



Universiteit
Leiden

The Netherlands

The 'free drug hypothesis' : fact or fiction?

Steeg, T.J. van

Citation

Steeg, T. J. van. (2008, November 26). *The 'free drug hypothesis' : fact or fiction?*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/13283>

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/1887/13283>

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

Synopsis in Dutch

Nederlandse samenvatting

Algemene inleiding en doel van het onderzoek

Het onderzoek in dit proefschrift heeft betrekking op de rol van plasma eiwitbinding op de werking van farmaca in het lichaam. Over het algemeen binden farmaca aan eiwitten wanneer ze het plasma betreden. De belangrijkste bindingseiwitten in plasma zijn albumine en alfa-1-zure glycoproteïne (AGP). Albumine is hoofdzakelijk betrokken bij de binding van zure farmaca, terwijl AGP hoofdzakelijk betrokken is bij de binding van neutrale en basische stoffen. De plasma eiwitbinding verschilt per farmacon en is met name afhankelijk van de affiniteit van het farmacon voor het bindingseiwit. Daarnaast is de eiwitbinding afhankelijk van de concentratie van het eiwit in plasma. Het is algemeen bekend dat plasma eiwitbinding zowel de farmacokinetiek als de farmacodynamiek van het farmacon kan beïnvloeden.

De invloed van plasma eiwitbinding op de primaire farmacokinetische parameters is uitvoerig onderzocht en gedocumenteerd. De extractie ratio van een farmacon bepaalt of plasma eiwitbinding restrictief of niet-restrictief is voor de klaring. De klaring is bijna onafhankelijk van eiwitbinding voor farmacon met een hoge extractie ratio. Voor stoffen met een lage extractie ratio is de klaring in hoge mate afhankelijk van de mate van plasma eiwitbinding. De andere primaire PK parameter, verdelings volume, wordt beïnvloed door de vrije fractie voor lipofiele stoffen met een relatief klein verdelingsvolume, terwijl dit niet geldt voor hydrofiele stoffen. Over het algemeen genomen wordt plasma eiwitbinding gezien als een positieve eigenschap voor de farmacokinetiek van een farmacon, aangezien eiwitbinding mogelijk een langere retentie in het lichaam veroorzaakt. De invloed van plasma eiwitbinding op het farmacologische effect van het farmacon wordt als negatief gezien, omdat wordt aangenomen dat plasma eiwitbinding voorkomt dat het farmacon aan de receptor bindt. Deze aanname is bekend als de hypothese van het 'vrije farmacon' en stelt dat de vrije fractie in plasma bepalend is voor de farmacologische activiteit van het farmacon. Op basis van deze hypothese wordt een hoge mate van plasma eiwitbinding (>95%) gezien als een negatieve eigenschap voor nieuw ontwikkelde farmaca. Voor sommige farmaca, zoals de benzodiazepines, de opiaten en de neurosteroiden, blijkt de hypothese van het 'vrije farmacon' juist te zijn. Voor andere stoffen zoals de adenosine A₁ agonisten, de selectieve CCK1 receptor antagonisten en de corticosteroiden blijkt de totale concentratie i.p.v. de vrije concentratie bepalend te zijn voor het farmacologische effect. De hypothese van het vrije farmacon wordt veelvuldig gebruikt bij de selectie van nieuwe kandidaat geneesmiddelmoleculen ondanks het tegenstrijdige experimentele bewijs. Het doel van het onderzoek beschreven in dit proefschrift is het bepalen van de invloed van plasma eiwitbinding op de farmacodynamiek van farmaca en het systematisch beproeven van de hypothese van het 'vrije farmacon'.

Ontwikkeling van een theoretisch kader voor de voorspelling van de invloed van plasma eiwitbinding op de farmacodynamiek

Een *in silico* aanpak biedt de mogelijkheid om verschillende hypothesen te testen zonder dat er uitvoerige experimenten nodig zijn. Een bijkomend voordeel is dat de *in silico* resultaten gebruikt kunnen worden om experimentele vindingen die *in vivo* verkregen zijn te ondersteunen. In hoofdstuk 2 is gekozen voor een *in silico* aanpak om de theoretische invloed van plasma eiwitbinding op de farmacodynamiek van farmaca te onderzoeken.

Als eerste stap werden de theoretische eigenschappen van plasma eiwitbinding onderzocht met behulp van computer simulaties. De mate van plasma eiwitbinding wordt doorgaans gerapporteerd als het percentage door eiwitten gebonden farmacon. Het percentage gebonden farmacon is afhankelijk van zowel de affiniteit (K_{dp}) als de concentratie eiwit in plasma. De affiniteit van het farmacon voor albumine

of AGP is een stof specifieke eigenschap, maar deze waarden worden weinig vermeld in de literatuur. Op basis van de concentratie plasma eiwit en de vrije fractie farmacon kan de affiniteit berekend worden. Op basis van literatuurgegevens is de range van affiniteiten verkregen voor albumine (10^{-7} tot 10^{-3} M) en voor AGP (10^{-9} tot 10^{-2} M).

Het bindingseiwit albumine komt in hoge concentratie voor in plasma en heeft meerdere bindingsplaatsen. De hoge bindingscapaciteit van dit eiwit zorgt ervoor dat de binding van kleine moleculen over het algemeen genomen onverzadigbaar is (lineair). Een belangrijke eigenschap van AGP is dat de concentraties sterk variëren tussen en binnen individuen. AGP is een acuut fase-eiwit, en de plasmaconcentratie ervan neemt belangrijk toe bij ontstekingen. Onder normale omstandigheden is de binding van een farmacon aan AGP verzadigbaar, dus neemt vrije fractie toe bij toenemende farmacon concentraties. De simulaties in hoofdstuk twee laten zien dat de binding van farmaca aan AGP lineair wordt als de concentratie van AGP ($\sim 8x$) verhoogd wordt zoals het geval is tijdens een ontsteking.

Het farmacologische effect van een farmacon is afhankelijk van de binding van het farmacon aan de receptor in het lichaam. De invloed van plasma eiwitbinding op de farmacodynamiek is dus afhankelijk van de 'directe' competitie tussen eiwitbinding en receptor binding. De computer simulaties uitgevoerd in hoofdstuk 1 laten zien dat naast de affiniteit van het farmacon voor zowel eiwit als receptor, de capaciteit ook een belangrijke factor is in de competitie tussen eiwit en receptor. Het verschil in affiniteit en capaciteit voor eiwit en receptor bepaalt de invloed van plasma eiwitbinding op de receptor bezetting van een farmacon onder evenwichtcondities. Capaciteit is dus een factor die in ogenschouw moet worden genomen als men de competitie tussen eiwitbinding en receptor binding onderzoekt.

Wat betreft de verschillen in affiniteit voor het eiwit en de receptor is gevonden dat de affiniteit voor de receptor waarschijnlijk hoger is dan de affiniteit voor het eiwit. De range voor receptor affiniteit is 10^{-12} tot 10^{-5} M en overlapt de ranges voor albumine en AGP affiniteiten. Als gevolg van de overlap is het mogelijk dat de affiniteit voor het eiwit de affiniteit voor de receptor benadert. Ondanks dat sommige studies laten zien dat eiwitbinding zowel niet-restrictief als restrictief voor de farmacodynamiek kan zijn, wordt over het algemeen aangenomen dat alleen de vrije fractie verantwoordelijk is voor het uiteindelijke farmacologische effect. Er wordt dus aangenomen dat eiwitbinding restrictief is voor de farmacodynamiek. De simulaties bevestigen dat eiwitbinding inderdaad restrictief is voor het effect van de meeste farmaca. Niet-restrictieve eiwitbinding voor de farmacodynamiek wordt alleen gezien voor stoffen met een hoge affiniteit voor de receptor vergeleken met de affiniteit voor het eiwit ($>1000x$ verschil). De simulaties laten dus zien dat de hypothese van het vrije farmacon niet in alle gevallen geldt.

Farmacokinetisch-farmacodynamisch modelleren van β -blokkers

β -adrenoceptor antagonisten als model stoffen

De β -adrenoceptor antagonisten (β -blokkers) zijn geselecteerd als model stoffen in het onderzoek, omdat deze stoffen verschillen in de mate van plasma eiwitbinding en in de affiniteit voor de β -adrenoceptor. Een praktisch voordeel van het gebruik van β -blokkers is dat ze een goed meetbaar farmacodynamisch eindpunt hebben in mensen en dieren, namelijk hartslag. Daarnaast zijn deze stoffen antagonisten en kan het farmacologische effect op de hartslag dus direct gerelateerd worden aan de receptor bezetting.

De β -blokker, propranolol is vaak gebruikt in het onderzoek naar plasma eiwitbinding. De meeste studies laten zien dat voor deze stof de vrije concentratie verantwoordelijk is voor het farmacologische effect. De gerapporteerde resultaten zijn nog nooit systematisch beproefd met behulp van mechanistisch farmacokinetisch-farmacodynamisch modelleren. Deze aanpak is van belang om dat plasma eiwitbinding

zowel de farmacokinetiek als de farmacodynamiek beïnvloedt. Het gebruik van mechanistisch farmacokinetisch-farmacodynamisch modelleren zorgt ervoor dat niet alleen de invloed op de farmacokinetiek wordt meegenomen, maar ook, door het gebruik van de receptor theorie, realistische schattingen van de *in vivo* receptor binding affiniteit kunnen worden verkregen. Het doel van de onderzoeken beschreven in dit proefschrift is dan ook het beproeven van de hypothese van het vrije farmacon op een systematische wijze door middel van mechanistisch farmacokinetisch-farmacodynamisch modelleren.

Hartslag onder door isoprenaline geïnduceerde tachycardie als PD eindpunt in ratten

De verlaging in hartslag na toediening van β -blokkers is klein en moeilijk te onderscheiden van normale variaties in hartslag. Om die reden wordt het effect van de β -blokkers in de kliniek onderzocht met behulp van door isoprenaline of door lichamelijke activiteit geïnduceerde tachycardie. De door isoprenaline geïnduceerde tachycardie wordt verkregen door middel van korte intraveneuze infusies met isoprenaline. Het effect op de hartslag van isoprenaline wordt vervolgens geëvalueerd met en zonder de toediening van β -blokker. Een vergelijkbare methodologie wordt gebruikt voor de door lichamelijke activiteit geïnduceerde tachycardie. De respons in hartslag als gevolg van lichamelijke activiteit wordt bestudeerd zonder en met toediening van een β -blokker.

Voor de ontwikkeling van mechanistische farmacokinetische-farmacodynamische modellen heeft het continue meten van het farmacologische effect de voorkeur (bv. hartslag, EEG, temperatuur). Om die reden hebben we het gebruik van een continue isoprenaline infuus ($5 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) voor de farmacodynamische meting van S(-)-atenolol in Wistar Kyoto (WKY) ratten onderzocht. In hoofdstuk 3 wordt de validatie van hartslag onder door isoprenaline geïnduceerde tachycardie als continue farmacodynamisch eindpunt voor de β -blokkers beschreven. S(-)-atenolol werd gebruikt als prototype voor de β -blokkers. Een secundair doel was het identificeren van de concentratie-effect relatie voor isoprenaline, omdat dit noodzakelijk was voor de ontwikkeling van een mechanistisch farmacokinetisch-farmacodynamisch model (hoofdstuk 4).

De resultaten in hoofdstuk 3 laten zien dat hartslag onder door isoprenaline geïnduceerde tachycardie een robuust en betrouwbaar farmacodynamisch eindpunt is. Tachycardie geïnduceerd door isoprenaline is eenvoudig te bewerkstelligen en te controleren in dieren waarneer dit wordt vergeleken met de door lichamelijke activiteit geïnduceerde tachycardie. Een bijkomend voordeel is de mogelijkheid om de concentratie isoprenaline in plasma te meten. Dit is voornamelijk belangrijk voor het ontwikkelen van een mechanistisch farmacokinetisch-farmacodynamisch model die de competitieve interactie tussen isoprenaline en de β -blokkers beschrijft.

Ontwikkeling mechanistisch PD interactie model voor een agonist en een antagonist

De *in vivo* affiniteit voor antagonisten is doorgaans moeilijk te schatten, omdat onder normale fysiologische omstandigheden de effecten van deze stoffen klein zijn. De farmacologische activiteit van een antagonist is alleen afhankelijk van binding en het resultaat van vervanging van de (endogene) agonist op de receptor. Het meten van de concentratie van de (endogene) agonist is vereist voor het schatten van de *in vivo* affiniteit voor antagonisten. Daarnaast is het bepalen van de affiniteit en de intrinsieke effectiviteit van de agonist essentieel voor het mechanistisch modelleren.

In hoofdstuk 4 wordt de ontwikkeling van een farmacodynamisch interactie model voor een agonist en een antagonist dat gebruikt kan worden voor het schatten van de *in vivo* affiniteit van β -blokkers beschreven. Als eerste werd de concentratie-effect relatie van isoprenaline gekarakteriseerd op basis van het

operationele model van antagonisme. The affiniteit (K_A) van isoprenaline, 3.2×10^{-8} M (linker atria WKY ratten), werd verkregen uit de literatuur. De schattingen inclusief de coëfficiënten van variatie voor de basislijn (E_0), het maximale effect (E_{max}), en de intrinsieke effectiviteit waren 374 (1.9%) slagen per minuut, 130 (5.9%) slagen per minuut en 274 (33%). De isoprenaline resultaten laten zien dat deze stof een uiterst effectieve agonist is in een systeem met een grote receptor reserve en deze vindingen zijn in overeenstemming met de literatuur.

De volgende stap was de ontwikkeling van het mechanistische farmacodynamisch interactie model voor Isoprenaline en S(-)-atenolol. De hartslag profielen in WKY ratten na toediening van de agonist, Isoprenaline, en de antagonist, S(-)-atenolol, werden goed beschreven door het ontwikkelde interactie model. De verkregen schatting voor de *in vivo* affiniteit van S(-)-atenolol, 4.62×10^{-8} M, is vergelijkbaar met gevonden literatuur waarden (3.26×10^{-8} M en 2.5×10^{-8} M) in ratten. De bevindingen laten zien dat het ontwikkelde mechanistische interactie model gebruikt kan worden voor het schatten van de *in vivo* affiniteit van β -blokkers.

Evaluatie van het effect van plasma eiwitbinding op de farmacodynamiek

PKPD correlatie voor β -blokkers met een variërend percentage plasma eiwitbinding

Het doel van het in hoofdstuk 5 beschreven onderzoek was het bestuderen van de invloed van plasma eiwitbinding op de farmacodynamiek. De farmacokinetiek en farmacodynamiek van vier β -blokkers met een variërend percentage plasma eiwitbinding werd onderzocht in WKY ratten. De β -blokkers, S(-)-atenolol, S(-)-metoprolol, S(-)-propranolol en timolol zijn geselecteerd vanwege de verschillen in eiwitbinding (3 – 95%). Het in hoofdstuk 4 ontwikkelde mechanistische PD interactie model werd toegepast op de farmacodynamische interactie tussen isoprenaline en de individuele β -blokkers. De concentratie-effect relaties werden gemodelleerd op basis van de totale of vrije concentraties. De verkregen schatting van de *in vivo* affiniteit voor de verschillende β -blokkers werd vervolgens vergeleken met de *in vitro* affiniteit. Als de vrije concentratie verantwoordelijk is voor de farmacodynamiek van de β -blokkers, dan zal de *in vivo* affiniteit op basis van de vrije concentratie overeenkomen met de *in vitro* affiniteit.

De *in vitro-in vivo* correlatie voor de receptor affiniteit op basis van de vrije concentratie was lineair ($r^2 = 0.97$) en benaderde de identiteitslijn ($x=y$). Daarnaast was de verkregen schatting van de *in vivo* affiniteit ($K_{B,vivo} = 2.0 \pm 0.7$ nM) op basis van de vrije concentratie voor de in hoge mate gebonden stof, S(-)-propranolol, vergelijkbaar met de *in vitro* affiniteit (1.9 ± 0.5 nM). Op basis van deze resultaten werd geconcludeerd dat de vrije fractie verantwoordelijk is voor het effect van de β -blokkers op de hartslag.

De simulaties (hoofdstuk 2) bevestigden de verkregen resultaten in hoofdstuk 5. Voor de meeste stoffen en dus ook de β -blokkers de vrije concentratie verantwoordelijk is voor het effect *in vivo*.

*Ontwikkeling van een *in vivo* methode om plasma eiwitbinding te veranderen*

In hoofdstuk 6 werd een *in vivo* methode ontwikkeld om de hypothese van het vrije farmacon te beproeven door middel van het veranderen in plasma eiwitbinding.

Het veranderen van plasma eiwitbinding biedt de mogelijkheid tot het onderzoeken van de invloed van eiwitbinding op de farmacodynamiek van een in hoge mate gebonden stof. Om deze methode *in vivo* te kunnen gebruiken is het van belang om plasma eiwitbinding op een gecontroleerde manier te veranderen.

The resultaten in hoofdstuk 6 laten zien dat implanteren van permanente canules de AGP serum concentraties 10 tot 15-voudig verhogen twee dagen na de operatie. De AGP serum concentratie was

1540 ± 122 µg/ml twee dagen na de implantatie en keerde binnen één week terug naar de basislijn (85 ± 21 µg/ml). Vervolgens werd *ex vivo* aangetoond dat een verandering in de AGP serum concentratie van 55 tot 675 µg/ml resulteerde in een reductie van de vrije fractie van 14 ± 0.6 tot 1.9 ± 0.3 % voor S(-)-propranolol. Het implanteren van permanente canules verandert de plasma eiwitbinding van S(-)-propranolol, dus op een robuuste, reproduceerbare en tijdafhankelijke wijze.

Invloed van veranderde plasma eiwitbinding op de concentratie-effect relatie van S(-)-propranolol

Het veranderen van plasma eiwitbinding van een hoog gebonden stof zoals S(-)-propranolol en het bestuderen van de concentratie-effect relatie van deze stof onder normale en veranderde eiwitbinding is een interessante methode om de invloed van plasma eiwitbinding op de farmacodynamiek te onderzoeken. Het doel van hoofdstuk 7 was het beproeven van de hypothese van het vrije farmacon door het veranderen van de plasma eiwitbinding van S(-)-propranolol *in vivo* in ratten. De invloed van veranderde AGP serum concentraties op hartslag effecten van S(-)-propranolol werd bestudeerd door het vergelijken van de concentratie-effect relatie in ratten 2 (verhoogde plasma eiwitbinding) en 7 dagen (normale plasma eiwitbinding) na implantatie van permanente canules. De analyse van de concentratie-relatie van S(-)-propranolol onder condities van verhoogde en normale plasma eiwitbinding werd uitgevoerd met het in hoofdstuk 4 ontwikkelde mechanistische PD interactie model.

De mechanistische analyse liet zien dat de AGP concentratie een covariaat is voor zowel de intercompartimentele klaring (Q3) als de geschatte *in vivo* affiniteit voor de beta receptor. De *in vivo* affiniteit nam af met hogere AGP concentraties en dit is een aanwijzing dat de hypothese van het vrije farmacon inderdaad toepasbaar is op de farmacodynamiek van S(-)-propranolol. Deze bevinding is in overeenstemming met de gevonden resultaten in hoofdstuk 5.

Op basis van hoofdstuk 6 werd vervolgens de verandering in de vrije fractie van S(-)-propranolol als gevolg van de variatie in de AGP concentratie bepaald. De belangrijkste vraag was of de verandering in de concentratie-effect relatie van S(-)-propranolol te verwachten is op basis van de verandering van de vrije fractie. De individuele serum AGP concentraties in hoofdstuk 7 varieerde van 110 (dag 7) tot 1150 µg/ml (dag 2). De geschatte percentages vrij farmacon waren gemiddeld 1,4 % op dag 2 en 8,3 % op dag 7 na implantatie van de canules. De affiniteiten op basis van totale plasma concentraties waren 4.6 nM en 30 nM onder condities van normale en verhoogde plasma eiwitbinding, respectievelijk. De voor plasma eiwitbinding gecorrigeerde affiniteiten waren 0.31 nM en 0.41 nM. Corrigeren van de affiniteit voor de vrije fractie resulteerde in bijna identieke schatting voor de affiniteit onder condities van normale en verhoogde plasma eiwitbinding en dit bevestigt de conclusie dat de vrije fractie van S(-)-propranolol verantwoordelijk is voor het effect op hartslag.

Conclusies

Het doel van het onderzoek beschreven in dit proefschrift was het bepalen van de invloed van plasma eiwitbinding op de farmacodynamiek van farmaca en het systematisch beproeven van de hypothese van het 'vrije farmacon'.

Dit proefschrift laat zien dat onder evenwichts condities voor de meeste stoffen inclusief de β -blokkers de vrije fractie bepalend is voor het farmacologisch effect. Alleen in het geval van een heel hoge affiniteit voor de receptor vergeleken met de affiniteit voor het eiwit (1000-voudig verschil) kan eiwitbinding niet-restrictief zijn voor het effect. Dit betekent dat de hypothese van het vrije farmacon onder evenwichtscondities niet voor alle stoffen geldt. Daarnaast is het van belang om de hypothese van het

vrije farmacon verder te beproeven en onderzoeken onder niet evenwichts (dynamische) condities.