



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Towards predictive cardiovascular safety : a systems pharmacology approach**

Snelder, N.

### **Citation**

Snelder, N. (2014, June 25). *Towards predictive cardiovascular safety : a systems pharmacology approach*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/26945>

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/1887/26945>

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

Cover Page



Universiteit Leiden

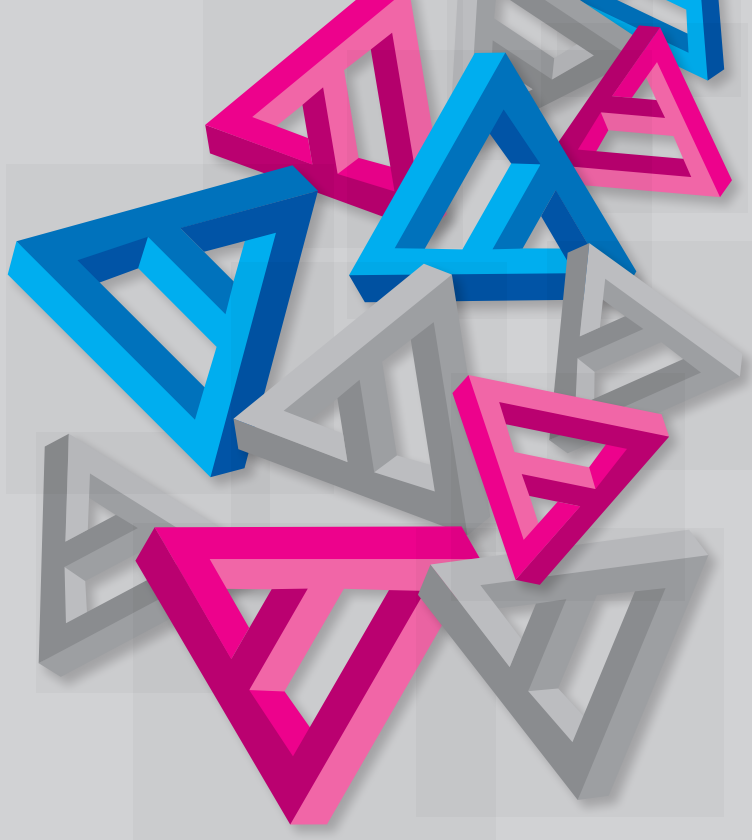


The handle <http://hdl.handle.net/1887/26945> holds various files of this Leiden University dissertation

**Author:** Snelder, Nelleke

**Title:** Towards predictive cardiovascular safety : a systems pharmacology approach

**Issue Date:** 2014-06-25



Samenvatting in het Nederlands



## Algemene inleiding en doel van het onderzoek

Nieuwe geneesmiddelen hebben vaak cardiovasculaire bijwerkingen die gerelateerd zijn aan veranderingen in bloeddruk. Een voorbeeld van een geneesmiddel met ongewenste effecten op de bloeddruk is finglimod, dat het onlangs geregistreerd is voor de behandeling van multiple sclerose (MS). Dit middel werkt op de zogenaamde sphingosine-1-fosfaatreceptor (S1P) welke naast de gewenste verbetering van de MS symptomen ook voor een (kleine) verhoging van de bloeddruk en een (kortstondige) verlaging van de hartslag zorgt. Deze stof is in dit onderzoek als voorbeeld stof gebruikt om de ongewenste effecten op de bloeddruk te begrijpen. Dit proefschrift beschrijft de ontwikkeling van een systeemfarmacologiemodel dat gebruikt kan worden om de verandering in bloeddruk (en andere hemodynamische variabelen) in mensen te voorspellen, op basis van informatie verkregen uit preklinisch, reageerbuis (*in vitro*) en dierexperimenteel onderzoek. Dit model is gebaseerd op de algemeen bekende principes van de bloeddrukregulatie. Dat wil zeggen, het gemiddelde van de arteriële bloeddruk (*'mean arterial pressure (MAP)'*) is gelijk aan het product van het hartminuutvolume (*'cardiac output (CO)'*) en de perifere weerstand (*'total peripheral resistance (TPR)'*). Vervolgens, is CO gelijk aan het product van de hartslag (*'heart rate (HR)'*) en het slagvolume (*'stroke volume (SV)'*). Hoewel deze relaties algemeen bekend zijn, zijn de effecten van geneesmiddelen op deze relaties nog niet op een mechanistische en kwantitatieve manier onderzocht.

Het onderzoek is ook gebaseerd op de principes van farmacokinetisch-farmacodynamisch modeleren (*'pharmacokinetic-pharmacodynamic (PKPD) modelling'*). Bij PKPD modeleren wordt de relatie tussen de verandering in de geneesmiddelconcentratie (farmacokinetiek) en verandering in het geneesmiddeffect (farmacodynamiek) over tijd gekwantificeerd. Mechanistische PKPD modellen karakteriseren, op een kwantitatieve manier, het causale verband tussen de toediening van het geneesmiddel en het uiteindelijke effect. Eén van de eigenschappen van een mechanistisch PKPD model is de strikte scheiding tussen de eigenschappen van het geneesmiddel en die van het biologische systeem. Stofspecifieke parameters beschrijven de interactie tussen het geneesmiddel en het biologische systeem met binding- en activeringconstanten, terwijl de systeemspecifieke parameters de dynamiek van het biologische systeem beschrijven. Dit onderscheid maakt het voorspellen van de geneesmiddeffecten in andere biologische systemen mogelijk (bijvoorbeeld de voorspelling van geneesmiddeffecten in mensen op basis van een mechanistisch model dat ontwikkeld is voor ratten). Recent is het concept van de systeemfarmacologie geïntroduceerd. Systeemfarmacologiemodellen zijn complexer dan mechanistische PKPD modellen, omdat deze zijn gebaseerd op de relaties tussen verschillende componenten van een biologisch/farmacologisch systeem of netwerk. Om deze redenen is een systeem-

farmacologiemodel uitermate geschikt om de effecten van geneesmiddelen op de relatie tussen MAP, CO, HR, SV en TPR te kwantificeren (**Hoofdstuk 1**)

De doelen van het onderzoek dat beschreven is in dit proefschrift waren 1) het ontwikkelen van een systeemfarmacologiemodel om de effecten van geneesmiddelen met verschillende werkingsmechanismen op de relatie tussen MAP, CO, HR, SV en TPR op een kwantitatieve manier te karakteriseren en 2) het kwantificeren van de cardiovasculaire effecten van de S1P modulator fingolimod met dit model.

## Ontwikkeling van een systeemfarmacologiemodel om het cardiovasculaire systeem (CVS) te karakteriseren

In **Hoofdstuk 3** is een systeemfarmacologiemodel ontwikkeld om geneesmiddeleffecten op het CVS te karakteriseren in spontaan hypertensieve ratten (SHR). Dit model is gebaseerd op de wisselwerking tussen MAP, CO en TPR en wordt hier het '*Basic CVS model*' genoemd. De effecten van een groep geneesmiddelen die op verschillende manieren de bloeddruk veranderen werden gekarakteriseerd in SHR's. Deze ratten waren langdurig geïnstrumenteerd met sondes die de stroming van het bloed in de aortawortel (CO), HR en MAP continue registreren. De veronderstelling was dat twee aspecten van de studieopzet essentieel zijn om de parameters van het '*Basic CVS model*' succesvol te karakteriseren: i) de selectie van de groep van geneesmiddelen met een werking op het cardiovasculaire systeem en ii) de continue meting van de waarden van zowel MAP als CO, voor, tijdens en na toedienen van het geneesmiddel. Door het selecteren van een aantal cardiovasculaire geneesmiddelen met bekende, maar verschillende werkingsmechanismes, was het mogelijk alle systeemspecifieke parameters van het '*Basic CVS model*' met goede precisie te schatten. Bovendien kon er een onderscheid gemaakt worden tussen systeemspecifieke en stofspecifieke parameters. Dit geeft aan dat het model inderdaad stofonafhankelijk is. Het model kan daarom, in principe, ook toegepast worden om de cardiovasculaire effecten van nieuwe stoffen (geneesmiddelen die niet voor dit onderzoek gebruikt zijn) te voorspellen. Het meten van CO was essentieel om alle parameters van het '*Basic CVS model*' te kunnen identificeren, omdat dit resulteerde in de informatie die nodig is om een onderscheid te kunnen maken tussen hemodynamische veranderingen in CO en TPR. De conclusie was dat de onderzoeksopzet heeft geresulteerd in de data om de wisselwerking tussen MAP, CO en TPR op een kwantitatieve en mechanistisch manier te identificeren. Het model kan worden toegepast om het werkingsmechanisme (het aangrijpingspunt) van nieuwe geneesmiddelen die de bloeddruk veranderen te identificeren.

Een beperking van dit model is dat in de praktijk CO niet vaak gemeten wordt vanwege het complexe en invasieve karakter van de bijbehorende procedure. Om deze reden, is het 'Basic CVS model' uitgebreid door CO te splitsen in HR en SV (**Hoofdstuk 4; 'Extended CVS model'**) met als doel 1) het karakteriseren van de werking van geneesmiddelen op de relatie tussen HR en MAP, welke beide belangrijke variabelen zijn voor de veiligheid van nieuwe geneesmiddelen, en 2) te onderzoeken of het werkingsmechanisme en het aangrijpingspunt van nieuwe geneesmiddelen vastgesteld kan worden op basis van alleen HR en MAP metingen.

Het gedrag van het 'Extended CVS model' is geëvalueerd door de verandering in MAP, CO, HR, SV en TPR te simuleren na het inhiberen van HR, SV of TPR met een fictief (hypothetisch) geneesmiddel. De karakteristieke profielen van het tijdsverloop van het geneesmiddeleffect op MA, CO, HR, SV en TPR worden ook wel 'signature profiles' genoemd. Er waren duidelijke verschillen zichtbaar na het inhiberen van HR, SV of TPR. Hieruit kan geconcludeerd worden dat, zelfs als CO niet wordt gemeten, het waarschijnlijk is dat 'Extended CVS model' gebruikt kan worden om het aangrijpingspunt van nieuwe geneesmiddelen te identificeren. De volgende wetmatigheden werden waargenomen bij de ontwikkeling van het model: i) Als de richting van het geneesmiddeleffect op HR en MAP hetzelfde is (een verhoging van HR en MAP of een daling van HR en MAP) is het waarschijnlijk dat het geneesmiddel primair HR beïnvloedt. ii) Als de richting van geneesmiddeleffect op HR en MAP tegengesteld is (een verhoging van HR en een daling in MAP of *vice versa*) is het waarschijnlijk dat het geneesmiddel een primair effect op SV of TPR heeft. Vervolgens kan er een onderscheid gemaakt worden tussen een primair effect op SV of TPR, op basis van de vertraging tussen het moment toedienen van het geneesmiddel en het optreden van het effect op MAP. Een grotere vertraging duidt op een primair effect op SV en een kleine vertraging duidt op een primair effect op TPR. Zowel MAP als HR zijn belangrijke variabelen in het onderzoek naar veiligheid van nieuwe geneesmiddelen.

Ondanks het feit dat in de praktijk vaak de verandering in MAP en HR simultaan gemeten wordt, worden er in het algemeen in het geneesmiddelonderzoek twee onafhankelijke relaties tussen de blootstelling aan het geneesmiddel en het effect op MAP en HR bepaald. Op deze manier wordt er geen rekening gehouden met de relatie tussen MAP en HR. Het 'Extended CVS model' heeft daarom als bijkomend voordeel dat geneesmiddeleffecten op MAP en HR simultaan geanalyseerd kunnen worden. Dit resulteert in één set van parameters en daarmee één schatting van de dosering/concentratie die nodig is om 50% van het maximale effect (' $EC_{50}$ ') te bereiken. Hierdoor kunnen eenduidige conclusies over de cardiovasculaire effecten van nieuwe geneesmiddelen getrokken worden en dit komt de selectie van nieuwe geneesmiddelen ten goede.

Het *'Basic CVS model'* is verder uitgebreid door de invloed van verschillen in bloedregulatie tussen normotensieve en hypertensieve ratten te kwantificeren. Omdat er duidelijke verschillen in bloeddrukregulatie zijn tussen normotensieve en hypertensieve ratten, kan de grootte van het geneesmiddeleffect op de verschillende hemodynamische eindpunten sterk variëren tussen verschillende rat stammen. Om deze reden zijn de uitkomsten die zijn verkregen met het *'Basic CVS model'* niet direct toepasbaar op normotensieve ratten. Dit is een nadeel, omdat de veiligheid van nieuwe geneesmiddelen initieel vaak in normotensieve ratten onderzocht wordt. Om het systeemfarmacologie model uiteindelijk te kunnen toepassen om de cardiovasculaire effecten van nieuwe geneesmiddelen in gezonde vrijwilligers en in patiënten met hoge bloeddruk te voorspellen, is het essentieel dat het model voor zowel normotensieve als hypertensieve ratten toepasbaar is. In vergelijking met normotensieve ratten hebben hypertensieve ratten een hogere uitgangswaarde voor MAP en lagere uitgangswaarde voor CO, terwijl de uitgangswaarde voor HR niet significant verschillend is. Uit de hemodynamische wetten ( $MAP=CO \times TPR$  en  $CO=HR \times SV$ ) volgt dan dat hypertensieve ratten een lagere uitgangswaarde voor SV en een hogere uitgangswaarde voor TPR hebben dan normotensieve ratten. Bovendien is er op individueel niveau een relatie vastgesteld tussen de sterkte van bloeddrukregulatie (*'feedback'*) en de uitgangswaarde van MAP wat resulteert in een 2-keer sterkere feedback van MAP (bloeddrukregulatie) in een typische normotensieve rat in vergelijking met een typische hypertensieve rat. Dit duidt op verminderde bloeddrukregulatie in hypertensieve ratten.

## **Toepassing van het systeemfarmacologiemodel op S1P receptor agonisten**

Fingolimod is een S1P receptor agonist die wordt gebruikt in de behandeling van multiple sclerose. In mensen wordt het gebruik van S1P receptor agonisten geassocieerd met cardiovasculaire bijwerkingen. Er kan een kortstondige verlaging van hartslag (gemiddeld 8 bpm, 6 uur na de eerste toediening) en een kleine verhoging van MAP (gemiddeld 1-2 mmHg na 2 maanden) optreden na toediening van een therapeutische dosering van 0.5 mg fingolimod. Bovendien zijn er bij hogere doseringen van 1.25 en 5 mg gemiddelde verlagingen in HR van respectievelijk 13.8 en 16.6 bpm waargenomen, waarbij het minimum 6 uur na de eerste toediening bereikt werd. Na langdurige toediening verdween het effect en keerde HR terug naar de uitgangswaarde. Bij de hogere doseringen werd een milde verhoging in MAP waargenomen van ongeveer 5-6 mmHg. Zowel het immunosuppressieve effect, als de cardiovasculaire effecten, van deze stoffen worden veroorzaakt door binding aan de S1P receptor. Dit bemoeilijkt de zoektocht naar nieuwe S1P receptor



agonisten welke effectief zijn in de behandeling van multiple sclerose, maar geen cardio-vasculaire bijwerkingen hebben. Een kwantitatief begrip van de hemodynamica van deze effecten zou de basis kunnen vormen voor de selectie van nieuwe geneesmiddelen met een verbeterd bijwerkingenprofiel. Bovendien zou dit inzicht geven in de mogelijkheden om deze effecten voor bestaande en nieuwe S1P agonisten te voorkomen of te verminderen door gelijktijdige toediening van andere geneesmiddelen met een tegengesteld effect of door het ontwikkelen van titratieschema's, waarbij de dosering langzaam wordt verhoogd om het lichaam de tijd te geven de (geringe) verandering in de bloeddruk te compenseren voordat de volgende, hogere, dosering wordt gegeven. Het '*Extended CVS model*' kan gebruikt worden om een kwantitatief begrip van deze effecten te verkrijgen, omdat de modelstructuur en de bijbehorende parameterschattingen onafhankelijk zijn van de geneesmiddelen die gebruikt zijn om het model te ontwikkelen. Daarom kan het model in principe ook voor nieuwe geneesmiddelen gebruikt worden en zodoende ook voor fingolimod. Het effect van fingolimod wordt bewerkstelligd door binding aan de S1P receptor. In het algemeen, wordt receptorbinding gekarakteriseerd door de evenwichtsconstante (dissociatieconstante), welke de concentratie weergeeft waarbij 50% van de receptoren bezet is. Dissociatieconstanten kunnen met *in vitro* experimenten bepaald worden. Door het '*Extended CVS model*' met een receptorbinding- en activatiemodel te integreren kan het model niet alleen voor fingolimod, maar ook voor nieuwe S1P agonisten gebruikt worden (door de dissociatieconstante van fingolimod te vervangen door de dissociatieconstante van de nieuwe S1P agonist). Bovendien kan het model hierdoor gebruikt worden om de cardio-vasculaire effecten van fingolimod en nieuwe S1P agonisten in mensen te voorspellen.

De translatie van de farmacologie van fingolimod en andere S1P agonisten van ratten naar mensen wordt bemoeilijkt door het feit dat niet de stof zelf, maar de fosfaatmetabolieten, welke gevormd worden door afbraak (metabolisme) van het geneesmiddel, farmacologisch actief zijn. De eerste stap in de ontwikkeling van een translationeel model voor S1P agonisten was het karakteriseren van de PK van fingolimod en de actieve metaboliet fingolimod-fosfaat ('*fingolimod-phosphate (fingolimod-P)*') in ratten en mensen. Omdat er tussen ratten en mensen grote verschillen bestaan in weefseldistributie en activiteit van het enzym sphingosine kinase (S1PHK) dat de omzetting van fingolimod in fingolimod-P katalyseert, kan de PK van fingolimod-P in mensen niet eenvoudig voorspeld worden met behulp van schaling op basis van het verschil in het gewicht tussen ratten en mensen (allometrische schaling). In **Hoofdstuk 5** is daarom een semi-mechanistisch PK model ontwikkeld voor de inter-conversie van S1PHK substraten en de gevormde fosfaten in ratten en mensen. Een specifiek doel was het onderzoeken of de snelheid van de fosforylering

in de bloedplaatjes (welke *ex vivo* bepaald kan worden) een voorspellende waarde heeft voor de verschillen in farmacokinetiek tussen ratten en mensen.

In deze studies is het tijdsverloop van de fingolimod en fingolimod-P bloedconcentraties in ratten, na intraveneuze en orale toediening, simultaan geanalyseerd met gegevens over de snelheid van de inter-conversie in *ex vivo* experimenten en *ex vivo* gegevens over de verdeling tussen bloed en plasma. Daarnaast zijn data van twee studies in gezonde vrijwilligers, die oraal fingolimod kregen in dosering van 0.5, 1.25 en 5 mg, simultaan geanalyseerd met data van *ex vivo* inter-conversie en bloed-plasma verdelings experimenten in humaan bloed. De farmacokinetiek van fingolimod en fingolimod-P in de rat en in de mens kon goed worden beschreven met een semi-mechanistisch PK model met 1) een term (parameter) voor de pre-systemische fosforylering van fingolimod tijdens de eerste leverpassage, 2) een parameter voor de fosforylering in de bloedplaatjes en 3) een parameter voor de defosforylering in het plasma. Het integreren van *ex vivo* en *in vivo* data maakt de voorspelling van het de fingolimod en fingolimod-P concentraties in zowel plasma als bloed (in plaats van alleen in bloed) mogelijk. Dit is belangrijk omdat volgens de '*free drug hypothesis*' geneesmiddeleffecten gedreven worden door vrije plasmaconcentraties. Bovendien heeft het integreren van data van *ex vivo* en *in vivo* experimenten het mogelijk gemaakt verschillen in de fosforyleringssnelheid te kwantificeren. In mensen wordt fingolimod in bloedplaatjes vier keer langzamer gefosforyleerd dan in ratten, terwijl de defosforyleringssnelheid vergelijkbaar is tussen ratten en mensen.

Er kan geconcludeerd worden dat er grote verschillen bestaan in de fosforyleringssnelheid van fingolimod tussen ratten en mensen welke niet verklaard kunnen worden met allometrische schaling. Hoewel het verschil in fosforylering in de bloedplaatjes de twaalfvoudige overschatting van de fingolimod-P blootstelling in mensen slechts gedeeltelijk verklaart, vormt het ontwikkelde PK model een basis voor het voorspellen van het verloop van de plasmaconcentraties van S1PHK substraten en de bijbehorend fosfaatmetabolieten. Verschillen in de pre-systemische fosforylering moeten daarbij worden meegenomen.

In **Hoofdstuk 6**, zijn de cardiovasculaire effecten van fingolimod in normotensieve en hypertensieve ratten gekarakteriseerd op basis van het '*Extended CVS model*' in combinatie met het semimechanistische farmacokinetische model voor fingolimod. De eerste stap, in deze analyse, was de evaluatie van verschillende hypothesen over het werkingsmechanisme van fingolimod. Daartoe werden simulaties uitgevoerd, zonder daarbij de systeemspecifieke parameters van het '*Extended CVS model*' te veranderen.

- 1) Er werden verschillende hypothesen geformuleerd met betrekking tot het aangrijpingspunt (HR, SV of TPR) en de richting van het effect (positief of negatief). Dit resulteerde in 6 mogelijke combinaties van effecten.
- 2) Voor elke hypothese werden simulaties uitgevoerd voor de effecten op de MAP, CO, HR, SV en TPR.
- 3) Er werd geëvalueerd welke hypothese resulteerde in beste beschrijving van de experimentele data.

De conclusie was dat het effect van fingolimod-P op het CVS alleen beschreven kon worden als fingolimod-P op meerdere plaatsen het CVS beïnvloedt. Uiteindelijk zijn er 3 verschillende effecten geïdentificeerd: 1) een snel optredend positief effect op TPR, 2) een langzaam optredend (en blijvend) positief effect op TPR en 3) een kortstondig (en van tijdelijke aard) negatief effect op HR. In deze eerste stap werden empirische modellen gebruikt om het effect van fingolimod-P te beschrijven. Met deze modellen kon de meest waarschijnlijke werkingsplaats geïdentificeerd worden. Bovendien werd aangetoond dat het *'Extended CVS model'* toegepast kan worden om de hemodynamische veranderingen in vijf verschillende parameters (MAP, CO, HR, SV en TPR) te beschrijven, onder de aanname dat fingolimod-P het CVS op twee plaatsen beïnvloedt. Vervolgens werd de op deze manier verkregen informatie over het werkingsmechanisme van fingolimod-P vergeleken met informatie uit de literatuur. De volgende samengevatte informatie over het werkingsmechanisme van fingolimod-P was beschikbaar ten tijde van de analyse.

- i. Fingolimod-P beïnvloedt HR via binding aan de  $S1P_1$  receptor. Hierdoor wordt het kaliumkanaal IKACH geactiveerd wat resulteert in een negatief chronotroop effect.
- ii. Fingolimod-P induceert internalisatie en degradatie van de  $S1P_1$  receptor, waardoor deze niet meer functioneel is. Hierdoor gedraagt fingolimod-P zich als een functionele antagonist (een geneesmiddel dat de werking van een lichaamseigen stof opheft).
- iii. Fingolimod-P bindt aan de  $S1P_3$  receptor en heeft hierdoor een effect op TPR.
- iv. Samentrekken van het gladde spierweefsel in de bloedvaten wordt geïnduceerd door een verhoging van de intracellulaire calciumconcentratie. De calciumafhankelijke fase van samentrekken van het gladde spierweefsel verloopt snel en is van korte duur, maar calcium sensitiviteit als resultaat van stimulatie door een agonist is van blijvende aard en resulteert in een blijvende verhoging van TPR

Deze informatie komt overeen met het op basis van het model geïdentificeerde werkingsmechanisme van fingolimod-P. In een volgende stap werd daarom het empirische model voor het effect van het geneesmiddel vervangen door een model dat is gebaseerd op de receptortheorie. In dit model wordt onderscheid gemaakt tussen receptorbinding en activatie processen. Hierdoor heeft het model een grotere voorspellende waarde voor het effect van fingolimod-P in mensen en voor het effect van andere  $S1P$  agonisten in ratten en mensen. Omdat fingolimod-P een agonist voor de  $S1P$  receptor is, is het van belang om

rekening te houden met de competitieve interactie tussen de endogene agonist, S1P, en fingolimod-P voor zowel het effect op HR als het effect op TPR. Het ontwikkelde model bestond uit vergelijkingen voor de beschrijving van 1) de kinetiek van competitieve binding aan de S1P<sub>1</sub> receptor (snel effect op HR), 2) de snelheid van S1P<sub>1</sub> receptor internalisatie en degradatie (kortstondig effect op HR), 3) de competitieve binding aan de S1P<sub>3</sub> receptor (snel effect op TPR) en 4) de sensibilisatie van de S1P<sub>3</sub> receptor (langzaam en blijvend effect op TPR).

Door het karakteriseren van de effecten op HR en TPR kon de door fingolimod-P geïnduceerde verandering in MAP, CO, HR, SV en TPR in normotensieve en hypertensieve ratten goed beschreven worden. De dissociatieconstanten voor de effecten op TPR ( $Kd_{TPR}$ ) en HR ( $Kd_{HR}$ ) werden geschat op respectievelijk 17.7 [betrouwbaarheidsinterval ('*confidence interval* (CI)'): 3.74 – 31.6] en 132 [CI: 68.9 – 195] nM op basis van de vrije plasmaconcentratie. De  $Kd_{TPR}$  is in dezelfde orde van grootte als de in de literatuur gerapporteerde *in vitro* dissociatieconstanten voor binding van fingolimod-P aan de humane S1P<sub>3</sub> receptor van  $3.15 \pm 1.7$  nM. Echter, de geschatte waarde voor  $Kd_{HR}$  is ongeveer 1000 keer groter dan de in de literatuur gerapporteerde waarde van  $0.17 \pm 0.14$  nM. Hierbij is het belangrijk om op te merken dat de S1P<sub>1</sub> receptor *in vivo* geïnternaliseerd en gedegradeerd wordt. Dit kan de schatting van dissociatieconstanten beïnvloeden. Bovendien refereren de waardes uit de literatuur naar experimenten met de humane S1P<sub>1</sub> en S1P<sub>3</sub> receptoren en zijn er geen dissociatieconstanten voor ratten gerapporteerd. Dit is belangrijk omdat er bekend is dat er grote verschillen in receptorbinding tussen ratten en mensen kunnen bestaan. Dit is een complicerende factor in de interpretatie van het eerder genoemde duizendvoudig verschil tussen de geschatte *in vivo*  $Kd_{HR}$  en de gerapporteerde *in vitro*  $Kd_{HR}$ .

Omdat het ontwikkelde model gebaseerd is op concepten uit de receptortheorie kon het model gebruikt worden om het effect van siponimod (een nieuwe S1P receptor agonist met een ander selectiviteitsprofiel) op CVS te voorspellen. Hiertoe werden de voor fingolimod-P geschatte dissociatieconstanten gecorrigeerd voor het moleculairgewicht, de vrije fractie en de ratio van de  $EC_{50}$ 's uit *in vitro* bindingsexperimenten. Dit resulteerde in een goede voorspelling van het effect van siponimod op MAP en HR in ratten. Dit impliceert dat het model in principe gebruikt kan worden om het effect van andere S1P agonisten op het CVS in ratten te voorspellen.

## Prospect

Een uiteindelijke toepassing van het ontwikkelde systeemfarmacologiemodel is het voorspellen van de effecten van nieuwe geneesmiddelen, en specifiek S1P agonisten, op het

cardiovasculaire systeem in mensen op basis informatie uit preklinische experimenten. In de **Hoofdstuk 7** werd besproken welke stappen hiervoor nodig zijn en welke aannames hiervoor gedaan moeten worden.

Het is de verwachting dat het *'Extended CVS model'* van ratten naar mensen geëxtrapoleerd kan worden, maar deze extrapolatie zal niet alleen gebaseerd zijn op lichaamsgrootte en andere factoren. Deze verwachting is gebaseerd op de voorspelling de cardiovasculaire effecten van nicardipine (een calciumantagonist) als modelstof. Na het vermenigvuldigen van de dissipatiesnelheden ( $k_{out}$ ) met een bepaalde factor (een hoge waarde wat resulteert in een erg kleine vertraging in respons in mensen) en het schatten van de *'feedback'* kon het effect van nicardipine op MAP en CO goed voorspeld worden. Deze extrapolatie is gebaseerd op data van slechts één voorbeeld stof, met een werkingsmechanisme dat identiek is aan dat van een de stoffen in de trainingset (amlodipine). Daarom is het niet zeker of de verkregen systeemparemeters stofonafhankelijk zijn. Verder onderzoek is nodig om het effect van verschillende cardiovasculaire geneesmiddelen met verschillende werkingsmechanismes op MAP, CO en HR te voorspellen.

Als laatste werd onderzocht of het humane CVS model (dat ontwikkeld is voor nicardipine) gebruikt kan worden om het effect van S1P agonisten te karakteriseren en te voorspellen. In het supplement van dit proefschrift is beschreven welke stappen en aannames hiervoor nodig zijn.

## Conclusies

Het onderzoek beschreven in dit proefschrift heeft geleid tot een systeemspecifiek model dat gebruikt kan worden om de effecten van nieuwe geneesmiddelen (die niet gebruikt zijn om het model te ontwikkelen) op de relatie tussen MAP, CO, HR, SV en TPR te kwantificeren. Bovendien kan dit model gebruikt worden om het aangrijpingspunt van nieuwe geneesmiddelen te identificeren op basis van alleen MAP en HR metingen. Een ultieme toepassing van het *'Extended CVS model'* is de voorspelling van cardiovasculaire effecten in mensen op basis van informatie uit preklinische experimenten. Voordat het ontwikkelde model hiervoor gebruikt kan worden, moeten de systeemspecifieke parameters naar mensen geschaald worden en moet het model gevalideerd worden met behulp dat MAP, HR en CO metingen na toediening van verschillende stoffen met een werking op het cardiovasculaire systeem.

Daarnaast heeft het onderzoek geleid tot een systeemfarmacologiemodel dat gebruikt kan worden om de cardiovasculaire effecten van fingolimod-P en andere S1P agonisten in

ratten te kwantificeren en voorspellen. Dit systeemfarmacologiemodel is een combinatie van het 'Extended CVS model' en receptorbinding en activatie modellen om het effect van fingolimod-P (en andere S1P agonisten) op HR en TPR te kwantificeren. Het ontwikkelde model geeft een kwantitatief begrip van het werkingsmechanisme onderliggend aan de cardiovasculaire effecten van fingolimod-P. Bovendien kon het model gebruikt worden om de cardiovasculaire effecten van een nieuwe stof, siponimod te voorspellen. Hiertoe werden de voor fingolimod-P geschatte dissociatieconstanten gecorrigeerd voor het moleculairgewicht, de vrije fractie en de ratio van de  $EC_{50}$ 's uit *in vitro* bindingsexperimenten. Op grond hiervan kan worden geconcludeerd dat het model gebruikt kan worden om het effect van andere S1P agonisten op het CVS in ratten te voorspellen. De verwachting is dat dit model ook gebruikt kan worden om de cardiovasculaire effecten van fingolimod-P en andere S1P agonisten in mensen te voorspellen. De aannames, beschreven in het supplement van dit proefschrift, dienen gevalideerd te worden middels verder onderzoek.