Cys = Cystein, Asp = Asparaginsäure, Phe = Phenylalanin, Gly = Glycin, His = Histidin, Ile = Isoleucin, Lys = Lysin, Leu = Leucin, Met = Methionin, Pro = Prolin, Glu = Glutamin, Arg = Arginin, Ser = Serin, Thr = Threonin, Val = Valin und Tyr = Tyrosin.

Gemäß der Definition von Biomarkern gehören natriuretische Peptide zu den Markern, die einen pathogenen Prozess beschreiben. Mit zunehmender kardialer Dysfunktion nimmt die Höhe des Plasmaspiegels der natriuretischen Peptide bei Erwachsenen zu. Deswegen können sie sowohl für die Diagnose als auch die Prognose einer Linksherzinsuffizienz eingesetzt werden (Clerico und Emdin 2004, Doust et al. 2004, Doust et al. 2005). So konnte zum Beispiel in einer prospektiven Studie mit 142 Patienten mit fortgeschrittener Linksherzinsuffizienz gezeigt werden, dass NT-proBNP ein unabhängiger Marker für die Prognose dieser Patienten war (Gardner et al. 2003). Aber auch in einer Studie mit 3346 nicht-stationären Personen ohne Herzinsuffizienz bedeutete ein BNP-Wert über der 80ten Perzentile in diesem Kollektiv ein dreifach höheres Risiko, herzinsuffizient zu werden (Wang et al. 2004). Auch bei einer Rechtsherzinsuffizienz gibt es Hinweise darauf, dass die natriuretischen Peptide mit der Schwere der Insuffizienz korrelieren. Zum Beispiel war bei 21 asymptomatischen bzw. leicht symptomatischen Patienten mit chronischer rechtsventrikulärer Drucküberlastung infolge angeborener Herzfehler die rechtsventrikuläre Ejektionsfraktion invers mit ANP und BNP korreliert (Tulevski et al. 2001). In einem Kollektiv von 50 erwachsenen Patienten mit Fallot'scher Tetralogie nach Korrekturoperation hatten die Patienten erhöhte NT-proBNP-Werte, die mit ihrer Herz-Kreislauf-Belastbarkeit korreliert waren (Norozi et al. 2005). Dass natriuretische Peptide möglicherweise auch geeignet sind, eine Herzinsuffizienz-Therapie zu monitorieren, zeigt eine Studie mit erwachsenen Herzinsuffizienzpatienten: Eine NT-proBNP-kontrollierte Therapie der Herzinsuffizienz zeigte sich im Hinblick auf kardiovaskuläre Ereignisse einer klinisch-monitorierten Therapie als überlegen (Troughton et al. 2000).

NT-proBNP besitzt im Vergleich zu BNP einige Vorteile für den Gebrauch als kardialer Biomarker. So ist zum einen die Halbwertszeit mit 120 Minuten ca. sechsfach höher als die Halbwertszeit des BNP (Vanderheyden et al. 2004), zum anderen ist die Stabilität bei Raumtemperatur mit bis zu sieben Tagen im Vergleich zu 24 Stunden für BNP deutlich höher (Gobinet-Georges et al. 2000, Collinson et al. 2004, Mueller et al. 2004). Während bei Gesunden die Plasmakonzentrationen für BNP und NT-proBNP vergleichbar sind, ist die NT-proBNP-Plasmakonzentration bei herzkranken Patienten 2- bis 10-fach höher im Vergleich zum BNP; als Ursache werden eine Verschiebung der kardialen Sekretion und/oder der Clearance-Mechanismen diskutiert (Hunt et al. 1997, Vanderheyden et al. 2004).

1.5.2 NT-proBNP-Normalwerte

Für Erwachsene ist bereits bekannt, dass die NT-proBNP-Plasmakonzentration mit zunehmendem Alter ansteigt und die Werte bei Frauen höher sind als bei Männern (Raymond et al. 2003). Für den Einfluss des Alters werden unterschiedliche Mechanismen wie eine veränderte Nierenfunktion (Giannessi et al. 2001), eine erhöhte myokardiale

Masse (Sayama et al. 1999) oder eine veränderte herzkammerspezifische Genexpression (Raizada et al. 2001) diskutiert. Der Einfluss des Geschlechts wird zum Teil zurückgeführt auf ein niedrigeres Verteilungsvolumen bei Frauen (Raymond et al. 2003). Bei Kindern gibt es bislang nur wenige Untersuchungen mit einer geringen Anzahl an Kindern (Mir et al. 2002, Mir et al. 2003, Rauh und Koch 2003, Nir et al. 2004, Schwachtgen et al. 2005). Aus diesen Untersuchungen resultieren inkonsistente Referenzbereiche, die von Größe und Zusammensetzung des Kollektivs abhängen. Auch die verwendete Methode zur Bestimmung des NT-proBNPs kann die Ergebnisse beeinflussen. In einem direkten Vergleich zweier NT-proBNP-Assays konnte bereits gezeigt werden, dass die Ergebnisse dieser Assays stark voneinander abweichen (Mueller et al. 2003). Ob sich diese Unterschiede auch auf die Interpretation der Ergebnisse für NT-proBNP-Normalwerte bei Kindern auswirken, ist bislang nicht untersucht worden.

Bei Erwachsenen erfüllt NT-proBNP bereits die Voraussetzungen, um als kardialer Biomarker eingesetzt werden zu können (Collinson et al. 2004). Damit dieser Marker auch bei Kindern und speziell bei Patienten mit angeborenen Herzfehlern in klinischen Studien und für die Diagnose- und Prognosestellung eingesetzt werden kann, waren dringend weitere Untersuchungen mit einem größeren Kollektiv erforderlich. Neben der Frage der Alters- und/oder Geschlechtsabhängigkeit galt es den Einfluss des verwendeten Assays auf diese Fragestellung zu untersuchen.

1.6 Der Beta-Rezeptorenblocker Carvedilol

1.6.1 Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von Carvedilol

Carvedilol [C@@H](N1C=CC=C(C=C1)OC)C[C@H](N)CC2=CC=CC=C2 [(±)-1-(Carbazolyl-4-oxy)-3-[2-(2-methoxyphenoxy)ethylamino]-propan-2-ol] (Abbildung 3) ist ein nicht-selektiver Beta-Rezeptorenblocker der dritten Generation mit zusätzlich α_1 -rezeptorenblockierender Komponente und antioxidativen Eigenschaften. Die durch die α_1 -Rezeptorenblockade bedingte Vasodilatation ist besonders in der Herzinsuffizienztherapie erwünscht, da einerseits die Nachlast gesenkt, andererseits eine durch sympathische Gegenregulation auf die Herzfrequenzsenkung hervorgerufene Vasokonstriktion verhindert wird. Die Substanz ist sehr lipophil und hat eine orale Bioverfügbarkeit von ca. 25% (von Mollendorff et al. 1987). Maximale Plasmaspiegel (C_{max}) werden nach ca. 1 - 2 Stunden erreicht, die Plasma-Eliminations-Halbwertszeit ($t_{1/2}$) beträgt ca. 6 - 10 Stunden (McTavish et al. 1993, Morgan 1994). Aufgrund ihrer Lipophilie hat die Substanz ein relativ hohes Verteilungsvolumen mit ca. 1,5 - 2 l/kg Körpergewicht und liegt zu 98 - 99% an Plasmaproteine gebunden vor (von Mollendorff et al. 1987).

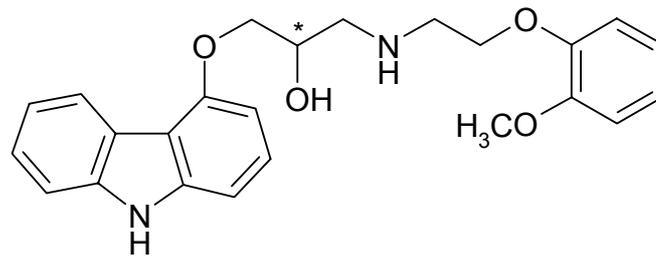


Abbildung 3: Strukturformel Carvedilol

Carvedilol ist optisch aktiv und wird als Racemat in der Therapie eingesetzt, obwohl die Enantiomere sich in ihrer Pharmakodynamik unterscheiden. Das (S)-Enantiomer ist ca. 100-fach stärker β_1 -blockierend als das (R)-Enantiomer; bezüglich der α_1 -Blockade sind die Enantiomere allerdings äquipotent (Ruffolo et al. 1990, Stoschitzky et al. 2001). Die Metabolisierung von (R,S)-Carvedilol erfolgt enantioselektiv und resultiert in Unterschieden in der Bioverfügbarkeit mit 31% für das (R)-Enantiomer versus 15% für das (S)-Enantiomer.

Carvedilol wird hauptsächlich durch hepatische Metabolisierung eliminiert; nur 2% der Substanz werden unverändert mit dem Urin ausgeschieden (Neugebauer et al. 1987). Die totale Clearance beträgt bei Erwachsenen ca. 590 ml/min und kann zu ca. 50% dem polymorph exprimierten Enzym Cytochrom-P450-2D6 (CYP2D6) zugeschrieben werden (Giessmann et al. 2004). Die Cytochrom-P-450-Enzyme gehören zu den Phase-I Enzymen unter den Arzneistoff-abbauenden Enzymen, die hauptsächlich für oxidative Prozesse verantwortlich sind. Man unterscheidet bei den CYP-Enzymen drei Genfamilien (CYP1 - 3), die insgesamt für 24 verschiedene Enzyme kodieren (Hines und McCarver 2002). Für das CYP2D6-Gen sind bisher über 50 verschiedene Allele bekannt (Gaedigk et al. 1999). Mutationen im Bereich dieses Gens führen zu einer großen Variabilität in der Aktivität des Enzyms. Das hat wiederum großen Einfluss auf die resultierenden Carvedilol-Plasmakonzentrationen. In der kaukasischen Bevölkerung zählt man fünf bis zehn Prozent zu den sogenannten Langsammetabolisierern (poor metabolizer). Bei diesen Personen wird als Folge einer Mutation im CYP2D6-Gen kein oder ein nicht funktionstüchtiges Enzym gebildet. Für Carvedilol ist bekannt, dass Personen mit einer eingeschränkten CYP2D6-Enzymaktivität höhere Plasmakonzentrationen als Personen mit einer normalen Enzymaktivität aufweisen (Giessmann et al. 2004). Dadurch kann es bei diesen Personen zu einer höheren Nebenwirkungsrate kommen. Umgekehrt sind ca. ein Prozent der kaukasischen Bevölkerung zu einer sehr schnellen Metabolisierung (ultra rapid metabolizer, URM) über CYP2D6 in der Lage. Dies resultiert in eher niedrigen Plasmakonzentrationen und einer eventuell ineffektiven Therapie. Auch eine CYP2D6-Enzyminduktion durch Rifampicin führt zu niedrigeren Carvedilol-Plasmakonzentrationen (Giessmann et al. 2004).

Neben CYP2D6 sind hauptsächlich noch CYP2C9 und CYP1A2, in geringerem Maß auch CYP1A1, CYP3A4, CYP2C19 und CYP2E1, am Metabolismus des Carvedilols beteiligt (Oldham und Clarke 1997). Zusätzlich kann Carvedilol in einer Phase-II-Reaktion direkt am optisch aktiven Kohlenstoff glucuronidiert werden.

Carvedilol ist auch ein Substrat des Arzneistoff-Transporters P-Glykoprotein (PGP). Hinweise darauf lieferten kompetitive Bindungsassays und transzelluläre Transportstudien, wo Carvedilol eine hohe Affinität zu PGP zeigte (Neuhoff et al. 2000, Bachmakov et al. 2006). Außerdem erhöht Carvedilol bei gleichzeitiger Applikation mit anderen PGP-Substraten wie Digoxin und Cyclosporin A deren Bioverfügbarkeit (De Mey et al. 1990, Kaijser et al. 1997). PGP ist das Produkt des multidrug-resistance Gens 1 (MDR-1) und gehört zu den Effluxtransportern. Es ist in der Bluthirnschranke, der Leber, der Niere, dem Pankreas und zu großen Teilen im Darm an der luminalen Seite der Enterozyten lokalisiert (Thiebaut et al. 1987). Dort transportiert es unter anderem Arzneistoffe aus dem Cytoplasma der Enterozyten wieder hinein in das intestinale Lumen. Dass neben CYP2D6 auch PGP mitbestimmend für die Carvedilol Plasmakonzentration ist, zeigen Untersuchungen analog zur CYP2D6-Induktion durch Rifampicin: Auch die Induktion des PGP durch Rifampicin resultiert in niedrigeren Carvedilol-Plasmakonzentrationen (Giessmann et al. 2004).

1.6.2 Carvedilol in der Therapie der Herzinsuffizienz bei Kindern

Nachdem Carvedilol als erster Beta-Rezeptorenblocker für die Therapie der Herzinsuffizienz bei Erwachsenen zugelassen wurde, hat sich die Substanz mittlerweile auch in der pädiatrischen Herzinsuffizienztherapie zunächst in retrospektiven (Bruns et al. 2001, Shaddy 2001, Rusconi et al. 2004), dann auch in prospektiven Studien als wirksam erwiesen (Azeka et al. 2002, Laer et al. 2002). Bei 15 Patienten im Alter von sechs Wochen bis 19 Jahre erhöhte sich die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) nach sechsmonatiger Carvedilol-Therapie von 36% auf 54% (Laer et al. 2002). In der Studie von Azeka et al. konnten 9 von 14 mit Carvedilol therapierte Patienten nach sechsmonatiger Therapie von der Transplantationsliste genommen werden (Azeka et al. 2002). Vorläufige Ergebnisse der jüngsten placebo-kontrollierten Studie zur Untersuchung der Wirksamkeit von Carvedilol bei pädiatrischen Patienten mit Herzinsuffizienz konnten allerdings im Hinblick auf die untersuchten Endpunkte keinen Vorteil von Carvedilol im Vergleich zu Placebo zeigen (Shaddy et al. 2006). Hinsichtlich der LVEF war zwar die Tendenz einer dosisabhängigen Verbesserung zu erkennen, diese war aber mit $p = 0,09$ nicht signifikant. Der Placebo-Effekt war allerdings überraschend hoch: 55,6% der Patienten aus der Placebogruppe verbesserten sich in Bezug auf einen kombinierten Endpunkt aus subjektiven und objektiven Parametern im Vergleich zu 56,3% der Patienten in der Carvedilolgruppe.

Die Wirkung von Carvedilol bei Rechtsherzinsuffizienz ist bislang wenig untersucht. Quaife et al. konnten bei erwachsenen Patienten mit idiopathisch dilatativer oder ischämischer Kardiomyopathie zeigen, dass nach viermonatiger Carvedilol-Therapie im Vergleich zu Placebo die rechtsventrikuläre Funktion von 27% auf 38% anstieg (Quaife et al. 1998). Unklar ist hier, ob die verbesserte rechtsventrikuläre Funktion nicht eine Folge der ebenfalls verbesserten linksventrikulären Funktion war. In der retrospektiven Studie von Bruns et al., wo sich Carvedilol als wirksam erwiesen hat, waren 20% der Studienteilnehmer Patienten mit angeborenen Herzfehlern (Bruns et al. 2001). Um zu prüfen, ob auch Patienten mit angeborenen Herzfehlern und infolgedessen einer Rechtsherzinsuffizienz von einer Carvedilol-Therapie profitieren, ist eine prospektive, placebo-kontrollierte Studie dringend erforderlich.

Bis jetzt wird Carvedilol bei Kindern in einer für alle Altersgruppen einheitlichen Dosis bezogen auf das Körpergewicht eingesetzt. Es wurden aber bereits bei $n = 15$ Patienten altersabhängige Unterschiede für die Halbwertszeit und die körpergewichtsbezogene Clearance gefunden (Laer et al. 2002). Diese Ergebnisse sprechen für eine altersabhängige statt einer einheitlichen Dosis wie bei Shaddy et al. und könnten eine Erklärung für den ausgebliebenen Vorteil von Carvedilol gegenüber Placebo sein. Ob eine altersabhängige Dosierung tatsächlich sinnvoller ist, wurde bislang noch nicht untersucht. Deswegen sollte in der vorliegenden Arbeit mithilfe eines nichtlinearen Regressionsmodells unter Berücksichtigung gemischter Effekte die Pharmakokinetik von Carvedilol bei Kindern untersucht und relevante Kovariaten identifiziert werden. Mit den Ergebnissen sollte das Dosierungsregime für Carvedilol bei pädiatrischen Patienten in einer Simulation überprüft und gegebenenfalls angepasst werden.

1.7 NT-proBNP für das Monitoring einer Carvedilol-Therapie

Eine NT-proBNP-kontrollierte Therapie von Herzinsuffizienzpatienten zeigte sich bereits einer klinisch-kontrollierten Therapie überlegen (Troughton et al. 2000). Die Therapie enthielt aber keinen Beta-Rezeptorenblocker. In kleineren Kollektiven konnte zwar für NT-proBNP bereits gezeigt werden, dass es auch unter Beta-Rezeptorenblockertherapie gesenkt wird (Stanek et al. 2001, Fung et al. 2003), aber in einer großen, randomisierten Studie mit Carvedilol trat keine signifikante Senkung auf (Hartmann et al. 2004). In der vorliegenden Arbeit sollte NT-proBNP bei den mit Carvedilol therapierten Kindern untersucht werden, um Hinweise auf ein mögliches Monitoring einer Carvedilol-Therapie mit NT-proBNP bei Kindern zu erhalten.

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Um die Voraussetzungen für einen sicheren und effektiven Einsatz des Biomarkers NT-proBNP und des Beta-Rezeptorenblockers Carvedilol in klinischen Studien bei herzkranken Kindern im Allgemeinen bzw. Kindern mit angeborenen Herzfehlern im Speziellen zu schaffen, wurden NT-proBNP und Carvedilol in der vorliegenden Arbeit näher untersucht. Für NT-proBNP wurden in einem Kollektiv gesunder Kinder Normalwerte unter Verwendung zwei verschiedener Methoden erhoben. Ein multizentrischer Laborvergleich sollte die Sicherheit und Vergleichbarkeit der NT-proBNP-Bestimmung in klinischen Studien gewährleisten. Für Carvedilol wurde ausgehend von einer klinischen Studie bei pädiatrischen Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz ein populationspharmakokinetisches Modell entwickelt. Da die Pharmakokinetik von Carvedilol bei Kindern mit Links- bzw. Rechtsherzinsuffizienz vergleichbar ist, können die pharmakokinetischen Daten auf beide Patientenpopulationen angewendet werden. Das populationskinetische Modell wurde evaluiert und für Dosis-Simulationen verwendet. Mit den Ergebnissen der Simulation sollte das aktuelle Dosierungsregime für Carvedilol bei Kindern überprüft und gegebenenfalls optimiert werden. Die abschließende Untersuchung von NT-proBNP bei den mit Carvedilol therapierten Kindern sollte Hinweise liefern, ob NT-proBNP für das Monitoring einer Carvedilol-Therapie eingesetzt werden kann.

Folgende Fragestellungen wurden in der Arbeit berücksichtigt:

- Sind NT-proBNP-Plasmakonzentrationen bei Kindern von Alter und/oder Geschlecht abhängig und entsprechen sie den Werten von Erwachsenen?
- Sind die verschiedenen NT-proBNP-Assays miteinander vergleichbar und wird NT-proBNP in verschiedenen Laboren vergleichbar gemessen?
- Welche Kovariaten beeinflussen die Pharmakokinetik von Carvedilol?
- Lässt sich ein geeignetes populationspharmakokinetisches Modell entwickeln und sind die Ergebnisse mit den individuellen Werten vergleichbar?
- Wie sieht aus pharmakokinetischer Sicht ein adäquates Carvedilol-Dosierungsregime für die Therapie von pädiatrischen Patienten mit Herzinsuffizienz aus?
- Wie verhält sich NT-proBNP bei den mit Carvedilol therapierten Patienten?

2 Methoden

2.1 NT-proBNP-Studie und -Untersuchungen

2.1.1 Studiendesign und -protokoll

An der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf wurde eine offene, prospektive Studie zur Untersuchung der NT-proBNP-Plasmakonzentration bei Kindern und Erwachsenen durchgeführt. Kinder unter 18 Jahren waren ambulante Patienten oder Patienten niedergelassener Kinderärzte mit unkomplizierten Erkrankungen (z.B. leichte Infektion der oberen Atemwege, Bewegungs- und Entwicklungsstörungen, Sozial- und Verhaltensstörungen oder neurologische Erkrankungen wie Migräne), die mittels klinischer Untersuchung und/oder klinisch-chemischer Parameter diagnostiziert wurden. Gesunde Erwachsene waren freiwillige Probanden. Das Studienprotokoll, entsprechend der Deklaration von Helsinki, wurde von der Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg genehmigt (Nachtrag zum Ethikantrag Nr. 1292). Die Durchführung der Studie erfolgte gemäß den ICH- und GCP-Richtlinien. Eine schriftliche Einverständniserklärung wurde von den Erwachsenen selbst oder bei Kindern unter 18 Jahren von einem Erziehungsberechtigten unterzeichnet.

Die Blutentnahme sowohl zur Bestimmung der NT-proBNP-Plasmakonzentration als auch der klinisch-chemischen Parameter fand bei Kindern unter 18 Jahren ausschließlich im Rahmen von Routine-Untersuchungen statt. Bei Erwachsenen erfolgte die Blutentnahme auf freiwilliger Basis.

2.1.2 Einschlusskriterien

- Kinder und Erwachsene beiderlei Geschlechts (0 - 50 Jahre)
- Normalwerte für C-reaktives Protein (CRP), Leberenzyme, Leukozyten, Kreatinin und Elektrolyte

2.1.3 Ausschlusskriterien

- Jede Herz-Kreislauf-Erkrankung
- Nieren- und/oder Leberinsuffizienz
- Störungen des Wasser- und/oder Elektrolythaushaltes

2.1.4 NT-proBNP-Plasmakonzentrations-Bestimmung

Blut wurde mittels Venenpunktion in eine Ammonium-Heparin-Monovette® abgenommen. Das Plasma wurde bei 4000 rpm und 4°C abzentrifugiert und Aliquote bei -80°C bis zur Analyse gelagert. Die NT-proBNP-Plasmakonzentration wurde für jede Probe zweimal bestimmt; einmal mit einem Elektrochemilumineszenz-Immunoassay (ECLIA) und einmal mit einem Enzymimmunoassay (EIA).

2.1.4.1 Elektrochemilumineszenz-Immunoassay (ECLIA)

Der ECLIA ist ein vollautomatisierter, nicht-kompetitiver Immunoassay zur Bestimmung des NT-proBNPs in humanem Plasma und Serum. Er enthält zwei polyklonale Antikörper, die gegen verschiedene Epitope des NT-proBNPs gerichtet sind. Ein biotinylierter Antikörper detektiert die Aminosäuren 1 - 21, ein mit einem Ruthenium-Komplex markierter Antikörper detektiert die Aminosäuren 39 - 50.

20 µl der Probe werden mit beiden Antikörpern inkubiert und bilden einen Sandwich-Komplex. Nach Zugabe von mit Streptavidin beschichteten Mikropartikeln wird der Komplex durch eine Biotin-Streptavidin-Wechselwirkung an die Festphase gebunden. Das Reaktionsgemisch wird in eine Messzelle überführt und durch Anlegen einer Spannung wird die Ruthenium-Chemilumineszenz induziert, welche mit einem Photomultiplier aufgenommen wird. Die Konzentration wird mithilfe einer 2-Punkt-Kalibrationskurve berechnet. Der Assay kann auf den Geräten Elecsys 1010, 2010 oder Modul E170 der Elecsys®-Serie (Roche Diagnostics, Mannheim) eingesetzt werden. Er umfasst einen Messbereich von 5 - 35.000 ng/l (0,6 - 4120 pmol/l). Die Intraassay-Präzision am Elecsys Modul E170 beträgt 0,9% (474 ng/l) bzw. 3,0% (3786 ng/l), die Interassay-Präzision beträgt 3,6% (4002 ng/l) bzw. 5,8% (494 ng/l).

Die NT-proBNP-Messungen mit dem ECLIA-Assay wurden für diese Studie in dem Institut für Klinische Chemie Zentrallaboratorien der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf an Elecsys® Modul E170 durchgeführt.

2.1.4.2 Enzymimmunoassay (EIA)

Der EIA ist im Gegensatz zu dem ECLIA ein kompetitiver Immunoassay. Er enthält einen aufgereinigten, polyklonalen Schafantikörper, der auf der Oberfläche einer Mikrotiterplatte fixiert ist. Dieser Antikörper detektiert die Aminosäuren 8 - 29 des NT-proBNPs. Das NT-proBNP der Probe konkurriert mit zugesetztem, mit Peroxidase gelabeltem NT-proBNP (Tracer) um den Antikörper. Je höher die NT-proBNP-Konzentration der Probe, desto mehr Tracer wird freigesetzt bzw. desto weniger Tracer liegt mittels der Antikörper gebunden vor. Nur der gebundene Tracer wird durch eine Peroxidase vermittelte Farbreaktion nachgewiesen. Die Intensität dieser Reaktion ist proportional zu der Tracermenge und

antiproportional zu der NT-proBNP-Konzentration der Probe. Der Messbereich des EIA liegt bei 42 - 8457 ng/l (5 - 1000 pmol/l). Die Intraassay-Präzision beträgt 6,5% (2688 ng/l) bzw. 4,0% (5594 ng/l) und die Interassay-Präzision beträgt 4,4% (2688 ng/l) bzw. 3,8% (5594 ng/l).

Die Messungen wurden am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf durchgeführt. Alle Reagenzien wurden bis zu ihrer Verwendung bei 4°C im Kühlschrank gelagert und vor der Analyse auf Raumtemperatur gebracht. Ein lyophilisierter NT-proBNP-Standard wurde in 3 ml Assaypuffer gelöst. Diese Lösung (900 fmol/ml = 7560 ng/l) diente als Ausgangslösung für die Herstellung einer Verdünnungsreihe. Bei jedem Verdünnungsschritt wurde 1:3 mit dem Assaypuffer verdünnt, so dass folgende Standardlösungen entstanden: 900, 300, 100, 33 und 11 fmol/l. Als Nullkontrolle diente der reine Assaypuffer. Eine mitgelieferte NT-proBNP-Kontrolle wurde in 250 µl Aqua bidest gelöst und mit Assaypuffer auf 2 ml verdünnt.

Die Messung beginnt mit der Bindung des NT-proBNP-Antikörpers an die Festphase. Dazu wurde der lyophilisierte NT-proBNP-Antikörper in 22 ml Assaypuffer gelöst. Je 200 µl wurden in die benötigten Wells der Mikrotiterplatte pipettiert und anschließend erfolgte die erste Inkubation für fünf Stunden bei Raumtemperatur. Nach Verwerfen der Inhalte wurden drei Waschgänge mit jeweils 350 µl pro Well mit dem mitgeliefertem Waschpuffer durchgeführt. Dieser wird aus einem Konzentrat hergestellt, welches 1:10 mit Aqua bidest verdünnt wird. Die Waschvorgänge erfolgten an einem automatischen Mikrotiterplattenwaschgerät. Nach der Bindung des NT-proBNP-Antikörpers an die Festphase erfolgte die Probenaufgabe. Je 200 µl der Standardlösungen und der Kontrolle wurden in separate Wells gegeben. 50 µl der zu vermessenden Proben wurden ebenfalls getrennt in die Wells pipettiert und mit 150 µl Assaypuffer verdünnt. In jedes Well (außer der Nullkontrolle) wurden 50 µl mit Peroxidase gelabeltem NT-proBNP (Tracer) zugesetzt. Danach erfolgte eine Inkubation über Nacht für 20 Stunden bei 4°C im Dunkeln. Nach der Inkubation wurde der Inhalt der Wells verworfen und dreimal mit je 350 µl Waschpuffer gewaschen. Nach Zugabe von 200 µl Tetramethylbenzidin (TMB) als Substrat für die Peroxidase wurde ein letztes Mal für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach genau 20 Minuten wurde jeweils 50 µl Stop-Lösung (H₂SO₄) zugesetzt, um die Reaktion zu unterbrechen. Mit einem ELISA-Reader wurde die Absorption bei 450 nm gemessen. Mit den Standardlösungen wurde eine sigmoide Eichkurve erstellt, anhand derer die Konzentration der Kontrolle und der zu vermessenden Proben bestimmt wurden. Alle Proben wurden dreifach vermessen.

2.1.5 Multizentrischer NT-proBNP-Laborvergleich

Bei einem multizentrischen Laborvergleich sollte die Vergleichbarkeit und die Präzision der NT-proBNP-Bestimmung in verschiedenen Zentren überprüft werden. An diesem Laborvergleich nahmen zunächst vier und in einem zweiten Schritt elf Zentren aus Deutschland teil. NT-proBNP-Plasmaproben aus Routine-Analysen von Patienten stammten aus dem Institut für Klinische Chemie Zentrallaboratorien der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf. Diese wurden mit Plasma von Gesunden vermischt und aliquotiert. Wegen der guten Stabilität des NT-proBNPs wurden die Plasmaproben bei Raumtemperatur an die Zentren verschickt (Collinson et al. 2004). Jedes Zentrum erhielt drei heparinisierte Plasmaproben zu jeweils 800 bzw. 600 µl, die bis zur Analyse im Kühlschrank gelagert wurden. Die Messung sollte in jedem Labor zwei (erster Laborvergleich) bzw. drei (zweiter Laborvergleich) Tage nach Versand in einem Zeitfenster von zwei Stunden erfolgen. Die Messmethode war die in dem jeweiligen Zentrum übliche Methode zur Bestimmung des NT-proBNPs. Da die Zentren zum Teil routinemäßig Mehrfachbestimmungen durchführen, wurden vor der Berechnung der Präzision die Messwerte von jedem Labor gemittelt, so dass pro Labor pro Probe nur ein Messwert resultiert. Die Präzision wurde über die relative Standardabweichung der Messwerte ermittelt. Diese sollte kleiner als 20% sein. Die Richtigkeit der Messung konnte nicht ermittelt werden, da die wahre Konzentration der Proben nicht bekannt war.

2.1.6 Statistik

Die Auswertung erfolgte mit der Software SPSS für Windows (Version 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) und Microsoft Excel für Windows (Version für Microsoft Office XP, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA). Da NT-proBNP nicht normalverteilt ist, wurde der nicht-parametrische Kruskal-Wallis-Test zur Bewertung des Einflusses von Alter und Geschlecht auf NT-proBNP bei Kindern genutzt. Bei den Erwachsenen, bei denen nur zwischen männlich und weiblich unterschieden wurde, wurde der Wilcoxon-Test verwendet. Für den Vergleich der beiden NT-proBNP-Assays wurden eine Passing-Bablok-Regression, der Wilcoxon-Test und der Bland-Altman-Plot verwendet. P-Werte kleiner 0,05 wurden als statistisch signifikant betrachtet.

2.2 Populationsbasierte Analyse der Carvedilol-Studie

2.2.1 Studiendesign und -protokoll

Aufbauend auf eine offene, nicht-kontrollierte, prospektive Studie zur Therapie der terminalen Herzinsuffizienz bei pädiatrischen Patienten mit Carvedilol wurde eine populationsbasierte Analyse durchgeführt. Die Patienten wurden in der Abteilung für pädiatrische Kardiologie der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universitätsklinik Eppendorf in Zusammenarbeit mit dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie behandelt. Das Studienprotokoll gemäß der Deklaration von Helsinki wurde von der Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg genehmigt (AZ 1292). Die Durchführung der Studie erfolgte entsprechend den ICH- und GCP-Richtlinien. Kinder, sofern möglich, und Erziehungsberechtigte wurden über die Ziele und Risiken der Studie aufgeklärt und gaben schriftlich ihr Einverständnis.

Die Patienten wurden über einen Zeitraum von sechs Monaten beobachtet. An zwei Tagen wurden Plasmakonzentrations-Zeitprofile von Carvedilol durchgeführt (siehe 2.2.8). Vor Beginn der Therapie wurden die Patienten für das arzneimittelabbauende Enzym CYP2D6 phäno- (siehe 2.2.9) und genotypisiert. Zur Bewertung des klinischen Verlaufs wurde die Herzfunktion vor und einmal monatlich unter der Therapie mittels Echokardiographie geprüft. Die körperliche Leistungsfähigkeit wurde mithilfe der NYHA-Klassifikation und einer Bewertungsskala nach Ross vor und nach der Therapie beurteilt. Als biochemischer Marker wurde zunächst Noradrenalin vor und während der Therapie untersucht. NT-proBNP wurde mithilfe des ECLIA-Assays retrospektiv untersucht (siehe 2.2.10).

2.2.2 Einschlusskriterien

- Patienten beiderlei Geschlechts (0 - 20 Jahre)
- Diagnostizierte Herzinsuffizienz
- Maximale Therapie mit Herzglykosiden, ACE-Hemmern und Diuretika seit mindestens zwei Monaten ohne Verbesserung des Krankheitszustandes
- Seit mindestens vier Wochen vor Studienbeginn klinisch stabiler Zustand der Patienten

2.2.3 Ausschlusskriterien

- Frühgeborene oder hypotrophe Neugeborene (unter der zehnten Gewichtsperzentile)
- Anhaltende, ventrikuläre Tachykardien
- Altersentsprechende, klinisch gesicherte Hypertonie über der 97ten Perzentile
- Altersentsprechende, klinisch gesicherte Bradykardie unter der dritten Perzentile

- Höhergradiger Herzblock, welcher nicht durch eine antiarrhythmische Intervention oder einen Schrittmacher beherrscht wurde
- Akute Myokarditis
- Akute Infektionserkrankungen
- Andere Erkrankungen außer der Herzinsuffizienz, die das Überleben einschränken können (z.B. terminale Nieren- oder Leberinsuffizienz)
- Einnahme von Alpha- und/oder Beta-Rezeptorenblockern, Calciumkanalblockern oder Antiarrhythmika der Klasse I
- Bekannte allergische Reaktionen auf den verwendeten Wirkstoff oder sonstige Bestandteile des Arzneimittels
- Fehlende Sicherstellung einer kontinuierlichen Betreuung und Überwachung des Patienten in seiner häuslichen Situation

2.2.4 Kriterien für den Abbruch bei einzelnen Patienten

- Medikamentenunverträglichkeit nach Gabe einer Testdosis Carvedilol
- Blutdruckabfall systolisch unter die altersentsprechende dritte Perzentile, Unwohlsein, Benommenheit oder Somnolenz des Patienten
- Verstärkung der terminalen Herzinsuffizienz mit Beeinträchtigung der Herzfunktion, die bis zum Herzstillstand führen kann
- Andere, bei Beginn der Studie nicht vorhersehbare Erkrankungen des Patienten
- Nichteinhalten der Prüfungsbedingungen

2.2.5 Kriterien für den Abbruch der gesamten Studie

- Auftreten schwerwiegender Begleitsymptome bei zwei oder mehr Patienten
- Auftreten schwerwiegender, bisher unbekannter unerwünschten Wirkungen

2.2.6 Therapieschema

Die Therapie mit Carvedilol muss einschleichend erfolgen und wurde mit einer Testdosis von 0,09 mg/kg Körpergewicht pro Tag begonnen. Bei guter Verträglichkeit wurde Carvedilol ab dem zweiten Tag zweimal täglich im Abstand von zwölf Stunden gegeben. Die Dosissteigerung erfolgte bei Patienten, die jünger als vier Jahre waren, in einwöchigen Abständen, bei Patienten, die älter als vier Jahre waren, in zweiwöchigen Abständen bis zu einer Zieldosis von 0,7 mg/kg Körpergewicht verteilt auf zwei Einzeldosen. Die Studienmedikation wurde in der Apotheke der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf in Form von Kapseln hergestellt. Dazu wurden Dilatrend® Tabletten (Hoffmann-La-Roche AG,

Grenzach-Wyhlen) mit Kapselfüllstoff nach DAB (99,5% Mannitol und 0,5% Siliciumdioxid) verrieben. Der Kapselinhalt wurde wiederum für die Einnahme in Wasser gegeben und die Mischung oral verabreicht. Im Anschluss sollten, wenn möglich, ca. 100 ml Wasser getrunken werden.

2.2.7 Plasmakonzentrations-Zeitprofile

Die Plasmakonzentrations-Zeitprofile wurden einmal am Tag der Testdosis und ein zweites Mal nach mindestens drei Tagen unter der Zieldosis abgenommen. Von einigen Patienten wurden Plasmakonzentrations-Zeitprofile bei einer mittleren Dosis abgenommen. Die älteren Patienten blieben bis vier Stunden nach der Einnahme nüchtern; Patienten jünger als zwei Jahre blieben eine Stunde vor bis zwei Stunden nach der Einnahme nüchtern. Über eine Venenverweilkanüle wurden Blutproben zu den Zeitpunkten vor und 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 6, 8 und 12 Stunden nach Einnahme von Carvedilol zur Bestimmung der Carvedilol-Plasmakonzentration entnommen. Einzelne Carvedilol-Plasmakonzentrationen, die im Rahmen des Monitorings der Therapie überprüft wurden, gingen nicht in die populationskinetische Analyse ein.

2.2.8 Bestimmung der Plasmakonzentration von Carvedilol

Carvedilol wurde mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und Fluoreszenzdetektion bestimmt (Behn et al. 2001). Als interner Standard wurde Naftopidil eingesetzt. Die Methode umfasst einen Konzentrationsbereich von 0,40 - 242,0 µg/l.

Zunächst wird das Plasma der Patientenproben 20 Minuten bei 4000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Zu 300 µl Patientenplasma werden 500 µl Kaliumacetatpufferlösung (0,5 mol/l, pH 3,5) und 100 µl Naftopidilstandardlösung gegeben, die Proben werden gut durchmischt (Vortexer) und anschließend 20 Minuten bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert. Zur Quantifizierung der unbekanntenen Proben werden Vergleichslösungen mit bekannter Carvedilolkonzentration eingesetzt, die ebenfalls aus 300 µl Leerplasma, je 100 µl Carvedilol- und Naftopidilstandardlösung und 500 µl Kaliumacetatpufferlösung hergestellt werden. Diese Proben werden wie oben beschrieben gemischt und zentrifugiert. Alle Proben werden durch eine Festphasenextraktion aufgereinigt. Dazu werden Cyanopropyl- (CN-) Säulen verwendet, die mit einer entsprechenden Steckvorrichtung auf eine Vakuumkammer gesteckt werden. Die Säulen werden zweimal mit je 1 ml Methanol und zweimal mit je 1 ml Aqua bidest gereinigt und aktiviert. Die Überstände der zentrifugierten Plasmaproben werden auf die Säulen gegeben und langsam mithilfe des Vakuums durch die Säulen gezogen. Dabei binden Carvedilol und Naftopidil an das CN-Material. Anschließend wird zweimal mit je 1 ml Aqua bidest gespült, um wasserlösliche Restbestandteile zu entfernen. Die Analyten werden mit zweimal 200 µl Extraktionspuffer von der Säule gewaschen und in Eppendorfgläsern aufgefangen. Die so erhaltene, aufgereinigte Probe wird

20 Minuten bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert und je 100 µl der Überstände werden in die HPLC überführt.

Es wurde ein HPLC-System der Firma Shimadzu mit der dazugehörigen Software verwendet (siehe auch 3.2.2). Als mobile Phase diente ein Gemisch aus 0,25 mol/l Kaliumacetatpufferlösung pH 4,0 und Acetonitril im Verhältnis 40:60 (V/V), welches vor der Verwendung 30 Minuten mit Helium begast wurde. Die C6-Vor- und Trennsäule wurde mindestens eine Stunde lang mit der mobilen Phase äquilibriert. Die Fließgeschwindigkeit betrug 1 ml/min, die Analysenzeit acht Minuten. Die Detektion erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 285 nm, die Emission wurde bei 360 nm gemessen. Das Injektionsvolumen betrug 25 µl.

2.2.9 Phänotypisierung für CYP2D6

Die Phänotypisierung für das Enzym CYP2D6 erfolgte mithilfe der Testsubstanz Dextromethorphan (enthalten in NeoTussan® Hustensaft), die fast vollständig über dieses Enzym abgebaut wird. Patienten, die älter als 0,5 Jahre waren, nahmen zur Nacht eine altersentsprechende Menge NeoTussan® Hustensaft ein: 0,5 - 2 Jahre 3 ml, 3 - 6 Jahre 5 ml, 7 - 12 Jahre 7,5 ml und 12 - 19 Jahre 15 ml; 1 ml Hustensaft enthält 1,23 mg Dextromethorphan. Eine Urinprobe vor der Einnahme sowie der Sammelurin über acht Stunden nach der Einnahme wurden von jedem Patienten abgegeben. In dem Sammelurin wurden die Muttersubstanz Dextromethorphan und der durch O-Desmethylierung entstehende Hauptmetabolit Dextrorphan mittels HPLC und Fluoreszenzdetektion bestimmt (Jurima-Romet et al. 1997). Die Methode wurde leicht modifiziert angewendet. Interner Standard war Verapamil. Die metabolische Kapazität für CYP2D6 errechnet sich aus dem Logarithmus des Quotienten aus Muttersubstanz- zu Metabolit-Konzentration. Je kleiner dieser Wert, desto schneller erfolgt die Metabolisierung. Ab einer metabolischen Kapazität größer 0,3 spricht man von einem Langsammetabolisierer (poor metabolizer).

1 ml Urin wurden mit 2000 Einheiten Beta-Glucuronidase, die in 1 ml 0,1 mol/l Kaliumacetatpufferlösung pH 5,0 gelöst worden waren, über Nacht bei 37°C inkubiert. Es wurden jeweils die beiden Patientenproben und zwei Vergleichsproben analysiert. Die Vergleichsproben wurden mit dem Urin gesunder Personen hergestellt und vor der Inkubation wurden zusätzlich 50 µl Dextromethorphan- und 50 µl Dextrorphan-Lösung zugesetzt. Nach der Inkubation wurde allen Proben außer dem Nullwert des Patienten 50 µl der Verapamil-Standardlösung hinzugefügt. Die Aufarbeitung erfolgt analog zu 2.2.8. Abweichend davon erfolgt die Elution der Analyten von den Festphasenextraktionssäulen mit zweimal 250 µl des Dextromethorphan-Extraktionspuffers.

Für die HPLC wurde als Fließmittel ein Gemisch aus 0,25 mol/l Kaliumacetatpuffer pH 4 und Acetonitril im Verhältnis 50:50 (V/V) verwendet. Die C6-Vor- und Trennsäule wurden eine Stunde vor Analysenbeginn mit der mobilen Phase äquilibriert. Die Fließgeschwin-

digkeit betrug 1,2 ml bei einer Analysenzeit von neun Minuten. Bei einer Wellenlänge von 270 nm erfolgte die Anregung zur Fluoreszenz, die bei 300 nm gemessen wurde. Das Injektionsvolumen betrug 25 µl.

2.2.10 NT-proBNP-Bestimmung

NT-proBNP wurde mit dem ECLIA-Assay retrospektiv untersucht, was aufgrund der guten Stabilität des NT-proBNPs möglich war. Es wurden Verlaufsproben im Zeitraum von null bis sechs Monaten unter der Therapie untersucht. Jeweils 200 µl Plasma dieser Proben wurden in dem Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik der Heinrich-Heine-Universität an dem Elecsys® E170 Modul auf ihre NT-proBNP-Konzentration hin untersucht. Es sollte einerseits der Zusammenhang zwischen NT-proBNP und der linksventrikulären Ejektionsfraktion und andererseits der Effekt der Therapie auf die NT-proBNP-Plasmakonzentration beurteilt werden.

2.2.11 Populationskinetische Auswertung

Die populationskinetische Auswertung erfolgt mit Hilfe der in Fortran geschriebenen Software NONMEM (Nonlinear Mixed Effects Model). Diese berechnet mithilfe nichtlinearer Regressionsmodelle Populationsmittelwerte, deren Variabilität und individuelle Werte für pharmakokinetische Parameter. Das Modell setzt sich aus sogenannten fixen und zufälligen Effekten zusammen. Zu den fixen Effekten zählen die Populationsmittelwerte, unabhängige Größen wie Dosis und Zeit, aber auch die Einflussgrößen (Kovariaten) wie Alter oder Geschlecht. Zu den zufälligen Effekten zählen die inter- und intraindividuelle Variabilität. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die pharmakokinetischen Modelle, die für die Kinetik von Carvedilol nach oraler Gabe in Frage kamen und in dieser Arbeit getestet wurden.

Modell	Kodierung in NONMEM	Pharmakokinetische Parameter
Einkompartimentmodell	ADVAN2 TRANS2	CL (Clearance) V (Verteilungsvolumen) K (Absorptionsgeschwindigkeitskonstante)
Einkompartimentmodell mit verzögerter Absorption (Lagtime)	ADVAN2 TRANS2 + TLAG	CL (Clearance) V (Verteilungsvolumen) K (Absorptionsgeschwindigkeitskonstante) TLAG (Lagtime)
Zweikompartimentmodell	ADVAN4 TRANS4	CL (Clearance) V2 (zentrales Verteilungsvolumen) V3 (peripheres Verteilungsvolumen) Q (interkompartimentelle Clearance) KA (Absorptionsgeschwindigkeitskonstante)
Zweikompartimentmodell mit verzögerter Absorption (Lagtime)	ADVAN4 TRANS4 + TLAG	CL (Clearance) V2 (zentrales Verteilungsvolumen) V3 (peripheres Verteilungsvolumen) Q (interkompartimentelle Clearance) KA (Absorptionsgeschwindigkeitskonstante) TLAG (Lagtime)

Tabelle 1: Übersicht über die pharmakokinetischen Modelle und ihre Parameter

Die vier dargestellten Modelle kamen für die Kinetik von Carvedilol nach oraler Applikation in Frage. ADVAN2 und 4 sind die Fortran-Routinen für ein Ein- bzw. Zweikompartimentmodell mit Absorption erster Ordnung; TRANS2 und TRANS4 sind die dazugehörigen TRANS-Routinen, die die kinetischen Parameter reparametrisieren. Die Lagtime (TLAG) wird in dem Modell definiert und ist nicht Bestandteil der jeweiligen Fortran-Routine.

2.2.11.1 Prinzip der populationskinetischen Analyse

Abgeleitet wird das populationskinetische Modell von der individuellen pharmakokinetischen Analyse, wo die Plasmakonzentration, zum Beispiel in einem Zweikompartimentmodell nach Einmaldosierung mit einer Absorption erster Ordnung, wie folgt berechnet wird:

$$c_j = A \times e^{-\alpha \times t} + B \times e^{-\beta \times t} - (A + B) \times e^{-ka \times t} \quad (1)$$

Die Plasmakonzentration zum Beobachtungszeitpunkt j (c_j) hängt von der Zeit (t), der Absorptionsgeschwindigkeitskonstanten (ka) und den sogenannten Hybridkonstanten (A , B , α und β) ab. In diese gehen wiederum Informationen über die Dosis, die Bioverfügbarkeit, das Verteilungsvolumen und die Geschwindigkeitskonstanten für den Austausch zwischen den Kompartimenten und für die Elimination ein. Oder allgemeiner formuliert:

$$y_j = f(x_j, \varphi) + \varepsilon_j \quad (2)$$

Die Plasmakonzentration zum Beobachtungszeitpunkt j (y_j) wird beschrieben durch eine Funktion (f , z.B. Zweikompartimentmodell) sowie durch einen Restfehler (ε_j , z.B. Messfehler). In die Funktion f gehen wiederum unabhängige Variablen (x_j , z.B. Zeit und Dosis) und pharmakokinetische Parameter (φ , z.B. Absorptionsgeschwindigkeitskonstante) ein.

Für die populationskinetische Analyse mithilfe nichtlinearer Regressionsmodelle werden alle Individuen in einem Modell zusammengefasst. Die Plasmakonzentration zum Beobachtungszeitpunkt j für Individuum $i=1, \dots, n$ errechnet sich dann wie folgt:

$$y_{ij} = f(x_{ij}, \varphi_i) + \varepsilon_{ij} \quad (3)$$

$$\text{mit } \varphi_i = g(z_i, \theta) + \eta_i \quad (4)$$

Die obere Formel entspricht Formel (2) unter zusätzlicher Berücksichtigung der verschiedenen Individuen $i=1, \dots, n$. Die pharmakokinetischen Parameter eines Individuums (φ_i) werden durch eine Funktion g beschrieben, die von Kovariaten (z_i , z.B. Alter) und Populationsmittelwerten (θ) abhängt. Im Gegensatz zur individuellen Analyse gehen hier auch interindividuelle Unterschiede (η_i) mit in das Modell ein.

2.2.11.2 Modellentwicklung mit NONMEM

Die Modellentwicklung in NONMEM erfolgt in drei Schritten: Zunächst wird ein strukturelles Modell (f) ausgewählt, welches den Verlauf der Arzneistoffkonzentration über die Zeit beschreibt (z.B. Zweikompartimentmodell). In dem strukturellen Modell werden die Populationsmittelwerte (θ) definiert. Der zweite Schritt ist die Einführung der interindividuellen Variabilitäten (η) und die Auswahl eines geeigneten Fehlermodells, welches die intraindividuelle Variabilität (ε , Restfehler; z.B. Messfehler) beschreibt. Das Kovariatenmodell (z) wird im dritten Schritt entwickelt und beschreibt zum Beispiel den Einfluss von Alter, Gewicht oder Komedikation auf die kinetischen Parameter. Abbildung 4 zeigt die Bedeutung der inter- und intraindividuellen Variabilität in der populationskinetischen Analyse.

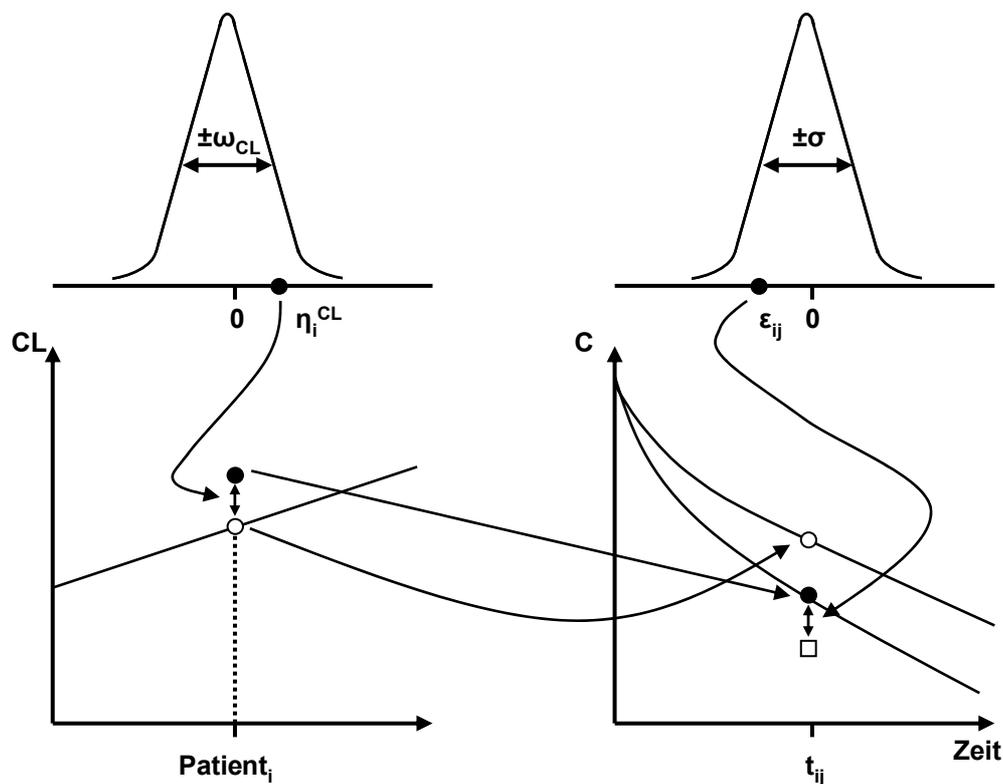


Abbildung 4: Bedeutung der inter- und intraindividuellen Variabilität

Linke Hälfte: Interindividuelle Variabilität. Offener Kreis ist der populationsbasierte Wert der Clearance (CL); geschlossener Kreis ist die tatsächliche Clearance für den i -ten Patienten, die um den Wert η_i^{CL} , zufällig gewählt aus normalverteilten Werten mit einem Mittelwert 0 und einer Standardabweichung ω_{CL} , vom Populationswert abweicht.

Rechte Hälfte: Intraindividuelle Variabilität. Die populationsbasierte Konzentration (offener Kreis) zum Beobachtungszeitpunkt t_{ij} wird um die veränderte Clearance für das i -te Individuum zur vorhergesagten Konzentration (geschlossener Kreis) korrigiert. Die vorhergesagte Konzentration weicht wiederum von der gemessenen Konzentration (offenes Quadrat) um den Restfehler ε_{ij} ab, zufällig gewählt aus einer Normalverteilung mit Mittelwert 0 und Standardabweichung σ (modifiziert nach NONMEM User Guide - Part V).

Während des Tests eines Modells mit NONMEM werden folgende Schritte durchlaufen:

1. Initiale Schätzung (Initial Estimation Step): Berechnung der Anfangswerte der pharmakokinetischen Parameter; diese werden in der Regel vom Anwender vorgegeben.
2. Schätzung (Estimation Step): Berechnung der für das Modell am besten geeigneten pharmakokinetischen Parameter. NONMEM versucht mithilfe der oben beschriebenen Funktionen (3) und (4) eine Kurve an die Daten anzupassen. Die Abweichung der von dem Modell vorhergesagten Konzentrationen von den tatsächlich gemessenen Konzentrationen dient zur Beurteilung der Anpassungsgüte: Je kleiner die Summe der gewichteten Abweichungsquadrate, desto besser die Anpassung. Dieser Wert geht in einen Algorithmus, die sogenannte logarithmierte Maximum Likelihood Funktion ein. Die Minimierung dieser Funktion ist das Ziel und liefert die finalen Schätzwerte für die pharmakokinetischen Parameter.
3. Kovarianzschritt: Schätzung der Kovarianzmatrix der pharmakokinetischen Parameter. Mithilfe dieser Matrix können Standardabweichungen und Korrelationen berechnet werden.
4. Tabellen und Scatterplots: Darstellung der Ergebnisse in Tabellen und Scatterplots.

Alle Schritte sind optional, einige hängen allerdings voneinander ab. Auch ein Simulationsschritt ist möglich, wie in Abschnitt 2.3 näher beschrieben wird.

2.2.11.3 Modellentwicklung für die Populationskinetik von Carvedilol

In die Modellentwicklung für die Populationskinetik von Carvedilol gehen die Daten der Patienten (z.B. Alter, Größe) und deren Plasmakonzentrations-Zeitprofile ein. Wegen des großen Konzentrationsbereiches der gemessenen Carvedilol-Plasmakonzentrationen (0 - 193 µg/l) wurden die Konzentrationen für die populationskinetische Analyse logarithmiert. Um die Zeitspanne zwischen Test- und Zieldosis zu berücksichtigen, kann man eine sogenannte inter-occasion Variabilität (IOV) einführen (Karlsson und Sheiner 1993). Allerdings ist die Variabilität für ein Individuum zwischen zwei Untersuchungszeitpunkten oft größer als die interindividuelle Variabilität. Deswegen kann man näherungsweise auch so verfahren, dass zwei zusammengehörige Profile als zwei von verschiedenen Patienten stammende Profile betrachtet werden (Sheiner 1999). Initiale Parameter wurden mithilfe der individuell ermittelten pharmakokinetischen Parameter geschätzt, die kompartimentell berechnet wurden. Da die Carvedilol-Applikation nur oral und nicht intravenös erfolgte, kann die orale Bioverfügbarkeit nicht ermittelt werden und geht somit als zusätzlicher Faktor (f) in die Werte der Clearances und der Verteilungsvolumina ein.

Die Modellentwicklung wurde mit der Auswahl des pharmakokinetischen (= strukturellen) Modells begonnen. Es wurden sowohl das Ein- als auch das Zweikompartimentmodell jeweils mit und ohne Lagtime getestet (siehe auch Tabelle 1). Für die Einführung des Restfehlers in das Modell wurde ein additives Modell verwendet:

$$y = IPRED + ERR(1) \quad (5)$$

wobei y die vorhergesagte logarithmierte Konzentration darstellt, die sich aus der *individuell* vorhergesagten, logarithmierten Konzentration ($IPRED$) und einem Restfehler (ERR) zusammensetzt. Das additive Restfehlermodell für logarithmierte Werte ist mit einem proportionalen Restfehlermodell für die entlogarithmierten Werte gleichzusetzen. Es gilt:

$$\ln(y) = \ln(IPRED) + ERR \equiv y = IPRED \times e^{(ERR)} \quad (6)$$

NONMEM berechnet $y = IPRED \times e^{(ERR)}$ näherungsweise mit $y = IPRED \times (1 + ERR)$.

Interindividuelle Variabilitäten (η) wurden exponentiell in das Modell eingeführt:

$$CL = TVCL \times e^{(\eta)} \quad (7)$$

wobei CL die individuelle Clearance und $TVCL$ den typischen Wert der Clearance, basierend auf dem Populationsmittelwert und den Kovariaten, darstellt.

Für interindividuelle Variabilitäten (η) wird angenommen, dass sie einer Normalverteilung mit einem Mittelwert null und einer Varianz ω^2 entstammen (siehe auch Abbildung 4). Diese Varianz ω^2 wird von NONMEM geschätzt. Auch die Schätzung von Kovarianzen für zwei Parameter mit interindividueller Variabilität ist möglich. Allgemein beschreibt die Varianz die Streuung eines einzelnen Parameters, wohingegen Kovarianz das Variieren zweier Parameter miteinander bedeutet und ein Maß für die lineare Assoziation dieser beiden Parameter ist. Eine positive Kovarianz ist gleich zu setzen mit einer positiven linearen Assoziation zweier Parameter. Das Ausmaß der Assoziation kann durch die Kovarianz allerdings nicht geschätzt werden. Kovarianzen sind zum Beispiel zwischen Clearance und Verteilungsvolumen vorhanden und wurden auch auf eine signifikante Verbesserung des Modells getestet.

Der nächste Schritt in der Modellentwicklung ist die Beschreibung der Einflüsse von Kovariaten. Hierbei unterscheidet man zwischen kontinuierlichen und kategorischen Kovariaten. Kontinuierliche Kovariaten sind in der vorliegenden Population Alter (AGE), Gewicht (WT), Größe (HT) und Aktivität des Enzyms CYP2D6 (CYP). Gewicht geht schon vor der Entwicklung des Kovariatenmodells dem Prinzip der allometrischen Skalierung folgend in das Modell ein und wird an dieser Stelle nicht mehr als Einflussgröße getestet. Die Allometrie bezieht Körperfunktionen und -morphologie auf die Körpermaße selbst, zum Bei-

spiel in Form des Körpergewichtes. Dieser Ansatz dient unter anderem der Übertragung von Daten aus dem Tierbereich auf den Menschen und wird deshalb auch erfolgreich im Rahmen der Arzneistoffentwicklung während des Übergangs von der präklinischen zur klinischen Phase eingesetzt (Holford 1996, Mahmood 1999, West et al. 1999). Pharmakokinetische Parameter werden mithilfe eines sogenannten Power-Modells auf das Körpergewicht bezogen:

$$TVCL = \theta_1 \times (WT / WT_{Std})^x \quad (8)$$

wobei $TVCL$ den typischen Wert für die Clearance beschreibt, der von dem Populationsmittelwert (θ_1) und dem Gewicht (WT) bzw. standardisiertem Gewicht (WT_{Std}) abhängt. Für die Berechnung von metabolischen Raten, zum Beispiel der Clearance, hat sich ein Exponent (x) von 0,75 bewährt; für die Berechnung von Verteilungsvolumina ein Exponent von 1. Auch Halbwertszeiten können mithilfe der allometrischen Skalierung extrapoliert werden. Hier hat sich ein Exponent von 0,25 bewährt. In der vorliegenden Arbeit war die Halbwertszeit allerdings kein zu schätzender Parameter des Modells, so dass nur die Clearances und die Verteilungsvolumina allometrisch skaliert wurden.

Da die Größe sehr stark mit Gewicht und Alter korreliert, wurde diese nicht extra als Einflussgröße untersucht. Daraus folgt, dass für das Modell nur das Alter und die Aktivität des Enzyms CYP2D6 als kontinuierliche Kovariaten getestet wurden. In das allometrisch skalierte Modell wurden die kontinuierlichen Kovariaten wie folgt eingefügt und auf eine Verbesserung des Modells getestet:

$$TV = \theta_1 + \theta_2 \times (KOV / KOV_{Median}) \quad (9)$$

$$TV = \theta_1 \times (1 + \theta_2 \times (KOV / KOV_{Median})) \quad (10)$$

$$TV = \theta_1 \times (KOV / KOV_{Median})^{\theta_2} \quad (11)$$

$$TV = \theta_1 \times e^{(\theta_2 \times KOV / KOV_{Median})} \quad (12)$$

wobei TV den typischen Wert eines pharmakokinetischen Parameters beschreibt, der wiederum von einem Populationsmittelwert (θ_1) und einem Parameter (θ_2), der die Kovariate (KOV) in die Gleichung einbindet, beschrieben wird. Die kontinuierlichen Kovariaten wurden auf den Median der untersuchten Population normalisiert (KOV_{Median}).

Als kategorische Kovariaten wurden das Geschlecht (SEX), die Ätiologie der Erkrankung (RX), die Dosisstufe (OCC1 - 3), eine linksventrikuläre Ejektionsfraktion kleiner als 30% (EF30) und eine Gewichtsperzentile < 25 (PZ25) getestet. Diese wurden wie folgt in das Modell eingefügt:

$$TV = \theta_1 + \theta_2 \times KOV \quad (13)$$

$$TV = \theta_1 \times (1 + \theta_2 \times KOV) \quad (14)$$

$$TV = \theta_1 \times \theta_2^{KOV} \quad (15)$$

$$TV = \theta_1 \times e^{(\theta_2 \times KOV)} \quad (16)$$

Die Komedikation wurde nicht als Einflussgröße getestet, da alle Patienten zu dem Zeitpunkt der Carvedilol-Therapie die gleiche Standard-Herzinsuffizientherapie, bestehend aus einem Angiotensin-konvertierendes Enzym (ACE)-Hemmer, einem Diuretikum und einem herzwirksamen Glykosid, erhielten.

Die Güte der Modell-Anpassung wurde in der vorliegenden Arbeit insgesamt nach folgenden Kriterien bewertet:

- Verbesserung der objective function (OBF): Die OBF (= -2 log likelihood) ist ein Zahlenwert, der die Anpassungsgüte beschreibt. Je niedriger der Wert, desto besser die Anpassung. Eine absolute Erniedrigung um 3,8 gilt als statistisch signifikant ($p < 0,05$).
- Abnahme des Restfehlers ε (gemessen an seiner Varianz σ^2).
- Abnahme der interindividuellen Variabilität η (gemessen an der Varianz ω^2) und der Fehler in der Schätzung der kinetischen Parameter (gemessen an der relativen Standardabweichung).
- Güte der graphischen Gegenüberstellung von gemessener vs. vorhergesagter Konzentration (optimalerweise identisch) und vorhergesagter Konzentration vs. gewichteten Residuen. Als vorhergesagte Konzentrationen im Rahmen der Modellentwicklung wurden die populationsbasierten und nicht die individuellen Werte verwendet.
- Berechnung der Korrelation zwischen gemessener und vorhergesagter Konzentration und des Akaike Informationskriteriums (AIC) (Akaike 1973).

Auch wenn die hier aufgeführten, objektiven Kriterien eine Modellverbesserung anzeigen, muss trotzdem zusätzlich bewertet werden, ob das Ergebnis physiologisch sinnvoll ist und die Daten ein solches Ergebnis hergeben bzw. unterstützen.

Die Kovariaten werden zunächst einzeln wie oben beschrieben in das Modell eingefügt und auf ihren Einfluss auf die pharmakokinetischen Parameter getestet. Dabei werden für jeden Parameter relevante Kovariaten identifiziert und diese je nach Güte der Modellverbesserung geordnet. Die wichtigste Kovariate wird in das Modell aufgenommen. Mit diesem neuen Modell wird der Einfluss einer nächsten, vorher als relevant identifizierten Kovariate getestet (step-up approach). Dieses Verfahren wird so oft wiederholt, bis keine Modellverbesserung mehr erreicht werden kann. Das Resultat ist ein vorläufiges, finales Modell. Aus diesem Modell wird wiederum jede Kovariate einzeln und nacheinander eliminiert (step-down approach). Wegen multipler Vergleiche wird das Signifikanzniveau erhöht, so dass bei dieser „Rückwärts“-Prozedur nur Kovariaten im Modell verbleiben, bei denen sich die OBF um ein Delta von mindestens 7,8 verschlechtert ($p < 0,005$).

Bei der Suche nach relevanten Kovariaten wurde außerdem die GAM-Analyse (Generalized Additive Modelling) verwendet. Diese Art der Analyse wurde mit Xpose, einer S-Plus basierten Modellbildungshilfe für Populationsanalysen mit NONMEM, durchgeführt (Jonsson und Karlsson 1999). Jede Kovariate wird nicht, linear, oder nicht-linear in das Modell eingefügt. Das Modell, welches das Akaike Informationskriterium (AIC) als Anpassungskriterium am meisten senkt, wird beibehalten und im nächsten Schritt weiter auf einflussreiche Kovariaten getestet, so lange, bis das AIC nicht weiter gesenkt werden kann. Der Vorteil dieser Methode im Vergleich zu dem „step-up approach“ ist der, dass die Kovariaten nicht nur einzeln und nacheinander, sondern auch in Kombination miteinander getestet werden können. Die GAM-Analyse wurde nacheinander auf jeden pharmakokinetischen Parameter angewendet, der auf relevante Kovariaten untersucht werden soll. Sie liefert nur Hinweise und ist nicht die Grundlage einer Entscheidung für oder gegen den Verbleib einer Kovariate im Modell.

Die Annäherung an die Schätzwerte der pharmakokinetischen Parameter (Estimation Step) erfolgte während der Modellentwicklung mit einer Annäherung der ersten Ordnung (FO = first order). Das so entwickelte finale Modell wurde auf die sogenannte FOCE (first order conditional estimates) - Methode mit Interaktion umgestellt. Mit dieser Methode sind eine genauere Schätzung der pharmakokinetischen Parameter und deren Variabilität möglich.

2.2.12 Evaluierung des Pop-PK-Modells

Das entwickelte Pop-PK-Modell wurde mithilfe der sogenannten „Bootstrap“-Analyse evaluiert. Diese Methode ist eine „resampling“-Technik, die durch eine auf den zugrunde liegenden Daten basierende Simulation statistische Inferenzen ermöglicht. Die Bootstrap wurde um 1979 durch moderne Computertechniken möglich (Efron 1979). Für die Evaluierung in der vorliegenden Arbeit wurde eine nicht-parametrische Bootstrap-Analyse mit der Software „Wings for NONMEM“ durchgeführt (Parke et al. 1999). Das Prinzip ist wie folgt: Aus der ursprünglichen Datei mit den Konzentrations-Zeit-Messungen und Kovariaten der Patienten, die auch für die Pop-PK-Modellentwicklung zur Verfügung stand, werden zufällig und wiederholt Patienten mit den dazugehörigen Daten ausgewählt. Die Auswahl erfolgt mit „Zurücklegen“, so dass es durchaus vorkommen kann, dass Patient x zwei- oder dreimal, Patient y aber kein Mal in die Bootstrap-Datei gelangt (Abbildung 5). Die absolute Anzahl an Patienten bleibt allerdings gleich. Auf diese Art und Weise werden $n = 1, 2, \dots, n$ neu zusammengesetzte Bootstrap-Dateien konstruiert. Jede dieser Dateien wird einer populationskinetischen Analyse mit dem zu bewertendem Modell unterzogen und liefert $n = 1, 2, \dots, n$ Schätzwerte für die Populationsmittelwerte der pharmakokinetischen Parameter. Unter der Annahme, dass die Patienten der Original-Datei repräsentativ für die Population, in diesem Fall pädiatrische Patienten mit Herzinsuffizienz, sind, kann man erwarten, dass der durchschnittliche pharmakokinetische Parameter einer großen Anzahl von Bootstrap-Analysen sich dem tatsächlichen Wert in der Population sehr stark annähert. Ebenso ist die Verteilung eines Parameters aus einer großen Anzahl von Bootstrap-Analysen nahe der wirklichen Verteilung dieses Parameters in der Population.

Die Beurteilung des Modells erfolgte anhand der Differenz zwischen „originalen“ NON-MEM- und Bootstrap-Schätzwerten. Außerdem wurden die 2,5te und 97,5te Perzentile der 1000 Bootstrap-Schätzwerte für jeden Parameter berechnet. Diese stellen das 95%-Konfidenzintervall dar, in dem mit 95%-iger Wahrscheinlichkeit bei Wiederholung einer Pop-PK-Analyse die Parameter liegen. Je enger das 95%-Konfidenzintervall, desto geringer ist die Variabilität für diesen Parameter.

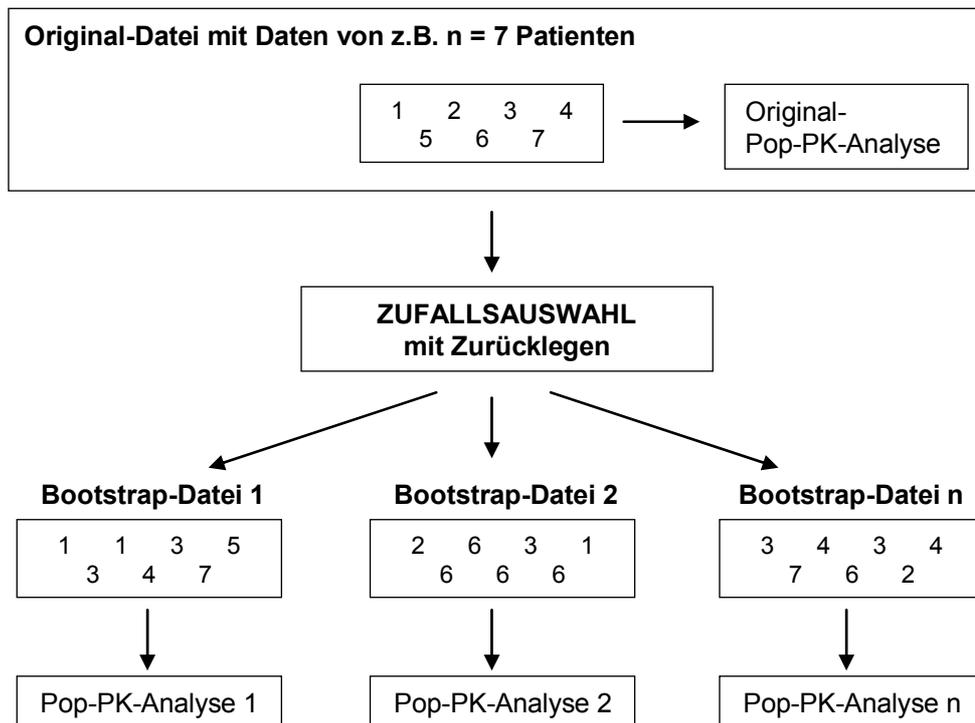


Abbildung 5: Prinzip der Bootstrap-Analyse

Die Original-Datei mit Daten von zum Beispiel sieben Patienten wird für eine populationskinetische (Pop-PK) Analyse genutzt. Mit den per Zufall neu zusammen gestellten Bootstrap-Dateien wird genauso verfahren. Das ergibt $n = 1, 2, \dots, n$ Populationsmittelwerte für die pharmakokinetischen Parameter.

Einen weiteren Hinweis auf die Güte des Modells soll der Vergleich der pharmakokinetischen Parameter der Pop-PK-Analyse mit den gemessenen Parametern liefern. Die gemessenen Parameter wurden basierend auf den gemessenen Konzentrationen für jeden Patienten individuell ermittelt und anschließend gemittelt. Dies entspricht dem Vorgehen bei der Zwei-Stufen-Methode in der Populationskinetik. Wegen der Vergleichbarkeit wurde für die individuelle Analyse das gleiche pharmakokinetische Kompartimentmodell (z.B. Zweikompartimentmodell) wie für das populationskinetische Modell verwendet.

2.3 Dosis-Simulation auf Basis des Pop-PK-Modells

Mithilfe des Pop-PK-Modells wurde in NONMEM eine Dosis-Simulation durchgeführt. In der Simulation wurden das Dosierungsintervall, die Dosis und die Zeitpunkte, zu denen Konzentrationen simuliert werden, variiert; die Kovariaten der Patienten blieben erhalten. Unter Vorgabe der Populationsmittelwerte, der Varianzen für die inter- und die intraindividuelle Variabilität und der Kovarianzen errechnet NONMEM im Simulationsmodus für alle Individuen zu den vorher definierten Zeitpunkten eine Plasmakonzentration. Für jedes Individuum erhält man so pro Simulation ein komplettes Plasmakonzentrations-Zeitprofil. Dieses kann wiederum pharmakokinetisch analysiert werden, zum Beispiel im Hinblick auf die Fläche unter der Plasmakonzentrations-Zeitkurve (AUC = engl.: area under the curve), die ein Maß für die systemische Verfügbarkeit des Arzneistoffes darstellt. Pro Patient und pro Dosis wurden 100 Simulationen durchgeführt, so dass jeweils 100 simulierte Plasmakonzentrations-Zeitprofile entstanden. Um Profile unter steady-state Bedingungen zu simulieren, wurden in dem Zeitraum 0 bis 120 Stunden nur die Dosisgabe und erst danach die Plasmakonzentrationen simuliert.

Zunächst wurden Simulationen mit den tatsächlich in der Carvedilol-Studie eingesetzten Dosen 0,09 mg/kg (Testdosis) und 0,35 mg/kg (Zieldosis) durchgeführt. Als zu simulierende Patienten wurden diejenigen ausgewählt, von denen gemessene Konzentrationen unter diesen Dosen vorlagen. Der Vergleich der simulierten mit den tatsächlich gemessenen Plasmakonzentrations-Zeitprofilen ist eine weitere Art der Modellbewertung und soll zeigen, dass die Simulation die realen Daten gut annähert. Dazu wurden der Median, die 10te und die 90te Perzentile der simulierten Konzentrationen für die jeweilige Dosis ermittelt und mit den tatsächlich gemessenen Daten verglichen.

Zur Entwicklung eines Carvedilol-Dosierungsregimes für Kinder wurden in einem zweiten Schritt verschiedene Dosierungen und Dosierungsintervalle simuliert. Um einen ersten Eindruck über die systemische Carvedilol-Verfügbarkeit mit zunehmendem Alter zu bekommen, wurde eine Dosis von $2 \times 0,35$ mg/kg im steady-state für Patienten möglichst aller Jahrgänge simuliert. Die entstandenen Plasmakonzentrations-Zeitprofile wurden nicht-kompartimentell im Hinblick auf ihre AUC ausgewertet. Dabei wurde die AUC über das Dosierungsintervall von 0 -12 Stunden nach der linear-trapezoidalen Methode berechnet. Mithilfe dieser Simulation sollten die Patienten je nach altersabhängigen Unterschieden in der AUC in Altersgruppen eingeteilt werden, um anschließend stellvertretend für einen Patienten aus jeder Gruppe die Simulation mit ansteigenden Dosierungen durchzuführen. Es wurde überprüft, ob die Alterseinteilung der „International Conference on Harmonisation“ (ICH; (ICH 2001)) an dieser Stelle sinnvoll ist. Diese sieht eine Einteilung in Neugeborene (0 - 27 Tage), Kleinkinder (28 Tage - 23 Monate), Kinder (2 - 11 Jahre) und Heranwachsende (12 - 16/18 Jahre, je nach Region) vor. Eine Zusammenfassung

von Patienten in Altersgruppen ist an dieser Stelle wichtig, da mithilfe der Simulation eine Dosierungsempfehlung gegeben werden soll, die praktikabel ist, und somit nicht für jedes Alter unterschiedlich sein kann.

Abschließend wurden für ausgewählte pädiatrische Patienten der im vorherigen Schritt festgelegten Altersgruppen Simulationen durchgeführt. Die Patienten wurden so ausgewählt, dass ihr Alter in der Mitte der jeweiligen Altersgruppe liegt. Die übliche Einzeldosis bei erwachsenen Patienten mit Herzinsuffizienz beträgt 0,35 mg/kg, die höchste Einzeldosis beträgt 0,6 mg/kg; das übliche Dosierungsintervall beträgt zwölf Stunden (Fachinformation Dilatrend® 2004). Damit beträgt die höchste Tagesdosis für Erwachsene 1,2 mg/kg. Für die pädiatrischen Patienten wurden Simulationen mit Tagesdosen (Dosierungsregime) von ca. 0,7 mg/kg (2 x 0,35 und 3 x 0,25 mg/kg), ca. 1 mg/kg (2 x 0,5 und 3 x 0,35 mg/kg), ca. 1,5 mg/kg (2 x 0,7 und 3 x 0,5 mg/kg), ca. 2,0 mg/kg (2 x 1 und 3 x 0,7 mg/kg) und 3 mg/kg (2 x 1,5 und 3 x 1 mg/kg) durchgeführt. Die AUC wurde nicht-kompartimentell nach der linear-trapezoidalen Methode berechnet. Für die Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Dosierungsregime wurde sowohl für die zweimal als auch für die dreimal tägliche Gabe die AUC über einen Zeitraum von 0 - 12 Stunden berechnet. Der Vergleich der AUC bei den Kindern untereinander und mit den Werten von erwachsenen Patienten sollte Aufschluss darüber geben, ob das aktuelle Carvedilol-Dosierungsregime mit einer einheitlichen Dosis für alle Altersgruppen sinnvoll ist.

Der Test auf signifikante Unterschiede der AUC wurde nach Logarithmierung der Werte mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) und der Bonferroni Post Hoc-Analyse durchgeführt. Ein p-Wert kleiner als 0,05 gilt als signifikant.

3 Material

3.1 NT-proBNP-Plasmakonzentrations-Bestimmung

NT-proBNP-Kit (Biomedica Group, Wien, Österreich)

- 12x8 Well Mikrotiterplatte
- Waschpufferkonzentrat
- Assay-Puffer
- Lyophilisierter NT-proBNP-Standard
- Lyophilisierte NT-proBNP-Kontrolle
- Lyophilisierter NT-proBNP-Antikörper
- HRP-gelabeltes NT-proBNP
- Substrat (TMB)
- Stop-Lösung (H₂SO₄)

3.2 HPLC

3.2.1 Arzneistoffe und Reagenzien

Beta-Glucuronidase (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)

Carvedilolracemat (Hoffmann-La-Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland)
[(±)-1-(Carbazolyl-4-oxy)-3-[2-(2-methoxyphenoxy)ethylamino]-propan-2-ol]

Dextromethorphan (Hoffmann-La-Roche AG, Basel, Schweiz)
[(+)-cis-1, 3, 4, 9, 10, 10a-Hexahydro-6-methoxy-11-methyl-2H-10, 4a-iminoethano-phenanthren]

Dextrorphan (Hoffmann-La-Roche-AG, Basel, Schweiz)
[(+)-cis-1, 3, 4, 9, 10, 10a-Hexahydro-6-hydroxy-11-methyl-2H-10, 4a-iminoethano-phenanthren]

Dilatrend®, Wirkstoff Carvedilol (Hoffmann-La-Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland)

Kaliumhydroxid (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Naftopidilracemat (Research Biochemicals International, Massachussetts, USA)
[(±)-4-(O-Methoxyphenyl)-α-[(1-naphthyl-oxy)methyl]-1-piperazinethanol]

Neo-Tussan®, Wirkstoff Dextromethorphan (Novartis Consumer Health, München, Deutschland)

Verapamil (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)
[(+)-5-[3, 4-Dimethoxyphenethyl)methylamino]-2-(3, 4-dimethoxyphenyl)-2-isopropylvaleronitril]

3.2.2 Lösungsmittel und Lösungen

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

Acetonitril, HPLC grade (Merck, Darmstadt, D)	R 11-23/24/25	S 16-27-45
Eisessig (Merck, Darmstadt, D)	R 10-35	S 23-26-45
Methanol, HPLC grade (Merck, Darmstadt, D)	R 11-23/25	S 7-16-24-45
Carvedilol Extraktionspuffer	60:40 (V/V)	Acetonitril/Kaliumacetatpuffer (0,25 mol/l, pH 4,0)
Carvedilol Standardlösung	172,5 µg/l	in 50% Methanol
Dextromethorphan Extraktionspuffer	20:80	Kaliumacetatpuffer (0,1 mol/l, pH 5,0)/Acetonitril
Dextromethorphan Standardlösung	10 µg/ml	in 50% Methanol
Dextrorphan Standardlösung	10 µg/ml	in 50% Methanol
Kaliumacetatpuffer	0,5 mol/l	28,5 ml/l Eisessig
	pH 3,5	ad pH 3,5 mit konz. KOH
Kaliumacetatpuffer	0,25 mol/l	14,3 ml/l Eisessig
	pH 4,0	ad pH 4,0 mit konz. KOH
Kaliumacetatpuffer	0,1 mol/l	5,72 ml Eisessig
	pH 5,0	ad pH 5,0 mit konz. KOH
Methanol 50%	50:50 (V/V)	Methanol/Aqua bidest
Naftopidil Standardlösung	290 µg/l	in 50% Methanol
Verapamil Standardlösung	10 µg/ml	in 50% Methanol

3.2.3 HPLC-Apparatur

LC Workstation Class LC10 (Shimadzu, Kyoto, Japan)

SIL-10A Autoinjektor (Shimadzu, Kyoto, Japan)

LC-10AT-Pumpe (Shimadzu, Kyoto, Japan)

RF-10A-Fluoreszenzdetektor (Shimadzu, Kyoto, Japan)

Spherisorb C6-Vorsäule (CS-Chromatographie, Langerwehe, Deutschland)
17 x 4 mm Innendurchmesser, 5 µm Partikelgröße

Spherisorb C6-Trennsäule (CS-Chromatographie, Langerwehe, Deutschland)
150 x 4,6 mm Innendurchmesser, 5 µm Partikelgröße

Class-VP Software, Version 5.03 (Shimadzu, Kyoto, Japan)

3.3 Verbrauchsmaterialien

Aqua ad iniectabilia (Pharmacia & Upjohn, Erlangen, Deutschland)

Aqua bidest

Bond-Elut CN-Extraktionssäulen (Varian, Harbor City, USA)
40 µm Partikelgröße, 100 mg/ml Säulenvolumen

Eppendorfgefäße (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

Leerplasma (Blutbank der Abteilung für Transfusionsmedizin, Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

Pipettenspitzen, 100 µl, 1 ml (Treff Lab, Deggersheim, Schweiz)

Sarstedt-Röhrchen (Sarstedt, Nuembrecht, Deutschland)

3.4 Laborgeräte

Analysenwaage (Mettler, Greifensee, Schweiz)

Destamat Destillationsapparatur (Heraeus, Hanau, Deutschland)

Hettich Rotanta Zentrifuge (Hettich, Tuttlingen, Deutschland)

Inkubator (Heidolph, Kehlheim, Deutschland)

Kühltruhen, -20°C, -80°C (Kryotec, Hamburg, Deutschland)

Magnetrührer (Heidolph, Kehlheim, Deutschland)

Mikrotiterplattenwaschgerät (MRW, Dynex Technologies, Denkendorf, Deutschland)

pH-Meter (Knick, Berlin, Deutschland)

Schüttelinkubator (OSFT-HS-R, CLF Laborgeräte GmbH, Emersacker, Deutschland)

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

Vakuumpumpe (KNF Neuberger, Freiburg, Deutschland)

Vortexer (Heidolph, Kehlheim, Deutschland)

3.5 Software

Census, Version 0.998r5a (J. Wilkins, Uppsala, Schweden)

Digital Visual Fortran, Version 5.0.A (Hewlett-Packard, Palo Alto, Kalifornien, USA)

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

NONMEM, Version 5 Level 1.1, Double precision (GloboMax, Hanover, Maryland, USA)

S-Plus, Version 6.0 für Pharsight Trial Simulator (Insightful Corporation, Seattle, Washington, USA)

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

Wings for NONMEM, Version 409d (N. Holford, Auckland, Neuseeland)

WinNonlin Professional, Version 4.1 (Pharsight Corporation, Cary, North Carolina, USA)

Xpose, Version 3.104 (E.N. Jonsson und M.O. Karlsson, Uppsala, Schweden)

4 Ergebnisse

4.1 NT-proBNP-Studie und -Untersuchungen

4.1.1 NT-proBNP-Normalwerte bei Kindern

NT-proBNP-Plasmakonzentrationen unterhalb des Detektionslimits für den ECLIA bzw. außerhalb des linearen Bereichs für den EIA wurden für die Auswertung auf die untere Assaygrenze von fünf bzw. die untere Grenze des linearen Bereichs von 253,7 ng/l gesetzt. Tabelle 2 charakterisiert die in die Studie eingeschlossenen Probanden.

Probanden-Charakteristika	n (%)
Gesamt	402 (100)
Geschlecht	
Männlich	164 (40,8)
Weiblich	238 (59,2)
Alter [Jahre]	
≤ 18	292 (72,6)
> 18	110 (27,4)
Diagnose	
Gesund	209 (52,0)
Herzerkrankung	0 (0)
Infektion	27 (6,7)
Neurologische Störung (z.B. Migräne)	12 (3,0)
Hormonstörung (z.B. Diabetes)	135 (33,6)
Sonstige (z.B. Lungentransplantation)	19 (4,7)

Tabelle 2: Charakteristika der in die NT-proBNP-Studie eingeschlossenen Probanden

Mit dem ECLIA konnten bei 402 gesunden Personen im Alter von 1 - 29 Jahren NT-proBNP-Plasmakonzentrationen bestimmt werden. Bei den Personen ≤ 18 Jahren ($n = 292$) hat das Geschlecht keinen signifikanten Einfluss (Kruskal-Wallis-Test, $p > 0,05$). Das Alter hingegen hat in dieser Population einen signifikanten Einfluss (Kruskal-Wallis-Test, $p < 0,05$) mit 4,3-fach höheren Werten für Kinder von 1 - 3 Jahren im Vergleich zu 18-Jährigen. Mediane NT-proBNP-Plasmakonzentrationen reichen von 129,0 ng/l (1 - 3 Jahre) bis 29,7 ng/l (18 Jahre; Abbildung 6A). Die 97,5te (75te) Perzentile verläuft von 319,9 ng/l (231,2 ng/l; 1 - 3 Jahre) zu 114,9 ng/l (53,3 ng/l; 18 Jahre; Abbildung 7A und B). Bei Erwachsenen (> 18 Jahre) beträgt der Median (97,5te Perzentile) 17,2 ng/l (110,9 ng/l) bei Männern und 39,6 ng/l (151,3 ng/l) bei Frauen. NT-proBNP bei erwachsenen Frauen ist signifikant höher als bei erwachsenen Männern (Wilcoxon-Test, $p < 0,05$). Vergleicht man die NT-proBNP-Perzentilen der Kinder mit denen von Erwachsenen, so sind die Werte der Kinder deutlich höher. Im Alter von 11 - 16 Jahren werden die oberen Perzentilkurven stark durch die Ausreißer und Extremwerte beeinflusst, die in Abbildung 6A dargestellt sind.

Mit dem EIA wurde ebenfalls bei 402 gesunden Personen im Alter von 1 - 29 Jahren die NT-proBNP-Plasmakonzentration bestimmt. Bei den in diesem Fall 291 Personen ≤ 18 Jahren zeigen weder das Alter (Kruskal-Wallis-Test, $p > 0,05$) noch das Geschlecht (Kruskal-Wallis-Test, $p > 0,05$) einen signifikanten Einfluss. Mediane NT-proBNP-Plasmakonzentrationen reichen von 1953,7 ng/l (1 - 3 Jahre) bis 1264,6 ng/l (18 Jahre; Abbildung 6B).

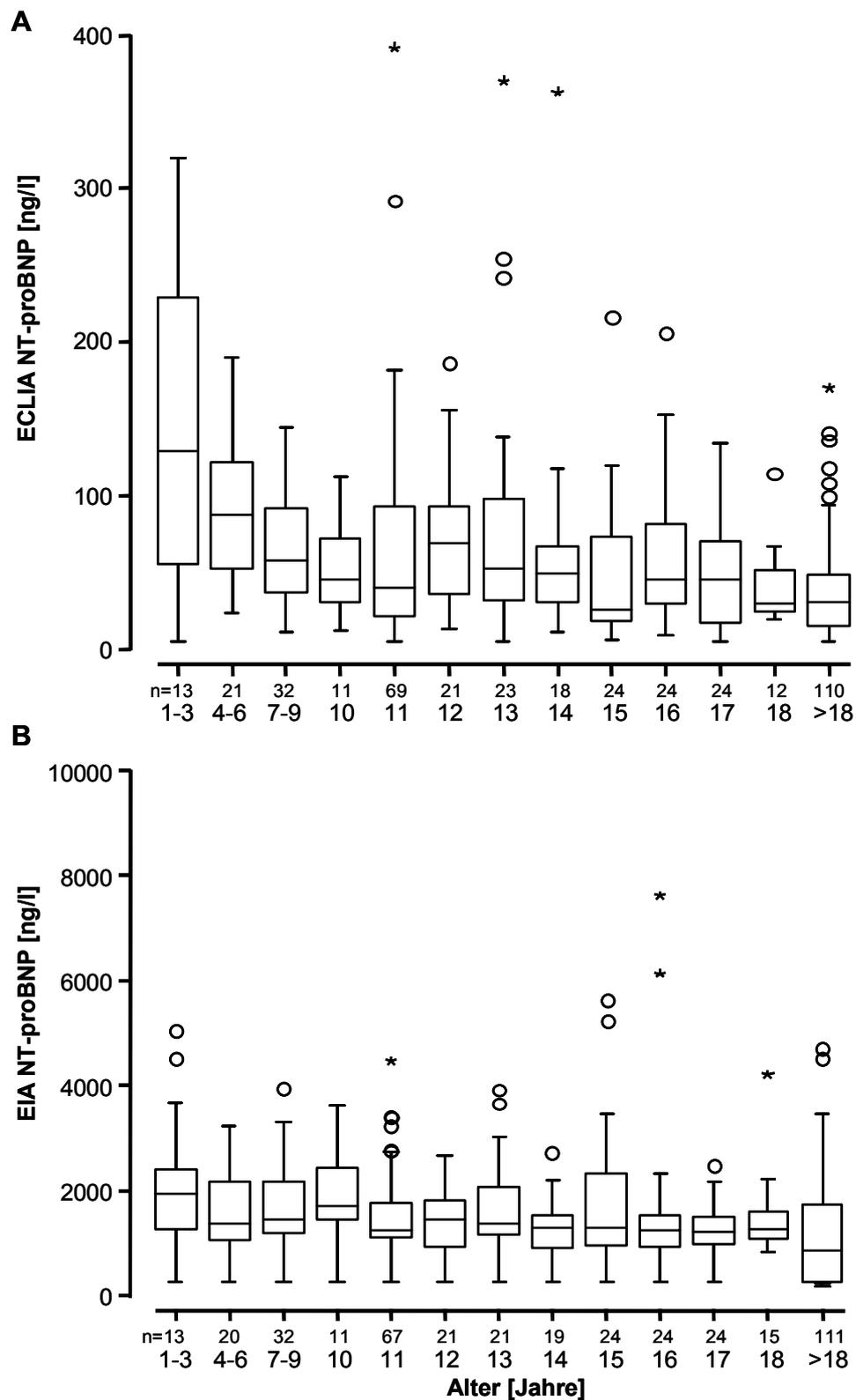


Abbildung 6: NT-proBNP in der pädiatrischen Population

(A) NT-proBNP-Werte bestimmt mit dem Elektrochemilumineszenz-Immunoassay (ECLIA); (B) NT-proBNP-Werte bestimmt mit dem Enzymimmunoassay (EIA). Der Boxplot zeigt den Median, die 25te und 75te Perzentile (Box), die obere und untere Grenze des Normalbereichs (Fehlerbalken), Ausreißer (o) und Extremwerte (x).

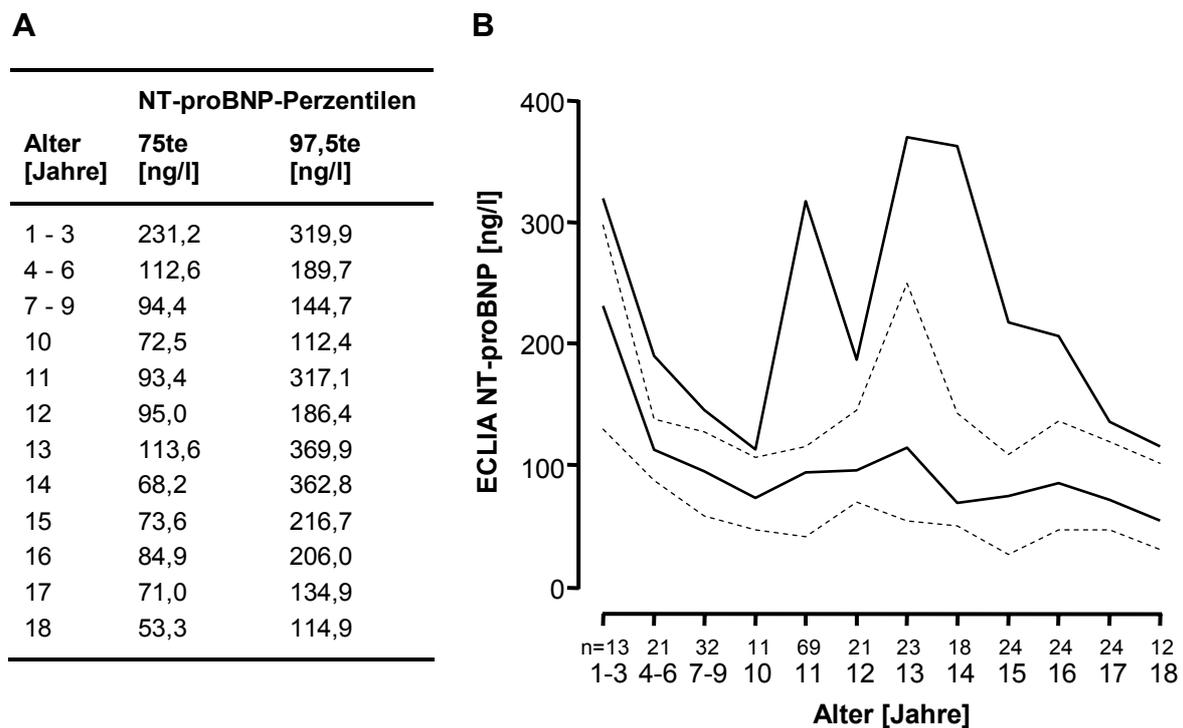


Abbildung 7: NT-proBNP-Perzentilen in der pädiatrischen Population

NT-proBNP wurde mit dem Elektrochemilumineszenz-Immunoassay (ECLIA) bestimmt. (A) In der Tabelle sind die 75te und die 97,5te Perzentile für die jeweilige Altersgruppe dargestellt mit (B) der entsprechenden graphischen Darstellung. Die durchgezogenen Linien entsprechen der 75ten und 97,5ten Perzentile; die gestrichelten Linien entsprechen der 50ten und 90ten Perzentile.

4.1.2 NT-proBNP-Methodenvergleich

Die Ergebnisse aus 4.1.1 weisen schon daraufhin, dass die beiden Methoden nicht vergleichbare Ergebnisse liefern. NT-proBNP-Plasmakonzentrationen, die mit dem EIA bestimmt wurden, sind signifikant verschieden von den ECLIA NT-proBNP-Plasmakonzentrationen (Wilcoxon Test, $p < 0,01$) mit 3 - 535-fach höheren Werten für den EIA. Die gemessenen ECLIA-Werte umfassen einen Bereich von 5,0 - 391,5 ng/l im Vergleich zu 253,7 - 7602,8 ng/l für den EIA. Das Bestimmtheitsmaß (r^2) der linearen Regression der logarithmierten Werte beträgt 0,08 (Abbildung 8A). Trägt man die jeweiligen Wertepaare gegeneinander auf, so lässt sich mithilfe der Passing-Bablok-Regression ein y-Achsenabschnitt von 17,2 ng/l (8,2 - 24,3 ng/l; 95%-Konfidenzintervall (KI); Abbildung 8B) und eine Steigung von 0,018 (0,013 - 0,025 ng/l; 95%-KI) für die Regressionsgerade errechnen. Der y-Achsenabschnitt ist signifikant verschieden von null, das heißt die beiden Assays unterscheiden sich mindestens um einen konstanten Wert. Da die Steigung auch signifikant verschieden von eins ist, muss man von einem proportionalen Fehler ausgehen. Der Durchschnitt der Wertepaare aufgetragen gegen deren Differenz (Bland-Altman-Differenzplot; Abbildung 8C) zeigt ebenfalls einen großen proportionalen Fehler mit einer mittleren Differenz von 1649,7 ng/l (1546,3 - 1753,1 ng/l; 95%-KI).

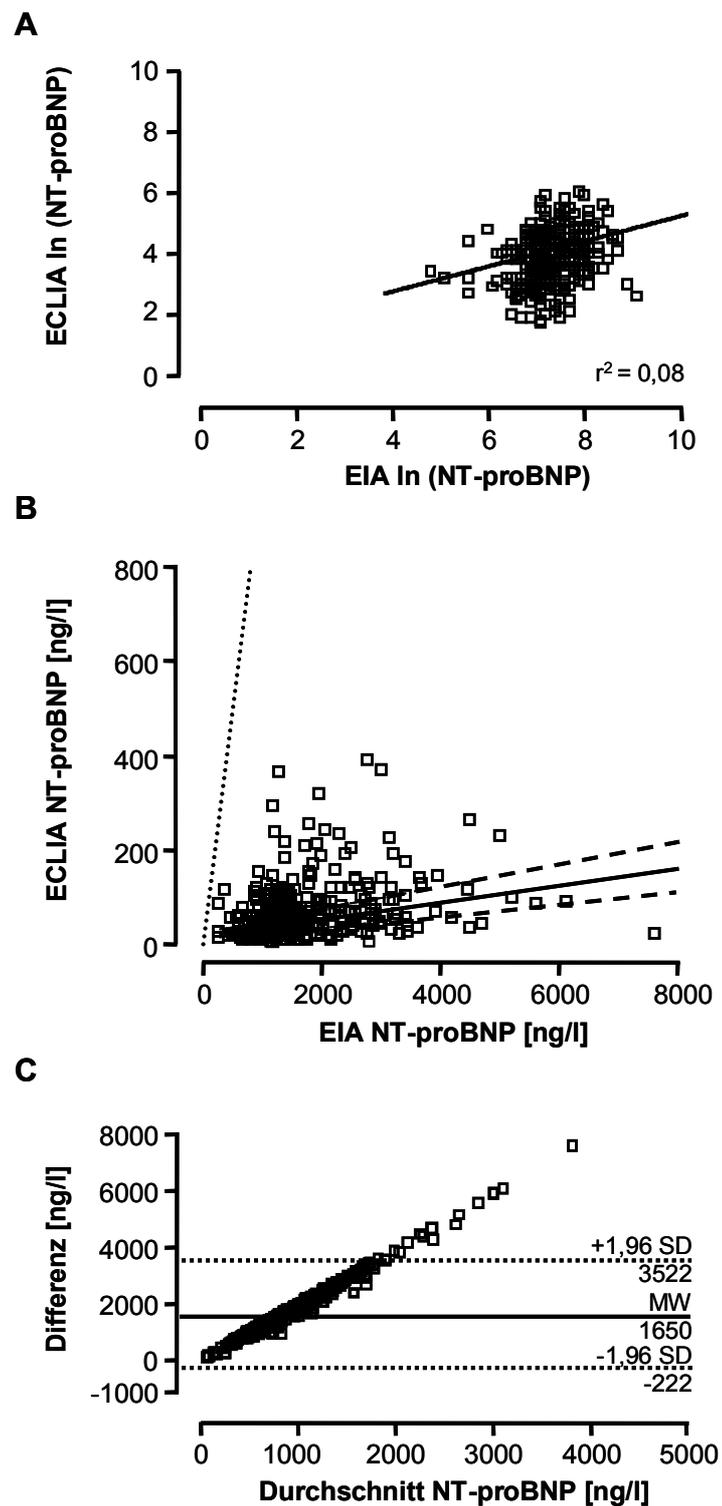


Abbildung 8: NT-proBNP-Methodenvergleich

(A) Lineare Regression der logarithmierten NT-proBNP-Werte. NT-proBNP wurde bestimmt mit dem Elektrochemilumineszenz-Immunoassay (ECLIA) und dem Enzymimmunoassay (EIA); r^2 = Bestimmtheitsmaß. (B) Passing-Bablok-Regression. Die durchgezogene Linie ist die Regressionslinie mit der gestrichelten Linie als 95%-Konfidenzintervall. Die gepunktete Linie ist die Identitätslinie. (C) Bland-Altman Differenz Plot. Die durchgezogene Linie ist die mittlere Differenz (MW) mit den gepunkteten Linien als $\pm 1,96$ -fache Standardabweichung (SD).

4.1.3 Multizentrischer NT-proBNP-Laborvergleich

Alle teilnehmenden Labore bestimmten NT-proBNP mit dem vollautomatisierten ECLIA, allerdings an unterschiedlichen Gerätetypen. In dem ersten Laborvergleich (n = 4) wurde NT-proBNP an Elecsys 2010 (n = 2) und Elecsys Modul E170 (n = 2) gemessen. Die Mittelwerte sind 51,3, 1523,7 und 3508,0 ng/l mit relativen Standardabweichungen (Variationskoeffizient = VK) von 6,5, 6,0 und 4,8% (Tabelle 3). Der zweite Laborvergleich mit elf Laboren ergab ähnliche Ergebnisse mit Mittelwerten von 1240,8, 1243,0 und 6618,1 ng/l und relativen Standardabweichungen von 4,3, 4,1 und 3,8%. NT-proBNP wurde gemessen an Elecsys 2010 (n = 5), Elecsys 1010 (n = 2) und Elecsys Modul E170 (n = 4).

Probe	n	Median NT-proBNP [ng/l]	MW NT-proBNP [ng/l]	SD [ng/l]	VK [%]
1	4	51,1	51,3	3,3	6,5
2	4	1517,6	1523,7	90,8	6,0
3	4	3508,0	3495,4	168,6	4,8
4	11	1227,5	1240,8	52,8	4,3
5	11	1224,0	1243,0	50,6	4,1
6	11	6566,5	6618,1	250,2	3,8

Tabelle 3: Multizentrischer Laborvergleich

Dargestellt sind Median und Mittelwert (MW) mit absoluter (SD) und relativer Standardabweichung (VK = Variationskoeffizient).

4.2 Populationsbasierte Analyse der Carvedilol-Studie

4.2.1 Charakteristik der Patienten

In die populationskinetische Analyse konnten 41 Plasmakonzentrations-Zeitprofile von 25 Patienten eingeschlossen werden. Es handelt sich um n = 21 Testdosisprofile (0,09 mg/kg), n = 3 Profile bei einer mittleren Dosis (0,18 mg/kg) und n = 17 Zieldosisprofile (0,35 mg/kg). Da die Variabilität zwischen zwei Untersuchungszeitpunkten oft größer als die interindividuelle Variabilität ist, hat sich auch in der vorliegenden Arbeit der folgende Ansatz bewährt: Für Patienten, bei denen Test- und Zieldosisprofil vorlagen, wurden diese als unabhängige Profile von zwei verschiedenen Patienten betrachtet (Sheiner 1999) (siehe auch Abschnitt 2.2.11.3). Deswegen wird im Rahmen der populationskinetischen Analyse von 41 Patienten entsprechend der Anzahl an Plasmakonzentrations-Zeitprofilen gesprochen. Ein Profil besteht aus durchschnittlich $11,7 \pm 2,2$ Konzentrationen, insgesamt lagen 480 Carvedilol-Plasmakonzentrationen vor. Diese umfassen einen Bereich von 0 - 193 µg/l. Hinsichtlich der Enzymaktivität für CYP2D6 befinden sich kein Langsam- und kein sehr schneller Metabolisierer in dem untersuchten Kollektiv. Die Charakteristika der Patienten sind Tabelle 4 zu entnehmen. Die klinischen Ergebnisse eines Teilkollektivs dieses Pop-PK-Kollektivs wurden bereits veröffentlicht und werden an dieser Stelle nicht näher beschrieben (Laer et al. 2002).

Patientencharakteristika	n (%)	Median (Bereich)
Gesamt	41 (100)	
Geschlecht		
Männlich	30 (73,2)	
Weiblich	11 (26,8)	
Diagnose		
VSD; MI	7 (17,1)	
HLH	3 (7,3)	
DCM	31 (75,6)	
LVEF < 30%	12 (29,3)	
Gewichtszentile < 25%	24 (58,5)	
Alter [Jahre]		3,5 (0,1 - 19,3)
Gewicht [kg]		13,1 (3,1 - 98,2)
CYP2D6-Aktivität		-2,4 (-1 - (-3,5))

Tabelle 4: Patientencharakteristika

Als kategorische Kovariaten wurden das Geschlecht, die Diagnose (VSD = Ventrikelseptumdefekt, MI = Mitralklappeninsuffizienz, HLH = Hypoplastisches Linksherz, DCM = Dilatative Kardiomyopathie), eine linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) kleiner 30% und ein Gewicht kleiner als die altersentsprechende 25te Perzentile getestet. Kontinuierliche Kovariaten waren Alter, Gewicht und die Enzymaktivität des Enzyms Cytochrom P450 2D6. Dargestellt sind bei kategorischen Kovariaten die Anzahl (n, %), bei kontinuierlichen Kovariaten der Median und der Wertebereich.

4.2.2 Das populationskinetische Modell

Die Modellentwicklung erfolgte in drei Schritten: Zunächst wurde das strukturelle (= pharmakokinetische) Modell ausgewählt. Danach erfolgte die Modellbildung für die inter- und intraindividuellen Variabilitäten. Abschließend wurde bei der Entwicklung des Kovariatenmodells der Einfluss verschiedener Kovariaten wie Alter oder Geschlecht auf die pharmakokinetischen Parameter untersucht.

Als pharmakokinetische Modelle wurden das Ein- und Zweikompartimentmodell jeweils mit und ohne verzögerte Absorption (Lagtime) getestet. Dabei war das Zweikompartimentmodell dem Einkompartimentmodell deutlich überlegen (Δ OBF = -72,7). Die Einführung einer Lagtime brachte an dieser Stelle noch keine signifikante Verbesserung des Modells (Δ OBF = -2,9). Anschließend wurden für jeden pharmakokinetischen Parameter interindividuelle Variabilitäten exponentiell in das Modell eingeführt. Eine Re-Analyse des pharmakokinetischen Modells nach diesem Schritt zeigte, dass das Lagtime-Modell dem normalen Zweikompartimentmodell überlegen war (Δ OBF = -69,3). Demnach wurde ein Zweikompartimentmodell mit Lagtime als strukturelles Modell verwendet (Tabelle 5, Modell 1). Folgende kinetische Parameter werden von NONMEM für dieses Modell (ADVAN4 TRANS4 Routine) geschätzt bzw. müssen als initiale Werte eingegeben werden:

- Clearance (CL)
- Zentrales Verteilungsvolumen (V2)
- Peripheres Verteilungsvolumen (V3)
- Interkompartimentelle Clearance (Q)
- Absorptionsgeschwindigkeitskonstante (KA)
- Lagtime (TLAG)

An dieser Stelle sei noch einmal erwähnt, dass die Bioverfügbarkeit nicht ermittelt werden konnte. Wenn nachfolgend im Zusammenhang mit der Populationskinetik von Carvedilol die Clearance bzw. CL, das zentrale oder periphere Verteilungsvolumen bzw. V2 oder V3 oder die interkompartimentelle Clearance bzw. Q erwähnt werden, so geht in diese Parameter immer ein unbekannter Faktor (f) für die Bioverfügbarkeit mit ein.

Wie in Abschnitt 2.2.11.2 beschrieben, entstammen die Werte für die interindividuelle Variabilität einer Normalverteilung mit einem Mittelwert von null und einer Varianz ω^2 . Diese Varianz ω^2 wird von NONMEM für jeden Parameter, für den interindividuelle Unterschiede zugelassen werden, geschätzt. Für das vorliegende Modell wurden für alle sechs pharmakokinetischen Parameter interindividuelle Variabilitäten zugelassen und deren Varianzen geschätzt. Zusätzlich wurde das gemeinsame Variieren zweier Parameter (Kovarianz) auf eine Verbesserung des Modells getestet. Kovarianzen einerseits zwischen CL, V2, V3

und Q und andererseits zwischen KA und TLAG brachten eine signifikante Verbesserung des Modells (Δ OBF = -69,1 bzw. -4,2). Da für KA und TLAG die interindividuelle Variabilität oft schlecht zu schätzen ist und eine Überparametrisierung (zu viele zu schätzende Parameter) vermieden werden sollte, wurden die Varianzen bzw. die Kovarianz für KA und TLAG fixiert. Die OBF verschlechterte sich dabei nicht (Tabelle 5, Modell 2).

Der Restfehler (= intraindividuelle Variabilität) wurde sowohl vor als auch nach der Einführung der interindividuellen Variabilitäten am Besten durch ein additives Modell beschrieben. Bei logarithmierten Konzentrationen, wie es in der vorliegenden Arbeit der Fall ist, entspricht das additive Modell einem proportionalen Modell bei nicht-logarithmierten Konzentrationen (siehe auch Abschnitt 2.2.11.3). Das proportionale Fehlermodell besagt, dass der Restfehler nicht konstant, sondern von der vorhergesagten Konzentration abhängig ist.

Vor der Entwicklung des Kovariatenmodells wurde das Gewicht (WT) in Form der allometrischen Skalierung für CL, V2, V3 und Q in das Modell eingeführt. Dies brachte zwar gemessen an der OBF keine Verbesserung des Modells, ist aber aus physiologischen Gründen erforderlich und sinnvoll. Das erkennt man auch daran, dass für drei der vier allometrisch skalierten pharmakokinetischen Parameter (CL, V3 und Q) die interindividuelle Variabilität (ω^2) gesenkt wird (Tabelle 5, Modell 3). Die Varianz ω^2 der interindividuellen Variabilität lässt sich in die prozentuale interindividuelle Variabilität umrechnen; dabei entspricht die Wurzel aus ω^2 der prozentualen interindividuellen Variabilität. So konnte durch die Einführung des Gewichts in Form der allometrischen Skalierung die prozentuale interindividuelle Variabilität der Clearance von 66,3% ($\omega^2 = 0,44$) auf 56,6% ($\omega^2 = 0,32$), die prozentuale interindividuelle Variabilität des peripheren Verteilungsvolumens von 185,2% ($\omega^2 = 3,43$) auf 110,9% ($\omega^2 = 1,23$) gesenkt werden. Demnach ist das Gewicht für einen Teil der interindividuellen Unterschiede bei den pharmakokinetischen Parametern verantwortlich. Auch die relativen Standardabweichungen bei der Schätzung der Populationsmittelwerte werden durch die Einführung der Kovariate Gewicht geringer. Vergleicht man für dieses Modell die vorhergesagten mit den gemessenen Konzentrationen, dann wird deren Korrelation schlechter im Vergleich zu dem strukturellen Modell (Abbildung 9A + B). Trägt man aber die gewichteten Residuen gegen die vorhergesagte Konzentration auf, dann weichen diese deutlich weniger von der Nulllinie ab als bei dem strukturellen Modell (Abbildung 10A + B). An dieser Stelle wird auch schon deutlich, dass die altersabhängigen Unterschiede in der Pharmakokinetik von Carvedilol wie zu erwarten nicht allein durch die altersbedingte Gewichtszunahme zu erklären sind, da die vorhergesagten Daten gerade bei höheren Konzentrationen noch stark von den gemessenen abweichen. Die Beurteilung der nachfolgenden Modelle erfolgt ausgehend von diesem allometrisch skalierten Modell (Modell 3).

Parameter	Modell 1	Modell 2	Modell 3	Modell 4	Modell 5	Modell 5 mit FOCE
	Strukturelles Modell	Einführung von ETAs	Allometrische Skalierung	Alter auf CL	Alter auf CL und V2	Alter auf CL und V2
CL/f [l/h] (VK [%])	36,0 (10,9)	35,3 (10,8)	31,5 (9,2)	40,6 (7,7)	41,3 (7,1)	38,1 (7,1)
V2/f [l] (VK [%])	23,8 (32,4)	17,8 (17,5)	18,1 (16,7)	20,1 (16,9)	25,5 (15,6)	22,0 (22,7)
V3/f [l] (VK [%])	115,0 (41,7)	106,0 (24,8)	99,2 (18,3)	96,4 (18,5)	96,9 (16,6)	96,5 (22,7)
Q/f [l/h] (VK [%])	13,5 (24,0)	15,1 (22,6)	16,1 (15,5)	17,1 (16,1)	14,9 (15,4)	13,5 (12,8)
KA [1/h] (VK [%])	0,55 (15,1)	0,52 (7,9)	0,55 (8,0)	0,55 (6,5)	0,54 (6,9)	0,62 (5,7)
TLAG [h] (VK [%])	0,11 (34,6)	0,14 (12,8)	0,14 (11,9)	0,14 (10,5)	0,14 (12,3)	0,15 (12,5)
θ_7 (VK [%])				2,70 (3,1)	2,77 (2,2)	2,70 (2,2)
θ_8 (VK [%])					-0,15 (6,0)	-0,13 (18,0)
ω^2_{CL}		0,44	0,32	0,18	0,17	0,19
ω^2_{V2}		1,97	2,11	2,17	1,86	1,29
ω^2_{V3}		3,43	1,23	0,98	1,42	1,49
ω^2_Q		1,30	0,48	0,49	0,41	0,42
σ^2	0,75	0,052	0,054	0,055	0,052	0,054
r	0,807	0,803	0,695	0,835	0,865	0,859
OBF	341,712	-429,532	-429,320	-453,987	-478,692	-482,987
AIC	355,712	-395,532	-395,320	-417,987	-440,692	-444,987

Tabelle 5: Entwicklung des Pop-PK-Modells

Dargestellt sind die Schätzwerte der kinetischen Parameter für verschiedene Modelle: CL = Clearance, V2 und V3 = zentrales und peripheres Verteilungsvolumen, Q = interkompartimentelle Clearance, KA = Absorptionsgeschwindigkeitskonstante, TLAG = Lagtime, THETA7 und THETA8 = mit den Kovariaten verbundene Thetas, ω^2 = Varianz der interindividuellen Variabilität, σ^2 = Varianz des Restfehlers. In die kinetischen Parameter CL, V2, V3 und Q geht jeweils die Bioverfügbarkeit f als Faktor mit ein. Die Anpassungsgüte wird anhand von r^2 = Bestimmtheitsmaß, OBF = objective function und AIC = Akaike Informationskriterium bewertet. Das endgültige = finale Modell wurde auf die FOCE-Methode (first order conditional estimation) umgestellt.

Modell 1: Strukturelles Modell = Zweikompartimentmodell mit Lagtime.

Modell 2: Strukturelles Modell inclusive ETAs für die interindividuelle Variabilität.

Modell 3: Allometrisch skaliertes Modell.

Modell 4: Alter als Kovariate auf der Clearance (CL).

Modell 5: Alter als Kovariate auf CL und dem zentralen Verteilungsvolumen (V2).

Die Entwicklung des Kovariatenmodells beginnt mit der Suche nach Kovariaten, die die Vorhersage des allometrisch skalierten Modells signifikant verbessern. Das Ergebnis dieser Suche ist in Tabelle 6 zu sehen. Alle hier aufgeführten Kovariaten haben einzeln und nacheinander getestet das allometrisch skalierte Modell gemessen an der OBF signifikant verbessert (Δ OBF > 3,8).

Parameter	Kovariate (geordnet nach Relevanz)
CL	AGE > SEX = PZ25 > RX
V2	RX > CYP > AGE > OCC1 > EF30
V3	AGE > EF30 = RX
Q	AGE > RX > OCC1 > OCC2 > EF30 = SEX

Tabelle 6: Relevanz der Kovariaten

Als relevante Kovariaten wurden identifiziert: Alter (AGE), Geschlecht (SEX), Gewicht unter der altersentsprechenden 25ten Perzentile (PZ25), Ätiologie der Erkrankung (RX), Aktivität des Cytochrom P450 2D6, eine linksventrikuläre Ejektionsfraktion unter 30%, Dosisstufe 1 (OCC1) und 2 (OCC2).

Die Ergebnisse der „Generalized additive modelling (GAM)“-Analyse für das allometrisch skalierte Modell waren wie folgt: Alter hat einen nicht-linearen Einfluss auf CL, V3 und Q und einen linearen Einfluss auf V2. Die Dosisstufe OCC1 (= Testdosis) hat einen linearen Einfluss auf V2. Die restlichen Kovariaten zeigten in der GAM-Analyse keinen Einfluss.

Der Einfluss des Alters auf die Clearance hatte die größte Relevanz (Δ OBF = -24,7). Ein nichtlinearer Zusammenhang entsprechend der Ergebnisse der GAM-Analyse konnte bestätigt werden. Dabei erwies sich folgendes Clearance-Modell als am Besten geeignet:

$$TVCL = \theta_1 \times (WT / 13)^{0,75} - \left((AGE / 3,5)^{\theta_7} \right) \quad (17)$$

wobei $TVCL$ den typischen Wert der Clearance beschreibt, der neben dem Populationsmittelwert (θ_1) von dem Gewicht (WT) und dem Alter (AGE) der Patienten abhängt.

Mit diesem Modell konnten die OBF, die Korrelation und die relativen Standardabweichungen der Parameter deutlich verbessert werden (Tabelle 5, Modell 4; Abbildung 9C, 10C). Die Abnahme der interindividuellen Variabilität der Clearance ω^2_{CL} von 0,32 (\triangleq 56,6%) auf 0,18 (\triangleq 42,4%) durch die Einführung der Kovariate Alter zeigt, dass diese neben dem Gewicht eine wichtige Rolle für die Carvedilol-Clearance bei Kindern spielt. Das Clearance-Modell (Formel 17) besagt, dass die gewichtsstandardisierte Clearance mit zunehmendem Alter abnimmt, da für θ_7 ein Wert von 2,7 geschätzt wird.

Wenn man Alter als Kovariate für die Clearance in das Pop-PK-Modell aufnimmt und die oben aufgeführten relevanten Kovariaten nacheinander und einzeln weiter auf eine Verbesserung des Modells testet, dann wird als nächstes ein relevanter Einfluss des Alters auf das zentrale Verteilungsvolumen gefunden (Δ OBF = -24,7; Tabelle 5, Modell 5). Entsprechend der GAM-Analyse ist der Zusammenhang zwischen Alter und V2 linear:

$$TVV2 = \theta_2 \times (WT / 13) \times (1 + (\theta_8 \times AGE / 3,5)) \quad (18)$$

mit $TVV2$ als der typische Wert für das zentrale Verteilungsvolumen, abhängig von dem Populationsmittelwert für V2 (θ_2), dem Gewicht (WT) und dem Alter (AGE).

Nachfolgend wurden in diesem sogenannten „step-up approach“ zunächst auch noch die Zieldosis (OCC2) für die interkompartimentelle Clearance (Q) und eine linksventrikuläre Ejektionsfraktion kleiner 30% (EF30) für das periphere Verteilungsvolumen (V3) als relevante Kovariaten identifiziert. Dabei war Q kleiner unter der Zieldosis und V3 größer bei einer linksventrikulären Ejektionsfraktion kleiner als 30%. OCC2 als Kovariate für Q hat zwar die OBF verbessert (Δ OBF = -6,8), aber weder die interindividuelle Variabilität für Q, noch die Varianz σ^2 des Restfehlers, noch der Vergleich der gemessenen mit den vorhergesagten Konzentrationen wurden verbessert, so dass OCC2 als Kovariate für Q nicht in das Modell aufgenommen wurde. Ebenso verbesserte die EF30 als Kovariate für V3 zwar die OBF (Δ OBF = -12,3), aber auch hier wurden die interindividuelle Variabilität für V3 und die Varianz σ^2 des Restfehlers nicht verbessert. Die Kovariate EF30 trägt somit nicht dazu bei, V3 besser vorherzusagen, deswegen wurde sie nicht in das Modell aufgenommen. Während der Modellentwicklung wurde auch ein Einfluss der Dosis OCC2 auf CL bei Kindern unter einem Jahr gefunden. Die Clearance war bei diesen Kindern unter der Zieldosis höher als unter der Testdosis. Dieser Effekt verbesserte die OBF signifikant und auch die interindividuelle Variabilität der Clearance konnte reduziert werden. Der Restfehler und der Vergleich der gemessenen mit den vorhergesagten Konzentrationen konnten aber nicht verbessert werden. Da das Pop-PK-Modell auch für Dosis-Simulationen genutzt werden soll und nicht klar ist, ob der gefundene Dosis-Effekt auf andere Dosen übertragen werden kann, wurde OCC2 als Kovariate auf CL bei Kindern unter einem Jahr nicht in das Modell mit aufgenommen.

Der nichtlineare Einfluss von Alter auf V3 und Q laut GAM-Analyse konnte zwar bei alleinigen Test der Kovariate Alter auf den jeweiligen Parameter bestätigt werden (Δ OBF = -6,35 bzw. Δ OBF = -22,37), war aber zusätzlich zu dem Modell mit Alter als Kovariate für CL und V2 nicht mehr signifikant. Ebenso konnte ein linearer Einfluss der Dosisstufe OCC1 auf V2 beim alleinigen Test bestätigt werden (Δ OBF = -9,53), der aber nach der Einführung von Alter auf CL und V2 auch nicht mehr signifikant war. Da in der GAM-Analyse nur der Einfluss von Kovariaten auf einen pharmakokinetischen Parameter nach

dem anderen getestet wird, wird die Verbesserung und Veränderung des Modells durch bereits aufgenommene Kovariaten auf andere pharmakokinetische Parameter nicht berücksichtigt. Deswegen kann es vorkommen, dass nicht alle Parameter der GAM-Analyse in das Pop-PK-Modell eingehen.

Für Q und V3 konnten somit neben Gewicht keine weiteren relevanten Kovariaten identifiziert werden. Zwischen Q und CL besteht ein linearer Zusammenhang ($r^2 = 0,86$). Durch das gute Kovariatenmodell für die Clearance und den linearen Zusammenhang zwischen CL und Q sind vermutlich keine weiteren Kovariaten für die Vorhersage von Q erforderlich. Die Korrelation zwischen V2 und V3 ist fast gleich null ($r^2 = 0,001$); es besteht also kein linearer Zusammenhang zwischen diesen beiden Parametern. Allerdings korreliert V3 mit CL ($r^2 = 0,72$).

Für V3 und Q werden demnach in dem Pop-PK-Modell die allometrisch skalierten Modelle ohne weitere Kovariaten verwendet:

$$TVV3 = \theta_3 \times (WT / 13) \quad (19)$$

$$TVQ = \theta_4 \times (WT / 13)^{0,75} \quad (20)$$

wobei die jeweils typischen Werte für V3 ($TVV3$) und Q (TVQ) nur von dem jeweiligen Populationsmittelwert (θ_3 und θ_4) und dem Gewicht (WT) abhängen.

Das so entwickelte Pop-PK-Modell mit Gewicht in Form der allometrischen Skalierung für CL, V2, V3 und Q und Alter als Kovariate für CL und V2 wurde der sogenannten „backward elimination“ unterzogen. Bei der Elimination jeder der Kovariaten einzeln und nacheinander verschlechterte sich die OBF signifikant (Δ OBF > 7,8). Alle Kovariaten tragen somit signifikant zu einer besseren Vorhersage durch das Modell bei und verbleiben im Modell (Modell 5). Dieses Modell wurde abschließend auf die FOCE-Methode mit Interaktion umgestellt und wird nachfolgend als finales Modell (Modell 5 mit FOCE) bezeichnet. Insgesamt zeigt es eine deutlich verbesserte Vorhersage der Konzentrationen im Vergleich zu dem ersten Modell (Abbildung 9D); die Abweichung der gewichteten Residuen von der Nulllinie ist deutlich geringer geworden, auch wenn nach wie vor bei den kleinen Konzentrationen eine Abweichung besteht (Abbildung 10D). Der Restfehler gemessen an seiner Varianz σ^2 konnte von anfänglich 0,75 auf 0,054 reduziert werden (Tabelle 5, Modell 5 mit FOCE). Die unerklärte interindividuelle Variabilität konnte durch die Einführung von Kovariaten für alle kinetischen Parameter gesenkt werden. Für V2 und V3 ist diese allerdings immer noch relativ hoch. So konnte sie für V2 von anfänglich 1,97 (\triangleq 140,4%) auf 1,29 (\triangleq 113,6%) gesenkt werden, ist damit am Ende aber immer noch 2,6-fach höher als die interindividuelle Variabilität der Clearance mit 0,19 (\triangleq 43,6%).

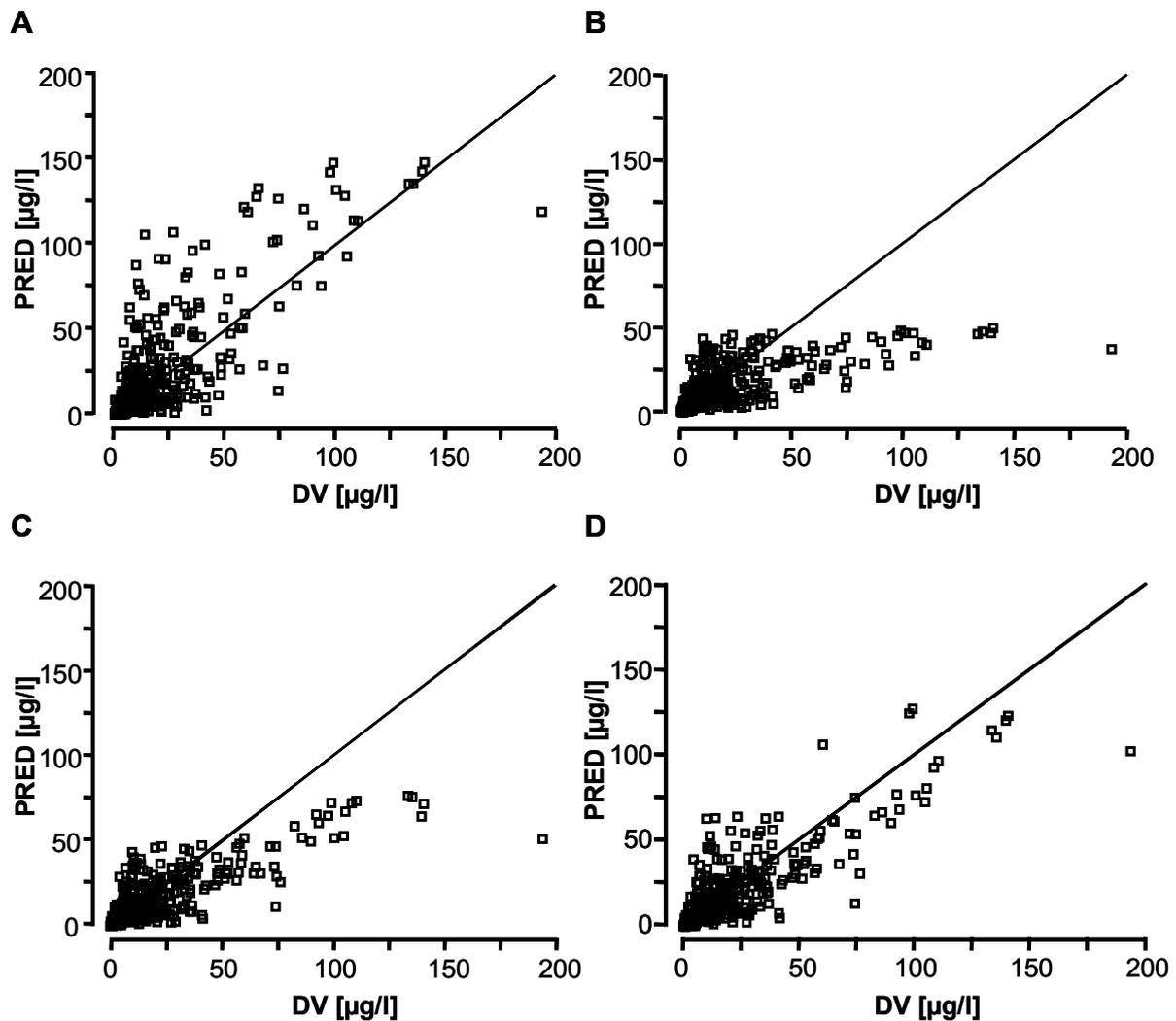


Abbildung 9: Vergleich zwischen vorhergesagter und gemessener Carvedilol-Konzentration

Die Abbildung zeigt jeweils die gemessenen Konzentrationen (DV = dependent variable) im Vergleich zu den durch das Modell vorhergesagten Konzentrationen (PRED = predicted variable). Optimalerweise sollten sich die Punkte auf der Winkelhalbierenden befinden („line of identity“) oder zumindest gleichmäßig um diese streuen. Dargestellt sind (A) das strukturelle Modell inclusive ETAs (Modell 2), (B) das allometrisch skalierte Modell (Modell 3), (C) das Modell mit Alter als Kovariate auf der Clearance (Modell 4) und (D) das finale Modell mit Alter auf der Clearance und dem zentralen Verteilungsvolumen (Modell 5 mit FOCE). Durch die Einführung von Kovariaten wird die Streuung um und die Abweichung von der Winkelhalbierenden vermindert.

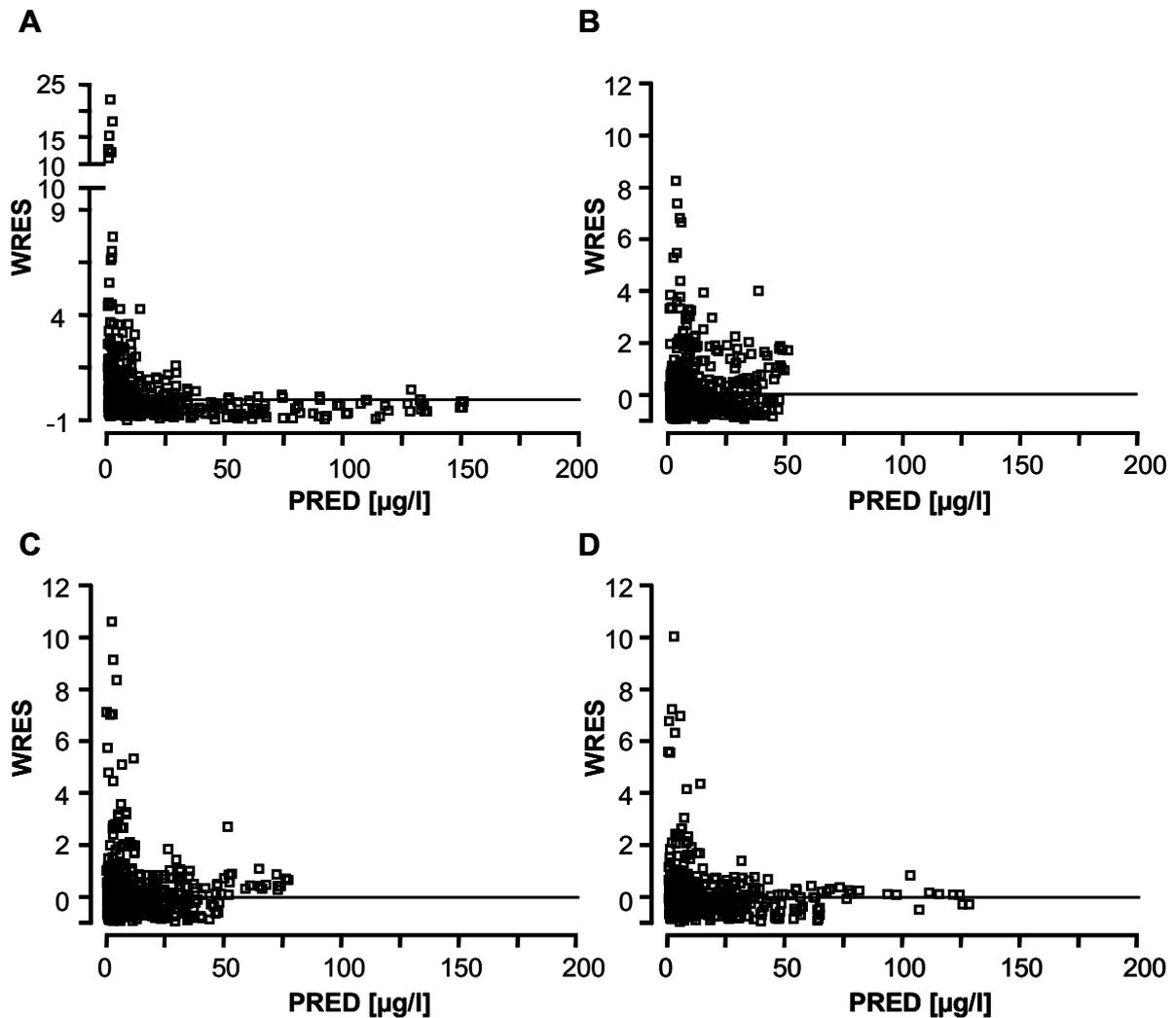


Abbildung 10: Gewichtete Residuen in Abhängigkeit von der vorhergesagten Konzentration
Die Abbildungen zeigen die gewichteten Residuen (WRES = weighted residuals) aufgetragen gegen die vorhergesagte Konzentration (PRED). Die Gerade entspricht der Nulllinie, um die die WRES streuen. Je weiter das Modell entwickelt wird, desto geringer ist die Abweichung von der Nulllinie. Dargestellt sind (A) das strukturelle Modell inclusive ETAs (Modell 2), (B) das allometrisch skalierte Modell (Modell 3), (C) das Modell mit Alter als Kovariate auf der Clearance (Modell 4) und (D) das finale Modell mit Alter auf der Clearance und dem zentralen Verteilungsvolumen (Modell 5 mit FOCE).

Korrelationsanalysen wurden durchgeführt um zu prüfen, ob der während der Pop-PK-Modellentwicklung gefundene Einfluss des Alters auf CL und V2 sich auch anhand der Patientenwerte nachvollziehen lässt. Zu diesem Zweck wurden die gemessenen Werte für CL und V2 jeweils absolut und körperlgeichtsbezogen mit dem Alter korreliert.

Die absolute Clearance ist nicht signifikant mit dem Alter korreliert ($p = 0,052$). Sie erreicht schon bei Kindern in einem Alter von zwei Jahren das Niveau der Erwachsenen. Die körperlgeichtsbezogene Clearance nimmt hingegen kontinuierlich mit zunehmendem Alter ab. Die Korrelation ist signifikant ($p < 0,01$; Abbildung 11A). Für einen einjährigen Patienten beträgt die körperlgeichtsbezogene Clearance 2,7 l/h/kg im Vergleich zu 0,7 l/h/kg für einen 19,3 Jahre alten Patienten.

Sowohl das absolute als auch das körperlgeichtsbezogene V2 ist signifikant mit dem Alter korreliert ($p < 0,01$ bzw. $p < 0,05$). Ähnlich wie bei der körperlgeichtsbezogenen Clearance nehmen die Werte für das körperlgeichtsbezogene V2 mit zunehmendem Alter ab: Ein einjähriger Patient hat einen Wert von 2,6 l/kg im Vergleich zu 0,9 l/kg für einen 19,3 Jahre alten Patienten (Abbildung 11B). V2 geht außerdem noch in das Verteilungsvolumen im Fließgleichgewicht (VSS) ein, welches die Summe aus V2 und V3 darstellt. Hier ist zwar die Korrelation zwischen Alter und absolutem VSS signifikant ($p < 0,01$), aber für das körperlgeichtsbezogene VSS besteht keine signifikante Korrelation mit dem Alter ($p = 0,46$).

Der während der Modellentwicklung gefundene Einfluss des Alters auf die körperlgeichtsbezogenen Werte für CL und V2 konnte somit anhand der gemessenen Patientenwerte bestätigt werden. An dieser Stelle muss erwähnt werden, dass für die individuelle Auswertung der pharmakokinetischen Parameter von den insgesamt 41 Patienten der Pop-PK-Analyse nur Werte für $n = 32$ Patienten ermittelt werden konnten. Für die Vergleichbarkeit der gemessenen, individuell ermittelten, Werte mit den Pop-PK-Werten wurde für die individuelle Analyse ebenfalls ein Zweikompartimentmodell mit Lagtime verwendet, welches nicht auf alle Patienten erfolgreich angewendet werden konnte.

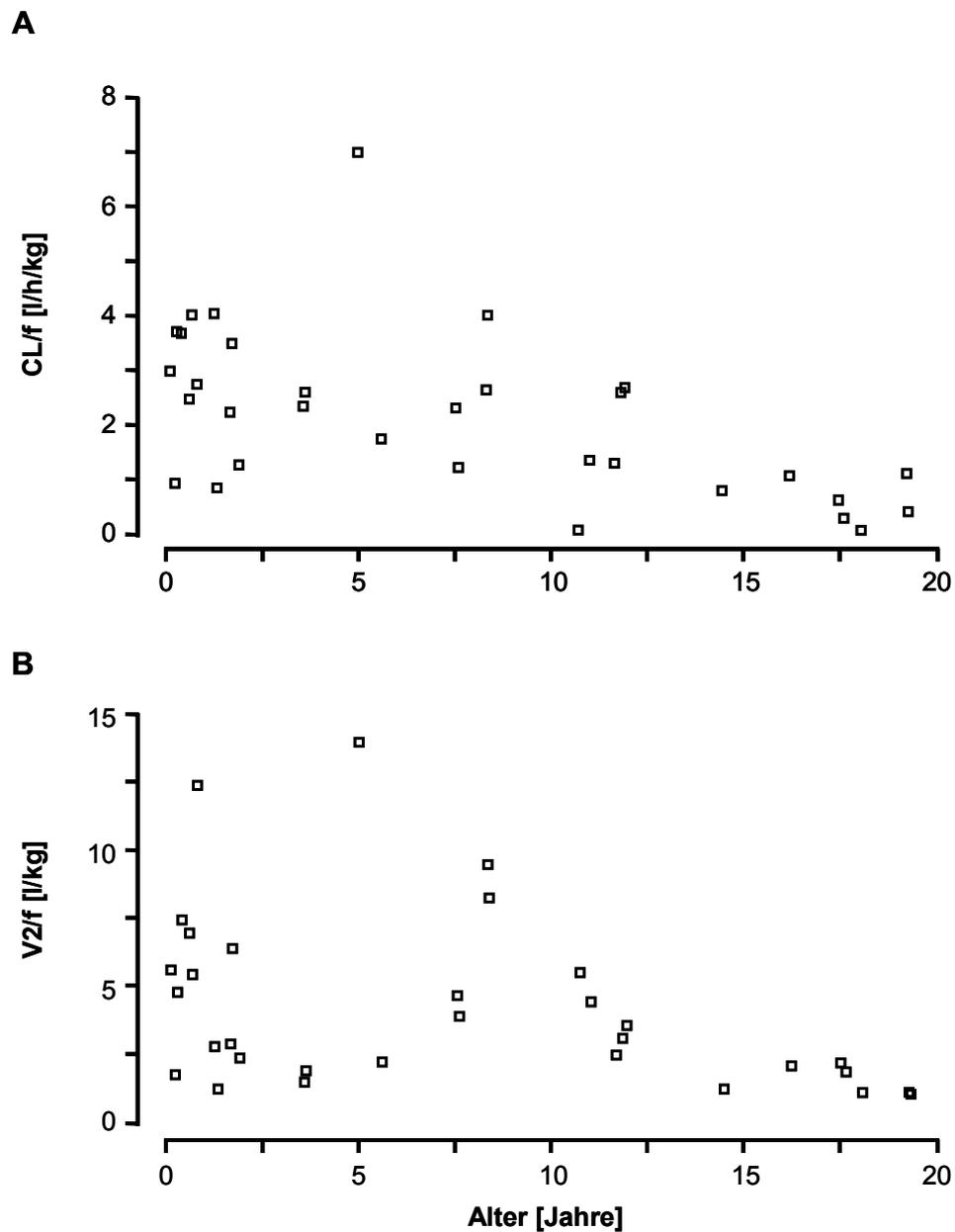


Abbildung 11: Körpergewichtsbezogene Werte für CL und V2 in Abhängigkeit vom Alter

(A) Die gemessene körpergewichtsbezogene Clearance (CL) nimmt mit zunehmendem Alter ab. Die Korrelation ist mit $p < 0,01$ signifikant. (B) Das gemessene körpergewichtsbezogene zentrale Verteilungsvolumen (V2) ist ebenfalls negativ mit dem Alter korreliert; die Korrelation ist mit $p < 0,05$ signifikant. In die Werte geht jeweils die Bioverfügbarkeit (f) als Faktor mit ein.

4.2.3 Evaluierung des Pop-PK-Modells

Die Schätzwerte für die NONMEM-Populationsmittelwerte stimmen sehr gut mit den mittleren Werten aus der nicht-parametrischen Bootstrap-Analyse ($n = 1000$) überein (Tabelle 7). Dies wird deutlich durch die geringen Differenzen zwischen Pop-PK- und Bootstrap-Mittelwert. Die 2,5te und 97,5te Perzentile der 1000 Bootstrap-Werte ergeben das 95%-Konfidenzintervall, welches für CL, Q, KA, TLAG und θ_7 relativ eng ist. Bei V2 und V3 zeigt sich wie schon in Abschnitt 4.2.2 eine größere Variabilität mit entsprechend breiteren Konfidenzintervallen. Auch θ_8 unterliegt einer größeren Variabilität als die anderen Parameter, ist aber auch in 1000 Bootstrap-Wiederholungen signifikant verschieden von null, da das 95%-Konfidenzintervall den Wert null nicht mit einschließt. Die Häufigkeitsverteilung der Schätzwerte aus der Bootstrap-Analyse ist in Abbildung 12 abgebildet. Für θ_7 und θ_8 ist diese im Anhang unter Abschnitt 9.2 zu finden.

Parameter	Populations- mittelwert Pop-PK-Modell	Mittelwert der Bootstrap-Analyse ($n=1000$)	95% KI (%)
CL/f [l/h]	38,1	37,6	31,6 - 43,7 (84,0 - 116,2)
V2/f [l]	22,0	21,8	13,4 - 32,1 (61,5 - 147,2)
V3/f [l]	96,5	103,7	62,6 - 170,0 (60,4 - 163,9)
Q/f [l/h]	13,5	13,6	10,3 - 17,8 (75,7 - 130,9)
KA [1/h]	0,62	0,62	0,55 - 0,72 (88,7 - 116,1)
TLAG [h]	0,15	0,15	0,11 - 0,19 (73,3 - 126,7)
θ_7	2,70	2,67	2,44 - 2,82 (91,4 - 105,6)
θ_8	-0,13	-0,12	-0,17 - (-) 0,04 (141,7 - 33,3)

Tabelle 7: Ergebnis der Bootstrap-Analyse

Dargestellt sind die Schätzwerte aus dem finalen Modell im Vergleich zu 1000 Bootstrap-Wiederholungen für die Parameter Clearance (CL), zentrales und peripheres Verteilungsvolumen (V2 und V3), interkompartimentelle Clearance (Q), Absorptionsgeschwindigkeitskonstante (KA), Lagtime (TLAG), θ_7 und θ_8 . Für die Bootstrap-Ergebnisse ist das 95%-Konfidenzintervall (95% KI) absolut und in Prozent vom Bootstrap-Mittelwert angegeben.

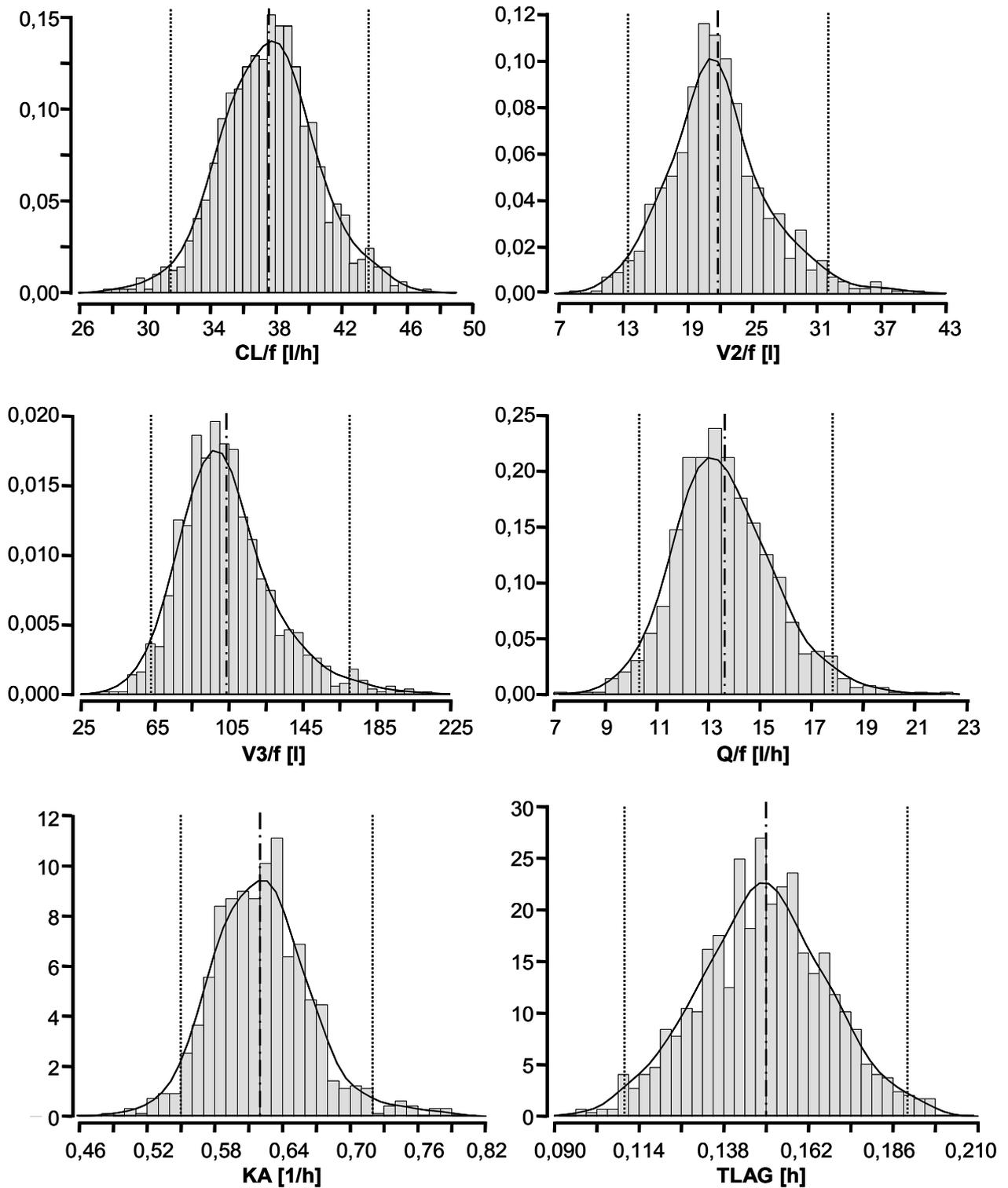


Abbildung 12: Histogramme der Bootstrap-Schätzwerte

Für die kinetischen Parameter Clearance (CL), zentrales und peripheres Verteilungsvolumen ($V2$, $V3$), interkompartmentelle Clearance (Q), Absorptionsgeschwindigkeitskonstante (KA) und Lagtime ($TLAG$) ist die Häufigkeitsverteilung und die Dichtefunktion der 1000 Bootstrap-Schätzwerte dargestellt mit den 95%-Konfidenzintervallen (gepunktete Linien) und dem Mittelwert der Bootstrap-Analyse (Punkt-Strich-Linie; siehe auch Tabelle 7). In CL , $V2$, $V3$ und Q geht die Bioverfügbarkeit als Faktor f mit ein.

Vergleicht man für jedes Individuum die gemessene mit der durch das finale Modell *individuell* vorhergesagten Konzentration in Abhängigkeit von der Zeit nach der Carvedilol-Einnahme, dann stimmen die beiden Konzentrations-Zeitverläufe optisch beurteilt sehr gut überein. In Abbildung 13 sind beispielhaft die Plasmakonzentrations-Zeitverläufe für zehn Patienten dargestellt; die restlichen Profile sind im Anhang unter Abschnitt 9.2 abgebildet. Die individuelle Vorhersage (individual predicted = IPRED) berücksichtigt die interindividuelle Variabilität und ist deshalb noch präziser als die Vorhersage auf Basis der Populationsmittelwerte und Kovariaten (predicted = PRED). Bei der individuellen Vorhersage können die pharmakokinetischen Parameter für zwei Individuen mit gleichen Kovariaten unterschiedliche Werte annehmen, wohingegen ohne Berücksichtigung interindividueller Unterschiede die Werte gleich geschätzt werden.

Für die Vorhersage auf Basis der Populationsmittelwerte und Kovariaten (PRED) gilt, dass die Carvedilol-Plasmakonzentrationen ab vier Stunden nach der Einnahme deutlich besser vorhergesagt werden als die Plasmakonzentrationen in den ersten vier Stunden nach der Einnahme. Das bedeutet auch, dass die Konzentration am Ende eines Dosierungsintervalls (Talspiegel), wie sie im Rahmen eines Drug Monitorings bestimmt wird, besser als die maximale Plasmakonzentration nach der Einnahme (c_{\max}) vorhergesagt werden kann.

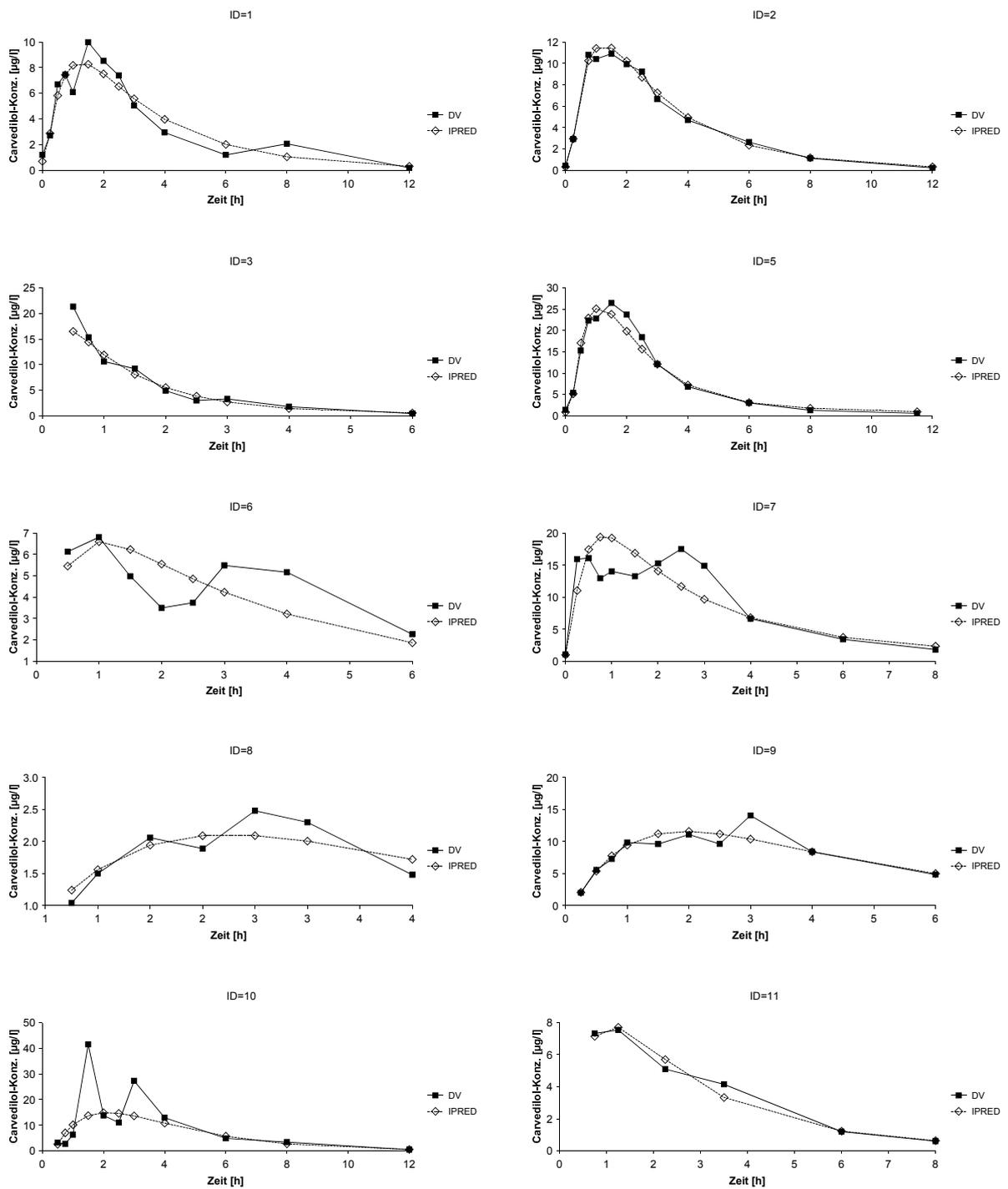


Abbildung 13: Vergleich der individuell vorhergesagten mit der gemessenen Konzentration Beispielhaft sind für n = 10 Patienten (ID = Individuum) die individuell vorhergesagten (IPRED = individual predicted) und die gemessenen (DV = dependent variable) Konzentrationen in Abhängigkeit von der Zeit nach der Einnahme von Carvedilol aufgetragen. Die Patienten sind nicht durchgehend von 1 - 41 durchnummeriert, deswegen gibt es zum Beispiel keinen Patienten mit der ID = 4.

Der Vergleich der populationskinetisch ermittelten pharmakokinetischen Parameter mit den gemessenen Werten ist in Tabelle 8 dargestellt. Entsprechend dem strukturellen Modell der Pop-PK-Analyse wurden die gemessenen Werte für diesen Vergleich individuell in einem Zweikompartimentmodell mit Lagtime ermittelt. Die populationskinetischen Werte für die Clearance (CL/f) und das Verteilungsvolumen im Fließgleichgewicht (VSS/f) stimmen im Mittel sehr gut mit den Mittelwerten der gemessenen Parameter überein. Die Werte für die Absorptionsgeschwindigkeitskonstante (KA) unterscheiden sich allerdings. Für die populationskinetische Analyse wurde die Varianz der interindividuellen Variabilität für KA (ω^2_{KA}) fixiert. Dies war erforderlich, da die Daten eine Schätzung dieser Varianz im Rahmen der Pop-PK-Analyse nicht unterstützen, schränkt aber natürlich das Ausmaß der interindividuellen Unterschiede für KA ein. Aus dem gleichen Grund ist auch die Variabilität der populationskinetischen Lagtime (TLAG) geringer als die Variabilität bei der individuellen Analyse, weil auch hier die Varianz für die interindividuelle Variabilität fixiert werden musste. Die mittlere Lagtime der beiden Analysen ist aber gut vergleichbar. Die interkompartimentelle Clearance ist in dieser Tabelle nicht aufgeführt, weil hier kein vergleichbarer Parameter in der individuellen Analyse existiert.

Mittelwerte der Patienten		
Parameter	Pop-PK-Analyse (n = 41)	Individuelle Analyse (n = 32)
CL/f [l/h] (VK [%])	39,6 (68,0)	39,0 (80,5)
VSS/f [l] (VK [%])	337,4 (144,2)	330,3 (121,3)
KA [1/h] (VK [%])	0,65 (19,0)	9,92 (134,6)
TLAG [h] (VK [%])	0,19 (64,4)	0,18 (163,6)

Tabelle 8: Vergleich der populationskinetischen mit den gemessenen Werten

Aufgeführt sind die kinetischen Parameter Clearance (CL) und Verteilungsvolumen im Fließgleichgewicht (VSS = zentrales + peripheres Verteilungsvolumen) in Abhängigkeit von der Bioverfügbarkeit (f), die Absorptionsgeschwindigkeitskonstante (KA) und die Lagtime (TLAG). Die individuellen Werte wurden auf Basis eines Zweikompartimentmodells mit Lagtime errechnet. Die Werte sind dargestellt als Mittelwerte mit relativer Standardabweichung (VK = Variationskoeffizient).

Auch die populationskinetisch ermittelten pharmakokinetischen Parameter für einen 19,3 Jahre alten Patienten mit einem Gewicht von 98,0 kg zeigen im Vergleich mit den bekannten Werten von Erwachsenen, dass das entwickelte Pop-PK-Modell die realen Werte gut annähert. So wird für diesen Patienten eine orale Carvedilol-Clearance von 10 ml/min/kg berechnet im Vergleich zu 8,4 ml/min/kg für einen 70 kg schweren Erwachsenen (Neugebauer et al. 1987). Das vorhergesagte Verteilungsvolumen im Fließgleichgewicht für diesen Patienten beträgt 2,3 l/kg und wird für einen 70 kg schweren Erwachsenen mit 1,5 - 2 l/kg angegeben (von Mollendorff et al. 1987).

Die Evaluierung mittels Bootstrap und der Vergleich mit den gemessenen Werten zeigen, dass das Pop-PK-Modell die realen Daten in der Population gut annähert.

4.3 Dosis-Simulation auf Basis des Pop-PK-Modells

Die mit dem finalen Modell geschätzten Populationsmittelwerte, Varianzen und Kovarianzen wurden nach der Bewertung des Modells in der Simulation eingesetzt. Zur Kontrolle der Simulationsgüte wurden zunächst Simulationen mit den tatsächlich verabreichten Carvedilol-Dosen (0,09 und 0,35 mg/kg) durchgeführt. Für $n = 21$ Patienten liegen gemessene Carvedilol-Plasmakonzentrationen unter der Testdosis (0,09 mg/kg) und für $n = 17$ Patienten gemessene Carvedilol-Plasmakonzentrationen unter der Zieldosis ($2 \times 0,35$ mg/kg) vor. Für jeden dieser Patienten wurden 100 Simulationen mit einer Dosis von $1 \times 0,09$ mg/kg bzw. $2 \times 0,35$ mg/kg im Fließgleichgewicht durchgeführt. Konzentrationen wurden zu den gleichen Zeitpunkten nach Carvedilol-Einnahme simuliert wie bei den gemessenen Profilen. Der Vergleich der simulierten Plasmakonzentrationen mit den tatsächlich gemessenen ist in Abbildung 14 dargestellt. Der Median, die 10te und die 90te Perzentile wurden über alle Simulationen mit der Dosis 0,09 mg/kg bzw. 0,35 mg/kg berechnet. Für beide Dosierungen gilt, dass ca. 90% der tatsächlich gemessenen Konzentrationen unter der 90ten Perzentile der simulierten Konzentrationen für die jeweilige Dosis liegen.

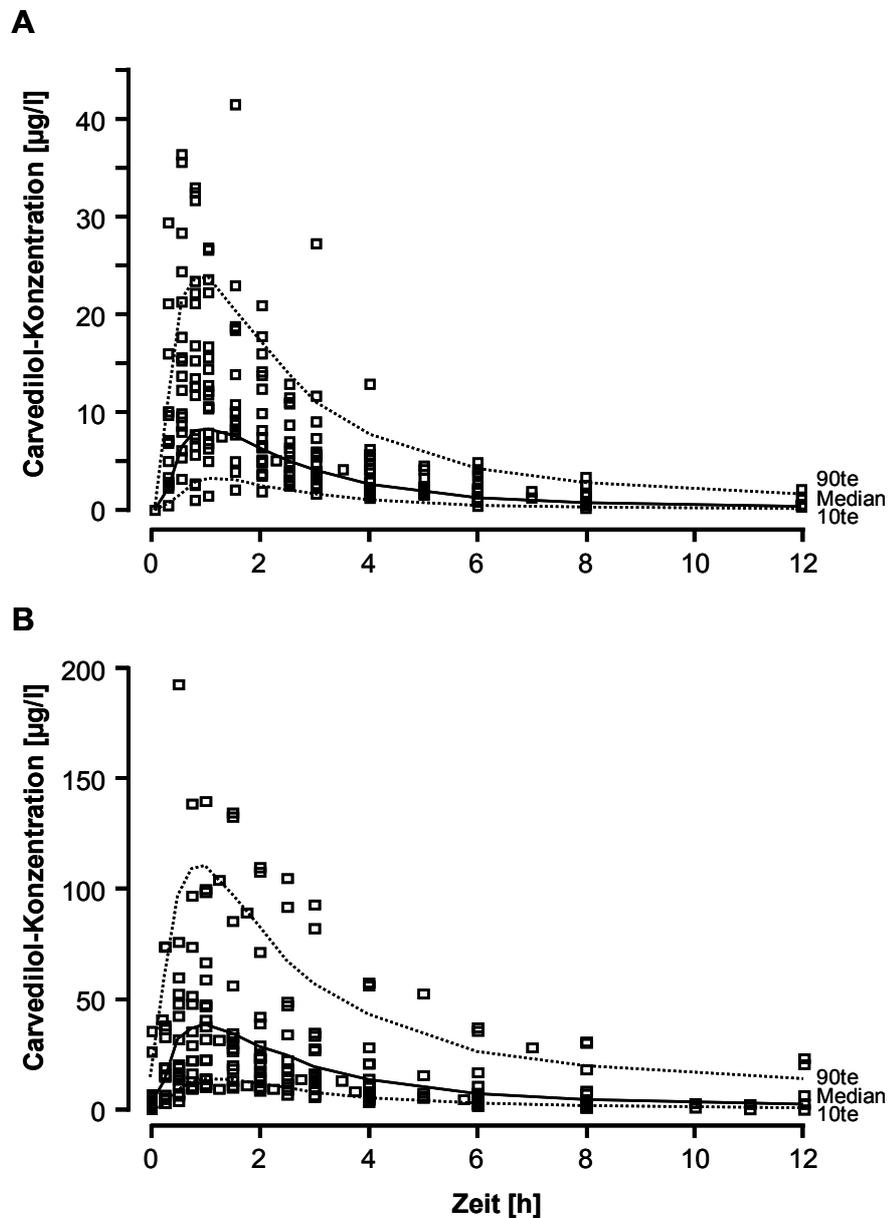


Abbildung 14: Vergleich zwischen gemessenen und simulierten Konzentrationen

(A) Gemessene vs. simulierte Konzentrationen für die Testdosis $1 \times 0,09 \text{ mg/kg}$. Dargestellt sind die gemessenen Konzentrationen (offene Quadrate) von $n = 21$ Patienten im Vergleich zum Median (durchgezogene Linie) und der 10te und 90te Perzentile (gestrichelte Linien) aus 100 Simulationen für jeden dieser Patienten. (B) Gemessene vs. simulierte Konzentrationen für die Zieldosis $2 \times 0,35 \text{ mg/kg}$ im Fließgleichgewicht. Gemessene Konzentrationen liegen von $n = 17$ Patienten vor im Vergleich zum Median (durchgezogene Linie) und der 10ten und 90ten Perzentile (gestrichelte Linien) aus 100 Simulationen.

Als nächstes wurde für Patienten möglichst aller Jahrgänge die Fläche unter der Plasmakonzentrations-Zeitkurve (AUC) aus 100 simulierten Profilen unter der Dosis $2 \times 0,35$ mg/kg über das Dosierungsintervall von 12 Stunden nicht-kompartimentell ermittelt (Abbildung 15). Die systemische Verfügbarkeit von Carvedilol nimmt trotz gleicher Dosis bezogen auf das Körpergewicht mit zunehmendem Alter zu, entsprechend der altersabhängigen Clearance. Dabei reicht die mediane AUC von $78,6 \mu\text{g}\cdot\text{h/l}$ für den 0,1 Jahre alten Patienten bis $495,4 \mu\text{g}\cdot\text{h/l}$ für den 19,3 Jahre alten Patienten. Die Varianzanalyse zeigt ebenfalls einen signifikanten Alterseinfluss; im paarweisen Vergleich mit dem nächst älteren bzw. nächst jüngeren Patienten ist aber nur der Unterschied zwischen 8,3 und 10,7 Jahre, 11,9 und 14,5 Jahre, und 14,5 und 16,2 Jahre signifikant ($p < 0,05$). Bei den ersten beiden Vergleichen beträgt die Altersdifferenz allerdings 2,4 bzw. 2,6 Jahre, so dass die Signifikanz vermutlich durch den großen Altersunterschied zustande kommt. Zwischen einem 14,5 und 16,2 Jahre alten Patienten ist der Unterschied in der AUC trotz einer geringen Altersdifferenz von 1,7 Jahren signifikant; bei Patienten älter als 16,2 Jahren bestehen keine signifikanten Unterschiede mehr. Auch optisch beurteilt lassen sich Patienten im Alter von 16 - 19 Jahren der gleichen Altersgruppe zuordnen.

Im Hinblick auf die Einteilung in Altersgruppen erscheint somit die Zusammenfassung in Neugeborene (0 - 27 Tage), Kleinkinder (28 Tage - 23 Monate) und Kinder (2 - 11 Jahre) gemäß der ICH sinnvoll, da jeweils an den Grenzen dieser Gruppen keine signifikanten AUC-Unterschiede zu erwarten sind. Für die Gruppe der Heranwachsenden wurde allerdings abweichend von der ICH eine obere Grenze von 15 Jahren für sinnvoll befunden, da der Unterschied in der AUC zu Älteren statistisch signifikant war. Auch optisch beurteilt lässt sich ein 16-Jähriger der Gruppe der Erwachsenen zuordnen. Damit gelten Patienten ≥ 16 Jahre für die nachfolgende Simulation als erwachsen.

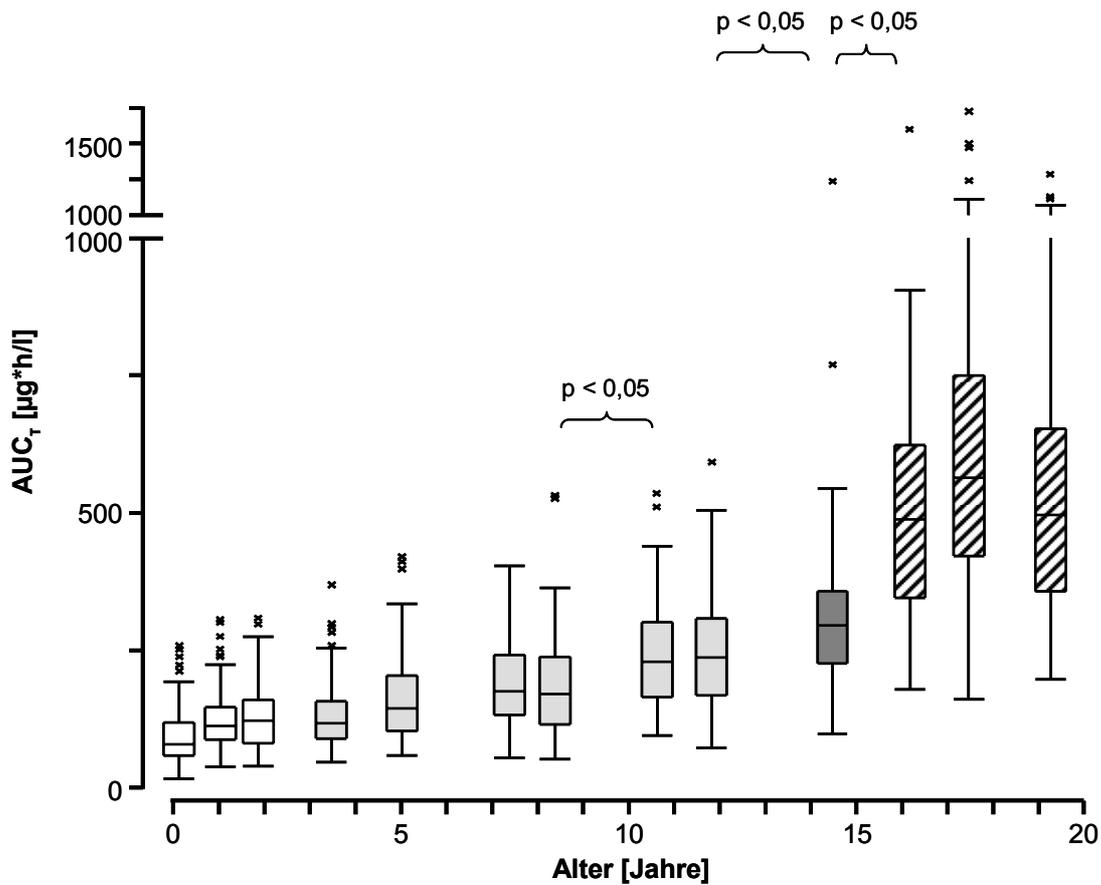


Abbildung 15: Simulierte AUC unter 2 x 0,35 mg/kg Carvedilol für Patienten unterschiedlichen Alters

Für $n = 13$ Patienten unterschiedlichen Alters ist die Fläche unter der Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve (AUC) aus 100 Simulationen dargestellt. Die AUC wurde nicht-kompartimentell über das Dosierungsintervall $\tau = 12$ Stunden berechnet. Der Boxplot zeigt den Median, die 25te und 50te Perzentile (Box), die obere und die untere Grenze des Normalbereichs (Fehlerbalken) und die Ausreißer (x). Signifikante Unterschiede zu den nächst älteren oder jüngeren Patienten sind in der Abbildung angegeben. Die Patienten werden den Gruppen Kleinkinder (28 Tage - 23 Monate; weiße Box), Kinder (2 - 11 Jahre; hellgraue Box) Heranwachsende (12 - 15 Jahre; dunkelgraue Box) und Erwachsene (≥ 16 Jahre; schraffierte Box) zugeordnet.

Für die Dosis-Simulation wurde beispielhaft je ein Patient aus der Mitte der Altersgruppen Kleinkinder, Kinder und Heranwachsende ausgewählt. Aus der Gruppe der Neugeborenen wurde kein Patient ausgewählt. Der jüngste Patient in der untersuchten Population wird zwar dieser Gruppe zugeordnet, befindet sich aber mit einem Alter von 0,07 Jahren (23 Tagen) eher an der Schwelle zu den Kleinkindern und nicht in der Mitte der Altersgruppe. Tabelle 9 zeigt die für die Simulation ausgewählten Patienten mit ihren dazugehörigen, für die Kinetik relevanten, Kovariaten.

Altersklassifikation	Patient	Alter [Jahre]	Gewicht [kg]
Kleinkinder (28 Tage - 23 Monate)	ID 15	1,0	9,1
Kinder (2 - 11 Jahre)	ID 25	7,5	24,3
Heranwachsende (12 - 15 Jahre)	ID 35	14,5	52,0

Tabelle 9: Ausgewählte Patienten für die Dosis-Simulation

Für die Patienten (ID = Individuum) aus den verschiedenen Altersgruppen sind die relevanten Kovariaten Alter und Gewicht angegeben.

Zunächst wurden verschiedene Carvedilol-Dosen für das Dosierungsregime „zweimal tägliche Applikation“ (BID = lat.: bis in die) simuliert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 und Abbildung 16 dargestellt: Die simulierten AUC-Werte der drei Patienten über das Dosierungsintervall von 12 Stunden sind für jede Dosis, paarweise miteinander verglichen, signifikant voneinander verschieden ($p < 0,05$). Die AUC nimmt zwar mit zunehmender Dosis für alle drei Patienten zu, aber das Niveau der Werte ist trotz gleicher Dosis bezogen auf das Körpergewicht sehr unterschiedlich. Die mediane AUC des erwachsenen Patienten (schraffierte Box in Abbildung 16) beträgt unter der Dosis 0,35 mg/kg BID 495 $\mu\text{g}\cdot\text{h/l}$ und ist damit 1,7-fach höher als die mediane AUC des 14,5 Jahre alten Patienten, die bei gleicher Dosis 300,1 $\mu\text{g}\cdot\text{h/l}$ beträgt (Tabelle 10). Verglichen mit den jüngeren Patienten hat der Erwachsene unter 0,35 mg/kg BID eine 3,2-fach (4,4-fach) höhere mediane AUC als der 7,5 Jahre (1,0 Jahre) alte Patient mit Werten von 153,9 $\mu\text{g}\cdot\text{h/l}$ (113,2 $\mu\text{g}\cdot\text{h/l}$). Betrachtet man die mediane AUC des erwachsenen Patienten als Ziel-AUC, dann müsste ein 14,5 Jahre alter Patient eine Dosis von 0,5 mg/kg BID einnehmen, damit diese Ziel-AUC mit einer ca. 50%-igen Wahrscheinlichkeit bei einer ähnlichen Variabilität erreicht wird. Ein 7,5 Jahre (1,0 Jahre) alter Patient müsste 1,0 mg/kg (1,5 mg/kg) BID einnehmen, um ebenfalls mit 50%-iger Wahrscheinlichkeit und gleicher Variabilität die Ziel-AUC des Erwachsenen zu erreichen.

Betrachtet man die AUC bei unterschiedlichen Dosen für einen Patienten, dann verhält sich diese linear zur Dosis: Die doppelte Dosis erzielt ungefähr die doppelte AUC.

Patient	Einzel-dosis BID [mg/kg]	AUC Median [µg*h/l]	Einzel-dosis TID [mg/kg]	AUC Median [µg*h/l]
ID 15	0,35	113,2	0,25	136,5
	0,5	153,6	0,35	213,9
	0,7	231,4	0,5	309,5
	1,0	332,5	0,7	378,3
	1,5	451,4	1,0	580,5
ID 25	0,35	153,9	0,25	222,0
	0,5	227,5	0,35	303,9
	0,7	322,7	0,5	398,5
	1,0	474,4	0,7	621,7
	1,5	682,5	1,0	792,9
ID 35	0,35	300,1	0,25	384,3
	0,5	421,9	0,35	526,1
	0,7	556,7	0,5	721,2
	1,0	891,7	0,7	1029,2
	1,5	1272,6	1,0	1553,1

Tabelle 10: Mediane AUC bei zwei- bzw. dreimal täglicher Applikation verschiedener Dosen
Für die drei Patienten ID 15, ID 25 und ID 35 ist die mediane Fläche unter der Konzentrations-Zeitkurve (AUC) nach zweimal täglicher (BID) bzw. dreimal täglicher Applikation (TID) dargestellt.

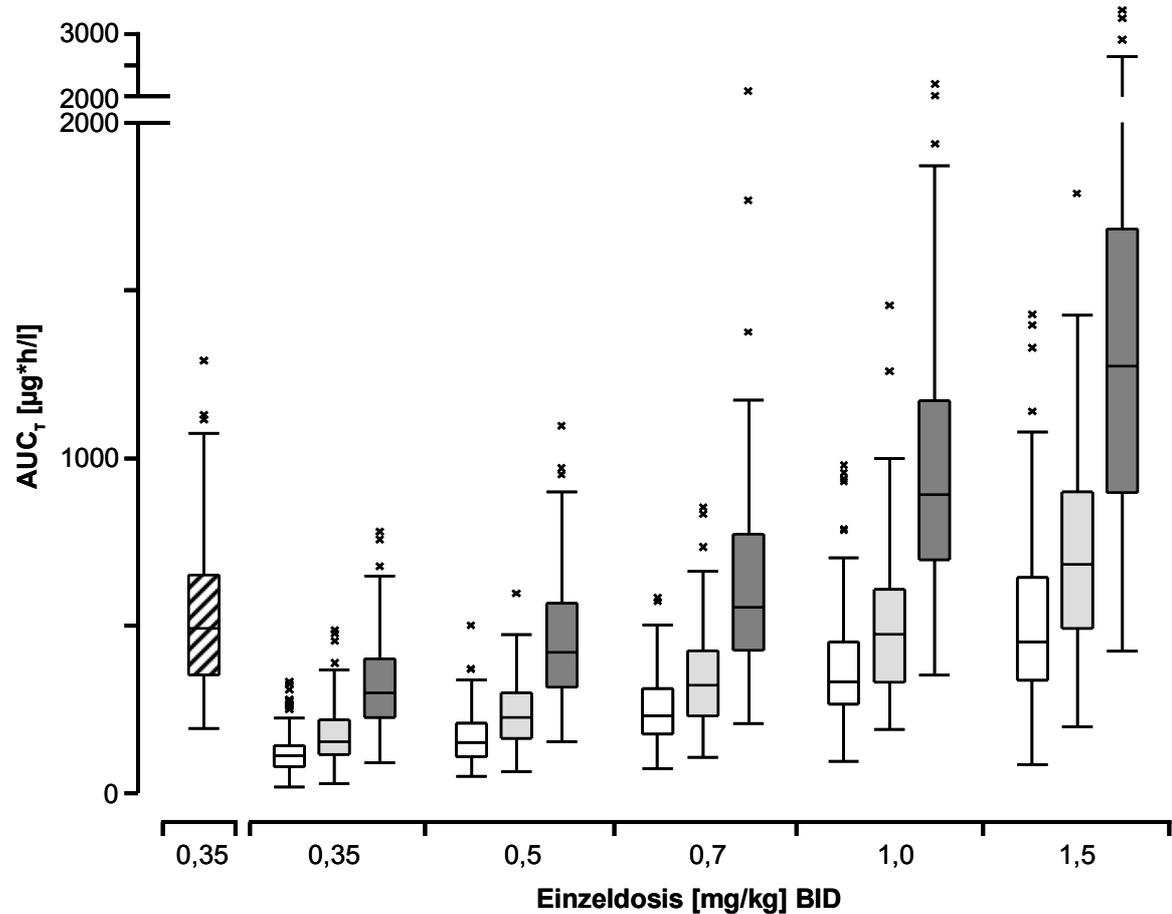


Abbildung 16: Simulierte AUC unter Dosierungsregime BID für verschiedene Carvedilol-Einzeldosen

Dargestellt ist die simulierte Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (AUC) bei unterschiedlichen Carvedilol-Dosen. Die AUC wird bei zweimal täglicher Applikation (BID) über das Dosierungsintervall von 12 Stunden berechnet. In dem Boxplot sind der Median, die 25te und 75te Perzentile (Box), die oberen und unteren Grenzen des Normalbereiches (Fehlerbalken) und die Ausreißer (x) von 100 aus der Simulation ermittelten AUC-Werten dargestellt. Bei jeder Dosis werden folgende Patienten unterschieden: ID 15 (1,0 Jahre; hellgraue Box), ID 25 (7,5 Jahre; weiße Box) und ID 35 (14,5 Jahre; dunkelgraue Box). Zum Vergleich sind zusätzlich die AUC-Werte für einen 19,3 Jahre alten Patienten abgebildet (schraffierte Box). Im paarweisen Vergleich der Varianzanalyse sind die Unterschiede zwischen den Patienten für jede Dosis mit $p < 0,05$ signifikant.

Neben der Erhöhung der Dosis kann auch die Verkürzung des Dosierungsintervalls zu einer höheren systemischen Verfügbarkeit des Arzneistoffes beitragen. Die Akkumulation von Carvedilol bei einer zweimal täglichen Applikation ist bedingt durch die höhere Carvedilol-Clearance bei jüngeren Patienten nur gering. Deswegen wurden Simulationen für eine dreimal tägliche Applikation (TID = lat.: ter in die) der bereits oben aufgeführten Tagesdosen durchgeführt. Das Dosierungsintervall betrug acht Stunden. Die AUC wurden wegen der Vergleichbarkeit mit dem BID-Dosierungsregime ebenfalls von 0 - 12 Stunden berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 und Abbildung 17 dargestellt: Wie schon bei der zweimal täglichen Applikation sind die Unterschiede zwischen den Patienten im paarweisen Vergleich mit $p < 0,05$ signifikant. Die Ergebnisse zeigen ebenfalls, dass die AUC mit steigender Dosis für alle drei Patienten ansteigt, das Niveau der Werte bei gleicher Dosis aber nach wie vor sehr unterschiedlich ist. Insgesamt ist die Akkumulation des Arzneistoffes für alle drei Patienten höher als unter der zweimal täglichen Gabe. So erzielt eine Dosis von 1 mg/kg dreimal täglich verabreicht bei dem einjährigen Patienten eine mediane AUC von 580,5 $\mu\text{g}\cdot\text{h/l}$ im Vergleich zu 451,4 $\mu\text{g}\cdot\text{h/l}$ unter einer Dosis von 1,5 mg/kg zweimal täglich verabreicht (Tabelle 10). Vergleicht man die simulierten AUC-Werte für das TID-Dosierungsregime mit der Ziel-AUC des Erwachsenen (schraffierte Box) unter dem BID-Dosierungsregime, dann bleibt für den 14,5-Jährigen (dunkelgraue Box) eine Tagesdosis von ca. 1 mg/kg verteilt auf drei Einzeldosen erforderlich, um die Ziel-AUC von 495,4 $\mu\text{g}\cdot\text{h/l}$ mit einer 50%-igen Wahrscheinlichkeit bei gleicher Variabilität zu erreichen. Für den 7,5 Jahre alten Patienten wird die Ziel-AUC unter einer Dosis von $3 \times 0,5$ mg/kg mit einer weniger als 50%-igen Wahrscheinlichkeit erreicht, unter einer Dosis von $3 \times 0,7$ mg/kg mit einer fast 75%-igen Wahrscheinlichkeit aber auch einer höheren Variabilität. Ähnliches gilt für den Einjährigen, wo eine Dosis von $3 \times 0,7$ mg/kg mit einer weniger als 50%-igen Wahrscheinlichkeit, eine Dosis von $3 \times 1,0$ mg/kg mit einer größer als 50%-igen Wahrscheinlichkeit die Ziel-AUC erzielt.

Die Ergebnisse der Simulation zeigen, dass die systemische Verfügbarkeit des Arzneistoffes Carvedilol bei Kindern sehr unterschiedlich ist. Um trotzdem bei Kindern verschiedener Altersgruppen eine ähnliche systemische Verfügbarkeit wie bei Erwachsenen zu erzielen, waren in der Simulation für Kleinkinder, Kinder und Heranwachsende Tagesdosen von 3, 2 und 1 mg/kg/Tag verteilt auf zwei oder drei Einzeldosen erforderlich.

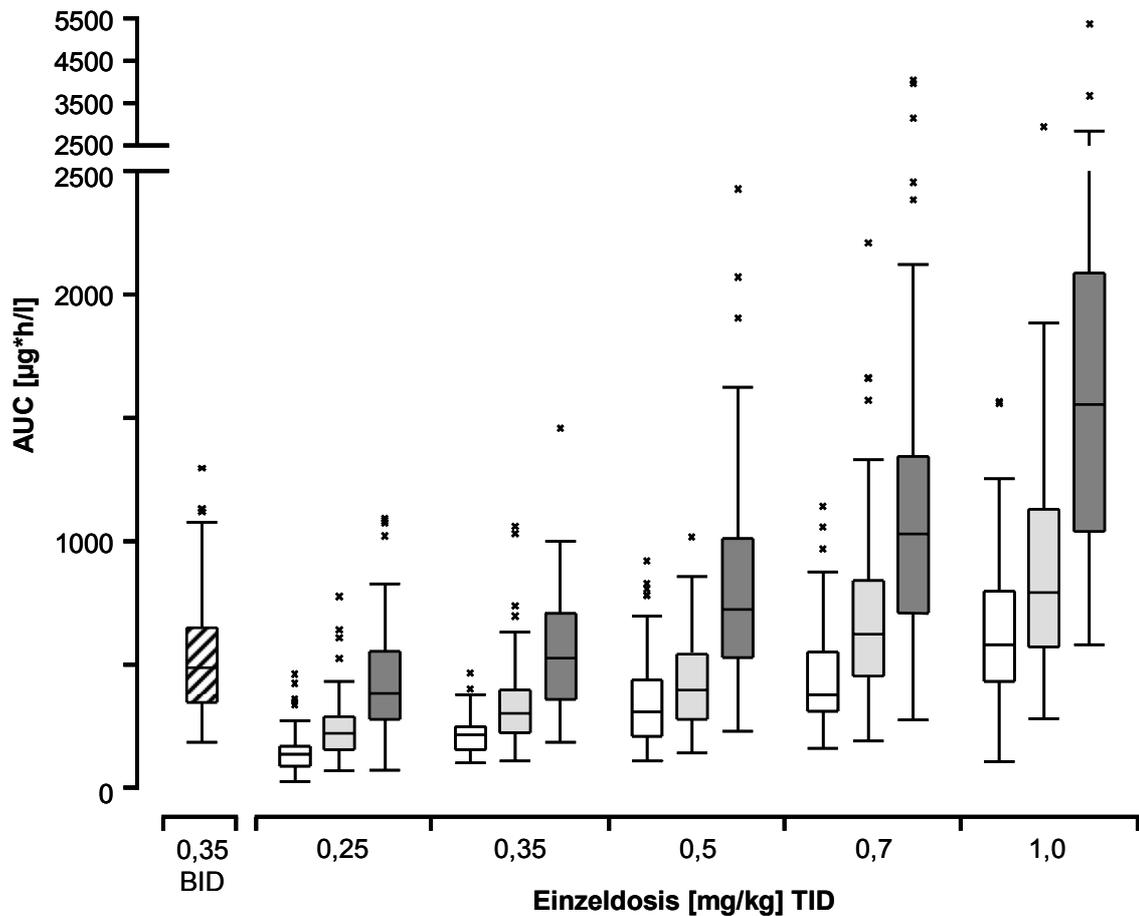


Abbildung 17: Simulierte AUC unter Dosierungsregime TID für verschiedene Carvedilol-Einzeldosen

Dargestellt ist die simulierte Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (AUC) bei unterschiedlichen Carvedilol-Dosen. Die AUC wird bei dreimal täglicher Applikation (TID) über 12 Stunden berechnet. In dem Boxplot sind der Median, die 25te und 75te Perzentile (Box), die oberen und unteren Grenzen des Normalbereiches (Fehlerbalken) und die Ausreißer (x) von 100 aus der Simulation ermittelten AUC-Werten dargestellt. Bei jeder Dosis werden analog zu Abbildung 16 folgende Patienten unterschieden: ID 15 (1,0 Jahre; hellgraue Box), ID 25 (7,5 Jahre; weiße Box) und ID 35 (14,5 Jahre; dunkelgraue Box). Zum Vergleich sind die AUC-Werte für den 19,3 Jahre alten Patienten abgebildet (schraffierte Box), allerdings unter 2 x 0,35 mg/kg. Im paarweisen Vergleich der Varianzanalyse sind die Unterschiede zwischen den Patienten für jede Dosis signifikant.

4.4 NT-proBNP in der Carvedilol-Studie

NT-proBNP wurde retrospektiv mit dem ECLIA bestimmt. Von $n = 7$ Patienten (1,3 - 19,3 Jahre) liegen insgesamt 26 Wertepaare für die Korrelation der NT-proBNP-Plasmakonzentration mit der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) vor. Die gemessenen NT-proBNP-Plasmakonzentrationen umfassen einen Bereich von 60 - 3754 ng/l. NT-proBNP ist negativ mit der LVEF korreliert, das heißt je schlechter die LVEF desto höher die NT-proBNP-Plasmakonzentration ($r = -0,47$; $p < 0,05$; Abbildung 18).

Bei sechs dieser sieben Patienten liegen Werte für den Zeitraum null bis mindestens sechs Monate nach Beginn der Therapie vor. Insgesamt verbesserte sich bei diesen sechs Patienten nach mindestens sechs Monaten unter Carvedilol-Therapie die Herzfunktion gemessen an der LVEF signifikant von $37 \pm 10\%$ auf $57 \pm 15\%$ (Wilcoxon-Test; $p < 0,01$). Beurteilt man für diese sechs Patienten die NT-proBNP-Plasmakonzentration sowohl mithilfe der bekannten Erwachsenen-Werte als auch mit den in dieser Arbeit abgeleiteten altersentsprechenden Perzentilen, so kommt man zu dem gleichen Ergebnis: Vor Beginn der Therapie haben fünf der sechs Patienten eindeutig eine erhöhte NT-proBNP-Plasmakonzentration. Ein Patient weist verglichen mit beiden Referenzen normale NT-proBNP-Werte auf, obwohl seine LVEF mit 34% stark eingeschränkt ist. Die NT-proBNP-Plasmakonzentration für die sechs Patienten betrug zu Beginn der Therapie im Mittel $1285,0 \pm 1578,1$ ng/l und nach mindestens sechs Monaten unter der Therapie $868,2 \pm 1123,8$ ng/l. Insgesamt ist eine Tendenz zu niedrigeren NT-proBNP-Plasmakonzentrationen im Verlauf der Therapie zu erkennen. Aufgrund der geringen Anzahl an Patienten, den verschiedenen Altersgruppen und dem unterschiedlichen Schweregrad der Erkrankung ist ein statistischer Vergleich an dieser Stelle allerdings nicht möglich. Betrachtet man die individuellen Verläufe, nimmt NT-proBNP bei vier von sechs Patienten um mehr als 30% ab. Über den Therapiezeitraum von sechs Monaten wurde nur für einen der insgesamt fünf Patienten mit erhöhten NT-proBNP-Werten der Wert in den Normalbereich gesenkt. Generell scheint die Beurteilung des individuellen NT-proBNP-Verlaufs sinnvoller als ein Gruppenvergleich zu sein, besonders wenn die Patienten sehr unterschiedliche Ausgangswerte haben.

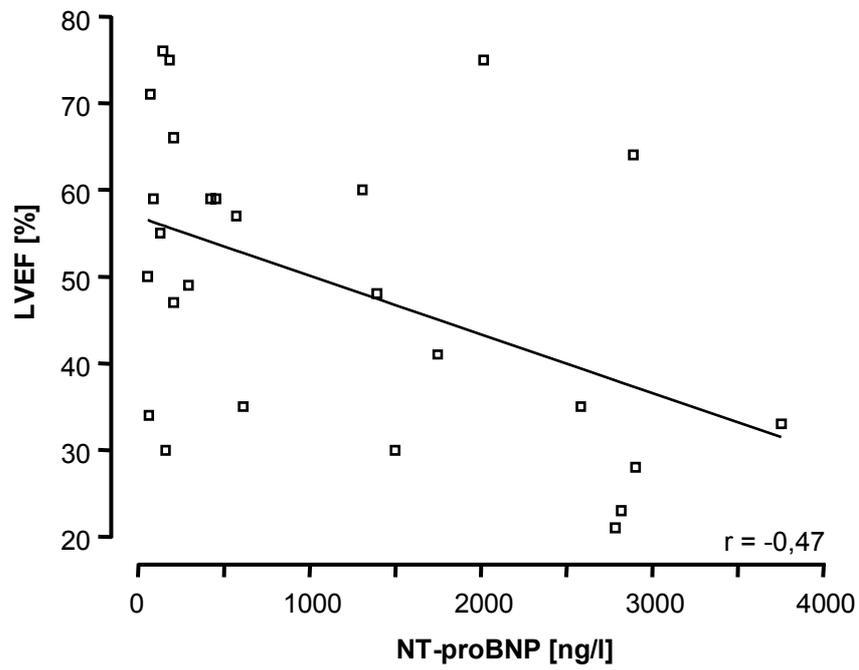


Abbildung 18: Korrelation der NT-proBNP-Plasmakonzentration mit der LVEF

Die NT-proBNP-Plasmakonzentration ist negativ mit der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF)

5 Diskussion

5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden Normalwerte des Biomarkers NT-proBNP bei Kindern erhoben und ein NT-proBNP-Methoden- und -Laborvergleich durchgeführt. Außerdem wurde ein populationskinetisches Modell für Carvedilol entwickelt, welches für eine Dosis-Simulation eingesetzt wurde. NT-proBNP wurde abschließend bei den mit Carvedilol therapierten pädiatrischen Patienten untersucht. Die Untersuchung von NT-proBNP-Normalwerten bei Kindern ist eine der Voraussetzungen für den Einsatz dieses Biomarkers bei pädiatrischen Patienten. Für Carvedilol ist ein altersentsprechendes Dosierungsregime die Voraussetzung für eine sichere und effektive Therapie bei Kindern. Die Hauptergebnisse sind im Folgenden kurz zusammengestellt und werden anschließend diskutiert.

- NT-proBNP-Normalwerte bei gesunden Kindern sind alters-, aber nicht geschlechtsabhängig und unterscheiden sich von den Werten von Erwachsenen. Jüngere Kinder haben höhere NT-proBNP-Plasmakonzentrationen. Die NT-proBNP-Werte für Kinder zwischen 11 und 16 Jahren werden stark durch Ausreißer und Extremwerte beeinflusst.
- Die zwei verwendeten Methoden zur Bestimmung des NT-proBNPs sind nicht miteinander vergleichbar. Die Altersabhängigkeit des NT-proBNPs wird nur mit dem Elektrochemilumineszenz-Immunoassay (ECLIA), nicht aber mit dem Enzymimmunoassay (EIA) detektiert. Die Korrelation der Messwerte untereinander ist schlecht und es zeigt sich ein großer proportionaler Fehler für den EIA. Ein multizentrischer Laborvergleich zeigt, dass NT-proBNP mit dem ECLIA sehr präzise gemessen werden kann.
- Relevante Kovariaten für die Carvedilol-Clearance bei Kindern sind Gewicht und Alter. Dabei nimmt die absolute Clearance mit dem Alter zu und erreicht bereits ab einem Alter von zwei Jahren das Niveau von Erwachsenen. Die körperrgewichtsbetonte Clearance nimmt hingegen kontinuierlich mit dem Alter ab. Das zentrale Verteilungsvolumen ist ebenfalls von Gewicht und Alter abhängig. Die körperrgewichtsbetonten Werte nehmen analog zur Clearance mit dem Alter ab. Für das periphere Verteilungsvolumen und die interkompartimentelle Clearance können neben dem Gewicht keine weiteren relevanten Kovariaten identifiziert werden.
- Das entwickelte populationskinetische Modell liefert stabile Vorhersagen. Sowohl die Bootstrap-Analyse als auch der Vergleich mit den gemessenen pharmakokine-

tischen Parametern zeigen, dass die realen Daten durch das Modell gut angenähert werden.

- Die Simulation zeigt, dass ein altersabhängiges Carvedilol-Dosierungsregime erforderlich ist, um in allen Altersgruppen eine vergleichbare systemische Verfügbarkeit des Arzneistoffes zu erreichen. Diese nimmt bei gleicher Dosis bezogen auf das Körpergewicht mit dem Alter zu. In der Simulation sind für Kleinkinder (28 Tage - 23 Monate), Kinder (2 - 11 Jahre) und Heranwachsende (12 - 15 Jahre) Tagesdosen von 3, 2 und 1 mg/kg verteilt auf zwei oder drei Einzeldosen erforderlich, um eine den Erwachsenen unter 0,7 mg/kg/Tag vergleichbare systemische Verfügbarkeit zu erzielen.
- NT-proBNP korreliert negativ mit der linksventrikulären Ejektionsfraktion. Nur für einen von fünf Patienten mit einer erhöhten NT-proBNP-Plasmakonzentration wird der Wert nach sechs Monaten unter der Therapie in den Normalbereich gesenkt.

5.2 NT-proBNP-Studie und -Untersuchungen

5.2.1 Einfluss des Alters auf die NT-proBNP-Plasmakonzentration

Das Alter hatte in der untersuchten pädiatrischen Population einen signifikanten Einfluss auf die NT-proBNP-Plasmakonzentration. Die Werte sind bei Kindern von 1 - 3 Jahren ca. vierfach höher als bei 18-Jährigen. Mit zunehmendem Alter sinken die NT-proBNP-Konzentrationen der Kinder auf das Niveau der Erwachsenenwerte ab. Bei den Erwachsenen (> 18 Jahre) des untersuchten Kollektivs entsprechen die gemessenen NT-proBNP-Konzentrationen den bekannten Referenzwerten. Für NT-proBNP ist analog zu anderen natriuretischen Peptiden bekannt, dass die Werte in den ersten Tagen nach der Geburt erhöht sind, dann aber rasch abnehmen auf Erwachsenenwerte (Mir et al. 2002, Mir et al. 2003, Nir et al. 2004). Als Ursachen werden hier der Wasserverlust in den ersten Lebenswochen und die Umstellung des Herzkreislaufsystems bei der Geburt diskutiert. Zwei andere Studien haben ähnlich wie in der vorliegenden Studie eine Altersabhängigkeit mit abnehmenden NT-proBNP-Plasmakonzentrationen über mehrere Jahre beobachtet (Rauh und Koch 2003, Schwachtgen et al. 2005). Da NT-proBNP hauptsächlich renal eliminiert wird, wird die Reifung der Niere für diese Entwicklung verantwortlich gemacht. Die glomeruläre Filtrationsrate und die tubuläre Sekretion erreichen allerdings im Alter von 8 - 12 Monaten die Erwachsenenwerte (Kearns et al. 2003). Es müssen also auch andere Mechanismen beteiligt sein, da die NT-proBNP-Werte bei Kindern, die älter als ein Jahr sind, immer noch höher als bei Erwachsenen sind. So könnten auch altersabhängige Veränderungen in der Herzmechanik für höhere NT-proBNP-Werte bei Kindern verantwortlich sein. Colan et al. stellten in einer Untersuchung mit 256 gesunden Kindern im Alter von sieben Tagen bis 19 Jahre fest, dass obwohl der Blutdruck mit zunehmendem Alter auf die Erwachsenenwerte anstieg, die Ventrikelform und das Verhältnis zwischen Herzwanddicke und -dimension nicht altersbedingt verschieden waren. Das hat einen Anstieg der Wandspannung zufolge, der in den ersten Lebensjahren besonders ausgeprägt war (Colan et al. 1992). Da eine erhöhte Wandspannung den Freisetzungszusatz für die natriuretischen Peptide darstellt, ist dies neben der altersabhängigen Entwicklung der Nierenfunktion eine weitere mögliche Erklärung.

5.2.2 Einfluss des Geschlechts auf die NT-proBNP-Plasmakonzentration

Das Geschlecht hatte in der vorliegenden Studie keinen Einfluss auf die NT-proBNP-Plasmakonzentration bei Kindern. Bei den Erwachsenen des untersuchten Kollektivs wurden analog zu bekannten Referenzwerten höhere Werte für Frauen gefunden. Nur eine Studie bei Kindern zeigte bisher eine Tendenz mit leicht höheren Werten für Mädchen im Vergleich zu Jungen, die aber nicht signifikant war (Schwachtgen et al. 2005). Da neben der vorliegenden Untersuchung mit dem bisher größten Kollektiv auch zwei andere Unter-

suchungen keinen Einfluss des Geschlechts gefunden haben, ist dieser vermutlich auszuschließen (Rauh und Koch 2003, Nir et al. 2004). Das steht allerdings im Gegensatz zu den Ergebnissen für BNP, dem aktiven Spaltprodukt bei der Entstehung des NT-proBNPs. Dieses weist bei Mädchen, die älter als zehn Jahre sind, höhere Konzentrationen als bei Jungen im gleichen Alter auf (Koch und Singer 2003). Mögliche Ursachen für diesen Unterschied können geschlechtsabhängige Clearance-Mechanismen sein, die für NT-proBNP nicht relevant sind. BNP wird unter anderem durch eine neutrale Endopeptidase abgebaut; für andere Endopeptidasen konnte gezeigt werden, dass sie unter androgener Kontrolle stehen (Shih et al. 1986). Auf der anderen Seite erhöhen Estrogene die BNP-Plasmakonzentration bei Frauen unter Hormonersatztherapie, der genaue Mechanismus ist jedoch unklar (Maffei et al. 2001).

5.2.3 NT-proBNP-Normalwerte bei Kindern

Vergleicht man die verschiedenen Untersuchungen zu NT-proBNP-Normalwerten bei Kindern im Hinblick auf die Ableitung von Normalwerten, dann ergeben sich unterschiedliche Referenzbereiche, je nach Zusammensetzung der Studienpopulation. Nir et al. bestimmten NT-proBNP ebenfalls mit dem ECLIA bei $n = 58$ gesunden Kindern im Alter von vier Monaten bis 15 Jahre (Nir et al. 2004). NT-proBNP zeigte keinen altersabhängigen Unterschied, was vermutlich auf die kleine Studienpopulation zurückzuführen ist. Sie definierten die 97,5te Perzentile (348,6 ng/l) als Obergrenze des Normalbereichs, basierend auf dem Vergleich von gesunden Kindern und Kindern mit Herzinsuffizienz. Wenn man in der vorliegenden Studie Alter als Einflussgröße herausnimmt und die 97,5te Perzentile über alle Werte berechnet, dann ergibt sich ein Wert von 190,3 ng/l. Dieser ist deutlich niedriger als bei Nir et al. und vermutlich durch den höheren Altersschnitt in der vorliegenden Studie bedingt. Nir et al. haben mehr Kinder bis sieben Jahre untersucht, die, wie nach der vorliegenden Untersuchung bekannt wurde, höhere NT-proBNP-Plasmakonzentrationen als ältere Kinder haben. Die bereits oben zitierten Untersuchungen, die ebenfalls eine Altersabhängigkeit für NT-proBNP-Werte gefunden haben, bestimmten NT-proBNP ebenfalls mit dem ECLIA und untersuchten $n = 78$ gesunde Kinder im Alter von vier Monaten bis 18 Jahre bzw. $n = 111$ gesunde Kinder im Alter von 1 - 18 Jahren (Rauh und Koch 2003, Schwachtgen et al. 2005). Auch Rauh et al. geben die 97,5te Perzentile an, die von 299 ng/l für Einjährige abnimmt auf 48 ng/l für 16-Jährige. Für die Einjährigen stimmt dieses Ergebnis gut mit den vorliegenden Daten überein (319,9 ng/l), wohingegen bei den 16-Jährigen die Perzentile vierfach höher als bei Rauh et al. ist (206,0 ng/l). Wegen der geringen Anzahl an Personen in dieser Altersgruppe ist der Wert bei Rauh et al. aber vermutlich nicht repräsentativ.

Auffällig in der von uns untersuchten Population sind die höheren NT-proBNP-Konzentrationen und die große Anzahl an Ausreißern und Extremwerten für Kinder im

Alter von 11 - 16 Jahren. Dieses ist wahrscheinlich auf die große Variabilität zwischen den Individuen zum Zeitpunkt der Pubertät und des Wachstums zurückzuführen. Betrachtet man altersbasierte Wachstumsgeschwindigkeitsperzentilen, so gleichen diese Kurven dem NT-proBNP-Perzentilenverlauf: In den ersten vier Lebensjahren nimmt die Wachstumsgeschwindigkeit stark ab, bis zum zehnten Lebensjahr verlaufen die Kurven etwas weniger steil, um dann zwischen 11 und 14 nochmal anzusteigen, bevor das Wachstum dann gegen null geht (Niessen 1996). Auch wenn das Geschlecht in unserer Untersuchung keinen Einfluss auf die NT-proBNP-Plasmakonzentration hat, so werden doch auch endokrinologische Veränderungen für die große Variabilität der NT-proBNP-Werte bei 11 - 16-Jährigen diskutiert (Mir et al. 2005). Einen weiteren Hinweis darauf liefert auch eine Studie, in der NT-proBNP mit der Höhe der Schilddrüsenhormone Thyroxin und Trijodthyronin (jeweils in freier Form) korreliert war (Schultz et al. 2004). Wenn man die insgesamt 16 Ausreißer und Extremwerte im Hinblick auf ihre Diagnose, die Laborwerte und die demographischen Daten nachträglich kontrolliert, dann können keine Auffälligkeiten festgestellt werden. 10 von diesen 16 Personen sind gesund, die anderen leiden an neurologischen Erkrankungen (n = 3), einer gastro-intestinalen Infektion (n = 1) und Hormonstörungen (n = 2). Bei den sechs leicht-erkrankten Personen sind alle untersuchten klinisch-chemischen Parameter im Normalbereich. Allerdings kann die Möglichkeit, dass auch leichte Erkrankungen die NT-proBNP-Plasmakonzentration beeinflussen, nicht völlig ausgeschlossen werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie machen deutlich, dass bei Kindern altersentsprechende NT-proBNP-Normalwerte zugrunde gelegt werden müssen. Bei Erwachsenen liegt die obere Grenze des Normalbereichs bei 125 ng/l. Würde man die Kinder an diesem Wert messen, dann würden besonders die jüngeren Kinder von 1 - 3 Jahren mit einer 97,5ten Perzentile von 319,9 ng/l falsch klassifiziert werden. Ein Erwachsener würde mit diesem Wert bereits einer Klassifizierung der New York Heart Association zufolge der Herzinsuffizienzklasse II (NYHA II) zugeordnet werden. Für eine erste Einschätzung der Herzfunktion sollte bei Kindern in den Altersgruppen 1 - 3, 4 - 6, 7 - 9, 10, 17 und 18 Jahren die altersentsprechende 97,5te Perzentile zugrunde gelegt werden. Wegen der hohen Variabilität ist diese bei 11 - 16-Jährigen womöglich nicht ausreichend, um zwischen gesund und herzkrank zu diskriminieren. In diesem Fall könnte die 75te Perzentile für eine erste Einschätzung herangezogen werden. Liegt die NT-proBNP-Konzentration bei 11 - 16-Jährigen oberhalb der jeweils altersentsprechenden 75ten Perzentile, dann können weitere diagnostische Maßnahmen wie zum Beispiel eine echokardiographische Untersuchung durchgeführt werden. Eine direkte Abgrenzung zu pathophysiologischen Werten, ein sogenannter „cut-off“, kann mit den vorliegenden Ergebnissen nicht definiert werden, da keine herzkranken Kinder untersucht wurden.

5.2.4 NT-proBNP-Methodenvergleich und Präzision

Eine frühere Untersuchung unserer Arbeitsgruppe scheint konträr zu den jetzigen Ergebnissen zu sein (Mir et al. 2002). Bei $n = 133$ Gesunden im Alter von zehn Tagen bis 32 Jahre wurde NT-proBNP mit dem EIA bestimmt und keine Altersabhängigkeit gefunden. Tatsächlich stimmt die Untersuchung mit den jetzigen Ergebnissen überein, da auch aktuell kein Alterseinfluss mit dem EIA detektiert werden konnte. Der EIA mit nur einem Antikörper ist vermutlich im Vergleich zu dem ECLIA nicht sensitiv und spezifisch genug, um diese Unterschiede zu detektieren. Dies wird auch durch den vorliegenden Methodenvergleich bestätigt. Das unterschiedliche Niveau der Werte alleine, mit höheren Werten für den EIA, muss noch nicht gegen die Vergleichbarkeit der beiden Methoden sprechen, da Normalwerte Assay-spezifisch definiert werden. Die schlechte Korrelation der jeweiligen Messwerte ($r^2 = 0,08$), die lineare Regression mit einem signifikant von null verschiedenem y-Achsenabschnitt und einer signifikant von eins verschiedenen Steigung und die zunehmende Differenz zwischen den jeweiligen Messwerten zeigen aber einen systematischen, proportionalen Fehler. Damit sind diese beiden Methoden nicht miteinander vergleichbar. Bei einer anderen Untersuchung, die den ECLIA mit dem EIA verglichen hat, war auch nur der ECLIA in der Lage, eine asymptotische Herzinsuffizienz mit leicht erhöhten NT-proBNP-Werten anzuzeigen (Mueller et al. 2003). Vermutlich detektiert der EIA auch NT-proBNP-Spaltprodukte, die im Blut zirkulieren. Das erklärt auf der einen Seite die höheren NT-proBNP-Werte und auf der anderen Seite den Verlust der Sensitivität. Dieses Ergebnis zeigt sehr deutlich, dass die Auswahl eines Assays die Interpretation der Ergebnisse wesentlich beeinflussen kann.

Der multizentrische Laborvergleich zeigt außerdem, dass mit dem ECLIA gemessenen Werte in verschiedenen Laboren gut vergleichbar sind. Die Anforderung an die Präzision betrug $\pm 20\%$ und wurde mit Variationskoeffizienten von maximal 6,5% deutlich unterboten. Ähnliche Untersuchungen gibt es auch schon mit weniger Zentren (Collinson et al. 2004, Sokoll et al. 2004). Der vorliegende Laborvergleich zeigt dabei erstmals auch für physiologische NT-proBNP-Plasmakonzentrationen eine hohe Präzision, mit einem Variationskoeffizienten von 6,5% bei einer NT-proBNP-Plasmakonzentration von 51,3 ng/l. Im Rahmen einer multizentrischen Studie ist mit diesen Ergebnissen durchaus eine dezentrale Bestimmung der NT-proBNP-Plasmakonzentration vorstellbar, besonders, wenn man die potentiellen Fehlerquellen wie Probenbeschriftung, Lagerung und Verschickung bei einer zentralen Bestimmung bedenkt.

5.3 Populationsbasierte Analyse der Carvedilol-Studie

5.3.1 Relevante Kovariaten für die Pharmakokinetik von Carvedilol

Das Alter und das Körpergewicht sind die wichtigsten Kovariaten für die Carvedilol-Pharmakokinetik bei pädiatrischen Patienten. In vielen populationskinetischen Modellen für Kinder sind diese Kovariaten enthalten, weil sie die Entwicklung des Organismus und damit verbunden die Entwicklung der pharmakokinetischen Parameter gut widerspiegeln (Anderson et al. 2000, Krishna et al. 2004). Manchmal werden auch Körpergröße und Körperoberfläche als Kovariaten verwendet, um den Unterschieden in der pädiatrischen Population gerecht zu werden (Shi et al. 2001, Sallas et al. 2003, Laer et al. 2005). Diese vier Parameter sind alle eng miteinander korreliert und es muss im Einzelfall überprüft werden, welcher Parameter besser geeignet ist.

5.3.1.1 Gewicht

In dem in der vorliegenden Arbeit entwickelten Pop-PK-Modell ging das Körpergewicht in Form der allometrischen Skalierung unabhängig von der Kovariaten-Modellentwicklung in das Pop-PK-Modell ein. Bei Studien mit pädiatrischen Patienten ist es nicht ungewöhnlich, dass die Studienpopulation sehr heterogen ist im Vergleich zu erwachsenen Studienpopulationen. So wurden in der vorliegenden Studie Patienten im Alter von 0,1 - 19,3 Jahren untersucht mit einem Körpergewicht von 3,1 - 98,2 kg. Die pharmakokinetischen Parameter wie Clearance und Verteilungsvolumen hängen von dem Körpergewicht ab. Wird dieses nicht von Anfang an berücksichtigt, dann können Effekte anderer Kovariaten durch den starken Einfluss des Gewichts überdeckt und nicht identifiziert werden (Meibohm et al. 2005). Die allometrische Skalierung ist eine Standardisierung von Parametern auf die Körpermaße und ursprünglich entwickelt worden, um Daten aus dem Tierbereich auf den Menschen zu extrapolieren. Deswegen wird sie unter anderem in der Arzneistoffentwicklung beim Übergang von der präklinischen zur klinischen Phase eingesetzt (Mahmood 1999). Sie wird auch empfohlen zur Standardisierung pharmakokinetischer Parameter (Holford 1996). Wegen der Überlappung des Gewichts mit anderen Kovariaten bzw. Kollinearitäten zwischen diesen wird empfohlen, die allometrische Skalierung vor Beginn der Entwicklung des Kovariatenmodells einzuführen (Meibohm et al. 2005). Dies wurde in dem vorliegenden Pop-PK-Modell gemacht, indem die Clearance, die interkompartimentelle Clearance, das zentrale und das periphere Verteilungsvolumen auf das Median-normalisierte Gewicht standardisiert wurden. Als Exponenten für die Clearances und die Verteilungsvolumina wurden die bereits etablierten Werte 0,75 bzw. 1 eingesetzt.

Die allometrische Skalierung hat sich auch in anderen Studien mit pädiatrischen Patienten als nützlich erwiesen (Anderson et al. 2000, Rajagopalan und Gastonguay 2003, Krishna

et al. 2004). Rajagopalan und Gastonguay untersuchten die Populationskinetik von Ciprofloxacin bei $n = 150$ Patienten im Alter von 0,3 - 16,9 Jahren. Für die allometrische Skalierung wurde das Gewicht auf ein Standardgewicht von 70 kg normalisiert und für die Clearances mit einem Exponenten von 0,75, für die Verteilungsvolumina mit einem Exponenten von 1 versehen. Sowohl die Modellanpassungsgüte, gemessen an der OBF, als auch die interindividuelle Variabilität der pharmakokinetischen Parameter konnten dadurch verbessert werden. Auch in der Studie von Krishna et al., die die Populationskinetik von Fexofenadin bei Kindern ($n = 77$; sechs Monate bis zwölf Jahre) und Erwachsenen untersuchten, verbesserte die allometrische Skalierung die OBF signifikant. In der vorliegenden Studie konnte zwar die OBF durch die allometrische Skalierung nicht verbessert werden, aber die interindividuellen Variabilitäten konnten für drei der vier allometrisch skalierten Parameter deutlich reduziert werden. Die Entfernung der Kovariate Gewicht aus dem finalen Modell bei der Rückwärtselimination zeigte außerdem eine deutliche Verschlechterung der OBF, so dass die Kovariate Gewicht für relevant befunden wurde.

Kontrovers diskutiert wird, ob der allometrische Ansatz auf alle Patienten gleich gut anzuwenden ist. Im Fettgewebe findet üblicherweise keine Clearance statt, so dass bei Übergewichtigen Patienten eventuell das normale und nicht das aktuelle Körpergewicht eingehen sollte (Holford 1996). Eine andere Möglichkeit ist die Verwendung des aktuellen Körpergewichts bei gleichzeitiger Einführung einer neuen Kovariate für Übergewicht. Wenn Übergewicht einen Einfluss auf pharmakokinetische Parameter haben kann, dann wäre es auch vorstellbar, dass Untergewicht einen Einfluss hat. Kinder mit Herzerkrankungen sind häufig untergewichtig. In der vorliegenden Studie wurde zusätzlich zur allometrischen Skalierung untersucht, ob ein Gewicht unter- bzw. oberhalb der altersentsprechenden 25ten Gewichtsperzentile einen Einfluss auf die Clearances und die Verteilungsvolumina hat. Für die Clearance konnte ein Einfluss gefunden werden, der aber am Ende der Modellentwicklung nicht mehr signifikant war. Für das periphere Verteilungsvolumen wäre es denkbar, dass es für Kinder mit einem Gewicht unterhalb der 25ten Gewichtsperzentile reduziert ist. Diese Hypothese konnte während der Modellentwicklung nicht bestätigt werden.

5.3.1.2 Alter

Während der Modellentwicklung wurde ein Einfluss des Alters auf die Clearance und das zentrale Verteilungsvolumen (V_2) gefunden. Dieser war für beide Parameter auch anhand der Patientenwerte nachvollziehbar. Für die Clearance müssen als Ursache sowohl altersbedingte Unterschiede in der hepatischen Clearance als auch Unterschiede in der Bioverfügbarkeit diskutiert werden. Für V_2 könnte der Alterseinfluss physiologisch auf altersbedingte Unterschiede in der Körperzusammensetzung zurückzuführen sein. Aber auch hier müssen Bioverfügbarkeitsunterschiede diskutiert werden. Nachfolgend wird

zunächst der Einfluss des Alters auf die Clearance diskutiert und im Anschluss daran der Einfluss des Alters auf V₂.

Clearance

Bei Kindern erreicht die absolute Carvedilol-Clearance bereits ab einem Alter von zwei Jahren das Niveau von Erwachsenen; die körperlsgewichtsbezogene Clearance nimmt hingegen kontinuierlich mit zunehmendem Alter ab. Damit werden die Ergebnisse von einem Teilkollektiv dieses Pop-PK-Kollektivs bestätigt (Laer et al. 2002). Für die Clearance bei Neugeborenen (0 - 27 Tage) kann mit den vorliegenden Ergebnissen keine konkrete Aussage gemacht werden, da der jüngste Patient schon 23 Tage alt war und eine Extrapolation für Jüngere nicht zulässig ist. Es ist aber anzunehmen, dass die körperlsgewichtsbezogene Clearance aufgetragen gegen das Alter wie bei anderen hepatisch eliminierten Arzneistoffen ihren Ursprung in null und nicht etwa in dem Schnittpunkt der y-Achse bei der Extrapolation der Kurve hat (Edginton et al. 2006). Erst wenn die metabolisierenden Enzyme bei Kindern eine bestimmte Aktivität erreicht haben, übersteigt die körperlsgewichtsbezogene Clearance der Jüngeren die der Älteren. Da CYP2D6 vermutlich mit 23 Tagen schon voll aktiv ist, ist die körperlsgewichtsbezogene Clearance für diesen Patienten bereits höher als für einen Erwachsenen.

Es ist nicht überraschend, dass jüngere Kinder eine höhere körperlsgewichtsbezogene Clearance haben als Erwachsene, da dies für hepatisch eliminierte Arzneistoffe bereits in mehreren Studien gezeigt wurde (Kearns et al. 2003). Die hepatische Clearance setzt sich grundsätzlich aus drei Komponenten zusammen: der Leberdurchblutung, der Proteinbindung des Arzneistoffes und der maximalen Eliminationsleistung der Leber bei unlimitierter Arzneistoffzufuhr, der sogenannten intrinsischen Clearance (Derendorf et al. 2002). Man unterscheidet sogenannte „high-“ und „low-extraction drugs“. Bei den „high-extraction drugs“ hängt die hepatische Clearance hauptsächlich von der Leberdurchblutung ab, bei den „low-extraction drugs“ hauptsächlich von der Proteinbindung und der intrinsischen Clearance. Carvedilol nimmt eine Zwischenrolle ein, so dass jede der Komponenten für einen altersbedingten Unterschied verantwortlich sein kann. Sowohl für den relativen Leberblutfluss als auch für die relative Lebermasse gibt es bereits Hinweise auf altersabhängige Unterschiede. Evans et al. untersuchten mithilfe der Testsubstanz Indocyaningrün den Leberblutfluss bei Kindern (Evans et al. 1989). Bei n = 115 Kindern im Alter von 0,9 - 17,8 Jahren war dieser bezogen auf das Körpergewicht größer als bei Erwachsenen, für Kinder unter zehn Jahren war der Unterschied zu den Erwachsenen noch stärker ausgeprägt. Murry et al. untersuchten bei Kindern im Alter von 3 - 18 Jahren das Lebervolumen in Abhängigkeit vom Körpergewicht und fanden zwei- bis dreifach höhere Werte für jüngere Kinder (Murry et al. 1995). Den jüngeren Kindern steht damit relativ gesehen mehr Lebermasse für die Metabolisierung zur Verfügung. Dies führt nur dann zu

einer höheren Clearance, wenn die Enzymaktivität vergleichbar ist. Für CYP2D6, das für ca. 50% der totalen Carvedilol-Clearance verantwortlich ist, gibt es unterschiedliche Angaben, ab welchem Alter die Aktivität von Erwachsenen erreicht wird: Einem älteren Bericht zufolge ist dies ab einem Alter von einem Jahr der Fall (Tateishi et al. 1997), ein jüngerer Bericht gibt ein Alter von zwei Wochen an, ab dem die Erwachsenenaktivität erreicht wird (Leeder et al. 2000). Das würde zu den vorliegenden Ergebnisse passen, wo zwar bei Patienten, die älter als 0,5 Jahre waren, interindividuelle Unterschiede für die metabolische Kapazität von CYP2D6 gefunden wurden, diese aber keine Altersabhängigkeit zeigten. CYP1A2 erreicht vermutlich frühestens ab einem Alter von einem Jahr die Aktivität von Erwachsenen. Auch CYP2C9 weist im ersten Lebensjahr eine reduzierte Aktivität auf, CYP3A4 hingegen ist bei Kindern unter zehn Jahren stärker aktiv als bei Erwachsenen (Tateishi et al. 1997, Alcorn und McNamara 2002, Kearns et al. 2003). Auch altersbedingte Unterschiede in der Proteinbindung können die hepatische Clearance beeinflussen, da nur der freie Arzneistoff metabolisiert wird. Bei Neugeborenen und Kleinkindern ist die totale Menge an Plasmaproteinen reduziert, so dass der freie Arzneistoffanteil erhöht ist (Kearns et al. 2003). Da Carvedilol zu 98 - 99% an Plasmaproteine gebunden vorliegt, könnte das auch in diesem Fall eine Erklärung für altersbedingte Clearance-Unterschiede sein.

Für andere hepatisch eliminierte Arzneistoffe wurde ebenfalls eine altersabhängige Clearance gefunden. Goresky et al. untersuchten die Pharmakokinetik von Alfentanil bei 18 Kindern im Alter von drei Monaten bis 14 Jahre (Goresky et al. 1987). Alfentanil besitzt eine hohe Proteinbindung (ca. 90%) und wird hauptsächlich hepatisch über CYP3A4 metabolisiert. Die körperrgewichtbezogene Clearance war negativ mit dem Alter korreliert. Die Autoren diskutieren dies allerdings nicht. Bei n = 55 mit Tacrolimus therapierten Patienten im Alter von sechs Monaten bis 18 Jahre zeigte eine retrospektive Analyse, dass die Tacrolimus-Clearance zwei Wochen nach dem Beginn einer intravenösen Therapie bei Kindern unter sechs Jahren größer ist als bei älteren Kindern (Przepiorka et al. 2000). Hier diskutieren die Autoren als Ursache auch Unterschiede in der Enzymaktivität für CYP3A4 und in der relativen Lebermasse und -durchblutung. Perry et al. untersuchten die Pharmakokinetik von Flecainid bei n = 25 Kindern im Alter von 0 - 12 Jahren nach oraler Gabe (Perry et al. 1989). Flecainid wird sowohl renal als auch hepatisch über CYP2D6 eliminiert. Kinder zwischen eins und zwölf Jahren hatten eine höhere körperrgewichtbezogene Clearance als Erwachsene. Bei Kindern unter einem Jahr war die Elimination allerdings verzögert. Im Gegensatz zu Carvedilol wird Flecainid auch renal eliminiert. Die Nierenfunktion reift innerhalb des ersten Lebensjahres, so dass die Elimination von Flecainid vermutlich deswegen bei den Einjährigen anders als für Carvedilol langsamer verläuft.

In einer populationskinetischen Analyse untersuchten Hirt et al. die Pharmakokinetik von Nelfinavir bei $n = 182$ Kindern im Alter von drei Tagen bis 17 Jahre und fanden ebenfalls neben Gewicht in Form der allometrischen Skalierung einen signifikanten Einfluss des Alters auf die Clearance und das Verteilungsvolumen (Hirt et al. 2006). Die körpergewichtsbezogene Clearance nahm mit zunehmendem Alter ab. Da der Einfluss des Alters für die Clearance und das Verteilungsvolumen gleich groß war, führten die Autoren diesen Effekt auf eine bei jüngeren Kindern herabgesetzte Bioverfügbarkeit zurück. Als Ursachen werden die unterschiedliche Nahrungszusammensetzung bei Kindern, ein hoher intragastraler Magen-pH bei Neugeborenen oder auch eine geringere Absorptionsfläche im Darm diskutiert. Nelfinavir wurde oral verabreicht. Auch für Carvedilol können altersbedingte Unterschiede in der Bioverfügbarkeit nicht ausgeschlossen werden, da diese nicht bestimmt werden konnte und deswegen als unbekannter Faktor in die Clearance eingeht. Relevant ist in diesem Zusammenhang vermutlich auch die intestinale P-Glykoprotein-Aktivität als Determinante für die orale Bioverfügbarkeit. Im Tiermodell war diese allerdings bei jüngeren Tieren herabgesetzt, was eine höhere Bioverfügbarkeit für Carvedilol zufolge hätte (Mahmood et al. 2001). Nelfinavir besitzt eine ähnlich hohe Proteinbindung wie Carvedilol und wird auch hauptsächlich hepatisch eliminiert. Neben einer veränderten Bioverfügbarkeit könnten auch für diesen Arzneistoff altersbedingte Unterschiede in der Leberphysiologie eine Rolle spielen.

Vermutlich sind sowohl altersbedingte Unterschiede in der Leberphysiologie als auch in der Bioverfügbarkeit gemeinsam für die höhere körpergewichtsbezogene Carvedilol-Clearance bei jüngeren Kindern verantwortlich. Dieser Unterschied muss auf jeden Fall bei der Therapie mit Carvedilol berücksichtigt werden, da er wiederum große Unterschiede in der systemischen Verfügbarkeit von Carvedilol zufolge hat.

Zentrales Verteilungsvolumen

Für das Carvedilol-Pop-PK-Modell wurde ein Zweikompartimentmodell verwendet, welches das Verteilungsvolumen in eine zentrale (V_2) und eine periphere Komponente (V_3) teilt. Zu dem zentralen Kompartiment zählen das Blut und alle mit diesem in zeitlich zu vernachlässigendem Austausch stehende Volumina oder Gewebe; dem peripheren Kompartiment wird zum Beispiel das Fettgewebe zugeordnet. An dieser Stelle sei erwähnt, dass Verteilungsvolumina fiktive Volumina darstellen und nicht eindeutig physiologischen Volumina zuzuordnen sind. Die Summe aus V_2 und V_3 entspricht dem Verteilungsvolumen im Fließgleichgewicht (VSS).

Das Alter hat einen signifikanten Einfluss auf V_2 : Mit zunehmendem Alter nimmt das körpergewichtsbezogene V_2 ab. Eine vergleichbare Studie, die ebenfalls das zentrale und periphere Verteilungsvolumen getrennt betrachtet und nur für eine der beiden Komponenten einen Alterseinfluss findet, wurde nicht gefunden. Betrachtet man das Verteilungsvolumen

lumen im Fließgleichgewicht, dann können altersbedingte Unterschiede zum Beispiel auf eine veränderte Körperzusammensetzung zurückgeführt werden. So zeigte ein Vergleich der pharmakokinetischen Daten von Alfentanil bei Kindern und Erwachsenen, dass das körperrgewichtbezogene Verteilungsvolumen im Fließgleichgewicht bei Kindern im Alter von 4 - 8 Jahren niedriger als bei Erwachsenen war (Meistelman et al. 1987). Die Autoren führen diesen Unterschied auf einen prozentual niedrigeren Anteil von Fettgewebe bei Kindern zurück. Alfentanil wird ebenfalls hepatisch eliminiert und die Kinetik wurde nach intravenöser Gabe in einem Zweikompartmentmodell berechnet. Altersbedingte Unterschiede im Fettgewebsanteil hätten sich jedoch in dem für Carvedilol verwendeten Zweikompartmentmodell eher in einem Alterseinfluss für das periphere Verteilungsvolumen widerspiegeln müssen. Dies war nicht der Fall. Außerdem war das körperrgewichtbezogene VSS für Carvedilol bei jüngeren Kindern tendenziell eher höher im Vergleich zu Erwachsenen, auch wenn die Korrelation nicht signifikant war.

Eine weitere Möglichkeit für den Alterseinfluss auf das V_2 von Carvedilol kann wie bei der Clearance die erniedrigte Menge an Plasmaproteinen bei Kindern sein. Der freie Arzneistoffanteil ist infolgedessen erhöht und nur dieser verteilt sich in periphere Kompartimente. Der verbleibende Anteil im zentralen Kompartiment ist relativ betrachtet reduziert, der periphere Anteil wäre erhöht. Nimmt man an, dass sich dieser wiederum mit dem höheren Fettgewebsanteil für ältere Kinder ausgleicht, könnte das eine Erklärung dafür sein, dass für V_3 kein Alterseinfluss gefunden wird.

Ähnlich wie für die Clearance können auch altersbedingte Unterschiede in der Bioverfügbarkeit einen Einfluss auf das Verteilungsvolumen haben. Alfentanil wurde intravenös verabreicht, so dass Bioverfügbarkeitsunterschiede hier nicht relevant sind. In der Studie von Hirt et al. nahm das körperrgewichtbezogene Verteilungsvolumen für Nelfinavir im gleichen Ausmaß wie für die Clearance mit zunehmendem Alter ab (Hirt et al. 2006). Als Ursache wird eine bei jüngeren Kindern herabgesetzte Bioverfügbarkeit diskutiert (siehe oben).

Zusammenfassend ist für V_2 vermutlich wie bei der Clearance eine Kombination verschiedener Faktoren für den Einfluss des Alters verantwortlich. Alter als Kovariate für V_2 verbessert zwar die Modellvorhersage, hat aber in diesem Fall für die Therapie mit Carvedilol keine Konsequenzen, da für das körperrgewichtbezogene VSS keine signifikanten altersabhängigen Unterschiede gefunden wurden. Da die Variabilität für V_2 und auch V_3 relativ hoch ist, könnte neben dem Alter auch eine weitere, bislang noch nicht identifizierte Kovariate einen Einfluss auf V_2 und V_3 haben.

5.3.1.3 Enzymaktivität für CYP2D6

Nach vorherigen Ergebnissen wäre zu erwarten gewesen, dass auch die Enzymaktivität von CYP2D6 einen Einfluss auf die Carvedilol-Clearance hat, was in der vorliegenden

Population nicht der Fall war. Es ist bekannt, dass die Fläche unter der Konzentrations-Zeitkurve (AUC) für Carvedilol infolge der erniedrigten Clearance bei Langsammetabolisierern ungefähr doppelt so hoch wie bei normalen Metabolisierern ist (Giessmann et al. 2004). In einem Teilkollektiv des hier untersuchten Kollektivs wurde für 13 Patienten die metabolische CYP2D6-Kapazität bestimmt. Diese lag im Mittel bei $-2,5 \pm 0,4$ und die körpergewichtsbezogene Clearance war positiv mit der metabolischen Kapazität korreliert (Behn 2001). Die 13 Patienten des Teilkollektivs waren alle schnelle Metabolisierer.

In dem für die Populationskinetik untersuchten Gesamtkollektiv befand sich kein „poor metabolizer“, zwei intermediäre Metabolisierer und der Rest gehört zu den schnellen Metabolisierern. Von 41 Patienten wurde für 33 die metabolische Kapazität bestimmt mit im Mittel $-2,3 \pm 0,6$. Dies ist vergleichbar mit den oben aufgeführten Werten. Trotzdem konnte der Einfluss der metabolischen Kapazität für CYP2D6 auf die Carvedilol-Clearance in diesem größeren Kollektiv (13 vs. 33) von hauptsächlich schnellen Metabolisierern nicht bestätigt werden. Eine eingeschränkte Enzymaktivität im Sinne eines „poor metabolizer“ hat aber mit großer Wahrscheinlichkeit auch bei Kindern einen Einfluss auf die Clearance und sollte auf jeden Fall berücksichtigt werden. Da man von Erwachsenen weiß, dass die gleiche Carvediloldosis bei Langsammetabolisierern die doppelte AUC im Vergleich zu schnellen Metabolisierern erzielt (Giessmann et al. 2004), kann man dies für eine Extrapolation der vorliegenden Ergebnisse für Langsammetabolisierer nutzen: Da Carvedilol eine lineare Pharmakokinetik besitzt, kann für Langsammetabolisierer die Dosis halbiert werden, um eine den schnellen Metabolisierern vergleichbare systemische Verfügbarkeit zu erzielen.

5.3.1.4 Sonstige Kovariaten

Ein Einfluss der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) auf die Carvedilol-Clearance wurde nicht gefunden. Die Metabolisierung von Carvedilol ist auch von der Leberdurchblutung abhängig, die infolge einer eingeschränkten Herzfunktion reduziert sein kann. Außerdem kann eine eingeschränkte Herzfunktion zu einer Leberstauung und damit einer eingeschränkten Leberfunktion führen. Bei Erwachsenen gibt es bereits Hinweise, dass Patienten mit Herzinsuffizienz höhere Carvedilol-Plasmakonzentrationen als Gesunde haben (Tenero et al. 2000). Immerhin hatten in der vorliegenden Studie ca. 30% der Patienten eine stark eingeschränkte LVEF ($< 30\%$). Es wurde jedoch kein Einfluss der LVEF auf die Clearance gefunden. Für eine alternative Beschreibung der Leberfunktion durch die Leberenzyme Aspartataminotransferase (AST) und Alaninaminotransferase (ALT) liegen keine Daten vor. Die LVEF zeigte im Rahmen der Modellentwicklung einen Einfluss auf das periphere Verteilungsvolumen (V_3), das größer war bei einer LVEF $< 30\%$. Auch wenn es plausibel erscheint, dass bei einer eingeschränkten Herzfunktion und infolgedessen vermutlich auch eingeschränkter peripherer Durchblutung V_3 erhöht ist, so konnte

die interindividuelle Variabilität für V3 und der Restfehler nicht reduziert werden. Die Kovariate LVEF trägt somit nicht zu einer besseren Beschreibung von V3 bei.

Die Komedikation wurde in der vorliegenden Arbeit nicht als Kovariate untersucht, da alle Patienten die gleiche kardiovaskuläre Komedikation, bestehend aus einem ACE-Hemmer, einem herzwirksamen Glykosid und einem Diuretikum, erhielten. Zwischen Carvedilol und Digoxin kann es prinzipiell zu Interaktionen kommen, weil beide Substanzen Substrate des P-Glykoprotein (PGP) sind. Bei gleichzeitiger Applikation fungiert Carvedilol allerdings als Inhibitor für PGP, so dass die Digoxin-Plasmakonzentration zwar erhöht ist, aber die Carvedilol-Plasmakonzentration nicht verändert ist (De Mey et al. 1990). Selbst wenn die Patienten also mit unterschiedlichen Digoxin-Dosen behandelt werden, wie bei einer individuellen Digoxin-Therapie zu erwarten ist, resultieren daraus bei gleicher Carvediloldosis keine Unterschiede in der Carvedilol-Plasmakonzentration. Auch für die beiden Diuretika Hydrochlorothiazid aus der Gruppe der Thiazide und Torasemid aus der Gruppe der Schleifendiuretika konnte gezeigt werden, dass die gleichzeitige Applikation mit Carvedilol keinen Einfluss auf die Carvedilol-Plasmakonzentration hat (FDA 2005). ACE-Hemmer interagieren zwar auf der pharmakodynamischen Ebene mit Carvedilol im Sinne einer verstärkten Blutdrucksenkung, es gibt aber bislang keine Beschreibung einer pharmakokinetischen Interaktion (Fachinformation Dilatrend® 2004). Für die vorliegende Studie kann somit ein Einfluss der hier eingesetzten kardiovaskulären Komedikation auf die Pharmakokinetik von Carvedilol mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Generell können für Carvedilol als PGP- und CYP-Substrat aber pharmakokinetische Interaktionen auftreten. Zum Beispiel führt die Induktion von PGP durch Rifampicin zu niedrigeren Carvedilol-Plasmakonzentrationen (Giessmann et al. 2004). Ebenso kann eine Enzymhemmung durch Cimetidin zu höheren Carvedilol-Plasmakonzentrationen führen (Fachinformation Dilatrend® 2004).

5.3.2 Evaluierung des Pop-PK-Modells

Die Einführung von Kovariaten in das Zweikompartimentmodell mit Lagtime verbessert die Vorhersage der Carvedilol-Plasmakonzentrationen deutlich. Die OBF wurde von ursprünglich 341,712 auf -482,987 reduziert, die Varianz des Restfehlers von 0,75 auf 0,054 und die Korrelation der gemessenen mit den vorhergesagten Konzentrationen wurde von $r = 0,807$ auf 0,859 verbessert. Zusätzlich konnte die interindividuelle Variabilität für CL, V2, V3 und Q reduziert werden, das heißt zu großen Teilen auf die eingefügten Kovariaten zurückgeführt werden. Trotzdem werden die kleinen Konzentrationen durch das Modell tendenziell etwas zu hoch vorhergesagt, die höheren eher zu niedrig. Vergleicht man die gemessenen Konzentrationen mit den vorhergesagten (Abbildung 9), dann sind zunächst keine Gemeinsamkeiten für die abweichenden Werte festzustellen. Bei näherer Betrachtung fällt allerdings auf, dass die Werte innerhalb der ersten zwei Stunden nach

der Carvedilol-Einnahme eine deutlich größere Abweichung als die Werte in dem Zeitraum danach zeigen. Die Abweichungen sind somit größer während der Absorptionsphase als während der Eliminationsphase. Für die weitere Verwendung des Pop-PK-Modells zum Beispiel für ein Carvedilol Drug Monitoring ist das kein Nachteil. Im Rahmen eines Drug Monitoring würde man eine Plasmakonzentration am Ende des Dosierungsintervalls (Talspiegel) messen. Zu diesem Zeitpunkt ist die Abweichung zwischen vorhergesagter und tatsächlicher Carvedilol-Plasmakonzentration relativ gering, so dass statt einer Blutentnahme zur Talspiegelbestimmung die Vorhersage durch das Pop-PK-Modell genutzt werden kann. Betrachtet man die gewichteten Residuen aufgetragen gegen die vorhergesagte Konzentration (Abbildung 10), dann gehören die stark von der Nulllinie abweichenden Werte im Wesentlichen zu vier Patienten. Hinsichtlich der untersuchten Kovariaten gibt es auch hier bislang keine auffällige Gemeinsamkeit bei diesen Patienten.

Nach wie vor ist die interindividuelle Variabilität für die beiden Verteilungsvolumina V_2 und V_3 mit $\omega^2_{V_2} = 1,29$ ($\triangleq 113,6\%$) und $\omega^2_{V_3} = 1,49$ ($\triangleq 122,1\%$) relativ hoch. Eine Erklärung dafür könnte die Bioverfügbarkeit sein, die in der vorliegenden Studie nicht untersucht wurde und deswegen als unbekannter Faktor in die beiden Volumina eingeht. Eine andere Möglichkeit wäre eine bislang noch nicht identifizierte, aber relevante Kovariate. Generell scheinen Verteilungsvolumina von lipophilen Substanzen eher mit einer großen Variabilität geschätzt zu werden als die von hydrophilen Substanzen. Bei Kindern ergab eine populationskinetische Analyse von Nelfinavir, das eine Löslichkeit in Wasser von 1 - 10 mg/ml besitzt, eine interindividuelle Variabilität für das Verteilungsvolumen von 109% (Hirt et al. 2006). Eine andere populationskinetische Analyse bei Kindern untersuchte die Therapie mit Oxcarbazepin, das eine Löslichkeit in Wasser von 0,0003 mg/ml besitzt, und zeigte eine interindividuelle Variabilität von 291% für das Verteilungsvolumen (Sallas et al. 2003). Beide Substanzen wurden oral verabreicht. Auf der anderen Seite zeigte Fluoxetin, dessen Löslichkeit in Wasser 50 mg/ml beträgt, in einer populationskinetischen Analyse bei Kindern eine interindividuelle Variabilität von 20,5% (Wilens et al. 2002); eine populationskinetische Analyse von Sotalol, mit einer Löslichkeit von 5,5 mg/ml in Wasser, zeigte eine Variabilität von 20,0% (Shi et al. 2001). Beide Substanzen wurden ebenfalls oral verabreicht. Carvedilol ist relativ lipophil und besitzt eine Löslichkeit in Wasser von 0,0005 mg/ml. Lipophile Substanzen verteilen sich viel stärker im Körper und vor allem im Gewebe als hydrophile Substanzen, so dass es plausibel erscheint, dass für lipophile Substanzen wie Carvedilol das Verteilungsvolumen nur mit einer großen Variabilität geschätzt werden kann.

Zur Evaluierung des Pop-PK-Modells wurden außerdem die Ergebnisse der Bootstrap-Analyse mit den Werten der NONMEM-Pop-PK-Analyse verglichen. Vorgeschriebene Grenzen für die Breite der in der Bootstrap-Analyse ermittelten 95%-Konfidenzintervalle gibt es nicht. Rajagopalan und Gastonguay führten ebenfalls eine Evaluierung ihres Pop-

PK-Modells unter anderem mithilfe der nicht-parametrischen Bootstrap-Analyse durch (Rajagopalan und Gastonguay 2003). Sie untersuchten die Populationskinetik von Ciprofloxacin bei pädiatrischen Patienten mit cystischer Fibrose in einem Zweikompartimentmodell mit Lagtime. Von den pharmakokinetischen Parametern CL, Q, V₂, V₃, KA und TLAG sind die 95%-Konfidenzintervalle bei n = 1000 Bootstrap-Wiederholungen für Q (77,5 - 124,6%) und KA (78,3 - 128,7%) am breitesten. In der vorliegenden Arbeit liegen von den sechs pharmakokinetischen Parametern nur die Intervalle für V₂ (61,5 - 147,2%) und V₃ (60,4 - 163,9%) außerhalb dieses Bereichs. Hier sind die entsprechenden Werte von Rajagopalan und Gastonguay 85,2 - 116,3% für V₂ bzw. 88,8 - 111,6% für V₃. Auch Hirt et al. nutzten die Bootstrap-Analyse zur Evaluierung ihres Nelfinavir-Pop-PK-Modells (Hirt et al. 2006). Da sie ein Einkompartimentmodell verwenden, gibt es nur ein zentrales Verteilungsvolumen, dessen Bootstrap-Mittelwert (n = 1000) ein 95%-Konfidenzintervall von 53,0 - 176% besitzt. In dieser Studie war die interindividuelle Variabilität für das Verteilungsvolumen wie bereits zitiert mit 109% ähnlich groß wie für Carvedilol, so dass die breiten Konfidenzintervalle durch diese hohe Variabilität zu erklären sind. Ein enges Konfidenzintervall scheint somit wünschenswert zu sein, weil der betreffende Parameter dann einer geringen Variabilität unterliegt, aber nicht eine notwendige Voraussetzung für die Validität eines Modells zu sein. Wichtiger ist die Differenz zwischen NONMEM-Populationswert und Bootstrap-Mittelwert. Unter der Annahme, dass die untersuchten Patienten repräsentativ für die pädiatrische Population sind, bedeutet eine geringe Differenz, dass das Pop-PK-Modell die wahren Werte und Verteilungen in der Population sehr gut annähert. In der vorliegenden Arbeit ist diese Differenz für alle Parameter sehr gering, das heißt die realen Werte werden sehr gut angenähert. Die Güte der populationskinetisch geschätzten Parameter kann auch mithilfe eines Vergleichs mit den gemessenen Werten beurteilt werden. Diese Werte werden in einer individuellen Analyse ermittelt, die auf den gemessenen Konzentrationen basiert und dadurch genauer als die populationsbasierte Analyse ist. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit für die populationskinetischen Parameter und die gemessenen Werte sind in Mittelwert und Variabilität fast identisch. Dies ist ein weiterer Beleg für die Güte des Pop-PK-Modells.

Für Carvedilol gibt es bislang kein Pop-PK-Modell für pädiatrische Patienten. Ein Vergleich des in dieser Arbeit entwickelten Modells mit Erwachsenen ist an dieser Stelle nur in Bezug auf das pharmakokinetische Grundmodell interessant. Bei Erwachsenen gibt es eine Studie zur Populationskinetik von Carvedilol, die bei gesunden erwachsenen Japanern den Einfluss einer Mutation im CYP2D6-Gen auf die Pharmakokinetik von Carvedilol untersucht hat (Honda et al. 2005). In dieser Studie wird als pharmakokinetisches Modell ein Einkompartimentmodell zugrunde gelegt im Gegensatz zu einem Zweikompartimentmodell mit Lagtime in unserem Modell. Es liegen allerdings auch nur Carvedilol-Plasmakonzentrationen zu den Zeitpunkten zwei und sechs Stunden nach Einnahme vor,

so dass mit diesen Daten komplexere Modelle als ein Einkompartimentmodell nicht dargestellt werden können. In der vorliegenden Carvedilol-Studie wurden in dem Zeitraum 0 - 12 Stunden nach der Einnahme zu insgesamt 13 Zeitpunkten Carvedilol-Konzentrationen bestimmt. Das Zweikompartimentmodell war dem Einkompartimentmodell deutlich überlegen. Für einen Vergleich des vorliegenden Modells mit Pop-PK-Modellen anderer Beta-Rezeptorenblocker bei Kindern kommen bislang nur zwei Studien mit dem Beta-Rezeptorenblocker Sotalol (Shi et al. 2001, Laer et al. 2005) in Frage. In die Studie von Læer et al. konnten $n = 76$ Patienten im Alter von 0,03 - 17 Jahren eingeschlossen werden. Als pharmakokinetisches Modell wurde ein Einkompartimentmodell verwendet. Die Clearance und das Verteilungsvolumen wurden wie in dem Carvedilol-Pop-PK-Modell auf das Körpergewicht normiert. Das Alter hatte nur bei den jünger als ein Jahr alten Patienten einen Einfluss auf die Sotalol-Clearance. Dieser Unterschied im Vergleich zu Carvedilol kommt allerdings durch die unterschiedliche Elimination zustande: Sotalol wird unverändert renal ausgeschieden, so dass die Reifung der Nierenfunktion innerhalb des ersten Lebensjahres eine große Rolle für die Sotalol-Clearance spielt. Diese Entwicklung ist mit ca. einem Jahr abgeschlossen (Kearns et al. 2003), so dass in dem Fall der Sotalol-Clearance für Kinder älter als ein Jahr das Gewicht ausreichend war, um die entwicklungsbedingten Unterschiede darzustellen.

5.4 Altersabhängige systemische Verfügbarkeit und Dosierung für Carvedilol

Die Simulation zeigt, dass die Fläche unter der Konzentrations-Zeitkurve (AUC) als Maß für die systemische Verfügbarkeit des Carvedilols für Patienten unterschiedlichen Alters sehr verschieden ist. Dabei ist die mediane AUC der Erwachsenen (> 16 Jahre) ca. fünfmal größer als die der Kleinkinder (28 Tage - 23 Monate). Dieser Unterschied ist auf die altersabhängige Clearance zurückzuführen: Kleinkinder haben eine ca. sechsfach größere körperlgegewichtsbezogene Clearance als Erwachsene. Das bestätigt die Ergebnisse des bereits untersuchten Teilkollektivs (Laer et al. 2002). Durch die Berücksichtigung der intra- und interindividuellen Unterschiede bei der Simulation in der vorliegenden Arbeit ist die Aussagekraft allerdings noch stärker. Nicht auf Basis eines einzelnen Messwertes, sondern auf der Basis von 100 simulierten Werten pro Patient sind die Unterschiede in der systemischen Verfügbarkeit signifikant.

Für die Dosis-Simulation wurde die mediane AUC des 19,3 Jahre alten Patienten als Ziel-AUC ausgewählt. Diese betrug $495,4 \mu\text{g}\cdot\text{h/l}$ und ist mit bekannten Daten von Erwachsenen vergleichbar, bei denen die AUC bei gleicher Dosis und Beobachtungszeitraum $554 \mu\text{g}\cdot\text{h/l}$ betrug (Tenero et al. 2000). Um die systemische Verfügbarkeit bei jüngeren Patienten zu erhöhen, kann entweder die Dosis erhöht oder das Dosierungsintervall verkürzt werden. Die Simulationen wurden beispielhaft für jeweils einen Patienten der Altersgruppen Kleinkinder, Kinder und Heranwachsende durchgeführt. Das Ergebnis zeigt, dass

bei einer zweimal täglichen Applikation Kleinkinder, Kinder und Heranwachsende Tagesdosen von 3, 2 und 1 mg/kg einnehmen müssen, um eine den Erwachsenen unter 0,7 mg/kg/Tag vergleichbare systemische Verfügbarkeit zu erzielen. Bei einer dreimal täglichen Applikation kann man wie zu erwarten eine Akkumulation des Arzneistoffes beobachten. Diese ist aber nicht so groß, dass die Tagesdosis reduziert werden kann. Für Neugeborene kann keine Dosisempfehlung gegeben werden, da der jüngste Patient 23 Tage alt war und eine Extrapolation für jüngere an dieser Stelle nicht zulässig ist. Die Tageshöchstdosis bei Erwachsenen beträgt 1,2 mg/kg verteilt auf zwei Einzeldosen. Die Tagesdosis für Heranwachsende mit 1 mg/kg befindet sich damit noch im Rahmen der Erwachsenenendosis, wohingegen Kinder und Kleinkinder 1,6- bzw. 2,6-fach über dieser Dosis liegen.

Die vorgeschlagenen Tagesdosen von 3, 2 und 1 mg/kg für Kleinkinder, Kinder und Heranwachsende ergeben sich aus dem Vergleich der AUC-Mediane für die verschiedenen simulierten Patienten. Außerdem wurde ein Vergleich des Bereichs der AUC-Werte bzw. der 90ten Perzentile als eine Art Sicherheitsanalyse vorgenommen. Dieses Vorgehen kann auch bei anderen beobachtet werden. Zum Beispiel führten Krishna et al. eine Dosis-Simulation für Fexofenadin bei Kindern durch (Krishna et al. 2004). Sie bewerteten die Verteilung der 10ten, 50ten und 90ten Perzentile, um anschließend ein Dosierungsregime abzuleiten. Bei einer Dosis-Simulation ist es nicht wünschenswert, dass zwar im Median die gleiche AUC erreicht wird, dafür aber die 90te Perzentile ungleich höher und infolgedessen das Nebenwirkungspotential höher ist. Für die Simulation der zweimal täglichen Gabe von Carvedilol waren sowohl die mediane AUC als auch die 90ten Perzentilen für die empfohlenen Tagesdosen bei Kleinkindern, Kindern und Heranwachsenden vergleichbar mit den Erwachsenen. Bei der Simulation der dreimal täglichen Gabe liegen die Mediane von Kleinkindern und Kindern mit den auch in der zweimal täglichen Applikation empfohlenen Tagesdosen etwas über dem Median der Erwachsenen. Auch die entsprechenden 90ten Perzentilen für diese beiden Gruppen liegen etwas höher als die 90te Perzentile der Erwachsenen. Da es bei Beta-Rezeptorenblockern um die Festlegung einer anzustrebenden Zieldosis geht und die jeweils niedrigere Dosisstufe bei Kleinkindern und Kindern in der medianen AUC deutlich unter der medianen AUC der Erwachsenen bleibt, wurden für die dreimal tägliche Applikation die gleichen Tagesdosen wie für die zweimal tägliche Gabe empfohlen. Bei Beta-Rezeptorenblockern sind empfohlene Dosen nicht zwingend erforderlich sondern theoretisch möglich. Anders als zum Beispiel bei Antibiotika, wo schnell ein wirksamer Arzneistoffspiegel erreicht werden muss, wird eine Beta-Rezeptorenblockertherapie einschleichend begonnen und bis zur tolerierten Zieldosis gesteigert. Ist die Therapie noch nicht wirksam und toleriert der Patient die Dosis, dann kann die Dosis bei pädiatrischen Patienten bis zu der hier empfohlenen Tagesdosis gesteigert werden. Dabei sollte individuell entschieden werden, ob die Tagesdosis auf zwei

oder drei Einzeldosen verteilt wird. Bei Patienten, die zum Beispiel mit einer starken Blutdrucksenkung auf die Carvedilol-Einnahme reagieren, wäre eine niedrigere Einzeldosis und deswegen dreimal tägliche Applikation vermutlich sinnvoll. Bei Heranwachsenden könnte die zweimal tägliche Applikation eine größere Compliance bewirken. Die in der vorliegenden Arbeit empfohlenen Dosen sind weit entfernt von der Dosis, bis zu der keine offensichtlich toxischen Effekte auftreten (60 mg/kg/Tag) und von der Dosis, die bei Ratten in 50% der Fälle zum Tod führt (LD₅₀ > 8000 mg/kg) (FDA 2005).

Bei der reinen Dosis-Simulation wird davon ausgegangen, dass es für alle Patienten erstrebenswert ist, die gleiche systemische Verfügbarkeit zu erreichen. Dabei bleiben altersbedingte Unterschiede in der Pharmakodynamik unberücksichtigt. Es gibt bereits Hinweise, dass Carvedilol eine höhere Potenz bezüglich der Herzfrequenzsenkung bei jüngeren Patienten im Vergleich zu älteren besitzt (Behn 2001). Außerdem sind sowohl für Beta₁- als auch für Beta₂-Rezeptoren genetische Polymorphismen beschrieben. Es ist noch nicht klar, inwiefern diese eine Bedeutung für die Therapie mit Beta-Rezeptorenblockern haben (Johnson und Terra 2002). Die Dosis-Empfehlung der vorliegenden Arbeit stützt sich ausschließlich auf die Pharmakokinetik. Pharmakodynamische Aspekte sollten in einem nächsten Schritt untersucht werden.

Bisher wurde für die Carvedilol-Therapie bei Kindern ein für alle Altersgruppen einheitliches Dosierungsregime verwendet. Dabei unterschieden sich die angestrebten Zieldosen allerdings deutlich. Azeka et al. untersuchten bei 22 Patienten im Alter von 3,2 Monaten bis 10 Jahre die Therapie mit Carvedilol im Vergleich zu Placebo (Azeka et al. 2002). Die angestrebte Zieldosis betrug 0,2 mg/kg/Tag verteilt auf zwei Einzeldosen. Die Patienten waren im Mittel 2,1 Jahre alt und hatten alle eine LVEF ≤ 30%. Rusconi et al. führten eine retrospektive Studie bei Kindern im Alter von einem Tag bis 16,5 Jahre durch und fanden eine mittlere Zieldosis von 0,98 ± 0,26 mg/kg/Tag (Rusconi et al. 2004). Das mediane Alter betrug 3 Jahre und die mittlere LVEF 24,6 ± 7,6%. In beiden Studien war die Carvedilol-Therapie erfolgreich. Das Teilkollektiv des in der vorliegenden Arbeit untersuchten Kollektivs bestand aus 15 Patienten im Alter von 0,1 - 19 Jahren. Bei diesen Patienten war die Carvedilol-Therapie mit einer Zieldosis von 0,7 mg/kg/Tag ebenfalls erfolgreich (Laer et al. 2002). Der Altersmedian lag bei 3,5 Jahren und die Patienten hatten vor Therapiebeginn im Mittel eine LVEF von 36%. Erst kürzlich wurden vorläufige Ergebnisse einer großen randomisierten, doppelblinden, placebo-kontrollierten Studie veröffentlicht, in der eine niedrige (0,4 mg/kg/Tag) und eine hohe Carvediloldosis (0,8 mg/kg/Tag) im Vergleich zu Placebo bei 161 Kindern im Alter von drei Monaten bis 17 Jahre getestet wurden (Shaddy et al. 2006). Carvedilol zeigte im Bezug auf den primären kombinierten Endpunkt keinen Vorteil gegenüber Placebo. Die Autoren diskutieren als Ursachen einen unerwartet hohen Placebo-Effekt oder auch den hohen Anteil von 71% an Herzinsuffizienzpatienten der NYHA-Klasse II. 45% der Patienten waren jünger als zwei Jahre und die mediane

LVEF betrug 26%. Die Patienten der placebo-kontrollierte Studie von Azeka et al. hatten eine deutlich schlechtere Herzfunktion als die Patienten in dieser aktuellen Studie. Bei Rusconi et al. und auch bei Læer et al. wurde kein Placebo getestet, so dass ein Placebo-Effekt nicht beurteilt werden kann. In allen Studien sind ca. 50% der Patienten jünger als drei Jahre. Nach den vorliegenden Ergebnissen der Simulation werden diese jungen Patienten in allen Studien mit einer zu niedrigen Dosis therapiert. Patienten mit einer sehr schlechten Herzfunktion reagieren vermutlich eher auf niedrige Carvedilol-Dosen als Patienten mit einer nicht so stark eingeschränkten Herzfunktion, so dass bei Azeka et al. eine Tagesdosis von 0,2 mg/kg/Tag schon erfolgreich war. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen aber vermuten, dass bei jüngeren Patienten voraussichtlich höhere Tagesdosen erforderlich, damit Carvedilol im Vergleich zu Placebo wirksam ist.

Das in dieser Arbeit entwickelte Carvedilol-Dosierungsregime muss zunächst in einer prospektiven klinischen Studie überprüft werden, damit es therapeutisch genutzt werden kann. Auch für die in Abschnitt 5.3.1.2 beispielhaft aufgeführten Arzneistoffe mit einer ebenfalls höheren körperlgeichtsbezogenen Clearance bei jüngeren Kindern hat dieser Unterschied bereits Eingang in die Therapie gefunden. So wird für Tacrolimus bei Kindern ausdrücklich eine höhere orale Dosis bezogen auf das Körpergewicht empfohlen (Fachinformation Prograf® 2003). Die Initialdosis von Alfentanil ist zwar bezogen auf das Körpergewicht für Erwachsene und Kinder gleich, aber es wird darauf hingewiesen, dass bei Kindern eine Nachdosierung in kürzeren Abständen erforderlich werden kann (Fachinformation Rafipen® 2006).

5.5 NT-proBNP in der Carvedilol-Studie

Die Kenntnis von NT-proBNP-Normalwerten bei Kindern stellt eine der Voraussetzungen für den Einsatz dieses Biomarkers in der pädiatrischen Population dar. Eine weitere Voraussetzung ist, dass der Biomarker genau wie bei Erwachsenen mit der Herzfunktion korreliert. Für das aktive BNP konnte bereits gezeigt werden, dass es bei Kindern negativ mit der Herzfunktion korreliert (Tulevski et al. 2001, Book et al. 2005). Für NT-proBNP, gemessen mit dem auch in dieser Arbeit untersuchten Enzymimmunoassay, konnte ebenfalls eine signifikante Korrelation zwischen LVEF und NT-proBNP gezeigt werden ($r = -0,53$) (Mir et al. 2002). Für diese Korrelation wurden allerdings nur Patienten mit einer eingeschränkten LVEF von 11 - 56% untersucht. Bei Patienten mit einer höheren LVEF war die Korrelation nicht mehr signifikant. In der vorliegenden Arbeit wurde NT-proBNP retrospektiv mit dem Elektrochemilumineszenz-Immunoassay (ECLIA) bestimmt. Wie im Methodenvergleich der beiden Assays festgestellt wurde ist der ECLIA spezifischer. So war in der vorliegenden Arbeit die Korrelation zwischen NT-proBNP und LVEF auch unter Berücksichtigung von Patienten mit normaler LVEF signifikant (21 - 76%; $r = -0,47$). Gerade bei Patienten mit angeborenen Herzfehlern, die anfangs keine oder eine nur leichte Ein-

schränkung der Herzfunktion haben, sollte NT-proBNP mit dem spezifischen ECLIA bestimmt werden, um frühzeitig eine Verschlechterung zu erkennen.

Die Einordnung von sechs Patienten vor Beginn der Therapie mithilfe der altersentsprechenden NT-proBNP-Perzentilen kam zu dem gleichen Ergebnis wie die Einordnung mithilfe des Erwachsenen-cut-offs. Dies ist nicht verwunderlich, da vier der sechs Patienten deutlich erhöhte NT-proBNP-Werte haben und damit nicht nur deutlich über dem Erwachsenen-cut-off, sondern auch über den altersentsprechenden NT-proBNP-Perzentilen liegen. Die Überlegenheit der altersentsprechenden Perzentile im Vergleich zum Erwachsenen-cut-off liegt bei Gesunden bzw. Patienten mit nur leicht eingeschränkter Herzfunktion im Alter von 1 - 6 und 11 - 16 Jahren. Hier unterscheiden sich die 97,5te bzw. 75te Perzentile deutlich von dem Erwachsenen-cut-off. Zwei der sechs untersuchten Patienten fallen in diese Altersgruppen. Für einen 1,3 Jahre alten Patienten war die NT-proBNP-Plasmakonzentration trotz stark eingeschränkter Herzfunktion gemessen an beiden Referenzen im Normalbereich. Auch wenn NT-proBNP eine niedrige Rate für falsch negative Ergebnisse hat (Doust et al. 2004) kann dieses trotzdem der Fall sein. Der andere Patient, ein 12 Jahre alter Junge, hatte vor Beginn der Therapie eine deutlich erhöhte NT-proBNP-Konzentration, die nach sechs Monaten nicht nur unterhalb des Erwachsenen-cut-offs, sondern auch unterhalb der entsprechenden 75ten Perzentile lag. In einem größeren Kollektiv mit mehr Patienten in den verschiedenen Altersgruppen ist zu erwarten, dass die altersentsprechenden Perzentilen dem Erwachsenen-cut-off überlegen sind, besonders bei der Beurteilung von Patienten mit nur leicht eingeschränkter Herzfunktion.

In der vorliegenden Arbeit konnte die klinische Verbesserung der Patienten durch die Carvedilol-Therapie gemessen an der LVEF nicht eindeutig durch ein Absinken der NT-proBNP-Spiegel bestätigt werden, da nur sechs Patienten verschiedener Altersgruppen und mit unterschiedlich eingeschränkter Herzfunktion untersucht wurden. Auch bei Erwachsenen ist noch unklar, ob anhand der NT-proBNP-Werte der Erfolg einer Beta-Rezeptorenblockertherapie gemessen werden kann. Fung et al. beobachteten bei $n = 49$ Patienten, die entweder mit Carvedilol ($n = 25$) oder Metoprolol ($n = 24$) therapiert wurden, bereits nach drei Monaten eine signifikante Senkung des NT-proBNPs (Fung et al. 2003). Stanek et al. führten eine placebo-kontrollierte Studie zu dem Einsatz von Atenolol bei $n = 91$ Patienten mit Herzinsuffizienz durch. NT-proBNP war nach sechs Monaten Therapie signifikant gegenüber Placebo gesenkt (Stanek et al. 2001). Hartmann et al. hingegen untersuchten die Therapie mit Carvedilol gegen Placebo bei $n = 1011$ Patienten und konnten nach sechs Monaten keinen signifikanten Unterschied zwischen Carvedilol und Placebo im Hinblick auf die NT-proBNP-Plasmakonzentration feststellen (Hartmann et al. 2004). Bevor NT-proBNP für das Monitoring einer Beta-Rezeptorenblockertherapie bei Kindern eingesetzt werden kann, sollte dieses zunächst in der Erwachsenentherapie etabliert werden.

6 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit leisten einen wichtigen Beitrag, um den Biomarker NT-proBNP und den Beta-Rezeptorenblocker Carvedilol zukünftig sicherer und effektiver in klinischen Arzneimittelstudien bei pädiatrischen Patienten einzusetzen. Dabei haben sich die Populationskinetik und die Dosis-Simulation als geeignet erwiesen, das Carvedilol-Dosierungsregime bei Kindern zu überprüfen und anzupassen.

Die Ergebnisse für NT-proBNP zeigen, dass in der pädiatrischen Population altersentsprechende Normalwerte zugrunde gelegt werden müssen, die sich von den Werten der Erwachsenen unterscheiden. In der vorliegenden Arbeit konnten erstmals altersentsprechende Perzentilen bei gesunden Kindern abgeleitet werden. Gerade bei Kindern mit angeborenen Herzfehlern, die zunächst eine oft nur leicht eingeschränkte Herzfunktion haben, sollte der spezifischere Elektrochemilumineszenz-Immunoassay zur NT-proBNP-Bestimmung genutzt werden, damit auch frühzeitig eine Veränderung der Herzfunktion detektiert werden kann. Der Einsatz von NT-proBNP für das Monitoring einer Carvedilol-Therapie sollte zunächst bei Erwachsenen etabliert werden, bevor diese Art des Monitorings bei Kindern genutzt werden kann. Die Voraussetzung, dass NT-proBNP auch bei Kindern mit der Herzfunktion korreliert, ist aber gegeben.

Für NT-proBNP sollte als nächstes bei Kindern ein cut-off zur Unterscheidung zwischen herzgesund und -krank definiert werden. Es gibt bereits eine Studie, die keine Altersabhängigkeit gefunden hat und deswegen einen einheitlichen cut-off für alle pädiatrischen Patienten vorschlägt (Nir et al. 2004). Nach den vorliegenden Ergebnissen ist aber zu erwarten, dass auch der cut-off Altersgruppen-spezifisch definiert werden muss. In der vorliegenden Arbeit wurden nur $n = 13$ gesunde Kinder im Alter von 1 - 3 Jahren untersucht, so dass diese in einer Gruppe zusammengefasst werden mussten. Es wäre sinnvoll, hier eine größere Anzahl von Kindern zu untersuchen, um zu prüfen, ob diese Altersgruppe in kleinere Gruppen unterteilt werden muss. Kinder von 0 - 1 Jahren wurden in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Für diese Gruppe sollten ebenfalls altersentsprechende Perzentilen abgeleitet werden, gerade weil die Veränderungen im Wasserhaushalt und im Herz-Kreislaufsystem in den ersten Tagen und Wochen besonders groß sind.

Für die Therapie von pädiatrischen Patienten mit dem Beta-Rezeptorenblocker Carvedilol steht jetzt erstmals ein altersabhängiges Dosierungsregime zur Verfügung, welches eine in allen Altersgruppen vergleichbare systemische Verfügbarkeit des Arzneistoffes zum Ziel hat. Dieses sieht für jüngere Kinder höhere körperegewichtsbezogene Dosen vor. Dabei sollte im Einzelfall entschieden werden, ob die Tagesdosis auf zwei oder drei Einzeldosen verteilt wird, je nach Empfindlichkeit und Compliance des Patienten.

Der nächste Schritt ist jetzt die Überprüfung des entwickelten Dosierungsregimes in einer prospektiven klinischen Studie. Die Dosis-Empfehlung stützt sich bis jetzt nur auf die Pharmakokinetik und lässt pharmakodynamische Aspekte unberücksichtigt. Altersbedingte Unterschiede bei Kindern für die Carvedilol-Potenz bezüglich der Herzfrequenzsenkung sind bereits beschrieben. Ob diese auch eine Dosisanpassung erforderlich machen, ist noch nicht bekannt. Außerdem sind sowohl für Beta₁- als auch für Beta₂-Rezeptoren genetische Polymorphismen beschrieben. Auch hier ist nicht bekannt, ob diese einen Einfluss auf eine Beta-Rezeptorenblockertherapie haben. Das in dieser Arbeit entwickelte Pop-PK-Modell könnte mit einem populationspharmakodynamischen Modell gekoppelt werden. So können pharmakokinetische und pharmakodynamische Aspekte gemeinsam in die Simulation eingehen. Auch im Hinblick auf die Pharmakokinetik kann das Pop-PK-Modell noch ergänzt werden. So wurden bislang noch keine Langsammetabolisierer für CYP2D6 untersucht. Bei diesen Patienten ist zu erwarten, dass die in dieser Arbeit empfohlenen Dosen circa um die Hälfte reduziert werden können. Im Hinblick auf altersbedingte Unterschiede in der Bioverfügbarkeit wäre eine Bestimmung der P-Glykoprotein-Aktivität interessant. Es müssen außerdem noch Daten von Neugeborenen ergänzt werden. Für diese Gruppe kann mit den vorliegenden Ergebnissen keine Dosis-Empfehlung gegeben werden.

7 Zusammenfassung

7.1 Zusammenfassung

Klinische Arzneimittelstudien bei Kindern sind dringend erforderlich, damit diese sicher und effektiv mit modernen Arzneimitteln therapiert werden können. Ziel dieser Studien ist es unter anderem, den Zusammenhang zwischen Arzneimitteldosis, Konzentration im Blut und klinischem Effekt zu untersuchen, um adäquate Dosierungsregime abzuleiten. Moderne Ansätze wie der Einsatz von Biomarkern und in-silico-Verfahren können dabei helfen. In der vorliegenden Arbeit wurden der Biomarker NT-proBNP und der Beta-Rezeptorenblocker Carvedilol für den Einsatz in klinischen Arzneimittelstudien bei herzkranken Kindern untersucht. Ziel der Arbeit war es unter anderem, Normalwerte für NT-proBNP bei Kindern abzuleiten. Außerdem wurde die Pharmakokinetik von Carvedilol in einer populationskinetischen Analyse untersucht. Dosis-Simulationen wurden durchgeführt, um das aktuelle Carvedilol-Dosierungsregime für Kinder zu prüfen und gegebenenfalls anzupassen.

Für die Untersuchung von NT-proBNP-Normalwerten bei Kindern wurde eine prospektive Studie mit 402 gesunden Probanden im Alter von 1 - 29 Jahren durchgeführt. Dabei wurde auch die Vergleichbarkeit zweier NT-proBNP-Assays getestet. Die Ergebnisse zeigten, dass NT-proBNP bei Kindern negativ mit dem Alter korreliert ist, aber das Geschlecht keinen Einfluss hat. Die Werte unterschieden sich von den bisher bekannten Werten von Erwachsenen mit zum Teil deutlich höheren Werten bei Kindern. Nur der Elektrochemilumineszenz-Immunoassay war sensitiv genug, den Alterseinfluss zu detektieren.

Die Daten für die populationskinetische Analyse von Carvedilol wurden aus einer prospektiven, nicht-kontrollierten Studie zur Therapie der Herzinsuffizienz bei pädiatrischen Patienten gewonnen. Insgesamt konnten 41 Plasmakonzentrations-Zeitprofile von 25 Patienten in die Analyse eingeschlossen werden. Gewicht und Alter wurden als relevante Kovariaten identifiziert. Die Dosis-Simulation zeigte, dass die Fläche unter der Konzentrations-Zeitkurve als Maß für die systemische Verfügbarkeit des Arzneistoffes bei gleicher Dosis mit dem Alter zunimmt. Für Kleinkinder (28 Tage - 23 Monate), Kinder (2 - 11 Jahre) und Heranwachsende (12 - 15 Jahre) waren in der Simulation Tagesdosen von 3, 2 und 1 mg/kg erforderlich, verteilt auf zwei oder drei Einzeldosen, um eine den Erwachsenen unter 0,7 mg/kg/Tag vergleichbare systemische Verfügbarkeit zu erzielen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass sowohl die NT-proBNP-Plasmakonzentration als auch die Pharmakokinetik von Carvedilol bei Kindern altersabhängige Unterschiede aufweisen. Diese müssen für den sicheren und effektiven Einsatz von NT-proBNP und Carvedilol in klinischen Arzneimittelstudien bei Kindern berücksichtigt werden.

7.2 Summary

For a safe and effective treatment of pediatric patients with modern drugs, clinical trials with these patients are mandatory. In clinical trials, the relationship between dose, plasma concentration and response is investigated to derive adequate dosing regimens. Here, modern tools like biomarkers and in silico techniques can help. In the presented work, the biomarker NT-proBNP and the beta-receptorblocker Carvedilol were investigated for their use in clinical trials with pediatric patients with heart diseases. One aim was the evaluation of NT-proBNP normal ranges in the pediatric population. Second, the ontogeny of Carvedilol pharmacokinetics was investigated by population pharmacokinetic analysis. Dose simulations were performed to confirm or – if necessary – to adjust the Carvedilol dosing regimen.

For the investigation of NT-proBNP normal values in the pediatric population, 402 healthy subjects from 1 to 29 years were included. In the context of this investigation, a method comparison for two commercially available assays was performed. The results revealed that NT-proBNP in the pediatric population is negatively correlated with age, but gender has no influence. Values were different from known adult reference values with clearly higher values for some pediatric age groups. Only the electrochemiluminescent immunoassay was sensitive enough to detect the age influence.

Data for the population pharmacokinetic analysis of Carvedilol were derived from a prospective, not placebo-controlled investigation of Carvedilol for the therapy of pediatric patients with congestive heart failure. 41 plasma-concentration-time profiles from 25 patients could be included for the analysis. Weight, used for the allometric scaling approach, and age were the most important covariates for Carvedilol pharmacokinetics. Dose simulations revealed that the area under the plasma-concentration-time curve as a measure of systemic drug availability is increasing with age despite an equal dose with respect to bodyweight. For infants (28 days - 23 months), children (2 - 11 years) and adolescents (12 - 15 years) daily doses of 3, 2 and 1 mg/kg, administered in two or three doses, were necessary to reach an exposure comparable to adults with 0.7 mg/kg/day.

The presented results reveal that both NT-proBNP and the pharmacokinetics of Carvedilol show age-dependent differences. These differences have to be considered for a safe and effective use of NT-proBNP and Carvedilol in clinical trials with pediatric patients.

8 Literaturverzeichnis

- Akaike H. An Information Criterion (AIC). *Math Sci* 1973; 14: 5-9.
- Alcorn J, McNamara PJ. Ontogeny of hepatic and renal systemic clearance pathways in infants: part I. *Clin Pharmacokinet* 2002; 41: 959-998.
- Anderson BJ, Woollard GA, Holford NH. A model for size and age changes in the pharmacokinetics of paracetamol in neonates, infants and children. *Br J Clin Pharmacol* 2000; 50: 125-134.
- Azeka E, Franchini Ramires JA, Valler C, Alcides Bocchi E. Delisting of infants and children from the heart transplantation waiting list after carvedilol treatment. *J Am Coll Cardiol* 2002; 40: 2034-2038.
- Bachmakov I, Werner U, Endress B, Auge D, Fromm MF. Characterization of beta-adrenoceptor antagonists as substrates and inhibitors of the drug transporter P-glycoprotein. *Fundam Clin Pharmacol* 2006; 20: 273-282.
- Beck-da-Silva L, de Bold A, Davies R, Chow B, Ruddy T, Fraser M, Struthers C, Haddad H. Effect of bisoprolol on right ventricular function and brain natriuretic peptide in patients with heart failure. *Congest Heart Fail* 2004; 10: 127-132.
- Behn F. Promotionsarbeit. Universität Hamburg, 2001.
- Behn F, Laer S, Mir TS, Scholz H. Quantification of carvedilol in small plasma volumes from children using high-performance liquid chromatography. *Chromatographia* 2001; 53: 641-644.
- Biomarker Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 69: 89-95.
- Bolger AP, Sharma R, Li W, Leenarts M, Kalra PR, Kemp M, Coats AJ, Anker SD, Gatzoulis MA. Neurohormonal activation and the chronic heart failure syndrome in adults with congenital heart disease. *Circulation* 2002; 106: 92-99.
- Bonate PL. Clinical trial simulation in drug development. *Pharm Res* 2000; 17: 252-256.
- Book WM, Hott BJ, McConnell M. B-type natriuretic peptide levels in adults with congenital heart disease and right ventricular failure. *Am J Cardiol* 2005; 95: 545-546.
- Bristow M, Port JD. Beta-adrenergic blockade in chronic heart failure. *Scand Cardiovasc J Suppl* 1998; 47: 45-55.
- Bruns LA, Chrisant MK, Lamour JM, Shaddy RE, Pahl E, Blume ED, Hallowell S, Adonizio LJ, Canter CE. Carvedilol as therapy in pediatric heart failure: an initial multicenter experience. *J Pediatr* 2001; 138: 505-511.

- CIBIS. The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS-II): a randomised trial. *Lancet* 1999; 353: 9-13.
- Clerico A, Emdin M. Diagnostic accuracy and prognostic relevance of the measurement of cardiac natriuretic peptides: a review. *Clin Chem* 2004; 50: 33-50.
- Colan SD, Parness IA, Spevak PJ, Sanders SP. Developmental modulation of myocardial mechanics: age- and growth-related alterations in afterload and contractility. *J Am Coll Cardiol* 1992; 19: 619-629.
- Collinson PO, Barnes SC, Gaze DC, Galasko G, Lahiri A, Senior R. Analytical performance of the N terminal pro B type natriuretic peptide (NT-proBNP) assay on the Elecsys 1010 and 2010 analysers. *Eur J Heart Fail* 2004; 6: 365-368.
- de Bold AJ, Borenstein HB, Veress AT, Sonnenberg H. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sci* 1981; 28: 89-94.
- De Mey C, Brendel E, Enterling D. Carvedilol increases the systemic bioavailability of oral digoxin. *Br J Clin Pharmacol* 1990; 29: 486-490.
- Derendorf H, Gramatté T, Schäfer HG. *Pharmakokinetik. Einführung in die Theorie und Relevanz für die Arzneimitteltherapie.* 2 ed. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 2002.
- Doust JA, Glasziou PP, Pietrzak E, Dobson AJ. A systematic review of the diagnostic accuracy of natriuretic peptides for heart failure. *Arch Intern Med* 2004; 164: 1978-1984.
- Doust JA, Pietrzak E, Dobson A, Glasziou P. How well does B-type natriuretic peptide predict death and cardiac events in patients with heart failure: systematic review. *Bmj* 2005; 330: 625.
- Edginton AN, Schmitt W, Voith B, Willmann S. A mechanistic approach for the scaling of clearance in children. *Clin Pharmacokinet* 2006; 45: 683-704.
- Efron B. Bootstrap methods: another look at the jackknife. *Ann Statist* 1979; 7: 1-26.
- Europäische Kommission. Modified Proposal COM (2005) 577. http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/de/com/2005/com2005_0577de01.pdf. 2005.
- Europäische Kommission. Original Proposal COM (2004) 599. http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/de/com/2004/com2004_0599de01.pdf. 2004.
- Evans WE, Relling MV, de Graaf S, Rodman JH, Pieper JA, Christensen ML, Crom WR. Hepatic drug clearance in children: studies with indocyanine green as a model substrate. *J Pharm Sci* 1989; 78: 452-456.
- Fachinformation Dilatrend. Hoffman-La-Roche AG. Juli 2004.

Fachinformation Prograf. Fujisawa Deutschland GmbH. Juni 2003.

Fachinformation Rafipen. Janssen-Cilag. Juli 2006.

FDA. Coreg. Prescribing Information.

http://redpoll.pharmacy.ualberta.ca/drugbank/drugBank/FDA_labels/020297.pdf. 2005.

FDA. Food and drug administration modernization act of 1997.

<http://www.fda.gov/cder/guidance/105-115.htm>. Letzte Aktualisierung 20.06.2005.

FDA. Guidance for industry on Population Pharmacokinetics; availability. Food and Drug Administration, HHS. Notice. Fed Regist 1999; 64: 6663-6664.

Fung JW, Yu CM, Yip G, Chan S, Yandle TG, Richards AM, Nicholls MG, Sanderson JE. Effect of beta blockade (carvedilol or metoprolol) on activation of the renin-angiotensin-aldosterone system and natriuretic peptides in chronic heart failure. *Am J Cardiol* 2003; 92: 406-410.

Gaedigk A, Gotschall RR, Forbes NS, Simon SD, Kearns GL, Leeder JS. Optimization of cytochrome P4502D6 (CYP2D6) phenotype assignment using a genotyping algorithm based on allele frequency data. *Pharmacogenetics* 1999; 9: 669-682.

Gardner RS, Ozalp F, Murday AJ, Robb SD, McDonagh TA. N-terminal pro-brain natriuretic peptide. A new gold standard in predicting mortality in patients with advanced heart failure. *Eur Heart J* 2003; 24: 1735-1743.

Giannessi D, Andreassi MG, Del Ry S, Clerico A, Colombo MG, Dini N. Possibility of age regulation of the natriuretic peptide C-receptor in human platelets. *J Endocrinol Invest* 2001; 24: 8-16.

Giessmann T, Modess C, Hecker U, Zschiesche M, Dazert P, Kunert-Keil C, Warzok R, Engel G, Weitschies W, Cascorbi I, Kroemer HK, Siegmund W. CYP2D6 genotype and induction of intestinal drug transporters by rifampin predict presystemic clearance of carvedilol in healthy subjects. *Clin Pharmacol Ther* 2004; 75: 213-222.

Gobinet-Georges A, Valli N, Filliatre H, Dubernet MF, Dedeystere O, Bordenave L. Stability of brain natriuretic peptide (BNP) in human whole blood and plasma. *Clin Chem Lab Med* 2000; 38: 519-523.

Goresky GV, Koren G, Sabourin MA, Sale JP, Strunin L. The pharmacokinetics of alfentanil in children. *Anesthesiology* 1987; 67: 654-659.

Hall C. Essential biochemistry and physiology of (NT-pro)BNP. *Eur J Heart Fail* 2004; 6: 257-260.

- Hartmann F, Packer M, Coats AJ, Fowler MB, Krum H, Mohacsi P, Rouleau JL, Tendera M, Castaigne A, Trawinski J, Amann-Zalan I, Hoersch S, Katus HA. NT-proBNP in severe chronic heart failure: rationale, design and preliminary results of the CO-PERNICUS NT-proBNP substudy. *Eur J Heart Fail* 2004; 6: 343-350.
- Hines RN, McCarver DG. The ontogeny of human drug-metabolizing enzymes: phase I oxidative enzymes. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 300: 355-360.
- Hirt D, Urien S, Jullien V, Firtion G, Rey E, Pons G, Blanche S, Treluyer JM. Age-related effects on nelfinavir and M8 pharmacokinetics: a population study with 182 children. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 910-916.
- Hjalmarson A, Goldstein S, Fagerberg B, Wedel H, Waagstein F, Kjekshus J, Wikstrand J, El Allaf D, Vitovec J, Aldershvile J, Halinen M, Dietz R, Neuhaus KL, Janosi A, Thorgeirsson G, Dunselman PH, Gullestad L, Kuch J, Herlitz J, Rickenbacher P, Ball S, Gottlieb S, Deedwania P. Effects of controlled-release metoprolol on total mortality, hospitalizations, and well-being in patients with heart failure: the Metoprolol CR/XL Randomized Intervention Trial in congestive heart failure (MERIT-HF). MERIT-HF Study Group. *Jama* 2000; 283: 1295-1302.
- Holford NH. A size standard for pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet* 1996; 30: 329-332.
- Honda M, Nozawa T, Igarashi N, Inoue H, Arakawa R, Ogura Y, Okabe H, Taguchi M, Hashimoto Y. Effect of CYP2D6*10 on the pharmacokinetics of R- and S-carvedilol in healthy Japanese volunteers. *Biol Pharm Bull* 2005; 28: 1476-1479.
- Hoover SV, Perry RF. *Simulation: A Problem Solving Approach*. New York: Addison-Wesley Longman Publishing Co., 1989.
- Hunt PJ, Richards AM, Nicholls MG, Yandle TG, Doughty RN, Espiner EA. Immunoreactive amino-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-PROBNP): a new marker of cardiac impairment. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1997; 47: 287-296.
- ICH. Clinical Investigation of Medicinal Products in the Paediatric Population. <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA487.pdf>. Letzte Aktualisierung 19.07.2000.
- ILP. Zentralinstitut für Laboratoriumsdiagnostik und Pathobiochemie der Charité Berlin. Parameter und Referenzwerte. <http://www.charite.de/ilp/routine/parameter.html>. Letzte Aktualisierung 29.09.2006.
- Johnson JA, Terra SG. Beta-adrenergic receptor polymorphisms: cardiovascular disease associations and pharmacogenetics. *Pharm Res* 2002; 19: 1779-1787.
- Jonsson EN, Karlsson MO. Xpose--an S-PLUS based population pharmacokinetic/pharmacodynamic model building aid for NONMEM. *Comput Methods Programs Biomed* 1999; 58: 51-64.
- Jurima-Romet M, Foster BC, Casley WL, Rode A, Vloshinsky P, Huang HS, Geertsen S. CYP2D6-related oxidation polymorphism in a Canadian Inuit population. *Can J Physiol Pharmacol* 1997; 75: 165-172.

- Kaijser M, Johnsson C, Zezina L, Backman U, Dimeny E, Fellstrom B. Elevation of cyclosporin A blood levels during carvedilol treatment in renal transplant patients. *Clin Transplant* 1997; 11: 577-581.
- Karlsson MO, Sheiner LB. The importance of modeling interoccasion variability in population pharmacokinetic analyses. *J Pharmacokinet Biopharm* 1993; 21: 735-750.
- 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: 1157-1167.
- Koch A, Singer H. Normal values of B type natriuretic peptide in infants, children, and adolescents. *Heart* 2003; 89: 875-878.
- Krishna R, Krishnaswami S, Kittner B, Sankoh AJ, Jensen BK. The utility of mixed-effects covariate analysis in rapid selection of doses in pediatric subjects: a case study with fexofenadine hydrochloride. *Biopharm Drug Dispos* 2004; 25: 373-387.
- 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: 1322-1330.
- Laer S, Mir TS, Behn F, Eiselt M, Scholz H, Venzke A, Meibohm B, Weil J. Carvedilol therapy in pediatric patients with congestive heart failure: a study investigating clinical and pharmacokinetic parameters. *Am Heart J* 2002; 143: 916-922.
- Leeder JS, Adcock K, Gaedigk A, Gotschall R, Wilson JT, Kearns GL. Acquisition of CYP2D6 and CYP3A4 Activities in the First Year of Life. *Clin Pharmacol Ther* 2000; 67: 169, OIII-B-163.
- Maffei S, Del Ry S, Prontera C, Clerico A. Increase in circulating levels of cardiac natriuretic peptides after hormone replacement therapy in postmenopausal women. *Clin Sci (Lond)* 2001; 101: 447-453.
- Mahmood B, Daood MJ, Hart C, Hansen TW, Watchko JF. Ontogeny of P-glycoprotein in mouse intestine, liver, and kidney. *J Investig Med* 2001; 49: 250-257.
- Mahmood I. Allometric issues in drug development. *J Pharm Sci* 1999; 88: 1101-1106.
- McTavish D, Campoli-Richards D, Sorkin EM. Carvedilol. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy. *Drugs* 1993; 45: 232-258.
- Meibohm B. PK/PD-Modeling as the basis for the development and validation of biomarkers. *AAPS Workshop*. Baltimore: AAPS, 2004.
- Meibohm B, Laer S, Panetta JC, Barrett JS. Population pharmacokinetic studies in pediatrics: issues in design and analysis. *Aaps J* 2005; 7: E475-487.

- Meistelman C, Saint-Maurice C, Lepaul M, Levron JC, Loose JP, Mac Gee K. A comparison of alfentanil pharmacokinetics in children and adults. *Anesthesiology* 1987; 66: 13-16.
- Mir TS, Flato M, Falkenberg J, Haddad M, Budden R, Weil J, Albers S, Laer S. Plasma Concentrations of N-Terminal Brain Natriuretic Peptide in Healthy Children, Adolescents, and Young Adults: Effect of Age and Gender. *Pediatr Cardiol* 2005.
- Mir TS, Laux R, Hellwege HH, Liedke B, Heinze C, von Buelow H, Laer S, Weil J. Plasma concentrations of aminoterminal pro atrial natriuretic peptide and aminoterminal pro brain natriuretic peptide in healthy neonates: marked and rapid increase after birth. *Pediatrics* 2003; 112: 896-899.
- Mir TS, Marohn S, Laer S, Eiselt M, Grollmus O, Weil J. Plasma concentrations of N-terminal pro-brain natriuretic peptide in control children from the neonatal to adolescent period and in children with congestive heart failure. *Pediatrics* 2002; 110: e76.
- Morgan T. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of carvedilol. *Clin Pharmacokinet* 1994; 26: 335-346.
- Mueller T, Gegenhuber A, Dieplinger B, Poelz W, Haltmayer M. Long-term stability of endogenous B-type natriuretic peptide (BNP) and amino terminal proBNP (NT-proBNP) in frozen plasma samples. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 942-944.
- Mueller T, Gegenhuber A, Poelz W, Haltmayer M. Comparison of the Biomedica NT-proBNP enzyme immunoassay and the Roche NT-proBNP chemiluminescence immunoassay: implications for the prediction of symptomatic and asymptomatic structural heart disease. *Clin Chem* 2003; 49: 976-979.
- Murphy JG, Gersh BJ, Mair DD, Fuster V, McGoon MD, Ilstrup DM, McGoon DC, Kirklín JW, Danielson GK. Long-term outcome in patients undergoing surgical repair of tetralogy of Fallot. *N Engl J Med* 1993; 329: 593-599.
- Murry DJ, Crom WR, Reddick WE, Bhargava R, Evans WE. Liver volume as a determinant of drug clearance in children and adolescents. *Drug Metab Dispos* 1995; 23: 1110-1116.
- Neffke JG, Tulevski, II, van der Wall EE, Wilde AA, van Veldhuisen DJ, Dodge-Khatami A, Mulder BJ. ECG determinants in adult patients with chronic right ventricular pressure overload caused by congenital heart disease: relation with plasma neurohormones and MRI parameters. *Heart* 2002; 88: 266-270.
- Neugebauer G, Akpan W, von Mollendorff E, Neubert P, Reiff K. Pharmacokinetics and disposition of carvedilol in humans. *J Cardiovasc Pharmacol* 1987; 10 Suppl 11: S85-88.

- Neuhoff S, Langguth P, Dressler C, Andersson TB, Regardh CG, Spahn-Langguth H. Affinities at the verapamil binding site of MDR1-encoded P-glycoprotein: drugs and analogs, stereoisomers and metabolites. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2000; 38: 168-179.
- Niessen K-H. *Lehrbuch Pädiatrie*. 4. Auflage ed. Mannheim: Chapman & Hall GmbH, 1996.
- Nir A, Bar-Oz B, Perles Z, Brooks R, Korach A, Rein AJ. N-terminal pro-B-type natriuretic peptide: reference plasma levels from birth to adolescence. Elevated levels at birth and in infants and children with heart diseases. *Acta Paediatr* 2004; 93: 603-607.
- Norozi K, Buchhorn R, Kaiser C, Hess G, Grunewald RW, Binder L, Wessel A. Plasma N-terminal pro-brain natriuretic peptide as a marker of right ventricular dysfunction in patients with tetralogy of fallot after surgical repair. *Chest* 2005; 128: 2563-2570.
- Oldham HG, Clarke SE. In vitro identification of the human cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of R(+)- and S(-)-carvedilol. *Drug Metab Dispos* 1997; 25: 970-977.
- Packer M, Bristow MR, Cohn JN, Colucci WS, Fowler MB, Gilbert EM, Shusterman NH. The effect of carvedilol on morbidity and mortality in patients with chronic heart failure. U.S. Carvedilol Heart Failure Study Group. *N Engl J Med* 1996; 334: 1349-1355.
- Packer M, Fowler MB, Roecker EB, Coats AJ, Katus HA, Krum H, Mohacsi P, Rouleau JL, Tendera M, Staiger C, Holcslaw TL, Amann-Zalan I, DeMets DL. Effect of carvedilol on the morbidity of patients with severe chronic heart failure: results of the carvedilol prospective randomized cumulative survival (COPERNICUS) study. *Circulation* 2002; 106: 2194-2199.
- Parke J, Holford NH, Charles BG. A procedure for generating bootstrap samples for the validation of nonlinear mixed-effects population models. *Comput Methods Programs Biomed* 1999; 59: 19-29.
- Perry JC, McQuinn RL, Smith RT, Jr., Gothing C, Fredell P, Garson A, Jr. Flecainide acetate for resistant arrhythmias in the young: efficacy and pharmacokinetics. *J Am Coll Cardiol* 1989; 14: 185-191; discussion 192-183.
- Przepiorka D, Blamble D, Hilsenbeck S, Danielson M, Krance R, Chan KW. Tacrolimus clearance is age-dependent within the pediatric population. *Bone Marrow Transplant* 2000; 26: 601-605.
- Quaife RA, Christian PE, Gilbert EM, Datz FL, Volkman K, Bristow MR. Effects of carvedilol on right ventricular function in chronic heart failure. *Am J Cardiol* 1998; 81: 247-250.
- Raizada V, Thakore K, Luo W, McGuire PG. Cardiac chamber-specific alterations of ANP and BNP expression with advancing age and with systemic hypertension. *Mol Cell Biochem* 2001; 216: 137-140.

- Rajagopalan P, Gastonguay MR. Population pharmacokinetics of ciprofloxacin in pediatric patients. *J Clin Pharmacol* 2003; 43: 698-710.
- Rauh M, Koch A. Plasma N-terminal pro-B-type natriuretic peptide concentrations in a control population of infants and children. *Clin Chem* 2003; 49: 1563-1564.
- Raymond I, Groenning BA, Hildebrandt PR, Nilsson JC, Baumann M, Trawinski J, Pedersen F. The influence of age, sex and other variables on the plasma level of N-terminal pro brain natriuretic peptide in a large sample of the general population. *Heart* 2003; 89: 745-751.
- Rolan P, Atkinson AJ, Jr., Lesko LJ. Use of biomarkers from drug discovery through clinical practice: report of the Ninth European Federation of Pharmaceutical Sciences Conference on Optimizing Drug Development. *Clin Pharmacol Ther* 2003; 73: 284-291.
- Ruffolo RR, Jr., Gellai M, Hieble JP, Willette RN, Nichols AJ. The pharmacology of carvedilol. *Eur J Clin Pharmacol* 1990; 38 Suppl 2: S82-88.
- Rusconi P, Gomez-Marin O, Rossique-Gonzalez M, Redha E, Marin JR, Lon-Young M, Wolff GS. Carvedilol in children with cardiomyopathy: 3-year experience at a single institution. *J Heart Lung Transplant* 2004; 23: 832-838.
- Sallas WM, Milosavljev S, D'Souza J, Hossain M. Pharmacokinetic drug interactions in children taking oxcarbazepine. *Clin Pharmacol Ther* 2003; 74: 138-149.
- Sayama H, Nakamura Y, Saito N, Kinoshita M. Why is the concentration of plasma brain natriuretic peptide in elderly inpatients greater than normal? *Coron Artery Dis* 1999; 10: 537-540.
- Schmaltz AA, Singer H. Herz-Kreislauf-Erkrankungen. In: Niessen K-H, ed. *Pädiatrie*. 4 ed. Weinheim: Chapman & Hall, 1996: 453 ff.
- Schultz M, Faber J, Kistorp C, Jarlov A, Pedersen F, Wiinberg N, Hildebrandt P. N-terminal-pro-B-type natriuretic peptide (NT-pro-BNP) in different thyroid function states. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004; 60: 54-59.
- Schwachtgen L, Herrmann M, Georg T, Schwarz P, Marx N, Lindinger A. Reference values of NT-proBNP serum concentrations in the umbilical cord blood and in healthy neonates and children. *Z Kardiol* 2005; 94: 399-404.
- Shaddy RE. Beta-adrenergic receptor blockers as therapy in pediatric chronic heart failure. *Minerva Pediatr* 2001; 53: 297-304.
- Shaddy RE, Boucek MM, Hsu DT, et al. Pediatric carvedilol study group. Multicenter, randomized, placebo-controlled, double-blind trial of carvedilol in children with heart failure. Program and abstracts of the American College of Cardiology 55th Annual Scientific Session 2006: Abstract 418-416.

- Sheiner L. Repeating Cases. NONMEM User Archive. Personal Communication. Cognigen Corporation 1999.
- Sheiner LB, Beal SL. Evaluation of methods for estimating population pharmacokinetics parameters. I. Michaelis-Menten model: routine clinical pharmacokinetic data. *J Pharmacokinet Biopharm* 1980; 8: 553-571.
- Sheiner LB, Rosenberg B, Marathe VV. Estimation of population characteristics of pharmacokinetic parameters from routine clinical data. *J Pharmacokinet Biopharm* 1977; 5: 445-479.
- Shi J, Ludden TM, Melikian AP, Gastonguay MR, Hinderling PH. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of sotalol in pediatric patients with supraventricular or ventricular tachyarrhythmia. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 2001; 28: 555-575.
- Shih HC, Chao L, Chao J. Age and hormonal dependence of tonin levels in rat submandibular gland as determined by a new direct radioimmunoassay. *Biochem J* 1986; 238: 145-149.
- Sokoll LJ, Baum H, Collinson PO, Gurr E, Haass M, Luthe H, Morton JJ, Nowatzke W, Zingler C. Multicenter analytical performance evaluation of the Elecsys proBNP assay. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 965-972.
- Stanek B, Frey B, Hulsmann M, Berger R, Sturm B, Strametz-Juraneck J, Bergler-Klein J, Moser P, Bojic A, Hartter E, Pacher R. Prognostic evaluation of neurohumoral plasma levels before and during beta-blocker therapy in advanced left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2001; 38: 436-442.
- Stoschitzky K, Koshucharova G, Zweiker R, Maier R, Watzinger N, Fruhwald FM, Klein W. Differing beta-blocking effects of carvedilol and metoprolol. *Eur J Heart Fail* 2001; 3: 343-349.
- Sudoh T, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H. A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature* 1988; 332: 78-81.
- Tateishi T, Nakura H, Asoh M, Watanabe M, Tanaka M, Kumai T, Takashima S, Imaoka S, Funae Y, Yabusaki Y, Kamataki T, Kobayashi S. A comparison of hepatic cytochrome P450 protein expression between infancy and postinfancy. *Life Sci* 1997; 61: 2567-2574.
- Tenero D, Boike S, Boyle D, Ilson B, Fesniak HF, Brozena S, Jorkasky D. Steady-state pharmacokinetics of carvedilol and its enantiomers in patients with congestive heart failure. *J Clin Pharmacol* 2000; 40: 844-853.
- Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 7735-7738.

- Troughton RW, Frampton CM, Yandle TG, Espiner EA, Nicholls MG, Richards AM. Treatment of heart failure guided by plasma aminoterminal brain natriuretic peptide (N-BNP) concentrations. *Lancet* 2000; 355: 1126-1130.
- Tulevski, II, Groenink M, van Der Wall EE, van Veldhuisen DJ, Boomsma F, Stoker J, Hirsch A, Lemkes JS, Mulder BJ. Increased brain and atrial natriuretic peptides in patients with chronic right ventricular pressure overload: correlation between plasma neurohormones and right ventricular dysfunction. *Heart* 2001; 86: 27-30.
- Vanderheyden M, Bartunek J, Goethals M. Brain and other natriuretic peptides: molecular aspects. *Eur J Heart Fail* 2004; 6: 261-268.
- von Mollendorff E, Reiff K, Neugebauer G. Pharmacokinetics and bioavailability of carvedilol, a vasodilating beta-blocker. *Eur J Clin Pharmacol* 1987; 33: 511-513.
- Wang TJ, Larson MG, Levy D, Benjamin EJ, Leip EP, Omland T, Wolf PA, Vasan RS. Plasma natriuretic peptide levels and the risk of cardiovascular events and death. *N Engl J Med* 2004; 350: 655-663.
- West GB, Brown JH, Enquist BJ. The fourth dimension of life: fractal geometry and allometric scaling of organisms. *Science* 1999; 284: 1677-1679.
- Whitworth JA. 2003 World Health Organization (WHO)/International Society of Hypertension (ISH) statement on management of hypertension. *J Hypertens* 2003; 21: 1983-1992.
- Wilens TE, Cohen L, Biederman J, Abrams A, Neft D, Faird N, Sinha V. Fluoxetine pharmacokinetics in pediatric patients. *J Clin Psychopharmacol* 2002; 22: 568-575.
- Yasue H, Yoshimura M, Sumida H, Kikuta K, Kugiyama K, Jougasaki M, Ogawa H, Okumura K, Mukoyama M, Nakao K. Localization and mechanism of secretion of B-type natriuretic peptide in comparison with those of A-type natriuretic peptide in normal subjects and patients with heart failure. *Circulation* 1994; 90: 195-203.

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

I. Originalarbeiten

- Albers S, Mir TS, Haddad M, Laer S. N-Terminal pro-brain natriuretic peptide: normal ranges in the pediatric population including method comparison and interlaboratory variability. *Clin Chem Lab Med* 2006; 44: 80-85.
- Albers S, Elshoff JP, Volker C, Richter A, Laer S. HPLC quantification of metoprolol with solid-phase extraction for the drug monitoring of pediatric patients. *Biomed Chromatogr* 2005; 19: 202-207.
- Mir TS, Flato M, Falkenberg J, Haddad M, Budden R, Weil J, Albers S, Laer S. Plasma concentrations of N-terminal brain natriuretic peptide in healthy children, adolescents, and young adults: effect of age and gender. *Pediatr Cardiol* 2006; 27: 73-77.
- Sumner ME, Albers S, Schmidt KG, Laws HJ, Laer S. [Drug interactions of tacrolimus]. *Med Monatsschr Pharm* 2006; 29: 139-141.

II. Vorträge und Poster mit publiziertem Abstract

- Albers S, Mir TS, Falkenberg J, Haddad M, Budden R, Weil J, Lärer S. Evaluation of N-BNP for pediatric patients in multicenter studies. DGPK-Meeting 2004. *Z Kardiol* 2004; 93: 739.
- Albers S, Mir TS, Flato M, Falkenberg J, Weil J, Haddad M, Budden M, Lärer S. Evaluation of the cardiac biomarker NT-proBNP in children to guide pharmacotherapy. ESDP-Meeting 2004. Final Program and Abstracts 2004:114.
- Lärer S, Albers S, Gupta M, Mir TS, Meibohm B. Population pharmacokinetics of carvedilol in pediatric patients with congestive heart failure. ASCPT-Annual Meeting 2005. *Clin Pharm Ther* 2005; 77: P88.
- Verde PE, Albers S, Lärer S. Statistical analysis and confidence intervals for the maximum oxygen uptake for a subject: a modern statistical approach. ISCB Annual Conference 2006.

III. In Vorbereitung

- Albers S, Meibohm B, Mir TS, Lärer S. Population pharmacokinetics and dose simulation for Carvedilol in pediatric patients with congestive heart failure. *Clin Pharmacokin.* In preparation.
- Verde PE, Albers S, Lärer S. Statistical analysis and confidence intervals for the maximum oxygen uptake for one subject: a modern statistical approach. *Med Sci Sports Exerc.* In preparation.

9 Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym
AGE	Alter
AIC	Akaike Informationskriterium
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
ANOVA	Engl.: Analysis of variance = Varianzanalyse
AUC	Engl.: Area under the curve = Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve
BID	Lat.: bis in die = zweimal täglich
BNP	Brain natriuretisches Peptid
Carvedilol	Racemat aus (R)-(+)- und (S)-(-)-Carvedilol
CL	Totale Clearance
CNP	C-Typ natriuretisches Peptid
CYP	Enzym der Familie Cytochrom-P-450
DAB	Deutsches Arzneibuch
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DV	Engl.: Dependent variable = gemessene Konzentration
ECLIA	Elektrochemilumineszenz-Immunoassay
EF30	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion unter 30%
EIA	Enzymimmunoassay
ELISA	Engl.: Enzym linked immunosorbent assay
f	Bioverfügbarkeit
FDA	Engl.: Food and drug administration = amerikanische Arzneimittelbehörde
FO	Engl.: First order = Annäherung erster Ordnung an Schätzwerte
FOCE	Engl.: First order conditional estimates = Annäherung erster Ordnung an Schätzwerte unter Verwendung von individuellen Schätzwerten
GAM	Engl.: Generalized additive modelling
GCP	Engl.: Good clinical practice = Gute klinische Praxis
h	Stunde
HLH	Hypoplastisches Linksherz
HPLC	Engl.: High performance liquid chromatography = Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP	Horse radish peroxidase = Meerrettich-Peroxidase
HT	Engl.: Height = Größe

ICH	Engl.: International Conference on Harmonisation = Internationale Harmonisierungskonferenz
IPRED	Engl.: individual predicted = individuelle Vorhersage
KA	Absorptionsgeschwindigkeitskonstante
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
KI	Konfidenzintervall
KOH	Kaliumhydroxid
KOV	Kovariate
l	Liter
LD50	Dosis, die in 50% der Fälle letal wirkt
ln	Natürlicher Logarithmus zur Basis e
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
MI	Mitralklappeninsuffizienz
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MW	Arithmetischer Mittelwert
n	Anzahl
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NONMEM	Engl.: Nonlinear mixed effects model
NT-proANP	Amino-terminales pro atriales natriuretisches Peptid
NT-proBNP	Amino-terminales pro brain natriuretisches Peptid
NYHA	Engl.: New York Heart Association
OFB	Engl.: Objective Function = Modellanpassungs-Kriterium
OCC 1-3	Engl.: Occasion = Dosisstufe
p	Wahrscheinlichkeit
PD	Pharmakodynamik
PGP	P-Glykoprotein
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der H ₃ O ⁺ -Konzentration
PK	Pharmakokinetik
Pop-PK	Populationspharmakokinetik
PRED	Engl.: Predicted = vorhergesagte Konzentration
proBNP	Pro brain natriuretisches Peptid

PZ25	Gewicht unter der altersentsprechenden 25ten Perzentile
Q	Interkompartimentelle Clearance
rpm	Engl.: Rounds per minute = Umdrehungen pro Minute
RX	Ätiologie der Erkrankung
SD	Standardabweichung
SEX	Geschlecht
TID	Lat.: ter in die = dreimal täglich
TLAG	Engl.: Lagtime = verzögerte Absorption
TMB	Tetramethylbenzidin
TV	Engl.: Typical Value = Populationsmittelwert
V2	Zentrales Verteilungsvolumen
V3	Peripheres Verteilungsvolumen
VK	Variationskoeffizient
VSD	Ventrikelseptumdefekt
VSS	Verteilungsvolumen im Fließgleichgewicht; Summe aus V2 und V3
V/V	Volumen pro Volumen
WRES	Engl.: weighted residuals = gewichtete Residuen
WT	Engl.: weight = Gewicht

9.2 Abbildungsverzeichnis

Liste der in der Arbeit dargestellten Abbildungen:

Abbildung 1:	Zusammenhang zwischen Dosis, Biomarker und klinischem Effekt	3
Abbildung 2:	Entstehung von BNP und NT-proBNP	7
Abbildung 3:	Strukturformel Carvedilol.....	10
Abbildung 4:	Bedeutung der inter- und intraindividuellen Variabilität.....	25
Abbildung 5:	Prinzip der Bootstrap-Analyse.....	32
Abbildung 6:	NT-proBNP in der pädiatrischen Population	41
Abbildung 7:	NT-proBNP-Perzentilen in der pädiatrischen Population	42
Abbildung 8:	NT-proBNP-Methodenvergleich	43
Abbildung 9:	Vergleich zwischen vorhergesagter und gemessener Carvedilol-Konzentration	52
Abbildung 10:	Gewichtete Residuen in Abhängigkeit von der vorhergesagten Konzentration	53
Abbildung 11:	Körpergewichtsbezogene Werte für CL und V2 in Abhängigkeit vom Alter	55
Abbildung 12:	Histogramme der Bootstrap-Schätzwerte	57
Abbildung 13:	Vergleich der individuell vorhergesagten mit der gemessenen Konzentration	59
Abbildung 14:	Vergleich zwischen gemessenen und simulierten Konzentrationen	62
Abbildung 15:	Simulierte AUC unter 2 x 0,35 mg/kg Carvedilol für Patienten unterschiedlichen Alters	64
Abbildung 16:	Simulierte AUC unter Dosierungsregime BID für verschiedene Carvedilol-Einzeldosen.....	67
Abbildung 17:	Simulierte AUC unter Dosierungsregime TID für verschiedene Carvedilol-Einzeldosen.....	69
Abbildung 18:	Korrelation der NT-proBNP-Plasmakonzentration mit der LVEF	71

Liste der im Anhang dargestellten Abbildungen:

Abbildung 19:	Histogramme der Bootstrap-Schätzwerte - Fortsetzung	112
Abbildung 20:	Vergleich der individuell vorhergesagten mit der gemessenen Konzentration - Fortsetzung	113

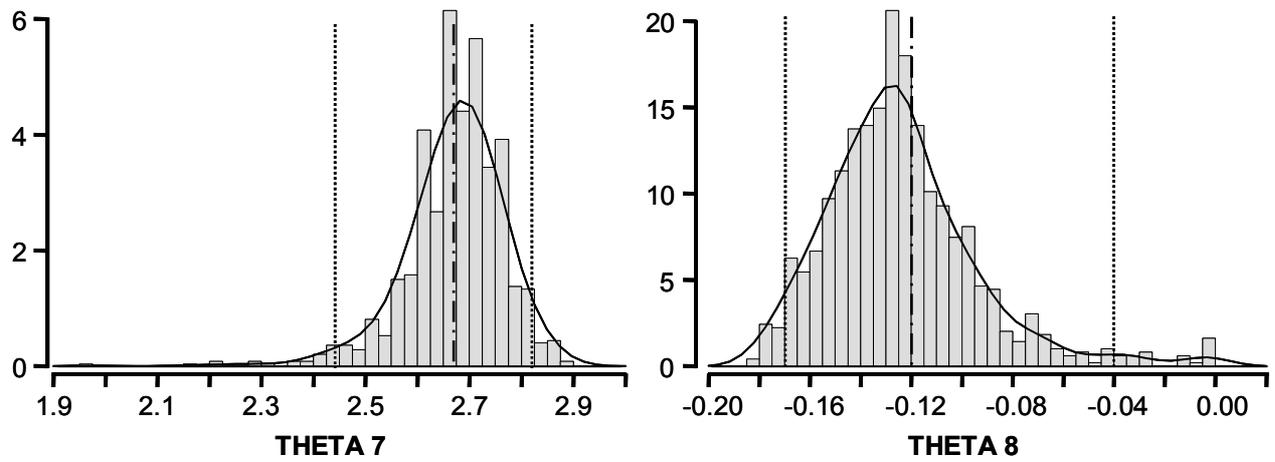
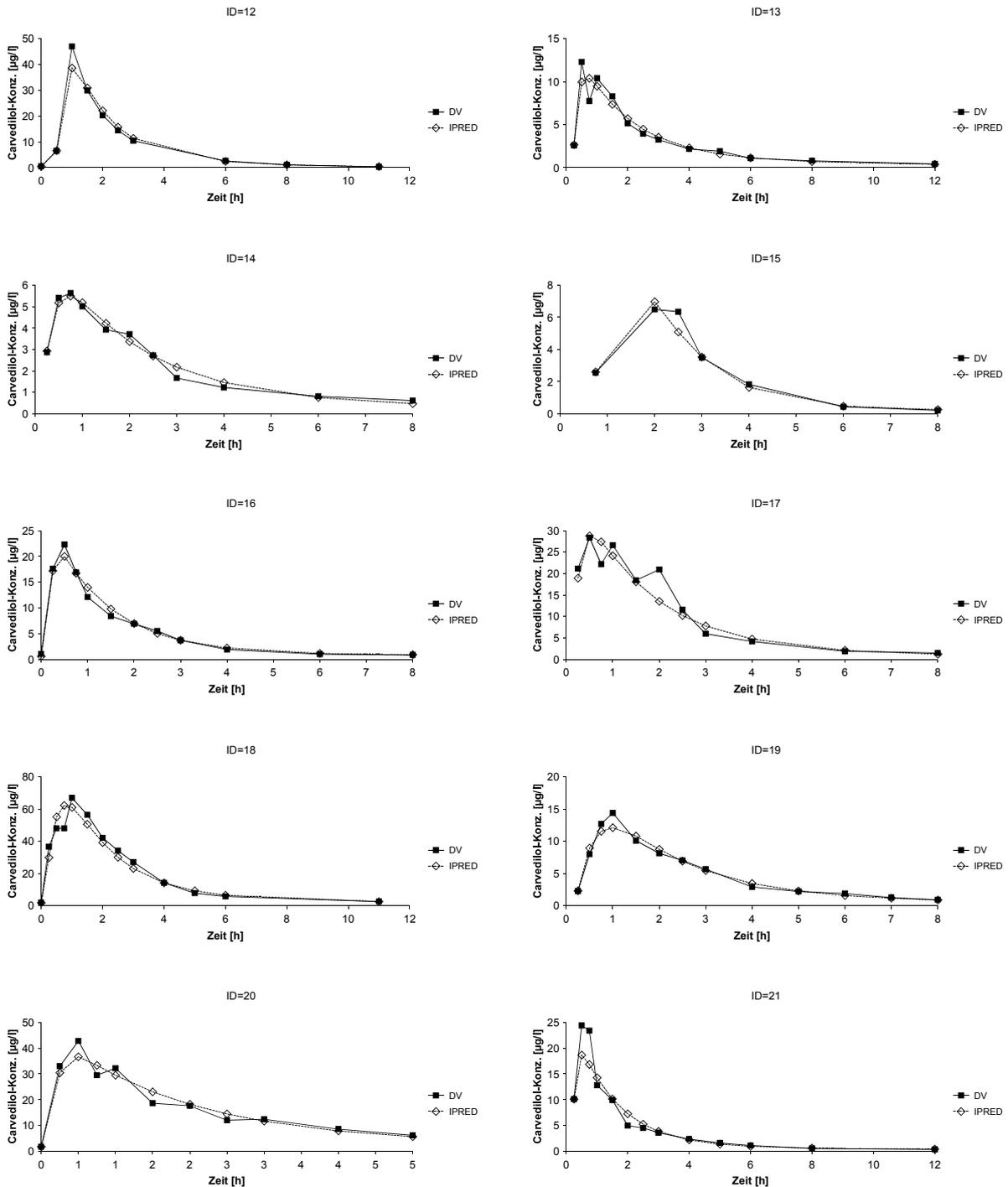


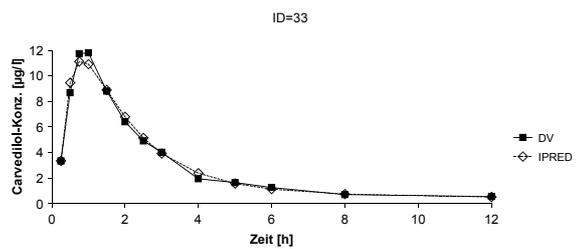
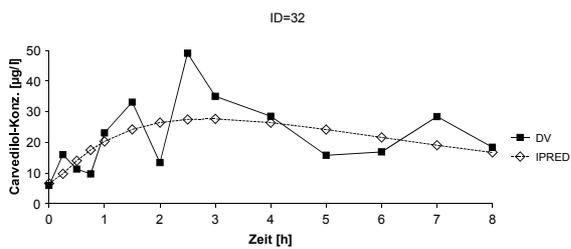
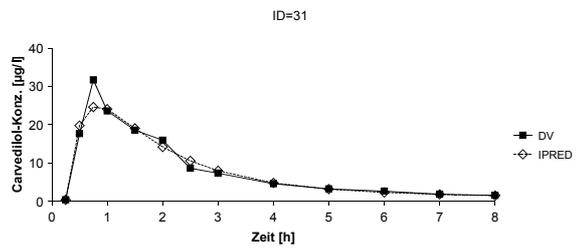
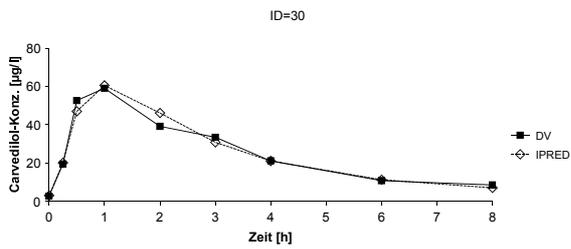
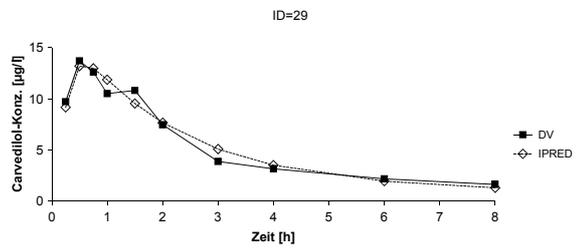
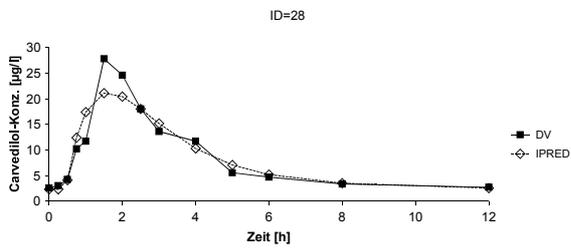
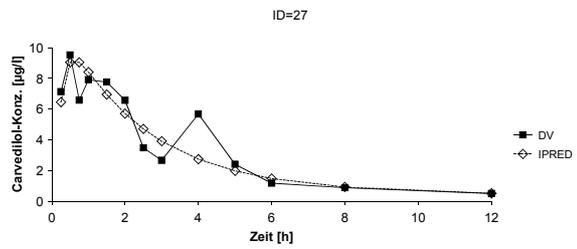
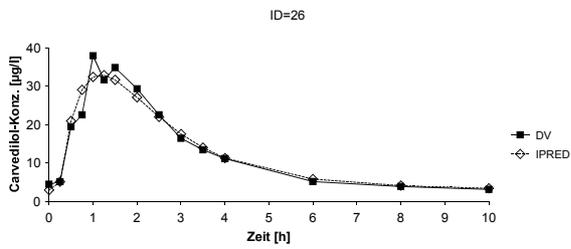
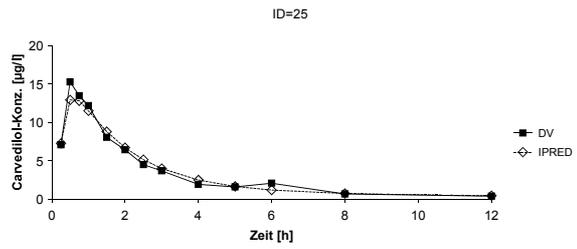
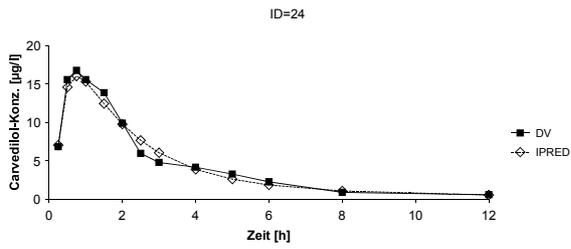
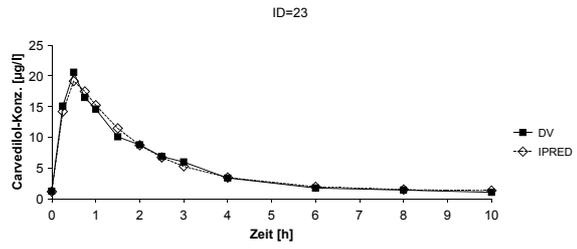
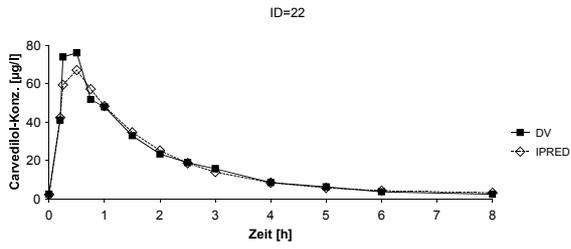
Abbildung 19: Histogramme der Bootstrap-Schätzwerte - Fortsetzung

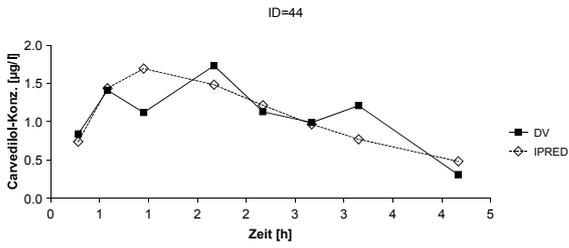
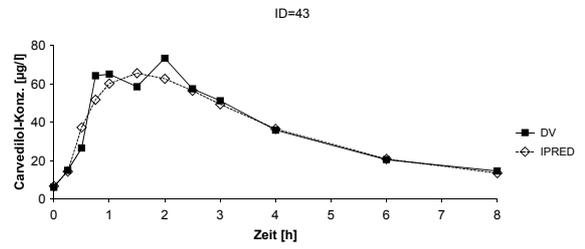
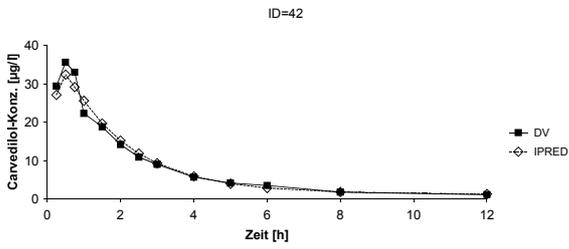
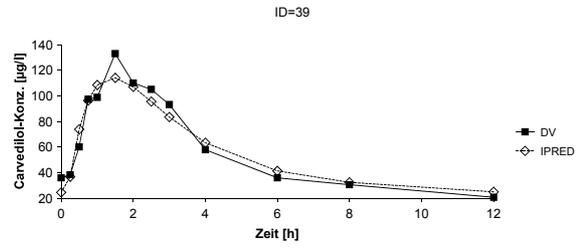
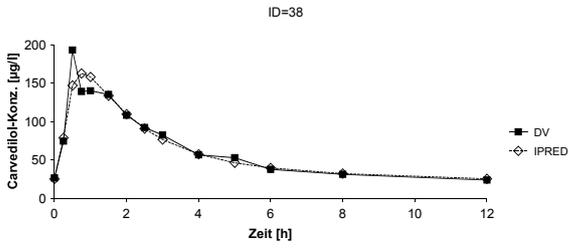
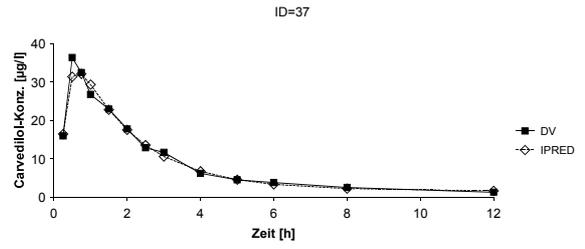
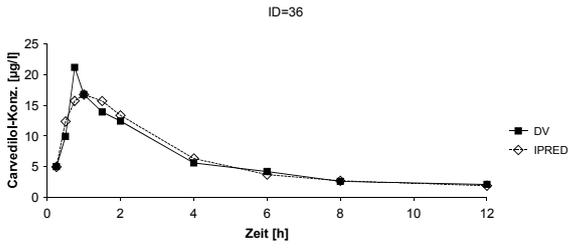
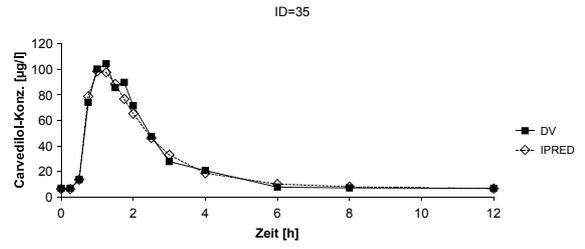
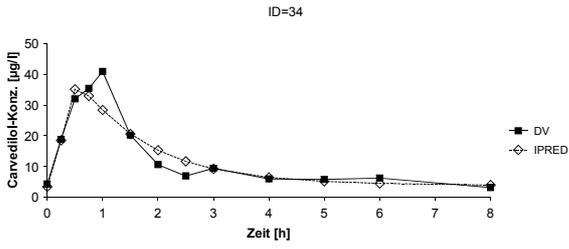
Dargestellt sind die Dichteverteilungen für THETA 7 und 8 mit dem 95%-Konfidenzintervall (gepunktete Linie) und dem Mittelwert der Bootstrap-Analyse (Punkt-Strich-Linie).

Abbildung 20: Vergleich der individuell vorhergesagten mit der gemessenen Konzentration - Fortsetzung

Für die restlichen 31 Patienten sind die individuell vorhergesagten (IPRED = individual predicted) und die gemessenen (DV = dependent variable) Konzentrationen in Abhängigkeit von der Zeit nach der Einnahme von Carvedilol aufgetragen. Die Patienten sind nicht durchgehend von 1 - 41 durchnummeriert, deswegen gibt es zum Beispiel einen Patienten mit der ID = 44.







9.3 Verzeichnis der Tabellen

Liste der in der Arbeit dargestellten Tabellen:

Tabelle 1: Übersicht über die pharmakokinetischen Modelle und ihre Parameter	23
Tabelle 2: Charakteristika der in die NT-proBNP-Studie eingeschlossenen Probanden ..	39
Tabelle 3: Multizentrischer Laborvergleich	44
Tabelle 4: Patientencharakteristika	45
Tabelle 5: Entwicklung des Pop-PK-Modells.....	48
Tabelle 6: Relevanz der Kovariaten	49
Tabelle 7: Ergebnis der Bootstrap-Analyse.....	56
Tabelle 8: Vergleich der populationskinetischen mit den gemessenen Werten	60
Tabelle 9: Ausgewählte Patienten für die Dosis-Simulation.....	65
Tabelle 10: Mediane AUC bei zwei- bzw. dreimal täglicher Applikation verschiedener Dosen	66

Liste der im Anhang dargestellten Tabellen:

Tabelle 11: Kovariaten der Patienten aus der Carvedilol-Studie.....	117
---	-----

Patient	Alter [Jahre]	Geschlecht	Diagnose	LVEF < 30%	Gewicht [kg]	Gewichtspersentile < 25%	CYP2D6- Aktivität
1	0,07	1	1	0	3,6	0	-
2	0,10	0	1	0	3,2	1	-2,3
3	0,11	1	3	0	3,1	0	-1,6
6	0,14	0	1	0	4,1	1	-
8	0,16	0	3	1	4,0	1	-2,3
10	0,18	0	1	0	4,4	0	-2,8
11	0,23	1	3	0	4,4	1	-1,8
9	0,24	0	3	1	5,3	1	-2,3
12	0,24	1	1	0	4,3	1	-1,0
7	0,36	0	1	0	5,1	1	-
13	0,56	1	3	1	5,2	1	-2,7
5	0,63	1	3	0	6,9	1	-1,6
14	0,76	0	2	1	8,0	1	-3,0
15	1,04	0	3	1	9,1	0	-3,5
16	1,21	0	3	1	10,4	0	-3,5
17	1,29	0	3	0	10,1	0	-2,4
19	1,62	0	2	1	9,5	1	-3,0
20	1,67	0	2	1	9,8	1	-3,0
18	1,86	0	3	0	10,6	1	-2,4
44	3,37	1	3	0	13,4	0	-1,6
21	3,53	1	3	0	13,1	1	-3,0
22	3,58	1	3	0	13,1	1	-3,0
23	4,96	0	3	1	16,2	1	-
24	5,57	0	3	0	20,2	0	-2,1
25	7,51	0	3	0	24,3	0	-2,4
26	7,57	0	3	0	25,0	0	-2,4
27	8,30	0	3	1	20,0	1	-2,5
28	8,34	0	3	1	21,0	1	-2,5
29	10,70	0	3	0	25,5	1	-
30	10,99	0	3	0	24,3	1	-
31	11,64	1	3	0	34,3	0	-1,7
32	11,67	1	3	0	34,3	0	-1,7
33	11,81	0	3	0	39,0	0	-2,4
34	11,92	0	3	0	38,2	0	-2,4
35	14,45	0	1	1	52,0	0	-
36	16,20	0	3	0	45,0	1	-1,1
37	17,48	0	3	0	53,4	1	-2,1
38	17,62	0	3	0	56,0	1	-2,1
39	18,06	0	3	0	58,0	1	-
42	19,26	0	3	0	98,2	0	-2,2
43	19,30	0	3	0	98,0	0	-2,2

Tabelle 11: Kovariaten der Patienten aus der Carvedilol-Studie

Aufgelistet sind dem Alter nach alle Patienten mit den Kovariaten, die während der Pop-PK-Modellentwicklung getestet wurden: Alter, Geschlecht (0 = männlich, 1 = weiblich), Diagnose (1 = Ventrikelseptumdefekt oder Mitralklappeninsuffizienz; 2 = Hypoplastisches Linksherzsyndrom; 3 = Dilatative Cardio-myopathie), eine linksventrikuläre Ejektionsfraktion < 30% (1 = ja, 0 = nein), Gewicht, eine altersentsprechende Gewichtspersentile < 25% (1 = ja, 0 = nein) und die CYP2D6-Aktivität als Maß für die Aktivität des Enzyms Cytochrom-P450-2D6.

9.4 FORTRAN-Code des finalen Pop-PK-Modells

```
;Model Desc: Finales Modell
;Project Name: carvedilol
;Project ID: 03-2006

$PROB RUN#1113 Finales Modell
$INPUT C ID TIME AMT DV XDV SEX AGE WT HT BSA OCC1 OCC2 OCC3 RX CYP
EVID EF30 PZ25
$DATA C107_SA_EF30neu.csv IGNORE=C

$SUBROUTINE ADVAN4 TRANS4

$PK
TVCL=THETA(1)*((WT/13)**0.75)-((AGE/3.5)**THETA(7))
CL=TVCL*EXP(ETA(1))
TVV2=(THETA(2)*(WT/13))*(1+(THETA(8)*AGE/3.5))
V2=TVV2*EXP(ETA(2))
TVV3=THETA(3)*(WT/13)
V3=TVV3*EXP(ETA(3))
VSS=V2+V3
TVQ=THETA(4)*((WT/13)**0.75)
Q=TVQ*EXP(ETA(4))
TVKA=THETA(5)
KA=TVKA*EXP(ETA(5))
TLAG=THETA(6)
ALAG=TLAG*EXP(ETA(6))

ALAG1=ALAG
S2=V2
K=CL/V2
K23=Q/V2
K32=Q/V3
KA=KA

;Time after Dose Coding
IF (AMT.GT.0) THEN
TDOS=TIME
TAD=0.0
ENDIF
IF (AMT.EQ.0) TAD=TIME-TDOS

$ERROR CALLFL=0
IF(F.GT.0) THEN
IPRED=LOG(F)
ELSE
IPRED=0
ENDIF
FX=0
IF (F.EQ.0) FX=1
W=F+FX
IRES=DV-IPRED
IWRES=IRES/W
```

Y=IPRED+ERR(1)

\$THETA

(0,40) ;CL
(0,20) ;V2
(0,95) ;V3
(0,15) ;Q
(0.1,0.6,2.0) ;KA
(0,0.14,0.2) ;TLAG
(1,2.7) ;THETA7
(-0.3,-0.13,0) ;THETA8

\$OMEGA BLOCK(4)

0.2
0.2
1.3
0.3
0.1
1.6
0.2
0.3
0.6
0.4

\$OMEGA BLOCK(2) FIXED

0.06
0.1
0.4

\$SIGMA

0.05

\$EST METHOD=1 INTERACTION MAXEVAL=3000 PRINT=5 NOABORT
MSF=1113.MSF
\$COV

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Stefanie Albers
Geboren: 16.01.1976 (Hamm)
Eltern: Elisabeth Albers, geb. Gausmann
Leo Albers
Adresse: Semperstraße 91, 22303 Hamburg

Schulbildung

1982 - 1986 Besuch der Marienschule, Ahlen
1986 - 1995 Besuch des St. Michael Gymnasium, Ahlen
05/1995 Abitur

Studium und Praktika

10/1995 - 06/2001 Studium der Pharmazie an der Westfälischen Wilhelms-Universität, Münster
03/1996 Famulatur in einer öffentlichen Apotheke, Ahlen
08/1996 Famulatur in einer Krankenhausapotheke, Ahlen
09/1997 Erster Abschnitt der pharmazeutischen Prüfung
09/1998 Pharmakologiepraktikum an der Universität in Kuopio, Finnland
08/1999 Praktikum in der Krankenhausapotheke von Antibes, Frankreich
04/2000 Zweiter Abschnitt der pharmazeutischen Prüfung
05/2000 - 10/2000 Industriepraktikum bei Lilly Forschung GmbH, Hamburg
11/2000 - 04/2001 Praktikum in der Victoria Apotheke, Hamburg
06/2001 Dritter Abschnitt der pharmazeutischen Prüfung
08/2001 Approbation als Apothekerin

Berufserfahrung

08/2001 - 05/2003 Durchgehende Vertretungstätigkeit als Apothekerin in Hamburg
06/2003 - 12/2004 Beginn der Forschungsarbeit an dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf unter der Betreuung von Frau PD Dr. med. S. Lärer und Herrn Prof. Dr. Geffken aus dem Institut für Pharmazie der Universität Hamburg
01/2005 - 12/2006 Weiterführung der Forschungsarbeit in der Klinischen Pharmazie und Pharmakotherapie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der Betreuung von Prof. Dr. med. S. Lärer

11 Danksagungen

Frau Prof. Dr. Stephanie Laer möchte ich sehr herzlich danken für die Überlassung dieses interessanten und aktuellen Themas, die kontinuierliche Unterstützung, die stete Motivation und die vielfältigen interessanten, mit meiner Promotion verbundenen Erfahrungen.

Für die Ermöglichung der Untersuchungen in der Abteilung für Kinderkardiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Jochen Weil bedanken.

Herrn Prof. Dr. Thomas Eschenhagen und den ehemaligen Kolleginnen und Kollegen aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf gilt mein Dank für die freundliche Aufnahme und die schöne Zeit in Hamburg. Besonders möchte ich meinem ehemaligen Arbeitskreiskollegen Jan-Peer Elshoff danken, für seine ständige Hilfsbereitschaft und Unterstützung auch über unsere gemeinsame Zeit in Hamburg hinaus.

Meinen Kolleginnen und meinem Kollegen aus der Klinischen Pharmazie und Pharmakotherapie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf möchte ich ganz herzlich danken für die gute Zusammenarbeit und die tolle Unterstützung.

Herrn Pablo E. Verde aus dem Koordinierungszentrum für Klinische Studien der medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf möchte ich für die Unterstützung bei statistischen Fragestellungen und die zahlreichen anregenden Diskussionen herzlich danken.

Bedanken möchte ich mich auch bei PD Dr. Thomas S. Mir und Jan Falkenberg für die Rekrutierung der Patienten und die Unterstützung auf der Station der Kinderkardiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf.

Ein ganz herzlicher Dank gilt natürlich auch meiner Familie, ohne die vieles gar nicht erst möglich gewesen wäre, und meinen Freunden, die mich immer unterstützt haben. Besonders möchte ich an dieser Stelle Sandra Deneke danken, die mich nicht nur mental, sondern auch beim Korrigieren meiner Arbeit sehr unterstützt hat.

Und ganz besonders herzlich möchte ich mich bei meinem Freund Ingo Schellhammer bedanken. Ohne ihn und seine fortwährende Unterstützung, Motivation, Diskussionsbereitschaft und Geduld während aller Höhen und Tiefen wäre ich nie so weit gekommen.

Dem Kompetenznetz für Angeborene Herzfehler und dem Bundesministerium für Bildung und Forschung gilt mein Dank für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

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 13.12.2006