



**Universiteit
Leiden**
The Netherlands

Translational pharmacology of dopamine receptor agonists and antagonists : prolactin and oxytocin as biomarkers

Stevens, J.

Citation

Stevens, J. (2011, September 22). *Translational pharmacology of dopamine receptor agonists and antagonists : prolactin and oxytocin as biomarkers*.

Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/17851>

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/1887/17851>

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

APPENDICES

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Het dopaminerge systeem is betrokken bij vele neurologische functies in het centrale zenuwstelsel, waaronder regulatie van gedrag, (vrijwillige) beweging, motivatie- en beloningssystemen, inhibitie van prolactine afgifte, slaap, stemmingswisselingen, aandacht en leerprocessen. Veel ziekten van het centrale zenuwstelsel vinden dan ook hun oorsprong in het disfunctioneren van dit belangrijke systeem. Voorbeelden hiervan zijn de ziekte van Parkinson, schizofrenie, en seksuele aandoeningen.

De therapieën die beschikbaar zijn voor de behandeling van neurologische aandoeningen waarin het dopaminerge systeem een rol speelt laten echter nog veel te wensen over. Verbeteringen zijn te verwachten door:

- onderzoek naar betere toedieningsroutes
- het ontwikkelen van mathematische modellen met een beter voorspellende waarde.

Veel dopaminerge stoffen hebben een lage en/of zeer variabele orale biologische beschikbaarheid. Dit tengevolge van beperkte absorptie vanuit de darm en/of een groot First-pass effect. Daarnaast is het bloedhersens-barriere transport van een aantal dopaminerge stoffen beperkt. Het is daarom belangrijk te zoeken naar alternatieve toedieningsroutes.

Intranasale toediening omzeilt de problemen met betrekking tot darmassage en First-pass effect. Daarnaast zou er via deze route mogelijk een selectieve verhoging van de hersendistributie plaats kunnen vinden wanneer er direct neus-naar-hersenen transport zou plaatsvinden. Om deze redenen zou intranasale toediening van belang kunnen zijn voor centraal werkende dopaminerge stoffen.

Verder is voor het ontwikkelen van betere therapieën meer kennis nodig van de biologische mechanismen die bepalend zijn voor het concentratie-tijd profiel (farmacokinetiek, PK) van de toegediende stof op de plaats van werking en het daarmee samenhangend verloop van het farmacologisch effect (farmacodynamiek, PD).

Voor centraal werkende dopamine agonisten en antagonist is de plaats van werking de extracellulaire vloeistof in de hersenen (hersens ECF) waaraan de membraangebonden dopamine receptoren zijn blootgesteld. Het is belangrijk om informatie over de PK van de stof op de plaats van werking te hebben omdat daarmee een beter onderscheid gemaakt kan worden tussen de stof- en de biologisch systeem-specifieke eigenschappen, die samen de PK-PD relatie van de stof bepalen. Dit onderscheid is nodig voor de ontwikkeling van meer mechanistische PK-PD modellen met een hogere voorspellende waarde.

De technieken die in onderzoek naar PK-PD relaties van centraal werkende stoffen in de mens toegepast kunnen worden beperken zich tot seriële bloedafname, in zeer beperkte mate het afnemen van lumbale cerebrospinaal vloeistof, en beeldvormende technieken waarmee op niet-invasieve wijze de bezetting van receptoren in het centrale zenuwstelsel zichtbaar gemaakt kan worden. Dit is op zich onvoldoende voor het verkrijgen van meer mechanistische informatie en er zal daarom gebruik gemaakt moeten worden van geavanceerde en goed gecontroleerde dierexperimenten. Vervolgens moet er dan speciale aandacht worden besteed aan de translatie van de PK-PD relatie in het proefdier naar dat in de mens.

Voor het bestuderen van de PK-PD relatie van een centraal werkende dopaminerge stof is het essentieel om te beschikken over een goed gekarakteriseerde biomarker die de dopaminerge activiteit in de hersenen weerspiegelt. Daarnaast zou deze biomarker bij voorkeur in het bloed gemeten moeten worden zodat het mogelijk is om dit zowel in het proefdier als in de mens te bepalen en vervolgens met elkaar in verband te brengen.

Het hormoon prolactine is mogelijk een geschikte functionele en translationele biomarker voor dopaminerge hersenactiviteit. Prolactine wordt geproduceerd in lactotrofen die zich in de hypofyse bevinden en uitgescheiden in het bloed, waarin het vervolgens gemeten kan worden. De afgifte van prolactine vanuit de lactotrofen wordt mede gereguleerd door dopaminerge hersenactiviteit. Daarnaast is er veel kennis beschikbaar over prolactine afgifte in meerdere biologische systemen, waaronder de rat en de mens. De vraag of prolactine geschikt is als translationele biomarker moet echter nog worden beantwoord. Dit kan worden onderzocht door prolactine spiegels in dier en mens te bestuderen na beïnvloeding van dopaminerge hersenactiviteit door toediening van dopamine (ant)agonisten.

In een aantal klinische studies is de PK-PD relatie tussen de PK van dopamine antagonist in plasma en de resulterende prolactine plasma spiegels als PD reeds onderzocht. Op basis hiervan zijn er een aantal humane PK-PD modellen ontwikkeld, waarin echter belangrijke informatie ontbreekt met betrekking tot de distributie van de antagonist naar de plaats van werking. Zoals reeds genoemd is deze informatie van bijzonder belang voor het maken van een onderscheid tussen de stof- en de biologisch systeem-specifieke eigenschappen, en daarmee voor het *voorspellen* van PK-PD relaties onder condities die anders zijn dan die waarvoor het model ontwikkeld is. Hierbij valt te denken aan een andere vorm van toediening, een andere (nieuw ontwikkelde) stof, een ziekte, en/of een ander biologisch systeem (dier vs. mens). In dat laatste geval is het noodzakelijk om voldoende informatie te hebben over de verschillen tussen de biologische systemen (*hoofdstuk 2*).

Dit proefschrift betreft het onderzoek naar de PK-PD relatie van de modelstof remoxipride, als centraal werkende dopamine antagonist. Hierin zijn prolactine plasma spiegels gebruikt als PD biomarker voor dopaminerge functionaliteit. Eerst is de PK-PD relatie onderzocht in de rat, na intranasale toediening in vergelijking tot intraveneuze toediening. Hierbij is de PK van remoxipride op de plaats van werking expliciet gemeten. Op basis van de intraveneuze data is een PK-PD model ontwikkeld. Vervolgens is getoetst of dit de PK-PD relatie na intranasale toediening zou kunnen *voorspellen*. Het uiteindelijke onderzoek betrof het toetsen van de voorspellende waarde van het PK-PD model voor de PK-PD relatie in de humane situatie na intraveneuze toediening van remoxipride.

Een nieuw, vrij-bewegend diermodel onder minimale stress omstandigheden voor preklinische studies na intranasale toediening van stoffen die actief zijn in het centraal zenuwstelsel

Voor de ontwikkeling van mechanistische PK-PD modellen is het cruciaal om te beschikken over diermodellen waarin de PK op de plaats van werking kan worden bepaald in samenhang met het verloop van het effect in vrij bewegende dieren onder minimale stress condities. Voor de intranasale toediening van stoffen voldeden de beschikbare methoden niet doordat gebruik werd gemaakt van anesthesie/fixatie tijdens het experiment, waardoor de fysiologie van het neus-epitheel beïnvloed wordt. Aangezien intranasale toediening in de mens niet plaatsvindt onder dergelijke omstandigheden, werd een nieuw model voor stressvrije intranasale toediening in de vrijbewegende rat ontwikkeld.

In de rat werden vier chronische implantaties uitgevoerd; i) een nieuw-ontwikkelde toedienings-canule in de neusholte voor de intranasale toediening, ii) een canule in de vena femoralis voor de intraveneuze toediening van remoxipride, iii) een intracerebrale microdialyse canule voor seriële opvang van microdialysaat monsterfracties (hersens ECF) en iv) een canule in de arteria femoralis voor seriële afname van bloedmonsters. De ratten kregen vervolgens een week rust voor herstel van de operatie en anesthesie alvorens de experimenten werden gestart. In dit nieuwe diermodel bleek de intranasale toediening van de kleurstof Evans Blue via de intranasale canule vooral het nasale olfactorisch epitheel aan te kleuren. Als biomarker voor de mate van stress werden corticosteron concentraties in plasma gemeten tijdens- en na een 1 minuut durende intranasale infusie van 10, 20 en 40 µl fysiologisch zout oplossing. Ter vergelijking werd dit tevens gemeten na intraveneuze toediening van deze oplossing. Hieruit bleek dat de ratten geen verhoogde stressrespons vertoonden als gevolg van intranasale toediening of experimentele handelingen in vergelijking tot die na intraveneuze toediening. Van paracetamol, als modelstof voor lineaire distributie, werd de PK in plasma- en in de hersens ECF bepaald, na intraveneuze en intranasale toediening van

equimolaire doses. Deze studie toonde aan dat de opname van paracetamol in de neus erg snel is en, zoals verwacht, werden er identieke waarden voor plasma en hersen ECF PK parameters gevonden (*hoofdstuk 3*).

Nieuwe analytische methoden voor de bepalingen van remoxipride concentraties in kleine plasma-, hersen homogenaat en hersen microdialysaat monsters

Voor het ontwikkelen van een mechanistisch PK-PD model voor dopaminerge stoffen werd de dopamine D2-antagonist remoxipride gekozen als modelstof. In de literatuur zijn diverse analytische methoden beschikbaar voor het bepalen van remoxipride concentraties in plasma en in cerebrospinaal vloeistof. Deze methoden zijn gebaseerd op monstervolumes van respectievelijk 0.5 tot 2 ml, met bijbehorende bepalinglimieten van 0.7-20 ng/ml.

De volumina van monsters verkregen uit proefdieren zijn echter veel kleiner; (maximaal) 200 µl bloed, wat overeenkomt met ~100 µl plasma, terwijl de microdialysaatmonsters rond de 20-40 µl liggen. Bepalingen in deze kleine volumina vereisen zeer gevoelige analytische technieken die voor de studies in dit proefschrift ontwikkeld moesten worden. Voor het bepalen van remoxipride in hersenhomogenaatmonsters was geen analyse beschikbaar.

Om remoxipride te meten in kleine plasma-, hersenhomogenaat en microdialyse monsters werd gebruik gemaakt van *vaste stof extractie en gecombineerde vloeistofchromatografie - massaspectrometrie*. **Hoofdstuk 4** beschrijft de ontwikkeling van deze methode, met optimalisatie en validatie in termen van calibratie curven, mate van extractie, de bepalinglimiet, de nauwkeurigheid, en de intra-dag en inter-dag variatie.

De remoxipride analyses werden met succes ontwikkeld en in grote aantallen plasma-, hersen ECF- en hersenhomogenaatmonsters werden de concentraties van remoxipride met hoge gevoeligheid en goede reproduceerbaarheid gemeten.

Distributie naar de hersenen: een nieuw mechanistisch farmacokinetisch model voor remoxipride na intranasale en intraveneuze toediening

Bovenstaande dierexperimentele- en analytische technieken werden gebruikt om de PK van remoxipride in plasma en hersen ECF te bepalen na intranasale- en intraveneuze toediening van 3 doseringen (4, 8 en 16 mg/kg). De PK van remoxipride werd beschreven met behulp van compartimentele PK *non-linear mixed effects modeling* (NONMEM).

Diverse geoptimaliseerde mathematische PK modelstructuren werden op kwantitatieve wijze met elkaar vergeleken en het beste model werd geselecteerd voor verdere PK modelontwikkeling. Op basis van de data verkregen uit de intrave-

neuze studies was een PK modelstructuur nodig bestaande uit een plasma-, een hersen ECF- en een perifeer compartiment. Elk compartiment werd beschreven door parameters voor volume van distributie en (intercompartimentele) klaring. Eliminatie van remoxipride uit de hersenen bleek essentieel om de PK in hersen ECF te kunnen omschrijven.

Vervolgens werden de intranasale data toegevoegd om de absorptieroutes te karakteriseren in termen van de mate van absorptie (biologische beschikbaarheid) en de absorptiesnelheid. Er werden drie absorptieroutes getoetst; neus-naar-systemische circulatie, neus-naar-hersenen en de combinatie van deze twee routes. De laatste omschreef de data het beste en resulteerde in een mathematisch PK model met *als primeur* het *kwantitatieve onderscheid* tussen de absorptie vanuit de neus naar de systemische circulatie en de directe absorptie vanuit neus naar de hersenen.

De totale biologische beschikbaarheid van remoxipride naar de hersenen was hoog (89%) en een groot deel daarvan (75%) kon worden toegeschreven aan voor deze stof trage directe absorptie van neus naar hersenen. De absorptiesnelheidsconstante voor het directe transport van de neus naar de hersenen was laag vergeleken met de absorptiesnelheidsconstante voor systemische opname vanuit de bloedbaan. Dit verklaarde de relatief langzame eliminatie van remoxipride uit plasma- en met name hersen ECF na intranasale toediening. Het PK model was hiermee in staat om zowel de intraveneuze als de intranasale kinetiek van remoxipride in plasma en op de plaats van werking te beschrijven (*hoofdstuk 5*).

Preklinisch mechanistisch PK-PD model en de translatie van rat-naar-mens

Er is redelijk veel bekend over het verband tussen dopaminerge activiteit in de hersenen en het verloop van de concentratie van het hormoon prolactine in plasma. Het hormoon prolactine wordt aangemaakt in de lactotrofen die zich in de hypofyse bevinden. De prolactine afgifte aan het bloed wordt onder meer gereguleerd door dopamine in de hersenen. Dopamine remt de afgifte van prolactine terwijl dopamine antagonisten de afgifte stimuleren. De homeostase wordt vervolgens weer hersteld doordat de lactotrofen prolactine aanmaken en zich daarmee weer vullen.

Op basis van de PK en PD data werd een PK-PD model ontwikkeld. Hierin bleek dat de afgiftesnelheid van prolactine vanuit de lactotrofen aan het bloed bepaald wordt door de PK van remoxipride in hersen ECF. Voor de aanmaaksnelheid van prolactine in de lactotrofen waren data nodig, verkregen na herhaalde toediening van remoxipride. Hierbij werd het tijdsinterval tussen de eerste en tweede toediening gevarieerd, analoog aan de klinische studie waarvan de PK-PD waarden beschikbaar werden gesteld voor toetsing van de voorspellende waarde van het ontwikkelde PK-PD model. Ook werd een postieve homeostatische terug-

koppeling van prolactine concentraties in plasma op de aanmaak van prolactine in de lactotrofen in het model ingebouwd. Circadiane ritmiek, zoals in klinische PK-PD modellen als onderdeel werd gepubliceerd, bleek voor het preklinische model niet identificeerbaar. Zo werd er een nieuw mechanistisch PK-PD model ontwikkeld bestaande uit de volgende componenten:

1. Het PK model voor remoxipride concentraties op de plaats van werking.
2. Een pool-model dat de prolactine aanmaak en opslag in lactotrofen, en de prolactine afgifte naar en de prolactine eliminatie uit plasma beschrijft.
3. De positieve terugkoppeling (homeostase) voor de fysiologische relatie tussen prolactine concentraties in plasma en de aanmaaksnelheid van prolactine in de lactotrofen, en
4. De relatie tussen remoxipride hersen ECF concentraties en prolactine afgifte (dopamine antagonist model).

Dit mechanistische PK-PD model bleek de lagere afgifte van prolactine aan plasma na herhaalde dosering van remoxipride op verschillende tijdstippen goed te beschrijven.

Het model maakt vervolgens een onderscheid tussen stof (remoxipride) afhankelijke effecten en de homeostatische terugkoppeling van het biologische systeem middels prolactine plasma concentraties. Deze *positieve terugkoppeling* is een *nieuwe bevinding* die het inzicht in dit biologische systeem verdiept. Daarnaast bleek het mechanistische PK-PD model de PK-PD relatie van remoxipride na intranasale toediening in de rat goed te kunnen voorspellen.

Voor de volgende stap, de translatie naar de mens, moest eerst een aantal parameters van het biologische systeem "rat" naar "mens" aangepast worden. Zo werd in het pool-model gebruik gemaakt van allometrische schaling op basis van lichaamsgewicht voor de parameters voor prolactine aanmaak-, afgifte- en eliminatiesnelheidscontanten. Voor de aanpassing van de positieve homeostatische terugkoppeling werden gegevens uit de literatuur gebruikt om te corrigeren voor het verschil in dichtheid van de lactotrofen in de hypofyse tussen rat en mens. Voor de bindingsaffiniteit van remoxipride voor de dopaminerge receptor werd in het dopamine antagonist model de literatuurwaarde gebruikt zoals bepaald in *in vitro* experimenten met menselijke lactotrofen. Omdat in de mens geen hersenconcentraties gemeten waren (/konden worden) en het verband tussen plasma- en hersenconcentraties van remoxipride in de rat lineair is, werd de aanname gemaakt dat de verhouding tussen concentraties in de compartimenten die de vrije fractie beschrijven in de rat dezelfde is als die voor de mens. Met deze aanpassingen naar het menselijke biologische systeem bleek het model in staat de PK-PD van remoxipride in de mens te voorspellen, ook na herhaalde intraveneuze toediening (*hoofdstuk 6*).

Samenvattend zijn de belangrijkste resultaten en bevindingen:

- De ontwikkeling van een nieuw verfijnd proefdiermodel voor intranasale toediening onder nagenoeg stressvrije omstandigheden.
- De ontwikkeling van gevoelige analyse methoden voor het meten van remoxipride in diverse matrices in kleine monstervolumina.
- De ontwikkeling van een nieuw semi-fysiologisch compartimenteel PK model waarin voor de eerste keer is aangetoond dat het mogelijk is het transport vanuit de neus naar het bloed zowel als het directe transport vanuit neus naar hersenen in kwantitatieve termen van zowel mate als snelheid te beschrijven.
- De ontwikkeling van een nieuw mechanistisch PK-PD model waarmee de prolactine respons na intraveneuze en intranasale toediening van remoxipride beschreven kan worden, waarbij de postieve terugkoppeling van prolactine concentraties in plasma op de aanmaak van prolactine in de lactotrofen voor het eerst gekarakteriseerd is.
- De aanpassing van het nieuwe mechanistische PK-PD model voor het humane biologische systeem, waarmee de prolactine respons na toediening van remoxipride in de mens voorspeld kan worden.

Het in kwantitatieve termen kunnen beschrijven van de diverse absorptieroutes van stoffen na intranasale toediening is een *absolute primeur* en geeft de mogelijkheid om een strict onderscheid te kunnen maken tussen de invloed van de specifieke stof- en formuleringseigenschappen en de systeem-specifieke eigenschappen. Hierdoor kan er een grote vooruitgang geboekt worden in de kennis van de intranasale toediening en de toepassing daarvan.

De ontwikkeling van het preklinische PK-PD model voor dopaminerge inhibitie door remoxipride toediening kan worden gezien als een eerste stap naar een alomvattend translationeel mechanistisch PK-PD model voor dopaminerge modulatie. Het model is ontwikkeld voor de dopamine antagonist remoxipride. Voor verdere ontwikkeling van het model zijn er een aantal belangrijke stappen te nemen.

Zo zou het translationele mechanistische PK-PD model verder gevalideerd en uitgebreid moeten worden voor andere dopamine antagonisten en vervolgens voor dopamine agonisten. Voor de dopamine agonisten speelt naast dopamine receptor affiniteit ook de intrinsieke effectiviteit een rol. Door samenvoegen van data verkregen in preklinische studies voor dopamine agonisten met verschillende intrinsieke effectiviteit zal uiteindelijk informatie beschikbaar komen over het maximale effect dat in een bepaald biologisch systeem te behalen valt. Daarnaast zouden de systeem specifieke parameters constant moeten blijven waardoor deze gevalideerd kunnen worden.

Voor dopamine agonisten is het gebruik van de prolactine plasma concentraties als biomarker voor dopaminerge modulatie in de rat minder geschikt. De concentraties van prolactine in plasma in de rat zijn onder basale condities erg laag en een verdere verlaging door dopaminerge stimulatie zou mogelijk niet goed te bepalen zijn. Dit betekent dat er in het mechanistische PK-PD model een biomarker voor dopamine stimulatie opgenomen zou moeten worden. Hiervoor zou de plasma concentratie van het hormoon oxytocine mogelijk geschikt zijn. Tevens zijn ook de verandering in het electro-encefalogram (EEG) en veranderingen in functionele magnetische resonantie beelden geschikt als translationele biomarkers. Uitbreiding van het model zou verder mogelijk zijn door het incorporeren van informatie over dopaminerge receptor bezetting, zoals zowel in de rat als in de mens te bepalen is, met behulp van positron emissie tomografie (PET). Met de combinatie van deze translationele biomarkers (biomarker "fingerprint") zal het mechanistische gehalte van het translationele PK-PD model, en daarmee de voorspellende waarde, sterk verbeterd worden.

Uiteindelijk zal het mechanistische begrip voor functionaliteit van het dopaminerge systeem geïncorporeerd kunnen worden in modellen voor ziekteprogressie in ziekten van het dopaminerge systeem, zoals de ziekte van Parkinson, schizofrenie en depressie.

NAWOORD

Een promotietraject is een tijdrovende en drukke periode. De rode lijnen die ten grondslag lagen aan dit proefschrift namen een hoge plaats in op mijn prioriteitenlijst. Nu dit traject is afgerond kan ik terugblikken en dringt het pas echt door hoeveel mensen direct danwel indirect aan een geweldige periode hebben bijgedragen.

Ik wil de gehele afdeling *Farmacologie* bedanken voor de prettige werksfeer en een paar personen in het bijzonder.

Joost, we hebben vanuit de J&J kamer talloze uren gespendeerd op werkgebied. Omdat onze projecten directe raakvlakken hebben, kon jij mijn ideeën inhoudelijk bekritisieren en ik die van jou, wat de kwaliteit ten goede kwam. Naast werk hebben we ook vele persoonlijke gesprekken gehad en plezier gemaakt.

Elke, bedankt voor de hulp die je mij gegeven hebt in het begin van mijn modelleer-perikelen, en voor het ontbijt na de 24-uurs studie van Ernst en mij.

Max, I want to thank you for the help you provided in my early stages of modeling. Also thanks for providing a place where we could play D&D, and many thanks for your hospitality when I visited Lodi.

Ernst, ik wil je bedanken voor het samen voorbereiden en uitvoeren van dier- experimenten en de ontwikkeling van het nieuwe diermodel. Daarnaast was je vrijgezellenfeest ook een van de hoogtepunten.

Robin, ook jij bedankt voor je bijdrage aan de dierexperimentele interpretaties.

Verder wil ik, in de volgorde van samenwerking, *Margret en Dirk-Jan* bedanken voor de onmisbare hulp die ze zijn geweest bij het uitvoeren van de analytische aspecten in dit proefschrift. Ik heb ontzettend veel van jullie geleerd.

Dank ben ik ook verschuldigd aan twee studenten die delen van de experimenten hebben uitgevoerd; *Sanne en Joëlle*. Jullie hebben echt goed en secuur werk afgeleverd, waardoor de vervolgstappen voor mij vergemakkelijkt werden.

Binnen de *LACDR borrelcommissie* wil ik specifiek *Miranda en Kjeld* bedanken voor de “vergaderingen”, lunchafspraken, een dubieus feest in Rotterdam en uiteraard de borrels zelf.

Ook ben ik *Joost en Bart*, werkzaam bij *LAP&P Consultants*, zeer dankbaar. Zonder jullie kennis, hulpvaardigheid en geduld had ik niet een dergelijk mechanistisch PK-PD model kunnen ontwikkelen.

Lieve ouders en vrienden, heel erg bedankt voor jullie belangstelling in mijn werk. Ik kan moeilijk uitleggen hoe nuttig het voor mij is geweest dit werk uit te leggen aan mensen die niet in dit specialistische vakgebied werkzaam zijn. Dat moeten jullie dus maar aannemen.

Lieve Nienke, aan jou ben ik enorm veel dank verschuldigd. Naast het feit dat je mijn privé-leven bijzonder veel glans geeft, ben je ook een goede steun in de rug geweest tijdens het werk dat ik heb verricht voor dit proefschrift. Je weet op welke momenten je mij kunt stimuleren met je optimisme, mij moet laten doorworstelen met een probleem of mij afstand moet laten nemen.

LIST OF PUBLICATIONS

- Stevens J, Suidgeest E, Van der Graaf PH, Danhof M and De Lange EC (2009) A new minimal-stress freely-moving rat model for preclinical studies on intranasal administration of CNS drugs. *Pharm Res* **26**:1911-1917.
- Stevens J, Van den Berg D-J, De Ridder S, Niederländer HAG, Van der Graaf PH, Danhof M and De Lange ECM (2010) Online solid phase extraction with liquid chromatography-tandem mass spectrometry to analyze remoxipride in small plasma-, brain homogenate-, and brain microdialysate samples. *Journal of Chromatography B* **878**:969-975.
- Stevens J, Ploeger BA, Van der Graaf PH, Danhof M, De Lange ECM Systemic- and direct nose-to-brain transport in the rat; a pharmacokinetic model for remoxipride after intravenous and intranasal administration.
Manuscript submitted
- Stevens J, Ploeger BA, Hammarlund-Udenaes M, Osswald G, Van der Graaf PH, Danhof M, De Lange ECM Mechanism-based PK-PD model for the prolactin biological system response following a dopamine inhibition challenge - quantitative extrapolation to humans.
Manuscript ready to be submitted

ABBREVIATIONS

AUC	area under the curve
BBB	blood-brain barrier
BSL	baseline
CL	clearance
C_{max}	maximum concentration
CN	hysphere silica based cyano propyl phase
CNS	central nervous system
CSF	cerebrospinal fluid
CORT	corticosterone
CV	coefficient of variation
DE	drug effect
EC₅₀	concentration inducing 50% of the E _{max}
ECD	electrochemical detection
ECF	extracellular fluid
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
E_{max}	maximal effect
F	bioavailability
GP	resin general phase
HPLC	high pressure liquid chromatography
ID	internal diameter
IIV	interindividual variability
IN	intranasal
IS	internal standard
IV	intravenous
k	rate constant
k_a	absorption rate constant
LC	liquid chromatography
LLOD	lower limit of detection
LLOQ	lower limit of quantitation
MCX	mixed mode cationic exchange
MS-MS	tandem mass spectrometry
MQ	purified Millipore water
OFV	objective function value
PD	pharmacodynamic

APPENDICES - ABBREVIATIONS

PF	positive feedback
PK	pharmacokinetic
QC	quality control
RP	reverse phase
SD	standard deviation
SEM	standard error of the mean
SH	resin strong hydrophobic phase
SPE	solid phase extraction
VPC	visual predictive check
V	volume of distribution
WCX	weak cationic exchange
Q	intercompartmental clearance