



Universiteit
Leiden
The Netherlands

First-pass and systemic metabolism of cytochrome P450 3A substrates in neonates, infants, and children

Brussee, J.M.

Citation

Brussee, J. M. (2018, December 4). *First-pass and systemic metabolism of cytochrome P450 3A substrates in neonates, infants, and children*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/67291>

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/1887/67291>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/67291> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Brussee, J.M.

Title: First-pass and systemic metabolism of cytochrome P450 3A substrates in neonates, infants, and children

Issue Date: 2018-12-04

Chapter 9

Presystemisch en systemisch
metabolisme van geneesmiddelen
door cytochroom P450 3A enzymen in
kinderen – Nederlandse samenvatting

De farmacokinetiek (PK) van geneesmiddelen die worden toegediend aan neonaten, kinderen en adolescenten verschilt in kinderen ten opzichte van volwassenen door fysiologische verschillen als gevolg van groei en ontwikkeling (1, 2). Eén van deze ontwikkelingen is de rijping (maturatie) van metaboliserende enzymen, die invloed heeft op de metabole klaring van geneesmiddelen (3). Zoals beschreven in **Hoofdstuk 1**, richt het onderzoek in dit proefschrift zich op het metabolisme in kinderen door cytochroom P450 (CYP) 3A enzymen, waarbij midazolamklaring als surrogaat marker voor CYP3A activiteit is gebruikt (4). Het doel van dit proefschrift is het voorspellen van CYP3A-gemedieerde plasmaklaring van verschillende geneesmiddelen in neonaten, kinderen en adolescenten. Accurate voorspelling van plasmaklaring van geneesmiddelen is essentieel voor de wetenschappelijke onderbouwing van pediatrische doseringen voor een eerste klinische studie in kinderen en voor het ontwikkelen van doseeradviezen voor kinderen in de klinische praktijk.

Voor dit doel presenteren we in **Sectie I** onze visie op klinische studies in kinderen. Deze sectie beschrijft hoe op basis van PK eigenschappen van geneesmiddelen in kinderen geïndividualiseerde doseringsschema's in de pediatrische populatie kunnen worden ontwikkeld. **Sectie II** beschrijft het CYP3A-gemedieerde systemische metabolisme in kritisch zieke kinderen. Binnen het ontwikkelde populatie PK model zijn lichaamsgewicht, kritisch ziek-zijn en inflammatie geïdentificeerd als covariaten, welke een deel van de inter- en intra-individuele variabiliteit binnen deze populatie verklaren. De voorspellingen van dit model zijn vervolgens geëvalueerd in vergelijkbare (postoperatieve of kritisch zieke) patiënten en bij andere populaties waaronder preterm neonaten en gezonde en kritisch zieke volwassenen. **Sectie III** beschrijft methoden die onderscheid maken tussen presystemisch en systemisch CYP3A-gemedieerd metabolisme, om de rol van intestinale en hepatische CYP3A activiteit bij neonaten en kinderen met een grote leeftijdsspreiding te bestuderen. Tenslotte beschrijft **Sectie IV** hoe informatie over CYP3A-gemedieerde klaring van midazolam in kinderen kan worden gebruikt om plasmaklaring van andere CYP3A-substraten te schalen. De scenario's worden beschreven wanneer een pediatrische covariaatfunctie voor CYP3A-gemedieerde midazolamklaring kan worden toegepast voor het schalen van klaring van andere CYP3A-substraten bij pediatrische patiënten.

Sectie I. Kinderen in klinische studies: wetenschappelijk- onderbouwde farmacotherapie in kinderen met behulp van farmacokinetische-farmacodynamische modellen

In **Hoofdstuk 2** wordt onze visie op modelgebaseerde geneesmiddelontwikkeling in kinderen besproken. Er zijn vergeleken met volwassenen weinig en soms zelfs geen farmacokinetische-farmacodynamische (PKPD) studies in kinderen gedaan en daarom

worden doseringen van CYP3A-substraten en andere geneesmiddelen in kinderen vaak lineair of allometrisch geschaald vanaf doseringen in volwassenen. Echter, het voorspellen van plasmaklaring in voornamelijk jonge kinderen is ingewikkelder dan dat, omdat veel fysiologische veranderingen plaatsvinden, onder andere in de darmoppervlakte, de grootte van de lever ten opzichte van lichaamsgewicht en de cardiac output. Bovendien heeft elk hepatisch isoenzym een ander maturatieprofiel en daarom zijn maturatiefuncties voor elke hepatische eliminatieroute nodig die deze veranderingen goed beschrijven en kunnen voorspellen. Deze functies zijn niet altijd bekend, maar het bestuderen van klaring van het CYP3A-substraat midazolam (5) in kinderen zal onze kennis van de maturatiepatronen van CYP3A-enzymen vergroten.

Pediatrische PK modellen die geneesmiddelklaring beschrijven moeten worden ontwikkeld om wetenschappelijk-onderbouwde doseringsschema's voor kinderen te kunnen ontwikkelen. Deze modellen moeten grondig worden geëvalueerd en gevalideerd met externe data, zoals in hoofdstuk 4.

Een goede studieopzet is extreem belangrijk om een onderzoeksvraag in een farmacologische studie te kunnen beantwoorden. Daarom zou een multidisciplinair team van artsen, klinisch farmacologen en farmacometristen betrokken moeten zijn bij het opzetten van de studie, om onder andere te bespreken welke (covariaat) gegevens moeten worden verzameld op welke tijdstippen. De covariaatrelaties met klaring in de ontwikkelde PK modellen kunnen vervolgens worden gebruikt voor het individualiseren van doseringsschema's, mits de effectieve en veilige concentratie bekend is voor patiënten met verschillende niveaus van (kritisch) ziek-zijn. Gebaseerd op simulaties met het model kunnen doseeradviezen worden gedaan. Tevens moet het geoptimaliseerde doseringsschema worden geëvalueerd in de klinische praktijk. Voor deze aanpak zullen goed opgezette klinische PKPD studies een centrale rol spelen bij het ontwikkelen en bevestigen van modelgebaseerde adviezen voor doseringsschema's in kinderen.

Sectie II. Systemische CYP3A-gemedieerd metabolisme in kritisch zieke kinderen

In het verleden zijn grote verschillen waargenomen tussen de gerapporteerde gemiddelde waarden van midazolamklaring in pediatrische populaties van vergelijkbare leeftijden. Het belangrijkste verschil tussen deze cohorten is de mate van ziek-zijn, waar bij relatief gezonde kinderen een hogere midazolamklaring is gemeten dan in kritisch zieke kinderen. Onze hypothese is daarom dat deze

verschillen mogelijk kunnen worden verklaard door de mate van ziek-zijn en/of inflammatie.

In **Hoofdstuk 3** beschrijven we de systemische CYP3A-gemedieerde klaring van midazolam in kritisch zieke neonaten, kinderen en adolescenten na meerdere intraveneuze toedieningen getitreerd op therapeutisch effect. Gebaseerd op prospectief verzamelde PK data van 83 patiënten tussen de 0 en 17 jaar, is een twee-compartimenten PK model ontwikkeld dat de midazolamconcentraties goed beschrijft. Lichaamsgewicht is geïdentificeerd als meest significante covariaat voor klaring in het model, met een bijna lineaire toename in klaring met toenemend lichaamsgewicht. In overeenstemming met onze hypothese is een correlatie gevonden van verhoogde concentraties van de inflammatiemarker C-reactive protein (CRP) met verlaagde midazolamklaring, met een 51,2% lagere klaring als CRP toeneemt van 10 tot 100 mg/L. Orgaanfalen is ook gerelateerd aan midazolamklaring, namelijk zodra het aantal organen met orgaanfalen toeneemt van 1 naar bijvoorbeeld 2 of 3, dan daalt de klaring met respectievelijk 25,6% of 34,9%. Als gevolg hiervan kan de CYP3A-gemedieerde klaring van midazolam tot 77,4% lager zijn in patiënten met verhoogde CRP concentraties en een verhoogd aantal falende organen ten opzichte van gezondere patiënten.

De verlaagde midazolamklaring in kritisch zieke kinderen die wordt beschreven in **Hoofdstuk 3** is waarschijnlijk te wijten aan de verlaagde CYP3A activiteit bij verhoogde concentraties van de inflammatiemarkers CRP en interleukine-6 (6-8). Bovendien kan orgaanfalen, bovenop inflammatie, leiden tot een lagere midazolamklaring, al zijn de onderliggende mechanismes van hoe cardiovasculair, respiratoir (9), hepatisch en renaal falen (10) midazolam PK beïnvloeden nog onbekend (6). Deze verlaagde midazolamklaring in kritisch zieke kinderen leidt tot verhoogde midazolam plasmaconcentraties en -blootstelling in patiënten met inflammatie, orgaanfalen, of beide (**Hoofdstuk 3**).

Het ontwikkelde populatie PK model voor midazolam (**Hoofdstuk 3**) is vervolgens extern gevalideerd, zoals beschreven in **Hoofdstuk 4**, waar de voorspellende waarde van het model is geëvalueerd in zowel kritisch zieke en postoperatieve kinderen, als andere populaties zoals preterm neonaten en gezonde en kritisch zieke volwassenen. De resultaten laten zien dat het model de midazolamklaring adequaat kan voorspellen in kritisch zieke terme neonaten, kinderen en volwassenen. Vergeleken met de gerapporteerde waarden in de literatuur voor midazolamklaring, is de klaring in kritische zieke patiënten in onze studie over het algemeen lager, wat mogelijk te verklaren is door hun mate van ziek-zijn, omdat de meeste

gerapporteerde klaringswaarden uit studies met relatief gezonde kinderen komen (11-15).

In gezonde volwassenen wordt ook een hogere klaring voorspeld en waargenomen dan in de kritisch zieke volwassenen, dat kan worden verklaard door de afwezigheid van inflammatie en orgaanfalen in deze populatie. De voorspelde klaring wordt daarentegen sterk overschat in preterm neonaten met een lichaamsgewicht onder de 3,5 kg, die geboren zijn na een zwangerschapsduur korter dan 37 weken. Dit is waarschijnlijk te wijten aan het feit dat het model niet meeneemt dat in preterm neonaten CYP3A onrijp en onderontwikkeld is. De totale CYP3A activiteit is veel lager in preterm neonaten vergeleken met term geboren neonaten en zuigelingen en zelfs lager dan zou worden verwacht gebaseerd op schalen van lichaamsgewicht vanaf term neonaten (16-18). Concluderend kan worden gezegd dat, hoewel het in **Hoofdstuk 3** ontwikkelde model niet kan worden toegepast voor extrapolatie naar preterm neonaten, de externe validatie in **Hoofdstuk 4** bevestigt dat het ontwikkelde PK model CYP3A-gemedieerde midazolamklaring kan voorspellen in (pediatrische) patiënten met verschillende mate van (kritisch) ziek-zijn.

Sectie III. Presystemisch CYP3A-gemedieerd metabolisme in kinderen na orale toediening van geneesmiddelen

Een eerdere studie heeft laten zien dat de orale biobeschikbaarheid van midazolam een stuk hoger is in preterm neonaten (19) dan in volwassenen. Dit suggereert dat CYP3A activiteit in de darm en/of lever mogelijk onderontwikkeld is, wat leidt tot een hogere systemische blootstelling aan midazolam. De relatieve bijdrage van het intestinale en hepatisch CYP3A-gemedieerde metabolisme, en hun relatieve veranderingen in metabole activiteit op verschillende leeftijden zijn echter nog niet eerder bestudeerd *in vivo*.

De presystemische CYP3A-gemedieerde klaring kan alleen worden beschreven op basis van orale PK data in combinatie met intraveneuze PK data. In **Hoofdstuk 5 en 6** is de rol van CYP3A-enzymen in de darmwand en lever in de presystemische klaring van midazolam onderzocht in respectievelijk preterm neonaten en in kinderen van 1 tot en met 18 jaar. Hiervoor is een nieuwe aanpak gebruikt, namelijk fysiologisch populatie PK modelleren, waarbij we zowel informatie benutten over de fysiologie van het maag-darmkanaal en de lever, als populatie PK modelleren van data van zowel midazolam als de primaire metaboliet (1-OH-midazolam) in kinderen van variërende leeftijden.

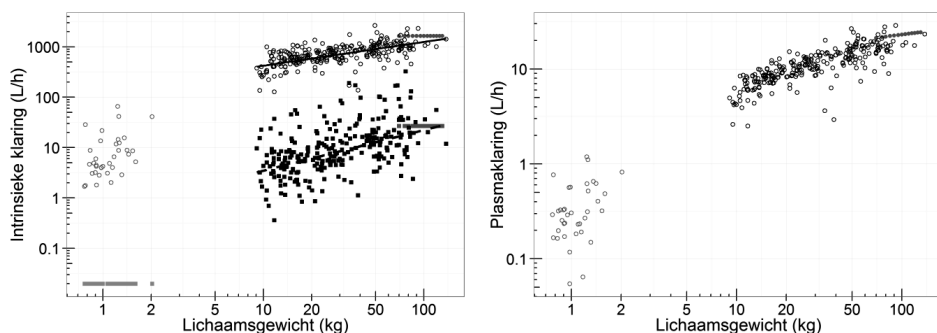
De intrinsieke klaring in de darmwand en lever lijken beide toe te nemen met toenemend lichaamsgewicht in kinderen van 1-18 jaar. Figuur 1A laat zien dat de intrinsieke intestinale en hepatische CYP3A-gemedieerde klaring niet parallel toenemen en dat de intrinsieke klaring in de darmwand sneller toeneemt met leeftijd. De intrinsieke intestinale klaring is lager dan de intrinsieke hepatische klaring voor kinderen en volwassenen van alle leeftijden en de relatieve bijdrage van CYP3A in de darmwand en lever aan het presystemische metabolisme van CYP3A-substraten verandert met leeftijd. In preterm neonaten is de ratio van intrinsieke hepatische versus intestinale klaring veel groter dan in kinderen en gezonde volwassenen, met een ratio van ongeveer 340 in preterm neonaten (**Hoofdstuk 5**) vergeleken met 153 in jonge kinderen tot 2 jaar, 87 voor een typisch individu van 27 kg, 48 in adolescenten ≥ 16 jaar (**Hoofdstuk 6**) en een ratio van 60 in volwassenen (20). Dit betekent dat de intrinsieke klaring in de darmwand een kleinere bijdrage levert aan de totale presystemische klaring met afnemende leeftijd.

Als we aannemen dat de intrinsieke klaring van midazolam een surrogaat marker is voor totale intestinale en hepatische activiteit van CYP3A-enzymen, duidt de veranderende ratio erop dat de hepatische activiteit in kinderen van 1 jaar en ouder al dicht bij de volwassen waarden ligt, in tegenstelling tot de totale intestinale CYP3A activiteit die nog ontwikkelt met leeftijd (**Hoofdstuk 6**). In preterm neonaten kan echter een erg lage intestinale en hepatische CYP3A activiteit worden waargenomen (**Hoofdstuk 5**), hetgeen wijst op een onderontwikkeld enzymstelsel.

In de literatuur is gerapporteerd dat zowel de CYP3A enzymaantallen die aanwezig zijn in de enterocyten, als het totale gewicht van de dunne darm toeneemt met leeftijd (1, 21, 22). Dit leidt samen tot een hogere intrinsieke CYP3A-gemedieerde klaring in de darmwand in adolescenten en volwassenen ten opzichte van neonaten en jonge kinderen. Betreffende de hepatische CYP3A activiteit, suggereren onze resultaten in **Hoofdstuk 6** dat levergroei het meest bijdraagt aan de toename in intrinsieke hepatische CYP3A-gemedieerde klaring in kinderen, terwijl de CYP3A enzymaantallen en de hoeveelheid microsomaal eiwit per gram lever relatief constant blijven met leeftijd (17, 23, 24).

Plasmaklaring is voornamelijk afhankelijk van de intrinsieke hepatische klaring en kan worden berekend gebaseerd op het *well-stirred model* dat de intrinsieke hepatische klaring samen met de doorbloeding (bloedstroom) in de lever, de eiwitbinding en de bloed:plasma ratio meeneemt. Uit onze resultaten kan worden afgeleid dat plasmaklaring toeneemt van 0,03-0,79 (mediaan 0,18) L/h in preterm neonaten

naar 2,5-8,7 (mediaan 6,0) L/h in 1-2 jaar oude kinderen tot 9,0-24,6 (mediaan 17,5) L/h in kinderen ≥ 16 jaar (Hoofdstuk 5 en 6) (figuur 1B).



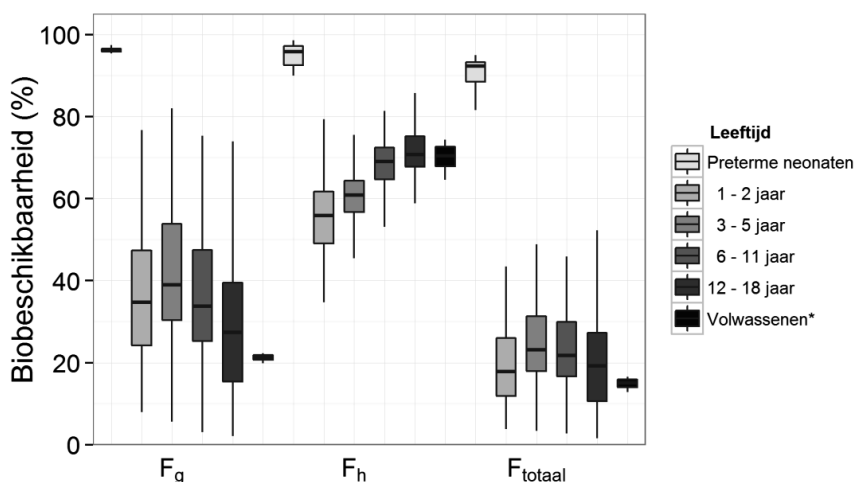
Figuur 1. A) Intrinsieke totale orgaan klaring van midazolam in de darmwand (vierkant) en de lever (cirkels) is weergegeven versus lichaamsgewicht, met waarden voor preterm neonaten (lichtgrijs) (Hoofdstuk 5) en kinderen van 1-18 jaar (zwart) (Hoofdstuk 6). Gerapporteerde waarden voor volwassenen (20) van respectievelijk 26,7 (grijze vierkanten) en 1640 L/h (grijze gesloten cirkels) zijn ook weergegeven. B) De totale plasmaklaring is weergegeven versus lichaamsgewicht, met waarden voor preterm neonaten (lichtgrijze open cirkel) (Hoofdstuk 5), kinderen van 1-18 jaar (zwarte open cirkel) (Hoofdstuk 6), en gerapporteerde waarden voor een typische volwassen populatie (grijze gesloten cirkel) (20). Aangepast van Brussee et al. met toestemming (25).

In **Hoofdstuk 5** wordt ook beschreven dat de extractieratio voor midazolam in de darm en lever erg laag zijn (mediaan voor elk 0,04), wat leidt tot een extreem lage presystemische klaring in preterm neonaten. De totale biobeschikbaarheid is het product van de fractie die wordt opgenomen (F_a) en de fracties die ontsnappen aan metabolisme in de darmwand (F_g) en de lever (F_h), weergegeven in vergelijking 1.

$$F_{\text{totaal}} = F_a \times F_g \times F_h \quad [1]$$

De resulterende biobeschikbaarheid van 92,3% is daarom zeer hoog, maar is zeer variabel binnen de populatie (90%CI: 75,4-94,5%) (figuur 2). Dit kan leiden tot grote verschillen in blootstelling en geneesmiddeleffect na orale toediening van CYP3A-substraten in preterm neonaten.

We rapporteren ook een hoge variabiliteit in biobeschikbaarheid rond de mediaan van 20,8% in kinderen van 1-18 jaar (90%CI: 4,6-44,6%) (Hoofdstuk 6). Zoals figuur 2 laat zien, neemt de fractie die ontsnapt aan hepatisch metabolisme (F_h) toe met leeftijd, terwijl de fractie die ontsnapt aan metabolisme in de darmwand (F_g) afneemt met leeftijd, wat leidt tot een leeftijdsafhankelijke totale biobeschikbaarheid van midazolam (F_{totaal} , berekend met vergelijking 1).



Figuur 2. De fractie die ontsnapt aan intestinaal (F_g) en hepatisch (F_h) metabolisme en de totale biobeschikbaarheid van midazolam (F_{totaal}) zijn significant hoger in preterm neonaten (lichtgrijs) (Hoofdstuk 5), vergeleken met kinderen in vier verschillende leeftijdscategorieën: 1-2 jaar, 3-5 jaar, 6-11 jaar en 12-18 jaar (toenemende grijschaal) (Hoofdstuk 6) en vergeleken met waarden in volwassenen (zwart) (20).

*De biobeschikbaarheid in volwassenen is uitgerekend op basis van de gerapporteerde typische intrinsieke hepatische klaring, de hepatische bloedstroom toenemend met lichaamsgewicht, de ongebonden fractie en de bloed:plasma ratio (20). Aangepast van Brussee et al. met toestemming (25).

Sectie IV. Midazolam als surrogaat geneesmiddel voor andere CYP3A-substraten

Midazolam is een bewezen CYP3A-substraat (4, 5) en midazolamklaring in kinderen wordt gebruikt om de maturatie van CYP3A in de pediatrie populatie te beschrijven. Daarom wordt in Sectie IV van dit proefschrift onderzocht of PK informatie afkomstig van midazolam kan worden gebruikt om klaring van andere CYP3A-substraten in kinderen te voorspellen.

Het zou te veel tijd en middelen kosten om de PK van alle CYP3A-substraten in kinderen in klinische studies te bestuderen. Daarom zijn andere benaderingen voorgesteld, zoals op fysiologie-gebaseerde PK (PBPk) modellen om klaring van enzymsubstraten in kinderen te voorspellen. Omdat voor deze PBPk modellen veel systeem- en geneesmiddelspecifieke informatie vereist zijn en deze informatie niet altijd beschikbaar is, is als alternatieve methode om klaring te schalen in kinderen voorgesteld om de PK informatie te gebruiken van geneesmiddelen die door dezelfde eliminatieroute worden afgebroken (26). Deze extrapolatie van het ene naar het andere geneesmiddel is al succesvol toegepast in het voorspellen van klaring van verscheidene antibiotica die door glomerulaire filtratie worden uitgescheiden in neonaten, met amikacine als surrogaat geneesmiddel (27, 28). Ook de klaring van

het UGT2B7-substraat zidovudine in kinderen is accuraat geschaald gebaseerd op een pediatrische covariaatfunctie voor UGT2B7-gemedieerde glucuronidatie afkomstig van een morfine PK model (26).

Hoewel dit een veelbelovende aanpak lijkt, roept dit de vraag op of dit ook toepasbaar is op het voorspellen van CYP3A-gemedieerde klaring. Calvier *et al.* (29) hebben deze aanpak op een systematische manier onderzocht voor alle hepatische isoenzymen. Gebaseerd op het ontwikkelde framework (29) blijkt dat accuraat schalen van klaring gebruikmakend van een covariaatfunctie ontwikkeld voor een geneesmiddel met dezelfde eliminatieroute, niet alleen afhankelijk is van de fractie van het metabolisme dat dit specifieke hepatische isoenzym op zich neemt, maar ook van andere eigenschappen van het surrogaat geneesmiddel en het nieuwe geneesmiddel, zoals de extractieratio in volwassenen (ER), het type plasmaeiwit waar het geneesmiddel aan bindt en de ongebonden fractie in volwassenen (f_u).

In **Hoofdstuk 7** wordt het hiervoor beschreven framework toegepast om, gebruikmakend van een pediatrische covariaatfunctie voor midazolamklaring, de klaring van verschillende veelgebruikte CYP3A-substraten in kinderen te schalen vanaf volwassen klaringswaarden. Volgens het framework (29) kan op basis van midazolam de klaring van CYP3A-substraten systematisch accuraat worden geschaald voor substraten met een extractieratio van 0,35-0,65 of 0,05-0,55 en die respectievelijk <10% of >90% gebonden zijn aan albumine. Voor CYP3A substraten die binden aan α -1-zuur-glycoproteïne (AGP) is van minder combinaties van geneesmedeleigenschappen *a priori* duidelijk dat klaring accuraat kan worden geschaald. Voor alprazolam, atorvastatine, quinidine, sildenafil, solifenacine, sufentanil en tacrolimus betekent dit dat, op basis van de eigenschappen van deze geneesmiddelen, klaring accuraat kan worden geschaald vanaf volwassenen naar jongere kinderen tot en met term geboren kinderen van 1 dag oud door het toepassen van de pediatrische covariaatfunctie voor klaring van een PK model voor midazolam.

Voor CYP3A-substraten waarvoor klaringswaarden in kinderen en volwassenen beschikbaar zijn in de literatuur hebben we bevestigd dat de geschaalde klaringswaarden voor atorvastatine, quinidine, sildenafil, sufentanil, tacrolimus en tamsulosine tot kinderen van 1 jaar en ouder accuraat zijn, aangezien de geschaalde klaringswaarden overeenkomen met de gerapporteerde klaringswaarden in kinderen (voorspellingsfout PE <50%) (**Hoofdstuk 7**). Voor sirolimus en vincristine hebben we grotere voorspellingsfouten gevonden, die kunnen worden verklaard door de inductie van CYP3A activiteit door sirolimus (30) dat de plasmaklaring beïnvloedt en

vanwege het grotere aandeel dat CYP3A5 heeft in het metabolisme van vincristine (31) en de kleinere rol voor CYP3A4 vergeleken met midazolam.

Bovendien beschrijft **Hoofdstuk 7**, op basis van PK data in 156 kinderen die sildenafil toegediend kregen, dat de klaring van dit CYP3A-substraat in kinderen van 1-17 jaar accuraat kan worden geschaald door de pediatrische covariaatfunctie voor CYP3A-gemedieerde midazolamklaring, aangezien er geen grote verschillen (PE <50%) zijn gevonden met de klaring die is geschat op basis van een populatie PK model. Het schalen van klaring kan niet worden geëxtrapoleerd buiten de populatie waarvoor de covariaatfunctie ontwikkeld is en ook niet in preterme neonaten vanwege de onderontwikkelde CYP3A activiteit waardoor de klaring in deze populatie afwijkt.

Extrapolatie van klaring van midazolam naar andere geneesmiddelen die voornamelijk door CYP3A worden gemetaboliseerd ($\geq 75\%$ metabolisme via deze route), met de hierboven beschreven eigenschappen (d.w.z. ER van 0,35-0,65 of 0,05-0,55 voor respectievelijk <10% of >90% eiwitbinding aan albumine in volwassenen), kan een waardevolle methode zijn om klaring van CYP3A-substraten in kinderen te voorspellen, vooral voor CYP3A-substraten waarvan geen of zeer weinig PK informatie in kinderen beschikbaar is.

Conclusies

CYP3A-gemedieerde plasmaklaring van midazolam in terme neonaten en kinderen neemt non-lineair toe met toenemend lichaamsgewicht en is sterk verlaagd in kinderen met inflammatie en orgaanfalen.

Pediatrische midazolam PK modellen kunnen worden gebruikt voor het voorspellen van midazolamklaring in terme neonaten en kinderen, maar preterm neonaten hebben een veel lagere klaring vanwege de onderontwikkelde CYP3A activiteit.

Een fysiologische populatie PK modelleeranalyse is geschikt om onderscheid te maken tussen metabolisme door CYP3A-enzymen in de darmwand en de lever, en om de fracties die ontsnappen aan intestinaal (F_g) en hepatisch (F_h) metabolisme te kwantificeren.

Het presystemisch intestinaal en hepatisch CYP3A-gemedieerd metabolisme in preterm neonaten is zeer laag vergeleken met kinderen en volwassenen.

De maturatie van CYP3A activiteit in de darmwand en lever verloopt niet parallel. De CYP3A activiteit in de darmwand is lager dan de hepatische CYP3A activiteit in neonaten, kinderen en volwassenen, en draagt meer bij aan presystemisch metabolisme met toenemende leeftijd.

Extrapolatie van klaring van midazolam naar andere CYP3A-substraten is mogelijk: een pediatrische covariaatfunctie voor CYP3A-gemedieerde midazolamklaring kan de klaring van verschillende veelgebruikte CYP3A-substraten accuraat schalen tot 1 jaar, als ze $\geq 75\%$ worden gemetaboliseerd door CYP3A, en een $ER < 0,55$ of $0,35-0,65$ hebben in volwassenen voor respectievelijk lage en hoge eiwitbinding.

Perspectieven

Vertaling naar de kliniek: de impact van ziekte op midazolam PK en PD

Het ontwikkelde PK model voor midazolam in **Hoofdstuk 3** beschrijft de CYP3A-gemedieerde klaring in kritisch zieke kinderen en verklaart een deel van de interindividuele variabiliteit door rekening te houden met het lichaamsgewicht van de patiënt, het inflammatie niveau (weerspiegeld door CRP concentraties) en orgaanfalen. Gebaseerd op deze covariaten voor klaring kunnen doseeradviezen worden gedaan indien de effectieve concentratie of blootstelling bekend is, maar voor midazolam worden doseringen getitreerd op effect om optimale sedatie te bereiken. Deze behandeling start met een onderhoudsdosering van 0,05-0,2 mg/kg/uur na een oplaaddosering van 0,05-0,1 mg/kg (32, 33). Er dient echter wel rekening gehouden te worden met mogelijke doseringsaanpassingen voor kritisch zieke kinderen met inflammatie en orgaanfalen.

De voorspelde lagere klaring in kritisch zieke patiënten (**Hoofdstuk 3 en 4**), die ook beschreven is in andere patiëntpopulaties (9, 10), suggereert dat een lagere dosering voldoende moet zijn om dezelfde plasmaconcentratie te bereiken. Studies die de midazolamdosering in kritisch zieke kinderen onderbreken of verlagen laten echter zien dat dit geen verbetering is in de behandeling (34). Dit suggereert dat er wellicht een hogere plasmaconcentratie nodig is om adequate sedatie in kinderen met inflammatie en meervoudig orgaanfalen te bereiken. Ook de bijdrage van de metabolieten aan het therapeutisch effect in kritisch zieke patiënten is kleiner vanwege de verminderde vorming van de CYP3A-gemedieerde metaboliet 1-OH-midazolam, met ongeveer de helft van de activiteit als de moederstof (35), en de glucuronide metabolieten, die ook een substantieel farmacologisch effect hebben (36).

Deze resultaten kunnen wellicht worden verklaard door verschillen in de PKPD relatie, of de PD tijdens inflammatie. In ratten wordt de receptorbinding aan GABA_A- en GABA_B-receptoren beïnvloed door inflammatie (37, 38) en ook in de darmen in mensen lijken GABA-receptoren te worden beïnvloed door inflammatie (39). In tegenstelling tot de mogelijk hogere benodigde midazolamconcentraties in kritisch zieke kinderen wordt in kritisch zieke volwassenen een diepere sedatie gerapporteerd na toediening van propofol, dat tenminste deels werkt via GABA-receptoren (40). Of GABA-receptoren in de hersenen, waar midazolam zijn effect heeft, ook worden beïnvloed door inflammatie of mate van ziek-zijn in kritisch zieke patiënten is echter niet bekend.

Bovendien is het belangrijk dat, onafhankelijk van de mate van ziek-zijn, verschillen in therapeutisch effect van midazolam op verschillende leeftijden kunnen worden verwacht, vanwege verschillende aantallen, dichtheid, distributie en ligand affiniteit van GABA-receptoren (41, 42). De GABA-receptoren ontwikkelen zich nog in de eerste levensjaren (43), aangezien een toenemende activiteit wordt waargenomen met toenemende leeftijd. Daarom zijn verdere studies nodig om te bepalen wat de beste variabele is om geneesmiddeleffect op te optimaliseren (bijvoorbeeld piek- of dalconcentratie, *steady-state* concentratie of totale blootstelling) en om de PD en PKPD relatie van midazolam te bestuderen voor verschillende mate van ziek-zijn in kinderen van verschillende leeftijden, om uiteindelijk tot een optimaal en wetenschappelijk-onderbouwd doseringsschema te komen voor midazolam in neonaten, kinderen en adolescenten.

Deze optimalisatie van doseren kan bijvoorbeeld worden gedaan door de longitudinale PK metingen met *time-to-event* PD uitkomsten zoals het gebruik van *rescue* medicatie te combineren en deze twee datatypes tegelijk te analyseren (44). Herhaalde metingen van plasma concentraties van geneesmiddelen (PK) en *survivaldata* (PD) worden meestal apart of opeenvolgend geanalyseerd met verschillende statistische methoden, maar gecombineerd leveren ze meer informatie over de wisselwerking tussen PK, PD, en mate van ziek-zijn (44). Dit is bijvoorbeeld geïllustreerd door Juul *et al.* in een analyse van benodigde postoperatieve pijnstilling (45). De toepassing van deze gecombineerde modelgebaseerde aanpak voor sedatie kan farmacotherapie in kinderen in de klinische praktijk mogelijk ook verbeteren.

PD eindpunten

Om het therapeutisch effect van geneesmiddelen te evalueren en te kwantificeren zijn gevalideerde en bij voorkeur niet-invasieve biomarkers of PD eindpunten in kinderen nodig, die longitudinaal kunnen worden gemeten en de dynamische veranderingen in gezondheid en ziekte over tijd representeren (41). Voor midazolam kan de COMFORT-B score worden gebruikt om sedatieniveau in kinderen te kwantificeren (46), maar voor veel CYP3A-substraten kan het geneesmiddeleffect niet kwantitatief worden vastgesteld. Het opkomende vakgebied van metabolomics is een nuttige aanvulling bij het identificeren van biomarkers die de mate van ziek-zijn en/of de effecten van geneesmiddelen in kinderen kan reflecteren (47). Metabolomics is een systeembiologische methode (47, 48), waarbij een uitgebreide analyse van lichaamseigen stoffen (metabolieten) in lichaamsvloeistoffen plaatsvindt (48). In kinderen zijn verscheidene matrices zoals urine, plasma en ontlasting mogelijk relevant voor metabolomics analyses (47).

Aangezien metabolomics dichterbij het geobserveerde fenotype (bijv. ziekte of uitkomst van de behandeling) ligt dan bijvoorbeeld genomics of proteomics, worden metabolomicsprofielen beschouwd als het meest voorspellend voor klinische uitkomsten (49), hoewel standaardisatie en validatie van deze nieuwe metabolomics methodologie eerst vereist is (50, 51). Het combineren van metabolomics, genomics en proteomics kan wellicht nog meer bijdragen aan het identificeren van biomarkers als vroege voorspellers van uitkomst (49).

De recente identificatie van verscheidene biomarkers in de oncologie bewijzen dat metabolomics potentie heeft voor het ontdekken van biomarkers (52-57), al zijn er nog weinig gevalideerde biomarkers beschikbaar voor het nemen van beslissingen in de klinische praktijk, inclusief diagnose en monitoren van ziektes en behandelingseffecten, en het ontwikkelen van geïndividualiseerde farmacotherapie (58). Geïdentificeerde biomarkers kunnen na grondige evaluatie worden gebruikt in PKPD modellen, waarin blootstelling aan een geneesmiddel en PD biomarkers worden gerelateerd aan klinische uitkomsten in kinderen. Deze modellen kunnen dan rationele ondersteuning geven voor *dose-finding* studies in kinderen om farmacotherapie in kinderen te optimaliseren.

Fysiologische benadering

In Hoofdstuk 5 en 6 hebben door het combineren van op fysiologie-gebaseerde PK modellen en de populatie aanpak de intrinsieke klaringsparameters kunnen schatten in de darmwand en de lever, gebruikmakend van PBPK principes en de beschikbare midazolam PK data in neonaten en kinderen. In PBPK modellen worden patiëntspecifieke parameters gerelateerd aan anatomie, fysiologie en pathofysiologie gecombineerd met geneesmiddelspecifieke eigenschappen zoals fysisch-chemische kenmerken (59). Eén van de grootste voordelen van deze aanpak is de mogelijkheid om preklinische *in vitro* en *in vivo* informatie met klinische informatie te combineren (60). Daarnaast kan het gebruik van deze PBPK modellen het ontwikkelen van geneesmiddelen versnellen met tevens minder last voor de patiënten (61).

PBPK modelleren is een voorbeeld van een systeemaanpak en past in het opkomende veld van de systeemfarmacologie (62, 63), die systeembiologie combineert met PKPD modelleren en simulatie. Systeemfarmacologie richt zich op het begrijpen van het systeem als een geheel door kwantitatief de dynamische interacties tussen geneesmiddel en biologisch systeem te analyseren (62, 63). In Hoofdstuk 5 en 6 hebben we een minder complex model gebruikt dan een volledig PBPK model, omdat een groot nadeel van deze complexe modellen is dat ze veel systeem- en geneesmiddelspecifieke informatie nodig hebben.

Om klaring van geneesmiddelen in kinderen te voorspellen gebaseerd op een complex PBPK model, is meer fysiologische informatie over o.a. de anatomie van neonaten, kinderen en adolescenten nodig (59). In de literatuur worden verschillende aannames gedaan voor zowel de doorbloeding in de weefsels, als voor de orgaanvolumes en intestinale oppervlakte. Harmonisering van deze waarden gebaseerd op betrouwbare meetmethoden in kinderen van alle leeftijden, van preterme neonaten tot en met adolescenten, is daarom extreem belangrijk om de onzekerheid in de voorspellingen van klaring door PBPK modellen te verlagen. Consistentere fysiologische informatie zal ook leiden tot een beter begrip van de mechanismen van absorptie, distributie, metabolisme en excretie van geneesmiddelen in kinderen (59). Voor alle leeftijden is informatie over de doorbloeding in de weefsels en organen, met name de hepatische doorbloeding, essentieel, omdat de sensitiviteitsanalyses in **Hoofdstuk 5 en 6** laten zien dat de aannames over de snelheid van deze doorbloeding mogelijk invloed hebben op onze conclusies met betrekking tot intrinsieke klaring en lokale biobeschikbaarheid. De uitdaging voor de komende jaren is om de hepatische doorbloeding en andere fysiologische informatie in kinderen te verzamelen. Dit is vooral urgent in preterme neonaten, omdat van deze populatie de minste fysiologische informatie bekend is (22).

Doseren van CYP3A-substraten in de toekomst

Om de optimale *first-in-child* dosering tijdens de ontwikkeling van geneesmiddelen te vinden en om doseeradviezen te kunnen doen in kinderen, is het accuraat kunnen voorspellen van klaring van geneesmiddelen essentieel. Zoals beschreven in **Hoofdstuk 7**, wordt de typische klaring (CL_i) van een CYP3A-substraat in een individueel kind i van 1 jaar of ouder met een lichaamsgewicht van WT_i (in kg) beschreven door:

$$CL_i = CL_{volw} \times \left(\frac{WT_i}{70} \right)^{0.874} \quad [2]$$

waarbij CL_{volw} de waarde voor klaring in volwassenen is en waarin beide klaringswaarden (CL_i en CL_{volw}) worden uitgedrukt in volume per tijd. Deze pediatrie covariaatfunctie voor CYP3A-gemedieerde klaring is extra nuttig voor het voorspellen van klaring van CYP3A-substraten met een smal bereik voor therapeutisch effect en CYP3A-substraten met hoge toxiciteit zoals sommige oncologische middelen (64). Accurate voorspellingen van klaring van deze substraten leveren optimale voorspellingen van de blootstelling en daarmee kan uiteindelijk de toxiciteit beperkt worden. Bovendien kan deze aanpak nuttig zijn voor *dose-finding* studies in verwaarloosde (tropische) ziektes, omdat er bijvoorbeeld erg weinig PK informatie in kinderen bekend is over anthelminthica die door CYP3A worden gemetaboliseerd zoals ivermectine en praziquantel (65).

Het gebruik van de pediatrische covariaatfunctie voor CYP3A-gemedieerde klaring gebaseerd op midazolam kan de noodzaak voor PK studies voor elk CYP3A-substraat in kinderen significant verminderen, omdat informatie van het ene geneesmiddel kan worden gebruikt voor het volgende. Dit is wellicht ook mogelijk bij het voorspellen van klaring via andere eliminatieroutes, met bijvoorbeeld losartan, dextromethorphan en omeprazol als surrogaat geneesmiddelen voor respectievelijk CYP2C9, CYP2D6 en CYP2C19 (66), aangezien deze methode al succesvol is gebleken voor onder andere UGT2B7-gemedieerd metabolisme en eliminatie via glomerulaire filtratie in kinderen (26-28).

Enkele limitaties moeten echter in beschouwing worden genomen. In onze analyse in **Hoofdstuk 7** hebben we aangenomen dat de grootste eliminatieroute hetzelfde is in kinderen en volwassenen, hoewel de fractie van het metabolisme door CYP3A mogelijk verandert met leeftijd. Bijvoorbeeld voor paracetamol wordt meer sulfatering en minder glucuronidatie waargenomen in neonaten en jongere kinderen vergeleken met kinderen van 12 jaar en ouder en volwassenen (67, 68). De ratio tussen eliminatieroutes verandert mogelijk voor sommige geneesmiddelen (69) waarvoor kan worden gecorrigeerd als met beide (of meerdere) routes rekening wordt gehouden, in plaats van alleen de voornaamste route. Bovendien zou voor sommige geneesmiddelen de eliminatieroute volledig kunnen veranderen, zoals cafeïne dat een CYP1A2-substraat in volwassenen terwijl dit renaal wordt geklaard in neonaten (70). Daarnaast zal het niet voor alle geneesmiddelen mogelijk zijn om in alle leeftijdscategorieën klaring accuraat te voorspellen, maar afhankelijk van de eigenschappen van het geneesmiddel alleen tot een bepaalde leeftijd. Daarom blijft evaluatie op basis van klinische data nodig voordat de methodologie kan worden toegepast voor het voorspellen van klaring voor alle metabole eliminatieroutes.

Ondanks deze limitaties voor andere eliminatieroutes zal de ontwikkelde pediatrische covariaatfunctie voor CYP3A-gemedieerd midazolam metabolisme informatief zijn voor het voorspellen van klaring van verschillende CYP3A-substraten. Na evaluatie kan deze functie ook prospectief worden gebruikt voor het schatten van doseringen van CYP3A-substraten in kinderen.

Conclusie

Voor een optimale behandeling met CYP3A-substraten zijn accurate voorspellingen van CYP3A-gemedieerde klaring voor kinderen van alle leeftijden noodzakelijk. We hebben gevonden dat lichaamsgewicht en mate van ziek-zijn kunnen worden gebruikt in een pediatrische covariaatfunctie voor CYP3A-gemedieerde klaring, om

de interindividuele midazolamklaring in terme neonaten, kinderen en adolescenten zo goed mogelijk te beschrijven. Een uitzondering vormen preterme neonaten voor wie met name hun onderontwikkelde intestinale en hepatische CYP3A activiteit ook van belang is. Bovendien hebben we bevestigd dat wanneer midazolamklaring in kinderen van 1-18 jaar wordt gebruikt om CYP3A-gemedieerd metabolisme in kinderen te representeren, de klaring van verscheidene veelgebruikte CYP3A-substraten met verschillende eigenschappen accuraat geschaald kunnen worden vanaf klaringswaarden in volwassenen. Met deze covariaatfunctie zal het voorspellen van CYP3A-gemedieerde klaring in neonaten, kinderen en adolescenten significant verbeteren en, na evaluatie van deze modelgebaseerde voorspellingen van klaring in pediatrie PKPD studies, kunnen de doseeradviezen voor midazolam en andere CYP3A-substraten worden toegepast in de klinische praktijk.

REFERENTIES

1. Lu H, Rosenbaum S. Developmental pharmacokinetics in pediatric populations. *J Pediatr Pharmacol Ther.* 2014;19(4):262-76.
2. Kearns GL, Abdel-Rahman SM, Alander SW, Blowey DL, Leeder JS, Kauffman RE. Developmental pharmacology–drug disposition, action, and therapy in infants and children. *The New England journal of medicine.* 2003;349(12):1157-67.
3. Alcorn J, McNamara PJ. Ontogeny of hepatic and renal systemic clearance pathways in infants: part II. *Clin Pharmacokinet.* 2002;41(13):1077-94.
4. Thummel KE, Shen DD, Podoll TD, Kunze KL, Trager WF, Hartwell PS, et al. Use of midazolam as a human cytochrome P450 3A probe: I. In vitro-in vivo correlations in liver transplant patients. *J Pharmacol Exp Ther.* 1994;271(1):549-56.
5. Gorski JC, Hall SD, Jones DR, VandenBranden M, Wrighton SA. Regioselective biotransformation of midazolam by members of the human cytochrome P450 3A (CYP3A) subfamily. *Biochem Pharmacol.* 1994;47(9):1643-53.
6. Carcillo JA, Doughty L, Kofos D, Frye RF, Kaplan SS, Sasser H, et al. Cytochrome P450 mediated-drug metabolism is reduced in children with sepsis-induced multiple organ failure. *Intensive Care Med.* 2003;29(6):980-4.
7. Aitken AE, Richardson TA, Morgan ET. Regulation of drug-metabolizing enzymes and transporters in inflammation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2006;46:123-49.
8. Vet NJ, de Hoog M, Tibboel D, de Wildt SN. The effect of inflammation on drug metabolism: a focus on pediatrics. *Drug Discov Today.* 2011;16(9-10):435-42.
9. Taburet AM, Tollier C, Richard C. The effect of respiratory disorders on clinical pharmacokinetic variables. *Clin Pharmacokinet.* 1990;19(6):462-90.
10. Kirwan CJ, MacPhee IA, Lee T, Holt DW, Philips BJ. Acute kidney injury reduces the hepatic metabolism of midazolam in critically ill patients. *Intensive Care Med.* 2012;38(1):76-84.

11. Peeters MY, Prins SA, Knibbe CA, Dejongh J, Mathot RA, Warris C, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of midazolam and metabolites in nonventilated infants after craniofacial surgery. *Anesthesiology*. 2006;105(6):1135-46.
12. Muchohi SN, Kokwaro GO, Ogutu BR, Edwards G, Ward SA, Newton CR. Pharmacokinetics and clinical efficacy of midazolam in children with severe malaria and convulsions. *Br J Clin Pharmacol*. 2008;66(4):529-38.
13. Reed MD, Rodarte A, Blumer JL, Khoo KC, Akbari B, Pou S, et al. The single-dose pharmacokinetics of midazolam and its primary metabolite in pediatric patients after oral and intravenous administration. *J Clin Pharmacol*. 2001;41(12):1359-69.
14. Tolia V, Brennan S, Aravind MK, Kauffman RE. Pharmacokinetic and pharmacodynamic study of midazolam in children during esophagogastroduodenoscopy. *J Pediatr*. 1991;119(3):467-71.
15. Rey E, Delaunay L, Pons G, Murat I, Richard MO, Saint-Maurice C, et al. Pharmacokinetics of midazolam in children: comparative study of intranasal and intravenous administration. *Eur J Clin Pharmacol*. 1991;41(4):355-7.
16. Grijalva J, Vakili K. Neonatal liver physiology. *Semin Pediatr Surg*. 2013;22(4):185-9.
17. Hines RN, McCarver DG. The ontogeny of human drug-metabolizing enzymes: phase I oxidative enzymes. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002;300(2):355-60.
18. Ince I, Knibbe CA, Danhof M, de Wildt SN. Developmental changes in the expression and function of cytochrome P450 3A isoforms: evidence from in vitro and in vivo investigations. *Clin Pharmacokinet*. 2013;52(5):333-45.
19. de Wildt SN, Kearns GL, Hop WC, Murry DJ, Abdel-Rahman SM, van den Anker JN. Pharmacokinetics and metabolism of oral midazolam in preterm infants. *Br J Clin Pharmacol*. 2002;53(4):390-2.
20. Frechen S, Junge L, Saari TI, Suleiman AA, Rokitta D, Neuvonen PJ, et al. A semiphysiological population pharmacokinetic model for dynamic inhibition of liver and gut wall cytochrome P450 3A by voriconazole. *Clin Pharmacokinet*. 2013;52(9):763-81.
21. Johnson TN, Tanner MS, Taylor CJ, Tucker GT. Enterocytic CYP3A4 in a paediatric population: developmental changes and the effect of coeliac disease and cystic fibrosis. *Br J Clin Pharmacol*. 2001;51(5):451-60.
22. Bjorkman S. Prediction of drug disposition in infants and children by means of physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modelling: theophylline and midazolam as model drugs. *Br J Clin Pharmacol*. 2005;59(6):691-704.
23. Barter ZE, Bayliss MK, Beaune PH, Boobis AR, Carlile DJ, Edwards RJ, et al. Scaling factors for the extrapolation of in vivo metabolic drug clearance from in vitro data: reaching a consensus on values of human microsomal protein and hepatocellularity per gram of liver. *Curr Drug Metab*. 2007;8(1):33-45.
24. Treluyer JM, Bowers G, Cazali N, Sonnier M, Rey E, Pons G, et al. Oxidative metabolism of amprenavir in the human liver. Effect of the CYP3A maturation. *Drug Metab Dispos*. 2003;31(3):275-81.
25. Brussee JM, Yu H, Krekels EHJ, Palic S, Brill MJE, Barrett JS, et al. Characterization of Intestinal and Hepatic CYP3A-Mediated Metabolism of Midazolam in Children Using a Physiological Population Pharmacokinetic Modelling Approach. *Pharm Res*. 2018;35(9):182.

26. Krekels EH, Neely M, Panoilia E, Tibboel D, Capparelli E, Danhof M, et al. From pediatric covariate model to semiphysiological function for maturation: part I-extrapolation of a covariate model from morphine to Zidovudine. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*. 2012;1:e9.
27. Zhao W, Biran V, Jacqz-Aigrain E. Amikacin maturation model as a marker of renal maturation to predict glomerular filtration rate and vancomycin clearance in neonates. *Clin Pharmacokinet*. 2013;52(12):1127-34.
28. De Cock RF, Allegaert K, Sherwin CM, Nielsen EI, de Hoog M, van den Anker JN, et al. A neonatal amikacin covariate model can be used to predict ontogeny of other drugs eliminated through glomerular filtration in neonates. *Pharmaceutical research*. 2014;31(3):754-67.
29. Calvier EAM, Krekels EHJ, Yu H, Valitalo PAJ, Johnson TN, Rostami-Hodjegan A, et al. Drugs Being Eliminated via the Same Pathway Will Not Always Require Similar Pediatric Dose Adjustments. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*. 2018.
30. Bai S, Stepkowski SM, Kahan BD, Brunner LJ. Metabolic interaction between cyclosporine and sirolimus. *Transplantation*. 2004;77(10):1507-12.
31. Dennison JB, Jones DR, Renbarger JL, Hall SD. Effect of CYP3A5 expression on vincristine metabolism with human liver microsomes. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007;321(2):553-63.
32. Vet NJ, de Wildt SN, Verlaet CW, Knibbe CA, Mooij MG, Hop WC, et al. Daily interruption of sedation in critically ill children: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*. 2014;15:55.
33. Kinderformularium, Accessed on February 20, 2018, Available from <https://www.kinderformularium.nl/geneesmiddel/140/midazolam>.
34. Vet NJ, de Wildt SN, Verlaet CW, Knibbe CA, Mooij MG, van Woensel JB, et al. A randomized controlled trial of daily sedation interruption in critically ill children. *Intensive Care Med*. 2016;42(2):233-44.
35. Johnson TN, Rostami-Hodjegan A, Goddard JM, Tanner MS, Tucker GT. Contribution of midazolam and its 1-hydroxy metabolite to preoperative sedation in children: a pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis. *Br J Anaesth*. 2002;89(3):428-37.
36. Bauer TM, Ritz R, Haberthur C, Ha HR, Hunkeler W, Sleight AJ, et al. Prolonged sedation due to accumulation of conjugated metabolites of midazolam. *Lancet*. 1995;346(8968):145-7.
37. Castro-Lopes JM, Malcangio M, Pan BH, Bowery NG. Complex changes of GABAA and GABAB receptor binding in the spinal cord dorsal horn following peripheral inflammation or neurectomy. *Brain Res*. 1995;679(2):289-97.
38. Anseloni VC, Gold MS. Inflammation-induced shift in the valence of spinal GABA-A receptor-mediated modulation of nociception in the adult rat. *J Pain*. 2008;9(8):732-8.
39. Auteri M, Zizzo MG, Serio R. GABA and GABA receptors in the gastrointestinal tract: from motility to inflammation. *Pharmacol Res*. 2015;93:11-21.
40. Peeters MY, Bras LJ, DeJongh J, Wesselink RM, Aarts LP, Danhof M, et al. Disease severity is a major determinant for the pharmacodynamics of propofol in critically ill patients. *Clin Pharmacol Ther*. 2008;83(3):443-51.
41. Kearns GL, Artman M. Functional Biomarkers: an Approach to Bridge Pharmacokinetics and Pharmacodynamics in Pediatric Clinical Trials. *Curr Pharm Des*. 2015;21(39):5636-42.

42. Mulla H. Understanding developmental pharmacodynamics: importance for drug development and clinical practice. *Paediatr Drugs*. 2010;12(4):223-33.
43. Jansen LA, Peugh LD, Roden WH, Ojemann JG. Impaired maturation of cortical GABA(A) receptor expression in pediatric epilepsy. *Epilepsia*. 2010;51(8):1456-67.
44. Asar O, Ritchie J, Kalra PA, Diggle PJ. Joint modelling of repeated measurement and time-to-event data: an introductory tutorial. *Int J Epidemiol*. 2015;44(1):334-44.
45. Juul RV, Rasmussen S, Kreilgaard M, Christrup LL, Simonsson US, Lund TM. Repeated Time-to-event Analysis of Consecutive Analgesic Events in Postoperative Pain. *Anesthesiology*. 2015;123(6):1411-9.
46. Ista E, van Dijk M, Tibboel D, de Hoog M. Assessment of sedation levels in pediatric intensive care patients can be improved by using the COMFORT "behavior" scale. *Pediatr Crit Care Med*. 2005;6(1):58-63.
47. Moco S, Collino S, Rezzi S, Martin FP. Metabolomics perspectives in pediatric research. *Pediatr Res*. 2013;73(4 Pt 2):570-6.
48. Ramautar R, Berger R, van der Greef J, Hankemeier T. Human metabolomics: strategies to understand biology. *Curr Opin Chem Biol*. 2013;17(5):841-6.
49. Peng B, Li H, Peng XX. Functional metabolomics: from biomarker discovery to metabolome reprogramming. *Protein Cell*. 2015;6(9):628-37.
50. Fanos V, Barberini L, Antonucci R, Atzori L. Metabolomics in neonatology and pediatrics. *Clin Biochem*. 2011;44(7):452-4.
51. Fanos V, Antonucci R, Atzori L. Metabolomics in the developing infant. *Curr Opin Pediatr*. 2013;25(5):604-11.
52. Zhang A, Sun H, Yan G, Wang P, Han Y, Wang X. Metabolomics in diagnosis and biomarker discovery of colorectal cancer. *Cancer Lett*. 2014;345(1):17-20.
53. Gunther UL. Metabolomics Biomarkers for Breast Cancer. *Pathobiology*. 2015;82(3-4):153-65.
54. Suzuki M, Nishiumi S, Matsubara A, Azuma T, Yoshida M. Metabolome analysis for discovering biomarkers of gastroenterological cancer. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2014;966:59-69.
55. Peng J, Chen YT, Chen CL, Li L. Development of a universal metabolome-standard method for long-term LC-MS metabolome profiling and its application for bladder cancer urine-metabolite-biomarker discovery. *Anal Chem*. 2014;86(13):6540-7.
56. Tosoian JJ, Ross AE, Sokoll LJ, Partin AW, Pavlovich CP. Urinary Biomarkers for Prostate Cancer. *Urol Clin North Am*. 2016;43(1):17-38.
57. Tumas J, Kvederaviciute K, Petrulionis M, Kurlinkus B, Rimkus A, Sakalauskaitė G, et al. Metabolomics in pancreatic cancer biomarkers research. *Med Oncol*. 2016;33(12):133.
58. Monteiro MS, Carvalho M, Bastos ML, Guedes de Pinho P. Metabolomics analysis for biomarker discovery: advances and challenges. *Curr Med Chem*. 2013;20(2):257-71.
59. Barrett JS, Della Casa Alberighi O, Laer S, Meibohm B. Physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling in children. *Clin Pharmacol Ther*. 2012;92(1):40-9.
60. Maharaj AR, Edgington AN. Physiologically based pharmacokinetic modeling and simulation in pediatric drug development. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*. 2014;3:e150.
61. Zhuang X, Lu C. PBPK modeling and simulation in drug research and development. *Acta Pharm Sin B*. 2016;6(5):430-40.

62. van der Graaf PH, Benson N. Systems pharmacology: bridging systems biology and pharmacokinetics-pharmacodynamics (PKPD) in drug discovery and development. *Pharm Res.* 2011;28(7):1460-4.
63. Vicini P, van der Graaf PH. Systems pharmacology for drug discovery and development: paradigm shift or flash in the pan? *Clin Pharmacol Ther.* 2013;93(5):379-81.
64. Coutant DE, Kulanthaivel P, Turner PK, Bell RL, Baldwin J, Wijayawardana SR, et al. Understanding Disease-Drug Interactions in Cancer Patients: Implications for Dosing Within the Therapeutic Window. *Clin Pharmacol Ther.* 2015;98(1):76-86.
65. Olliaro P, Delgado-Romero P, Keiser J. The little we know about the pharmacokinetics and pharmacodynamics of praziquantel (racemate and R-enantiomer). *J Antimicrob Chemother.* 2014;69(4):863-70.
66. Williams D, Tao X, Zhu L, Stonier M, Lutz JD, Masson E, et al. Use of a cocktail probe to assess potential drug interactions with cytochrome P450 after administration of belatacept, a costimulatory immunomodulator. *Br J Clin Pharmacol.* 2017;83(2):370-80.
67. Levy G, Khanna NN, Soda DM, Tsuzuki O, Stern L. Pharmacokinetics of acetaminophen in the human neonate: formation of acetaminophen glucuronide and sulfate in relation to plasma bilirubin concentration and D-glucuronic acid excretion. *Pediatrics.* 1975;55(6):818-25.
68. Miller RP, Roberts RJ, Fischer LJ. Acetaminophen elimination kinetics in neonates, children, and adults. *Clin Pharmacol Ther.* 1976;19(3):284-94.
69. Salem F, Johnson TN, Barter ZE, Leeder JS, Rostami-Hodjegan A. Age related changes in fractional elimination pathways for drugs: assessing the impact of variable ontogeny on metabolic drug-drug interactions. *J Clin Pharmacol.* 2013;53(8):857-65.
70. Ginsberg G, Hattis D, Sonawane B. Incorporating pharmacokinetic differences between children and adults in assessing children's risks to environmental toxicants. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2004;198(2):164-83.

