



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Pumping new life into preclinical pharmacokinetics: exploring the pharmacokinetic application of ex vivo organ perfusion

Stevens, L.J.

Citation

Stevens, L. J. (2024, October 29). *Pumping new life into preclinical pharmacokinetics: exploring the pharmacokinetic application of ex vivo organ perfusion*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4106882>

Version: 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/1887/4106882>

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

ADDENDUM

Nederlandse samenvatting

Curriculum Vitae

List of publications

Dankwoord

Nederlandse samenvatting

De karakteriseren van het farmacokinetische profiel van een stof is een uitdagend en ingewikkeld proces met een lage slagingskans. Preklinische experimenten zijn een belangrijk onderdeel in het proces van medicijn ontwikkeling met als doel om informatie te voorzien over het veiligheidsprofiel en de werkzaamheid van het medicijn. Dit maakt dat het essentieel is dat alle aspecten van medicijn zoals de absorptie, distributie, metabolisme en excretie (ADME) gekarakteriseerd zijn. Om ADME processen te karakteriseren zijn preklinische ex vivo modellen zeer waardevol en kunnen ze worden beschouwd als de schakel tussen *in vitro* en *in vivo* modellen zoals besproken in deel I van deze dissertatie. In Hoofdstuk 2 wordt een overzicht gegeven van de huidige preklinische ex vivo modellen om medicijn absorptie, metabolisme en excretie te bestuderen. Daarnaast wordt de toepassing om drug-drug interacties (DDI) in gezondheid en de toepassing van ziekte (ex vivo) modellen bediscussieerd. Het gebruik van normotherme machine perfusie in het veld van transplantatie onderzoek heeft laten zien dat orgaan functie en dynamische processen op een representatieve manier kunnen worden bestudeerd. Toepassing voor het preklinische farmacologie veld zou een toepassing kunnen zijn; de intacte morfologische structuur van het orgaan, applicatie van fysiologische bloedstroom en de aanwezigheid van intacte galwegen en urine structuren zijn belangrijke karakteristieken nodig om bepaalde ADME processen in kaart te brengen. Deze hiervoor genoemde aspecten zijn vaak afwezig in preklinische simplistische *in vitro* modellen maar zijn van essentieel belang om inzichten te bieden in transporter affiniteit, DDI en eliminatie routes. Het doel van deze dissertatie was het exploreren van de toepasbaarheid van *ex vivo* orgaanperfusie om farmacologische processen in darm, lever en nier te karakteriseren. In de verschillende hoofdstukken hebben we het gebruik van o.a. leverperfusie en multi-orgaan perfusie laten zien dat farmacokinetische processen zoals DDI, endogene substraten processen, pre-systemische darm en lever metabolisme en excretieprofielen kunnen karakteriseren.

In deel II van deze dissertatie hebben we de toepasbaarheid van normotherme machine perfusie (NMP) van de lever bestudeerd om medicijn farmacokinetiek en het metabolisme van endogene substraten te karakteriseren. Als eerste stap hebben we in hoofdstuk 3 het perfusie model met varkenslevers opgezet en onderzocht of het model een geschikt platform is om klinische geobserveerde OATP-gemedieerde DDI na te bootsen. We hebben aangetoond dat NMP van

varkenslevers een nieuw en betrouwbaar model is om OATP-gemedieerde DDI te bestuderen. We hebben de DDI effecten op hepatische klaring, galexcretie en perfusate(metaboliet) profielen van verschillende statines bestudeerd. De rangorde in de mate van DDI die we in onze experimenten hebben gevonden kwamen goed overeen met klinisch gevonden mate van DDI waarbij de laagste DDI werd gevonden voor Pitavastatine en de hoogste interactie voor Atorvastatine. Dit wijst naar het potentiële toepassing van het nieuwe ex vivo model in de vroege fase van geneesmiddel ontwikkeling.

Het vertalen van preklinische bevindingen met behulp van dierlijke materiaal, zoals het varkenslever model, naar de klinische setting blijft uitdagend vanwege onder andere de verschillend in de eiwitexpressie van transporters en CYP-enzymen. Bovendien kan een leveraandoening en ziekte zoals cirrose leiden tot morfologische afwijkingen en verschillen de eiwit expressie van verschillende transporters en CYP-enzymen waardoor de farmacokinetische profielen van medicijnen worden beïnvloed. Met de huidig beschikbare preklinische modellen blijft het een uitdaging om effecten van deze pathologische veranderingen op het farmacokinetische profiel te bestuderen. In hoofdstuk 4 hebben we het gebruik van geëxplanteerde humane levers laten zien als toepassing voor machine perfusie. Met het model hebben we de invloed van cirrose op de hepatische extractie, galklaring en DDI van 4 geneesmiddelen voor verschillende transporter substraten onderzocht. We hebben succesvol 7 cirrotische levers en 4 niet-cirrotische levers voor 360 minuten geperfundeed waarbij viabiliteit en functionaliteit behouden bleven. De hepatische klaring van rosuvastatine en digoxine bleken het meest te worden beïnvloed door cirrose, deze stoffen lieten een toename zien in C_{max} van respectievelijk 11.5 en 2.89 keer vergelijkbaar met niet-cirrotische levers. Er werden geen grote verschillen waargenomen voor metformin en furosemide. De interactie van rosuvastatine of digoxine met een interacterend geneesmiddel was duidelijker in niet-cirrotische levers vergeleken met cirrotische levers. Het bestuderen van de farmacokinetiek van geneesmiddelen met behulp van geëxplanteerde humane levers kan als basis dienen om verschillen in de hepatische klaring van geneesmiddelen voor patiënten met leverziekten te bestuderen.

Een voordeel van het perfusiemodel is het bepalen van specifieke functies van het hele orgaan zoals het karakteriseren van het hepatische first-pass effect en de biliaire excretie in een geïsoleerde omgeving zonder de aanwezigheid van andere systemische effecten. De lever is echter een centraal orgaan in het

menselijke lichaam en via is via de poortader in connectie met de darmen die voedingsstoffen, galzouten en hormonen transporteert richt de lever. Deze (endogene) stoffen remmen en/of stimuleren vaak bepaalde processen in de lever zoals lipide metabolisme, glucose huishouding en het galzoutmetabolisme. Galzouten regelen hun eigen homeostase door negatieve terugkoppeling op de biosynthese van galzouten. Galzouten remmen CYP27A2, CYP7A1 en CYP8B1 door FXR activatie. Na activatie zal het ook galzout import remmen en export stimuleren en daarbij voorkomen dat galzouten in de lever accumuleren wat toxisch kan zijn. Echter, de momenteel gebruikte NMP protocollen, die veel worden toegepast in zowel klinische als onderzoek setting, limiteren de nabootsing van de *in vivo* galzout fysiologie. Tijdens perfusies wordt namelijk alleen taurocholaat (TCA) gebruik als galzout infusie wat slechts een van de vele geconjugeerde circulerende galzouten is. Dit legt een aanzienlijke last op de lever tijdens NMP gezien de *de novo* synthese van galzouten aanslaat maar er geen teruggave is van een gevarieerde galzout pool. In hoofdstuk 5 hebben we dit bestudeerd en geprobeerd de *de novo* synthese van galzouten te karakteriseren door het profileren van de galzout excretie in de gal, cholesterol homeostase te karakteriseren en hebben we de genexpressie van transporter eiwitten tijdens machine perfusie in kaart te brengen. We hebben aangetoond dat de galzout synthese (g/h) bovengemiddeld is tijdens machineperfusie wat resulteerde in een afname van perfusaat cholesterol levels in varkensperfusies. Bovendien was er een afname in de expressie van genen gerelateerd aan de galzout synthese en een toename van de genexpressie van genen gerelateerd aan cholesterol metabolisme en een afname van galzout afhankelijke opname en efflux transporter expressie. Het vervangen van TCA infusie door een representatievere galzout pool met (on)geconjugeerde galzouten heeft veelbelovende resultaten opgeleverd. De infusie van een fysiologische relevante geconjugeerde galzoutmix resulteerde in een verminderde levels van ALT en AST en behield stabiele perfusaat cholesterol waarden. Daarnaast konden we een link leggen tussen galzout klaring en leverfunctie.

In deel III hebben we farmacokinetische processen bestudeerde door middel van perfusie van abdominale organen. Real-time karakteriseren van het first-pass effect van oraal toegediende geneesmiddelen, bestaande uit darm absorptie en metabolisme, transport via de poortader en hepatobiliaire processen, blijft een uitdaging. In hoofdstuk 6 laten we de ontwikkeling en applicatie van een *ex vivo* varkens perfusie model zien met abdominale

organen wat het potentieel laat zien voor het bestuderen van ADME gerelateerde processen. Met behulp van dit model konden we pre-systemische extractie van midazolam karakteriseren voor zowel de darm als lever. Als gevolg daarvan kon de orale biobeschikbaarheid worden bepaald. De hepatische extractie (F_H) en darm extractie (F_G) en de berekende orale bio beschikbaarheid hieruit waren in overeenstemming met *in vivo* data van varkens. Door deze aanpak kunnen waardevolle inzichten worden verkregen in de absorptie en metabolisme van nieuwe geneesmiddelen waardoor de ontwikkeling en optimalisatie van geneesmiddelen in ontwikkeling voor humaan gebruik.

In conclusie, in deze dissertatie hebben we ons gericht op de farmacokinetische toepassing van NMP. Met behulp van deze techniek hebben we geprobeerd de vakgebieden van transplantatie en farmacologie samen te brengen. De verschillende studies hebben aangetoond dat NMP ingezet kan worden om verschillende farmacokinetische processen van geneesmiddelen in kaart te brengen zoals het hepatische first-pass effect, hepatische klaring, galklaring, transporterfunctie en DDI met behulp van geëxplanteerde zieke humane levers en uit het slachthuis verkregen varkenslevers. Het gebruik van varkenslevers bleek een geschikt alternatief voor menselijke levers om de mechanistische bijdrage van transporters in geneesmiddelopname, geneesmiddeluitscheiding en DDI te bestuderen. Deze studies maakten het mogelijk om DDI, gemedieerd door OATP1B1/1B3, te onderzoeken, met resultaten die goed in overeenstemming waren met klinische data. Bovendien bleken geëxplanteerde zieke humane levers geschikt te zijn voor perfusieonderzoek en kunnen ze dienen als basis om de verschillen in hepatische verwerking van geneesmiddelen bij patiënten met verschillende soorten leveraandoeningen beter te bestuderen. De hepatische klaring van rosuvastatine en digoxine bleek het meest beïnvloed door cirrose, terwijl er geen grote verschillen werden waargenomen voor de renaal geklaarde geneesmiddelen metformine en furosemide. De 3-voudig lagere portale flow in cirrotische levers verminderde de hepatische extractie van rosuvastatine, wat het belang van portale flow in een preklinisch model voor het bepalen van hepatische klaring aantoont. Verder werd de optimalisatie van het leverperfusiemodel bestudeerd door infusie van een (on)geconjugeerde galzuurpool om fysiologische omstandigheden na te bootsen voor een nauwkeurigere beoordeling van hepatische farmacokinetische processen. Deze strategie toonde aan dat de infusie van (on)geconjugeerde galzuren de belasting van de de novo galzuursynthese verlichtte en de leverfunctie

verbeterde, wat wijst op potentiële vooruitgangen in leverpreservatie en transplantatietechnieken. De mogelijkheden van het perfusiesysteem bleken talrijk, zoals we aantoonde bij de ontwikkeling en toepassing van multi-orgaanperfusie om de interactie tussen de darm en lever te begrijpen door karakterisatie van het first-pass effect en pre-systemische CYP3A4 metabolisme. Het gebruik van perfusie bleek een uitstekend hulpmiddel te zijn om geneesmiddelconcentraties in bloedstromen en weefsels te bestuderen die anders onmogelijk te bereiken zijn, waardoor nieuwe en diepgaande inzichten kunnen worden verkregen in het ADME-profiel van geneesmiddelen.

