MATERIAL UND METHODEN, KLINISCHE STUDIE

2 MATERIAL, METHODEN UND KLINISCHE STUDIE

2.1 BIOANALYTIK, ULTRAFILTRATION UND MIKRODIALYSE

2.1.1 Material

Chemikalien, Reagenzien und Fertigarzneimittel

Acetonitril für HPLC	Acros Organics, Geel, Belgien
Cefotiam ·2HCl (Spizef®)	Takeda, Aachen
Dexamethason-21-dihydrogenphosphat (Fortecortin®)	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat wasserfrei (p.A.)	Merck, Darmstadt
Flucloxacillin-Natrium (Staphylex®)	SmithKline Beecham, München
Kaliumcanrenoat (Aldactone®)	Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen
Ketamin ·HCl (Ketanest®)	Parke-Davis, Berlin
Levofloxacin (Tavanic®)	Hoechst Marion Roussel, Frankfurt a.M.
Linezolid (Reinheit > 99.9 %)	Pharmacia Corp., Kalamazoo, USA
Linezolid (Zyvoxid®)	Pharmacia, Erlangen
Midazolam ·HCl (Dormicum®)	Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen
Milli-Q®-Wasser (s. Kap. 2.1.2)	Millipore, Eschborn
Natriumacetat wasserfrei	Merck, Darmstadt
Phenytoin-Natrium (Phenhydan®)	Desitin, Hamburg
Phosphorsäure 85% (m/V), p.A.	Merck, Darmstadt
Physostigminsalicylat (Anticholium®)	Dr. Franz Koehler Chemie, Alsbach-Haehnlein
Procain ·HCl (Procain 2 % Jenapharm)	Jenapharm, Jena
Promethazin ·HCl (Atosil®)	Bayer Vital, Leverkusen
Propranolol ·HCl (Obsidan®)	Isis Pharma, Zwickau
Ranitidin ·HCl (Ranitidin ratiopharm®)	Ratiopharm, Ulm
Rifampicin-Natrium (Eremfat®)	Fatol, Schiffweiler
Ringer-Lösung	Serumwerk Bernburg, Bernburg
Ropivacain ·HCl (Naropin®)	Astra Zeneca, Wedel
Salzsäure 37 % (m/V)	Riedel-de Haën, Seelze

Hergestellte Puffer

Acetatpuffer

Natriumacetat, wasserfrei 2.05 g
Milli-Q®-Wasser ad 1 000.0 mL
(0.025 M, mit Salzsäure 6 N auf pH 5.0 eingestellt)

Phosphatpuffer

Dinatriumhydrogenphosphat wasserfrei 1.42 g
Milli-Q®-Wasser ad 100.0 mL
(0.1 M, mit Phosphorsäure 85 % (m/V) auf pH 7.4 eingestellt)

Salzsäure 6 N

Salzsäure 37 % (m/V) 60.0 mL
Milli-Q®-Wasser ad 100.0 mL

Verbrauchsmaterialien

Centrifree® Ultrafiltrationseinheit	Millipore, Eschborn
SPE-Säulen (LiChrolut® RP18, 100 mg/1 mL)	Merck, Darmstadt
Mikrodialysesonden (CMA60)	CMA, Stockholm, Schweden
Mikrodialysespritze BD® 1 mL Syringe Luer Lock®	Beckton Dickinson, Singapur
S-Monovette® (Lithium-Heparin, Citrat)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße (0.5 - 1.5 mL)	Eppendorf, Hamburg
Rundbodenröhrchen (5 mL)	Sarstedt, Nümbrecht
Sterilfilter (0.2 µm, regenerierte Cellulose)	Sartorius, Göttingen

2.1.2 Geräte

Digitale Analysenwaage R180 D-*D1	Sartorius, Göttingen
Einkanal-Pipetten (2 - 1 000 µL)	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Centrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Heraeus Sepatech® Megafuge 1.0 R	Heraeus, Hanau
HPLC-System (s. Kap. 2.1.3.1)	
HPLC-Trennsäulen (s. Kap. 2.1.3.1)	
Infusomat®	Braun, Melsungen
Mikrodialyse-Pumpe (CMA102)	CMA, Stockholm, Schweden
Multipette® (5 - 1 000 µL)	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter, CG 837	Schott, Mainz
Speed-Vac® Plus SC110A	Savant, Farmingdale, NY, USA
Vakuumfiltrationseinheit (1 L)	Sartorius, Göttingen
Vibrofix® VF 1 Electronic	IKA Jahnke & Kunkel, Staufen

2.1.3 Quantifizierung von Linezolid

2.1.3.1 Messprinzip und Geräteaufbau

Die Quantifizierung von Linezolid erfolgte mit Hilfe der Hochleistungsflüssigkeits-chromatografie (*High performance liquid chromatography*, HPLC) mit UV-Detektion. Dabei werden Stoffgemische durch Wechselwirkungen mit einer stationären Phase (Trennsäule) und einer mobilen Phase (Fließmittel) getrennt. Die Auftrennung innerhalb eines gegebenen Systems erfolgt z.B. bei der Umkehrphasen-Chromatografie aufgrund der unterschiedlichen substanzspezifischen Lipophilie, die der Verteilungskoeffizient wiedergibt. Ausgeprägte Wechselwirkungen mit der stationären Phase führen zu längeren Verweilzeiten im System. Ein UV-Detektor erfasst die von der Trennsäule eluierten Verbindungen. In Abhängigkeit von der Konzentration und dem Absorptionskoeffizienten der Substanz bei einer ausgewählten Wellenlänge wird ein Signal erzeugt, welches mit Hilfe spezieller Software (Integrationssoftware) ausgewertet werden kann (88).

Das HPLC-System bestand aus den folgenden Komponenten:

Pumpe:	HPLC Pump 422 und HPLC Pump 420 (Kontron, Neufahrn)
Probenaufgabesystem:	HPLC Autosampler SA 360 (Kontron, Neufahrn)
Trennsäule:	Spherimage ODS2, RP-18 Säule, 5 µm, 125 x 4 mm (Knauer, Berlin)
UV-Detektor:	HPLC Detector 430 (Kontron, Neufahrn)
Steuereinheit:	HPLC Multiport (Kontron, Neufahrn)
Integrationssoftware:	KromaSystem® KS2000, Version: 1.83 (Bio-Tek Instruments, Neufahrn).

2.1.3.2 Probenaufarbeitung

Für die Quantifizierung von Linezolid in biologischen Matrizes wurden verschiedene Methoden der Probenaufarbeitung untersucht. Die gewählte Methode sollte für Routine-messungen im Rahmen von Klinischen Studien angewendet werden können und die Anforderungen internationaler Validierungsrichtlinien erfüllen.

Aufarbeitung von Plasmaproben mittels Festphasenextraktionsmethode

Auf der Grundlage der Methode von Peng et al. (89) wurde die Festphasenextraktionsmethode (*solid phase extraction*, SPE) auf mit Linezolid versetzte (gespikten) Plasmaproben angewendet. Abweichend von der Literaturmethode wurde

kein interner Standard verwendet. SPE-Säulen LiChrolut® RP18 wurden je mit 1 mL Milli-Q®-Wasser und 1 mL Acetonitril (ACN) konditioniert. Über einen Konzentrationsbereich von 0.1 bis 20 µg/mL wurden sechs Konzentrationsstufen (n = je 2) untersucht. Je 50 µL einer gespikten Plasmaprobe wurden mit 500 µL Milli-Q®-Wasser gemischt, vollständig auf eine SPE-Säule überführt und 1 min lang bei 18 *g* zentrifugiert. Anschließend wurde mit 1 mL Milli-Q®-Wasser gewaschen und die Extraktionseinheit erneut für 1 min bei 18 *g* zentrifugiert. Das Waschwasser wurde durch Zentrifugation für 5 min bei 3 219 *g* vollständig vom Säulenmaterial entfernt. Alle bisher aufgefangenen Flüssigkeitsvolumina wurden verworfen. Da Vorversuche für ACN eine besser reproduzierbare Elution gezeigt hatten, erfolgte die Elution des Arzneistoffs abweichend zur Literaturmethode (89) anstelle von Methanol mit 1 mL ACN. In zwei Zentrifugationsschritten (1 min bei 18 *g*, 5 min bei 3 219 *g*) wurde das Eluat quantitativ von der SPE-Säule entfernt. Die linezolidhaltige Lösung wurde in einer Vakuumzentrifuge (Speed-Vac®) bei mittlerer Hitze (50 °C) zur Trockne eingedampft, der Rückstand in 50 µL ACN/Milli-Q®-Wasser 20/80 (V/V) aufgenommen und die Lösung vermessen. Parallel dazu wurden wässrige Lösungen in den nach der Aufarbeitung der gespikten Plasmaproben erwarteten Konzentrationen der Messlösungen hergestellt und vermessen. Mit Hilfe einer gewichteten linearen Regression (Gewichtungsfaktor: $1/C^2$) wurde aus den extrahierten Proben eine Kalibrierfunktion (s. Kap. 2.1.3.3) ermittelt und die relative Abweichung der aus der Kalibrierfunktion berechneten Konzentrationen von den Nominalkonzentrationen bestimmt (s. Kap. 2.1.3.3). Aus den Peakflächen der aufgearbeiteten Proben und der wässrigen Lösungen wurde nach Gleichung 2-2 die Wiederfindungsrate (s. Kap. 2.1.3.3) berechnet.

Aufarbeitung von Plasmaproben mittels Proteinfällungsmethode

50 µL Probe wurden mit 200 µL ACN versetzt, gemischt und nach einer zehnminütigen Ruhephase für 5 min bei 10 000 *g* zentrifugiert. 200 µL des Überstands wurden in der Speed-Vac® bei mittlerer Hitze (50 °C) zur Trockne eingedampft und anschließend mit 50 µL ACN/Milli-Q®-Wasser 20/80 (V/V) aufgenommen. Von dieser Lösung wurden 20 µL in die HPLC injiziert.

Aufarbeitung von Mikrodialysatproben

Zu 30 µL Milli-Q®-Wasser wurden 10 µL Mikrodialysatprobe pipettiert und gemischt. Von den Proben zur Sondenkalibrierung wurden 10 µL zu 390 µL Milli-Q®-Wasser gegeben. Nach dem Verdünnungsschritt wurden 20 µL dieser Lösung in die HPLC injiziert.

2.1.3.3 Validierung

Für die entwickelten Methoden für Plasma (Proteinfällungsmethode) und Mikrodialysat wurde hinsichtlich Selektivität, Stabilität, Wiederfindung, Linearität, Richtigkeit und Präzision eine Vorstudienvalidierung durchgeführt (90). Sie erfolgte nach den aktuellen Richtlinien der amerikanischen Zulassungsbehörde FDA zur Validierung bioanalytischer Methoden (91).

Selektivität

Zur Überprüfung der Selektivität wurden je Matrix analytfreie Proben von sechs verschiedenen Probanden nach Kap. 2.1.3.2 aufgearbeitet und vermessen. Im jeweiligen Chromatogramm durften durch Matrixbestandteile bei der Retentionszeit von Linezolid keine Interferenzpeaks auftreten.

Für die Untersuchung von Proben im Rahmen einer Klinischen Studie musste sichergestellt werden, dass die Analytik von Linezolid nicht durch ggf. erfolgende Komedikation beeinflusst wird. Dazu wurde in jeder Matrix eine Auswahl verschiedener Fertigarzneimittel zur parenteralen Applikation analysiert. Trockensubstanzen wurden nach Vorschrift der jeweiligen Packungsbeilage aufgelöst. Die gebrauchsfertigen Lösungen wurden mit linezolidfreiem Plasma oder Phosphatpuffer so verdünnt, dass Konzentrationen innerhalb oder oberhalb klinisch relevanter Konzentrationsbereiche erreicht wurden. Alle Proben wurden aufgearbeitet und vermessen, wie in Kap. 2.1.3.2 beschrieben. Tab. 2-1 gibt einen Überblick über die verwendeten Arzneimittellösungen.

Tab. 2-1: Zur Selektivitätsuntersuchung verwendete Arzneimittellösungen.

Fertigarzneimittel	Arzneistoff	Konzentration
Spizef®	Cefotiam ·2HCl	50 mg/L
Fortecortin®	Dexamethason-21-dihydrogenphosphat	20 mg/L
Staphylex®	Flucloxacillin-Natrium	10 mg/mL
Aldactone®	Kaliumcanrenoat	10 mg/mL
Dormicum®	Midazolam ·HCl	0.8 mg/mL
Ketanest®	Ketamin ·HCl	0.1 mg/mL
Tavanic®	Levofloxacin	0.17 mg/mL
Phenhydan®	Phenytoin-Natrium	40 mg/L
Anticholium®	Physostigminsalicylat	50 mg/L
Procain 2 % Jenapharm	Procain ·HCl	5 mg/mL
Atosil®	Promethazin ·HCl	2 mg/mL
Obsidan®	Propranolol ·HCl	100 mg/L
Ranitidin ratiopharm®	Ranitidin ·HCl	1 mg/mL
Eremfat®	Rifampicin-Natrium	2 mg/mL
Naropin®	Ropivacain ·HCl	67 mg/L

Stabilität

Während der Lagerung, Probensammlung und -aufarbeitung und während der Messung kann sich die Arzneistoffkonzentration innerhalb einer Probe z.B. aufgrund von Instabilitäten ändern. Deshalb wurde die Stabilität von Linezolid in Plasma und Mikrodialysat unter verschiedenen Bedingungen für jeweils eine hohe und eine niedrige Konzentration (0.518 und 15.5 µg/mL in Plasma, 2.07 und 15.5 µg/mL in Mikrodialysat) charakterisiert. Die Stabilität wurde nach Gleichung 2-1 berechnet.

$$\text{Stabilität}, \% = 100 \cdot \frac{\text{Ergebnis}_{\text{gelagerte Probe}}}{\text{Ergebnis}_{\text{Vergleichsprobe}}} \qquad \textit{Gleichung 2-1}$$

Als „Ergebnis“ wurde die gemessene Peakfläche eingesetzt. Bei der Untersuchung der Langzeit-Stabilität wurde jeweils der Quotient Peakfläche/C_{nom} verwendet, um die unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen der gelagerten Proben und der frisch hergestellten Vergleichslösung zu berücksichtigen.

Stabilität der Stammlösung

Zunächst wurden drei Proben einer wässrigen linezolidhaltigen Stammlösung (1.5 mg/mL) sechs Stunden bei Raumtemperatur gelagert und die Messergebnisse mit denen von frisch aufgetauter Stammlösung (-70 °C, n = 3) der gleichen Konzentration verglichen.

Einfrier-Auftau-Stabilität

Es wurde untersucht, ob sich die Konzentration linezolidhaltiger Plasma- bzw. Mikrodialysatproben durch ein-, zwei- oder dreimaliges Einfrieren (-24 °C) und Auftauen ändert. Je Einfrier-Auftau-Zyklus und Konzentration wurden drei Proben verwendet. Als Vergleich dienten drei aus frisch aufgetauter Arbeitslösung (-70 °C) hergestellte QC-Lösungen der jeweiligen Matrix und Konzentration.

Stabilität bei Raumtemperatur

Je drei gespikte Proben jeder Matrix und Konzentration wurden für vier oder 24 Stunden bei Raumtemperatur gelagert und die Ergebnisse mit denen frisch aufgetauter Linezolidlösungen (-70 °C, n = 3) der jeweiligen Konzentration verglichen.

Stabilität nach der Aufarbeitung

Aus verschiedenen Gründen, wie z.B. mehrstündige Messzeit durch hohe Probenanzahl, kann es erforderlich sein, aufgearbeitete Proben zu lagern. Zur Untersuchung der Stabilität von Linezolid nach der Aufarbeitung wurden je drei gespikte Proben jeder Matrix und Konzentration aufgearbeitet und für acht Stunden bei Raumtemperatur gelagert oder über mindestens 24 Stunden eingefroren und wieder aufgetaut. Die Ergebnisse der gelagerten Proben wurden mit denen frisch aufgetauter (-70 °C) und aufgearbeiteter Linezolidlösungen (n = 3) der jeweiligen Konzentration verglichen.

Langzeitstabilität

Je Matrix und Konzentration wurden drei Proben hinsichtlich ihrer Langzeitstabilität bei einer Lagerungstemperatur von -24 °C untersucht. Die Proben wurden 29 Monate gelagert, aufgearbeitet und vermessen. Ihre Peakflächen wurden mit denen von drei frisch hergestellten und aufgearbeiteten Linezolidlösungen der gleichen Konzentration verglichen.

Wiederfindungsrate

Als Wiederfindungsrate bezeichnet man das Verhältnis aus dem Detektorsignal verursacht durch eine aufgearbeitete Probe gespikter Matrix zum Detektorsignal einer

wässrigen Lösung der nach der Aufarbeitung erwarteten Konzentration.

Je Matrix wurden je sechs gespikte Proben von drei verschiedenen Konzentrationen aufgearbeitet und vermessen. Die Peakflächen wurden mit denen wässriger Lösungen in der Nominalkonzentration der Messlösungen verglichen. Die Wiederfindungsrate berechnete sich nach Gleichung 2-2.

$$\text{Wiederfindungsrate}, \% = 100 \cdot \frac{\text{Peakfläche}_{\text{gespikte Matrix}}}{\text{Peakfläche}_{\text{wässriger Vergleich}}} \qquad \textit{Gleichung 2-2}$$

Richtigkeit und Präzision

Die Vorstudienvalidierung wurde für jede Matrix an drei Tagen durchgeführt. An jedem Tag wurden die Parameter Richtigkeit und Präzision berechnet, mit deren Hilfe die Genauigkeit der Methode beurteilt werden sollte.

Als Maß für die Richtigkeit diente der relative Fehler (*relative error*, RE). Er beschreibt die relative Abweichung einer mit Hilfe der Kalibrierfunktion berechneten Konzentration (C_{calc}) von der Nominalkonzentration (C_{nom}) und wurde nach Gleichung 2-3 bestimmt. Es sei darauf hingewiesen, dass aus einem kleineren RE eine höhere Richtigkeit resultiert.

$$\text{RE}, \% = 100 \cdot \frac{C_{calc} - C_{nom}}{C_{nom}} \qquad \textit{Gleichung 2-3}$$

Zur Ermittlung der Richtigkeit der Methode wurden an jedem Messtag der Vorstudienvalidierung je vier Konzentrationsstufen von 0.208 bis 15.5 µg/mL in Plasma und von 0.827 bis 15.5 µg/mL in Mikrodialysat untersucht. Je Konzentration, Matrix und Tag wurden sechs Lösungen vermessen und ausgewertet.

Die Präzision wurde mit Hilfe des Variationskoeffizienten (*coefficient of variation*, CV, s. Kap. 2.3.1) beurteilt, der auch als relative Standardabweichung (*relative standard deviation*, RSD) bezeichnet wird. Dabei bedeutet ein kleinerer CV eine bessere Präzision. Es wurde zwischen der *Intraday*-Variabilität und der *Interday*-Variabilität unterschieden. Die *Intraday*-Variabilität charakterisiert die Streuung der Messwerte innerhalb eines Messtagss, während die *Interday*-Variabilität die Präzision der Methode von verschiedenen Messtagen wiedergibt. Für die Bestimmung der Präzision wurden an jedem Messtag der Vorstudienvalidierung je vier Konzentrationsstufen von 0.208 bis 15.5 µg/mL in Plasma und von 0.827 bis 15.5 µg/mL in Mikrodialysat verwendet. Je Konzentration, Matrix und Tag wurden sechs Lösungen vermessen und die aus ihren Peakflächen mit Hilfe der Kalibrierfunktion (s. Kap. 2.1.3.3, Kalibrierfunktion) berechneten

Konzentrationen ausgewertet.

Der Entscheidung über die Akzeptanz der Vorstudienvalidierung wurden die Anforderungen der FDA-Richtlinie (91) zugrunde gelegt. Danach durfte der RE maximal ±15 % (bzw. höchstens ±20 % an der unteren Bestimmungsgrenze) und der CV bis zu 15 % (an der unteren Bestimmungsgrenze maximal 20 %) betragen.

Kalibrierfunktion

Die Kalibrierfunktion beschreibt den Zusammenhang zwischen dem Detektorsignal und der Konzentration der zu untersuchenden Substanz. Für jede verwendete Matrix wurden eigene Kalibratoren hergestellt. Alle Kalibratoren entstammten einer gemeinsamen wässrigen Stammlösung mit einer Linezolidkonzentration von 1.5 mg/mL. Die Stammlösung wurde zu wässrigen Arbeitslösungen mit zehnfacher Konzentration des Kalibrators verdünnt. Arbeitslösungen mit einer Konzentration < 15 µg/mL wurden durch Verdünnen der Arbeitslösung eines höher konzentrierten Kalibrators erhalten. Alle Arbeitslösungen wurden in ausreichendem Volumen auf Vorrat hergestellt, aliquotiert und in diesem Stadium bei -70 °C gelagert. Der letzte Herstellungsschritt bestand nach dem Auftauen in einer 1 + 9-Verdünnung (V/V) der jeweiligen Arbeitslösung mit analytfreier Matrix. Für die Kalibrierfunktion in Plasma wurden wässrige Arbeitslösungen mit linezolidfreiem Plasma zu Kalibratorkonzentrationen von 0.2, 0.5, 1, 5, 10 und 20 µg/mL verdünnt. In Mikrodialysat enthielten die Kalibratoren nach der Verdünnung mit Ringer-Lösung 0.8, 1.5, 3, 6, 12 und 20 µg/mL Linezolid. Die Güte jeder Kalibrierfunktion wurde mit Qualitätskontrollproben geprüft (s. Kap. 2.1.3.3, Qualitätssicherung während der Messung).

Üblicherweise werden Kalibrierlösungen in der Matrix hergestellt, aus der die Konzentrationsbestimmung erfolgen soll. Neben Plasma und Mikrodialysat (Ringer-Lösung) sollte die bioanalytische Methode auch für die Matrix Ultrafiltrat (UF) etabliert werden. Da linezolidfreies UF nicht in ausreichender Menge für eigene Kalibrierlösungen und Qualitätskontrollproben verfügbar war, wurde untersucht, ob sich die Peakflächen von Linezolid in Mikrodialysat und UF unterscheiden. Dazu wurden je zwei Kalibratoren der Konzentrationen 3.01 und 12.0 µg/mL anstelle von Ringer-Lösung mit analytfreiem UF hergestellt und gemeinsam mit einer Kalibrierfunktion Mikrodialysat vermessen. Anschließend wurden die Konzentrationen und die Abweichungen von der Nominalkonzentration (s. Gleichung 2-3) berechnet.

Als untere Bestimmungsgrenze wurde für jede Matrix die Konzentration festgelegt, die sich mit hinreichender Präzision und Richtigkeit gemäß der Validierungsrichtlinie (91) quantifizieren ließ. Die obere Bestimmungsgrenze für die klinische Anwendung wurde

nach Auswertung der Literatur (89, 92-94) in beiden Matrizes bei 20 µg/mL etabliert. Höher konzentrierte Proben aus der Studie (< 1.5 %) wurden während der Aufarbeitung auf Konzentrationen innerhalb des validierten Messbereichs verdünnt. Zur Validierung dieses Vorgehens wurden fünf Proben linezolidhaltiges Plasma mit einer Konzentration von 40.2 µg/mL aufgearbeitet. Im letzten Schritt der Aufarbeitung wurde der zur Trockne eingedampfte Rückstand anstelle von 50 µL in 150 µL ACN/Milli-Q®-Wasser 20/80 (V/V) aufgenommen. Auch in Ringer-Lösung wurden fünf Proben mit einer Konzentration von 40.2 µg/mL hergestellt. Nach dem für Mikrodialysat beschriebenen Aufarbeitungsschritt, der 1 + 3-Verdünnung (V/V), wurden zu 20 µL dieser Lösung anschließend noch 40 µL Milli-Q®-Wasser zugegeben. Nach der Messung wurden die berechneten mit den Nominalkonzentrationen verglichen und Präzision und Richtigkeit bestimmt.

Die Berechnung der Linezolidkonzentrationen erfolgte mit Hilfe der Methode der Kalibrierfunktion. Diese resultierte aus der linearen Regression der Peakflächen und der Nominalkonzentrationen der Kalibratoren. Die unterschiedliche Höhe der Konzentrationen (C_i) wurde durch den Gewichtungsfaktor $1/C_i^2$ berücksichtigt (95). Die Bestimmung des Gewichtungsfaktors ist in Kap. 2.3.2 (Regressionsanalyse) ausführlich beschrieben. Die Linearität der Kalibrierfunktion wurde mit Hilfe des Regressionskoeffizienten, der Steigung und des Ordinatenabschnitts der Regressionsgeraden beurteilt.

Qualitätssicherung während der Messung

Je zwei Qualitätskontrollproben (*quality control*, QC-Proben) in drei Konzentrationsstufen (0.518, 10.3 und 15.5 µg/mL in Plasma, 2.07, 10.3 und 15.5 µg/mL in Mikrodialysat) wurden jeder Messreihe hinzugefügt und dienten der Überprüfung der Güte der Kalibrierfunktion jeder Messreihe.

Für die wässrige Stammlösung der QC-Proben aller Matrizes mit einer Konzentration von 1.5 mg/mL wurde Linezolid separat einwogen. Die hergestellten wässrigen Arbeitslösungen wurden mit analytfreier Matrix 1 + 9 (V/V) zur jeweiligen QC-Probe verdünnt. Abschließend wurden die nicht unmittelbar benötigten aliquotierten QC-Proben bei -70 °C gelagert.

Nach den Anforderungen der Validierungsrichtlinie (91) durften die aus der Kalibrierfunktion berechneten Konzentrationen der QC-Proben nur um maximal $\pm$ 15 % von der Nominalkonzentration abweichen. Erfüllten mehr als zwei QC-Proben oder beide Proben einer Konzentrationsstufe diese Anforderungen nicht, wurde der gesamte Analysenlauf abgelehnt und wiederholt.

2.1.4 Proteinbindung von Linezolid

Mit Hilfe der Mikrodialyse-Technik (s. Kap. 2.1.5) wird die Konzentration des im Interstitium ungebunden vorliegenden Arzneistoffs erfasst. Für den direkten Vergleich muss daher auch in Plasma die ungebundene Arzneistoffkonzentration bestimmt werden, da nur der freie Anteil der Arzneistoffmoleküle in den extravasalen Raum und zu den jeweiligen Zielstrukturen diffundieren kann.

Zur Erfassung der ungebundenen Fraktion (f_u) von Linezolid wurde Plasma in einem Ultrafiltrationssystem (Centrifree®-Röhrchen, regenerierte Cellulose, *molecular weight cut-off* 30 kDa) bei Raumtemperatur 10 min lang bei 1 064 *g* zentrifugiert. Aus dem Verhältnis der Konzentration der Ultrafiltratprobe (C_{UF}) und der korrespondierenden totalen Plasmakonzentration (C_{Plasma}) wurde f_u nach Gleichung 2-4 errechnet.

$$f_u\,,\,\% = 100 \cdot \frac{C_{UF}}{C_{Plasma}} \qquad \textit{Gleichung 2-4}$$

Die Proteinbindung ergibt sich aus der Differenz des jeweiligen f_u-Werts zu 100 %. Im Folgenden sind die Untersuchungen zur Ultrafiltration von Linezolid beschrieben.

2.1.4.1 Adsorption an die Ultrafiltrationseinheit *in vitro*

Zunächst wurde geprüft, ob Linezolid mit den Bestandteilen der Ultrafiltrationseinheit interagiert. Dafür wurde eine wässrige Linezolidlösung (10 µg/mL) in sechs Proben aliquotiert. Drei Proben wurden unter den gleichen Bedingungen wie Plasma ultrafiltriert (s. Kap. 2.1.4). Aus den gemessenen Peakflächen der ultrafiltrierten Lösungen und dem Mittelwert der Peakflächen der nicht ultrafiltrierten Proben (wässriger Vergleich) wurde analog Gleichung 2-3 die relative Abweichung vom Nominalwert bestimmt. Dabei entsprachen die Peakflächen der ultrafiltrierten Lösung „C_{calc}“ und die mittlere Peakfläche der wässrigen Vergleichslösungen „C_{nom}“.

2.1.4.2 Einfluss der Inkubationszeit auf die ungebundene Fraktion *in vitro*

Linezolidhaltiges Plasma mit einer Konzentration von 5 µg/mL wurde bei Raumtemperatur über 10, 20, 40 und 90 min inkubiert. Anschließend wurden je Zeitintervall zwei Ultrafiltratproben (UF-Proben) gewonnen. Nach Messung dieser und zweier Proben einer wässrigen Vergleichslösung von 5 µg/mL wurde aus den Ergebnissen jeweils f_u analog Gleichung 2-4 berechnet. Dabei wurde „C_{UF}“ durch die Peakfläche der erhaltenen UF-Probe ersetzt, „C_{Plasma}“ durch die mittlere Peakfläche der wässrigen Vergleichslösungen. Die f_u-Werte wurden in Abhängigkeit von der Inkubationszeit einer gewichteten linearen Regression unterzogen (Gewichtungsfaktor

1/Inkubationszeit; s. Kap. 2.3.2, Regressionsanalyse). Unterschied sich die Steigung der berechneten linearen Funktion signifikant von Null, wurde auf das Vorliegen einer Abhängigkeit geschlossen.

2.1.4.3 Einfluss der Konzentration auf die ungebundene Fraktion *in vitro*

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob f_u über den gesamten Bereich der Plasmakonzentrationen konstant bleibt. Linezolidhaltiges Plasma wurde in den Konzentrationen 2, 10 und 20 µg/mL eingesetzt. Parallel dazu wurden wässrige Vergleichslösungen derselben Konzentrationen hergestellt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei Raumtemperatur wurden aus dem gespikten Plasma je Konzentrationsstufe zwei UF-Proben gewonnen. Wie in Kap. 2.1.4.2 beschrieben, wurde aus den Peakflächen der UF-Proben und denen der unfiltrierten wässrigen Lösungen jeweils f_u berechnet. Es wurde eine ungewichtete lineare Regression von f_u gegen die Konzentration durchgeführt (s. Kap. 2.3.2, Regressionsanalyse). Im Falle einer Konzentrationsabhängigkeit von f_u sollte die errechnete Funktion statistisch signifikant ansteigen oder abfallen (s. Kap. 2.3.2).

2.1.4.4 Einfluss des Antikoagulans im Blutentnahmeröhrchen auf die ungebundene Fraktion *in vivo*

Die *In-vitro*-Untersuchungen zur Proteinbindung von Linezolid wurden mit citrathaltigem analytfreiem Plasma als Ausgangsmatrix durchgeführt. Zur Probensammlung während der Klinischen Studie wurden jedoch heparinisierte Blutentnahmeröhrchen eingesetzt. Zwischen den *in vitro* einschließlich der Literatur (z.B. (96)) und den *in vivo* gemessenen Werten der Proteinbindung während der Studie wurden teilweise deutliche Unterschiede beobachtet. Deshalb wurde untersucht, ob das im Blutentnahmeröhrchen enthaltene Antikoagulans das Ausmaß von f_u verändert. Dazu wurden vier Blutproben eines Studienteilnehmers zu verschiedenen Zeitpunkten unmittelbar nach der Entnahme in eine heparinisierte und eine Citrat-Monovette aliquotiert. Die aus dem Plasma gewonnenen UF-Proben wurden vermessen und aus ihren Konzentrationen und den korrespondierenden totalen Plasmakonzentrationen f_u nach Gleichung 2-4 berechnet.

2.1.5 *In-vitro*-Mikrodialyse mit Linezolid

Vor der Durchführung von *In-vivo*-Mikrodialyse-Untersuchungen im Rahmen der Klinischen Studie wurden zunächst *in vitro* die Dialyseeigenschaften von Linezolid durch die semipermeable Membran der Mikrodialysesonde charakterisiert. Der apparative

Aufbau für die Durchführung einer *In-vitro*-Mikrodialyse-Untersuchung ist in Abb. 2-1 (links) schematisch dargestellt. Eine Mikrodialysesonde besteht aus zwei konzentrischen Schläuchen (s. Abb. 2-1 (rechts)). Sie wird kontinuierlich von einer Elektrolytlösung durchspült (Perfusat), die in ihrer Zusammensetzung dem Elektrolytmilieu des sondenumgebenden Mediums ähneln soll, wie z.B. Ringer-Lösung. Durch den inneren Schlauch gelangt das Perfusat in die Sonde und strömt zwischen dem zuführenden Schlauch und der Sondenmembran zum Sondenausgang zurück. Substanzen, für die zwischen dem Perfusat und dem Medium ein Konzentrationsgradient besteht, können währenddessen durch die Membran diffundieren. Am Sondenausgang wird nach erfolgtem Stoffaustausch die durchspülende Flüssigkeit in vorher festgelegten Zeitintervallen als Dialysat gesammelt.

Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Mikrodialysesonden (CMA60) hatten einen Außendurchmesser von 0.6 mm. Die Länge der Membran betrug 30 mm, der *molecular weight cut-off* lag bei 20 kDa. Die Mikrodialysesonde wurde bei verschiedenen Flussraten zwischen 0.8 und 10 µL/min mit Hilfe einer Präzisionspumpe perfundiert. In die Pumpe wurde eine Mikrospritze mit der Perfusatlösung eingespannt. Als Auffanggefäß für das Dialysat diente ein Reaktionsgefäß (0.5 mL).

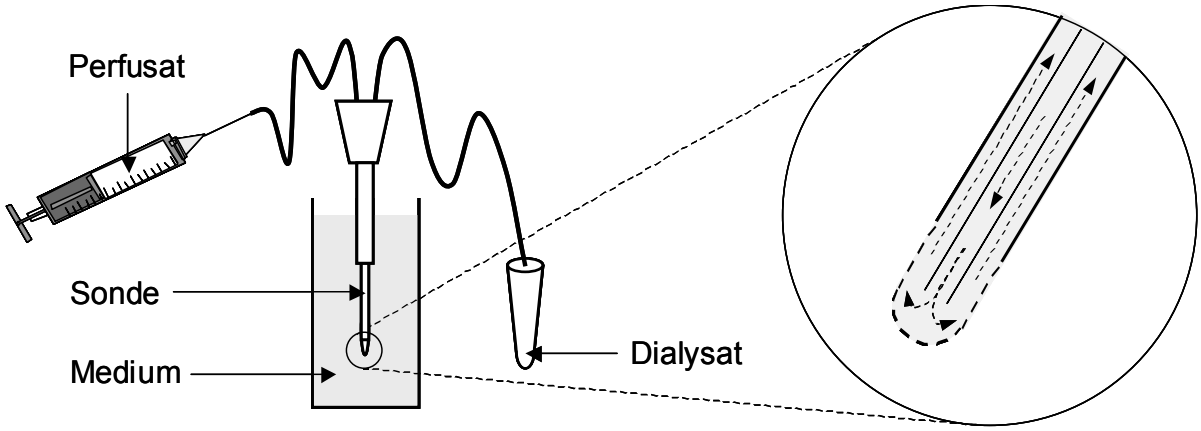

Abb. 2-1: In-vitro-Mikrodialyse: Schematische Darstellung des apparativen Aufbaus (links) und der Sondenspitze (vergrößert, rechts).

2.1.5.1 Methoden zur Kalibrierung von Mikrodialysesonden

Zur Quantifizierung der ungebundenen Arzneistoffkonzentration im Interstitium wird die Substanzmenge im Dialysat vermessen. Aufgrund der ständig strömenden Perfusatlösung wird an der Membran das Diffusionsgleichgewicht meist nicht erreicht und es gelangt immer nur ein bestimmter Anteil der Stoffe aus dem umgebenden Interstitium in das

Sondeninnere. Der Faktor, mit Hilfe dessen von der gemessenen Dialysatkonzentration auf die tatsächliche ungebundene Konzentration im Interstitium geschlossen werden kann, wird als *relative recovery* (relative Wiederfindung, RR) bezeichnet. Jede Sonde muss *in vivo* individuell kalibriert werden, da RR von Sonde zu Sonde und in Abhängigkeit z.B. vom untersuchten Gewebe und von der Lokalisation darin variiert.

Für die nachfolgend beschriebenen *In-vitro*-Mikrodialyse-Untersuchungen mit Linezolid wurden die *Recovery*-Methode und die Retrodialyse-Methode (97) angewendet.

***Recovery*-Methode**

Bei der *Recovery*-Methode werden Mikrodialysesonden in arzneistoffhaltige Ringer-Lösung in ein Röhrchen eingebracht. Die Sonde wird mit arzneistofffreier Ringer-Lösung perfundiert (s. Abb. 2-2, A). Arzneistoffmoleküle diffundieren aus der sondenumgebenden Lösung durch die semipermeable Membran in das Sondeninnere und werden in den Dialysatfraktionen aufgefangen.

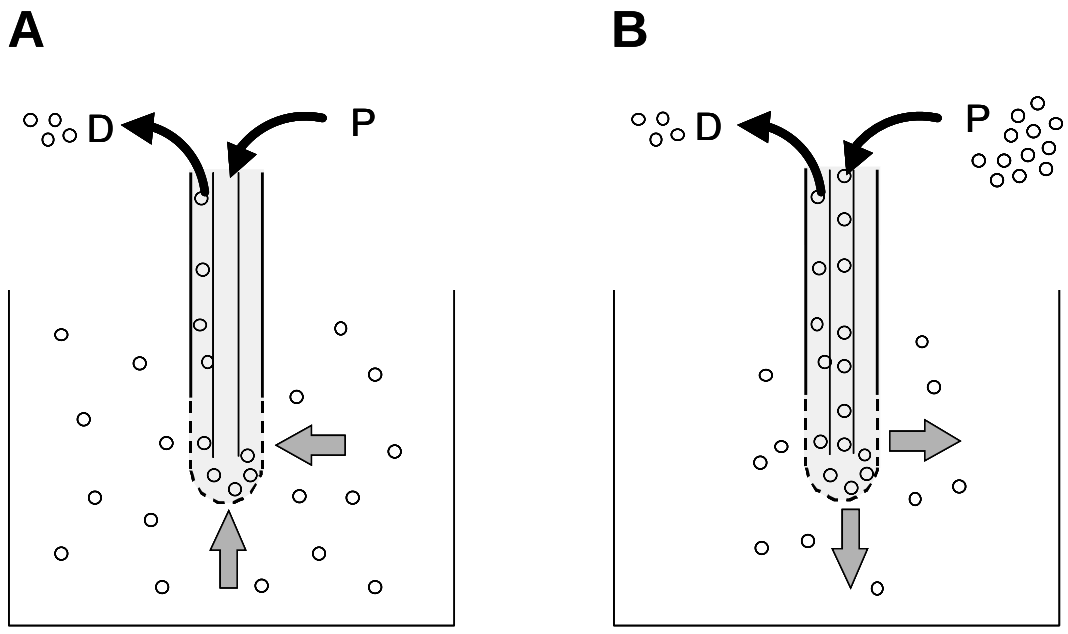

Abb. 2-2: Schematische Darstellung des Recovery-Experiments (A) und der Retrodialyse-Methode (B) in vitro (P = Perfusat, D = Dialysat).

Nach der Konzentrationsmessung der Dialysate wird RR aus dem Verhältnis der Konzentrationen des Dialysats ($C_{Dialysat}$) und der sondenumgebenden Lösung (C_{Medium}) wie folgt berechnet:

$$RR, \% = 100 \cdot \frac{C_{Dialysat}}{C_{Medium}}$$ *Gleichung 2-5*

Retrodialyse-Methode

Die Anwendung der Retrodialyse-Methode (97) zur Sondenkalibrierung beruht auf der Annahme, dass die Diffusion einer Substanz an der Membran in beide Richtungen gleichartig stattfindet. RR sollte also für beide Diffusionsrichtungen gleiche Werte annehmen. Damit könnte auch gezeigt werden, dass die Substanz nicht an das Sondenmaterial adsorbiert (98).

Arzneistoffhaltiges Perfusat strömt durch die Mikrodialysesonden. Diese befinden sich in arzneistofffreier Ringer-Lösung, so dass die Arzneistoffmoleküle aus der Sonde in die umgebende Lösung diffundieren können (s. Abb. 2-2, B). Das nun arzneistoffärmere Dialysat wird aufgefangen und vermessen. Aus dem Verhältnis der Konzentrationen des Dialysats und des Perfusats ($C_{Perfusat}$) wird RR nach Gleichung 2-6 berechnet.

$$RR, \% = 100 \cdot (1 - \frac{C_{Dialysat}}{C_{Perfusat}})$$ *Gleichung 2-6*

2.1.5.2 Einfluss der Flussrate auf die relative Wiederfindung

Die Variation der Flussrate beeinflusst die Diffusionsvorgänge an der Sondenmembran (99). Zur Untersuchung dieses Zusammenhangs für Linezolid und zur Etablierung einer optimalen Flussrate für die Anwendung der Mikrodialyse in der in Kap. 2.2 beschriebenen Klinischen Studie wurde RR bei Flussraten von 0.8, 1.0, 1.5, 2.0 und 2.5 µL/min bestimmt. Beginnend mit der kleinsten Flussrate wurde bei jedem Flussratenwechsel 20 min lang gespült, um das System auf die neue Flussrate zu äquilibrieren. Unter Anwendung der Retrodialyse-Methode (s. Kap. 2.1.5.1) wurden drei Mikrodialysesonden (CMA60) mit einer linezolidhaltigen Ringer-Lösung der Konzentration 10 µg/mL perfundiert. Je Sonde und Flussrate wurden drei Dialysatfraktionen gesammelt: bei Flussraten $\leq$ 1 µL/min alle 20 min, bei höheren Flussraten alle 10 min.

Nach der Messung der Perfusat- und Dialysatkonzentrationen wurden die RR-Werte nach Gleichung 2-6 berechnet und eine Flussrate für alle weiteren Mikrodialyseuntersuchungen festgelegt.

2.1.5.3 Einfluss der Konzentration auf die relative Wiederfindung

Während bei den bisher beschriebenen *In-vitro*-Untersuchungen Linezolid in nur einer Konzentration eingesetzt wurde, sollte sichergestellt werden, dass RR von der

verwendeten Arzneistoffkonzentration unabhängig ist. Dazu wurden Linezolidkonzentrationen von 1, 5, 10, 20 und 50 µg/mL untersucht. Für alle eingesetzten Konzentrationen wurden die RR-Werte im *Recovery*-Experiment und mit der Retrodialyse-Methode (s. Kap. 2.1.5.1) bestimmt. Drei Mikrodialysesonden (CMA60) wurden mit einer Flussrate von 1.5 µL/min perfundiert. Beginnend mit der kleinsten Konzentration wurde bei jedem Konzentrationswechsel 1 min lang bei 10 µL/min und anschließend für 20 min bei 1.5 µL/min gespült. Bei beiden Kalibriermethoden wurden je Sonde und Konzentrationsstufe drei Dialysatfraktionen in zehnminütigen Intervallen gesammelt. Bei einer Konzentration von 1 µg/mL wurde das Dialysat jeweils 30 min lang aufgefangen, da eine Verdünnung der Lösung vor der Messung wegen der unteren Bestimmungsgrenze der HPLC-Methode nicht möglich war.

Aus den Dialysat- und Perfusatkonzentrationen wurden nach Gleichung 2-5 und Gleichung 2-6 die RR-Werte berechnet. Anhand der Ergebnisse wurde geprüft, ob die Diffusion durch die Membran über den untersuchten Konzentrationsbereich in beide Richtungen, aus der Sonde heraus und in sie hinein, in gleichem Ausmaß erfolgt. Die RR-Werte beider Kalibirierungsmethoden wurden anschließend einer gewichteten linearen Regression unterzogen (Gewichtungsfaktor $1/\sqrt{C}$, s. Kap. 2.3.2, Regressionsanalyse). Ergibt sich dabei eine von Null nicht statistisch signifikant abweichende Geradensteigung, kann von der Unabhängigkeit der RR-Werte von der eingesetzten Linezolidkonzentration ausgegangen werden.

2.1.5.4 Sondenkalibrierung im Steady State

Üblicherweise findet die Kalibirierung der Mikrodialysesonden bei der klinischen Anwendung vor der Gabe des zu dialysierenden Arzneistoffs statt. Häufig wird dafür die Retrodialyse-Methode (s. Kap. 2.1.5.1) eingesetzt. Während der Klinischen Studie wurde die Mikrodialyse-Untersuchung bei Probanden und Patienten u.a. nach mehrtägiger Linezolid-Applikation durchgeführt. Zum Zeitpunkt der Sondenkalibrierung, 8 Stunden nach der Dosierung im Steady State, war der Arzneistoff bereits im Interstitium präsent. Für die Anwendung der Retrodialyse-Methode hatte das zur Folge, dass die Perfusatlösung deutlich mehr Linezolid als das sondenumgebende Interstitium enthalten musste. Denn nur bei einem ausreichend hohen Konzentrationsgradienten konnte die Diffusion an der Sondenmembran ungehindert erfolgen.

Ausgehend von einer mittleren maximalen totalen Plasmakonzentration nach intravenöser (*iv*) Mehrfachdosierung von 15.1 µg/mL (96) und unter der vereinfachenden Annahme einer monoexponentiellen Konzentrationsabnahme mit einer Halbwertszeit ($t_{1/2}$)

von 5 bis 7 Stunden (96) beträgt die Konzentration nach 8 Stunden 6.8 µg/mL (für $t_{1/2}$ = 7 h). Basierend auf diesem Ergebnis und unter Berücksichtigung einer theoretischen Plasmaproteinbindung von 30 % (96) wurde in dem *In-vitro*-Experiment zur Festlegung der Linezolidkonzentration in der Perfusatlösung angenommen, dass 8 Stunden nach Applikation von 600 mg Linezolid im Steady State weniger als 10 µg/mL ungebundener Arzneistoff im Plasma und im sondenumgebenden Interstitium vorliegen.

Drei Mikrodialysesonden (CMA60) wurden in einer linezolidhaltigen Ringer-Lösung der Konzentration 10 µg/mL platziert und mit einer Flussrate von 1.5 µL/min perfundiert. Die Ringer-Lösung des Perfusats enthielt 50, 100, 150 oder 200 µg/mL Linezolid. Beginnend mit der kleinsten Konzentration wurden die Sonden bei jedem Konzentrationswechsel 1 min lang bei 10 µL/min und anschließend für 20 min bei 1.5 µL/min gespült. Je Sonde und Konzentration wurden drei Dialysatfraktionen im Abstand von 10 min gesammelt. Es sollte die kleinstmögliche Perfusatkonzentration ermittelt werden, bei der die Diffusion von Linezolid aus der Sonde ungehindert erfolgte.

Nach der Messung der Perfusat- und Dialysatkonzentrationen wurde RR jeweils nach Gleichung 2-6 berechnet und ausgewertet. Dabei wurde untersucht, ab welcher Konzentration der Perfusatlösung RR nicht mehr statistisch signifikant zunahm. Das heißt, die errechneten RR-Werte sollten sich nicht von den Ergebnissen der *In-vitro*-Untersuchungen zur Konzentrationsabhängigkeit (s. Kap. 2.1.5.3) unterscheiden.

2.2 Klinisch-pharmazeutische Untersuchungen zur Pharmakokinetik von Linezolid

2.2.1 Klinische Studie

In Zusammenarbeit mit Dr. C. Joukhadar (Abteilung Klinische Pharmakologie, Medizinische Universität Wien, Österreich) und Chefarzt Dr. S. Ključar (Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, DRK-Kliniken Berlin, Campus Westend) wurde eine klinisch-pharmazeutische Untersuchung zur „Bestimmung der Pharmakokinetik (PK) und Pharmakodynamik (PD) von Linezolid im Zielgewebe bei gesunden Probanden und septischen Patienten nach Einmaldosis und Mehrfachdosis“ durchgeführt. Im Zeitraum von August 2002 bis März 2004 wurden insgesamt 22 Probanden und Patienten (s. Kap. 2.2.1.1) im Studienzentrum Wien in das Projekt eingeschlossen. Im Studienzentrum Berlin wurde mit der Rekrutierung der Patienten begonnen und dauert noch an.

Ziel der Untersuchung war, die ungebundenen Konzentrationen von Linezolid im Plasma und korrespondierend im Interstitium, dem Ort der bakteriellen Infektion, zu

messen. Dabei sollten die von Probanden und Intensivpatienten erhaltenen Daten zur PK und PD verglichen werden. Die erworbenen Kenntnisse über die Zusammenhänge der PK und PD könnten nach der Identifizierung von sog. Covariaten zu einer individualisierten Dosisoptimierung von Linezolid bei Intensivpatienten verwendet werden. Außerdem sollte die Anwendung der Mikrodialyse-Technik im Rahmen von Klinischen Studien mit Intensivpatienten in Berlin etabliert werden.

2.2.1.1 Studiendesign und -populationen

Bei der klinisch-pharmazeutischen Untersuchung handelte es sich um eine multizentrische, offene und prospektive Vergleichsstudie. Das Projekt wurde von den zuständigen unabhängigen Ethikkommissionen der Medizinischen Universität Wien und der Ärztekammer Berlin befürwortet.

Grundlage für die pharmakokinetischen Auswertungen dieser Arbeit bildeten die Daten der im Studienzentrum Wien untersuchten Probanden und Patienten.

Probandenkollektiv

In Tab. 2-2 sind die Ein- und Ausschlusskriterien für die Probanden zusammengefasst. Im Rahmen der Studienvoruntersuchung (*Screening visit*) wurde der aktuelle Gesundheitszustand dokumentiert und die Einschluss- und Ausschlusskriterien überprüft.

Tab. 2-2: Ein- und Ausschlusskriterien für Probanden.

Einschlusskriterien
• Frauen und Männer im Alter von 40 bis 80 Jahren
• Kein Alkoholabusus ($\geq$ 40 g Ethanol/Tag)
• Keine regelmäßige Arzneimitteleinnahme innerhalb der letzten 2 Wochen vor der Studienteilnahme (ausgenommen Kontrazeptiva)
• BMI[#1] zwischen 20 und 30 kg/m²
• Laborwerte im Referenzbereich oder klinisch nicht relevante Abweichungen
• Blutdruck < 150 mmHg (systolisch) und <90 mmHg (diastolisch) nach 5 min in Rückenlage
• Schriftliche Einwilligungserklärung
Ausschlusskriterien
• Positiver Test auf Hepatitis B- oder HIV bei der Einschlussuntersuchung
• Schwangerschaft oder Stillzeit
• Überempfindlichkeit gegen die Studienmedikation

[#1] *Body mass index:* $\mathrm{BMI} = \text{Körpergewicht [kg]} / (\text{Körpergröße [m]})^2$

Insgesamt zehn Probanden erfüllten die Einschlusskriterien und gaben vor der Aufnahme in die Studie ihre schriftliche Einwilligung nach Aufklärung.

Studienzeitplan

Im Folgenden ist der Ablauf am Studientag 1 beschrieben:

- Legen von zwei periphervenösen Zugängen zum einen für die Applikation von Linezolid und zum anderen für die Entnahme von Plasmaproben zu definierten Zeitpunkten
- Insertion von zwei Mikrodialysesonden in das Unterhautfettgewebe (s.c.) und das Muskelgewebe (i.m.) der unteren Extremitäten
- Perfusion der Mikrodialysesonden mit Ringer-Lösung bei einer Flussrate von 1.5 µL/min
- Sammeln von Mikrodialysat (Basiswert): 30 min
- Kalibrierung der Mikrodialysesonden durch Retrodialyse (s. Kap. 2.1.5.1)
- Umstellen auf Ringer-Lösung mit einer Auswaschphase von 30 min
- Applikation von 600 mg Linezolid als Kurzinfusion: 30 min
- Probenentnahmeintervalle für Mikrodialysat und Plasma: alle 20 min (0 - 3 h nach Start der Infusion), alle 30 min (3 - 8 h nach Start der Infusion)
- Entfernen der Mikrodialysesonden
- Weiteres Dosierungsschema: 600 mg Linezolid als Tablette (12 h nach der ersten Gabe, danach weiterhin zweimal täglich 600 mg Linezolid als Tablette).

Die Zeitpunkte der selbstständigen Tabletteneinnahme wurden von jedem Probanden in einem sog. „Probandentagebuch“ dokumentiert. Nach der Einnahme von Linezolid über mindestens drei Tage wurden ein zweiter Untersuchungstag (Studientag 2) durchgeführt. Nicht eingenommene Tabletten wurden am Studientag 2 im Studienzentrum zurückgegeben. Studientag 2 fand unter Steady-State-Bedingungen statt. Im Gegensatz zu Studientag 1 erfolgte die Kalibrierung der Mikrodialysesonden durch Retrodialyse (s. Kap. 2.1.5.1) erst nach Abschluss der Probenentnahmen, frühestens 8 h nach der letzten Linezolidapplikation.

In-vivo-Kalibrierung der Mikrodialysesonden

Die Kalibrierung der Mikrodialysesonden *in vivo* wurde mit Hilfe der Retrodialyse-Methode (s. Kap. 2.1.5.1) durchgeführt. An Studientag 1 wurde Ringer-Lösung mit einer Linezolidkonzentration von ~ 85 µg/mL als Perfusat bei einer Flussrate von 1.5 µL/min eingesetzt und die Sonden vor der Applikation der ersten Linezoliddosis kalibriert. Nach jeweils 15minütigen Intervallen wurden je Sonde zwei Dialysatfraktionen gesammelt. Die Konzentrationen der Dialysat- und Perfusatproben wurden bestimmt und RR nach Gleichung 2-6 berechnet. Am Studientag 2 wurde zur Kalibrierung eine Perfusatlösung mit

einer Konzentration von 150 µg/mL verwendet.

Grundsätzlich wurde je Sonde und Tag der mittlere RR-Wert zur Berechnung der ungebundenen Linezolidkonzentration im Interstitium eingesetzt. Zeigten die beiden Einzelwerte einer Sonde jedoch eine relative Streuung von $\geq$ 20 %, wurde nur der RR-Wert der späteren (= zweiten) Dialysatfraktion berücksichtigt. Die Erfahrung zeigte, dass die zweite Dialysatfraktion zur Berechnung von RR die größere Aussagekraft besaß, da möglicherweise zu früheren Zeitpunkten noch keine stabile Flussrate vorherrschte und die Sonde inkl. dem Auslassschlauch noch nicht vollständig mit der gewünschten Kalibrierlösung durchströmt wurde. Fehlten Kalibrierproben einer Sonde, wurde für RR der Mittelwert der übrigen Sonden desselben Insertionsortes und Studientags einer Studienpopulation verwendet. Die ungebundene Linezolidkonzentration im s.c.- oder i.m.-Interstitium berechnete sich gemäß Umformung der Gleichung 2-5 wie folgt:

$$C_{ISF,ungebunden}\,[\mu g/mL] = 100 \cdot \frac{C_{Dialysat}\,[\mu g/mL]}{RR,\,\%} \qquad \textit{Gleichung 2-7}$$

Patientenkollektiv

In Tab. 2-3 sind die Ein- und Ausschlusskriterien der Intensivpatienten zusammengefasst. Nach Möglichkeit willigten die Patienten nach der Aufklärung durch den Prüfarzt schriftlich vor der Aufnahme in die Studie ein. Konnte ein Patient aufgrund seines Gesundheits- und Bewusstseinszustands Wesen, Bedeutung, Tragweite und Risiken der Studie nicht ermessen, wurde über die Einwilligung durch zwei von der Studie unabhängige Ärzte nach dem mutmaßlichen Willen des Patienten entschieden. Insgesamt wurden im Studienzentrum Wien 12 Patienten in die Studie eingeschlossen.

Tab. 2-3: Ein- und Ausschlusskriterien für Intensivpatienten.

Einschlusskriterien

- Frauen und Männer im Alter zwischen 40 und 80 Jahre
- Indikation zur Linezolidtherapie durch einen von der Studie unabhängigen Arzt
- Keine Linezolidtherapie innerhalb der letzten 72 Stunden
- Schwere Sepsis und septischer Schock wurden gemäß der Kriterien der Konsensus-Konferenz 1991 von ACCP (*American College of Chest Physicians*) und SCCM (*Society of Critical Care Medicine*) (100) diagnostiziert. Mindestens 2 der folgenden Kriterien mussten erfüllt sein:
  - Tachykardie (> 90 min^{-1})
  - Tachypnoe (> 20 min^{-1})
  - Körpertemperatur < 36 °C oder > 38 °C
  - Leukozytose (> 12 /nL) oder Leukopenie (< 4 /nL) oder > 10 % unreife Formen
  - Hypotonie: entweder systolischer Blutdruck < 90 mmHg oder der Nachweis, dass Vasopressoren zur Aufrechterhaltung des Blutdrucks benötigt wurden. Diese Kriterien mussten ohne die Anwesenheit anderer Hypotonieursachen erfüllt sein und trotz adäquater Flüssigkeitszufuhr (sofern nicht kontraindiziert) bestehen bleiben

Ausschlusskriterien

- Positiver Test auf Hepatitis B- oder HIV bei der Einschlussuntersuchung
- Hämodialyse oder Hämofiltration während der ersten drei Tage der Linezolidtherapie
- Überempfindlichkeit gegen die Studienmedikation
- Komedikation mit Monoaminoxidase-Inhibitoren
- Serumkreatininkonzentration > 3 mg/dL

Studienzeitplan

Prinzipiell wurde bei der Untersuchung der Patienten der gleiche Studienablauf eingehalten wie bei den Probanden ausführlich dargestellt (s. Kap. 2.2.1.1). Unterschiede gab es lediglich in der applizierten Arzneiform ab der zweiten Dosis. Die Therapie wurde anstelle von Tabletten mit der Gabe von je 600 mg Linezolid als Kurzinfusion über 30 min fortgesetzt. Das Dosierungsintervall von 12 Stunden blieb unverändert.

In-vivo-Kalibrierung der Mikrodialysesonden

Das Vorgehen bei der Kalibrierung der Mikrodialysesonden und die Berechung der Arzneistoffkonzentration im Interstitium entsprachen den Ausführungen zu den Probanden in diesem Kapitel (s. S. 36).

2.2.1.2 Probengewinnung und -lagerung

Zu den im Kap. 2.2.1.1 aufgeführten Zeitpunkten wurden Blut- und Mikrodialysatproben gewonnen und jeweils die tatsächlichen Entnahmezeiten dokumentiert. Um auch während der Linezolidinfusion Blut entnehmen zu können, wurde bei den Studienteilnehmern einer der beiden periphervenösen Zugänge (s. Kap. 2.2.1.1) zur Infusion und der andere zur

Probensammlung benutzt. Das Vollblut wurde unmittelbar nach der Entnahme bei Raumtemperatur 5 min lang bei 2 500 *g* zentrifugiert, das überstehende Plasma pipettiert und dieses ebenso wie die Dialysatfraktionen bei -70 °C gelagert. Die Probentransporte von Wien nach Berlin erfolgten auf Trockeneis unter Einhaltung einer Tiefkühlkette.

Im Arbeitskreis Klinische Pharmazie in Berlin wurden von Probanden- und Patientenproben zu ausgewählten Zeitpunkten UF-Proben hergestellt (s. Kap. 2.1.4). Bei der Auswahl wurde berücksichtigt, je Studientag eine Probe zu Beginn (nach 40 min, „früh“) und am Ende des Sammlungszeitraums (nach 8 h, „spät“) zu verwenden. Ferner spielte insbesondere bei den späten Zeitpunkten die totale Plasmakonzentration eine Rolle. Bestand das Risiko, bei der Messung des Ultrafiltrats eines „späten“ Zeitpunkts die Bestimmungsgrenze der HPLC-Methode zu unterschreiten, wurde eine frühere Probe des gleichen Studientags (nach 7 oder 7.5 h) herangezogen. Die Berechnung von f_u erfolgte nach Gleichung 2-4. Die Ergebnisse wurden nach den folgenden Kriterien verwendet: UF-Proben mit f_u > 100 % wurden erneut vermessen. Ergab sich auch in der Nachmessung eine f_u von mehr als 100 %, wurde dieser Wert verworfen und eine neue Plasmaprobe aus der unmittelbaren zeitlichen Umgebung ausgewählt und ultrafiltriert. Aus den beiden für jedes Individuum erhaltenen f_u-Werten jedes Studientags wurde der Mittelwert berechnet. Zeigten die Werte eine relative Abweichung vom Mittelwert um mehr als 6 %, wurde zu einem dritten Zeitpunkt (nach ca. 4 h, „mittel“) f_u bestimmt („6 %-Regel“). Gab es unter den drei Werten ein Paar, das die „6 %-Regel“ erfüllte, wurde der stärker abweichende Wert verworfen. Stimmte kein Wertepaar mit der „6 %-Regel“ überein, galt die folgende Zuordnung:

Tab. 2-4: Zuordnung von f_u-Werten zu den totalen Plasmakonzentrationen.

Messzeitpunkt (Plasma)	0 - 2.5 h	2.6 - 5 h	5.1 - 8 h
Messzeitpunkt (f_u)	früh	mittel	spät

2.2.1.3 Klinische Dokumentation

Zu Beginn und während der Linezolidtherapie wurden bei den Intensivpatienten verschiedene klinisch-chemische und hämatologische Laborparameter im Zentrallabor des Allgemeinen Krankenhauses in Wien bestimmt. Sie dienten der Überwachung der unerwünschten Arzneimittelwirkungen und der Dokumentation des Krankheitsverlaufs. Zu ihnen zählten:

- klinisch-chemische Parameter: Gesamtprotein, Totales Bilirubin, Alkalische

Phosphatase (AP), Aspartataminotranferase (ASAT), Alaninaminotransferase (ALAT), γ-Glutamyltransferase (GGT), Lactatdehydrogenase (LDH), Harnstoff, Serumkreatinin (SCr), Harnsäure, Elektrolyte, Gerinnungsparameter,

- hämatologische Parameter: Erythrozyten, Leukozyten (LEUC), Hämoglobin, mittleres Volumen des Einzelerythrozyten (MCV), mittlerer Hämoglobingehalt des Einzelerythrozyten (MCH), mittlere Hämoglobinkonzentration des Einzelerythrozyten (MCHC), Hämatokrit, Thrombozyten (THRO),
- mikrobiologische Parameter: Bestimmung der infektionsauslösenden Bakterien inkl. der individuellen minimalen Hemmkonzentration.

Aus ihnen sollen nach dem Abschluss der pharmakokinetischen Datenanalyse dieser Arbeit Kenngrößen für die verknüpfte PK/PD-Auswertung etabliert werden.

2.2.2 Individuelle pharmakokinetische Datenanalyse

2.2.2.1 Grafische und statistische Analyse des Datensatzes

Vor Beginn der pharmakokinetischen Datenauswertung wurden die Konzentrations-Zeit-Profile aller Probanden einer grafischen und statistischen Datenanalyse unterzogen. Dabei wurden die Datensätze mit Hilfe grafischer Darstellungen auf Plausibilität geprüft und ein erster Überblick über das pharmakokinetische Verhalten von Linezolid erhalten. Zur statistischen Auswertung wurden die Daten jeder Matrix und jedes Studientags nach Zeitpunkten gruppiert. Wich der tatsächliche Zeitpunkt der Probenentnahme um mehr als 0.1 h vom gewählten Gruppierungszeitpunkt ab, wurde er als individueller Datenpunkt belassen.

Zunächst wurden die individuellen Maximalkonzentrationen und die zugehörigen Zeitpunkte aus den Ultrafiltrat- und ISF-Konzentrations-Zeit-Profilen aller Probanden zusammengestellt. Aus den UF-Datensätzen nach der letzten oralen Dosis wurde jeweils die höchste gemessene UF-Konzentration als Maximalkonzentration verwendet. Nach *iv*-Applikation wurden laut Studienprotokoll am Ende der Infusion (t = 30 min) keine Blutproben entnommen, so dass zu diesen Zeitpunkten keine Messwerte vorlagen. Deshalb wurden nachträglich mit Hilfe der PK-Modelle die Maximalkonzentrationen am Infusionsende berechnet (s. Kap. 2.2.2.3). Die Verwendung der Konzentrationen zu Zeitpunkten während oder zehn Minuten nach dem Ende der Infusion erschien wenig sinnvoll und erlaubte keinen Vergleich mit den Ergebnissen anderer Studien.

2.2.2.2 Nichtkompartimentelle pharmakokinetische Auswertung

Zur Bestimmung der pharmakokinetischen Parameter von ungebundenem Linezolid in

Plasma und im Interstitium nach systemischer Applikation wurde eine nichtkompartimentelle Auswertung (101) durchgeführt. Sie diente auch zur Ermittlung pharmakokinetischer Parameter, die direkt aus den Konzentrations-Zeit-Profilen abgeleitet werden konnten.

Die terminale Eliminationsgeschwindigkeitskonstante (λ_z) wurde aus der semi-logarithmischen Darstellung der individuellen Messpunkte vorgenommen. Die gewichtete lineare Regression (Gewichtungsfaktor: $1/C_i^2$) der Messdaten der Eliminationsphase eines Konzentrations-Zeit-Profils ergab eine Gerade mit der Steigung λ_z. Voraussetzung für die Abschätzung dieser Konstante war eine lineare Pharmakokinetik.

Aus der ermittelten terminalen Eliminationsgeschwindigkeitskonstante λ_z wurde die terminale Eliminationshalbwertszeit wie folgt berechnet:

$$t_{1/2_z} = \frac{\ln 2}{\lambda_z} \qquad \textit{Gleichung 2-8}$$

Der Berechnung der Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (*area under the curve*, $AUC_{0\text{-}t_z}$) vom Zeitpunkt 0 h bis zum Zeitpunkt der letzten Konzentrationsmessung t_z lag die lineare Trapezregel (s. Gleichung 2-9) zugrunde (101). Dabei wurde die Fläche unter der Kurve in Teilflächen zwischen den Messpunkten unterteilt, die Flächen dieser Trapeze berechnet und addiert.

$$AUC_{0-t_z} = \sum_{i=1}^{z} \frac{C_i + C_{i+1}}{2} \cdot (t_{i+1} - t_i) \qquad \textit{Gleichung 2-9}$$

C_i: Messkonzentrationen

t_i: Zeitpunkte

Aus den Verhältnissen der $AUC_{0\text{-}t_z}$-Werte der ungebundenen Linezolidkonzentrationen im Plasma und im jeweiligen Interstitium wurden für jedes Individuum und jeden Studientag gewebespezifische Penetrationsfaktoren (*factor of tissue penetration*, FT) berechnet (102, 103):

$$FT = \frac{AUC_{0-t_x(ISF)}}{AUC_{0-t_x(UF)}} \qquad \textit{Gleichung 2-10}$$

Die Berechnung der Gewebepenetrationsfaktoren beruht auf den Flächen unter der Konzentrations-Zeit-Kurve, die das Zeitintervall 0 bis t_z der jeweiligen Dosierung einschließen. Bei einem vorzeitigen Abbruch der Probensammlung in einer Matrix wurde

die AUC der für die Berechnung erforderlichen zweiten Matrix über dasselbe (kürzere) Intervall verwendet.

Die Berechnung weiterer pharmakokinetischer Parameter ist in Kap. 2.2.2.3 vorgestellt.

2.2.2.3 Kompartimentelle pharmakokinetische Auswertung

Kompartiment-Modelle

Bei der kompartimentellen pharmakokinetischen Datenanalyse wird der Organismus als ein System imaginärer kinetischer Verteilungsräume angesehen. Physiologisch betrachtet, repräsentiert ein Kompartiment eine Gruppe von Körperregionen, z.B. Geweben (60). Innerhalb eines Kompartiments erfolgt an jeder Stelle die gleiche Konzentrationsänderung pro Zeiteinheit. Bei Vorliegen einer linearen Pharmakokinetik werden die Transportvorgänge in ein bzw. aus einem Kompartiment durch Geschwindigkeitskonstanten erster Ordnung wiedergegeben (69, 104).

Bei einem Ein-Kompartiment-Modell wird der Verteilungsraum im Körper pharmakokinetisch als ein Raum mit dem Volumen V1 angesehen, in dem alle zugehörigen Körperflüssigkeiten miteinander in einem Fließgleichgewicht stehen. Der Arzneistoff verteilt sich in diesem Raum in einer vernachlässigbar kurzen Zeitspanne. In Abb. 2-3 ist das Ein-Kompartiment-Modell schematisch dargestellt. In diesem Modell wird die Arzneistoffdosis (D) entweder als *iv*-Bolus injiziert, nach einer Kinetik nullter Ordnung in den Körper infundiert (Geschwindigkeitskonstante k_{01}) oder nach oraler Applikation mit einer Kinetik erster Ordnung mit der Geschwindigkeitskonstante k_a resorbiert. Die Elimination erfolgt nach einer Kinetik erster Ordnung mit der Geschwindigkeitskonstante k_{10}.

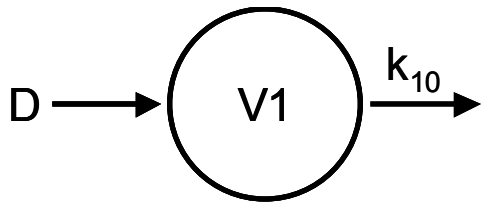

Abb. 2-3: Schematische Darstellung eines Ein-Kompartiment-Modells.

Für die Beschreibung der Konzentration C in Abhängigkeit von der Zeit t nach *iv*-Bolusinjektion lautet die allgemeine Modellgleichung (105, 106):

$$C = \sum_{x=1}^{n} C_x \cdot e^{-\lambda_x \cdot t} \qquad \textit{Gleichung 2-11}$$

n: Anzahl der Kompartimente (z.B. n = 1 oder 2)

Der Koeffizient C_x und der Exponent λ_x werden als Modellparameter der Modellgleichung bezeichnet.

Für eine Arzneistoffinvasion nullter Ordnung (Infusion) wird die Infusionsgeschwindigkeit in die Gleichung einbezogen. Die Konzentration errechnet sich aus (105)

$$C = C_1 \cdot \frac{1 - e^{-\lambda_1 \cdot TI}}{\lambda_1 \cdot TI} \cdot e^{-\lambda_1 \cdot (t - TI)} \qquad \textit{Gleichung 2-12}$$

TI: Infusionsdauer

Zur Beschreibung der Daten nach *po*-Dosierung wurde die Modellgleichung um einen Exponentialterm erweitert. Für das Ein-Kompartiment-Modell ergab sich (105):

$$C = C_1 \cdot e^{-\lambda_1 \cdot t} - C_a \cdot e^{-k_a \cdot t} \qquad \textit{Gleichung 2-13}$$

Die Berechnung von Konzentrationen nach Mehrfachdosierung erfolgte nach dem Prinzip der Überlagerung (engl. *superposition*) (107). Dabei wurde unter der Annahme, dass sich die pharmakokinetischen Parameter nicht ändern und die applizierte Substanz eine lineare Pharmakokinetik zeigt, jede Gabe als „Einzeldosis“ behandelt und der Konzentrations-Zeit-Verlauf jeweils separat berechnet. Die tatsächliche Gesamtkonzentration ergab sich aus der Addition der Konzentrationen nach jeder „Einzeldosis“ zum jeweiligen Zeitpunkt (= Überlagerung).

In einigen Fällen setzte der Anstieg der Plasmakonzentration erst eine definierte Zeitspanne nach der oralen Linezolidapplikation ein. In das Modell wurde die Verzögerungszeit (Lagzeit, t_{lag}) einbezogen. Die Modellgleichung änderte sich wie folgt:

$$C = C_1 \cdot e^{-\lambda_1 \cdot (t - t_{lag})} - C_a \cdot e^{-k_a \cdot (t - t_{lag})} \qquad \textit{Gleichung 2-14}$$

Im Zwei-Kompartiment-Modell wird der Verteilungsraum im Organismus pharmakokinetisch in zwei Räume unterteilt. Es wird zwischen dem

- zentralen Kompartiment mit dem Volumen V1 und dem
- peripheren Kompartiment mit dem Volumen V2

unterschieden. Dabei wird angenommen, dass das zentrale Kompartiment in

unmittelbarem Gleichgewicht mit dem Plasma steht und der Verteilungsvorgang zeitlich vernachlässigt werden kann (z.B. in stark perfundierten Organen). Das periphere Kompartiment umfasst schlechter perfundierte Organe. Nach der Arzneistoffapplikation wird einige Zeit benötigt, um mit dem zentralen Kompartiment einen Gleichgewichtszustand zu erreichen (69). Der Stofftransport wird durch die Geschwindigkeitskonstanten erster Ordnung k_{12} (Transport vom zentralen ins periphere Kompartiment) und k_{21} (Transport vom peripheren ins zentrale Kompartiment) charakterisiert. Ein allgemeines Zwei-Kompartiment-Modell ist in Abb. 2-4 schematisch wiedergegeben.

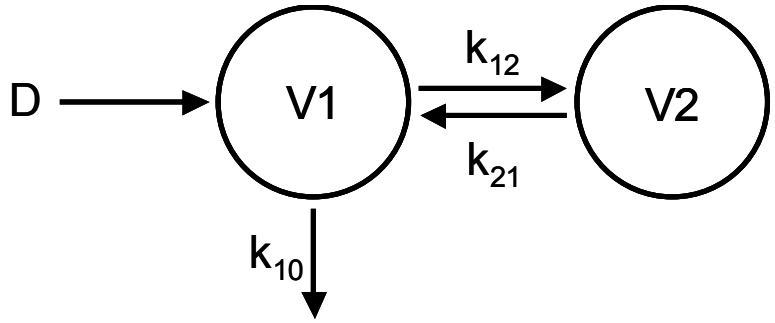

Abb. 2-4: Schematische Darstellung eines Zwei-Kompartiment-Modells.

Nachfolgend werden die in der Modellgleichung (s. Gleichung 2-11) aufgeführten Koeefizienten C_1 und C_2 als A und B und die Exponenten λ_1 und λ_2 als α und β wiedergegeben.

Strategien zur Modellentwicklung

Die kompartimentelle pharmakokinetische Auswertung basierte in allen Matrizes auf den ungebundenen Linezolidkonzentrationen, um jeweils klinisch relevante Konzentrationen miteinander vergleichen zu können. Die ultrafiltrierbare, ungebundene Linezolidkonzentration wurde dazu, wie in Kap. 2.2.1.2 beschrieben, mit Hilfe des individuellen f_u-Werts aus der totalen Plasmakonzentration berechnet. Für die ISF-Konzentrationen war eine Umrechnung nicht nötig, da in Mikrodialysat direkt die freie, diffusionsfähige Arzneistoffkonzentration vermessen wurde. Die im Dialysat gemessenen Linezolidkonzentrationen wurden mit der *relative recovery* der jeweiligen Mikrodialysesonde in die im Interstitium vorliegenden ungebundenen Konzentrationen umgerechnet, wie in Kap. 2.2.1.1 beschrieben.

Die pharmakokinetische Datenauswertung erfolgte mit der validierten Software WinNonlin®, Version 4.0 (Pharsight Corp., Mountain View, USA). Alle UF-Modelle wurden

mit Hilfe von Modellgleichungen algebraisch gelöst. In den integrierten Modellen für UF- und ISF-Konzentrationen wurden zur Beschreibung der Konzentrations-Zeit-Profile in den einzelnen Kompartimenten Differenzialgleichungen eingesetzt (numerische Lösung). Dadurch konnten die Modellstrukturen flexibel variiert werden, ohne auf Transparenz in der Modellprogrammierung verzichten zu müssen. Die Modellauswahl erfolgte individuell anhand der in diesem Kapitel unter „Beurteilung der Modellanpassung" beschriebenen Kriterien.

Modelle zur Beschreibung des Konzentrations-Zeit-Verlaufs in Ultrafiltrat

Die pharmakokinetische Datenanalyse erfolgte mit Hilfe von Kompartiment-Modellen. Zunächst wurden die Konzentrations-Zeit-Profile jedes **Probanden** in UF in semi-logarithmischer Darstellung visuell beurteilt und entsprechend der Anzahl unterschiedlicher Steigungen in der Phase absinkender Konzentrationen Modelle verschiedener Struktur ausgewählt. Danach sollten sich alle UF-Konzentrations-Zeit-Profile der Probanden mit einem offenen Ein- oder Zwei-Kompartiment-Modell mit einer Invasionskinetik nullter (*iv*) oder erster Ordnung (*po*) und einer Elimination erster Ordnung beschreiben lassen. Im Zwei-Kompartiment-Modell erfolgte die Elimination ausschließlich aus dem zentralen Kompartiment (s. Abb. 2-4).

Auf dieser Grundlage wurde zu Beginn ein Basismodell für die Evaluierung der PK nach *iv*-Einmaldosis bei **Probanden** entwickelt. Für das Modell zur Beschreibung der Daten nach *po*-Mehrfachdosierung wurden ausschließlich die gemessenen UF-Konzentrationen nach der letzten Linezolidgabe verwendet. Für jeden Probanden wurde die Anzahl der Kompartimente des Strukturmodells individuell bestimmt. Dafür wurden die Ergebnisse der Anwendung der Ein- und Zwei-Kompartiment-Modelle jeweils mit und ohne Lagzeit verglichen und das am besten den Daten angepasste Modell ausgewählt. Auf der Grundlage beider Modelle wurden die pharmakokinetischen Parameter der verschiedenen Applikationswege sowie nach Einmal- und Mehrfachdosierung verglichen. Anschließend wurde die intravenöse mit der oralen Arzneistoffinvasion in einem selbst entwickelten Modell kombiniert (**kombiniertes** *iv* + *po*-**Modell**). Der Arzneistoff gelangte nun während der ersten Dosis nach einer Kinetik nullter und nach allen weiteren Gaben nach einer Kinetik erster Ordnung in den Organismus. Die Elimination basierte auf einer Kinetik erster Ordnung.

Als Basis der Modellentwicklung für die **Patienten** diente, wie bereits für das Probandenkollektiv beschrieben, die grafische Analyse der semilogarithmisch dargestellten Konzentrations-Zeit-Profile in UF. Daraus wurde abgeleitet, dass für alle Patienten nach *iv*-Einmaldosis ein Zwei-Kompartiment-Modell verwendet werden konnte.

Dennoch wurde die Anzahl der Kompartimente individuell geprüft. Im nächsten Schritt wurde die *iv*-Mehrfachdosierung in das Modell eingebunden, mit dem die PK von Linezolid bei Intensivpatienten beider Applikationszeiträume in einem **kombinierten Modell** untersucht werden sollte. Wegen der nur unzureichend durchführbaren Modellanpassung im kombinierten Modell wurde separat für die Daten nach der letzten Linezolidinfusion ein PK-Modell entwickelt. Auf der Grundlage der beiden Modelle nach der ersten und nach der letzen Dosierung wurden die pharmakokinetischen Parameter verglichen. Die Struktur der an die Patientendaten angepassten Modelle beruhte auf den Darstellungen in Abb. 2-3 und Abb. 2-4. Die Patienten erhielten Linezolid ausschließlich als *iv*-Infusion (Invasionskinetik nullter Ordnung).

Modelle zur simultanen Beschreibung des ungebundenen Konzentrations-Zeit-Verlaufs in Ultrafiltrat und im Interstitium

Die simultane Analyse der UF- und ISF-Konzentrations-Zeit-Profile erfolgte mit selbst entwickelten PK-Modellen. Zunächst wurden die Daten der **Probanden** nach *iv*-Einmaldosis untersucht. Mit der Einbindung der ISF-Konzentrationen in das Modell wurde die Anzahl der Kompartimente erhöht. Es wurden offene 3- und 4-Kompartiment-Modelle verschiedener Struktur analysiert. Außerdem wurden die Anzahl der Clearance-Parameter und ihre Lokalisation im Modell variiert. Die Kinetiken der Arzneistoffinvasion und -elimination wurden von den reinen UF-Modellen übernommen und nicht verändert. Mit der Einbindung der *po*-Applikation wurde für die Probanden das **integrierte** *iv* + *po*-**Modell** entwickelt.

Auch die Konzentrations-Zeit-Profile der **Patienten** wurden mit Hilfe eines integrierten Modells nach *iv*-Einmaldosis dargestellt. Dafür wurde versucht, ausgehend vom integrierten Modell für die Probanden nach *iv*-Einmaldosis durch Variation der Modellstruktur die Anpassung an die Patientendaten zu verbessern. Nach den Erfahrungen aus der Entwicklung eines kombinierten UF-Modells für die Patienten nach Einmal- und Mehrfachdosierung wurden im nächsten Schritt ausschließlich die Daten nach der letzten Linezolidinfusion der Modellanpassung zugrunde gelegt. Durch weitere Variation der Modellstruktur wurde für jeden Patienten ein individuelles **integriertes Modell** nach *iv*-Mehrfachdosierung entwickelt.

Mit dem für jeden Studienteilnehmer am besten den Daten angepassten Modell wurden das Verteilungsvolumen im Steady State (Vss) und die Gesamtclearance (CL) berechnet.

Tab. 2-5 gibt einen zusammenfassenden Überblick über die beschriebene Modell-entwicklungsstrategie und die Herkunft der verwendeten Modelle.

Tab. 2-5: Planung der Modellentwicklungsstrategie.

Probanden	
• Matrix UF:	*iv*-Einmaldosis[#1]
	po-Mehrfachdosierung[#1]
	iv + *po*-Mehrfachdosierung (**kombiniertes Modell**)[#2]
• Matrizes UF, s.c.- und i.m.-ISF (**integrierte Modelle**):	
	iv-Einmaldosis[#1]
	iv + *po*-Mehrfachdosierung[#2]
Patienten	
• Matrix UF:	*iv*-Einmaldosis[#1]
	iv-Mehrfachdosierung[#1]
• Matrizes UF, s.c.- und i.m.-ISF (**integrierte Modelle**):	
	iv-Einmaldosis[#2]
	iv-Mehrfachdosierung[#2]

[#1] Modelle der Softwarebibliothek, [#2] Modelle eigener Entwicklung

Abschätzung der Initialwerte und mathematische Kurvenanpassung

Die mathematische Kurvenanpassung hatte zum Ziel, Parameter für eine der aufgeführten Modellgleichungen zu berechnen, die den gemessenen Konzentrations-Zeit-Verlauf am besten wiedergibt. Dabei wurde eine nichtlineare Regression durchgeführt. Mathematisch handelte es sich bei der Optimierung der Modellgleichung um die Minimierung der Summe der gewichteten Abweichungsquadrate (*weighted sum of squares*, WSS), die gemäß Gleichung 2-16 aus den gewichteten Differenzen der gemessenen Konzentrationen (C_i) und den modellvorhergesagten Konzentrationen ($\hat{C}_i$) berechnet wurde (107).

$$WSS = \sum_{i=1}^{n} W_i (C_i - \hat{C}_i)^2 \qquad \textit{Gleichung 2-15}$$

W_i: Gewichtungsfaktor

n: Anzahl der gemessenen Konzentrationen

Zur Standardisierung des Einflusses des analytischen Fehlers bei unterschiedlich hohen Konzentrationen wurde ein Gewichtungsfaktor eingeführt. Die Gewichtungsfaktoren 1, $1/C_i$ und $1/C_i^2$ wurden in einem frühen Stadium der Modellentwicklung auf ihren Einfluss auf die Optimierung der Modellgleichung untersucht.

Da es sich bei PK-Modellen um nichtlineare mathematische Modelle handelt, können während des Anpassungsprozesses multiple lokale Minima auftreten. Um jedoch das

absolute Minimum der WSS-Funktion zu erhalten, wurden zunächst geeignete Initialwerte für die Modellparameter abgeschätzt. Die Initialwerte wurden mit Hilfe des in der PK-Software enthaltenen Abschälverfahrens (Stripping-Algorithmus) anhand des individuellen Linezolidkonzentrations-Zeit-Verlaufs ermittelt und im weiteren Verlauf der Modellanpassung variiert. Basierend auf den Ergebnissen der reinen UF-Modelle wurden für die integrierten Modelle der UF- und ISF-Konzentrationen Initialwerte vorgegeben.

Ausgehend von den Initialwerten wurde die Minimierung von WSS iterativ nach dem Gauss-Newton-Algorithmus (108) so lange durchgeführt, bis die relative Änderung von WSS zwischen zwei Iterationsschritten einem bestimmten Konvergenzkriterium (< 0.0001) entsprach, d.h. die Anpassung nicht weiter verbessert werden konnte.

Beurteilung der Modellanpassung

Die Beurteilung der Qualität der Kurvenanpassung und der Parameterabschätzung beruhte zusätzlich zu WSS auf weiteren Kriterien. Diese dienten als Entscheidungsgrundlage für ein endgültiges Modell einschließlich der Gewichtungsfunktion für die pharmakokinetische Auswertung.

- Akaike-Informationskriterium (AIC) (107): Vergleich verschiedener Modelle gleicher Gewichtungsart. Die Anzahl der Messpunkte (n) und der Modellparameter (m) ging in die Berechnung des AIC nach Gleichung 2-17 ein. Das kleinere AIC zeigt das Modell an, das den Konzentrations-Zeit-Verlauf besser beschreibt.

$$AIC = n \cdot \ln(WSS) + 2 \cdot m \qquad \textit{Gleichung 2-16}$$

- Variabilität (CV) der abgeschätzten Modellparameter
- Zufällige Verteilung der gewichteten Residuen zwischen gemessenen und modell-angepassten Konzentrationen in Abhängigkeit von der Zeit
- keine signifikante Korrelation zwischen den unabhängigen Modellparametern (< 0.95 (101))

Berechnung pharmakokinetischer Parameter

Mit Hilfe der von den Modellen abgeschätzten PK-Parameter wurden weitere Kenngrößen berechnet.

Die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve ($AUC_{0-\infty}$) charakterisiert das Ausmaß der Arzneistoffexposition.

$$AUC_{0-\infty} = \frac{D \cdot F}{CL}$$ *Gleichung 2-17*

D: Dosis

F: Bioverfügbarkeit (nach *iv*-Applikation: F = 1)

Im Steady State gilt für die AUC innerhalb eines Dosierungsintervalls τ:

$$AUC_{t-(t+\tau)} = AUC_{0-\infty}(\text{Einmaldosis}) = \frac{D \cdot F}{CL}$$ *Gleichung 2-18*

Am Ende einer *iv*-Infusion wurde die Maximalkonzentration (C_{max}) in UF zum Zeitpunkt t = TI mit Hilfe der jeweiligen Modellgleichung berechnet. Nach oraler Gabe wurden die Maximalkonzentrationen in UF aus den modellvorhergesagten Konzentrations-Zeit-Profilen entnommen. Gleiches gilt für die Minimalkonzentrationen (C_{min}, C_{trough}) in UF unabhängig von der Applikationsart.

Wurden in einem Modell mehrere CL-Parameter berechnet, addierten sich die Einzelwerte zur Gesamtclearance CL_{tot}. Das Verteilungsvolumen im Steady State (Vss) wurde durch Addition der Einzelvolumina der Kompartimente erhalten. Die Halbwertszeit einzelner Phasen $t_{1/2,\,x}$ ergab sich nach:

$$t_{1/2,x} = \frac{\ln 2}{\lambda_x}$$ *Gleichung 2-19*

2.2.2.4 Berechnung pharmakodynamischer Indizes

Zur Beurteilung der Effektivität der für Linezolid zur Zeit empfohlenen therapeutischen Dosierung wurden verschiedene PD-Indizes auf der Basis der ungebundenen Linezolidkonzentrationen aller drei Matrizes im Steady State berechnet.

Der Index $fT_{>MIC}$ gibt den kumulierten prozentualen Zeitanteil von 24 h wieder, während dessen die ungebundene Konzentration eines Antibiotikums die MIC_{90} eines ausgewählten Bakteriums überschreitet (109). Dafür wurden die mit Hilfe der PK-Modelle berechneten individuellen Konzentrations-Zeit-Profile analysiert.

Für die Berechnung des PD-Parameters *f*AUC/MIC wurde zunächst $AUC_{0\text{-}12}$ bestimmt. Dafür wurden die gemessenen Konzentrations-Zeit-Kurven von der letzten gemessenen Konzentration C_z zum Zeitpunkt t_z bis zur Konzentration nach 12 h (C_{12}) unter der Verwendung von Gleichung 2-20 extrapoliert.

$$C_{12} = C_z \cdot e^{-\lambda_z \cdot t}$$ *Gleichung 2-20*

C_{12}: Messkonzentration zum Zeitpunkt 12 h nach Applikationsbeginn

C_Z: Letzte messbare Konzentration

t: Intervall zwischen t_z und 12 h

Die Berechnung der AUC zwischen t_z und t_{12} ($AUC_{t_z\text{-}t_{12}}$) erfolgte nach Gleichung 2-9. Die Addition von $AUC_{0\text{-}t_z}$ (s. Kap. 2.2.2.2) und $AUC_{t_z\text{-}t_{12}}$ lieferte $AUC_{0\text{-}12}$, die AUC während eines Dosierungsintervalls. Die meisten PD-Indizes sind auf einen Zeitraum von 24 h bezogen. Dies entsprach im Fall von Linezolid zwei Dosierungsintervallen à 12 Stunden. Deshalb wurde die $AUC_{0\text{-}12}$ verdoppelt, um die $AUC_{0\text{-}24}$, nachfolgend als *f*$AUC_{0\text{-}24}$ bezeichnet, zu berechnen. Aus dem Verhältnis von *f*$AUC_{0\text{-}24}$ und MIC_{90} ließ sich der PD-Index *f*AUC/MIC ermitteln (109).

Für alle Berechnungen wurde die MIC_{90} mit 4 µg/mL angenommen. Dieser Wert wird für Linezolid als Grenzwert bei der Empfindlichkeitsprüfung von Bakterien angesehen (38, 44, 45).

2.3 STATISTISCHE VERFAHREN UND BEURTEILUNG

Die statistische Auswertung und Beurteilung erfolgte nach Standardverfahren (110, 111). Die Berechnungen wurden mit den Programmen SPSS® für Windows (Version 11.5, SPSS Inc., Chicago, USA) und WinNonlin® (Version 4.0) durchgeführt.

2.3.1 Deskriptive Statistik

Die im Folgenden aufgeführten Lage- und Streuungsparameter dienten der Darstellung und Zusammenfassung der erhobenen Daten und der Ergebnisse der pharmakokinetischen Datenanalyse.

Lagemaße

- Arithmetischer Mittelwert ($\bar{x}$)
- Median ($\tilde{x}$)
- Geometrischer Mittelwert ($\bar{x}_{geo}$)

Streuungsmaße

- Standardabweichung (s) und Varianz (s^2)
- Standardabweichung des geometrischen Mittelwerts (s_{geo})
- Relative Standardabweichung (Variationskoeffizient, CV, %)
- Geometrischer Variationskoeffizient (CV_{geo}, %)

- 5. und 95. Perzentil: Wert einer der Größe nach geordneten Reihe, unterhalb dessen 5 % bzw. 95 % aller Werte liegen

2.3.2 Explorative Statistik

Mit Hilfe der Verfahren der beurteilenden Statistik (Signifikanztests) wurde untersucht, ob eine Nullhypothese anzunehmen oder zu verwerfen war. Dafür wurde eine sog. Irrtumswahrscheinlichkeit (p) berechnet, die das Risiko wiedergab, eine zutreffende Nullhypothese fälschlicherweise abzulehnen. Die Auswahl des Testverfahrens erfolgte nach der Art der Fragestellung, der Verteilung, der Varianzhomogenität der Parameter und des Stichprobenumfangs (n). Das Signifikanzniveau (α) wurde auf 0.05 festgelegt. Bei einer berechneten Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5 % ($p < 0.05$) wurde die Nullhypothese verworfen.

In dieser Arbeit wurden die nachfolgend aufgeführten statistischen Testverfahren eingesetzt. Dabei werden der jeweilige verwendete Test, die Irrtumswahrscheinlichkeit und der Stichprobenumfang angegeben.

Gruppenvergleich

Zunächst wurden die zu vergleichenden Stichproben auf Normalverteilung und Varianzhomogenität geprüft. In Abhängigkeit der Prüfergebnisse wurden parametrische oder nichtparametrische Verfahren angewendet:

- Shapiro-Wilk-Test: Prüfung auf Normalverteilung,
- Test nach Levene: verteilungsunabhängige Prüfung auf Varianzhomogenität,
- Student's t-Test: Vergleich von Mittelwerten zweier unabhängiger, normalverteilter Stichproben,
- Student's gepaarter t-Test: Vergleich von Mittelwerten zweier abhängiger, normalverteilter Stichproben,
- Welch-Test: Vergleich von Mittelwerten zweier unabhängiger, normalverteilter Stichproben mit inhomogenen Varianzen,
- Mann-Whitney-Test (U-Test): Rangsummentest zum Vergleich zweier unabhängiger Stichproben,
- Wilcoxon-Test für Paardifferenzen: Rangtest zum Vergleich zweier abhängiger Stichproben,
- F-Test zum Vergleich verschiedener Kompartiment-Modelle (112, 113).

Korrelation

Bei der Korrelationsanalyse werden zwei unabhängige Zufallsvariablen auf ihren

Zusammenhang geprüft. Der Korrelationskoeffizient (r) gibt das Ausmaß und die Richtung des Zusammenhangs an. Der Wertebereich von r erstreckt sich von -1 bis +1. Eine sehr starke lineare bzw. funktionale Korrelation ist durch $r = \pm 1$ gekennzeichnet. Im Fall von r = 0 liegt kein Zusammenhang vor.

Regressionsanalyse

Ziel der Regressionsanalyse ist es, den funktionalen Zusammenhang zwischen einem Merkmal (y) und mehreren (n) voneinander unabhängigen Einflussgrößen (x_i) in einer allgemeinen Funktionsgleichung (Gleichung 2-21) wiederzugeben.

$$y = a_1 \cdot x_1 + a_2 \cdot x_2 + ... + a_n \cdot x_n + b \qquad \textit{Gleichung 2-21}$$

Aus der Regressionsgleichung kann dann zu jedem beliebigen Wert der Einflussgröße x der Funktionswert der abhängigen Zielgröße y berechnet werden. Die Ermittlung der Funktionsgleichung beruht auf der Minimierung der Summe der gewichteten Abweichungsquadrate.

Die einfache Regressionsanalyse beschreibt den linearen Zusammenhang eines Merkmals (y) und einer unabhängigen Variable (x) in der Geradengleichung

$$y = a \cdot x + b \qquad \textit{Gleichung 2-22}$$

Vor der Durchführung der einfachen Regressionsanalyse wurde mit Hilfe der Statistik-Software ein geeigneter Gewichtungsfaktor $1/(\text{gewichtete Variable})^k$ für $-2 \leq k \leq +2$ bestimmt. Es wurde der Faktor ausgewählt, der die Funktion mit der kleinsten Summe der gewichteten Abweichungsquadrate ergab. Das Bestimmtheitsmaß R^2 charakterisiert die Güte der linearen Kurvenanpassung ($0 \leq R^2 \leq 1$). In seine Berechnung gehen die Varianzen der beobachteten und der durch die Funktionsgleichung vorhergesagten y-Werte ein. R^2 beschreibt den prozentualen Anteil der Varianz der y-Werte, der durch die Einflussgröße x erklärbar ist (111). In einigen Darstellungen wird der Regressionskoeffizient R verwendet ($R = \sqrt{R^2}$).