



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Multi-biomarker pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of central nervous systems active dopaminergic drugs

Brink, W.J. van den

Citation

Brink, W. J. van den. (2018, November 21). *Multi-biomarker pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of central nervous systems active dopaminergic drugs*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/65997>

Version: Not Applicable (or Unknown)

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/65997>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/65997> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Brink, W.J. van den

Title: Multi-biomarker pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of central nervous systems active dopaminergic drugs

Issue Date: 2018-11-21

APPENDICES

Nederlandse samenvatting

Ziekten van het centraal zenuwstelsel (*Central Nervous System; CNS*) verlagen de kwaliteit van leven van miljoenen mensen over de hele wereld. Er is veel tijd, moeite en energie gestoken in het ontwikkelen van *CNS* medicijnen, terwijl de successen beperkt zijn. Een belangrijke reden hiervoor zijn het beperkte begrip van de complexiteit van de hersenen, de aanwezigheid van de bloed-hersen-barrière die de penetratie van medicijnen in de hersenen tegenhoudt, bijwerkingen in het centraal zenuwstelsel, en de afwezigheid van goede biomarkers die de interactie tussen medicijnen en neurofysiologische systemen representeren.

Systeemfarmacologie heeft als doel om meerdere biologische systemen te integreren bij het evalueren van farmacologische effecten, om zo het begrip en de voorspelbaarheid van medicijneffecten te verbeteren. Veel systeem-farmacologische benaderingen zijn veelbelovend, echter, deze zijn veelal gebaseerd op gedetailleerde farmacologische voorkennis van het betreffende medicijn en biologische systeem. Dit is niet altijd het geval tijdens de vroege fase van medicijn-ontwikkeling. Met de zogenaamde *metabolomics*-benadering kunnen de farmacologische effecten gescreend worden op een data-gedreven manier om de systeem-effecten van medicijnen te evalueren op het niveau van biochemische mechanismen. Echter, om de typisch niet-lineaire relaties tussen medicijn dosering en effect te begrijpen en te extrapoleren, moeten deze relaties gekwantificeerd worden met behulp van farmacokinetisch/farmacodynamisch (PK/PD) modelleren. Het is daarom belangrijk om van een volledige empirische benadering te bewegen naar een mechanistische benadering zonder daarbij de data-gedreven eigenschappen van de *metabolomics*-benadering te verliezen. Bovendien, omdat de mogelijkheden het bemonsteren van het brein beperkt zijn, is het belangrijk om biomarkers te vinden die, aanwezig in het bloed, de medicijneffecten in het brein representeren. Dit proefschrift gaat daarom in op twee vragen:

1. Hoe kunnen we de relatie tussen medicijn dosering en de systeem-respons *in vivo* kwantificeren?
2. Hoe kunnen we biomarkers in het bloed identificeren die effecten in het brein representeren?

Sectie I – Algemene introductie

Als eerste stap zijn deze vragen in **hoofdstuk 2** in de context geplaatst van de vroege fase van *CNS* medicijnontwikkeling, namelijk die van de translationele farmacologie; de stap van dier naar mens. Hierbij ligt een speciale focus op de farmacologische schaling tussen diersoorten. Aan de ene kant maakt *metabolomics* het mogelijk om de biochemische verschillen tussen dieren grondig te onderzoeken. Aan de andere kant geeft mechanistisch PK/PD modelleren, in combinatie met technieken als allometrische en fysiologie-gebaseerde schaling, de mogelijkheid om medicijneffecten te extrapoleren van de ene naar

de andere soort. Bovendien kan mechanistisch PK/PD modelleren gebruikt worden om de relatie tussen neurologische effecten en biomarkers in het bloed te beschrijven. Het zogenaamde PK/PD-*metabolomics* modelleren is voorgesteld als een integratie tussen PK/PD en *metabolomics* die de potentie heeft om het begrip en het voorspelbaar vermogen gedurende translationeel medicijnonderzoek te verbeteren. In **hoofdstuk 3** hebben we een systematische zoektocht in PubMed uitgevoerd om de biochemische mechanismen te onderzoeken die betrokken zijn bij dopaminerge medicijn-effecten, met daarin meegenomen de beschikbaarheid van biomarkers in het bloed die hieraan gerelateerd zijn. Een veelvoud aan biochemische mechanismen bleek geassocieerd met dopaminerge medicijneffecten, zoals de neurotransmitter, the *nitric oxide*, en de *kynurenine* systemen. Daarnaast bleken de neuro-endocriene en metabole systemen te reageren op toediening van dopaminerge medicijnen. Hoewel dit deels toe te schrijven is aan de beperkte selectiviteit van veel dopaminerge medicijnen, lieten ook de selectieve medicijnen een breed effectenpatroon zien. Met uitzondering van prolactine vonden we in deze literatuurstudie geen biomarkers die de relatie tussen medicijneffecten in het brein en biomarkers in het bloed beschreven. Bovendien liet deze studie zien dat farmacologische effecten over het algemeen statisch worden geëvalueerd (dosis-respons relatie op één tijdstip), zonder de tijdsdynamiek mee te nemen die van groot belang is voor de dosis-effect relatie.

Op basis van deze twee hoofdstukken hebben we drie eigenschappen bepaald waaraan een PK/PD-*metabolomics* methode-ontwikkeling aan moet voldoen om onze vragen te beantwoorden:

1. Een longitudinale analyse van een systeem-biomarker respons met meerdere doseringsniveaus
2. Simultane analyse van medicijnconcentraties en medicijneffect in het bloed en de hersenen
3. Een integratie van PK/PD principes in multivariate analyse van *metabolomics* data

Sectie II – De dynamische respons van het neuro-endocriene systeem om dopamine D₂ medicijneffecten te bestuderen

Een van de manieren om biomarkers in het bloed te vinden is om de respons van het neuro-endocriene systeem op toediening van CNS medicijnen te bestuderen. Het neuro-endocriene systeem verbindt het neurale systeem met het endocriene systeem, en bestaat uit de hypothalamus, de hypofyse en verschillende verder afgelegen endocriene organen. Neurale projecties vanuit de hypothalamus naar de hypofyse, zoals de tubero-infundibulaire dopamine (TIDA) neuronen, worden aangestuurd door neuro-chemische stoffen zoals dopamine, serotonine en acetylcholine. Deze neuronen geven een signaal aan de hypofyse (door bijvoorbeeld dopamine uit te scheiden) om van daaruit de uitscheiding van hormonen (bijvoorbeeld prolactine) in het bloed te reguleren. Daarnaast

kunnen neuronen die hun cellichaam in de hypothalamus hebben ook neuro-peptiden (zoals oxytocine) uitscheiden vanuit hun eind-voeten die zich in de hypofyse bevinden. Het principe van deze neuro-endocriene mechanismen is al vaker gebruikt om dopaminerge medicijneffecten te bestuderen met behulp van prolactine als biomarker.

Hoewel het vaak toegepast is, met bewezen nut in biomarker-gedreven medicijnontwikkeling, heeft een *single*-biomarker benadering nadelen. Zoals we zagen in **hoofdstuk 3**, veroorzaken dopaminerge medicijnen een veelvoud aan effecten op het neuro-endocriene systeem. Anticiperend op een breder *in vivo* farmacologisch profiel, willen we een multi-biomarker benadering ontwikkelen dat de dynamische respons van het neuro-endocriene systeem op dopaminerge medicijntoediening beschrijft. In **hoofdstuk 4** hebben we de haalbaarheid van deze benadering onderzocht met behulp van de dopamine D₂ antagonist remoxipride. Interessant genoeg lieten allen *adrenocorticotropic hormone* (ACTH) en prolactine een respons zien, terwijl *brain-derived neurotropic factor*, follikelstimulerend hormoon, groeihormoon, luteïniserend hormoon, schildklier stimulerend hormoon en oxytocine niet reageerden op remoxipride. Het aantal neuro-endocriene hormonen dat een effect liet zien na toediening van de dopamine D₂ agonist quinpirole was ook laag, zoals we laten zien in **hoofdstuk 5**, hoewel nu ook groeihormoon en schildklier stimulerend hormoon een effect lieten zien. Overwegende dat het dopaminerge systeem biologisch verbonden is met meer neuro-hormonen en neuro-peptiden dan het aantal dat wij identificeerden in onze studies, is het waarschijnlijk dat de onderliggende biologische netwerken een bepaalde veerkracht hebben als het gaat om dopaminerge verstoring door remoxipride en quinpirole. Daarnaast suggereert de afwezigheid van het effect van de antagonist remoxipride op groeihormoon en schildklierhormoon dat er geen endogene dopaminerge stimulatie van deze hormonen plaatsheeft. Gegeven de hogere affiniteit van quinpirole voor de D₂ receptor, in vergelijking met endogeen dopamine, lijkt het waarschijnlijk dat alleen hoge mate van D₂ receptor activatie van invloed is op de uitscheiding van deze twee hormonen. Vervolgstudies met meerdere dopamine agonisten en antagonisten zijn nodig om de gevonden biomarkers te valideren.

Met behulp van PK/PD modelleren zijn de potenties (mate van activiteit van een medicijn) van quinpirole en remoxipride op de verschillende hormonen bepaald. Een belangrijke vraag is hoe deze geïnterpreteerd moeten worden. Er zijn twee factoren die de potentie van medicijnen beïnvloeden: receptor affiniteit (mate van bindingsvermogen aan de receptor) en signaal transductie efficiëntie (mate van doorgeven van een signaal na binding aan de receptor). In het geval van remoxipride laten we zien dat de receptor activiteit bepalend kan zijn voor verschillen in potenties tussen de verschillende biomarkers. Prolactine en ACTH lieten allebei een effect zien met een verschillende potentie voor remoxipride. Prolactine is welbekend als biomarker voor dopamine effecten. De ACTH respons betreft

waarschijnlijk een *off-target* effect, aangezien de verhoging van ACTH concentraties in het bloed niet verklaard kan worden met een dopamine effect – de ACTH concentraties zouden dan verlagen. Mogelijk kan dit effect verklaard worden met een adrenerg mechanisme, aangezien de ratio van de potenties ($EC_{50,ACTH}/EC_{50,PRL}$) vergelijkbaar is aan de ratio van de receptor affiniteiten ($k_{i,\alpha 2}/k_{i,D2}$) (**hoofdstuk 4**). Terwijl dit voorbeeld laat zien dat de receptor affiniteit bepalend kan zijn voor het verschil in potenties, laten we in **hoofdstuk 5** zien hoe signaal transductie de verschillen kan verklaren. Met behulp van vergelijking (1) hebben we de relatie tussen quinpirole concentraties en hormoon effecten beschreven. Hierin namen we aan dat de affiniteit (k_A) gelijk was bij ieder hormoon, terwijl het maximale effect (E_m) en de signaaltransductie efficiëntie parameter (τ) verschillend waren tussen de hormonen. Onder deze aannames kon deze vergelijking de effecten van quinpirole op de hormoonspiegels goed beschrijven. Een interessante observatie in **hoofdstuk 5** was, bovendien, dat de signaaltransductie efficiëntie beschreven kon worden aan de hand van de dopamine D_2 receptor expressie op de hormoon-uitscheidende cellen in de hypofyse (vergelijking (2)). Dit laat zien dat de signaal transductie efficiëntie gedreven kan worden door karakteristieken van een specifiek biologisch sub-systeem.

$$E = \frac{E_m * \tau * C}{k_A + (1 + \tau) * C} \quad (1)$$

$$\tau = \tau_0 * e^{slp * \text{receptor expression}} \quad (2)$$

Naast het effect van eenmalige toediening van quinpirole op de hormoonspiegels, hebben we in **hoofdstuk 5** ook de effecten onderzocht van langdurige toediening. Dit kan belangrijk zijn voor medicijnen die bedoeld zijn om langdurig gebruikt te worden, zoals anti-parkinson D_2 agonisten. Inderdaad kan het effect van D_2 agonisten over tijd veranderen als gevolg van sensitisatie en tolerantie mechanismen, zoals eerder aangetoond in ratten. In onze studies zagen we de basale bloedspiegels van ACTH en prolactine veranderen na acht dagen van toediening. Bovendien veranderden niet alleen de basale spiegels, maar ook de potentie van quinpirole om schildklier stimulerend hormoon te beïnvloeden. Biologische terugkoppelingsmechanismen kunnen dus, als gevolg van langdurige toediening van quinpirole, zowel de basale biomarker spiegels als de farmacologische gevoeligheid van biomarkers veranderen. In tegenstelling tot de neuro-endocriene biomarkers, lieten de *biogenic amines* en aminozuren geen specifieke verandering zien als gevolg van langdurige toediening, zoals we in **hoofdstuk 7** laten zien. Dit suggereert dat de systemen onderliggend aan deze biomarkers veerkrachtiger zijn dan het neuro-endocriene systeem als het gaat om langdurige blootstelling aan quinpirole.

In de hoofdstukken 4 en 5 hebben we aangenomen dat de neuro-hormonen aangestuurd werden vanuit het brein. Aangezien de hypofyse niet beschermd wordt door de bloed-hersen-barrière, is deze ook blootgesteld aan medicijnconcentraties in het bloed. Hoewel

we in **hoofdstuk 4** op basis van model selectie criteria konden aantonen dat de prolactine respons op remoxipride waarschijnlijk hoofdzakelijk vanuit de hersenen aangestuurd wordt, konden we dit niet aantonen voor ACTH. Ook voor het effect van quinpirole op de verschillende hormonen konden we dit niet aantonen in **hoofdstuk 5**. In het geval van quinpirole namen we aan dat het effect op de neuro-endocriene hormonen hoofdzakelijk in het brein geïnitieerd werd, vanwege het feit dat de vrije medicijnconcentraties in het brein 5 keer hoger zijn dan in het bloed. De huidige afwezigheid van simultane medicijn en dopamine concentraties in hersenen en bloed, beperkt de mogelijkheden tot het ontwikkelen van den model dat de invloed van *CNS* medicijnen op beide niveaus tegelijk beschrijft.

Samenvattend beschrijven deze hoofdstukken studies die een longitudinale analyse van een neuro-endocriene systeem-biomarker bevatten met meerdere doseringsniveaus van een D_2 agonist en een D_2 antagonist. Door PK/PD modellering toe te passen op deze data kregen we kwantitatief inzicht in de neuro-endocriene respons op dopaminerge medicijnen, en konden we deze relateren aan medicijn-specifieke en biologisch systeem-specifieke farmacologische eigenschappen.

Sectie III – De dynamische respons van biochemische systemen om dopamine D_2 medicijneffecten te bestuderen

In dit deel van het proefschrift hebben we de multi-biomarker benadering uitgebreid van een neuro-endocrien platform met 15 hormonen en peptiden naar een *metabolomics* platform met 76 aminozuren en *biogenic amines*. Er bestaan verschillende statische methoden om tijdsafhankelijke en multi-biomarker (bijv. *metabolomics*) data te analyseren. Zo is clusteren een gebruikelijke methode om de belangrijkste longitudinale patronen in een multivariate dataset te identificeren. In onze data, echter, wilden we niet alleen de tijdsdimensie, maar ook de dimensie van dosering en plaats van bemonstering (zoals bloed en brein) bestuderen. Al eerder is een multivariate methode ontwikkeld, *ANOVA-simultaneous component analysis* (ASCA), die dit mogelijk maakt. Met deze methode worden de onafhankelijke variabelen (tijd, dosering etc.) als categorische data behandeld. Hoewel dit goed werkt in het geval deze categorieën zich relatief lineair tot elkaar verhouden, wordt het problematisch wanneer dit niet het geval is. In onze data waren de monstertijden en de verschillende doseringen erg niet-lineair, waardoor deze methode het identificeren van de onderliggende dynamiek zou beperken. Belangrijker nog, geen van de bestaande methoden om multivariate dynamische patronen te analyseren integreerde farmacologische principes. Om die reden besloten we een methode te ontwikkelen die om kan gaan met niet-lineaire tijds- en doserings-patronen, en die PK/PD concepten integreert in de multivariate data analyse. In **hoofdstuk 6** hebben we tijdsafhankelijke *biogenic amine* en aminozuur patronen gemeten na toediening van verschillende doseringen

van de D₂ antagonist remoxipride. Vervolgens hebben we een drie-stappen benadering gebruikt – i) het beschrijven van alle individuele biomarkers met een *turnover model*; ii) het clusteren van de metabolieten op basis van hun farmacologische parameters; iii) het beschrijven van de clusters met een *turnover model*. Hiermee konden we zes verschillende PK/PD patronen identificeren, met *in vivo* potenties van 0.0027, 0.019 of 0.12 µM, wat suggereert dat er meerdere biochemische systemen beïnvloed worden door remoxipride. Hoewel we niet kunnen zeggen of deze verschillen gerelateerd zijn aan *off-target* effecten of verschillen in signaaltransductie efficiëntie, kunnen we met dit model wel iets zeggen over de therapeutische range op basis van een systeem-effect. Van de 44 metabolieten die we robuust genoeg konden meten, werden er 18 geïdentificeerd als potentiële biomarker voor verdere validatie.

Hoewel dit een stap voorwaarts was van een volledig empirische, data-gedreven methode, miste dit model nog een belangrijk element; er was geen component dat de biomarker respons in het brein beschreef. Helaas was toentertijd de methode om *biogenic amines* en aminozuren in de extracellulaire vloeistof van het brein (via microdialyse) nog niet robuust genoeg om te gebruiken voor onze modellen. Na optimalisatie van deze methode konden we in **hoofdstuk 7** *biogenic amines* en aminozuren simultaan meten in bloed en brein. Met onze modelleringsmethoden konden we nu de plaats van medicijnwerking bepalen; een belangrijke stap vooruit. Met betrekking tot deze uitbreiding van de methode doen we drie belangrijke observaties. Allereerst, hoewel de concentraties van quinpirole in het brein 5 keer hoger zijn, lijken veel effecten te ontstaan buiten het brein. Ten tweede blijken veel van deze effecten over de bloed-hersen-barrière heen te getransporteerd te worden om alsnog een respons in het brein te veroorzaken. Als derde, hoewel een veelvoud aan biochemische responsen in de hersenen waargenomen worden als gevolg van quinpirole toediening, worden maar een enkele van deze responsen over de bloed-hersen-barrière getransporteerd om vervolgens in het bloed potentieel te kunnen functioneren als biomarker.

Tegen de verwachting in, namen we een heel aantal aminozuren en *biogenic amines* waar die verlaagd waren na toediening van remoxipride (antagonist), maar ook na quinpirole (agonist). Mogelijk kan dit verklaard worden met *off-target* effecten. Zo heeft remoxipride hoge affiniteit voor de sigma receptor, en zou het op deze manier de opname van aminozuren kunnen reduceren. Verder onderzoek is echter nodig om de onderliggende verklaring te achterhalen. Bovendien benadrukt deze observatie het belang van uitbreiding van deze studies naar meerdere dopaminerge medicijnen. Hiermee is het mogelijk om te identificeren welke effecten specifiek zijn voor interactie met de dopamine receptor.

Kortom, in **hoofdstuk 6** en **hoofdstuk 7** hebben we een methode ontwikkeld dat de farmacologische principes die onderliggend zijn aan de relatie tussen medicijn dosering en biochemische systeem-respons te kwantificeren. Hiermee hebben we de *in vivo* concentratie-effect relaties, de plaats van werking, en potentiële biomarkers in het bloed bepaald.

Perspectieven van de PK/PD-*metabolomics* methode in CNS medicijnontwikkeling

De PK/PD-*metabolomics* methode heeft potentie om de vroege inzichten tijdens het traject van medicijnontwikkeling te vergroten op een data-gedreven en integrale manier. *Metabolomics* analyse kan eenvoudig toegevoegd worden aan de standaard set van analyses die worden gedaan in (pre-)klinische studies op een relatief goedkope manier, afgezet tegen de kosten van een laat-klinische mislukking van een medicijn. In tegenstelling tot de huidige selectiecriteria van nieuwe medicijnen gedurende de vroege ontwikkeling, veelal op basis van affiniteit voor een enkele receptor, is het mogelijk beter om te selecteren op basis van een affiniteitsprofiel voor meerdere receptoren, zoals blijkt uit literatuur. PK/PD-*metabolomics* zou een manier kunnen zijn om de relatie tussen zo'n *in vitro* affiniteitsprofiel en de *in vivo* systeem-effecten verder te bestuderen om uiteindelijk te komen tot een model dat de systeem-effecten kan voorspellen op basis van een affiniteitsprofiel. Hoe dan ook zal PK/PD-*metabolomics* van waarde zijn voor het ontdekken van nieuwe biomarkers, samen met hun farmacologische karakterisering. Bovendien kunnen op deze manier al vroegtijdig potentiële biomarkers in het bloed geïdentificeerd worden in relatie tot hun respons in het brein. Dit is van grote waarde, gezien de beperkingen van bemonstering van het menselijk brein. Uiteindelijk kan PK/PD-*metabolomics* zo de basis vormen van de schaling van medicijneffecten van dieren naar mensen om zo richting te geven aan de doseringsbepaling in de *first-in-human* studies.

Algemene conclusie

Het doel van deze studies was om een methode te ontwikkelen die de relatie tussen medicijndosering en de dynamische systeem-biomarker respons kan beschrijven, en die biomarkers in het bloed identificeert die iets vertellen over medicijneffecten in het brein. Hiervoor hebben we de PK/PD-*metabolomics* methode ontwikkeld die de belangrijkste biomarker patronen beschrijft in termen van farmacologisch relevante parameters zoals E_{MAX} en EC_{50} . Voor het neuro-endocriene systeem, waar we veel *a priori* biologische kennis van hebben, konden we een model ontwikkelen om de verschillen in hormoonrespons te verklaren met behulp van receptor expressie niveaus van de D_2 receptor. De combinatie van deze responsen zijn daarmee uniek voor stimulatie van de D_2 receptor. Daarnaast hebben we laten zien dat met PK/PD-*metabolomics*, in combinatie met tijdsopgeloste *metabolomics* data in het brein en het bloed, de plaats van werking van medicijnen bepaald

kan worden, en biomarkers in het bloed gevonden kunnen worden die iets zeggen over effecten in het brein. Met haar positie tussen data-gedreven multivariate methodes en mechanistische systeem-farmacologie modellen, kan PK/PD-*metabolomics* kwantitatieve farmacologische inzichten geven in de systeem-respons van *CNS* medicijnen op een data-gedreven manier.