

2. PROBANDEN UND METHODEN

2.1. Studiendesign und Fallzahlschätzung

Die vorliegende klinische Studie war offen, nicht-randomisiert, nicht-kontrolliert und monozentrisch. Der Prüfplan, die Probandeninformation und die Einverständniserklärung wurden den im Jahre 2000 überarbeiteten Richtlinien der Declaration of Helsinki gemäß erstellt. Die Ethikkommission der Charité Berlin stimmte der Durchführung der Studie zu.

Die Fallzahlschätzung erfolgte aufgrund zuvor an nierentransplantierten Kindern [40] bzw. Erwachsenen [84] gewonnener pharmakokinetischer CyA-Daten. Als Ausgangswert wurde bei Erwachsenen eine CyA-AUC (monoklonal) von 5069 ± 1480 ng×h/ml angenommen. Bei Kindern wurde von einer CyA-AUC (monoklonal) von 4405 ± 1380 ng×h/ml ausgegangen. Es wurde zweiseitig getestet, da sowohl die Abnahme der pharmakokinetischen Parameter von CyA bzw. MPA als auch deren Zunahme durch Sevelamer-Einnahme möglich erschienen. Es wurden eine Irrtumswahrscheinlichkeit 1. Art von 5 % und einer Irrtumswahrscheinlichkeit 2. Art von 20 % (Power 80 %) angenommen. Eine 25%ige Verminderung der CyA-AUC durch die Sevelamer-Begleitmedikation wurde als klinisch relevant angesehen. Daraus ergab sich eine statistisch erforderliche Fallzahl von je 12 erwachsenen und 12 pädiatrischen Probanden (Berechnung mit dem Statistikprogramm NQueryAdvisor™ 1.0; Janet D. Elshoff). Die Rekrutierung erfolgte nach Aufklärung und schriftlicher Einwilligung der Probanden bzw. (bei Kindern) deren Erziehungsberechtigter. Der erste Proband begann die Studie am 31. Juli 2001, der letzte Proband beendete die Studie am 04. Juni 2002. Die Studie wurde von allen Probanden abgeschlossen.

Ein- und Ausschlusskriterien

Klinische Studien an Menschen unterliegen definierten ethischen Prinzipien (Declaration of Helsinki, 2000). Mögliche Risiken der vorliegenden Studie ergeben sich zum einen aus der Sevelamer-Medikation an sich (vor allem gastrointestinale Nebenwirkungen), zum anderen aus Veränderungen der Blutspiegel der Immunsuppressiva als Folge einer Interaktion mit Sevelamer. Zu hohe Blutspiegel der Immunsuppressiva können Ursache verstärkter Toxizität, eines erhöhten Risikos von Infektionen und malignen Erkrankungen sowie einer Teratogenität in der Schwangerschaft sein. Zu niedrige Blut-

spiegel können zu Abstoßungsreaktionen und zum Transplantatverlust führen. Auch die Blutspiegel der Begleitmedikation der Probanden könnten sich durch die Sevelamer-Medikation ändern, und ihrerseits zu Nebenwirkungen führen. Um einerseits die Sicherheit der Probanden zu gewährleisten und andererseits die Aussagekraft der Studie zu optimieren, wurden folgende Ein- und Ausschlusskriterien festgelegt:

Einschlusskriterien:

In die Studie eingeschlossen wurden Patienten, welche die folgenden Kriterien erfüllten:

- pädiatrische Patienten im Alter von 4 bis 16 Jahren bzw. erwachsene Patienten im Alter von 18 bis 65 Jahren,
- stabile Transplantatfunktion (Kreatinin-Clearance > 30 ml/min innerhalb der letzten 6 Monate vor Studienbeginn),
- stabile orale Cyclosporin A Medikation der Formulierung Sandimmun Optoral® (unveränderte CyA-Dosierung seit mindestens 2 Monaten und CyA-Talspiegelkonzentration von 80-150 ng/ml im Vollblut, bestätigt durch mindestens zwei konsequente Messungen),
- Ausschluss einer Schwangerschaft durch Messung des menschlichen Choriongonadotropins (β -HCG) im Serum (bei Probandinnen in gebärfähigem Alter).

Ausschlusskriterien:

Von der Studie ausgeschlossen waren

- Patienten, die bereits Sevelamer einnahmen oder bei denen eine Allergie gegen Sevelamer bzw. gegen einen der Inhaltstoffe bekannt war,
- Patienten, die während der letzten Monate an einer anderen Studie teilgenommen oder Blut gespendet hatten,
- schwangere Patientinnen bzw. Patientinnen in der Stillzeit,
- Patienten mit Erkrankungen des blutbildenden Systems, des Zentralen Nervensystems, malignen Erkrankungen, Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes oder therapiebedürftigen Herzrhythmusstörungen,
- Patienten mit relevanten Abweichungen der Laborbefunde insbesondere Hyperkalzämie (Serum-Kalzium > 2,75 mmol/l) oder schwerem Hyperparathyreoidismus (Plasma-Parathormon > 500 ng/l),
- Patienten, bei denen der Verdacht auf Alkohol- oder Drogenabusus bestand sowie

- Patienten mit einer Therapie, die nach Ansicht des Prüfarztes die Teilnahme an der Studie beeinträchtigen würde. Dies galt für eine bestehende oder notwendig gewordene Therapie mit Rifampicin, Phenobarbital, Erythromycin, Azolantimykotika, Vitamin-E-haltigen Multivitaminpräparaten oder Vitamin-E-Monopräparaten, Antazida, Komplexbildnern, motilitätsbeeinflussenden Arzneimitteln, Johanniskraut oder anderen Phytopharmaka. Für diese Medikamente sind Interaktionen mit CyA und / oder MMF bekannt [14, 18].

Diätetische Maßnahmen

Ab vier Tage vor Studienbeginn bis Studienende war den Probanden der Konsum von Alkohol, Drogen, Grapefruits und Grapefruitsaft untersagt, da hierdurch die Resorption und der Metabolismus von CyA beeinflusst werden können [18, 129]. Das Einhalten der Alkohol- und Drogenkarenz (Benzodiazepine, Barbiturate, Amphetamine, Opiate, Cannabinoide, Kokain) wurde jeweils an den Studientagen 1 und 7 mittels einer Urinprobe überprüft. Hierzu wurden Enzymimmunoassay-Testkits der Firma Syva, Dade Behring, Cupertino, USA verwendet. Die Messungen erfolgten am Laborautomaten COBAS MIRA S der Firma Roche Diagnostika im Institut für Klinische Pharmakologie der Berliner Charité. Während der gesamten Studie (Tag 1-7) sollten die Probanden außerdem keine koffeinhaltigen Getränke (Kaffee, Tee, Cola-Getränke) zu sich nehmen, da Koffein verschiedene Cytochrome beeinflusst (u.a. das für den Cyclosporin A-Metabolismus verantwortliche CYP-450 3A4) [129]. An den Kinetiktagen (Tag 1, 2 und 7) hielten die Probanden jeweils 10 Stunden vor Einnahme der morgendlichen Prüfmedikation eine strikte Nahrungskarenz ein. Stilles Wasser (ohne Kohlensäure) war erlaubt. Die erste Mahlzeit konnte an diesen Studientagen frühestens zwei Stunden nach der morgendlichen Gabe der Prüfmedikation eingenommen werden. Frühstück, Mittagessen und Abendbrot bestanden aus der jeweils für diesen Tag gültigen Krankenhauskost. Eine Einnahme von CyA und MMF in nüchternem Zustand sowie eine Standardisierung der Mahlzeiten waren notwendig, da eine Beeinflussung der Resorption beider Medikamente durch Nahrungsmittel nicht ausgeschlossen werden kann [13, 18, 85].

Prüfmedikation und Dosierung

Für die Studie wurde als Handelspräparat verwendet: Sevelamer (Renagel[®], Herstellerfirma Genzyme B.V., Naarden, Niederlande). Eine Kapsel Renagel[®] enthält 403 mg Sevelamer, weitere Bestandteile sind 4,6 mg hochdisperses Siliziumdioxid und 4,6 mg

Stearinsäure. Die Kapsel selbst besteht aus Gelatine, Titanoxid (E171), Natriumdodecylsulfat und Siliziumdioxid. Die Druckfarbe enthält Schellack, Propylenglykol und Indigokarmin (E132).

Es wurde gewährleistet, dass die Prüfmedikation aus einer Charge stammt. Die Prüfmedikation wurde durch das Institut für Klinische Pharmakologie der Charité zur Verfügung gestellt.

Als Dosis für Renegel waren vorgesehen:

- | | | |
|--|-----------------------|----------------|
| - Erwachsene: | (Studientage 2 und 7) | 1 × 4 Kapseln |
| | (Studientage 3 bis 6) | 3 × 4 Kapseln |
| - Kinder mit einem Körpergewicht über 30 kg: | | |
| | (Studientage 2 und 7) | 1 × 3 Kapseln |
| | (Studientage 3 bis 6) | 3 × 3 Kapseln. |

Dies entspricht der bei Kindern und Erwachsenen mit präterminaler Niereninsuffizienz üblichen Dosierung. Für Kinder mit einem Körpergewicht unter 30 kg war die Gabe von 1 × 2 bzw. 3 × 2 Kapseln pro Tag vorgesehen. Alle in die Studie eingeschlossenen Kinder hatten aber ein Körpergewicht von über 30 kg.

An den Studientagen 2 und 7 wurde Sevelamer einmalig (morgens, zusammen mit den jeweiligen Immunsuppressiva und einem Glas Wasser) verabreicht. Die Probanden nahmen die Prüfmedikation unter Aufsicht eines Prüfarztes ein, bei Einnahme waren sie nüchtern. An den Studientagen 3 bis 6 (ambulant) nahmen die Probanden die oben angegebene Sevelamer-Dosis jeweils zum Frühstück, Mittag- und Abendessen ein. Morgens und abends wurden zusätzlich die individuell verordneten Immunsuppressiva eingenommen. Die Einnahme sonstiger verordneter Dauermedikation erfolgte wie gewohnt.

Überprüfung der Compliance

Die Überprüfung der Compliance bei der ambulanten Medikation erfolgte durch

- das Abzählen und die Dokumentation der Anzahl ausgegebener und zurückgenommener Sevelamer-Kapseln durch den Prüfarzt sowie
- die Dokumentation von Datum, Uhrzeit und Menge der Sevelamer-, CyA- und MMF-Einnahme durch die Probanden bzw. (bei Kindern) durch deren Erziehungsberechtigte.

2.2. Untersuchte Probanden

In die Studie eingeschlossen wurden achtzehn nierentransplantierte Patienten. Davon waren zehn Probanden Erwachsene, acht Probanden waren Kinder.

Erwachsene Probanden

Zur Gruppe der Erwachsenen gehörten eine Frau und neun Männer. Alle Probanden waren Kaukasier. Die demographischen Daten der Erwachsenen sind in Tabelle 1 und 2 zusammengefasst.

Alle Probanden wurden mit CyA (Sandimmun Optoral[®]) behandelt, drei der Probanden erhielten zusätzlich MMF (Cellcept[®]).

Als weitere Immunsuppressiva erhielten die Erwachsenen Azathioprin (n = 2) und Glucocorticoide (n = 7). Zusätzlich nahmen die Probanden folgende Medikamente ein: Acetylsalicylsäure (n = 1), Alendronat (n = 1), Allopurinol (n = 1), Amlodipin (n = 6), Benzbromaron (n = 5), Captopril (n = 1), Celiprolol (n = 2), Cerivastatin (n = 1), Colecalciferol (n = 1), Doxazosin (n = 2), Eisen (n = 1), Famotidin (n = 1), Felodipin (n = 1), Fenofibrat (n = 1), Fluvastatin (n = 1), Furosemid (n = 3), Gliquidon (n = 1), Kalzium (n = 1), Magnesium (n = 2), Metoprolol (n = 4), Moxonidin (n = 1), Natriumbicarbonat (n = 1), Nebivolol (n = 1), Nifedipin (n = 1), Nitrendipin (n = 1), Pravastatin (n = 1), Ranitidin (n = 1), Spironolacton (n = 1) und Torasemid (n = 3). Die Begleitmedikation wurde während der Studiendauer nicht verändert.

Bei den Probanden hatten jeweils folgende nephrologische Grunderkrankungen zur Niereninsuffizienz geführt: chronische Glomerulonephritis (n = 3), IgA-Nephropathie (n = 2), polyzystische Nieren (n = 1), Pyelonephritis (n = 1) und Wegner-Granulomatose (n = 2). Bei einem Probanden bestand eine terminale Niereninsuffizienz unklarer Genese.

Einer der Probanden lag mit einem Lebensalter von 68 Jahren über der in den Einschlusskriterien festgelegten Altersspanne. Aufgrund seines guten Allgemeinzustandes wurde eine Teilnahme an der Studie jedoch als unbedenklich erachtet.

Pädiatrische Probanden

Zur Gruppe der Kinder gehörten vier Mädchen und vier Jungen. Alle Probanden waren Kaukasier. Die demographischen Daten der Kinder sind in Tabelle 1 und 2 dargestellt.

Alle Probanden erhielten eine CyA (Sandimmun Optoral®)-Medikation. MMF (Cellcept®) wurde von sechs Probanden eingenommen.

Als immunsuppressive Begleitmedikation erhielten die Probanden Azathioprin (n = 2) und Glucocorticoide (n = 6). Die Kinder nahmen zusätzlich folgende Medikamente ein: Atenolol (n=2), Dihydralazinsulfat (n=3), Doxazosin (n=2), Eisen (n=3), Magnesium (n = 3), Natriumbikarbonat (n = 2) und Ramipril (n = 2). Die Begleitmedikation wurde im Verlauf der Studie nicht verändert.

Die Kinder hatten folgende nephrologische Grunderkrankungen: Alport-Syndrom (n = 1), Anti-Basalmembran-Glomerulonephritis (n = 1), Hämolytisch Urämisches Syndrom (n = 1), Joubert-Syndrom (n = 1), Multiorganversagen nach fetofetaler Transfusion (n = 1), obstruktive Uropathie (n = 1), Prune-Belly-Syndrom (n = 1) und Urethralklappe mit vesikoureteralem Reflux (n=1).

Eines der Kinder war psychomotorisch retardiert. Eine Studienteilnahme wurde jedoch als unbedenklich erachtet.

Tabelle 1: Demographische Daten (Zusammenfassung)

| | Erwachsene | | Kinder | |
|--|---------------------------------|-------------|---------------------------------|-------------|
| | Mittelwert ± Standardabweichung | Spannweite | Mittelwert ± Standardabweichung | Spannweite |
| Alter (Jahre) | 43 ± 14 | 24-68 | 12 ± 3 | 8-15 |
| Geschlecht: weiblich/männlich | 1/9 | | 4/4 | |
| Körpergewicht (kg) | 74 ± 17 | 45 - 107 | 52 ± 22 | 31 - 70 |
| Körpergröße (cm) | 176 ± 13 | 164 - 194 | 150 ± 14 | 128 - 163 |
| Monate nach Transplantation | 99 ± 64 | 8 - 208 | 42 ± 25 | 11 - 83 |
| Art des Transplantats: LS / VS | 2 / 7 | | 1 / 6 | |
| Serum-Kreatinin bei Studieneinschluss (mg/dl) | 1,80 ± 0,70 | 0,71 - 2,82 | 1,02 ± 0,20 | 0,72 - 1,39 |
| Cyclosporin A-Dosis (mg/d) | 209 ± 53 | 150 - 300 | 206 ± 52 | 130 - 300 |
| Cyclosporin A / Körperoberfläche (mg/m²×d) | 111 ± 27 | 89 - 170 | 145 ± 35 | 102 - 189 |
| MMF-Dosis (mg/d) | 1667 ± 577 | 1000 - 2000 | 1117 ± 553 | 500 - 2000 |
| MMF / Körperoberfläche (mg/m²×d) | 861 ± 382 | 446 - 1198 | 717 ± 268 | 40 - 1136 |

LS: Lebendspende; VS: Verstorbenenenspende

Tabelle 2: Demographische Daten der einzelnen Probanden

| Proband | Alter (Jahre) | Geschlecht | Körpergewicht (kg) | Körpergröße (cm) | Monate nach Transplantation | Art des Transplantats | Kreatinin bei Studieneinchluss (mg/dl) | Cyclosporin A-Dosis (mg/d) | Cyclosporin A / Körperoberfläche (mg/m ² ×d) | MMF-Dosis (mg/d) | MMF / Körperoberfläche (mg/m ² ×d) |
|---------|---------------|------------|--------------------|------------------|-----------------------------|-----------------------|--|----------------------------|---|------------------|---|
| SE01 | 51 | m | 73,0 | 181 | 208 | VS | 1,95 | 170 | 88,77 | - | - |
| SE02 | 42 | m | 69,0 | 164 | 170 | VS | 1,59 | 200 | 112,99 | - | - |
| SE03 | 39 | m | 107,0 | 169 | 132 | VS | 2,64 | 220 | 98,21 | 1000 | 446,43 |
| SE04 | 68 | m | 71,0 | 168 | 78 | * | 0,71 | 200 | 109,89 | - | - |
| SE05 | 64 | w | 63,0 | 160 | 60 | VS | 1,46 | 150 | 89,82 | 2000 | 1197,60 |
| SE06 | 45 | m | 83,0 | 187 | 79 | VS | 1,59 | 300 | 144,51 | - | - |
| SE07 | 37 | m | 62,0 | 180 | 156 | VS | 2,74 | 300 | 170,36 | - | - |
| SE08 | 27 | m | 45,0 | 165 | 56 | VS | 2,82 | 150 | 104,17 | - | - |
| SE09 | 24 | m | 83,0 | 194 | 42 | LS | 1,56 | 200 | 94,79 | 2000 | 947,87 |
| SE10 | 37 | m | 84,0 | 194 | 8 | LS | 0,90 | 200 | 93,90 | - | - |
| SK01 | 15 | w | 36,5 | 153 | 45 | * | 0,97 | 170 | 136,00 | 500 | 400,00 |
| SK02 | 15 | m | 93,4 | 163 | 36 | VS | 1,24 | 220 | 106,80 | 1200 | 582,52 |
| SK03 | 15 | w | 64,2 | 161 | 73 | VS | 1,39 | 300 | 177,51 | 1400 | 828,40 |
| SK04 | 13 | m | 70,0 | 159 | 17 | VS | 0,94 | 180 | 102,27 | 2000 | 1136,36 |
| SK05 | 9 | m | 30,8 | 132 | 41 | VS | 1,13 | 200 | 188,68 | - | - |
| SK06 | 13 | w | 50,0 | 160 | 83 | LS | 0,85 | 250 | 167,79 | - | - |
| SK07 | 8 | w | 37,3 | 128 | 26 | VS | 0,93 | 130 | 113,04 | 600 | 521,74 |
| SK08 | 11 | m | 36,2 | 143 | 11 | VS | 1,72 | 200 | 166,67 | 1000 | 833,33 |

Proband: Probanden-Identifikationsnummer SE01 bis SE10 für Erwachsene; SK01 bis SK08 für Kinder

Geschlecht: m = männlich, w = weiblich

Art des Nierentransplantats: LS = Lebendspende, VS = Verstorbenen spende

(*) keine Angaben, (-) trifft nicht zu

2.3. Studienablauf

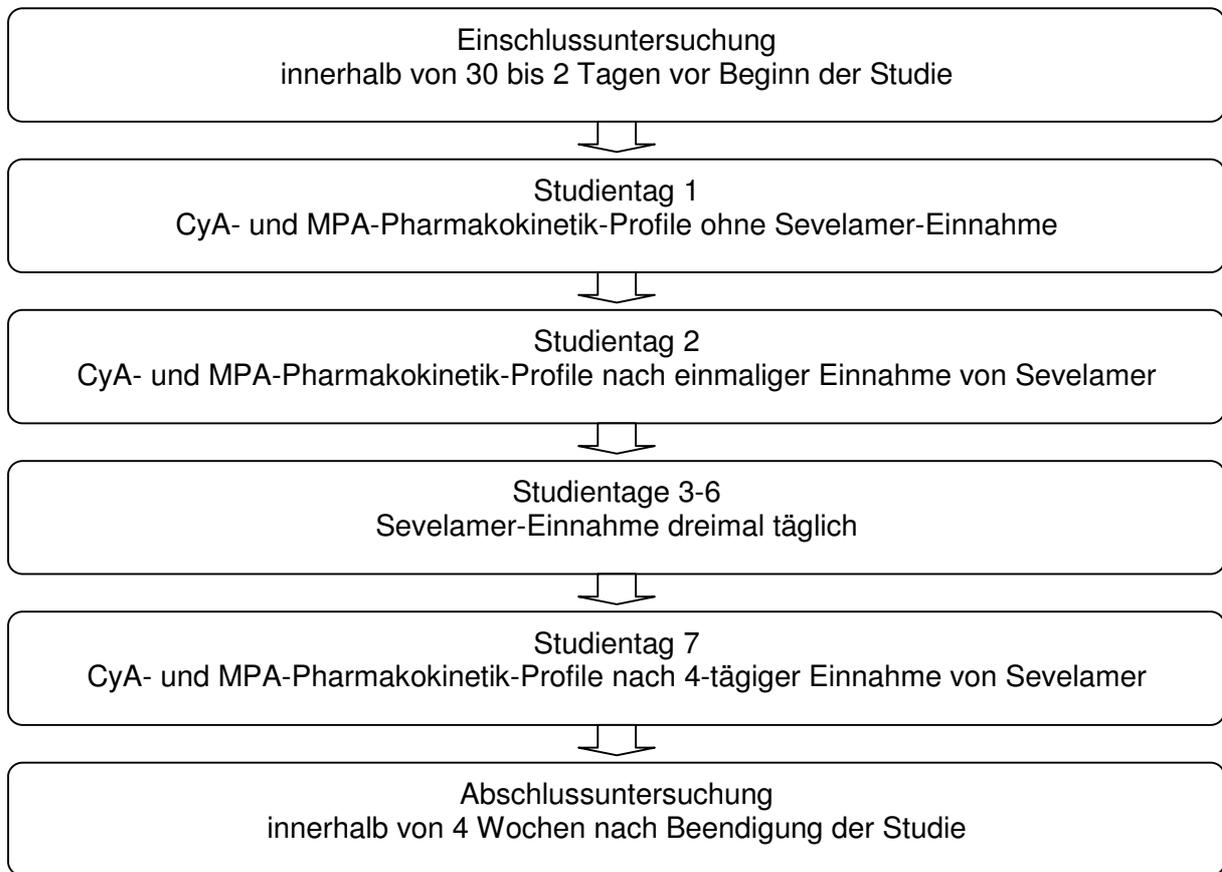


Abbildung 3: Übersicht Studienablauf

Einschlussuntersuchung (Tag -30 bis -2)

Innerhalb von 30 bis 2 Tagen vor Beginn der Studie wurde für jeden Probanden eine Einschlussuntersuchung durchgeführt. Es wurden die Ein- und Ausschlusskriterien geprüft sowie zusätzlich folgende Daten erfasst: demographische Daten (Alter, Geschlecht, ethnische Abstammung, Körpergröße, Körpergewicht), Angaben zur nephrologischen Grunderkrankung (Diagnose, Zeitpunkt der letzten Nierentransplantation, Angaben zum Spender), Begleiterkrankungen, Begleitmedikation und Angaben zu Lebensgewohnheiten (Alkohol-, Nikotin-, Koffeingenuss bzw. das Einhalten einer spezifischen Diät). Die Anamnese und der allgemeine körperliche Status wurden erhoben, es wurde der Blutdruck gemessen und ein 12-Kanal-EKG abgeleitet. Weiterhin wurden der Cyclosporin A-Talspiegel sowie folgende laborchemische Parameter bestimmt: Kalium, Natrium, Phosphat, Kalzium, ASAT, ALAT, γ -GT, AP, Amylase, Gesamt-CK, Gesamt-

protein, Albumin, Quick, PTT, Glucose, Kreatinin, Harnstoff, Hämoglobin, Hämatokrit, Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten, Bilirubin sowie iPTH.

Sämtliche Werte wurden in den Laboratorien für Klinische Chemie der Charité gemessen. Alle Patientendaten wurden in vorbereiteten Patienten-Dokumentationsbögen erfasst und später in eine SPSS-Datentabelle übertragen („Statistical Package for the Social Sciences“, SPSS für Windows, Version 10.0). Die Laborparameter wurden jeweils mit den Referenzbereichen für Erwachsene [128] bzw. mit den Referenzbereichen für Kinder [123] verglichen. Bei Probandinnen in gebärfähigem Alter wurde ein serologischer Schwangerschaftstest durchgeführt.

Erster Studientag (Pharmakokinetikprofile ohne Sevelamer-Einnahme)

Ziel des ersten Studientages war die Erfassung der individuellen pharmakokinetischen Parameter für Cyclosporin A (CyA) und gegebenenfalls Mycophenolsäure (MPA) ohne Sevelamer-Einnahme für jeden einzelnen Probanden.

Die Probanden trafen am ersten Studientag nüchtern (d.h. nach 10 Stunden Nahrungskarenz) morgens in der Probandeneinheit im Institut für Klinische Pharmakologie der Charité ein. Zunächst wurde ein peripherer venöser Verweilkatheter gelegt, und es erfolgte jeweils eine Blutentnahme (je 1 ml EDTA-Blut) für CyA und gegebenenfalls MPA. Unmittelbar danach (um ca. 8.00 Uhr) nahmen die Probanden ihre individuelle morgendliche CyA- sowie gegebenenfalls MMF-Dosis unter Aufsicht des Prüfarztes mit 100-200 ml Wasser ein. Anschließend wurde zur Bestimmung der CyA-Pharmakokinetik zu folgenden Zeitpunkten jeweils 1 ml EDTA-Blut abgenommen: 30 Minuten, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 12 Stunden nach der Medikamenteneinnahme. Bei Probanden mit CyA-/MMF-Kombinationstherapie wurde zu denselben Zeitpunkten zusätzlich 1 ml EDTA-Blut zur Bestimmung der individuellen MPA-Pharmakokinetik abgenommen. Zwei Stunden nach Medikamenteneinnahme erhielten die Probanden die erste Mahlzeit. Das Trinken von stillem Wasser war bereits 1 Stunde nach Medikamenteneinnahme erlaubt. Alle Probanden waren auf ein 12-stündiges Dosierungsintervall für CyA bzw. MMF eingestellt, so dass die abendliche Medikamenteneinnahme nach der letzten Blutabnahme erfolgte.

Desweiteren wurde am ersten Studientag wie oben beschrieben ein Alkohol- und Drogenscreening (Benzodiazepine, Barbiturate, Amphetamine, Opiate, Cannabinoide, Kokain) im Urin vorgenommen. Alle Probanden übernachteten in der Probandeneinheit

des Instituts für Klinische Pharmakologie der Charité. Dadurch konnte die Compliance der Probanden in Bezug auf die diätetischen Maßnahmen kontrolliert werden.

Zweiter Studientag (Pharmakokinetikprofile nach einmaliger Einnahme von Sevelamer)

Am zweiten Studientag sollte eine potentielle Beeinflussung der CyA- bzw. MPA-Pharmakokinetik durch einmalige Einnahme von Sevelamer untersucht werden. Grundlage zum Vergleich bildeten die am Tag 1 gewonnenen pharmakokinetischen Daten.

Nach einer Nüchtern-Blutabnahme (nach 10 Stunden Nahrungskarenz) nahmen die Probanden ihre individuelle CyA- sowie gegebenenfalls MMF-Dosis zusammen mit der Prüfmedikation Sevelamer (Dosierung siehe oben) und einem Glas Wasser ein. Wie am Tag 1 wurden für CyA und MPA jeweils eine 10-Punkte-Kinetik über 12 Stunden erstellt. Es galten dieselben diätetischen Maßnahmen wie am Tag 1.

Studientage drei bis sechs (ambulant, Sevelamer-Medikation dreimal täglich)

Am Abend des 2. Tages bis einschließlich Tag 6 waren die Probanden nicht stationär. Sie waren unterwiesen, die vorgeschriebene Sevelamer-Dosis (siehe oben) dreimal täglich zu den Mahlzeiten einzunehmen (morgens und abends zusammen mit ihrer individuellen CyA- bzw. MMF-Medikation). Auf vorbereiteten Dokumentationsbögen sollten jeweils die Uhrzeit der Einnahme von Sevelamer, CyA und gegebenenfalls MMF sowie das Auftreten unerwünschter Ereignisse von den Probanden vermerkt und dem Prüfarzt mitgeteilt werden.

Am Tag 3 wurden im Institut für Klinische Pharmakologie der Charité die Kinetiken der Tage 1 und 2 für CyA ermittelt und ausgewertet. Im Falle einer 30%igen Differenz der individuellen CyA-AUC von Tag 1 zu Tag 2 im Rahmen dieser Zwischenauswertung war eine CyA-Talspiegelkontrolle am Tag 5 vorgesehen. Ausgeprägte Veränderungen der CyA-Blutspiegel mit möglichen klinischen Konsequenzen (siehe oben) sollten damit rechtzeitig erkannt und entsprechend therapiert werden.

Siebenter Studientag (Pharmakokinetikprofile nach 4-tägiger Sevelamer-Einnahme)

Ziel des 7. Studientages war es, anhand der CyA- bzw. MPA-Blutkonzentrationen zu untersuchen, ob es erst unter mehrmaliger Einnahme von Sevelamer (wenn am Tag 1 keine Beeinflussung auftrat) zu einer Veränderung der Pharmakokinetik der genannten Immunsuppressiva kommt, oder sich diese (wenn am Tag 1 eine Beeinflussung auftrat)

im Verlauf der gleichzeitigen Sevelamer-Medikation noch weiter verändert. Zum Vergleich wurden die am Tag 1 und 2 erhobenen Parameter herangezogen.

Die Probanden trafen morgens nüchtern (d.h. nach 10 h Nahrungskarenz) in der Probandeneinheit im Institut für Klinische Pharmakologie der Charité ein. Nach dem Legen eines peripheren venösen Verweilkatheters erfolgte je eine Blutentnahme zur Bestimmung der CyA- bzw. gegebenenfalls der MPA-Blutspiegel. Anschließend wurde die individuelle CyA- bzw. MMF-Dosis zusammen mit der Prüfmedikation Sevelamer (Dosis siehe oben) und 100-200 ml Wasser unter Aufsicht des Prüfarztes eingenommen. Es wurde zu den gleichen Zeitpunkten wie an den Tagen 1 und 2 jeweils 1 ml EDTA-Blut zur Bestimmung der CyA- und MPA-Blutspiegel abgenommen.

Wie am ersten Studientag wurde ein Alkohol- und Drogenscreening (Benzodiazepine, Barbiturate, Amphetamine, Opiate, Cannabinoide, Kokain) im Urin vorgenommen.

Abschlussuntersuchung

Die Abschlussuntersuchung erfolgte innerhalb von 4 Wochen nach Beendigung der Studie. Es wurden die Anamnese seit Studienbeginn sowie der allgemeine körperliche Zustand des Patienten erfasst und der Blutdruck gemessen. Dieselben laborchemischen Parameter wie in der Einschlussuntersuchung wurden erneut abgenommen und in den Laboratorien für Klinische Chemie der Charité gemessen. Wiederum wurden alle Ergebnisse in den Patienten-Dokumentationsbögen erfasst und später in eine SPSS-Datentabelle übertragen. Die Laborparameter wurden mit den jeweiligen Referenzbereichen verglichen. Mit Hilfe des Wilcoxon-Tests (nicht-parametrisch, für zwei verbundene Variablen) wurden die Laborparameter der Ein- und Abschlussuntersuchung auf signifikante Veränderungen untersucht, und diese auf ihren Bezug zur Studie geprüft. Durch dieses Vorgehen sollten unerwünschte Ereignisse im Zusammenhang mit der Klinischen Studie erkannt und so das Risiko für die Probanden minimiert werden.

2.4. Analytische Auswertung

Cyclosporin A – Analytik

Die quantitative Bestimmung der CyA-Konzentrationen erfolgte im Labor für Therapeutisches Drug Monitoring des Instituts für Klinische Pharmakologie der Charité gemäß den Standards für routinemäßige Arzneimittelbestimmungen (monatliche externe Qua-

litätskontrolle, Ringversuche). Die Blutproben wurden im Kühlschrank aufbewahrt und am Folgetag analysiert.

Quantitative Bestimmung des monoklonalen Cyclosporin A

Hierbei wurde spezifisch die CyA-Muttersubstanz aus Vollblut mit EDTA-Zusatz bestimmt. Verwendet wurden CEDIA[®] (cloned enzyme donor immuno assay technique) Cyclosporin PLUS-Kits sowie CEDIA[®] Cyclosporin PLUS-Kalibratoren der Firma Microgenics am Probenautomaten Hitachi der Firma Roche Diagnostics.

- Messtheorie: Das Assay basiert auf der Konkurrenz des in der Blutprobe enthaltenen CyA mit dem Analyt in der Testsubstanz um eine Antikörperbindungsstelle. Dabei ist der Analyt der Testsubstanz an ein inaktives Fragment des bakteriellen Enzyms Beta-Galaktosidase gebunden. Dieses Enzym wird gentechnisch in zwei inaktive Fragmente gespalten. Die Fragmente assoziieren spontan zum aktiven Enzym, welches im Test ein Substrat spaltet. Die entstehende Farbänderung kann spektral-photometrisch gemessen werden. Enthält die Blutprobe CyA, so bindet sich dieses an den Antikörper. Die inaktiven Enzymfragmente bilden ein aktives Enzym; Substrat wird gespalten. Enthält die Blutprobe kein CyA, so binden die Antikörper an den mit dem inaktiven Enzymfragment konjugierten Analyt der Testsubstanz. Eine Reassoziierung der inaktiven Enzymfragmente wird verhindert; es wird kein aktives Enzym gebildet. Die Menge des gebildeten aktiven Enzyms und die daraus resultierende Extinktionsänderung sind direkt proportional zur Menge des in der Blutprobe enthaltenen CyA [130].
- Durchführung: In Vorbereitung auf den Test wurden alle Proben (Blutproben, Kalibratoren und Kontrollen) vorsichtig gemischt. Exakt 100 µl jeder Probe wurden in je ein Probengefäß gefüllt. Zu jeder Probe wurden jeweils 400 µl CEDIA[®] Cyclosporin Plus Lyse Reagenz pipettiert. Dann wurden die Probengefäße für 2-5 Sekunden gevortext. Schließlich konnte der Test am Probenautomaten durchgeführt werden.

Der Messbereich dieses Systems liegt zwischen 25 und 2000 ng/ml. Proben, die über dem hohen Cyclosporin PLUS Kalibrator lagen, wurden zu gleichen Teilen mit CyA-freiem Vollblut verdünnt und erneut gemessen. Um die Verdünnung wieder auszugleichen, wurde das Messergebnis mit dem Faktor 2 multipliziert [130].

Quantitative Bestimmung des polyklonalen Cyclosporin A

Die Bestimmung der polyklonalen CyA-Konzentration (Muttersubstanz und Metabolite) erfolgte unter Verwendung von FPIA Kits (Fluoreszenz-Polarisations-Immunoassay, Firma Abbott) am Probenautomat TDx[®] (Firma Abbott).

- Messtheorie: Dieses Verfahren beruht auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion zwischen CyA, seinen Metaboliten (besonders AM1, AM4N und AM9) und den entsprechenden Antikörpern. Nach dem Prinzip des Fluoreszenzpolarisations-Immunoassays (FPIA) emittiert die Wolfram-Halogenlampe des TDx[®] Systems Licht unterschiedlicher Wellenlängen und Farben, dessen räumliche Ausrichtung rein zufällig ist. Ein vor der Lichtquelle angebrachter Interferenzfilter sorgt dafür, dass blaues Licht (481-489 nm) passieren kann. Dieses Licht wird anschließend durch einen Flüssigkristall-Polarisator geleitet, der das blaue Licht in einer Ebene polarisiert. Das polarisierte blaue Licht trifft auf einen Tracer bzw. einen Fluoreszenzfarbstoff, wodurch dieser angeregt wird. Danach kehrt der Fluoreszenzfarbstoff wieder in seinen Ausgangszustand zurück, wobei er grünes Licht (525-550 nm) emittiert. Wird der Fluoreszenzfarbstoff nun aber an ein sehr großes Antikörpermolekül gebunden, kann er nicht mehr frei drehen. Das emittierte grüne Licht schwingt dann in der gleichen Ebene wie das angeregte blaue Licht; die Polarisation wird beibehalten. Andernfalls bleibt die freie Rotation des Fluoreszenzfarbstoffes möglich. Das emittierte grüne Licht schwingt in einer anderen Ebene als das angeregte blaue Licht und die Polarisation geht verloren. Aufgrund der Rotationseigenschaften von Molekülen in Lösung verhält sich der Polarisationsgrad direkt proportional zur Molekülgröße [124, 125].
- Durchführung: Jeweils 50 µl der zu testenden EDTA-Vollblutprobe wurden in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert. Mit Hilfe des Präzisionsdispensers wurden dann zu jeder Probe je 50 µl Lösungsmittel und 300 µl Fällungsreagenz hinzugefügt. Nach gründlicher Durchmischung auf dem Vortex wurden die Zentrifugenröhrchen mindestens 5 Minuten bei 9500 Umdrehungen zentrifugiert. Mittels dieser Vorbehandlung konnten einerseits die Zellen aufgelöst und andererseits das Protein ausgefällt werden. Das Assay wurde anschließend mit dem durch Zentrifugieren gewonnenen klaren Überstand durchgeführt. Durch dieses Vorgehen konnten Interferenzen durch endogene, proteingebundene fluoreszierende Bestandteile auf ein Minimum redu-

ziert werden. Der Überstand sollte möglichst vollständig in die Probenkammer übertragen werden. Für die Durchführung des Assays waren 150 µl Probenüberstand notwendig. Kalibratoren und Kontrollen wurden auf dieselbe Weise vorbehandelt.

Der Messbereich des beschriebenen Verfahrens liegt zwischen 65 und 2000 ng/ml. Bei Cyclosporin A- und Metaboliten-Konzentrationen > 2000 ng/ml wurden die Proben vor dem Messen mit der gleichen Menge Kalibrator A verdünnt. Um die Verdünnung wieder auszugleichen, wurde das Messergebnis mit dem Faktor 2 multipliziert [124, 125]

Mycophenolsäure – Analytik

Mycophenolat Mofetil (MMF) ist der 2-Morpholinoethylester der Mycophenolsäure (MPA). MMF wurde als Beimedikation entwickelt, um die Bioverfügbarkeit von MPA, dem aktiven Immunsuppressivum, zu verbessern. In vivo wird MMF schnell zu MPA hydrolysiert. Für die Messung der MPA-Konzentration ist Plasma das geeignete Kompartiment, da sich MPA fast ausschließlich im Plasma befindet [88]. Zur quantitativen Bestimmung der MPA wurden der Emit[®]-Mycophenolsäure-Test sowie EMIT[®]-Mycophenolsäure-Kalibratoren und -Kontrollsubstanzen der Firma Dade Behring am Analysegerät COBAS MIRA[®] von Roche Diagnostic Systems, Inc. verwendet.

- Messtheorie: Es handelt sich um einen homogenen Enzymimmuntest, welcher auf der Konkurrenz um MPA-Antikörper-Bindungsstellen basiert. MPA in der Probe konkurriert mit MPA in Enzymreagenz 2, welche mit dem Enzym Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) markiert ist. Das aktive (ungebundene) Enzym wandelt das oxidierte Nikotinamidadenindinucleotid (NAD) von Antikörperreagenz 1 in NADH um. Dadurch wird eine Veränderung der kinetischen Absorbanz bewirkt, die sich spektralphotometrisch messen läßt. Die Enzymaktivität verringert sich nach Bindung an den Antikörper, so dass die MPA-Konzentration anhand der Enzymaktivität gemessen werden kann. Das endogene G6P-DH-System des Serums stört dabei nicht, da das Koenzym NAD nur mit dem bakteriellen Enzym (Leukonostoc mesenteroides) zusammenwirkt, das in diesem Test verwendet wird [131].
- Durchführung: In Vorbereitung auf den Test wurden Vollblutproben mit EDTA-Zusatz 5 Minuten bei 5000 Umdrehungen zentrifugiert. Plasma wurde abpipettiert und dann bei -20 °C tiefgefroren. Bei dieser Temperatur können die Proben mindestens 11

Monate lang gelagert werden. Der Test wurde innerhalb von 14 Tagen durchgeführt. Es handelt sich um ein vollautomatisiertes Verfahren. Nacheinander wurden laut Anweisung Antikörperreagenz 1, Probenvolumen und Enzymreagenz 2 in die vorgesehenen Küvetten pipettiert. Das Gerät führte die photometrischen Messungen bei 340 nm Wellenlänge durch.

Der dynamische Testbereich liegt zwischen 0,1 µg/ml und 15 µg/ml, je nach analytischer Empfindlichkeit des Tests und des Kalibrators der höchsten Ebene [131].

MPA-Proben, deren Konzentration über 15 µg/ml lag, wurden die Proben vor dem Messen mit der gleichen Menge MPA-freien Plasmas verdünnt. Um die Verdünnung wieder auszugleichen, wurde das Messergebnis mit dem Faktor 2 multipliziert.

2.5. Datenerfassung und Statistische Auswertung

Erfassung der pharmakokinetischen Daten

Für monoklonales CyA, polyklonales CyA und MPA wurde jeweils eine 10-Punkte-Kinetik (Konzentrationen unmittelbar vor sowie 30 Minuten, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8 und 12 Stunden nach Medikamenteneinnahme) erstellt. Alle gemessenen Blutkonzentrationen wurden in einer Excel-Datenbank erfasst. Dies ermöglichte eine eindeutige Zuordnung sowie eine einheitliche Auswertung aller Daten.

Die Berechnung der Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (AUC) erfolgte mit Hilfe der linearen Trapez-Regel im Programm Microsoft Excel 1997:

$$\mathbf{AUC} = \sum_{(i=1)}^n \frac{1}{2} \times (\mathbf{c}_{t_{i+1}} - \mathbf{c}_{t_i}) \times (\mathbf{t}_{i+1} - \mathbf{t}_i) \quad [\text{ng} \times \text{h/ml} \text{ für CyA, } \mu\text{g} \times \text{h/ml} \text{ für MPA}]$$

(c_{t_i} : Konzentration zum Zeitpunkt t_i).

Als Talspiegel (c_{Tal}) galten die CyA- bzw. die MPA-Konzentrationen der letzten Blutabnahme des jeweiligen Kinetiktages (c_{12}) direkt vor der abendlichen CyA- bzw. MMF-Einnahme. Die Maximalkonzentration (c_{max}) und die Zeit bis zum Erreichen der Maxi-

malkonzentration (t_{\max}) wurden direkt aus den in der Excel-Datentabelle erfassten Wertepaaren abgelesen.

Statistische Auswertung

Die erhobenen Daten wurden mit Hilfe des „Statistical Package for the Social Sciences“ (SPSS für Windows, Version 10.0) analysiert. Da bei der Auswertung von Boxplots, Histogrammen und Kolmogorov-Smirnov-Test keine Normalverteilung nachgewiesen werden konnte, wurde von nicht normalverteilten Daten ausgegangen. Alle Daten wurden deskriptiv ausgewertet und als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Im Folgenden wurden die Daten mit Hilfe des Wilcoxon-Tests (nicht parametrisch) für zwei verbundene Stichproben auf signifikante Unterschiede untersucht. Verglichen wurden die Kinetikprofile von Tag 1 versus Tag 2, Tag 1 versus Tag 7 und Tag 2 versus Tag 7 jeweils für CyA (mono- und polyklonal) und MPA. Das Signifikanzniveau wurde auf 5 % ($p < 0,05$) festgelegt. Die Fragestellung war – wie oben bereits formuliert – zweiseitig.

Auswertung der Pharmakokinetik von Cyclosporin A

Als Hauptkriterium wurde die Gesamtexposition von monoklonalem CyA über den Zeitraum von 12 Stunden gewählt. Diese wird verdeutlicht als Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (AUC, area under the curve). Die AUC für monoklonales CyA hat sich als aussagekräftigster Parameter in Bezug auf klinische Auswirkungen bewährt [74].

Als Nebenkriterien galten:

- die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (AUC) für polyklonales CyA,
- die Talspiegel (c_{Tal} , Blutspiegel 12 Stunden nach CyA-Einnahme) für monoklonales und polyklonales CyA,
- die maximalen Blutspiegel (c_{max}) für monoklonales und polyklonales CyA sowie
- die Zeiträume bis zum Erreichen des maximalen Blutspiegels (t_{max}) für monoklonales und polyklonales CyA.

Auswertung der Pharmakokinetik von Mycophenolsäure

Als Hauptkriterium galt die Gesamtexposition von MPA über den Zeitraum von 12 Stunden (AUC), da diese am besten geeignet ist, klinische Ereignisse vorherzusagen [90, 117].

Als Nebenkriterien galten:

- die MPA-Talspiegel (c_{Tal} , Blutspiegel 12 Stunden nach MMF-Einnahme),
- die maximalen MPA-Blutspiegel (c_{max}) sowie
- die Zeiträume bis zum Erreichen der maximalen MPA-Blutspiegel (t_{max}).