

Pharmazeutische Chemie

Klinisch-pharmazeutische
Untersuchungen zur Hochdosis-
Chemotherapie mit Methotrexat bei
Kindern

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften im Fachbereich Chemie und Pharmazie

der Mathematischen-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Rainer Lingg

aus Karlsruhe

- 2002 -

Dekan:

Prof. Dr. V. Leute

Erster Gutachter:

Prof. Dr. G. Blaschke

Zweiter Gutachter:

Prof. Dr. J. Boos

Tag der mündlichen Prüfung:

04.,09.,10.07.2002

Tag der Promotion:

10.07.2002

Meinen Eltern

1	Einleitung und Fragestellungen	9
1.1	Abbau von R,S-Leukovorin durch Carboxypeptidase G ₂	10
1.2	Pharmakokinetische Untersuchungen zu Methotrexat	11
1.3	Bestimmung von an Humanem Serumalbumin gebundenem Methotrexat und freiem Methotrexat mittels Kapillarelektrophorese	12
1.4	Pharmakodynamische Untersuchungen zum Metaboliten 7-OH Methotrexat gemessen mit dem Thymidylat-Synthase Inhibition Assay <i>ex-vivo</i>	12
2	Chemisch-physikalische Eigenschaften der wichtigsten verwendeten Substanzen	14
3	Verwendete Geräte, Programme und Substanzen	19
4	Abbau von R,S-Leukovorin durch Carboxypeptidase G₂	22
4.1	Einleitung und Fragestellung	22
4.1.1	Fallbericht einer Osteosarkom-Patientin	23
4.1.2	Fragestellung	26
4.2	Methoden	27
4.2.1	Herstellung der verwendeten Substanzen	27
4.2.2	Probenvorbereitung	29
4.2.3	Gerät und Trennbedingungen	29
4.3	Validierung	30
4.3.1	Peakbestimmung	30
4.3.2	Inaktivierung und Stabilität der Proben	34
4.3.3	Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten	36
4.3.4	Kalibrierung	37
4.3.5	Präzision und Richtigkeit	38
4.4	Ergebnis	39
4.5	Diskussion	43
4.5.1	Analytik	43
4.5.2	Klinische Anwendung der Carboxypeptidase G ₂	44
4.6	Schlussfolgerung für die klinische Anwendung der Carboxypeptidase G ₂	47

5	Pharmakokinetische Untersuchungen zum Methotrexat bei einer	
	Dosierung von 5 g/m²	49
5.1	Einleitung	49
5.1.1	Populationspharmakokinetik	49
5.1.2	Pharmakokinetik des Methotrexates	50
5.1.3	Pharmakokinetik des 7-OH Methotrexates	52
5.2	Protokoll	54
5.3	Patienten	55
5.4	Messmethoden	56
5.4.1	Kapillarelektrophoretische Bestimmung der Methotrexat und 7-OH Methotrexat Plasmakonzentrationen	56
5.4.2	Emit-Methotrexat-Test	57
5.5	Populationspharmakokinetik	57
5.5.1	Kinetica 2000	57
5.5.2	NONMEM	58
5.6	Ergebnisse	59
5.6.1	Deskriptive Statistik der Rohdaten	59
5.6.2	Kinetica 2000	63
5.6.3	Nonmem	71
5.7	Diskussion	78
6	Bestimmung von an Humanem Serumalbumin gebundenem	
	Methotrexat und freiem Methotrexat mittels Kapillarelektrophorese	84
6.1	Einleitung und Fragestellung	84
6.2	Methoden und Stoffeigenschaften	85
6.2.1	Methode 1: 60 mM Boratpuffer pH 10,0 mit 200 mM SDS	85
6.2.2	Methode 2: 50 mM Phosphat Puffer pH 5,0	88
6.2.3	Methode 3: 60 mM Borat Puffer pH 9,7	91
6.3	Ergebnisse der Trennversuche und Diskussion	94

7	Pharmakodynamische Untersuchungen zum Metaboliten	
	7-OH Methotrexat, gemessen mit dem Thymidylat-Synthase Inhibition	
	Assay ex-vivo	96
7.1	Einleitung und Fragestellung	96
7.2	Material und Methoden	100
7.2.1	Proben	100
7.2.2	Patientenstatistik	100
7.2.3	Versuchsdurchführung	102
7.3	Ergebnisse	106
7.3.1	Allgemein	106
7.3.2	Ergebnisse der 7-OH Methotrexat Versuchsreihen	108
7.3.3	Ergebnisse der Versuchsreihen mit Methotrexat und 7-OH Methotrexat	111
7.3.4	Weitere Ergebnisse des Thymidylat-Synthase Inhibition Assays	119
7.4	Diskussion	128
7.4.1	7-OH Methotrexat	128
7.4.2	Wechselwirkung zwischen 7-OH Methotrexat und Methotrexat	129
7.4.3	Hypothese eines Wirkmechanismus	130
7.4.4	Klinische Relevanz der Versuchsergebnisse	130
8	Zusammenfassung	132
9	Anhang	137
9.1	Abbau von R,S-Leukovorin durch Carboxypeptidase G ₂	137
9.2	Pharmakokinetische Untersuchungen zum Methotrexat bei einer Dosierung von 5 g/m ²	141
9.3	Pharmakodynamische Untersuchungen zum Metaboliten 7-OH Methotrexat, gemessen mit dem Thymidylat-Synthase Inhibition Assay ex-vivo	145
10	Abkürzungsverzeichnis	155
11	Literaturverzeichnis	158

1 **Einleitung und Fragestellungen**

Folsäureanaloga wie Methotrexat (MTX, Abbildung 1) oder Aminopterin (AMP) waren eine der ersten erfolgreich am Menschen eingesetzten Chemotherapeutika zur Behandlung von Krebs [68, 108]. Seitdem hat sich MTX als eines der wichtigsten Zytostatika im Kampf gegen kindliche Tumore [17] - insbesondere der akuten lymphatischen Leukämien [134] - etabliert, wird aber auch erfolgreich bei Tumoren der Brust und des Kopf-Nacken Bereiches [17, 72] eingesetzt.

Ausgehend von Dosierungen von $0,5 - 1 \text{ mg/m}^2$ [68] entwickelte sich in den siebziger Jahren die so genannte Hochdosistherapie (HD). Dabei werden Dosen ab $0,5 \text{ g/m}^2$ bis zu 33 g/m^2 [27] MTX eingesetzt, Mengen, die eigentlich für die Patienten hochtoxisch bis letal wären [7, 165]. Leukovorin (LV, Abbildung 4), ein Folsäure-abkömmling, dient daher als lebensnotwendiger Rescue, der zum Schutz der gesunden Körperzellen appliziert wird und die Wirkung des Hochdosis-MTX an diesen gesunden Zellen aufhebt bzw. abmildert [21, 49, 50, 132, 180]. Dabei handelt es sich bei LV um ein Diastereomerenpaar (s. S. 16). Davon besitzt ausschließlich S-Leukovorin (S-LV) pharmakologische Wirkung [80]. Es wird zur aktiven 5-Methyltetrahydrofolsäure (5-MTHF, Abbildung 6) reduziert [122] und in die Zelle aufgenommen. Intrazellulär erfolgt die Integration in den Folsäurepool und die Metabolisierung zu weiteren Folsäurederivaten. R-Leukovorin (R-LV) wird dagegen hauptsächlich unverändert renal eliminiert und gelangt nicht in die Zellen [119, 167, 168]. R-LV wird daher pharmakodynamisch keine Wirkung zugeschrieben [19].

Eine Reihe von Studien konnte zeigen, dass diese HD-Schemata mit anschließendem LV-Rescue zu Verbesserungen des Therapieergebnisses bei Osteosarkom, der akuten lymphatischen Leukämie und Lymphomen führten [7, 47, 57, 71, 72, 81, 93, 125, 145, 151]. Obwohl nur wenige Studien einen direkten Vergleich zwischen HD-MTX und einer Dosis unter 1 g/m^2 durchführten [112, 120], ist HD-MTX heute ein entscheidender Baustein in der Therapie kindlicher und juveniler Tumore.

Im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit werden vier klinisch orientierte Fragen untersucht, die weitere Erkenntnisse zur Verbesserung der Behandlung beisteuern. Dabei werden sowohl reine analytischen Fragestellungen (Kapitel 6) ebenso untersucht wie analytische Fragestellungen, die in konkreten Anwendungsempfehlungen münden (Kapitel 4). Weiterhin werden pharmakokinetische Untersuchungen, die zur weiteren Planung von Therapieschemata nützlich sind, vorgestellt und pharmakine-

tische Wechselwirkungen des MTX mit dem Metaboliten untersucht (Kapitel 5). Ergänzend werden in Kapitel 7 die pharmakodynamischen Eigenschaften des MTX Metaboliten 7-Hydroxymethotrexat (7-OH MTX, Abbildung 2) und die Wechselwirkung mit der Muttersubstanz untersucht. Dies ermöglicht eine präzisere klinische Interpretation der routinemäßig gemessenen Plasmakonzentration und ermöglicht ein Abschätzen dessen Effektes auf die Therapie.

1.1 Abbau von R,S-Leukovorin durch Carboxypeptidase G₂

Meist aufgrund nicht ausreichender intravenöser Flüssigkeitszufuhr (Hydrierung, s. S. 54) und Alkalisierung [154], manchmal aber auch unerklärlich [5], ist die Niere in seltenen Fällen bei den oben erwähnten HD-Zyklen mit der Ausscheidung des Zytostatikums und seiner Metabolite überfordert und die Clearance der Antifolate sinkt rapide ab [91, 92, 181]. Die dann verbleibenden stark erhöhten MTX-Plasmakonzentrationen stellen eine lebensbedrohende Situation für den Patienten dar. Neben der Gabe von LV und Thymidin als Supplement für die fehlenden Folsäurederivate und folsäureabhängigen Zellprodukte dient die peritoneale Dialyse, Hämodialyse und die Gabe von Aktivkohle der Senkung der MTX-Plasmakonzentration. Der erzielte Effekt dieser aufwendigen Therapien ist jedoch gering [10, 16, 85, 138].

1985 konnte mit der Gewinnung der Carboxypeptidase G₂ (CPG₂) [117, 160] aus rekombinant veränderten E. coli Bakterien ein Enzym gewonnen werden, das innerhalb weniger Minuten die MTX-Plasmakonzentration auf einen Bruchteil senkt [179]. Dabei trennt die CPG₂ als Exopeptidase den Glutaminsäureanteil des MTX ab und bildet dadurch die pharmakodynamisch unwirksame 2,4-Diamino-N¹⁰-methylpteroinsäure (DAMPA, Abbildung 4). Die Selektivität dieses Enzyms für MTX ist jedoch eingeschränkt. Nicht nur der Metabolit 7-OH MTX wird ebenfalls deglutaminiert, auch vom lebensnotwendigen LV wird die für die Wirksamkeit unabkömmliche Glutaminsäure abgespalten [160] und der Rescue damit erheblich eingeschränkt.

Wie oben erwähnt, handelt es sich bei LV um Epimere. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher die Stereoselektivität des Abbaus von R-LV und S-LV durch CPG₂ untersucht. Dazu wurde eine kapillarelektrophoretische Methode entwickelt, welche dieses Epimerenpaar und deren Abbauprodukte trennt und somit eine Aussage über

den Abbau des pharmakologisch aktiven S-LV zulässt und zur Diskussion um den klinischen Nutzen dieses Enzym beiträgt.

1.2 Pharmakokinetische Untersuchungen zu Methotrexat

Bei der wichtigsten mit MTX behandelten kindlichen Tumorentität, der akuten lymphatischen Leukämie (ALL), setzt man MTX in Dosen von 5 g/m^2 über 24 h ein. Diese HD-Therapie sollte aufgrund von vielfältigen und möglicherweise lebensbedrohenden Komplikationen nur in dafür eingerichteten Kliniken erfolgen, die unter anderem über eine etablierte und schnelle MTX-Analytik verfügen. Seit 1998 ist in der Klinik und Poliklinik für Kinderheilkunde, Fachbereich Pädiatrische Hämatologie/Onkologie in Münster neben dem routinemäßig verfügbaren Fluoreszenz-Antikörper-Assay (EMIT) eine kapillarelektrophoretische Methode etabliert, die neben den MTX-Konzentrationen auch das bei der HD-Therapie gebildete 7-OH MTX quantitativ erfasst [156].

In den Jahren 1998-2000 wurden Plasmaproben von über 60 Kindern gesammelt, gemessen und in dieser Arbeit mittels zweier populationspharmakokinetischer Methoden ausgewertet. Dabei wurde neben dem Metaboliten 7-OH MTX auch Einflüsse anderer Kovariablen wie Geschlecht und Alter auf die Pharmakokinetik untersucht. Besonderes Interesse lag weiterhin auf denen in Münster gemessenen 48 h Werten. Diese Plasmakonzentrationen erwiesen sich als statistisch signifikant gegenüber anderen Kliniken erhöht. Da es sich dabei um Werte handelt, die zur Steuerung des LV-Rescues mit herangezogen werden, kann somit möglicherweise die Wirksamkeit der Antifolat-Therapie negativ beeinflusst werden [30].

Es handelt sich hier um die erste populationpharmakokinetische Auswertung für MTX in dieser Dosierung. Zusätzlich wird erstmals der Zusammenhang der PK-Parameter mit dem Metaboliten 7-OH MTX untersucht und die Variabilität der pharmakokinetischen Parameter sowohl intra- als auch interindividuell abgeschätzt.

1.3 Bestimmung von an Humanem Serumalbumin gebundenem Methotrexat und freiem Methotrexat mittels Kapillarelektrophorese

Mit Pharmakokinetik ist die quantitative Beschreibung des Umgangs des Körpers mit dem Arzneimittel definiert. Neue pharmazeutische Ansätze versuchen dabei, die Pharmakokinetik zu beeinflussen [159] und damit eine erhöhte Wirksamkeit bei geringeren Nebenwirkungen zu erzielen. Ein wichtiger Ansatz in der Chemotherapie ist dabei die Bindung eines bereits bekannten Zytostatikums an einen Trägerstoff wie Polyethylenglykol (PEG) oder humanes Serumalbumin (HSA). Neben einer verminderten Clearance des Arzneistoffes kann dabei die erhöhte Aufnahme in tumorösen Gewebe das Ziel sein. Zur Untersuchung im Zellsystem, aber auch *in-vivo*, ist dafür eine spezielle Analytik erforderlich, die das freie Zytostatikum vom gebundenen Wirkstoff unterscheidet und zu quantifizieren ermöglicht. Für an humanes Serumalbumin gebundenes MTX (HSA-MTX) wurde in dieser Arbeit eine kapillarelektrophoretische Methode entwickelt, welche diese Anforderung erfüllt (Kapitel 6).

1.4 Pharmakodynamische Untersuchungen zum Metaboliten 7-OH Methotrexat gemessen mit dem Thymidylat-Synthase Inhibition Assay *ex-vivo*

Im Rahmen der Qualitätssicherung werden an den Universitätsklinken Münster die Plasmakonzentrationen der ALL-Patienten bei ihren MTX-Zyklen mittels Kapillarelektrophorese (Kapitel 5.4.1.1, S. 56) überwacht. Die dabei verwendeten Dosen von 5 g/m^2 MTX über 24 h sind wichtiger Teil der so genannten Hochdosistherapie.

Nur in dieser Hochdosistherapie tritt neben dem MTX auch sein Metabolit 7-OH MTX (Kapitel 2.1.1.2, S. 15) in nennenswerten Konzentrationen auf. Am Infusionsende überwiegt das MTX noch um etwa den Faktor 3. Kurz nach Infusionsende jedoch übersteigt der Metabolit die Konzentration seiner Muttersubstanz (Abbildung 58, S. 97) und erreicht während der Eliminationsphase Konzentrationen, die um etwa eine Zehnerpotenz höher liegen als die des MTX.

Die Anwendung der Kapillarelektrophorese ermöglicht im Gegensatz zum Emit-Assay die parallele Quantifizierung von MTX und 7-OH MTX bei diesen Patienten und damit eine Überwachung dieser klinischen Laborparameter.

Um eine detailliertere Interpretation der gemessenen Werte zu ermöglichen, wurde in Rahmen dieser Arbeit eine Methode etabliert, welche die Wechselwirkung zwischen MTX und 7-OH MTX auf pharmakodynamischer Ebene untersucht.

Dabei zeigen Antifolate wie das MTX keine direkte Zelltoxizität. Ihre Wirkung beruht vielmehr auf der Hemmung verschiedener Enzyme, vor allem der Dihydrofolat-Reduktase (DHFR) und der Thymidylat-Synthase (TS). Diese Enzymhemmung vermindert dabei die Bereitstellung für die Zelle überlebenswichtiger Substrate wie des Thymidins (Abbildung 61, S. 99).

Es ist daher nicht verwunderlich, dass einfache Zelltötungsassays – z.B. der MTT-Assay – nur bedingt für diese Art von Substanzen geeignet sind. Insbesondere bei *ex-vivo* Versuchen versagen diese Assays. Es wird vermutet, dass zelluläre Bausteine bei der Lyse der ersten absterbenden Zellen frei werden. Diese dienen dann den überlebenden Zellen als Rescuefaktoren (Kapitel 7.1, S. 96).

Grundlage der hier vorgestellten Methode ist daher ein indirekter Toxizitätsassay. Der so genannte Thymidylat-Synthase Inhibition Assay (TSIA) quantifiziert die Wirkung durch die Hemmung des Thymidineinbaus in der Zelle (Kapitel 7.1, S. 96). Dieser Assay ermöglicht daher, Patientenproben direkt zu messen. Ungenauigkeiten, die durch die Übertragung von Ergebnissen aus Zelllinien auf Patientenblasten entstehen, werden dadurch vermieden. Den Bezug zu weiteren klinischen Beobachtungen herzustellen wird dadurch erleichtert.

Bei unseren Untersuchungen wurden daher Patientenblasten *ex-vivo* mit 7-OH MTX allein, MTX allein und in verschiedenen Mischungsverhältnissen inkubiert und miteinander verglichen.

Im Rahmen dieser Versuchsreihen wird zum ersten Mal die pharmakodynamische Wirkung von 7-OH MTX *ex-vivo* untersucht. Auch die Interaktion zwischen Metabolit und Muttersubstanz wird erstmals in Patientenproben analysiert. Das Verwenden von Patientenproben vermindert das Risiko, falsche Interpretationen aus den Ergebnissen für die Klinik zu ziehen.

2 Chemisch-physikalische Eigenschaften der wichtigsten verwendeten Substanzen

2.1.1.1 Methotrexat

Methotrexat (MTX) ist der internationale Freiname für den Folsäure-Antagonisten 4-Amino-4-desoxy-10-methylfolsäure, auch Amethopterin genannt. Die Summenformel $C_{20}H_{22}N_8O_5$ resultiert in einer Molmasse von 454,46 g/mol. Bei MTX handelt es sich um ein gelbes bis orange-braunes, kristallines Pulver mit einem Schmelzpunkt von 182–189° C. MTX ist in Wasser praktisch unlöslich, in anorganischen Säuren sowie im alkalischen Bereich löslich. Die Lagerung sollte vor Licht und Luft geschützt erfolgen. Ebenso muss bei Dauerinfusionen über 12 h für einen ausreichenden Lichtschutz gesorgt werden [111]. MTX besteht aus einem Pteringerüst und einer daran peptidisch verknüpften L-Glutaminsäure (Abbildung 1). Im Gegensatz zur Folsäure befindet sich am C₄ der Pteroinsäure eine primäre Aminogruppe und am N₁₀ eine Methylgruppe.

Die pK_s-Werte der funktionellen Gruppen liegen bei 3,4 und 4,7 für die α- und γ-Carboxylfunktion der Glutaminsäure und bei 5,71 für das N₁ [2, 109].

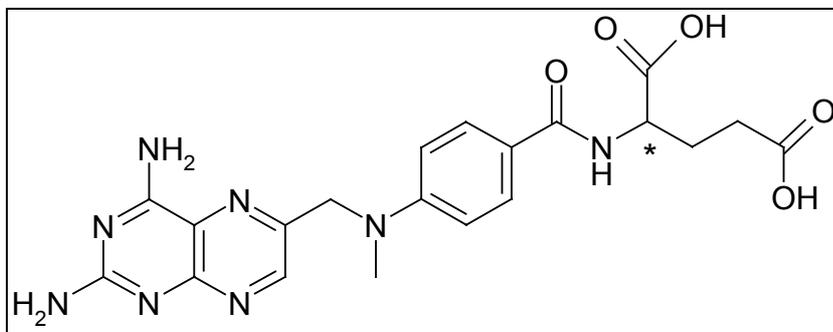


Abbildung 1: Methotrexat (MTX).

2.1.1.2 7-OH Methotrexat

Bei 7-Hydroxymethotrexat (7-OH MTX) handelt es sich um den in der Leber durch unspezifische Aldehydoxidasen [91, 99] und Xanthinoxidase [99] gebildeten Hauptmetaboliten in der Hochdosis-Chemotherapie [91]. Er unterscheidet sich von MTX durch die Hydroxylgruppe am C₇ (Abbildung 2). Dabei wird die Löslichkeit im physiologisch interessanten Bereich von pH 5 bis 7 vermutlich aufgrund intramolekularer Wasserstoffbrücken [170] deutlich erniedrigt (Tabelle 5, S. 46). Trotz fehlender direkter Wirkung auf die DHFR [69] konnte gezeigt werden, dass dieser Metabolit sowohl in Affen [91] als auch in Ratten [162, 163] Nierenversagen induzieren kann.

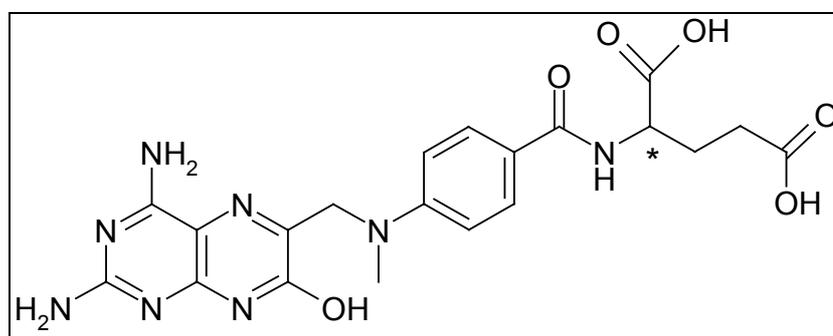


Abbildung 2: 7-Hydroxymethotrexat (7-OH MTX).

2.1.1.3 2,4 Diamino-N¹⁰-methylpteroinsäure (DAMPA)

DAMPA ist ein hauptsächlich durch Intestinalbakterien gebildetes Abbauprodukt von MTX, das nicht nennenswert im Blut der Patienten zu finden ist [52, 172]. Chemisch unterscheidet sich DAMPA vom MTX durch das Fehlen des Glutaminsäurerestes. Die Wirksamkeit auf die Dihydrofolatreduktase (DHFR) beträgt nur 1/200 des MTX [172]. Daher misst man diesem Metaboliten nur wenig Bedeutung zu. Interessant ist dagegen sein Auftreten bei der Gabe von CPG₂. Einerseits kreuzreagiert DAMPA dabei erheblich mit dem EMIT-Assay [11], weiterhin ist seine Löslichkeit – vermutlich aufgrund des fehlenden Glutaminsäuresubstituenten – weiter eingeschränkt (Tabelle 5, S. 46). DAMPA besitzt eine Molmasse von 326 g/mol.

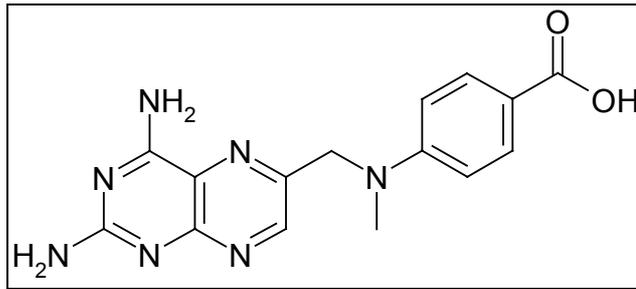


Abbildung 4: 2,4 Diamino-N¹⁰-methylpterinoinsäure (DAMPA).

2.1.1.4 Leukovorin

Bei Leukovorin (LV) handelt es sich chemisch um N-[(6R,S)-5-Formyl-5,6,7,8-tetrahydropteroyl]-L-glutaminsäure, auch 5-Formyltetrahydrofolsäure, *Citrovorum Faktor* oder Folsäure genannt.

Mit einer Summenformel $C_{20}H_{23}N_7O_7$ beträgt das entsprechende Molgewicht des LV 473,45 g/mol. LV kommt in verschiedenen Mikroorganismen vor, für die LV ein Wachstumsfaktor darstellt, so z.B. für das Milchsäurebakterium *Leuconostoc citrovorum*, weshalb LV auch als Citrovorum-Faktor bezeichnet wurde. LV tritt als aktiver C-1-Körper und Überträger der Formylgruppen im Stoffwechsel der Folsäureabkömmlinge auf. Das Calciumsalz des auch synthetisch zugänglichen LV findet therapeutische Verwendung als Antidot gegen Folsäure-Antagonisten [142]. Dabei muss es nach *in-vitro* Studien an Zelllinien spätestens 24 h nach MTX Gabe appliziert werden [34].

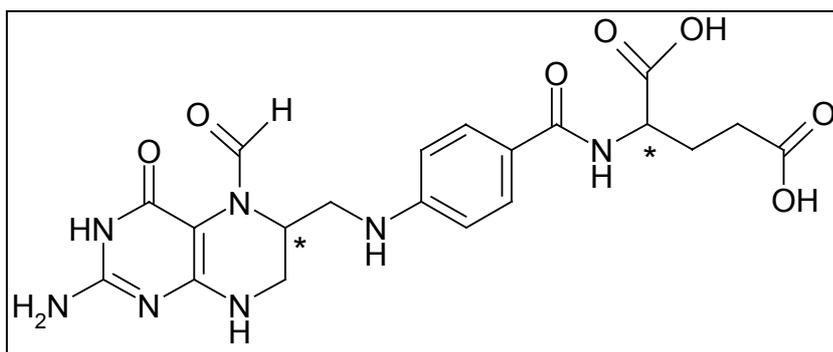


Abbildung 4: Leukovorin (LV). Der Glutaminsäurerest ist als Abkömmling einer natürlichen Aminosäure S-konfiguriert.

LV besitzt zwei Chiralitätszentren. Es handelt sich daher um ein Diastereomerenpaar [19, 20, 22]. Als Abkömmling der Folsäure ist dabei ein Chiralitätszentrum als

Teil der Glutaminsäure immer S- konfiguriert. Der asymmetrisch substituierte Kohlenstoff C₆ - als Teil des Pteridinrings – kommt sowohl in S- als auch R- Konfiguration vor, es handelt sich also um Epimere. Kommerziell erhältliche Produkte enthalten gleiche Mengen dieser Epimere. Dabei zeigt nur S-LV pharmakologische Aktivität, indem es rasch im Blut zum aktiven 5-MTFH (Abbildung 6) metabolisiert wird [19, 20]. L-LV wird unverändert vorwiegend renal eliminiert und zeigt keine pharmakodynamische Aktivität [119, 168].

Die pK_a Werte des LV betragen 3,1, 4,8, und 10,6 [168].

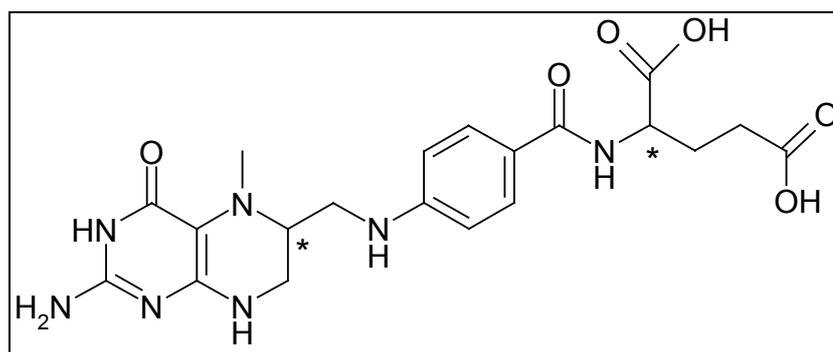


Abbildung 6: 5-Methyltetrahydrofolsäure (5-MTHF).

2.1.1.5 Carboxypeptidase G₂ (CPG₂)

Die Metall-Carboxypeptidase CPG₂ gehört zu der Substanzklasse der Carboxypeptidase G. Enzyme dieser Gruppe spalten C-terminale Glutaminsäure-reste von Folsäure und strukturell ähnlichen Substanzen enzymatisch ab. Es handelt sich bei der CPG₂ um ein 2 x 42 kD schweres Protein, das Zn²⁺ als Cofaktor zur Enzymfunktion benötigt. Das Aktivitätsmaximum für die Exopeptidaseaktivität liegt im pH-Bereich von 7,0 bis 7,5. Der isoelektrische Punkt beträgt pH 7,8. Eine Einheit CPG₂ wird dabei definiert als die Menge CPG₂, die benötigt wird, um 1 µM MTX pro Minute und ml Reaktionslösung abzubauen. Die Reaktionslösung besteht aus 100 µmol Tris/HCl; 60 nmol MTX und 260 nmol ZnCl₂ pro ml. Die Umsetzung erfolgt bei 37° C und wurde bei 320 nm mit einem Absorptionskoeffizienten von 8300 l/mol/cm gemessen [114, 160].

2.1.1.6 Serumalbumin

Bei den Albuminen handelt es sich mit etwa 60 % des Gesamteiweißes um die größte Gruppe von Proteinen im Plasma. Die Albumine unterscheiden sich durch ihre Löslichkeit in elektrolytfreiem Wasser von den sie begleitenden Globulinen. Im

Vergleich zu den erwähnten Globulinen besitzen Albumine niedrigere Molmassen (um 69000 g/mol) und sind erst durch relativ hohe Salzkonzentrationen ausfällbar. Albumine sind reich an negativ geladenen Aminosäuren (Glutamin- u. Asparaginsäure) sowie an Leucin u. Isoleucin, wohingegen Glycin nur gering vertreten ist. Der isoelektrische Punkt liegt bei 5,9. Albuminlösungen werden medizinisch bei Schockzuständen, Eiweiß- und Blutverlusten infundiert. Die Halbwertszeit beträgt dann etwa 10 Tage. Radioaktiv mit ^{131}I markiertes Albumin wird in der Radiodiagnostik eingesetzt [142].

Als pharmakodynamisch neutraler Träger für Arzneistoffe wird zumeist humanes Serumalbumin (HSA) eingesetzt. MTX kann dabei durch die α - oder γ -Carbonsäuregruppe der Glutaminsäure an das HSA kovalent gebunden sein.

3 *Verwendete Geräte, Programme und Substanzen*

Geräte

Tabelle 1: Verwendete Geräte.

Gerät	Typ	Firma
Analytische Waage	Sartorius Waage BP 210 S	Sartorius AG
pH Meter	pH 530	WTW
Abblaseeinrichtung		Supelco
Ultraschallbad	Sonorex TK 20	Bandelin Elektronik
Schüttler	Vortex Genie 2	Bender & Hobein, Zürich
Kühlzentrifuge	Centrifuge 5417 R	Eppendorf
Wasseraufbereitungsanlage	Mill-Q	Millipore
Elektrophoresegerät 1	System P/ACE 5510	Beckman
Elektrophoresegerät 2	System P/ACE 5010	Beckman
Elektrophoresegerät 3	Biorad Focus 3100	Biorad
Kapillare	Agilent Bubble Cell	Agilent

Substanzen

Tabelle 2: Liste der verwendeten Substanzen.

Substanz	Abkürzung	Quelle	CAS-Nr.
Methotrexat	MTX	Sigma	59052
7-Hydroxymethotrexat	7-OH MTX	Schircks	86245
4-Deoxy-4-amino-N10-methylpteroinsäure	DAMPA	Sigma	19741141
5-Methyltetrahydrofolsäure	5-MTHF	Sigma	68703913
Leukovorin	LV	Sigma	6035456
S-Leukovorin	S-LV	Zamban, It.	AM: Folaxin
Aminopterin	als Interner Standard IS	Sigma	54626
Carboxypeptidase G ₂	CPG ₂	CAMR, Salzburg, GB	AM : Lot 003 Oct. 1991
Acetonitril	ACN	Roth	75058
2,6-Dimethyl-β-Cyclodextrin	DM-β-CD	Sigma	51166-713
Natriumdodecylsulfat	SDS	Sigma	151213
Harnstoff	Urea	Roth	57136
β-Hydroxypropyl-Cyclodextrin	β-HPCD	Fluka	136019120
γ-Cyclodextrin	γ-CD	Wacker Chemie	17465860
Natriumdihydrogenphosphat	Na ₂ HPO ₄ *2 H ₂ O	Merck	75588058
Dinatriumhydrogenphosphat	Na ₂ HPO ₄ *1 H ₂ O	Merck	7558794
Zinkchlorid	ZnCl ₂	Sigma	7646857
2-Amino-2-hydroxyethyl-1,3-propandiol	Tris	Merck	

Programme

Tabelle 3: Verwendete Programme.

Softwareprogramm	Version	Hersteller
SigmaStat	Version 2.03	SPSS Inc.
SigmaPlot	Version 5	SPSS Inc.
Kinetica	Version 4.00	Inna Phase Corporation
NonMem	Version 5.0	NonMem Project Group, University of California, S.F.
Fortran Compiler	Fortran 90 V 4.0	Lahey
Topfit	Version 2.0	Thomae
Excel	als Teil von MS Office 2000	Microsoft
Rechner	Celeron Pro	Intel

4 *Abbau von R,S-Leukovorin durch Carboxypeptidase G₂*

4.1 Einleitung und Fragestellung

Mit der zunehmenden Bedeutung von MTX in der Tumorthherapie stieg auch das Interesse, neue Wege zu finden, um in den Folsäurestoffwechsel einzugreifen und damit eine tumorhemmende Wirkung zu erzielen. *Levy et al.* gelang 1967 die Synthese einer neuen Gruppe von Peptidasen, den Carboxypeptidasen G [78]. Diese Exopeptidasen spalten enzymatisch den für die Wirksamkeit wichtigen Glutaminsäureanteil der reduzierten Folate und Antifolate ab [107] und bieten somit die gesuchte Möglichkeit, den Folsäurestoffwechsel zu hemmen.

Mit der Carboxypeptidase G₁ konnten *McCullough et al.* 1971 eine Metall-Carboxypeptidase gewinnen, die etwa gleich schnell Folsäure, Leukovorin, MTX und Aminopterin abbaut [114]. In Zellversuchen zeigt diese Carboxypeptidase jedoch nur eine geringe Hemmung des Tumorwachstums [42, 100]. Erste Untersuchungen am Menschen wiesen dabei schon auf die Einsatzmöglichkeiten der Carboxypeptidase als Notfallmedikament in der Antifolattherapie hin. Schlussendlich ging der Bakterienstamm zur Gewinnung der CPG₁ jedoch verloren, so dass diese Carboxypeptidase nicht mehr zur Verfügung steht [105].

Erst die Gewinnung der CPG₂ aus rekombinant veränderter *E. coli* Keimen [117, 160] im Jahre 1983 führte zur erweiterten klinischen Anwendung. Im Mittelpunkt steht seitdem die Verwendung der CPG₂ als Notfallmedikament in der HD-MTX Therapie. Die unterschiedlichen K_M-Werte für Folsäure (K_M = 4 µM), 5-MTHF (K_M = 34 µM), MTX (K_M = 8 µM) und LV (K_M = 120 µM) [160] ermöglichen den schnellen Abbau stark erhöhter und somit lebensbedrohende MTX-Werte innerhalb weniger Minuten [179]. Untersuchungen an Rhesus-Affen konnten die Effektivität des MTX-Abbaus *in-vivo* durch dieses Enzyms belegen [8]. Die MTX-Konzentrationen der drei mit CPG₂ behandelten Affen lag 15 min nach Gabe des Enzyms um zwei Zehnerpotenzen niedriger als die der Kontrollgruppe. Auch am Menschen konnte die Effektivität des Enzyms gezeigt werden [179].

Adamson et al. untersuchten die Kinetik des Enzyms an zwei Rhesus-Affen. Nach einer Bolusgabe von 50 U/kg CPG₂ konnte die Elimination mit einem linearen

1-Kompartiment Modell beschrieben werden. Das Enzym zeigte eine HWZ von 55 min in dieser Versuchsreihe [8]. Über das Verteilungsvolumen wird keine Angabe gemacht. Über $V = m/c$ bei einer Bolusgabe kann ein Verteilungsvolumen von 25 ml/kg^1 abgeschätzt werden. Dies entspricht in der Größenordnung dem Blutplasmavolumen.

Die klinische Wirksamkeit und Problematik der Anwendung der CPG₂ soll im folgenden Abschnitt am Beispiel einer Osteosarkom-Patientin, die im Rahmen einer renalen Ausscheidungsstörung stark erhöhte MTX-Plasmakonzentrationen zeigte, erläutert werden.

4.1.1 Fallbericht einer Osteosarkom-Patientin

Die 15 jährige Osteosarkom-Patientin erhielt in ihrer 18. Therapiewoche protokollgemäß 12 g/m^2 MTX als 4 h Infusion. Dies entspricht bei einer Körperoberfläche (KOF) von $1,46 \text{ m}^2$ $17,5 \text{ g}$ MTX. Der Kreatininwert als Maß für die Nierenfunktion war eine Woche vorher bestimmt worden und zeigte mit $0,7 \text{ mg/dl}$ keine Anzeichen eines Nierenschadens. Die 4 h Infusion verlief unauffällig. Überraschenderweise zeigte sich am Infusionsende eine MTX-Konzentration, die mit $200 \text{ }\mu\text{M}$ weit unterhalb der Konzentration einer Vergleichspopulation auf Basis der Daten von *Graf et al.* [81] von $1340 \text{ }\mu\text{M}$ lag (Tabelle 24, S. 143). Die folgende routinemäßig mit der CE gemessene 24 h Plasmakonzentration zeigte allerdings bereits einen Wert, der mit $238 \text{ }\mu\text{M}$ (Tabelle 21, S. 137) deutlich erhöht war.

¹ Aus der Grafik wurde $c(t_0)$ von etwa 2 U/ml abgelesen. Die Bolusgabe betrug wie oben erwähnt 50 U/kg .

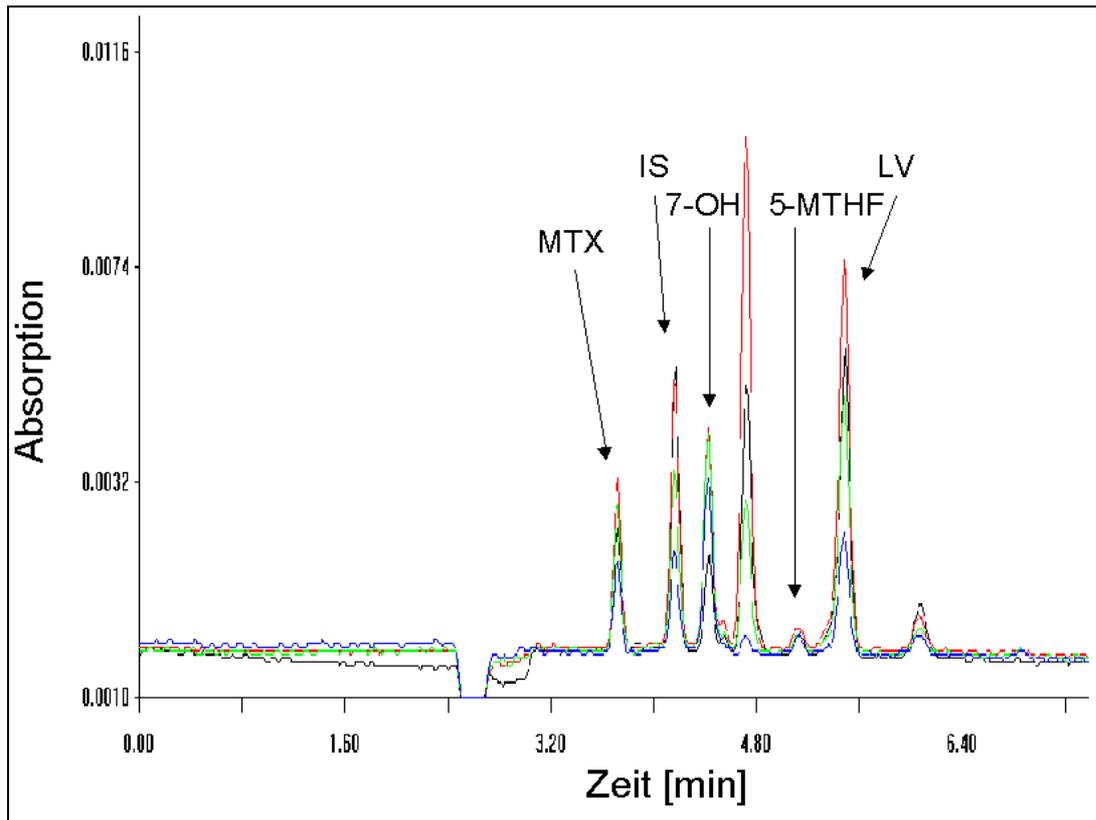


Abbildung 6: Elektropherogramm einer Plasmaprobe einer Osteosarkom-Patientin unmittelbar vor CPG₂-Gabe (—: 270 nm; —: 300 nm; —: 310 nm; —: 320 nm).

Die weiteren engmaschig kontrollierten MTX-Plasmakonzentrationen sanken bedeutend langsamer als üblich (Abbildung 8, S. 26). Daher entschied man sich zur Stunde 54 für die Gabe von 2000 U CPG₂. Dies entspricht etwa der empfohlenen Dosis von 50 U/kg. Abbildung 6 zeigt das Elektropherogramm (Methode nach Sczesny [156]; Kapitel 5.4.1, S. 56) der Plasmaprobe dieser Patientin unmittelbar vor CPG₂-Gabe. Die Peaks lassen sich durch die Migrationszeiten, deren Reihenfolge und den vier gleichzeitig gemessenen Wellenlängen (schwarz: 270 nm; rot: 300 nm; grün: 310 nm und blau: 320 nm) zu den entsprechenden Substanzen zuordnen. Die hohen MTX-Plasmakonzentrationen zeigen sich durch einen Peak bei etwa 3,6 min.

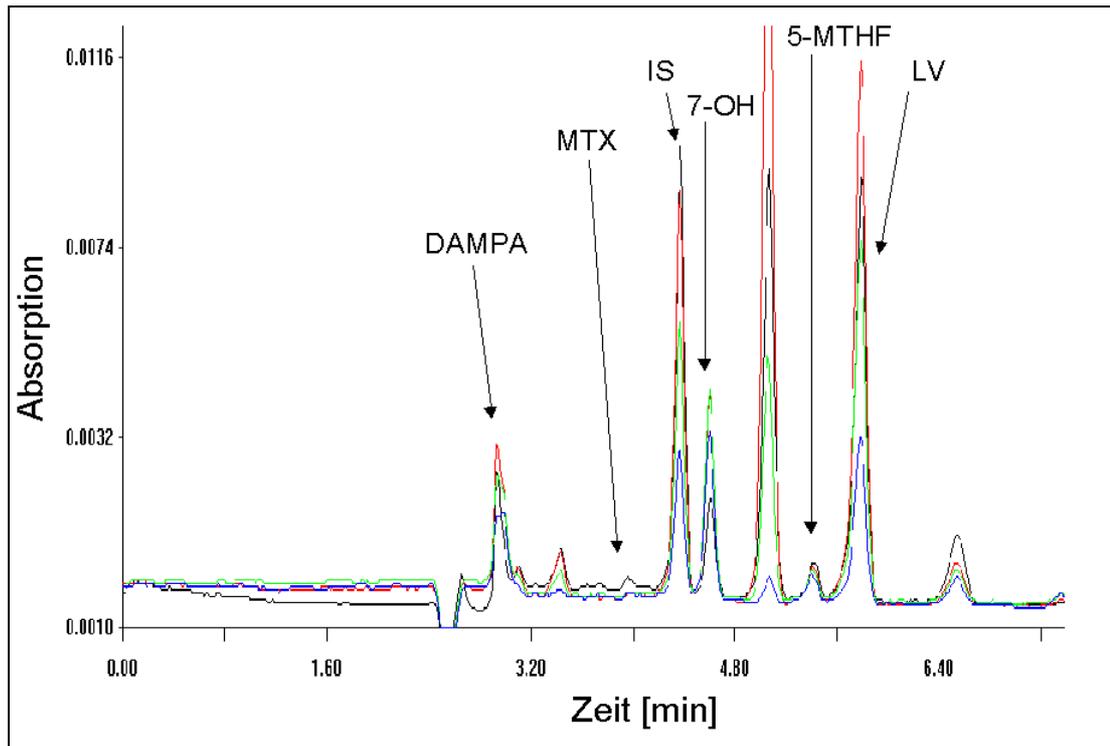


Abbildung 7: Elektropherogramm einer Plasmaprobe einer Osteosarkom-Patientin unmittelbar nach CPG₂-Gabe (50 U/kg) (—: 270 nm; —: 300 nm; —: 310 nm; —: 320 nm).

Abbildung 7 zeigt das Elektropherogramm dieser Patientin unmittelbar nach Gabe von 2000 U CPG₂. Der in Abbildung 6 klar erkennbare MTX-Peak liegt in Abbildung 7 unterhalb der Bestimmungsgrenze von 5 µM. Zusätzliche Peaks werden bei etwa 3,10 min sichtbar (vgl. [156]), dabei handelt es sich um die um eine Glutaminsäure verkürzten Abbauprodukte der Folsäurederivate, hauptsächlich das von MTX abgeleitete DAMPA (s. S. 15). Da die Ladung der bei pH 5,9 ionisierten Glutaminsäure fehlt, wandern diese Metabolite verstärkt mit dem elektroosmotischen Fluss (EOF), wodurch sich die Migrationszeiten verkürzen.

Abbildung 8 zeigt den Plasmakonzentrationszeitverlauf dieser Patientin. Die schwarze Linie zeigt den berechneten Normalverlauf dieser Werte, beruhend auf den von *Graf et al.* veröffentlichten Daten [81] als Vergleich. Die mit dem Emit-Assay gemessenen MTX-Werte sind aufgrund der Kreuzreaktivität mit dem im Normalfall nicht erscheinenden DAMPA gegenüber den CE-Werten falsch erhöht. Die CE beweist hierbei den Wert dieser Analytik in klinisch seltenen, aber sehr gefährlichen Situationen.

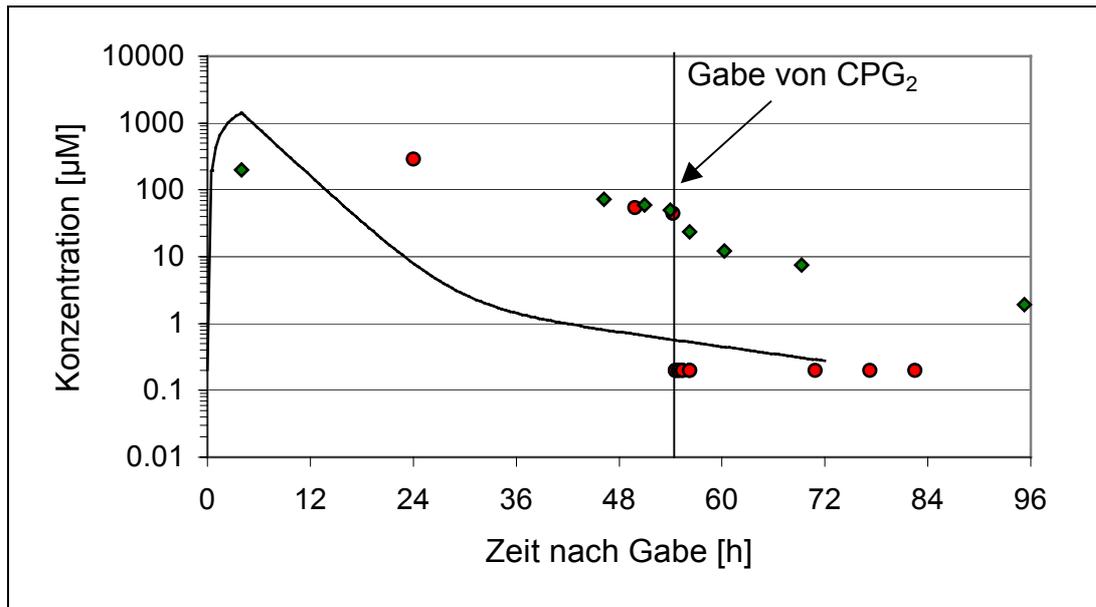


Abbildung 8: Plasmakonzentrationen einer Patientin bei Gabe von CPG₂ (●: MTX-Werte mittels CE gemessen; ◆: MTX gemessen mit dem Emit-Assay) gegenüber den Werten einer vergleichbaren Population [81] (schwarze Linie: Normalverlauf mit Mittelwerten).

4.1.2 Fragestellung

Als Vorteil der CPG₂ gegenüber der CPG₁ und theoretische Grundlage für die Anwendung der CPG₂ als Notfallmedikament gelten die stark unterschiedlichen K_M -Werte des Antifolates MTX gegenüber dem LV-Rescue [160]. Der K_M -Wert für MTX wird dabei mit 8,0 µM angegeben, während der K_M -Wert des LV auf 120 µM bestimmt wurde. Weiterhin scheint das Allergisierungspotential der CPG₂ aufgrund der rekombinanten Herstellung gegenüber ihrer Vorgängerin reduziert [6].

Wie in Kapitel 2.1.1.4 auf S. 16 beschrieben wurde, handelt es sich bei LV um Enantiomere. Aufgrund der Stereoselektivität vieler Enzyme kann nicht von einem equimolaren Abbau des S- und des R-LV ausgegangen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher eine stereoselektive kapillarelektrophoretische Methode entwickelt, welche die beiden Diastereomere und deren Abbauprodukte trennt und somit einen Rückschluss auf den tatsächlich vorhandenen lebensnotwendigen Rescue für die Patienten zulässt.

Diese Untersuchung leistet einen Beitrag in der Diskussion um die CPG₂ und dient damit unmittelbar den Patienten, insbesondere in Anbetracht der immer weiter verbreiteten Anwendung der CPG₂ [105].

4.2 Methoden

4.2.1 Herstellung der verwendeten Substanzen

4.2.1.1 LV-Stammlösung

100 mg R,S-LV wurde in einen 100 ml Messkolben eingewogen und mit unten erwähntem Tris-Puffer aufgefüllt. Daraus wurde eine 554 µM Lösung (Endkonzentration der beiden Epimeren nach Zugabe von 1/10 CPG₂-Lösung jeweils 250 µM) hergestellt. 2,62 ml wurden mit Tris-Puffer ad 10 ml im Messkolben aufgefüllt.

2 x 15 ml der oben hergestellten Stammlösung (1 g/l) wurden vor Licht geschützt bei -20° C gelagert. Verdünnte Lösungen wurden in Mengen um 10 ml zum täglichen Arbeiten etwa eine Woche lang verwendet und anschließend verworfen. Während dieser Zeit wurden sie im Kühlschrank bei -4° C aufbewahrt.

4.2.1.2 Tris-Puffer

26,8 mg ZnCl₂ und 12,2 g Tris wurden in ein 1 l Messkolben eingewogen. Mit Aqua pur. wurde auf 1 l aufgefüllt und die Substanzen mittels eines Magnetrührers gelöst. Anschließend erfolgte mit 1 mM H₃PO₄ die Einstellung des Puffers auf pH 7,3.

4.2.1.3 CPG₂-Lösung

Ein Vial mit 1000 U CPG₂ wurde mit 2,5 ml Tris-Puffer aufgelöst und etwa 10 min ins Ultraschallbad gestellt. 500 µl dieser Lösung wurden mit Tris-Puffer zu einem Gesamtvolumen von 20 ml aufgefüllt. Diese Lösung enthielt damit 10 U/ml CPG₂.

4.2.1.4 Phosphat-Puffer

Die Einstellung von 10 ml 90 mM NaH₂PO₄ auf pH 7,0 erfolgte mit 90 mM Na₂HPO₄. Dieser Puffer wurde täglich frisch hergestellt.

Der Laufpuffer selbst enthielt zusätzlich 50 mM DM-β-CD zur chiralen Trennung. 5 ml des oben hergestellten Phosphatpuffers wurde mit 380 mg DM-β-CD versetzt. Der Puffer wurde gerührt und für mindestens 15 min ins Ultraschallbad gestellt. Der Puffer wurde täglich durch einen Sterilfilter mit 0,45 µm Durchmesser filtriert und jede Woche neu angesetzt.

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Dimethyl- β -Cyclodextrin handelt es sich um Heptakis-(2,6-di-O-methyl)- β -cyclodextrin (Dimeb; DM- β -CD) mit einem Schmelzpunkt von 298-310° C. Aus der Summenformel C₆₄H₁₁₂O₄₀ ergibt sich eine Molekülmasse von 1521 g/mol.

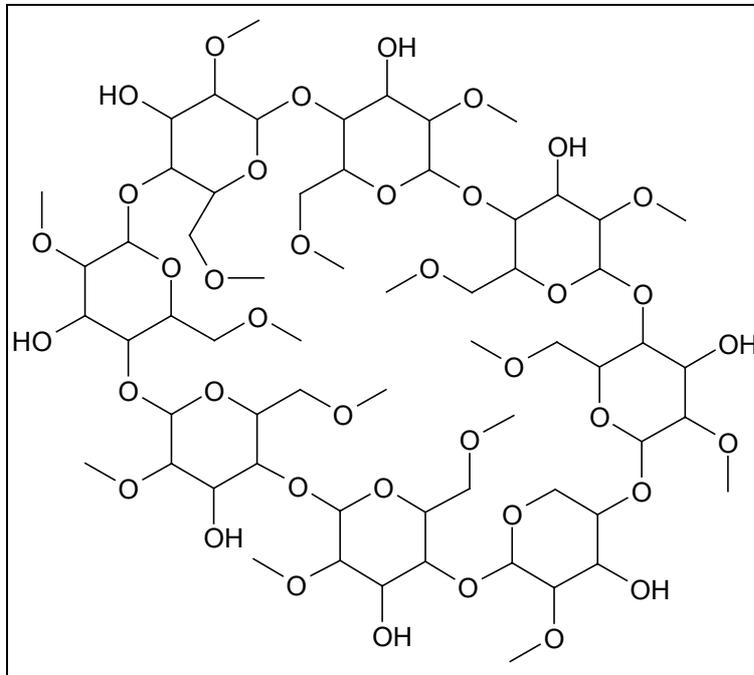


Abbildung 9: 2,6-Dimethyl- β -Cyclodextrin (DM- β -CD).

Cyclodextrine enthalten in ihrem Kristallgitter Cyclohexa-(-hepta-, -octa-)amylosen, die so aufeinander geschichtet sind, dass sie durchgehende innermolekulare Kanäle bilden, in denen sie hydrophobe Gastmoleküle, in wechselnden Mengen bis zur Sättigung einschließen können („molekulare Verkapselung“). Bekannteste Einschlussverbindung ist α -Cyclodextrin mit Iod, die blau gefärbt ist und in der die Iod-Atome perlschnurartig in den Kanälen angeordnet sind. Cyclodextrine werden aufgrund dieser Eigenschaften zur Fertigung von Nahrungsmitteln, Kosmetika, Pharmazeutika u. Pestiziden sowie zur Festphasenextraktion eingesetzt. Durch ihre Wechselwirkungen mit chiralen Molekülen eignen sie sich als chirale Selektoren [142].

4.2.1.5 *Interner Standard*

Als interner Standard wurde Aminopterin in einer Konzentration von etwa 0,1 g/l verwendet. Die Substanz wurde abgewogen und in einem 100 ml Messkolben mit Aqua pur. aufgefüllt.

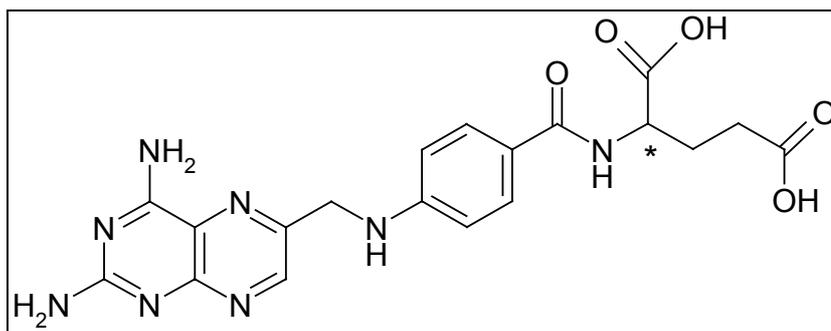


Abbildung 10: Aminopterin (AMP).

4.2.2 Probenvorbereitung

500 µl der zu untersuchenden LV-Lösung wurden aus dem Kühlschrank (4° C) mind. 30 min vor Inkubationsbeginn mittels eines schüttelnden Thermostatblocks auf 37° C erwärmt. Währenddessen wurde für jede Zeitentnahme, jede Kalibration und Richtigkeitskontrolle ein 2 ml Eppendorf-Gefäß vorbereitet. In diese pipettierte man 50 µl eiskaltes ACN und 20 µl der Aminopterin-Lösung als IS. Die Gefäße wurden verschlossen und auf Eis gestellt. Unmittelbar vor Beginn des Abbaus erfolgte die Entnahme von 50 µl LV-Lösung als 0 min Wert, die in das entsprechende Eppendorf Gefäß abgefüllt wurde. Zum Zeitpunkt t_0 wurden dann 50 µl, der ebenfalls auf 37° C erwärmten 10 U/ml CPG₂-Lösung zugegeben (Endkonzentration 1 U/ml) und somit der enzymatische Abbau des LV gestartet. Zu den gewünschten Zeitpunkten wurden 50 µl der Lösung entnommen und in das jeweilige auf Eis stehende Eppendorf-Gefäß pipettiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation der Probengefäße für 10 min (4° C; 15000 rpm). 35 µl des Überstandes wurden zur Analyse in ein CE-Vial abgefüllt.

4.2.3 Gerät und Trennbedingungen

Die oben gewonnenen Proben wurden mit Hilfe eines Beckman System P/ACE 5510 oder P/ACE 5010 analysiert. Zur Trennung wurde eine 20/26,8 cm lange Kapillare mit erweitertem Detektionsfenster verwendet. Der Durchmesser betrug 50 µm. Die Konditionierung erfolgte vor jedem Lauf durch Spülen der Kapillare 2 min mit NaOH, 2 min mit Laufpuffer ohne Zusatz von DM-β-CD und anschließend 30 sec mit Laufpuffer, der 50 mM DM-β-CD enthält. Die Trennung erfolgte bei normaler Polung (Kathode an der Detektorseite) und einer angelegten Spannung von 8 kV. Die resultierende Stromstärke betrug bei dem verwendeten 90 mM Phosphat-

puffer mit 50 mM DM- β -CD etwa 60 μ A. Der Puffer wurde für bis zu 7 Läufe verwendet und dann erneuert.

Zur Detektion wurde entweder ein Diodenarray Spektrum von 220 bis 330 nm aufgenommen oder die UV-Absorption bei 300 nm mittels eines UV-VIS Detektors gemessen.

Die Injektion der Probe erfolgte im hohen Konzentrationsbereich (Abbau von 250 μ M LV) für 6 s bzw. im niedrigen Konzentrationsbereich (Abbau von 30 μ M) 10 s mit jeweils 3448 Pa.

4.3 Validierung

4.3.1 Peakbestimmung

Die Peakzuordnung erfolgte durch Zumischung des S-LV direkt bzw. nach 10 min Abbau durch die CPG₂ zu den entsprechenden Lösungen der Epimere. Abbildung 11 zeigt die Zumischung von S-LV (rot) zu dem Epimerengemisch R- und S-LV. Wie zu erwarten sind die korrigierten Peakflächen (kA) der beiden Epimere mit $kA_{R-LV} = 1964$ und $kA_{S-LV} = 1936$ im ersten Lauf (rot) praktisch gleich. Da keine CPG₂ zugesetzt wurde, treten hierbei keine Abbauprodukte auf.

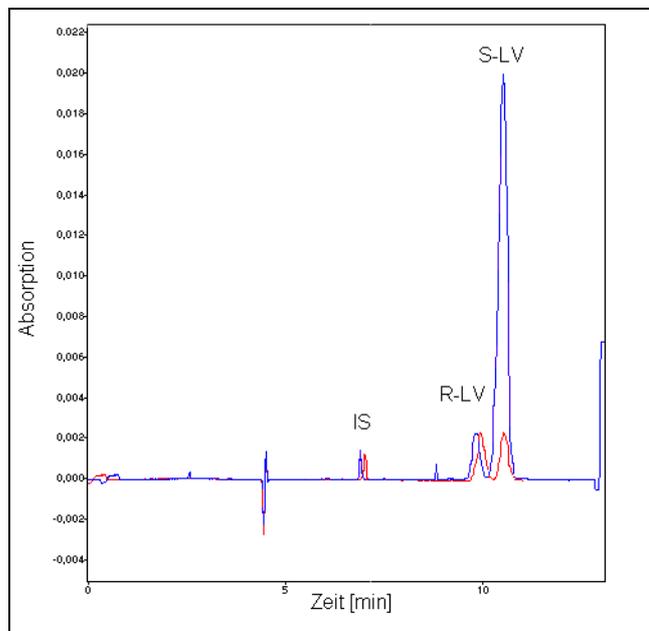


Abbildung 11: Elektropherogramme der Epimere S-LV und R-LV (rot) und Zumischung von S-LV zu diesem Gemisch (blau).

Zur weiteren Identifizierung wurden Dioden-Array Spektren im Bereich von 220 bis 330 nm aufgenommen. Für R-LV (Abbildung 12) konnten zwei Maxima bei 292 und 224 nm, sowie ein Minimum bei 248 nm ermittelt werden. S-LV (Abbildung 13) zeigt das gleiche Spektrum. Diese liegen für die Maxima bei 293 nm und 225 nm und für das Minimum bei 248 nm. Auch die grafische Betrachtung zeigt die Übereinstimmung der UV-Spektren der beiden Diastereomere untereinander und mit der Literatur [79].

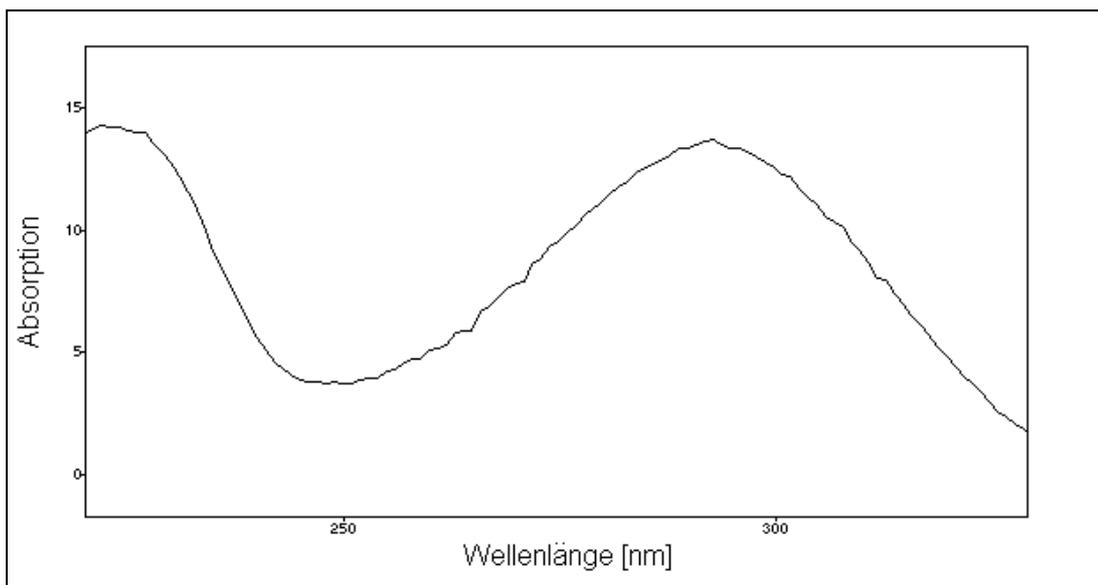


Abbildung 12: UV-Spektrum von R-LV im Bereich von 220 nm bis 330 nm mit Maxima bei 224 nm und 292 nm.

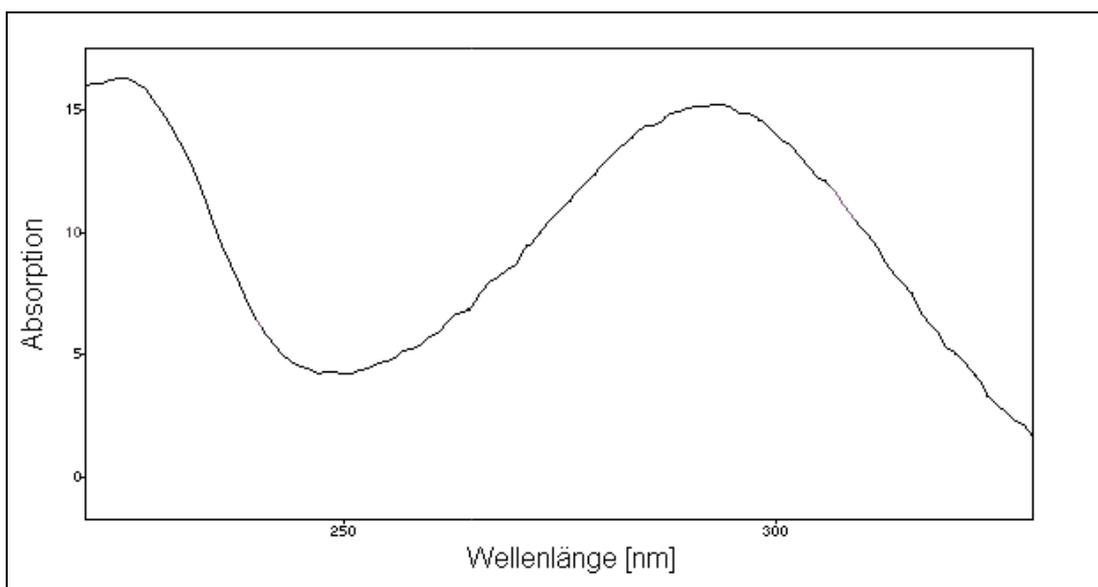


Abbildung 13: UV-Spektrum des S-LV im Bereich von 220 nm bis 330 nm mit Maxima bei 225 nm und 293 nm.

Nach 16 min Abbau (rot) von R,S-LV durch CPG₂ zeigen sich in Abbildung 14 neben den beiden Epimeren auch die um die Glutaminsäurereste verkürzten Abbauprodukte (Abbildung 15). Dabei handelt es sich um die beiden Enantiomere der N-(6R,S)-5-Formyl-5,6,7,8-tetrahydropterinsäuren (FTHPA). Die Zumischung von S-LV, das ebenfalls mit CPG₂ abgebaut wurde zeigt, dass es sich bei den beiden später auftretenden Peaks um S-LV bzw. seinen Abkömmling (in Abbildung 14 als S-FTHPA bezeichnet) handelt (Abbildung 14, blau).

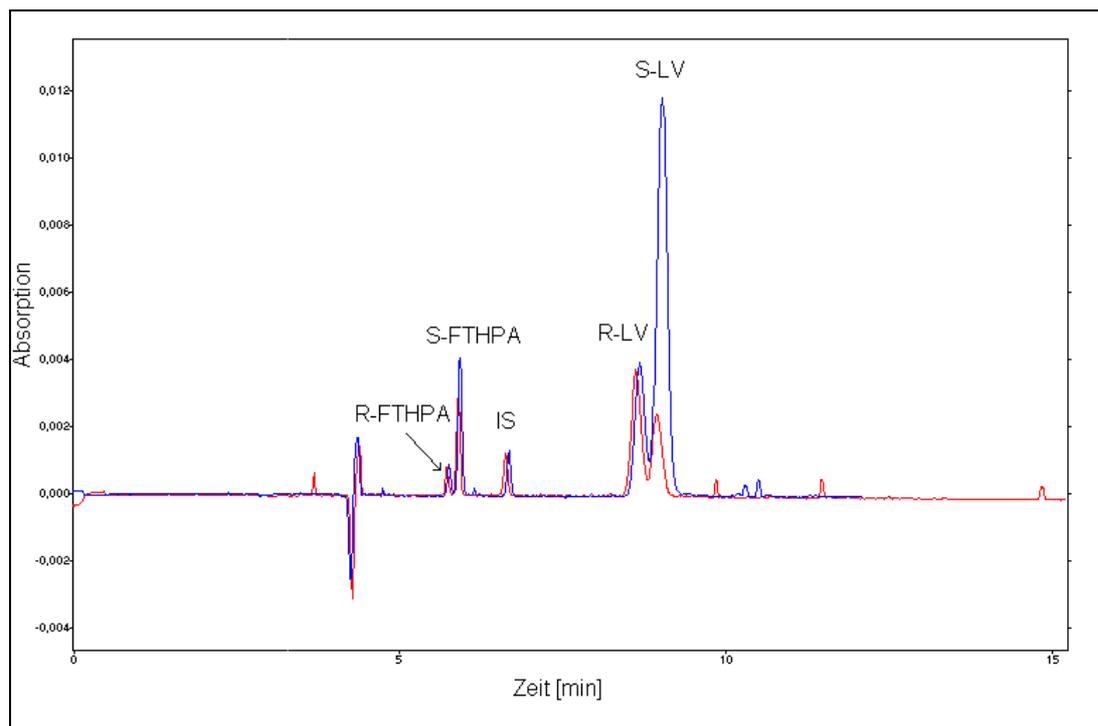


Abbildung 14: Elektropherogramm der Zumischung von 16 min abgebautem S-LV (blau, Druckinjektion 6 s bei 3448 Pa) zu R,S-LV (rot, Druckinjektion bei 10 s bei 3448 Pa). Neben R- und S-Leukovorin sind die beiden Abbauprodukte N-(6R,S)-5-Formyl-5,6,7,8-tetrahydropterinsäuren (R-FTHPA bzw. S-FTHPA) und der interne Standard Aminopterin sichtbar.

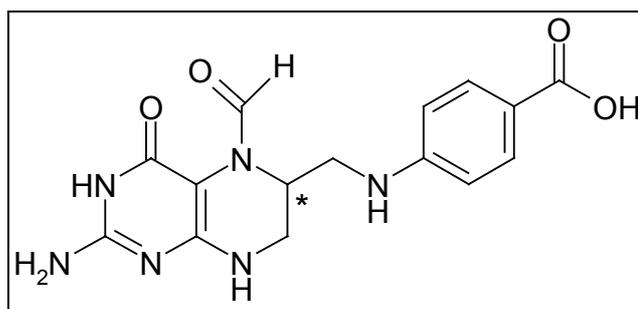


Abbildung 15: N-(6R,S)-5-Formyl-5,6,7,8-tetrahydropterinsäure (6R,S-FTHPA).

Die beiden Abbauprodukte wurden mittels DAD untersucht. Als Enantiomere dürfen sie sich in ihren UV-Spektren nicht unterscheiden.

Abbildung 16 zeigt das Spektrum der N-(6R)-5-Formyl-5,6,7,8-tetrahydropterinsäure im Bereich von 220 nm bis 330 nm. Darin sind zwei Maxima bei 226 nm und 289 nm zu erkennen. Weiterhin zeigt sich ein Extinktionsminimum bei 246 nm. Das Spektrum entspricht dem in Abbildung 17 gezeigten Spektrum von N-(6S)-5-Formyl-5,6,7,8-tetrahydropterinsäure. Die Maxima liegen bei 288 nm und 225 nm, das Minimum bei 247 nm. Insgesamt ist bei beiden Spektren die nahe Verwandtschaft zu den Spektren der Muttersubstanzen zu erkennen, da das für die UV-Absorption verantwortliche konjugierte π -Elektronensystem des Pteridinrings von der abgespaltenen Glutaminsäure (vgl. Strukturformel in Abbildung 4, S. 14 und Abbildung 15, S. 32) nur wenig beeinflusst wird.

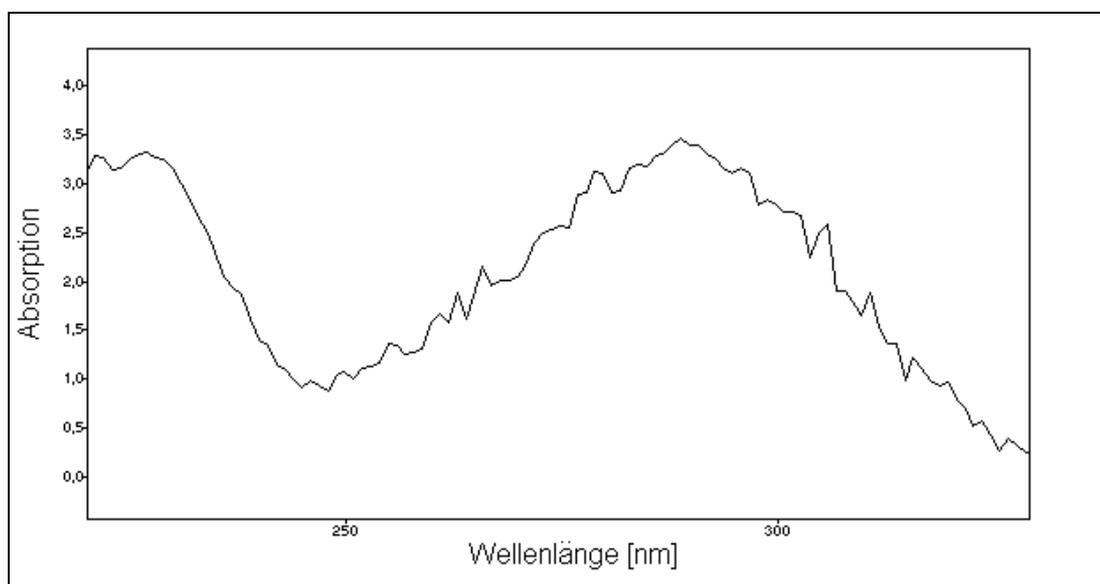


Abbildung 16: UV-Spektrum der N-(6R)-5-Formyl-5,6,7,8-tetrahydropterinsäure im Bereich von 220 nm bis 330 nm.

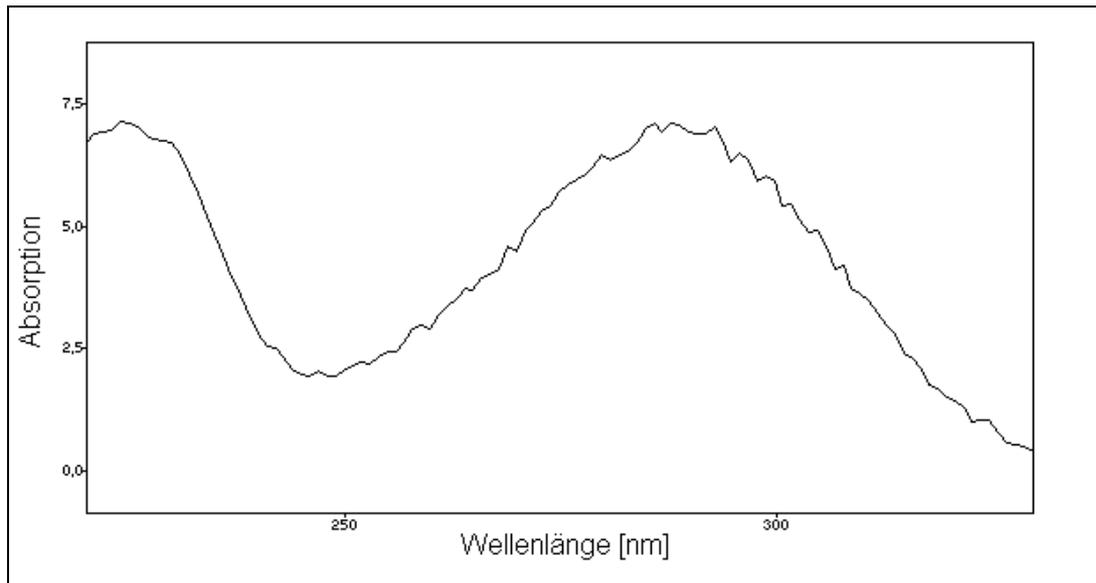


Abbildung 17: UV-Spektrum der N-(6S)-5-Formyl-5,6,7,8-tetrahydropteroinsäure im Bereich von 220 nm bis 330 nm.

4.3.2 Inaktivierung und Stabilität der Proben

Zur Bestimmung des Abbaus muss ausgeschlossen werden, dass nach Ablauf der gewünschten Reaktionszeit eine weitere Umsetzung der Folate und Antifolate durch die CPG₂ stattfindet. Nach *Widemann et al.* wird der Plasmaprobe ein Zehntel des Probenvolumens an 1 N HCl zugesetzt [178]. Die Zugabe der Säure führte in dieser Versuchsreihe jedoch zu keiner vollständigen Inaktivierung der CPG₂ und führte gleichzeitig zu einer verminderten Trennleistung, insbesondere der Abbauprodukte (Abbildung 19). Der gleich schnelle Abbau beider Diastereomere kann dabei als Hinweis auf eine unspezifische saure Verseifung der Peptidbindung angesehen werden.

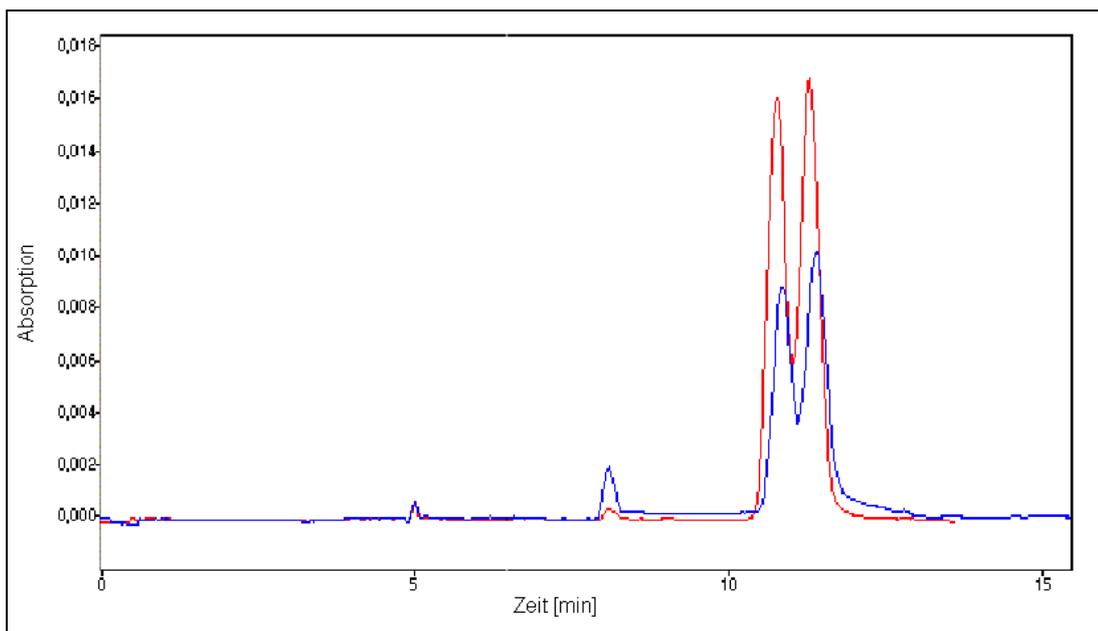


Abbildung 19: Abbau von R,S-LV (rot) zu 5-FTHPA (blau) nach Zugabe von 1 N HCl (1+9) zur Inaktivierung der CPG₂.

Alternativ wurde daher 10 %, 20 %, 100 % (bezogen auf die Probenmenge) eisgekühltes ACN zur Inaktivierung zugesetzt. Dabei zeigte sich nur für die 100 % ACN-Zugabe eine vollständige Inaktivierung der CPG₂ (Abbildung 20). Für niedrigere Konzentrationen an ACN wurde ein Abbau beider Diastereomere beobachtet. Dabei überwog der Abbau des S-LV gegenüber dem Abbau von R-LV.

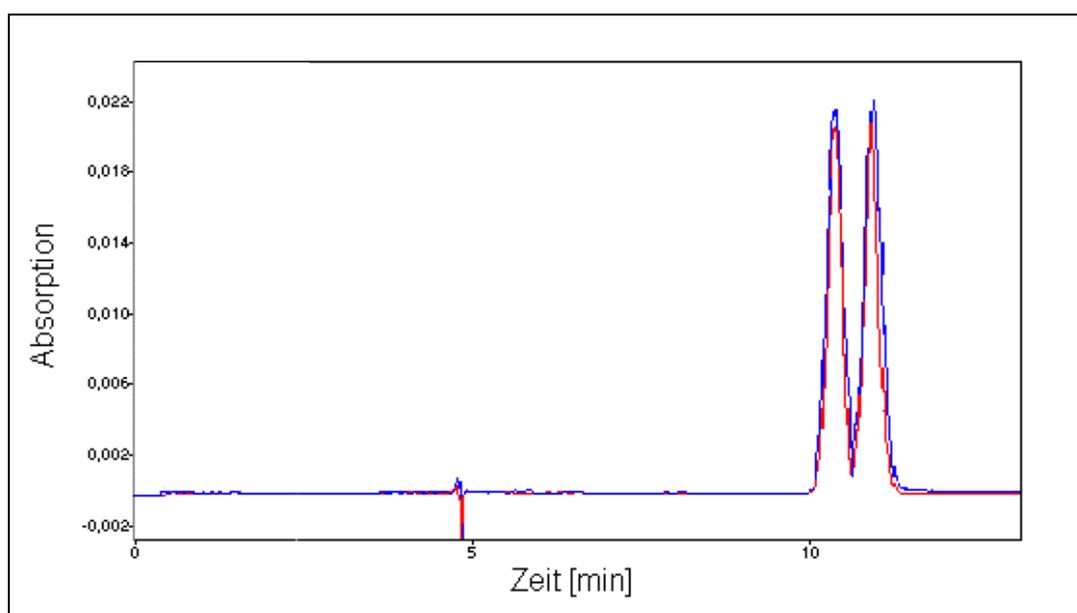


Abbildung 20: Elektropherogramme der R,S-LV Probe direkt (blau) nach Inaktivierung mit ACN (1+1) und nach 4 h Lagerung (rot) gemessen.

4.3.3 Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten

Zur Identifizierung und Zuordnung der Peaks sind neben den oben erwähnten UV-Spektren, der Reihenfolge der Peaks auch die Migrationszeiten der Peaks zu verwenden. Aufgrund der fehlenden Referenzsubstanz für die FTHPA wurden die Migrationszeiten beim Abbau analysiert und die entsprechenden Peaks ab dem Lauf der Detektion (zwei bzw. 3) aufgetragen (Abbildung 21). In Tabelle 4 sind die Migrationszeiten an mehreren Tagen mit ihrem Mittelwert der Migrationszeiten, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten aufgetragen. Die höchsten Variationskoeffizienten zeigten sich bei S-LV, das auch die größten Migrationszeiten aufwies. Der maximale VK betrug 7,5 % am Tag 1. Eine Zuordnung der Peaks war, wie in Abbildung 23 auf S. 40 dargestellt, aufgrund der Reihenfolge der Peaks trotzdem problemlos möglich. Weiterhin können auch UV-Spektren zur Identifizierung, wie in Kapitel 4.3.1 auf S. 30 beschrieben, herangezogen werden.

Tabelle 4: Migrationszeiten der Analyten an drei verschiedenen Tagen mit Standardabweichung (SD) und Variationskoeffizient (VK).

		R-FTHPA	S-FTHPA	IS	R-LV	S-LV
Tag 1	Mittelwert [min]	6,6	6,9	8,1	11,2	11,8
	SD [min]	0,2	0,2	0,4	0,8	0,9
	VK	2,7%	2,3%	5,0%	6,8%	7,5%
Tag 2	Mittelwert [min]	6,9	7,0	8,5	11,5	12,0
	SD [min]	0,1	0,1	0,4	0,6	0,7
	VK	1,8%	1,5%	4,8%	5,4%	5,6%
Tag 3	Mittelwert [min]	6,5	6,7	8,1	11,1	11,6
	SD [min]	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2
	VK	0,8%	1,5%	4,8%	5,4%	5,6%

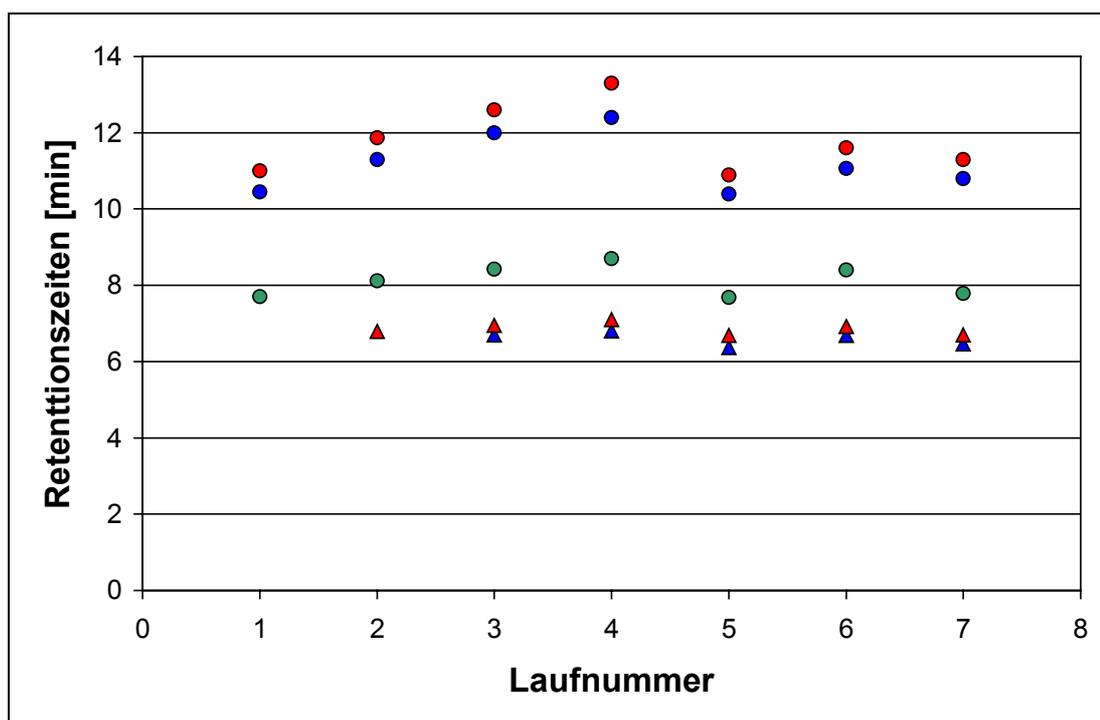


Abbildung 21: Migrationszeiten bei 7 Läufen innerhalb eines Tages (▲: S-FTHPA; ▲: R-FTHPA; ●: IS; ●: R-LV; ●: S-LV).

4.3.4 Kalibrierung

Zur quantitativen Bestimmung wurde eine Kalibrationsgerade für R- und S-LV aus jeweils fünf unterschiedlichen Konzentrationen erstellt. Die Auswertung erfolgte über das Verhältnis der korrigierten Peakfläche (kA) des Analyten zu der kA des Internen Standards. Als Bereich für die Kalibration wurden Konzentrationen von 250 μM bis zu 31 μM verwendet. In diesem Bereich liegen auch die während des Abbaus erhaltenen Konzentrationen. Wie nach dem Lambert-Beerschen Gesetz zu erwarten, zeigt sich für alle Kalibrationsgeraden Linearität (Abbildung 21). Das Bestimmtheitsmaß R liegt für alle Ausgleichgeraden über 0,993. Für R-LV berechnet sich die durchschnittliche Steigung der Ausgleichgeraden ($n = 5$) auf $0,0175 \mu\text{M}^{-1}$, der y -Achsenabschnitt auf 0,0002. Für S-LV ($n = 5$) beträgt die mittlere Steigung $0,0176 \mu\text{M}^{-1}$ mit einem y -Achsenabschnitt von $-0,016$.

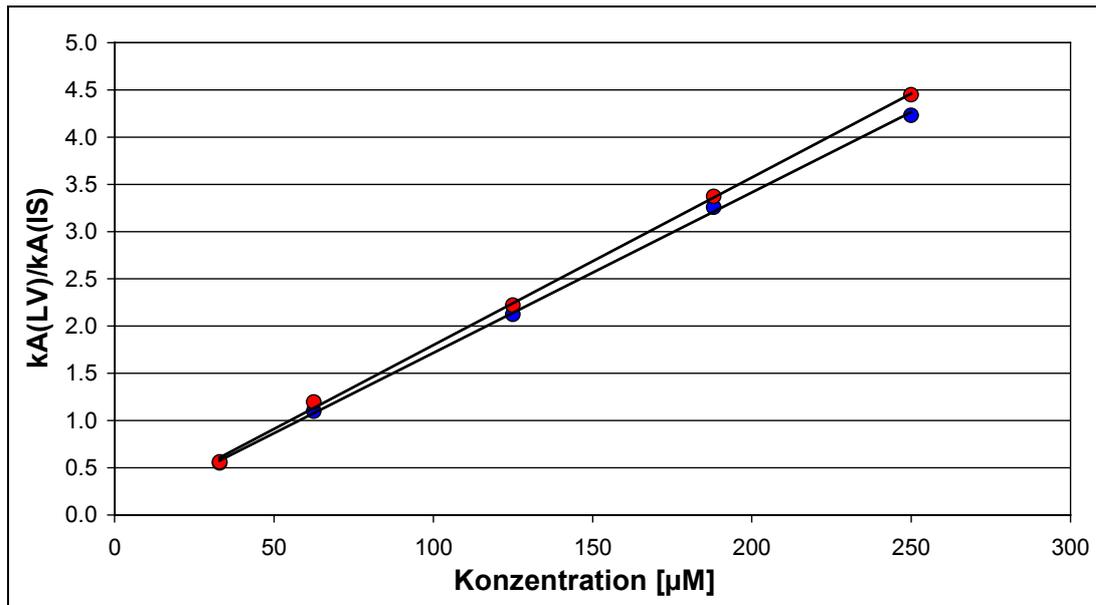


Abbildung 21: Kalibrationsgeraden von R-LV (blau) und S-LV (rot). Das Bestimmtheitsmaß lag bei allen Kalibrationsgeraden über 0,993.

4.3.5 Präzision und Richtigkeit

Zur Überprüfung der Präzision und Richtigkeit wurden zwei verschiedene Konzentrationen mit 50 µM und 200 µM mehrfach (n = 5) an einem Tag und an vier verschiedenen Tagen gemessen. Die Mehrfachmessung eines Tages zeigte einen Mittelwert für die 200 µM Konzentration von 201,7 µM bzw. 201,9 µM (R- bzw. S-LV). Der Variationskoeffizient lag bei 2,7 % und 3,3 %. Die vier Messungen an verschiedenen Tagen zeigten einen Mittelwert von 200,5 µM (R-LV) und 199,3 µM (S-LV) mit einem Variationskoeffizienten von 2,4 % bzw. 2,7 %.

Für die 50 µM Konzentration zeigten sich ähnliche Ergebnisse. Der Mittelwert der Messungen an einem Tag betrug 50,6 µM für R-LV und 51,4 µM für S-LV. Die zugehörigen Variationskoeffizienten konnten auf 6,9 % und 7,1 % bestimmt werden. Die Ergebnisse für die vier Messungen an verschiedenen Tagen betragen 50,6 µM (R-LV) und 51,5 µM (S-LV). Die Variationskoeffizienten lagen bei 3,9 % und 6,3 %.

Die Methode konnte damit für die im Rahmen dieser Arbeit gestellten Anforderungen verwendet werden.

4.4 Ergebnis

Nach der oben beschriebener Methode wurde der Abbau des LV durch CPG₂ untersucht. Dabei lagen R- und S-LV in einer jeweils Startkonzentration von 250 µM vor. An den Zeitpunkten $t_{0,5}$, t_1 , $t_{1,5}$, t_2 , t_3 , t_4 , t_8 , t_{16} , t_{30} , t_{60} wurde der Abbau mit ACN gestoppt und nach Aufarbeitung mittels CE bestimmt.

Abbildung 23 (S. 40) zeigt den Abbau des R,S-LV. Wie oben beschrieben verwendete man als Laufpuffer einen 90 mM Phosphatpuffer pH 7,0. Diesem Puffer waren 50 mM 2,6-DM-β-CD als chiraler Selektor zugesetzt. Die Trennung erfolgte nach 6 s langer Druckinjektion bei 3448 Pa mit normaler Polung und 8 kV Spannung. Die Detektion erfolgte bei 300 nm. Im obersten Pherogramm (rot) liegen beide Epimere R-LV (10,2 min) und S-LV (11 min) vor Beginn des Abbaus in etwa gleichen Konzentrationen vor. Der IS Aminopterin erscheint bei 7,9 min. Bereits nach 8 min Abbau mit CPG₂ (schwarze Abbildung) erscheinen zusätzlich die beiden Abbauprodukte des LV, die N-(6R,S)-5-Formyl-5,6,7,8-tetrahydropterinsäuren deutlich erkennbar. Der S-LV Peak ist dabei schon deutlich kleiner als der R-LV Peak und zeigt den schnelleren Abbau des aktiven Epimers. Das R-Enantiomer (R-FTHPA) erscheint bei 6,6 min vor dem S-Enantiomer bei 6,9 min. Bei den folgenden Bildern erfolgte der Abbau über einen Zeitraum von 30 min (blau) bzw. 60 min (grün). Die S-LV Peaks sind deutlich kleiner als die Peaks des R-LV und somit auch die Konzentration des S-LV kleiner als die des R-LV. Entsprechend ist die Konzentration des Abbauproduktes S-FTHPA höher als die des R-FTHPA. Neben den Epimeren R-LV und S-LV liegen auch die Enantiomere R-FTHPA und S-FTHPA getrennt vor.

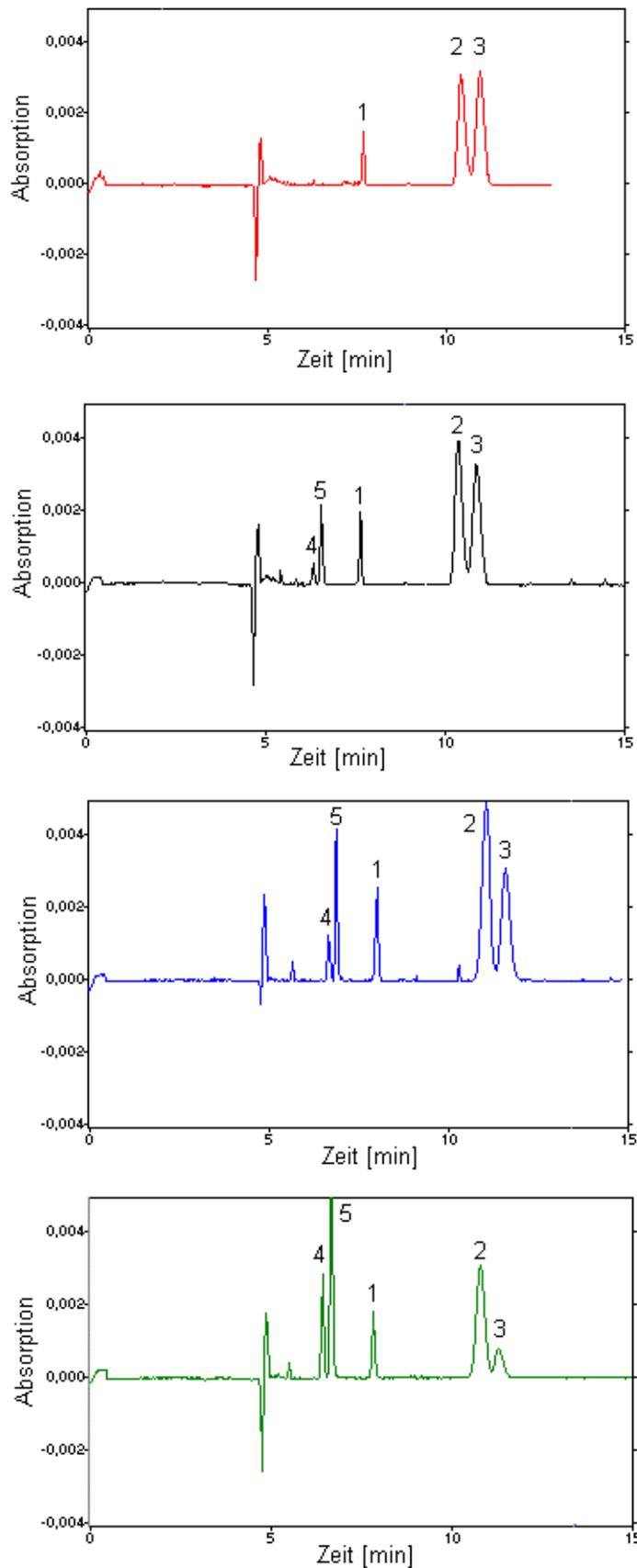


Abbildung 23: Elektropherogramme des Abbaus von R- (2) und S-Leukovorins (3) mit CPG₂ zu Beginn des Abbaus (rot), nach 8 min Abbau (schwarz), 30 min Abbau (blau) und nach 60 min Abbau. Die Abbauprodukt R- (4) und S-Formyltetrahydropterinsäure (5) sind bereits nach 8 min sichtbar. Als interner Standard wurde Aminopterin (1) verwendet.

Die Peaks wurden quantitativ ausgewertet. In Abbildung 23 sind die gemessenen Konzentrationen zu den entsprechenden Zeitpunkten halblogarithmisch aufgetragen (Tabelle 23, S. 140). Die roten Messpunkte stellen die gemessenen S-LV Werte dar. Sie liegen an den jeweiligen Zeitpunkten niedriger als die entsprechenden blau eingezeichneten R-LV Messwerte.

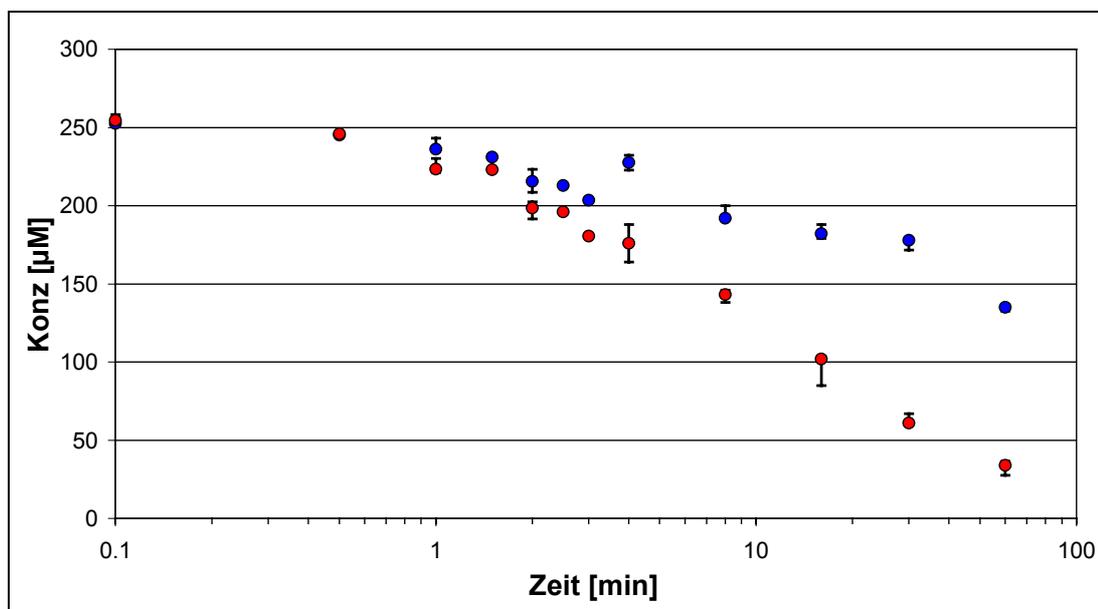


Abbildung 23: Abbau von R,S-LV in halblogarithmischer Auftragung. S-LV (rot) wird signifikant schneller abgebaut als R-LV (blau). Angezeigt sind Median, 25 % und 75 % Perzentile.

Quantitativ unterscheiden sich die beiden Diastereomere in ihrer gemessenen Konzentration zum Zeitpunkt t_0 in einem verbundenen t-Test ($n = 6$) erwartungsgemäß nicht ($P > 0,9$). Bereits zum Zeitpunkt t_1 jedoch zeigt ein verbundener t-Test einen hochsignifikanten Unterschied im Abbau beider Substanzen ($p \leq 0,001$). Dabei beträgt der Mittelwert der sechs Versuche für das R-LV $235,5 \mu\text{M} \pm 10,3 \mu\text{M}$. Für das S-LV beträgt der Mittelwert $224 \mu\text{M} \pm 10,3 \mu\text{M}$. Grafisch ist zu erkennen, dass sich die Konzentrationen an allen weiteren Zeitpunkten ebenfalls unterscheiden.

Weiterhin wurde aus den Differenzen der Konzentrationen zweier aufeinander folgender Zeitpunkte ($v_c = \frac{\Delta c}{\Delta t}$) die Abbaugeschwindigkeit v_c abgeschätzt (dies entspricht der 1. Ableitung). Die Zeitpunkte $t_{0,5}$, $t_{1,5}$ und $t_{2,5}$ wurden nicht mit einbezogen, da es sich dabei um Einzelbeobachtungen handelte. Die grafische Auftragung (Abbildung 25) zeigt deutlich die größere Abbaugeschwindigkeit des S-LV gegenüber dem R-LV. Eine Bestimmung von V_{\max} und K_M ist nicht möglich, da im beobachteten Konzentrationsbereich noch keine V_{\max} erreicht wurde. V_{\max} scheint aber

in unserer Versuchsreihe für S-LV weit oberhalb von 30 µM/min gelegen zu haben. Für R-LV kann man einen Wert oberhalb von 20 µM/min abschätzen. Die Literatur gibt wie oben erwähnt nur einen gemeinsamen K_M-Wert für R- und S-LV von 120 µM an [160].

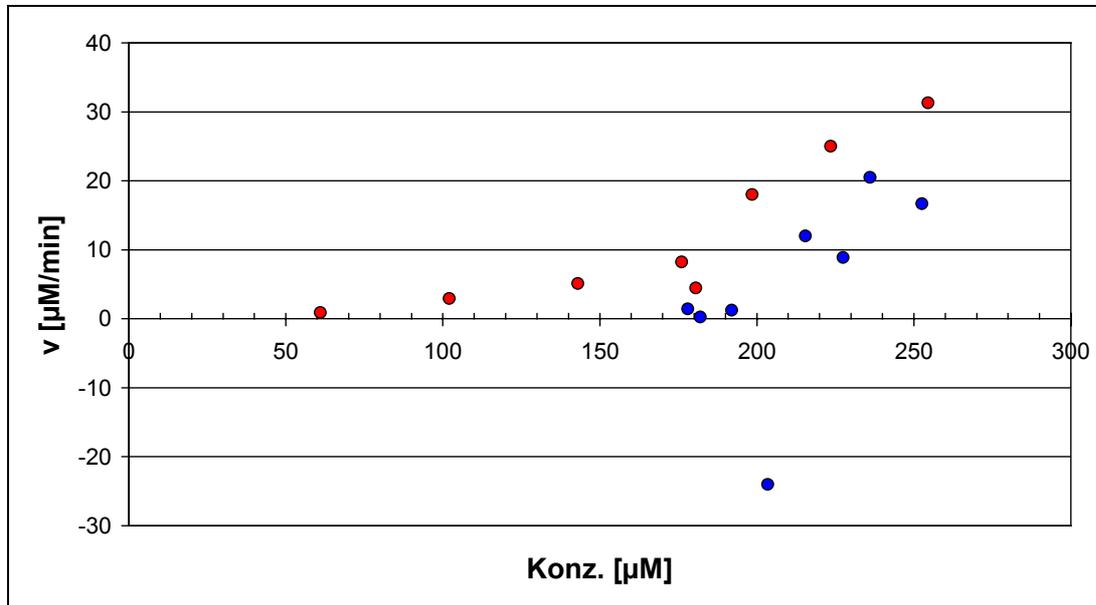


Abbildung 25: Abbaugeschwindigkeiten [µM/min] gegen die Konzentrationen für S-LV (rot) und R-LV (blau).

Weiterhin wurde ein niedrigerer Konzentrationsbereich untersucht. Die untersuchten Konzentrationen der Epimere liegen dabei im Konzentrationsbereich des Rescues nach Standarddosierung [126, 168, 171, 183, 187]. Die Ausgangskonzentrationen von R- und S-LV betragen nach Zugabe von CPG₂ 30 µM. Wie in Abbildung 26 ersichtlich wird auch bei diesen Konzentrationen das aktive Epimer S-LV deutlich schneller abgebaut als R-LV. Die Aufarbeitung und Trennung erfolgte nach der oben beschriebenen Methode, allerdings ohne IS und einer auf 10 s verlängerten Druckinjektion bei 3448 Pa. Es erfolgte keine quantitative Auswertung, da bei diesen Versuchen aufgrund der geringen Konzentration keine Kalibration durchgeführt werden konnte. Die Konzentrationen beziehen sich daher auf das Verhältnis zur Ausgangskonzentration (30 µM) und sind mit Vorsicht zu interpretieren.

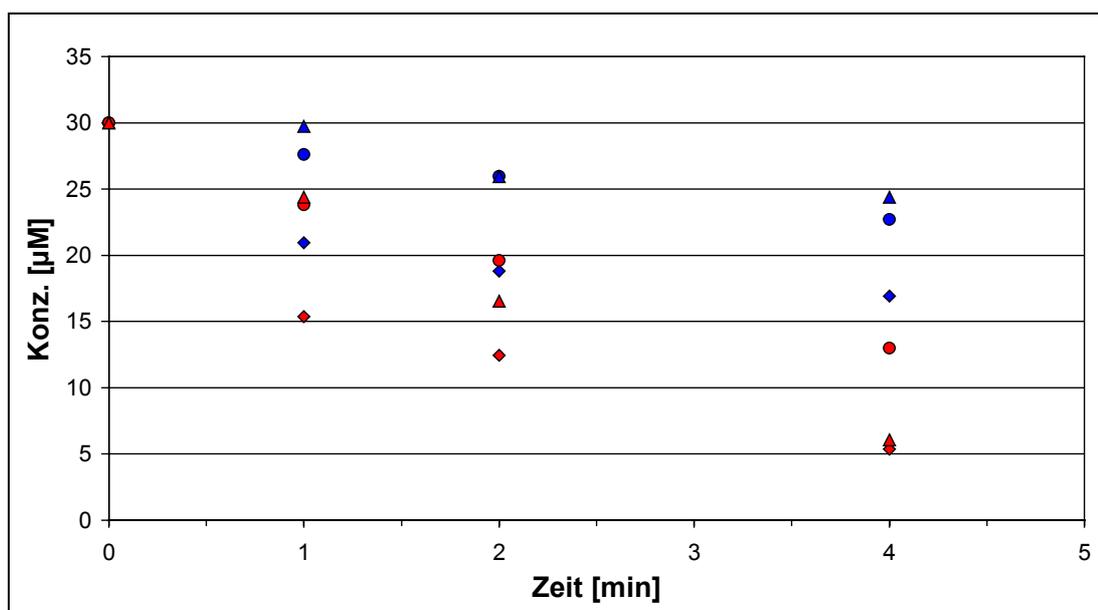


Abbildung 26: Abbau des R-LV (blau) und S-LV (rot) ab einer Konzentrationen von jeweils 30 µM.

4.5 Diskussion

4.5.1 Analytik

In dieser Arbeit ist die erste analytische Methode dargestellt, die kapillarelektrophoretisch die beiden Diastereomere R-LV und S-LV trennt. Diese wurde verwendet, um den Abbau durch CPG₂ zu untersuchen. Die dabei gewonnenen Ergebnisse stehen im Einklang mit der Literatur. *Cellai et al.* gelang ebenfalls durch 2,6-DM-β-CD die kapillarelektrophoretische Trennung der Epimere. Unter Einsatz von β-CD oder Trimethyl-β-CD konnte keine Trennung erreicht werden. Dabei verwendete *Cellai et al.* eine belegte Kapillare, die nur einen geringen elektroosmotischen Fluss (EOF) aufweist [40]. Die Methode von *Cellai et al.* eignet sich allerdings nicht für die Detektion der beiden N-(6R,S)-5-Formyl-5,6,7,8-tetrahydropterinsäuren (FTHPA). Aufgrund der fehlenden dissoziierten Glutaminsäure ist die Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld geringer als die des LV, und die Laufzeiten verlängern sich entsprechend. Dies wird in der hier vorgelegten Arbeit durch den Einsatz des EOF umgekehrt und ermöglicht auch eine Detektion der LV-Abbauprodukte.

In der hier vorgestellten Methode wurden erstmals die beiden chiralen Abbauprodukte der beiden Leukovorine kapillarelektrophoretisch getrennt und spektro-

metrisch bestimmt. Eine Quantifizierung erfolgte dabei nicht. Bei den Abbauprodukten handelt es sich mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit um die FTHPA, den um die Glutaminsäure verkürzten Teil der beiden LV Diastereomere, parallel dem Abbau von MTX zu DAMPA dem Wirkmechanismus der CPG₂ folgend.

Analytisch kann durch Zumischung gezeigt werden, dass die Wechselwirkung des S-LV mit dem chiralen Selektor schwächer ist als die Wechselwirkung des R-LV mit DM- β -CD. Durch diese Wechselwirkung wird der Analyt trotz seiner negativen Ladung, die ihn im elektrischen Feld zum Kapillareinlaß zurückbeschleunigt, zum Detektor gezogen. Als Konsequenz dieser geringeren Wechselwirkung folgt - wie in Abbildung 11 auf S. 30 gezeigt -, dass S-LV später den Detektor erreicht als R-LV. Entsprechende Überlegungen führen zu dem Ergebnis, dass das Abbauprodukt des S-LV gegenüber dem R-FTHPA eine geringere Wechselwirkung mit DM- β -CD zeigt.

Da die Paare R- und S-LV bzw. R- und S-FTHPA jeweils trennbar sind, scheint der Glutaminsäurerest - wenn überhaupt - eine geringe Wechselwirkung mit dem Cyclodextrin zu besitzen und wenig Einfluss auf die Trennung zu haben. Weiterhin unterstützt ACN die Trennung der beiden Abbauprodukte. Dieser Effekt könnte aufgrund einer erhöhten lokalen Feldstärke, aber auch durch Veränderung der Wechselwirkung zwischen dem eingesetzten DM- β -CD und den Analyten erfolgen.

4.5.2 Klinische Anwendung der Carboxypeptidase G₂

Grundlegende Idee für die Entwicklung der Carboxypeptidasen war deren Wirkung auf Folsäurederivate und damit auf den für das Tumorstadium notwendigen Folsäurepool. Als weitere Option für die Anwendung der Carboxypeptidasen erkannte man die Möglichkeit, das klinisch immer wichtiger werdende MTX in Notfallsituationen schnell abzubauen zu können. Die Gewinnung der CPG₂ als Nachfolger der CPG₁ war dabei ein Fortschritt, konnte doch eine K_M für MTX erreicht werden, die sich um mehr als eine Zehnerpotenz von der des LV unterschied. Dabei können auch klinische Fälle belegen, dass selbst höchste MTX-Plasmakonzentrationen innerhalb kürzester Zeit zu dem pharmakodynamisch inaktiven Metaboliten DAMPA abgebaut werden konnten.

Dieser Anwendung stehen allerdings gravierende Nachteile gegenüber. So eignet sich der routinemäßig verwendete Emit-Assay nach Einsatz von CPG₂ nicht mehr zur Bestimmung der MTX-Plasmakonzentrationen (Abbildung 8, S. 26), da aufgrund der erheblichen Kreuzreaktivität des DAMPA mit den verwendeten Antikörpern eine zu hohe Konzentration bestimmt würde [4, 51, 52, 128]. Daher muss bei

CPG₂-Gabe auf sehr viel aufwendigere und meist auch zeitintensivere Trennmetho-
den wie HPLC und CE zurückgegriffen werden [9], falls diese überhaupt validiert
vorhanden sind. Dies stellt einen erheblichen Nachteil in solchen für den Patienten
bedrohlichen Situationen dar.

Trotz seiner pharmakologischen Inaktivität muss man auch das weitere Verhalten
des DAMPA beachten. Dieses Abbauprodukt unterliegt wie die anderen Folsäure-
abkömmlinge der renalen Ausscheidung. Diese pharmakokinetische Komponente
wird maßgeblich durch die fehlende Glutaminsäure beeinflusst. Diese liegt bei pH
7,3 – einem pH, wie er bei den Patienten in Blut und Harn herrschen sollte - größ-
tenteils ionisiert vor und erhöht somit die Löslichkeit. Diese durch Fehlen der Gluta-
minsäure stark verminderte Löslichkeit (Tabelle 5) von DAMPA gegenüber MTX
kann somit die Nieren noch weiter belasten und schlimmstenfalls gar zum Verlust
dieses Ausscheidungsorgan führen. Weiterhin ist zu beachten, dass nicht wie
selbstverständlich der Abbau einer bestimmten MTX-Konzentration zu gleichen
DAMPA-Konzentrationen führen muss. Über die Massengleichung
 $c_{\text{MTX}} \cdot V_{\text{MTX}} = c_{\text{DAMPA}} \cdot V_{\text{DAMPA}}$ zeigt sich, dass dabei die Verteilungsvolumina ebenfalls
eine Rolle spielen. Die einzige Literaturstelle beschreibt jedoch in einem Einzelfall
gleiche Konzentrationen von MTX vor und DAMPA nach CPG₂-Gabe. Eine interes-
sante Beobachtung, da die Glutaminsäure als eine Voraussetzung für die Aufnahme
in die Zellen angesehen wird. Das Fehlen dieser Struktur könnte somit zu einem
kleineren Verteilungsvolumen und damit einer höheren Konzentration von DAMPA
im Plasma führen. Für die Niere, die meist die Ursache für die verminderte Aus-
scheidung ist, eine weitere Belastung. Analoge Überlegungen kann man auch für
die Abbauprodukte des 7-OH MTX und des LV anstellen. Von besonderer Interesse
könnte dabei das R-LV sein. Ihm wird pharmakodynamisch ebenfalls keine Aktivität
zugeschrieben. Kinetisch verteilt es sich hauptsächlich im Blut und zeigt daher ein
kleineres Verteilungsvolumen als S-LV [168]. Somit ist R-LV auch dem Abbau durch
die CPG₂ unterworfen. Bei fehlender Glutaminsäure dürfte auch sein Metabolit N-
(6R)-5-Formyl-5,6,7,8-tetrahydropterinsäure schlechter wasserlöslich sein und die
Niere weiter belasten.

Tabelle 5: Löslichkeiten von MTX, 7-OH MTX und DAMPA im wässrigen [51, 91, 166].

	pH 5		pH 6		pH 7	
	g/l	µM	g/l	µM	g/l	µM
MTX	0,39	859	1,55	3414	9,04	19912
7-OH MTX	0,13	276	0,37	786	1,55	3291
DAMPA	0,05	153	0,1	307	0,85	2607

Wie in Kapitel 2.1.1.5 (S. 17) beschrieben, handelt es sich bei der CPG₂ um ein Protein. Aufgrund dieser Eigenschaft kann CPG₂ weder in die Zelle noch in den Liquor vordringen, um dort wirksame MTX-Konzentrationen abzubauen. Daher könnte bei alleiniger Anwendung der CPG₂ kein intrazellulärer Rescue erfolgen und Toxizitäten wären unvermeidlich. Die Gabe von Leukovorin ist daher lebensnotwendig.

Wie oben erwähnt, wurde die K_M der CPG₂ für LV und MTX bestimmt. Außer Acht wurde dabei gelassen, dass es sich bei LV im Gegensatz zu MTX um ein Diastereomergemisch handelt. In der hier vorgestellten kapillar-elektrophoretischen Methode konnte dabei die Trennung der beiden Substanzen erfolgen und der Abbau untersucht werden. Dabei zeigt sich, dass das pharmakodynamisch aktive S-LV einem signifikant stärkeren Abbau ($p \geq 0,001$) unterliegt als das R-LV. Der lebensnotwendige Rescue in der Zelle und im Liquor wird daher vermindert. Eine reaktive Erhöhung der LV-Dosis ist dabei ebenfalls nicht bedenkenlos möglich, da - wie bereits mehrfach erwähnt - die Niere die Folate, Antifolate und deren Abbauprodukte ausscheiden muss.

Eher zu Vernachlässigen ist das Allergisierungsrisiko des Proteins. Bei einmaliger Anwendung ist eine Allergie aber höchst unwahrscheinlich. Auch vermindert die rekombinante Darstellung des Proteins im Gegensatz zur CPG₁ das Allergisierungspotential weiter, so dass hierbei kaum klinische Probleme zu erwarten sind.

Der anwendende Arzt muss sich weiterhin über den klinischen Status der Substanz klar werden. Es handelt sich bei der CPG₂ nicht um ein zugelassenes Arzneimittel. Qualität und Anwendung unterliegen dabei keinen festgeschriebenen Regeln.

Trotz alledem ist der Enthusiasmus für die CPG₂ ungebremst, hat man doch eine Substanz - nicht Medikament - in der Hand, die rapide die überhöhten MTX-Plasmakonzentrationen senkt. Im Gegensatz dazu wird die Wirkung des LV

analytisch kaum wahrgenommen, da sie die MTX-Werte selbst nicht beeinflusst. Weiterhin wird auch die Effektivität des LV ab MTX-Konzentrationen über 10 µM in Frage gestellt [5, 72, 76, 132].

Flombaum et al. konnte allerdings an 13 Patienten zeigen, dass auch stark überhöhte MTX-Werte allein durch LV-Gaben beherrscht werden können [70]. Dies deutet mit weiteren Einzelfallbeschreibungen [104, 173] und eigenen klinischen Erfahrungen auf eine ausreichende Wirkung des LV-Rescues auch bei höheren MTX-Konzentrationen hin.

4.6 Schlussfolgerung für die klinische Anwendung der Carboxypeptidase G₂

Nach obiger Diskussion ist eine Anwendung der CPG₂ mit zahlreichen Begleiterscheinungen belastet. Ein vermeintlich schneller Erfolg durch die Abnahme der MTX-Plasmakonzentration wird durch eine weder analytisch noch pharmakokinetisch oder pharmakologisch überschaubare Situation erkauft. Die Anwendung ist daher nur in absoluten Notfällen und bei völligem Versagen der MTX-Clearance zu empfehlen. Dann sollte sie jedoch so früh wie möglich begonnen werden, um das Eindringen von MTX in Bereiche, in denen die CPG₂ nicht wirken kann, so gering wie möglich zu halten. Aufgrund des schnellen Abbaus von MTX und des möglichen Allergisierungspotential ist eine Wiederholung der Gabe des Proteins zu vermeiden. Weiterhin darf trotz CPG₂-Gabe weder auf die forcierte Diurese noch auf den LV-Rescue verzichtet werden. Der Rescue kann dabei, um die Calcium und Folatbelastung für die Niere zu minimieren, mit reinem S-LV erfolgen. Dabei scheint eine Dosis des S-LV, die der Hälfte des Epimerengemisches entspricht, ausreichend [80, 94, 187].

Eine Fallbeschreibung einer 16-jährigen Osteosarkom-Patientin zeigt die Regeneration der Nierenfunktion nach MTX-Konzentrationen von 300-500 µM am Tag drei nach HD-MTX und einem maximalen Kreatininwert von 5,2 mg/dl. Die Therapie wurde anschließend mit Ifosfamid, Cisplatin und Doxorubicin fortgeführt. Trotz diesen potentiell nephrotoxischen Substanzen entwickelte die Patientin keine weiteren Zeichen einer Nierentoxizität [179]. Eine Fortführung der überlebenswichtigen Chemotherapie nach Erholung der Laborparameter scheint daher empfehlenswert.

Die MTX-Hochdosistherapie sollte immer in dafür spezialisierten Zentren erfolgen. Diese sollten bei Anwendung des Enzyms zumindest über eine adäquate Analytik verfügen, um den Abbau und die klinische Situation kontrollieren zu können.

Besonderen Wert sollte auf die Vorbeugung von solchen schwierigen klinischen Situationen gelegt werden. Hierzu zählt vor allem die ausreichende und regelmäßig kontrollierte Alkalisierung und Hydrierung der Patienten vor, während und nach der MTX-Gabe, sowie regelmäßige Gewichtskontrolle und Bestimmung der MTX-Plasmakonzentrationen.

5 *Pharmakokinetische Untersuchungen zum Methotrexat bei einer Dosierung von 5 g/m²*

5.1 Einleitung

5.1.1 Populationspharmakokinetik

Pharmakokinetik (PK) beschreibt quantitativ den Umgang des Körpers mit dem gegebenen Arzneistoff [82]. Insbesondere bei Arzneimitteln mit einer geringen therapeutischen Breite – wie sie vielfach in der Chemotherapie eingesetzt werden – kann die PK wichtige Hinweise für die Anwendung der Wirkstoffe geben. Mathematische Modelle dienen dabei der Beschreibung und Vorhersage von Konzentrationszeitverläufen, meist denen des Plasmas. Ziel ist die Bestimmung der PK-Parameter für jeden einzelnen Patienten unter Einsatz der in bereits behandelten Patienten gewonnenen Erfahrungen über das Verhalten des Arzneistoffes im Körper, um eine optimale Therapie ansteuern zu können [95].

Sich diesem Ziel anzunähern ist Zweck der Populationspharmakokinetik. Diese schätzt neben den PK-Parameter auch die Variabilitäten zwischen den Patienten (interindividuell) als auch die Variabilität innerhalb eines Patienten bei wiederholter Gabe (intraindividuell) ab. Zusätzlich ermöglichen komplexere Modelle auch die Integration von Kovariablen wie Geschlecht und Alter, aber auch Metabolitenkonzentrationen oder Laborparametern. Durch die Bestimmung der individuellen PK-Parameter als Teil einer gesamten Population verringert sich die Anzahl der benötigten Messpunkte [152]. Fehlende Parameter und Messpunkte werden mit Hilfe der zugrunde liegenden Populationsparameter und deren Variabilität abgeschätzt. Dies erhöht die Durchführbarkeit von PK-Studien und führt zu erheblichen Einsparungen an Blutentnahmen. Es verwundert daher nicht, dass sich die Populationspharmakokinetik bei der Arzneistoffentwicklung in der pharmazeutischen Industrie durchgesetzt hat und zwischenzeitlich auch von den Zulassungsbehörden gefordert wird [1].

Obwohl die Vorteile der Populationspharmakokinetik gegenüber der üblichen klassischen, individuellen Kinetikauswertung auf der Hand liegen, hat sie sich im klinischen Alltag der Kinderheilkunde noch nicht durchgesetzt [141]. Ansätze wie beim Busulfan zeigen dabei aber heute schon Möglichkeiten auf, aufgrund rationaler indi-

vidueller Dosierung verbesserte Therapieergebnisse bzw. verminderte Toxizitäten zu erreichen [23].

Im Rahmen dieser Arbeit wird die Populationspharmakokinetik mittels zweier etablierter PK-Programme auf die Anwendbarkeit in klinischen Datensätzen untersucht. Insbesondere sollen die PK-Parameter und deren Variabilität in der zugrunde liegenden Population abgeschätzt und mit den vorhandenen deskriptiv beschriebenen Werten der Literatur verglichen werden. Weiterhin wird der Einfluss der Kovariablen und des Metaboliten 7-OH MTX untersucht. Schlussendlich wird überprüft, ob die in Münster im Vergleich mit anderen Kliniken beobachteten erhöhten 48 h Plasmakonzentrationen mittels PK-Analyse erklärt werden können und ob die 24 h Maximalkonzentrationen einen prädiktiven Wert für die Plasmakonzentrationszeitverläufe besitzen.

5.1.2 **Pharmakokinetik des Methotrexates**

Wie in vielen Studien gezeigt wurde, steht in chemosensiblen Tumoren die applizierte Dosis oft in einer linearen Beziehung zur Wirksamkeit und somit zum Therapieerfolg [25, 39]. In solchen Studien profitierten Patienten von einer höheren Gabe des Zytostatikums. Für die meisten Substanzen ist die maximale Dosis durch die Verträglichkeit bzw. das Auftreten von Toxizitäten limitiert. Eine Ausnahme stellt das MTX dar [143, 144], das bereits in Dosen von 33 g/m^2 verwendet wurde. Durch die Möglichkeit des Rescue mittels LV kann MTX daher theoretisch in der Dosierung verwendet werden, die eine optimale Therapie unterstützt [56], ohne die Grenze an tolerierbarer Toxizität zu überschreiten. Es ist daher nicht verwunderlich, dass für MTX sehr viele Arbeiten erschienen sind, die sich mit der Pharmakokinetik und dem Bezug zur Pharmakodynamik beschäftigen (vgl. [47]).

Beim Osteosarkom wiesen *Stoller et al.* bereits 1977 darauf hin, dass eine 48 h MTX-Plasmakonzentration über $0,9 \mu\text{M}$ mit einem erhöhten Risiko zur Entwicklung von Toxizitäten einhergeht [165]. Nachdem erstmals die PK des heute gültigen Schema von 12 g/m^2 über 4 h von *Erttmann et al.* 1985 beschrieben wurde [55], zeigten *Delepine et al.*, dass Patienten von einer individualisierten Dosierung profitieren können und eliminierten damit das Alter als negativen Prognosefaktor [48]. Die dort als Ziel verwendete Spitzenkonzentration von 1 mM bestätigte *Graf et al.* in einer weiteren Studie mit 198 Patienten und 1703 Zyklen als wichtige Zielgröße für die Wirksamkeit der MTX-Therapie bei dieser Tumorentität [81]. In einer weiteren

Studie konnten *Saeter et. al* zeigen, dass Patienten, die schlechter auf die Therapie ansprachen, niedrigere 24 h und 48 h Plasmakonzentrationen aufwiesen [151].

Die zweite große Indikation für die HD-Gabe von MTX ist die akute lymphatische Leukämie (ALL). *Evans et al.* entdeckten schon 1984 bei einer Dosierung von 1 g/m^2 einen möglichen Zusammenhang zwischen dem ereignisfreien Überleben (EFS) und der Clearance (Cl) des MTX [58]. Diese Cl wird durch die renale Ausscheidung von 80 % bestimmt, die wiederum bei etwa 65 % der glomerulären Filtrationsrate liegt [32, 90].

Diese Ergebnisse wurden von *Borsi et al.* bei 21 Patienten bestätigt. Diese fanden eine Korrelation bei Änderung der Clearance² (Cl) zwischen der ersten und zweiten MTX-Gabe und dem EFS. Dabei verwendeten sie Dosen von 500 mg/m^2 über 24 h [29]. In einer weiteren Arbeit zeigten sie an 58 ALL-Patienten, dass diese erhöhte systemische Cl in einem Dosisbereich von $0,5 \text{ g/m}^2$ bis 33 g/m^2 auch dosisunabhängig einen prognostischen Faktor darstellt. Eine große inter- und intraindividuelle Variabilität der PK-Parameter konnte ebenfalls beobachtet werden [27, 28]. *Donelli et al.* unternahmen den Versuch, mit einer Standard-two-Stage (S2S) pharmakokinetischen Analyse Unterschiede zwischen verschiedenen Altersgruppen in einem 1- oder 2-Kompartimentmodell zu beschreiben. Aufgrund der geringen Anzahl an Messwerten (Kapitel 5.1.1) verwendeten sie aber auch hier schließlich eine kompartmentfreie PK-Analytik der 122 untersuchten Patienten [75], obwohl auch diese kompartmentfreie Analytik Schwächen bei einer geringen Anzahl von Messwerten zeigt. Schlussendlich kamen *Donelli et al.* zu dem Ergebnis, dass die Cl bezogen auf die KOF bei Patienten über 10 Jahren ($10,7 \text{ l/m}^2/\text{h}$) kleiner ist als die bei Patienten unter 10 Jahren ($6,6 \text{ l/m}^2/\text{h}$). Eine Veränderung der Pharmakokinetik bei aufeinander folgenden Zyklen konnte hierbei nicht gefunden werden. *Donelli et al.* schlussfolgerten, dass die gute Verträglichkeit der MTX-Zyklen und die schlechtere Prognose bei jungen Patienten daher möglicherweise einen pharmakokinetischen Hintergrund besitzt [53]. Im folgenden Jahr zeigte eine Vergleichsstudie zwischen HD-Therapie (1 g/m^2 über 24 h) und peroraler MTX-Gabe (30 mg/m^2 6 x alle 6 h) eine erhöhte Wirksamkeit der HD-Therapie gemessen an den Surrogat-Parametern zirkulierende Blasten am Tag 4 und intrazellulär gebildete Polyglutamate 44 h nach Infusionsbeginn [112].

² Die Clearance wurde hierbei berechnet als $Cl = k_0 / cp(ss)$ und ist damit nur vom Plasmaspitzenpegel ($cp(ss)$) abhängig.

Einen neuen Ansatz unternahmen *Evans et al.* 1998 in einer Studie mit dem Vergleich von konventioneller Dosierung nach Quadratmeter gegen eine individualisierte Dosierung [60]. Als Ziel für die Dosisindividualisierung wurde eine AUC von 580 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$ bis 950 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$ ausgegeben, an der schlussendlich zumindest bei der B-ALL, der größten ALL-Subgruppe, ein Nutzen für die Patienten gezeigt werden konnte. Die optimierte Dosis wurde so eingestellt, dass ein c_{max} am Ende der 24 h Infusion von mindestens 20 μM erreicht wurde. Dieser Grenzwert ergab sich aus einer vorangegangenen Studie. Diese Studie zeigte, dass ein c_{max} bei diesem Infusionsschema von über 16 μM mit einer geringeren Rezidivrate verbunden war ($p < 0,05$). Zu diesen 16 μM kam für diese individuelle Dosierung ein „Sicherheitszuschlag“ von 25 % und somit 20 μM .

Wall et al. versuchten, von dieser Dosisindividualisierung Kinder, die bereits ein Rezidiv erlitten hatten, profitieren zu lassen. Durch die Bestimmung der MTX-Plasmakonzentration während der Infusion und anschließender Dosisanpassung gelang es, eine Maximalkonzentration von 65 μM am Infusionsende zu erreichen. Dies entspricht der mittleren Konzentration, die Kinder bei einer Dosierung von 5 g/m^2 über 24 h erzielt hatten, die rezidivfrei geblieben waren [60]. Die mediane Zeit bis zum erneuten Rezidiv dieser Gruppe war mit 180 Tagen allerdings weiter gering [175].

5.1.3 Pharmakokinetik des 7-OH Methotrexates

Auch die PK des 7-OH MTX war Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. 1989 verglichen *Fahrig et al.* die PK des 7-OH MTX nach i.v. Gabe von 4 mg/kg in einem Rattenmodell mit der PK des MTX. Bei beide Substanzen zeigten sich biphasische Plasmakonzentrationsverläufe mit einer terminalen HWZ von etwa 90 min und daraus folgend einer Cl von etwa 9 $\text{ml}/\text{kg}/\text{min}$ [67]. Im Gegensatz zum MTX konnte bei Gabe von 7-OH MTX ein Großteil (73 %) des Metaboliten in der Gallenflüssigkeit wiedergefunden werden. Die renale Ausscheidung betrug hingegen nur etwa 11 %. *Bremnes et al.* konnten ebenfalls in einem Rattenmodell zeigen, dass der hepatische Metabolismus von MTX zu 7-OH MTX keiner Sättigung unterliegt [33]. Eine iBeobachtung zeigte in 5 von 6 Ratten das Auftreten einer Cholestase bei einer Gabe von 1 g/kg MTX. Bei diesen fünf Ratten konnte eine biliäre 7-OH MTX-Konzentration von 9,8 $\text{mM} \pm 1,1 \text{ mM}$ gemessen werden, während in der anderen Ratte nur 1/5 dieser Konzentration gefunden werden konnte. Die Analyse zeigte, dass 97 % des Präzipitates aus 7-OH MTX und nur 3 % aus MTX bestand. Neben der Leber [99], die hauptsächlich für die Bildung des 7-OH MTX verantwort-

lich ist, scheinen auch die Lunge und Niere diesen Metaboliten in geringen Mengen - zumindest in der Ratte - zu bilden [153]. Ebenfalls zeigte sich akute Toxizität durch 7-OH MTX bei Dosen von 0,4 g/kg. Diese Dosen resultierten in einer Plasmakonzentrationen über 1,4 mM, die mit der Ausfällung von gelben Kristallen in den Nierentubuli einhergingen. In einer anderen Studie konnte bei Gaben von 100 mg/kg eine Erhöhung des Serumkreatinin um 2,6 und der Aspartataminotransferase um den Faktor zwei beobachtet werden [162]. Schlussendlich zeigte *Fuskevåg et al.* bei Ratten sogar eine um den Faktor 10 niedrigere tolerable Dosis von 7-OH MTX als die tolerierte Dosis von 3 g/kg für MTX [73].

PK-Untersuchungen an Kaninchen zeigten, dass bei dieser Spezies das 7-OH MTX ebenfalls gebildet wird. Dabei scheint der Metabolit eine längere Verweildauer im Körper und ein größeres Verteilungsvolumen als die Muttersubstanz zu besitzen. Die Ausscheidung erfolgt hierbei vorwiegend renal [44, 45].

Die ersten Untersuchungen im Menschen konnten 1976 zeigen, dass 7-OH MTX als Metabolit des MTX im Harn ausgeschieden wird [91]. *Breithaupt et al.* unternahmen 1982 die ersten Versuche, den Metaboliten *in-vivo* zu bestimmen und beobachteten die Plasmakonzentrationszeitverläufe bei 7 Osteosarkompatienten bei einer Dosierung von 140-350 mg/kg MTX über 6 h. Der Metabolit überstieg dabei die Konzentration des MTX deutlich und wurde sowohl über die Nieren als auch über die Galle ausgeschieden. Der Plasmakonzentrationszeitverlauf konnte mit einem linearen 1-Kompartiment Modell beschrieben werden, bei dem die Halbwertszeit (HWZ) $23,8 \text{ h} \pm 15,2 \text{ h}$ betrug. 7-OH MTX zeigte dabei eine hohe Plasmaproteinbindung von über 90 % [32]. Dieser Befund konnte später in anderen Arbeiten bestätigt werden [161]. Ähnliche Ergebnisse erzielte eine Studie an 13 erwachsenen Patienten mit unterschiedlichsten Tumorerkrankungen, die MTX in Dosen von 750 mg bis 6 g über 6 h verabreicht bekamen. Dabei konnte auch eine Korrelation zwischen der gegebenen MTX-Dosis und der 7-OH MTX Maximalkonzentration im Plasma gefunden werden. Dies gibt einen Hinweis auf eine lineare Kinetik in diesem Konzentrationsbereich [116]. Diese Ergebnisse konnten auch auf Jugendliche übertragen werden. *Erttmann et al.* untersuchten 19 Osteosarkom-Patienten (7 a bis 24 a), die das heute noch gültige Infusionsschema von 12 g/m^2 über 4 h für diese Erkrankung erhielten. Neben einer großen interindividuellen Streubreite des Metaboliten zeigte diese Studie auch eine starke intraindividuelle Variabilität bei den sich wiederholenden MTX-Zyklen. Diese Variabilität zeichnete sich durch sinkende 7-OH MTX-Konzentrationen bei steigenden Therapiezyklen aus und steht damit im Widerspruch zu Untersuchungen von *Lakelma et al.*, die aufgrund Enzyminduktion

eine vermehrte Produktion von 7-OH MTX vermuteten [106]. Für den Metaboliten wurde bei einer Kinetik 1. Ordnung eine HWZ von 6,6 h und für MTX von 2,5 h bestimmt. Dabei konnte kein Zusammenhang zwischen dem 7-OH MTX / MTX Verhältnis und den Kovariablen Alter, Geschlecht, Leukozytenzahl oder Kreatinin gefunden werden [55]. 1986 untersuchten *Winograd et al.* 8 Kinder im Alter von 7 bis 12 Jahren mit verschiedenen Lymphatischen Leukämien. Die Dosierung betrug dabei 18-200 mg/kg MTX über 24 h und ähnelt damit dem hier vorgestellten Protokoll. Dabei konnte erneut gezeigt werden, dass die renale Clearance des Metaboliten geringer war als die des MTX. Sie betrug $18 \text{ ml/min} \pm 8 \text{ ml/min}$ und war abhängig vom Urinfluss [182].

Zusammenfassend sieht man bei einer Vielzahl veröffentlichter Studien, dass 7-OH MTX eine klinische Wirkung besitzt, die aller Wahrscheinlichkeit nach pharmakokinetische Natur ist. In dieser Arbeit soll daher auch der Einfluss des 7-OH MTX auf die kinetischen Parameter bei Kindern, die aufgrund ihrer ALL Erkrankung mit MTX behandelt werden, untersucht werden. Dies dient der besseren Interpretierbarkeit der routinemäßig gemessenen Plasmakonzentrationen des Metaboliten und damit direkt der Sicherheit der Patienten.

5.2 Protokoll

Die ausgewerteten Patienten wurden gemäß den ALL-Therapieprotokollen Berlin-Münster-Frankfurt (BFM) der Jahre 1998 bis 2000 behandelt [155]. Bei allen diesen Protokollen erhalten die Patienten viermal 5 g/m^2 MTX über 24 h im Abstand von zwei Wochen. Der LV-Rescue beginnt zur Stunde 42 nach Infusionsbeginn und beträgt 15 mg/m^2 i.v.. Die LV-Gabe wird im Regelfall dreimal in sechsstündigem Abstand wiederholt.

Besondere Beachtung muss in der MTX-Hochdosistherapie auf Hydrierung und Alkalisierung gelegt werden [121, 154]. Der Hydrierungsvorlauf beginnt im Protokoll M am Abend vor der MTX-Gabe. Dabei werden $2 \text{ mmol/kg NaHCO}_3$ in $2 \text{ ml/kg H}_2\text{O}$ über 1 h p.i. infundiert. Anschließend ist die Gabe von 500 ml einer Lösung aus 0,45 %iger NaCl und 5 %iger Glucose mit 40 ml NaHCO_3 und 10 ml einer 7,45 %igen KCl-Lösung vorgeschrieben. Die MTX-Infusion führt den Patienten weitere 3270 ml/m^2 verteilt über einen Tag zu. Die Hydrierung wird ohne MTX an den zwei folgenden Tagen weitergeführt.

5.3 Patienten

Für die pharmakokinetische Auswertung wurde die Datenbank des Fachbereichs klinische Pharmakologie der Klinik und Poliklinik für Kinderheilkunde - Pädiatrische Hämatologie/Onkologie – mit Stand vom Dezember 2000 verwendet.

Pharmakokinetisch ausgewertet werden konnten schließlich 59 Patienten (Tabelle 25, S. 137), von denen 471 Messwerten zur Verfügung standen. Das Alter betrug im Mittel $6,0 \pm 4,4$ Jahre (a) ($n = 57$). Das Minimum bei Pat. 32 betrug 0,8 a. Das Maximum lag mit 16,8 a bei Pat. 21. Der Median unterschied sich mit 5,4 a nur unwesentlich vom Mittelwert. In Abbildung 27 ist die Altersverteilung der Patienten aufgetragen.

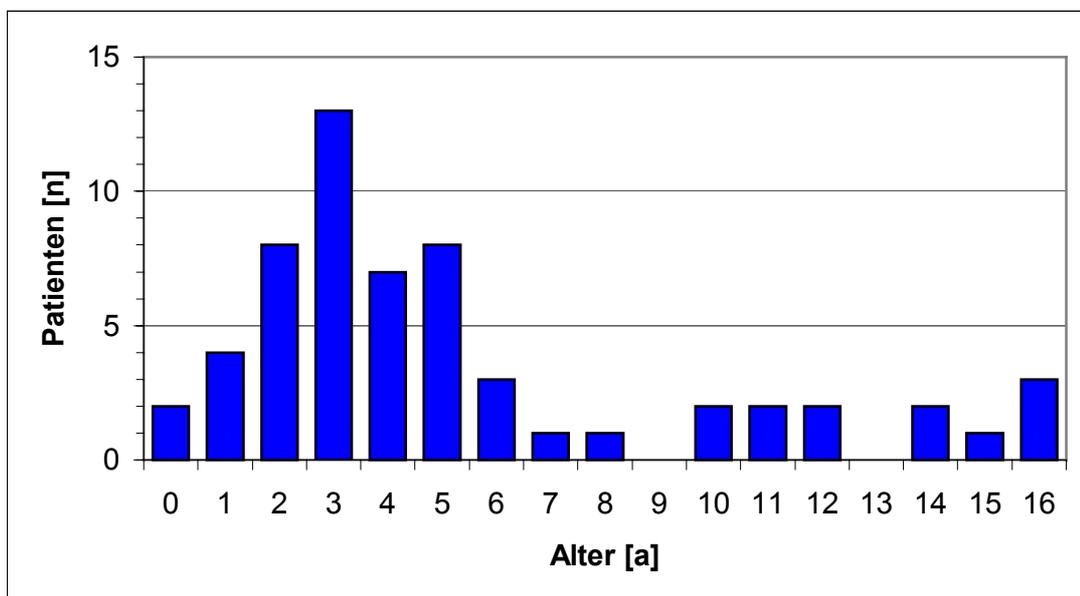


Abbildung 27: Altersverteilung der ausgewerteten ALL-Patienten.

Die weiteren Kovariablen Länge, KOF und Masse korrelierten (nicht linear) wie erwartet mit dem Alter und sind in Tabelle 25 (S. 137) aufgeführt.

Die Unterteilung nach Geschlecht zeigt 30 weibliche und 29 männliche Patienten.

Die absoluten MTX-Dosen reichten von 1,5 g (Pat. 32) bis 9,7 g (Pat. 16) und lagen im Mittel bei $4,4 \text{ g} \pm 1,9 \text{ g}$ bzw. im Median bei 3,9 g. Dabei wurden den Patienten im Mittel $98 \% \pm 6 \%$ und im Median 100 % der Solldosis von 5 g/m^2 verabreicht. Die kleinste Dosis bekam mit 73 % der jüngste Pat. 32. Die höchste Dosis liegt mit 104 % nur unwesentlich über der Solldosis von 5 g/m^2 .

Ingesamt handelt sich hierbei um eine repräsentative Gruppe von ALL-Patienten, wie sie auch in anderen Studien beobachtet wurde [29, 53, 123, 135].

5.4 Messmethoden

5.4.1 Kapillarelektrophoretische Bestimmung der Methotrexat und 7-OH Methotrexat Plasmakonzentrationen

Die Bestimmung der Plasmakonzentrationen erfolgte durch eine im Labor des Arbeitskreises Klinische Pharmakologie der Kinderklinik validierte kapillarelektrophoretische (CE) Bestimmungsmethode, die 1998 von Sczesny etabliert wurde [156].

Einige Plasmaproben, die am Infusionsende abgenommen wurden, bestimmte man sowohl mit dem Emit-Assay als auch mit der CE-Methode. Im Fall solcher doppelt bestimmter Proben wurde die kapillarelektrophoretische Methode in die Auswertung integriert und das Ergebnis des Emit-Assays verworfen, um keine zu starke Wichtung dieses Messwertes zu bekommen. Die kapillarelektrophoretische Methode wurde dem Emit-Assay vorgezogen, da zur Bestimmung dieser c_{\max} Konzentrationen bei der CE-Methode keine Verdünnungsschritte angewandt werden müssen. Der Emit-Assay ist daher eher mit Fehlern behaftet [54]. Weiterhin konnten somit die MTX und 7-OH MTX-Werte mit der gleichen Methode, die ja nur durch die CE zu bestimmen sind, ausgewertet werden.

5.4.1.1 Durchführung der CE-Bestimmung

Die abgeserten Plasmaproben wurden im Gefrierschrank bei 4° C bis zur Aufarbeitung gelagert. 20 µl dieser Proben wurden mit 20 µl PBS und 10 µl Aminopterin als Internem Standard versetzt. Anschließend setzte man 500 µl eiskaltes Acetonitril (ACN) zur Fällung der Proteine zu. Die aufgearbeiteten Proben wurden dann 15 min bei 15000 rpm und 4° C abzentrifugiert. Etwa 30 µl des Überstandes wurden in CE-Probengefäße überführt.

Die Trennung erfolgte in einem täglich frisch hergestellten Puffer aus 90 mM NaH_2PO_4 , dem 8 mg/ml β -Hydroxypropyl-Cyclodextrin zugesetzt werden. Der Puffer wurde schließlich mit Na_2HPO_4 auf pH 5,9 eingestellt. Die 30/37 cm Kapillare (ID: 50 µm) mit erweitertem Detektionsfenster (Bubble Cell) wurde 2 min mit NaOH und 2 min mit Laufpuffer vor jedem Lauf gespült. Nach der Druckinjektion (10 s mit

3448 Pa) der Analyse erfolgte die Trennung bei 20 kV. Anschließend wurde 1 min mit H₂O nachgespült.

Zur Quantifizierung der Proben wurde eine Kalibrationsgerade, bestehend aus 6 Messpunkten im Bereich von 5 µM bis 150 µM, erstellt. Als Kontrolle bestimmte man vier Richtigkeitskontrollen in diesem Bereich.

Die Bestimmungsgrenze der Methode liegt sowohl für MTX als auch für 7-OH MTX bei 5 µM.

5.4.2 Emit-Methotrexat-Test

Der Emit-MTX-Test ist ein homogener Enzymimmunoassay, der zur Verwendung bei der quantitativen Analyse von MTX in menschlichem Serum oder Plasma verwendet wird. Er wird in der Routine im Stationslabor zur Kontrolle der MTX-Werte und zur Steuerung des LV-Rescues verwendet. Der angegebene Messbereich liegt zwischen 0,3 µM und 2600 µM. Konzentrationen über 2,0 µM müssen entsprechend verdünnt werden [169]. Bis zu einer Grenze von 0,2 µM werden die Messwerte quantitativ dokumentiert (vgl. Bestimmungsgrenze). Werte unter dieser Grenze werden als LOQ gekennzeichnet und wurden in der folgenden pharmakokinetischen Auswertung nicht mit einbezogen.

5.5 Populationspharmakokinetik

5.5.1 Kinetica 2000

Bei Kinetica handelt es sich um eine pharmakokinetische Software, die zur Bestimmung von PK-Parametern so genannte „nonlinear mixed effect“ Modelle verwendet. Dabei kann die Verteilung der kinetischen Populationsparameter (normalverteilt oder log-normalverteilt) ebenso abgeschätzt werden wie die interindividuelle Variabilität und der so genannte Restfehler, der nicht durch das Modell beschrieben werden kann. Im Gegensatz zur Standard-2-Stage (S2S) Methode können hierbei Kovariablen wie Alter und Körperoberfläche in die Auswertung eingeschlossen werden.

Die Abschätzung der individuellen und der populationspharmakokinetischen (PK) Parameter erfolgt in zwei Schritten. Beim Schritt E, der „Conditional Expectation“, werden die individuelle PK-Parameter unter der Annahme einer bekannten Verteilung der Populationsparameter (Mittelwert ± Varianz) und einer bekannten Fehler-

verteilung (Mittelwert \pm Varianz) abgeschätzt. Beim Schritt M, der „Likelihood Maximization“, werden die neuen Populationsparameter (Mittelwert \pm Varianz) aus den im ersten Schritt gewonnenen Werten berechnet. Diese iterativen Schritte werden wiederholt dieser EM-Prozedur unterzogen, bis ein vorher definiertes Abbruchkriterium erreicht wird. Bei solch einem Abbruchkriterium kann es sich um die Anzahl der Wiederholungen oder die Differenz zwischen den Ergebnissen zweier aufeinander folgender Läufe handeln. Diese Kriterien können frei festgelegt werden (Abbildung 28).

Schlussendlich erhält man sowohl die Populationsparameter für die kinetischen Parameter („fixed Effect“) als auch die Abschätzung der interindividuellen Schwankung und des Restfehlers.

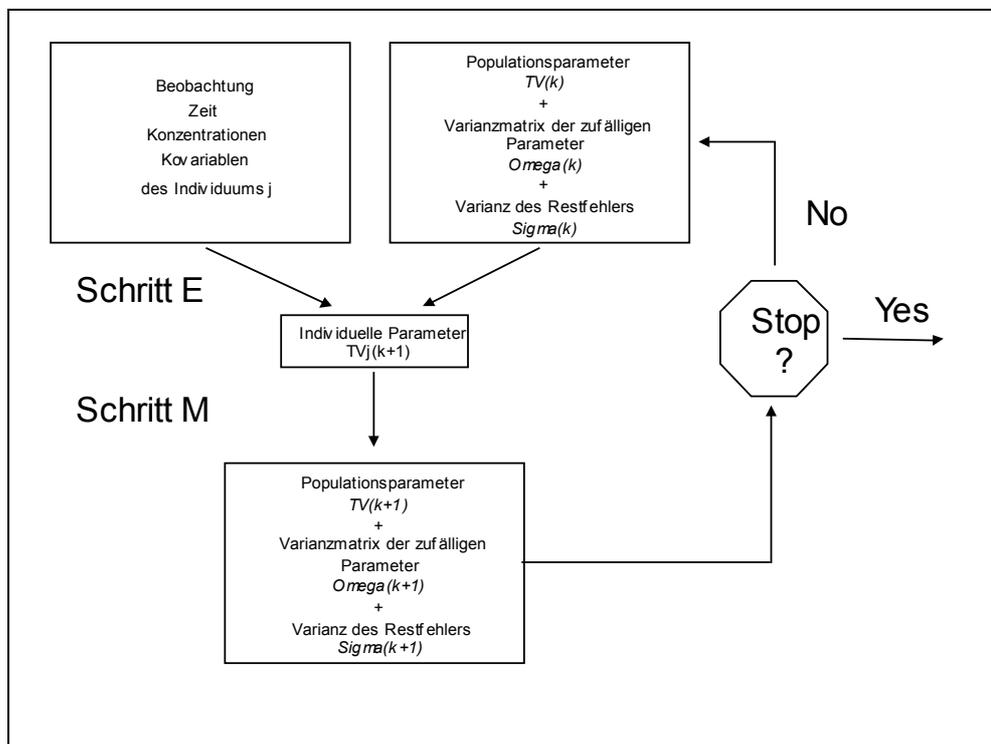


Abbildung 28: Beschreibung der Methode zur Gewinnung der Populationsparameter nach dem EM-Prinzip (Estimation and Maximization), wie es in Kinetica integriert ist.

5.5.2 NONMEM

Bei NONMEM (nonlinear mixed effects model) handelt es sich um eine Software, das computergestützt nichtlineare Regressionsmodelle an Daten mittels des „Maximum likelihood“-Algorithmus anpasst [3, 14, 24]. In unserem Fall werden populati-

onpharmakokinetische (PK) Parameter durch diese Modelle abgeschätzt, wobei sowohl berechnete feste Parameter (fixed effects) als auch durch das Modell nicht erklärbare inter- und intraindividuelle Effekte (random effects) berücksichtigt werden, daher der Name „mixed effect model“. Nonmem ist insbesondere dann nützlich, wenn nur eine geringe Anzahl an Messwerten für jedes Individuum (sparse data) vorhanden sind (z.B. aus ethischen Gründen) [177]. Dabei schätzt es fehlende PK-Parameter aus den Werten der übrigen Population ab. Weiterhin ermöglicht Nonmem den Einfluss von Kovariablen wie Alter, Masse und Kreatininclearance in das Modell quantitativ zu integrieren [174].

5.6 Ergebnisse

5.6.1 Deskriptive Statistik der Rohdaten

Im folgenden Abschnitt werden die Rohdaten des 5 g/m² MTX über 24 h Protokolls deskriptiv beschrieben. Dabei werden die 24 h und 48 h Werte detailliert besprochen und können als Richtgröße für weitere Messwerte herangezogen werden.

Soweit bekannt, werden die in Münster gemessenen Daten mit dem Gesamtkollektiv der Daten der ALL-Patienten verglichen.

5.6.1.1 24 h Werte von Methotrexat und 7-OH Methotrexat

Von besonderem Interesse für die Therapie sind die 24 h Werte, die am Ende der Infusion gemessen werden. Da MTX nach Infusionsende sehr schnell eliminiert wird, korreliert diese Maximalkonzentration stark mit der AUC, einem Parameter für die Therapieintensität der Substanz. Es verwundert daher nicht, dass dieser 24 h Wert als Ziel für individuell dosierte Therapieschemata diente [60, 175].

Bei den hier untersuchten Patienten betrug der Mittelwert der 160 bestimmten Proben 57,9 µM ± 23,3 µM (Abbildung 29). Der Median lag bei 55,9 µM. Der Streubereich der Daten reichte von einem Minimum von 14,8 µM bis zu einem Maximum bei 157,6 µM. Die Werte erstreckten sich also über mehr als eine Zehnerpotenz.

Die Ergebnisse der Studienzentrale in Hannover, welche die Daten für Deutschland erhebt, zeigten für das ALL 95 Protokoll statistisch die gleiche Werte (P > 0,8, unverbundener t-Test). Die Standardabweichung der Werte war allerdings etwa doppelt so hoch wie in Münster (Tabelle 6, S. 63).

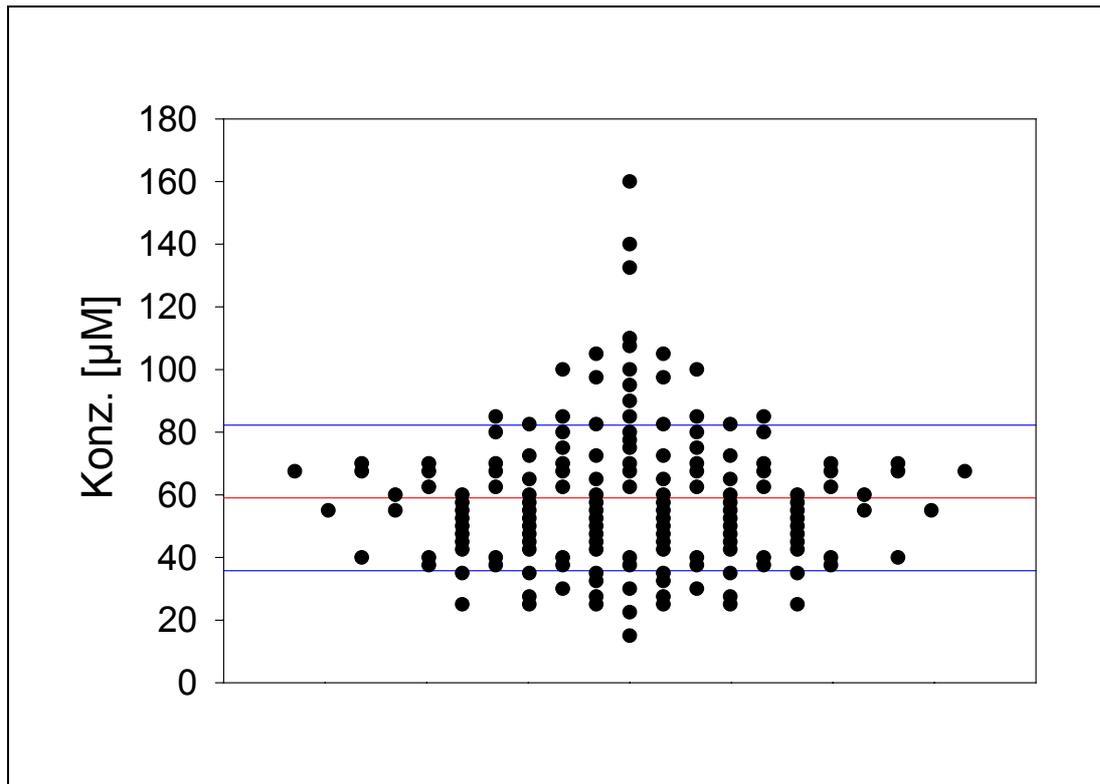


Abbildung 29: Häufigkeitsverteilung der 24 h MTX-Werte. Der Mittelwert der 160 gemessenen Werte liegt bei 57,9 µM (rot) \pm 23,3 µM (blau).

Die 159 gemessenen 7-OH MTX-Werte zeigten einen Mittelwert von 22,9 µM \pm 10 µM (Abbildung 31). Damit lagen die Werte des Metaboliten um etwa den Faktor 2,5 niedriger als die MTX-Werte. Vergleichsdaten mit anderen deutschen Kliniken waren hier nicht vorhanden.

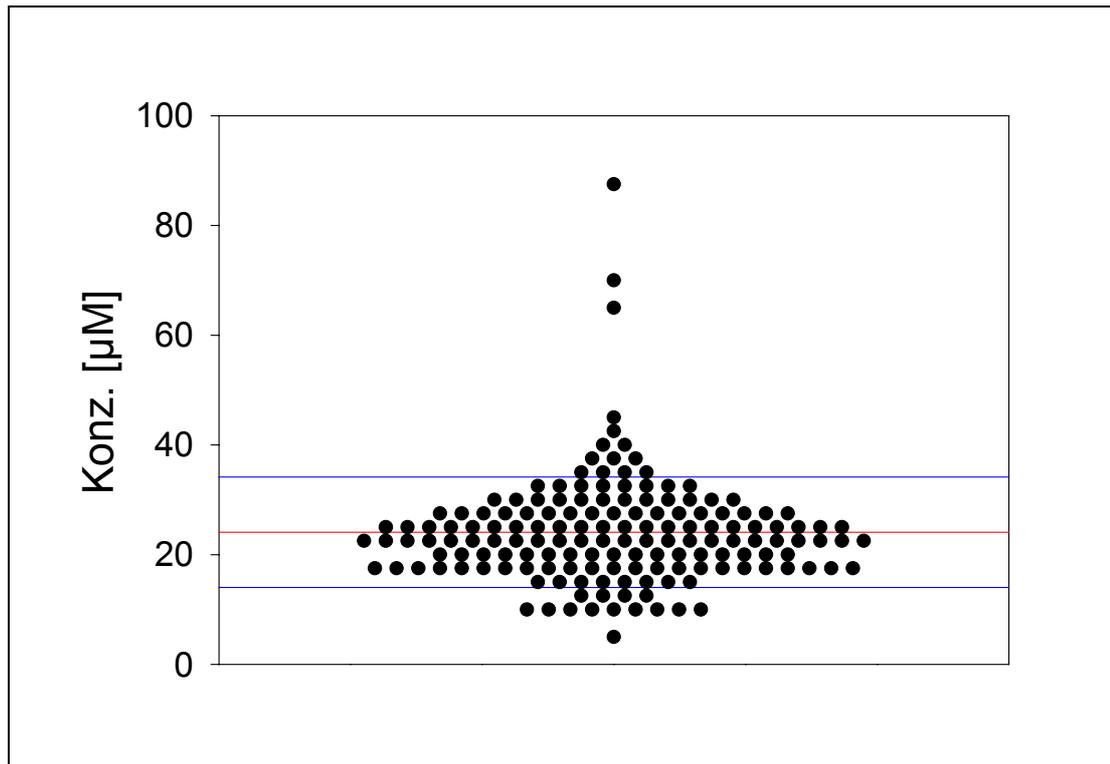


Abbildung 31: Häufigkeitsverteilung der 7-OH MTX-Werte am Ende der Infusion (Stunde 24). Der Mittelwert ($n = 159$) beträgt $22,9 \mu\text{M}$ (rot) $\pm 10,0 \mu\text{M}$ (blau).

5.6.1.2 44 h und 48 h Werte

Obwohl die AUC von MTX bei diesem Infusionschemata maßgeblich von den 24 h Werten geprägt wird, fällt den 44 h und 48 h Spiegel in erhebliche klinische Bedeutung zu. Mit Mittelwerten von $0,57 \mu\text{M}$ bzw. $0,49 \mu\text{M}$ lagen diese Werte zwar nur noch bei etwa 1 % der 24 h maximal erreichten Plasmakonzentrationen, sie sind jedoch noch immer hochtoxisch [59, 127, 165]. Weiterhin wird die Dosis des lebensnotwendigen Rescue nach diesen Werten eingestellt. Dies kann nicht nur zur Vermeidung von Toxizitäten, sondern auch zur Abschwächung bzw. Aufhebung des zytostatischen Effektes führen [34], wie *Borsi et al.* in einer retrospektiven Studie mit 71 ALL-Patienten zeigen konnte [30].

Die 44 h Werte lagen in unserem Patientenkollektiv bei $0,57 \mu\text{M} \pm 0,21 \mu\text{M}$. Der Median betrug $0,55 \mu\text{M}$ und lag damit etwa beim Mittelwert. Das Minimum lag bei $0,24 \mu\text{M}$ und somit noch oberhalb der Grenze, bei der die Kinder aus der stationären Behandlung entlassen werden (s. S. 57).

Der Mittelwert der 99 gemessenen 48 h Werte bestimmt man auf $0,49 \mu\text{M} \pm 0,19 \mu\text{M}$ mit einem Median von $0,5 \mu\text{M}$. Das Minimum lag hier bereits unter der

0,2 µM Grenze. Betrachtet man die Mittelwerte der in Münster gemessenen Werte und den in Hannover gesammelten Werte, zeigt sich auf den ersten Blick kein Unterschied. Allerdings ist die Standardabweichung (SD) dieser Werte 4mal größer als der beschriebene Mittelwert. Dies ist ein klares Zeichen, dass keine Normalverteilung der Daten vorliegt. Betrachtet man daher die normierte Häufigkeitsverteilung (Abbildung 32) zeigt sich ein deutlicher Unterschied der Messergebnisse. Dieser schlägt sich ebenfalls in den unterschiedlichen Medianen von 0,5 µM in Münster und 0,26 µM des Gesamtkollektivs nieder.

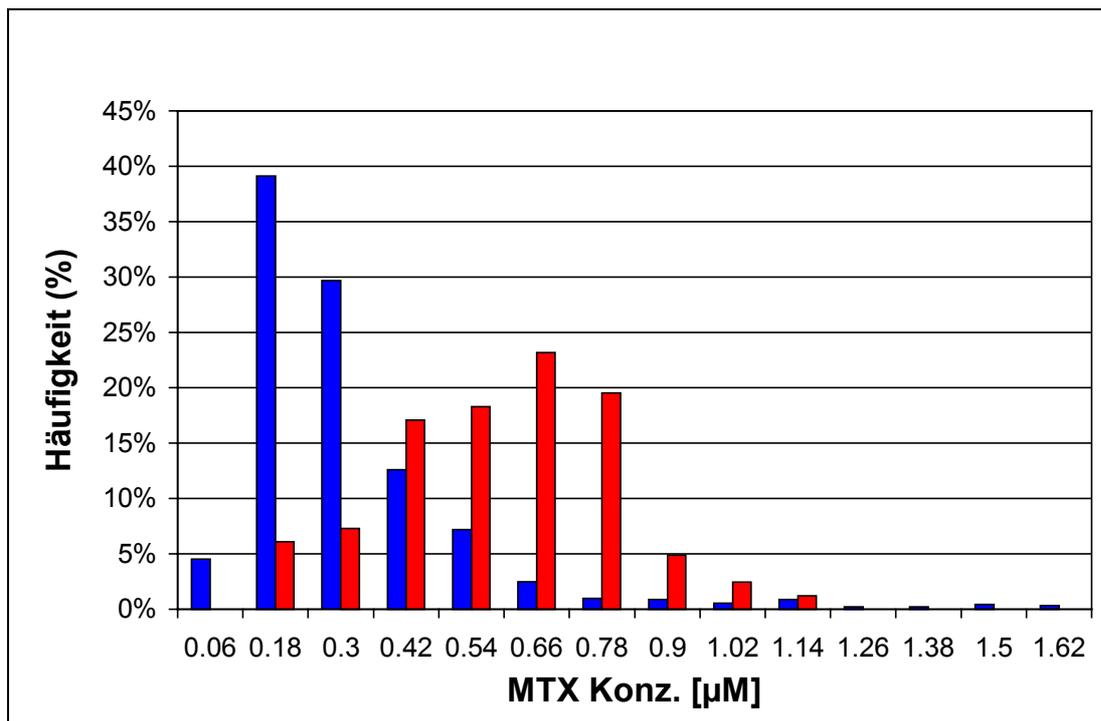


Abbildung 32: Häufigkeitsverteilung der 48 h MTX-Werte. Trotz eines identischen Mittelwertes erkennt man die Unterschiede zwischen den Werten aus Münster (rot) und den 48 h Werten des Gesamtkollektiv aller mit diesem Therapieschema behandelten Patienten (blau).

Tabelle 6: Deskriptive Beschreibung der in dieser Arbeit und in der Gesamtstudie bestimmten MTX und 7-OH MTX Plasmakonzentrationen. „< 5“ bzw. „< 0,2“ zeigen, dass diese Werte unter der Bestimmungsgrenze der CE-Methode bzw. des Emit-Assays lagen.

	Münster				Gesamtstudie	
	7-OH MTX	MTX			MTX	
	24 h	24 h	44 h	48 h	24h	48h
n	159	160	78	99	1221	1044
Mittelwert [μM]	22,9	57,9	0,57	0,49	57,3	0,47
SD [μM]	10	23,3	0,21	0,19	41,6	2,11
Max [μM]	86	157,6	1,15	0,93	k.A.	k.A.
Min [μM]	< 5	14,8	0,24	< 0,2	k.A.	k.A.
Med [μM]	22	55,9	0,55	0,5	48,6	0,26
25% [μM]	17	40,7	0,39	0,363	32,4	0,2
75% [μM]	27	68,6	0,7	0,618	72,5	0,4

5.6.2 Kinetica 2000

5.6.2.1 Bestimmung des Strukturmodells

Nach Aufbereitung der Rohdaten wurde mittels Kinetica das so genannte Strukturmodell bestimmt. Dieses Modell stellt die Grundlage für weitergehende pharmakokinetische Untersuchungen dar. Es bestimmt die Anzahl der verwendeten Kompartimente [74], die zugrunde liegende Kinetik, die Wichtung der Messpunkte sowie die Verteilung der verwendeten pharmakokinetischen Parameter. Bereits durch visuelle Betrachtung der halblogarithmisch aufgetragenen Rohdaten kann man ein 1-Kompartiment Modell ausschließen, da sich durch die Messpunkte in Abbildung 33 keine sinnvolle Ausgleichsgerade legen lässt. Die schlechte Anpassung der berechneten MTX-Plasmakonzentrationen (c_{pred}) an die beobachteten Werte (c_{obs}) bestätigt dies im Kinetikmodell (Abbildung 34). Aufgrund der Literatur kann von einer linearen Kinetik (Kinetik 1. Ordnung) ausgegangen werden. Dies wurde hier nicht weiter untersucht, da keine Daten mit verschiedenen Dosierungen vorhanden waren, wie sie für diese Analyse notwendig wären.

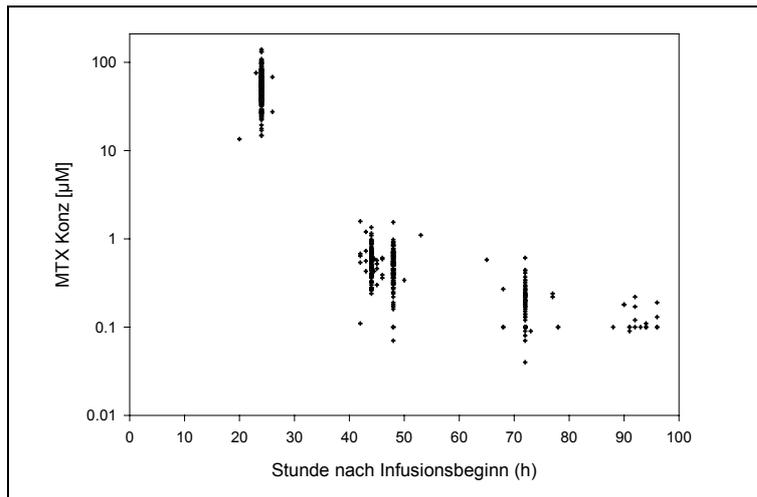


Abbildung 33: Halblogarithmische Auftragung der 471 MTX-Plasmakonzentrationen bei einer 24 h Infusion von 5 g/m² Methotrexat.

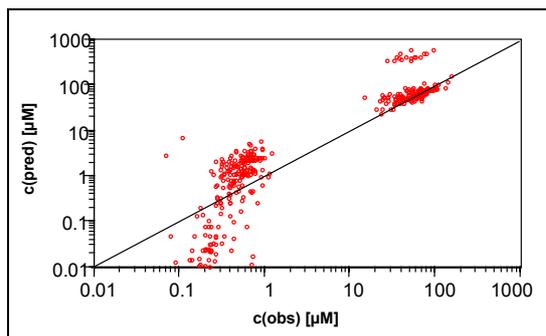


Abbildung 34: Logarithmische Auftragung der beobachteten MTX-Konzentrationen (c_{obs}) gegen die berechneten Konzentrationen (c_{pred}) bei Anpassung an ein 1-Kompartimentmodell.

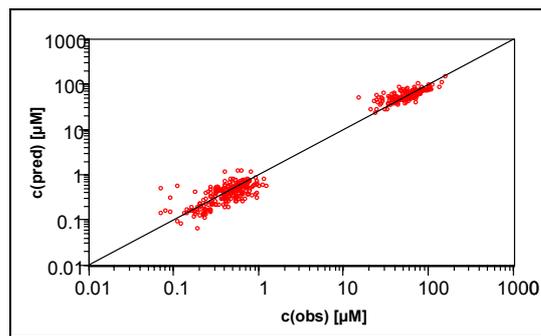


Abbildung 35: Logarithmische Auftragung von c_{obs} gegen c_{pred} eines 2-Kompartimentmodells und erster Winkelhalbierenden.

In Tabelle 8 (S. 68) sind die Ergebnisse verschiedener PK-Auswertungen der Patienten und deren gemessen Plasmakonzentrationen zusammengestellt. Die Auswertungen unterscheiden sich in dem Modell, das der Auswertung unterstellt wurde.

So unterscheiden sich die Modelle 1, 4 und 5 jeweils in der Wichtung der Messwerte. Modell 5 verwendet ein additives oder auch homoskedastisches Fehlermodell. Bei diesem Fehlermodell geht man davon aus, dass der Messfehler bei allen Konzentrationen gleich ist. Dieses Fehlermodell zeigt bereits grafisch eine sehr schlechte Anpassung der c_{obs} - gegen die c_{pred} -Werte (nicht gezeigt). Das zugrunde liegende Modell kann daher verworfen werden.

In Modell 1 und 4 sind so genannte proportionale oder auch heteroskedastische Fehlermodelle verwendet worden. Dabei handelt es sich um Fehlermodelle, bei denen man davon ausgeht, dass der Messfehler proportional zum Messwert ansteigt.

Dabei wurde in Modell 4 ein Proportionalitätsfaktor, der umgekehrt proportional zum Quadrat der beobachteten Konzentrationen ($1/c_{\text{obs}}^2$) steht, verwendet. In Modell 1 erfolgte die Auswertung über einen Proportionalitätsfaktor der, reziprok zur beobachteten Konzentration ($1/c_{\text{obs}}$) steht. Die grafische Auswertung von Modell 1 (Abbildung 36) zeigt, dass die gewichteten Restfehler (wres) gleichmäßig über alle Konzentrationsbereiche verteilt sind. Im Gegensatz dazu unterscheiden sich im Modell 4 die Restfehler zwischen dem hohen und dem niedrigen Konzentrationsbereich nicht zufällig (Abbildung 37). Das Modell wird daher verworfen.

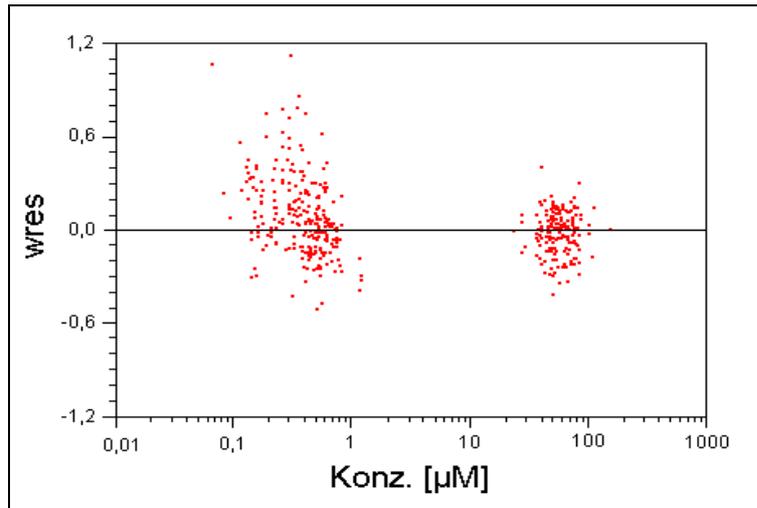


Abbildung 36: Halblogarithmische Auftragung der $1/c_{\text{pred}}$ gewichteten Residuen (wres) gegen die berechneten MTX-Konzentrationen der Kinetica Auswertung von Modell 1.

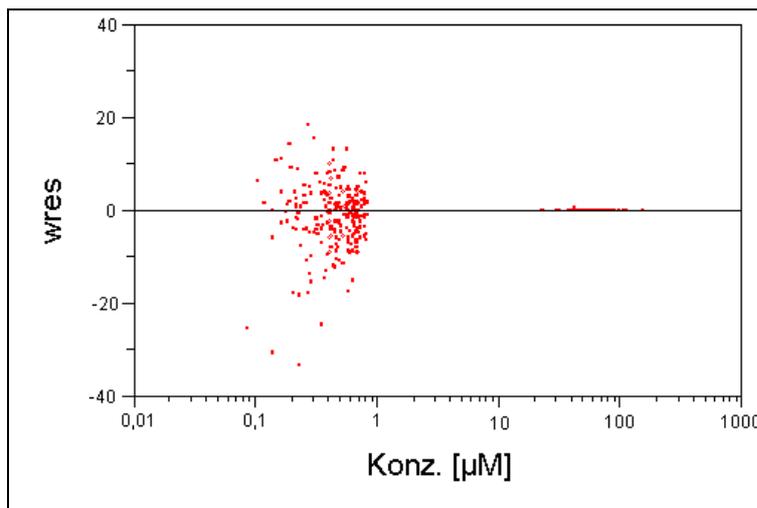


Abbildung 37: Halblogarithmische Auftragung der $1/c_{\text{pred}}^2$ gewichteten Residuen (wres) gegen die berechneten Konzentrationen (c_{calc}) aus Modell 4.

In Abbildung 35 (s. S. 64) sind die beobachteten MTX-Plasmakonzentrationen (C_{obs}) gegen die berechneten MTX-Werte (C_{pred}) von Modell 1 aufgetragen. Die eingezeichnete 1. Winkelhalbierende zeigt den Idealfall der Übereinstimmung von berechnetem (predicted) und gemessenem (observed) Wert an. In Abbildung 35 sieht man das regellose Schwanken der Punkte um diese Winkelhalbierende. Dies schließt einen systematischen Fehler aus.

Mit der Wichtung $1/c_{\text{pred}}$ wurde anschließend die Verteilung der kinetischen Parameter V , k_e , k_{12} , k_{21} untersucht. Dabei kann eine Normalverteilung (NV) oder eine log-Normalverteilung dieser Parameter unterstellt werden.

Tabelle 8 (S. 68) zeigt mit den Modellen 1, 6, 9, 12 und 13 verschiedene Ansätze, die sich nur in der unterlegten Verteilung der vier PK-Parameter unterscheiden. Bei NV aller vier PK-Parameter zeigt sich dabei die geringste Objective Function (ObjF) (Modell 1). Diese dient dabei als eines der Kriterien für die Güte der Anpassung der Plasmakonzentrationen des Modells an die gemessenen Plasmakonzentrationen und errechnet sich aus der Summe der Abweichungsquadrate [133]

Für das Modell 1 ergeben sich schließlich folgende PK-Parameter. Aus $V_1 = 12,4 \text{ l}$, $k_e = 0,519 \text{ 1/h}$, $k_{12} = 0,014 \text{ 1/h}$ und $k_{21} = 0,046 \text{ 1/h}$ (Variationskoeffizient s. Tabelle 8) berechnet sich $V_2 = 3,8 \text{ l}$ und $V_{d_{ss}} = 16,2 \text{ l}$. Die Clearance berechnet sich zu $6,43 \text{ l/h}$. Die Flächenanteile von 99,7 % für die Verteilungsphase und 0,3 % für die Eliminationsphase stellen MTX aufgrund der langen Verteilungsphase als eine Ausnahme unter den Arzneistoffen heraus. Die Halbwertszeiten betragen $1,3 \text{ h}$ ($t_{1/2\alpha}$) und $15,5 \text{ h}$ ($t_{1/2\beta}$). Weiterhin kann das V auf die KOF normiert werden und ergibt sich aus $\frac{12,4 \text{ l}}{0,87 \text{ m}^2}$ zu $14,3 \text{ l/m}^2$, wobei $0,87 \text{ m}^2$ die durchschnittliche KOF unserer Population

ist.

Tabelle 8: Übersicht über die wichtigsten Kinetica 2-Kompartimentmodelle ohne Kovariablen zur Ermittlung des Strukturmodells

ModellNr.	1	4	5	6	9	12	13
Wichtung	$1/c_{\text{pred}}$	$1/c_{\text{pred}}^2$	1	$1/c_{\text{pred}}$	$1/c_{\text{pred}}$	$1/c_{\text{pred}}$	$1/c_{\text{pred}}$
V	NV	NV	NV	lgNV	lgNV	lgNV	NV
k_e	NV	NV	NV	lgNV	lgNV	NV	lgNV
k_{12}	NV	NV	NV	lgNV	NV	NV	NV
k_{21}	NV	NV	NV	lgNV	NV	NV	NV
ObjF	1281	612	2460	1797	1509	1843	1234
V [l]	12,4	11,4	12,3	12,0	10,2	15,0	11
k_e [1/h]	0,52	0,53	0,54	0,588	0,69	0,47	0,59
k_{12} [1/h]	0,014	0,019	0,011	0,046	0,017	0,014	0,15
k_{21} [1/h]	0,046	0,036	0,08	0,073	0,039	0,046	0,043
VK(V) [%]	48	39	46	50	48	43	56
VK(k_e) [%]	38	40	0,1			11	
VK(k_{21}) [%]	57	113	0		47	51	54
VK(k_{12}) [%]	131	97	1		152	117	141

5.6.2.2 Integration von Kovariablen

Weiterhin wurde die Abhängigkeit der kinetischen Parameter von den Kovariablen Alter und Körperoberfläche (KOF) untersucht. Kinetica bietet dabei die Möglichkeit, über eine lineare Regression die Kovariablen einzubinden und die Abhängigkeit abzuschätzen. Die ObjF dient dabei erneut als eines der Kriterien für die Annahme der Hypothese, dass das erweiterte Modell eine Verbesserung darstellt. In Tabelle 10 sind unterschiedliche Modelle aufgelistet. Gegenüber dem Basismodell (Modell 1), das absolute PK-Parameter liefert, zeigen alle aufgeführten Modelle eine Verbesserung der ObjF (niedrigerer Wert). Am besten schneidet dabei das Modell 15 ab, das die Kovariable Alter in das Verteilungsvolumen über eine lineare Regression integriert. Die ObjF sinkt dabei von 1239 (ohne Kovariablen) auf 1174 ab. Weiterhin sinken auch die interindividuellen Variabilitäten aller vier PK-

Parameter. So beträgt der Variationskoeffizient (VK) anstatt 49 % nach Integration der Kovariable V nur noch 24 %. Das Einschließen weiterer Kovariablen, wie in den Modellen 18, 19, 22 und 23 gezeigt, verbessert die ObjF nicht weiter. Ebenfalls zu keiner Verbesserung des Modells führt die Integration von Kovariablen in die Parameter k_{12} und k_{21} . Diese Parameter beschreiben im wesentlichen das 2. Kompartiment. Da vom peripheren Kompartiment keine Messwerte vorliegen, dient dieses Kompartiment nur der mathematischen Beschreibung der Verteilungsvorgänge. Ein Bezug zu physiologischen Variablen wie dem Verteilungsvolumen V ist nicht zu erwarten.

Tabelle 10: Kinetica 2-Kompartimentmodelle mit integrierten Kovariablen, normalverteilten Parametern und einer Wichtung $1/c_{pred}$. Dabei beziehen sich die blau markierten Werte auf einen Patienten mit durchschnittlichem Alter (5,9 a). Die rot markierte Werte beziehen sich auf einen Patienten mit durchschnittlicher Körperoberfläche (KOF [m^2]), die hier $0,87 m^2$ beträgt. Der grün markierte Wert bezieht sich auf einen Patienten mit durchschnittlicher KOF ($0,87 m^2$) und einem Alter von 5,9 a. Die Einheit ist daher [$1/m^2/a$].

Modell Nr.	1	15	25	22	23	18	19	20	21
Kovariablen	keine	Alter	Alter	Alter	Alter	KOF	KOF	KOF	KOF+Alter
auf		V	k_e	V, k_e	V, k_{12}	V	V, k_e	V, k_{21}	V
ObjF	1239	1174	1200	1209	1200	1201	1229	1224	1200
V [l]	12,4	13,7	12,6	18,7	15,6	18,0	20,3	17,9	17,8
k_e [1/h]	0,520	0,490	0,519	0,350	0,442	0,378	0,320	0,378	0,380
k_{12} [1/h]	0,014	0,013	0,014	0,011	0,014	0,011	0,013	0,012	0,011
k_{21} [1/h]	0,046	0,045	0,044	0,048	0,048	0,045	0,010	0,025	0,045
VK(V) [%]	49	24	33	23	23	23	25	23	22
VK(k_e) [%]	38	28	25	26	28	28	28	29	27
VK(k_{12}) [%]	58	55	63	66	56	63	82	66	63
VK(k_{21}) [%]	132	128	194	166	156	174	143	263	175

Für Modell 18 ergibt sich aus den ermittelten Mikrokonstanten eine CI von 7,99 l/h mit einem Verteilungsvolumen von $21,1 l/m^2 \pm 4,9 l/m^2$, das wie erwähnt in diesem

Modell linear abhängig von der KOF ist ($V = \text{KOF} * 24,7 \text{ l/m}^2 - 3,56 \text{ l}$). Die Halbwertszeiten berechnen sich für $t_{1/2\alpha}$ zu 1,77 h und für $t_{1/2\beta}$ zu 15,8 h.

Wie Abbildung 38 verdeutlicht, steigt im Modell 18 das V trotz Normierung durch die KOF mit zunehmender KOF an.

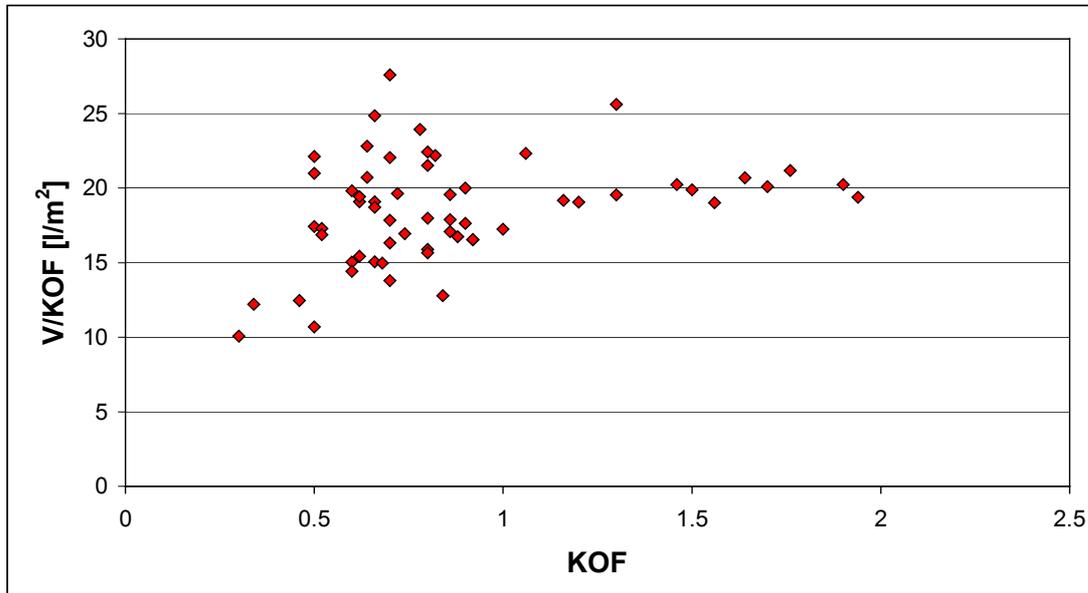


Abbildung 38: Das auf die Körperoberfläche normierte Verteilungsvolumen (V/KOF) steigt mit zunehmender Körperoberfläche an.

Dies führt bei Patienten mit kleiner KOF bei der Gabe von 5 g/m^2 MTX zu höheren Plasmakonzentrationszeitverläufen. In Abbildung 39 sind die Plasmakonzentrationszeitverläufe basierend auf Modell 18 in Abhängigkeit von der KOF dargestellt.

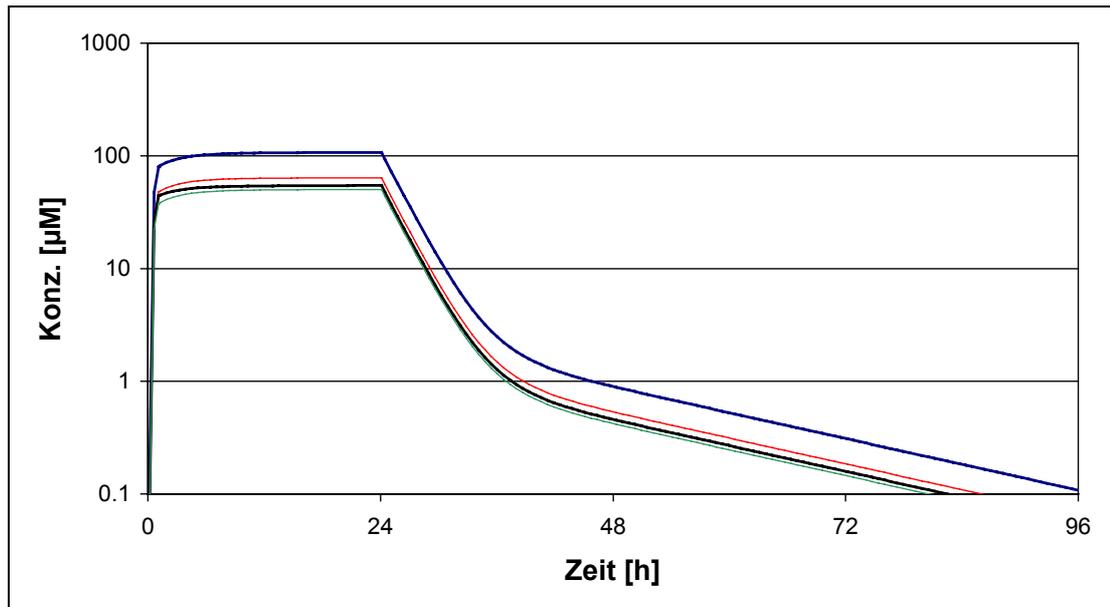


Abbildung 39: MTX-Plasmakonzentrationszeitverläufe basierend auf Modell 18 bei verschiedenen KOF. Die (extrapolierten) Werte bei $0,25 \text{ g/m}^2$ (blau) liegen deutlich oberhalb der Werte für $0,5 \text{ g/m}^2$ (rot), $0,87 \text{ g/m}^2$ (schwarz) und $1,5 \text{ g/m}^2$ (grün).

5.6.3 Nonmem

5.6.3.1 Strukturmodell

Aus den in Kapitel 5.6.2.1 (S. 63) genannten Gründen wurde auch für die Auswertung mit Nonmem ein lineares 2-Kompartimentmodell verwendet. Dieses 2-Kompartiment Modell schätzt die PK-Parameter V , k_{el} , k_{12} und k_{21} , die mit theta (θ) 1-4 benannt sind, ab. Diese Parameter schwanken von Individuum zu Individuum. Neben der interindividuelle Variabilität eta (η) und deren Varianz omega (ω) wird auch der Restfehler epsilon (ϵ) und dessen Varianz sigma (σ) abgeschätzt. Dabei wird in dieser Auswertung ein gemischtes Fehlermodell aus additivem und multiplikativem Fehler verwendet. In Tabelle 28 (S. 144) sind die Fortran-Befehlszeilen des hier verwendeten Strukturmodells aufgeführt.

Wie in Tabelle 9 bei Modell 45 gezeigt, ergibt sich für die Population ohne Einarbeitung von Kovariablen ein Verteilungsvolumen von $14,1 \text{ l}$. Die Eliminationskonstanten k_e , k_{12} , k_{21} werden auf $0,347 \text{ 1/h}$, $0,00598 \text{ 1/h}$ und $0,0332 \text{ 1/h}$ bestimmt. Auffallend sind die Variationskoeffizienten (VK) dieser Parameter mit 57 % für das Verteilungsvolumen V , 0 %, 46 % und 0 % für k_e bzw. k_{12} und k_{21} . Erst die Einführung der Körperoberfläche (KOF) als Kovariable (Modell 46) führt zu einem sinnvollen Ergebnis, das sich auch durch eine niedrigere ObjF auszeichnet. Dabei ergeben

sich V zu $12,7 \text{ l/m}^2 \pm 27 \%$, k_e zu $0,73 \text{ 1/h/m}^2 \pm 37 \%$, k_{12} zu $0,022 \text{ 1/h/m}^2 \pm 27 \%$ und k_{21} zu $0,0234 \text{ 1/h/m}^2 \pm 54 \%$. Die Darstellung der beobachteten Konzentrationen gegen die durch das Modell vorhergesagten Konzentrationen (Abbildung 40) schwanken sowohl im niedrigen als auch im hohen Konzentrationsbereich um die erste Winkelhalbierende. Bei der Darstellung der gewichteten Residuen (wres) - also den um die Konzentration normalisierten Abweichungsquadraten - zeigt sich sowohl im niedrigen als auch im hohen Konzentrationsbereich keine regellose Streuung um die y-Achse (Abbildung 41). In beiden Konzentrationsbereichen steigen die wres mit steigender Konzentration an. Dies deutet vorhandene Schwierigkeiten für die Anpassung der PK-Parameter des Modells an. Daher sind die hierbei gewonnenen Ergebnisse kritisch zu bewerten und vorsichtig zu interpretieren.

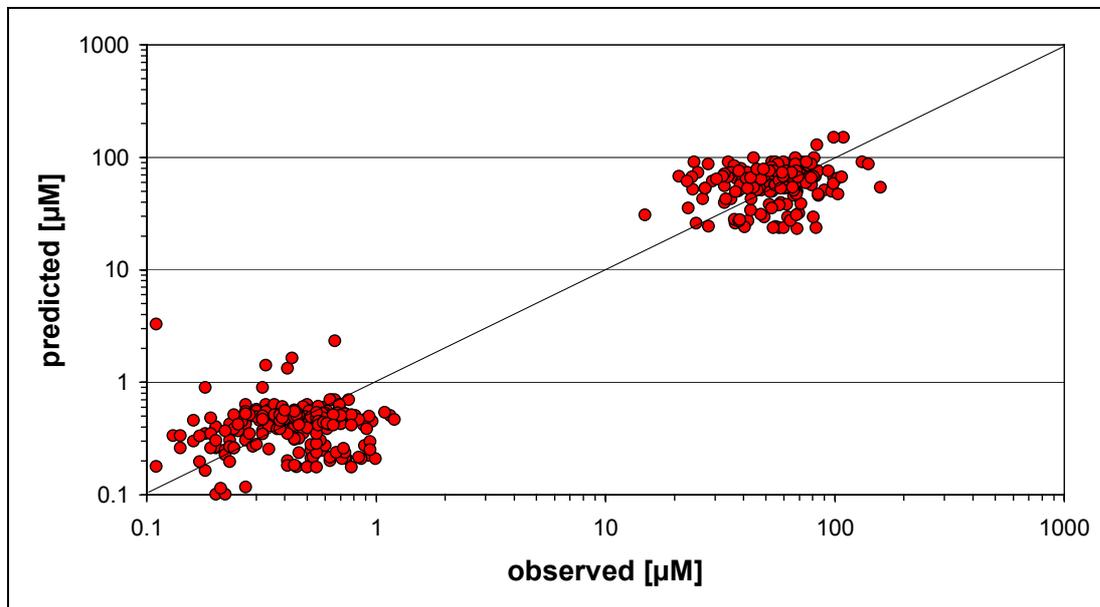


Abbildung 40: Logarithmische Darstellung der beobachteten (gemessenen) MTX-Plasmakonzentrationen (C_{obs}) gegen die vom Modell 46 vorhergesagten (C_{pred}) MTX-Plasmakonzentrationen. Zur Orientierung ist die erste Winkelhalbierende mit eingezeichnet.

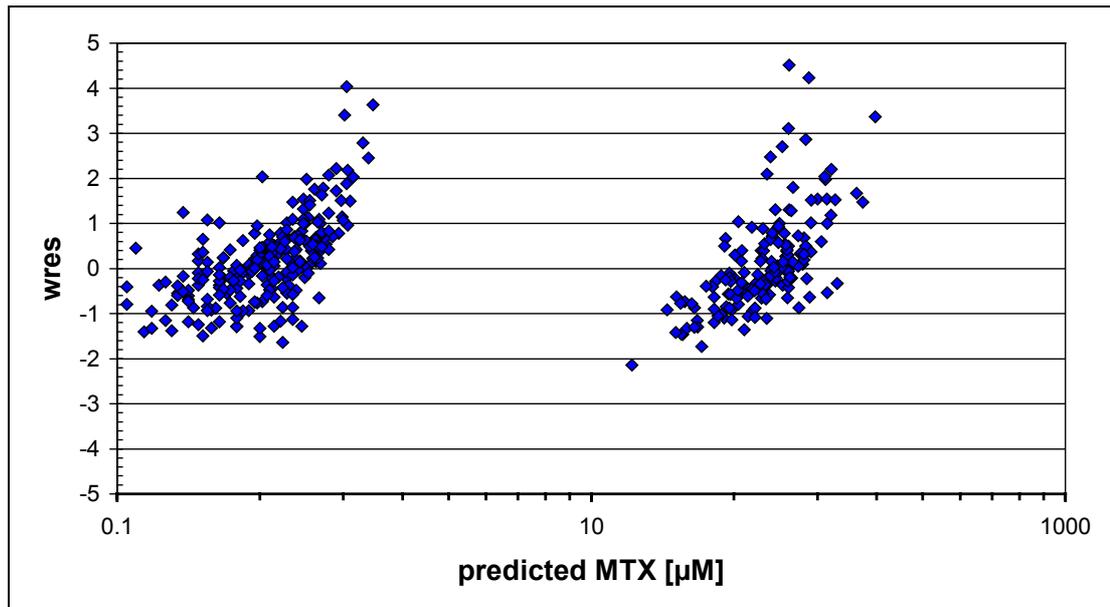


Abbildung 41: Halblogarithmische Darstellung der gewichteten Residuen (wres) gegen die vorhergesagte Konzentration (predicted) aus Modell 46.

Weitere Modelle mit der Kovariablen Alter wurden ebenfalls untersucht und sind in Tabelle 9 aufgeführt. Im Gegensatz zu Kinetica konnte zwar auch hierbei eine Verbesserung der ObjF erreicht werden, dabei gab es jedoch Ergebnisse, die das Modell in Frage stellten. So konnte z.B. keine Variabilität für k_e gefunden werden.

Tabelle 9: Nonmem Modelle zur Bestimmung des Grundmodells. Dabei wurde jeweils ein lineares 2-Kompartimentmodell mit kombiniertem Fehlermodell und normal verteilten PK-Parametern verwendet. Bei den rot markierten Werten ist die Körperoberfläche in das Modell integriert. Daher bezieht sich dieser Wert auf m^2 . Bei den blau markierten Werten ist das Alter als Kovariable integriert. Daher beziehen sich diese Werte auf Jahre [a]. Die kursiv gedruckten Werte θ_5 und θ_6 entsprechen dem y-Achsenabschnitt der Regressionsgerade und waren auf diesen Wert fixiert.

Modell Nr.	45	26	20	51	46	47	52	55	56	57
Alter						Age* θ	(Age* θ)+ θ_6			
auf						alle	alle	V u. k_e	V	k_e
KOF		(KOF* θ)+ θ_5	KOF* θ							
auf		V	V	V u. k_e	alle					
ObjF.	708	508	515	775	659	1400	731	533	531	653
V [l]	14,1	21,6	21,6	Fehler	12,7	Fehler		2,18	2,45	11,5
k_e [1/h]	0,347	0,328	0,328		0,728		0,0001	0,308	0,023	
k_{12} [1/h]	0,006	0,008	0,008		0,022		0,008	0,007	0,009	
k_{21} [1/h]	0,033	0,029	0,029		0,023		0,030	0,028	0,034	
θ_5 [l]		≈ 0					6,24	6,24		
θ_6 [1/h]							0,33		0,33	
VK(V)	57%	20%	19%	Fehler	27%	Fehler		24%	24%	39%
VK(k_e)	0%	0%	0%		37%		0%	0%	0%	
VK(k_{12})	46%	15%	16%		27%		21%	21%	57%	
VK(k_{21})	0%	24%	25%		54%		28%	31%	22%	

5.6.3.2 Einbau der Inter-Occasional-Variability (IOV)

Als einziges Kinetikprogramm ermöglicht Nonmem den Einbau einer so genannten Inter-Occasional Variability (IOV). Diese ermöglicht - analog zur Abschätzung der Variabilität zwischen zwei Individuen - die Abschätzung der Variabilität der PK-Parameter eines Individuums bei zwei oder mehr Gaben eines Arzneimittels. Diese wird parallel zu den PK-Parametern abgeschätzt. Da MTX im Protokoll der akuten lymphatischen Leukämie aus vier Gaben im Abstand von jeweils zwei Wochen besteht, kann man neben der interindividuellen Variabilität auch die Variabilität abschätzen, die ein Patient bei mehreren Gaben zeigt. Diese so genannte Interoc-

casional Variability (IOV) wurde ebenfalls in das Nonmem Modell 46 integriert. Dabei ergibt sich in allen drei Modellen eine um etwa 10 Punkte verbesserte ObjF. Ein Wert, der auf dem 1 % Signifikanzniveau eine Verbesserung des Modells anzeigt [43]. Dabei scheint es unwesentlich, ob die IOV in das Verteilungsvolumen oder in die Eliminationskonstante integriert wird. In der Darstellung der beobachteten zu den vorhergesagten MTX-Konzentrationen (nicht abgebildet) ist kein Unterschied zu Abbildung 40 zu erkennen. Die interindividuelle Variabilität bleibt nahezu unverändert, während der Restfehler sich leicht verringert.

Tabelle 10: Nonmem-Modelle mit integrierter Interoccasional Variability (IOV). Als Grundmodell dient jeweils ein Modell bei der die Körperoberfläche in alle PK-Parameter (V , k_e , k_{12} , k_{21}) integriert ist ($KOF * \theta$). Die rot markierten Werte beinhalten die IOV.

Modell Nr.	46	48	49	50
IOV	-	*(1+IOV)	*(1+IOV)	*(1+IOV)
auf	-	V	k_e	V und k_e
ObjF.	659	649	650	648
V [l/m ²]	12,7+27%	13,3+26%	12,5+23%	13,3+26%
k_e [1/h/m ²]	0,728+37%	0,72+42%	0,78+47%	0,721+42%
k_{12} [1/h/m ²]	0,022+27%	0,021+28%	0,0215+32%	0,021+28%
k_{21} [1/h/m ²]	0,0234+54%	0,025+64%	0,024+77%	0,0253+64%
θ_5 (IOV auf V)		19,8%		19,8%
θ_6 (IOV auf k_e)			11,8%	≈ 0%
σ (prop.) [%]	33%	28%	32%	29 %

5.6.3.3 Effekt von 7-OH Methotrexat auf die Pharmakokinetik des Methotrexat

In Modell 49 wurde zusätzlich der Einfluss des Metaboliten auf die PK-Parameter des MTX untersucht. Dabei können zwei physiologische Mechanismen auftreten. Da der Metabolit aus seiner Muttersubstanz gebildet wird, würde eine hohe 7-OH MTX-Konzentration für eine große metabolische Clearance des MTX sprechen. Auf der anderen Seite werden beide Substanzen renal eliminiert. Eine hohe 7-OH MTX-Plasmakonzentration könnte ebenfalls für eine geringe renale Clearance sprechen, die eine hohe MTX-Konzentration zur Folge hätte.

In Abbildung 42 ist der Zusammenhang zwischen den gemessenen 7-OH MTX-Werten und den entsprechenden vorhergesagten MTX-Konzentrationen dargestellt (Modell 49). Durch die Regressionsgerade erkennt man, dass die vorhergesagten MTX-Konzentrationen unabhängig von den gemessenen 7-OH MTX-MTX-Plasmakonzentrationen sind.

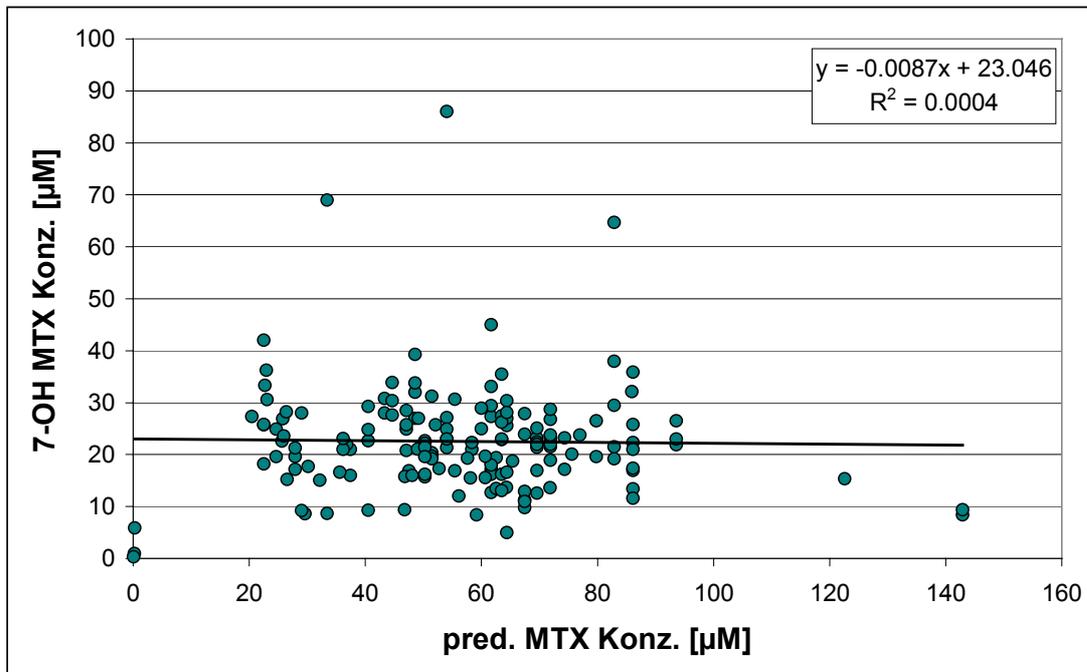


Abbildung 42: Darstellung der gemessenen 7-OH MTX-Konzentrationen gegen die vorhergesagten MTX-Konzentrationen.

Abbildung 43 und Abbildung 44 zeigen die Abhängigkeit von k_e bzw. V und der gemessenen 7-OH MTX-Konzentration. Dabei zeigt sich für die Eliminationskonstante eine schwache negative Korrelation ($R^2 = 0,07$), während das Verteilungsvolumen unabhängig von der Metabolitenkonzentration ist.

Aufgrund der fehlenden Abhängigkeit wurde 7-OH MTX nicht in das Modell integriert.

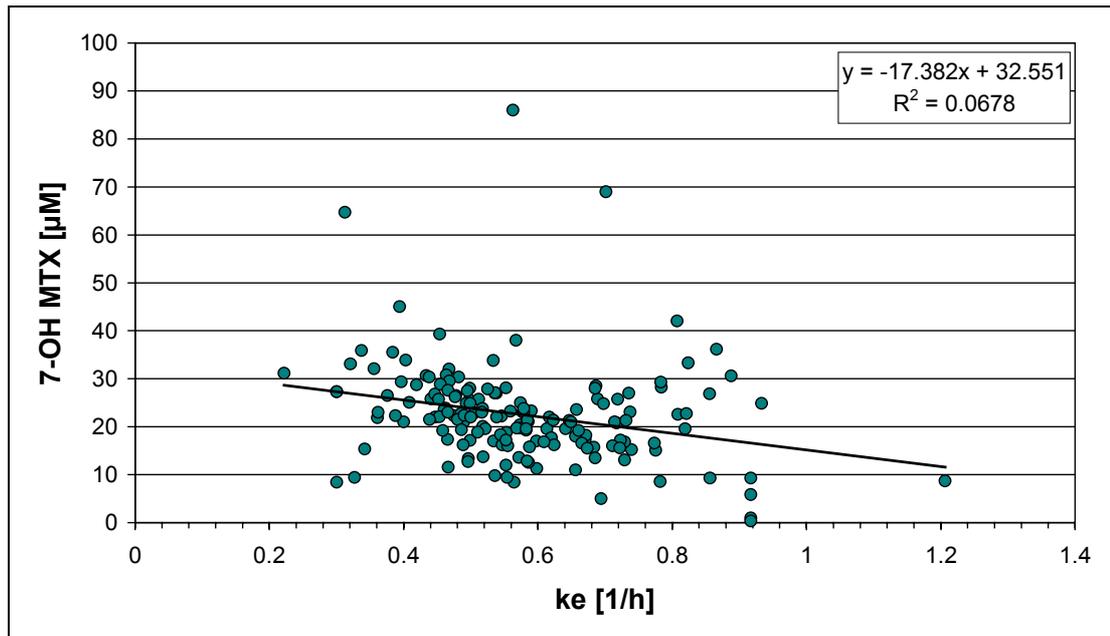


Abbildung 43: Eliminationskonstante k_e gegen die gemessenen 7-OH MTX-Konzentrationen.

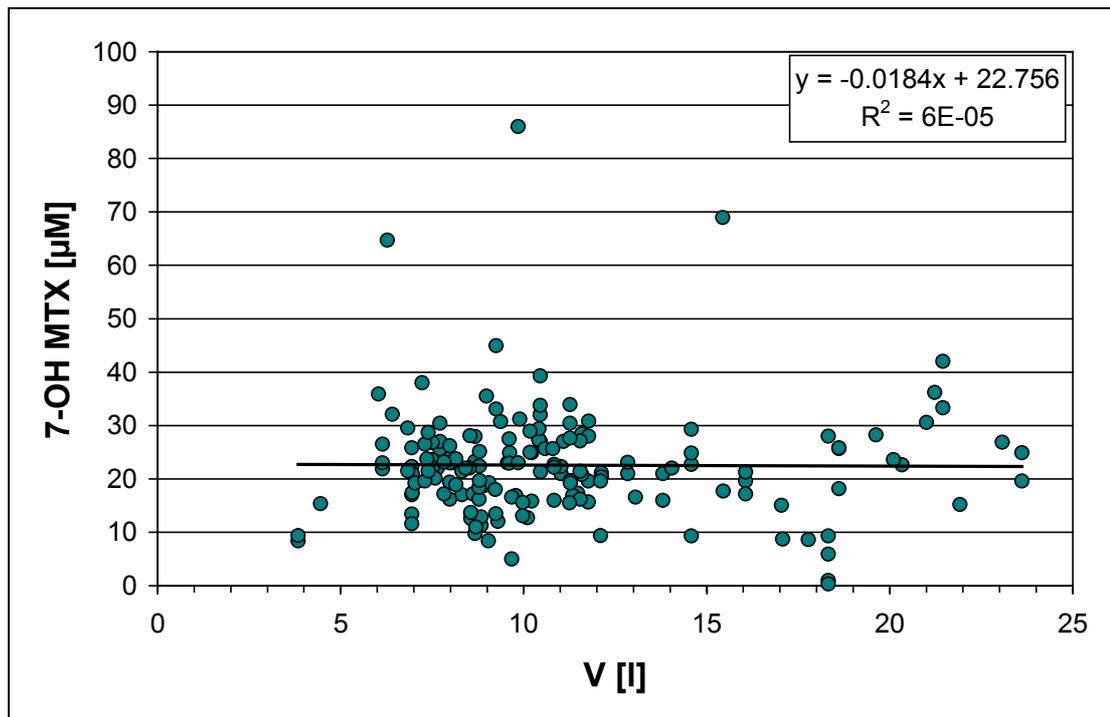


Abbildung 44: Verteilungsvolumen V gegen die gemessenen 7-OH MTX-Konzentrationen.

5.7 Diskussion

Obwohl bereits eine große Anzahl an Veröffentlichungen erschienen ist, die sich mit der Kinetik des MTX beschäftigen, findet man bis heute nur eine Veröffentlichung, die eine populationspharmakokinetische Methode zur Berechnung der PK-Parameter des MTX verwendet. Bei dieser im Jahre 1999 erschienenen Arbeit untersuchten *Odoul et al.* 23 an ALL erkrankte Kinder, die nach dem französischen ALL-Protokoll 8 g/m^2 über 24 h erhielten. Sie verwendeten ebenfalls ein 2-Kompartimentmodell mit 234 Messwerten. Die dabei ermittelten PK-Parameter (VK) für Cl , V , k_{12} und k_{21} betragen $3,51 \text{ l/h}$ (65,8 %), $8,67 \text{ l}$ (58,1 %), $0,0044 \text{ 1/h}$ (105 %) bzw. $0,039 \text{ 1/h}$ (24,9 %) [124] ohne Integration von Kovariablen. Weiterhin behandelten *Odoul et al.* jede Gabe eines Patienten als unabhängige Beobachtung und somit als eigenständigen Patienten. Die PK-Parameter unterscheiden sich dabei wesentlich von den in dieser Arbeit gefundenen. Das Verteilungsvolumen beträgt 70 %, die Cl 55 %, das k_{12} 31 % und schließlich k_{21} 85 % von den entsprechenden in dieser Arbeit bestimmten Werten, obwohl sich die beiden Strukturmodelle in den Ausgangsbedingungen nicht unterscheiden. Sie verwenden beide ein lineares 2-Kompartimentmodell mit proportionalem Restfehler ($1/c_{pred}$). Interessanterweise fanden nur *Borsi et al.* keinen Unterschied zwischen den c_{ss} einer 24 h Infusion von 4 g, 6 g und 8 g [27]. Dies deutet auf eine nichtlineare Kinetik des MTX in diesem Bereich hin und könnte eine Erklärung für die unterschiedlichen PK-Parameter sein. Geht man allerdings wie alle anderen Autoren von einer linearen Kinetik in diesem Bereich aus, kann man die PK-Parameter trotz unterschiedlicher Dosierung vergleichen. Interessant scheint dann die Beobachtung, dass die Mikrokonstante k_{12} , die ein Parameter für die Diffusion in das periphere Kompartiment darstellt, nur 31 % des in unserer Arbeit bestimmten Wertes beträgt. Dies wird zwar dadurch relativiert, dass auch die den umgekehrten Vorgang beschreibende Konstante k_{21} kleiner ist, letztlich bleibt jedoch ein geringerer Abfluss ins periphere Kompartiment in der Arbeit von *Odoul et al.* (vgl. Abbildung 45). Möglicher, allerdings spekulativer Hintergrund könnte die unterschiedliche Hydrierungsmodalität der Protokolle sein. Bei *Odoul et al.* werden die Kinder 2 h vor Beginn der Infusion mit 10 ml/kg und mit $2 \text{ l/m}^2/24 \text{ h}$ während der Infusion hydriert. Zusätzlich erhalten die Patienten mit der MTX-Infusion bis zu $1,2 \text{ l}$ Flüssigkeit und somit trotz der höheren Dosierung weniger als in dem hier verwendeten Protokoll (vgl. Kapitel 5.2, S. 54). Das deutlich niedrigere Verteilungsvolumen des peripheren Kompartiments V_2 bei *Odoul et al.* von 1 l gegenüber $3,8 \text{ l}$ in dieser Arbeit untermauert diese These.

Ein weiterer Hinweis für den möglichen Einfluss der Hydrierung auf die PK-Parameter sind die MTX-Vergleichswerte mit anderen Zentren aus der Bundesrepublik. Trotz gleicher 24 h Werte überragen die in Münster gemessenen 48 h Werte die Vergleichswerte (Tabelle 6, S. 63). Auch dies kann hypothetisch mit einer vermehrten Aufnahme von MTX in das durch die vermehrte Hydrierung vergrößerte 2. Kompartiment erklärt werden. Nach Infusionsende kann diese Anreicherung zu einem vermehrten Rückfluss aus diesem Kompartiment führen und könnte die erhöhten 48 h Werte erklären. Allerdings bleibt die Frage ungeklärt, ob die in dieser Arbeit gemessenen höheren Konzentrationen der Rohdaten die veränderten PK-Werte bedingen oder umgekehrt.

Ein Vergleich mit der übrigen Literatur wird aufgrund der verschiedenen verwendeten Parameter, Dimensionen und Definitionen der Konstanten sowie der verschiedenen Dosierungen und Patienten erschwert [123]. Jedoch liegen alle hier bestimmten Parameter in der Größenordnung der veröffentlichten Werte (vgl. Tabelle 11).

Tabelle 11: Übersicht über die wichtigste MTX-PK Literatur.

Lit.	Autor	Jahr	n(Pat)	Zyklen	Diagnose.	Dosierung	Modell
[32]	Breithaupt	1982	7	27	OS	140-350mg/kg ü. 6h	2 Komp.
[29]	Borsi	1987	21	42	ALL	0,5g/m ² ü. 24 h	Cl= k ₀ / c _{SS}
[28]	Borsi	1987	58	380	ALL (1.od.2. Remission)	0,5-33g ü. 24 h	Cl= k ₀ / c _{SS}
[183]	Wolfrom	1990	5	20	ALL	5g/m ² ü. 24 h	Cl= k ₀ / c _{SS}
[81]	Graf	1994	198	1703	OS	12g/m ² ü. 4h	2 Komp. ohne Inf. Phase
[131]	Pignon	1994	22	222	OS Erw.	auf 1mM nach 6h (=>13,2 ±2g/m ²)	Cl= k ₀ / c _{SS}
[150]	Sabot	1995	10	10	diff.	diff/4h	2 Komp.
[53]	Donelli	1995	122		ALL	5g/m ² ü. 24 h	Cl= k ₀ / c _{SS}
[157]	Seidel	1997	42	293	ALL	6-8g/m ² ü. 24 h	Cl= k ₀ / c _{SS}
[124]	Odoul	1999	23	234	ALL	8g/m ² ü. 24 h	2 Komp.
[175]	Wall	2000	24	24	rALL ³	adaptiert: 3-6,7 g/m ² ü. 24 h	2 Komp.
	Kinetica	2002	59	471	ALL	5g/m ² ü. 24 h	2 Komp.
	Kinetica	2002	59	471	ALL	5g/m ² ü. 24 h	2 Komp.
	Nonmem	2002	59	471	ALL	5g/m ² ü. 24 h	2 Komp.
	Nonmem	2002	59	471	ALL	5g/m ² ü. 24 h	2 Komp.

³ rALL: relapsed ALL

Fortsetzung von Tabelle 11:

Autor	k_{10} [1/h]	k_{12} [1/h]	k_{21} [1/h]	V_c [l]	Cl [l/h]	sonstiges
Breithaupt	0,39 kg ⁻¹	0,11 kg ⁻¹	1,03 kg ⁻¹	0,19 kg ⁻¹	0,021 kg ⁻¹	
Borsi				Vd _{ss} = 14	4,0 m ⁻²	
Borsi	Cl _{relapsed} = 7,3 l/m ² /h bzw, Cl _{EFS} = 4,3 l/h/m ²					
Wolfrom	"3Komp"				6,6 l/h ²	Kompartimentdefinition aufgrund der 4 Messpunkte
Graf	0,22	0,014	0,064	0,00074		berechnet aus α und β , τ nicht einberechnet
Pignon				0,32 kg ⁻¹	2,94 m ⁻²	
Sabot	0,33	0,0054	0,045	22		nur 1. Zyklus in Studie integriert
Donelli	Cl nach Alter: von 10 l/m ² /h (0-10a) bis 6,6 l/m ² /h (>10a)					
Seidel					4,2 m ⁻²	Cl _{rel} (1. Gabe) > Cl _{rel} (2. Gabe) ⁴
Odoul	0,4	0,0044	0,039	8,67	3,5	
Wall	0,58	0,134	0,11	10,9 m ⁻²	6,18 m ⁻²	
Kinetica	0,519	0,014	0,046	12,4	6,43	
Kinetica	0,447m ⁻²	0,011m ⁻²	0,0266m ⁻²	16,6 m ⁻²		
Nonmem	0,728m ⁻²	0,022m ⁻²	0,024m ⁻²	12,7 m ⁻²		
Nonmem	0,347	0,006	0,033	14,1		

⁴ Cl_{rel} ist die Clearance bei Patienten, die ein Rezidiv erlitten.

Ebenfalls schwierig ist der Vergleich zwischen den beiden Kinetikprogrammen Nonmem und Kinetica.

Die Ergebnisse unterscheiden sich hier maßgeblich durch die unterschiedliche Wichtung. Da bei Kinetica mit einer $1/c_{\text{pred}}$ Wichtung gearbeitet wurde, sind die hohen MTX-Konzentrationen zum Zeitpunkt t_{24} besser angepasst als die entsprechenden Nonmem-Werte (Abbildung 45). Für die niedrigen Konzentrationen gilt umgekehrtes. Während jedoch für Kinetica eine gleichmäßige Verteilung der gewichteten Residuen (w_{res}) mittels dem oben genannten Fehlermodell erreicht wurde (Abbildung 36), konnte bei Nonmem stets ein Trend (Abbildung 41) und keine zufällige Verteilung beobachtet werden. Daher scheinen die durch Kinetica gewonnenen Ergebnisse glaubwürdiger.

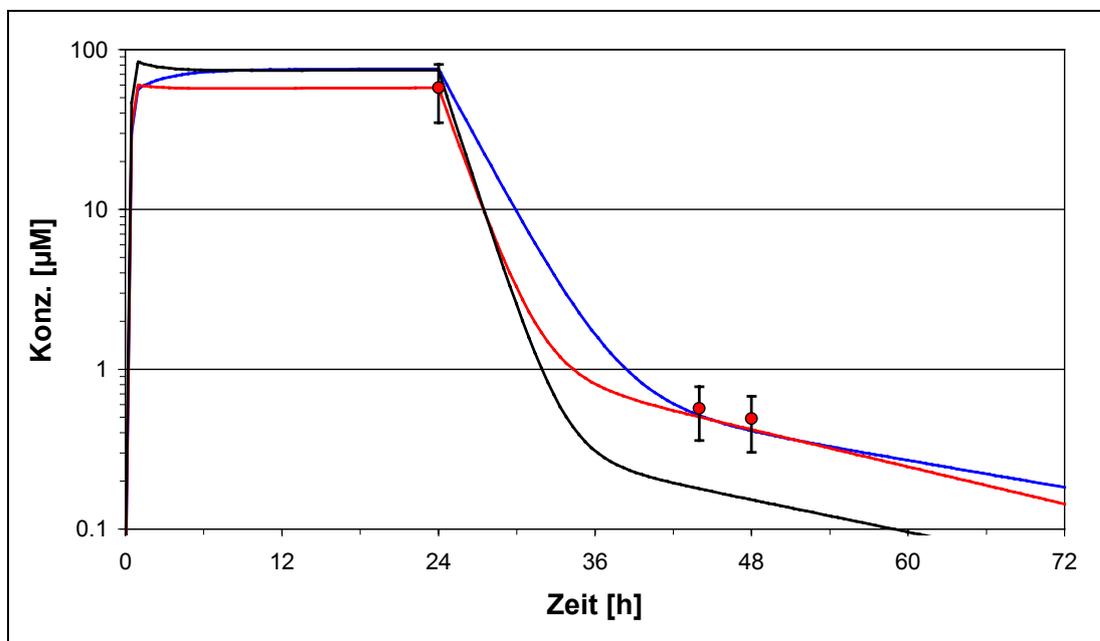


Abbildung 45: Vergleich des Nonmem-Modells 45 (—), des Kinetica-Modells 1 (—) und der Mittelwerte der Rohdaten bei t_{24} , t_{44} , t_{48} . Beide Modelle sind als 2-Kompartiment Modell ohne Kovariablen dargestellt. Weiterhin ist der Plasmakonzentrationszeitverlauf auf Basis der PK-Parameter von *Odoul et al.* dargestellt (—), die für 5 g/m^2 simuliert wurde.

Zum ersten Mal konnte im Rahmen einer pharmakokinetischen Untersuchung mit Hilfe einer populationspharmakokinetischen Methode die intraindividuelle Variabilität auch - interoccasional variability (IOV) - abgeschätzt werden. Dies ist mittels Nonmem möglich [101]. Die IOV kann dabei für das Verteilungsvolumen auf etwa 20 % und getrennt davon für die k_e auf etwa 11 % abgeschätzt werden. Bei beiden Modellen änderte sich dabei die ObjF als Maß für die Güte der Anpassung signifikant.

Die Varianz σ des Restfehlers ε konnte ebenfalls von 33 % auf 28 % gesenkt werden. Die interindividuelle Variabilität blieb wie erwartet etwa gleich groß. Zu beachten ist jedoch, dass bei Nonmem die vorhergesagten MTX-Plasmakonzentrationen (C_{pred}) schlechter an die gemessenen Werte (C_{obs}) angepasst wurden als bei Kinetica. Die Ergebnisse sind daher vorsichtig zu interpretieren.

Weiterhin wurde erstmals die Korrelation zwischen dem Metaboliten 7-OH MTX und den PK-Parametern des MTX untersucht. Dabei zeigte erwartungsgemäß die Metabolitenkonzentration keine Abhängigkeit vom individuell abgeschätzten Verteilungsvolumen. Auch die vorhergesagte MTX-Konzentration zum Zeitpunkt 24 h scheint keinen Einfluss auf die 7-OH MTX-Konzentration zu besitzen. Einzig die Eliminationskonstante k_e des MTX scheint möglicherweise schwach negativ mit der Metabolitenkonzentration korreliert. Daher zeigt der kinetische Effekt von 7-OH MTX eher eine niedrigere Ausscheidung der Muttersubstanz aus dem Körper an als einen verstärkten Metabolismus und damit eine größere Elimination des MTX. Allerdings ist die hier gefundene Korrelation mit R^2 von 0,07 sehr schwach. Die Möglichkeit aus gemessenen 7-OH MTX-Plasmakonzentrationen auf den weiteren Verlauf der MTX-Plasmakonzentrationen zu schließen, scheint daher gering. Dies steht insofern in Einklang mit der Literatur, da es hierfür keine Anhaltspunkte gibt.

In dieser Arbeit wird die Möglichkeit moderner computergestützter pharmakokinetischer Auswertungsmethoden und deren Nutzen für den Patienten erörtert. Dabei zeigt sich, dass Programme wie Nonmem ein sehr interessantes Spektrum an neuen Methoden eröffnet, jedoch aufgrund der schweren Verständlichkeit und Handhabung sich für die patientenorientierte Versorgung kaum verwenden lässt. Kinetica 2000 ist anwendungsfreundlicher und dürfte für die Lösung der meisten klinischen Fragen ausreichend sein.

6 *Bestimmung von an Humanem Serumalbumin gebundenem Methotrexat und freiem Methotrexat mittels Kapillarelektrophorese*

6.1 Einleitung und Fragestellung

Wie in den vorherigen Kapiteln beschrieben, wird MTX mehrfach über längere Zeiträume in Hochdosisschemata angewandt. Eine Optimierung der pharmakokinetischen Eigenschaften könnte sowohl zu einer Erleichterung in der Anwendung für die Patienten als auch zu einer Veränderung der Wirksamkeit führen. Dabei werden verschiedene Ansätze verfolgt, wie eine liposomale Verkapselung [87] von MTX, die ein verlängertes Verweilen des MTX im Blut erreichen soll. Auch gewebespezifisch wirksame Arzneiformen, z.B. die mit MTX beladenen Erythrozyten, die zur verstärkten Aufnahme in die Leber mit Biotin verestert wurden, sind bereits in Tiermodellen getestet worden [118, 159].

Eine weitere Option besteht durch peptidische α - oder γ -Verknüpfung des Glutaminsäureanteils des MTX (Abbildung 1) an humanes Serumalbumin (HSA-MTX) [35, 36]. Niedrigere Dosen bei gleicher Antitumorwirksamkeit sind eines der erwünschten Ziele. Postuliert wird bei dieser Kopplung eine verstärkte Aufnahme in Tumorgewebe und in die Tumorzelle, da das Wachstum des Tumors auf eine hohe Proteinlieferung – wie HSA - angewiesen ist. Eine veränderte Freisetzung und damit veränderte Einwirkzeit auf den Tumor kann ebenfalls festgestellt werden [84].

In Walker-256-Carcinom-Ratten zeigte sich bei Gabe von an Rattenserumalbumin gekoppeltem MTX nach 24 h eine Anreicherung von 14 % der applizierten Gesamtdosis im Tumorgewebe. Gewebe, das phagozytotisch aktiv ist, zeigte deutlich niedrigere Anreicherung. So fanden sich in der Leber weniger als 7 %, in der Milz sogar unter 2 % der Gesamtbelastung. Freies MTX selbst erreichte unter den gleichen Versuchsbedingungen nur eine Akkumulation von unter 0,1 % im Tumorgewebe [164]. Allerdings führte bei diesen Ratten die Albumingabe nur zu einem leicht besseren Ansprechen als bei einer alleinigen Gabe von MTX [184]. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich in Zellkulturen [31].

Eine Phase I Studie bei Tumorpatienten verschiedener Entitäten wurde bereits 1999 in Deutschland durchgeführt [37, 86]. Hierbei zeigte sich bei einigen Erkrankungen ein teilweises Ansprechen.

Zum Nachweis der veränderten Wirksamkeit gegenüber konventionellem MTX selber ist eine Bestimmung bzw. Abtrennung des MTX und des HSA-gebundenen MTX voneinander notwendig. Dies ermöglicht ein Abschätzen, in wie weit das an Albumin gebundene MTX zur Wirkung beiträgt bzw. freies MTX die Versuche unerwünscht beeinflusst. Ziel der folgenden Versuchsreihe war die Überprüfung der Möglichkeit an Albumin kovalent gebundenes MTX (HSA-MTX) mittels Kapillarelektrophorese (CE) zu bestimmen und dabei das freie MTX zu bestimmen bzw. abzutrennen.

6.2 Methoden und Stoffeigenschaften

Alle Analysen wurden auf einer BioRad Focus 3100 durchgeführt. Die verwendeten Substanzen (s. S. 20) und Geräte (s. S. 19) sind in Kapitel 3 dokumentiert. Details über die Eigenschaften der verwendeten Substanzen sind für MTX auf S. 14 und für Serumalbumin auf S. 17 (Kapitel 2) zusammengefasst.

6.2.1 Methode 1: 60 mM Boratpuffer pH 10,0 mit 200 mM SDS

6.2.1.1 Herstellung:

Aus Borsäure wurde 1 l 60 mM Boratpuffer hergestellt. 15 ml dieses Puffers wurden mit 1 N NaOH auf pH 10,0 eingestellt. 864 mg SDS (entspricht 200 mM) gab man unter Rühren und leichter Erwärmung zu. Der Puffer wurde anschließend filtriert.

Die Trennung erfolgte in einer Fused-Silica Kapillare der Länge 20,3/25 cm mit einem Innendurchmesser von 50 µm.

6.2.1.2 CE-Bedingungen:

Bei normaler Polung (Kathode an der Detektorseite) wurde eine Spannung von 8,1 kV über zwei Minuten kontinuierlich angelegt. Die Probenaufgabe erfolgte durch eine 6 sek Injektion mit 3448 Pa. Vor jedem Lauf wurde 3 min jeweils mit H₂O, 0,1 N NaOH und dem oben genannten Puffer gespült. Das Gerät wurde dabei auf 20° C

temperiert. Bei der Trennung wurde ein Hochgeschwindigkeitsspektrum von 250 nm bis 330 nm aufgenommen.

6.2.1.3 **Ergebnisse:**

Unter den oben genannten Bedingungen wurde 1:100 verdünntes HSA injiziert und durch das entsprechende Spektrum detektiert. Neben den vier im Elektropherogramm aufgezeichneten Wellenlängen (schwarz: 270 nm, rot: 300 nm, grün: 310 nm und blau: 320 nm) konnte durch ein UV-Spektrum ein weiteres Kriterium für die Zuordnung genutzt werden (Abbildung 47). Die beobachtete Stromstärke betrug etwa 100 μA .

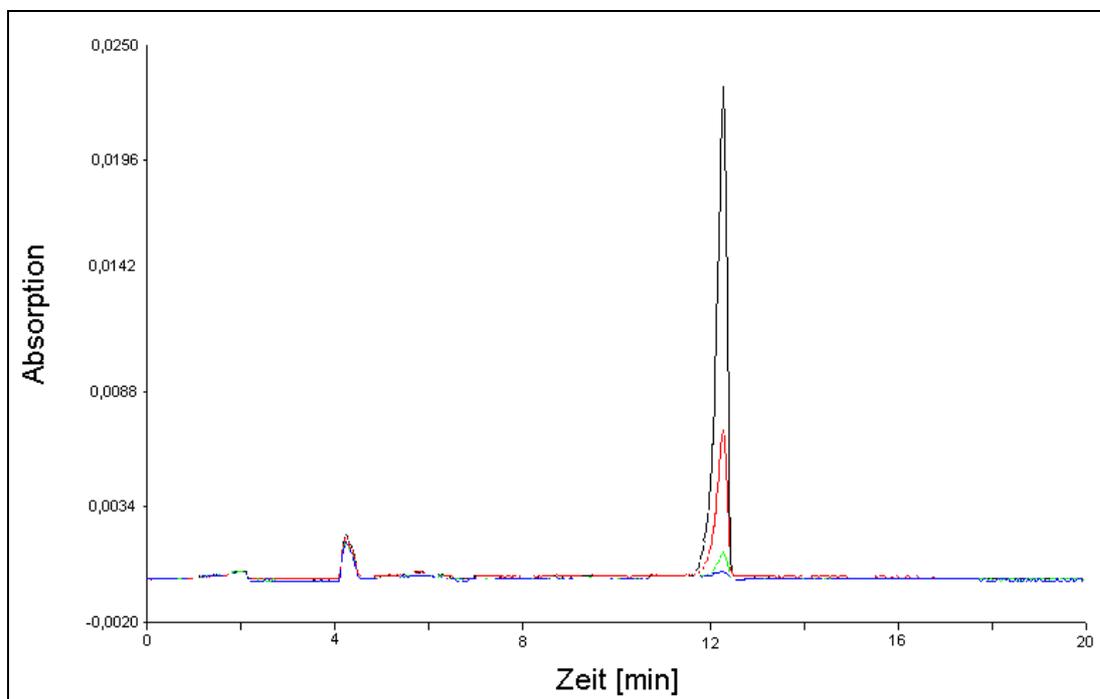


Abbildung 47: Elektropherogramm des HSA (12 min) (schwarz: 270 nm; rot: 300 nm; grün: 310 nm und blau: 320 nm).

Für die HSA-MTX Probe zeigte sich ebenfalls ein Peak bei etwa 12 min, der weder durch die Migrationszeit noch durch das UV-Spektrum vom entsprechenden reinen HSA-Peak unterschieden werden konnte. Weiterhin konnte ein zusätzlicher Peak bei etwa 19 min gefunden werden (Abbildung 48). Dieser Peak konnte durch ein UV-Spektrum und durch Zumischung (60 μM MTX) als freies MTX identifiziert werden (Abbildung 49).

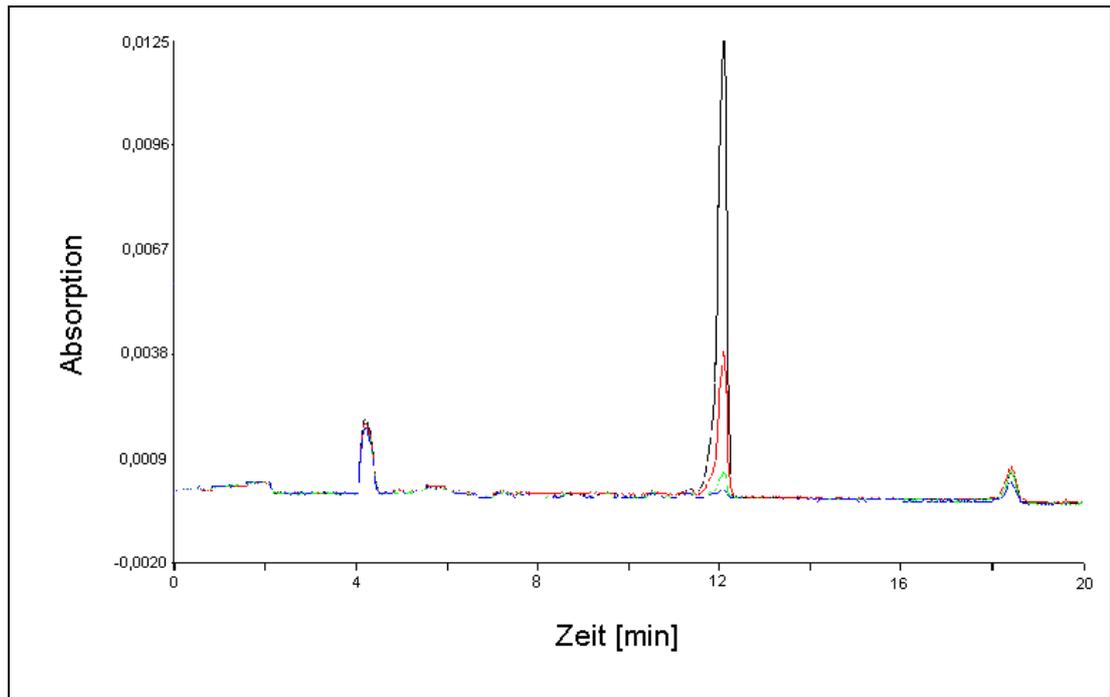


Abbildung 48: Elektropherogramm des HSA-MTX (12 min) und freigesetztem MTX (18 min) in 60 mM Boratpuffer pH 10,0 mit 200 mM SDS (schwarz: 270 nm; rot: 300 nm; grün: 310 nm und blau: 320 nm).

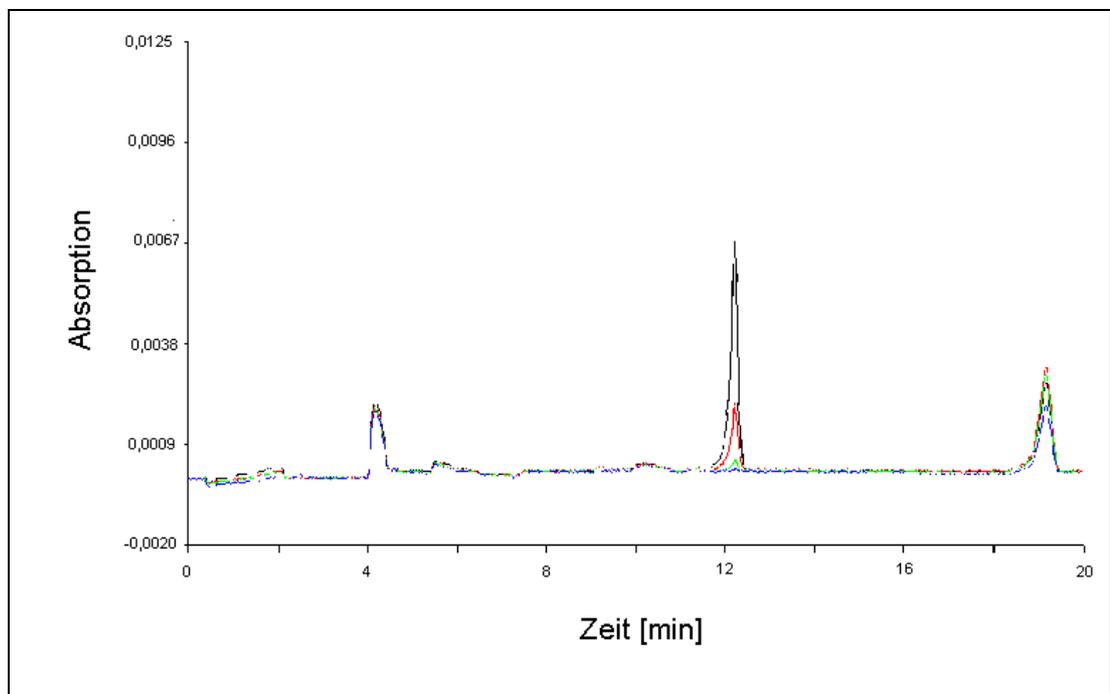


Abbildung 49: HSA-MTX mit zugesetztem MTX in Boratpuffer pH 10 mit 200 mM SDS (schwarz: 270 nm; rot: 300 nm; grün: 310 nm und blau: 320 nm).

6.2.2 Methode 2: 50 mM Phosphat Puffer pH 5,0

6.2.2.1 Pufferherstellung:

50 mM wässrige Na_2HPO_4 Lösung wird mit H_3PO_4 auf pH 5,0 eingestellt, anschließend filtriert und bei 12000 U für 5 min zentrifugiert.

6.2.2.2 CE-Bedingungen:

Bei dieser Methode wurden 25 kV (Anode an der Detektorseite) als Trennungsspannung angelegt. Die Temperatur der Kapillare und des Probenellers wurde auf 20° C fixiert. Eine 45,3/50 cm lange mit Polyvinylalkohol (PVA) beschichtete Kapillare von Agilent mit erweitertem Detektionsfenster und einem Innendurchmesser von 50 μM wurde zur Trennung benutzt. Die Injektion der Proben erfolgte mit einem Druck von 3448 Pa für 10 s. Bei der Trennung wurde ein Spektrum mittels Hochgeschwindigkeits-Scanning im Bereich von 250-330 nm aufgenommen, das zusätzlich zu den Migrationszeiten zur Identifizierung der Peaks herangezogen werden konnte. Vor jedem Lauf wurde 1 min mit H_2O und 1 min mit Laufpuffer vorgespült.

6.2.2.3 Ergebnisse:

Unter oben genannten Bedingungen konnten die Peaks von HSA (Abbildung 50) und HSA-MTX (Abbildung 51) bei etwa 9 min gefunden werden. Die HSA-MTX Probe zeigte auch hierbei einen zusätzlichen Peak, dessen UV-Spektrum ihn als MTX identifiziert. Auch durch Zumischung von MTX zu HSA (Abbildung 52) bzw. HSA-MTX (nicht gezeigt) konnte dieser Peak als MTX-Peak identifiziert werden.

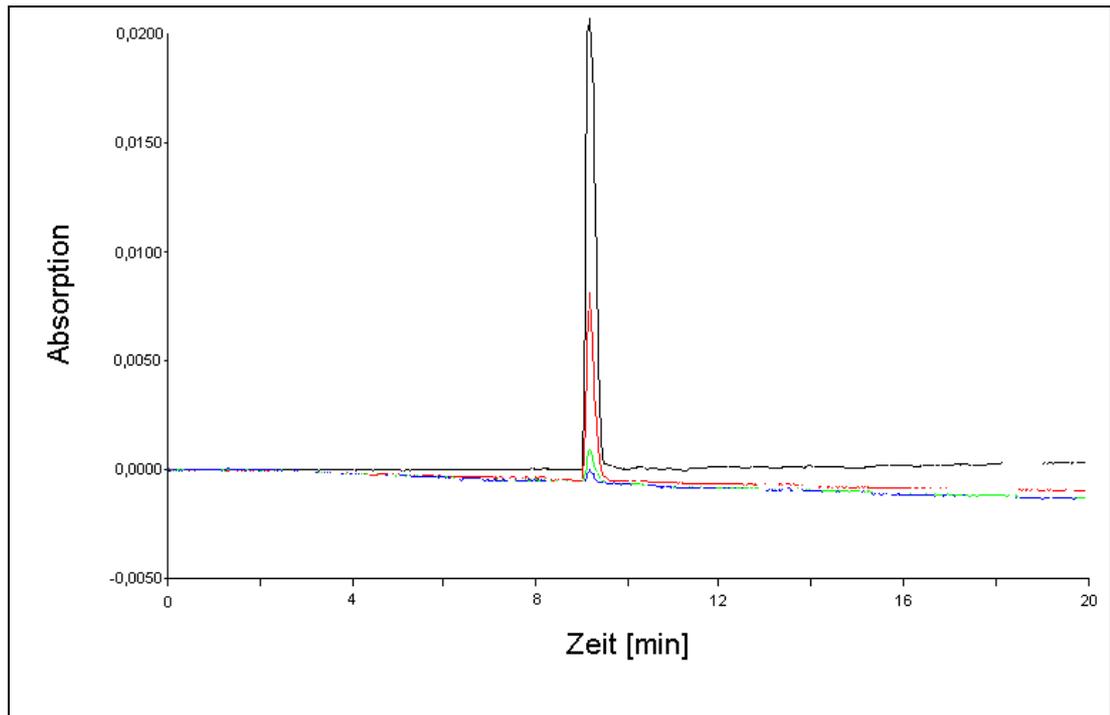


Abbildung 50: HSA in Phosphatpuffer pH 5,0 und beschichteter Kapillare (schwarz: 270 nm; rot: 300 nm; grün: 310 nm und blau: 320 nm).

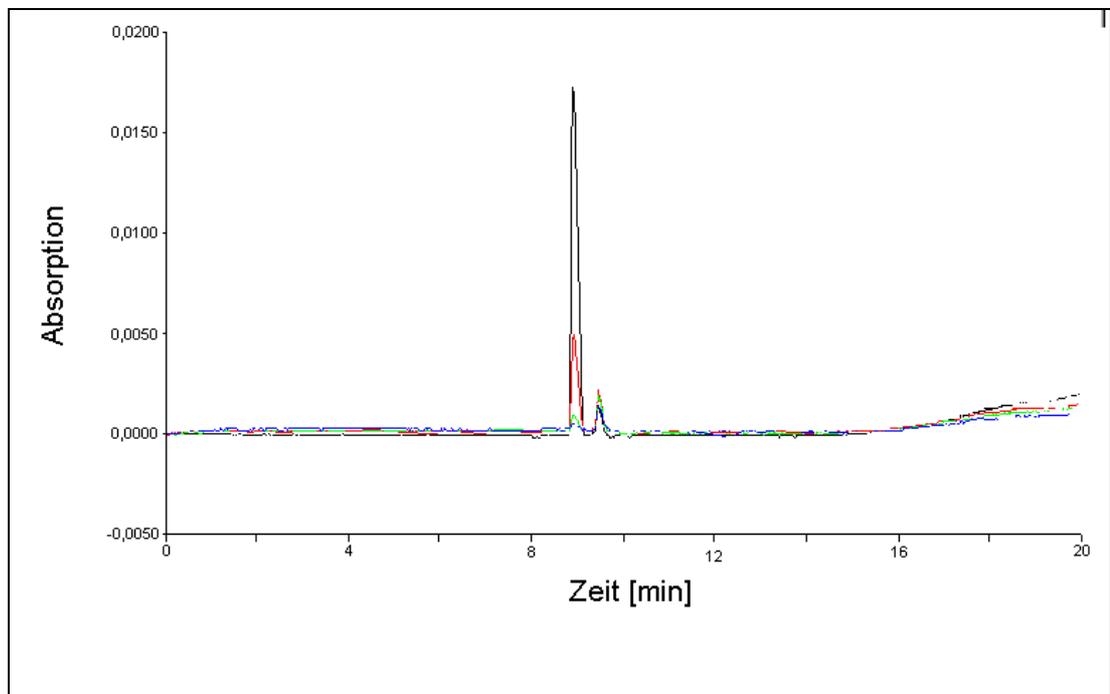


Abbildung 51: HSA-MTX in Phosphatpuffer pH 5,0 und beschichteter Kapillare; (schwarz: 270 nm; rot: 300 nm; grün: 310 nm und blau: 320 nm) mit freigesetztem MTX.

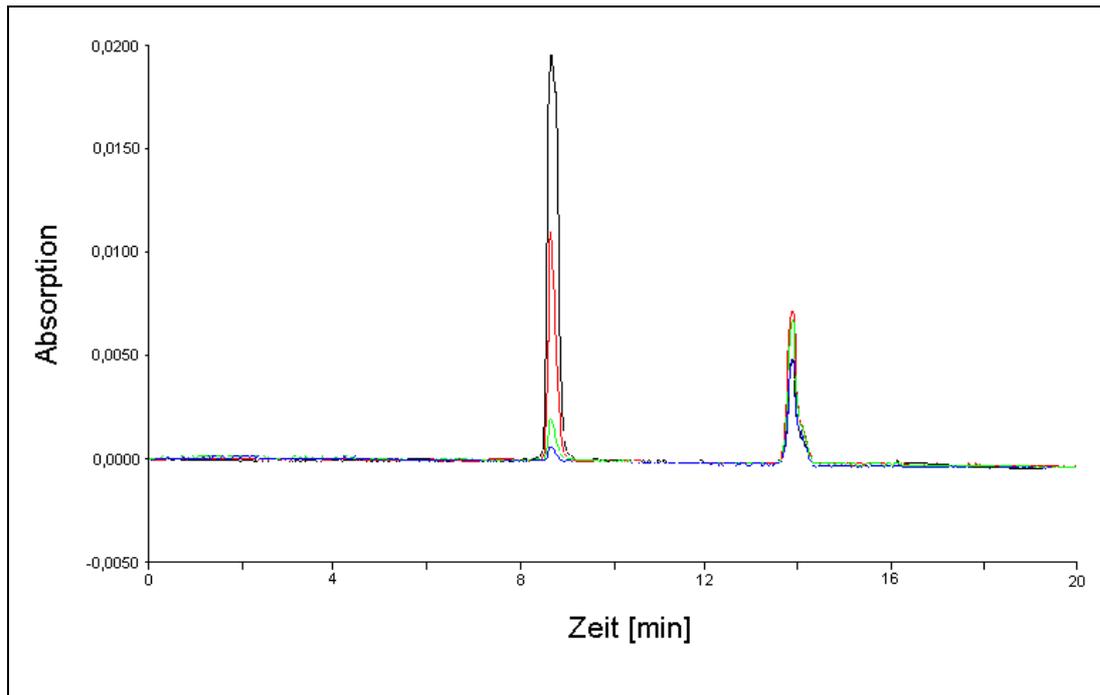


Abbildung 52: HSA+MTX in Phosphatpuffer pH 5,0 (schwarz: 270 nm; rot: 300 nm; grün: 310 nm und blau: 320 nm).

Wie in Abbildung 53 und Abbildung 54 gezeigt ist, unterscheiden sich die beiden UV-Spektren des HSA und des HSA-MTX unter diesen Bedingungen nicht. Eine direkte Bestimmung der Konzentrationen ist allein durch UV-Detektion daher nicht möglich.

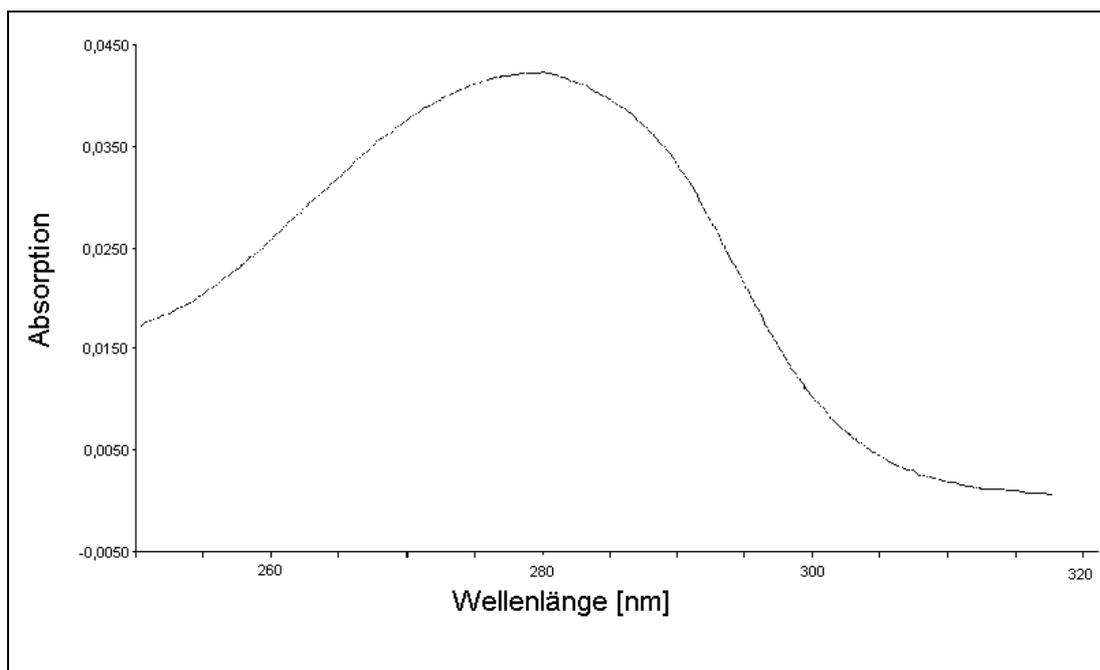


Abbildung 53: UV-Spektrum von humanen Serumalbumin in Phosphat-Puffer pH 5,0.

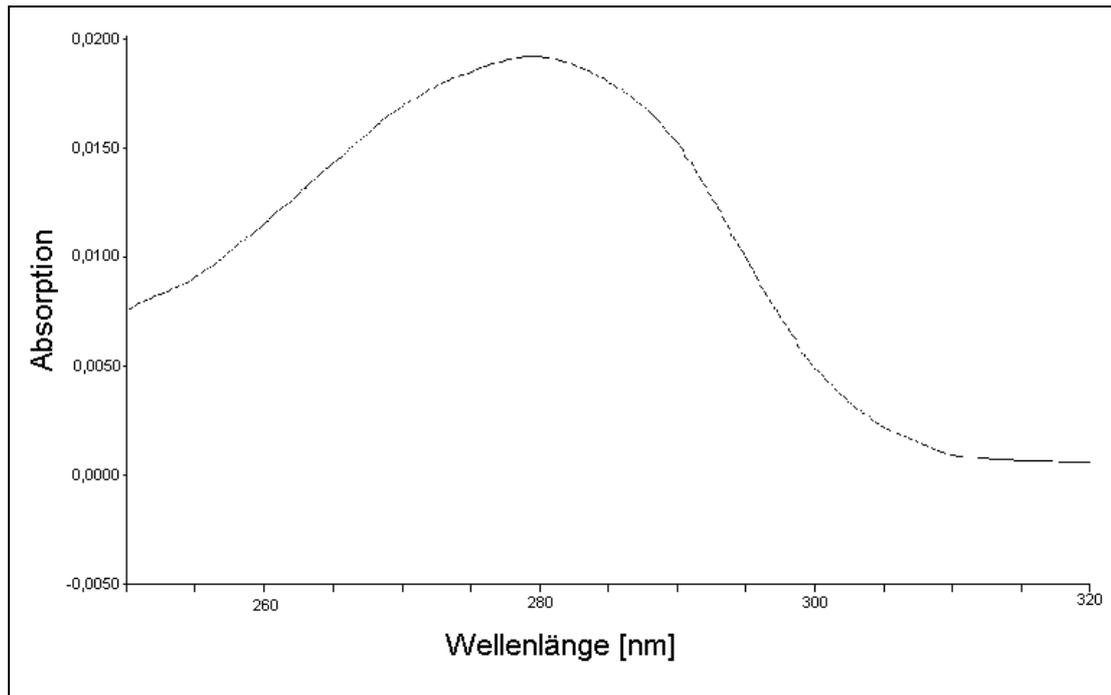


Abbildung 54: UV-Spektrum von an humanes Serumalbumin gebundenem Methotrexat im Bereich von 250–320 nm.

Auch bei dieser Methode konnte gezeigt werden, dass freies MTX und HSA vollständig getrennt und detektiert werden können.

Auffallend ist bei dieser Methode, dass trotz konstanter Migrationszeit des HSA Peaks die MTX Peaks in ihren Migrationszeiten deutlich schwanken.

6.2.3 Methode 3: 60 mM Borat Puffer pH 9,7

6.2.3.1 Pufferherstellung:

60 mM Boratpuffer wurde mit 1 N NaOH auf pH 9,7 eingestellt, anschließend filtriert und 5 min bei 12000 U zentrifugiert.

6.2.3.2 CE-Bedingungen:

Da der Puffer selbst kein SDS enthält, wurde 3 min mit 60 mM Boratpuffer 200 mM SDS gespült, um an der Kapillare anhaftende Proteine zu entfernen. Daraufhin wurde 2 min mit 0,1 N NaOH und 2 min mit dem SDS freien Laufpuffer gespült.

Die Probenaufgabe erfolgte 6 s lang mit einem Druck von 3448 Pa. Anschließend wurde eine Spannung (Kathode an der Detektorseite) von 10 kV über 2 min aufge-

baut. Die Temperatur des Probenellers und der Kapillare war auf 20° C fixiert. Die Kapillare besaß eine Länge von 21,4/25 cm und einen Innendurchmesser von 50 µm. Ein Spektrum wurde im Bereich von 250 nm bis 320 nm aufgenommen.

6.2.3.3 *Ergebnisse:*

Die angelegte Spannung von 20 kV resultierte in einer Stromstärke von etwa 100 µA.

Gezeigt werden konnte das Auftreten eines HSA-Peaks bei 6 min (Abbildung 55).

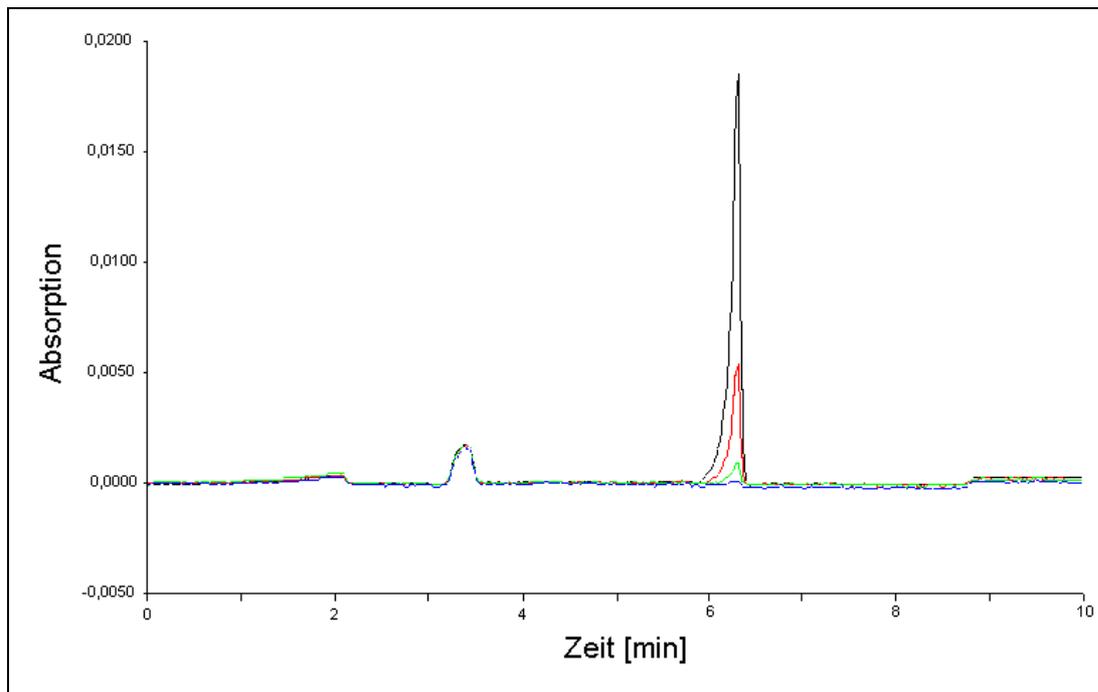


Abbildung 55: HSA in Boratpuffer, pH 9,7 (schwarz: 270 nm; rot: 300 nm; grün: 310 nm und blau: 320 nm).

Bei der Injektion von HSA-MTX zeigt sich bei 6 min ein Peak, der sich weder durch die Migrationszeit noch durch das UV-Spektrum von reinem HSA unterscheiden lässt. Bei 8 min erscheint ein zusätzlicher Peak, bei dem es sich um freies MTX handelt (Abbildung 56).

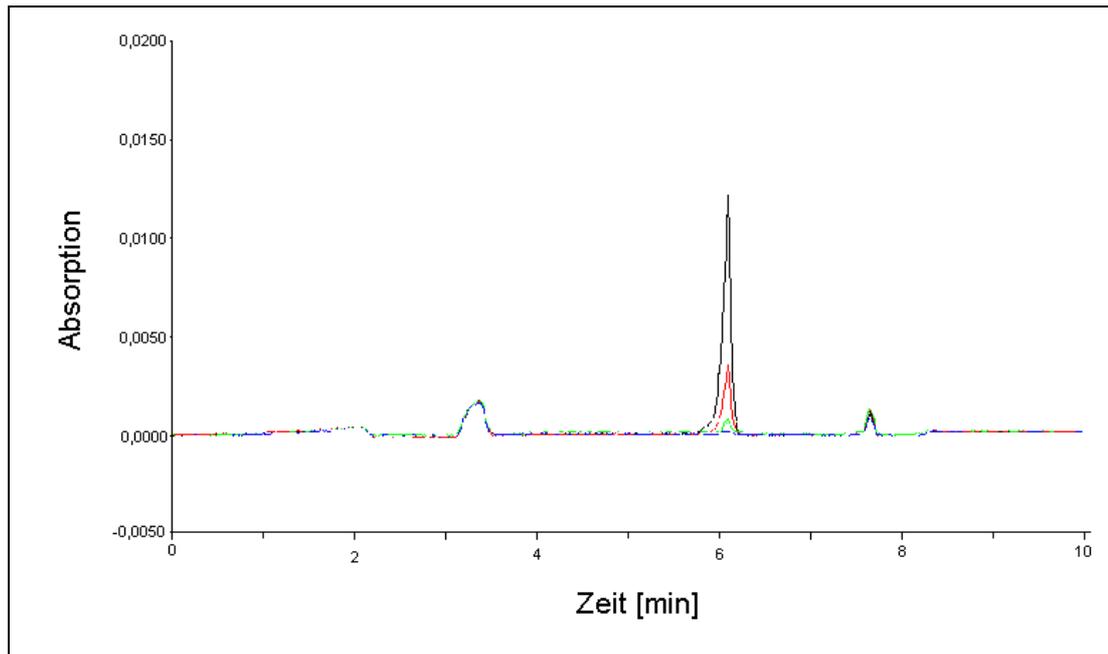


Abbildung 56: HSA-MTX in Boratpuffer, pH 9,7 (schwarz: 270 nm; rot: 300 nm; grün: 310 nm und blau: 320 nm).

Neben dem UV-Spektrum kann dies durch Zugabe von MTX (60 μ M) bewiesen werden. In Abbildung 57 erscheint neben dem HSA-Peak nach etwa 8 min ein MTX-Peak.

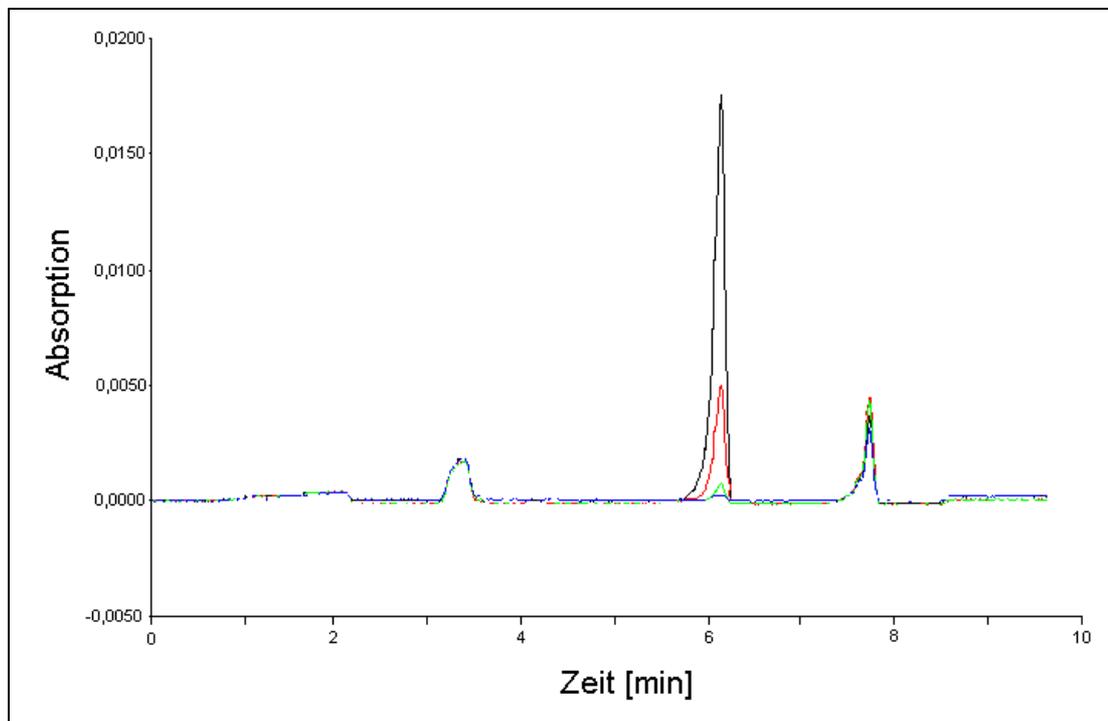


Abbildung 57: HSA mit freiem MTX in Boratpuffer pH 9,7 (schwarz: 270 nm; rot: 300 nm; grün: 310 nm und blau: 320 nm).

Auch bei Zumischung von MTX zum HSA-MTX erscheinen diese beiden Peaks im Pherogramm (Abbildung 58).

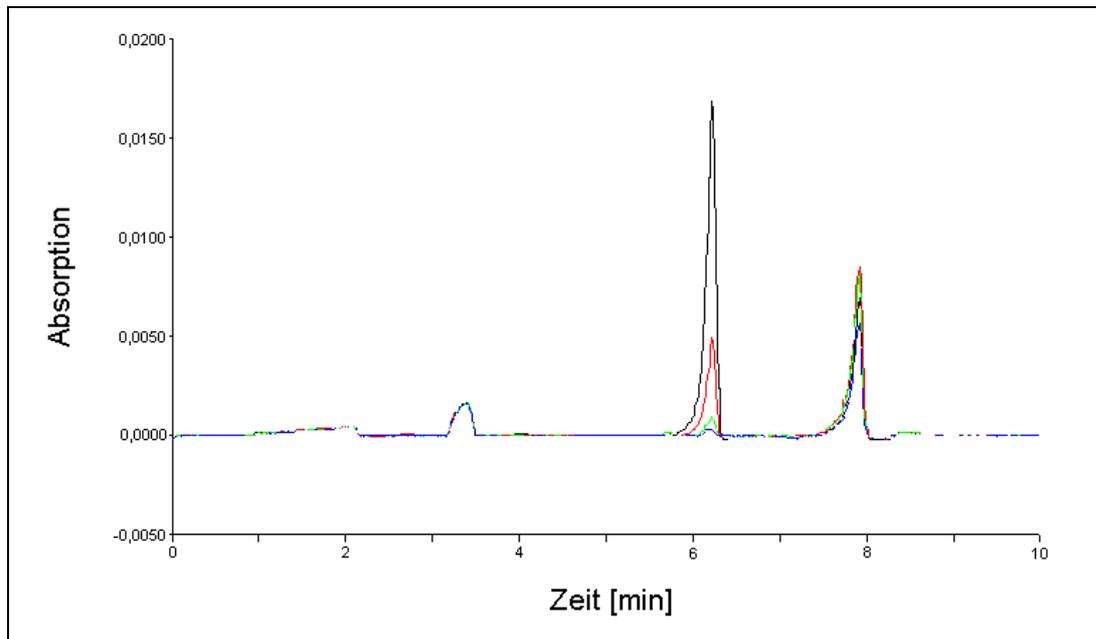


Abbildung 58: HSA-MTX mit zugemischtem MTX in Boratpuffer pH 9,7 (schwarz: 270 nm; rot: 300 nm; grün: 310 nm und blau: 320 nm).

6.3 Ergebnisse der Trennversuche und Diskussion

Bei diesen Versuchsreihen handelt es sich um die erste Methode zur Abtrennung von HSA-MTX und MTX mittels Kapillarelektrophorese.

Unter keiner der oben genannten Trennbedingungen konnte Albumin und an Albumin gebundenes MTX kapillarelektrophoretisch getrennt werden. Eine Unterscheidung durch die Messung bei 300 nm (das Optimum für MTX) bzw. bei einer noch höheren Wellenlängen (bis 320 nm) ergab ebenfalls keine Möglichkeit zur Bestimmung bzw. Unterscheidung, obwohl Albumin bei diesen Wellenlängen aufgrund seiner Aminosäurezusammensetzung sehr wenig bzw. gar nicht mehr absorbieren sollte (vgl. S. 17). Vermutlich ist die Absorption des geringen gebundenen Anteils an MTX nicht ausreichend, um eine messbare Differenz zur Absorption des HSA zu erreichen. Dabei entsprechen 2 mol gebundenem MTX an ein Mol Albumin einem Massenverhältnis von etwa 1:60. Möglicherweise wäre bei einer Erhöhung des MTX-Anteils, wie er bei *Bures et al.* beschrieben wird [36], eine solche Bestimmung möglich. Dabei wird ein Molverhältnis von 60:1 erreicht, was in einem Massenverhältnis von 1:2 resultiert.

Freies MTX konnte mit allen drei Methoden von HSA bzw. an HSA gebundenem MTX getrennt werden. Dabei zeigte sich auch, dass bei den HSA-MTX Proben bereits freies MTX nachzuweisen ist. Dies konnte durch Aufnahme von UV-Spektren und durch Zumischung von MTX gezeigt werden. Die Migrationszeiten waren für die unbeschichteten Kapillaren stabil. Dabei ist nochmals zu bemerken, dass bei der SDS-freien Trennungsmethode (s. S. 91), vor der Trennung SDS-Boratpuffer als Waschlösung benutzt wurde. Die Methode (s. S. 88) mit beschichteter Kapillare und Phosphatpuffer zeigte allerdings an zwei verschiedenen Tagen unterschiedliche Migrationszeiten, die sich mit zunehmender Analysenzahl immer weiter verlängerten. Dabei zeigte sich am 2. Versuchstag zusätzlich eine Verringerung der Stromstärke von etwa 50 μA auf 35 μA trotz gleicher Bedingungen, die sehr wahrscheinlich der Grund für die verlängerten Migrationszeiten ist. Möglicherweise führt hier eine Optimierung der Spülschritte zu gleich bleibenden Migrationszeiten. Ein weiterer Nachteil dieser Methode ist möglicherweise die deutlich höhere Spannung von 25 kV. Hierbei sind unerwünschte Reaktionen wahrscheinlicher als bei den beiden Methoden, die nur etwa 10 kV als Trennungsspannung benutzten.

Eine Validierung zur Bestimmung des freien MTX ist möglich. Bei Methode 3 (s. S. 91) konnte die Trennung in weniger als 9 min durchgeführt werden. Dabei ist zu beachten, dass dem Laufpuffer kein SDS zugesetzt war und nur zur Spülung der Kapillare SDS benutzt wurde. Daher ist bei weiteren Versuchen zu klären, wie lange die Kapillare aufgrund der Albuminbelastung verwendbar ist.

Insgesamt stellen diese Methoden eine Möglichkeit dar, bei geringem Substanzbedarf eine rasche effiziente Trennung und Bestimmung von HSA-MTX und freiem MTX zu erreichen.

7 *Pharmakodynamische Untersuchungen zum Metaboliten 7-OH Methotrexat, gemessen mit dem Thymidylat-Synthase Inhibition Assay ex-vivo*

7.1 Einleitung und Fragestellung

Wie bereits mehrfach in dieser Arbeit erwähnt, gilt MTX als eines der wichtigsten Zytostatika im Kampf gegen kindliche Tumore [17]. In den aktuellen Studien verwendet man bei der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) ein Hochdosis-Regime, das einen späteren Rescue mit Leukovorin benötigt. In diesen Hochdosis-Schemata wird in der Leber der primäre Hauptmetabolit 7-Hydroxymethotrexat (7-OH MTX, Abbildung 2, S. 15) gebildet [99]. Abbildung 58 zeigt die in der Arbeit von *Wolfrom et al.* [183] publizierten MTX-Daten⁵. Die MTX-Plasmakonzentration erreicht am Ende der 24-stündigen Infusion (Stunde 24) von 5 g/m² einen Wert von etwa 60 µM. Der zugehörige 7-OH MTX Messwert liegt bei ungefähr 20 µM und damit etwa um 2/3 niedriger. Bereits wenige Stunden nach Ende der Infusion jedoch übersteigen die gemessenen Plasmakonzentrationen des 7-OH MTX die Plasmakonzentrationen des MTX [26, 106, 116]. Zu Beginn des lebensnotwendigen LV-Rescues zur Stunde 36 h liegt die Plasmakonzentration des Metaboliten um etwa eine Zehnerpotenz höher als die des MTX [70, 96, 99].

⁵ Der Plasmakonzentrationszeitverlauf wurde auf Basis der HPLC-Werte von *Wolfrom et al.* [183] mit der Software Topfit berechnet. Die Emit-Werte wurden nicht berücksichtigt. Die Berechnung erfolgte mit einer Wichtung von 1/c in einem linearen 2-Kompartiment Modell. t_{lag} setzte man auf 0,01 h fest.

Die 7-OH MTX-Konzentrationen wurden in diese Berechnung nicht integriert und sind daher als Punkte aufgetragen.

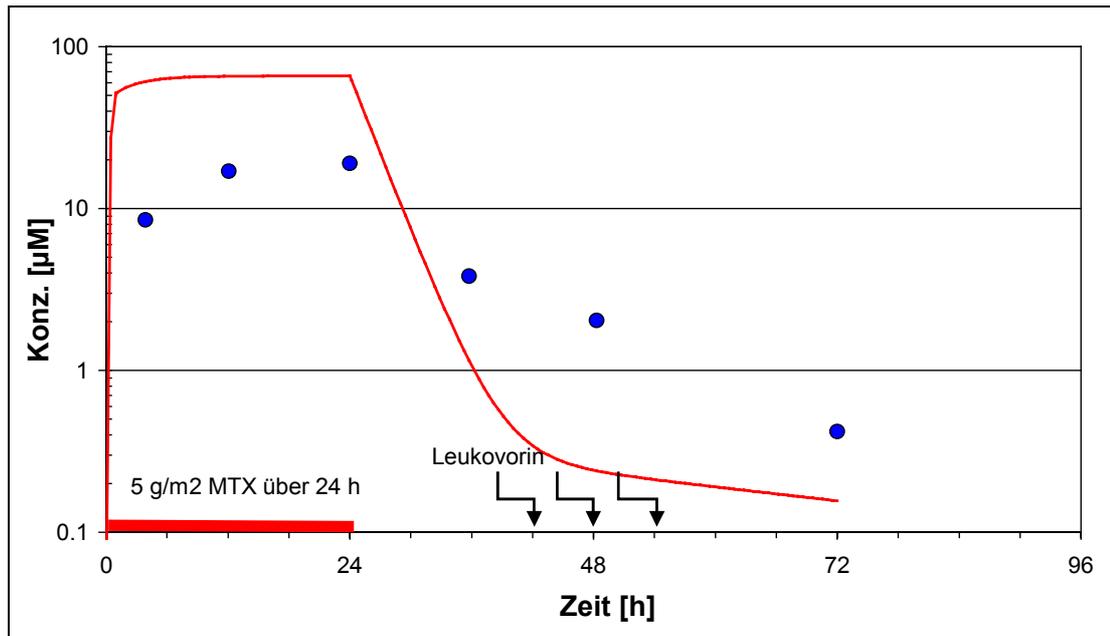


Abbildung 58: Berechneter Verlauf der Plasmakonzentrationen für MTX (—) und gemessene 7-OH MTX (●) bei einer 24-stündigen MTX Infusion von 5 g/m^2 und 60-minütiger Bolusgabe.

Zur Qualitätssicherung der Therapie werden an der Klinik und Poliklinik für Kinderheilkunde - Abt. Pädiatrische Hämatologie/Onkologie - in Münster regelmäßig Plasmaproben entnommen und die MTX und 7-OH MTX-Konzentrationen mittels Kapillarelektrophorese bestimmt.

Für die klinische Interpretation dieser Messwerte ist ein besseres Verständnis der Interaktionen von MTX und seines Hauptmetaboliten 7-OH MTX sowohl auf pharmakokinetischer (vgl. Kapitel 5.6.3.3, S. 75) als auch auf pharmakodynamischer Ebene ein wesentlicher Schritt vorwärts. In diesem Abschnitt der Arbeit sollen daher die Wirkung und Wechselwirkung zwischen 7-OH MTX und MTX untersucht werden. Dabei führte man *ex-vivo* Versuche durch, d. h. man verwendete Zellen, die unmittelbar aus Patienten gewonnenen wurden. Veränderungen, die bei der Gewinnung von Zelllinien auftreten, sind damit praktisch ausgeschlossen. Auch spiegelt dieser Versuchsansatz die großen Unterschiede der verschiedenen Zellklone in den Patienten besser wieder als standardisierte Zelllinien.

Normalerweise werden für Dosis-Wirkungsuntersuchungen bzw. Untersuchungen von konzentrationsabhängigen Effekten zytotoxischer Arzneistoffe Zellwachstumsversuche, z.B. der so genannte MTT-Assay durchgeführt. Bei diesem Assay werden Zellen mit MTT (=3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyltetrazoliumbromid) versetzt, das durch mitochondriale Hydrolasen zu einem purpurnen Formazan umge-

setzt wird. Diese Änderung der Farbintensität wird photometrisch gemessen und anhand einer Kalibrationsgeraden quantitativ ausgewertet [103, 130].

Für Patientenproben *ex-vivo* sind solche Sensitivitätsassays, welche die Zelltötung messen, bei MTX nicht zu verwenden [148], weil etwa 35 % dieser Zellen spontan absterben [102]. Diese geringe Überlebensfähigkeit der aus Patienten gewonnenen Blasten führt zu einem internen Rescue der übrigen Blasten durch Zellmetabolite wie Purine und Pyrimidine [38, 83, 88, 89, 129, 148]. Als Alternative wurde daher ein *in-situ* Thymidylat-Synthase Inhibition Assay (TSIA) entwickelt [140, 185]. Dieser zeigte bei leukämischen Zelllinien mit geringer Absterbe- und somit Rescuerate streng korrelierte Ergebnisse mit den konventionellen Assays [113]. Dieser sehr viel aufwendigere indirekte quantitative Toxizitätsassay kann auch zur Resistenztestung von Antifolaten benutzt werden [148]. Er beruht auf der Freisetzung von H_2O bei der folsäureabhängigen Methylierung von 5-dUMP zu 5-dTMP durch das Enzym Thymidylat-Synthase (TS). Durch Einsatz von $^3[5H]$ -dCyt, das über die zellzyklusunabhängige Cytidinkinase und spontane Desaminierung zu dUMP derivatisiert wird [148], wird durch die TS 3H_2O abhängig von der Aktivität des Enzyms freigesetzt (Abbildung 60). Die Menge der Freisetzung dieses β - Strahlers kann dann nach entsprechender Aufarbeitung bestimmt und eine quantitative Abschätzung der TS-Aktivität gegenüber den unbehandelten Kontrollen (ohne Substanz) und den Blindwerten (ohne Zellen) vorgenommen werden.

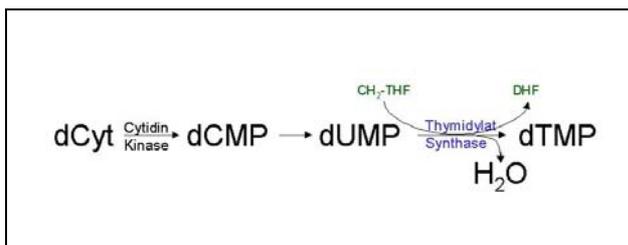


Abbildung 60: Biochemisches Prinzip des Thymidylat-Synthase Inhibition Assays (TSIA).

Durch den TSIA besteht daher die Möglichkeit, eine quantitative Aussage über die Wirkung der Folsäureantagonisten auf zellulärer Ebene zu machen [140, 185]. Dabei wird ein entscheidender Teil des Wirkungsspektrums der Folsäureantagonisten [77], die Hemmung der TS [46], quantitativ ausgewertet und eine halbmaximale hemmende Konzentration TSA(50%) (Kapitel 7.2.3.6, S. 105) bestimmt. Die Hemmung der TS resultiert einerseits indirekt aus dem Fehlen der reduzierten Folate und andererseits aus einer direkten Hemmung der TS durch die intrazellulär gebildeten Methotrexat-Polyglutamate (MTX-PG) (Abbildung 61, S. 99).

Sowohl MTX als auch 7-OH MTX werden intrazellulär polyglutamiert [61, 63, 97, 139, 158, 176]. Diese Polyglutaminierung führt zu einem veränderten Wirkspektrum [41, 97]. Dies gilt insbesondere für die Hemmung der TS [12], aber auch für Enzyme der Purin-de-Novo-Synthese (PDNS) [13]. Weiterhin ermöglicht die Polyglutaminierung einen längeren Verbleib der Antifolate innerhalb der Zelle [97, 98]. Dadurch kann die Zelle trotz fehlendem extrazellulärem MTX am Wachstum gehemmt werden. Diese Polyglutaminierung und Retention des MTX wird stark vom Zelltyp beeinflusst und erklärt zum Teil die unterschiedliche Wirkstärken des MTX bei verschiedenen Tumorentitäten [77]. Um einen Eindruck über die Effekte der Polyglutaminierung zu gewinnen, unterscheidet der Assay den *short exposure* Ansatz und den *long exposure* Ansatz. Die Durchführung ist in Kapitel 7.2.3.5 (S. 103) beschrieben.

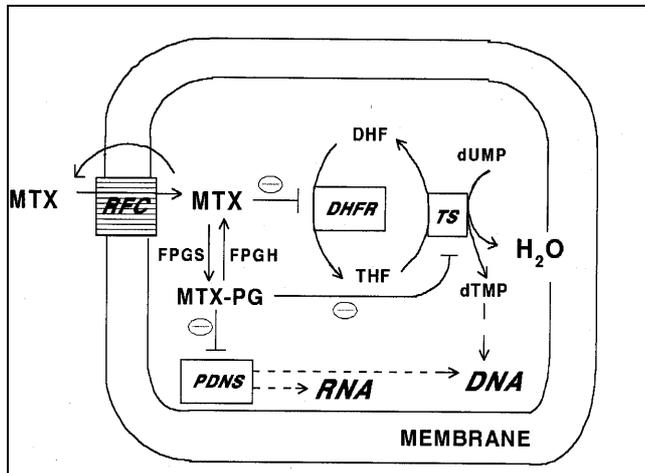


Abbildung 61: Pharmakodynamische Wirkung von Methotrexat mit Aufnahme, Polyglutaminierung und Effekt auf die folatabhängigen Enzyme [146].

7.2 Material und Methoden

7.2.1 Proben

Für diese Versuchsreihen wurden Restproben von Patientenproben verwendet, deren Blasten für diagnostischen Punktionen entnommen wurden. Insgesamt wurden 33 Patientenproben aufgearbeitet, die irreversibel anonymisiert wurden. Aus fünf dieser Patientenproben konnte keine ausreichende Anzahl lebender Zellen gewonnen werden (s. S. 143). Weiterhin war bei fünf Versuchen der Aktivitätsunterschied zwischen den Blindwerten und den Kontrollen kleiner als Faktor zwei (s. S. 145) und somit nicht auswertbar. Bei weiteren fünf Versuchen wurde aufgrund fragwürdiger Ergebnisse der Versuch wiederholt und die Wiederholung anstatt der ersten Durchführungen in die Auswertung einbezogen (s. S. 145). Die verbleibenden 18 Proben (16 Patienten) benutzte man dann für die gemeinsame Auswertung.

7.2.2 Patientenstatistik

Untersucht wurden 18 Proben von 17 verschiedenen Patientenproben. Dabei handelte es sich um 9 Zellproben von männlichen, vier von weiblichen und vier vom Geschlecht unbekannter Patienten. Bei den Diagnosen handelte es sich um 11 akute myeloische Leukämie (AML)-Proben, die sich weiter in drei monozytische (M5), vier myelomonozytäre (M4) inklusive eines Rezidives und eine myeloblastische (M2) Leukämie aufteilten. Ein weiterer Patient mit AML-Rezidiv war, wie auch ein weiterer mit myeloischer Leukämie, nicht genauer beschrieben. Die 6 akuten lymphatischen Leukämien (ALL) teilten sich in drei T-ALL, zwei c-ALL und eine nicht näher beschriebene ALL auf (Tabelle 12).

Ein männlicher Patient ging mit einer primären AML-M4 (#15) und einem erlittenen Rezidiv (#14) (s. S. 123) in die Untersuchungen ein und Patient #6 lieferte eine ausreichende Anzahl an Zellen für die Durchführung von zwei Assays. Damit konnte ein Anhaltspunkt über die Reproduzierbarkeit dieses Assays gewonnen werden (s. S. 119).

Tabelle 12: Daten der untersuchten Patienten.

Geschlecht	Nr.	Diagnose	Alter	% Blasten	Jahrgang
männlich	#1	ALL(t)		95%	98
männlich	#2	AML M5		86%	00
weiblich	#3	AML M4		84%	98
männlich	#4	ALL(c)		94%	91
weiblich	#5	AML-M2		82%	
männlich	#6(1)	AML-M5	1,3	84%	97
männlich	#6(3)	AML-M5	1,3	84%	97
weiblich	#7	ALL		98%	
weiblich	#8	ALL(c)	10,5	96%	84
männlich	#9	ALL(t)	5,1	94%	87
	#10	AML			
männlich	#11	AML-M4	8,1		91
männlich	#12	AML-M5		96%	
	#13	AML-Rezidiv			
männlich	#14	AML-M4/rez		91%	
männlich	#15	AML M4/prim			
	#16	ALL(t)		96,5%	87
	#17	ALL			

7.2.3 Versuchsdurchführung

7.2.3.1 *Material*

Tabelle 14: Übersicht über die beim Thymidylat-Synthase Inhibition Assay verwendeten Substanzen.

Substanz	Abkürzung	Hersteller
Methotrexat	MTX	Pharmachemie (Haarlem, Niederlande)
7-OH Methotrexat	7-OH MTX	Schircks (Jona, Schweiz)
5-[³ H]-2'-Desoxycytidin	5-[³ H]-dCyt	Moravек Biochemicals (Brea, CA, USA)
Fetales Kälberserum (hitzeinaktiviert)	FCS	Flow Laboratories (Irvine, UK)
Dextran, Kohle		Sigma (Zwijndrecht, Niederlande)
Bovines Serumalbumin	BSA	Organon Technika (Oss, Niederlande)
Roswell Park Memorial Institute Kulturmedium	RPMI	Sigma (Zwijndrecht, Niederlande)
Phosphat-Borat-Puffer	PBS	Flow Laboratories (Irvine, UK)
Streptomycin, Penicillin, Fungizon,		Flow Laboratories (Irvine, UK)
Gentamycin, L-Glutamin		Flow Laboratories (Irvine, UK)
Insulin, Transferrin, Na ₂ SeO ₃		Flow Laboratories (Irvine, UK)

7.2.3.2 *Vorbereitung der Zellen, Auftauen*

Die in flüssigem N₂ gelagerten Zellvials (Volumen etwa 1-2 ml RPMI inkl. 20 % FCS und 10 % Dimethylsulfoxid) wurden im Wasserbad bei 37° C permanent geschüttelt, bis die Zellsuspension aufgetaut war. Die Vials spülte man sofort mit EtOH ab und öffnete sie unter der Sterilbank. Mittels einer sterilen Pipette wurden die Blasten in eine sterile Auftaulösung, die aus 4 ml hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum (FCS) und 14 ml RPMI bestand, überführt. Diese Schritte wurden sehr zügig hintereinander durchgeführt, um das zytotoxische, aber für den Einfriervorgang unabdingbare Dimethylsulfoxid (DMSO) rasch zu verdünnen. Die Zellsuspension wurde daraufhin 10 min bei 250 g (1200 rpm) zentrifugiert und der zellfreie Überstand durch schwachen Unterdruck (Pipette) unter der Sterilbank abgesaugt. Nach erneu-

tem vorsichtigem Aufschütteln der Zellsuspension zentrifugierte man zwei weitere Male in 10 ml Waschlösung (1 % FCS in RPMI) bei oben genannten Bedingungen, und erneut wurde vorsichtig der zellfreie Überstand abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen in der für den TSIA benötigten Menge Kulturmedium, bestehend aus 40 ml RPMI, 10 ml FCS, 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 0,125 µg/ml Fungizon, 200 µg/ml Gentamycin, 2 mM L-Glutamin, 5 µg/ml Insulin, 5 µg/ml Transferrin und 5 ng/ml Na₂SeO₃, aufgenommen.

7.2.3.3 Cytospins

Cytospins dienen der Bestimmung der Anzahl Blasten im Verhältnis zu den gesunden Zellen der Zellprobe. Cytospins verhindern daher, Effekte zu messen, die nicht auf Blasten zurückgehen, und sichern somit die Ergebnisse des TSIA ab.

Etwa 25000 Zellen wurden zur Cytospinbestimmung in die Gefäße pipettiert. Die Zellsuspension wurde für 7 min bei 680 rpm zentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend getrocknet und nach Pappenheimer (Kombination von May-Grünwald und Giemsa-Färbung) angefärbt. Nach einem weiteren Tag zählte man die Anzahl der Blasten und die Anzahl der gesunden Zellen unter dem Mikroskop aus. Die Angabe erfolgt in Prozent der Blasten zu der Gesamtzellzahl. Dabei sollte die Anzahl Blasten mindestens 80 % betragen.

7.2.3.4 Zellzahlbestimmung

Zu Beginn der Inkubation und am Ende der Inkubation nahm man 20 µl Zellsuspension zum Zählen ab. Diese wurden mit weiteren 20 µl Trypanblau versetzt und im Mikroskop ausgezählt.

7.2.3.5 Durchführung des Thymidylat-Synthase Inhibition Assay

Die Versuchsdurchführung teilte sich in einen *short exposure* Teil (auch Efflux genannt) und einen *long exposure* Teil (Influx) (Abbildung 62).

Der *short exposure* Ansatz zeichnete sich durch eine 3 Stunden Inkubation von 135 µl Zellsuspension (etwa 1x10⁶ Zellen/ml) und 15 µl der verschiedenen Antifolatkonzentrationen aus. Nach der 3 h Inkubation mit der gewünschten Konzentration an Antifolaten wurde 1 ml RPMI-Medium (inkl. 1 % FCS) mittels einer Repetierpipette zu jedem Vial zugegeben und anschließend 5 min bei 20°C mit 1500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig und gleichmäßig abgegossen, wobei keine Zellen verloren gehen sollten. Die abgesetzten Zellen schüttelte man daraufhin wie-

der vorsichtig auf. Diese Schritte wurden zweimal wiederholt und nach dem letzten Zentrifugationsschritt 135 µl Kulturmedium zugegeben und im Wasserbad (37° C; 100 rpm) weiter inkubiert, um den Zellen unter optimalen Bedingungen wieder das Wachstum zu ermöglichen. Ab diesem Punkt wurden die beiden Varianten gemeinsam weiter verarbeitet (Abbildung 60).

Beim *long exposure* erfolgte die Inkubation mit den verschiedenen Antifolatkonzentrationen 21 h lang (also bis zur Aufarbeitung). Daher entfiel der Waschschrift. Auch hier wurden antifolatfreie Kontrollen (C₆) in vier- oder fünffach Bestimmung verwendet.

Zu Stunde 4 nach Inkubationsbeginn wurde bei beiden Varianten den Zellen 5-[³H]-2'-Desoxycytidin ([³H]-dCyt) mit einer Endkonzentration von 1 µM in PBS-Puffer pH 7,4 und einer Endaktivität von 2,5 Ci/mmol⁶ zugesetzt.

21 Stunden nach Beginn der Inkubation wurden beide Versuchsansätze zusammen aufgearbeitet. Die Vials stellte man auf Eis, und jedes Vial versetzte man daraufhin mit 150 µl eiskalter Trichloressigsäure (35 %), um die Reaktion zu beenden und die Zellen aufzuschließen. Anschließend wurde 750 µl aktivierter Kohle, bestehend aus 10 g gewaschener Kohle, 0,5 g Dextran und 2,5 g humanem Serumalbumin in 100 ml gereinigtem Wasser, zugegeben. Dies bindet das nicht umgesetzte [³H]-dCyt. Die Zellen wurden gevortext und für etwa 30 Minuten auf Eis stehen gelassen. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 800 g über 30 Minuten (4° C). 450 µl der wässrigen Phase, die das radioaktive ³H₂O enthielt, wurden anschließend entnommen und in Szintillationsgefäße pipettiert. Daraufhin gab man noch 4-5 ml Szintillationsflüssigkeit zu.

Alle Proben wurden doppelt aufgearbeitet und bestimmt.

⁶ In 1 g Radium finden in jeder Sek. $3,7 \cdot 10^{10}$ Zerfallsreaktionen statt (Definition des Curie u. des Rutherford als – veralteten – Einheiten der Aktivität; 1 Ci = 37000 rd = 37 GBq)

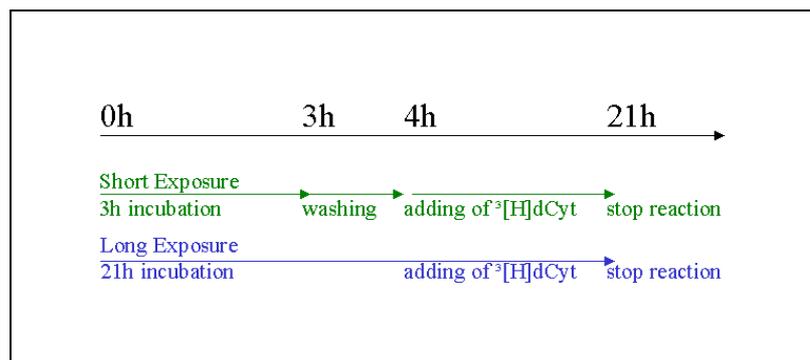


Abbildung 62: Durchführung des Thymidylat-Synthase Inhibition Assays (TSIA). Schwarz zeigt die gesamte Zeitachse, grün den *short exposure* Teil (Efflux) und blau den *long exposure* Teil (Influx).

7.2.3.6 Auswertung und Statistik:

Nach Abzug der Blindwerte (Vials ohne Zellen) - dem 0 %-Wert TS-Aktivität entsprechend - wurden die Aktivitätswerte als Mittelwert aus den Doppelbestimmungen im Verhältnis zur substanzfreien Kontrolle C_1 und C_6 (Zellen in reinem Kulturmedium) - dem 100 %-Wert TS-Aktivität entsprechend - bestimmt. Die TSA(50%) wurde daraufhin bestimmt, indem der Wert vor und nach der 50 % Grenze als Punkte einer Gerade angesehen wurden (also Linearität zwischen Konzentration und Effekt in diesem Bereich angenommen wird). Durch diese Gerade wurde der 50 % TS-Aktivitätswert berechnet und daraus die Konzentration ermittelt, die TSA(50%) genannt wurde.

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software SigmaStat Version 2.03. Dem Friedman-Test, der einen verbundenen Rangtest darstellt, um signifikante Unterschiede der Ergebnisse zu erkennen, folgend wurden die Daten nach Dunn als multiple Vergleichsmethode ausgewertet, falls ein Unterschied (H_0 wurde abgelehnt) gefunden wurde.

7.3 Ergebnisse

7.3.1 Allgemein

Zur Absicherung der Ergebnisse wurde in 13 Fällen ein Cytospin (s. S. 103) durchgeführt. Hierbei wurde die Anzahl an Blasten an der Gesamtpopulation der Zellen bestimmt.

Bei allen Proben lag der Prozentsatz an Blasten über den laborintern geforderten 80 %. Bei #5 lag das Minimum (82 %) dieser Versuchsreihen. Damit konnte gezeigt werden, dass das freigesetzte $^3\text{H}_2\text{O}$ tatsächlich aus Blasten und nicht aus gesunden Zellen stammte.

Weiterhin wurde für die Doppelbestimmung eine Abweichung (berechnet nach der Formel für die Standardabweichung) berechnet. Eine Abweichung von bis zu 15 % im Mittel aller Abweichungen der 7-OH MTX, MTX und 1:1-Versuche tolerierte man.

Als weiteres Qualitätskriterium musste das Verhältnis der Kontrollen (C_1 und C_6) zu den Blindwerten mindestens den Faktor zwei betragen. #8 lag mit Werten von 3911 (C_1) und 4658 (C_6) zu 2020 (Blindwert) genau an dieser Grenze (Abbildung 63).

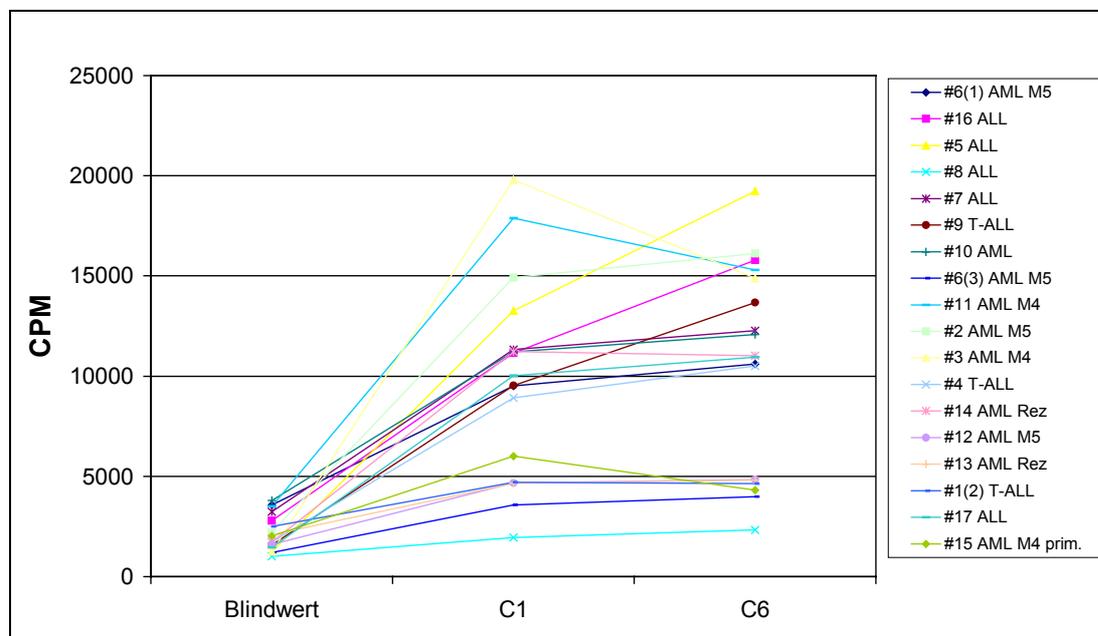


Abbildung 63: Freigesetzte Radioaktivität in „Counts per minute“ (CPM) der Blindwerte und der Kontrollen bei jeder Versuchsdurchführung zur Qualitätssicherung.

Am Beispiel des Patienten #2 wird ein Versuchsergebnis beschrieben. Auf der x-Achse sind die MTX bzw. 7-OH MTX-Konzentrationen logarithmisch aufgetragen (Abbildung 64 und Abbildung 65). Die y-Achse zeigt die gemessene TSA. 7-OH MTX zeigte keine Enzymhemmung, da alle Werte etwa 100 % Aktivität – verglichen mit den Kontrollen (C_1 bzw. C_6) - aufwiesen. MTX zeigte einen konzentrationsabhängigen Aktivitätsabfall, da mit steigenden MTX-Konzentrationen die Enzymaktivität der TS immer weiter sank und schließlich auf dem Niveau der zellfreien Blindwerte endete. Das 1:1-Verhältnis von MTX und 7-OH MTX beschrieb einen dazu nach links verschobenen konzentrationsabhängigen Effekt. Niedrigere MTX-Dosen waren mit diesem Gemisch erforderlich, um die gleiche TS-Hemmung zu erreichen. Die 16:1 Proben zeigten einen konzentrationsabhängigen Aktivitätsabfall, der wieder etwa auf dem Niveau der MTX-Kurve lag.

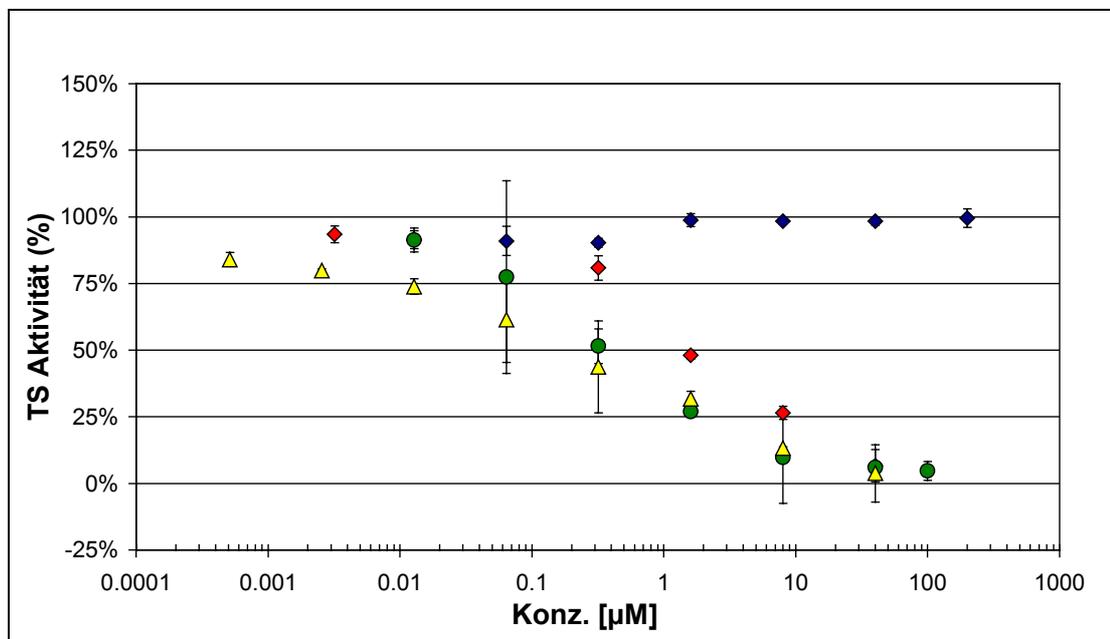


Abbildung 64: *Short exposure* Versuch der Probe #2. 7-OH MTX (♦) zeigte keinen konzentrationsabhängigen Effekt. Alle Werte lagen um 100 % TS-Aktivität. MTX (♦), 1-1 (●) und 5-1 (▲, Konzentration im Diagramm bezieht sich auf MTX) zeigten jeweils einen konzentrationsabhängigen Aktivitätsabfall.

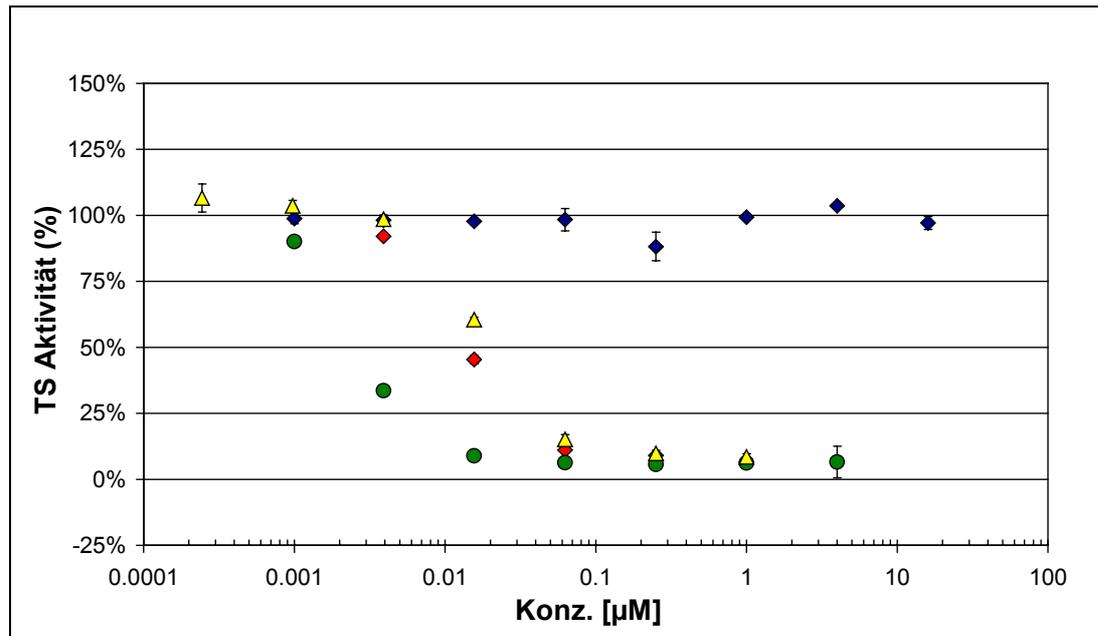


Abbildung 65: *Long exposure* Versuch des Patienten #2. 7-OH MTX (♦) zeigte auch hier keinen konzentrationsabhängigen Effekt auf die Thymidylat-Synthase. Alle Werte lagen um 100 % TS-Aktivität. MTX (♦), 1-1 (●) und 5-1 (▲, im Diagramm angegebene Konzentration bezieht sich auf MTX) beschrieben jeweils eine konzentrationsabhängige Wirkung.

7.3.2 Ergebnisse der 7-OH Methotrexat Versuchsreihen

7.3.2.1 7-OH Methotrexat short exposure

Für die Bestimmung der Hemmung der TS durch 7-OH MTX wurden 18 Proben untersucht. Von diesen 18 Versuchsreihen lieferte #13 fünf von 8 möglichen Werten. Bei #6(3), #2 und #3 fehlten jeweils die höchste 7-OH MTX-Konzentration.

In dem verwendeten Konzentrationsbereich von 0,01 µM bis 1 mM konnte in keinem dieser Versuche ein konzentrationsabhängiger Effekt nachgewiesen werden.

Wie Abbildung 66 zeigt, schwankten die Messreihen regellos um die 100 % TS-Aktivität. Dabei erzielte keine Patientenprobe eine TS-Aktivität konstant über 100 % und nur eine Patientenprobe (#15) zeigte eine TS-Aktivität ständig unter 100 %. Aus den oben genannten Gründen konnte für die 7-OH MTX *short exposure* Werte keine TSA(50%) bestimmt werden.

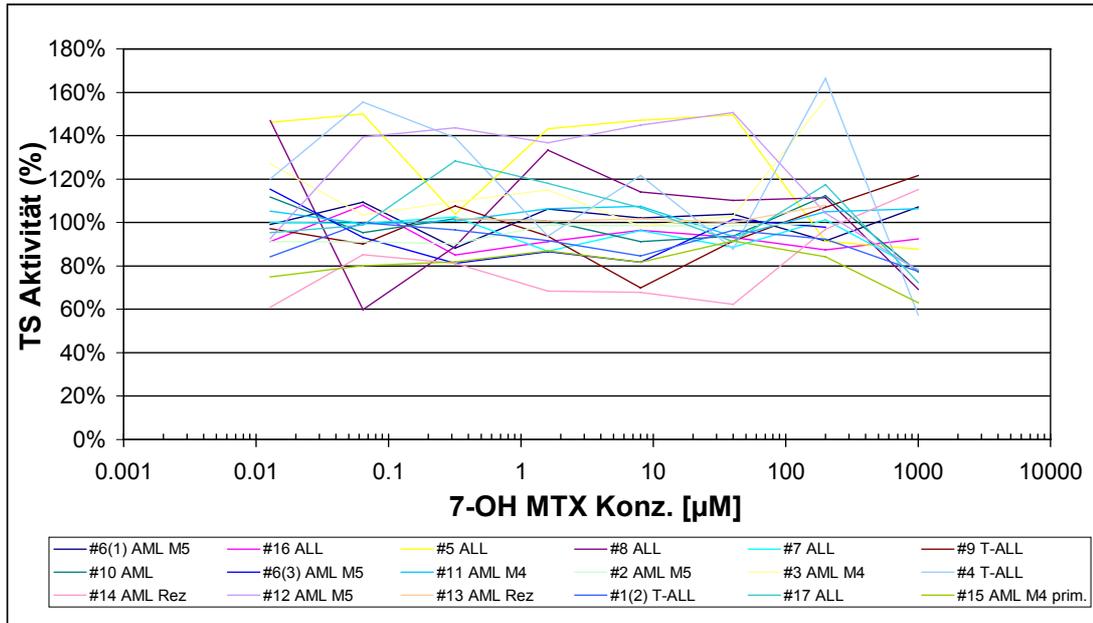


Abbildung 66: Halblogarithmische Darstellung der Rohdaten der 7-OH MTX *short exposure* Versuche.

Über den gesamten Konzentrationsbereich lagen die Mediane der TSA bei 100 %. Ausnahme war die 1 mM 7-OH MTX-Konzentration, deren Median auf 80 % TSA bestimmt wurde und die 40 µM Gruppe mit einem Median von 90 %. Alle 25 % Perzentilen lagen unter 100 % TSI, alle 75 % Perzentilen lagen über 100 % (s. S. 145 und Abbildung 67).

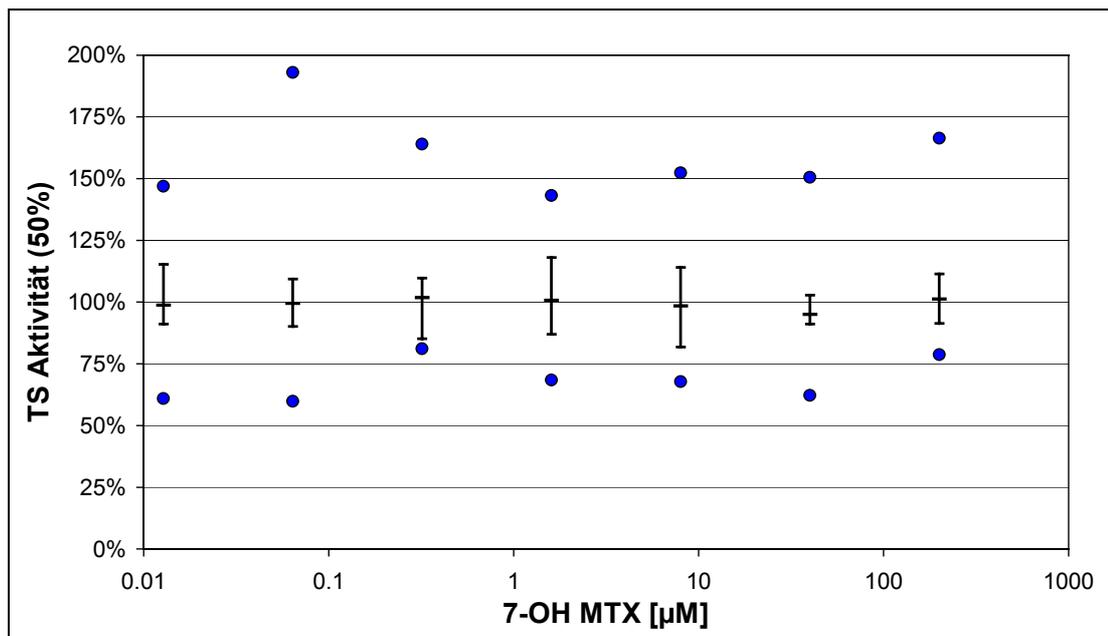


Abbildung 67: Boxplot der 7-OH MTX *short exposure* Versuche mit Minimum, 25 % Perzentile, Median, 75 % Perzentile und maximal gemessener Thymidylat-Synthase Aktivität.

Der Friedman-Test zeigte mit einem p-Wert von 0,429, dass alle 7-OH MTX-Konzentrationen die TS gleich (s. S. 145) hemmten. Bemerkenswert ist hierbei, dass die Patienten #2, #13, #6(3) und #3 nicht in die Auswertung eingingen, da sämtliche Reihen mit mindestens einem fehlenden Wert beim nichtparametrischen Friedman-Test eliminiert werden. Daher wurde erneut der Friedman-Test ohne die höchste Konzentration (1 mM) geprüft. 17 Patienten konnten dabei in die Auswertung eingehen (fehlend: #13). Erneut ergab sich kein Unterschied innerhalb der einzelnen Konzentrationsgruppen. Der p-Wert betrug nun 0,76.

7.3.2.2 7-OH Methotrexat long exposure

Bei den 7-OH MTX *long exposure* (influx) Versuchen kamen 16 Patienten zur Auswertung (Abbildung 68).

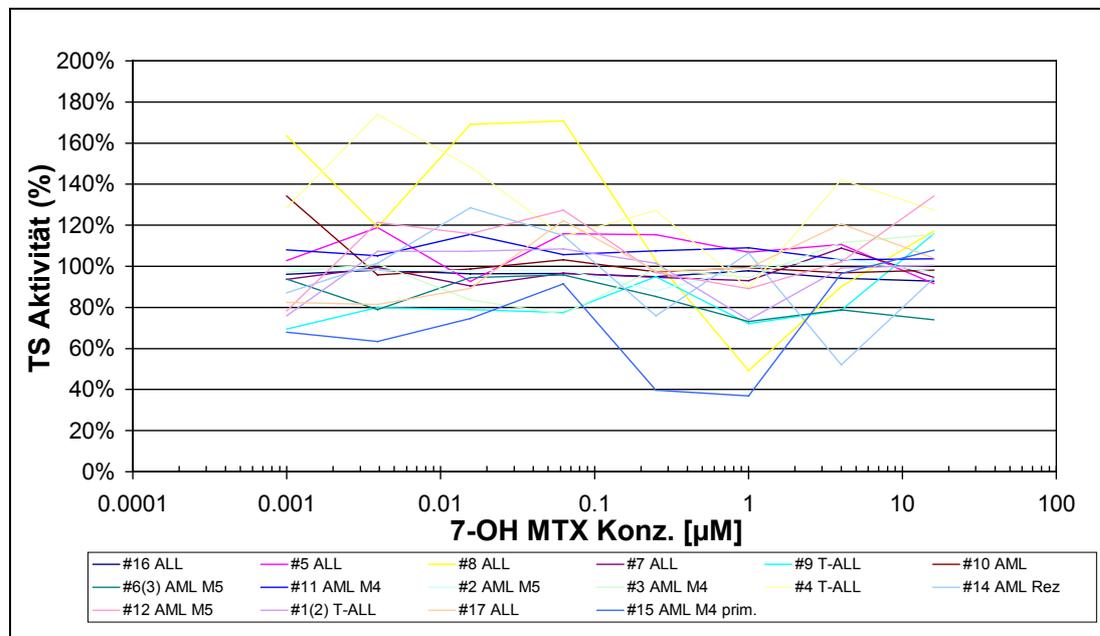


Abbildung 68: Die 7-OH MTX *long exposure* Versuche zeigen keinen konzentrationsabhängigen Effekt auf die TS.

Auch bei dieser Versuchsreihe konnte keine Patientenprobe eine konzentrationsabhängige TS-Hemmung zeigen. Es ergab sich für den untersuchten Konzentrationsbereich von 16 µM bis 0,001 µM kein signifikanter Unterschied ($p = 0,166$) in der Hemmung der TS bei dieser 21 h Inkubation mit 7-OH MTX.

Der Median der TSA lag bei allen eingesetzten Konzentrationen bei 100 % mit Ausnahme der 0,001 µM 7-OH MTX-Konzentration und der 1 µM Konzentration

(jeweils 90 % TSA) (Abbildung 69). Die 25 % Perzentile lag immer unterhalb 100 % und die 75 % Perzentile oberhalb 100 % TSA (s. S. 146).

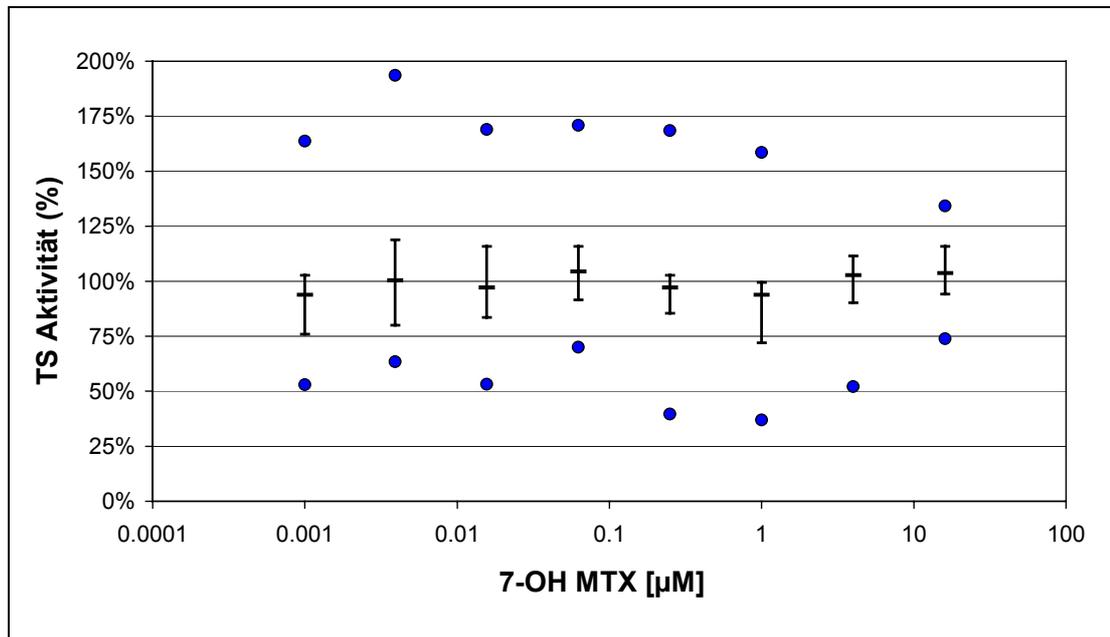


Abbildung 69: Boxplot der 7-OH MTX *long exposure* Versuche mit Minimum, 25 % Perzentile, Median, 75 % Perzentile und Maximum.

7.3.3 Ergebnisse der Versuchsreihen mit Methotrexat und 7-OH Methotrexat

7.3.3.1 Short exposure

Im Gegensatz zu den 7-OH MTX *short exposure* Versuchen konnte für die MTX Versuchsreihen jeweils ein konzentrationsabhängiger Effekt auf die TS gefunden werden. Mit steigenden Konzentrationen an MTX sank die Aktivität der TS bis zur TSA der Kontrollen (Abbildung 71). Der Median der dabei bestimmten TSA(50%) Konzentrationen betrug 0,857 µM.

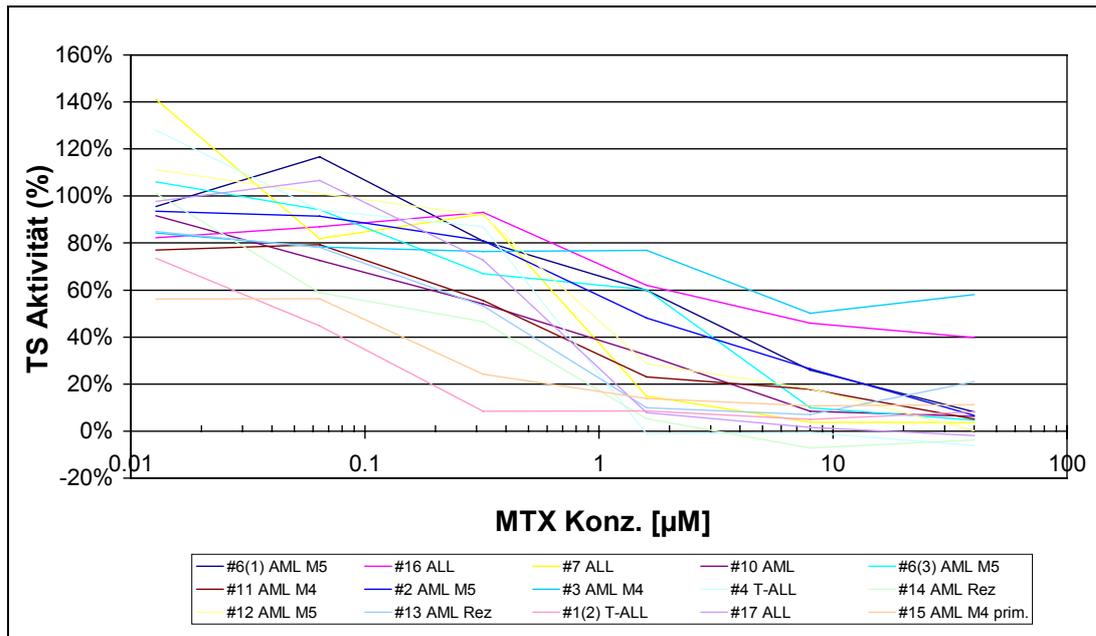


Abbildung 71: Halblogarithmische Darstellung der Rohdaten der MTX *short exposure* Versuche. Bei allen Versuchsreihen erfolgte eine Abnahme der TS-Aktivität mit steigender MTX-Konzentration.

Weiterhin wurde ein Gemisch von MTX und 7-OH MTX mit einem Molverhältnis von 1:1 (1:1) unter den Bedingungen des *short exposure* untersucht. Auch hierbei zeigte sich ein konzentrationsabhängiger Effekt der 14 ausgewerteten Versuchsreihen auf die TS (Abbildung 72). Dabei konnte der Median der TSA(50%) auf 0,0088 µM bestimmt werden.

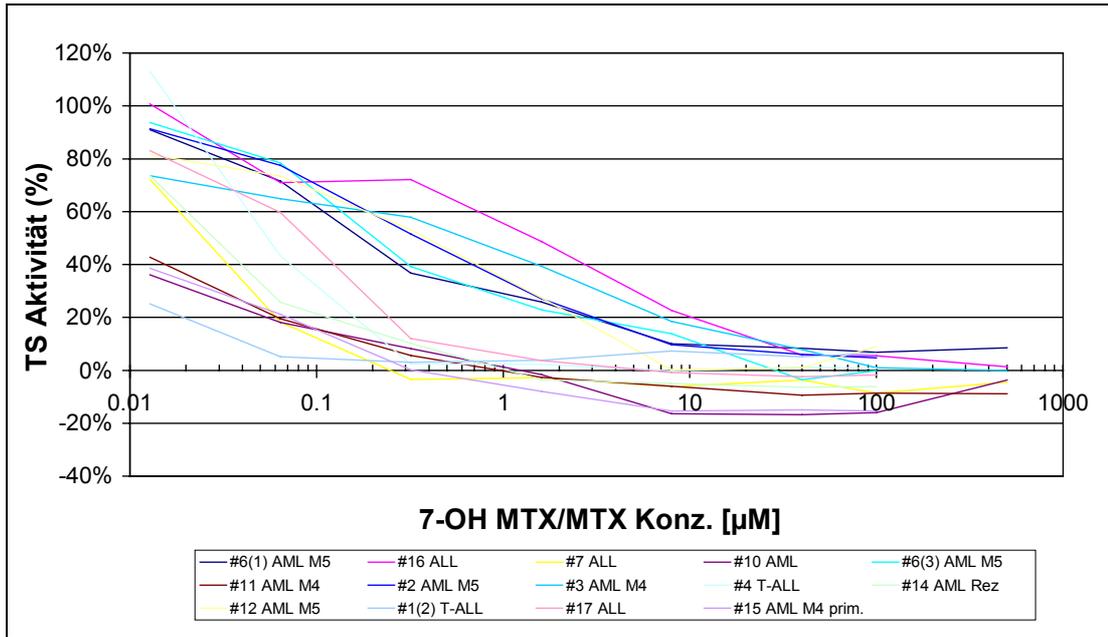


Abbildung 72: Halblogarithmische Darstellung der Rohdaten der 1:1 *short exposure* Versuche.

Weiterhin wurde ein Überschuss an 7-OH MTX seiner Muttersubstanz zugesetzt. Dieses Verhältnis betrug beim *short exposure* 5:1 (5:1). Auch bei dieser 5:1-Versuchsreihe konnte eine Konzentrations-Wirkungsbeziehung gefunden werden (Abbildung 73). Der Median der TSA(50%) betrug 0,699 µM.

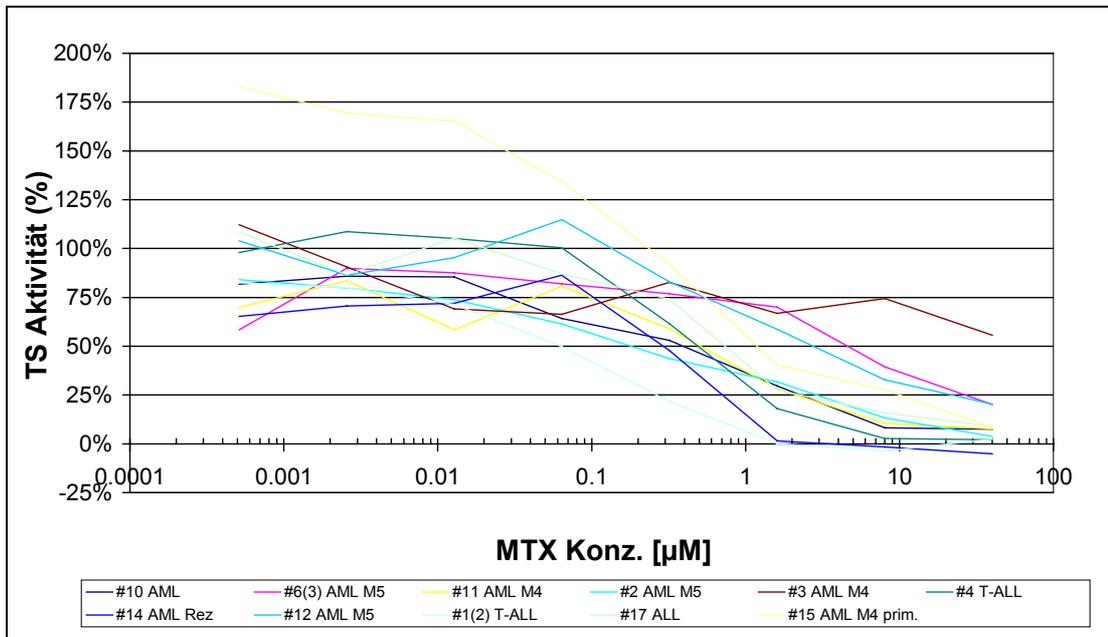


Abbildung 73: Halblogarithmische Auftragung der Rohdaten der 7-OH MTX: MTX=5:1 *short exposure* Versuche.

Tabelle 15 vergleicht die Ergebnisse verschiedener *short exposure* Durchführungen. Während bei 7-OH MTX allein zwischen der niedrigsten und höchsten eingesetzten Konzentration kein Unterschied in der TS-Aktivität zu erkennen war, sank bei den Versuchsreihen mit MTX die Aktivität der TS mit steigenden Konzentrationen der Antifolate und eine TSA(50%) konnte berechnet werden.

Tabelle 15: Überblick über die durchgeführten *short exposure* Versuchsreihen. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf MTX in μM .

	MTX	1:1	5:1	7-OH MTX
n	15	15	11	18
max. eingesetzte Konz.	40	1000	40	1000
min. eingesetzte Konz.	0,0128	0,0128	0,0005	0,0125
TSA bei der max. Konz.	10 %	-2 %	8 %	80 %
TSA bei der min. Konz.	90 %	80 %	80 %	100 %
Median der TSA(50%)	0,857	0,088	0,699	-

Vergleich zwischen den *short exposure* Versuchsreihen

Bei den MTX und 1:1 *short exposure* Auswertungen konnte für 14 Patienten eine TSA(50%) bestimmt werden. Patient #3 zeigte alle TS-Aktivitätswerte für den MTX *short exposure* oberhalb der 50 % TSA, daher wurde der Wert auf 20 μM gesetzt (oberhalb der höchsten Konzentration von 16 μM). Bei 1:1 erreichten vier Proben (#1, #10, #11, #15) niemals eine 50 % Hemmung. Diesen wurde für die Auswertung ein TSA(50%)-Wert von 0,0128 μM (kleinste eingesetzte Konzentration) zugewiesen.

Die 5:1 Reihe bestand aus 11 Patienten. #3 zeigte - wie bereits beim MTX-Teil - alle Aktivitäten über 50 % der TSA verglichen mit den Kontrollen. Der TSA(50%)-Wert dieser Probe wurde daher auf 20 μM festgesetzt. Die Übersicht der gesamten TSA(50%)-Werte ist auf S. 150 zu finden. Rot markiert sind diese abgeschätzten Werte.

Tabelle 16: Mediane der TSA(50%) *short exposure* Versuche. Zahlen in Klammern geben die Anzahl der gemessenen Proben an.

Gruppe	7-OH MTX	MTX	1:1	5:1
alle	>50%	0,939 µM (14)	0,088 µM (14)	0,699 µM (11)
ALL	>50%	0,857 µM (5)	0,059 µM (5)	0,661 µM (3)
AML	>50%	0,819 µM (9)	0,144 µM (9)	1,030 µM (8)
T-ALL	>50%	3,212 µM (2)	0,769 µM (2)	0,063 µM (1)
c/preB-ALL	>50%	0,857 µM (3)	0,059 µM (3)	0,822 µM (2)

Auffallend ist, dass ausnahmslos alle MTX TSA(50%) *short exposure* Werte größer waren als die dazugehörigen 1:1-Werte (Abbildung 74). Dies zeigte sich in den Medianen der 1:1-Werte (Tabelle 16), die etwa eine Zehnerpotenz niedriger lagen als die Mediane der MTX-Versuchsgruppe. Unterteilt man die Patienten weiter nach ihrer Diagnose (AML gegen ALL) liegt der Median der 1:1 AML-Proben etwa 6mal, der Median der 1:1 ALL-Proben sogar 15mal niedriger als bei den entsprechenden MTX Versuchen.

Gleiches galt für das Verhältnis der 1:1 und 5:1-Versuchsreihen. Hierbei waren 10 der 11 gemeinsamen TSA(50%)-Werte bei den 1:1-Versuchen kleiner. Ausnahme war Patient #2 (Abbildung 64). Bei diesem Patienten (AML-M5) lag die TSA(50%) für den 1:1 *short exposure* bei 0,399 µM bei dem 5:1-Versuch bei 0,229 µM. Die Mediane dieser Versuchsreihen wiesen ebenfalls auf einen Unterschied zwischen diesen beiden Versuchsreihen hin.

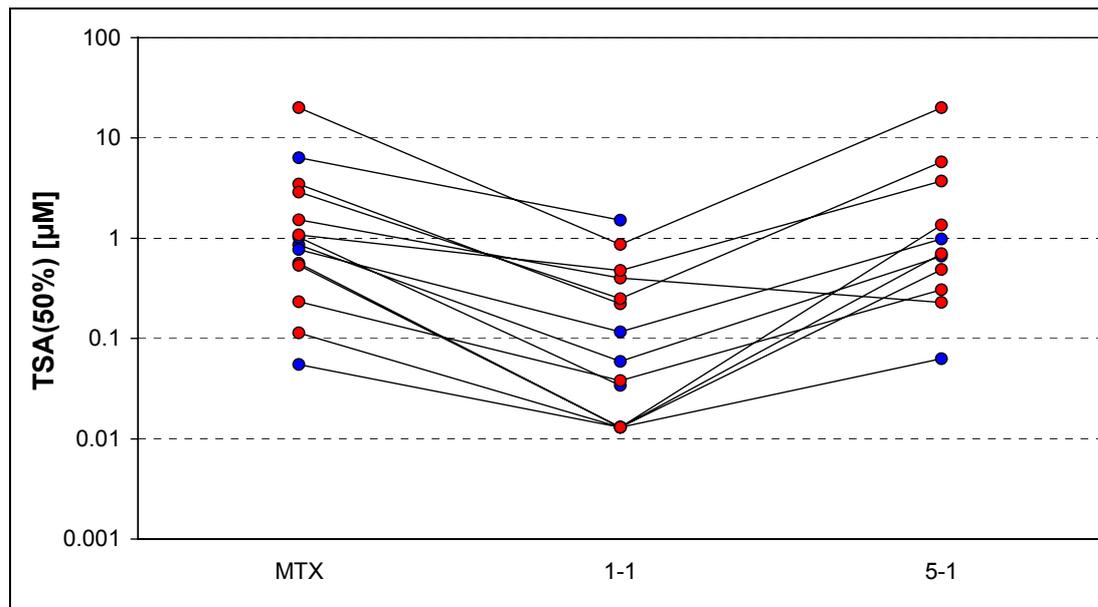


Abbildung 74: TSA(50%)-Werte der *short exposure* Versuche. Dabei sind die MTX und 5:1 Werte signifikant vom 1:1-Gemisch verschieden. Zwischen den ALL- (●) und AML-Werten (●) kann kein Unterschied beobachtet werden.

Ein gemeinsamer Vergleich der TSA(50%) *short exposure* Werte erfolgte durch einen nichtparametrischen Friedman-Test (s. S. 151). Dabei zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied ($p \leq 0,001$) zwischen den drei Gruppen. Die folgende statistische Auswertung mittels multipler Vergleiche nach Dunn bewies einen signifikanten Unterschied zwischen MTX und 1:1 ($p < 0,05$) und 5:1 und MTX ($p < 0,01$).

Beim Vergleich von MTX und den 5:1 Durchführungen, zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Der Mittelwert von $2,8 \mu\text{M} \pm 5,2 \mu\text{M}$ der MTX-Versuche war nur leicht geringer als der Mittelwert des Gemisches von $3,12 \mu\text{M} \pm 5,9 \mu\text{M}$. Analoge Ergebnisse zeigte der Median von MTX und dem 5:1-Gemisch.

Die Unterteilung nach Diagnose zeigte für den Median der AML-Patienten einen leicht niedrigeren Wert für MTX gegenüber den ALL-Patienten. Die MTX TSA(50%)-Werte der ALL-Patienten waren dagegen mit $0,857 \mu\text{M}$ als Median geringfügig höher als bei 5:1 mit $0,661 \mu\text{M}$.

7.3.3.2 Long exposure

Auch bei den *long exposure* Versuchsreihen zeigte sich für MTX eine konzentrationsabhängige Wirkung, die für 7-OH MTX nicht gefunden werden konnte. Dabei konnte durch Einsatz steigender Konzentrationen die TSA auf 0 % reduziert werden (Abbildung 75). Der Median der TSA(50%) wurde dabei auf $0,031 \mu\text{M}$ bestimmt.

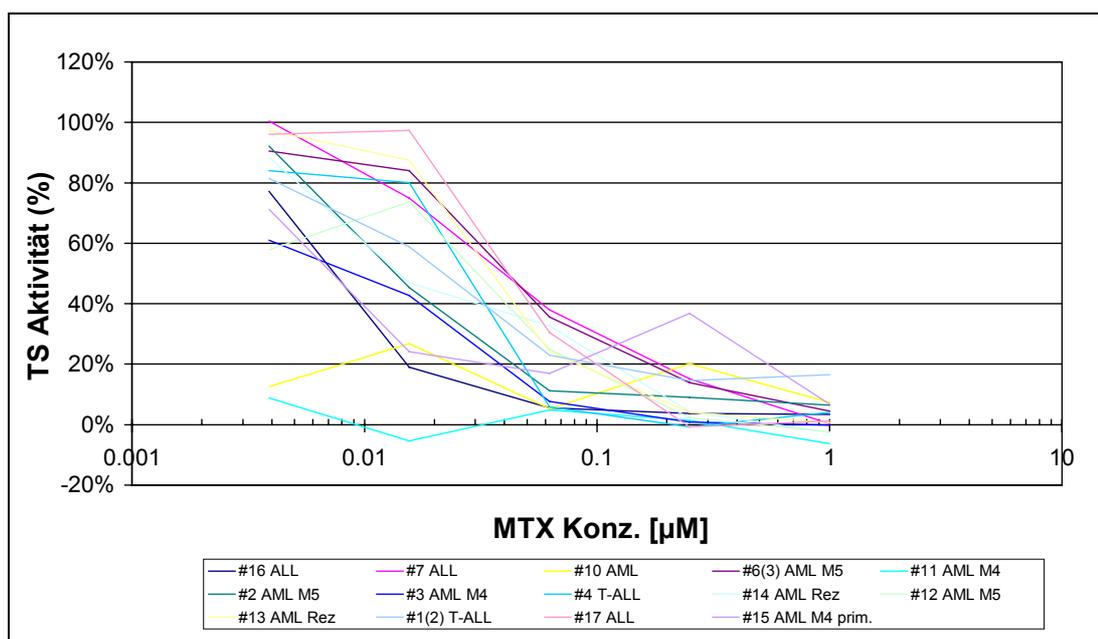


Abbildung 75: Halblogarithmische Darstellung der Rohdaten der MTX *long exposure* Versuche.

Weiterhin wurden equimolare Verhältnisse (1:1) von MTX und 7-OH MTX sowie ein 16facher Überschuss von 7-OH MTX (16:1) untersucht. Für beide Versuchsreihen konnte erneut ein konzentrationsabhängiger Effekt gezeigt werden, der auch zu einem signifikanten Unterschied in der TSA zwischen der höchsten und der niedrigsten eingesetzten Konzentration führte (Tabelle 17).

Tabelle 17: Überblick über die durchgeführten *long exposure* Versuchsreihen. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf MTX in µM.

	MTX	1:1	16:1	7-OH MTX
n	14	13	11	16
max. eingesetzte Konz.	1	16	1	16
min. eingesetzte Konz.	0,004	0,001	0,0002	0,001
TSA bei der max. Konz.	2 %	0 %	6 %	100 %
TSA bei der min. Konz.	80 %	90 %	80 %	90 %
Median der TSA(50%)	0,031	0,004	0,027	-

Vergleich zwischen den *long exposure* Versuchsreihen

Bei der *long exposure* Versuchsreihe konnte für MTX bei 14 Patienten eine Konzentrations-Wirkungsbeziehung gesehen werden. Der Median des TSA(50%) betrug hierbei 0,031 µM. Ohne Patient #13, der aus Mangel an Zellen nur für den MTX-Versuch benutzt wurde, sank der Median nur unwesentlich auf 0,028 µM. Anzumerken ist dabei, dass die TSA(50%) von #10 und #11 auf 0,001 µM gesetzt wurde, da bei beiden Proben alle MTX-Konzentrationen unter 50 % TSA blieben.

Die Versuchsreihe 1:1 zeigte einen Median von 0,004 µM (n = 13). Dabei wurden die TSA(50%) der Patienten #10 und #11 auf 0,001 µM festgesetzt, da alle TS-Aktivitäten (wie auch dies entsprechenden MTX-Werte) unterhalb von 50 % gegenüber den Kontrollen blieb. Den höchsten TSA(50%)-Wert hatte #7 mit einer TSA(50%) von 0,021 µM.

Weiterhin wurde für die 11 16:1-Versuche ein Median von 0,027 µM bestimmt. Die Mittelwerte waren hierbei $0,041 \mu\text{M} \pm 0,04 \mu\text{M}$.

Die Werte sind zusammenfassend im Anhang auf S. 151 aufgeführt.

Tabelle 18: Mediane der TSA(50%) *long exposure* Versuche. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der ausgewerteten Proben an.

Gruppe	7-OH MTX	MTX	1:1	16:1
alle	> 50 %	0,028 µM (14)	0,004 µM (13)	0,027 µM (11)
ALL	> 50 %	0,035 µM (5)	0,011 µM (5)	0,046 µM (3)
AML	> 50 %	0,0144 µM (9)	0,003 µM (8)	0,027 µM (8)

Es zeigte sich für alle Patienten ein niedrigerer TSA(50%)-Wert für die 1:1-Versuchsreihe als für die MTX-Versuchsreihe. Weiterhin #16, der im Rahmen der Genauigkeit dieser Versuchsreihe mit 0,0094 µM für MTX und 0,0089 µM für 1:1, gleiche TS-Aktivitäten aufwies. Auch gegenüber den 16:1-Versuchen zeigten die 1:1-Versuchen bei allen Patientenproben höhere TSA(50%)-Werte (Abbildung 76).

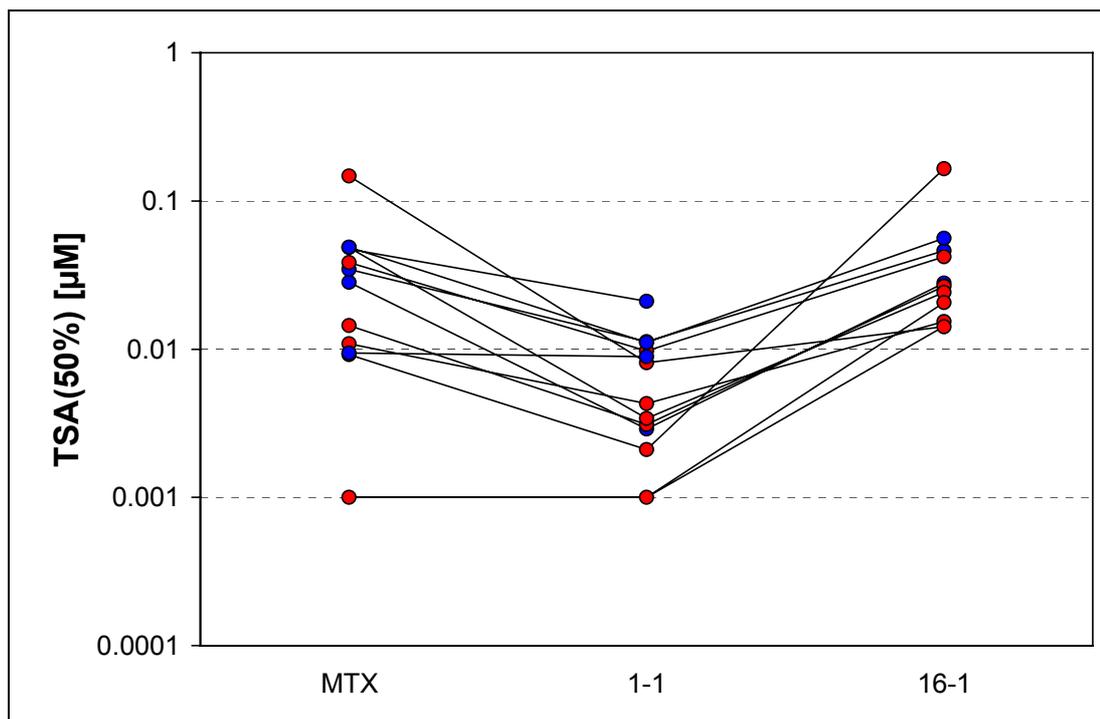


Abbildung 76: TSA(50%)-Werte der *long exposure* Versuche: MTX und 1:1 sowie 16:1 und 1:1 unterscheiden sich auf dem 5 % Niveau signifikant. AML-Patientenproben (●) unterscheiden sich jedoch nicht von den ALL-Proben (●)

Durch einen Friedman-Test konnte gezeigt werden, dass sich die TSA(50%)-Werte innerhalb dieser drei Versuchsreihen signifikant unterschieden. Die folgenden multiplen Vergleiche nach Dunn's Methode zeigten einen signifikanten Unterschied auf dem 5 % Signifikanzniveau zwischen der 1:1-Versuchsreihe und MTX, bzw. 1:1 und 16:1, nicht jedoch zwischen der 16:1 Reihe und MTX. Dabei ist zu beachten, dass die Patienten #16 und #7 nicht in die Auswertung mit eingingen, da für sie keine 16:1-Versuchsergebnisse vorlagen. Die Ergebnisse sind im Anhang auf S. 153 angegeben.

7.3.4 Weitere Ergebnisse des Thymidylat-Synthase Inhibition Assays

7.3.4.1 Patientenprobe #6: Abschätzung der Reproduzierbarkeit

Da es sich bei dem TSIA um einen *ex-vivo* Toxizitätsassay handelt, werden hierbei Zellen von Leukämiekranken verwendet, die aus Knochenmarkspunktionen gewonnen wurden. Bei einem Patienten konnte eine ausreichende Anzahl Blasten gewonnen werden, um die Reproduzierbarkeit des Assays zu überprüfen. Bei diesem etwa

1,7 Jahre alten Patienten handelt es sich um eine AML-M5 Erkrankung. Die Anzahl der Blasten an der Gesamtzellzahl im Ausstrich betrug dabei 84 % (s. S. 100). Für diesen Patienten wurden sowohl die *long exposure* als auch die *short exposure* Versuche mit verschiedenen MTX bzw. 7-OH MTX Lösungen wiederholt.

Die Zellzahlen betragen zu Beginn der Versuchsreihe 1,6 bzw. $1,1 \cdot 10^6$ Blasten/ml. Am Ende der *short exposure* wurde die Zellzahl auf 1,1 bzw. $1,0 \cdot 10^6$ Blasten/ml bestimmt. Dies entspricht in der Größenordnung dem Zielwert von $1 \cdot 10^6$ Blasten/ml.

Es zeigte sich für keinen der beiden 7-OH MTX *short exposure* Versuche eine konzentrationsabhängige Änderung der TS-Aktivität. Die Werte schwankten im gesamten Konzentrationsbereich um die 100 % TSA der entsprechenden Kontrollen (Abbildung 77).

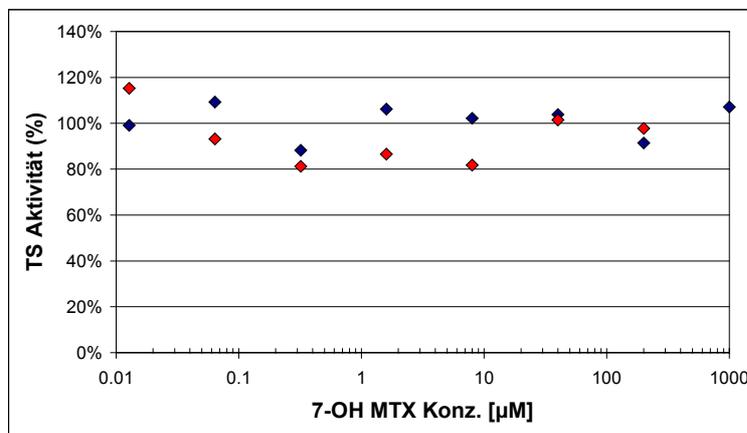


Abbildung 77: Reproduzierbarkeit der 7-OH MTX *short exposure* Versuche (◆: 1. Versuchsreihe; ◆: 2. Versuchsreihe).

Auch für die MTX *short exposure* Versuche ergab sich bei beiden Versuchsreihen ein ähnliches Bild (Abbildung 78). Neben dem konzentrationsabhängigen Aktivitätsabfall, die bei beiden Versuchsreihen deutlich sichtbar war, unterschieden sich die berechneten TSA(50%)-Werte mit $3,47 \mu\text{M}$ und $2,89 \mu\text{M}$ nur unwesentlich, wenn man sie mit dem Bereich in dem die TSA(50%)-Werte insgesamt lagen, vergleicht. Dieser erstreckte sich von $0,055 \mu\text{M}$ bis $16 \mu\text{M}$ (Maximum der eingesetzten Konzentration), also etwa um den Faktor 300 bzw. mehr als zwei Zehnerpotenzen (s. S. 151).

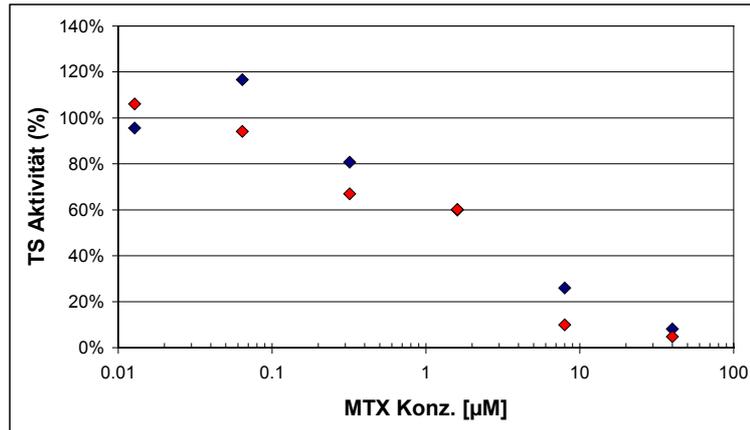


Abbildung 78: Reproduzierbarkeit der MTX *short exposure* Versuche (◆: 1. Versuchsreihe; ◆: 2. Versuchsreihe).

Für die *short exposure* 1:1-Versuchsreihen gilt, dass sich beide Kurven sehr gut entsprachen (Abbildung 80). Der maximale Abstand der Versuchsreihen betrug 20 % und ist im Vergleich zur Schwankungen, die schon bei den Doppelbestimmungen innerhalb einer Probe auftraten, als akzeptabel zu betrachten. Bei beiden Versuchsreihen konnte eine konzentrationsabhängige TS-Aktivitätsänderung gesehen werden. Die TSA(50%) zeigte hierbei mit 0,25 µM und 0,22 µM praktisch sogar den gleichen Wert an.

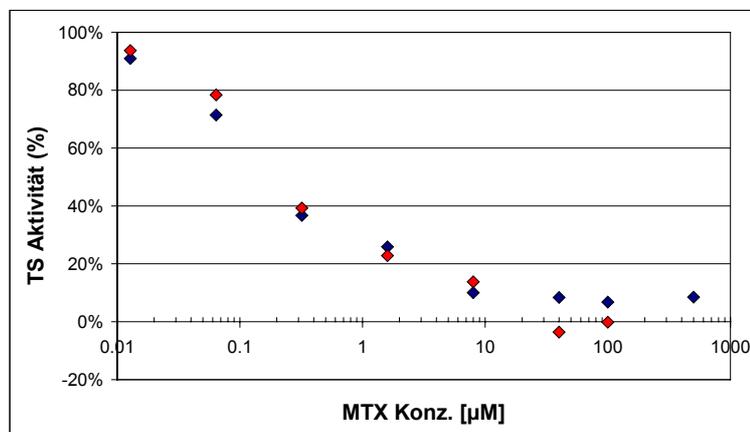


Abbildung 80: Reproduzierbarkeit der 1:1 *short exposure* Versuche (◆: 1. Versuchsreihe; ◆: 2. Versuchsreihe).

Zum Ende der *long exposure* Versuche wurde eine Zellzahl von $6,6 \cdot 10^5$ Blasten/ml bzw. $9 \cdot 10^5$ Blasten/ml bestimmt. Bei diesen Versuchen zeigte sich für 7-OH MTX bei keinem der beiden Versuchsreihen eine Abhängigkeit der TSA von der eingesetzten Konzentration (Abbildung 81). Allerdings war hierbei auffällig, dass die Werte der 1. Versuchsreihe zu Beginn deutlich unterhalb der 100 % TSA und unterhalb

der 2. Versuchsreihe lagen, die zwei höchsten Konzentrationen mit etwa 120 % an TSA jedoch deutlich über den Kontrollen und der 2. Versuchsreihe. Die 2. Versuchsreihe zeigte alle Werte zwischen 78 % und 100 % verglichen mit den Kontrollen.

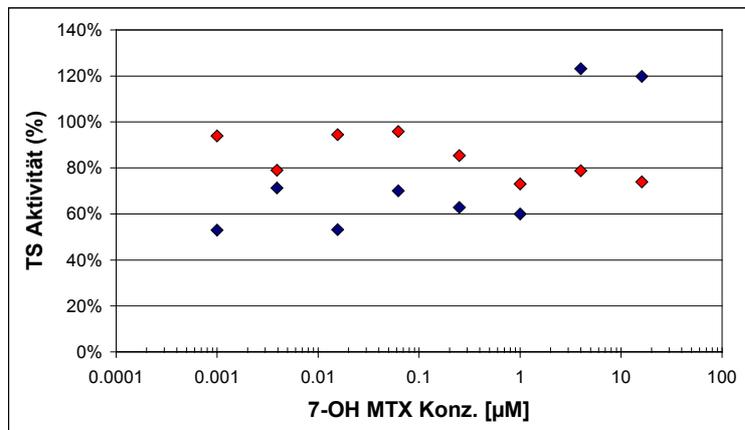


Abbildung 81: Reproduzierbarkeit der 7-OH MTX *long exposure* Versuche (◆: 1. Versuchsreihe; ◆: 2. Versuchsreihe).

Für die MTX *long exposure* Werte zeigte sich bei beiden Versuchsreihen eine konzentrationsabhängige Änderung der TSA (Abbildung 82). Die TSA(50%)-Werte unterschieden sich mit 0,048 µM und 0,0091 µM immerhin um den Faktor fünf und zeigten somit die größte Differenz dieser gesamten Doppelbestimmung. Auch hier bleibt anzumerken, dass dieser Unterschied im Hinblick auf den großen Bereich von 0,001 µM bis 0,147 µM in dem die TSA(50%) bei allen Versuchen insgesamt lagen (s. S. 151) noch akzeptabel ist. Allerdings deutet es auch auf Probleme hin, die bei der Interpretation dieser Versuche zu beachten sind und zeigt die Problematik vieler biologischer Untersuchungen mit Patientenproben, die von vielen Faktoren, z.B. der Zellzahl, abhängig sind.

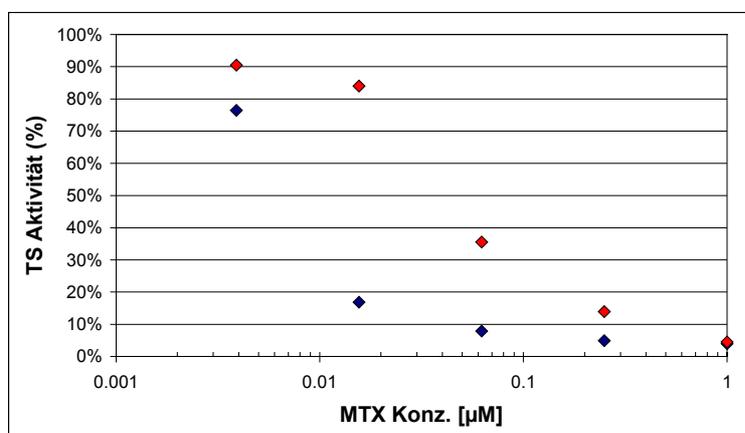


Abbildung 82: Reproduzierbarkeit der MTX *long exposure* Versuche (◆: 1. Versuchsreihe; ◆: 2. Versuchsreihe).

Beide 1:1-Versuchsreihen zeigten wieder eine gute Übereinstimmung (Abbildung 84). Die TSA nahm mit Zunahme der eingesetzten Substanzmenge ab und resultierte in einem TSA(50%)-Wert von 0,0085 μM bzw. 0,0034 μM . Diese unterscheiden sich um etwa den Faktor 2,5.

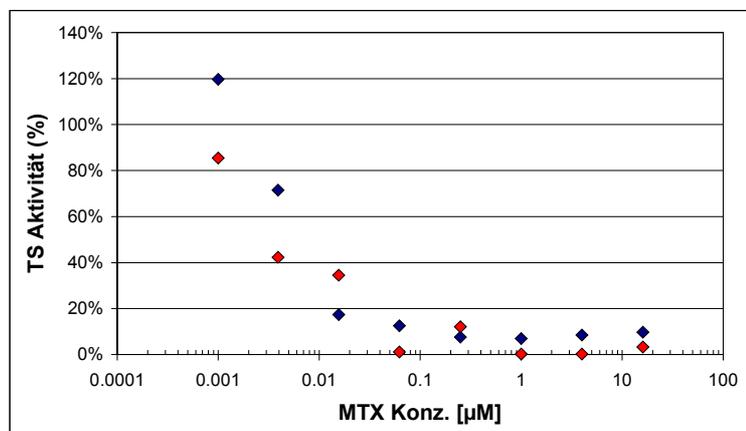


Abbildung 84: Reproduzierbarkeit der 1:1 *long exposure* Versuche (\blacklozenge : 1. Versuchsreihe; \blacklozenge : 2. Versuchsreihe).

Insgesamt zeigten diese Versuchsreihe eine deutlich bessere Übereinstimmung bei den *short exposure* Versuchen als bei den *long exposure* Versuchen. Dies ist insoweit verwunderlich, da man erwarten könnte, dass die *short exposure* Versuche, die drei Waschschriffe beinhalteten, deutlich größere Schwankungen zeigen würden als die *long exposure* Versuche, die nach der Inkubation nur noch am Ende aufgearbeitet wurden.

7.3.4.2 **Patientenprobe #15, #14 : AML Primärerkrankung und Rezidiv**

In der Versuchsreihe befand sich auch ein Junge, von dem sowohl Blasten seiner primären AML-M4 (#15) als auch seines AML-M4 Rezidives (#14) zur Untersuchung zur Verfügung standen (s. S. 101). Wichtig ist dabei zu beachten, dass das normale AML-Therapieschema keine MTX-Gaben vorsieht, da die bisher angewandten Therapieversuche keine oder nur geringe Wirkung zeigten [15] und MTX hauptsächlich aufgrund fehlender Polyglutaminierung als nicht wirksam gegen AML angesehen wird [18, 110, 149, 186].

Diese Versuchsreihen in Abbildung 85 (Primärerkrankung) und Abbildung 86 (Rezidiv) zeigten ebenfalls keine konzentrationsabhängige TS-Hemmung für 7-OH MTX, somit wurde auch keine TSA(50%) berechnet. Die TSA(50%) von MTX bei der

short exposure betrug für die Primärerkrankung 0,114 μM gegenüber 0,233 μM für das Rezidiv. Auch die *long exposure* stimmte mit 0,0147 μM und 0,0092 μM im Rahmen der Möglichkeiten dieses Assays überein (s. S. 125).

Weiterhin unterschieden sich beide Versuche bei den 1:1-Versuchen beim *short exposure* etwa um Faktor drei (0,0128 μM gegenüber 0,038 μM) bzw. Faktor vier beim *long exposure* (0,0081 μM gegenüber 0,0021 μM). Dies erscheint im Rahmen der Genauigkeit dieser Methode zu gering, um weitere Interpretationen zuzulassen.

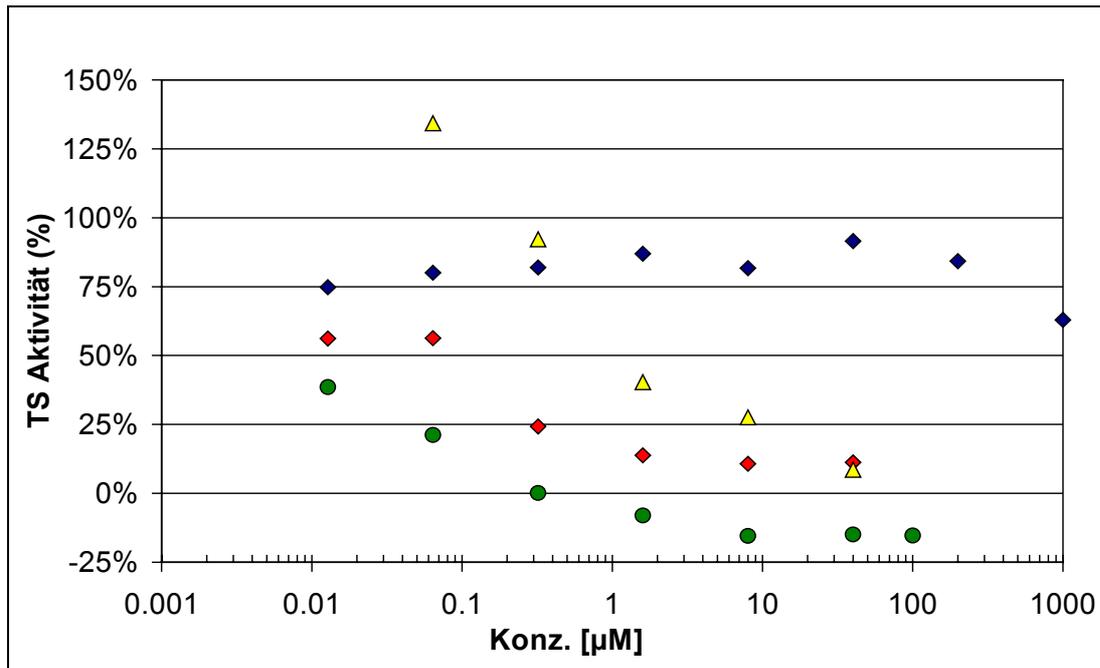


Abbildung 85: *Short exposure* eines AML-M4 Patienten. 7-OH MTX (♦) zeigt bei allen verwendeten Konzentrationen 100 % TS-Aktivität. Alle übrigen Versuchsreihen zeigen eine Abnahme der TS-Aktivität mit steigenden Konzentrationen. Dabei liegt die 1:1 (●) unterhalb der MTX-Kurve (◆) und des 5:1 (▲) Gemisches.

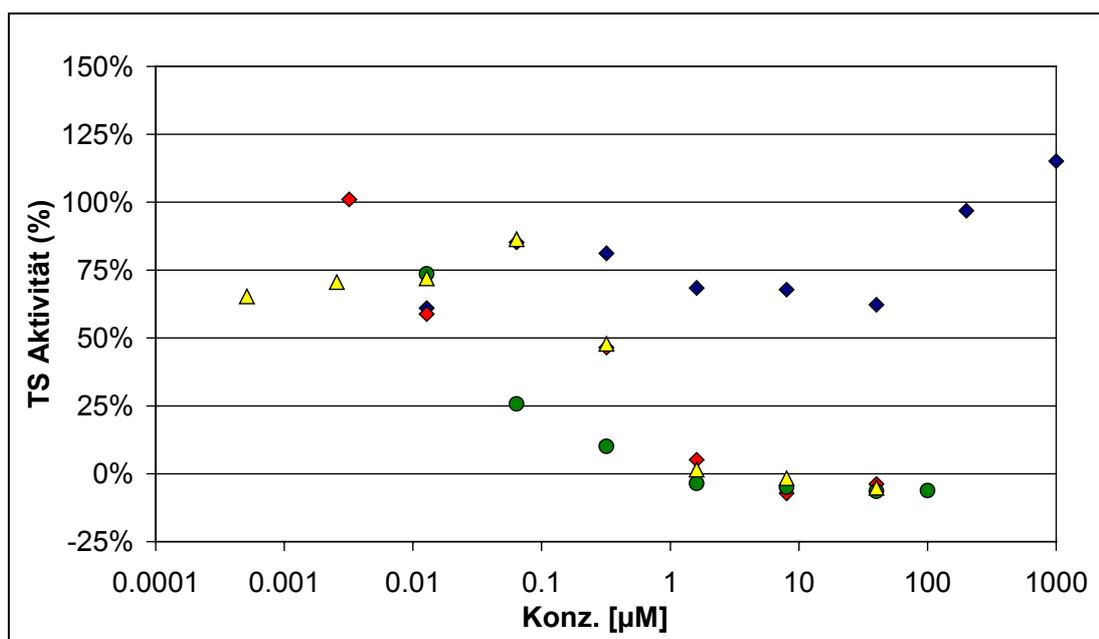


Abbildung 86: *Short exposure* des AML-M4 Rezidives. Hierbei zeigt 7-OH MTX (◆) ebenfalls bei allen verwendeten Konzentrationen 100 % TS-Aktivität. Die übrigen Versuchsreihen zeigen eine konzentrationsabhängige Wirkung auf die TS (●: 1:1; ◆: MTX; ▲: 5:1).

Bei 7-OH MTX im Überschuss (7-OH MTX:MTX=5:1) unterschieden sich die beiden *short exposure* Durchführungen um den Faktor 4. Der *long exposure* Teil dieser Versuchsreihe zeigte allerdings mit 0,16 µM für die Primärerkrankung und 0,014 µM für das Rezidiv, der immerhin eine Zehnerpotenz überschritt. Dabei schien das Rezidiv weniger empfindlich gegenüber der Zugabe von 7-OH MTX zu sein. Einschränkung ist dabei zu sagen, dass die Versuchsreihe der Primärerkrankung hierbei TS-Aktivitäten von -30 % bis +150 % gezeigt hat und somit diese Ergebnisse als fragwürdig anzusehen sind.

Tabelle 19: Gegenüberstellung der TSA(50%)-Werte der AML-M4 mit Rezidiv. Bei #15, 1:1 ist die minimale eingesetzte Konzentration angegeben, da selbst bei dieser Konzentration keine TSA(50%) erreicht wurde.

TSA(50%) von:	#15 (prim.)	#14 (rez.)
MTX (<i>short exposure</i>)	0,114 µM	0,233 µM
MTX (<i>long exposure</i>)	0,0147 µM	0,0092 µM
1:1 (<i>short exposure</i>)	~0,0128 µM	0,038 µM
1:1 (<i>long exposure</i>)	0,0081 µM	0,0021 µM
5:1 (<i>short exposure</i>)	1,36 µM	0,31 µM
16:1 (<i>long exposure</i>)	0,1648 µM	0,0142 µM

7.3.4.3 Vergleich mit Literaturwerten

Der Median der fünf gemessenen ALL *short exposure* TSA(50%)-Werte liegt wie in Tabelle 16 (S. 115) gezeigt bei 0,93 μM . Dieser Wert kann man auf zwei T-ALL mit Median 3,2 μM (#1: 0,055 μM und #16: 6,37 μM) und drei c/pre B-ALL mit Median 0,86 μM unterteilen. *Rots et al.* beschreiben hierfür Werte von 1,66 μM für die dort gemessenen 29 T-ALL-Proben und 0,49 μM für die 51 c/pre B-ALL-Proben [148]. Die hier gezeigten TSA(50%)-Werte korrelieren gut mit der Literatur und geben einen weiteren Hinweis über die Güte und Reproduzierbarkeit der Versuchsreihen (Tabelle 21).

Unterteilt man die Mediane der gemessenen *long exposure* TSA(50%) Versuche in die ALL-Subtypen T-ALL (0,038 μM) und c/pre B-ALL (0,047 μM), ergibt sich für die Versuchsreihen hier ein maximaler Unterschied von etwa Faktor zwei gegenüber der Literatur. Dem Median der T-ALL Werte von 0,038 μM steht ein Literaturwert von 0,06 μM und dem c/pre B-ALL Wert von 0,047 μM ein Literaturwert von 0,10 μM gegenüber [148].

Für die AML-Werte unterscheiden *Rots et al.* in ihrer Arbeit [147] die AML-M5 (monozyten Leukämie) von den übrigen myeloischen Leukämien. Hierbei zeigt sich bei der AML-M5 für die *short exposure* eine TSA(50%)-Wert von 0,73 μM ($n = 15$), der etwa die Hälfte unserer gemessenen 1,5 μM ($n = 3$) beträgt. Die *long exposure* zeigt in oben genannter Veröffentlichung einen Wert von 0,04 μM ($n = 22$), der mit den hier bestimmten 0,038 μM übereinstimmt. Die übrigen AML-Werte (ohne Rezidive) wurden in der Literatur auf 2,1 μM (*short exposure*) bzw. 0,05 μM (*long exposure*) bestimmt. Die korrespondierenden Werte betragen in dieser Messreihe 0,48 μM (*short exposure*) bzw. 0,01 (*long exposure*) und damit jeweils etwa 1/5 der Literaturangaben. Anzumerken ist hierbei, dass derselbe Patient mit zwei Proben #14 und #15 (Primärerkrankung und Rezidiv) in diese Auswertung einging. Dieser Patient stellt die beiden kleinsten TSA(50%)-Werte dieser AML-Reihe.

Zieht man die weite interindividuelle Streubreite der TSA(50%)-Werte, die sich häufig über 2-3 Zehnerpotenzen erstreckt, mit in Betracht, kann man die TSA(50%)-Werte, die sich um den Faktor 4-5 unterscheiden, als gleich betrachten (vgl. Abbildung 74, S. 116 und Abbildung 76, S. 119, jeweils MTX Teile bzw. Lit. [148]).

Tabelle 19: Vergleich der gemessenen *short exposure* Werte mit der Literatur. Die hier vorgestellten AML-Ergebnisse beinhalten im Gegensatz zur Literatur zwei AML-Rezidive. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl an untersuchten Proben an.

Diagnose	gemessen (n)	Literatur (n)	Bereich
c/pre B-ALL	0,86 µM (3)	0,49 µM (51)	0,16-15 µM
T-ALL	3,21 µM (2)	1,66 µM (29)	0,16->40 µM
AML-M5	1,53 µM (3)	0,73 µM (15)	0,2-25 µM
übrige AML	0,48 µM (6)	2,16 µM (22)	0,2->40 µM

Tabelle 21: Vergleich der gemessenen *long exposure* Werte mit der Literatur. Die hier vorgestellten AML Ergebnisse beinhalten im Gegensatz zur Literatur zwei AML-Rezidive. In Klammer ist die Anzahl der untersuchten Proben angegeben.

Diagnose	gemessen (n)	Literatur (n)	Bereich
c/pre B-ALL	0,05 µM (3)	0,10 µM (51)	0,006-1 µM
T-ALL	0,04 µM (2)	0,06 µM (29)	<0,007-0,2 µM
AML-M5	0,04 µM (3)	0,04 µM (15)	0,015-0,15
übrige AML	0,01 µM (6)	0,05 µM (22)	0,01-1 µM

7.4 Diskussion

7.4.1 7-OH Methotrexat

Bereits 1969 konnte von *Johns et al.* in zellfreiem Medium gezeigt werden, dass 7-OH MTX nur sehr schwach an die Dihydrofolatreduktase (DHFR) bindet [64, 96]. 1976 erkannte man, dass dieser Metabolit auch im Menschen eine Rolle spielt [91]. Weiterführende Untersuchungen von *Fabre et al.* 1984 kamen zu dem Ergebnis [87], dass 7-OH MTX in Dosen bis 50 μM selbst keine Wirkung auf Ehrlich-Aszites-Tumorzellen *in-vitro* besitzt. Dabei konnte allerdings gezeigt werden, dass eine Aufnahme in die Zellen vonstattent geht [64, 106]. Diese unterscheidet sich mit einer K_M für MTX von 5 μM und für 7-OH MTX von 9 μM kaum.

Intrazellulär wird 7-OH MTX sowohl in Ehrlich-Aszites-Tumorzellen [62] als auch in MOLT-4-Zelllinien [65] polyglutaminieren. Polyglutaminierung des 7-OH MTX und Aufnahme in die Zelle sind Charakteristika, die auch die Muttersubstanz MTX zeigt und Hinweise auf Wechselwirkungen gibt. Hier zeigten *Fabre et al.* auch, dass beide Substanzen durch eine kompetitive Inhibition sich gegenseitig bei der Aufnahme in die Zelle hemmen, die aber nach einer Inkubationszeit von mehr als 40 Minuten bei Konzentrationen von 10 μM 7-OH MTX und 1 μM MTX nicht in einer niedrigeren Bindung des MTX an die DHFR mündet, jedoch den Einbau von dUrd in die DNA vermindert.

Im Widerspruch zu diesen Ergebnissen zeigten *Fabre et al.* 1985 allerdings, dass in der chronisch myeloischen Zelllinie K-562 eine Hemmung des Zellwachstums dieser Zelllinie erfolgt, die mit 7-OH MTX bei einer zweistündigen Exposition etwa eine Zehnerpotenz niedriger liegt als mit MTX und daraus die Schlussfolgerung der Zytotoxizität für 7-OH MTX zog.

Im Jahr 2000 zeigten *Fuskevag et al.*, dass Ratten durch Gabe hoher 7-OH MTX Dosen verenden. Die zugehörigen gemessenen Plasmakonzentrationen lagen dabei beim 7-OH MTX mit 1 mM niedriger als die MTX-Konzentration von 22 mM, die für die Ratten letal war [73].

Unsere Versuchsreihe zeigt zum ersten Mal *ex-vivo* Versuche, welche die Wirkung von 7-OH MTX direkt auf Patientenblasten untersucht. Dabei zeigen die *short exposure* Versuche statistisch signifikant, dass 7-OH MTX keine Wirkung im Bereich von 1 mM bis 0,0125 μM zeigt (s. S. 108). Auch für die *long exposure* Versuchsreihe

konnte kein konzentrationsabhängiger Effekt gesehen werden. Dies wurde durch den Vergleich der TS-Aktivitäten bei den unterschiedlichen Konzentrationen, den Vergleich der TS-Aktivitätsdifferenz innerhalb einer Probe und der deskriptiven Statistik gezeigt werden.

Dabei fand man keinen Unterschied zwischen dem *long* und *short exposure*. Dies legt daher nahe, dass die Polyglutaminierung dabei keine entscheidende Rolle spielt. Es scheint kein direkter Effekt des 7-OH MTX auf die TS vorzuliegen. Diesen Ergebnissen zufolge hat 7-OH MTX selbst keinen zellulären Effekt auf das Wachstum von AML oder ALL Blasten *ex-vivo*.

Vergleicht man weiterhin die TSA(50%)-Werte, die bei dieser Versuchsdurchführung für MTX bestimmt wurden, mit den eingesetzten 7-OH MTX-Konzentrationen und setzt sie mit den vorherrschenden *in-vivo* Plasmakonzentrationen ins Verhältnis, kann man zu dem Schluss kommen, dass 7-OH MTX in dem momentanen Therapieschema von 5 g/m² MTX über 24 h für die pharmakodynamische Wirkung selbst keine Rolle spielt.

7.4.2 Wechselwirkung zwischen 7-OH Methotrexat und Methotrexat

Von klinischem Interesse sind die Kombinationsversuche der Antifolate, da 7-OH MTX alleine in der Therapie nicht eingesetzt wird und die beiden Substanzen nur gemeinsam auftreten. Quantitativ liegen die TSA(50%)-Werte der 1:1 Kombination signifikant niedriger als die entsprechenden MTX TSA(50%)-Werte. Da 7-OH MTX in diesen Konzentrationen keine Wirkung auf die TS zeigte, kann man hierbei von einem Sonderfall von Synergismus der beiden Substanzen sprechen. Der Effekt ist stärker als die Summe der Einzeleffekte, wobei jedoch eine Substanz (7-OH MTX) selbst keinen Effekt zeigt. Eine weitere Erhöhung der 7-OH MTX führte zu einer Abschwächung dieses Synergismus, der bei den 5-1 bzw. 16-1 (also etwa eine Zehnerpotenz) Versuchen sich der TSA(50%) von MTX alleine annähert bzw. leicht schwächer (nicht signifikant) ist.

Es wäre möglich, dass eine weitere Erhöhung der 7-OH MTX-Konzentration gegenüber der MTX-Konzentration zu einer weiteren Abschwächung und somit zu einem 7-OH MTX-„Rescue“ führen könnte.

7.4.3 Hypothese eines Wirkmechanismus

Durch equimolare Konzentrationen von 7-OH MTX und MTX verstärkt sich bei diesem Versuchsaufbau die Hemmung der TS gegenüber MTX selbst. Diese Wirkungsverstärkung könnte durch einen Synergismus erklärt werden, in dem die schwach TS inhibierenden 7-OH MTX-Polyglutamate die wesentlich stärker wirkenden MTX-Polyglutamate schwach, aber bemerkbar unterstützten. Ein Überschuss an 7-OH MTX schwächt diese Wirkung wieder ab. Dies ist auf der Ebene der Polyglutaminierung vorstellbar, da nun sehr viel mehr kaum TS hemmende 7-OH MTX-Polyglutamate gebildet werden und somit die Bildung der stärker wirkenden MTX-Polyglutamate vermindert wird. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass 7-OH MTX über die Hemmung der De-Novo-Purin-Synthese [66], die durch den TSIA kaum erkannt wird, die MTX Wirkung unterstützt. Eine Hemmung, die ausschließlich auf der Aufnahme oder Ausscheidung in bzw. aus der Zelle beruht, ist eher unwahrscheinlich, da für den *short* und *long exposure* gleiche Ergebnisse erzielt wurden, obwohl die Literatur dort Wechselwirkungen beschreibt [106].

7.4.4 Klinische Relevanz der Versuchsergebnisse

Durch diese Versuche konnte *ex-vivo* gezeigt werden, dass weder in einem equimolaren Verhältnis von MTX zu 7-OH MTX noch bei einem etwa 10fachen Überschuss von 7-OH MTX eine geringere Wirkung des Antifolatgemisches auf die TS auftritt als durch MTX allein. Dies gilt sowohl für AML- als auch für ALL-Patientenblasten.

Von Beginn bis Ende der Infusion von 5 g/m^2 – der heute üblicherweise verwendeten Dosierung - überwiegt die Konzentration von MTX im Plasma deutlich. Nach Infusionsende zur Stunde 24 bis zur Stunde 36 h nach Infusionsbeginn überwiegt der Metabolit um etwa den Faktor 10 [32, 183]. Ab diesem Zeitpunkt (36 h) wird den Patienten das lebensnotwendige Leukovorin [7] verabreicht und damit die Wirkung der Antifolate durch diesen Rescue aufgehoben. Eine Wechselwirkung zwischen MTX und 7-OH MTX spielt somit ab diesem Moment auf zellulärer Ebene sehr wahrscheinlich keine entscheidende Rolle mehr.

Eine von uns beobachtete konzentrationsabhängige Wirkungsverstärkung durch den Metaboliten kann aufgrund der 1:1-Versuchsreihen postuliert werden. Allerdings ist der Effekt in der Therapie nicht quantifizierbar, da weder konstante Konzentrationen der beiden Substanzen vorliegen noch der Effekt unseres Erachtens nach groß genug im Verhältnis zur eigenen Wirkung des HD-MTX ist. Interessanterweise wird

klinisch von *Rask et al.* in 13 Kindern mit 28 Infusionen beobachtet, dass ein geringes 7-OH MTX zu MTX Verhältnis zur Stunde 66 mit einem erhöhten Risiko einer oralen Mukositis einhergeht [136]. Erhöht man bei der vorgestellten Versuchsreihe das Antifolatverhältnis zugunsten des 7-OH MTX minimiert über das 1:1 Verhältnis hinaus, minimiert sich dieser synergistische Effekt, bis er bei einem Verhältnis von etwa 10:1 nur noch etwa dem Effekt von MTX entspricht. Dies ist auch wie oben beschrieben etwa das Konzentrationsverhältnis zum Zeitpunkt der Rescuegabe.

Daher wird postuliert, dass bei „normaler“ Metabolitenbildung die MTX Wirkung nicht negativ moduliert wird. Eine unerwartet hohe Konzentration des Metaboliten könnte allerdings zu einer Wirkungsverminderung führen. Dies würde auch mit einer Beobachtung von *Redeztki et al.* übereinstimmen, der bereits 1966 die Unempfindlichkeit von Kaninchen, die MTX in hohem Maße zu 7-OH MTX verstoffwechseln, gegenüber MTX belegen konnte. [137].

8 Zusammenfassung

Die hier vorgelegte Arbeit entstand in enger Zusammenarbeit zwischen dem Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie und der Abteilung für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie des Universitätsklinikums Münster. Die Ergebnisse dieser Arbeit reichen dabei von klinischen Anwendungsbeobachtungen bis zu analytischen Ergebnissen und *ex-vivo* Zellversuchen. Damit wird der gesamte für die klinische Pharmazie relevante Arbeitsbereich abgedeckt und, wo immer möglich, ein direkter Bezug zur klinischen Versorgung geschaffen.

Analytisch konnte eine kapillarelektrophoretische Methode validiert werden, die neben den beiden Epimeren R- und S-Leukovorin (LV) gleichzeitig die beiden Enantiomere (6-R,S)-5-Formyltetrahydropterinsäure trennt und quantifiziert (Abbildung 89). Diese Methode wurde verwendet, um den Einsatz des Notfallmedikamentes Carboxypeptidase G₂ (CPG₂) in der Hochdosis-Chemotherapie mit Methotrexat (MTX) zu hinterfragen.

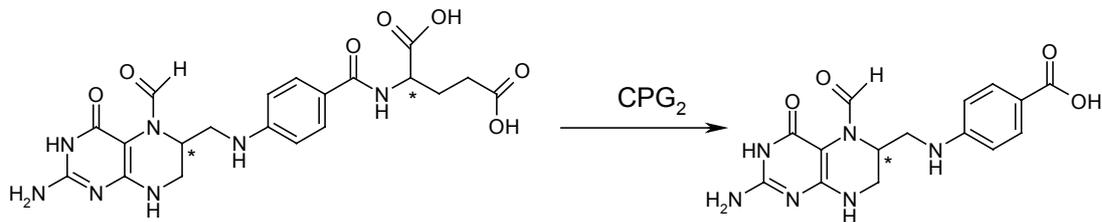


Abbildung 81: Abbau von R- und S-Leukovorin (LV) durch die Carboxypeptidase G₂ zu (6-R,S)-5-Formyltetrahydropterinsäure.

Durch diese stereoselektive Analysenmethode wurde gezeigt, dass die CPG₂ neben dem MTX auch hauptsächlich S-LV spaltet und somit den lebensnotwendigen Rescue abbaut. Dies hat zur Folge, dass der Einsatz von CPG₂ in jedem Einzelfall kritisch diskutiert und abgewogen werden muss und der Einsatz nur in seltenen Fällen sinnvoll ist.

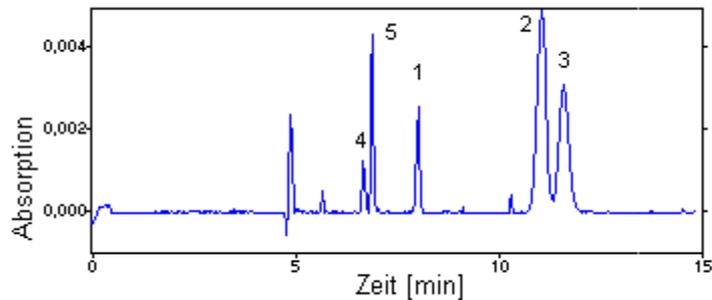


Abbildung 89: Kapillarelektrophoretische Trennung der Enantiomere 6S- und 6R- Formyltetrahydropterinsäure (5,4), der Epimere 6S- und 6R- Leukovorin (3,2), sowie Aminopterin (1) als Internem Standard. S-LV wird durch die CPG₂ dabei schneller abgebaut als R-LV.

Weiterhin wurden in dieser Arbeit kapillarelektrophoretische Methoden vorgestellt, welche die Trennung von MTX und kovalent an humanes Serumalbumin gebundenem MTX erlauben. Diese Verfahren können insbesondere für die Weiterentwicklung und Wirksamkeitsuntersuchungen dieses Arzneistoffes dienen.

Im Rahmen pharmakokinetischer Untersuchungen wurden die Plasmakonzentrationen der in Münster behandelten, an akuter lymphatischer Leukämie erkrankten Kinder gemessen und ausgewertet. Die deskriptive Statistik dieser Plasmakonzentrationen wird dabei als Kontrolle für den klinischen Alltag benötigt. Sie zeigte im Vergleich mit anderen Behandlungszentren bei der hier verwendeten Dosierung von 5 g/m² MTX signifikant erhöhte 44 h- und 48 h-Werte, die verstärkte Rescuedgaben von LV zur Folge hatten.

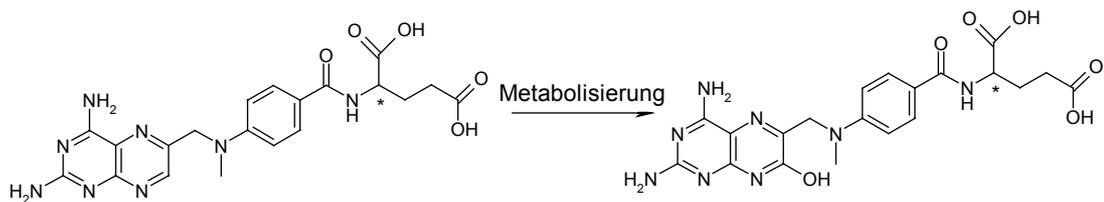


Abbildung 83: Methotrexat und der in der Leber gebildete Metabolit 7-Hydroxymethotrexat.

Zusätzlich wurden erstmals populationspharmakokinetische Auswertungen für dieses Dosierungsschema durchgeführt. Mit den dabei verwendeten Programmen Nonmem und Kinetica (Abbildung 84) konnten die intra- und interindividuelle Variabilität der populationspharmakokinetischen Parameter abgeschätzt werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass durch die Einführung bestimmter Kovariablen (hier Körperoberfläche) die Variabilität dieser Parameter sinkt und damit eine genauere

Vorhersage der Plasmakonzentrationszeitverläufe durch den Einsatz dieser Kovariablen möglich wird.

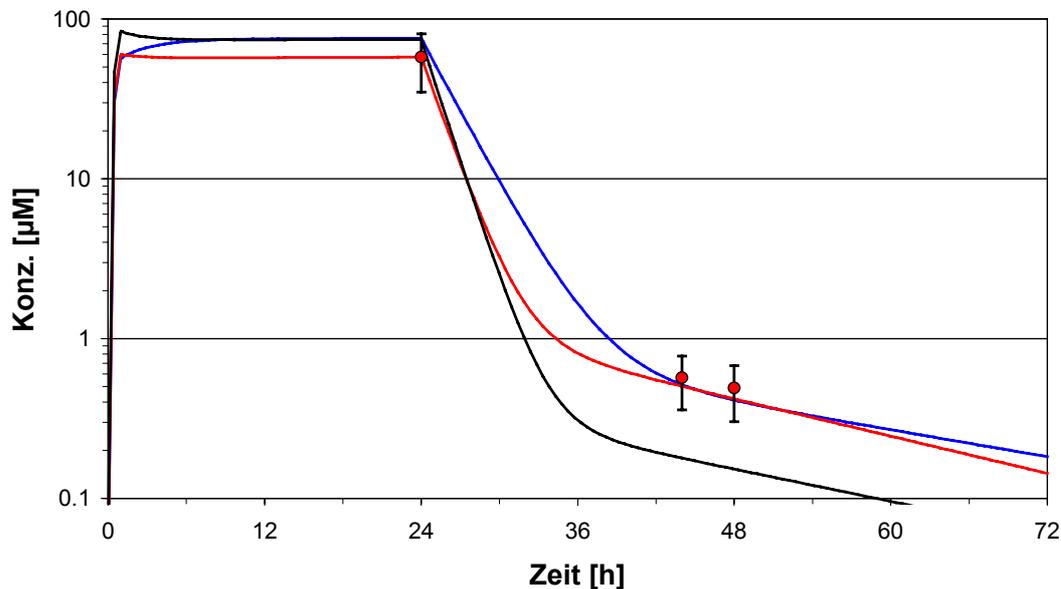


Abbildung 84: Vergleich eines Nonmem-Modells (—), eines Kinetica-Modells 1 (—) und der Mittelwerte der Rohdaten bei t_{24} , t_{44} , t_{48} . Beide Modelle sind als 2-Kompartiment Modell ohne Kovariablen dargestellt. Weiterhin ist der Plasmakonzentrationszeitverlauf auf Basis der PK-Parameter von *Odoul et al.* dargestellt (—), die für 5 g/m^2 simuliert wurde.

Weiterhin untersuchte man auch den Effekt des Metaboliten 7-Hydroxymethotrexat (7-OH MTX) auf die Pharmakokinetik der Muttersubstanz. Ein Einfluss des 7-OH MTX auf die PK-Parameter konnte dabei jedoch nicht gefunden werden. Dies lässt vermuten, dass eine routinemäßige Bestimmung des Metaboliten nicht sinnvoll ist (Abbildung 85).

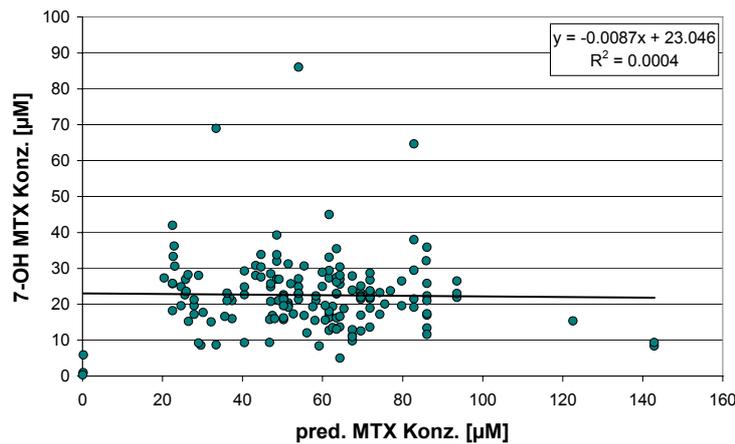


Abbildung 85: Die gemessenen 7-OH MTX Plasmakonzentrationen beeinflussen die durch das Modell vorhergesagten MTX Konzentrationen nicht.

Ein Vergleich der hier gewonnenen PK-Parametern mit der Literatur zeigte, dass die durch die Populationspharmakokinetik gewonnenen Parameter in der Größenordnung denen durch klassische Analyse gewonnenen entsprechen. Verglichen mit einer populationspharmakokinetischen Analysenmethode für das Dosierungsschema von 8 g/m^2 (Abbildung 84) zeigte sich eine verstärkte Aufnahme des MTX in das periphere Kompartiment. Möglicher klinischer Hintergrund könnten dabei die unterschiedlichen Hydrierungsmodalitäten der beiden Protokolle sein.

In einer weiteren Untersuchungsreihe wurde zudem erstmals der pharmakodynamische Effekt des 7-OH MTX auf Patientenblasten *ex-vivo* untersucht. Dabei wurde ein indirekter Toxizitätsassay - der Thymidylat-Synthase Inhibition Assay – angewandt. Dieser bestimmt die Syntheserate des für die DNA-Replikation unabhängigen Desoxythymidinmonophosphates (dTMP).

Es konnte bewiesen werden, dass das 7-OH MTX in klinisch beobachtbaren Konzentrationen selbst keinen Effekt auf die Thymidylat-Synthase (TS) der Blasten zeigt. Eine pharmakodynamische Wirkung des 7-OH MTX allein ist daher sowohl bei akuter lymphatischer Leukämie (ALL) als auch bei akuter myeloischer Leukämie (AML) auszuschließen.

In-vivo tritt jedoch der Metabolit immer gemeinsam mit MTX auf. Daher untersuchte man die TS-Hemmung mit verschiedenen Konzentrationsverhältnisse der beiden Substanzen. Dabei zeigte das 1:1-Gemisch eine signifikant stärkere Hemmung der TS als MTX allein oder Gemische mit einem Überschuss von 7-OH MTX (Abbildung 86). Dabei waren die Ergebnisse unabhängig von der Diagnose AML oder ALL.

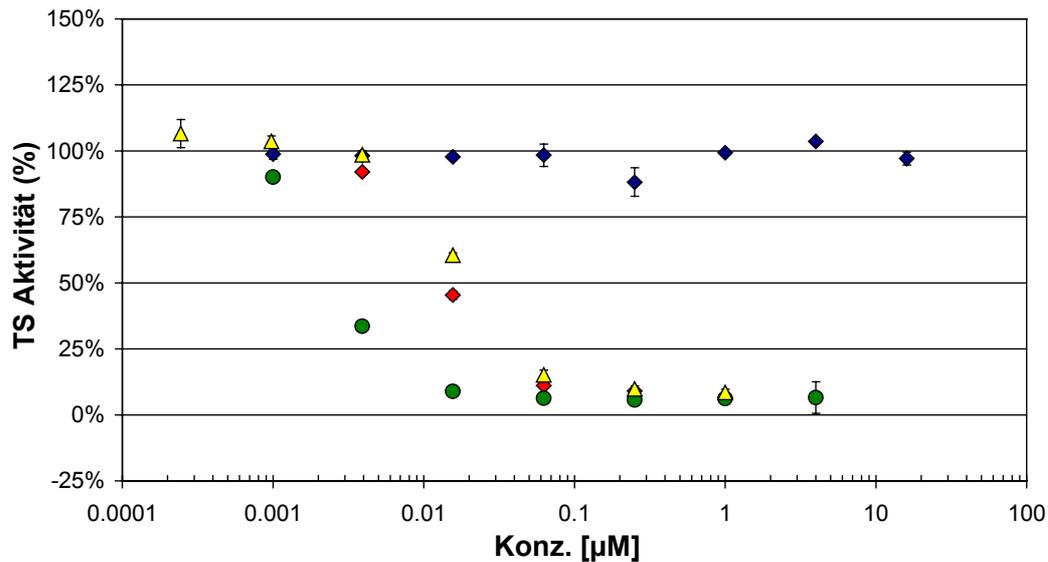


Abbildung 86: *Long exposure* Versuchsreihe eines Patienten. 7-OH MTX (\blacklozenge) zeigte keinen konzentrationsabhängigen Effekt auf die Thymidylat-Synthase. Alle Werte lagen um 100 % TS-Aktivität. MTX (\blacklozenge), 1:1 (\bullet) und 5:1 (\blacktriangle , im Diagramm angegebene Konzentration bezieht sich auf MTX) beschrieben jeweils eine konzentrationsabhängige Wirkung, wobei die 1:1-Versuchsreihe, die für die Hemmung der TS niedrigsten Konzentrationen an MTX benötigte.

Aufgrund des vielfältigen Eingriffs der Folsäurederivate in das Zellwachstum kann über einen Wirkungsmechanismus nur spekuliert werden. Allerdings werden mindestens zwei Angriffspunkte benötigt, um einerseits die Wirkungsverstärkung des 1:1-Gemisches wie auch die Abschwächung bei einem Überschuss an 7-OH MTX erklären zu können. Dabei scheint die Polyglutaminierung nicht die entscheidende Rolle zu spielen. Die beiden Versuchsmodifikationen *long* und *short exposure*, die einen Hinweis über die Polyglutaminierung geben, zeigten entsprechende Ergebnisse.

Klinisch scheint dabei ableitbar zu sein, dass bei durchschnittlicher Metabolisierung und normalen Plasmaskonzentrationszeitverläufe der beiden Substanzen zumindest keine Abschwächung der Antifolattherapie durch den Metaboliten stattfindet. Dies gilt allerdings nur für das Schema von 5 g/m^2 , das hierbei simuliert wurde.

9 Anhang

9.1 Abbau von R,S-Leukovorin durch Carboxypeptidase G₂

9.1.1.1 Tabelle 21: Klinische Daten der Osteosarkom Fallbeschreibung.

Stunde nach MTX Gabe	Kreatinin	Ereignis	CE MTX	Emit MTX	CE 7-OH	DAMPA	5-MTHF	Gewicht
[h]	[mg/dl]		[μ M]	[kg]				
-169,75	0,70							
0,00		12g/m² (17,5g/4h) MTX Gabe						46
4,00		Ende der Gabe		200				
22,25								46,1
24,00			287		138,0			
34,25								48,5
46,25				72				
46,25								49,1
49,75		1g LV						
49,83			54		64,4			
51,00				59				
52,75		1g LV						
54,00				49				
54,25			44		62,8			

Stunde nach MTX Gabe	Kreatinin	Ereignis	CE MTX	Emit MTX	CE 7-OH	DAMPA	5-MTHF
54,42		Carboxypeptidase G₂ 2000 U, langsam iv,					
54,58			0,20		36,4		
54,58			0,20		14	9,2	0,45
54,92			0,2		36		
54,92			0,2		8,8	9,6	0,57
55,25	2,00						
55,42			0,2		27		
55,42			0,2		9,4	7,2	0,6
56,25			0,2		21		
56,25				23,7			
56,25			0,2		5,8	4	0,45
58,25							48,4
60,25				12,1			
69,25				7,5			
70,25							47,9
70,83			0,2		2,9	5,7	1,6
72,80	2,00						
77,25			0,2		3,0	1,2	1,3
82,25							47,5
82,50			0,2		3,4	1,2	3,2
94,25							48,1
95,25				1,9			
106,25							47,8
142,25				1,3			
142,25	1,40						

Stunde nach MTX Ga- be	Kreatinin	Ereignis	CE MTX	Emit MTX	CE 7-OH	DAMPA	5-MTHF	Gewicht
166,25				0,7				
166,25	1,30							
190,25	1,20							
214,25				0,5				
214,25	1,10							
238,25				0,4				
238,25	1,30							
262,25	1,00							
622,25	1,10							

9.1.1.2 **Tabelle 23: Konzentrationen von R- und S-LV [μM] nach Abbau durch CPG₂.**

Zeit [min]	R-LV(1)	S-LV(1)	R-LV(2)	S-LV(2)	R-LV(3)	S-LV(3)
0,1	252	250	261	259	258	256
0,5					245	246
1	237	225	245	232	245	238
1,5					231	223
2	208	190	239	206	210	201
2,5					213	196
3	203	180			204	181
4			218	152		
8	192	146	228	129		
16	179	106	188	73		
	R-LV(4)	S-LV(4)	R-LV(5)	S-LV(5)	R-LV(6)	S-LV(6)
0,1	250	253	248	249	253	259
0,5						
1	217	208	234	222	235	221
1,5						
2	221	203	205	187	224	196
3			200	177	208	184
4	237	200				
8	192	138	189	143	200	152
16	196	102	177	104	182	85
30	178	61	180	73	165	58
60		21	139	39	130	34

9.2 Pharmakokinetische Untersuchungen zum Methotrexat bei einer Dosierung von 5 g/m²

9.2.1.1 *Tabelle 25: Demografische Daten der Patienten.*

ID	Alter [a]	Länge [m]	abs. Dosis [g]	Geschlecht	KOF [m ²]	Gewicht [kg]
1	4,5	1,18	4,1	m	0,82	20,3
2	2,5	0,93	3,2	m	0,64	15,8
3	1,6	0,8	2,5	m	0,5	11,5
4	16,8	1,76	8,8	w	1,76	60
5	3,3	0,99	3,5	w	0,7	18
6	2,3		2,5	w	0,5	
7	3,6		3,1	w	0,62	
8	3,9	1,02	3,3	w	0,66	15
9	4	0,95	3	w	0,6	13
10	6,2		4,4	m	0,88	
11	14,5	1,7	8,2	m	1,64	88
12	16,1	1,84	9,5	m	1,9	70,3
13	1,9	0,81	2,3	m	0,46	10
14	14,4	1,54	6,5	w	1,3	39,5
15	6,6		4,5	m	0,9	
16	15,9	1,85	9,7	w	1,94	73
17	5,5	1,09	3,5	m	0,7	17
18	1,8	0,83	2,5	m	0,5	12,7
21	16,7	1,72	7,8	m	1,56	51
22	12,1	1,58	7,3	m	1,46	48
23	10,3		5,8	w	1,16	
24	12	1,56	8,5	m	1,7	61,4
25	3,1		4	m	0,8	
26	8,1		5	w	1	
27	5,2		4,3	w	0,86	

ID	Alter [a]	Länge [m]	abs. Dosis [g]	Geschlecht	KOF [m ²]	Gewicht [kg]
28	5,7	1,17	4	w	0,8	20
29	2,4		3	m	0,6	
30		1,14	3,5	w	0,7	16
31	10,3	1,43	6	m	1,2	35,7
32	0,8	0,72	1,5	m	0,3	8,4
33	12,2	1,57	7,5	m	1,5	51,3
35	2,3	0,82	2,6	w	0,52	13,5
36	4,4	1,17	4,6	w	0,92	29
37	2,8	0,89	2,6	w	0,52	11,7
38	11,9		6,5	w	1,3	
40	1,5		2,5	w	0,5	
41	2,6	0,96	3,3	m	0,66	16
42	4,8	1,04	3,7	w	0,74	19
43	5,1	1,12	4	m	0,8	20,5
44	4,4	1,04	3,6	m	0,72	18
45	2,5		3	m	0,6	
47	4,5	1,15	4	w	0,8	21,8
48	0,9		1,7	w	0,34	
49	5,9	1,25	5,3	m	1,06	33
50	5,4		4	w	0,8	
51	7,1		4,6	w	0,92	
52	4,5		3,5	m	0,7	
53	3,9	1,01	3,4	m	0,68	17,5
55	3,2		3,1	m	0,62	
56	6,3		4,5	w	0,9	
57	3,4		3,5	w	0,7	
58	3,4	0,97	3,3	w	0,66	16
60	3,2	0,99	3,1	m	0,62	13,3
62	5,9		4,3	w	0,86	
63	3,8		3,2	w	0,64	
64		1,19	4,2	w	0,84	19,8
66	4,7	1,11	3,9	w	0,78	19,6
67	2,8	0,91	3,3	m	0,66	16,6
68	5,9	1,15	4,3	m	0,86	23,5

ID	Alter [a]	Länge [m]	abs. Dosis [g]	Geschlecht	KOF [m ²]	Gewicht [kg]
N	57	38	59	59	59	38
MW	6,0	1,18	4,35		0,87	28,02
Harm. MW	3,6	1,11	3,71		0,74	19,60
Geometr. MW	4,69	1,14	4,00		0,80	22,89
SD	4,38	0,32	1,93		0,39	20,23
Median	4,5	1,16	3,9		0,78	19,3
Min	0,8	0,72	1,5		0,3	8,4
Max	16,8	1,85	9,7		1,94	

9.2.1.2 **Tabelle 24: Deskriptive Statistik der Daten von Graf [81] bei einer 4 h Infusion von 12 g/m² MTX.**

Zeit	n	MW	SD	Max	Min	Median	25 %	75 %
4h	1748	1340,2	774,7	14226,0	0,4	1238,0	985,0	1555,0
24h	36	7,8	7,2	36,5	0,9	5,6	3,3	9,5
40h	102	2,3	3,0	16,8	0,1	1,0	0,5	3,0
44h	155	0,9	1,9	19,8	0,1	0,5	0,3	0,6
48h	37	0,6	1,0	6,5	0,1	0,4	0,3	0,5
72h	19	0,3	0,1	0,8	0,1	0,3	0,2	0,3

Konzentrationen in μM

9.2.1.3 *Tabelle 28: Fortran Routine, die für die Bestimmung der PK-Parameter des Strukturmodelles in Nonmem verwendet wurde.*

```
$PROBLEM MTX5g2komptrans1
$INPUT  ID TIME DV AMT RATE EVID AGE L M DABS GEND DPRO META GABE ASS
KOF
$DATA  c:\nmv\5gm2\oh65oloq.csv IGNORE=#
$SUBROUTINES ADVAN3 TRANS1
$PK
TVV    =THETA(1)
TVK    =THETA(2)
TVK12  =THETA(3)
TVK21  =THETA(4)
V      =TVV*(1+ETA(1))
K      =TVK*(1+ETA(2))
K12    =TVK12*(1+ETA(3))
K21    =TVK21*(1+ETA(4))
F1     =1
S1     =V
$ERROR
IPRED  =F
Y      =F+(F*EPS(1))+EPS(2)
;----- INITIAL ESTIMATES -----
$THETA (0.0001,10);    V
$THETA (0.0001,0.5);  k
$THETA (0.0001,0.01); k12
$THETA (0.0001,0.1);  k21
$OMEGA 1 1 1 1
$SIGMA 1 0.01

$EST METHOD=0 POSTHOC MAXEVALS=9900 PRINT=5 MSFO=msfb11
$TAB ID TIME V K K12 K21 ONEHEADER NOPRINT FILE=mut.txt
$TAB ID TIME META ONEHEADER NOPRINT FILE=pat.txt
$TAB ID TIME AGE L M DABS GEND DPRO GABE ASS KOF ONEHEADER NOPRINT
FILE=cov.txt
```

9.3 Pharmakodynamische Untersuchungen zum Metaboliten 7-OH Methotrexat, gemessen mit dem Thymidylat-Synthase Inhibition Assay ex-vivo

9.3.1.1 *Patientenproben mit nicht ausreichender Anzahl lebender Zellen:*

1x AML-M1; 1x AML-M5; 1x ALL; 2x T-ALL

9.3.1.2 *Patientenproben bei denen die Kontrollen die gleiche Aktivität zeigten wie die Blindwerte:*

1x AML-M4; 1x ALL; 1x AML-M5; 1x AML sek.; 1x T-ALL

9.3.1.3 *Patientenproben, die wiederholt wurden:*

#6 (2x); #18; #1; #8; #12

9.3.1.4 *7-OH MTX; short exposure; nichtparametrische Auswertung*

Friedman Repeated Measures Analysis of Variance on Ranks

Normality Test: Failed (P = <0,001)

Konz.	n	Median	25%	75%
1000 µM	14	0,8	0,7	1,1
200 µM	18	1,0	0,9	1,1
40 µM	18	0,9	0,9	1,0
8 µM	18	1,0	0,8	1,1
1,6 µM	18	1,0	0,9	1,1
0,32 µM	18	1,0	0,9	1,1
0,064 µM	17	1,0	0,9	1,1
0,0125 µM	17	1,0	0,9	1,2

Chi-square= 7,0 with 7 degrees of freedom. (P = 0,429)

The differences in the median values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0,429)

9.3.1.5 7-OH MTX; long exposure; nichtparametrische Auswertung

Friedman Repeated Measures Analysis of Variance on Ranks

Normality Test: Failed (P = <0,001)

Konz.	n	Median	25%	75%
16 µM	16	1,0	0,9	1,2
4 µM	16	1,0	0,9	1,1
1 µM	16	0,9	0,7	1,0
0,25 µM	16	1,0	0,9	1,0
0,0625 µM	16	1,0	1,0	1,2
0,0156 µM	16	1,0	0,9	1,2
0,0039 µM	16	1,0	0,9	1,1
0,001µM	16	0,9	0,8	1,1

Chi-square= 10,4 with 7 degrees of freedom. (P = 0,166)

The differences in the median values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0,166)

9.3.1.6 MTX; short exposure; deskriptive Statistik

Konz.	n	MW	SD	Max	Min	Median
40 µM	15	0,1	0,2	0,6	-0,06	0,06
8 µM	15	0,1	0,2	0,5	-0,07	0,10
1,6µM	15	0,3	0,3	0,8	-0,010	0,2
0,32 µM	15	0,7	0,3	0,9	0,08	0,7
0,0640 µM	15	0,8	0,2	1,2	0,5	0,8
0,0128 µM	15	0,9	0,2	1,4	0,6	0,9

9.3.1.7 MTX; long exposure; deskriptive Statistik

Konz.	n	MW	SD	Max	Min	Median
1.0000 µM	14	0,1	0,2	0,16	-0,1	0,02
0.2500 µM	14	0,1	0,1	0,37	0,5	0,04
0.0625 µM	14	0,3	0,3	0,38	-0,5	0,20
0.0156 µM	14	0,7	0,3	0,97	90	0,53
0.0039 µM	14	0,8	0,2	1	-0,1	0,83

9.3.1.8 7-OH MTX-MTX =1:1 ; short exposure; deskriptive Statistik

Konz.	n	MW	SD	Max	Min	Median
1000 µM	6	-0,01	0,06	0,08	-0,09	-0,02
100 µM	15	-0,009	0,08	0,09	-0,2	0,010
40 µM	15	-0,008	0,08	0,10	-0,2	0,010
8 µM	15	0,03	0,1	0,2	-0,2	0,0
1,6 µM	15	0,1	0,2	0,5	-0,08	0,04
0,32 µM	15	0,2	0,2	0,7	-0,03	0,1
0,064 µM	14	0,5	0,3	0,8	0,05	0,5
0,0128 µM	14	0,7	0,3	1,1	0,3	0,8

9.3.1.9 7-OH MTX-MTX =1:1 ; long exposure; deskriptive Statistik

Konz.	n	MW	SD	Max	Min	Median
16 µM	5	-0,02	0,1	0,2	-0,3	0,002
4 µM	8	0,02	0,06	0,2	-0,1	0,03
1 µM	8	0,03	0,1	0,4	-0,2	0,02
0,25 µM	8	0,06	0,1	0,4	-0,09	0,03
0,0625 µM	8	0,06	0,1	0,4	-0,09	0,06
0,0156 µM	8	0,2	0,2	0,6	-0,1	0,1
0,0039 µM	8	0,5	0,3	0,9	0,007	0,5
0,0010 µM	13	0,8	0,3	1,2	0,2	0,9

9.3.1.10 7-OH MTX-MTX =5:1 ; short exposure; deskriptive Statistik

Konz.	n	MW	SD	Max	Min	Median
40 µM	11	0,1	0,2	0,6	-0,05	0,08
8 µM	11	0,2	0,2	0,7	-0,04	0,1
1,6 µM	11	0,3	0,2	0,7	0,0010	0,3
0,32 µM	11	0,6	0,2	0,9	0,2	0,6
0,064 µM	11	0,8	0,2	1,3	0,5	0,8
0,0128 µM	11	0,9	0,3	1,7	0,6	0,9
0,0026 µM	11	0,9	0,3	1,7	0,7	0,9
0,0005 µM	11	1,0	0,3	1,8	0,6	0,8

9.3.1.11 7-OH MTX-MTX =16:1 ; long exposure; deskriptive Statistik

Konz.	n	MW	SD	Max	Min	Median
1 µM	11	0,2	0,2	0,6	-0,02	0,06
0,25 µM	11	0,10	0,09	0,3	-0,04	0,10
0,0625 µM	11	0,2	0,2	0,7	0,05	0,2
0,0156 µM	11	0,7	0,2	1,0	0,2	0,6
0,0039 µM	11	0,9	0,3	1,4	0,5	0,9
0,0008 µM	11	0,9	0,3	1,5	0,4	0,9
0,0002 µM	11	0,9	0,3	1,6	0,4	0,8

9.3.1.12 TSA(50%): Aufstellung der Werte

Nr.	Diagnose	short exposure [μM]				long exposure [μM]			
		7-OH	MTX	1:1	5:1	7-OH	MTX	1:1	16:1
#1	ALL(t)	>50%	0,055	0,013	0,063	>50%	0,028	0,003	0,028
#2	AML M5	>50%	1,527	0,399	0,229	>50%	0,014	0,003	0,027
#3	AML M4	>50%	20,000	0,865	20,000	>50%	0,011	0,004	0,015
#4	ALL(c)	>50%	0,857	0,059	0,661	>50%	0,035	0,011	0,046
#5	AML-M2	>50%				>50%			
#6	AML-M5	>50%	3,466	0,222					
#6	AML-M5	>50%	2,892	0,250	5,770	>50%	0,048	0,003	0,024
#7	ALL	>50%	1,020	0,034		>50%	0,047	0,021	
#8	ALL(c)	>50%				>50%			
#9	ALL(t)	>50%				>50%			
#10	AML	>50%	0,560	0,013	0,487	>50%	0,001	0,001	0,014
#11	AML-M4	>50%	0,538	0,013	0,699	>50%	0,001	0,001	0,021
#12	AML-M5	>50%	1,078	0,476	3,717	>50%	0,038	0,010	0,042
#13	AML-Rez	>50%	0,416			>50%	0,043		
#14	AML-M4/rez	>50%	0,233	0,038	0,306	>50%	0,147	0,008	0,014
#15	AML M4/prim	>50%	0,114	0,013	1,360	variabl,	0,009	0,002	0,165
#16	ALL(t)	>50%	6,369	1,513		>50%	0,009	0,009	
#17	ALL	>50%	0,769	0,116	0,982	>50%	0,049	0,011	0,056

rote TSA(50%)-Werte sind abgeschätzt.

9.3.1.13 TSA(50%): deskriptive Statistik short exposure:

Versuch	n	MW	SD	Max	Min	Median
MTX	14	2,820	5,23	20,000	0,0550	0,939
1-1	14	0,287	0,43	1,513	0,0130	0,0875
5-1	11	3,116	5,86	20,000	0,0630	0,699

9.3.1.14 TSA(50%): deskriptive Statistik long exposure:

Versuch	n	MW	SD	Max	Min	Median
MTX	13	0,0336	0,034	0,147	0,00100	0,0280
1-1	13	0,0066	0,0057	0,0210	0,00100	0,0040
16-1	11	0,0411	0,041	0,165	0,014	0,0270

9.3.1.15 TSA(50%): short exposure, nichtparametrische Auswertung

Friedman Repeated Measures Analysis of Variance on Ranks

Normality Test: Failed (P = <0,001)

Versuch	n	Median	25%	75%
MTX	14	0,939	0,538	2,892
1-1	14	0,0875	0,0130	0,399
5-1	11	0,699	0,351	3,128

Chi-square= 14,372 with 2 degrees of freedom. (P = <0,001)

The differences in the median values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0,001)

To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Dunn's Method) :

Vergleich	Diff. der Ränge	Q	P<0,05
5-1 gg. 1-1	1,500	3,518	Ja
5-1 gg. MTX	0,273	0,640	Nein
MTX gg. 1-1	1,227	2,878	Ja

9.3.1.16 TSA(50%): short exposure, parametrische Auswertung

Normality Test: Failed (P = <0,001)

Equal Variance Test: Passed (P = 0,754)

Versuch	n	MW	SD	SEM
MTX	14	2,820	5,234	1,399
1-1	14	0,287	0,430	0,115
5-1	11	3,116	5,869	1,770

Ursache d. Variation	DF	SS	MS	F	P
Patienten	13	483,215	37,170		
Konzentrationen	2	66,393	33,196	3,474	0,048
Restfehler	23	219,780	9,556		
Gesamt	38	767,160	20,188		

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = 0,048). To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

Power of performed test with alpha = 0,050: 0,437

The power of the performed test (0,437) is below the desired power of 0,800.

You should interpret the negative findings cautiously.

Expected MW Squares:

Approximate DF Residual = 23

Expected MS(Subj) = var(res) + 2,769 var(Subj)

Expected MS(Treatment) = var(res) + var(Treatment)

Expected MS(Residual) = var(res)

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Student-Newman-Keuls Method) :

Comparisons for factor:

Vergleich	Differenz der MW	p	q	P	P<0,050
5-1 gg. 1-1	2,978	3	3,285	0,073	Ja
5-1 gg. MTX	0,446	2	0,492	0,731	Ja
MTX gg. 1-1	2,532	2	3,065	0,041	Nein

9.3.1.17 TSA(50%): long exposure, nichtparametrische Auswertung

Normality Test: Failed (P = <0,001)

Versuch	n	Median	25%	75%
MTX	13	0,0280	0,00900	0,0473
1-1	13	0,00400	0,00275	0,0103
16-1	11	0,0270	0,0165	0,0450

Chi-square= 17,024 with 2 degrees of freedom. (P =< 0,001)

The differences in the median values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P =<0,001)

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Dunn's Method) :

Vergleich	Diff. der Ränge	Q	P<0,05
16-1 gg. 1-1	1.682	3,944	Yes
16-1 gg. MTX	0.636	1,492	No
MTX gg. 1-1	1.045	2,452	Yes

Note: The multiple comparisons on ranks do not include an adjustment for ties.

9.3.1.18 TSA(50%): long exposure, parametrische Auswertung

Normality Test: Failed (P = <0,001)

Equal Variance Test: Passed (P = 0,759)

Versuch	n	MW	SD	SEM
MTX	13	0,0336	0,0385	0,0107
1-1	13	0,00669	0,00574	0,00159
16-1	11	0,0411	0,0434	0,0131

Ursache d. Variation	DF	SS	MS	F	P
Patienten	12	0,0107	0,000894		
Konzentrationen	2	0,00800	0,00400	3,353	0,054
Restfehler	22	0,0263	0,00119		
Gesamt	36	0,0451	0,00125		

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0,054).

Power of performed test with alpha = 0,050: 0,415

The power of the performed test (0,415) is below the desired power of 0,800.

You should interpret the negative findings cautiously.

Expected MW Squares:

Approximate DF Residual = 22,000

Expected MS(Subj) = var(res) + 2,833 var(Subj)

Expected MS(Treatment) = var(res) + var(Treatment)

Expected MS(Residual) = var(res)

10 **Abkürzungsverzeichnis**

Abkürzung	Erklärung
$^3\text{H-dCyt}$	5- $[\text{}^3\text{H}]$ -2'-Desoxycytidin
5-MTHF	5-Methyltetrahydrofolsäure
7-OH MTX	7-Hydroxymethotrexat
ACN	Acetonitril
1:1	Versuchsreihe mit equimolaren Konzentrationsverhältnissen von MTX und 7-OH MTX
5:1	Versuchsreihe mit einem 5fachen 7-OH MTX Überschuss gegenüber MTX
16:1	Versuchsreihe mit einem 16fachen 7-OH MTX Überschuss gegenüber MTX
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
AMP	Aminopterin
ANOVA	Varianzanalyse
b	y-Achsenabschnitt
CE	Kapillarelektrophorese
Cl	Clearance
C_{obs}	Beobachtete (gemessene) Konzentration
CPG ₂	Carboxypeptidase G2
C_{pred}	Durch das Modell vorhergesagte Konzentration
DAD	Dioden Array Detektor
DAMPA	2,4-Diamino-N ¹⁰ -methylpteroinsäure
DF	Anzahl der Freiheitsgrade (Degrees of Freedom)
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DM- β -CD	Dimethyl- β -Cyclodextrin
DMSO	Dimethylsulfoxid
EFS	Ereignisfreies Überleben
EMIT	Homogener Enzymimmunoassay (enzyme-multiplied immunoassay)
EOF	Elektroosmotischer Fluss (electroosmotic flow)
Epsilon (ϵ)	Restfehler in Nonmem
Eta (η)	Interindividuelle Variabilität in Nonmem
EtOH	Ethanol

Abkürzung	Erklärung
FCS	Fetales Kälberserum
FTHPA	5-Formyl-5,6,7,8-tetrahydropterinsäure
HD	Hochdosis
HSA	Humanes Serumalbumin
HSA-MTX	An humanes Serumalbumin gebundenes Methotrexat
HWZ	Halbwertszeit
IOV	Interoccasional Viability (Variabilität zwischen verschiedenen Gaben des gleichen Patienten)
k_{12}	Eliminationskonstante vom zentralen Kompartiment in das periphere Kompartiment
k_{21}	Eliminationskonstante vom peripheren Kompartiment in das zentrale Kompartiment
k.A.	Keine Angabe
kA	Korrigierte Peakfläche
k_e	Eliminationskonstante aus dem zentralen Kompartiment
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
KOF	Körperoberfläche
Lg NV	Logarithmisch normalverteilt
LV	Leukovorin
m	Geradensteigung
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazoliumbromid
MTX	Methotrexat
MW	Mittelwert
n	Anzahl
NV	Normalverteilt
ObjF.	Objective function
Omega (ω)	Varianz der interindividuelle Variabilität in Nonmem
p	Signifikanzniveau
PBS	Phosphat gepufferte NaCl Lösung
PDNS	Purin-De-Novo-Synthese
PEG	Polyethylenglykol
PK	Pharmakokinetik
RPMI	Roswell-Park-Memorial-Institute Kulturmedium
Sigma (σ)	Varianz des Restfehlers in Nonmem
SD	Standardabweichung
SS	Summe der Abweichungsquadrate (Sum of Squares)

Abkürzung	Erklärung
Theta (θ)	Mittelwerte der Populationpharmakokinetischen Parameter in Nonmem
TS	Thymidylatsynthase
TSA	Thymidylatsynthase-Aktivität
TSA(50%)	Benötigte Konzentration um 50 % der Thymidylatsynthase im Vergleich mit Kontrollen zu hemmen
TSIA	Thymidylatsynthase-Inhibitor-Assay
V	Verteilungsvolumen
VK	Variationskoeffizient
V_{\max}	Maximale Umsetzungsgeschwindigkeit der Michaelis-Menten Gleichung
wres	gewichteter Restfehler (weighted residual)

11 Literaturverzeichnis

1. *Note for guidance on clinical investigation of medicinal products in the paediatric population.* in *International Conference on Harmonisation.* 2000.
2. *Methotrexat-Fachinformation für Krankenhaus Apotheker,* in *Fachinformation für Krankenhausapotheker.* 2002.
3. Aarons, L., *Software for population pharmacokinetics and pharmacodynamics.* Clin Pharmacokinet, 1999. **36**(4): p. 255-64.
4. Abelson, H.T., W. Ensminger, A. Rosowsky, and J. Uren, *Comparative effects of citrovorum factor and carboxypeptidase G1 on cerebrospinal fluid-methotrexate pharmacokinetics.* Cancer Treat.Rep., 1978. **62**(10): p. 1549-1552.
5. Abelson, H.T., M.T. Fosburg, G.P. Beardsley, A.M. Goorin, C. Gorka, M. Link, and D. Link, *Methotrexate-induced renal impairment: clinical studies and rescue from systemic toxicity with high-dose leucovorin and thymidine.* J.Clin.Oncol., 1983. **1**(3): p. 208-216.
6. Abelson, H.T., D.W. Kufe, A.T. Skarin, P. Major, W. Ensminger, G.P. Beardsley, and G.P. Canellos, *Treatment of central nervous system tumors with methotrexate.* Cancer Treat.Rep., 1981. **65 Suppl 1:137-40.**: p. 137-140.
7. Ackland, S.P. and R.L. Schilsky, *High-dose methotrexate: a critical reappraisal.* J.Clin.Oncol., 1987. **5**(12): p. 2017-2031.
8. Adamson, P.C., *Methotrexate pharmacokinetics following administration of recombinant carboxypeptidase-G2 in rhesus monkeys.* J.Clin.Oncol.1992.Aug. **10**: p. 1359-1364.
9. Adamson, P.C., F.M. Balis, C.L. McCully, K.S. Godwin, and D.G. Poplack, *Methotrexate Pharmacokinetics Following Administration of Recombinant Carboxypeptidase-G2 in Rhesus Monkeys.* Journal of Clinical Oncology, 1992. **10**(8): p. 1359-1364.
10. Ahmad, S., F.H. Shen, and W.A. Bleyer, *Methotrexate-induced renal failure and ineffectiveness of peritoneal dialysis.* Arch.Intern.Med., 1978. **138**(7): p. 1146-1147.
11. Albertioni, F., C. Rask, S. Eksborg, J.H. Poulsen, H. Schroeder, O. Beck, and C. Peterson, *Evaluation of clinical assays for measuring high-dose methotrexate in plasma.* Clinical Chemistry, 1996. **42**(1): p. 39-44.

12. Allegra, C.J., B.A. Chabner, J.C. Drake, R. Lutz, D. Rodbard, and J. Jolivet, *Enhanced inhibition of thymidylate synthase by methotrexate polyglutamates*. J.Biol.Chem., 1985. **260**: p. 9720-9726.
13. Allegra, C.J., K. Hoang, G.C. Yeh, J.C. Drake, and J. Baram, *Evidence for direct inhibition of de novo purine synthesis in human MCF-7 breast cells as a principal mode of metabolic inhibition by methotrexate*. J.Biol.Chem., 1987. **262**: p. 13520-13526.
14. Beal, S.S., LB, *The NONMEM System*. Am Stat, 1980. **34**: p. 118-9.
15. Bender, R.A., *Anti-folate resistance in leukemia: treatment with "high-dose" methotrexate and citrovorum factor*. Cancer Treat.Rev., 1975. **2**(3): p. 215-224.
16. Bertino, J.R., *"Rescue" techniques in cancer chemotherapy: use of leucovorin and other rescue agents after methotrexate treatment*. Seminars in Oncology, 1977. **4**: p. 203-207.
17. Bertino, J.R., *Ode to Methotrexate*. Journal of Clinical Oncology, 1993. **11**(1): p. 5-14.
18. Bertino, J.R., E. Goker, R. Gorlick, W.W. Li, and D. Banerjee, *Resistance mechanisms to methotrexate in tumors*. Stem.Cells, 1996. **14**(1): p. 5-9.
19. Bertrand, R. and J. Jolivet, *The natural and unnatural diastereomers of leucovorin: aspects of their cellular pharmacology*. Adv.Exp.Med.Biol., 1988. **244:13-24**.: p. 13-24.
20. Bertrand, R. and J. Jolivet, *Lack of interference by the unnatural isomer of 5-formyltetrahydrofolate with the effects of the natural isomer in leucovorin preparations*. J.Natl.Cancer Inst., 1989. **81**(15): p. 1175-1178.
21. Bleyer, W.R., *The clinical pharmacology of methotrexate*. Cancer, 1978. **41**: p. 36-51.
22. Bleyer, W.R., *New vistas for leucovorin in cancer chemotherapy*. Cancer, 1989. **63**: p. 995-1007.
23. Bleyzac, N., G. Souillet, P. Magron, A. Janoly, P. Martin, Y. Bertrand, C. Galambrun, Q. Dai, P. Maire, R.W. Jelliffe, and G. Aulagner, *Improved clinical outcome of paediatric bone marrow recipients using a test dose and Bayesian pharmacokinetic individualization of busulfan dosage regimens*. Bone Marrow Transplant, 2001. **28**(8): p. 743-51.
24. Boeckmann, A., L. Sheiner, and S. Beal, *NONMEM User Guide Part V*, in *Nonmem User Guide*. 1994, Nonmem Project Group: San Francisco.
25. Bonadonna, G. and P. Valagussa, *Dose-response effect of adjuvant chemotherapy in breast cancer*. N Engl J Med, 1981. **304**(1): p. 10-5.

26. Bore, P., R. Bruno, N. Lena, R. Favre, and J.P. Cano, *Methotrexate and 7-hydroxymethotrexate pharmacokinetics following intravenous bolus administration and high-dose infusion of methotrexate*. Eur.J.Cancer Clin.Oncol., 1987. **23**: p. 1385-1390.
27. Borsi, J.D. and P.J. Moe, *A comparative study on the pharmacokinetics of methotrexate in a dose range of 0.5 g to 33.6 g/m² in children with acute lymphoblastic leukemia*. Cancer, 1987. **60**: p. 5-13.
28. Borsi, J.D. and P.J. Moe, *Systemic clearance of methotrexate in the prognosis of acute lymphoblastic leukemia in children*. Cancer, 1987. **60**(12): p. 3020-3024.
29. Borsi, J.D., T. Revesz, and D. Schuler, *Prognostic importance of systemic clearance of methotrexate in childhood acute lymphoblastic leukemia*. Cancer Chemother.Pharmacol., 1987. **19**: p. 261-264.
30. Borsi, J.D., F. Wesenberg, T. Stokland, and P.J. Moe, *How much is too much? Folinic acid rescue dose in children with acute lymphoblastic leukaemia*. Eur.J.Cancer, 1991. **27**(8): p. 1006-1009.
31. Bostik, J., L. Bures, and M. Spundova, *The use of protein as a carrier of methotrexate for experimental cancer chemotherapy. IV. Therapy of murine melanoma B16 by human serum albumin-methotrexate derivative*. Neoplasma., 1988. **35**(3): p. 343-349.
32. Breithaupt, H. and E. Küenzlen, *Pharmacokinetics of methotrexate and 7-hydroxymethotrexate following infusions of high-dose methotrexate*. Cancer Treatment Reports, 1982. **66**(9): p. 1733-1741.
33. Bremnes, R.M., L. Slordal, E. Wist, and J. Aarbakke, *Formation and elimination of 7-hydroxymethotrexate in the rat in vivo after methotrexate administration*. Cancer Res, 1989. **49**(9): p. 2460-4.
34. Browman, G.P., *Modulation of the antitumor effect of methotrexate by low-dose leucovorin in squamous cell head and neck cancer: a randomized placebo-controlled clinical trial*. J.Clin.Oncol.1990.Feb., 1990. **8**: p. 203-208.
35. Bures, L., J. Bostik, K. Motycka, M. Spundova, and L. Rehak, *The use of protein as a carrier of methotrexate for experimental cancer chemotherapy. III. Human serum albumin-methotrexate derivative, its preparation and basic testing*. Neoplasma., 1988. **35**(3): p. 329-342.
36. Bures, L., A. Lichy, J. Bostik, and M. Spundova, *The use of protein as a carrier of methotrexate for experimental cancer chemotherapy. V. Alternative method for preparation of serum albumin-methotrexate derivative*. Neoplasma., 1990. **37**(3): p. 225-231.

37. Burger, A.M., G. Hartung, G. Stehle, H. Sinn, and H.H. Fiebig, *Pre-clinical evaluation of a methotrexate-albumin conjugate (MTX-HSA) in human tumor xenografts in vivo*. Int J Cancer, 2001. **92**(5): p. 718-24.
38. Campling, B.G., J. Pym, P.R. Galbraith, and S.P. Cole, *Use of the MTT assay for rapid determination of chemosensitivity of human leukemic blast cells*. Leuk.Res., 1988. **12**(10): p. 823-831.
39. Carde, P., F.R. MacKintosh, and S.A. Rosenberg, *A dose and time response analysis of the treatment of Hodgkin's disease with MOPP chemotherapy*. J Clin Oncol, 1983. **1**(2): p. 146-53.
40. Cellai, L., C. Desiderio, R. Filippetti, and S. Fanali, *Capillary electrophoresis quantitation of L-L-folinic acid in the presence of its inactive d-L-form*. Electrophoresis, 1993. **14**(8): p. 823-825.
41. Chabner, B.A., C.J. Allegra, G.A. Curt, N.J. Clendeninn, J. Baram, S. Koizumi, J.C. Drake, and J. Jolivet, *Polyglutamation of methotrexate. Is methotrexate a prodrug?* Journal of Clinical Investigation, 1985. **76**: p. 907-912.
42. Chabner, B.A., P.L. Chello, and J.R. Bertino, *Antitumor activity of a folate-cleaving enzyme, carboxypeptidase G 1*. Cancer Res., 1972. **32**(10): p. 2114-2119.
43. Chatelut, E., A.V. Boddy, B. Peng, H. Rubie, M. Lavit, A. Dezeuze, A.D. Pearson, H. Roche, A. Robert, D.R. Newell, and P. Canal, *Population pharmacokinetics of carboplatin in children*. Clin Pharmacol Ther, 1996. **59**(4): p. 436-43.
44. Chen, M.L. and W.L. Chiou, *Clearance studies of methotrexate and 7-hydroxymethotrexate in rabbits after multiple-dose infusion*. J.Pharmacokinet.Biopharm., 1983. **11**(5): p. 515-527.
45. Chen, M.L. and W.L. Chiou, *Pharmacokinetics of methotrexate and 7-hydroxymethotrexate in rabbits after intravenous administration*. J.Pharmacokinet.Biopharm., 1983. **11**(5): p. 499-513.
46. Chu, E., *Mechanism of thymidylate synthase inhibition by methotrexate in human neoplastic cell lines and normal human myeloid progenitor cells*. J.Biol.Chem.1990.May.25. **265**: p. 8470-8478.
47. Delepine, N., G. Delepine, G. Bacci, G. Rosen, and J.C. Desbois, *Influence of methotrexate dose intensity on outcome of patients with high grade osteogenic osteosarcoma*. Cancer, 1996. **78**(10): p. 2127-2136.
48. Delepine, N., G. Delepine, C. Jasmin, J.C. Desbois, H. Cornille, and G. Mathe, *Importance of age and methotrexate dosage: prognosis in children and young adults with high-grade osteosarcomas*. Biomed.& Pharmacother., 1988. **42**: p. 257-262.

49. Djerassi, I., *High-dose methotrexate (NSC-740) and citrovorum factor (NSC-3590) rescue: background and rationale*. Cancer Chemother Rep, 1975. **6**(3): p. 3-6.
50. Djerassi, I., S. Farber, E. Abir, and W. Neikirk, *Continuous infusion of methotrexate in children with acute leukemia*. Cancer, 1967. **20**: p. 223-242.
51. Donehower, R.C., *Metabolic conversion of methotrexate in man*. Recent Results Cancer Res., 1980. **74:37-41**.: p. 37-41.
52. Donehower, R.C., K.R. Hande, J.C. Drake, and B.A. Chabner, *Presence of 2,4-diamino-N¹⁰-methylpteroic acid after high-dose methotrexate*. Clin.Pharmacol.Ther., 1979. **26**(1): p. 63-72.
53. Donelli, M.G., M. Zucchetti, A. Robatto, V. Perlangeli, M. D'Incalci, G. Masera, and M.R. Rossi, *Pharmacokinetics of HD-MTX in infants, children, and adolescents with non-B acute lymphoblastic leukemia*. Med.Pediatr.Oncol., 1995. **24**(3): p. 154-159.
54. Eksborg, S., F. Albertioni, C. Rask, O. Beck, C. Palm, H. Schroeder, and C. Peterson, *Methotrexate plasma pharmacokinetics: importance of assay method*. Cancer Lett., 1996. **108**(2): p. 163-169.
55. Erttmann, R., S.S. Bielack, and G. Landbeck, *Kinetics of 7-hydroxy-methotrexate after high-dose methotrexate therapy*. Cancer Chemother.Pharmacol., 1985. **15**: p. 101-104.
56. Evans, W.E., W.R. Crom, M. Abromowitch, R. Dodge, A.T. Look, W.P. Bowman, S.L. George, and C.H. Pui, *Clinical pharmacodynamics of high-dose methotrexate in acute lymphocytic leukemia*. The New England Journal of Medicine, 1986. **314**(8): p. 471-477.
57. Evans, W.E., W.R. Crom, M. Abromowitch, R. Dodge, A.T. Look, W.P. Bowman, S.L. George, and C.H. Pui, *Clinical pharmacodynamics of high-dose methotrexate in acute lymphocytic leukemia. Identification of a relation between concentration and effect*. N.Engl.J.Med., 1986. **314**(8): p. 471-477.
58. Evans, W.E., W.R. Crom, C.F. Stewart, W.P. Bowman, C.H. Chen, M. Abromowitch, and J.V. Simone, *Methotrexate systemic clearance influences probability of relapse in children with standard-risk acute lymphocytic leukaemia*. Lancet, 1984. **1**(8373): p. 359-362.
59. Evans, W.E., C.B. Pratt, H. Taylor, L.F. Barker, and W.R. Crom, *Pharmacokinetic Monitoring of High-dose Methotrexate*. Cancer Chemother.Pharmacol., 1979. **3**: p. 161-166.

60. Evans, W.E., M.V. Relling, J.H. Rodman, W.R. Crom, J.M. Boyett, and C.H. Pui, *Conventional compared with individualized chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia*. New England Journal of Medicine, 1998. **338**(8): p. 499-505.
61. Fabre, G., I. Fabre, L.H. Matherly, J.P. Cano, and I.D. Goldman, *Synthesis and properties of 7-hydroxymethotrexate polyglutamyl derivatives in Ehrlich ascites tumor cells*. J.Biol.Chem., 1984. **259**: p. 5066-5072.
62. Fabre, G., I. Fabre, L.H. Matherly, J.P. Cano, and I.D. Goldman, *Synthesis and properties of 7-hydroxymethotrexate polyglutamyl derivatives in Ehrlich ascites tumor cells in vitro*. J Biol Chem, 1984. **259**(8): p. 5066-72.
63. Fabre, G. and I.D. Goldman, *Formation of 7-hydroxymethotrexate polyglutamyl derivatives and their cytotoxicity in human chronic myelogenous leukemia cells, in vitro*. Cancer Res., 1985. **45**(1): p. 80-85.
64. Fabre, G., L.H. Matherly, I. Fabre, J.P. Cano, and I.D. Goldman, *Interactions between 7-hydroxymethotrexate and methotrexate at the cellular level in the Ehrlich ascites tumor in vitro*. Cancer Res., 1984. **44**(3): p. 970-975.
65. Fabre, G., L.H. Matherly, R. Favre, J. Catalin, and J.P. Cano, *In vitro formation of polyglutamyl derivatives of methotrexate and 7-hydroxymethotrexate in human lymphoblastic leukemia cells*. Cancer Res., 1983. **43**(10): p. 4648-4652.
66. Fabre, I., G. Fabre, and J.P. Cano, *7-Hydroxymethotrexate cytotoxicity and selectivity in a human Burkitt's lymphoma cell line versus human granulocytic progenitor cells: rescue by folic acid and nucleosides*. Eur.J.Cancer Clin.Oncol.1986.Oct., 1986. **22**: p. 1247-1254.
67. Fahrig, L., H. Brasch, and H. Iven, *Pharmacokinetics of methotrexate (MTX) and 7-hydroxymethotrexate (7-OH-MTX) in rats and evidence for the metabolism of MTX to 7-OH-MTX*. Cancer Chemother.Pharmacol., 1989. **23**(3): p. 156-160.
68. Farber, S., R.D. Diamond, R.D. Mercer, R.F. Sylvester, and J.A. Wolf, *Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroyl-glutamic acid (aminopterin)*. New England Journal of Medicine, 1948. **238**: p. 787-793.
69. Farquhar, D. and T.L. Loo, *Synthesis and biologic evaluation of 7-hydroxymethotrexate 7-methylaminopterin, and 7-methylmethotrexate*. J Med Chem, 1972. **15**: p. 567.
70. Flombaum, C.D. and P.A. Meyers, *High-dose leucovorin as sole therapy for methotrexate toxicity*. J.Clin.Oncol., 1999. **17**(5): p. 1589-1594.

71. Freeman, A.I., V. Weinberg, M.L. Brecher, B. Jones, A.S. Glicksman, L.F. Sinks, M. Weil, H. Pleuss, J. Hananian, E.O. Burgert, Jr, G.S. Gilchrist, T. Necheles, M. Harris, F. Kung, R.B. Patterson, H. Maurer, B. Leventhal, L. Chevalier, E. Forman, and J.F. Holland, *Comparison of intermediate-dose methotrexate with cranial irradiation for the post-induction treatment of acute lymphocytic leukemia in children*. N.Engl.J.Med., 1983. **308**(9): p. 477-484.
72. Frei, E., 3rd, R.H. Blum, S.W. Pitman, J.M. Kirkwood, I.C. Henderson, A.T. Skarin, R.J. Mayer, R.C. Bast, M.B. Garnick, L.M. Parker, and G.P. Canellos, *High dose methotrexate with leucovorin rescue. Rationale and spectrum of antitumor activity*. Am J Med, 1980. **68**(3): p. 370-6.
73. Fuskevag, O.M., C. Kristiansen, S. Lindal, and J. Aarbakke, *Maximum tolerated doses of methotrexate and 7-hydroxy-methotrexate in a model of acute toxicity in rats*. Cancer Chemother.Pharmacol.2000.;46.(1.):69.-73., 2000. **46**(1): p. 69-73.
74. Gibaldi, M. and P. D., *Pharmacokinetics*. 1982, New York: Marcel Decker.
75. Gibaldi, M. and D. Perrier, *Appendix V*, in *Pharmacokinetics*, Dekker, Editor. 1975: New York. p. 119-128.
76. Goldman, I.D., *Membrane transport of methotrexate (NSC-740) and other folate compounds: relevance to rescue protocols*. Cancer Chemother Rep, 1975. **6**: p. 63-72.
77. Goldman, I.D. and L.H. Matherly, *The cellular pharmacology of methotrexate*. Pharmacol.Ther.1985., 1985. **28**: p. 77-102.
78. Goldman, P. and C.C. Levy, *Carboxypeptidase G: purification and properties*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 1967. **58**(4): p. 1299-1306.
79. Gomez, M., *Determination of triamterene and leucovorin in biological fluids by UV derivative-spectrophotometry and partial least squares calibration*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2002. **27**: p. 81-90.
80. Goorin, A., D. Strother, D. Poplack, L.A. Letvak, M. George, and M. Link, *Safety and Efficacy of I-Leucovorin Rescue Following High-Dose Methotrexate for Osteosarcoma*. Medical and Pediatric Oncology, 1995. **24**: p. 362-367.
81. Graf, N., M. Betlemovic, N. Fuchs, and U. Bode, *Methotrexate pharmacokinetics and prognosis in osteosarcoma*. J.Clin.Oncol., 1994. **12**(7): p. 1443-1451.
82. Gugeler N and K. U, *Einführung in die Pharmakokinetik*, ed. G. Verlag. Vol. 2. 2000, Frankfurt a. Main: Govi Verlag. 11.
83. Haber, M., *Methotrexate cytotoxicity determination using the MTT assay following enzymatic depletion of thymidine and hypoxanthine*. J.Cancer Res.Clin.Oncol.1993. **119**: p. 315-317.

84. Halbert, G.W., A.T. Florence, and J.F. Stuart, *Characterization of in-vitro drug release and biological activity of methotrexate-bovine serum albumin conjugates*. J.Pharm.Pharmacol., 1987. **39**(11): p. 871-876.
85. Hande, K.R., J.E. Balow, J.C. Drake, S.A. Rosenberg, and B.A. Chabner, *Methotrexate and hemodialysis*. Ann.Intern.Med., 1977. **87**(4): p. 495-496.
86. Hartung, G., G. Stehle, H. Sinn, A. Wunder, H.H. Schrenk, S. Heeger, M. Kranzle, L. Edler, E. Frei, H.H. Fiebig, D.L. Heene, W. Maier-Borst, and W. Queisser, *Phase I trial of methotrexate-albumin in a weekly intravenous bolus regimen in cancer patients. Phase I Study Group of the Association for Medical Oncology of the German Cancer Society*. Clin.Cancer Res., 1999. **5**(4): p. 753-759.
87. Hong, M.S., S.J. Lim, M.K. Lee, Y.B. Kim, and C.K. Kim, *Prolonged blood circulation of methotrexate by modulation of liposomal composition*. Drug Deliv.2001.Oct.-Dec.;8.(4.):231.-7. **8**(4): p. 231-237.
88. Hongo, T., Y. Fujii, and Y. Igarashi, *An in vitro chemosensitivity test for the screening of anti-cancer drugs in childhood leukemia*. Cancer, 1990. **65**(6): p. 1263-1272.
89. Hughes, J.M., A. deFazio, and M.H. Tattersall, *Modulation of antifolate cytotoxicity by metabolites from dying cells in a lymphocyte clonal assay*. Br.J.Cancer, 1988. **57**(5): p. 459-463.
90. Isacoff, W.H., P.F. Morrison, J. Aroesty, K.L. Willis, J.B. Block, and T.L. Lincoln, *Pharmacokinetics of high-dose methotrexate with citrovorum factor rescue*. Cancer Treatment Reports, 1977. **61**: p. 1665-1674.
91. Jacobs, S.A., R.G. Stoller, and B.A. Chabner, *7-Hydroxymethotrexate as a urinary metabolite in human subjects and rhesus monkeys receiving high-dose methotrexate*. J.Clin.Invest., 1976. **57**: p. 534-538.
92. Jacobs, S.A., R.G. Stoller, B.A. Chabner, and D.G. Johns, *Dose-dependent metabolism of methotrexate in man and rhesus monkeys*. Cancer Treat.Rep., 1977. **61**(4): p. 651-656.
93. Jaffe, N., *Recent advances in the chemotherapy of metastatic sarcoma*. Cancer, 1972. **30**: p. 1627-1631.
94. Jaffe, N., K. Jorgensen, R. Robertson, M. George, L. Letvak, and G. Barrett, *Substitution of l-leucovorin for d,l-leucovorin in the rescue from high-dose methotrexate treatment in patients with osteosarcoma*. Anticancer Drugs, 1993. **4**(5): p. 559-564.
95. Jelliffe, R.W., A. Schumitzky, D. Bayard, M. Milman, M. Van Guilder, X. Wang, F. Jiang, X. Barbaut, and P. Maire, *Model-based, goal-oriented, individualised drug ther-*

- apy. Linkage of population modelling, new 'multiple model' dosage design, bayesian feedback and individualised target goals.* Clin.Pharmacokinet., 1998. **34**(1): p. 57-77.
96. Johns, D.G. and T.L. Loo, *Metabolite of 4-amino-4-deoxy-N-10-methyl-pteroylglutamic acid (methotrexate).* Journal of Pharm.Sci., 1969. **56**: p. 356-359.
97. Jolivet, J. and B.A. Chabner, *Intracellular pharmacokinetics of methotrexate polyglutamates in human breast cancer cells. Selective retention and less dissociable binding of 4-NH₂-10-CH₃-pteroylglutamate₄ and 4-NH₂-10-CH₃-pteroylglutamate₅ to dihydrofolate reductase.* J.Clin.Invest., 1983. **72**(3): p. 773-778.
98. Jolivet, J., R.L. Schilsky, B.D. Bailey, J.C. Drake, and B.A. Chabner, *Synthesis, retention, and biological activity of methotrexate polyglutamates in cultured human breast cancer cells.* Journal of Clinical Investigation, 1982. **70**: p. 351-360.
99. Jordan, C.G., M.R. Rashidi, H. Laljee, S.E. Clarke, J.E. Brown, and C. Beedham, *Aldehyde oxidase-catalysed oxidation of methotrexate in the liver of guinea-pig, rabbit and man [In Process Citation].* J.Pharm.Pharmacol., 1999. **51**(4): p. 411-418.
100. Kalghatgi, K.K., B.A. Moroson, C. Horvath, and J.R. Bertino, *Enhancement of antitumor activity of 2,4-diamino-5-(3',4'-dichlorophenyl)-6-methylpyrimidine and Baker's antifol (triazinate) with carboxypeptidase G1.* Cancer Res., 1979. **39**(9): p. 3441-3445.
101. Karlsson, M.O. and L.B. Sheiner, *The importance of modeling interoccasion variability in population pharmacokinetic analyses.* J Pharmacokinet Biopharm, 1993. **21**(6): p. 735-50.
102. Kaspers, G.J., R. Pieters, C.H. Van Zantwijk, P.A. De Laat, F.C. De Waal, E.R. Van Wering, and A.J. Veerman, *In vitro drug sensitivity of normal peripheral blood lymphocytes and childhood leukaemic cells from bone marrow and peripheral blood.* Br J Cancer, 1991. **64**(3): p. 469-74.
103. Kaspers, G.J., R. Pieters, C.H. Van Zantwijk, E.R. Van Wering, A. Van Der Does-Van Den Berg, and A.J. Veerman, *Prednisolone resistance in childhood acute lymphoblastic leukemia: vitro-vivo correlations and cross-resistance to other drugs.* Blood, 1998. **92**(1): p. 259-66.
104. Kobayashi, H., T. Morita, Y. Hirata, T. Kato, Y. Okada, and T. Sato, *[Toxicosis of high-dose methotrexate (HD-MTX) for osteosarcoma, cured with treatment by leucovorin (LV) rescue and hemoperfusion--a case report].* Gan.To.Kagaku.Ryoho.2000.Mar.;27.(3.):475.-8., 2000. **27**(3): p. 475-478.
105. Krackhardt, A., S. Schwartz, and E. Thiel, *Targeting Folates by Carboxypeptidase G2: Potential Applications in Anticancer Therapy.* Onkologie.2000.Dec.;23.(6.):538.-543. **23**(6): p. 538-543.

106. Lankelma, J. and E. van der Kleijn, *The role of 7-hydroxymethotrexate during methotrexate anti-cancer therapy*. Cancer Letters, 1980. **9**: p. 133-142.
107. Levy, C.C. and P. Goldman, *The enzymatic hydrolysis of methotrexate and folic acid*. J.Biol.Chem., 1967. **242**(12): p. 2933-2938.
108. Li, M.C., R. Hertz, and D.B. Spencer, *Effect of methotrexate therapy upon choriocarcinoma and chorioadenoma*. Proc Soc Exp Biol Med, 1956. **93**: p. 361-366.
109. Liegler, D.G., E.S. Henderson, and M.A. Hahn, *The effect of organic acids on renal clearance of methotrexate in man*. Clin.Pharmacol.Ther., 1969. **10**: p. 849-857.
110. Lin, J.T., *Basis for natural resistance to methotrexate in human acute non-lymphocytic leukemia*. Leuk.Res.1991. **15**: p. 1191-1196.
111. Lippens, R.J., *Methotrexate. I. Pharmacology and pharmacokinetics*. Am.J.Pediatr.Hematol.Oncol., 1984. **6**(4): p. 379-395.
112. Masson, E., M.V. Relling, T.W. Synold, Q. Liu, J.D. Schuetz, J.T. Sandlund, C.H. Pui, and W.E. Evans, *Accumulation of methotrexate polyglutamates in lymphoblasts is a determinant of antileukemic effects in vivo. A rationale for high-dose methotrexate*. J.Clin.Invest., 1996. **97**(1): p. 73-80.
113. Mauritz, R., M.W. Bekkenk, M.G. Rots, R. Pieters, E. Mini, C.H. van Zantwijk, A.J. Veerman, G.J. Peters, and G. Jansen, *Ex vivo activity of methotrexate versus novel antifolate inhibitors of dihydrofolate reductase and thymidylate synthase against childhood leukemia cells*. Clin.Cancer Res., 1998. **4**(10): p. 2399-2410.
114. McCullough, J.L., B.A. Chabner, and J.R. Bertino, *Purification and Properties of Carboxypeptidase G1*. The Journal of Biological Chemistry, 1971. **216**(23): p. 7207-7213.
115. McGuire, J.J., P. Hsieh, J.K. Coward, and J.R. Bertino, *In vitro methotrexate polyglutamate synthesis by rat liver folylpolyglutamate synthetase and inhibition by bromosulphophthalein*. Adv Exp Med Biol, 1983. **163**: p. 199-214.
116. Milano, G., A. Thyss, N. Renee, M. Schneider, N. Namer, J.L. Boubliil, and C.M. Lallanne, *Plasma levels of 7-hydroxymethotrexate after high-dose methotrexate treatment*. Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 1983. **11**: p. 29-32.
117. Minton, N.P., T. Atkinson, and R.F. Sherwood, *Molecular cloning of the Pseudomonas carboxypeptidase G2 gene and its expression in Escherichia coli and Pseudomonas putida*. J.Bacteriol., 1983. **156**(3): p. 1222-1227.
118. Mishra, P.R. and N.K. Jain, *Biotinylated methotrexate loaded erythrocytes for enhanced liver uptake. 'A study on the rat'*. Int.J.Pharm.2002.Jan.14.;231.(2.):145-53. **231**(2): p. 145-153.

119. Newman, E.M., J.A. Straw, and J.H. Doroshow, *Pharmacokinetics of Diastereoisomers of (6R,S)-Folinic Acid (Leucovorin) in humans during constant High-Dose Intravenous Infusions*. *Cancer Research*, 1989. **49**: p. 5755-5760.
120. Niemeyer, C.M., R.D. Gelber, N.J. Tarbell, M. Donnelly, L.A. Clavell, S.R. Blattner, K. Donahue, H.J. Cohen, and S.E. Sallan, *Low-dose versus high-dose methotrexate during remission induction in childhood acute lymphoblastic leukemia (Protocol 81-01 update)*. *Blood*, 1991. **78**(10): p. 2514-9.
121. Nirenberg, A., C. Mosende, B. Mehte, and et.al, *High-dose methotrexate with citrovorum factor rescue: predictive value of serum methotrexate concentrations and corrective measures to avert toxicity*. *Cancer Treatment Reports*, 1977. **61**: p. 779-783.
122. Nixon, P.F. and J.R. Bertino, *Effective absorption and utilization of oral formyltetrahydrofolate in man*. *N.Engl.J.Med.*, 1972. **286**(4): p. 175-179.
123. Odoul, F., C. Le Guellec, J.P. Lamagnere, D. Breilh, M.C. Saux, G. Paintaud, and E. Autret-Leca, *Prediction of methotrexate elimination after high dose infusion in children with acute lymphoblastic leukaemia using a population pharmacokinetic approach*. *Fundam.Clin.Pharmacol.*, 1999. **13**(5): p. 595-604.
124. Odoul, F., C. Le Guellec, J.P. Lamagnere, D. Breilh, M.C. Saux, G. Paintaud, and E. Autret-Leca, *Prediction of methotrexate elimination after high dose infusion in children with acute lymphoblastic leukaemia using a population pharmacokinetic approach*. *Fundam Clin Pharmacol*, 1999. **13**(5): p. 595-604.
125. Patte, C., T. Philip, and C. Rodary, *High survival rate in advanced-stage-B-cell lymphomas and leukemias without CNS involvement with a short intensive polychemotherapy: results from the French Pediatric Oncology Society of a randomized trial of 216 children*. *Journal of Clinical Oncology*, 1991. **9**: p. 123-132.
126. Payet, B., G. Fabre, N. Tubiana, and J.P. Cano, *Plasma kinetic study of folinic acid and 5-methyltetrahydrofolate in healthy volunteers and cancer patients by high-performance liquid chromatography*. *Cancer Chemother.Pharmacol.*, 1987. **19**: p. 319-325.
127. Perez, C., Y.M. Wang, W.W. Sutow, and J. Herson, *Significance of the 48-hour plasma level in high-dose methotrexate regimens*. *Cancer Clin Trials*, 1978. **1**(2): p. 107-11.
128. Pesce, M.A. and S.H. Bodourian, *Evaluation of a fluorescence polarization immunoassay procedure for quantitation of methotrexate*. *Ther Drug Monit.*, 1986. **8**(1): p. 115-121.
129. Pieters, R., A.H. Loonen, D.R. Huismans, G.J. Broekema, M.W. Dirven, M.W. Heyenbrok, K. Hahlen, and A.J. Veerman, *In vitro drug sensitivity of cells from children with*

- leukemia using the MTT assay with improved culture conditions*. Blood, 1990. **76**(11): p. 2327-2336.
130. Pieters, R., A.H. Loonen, D.R. Huismans, G.J. Broekema, M.W. Dirven, M.W. Heyenbrok, K. Hahlen, and A.J. Veerman, *In vitro drug sensitivity of cells from children with leukemia using the MTT assay with improved culture conditions*. Blood, 1990. **76**(11): p. 2327-36.
131. Pignon, T., B. Lacarelle, F. Duffaud, P. Guillet, J. Catalin, A. Durand, S. Monjanel, and R. Favre, *Pharmacokinetics of high-dose methotrexate in adult osteogenic sarcoma*. Cancer Chemother.Pharmacol., 1994. **33**: p. 420-424.
132. Pinedo, H.M., D.S. Zaharko, J.M. Bull, and B.A. Chabner, *The reversal of methotrexate cytotoxicity to mouse bone marrow cells by leukovorin and nucleosides*. Cancer Research, 1976. **36**: p. 4418-4424.
133. Press, W., S. Teukolsky, and W. Vetterling, *Numerical recipes in C, The Art of Scientific Computing*. 2. ed, ed. I. BP. 1992, Cambridge: Cambridge University Press.
134. Pui, C.H. and W.E. Evans, *Acute lymphoblastic leukemia*. N.Engl.J.Med., 1998. **339**(9): p. 605-615.
135. Rask, C., F. Albertioni, S.M. Bentzen, H. Schroeder, and C. Peterson, *Clinical and pharmacokinetic risk factors for high-dose methotrexate- induced toxicity in children with acute lymphoblastic leukemia--a logistic regression analysis*. Acta Oncol., 1998. **37**(3): p. 277-284.
136. Rask, C., F. Albertioni, H. Schroeder, and C. Peterson, *Oral mucositis in children with acute lymphoblastic leukemia after high-dose metotrexate treatment without delayed elimination of metotrexate*. Pediatric Hematology and Oncology, 1996. **13**(4): p. 359-367.
137. Redetzki, H.M., J.E. Redetzki, and A.L. Elias, *Resistance of the rabbit to methotrexate: isolation of a drug metabolite with decreased cytotoxicity*. Biochem Pharmacol, 1966. **15**(4): p. 425-33.
138. Relling, M.V., F.B. Stapleton, J. Ochs, D.P. Jones, W. Meyer, I.W. Wainer, W.R. Crom, C.P. McKay, and W.E. Evans, *Removal of Methotrexate, Leucovorin, and Their Metabolites by Combined Hemodialysis and Hemoperfusion*. Cancer, 1988. **62**: p. 884-888.
139. Rhee, M.S. and J. Galivan, *Conversion of methotrexate to 7-hydroxymethotrexate and 7- hydroxymethotrexate polyglutamates in cultured rat hepatic cells*. Cancer Res., 1986. **46**(8): p. 3793-3797.

140. Rodenhuis, S., J.J. McGuire, R. Narayanan, and J.R. Bertino, *Development of an assay system for the detection and classification of methotrexate resistance in fresh human leukemic cells*. *Cancer Res.*, 1986. **46**(12 Pt 1): p. 6513-6519.
141. Rodman, J.H., M.V. Relling, C.F. Stewart, T.W. Synold, H. McLeod, C. Kearns, N. Stute, W.R. Crom, and W.E. Evans, *Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of anticancer drugs in children*. *Semin Oncol*, 1993. **20**(1): p. 18-29.
142. Römpp, *Römpp Chemielexikon*. 1995, Georg Thieme Verlag.
143. Rosen, G., *Preoperative (neoadjuvant) chemotherapy for osteogenic sarcoma: a ten year experience*. *Orthopedics*, 1985. **8**(5): p. 659-64.
144. Rosen, G. and A. Nirenberg, *Chemotherapy for osteogenic sarcoma: an investigative method, not a recipe*. *Cancer Treat Rep*, 1982. **66**(9): p. 1687-97.
145. Rosen, G., C. Tan, A. Sanmaneechai, E.J. Beattie, R.C. Marcove, and M.L. Murphy, *The rationale for multiple drug chemotherapy in the treatment of osteogenic sarcoma*. *Cancer*, 1975. **35**: p. 936-945.
146. Rots, M.G., *Classification of EX VIVO Methotrexate Resistance in Acute Lymphoblastic and Myeloid Leukaemia*. *British Journal of Haematology*, 2000. **110**: p. 791-800.
147. Rots, M.G., R. Pieters, G. Jansen, G.J. Kaspers, C.H. van Zantwijk, P. Noordhuis, D.A. Voorn, E.R. van Wering, U. Creutzig, A.J. Veerman, and G.J. Peters, *A possible role for methotrexate in the treatment of childhood acute myeloid leukaemia, in particular for acute monocytic leukaemia*. *Eur.J.Cancer* 2001.Mar.;**37**(4.):492.-8., 2001. **37**(4): p. 492-498.
148. Rots, M.G., R. Pieters, G.J. Kaspers, C.H. van Zantwijk, P. Noordhuis, R. Mauritz, A.J. Veerman, G. Jansen, and G.J. Peters, *Differential methotrexate resistance in childhood T- versus common/preB- acute lymphoblastic leukemia can be measured by an in situ thymidylate synthase inhibition assay, but not by the MTT assay*. *Blood*, 1999. **93**(3): p. 1067-1074.
149. Rots, M.G., R. Pieters, G.J. Peters, P. Noordhuis, C.H. van Zantwijk, G.J. Kaspers, K. Hahlen, U. Creutzig, A.J. Veerman, and G. Jansen, *Role of folylpolyglutamate synthetase and folylpolyglutamate hydrolase in methotrexate accumulation and polyglutamylation in childhood leukemia [In Process Citation]*. *Blood*, 1999. **93**(5): p. 1677-1683.
150. Sabot, C., J. Debord, B. Roulet, P. Marquet, L. Merle, and G. Lachatre, *Comparison of 2- and 3-compartment models for the Bayesian estimation of methotrexate pharmacokinetics*. *Int.J.Clin.Pharmacol.Ther.*, 1995. **33**(3): p. 164-169.

151. Saeter, G., T.A. Alvegard, I. Elomaa, A.E. Stenwig, T. Holmstrom, and O.P. Solheim, *Treatment of osteosarcoma of the extremities with the T-10 protocol, with emphasis on the effects of preoperative chemotherapy with single-agent high-dose methotrexate: a Scandinavian Sarcoma Group study*. J Clin Oncol, 1991. **9**(10): p. 1766-75.
152. Samara, E. and R. Granneman, *Role of population pharmacokinetics in drug development. A pharmaceutical industry perspective*. Clin Pharmacokinet, 1997. **32**(4): p. 294-312.
153. Sasaki, K., R. Hosoya, Y.M. Wang, W.W. Sutow, and T. Fujimoto, *[Experimental study on pharmacokinetics of methotrexate and its metabolite (7-hydroxy-methotrexate) in tissue]*. Gan.To.Kagaku.Ryoho., 1982. **9**(10): p. 1678-1687.
154. Sasaki, K., J. Tanaka, and T. Fujimoto, *Theoretically required urinary flow during high-dose methotrexate infusion*. Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 1984. **13**: p. 9-13.
155. Schrappe, M., A. Reiter, M. Zimmermann, J. Harbott, W.D. Ludwig, G. Henze, H. Gadner, E. Odenwald, and H. Riehm, *Long-term results of four consecutive trials in childhood ALL performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 1995. Berlin-Frankfurt-Munster*. Leukemia, 2000. **14**(12): p. 2205-22.
156. Sczesny, F., G. Hempel, J. Boos, and G. Blaschke, *Capillary electrophoretic drug monitoring of methotrexate and leucovorin and their metabolites*. J.Chromatogr.B Biomed.Sci.Appl., 1998. **718**(1): p. 149-156.
157. Seidel, H., R. Nygaard, P.J. Moe, G. Jacobsen, B. Lindqvist, and L. Slordal, *On the prognostic value of systemic methotrexate clearance in childhood acute lymphocytic leukemia*. Leuk.Res., 1997. **21**(5): p. 429-434.
158. Seither, R.L., T.J. Rape, and I.D. Goldman, *Further studies on the pharmacologic effects of the 7-hydroxy catabolite of methotrexate in the L1210 murine leukemia cell*. Biochem.Pharmacol., 1989. **38**(5): p. 815-822.
159. Sett, R., H.S. Sarkar, and P.K. Das, *Pharmacokinetics and biodistribution of methotrexate conjugated to mannosyl human serum albumin*. J.Antimicrob.Chemother., 1993. **31**(1): p. 151-159.
160. Sherwood, R.F., R.G. Melton, S.M. Alwan, and P. Hughes, *Purification and properties of carboxypeptidase G2 from Pseudomonas sp. strain RS-16*. Eur.J.Biochem., 1985. **148**: p. 447-453.
161. Slordal, L., S. Kolmannskog, P.S. Prytz, P.J. Moe, and J. Aarbakke, *Pharmacokinetics of methotrexate and 7-hydroxy-methotrexate after high-dose (33.6 g/m²) methotrexate therapy*. Pediatr.Hematol.Oncol., 1986. **3**(2): p. 127-134.

162. Smeland, E., R.M. Bremnes, A. Andersen, R. Jaeger, T.J. Eide, N.-E. Huseby, and J. Aarbakke, *Renal and hepatic toxicity after high-dose 7-hydroxymethotrexate in the rat*. *Cancer Chemother.Pharmacol.*, 1994. **34**: p. 119-124.
163. Smeland, E., O.M. Fuskevåg, K. Nymann, J.S. Svendsen, R. Olsen, S. Lindal, R.M. Bremnes, and J. Aarbakke, *High-dose 7-hydroxymethotrexate: acute toxicity and lethality in a rat model*. *Cancer Chemother.Pharmacol.*, 1996. **37**: p. 415-422.
164. Stehle, G., A. Wunder, H. Sinn, H.H. Schrenk, S. Schutt, E. Frei, G. Hartung, W. Mayer-Borst, and D.L. Heene, *Pharmacokinetics of methotrexate-albumin conjugates in tumor-bearing rats*. *Anticancer Drugs*, 1997. **8**(9): p. 835-844.
165. Stoller, R.G., K.R. Hande, S.A. Jacobs, S.A. Rosenberg, and B.A. Chabner, *Use of plasma pharmacokinetics to predict and prevent methotrexate toxicity*. *N.Engl.J.Med.*, 1977. **297**(12): p. 630-634.
166. Stoller, R.G., S.A. Jacobs, J.C. Drake, R. Lutz, and B.A. Chabner, *Pharmacokinetics of high-dose methotrexate (NSC-740)*. *Cancer Chemother Rep*, 1975. **6**: p. 19-24.
167. Straw, J.A., E.M. Newman, and J.H. Doroshow, *Pharmacokinetics of leucovorin (d,l-5-formyltetrahydrofolate) after intravenous injection and constant intravenous infusion*. *Natl.Cancer Inst.Monogr.*, 1987. **5**: p. 41-45.
168. Straw, J.A., D. Szapary, and W.T. Wynn, *Pharmacokinetics of the diastereoisomers of leucovorin after intravenous and oral administration to normal subjects*. *Cancer Research*, 1984. **44**: p. 3114-3119.
169. SyvaCompany, *Emit Methotrexat Test*. 1992.
170. Tjaden, U.R. and E.A. de Bruijn, *Chromatographic analysis of anticancer drugs*. *J Chromatogr*, 1990. **531**: p. 235-94.
171. Tubiana-Mathieu, N., S. Monjanel-Mouterde, C. Lejeune, B. Payet, J. Catalin, Y. Carcassonne, and J.P. Cano, *Pharmacokinetics of Folinic Acid and 5-Methyltetrahydrofolic Metabolite After Repeated Oral Administration of Calcium Folinic Acid Following Methotrexate Treatment*. *Eur.J.Cancer*, 1994. **30A**(9): p. 1281-1284.
172. Valerino, D.M., D.G. Johns, D.S. Zaharko, and et.al, *Studies of the metabolism of methotrexate by intestinal flora. I. Identification and study of biological properties of the metabolite 4-amino-4-deoxy-N10-methylpteroic acid*. *Biochemical Pharmacology*, 1972. **21**: p. 821.
173. van den Bongard, H.J., R.A. Mathijt, W. Boogerd, J.H. Schornagel, M. Soesan, J.H. Schellens, and J.H. Beijnen, *Successful rescue with leucovorin and thymidine in a patient with high-dose methotrexate induced acute renal failure*. *Cancer Chemother.Pharmacol.*2001.Jun.;**47**(6):537.-40. **47**(6): p. 537-540.

174. Vermes, A., R.A. Math t, I.H. van der Sijs, J. Dankert, and H.J. Guchelaar, *Population pharmacokinetics of flucytosine: comparison and validation of three models using STS, NPEM, and NONMEM*. Ther Drug Monit, 2000. **22**(6): p. 676-87.
175. Wall, A.M., A. Gajjar, A. Link, H. Mahmoud, C.H. Pui, and M.V. Relling, *Individualized methotrexate dosing in children with relapsed acute lymphoblastic leukemia*. Leukemia 2000.Feb.;14.(2.):221.-5. **14**(2): p. 221-225.
176. Whitehead, V.M., C. Payment, L. Cooley, S.J. Lauer, D.H. Mahoney, J.J. Shuster, M.J. Vuchich, M.L. Bernstein, A.T. Look, D.J. Pullen, and B. Camitta, *The association of the TEL-AML1 chromosomal translocation with the accumulation of methotrexate polyglutamates in lymphoblasts and with ploidy in childhood B-progenitor cell acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group study*. Leukemia 2001.Jul.;15.(7.):1081.-8. **15**(7): p. 1081-1088.
177. Whiting, B., A.W. Kelman, and J. Grevel, *Population pharmacokinetics. Theory and clinical application*. Clin.Pharmacokinet., 1986. **11**(5): p. 387-401.
178. Widemann, B.C., *Carboxypeptidase: personal communication*. 2000.
179. Widemann, B.C., M.L. Hetherington, R.F. Murphy, F.M. Balis, and P.C. Adamson, *Carboxypeptidase-G2 Rescue in a Patient with High Dose Methotrexate-Induced Nephrotoxicity*. Cancer, 1995. **1**(3): p. 521-526.
180. Wilmanns, W., H. Sauer, and A. Schalhorn, *Biochemical control of high-dose methotrexate/Leucovorin rescue therapy*. Recent Results Cancer Res, 1980. **74**: p. 42-9.
181. Winkler, K., G. Beron, G. Delling, U. Heise, H. Kabisch, C. Purfürst, J. Berger, J. Ritter, H. Jürgens, V. Gerein, N. Graf, W. Russe, E.R. Greumayer, W. Ertelt, R. Kotz, P. Preusser, G. Prindull, W. Brandeis, and G. Landbeck, *Neoadjuvant chemotherapy of osteosarcoma: results of a randomized cooperative trial (COSS 82) with salvage chemotherapy based on histological tumor response*. Journal of Clinical Oncology, 1988. **6**(2): p. 329-337.
182. Winograd, B., R.J. Lippens, M.J. Oosterbaan, M.J. Dirks, T.B. Vree, and E. van der Kleijn, *Renal excretion and pharmacokinetics of methotrexate and 7-hydroxymethotrexate following a 24-h high dose infusion of methotrexate in children*. Eur.J.Clin.Pharmacol., 1986. **30**(2): p. 231-238.
183. Wolfrom, C., R. Hepp, R. Hartmann, H. Breithaupt, and G. Henze, *Pharmacokinetic study of methotrexate, folinic acid and their serum metabolites in children treated with high-dose methotrexate and leucovorin rescue*. Eur.J.Clin.Pharmacol., 1990. **39**(4): p. 377-383.

184. Wunder, A., G. Stehle, H.H. Schrenk, G. Hartung, D.L. Heene, W. Maier-Borst, and H. Sinn, *Antitumor activity of methotrexate-albumin conjugates in rats bearing a Walker-256 carcinoma*. *Int.J.Cancer*, 1998. **76**(6): p. 884-890.
185. Yalowich, J.C. and T.I. Kalman, *Rapid determination of thymidylate synthase activity and its inhibition in intact L1210 leukemia cells in vitro*. *Biochem.Pharmacol.*, 1985. **34**(13): p. 2319-2324.
186. Yamauchi, H., N. Iwata, M. Omine, and T. Maekawa, *In vitro methotrexate polyglutamate formation is elevated in acute lymphoid leukemia cells compared with acute myeloid leukemia and normal bone marrow cells*. *Nippon.Ketsueki.Gakkai.Zasshi.*, 1988. **51**(4): p. 766-773.
187. Zittoun, J., *Pharmacokinetics and in vitro studies of l-leucovorin. Comparison with the d and d,l-leucovorin*. *Ann Oncol*, 1993. **4**(Suppl 2): p. 1-5.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 1999 bis Mai 2002 unter der Leitung von Prof. Dr. G. Blaschke und Prof. Dr. J. Boos am Institut für Pharmazeutische Chemie der Westfälischen Wilhelm-Universität Münster und an der Kinderklinik – Hämatologie und Onkologie – der Medizinischen Einrichtungen der Universität Münster durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. G. Blaschke, Dr. Georg Hempel und Prof. Dr. J. Boos möchte ich für die Überlassung des interessanten Themas, das stete Interesse am Fortgang der Arbeit und den vielschichtigen interessanten Diskussionen danken.

Frau Dr. Würthwein danke ich für die interessanten Diskussionen und Hilfestellungen in allen Lebenslagen.

Meinen Amsterdamer Freunden und Kollegen, insbesondere Gertjan Kaspers, Christina van Zantwijk, Marianne Rots und Eric Haarman, für die wissenschaftliche Zusammenarbeit, aber auch für die tolle Zeit in Amsterdam.

Monika Winkelhorst, Borna Truckenbrod und dem gesamten Laborteam danke ich für die wissenschaftliche und moralische Unterstützung.

Dem Personal der Auerhahn-Apotheke danke ich für den unglaublichen Einsatz und der mir damit eröffneten Möglichkeit der Promotion.

Joost Hagemann und Matthias Lempka danke ich für die einzigartige Freundschaft und die gemeinsame Zeit in Münster.

Besonderer Dank gilt meiner Freundin Angela Soor für die Hilfe, Unterstützung und Geduld mit mir.

Lebenslauf:

Persönliche Daten:

Rainer Markus Kwame Lingg

geboren am 13.03.1971 in Karlsruhe (Baden)

ledig

Vater: Dieter Lingg

Mutter: Christl Lingg, geb. Wieland

Schulbildung:

1976 - 1980

Schlossschule in Karlsruhe-Durlach

1981 - 1991

Markgrafengymnasium in Karlsruhe-Durlach mit Abschluss der Hochschulreife am 12.06.1991

Hochschulausbildung:

SS 1992 - SS 1996

Studium der Pharmazie an der Ruprecht-Karls Universität Heidelberg mit Abschluss des zweiten Abschnitts der pharmazeutischen Prüfung am 07.10.1996

Praktika:

1.11.1996 - 31.1.1996

Pharmaziepraktikant in der Krankenhausapotheke des Universitätsklinikums Göttingen

1.02.1997 - 31.4.1997

Pharmaziepraktikant als Erasmus-Student in der Krankenhausapotheke des Hôpital Antoine Charial in Lyon

1.5.1998 - 31.10.1997

Pharmaziepraktikant in der Saniplus-Apotheke im OEG in München

Abschluss:

22.12.1997

Erteilung der Approbation als Apotheker

seit 01.01.1999

Beginn der Dissertation am Institut für Pharmazeutische Chemie unter Leitung von Prof. G. Blaschke in Zusammenarbeit mit Prof. Boos aus der Kinderklinik –Hämatologie und Onkologie – der medizinischen Einrichtungen der WWU Münster

Münster, den 9. April 2002