



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Mechanism-based pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling of opioids : role of biophase distribution and target interaction kinetics
Groenendaal, D.

Citation

Groenendaal, D. (2007, September 18). *Mechanism-based pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling of opioids : role of biophase distribution and target interaction kinetics*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/12321>

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/1887/12321>

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

Samenvatting
SAMENVATTING IN HET NEDERLANDS
SYNOPSIS IN DUTCH

Sam



1. ALGEMENE INLEIDING EN DOEL VAN HET ONDERZOEK

Het onderzoek in dit proefschrift heeft betrekking op de relaties tussen farmacokinetiek (PK) en farmacodynamiek (PD) van opiaten, met speciale aandacht voor de distributie vanuit het bloed naar de plaats van werking (de biofase) in het centrale zenuwstelsel en de interactie met de μ -opiat receptor. In hoofdstuk 1 wordt een inleiding gegeven over de achtergronden van de PK-PD modellering in het algemeen en van opiaten in het bijzonder.

1.1 Farmacokinetisch-farmacodynamische modellering

Het doel van farmacokinetisch-farmacodynamische (PK-PD) modellering is de beschrijving en voorspelling van het tijdsverloop van geneesmiddel effecten *in vivo* in gezonde en zieke toestand. Klassieke PK-PD modellen bestaan uit drie componenten: 1) een farmacokinetisch model, 2) een farmacodynamisch model en 3) een link model. Het farmacokinetische model beschrijft het verloop van de concentratie van het geneesmiddel in bloed/plasma in de tijd. In deze modellen wordt de farmacokinetiek vaak beschreven met hypothetische compartimentele modellen die de processen van absorptie, distributie en eliminatie nabootsen. Het farmacodynamische model beschrijft de relatie tussen de geschatte biofase concentratie en het farmacologische effect. Het meest bekende farmacodynamische model is het sigmoidale $E_{\max}$ model dat de relatie tussen concentratie en effect beschrijft met een s-vormige curve, de zogenaamde Hill vergelijking. Een beperking van dit model is dat het geen mechanistisch model is. Dat wil zeggen dat er geen onderscheid gemaakt wordt tussen stof-specifieke en systeem-specifieke eigenschappen die de vorm en de ligging van de concentratie-werkingsrelatie bepalen. Het link model tenslotte wordt gebruikt voor het beschrijven van de vertraging tussen het verloop van de concentratie in bloed/plasma en het effect (hysteresis). Hysteresis wordt vaak beschreven op basis van distributie naar een hypothetisch effect-compartiment, waarbij de intensiteit van het effect wordt gerelateerd aan de concentratie in het hypothetische effect compartiment (de biofase).

1.2 Mechanistische PK-PD modellering: onderscheid tussen de verschillende processen die het verloop van het farmacologische effect bepalen

Er is een duidelijke trend in de richting van de ontwikkeling van mechanistische PK-PD modellen waarbij onderscheid wordt gemaakt tussen de verschillende (deel-) processen die bepalend zijn voor het verloop van het farmacologische effect. Deze modellen bevatten beschrijvingen van 1) het verloop van de concentratie in bloed/plasma, 2) de biofase distributie, 3) de binding en activatie van het doeleiwit op de plaats van werking, 4) de transductie en 5) de homeostatische terugkoppelings mechanismen. Het onderzoek dat in dit proefschrift wordt beschreven richt zich met name op 1) de rol van biofase distributie, dat de concentratie op de plaats van werking bepaalt, en 2) de beschrijving van de binding aan en de activatie van de receptoren op de plaats van werking.

Biofase distributie

Biofase distributie is afhankelijk van de bloedperfusiesnelheid van het weefsel waarin zich het doeleiwit bevindt en weefseldistributie processen waarbij de laatste kunnen worden onderverdeeld in passieve diffusie en transporter-gemedieerd transport. Voor stoffen met een werking binnen het centrale zenuwstelsel, wordt de biofase distributie in belangrijke mate bepaald door het transport over de bloed-hersen barriere (BBB). De BBB bevindt zich in de wanden van de bloedvaten in de hersenen en onderscheidt zich van andere vaatwanden in het lichaam onder meer doordat de vaatwanden in de hersenen sterk vernauwde ruimtes hebben tussen aangrenzende vaatwandcellen. Dit maakt dat het transport van stoffen die niet over celmembranen kunnen diffunderen in hoge mate beperkt wordt. Daarnaast bezit de BBB een diversiteit aan actieve transporter-eiwitten waaronder P-glycoproteïne (Pgp), een efflux-transporter die stoffen vanuit de hersenen terug naar het bloed pompt. Experimenten *in vitro*, in cellijnen die getransfecteerd waren met het MDR1 gen, dat codeert voor het humane Pgp, hebben inzicht gegeven in de functionele rol van Pgp op het transport van veel stoffen. Daarnaast hebben *in vivo* studies waarin specifieke blokkers zijn toegediend, inzicht gegeven in de functionele rol van specifieke transporters bij de distributie naar de hersenen. Een gevoelige techniek om het transport naar de hersenen *in vivo* te kwantificeren is intracerebrale microdialyse. Hierbij wordt een microdialyse probe in een specifiek gedeelte van de hersenen geïmplanteerd. De probe wordt geperfuseerd met een artificiële extracellulaire vloeistof (ECF). Moleculen die klein genoeg zijn om het semi-permeabele membraan aan de punt van de probe te passeren, zullen de probe in diffunderen en worden meegenomen met de perfusiestroom. Vervolgens kunnen *ex vivo* fracties te worden opgevangen om geanalyseerd te worden. Op deze manier wordt een afspiegeling van de concentratie van de te meten stof in de hersen ECF verkregen.

Hersenen en biofase distributie modellen

Wanneer het verloop van de concentratie in bloed/plasma en in de hersen ECF bepaald is, kan een farmacokinetisch model worden opgesteld waarmee het transport naar de hersenen beschreven kan worden en waarmee de invloed van transporters kan worden gekarakteriseerd. Op die manier kan inzicht worden verkregen in de mechanismen die bepalend zijn voor de distributie naar de plaats van werking.

Recent is deze benadering toegepast in PK-PD experimenten waarbij gelijktijdig de distributie naar de hersenen, met behulp van microdialyse, en de concentratie-EEG effect relatie van het geneesmiddel norfloxacin zijn bepaald. Er werd hysteresis waargenomen, die het beste beschreven kon worden met het effect-compartment model. De waarde van de snelheidsconstante voor distributie naar het effect compartment was verschillend van die voor de distributie over de BBB. Dit geeft aan dat de ECF concentratie niet representatief is voor de norfloxacin concentratie op de plaats van werking voor het EEG. Echter, voor morfine kon de hysteresis die is waargenomen in het anti-nociceptieve effect voor 80% verklaard worden door het transport over de BBB.

1.3 PK-PD modellering van opiaten

Biofase distributie kinetiek van opiaten

Voor de PK-PD modellering van opiaten is het van belang de biofase distributie in detail te karakteriseren vanwege de sterk verschillende fysisch-chemische eigenschappen van de opiaten, alsook vanwege de mogelijke interactie met transporters op de BBB. In de literatuur zijn verschillende studies beschreven waarin de biofase distributie kinetiek van opiaten is bestudeerd in *in vitro* en *in vivo* modellen. Daarbij werd voor morfine en loperamide aangetoond dat Pgp een functionele rol speelt bij het transport over de BBB. Voor alfentanil en sufentanil werd geen interactie gevonden, terwijl voor fentanyl de resultaten niet eenduidig waren. De biofase distributie kinetiek van morfine en metabolieten is uitvoerig bestudeerd met behulp van intracerebrale microdialyse. PK-PD studies hebben aangetoond dat onder invloed van de Pgp blokker GF120918 het anti-nociceptieve effect van morfine langer duurt door een langere halfwaardetijd in de hersenen.

EEG als biomarker voor receptor activatie

Om in PK-PD studies de biofase distributie kinetiek in detail te kunnen bestuderen is de keuze van het farmacodynamische eindpunt erg belangrijk. Electroencefalogram (EEG) metingen vormen bij uitstek een geschikt farmacodynamisch eindpunt omdat het een continu eindpunt is, het effect met hoge resolutie in de tijd kan worden gemeten en het effect zowel bij proefdieren als bij de mens kan worden gekwantificeerd. Opiaten laten een specifiek effect zien in de delta-band van het EEG; onder invloed van opiaten verandert het EEG van een signaal met hoge frequentie en lage amplitude naar een signaal met lage frequentie en hoge amplitude.

PK-PD modellering van de EEG effecten van opiaten

In eerdere studies zijn de EEG effecten van de synthetische opiaten alfentanil, fentanyl en sufentanil bestudeerd in ratten. Daarbij werd hysteresis waargenomen voor fentanyl en sufentanil. Deze kon goed beschreven worden met het effect-compartment model. Voor alfentanil werd een directe relatie tussen bloed concentratie en EEG effect waargenomen. De biofase concentratie-effect relatie van de drie opiaten kon gekarakteriseerd worden met het sigmoidale $E_{\max}$ model. Aanvullend is er ook mechanistisch onderzoek verricht naar de factoren die de vorm en de ligging van deze concentratie-effect relaties bepalen. Dit had vooral betrekking op de rol van receptor binding en activatie. De receptor bindingskarakteristieken werden bepaald met behulp van een *in vitro* model en de PK-PD relaties werden geanalyseerd op basis van het zogenaamde “operational model of agonism”. Dit leverde aanwijzingen op voor een aanzienlijke receptor reserve, wat inhoudt dat niet alle receptoren bezet hoeven te zijn om het maximale effect te bereiken. Dit werd bevestigd in studies naar de invloed van voorbehandeling met de irreversibele antagonist β -FNA, wat resulteert in een

afname van het aantal functionele receptoren (experimentele receptor “knock-down”). Voorbehandeling met β -FNA resulteerde in een verschuiving van de concentratie-effect relatie naar hogere alfentanil concentraties met een gelijkblijvend maximaal effect. De verschuiving in de concentratie-effect relatie kwam overeen met een 40-60% afname in het aantal beschikbare receptoren.

1.4 Doel van het in dit proefschrift beschreven onderzoek

Het onderzoek in dit proefschrift heeft betrekking op de ontwikkeling van mechanistische PK-PD modellen voor de effecten van opiaten, met speciale aandacht voor 1) de distributie naar de plaats van werking in de hersenen en 2) de binding en activatie van de μ -opiat receptor. Hiertoe werden de PK-PD relaties van een serie van opiaten met sterk verschillende fysisch-chemische en farmacologische eigenschappen onderzocht. De opiaten werden voornamelijk gekozen op basis van (partiële) agonistische eigenschappen op de μ -opiat receptor. De veranderingen in de delta-frequentieband van het EEG werden gebruikt als farmacodynamisch eindpunt. De volgende opiaten zijn bestudeerd: alfentanil, fentanyl, sufentanil, morfine, nalbuphine en butorphanol.

2. KARAKTERISERING VAN DE ROL VAN BIOFASE DISTRIBUTIE

2.1 Bepaling van morfine, nalbuphine en butorphanol concentraties in bloed en hersenmicrodialysaat monsters met behulp van HPLC

Om de PK-PD relaties van morfine, nalbuphine en butorphanol te kunnen karakteriseren werd een gevoelige HPLC methode ontwikkeld voor de bepaling van de concentratie in bloed en hersen microdialysaat monsters (hoofdstuk 3). Deze methode bestond uit een vloeistof-vloeistof extractie van de bloedmonsters met ethylacetaat. Voor de hersen-microdialysaat monsters was geen monstervoorbewerking nodig. De (voorbewerkte) monsters werden geïnjecteerd op een HPLC systeem dat gekoppeld was aan een electrochemische detector. De detectielimiet lag tussen 25 en 50 ng/ml voor de bloedmonsters en was 0.5 ng/ml voor morfine in microdialysaat. Voor de analyses kon worden volstaan met kleine monster volumina van rond de 50 μ l wat de methode zeer geschikt maakt voor PK-PD studies in ratten.

2.2 Membraan transport van opiaten *in vitro*: invloed van P-glycoproteïne en passieve permeabiliteit.

In hoofdstuk 4 wordt het onderzoek beschreven naar de relatieve bijdrage van het door het P-glycoproteïne gemedieerde efflux transport en de passieve diffusie aan het totale membraan transport van opiaten. De experimenten werden uitgevoerd in MDCKII: MDR1 en LLC-PK1:MDR1a cellen. Deze cellen zijn getransfecteerd met respectievelijk het humane MDR1 gen of het muizen MDR1a gen. De interactie van de opiaten met P-glycoproteïne werd zowel indirect, op basis van de inhibitie van de Pgp-gemedieerde efflux van 3 H-digoxine, als direct, op basis van het transport van het betreffende opiaat

in aan- en afwezigheid van de Pgp-blokker GF120918 bepaald. De passieve permeabiliteit van de opiaten werd bepaald in aanwezigheid van GF120918, waarmee de actieve efflux door Pgp werd geblokkeerd. De resultaten zoals verkregen met de digoxine assay lieten zien dat alfentanil, fentanyl, sufentanil, morfine en loperamide mogelijk substraten zijn voor Pgp omdat zij de actieve efflux van digoxine kunnen remmen. Echter, in de transport studies kon niet worden aangetoond dat alfentanil, fentanyl en sufentanil substraat zijn voor Pgp. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat de bijdrage van Pgp-gemedieerd transport aan het totale transport van deze opiaten niet significant is door de hoge passieve permeabiliteit (>500 nm/sec). Omgekeerd geldt dat Pgp transport een belangrijke invloed heeft op het totale BBB transport van morfine en loperamide omdat de passieve permeabiliteit van deze opiaten relatief laag is.

De relaties tussen de passieve permeabiliteit en de fysisch chemische eigenschappen (LogP, LogBBB, PSA) werden bestudeerd met regressie analyse. Er konden echter geen significante verbanden worden geïdentificeerd. Dit betekent dat de fysisch-chemische eigenschappen geen voorspellende waarde hebben met betrekking tot de passieve permeabiliteit. In dit verband is het van belang dat slechts een beperkt aantal opiaten is bestudeerd en bovendien dat de bestudeerde opiaten, qua structuur, tot twee afzonderlijke groepen behoren.

2.3 Populatie pharmacokinetische modellering van de hersen distributie van morfine: invloed van actieve verzadigbare influx and Pgp-gemedieerde efflux

Voor morfine werd de rol van biofase distributie kinetiek bestudeerd *in vivo* in chronisch geïstrumenteerde ratten. In deze ratten kan simultaan het verloop van de concentratie in de ECF en het EEG effect worden bestudeerd. Daartoe werden bij ratten vier corticale EEG elektroden en een microdialyse probe geïmplant. Voor de toediening van morfine, de Pgp blokker GF120918 (of het oplosmiddel) en midazolam en om bloed monsters af te kunnen nemen, werden vier permanente arteriële en veneuze cannules ingebracht. In elk experiment werd midazolam toegediend via een continu infuus om mogelijke opiaat-geïnduceerde convulsies te onderdrukken. In de verschillende studies varieerde de morfine dosering van 4 mg/kg tot 40 mg/kg. Om de invloed van Pgp te onderzoeken werd bij één serie van ratten ook GF120918 toegediend via een continu infuus. In hoofdstuk 5 lag de nadruk op het karakteriseren van het transport over de BBB en de invloed van Pgp hierop. De farmacokinetiek van morfine in bloed kon het beste beschreven worden met een drie-compartimenten model. De farmacokinetiek van de distributie naar de hersenen was niet-lineair over de verschillende doseringsgroepen. Bovendien werd een duidelijk effect van Pgp waargenomen. Om de distributie van morfine naar de hersenen te beschrijven werd een farmacokinetisch model opgesteld met verschillende wiskundige vergelijkingen voor het transport door passieve diffusie van en naar de hersenen, een verzadigbare actieve influx en een actieve efflux door Pgp. De actieve influx was al bij lage morfine concentraties verzadigd ($C_{50} = 9.9$ ng/ml). Er is op dit moment nog geen aanwijzing welke transporter betrokken is bij deze actieve

influx, maar in andere studies in *mdr1a* knock-out muizen is hetzelfde waargenomen. De actieve efflux door Pgp werd voor 42% geremd door GF120918. Deze resultaten laten zien dat de actieve efflux (voor een deel) via Pgp verloopt. Uit deze analyse kon geconcludeerd worden dat de kinetiek van distributie naar de hersenen van morfine complex is, wat belangrijke gevolgen kan hebben voor het karakteriseren van de PK-PD relaties.

2.4 PK-PD modellering van de EEG effecten van morfine: invloed van biofase distributie en de interactie met Pgp.

In hoofdstuk 6 werd de invloed van biofase distributie en Pgp op de EEG effecten van morfine bestudeerd. Er werd een significante hysteresis waargenomen tussen het verloop van de bloed concentraties en het verloop van het EEG effect in de tijd. Bovendien leidde toediening van GF120918 tot een sterke verlenging van de duur van het EEG effect. De hysteresis kon niet beschreven worden met een eenvoudig effect compartiment model. Uiteindelijk werd een “extended catenary biophase distribution model” voor het EEG effect van morfine ontwikkeld. In dit model wordt de distributie van morfine van het bloed naar de plaats van werking in de hersenen beschreven op basis van twee in serie geschakelde compartimenten; een transfer compartiment en een effect compartiment. Daarbij worden twee snelheidsconstanten bepaald, k_{le} die de snelheid van het transport door het transfer compartiment beschrijft en de k_{eo} die de snelheid van het transport uit het effect compartiment beschrijft. Vervolgens werd de relatie tussen de geschatte concentraties in het effect compartiment en het EEG effect beschreven met het sigmoidale E_{max} model.

Gelijktijdige toediening van GF120918 had alleen invloed op de k_{eo} . Deze waarneming is geheel in overeenstemming met de bevindingen in het hersendistributie model waar GF120918 ook alleen invloed had op de actieve efflux. In tegenstelling tot het hersendistributie model kon voor het extended catenary biophase distributie model geen actieve influx worden geïdentificeerd. Een opmerkelijke bevinding was verder dat de voorspelde biofase concentratie-tijd profielen duidelijk verschilden van de ECF concentratie-tijd profielen zoals bepaald met intracerebrale microdialyse. De maximale concentratie in ECF werd snel bereikt, terwijl een duidelijke vertraging werd waargenomen in de maximale biofase concentratie. Ook werd na toediening van een lage dosering van morfine in het ECF concentratie-tijd profiel een plateau waargenomen, terwijl dat voor de voorspelde biofase concentratie niet het geval was. Dit betekent dat bestudering van de hersendistributiekinetiek met behulp van intracerebrale microdialyse weliswaar belangrijke informatie kan opleveren over de mechanismen die de verdeling van morfine naar de plaats van werking in de hersenen bepalen, maar dat uiteindelijk geïntegreerde PK-PD studies nodig zijn om het concentratieverloop op de plaats van werking vast te stellen.

3. PK-PD MODELLERING VAN DE EEG EFFECTEN VAN OPIATEN DIE VERSCHILLEN IN FYSISCH-CHEMISCHE EN FARMACOLOGISCHE EIGENSCHAPPEN

3.1 De rol van complexe biofase distributie kinetiek

Het doel van het onderzoek dat wordt beschreven in dit deel van het proefschrift is gericht op de ontwikkeling van een mechanistisch PK-PD model voor opiaten. Daartoe werden de PK-PD relaties van de gehele set van opiaten, die onderling sterk verschillen in fysisch-chemische (lipofilie) en farmacologische (receptor affiniteit en intrinsieke effectiviteit) eigenschappen bestudeerd. De EEG effecten van de opiaten werden onderzocht in ratten waarbij corticale electrodes waren geïmplantéerd voor het monitoren van het EEG en permanente cannules voor de infusie van de opiaten, midazolam en vecuronium bromide en voor het afnemen van bloed monsters. Evenals in de studies met morfine, werd in alle ratten midazolam toegediend via een continue infusie om mogelijke opiaat geïnduceerde convulsies te onderdrukken. Na toediening van opiaten kan ademhalingsdepressie optreden. Bij toediening van alfentanil, fentanyl, sufentanil en de hoge dosering van morfine (40 mg/kg) moesten de ratten beademd worden, waarvoor toediening van de spierverslapper vecuronium bromide noodzakelijk was. Eerst werd de invloed van biofase distributie kinetiek in kaart gebracht (hoofdstuk 7). Met uitzondering van alfentanil werd voor alle opiaten een significante hysteresis waargenomen tussen het verloop van de concentratie in bloed en het verloop van het EEG effect. Voor deze opiaten werden twee verschillende biofase distributie modellen getest om de hysteresis te beschrijven, 1) het effect compartiment model en 2) het extended-catenary biophase distributie model zoals beschreven voor morfine. Alleen voor morfine was het extended-catenary biophase distributie model het beste model wat erop duidt dat alleen morfine een complexe biofase kinetiek laat zien.

Regressie analyse liet zien dat er een relatie bestaat tussen de passieve permeabiliteit en de waarde van k_{1e} , dat het transport naar het effect compartiment beschrijft.

3.2 Identificatie van het operational model of agonism voor de EEG effecten van opiaten: schatting van de *in vivo* affiniteit en intrinsieke activiteit op de μ -opioid receptor

In hoofdstuk 8 werd de relatie tussen de *in vivo* concentratie-effect relatie en de interactie met de μ -opioid receptor onderzocht. De voorspelde biofase concentratie-effect relaties werden eerst simultaan geanalyseerd met het sigmoïdaal E_{max} model.

De analyse was uitgevoerd om de opiaten te rangschikken op de waarde voor intrinsieke activiteit (maximale effect). Alfentanil had de hoogste intrinsieke activiteit ($123 \pm 13 \mu V$). Voor de andere opiaten werd de intrinsieke activiteit uitgedrukt als een fractie van alfentanil en deze fracties lagen tussen 0.81 en 0.10. Echter, om de *in vivo* concentratie-effect relaties volledig te begrijpen zijn meer mechanistische modellen noodzakelijk.

Hierbij dienen zowel de binding aan de receptor als de daaropvolgende signaal transductie processen te worden meegenomen en zal een duidelijk onderscheid gemaakt moeten worden tussen specifieke eigenschappen van zowel de stof als het biologische systeem. Daarom werden de pharmacodynamische data verder geanalyseerd op basis van het "operational model of agonism". Het daarin te gebruiken systeem maximum (oftewel het maximaal bereikbare effect in het biologische systeem) werd gelijk gesteld aan de intrinsieke activiteit van alfentanil, terwijl ook de helling van de concentratie-effect relatie van alfentanil werd gebruikt. Op basis van het operational model of agonism werden grote verschillen gevonden tussen de opiaten in zowel *in vivo* affiniteit als intrinsieke effectiviteit.

Het verband tussen de *in vivo* affiniteit (pK_A) en de *in vitro* affiniteit (pK_i) was een aanwijzing voor het bestaan van twee subgroepen binnen deze set van opiaten. Ook werd het verband tussen de *in vivo* effectiviteit ($\log \tau$) en de *in vitro* effectiviteit (Na/GTP-shift) onderzocht, maar er werd voor deze set van opiaten geen duidelijk verband gevonden. Mogelijke verklaringen hiervoor zijn het bestaan van meerdere μ -opiaat receptor subtypes en de mogelijke interactie van de opiaten met andere types opiaat receptoren.

4. CONCLUSIES

Het doel van het onderzoek beschreven in dit proefschrift was om een PK-PD model te ontwikkelen voor de EEG effecten van opiaten, waarbij inzicht zou worden verkregen in de mechanismen die de farmacologische effecten van opiaten bepalen. Dit proefschrift laat zien dat zowel biofase distributie als receptor interactie van invloed zijn op deze PK-PD relaties. Om een mechanistisch model te ontwikkelen dat ook nog voorspellende waarde heeft, moeten deze processen in detail bestudeerd worden. Daarnaast zijn ondersteunende data (bijv *in vitro* bindings data) essentieel voor de validatie en voorspelbaarheid van het model.



