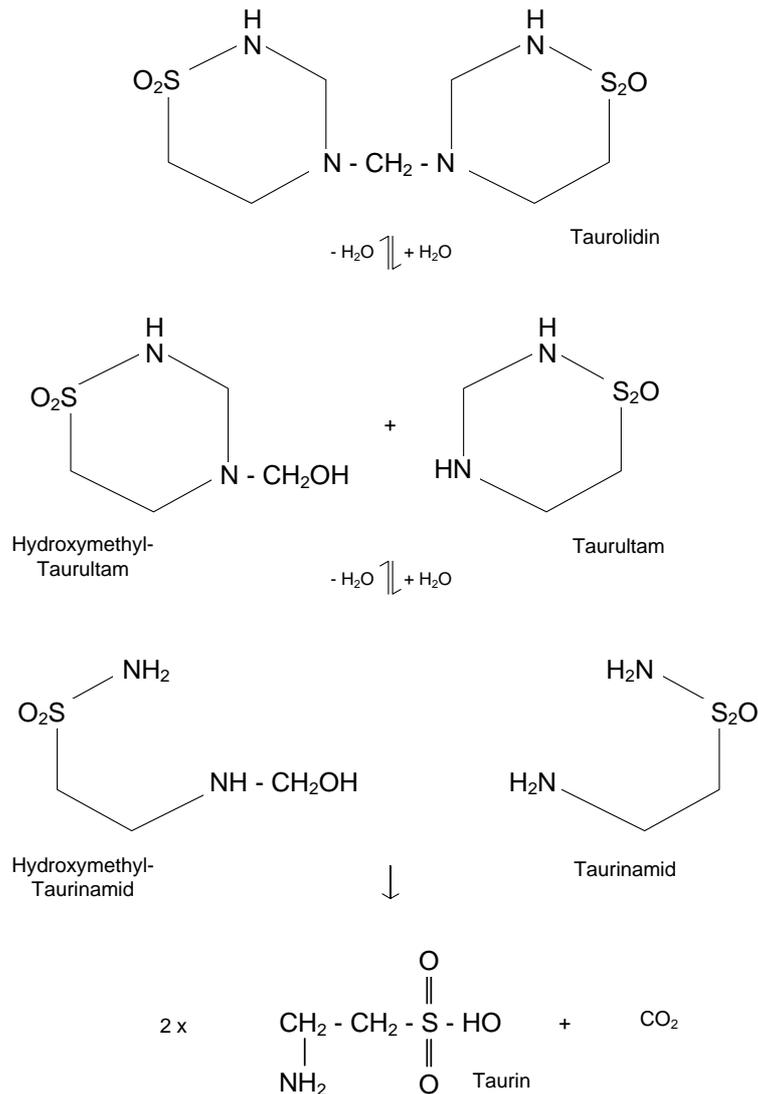


### 3 Pharmakokinetik von Taurolidin nach intravenöser Gabe

#### 3.1 Einführung

Magnetresonanzspektroskopische und pharmakologische Untersuchungen haben gezeigt, dass Taurolidin in wässriger Lösung im Gleichgewicht mit N-Hydroxymethyl-Taurultam, Taurultam und Spuren von Methylenglycol vorliegt (Knight *et al.* 1983a; Sihm *et al.* 1997a)(Bild 3.1).



**Bild 3.1** Taurolidin liegt in wässriger Lösung im Gleichgewicht mit Taurultam und Hydroxymethyl-Taurultam vor. Taurultam wird zu Hydroxymethyl-Taurinamid und schließlich zu Taurin metabolisiert. [nach: (Pfirrmann 1985; Waser *et al.* 1985)].

Für die intravenöse Infusion steht Taurolidin als 2 %-ige Lösung zusammen mit 5 % Polyvinylpyrrolidon (Kollidon® 17 PF) als Lösungsstabilisator zur Verfügung (Taurolin™) (Erb *et al.* 1982). Die rasche Verteilung und Metabolisierung von Taurolidin in die Endprodukte Taurin und CO<sub>2</sub> erklärt, warum Taurolidin bei langsamer intravenöser Infusion nur eine kaum nachweisbare Toxizität aufweist

(Steinbach-Lebbin et al. 1982). Lediglich bei sehr rascher intravenöser Infusion kann es zu vagotonen Nebenwirkungen wie Miosis, Tränenfluss und Agitation, später auch Sedierung kommen (Pfirrmann 1985); (Waser et al. 1985). Die mittlere letale Dosis  $LD_{50}$  bei der Maus liegt bei intravenöser Gabe bei mehr als 4 g/kg Körpermasse (Pfirrmann 1985). Nach einer chronischen peroralen Verabreichung von 500 mg/kg Taurolidin pro Tag an der Ratte für 1 Jahr konnten keine toxischen Veränderungen auf das Körpergewicht, das allgemeine Verhalten, die Blutbildung und die Histopathologie festgestellt werden (Waser et al. 1985).

Für die Therapie von Patienten mit einem Glioblastom mit Taurolidin wird die repetitive Infusion (4 Infusionen Taurolidin-Lösung 2 % (jeweils 5 g Taurolidin) über jeweils 2 Stunden pro Tag mit einer Pause von 1 Stunde zwischen den Infusionen) verwendet.

Über die Pharmakokinetik von Taurolidin nach repetitiver intravenöser Gabe beim Menschen ist nur wenig bekannt. Lediglich eine Publikation beschäftigt sich mit der Pharmakokinetik von Taurolidin nach intravenöser Infusion bei freiwilligen Versuchspersonen (Erb et al. 1982). Dabei wurden die maximalen Serumkonzentrationen am Ende der Infusionszeit erreicht. Eine Kumulation konnte nicht beobachtet werden (Erb et al. 1982). Nichts ist derzeit bekannt über die Pharmakokinetik der Metabolite von Taurolidin nach repetitiver Infusion, obwohl Taurolidin in wässriger Lösung hauptsächlich in Form dieser Metabolite vorliegt (Knight et al. 1983b; Sihn et al. 1997b). Außerdem existieren keine pharmakokinetischen Daten über Taurultam und Taurinamid.

### 3.2 Fragestellung

Das Ziel der nachfolgenden Untersuchungen war es, die Stabilität von Taurolidin im Serum und Vollblut sowie die Pharmakokinetik von Taurolidin und seiner Metaboliten nach repetitiver intravenöser Infusion zu untersuchen. Der Nachweis von Taurolidin bzw. seiner Metaboliten erfolgt vorzugsweise mit einer Kombination aus HPLC und MS (Knight et al. 1981). Diese Methode ist zwar sehr genau und empfindlich, jedoch auch sehr aufwändig. Deshalb sollte untersucht werden, ob eine relativ einfache colorimetrische Methode in der Lage ist, Taurolidin genau nachzuweisen. Folgende Fragen wurden gestellt:

1. Sind Taurolidin, Taurultam und Taurinamid im Serum und Vollblut stabil?
2. Wie ist der Konzentrationsverlauf von Taurolidin, Taurultam und Taurinamid im Serum bei repetitiver Infusion?
3. Wie sind die pharmakokinetischen Parameter (maximale und durchschnittliche Serumkonzentrationen, Verteilungsvolumen, Halbwertszeit, Clearance) von Taurolidin, Taurultam und Taurinamid bei repetitiver Infusion?
4. Ist eine einfach durchführbare colorimetrische Reaktion zur Untersuchung der Serumkonzentrationen von Taurolidin geeignet?

### 3.3 Patienten und Methoden

#### 3.3.1 Taurolidin

Für die Versuche zur Bestimmung der Stabilität von Taurolidin im Serum und Vollblut wurde Festsubstanz von Geistlich Pharma, Charge 41692/7 verwendet. Daraus wurden Stammlösungen von Taurolidin mit den Konzentrationen 100, 200 und 400  $\mu\text{g/ml}$  in aqua dest. hergestellt.

#### 3.3.2 Patienten

Die Untersuchungen zum Nachweis von Taurolidin im ex vivo Serum nach repetitiver Infusion wurden an 7 Patienten (3 männlich, 4 weiblich, mittleres Alter:  $48.4 \pm 12,8$  Jahre, von 27-66 Jahre) mit einem Glioblastom während der Infusionstherapie mit Taurolidin durchgeführt. Bei 4 Patienten wurden die Serumproben während eines Therapietages entnommen, bei 3 an 2 verschiedenen Therapietagen im Abstand von 7 Tagen, wobei die arithmetischen Mittelwerte der jeweiligen Werte für die Berechnungen verwendet wurden. Die Patienten erhielten pro Tag 4 Infusionen über je 2 Stunden mit einer Pause von jeweils einer Stunde. Die Tagesgesamtdosis an Taurolidin betrug 20 g.

#### 3.3.3 Entnahme und Aufarbeitung der Proben

Für die Serumproben wurden stündliche Blutentnahmen (8ml), beginnend unmittelbar vor der ersten Infusion, durchgeführt. Nach der Blutentnahme wurde jeweils innerhalb von 20 Minuten das Serum durch Zentrifugieren (Hermle, 3000 U/min, 5 min) gewonnen, in ein neues Röhrchen überführt und anschließend eingefroren und bei  $-80^\circ\text{C}$  bis zur Analyse aufbewahrt. Jede Probe enthielt 2-4 ml Serum.

Für die Urinproben wurde bei jedem Wasserlassen eine Probe von 10 ml entnommen, in ein steriles Röhrchen überführt, sofort eingefroren und bei  $-80^\circ\text{C}$  bis zur Analyse aufbewahrt.

#### 3.3.4 Nachweis von Taurolidin mit HPLC-MS

##### Allgemeines

Taurolidin und dessen Metabolite sind unter den "electrospray ionization - mass spectrometry" (ESI-MS) Bedingungen ( $\text{H}_2\text{O}/\text{acetonitril} + 0.05\% \text{HCOOH}$ ) nicht stabil. Deshalb wurde eine sensitive Quantifizierungsmethode von Taurultam und Taurinamid in Vollblut und Blutserum angewendet. Nach der Dansyl-Derivatisierung (Knight et al. 1981), wurden die Proben mittels HPLC (High-Performance-Liquid-Chromatography)-ESI-MS im "multiple reaction monitoring" (MRM) Modus untersucht. Dieser selektive und sensitive Ansatz erlaubt die Bestimmung der Taurolidinkonzentration aus den Taurultam und Taurinamid-Werten.

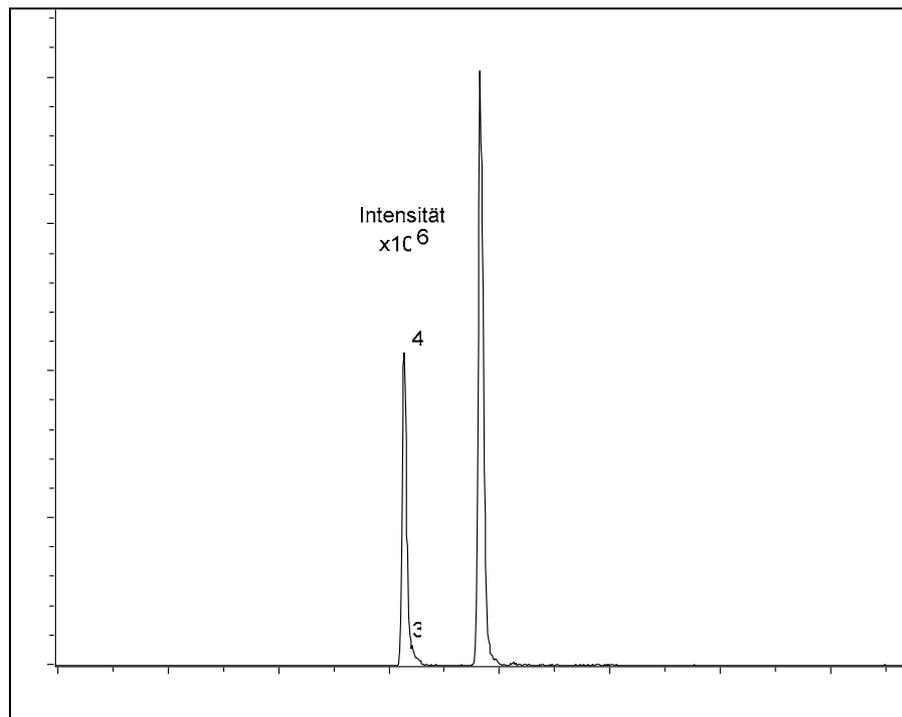
### Probenaufbereitung

Die Versuche mit HPLC-MS wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Prof.Dr. Hanns Möhler, Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Zürich und Prof.Dr. Laurant Bigler, Institut für Organische Chemie der Universität Zürich durchgeführt. Um den Quantifizierungsbereich der HPLC-MS Methode zu erreichen, wurden die Serumproben mit humanem Serum verdünnt (ex vivo Proben: Verdünnungsfaktor 2, 5 oder 10; in vitro Proben: Verdünnungsfaktor: 10). Fünf Milliliter Acetonitril wurden zu 1 ml der Serumprobe hinzugefügt und für 10 min bei 300 U/min geschüttelt. Nach der Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 3000 U/min (Eppendorf), wurde der Überstand in ein neues Röhrchen (Eppendorf) dekantiert und das Volumen unter einem N<sub>2</sub>-Strom (45 min, 45°C) auf etwa 2ml reduziert. Die Derivatisierung erfolgte durch Zusatz von 1mg Dansylchlorid, gelöst in 3ml Acetonitril. Nach dem Schütteln für 10 min bei 250 /min und Lagerung für 30 min bei Raumtemperatur, wurden 4 ml Dichlormethan hinzugefügt und die Röhrchen für weitere 10 Minuten bei 4 °C mit 300 /min geschüttelt. Nach der Zentrifugation (Eppendorf, 10 min bei 4°C und 3000 U/min), wurde die organische Schicht in ein neues Röhrchen transferiert und unter einem leichten Strom von N<sub>2</sub> (40 min, 45°C) getrocknet. Das getrocknete Material wurde dann in 0,5 ml Acetonitril rekonstituiert und 5 µl wurden für die HPLC-MS Analyse injiziert.

### Analyse

Die HPLC-Analyse wurde an einem Agilent 1100 System (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, U.S.A.) ausgestattet mit einer binären Pumpe und einem HTS PAL "autosampler" (CTC Analytics, Zwingen, Schweiz) durchgeführt. Chromatographische Bedingungen: Waters Symmetry C18 Säule (100-5 150 x 2.1mm); Flußrate 200 µl/min; Mobile Phase: linearer Gradient in 4 min von 10 bis 65% des Lösungsmittels B, dann isokratisch auf 65% auf Lösungsmittel B für weitere 4 min (Lösungsmittel A: 0.05% HCOOH Lösung in H<sub>2</sub>O; Lösungsmittel B: 0.05% HCOOH Lösung in Acetonitril).

Die ESI-MS Experimente im MRM-Modus wurden auf einem Bruker ESQUIRE-LC „quadrupole ion trap instrument“ (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Deutschland), ausgestattet mit einer kombinierten „Agilent Atmospheric Pressure Ion source“ (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, U.S.A.) durchgeführt. Der HPLC Ausgang war direct mit der ESI Ionenquelle verbunden. Die MS-Bedingungen waren: Vernebelungsgas (N<sub>2</sub>) 40 psi, Trocknungsgas (N<sub>2</sub>) 9 l/min, Trocknungstemperatur 300°C, HV Kapillare -4500 V, HV Endplatten-Offset -913 V, Kapillar-Ausgang 104 V, Skimmer I 30 V, und trap drive 35. Die MS/MS Messungen wurden bei normaler Auflösung durchgeführt (0.6 u bei halber Peak-Höhe), unter ion charge control (ICC) Bedingungen (10000). Für Taurinamid (Relaxationszeit 6.3 min) betrug die MS/MS Reaktion von  $[M+H]^+ = m/z 358$  z fragment ions  $m/z 170$  (scan range  $m/z 160 - 180$ ) und für Taurultam (Relaxationszeit 7.7 min):  $[M+H]^+ = m/z 370$  to  $m/z 289$  (scan range  $m/z 280 - 300$ ). Die Ionenchromatogramme (Bild 3.2) wurden für die Quantifizierung integriert (Taurinamid:  $m/z 170$ , Taurultam:  $m/z 289$ ).



**Bild 3.2** HPLC-ESI-MS einer humanen Serumprobe mit 100  $\mu\text{g/ml}$  Taurolidin. Die hohe Selektivität der Methode zur Quantifizierung von Taurultam und Taurinamid wird deutlich.

Taurinamid

Die Kalibrationsstandards ( $n = 7$ ) in einer Konzentration von 0.2 – 20  $\mu\text{g/ml}$  wurden durch Verdünnung entsprechender Volumina ( $< 5\%$  des Serumvolumens) von wässriger Taurultam oder Taurinamidlösung in humanem Serum hergestellt. Die Standards wurden in Röhrchen abgefüllt und bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  eingefroren.

Das Auftragen der gemessenen Werte im Diagramm gegen die Konzentration der Standards ergab die Kalibrationskurven. Weil Taurultam zu Taurinamid und Wasser abgebaut wird, musste die Taurultamkonzentration korrigiert werden (Bild 3.3).

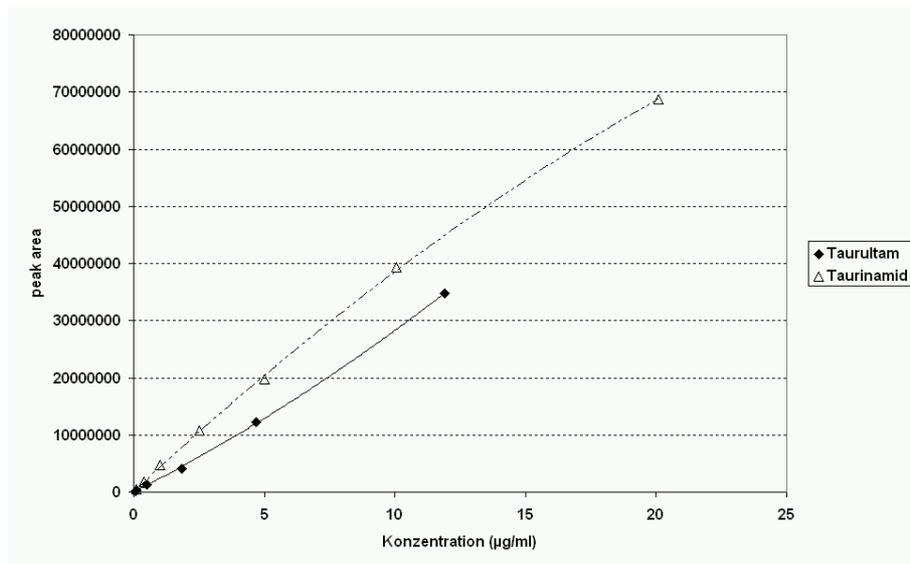
c

c

2

4

6



**Bild 3.3** Kalibrationskurve für die Bestimmung von Taurinamid und Taurultam in wässriger Lösung und in humanem Serum in einem Konzentrationsbereich von 0,2 – 20 µg/ml. Es besteht ein linearer Zusammenhang. Die Probenvolumina betragen 200 µl für die Messung in wässriger Lösung und 310 µl für die Messung in Humanserum wegen des Zusatzes der Lösungen für die Proteinfällung. Diese Differenzen erklären den unterschiedlichen Kurvenverlauf.

### Präzision des Nachweises von Taurultam und Taurinamid mittels HPLC-MS

Die Genauigkeit der Methode wurde bestimmt durch die Analyse von 2 Replikaten humaner Serumproben, die mit Taurinamid oder Taurultam in 3 verschiedenen Konzentrationen (0,2, 2,0 und 20 µg/ml) versetzt wurden, in zwei separaten Ansätzen (Tabelle 3.1).

**Tabelle 3.1** Präzision der HPLC-MS Methode.

	nominale Konzentration	CV <sup>a</sup>	ACC <sup>b</sup>
	(µg/ml)	(%) n = 4	(%) n = 4
<b>Taurinamid</b>	0.2	5.6	86
	2.0	2.4	98
	20.0	6.5	101
<b>Taurultam</b>	0.2	10.0	86
	2.0	8.4	95
	20.0	9.0	109

<sup>a</sup> Variationskoeffizient zwischen den Proben als Maß der Dispersion einer Wahrscheinlichkeitsverteilung

<sup>b</sup> Präzision (zwischen den Proben) in % der nominalen Konzentration

Die Konzentrationen von Taurolidin wurden als Summe der Taurultam und Taurinamid-Werte plus der noch entstehenden Reaktionsprodukte (Bild 3.1) berechnet.

### 3.3.5 Untersuchung der Stabilität von Taurolidin im Serum mit HPLC-MS

Vollblut (80 ml) wurde von einem gesunden Freiwilligen (R.S.) gewonnen und das Serum durch Zentrifugation bei 3000 /min für 5 Minuten (Hermle) extrahiert. Anschließend wurde Taurolidin zu einer Endkonzentration von 100  $\mu\text{g/ml}$  hinzugefügt. Danach erfolgte die Inkubation bei 37°C für 0, 5, 10, 20, 30, 60, 120, 240 oder 360 Minuten. Nach der Zentrifugation mit 3000 /min für 5 Minuten (Hermle) wurden die Proben sofort eingefroren und bei -80°C bis zur Analyse gelagert. Die weitere Aufbereitung der Proben und die Analyse erfolgten wie im Abschnitt „Nachweis von Taurolidin mit HPLC-MS“ beschrieben.

### 3.3.6 Untersuchung der Stabilität von Taurolidin im Vollblut mit HPLC-MS

Vollblut (80 ml) wurde von einem gesunden Freiwilligen (R.S.) gewonnen. Anschließend wurde Taurolidin bis zu einer Endkonzentration von 50 oder 100  $\mu\text{g/ml}$  hinzugefügt. Dann erfolgte die Inkubation bei 37°C für 0, 5, 10, 20, 30, 60, 120, 240 oder 360 min. Nach der Zentrifugation mit 3000 /min für 5 Minuten (Hermle) wurden die Proben sofort eingefroren und bei -80°C bis zur Analyse gelagert. Die weitere Aufbereitung der Proben und die Analyse erfolgten wie im Abschnitt „Nachweis von Taurolidin mit HPLC-MS“ beschrieben.

### 3.3.7 Nachweis von Taurolidin mit der colorimetrischen Reaktion

#### Probenaufbereitung

Um eine Beeinflussung der NASH-Reaktion durch die proteinhaltigen Seren zu vermeiden, wurde durch Fällung mit Ammoniumsulfat und Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS) ein proteinfreies Serum hergestellt. Zu 200  $\mu\text{l}$  desselben Serum wurden 0, 5, 10 bzw. 20  $\mu\text{g/ml}$  Taurolidin (interner Standard) zugegeben und anschließend mit 50  $\mu\text{l}$  SDS (20 %; wässrige Lösung) und 210-240 mg Ammoniumsulfat (100 %; Festsubstanz) (Endvolumen: 310  $\mu\text{l}$ , gesättigt mit Ammoniumsulfat) zur Fällung der Proteine gemischt. Nach dem Zentrifugieren wurde der klare Überstand zur Quantifizierung verwendet.

#### Interner Standard

Die Bestimmung von Taurolidin im proteinfreien Serum erfolgte über die Zugabe eines internen Standards von Taurolidin. Aliquots der Serumproben (200  $\mu\text{l}$ ) wurden vor der Proteinfällung mit verschiedenen Konzentrationen an Taurolidin (0,5, 10, 20  $\mu\text{g/ml}$ ) versetzt. Bei jeder Probe wurde die gesamte Konzentrationsreihe an internem Standard mit gemessen.

### **Colorimetrische Reaktion von Taurolidin mit NASH-Reagenz**

Die NASH-Reaktion beruht auf der Entwicklung einer gelben Färbung aus Methylenglykol mit Acetylaceton in Anwesenheit von Ammonium-Salzen (Nash 1952; Nash 1953). Proteinfreies Serum mit oder ohne Taurolidin (50  $\mu\text{l}$ ) wurde mit NASH-Reagenz (200  $\mu\text{l}$ , Zusammensetzung in wässriger Lösung: Ammoniumazetat 18 g/l, Essigsäure 0,38 ml/l, Acetylaceton 0,5 ml/l) gemischt, 30 min. bei 60 °C und danach 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Quantifizierung wurde die Reaktionslösung in einem Fotospektrometer bei 414 nm (Referenzwellenlänge 500 nm) ausgemessen und mittels einer Eichgeraden mit Taurolidin-Standards (0; 2,5; 5; 10; 20; 40; 80  $\mu\text{g/ml}$  in aqua dest.) berechnet. Bei den Serumproben wurde die Farbreaktion der Probe ohne internen Standard mit den Werten der Probe mit den internen Standards verglichen.

### **Überprüfung der Linearität des Assays nach der Aufarbeitung von humanem Serum**

Humanserum wurde mit Taurolidin (2,5; 5; 10; 20; 40; 80  $\mu\text{g/ml}$ ) versetzt und wie beschrieben aufgearbeitet.

### **Überprüfung der Linearität des Assays bei unterschiedlichen Anteilen an gesättigter Ammoniumsulfatlösung.**

Es wurde eine Taurolidinstandardreihe (2,5; 5; 10; 20; 40; und 80  $\mu\text{g/ml}$  aqua dest.) in Gegenwart von 16, 32, 64, 128, 256, oder 512  $\mu\text{l/ml}$  Assay mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung gemessen.

### **3.3.8 Bestimmung der Stabilität von Taurolidin im Serum mit der colorimetrischen Methode**

Dem Serum wurden vor und nach Aufarbeitung 60  $\mu\text{g/ml}$  Taurolidin zugesetzt und bei Raumtemperatur (25°C) für 0, 30, 60, 60, 120, bzw. 240 Minuten inkubiert und sofort aufgearbeitet und gemessen (Zugabe vor Aufarbeitung) oder nur gemessen (Zugabe nach Aufarbeitung).

Zur Berechnung des Verdünnungsfaktors bei der Aufbereitung von Serum wurden:

1. Aqua dest. mit 2,5; 5; 10; 20; 40 und 80  $\mu\text{g/ml}$  Taurolidin direkt gemessen.
2. Aqua dest. mit 2,5; 5; 10; 20; 40 und 80  $\mu\text{g/ml}$  Taurolidin nach Vorschrift aufgearbeitet und gemessen.
3. Aqua dest. nach Vorschrift aufgearbeitet und anschließend 2,5; 5; 10; 20; 40 und 80  $\mu\text{g/ml}$  Taurolidin zugesetzt und gemessen.
4. Serum nach Vorschrift aufgearbeitet und anschließend 2,5; 5; 10; 20; 40 und 80  $\mu\text{g/ml}$  Taurolidin zugesetzt und gemessen.

### **3.3.9 Bestimmung der Stabilität von Taurolidin im Vollblut mit der colorimetrischen Methode**

Dazu wurden A: Blut (ohne Citrat) mit 20  $\mu\text{g/g}$ , B: Blut (ohne Citrat) mit 120  $\mu\text{g/g}$  und C: Blut (mit Citrat) mit 120  $\mu\text{g/g}$  Taurolidin 0, 5, 10, 20, 30, 45 Minuten, sowie 1, 2, 4, 6, 24 und 48 Stunden

inkubiert (37°C). Nach der Inkubationszeit wurde das Blut bei 1900 x g und 4°C für 3 Minuten zentrifugiert, das Serum zur Taurolidinbestimmung eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

### 3.3.10 Einfluss des Povidons auf die colorimetrische Reaktion

Es wurde Taurolidin (50 µg/ml) in Povidonlösung (5 % in Wasser) verglichen mit einer wässrigen Lösung von Taurolidin in Wasser (50 µg/ml).

### 3.3.11 Berechnung pharmakokinetischer Parameter zur Beschreibung der repetitiven Infusion

Wegen des repetitiven Infusionsschemas (4 Infusionen mit je 2 Stunden Dauer und 1 Stunde Intervall) wurde eine Approximation des steady-state-Zustandes verwendet. Dieses wurde auf ein Zeitintervall von 10 Stunden, von der Stunde 2 bis zur Stunde 12 nach Infusionsbeginn, bezogen. Aus dem gleichen Grund wurden die Berechnungen ohne Anpassung an ein Kompartiment-Modell vorgenommen.

Die niedrigsten ( $C_{\min(2-12h)}^{SS}$ ) und höchsten ( $C_{\max(2-12h)}^{SS}$ ) beobachteten Taurolidin-Konzentrationen während des steady-state innerhalb des 10-Stunden-Intervalls, wurden von den individuellen Konzentrations-/Zeitkurven jedes Patienten bestimmt. Die Fläche unter der Kurve wurde mit Hilfe der Trapezformel in dem genannten Intervall ermittelt. Die mittlere Taurolidinkonzentration  $C_{av(2-12h)}^{SS}$  im steady-state wurde mit Hilfe der Formel 3.1 ermittelt.

$$C_{av(2-12h)}^{SS} = \frac{AUC_{(2-12h)}^{SS}}{\text{steady} - \text{state} - \text{interval}} \quad \text{Formel 3.1}$$

$C_{av(2-12h)}^{SS}$  = durchschnittliche Taurolidinkonzentration;  $AUC_{(2-12h)}^{SS}$  = area under the curve während des steady state; steady-state-interval = untersuchtes steady-state-Intervall (= 10 h)

Die peak trough flow fluctuation wurde nach der Formel 3.2 berechnet.

$$PTF_{(2-12h)}^{SS} = \frac{100 \cdot (C_{\max(2-12h)}^{SS} - C_{\min(2-12h)}^{SS})}{C_{av(2-12h)}^{SS}} \quad \text{Formel 3.2}$$

$PTF_{(2-12h)}^{SS}$  = peak trough flow fluctuation;  $C_{\max(2-12h)}^{SS}$  = höchste beobachtete Taurolidinkonzentration während des steady-state in dem beobachteten Zeitintervall;  $C_{\min(2-12h)}^{SS}$  = kleinste beobachtete Taurolidinkonzentration während des steady-state in dem beobachteten Zeitintervall.

Das Verteilungsvolumen im Rahmen des steady-state-Konzeptes wurde mit Hilfe der Formel 3.3 berechnet.

$$V_{D(2-12h)}^{SS} = \frac{\text{total dose administered}}{C_{\max(2-12h)}^{SS}}$$

**Formel 3.3**

$V_{D(2-12h)}^{SS}$  = Verteilungsvolumen für das betrachtete steady-state-Intervall [l]; total dose administered = verabreichte Gesamtdosis pro Tag (20 g);  $C_{\max(2-12h)}^{SS}$  = höchste beobachtete Taurolidinkonzentration während des steady-state in dem beobachteten Zeitintervall

Die Clearance im Rahmen des steady-state-Konzeptes wurde mit Hilfe der Formel 3.4 berechnet.

$$Cl_{(2-12h)}^{SS} = \frac{\text{total dose administered}}{AUC_{(2-12h)}^{SS}}$$

**Formel 3.4**

$Cl_{(2-12h)}^{SS}$  = Clearance im Rahmen des steady-state-Konzeptes [l/h]; total dose administered = verabreichte Gesamtdosis pro Tag (20 g);  $AUC_{(2-12h)}^{SS}$  = area under the curve während des steady state

Die Plasma-Halbwertszeit während der beobachteten 10stündigen steady-state-Phase wurde nach der Formel 3.5 bestimmt.

$$t_{\frac{1}{2}(2-12h)}^{SS} = \frac{\ln 2 \cdot V_{D(2-12h)}^{SS}}{Cl_{(2-12h)}^{SS}}$$

**Formel 3.5**

$t_{\frac{1}{2}(2-12h)}^{SS}$  = Plasma-Halbwertszeit während des approximierten 10-stündigen steady-state-Intervalls [h];  $\ln 2 = 0,693$ ;  $V_{D(2-12h)}^{SS}$  = Verteilungsvolumen für das betrachtete steady-state-Intervall [l];  $Cl_{(2-12h)}^{SS}$  = Clearance im Rahmen des steady-state-Konzeptes [l/h].

## 3.4 Ergebnisse

### 3.4.1 Nachweis von Taurolidin, Taurultam und Taurinamid mit HPLC-MS

Taurolidin konnte mit dieser Methode nicht direkt nachgewiesen werden. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass es sehr instabil ist und in wässriger Lösung vorwiegend in Form seiner Metabolite Taurultam und Taurinamid vorliegt (Knight *et al.* 1983b; Sihm *et al.* 1997b). Daher wurden Taurultam und Taurinamid bestimmt und Taurolidin als die Summe der beiden Metabolite und der anderen Reaktionsprodukte bestimmt. Daraus erhält man dann sogenannte „Taurolidinäquivalente“, die aber im Folgenden ohne nochmals darauf hinzuweisen, als Taurolidin bezeichnet werden.

#### Präzision des Nachweises von Taurultam und Taurinamid mittels HPLC-MS

Die Validierung des Meßverfahrens während der Studie erfolgte durch die Messung zweier Replikate humaner Serumproben, die mit Taurolidin bis zu einer Endkonzentration von 2.5 und 20.0  $\mu\text{g/ml}$

versetzt wurden in jedem Durchlauf. Die Konzentration von Taurolidin wurde dann rückgerechnet aus den Konzentrationen von Taurultam und Taurinamid (Tabelle 3.2).

**Tabelle 3.2** Within-study validation of the total taurolidine concentration

	<b>nominale Konzentration<sup>a</sup></b> ( $\mu\text{g/ml}$ )	<b>CV<sup>b</sup></b> (%) n = 6	<b>ACC<sup>c</sup></b> (%) n = 6
<b>ex vivo</b>	2.52	8.9	112
	18.1	8.5	107
<b>in vitro</b>	2.66	5.2	107
	19.1	6.1	115

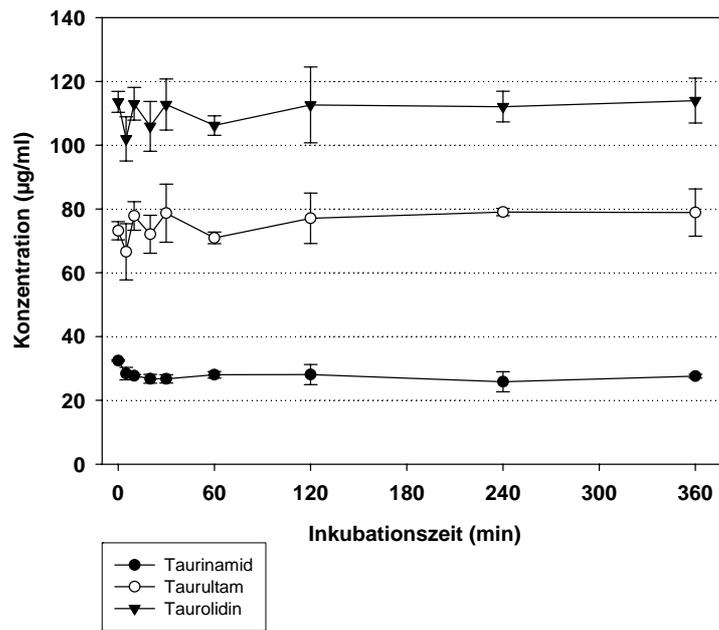
<sup>a</sup> nominale Taurolidin-Konzentration

<sup>b</sup> Variationskoeffizient zwischen den Proben als Maß der Dispersion einer Wahrscheinlichkeitsverteilung

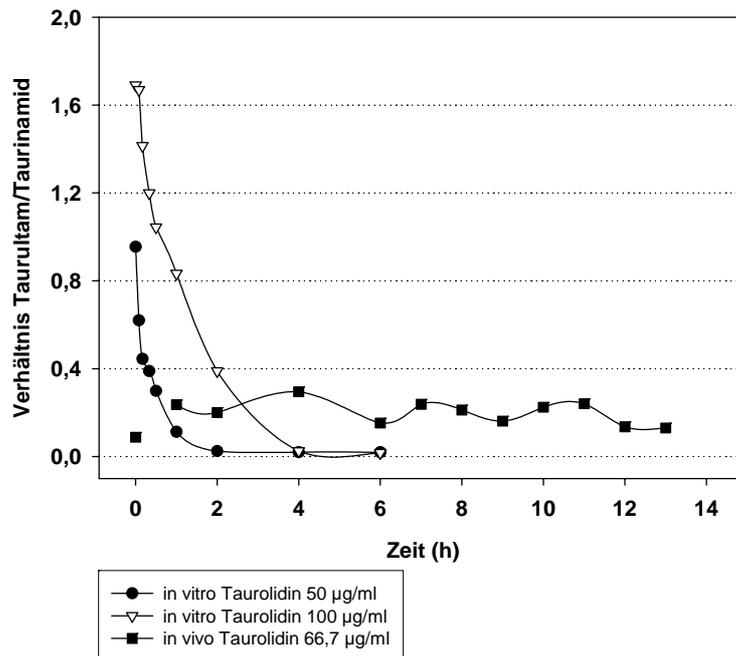
<sup>c</sup> Präzision (zwischen den Proben) in % der nominalen Konzentration

### 3.4.2 Untersuchung der Stabilität von Taurolidin im Serum mit HPLC-MS

Die Konzentrationen von Taurolidin, Taurultam and Taurinamid blieben nach Inkubation bei 37°C über einen 6-stündigen Zeitraum konstant (repeated-measures-Varianzanalyse, n.s.; Bild 3.4). Die Taurultam/Taurinamid-Ratio veränderte sich nicht statistisch signifikant während dieses Zeitraumes. (2.25 vs. 2.85; paired-t-test; n.s; Bild 3.5).



**Bild 3.4** Stabilität von Taurolidin, Taurultam und Taurinamid in menschlichem Serum bei 37 °C über 6 Stunden bei einer Ausgangskonzentration von 100 µg/ml. Die Konzentrationen verändern sich nicht statistisch signifikant während dieses Zeitraumes (repeated-measures-Varianzanalyse, n.s.).

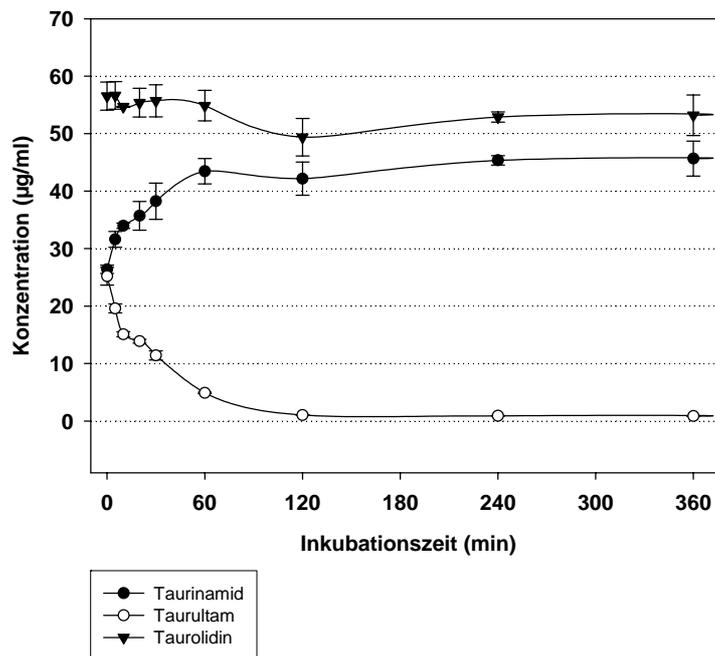


**Bild 3.5** Zeitlicher Verlauf der Taurultam/Taurinamide Ratio in Vollblut bei 2 verschiedenen Taurolidin-Ausgangskonzentrationen und während repetitiver intravenöser Infusionen bei 7 Patienten mit einem Glioblastom (mittlere Konzentration von Taurolidin 66,7 µg/ml).

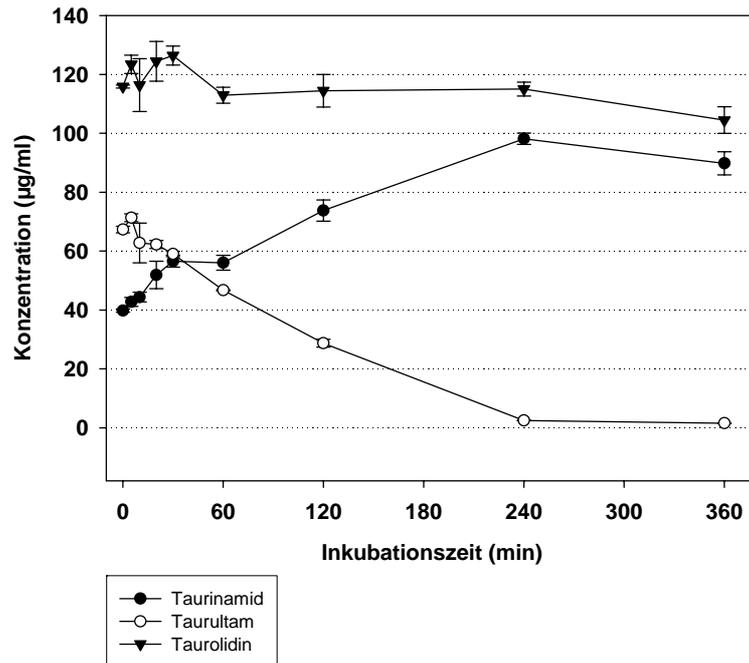
### 3.4.3 Untersuchung der Stabilität von Taurolidin im Vollblut mit HPLC-MS

Im Vollblut war ein Zeit- und konzentrationsabhängiger Abbau von Taurolidin zu beobachten. Unmittelbar nach der Inkubation des Vollblutes mit Taurolidin betrug die Taurultam/Taurinamid Ratio bei einer Taurolidin-Ausgangskonzentration von  $50\mu\text{g/ml}$  0,95 und bei einer Taurolidin-Ausgangskonzentration von  $100\mu\text{g/ml}$  1,69 (t-test;  $p < 0.05$ ) (Bild 3.5).

Während der Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  sank die Taurultam-Konzentration in derselben Weise wie die Taurinamid-Konzentration anstieg. Der Konzentrationsverlauf zeigte eine logarithmische Kinetik (Bild 3.6 und Bild 3.7).



**Bild 3.6** Stabilität von Taurolidin in humanem Vollblut während einer 6-stündigen Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  bei einer Ausgangskonzentration von  $50\mu\text{g/ml}$ .

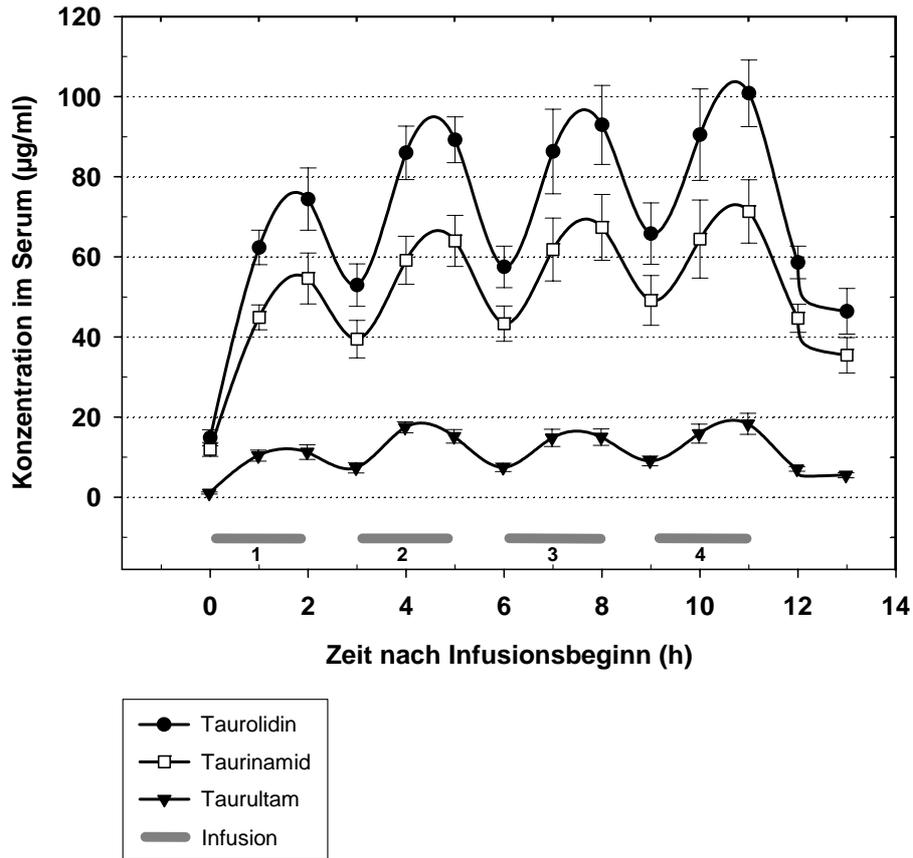


**Bild 3.7** Stabilität von Taurolidin in humanem Vollblut während einer 6-stündigen Inkubation bei 37°C bei einer Ausgangskonzentration von 100 µg/ml.

Nach 360 Minuten betrug die Taurultam/Taurinamid Ratio bei beiden Ausgangskonzentrationen nur noch 0,02 (t-Test, n.s.; Bild 3.5). Die Taurolidin-Konzentration blieb konstant bis der Anstieg des Taurinamid beendet war (Bild 3.6 und Bild 3.7).

#### 3.4.4 Nachweis von Taurolidin, Taurultam und Taurinamid während repetitiver Taurolidin-Infusionen

Die Serumkonzentrationen von Taurolidin, Taurultam und Taurinamid stiegen vom Beginn bis zum Ende jeder Taurolidininfusion an. Danach kam es zu einem raschen Abfall der Konzentrationen (Bild 3.8). Die Taurultam/Taurinamid Ratio fluktuierte zwischen 0,1 und 0,3 abhängig von der zeitlichen Beziehung zur vorherigen oder nächsten Infusion (Bild 3.5). Taurolidin und Taurinamid zeigten im Gegensatz zu Taurultam eine moderate Kumulation über die 12-stündige Meßperiode (Bild 3.8).



**Bild 3.8** Serumkonzentrationen von Taulolidin, Taurultam und Taurinamid während 4 repetitiver intravenöser Taulolidin-Infusionen (Mittelwerte von 7 Patienten und standard error of means) Die Infusionen wurden über einen Zeitraum von je 2 Stunden mit einer 1-stündigen Pause zwischen den Infusionen durchgeführt.

### 3.4.5 Pharmakokinetische Parameter von Taulolidin, Taurultam und Taurinamid

Die pharmakokinetischen Parameter von Taulolidin, Taurultam und Taurinamid sind in der Tabelle 3.3 zusammengefasst.

**Tabelle 3.3** Die pharmakokinetischen Parameter von Taurolidin, Taurultam und Taurinamid wurden aus den Daten von 7 Patienten errechnet, denen 4 Infusionen mit Taurolidin 2% pro Tag intravenös appliziert wurden.

Parameter	Taurolidin	Taurultam	Taurinamid
	Mittelwert $\pm$ SD <sup>a</sup>		
<sup>b</sup> $C_{\max(2-12h)}^{SS}$ [ $\mu\text{g/ml}$ ]	101.2 $\pm$ 19.8	20.0 $\pm$ 6.4	72.6 $\pm$ 18.7
<sup>c</sup> $C_{av(2-12h)}^{SS}$ [ $\mu\text{g/ml}$ ]	66.7 $\pm$ 20.2	11.0 $\pm$ 3.8	51.1 $\pm$ 17.4
<sup>d</sup> $C_{\min(2-12h)}^{SS}$ [ $\mu\text{g/ml}$ ]	44.8 $\pm$ 12.5	5.4 $\pm$ 2.5	34.1 $\pm$ 10.8
<sup>e</sup> $t_{\frac{1}{2}}^{SS(2-12h)}$ [h]	4.5 $\pm$ 0.9	3.9 $\pm$ 0.9	4.9 $\pm$ 0.6
<sup>f</sup> $AUC_{(2-12h)}^{SS}$ [ $\mu\text{g h/ml}$ ]	683.6 $\pm$ 232.6	111.3 $\pm$ 37.4	510.6 $\pm$ 174.2
<sup>g</sup> $PTF_{(2-12h)}^{SS}$ [%]	91.9 $\pm$ 33.0	142.8 $\pm$ 51.2	78.9 $\pm$ 19.2
<sup>h</sup> $V_D^{SS(2-12h)}$ [l]	197.7 $\pm$ 45.6	1129.5 $\pm$ 507.4	293.6 $\pm$ 80.3
<sup>i</sup> $Cl_{(2-12h)}^{SS}$ [l/h]	33.5 $\pm$ 14.2	212.2 $\pm$ 121.7	42.9 $\pm$ 15.0

- <sup>a</sup> Standardabweichung  
<sup>b</sup> mittlere maximale Serumkonzentration  
<sup>c</sup> durchschnittliche mittlere Serumkonzentration  
<sup>d</sup> mittlere minimale Serumkonzentration  
<sup>e</sup> mittlere Halbwertszeit  
<sup>f</sup> area under the curve  
<sup>g</sup> peak trough flow fluctuation  
<sup>h</sup> mittleres Verteilungsvolumen  
<sup>i</sup> Clearance

### 3.4.6 Nachweis von Taurolidin mit Hilfe der colorimetrischen Reaktion

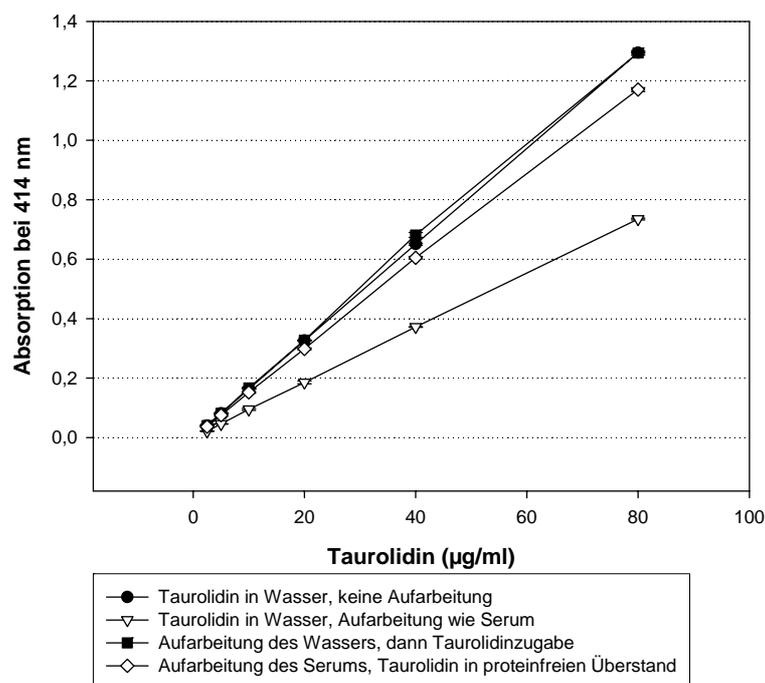
Taurolidin kann mit dieser Methode nicht direkt nachgewiesen werden. Sie kann lediglich die Summe der einiger Metabolite nachweisen. Diese werden jedoch im folgenden als „Taurolidin“ bezeichnet, ohne nochmals darauf hinzuweisen.

#### Überprüfung der Linearität des Assays nach der Aufarbeitung von Humanserum

Die Linearität der Farbreaktion von Taurolidin mit NASH-Reagenz wurde weder durch die Bestimmung in proteinhaltigen Proben wie Blutplasma (nach Fällung der Proteine) noch durch das zugesetzte Ammoniumsulfat beeinträchtigt (Bild 3.10, Bild 3.11). Nur bei 512  $\mu\text{l}$  gesättigter Ammoniumsulfatlösung in 1 ml Assay war die Linearität lediglich bis zu einer Taurolidinkonzentration von 40  $\mu\text{g/ml}$  Wasser gegeben (Bild 3.11).

#### Berechnung des Verdünnungsfaktors während der Aufarbeitung von Plasma

Vergleicht man die Werte der Taurolidin-Verdünnungsreihe in Wasser (direkt gemessen) mit einer Verdünnungsreihe in aufgearbeitetem Wasser (nach Vorschrift), so sind diese Werte identisch. Das heisst, dass die Zugabe von SDS,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  und Ammoniumsulfat auf die Farbreaktion mit NASH-Reagenz keinen Einfluss hat. Nimmt man zum Vergleich die Werte von nach Vorschrift aufgearbeitetem Plasma mit nachträglich zugesetztem Taurolidin, so erkennt man, dass diese Werte um ca. 10 % tiefer lagen, was eventuell auf vorhandene Amine und Aminosäuren zurückzuführen ist (Bild 3.9).



**Bild 3.9** Absorptionswerte bei verschiedenen Taurolidinkonzentrationen in Abhängigkeit von der Aufarbeitung der Proben.

Vergleicht man nun die Werte der wässrigen Standardreihe, bei der das Taurolidin vor der Aufarbeitung zugesetzt wurde, zeigt sich eine Differenz von ca. 44 % (Bild 3.9), die aus der Verdünnung durch den Zusatz von SDS,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  und Ammoniumsulfat resultiert.

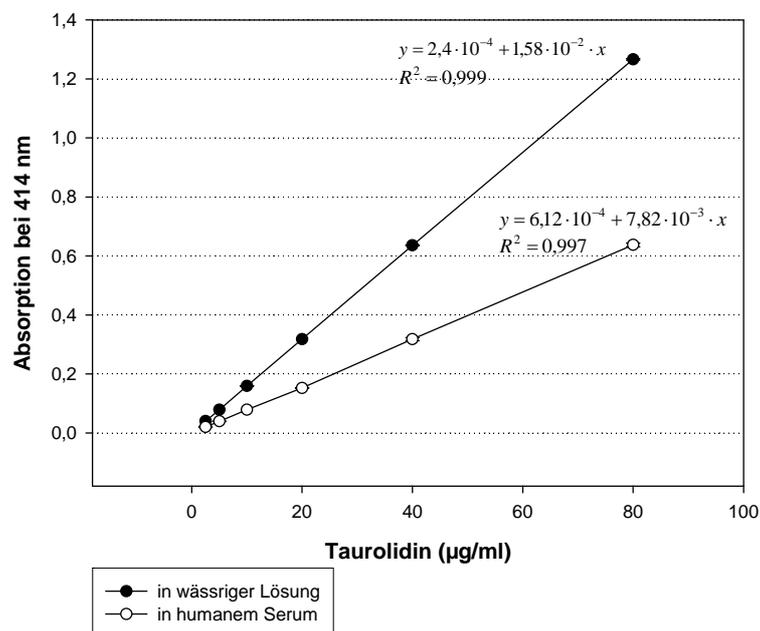
Es hatte sich gezeigt, dass die Farbreaktion mit Serumproben um einen Faktor zwei kleiner ist als in rein wässriger Lösung. Aus diesem Grund werden dem Serum noch interne Taurolidinstandards (5, 10 und 20  $\mu\text{g/ml}$ ) zugegeben.

### Bestimmung von Taurolidin mit NASH-Reagenz in wässriger Lösung

Die Bestimmung von Taurolidin in einer wässrigen Lösung mit Hilfe des NASH-Reagenz ergibt eine lineare Dosis-Wirkungskurve im Bereich von 2,5-80  $\mu\text{g}$  Taurolidin/ml Probe (Bild 3.10). Damit erweist sich die NASH-Reagenz Reaktion als lineare Nachweismethode für Taurolidin in einem breiten Messbereich.

### Bestimmung von Taurolidin mit NASH-Reagenz in Kontrollserum

Serum (200  $\mu\text{l}$ ) einer Kontrollperson (R.S.) wurde mit Taurolidin (2,5; 5; 10; 20; 40; 80  $\mu\text{g/ml}$  Serum) versetzt und wie beschrieben zu proteinfreiem Serum aufgearbeitet. Im proteinfreien Serum ergab sich eine lineare Dosis-Wirkungsbeziehung im Bereich von 2,5-80  $\mu\text{g}$  Taurolidin/ml Serum (Bild 3.10).



**Bild 3.10** Eichgeraden für die Bestimmung von Taurolidin in wässriger Lösung und im proteinfreien Humanserum. Es ergibt sich eine lineare Beziehung. Das Testvolumen für die Messung in wässriger Lösung betrug 200  $\mu\text{l}$ , bei der Messung in Humanserum, bedingt durch die Reagenzien zur Proteinfällung 310  $\mu\text{l}$ . Dies erklärt den unterschiedlichen Geradenverlauf.

Im Vergleich zu der Eichgeraden mit Taurolidin in einer wässrigen Lösung war die Färbintensität jedoch auf Grund des Verdünnungsfaktors geringer. Durch Zugabe der Reagentien und des internen Standards erhöht sich das Probenvolumen von 200  $\mu\text{l}$  (Serum) auf ein Endvolumen von 310  $\mu\text{l}$  mit

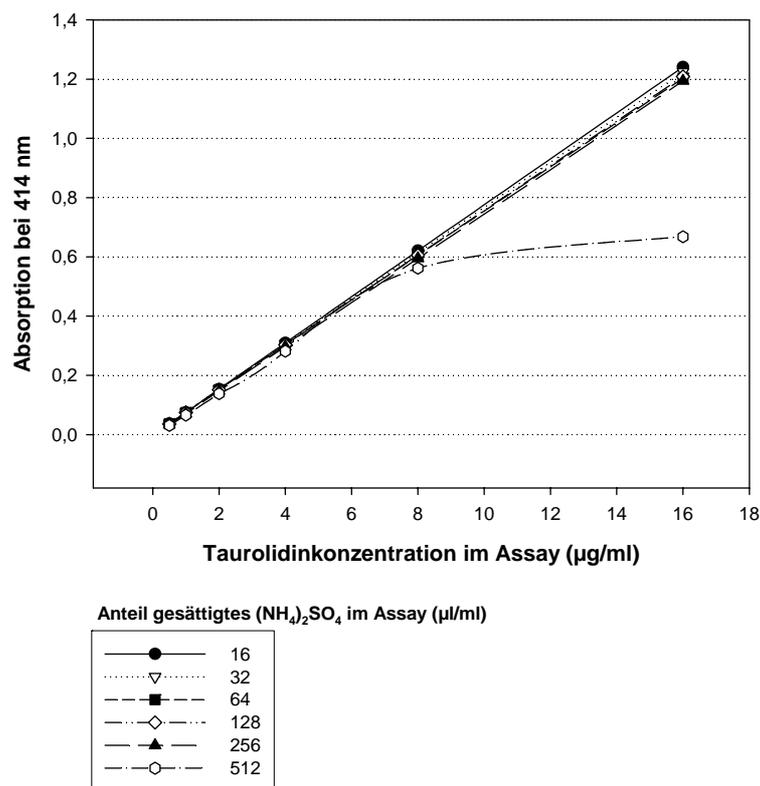
konsekutiver Reduktion des Meßsignals (Bild 3.10). Da der Verdünnungseffekt jedoch auch für den internen Standard an Taurolidin gilt, ist die Messung von Taurolidin im Serum mittels des internen Standards von Taurolidin ein korrektes Verfahren.

### Einfluss des Povidons auf die Farbreaktion mit dem NASH-Reagenz

Das Povidon hatte bis zu einer Konzentration von 5 % in der wässrigen Probe keinen Einfluss auf die Farbreaktion.

### Überprüfung der NASH-Reaktion bei erhöhter Ammonium-Salz Konzentration

Die NASH-Reaktion beinhaltet den Zusatz von Ammonium-Salzen. Bei der Aufarbeitung der Serumproben wird für die Proteinfällung jedoch eine höhere Konzentration von Ammonium-Salzen eingesetzt, als im NASH-Reagenz vorgesehen. Es wurde daher überprüft, ob die höheren Konzentrationsbereiche von Ammoniumsulfat die lineare Dosis Wirkungskurve für die Taurolidin-Bestimmung mit NASH-Reagenz in wässriger Lösung beeinflussen. Es zeigte sich, dass eine Varianz von Ammonsulfat in einem breiten Bereich (16 bis 256  $\mu\text{l/ml}$ ) denselben Absorptionswert im NASH-Reagenz-Test ergibt (Bild 3.11).



**Bild 3.11** Absorptionswerte bei verschiedenen Taurolidinkonzentrationen in Abhängigkeit von der Ammoniumsalzkonzentration. Bis zu einer Ammoniumsalzkonzentration von 256  $\mu\text{l/ml}$  zeigen sich keine signifikanten Unterschiede in den gemessenen Absorptionswerten.

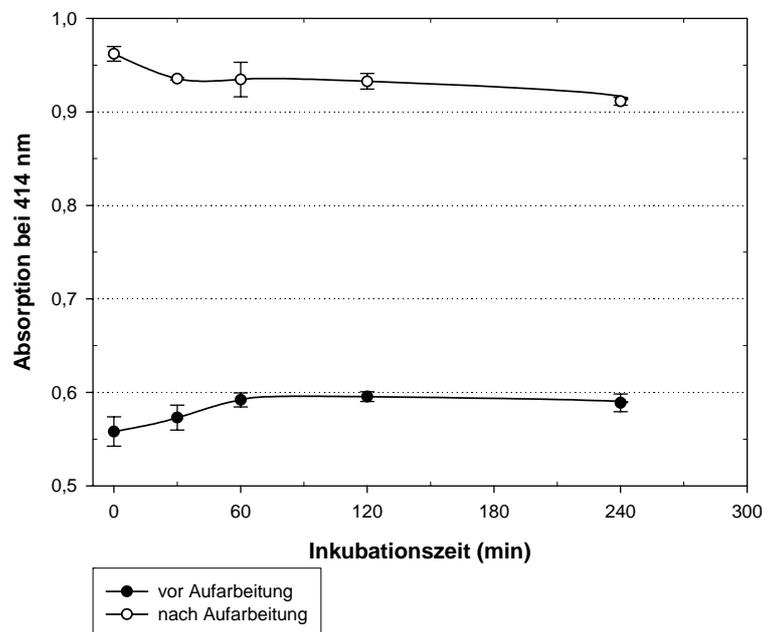
Daher wurde eine Ammoniumsulfat-Konzentration von 256  $\mu\text{l/ml}$  für den Test eingesetzt.

### Minimale Interferenzen der Reagentien der Proteinfällung mit der NASH-Reaktion

Die proteinfreien Serumproben enthalten Komponenten, die zur Fällung des Proteins eingesetzt worden waren. Es musste daher sichergestellt werden, dass keine Interferenzen mit der NASH-Reaktion auftritt. Der Zusatz von Taurolidin zu proteinfreiem Serum ( $200 \mu\text{l}$ ) ergab nahezu dieselbe Eichkurve wie beim Zusatz von Taurolidin zu einer wässrigen Lösung (Bild 3.10). Lediglich die Steigung der Eichkurve war geringer. Durch die Verwendung von internen Taurolidin-Standards wird diese Änderung in die Messung einbezogen.

#### 3.4.7 Untersuchung der Stabilität von Taurolidin im Serum mit der colorimetrischen Methode

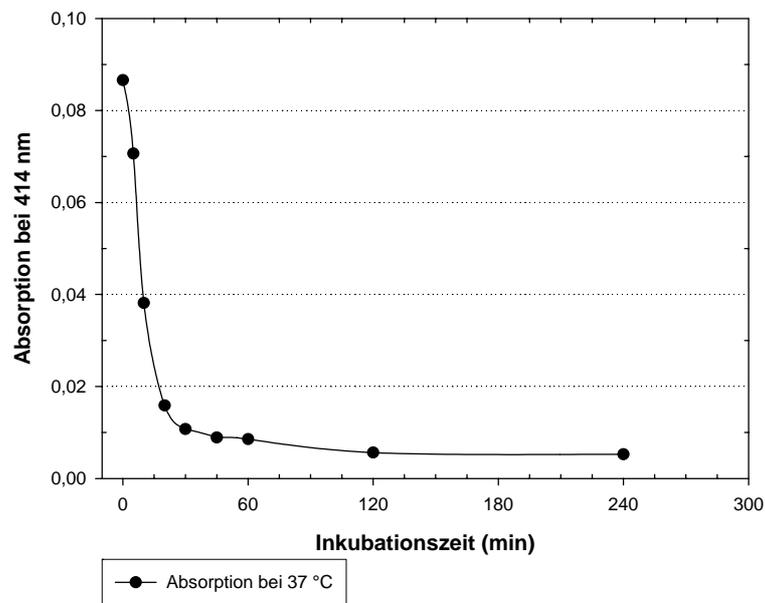
Taurolidin in einer Konzentration von  $120 \mu\text{g/ml}$  wurde für 0, 30, 60, 120 und 240 Minuten in proteinfreiem Serum eines Freiwilligen (R.S.) inkubiert vor der Bestimmung mit NASH Reagenz. Im Zeitraum von 4h ergab sich nur eine marginale, nicht signifikante Abnahme (etwa 5 %) der Absorption bei  $414 \text{ nm}$  (Bild 3.12). Ein vergleichbarer Befund ergab sich, wenn Taurolidin zum Serum hinzugegeben wurde und das proteinfreie Serum nach 0, 30, 60, 120 und 240 Minuten präpariert wurde. Es ergab sich keine Abnahme des Messsignals über die Zeit. Der Verdünnungsfaktor im Test führte jedoch zu einem geringeren absoluten Absorptionswert im Vergleich zu dem ersten Versuch (Bild 3.12).



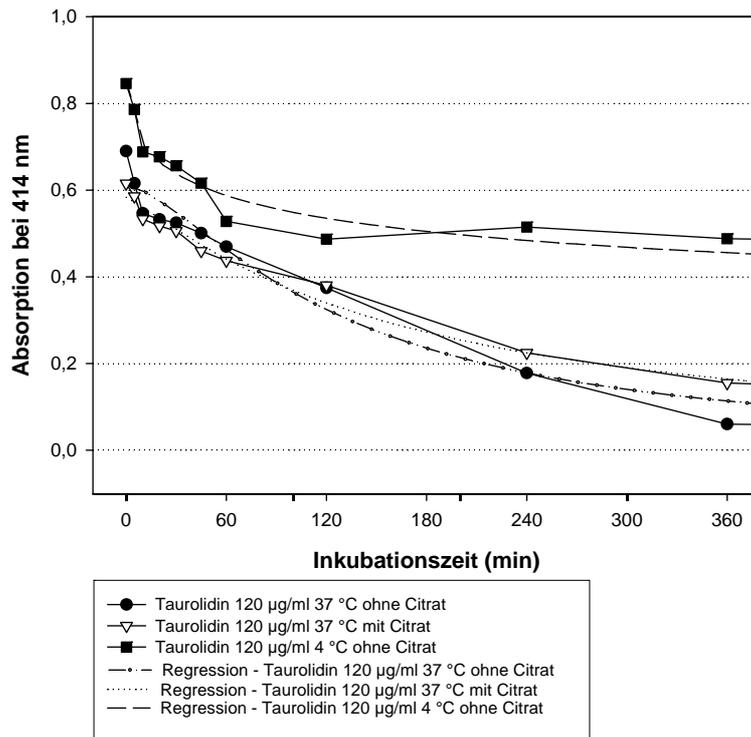
**Bild 3.12** Stabilität von Taurolidin in proteinfreiem Humanserum während 4 Stunden. Es zeigt sich keine wesentliche Reduktion der Absorption unabhängig davon ob Taurolidin vor oder nach der Präparation zu proteinfreiem Serum zugegeben wurde. Der unterschiedliche absolute Absorptionswert in beiden Fällen ergibt sich aus den unterschiedlichen Endvolumina im Test.

### 3.4.8 Untersuchung der Stabilität von Taurolidin in Vollblut mit der colorimetrischen Methode

Es wurde das Blut eines Freiwilligen (R.S.) verwendet. Nach Zugabe von Taurolidin in einer Ausgangskonzentration von  $20 \mu\text{g/ml}$  reduzierte sich die Absorption in den ersten 20 min auf ca. 10 % des Ausgangswertes (Bild 3.13). Bei einer Ausgangskonzentration von  $120 \mu\text{g/ml}$  trat eine Reduktion um ca. 20 % ein (Bild 3.14).



**Bild 3.13** Zeitlicher Verlauf des Abbaus von Taurolidin im Vollblut bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  und einer Ausgangskonzentration von  $20 \mu\text{g/ml}$ .



**Bild 3.14** Zeitlicher Verlauf des Abbaus von Taurolidin im Vollblut bei einer Ausgangskonzentration von 120 µg/ml mit und ohne Citratzusatz und Regressionsanalyse der Abbaukurven. Bei 37 °C zeigt sich im Vergleich zu 4 °C ein deutlich beschleunigter Abbau.

Die Geschwindigkeit des Abbaus war stark temperaturabhängig (Bild 3.14). Der Zusatz von Citrat hatte keinen Einfluß auf die Geschwindigkeit des Taurolidin-Abbaus (Bild 3.14).

Das Abbauverhalten konnte mittels Regressionsanalyse durch die Formel 3.6

$$y = \min + \frac{\max - \min}{1 + 10^{(\log a - x)b}} \quad \text{Formel 3.6}$$

mit hoher Genauigkeit beschrieben werden. Die entsprechenden Parameter sind in der Tabelle 3.4 aufgeführt.

**Tabelle 3.4** Parameter der Regressionsanalyse für den Abbau von Taurolidin im Vollblut (SD=Standardabweichung)

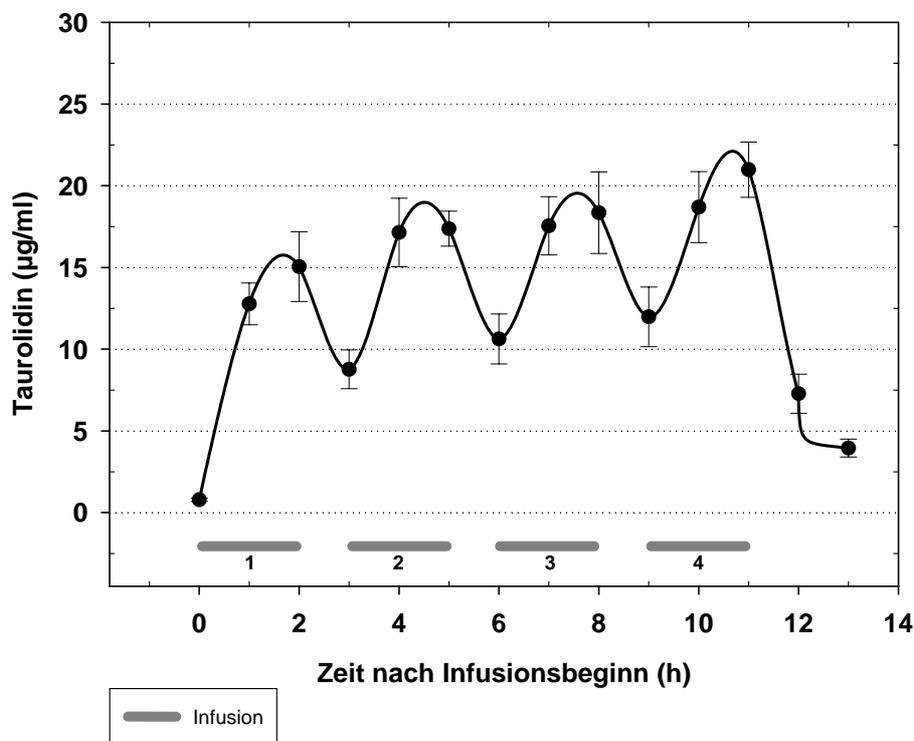
Taurolidin	120 µg/ml		
	37 °C	37 °C	4 °C
Temperatur	37 °C	37 °C	4 °C
Citrat	ohne	mit	ohne
min ± SD	$2,1 \cdot 10^{-10} \pm 3,9 \cdot 10^{-2}$	$4,0 \cdot 10^{-10} \pm 2,8 \cdot 10^{-2}$	$0,25 \pm 0,1$
max ± SD	$0,6 \pm 0,03$	$0,58 \pm 0,02$	$0,86 \pm 0,05$
a ± SD	$130 \pm 23,5$	$160 \pm 22$	$910 \pm 919$
b ± SD	$1,5 \pm 0,3$	$1,2 \pm 0,2$	$0,51 \pm 0,2$
R <sup>2</sup>	0,975	0,990	0,938

### Minimale NASH-Reaktions-Färbung im Serum von Kontrollpersonen

Im proteinfreien Serum von unbehandelten Kontrollpersonen trat nur eine schwache NASH-Reagenz-Färbung auf. Sie entsprach einem Taurolidin-Äquivalent von weniger als 0,5 µg/ml.

#### 3.4.9 Bestimmung von Taurolidin im Serum von Patienten nach repetitiver Infusion mit der colorimetrischen Methode

Serumproben, die stündlich abgenommen worden waren, wurden von 10 Patienten mit einem Glioblastom gewonnen. Es ergaben sich starke Anstiege der Konzentration nach Beginn der jeweiligen Infusionsperioden. Der Anstieg der Konzentration setzte sich bis zum Ende der Infusionsperiode fort. Dann fiel die Konzentration rasch ab. Die intermittierenden Infusionen spiegelten sich in der auf- und abschwelenden Serumkonzentration wider (Bild 3.15).



**Bild 3.15** Serumspiegel von Taurolidin während 4 intermittierender Taurolidin-Infusionen (Mittelwerte von 10 Patienten). Die Infusionen wurden über einen Zeitraum von jeweils 2 Stunden mit einer Pause von 1 Stunde appliziert. Der Serumspiegel liegt im zytotoxisch wirksamen Konzentrationsbereich.

Die Serumprobe vor der ersten Infusion ergab nur eine sehr geringe NASH-Reaktions-Färbung (Bild 3.15). Insgesamt ergab sich nach mehreren Infusionen eine Zunahme der Blutspiegelmaxima, was auf eine leichte Kumulation hindeutet.

#### 3.4.10 Vergleich der Bestimmungsmethoden

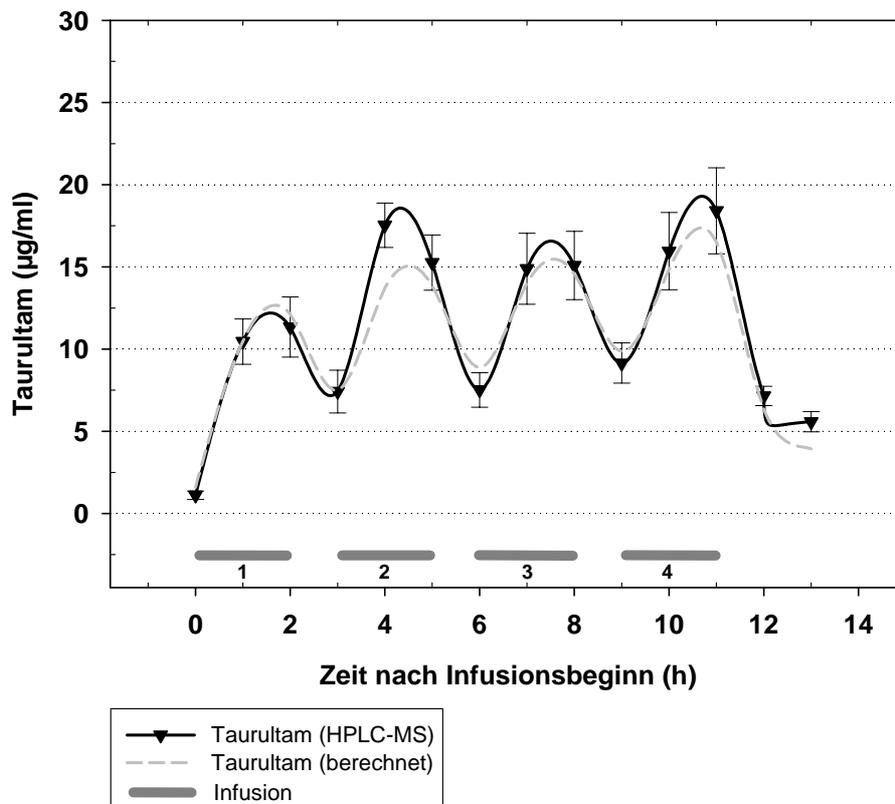
Die Taurolidin-Serumkonzentrationen nach repetitiver Infusion von Taurolidin waren bei Messung nach der colorimetrischen Methode deutlich geringer als bei der HPLC-MS-Bestimmung. Auffällig ist, dass sich die Messwerte bei den Abbauversuchen im Vollblut (Bild 3.6, Bild 3.7, Bild 3.13, Bild 3.14)

verhalten wie die des Taurultam, das mit der HPLC-MS Methode gemessen wurde (Bild 3.8). Lediglich die Konzentration liegt bei der colorimetrischen Methode etwas höher. So liegt die Möglichkeit nahe, dass bei der colorimetrischen Methode primär das Taurultam als aktiver Metabolit gemessen wird, evtl. als Summe mit einem weiteren Metaboliten in deutlich geringerer Konzentration. Dabei kann es sich, zieht man das Abbauverhalten im Vollblut in Betracht, nicht um Taurinamid handeln. Mit anderen Worten, die colorimetrische Methode bestimmt hauptsächlich das Taurultam. In der Tat besteht eine sehr gute Korrelation zwischen der Taurultam-Konzentration, die mit der HPLC-MS Methode gemessen wurde, und den Werten der colorimetrischen Bestimmung (Pearson-Rank-Test;  $p < 0,0001$ ; Spearman-Rank-Order-Test;  $p < 0,0001$  Korrelationskoeffizient = 0,968). Mit Hilfe einer linearen Regression (Formel 3.7) konnten daher die Taurultam-Konzentrationen, die bei der HPLC-MS Methode bestimmt wurden, mit sehr guter Genauigkeit ( $r = 0,968$ ,  $r^2 = 0,938$ ) aus den Werten der colorimetrischen Messung angenähert werden (Bild 3.16).

$$C_{HPLC-MS} = 1,002 + (0,74 \cdot C_{col})$$

**Formel 3.7**

$C_{HPLC-MS}$  = Konzentration, bestimmt mit der HPLC-MS ( $\mu\text{g/ml}$ ) Methode;  $C_{col}$  = Konzentration, bestimmt mit der colorimetrischen Reaktion [ $\mu\text{g/ml}$ ]



**Bild 3.16** Mit Hilfe der Ergebnisse der colorimetrischen Methode lassen sich die Taurultam-Konzentrationen, die mit der HPLC-MS Methode gemessen wurden, mit hoher Genauigkeit annähern. Die nach der Berechnung erhaltenen Werte unterscheiden sich nicht statistisch signifikant von den mit der HPLC-MS Methode bestimmten (t-Test;  $p = 0,994$ ).

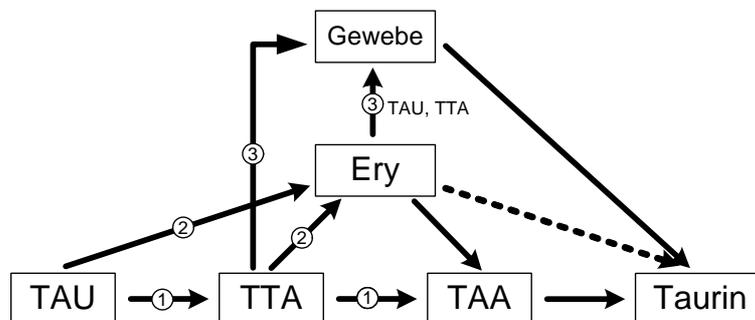
### 3.5 Diskussion

Taurolidin befindet sich in wäßriger Lösung im Gleichgewicht mit den Metaboliten N-Hydroxymethyl-Taurultam und Taurultam (Knight *et al.* 1983b; Sihm *et al.* 1997b)(Figures 6, 7). Diese sind aktive Metaboliten hinsichtlich des anti-neoplastischen Effektes von Taurolidin (Stendel *et al.* 2001; Stendel *et al.* 2004c; Stendel *et al.* 2006). Die Mechanismen der antineoplastischen Wirkung von Taurolidin und seiner Metabolite/Derivate wurde im Kapitel 2 ausführlich erläutert.

Die antibakterielle Wirkung von Taurolidin beruht hingegen auf der raschen Metabolisierung zu Taurultam und Taurinamid unter Bildung der entsprechenden N-Hydroxymethyl-Derivate (Knight *et al.* 1981) (Bild 3.1). Diese sind in der Lage, Hydroxymethyl-Gruppen zu übertragen und bilden damit die reaktiven Derivate des Taurolidin hinsichtlich des antibakteriellen Effektes (Wicki und Pffirman 1979) (Abschnitt 1.2.2; Bild 1.3).

Die Ergebnisse der jetzigen Untersuchung zeigen, daß Taurolidin in proteinfreiem Serum ebenfalls in Form seiner Metabolite Taurultam und Taurinamid vorliegt. Diese, und damit auch die "Taurolidin-Konzentration" sind stabil über einen 6-stündigen Inkubationszeitraum.

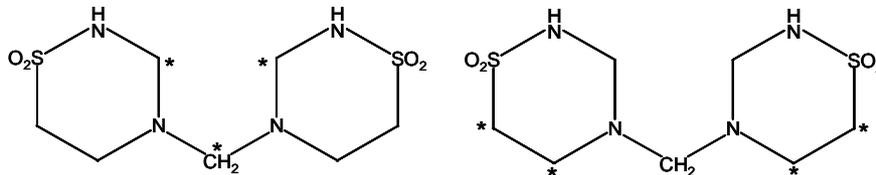
Im Vollblut findet ein Zeit-, Konzentrations- und temperaturabhängiger Abbau des Taurultams unter Bildung von Taurinamid statt. Damit bleibt die Summe der beiden nahezu konstant und die "Taurolidin-Konzentration" auch. Die Resultate der vorliegenden Untersuchung lassen den Schluß zu, dass 2 Phasen des Taurolidinabbaus im Vollblut unterschieden werden können (Bild 3.17).



**Bild 3.17** Pharmakokinetik von Taurolidin. In wäßriger Lösung und im Serum liegt Taurolidin hauptsächlich in Form seiner Metabolite Taurultam und Taurinamid vor, deren Konzentrationen konstant bleiben (Weg 1). Im Vollblut bilden die Bindung an die Erythrozyten und der beginnende Abbau die erste Phase, gefolgt von einer langsameren zweiten Phase mit enzymatischem Abbau von Taurultam zu Taurinamid (Weg 2). In vivo warden Taurolidin und Taurultam zusätzlich direkt und über die Erythrozyten an das Gewebe abgegeben und dort metabolisiert (Weg 3).

Während der ersten Phase wird Taurolidin an die Erythrozyten gebunden und sehr schnell zu Taurultam und nachfolgend Taurinamid metabolisiert. Die Daten lassen die Hypothese zu, dass etwa 9 µg Tauroidine und 6 µg Taurultam pro Milliliter Blut gebunden werden. Eine kompetitive Bindung an Plasmaproteine ist anhand der Ergebnisse von Experimenten mit radioaktiv markiertem Taurolidin (Steinbach-Lebbin *et al.* 1982) unwahrscheinlich. Dabei wurden Lösungen verschiedener

Konzentration an Taurolidin mit radioaktiv markiertem Taurinamidanteils ( $4^*T$ ) nach der Methode von Scholtan (Scholtan und Schmid 1962) gegen humanes Blutplasma dialysiert. Eine Bindung an Plasmaproteine konnte nicht nachgewiesen werden (Steinbach-Lebbin et al. 1982). Waser et al. (Waser et al. 1985) führten neben Experimenten mit  $4^*T$  auch Versuche mit am Hydroxymethylbereich radioaktiv markiertem Taurolidin ( $3^*T$ ) durch (Bild 3.18).



**Bild 3.18** Taurolidin wurde im Bereich der Hydroxymethylgruppen (links;  $3^*T$ ), bzw. am Taurinamid-Anteil (rechts;  $4^*T$ ) mit  $^{14}C$  radioaktiv markiert, um die Pharmakokinetik zu untersuchen. Nach Steinbach-Lebbin et al. (Steinbach-Lebbin et al. 1982) und Waser et al. (Waser et al. 1985).

Aus dem unterschiedlichen Bindungsverhalten von  $3^*T$  und  $4^*T$  an Plasmaproteine wurde gefolgert, dass Taurolidin selbst nicht an Plasmaproteine gebunden wird, aber bei niedrigem Plasmaspiegel eine reversible Übertragung von Hydroxymethylgruppen auf die Plasmaproteine stattfinden kann (Waser et al. 1985). Der Metabolismus während der ersten Phase hängt von der Ausgangskonzentration des Taurolidins ab. Die zweite Phase, bei der es wahrscheinlich zu einem enzymatischen Abbau kommt, ist charakterisiert durch einen nahezu linearen Abbau. Diese zweite Phase läuft wesentlich langsamer ab als die erste. In vivo kommt es schließlich zum Abbau des Taurinamids zu Taurin. Dieser Schritt bewirkt dann auch eine Veränderung der „Taurolidinkonzentration“ (Bild 3.8).

In der vorliegenden Studie wurde die Pharmakokinetik von Taurolidin im Serum von Patienten während repetitiver Taurolidin-Infusionen untersucht. Dieses Infusionsregime wird durch die steigenden und fallenden Serumkonzentrationen von Taurolidin und seinen Metaboliten abgebildet. Die Serumkonzentrationen von Taurolidin und Taurultam während der repetitiven Infusionen liegen im antineoplastisch wirksamen Konzentrationsbereich (Calabresi et al. 2001; Stendel et al. 2002c; Stendel et al. 2003b). Die realen Serumkonzentrationen sind wahrscheinlich noch höher, weil einige Verzögerung von der Blutentnahme bis zur Aufbereitung und zum Einfrieren der Proben unvermeidbar ist. In dieser Zeit kommt es, wie die vorliegenden Abbauprobeversuche im Vollblut gezeigt haben, zu einer raschen Metabolisierung von Taurolidin und Taurultam.

Das Verteilungsvolumen von Taurolidin war 66-mal und das von Taurultam etwa 377-mal höher als das durchschnittliche Plasmavolumen. Dies lässt den Schluss zu, dass die Gewebkonzentrationen dieser Substanzen noch deutlich höher liegen als die Konzentration im Serum. Das Verteilungsvolumen liegt höher als das in der bisher einzigen Studie veröffentlichte (Erb et al. 1982). Auch die mittleren und maximalen Serumkonzentrationen von Taurolidin liegen in der vorliegenden Untersuchung deutlich höher als in der zitierten Studie (Erb et al. 1982), in der eine maximale Serumkonzentration von  $5\mu g/ml$  ohne kumulativen Effekt angegeben wurde. Schwierig zu

interpretieren ist in der zitierten Studie (Erb et al. 1982) der Fakt, dass die maximale Serumkonzentration nach der dritten Infusion mit  $2\mu\text{g/ml}$  deutlich unter der nach der zweiten Infusion liegt. Die generell deutlich niedrigeren Serumkonzentrationen in der zitierten Studie (Erb et al. 1982) im Vergleich zu den aktuellen Ergebnissen ist möglicherweise durch die Art der Probenaufbereitung bedingt. Die in der vorliegenden Untersuchung gewählte Art der Aufbereitung mit dem sehr engen Zeitfenster wurde anhand der Ergebnisse der Abbauprobe im Vollblut gewählt. Die Halbwertszeit von Taurolidin im Serum ist länger als die in einer anderen Studie angegebene (Pfirrmann 1985).

Die Serumkonzentrationen von Taurolidin und Taurinamid, viel geringer auch die von Taurultam, zeigten eine leichte Kumulation im Laufe des Tages mit zunehmender Infusionszahl. Die geringere Kumulation von Taurultam hat möglicherweise 2 Ursachen: 1.) das deutlich höhere Verteilungsvolumen von Taurultam und 2.) die kürzere Halbwertszeit von Taurultam im Vergleich mit Taurolidin und Taurinamid. Das Infusionsschema, das in der vorliegenden Untersuchung verwendet wurde, wird durch die Ergebnisse dieser Untersuchung bestätigt. Es gewährleistet eine adäquate anti-neoplastische Konzentration ohne zu einer ausgeprägten Kumulation zu führen.

Die colorimetrische Reaktion (Nash 1953) scheint hauptsächlich den aktiven Metaboliten Taurultam nachzuweisen. Die Reaktion ist für den Nachweis nicht nur in wässrigen Lösungen, sondern auch in Serumproben nach Proteinfällung geeignet. Die Reagenzien zur Proteinfällung verursachen eine Verdünnung der Probe, die zu niedrigeren Messwerten führt. Dieser Effekt kann durch die Verwendung interner Standards kompensiert werden. Eine Interferenz von Bestandteilen des proteinfreien Serums mit der colorimetrischen Reaktion konnte ausgeschlossen werden.

### 3.6 Schlußfolgerungen

Im humanen Serum liegt Taurolidin hauptsächlich in Form seiner Metabolite Taurultam (75 %) und Taurinamid (25 %) vor. Das instabile Taurolidin lässt sich deshalb nicht direkt nachweisen. Die HPLC-MS-Methode gestattet einen sehr präzisen und empfindlichen Nachweis von Taurultam und Taurinamid. Die Summe der Metabolite Taurultam und Taurinamid bleibt im Blutserum stabil, während im Vollblut ein zeit-, konzentrations- und temperaturabhängiger Abbau erfolgt. Dieser Abbau vollzieht sich in einer ersten schnellen Phase mit Bindung an die Erythrozyten, und in einer zweiten langsameren, linearen Phase mit enzymatischer Metabolisierung.

Die vorliegende Arbeit zeigt zum ersten Mal die Pharmakokinetik von Taurolidin im Serum von Patienten nach repetitiver Infusion bei Patienten mit einem Glioblastom. Die durchschnittliche Serumkonzentration von Taurolidin bei Anwendung dieses Infusionsschemas erreichte den zytotoxisch wirksamen Bereich. Das Verteilungsvolumen von Taurolidin ist etwa 66-mal, das von Taurultam etwa 377-mal größer als das Plasmavolumen. Das spricht dafür, dass die Gewebekonzentrationen von Taurolidin und Taurultam deutlich höher als die Plasmakonzentrationen

sind. Die repetitive Infusion von Taulolidin ist für diese Indikation die therapeutisch richtige Applikationsform (Stendel et al. 2006).

Die colorimetrische Reaktion scheint hauptsächlich den aktiven Metaboliten Taurultam nachzuweisen. Die Reaktion ist für den Nachweis nicht nur in wässrigen Lösungen, sondern auch in Serumproben nach Proteinfällung geeignet. Eine Interferenz von Bestandteilen des proteinfreien Serums mit der colorimetrischen Reaktion konnte ausgeschlossen werden.