

---

Aus dem Institut für Experimentelle und Klinische  
Pharmakologie und Toxikologie,  
Abteilung für Pharmakologie,  
der Universität Hamburg

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. H. Scholz

**Pharmakokinetik, Pharmakodynamik und Pharmakogenetik von Carvedilol in  
Abhängigkeit vom Lebensalter bei pädiatrischen Patienten mit Herzinsuffizienz**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereichs Chemie  
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Frederike Behn

Hamburg 2001

---

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. D. Geffken
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. h. c. H. Scholz

Den Kindern der Herzstation



**Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Einsatz von Arzneimitteln in der Pädiatrie	1
1.2	Pharmakokinetik im Kindesalter	2
1.3	Pharmakodynamik im Kindesalter	2
1.4	Pharmakokinetisch/pharmakodynamisches Modelling	3
1.5	Herzinsuffizienz im Kindesalter	5
1.6	Therapie der Herzinsuffizienz mit Beta-Rezeptorenblockern	6
1.7	Einsatz von Beta-Rezeptorenblockern bei Kindern mit Herzinsuffizienz	6
1.8	Der Beta-Rezeptorenblocker Carvedilol	7
1.9	Genetischer Polymorphismus des Enzyms Zytochrom-P450-2D6	9
1.10	Ziele der Arbeit	11
<b>2</b>	<b>Methoden</b>	<b>12</b>
2.1	Entwicklung neuer Methoden	12
2.2	Studiendesign	12
2.2.1	Studienziel	12
2.2.2	Einschlusskriterien	13
2.2.3	Ausschlusskriterien	13
2.2.4	Kriterien für den Abbruch der Studie bei einzelnen Patienten	13
2.2.5	Kriterien für den Abbruch der gesamten Studie	14
2.2.6	Therapieschema	14
2.2.7	Studienprotokoll	15
2.3	Pharmakokinetische Untersuchung bei erwachsenen Probanden	16
2.4	Bestimmung der Plasmakonzentrationen von Carvedilol	17
2.4.1	Methodenentwicklung	17
2.4.2	Standardlösungen	18
2.4.3	Probenaufarbeitung und Messprotokoll	18
2.4.4	Quantifizierung und Ausschluss von Interferenzen	20
2.4.5	Bestimmungsgrenze, Linearität und Wiederfindung	20
2.4.6	Validierung	21
2.4.7	Repräsentative Chromatogramme	23
2.5	Bestimmung der Plasmakonzentrationen der Enantiomere von Carvedilol	24
2.5.1	Standardlösungen	24
2.5.2	Probenaufarbeitung und Messprotokoll	25
2.5.3	Ausschluss von Interferenzen	26
2.5.4	Kalibrierung, Linearität und Bestimmungsgrenze	26
2.5.5	Validierung	28
2.5.6	Repräsentative Elektropherogramme	30
2.6	Pharmakokinetische Auswertung	31
2.6.1	Simulation der Zieldosis-Konzentrationen mit KINETICA™ Software	31
2.6.2	Kompartimentelle und nichtkompartimentelle Analyse	31
2.7	Pharmakokinetisch/pharmakodynamisches Modelling	35
2.8	Bestimmung des Phänotyps für das Enzym Zytochrom-P450-2D6	37
2.8.1	Standardlösungen	38
2.8.2	Probenaufarbeitung und Messprotokoll	38
2.8.3	Quantifizierung, Ausschluss von Interferenzen und Wiederfindung	39
2.8.4	Validierung	39
2.8.5	Repräsentative Chromatogramme	41

2.9	Bestimmung des Genotyps für das Enzym Zytochrom-P450-2D6	42
2.9.1	DNA-Isolation aus Vollblut	42
2.9.2	Polymerase-Kettenreaktionen	43
2.9.3	Restriktionsverdau	45
2.9.4	Gelelektrophorese	46
2.10	Statistik	49
<b>3.</b>	<b>Material</b>	<b>50</b>
<hr/>		
3.1	Arzneistoffe	50
3.2	Lösungsmittel und Reagenzien mit Gefahrenhinweisen und Sicherheitsratschlägen	50
3.3	Zusammensetzungen der Lösungen	52
3.4	Enzyme und Primersequenzen	53
3.5	Verbrauchsmaterial und Laborgeräte	53
3.6	Software	54
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>55</b>
<hr/>		
4.1	Charakteristik der Studienteilnehmer	55
4.2	Lineare Pharmakokinetik von (R, S)-Carvedilol	57
4.3	Einfluss des Lebensalters auf die Pharmakokinetik von (R, S)-Carvedilol	57
4.4	Phänotypisierung und Genotypisierung für das Enzym Zytochrom-P450-2D6	61
4.4.1	Einfluss des Phänotyps für CYP2D6 auf die Pharmakokinetik von (R, S)-Carvedilol	64
4.4.2	Einfluss von Alter und Krankheitszustand auf die Metabolisierungskapazität von CYP2D6	66
4.5	Bestimmung der Lebergröße	67
4.6	Änderungen der Herzfrequenz unter der Therapie mit Carvedilol	69
4.7	Trennung der Enantiomere von (R, S)-Carvedilol	71
4.7.1	Konzentrations-Zeitverläufe von (R)- und (S)-Carvedilol	71
4.8	Pharmakokinetisch/pharmakodynamisches Modellierung (PK/PD-Modellierung)	73
4.8.1	Einfluss des Lebensalters auf die Herzfrequenz unter Carvedilol-Therapie	76
4.8.2	Einfluss des Lebensalters auf den mittleren arteriellen Druck unter Carvedilol-Therapie	80
4.9	Klinische Ergebnisse	82
4.9.1	Verlauf der Ejektionsfraktion unter Carvedilol-Therapie	82
4.9.2	Klinische Beurteilung der Patienten unter Carvedilol-Therapie	83
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>85</b>
<hr/>		
5.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	85
5.2	Altersabhängige Veränderungen der Pharmakokinetik von (R, S)-Carvedilol	86
5.3	Bisherige Kenntnisse über die Pharmakokinetik verschiedener Arzneistoffe im Kindesalter	89
5.4	Altersabhängige Unterschiede in der Potenz von (S)- und (R, S)-Carvedilol zur Senkung der Herzfrequenz	91
5.5	Altersabhängige Unterschiede in der maximalen Wirkstärke von (R, S)-Carvedilol zur Senkung des Blutdrucks	93
5.6	Einfluss der Metabolisierungskapazität für das Enzym Zytochrom-P450-2D6 auf die Pharmakokinetik von (R, S)-Carvedilol	94
5.7	Altersabhängige Unterschiede im Verlauf der Ejektionsfraktion unter Carvedilol-Therapie	95
5.8	Ausblick	96

## Inhaltsverzeichnis

---

<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>99</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	<b>105</b>
<b>8. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen</b>	<b>113</b>
<b>9. Anhang</b>	<b>116</b>
Ergebnistabellen	116
Erklärung	124
Lebenslauf	125
Danksagungen	126

## **1. Einleitung**

### **1.1 Einsatz von Arzneimitteln in der Pädiatrie**

Für die Arzneimitteltherapie im Kindesalter fehlen häufig klinisch fundierte Daten über Wirksamkeit, unerwünschte Wirkungen und Sicherheit. Dosierungsempfehlungen für Kinder liegen von den wenigsten Arzneistoffen vor. Nur etwa die Hälfte der Pharmaka, die in Europa in der Pädiatrie eingesetzt werden, haben auch eine Zulassung für diese Patienten (Conroy et al. 2000). Die Ergebnisse von Arzneimittelprüfungen bei Erwachsenen sind jedoch nur bedingt auf Kinder übertragbar. Und sind die eingesetzten Arzneimittel nicht in dieser speziellen Patientenpopulation untersucht worden, so treten bei ihnen häufiger unerwünschte Arzneimittelwirkungen auf (Turner et al. 1999). Ursachen für unerwünschte Wirkungen im Kindesalter können Veränderungen von Aufnahme, Verteilung und Ausscheidung eines Arzneistoffs sein. Auch die Zielstrukturen von Pharmaka, wie das Myokard oder das autonome Nervensystem, können bei Kindern andersartig auf Arzneimittel ansprechen als bei Erwachsenen. Dadurch kann es bei pädiatrischen Patienten zu Über- oder Unterdosierungen nach Anwendung von Erwachsenen-Dosierungsschemata kommen. Für eine optimale Therapie im Kindesalter ist es also notwendig, den Zusammenhang zwischen Dosis, Plasmakonzentration und Effekt eines Arzneistoffs zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit wurden im Rahmen einer klinischen Studie diese Untersuchungen für den Beta-Rezeptorenblocker Carvedilol bei pädiatrischen Patienten mit Herzinsuffizienz durchgeführt. Damit wurde auch Kindern der Zugang zu dieser bei Erwachsenen bereits etablierten innovativen Therapie ermöglicht.

### **1.2 Pharmakokinetik im Kindesalter**

Zwischen den verschiedenen Altersstufen vom Säugling bis zum Erwachsenen können im Hinblick auf Arzneimittelabsorption, Verteilung, Metabolismus und Elimination eines Arzneistoffs erhebliche Unterschiede auftreten (Steinberg und Notterman 1994). Änderungen der Anteile von Wasser und Fett im Körper können die Verteilung von Arzneistoffen beeinflussen. Während das Fettgewebe von Neugeborenen noch hauptsächlich Wasser enthält, überwiegt im Erwachsenenalter der Fettanteil (Friis-Hansen 1971). Auch die Plasmaproteinbindung hat einen Einfluss auf die Verteilung von Wirkstoffen im Körper. Die

Eiweißbindung vieler Medikamente ist bei Neugeborenen und Säuglingen bis zu etwa einem Lebensmonat erniedrigt (Schwarz 1998). Die hauptsächlich an der Verstoffwechslung von Pharmaka beteiligten Organe Leber und Niere durchlaufen ebenfalls verschiedene Reifestadien (Kearns und Reed 1989). Die Entwicklung der verschiedenen Enzymsysteme der Leber verläuft zeitlich sehr unterschiedlich. Einige Enzyme erreichen erst bei Drei- bis Vierjährigen die Metabolisierungskapazität von Erwachsenen, andere Enzyme zeigen bei Kindern sogar überschießende Aktivität (Jacqz-Aigrain 2000). Auch die Nierenfunktion ist bei Neugeborenen noch nicht voll ausgereift, sie gleicht sich innerhalb des ersten Lebensjahres Erwachsenenwerten an (Kearns und Reed 1989). Von mehreren Arzneistoffen ist bereits eine altersabhängige Pharmakokinetik bekannt, die durch die vielfältigen entwicklungsbedingten Veränderungen des kindlichen Organismus hervorgerufen wird. Daher war es notwendig, die Pharmakokinetik des Arzneistoffs Carvedilol bei pädiatrischen Patienten unterschiedlichen Alters zu untersuchen, um Grundlagen für ein effektives und sicheres Dosierungsschema für Carvedilol bei Kindern zu erhalten.

### **1.3 Pharmakodynamik im Kindesalter**

Während altersbedingte pharmakokinetische Unterschiede inzwischen von einigen Arzneistoffen bekannt wurden, liegen kaum Untersuchungen vor, die auf tatsächliche pharmakodynamische Unterschiede hinweisen. Der Calciumkanalblocker Verapamil wird bei Säuglingen nicht mehr eingesetzt, da es bei Kindern unter einem Jahr nach Behandlung von supraventrikulären Tachykardien mit intravenösem Verapamil zu erhöhter Toxizität in Bezug auf Hypotension, Bradykardie und Apnoe kam (Garson 1987). Dies könnte erklärt werden durch die Ergebnisse von Skovranek et al. (1986). Die Autoren fanden bei jungen Ratten eine deutlich höhere Sensitivität gegenüber Verapamil als bei älteren Ratten. Ebenfalls zu Überdosierungen bei pädiatrischen Patienten könnte es bei einer Cyclosporin-Behandlung kommen. Marshall und Kearns (1999) fanden bei *in vitro*-Untersuchung des Bluts von Säuglingen bis zu einem Alter von einem Jahr eine erhöhte Potenz von Cyclosporin bezüglich der Inhibition der Monozytenproliferation und der Hemmung der Interleukin-2-Expression im Vergleich zu älteren Kindern und Erwachsenen.

Das Herz als Haupteffektorgan von Beta-Rezeptorenblockern weist altersabhängige Unterschiede auf. Das Herzzeitvolumen wird bei Neugeborenen stärker über die Herzfrequenz

reguliert als bei Erwachsenen (Steinberg und Notterman 1994). Das sympathische Nervensystem ist beim neugeborenen Herzen noch nicht voll ausgebildet, während die parasympathische Innervation keinen Unterschied zu Erwachsenen aufweist (Perloff et al. 1986). Dadurch könnte es bei Neugeborenen zu einem relativen Überwiegen des Parasympathikus kommen. Brodde et al. (1995) beschrieben nach Untersuchungen von rechtem Vorhofgewebe eine altersabhängig abnehmende Aktivität der den Beta-Rezeptoren nachgeschalteten Adenylylcyclase. Durch diese altersabhängigen Unterschiede könnte auch die Pharmakodynamik eines Beta-Rezeptorenblockers bei Kindern anders sein als von Erwachsenen bekannt.

Anhand der Ergebnisse der vorliegenden Studie sollten Grundlagen gelegt werden, um ein adäquates Dosierungsregime für Kinder zur Behandlung mit Carvedilol entwickeln zu können. Daher war es notwendig, pharmakodynamische Parameter wie die Empfindlichkeit auf diesen Beta-Rezeptorenblocker und die Wirkstärke dieses Arzneistoffs in den verschiedenen Altersgruppen pädiatrischer Patienten zu untersuchen.

### **1.4 Pharmakokinetisch/pharmakodynamisches Modelling**

Methoden zur pharmakokinetischen Auswertung der Zeitverläufe von Wirkstoffkonzentrationen im Blut wurden in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts entwickelt und gewannen zunehmend an Interesse. Auch Formeln und Grundbegriffe der Pharmakokinetik wie die mittlere Verweildauer, Arzneistoffclearance und Verteilungsvolumen stammen aus dieser Zeit (Hamilton et al. 1931, Moller et al. 1929, Dominguez et al. 1934). Seit 1960 wurden zusätzlich mathematische Modelle entwickelt, um pharmakokinetische Daten, die die Beziehung zwischen Blutkonzentration und Zeit nach Einnahme einer bestimmten Wirkstoffdosis beschreiben, und pharmakodynamische Daten, als die Beziehungen zwischen Blutkonzentration und Effekt eines applizierten Wirkstoffs, miteinander zu verbinden. Die Verknüpfung dieser beiden Teilgebiete durch das pharmakokinetisch/pharmakodynamische Modelling (PK/PD-Modelling) erfolgt mit dem Ziel, Aussagen über die Zusammenhänge von Dosis, Konzentration und Wirkung zu erhalten. Anhand dieser Beziehungen wurden Vorhersagen für die zu erwartenden Effekte über die Zeit nach Einnahme einer bestimmten Dosis des Arzneistoffs möglich (Hochhaus et al. 2000).

Für diesen Zweck wurden verschiedene Modelle bestehend aus pharmakokinetischer und pharmakodynamischer Seite und Verknüpfung der beiden entwickelt. Als pharmakokinetischer Teil wird entsprechend dem Konzentrations-Zeitverlauf ein Ein- oder Mehrkompartimentmodell gewählt. Die Wahl des pharmakodynamischen Modells richtet sich nach dem Konzentrations-Wirkungsverlauf. Neben linearen Modellen werden häufig  $E_{max}$ -Modelle eingesetzt, die direkt oder indirekt mit dem pharmakokinetischen Modell verknüpft werden. Auch die Art der Verknüpfung von Pharmakokinetik und -dynamik wird entsprechend dem Verlauf der Konzentrations-Wirkungsbeziehungen gewählt. Tritt eine zeitliche Verzögerung zwischen der maximalen Wirkstoffkonzentration im Blut und dem maximalen Effekt auf, wird zwischen die pharmakokinetische und die pharmakodynamische Seite des Modells ein sogenanntes „hypothetisches Effektkompartiment“ geschaltet (Nagashima et al. 1969, Sheiner 1969). In diesem Kompartiment liegt eine Konzentration des Wirkstoffs vor, die die hypothetische Arzneistoffkonzentration am Wirkort darstellt. Experimentell kann diese Konzentration nicht bestimmt werden, sie wird aus den patientenspezifischen pharmakokinetischen Konstanten und der Eliminationskonstante aus dem pharmakokinetischen Kompartiment in das Effektkompartiment errechnet. Die Effektkompartiment-Konzentration wird schließlich über das gewählte pharmakodynamische Modell mit dem Effekt in Beziehung gesetzt (Meibohm und Derendorf 1997).

Von der Entdeckung des positiven Effekts von Beta-Rezeptorenblockern in der Behandlung der Herzinsuffizienz (Waagstein et al. 1975) bis zur Etablierung dieser Therapie bei erwachsenen Patienten mit einem effektiven und sicheren Dosierungsschema (Packer et al. 1996) hat es etwa 20 Jahre bedurft. Sowohl die Pharmakokinetik als auch die Pharmakodynamik von Arzneistoffen können sich bei Kindern deutlich von denen bei Erwachsenen unterscheiden. Um bei der Untersuchung der Therapie einer Herzinsuffizienz mit einem Betarezeptorenblocker für Kinder möglichst schnell maximale Informationen zu erhalten, erschien das PK/PD-Modelling als besonders geeignete Methode. Denn über das Verknüpfen von Pharmakokinetik und Pharmakodynamik wird der sinnvolle Einsatz von Arzneistoffen und die Entwicklung wirksamer Therapieschemata erleichtert (Meibohm und Derendorf 1997).

### **1.5 Herzinsuffizienz im Kindesalter**

Die Ursachen einer Herzinsuffizienz im Kindesalter sind großenteils andere als im Erwachsenenalter. Liegen bei älteren Patienten häufig eine koronare Herzkrankheit, chronische Druck- oder Volumenbelastung durch Hypertonie oder Herzklappenfehler, hochgradige Herzrhythmusstörungen oder ein Myokardinfarkt zugrunde, so sind bei Kindern meist angeborene anatomische Fehlbildungen des Herzens wie Ventrikelseptumdefekte, ein hypoplastisches Linksherzsyndrom oder Fehlbildungen der Gefäße Ursachen für eine unzureichende Herzleistung. In allen Altersgruppen können Myokarditiden oder Kardiomyopathien zu einer Herzleistungsschwäche führen. Die Herzinsuffizienz ist im Kindesalter eine relativ seltene Erkrankung. So liegt bei Kindern die Inzidenz einer dilatativen Kardiomyopathie, einer der häufigsten Formen der Herzinsuffizienz im Kindesalter, beispielsweise bei 3,4 Neuerkrankungen pro 1.000.000 Einwohner pro Jahr (Arola et al. 1997). Die Prognose von Kindern, die an einer Herzinsuffizienz leiden, ist schlecht: die Fünf-Jahres-Letalität wird mit bis zu 80% angegeben (Arola et al. 1998). Sind die Kinder mit der konservativen Standardtherapie, bestehend aus Digoxin, Diuretika und einem Inhibitor des Angiotensin-Konversions-Enzyms, maximal therapiert, bleibt für sie oft als letzte Option nur eine Herztransplantation (Friedmann et al. 1991). Die häufigste Indikationsstellung der Herztransplantation bei Säuglingen ist das hypoplastische Linksherzsyndrom, bei älteren Kindern die dilatative Kardiomyopathie. Die Aussichten auf Spenderherzen sind besonders im Kindesalter sehr gering. Eine Organabstoßung tritt in etwa 23% der Fälle bis zu einem Zeitraum von zehn Jahren nach erfolgter Herztransplantation auf (Experten-Symposium pädiatrische Herz- und Lungentransplantation, München, 1997). Daher erschien es sinnvoll, eine innovative Therapiemöglichkeit der Erwachsenenkardiologie bei Kindern zu untersuchen, um damit auch in dieser Patientengruppe eventuell eine Herztransplantation hinauszögern oder sogar verhindern zu können.

### **1.6 Therapie der Herzinsuffizienz mit Beta-Rezeptorenblockern**

Lange galten Beta-Rezeptorenblocker bei Herzinsuffizienz als kontraindiziert. Erst 1996 zeigten Packer et al. in einer multizentrischen Studie zur Therapie erwachsener Patienten mit einer leichten bis mittelschweren Herzinsuffizienz mit dem Beta-Rezeptorenblocker Carvedilol eine Reduktion der Morbidität und der Letalität bei Behandlung zusätzlich zur

Standardtherapie mit einem Digitalisglykosid, einem oder einer Kombination aus zwei Diuretika und einem ACE-Inhibitoren. Inzwischen sind auch für die Beta-Rezeptorenblocker Metoprolol und Bisoprolol vergleichbare Effekte in der ergänzenden Therapie der mittelgradigen Herzinsuffizienz in Studien bestätigt worden (MERIT-HF 1999, CIBIS II 1999). Bei der Behandlung schwer herzinsuffizienter Patienten mit Carvedilol zusätzlich zur Standardtherapie kam es ebenfalls zu einer deutlich höheren Überlebenschance als unter Placebo, nicht so jedoch mit Bucindolol (Packer et al. 2001, The Beta-Blocker Evaluation of Survival Trial Investigators 2001). Somit ist Carvedilol bislang der einzige Beta-Rezeptorenblocker, für den auch bei der Therapie hochgradig herzinsuffizienter erwachsener Patienten eine reduzierte Letalität in klinischen Studien nachgewiesen wurde.

Dem Einsatz von Beta-Rezeptorenblockern in der Therapie der Herzinsuffizienz liegen folgende Erkenntnisse zugrunde: Bei unzureichender Herzleistung kommt es als Gegenregulation des Organismus zur Aktivierung des sympathischen Nervensystems (Hasking et al. 1986). Durch dauerhafte Einwirkung überschüssiger Katecholamine kann das Herz geschädigt werden, es kommt zur Desensitivierung des Signaltransduktionssystems der Beta-Rezeptoren und zu unerwünschten Effekten wie Zelluntergang, Dilatation und *Remodelling* des Herzens (Eichhorn und Bristow 1996). Die Höhe der Katecholaminspiegel korreliert dabei mit dem Schweregrad der Symptome der Herzinsuffizienz (Cohn et al. 1984). Die Gabe von Beta-Rezeptorenblockern bei der chronischen Herzinsuffizienz erfolgt mit dem Ziel, die unerwünschten Wirkungen überschüssiger Katecholaminkonzentrationen zu verhindern (Bristow und Port 1998).

### **1.7 Einsatz von Beta-Rezeptorenblockern bei Kindern mit Herzinsuffizienz**

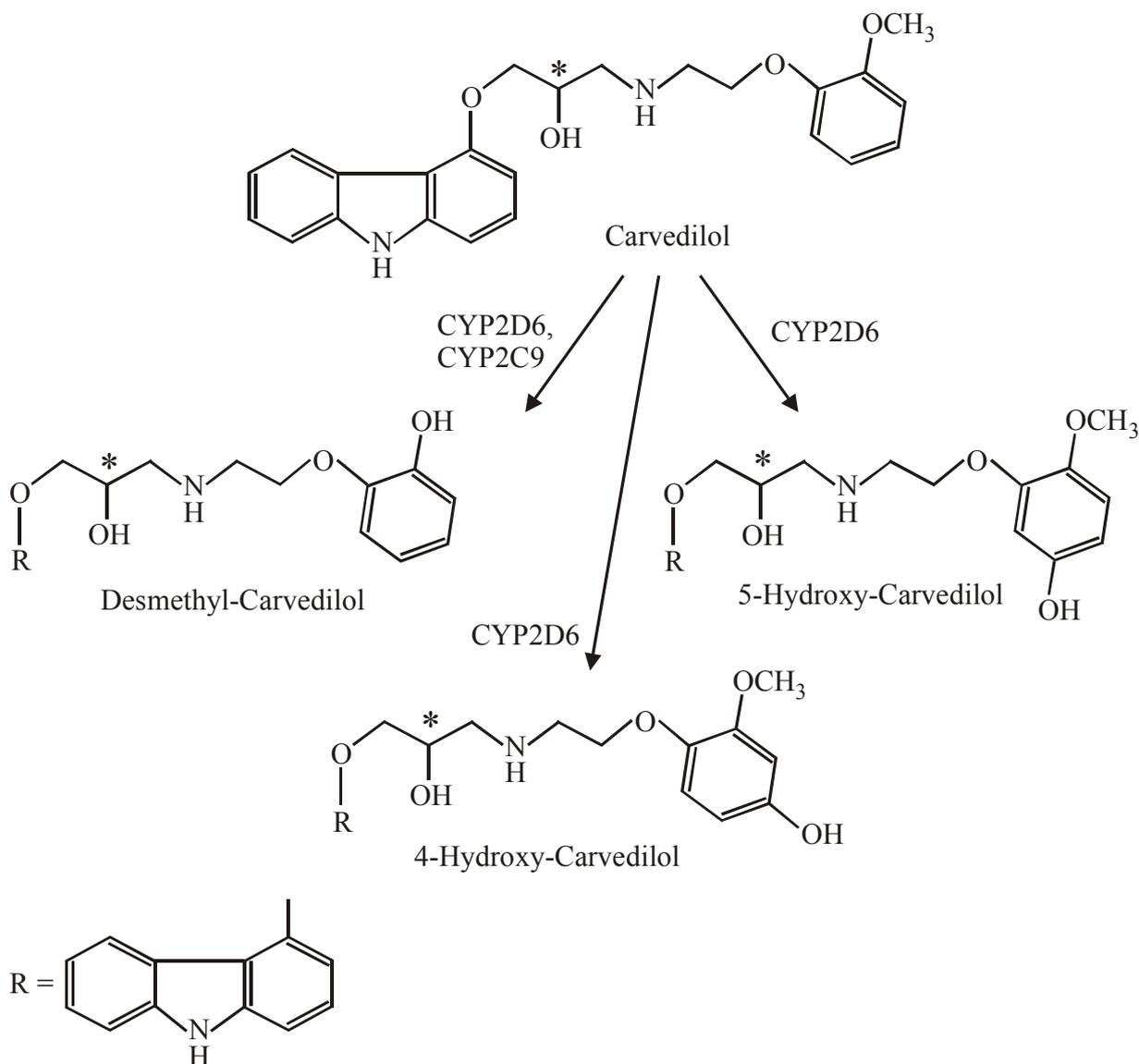
Bislang sind nur wenige Ergebnisse zur Behandlung von Kindern mit Herzinsuffizienz mit Beta-Rezeptorenblockern bekannt. Shaddy et al. (1999) untersuchten 15 betroffene Kinder im Alter von zwei bis 15 Jahren, die mit dem beta<sub>1</sub>-selektiven Rezeptorenblocker Metoprolol zusätzlich zur Standardtherapie behandelt wurden. Die Ejektionsfraktion des Herzens der untersuchten Patienten besserte sich nach 1,2 bis 102 Monaten signifikant von im Mittel 23% auf 41%. Von Bruns et al. (2001) wurde in einer retrospektiven Analyse an sechs pädiatrischen Studienzentren in den USA der Einsatz von Carvedilol zusätzlich zur Standardtherapie bei 46 Kindern mit Herzinsuffizienz im Alter von drei Monaten bis 19

Jahren beurteilt. Die Verkürzungsfraction verbesserte sich signifikant. Bei den Kindern, die über sechs Monate beobachtet wurden, stieg sie von im Mittel 16% auf 19%, bei Patienten mit zwölf-monatiger Beobachtungsdauer von im Mittel 18% auf 21% (Bruns et al. 2001). Pharmakokinetische und pharmakodynamische Daten sowie pharmakokinetisch/pharmakodynamische Parameter wurden bei den pädiatrischen Patienten dieser Studien nicht erhoben. Die vorliegende Studie ist die erste prospektive Untersuchung zur Therapie der Herzinsuffizienz im Kindesalter mit Carvedilol.

### **1.8 Der Beta-Rezeptorenblocker Carvedilol**

Carvedilol [(±)-1-(Carbazolyl-4-oxy)-3-[2-(2-methoxy-phenoxy) ethylamino] propan-2-ol] ist ein unselektiver Beta-Rezeptorenblocker mit zusätzlichen  $\alpha_1$ -antagonistischen Wirkungen. Die Substanz ist sehr lipophil, ihre Bioverfügbarkeit aufgrund hoher präsystemischer Elimination mit etwa 25% gering (Neugebauer et al. 1987). (R, S)-Carvedilol wird zu etwa 95% an Plasmaproteine gebunden (Morgan 1994). Es besitzt eine Aryloxypropanolaminstruktur mit einem asymmetrischen Kohlenstoffatom. In der Therapie wird Carvedilol als Racemat eingesetzt, die Enantiomere sind jedoch pharmakodynamisch unterschiedlich aktiv. Das (S)-Enantiomer wirkt etwa 100-fach stärker  $\beta_1$ -blockierend als das (R)-Enantiomer. Dieses äußert sich in einem Abfall der Herzfrequenz nach Gabe des (S)-Enantiomers, während nach Einnahme des (R)-Enantiomers ein leichter Anstieg der Herzfrequenz beobachtet wurde (Stoschitzky et al. 2001). Bezüglich der  $\alpha_1$ -Rezeptorenblockade sind beide Carvedilol-Enantiomere äquipotent (Ruffolo et al. 1990). (R, S)-Carvedilol wird schon seit längerem zur Behandlung der Hypertonie und der Angina pectoris eingesetzt und war 1997 der erste Beta-Rezeptorenblocker, der in Deutschland zur Behandlung der Herzinsuffizienz bei Erwachsenen zugelassen wurde (Frishman 1998).

Die Elimination von (R, S)-Carvedilol erfolgt überwiegend durch hepatische Metabolisierung. An der Biotransformation ist vor allem das Enzym Zytochrom-P450-2D6 (CYP2D6) beteiligt aber zu geringeren Teilen auch weitere Enzyme des Zytochrom-P450-Systems wie CYP1A1, CYP1A2, CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19 und CYP2E1 (Oldham und Clarke 1997). Die Hauptmetaboliten entstehen durch O-Desmethylierung bzw. durch Hydroxylierung in 4- und 5-Stellung am Phenylkern des (R, S)-Carvedilols. An der Abspaltung des Methylrests ist neben CYP2D6 auch das Enzym CYP2C9 beteiligt, die Hydroxylierungsreaktionen verlaufen fast ausschließlich über das Enzym CYP2D6 (Abbildung 1).



**Abbildung 1** Schema der Metabolisierung von (R, S)-Carvedilol zu den Hauptmetaboliten Desmethyl-Carvedilol, 4- und 5-Hydroxy-Carvedilol durch die Enzyme CYP2D6 und CYP2C9. CYP = Zytochrom-P450, \* = asymmetrisches Kohlenstoffatom.

Die Metabolisierung von (R, S)-Carvedilol erfolgt stereoselektiv. Für die Biotransformation des (R)-Enantiomers von Carvedilol spielt das Enzym CYP2D6 die entscheidende Rolle. Es wandelt (R)-Carvedilol zu etwa gleichen Teilen zu (R)-4-, (R)-5-Hydroxy-Carvedilol und (R)-Desmethyl-Carvedilol um. Die Beteiligung von CYP2C9 an der O-Desmethylierung von (R)-Carvedilol ist gering, ebenso sind die Enzyme CYP1A2, CYP3A4 und CYP2E1 nur gering beteiligt. In der Biotransformation des (S)-Enantiomers von Carvedilol sind verschiedene Enzyme zu größeren Anteilen involviert. Die Metabolisierung zu seinem Hauptmetaboliten (S)-Desmethyl-Carvedilol verläuft hauptsächlich über CYP2C9, aber auch über das Enzym CYP2D6. Zu kleineren Teilen wird (S)-Carvedilol von CYP2D6 auch am Phenylkern in 4-Stellung hydroxyliert, die Hydroxylierung in 5-Position erfolgt zu noch geringeren Anteilen. Die Metabolisierung des (S)-Enantiomers verläuft zusätzlich über die Enzyme CYP1A1, CYP1A2, CYP3A4, CYP2C19 und CYP2E1 (Oldham und Clarke 1997). Die stereoselektive Metabolisierung von (R, S)-Carvedilol führt zu Unterschieden in der Bioverfügbarkeit zwischen (R)- und (S)-Carvedilol von ca. 31% versus 15%. Ebenso sind die pharmakokinetischen Parameter der beiden Enantiomere verschieden. Die systemische Clearance von (S)-Carvedilol ist schneller, daher sind die maximale Plasmakonzentration und die Fläche unter der Plasmakonzentrations-Zeitkurve geringer. Das Verteilungsvolumen von (S)-Carvedilol ist etwa doppelt so groß wie das des anderen Enantiomers, die terminale Halbwertszeit von (S)-Carvedilol ist länger als die von (R)-Carvedilol (Neugebauer et al. 1990, Neugebauer et al. 1992).

### **1.9 Genetischer Polymorphismus des Enzyms Zytochrom-P450-2D6**

Das hauptsächlich an der Metabolisierung von (R, S)-Carvedilol beteiligte Enzym Zytochrom-P450-2D6 (CYP2D6) unterliegt einem genetischen Polymorphismus. Es sind bislang mehr als 50 verschiedene Allele des für CYP2D6 codierenden Gens bekannt (Gaedigk 1999). Die Mutationen führen zu einer großen Breite der metabolischen Aktivität des Enzyms. Beispielsweise in der kaukasischen Bevölkerung tritt bei etwa fünf bis 10% ein defizienter Metabolisierungstyp auf, hervorgerufen durch Mutationen im Bereich des für CYP2D6 codierenden Genabschnitts der DNA, in deren Folge kein oder nur ein nicht funktionsfähiges Enzym gebildet wird. Der überwiegende Teil der Kaukasier gehört zu den schnellen Metabolisierern, etwa 1% metabolisieren sehr schnell über dieses Enzym (ultraschnelle Metabolisierer), und ein geringer Teil steht mit einem intermediären

Metabolisierungstyp zwischen den schnellen und den defizienten Metabolisierern (Bertilsson 1995).

Der Metabolisierungstyp für CYP2D6 kann sowohl mithilfe einer Testsubstanz phänotypisch als auch durch Analyse der DNA auf Mutationen genotypisch bestimmt werden. Diese Untersuchungen wurden bei den Patienten der vorliegenden Studie durchgeführt, um zu prüfen, inwieweit die Enzymaktivität von CYP2D6 die Pharmakokinetik von (R, S)-Carvedilol beeinflusst.

### 1.10 Ziele der Arbeit

Um Kindern mit Herzinsuffizienz die Behandlung mit einem Beta-Rezeptorenblocker zu ermöglichen und dadurch eventuell eine Herztransplantation hinauszögern oder verhindern zu können, wurde eine prospektive Studie zur Therapie der terminalen Herzinsuffizienz bei pädiatrischen Patienten mit dem Beta-Rezeptorenblocker Carvedilol durchgeführt. Carvedilol wurde verwendet, weil es zu Beginn der Studie der einzige Beta-Rezeptorenblocker war, für den in klinischen Studien bei erwachsenen Patienten mit Herzinsuffizienz eine Reduktion der Morbidität und der Letalität gezeigt worden war. Ziel der Arbeit war, bei den Kindern die Pharmakokinetik, Pharmakodynamik und Pharmakogenetik von Carvedilol zu bestimmen sowie die Beziehungen von Pharmakokinetik und Pharmakodynamik zu untersuchen. Damit sollte die Therapie mit Beta-Rezeptorenblockern im Kindesalter im Hinblick auf Wirksamkeit und Sicherheit zukünftig möglichst optimal gestaltet werden. Für die vorliegende Arbeit ergaben sich folgende Fragestellungen:

- Wie verhält sich die Pharmakokinetik von (R, S)-Carvedilol bei Kindern unterschiedlicher Altersgruppen?
- Wie unterscheidet sich die Pharmakokinetik des (S)-Enantiomers von Carvedilol, das für die herzfrequenzsenkende Wirkung verantwortlich ist, zwischen pädiatrischen Patienten unterschiedlichen Alters?
- Welchen Einfluss hat die Metabolisierungskapazität des Enzyms Zytochrom-P450-2D6 auf die Pharmakokinetik von (R, S)-Carvedilol, und wie verhält sie sich in Abhängigkeit vom Lebensalter?
- Wie verhält sich die Herzfrequenz unter der Carvedilol-Therapie in Abhängigkeit vom Lebensalter?
- Wie verhält sich der Blutdruck unter der Carvedilol-Therapie in Abhängigkeit vom Lebensalter?
- Wie wirkt sich die Carvedilol-Therapie auf den Verlauf der Herzfunktion bei der Herzinsuffizienz im Kindesalter aus?

## **2. Methoden**

### **2.1 Entwicklung neuer Methoden**

Zur Bestimmung der Pharmakokinetik von Carvedilol und der Carvedilol-Enantiomere bei den pädiatrischen Patienten war es notwendig, Methoden zu entwickeln, mit denen aus möglichst geringen Blutvolumina die Plasmakonzentrationen bestimmt werden konnten (siehe 2.4 und 2.5). Zur Phänotypisierung und Genotypisierung wurden bereits beschriebene Methoden mit geringfügigen Abwandlungen eingesetzt (siehe 2.8 und 2.9).

### **2.2 Studiendesign**

Es wurde eine offene, nicht kontrollierte, prospektive Therapiestudie zur Behandlung der terminalen Herzinsuffizienz bei pädiatrischen Patienten mit Carvedilol durchgeführt. Carvedilol war zur Zeit der Studienplanung der einzige Beta-Rezeptorenblocker, für den bei Erwachsenen mit Herzinsuffizienz in klinischen Studien eine Senkung der Morbidität und der Letalität gezeigt worden war. Daher wurde dieser Arzneistoff in der vorliegenden Studie eingesetzt. Über einen Zeitraum von drei Jahren wurden Patienten von der Abteilung für pädiatrische Kardiologie der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf rekrutiert und in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Pharmakologie des Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums betreut und untersucht. Das Studienprotokoll war von der Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg genehmigt worden (AZ 1292). Die Erziehungsberechtigten der pädiatrischen Patienten wurden vor Beginn der Prüfung ausführlich sowohl schriftlich als auch mündlich über Wesen, Ziel und Risiko der Prüfung informiert und erklärten schriftlich ihr Einverständnis.

#### **2.2.1 Studienziel**

Ziel dieser Studie war die Prüfung von Carvedilol als Therapeutikum zur Verbesserung der terminalen Herzinsuffizienz bei Patienten im Säuglings-, Kleinkind-, Kindes- und Jugendalter. Durch Untersuchung von Pharmakokinetik, Pharmakodynamik, Pharmakogenetik, erwünschten und unerwünschten Wirkungen von Carvedilol im Kindesalter

sollten Kenntnisse erworben werden, um die ergänzende Therapie der Herzinsuffizienz mit einem Beta-Rezeptorenblocker für die verschiedenen pädiatrischen Altersstufen möglichst effektiv und sicher gestalten zu können.

### **2.2.2 Einschlusskriterien**

- Patienten beiderlei Geschlechts.
- Diagnose einer Herzinsuffizienz.
- Maximale Therapie mit Herzglykosiden, ACE-Inhibitoren und Diuretika seit mindestens zwei Monaten ohne Verbesserung des Krankheitszustands.
- Klinisch stabiler Zustand der Patienten seit mindestens vier Wochen vor Studienbeginn.

### **2.2.3 Ausschlusskriterien**

- Frühgeborene oder hypotrophe Neugeborene (unter der zehnten Gewichtsperzentile).
- Anhaltende ventrikuläre Tachykardie.
- Altersentsprechend klinisch gesicherte Hypertonie über der 97. Perzentile.
- Altersentsprechend klinisch gesicherte Bradykardie unter der dritten Perzentile.
- Höhergradiger Herzblock, welcher nicht durch eine antiarrhythmische Intervention oder einen Schrittmacher beherrscht wurde.
- Akute Myokarditis.
- Akute Infektionserkrankungen.
- Andere Erkrankungen (z. B. terminale Nieren- oder Leberinsuffizienz) außer der Herzinsuffizienz, die das Überleben einschränken können.
- Einnahme von Alpha- und/oder Beta-Rezeptorenblockern, Calciumkanalblockern oder Antiarrhythmika der Klasse I.
- Bekannte allergische Reaktionen auf den verwendeten Wirkstoff oder sonstige Bestandteile des Arzneimittels.
- Fehlende Sicherstellung einer kontinuierlichen Betreuung und Überwachung des Patienten in seiner häuslichen Situation.

### **2.2.4 Kriterien für den Abbruch der Studie bei einzelnen Patienten**

- Medikamentenunverträglichkeit nach Gabe einer Testdosis von Carvedilol.
- Blutdruckabfall systolisch unter die altersentsprechende dritte Perzentile, Unwohlsein, Benommenheit, Somnolenz des Patienten.

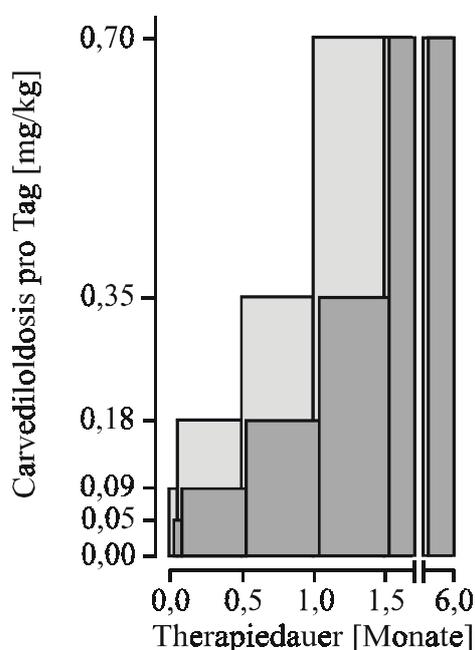
- Verstärkung der terminalen Herzinsuffizienz mit Beeinträchtigung der Herztätigkeit, die bis zum Herzstillstand führen kann.
- Andere, bei Beginn der Prüfung nicht vorhersehbare Erkrankungen des Patienten.
- Nichteinhalten der Prüfungsbedingungen.

### 2.2.5 Kriterien für den Abbruch der gesamten Studie

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

### 2.2.6 Therapieschema

Die Therapie mit Carvedilol erfolgte einschleichend, begonnen wurde mit einer einmalig applizierten Testdosis von 0,09 mg/kg pro Tag. Ab dem zweiten Tag wurde Carvedilol zweimal täglich, jeweils im Abstand von zwölf Stunden, gegeben. Die Dosissteigerung erfolgte in zweiwöchigen Abschnitten bis zu einer Zieldosis von 0,70 mg/kg pro Tag. Das Dosierungsschema der Studie orientierte sich an den Therapieempfehlungen für Erwachsene (Packer et al. 1996) bezogen auf das Körpergewicht der Patienten, die Aufsättigung erfolgte jedoch etwas schneller (Abbildung 2).



**Abbildung 2** Dosierungsschema von Carvedilol in der vorliegenden Studie (hellgraue Balken) im Vergleich zum konventionellen Dosierungsregime bei Erwachsenen (dunkelgraue Balken) über die sechs-monatige Therapiedauer.

Die individuelle auf das Körpergewicht der Patienten bezogene Carvedilol-Dosis wurde in Kapselform aus Dilatrend<sup>®</sup> Tabletten durch Verreiben mit Kapselfüllstoff nach DAB, bestehend aus 99,5% Mannitol und 0,5% Siliciumdioxid, in der Apotheke des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf hergestellt. Für die Einnahme wurde der Kapselinhalt in Wasser gegeben, die Mischung oral verabreicht und wenn möglich anschließend etwa 100 ml Wasser getrunken.

### **2.2.7 Studienprotokoll**

Die Patienten wurden über einen Zeitraum von sechs Monaten beobachtet. Während des Studienzeitraums wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

- Für die Bestimmung pharmakokinetischer Kenngrößen wurden an zwei Tagen Plasmakonzentrations-Zeitprofile von Carvedilol im Rahmen der stationären Behandlung durchgeführt. Das erste Profil erfolgte direkt nach Gabe der Testdosis von Carvedilol, das zweite Profil drei Tage nach Erreichen der letzten Dosisstufe, im Fließgleichgewicht unter der Zieldosis. Die älteren Patienten blieben bis vier Stunden nach Carvedilol-Einnahme nüchtern, die jüngeren Patienten bis zu einem Alter von zwei Jahren lediglich von einer Stunde vor bis zwei Stunden nach Einnahme des Medikaments. Für die Profile wurden zu den Zeitpunkten vor, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 6, 8 und 12 Stunden nach Einnahme von Carvedilol Blutproben über eine Verweilkanüle entnommen und auf die Plasmakonzentrationen an Carvedilol untersucht (siehe 2.4).
- Während der Tagesprofile wurden zeitgleich mit den Blutentnahmen die Herzfrequenz und der Blutdruck der Patienten als pharmakodynamische Parameter von Carvedilol gemessen. Durch Korrelation dieser Daten mit den Plasmakonzentrationen konnten Aussagen über individuelle pharmakodynamische Kenngrößen wie Potenz und maximale Wirkstärke von Carvedilol bezüglich dieser Wirkungen ermittelt werden (siehe 2.7).
- Die Compliance der Patienten bezüglich der Einnahme von Carvedilol wurde durch monatliche Bestimmung der Carvedilol-Talspiegel überprüft.
- Vor Beginn der Carvedilol-Therapie wurden die Patienten für das Enzym Zytochrom-P450-2D6 (CYP2D6) phänotypisiert (siehe 2.8). Als Testsubstanz diente

Dextromethorphan, eine antitussiv wirkende Substanz, die hauptsächlich über das Enzym CYP2D6 abgebaut wird.

- Zusätzlich wurde eine Genotypisierung der Patienten bezüglich CYP2D6 vorgenommen. Dafür wurden den Patienten einmalig 2 ml Blut entnommen. Aus den Leukozyten wurde DNA isoliert, die auf die sechs häufigsten Mutationen des für CYP2D6 codierenden Gens untersucht wurde (2.6).
- Die Herzfunktion wurde vor Beginn der Therapie und unter Carvedilol-Behandlung einmal monatlich mittels Echokardiographie von zwei erfahrenen Pädiatern unabhängig voneinander geprüft. Zur Beurteilung des Verlaufs der Herzinsuffizienz wurde unter anderem die Auswurfraction des Systemventrikels ermittelt.
- Zur Einschätzung der körperlichen Leistungsfähigkeit wurden die Patienten anhand der NYHA-Klassifikation eingestuft, bei jüngeren Patienten wurde eine Bewertungsskala mit kleineren Modifikationen verwendet, die von Ross (1992) speziell für die Beurteilung von Kindern mit Herzinsuffizienz entwickelt worden war.
- Als biochemischer Marker der Herzinsuffizienz wurde vor Therapiebeginn und unter Therapie monatlich die NoradrenalinKonzentration im Plasma der Patienten bestimmt. Diese Analysen wurden im Labor von Herrn Dipl. Biol. J. Pilz an der Universität Göttingen mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) und elektrochemischer Detektion durchgeführt.
- Zusätzlich wurden bei den Patienten von einem Kinderkardiologen monatlich anhand eines Fragebogens mögliche unerwünschte Wirkungen unter Carvedilol-Therapie ermittelt. Dafür wurden, besonders bei den jüngeren Patienten, auch Aussagen der Eltern herangezogen.

### **2.3 Pharmakokinetische Untersuchung bei erwachsenen Probanden**

Zum Vergleich der von den pädiatrischen Patienten ermittelten pharmakokinetischen Daten mit Erwachsenenwerten wurde die Pharmakokinetik von Carvedilol bei erwachsenen, gesunden, freiwilligen Probanden untersucht. Sie nahmen eine Testdosis von 0,09 mg/kg in gleicher Weise wie die pädiatrischen Patienten ein (siehe 2.2.6). Die Probanden blieben bis vier Stunden nach Carvedilol-Einnahme nüchtern. Nach der Medikamenteneinnahme folgten

Blutentnahmen über einen Zeitraum von zwölf Stunden zu den gleichen Zeitpunkten wie bei den Patienten (siehe 2.2.7). Die Probanden wurden ebenfalls vor Einnahme von Carvedilol hinsichtlich ihrer metabolischen Kapazität des Enzyms Zytochrom-P450-2D6 phänotypisiert und genotypisiert.

### **2.4 Bestimmung der Plasmakonzentrationen von Carvedilol**

#### **2.4.1 Methodenentwicklung**

Zur Bestimmung der Pharmakokinetik von Carvedilol bei den pädiatrischen Patienten war es notwendig, eine Methode zu entwickeln, um aus möglichst geringen Blutvolumina die Plasmakonzentrationen bestimmen zu können. In der Literatur bislang beschriebene Methoden benötigten 500 – 1000 µl Plasma zur Probenaufarbeitung (Varin et al. 1986, Louis et al. 1987, Reiff 1987). Bei 13 benötigten Blutentnahmen für die Durchführung eines Plasmakonzentrations-Zeitprofils über ein Dosierungsintervall entspräche dies einer Gesamtmenge von mindestens 13 - 26 ml Blut. Bei einem geschätzten Blutvolumen von 80 ml/kg wäre die erforderliche Blutmenge für ein Kleinkind von 3 kg Körpergewicht bei den herkömmlichen Methoden mit 5 – 11% des Gesamtblutvolumens sehr hoch. Diese Menge entspricht etwa der bei Blutspenden von Erwachsenen abgenommenen Blutmenge (9 – 10%). Es ist vertretbar, für pharmakokinetische Untersuchungen bis zu 5% des Blutvolumens eines Säuglings zu entnehmen. Bedacht werden muss dabei, dass zusätzlich zu den Blutproben für das pharmakokinetische Profil Routineblutentnahmen für die Überwachung der Patienten im Rahmen der stationären Behandlung notwendig sind.

Durch Aufarbeitung der Patientenproben über eine Festphasenaufreinigung statt durch Flüssig-flüssig-Extraktion war es möglich, die benötigte Plasmamenge auf 300 µl zu reduzieren (Behn et al. 2001-a). Das dafür über einen Tag entnommene Blutvolumen von 7,8 ml lag deutlich unter der maximal möglichen Abnahmemenge und war mit etwa 3% des Gesamtblutvolumens eines Kleinkinds von 3 kg Körpergewicht vertretbar.

Die Carvedilol-Plasmakonzentrationen wurden mithilfe einer Internen-Standard-Methode bestimmt. Als interner Standard diente Naftopidil. Die Analyse wurde mittels HPLC und

Fluoreszenzdetektion durchgeführt. Die Methode ermöglichte die Bestimmung von Carvedilol im Konzentrationsbereich von 0,40 – 242 µg/l.

### 2.4.2 Standardlösungen

6,90 mg Carvedilol wurden in 100 ml 50%igem (V/V) wässrigen Methanol (50% MeOH) gelöst. Diese Lösung wurde 1:100 mit 50% MeOH verdünnt, so dass eine Standardlösung von 690 µg/l Carvedilol erhalten wurde. Durch Verdünnen um 1:4 mit 50% MeOH wurde eine Lösung von 172,5 µg/l hergestellt, die zum Spiken der Vergleiche bei der Untersuchung der Patientenproben verwendet wurde. Die Standardlösung des internen Standards Naftopidil mit einer Konzentration von 290 µg/l wurde durch Lösen von 5,80 mg Naftopidil in 50% MeOH und Verdünnen im Verhältnis 1:200 mit 50% MeOH erhalten. Aus je 100 µl der beiden Standardlösungen verdünnt mit 300 µl Extraktionspuffer wurden Qualitätskontrollproben für die HPLC-Analytik hergestellt. Diese wurden zu Beginn der HPLC-Messreihen und als jede achte Probe injiziert. Die Schwankungen des Peakhöhenverhältnisses von Carvedilol zu Naftopidil in den Kontrollproben, berechnet als Variationskoeffizient, lagen im Lauf der Bestimmungen bei weniger als 10% (n = 75). Alle Standardlösungen wurden bei 4°C aufbewahrt.

### 2.4.3 Probenaufarbeitung und Messprotokoll

Zur Quantifizierung der Carvedilol-Konzentrationen im Plasma der Patienten wurden zusätzlich zu den Patientenproben jeweils zwei Vergleichsproben, denen vorher eine definierte Menge an Carvedilol zugesetzt worden war, aufgearbeitet und analysiert. Für diese Vergleichsproben wurde Plasma von Spendern ohne jegliche Medikation (Leerplasma) verwendet.

Zu 300 µl Patientenplasma wurden 500 µl Kaliumacetatpufferlösung (0,5 mol/l, pH 3,5) sowie 100 µl Naftopidilstandardlösung gegeben, die Proben wurden durch starke Vibration geschüttelt und bei 4°C mit 4000 U/min für 20 Minuten zentrifugiert. Für die beiden Vergleichsproben wurden zu je 300 µl Leerplasma 500 µl Kaliumacetatpufferlösung sowie je 100 µl der Carvedilol- und Naftopidilstandardlösungen gegeben und die Proben ebenfalls durch starke Vibration geschüttelt und zentrifugiert. Die Aufreinigung der Proben erfolgte

über eine Festphasenextraktion. Das Extraktionssystem bestand aus Cyanopropyl- (CN-) Säulen sowie einer Vakuumkammer mit Steckvorrichtung für die Extraktionssäulen. Zur Reinigung und Aktivierung wurden die Säulen zweimal mit je 1 ml Methanol und anschließend zweimal mit je 1 ml doppeltdestilliertem Wasser (H<sub>2</sub>O) gespült. Die vorbehandelten Plasmaproben wurden mit 4000 U/min für 20 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden auf die Extraktionssäulen gegeben und mithilfe des angelegten Vakuums tropfenweise durch die Säulen gezogen, wobei die Probeninhaltsstoffe mit Affinität zum CN-Material an dieses gebunden wurden. Um restliche wasserlösliche Probenbestandteile zu entfernen, wurden die Extraktionssäulen zweimal mit je 1 ml H<sub>2</sub>O gespült und anschließend durch Erzeugen von Unterdruck trocken gesaugt. Die an die Festphase gebundenen Bestandteile wurden mit zweimal 200 µl Extraktionspuffer von der Säule gewaschen und in Eppendorfgefäßen aufgefangen. Nach Zentrifugation bei 4°C mit 4000 U/min für 20 Minuten wurden je 100 µl der Überstände in die HPLC-Messapparatur injiziert.

Das HPLC-System lief unter Verwendung der zugehörigen Software des Herstellers (Shimadzu, Kyoto, Japan). Das Laufmittel wurde vor der Verwendung für 30 Minuten mit Helium begast, um gelöste Gase zu beseitigen, die die HPLC-Analytik stören könnten. Vor Beginn der Messungen wurde die HPLC-Apparatur mindestens eine Stunde lang mit der mobilen Phase äquilibriert. Als mobile Phase für die HPLC-Analyse diente ein Gemisch aus 0,25 mol/l Kaliumacetatpufferlösung pH 4,0 und Acetonitril im Verhältnis 40:60 (V/V). Bei diesem Mischungsverhältnis war die Trennung von Carvedilol und Naftopidil optimal, ohne dass Interferenzen mit den übrigen Plasmabestandteilen oder Metaboliten von Carvedilol auftraten. Die Fließgeschwindigkeit lag bei 1,0 ml/min. Die Leitungen des automatischen Probengebers und des Injektionssystems wurden vor und nach jeder Messung mit entgastem 50% MeOH bzw. mit 50%igem wässrigen Acetonitril gespült. Das Säulensystem wurde nach jeder Messreihe für mindestens 30 Minuten mit entgastem 50% MeOH gespült. Die Detektion erfolgte mithilfe eines Fluoreszenzdetektors bei einer Anregungswellenlänge von 285 nm, die Emission wurde bei 360 nm gemessen. Die Analysenzeit betrug acht Minuten, die Retentionszeit für Carvedilol lag bei 5,8 Minuten und für Naftopidil bei 7,1 Minuten.

#### **2.4.4 Quantifizierung und Ausschluss von Interferenzen**

Die Quantifizierung der Plasmakonzentrationen erfolgte über die Peakhöhen. Die Konzentrationen an Carvedilol wurden berechnet, indem das Verhältnis der Peakhöhe von Carvedilol zu der des internen Standards Naftopidil der Patientenprobe mit dem Peakhöhenverhältnis aus der Vergleichsprobe mit bekannter Carvedilol-Konzentration in Beziehung gesetzt wurde.

Bei der Analyse von Leerplasma traten zu den Retentionszeiten von Carvedilol und Naftopidil keine Peaks auf, so dass mögliche Interferenzen durch Bestandteile der Plasmamatrix ausgeschlossen werden konnten (Abbildung 3 A). Zusätzlich wurden Lösungen der Hauptmetaboliten von Carvedilol mit der gleichen HPLC-Methode analysiert. Sowohl die Retentionszeiten von Desmethyl-Carvedilol, als auch die von 4- und 5-Hydroxy-Carvedilol waren kürzer als die Retentionszeit von Carvedilol, so dass auch die Störung der Analyse durch mögliche in biologischen Proben vorhandene Metaboliten ausgeschlossen werden konnte.

#### **2.4.5 Bestimmungsgrenze, Linearität und Wiederfindung**

Die untere Bestimmungsgrenze des Messverfahrens wurde nach den Kriterien der „Conference on analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence, and pharmacokinetic studies“ (Shah et al. 1992) ermittelt. Dafür wurden je fünf Proben bei drei verschiedenen Carvedilol-Konzentrationen ermittelt. Die Präzision, berechnet als Variationskoeffizient innerhalb dieser Proben, sollte nicht größer sein als 20%, die Richtigkeit um nicht mehr als  $\pm 20\%$  vom Sollwert abweichen (Shah et al. 1992). Die Bestimmungsgrenze für Carvedilol wurde zu  $0,40 \mu\text{g/l}$  ermittelt.

Die Linearität der Messung wurde durch die Analyse von Verdünnungsreihen bestehend aus fünf Konzentrationen über den Bereich von  $0,40 - 242 \mu\text{g/l}$  Carvedilol mit je fünf Proben pro Konzentrationsstufe ermittelt. Die Beziehung von Peakhöhenverhältnis zu Plasmakonzentration war über den gesamten Konzentrationsbereich linear, entsprechend der Geradengleichung:  $y = 0,11 x$ . Der Korrelationskoeffizient für diese Beziehung lag bei 0,999.

Die bei den Patienten bestimmten Carvedilol-Plasmakonzentrationen lagen mit Werten zwischen 0,42 und 132,5 µg/l alle im linearen Bereich der Messung.

Zur Bestimmung der Wiederfindung wurde der Prozentsatz der absoluten Peakhöhen von Carvedilol und Naftopidil der aufgearbeiteten Proben der Validierung von den jeweiligen Peakhöhen nach Einspritzen von Standardlösungen der gleichen Konzentrationen berechnet. Die Wiederfindungsraten für Carvedilol lagen bei 85,4% ± 5,1% und für Naftopidil in denselben Proben bei 89,2% ± 4,2% (je n = 75). Die Werte sind in Tabelle 1A und 1B aufgeführt.

Eingesetzte Konzentration [µg/l]	0,40	1,08	8,63	34,5	242
Wiederfindung (arithmetischer Mittelwert) [%]					
Tag 1 (n = 5)	89,0	84,4	61,4	88,9	94,8
Tag 2 (n = 5)	86,1	84,1	81,0	82,6	84,8
Tag 3 (n = 5)	83,5	95,5	88,4	85,9	91,3
<i>Inter-assay</i> (n = 15)	86,2	88,0	76,9	85,8	90,3

**Tabelle 1A** Wiederfindung von Carvedilol in Plasma. n = Anzahl der untersuchten Proben.

Eingesetzte Konzentration [µg/l]	72,5	72,5	72,5	72,5	72,5
Wiederfindung (arithmetischer Mittelwert) [%]					
Tag 1 (n = 5)	88,4	89,8	60,7	96,5	95,0
Tag 2 (n = 5)	91,6	69,0	100	98,5	108
Tag 3 (n = 5)	107	114	100	103	120
<i>Inter-assay</i> (n = 15)	93,1	86,0	84,0	89,9	93,2

**Tabelle 1B** Wiederfindung des internen Standards Naftopidil in denselben Plasmaproben wie unter 1A. n = Anzahl der untersuchten Proben.

#### 2.4.6 Validierung

Zur Bestimmung der *Intra-assay*-Präzision und -Richtigkeit des Messverfahrens wurden jeweils fünf Proben bei fünf verschiedenen Carvedilol-Konzentrationen über den gesamten

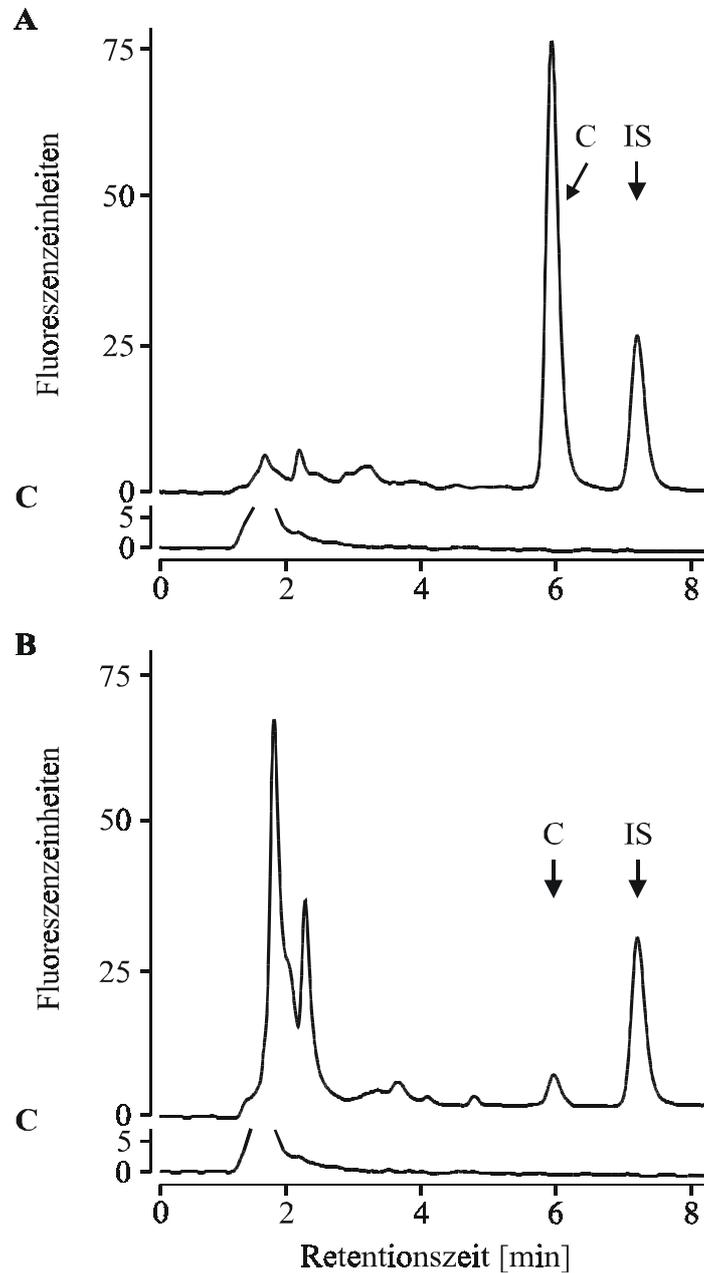
Messbereich analysiert. Dafür wurden mit 50%igem wässrigen Methanol Verdünnungen der Stammlösungen von Carvedilol hergestellt, mit denen Leerplasmaproben versetzt wurden, so dass Plasmakonzentrationen von 0,40, 1,08, 8,63, 34,5 und 242 µg/l Carvedilol resultierten. Diese Proben wurden wie unter 2.4.3 beschrieben aufgearbeitet und in einer Serie mit dem HPLC-System vermessen. Zur Bestimmung der *Inter-assay*-Richtigkeit und -Präzision wurde dieses Verfahren an zwei Tagen wiederholt. Die Bewertung der Validierungsproben erfolgte nach den Kriterien von Shah et al. (1992): Die Präzision der Konzentrationsmessungen im Konzentrationsbereich außerhalb der Bestimmungsgrenze sollte nicht mehr als 15% betragen, die Richtigkeit sollte nicht um mehr als ± 15% vom Sollwert abweichen. Die Ergebnisse der Validierung sind in Tabelle 2 dargestellt.

Eingesetzte Konzentration [µg/l]					
	0,40	1,08	8,63	34,5	242
Gemessene Konzentration (arithmetischer Mittelwert) [µg/l]					
Tag 1 (n = 5)	0,46	1,19	8,52	34,4	228
Tag 2 (n = 5)	0,47	1,22	8,23	34,6	243
Tag 3 (n = 5)	0,43	1,19	8,40	34,6	233
<i>Inter-assay</i> (n = 15)	0,45	1,20	8,38	34,5	235
Richtigkeit (arithmetischer Mittelwert) [%]					
Tag 1 (n = 5)	114	111	98,8	99,8	94,3
Tag 2 (n = 5)	117	113	95,4	100	101
Tag 3 (n = 5)	105	111	97,4	100	96,5
<i>Inter-assay</i> (n = 15)	112	111	97,2	100	97,2
Präzision (C. V., arithmetischer Mittelwert) [%]					
Tag 1 (n = 5)	6,49	5,00	4,00	1,93	3,15
Tag 2 (n = 5)	17,4	9,03	2,85	3,71	3,43
Tag 3 (n = 5)	12,2	6,68	1,99	1,93	2,67
<i>Inter-assay</i> (n = 15)	12,8	6,67	3,21	2,47	4,06

**Tabelle 2** *Intra-* und *Inter-assay*-Richtigkeit und -Präzision von Carvedilol in Plasma. n = Anzahl der untersuchten Proben, C. V. = Variationskoeffizient.

### 2.4.7 Repräsentative Chromatogramme

In Abbildung 3 sind typische Chromatogramme für die Analyse von Leerplasma, einer Vergleichsprobe mit zugesetztem Carvedilol und einer Patientenprobe dargestellt.



**Abbildung 3** Chromatogramme **A** einer Leerplasmaprobe, **B** einer Vergleichsprobe mit einer Carvedilol-Konzentration von 34,5 µg/l und **C** einer Plasmaprobe von der sechs Monate alten Patientin P4 unter Carvedilol-Therapie. Die Blutprobe wurde zwölf Stunden nach Gabe von 0,35 mg/kg Carvedilol entnommen. Die Plasmakonzentration an Carvedilol betrug 1,26 µg/l. Die Pfeile geben die Retentionszeiten von Carvedilol (C) und des internen Standards Naftopidil (IS) an.

## 2.5 Bestimmung der Plasmakonzentrationen der Enantiomere von Carvedilol

Zusätzlich zur Bestimmung der Racematkonzentrationen von Carvedilol wurde eine Trennung der Enantiomere aus dem Patientenplasma durchgeführt. In Weiterentwicklung der Arbeiten von Michels (2000) am Institut für Pharmazeutische Chemie der Universität Münster wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Methode erarbeitet, um aus möglichst kleinen Blutvolumina die Enantiomerenkonzentrationen von Carvedilol bestimmen zu können (Behn et al. 2001-b). Für die Analyse wurden durch den Einsatz der sehr effektiven Laser-induzierten Fluoreszenzdetektion und die nur wenige Nanoliter Probenvolumen erfordernde Kapillarelektrophoresemethode nur 100 µl Plasma benötigt.

Die Carvedilol-Enantiomerenkonzentrationen wurden mithilfe einer Internen-Standard-Methode bestimmt. Als interner Standard diente (R, S)-Carazolol. (R)- und (S)-Carvedilol wurden mithilfe einer Kapillarelektrophoreseapparatur unter Zusatz von Cyclodextrinen zum Laufpuffer getrennt, die Detektion der Substanzen erfolgte mit einem Laser-induzierten Fluoreszenzdetektor (CE-LIF). Die Messungen wurden bei einer Raumtemperatur von 20°C durchgeführt.

### 2.5.1 Standardlösungen

Für die Standardlösungen wurden 5,00 mg Carvedilol-Racemat und 1,00 mg Carazolol-Racemat jeweils zu 100 ml in 0,025 N Salzsäure gelöst, so dass Lösungen von 50,00 mg/l Carvedilol und von 10,00 mg/l (R, S)-Carazolol entstanden. Die (R, S)-Carazolol-Standardlösung wurde nochmal um 1:100 mit 0,025 N Salzsäure verdünnt. Die resultierende (R, S)-Carazolol-Lösung der Konzentration 100 µg/l wurde den Proben als interne Standardlösung zugesetzt. Als Qualitätskontrollproben für die CE-Analytik wurden drei Lösungen unterschiedlicher Carvedilol-Konzentrationen hergestellt. Diese wurden, ergänzt durch den internen Standard, zu Beginn der Messreihen und als jede achte Probe abwechselnd injiziert. Die Lösungen enthielten 25,0, 12,5 bzw. 2,50 µg/l der Carvedilol-Enantiomere und jeweils 100 µg/l (R, S)-Carazolol. Diese Kontrollproben zeigten im Lauf der Bestimmungen Schwankungen des Peakhöhenverhältnisses von (R)-Carvedilol bzw. (S)-Carvedilol zu (R, S)-Carazolol, berechnet als Variationskoeffizient, von weniger als 10% (jeweils n = 25). Alle Standardlösungen wurden bei 4°C gelagert.

### 2.5.2 Probenaufarbeitung und Messprotokoll

Für die Analyse wurden 50 – 200 µl Plasma eingesetzt. Dem Plasma wurden 100 µl Britton-Robinson-Puffer (pH 8,0) und 20 µl interne Standardlösung ((R, S)-Carazolol 100 µg/l) zugesetzt. Die Probelösungen wurden zehn Sekunden lang durch starke Vibration geschüttelt, anschließend erfolgte die Flüssig-flüssig-Extraktion mit 1,1 ml Diethylether. Dafür wurden die Proben fünf Minuten lang geschüttelt und nachfolgend fünf Minuten bei Raumtemperatur mit 5000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde unter Stickstoffbegasung bei Raumtemperatur zur Trockne eingedampft. Durch Aufnahme des Rückstands in nur 20 µl 0,025 N HCl wurde eine Aufkonzentrierung erzielt. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur mit 5000 U/min zentrifugiert und ein Aliquot des Überstands mit der CE-Apparatur analysiert.

Vor der ersten Nutzung wurde die Kapillare durch 60-minütiges Spülen mit 0,1 N NaOH präkonditioniert. Vor jedem Lauf wurde ein fünf-minütiges Kapillarspülprogramm mit folgenden Schritten durchlaufen: 2 min Spülen mit 0,1 N NaOH, um Cyclodextrine aus dem Laufpuffer vom Säulenmaterial zu spülen, 2 min Spülen mit Methanol, um lipophile Rückstände zu entfernen, zum Neutralisieren 0,5 min Spülen mit doppeltdestilliertem Wasser und 0,5 min Spülen mit Anodenpuffer, um die Kapillare mit Pufferlösung zu füllen. Vor jeder Lagerung wurde die Kapillare durch folgende Spülschritte gereinigt: 4 min Spülen mit 0,1 N NaOH, 4 min Spülen mit doppeltdestilliertem Wasser, 2 min Spülen mit Luft/Stickstoff. Alle Spülschritte wurden mit 20 pounds per square inch (psi, 1 psi = 6894,76 Pa) Druck durchgeführt. Die Probenaufgabe erfolgte hydrodynamisch mit 0,5 psi für 25 sec. Das entspricht einem Probenvolumen von etwa 36 nl. Während der Probenaufgabe steckte das gegenüberliegende Ende der Kapillare im Kathodenpuffer. Die Trennung wurde bei normaler Polarität mit 16 kV durchgeführt, das entspricht einer elektrischen Feldstärke von 432 V/cm. Die resultierende Stromstärke lag bei etwa 85 µA. Der interne Standard (R, S)-Carazolol wurde unter diesen Bedingungen nicht in die Enantiomere aufgetrennt. Die Analysenzeit betrug zwölf Minuten, die Migrationszeiten lagen bei 8,5 Minuten für (R, S)-Carazolol, 11,2 für (R)-Carvedilol und 11,5 Minuten für (S)-Carvedilol.

### 2.5.3 Ausschluss von Interferenzen

Das Auftreten möglicher Störpeaks durch die Plasmamatrix wurde nach der Analyse von Leerplasma mit der gleichen CE-LIF-Methode ausgeschlossen. Zu den Migrationszeiten des internen Standards (R, S)-Carazolol und der Carvedilol-Enantiomere traten keine Peaks auf (Abbildung 4 C). Zusätzlich wurden die Migrationszeiten der Metaboliten überprüft. Die in 4- bzw. 5-Stellung des Phenylkerns hydroxylierten Metaboliten migrierten schneller als die Carvedilol-Enantiomere, Desmethyl-Carvedilol migrierte langsamer. Die Migrationszeiten der Metaboliten unterschieden sich deutlich von denen der Carvedilol-Enantiomere, so dass für deren Analyse eine Störung durch die eventuell in biologischen Proben vorhandenen Metaboliten ausgeschlossen werden konnte.

### 2.5.4 Kalibrierung, Linearität und Bestimmungsgrenze

Lösungen verschiedener Konzentrationen von racemischem Carvedilol, gemessen mit der CE-LIF-Methode, ergaben reproduzierbar Verhältnisse der auf die Migrationszeit korrigierten Peakflächen der beiden Carvedilol-Enantiomere von 1:1. Für die Herstellung der Kalibrierungsproben wurde daher racemisches Carvedilol eingesetzt. Nach Versetzen von je 980 µl Plasma mit 20 µl einer Standardlösung von Carvedilol-Racemat in sechs verschiedenen Konzentrationen resultierten Plasmakonzentrationen von 1,56 bis 50,0 µg/l pro Enantiomer. Die Proben wurden bis zur Vermessung bei -20°C aufbewahrt. Je drei Proben pro Konzentration wurden wie unter 2.5.2 beschrieben aufgearbeitet und in einer Sequenz analysiert. Die Kalibrationsgeraden wurden entsprechend der Internen-Standard-Methode durch Auftragen der korrigierten Peakflächenverhältnisse von Carvedilol-Enantiomer zu internem Standard gegen die korrespondierenden Konzentrationen erstellt.

Die Messungen waren über den gesamten Konzentrationsbereich linear. Die linearen Regressionsanalysen ergaben eine Geradengleichung von:  $y = 0,02764 x - 0,004$  für (R)-Carvedilol und von:  $y = 0,02760 x - 0,006$  für (S)-Carvedilol, der Korrelationskoeffizient lag für (R)-Carvedilol bei 0,99997 und für (S)-Carvedilol bei 0,99993. Die Quantifizierung der Enantiomere erfolgte mithilfe der beiden Geradengleichungen der Kalibrierung.

Zur Ermittlung der Bestimmungsgrenze wurden in einem weiteren Experiment jeweils sechs Proben von 1,56 und 1,04  $\mu\text{g/l}$  der Carvedilol-Enantiomere analysiert. Die Präzision an der Bestimmungsgrenze sollte maximal 20% betragen, die Richtigkeit maximal  $\pm 20\%$  sein (Shah et al. 1992). Die Bestimmungsgrenze wurde demnach für jedes Carvedilol-Enantiomer zu 1,56  $\mu\text{g/l}$  bestimmt.

### 2.5.5 Validierung

Die Validierung der Methode erfolgte für eine Plasamenge von 100 µl. Um die Richtigkeit und die Präzision der Methode zu bestimmen, wurden von der Carvedilol-Stammlösung vier verschiedene Verdünnungen hergestellt, die jeweils Leerplasmaproben zugesetzt wurden. So ergaben sich Konzentrationen der Carvedilol-Enantiomere von 1,56, 3,13, 12,5 und 50,0 µg/l. Pro Konzentration wurden sechs Proben aufgearbeitet und in einer Sequenz vermessen, um die *Intra-assay*-Variabilität zu bestimmen. Zur Ermittlung der *Inter-assay*-Variabilität wurden diese Experimente an zwei weiteren Tagen wiederholt. Die Richtigkeit der Methode sollte im Arbeitsbereich bei weniger als  $\pm 10\%$  liegen. Die Präzision, angegeben als Variationskoeffizient in Prozent, sollte kleiner als 10% sein. Die Ergebnisse der Validierung sind in Tabelle 3A für (R)-Carvedilol und in Tabelle 3B für (S)-Carvedilol dargestellt.

Eingesetzte Konzentration [µg/l]	1,56	3,13	12,5	50,0
Gemessene Konzentration (arithmetischer Mittelwert) [µg/l]				
Tag 1 (n = 6)	1,75	2,98	12,3	51,7
Tag 2 (n = 6)	1,51	2,90	11,3	53,3
Tag 3 (n = 6)	1,61	3,26	12,3	50,0
<i>Inter-assay</i> (n = 18)	1,62	3,05	12,0	51,7
Richtigkeit (arithmetischer Mittelwert) [%]				
Tag 1 (n = 6)	112	95,5	98,6	103
Tag 2 (n = 6)	96,6	92,7	90,5	107
Tag 3 (n = 6)	103	104	98,2	100
<i>Inter-assay</i> (n = 18)	104	97,6	95,8	103
Präzision (C. V., arithmetischer Mittelwert) [%]				
Tag 1 (n = 6)	8,38	6,63	9,46	4,03
Tag 2 (n = 6)	8,22	8,36	5,86	1,41
Tag 3 (n = 6)	11,3	6,86	7,36	2,66
<i>Inter-assay</i> (n = 18)	10,9	8,64	8,34	3,81

**Tabelle 3A** *Intra-* und *Inter-assay*-Richtigkeit und -Präzision für (R)-Carvedilol in Plasma. n = Anzahl der untersuchten Proben, C. V. = Variationskoeffizient.

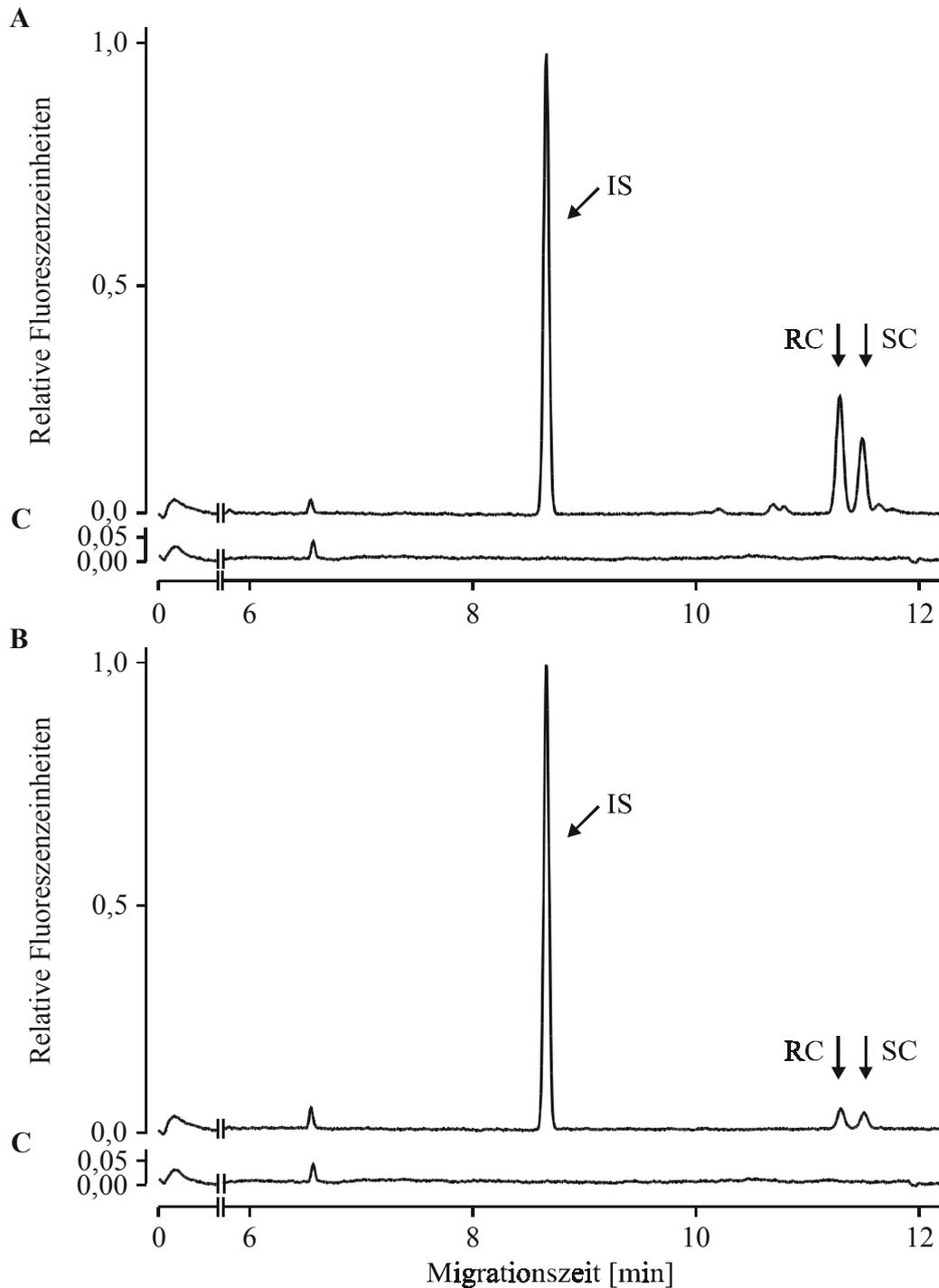
## Methoden

Eingesetzte Konzentration [ $\mu\text{g/l}$ ]				
	1,56	3,13	12,5	50,0
Gemessene Konzentration (arithmetischer Mittelwert) [ $\mu\text{g/l}$ ]				
Tag 1 (n = 6)	1,76	3,03	12,8	51,9
Tag 2 (n = 6)	1,57	3,07	11,5	52,9
Tag 3 (n = 6)	1,70	3,30	12,1	50,1
<i>Inter-assay</i> (n = 18)	1,68	3,13	12,1	51,6
Richtigkeit (arithmetischer Mittelwert) [%]				
Tag 1 (n = 6)	113	96,9	102	104
Tag 2 (n = 6)	101	98,3	92,1	106
Tag 3 (n = 6)	109	106	96,8	100
<i>Inter-assay</i> (n = 18)	107	100	97,1	103
Präzision (C. V., arithmetischer Mittelwert) [%]				
Tag 1 (n = 6)	5,58	4,71	4,36	5,81
Tag 2 (n = 6)	3,30	2,29	6,38	6,33
Tag 3 (n = 6)	9,31	7,13	9,54	2,82
<i>Inter-assay</i> (n = 18)	7,91	6,32	7,86	5,47

**Tabelle 3B** *Intra-* und *Inter-assay*-Richtigkeit und -Präzision für (S)-Carvedilol in Plasma. n = Anzahl der untersuchten Proben, C. V. = Variationskoeffizient.

### 2.5.6 Repräsentative Elektropherogramme

Abbildung 4 zeigt typische Elektropherogramme von Patientenproben und von Leerplasma.



**Abbildung 4** Elektropherogramme von Proben des fünf Jahre alten Patienten P9 von 0,75 Stunden nach Einnahme der Testdosis von 0,09 mg/kg Carvedilol (**A**; (R)-Carvedilol-Konzentration: 10,5  $\mu\text{g/l}$ ; (S)-Carvedilol-Konzentration: 6,54  $\mu\text{g/l}$ ) bzw. von 6 Stunden nach Einnahme der Testdosis (**B**; (R)-Carvedilol: 1,58  $\mu\text{g/l}$ ; (S)-Carvedilol: 1,39  $\mu\text{g/l}$ ), **C** Pherogramm einer Leerplasmaprobe. Die Pfeile geben die Migrationszeiten des internen Standards (R, S)-Carazolol (IS), von (R)-Carvedilol (RC) und (S)-Carvedilol (SC) an.

## **2.6 Pharmakokinetische Auswertung**

### **2.6.1 Simulation der Zieldosis-Konzentrationen mit KINETICA<sup>TM</sup> Software**

Um zu überprüfen, ob die Pharmakokinetik von Carvedilol bei den pädiatrischen Patienten dieser Studie linear ist, wurden mithilfe des Programms KINETICA<sup>TM</sup> Simulationen der Zieldosisprofile ausgehend von den pharmakokinetischen Parametern der Testdosisprofile durchgeführt. Dafür wurden die Plasmakonzentrationen mit den entsprechenden Zeitpunkten des Testdosisprofils, die berechneten pharmakokinetischen Parameter der Patienten und die applizierten Carvedilol-Dosen mit Zeitpunkten bis zur Gabe der Zieldosis in das KINETICA<sup>TM</sup>-Datenblatt eingegeben. Anschließend wurde der Plasmakonzentrationsverlauf ausgehend von der Testdosis bis zum Fließgleichgewicht unter Zieldosis simuliert. Für eine lineare Pharmakokinetik sollten die simulierten Werte mit den beim Zieldosisprofil gemessenen Plasmakonzentrationen übereinstimmen.

### **2.6.2 Kompartimentelle und nichtkompartimentelle Analyse**

Die Auswertung der Plasmakonzentrations-Zeitprofile der Carvedilol-Konzentrationen bezüglich der pharmakokinetischen Parameter erfolgte sowohl mittels kompartimenteller als auch mittels nichtkompartimenteller Analyse. Für die kompartimentelle Analyse wurden die Plasmakonzentrationen von Carvedilol über den Zeitverlauf eines Dosierungsintervalls mithilfe des Programms KINETICA<sup>TM</sup> ausgewertet. Die Beschreibung der Daten erfolgte nach einem Ein- oder Zweikompartimentmodell, je nachdem, welchem Modell die Daten am besten entsprachen. Die Güte der Modellanpassung wurde dabei nach drei Kriterien (objective function, Schwartz criteria, Akaike criteria) beurteilt, die die Abweichungen der berechneten Konzentrationswerte von den gemessenen Daten angeben (Press et al. 1992, Akaike 1976, Akaike 1973). Je kleiner diese statistischen Kriterien, desto besser war die Anpassung.

Nachfolgend ist die Formel für die Anpassung nach einem Einkompartimentmodell aufgeführt.

$$C = A * k_a / (k_a - \alpha) * (e^{-\alpha * t_{lag}} - e^{-k_a * t_{lag}})$$

C = Plasmakonzentration, A = y-Achsenabschnitt der extrapolierten Geraden durch die Eliminationsphase,  $k_a$  = Absorptionsgeschwindigkeitskonstante,  $\alpha$  = Geschwindigkeitskonstante der Eliminationsphase,  $t_{lag}$  = Verzögerungszeit zwischen Medikamenteneinnahme und Plasmakonzentrationsanstieg.

Die Anpassung nach einem Zweikompartimentmodell erfolgte entsprechend folgender Formel:

$$C = A * k_a / (k_a - \alpha) * (e^{-\alpha * t_{lag}} - e^{-k_a * t_{lag}}) + B * k_a / (k_a - \beta) * (e^{-\beta * t_{lag}} - e^{-k_a * t_{lag}})$$

A = y-Achsenabschnitt der errechneten Geraden durch die Distributionsphase, B = y-Achsenabschnitt der extrapolierten Geraden durch die Eliminationsphase,  $\alpha$  = Geschwindigkeitskonstante der Distributionsphase,  $\beta$  = Geschwindigkeitskonstante der Eliminationsphase, C,  $k_a$  und  $t_{lag}$  siehe oben.

Mithilfe der kompartmentellen Analyse wurden folgende pharmakokinetische Parameter der pädiatrischen Patienten und erwachsenen Probanden berechnet:

AUC(0-t)	Fläche unter der Konzentrations-Zeitkurve ab Einnahme des Arzneistoffs bis zum Zeitpunkt t. $t = \infty$ für das Testdosisprofil, $t = 12$ h für das Zieldosisprofil.
AUMC(0-t)	Fläche unter der Momentkurve ab Einnahme des Arzneistoffs bis zum Zeitpunkt t. $t = \infty$ für das Testdosisprofil, $t = 12$ h für das Zieldosisprofil.
MRT	Mittlere Verweildauer
$t_{1/2}$	Terminale Eliminationshalbwertszeit
CL	Totale Körperclearance nach oraler Einnahme des Wirkstoffs
V	Verteilungsvolumen.

Dieselben Parameter wurden zusätzlich nichtkompartimentell bestimmt. Die Formeln zur Berechnung der pharmakokinetischen Parameter mittels kompartimenteller und nichtkompartimenteller Auswertung sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Pharmakokinetischer Parameter	Kompartimentelle Analyse		Nichtkompartimentelle Analyse
	Einkompartimentmodell	Zweikompartimentmodell	
AUC(0-t)	$A \cdot k_a / (k_a - \alpha) \cdot (1/\alpha - 1/k_a)$	$A \cdot k_a / (k_a - \alpha) \cdot (1/\alpha - 1/k_a) + B \cdot k_a / (k_a - \beta) \cdot (1/\beta - 1/k_a)$	$\frac{1}{2}(C_0 + C_1) \cdot (t_1 - t_0) + \frac{1}{2}(C_1 + C_2) \cdot (t_2 - t_1) + \dots + \frac{1}{2}(C_{n-1} + C_n) \cdot (t_n - t_{n-1}) + C_n / \beta$
AUMC(0-t)	$A \cdot k_a / (k_a - \alpha) \cdot (1/\alpha^2 - 1/k_a^2)$	$A \cdot k_a / (k_a - \alpha) \cdot (1/\alpha^2 - 1/k_a^2) + B \cdot k_a / (k_a - \beta) \cdot (1/\beta^2 - 1/k_a^2)$	$\frac{1}{2}(C_0 \cdot t_0) \cdot (t_1 - t_0) + \frac{1}{2}(C_1 \cdot t_1) \cdot (t_2 - t_1) + \dots + \frac{1}{2}(C_{n-1} \cdot t_{n-1}) \cdot (t_n - t_{n-1}) + C_n \cdot t_n / \beta + C_n \cdot \beta^2$
MRT	$AUMC(0-t) / AUC(0-t) - (t_{lag} + 1/k_a)$	$AUMC(0-t) / AUC(0-t) - (t_{lag} + 1/k_a)$	$AUMC(0-t) / AUC(0-t)$
$t_{1/2}$	$\ln 2 / \alpha$	$\ln 2 / \beta$	
CL	$D / AUC(0-t)$		
V	$CL / \alpha$	$CL / \beta$	

**Tabelle 4** Formeln zur Berechnung der pharmakokinetischen Parameter AUC(0-t) (Fläche unter der Konzentrations-Zeitkurve ab Einnahme des Arzneistoffs bis zum Zeitpunkt t), AUMC(0-t) (Fläche unter der Momentkurve ab Einnahme des Arzneistoffs bis zum Zeitpunkt t), MRT (mittlere Verweildauer),  $t_{1/2}$  (terminale Eliminationshalbwertszeit), CL (totale Körperclearance nach oraler Einnahme des Wirkstoffs) und V (Verteilungsvolumen) mit kompartimenteller Analyse entsprechend einem Einkompartimentmodell, einem Zweikompartimentmodell und zur Berechnung mit nichtkompartimenteller Analyse. D = Dosis, C = Konzentration, t = Zeitpunkt nach Arzneimittelanwendung, n = Kennzahl für die letzte der untersuchten Plasmaproben,  $k_a$  = Absorptionsgeschwindigkeitskonstante,  $t_{lag}$  = Verzögerungszeit zwischen Medikamenteneinnahme und Plasmakonzentrationsanstieg; Einkompartimentmodell: A = y-Achsenabschnitt der extrapolierten Geraden durch die Eliminationsphase,  $\alpha$  = Geschwindigkeitskonstante der Eliminationsphase; Zweikompartimentmodell: A = y-Achsenabschnitt der errechneten Geraden durch die Distributionsphase, B = y-Achsenabschnitt der extrapolierten Geraden durch die Eliminationsphase,  $\alpha$  = Geschwindigkeitskonstante der Distributionsphase,  $\beta$  = Geschwindigkeitskonstante der Eliminationsphase.

Zusätzlich wurden die maximalen Plasmakonzentrationen ( $C_{\max}$ ) und die Zeitpunkte bei Auftreten der maximalen Konzentrationen ( $t_{\max}$ ) durch visuelle Auswertung der Daten ermittelt.

Die Bioverfügbarkeit von Carvedilol bei den einzelnen Patienten konnte nicht ermittelt werden, da der Arzneistoff bei den Kindern nicht intravenös verabreicht werden konnte. Daher geht die Bioverfügbarkeit als zusätzlicher Faktor „ $f^e$ “ in die Werte der Clearance und des Verteilungsvolumens mit ein.

Kompartimentelle und nichtkompartimentelle Auswertung ergaben vergleichbare Ergebnisse, zur Endauswertung der pharmakokinetischen Parameter wurden die Werte der nichtkompartimentellen Analyse herangezogen.

## 2.7 Pharmakokinetisch/pharmakodynamisches Modelling

Das pharmakokinetisch/pharmakodynamische (PK/PD-) Modelling wurde für die pharmakodynamischen Parameter Herzfrequenz und Blutdruck durchgeführt. Diese Parameter wurden zeitgleich mit den Blutentnahmen während der Profile gemessen. Für die Auswertung des Blutdrucks wurde der mittlere arterielle Druck (MAD) über die Formel:  $MAD = (2 \times \text{diastolischer Blutdruck} + \text{systolischer Blutdruck}) / 3$  berechnet. Das PK/PD-Modelling wurde mithilfe des Computerprogramms Scientist<sup>TM</sup> durchgeführt. Um einen möglichst weiten Konzentrations-Wirkungsbereich abzudecken, wurden die Konzentrations- und Effektdaten sowohl des Test- als auch des Zieldosisprofils für die Berechnungen verwendet.

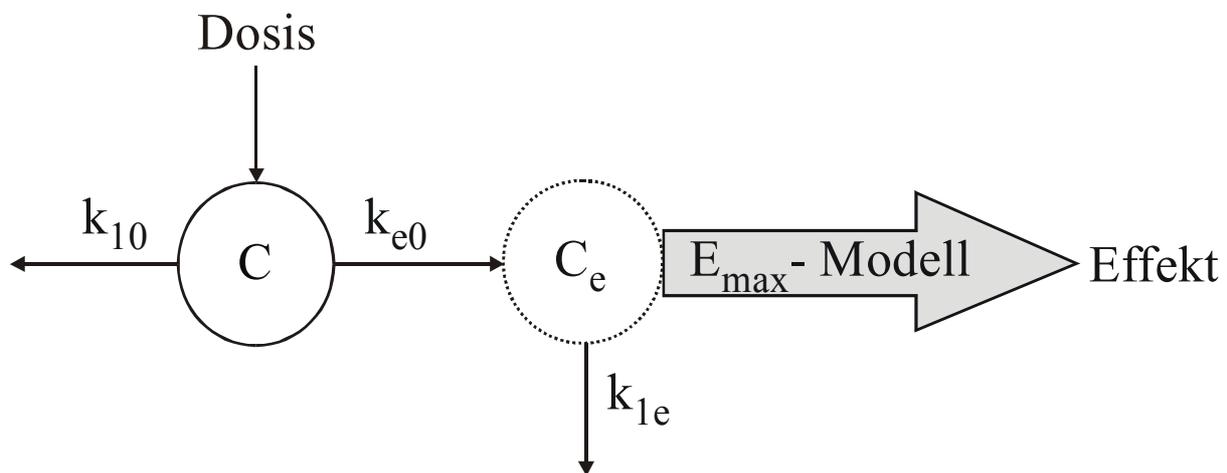
Das pharmakokinetische Modell war für jeden einzelnen Patienten schon bei der kompartimentellen Auswertung der Konzentrations-Zeitprofile ermittelt worden. Als pharmakodynamisches Modell wurde ein  $E_{max}$ -Modell herangezogen. Für die Verknüpfung von Pharmakokinetik und Pharmakodynamik musste zuerst der Zeitverlauf der Konzentrationen und Effekte genauer betrachtet werden. Hierbei zeigte sich innerhalb des Dosierungsintervalls eine Zeitverzögerung zwischen maximaler Konzentration und maximalem Effekt. Ursache für eine solche Zeitverzögerung können Verteilungsphänomene, eine allmähliche Sensitivierung des Effektorgans gegenüber dem Wirkstoff oder die Auslösung des Effekts durch eine bestimmte Substanz, z. B. einen Arzneistoffmetaboliten, dessen Bildung eine gewisse Zeit in Anspruch nimmt, sein. Um der Zeitverzögerung gerecht zu werden, wurde ein spezielles PK/PD-Modell angewendet, das von Levy und Sheiner unabhängig voneinander entwickelt worden war (Nagashima et al. 1969, Sheiner 1969). In diesem Modell wird zwischen die pharmakokinetische und die pharmakodynamische Seite ein zusätzliches Kompartiment geschaltet. In diesem hypothetischen „Effektkompartiment“ liegt eine bestimmte Konzentration des Wirkstoffs vor, die als Konzentration am Wirkort verstanden werden kann. Diese Konzentration wird über das pharmakodynamische Modell mit dem Effekt in Beziehung gesetzt.

Am Anfang des gesamten PK/PD-Modells (Abbildung 5) steht also das pharmakokinetische Modell, hier vereinfachend als Einkompartimentmodell dargestellt. Eine bestimmte Dosis wird appliziert, die in dem pharmakokinetischen Kompartiment eine als Plasmakonzentration

messbare Wirkstoffkonzentration hervorruft. Der Wirkstoff gelangt in einer bestimmten, über die Geschwindigkeitskonstante  $k_{e0}$  charakterisierten Zeit, in das hypothetische Effektkompartiment und ruft dort eine Konzentration des Wirkstoffs hervor, die als „hypothetische Effektkompartimentkonzentration“ ( $C_e$ ) bezeichnet wird. Diese Konzentration wird aus pharmakokinetischen Konstanten des Patienten und der im PK/PD-Modelling simulierten Geschwindigkeitskonstanten  $k_{e0}$  berechnet (Holford und Sheiner 1981). Die Konzentration im hypothetischen Effektkompartiment steht dann über das pharmakodynamische Modell in direktem zeitlichen Zusammenhang mit der auftretenden Wirkung.

Pharmakokinetik

Pharmakodynamik



$$C_e = \frac{D \cdot k_{e0}}{V} \cdot \left[ \frac{e^{-k_{1e} \cdot t}}{(k_{e0} - k_{10})} + \frac{e^{-k_{e0} \cdot t}}{(k_{10} - k_{e0})} \right]$$

$$\text{Effekt} = \frac{E_{\max} \cdot C_e}{EC_{50} + C_e}$$

**Abbildung 5** Schema und Formeln des verwendeten pharmakokinetisch/pharmakodynamischen Modells bei Anpassung der Plasmakonzentrations-Zeitverläufe an ein Einkompartimentmodell und für die einmalige Applikation des Wirkstoffs. C = gemessene Plasmakonzentration,  $k_{10}$ ,  $k_{e0}$ ,  $k_{1e}$  = Geschwindigkeitskonstanten erster Ordnung,  $C_e$  = Konzentration im hypothetischen Effektkompartiment, D = Dosis, V = Verteilungsvolumen, t = Zeitpunkt nach Wirkstoffeinnahme,  $E_{\max}$  = maximale Wirkstärke,  $EC_{50}$  = Wirkstoffkonzentration, die zum halbmaximalen Effekt führt (Potenz).

## 2.8 Bestimmung des Phänotyps für das Enzym Zytochrom-P450-2D6

Zur Messung der Kapazität des Enzyms Zytochrom-P450-2D6 (CYP2D6) *in vivo* eignen sich Spartein, Debrisoquin oder Dextromethorphan, da sie nahezu vollständig über dieses Enzym biotransformiert werden. Von diesen Substanzen ist ausschließlich Dextromethorphan in Deutschland als Arzneistoff zugelassen, daher diente es in der vorliegenden Untersuchung als Testsubstanz zur Phänotypisierung. Von Vorteil war, dass die einmalige Gabe dieses Antitussivums keine schwerwiegenden unerwünschten Wirkungen erwarten ließ (Brockmöller und Roots 1994).

Für die Phänotypisierung wurde eine altersentsprechende Menge NeoTussan<sup>®</sup> Hustensaft eingenommen: Patienten im Alter von 0,5 bis 2 Jahren erhielten 3 ml, 3- bis 6-jährige 5 ml, 7- bis 12-jährige 7,5 ml und 12- bis 19-jährige Patienten 15 ml des Hustensafts, die erwachsenen Probanden nahmen 20 ml ein. Dabei entsprachen 1 ml NeoTussan<sup>®</sup> Hustensaft 1,23 mg Dextromethorphan. Die Einnahme erfolgte etwa zwei Stunden nach dem Abendessen, anschließend wurde bis zum nächsten Morgen nichts mehr gegessen und keine alkoholischen Getränke genossen. Nach Einnahme von Dextromethorphan wurde der Urin der Patienten bzw. Probanden über acht Stunden gesammelt. Aus dem Sammelurin wurden sowohl die Muttersubstanz als auch der durch O-Desmethylierung entstehende Hauptmetabolit Dextrorphan quantitativ bestimmt. Als Kontrolle für mögliche störende Substanzen im Urin wurde jeweils zusätzlich eine Urinprobe, die vor der Einnahme von Dextromethorphan gesammelt worden war, untersucht. Die Bestimmung von Dextromethorphan und Dextrorphan erfolgte mithilfe einer Internen-Standard-Methode über eine HPLC-Analyse und Fluoreszenzdetektion nach dem Protokoll von Jurima-Romet et al. (1997) mit leichten Modifikationen. Als interner Standard diente Verapamil. Über den Logarithmus des Quotienten aus Dextromethorphan- zu Dextrorphan-Konzentration wurde die metabolische Kapazität bezüglich CYP2D6 für die einzelnen Studienteilnehmer berechnet. Je kleiner die Enzymkapazität, desto ausgeprägter die Metabolisierung (schnelle Metabolisierer), Personen mit einer Enzymaktivität größer als  $-1,5$  werden als intermediäre Metabolisierer bezeichnet, die Grenze zu den defizienten Metabolisierern liegt bei einer CYP2D6-Aktivität von  $0,3$  (Sachse et al. 1997).

### 2.8.1 Standardlösungen

10,00 mg Dextromethorphan-Hydrobromid, 10,00 mg Dextrorphan-Tartrat und 10,00 mg Verapamil wurden jeweils zu 100 ml in 50%igem (V/V) wässrigen Methanol (50% MeOH) gelöst. Diese Lösungen wurden je 1:10 mit 50% MeOH verdünnt, so dass Standardlösungen von jeweils 10,00 mg/l erhalten wurden. Aus je 50 µl der drei Standardlösungen verdünnt mit 850 µl Extraktionspuffer wurden Qualitätskontrollproben für die HPLC-Analytik hergestellt, die zu Beginn der HPLC-Messreihen und als jede achte Probe vermessen wurden. Diese Kontrollproben zeigten im Lauf der Bestimmungen Schwankungen des Peakhöhenverhältnisses von Dextromethorphan bzw. Dextrorphan zu Verapamil, berechnet als Variationskoeffizient, von weniger als 10% (jeweils n = 25). Alle Standardlösungen wurden bei 4°C gelagert.

### 2.8.2 Probenaufarbeitung und Messprotokoll

Zur Quantifizierung der Dextromethorphan- und Dextrorphan-Konzentrationen im Urin wurden zusätzlich zu den Patienten- bzw. Probandenproben jeweils zwei Vergleichsproben, denen vorher definierte Mengen an Dextromethorphan und Dextrorphan zugesetzt worden waren, aufgearbeitet und analysiert. Für die Vergleichsproben wurde als Matrix Urin einer gesunden Person ohne jegliche Medikation (Leerurin) verwendet.

Jeweils 1000 µl Urin wurden mit 2000 Einheiten Beta-Glucuronidase, die in 1000 µl 0,1 mol/l Kaliumacetatpufferlösung von pH 5,0 gelöst worden waren, über Nacht bei 37°C inkubiert, um die Glucuronsäurekonjugate zu spalten. Für die beiden Vergleichsproben wurde den 1000 µl Leerurin vor der Inkubation zusätzlich 50 µl Dextromethorphan-Lösung und 50 µl Dextrorphan-Lösung zugegeben. Nach der Inkubation wurde zu allen Proben außer zu den Kontrollproben für mögliche störende Substanzen 50 µl der internen Standardlösung hinzugefügt. Die weitere Verarbeitung der Proben erfolgte wie unter 2.4.3 beschrieben.

Für die HPLC-Analyse diente eine Mischung aus 0,25 mol/l Kaliumacetatpuffer von pH 4,0 und Acetonitril im Verhältnis 55:45 (V/V) als Fließmittel. Bei diesem Mischungsverhältnis war die Trennung von Dextromethorphan, Dextrorphan und Verapamil optimal, ohne dass Interferenzen mit den übrigen Urinbestandteilen auftraten. Die Fließgeschwindigkeit lag bei

1,2 ml/min. Die Detektion erfolgte mithilfe eines Fluoreszenzdetektors bei einer Anregungswellenlänge von 270 nm, die Emission wurde bei 300 nm gemessen. Zur HPLC-Analytik siehe auch 2.4.3. Die Analysenzeit betrug neun Minuten. Die Retentionszeit von Dextrorphan lag bei 3,4 Minuten, von Dextromethorphan bei 5,8 und von Verapamil bei 7,6 Minuten.

### **2.8.3 Quantifizierung, Ausschluss von Interferenzen und Wiederfindung**

Die Dextromethorphan- und Dextrorphan-Konzentrationen wurden berechnet, indem das Peakhöhenverhältnis von Dextromethorphan bzw. Dextrorphan zum internen Standard Verapamil der Patienten- oder Probandenprobe mit dem Peakhöhenverhältnis aus der Vergleichsprobe in Beziehung gesetzt wurde.

Zum Ausschluss möglicher Interferenzen durch die Urinmatrix wurde Leerurin mit der gleichen HPLC-Methode untersucht. Zu den Retentionszeiten von Dextrorphan, Dextromethorphan und Verapamil traten keine Peaks auf, die die Analyse der Substanzen stören könnten (Abbildung 6 C).

Zur Bestimmung der Wiederfindung wurde der Prozentsatz der absoluten Peakhöhen von Dextromethorphan, Dextrorphan und Verapamil von aufgearbeiteten Proben von den jeweiligen Peakhöhen nach Einspritzen von Standardlösungen der gleichen Konzentrationen berechnet. Dafür wurden je vier Proben bei fünf verschiedenen Konzentrationsstufen untersucht. Die Wiederfindungsraten für Dextromethorphan lagen bei  $94,4\% \pm 5,7\%$ , für Dextrorphan bei  $96,9\% \pm 7,2\%$  und für Verapamil bei  $98,4\% \pm 4,8\%$  (je  $n = 20$ ).

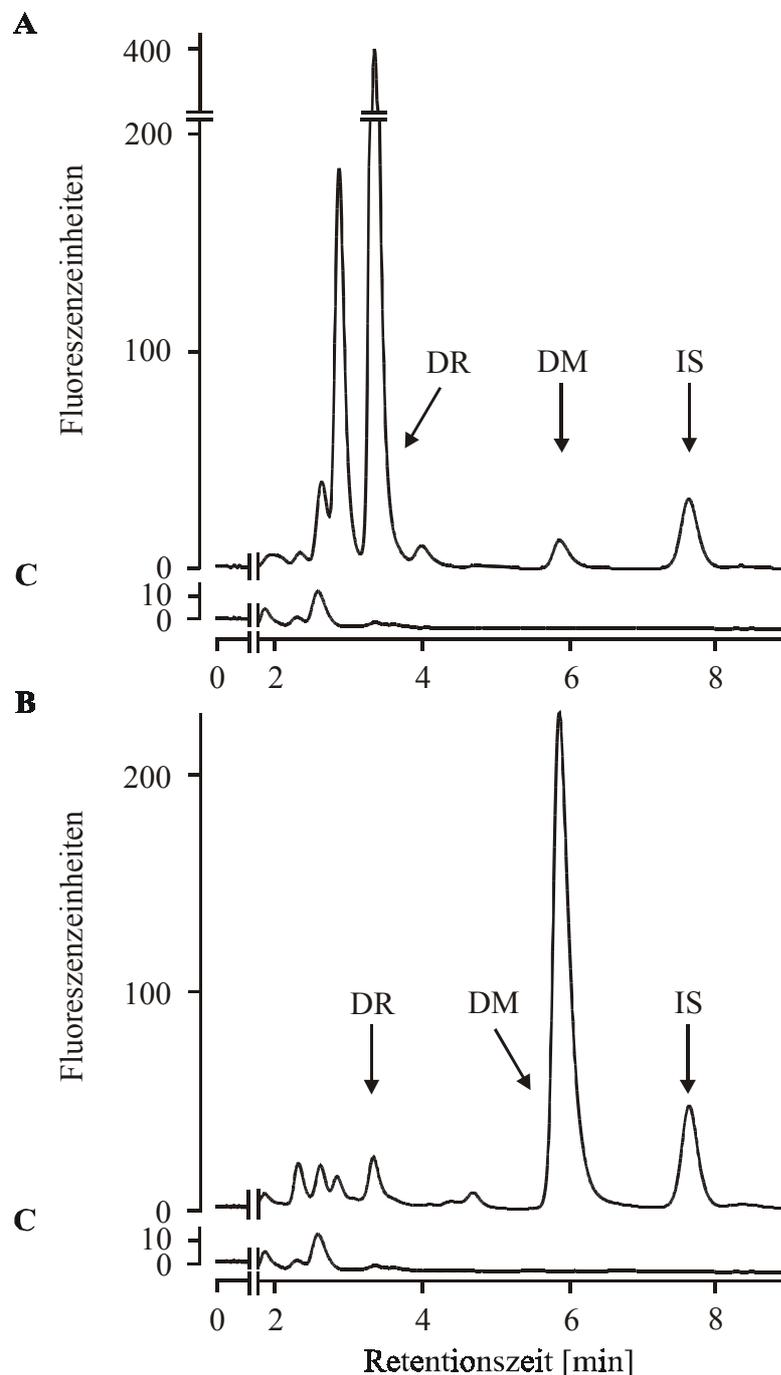
### **2.8.4 Validierung**

Zur Validierung des Messverfahrens wurden Verdünnungsreihen von Dextromethorphan und Dextrorphan hergestellt. Die Lösungen wurden Leerurinproben zugesetzt, so dass Konzentrationen von jeweils 0,05, 0,09, 0,19, 0,38, 0,75, 1,50 und 3,00  $\mu\text{g/l}$  entstanden. Es wurden je vier Proben pro Konzentration untersucht, diese Proben wurden wie unter 2.8.2 beschrieben aufgearbeitet und in einer Serie mit dem HPLC-System vermessen. Zur Bestimmung der *Inter-assay*-Richtigkeit und -Präzision wurde dieses Verfahren an zwei

Messtagen wiederholt. Die Bewertung der Validierungsproben erfolgte nach Shah et al. (1992). Die *Inter-assay*-Richtigkeit der Konzentrationsmessungen lag im Arbeitsbereich zwischen 98,6 und 98,9% mit einer Präzision zwischen 2,17 und 3,72% für Dextromethorphan und zwischen 95,6 und 102% mit einer Präzision zwischen 4,46 und 7,47% für Dextrorphan (je n = 72). Bei der Bestimmungsgrenze von 0,05 µg/l für beide Substanzen lag die Richtigkeit der Messungen für Dextromethorphan bei 113% mit einer Präzision von 9,95% und für Dextrorphan bei 110% mit einer Präzision von 12,4% (je n = 12).

### 2.8.5 Repräsentative Chromatogramme

In Abbildung 6 sind typische Chromatogramme für die Analyse von Leerurin und jeweils einer Probandenprobe des schnellen und des langsamen Metabolisierungstyps dargestellt.



**Abbildung 6** Chromatogramme **A** einer Probe eines Probanden des schnellen Metabolisierungstyps für CYP2D6 (mit einer metabolischen Kapazität (MR) von -1,7), **B** einer Probe eines Probanden des langsamen Metabolisierungstyps (mit einer MR von 0,8) und **C** einer Leerurinprobe. Die Pfeile geben die Retentionszeiten von Dextrorphan (DR), Dextromethorphan (DM) und des internen Standards Verapamil (IS) an.

## 2.9 Bestimmung des Genotyps für das Enzym Zytochrom-P450-2D6

Es sind bislang über 50 Mutationen auf dem für CYP2D6 codierenden Gen bekannt (Gaedigk et al. 1999). Im Rahmen der Studie wurden die Patienten auf die sechs häufigsten Mutationen (2D6\*2, 2D6\*3, 2D6\*4, 2D6\*5, 2D6\*6 und 2D6\*9) untersucht, womit ca. 94% aller bekannten auftretenden Mutationen erfasst wurden. Die Mutationen haben unterschiedliche Ursachen, es treten Basenaustausch (bei 2D6\*2), Basendeletionen (bei 2D6\*6 und 2D6\*9), Deletion des gesamten Gens (bei 2D6\*5), *Splice*-Defekte (bei 2D6\*4) und *Frameshift*-Mutationen (bei 2D6\*3) auf. Durch die Mutationen kommt es zu geringfügig eingeschränkter (bei 2D6\*2), mittelmäßig eingeschränkter (bei 2D6\*9) oder fehlender (bei 2D6\*3, 2D6\*4, 2D6\*5 und 2D6\*6) Aktivität des gebildeten Enzyms. Die Genotypisierung wurde nach der Methode von Sachse et al. (1997) durchgeführt. Für die molekularbiologischen Experimente wurde *aqua ad iniectabilia* (H<sub>2</sub>O) verwendet.

Im Institut für Klinische Pharmakologie in Stuttgart wurden von Herrn Dr. med. Matthias Schwab zusätzlich Untersuchungen der DNA auf Genduplikationen des für CYP2D6 codierenden Gens durchgeführt.

### 2.9.1 DNA-Isolation aus Vollblut

Zur Gewinnung von DNA aus Leukozyten wurde den Patienten und Probanden 2 ml Blut entnommen, das sofort mit Zitratpufferlösung im Verhältnis 6:1 gemischt und bei -80°C bis zur Aufarbeitung eingefroren wurde. Zwei Milliliter aufgetautes Vollblut wurden mit 4 ml Lysepuffer versetzt und die Erythrozyten während einer 20-minütigen Inkubation auf Eis lysiert. Die Proben wurden für zehn Minuten mit 1500 U/min bei 10°C zentrifugiert, die Überstände vorsichtig abgegossen und verworfen und, falls noch rote Blutzellen im Pellet vorhanden waren, die Lyse wiederholt. Die im Pellet erhaltenen Leukozyten wurden zweimal mit je 5 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und nach erneutem Zentrifugieren in 450 µl PBS resuspendiert. Anschließend wurden 500 µl des Lysispuffers hinzugefügt und die Proben durch starke Vibration geschüttelt, wobei das Detergens Natrium-Dodecyl-Sulfat des Puffers die Leukozyten lysierte und die genomische DNA freilegte. Die Inkubation mit 10 µl Proteinase K (10 mg/ml) bei 37°C über Nacht bewirkte den Abbau der Proteine zu kleineren Fragmenten, die sich mit Chloropan ausschütteln ließen. Dazu wurden

die Proben 1:1 mit Chloroform versetzt, für eine Minute vorsichtig geschüttelt und die Phasen anschließend durch Zentrifugation mit 4000 U/min bei Raumtemperatur getrennt. Die gefällten Proteine befanden sich nach der Zentrifugation in der Interphase, während die DNA in der oberen, wässrigen Phase vorlag. Die wässrige Phase wurde erneut mit Chloroform ausgeschüttelt und anschließend mit Chloroform/ Isoamylalkoholgemisch (24:1, V/V) extrahiert. Damit wurden Phenolreste beseitigt, um der Denaturierung von Enzymen vorzubeugen. Die DNA wurde durch Zugabe von einem Zehntel des Volumens an 3 mol/l Natriumacetatlösung und des zweifachen Volumens an 96%igem Ethanol bei  $-80^{\circ}\text{C}$  für 30 Minuten präzipitiert. Die DNA wurde durch Zentrifugation mit 4000 U/min bei  $4^{\circ}\text{C}$  für 30 Minuten pelletiert, das Pellet zweimal mit je 1 ml 75%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und anschließend in 100  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen. Der DNA-Gehalt der Lösung wurde photometrisch durch Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt und nach dem Lambert-Beerschen Gesetz berechnet. Der Wert für die Reinheit der DNA-Proben ergab sich über den Quotienten aus Absorption bei 260 nm (Absorptionsmaximum von DNA) und Absorption bei 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen). Der Quotient der verwendeten Proben lag zwischen 1,6 und 2,0.

### 2.9.2 Polymerase-Kettenreaktionen

Neben CYP2D6 existieren zwei Pseudogene (CYP2D7P und CYP2D8P), die auf dem DNA-Strang benachbart zum Gen für das Enzym CYP2D6 lokalisiert sind. Sie weisen mit dem für CYP2D6 codierenden Genabschnitt große Sequenzhomologien auf, können aber keine funktionsfähigen Enzyme produzieren. Um sicherzustellen, dass sich bei den Polymerasekettenreaktionen (PCR) nicht Abschnitte der Pseudogene vervielfältigten, wurde als erstes ein *Muttertemplate* hergestellt. Dafür wurde ein DNA-Stück von 4681 Basenpaaren (bp) amplifiziert, das die Bereiche des CYP2D6-Gens umfasste, auf denen die zu untersuchenden möglichen Mutationen lagen. Für die Amplifikation eines DNA-Fragments dieser Länge wurde eine Kombination aus Taq- und Pwo-Polymerase (*Expand* Polymerase; Enzyme aus *Thermus aquaticus* und *Pyrococcus wosei*) und die vom Hersteller (Hoffmann-La Roche) mitgelieferte Pufferlösung eingesetzt, um die Fehleinbaurate durch die Korrekturfähigkeiten des Pwo-Enzyms zu verringern.

Die Deletion des gesamten Gens (Mutation 2D6\*5) wurde durch eine weitere lange PCR nachgewiesen. Die *Primer* waren dafür so gewählt, dass bei vorhandenem Gen ein etwa 14.000 bp langes DNA-Stück amplifiziert wurde, das die CYP2D6-Sequenz vollständig einschloss. Im Falle einer Gendeletion entstand ein nur 3500 bp langes Amplifikat.

Der Reaktionsansatz für die PCR zur Herstellung des Muttertemplates und für die PCR zum Nachweis der Mutation 2D6\*5 wurde wie nachfolgend beschrieben hergestellt:

	Muttertemplate PCR	PCR für Mutation *5
H <sub>2</sub> O	ad 50,0 µl	ad 50,0 µl
10x Puffer mit 15mmol/l MgCl <sub>2</sub>	5,0 µl	0,0 µl
10 x Puffer ohne MgCl <sub>2</sub>	0,0 µl	5,0 µl
MgCl <sub>2</sub> 25 mmol/l	0,0 µl	3,0 µl
DMSO 99,9%	2,5 µl	2,5 µl
dNTP 10 mmol/l	2,0 µl	2,0 µl
<i>Primer</i> 140 bzw. 142, 20 µmol/l	1,2 µl	1,2 µl
<i>Primer</i> 141 bzw. 143, 20 µmol/l	1,2 µl	1,2 µl
Polymerase 3,5 u/µl ( <i>Expand</i> )	1,0 µl	0,33 µl
DNA	1,0 µg	1,0 µg

DMSO = Dimethylsulfoxid, dNTP = Desoxynukleosidtriphosphat-Gemisch zu gleichen Anteilen aus Adenosin-5'-triphosphat, Cytidin-5'-triphosphat, Guanosin-5'-triphosphat und Thymidin-5'-triphosphat.

Die Reaktionsbedingungen im *Thermocycler* für die PCR zur Herstellung des *Muttertemplates* wurden wie folgt gewählt:

2 min bei 94°C, [1 min bei 93°C, 30 s bei 63°C, 5 min bei 68 °C]<sub>35</sub> Zyklen, 7 min bei 68°C.

Die Reaktionsbedingungen für die PCR zum Nachweis der Mutation 2D6\*5 waren:

1 min bei 93°C, [1 min bei 93°C, 30 s bei 65°C, 5 min bei 68 °C]<sub>35</sub> Zyklen, 10 min bei 72°C.

Ausgehend vom *Muttertemplate* wurden drei weitere PCR mit verschiedenen *Primerpaaren* (P) durchgeführt, die kleinere DNA-Fragmente von 353 bp (P 144/145), 201 bp (P 146/147)

bzw. 387 bp (P148/149) Länge amplifizierten. Auf diesen Fragmenten lagen die zu untersuchenden möglichen Mutationen. Für die *nested* PCR wurde Taq-Polymerase und die vom Hersteller (Gibco BRL) vorgesehene Pufferlösung verwendet.

Die Reaktionsansätze für die *nested* PCR wurden nach den folgenden Schemata pipettiert:

	PCR P144/145	PCR P146/147	PCR P148/149
H <sub>2</sub> O	ad 50,0 µl	ad 50,0 µl	ad 50,0 µl
10 x Puffer + 15 mol/l MgCl <sub>2</sub>	5,0 µl	5,0 µl	5,0 µl
DMSO	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
dNTP 10 mmol/l	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl
<i>Primer 1</i>	2,5 µl	1,2 µl	2,5 µl
<i>Primer 2</i>	1,2 µl	1,2 µl	2,5 µl
Taq-Polymerase (5 u/µl)	0,4 µl	0,4 µl	0,4 µl
<i>Muttertemplate</i>	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl

Die Reaktionsbedingungen im *Thermocycler* für die *nested* PCR wurden wie folgt gewählt:

2 min bei 94°C, [ 30 s bei 94°C, 10 s bei 60°C, 1 min bei 72 °C]<sub>25</sub> Zyklen, 7 min bei 72°C.

### 2.9.3 Restriktionsverdau

Zum Nachweis der Mutationen wurden die aus den *nested* PCR erhaltenen Amplifikate durch Restriktionsenzyme verdaut. Dadurch entstanden für die unterschiedlichen Mutationen charakteristisch lange DNA-Fragmente, die auf Agarosegelen nachgewiesen werden konnten. Als Restriktionsenzyme wurden BstN I (aus *Bacillus stearothermophilus* N), BsaA I (aus *Bacillus stearothermophilus* A), Mbo II (aus *Moraxella bovis*) und Hha I (aus *Haemophilus haemolyticus*) verwendet, die Pufferlösungen wurden jeweils vom Hersteller (New England Biolabs für BstN I, BsaA I und Mbo II und Amersham Pharmacia Biotech für Hha I) mitgeliefert.

Die Reaktionsansätze und -bedingungen im *Thermocycler* für den Verdau mit den Restriktionsenzymen wurden wie folgt gewählt:

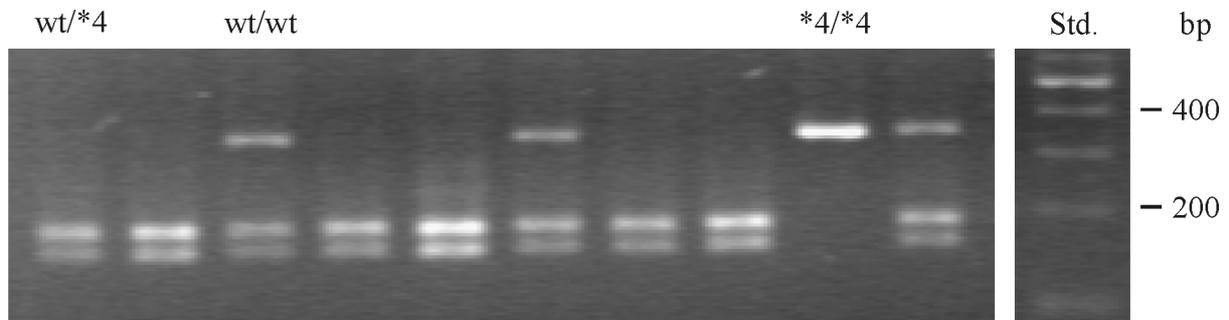
	BstN I	BsaA I	Mbo II	Hha I
H <sub>2</sub> O	ad 50,0 µl	ad 50,0 µl	ad 50,0 µl	ad 50,0 µl
10 x Puffer	5,0 µl	5,0 µl	5,0 µl	5,0 µl
Enzym	5 u	5 u	5 u	5 u
PCR-Produkt	10,0 µl	10,0 µl	10,0 µl	10,0 µl
Temperatur	60°C	37°C	37°C	37°C
Inkubationszeit	6 h	15 h	15 h	15 h

#### 2.9.4 Gelelektrophorese

Die Ergebnisse der einzelnen PCR und des Restriktionsverdaus wurden durch Elektrophorese in Agarosegelen nachgewiesen. Der Nachweis der Amplifikate aus den langen PCR wurde mit 1%igen Gelen durchgeführt, die Nachweise der Fragmente aus den nested PCR und der Ergebnisse des Enzymverdaus mithilfe 2%iger Gele. Für die Gele wurden 30 ml 1%ige bzw. 2%ige Agarose in Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE) in der Mikrowelle aufgeköcht, nach Abkühlung auf ca. 50°C 1 µl Ethidiumbromidlösung (1%ig) hinzugefügt, gleichmäßig verteilt und die Gellösung in gereinigte Gelhalter mit Probenkamm blasenfrei ausgegossen. Nach Erstarren der Gelmatrix wurde der Probenkamm entfernt und das Gel in die mit TBE gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Je 9 µl DNA-Lösung wurden mit 1 µl Ladefarbe gemischt und in die Schlitze des Agarosegels pipettiert. Die Laufzeit betrug etwa eine Stunde bei einer Spannung von 60 Volt.

Durch die angelegte Spannung wanderten die negativ geladenen DNA-Fragmente abhängig von ihrer Länge unterschiedlich weite Strecken im Gel in Richtung Pluspol. Mithilfe eines DNA-Markers aus Fragmenten definierter Länge wurde anhand der Laufhöhe der Banden die Fragmentgröße überprüft. Für die 1%igen Gele wurde ein 1 Kilobasenpaar- (kb) Marker mit Banden zwischen 0,5 – 10 kb verwendet, für die 2%igen Gele diente eine 100 bp DNA-Leiter mit Banden zwischen 100 – 1500 bp als Marker zur Größenabschätzung. Durch das Ethidiumbromid, das mit DNA interkaliert, konnten die DNA-Fragmente unter UV-Licht als

fluoreszierende Banden sichtbar gemacht werden. Die Gele wurden durch Fotos dokumentiert. Abbildung 7 zeigt ein typisches Foto eines Agarosegels zur Untersuchung auf die Mutation \*4. Abbildung 8 zeigt schematisch die beschriebenen Experimente zum Nachweis der untersuchten sechs Mutationen des CYP2D6-Gens.



**Abbildung 7** Typisches Foto eines 2%igen Agarosegels zum Nachweis der Mutation CYP2D6\*4. wt = Wildtyp, Std. = 100 bp DNA-Standard, bp = Fragmentlänge in Basenpaaren.



## 2.10 Statistik

Die angegebenen Werte sind arithmetische Mittelwerte mit den entsprechenden Standardabweichungen, n bezeichnet die Anzahl der Einzelwerte. Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des Programms SPSS Version 9.0 (SPSS, Inc. Chicago, USA). Die Veränderungen von Ejektionsfraktion, klinischer Bewertung und Katecholaminstatus im Vergleich der Werte vor Therapiebeginn und nach sechs Monaten unter Carvedilol-Therapie wurden mit dem Wilcoxon Test für matched pairs verglichen. Die pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Daten wurden hinsichtlich der Unterschiede zwischen den Altersgruppen mithilfe des Mann-Whitney U Tests statistisch ausgewertet. Für die Korrelation von pharmakokinetischen oder -dynamischen Daten mit dem Alter oder dem Metabolisierungsstatus der Patienten wurden lineare Regressionsanalysen durchgeführt und mittels ANOVA auf statistische Signifikanz geprüft. Ein p-Wert kleiner als 0,05 wurde als signifikant angesehen. Die Ergebnisse des pharmakokinetisch/pharmakodynamischen Modellings wurden bezüglich der möglichen Einflussgrößen zusätzlich mithilfe bivariater Korrelationsanalysen unter Verwendung des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman und durch Berechnung partieller Korrelationskoeffizienten untersucht.

### 3. Material

#### 3.1 Arzneistoffe

Dilatrend <sup>®</sup> (Wirkstoff: Carvedilol)	Hoffmann-La Roche (Grenzach-Wyhlen, D)
NeoTussan <sup>®</sup> (Wirkstoff: Dextromethorphan)	Novartis Consumer Health (München, D)
Carazololracemat	Klinge Pharma (München, D)
[(±)-1-(Carbazolyl-4-oxy)-3-(isopropylamino)-2-propanol]	
Carvedilolracemat	Hoffmann-La Roche (Grenzach-Wyhlen, D)
[(±)-1-(Carbazolyl-4-oxy)-3-[2-(2-methoxy-phenoxy) ethylamino] propan-2-ol]	
(R)-(+)- und (S)-(-)-Carvedilol	Hoffmann-La Roche (Grenzach-Wyhlen, D)
4-Hydroxy-Carvedilolracemat	Hoffmann-La Roche (Grenzach-Wyhlen, D)
[(±)-1-(Carbazolyl-4-oxy)-3-[2-(4-hydroxy-2-methoxy-phenoxy) ethylamino] propan-2-ol]	
5-Hydroxy-Carvedilolracemat	Hoffmann-La Roche (Grenzach-Wyhlen, D)
[(±)-1-(Carbazolyl-4-oxy)-3-[2-(5-hydroxy-2-methoxy-phenoxy) ethylamino] propan-2-ol]	
Desmethyl-Carvedilolracemat	Hoffmann-La Roche (Grenzach-Wyhlen, D)
[(±)-1-(Carbazolyl-4-oxy)-3-[2-(2-hydroxy-phenoxy) ethylamino] propan-2-ol]	
Dextromethorphan	Hoffmann-La Roche AG (Basel, CH)
[(+)-cis-1, 3, 4, 9, 10, 10a-Hexahydro-6-methoxy-11-methyl-2H-10, 4a-iminoethano-phenanthren]	
Dextrorphan	Hoffmann-La Roche AG (Basel, CH)
[(+)-cis-1, 3, 4, 9, 10, 10a-Hexahydro-6-hydroxy-11-methyl-2H-10, 4a-iminoethano-phenanthren]	
Naftopidilracemat	Research Biochemicals International, (Massachusetts, USA)
[(±)-4-(O-Methoxyphenyl)-α-[(1-naphthyl- oxy) methyl]-1-piperazinethanol]	
Verapamil	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, D)
[(+)-5-[(3, 4-Dimethoxyphenethyl) methylamino]-2-(3, 4-dimethoxyphenyl)-2-isopropyl-valeronitril]	

#### 3.2 Lösungsmittel und Reagenzien mit Gefahrenhinweisen und Sicherheitsratschlägen

Alle Substanzen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit der höchsten im Handel befindlichen Reinheit verwendet.

Acetonitril (HPLC grade)	Merck (Darmstadt, D)	R 11–23/24/25	S 16-27-45
Agarose	Life Technologies (Eggenstein, D)	-	-
Ammoniumchlorid	Merck (Darmstadt, D)	R 22-36	S 2-22
Borsäure	Merck (Darmstadt, D)	R 36/37/38-62-63	S22-26- 36/37/39
Chloroform	Merck (Darmstadt, D)	R 22-38-40-48/20/22	S 36/37
Desoxynukleotide	Biozym (Hessisch Oldendorf, D)	-	-
Dimethylsulfoxid	Merck (Darmstadt, D)	-	S 24/25

Material

---

Dinatriumhydrogenphosphat	Merck (Darmstadt, D)	-	-
DNA-Ladefarbe	MBI Fermentas (St. Leon-Rot, D)	-	-
100bp DNA-Leiter	Gibco BRL (Eggenstein, D)	-	-
1kb DNA-Leiter	New England Biolabs (Frankfurt, D)	-	-
Ethylendiamintetraessigsäure	Merck (Darmstadt, D)	R 36/37	S 22-24/25
Eisessig	Merck (Darmstadt, D)	R 10-35	S 23-26-45
Ethanol 96%	Merck (Darmstadt, D)	R 11	S 7-16
Ethidiumbromid	Fluka Biochemika (Deisenhofen, D)	R 22-26-36/37/38-40	S 26-28.1-36/37-45
Glycerol	Sigma (Deisenhofen, D)	-	-
Isoamylalkohol	Merck (Darmstadt, D)	R 10-20	S 24/25
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt, D)	R 36/37/38	S 26-36
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt, D)	-	-
Kaliumhydrogencarbonat	Merck (Darmstadt, D)	-	-
Kaliumhydroxid	Merck (Darmstadt, D)	R 35	S26-37/39-45
Methanol (HPLC grade)	Merck (Darmstadt, D)	R 11-23/25	S 7-16-24-45
Methyl-alpha-Cyclodextrin	Wacker Chemie (Burghausen, D)	-	-
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt, D)	R 36/37/38	S 26-36
Natriumhydroxid	Merck (Darmstadt, D)	R 35	S 26-37/39-45
Natriumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt, D)	-	-
Natriumdodecylsulfat	Sigma (Deisenhofen, D)	R 41-42-20/22-36/37/38	S 22-26-36
Phenol	Sigma (Deisenhofen, D)	R 24/25-34	S 28-45
Phosphorsäure	Merck (Darmstadt, D)	R 34	S 1/2-26-45
Succinyl-beta-Cyclodextrin	Wacker Chemie (Burghausen, D)	-	-
Tris-hydroxymethylaminomethan	Merck (Darmstadt, D)	R 36/38	-
Tris-HCl	Merck (Darmstadt, D)	R 36/38	-

### 3.3 Zusammensetzungen der Lösungen

Anodenpuffer	7,5 g/l 15 g/l in 150 mmol/l	Succinyl-beta-Cyclodextrin Methyl-alpha-Cyclodextrin Phosphatpuffer pH 3,0
Britton-Robinson-Puffer	6,18 g/l 5,70 ml/l 6,82 ml/l ad pH 8,0	Borsäure Eisessig Phosphorsäure 85% mit NaOH 0,5N
Chloropan	50% 49% 1%	Phenol, Tris-gepuffert Chloroform Isoamylalkohol
Desoxynukleosidtriphosphatmix (dNTPs)	je 2,5 mmol/l	Adenosin-5'-triphosphat, Cytidin-5'-triphosphat, Guanosin-5'-triphosphat, Thymidin-5'-triphosphat
Ethidiumbromidlösung	1%	Ethidiumbromid in H <sub>2</sub> O
Extraktionspuffer	20:80 (V/V)	Kaliumacetatpuffer (0,1 mol/l; pH 5,0): Acetonitril
Kaliumacetatpuffer 0,5 mol/l; pH 3,5	28,5 ml/l ad pH 3,5	Eisessig, mit konzentrierter KOH
Kaliumacetatpuffer 0,25 mol/l; pH 4,0	14,3 ml/l ad pH 4,0	Eisessig, mit konzentrierter KOH
Kaliumacetatpuffer 0,1 mol/l; pH 5,0	5,72 ml/l ad pH 5,0	Eisessig, mit konzentrierter KOH
Kathodenpuffer	150 mmol/l	Phosphatpuffer pH 3,0
Lysepuffer (autoklaviert)	10 mmol/l 155 mmol/l 0,1 mmol/l	KHCO <sub>3</sub> NH <sub>4</sub> Cl EDTA
Lysispuffer (autoklaviert)	20 mmol/l 20 mmol/l 300 mmol/l 0,4%	EDTA Tris-HCl NaCl SDS (frisch aus SDS 10%)
PBS (autoklaviert)	137 mmol/l 2,7 mmol/l 10 mmol/l 1,8 mmol/l ad pH 7,2	NaCl KCl Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> mit 1N NaOH
Phosphatpuffer 150 mmol/l, pH 3,0	21 g/l ad pH 3,0	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *1H <sub>2</sub> O, mit konzentrierter H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
SDS 10%	1g	ad 10 ml H <sub>2</sub> O
TBE-Puffer	108 g/l 61,7 g/l 0,5 M	Tris-Base Borsäure EDTA (40 ml) in H <sub>2</sub> O

### 3.4 Enzyme und Primersequenzen

Beta-Glucuronidase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, D)
<i>BsaA I</i> (5.000 u/ml)	New England Biolabs (Frankfurt, D)
<i>BstN I</i> (10.000 u/ml)	New England Biolabs (Frankfurt, D)
<i>Expand</i> Polymerase	Hoffmann-La Roche (Grenzach-Wyhlen, D)
<i>Hha I</i> (10.000 u/ml)	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, D)
<i>Mbo II</i> (5.000 u/ml)	New England Biolabs (Frankfurt, D)
Proteinase K	Hoffmann-La Roche (Grenzach-Wyhlen, D)
<i>Taq</i> Polymerase	Gibco BRL (Eggenstein, D)

P140 (20 µmol/l): GGT AAG GGC CTG GAG CAG GAA  
 P141 (20 µmol/l): GCC TCA ACG TAC CCC TGT CTC  
 P142 (20 µmol/l): ACC AGG CAC CTG TAC TCC TCA  
 P143 (20 µmol/l): GCA TGA GCT AAG GCA CCC AGA C  
 P144 (10 µmol/l): CCT GGG CAA GAA GTC GCT GGA CCA G  
 P145 (20 µmol/l): GAG ACT CCT CGG TCT CTC G  
 P146 (20 µmol/l): GCT GGG GCC TGA GAC TT  
 P147 (20 µmol/l): GGC TGG GTC CCA GGT CAT AC  
 P148 (10 µmol/l): AGG CCT TCC TGG CAG AGA TGA AG  
 P149 (10 µmol/l): CCC CTG CAC TGT TTC CCA GA

### 3.5 Verbrauchsmaterial und Laborgeräte

Aqua ad iniectabilia	Pharmacia & Upjohn (Erlangen, D)
Bond Elut CN-Extraktionssäulen (40 µm Partikelgröße, 100 mg/ml Säulenvolumen)	Varian (Harbor City, USA)
Eppendorfgeläße	Eppendorf (Hamburg, D)
Pipettenspitzen (10 µl, 100µl, 1 ml)	Treff Lab (Deggersheim, CH)
Sarstedt Röhren	Sarstedt (Heidelberg, D)

Das Leerplasma stammte von der Blutbank der Abteilung für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf von Spendern ohne jegliche Medikation.

Agarose-Gelkammer	Biorad (München, D)
Analysenwaage	Mettler (Greifensee, CH)
Destamat Destillationsapparatur	Heraeus (Hanau, D)
Dinamap <sup>TM</sup> , Vital Daten Monitor 8100	Critikon Company (Basingstoke Hants, GB)
Hettich Rotanta Zentrifuge	Hettich (Tuttlingen, D)
Inkubator	Heidolph (Kehlheim, D)
Kühltruhen (-20°C, -80°C)	Kryotec (Hamburg, D)
Magnetrührer	Heidolph (Kehlheim, D)
Mikrodismembrator	Braun (Melsungen, D)
pH-Meter	Knick (Berlin, D)
Spektrophotometer	Perkin Elmer (Palo Alto, USA)
Tischzentrifuge	Eppendorf (Hamburg, D)
Vakuumkammer Vac-Elut	Chromatographie Service (Langerwehe, D)
Vakuumpumpe	KNF Neuberger (Freiburg, D)
Vortexer	Heidolph (Kehlheim, D)

### HPLC-Messapparatur

System	LC Workstation Class LC 10 Version 1.60 (Shimadzu, Kyoto, J)
Probenaufgabesystem	Auto Injector SIL 10A (Shimadzu, Kyoto, J)
Pumpe	LC 10AT (Shimadzu, Kyoto, J)
Vorsäule	Spherisorb C6 Vorsäule (5 µm Partikelgröße, 17 x 4,6 mm Innendurchmesser)
Trennsäule	Spherisorb C6 Trennsäule (5 µm Partikelgröße, 150 x 4,6 mm Innendurchmesser)
Detektion	RF 10A Spektrofluorometrischer Detektor (Shimadzu, Kyoto, J)
Temperatur	Raumtemperatur (ca. 20°C)
Datenverarbeitung	Software des Herstellers (Shimadzu, Kyoto, J)

### Kapillarelektrophorese-Messapparatur

System	Beckman P/ACE 2100 Kapillarelektrophoreseapparatur (Beckman Instruments, München, D)
Detektion	Laser-induzierte Fluoreszenzdetektion, Omnichrome Helium-Cadmium-Laser, Series 74 (Laser 2000, Wessling, D) Anregung mit 20 mW bei 325 nm Wellenlänge
Lichtleiterkabel	Omnichrome POS FDS A ½
Emmissionsfilter	366 nm, halbe Bandweite 10 nm
Kapillaren	Fused silica, 37 cm Länge, 30 cm effektive Länge, unbehandelte Oberfläche, 50 µm Innendurchmesser, 365 µm Außendurchmesser, Polyimidcoating, Meterware
Kapillarkühlung	Flüssigkühlung der Kapillarkartusche mit FKW auf 20°C
Datenverarbeitung	Beckman System Gold Software Version 7.11

### 3.6 Software

KINETICA<sup>TM</sup> Version 2.0, Innaphase S. a. r. l., Champs-sur-Marne, Frankreich

MicroMath<sup>®</sup> Scientist<sup>®</sup> for Windows<sup>TM</sup> Version 2.02, MicroMath, Inc., Scientific Software, Salt Lake City, UT, USA

SPSS Version 9.0, SPSS, Inc., Chicago, IL, USA

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Charakteristik der Studienteilnehmer

Sechzehn pädiatrische Patienten mit Herzinsuffizienz im Alter von sechs Wochen bis 19 Jahren wurden in die Studie aufgenommen und über den Zeitraum der sechs-monatigen Behandlung mit Carvedilol beobachtet und untersucht. Die Herzinsuffizienz war bei den Patienten durch unterschiedliche Ursachen bedingt. Am häufigsten lag eine dilatative Kardiomyopathie zugrunde (n = 10), teilweise lagen anatomische Fehlbildungen vor (hypoplastisches Linksherz, n = 2, Ventrikelseptumdefekt, n = 1, double outlet right ventricle, n = 1), zum Teil verblieb eine Herzinsuffizienz nach Korrekturoperationen (Fontan-Kreislauf, n = 1, verbleibende Mitralklappeninsuffizienz nach Klappenersatz, n = 1).

Die Patienten wurden nach den Richtlinien der ICH (International Conference on Harmonisation; E11: Clinical Investigation of Medicinal Products in the Pediatric Population 2000) gemäß ihres Alters eingeteilt. Null bis 27 Tage alte Kinder werden als Neugeborene bezeichnet (Altersgruppe I), Kinder im Alter von einem Monat bis zwei Jahren als Säuglinge und Kleinkinder (Altersgruppe II), Zwei- bis Elf-Jährige als Kinder (Altersgruppe III) und die 12- bis 17-Jährigen als Jugendliche (Altersgruppe IV) eingestuft. Tabelle 7 charakterisiert die Patienten bezüglich Alter, Geschlecht und Diagnose.

Altersgruppe	Patient	Alter [Jahre]	Geschlecht	Diagnose
I	-	-	-	-
II	P1	0,12	w	DCM
II	P2	0,13	m	VSD
II	P3	0,15	m	DCM
II	P4	0,50	w	DCM
II	P5	0,75	m	HLH
II	P6	1,25	m	DCM
II	P7	1,50	m	HLH
III	P8	3,50	w	DCM
III	P9	5,50	m	DORV
III	P10	7,50	m	DCM
III	P11	8,25	m	DCM
III	P12	11,6	w	DCM
III	P13	11,8	m	DCM
IV	P14	17,5	m	MI
IV	P15	17,8	m	Fontan-Zirkulation
Erwachsen	P16	19,3	m	DCM

**Tabelle 7** Charakterisierung der 16 pädiatrischen Patienten (P) hinsichtlich Alter bei Studienbeginn, Geschlecht (w = weiblich, m = männlich) und Diagnose (DCM = dilatative Kardiomyopathie, VSD = Ventrikelseptumdefekt, HLH = Hypoplastisches Linksherzsyndrom, DORV = Double outlet right ventricle, MI = Mitralklappeninsuffizienz). Altersgruppen: I = 0 - 27 Tage, II = 1 Monat - 2 Jahre, III = 2 – 11 Jahre, IV = 12 – 17 Jahre.

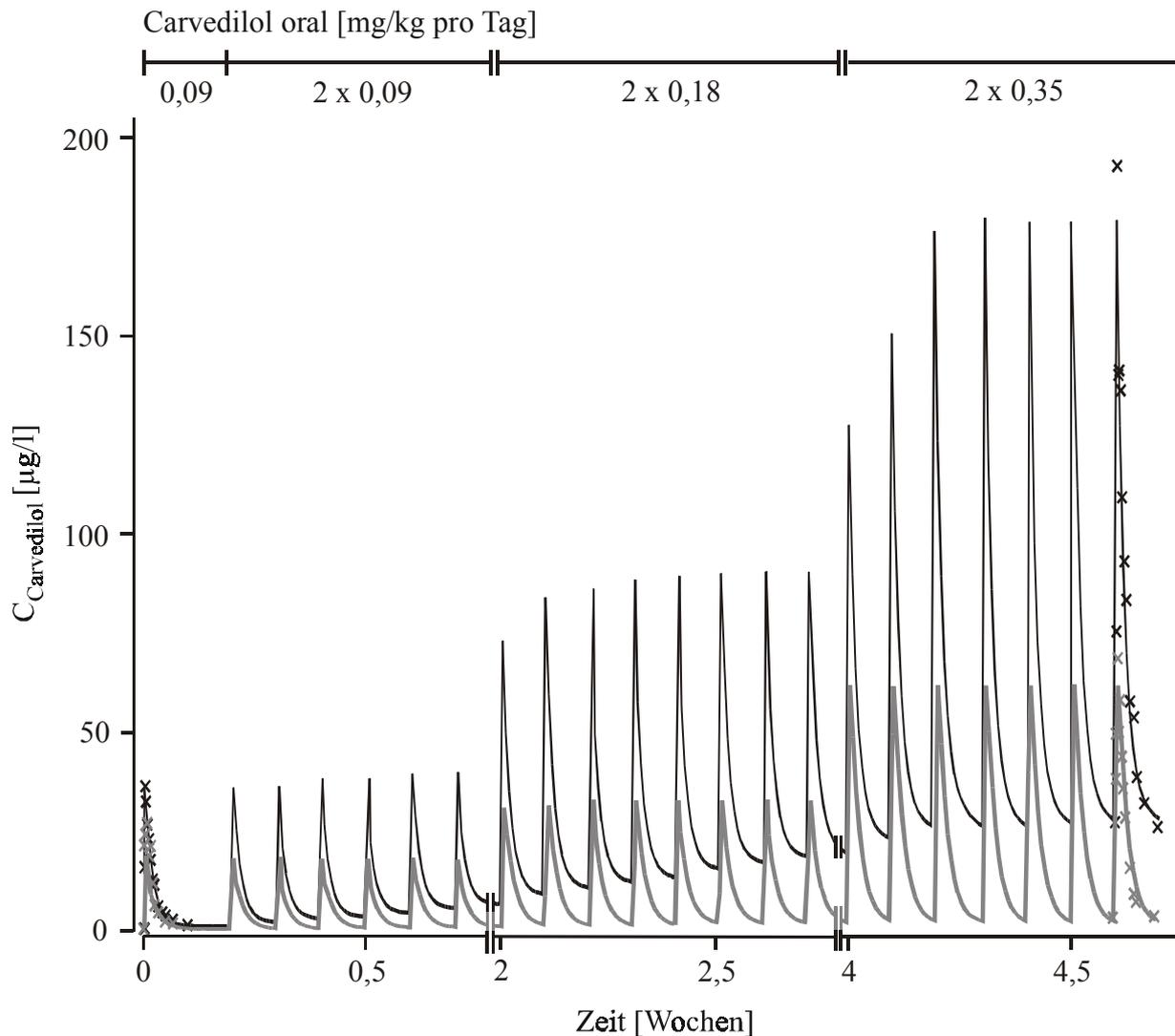
Der Patient P2 erhielt drei Monate nach Beginn der Carvedilol-Therapie eine Korrekturoperation des Ventrikelseptumdefekts, eine weitere Behandlung mit Carvedilol war nach dieser Operation nicht mehr notwendig. Bei der Patientin P4 wurde das Carvedilol nach 1,5 Monaten abgesetzt, da sie einen schweren Infekt bekam. Etwa vier Wochen nach Absetzen verstarb die Patientin an dem Infekt. Der Patient P9 wurde nur über einen Monat im Rahmen dieser Studie betreut, da er anschließend herztransplantiert wurde. Bei Patient P15 wurde das Carvedilol nach dem dritten Monat der Therapie abgesetzt, da bei ihm eine arterielle Verschlusskrankheit auftrat.

#### 4.2 Lineare Pharmakokinetik von (R, S)-Carvedilol

Aus den (R, S)-Carvedilol-Plasmakonzentrationen, die mit der HPLC-Methode für die bestimmten Zeitpunkte eines Dosierungsintervalls ermittelt worden waren, wurden die Profile unter Testdosisbedingungen (0,09 mg/kg Carvedilol) und Zieldosisbedingungen (0,35 mg/kg Carvedilol) für jeden Patienten dargestellt. Aus diesen Konzentrations-Zeitverläufen wurden wichtige pharmakokinetische Kenngrößen berechnet. (R, S)-Carvedilol zeigt bei Erwachsenen eine lineare Pharmakokinetik (von Möllendorf et al. 1987, McPhillips et al. 1988). Die Fläche unter der Konzentrations-Zeitkurve (AUC) ist also der Dosis proportional. Um die Veränderungen der Pharmakokinetik von (R, S)-Carvedilol mit Dosiserhöhung auch bei Kindern zu untersuchen, wurden jeweils die Flächen unter den Konzentrations-Zeitkurven (AUC) bei Test- und Zieldosis verglichen. Bei der Steigerung der Dosis um das 3,9-Fache nahmen die AUC-Werte vergleichbar um das 3,6-Fache zu (im Mittel von  $48,0 \pm 24,6 \mu\text{g}\cdot\text{h/l}$  auf  $170,7 \pm 149,4 \mu\text{g}\cdot\text{h/l}$ , je  $n = 14$ ). Zur weiteren Untersuchung der Linearität der Pharmakokinetik bei den pädiatrischen Patienten wurden Simulationen der Plasmakonzentrationen für das Fließgleichgewicht anhand der berechneten pharmakokinetischen Parameter der Testdosisprofile und unter Angabe der erfolgten Dosissteigerung mit dem Programm KINETICA<sup>TM</sup> durchgeführt. Die für die Zieldosisbedingungen simulierten Plasmakonzentrationen erreichten dabei Werte wie die im Profil nach Gabe der Zieldosis gemessenen Konzentrationen.

#### 4.3 Einfluss des Lebensalters auf die Pharmakokinetik von (R, S)-Carvedilol

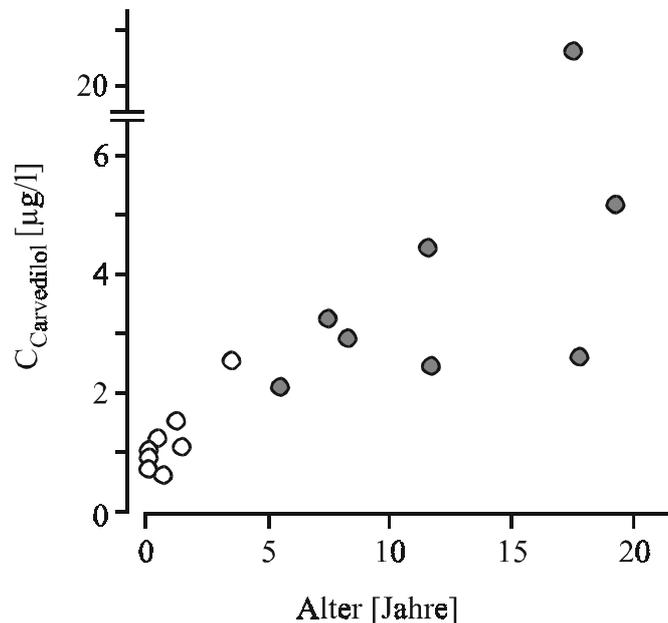
Beim Vergleich der Konzentrations-Zeitverläufe der Simulationen von Test- zu Zieldosis der Patienten zeigten sich Unterschiede in der Kumulation von (R, S)-Carvedilol. Bei den älteren Patienten kumulierte (R, S)-Carvedilol stärker als bei den jüngeren Patienten. Zum Vergleich ist in Abbildung 9 der simulierte Plasmakonzentrations-Zeitverlauf für (R, S)-Carvedilol von der Test- bis zur Zieldosis bei dem 1,25 Jahre alten Patienten P6 dem Verlauf bei dem 17,5 Jahre alten Patienten P14 gegenübergestellt.



**Abbildung 9** Simulationen der Plasmakonzentrationen ( $C$ ) von (R, S)-Carvedilol des 1,25 Jahre alten Patienten P6 (grau) und des 17,5 Jahre alten Patienten P14 (schwarz) von Testdosis (0,09 mg/kg) über Dosissteigerung bis zur Zieldosis (0,35 mg/kg). Die Kreuze stellen die gemessenen Werte dar, die Linien geben den Verlauf der mithilfe eines Zweikompartimentmodells simulierten Plasmakonzentrationen wieder. Oben ist das Dosierungsschema für Carvedilol angegeben.

Um die Kumulation von (R, S)-Carvedilol innerhalb des Patientenkollektivs zu vergleichen, wurden die Flächen unter den Konzentrations-Zeitkurven (AUC) als Maß für die im Körper verfügbare Menge an (R, S)-Carvedilol und die Talspiegel im Fließgleichgewicht unter Zieldosisbedingungen herangezogen. Mit zunehmendem Alter der Patienten stiegen sowohl die AUC als auch die Plasmakonzentrationen zum Zeitpunkt zwölf Stunden nach Gabe von (R, S)-Carvedilol signifikant an ( $r^2 = 0,35$ ,  $p = 0,027$  bzw.  $r^2 = 0,37$ ,  $p = 0,013$ , je  $n = 16$ ).

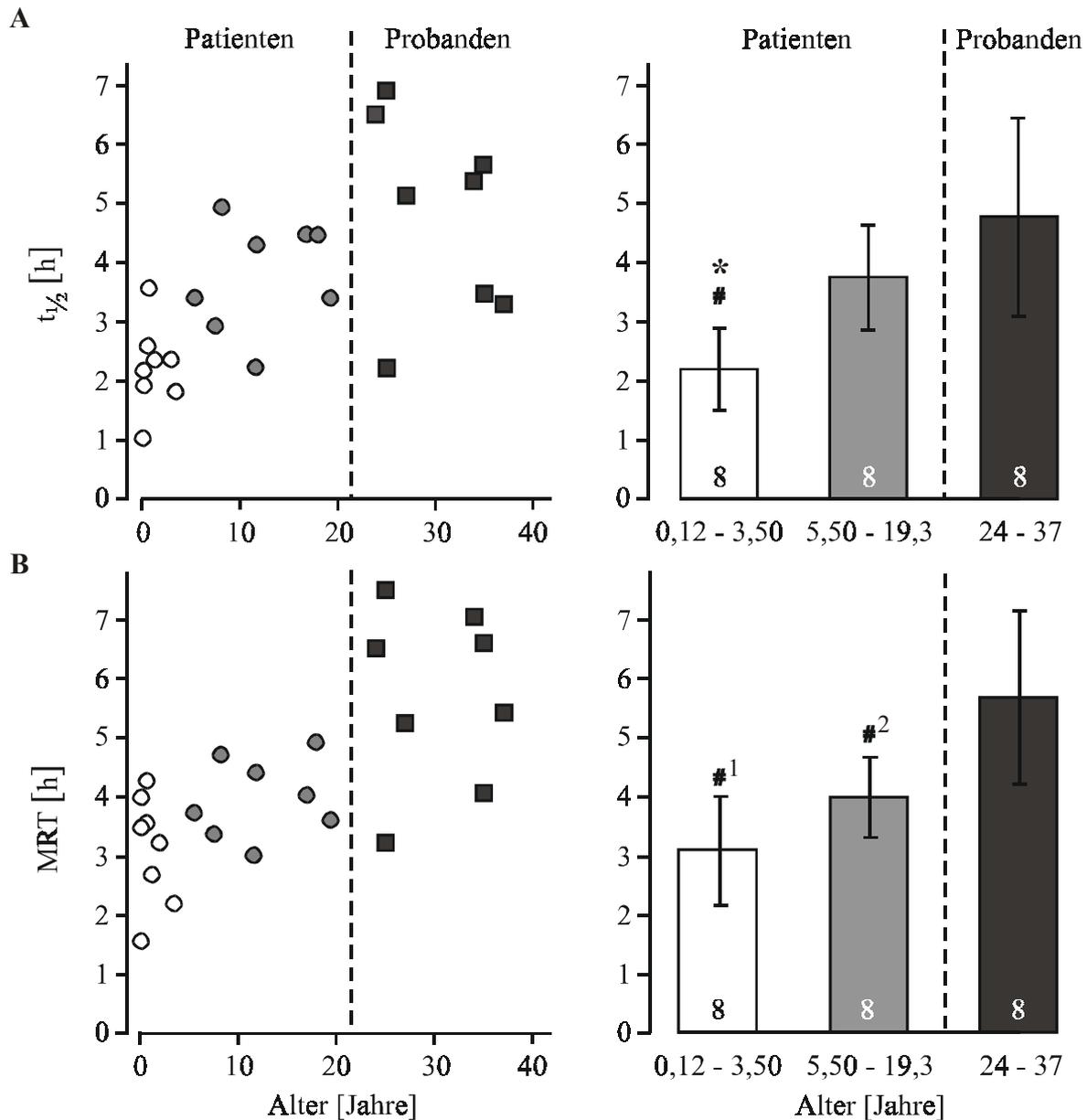
In Abbildung 10 sind beispielhaft die Talspiegelkonzentrationen gegen das Alter der Patienten aufgetragen.



**Abbildung 10** Talspiegel (C) von (R, S)-Carvedilol im Fließgleichgewicht zum Zeitpunkt zwölf Stunden nach Gabe von 0,35 mg/kg bei den acht jüngeren pädiatrischen Patienten im Alter von 0,12 – 3,50 Jahren (weiße Kreise) und den acht älteren pädiatrischen Patienten im Alter von 5,50 – 19,3 Jahren (graue Kreise) gegen das Alter der Patienten aufgetragen. Der Korrelationskoeffizient wurde zu  $r^2 = 0,37$  berechnet, die Korrelation war mit  $p = 0,013$  signifikant ( $n = 16$ ).

Die Kumulation eines Arzneistoffs ist abhängig vom Dosierungsintervall und von der Halbwertszeit. Das Dosierungsintervall war bei den Patienten gleich. Um die altersabhängigen Unterschiede im Konzentrations-Zeitverlauf erklären zu können, wurden also die terminale Eliminationshalbwertszeit sowie als weiterer Parameter für die Arzneistoffelimination die mittlere Verweildauer der Patienten und zum Vergleich auch die Werte der erwachsenen Probanden auf altersabhängige Unterschiede untersucht. Die terminale Halbwertszeit für (R, S)-Carvedilol nahm mit steigendem Alter zu ( $r^2 = 0,37$ ,  $p = 0,002$ ,  $n = 16$ ). Im Vergleich zu den erwachsenen Probanden war die Halbwertszeit der pädiatrischen Patienten im Mittel um etwa das 1,6-Fache kürzer (4,8 versus 3,0 Stunden,  $p = 0,014$ ,  $n = 8$  bzw.  $n = 16$ ). Und innerhalb des Patientenkollektivs war die Halbwertszeit der jüngeren Patienten mit  $2,2 \pm 0,7$  Stunden noch um etwa das 1,7-Fache kürzer als die der älteren Patienten ( $3,8 \pm 0,9$  Stunden;  $p = 0,010$ , je  $n = 8$ ; Abbildung 11A). Für die mittlere Verweildauer (MRT) zeigte sich ein ähnlicher Verlauf. Die MRT korrelierte im gesamten

Studienkollektiv mit dem Alter ( $r^2 = 0,46$ ,  $p < 0,001$ ,  $n = 16$ ). Sowohl in der jüngeren als auch in der älteren Altersgruppe pädiatrischer Patienten war die MRT signifikant kleiner als bei den erwachsenen Probanden ( $p = 0,005$ , bzw.  $p = 0,021$ , je  $n = 8$ ; Abbildung 11B).



**Abbildung 11** A Terminale Eliminationshalbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) von (R, S)-Carvedilol nach Einnahme der Testdosis (0,09 mg/kg) mit individuellen Werten gegen das Alter ( $r^2 = 0,37$ ,  $p = 0,002$ ,  $n = 16$  Patienten) und eingeteilt in die Gruppen der 0,12- bis 3,50-jährigen Patienten (weiße Säule), der 5,50- bis 19,3-jährigen Patienten (graue Säule) und der 24- bis 37-jährigen gesunden Probanden (schwarze Säule). B Mittlere Verweildauer (MRT) in entsprechender Darstellung ( $r^2 = 0,46$ ,  $p < 0,001$ ,  $n = 16$ ). \*  $p = 0,010$ : signifikant gegenüber Gruppe der älteren Patienten, #  $p = 0,007$ : signifikant gegenüber Probandengruppe, #<sup>1</sup>  $p = 0,005$ : signifikant gegenüber Probandengruppe, #<sup>2</sup>  $p = 0,021$ : signifikant gegenüber Probandengruppe, die Zahlen in den Säulen geben die Anzahl der untersuchten Personen an.

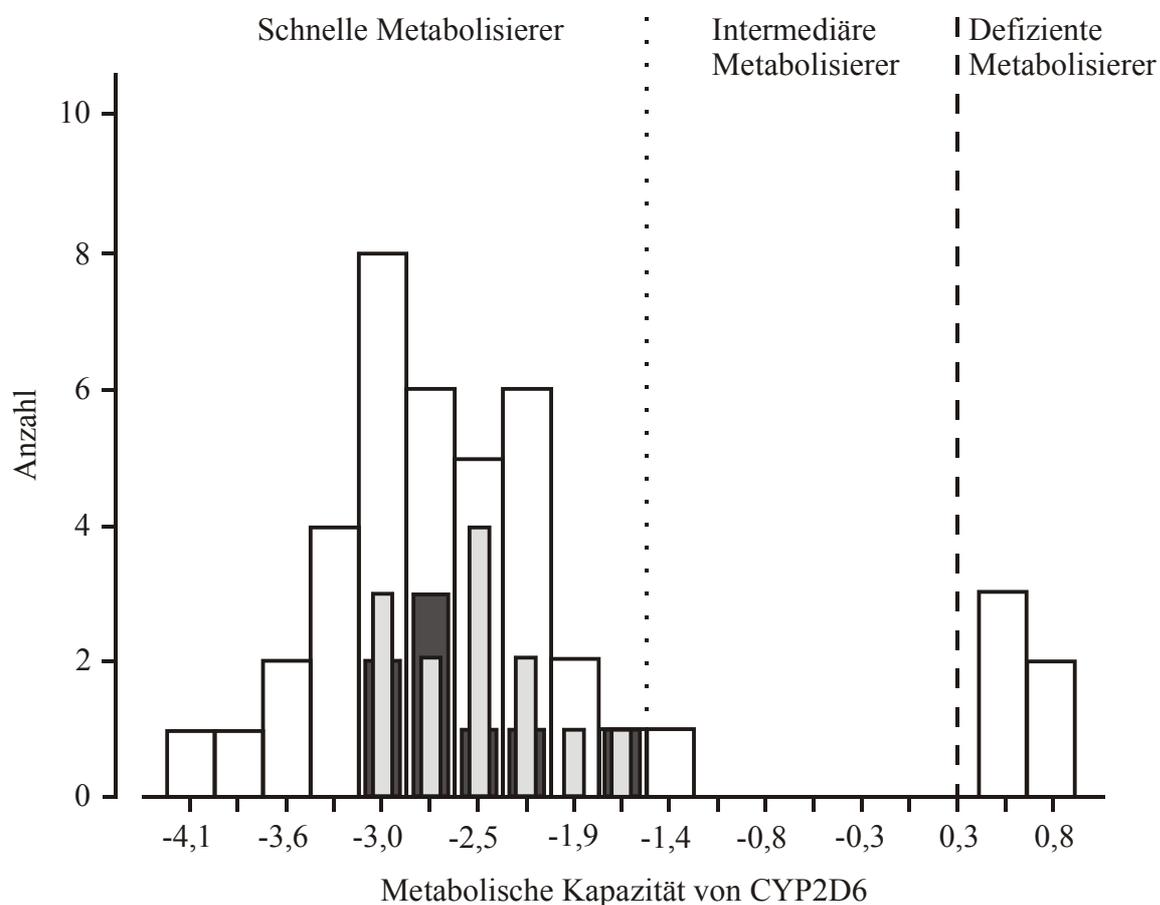
Ursachen für die altersabhängigen Unterschiede in Halbwertszeit, Verweildauer und damit in den Talspiegelkonzentrationen von (R, S)-Carvedilol könnten unterschiedlich große Verteilungsvolumina oder Unterschiede in der Clearance sein. Für diese Parameter spielt die Bioverfügbarkeit von (R, S)-Carvedilol eine entscheidende Rolle. Da das Carvedilol bei den pädiatrischen Patienten nicht intravenös verabreicht werden konnte, ist jedoch die individuelle Bioverfügbarkeit von (R, S)-Carvedilol bei den Patienten nicht bekannt und konnte daher nicht berücksichtigt werden. Daher lassen sich aus diesen Werten nur begrenzt Aussagen ableiten. Das körperrgewichtbezogene Verteilungsvolumen von (R, S)-Carvedilol zeigte keine Altersabhängigkeit. Die Werte für die auf das Körpergewicht bezogene Clearance nahmen über das Alter der Patienten signifikant ab ( $r^2 = 0,25$ ,  $p = 0,049$ ,  $n = 16$ ). Insgesamt zeigte sich also bei den jüngeren Patienten eine schnellere Ausscheidung von (R, S)-Carvedilol als bei älteren Patienten.

#### **4.4 Phänotypisierung und Genotypisierung für das Enzym Zytochrom-P450-2D6**

Im Folgenden wurden die möglichen Ursachen für die schnellere Elimination von (R, S)-Carvedilol bei den Säuglingen und Kleinkindern untersucht. (R, S)-Carvedilol wird zum größten Teil hepatisch eliminiert. An der Metabolisierung ist hauptsächlich das Enzym Zytochrom-P450-2D6 (CYP2D6) beteiligt. Aufgrund des genetischen Polymorphismus dieses Enzyms kommt es zu starken interindividuellen Unterschieden in der Metabolisierungskapazität. Die Patienten der vorliegenden Studie und die erwachsenen Probanden, bei denen auch die Bestimmung der Pharmakokinetik von Carvedilol erfolgte, wurden auf die Kapazität des Enzyms CYP2D6 untersucht, um zu ermitteln, ob die schnellere Elimination bei den jüngeren Patienten durch eine gesteigerte Enzymaktivität hervorgerufen wurde.

Die Reifung der verschiedenen Enzyme des Zytochromsystems verläuft zeitlich uneinheitlich. Nach Jacqz-Aigrain (2000) erreicht das Enzym CYP2D6 bei Kindern im Alter von zwei bis drei Jahren die Aktivität von Erwachsenen, Leeder et al. (2000) fanden eine ausgereifte CYP2D6-Aktivität bereits nach zwei Lebenswochen. Im Kollektiv dieser Studie wurde die Phänotypisierung ab einem Alter von sechs Monaten durchgeführt. Um die Befunde der Patienten und Probanden einordnen zu können, wurden mit derselben Methode weitere 42 gesunde, erwachsene Freiwillige phänotypisiert. Die Ergebnisse der Phänotypisierung sind in

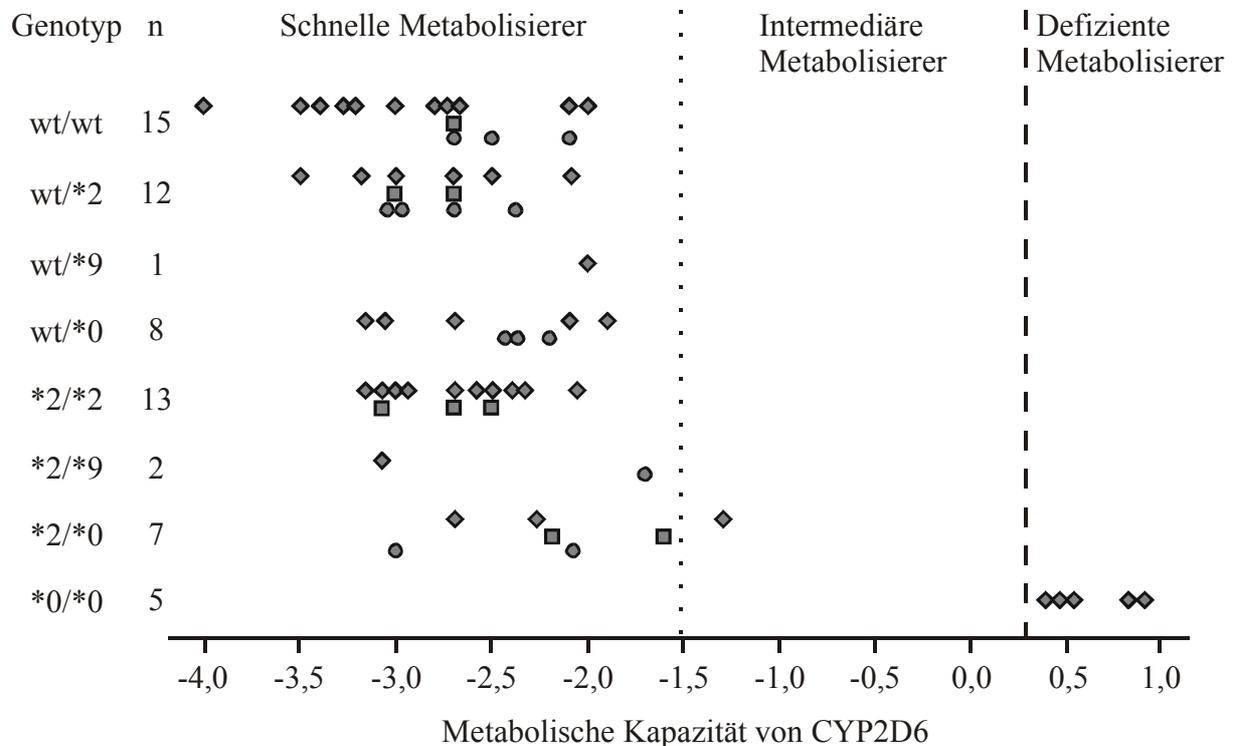
einer Häufigkeitsverteilung der Metabolisierungskapazität für CYP2D6, ausgedrückt als Logarithmus des Quotienten von Dextromethorphan zu Dextrorphan im Acht-Stunden-Sammelurin, dargestellt (Abbildung 12). Je kleiner der Wert der metabolischen Kapazität, desto ausgeprägter die Metabolisierung. Das Histogramm zeigt eine zweipipflige Verteilung zwischen schnellen und defizienten Metabolisierern. Mit einer Häufigkeit von 8% (5 von 63) lag der Prozentsatz an defizienten Metabolisierern in dem untersuchten Kollektiv im Bereich von Angaben in der Literatur (Bertilsson 1995; Lundqvist et al. 1999). Die Patienten und Probanden gehörten alle zu den schnellen Metabolisierern.



**Abbildung 12** Häufigkeitsverteilung der metabolischen Kapazität für das Enzym Zytochrom-P450-2D6 (CYP2D6) von gesunden, erwachsenen Freiwilligen (n = 42, weiße Säulen), von den erwachsenen Probanden, bei denen auch die Pharmakokinetik von Carvedilol untersucht wurde (n = 8, dunkelgraue Säulen), und von den pädiatrischen Patienten, die älter als sechs Monate waren (n = 13, hellgraue Säulen). Nach der Größe der metabolischen Kapazität erfolgte die Einteilung in schnelle, intermediäre und defiziente Metabolisierer.

Die Ergebnisse der Phänotypisierung wurden durch eine Genotypisierung überprüft. Innerhalb des gesamten Kollektivs zeigte sich eine exakte Übereinstimmung der Befunde von Phänotypisierung und Genotypisierung bezüglich der defizienten Metabolisierer. Bei allen Personen, die phänotypisch den defizienten Metabolisierern zuzuordnen waren, wurden zwei Mutationen identifiziert, die zu fehlender Enzymaktivität von CYP2D6 führen. Der Proband mit intermediärer Metabolisierungskapazität zeigte ebenfalls eine Mutation, die zu fehlender Enzymaktivität führt (\*5) und eine Mutation, durch die es zu geringfügig verminderter Enzymaktivität kommt (\*2). Für die Gruppen mit homozygot oder heterozygot vorliegendem Wildtyp lagen die Werte der metabolischen Aktivität jeweils im Bereich der schnellen Metabolisierer, im Mittel betrug die Metabolisierungskapazität  $-2,7 \pm 0,5$  ( $n = 36$ ). In der Gruppe mit homozygoter Mutation \*2 oder dem Vorliegen der Mutation \*2 und der Mutation \*9, die zu mittelmäßig eingeschränkter Enzymkapazität führt, lagen die Werte der metabolischen Aktivität mit im Mittel  $-2,7 \pm 0,4$  ( $n = 15$ ) vergleichbar. In der Gruppe mit Mutation \*2 und einer Mutation, die zu fehlender Enzymaktivität führt, lag die Metabolisierungskapazität mit im Mittel  $-2,2 \pm 0,6$  ( $n = 12$ ) tendenziell niedriger als in den anderen beiden Gruppen, der Unterschied zur Gruppe mit mindestens einem Wildtypallel war jedoch mit einem p-Wert von 0,052 nicht signifikant. Genduplikationen, die Ursache für den ultraschnellen Metabolisierungstyp für CYP2D6 sind, wurden weder bei den Patienten noch bei den Probanden gefunden.

In Abbildung 13 sind die genotypischen Daten der Patienten, Probanden und weiteren gesunden Erwachsenen des Vergleichskollektivs gegen die jeweiligen phänotypischen Daten aufgetragen.

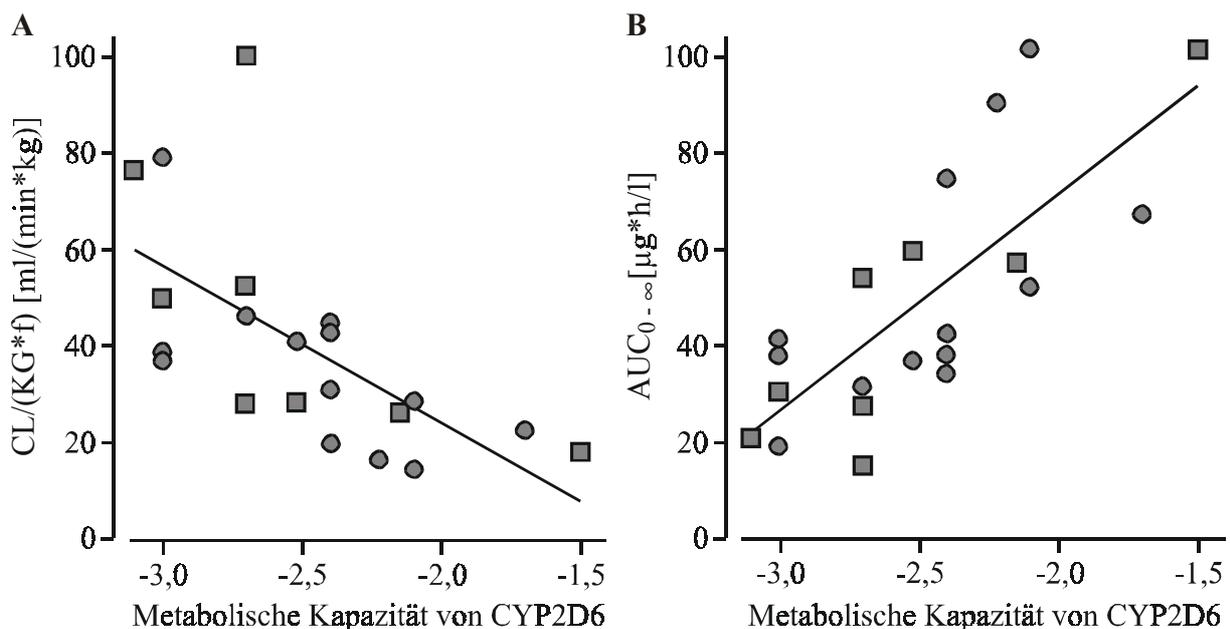


**Abbildung 13** Metabolische Kapazität für das Enzym Zytochrom-P450-2D6 (CYP2D6) gegen den entsprechenden Genotyp für CYP2D6 der pädiatrischen Patienten, die älter als sechs Monate waren (n = 13, Kreise), der erwachsenen, gesunden Probanden, bei denen auch die Pharmakokinetik von Carvedilol untersucht wurde (n = 8, Quadrate), und von erwachsenen, gesunden Freiwilligen (n = 42, Rhomben). n = Anzahl, wt = Wildtyp, \*0 = Mutationen, die zu fehlender Enzymaktivität von CYP2D6 führen (Mutationen \*3, \*4, \*5, \*6), \*2 = Mutation, die zu geringfügig verminderter Enzymaktivität von CYP2D6 führt, \*9 = Mutation, die zu mittelmäßig eingeschränkter Enzymaktivität von CYP2D6 führt.

#### 4.4.1 Einfluss des Phänotyps für CYP2D6 auf die Pharmakokinetik von (R, S)-Carvedilol

Der Einfluss des Phänotyps für CYP2D6 auf die Pharmakokinetik von (R, S)-Carvedilol wurde durch Korrelation der Enzymkapazität einerseits mit der körperrgewichtbezogenen Clearance und andererseits mit der Fläche unter der Konzentrations-Zeitkurve untersucht. Die körperrgewichtbezogene Clearance von (R, S)-Carvedilol änderte sich abhängig von der

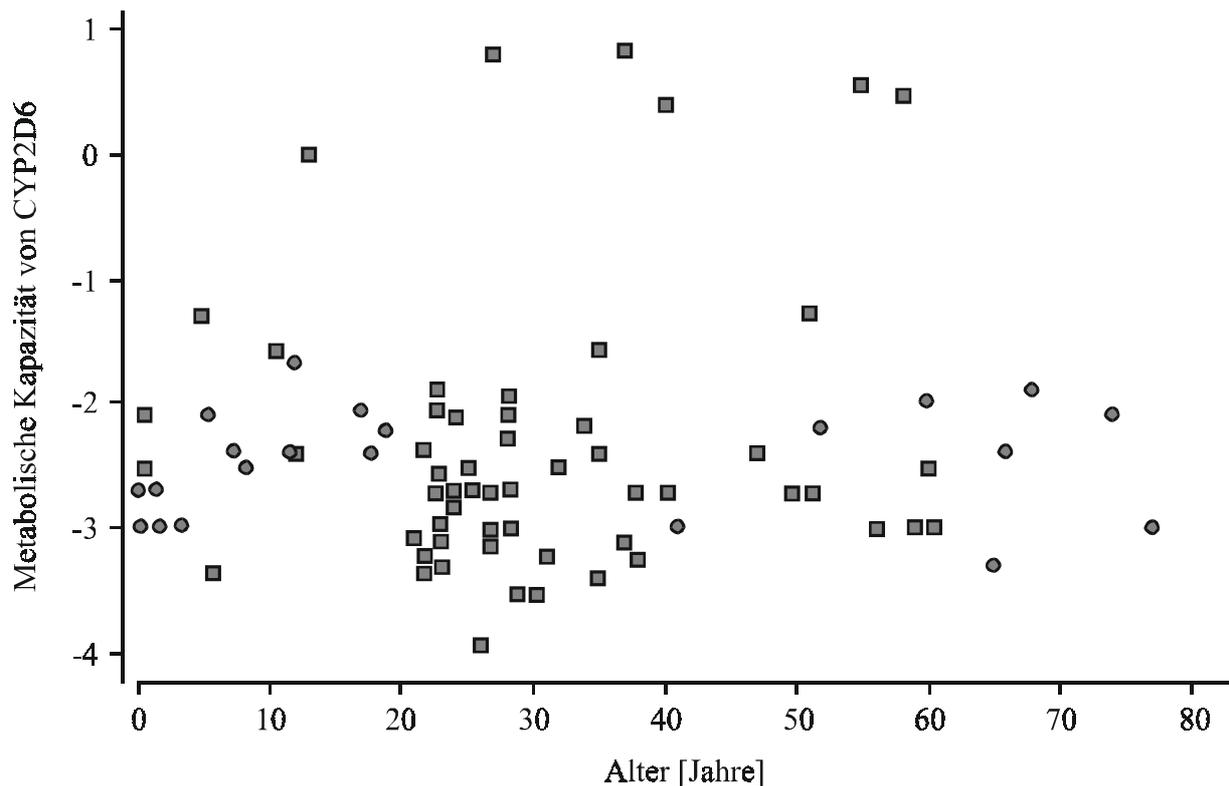
Metabolisierungskapazität für CYP2D6 signifikant ( $r^2 = 0,45$ ,  $p = 0,001$ ,  $n = 21$ ; Abbildung 14 A). Ebenso hing das Ausmaß der im Körper verfügbaren (R, S)-Carvedilol-Menge, gemessen als Fläche unter der Konzentrations-Zeitkurve, signifikant von der Enzymaktivität für CYP2D6 ab ( $r^2 = 0,57$ ,  $p < 0,001$ ,  $n = 21$ ; Abbildung 14 B). In dem bei den Patienten und Probanden gemessenen Bereich der Enzymaktivität zwischen  $-3,0$  bis  $-2,1$  variierten die Einzelwerte der AUC für (R, S)-Carvedilol abhängig von der metabolischen Kapazität um das bis zu Fünf-Fache. Würde innerhalb des Studienkollektivs eine Aufteilung in zwei Gruppen nach der Höhe der Enzymaktivität erfolgen, ergäbe sich für die Studienteilnehmer mit einer schnelleren Metabolisierungskapazität von  $-3,1$  bis  $-2,5$  im Mittel eine AUC von  $33,9 \mu\text{g}/(\text{l}\cdot\text{h})$ , während die Personen mit einer geringeren Enzymkapazität von  $-2,4$  bis  $-1,5$  im Mittel eine etwa doppelt so hohe AUC von  $65,8 \mu\text{g}/(\text{l}\cdot\text{h})$  aufwiesen ( $p = 0,005$ ,  $n = 11$  bzw.  $n = 10$ ). Die (R, S)-Carvedilol-Exposition wird also wesentlich vom CYP2D6-Phänotyp beeinflusst.



**Abbildung 14** A Clearance pro Körpergewicht und Bioverfügbarkeit ( $\text{CL}/(\text{KG}\cdot\text{f})$ ) und B Fläche unter der Plasmakonzentrations-Zeitkurve ( $\text{AUC}_{0-\infty}$ ) nach Einnahme der Testdosis von  $0,09 \text{ mg}/\text{kg}$  Carvedilol versus metabolische Kapazität für CYP2D6 der pädiatrischen Patienten im Alter von  $0,50 - 19,3$  Jahren ( $n = 13$ , Kreise) und der erwachsenen Probanden im Alter von  $24 - 37$  Jahren ( $n = 8$ , Quadrate). Eingefügt sind die Regressionsgeraden, die Korrelationskoeffizienten wurden zu  $r^2 = 0,45$  bzw.  $r^2 = 0,57$  berechnet, die Korrelationen waren mit  $p = 0,001$  bzw.  $p < 0,001$  signifikant (je  $n = 21$ ).

#### **4.4.2 Einfluss von Alter und Krankheitszustand auf die Metabolisierungskapazität von CYP2D6**

Da die Enzymkapazität von CYP2D6 einen großen Einfluss auf die Pharmakokinetik von (R, S)-Carvedilol hatte, wurde überprüft, ob diese Enzymaktivität abhängig vom Lebensalter war und somit die schnellere Elimination von (R, S)-Carvedilol bei den jüngeren Patienten erklären könnte. Bei einem Gruppenvergleich der Enzymkapazitäten zwischen den pädiatrischen Patienten und den erwachsenen Probanden, für die auch die Pharmakokinetik von Carvedilol untersucht worden war, ergab sich kein Unterschied. Im Mittel lagen die Werte der Metabolisierungskapazität der Patienten bei  $-2,5 \pm 0,4$  ( $n = 13$ ) und die der Probanden bei  $-2,6 \pm 0,5$  ( $n = 8$ ). Um gleichzeitig einen Einfluss des Krankheitszustands der Personen auf die Enzymaktivität auszuschließen, wurden zusätzlich zu den bereits untersuchten 42 gesunden erwachsenen Freiwilligen zwei weitere Vergleichskollektive für CYP2D6 phänotypisiert. Ein Kollektiv bildeten herz-, leber- und nierengesunde pädiatrische Patienten ab einem Alter von sechs Monaten, des Weiteren wurden erwachsene Patienten mit einer Herzinsuffizienz bezüglich ihres Phänotyps für CYP2D6 untersucht. Auch bei Auswertung der Ergebnisse aller untersuchter Personen war die metabolische Kapazität für CYP2D6 sowohl innerhalb des Kollektivs von 21 herzkranken Patienten als auch innerhalb der insgesamt 57 gesunden Probanden nicht abhängig vom Lebensalter und unterschied sich auch nicht zwischen diesen beiden Kollektiven (Abbildung 15). Die Enzymaktivität für CYP2D6, die die (R, S)-Carvedilol-Exposition bedeutend beeinflusst, war also innerhalb des untersuchten Kollektivs weder vom Lebensalter noch vom Krankheitszustand der betreffenden Person abhängig.

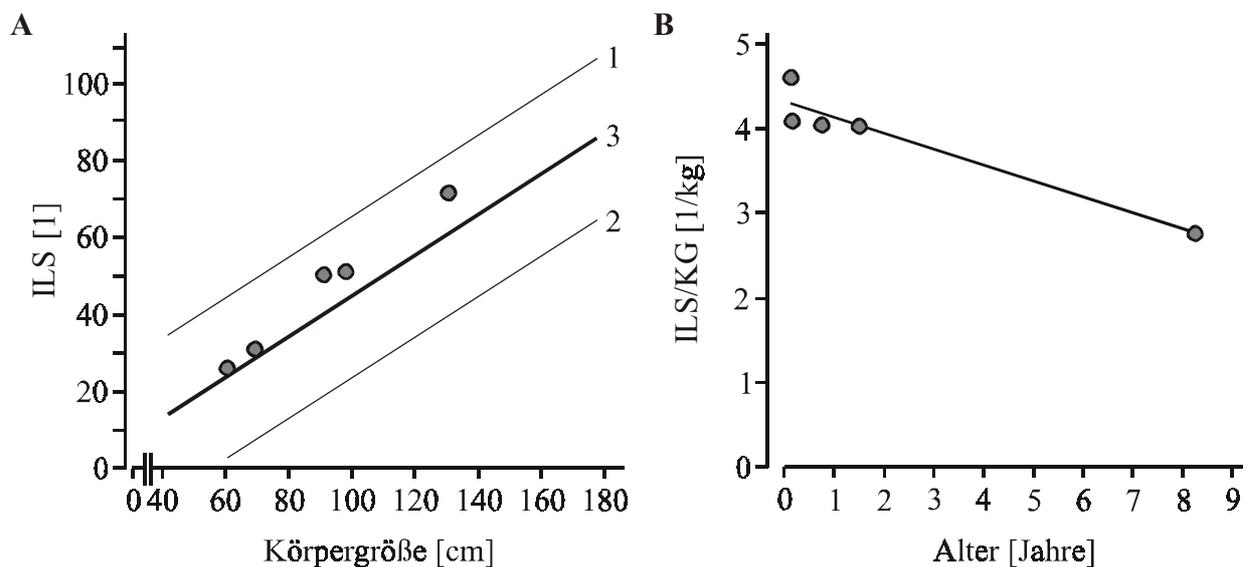


**Abbildung 15** Metabolische Kapazität für das Enzym CYP2D6 von Patienten mit Herzinsuffizienz im Alter von 0,5 – 77 Jahren (n = 21, Kreise) und von herzgesunden Probanden im Alter von 0,5 - 60 Jahren (n = 57, Quadrate), jeweils aufgetragen gegen das Lebensalter.

#### 4.5 Bestimmung der Lebergröße

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für das altersabhängige Verhalten der Elimination von (R, S)-Carvedilol könnte in der Entwicklung des Lebervolumens und damit des Leberblutflusses mit dem Alter liegen. Murry et al. (1995) fanden in einer Untersuchung von 16 Kindern und Jugendlichen im Alter von drei bis 19 Jahren ein mit zunehmendem Alter pro Körpergewicht abnehmendes Lebervolumen. Und zwischen Lebervolumen und Leberblutfluss besteht eine enge Korrelation (Wynne et al. 1989). Diese Ergebnisse könnten eine Rolle spielen für die Clearance des hepatisch metabolisierten Carvedilols. Die genaue Bestimmung des Lebervolumens ist wegen der strahlen- oder wärme- und lärmbelastenden, zeitintensiven Methoden (Computertomographie, Kernspinnresonanz) bei Kindern schwierig (Dittrich et al. 1983). Dittrich et al. (1983) haben daher eine Methode entwickelt, um mithilfe der Sonographie über die Bestimmung der Länge der vorderen Axillarlinie, der

Medioclavicularlinie und der Sternallinie der Leber den dem Lebervolumen entsprechenden Lebergrößenindex zu ermitteln. Bei fünf Patienten unterschiedlichen Alters des im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten pädiatrischen Studienkollektivs konnte eine Bestimmung der Lebergröße nach diesem Verfahren durchgeführt werden. Die Ergebnisse (Abbildung 16A) entsprachen Normwerten, die Dittrich et al. (1983) in einem Nomogramm anhand von Daten von 172 gesunden Kindern zusammengestellt hatten. Wurden die Werte des Lebergrößenindex auf das Körpergewicht der Patienten bezogen, so nahmen die Werte mit zunehmendem Alter ab (Abbildung 16B).



**Abbildung 16** **A** Werte für den nach dem Verfahren von Dittrich et al. (1983) sonographisch bestimmten Lebergrößenindex (ILS) von den Patienten P1 (0,12 Jahre alt), P3 (0,15 Jahre alt), P5 (0,75 Jahre alt), P7 (1,50 Jahre alt) und P11 (8,25 Jahre alt) gegen die jeweilige Körpergröße aufgetragen. Die Regressionsgerade (Linie 3) und die Grenzen des 95%igen Konfidenzintervalls (Linien 1 und 2) aus dem von Dittrich et al. (1983) anhand von Daten bei 172 gesunden Kindern gewonnenen Nomogramm sind zusätzlich angegeben. **B** Werte für den nach dem Verfahren von Dittrich et al. (1983) sonographisch bestimmten Lebergrößenindex (ILS) pro Körpergewicht (KG) von den Patienten P1, P3, P5, P7 und P11 gegen das jeweilige Patientenalter aufgetragen. Die Regressionsgerade ist eingefügt, der Korrelationskoeffizient wurde zu  $r^2 = 0,92$  berechnet, die Korrelation war mit  $p = 0,010$  signifikant ( $n = 5$ ).

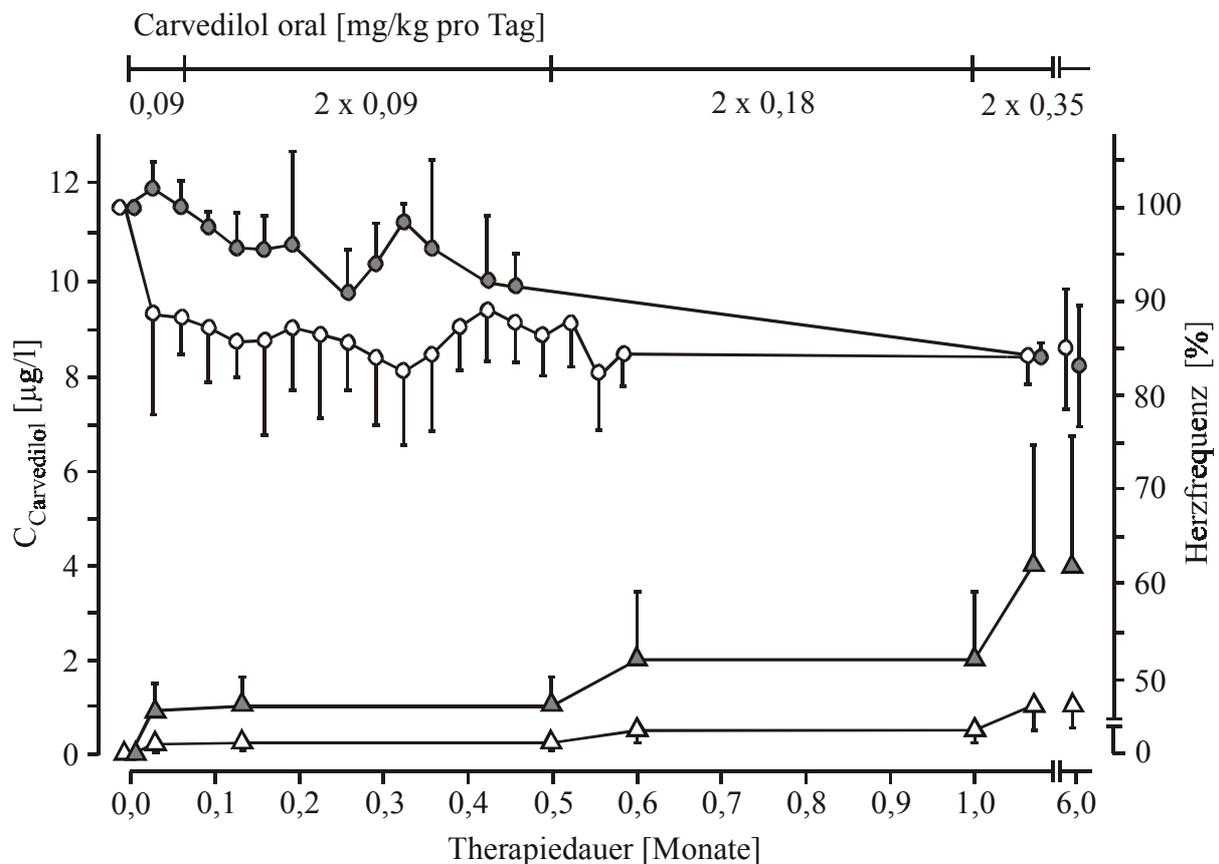
#### **4.6 Änderungen der Herzfrequenz unter der Therapie mit Carvedilol**

Im Folgenden wurde untersucht, ob die sich altersabhängig ändernde Pharmakokinetik von (R, S)-Carvedilol auch zu zwischen Kleinkindern und Kindern bzw. Jugendlichen unterschiedlichen Wirkungen führt.

Eine bei der Therapie der Herzinsuffizienz wichtige Wirkung eines Beta-Rezeptorenblockers ist die Senkung der Herzfrequenz. Dieser pharmakodynamische Parameter wurde bei den Patienten vor Therapiebeginn, während der Tagesprofile zeitgleich mit den Blutentnahmen und im Therapieverlauf bei den monatlichen Kontrollen gemessen. Die Herzfrequenz ist physiologischerweise bei jüngeren Menschen höher als bei älteren. Bei Neugeborenen liegt sie zwischen 120 bis 160 Schlägen pro Minute und erreicht circa ab dem elften Lebensjahr Werte zwischen 60 und 80 Schlägen pro Minute. Für einen interindividuellen Vergleich wurden die Änderungen der Herzfrequenz daher prozentual vom Ausgangswert vor Therapiebeginn berechnet, der jeweils gleich hundert Prozent gesetzt wurde. Bei dem Patienten P10 konnten die Herzfrequenzdaten nicht ausgewertet werden, da bei ihm ein Bigeminus vorliegt. Patient P11 hat einen Herzschrittmacher, daher gingen die von ihm erhobenen Herzfrequenzdaten ebenfalls nicht in die Auswertungen ein.

Um einen Eindruck vom Verlauf der Herzfrequenz unter Carvedilol-Therapie zu erhalten, wurden als erstes alle bei den Patienten über den Zeitraum der Therapie gemessenen Herzfrequenzdaten zusammengetragen. Die Messungen erfolgten jeweils im Wachzustand morgens um acht Uhr und unter der Therapie vor Gabe des Medikaments. Zur Auswertung wurden die Daten wieder nach dem Alter der Patienten in zwei Gruppen zusammengefasst. Werden die Herzfrequenzsenkungen in Prozent vom Ausgangswert vor Therapiebeginn über den Verlauf der sechs-monatigen Carvedilol-Therapie beurteilt (Abbildung 17), zeigt sich bei den acht jüngeren Patienten bereits in der Aufsättigungsphase mit Carvedilol ein Absinken der Herzfrequenz. Nach etwa zehn Tagen war bei den Säuglingen und Kleinkindern die maximale Senkung der Herzfrequenz erreicht. Bei den sechs älteren Patienten dauerte es dagegen etwa einen Monat bis die Herzfrequenz die niedrigsten Werte unter Carvedilol-Therapie annahm. Die Herzfrequenz sank aber bei beiden Altersgruppen um den gleichen prozentualen Anteil vom Ausgangswert, um etwa 15%. Bis zum Ende der Beobachtungsphase nach sechs-monatiger Carvedilol-Therapie blieb die Herzfrequenz auf etwa gleichem Niveau.

Altersabhängige Unterschiede traten also auch in der Pharmakodynamik von Carvedilol auf, jedoch wäre aufgrund der schnelleren Elimination und dadurch niedrigeren Plasmakonzentrationen (Abbildung 17) von (R, S)-Carvedilol bei den jüngeren Patienten eher eine geringere Wirkung oder ein erst bei höheren Dosen auftretender Effekt zu erwarten gewesen. Das schnellere Absinken der Herzfrequenz unter Carvedilol-Therapie konnte also nicht über die altersabhängig unterschiedliche Pharmakokinetik erklärt werden.



**Abbildung 17** Verlauf der Herzfrequenz in Prozent vom Ausgangswert vor Therapiebeginn (rechte Ordinate) als Mittelwerte + bzw. - Standardabweichung der Gruppe der jüngeren Patienten im Alter von 0,12 bis 3,50 Jahren (n = 8, weiße Kreise) und der älteren Patienten ohne Herzrhythmusstörungen im Alter von 5,50 bis 19,3 Jahren (n = 6, graue Kreise) über den Verlauf der sechs-monatigen Carvedilol-Therapie. Ebenfalls angegeben sind die Talspiegel (C) von (R, S)-Carvedilol (linke Ordinate) als Mittelwerte + bzw. - Standardabweichung der Gruppe der jüngeren pädiatrischen Patienten (n = 8, weiße Dreiecke) und der älteren pädiatrischen Patienten (n = 6, graue Dreiecke). Oben das Dosierungsschema für Carvedilol über die sechs Monate.

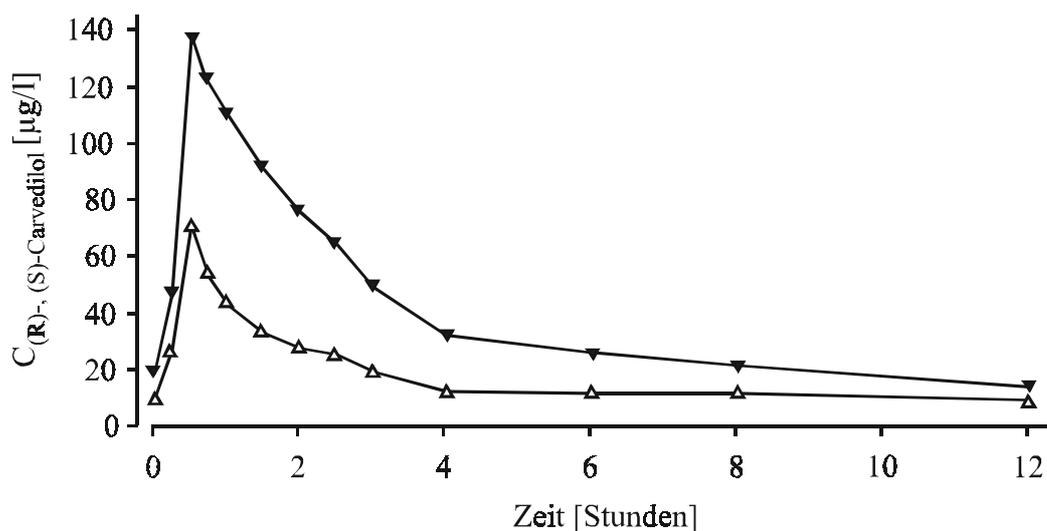
#### 4.7 Trennung der Enantiomere von (R, S)-Carvedilol

Für die Senkung der Herzfrequenz unter Carvedilol-Therapie ist das (S)-Carvedilol verantwortlich, da dieses Enantiomer im Vergleich zu (R)-Carvedilol etwa 100-fach potenter bezüglich der Beta-Rezeptorenblockade ist (Stoschitzky et al. 2001). Das in der Therapie eingesetzte racemische Carvedilol unterliegt einer stereoselektiven Metabolisierung. Dabei wird das (S)-Enantiomer deutlich schneller abgebaut als das (R)-Enantiomer. Daher wurden auch die Enantiomerenkonzentrationen von (R, S)-Carvedilol untersucht.

##### 4.7.1 Konzentrations-Zeitverläufe von (R)- und (S)-Carvedilol

Mithilfe der Kapillarelektrophoresemethode wurden die Konzentrationen von (R)- und (S)-Carvedilol separat bestimmt. Nur von den Patienten P3 und P12 war nicht von allen Proben zu den verschiedenen Zeitpunkten der Plasmakonzentrations-Zeitprofile genügend Probenmaterial zur Analyse der Enantiomerenkonzentrationen vorhanden.

Die Konzentrations-Zeitkurven der Enantiomere verlaufen durch die stereoselektive Verstoffwechslung unterschiedlich (Abbildung 18). Im Maximum liegt die (R)-Carvedilol-Konzentration im Vergleich zur (S)-Carvedilol-Konzentration fast zweifach höher.

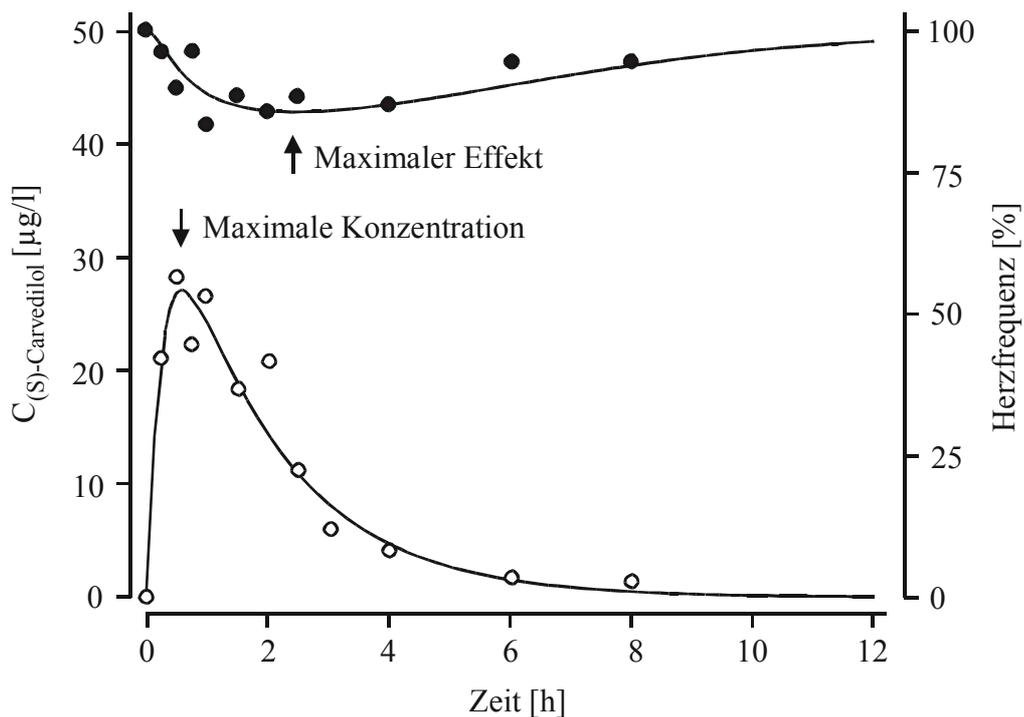


**Abbildung 18** Typische Konzentrations-Zeitverläufe der Plasmakonzentrationen (C) von (R)-Carvedilol (schwarze Dreiecke) und (S)-Carvedilol (weiße Dreiecke) über ein Dosierungsintervall im Fließgleichgewicht unter der Zieldosis nach Einnahme von 0,35 mg/kg Carvedilol-Racemat bei dem 17,5 Jahre alten Patienten P14.

Nach Trennung der Enantiomere konnten aus den Plasmakonzentrations-Zeitprofilen der Patienten für (S)-Carvedilol die gleichen pharmakokinetischen Parameter wie für das Racemat bestimmt werden. Auch für das einzelne (S)-Enantiomer von Carvedilol zeigte sich eine altersabhängige Pharmakokinetik, vergleichbar der des Racemats. Die Halbwertszeit und die mittlere Verweildauer von (S)-Carvedilol nahmen mit zunehmendem Alter signifikant zu ( $r^2 = 0,58$ ,  $p = 0,001$ ,  $n = 15$  bzw.  $r^2 = 0,63$ ,  $p = 0,001$ ,  $n = 14$ ). Die Halbwertszeit war bei beiden Patientengruppen kürzer als bei der Gruppe erwachsener Probanden ( $2,3 \pm 0,4$  h ( $n = 8$ ) bzw.  $3,5 \pm 1,2$  h ( $n = 7$ ) versus  $7,1 \pm 1,8$  h ( $n = 7$ );  $p = 0,001$  bzw.  $p = 0,004$ ). Und die Halbwertszeit der jüngeren Patienten war noch kürzer als die der älteren pädiatrischen Patienten ( $p = 0,037$ ,  $n = 8$  bzw.  $n = 7$ ). Vergleichbare Ergebnisse zeigten sich für die mittlere Verweildauer, in der sich alle Altersgruppen signifikant voneinander unterschieden (Säuglinge/Kleinkinder (II,  $n = 7$ ):  $3,5 \pm 0,4$  h, Kinder/Jugendliche (III,  $n = 7$ ):  $4,8 \pm 1,1$  h, Erwachsene (IV,  $n = 7$ ):  $9,0 \pm 2,5$ h; II versus IV:  $p = 0,001$ , III versus IV:  $p = 0,009$ , II versus III:  $p = 0,035$ ). Die Exposition von (S)-Carvedilol, gemessen als Fläche unter der Konzentrations-Zeitkurve, vergrößerte sich altersabhängig ( $r^2 = 0,50$ ,  $p = 0,003$ ,  $n = 15$ ). Insgesamt war auch für (S)-Carvedilol die Elimination bei den Säuglingen und Kleinkindern am schnellsten und damit die (S)-Carvedilol-Exposition bei den jüngsten Patienten am geringsten.

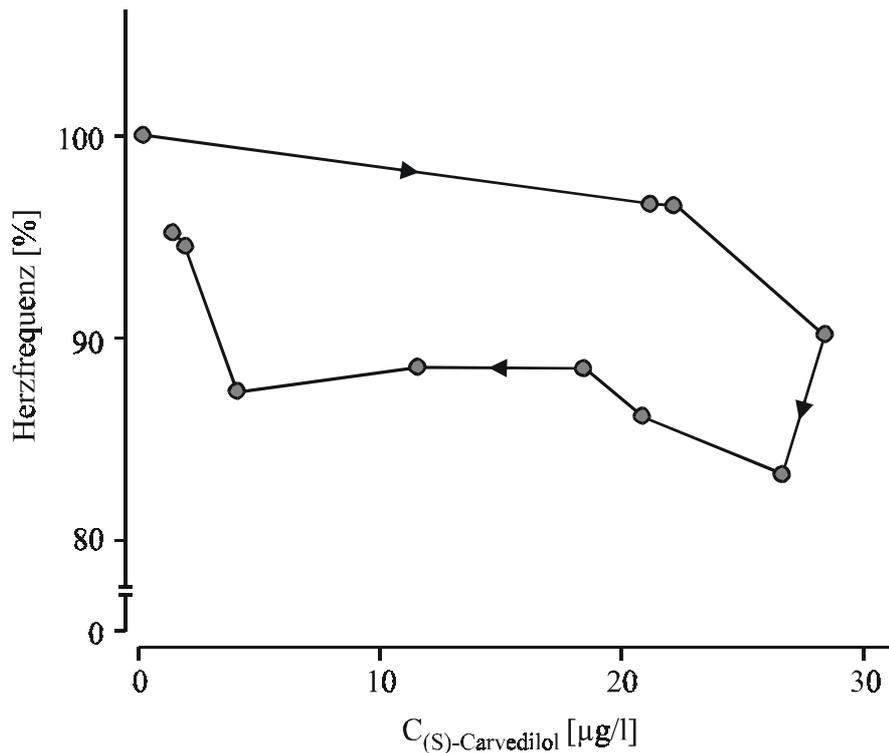
#### 4.8 Pharmakokinetisch/pharmakodynamisches Modelling (PK/PD-Modelling)

Durch das PK/PD-Modelling sollten die Zusammenhänge zwischen Konzentration und Wirkung von Carvedilol von den einzelnen Patienten näher untersucht werden, um darüber möglicherweise die Ursache der unter Carvedilol-Therapie schneller absinkenden Herzfrequenz trotz niedrigerer Plasmakonzentrationen bei den jüngeren Patienten herauszufinden. Mithilfe des pharmakokinetisch/pharmakodynamischen (PK/PD)-Modellings wurden die bei den Tagesprofilen zeitgleich zu den Blutentnahmen gemessenen Herzfrequenzwerte mit den Konzentrationen des für die Beta-Rezeptorenblockade verantwortlichen (S)-Enantiomers korreliert. Beim Gegenüberstellen von Konzentration und Wirkung über ein Dosierungsintervall (Abbildung 19) zeigte sich eine Zeitverzögerung zwischen maximaler Plasmakonzentration und maximalem Effekt. Das Maximum der Herzfrequenzsenkung trat erst etwa zwei Stunden nach dem Konzentrationsmaximum auf.



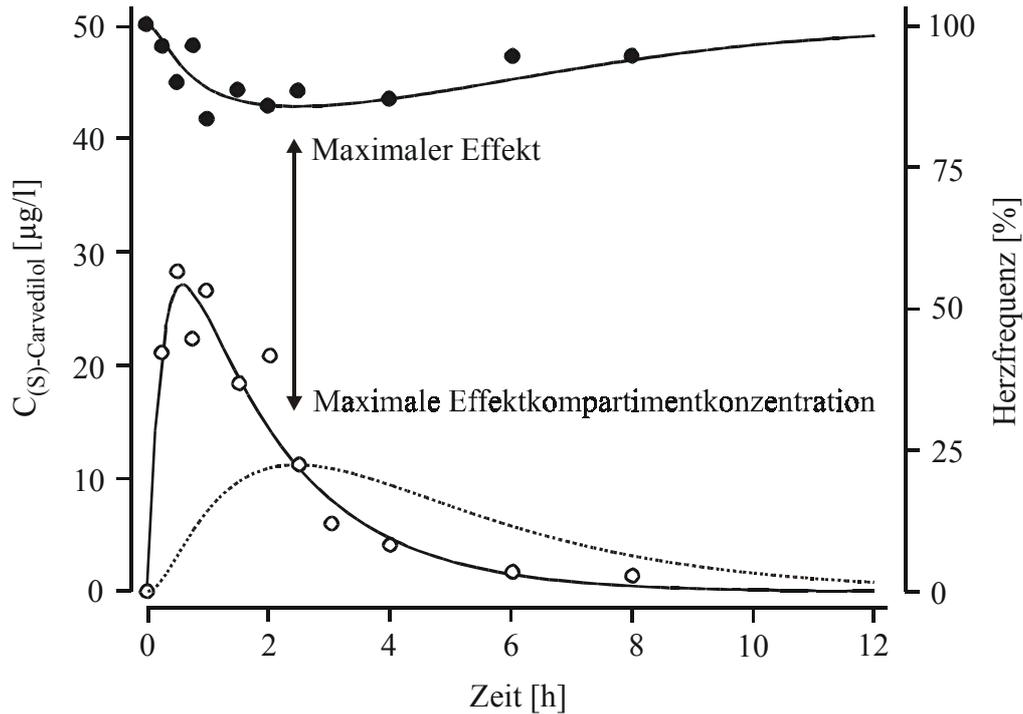
**Abbildung 19** Plasmakonzentrationen ( $C$ , weiße Kreise, linke Ordinate) von (S)-Carvedilol und Herzfrequenzwerte (in Prozent vom Ausgangswert vor Therapiebeginn, schwarze Kreise, rechte Ordinate) des 1,25 Jahre alten Patienten P6 nach Einnahme einer Carvedilol-Testdosis (0,09 mg/kg) über ein Dosierungsintervall. Die Kreise stellen die gemessenen Daten dar, die Linien geben die mittels eines Modells angepassten Verläufe wieder. Die Pfeile geben die Zeitpunkte bei maximaler Konzentration bzw. maximalem Effekt an.

Werden die Herzfrequenzwerte in Prozent vom Ausgangswert direkt gegen die korrespondierenden Plasmakonzentrationen aufgetragen, so ergibt sich daher eine Hysteresiskurve (Abbildung 20). Bei ansteigender Plasmakonzentration bleibt der Effekt zuerst etwa auf Ausgangsniveau, erst bei schon wieder abfallender Konzentration wird der Effekt maximal, um dann bei noch geringeren Konzentrationswerten wieder Ausgangswerte anzunehmen.



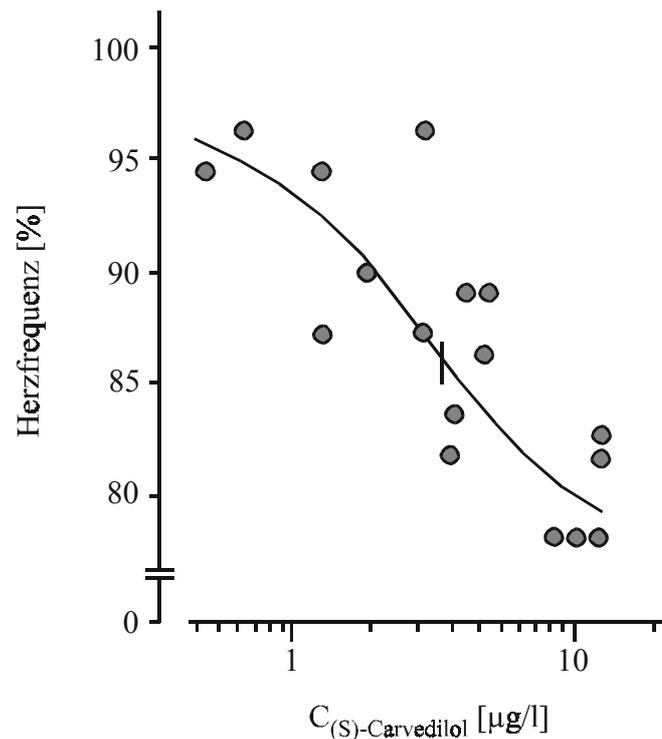
**Abbildung 20** Herzfrequenzwerte in Prozent vom Ausgangswert vor Therapiebeginn aufgetragen gegen die zeitgleich auftretenden Plasmakonzentrationen (C) von (S)-Carvedilol nach Einnahme einer Testdosis von 0,09 mg/kg bei dem 1,25 Jahre alten Patienten P6.

Zur Berücksichtigung dieser Zeitverzögerung, die vermutlich durch Verteilungsphänomene hervorgerufen wird, wurde das unter 2.8 beschriebene PK/PD-Modell mit zusätzlichem Effektkompartiment verwendet. Wird der Verlauf der Konzentration im Effektkompartiment, die als hypothetische Konzentration am Wirkort verstanden werden kann, zusätzlich zu der gemessenen Plasmakonzentration und dem Effekt über die Zeit aufgetragen, ergibt sich folgende Darstellung (Abbildung 21). Das Maximum der Konzentration im Effektkompartiment tritt zeitgleich mit dem maximalen Effekt auf.



**Abbildung 21** (S)-Carvedilol-Plasmakonzentrationen, Herzfrequenzwerte und die mithilfe des PK/PD-Modellings simulierten Konzentrationen im hypothetischen Effektkompartiment über den Zeitverlauf eines Dosierungsintervalls von dem 1,25 Jahre alten Patienten P6 nach Einnahme einer Carvedilol-Testdosis (0,09 mg/kg). Die Konzentrationen (C) von (S)-Carvedilol im Plasma (weiße Kreise) und im hypothetischen Effektkompartiment (gestrichelte Linie) beziehen sich auf die linke Ordinate, die Herzfrequenzwerte in Prozent vom Ausgangswert vor Therapiebeginn (schwarze Kreise) auf die rechte Ordinate. Die Kreise stellen die gemessenen Werte dar, die Linien geben die mittels eines Modells berechneten Verläufe für Konzentration und Herzfrequenz (durchgezogene Linien) und den simulierten Verlauf für die Effektkompartimentkonzentration (gestrichelte Linie) wieder. Die Pfeile geben die Zeitpunkte bei maximaler Effektkompartimentkonzentration bzw. maximalem Effekt an.

Der Effekt der Herzfrequenzsenkung direkt aufgetragen gegen die Konzentration im Effektkompartiment zeigt folgenden Verlauf (Abbildung 22). Der Kurvenverlauf entspricht einer Konzentrations-Wirkungskurve, die einer Hill-Funktion folgt (Hill 1910). Aus der Konzentrations-Wirkungskurve lassen sich schließlich die maximale Wirkstärke ( $E_{\max}$ ) und die Konzentration des Arzneistoffs, die zum halbmaximalen Effekt führt, ( $EC_{50}$ , Potenz) ableiten.

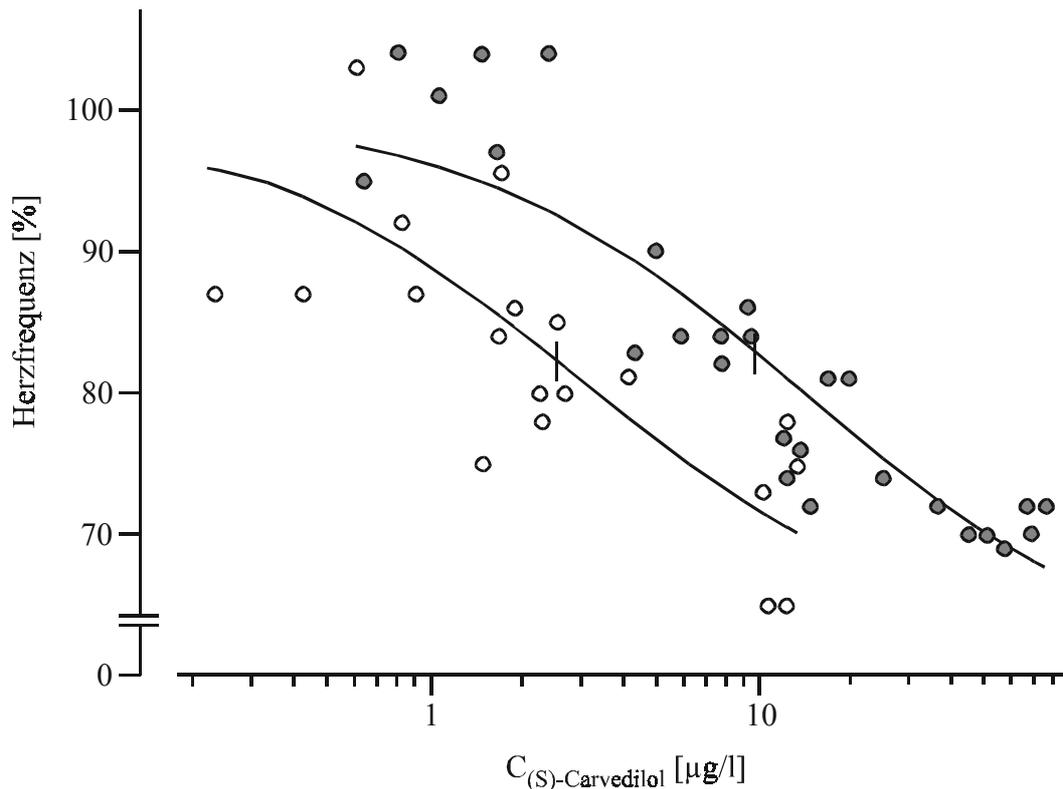


**Abbildung 22** Konzentrations-Wirkungskurve für die Herzfrequenzsenkung in Prozent von der Ausgangslage vor Beginn der Carvedilol-Therapie bei dem 1,25 Jahre alten Patienten P6. Die Kreise geben die gemessenen Werte an, die Linie zeigt den mithilfe des PK/PD-Modells simulierten Konzentrations-Wirkungsverlauf. Die Potenz ( $EC_{50}$ ) von (S)-Carvedilol bezüglich der Herzfrequenzsenkung, gekennzeichnet durch den senkrechten Strich, lag bei diesem Patienten bei  $3,68 \mu\text{g/l}$ , die maximale Wirkstärke ( $E_{\max}$ ) wurde zu  $28,7\%$  berechnet. C = Plasmakonzentration.

#### 4.8.1 Einfluss des Lebensalters auf die Herzfrequenz unter Carvedilol-Therapie

Die Konzentration, die zum halbmaximalen Effekt führt ( $EC_{50}$ ) und der maximale Effekt ( $E_{\max}$ ) von (S)-Carvedilol zur Senkung der Herzfrequenz wurden mithilfe des beschriebenen PK/PD-Modells für alle pädiatrischen Patienten errechnet, für die die

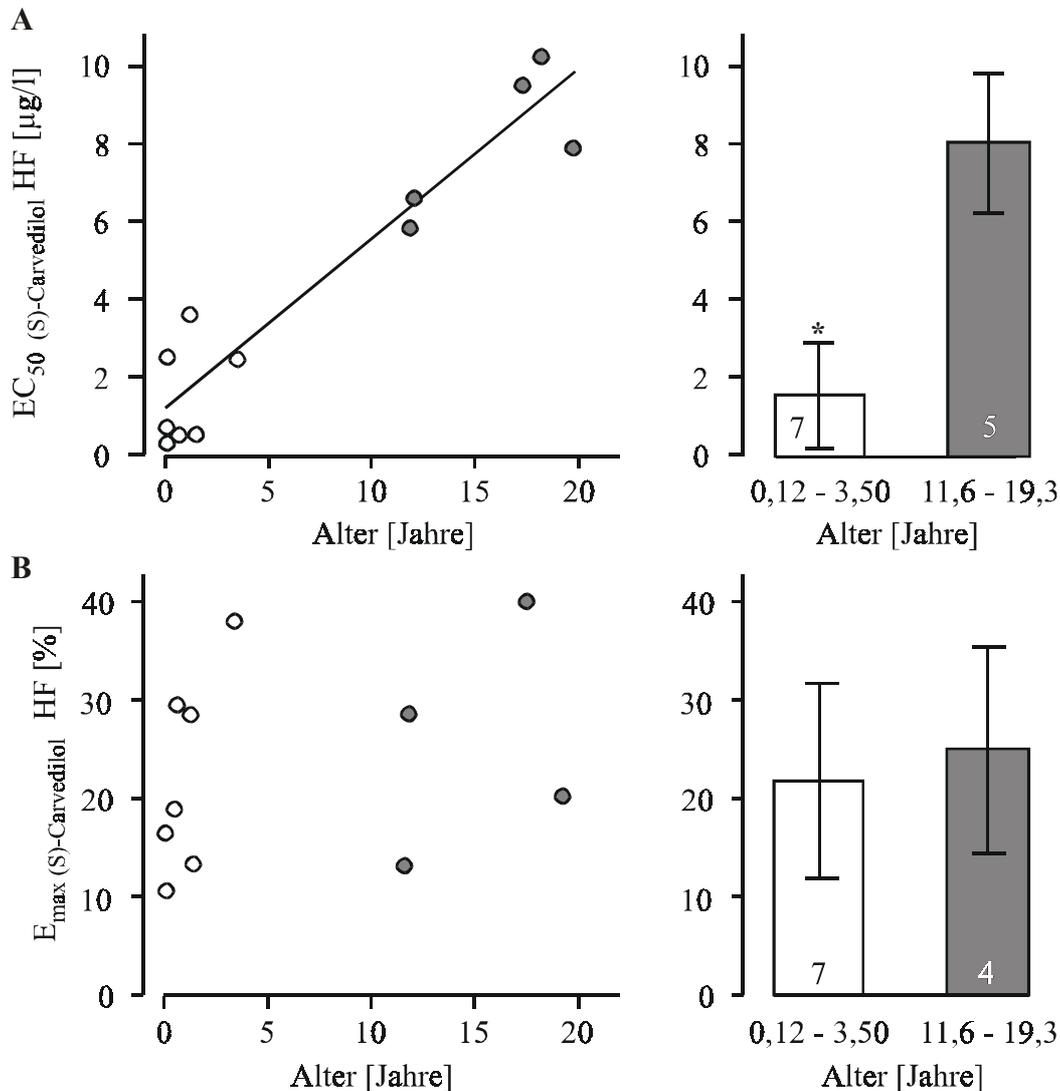
Konzentrationsbestimmung der Carvedilol-Enantiomere möglich gewesen war. Die Ergebnisse der  $EC_{50}$  von (S)-Carvedilol bezüglich der Herzfrequenzsenkung waren altersabhängig unterschiedlich. Repräsentative Konzentrations-Wirkungskurven zweier Patienten unterschiedlichen Alters sind in Abbildung 23 dargestellt. Die Kurve des älteren Patienten ist im Vergleich zu der des jüngeren Patienten nach rechts verschoben. Die  $EC_{50}$  des jüngeren Patienten betrug nur etwa ein Viertel des  $EC_{50}$ -Werts des älteren Patienten (2,49  $\mu\text{g/l}$  versus 9,53  $\mu\text{g/l}$ ).



**Abbildung 23** Konzentrations-Wirkungskurven für die Senkung der Herzfrequenz unter Carvedilol in Prozent vom Ausgangswert vor Carvedilol-Therapie der Patientin P8 im Alter von 3,50 Jahren (weiße Kreise) und des Patienten P14 im Alter von 17,5 Jahren (graue Kreise). Die Kreise geben die gemessenen Werte an, die Linien zeigen die mithilfe des PK/PD-Modellings simulierten Konzentrations-Wirkungsverläufe. Die  $EC_{50}$ -Werte von (S)-Carvedilol bezüglich der Herzfrequenzsenkung (senkrechte Striche), lagen bei der jüngeren Patientin bei 2,49  $\mu\text{g/l}$  und bei dem älteren Patienten bei 9,53  $\mu\text{g/l}$ . C = Plasmakonzentration.

Innerhalb des Patientenkollektivs waren die  $EC_{50}$ -Werte von (S)-Carvedilol bezüglich der Herzfrequenzsenkung bei den jüngeren Patienten am niedrigsten und nahmen mit zunehmendem Alter zu ( $r^2 = 0,90$ ,  $p < 0,001$ ,  $n = 12$ ). Im Mittel war die  $EC_{50}$  bei den älteren

Patienten etwa fünfmal so groß wie bei den jüngeren ( $8,04 \pm 1,88 \mu\text{g/l}$  ( $n = 5$ ) versus  $1,55 \pm 1,34 \mu\text{g/l}$  ( $n = 7$ ),  $p = 0,004$ ; Abbildung 24 A). Die Wirkstärke ( $E_{\text{max}}$ ) zeigte innerhalb des Patientenkollektivs Werte zwischen 10,7 und 40,0%, es war jedoch kein altersabhängiger Unterschied dieses Parameters zu erkennen (Abbildung 24 B).



**Abbildung 24** **A** Potenz von (S)-Carvedilol für die Herzfrequenzsenkung ( $EC_{50}$  HF). Auf der linken Seite die individuellen Werte gegen das Alter der jüngeren Patienten im Alter von 0,12 - 3,50 Jahren ( $n = 7$ , weiße Kreise) und der älteren Patienten im Alter von 11,6 - 19,3 Jahren ( $n = 5$ , graue Kreise), für die die Analyse durchgeführt werden konnte. Eingefügt ist die Regressionsgerade, der Korrelationskoeffizient wurde zu  $r^2 = 0,90$  berechnet, die Korrelation war mit  $p < 0,001$  signifikant ( $n = 12$ ). Auf der rechten Seite die Mittelwerte mit Standardabweichungen der jüngeren (weiße Säule) und der älteren pädiatrischen Patienten (graue Säule). Der Unterschied zwischen den beiden Altersgruppen war mit  $* p = 0,004$  signifikant. **B** Wirkstärke von (S)-Carvedilol für die Herzfrequenzsenkung ( $E_{\text{max}}$  HF) der pädiatrischen Patienten in entsprechender Darstellung. Die Zahlen in den Säulen geben die Anzahl der untersuchten Patienten an.

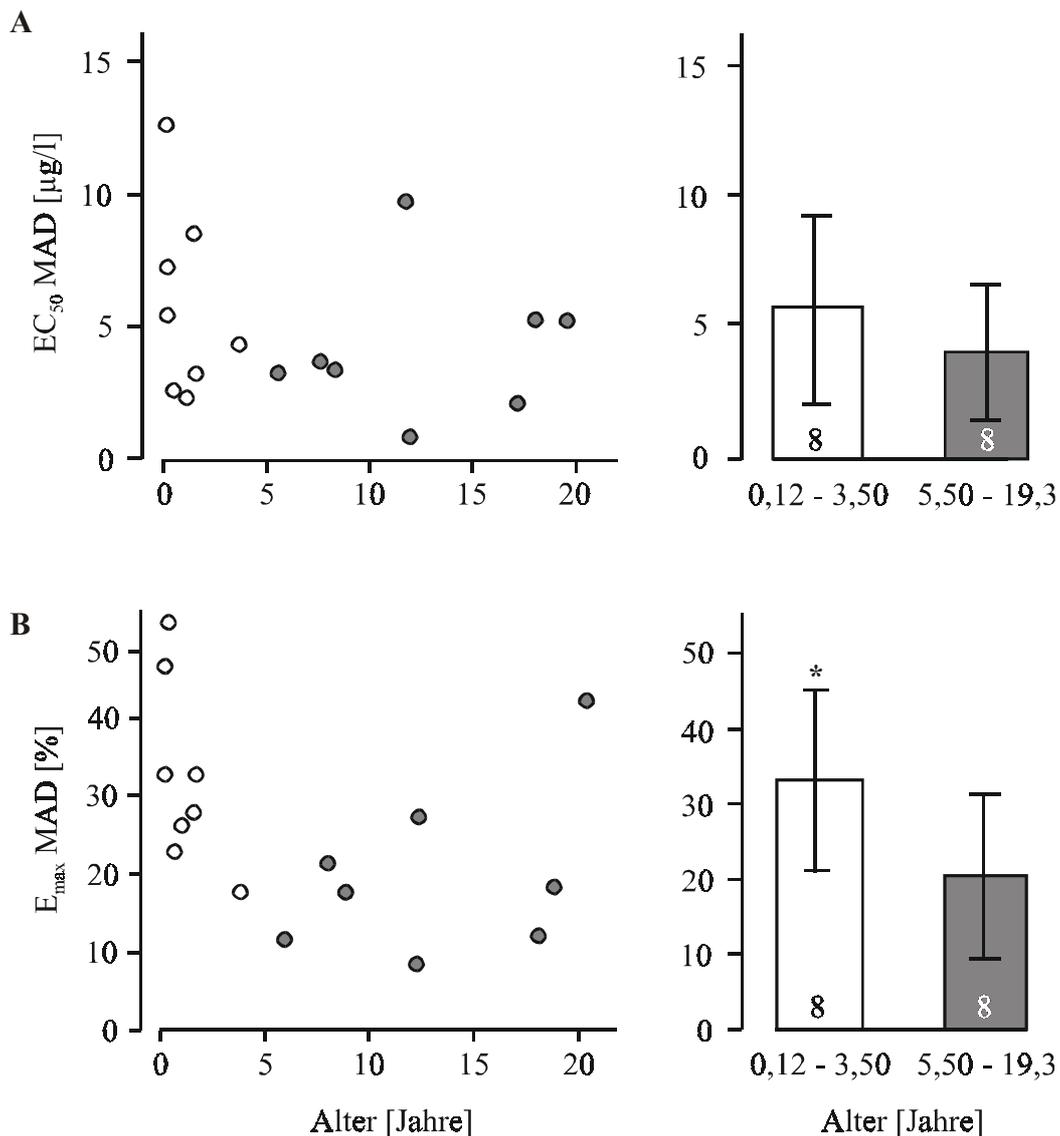
Diese Auswertungen mithilfe des pharmakokinetisch/pharmakodynamischen Modells wurden auch für die Racematkonzentrationen von Carvedilol durchgeführt. Für das racemische Carvedilol zeigte sich ebenfalls eine deutliche altersabhängige Zunahme der  $EC_{50}$ -Werte ( $r^2 = 0,73$ ,  $p < 0,001$ ,  $n = 14$ ). Der Vergleich der beiden Altersgruppen zeigte eine im Mittel etwa drei-fach höhere halbmaximale Konzentration bei den 0,12 bis 3,50 Jahre alten Patienten im Vergleich zu den 5,50 bis 19,3 jährigen Patienten ( $3,62 \pm 2,04 \mu\text{g/l}$  ( $n = 8$ ) versus  $10,8 \pm 1,78 \mu\text{g/l}$  ( $n = 6$ ),  $p = 0,002$ ). Die maximalen Effekte des Carvedilol-Racemats waren nicht altersabhängig ( $21,1 \pm 8,22\%$  ( $n = 8$ ) versus  $20,6 \pm 9,04\%$  ( $n = 6$ )).

Der Einfluss individueller Faktoren der Patienten auf die Beziehung zwischen der  $EC_{50}$  von (S)-Carvedilol zur Herzfrequenzsenkung und dem Alter der Patienten wurde durch bivariate Korrelationen und die Berechnung partieller Korrelationskoeffizienten ausgeschlossen. In bivariaten Korrelationen wurde der Einfluss von Alter,  $EC_{50}$  von (S)-Carvedilol für die Herzfrequenzsenkung, Ausgangsherzfrequenz, Ausgangsblutdruck, Ejektionsfraktion und Katecholaminstatus vor Therapiebeginn, maximalen Effekten für Herzfrequenz- und Blutdrucksenkung unter Carvedilol und  $EC_{50}$  für die Blutdrucksenkung der Patienten während der Carvedilol-Therapie untereinander ermittelt. Die Auswertung ergab neben der signifikanten Korrelation von  $EC_{50}$  von (S)-Carvedilol für die Herzfrequenzsenkung und dem Patientenalter ( $r^2 = 0,90$ ;  $p < 0,001$ ,  $n = 12$ ) auch signifikante Beziehungen zwischen dem Alter und der Ausgangsherzfrequenz ( $r^2 = -0,78$ ;  $p = 0,003$ ,  $n = 12$ ) und der  $EC_{50}$  von (S)-Carvedilol für die Herzfrequenzsenkung und der Ausgangsherzfrequenz ( $r^2 = -0,73$ ;  $p = 0,007$ ,  $n = 12$ ). Wurde die Korrelation zwischen  $EC_{50}$  von (S)-Carvedilol für die Senkung der Herzfrequenz und Alter ohne den Einfluss der Ausgangsherzfrequenz berechnet, so bestand zwischen diesen beiden Parametern jedoch weiterhin eine signifikante Korrelation ( $r^2 = 0,89$ ;  $p < 0,001$ ,  $n = 12$ ). Wurden die verschiedenen Parameter für die Variable Patientenalter korrigiert, so korrelierte die  $EC_{50}$  von (S)-Carvedilol für die Senkung der Herzfrequenz nicht mit einer anderen Größe.

Das Lebensalter der Patienten beeinflusst also unabhängig von den genannten individuellen Faktoren deutlich die Höhe der Konzentration von (S)-Carvedilol, die zur halbmaximalen Herzfrequenzsenkung führt.

#### **4.8.2 Einfluss des Lebensalters auf den mittleren arteriellen Druck unter Carvedilol-Therapie**

Auch für die Blutdruckwerte wurde eine Korrelation mit den Plasmakonzentrationen von Carvedilol durchgeführt, um eventuelle altersabhängige Entwicklungen dieses pharmakodynamischen Parameters zu ermitteln. Für das PK/PD-Modelling des mittleren arteriellen Blutdrucks wurden die Racematkonzentrationen von Carvedilol eingesetzt. Bezüglich der  $EC_{50}$ -Konzentrationen von (R, S)-Carvedilol zur Blutdrucksenkung bei den Patienten bestand kein altersabhängiger Unterschied. Die maximale Wirkstärke ( $E_{max}$ ) von (R, S)-Carvedilol bezüglich der Blutdrucksenkung war vor allem bei den besonders jungen Patienten im Alter von 0,12 bis 0,15 Jahren sehr groß. Im Mittel lag die  $E_{max}$  bei den jüngeren Patienten mit  $33,3 \pm 12,1\%$  etwa 1,6-fach höher als bei den älteren Patienten mit  $20,5 \pm 11,1\%$  ( $p = 0,027$ , je  $n = 8$ ; Abbildung 25).



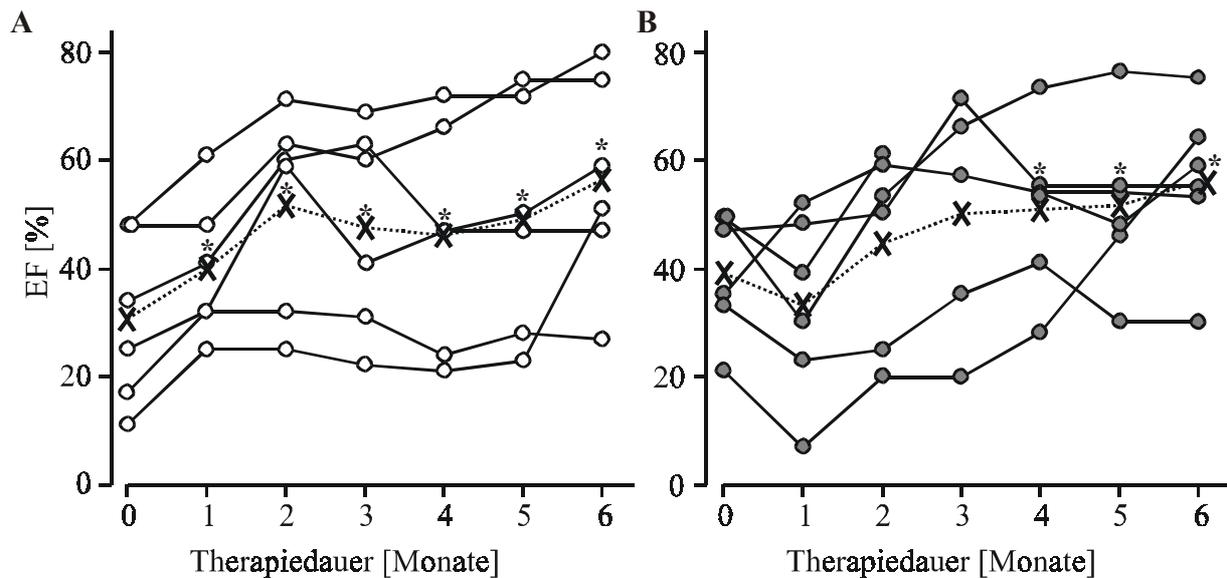
**Abbildung 25** **A** Potenz von (R, S)-Carvedilol zur Senkung des mittleren arteriellen Blutdrucks (EC<sub>50</sub> MAD). Auf der linken Seite die individuellen Werte gegen das Alter der jüngeren Patienten im Alter von 0,12 - 3,50 Jahren (n = 8, weiße Kreise) und der älteren Patienten im Alter von 11,6 - 19,3 Jahren (n = 8, graue Kreise). Auf der rechten Seite die Mittelwerte mit Standardabweichungen der jüngeren (weiße Säule) und der älteren pädiatrischen Patienten (graue Säule). **B** Wirkstärke von (R, S)-Carvedilol zur Blutdrucksenkung (E<sub>max</sub> MAD) der pädiatrischen Patienten in entsprechender Darstellung. Der Unterschied zwischen den beiden Altersgruppen war mit \* p = 0,027 signifikant (je n = 8). Die Zahlen in den Säulen geben die Anzahl der untersuchten Patienten an.

## 4.9 Klinische Ergebnisse

### 4.9.1 Verlauf der Ejektionsfraktion unter Carvedilol-Therapie

Ziel einer Beta-Rezeptorenblockertherapie bei Herzinsuffizienz ist letztendlich die Steigerung der Kontraktionskraft des insuffizienten Herzens. Diese kann über die Messung der Ejektionsfraktion abgeschätzt werden. Bei den Patienten der vorliegenden Studie wurde die Ejektionsfraktion des Systemventrikels vor Beginn der Therapie und unter Carvedilol-Therapie einmal monatlich echokardiographisch von zwei erfahrenen Pädiatern unabhängig voneinander gemessen. Die Messungen wurden in der Regel vormittags zwischen zehn und zwölf Uhr durchgeführt. Die Patienten mussten für die Untersuchung nicht nüchtern sein, eine Sedierung der Patienten wurde nicht vorgenommen.

Die Auswurfleistung des Herzens besserte sich unter der Carvedilol-Therapie im Mittel aller Patienten, die über sechs Monate beobachtet wurden, signifikant von  $35 \pm 14\%$  auf  $56 \pm 17\%$  (je  $n = 12$ ). Auch zur Beurteilung des Verlaufs der Ejektionsfraktionen wurden die Patienten in die Altersgruppen aufgeteilt. Die Ausgangswerte der Ejektionsfraktion unterschieden sich im Vergleich der jüngeren und älteren pädiatrischen Patienten nicht. Im Lauf der weiteren Therapie zeigten sich jedoch altersabhängig unterschiedliche Entwicklungen der Auswurfleistung des Herzens. Die Ejektionsfraktion der jüngeren Patienten besserte sich bereits nach einem Monat der Carvedilol-Behandlung signifikant im Vergleich zum Befund vor Therapiebeginn ( $31 \pm 14\%$  versus  $40 \pm 12\%$ ,  $p = 0,006$ , je  $n = 6$ ). Bei den älteren Patienten verschlechterte sich die Ejektionsfraktion nach einem Monat unter Carvedilol leicht, besserte sich über den zweiten und dritten Monat, war aber erst nach vier Monaten signifikant größer als der Vorbefund ( $39 \pm 10\%$  versus  $51 \pm 14\%$ ,  $p = 0,027$ , je  $n = 6$ ; Abbildung 26). Ein Verlauf der Ejektionsfraktion wie bei den älteren pädiatrischen Patienten, also mit einer initialen Abnahme der Auswurfleistung des Herzens, ist aus Studien zur Behandlung erwachsener Patienten mit Herzinsuffizienz mit einem Beta-Rezeptorenblocker bekannt (Packer et al. 1996, Eichhorn und Bristow 1996).



**Abbildung 26** Verlauf der Ejektionsfraktion (EF) **A** bei den jüngeren pädiatrischen Patienten im Alter von 0,12 - 3,50 Jahren (n = 6, weiße Kreise) und **B** bei den älteren pädiatrischen Patienten im Alter von 7,50 - 19,3 Jahren (n = 6, graue Kreise), die über sechs Monate unter Carvedilol-Therapie beobachtet wurden. Die Kreise geben die bei den Patienten erhobenen Daten an, die Kreuze und die gestrichelten Linien den Verlauf der Mittelwerte der jeweiligen Altersgruppe. \* p < 0,05: signifikant gegenüber dem Mittelwert der Ausgangsbefunde vor Therapiebeginn mit Carvedilol der jeweiligen Altersgruppe.

#### 4.9.2 Klinische Beurteilung der Patienten unter Carvedilol-Therapie

Als weitere Parameter zur Wirksamkeit und Sicherheit der Carvedilol-Therapie wurden monatlich eine Einstufung des klinischen Befindens der Patienten nach der Bewertungsskala von Ross (1992) oder bei älteren Patienten nach der Klassifikation der *New York Heart Association* (NYHA) vorgenommen, der Katecholaminstatus der Patienten bestimmt und die unerwünschten Wirkungen unter der Carvedilol-Therapie erfragt.

Zur Kontrolle der Compliance der Patienten wurden monatlich die Carvedilol-Talspiegel bestimmt. Die Carvedilol-Konzentrationen dieser Proben lagen im Bereich der entsprechenden beim Zieldosisprofil gemessenen Zwölf-Stunden-Werte. Daher konnte von einer regelmäßigen Einnahme von Carvedilol durch die Patienten ausgegangen werden.

Die klinische Beurteilung der Patienten nach der Bewertungsskala von Ross, in die Parameter wie Herzfrequenz, Atemfrequenz, Gewichtspersentile, Schwitzen, Hautdurchblutung,

Hypoxämie und Lebervergrößerung eingehen, besserte sich im Verlauf der sechs-monatigen Carvedilol-Therapie signifikant von im Mittel  $4,6 \pm 2,3$  auf  $2,8 \pm 2,5$  Punkte (je  $n = 14$ ). Vor Therapiebeginn mit Carvedilol war für vier Patienten eine Herztransplantation geplant worden. Bei einem Patienten (P9) wurde die Herztransplantation nach einem Monat der Carvedilol-Therapie durchgeführt. Bei den anderen drei Patienten (P5, P7, P11) besserte sich der klinische Zustand unter der Behandlung mit Carvedilol so sehr, dass sie von der Warteliste zur Herztransplantation genommen werden konnten.

Zur Beurteilung des Ausmaßes der Sympathikus-Stimulation durch die Herzinsuffizienz wurden vor Beginn der Carvedilol-Behandlung und unter der Therapie einmal monatlich die NoradrenalinKonzentrationen im Plasma der Patienten bestimmt. Mit der gleichen Messmethode waren zuvor 118 herzgesunde Kinder im Alter von Neugeborenen bis zu Jugendlichen auf ihre PlasmanoradrenalinKonzentrationen untersucht worden. Dabei hatten die Neugeborenen im Vergleich zu Erwachsenen höhere Noradrenalinwerte, aber bereits im Säuglingsalter, etwa ab einem Monat, nahmen die Werte das Niveau von Erwachsenen an. Unterschiede in der PlasmanoradrenalinKonzentration innerhalb des Patientenkollektivs der vorliegenden Studie waren also nicht altersbedingt. Unter der Carvedilol-Therapie sanken die Noradrenalinwerte der Patienten im Vergleich zum Vorbefund signifikant (von 231 ng/l bis 1689 ng/l auf 183 ng/l bis 522 ng/l,  $p = 0,005$ ,  $n = 15$  bzw.  $n = 13$ ). Die überschüssige Katecholaminstimulation wurde unter Carvedilol-Behandlung reduziert, nach sechs-monatiger Therapie lagen die Plasmanoradrenalin Spiegel im Normbereich gesunder Erwachsener (Benedict 1987, Hallman 1981).

Die unerwünschten Arzneimittelwirkungen unter der Carvedilol-Therapie wurden anhand eines Fragebogens ermittelt, der von einem Pädiater gemäß den Aussagen der Patienten und deren Eltern einmal monatlich ausgefüllt wurde. Es traten als unerwünschte Symptome Blutdruckabfall, Müdigkeit, Benommenheit und Sehstörungen auf. Die unerwünschten Wirkungen traten jeweils bei Patienten mit großer Fläche unter der Plasmakonzentrations-Zeitkurve für Carvedilol, also bei Patienten mit hoher Carvedilol-Exposition auf. Die Carvedilol-Medikation musste jedoch in keinem Fall abgesetzt werden.

## 5. Diskussion

### 5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde die Pharmakokinetik, die Pharmakodynamik und deren Beziehung untereinander, die Wirksamkeit und unerwünschte Wirkungen des Beta-Rezeptorenblockers Carvedilol und seiner Enantiomere bei pädiatrischen Patienten mit Herzinsuffizienz unterschiedlichen Lebensalters untersucht. Der Phänotyp und Genotyp der Patienten für das hauptsächlich an der Metabolisierung von Carvedilol beteiligte Enzym Zytochrom-P450-2D6 wurde ergänzend analysiert und deren Einfluss auf die Pharmakokinetik von Carvedilol bestimmt. Die Untersuchungen dienten dazu, den Zusammenhang zwischen applizierter Carvedilol-Dosis, resultierenden Plasmakonzentrationen und ausgelösten Effekten in den verschiedenen pädiatrischen Altersgruppen zu verstehen. Damit wurden Grundlagen für die Entwicklung von im Hinblick auf Wirksamkeit und Sicherheit optimalen Therapierichtlinien geschaffen, um letztendlich die Behandlung der Herzinsuffizienz mit Carvedilol auch für die pädiatrische Patientengruppe zugänglich machen zu können. Die Hauptergebnisse sind im Folgenden zusammengestellt und werden anschließend diskutiert.

- 1) Die Pharmakokinetik von (R, S)-Carvedilol änderte sich altersabhängig. Die Halbwertszeit und die mittlere Verweildauer von (R, S)-Carvedilol waren bei den Säuglingen und Kleinkindern am kürzesten und stiegen bis zum Erwachsenenalter an. Die Clearance normiert auf das Körpergewicht war bei den jüngeren größer als bei den älteren Patienten. Dieses wirkte sich auf die Kumulation von (R, S)-Carvedilol aus. Die Talspiegel und die Flächen unter den Plasmakonzentrations-Zeitkurven nahmen mit steigendem Patientenalter zu.
- 2) Die Pharmakokinetik des für die herzfrequenzsenkende Wirkung von Carvedilol verantwortlichen (S)-Enantiomers änderte sich ebenfalls altersabhängig. Die Halbwertszeit und die mittlere Verweildauer nahmen mit zunehmendem Alter zu, die Flächen unter den Plasmakonzentrations-Zeitkurven stiegen an.

- 3) Bei den Patienten und Probanden, die alle entsprechend ihrer Enzymkapazität von Zytochrom-P450-2D6 (CYP2D6) zu den schnellen Metabolisierern gehörten, wurde die körporgewichtsbezogene Clearance und das Ausmaß der Fläche unter der Plasmakonzentrations-Zeitkurve von (R, S)-Carvedilol maßgeblich durch die individuelle metabolische Kapazität von CYP2D6 bestimmt. Die Enzymaktivität von CYP2D6 war jedoch innerhalb des gesamten Kollektivs von 78 untersuchten Personen im Alter von sechs Monaten bis 77 Jahren unabhängig vom Lebensalter.
- 4) Bezüglich der pharmakodynamischen Parameter von Carvedilol zeigten sich folgende altersabhängige Unterschiede. Die Konzentration von (S)-Carvedilol, die zur halbmaximalen Senkung der Herzfrequenz führte, war bei den Patienten im Säuglings- und Kleinkindalter deutlich niedriger als bei den älteren pädiatrischen Patienten. Das Gleiche galt auch für die Konzentration an racemischem Carvedilol, die zum halbmaximalen Effekt der Herzfrequenzsenkung führte. Dieses äußerte sich in einem früheren Absinken der Herzfrequenz bei den jüngeren Patienten bereits in der Phase der Aufdosierung mit Carvedilol.
- 5) Ebenso war die maximale Wirkstärke ( $E_{\max}$ ) von racemischem Carvedilol in Bezug auf die Senkung des Blutdrucks altersbedingt unterschiedlich. Die  $E_{\max}$ -Werte für die Blutdrucksenkung waren bei den jüngsten Patienten am größten.
- 6) Unter der Therapie mit Carvedilol trat bei den jüngeren pädiatrischen Patienten bereits einen Monat nach Therapiebeginn eine Besserung der Auswurfleistung des Herzens ein, während die Ejektionsfraktion bei den Patienten im Kindes- und Jugendalter nach einem Monat der Therapie leicht abnahm und sich erst im Verlauf bis zum vierten Monat nach Behandlungsbeginn mit Carvedilol besserte.

## **5.2 Altersabhängige Veränderungen der Pharmakokinetik von (R, S)-Carvedilol**

In der vorliegenden Studie zeigte sich eine Altersabhängigkeit der Pharmakokinetik von (R, S)-Carvedilol. Bei den jüngeren Patienten im Alter von sechs Wochen bis 3,50 Jahren waren die terminale Eliminationshalbwertszeit und die mittlere Verweildauer von (R, S)-Carvedilol kürzer als bei den 5,50- bis 19,3-jährigen Patienten. Im Mittel der Altersgruppen war die Halbwertszeit bei den älteren Patienten um das 1,5-Fache länger. Die Einzelwerte variierten über die Altersspanne der Patienten um das fast Fünf-Fache, zwischen 1,0 und 4,9

Stunden. Die Halbwertszeit für (R, S)-Carvedilol bei gesunden Erwachsenen wird mit sechs bis sieben Stunden angegeben (Neugebauer et al. 1987). Allerdings wurden diese Daten nach Einnahme von racemischem Carvedilol in Kapselform erhoben. Von Möllendorff et al. (1987) führten zusätzlich Untersuchungen an gesunden Erwachsenen nach Einnahme von Carvedilol-Racemat in Form einer Suspension durch. Diese Applikationsform entspricht in etwa der Einnahmeart der vorliegenden Untersuchung, bei der die Verreibung von Dilatrend<sup>®</sup> Tabletten mit dem Kapselfüllstoff als Pulver mit Wasser eingenommen wurde. Von Möllendorff et al. (1987) fanden bei den untersuchten Erwachsenen Halbwertszeiten von im Mittel 4,3 Stunden für (R, S)-Carvedilol. Diese Werte entsprechen den Halbwertszeiten von im Mittel 4,7 Stunden, die in dem Kollektiv erwachsener Probanden der vorliegenden Untersuchung bestimmt wurden. Die Halbwertszeiten beider Altersgruppen der pädiatrischen Patienten der vorliegenden Studie lagen mit im Mittel 2,2 Stunden bei den jüngeren Patienten und 3,4 Stunden bei den älteren pädiatrischen Patienten somit unterhalb den von Erwachsenen bekannten Daten. Gleiches gilt für die Werte der mittleren Verweildauer von (R, S)-Carvedilol.

Für die Clearance und das Verteilungsvolumen nach oraler Gabe eines Arzneimittels spielt die Bioverfügbarkeit eine wichtige Rolle. Da Carvedilol bei den pädiatrischen Patienten nicht intravenös verabreicht werden konnte, war es nicht möglich, die individuelle Bioverfügbarkeit bei den Kindern zu bestimmen. Dies muss bei der Bewertung der Parameter Clearance und Verteilungsvolumen berücksichtigt werden. Die Werte für das körperlgeichtsbezogene Verteilungsvolumen von (R, S)-Carvedilol waren innerhalb des vorliegenden Studienkollektivs über das Alter vergleichbar. Dieser pharmakokinetische Parameter war also vermutlich nicht für die altersabhängigen Unterschiede in Halbwertszeit und Verweildauer verantwortlich. Die auf das Körpergeicht bezogene Clearance änderte sich dagegen abhängig vom Lebensalter. Sie war innerhalb des Patientenkollektivs sehr variabel, zeigte bei den jüngeren Patienten jedoch die größten Werte und nahm mit zunehmendem Alter ab. Somit scheint die schnellere Elimination von (R, S)-Carvedilol bei den Säuglingen und Kleinkindern durch eine im Vergleich zu den älteren Patienten größere Clearance pro Körpergeicht hervorgerufen zu sein.

Die körperlgeichtsbezogene Clearance war abhängig von der metabolischen Kapazität des hauptsächlich an der Biotransformation von (R, S)-Carvedilol beteiligten Enzyms

Zytochrom-P450-2D6 (CYP2D6). Der genetische Polymorphismus dieses Enzyms führt zu einer großen interindividuellen Breite der Enzymaktivitäten. Diese zeigte sich auch innerhalb des untersuchten Kollektivs. Selbst innerhalb der Patienten und Probanden, die alle zu den schnellen Metabolisierern für dieses Enzym gehörten, war die Enzymkapazität sehr variabel. Diese interindividuell unterschiedliche Enzymkapazität für CYP2D6 war zu einem großen Teil verantwortlich für die Variabilität der körperrgewichtbezogenen Clearance von (R, S)-Carvedilol innerhalb des Studienkollektivs. Die Enzymaktivität war jedoch innerhalb des Studienkollektivs und innerhalb des gesamten untersuchten Kollektivs von 78 Personen im Alter zwischen sechs Monaten und 77 Jahren nicht abhängig vom Lebensalter. Die schnellere Elimination von (R, S)-Carvedilol bei den jüngeren Patienten war also nicht in den Unterschieden der metabolischen Kapazität für CYP2D6 begründet.

Der Grund für die altersabhängig unterschiedlich schnelle Elimination von (R, S)-Carvedilol könnte in den Befunden von Murry et al. (1995) liegen. Diese Arbeitsgruppe fand für das Lebervolumen eine altersabhängige Entwicklung im Verhältnis zum Körpergewicht. Über eine Altersspanne von drei bis 18 Jahren sank das körperrgewichtbezogene Lebervolumen um das Zwei- bis Dreifache. Eine weitere Arbeitsgruppe fand bei einem Kollektiv von 24- bis 91-jährigen gesunden Personen neben einem pro kg Körpergewicht höheren Lebervolumen auch einen schnelleren Leberblutfluss bei den jüngeren Probanden (Wynne et al. 1989). Es bestand auch unabhängig vom Lebensalter eine Korrelation zwischen Lebervolumen und Leberblutfluss. So könnte das bei Kindern pro Körpergewicht größere Lebervolumen und der damit erhöhte Leberblutfluss zu der größeren Clearance und der kürzeren Halbwertszeit von (R, S)-Carvedilol bei den jüngeren Patienten führen. Denn bei (R, S)-Carvedilol als einem „high extraction drug“, welches bei der ersten Leberpassage dem zirkulierenden Blut zu einem hohen Anteil durch Metabolisierung entzogen wird, beeinflusst der Leberblutfluss die Clearance und die Halbwertszeit entscheidend (Shargel und Yu 1993).

Deutlich wurden die Auswirkungen der größeren Clearance und der kürzeren Halbwertszeit von (R, S)-Carvedilol bei den jüngeren Patienten bei der Auswertung der Flächen unter den Konzentrations-Zeitkurven (AUC). Sowohl nach der Testdosis als auch im Fließgleichgewicht unter der Zieldosis waren die AUC-Werte der Patienten im Säuglings- und Kleinkindalter etwa 1,7- bis zwei-fach niedriger als die der älteren pädiatrischen Patienten. Die Carvedilol-Exposition nahm also altersabhängig zu. Dieses wurde auch an den

Talspiegeln von (R, S)-Carvedilol im Fließgleichgewicht unter der Zieldosis deutlich. Diese waren bei den jüngeren Patienten im Alter von sechs Wochen bis 3,50 Jahre im Mittel fünf- bis sechs-fach niedriger im Vergleich zu den Talspiegeln bei den 5,50 bis 19,3 Jahre alten Patienten.

Bei der Behandlung insbesondere junger pädiatrischer Patienten mit Carvedilol muss also mit einer schnelleren Elimination des Arzneistoffs und dadurch mit niedrigeren Plasmakonzentrationen des Wirkstoffs gerechnet werden.

### **5.3 Bisherige Kenntnisse über die Pharmakokinetik verschiedener Arzneistoffe im Kindesalter**

Für einige Wirkstoffe ist bereits in den letzten zwei Jahrzehnten eine sich im Kindesalter entwicklungsbedingt ändernde Pharmakokinetik beschrieben worden. Dabei handelt es sich um hauptsächlich renal eliminierte Arzneistoffe wie Amikacin (Lanao et al. 1982), Trimethoprim (Hoppu 1987) und Sotalol (Läer et al. 2001), aber auch um, ähnlich wie Carvedilol, hepatisch eliminierte Arzneistoffe. Im Folgenden werden die Ergebnisse pharmakokinetischer Untersuchungen bei Kindern von drei hepatisch metabolisierten Arzneistoffen vorgestellt und anschließend mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie für Carvedilol verglichen.

Das Injektionsnarkotikum Thiopental, das ausschließlich über die Leber verstoffwechselt wird (Lange et al. 1992), zeigte bei 15 Kindern im Alter von fünf Monaten bis 13 Jahren nach intravenöser Gabe eine etwa halb so lange Eliminationshalbwertszeit wie bei Erwachsenen (Sorbo et al. 1984). Das körperlsgewichtsbezogene Verteilungsvolumen von Thiopental unterschied sich nicht zwischen den Altersgruppen. Die körperlsgewichtsbezogene Clearance des Arzneistoffs war jedoch bei den pädiatrischen im Vergleich zu erwachsenen Patienten doppelt so hoch.

Bei Flunitrazepam, einem Benzodiazepin, welches über Enzyme des Zytocromsystems biotransformiert wird (Coller et al. 1998), zeigte sich ein ähnliches altersabhängiges Verhalten der Pharmakokinetik nach intravenöser Applikation. Bei zehn Kindern im Alter von drei bis zehn Jahren war die Halbwertszeit für diesen Arzneistoff nur etwa halb so lang

wie bei Erwachsenen (Iisalo et al. 1984). Bei 31 Säuglingen und Kleinkindern bis zu einem Alter von 14 Monaten lag die Halbwertszeit jedoch im Bereich der Erwachsenenwerte (Pariante-Khayat et al. 1999). Auch die körperrgewichtbezogene Clearance glich in dieser Altersgruppe den von Erwachsenen erhobenen Daten, die Clearance nahm aber altersabhängig zu und lag bei Kindern von drei bis zehn Jahren mehr als zweifach höher als die Werte von Erwachsenen und Säuglingen (Pariante-Khayat et al. 1999, Iisalo et al. 1984). Das Verteilungsvolumen von Flunitrazepam pro Körpergewicht zeigte ebenfalls eine Altersabhängigkeit, es war bei pädiatrischen Patienten im Alter von drei bis zehn Jahren etwa verdoppelt, während die körperrgewichtbezogenen Verteilungsvolumina der Säuglinge und Kleinkinder für Flunitrazepam entsprechend den Erwachsenenwerten lagen (Iisalo et al. 1984).

Die Pharmakokinetik des Antiarrhythmikums Flecainid im Kindesalter wurde auch nach oraler Gabe untersucht (Perry et al. 1989). Flecainid wird sowohl renal eliminiert als auch in der Leber metabolisiert, seine Bioverfügbarkeit ist größer als 90% (Mikus et al. 1989). Die hepatische Elimination von Flecainid verläuft wie bei Carvedilol über das Enzym Zytochrom-P450-2D6 (Funck-Brentano et al. 1994, Haefeli et al. 1990). Perry et al. (1989) fanden für Flecainid bei 20 Säuglingen im Alter unter einem Jahr eine Halbwertszeit im Bereich von Erwachsenenwerten. Bei 25 Kleinkindern und Kindern im Alter von einem bis zu zwölf Jahren war die Halbwertszeit um das 1,4- bis 1,5-Fache kürzer. Die kürzere Halbwertszeit in der Gruppe der 1- bis 12-Jährigen wurde hervorgerufen durch eine signifikant höhere körperrgewichtbezogene Arzneistoffclearance in dieser Altersgruppe. In Bezug auf das körperrgewichtbezogene Verteilungsvolumen fanden die Autoren zwischen den verschiedenen Altersgruppen keine Unterschiede (Perry et al. 1989).

Ähnlich wie in der vorliegenden Untersuchung bei den pädiatrischen Patienten für (R, S)-Carvedilol gefunden, waren auch bei den beschriebenen drei Arzneistoffen die Halbwertszeiten bei Kindern nur etwa halb so lang wie von Erwachsenen bekannt. Jeweils waren auch die Werte der körperrgewichtbezogenen Clearance bei den Kindern erhöht. Während zwei Autoren hierfür keine genaue Erklärung geben, führen die Autoren Sorbo et al. (1984) die schnellere Elimination auf die relativ größere Lebermasse bei den pädiatrischen Patienten im Vergleich zu Erwachsenen zurück. Während die fetale Lebermasse 4% des Körpergewichts beträgt, macht die Leber eines Erwachsenen nur etwa 2% aus. Daher steht bei

Kleinkindern und Kindern relativ gesehen mehr Lebermasse zur Metabolisierung zur Verfügung (Sorbo et al. 1984). In Bezug auf das körperrgewichtbezogene Verteilungsvolumen zeigten sich für die Arzneistoffe Thiopental und Flecainid wie auch für (R, S)-Carvedilol in der vorliegenden Studie keine altersabhängigen Veränderungen. Das körperrgewichtbezogene Verteilungsvolumen für den Arzneistoff Flunitrazepam war dagegen abhängig vom Lebensalter unterschiedlich (Iisalo et al. 1984).

Ebenfalls anders als in der vorliegenden Untersuchung für (R, S)-Carvedilol gefunden, waren die bei Säuglingen und Kleinkindern bis zu etwa einem Jahr erhobenen pharmakokinetischen Parameter für die Arzneistoffe Flunitrazepam und Flecainid ähnlich denen von Erwachsenen. Diese im Vergleich zum Kindesalter langsamere Elimination bei den jüngsten Patienten führen die Autoren auf die noch unreifen Eliminationsorgane zurück. Wie inzwischen beschrieben wurde, sind an der Metabolisierung von Flunitrazepam die Enzyme Zytochrom-P450-2C19 und -3A4 beteiligt (Kilicarslan 2001). Diese beiden Enzyme erreichen erst sechs bis zwölf Monate nach der Geburt die Enzymaktivität Erwachsener (Jacqz-Aigrain 2000). Somit ist eine längere Halbwertszeit von Flunitrazepam bei Säuglingen im Vergleich zu Kindern auf die noch unreifen Enzyme zurückzuführen. Der Arzneistoff Flecainid unterliegt neben dem hepatischen Abbau durch CYP2D6 ungleich Carvedilol auch einer renalen Elimination. Daher könnte die längere Halbwertszeit von Flecainid bei Säuglingen auf die noch unreife Niere zurückzuführen sein. Für die Patienten der vorliegenden Studie mit Carvedilol wurde die Reife der Enzymkapazität des hauptsächlich an der Metabolisierung von Carvedilol beteiligten Enzyms Zytochrom-P450-2D6 ab einem Alter von sechs Monaten untersucht. Es zeigte sich eine vom Lebensalter unabhängige Enzymfunktion, diese scheint also spätestens ab einem halben Jahr bereits voll ausgebildet zu sein. Und auch die drei Patienten der vorliegenden Untersuchung, die jünger waren als ein halbes Jahr, zeigten für (R, S)-Carvedilol eine deutlich kürzere Halbwertszeit als Erwachsene.

#### **5.4 Altersabhängige Unterschiede in der Potenz von (S)- und (R, S)-Carvedilol zur Senkung der Herzfrequenz**

In der Aufsättigungsphase der Carvedilol-Therapie sank die Herzfrequenz bei den jüngeren Patienten schneller ab als bei den älteren Patienten. Die mit der Zieldosis erreichte Herzfrequenzsenkung war jedoch prozentual zwischen beiden Altersgruppen gleich. Da das

(S)-Enantiomer von Carvedilol mit einer im Vergleich zu dem anderen Enantiomer etwa 100-fach potenteren Beta-Rezeptorenblockade hauptsächlich für die herzfrequenzsenkende Wirkung von Carvedilol verantwortlich ist, wurde auch die Pharmakokinetik von (S)-Carvedilol untersucht. Diese hing wie die Pharmakokinetik von racemischem Carvedilol vom Lebensalter der Patienten ab. Die Halbwertszeit und die mittlere Verweildauer nahmen mit zunehmendem Alter zu, die (S)-Carvedilol-Exposition war bei den jüngeren Patienten kleiner als bei den älteren. Somit wird die schnellere Herzfrequenzsenkung bei den jüngeren Patienten nicht durch selektiv höhere Konzentrationen an (S)-Carvedilol hervorgerufen.

Die Korrelation der (S)-Carvedilol-Konzentrationen mit der zeitgleich gemessenen Herzfrequenz über ein PK/PD-Modelling zeigte eine altersbedingte Abnahme der Potenz von (S)-Carvedilol zur Senkung der Herzfrequenz, gemessen als Konzentration, die zum halbmaximalen Effekt führt ( $EC_{50}$ ). Die  $EC_{50}$  war bei den jüngeren Patienten etwa fünf-fach niedriger als bei den älteren Patienten. Diese Ergebnisse bestätigten sich im PK/PD-Modelling mit den Racematkonzentrationen von Carvedilol. Auch von racemischem Carvedilol war eine niedrigere Konzentration notwendig, um die Herzfrequenz halbmaximal zu senken. Die bei den Säuglingen und Kleinkindern bereits während der Dosisaufsättigung auftretende Herzfrequenzsenkung durch Carvedilol scheint somit durch eine höhere Empfindlichkeit der jüngeren Patienten bezüglich dieser Wirkung von Carvedilol bedingt zu sein. Die über das PK/PD-Modelling ermittelte maximale Wirkstärke war dagegen zwischen den beiden Altersgruppen vergleichbar. Dies könnte erklären, warum die Herzfrequenz nach Aufsättigung der Carvedilol-Dosis in den Altersgruppen um etwa den gleichen Prozentsatz gesenkt worden war.

Die höhere Potenz von (S)- und (R, S)-Carvedilol bezüglich der Herzfrequenzsenkung bei den jüngeren Patienten könnte in Zusammenhang mit Befunden von Brodde et al. (1995) stehen, die eine mit zunehmendem Alter nachlassende Aktivität der Adenylylcyclase beschrieben. Die Aktivität der Adenylylcyclase war bei den von Brodde et al. (1995) untersuchten 52 Patienten bei der Altersgruppe mit einem Durchschnittsalter von 3,7 Jahren maximal und nahm mit zunehmendem Alter ab. Eine altersabhängig unterschiedliche Anzahl an Beta-Rezeptoren wurde dagegen nicht gefunden (O'Hara et al. 1985). Eine erhöhte Aktivität der den Beta-Rezeptoren nachgeschalteten Reaktionen über die Adenylylcyclase könnte die

höhere Potenz von (S)- und (R, S)-Carvedilol für eine Herzfrequenzsenkung bei den jüngeren Patienten erklären.

Ein weiterer Erklärungsansatz könnte in den Befunden von Perloff et al. (1986) liegen. Nach Perloff ist die parasympathische Innervation der Herzen Neugeborener bereits vergleichbarer erwachsener Herzen, während die sympathischen Nerven in geringerer Anzahl als bei Erwachsenen vorhanden sind (Perloff et al. 1986). Der Parasympathikus überwiegt also relativ gesehen in dieser Altersgruppe den Sympathikus. Demnach könnte es im Kindesalter bei Verminderung der sympathischen Reize über einen Beta-Rezeptorenblocker zu einer verstärkten Wirkung des Parasympathikus und damit zu einer höheren Empfindlichkeit gegenüber der Senkung der Herzfrequenz kommen.

Aufgrund einer bei jüngeren Patienten größeren Potenz von (S)- und (R, S)-Carvedilol für die Herzfrequenzsenkung nimmt die Herzfrequenz von Säuglingen und Kleinkindern bereits bei niedrigeren Carvedilol-Dosen ab als bei älteren Patienten.

### **5.5 Altersabhängige Unterschiede in der maximalen Wirkstärke von (R, S)-Carvedilol zur Senkung des Blutdrucks**

Als weitere altersabhängige Entwicklung in der Pharmakodynamik von (R, S)-Carvedilol zeigte sich ein Unterschied in der maximalen Wirkstärke zur Blutdrucksenkung. Diese war bei den jüngeren Patienten im Alter von sechs Wochen bis 3,50 Jahren größer im Vergleich zu derjenigen der 5,50 bis 19,3 Jahre alten Patienten. Vor allem bei den jüngsten Patienten im Alter von weniger als einem halben Jahr war die Wirkstärke bezüglich der Blutdrucksenkung deutlich höher als bei den anderen Patienten, die  $E_{\max}$ -Werte lagen noch etwa 1,5-fach über dem Mittel der jüngeren Altersgruppe. Vermutlich durch die hohe Wirkstärke von (R, S)-Carvedilol zur Blutdrucksenkung bedingt, kam es bei der jüngsten, sechs Wochen alten Patientin P1, die einen der höchsten  $E_{\max}$ -Werte für die Senkung des mittleren arteriellen Drucks zeigte, vor allem zu Beginn der Carvedilol-Therapie zu starken Blutdruckabfällen.

Die größere Wirkstärke von (R, S)-Carvedilol zur Blutdrucksenkung bei den jüngeren Patienten könnte mit folgenden Befunden zusammenhängen: Es bestehen Hinweise für eine nach der Geburt zunehmende Steifheit intrakranialer Blutgefäße, vermutlich bedingt durch

eine Erhöhung der Wanddicke, wodurch die Elastizität dieser Gefäße nachlässt (Nagasawa et al. 1979). An einem Kollektiv von 600 gesunden Probanden vom Neugeborenenalter bis zu einem Alter von 65 Jahren fanden Laogun und Gosling (1982) eine bei Neugeborenen deutlich höhere Compliance der arteriellen Bahnen der Beine im Vergleich zur Compliance der Aorta als bei älteren Personen. Eventuell könnte durch elastischere Blutgefäße bei jüngeren Menschen eine stärkere Dehnung der Gefäße, damit eine größere Reduktion des peripheren Widerstands und somit eine stärkere Blutdrucksenkung möglich sein.

Die große Wirkstärke für die Blutdrucksenkung bei den jüngeren Patienten muss besonders bei der Dosierung der für die Therapie der Herzinsuffizienz eingesetzten Kombination aus Beta-Rezeptorenblocker und anderen blutdrucksenkenden Pharmaka wie Diuretika und ACE-Inhibitor berücksichtigt werden.

### **5.6 Einfluss der Metabolisierungskapazität für das Enzym Zytochrom-P450-2D6 auf die Pharmakokinetik von (R, S)-Carvedilol**

Die Enzymkapazität für das hauptsächlich an der Metabolisierung von Carvedilol beteiligte Zytochrom-P450-2D6 variiert aufgrund eines genetischen Polymorphismus des betreffenden Gens sehr stark. Bei Arzneistoffen mit hohen hepatischen Extraktionskoeffizienten wie Carvedilol ist die metabolische Kapazität einer der stärksten limitierenden Faktoren für die Elimination und beeinflusst insofern sowohl die Clearance des Wirkstoffs als auch die im Organismus verfügbare Arzneistoffmenge, quantifizierbar als Fläche unter der Konzentrations-Zeitkurve (Shargel und Yu 1993).

In der vorliegenden Studie lag die Metabolisierungskapazität von CYP2D6 bei allen pädiatrischen Patienten und bei allen erwachsenen Probanden, bei denen auch die Pharmakokinetik von (R, S)-Carvedilol untersucht wurde, im schnellen Metabolisierungsbereich. Jedoch war auch innerhalb dieses Bereichs der Enzymkapazität sowohl die körperrgewichtbezogene Clearance als auch die Fläche unter der Konzentrations-Zeitkurve (AUC) abhängig von der Metabolisierungskapazität des Enzyms CYP2D6. Bei Patienten mit einer größeren AUC sind stärkere unerwünschte Wirkungen zu erwarten. Da die vorliegende Studie nicht placebokontrolliert war, liegen keine Daten über das Befinden von Patienten mit vergleichbaren Erkrankungen ohne Carvedilol-Therapie vor. Daher muss bei

Bewertung der Aussagen über die unerwünschten Wirkungen unter Carvedilol die Subjektivität der Angaben berücksichtigt werden. Für folgende unerwünschte Wirkungen von Carvedilol ist eine Dosisabhängigkeit bekannt: Schwindel, Sehstörungen, Bradykardie und Verstärkung einer Herzinsuffizienz. Innerhalb des untersuchten Kollektivs traten unerwünschte Wirkungen wie Sehstörungen und Benommenheit jeweils bei Patienten mit niedriger metabolischer Kapazität für CYP2D6 auf, deren (R, S)-Carvedilol-AUC besonders hoch war. Als weitere unerwünschte Wirkung kam es bei dem Patienten P6 zu Müdigkeit. Auch die Enzymkapazität dieses Patienten war niedrig und die (R, S)-Carvedilol-AUC groß.

Die metabolische Kapazität für CYP2D6 war ein entscheidender Faktor für die Pharmakokinetik von (R, S)-Carvedilol und somit eventuell bestimmend für das Auftreten unerwünschter Arzneimittelwirkungen. Es scheint empfehlenswert, vor Beginn der Therapie einer Herzinsuffizienz mit Carvedilol eine Phänotypisierung bezüglich CYP2D6 durchzuführen, um gegebenenfalls die Dosis der individuellen Enzymkapazität anpassen zu können. Eine genaue Dosierungsrichtlinie für die Abstufung der Dosis entsprechend der Aktivität von CYP2D6 kann anhand dieser wenigen Aussagen allerdings noch nicht gegeben werden. Dafür müssten Daten an einem größeren Studienkollektiv erhoben werden, in dem zusätzlich auch langsame Metabolisierer für CYP2D6 untersucht würden.

### **5.7 Altersabhängige Unterschiede im Verlauf der Ejektionsfraktion unter Carvedilol-Therapie**

Ein Absinken der Ejektionsfraktion etwa einen Monat nach Beginn einer Beta-Rezeptorenblockertherapie, wie bei den älteren pädiatrischen Patienten der vorliegenden Studie beobachtet, ist aus Untersuchungen von erwachsenen Patienten mit Herzinsuffizienz bekannt. Dieser Effekt gehört zu den am meisten gefürchteten unerwünschten Wirkungen der Therapie der Herzinsuffizienz mit einem Beta-Rezeptorenblocker (Packer et al. 1996). Ausgelöst wird diese unerwünschte Wirkung vermutlich durch den negativ inotropen Effekt der Beta-Rezeptorenblockade. Eine signifikante Besserung der Herzfunktion trat bei erwachsenen Patienten wie auch bei den älteren pädiatrischen Patienten des vorliegenden Studienkollektivs erst etwa drei Monate nach Therapiebeginn ein (Eichhorn und Bristow 1996). Bei den sechs Wochen bis 3,50 Jahre alten Patienten der vorliegenden Untersuchung besserte sich die Ejektionsfraktion dagegen bereits nach einem Monat der Carvedilol-

Therapie signifikant gegenüber dem Ausgangsbefund. Dieses könnte durch die bei den jüngeren Patienten höhere Potenz von (S)- bzw. (R, S)-Carvedilol zur Herzfrequenzsenkung und das dadurch schnellere Absinken der Herzfrequenz unter Carvedilol-Therapie bedingt sein. Denn durch die Senkung der Herzfrequenz verbessert sich die diastolische Funktion und der Sauerstoffverbrauch des insuffizienten Herzens wird reduziert, wodurch es zu einer Zunahme der Ejektionsfraktion kommen kann. Besonders bei den jüngsten Patienten kann sich zusätzlich die bei ihnen höhere Wirkstärke von (R, S)-Carvedilol zur Blutdrucksenkung positiv auf die Herzleistung auswirken. Durch eine größere Senkung der Nachlast kann das Herz stärker entlastet und damit die Auswurfleistung gesteigert werden. Diese Zusammenhänge müssen in einer größeren, kontrollierten Studie untersucht werden.

Die jüngeren Patienten scheinen also schneller als ältere Patienten und ohne initiale myokardiale Depression von der Therapie mit einem Beta-Rezeptorenblocker zu profitieren.

### **5.8 Ausblick**

Nach den bisherigen Ergebnissen über die altersabhängigen Unterschiede in der Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von (R, S)-Carvedilol könnte die Steigerung der Dosis bei Säuglingen und Kleinkindern in kürzeren Zeitabständen erfolgen als bei Erwachsenen üblich. Durch die schnellere Elimination von (R, S)-Carvedilol bei den jüngeren Patienten stellt sich früher das Fließgleichgewicht ein, dadurch lassen sich die resultierenden Wirkungen schneller beurteilen. Außerdem traten bei den jüngeren Patienten kaum unerwünschte Wirkungen auf, und der negativ inotrope Effekt des Beta-Rezeptorenblockers äußerte sich nicht in einem Abfall der Ejektionsfraktion. Eine schnellere Aufsättigung wäre von Vorteil, um die Aufenthaltsdauer im Krankenhaus für die Kinder zu verringern und um ihnen möglichst schnell die maximale Therapie zu ermöglichen. Allerdings müsste aufgrund der höheren Wirkstärke von (R, S)-Carvedilol zur Blutdrucksenkung bei sehr jungen pädiatrischen Patienten bei gleichzeitiger Gabe eines ACE-Inhibitors eventuell dessen Dosis reduziert werden. Da die durchschnittliche Konzentration im Fließgleichgewicht von der Clearance bestimmt wird, könnte die Erhaltungsdosis von Carvedilol für Säuglinge und Kleinkinder aufgrund der in dieser Altersgruppe schnelleren Elimination höher gewählt werden. Oder die kürzere Halbwertszeit bei den Kindern könnte durch eine dreimal tägliche Gabe ausgeglichen werden. Um genaue Dosierungsangaben für die Therapie im Kindesalter

entwickeln zu können, müssten weitere Studien mit größeren Kollektiven pädiatrischer Patienten durchgeführt werden. Besonders bei Säuglingen und Kleinkindern scheint diese Therapie schnell zu einer Besserung des Zustands zu führen. Daher sollten weitere Patienten untersucht werden, um die Therapie schließlich auch für diese Altersgruppe etablieren zu können.

Es sollten jedoch Anstrengungen unternommen werden, die für die Bestimmung pharmakokinetischer Parameter notwendigen Blutvolumina bei Kindern noch weiter zu verringern oder sogar Blutentnahmen ganz zu vermeiden. Da auch analytische Verfahren eine Grenze bezüglich der Mikronisierung zeigen, sollten Alternativen zu Blutentnahmen gesucht und optimiert werden. Zum Beispiel könnte die Mikrodialysetechnik als geeignetes Verfahren dienen, um die Probleme bei Blutentnahmen zu umgehen. Die Patienten müssten dafür nur einmal zum Legen der Sonde punktiert werden, im Weiteren würde den Patienten kein Blut entnommen. Die Mikrodialysetechnik bietet einige Vorteile: Da bei der Analyse der Dialysierflüssigkeit eine Aufarbeitung entfällt, weil die Dialysate keine die HPLC-Analytik störenden Substanzen enthalten, werden nur geringe Mengen des Dialysats benötigt. Daher können über ein Dosierungsintervall sehr viele Dialysatproben gewonnen werden, wodurch die Konzentrationen sehr engmaschig verfolgt werden können. Aus den Dialysaten können zusätzlich auch andere Substanzen wie Verlaufparameter der Herzinsuffizienz, z. B. Katecholamine und Peptide (wie etwa atrial und brain natriuretic peptide) bestimmt werden. Dadurch wird eine genaue Analyse der Konzentrations-Wirkungsbeziehungen bezüglich dieser Marker ermöglicht. Ein weiterer Vorteil der Mikrodialysemethode ist die Bestimmung der freien, nicht an Plasmaproteine gebundenen Arzneistoffkonzentrationen durch das Verfahren. Es können also direkt die biologisch aktiven Konzentrationen bestimmt werden. Eine Weiterentwicklung dieser Methode zur Anwendung bei pädiatrischen Patienten erscheint daher als wichtig. Mit einer Mikrodialysemethode wäre die Bestimmung pharmakokinetischer Parameter bei pädiatrischen Patienten einfacher und aufgrund der entfallenden Probenaufarbeitung auch schneller zugänglich als mit konventionellen Methoden.

Zur Abschätzung der zu erwartenden im Körper verfügbaren Arzneistoffmenge wird gerade bei Kindern die Bestimmung der Halbwertszeit oder der Clearance als Parameter für die Elimination des Arzneistoffs als wichtig erachtet. Denn die genaue Bestimmung der für den jeweiligen Patienten notwendigen Dosierung nach dem Alter bei pädiatrischen Patienten wird

immer schwierig sein, da auch innerhalb der Altersgruppen starke Schwankungen der pharmakokinetischen Parameter durch die interindividuell unterschiedlich schnell verlaufende Entwicklung der eliminierenden Organe auftreten (Kearns und Reed 1989). Um die bei den pädiatrischen Patienten notwendigen Untersuchungen noch zu reduzieren, erscheint es daher sinnvoll, ein Populations-pharmakokinetisch/pharmakodynamisches Modell zu entwickeln. Darüber ließe sich anhand von Daten wie Geschlecht, Alter, Körpergewicht, Körpergröße, Begleitmedikation und Schweregrad der Herzinsuffizienz bei dem betreffenden Patienten und einer oder sehr weniger Plasmakonzentrationen eine Abschätzung der für eine gewünschte Wirkung notwendigen Dosierung vornehmen. So würde das individualisierte Dosieren bei der sehr heterogenen Gruppe pädiatrischer Patienten ermöglicht.

Wall et al. (2000) erzielten in einer prospektiven Studie bei Kindern mit lymphoblastischer Leukämie mit einer individualisierten Therapie von Methotrexat, bei der die Dosierung für jeden einzelnen Patienten nach der Arzneistoffclearance und der mittleren Wirkstoffkonzentration im Fließgleichgewicht reguliert wurde, im Vergleich zur Therapie nach Dosierungsschema einen besseren Therapieerfolg und eine geringere Rate an unerwünschten Wirkungen. Durch die individuellen altersabhängigen Entwicklungen in Pharmakokinetik und Pharmakodynamik bei Kindern kann in der Pädiatrie nur mit unzureichendem Erfolg nach Therapieschemata dosiert werden. Daher erscheint das individualisierte Dosieren besonders in der Pädiatrie erstrebenswert im Hinblick auf einen optimalen Therapieerfolg.

Carvedilol zeigte in dieser Studie eine gute Wirksamkeit und Verträglichkeit bei den pädiatrischen Patienten. Besonders die Patienten im Säuglings- und Kleinkindalter profitierten schnell von der Therapie mit einem Beta-Rezeptorenblocker. Die Pharmakokinetik und die Pharmakodynamik zeigten deutliche Unterschiede in Abhängigkeit vom Lebensalter der Patienten. Daher erscheint es sinnvoll, den Einsatz dieses Beta-Rezeptorenblockers in weiteren Studien bei Kindern mit Herzinsuffizienz zu optimieren, um allen pädiatrischen Patienten verschiedener Altersstufen, die unter einer Herzinsuffizienz leiden, diese Therapie zu ermöglichen.

## 6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde eine prospektive, nicht kontrollierte Therapiestudie zum Einsatz von Beta-Rezeptorenblockern in der Behandlung der Herzinsuffizienz im Kindesalter zusätzlich zur Standardmedikation mit Digoxin, Diuretika und ACE-Inhibitoren durchgeführt. Für die Untersuchung wurde der Beta-Rezeptorenblocker Carvedilol gewählt, weil es zu Beginn der Studie der einzige Beta-Rezeptorenblocker war, für den in klinischen Studien bei erwachsenen Patienten mit Herzinsuffizienz eine Reduktion der Morbidität und der Letalität gezeigt worden war.

Die Herzinsuffizienz ist im Kindesalter eine seltene Erkrankung. Die Prognose von pädiatrischen Patienten mit einer dilatativen Kardiomyopathie, einer der häufigsten Formen der Herzinsuffizienz im Kindesalter, ist mit einer Fünf-Jahres-Letalität von etwa 80% sehr schlecht. Sind die Patienten mit der Standardtherapie maximal therapiert, bleibt für sie als letzte Option häufig nur eine Herztransplantation. Um auch Kindern mit Herzinsuffizienz die bei Erwachsenen erfolgreich eingesetzte Therapie mit Beta-Rezeptorenblockern zu ermöglichen, wurden 16 Patienten mit Herzinsuffizienz im Alter von sechs Wochen bis 19 Jahren einschleichend mit Carvedilol therapiert und über sechs Monate untersucht. Um die Therapie mit Carvedilol für diese Patientenpopulation möglichst effektiv und sicher gestalten zu können, wurde bei den pädiatrischen Patienten die Pharmakokinetik und die Pharmakodynamik von Carvedilol bestimmt.

Für die pharmakokinetischen Untersuchungen wurden zwei Plasmakonzentrations-Zeitprofile durchgeführt. Das erste erfolgte nach Gabe der Testdosis (0,09 mg/kg pro Tag) von Carvedilol, das zweite im Fließgleichgewicht nach Erreichen der Zieldosis (2 x 0,35 mg/kg pro Tag), jeweils über ein Dosierungsintervall von zwölf Stunden. Aus den Plasmaproben wurden sowohl die Racematkonzentrationen durch HPLC-Analyse bestimmt als auch die Carvedilol-Enantiomere mithilfe einer Kapillarelektrophoresemethode getrennt. In der Pharmakokinetik von (R, S)-Carvedilol zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen Kindern und Erwachsenen. Die Halbwertszeit war bei den 0,12 bis 3,50 Jahre alten Patienten im Mittel etwa 1,7-fach kürzer als bei den 5,50 bis 19,3 Jahre alten Patienten und mehr als zwei-fach kürzer als bei 24 bis 37 Jahre alten gesunden Erwachsenen ( $2,2 \pm 0,7$  h versus  $3,8 \pm 0,9$  h bzw. versus  $4,8 \pm 1,7$  h; je  $p < 0,05$ , je  $n = 8$ ). Dies war begleitet von einer Abnahme der auf

das Körpergewicht bezogenen Clearance mit zunehmendem Lebensalter ( $r^2 = 0,25$ ;  $p < 0,05$ ,  $n = 16$ ) und einem Anstieg der Fläche unter der Konzentrations-Zeitkurve ( $r^2 = 0,45$ ;  $p < 0,05$ ,  $n = 16$ ). Insgesamt zeigte sich also eine schnellere Ausscheidung von Carvedilol bei den jüngeren pädiatrischen Patienten.

Das an der Metabolisierung von Carvedilol hauptsächlich beteiligte Enzym Zytochrom-P450-2D6 (CYP2D6) weist aufgrund eines genetischen Polymorphismus in der Bevölkerung sehr unterschiedliche Aktivität auf. Daher wurden die Patienten vor Beginn der Therapie bezüglich der Kapazität dieses Enzyms phänotypisiert und genotypisiert. So konnte der Einfluss der Enzymaktivität auf die Pharmakokinetik von Carvedilol untersucht werden. Die metabolische Kapazität von CYP2D6 bestimmte wesentlich die (R, S)-Carvedilol-Exposition ( $r^2 = 0,57$ ;  $p < 0,05$ ,  $n = 13$ ). Innerhalb des Studienkollektivs und auch bei Untersuchung weiterer 57 Probanden im Alter von 0,5 bis 77 Jahren war die Enzymaktivität jedoch unabhängig vom Lebensalter. Die schnellere Ausscheidung von Carvedilol bei den jüngeren Patienten war also nicht durch eine höhere Enzymaktivität begründet. Wahrscheinlich erklärt sich die schnellere Elimination durch ein bei Kindern relativ zum Körpergewicht größeres Lebervolumen, wodurch auch der hepatische Blutfluss in dieser Altersgruppe größer ist als bei älteren Patienten.

Die pharmakodynamischen Untersuchungen ergaben folgende Ergebnisse: Der Einfluss von Carvedilol auf die Herzfrequenz verhielt sich unerwartet. Während bei den jüngeren Patienten bereits in der Aufsättigungsphase innerhalb der ersten zehn Tage der Therapie die Herzfrequenz maximal gesenkt war, zeigte die Herzfrequenz der älteren pädiatrischen Patienten erst nach Gabe der Zieldosis, etwa einen Monat nach Therapiebeginn, eine maximale Senkung. Dies wies auf einen grundsätzlichen altersabhängigen Unterschied in der Pharmakodynamik von Carvedilol hin. Zur Quantifizierung wurden über ein pharmakokinetisch/pharmakodynamisches Modelling nicht nur die (R, S)-Carvedilolkonzentrationen, sondern auch die (S)-Carvedilolkonzentrationen mit den zeitgleich gemessenen Herzfrequenzwerten korreliert, denn die Herzfrequenzreduktion wird maßgeblich durch (S)-Carvedilol hervorgerufen. Es zeigte sich bei den jüngeren Patienten eine etwa dreifach höhere Potenz von (S)- und (R, S)-Carvedilol zur Senkung der Herzfrequenz als bei den älteren Patienten ( $EC_{50}$  (R, S)-Carvedilol =  $3,62 \pm 2,04 \mu\text{g/l}$  versus  $10,8 \pm 1,78 \mu\text{g/l}$ ;  $p < 0,05$ ,  $n = 8$  bzw.  $n = 6$ ). Gleichmaßen wurde auch der Blutdruck mit den (R, S)-Carvedilol-

Konzentrationen korreliert. Die maximale Senkung des Blutdrucks war bei den jüngeren Patienten im Mittel etwa 1,6-fach größer als bei den Kindern und Jugendlichen ( $33,3 \pm 12,1\%$  versus  $20,5 \pm 11,1\%$ ,  $p < 0,05$ , je  $n = 8$ ). Beide pharmakodynamischen Parameter zeigten also altersabhängige Unterschiede.

Sowohl eine frühere Senkung der Herzfrequenz als auch eine größere Abnahme des Blutdrucks können die Auswurfleistung des Herzens beeinflussen. Daher wurden die monatlich echokardiographisch ermittelten Ejektionsfraktionen, die sich insgesamt von  $35 \pm 14\%$  auf  $56 \pm 17\%$  ( $p < 0,05$ , je  $n = 12$ ) besserten, über die sechs Monate der Therapie aufgetragen und zwischen den beiden Altersgruppen verglichen. Dabei zeigte sich ein altersabhängiger Unterschied im Verlauf. Bei den Säuglingen und Kleinkindern war die Ejektionsfraktion bereits nach einem Monat signifikant gegenüber dem Ausgangsbefund angestiegen. Bei den älteren pädiatrischen Patienten zeigte sich der von erwachsenen Patienten bekannte Verlauf. Die Ejektionsfraktion nahm nach einem Monat etwas ab, besserte sich dann im Lauf des zweiten und dritten Monats und war im vierten Monat signifikant höher als der Ausgangswert.

Insgesamt zeigen pädiatrische Patienten mit Herzinsuffizienz unter Carvedilol-Therapie altersabhängige pharmakokinetische und pharmakodynamische Unterschiede. Weil die jüngeren Patienten Carvedilol schneller eliminieren und gut vertragen, kann sowohl die Aufsättigung in kürzeren Zeitabständen erfolgen als auch die Erhaltungsdosis höher als bei Erwachsenen gewählt werden. Bei den jüngeren Patienten senkte Carvedilol die Herzfrequenz früher und den Blutdruck stärker. Ob dieses in Zusammenhang mit der bei ihnen früher auftretenden Verbesserung der Ventrikelfunktion steht, muss in kontrollierten Studien untersucht werden.

## Summary

A prospective clinical trial was carried out for the treatment of congestive heart failure in infants and children with a beta-receptor blocking agent in addition to digoxin, diuretics and angiotensin-converting enzyme inhibitors. The beta-receptorblocker carvedilol was chosen as study drug because at the time this study was initiated it was the only beta-receptorblocker having shown a reduction in morbidity and mortality in clinical trials involving adult patients with congestive heart failure.

Congestive heart failure is a rare disease in infancy. But the prognosis of pediatric patients with dilated cardiomyopathy, one of the most frequent forms of heart failure in infancy, is poor, with a five-year-mortality of about 80%. Often heart transplantation is the last option for patients failing to improve on standard therapy. The treatment of heart failure with a beta-receptor blocker is successfully applied in adults. The aim of the study was to make this innovative therapy available for children as well. Sixteen pediatric patients suffering from congestive heart failure at the age of six weeks to 19 years were treated with increasing doses of carvedilol and were observed and examined for six months. Pharmacokinetic and pharmacodynamic data were studied in order to develop effective and safe dosing regimens for this special patient population.

Two plasma concentration profiles versus time were done to investigate pharmacokinetic parameters. The first profile was carried out directly after application of the first dose of carvedilol (0.09 mg/kg per day), and the second profile was done under steady state conditions after reaching the target dose (2 x 0.35 mg/kg per day), each over a twelve hour dosing interval. (R, S)-Carvedilol concentrations were analysed by HPLC and carvedilol enantiomers were separated by capillary electrophoresis. Pharmacokinetics of (R, S)-Carvedilol showed distinct differences between children and adults. In the patients aged six weeks to 3.5 years, half-life was 1.7 times shorter than in the 5.5- to 19-year-old patients and it was more than twice as short as that of 24- to 37-year-old adults ( $2.2 \pm 0.7$  h versus  $3.8 \pm 0.9$  h or versus  $4.8 \pm 1.7$  h, respectively;  $p < 0,05$ , each,  $n = 8$  in each group). This was accompanied by a decrease of the clearance corrected to body weight ( $r^2 = 0,25$ ;  $p < 0,05$ ,  $n = 16$ ) and an increase of the area under the concentration-time curve with age ( $r^2 = 0,45$ ;

$p < 0,05$ ,  $n = 16$ ). Altogether, carvedilol showed a faster elimination in the young pediatric patients.

The enzyme mainly involved in the metabolism of carvedilol is cytochrome-P450-2D6 (CYP2D6), which is polymorphically expressed giving rise to a great variability of metabolic capacity in the population. Therefore, the patients were phenotyped and genotyped for this enzyme activity before starting carvedilol therapy. The influence of the phenotype of CYP2D6 on carvedilol pharmacokinetics was assessed, showing a significant effect on carvedilol-exposure ( $r^2 = 0,57$ ;  $p < 0,05$ ,  $n = 13$ ). But within the study population no age dependency of the enzyme activity of CYP2D6 was noticed. This result was confirmed by phenotyping an additional 57 persons aged six months to 77 years. Thus, faster elimination of carvedilol in the young patients was not caused by a higher enzyme activity but could be explained by a greater liver volume per body weight and therefore by a higher liver blood flow in this age group.

The pharmacodynamic investigations yielded the following results: The influence of carvedilol on heart rate was unexpected. In the infants and toddlers heart rate was reduced to the minimum level within the phase of uptitration, after only ten days of carvedilol therapy. On the contrary, the maximum dose of carvedilol was required to reduce the older patients' heart rate to the maximum at about one month after the initiation of the carvedilol treatment. This indicated a fundamental age-dependent difference in the pharmacodynamics of carvedilol. To quantify this difference, not only the (R, S)-Carvedilol-concentrations but also the (S)-carvedilol-concentrations were correlated with the heart rate values using pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling, as (S)-carvedilol is substantially responsible for the heart rate lowering effect. The modelling revealed a three times higher potency of (S)- and (R, S)-Carvedilol for heart rate reduction in the younger patients as compared to the older ones ( $EC_{50}$  (R, S)-Carvedilol =  $3,62 \pm 2,04 \mu\text{g/l}$  versus  $10,8 \pm 1,78 \mu\text{g/l}$ ;  $p < 0,05$ ,  $n = 8$  and  $n = 6$ , respectively). In the same way, the (R, S)-Carvedilol-concentrations were correlated with the blood pressure values. The maximal reduction of blood pressure was 1.6 times higher in the infants and toddlers compared to the children and adolescents ( $33,3 \pm 12,1\%$  versus  $20,5 \pm 11,1\%$ ;  $p < 0,05$ ,  $n = 8$ , each). Thus, both pharmacodynamic parameters showed age-dependent differences.

Both an earlier reduction of heart rate and a greater decrease of blood pressure can influence the ejection fraction of the heart. Therefore, the monthly measured ejection fraction, which improved from  $35 \pm 14\%$  to  $56 \pm 17\%$  ( $p < 0.05$ ,  $n = 12$ , each) in all patients, was evaluated over the six months of carvedilol treatment and was compared between the two age groups. In infants and toddlers, it increased significantly during the first month of therapy whereas ejection fraction of children and adolescents exhibited a pattern similar to that of adult patients. One month after the start of the therapy the ejection fraction slightly decreased. During the second and third month it increased to a significant improvement after four months of treatment.

Overall, in pediatric patients with heart failure carvedilol shows age-dependent pharmacokinetic and pharmacodynamic differences. Because carvedilol was quickly eliminated and was well tolerated in the pediatric patients, uptitration of the dose could be performed in shorter intervals and the maintenance dose could be higher than in adults. In the younger patients carvedilol reduced heart rate earlier and reduced blood pressure to a greater extent compared to the older patients. Controlled studies will have to show whether this is linked to the earlier improvement of ventricular function in the younger patients.

## 7. Literaturverzeichnis

- Akaike H (1973) A new look at statistical model identification. *IEEE Trans Automat Contr* 19: 716 – 723
- Akaike H (1976) An information criterion (AIC). *Math Sci* 14: 5 - 9
- Arola A, Jokinen E, Ruuskanen O, Saraste M, Pesonen E, Kuusela AL, Tikanoja T, Paavilainen T, Simell O (1997) Epidemiology of idiopathic cardiomyopathies in children and adolescents. A nationwide study in Finland. *Am J Epidemiol* 146: 385 - 393
- Arola A, Tuominen J, Ruuskanen O, Jokinen E (1998) Idiopathic dilated cardiomyopathy in children: Prognostic indicators and outcome. *Pediatrics* 101: 369 – 376
- Behn F, Läer S, Mir TS, Scholz H (2001-a) Quantification of carvedilol in small plasma volumes from children using high-performance liquid chromatography. *Chromatographia* 53: 641 - 644
- Behn F, Michels S, Läer S, Blaschke G (2001-b) Separation of carvedilol enantiomers in very small volumes of human plasma by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence. *J Chromatogr B* 755: 111 - 117
- Benedict CR (1987) Simultaneous measurement of urinary and plasma norepinephrine, epinephrine, dopamine, dihydroxyphenylalanine and dihydroxyphenylacetic acid by coupled-column HPLC on C8 & C18 stationary phase. *J Chromatogr* 385: 369 - 375
- Bertilsson L (1995) Geographical/interracial differences in polymorphic drug oxidation. Current state of knowledge of cytochromes-P450 (CYP) -2D6 and -2C19. *Clin Pharmacokinet* 29: 192 – 209
- Bristow M, Port JD (1998) Beta-adrenergic blockade in chronic heart failure. *Scand Cardiovasc J Suppl* 47: 45 – 55
- Brockmöller J, Roots I (1994) Assessment of liver metabolic function. Clinical implications. *Clin Pharmacokinet* 27: 216 – 248
- Brodde OE, Zerkowski HR, Schranz D, Broede-Sitz A, Michel-Reher M, Schäfer-Beisenbusch E, Piotrowski JA, Oelert H (1995) Age-dependent changes in the beta-adrenoceptor-G-protein(s)-adenylyl cyclase system in human right atrium. *J Cardiovasc Pharmacol* 26: 20 – 26
- Bruns LA, Chrisant MK, Lamour JM, Shaddy RE, Pahl E, Blume ED, Hallowell S, Addonizio LJ, Canter CE (2001) Carvedilol as therapy in pediatric heart failure: An initial multicenter experience. *J Pediatr* 138: 505 – 511
- CIBIS-II Investigators and Committees (1999) The cardiac insufficiency bisoprolol study II (CIBIS-II): A randomised trial. *Lancet* 353: 9 – 13
- Cohn JN, Levine TB, Olivari MT, Garberg V, Lura D, Francis GS (1984) Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with congestive heart failure. *N Engl J Med* 311: 819 – 823

- Coller JK, Somogyi AA, Bochner F (1998) Quantification of flunitrazepam's oxidative metabolites, 3-hydroxyflunitrazepam and desmethylflunitrazepam, in hepatic microsomal incubations by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B* 719: 87 - 92
- Conroy S, Choonara I, Impicciatore P, Mohn A, Arnell H, Rane A, Knoepfel C, Seyberth H, Pandolfini C, Raffaelli MP, Rocchi F, Bonati M, t'Jong G, de Hoog M, van den Anker J (2000) Survey of unlicensed and off label drug use in paediatric wards in European countries. *BMJ* 320: 79 - 82
- Dittrich M, Milde S, Dinkel E, Baumann W, Weitzel D (1983) Sonographic biometry of liver and spleen in childhood. *Pediatr Radiol* 13: 206 – 211
- Dominguez R (1934) Studies of renal excretion of clearance: II. Volume of distribution. *Proc Soc Exp Biol Med* 31: 1146 - 1150
- Eichhorn EJ, Bristow MR (1996) Medical therapy can improve the biological properties of the chronically failing heart. *Circulation* 94: 2285 – 2296
- Experten-Symposium "Paediatrische Herz- und Lungentransplantation – Standortbestimmung" (1997) [www.med.uni-muenchen.de/kindergh](http://www.med.uni-muenchen.de/kindergh)
- Friedman R, Moak J, Garson A (1991) Clinical course of idiopathic dilated cardiomyopathy in children. *JACC* 18: 152 - 156
- Friis-Hansen B (1971) Body composition during growth: in vivo measurements and biochemical data correlated to differential anatomical growth. *Pediatrics* 47: 264 - 274
- Frishman WH (1998) Drug therapy. Carvedilol. *N Engl J Med* 339: 1759 – 1765
- Funck-Brentano C, Becquemont L, Kroemer HK, Bühl K, Knebel NG, Eichelbaum M, Jaillon P (1994) Variable disposition kinetics and electrographic effects of flecainide during repeated dosing in humans: Contribution of genetic factors, dose-dependent clearance, and interaction with amiodaron. *Clin Pharmacol Ther* 55: 256 – 269
- Gaedigk A, Gotschall RR, Forbes NS, Simon SD, Kearns GL, Leeder JS (1999) Optimization of cytochrome-P450-2D6 (CYP2D6) phenotype assignment using a genotyping algorithm based on allele frequency data. *Pharmacogenetics* 9: 669 - 682
- Garson A (1987) Medicolegal problems in the management of cardiac arrhythmias in children. *Pediatrics* 79: 84 - 88
- Gugeler N, Klotz U (2000) Einführung in die Pharmakokinetik. 2. Auflage, Govi-Verlag, Eschborn, Deutschland, pp: 137 - 140
- Haefeli WE, Bargetzi MJ, Follath F, Meyer UA (1990) Potent inhibition of cytochrome-P450-2D6 (Debrisoquin 4-Hydroxylase) by flecainide in vitro and in vivo. *J Cardiovasc Pharmacol* 15: 776 – 779
- Hallman H, Farnebo LO, Hamberger B, Johnsson G (1978) A sensitive method for the determination of plasma catecholamines using liquid chromatography with electrochemical detection. *Life Sci* 23: 1049 - 1052
- Hamilton W, Morore J, Kinsman J, Spurling R (1931) Studies on the circulation: IV. Further analysis of the injection method, and of changes in hemodynamics under physiological and pathological conditions. *Am J Physiol* 99: 534 - 551

- Hasking JG, Esler MD, Jennings GL, Burton D, Johns JA, Korner PI (1986) Norepinephrine spillover to plasma in patients with congestive heart failure: Evidence of increased overall and cardiorenal sympathetic nervous activity. *Circulation* 73: 615 – 621
- Hill AV (1910) The possible effect of the aggregation of molecules of haemoglobin on its dissociation curve. *J Physiol (London)* 40: iv
- Hochhaus G, Barrett JS, Derendorf H (2000) Evolution of pharmacokinetics and pharmacokinetic/dynamic correlations during the 20th century. *J Clin Pharmacol* 40: 908 – 917
- Holford NHG, Sheiner LB (1981) Understanding the dose-effect relationship: Clinical application of pharmacokinetic-pharmacodynamic models. *Clin Pharmacokinet* 6: 429 – 453
- Hoppu K (1987) Age differences in trimethoprim pharmacokinetics: Need for revised dosing in children? *Clin Pharmacol Ther* 41: 336 – 343
- Iisalo E, Kanto J, Aaltonen L, Mäkelä J (1984) Flunitrazepam as an induction agent in children. A clinical and pharmacokinetic study. *Br J Anaesth* 56: 899 - 902
- International Conference on Harmonisation; E11: Clinical investigation of medicinal products in the pediatric population (2000) Food and Drug Administration, Department of health and human services, Federal Register/Vol. 65, No. 71, Docket No. 00D-1223
- Jacqz-Aigrain E (2000) Vortrag „Pharmacogenetics in pediatrics. Developmental aspects“, „11. international conference on pharmaceutical medicine: Development and investigation for drugs in children“, Berlin
- Jurima-Romet M, Foster BC, Casley WL, Rode A, Vloshinsky P, Huang HS, Geertsens S (1997) CYP2D6-related oxidation polymorphism in a Canadian Inuit population. *Can J Physiol Pharmacol* 75: 165 – 172
- Kearns GL, Reed MD (1989) Clinical pharmacokinetics in infants and children. A reappraisal. *Clin Pharmacokin* 17 (Suppl 1): 29 – 67
- Kilicarslan T, Haining RL, Rettie AE, Busto U, Tyndale RF, Sellers EM (2001) Flunitrazepam metabolism by cytochrome-P450S-2C19 and -3A4. *Drug Metab Dispos* 29: 460 - 465
- Läer S, Wauer I, Behn F, Scholz H, Mir TS, Weil J, Meibohm B, Hulpke-Wette M (2001) Pharmacokinetics of sotalol in different age groups of children with tachycardia. *J Pediatr Pharmacol Ther* 6: 50 - 59
- Lanao JM, Dominguez-Gill A, Málaga S, Cespo M, Nuño F (1982) Modification in the pharmacokinetics of amikacin during development. *Eur J Clin Pharmacol* 23: 155 - 160
- Lange H, Stephan H, Zielmann S, Brandt C, Sonntag H (1992) Hepatische Elimination von Thiopental bei koronarchirurgischen Patienten. *Anaesthesist* 41: 171 - 178
- Laogun AA, Gosling RG (1982) In vivo arterial compliance in man. *Clin Phys Physiol Meas* 3: 201 - 212
- Leeder JS, Adcock K, Gaedigk A, Gotschall R, Wilson JT, Kearns GL (2000) Acquisition of CYP2D6 and CYP3A4 activities in the first year of life. *Clin Pharmacol Ther* 67: 169, OIII-B-3

- Louis W, McNeil JJ, Workman BS, Drummer OH, Conway EL (1987) A pharmacokinetic study of carvedilol (BM 14.190) in elderly subjects: Preliminary report. *J Cardiovasc Pharmacol* 10 (Suppl 11): 89 - 93
- Lundqvist E, Johansson I, Ingelman-Sundberg M (1999) Genetic mechanisms for duplication and multiduplication of the human CYP2D6 gene and methods for detection of duplicated CYP2D6 genes. *Gene* 226: 327 – 338
- Marshall JD, Kearns GL (1999) Developmental pharmacodynamics of cyclosporine. *Clin Pharmacol Ther* 66: 66 – 75
- McPhillips JJ, Schwemer GT, Scott DI, Zinny M, Patterson D (1988) Effects of carvedilol on blood pressure in patients with mild to moderate hypertension. A dose response study. *Drugs* 36: 82 – 91
- Meibohm B, Derendorf H (1997) Basic concepts of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) modelling. *Int J Clin Pharmacol Ther* 35: 401 – 413
- MERIT-HF Study Group (1999) Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL randomised intervention trial in congestive heart failure (MERIT-HF). *Lancet* 353: 2001 – 2007
- Michels S (2000) Promotionsarbeit: „Bestimmung des Arzneistoffes Carvedilol und seiner Metaboliten aus Körperflüssigkeiten durch Kapillarelektrophorese mit Laser-induzierter Fluoreszenzdetektion“, Fachbereich Chemie, Universität Münster, Münster, Deutschland
- Mikus G, Gross AS, Beckmann J, Hertrampf R, Gundert-Remy U, Eichelbaum M (1989) The influence of the sparteine/debrisoquin phenotype on the disposition of flecainide. *Clin Pharmacol Ther* 45: 562 - 567
- Moller E, McIntosh F, Van Slyke D (1929) Studies of urea excretion: II. Relationship between urine volume and the rate of urinary excretion by normal adults. *J Clin Invest* 6: 427 - 434
- Morgan T (1994) Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of carvedilol. *Clin pharmacokinet* 26: 335 – 346
- Murry DJ, Crom WR, Reddick WE, Bhargava R, Evans WE (1995) Liver volume as a determinant of drug clearance in children and adolescents. *Drug Metab Disp* 23: 1110 – 1116
- Nagasawa S, Handa H, Okumura A, Naruo Y, Moritake K, Hayashi K (1979) Mechanical properties of human cerebral arteries. Part 1: Effects of age and vascular smooth muscle activation. *Surg Neurol* 12: 297 - 304
- Nagashima R, O'Reilly RA, Levy G (1969) Kinetics of pharmacologic effects in man: The anticoagulant action of warfarin. *Clin Pharmacol Ther* 10: 22 – 35
- Neugebauer G, Akpan W, von Möllendorff E, Neubert P, Reiff K (1987) Pharmacokinetics and disposition of carvedilol in humans. *J Cardiovasc Pharmacol* 10 (Suppl 11): 85 – 88
- Neugebauer G, Akpan W, Kaufmann B, Reiff K (1990) Stereoselective disposition of carvedilol in man after intravenous and oral administration of the racemic compound. *Eur J Clin Pharmacol* 38 (Suppl 2): 108 – 111

- Neugebauer G, Gabor M, Reiff K (1992) Disposition of carvedilol enantiomers in patients with liver cirrhosis: Evidence for disappearance of stereoselective first-pass extraction. *J Cardiovasc Pharmacol* 19 (Suppl 1): 142 – 146
- O'Hara N, Daul AE, Fesel R, Siekmann U, Brodde OE (1985) Different mechanisms underlying reduced beta<sub>2</sub>-adrenoceptor responsiveness in lymphocytes from neonates and old subjects. *Mech Ageing Dev* 31: 115 – 122
- Oldham HG, Clarke SE (1997) In vitro identification of the human cytochrome-P450 enzymes involved in the metabolism of R(+)- and S(-)-carvedilol. *Drug Metab Disp* 25: 970 – 977
- Packer M, Bristow MR, Cohn JN, Colucci WS, Fowler MB, Gilbert EM, Shusterman NH (1996) The effect of carvedilol on morbidity and mortality in patients with chronic heart failure. *N Engl J Med* 334: 1349 – 1355
- Packer M, Coats AJS, Fowler MB, Katus HA, Krum H, Mohacsi P, Rouleau JL, Tendera M, Castaigne A, Roecker EB, Schultz MK, DeMets DL (2001) Effect of carvedilol on survival in severe chronic heart failure. *N Engl J Med* 344: 1651 - 1658
- Pariente-Khayat A, Tréluyer JM, Rey E, Mokhtari M, Werner E, Jouvét P, d'Athis P, Wood C, Hubert P, Hottelier F, Olive G, Pons G (1999) Pharmacokinetics and tolerance of flunitrazepam in neonates and in infants. *Clin Pharmacol Ther* 66: 136 - 139
- Perloff WH (1986) Physiology of the heart and circulation. In: Swedlow DB, Raphaely RC (eds.) *Cardiovascular problems in pediatric critical care*. New York, Livingstone, pp: 1 - 86
- Perry JC, McQuinn RL, Smith RT, Gothing C, Fredell P, Garson A (1989) Flecainid acetate for resistant arrhythmias in the young: Efficacy and pharmacokinetics. *JACC* 14: 185 - 191
- Press WH, Teukolsky SA, Vetterling WT, Flannery BP (1992) *Numerical recipes in C, the art of scientific computing*. Cambridge University Press, 2. Auflage
- Reiff K (1987) High-performance liquid chromatographic method for the determination of carvedilol and its desmethyl metabolite in body fluids. *J Chromatogr B* 413: 355 - 362
- Ross RD (1992) Grading the severity of congestive heart failure in infants. *Pediatr Cardiol* 13: 72 - 75
- Ruffolo RR, Gellai M, Hieble JP, Willette RN, Nichols AJ (1990) The pharmacology of carvedilol. *Eur J Clin Pharmacol* 38: 82 – 88
- Sachse C, Brockmüller J, Bauer S, Roots I (1997) Cytochrome-P450-2D6 variants in a caucasian population: Allele frequencies and phenotypic consequences. *Am J Hum Genet* 60: 284 – 295
- Schwarz JA, Holz-Slomczyk M, Wartensleben H (1998) Klinische Prüfungen von Arzneimitteln bei Jugendlichen, Kindern, Kleinkindern und Säuglingen. *Pharm Ind* 60: 386 - 394
- Shaddy RE, Tani LY, Gidding SS, Pahl E, Orsmond GS, Gilbert EM, Lemes V (1999) Beta-blocker treatment of dilated cardiomyopathy with congestive heart failure in children: A multi-institutional experience. *J Heart Lung Transplant* 18: 269 – 274

- Shah VP, Midha KK, Dighe S, McGilveray IJ, Skelly JP, Yacobi A, Layloff T, Viswanathan CT, Cook CE, McDowall RD, Pittman KA, Spector S (1992) Analytical methods validation: Bioavailability, bioequivalence, and pharmacokinetic studies. *J Pharmaceut Sci* 81: 309 – 312
- Shargel L, Yu ABC (1993) *Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics*. 3. Auflage, Appleton & Lange, Stamford, Connecticut, USA, pp: 321 - 326
- Sheiner LB (1969) Computer-aided long-term anticoagulation therapy. *Comput Biomed Res* 2: 507 – 518
- Skovranek J, Ostadal B, Pelouch V, Prochazka J (1986) Ontogenetic differences in cardiac sensitivity to verapamil in rats. *Pediatr Cardiol* 7: 25 - 29
- Sorbo S, Hudson RJ, Loomis JC (1984) The pharmacokinetics of thiopental in pediatric surgical patients. *Anaesthesiology* 61: 666 – 670
- Steinberg C, Notterman DA (1994) Pharmacokinetics of cardiovascular drugs in children. *Clin Pharmacokinet* 27: 345 – 367
- Stoschitzky K, Koshucharova G, Lercher P, Maier R, Sakotnik A, Klein W, Liebmann PM, Lindner W (2001) Stereoselective effects of (R)- and (S)-carvedilol in humans. *Chirality* 13: 342 – 346
- The Beta-Blocker Evaluation of Survival Trial Investigators (2001) A trial of the beta-blocker bucindolol in patients with advanced chronic heart failure. *N Engl J Med* 344: 1659 - 1667
- Turner S, Nunn AJ, Fielding K, Choonara I (1999) Adverse drug reactions to unlicensed and off-label drugs on paediatric wards: a prospective study. *Acta Paediatr* 88: 965 - 968
- Varin F, Cubeddu LX, Powell JP (1986) Liquid chromatographic assay and disposition of carvedilol in healthy volunteers. *J Pharm Sci* 75: 1195 - 1197
- von Möllendorff E, Reiff K, Neugebauer G (1987) Pharmacokinetics and bioavailability of carvedilol, a vasodilating beta-blocker. *Eur J Clin Pharmacol* 33: 511 – 513
- Waagstein F, Hjalmarson A, Varnauskas E, Wallentin I (1975) Effect of chronic beta-adrenergic receptor blockade in congestive cardiomyopathy. *Br Heart J* 37: 1022 - 1036
- Wall AM, Gajjar A, Link A, Mahmoud H, Pui CH, Relling MV (2000) Individualized methotrexate dosing in children with relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 14: 221 – 225
- Wynne HA, Cope LH, Mutch E, Rawlins MD, Woodhouse KW, James OFW (1989) The effect of age upon liver volume and apparent liver blood flow in healthy man. *Hepatology* 9: 297 – 301

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits wie folgt publiziert:

## **I. Originalarbeiten**

- Behn F, Läer S, Scholz H (2001) Determination of carvedilol in human cardiac tissue by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr Sci* 39: 121 – 124
- Behn F, Läer S, Mir TS, Scholz H (2001) Quantification of carvedilol in small plasma volumes from children using high-performance liquid chromatography. *Chromatographia* 53: 641 - 644
- Behn F, Michels S, Läer S, Blaschke G (2001) Separation of carvedilol enantiomers in very small volumes of human plasma by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence. *J Chromatogr B* 755: 111 - 117
- Läer S, Wauer I, Behn F, Scholz H, Mir TS, Weil J, Meibohm B, Hulpke-Wette M (2001) Pharmacokinetics of sotalol in different age groups of children with tachycardia. *J Pediatr Pharmacol Ther* 6: 50 – 59
- Läer S, Mir TS, Behn F, Eiselt M, Scholz H, Venzke A, Meibohm B, Weil J (2001) Carvedilol therapy in pediatric patients with congestive heart failure: A study investigating clinical and pharmacokinetic parameters. *Am Heart J*, im Druck

## **II. Vorträge und Poster mit publiziertem Abstract**

- Behn F, Läer S, Mir TS, Scholz H, Weil J (1998) Age related sotalol pharmacokinetics require modified dosage regimens in infants. *Eur J Clin Pharmacol* 54: A7
- Behn F, Läer S, Scholz H, Mir TS, Eiselt M, Venzke A, Weil J, Meibohm B (1999) Carvedilol in children with congestive heart failure – pharmacokinetic parameters. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, Suppl* 359: R 130
- Behn F, Läer S, Scholz H, Mir TS, Weil J, Meibohm B (2000) Heart rate and mean arterial pressure during carvedilol therapy in children of different ages. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, Suppl* 361: R 123
- Behn F, Eiselt M, Läer S, Mir, TS, Scholz H, Weil J (2001) Effects of the beta-adrenoceptor blocker carvedilol in children with myocardial failure. XXXIV International Congress of Physiological Sciences, Christchurch/New Zealand, Abstract Nr 26
- Läer S, Behn F, Scholz H, Mir TS, Eiselt M, Venzke A, Weil J, Meibohm B (1999) Carvedilol in children with congestive heart failure. *Eur J Clin Pharmacol* 55: A30
- Läer S, Behn F, Scholz H, Mir TS, Eiselt M, Weil J (1999) Differences in carvedilol pharmacokinetics between children and adults. *Z Kardiol* 88: 758
- Läer S, Behn F, Scholz H, Mir TS, Eiselt M, Venzke A, Weil J (1999) Carvedilol therapy in infants – dose adjustment due to genetic polymorphism of cytochrome-P450-2D6? *Z Kardiol* 88: 216

- Läer S, Behn F, Wauer I, Hulpke-Wette M, Mir TS, Meibohm B (2000) Pharmacokinetics of sotalol in children with supraventricular tachycardia. *Clin Pharmacol Ther* 67: PII-63, 130
- Mir TS, Eiselt M, Venzke A, Läer S, Behn F, Scholz H, Weil J (1998) Erste klinische Erfahrungen mit dem Beta-Rezeptorenblocker Carvedilol zur Behandlung der Herzinsuffizienz bei Kindern. *Z Kardiol* 87: 770
- Mir TS, Eiselt M, Bahhidai M, Läer S, Behn F, Scholz H, Weil J (1999) Therapie der chronischen Herzinsuffizienz mit Beta-Rezeptorenblockern bei pädiatrischen Patienten am Beispiel von Carvedilol. *Z Kardiol* 88: 758
- Mir TS, Eiselt M, Läer S, Behn F, Venzke A, Scholz H, Weil J (1999) Erweiterte Therapie der Herzinsuffizienz bei pädiatrischen Patienten mit dem Beta-Rezeptorenblocker Carvedilol. *Z Kardiol* 88: 216

## 8. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

A	Bei DNA-Sequenzen: Adenin
A	Bei einem pharmakokinetischen Einkompartimentmodell: y-Achsenabschnitt der extrapolierten Geraden durch die Eliminationsphase, bei einem Zweikompartimentmodell: y-Achsenabschnitt der errechneten Geraden durch die Distributionsphase
ACE	Angiotensin-Konversions-Enzym
alpha	Bei einem pharmakokinetischen Einkompartimentmodell: Geschwindigkeitskonstante der Eliminationsphase; bei einem Zweikompartimentmodell: Geschwindigkeitskonstante der Distributionsphase
AUC	Fläche unter der Plasmakonzentrations/Zeitkurve eines Wirkstoffs (englisch: <i>area under the curve</i> )
AUMC	Fläche unter der Momentkurve (englisch: <i>area under the first moment curve</i> )
B	y-Achsenabschnitt der extrapolierten Geraden durch die Eliminationsphase
beta	Geschwindigkeitskonstante der Eliminationsphase
BsaA I	Restriktionsenzym aus <i>Bacillus stearothermophilus A</i>
bp	Basenpaare
BstN I	Restriktionsenzym aus <i>Bacillus stearothermophilus N</i>
C	Bei DNA-Sequenzen: Cytosin
C	Plasmakonzentration
C <sub>e</sub>	Konzentration im hypothetischen Effektkompartiment
C <sub>max</sub>	Maximale Plasmakonzentration eines Wirkstoffs innerhalb eines Dosierungsintervalls
Carvedilol	Racemat aus (R)-(+)- und (S)-(-)-Carvedilol
CE-LIF	Kapillarelektrophorese mit Laser-induzierter Fluoreszenzdetektion
CH	Schweiz
CL	Totale Körperclearance aus Plasma
CN	Cyano-Propyl
C. V.	Variationskoeffizient
CYP2D6	Enzym Zytochrom-P450-2D6
D	Dosis
D	Als Länderbezeichnung: Deutschland
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure

## Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

---

dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate, Gemisch zu gleichen Anteilen aus Adenosin-5'-triphosphat, Cytidin-5'-triphosphat, Guanosin-5'-triphosphat, Thymidin-5'-triphosphat
E	Effekt
E <sub>max</sub>	Maximaler Effekt (Effektivität des Arzneistoffs)
EC <sub>50</sub>	Plasmakonzentration, die zum halbmaximalen Effekt führt (Potenz des Arzneistoffs)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	Ejektionsfraktion
f	Bioverfügbarkeit
G	Guanin
GB	Großbritannien
°C	Grad Celsius
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Doppeltdestilliertes Wasser, bei molekularbiologischen Arbeiten aqua ad iniectabilia
HF	Herzfrequenz
Hha I	Restriktionsenzym aus <i>Haemophilus haemolyticus</i>
HLH	Hypoplastisches Linksherzsyndrom (englisch: <i>hypoplastic left heart</i> )
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (englisch: <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
ILS	Lebergrößenindex (englisch: <i>index of liver size</i> )
J	Japan
k <sub>a</sub>	Absorptionsgeschwindigkeitskonstante
k <sub>e</sub>	Eliminationsgeschwindigkeitskonstante
k <sub>e0</sub>	Geschwindigkeitskonstante vom pharmakokinetischen Kompartiment in das hypothetische Effektkompartiment
KG	Körpergewicht
l	Liter
MAD	Mittlerer arterieller Druck
Mbo II	Restriktionsenzym aus <i>Moraxella bovis</i>
MeOH	Methanol
MI	Mitralklappeninsuffizienz
min	Minuten
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
MRT	Mittlere Verweildauer (englisch: <i>mean residence time</i> )

## Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

---

MW	Arithmetischer Mittelwert
n	Anzahl
NaOH	Natriumhydroxid
NYHA	Klassifikation des Schweregrads der Herzinsuffizienz nach der <i>New York Heart Association</i> (NYHA I-IV)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (englisch: <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerasekettenreaktion
PD	Pharmakodynamik
PK	Pharmakokinetik
PK/PD	Pharmakokinetisch/pharmakodynamisch
%	Prozent
psi	<i>Pounds per square inch</i>
Pwo	Polymerase aus <i>Pyrococcus wosei</i>
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat (englisch: <i>sodium dodecyl sulphate</i> )
ss	Fließgleichgewicht (englisch: <i>steady state</i> )
T	Thymin
t	Zeitpunkt nach Arzneimittelapplikation
t <sub>½</sub>	Terminale Eliminationshalbwertszeit
t <sub>lag</sub>	Verzögerungszeit zwischen Medikamenteneinnahme und Plasmakonzentrationsanstieg
Taq	Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
t <sub>max</sub>	Zeitpunkt nach Medikamenteneinnahme bei Erreichen der maximalen Plasmakonzentration des Wirkstoffs
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U/min	Umdrehungen pro Minute
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
V	Verteilungsvolumen
V/V	Volumen pro Volumen
VSD	Ventrikelseptumdefekt
wt	Wildtyp

Als pharmakokinetische Symbole wurden die von Gugeler und Klotz empfohlenen neuen pharmakokinetischen Standardsymbole verwendet (Gugeler und Klotz, 2000).

## 9. Anhang

### Ergebnistabellen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind zur Übersicht im Folgenden in tabellarischer Form zusammengefasst. Jede Tabelle ist mit dem entsprechenden Kapitel des Ergebnisteils und der dazugehörigen Abbildung gekennzeichnet.

### Inhaltsverzeichnis der Ergebnistabellen

<b>Tabelle 8:</b>	Pharmakokinetische Parameter von (R, S)-Carvedilol (Kapitel 4.2, 4.3; Abbildungen 11 und 14)	117
<b>Tabelle 9</b>	Pharmakokinetische Parameter von (S)-Carvedilol (Kapitel 4.7; nicht dargestellt)	118
<b>Tabelle 10</b>	Phänotypisierung und Genotypisierung für das Enzym Zytochrom-P450-2D6 (Kapitel 4.4; Abbildungen 12, 13, 14 und 15)	119
<b>Tabelle 11</b>	Lebergrößenindices (Kapitel 4.5; Abbildung 16)	119
<b>Tabelle 12</b>	Herzfrequenz und mittlerer arterieller Blutdruck vor Therapiebeginn und bei maximal erreichter Senkung (Kapitel 4.6, 4.8; nicht dargestellt)	120
<b>Tabelle 13</b>	Potenz und Wirkstärke von (S)-Carvedilol bzw. (R, S)-Carvedilol für die Herzfrequenzsenkung und die Blutdrucksenkung (Kapitel 4.8; Abbildungen 24 und 25)	121
<b>Tabelle 14</b>	Ejektionsfraktion (Kapitel 4.9; Abbildung 26)	122
<b>Tabelle 15</b>	Klinische Parameter, PlasmanoradrenalinKonzentrationen, Fläche unter der Plasmakonzentrations-Zeitkurve und Talspiegel unter Zieldosis, unerwünschte Wirkungen (Kapitel 4.9; nicht dargestellt)	123

## Tabellen

Patient/ Proband	Alter [Jahre]	C <sub>max</sub> [µg/l]	t <sub>max</sub> [h]	AUC <sub>0-∞</sub> [µg*h/l]	t <sub>1/2</sub> [h]	MRT [h]	CL(KG*f) [ml/(min*kg)]	V/(KG*f) [l/kg]
P1	0,12	21,30	0,5	30,6	1,0	1,5	47,5	4,2
P2	0,13	6,81	0,5	33,9	2,2	3,5	44,2	8,5
P3	0,15	2,48	2,5	10,9	1,9	4,0	133,8	22,0
P4	0,50	12,25	0,5	31,2	2,6	3,6	46,3	10,4
P5	0,75	5,63	0,8	19,1	3,6	4,3	78,7	24,2
P6	1,25	28,38	0,5	74,4	2,4	2,7	20,0	4,2
P7	1,50	14,42	1,0	39,9	2,4	3,2	37,3	7,8
P8	3,50	24,36	0,5	39,2	1,8	2,2	39,0	6,1
MW	0,99	14,45	0,9	34,9*	2,2* <sup>#</sup>	3,1 <sup>#</sup>	55,9*	10,9
SD	1,14	9,44	0,7	18,8	0,7	0,9	35,5	7,8
P9	5,50	16,82	0,5	52,0	3,4	3,7	28,5	8,4
P10	7,50	15,34	0,5	37,3	2,9	3,4	44,2	10,9
P11	8,25	9,53	0,5	36,7	4,9	4,7	40,8	17,2
P12	11,6	31,74	0,8	67,1	2,2	3,0	22,7	4,4
P13	11,8	11,80	0,5	33,7	4,3	4,4	45,7	15,5
P14	17,5	36,40	0,5	101,3	4,5	4,0	14,8	5,0
P15	17,8	16,43	0,5	46,7	4,5	4,9	35,4	7,2
P16	19,3	35,55	0,5	90,1	3,4	3,6	16,5	5,0
MW	12,4	21,70	0,5	58,1	3,8	4,0 <sup>#</sup>	31,8	9,2
SD	5,3	11,00	0,1	25,7	0,9	0,7	12,3	4,9
E1	24	11,49	1,0	53,9	6,5	6,6	27,8	15,7
E2	24	4,15	0,5	16,7	6,9	7,6	90,0	53,6
E3	25	17,38	0,5	60,2	2,2	3,2	28,3	5,4
E4	27	7,53	1,0	28,6	5,1	5,3	52,3	23,3
E5	34	9,16	0,8	57,0	5,4	7,1	26,3	12,3
E6	35	18,30	2,5	102,0	5,6	6,6	18,0	8,8
E7	35	9,53	0,8	30,3	3,5	4,1	49,5	14,9
E8	37	3,51	2,0	20,0	3,3	5,4	79,0	22,9
MW	30	10,13	1,1	46,1	4,8	5,7	46,4	19,6
SD	5	5,46	0,7	28,3	1,7	1,5	26,4	15,1

**Tabelle 8** Pharmakokinetische Parameter von (R, S)-Carvedilol (maximale Plasmakonzentration (C<sub>max</sub>), Zeit bis zum Erreichen von C<sub>max</sub> (t<sub>max</sub>), Fläche unter der Plasmakonzentrations-Zeitkurve ab Einnahme bis zur vollständigen Ausscheidung (AUC<sub>0-∞</sub>), Halbwertszeit (t<sub>1/2</sub>), mittlere Verweildauer (MRT), orale Clearance (CL) und Verteilungsvolumen (V) pro Körpergewicht (KG) und Bioverfügbarkeit (f) nach Einnahme einer Testdosis (0,09 mg/kg) der jüngeren (P1 – P8) und der älteren (P9 – P16) pädiatrischen Patienten und der erwachsenen Probanden (E1 – E8). MW = arithmetischer Mittelwert, SD = Standardabweichung, \* p < 0,05: signifikant versus Mittelwert der älteren pädiatrischen Patienten, <sup>#</sup> p < 0,05: signifikant versus Mittelwert der erwachsenen Probanden.

Patient/ Proband	Alter [Jahre]	C <sub>max</sub> [µg/l]	t <sub>max</sub> [h]	AUC <sub>0-∞</sub> [µg*h/l]	t <sub>1/2</sub> [h]	MRT [h]	CL(KG*f) [ml/(min*kg)]	V/(KG*f) [l/kg]
P1	0,12	3,48	0,5	7,5	2,3	3,4	5,8	19,5
P2	0,13	2,79	1,0	10,8	2,1	4,0	4,1	12,4
P3	0,15	0,99	2,5	5,2	2,3	n. e.	8,5	15,4
P4	0,50	2,59	0,5	7,7	2,6	3,8	5,7	21,1
P5	0,75	1,91	0,8	7,1	2,4	3,6	6,1	20,9
P6	1,25	7,33	0,8	19,8	1,8	3,2	2,3	5,9
P7	1,50	4,06	1,0	11,3	2,1	3,5	4,0	11,7
P8	3,50	5,09	0,5	9,4	3,1	2,9	4,9	22,0
MW	0,99	3,53	0,9	9,8* <sup>#</sup>	2,3* <sup>#</sup>	3,5* <sup>#</sup>	5,2	16,1
SD	1,14	1,99	0,7	4,5	0,4	0,4	1,9	5,8
P9	5,50	6,54	0,8	20,2	1,8	3,2	2,2	5,6
P10	7,50	3,42	0,8	9,3	3,0	3,8	5,3	22,9
P11	8,25	2,95	0,5	10,9	3,5	4,6	4,1	20,9
P12	11,6	6,79	0,8	n. e.	n. e.	n. e.	n. e.	n. e.
P13	11,8	3,20	0,8	11,2	3,8	5,5	4,1	22,2
P14	17,5	12,4	0,5	29,3	5,0	4,8	1,4	10,3
P15	17,8	3,82	0,8	14,9	4,9	6,7	3,0	21,4
P16	19,3	12,2	0,5	34,6	2,7	4,8	1,3	5,1
MW	12,4	6,41	0,6	18,6	3,5 <sup>#</sup>	4,8 <sup>#</sup>	3,1	15,5
SD	5,3	3,92	0,1	9,9	1,2	1,1	1,5	8,2
E1	24	3,48	1,0	18,5	6,1	7,1	2,4	21,3
E2	24	1,60	0,5	11,3	7,2	10,4	4,0	41,3
E3	25	5,25	1,0	17,3	4,3	4,7	3,0	18,3
E4	27	1,58	0,5	10,5	7,3	8,9	4,3	45,6
E6	35	5,59	2,5	32,8	10,2	11,1	1,7	24,7
E7	35	3,55	0,5	17,0	6,9	8,5	2,7	27,2
E8	37	0,81	1,5	9,8	7,8	12,0	4,8	54,1
MW	30	3,12	1,1	16,7	7,1	9,0	3,3	33,2
SD	6	1,87	0,7	7,9	1,8	2,5	1,1	13,7

**Tabelle 9** Pharmakokinetische Parameter von (S)-Carvedilol (maximale Plasmakonzentration (C<sub>max</sub>), Zeit bis zum Erreichen von C<sub>max</sub> (t<sub>max</sub>), Fläche unter der Plasmakonzentrations-Zeitkurve ab Einnahme bis zur vollständigen Ausscheidung (AUC<sub>0-∞</sub>), Halbwertszeit (t<sub>1/2</sub>), mittlere Verweildauer (MRT), orale Clearance (CL) und Verteilungsvolumen (V) pro Körpergewicht (KG) und Bioverfügbarkeit (f) nach Einnahme einer Testdosis (0,09 mg/kg) der jüngeren (P1 – P8) und der älteren (P9 – P16) pädiatrischen Patienten und der erwachsenen Probanden (E1 – E8). MW = arithmetischer Mittelwert, SD = Standardabweichung, n. e. = Werte konnten nicht ermittelt werden, \* p < 0,05: signifikant versus Mittelwert der älteren pädiatrischen Patienten, <sup>#</sup> p < 0,05: signifikant versus Mittelwert der erwachsenen Probanden.

<b>A</b>				<b>B</b>			
Patient	Alter [Jahre]	MR	GT	Proband	Alter [Jahre]	MR	GT
P1	0,12	n. e.	n. e.	E1	24	-2,7	wt/*2
P2	0,13	n. e.	wt/wt	E2	25	-2,7	wt/wt
P3	0,15	n. e.	n. e.	E3	25	-2,5	*2/*2
P4	0,50	-2,7	wt/*2	E4	27	-2,7	*2/*2
P5	0,75	-3,0	wt/*2	E5	34	-2,2	*2/*4
P6	1,25	-2,4	wt/wt	E6	35	-1,6	*2/*4
P7	1,50	-3,0	*2/*5	E7	35	-3,0	wt/*2
P8	3,50	-3,0	wt/*2	E8	37	-3,1	*2/*2
P9	5,50	-2,1	wt/wt	MW	30,4	-2,6	-
P10	7,50	-2,4	wt/*3	SD	5,6	0,5	-
P11	8,25	-2,5	wt/wt				
P12	11,6	-1,7	*2/*9				
P13	11,8	-2,4	wt/*2				
P14	17,5	-2,1	*2/*4				
P15	17,8	-2,4	wt/*4				
P16	19,3	-2,2	wt/*4				
MW	6,7	-2,5	-				
SD	6,9	0,4	-				

**Tabelle 10** Ergebnisse der Phänotypisierung und der Genotypisierung für das Enzym Zytochrom-P450-2D6 (CYP2D6) **A** der 16 pädiatrischen Patienten (P) und **B** der acht erwachsenen, gesunden Probanden (E), bei denen auch die Pharmakokinetik von Carvedilol untersucht wurde. MR = metabolische Kapazität für CYP2D6, GT = Genotyp für CYP2D6, n. e. = Daten konnten nicht ermittelt werden, wt = Wildtyp, \*x = Mutation, MW = arithmetischer Mittelwert, SD = Standardabweichung.

Patient	Alter [Jahre]	AAL [cm]	MCL [cm]	STL [cm]	ILS [l]	KG [kg]	ILS/KG [l/kg]
P1	0,12	6,95	6,03	4,17	26,72	5,8	4,61
P3	0,15	6,73	7,13	4,66	30,85	7,5	4,11
P5	0,75	8,23	9,24	6,21	50,18	12,4	4,05
P7	1,50	7,67	8,88	7,71	51,61	12,8	4,03
P11	8,25	11,85	9,93	6,05	72,16	26,0	2,78

**Tabelle 11** Werte für die Länge der vorderen Axillarlinie (AAL), der Medioclavicularlinie (MCL) und der Sternallinie (STL) der Leber und die daraus berechneten Lebergrößenindices (ILS) für fünf pädiatrische Patienten (P) unterschiedlichen Alters. KG = Körpergewicht.

Patient	Alter [Jahre]	HF [Schläge/min]		MAD [mmHg]	
		vor	min	vor	min
P1	0,12	128	97	54	44
P2	0,13	160	133	74	58
P3	0,15	149	125	67	57
P4	0,50	133	121	74	61
P5	0,75	125	110	68	53
P6	1,25	150	116	79	58
P7	1,50	130	111	87	55
P8	3,50	93	76	74	53
P9	5,50	94	77	80	70
P10	7,50	n. e.	n. e.	71	61
P11	8,25	n. e.	n. e.	73	65
P12	11,6	100	85	81	69
P13	11,8	71	60	64	61
P14	17,5	105	76	91	83
P15	17,8	82	70	77	63
P16	19,3	85	66	60	57

**Tabelle 12** Herzfrequenz und mittlerer arterieller Blutdruck vor Therapiebeginn (HF vor, MAD vor) und bei maximal erreichter Senkung unter Carvedilol-Therapie (HF min, MAD min) der pädiatrischen Patienten (P). Die Messungen von Herzfrequenz und Blutdruck erfolgten jeweils morgens um acht Uhr und unter Carvedilol-Therapie vor Gabe des Medikaments. n. e. = Werte konnten nicht ermittelt werden.

Patient	Alter [Jahre]	EC <sub>50</sub> HF,SC [µg/l]	E <sub>max</sub> HF,SC [%]	EC <sub>50</sub> HF,C [µg/l]	E <sub>max</sub> HF,C [%]	EC <sub>50</sub> MAD [µg/l]	E <sub>max</sub> MAD [%]
P1	0,12	2,56	10,7	2,12	10,1	12,4	48,1
P2	0,13	0,24	17,4	2,03	19,8	7,03	33,5
P3	0,15	0,75	19,3	1,51	17,8	5,23	53,6
P4	0,50	n. e.	n. e.	4,99	11,9	2,38	23,4
P5	0,75	0,62	29,4	1,34	23,3	2,21	26,9
P6	1,25	3,68	28,7	5,96	21,9	8,36	28,7
P7	1,50	0,52	13,0	5,97	33,7	2,98	33,8
P8	3,50	2,49	38,0	5,01	30,6	4,02	18,3
MW	0,99	1,55*	22,4	3,62*	21,1	5,58	33,3*
SD	1,14	1,34	9,93	2,04	8,22	3,53	12,1
P9	5,50	n. e.	n. e.	10,3	18,2	3,01	12,1
P10	7,50	n. e.	n. e.	n. e.	n. e.	3,46	22,3
P11	8,25	n. e.	n. e.	n. e.	n. e.	3,12	18,1
P12	11,6	5,84	13,1	9,61	5,73	9,50	27,9
P13	11,8	6,62	28,8	10,3	24,7	0,70	8,54
P14	17,5	9,53	40,0	14,4	25,8	2,01	12,4
P15	17,8	10,3	n. e.	10,1	31,9	5,00	19,1
P16	19,3	7,91	20,9	10,1	17,4	5,00	43,3
MW	12,4	8,04	25,7	10,8	20,6	3,98	20,5
SD	5,3	1,88	11,5	1,78	9,04	2,65	11,1

**Tabelle 13** Potenz (EC<sub>50</sub>) und maximale Wirkstärke (E<sub>max</sub>) von (S)-Carvedilol für die Herzfrequenzsenkung (HF) und von (R, S)-Carvedilol für die Blutdrucksenkung (MAD) bei den jüngeren Patienten im Alter von 0,12 - 3,50 Jahren (P1 - P8) und den älteren Patienten im Alter von 5,50 - 19,3 Jahren (P9 - P16). n. e. = Werte konnten nicht ermittelt werden, MW = arithmetischer Mittelwert, SD = Standardabweichung, \* p < 0,05: signifikant gegenüber Mittelwert der älteren Patienten.

Patient	Alter [Jahre]	Ejektionsfraktion [%]						
		vor	1	2	3	4	5	6
P1	0,12	48	61	71	69	72	72	80
P3	0,15	25	32	59	41	47	47	47
P5	0,75	11	25	25	22	21	23	51
P6	1,25	34	41	60	63	47	50	59
P7	1,50	17	32	32	31	24	28	27
P8	3,50	48	48	63	60	66	75	75
MW		31	40*	52*	48*	46*	49*	57*
SD		14	12	17	17	19	20	18
P10	7,50	49	30	53	66	73	76	75
P11	8,25	21	7	20	20	28	46	64
P12	11,6	49	39	61	-	54	54	53
P13	11,8	47	48	50	71	55	55	55
P14	17,5	35	52	59	57	54	48	59
P16	19,3	33	23	25	35	41	30	30
MW	13,4	39	33	45	50	51*	52*	56*
SD	4,8	10	15	16	19	14	14	14

**Tabelle 14** Werte der Ejektionsfraktion vor Beginn der Therapie mit Carvedilol (vor) und über die sechs Monate (1 – 6) unter Therapie aller zwölf pädiatrischer Patienten, die über sechs Monate therapiert wurden. Zusätzlich sind die monatlichen arithmetischen Mittelwerte (MW) und die Standardabweichungen (SD) der Altersgruppe der sechs jüngeren Patienten (P1 - P8) im Alter von 0,12 - 3,50 Jahren und der sechs älteren pädiatrischen Patienten (P10 - P16) im Alter von 7,50 - 19,3 Jahren angegeben. \*  $p < 0,05$  gegenüber dem Mittelwert des Vorbefunds der jeweiligen Altersgruppe.

Patient	Alter [Jahre]	Ross/NYHA		NA [ng/l]		AUC <sub>ss,0-12</sub> [µg*h/l]	C <sub>12h</sub> [µg/l]	UAW
		vor	nach	vor	nach			
P1	0,12	3	1	841	243	84,1	1,06	Blutdruckabfall
P2	0,13	6	6	486	514	74,1	0,78	Keine
P3	0,15	3	1	n. e.	n. e.	65,6	0,93	Keine
P4	0,50	8	8	1689	n. e.	129,6	1,26	Keine
P5	0,75	3	1	524	455	n. e.	0,65	Keine
P6	1,25	3	1	1204	491	192,3	1,53	Müdigkeit
P7	1,50	10	6	910	208	101,6	1,13	Keine
P8	3,50	3	1	369	511	146,2	2,56	Keine
P9	5,50	3	n. e.	231	n. e.	n. e.	2,11	Keine
P10	7,50	5	0	232	267	123,9	3,21	Keine
P11	8,25	7	3	650	373	94,3	2,90	Keine
P12	11,6	4	3	819	522	234,6	4,41	Benommenheit
P13	11,8	2	2	472	204	96,7	2,44	Keine
P14	17,5	II	II	281	399	625,8	20,7	Sehstörungen
P15	17,8	II	n. e.	635	240	94,4	2,61	Keine
P16	19,3	III	III	355	183	325,9	5,41	Sehstörungen
MW	14,4	4,6	2,8*	647	355*	170,7 <sup>#</sup>	3,51 <sup>#</sup>	-
SD	4,4	2,3	2,5	401	134	149,4	5,49	-

**Tabelle 15** Klinische Parameter (Bewertungsskala nach Ross (arabische Zahlen), NYHA-Klassifikation (römische Zahlen): Ross/NYHA) und Plasmanoradrenalin-konzentrationen (NA) vor (vor) und nach sechs-monatiger Carvedilol-Therapie (nach), Fläche unter der Plasmakonzentrations-Zeitkurve von (R, S)-Carvedilol über ein Dosierungsintervall (AUC<sub>ss,0-12</sub>) und Talspiegelkonzentrationen von (R, S)-Carvedilol (C<sub>12h</sub>) jeweils im Fließgleichgewicht nach Einnahme der Zieldosis von 0,35 mg/kg Carvedilol und unerwünschte Wirkungen (UAW) unter der Carvedilol-Therapie bei den 16 pädiatrischen Patienten (P). MW = arithmetischer Mittelwert, SD = Standardabweichung, n. e. = Werte konnten nicht ermittelt werden, \* p < 0,05 signifikant gegenüber dem Ausgangsbefund vor Beginn der Therapie mit Carvedilol, <sup>#</sup> p < 0,05 signifikanter Anstieg im Altersverlauf.

## **Erklärung**

An Eides statt versichere ich, dass ich die der Universität Hamburg zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

### **Pharmakokinetik, Pharmakodynamik und Pharmakogenetik von Carvedilol in Abhängigkeit vom Lebensalter bei pädiatrischen Patienten mit Herzinsuffizienz**

in der Abteilung für Pharmakologie des Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Scholz ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

## Lebenslauf

- 04.03.1973 Geboren als Tochter von Margret Behn, geb. Sprick, und Bruno Behn in Hamburg
- 1979 – 1983 Besuch der Grundschule Müssenredder, Hamburg
- 1983 – 1992 Besuch des Albert-Schweizer-Gymnasiums, Hamburg
- 05/1992 Abitur
- 1992 – 1996 Studium der Pharmazie an der Universität Hamburg
- 09/1994 Erstes pharmazeutisches Staatsexamen
- 10/1996 Zweites pharmazeutisches Staatsexamen
- 12/1996 – 11/1997 Pharmazeutisches Praktikum
- 12/96 – 05/97 Pharmacie de l'hôpital neuro-cardiologique de Lyon, Frankreich
- 06/97 – 11/97 Mannstein Apotheke, Hamburg
- 01/1998 Drittes pharmazeutisches Staatsexamen und Approbation als Apothekerin
- 01/1998 – 02/2001 Experimentelle Arbeiten in der Abteilung für Pharmakologie des Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. S. Läer unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Scholz und unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. D. Geffken aus dem Institut für Pharmazie der Universität Hamburg
- 12/1998 Gastaufenthalt an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität in Greifswald in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. H. K. Kroemer, molekularbiologische Arbeiten
- 02/1999 und 06/1999 Gastaufenthalt im College of Pharmacy an der University of South Carolina, Columbia, South Carolina, USA, in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. B. Meibohm, pharmakokinetische Analysen und pharmakokinetisch/pharmakodynamisches Modelling
- 06/2000 und 08/2000 Gastaufenthalt im Institut für Pharmazeutische Chemie der Universität Münster in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. G. Blaschke, Enantiomerentrennung mittels Kapillarelektrophorese

## **Danksagungen**

Herrn Prof. Dr. Hasso Scholz möchte ich sehr herzlich danken für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie in der Abteilung für Pharmakologie durchzuführen, und für die fortwährende Förderung und Unterstützung meiner wissenschaftlichen Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Detlef Geffken danke ich sehr für die Betreuung meiner Arbeit im Fachbereich Chemie.

Für die Ermöglichung der Untersuchungen in der Abteilung für Kinderkardiologie, für die freundliche, offene Aufnahme auf der Station und die Möglichkeit, an den Chefarztvisiten teilzunehmen, möchte ich Herrn Prof. Dr. Jochen Weil danken.

Ganz herzlich danke ich Frau Dr. Stephanie Lær für die Überlassung dieses spannenden Themas, für ihre kontinuierliche Unterstützung, Motivation und Förderung und die vielfältigen Möglichkeiten und zahlreichen anregenden Kontakte im In- und Ausland im Rahmen meiner Arbeit.

Herr Dr. Tom Mir und Herr Dr. Michele Eiselt haben die Patienten auf der Kinderherzstation betreut und die echokardiographischen Untersuchungen durchgeführt. Dafür einen herzlichen Dank.

Auch den weiteren Ärzten und den Schwestern der kinderardiologischen Abteilung bin ich sehr dankbar für die Zusammenarbeit und ihre Geduld im stressigen Klinikalltag.

Mein ganz besonderer Dank gilt auch den freiwilligen Probanden und den Eltern der Patienten für ihr Verständnis, ihre Bereitschaft und Geduld. Den Patienten der Studie wünsche ich alles Gute für ihre Zukunft.

Bei Herrn Prof. Dr. Bernd Meibohm möchte ich mich sehr herzlich für die Einführung in die Methoden der pharmakokinetischen und pharmakokinetisch/-dynamischen Auswertungen und für die angenehme Zusammenarbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. G. Blaschke danke ich für die Ermöglichung und die Unterstützung der Arbeiten mit der Kapillarelektrophoreseanlage in seinem Institut.

Die molekularbiologischen Arbeiten wurden ermöglicht durch die Kooperation mit Herrn Prof. Dr. H. K. Kroemer, dem ich hierfür danke.

Ich danke Antje Heilemann, Thomas Meyer, Sönke Lentz und meinen Eltern für die aufmerksame Durchsicht der Arbeit und für die hilfreichen Kommentare und Anregungen.

Der Deutschen Stiftung für Herzforschung gilt mein Dank für die finanzielle Unterstützung der Arbeit.