



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Non-invasive monitoring of pharmacokinetics and pharmacodynamics for pharmacological drug profiling in children and adolescents**

Schrier, L.

### **Citation**

Schrier, L. (2015, April 15). *Non-invasive monitoring of pharmacokinetics and pharmacodynamics for pharmacological drug profiling in children and adolescents*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/32719>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/32719>

**Note:** To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/32719> holds various files of this Leiden University dissertation

**Author:** Schrier, Lenneke

**Title:** Non-invasive monitoring of pharmacokinetics and pharmacodynamics for pharmacological drug profiling in children and adolescents

**Issue Date:** 2015-04-15

# Samenvatting

## *Summary in Dutch*

Dit proefschrift beschrijft de mogelijke rol van het non-invasief meten van farmacokinetiek en farmacodynamiek tijdens het onderzoek naar en de ontwikkeling van geneesmiddelen met een stimulerend of onderdrukkend effect op het centrale zenuwstelsel bij kinderen en adolescenten. Allereerst hebben wij in twee studies met psychostimulantia (cafeïne en methylfenidaat) de uitvoerbaarheid van het gebruiken van speeksel als een alternatief voor plasma onderzocht. Ten tweede zijn neuropsychologische en neurofysiologische functies longitudinaal gemeten met de NeuroCart, een testbatterij die door het Centre for Human Drug Research (CHDR, Leiden, Nederland) is ontwikkeld en non-invasieve testen bevat voor alertheid, visuomotorische coördinatie, motorische controle, geheugen en subjectieve geneesmiddeleffecten. Gebruikmakend van non-invasieve methoden zijn leeftijdsafhankelijke verschillen tussen gezonde adolescenten en volwassenen in de farmacokinetiek en farmacodynamiek van alcohol onderzocht. Dit proefschrift sluit af met de rapportage van de resultaten van twee klinische studies gericht op het evalueren van leeftijdsgeschiedte toedieningsvormen van sedativa die mogelijk bij kinderen toegepast kunnen worden.

### HOOFDSTUK 1: INTRODUCTIE

De medicamenteuze behandeling van kinderen en adolescenten met aandoeningen van het centrale zenuwstelsel heeft vanouds het ontwikkelprogramma bij volwassenen gevolgd. Vanwege verschillen in de neuropsychopathologie en ontwikkelingsspecifieke verschillen in de farmacokinetiek en/of farmacodynamiek kan de relatie tussen geneesmiddeleffect en geneesmiddelblootstelling bij kinderen echter niet altijd volledig worden begrepen door extrapolatie van informatie die is verkregen bij volwassen patiënten. Om deze reden is het belangrijk om leeftijdsafhankelijke verschillen in de farmacokinetiek en farmacodynamiek nader te onderzoeken. Helaas is ons begrip van deze verschillen bijna volledig gebaseerd op diermodellen. Bovendien loopt de registratie van geneesmiddelen met een effect op het centrale zenuwstelsel bij kinderen en adolescenten achter bij nieuwe ontwikkelingen bij volwassenen. Deze situatie wordt nog verder gecompliceerd door het dalen van het aantal registraties van nieuwe geneesmiddelen voor psychiatrische en neurologische indicaties bij volwassenen.

Ondanks bovengenoemde factoren is het aantal kinderen en adolescenten dat wordt behandeld met geneesmiddelen met een effect op het centrale zenuwstelsel alsmede de duur van blootstelling aan deze geneesmiddelen de afgelopen decennia fors toegenomen. Recente Europese wetgeving (de 'EU *Pediatric Regulation*', de Europese pediatrie Verordening) zal waarschijnlijk leiden tot een toename in het aantal studies bij kinderen en tot specifieke aanpassingen in de productbeschrijving van geneesmiddelen, doseringsadviezen en leeftijdsgeschikte toedieningsvormen. Er zijn verschillende uitdagingen naar voren gekomen tijdens het werken binnen het raamwerk van deze nieuwe wetgeving en er bestaat een dringende behoefte aan gevalideerde meetmethoden voor het evalueren van effectiviteit en veiligheid van geneesmiddelen met een effect op het centrale zenuwstelsel in de pediatrie populatie. Bovendien is het wenselijk dat onderzoekers proberen om de belasting van kinderen en adolescenten tijdens het deelnemen aan een studie te verminderen door gebruik te maken van non-invasieve of minimaal-invasieve meetmethoden.

De meest toegankelijke en non-invasieve manier om een geneesmiddel-effect in de hersenen te meten is door het bepalen van geneesmiddel-gerelateerde functionele activiteit van het centrale zenuwstelsel waarbij gebruik gemaakt wordt van methoden die voldoende sensitief en specifiek zijn. Om deze geneesmiddel-gerelateerde functionele activiteit te relateren aan veranderingen in farmacokinetiek dienen geneesmiddelconcentraties gemeten te worden. Traditionele protocollen voor het meten van de farmacokinetiek – bijvoorbeeld door middel van meerdere afnames en verblijfskatheters of meerdere venapuncties – zijn ongewenst in therapeutisch geneesmiddelenonderzoek bij kinderen.

Om een aantal van deze beperkingen te boven te komen, zijn er andere verzamelmethode voor het bepalen van de geneesmiddelconcentratie ontwikkeld en gevalideerd. Een voorbeeld van een dergelijke verzamelmethode is speekselverzameling. Speekselverzameling heeft het bijkomende voordeel dat het op locatie gedaan kan worden zonder de noodzaak voor medisch-geschoold personeel of gecompliceerde verrichtingen na afname van het monster, waardoor de belasting voor het kind nog verder wordt verminderd.

Helaas is door variabiliteit in de speeksel:plasma concentratie (s/p) ratio het nut van het bepalen van speekselconcentraties van verschillende geneesmiddelen in twijfel getrokken. Wij stellen voor dat wanneer de variabiliteit in de s/p ratio kan worden gekwantificeerd of geminimaliseerd, het meten van speekselconcentraties van een geneesmiddel een zinvol alternatief kan zijn voor het meten van plasmaconcentraties.

## HOOFDSTUK 2: DE EUROPESE PEDIATRISCHE VERORDENING: ZAL HET LEIDEN TOT GENEESMIDDELEN DIE KINDEREN NODIG HEBBEN?

In dit hoofdstuk wordt een studie beschreven waarin het effect van de Europese pediatrie Verordening (*European Pediatric Regulation*) is onderzocht op de ontwikkeling van geneesmiddelen voor kinderen, waaronder ook geneesmiddelen met een effect op het centrale zenuwstelsel. De Verordening verplicht farmaceutische bedrijven om klinische studies bij kinderen te plannen tijdens een vroeg stadium van de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen of in die gevallen waarin een nieuwe indicatie, toedieningsvorm of toedieningsweg wordt onderzocht voor volwassenen voor gepatenteerde geneesmiddelen. Het Pediatrie Onderzoeksplan (*Pediatric Investigational Plan*, PIP) beschrijft hoe een geneesmiddel bij kinderen onderzocht moet worden. Dit plan moet door het bedrijf in een vroeg stadium worden aangeboden aan het Pediatrie Comité (*Pediatric Committee*, PDCO) van de EMA (*European Medicines Agency*, het Europese Geneesmiddelen Agentschap), die vervolgens het plan beoordeelt. In deze studie hebben wij onderzocht voor welke geneesmiddelklassen de EMA het plan voor pediatrie onderzoek heeft goedgekeurd en voor welke klassen de EMA akkoord is gegaan met ontheffing van de noodzaak tot het doen van pediatrie onderzoek in de periode 2007 tot maart 2012. Wij zijn tevens nagegaan of de Verordening leidt tot de ontwikkeling van geneesmiddelklassen waarvoor een (niet voldane) behoefte bestaat voor pediatrie onderzoek (*'(unmet) pediatric need'*) of tot de ontwikkeling van klassen met de hoogste farmaceutische uitgaven. Bovendien hebben vijftig Nederlandse artsen die met kinderen werken aangegeven of zij vinden dat de geneesmiddelen (die onder

de Verordening voor kinderen worden ontwikkeld) daadwerkelijk nodig zijn. In de periode 2007 tot maart 2012 werd ongeveer tweederde van de geneesmiddelen door de EMA goedgekeurd voor pediatrisch onderzoek; uitstel van de start of afronding van maatregelen in het onderzoeksplan tot na de autorisatie van het geneesmiddel voor volwassenen werd door de EMA gehonoreerd voor 83% van deze geneesmiddelen. Geneesmiddelklassen en therapeutische subgroepen met een hoge noodzaak tot pediatrisch onderzoek op de EMA *Needs Lists*, zoals geneesmiddelen met een effect op het centrale zenuwstelsel, werden of weinig frequent goedgekeurd voor pediatrisch onderzoek of regelmatig ontheven van deze noodzaak. Bovendien werden geneesmiddelen die regelmatig worden voorgeschreven aan kinderen of adolescenten (PHARMO Database Network, 2005-2011), maar niet altijd goed beschikbaar zijn (en hierdoor een *'unmet pediatric need'* hebben) relatief zelden onder de Verordening goedgekeurd voor pediatrisch onderzoek. Geneesmiddelklassen met het laagste aantal geneesmiddelen waarvoor pediatrisch onderzoek was goedgekeurd waren klassen met de laagste farmaceutische uitgaven. Tenslotte waren de vijftig Nederlandse artsen er niet van overtuigd dat de geneesmiddelen waarvoor pediatrisch onderzoek was goedgekeurd noodzakelijk waren voor de klinische praktijk.

Wij concluderen dat de belangrijkste maatregel van de Verordening niet noodzakelijkerwijs leidt tot toename van geneesmiddelonderzoek bij kinderen van geneesmiddelklassen waarvoor een (*unmet*) *pedsiatric need* bestaat. De output van de Verordening komt overeen met farmaceutische uitgaven, waarschijnlijk door de *'adult-driven'* aanpak. Door het hoge aantal geneesmiddelen waarvoor uitstel van onderzoek door de EMA werd gehonoreerd blijft de registratie van geneesmiddelen met een effect op het centrale zenuwstelsel bij kinderen en adolescenten nog altijd achter bij die bij volwassenen. Wij stellen daarom een aantal belangrijke verbeteringen voor die nodig zijn in de implementatie van de regelgeving om ervoor te zorgen dat de Verordening leidt tot geneesmiddelen die kinderen en adolescenten daadwerkelijk nodig hebben. Bijvoorbeeld, evaluatie door de EMA van een Pediatrische Onderzoeksplan (of verzoek om ontheffing van deze verplichting) dient te worden gebaseerd op

de mogelijke pediatrische relevantie van het werkingsmechanisme of geneesmiddelen target en er kunnen nieuwe stimuleringsmaatregelen worden overwogen voor *first-in-children* indicaties.

### HOOFDSTUK 3: BIOMARKERS VAN ACUTE EFFECTEN VAN METHYLFENIDAAT BIJ KINDEREN EN ADOLESCENTEN MET ATTENTION-DEFICIT/HYPERACTIVITY DISORDER

Methylfenidaat (MPH) is het meest frequent voorgeschreven geneesmiddel voor de behandeling van *attention-deficit/hyperactivity disorder* (ADHD) bij kinderen. Eerder gepubliceerde studies die het effect van *immediate-release* methylfenidaat (MPH-IR) onderzochten, hebben tot tegengestelde resultaten geleid, onder ander door verschillende bronnen van variabiliteit zoals het gebrek aan gestandaardiseerde biomarkers voor het meten van een geneesmiddeleffect.

De studie die wordt beschreven in hoofdstuk 3 was een systematische literatuur reviewstudie waarin sensitieve en bruikbare non-invasieve biomarkers werden geïdentificeerd voor het monitoren van effecten van MPH-IR bij kinderen en adolescenten met ADHD. In publicaties tot december 2009 werden 78 gerandomiseerde, placebo-gecontroleerde klinische studies gevonden die de effecten op het centrale zenuwstelsel onderzochten van een enkele dosis van MPH-IR bij kinderen of adolescenten met ADHD. Om tot een redelijke mate van standaardisering tussen studies en testen te komen, werden de uitkomstmaten geclusterd in groepen van gerelateerde testen of testvarianten ('clusters'). Door de progressieve bundeling van de resultaten in logische clusters kon een meer algemene beoordeling worden gedaan van het geneesmiddeleffect op groepen van vergelijkbare testen of functionele domeinen. Neurocognitieve clusters en individuele testen die in vijf of meer studies waren onderzocht werden geëvalueerd voor consistentie in de gemeten MPH effecten.

De resultaten van deze review toonden aan dat er veel verschillende biomarkers worden toegepast om de effecten van MPH-IR bij ADHD te evalueren. De volgende uitkomstmaten toonden een consistente respons op

een therapeutische dosis van MPH in verschillende studies en verschillende cohorten: *Continuous Performance Test*, *Go/no-go Task*, *Visual Evoked Potentials* en verschillende observatieschalen (inclusief *Following Rules Observations*, *Oppositional Behavior Observations*, *On-Task Behavior Observations* en *Impulsivity Behavior Observations*). Het effect van MPH was het best te detecteren in testen en observaties gerelateerd aan motorische controle, volgehouden aandacht, gedeelde aandacht en impulsiviteit (controle van inhibitie); dit betekent dat MPH acute effecten heeft op de drie kernsymptomen van ADHD (aandachtstekort, hyperactiviteit en impulsiviteit) bij kinderen met ADHD die een effect ondervinden van MPH.

Wij stellen voor dat de potentiële biomarkers die in deze review zijn geïdentificeerd mogelijk kunnen bijdragen aan de identificatie van *responders* versus *non-responders* na een testdosis met MPH. Omdat het niet mogelijk was om dosis-effect relaties vast te stellen, dienen deze testen en clusters verder te worden onderzocht op dosis-respons relaties, inclusief de effectgrootte, en op klinisch relevante veranderingen. Idealiter worden in deze studies naast dosis-effect relaties ook concentratie-effect relaties onderzocht op verschillende tijdstippen na toediening van MPH, zodat het effectprofiel van MPH bij kinderen en adolescenten met ADHD kan worden vastgesteld.

#### HOOFDSTUK 4: BEPALING VAN METHYLFENIDAAT IN PLASMA EN SPEEKSEL DOOR LIQUID CHROMATOGRAPHY/TANDEM MASS SPECTROMETRY

Door het monitoren van MPH-concentraties kan een bijdrage worden geleverd aan het bepalen of de afwezigheid van een effect of de aanwezigheid van onverwachte bijwerkingen gerelateerd zijn aan farmacokinetische of farmacodynamische factoren. Therapeutisch monitoren van MPH-behandeling bij volwassenen wordt meestal gedaan door het meten van MPH-concentraties in plasma. Bij kinderen is het afnemen van bloedmonsters echter ongewenst. Speeksel is mogelijk een alternatieve matrix voor het monitoren van MPH-concentraties; echter, er zijn verschillende potentieel complicerende factoren

naar voren gekomen in eerdere studies. Complicerende factoren waren onder andere indicaties van orale contaminatie in de eerste speekselmonsters na inname van MPH en een aanzienlijke – nog onverklaarde – variatie in de s/p ratio na toediening van zowel de tablet als de capsule.

Het verkrijgen van een betrouwbare s/p ratio is essentieel voor het behalen van het volledige potentiaal van het gebruik van speekselmonsters voor het monitoren van MPH-concentraties. Om deze reden hebben wij een analytische methode ontwikkeld voor het nauwkeurig kwantificeren van MPH in zowel plasma als speeksel. In dit hoofdstuk presenteren wij de validatie van een *liquid chromatography-tandem mass spectrometry* methode waarbij gebruik wordt gemaakt van een *hydrophilic interaction liquid chromatography column* (HILIC). Eiwitten werden geprecipiteerd in een 100 µl monster met 750 µl acetonitril/methanol 84/16 (v/v) dat d<sub>9</sub>-methylfenidaat bevatte als interne standaard. Er werden standaardcurves geplot over een MPH-concentratiebereik van 0,5 – 100,0 µg/L. De totale analysetijd was 45 seconden. De accuraatheid bevond zich in het bereik van 98-108% en de *within*- en *between-run* onnauwkeurigheid was minder dan 7,0%. De matrixeffecten waren groter voor plasma dan voor speeksel met 46% and 8% ionisatiesuppressie. De matrixeffecten werden adequaat gecompenseerd door het gebruik van gedeutereerd MPH als interne standaard. MPH degradeerde significant in plasma en speeksel op kamertemperatuur en bij een temperatuur van 5°C. Stabiliteitsexperimenten toonden aan dat de monsters direct na afname bij een temperatuur van -20°C of lager moeten worden bewaard en dat de monsters direct na ontdooien moeten worden verwerkt. De monsters waren voor tenminste 4 weken stabiel bij een temperatuur van -20°C. De methode werd met succes toegepast voor de bepaling van MPH-concentraties in plasma en speeksel van een volwassen gezonde vrijwilliger.

Wij concluderen dat door het gebruik van eiwitprecipitatie en *hydrophilic interaction liquid chromatography* gecombineerd met *tandem mass spectrometry*, deze methode tot een snelle, betrouwbare en correcte kwantificatie van MPH leidt in zowel plasma als speeksel.

## HOOFDSTUK 5: POPULATIEFARMACOKINETISCH MODEL VAN TWEE TOEDIENINGSVORMEN VAN METHYLFENIDAAT IN PLASMA EN SPEEKSEL VAN GEZONDE VRIJWILLIGERS

In dit hoofdstuk wordt een studie beschreven waarin een eerste aanzet is gedaan om de bronnen van variabiliteit in MPH plasma- en speekselconcentraties te kwantificeren en om de relatie tussen MPH-concentratie in speeksel en MPH-concentratie in plasma te beschrijven door middel van een populatie-farmacokinetisch model.

In deze gerandomiseerde, open-label studie werden 10 mg MPH-IR (tablet) en 18 mg *osmotic release oral system* MPH (MPH-OROS, capsule) gekruist toegediend aan 12 volwassen gezonde vrijwilligers (zes mannen en zes vrouwen). Zowel bloed- als speekselmonsters werden voorafgaand aan en regelmatig na toediening van MPH afgenomen tot 6 (MPH-IR) of 11 (MPH-OROS) uur na toediening. De farmacokinetische analyses zijn uitgevoerd met het populatie-farmacokinetieksoftwarepakket NONMEM (*nonlinear mixed-effect modeling*).

Farmacokinetiek van MPH in plasma werd het best beschreven door een 1-compartimentenmodel met eerste-orde-absorptie (met aparte compartimenten voor MPH-IR en MPH-OROS) en eerste-orde-eliminatie. De geschatte klaring was 6.0 liter/uur en het distributievolume was 7.5 liter. De terminale halfwaardetijd was 0.9 uur. Interindividuele variabiliteit werd geïdentificeerd voor klaring, distributievolume en de absorptiesnelheidsconstante van MPH-OROS. De s/p ratio was 2.44 vanaf 2.5 uur na toediening. Interindividuele variabiliteit werd geïdentificeerd voor de s/p ratio.

Wij verwachten dat dit PK model met juiste allometrische schalingstechnieken bij kinderen gebruikt kan worden om het concentratie/tijdsprofiel in plasma te voorspellen op basis van gemeten MPH-concentraties in speeksel. De voorspellende prestatie van het model bij kinderen met ADHD behoeft nog verder onderzoek.

## HOOFDSTUK 6: FARMACOKINETIEK EN EFFECTEN VAN CAFEÏNE OP PARAMETERS VAN HET CENTRALE AND AUTONOME ZENUWSTELSEL BIJ ADOLESCENTEN

Kinderen en adolescenten gebruiken regelmatig cafeïne als psychostimulans. Ondanks het veelvuldige gebruik van cafeïne door adolescenten, is er relatief weinig onderzoek gedaan naar de fysiologische en gedragsmatige effecten van cafeïne in deze leeftijdsgroep. Data uit dierstudies suggereren dat de effecten van cafeïne bij volwassenen niet eenvoudig geëxtrapoleerd kunnen worden naar adolescenten.

Om deze reden hebben wij in deze studie het effect van cafeïne op parameters van het centrale en autonome zenuwstelsel onderzocht bij gezonde adolescenten na inname van een cafeïnehoudende drank (met een lage dosis); de resultaten werden vergeleken met data verkregen na inname van een cafeïnevrije drank. Cafeïneconcentraties werden gemeten in speekselmonsters. In een aparte studie bij gezonde volwassenen hebben wij de mate van orale contaminatie met cafeïne bepaald na inname van cafeïnehoudende drank versus een cafeïnehoudende capsule (200 mg). Speeksel- en plasmamonsters werden tegelijkertijd afgenomen om de s/p ratio van de cafeïneconcentraties te bepalen. Een populatiefarmacokinetisch model werd opgesteld gebaseerd op data uit deze kinetische studie om zo de plasmaconcentraties bij de eerdere studie bij adolescenten te schatten; dit model kon vervolgens worden gebruikt om een farmacokinetiek-farmacodynamiek (PK/PD) model op te stellen.

Cafeïne had bij adolescenten een significant effect op testparameters gerelateerd aan aandacht en visuomotorische coördinatie (*adaptive tracking task*) en alertheid (*saccadic peak velocity*). Na inname van cafeïne werd bovendien een toename in de *error rate* van de *attention switch task* waargenomen. Plasmaconcentraties van cafeïne werden bij volwassenen het best beschreven door een 2-compartimentenmodel met een dosisdepot, eerste-orde-absorptie- en eerste-orde-eliminatiekinetiek. Het plasmamodel identificeerde een dosis van 90 mg in de cafeïnehoudende drank. Vetvrije massa (*lean body mass*)-afhankelijke variabiliteit werd geïdentificeerd voor het volume van het

centrale compartiment. Het farmacokinetische model werd uitgebreid naar een populatiemodel waarin cafeïneconcentraties in speeksel bij volwassenen als een fractie (0,68) van de plasmaconcentraties werden beschreven vanaf 1 uur na toediening; in andere woorden, de *S/P* ratio was vanaf 1 uur na toediening 0,68. Tot 1 uur na toediening kon de speekselconcentratie niet als een fractie worden beschreven; om deze reden waren effecten van cafeïne die binnen 1 uur na toediening optraden niet geschikt voor inclusie in een PK/PD model.

Wij concluderen dat 90 mg cafeïne bij gezonde adolescenten een significant effect heeft op parameters gerelateerd aan alertheid en reactiesnelheid, ondanks de relatief lage dosis en het verwachte plafondeffect bij deze gezonde en alerte populatie. Verder onderzoek is nodig om te achterhalen of deze effecten bij adolescenten groter zijn dan bij volwassenen.

#### HOOFDSTUK 7: VERGELIJKING TUSSEN GEZONDE ADOLESCENTEN EN VOLWASSENEN VAN DE FARMACOKINETIEK EN DE EFFECTEN OP OBJECTIEVE EN SUBJECTIEVE BIOMARKERS VAN ALCOHOL

Ons begrip van leeftijdsafhankelijke verschillen in de farmacokinetiek en de farmacodynamiek van geneesmiddelen met een effect op het centrale zenuwstelsel is bijna volledig gebaseerd op diermodellen. In dit hoofdstuk wordt een studie beschreven waarin wij een PK/PD model hebben opgesteld om de objectieve en subjectieve effecten van alcohol tussen adolescenten en volwassenen te vergelijken. Het acute effect van inname van een sociaal-geaccepteerde dosis alcohol (2 standaardeenheden) werd bepaald bij 16-18 jarige adolescenten. Alcoholconcentraties werden non-invasief gemeten door middel van eind-expiratoire ademmonsters. Vervolgens is een PK/PD model opgesteld aan de hand van data van deze studie en data van eerder uitgevoerde alcoholstudies (met de *clamping* methode) bij volwassenen. Dit model werd gebruikt om de farmacokinetiek en effecten op een objectieve en op een subjectieve biomarker te karakteriseren en mogelijke bronnen van variabiliteit, zoals leeftijd, te onderzoeken.

Alcoholkinetiek in plasma werd het beste beschreven door een 2-compartimentenmodel met eerste-orde-absorptie en Michaelis-Menten-eliminatie. Interindividuele variabiliteit werd geïdentificeerd voor verschillende kinetische parameters. Er was sprake van vetvrije massa (*lean body weight*)-afhankelijke variabiliteit in het volume van het perifere compartiment en de maximale eliminatie, gewichtafhankelijke variabiliteit in het volume van het centrale compartiment en lengte- en leeftijdsafhankelijke variabiliteit in intercompartimentele klaring.

Gebaseerd op een verkennende meta-analyse van alle relevante alcoholdata werden *smooth pursuit performance* en *vas Alertness* geselecteerd als biomarkers voor het opstellen van het PK/PD model. De relatie tussen alcoholconcentratie en de effecten van alcohol op *baseline smooth pursuit performance* and *vas Alertness score* werd het best beschreven als een dosisafhankelijke relatie, zonder indicaties van vertraging of tolerantie. Hogere *baseline smooth pursuit performance* was gecorreleerd met een grotere absolute afname in uitvoering. Voor *smooth pursuit performance* en *vas Alertness* werden geen covariaten geïdentificeerd voor de relatie tussen alcoholconcentratie en -effect.

De covariaten die in ons PK-model werden geïdentificeerd kunnen (in-) direct gerelateerd zijn aan verschillen tussen adolescenten en volwassenen, aangezien aanzienlijke leeftijdsafhankelijke en rijpingsafhankelijke verschillen in lichaamssamenstelling optreden gedurende de adolescentie. *vas Alertness* en *smooth pursuit eye movements* vertegenwoordigen niet noodzakelijkerwijs alle alcoholgerelateerde effecten op het centrale zenuwstelsel en wij kunnen niet uitsluiten dat de gevoeligheid voor andere alcoholgerelateerde farmacodynamische effecten met de leeftijd verandert. Helaas waren andere gevoelige functionele biomarkers voor het effect van alcohol minder geschikt voor het opstellen van een PK/PD model, doordat het kleine effect bij adolescenten en het hoge aantal *non-responders* ons belette om de data bij adolescenten te kwantificeren en een leeftijdseffect te onderzoeken. Om deze reden moet nog worden vastgesteld of de gevoeligheid voor andere alcoholgerelateerde effecten verandert met de leeftijd.



## HOOFDSTUK 8: FARMACOKINETIEK VAN MELATONINE MINITABLETTEN MET VERLENGDE AFGIFTE BIJ KINDEREN MET EEN AUTISME SPECTRUM STOORNIS EN EEN SLAAPSTOORNIS

Melatonine is één van de middelen met een effect op het centrale zenuwstelsel waarvoor de EMA een pediatrie therapie noodzaak tot onderzoek heeft geïdentificeerd. Dit omvat de noodzaak tot het ontwikkelen van een leeftijdsgeschikte toedieningsvorm met verlengde afgifte en de noodzaak tot het verzamelen van data over de farmacokinetiek, werkzaamheid en veiligheid bij kinderen met autisme en een slaapstoornis.

De studie beschreven in hoofdstuk 8 maakt onderdeel uit van een Pediatrisch Ontwikkelplan (PIP) onder de Europese pediatrie Verordening. Deze studie was een gekruiste studie met oplopende doseringen van Circadin (1 mg minitabletten met een diameter van 3 mm), een toedieningsvorm met verlengde afgifte. In deze studie zijn het farmacokinetische profiel, de veiligheid en aanvaardbaarheid van Circadin geëvalueerd bij 16 kinderen en adolescenten met autisme spectrum stoornis en een slaapstoornis. Gebaseerd op de dosisrange in een toekomstige studie waarin de werkzaamheid zal worden onderzocht (die ook onderdeel is van de PIP) werden doseringen van 2 en 10 mg getest. Om afname van monsters gedurende de nacht zoveel mogelijk te beperken, namen de kinderen Circadin 's ochtends in. De eerste studiedag werd voorafgegaan door een 24-uur baseline meting van melatonine. Speekselmonsters werden non-invasief verkregen door passief kwijlen en de melatonineconcentratie in de monsters werd gemeten. Urinemonsters werden verzameld voor de bepaling van de metabooliet 6-sulfatoxymelatonine (6-SMT). Gedurende de studie werd gemonitord voor het optreden van bijwerkingen en sedatieve effecten werden geëvalueerd door middel van afname van de *Observer's Assessment of Alertness/Sedation (OAA/s)* schaal tot 10 uur na toediening. De farmacokinetische analyses zijn uitgevoerd met NONMEM.

Alle 16 deelnemers (12 man, 4 vrouw; leeftijd: 7-15 jaar) hadden de klinische diagnose autisme spectrum stoornis (gebaseerd op DSM-IV-TR criteria). Alle gerapporteerde bijwerkingen waren bekende bijwerkingen van melatonine.

De minitabletten waren veilig (geen van de kinderen verslikte zich) en werden door de kinderen geaccepteerd. De piekconcentratie trad binnen 2 uur op en melatonineconcentraties bleven gedurende enkele uren hierna verhoogd. Blootstelling aan Circadin was dosis-lineair en de klaring (1.000 L/u) was vergelijkbaar tussen de dosisgroepen. De terminale halfwaardetijd was vergelijkbaar tussen de doseringen. De gemiddelde hoeveelheid urine 6-SMT tijdens de baseline periode was 4,2 µg (gedurende de eerste 12 uren overdag) en 13,5 µg (gedurende de volgende 12 uren 's nachts). Na toediening van 2 mg Circadin was de gemiddelde hoeveelheid urine 6-SMT 989,5 µg (gedurende de eerste 12 uren overdag) en 95,3 µg (gedurende de volgende 12 uren 's nachts). De hoogste sedatiescores (OAA/s) traden op tussen 2 en 3 uur na toediening van 2 mg Circadin en tussen 2 en 6 uur na toediening van 10 mg Circadin. De deelnemers en hun verzorgers waren in het algemeen positief over de belasting en duur van de studie. Bijna alle deelnemers (69%) en verzorgers (88%) zouden (toestemming voor) deelname aan een vergelijkbare studie weer overwegen.

Wij concluderen dat deze studie de korte termijn veiligheid en aanvaardbaarheid aantoont en het farmacokinetische profiel van verlengde afgifte demonstreert van Circadin minitabletten bij 16 schoolgaande kinderen en adolescenten met autisme spectrum stoornis.

## HOOFDSTUK 9: FARMACOKINETIEK EN FARMACODYNAMIEK VAN EEN NIEUWE HOOG-GECONCENTREERDE INTRANASALE TOEDIENINGSVORM VAN MIDAZOLAM VOOR MATIGE SEDATIE

Vanwege de snelle werking en het snelle herstel is midazolam het geneesmiddel van eerste keus voor het verkrijgen van matige sedatie (voorheen ook wel *conscious sedation* genoemd) en de management van epileptische aanvallen. Nasale toediening van midazolam is een non-invasief alternatief voor intraveneuze toediening. Eerder ontwikkelde nasale toedieningsvormen van midazolam zijn weinig succesvol gebleken door het gebrek aan solvens waarin midazolam in therapeutische doseringen kan worden opgelost zonder dat er schade ontstaat aan de nasale mucosa.

In de studie die wordt beschreven in hoofdstuk 9 is de farmacokinetiek van twee doseringen van een nieuwe hoog-geconcentreerde waterige intranasale toedieningsvorm van midazolam (Nazolam) gekarakteriseerd. In dit vier-weg gekruiste, dubbelblinde, dubbel-*dummy*, gerandomiseerde, placebo-gecontroleerde onderzoek ontvingen 16 volwassen deelnemers 2,5 mg Nazolam, 5,0 mg Nazolam, 2,5 mg intraveneuze midazolam of placebo op verschillende studiedagen. De farmacokinetiek van midazolam en  $\alpha$ -hydroxy-midazolam werden gekarakteriseerd en gerelateerd aan uitkomstvariabelen voor sedatie (*saccadic peak velocity*, *Bond and Lader Visual Analogue Scale for sedation*, *simple reaction time task* en de *Observer's Assessment of Alertness/Sedation*). De aanvang en duur van het farmacologische effect werden geëvalueerd en vergeleken met intraveneus toegediende midazolam door middel van de biomarker *saccadic peak velocity* (SPV), aangezien er een relatie is beschreven tussen afname in de SPV en klinische werking. Nasale tolerantie werd geëvalueerd op basis van spontane rapportage door deelnemers en onderzoek van de neus.

De biologische beschikbaarheid van Nazolam was 75%. Maximale plasmaconcentraties van 31 ng/ml (cv, 42.3%) werden bereikt na 11 minuten (2,5 mg Nazolam) en van 66 ng/ml (cv, 31.5%) na 14 minuten (5,0 mg Nazolam). De aanvang van sedatie (gebaseerd op een -2SD verandering in SPV) trad 1 minuut na toediening van 2,5 mg intraveneuze midazolam, 7 minuten na 2,5 mg Nazolam, en 4 minuten na 5 mg Nazolam op. Duur van de sedatie was 85 minuten voor 2,5 mg intraveneuze midazolam, 47 minuten voor 2,5 mg Nazolam en 106 minuten voor 5,0 mg Nazolam. Klinisch relevante levels van sedatie (gemeten door middel van de OAA/S) werden binnen minuten na toediening bereikt. De eenmalige toediening werd bovendien goed verdragen, was veilig en leidde niet tot beschadiging van de nasale mucosa.

Wij concluderen dat deze studie de nasale tolerantie, korte-termijn veiligheid en werkzaamheid van deze nieuwe formulering aantoont bij 16 volwassen gezonde deelnemers. Matige sedatie kan in hetzelfde tijdbestek worden behaald indien de voorbereidingstijd die nodig is voor het verkrijgen van een intraveneuze toegangsweg overwogen wordt. Deze non-invasieve

toedieningsvorm heeft potentieel belangrijke voordelen voor matige sedatie en epilepsie en heeft een mogelijke toepassing bij kinderen.

#### HOOFDSTUK 10: ALGEMENE DISCUSSIE

Geneesmiddelen met een effect op het centrale zenuwstelsel worden onder de Verordening relatief weinig frequent onderzocht, ondanks de noodzaak tot pediatrisch onderzoek en de aanhoudende toename in het gebruik van deze geneesmiddelen bij kinderen en adolescenten. Afgaande op onze data is het onwaarschijnlijk dat de Verordening een positieve uitwerking zal hebben op de toegang van kinderen en adolescenten tot nieuwe geneesmiddelen met een effect op het centrale zenuwstelsel (aangezien er weinig van dit soort nieuwe geneesmiddelen voor volwassenen wordt ontwikkeld) of op de vertraging in pediatrische registratie van deze geneesmiddelen, zoals beschreven in de Introductie van dit proefschrift. Aangezien de meerderheid van de ontwikkelplannen voor geneesmiddelen met een effect op het centrale zenuwstelsel uitgestelde onderdelen bevat, is het belangrijk om *clinical trial strategies* tijdig te herzien.

In de Introductie van dit proefschrift stelden wij voor dat wanneer de variabiliteit in de S/P ratio gekwantificeerd of geminimaliseerd kan worden, het meten van geneesmiddelconcentraties in speeksel een zinvol alternatief kan zijn voor het meten van geneesmiddelconcentraties in plasma voor meer geneesmiddelen dan tot op heden is aangenomen. De studies beschreven in hoofdstuk 5 en 6 zijn een aanzet om deze bronnen van variabiliteit te onderzoeken en te kwantificeren door middel van een populatiefarmacokinetische model. Wij toonden aan dat de relatie tussen plasma- en speekselconcentraties voor MPH stabiel is vanaf 2,5 uur na toediening en voor cafeïne vanaf 1 uur na toediening. Voorafgaand aan deze tijdstippen was de relatie niet lineair; helaas waren onze pogingen om te corrigeren voor factoren die mogelijk bijdragen aan de variabiliteit in de S/P ratio niet succesvol. Voor geneesmiddelen met een korte  $T_{max}$  (zoals MPH en cafeïne) is het aantal speekselmonsters dat verzameld kan worden om de absorptiefase vast te stellen beperkt, waardoor de bepaling van de mate van contaminatie, de S/P ratio en bronnen van

variabiliteit in de eerste periode na toediening wordt belemmerd. Voor dit type geneesmiddelen zijn alleen effecten die relatief laat optreden geschikt voor het opstellen van een PK/PD model gebaseerd op gemeten speekselconcentraties of geschatte plasmaconcentraties. Speekselafname is echter mogelijk nog steeds een nuttige optie voor dit type onderzoek, omdat het farmacologische effect op het centrale zenuwstelsel van de meeste geneesmiddelen vertraagd is ten opzichte van veranderingen in de plasmaconcentratie. Om deze reden ondersteunen onze resultaten het verder onderzoeken van het gebruik van speeksel als een non-invasieve methode voor het profileren van geneesmiddelen met een effect op het centrale zenuwstelsel.

De non-invasieve testen die opgenomen zijn in de NeuroCart testbatterij zijn voldoende gevoelig om effecten van lage doseringen van cafeïne en alcohol bij gezonde adolescenten te detecteren (zoals wij aantoonde in hoofdstuk 5 en 6). Na toediening van cafeïne werden significante effecten gezien op parameters gerelateerd aan alertheid (*saccadic peak velocity*) en reactietijd (*adaptive tracking*), ondanks de relatief lage dosering en het verwachte plafondeffect in dit cohort van gezonde en alerte adolescenten. Omdat gerapporteerd is dat cafeïne vergelijkbare effecten heeft op het gedrag (zoals motorische activatie en *arousal*) als klassieke psychostimulantia zoals cocaïne en amfetamine, zijn deze testen mogelijk van toegevoegde waarde in pediatrische studies met andere stimulantia. Een lage dosering alcohol leidde tot significante veranderingen in *smooth pursuit eye movements*, *vas Alertness score*, *vas alcohol effect score*, *body sway*, systolische bloeddruk en hartfrequentie. In diermodellen zijn ontwikkelingsgerelateerde veranderingen beschreven in de farmacologische gevoeligheid van GABA<sub>A</sub>-receptor-gemedieerde *currents* in reactie op verschillende geneesmiddelen. Om deze reden kunnen deze taken wellicht gebruikt worden om leeftijdsafhankelijke veranderingen te onderzoeken in de effecten van geneesmiddelen die aangrijpen op GABA. De meerderheid van de adolescente deelnemers verdroeg de testen en de testduur goed.

In de Introductie van dit proefschrift brachten wij een aantal punten naar voren ten aanzien van neuropsychofarmacologie. Ten eerste is het belangrijk

om de verschillen in neuropsychopathologie en –farmacologie tussen kinderen en volwassenen te erkennen. Bovendien bestaat bij onderzoekers de behoefte aan gevalideerde methoden die geschikt zijn voor de evaluatie van de werkzaamheid en veiligheid van geneesmiddelen met een effect op het centrale zenuwstelsel. Tenslotte moet er nadruk worden gelegd op het onderzoek naar toedieningsvormen. Wij stellen voor dat het profileren van geneesmiddelen met een effect op het centrale zenuwstelsel het potentiaal heeft om een bijdrage te leveren aan al deze punten. Ten eerste kunnen leeftijdsafhankelijke effecten worden geëvalueerd door het geneesmiddelprofiel bij kinderen of adolescenten te vergelijken met een (reeds eerder vastgesteld) profiel bij volwassenen, zoals gedemonstreerd is door de studie beschreven in hoofdstuk 7. Ten tweede laten verschillende geneesmiddelklassen een uniek effectprofiel zien op de testen uit de NeuroCart testbatterij dat overeenkomt met het werkingsmechanisme van het middel. Wij hebben eerder voorgesteld dat deze ‘vingerafdrukken’ gebruikt kunnen worden om te differentiëren tussen een stimulerende en sedatieve geneesmiddeleigenschap, bijvoorbeeld door het effect op *saccadic peak velocity* te onderzoeken. Zoals reeds genoemd, zijn de testen in de NeuroCart voldoende gevoelig om de effecten van een lage dosering cafeïne of alcohol bij adolescenten te detecteren. Functionele biomarkers kunnen worden gebruikt om te bepalen of een specifiek geneesmiddel bij kinderen of adolescenten in een bepaalde dosering tot een farmacologisch effect leidt. Deze biomarkers kunnen ook worden gebruikt om (on)gewenste sedatieve of stimulerende eigenschappen van geneesmiddelen bij kinderen en adolescenten te onderzoeken. Ten derde kan het non-invasief monitoren van de farmacokinetiek en farmacodynamiek onderzoek naar toedieningsvormen bij kinderen en adolescenten vereenvoudigen, zoals geïllustreerd door de studies die zijn beschreven in hoofdstuk 8 en 9. De ‘*proof-of-pharmacology*’ strategie die is beschreven in hoofdstuk 9 kan wellicht ook worden gevolgd bij pediatrische studies waarin een leeftijdsgeschiedte toedieningsvorm wordt onderzocht voor een geneesmiddel waarvoor reeds veel data bestaan over de werkzaamheid en veiligheid.

Verschillende stappen moeten worden ondernomen in aanvulling op verdere verfijning van de methoden die in dit proefschrift zijn beschreven. Allereerst moet non-invasieve monitoring van geneesmiddelen worden geëvalueerd bij jongere kinderen en bij kinderen met andere neuropsychiatrische aandoeningen. Een tweede belangrijke stap, met name gezien het feit dat de meest neurologische en psychiatrische aandoeningen een chronisch of recidiverend karakter hebben, is het bepalen of vroege behandeling leidt tot acute verbetering van symptoomgerelateerde functies van het centrale zenuwstelsel en verbeterde lange-termijn uitkomsten. Tenslotte, vanwege de noodzaak om de effecten van anesthetica en analgetica te onderzoeken bij kinderen en adolescenten, dient er meer ervaring te worden opgedaan op het gebied van pediatrisch pijnonderzoek.

### *Conclusie*

De klinische studies beschreven in dit proefschrift tonen aan dat het non-invasief vaststellen van een geneesmiddelprofiel van geneesmiddelen die het centrale zenuwstelsel stimuleren of onderdrukken uitvoerbaar is bij gezonde adolescenten en bij kinderen en adolescenten met een autisme spectrum stoornis. Deze aanpak draagt bij aan de evaluatie van leeftijdsafhankelijke verschillen in farmacokinetiek en farmacodynamiek en de vergelijking van effectprofielen van verschillende toedieningsvormen van hetzelfde geneesmiddel. Deze aanpak vergemakkelijkt mogelijk bovendien de uitvoering van studies die onderdeel zijn van een Pediatrisch Ontwikkelplan onder de Verordening; gezien de noodzaak voor pediatrisch onderzoek op het gebied van geneesmiddelen met een effect op het centrale zenuwstelsel zou dit een belangrijke stap zijn. De ideale pediatrische studie dient zo opgesteld te zijn dat deze in de thuissituatie kan plaatsvinden. De s/p ratio moet worden bepaald in studies bij volwassenen met nieuwe geneesmiddelen waarvan de concentraties mogelijk in speekselmonsters kunnen worden gemeten. Omdat aanzienlijke variabiliteit in de farmacokinetiek is beschreven voor verschillende geneesmiddelen voor neuropsychiatrische aandoeningen, dienen

gevoelige non-invasieve of minimaal-invasieve farmacodynamische metingen longitudinaal te worden verricht. Pediatrische studies dienen bovendien zo te zijn opgesteld dat een vergelijking met studies bij volwassenen mogelijk is. Tenslotte, om onze kennis over de aanvaardbaarheid van verschillende meetmethoden te vergroten is het nodig (indien mogelijk) deelnemers te vragen een vragenlijst in te vullen om zo informatie te verzamelen over de redenen van deelname en over de ervaren onderzoeksbelasting.