

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TINA TRDAN

# DIPLOMSKA NALOGA

Univerzitetni študij farmacije

Ljubljana, 2008

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TINA TRDAN

**POPULACIJSKA ANALIZA FARMAKOKINETIKE  
AKTIVNEGA METABOLITA LEFLUNOMIDA PRI  
BOLNIKI Z REVMAATOIDNIM ARTRITISOM**

**A POPULATION PHARMACOKINETIC ANALYSIS OF  
THE ACTIVE METABOLITE OF LEFLUNOMIDE IN  
PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2008

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko, pod mentorstvom doc. dr. Iztoka Grabnarja. Klinični del raziskave so naredili v Bolnišnici dr. Petra Držaja. Genotipizacijo so opravili na Inštitutu za biokemijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani.

Za strokovno pomoč in nasvete pri izdelavi diplomske naloge se iskreno zahvaljujem mentorju doc. dr. Iztoku Grabnarju.

Hvala tudi sodelavcem Katedre za biofarmacijo in farmakokinetiko, ki so mi pomagali pri izdelavi diplomske naloge.

Iskrena hvala mojim domačim, ki so mi nudili podporo, me vzpodbujali in zaupali vame skozi vsa študijska leta. Zahvaljujem se tudi prijateljem, s katerimi sem preživela najlepše obštudijske trenutke.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo izdelala samostojno pod mentorstvom doc. dr. Iztoka Grabnarja.

Tina Trdan

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Slavko Pečar

Članica diplomske komisije: izr. prof. dr. Irena Mlinarič Raščan

Ljubljana, maj 2008

**VSEBINA**

|  |           |
|--|-----------|
| <b>VSEBINA</b> .....   | <b>1</b>  |
| <b>POVZETEK</b> .....  | <b>2</b>  |
| <b>ABECEDNI SEZNAM OKRAJŠAV</b> .....  | <b>4</b>  |
| <b>1. UVOD</b> .....   | <b>7</b>  |
| 1.1 REVMATOIDNI ARTRITIS .....   | 7         |
| 1.2 TERAPIJA REVMATOIDNEGA ARTRITISA .....   | 8         |
| 1.3 LEFLUNOMID .....   | 10        |
| 1.4 DOLOČANJE KONCENTRACIJE A77 1726 V PLAZMI .....  | 14        |
| 1.5 FARMAKOKINETIKA .....  | 14        |
| 1.5.1 LADME sistem.....  | 15        |
| 1.6 FARMAKOKINETIČNO MODELIRANJE .....   | 20        |
| 1.7 POPULACIJSKA FARMAKOKINETIKA .....   | 21        |
| 1.7.1 Tradicionalna in populacijska farmakokinetika .....  | 21        |
| 1.7.2 Model mešanih učinkov .....  | 23        |
| 1.7.3 Izbira sočasnih spremenljivk .....   | 24        |
| 1.8 ANALIZA POPULACIJSKE FARMAKOKINETIKE AKTIVNEGA<br>METABOLITA LEFLUNOMIDA V PRETEKLOSTI ..... | 25        |
| <b>2. NAMEN DELA</b> .....   | <b>27</b> |
| <b>3. MATERIALI IN METODE</b> .....  | <b>28</b> |
| 3.1 BOLNIKI .....  | 28        |
| 3.2 MATERIALI .....  | 29        |
| 3.3 HPLC ANALITIKA A77 1726 .....  | 31        |
| 3.4 PROGRAMSKA OPREMA .....  | 33        |
| 3.5 RAZVOJ POPULACIJSKEGA FARMAKOKINETIČNEGA MODELA .....  | 34        |
| 3.5.1 Osnovni model.....   | 34        |
| 3.5.2 Izbira sočasnih spremenljivk .....   | 35        |
| 3.5.3 Ocena in validacija končnega modela .....  | 38        |
| 3.6 UGOTAVLJANJE ZVEZE MED KONCENTRACIJO A77 1726 IN<br>AKTIVNOSTJO RA .....                     | 40        |
| <b>4. REZULTATI</b> .....  | <b>41</b> |
| 4.1 PODATKI O BOLNIKIH .....   | 41        |
| 4.2 RAZVOJ POPULACIJSKEGA FARMAKOKINETIČNEGA MODELA .....  | 43        |
| 4.2.1 Osnovni model.....   | 43        |
| 4.2.2 Izbira sočasnih spremenljivk .....   | 47        |
| 4.2.3 Validacija končnega modela.....  | 53        |
| 4.3 POVEZAVA MED KONCENTRACIJO A77 1726 IN AKTIVNOSTJO RA.....                                   | 58        |
| <b>5. RAZPRAVA</b> .....   | <b>61</b> |
| <b>6. SKLEP</b> .....  | <b>65</b> |
| <b>7. LITERATURA</b> .....   | <b>66</b> |

## POVZETEK

Značilnost leflunomida so velike razlike v plazemskih koncentracijah aktivnega metabolita leflunomida A77 1726 med posameznimi bolniki. Velik delež bolnikov mora zdravljenje z leflunomidom prekiniti bodisi zaradi neželenih učinkov bodisi zaradi neučinkovitosti. Namen diplomskega dela je ugotoviti ali je različna klinična učinkovitost posledica variabilnosti farmakokinetike. V diplomskem delu smo razvili populacijski farmakokinetični model A77 1726, ki nam je omogočil napovedovanje njegovih koncentracij pri posameznem bolniku in identifikacijo vzrokov za njihovo variabilnost.

V raziskavo smo zajeli 71 bolnikov z revmatoidnim artritisom, ki se zdravijo z leflunomidom v povprečju 3,4 leta. Tem bolnikom so bili odvzeti trije plazemski vzorci. Demografski in klinični parametri so bili pridobljeni iz popisov bolnikov. Dodatno so bili bolniki genotipizirani za *CYP 2C19* in *CYP 1A2*.

Za določanje plazemske koncentracije A77 1726 smo uporabili validirano metodo HPLC (tekočinska kromatografija visoke ločljivosti) z UV detekcijo. Na osnovi pridobljenih podatkov smo razvili populacijski farmakokinetični model s pomočjo programskega paketa NONMEM. Časovni potek plazemskih koncentracij smo opisali z enoprostornim modelom s 1. redom absorpcije. Ocenjevali smo geometrično sredino navideznega volumna porazdelitve in geometrično sredino navideznega očistka po peroralni aplikaciji. Navidezni volumen porazdelitve po peroralni aplikaciji  $V_d/F$  je bil 8,15 l, njegova interindividualna variabilnost pa je bila 54,0%. Navidezni očistek je bil 0.0282 l/h, njegova interindividualna variabilnost pa 69,6%. Ugotovili smo značilen vpliv hitrosti glomerulne filtracije (GFR) in polimorfizma *CYP 2C19* na navidezni plazemski očistek.

Pri manjši ledvični funkciji je bil navidezni očistek manjši. Pri bolnikih, ki so imeli vsaj en alel *CYP 2C19* z zmanjšano aktivnostjo (\*2), pa je bil  $Cl/F$  za 55% višji v primerjavi z ljudmi, ki tega alela niso imeli. Sklepamo, da je ta vpliv posledica počasnejše presnove leflunomida do A77 1726. Razviti model je potencialno uporaben za načrtovanje režima odmerjanja leflunomida.

Skupina pri kateri je bilo znižanje koncentracije C-reaktivnega proteina (CRP) med zdravljenjem z leflunomidom večje, je imela značilno višje povprečne koncentracije A77 1726 v stacionarnem stanju (Mann-Whitney,  $P=0,032$ ). To kaže, da je del variabilnosti klinične učinkovitosti mogoče pojasniti z variabilno farmakokinetiko. Vpliv plazemskih

koncentracij A77 1726 na prisotnost erozij, revmatoidnega faktorja (RF), protiteles proti cikličnemu citruliniranemu peptidu (antiCCP) ni bil značilen. Prav tako ni bil značilen vpliv plazemskih koncentracij A77 1726 na stopnjo v lestvici za aktivnost bolezni (DAS), stopnjo v vizualni analogni lestvici za bolečino (VAS) ter vpliv na hitrost sedimentacije eritrocitov (ESR). V vseh primerih pa je bil opažen enak trend.

**ABECEDNI SEZNAM OKRAJŠAV**

|                         |   |
|-------------------------|---|
| A77 1726                | aktivni metabolit leflunomida   |
| ALT                     | alanin aminotransferaza   |
| anti CCP protitelesa    | protitelesa proti cikličnemu citruliniranemu peptidu<br>( <i>ang. anti-citrulinated cyclic peptide antibodies</i> )   |
| AUC <sub>A77 1726</sub> | površina pod plazemsko krivuljo za A77 1726   |
| BSA                     | telesna površina ( <i>ang. body surface area</i> )  |
| C                       | koncentracija aktivnega metabolita  |
| CI                      | interval zaupanja   |
| Cl <sub>h</sub>         | jetrni očistek  |
| Cl <sub>p</sub>         | plazemski očistek   |
| Cl <sub>r</sub>         | renalni očistek   |
| C <sub>obs,ij</sub>     | izmerjena koncentracija   |
| C <sub>pred,ij</sub>    | napovedana koncentracija  |
| CRP                     | C-reaktivni protein   |
|                         | povprečna koncentracija aktivnega metabolita v plazmi v stacionarnem stanju   |
| C <sub>ss</sub>         | stanju  |
| CV                      | koeficient variacije  |
| CYP 1A2 C-163A          | genski polimorfizem v CYP 1A2 pri katerem je citozin na mestu 163 zamenjan z adeninom   |
| CYP 450                 | citokrom P450   |
| DAS                     | lestvica za aktivnost bolezni ( <i>ang. Disease Activity Scale</i> )  |
| DHODH                   | dihidro-orotat dehidrogenaza  |
| DMARD                   | Temeljne protirevmatske učinkovine<br>( <i>ang. disease-modifying antirheumatic drugs</i> )<br>(spojine z zlatom, D-penicilamin, sulfasalazin, antimalariki, metotreksat, azatioprin, ciklosporin, ciklofosfamid, leflunomid) |
| EDTA                    | etilendiamintetraocetna kislina   |
| E-max                   | maksimalni učinek   |
| ESR                     | hitrost sedimentacije eritrocitov   |

|          |  |
|----------|--|
| F        | obseg absorpcije   |
| $f_b$    | delež učinkovine, ki je vezan na plazemske proteine  |
| FD       | farmakodinamično   |
| FDA      | Food and Drug Administration   |
| FK       | farmakokinetično   |
| FO       | metoda prvega reda ( <i>ang. first order</i> )   |
| FOCE     | metoda prvega reda s pogojem ( <i>ang. first order conditional estimation</i> )                                    |
| FOCEI    | metoda prvega reda s pogojem in interakcijo<br>( <i>ang. first order conditional estimation with interaction</i> ) |
| GFR      | hitrost glomerulne filtracije  |
| HPLC     | tekočinska kromatografija visoke ločljivosti   |
| HT       | telesna višina   |
| IIV      | interindividualna variabilnost   |
| IPRE     | napovedana koncentracija pri posamezniku   |
| ITM      | indeks telesne mase  |
| $k_a$    | konstanta hitrosti absorpcije učinkovine   |
| $k_{el}$ | konstanta hitrosti eliminacije   |
| $k_m$    | konstanta hitrosti presnove  |
| $k_{MM}$ | Michaelis-Menten konstanta   |
| $k_r$    | konstanta hitrosti sproščanja učinkovine iz farmacevtske oblike  |
| LADME    | sproščanje, absorpcija, porazdelitev, metabolizem, eliminacija   |
| Lat.     | latinsko   |
| LOD      | meja zaznavnosti   |
| LOQ      | meja kvantitativne določitve   |
| MF       | mobilna faza   |
| MPE      | povprečna napaka napovedi ( <i>ang. mean prediction error</i> )  |
| N        | število enot   |
| NSAID    | nesteroidne protivnetne učinkovine   |
| OFV      | minimum objektivne funkcije  |
| P        | farmakokinetični parameter pri posameznem bolniku  |
| PE       | napaka napovedi ( <i>ang. prediction error</i> )   |
| PPK      | populacijska farmakokinetika   |

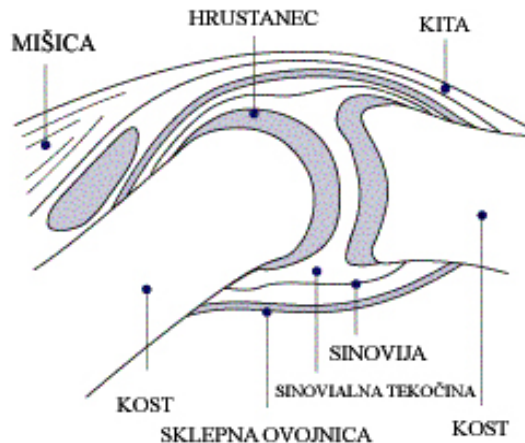


|               |   |
|---------------|---|
| PRED          | povprečna napovedana koncentracija v populaciji bolnikov  |
| QC            | kontrola analizne metode  |
| RA            | revmatoidni artritis  |
| RF            | revmatoidni faktor  |
|               | standardni odklon napake napovedi ( <i>ang. root mean square prediction error</i> )                                       |
| RMSE          |   |
| SCR           | koncentracija kreatinina v serumu   |
| SE            | standardna napaka   |
| SP1 – SP7     | standardne raztopine A77 1726 v krvni plazmi  |
| STS           | standardna dvostopenjska metoda   |
| SX            | spol  |
| t             | čas   |
| $t_{1/2}$     | biološka razpolovna doba  |
| TFMA          | 4-trifluorometilanilin  |
| VAS           | vizualna analogna lestvica za bolečino ( <i>ang. Visual Analogue Scale</i> )  |
| $V_d$         | volumen distribucije  |
| WRES          | utežen rezidual   |
| WT            | telesna teža  |
| $\varepsilon$ | rezidualna napaka, ki je vzorčena iz $N(0, \sigma^2)$   |
| $\eta$        | odstopanje farmakokinetičnega parametra posameznika od srednje vrednosti v populaciji, ki je vzorčena iz $N(0, \omega^2)$ |
| $\theta$      | srednja vrednost parametra v populaciji   |

## 1. UVOD

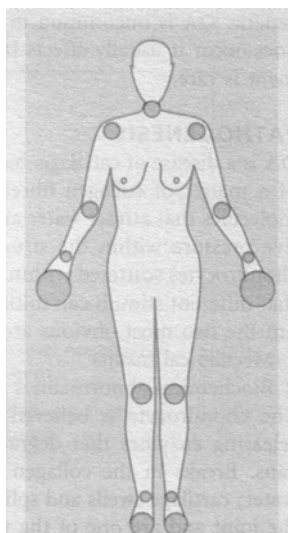
### 1.1 REVMATOIDNI ARTRITIS

Revmatoidni artritis je bolezen, ki prizadene 1-2% odraslih in je trikrat pogostejša pri ženskah kot pri moških. Najpogosteje se pojavi med 25. in 55. letom kot simetrično razporejeno kronično vnetje sklepov (poliartritis), ki lahko napreduje do hudih sklepnih okvar in do prizadetosti drugih tkiv in organov (pljuča, živčevje, oči). Napredujoče težave s sklepi vodijo do invalidnosti pri relativno mladih ljudeh ter posledično do visokih stroškov zdravljenja (zdravila, operacije) in rehabilitacije. Za revmatoidni artritis je značilna okvara hrustanca in vnetje sinovije. Sinovijske membrane so infiltrirane z nevtrofilci, makrofagi in limfociti, kar je značilno za imunski odziv. Velikokrat nastane žilnato granulacijsko tkivo (panus), ki okvari hrustanec sklepov in ga prerašča. K razvoju okvare prispevata humoralna in celično posredovana imunost (1, 2). Na sliki 1.1 je predstavljena zgradba sklepa.



Slika 1.1: Shematski prikaz sklepnih struktur

Na začetku bolezni so boleči in otekli predvsem mali sklepi rok, stopal, zapestja in komolci, in to obojestransko. Pozneje v poteku bolezni se lahko vnetje razširi še na velike sklepe, kot so kolena, kolki in gležnji, redkeje na hrbtenico (3, 4). Karakterističen vzorec prizadetosti sklepov pri RA je predstavljen na sliki 1.2.



Slika 1.2: Karakterističen vzorec prizadetosti sklepov pri revmatoidnem artritisu

## 1.2 TERAPIJA REVMATOIDNEGA ARTRITISA

Vzročni dejavniki pri revmatoidnem artritisu še niso v celoti pojasnjeni, zato je zdravljenje večinoma simptomatsko. Načini, ki se uporabljajo pri zdravljenju revmatoidnega artritisa so različni in vključujejo medicinsko, socialno in čustveno podporo bolniku. Glavni cilji zdravljenja so zmanjšanje bolečine in neugodja, preprečevanje deformacij in izgube sklepne funkcije ter ohranitev produktivnega in aktivnega življenja (3).

Zdravila za zdravljenje RA delimo v štiri skupine (5, 6):

1. Nesteroidne protivnetne učinkovine - NSAID (ang. *non-steroidal anti-inflammatory drugs*)

NSAID omilijo bolečino in pomirijo manjša vnetja, vendar so premalo učinkoviti, da bi spremenili dolgoročne uničujoče učinke revmatoidnega artritisa na sklepe. Protivnetni učinek imajo ob dolgotrajnem jemanju večjih odmerkov. Delimo jih na neselektivne NSAID (acetilsalicilna kislina, ibuprofen, naproksen), ki inhibirajo tako ciklooksigenazo-1 kot tudi ciklooksigenazo-2, ter na selektivne (celekoksib, rofekoksib, valdekoksib), ki inhibirajo le ciklooksigenazo-2.

## 2. Kortikosteroidi

Glavni predstavnik je metilprednizolon. Kortikosteroidi imajo močan protivnetni učinek. Hitro izboljšajo simptome RA kot sta bolečina in okorelost ter zmanjšajo oteklino in občutljivost sklepov. Uporabljajo se večinoma v kombinaciji z zdravili iz drugih skupin, saj je učinek steroidov v monoterapiji mnogo manjši kot pri kombiniranemu zdravljenju. Predpisujejo se predvsem pri bolnikih s hujšo obliko RA, ki ogroža normalno delovanje bolnika. Pri teh osebah služi steroidna terapija za nadzor simptomov in za ohranitev normalne funkcije, dokler ne pride do učinka drugih počasneje delujočih zdravil.

## 3. Imunomodulatorji - DMARD (*ang. disease-modifying antirheumatic drugs*)

Imunomodulatorji lahko zelo zmanjšajo vnetje pri RA, delujejo pa mnogo počasneje od steroidov. Klinične študije so pokazale, da imunomodulatorji zmanjšujejo poškodbe sklepov, ohranjajo sklepne strukture in funkcijo ter omogočajo normalno delovanje bolnika z RA. V skupino DMARD vključujemo spojine z zlatom, D-penicilamin, sulfasalazin, antimalarike, metotreksat, azatioprin, ciklosporin, ciklofosamid ter leflunomid. Za maksimalni učinek terapije je potrebno dolgotrajno redno jemanje predpisanega zdravila (najmanj 4-6 tednov pri zdravljenju z metotreksatom).

Pomanjkljivost konvencionalnih DMARD je v tem, da so nespecifični in zato lahko prizadenejo različne celice ter stopajo v interakcije z različnimi receptorji. Mnoge od teh spojin imajo resne in življenje ogrožujoče neželene učinke, kar zahteva stalen laboratorijski nadzor (7).

## 4. Biološka zdravila (*anti-TNF terapija, modifikatorji biološkega odgovora*)

Ta zdravila vplivajo na signalne molekule, ki so del vsakega vnetnega procesa. Nekatera od teh zdravil so beljakovine. Vežejo se na TNF, ki je pomembna proinflammatorna signalna molekula. V to skupino zdravil spadajo etanercept (Enbrel), adalimumab (Humira) in infliksimab (Remicade). Učinek teh zdravil je hitrejši od učinka imunomodulatorjev. Zaradi visoke cene proizvodnje in nepoznavanja posledic dolgotrajnega jemanja, je uporaba teh zdravil omejena na bolnike, ki težko prenašajo terapijo z imunomodulatorji pri odmerkih, ki so dovolj veliki za nadzor nad vnetjem.

Poleg učinkovin, ki reagirajo s TNF poznamo tudi molekule, ki biološki odgovor modificirajo na drugem mestu.

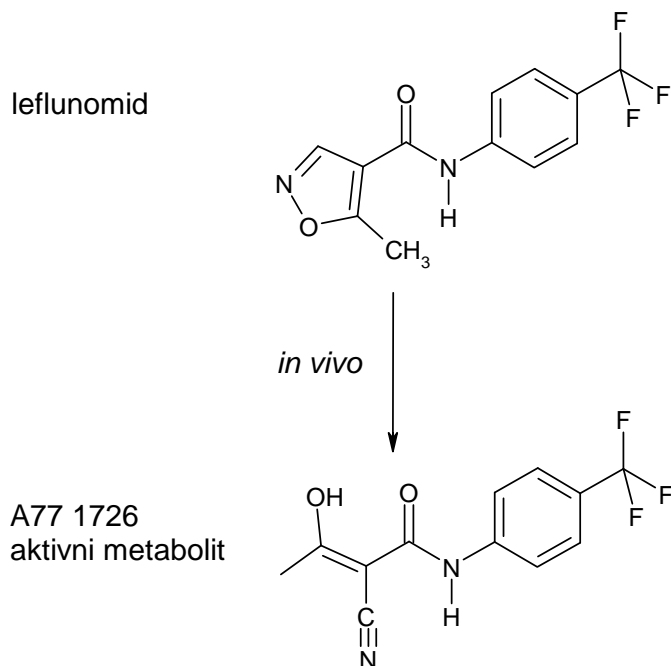
Splošen pristop k zdravljenju revmatoidnega artritisa je postopen v naslednjem vrstnem redu (8):

1. Počitek, izobraževanje bolnika in svetovanje bolniku
2. Salicilati
3. NSAID (nesteroidne protivnetne učinkovine)
4. DMARD (imunomodulirajoče antirevmatično zdravilo)
5. Kortikosteroidi
6. Imunosupresivne učinkovine

Zaradi pogostih in včasih tudi hudih neželenih učinkov zdravil pri terapiji RA, so potrebne redne kontrole v revmatološki ambulanti. Pogostost je odvisna od uporabljenega zdravila ter stanja bolezni.

### 1.3 LEFLUNOMID

Leflunomid je derivat izoksazola in predstavlja novi razred antirevmatičnih učinkovin, saj je v strukturi in mehanizmu delovanja različen od drugih imunomodulatornih učinkovin. *In vivo* se leflunomid že med presnovo prvega prehoda v črevesni steni in jetrih hitro in skoraj popolnoma presnovi v aktivni metabolit A77 1726, ki je aktiven *in vitro* in domnevno odgovoren za terapevtski učinek. Pretvorba leflunomida v njegov aktivni metabolit je prikazana na sliki 1.3. A77 1726 ima antiproliferativne in imunosupresivne učinke. Leflunomid reverzibilno inhibira mitohondrijski encim dihidro-orotat dehidrogenazo (DHODH) in s tem zavre sintezo pirimidinov. To prepreči proliferacijo aktiviranih limfocitov, ki igrajo pomembno vlogo pri razvoju in napredovanju revmatoidnega artritisa (9, 10).



Slika 1.3: Biotransformacija leflunomida v aktivni metabolit

### **Absorpcija**

Z radioaktivno označenim [ $^{14}\text{C}$ ] leflunomidom so pokazali, da se absorbira vsaj 82 do 95% odmerka. Absorpcija je hitra, čas do najvišje plazemske koncentracije A77 1726 pa je zelo spremenljiv. Najvišja koncentracija v plazmi se lahko pojavi med 1 in 24 urami po enkratnem odmerku. Leflunomid se lahko jemlje s hrano, saj je obseg absorpcije na poln in prazen želodec primerljiv. S hrano pa se zmanjša hitrost absorpcije leflunomida. Aktivni metabolit A77 1726 ima zelo dolg razpolovni čas (14 dni). Plazemske koncentracije se akumulirajo in so v primerjavi z enkratnim odmerkom v stanju dinamičnega ravnotežja 33-35 krat večje. Ker je za doseg stacionarnega stanja potrebno dolgo časa (22 tednov) se prve tri dni uporabljajo višji začetni odmerki (100 mg/dan), nato pa se zdravljenje nadaljuje z nižjimi odmerki 10 ali 20 mg/dan (11, 12).

### **Porazdelitev**

A77 1726 je v človeški plazmi močno vezan na plazemske beljakovine (albumin). Nevezana frakcija je približno 0,62%. Vezava A77 1726 je v območju terapevtskih koncentracij linearna. V plazmi bolnikov z revmatoidnim artritisom ali kronično ledvično insuficienco je vezava A77 1726 rahlo zmanjšana in bolj variabilna. Izrazita vezava A77 1726 na beljakovine lahko povzroči izpodrivanje drugih vezanih učinkovin. Vendar so v

raziskavah interakcij z varfarinom, ki je prav tako močno vezan na albumine (99%), ugotovili, da ta mehanizem interakcije klinično ni pomemben. Ibuprofen in diklofenak ne izpodrineta A77 1726 iz vezavnih mest na albuminu, v prisotnosti tolbutamida pa se nevezana frakcija A77 1726 zveča za dva do trikrat. Skladno z izrazito vezavo na plazemske beljakovine ima A77 1726 majhen navidezni volumen porazdelitve. Po intravenski aplikaciji leflunomida zdravim prostovoljcem je bil navidezni volumen porazdelitve približno 12,7 l (območje 6 od 30 l), kar je malo manj od volumna ekstracelularne tekočine in več od volumna krvi. Privzem A77 1726 v eritrocite je majhen (11, 12).

### **Presnova**

Leflunomid se presnovi v en glavni (A77 1726) in več stranskih presnovkov, med katerimi je tudi TFMA (4-trifluorometilanilin). Biotransformacije leflunomida v A77 1726 in nadaljnje presnove A77 1726 ne uravnava en sam encim. Presnova poteka v mikrosomski in citosolski celični frakciji. Študije interakcij s cimetidinom (nespecifičnim zaviralcem citokroma P450) in rifampicinom (nespecifičnim induktorjem citokroma P450) kažejo, da so encimi CYP *in vivo* v presnovo leflunomida vpleteni le v majhni meri (11).

V raziskavi, kjer so ugotavljali farmakokinetiko leflunomida in njegovih metabolitov (A77 1726, TFMA) po uporabi več odmerkov rifampicina (8 dni), so ugotovili, da se površina pod plazemsko krivuljo za A77 1726 v primerjavi z monoterapijo z leflunomidom poveča za 10% (9). Rezultati raziskave so podani v tabeli 1.1.

Tabela 1.1: Predstavitev srednjih vrednosti  $\pm$  SD površine pod plazemsko krivuljo za A77 1726

| Parameter                       | Leflunomid       | Leflunomid+rifampicin | P-vrednost* |
|---------------------------------|------------------|-----------------------|-------------|
| AUC <sub>0→120</sub> (hr×µg/ml) | 732,3 $\pm$ 74,0 | 809,5 $\pm$ 105       | 0,003       |

\*ANOVA

### **Izločanje**

Izločanje A77 1726 je počasno z navideznim plazemskim očistkom približno 31 ml/h. Razpolovni čas izločanja pri bolnikih je približno 2 tedna. Po aplikaciji radioaktivno označenega odmerka leflunomida se ta v enaki meri izloča v blato (verjetno preko žolča) in urin. A77 1726 je v urinu in blatu prisoten še 36 dni po enkratnem odmerku. Glavni

presnovki v urinu so glukuronidi derivatov leflunomida (predvsem v vzorcih prvega dne po aplikaciji) in trifluorometilanilin. Blato v glavnem vsebuje A77 1726 (11).

Uporaba peroralne suspenzije aktivnega oglja v prahu (50 g 4-krat dnevno, 11 dni) ali holestiramina (8 g 3-krat dnevno, 11 dni) pri ljudeh vodi do hitrega in pomembnega povečanja hitrosti izločanja A77 1726 in zmanjša njegovo koncentracijo v plazmi. V 24 urah se koncentracija zniža za 40% z uporabo holestiramina in 37% z uporabo aktivnega oglja. Z uporabo holestiramina ali aktivnega oglja se razpolovni čas zmanjša na 1-2 dneva. To je domnevno posledica prekinitve enterohepatične cirkulacije (12).

### **Neželeni učinki**

Najpogostejši neželeni učinki so driska, slabost, ekcem in suha koža. Najpomembnejši neželeni učinki pa so hepatični. Pri 5% bolnikov, ki so sodelovali v kliničnih raziskavah, so opazili povišano koncentracijo ALT. Zvišanje je bilo reverzibilno in je bilo manjše od dvakratne vrednosti zgornje meje.

Postmarketinške raziskave so pokazale povišane koncentracije ALT pri 2-4% bolnikov, incidenca hepatocelularne nekroze pa je precej nižja in znaša 0,02-0,04%. Tveganje za resno poškodbo jeter je majhno in glede na prednosti terapije sprejemljivo. Terapija z leflunomidom se odsvetuje pri bolnikih s poškodbo jeter, infekcijo z virusom hepatitisa ali bolnikih, ki prekomerno uživajo alkohol. Večje tveganje za hepatotoksične učinke povezujejo tudi s kombinacijo uporabe leflunomida in metotreksata.

V zgodnjih raziskavah in kasneje v klinični praksi so opazili izgubo telesne teže, vendar mehanizem ostaja neznan. Prekinitev terapije zaradi izgube telesne teže običajno ni potrebna.

V prvih dveh mesecih terapije je možno povišanje krvnega tlaka, zato je priporočljivo spremljanje le-tega.

Tveganje za pojav hematoloških motenj je večje pri bolnikih z obstoječo anemijo, levkopenijo in/ali trombocitopenijo, pri bolnikih z okvarjenim delovanjem kostnega mozga in tistih s tveganjem za supresijo kostnega mozga (13, 14).



## 1.4 DOLOČANJE KONCENTRACIJE A77 1726 V PLAZMI

Plazemske koncentracije aktivnega metabolita leflunomida se merijo s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC), vendar ne rutinsko. V literaturi je opisanih nekaj metod določanja A77 1726 v plazmi. V večini objavljenih raziskav so za določanje A77 1726 uporabili sisteme z gradientnim pretokom mobilne faze. Za pripravo plazemskega vzorca je uporabljenih več metod, primer je ekstrakcija z etil acetatom v dveh stopnjah. Uporabljene so tudi metode določanja z dvema zaporednima kromatografskima kolonama ali z nadzorom temperature kolone. Pomanjkljivost večine metod je zahtevna oprema in dolg čas analize (15, 16).

Hitrejšo in preprostejšo metodo določanja A77 1726 v plazmi so opisali Vivien Chan in sodelavci. Za pripravo vzorca so uporabili precipitacijo plazemskih proteinov z acetonitrilom, temu pa je sledilo centrifugiranje. Kot interni standard so uporabili  $\alpha$ -fenil cimetno kislino, ločba je potekala na C18 kromatografski koloni, detekcija pa z UV detektorjem pri 305 nm. Hitrost pretoka mobilne faze, ki je bila sestavljena iz 35% acetonitrila v acetatnem pufru (pH uravnan na 2.5), je bila 1,5 ml/min. Povprečna retencijska časa za A77 1726 in interni standard sta znašala 2.2 min in 5.7 min (15).

## 1.5 FARMAKOKINETIKA

Farmakokinetika obravnava usodo zdravila v telesu po določenem času, vključno s procesi absorpcije, porazdelitve, lokalizacije v tkivih, metabolizma in ekskrecije, kar pomeni, da proučuje medsebojno delovanje zdravila in telesa v določenem času. Definicija je mnogokrat razširjena tako, da vsebuje še odnos med plazemsko koncentracijo in učinkom, kar je pravilneje opisano s terminom farmakodinamika.

Delovanje zdravila je odvisno od lastnosti učinkovin (fizikalno–kemičnih lastnosti: lipofilnost, ionizacija, stereoizomerija) in telesa (starost, fiziološke in genetske značilnosti). Zdravilo oziroma učinkovina, ki je v telo vnesena peroralno, se mora raztopiti, dospeti do mesta absorpcije, pri čemer naj se v gastrointestinalnem traktu ne bi razgradila, se absorbirati, se izogniti t.i. efektu prvega prehoda, doseči krvni obtok, se izogniti lokalizaciji v tkivih in v čim večji koncentraciji prispeti na mesto delovanja. Vsi ti procesi

v telesu pa so odvisni od številnih fizioloških in drugih dejavnikov, zato se ljudje različno odzivamo na zdravilo.

Spremenljivost v odzivu je lahko (17):

- Interindividualna, med posamezniki populacije bolnikov (npr. spol, starost, telesna masa, delovanje ledvic, genetska dispozicija itd.)
- Intraidividualna, znotraj posameznega bolnika (npr. bolezensko stanje, menstrualni cikel, prehranjevalne navade)

Na farmakokinetično variabilnost lahko vplivajo naslednji dejavniki:

- Demografski (spol, telesna teža, telesna površina, starost, rasa)
- Dejavniki okolja (kajenje, dieta, izpostavljenost onesnaženemu okolju itd.)
- Genetski dejavniki, ki preko metabolizma v jetrih vplivajo na očistek zdravila (izoforme citokroma P450: CYP 2D6, CYP 2C19, CYP 2C9, CYP 2A6 itd.)
- Interakcije z drugimi zdravili
- Fiziološki in patofiziološki dejavniki (nosečnost, jetrna in ledvična insuficienca ter druga bolezenska stanja)
- Nekateri drugi dejavniki (cirkadiani ritem, učinek hrane, čas obrokov itd.)

Nekateri bolniki so zaradi drugačne kinetike izpostavljeni večjemu tveganju vnosa prevelikih ali prenizkih odmerkov, zato je zanje priporočljivo prilagoditi odmerjanje glede na jakost dejavnikov, ki povzročajo variabilnost. Glavni cilj populacijskih farmakokinetičnih študij je opredelitev teh skupin bolnikov, z namenom zagotavljanja varnega in učinkovitega jemanja določenega zdravila (17).

### 1.5.1 LADME sistem

LADME je sistem, po katerem lahko shematsko predstavimo usodo učinkovine v telesu. Poimenovan je po kraticah za sproščanje (L), absorpcijo (A), distribucijo (D), metabolizem (M), eliminacijo (E). Ta sistem je nekakšna osnova za ovrednotenje farmakokinetičnega profila, z njim se da razložiti farmakokinetiko pri kakršnikoli aplikaciji. V nadaljevanju je ta sistem predstavljen na primeru peroralne aplikacije.

I. **SPROŠČANJE** (*ang. liberation*); pomeni prehod učinkovine iz farmacevtske oblike v raztopino. Na sproščanje vpliva več dejavnikov:

- lastnosti učinkovine (kemijska struktura, polimorfizem, topnost, pKa, hitrost raztapljanja),
- farmacevtska oblika (suspenzija, tablete, kapsule, oblike s kontroliranim sproščanjem), pri raztopinah tega procesa ni,
- fiziološki pogoji v prebavnem traktu (pH medija, kisel želodčni sok in rahlo bazičen črevesni sok, motiliteta prebavnega trakta, vpliv hrane),

Sproščanje je edini proces, ki ga lahko tehnološko v celoti nadzorujemo, zato je pomemben dejavnik pri oblikovanju zdravil. Sproščanje je tudi tesno povezano z absorpcijo učinkovine. Še več, v primeru, ko je hitrost absorpcije dovolj velika, lahko s spreminjanjem hitrosti sproščanja vplivamo na hitrost absorpcije učinkovine.

II. **ABSORPCIJA** (*ang. absorption*); označuje prehod iz lumna prebavnega trakta v portalni krvni obtok ter nadalje skozi jetra v sistemski krvni obtok. Na absorpcijo učinkovine vplivajo (18):

- biološka membrana, ki jo mora učinkovina preiti; logP ter pKa sta parametra, od katerih je odvisna hitrosti prehoda učinkovine skozi membrano; največ učinkovin prehaja membrano s pasivno difuzijo, nekatere pa preko prenašalcev z aktivnim ali pasivnim transportom,
- pH medija, ki skupaj s pKa učinkovine določa stopnjo ionizacije učinkovine,
- površina membrane,
- prekrvavljenost prebavnega trakta,
- motiliteta prebavnega trakta, ki določa hitrost prehoda učinkovine skozenj,
- hrana; vpliva na motiliteto prebavnega trakta in pH v lumnu trakta; predstavlja pa tudi fizično pregrado za absorpcijo,
- bolezni prebavnega trakta,
- vpliv drugih učinkovin.

V zvezi z absorpcijo se omenja tudi biološko uporabnost (*ang. bioavailability*). Biološko uporabnost določata hitrost in obseg absorpcije. Obseg absorpcije je definiran s faktorjem F, ki predstavlja delež aplicirane učinkovine, ki pride v centralni krvni obtok. Poleg zgoraj

našteti vplivov je obseg absorpcije odvisen tudi od stopnje predsistemskega metabolizma, poimenovanega tudi učinek prvega prehoda (*ang. first pass effect*).

Večji kot je učinek prvega prehoda, manjši delež učinkovine (F) pride do sistemskega krvnega obtoka. Take učinkovine imajo navadno zelo variabilno farmakokinetiko, saj na predsistemski metabolizem vplivajo številni dejavniki (18):

- starost (s starostjo se metabolizem upočasni, zato F narašča),
- bolezni jeter (metabolične funkcije se upočasnijo, zato se F zveča),
- genetski polimorfizem metaboličnih encimov,
- indukcija encimov zaradi kajenja in nekaterih zdravilnih učinkovin (npr. rifampicin),
- inhibicija encimov, ki jo povzročajo nekatere zdravilne učinkovine (npr. cimetidin) in nekatere sestavine hrane, npr. sok grenivk zavira nekatere oksidaze,
- odmerek oz. hitrost absorpcije v primeru, ko imamo opravka z nelinearno farmakokinetiko metabolizma (nasičenje encimov).

III. **PORAZDELITEV** (*ang. distribution*); označuje prehajanje učinkovine iz sistemskega krvnega obtoka v ostala tkiva. Pri tem mora preiti lipofilno kapilarno membrano. Nizkomolekularne in lipofilne učinkovine prehajajo membrane in imajo zato velik volumen porazdelitve. Edini omejitveni faktor pri teh učinkovinah je perfuzija tkiv. Tak mehanizem porazdeljevanja imenujemo zato perfuzijsko omejen. Za ostale, hidrofilne ali visokomolekularne učinkovine, pa je prehod skozi kapilarno membrano glavni omejitveni faktor. Takrat govorimo o difuzijsko omejenem mehanizmu porazdeljevanja. Ker je prehoda skozi membrano največkrat sposobna samo prosta učinkovina, je za porazdeljevanje pomembna tudi vezava na plazemske proteine. Velja, da se bolj lipofilne učinkovine v večji meri vežejo na plazemske proteine. Glavna plazemska vezavna proteina sta albumin in  $\alpha_1$  kisli glikoprotein. Za obseg porazdelitve sta pomembni tudi afiniteta in vezava na tkivne proteine (18).

Farmakokinetična parametra, ki se pojavljata v zvezi z distribucijo učinkovine:

- navidezni volumen porazdelitve ( $V_d = [l]$ ); je količnik med trenutno količino učinkovine v telesu in njeno trenutno koncentracijo v plazmi,
- delež učinkovine, ki je vezan na plazemske proteine;  $f_b = [\%]$

IV. **METABOLIZEM** (*gr. metaballein = spremeniti*); namen metabolizma je spremeniti manj topne molekule – učinkovine – v bolj topne, ki se lažje izločijo iz telesa (19). Ni pa nujno, da metabolizem izniči učinek zdravilne učinkovine. Še več, obstajajo tudi predzdravila (*ang. prodrugs*), ki šele z metaboličnimi procesi postanejo učinkovita. Nekatere učinkovine pa se metabolizirajo v aktivne metabolite, ki so poleg glavne učinkovine odgovorni za učinkovitost zdravila. Metabolični procesi so sestavljeni iz dveh glavnih faz (19):

- reakcije 1. faze: oksidacije, redukcije, hidrolize, metiliranje, demetiliranje,
- reakcije 2. faze: konjugacije z glukuronsko kislino, žveplovo kislino, glicinom, glutationom ter acetiliranje.

Obstaja veliko encimov, ki katalizirajo zgoraj naštetih reakcije. Med najbolj raziskanimi je mikrosomalni, hem vsebujoči, citokrom P450 (CYP 450), ki katalizira reakcije oksidacije. Obstaja v več izoformah, za katere je značilen genetski polimorfizem.

Poleg vrste kemične reakcije je pomembna tudi njena kinetika. Metabolizem temelji na encimskih reakcijah, torej potekajo reakcije z encimsko kinetiko, ki jo opisuje Michaelis-Mentenova enačba:

$$v = -\frac{dC}{dt} = \frac{v_{MAX} \cdot C}{k_{MM} + C} \quad \text{Enačba 1.1}$$

Kjer C označuje koncentracijo učinkovine in v hitrost encimske reakcije. Parameter  $k_{MM}$  je Michaelis-Mentenova konstanta. Za Michaelis-Mentenovo kinetiko velja, da ko so koncentracije substrata (učinkovine) dovolj nizke, lahko predpostavimo 1. red reakcije, ko pa koncentracije substrata preidejo določeno vrednost, se encimi nasitijo in reakcije potekajo v skladu s kinetiko 0. reda. Takrat postane kinetika neke učinkovine nelinearna.

Metabolizem v največjem obsegu poteka v jetrnem parenhimu, zato običajno govorimo o hepaticnem očistku ( $Cl_h = [\text{ml/min}]$ ). Pomeni volumen krvi, ki se v jetrih očisti učinkovine na časovno enoto. Očistek je tudi farmakokinetični parameter, ki je neposredno povezan s hitrostjo eliminacije učinkovine.

V. **ELIMINACIJA** (*lat. eliminatio; odstraniti, izločiti*); telo izloča učinkovino preko več organov/načinov (18):

- skozi ledvice z urinom; velja za hidrofilnejše učinkovine, ker se lipofilnejše v večji meri vežejo na plazemske proteine, ki se v glavnem ne filtrirajo skozi glomerule;

tukaj se dogajajo procesi kot so: glomerulna filtracija proste učinkovine, pasivna difuzija, aktivna tubulna sekrecija in tubulna reabsorpcija,

- skozi jetra s procesi metabolizma; metaboliti se izločijo v krvni obtok (in nazadnje v urin) ali v žolč; če se izloči skozi žolč v tanko črevo in se tam ponovno absorbira, govorimo o enterohepatičnem ciklusu,
- pljuča; tu poteka eliminacija v manjši meri
- s slino, z materinim mlekom; slednje postane zelo pomembno pri dojenju.

Farmakokinetični parametri, ki se pojavijo v zvezi z eliminacijo:

- plazemski očistek ( $Cl_p$  [ml/min]), pomeni volumen plazme, ki ga celotno telo očisti učinkovine na časovno enoto; ločimo renalni očistek  $Cl_r$ , ki označuje očistek, ki ga opravijo ledvica ter prej omenjeni hepatici očistek,
- konstanta hitrosti eliminacije  $k_{el} = [h^{-1}]$ ; o njej govorimo kadar predpostavimo prvi red eliminacije učinkovine iz telesa, definirana pa je:

$$k_{el} = \frac{Cl_p}{V_d} \quad \text{Enačba 1.2}$$

Potrebno je poudariti, da  $k_{el}$  predstavlja skupek vseh načinov eliminacije, torej kot vsoto hitrostne konstante metabolizma ( $k_m$ ) in izločanja učinkovine v urin ( $k_{eu}$ ):

$$k_{el} = k_m + k_{eu} \quad \text{Enačba 1.3}$$

- biološka razpolovna doba  $t_{1/2} = [h]$ ; ja čas, ki je potreben, da se koncentracija v plazmi zniža na polovično vrednost, opisuje ga:

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k_{el}} \quad \text{Enačba 1.4}$$

Če združimo enačbi 1.2 ter 1.4, dobimo naslednjo enačbo za plazemski očistek:

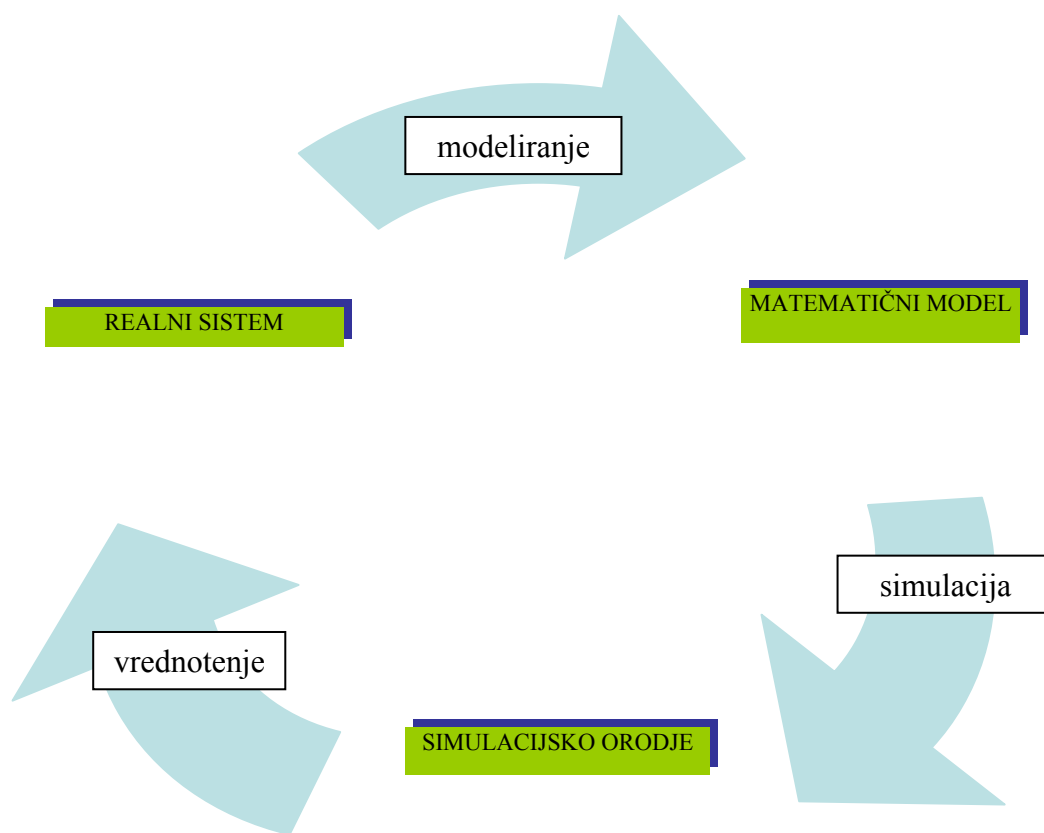
$$Cl_p = \frac{\ln(2) \cdot V_d}{t_{1/2}} \quad \text{Enačba 1.5}$$

V primeru, ko nimamo 1. reda eliminacije, zgoraj navedene enačbe ne veljajo. Eliminacijo takrat opišemo s parametri encimske kinetike.

## 1.6 FARMAKOKINETIČNO MODELIRANJE

Modeliranje je postopek razvoja modela, ki v bistvenih lastnostih zadovoljivo predstavlja dogajanje v sistemu, ki ga proučujemo. Model temelji na matematičnih funkcijah, ki opisujejo odvisnost izbrane spremenljivke (npr. krvne koncentracije) od neodvisne (npr. čas). Modeli imajo svojo strukturo in parametre. Struktura je prisotna v matematičnih funkcijah, parametri modela pa so koeficienti matematičnih enačb. Odziv modela je teoretična krivulja, ki je prilagojena eksperimentalnim podatkom. Dobimo ga tako, da skozi minimalizacijski postopek določimo parametre modela in nato numerične vrednosti teh parametrov vstavimo v enačbo modela. Dober model je torej tisti, ki se dobro prilega eksperimentalnim podatkom (20).

Namen farmakokinetičnega modeliranja je pojasnjevanje obnašanja učinkovine v telesu po aplikaciji zdravila. Struktura farmakokinetičnega modela temelji na LADME sistemu. Farmakokinetični eksperimentalni podatki so časovni poteki koncentracij učinkovine ali njenih metabolitov na različnih mestih v telesu (kri, urin itd.). Na sliki 1.4 je grafično predstavljen potek farmakokinetične analize.



Slika 1.4: Potek farmakokinetične analize

## 1.7 POPULACIJSKA FARMAKOKINETIKA

Populacijska farmakokinetika temelji na študiji vzrokov za variabilnost v koncentraciji zdravila v telesu pri posamezniku znotraj ciljne skupine uporabnikov zdravila, ki se pojavi kljub enakemu režimu odmerjanja.

Za razvoj populacijsko farmakokinetično (PK) – farmakodinamičnih (PD) modelov se običajno uporablja nelinearno modeliranje mešanih učinkov. S tem postopkom na podlagi meritev pridobljenih na skupini bolnikov ocenimo povprečne vrednosti PK-PD parametrov in njihovo variabilnost. Model nam predstavlja orodje za učenje/razumevanje odnosov med odmerkom zdravila in njegovo koncentracijo (PK) ter med koncentracijo zdravila in njegovo učinkovitostjo/toksičnostjo v telesu (PD). PK-PD modeliranje lahko koristno uporabimo pri načrtovanju terapije. Na ta način prispevamo k učinkovitosti razvojnega procesa zdravila.

### 1.7.1 Tradicionalna in populacijska farmakokinetika

Tradicionalne farmakokinetične študije se izvajajo na selektivno izbranem manjšem številu zdravih prostovoljcev, pri katerih se predvidi količina odmerkov, način in čas vnosa, prehrana, število jemanja vzorcev (pogosto, 10-15 vzorcev na osebo). Podatke se analizira s standardno dvostopenjsko metodo (Standard Two-Stage). Prva stopnja te metode obsega izračunavanje farmakokinetičnih parametrov za vsakega posameznika v poskusu, druga pa izračunavanje srednjih vrednosti (modus, mediana, aritmetična sredina) in variabilnosti (varianca in kovarianca) v populaciji. Dodatno lahko vsebuje še tretjo stopnjo – sočasne sprememljivke, v kateri opredelimo povezavo med določenim farmakokinetičnim parametrom in neko lastnostjo bolnikov (npr. odnos med volumnom porazdelitve in telesno težo). Zato se uporabljajo klasični statistični pristopi, kot so linearna regresija, razvrščanje v skupine, analiza kovariance itd. (17, 21).

Populacijski pristop k farmakokinetični analizi je bil prvotno namenjen analizi rutinsko zbranih podatkov. Danes pa se pogosteje uporablja v kliničnih študijah za oceno PK in PD lastnosti. Populacijski farmakokinetični pristop za oceno farmakokinetičnih parametrov odobrava tudi US Food and Drug Administration (FDA) (17).

V populacijski farmakokinetični analizi sočasno analiziramo podatke vseh oseb, kljub temu pa model omogoča razlikovanje med interindividualnimi in intraindividualnimi



podatki. Istočasno ocenimo srednje vrednosti farmakokinetičnih parametrov in variabilnost le teh. Ta način analize podatkov omogoča pridobitev ocene parametrov tudi za posameznike, za katere imamo malo podatkov.

V nasprotju s klasično farmakokinetiko, populacijska farmakokinetika obsega naslednje vidike:

- Pridobivanje farmakokinetičnih podatkov iz populacije bolnikov, ki so reprezentativni predstavniki ciljne skupine, ki prejema zdravilo.
- Prepozna vir variabilnosti (interindividualne, intraindividualne, med posameznimi aplikacijami) kot pomemben faktor, ki mora biti tekom razvoja zdravila identificiran in kvantificiran.
- Razlaga varibilnost z več dejavniki: demografskimi, patofiziološkimi, fiziološkimi in dejavniki okolja.
- Kvantitativno vrednoti nepojasnjeno variabilnost (22).

Eden glavnih ciljev populacijske farmakokinetike je razvoj modela kovariat, ki podaja zvezo med parametri modela in dugimi sočasnimi spremenljivkami. Sočasne spremenljivke so spremenljivke, ki so značilne za posameznika in opišejo demografske in bolezenske dejavnike ter dejavnike okolja. Zveza med parametrom in kovariato razloži, zakaj se farmakokinetika in farmakodinamika razlikujeta med posamezniki. Še bolj pomembno pa je, da lahko identificiramo posameznike z velikim tveganjem za toksične ali neučinkovite koncentracije, in jim potem določimo najbolj primeren odmerek zdravila (23).

V primerjavi s klasično je prednost populacijske farmakokinetike v tem, da lahko uporabimo tako redko kot tudi pogosto vzorčene profile. Populacijska farmakokinetična analiza omogoča tudi napoved v posebnih populacijah, kot so novorojenčki, starostniki, bolniki z AIDS-om, bolniki na intenzivni negi, bolniki z rakom, kjer je število vzorcev na posameznika omejeno zaradi etičnih in medicinskih načel (22).

Prednost populacijske farmakokinetike je natančnejša ocena variabilnosti v populaciji. Ker ta metoda ne zahteva pogostega vzorčenja, lahko vzorce pridobimo iz rutinskih analiz, ki so financirane iz zdravstvenega programa bolnika. To pomeni, da podatek ni drag in da se ocena farmakokinetike izvaja na bolnikih za katere je zdravilo namenjeno (17, 22).

### 1.7.2 Model mešanih učinkov

Populacijska farmakokinetika se poslužuje nelinearnega modela mešanih učinkov, pri čemer termin mešani pomeni kombinacijo stalnih in naključnih učinkov. Na populacijski farmakokinetični model lahko gledamo kot na sestav treh podmodelov: strukturnega, statističnega in kovariatnega. Strukturni podmodel z uporabo parametrov stalnih učinkov ( $Cl$ , E-max) opisuje trend podatkov (npr. enoprostorni model ali E-max model). Statistični podmodel opisuje interindividualne in rezidualno variabilnost (naključni učinki). Kovariatni podmodel z uporabo stalnih parametrov podaja zvezo med sočasnimi spremenljivkami in parametri modela.

Parametre (npr.  $Cl$ ) lahko opišemo kot

$$Cl_i = \theta_{Cl} + \eta_i \quad \text{Enačba 1.6}$$

$Cl_i$  pomeni individualen očistek pri posamezniku  $i$ , ki za  $\eta_i$  odstopa od stalnega učinka  $\theta_{Cl}$ , ki predstavlja povprečno vrednost očistka v populaciji. Za naključno interindividualno variabilnost ( $\eta$ ) je predpostavljena normalna porazdelitev v populaciji z varianco ( $\omega^2$ ) in srednjo vrednostjo 0. Parameter  $\omega^2$  torej predstavlja interindividualno varianco  $Cl$ .

Zvezo med tipično vrednostjo  $Cl$  v populaciji bolnikov in očistkom pri posameznem bolniku pa lahko opišemo tudi kot:

$$Cl_i = \theta_{Cl} \times e^{\eta_i} \quad \text{Enačba 1.7}$$

V tem primeru je porazdelitev  $Cl$  logaritemsko normalna,  $\theta_{Cl}$  je geometrična sredina,  $\eta_i$  pa je vzorčena iz normalne porazdelitve z aritmetično sredino 0 in varianco  $\omega^2$ . Tu  $\omega^2$  predstavlja  $CV^2$  interindividualne variabilnosti.

Čprav so vrednosti parametrov za posameznika znane in jih uporabimo za napoved koncentracije pri istem posamezniku v določenem času, se pojavi razlika med izmerjeno ( $C_{obs,ij}$ ) koncentracijo in napovedano ( $C_{pred,ij}$ ) koncentracijo. To razliko imenujemo rezidualna napaka ( $\varepsilon_{ij}$ ), ki zajema nepojasnjeno intraindividualno variabilnost, napako analize metode itd.

$$C_{obs,ij} = C_{pred,ij} + \varepsilon_{ij} \quad \text{Enačba 1.8}$$

Tudi za  $\varepsilon$  je predpostavljena normalna porazdelitev s srednjo vrednostjo 0 in varianco  $\sigma^2$ .

V enačbi 1.8 gre za model aditivne rezidualne napake. Model rezidualne napake pa je lahko tudi proporcionalen (multiplikativen), pri katerem so vrednosti logaritemsko normalno porazdeljene.

$$C_{obs,ij} = C_{pred,ij}(1 + \varepsilon_{ij}) \quad \text{Enačba 1.9}$$

Poznamo pa tudi kombinirani model rezidualne napake, ki je kombinacija zgornjih dveh.

$$C_{obs,ij} = C_{pred,ij}(1 + \varepsilon_{ij}) + \varepsilon_{ij2} \quad \text{Enačba 1.10}$$

Vsi trije pod modeli: strukturni, statistični in kovariatni so medsebojno odvisni, saj izbira strukturnega modela vpliva na izbiro kovariatnega modela in obratno. Proces iskanja modela, ki ustrezno opiše podatke je zato precej zapletena naloga.

### 1.7.3 Izbira sočasnih spremenljivk

Sočasne spremenljivke oziroma kovariate (*ang. covariates*) nam pomagajo pojasniti interindividualno variabilnost (spol, teža, starost,...) v farmakokinetičnih parametrih znotraj določene populacije. Vključitev sočasnih spremenljivk v model zahteva vsaj tri pomembne odločitve (17, 24):

- katero izmed možnih mnogih sočasnih spremenljivk vključiti v model,
- kakšen odnos naj bo uporabljen med parametrom in sočasno spremenljivko,
- kakšni naj bodo kriteriji za sprejem ali zavrnitev sočasnih spremenljivk.

Vključitev sočasnih spremenljivk v farmakokinetični ali farmakodinamični model ponavadi temelji na znanstveni sprejemljivosti, klinični pomembnosti in statistični značilnosti povezave.

Poznamo dve vrsti sočasnih spremenljivk (17):

- kategorične (posamezniki so razdeljeni na več skupin npr. moški/ženske, kadilec/nekadilec itd.),
- zvezne, kar pomeni, da je farmakokinetični parameter izražen kot funkcija zvezne sočasne spremenljivke (starost, teža itd.)

Pri določanju odnosa med kovariato in farmakokinetičnim parametrom igra pomembno vlogo grafična analiza, ki pa je lahko nenatančna, ko so ocene parametrov nepravilne, ko se parametri ali sočasne spremenljivke s časom spreminjajo, ali pa obstaja korelacija med posameznimi spremenljivkami. Zaradi tega je potrebno grafično analizo podpreti tudi s statističnim testom. Najpogosteje se uporablja test razmerja verjetja (*ang. likelihood ratio test*), ki temelji na razliki v minimalni vrednosti objektivne funkcije (OFV) med hierarhičnimi modeli (modeli z vključenimi sočasnimi spremenljivkami in modeli brez

njih). Vrednost OFV pri uporabi programa NONMEM je enaka dvakratniku negativnega logaritma vrednosti verjetja ( $-2\log L$ ). Porazdelitev razlike med OFV med dvema modeloma je skladna s teoretično  $\chi^2$  porazdelitvijo, zato lahko izboljšanje prileganja modela določimo s stopnjo statistične značilnosti. Razlike v OFV 3,84; 6,63 in 10,83 tako ustrezajo verjetnosti 0,05; 0,01 in 0.001, za eno stopnjo prostosti (en dodaten parameter) (25).

Polni (*ang. full*) model določimo tako, da predhodno testiramo vsako kovariato posamezno in dobljeni OFV primerjamo z OFV osnovnega (*ang. base*) modela. Sočasne spremenljivke, ki značilno zmanjšajo vrednost OFV vključimo v polni model. Iz polnega modela v naslednjem koraku postopoma odvezemamo kovariate in ugotavljamo, značilnost njihovega vpliva v primerjavi s polnim modelom. Ko iz polnega modela izločimo vse neznačilne vplive kovariat, dobimo končni (*ang. final*) model (23).

## 1.8 ANALIZA POPULACIJSKE FARMAKOKINETIKE AKTIVNEGA METABOLITA LEFLUNOMIDA V PRETEKLOSTI

Jun Shi in njegovi sodelavci so raziskovali populacijsko farmakokinetiko aktivnega metabolita leflunomida pri otrocih s poliartikularnim potekom juvenilnega revmatoidnega artritisa. V analizo populacijske farmakokinetike je bilo vključenih 73 bolnikov starih od 3 do 17 let. Populacijski farmakokinetični model so razvili z uporabo modela mešanih učinkov, ocenili in validirali pa so ga z navzkrižno validacijo in s preizkusom napovedne moči. Izmerjene koncentracije aktivnega metabolita leflunomida so ustrezno opisali z enoprostornim modelom in prvim redom absorpcije. Ugotovili so vpliv telesne teže (WT) tako na očistek kot tudi na volumen porazdelitve. Na vrednost očistka telesna teža šibko vpliva ( $Cl/F=0,020[l/h]*(WT[kg]/40\text{ kg})^{0,430}$ ), na vrednost volumna porazdelitve pa močno ( $V/F=5,8[l]*(WT[kg]/40\text{ kg})^{0,769}$ ). S simulacijo Monte-Carlo so primerjali koncentracije v stacionarnem stanju za različne režime odmerjanja zdravila. Ugotovili so, da je za doseg primerljivih koncentracij v stacionarnem stanju pri otrocih in odraslih potrebno odmerjanje pri otrocih ustrezno prilagoditi: 10 mg/dan za otroke, ki tehtajo od 10-20 kg, 15 mg/dan za otroke, ki tehtajo med 20 in 40 kg ter 20 mg/dan za otroke težje od 40 kg (26).

Vivien Chan in sodelavci so ugotavljali povezavo med plazemskimi koncentracijami aktivnega metabolita in aktivnostjo revmatoidnega artritisa. V raziskavo je bilo vključenih

23 odraslih bolnikov, ki so jemali leflunomid (kot edini DMARD) najmanj tri mesece. Poleg plazemskih koncentracij aktivnega metabolita leflunomida so ocenjevali tudi jakost bolečine, trajanje in intenziteto jutranje okorelost ter psihično stanje bolnika. Uporabili so model kontinuirane intravenske infuzije. Volumna distribucije niso ocenjevali, temveč so ga nastavili na 0,155 l/kg, Očistek A77 1726 so ocenili na 0,0184 l/h. Opazili so tudi, da so pri bolnikih z višjimi koncentracijami A77 1726 sklepi manj otekli, psihično stanje bolnika pa je boljše (27).

## 2. NAMEN DELA

Revmatoidni artritis (RA) je pogosta, kronična, sistemska bolezen z napredujočimi težavami s sklepi, ki lahko vodi v invalidnost in prizadene tudi druge organe (pljuča, živčevje, oči). Z RA povezujemo tudi visoke stroške zdravljenja (zdravila, operacije) in rehabilitacije.

Zdravljenje RA z antirevmatičnimi zdravili je pogosto potrebno prekiniti, bodisi zaradi resnih neželenih učinkov, bodisi zaradi neučinkovitosti. Ena takih učinkovin je tudi leflunomid, imunomodulirajoča antirevmatična učinkovina, ki se praktično v celoti presistemske presnovi v aktivni metabolit A77 1726.

Cilj diplomske naloge je določiti plazemske koncentracije A77 1726 v stacionarnem stanju pri skupini bolnikov z revmatoidnim artritisom in razviti populacijski farmakokinetični model, ki bo služil za napovedovanje plazemskega koncentracijskega profila A77 1726. Ugotoviti želimo ali so vzroki za variabilnost koncentracije A77 1726 različni demografski dejavniki, sočasno zdravljenje z drugimi zdravili ali genetski polimorfizem encimov, ki sodelujejo v njegovi presnovi. Proučevali bomo tudi vpliv plazemske koncentracije aktivnega metabolita leflunomida na klinične učinke.

### 3. MATERIALI IN METODE

#### 3.1 BOLNIKI

Klinični del raziskave so naredili v Bolnišnici dr. Petra Držaja v Ljubljani. Trajanje zdravljenja bolnikov z revmatoidnim artritismom z leflunomidom je do odvzema vzorca krvi trajalo od 6 mesecev do 8 let (povprečno 3,4 leta). 71 bolnikom so na dan rednega pregleda trikrat odvzeli kri; tik pred odmerkom leflunomida, 3 ure po odmerku in 6 ur po odmerku. Po odvzemu venske krvi so vzorce shranili v epruvete z EDTA. Vzorce so 1 uro po odvzemu centrifugirali (500 g, 15 min) in jih shranili na - 20°C do analize.

Bolniki so ob začetku zdravljenja z leflunomidom 3 dni prejeli 100 mg učinkovine, v nadaljevanju pa so leflunomid jemali enkrat dnevno, in sicer v odmerku 10 mg ali 20 mg leflunomida. Začetni odmerek 100 mg leflunomida na dan so uporabili z namenom hitrejše vzpostavitve stacionarnega stanja. Pomembno je, da so bile koncentracije aktivnega metabolita leflunomida v času odvzema krvi v območju stacionarnega stanja. Pri bolnikih, starejših od 65 let odmerka ni bilo potrebno prilagajati.

Skladnost jemanja zdravil z navodili so na podlagi pogovora z bolniki ocenili lečeči revamtologi. Bolnike, pri katerih smo sumili na slabo skladnost jemanja zdravil z navodili smo izločili iz analize.

Podatke so pridobili iz medicinske dokumentacije:

- Demografske značilnosti: starost, spol, višina, teža, ITM (indeks telesne mase), kajenje, alkohol,
- Klinični podatki: trajanje revmatoidnega artritisa, prisotnost RF/antiCCP, prisotnost erozij, ESR, CRP, DAS, VAS,  $\Delta$ ESR,  $\Delta$ CRP,
- Informacije o zdravljenju: trajanje zdravljenja z leflunomidom, odmerek, sočasno uporabljena zdravila, prekinitve zdravljenja, vzrok prekinitve zdravljenja, prisotnost neželenih učinkov, neučinkovitost ali neprenašanje zdravila.
- Polimorfizem genov: *CYP 1A2 C-163A*, *CYP 2C9*, *CYP 2C19*

Podatke o genotipizaciji nam je omogočil Inštitut za biokemijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani. Ostali podatki pa so bili pridobljeni v bolnišnici bodisi iz bolnikovih kartotek ali pa so jih pridobili na samem pregledu.

Pred populacijsko farmakokinetično analizo smo izločili bolnike s koncentracijami nižjimi od 5 mg/l. Pri njih smo sumili na slabo sodelovanje pri zdravljenju. Izločili pa smo tudi bolnika, za katerega so nam že iz bolnišnice sporočili, da zdravila ne jemlje v skladu z navodili. To pomeni, da smo izločili 6 bolnikov, populacijsko farmakokinetično analizo pa smo izvedli na 65 bolnikih.

## 3.2 MATERIALI

### Priprava fosfatnega pufra

V 1 l bidestilirane vode smo raztopili 3,36878 g 85% ortofosforjeve kisline in 2,8281 g kalijevega dihidrogenfosfata. Potem smo raztopino prefiltrirali s pomočjo vakuumske črpalke in presesalne buče. Uporabili smo celulozni filter z velikostjo por 0,45 µm. Z dodajanjem ortofosforjeve kisline smo umerili pH pufra na 2.

### Priprava karbonatnega pufra s koncentracijo 4,2 g/L

V 500 ml bučko smo natehtali 2,10 g natrijevega dihidrogenkarbonata in z bidestilirano vodo dopolnili do oznake. (pH = 8,5)

### Priprava mobilne faze

Mobilno fazo smo vsak dan pripravljali svežo. Ločeno smo pripravili 99% acetonitril in fosfatni pufer pH = 2. HPLC sistem je acetonitril in fosfatni pufer mešal v razmerju 35:65.

### Priprava raztopine internega standarda

V 50 ml bučko smo natehtali 7,54 mg trifluorometilcimetne kisline. Interni standard smo najprej raztopili v 5 ml metanola, potem pa smo do oznake napolnili s karbonatnim pufrom s koncentracijo 4,2 g/L. Koncentracija raztopine internega standarda je bila 150,8 mg/L.

### Aktivni metabolit A77 1726

Aktivni metabolit A77 1726 smo sintetizirali na Katedri za farmacevsko kemijo v laboratoriju doc. dr. Lucije Peterlin Mašič. Sintezo A77 1726 smo izvedli po postopku Faragherja s sodelavci (28). Strukturo spojine smo potrdili z <sup>1</sup>H-NMR, MS, IR, elementno analizo, TLC in temperaturo tališča. Čistost pripravljenega standarda smo določili s HPLC.



**Priprava osnovnih raztopin**

Osnovna raztopina 1: Zatehtali smo 62,4 mg standarda A77 1726 in ga raztopili v 25 ml bučki z 4 ml metanola in dopolnili do oznake s karbonatnim pufrom (pH= 8,5). Koncentracija aktivnega metabolita A77 1726 je bila 2496,0 mg/L.

Osnovna raztopina 2: Zatehtali smo 25,27 mg standarda A77 1726 in ga raztopili v 10 ml buči z 2 ml metanola in dopolnili do oznake s karbonatnim pufrom (pH= 8,5). Koncentracija aktivnega metabolita A77 1726 je bila 2527,0 mg/L.

**Priprava standardnih vodnih raztopin**

SV 1: 1 ml osnovne raztopine 1 smo v 5 ml bučki razredčili s karbonatnim pufrom.

Koncentracija aktivnega metabolita A77 1726 je bila 498,1 mg/L.

SV 2: 2,5 ml osnovne raztopine 1 smo v 50 ml bučki razredčili s karbonatnim pufrom (pH= 8,5). Koncentracija aktivnega metabolita A77 1726 je bila 124,5 mg/L.

SV 3: 1 ml osnovne raztopine 1 smo v 100 ml bučki razredčili s karbonatnim pufrom. Koncentracija aktivnega metabolita A77 1726 je bila 24,96 mg/L.

**Priprava standardnih plazemskih raztopin**

SP 1: 2 ml osnovne raztopine 1 smo v 25 ml bučki razredčili s plazmo. Koncentracija aktivnega metabolita A77 1726 je bila 199,24 mg/L.

SP 2: 1 ml osnovne raztopine 1 smo v 25 ml bučki razredčili s plazmo. Koncentracija aktivnega metabolita A77 1726 je bila 99,62 mg/L.

SP 3: 0,5 ml osnovne raztopine 1 smo v 25 ml bučki razredčili s plazmo. Koncentracija aktivnega metabolita A77 1726 je bila 49,81 mg/L.

SP 4: 1 ml raztopine SV1 smo v 25 ml bučki razredčili s plazmo. Koncentracija aktivnega metabolita A77 1726 je bila 19,88 mg/L.

SP 5: 0,5 ml raztopine SV1 smo v 25 ml bučki razredčili s plazmo. Koncentracija aktivnega metabolita A77 1726 je bila 9,94 mg/L.

SP 6: 2,5 ml raztopine SV2 smo v 25 ml bučki razredčili s plazmo. Koncentracija aktivnega metabolita A77 1726 je bila 4,97 mg/L.

SP 7: 1 ml raztopine SV3 smo v 25 ml bučki razredčili s plazmo. Koncentracija aktivnega metabolita A77 1726 je bila 0,9940 mg/L.

**Priprava kontrolnih raztopin**

Visoka koncentracija (QCh): 2 ml osnovne raztopine 2 smo v 25 ml bučki razredčili s plazmo. Koncentracija aktivnega metabolita A77 1726 je bila 201,45mg/L.

Srednja koncentracija (QCm): 1 ml osnovne raztopine 2 smo v 10 ml bučki razredčili s karbonatnim pufrom (SVm), potem pa smo 2 ml SVm razredčili v 25 ml bučki s plazmo. Koncentracija aktivnega metabolita A77 1726 je bila 20,08mg/L.

Nizka koncentracija (QCl): 1 ml osnovne raztopine 2 smo v 100 ml bučki razredčili s karbonatnim pufrom (SVI), potem pa smo 2 ml SVI razredčili v 25 ml bučki s plazmo. Koncentracija aktivnega metabolita A77 1726 je bila 2,008mg/L.

**3.3 HPLC ANALITIKA A77 1726**

Za spremljanje koncentracij aktivnega metabolita leflunomida A77 1726 smo uporabili validirano analizo metodo HPLC. Odzivi so bili linearni v območju od 1 mg/l do 200 mg/l. Podatki o točnosti, meddnevni ponovljivosti in ponovljivosti znotraj dneva so podani v tabelah 3.1, 3.2 in 3.3. Limita detekcije (LOD), ki smo jo izračunali kot trikratnik kvocienta standardnega odklona odseka in naklona umeritvene premice je 0,38 mg/l, limita kvantifikacije, ki predstavlja najmanjšo koncentracijo standardov, ki smo jo določili z ustrežno točnostjo in natančnostjo pa 0,9940 mg/l.

Tabela 3.1: Ponovljivost metode znotraj enega dneva pri treh različnih koncentracijah A77 1726

| QC  | c(mg/l) | izmerjena koncentracija metabolita |           |                     |           |                     |           |
|-----|---------|------------------------------------|-----------|---------------------|-----------|---------------------|-----------|
|     |         | 1. dan                             |           | 2. dan              |           | 3. dan              |           |
|     |         | Povprečje<br>(mg/l)                | CV<br>(%) | Povprečje<br>(mg/l) | CV<br>(%) | Povprečje<br>(mg/l) | CV<br>(%) |
| QCl | 2,008   | 1,98                               | 2,73      | 2,24                | 2,33      | 2,06                | 5,66      |
| QCm | 20,075  | 19,44                              | 1,74      | 20,32               | 3,09      | 20,27               | 3,23      |
| QCh | 201,450 | 201,57                             | 1,22      | 204,52              | 2,67      | 207,10              | 3,33      |

Tabela 3.2: Ponovljivost metode med dnevi pri treh različnih plazemskih koncentracijah A77 1726

| QC  | c(mg/l) | p(MET)/p(IS)             |        |
|-----|---------|--------------------------|--------|
|     |         | meddnevno povprečje ± SD | CV (%) |
| QCl | 2,008   | 0,0251±0,002222          | 8,86   |
| QCm | 20,075  | 0,2612±0,010384          | 3,98   |
| QCh | 201,450 | 2,6929±0,115407          | 4,29   |

Tabela 3.3: Točnost metode pri treh različnih koncentracijah A77 1726

| QC  | c(mg/l) | točnost (%) |        |        |
|-----|---------|-------------|--------|--------|
|     |         | 1. dan      | 2. dan | 3. dan |
| QCl | 2,008   | 98,87       | 111,58 | 102,78 |
| QCm | 20,075  | 96,81       | 101,21 | 100,98 |
| QCh | 201,450 | 100,06      | 101,53 | 102,80 |

### **Osnovni postopek priprave vzorcev za določanje koncentracije aktivnega metabolita A77 1726 s HPLC**

V 1,5 ml plastičnih epruvtkah smo k 100 µl plazme ali vodne raztopine metabolita dodali 40 µl internega standarda (trifluorometilcimetna kislina) in 15 sekund mešali na mešalniku. Nato smo dodali 200 µl acetonitrila in 30 sekund mešali na mešalniku. Po mešanju smo epruvtke za 20 minut postavili na led. Po 20 minutah smo v epruvtke dodali 300 µl fosfatnega pufra (pH = 2). Po 15 sekundah mešanja smo vzorce centrifugirali 10 min pri 15000 obratih/min (precipitacija proteinov). Po centrifugiranju smo odvzeli 170 µl supernatanta in z njim napolnili inserte, ki smo jih nato vstavili v vijale. Vijale z vzorci smo vložili v avtomatski vzorčevalnik HPLC sistema.

### **Analitski pogoji**

Kot optimalno mobilno fazo smo določili kombinacijo 99% acetonitrila in fosfatnega pufra s pH=2 v razmerju 35:65. Izbrali smo kolono Chromolith Performance, RP – 18e, 100 – 3 mm in predkolono Chromolith Performance, RP – 18e, 5 – 4,6 mm. Pretok mobilne faze skozi kolono je bil 1,7 mL/min, tlak na koloni pa med 94 in 95 barov. Injicirali smo 25,0 µL vzorca, po vsakem injiciranju pa smo iglo za injiciranje spirali v mešanici metanola in vode (50:50). Čas analize vsakega vzorca je bil 4,5 min. Valovne dolžine pri katerih smo

opravljali meritve smo izbrali na podlagi literaturnih podatkov. Odločili smo se za valovne dolžine: 270 nm, 280nm, 282 nm, 292 nm. Referenčna valovna dolžina je bila 380 nm.

### 3.4 PROGRAMSKA OPREMA

Za analizo farmakokinetičnih podatkov smo uporabili program NONMEM (*ang. Nonlinear Mixed Effects Modeling*), ki je najbolj razširjen program za populacijsko farmakokinetično analizo. Prva izdaja programa je bila leta 1979, razvili pa so ga na Kalifornijski univerzi v San Franciscu (UCSF). Trenutno je v uporabi NONMEM 5 (level 1.1; GloboMax LLC, Ellicott City, MD) in Visual NM 5 (R.D.P.P., Montpellier, France) (29).

Programski paket je sestavljen iz treh delov:

- NONMEM je osnovni regresijski program, ki je uporaben tako za prileganje parametrov, kot tudi za napovedovanje,
- PREDPP je zbirka farmakokinetičnih modelov, kar omogoča enostavnejše delo, saj uporabniku ni potrebno vsakega modela opisovati z diferencialnimi enačbami, ampak samo izbere model, ki ga želi uporabiti,
- NM-TRAN je predprocesor, ki omogoča vpis ukazov na uporabniku bolj prijazen način in so napake hitro prepoznane.

Vse tri komponente so napisane v jeziku ANSI FORTRAN 77, zato je potrebna tudi uporaba ustreznega prevajalnika (24).

Za obdelavo rezultatov ter za numerične in grafične analize smo uporabili SPSS, Microsoft Excel ter Sigma Plot.

#### **Ocenjevanje parametrov z NONMEM**

NONMEM za izračunavanje parametrov uporablja metodo največjega verjetja (*ang. maximum likelihood*). Parametri modela so izračunani tako, da je verjetje največje, kar pomeni, da je verjetnost, da se določena vrednost parametra modela pojavi v izmerjenih podatkih po spodaj navedeni enačbi največja:

$$L=F(Y,Model)=\{p[y_i, \text{parametri modela } (x_i)]\} \quad \text{Enačba 3.1}$$

Večje kot je verjetje (L), boljše je ujemanje modela s podatki. Program NONMEM uporablja kot objektivno funkcijo, na podlagi katere izračunava parametre modela, dvakratnik negativnega logaritma verjetja (-2logL). Iz tega sledi, da nižja vrednost objektivne funkcije – OFV (*ang. objective function value*) pomeni boljše ujemanje modela

s podatki. Največje verjetje je torej doseženo, ko je dosežen minimum vrednosti objektivne funkcije (23, 24). S pomočjo tega programa izračunamo srednje vrednosti, variance in kovariance posameznih parametrov. NONMEM sodi med programe, ki uporabljajo parametrično metodo, ki predpostavlja specifično distribucijo (normalno ali logaritemsko normalno) farmakokinetičnih parametrov.

Funkcijo verjetja je težko oceniti zaradi nelinearnega vstopa naključnih učinkov v model. NONMEM ravna s tem tako, da uvede aproksimacijo, ki vključuje linearizacijo naključnih učinkov. Prva in najbolj uporabna je aproksimacijska metoda prvega reda - FO (*ang. first order*), ki temelji na razširitvi v Taylorjevo vrsto (21, 23). Ta metoda določi samo ocene populacijskih parametrov, individualne parametre pa je mogoče pridobiti posteriorno kot empirične Bayesove (*posthoc*) ocene. Aproksimacijska metoda FOCE (*ang. first order conditional estimation*) je bolj izpopolnjena. Od FO metode se razlikuje v tem, da linearizacijo izvede glede na oceno individualnih ocen  $\eta$  vrednosti. Obstaja pa tudi še bolj izpopolnjena FOCE metoda, ki vključuje interakcijo med interindividualnimi in intraindividualnimi naključnimi učinki. Imenuje se FOCE INTER (*ang. first order conditional estimation with interaction*). Ta metoda se od FOCE metode razlikuje v načinu obravnavanja rezidualne napake. Tekom računanja OFV se zaradi vključene interakcije ohrani odvisnost modela od intraindividualne napake na  $\eta$  vrednostih. To pomeni, da je rezidualna napaka ovrednotena na podlagi napovedi, ki temelji na ocenjenih parametrih. Ocena parametrov v primeru, ki vključuje interakcijo je boljša od tipične ocene parametrov, ki interakcije ne upošteva. FOCE INTER metoda je primerna za obdelavo bogatih profilov, ki vključujejo interakcijo med  $\eta$  in  $\epsilon$ .

## **3.5 RAZVOJ POPULACIJSKEGA FARMAKOKINETIČNEGA MODELA**

### **3.5.1 Osnovni model**

Pri razvoju populacijskega farmakokinetičnega modela je prvi korak postavitve osnovnega strukturnega modela, ki je navadno izbran med prostorskimi modeli. Predpostavili smo enoprostorni model in 1. red absorpcije. Na tem modelu smo preverili kateri model rezidualne napake najboljše opisuje izmerjene plazemske koncentracije. Tako smo preizkusili tri modele rezidualne napake: aditivni, multiplikativni in kombinirani model.

Na podlagi vrednosti minimuma objektivne funkcije smo izbrali najustreznejši model. Model z najnižjo vrednostjo objektivne funkcije namreč najbolje ponazarja obnašanje učinkovine v telesu. Ocenjevanje parametrov modela smo izvedli z FOCE INTER aproksimacijsko metodo. Na enak način smo ocenjevali tudi model pri katerem smo predpostavili infuzijski profil. Ideja, da poskusimo z infuzijo pa se nam je porodila zato, ker je koncentracijski profil zaradi dolgega razpolovnega časa aktivnega metabolita podoben profilu infuzije. Najboljši model smo poleg OFV izbrali tudi s pomočjo grafične analize, kjer smo preverili ujemanje izmerjenih in napovedanih vrednosti. Vsak model smo ovrednotili tudi glede na sledeče štiri kriterije: število signifikantnih mest, gradiente, 95% interval zaupanja in največji koeficient korelacije. Pri tem smo si postavili naslednje pogoje: število signifikantnih mest  $>3$ , gradienti med  $1 \times 10^{-3}$  in  $1 \times 10^2$ , 95% interval zaupanja, ki smo ga izračunali po formuli:

$$95\%CI = \theta \pm 1,96 \times SE \quad \text{Enačba 3.2}$$

kjer je  $\theta$  ocena parametra v populaciji, SE pa standardna napaka ocene, ki ne sme vsebovati vrednosti 0. Koeficient korelacije med parametri strukturnega modela ( $\theta$ ) pa mora biti manjši od 0,95.

### 3.5.2 Izbira sočasnih spremenljivk

Po izbiri osnovnega strukturnega modela pričnemo z ocenjevanjem in izbiro sočasnih spremenljivk (dejavnikov, ki pojasnjujejo variabilnost določenih parametrov strukturnega modela).

Poznamo zvezne in kategorične spremenljivke. Vključevanje teh spremenljiv v model pa se razlikuje (23):

- Kategorične spremenljivke. Te zajemajo le dve kategoriji (npr. sočasna zdravila: DA/NE) ali pa več kategorij. Kovariato z dvema kategorijama lahko obravnavamo tako, da npr. bolnika, ki nima sočasne terapije označimo z 0, bolnika s sočasno terapijo pa z 1. Enačba za oceno ustreznega parametra (P) je torej sledeča:

$$P = \theta_1 + \theta_2 \times \text{soč.terapija} \quad \text{Enačba 3.3}$$

kjer je  $\theta_1$  tipična vrednost za farmakokinetični parameter (P) pri bolniku, ki nima sočasne terapije,  $\theta_2$  pa predstavlja zvečanje/zmanjšanje vrednosti paramatera P zaradi prisotnosti sočasnih zdravil. Ta model lahko transformiramo tako, da  $\theta_2$  predstavlja frakcionalno spremembo v P.

$$P = \theta_1 \times [1 + \theta_2 \times \text{soč.terapija}] \quad \text{Enačba 3.4}$$

Če ima kovariata več kategorij vsako kategorijo označimo kot indikatorsko (COV=1, 2, 3...). Model postavimo tako, da ima vsaka kategorija svojo oceno parametra.

$$P = \begin{cases} \theta_1 & \text{če COV} = 1 \\ \theta_2 & \text{če COV} = 2 \\ \theta_3 & \text{če COV} = 3 \end{cases} \quad \text{Enačba 3.5}$$

- Zvezne spremenljivke. Najenostavnejši primer imamo takrat, ko je parameter v linearnem odnosu s kovariato. Če imamo primer s telesno težo (WT):

$$P = \theta_1 + \theta_2 \times WT \quad \text{Enačba 3.6}$$

Kjer je  $\theta_1$  tipična vrednost za farmakokinetični parameter (P) pri bolniku, ki ima telesno težo 0,  $\theta_2$  pa predstavlja zvečanje/zmanjšanje vrednosti paramatera P.  $\theta_1$  dobi smiseln pomen, če enačbo preoblikujemo tako, da upoštevamo mediano vrednosti sočasnih spremenljivk:

$$P = \theta_1 \times [1 + \theta_2 \times (WT - \text{mediana WT})] \quad \text{Enačba 3.7}$$

V tem primeru  $\theta_1$  predstavlja oceno P pri posamezniku, ki ima telesno težo enako mediani,  $\theta_2$  pa je sprememba v P, za vsak kilogram razlike med telesno težo in mediano.

Nelinearna razmerja med parametrom P in sočasno spremenljivko razložimo s potenčnim, E-max (sigmoidnim) ali eksponentnim modelom. Primer potenčnega modela je:

$$P = \theta_1 \times [WT / \text{mediana WT}]^{\theta_2} \quad \text{Enačba 3.8}$$

Med podatki, ki smo jih dobili o bolnikih, ki so sodelovali, smo testirali sledeče:

- starost,
- telesna teža,
- telesna površina (BSA)
- koncentracija alanin aminotransferaze (ALT)
- spol
- sočasna terapija z metotreksatom
- sočasna terapija z NSAID
- sočasna terapija z metilprednizolonom

- sočasna terapija z ostalimi DMARD (sulfasalazin, metotreksat, adalimumab)
- trajanje revmatoidnega artritisa
- trajanje zdravljenja z leflunomidom
- hitrost glomerulne filtracije oziroma kreatininski očistek
- kajenje
- *CYP 1A2*
- *CYP 2C19*

Telesno površino (BSA, body surface area) smo računali po enačbi Mosteller:

$$BSA = \sqrt{\left(\frac{HT \times WT}{3600}\right)} \quad \text{Enačba 3.9}$$

Kjer HT [cm] pomeni telesno višino, WT [kg] pa telesno težo. BSA se podaja v m<sup>2</sup>.

Koncentracijo serumskega kreatinina pa smo v kreatininski očistek oziroma v hitrost glomerulne filtracije preračunali po MDRD enačbi:

$$GFR = 175 \times \left(\frac{SCR}{88,4}\right)^{(-1,154)} \times AGE^{(-0,203)} \times 0,742^{SX} \times \frac{BSA}{1,73} \quad \text{Enačba 3.10}$$

kjer je SCR [μmol/l] koncentracija kreatinina, AGE [leta] starost, SX pa spol. Vzrok za uvedbo GFR [ml/min] namesto serumskega kreatinina je, da hitrost glomerulne filtracije neposredno odraža funkcijo ledvic, medtem ko je koncentracija kreatinina odvisna od starosti, teže in spola posameznika (30).

Vsako sočasno spremenljivko smo v osnovni model vstavili posebej, potem pa smo primerjali OFV osnovnega modela (modela brez vključene sočasne spremenljivke) in OFV modela z vključeno sočasno spremenljivko. Če se je vrednost objektivne funkcije znižala za več kot 3,84, kar ustreza stopnji tveganja ( $\alpha$ ) 0,05, smo to sočasno spremenljivko vključili v polni model. Iz oblikovanega polnega modela smo kasneje postopoma odstranjevali po eno sočasno spremenljivko. Najprej smo odstranili tisto, ki je pri vključevanju v polni model najmanj zmanjšala OFV. Pri postopnem odstranjevanju iz polnega modela smo prav tako upoštevali stopnjo tveganja 0,05. Vsako odvzeto sočasno spremenljivko, ki je povzročila značilno zvišanje OFV smo vrnili nazaj v model, kjer pa je bilo zvišanje neznačilno oziroma manjše od 3,84, pa smo kovariato izključili iz modela.



Poleg upoštevanja znižanja OFV, je potrebno biti pozoren tudi na zmanjšanje standardne napake določenega parametra, na izboljšanje ujemanja modela (ocenjeno iz diagnostičnih diagramov) ter na biološko smiselnost povezave med sočasno spremenljivko in farmakokinetičnim parametrom. Po sprejetju vseh naštetih kriterijev smo dobili končni model, ki vsebuje le tiste spremenljivke, ki značilno vplivajo na farmakokinetiko učinkovine (31).

### **3.5.3 Ocena in validacija končnega modela**

#### **Grafična ocena modela**

Po postopnem dodajanju sočasnih spremenljivk in po kasnejšem odvzemanju tistih sočasnih spremenljivk, ki ne pripomorejo k statistično značilnemu izboljšanju modela dobimo končni model. Preverjanje predpostavk modeliranja in oceno prilaganja (*ang. goodness-of-fit*) raziščemo z grafično analizo. Diagrami, ki ponazorijo prilaganje so: odvisnost napovedanih koncentracij pri posameznemu bolniku (IPRE) od izmerjenih koncentracij, odvisnost uteženih rezidualov (WRES) od izmerjenih koncentracij, odvisnost napovedanih povprečnih koncentracij v populaciji (PRED) od izmerjenih koncentracij in odvisnost WRES od časa ( $t$ ) (32). Ustreznost modela je potrebno potrditi tudi s statistično analizo, ki je bolj zanesljiva od grafične.

#### **Vrednotenje napovedi**

Simulacijo končnega populacijskega farmakokinetičnega (PPK) modela izvedemo tako, da uporabimo take parametre stalnih in naključnih učinkov (interindividualna in rezidualna variabilnost), ki smo jih dobili v končnem modelu. Na vseh podatkih naredimo 1000 ponovitev, kar pomeni, da imamo  $65 \times 1000 = 65000$  posameznikov. Za vzorce vzete ob določenem času izračunamo mediano napovedanih koncentracij (50. centil) in 90% napovedni interval (5. in 95. centil). Naslednji korak je grafična primerjava mediane in 90% napovednega intervala opaženih in simuliranih podatkov (26).

#### **Napovedna moč**

Pri ugotavljanju napovedne moči smo podatke razdelili v dve skupini. V prvo testno skupino, na kateri smo ponovno ocenili parametre končnega modela, smo uvrstili 90%

bolnikov, v drugo validacijsko skupino, v kateri smo ponovno napovedovali koncentracije, pa 10%. Po ponovni oceni koncentracij na validacijskem setu smo PRED in IPRE primerjali z izmerjenimi koncentracijami. Delitev bolnikov v navedeni skupini smo izvedli glede na vrsto genotipa tako, da smo iz skupine vsakega genotipa vzeli 10% bolnikov. S tem smo dosegli, da sta bili v obeh skupinah približno enaki sestavi glede na vrsto genotipa.

Merila za ugotavljanje napovedne moči so:

- Napaka napovedi - PE (*ang. prediction error*) je razlika med izmerjeno in (populacijsko) napovedano koncentracijo.

$$PE = C_{obs} - C_{pred} \quad \text{Enačba 3.11}$$

- Povprečna napaka napovedi - MPE (*ang. mean prediction error*) je mera točnosti.

$$MPE = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N PE_i \quad \text{Enačba 3.12}$$

Da je model ustrezen, mora 95% interval zaupanja za MPE vključevati vrednosti 0.

- Standardni odklon napake napovedi - RMSE (*ang. root mean square error*) je mera natančnosti. Manjši kot je RMSE, bolj natančna je napoved.

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N PE^2} \quad \text{Enačba 3.13}$$

### **Preizkušanje stabilnosti modela**

Stabilnost modela smo preizkusili tako, da smo spreminjali nastavljeno vrednost hitrostne konstante absorpcije ( $k_a$ ). V končnem modelu smo hitrostno konstanto absorpcije nastavili na vrednost  $1 \text{ h}^{-1}$ , pri ocenjevanju stabilnosti pa smo model testirali še na štirih drugih vrednostih  $k_a$  ( $0,2 \text{ h}^{-1}$ ,  $0,5 \text{ h}^{-1}$ ,  $2 \text{ h}^{-1}$ ,  $5 \text{ h}^{-1}$ ).

### 3.6 UGOTAVLJANJE ZVEZE MED KONCENTRACIJO A77 1726 IN AKTIVNOSTJO RA

Z računalniškim programom SPSS for Windows 15.0 smo ugotavljali povezavo med povprečno napovedano koncentracijo pri posamezniku in spodaj naštetimi kliničnimi parametri. Povprečno napovedano koncentracijo pri posamezniku smo računali po enačbi:

$$\bar{C}_{ss} = \frac{D}{\tau \times \frac{Cl}{F}} \quad \text{Enačba 3.14}$$

kjer je  $\bar{C}_{ss}$  povprečna koncentracija v stacionarnem stanju, D je odmerek,  $\tau$  je dozirni interval,  $Cl/F$  pa je parameter, ki smo ga napovedali z modelom. Cl je očistek, F pa je obseg absorpcije oz. biološka uporabnost zdravila.

Klinični parametri s katerimi smo primerjali povprečne napovedane koncentracije so:

- RF/anti CCP (prisotna, nista prisotna)
- Erozijske (prisotne, niso prisotne)
- ESR (hitrost sedimentacije eritrocitov)
- CRP (C-reaktivni protein)
- DAS (lestvica aktivnosti bolezni)
- VAS (vizualna analogna lestvica za bolečino)
- $\Delta$ ESR
- $\Delta$ CRP

Prva dva klinična parametra sta kategorična, ostali pa so zvezni. Najprej smo zvezne parametre predstavili v diagramu: odvisnost povprečne koncentracije pri posamezniku od kliničnega parametra. Vsak zvezni parameter smo kasneje preoblikovali v dve kategoriji glede na mediano. Vrednosti parametra, ki so pod mediano smo definirali kot prvo skupino, ostale vrednosti pa kot drugo skupino. Kategorizirane podatke smo grafično predstavili s kvantilnimi diagrami. Za statistično vrednotenje smo uporabili neparametrični Mann-Whitneyev U test. S tem testom smo ugotavljali, če obstaja zveza med koncentracijo v stacionarnem stanju in vrednostjo posameznega kliničnega parametra.

## 4. REZULTATI

### 4.1 PODATKI O BOLNIKIH

Karakteristike bolnikov so opisane v tabeli 4.1.

Tabela 4.1: Podatki o bolnikih, ki so bili vključeni v raziskavo

|   | N     | Povprečje±<br>SD | Mediana | Območje      |
|---|-------|------------------|---------|--------------|
| <b>Demografski podatki</b>              |       |                  |         |              |
| Spol (moški:ženske)                     | 14:57 |                  |         |              |
| Starost (leta)                          |       | 58,5±13,2        | 59      | 27 - 82      |
| Telesna teža (kg)                       |       | 68,9±11,9        | 70      | 39 - 92      |
| Telesna višina (cm)                     |       | 164,9±7,4        | 166     | 150 - 182    |
| Kreatininski očistek (ml/min)           |       | 73,6±16,4        | 74,7    | 30,4 – 108,3 |
| Trajanje RA (leta)                      |       | 12,5±9,9         | 10      | 0,6 - 40     |
| Trajanje terapije z LEF (leta)          |       | 3,37±2,50        | 2       | 0,5 - 8      |
| Koncentracija ALT (μkat/l)              |       | 0,43±0,33        | 0,35    | 0,14 – 2,37  |
| <b>Sočasna zdravila</b>                 |       |                  |         |              |
| NSAID                                   | 24    |                  |         |              |
| Metotreksat                             | 11    |                  |         |              |
| Ostali DMARD                            | 14    |                  |         |              |
| Medrol                                  | 22    |                  |         |              |
| <b>Farmakokinetični podatki</b>         |       |                  |         |              |
| Vzorci                                  | 213   |                  |         |              |
| Plazemska koncentracija ob 8.00 (mg/l)  |       | 34,5±30,2        | 26,0    | 1,68 – 163,9 |
| Plazemska koncentracija ob 11.00 (mg/l) |       | 34,7±28,7        | 26,0    | 2,38 – 147,3 |
| Plazemska koncentracija ob 14.00 (mg/l) |       | 32,9±28,9        | 24,5    | 1,92 – 156,9 |
| Dnevni odmerek LEF (mg)                 |       | 19,1±2,80        | 20      | 10 – 20      |
| 10 mg                                   | 6     |                  |         |              |
| 20 mg                                   | 65    |                  |         |              |
| <b>Kajenje</b>                          |       |                  |         |              |
| ne                                      | 45    |                  |         |              |
| da                                      | 17    |                  |         |              |
| bivši kadilec/-ka                       | 9     |                  |         |              |

Eksperimentalne podatke o plazemskih koncentracijah aktivnega metabolita leflunomida A77 1726 smo pridobili z merjenjem le teh s HPLC. Pri analizi populacijske farmakokinetike smo upoštevali le podatke 65 bolnikov, saj smo podatke 6 bolnikov zaradi neustreznega sodelovanja pri zdravljenju izločili. Bolniki so prejeli leflunomid v odmerku po 10 ali 20 mg. Koncentracijski profili pri posameznikih so bili ravni z rahlimi (nekaj odstotnimi) razlikami med najvišjo in najnižjo koncentracijo.

Na Inštitutu za biokemijo Medicinske fakultete v Ljubljani pa so bolnikom določili genotipe *CYP 1A2*, *CYP 2C9*, *CYP 2C19*. Rezultati genotipizacije so podani v tabeli.

Tabela 4.2: Podatki o številu bolnikov z določenim genotipom

| <b>Genotipi</b>        | <b>N</b> |
|------------------------|----------|
| <b><i>CYP 1A2</i></b>  |          |
| 0 (CC)                 | 4        |
| 1 (CA)                 | 40       |
| 2 (AA)                 | 27       |
| <b><i>CYP 2C9</i></b>  |          |
| 0 (*1/*1)              | 53       |
| 1 (*1/*2)              | 10       |
| 2 (*1/*3)              | 6        |
| 3 (*2/*2)              | 0        |
| 4 (*2/*3)              | 1        |
| 5 (*3/*3)              | 1        |
| <b><i>CYP 2C19</i></b> |          |
| 0 (*1/*1)              | 22       |
| 1 (*1/*2)              | 10       |
| 2 (*1/*3)              | 0        |
| 3 (*1/*17)             | 28       |
| 4 (*2/*2)              | 0        |
| 5 (*3/*3)              | 0        |
| 6 (*17/*17)            | 9        |
| 7 (*2/*17)             | 2        |
| 8 (*3/*17)             | 0        |

## 4.2 RAZVOJ POPULACIJSKEGA FARMAKOKINETIČNEGA MODELA

### 4.2.1 Osnovni model

S programskim paketom NONMEM smo preizkušali različne možnosti za osnovni model. Kot osnovo smo izbrali enoprostorni model, oceno modela pa smo izvedli s FOCE INTER aproksimacijsko metodo. Najprej smo preizkusili model, ki bi ocenjeval tako volumen ( $V/F$ ) in očistek ( $Cl/F$ ) kot tudi konstanto absorpcije ( $k_a$ ), a tak model ni bil ustrezen, saj se je izkazalo, da hkratna ocena vseh parametrov ni možna. Zaradi zgornje ugotovitve smo se odločili, da konstanto absorpcije nastavimo glede na literaturne podatke. Iz podatkov o razpolovnem času učinkovine, ki je 336 h (14 dni) in o času, ki je potreben za doseg maksimalne koncentracije učinkovine (6-12 h), smo s pomočjo enačbe 4.1 in enačbe 4.2 izračunali, da je hitrostna konstanta absorpcije približno  $1 \text{ h}^{-1}$  (26, 33).

$$k_e = \frac{\ln 2}{t_{1/2}} \quad \text{Enačba 4.1}$$

$$t_{\max} = \frac{\ln(k_a) - \ln(k_e)}{k_a - k_e} \quad \text{Enačba 4.2}$$

Za opis rezidualne napake smo uporabili tri različne modele (aditivni, multiplikativni, kombinirani), za opis interindividualne variabilnosti pa eksponentni model. Srednje vrednosti farmakokinetičnih parametrov, vrednosti interindividualnih napak ter rezidualne napake smo zbrali v tabeli.

Tabela 4.3: Parametri aditivnega, multiplikativnega in kombiniranega modela napake

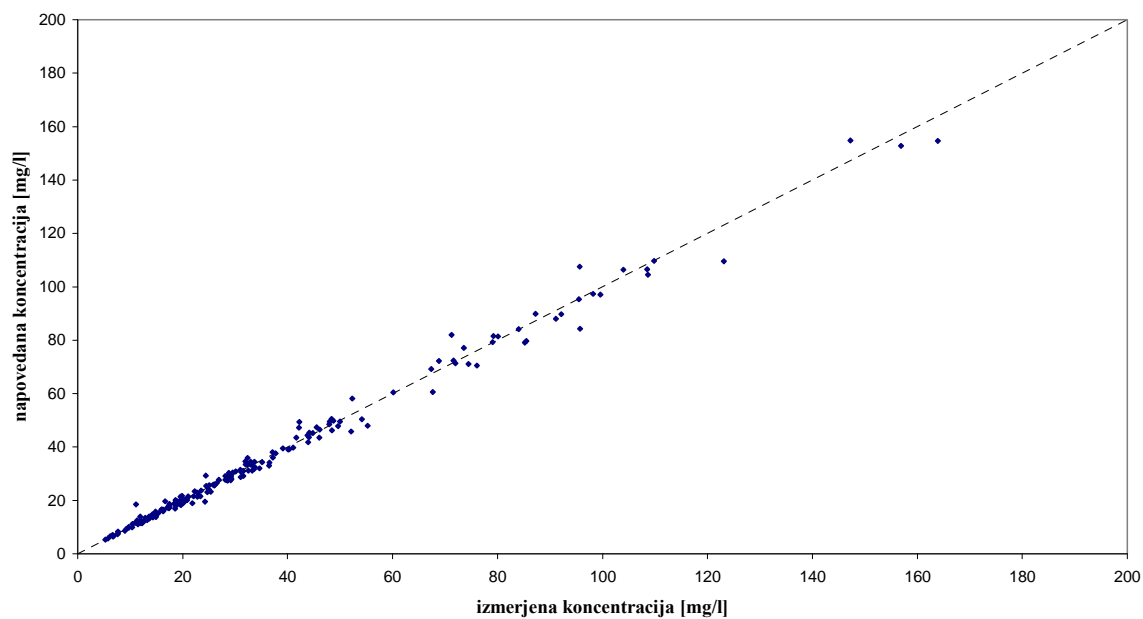
|  | adit.   | 95% CI        | multip. | 95% CI           | komb.   | 95% CI             |
|--|---------|---------------|---------|------------------|---------|--------------------|
| <b>OFV</b>                                 | 955,750 |               | 894,535 |                  | 894,462 |                    |
| $\Theta_{k_a} (\text{h}^{-1})$             | 1 FIX   |               | 1 FIX   |                  | 1 FIX   |                    |
| $\Theta_{Cl/F} (\text{l/h})$               | 0,0279  | 0,0232-0,0326 | 0,0282  | 0,0234 - 0,0330  | 0,0282  | 0,0234 - 0,0330    |
| $\Theta_{V/F} (\text{l})$                  | 1,35    | -8,98 - 11,7  | 8,15    | 6,00 - 10,31     | 8,22    | 5,89 - 10,55       |
| $\omega_{Cl/F} (\%)$                       | 68,7    | 57,2 - 78,6   | 69,6    | 58,0- 79,5       | 69,6    | 58,0- 79,5         |
| $\omega_{V/F} (\%)$                        | 122,9   | 52,1 - 165,8  | 54,0    | 27,3 - 71,4      | 54,6    | 17,7 - 75,1        |
| $\sigma_{\text{aditivni}} (\text{mg/l})^2$ | 8,46    | 4,34 - 12,6   |         |                  | 0,00653 | -0,00027 - 0,01333 |
| $\sigma_{\text{multip.}} (\text{CV}^2)$    |         |               | 0,00692 | 0,00286- 0,01100 | 0,169   | -3,163 - 3,501     |

Vsak model smo ovrednotili na podlagi naslednjih kriterijev: vrednost objektivne funkcije, število značilnih mest, gradient, 95% interval zaupanja za izračunane parametre ter vrednosti koeficientov korelacije. Z upoštevanjem vseh kriterijev smo ugotovili, da je najbolj primeren multiplikativni model rezidualne napake, z aditivnim in kombiniranim modelom rezidualne napake pa nam ni uspelo dobiti ustreznih rezultatov.

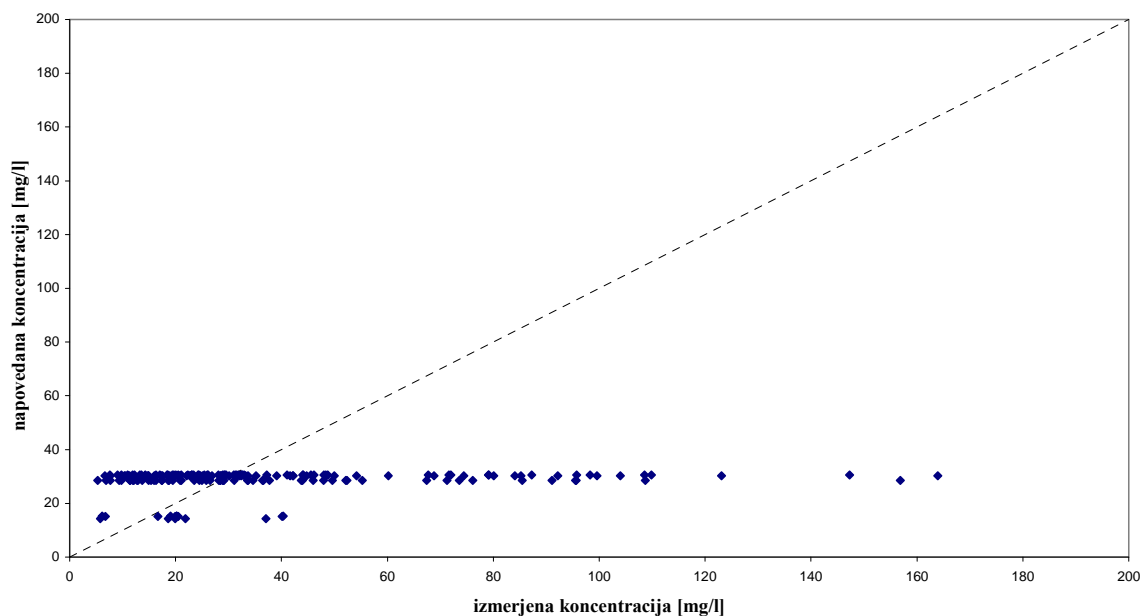
Tabela 4.4: Vrednotenje osnovnega modela

| Run                                   | BASE                            |                 |               |
|---------------------------------------|---------------------------------|-----------------|---------------|
| Model                                 | ADVAN 2 / TRANS 2               |                 |               |
| Opis modela                           | Enoprostorni, 1. red absorpcije |                 |               |
| Aproksimacijska metoda                | FOCEI                           |                 |               |
| Število značilnih mest                | 3,1                             |                 |               |
| Gradienti (območje)                   | -0,09371; -5,021                |                 |               |
| OFV                                   | 894,535                         |                 |               |
| Največja korelacija                   | -0,162                          |                 |               |
| Parametri                             | Opis                            | Ocena parametra | 95% CI        |
| <b>Strukturni model</b>               |                                 |                 |               |
| $\Theta_1$                            | ka (1/h)                        | 1 FIX           |               |
| $\Theta_2$                            | CL/F (l/h)                      | 0,0282          | 0,0234-0,0330 |
| $\Theta_3$                            | V/F (l)                         | 8,15            | 6,00-10,3     |
| <b>Interindividualna variabilnost</b> |                                 |                 |               |
| $\omega_2$                            | CL/F (CV%)                      | 69,6            | 58,1-79,4     |
| $\omega_3$                            | V/F (CV%)                       | 54,0            | 27,2-71,4     |
| <b>Rezidualna variabilnost</b>        | Multiplikativna                 |                 |               |
| $\sigma_1$                            | (CV%)                           | 8,32            | 5,3-10,5      |

S pomočjo diagnostičnih diagramov smo ugotavljali, kako dobro izbrani model opisuje izmerjene koncentracije. Slika 4.1 prikazuje odvisnost napovedanih koncentracij pri posamezniku od izmerjenih koncentracij. V primeru tega diagrama želimo, da se točke čim boljše prilegajo premici  $y=x$ . Slika 4.2 predstavlja odvisnost populacijskih napovedanih koncentracij od izmerjenih koncentracij. Slika 4.3 predstavlja odvisnost uteženih rezidualov (razlika med napovedano in izmerjeno koncentracijo) od plazemske koncentracije. V primeru tega diagrama se ujemanje modela s podatki kaže takrat, ko se rezultati enakomerno sipljejo okoli osi  $y=0$  in ko ni opaznega trenda. Slika 4.4 pa predstavlja odvisnost uteženih rezidualov od časa.

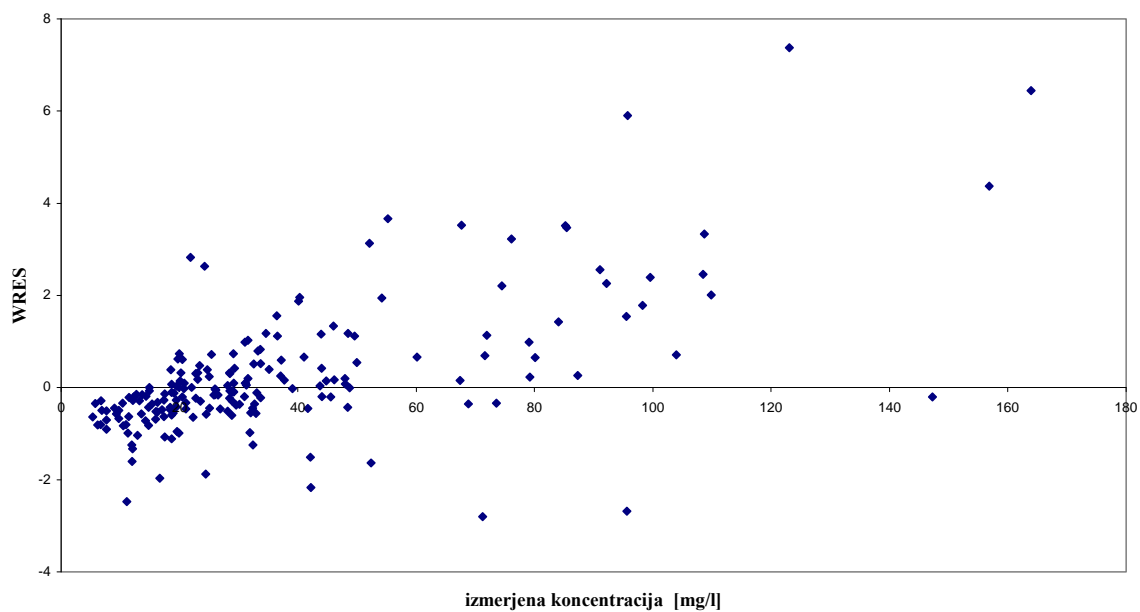


Slika 4.1: Odvisnost napovedanih koncentracij pri posameznem bolniku (IPRE) od izmerjenih koncentracij. Črtna črta predstavlja premico  $y=x$ .

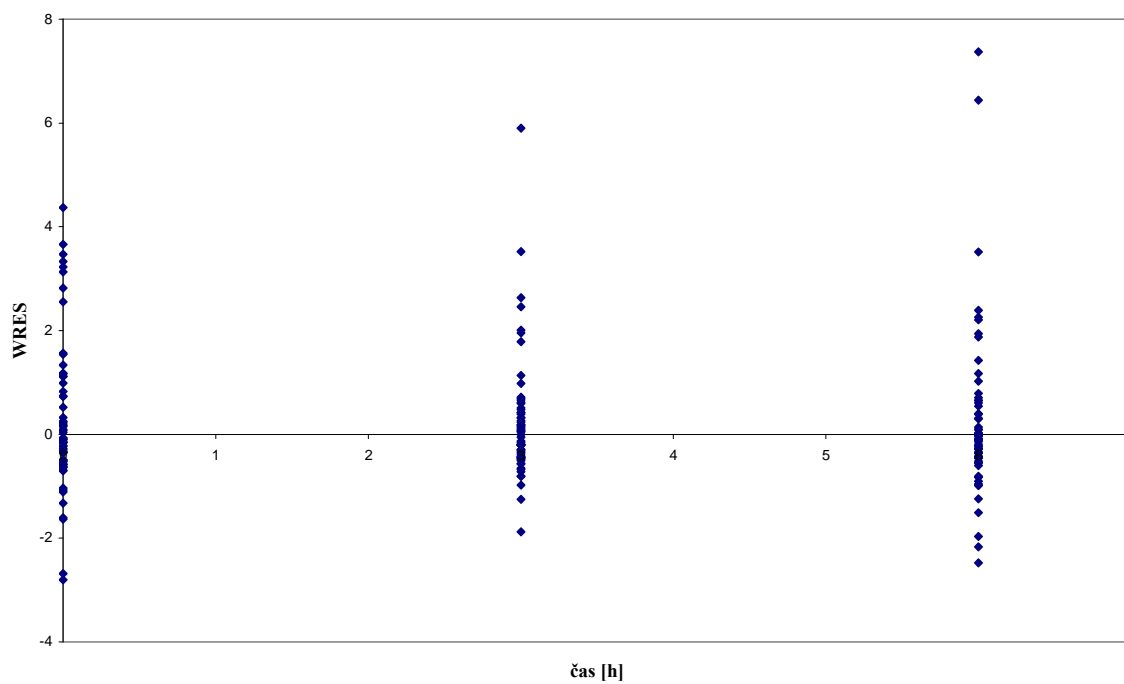


Slika 4.2: Odvisnost povprečnih napovedanih koncentracij v populaciji bolnikov (PRED) od izmerjenih koncentracij. Črtna črta predstavlja premico  $y=x$ .





Slika 4.3: Odvisnost uteženih rezidualov (WRES) od izmerjenih koncentracij.



Slika 4.4: Odvisnost uteženih rezidualov (WRES) od časa.

### 4.2.2 Izbira sočasnih spremenljivk

Izbiri sočasnih spremenljivk smo izvedli s programom NONMEM. V osnovni model smo vnašali po eno spremenljivko in preučevali, če je znižanje minimuma objektivne funkcije značilno, pri stopnji tveganja 0,05. Povzetek postopka razvoja modela s sočasnimi spremenljivkami je predstavljen v tabelah 4.5, 4.6, 4.7, 4.8.

Tabela 4.5: Testiranje vpliva sočasnih spremenljivk na volumen porazdelitve

|   | $\Delta$ OFV | P            | $\Theta_4 \pm SE$<br>$\Theta_5 \pm SE$<br>$\Theta_6 \pm SE$<br>$\Theta_7 \pm SE$ | $\omega^2_{CI/F} \pm SE$<br>$\omega^2_{V/F} \pm SE$ | $\sigma^2_1 \pm SE$    |
|---|--------------|--------------|--|---|------------------------|
| OSNOVNI MODEL   |              |              |  | 0.484±0.0752<br>0.292±0.111                         | 0.00692±0.00207        |
| AGE [leta]<br>TVV= $\theta_v \times (AGE/60)^\theta$                  | 0,109        | 0,741        | 0.199±0.403  | 0.484± 0.0753<br>0.291±0.112                        | 0.00693±0.00207        |
| WT [kg]<br>TVV= $\theta_v \times (WT/70)^\theta$                      | 0,726        | 0,394        | 0.696±0.885  | 0.484±0.0753<br>0.298±0.116                         | 0.00687±0.00211        |
| ALT<br>TVV= $\theta_v \times (ALT/0,4)^\theta$                        | <b>4,082</b> | <b>0,043</b> | <b>-0.564±0.393</b>  | <b>0.483±0.0752</b><br><b>0.17±0.263</b>            | <b>0.00707±0.00258</b> |
| BSA<br>TVV= $\theta_v \times (BSA/1,73)^\theta$                       | 0,823        | 0,364        | 1.24±1.41  | 0.484±0.0753<br>0.297±0.116                         | 0.00687±0.00209        |
| NSAID [0=ne, 1=da]<br>TVV= $\theta_v \times (\theta_{NSAID})^{NSAID}$ | 3,211        | 0,073        | 1.86±0.935   | 0.483±0.102<br>0.244±0.279                          | 0.00688±0.000804       |
| MTX [0=ne, 1=da]<br>TVV= $\theta_v \times (\theta_{MTX})^{MTX}$       | 0,164        | 0,686        | 1.22±0.754   | 0.484±0.103<br>0.283±0.292                          | 0.00695±0.000803       |
| SX [0=m, 1=ž]<br>TVV= $\theta_v \times (\theta_{sx})^{sx}$            | 0,127        | 0,722        | 0.889±0.381  | 0.484±0.0753<br>0.3±0.106                           | 0.00690±0.00216        |
| MED [0=ne, 1=da]<br>TVV= $\theta_v \times (\theta_{MED})^{MED}$       | 0,63         | 0,427        | 0.788±0.335  | 0.484±0.0103<br>0.266±0.265                         | 0.00695±0.000941       |
| DMARD [0=ne, 1=da]<br>TVV= $\theta_v \times (\theta_{DMARD})^{DMARD}$ | 0,121        | 0,728        | 0.88±0.451   | 0.483±0.106<br>0.301±0.312                          | 0.00689±0.000786       |

Tabela 4.6: Testiranje vpliva sočasnih spremenljivk na očistek

|   | $\Delta$ OFV | P            | $\Theta_4 \pm SE$<br>$\Theta_5 \pm SE$<br>$\Theta_6 \pm SE$<br>$\Theta_7 \pm SE$ | $\omega^2_{CI/F} \pm SE$<br>$\omega^2_{V/F} \pm SE$ | $\sigma^2_1 \pm SE$    |
|---|--------------|--------------|--|---|------------------------|
| <b>OSNOVNI MODEL</b>  |              |              |  | 0.484±0.0752<br>0.292±0.111                         | 0.00692±0.00207        |
| AGE [leta]<br>TVCl= $\theta_{CI} \times (AGE/60)^\theta$                              | 0,790        | 0,374        | -0.312±0.376   | 0.478±0.0776<br>0.292± 0.111                        | 0.00693±0.00207        |
| WT [kg]<br>TVCl= $\theta_{CI} \times (WT/70)^\theta$                                  | 0,752        | 0,386        | 0.402±0,512  | 0.478± 0.0787<br>0.292±0.111                        | 0.00693±0.00207        |
| ALT<br>TVCl= $\theta_{CI} \times (ALT/0,4)^\theta$                                    | 0,061        | 0,805        | -<br>0.0425±0.17<br>1  | 0.483±0.0748<br>0.293±0.111                         | 0.00693±0.00207        |
| BSA<br>TVCl= $\theta_{CI} \times (BSA/1,73)^\theta$                                   | 0,986        | 0,321        | 0.796*   | 0.476*<br>0.292*                                    | 0.00693*               |
| RA [mes]<br>TVCl= $\theta_{CI} \times (RA/150)^\theta$                                | 1,254        | 0,263        | 0,0917±0,07<br>69  | 0.475±0.0725<br>0.293±0.111                         | 0.00693±0.00207        |
| LF [leta]<br>TVCl= $\theta_{CI} \times (LF/3)^\theta$                                 | 0,141        | 0,707        | 0.0385±0,09<br>77  | 0.483±0.0748<br>0.293±0.111                         | 0.00693±0.00207        |
| <b>GFR</b><br>TVCl= $\theta_{CI} \times (GFR/110)^\theta$                             | <b>5,227</b> | <b>0,022</b> | <b>0.822±3890</b>  | <b>0.446±0.202</b><br><b>0.293±0.198</b>            | <b>0.00693±0.00465</b> |
| TOB [0=ne, 1=da, 2=bivši]<br>TVCl= $\theta_{CI} \times (\theta_{TOB})^{\theta_{TOB}}$ | 1,389        | 0,239        | 1.26±0.198   | 0.474± 0.0766<br>0.292±0.111                        | 0.00693±0.00207        |
| NSAID [0=ne, 1=da]<br>TVCl= $\theta_{CI} \times (\theta_{NSAID})^{\theta_{NSAID}}$    | 0,052        | 0,820        | 1.04±0.177   | 0.483±0.0747<br>0.292±0.111                         | 0.00692±0.00207        |
| MTX [0=ne, 1=da]<br>TVCl= $\theta_{CI} \times (\theta_{MTX})^{\theta_{MTX}}$          | 0,058        | 0,810        | 1.06±0.221   | 0.483±0.0752<br>0.292± 0.111                        | 0.00693±0.00207        |
| SX [0=m, 1=ž]<br>TVCl= $\theta_{CI} \times (\theta_{SX})^{\theta_{SX}}$               | 0,751        | 0,386        | 0.835±0.188  | 0.478±0.0792<br>0.293±0.111                         | 0.00693±0.00207        |
| MED [0=ne, 1=da]<br>TVCl= $\theta_{CI} \times (\theta_{MED})^{\theta_{MED}}$          | 1,125        | 0,289        | 1.22±0.203   | 0.475±0.0763<br>0.292±0.111                         | 0.00693±0.00207        |
| DMARD [0=ne, 1=da]<br>TVCl= $\theta_{CI} \times (\theta_{DMARD})^{\theta_{DMARD}}$    | 1,090        | 0,296        | 1.25*  | 0.472*<br>0.292*                                    | 0.00693*               |

\* kovarianca ni bila izračunana

Tabela 4.7: Testiranje vpliva CYP 1A2 in CYP 2C19 na očistek

|  | $\Delta$ OFV | P            | $\Theta_4 \pm \text{SE}$<br>$\Theta_5 \pm \text{SE}$<br>$\Theta_6 \pm \text{SE}$<br>$\Theta_7 \pm \text{SE}$ | $\omega^2_{CI/F} \pm \text{SE}$<br>$\omega^2_{V/F} \pm \text{SE}$ | $\sigma^2_1 \pm \text{SE}$ |
|--|--------------|--------------|--|---|----------------------------|
| <b>OSNOVNI MODEL</b>   |              |              |  | 0.484±0.0752<br>0.292±0.111                                       | 0.00692±0.00207            |
| CYP 1A2 <sup>a</sup><br>TVCI= $\theta_{CI} \times (\theta_{GEN1})^{GEN1} \times (\theta_{GEN2})^{GEN2} \times (\theta_{GEN3})^{GEN3}$                                | 0,405        | 0,817        | 1.23±0.418<br>1.27±0.441   | 0.469±0.0738<br>0.292±0.111                                       | 0.00693±0.00207            |
| CYP 1A2 <sup>aa</sup><br>TVCI= $\theta_{CI} \times (\theta_{GEN})^{GEN}$   | 0,381        | 0,537        | 1.25±0.412   | 0.481± 0.0737<br>0.293±0.111                                      | 0.00693±0.00207            |
| CYP 2C19 <sup>b</sup><br>TVCI= $\theta_{CI} \times (\theta_{GEN1})^{GEN1} \times (\theta_{GEN3})^{GEN3} \times (\theta_{GEN6})^{GEN6} \times (\theta_{GEN7})^{GEN7}$ | 5,816        | 0,213        | 1.7±0.333<br>1.37±0.285<br>1.05±0.240<br>2.57±0.405  | 0.43±0.0709<br>3.01E-13±<br>5.88E-14                              | 0.00801±0.00252            |
| CYP 2C19 <sup>bb</sup><br>TVCI= $\theta_{CI} \times (\theta_{GEN1})^{GEN1} \times (\theta_{GEN2})^{GEN2}$  | 5,717        | 0,057        | 1.85±0.345<br>1.29±0.243   | 0.443±0.0719<br>0.293±0.111                                       | 0.00693±0.00207            |
| <b>CYP 2C19<sup>bbb</sup></b><br>TVCI= $\theta_{CI} \times (\theta_{GEN})^{GEN}$   | <b>4,518</b> | <b>0,034</b> | <b>1.57±0.249</b>  | <b>0.455± 0.0748</b><br><b>0.309±0.138</b>                        | <b>0.00685±0.00206</b>     |

<sup>a</sup> vse tri genotipe primerjamo med seboj

<sup>aa</sup> genotipa 1 (CA) in 2 (AA) združimo v eno skupino (GEN) in primerjamo z genotipom 0 (CC)

<sup>b</sup> vse posamezne genotipe primerjamo med seboj

<sup>bb</sup> genotipe razdelimo v tri skupine: v skupini GEN1 sta genotipa 1 (\*1/\*2) in 7 (\*2/\*17), v GEN2 sta 3 (\*1/\*17) in 6 (\*17/\*17), v tretji skupini pa so vsi ostali genotipi

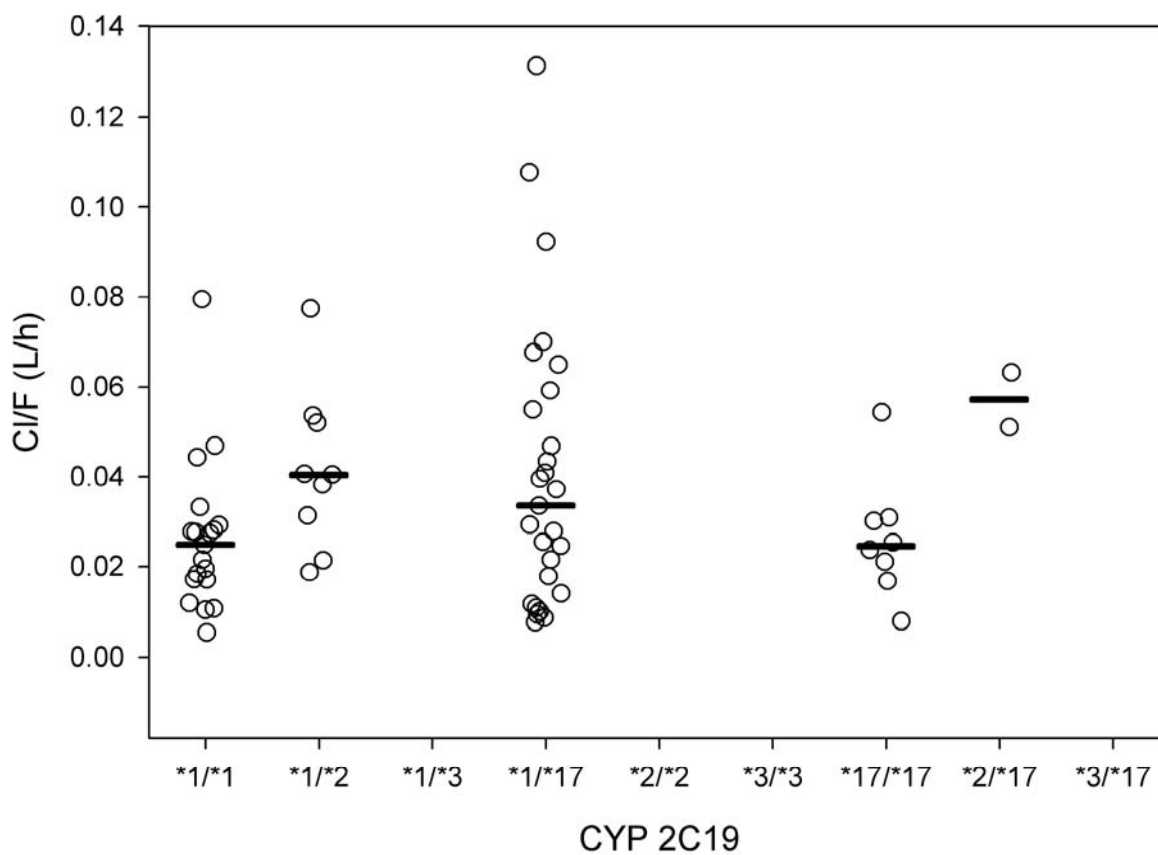
<sup>bbb</sup> genotipa 1 in 7 združimo GEN in primerjamo s skupino v kateri so vsi ostali

Tabela 4.8: Izključevanje sočasnih spremenljivk iz polnega modela

|   | $\Delta$ OFV | P     | $\Theta_{GEN} \pm SE$<br>$\Theta_{ALT} \pm SE$<br>$\Theta_{GFR} \pm SE$ | $\omega^2_{CI/F} \pm SE$<br>$\omega^2_{V/F} \pm SE$ | $\sigma^2_1 \pm SE$ |
|---|--------------|-------|---|---|---------------------|
| FULL<br>$TVCl = \theta_{CI} \cdot (\theta_{GEN})^{GEN} \cdot \left(\frac{GFR}{110}\right)^{\theta_{GFR}}$<br>$TVV = \theta_V \cdot \left(\frac{ALT}{0,4}\right)^{\theta_{ALT}}$ |              |       | 1.55±0.247<br>-0.563±0.386<br>0.809±0.335                               | 0.418±0.0802<br>0.173±0.254                         | 0.00706±0.00254     |
| RED1<br>$\Theta_{ALT=0}$  | 4,077        | 0,043 | 1.55±0.247<br>0<br>0.810±0.335  | 0.419±0.0803<br>0.293±0.111                         | 0.00694±0.00207     |
| RED2<br>$\Theta_{GEN=1}, \Theta_{ALT=0}$  | 4,088        | 0,043 | 1<br>0<br>0.822±0.00389   | 0.446±0.202<br>0.293±0.198                          | 0.00693±0.00465     |
| RED3<br>$\Theta_{ALT=0}, \Theta_{GFR=0}$  | 5,391        | 0,020 | 1.57±0.249<br>0<br>0  | 0.455±0.0749<br>0.292±0.111                         | 0.00692±0.00207     |
| RED4<br>$\Theta_{ALT=0}, \Theta_{GFR=1}$  | 0,309        | 0,578 | 1.55±0.249<br>0<br>1  | 0.421±0.0834<br>0.293±0.111                         | 0.00692±0.00207     |
| RED5<br>$\Theta_{GEN=1}, \Theta_{ALT=0}, \Theta_{GFR=1}$  | 5,562        | 0,018 | 1<br>0<br>1   | 0,446*<br>3.89E-9*                                  | 0.00801*            |

\* kovarianca ni bila izračunana

S posamičnim testiranjem sočasnih spremenljivk smo ugotovili, da ujemanje modela izboljšamo z vključitvijo vpliva ALT na volumen ter GFR in *CYP 2C19* na očistek. V prvem primeru *CYP 2C19* smo združili genotipa (\*1/\*2) in (\*2/\*17) v eno skupino, genotipa (\*1/\*17), (\*17/\*17) v drugo skupino, v tretji skupini pa so bili ostali genotipi. V tem primeru razlika med osnovnim modelom in modelom z vključeno kovariato ni bila značilna. V drugem primeru *CYP 2C19* pa smo združili genotipa (\*1/\*2) in (\*2/\*17) v eno skupino, ki smo jo primerjali z drugo skupino v kateri so bili vsi ostali genotipi. Za združitev genotipa (\*1/\*2) in (\*2/\*17) smo se odločili zato, ker oba genotipa vsebujeta alel \*2, ki je manj aktiven od alela \*1 z normalno aktivnostjo. Alel \*17 pa je bolj aktiven od alela \*1, vendar pa se izraža tako v manjši meri kot alel \*2. Slika 4.5 prikazuje odvisnost navideznega očistka (CI/F) A77 1726 od genotipa *CYP 2C19*. S pomočjo tega diagrama smo se odločili za združevanje bolnikov v skupine glede na *CYP 2C19*.

Slika 4.5: Odvisnost plazemskega očistka od *CYP 2C19*

V drugem koraku smo tri kovariate, pri katerih je bila sprememba značilna, vključili v polni model, nato pa smo jih posamično jemali iz modela in opazovali, ali se vrednost objektivne funkcije značilno zviša. Kriterij je bil enak kot pri posamičnem testiranju kovariat. Če je bila sprememba OFV pri odstranitvi določene sočasne spremenljivke značilna, smo jo vključili v končni model. Glede na ta kriterij bi bile v končni model vključene vse tri sočasne spremenljivke. Ko pa smo poleg OFV upoštevali še kriterij 95% CI, se je izkazalo, da 95% CI za GFR vključuje vrednost 1, 95% CI za ALT pa vrednost 0. Zaradi tega smo  $\theta_4$  za ALT nastavili na 0,  $\theta_5$  za GFR pa na 1. Končni model smo ovrednotili glede na štiri kriterije: število značilnih mest, gradienti, 95% interval zaupanja, korelacija med parametri modela. Iz končnega modela smo dobili oceni srednjih vrednosti za  $Cl/F=0,0399$  l/h in  $V/F=8,15$  l, model pa smo opisali z naslednjima enačbama:

$$Cl[l/h] = (0.0399 \pm 0.00372) \cdot (1.55 \pm 0.249)^{gen} \cdot \left( \frac{GFR}{110} \right) \quad \text{Enačba 4.3}$$

$$Vd[l] = 8.15 \pm 1.10 \quad \text{Enačba 4.4}$$

Parametri končnega modela so predstavljeni v tabeli 4.9.

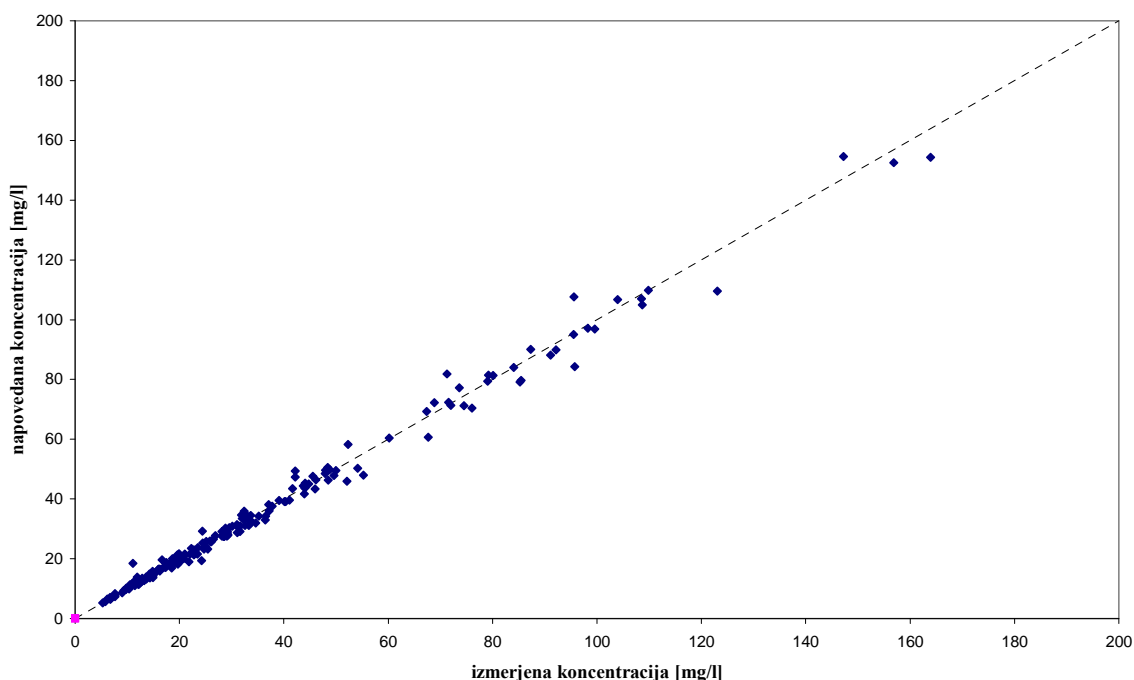
Tabela 4.9: Vrednotenje končnega modela

| Run                                   | FINAL                           |                 |               |
|---------------------------------------|---------------------------------|-----------------|---------------|
| Model                                 | ADVAN 2 / TRANS 2               |                 |               |
| Opis modela                           | Enoprostorni, 1. red absorpcije |                 |               |
| Aproksimacijska metoda                | FOCEI                           |                 |               |
| Število značilnih mest                | 3,1                             |                 |               |
| Gradienti (območje)                   | 0,007505; -6,390                |                 |               |
| OFV                                   | 885,529                         |                 |               |
| Največja korelacija                   | -0,582                          |                 |               |
| Parametri                             | Opis                            | Ocena parametra | 95% CI        |
| <b>Strukturni model</b>               |                                 |                 |               |
| $\Theta_1$                            | ka (1/h)                        | 1 FIX           |               |
| $\Theta_2$                            | CL (l/h)                        | 0,0399          | 0,0326-0,0472 |
| $\Theta_3$                            | V (l)                           | 8,15            | 6,00-10,3     |
| $\Theta_4$                            | CYP2C19/CL                      | 1,55            | 1,062-2,038   |
| $\Theta_5$                            | ALT/V                           | 0 FIX           |               |
| $\Theta_6$                            | GFR/Cl                          | 1 FIX           |               |
| <b>Interindividualna variabilnost</b> |                                 |                 |               |
| $\omega_2$                            | CL/F (CV%)                      | 64,9            | 50,7-76,5     |
| $\omega_3$                            | V/F (CV%)                       | 54,1            | 27,4-71,5     |
| <b>Rezidualna variabilnost</b>        | Multiplikativna                 |                 |               |
| $\sigma_1$                            | (CV%)                           | 8,32            | 5,35-10,5     |

### 4.2.3 Validacija končnega modela

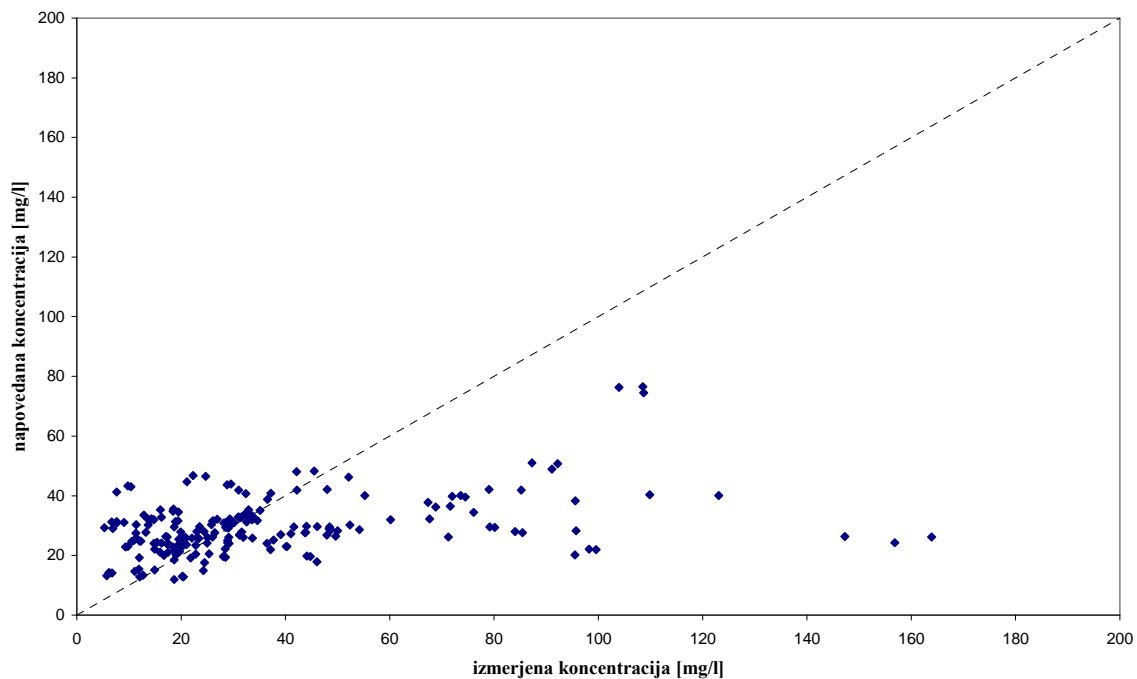
#### Grafična ocena modela

Ujemanje koncentracij, ki smo jih napovedali z modelom, in izmerjenih koncentracij smo preverili s pomočjo diagnostičnih diagramov (slike 4.6, 4.7, 4.8, 4.9). Poleg tega smo narisali tudi diagrame, ki predstavljajo odnos med sočasno spremenljivko in farmakokinetičnim parametrom za tiste vplive, ki so se pokazali kot značilni. Značilnost naklona smo preverili s testom ANOVA v statističnem programu SPSS.

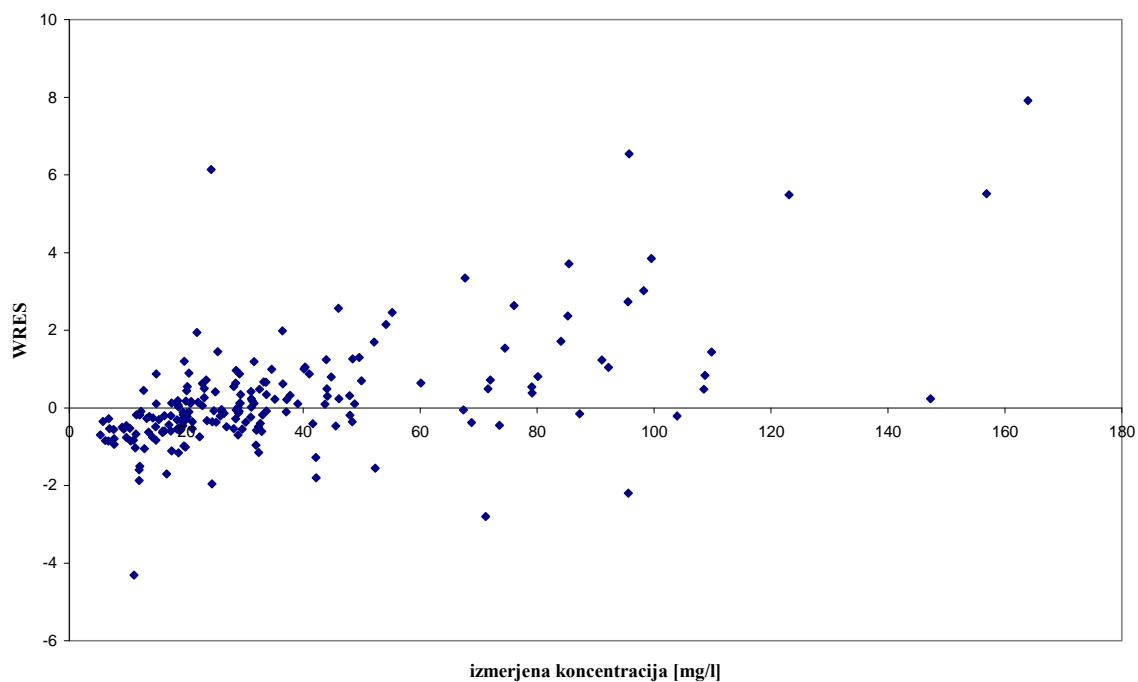


Slika 4.6: Odvisnost napovedanih koncentracij pri posameznem bolniku (IPRE) od izmerjenih koncentracij. Črtkana črta predstavlja premico  $y=x$ .

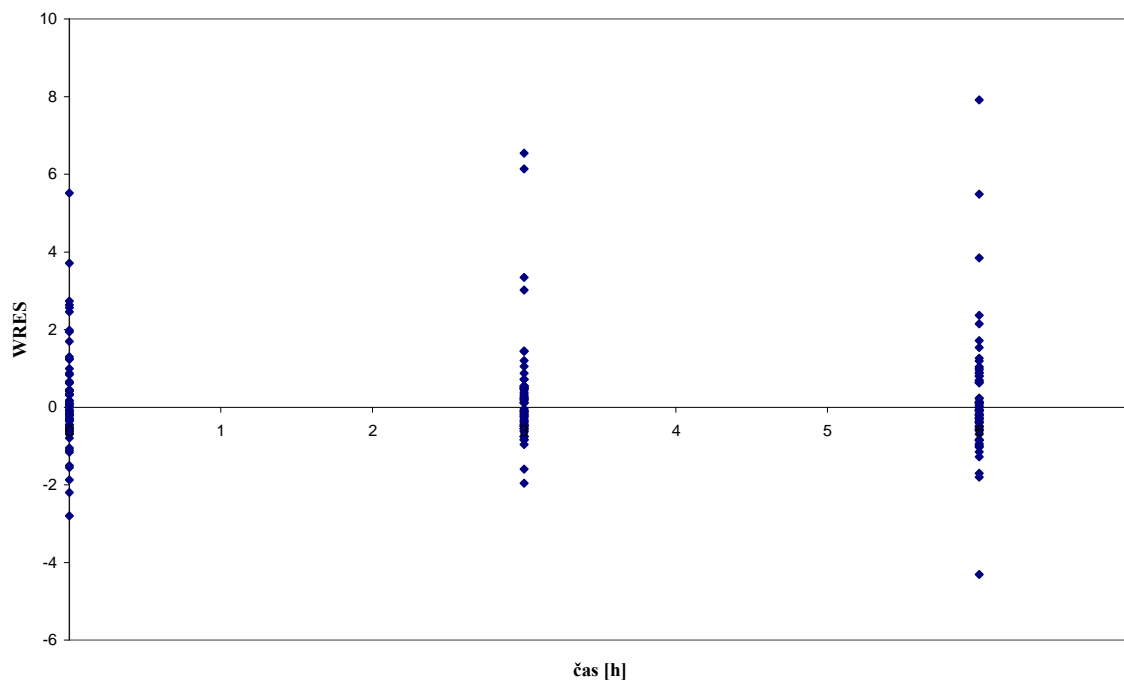




Slika 4.7: Odvisnost povprečnih napovedanih koncentracij v populaciji bolnikov (PRED) od izmerjenih koncentracij. Črtkana črta predstavlja premico  $y=x$ .



Slika 4.8: Odvisnost uteženih rezidualov (WRES) od izmerjenih koncentracij.



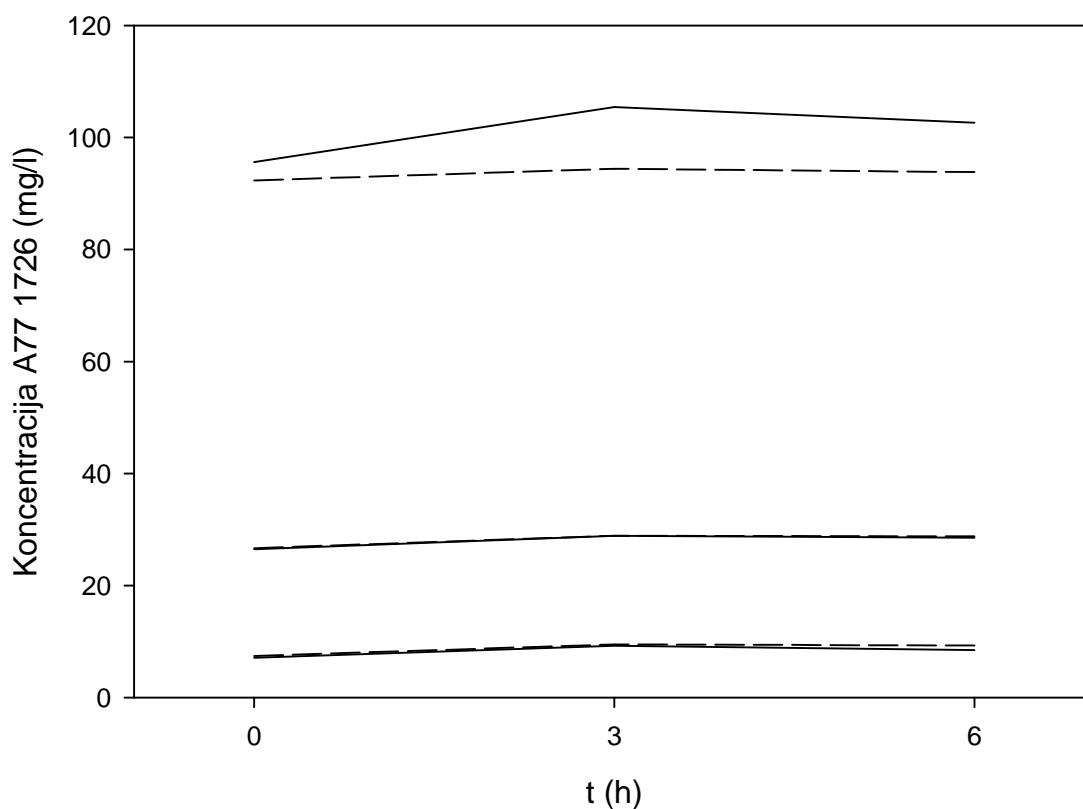
Slika 4.9: Odvisnost uteženih rezidualov (WRES) od časa.

**Vrednotenje napovedi**

S simulacijo smo ovrednotili napovedi modela. Da je model zanesljiv, mora ustrezati naslednjim pogojem (32):

- stalni učinki dobljeni s simulacijo morajo biti znotraj  $\pm 5\%$  stalnih učinkov končnega modela
- naključni učinki dobljeni s simulacijo pa morajo biti znotraj  $\pm 10\%$  naključnih učinkov končnega modela

Na sliki 4.10 je predstavljena grafična primerjava mediane in 90% intervala opaženih in simuliranih plazemskih koncentracij A77 1726.



Slika 4.10: Primerjava simuliranih koncentracij z izmerjenimi. S polno črto so označene opažene koncentracije, s prekinjeno črto pa simulirane. Prikazani sta mediani ter 5. in 95. centil.

**Napovedna moč**

V tabeli 4.10 so predstavljeni parametri končnega modela, ki smo ga dobili na testni množici, ki je vsebovala 90% vseh bolnikov. Na podlagi izračunanih parametrov smo ostalim 10% bolnikom napovedali plazemske koncentracije A77 1726.

Tabela 4.10: Končni model, ki smo ga razvili na testni množici bolnikov

| Run                                   | INDEX                           |                 |               |
|---------------------------------------|---------------------------------|-----------------|---------------|
| Model                                 | ADVAN 2 / TRANS 2               |                 |               |
| Opis modela                           | Enoprostorni, 1. red absorpcije |                 |               |
| Aproksimacijska metoda                | FOCEI                           |                 |               |
| Število značilnih mest                | 4,0                             |                 |               |
| Gradienti (območje)                   | -0,3248E-06; -0,7755            |                 |               |
| OFV                                   | 663,389                         |                 |               |
| Največja korelacija                   | 0,294                           |                 |               |
| Parametri                             | Opis                            | Ocena parametra | 95% CI        |
| <b>Strukturni model</b>               |                                 |                 |               |
| $\Theta_1$                            | ka (1/h)                        | 1 FIX           |               |
| $\Theta_2$                            | CL (1/h)                        | 0,0415          | 0,0324-0,0506 |
| $\Theta_3$                            | V (l)                           | 7,88            | 5,47-10,3     |
| $\Theta_4$                            | CYP2C19/C1                      | 1,48            | 0,565-2,395   |
| <b>Interindividualna variabilnost</b> |                                 |                 |               |
| $\omega_2$                            | CL/F (CV%)                      | 64,8            | 49,5-77,1     |
| $\omega_3$                            | V/F (CV%)                       | 99,8            | 83,2-114,0    |
| <b>Rezidualna variabilnost</b>        | Multiplikativna                 |                 |               |
| $\sigma_1$                            | (CV%)                           | 7,37            | 6,15-8,41     |
| <b>Komentar</b>                       | Matrix = S                      |                 |               |

Z osnovnim in končnim modelom, ki smo ju razvili na osnovi testne skupine, ki je vsebovala 90% bolnikov, smo napovedali koncentracije pri ostalih 10% bolnikov in izračunali točnost (MPE) in natančnost (RMSE) napovedi osnovnega in končnega modela. Ocena napovedne moči je predstavljena v tabeli 4.11.

Tabela 4.11: V tabeli so predstavljene vrednosti MPE in RMSE za osnovni in končni model ter za populacijsko in individualno napovedane plazemske koncentracije aktivnega metabolita.

|             | OSNOVNI MODEL           |                       | KONČNI MODEL            |                       |
|-------------|-------------------------|-----------------------|-------------------------|-----------------------|
|             | IPRE                    | PRED                  | IPRE                    | PRED                  |
|             | povprečje (95% CI)      | povprečje (95% CI)    | Povprečje (95% CI)      | povprečje (95% CI)    |
| <b>MPE</b>  | 0,0568 (-0,970 ; 1,084) | 14,55 (4,57 ; 24,53)  | 0,0274 (-1,041 ; 1,096) | 11,77 (3,09 ; 20,45)  |
| <b>RMSE</b> | 3,231 (1,285 ; 4,385)   | 34,59 (23,41 ; 42,96) | 3,362 (1,531 ; 4,501)   | 29,73 (18,18 ; 37,91) |

**Preizkušanje stabilnosti modela**

Spremljali smo, kako se s spreminjanjem hitrostne konstante absorpcije ( $k_a$ ) spreminjajo parametri modela. Rezultati so zbrani v tabeli 4.12.

Tabela 4.12: Vrednotenje končnih modelov z različnimi vrednostmi  $k_a$ 

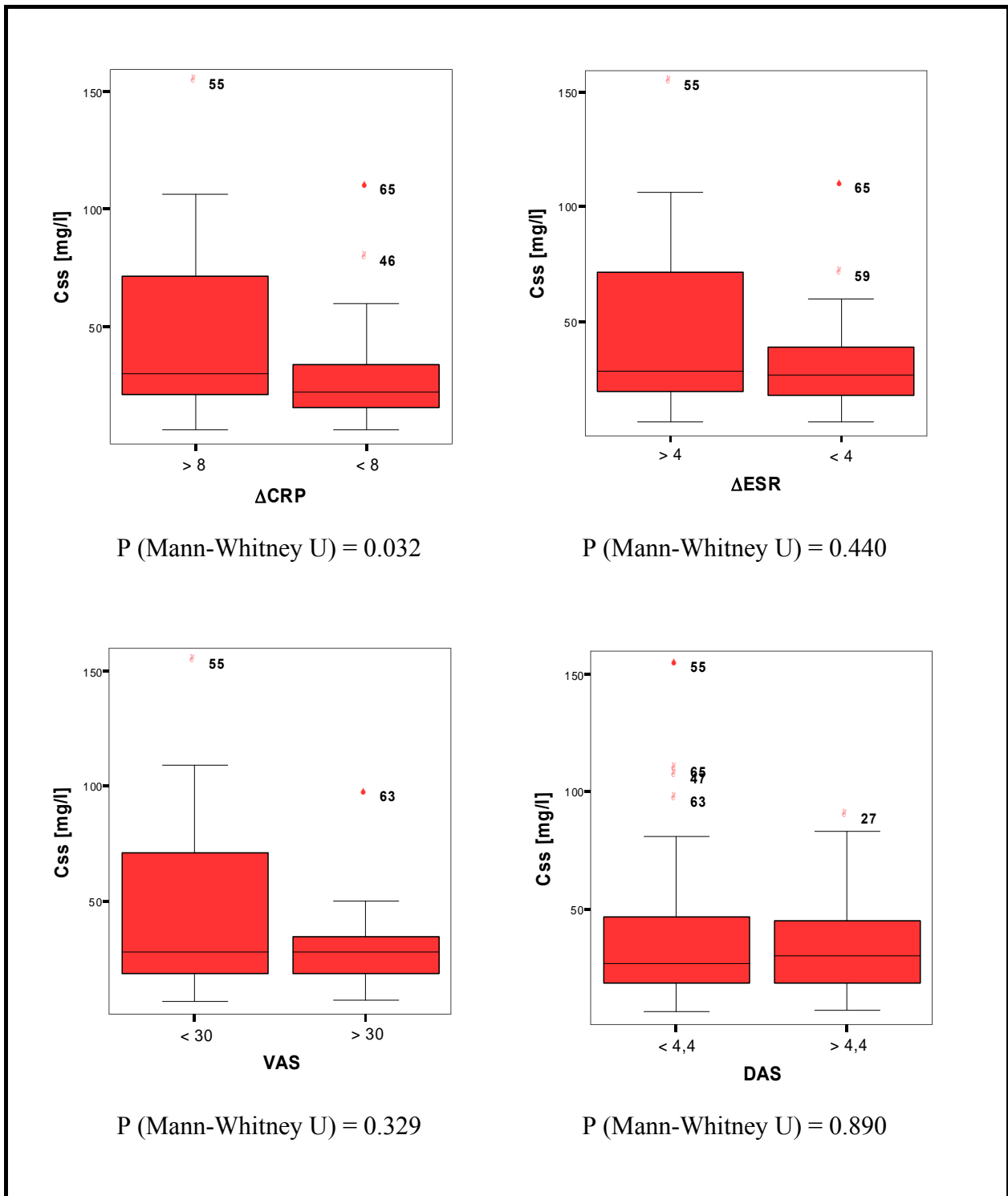
| $k_a$ [ $h^{-1}$ ]  | OFV     | $\Theta_{CI/F} \pm SE$<br>$\Theta_{V/F} \pm SE$<br>$\Theta_{CYP\ 2C19} \pm SE$ | $\omega_{CI/F} \pm SE$<br>$\omega_{V/F} \pm SE$ | $\sigma_1 \pm SE$     |
|---------------------|---------|--|---|-----------------------|
| $k_a = 1\ h^{-1}$   | 885,529 | 0.0399 $\pm$ 0.00372<br>8.15 $\pm$ 1.10<br>1.55 $\pm$ 0.249                    | 0.421 $\pm$ 0.0834<br>0.293 $\pm$ 0.111         | 0.00692 $\pm$ 0.00207 |
| $k_a = 0,2\ h^{-1}$ | 899,127 | 0,0395*<br>4,450*<br>1,530*  | 0,41*<br>5.52E-9*                               | 0,00877*              |
| $k_a = 0,5\ h^{-1}$ | 891,074 | 0.0399 $\pm$ 3.71E-03<br>6.93 $\pm$ 0.764<br>1.53 $\pm$ 0.246                  | 0.418 $\pm$ 0.0829<br>1.19E-11 $\pm$ 6.64E-12   | 0.00825 $\pm$ 0.00263 |
| $k_a = 2\ h^{-1}$   | 883,667 | 0.0399 $\pm$ 3.73E-03<br>8.45 $\pm$ 1.15<br>1.55 $\pm$ 0.249                   | 0.42 $\pm$ 0.0833<br>0.304 $\pm$ 0.113          | 0.00679 $\pm$ 0.00198 |
| $k_a = 5\ h^{-1}$   | 883,615 | 0.0399 $\pm$ 3.72E-03<br>8.46 $\pm$ 1.15<br>1.55 $\pm$ 0.248                   | 0.42 $\pm$ 0.0831<br>0.306 $\pm$ 0.114          | 0.00679 $\pm$ 0.00198 |

\* kovarianca ni bila izračunana

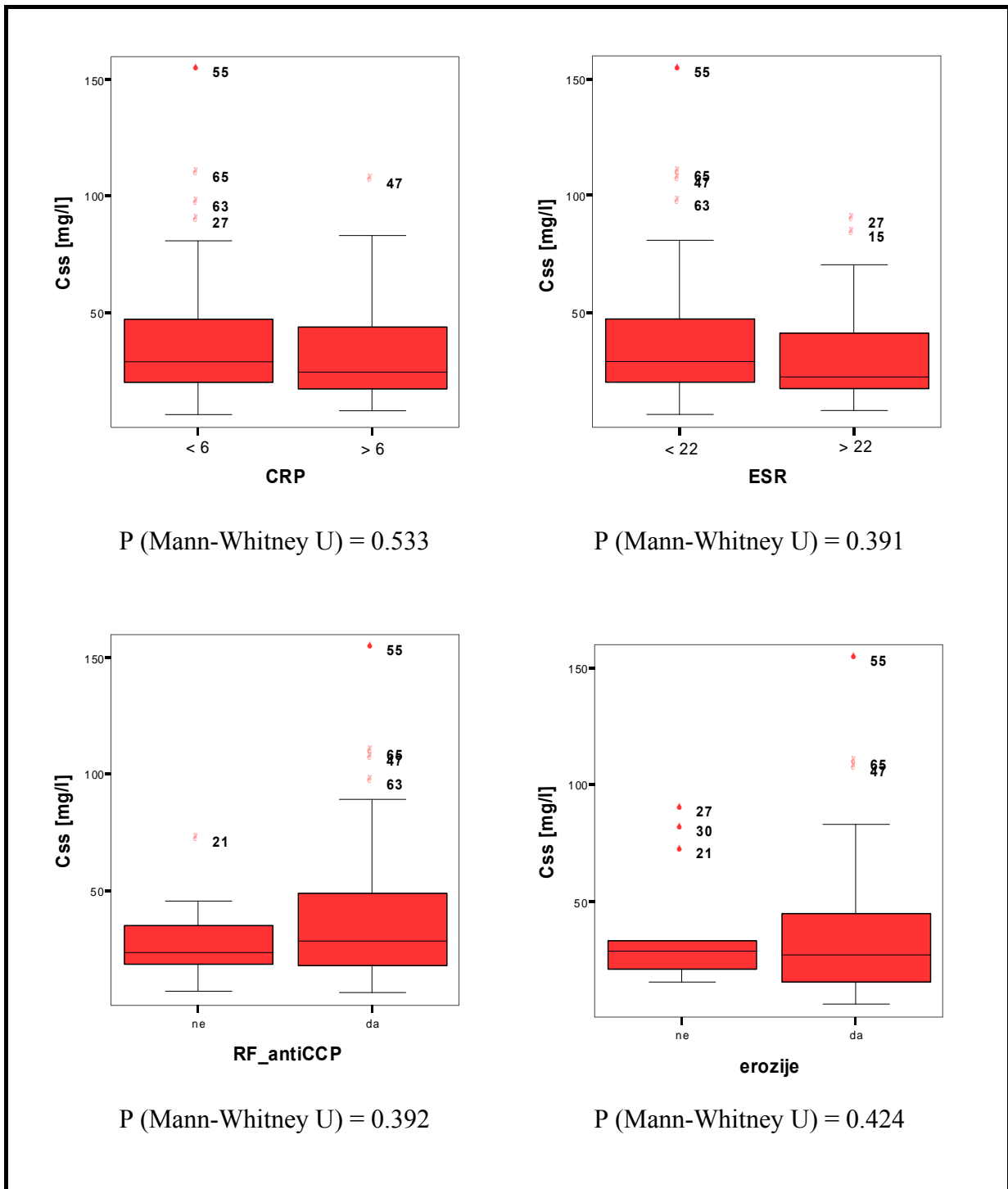
Iz tabele je razvidno, da spreminjanje  $k_a$  zelo malo vpliva na CI/F ter na izračunani vpliv genetskega polimorfizma *CYP 2C19* na CI/F. Pričakovano pa se s povečevanjem vrednosti  $k_a$  povečuje tudi V/F.

### 4.3 POVEZAVA MED KONCENTRACIJO A77 1726 IN AKTIVNOSTJO RA

Pri ugotavljanju zveze med koncentracijo A77 1726 in aktivnostjo revmatoidnega artritisa smo iz populacije bolnikov poleg šestih, pri katerih smo sumili na slabo sodelovanje pri zdravljenju – analize umaknili še 2 bolnika, ki sta imela psoriatični artritis. Rezultati ugotavljanja zveze med RA in posameznimi kliničnimi parametri so predstavljeni na slikah 4.11 in 4.12.



Slika 4.11: Predstavitev odvisnosti *posthoc* ocenjenih koncentracij v stacionarnem stanju od kategoriziranih  $\Delta CRP$ ,  $\Delta ESR$ , VAS, DAS. Pod vsakim kvantilnim diagramom je rezultat statističnega testa (Mann-Whitney U test).



Slika 4.12: Predstavitev odvisnosti *posthoc* ocenjenih koncentracij v stacionarnem stanju od kategoriziranih CRP, ESR, RF/antiCCP. Pod vsakim kvantilnim diagramom je rezultat statističnega testa (Mann-Whitney U test).

## 5. RAZPRAVA

Z uporabo populacijskega pristopa smo sistematično raziskovali vpliv različnih sočasnih spremenljivk na farmakokinetiko aktivnega metabolita leflunomida in proučili zvezo med njegovo koncentracijo v stacionarnem stanju in aktivnostjo revmatoidnega artritisa.

V raziskavi je sodelovalo 71 bolnikov z revmatoidnim artritismom, ki so jim ob treh časih odvzeli vzorce krvi. Z validirano metodo smo v plazmi določili koncentracije aktivnega metabolita leflunomida (A77 1726). Izkazalo se je, da je metoda za določanje A77 1726 hitra, ponovljiva, ustrezna, točna ter primerna za rutinsko merjenje.

Za pravilno farmakokinetično analizo je bistvenega pomena ustrezno zbiranje podatkov in dosledno beleženje. V našem primeru so bili vsem bolnikom vzeti vzorci ob osmi uri (tik pred odmerkom leflunomida), ob enajsti uri (tri ure po odmerku), kar ustreza vrhu v plazemski koncentraciji A77 1726, ob štirinajsti uri (6 ur po odmerku). V prihodnjih raziskavah bi predlagali, da bolniki vodijo dnevnik jemanja zdravila vsaj nekaj dni preden pridejo na kliniko, saj bi na ta način lahko preverili, skladnost jemanja zdravila z navodili zdravnika (*ang. compliance*) in morebitna odstopanja vključili v analizo. Z navodili neskladno jemanje je najverjetnejši razlog za zelo nizke koncentracije. Zato smo se odločili, da še pred razvojem modela iz podatkov izključimo tiste bolnike, ki so imeli izmerjene koncentracije nižje od 5 mg/l in tiste za katere so lečeči zdravniki sumili, da slabo sodelujejo pri zdravljenju. Na ta način smo izključili 6 bolnikov.

Pri razvoju osnovnega modela smo se po pregledu literature o farmakokinetiki leflunomida odločili za enoprostorni model s 1. redom absorpcije. Zaradi narave koncentracijskega profila leflunomida, ki je zaradi kombinacije kratkega odmernega intervala in dolge razpolovne dobe učinkovine podoben profilu dolgotrajne infuzije, ocenjevanje konstante absorpcije ni bilo mogoče. Ocena tega parametra bi bila mogoča, če bi imeli na voljo meritve v absorbtivni fazi. Vrednost hitrostne konstante absorpcije smo določili glede na literaturne podatke (33) o razpolovnem času učinkovine, ki je 336 h (14 dni) in o času za doseg maksimalne koncentracije učinkovine, ki je 6-12 h. Iz teh podatkov smo izračunali, da je hitrostna konstanta absorpcije približno  $1 \text{ h}^{-1}$ . Preizkusili smo tri modele rezidualne napake. Izkazalo se je, da imata multiplikativni in kombinirani model rezidualne napake zelo podobne vrednosti objektivne funkcije. Ob natančnejšem pregledu obeh modelov smo se odločili za multiplikativni model napake, saj je pri kombiniranem modelu standardna



napaka za aditivni del zelo velika. Znižanje vrednosti OFV ni bilo značilno. Za izbiro enostavnejšega modela smo se odločili po načelu parsimonije (Occamova britev).

Rezultati raziskave *in vitro* s človeškimi jetrnimi mikrosomi kažejo, da ima CYP 1A2 pri presnovi leflunomida do A77 1726 glavno vlogo. V nadaljnjih raziskavah s človeškimi rekombinantnimi izoencimi CYP pa so ugotovili, da imata pri metabolizmu leflunomida poleg CYP 1A2 vlogo tudi CYP 2C19 in CYP 3A4 (26). V naši populacijski analizi farmakokinetike vpliv različnih genotipov *CYP 1A2* ni bil značilen, medtem ko pa se je pri dani stopnji tveganja (0,05) za značilnega izkazal vpliv genotipa *CYP 2C19* na plazemski očistek. Leflunomid kot predzdravilo je neaktiven, zato je potrebna pretvorba v aktivni metabolit. V naši raziskavi se je izkazalo, da pretvorba v največji meri poteka s CYP 2C19, ki obstaja v različno aktivnih oblikah. V primeru, ko *CYP 2C19* vsebuje alel \*2, ki je manj aktiven od alela \*1, se poveča navidezni plazemski očistek (Cl/F) aktivnega metabolita. Pri tem se verjetno zmanjša obseg absorpcije (F). Ker je encim prisoten v črevesni steni in v jetrih, hkrati potekata tako absorpcija leflunomida kot tudi pretvorba v aktivni metabolit. Na podlagi tega lahko sklepamo, da se zmanjša obseg absorpcije, očistek pa najverjetneje ostane nespremenjen ali pa se zmanjša v manjši meri. Vrednosti parametra F ne poznamo, saj nimamo podatkov o intravenski aplikaciji učinkovine. Na plazemski očistek ima vpliv tudi hitrost glomerulne filtracije, ki smo jo določali na podlagi serumskih koncentracij kreatinina z uporabo DMARD formule. Večja kot je hitrost glomerulne filtracije, večji je plazemski očistek A77 1726, kar je tudi pričakovati, saj se leflunomid v enaki meri izloča tako v urin kot tudi v blato (izločanje z žolčem). Po peroralni aplikaciji se v urin izloči približno 43% odmerka, 48% pa se ga izloči v blato (26).

V raziskavi, kjer so preverjali *in vivo* interakcije z drugimi zdravili, so ugotavljali tudi interakcijo med leflunomidom in rifampicinom (nespecifični induktor CYP 450). Primerjali so  $AUC_{A77\ 1726}$  v primeru uporabe samega leflunomida in v primeru uporabe leflunomida po osemdnevni terapiji z rifampicinom. Dejstvo je, da se v primeru indukcije encima poveča hitrost pretvorbe leflunomida do A77 1726 (poveča se F), ali pa se poveča očistek (Cl). V tem primeru pa je prišlo do povišanja  $AUC_{A77\ 1726}$ , torej se je Cl/F zmanjšal, kar kaže, da rifampicin pospeši presnovo leflunomida do A77 1726 (9). Ta učinek je torej ravno nasproten genetskemu polimorfizmu CYP 2C19 \*2, saj je znano, da rifampicin inducira tudi CYP 2C19.

V nasprotju z raziskavo, ki jo je izvedel Shi s sodelavci nismo ugotovili značilnega vpliva telesne teže na farmakokinetiko A77 1726. Ker je večina bolnikov prejela odmerek

20 mg leflunomida na dan, tudi nismo mogli preveriti linernosti farmakokinetike A77 1726.

Interindividualna variabilnost farmakokinetičnih parametrov je pri leflunomidu velika, kar je verjetno posledica visokega obsega vezave aktivnega metabolita leflunomida na plazemske proteine in enterohepatične cirkulacije. Del interindividualne variabilnosti lahko razložimo tudi z variabilnostjo v obsegu absorpcije (F), torej količini učinkovine, ki iz prebavnega trakta preide v sistemski krvni obtok. Z vključitvijo *CYP 2C19* in GFR v model se je interindividualna variabilnost (IIV) za plazemski očistek zmanjšala iz 69,6% na 64,9%. IIV za volumen porazdelitve je v končnem modelu znašala 54,1%, rezidualna variabilnost pa 8,3%.

S končnim populacijskim modelom smo napovedali naslednje vrednosti farmakokinetičnih parametrov: 0,0399 l/h za Cl/F in 8,15 l za V/F. Obe vrednosti sta primerljivi z rezultati preteklih farmakokinetičnih analiz leflunomida.

Po pregledu diagnostičnih diagramov za končni model smo opazili, da model pri nizkih koncentracijah napoveduje višje koncentracije kot so bile izmerjene, pri visokih pa nižje od izmerjenih. Podobno oceno modela smo dobili tudi s simulacijo, kjer se je izkazalo, da so napovedane koncentracije v območju visokih vrednosti nižje od izmerjenih. Tudi z izračunom MPE smo pokazali, da model vsebuje sistematično napako. Napovedane koncentracije niso točne, saj 95% CI za MPE ne vključuje vrednosti 0. Z RMSE pa smo opredelili natančnost. Tako vrednost MPE kot tudi RMSE sta se pri končnem modelu glede na osnovni model zmanjšali, s čimer potrdimo smiselnost uvedbe ustreznih sočasnih spremenljivk v končni model.

Stabilnost modela smo preverjali z nastavljanjem konstante hitrosti absorpcije na različne vrednosti. Pri tem se ocene plazemskega očistka in *CYP 2C19* niso bistveno spreminjale, volumen distribucije pa se je pričakovano povečeval z večanjem  $k_a$ .

S primerjavo *posthoc* ocenjenih koncentracij v stacionarnem stanju in kliničnih parametrov, ki ocenjujejo aktivnost revmatoidnega artritisa smo z Mann-Whitneyevim U-testom ugotovili značilen vpliv le na razliko CRP ( $\Delta$ CRP).  $\Delta$ CRP je definirana kot razlika med CRP pred začetkom zdravljenja in CRP med zdravljenjem. Pri izboljšanju revmatoidnega artritisa se med zdravljenjem CRP zmanjša in je  $\Delta$ CRP pozitivna. Iz tega sledi, da je pri višjih koncentracijah aktivnega metabolita A77 1726 CRP nižji oz. da je pri višjih koncentracijah metabolita v stacionarnem stanju učinkovitost zdravljenja revmatoidnega artritisa večja.

Po predlogih iz raziskave V. Chana in sodelavcev smo preverili še vpliv sočasne terapije na farmakokinetiko A77 1726. Izkazalo se je, da vključitev sočasne terapije z metotreksatom, metilprednizolonom, NSAID ali z ostalimi DMARD pomembno ne izboljša prileganja modela. Vpliv sočasne terapije s temi zdravili na farmakokinetiko A77 1726 torej ni značilen.

S predhodno genotipizacijo bolnikov z revmatoidnim artritisom, bi lahko ustrezno priredili odmerke leflunomida. Tistim bolnikom, ki vsebujejo vsaj en manj aktivni alel *CYP 2C19* (\*2), bi bilo smiselno predpisati za 55% višje odmerke kot tistim z normalno aktivnim *CYP 2C19* (\*1) ali tistim, ki imajo *CYP 2C19* z višjo aktivnostjo (\*17).

## 6. SKLEP

- Razvili smo populacijski farmakokinetični model poteka plazemskih koncentracij aktivnega metabolita leflunomida A77 1726. Časovni potek koncentracij A77 1726 najbolje opisuje enoprostorni model s 1. redom absorpcije.
- Z analizo sočasnih spremenljivk smo ugotovili, da ima genotip *CYP 2C19* značilen vpliv na navidezni očistek. Bolniki, ki so imeli vsaj en alel *CYP 2C19* z zmanjšano aktivnostjo (\*2), so imeli navidezni očistek za 55% višji v primerjavi z ljudmi, ki tega alela niso imeli.
- Za značilnega se je po analizi kovariat izkazal tudi vpliv glomerulne filtracije. Pri manjši ledvični funkciji je bil navidezni očistek manjši.
- Bolniki, pri katerih je bilo znižanje CRP med zdravljenjem večje, so imeli značilno višje povprečne koncentracije A77 1726 v stacionarnem stanju.
- Razvit populacijski farmakokinetični model bi potencialno lahko uporabili v klinični praksi za načrtovanje režima odmerjanja leflunomida.

## 7. LITERATURA

1. Ihan A. Etiologija in patofiziologija revmatoidnega artritisa. Farm Vestn. 2004; 55: 109-112.
2. Vozelj M. Temelji imunologije, 1. izdaja, Ljubljana: DZS; 2000: 430-431.
3. Matsumoto AK. Rheumatoid Arthritis Clinical Presentation. Dostopno na: [http://www.hopkins-arthritis.org/arthritis-info/rheumatoid-arthritis/rheum\\_clin\\_pres.html](http://www.hopkins-arthritis.org/arthritis-info/rheumatoid-arthritis/rheum_clin_pres.html). Datum: 12.12.2007.
4. <http://www.revma.net>. Datum: 12.12.2007.
5. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. Pharmacology, 5. izdaja, London: Elsevier Churchill Livingstone; 2003: 255-260.
6. Shipley M, Black CM, Denton CP, Campston J, O'Gradaigh D. Rheumatology and bone disease. In: Kumar PJ, Clark ML. Clinical Medicine, 6th ed. London: Saunders; 2005: 555-564.
7. Bondeson J. The Mechanisms of Action of Disease-Modifying Antirheumatic Drugs: A Review with Emphasis on Macrophage Signal Transduction and the Induction of Proinflammatory Cytokines. Gen Pharmac. 1997; Vol. 29, No. 2: 127-150.
8. Borne FR. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Agents. In: David A. Williams, Thomas L. Lemke: Foye's Principles of Medicinal Chemistry. 5. izdaja, Lippincott Williams & Wilkins; 2002: 757-758.
9. Centre for drug evaluation and research. Food and drug administration. Clinical pharmacology and biopharmaceutics review(s). Application number ; NDA 20905. Dostopno na : [http://www.fda.gov/cder/foi/nda/98/20905\\_arava.htm](http://www.fda.gov/cder/foi/nda/98/20905_arava.htm). Datum: 21.01.2008.
10. Maini RN. Treatment of Rheumatoid Arthritis. Dostopno na: <http://www.patients.uptodate.com/topic.asp?file=rheumart/7624>. Datum: 20.03.2008.
11. Povzetek glavnih značilnosti zdravila. Arava. Sanofi-Aventis. Dostopno na: <http://zdravila.net>. Datum: 22.08.2008.
12. Rozman B. Clinical Pharmacokinetics of Leflunomide. Clin Pharmacokinet. 2002; Vol. 41: 421-431.

13. Olsen N, Stein CM. New Drugs for Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med.* 2004; Vol. 350: 2167-79.
14. Siva C, Eisen SA, Shepherd R, Cunningham F, Fang MA, Finch W, Salisbury D, Singh JA, Stern R, Zarabadi SA: Leflunomide Use During the First 33 Months After Food and Drug Administration Approval: Experience With a National Cohort of 3325 Patients. *American College of Rheumatology.* 2003; Vol. 49, No. 6: 745-751.
15. Chan V, Charles BG, Tett SE. Rapid determination of the active leflunomide metabolite A771726 in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Br J Pharmacol.* 2004; 803: 331-335.
16. Schmidt A, Schwind B, Gillich M, Brune K, Hinz B. Simultaneous determination of leflunomide and its active metabolite, A77 1726, in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Boimed Chromatogr.* 2003;17: 276-281.
17. Kozjek F, Manček B: Populacijska farmakokinetika. *Farm Vestn.* 1998; 49:153-166.
18. Welling PG. *Pharmacokinetics; process, mathematics, and applications* 2nd edition, Washington DC: American Chemical Society; 1997: 43-295.
19. Mrhar A: Kemični in kinetični vidiki metabolizma zdravil, *Farm.vest.* 1991;42:121–134.
20. Bogataj M, Kerec M, Grabnar I, Primožič S, Mrhar A. *Vaje iz biofarmacije s farmakokinetiko – skripta*, Ljubljana; 2000.
21. Ette EI, Williams PJ. Population pharmacokinetics II: estimation methods. *Ann Pharmacother.* 2004; 38:1707-15.
22. Ette EI, Williams PJ. Population pharmacokinetics I: background, concepts and models. *Ann Pharmacother.* 2004; 38:1702-16.
23. Wählby U. *Methodological Studies on Covariate Model Building in Population Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Analysis.* Acta Univ. Ups. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Pharmacy. 2002.
24. Carter AA, Rosenbaum SE, Dudley MN. Review of Methods in Population Pharmacokinetics. *Clin Res Regul Aff.* 1995; 12: 1-21.
25. Waehlby U, Jansson NE, Karlsson MO. Assessment of actual significance level for covariate effects in NONMEM. *J Pharmacokin Pharmacodyn.* 2001; 28(3): 231-235.

26. Shi J, Kovacs JS, Wang Y, Ludden TM, Bhargava VO. Population Pharmacokinetics of the Active Metabolite of Leflunomide in Pediatric Subjects with Polyartricular Course Juvenile Rheumatoid Arthritis. *J Pharmacokin Pharmacodyn.* 2005; 32 (3-4): 419-439.
27. Chan V, Charles BG, Tett SE. Population pharmacokinetics and association between A77 1726 plasma concentrations and disease activity measures following administration of leflunomide to people with rheumatoid arthritis. *Br J Clin Pharmacol.* 2005; 60 (3): 257-264.
28. Faragher RJ, Motto JM, Kaminski MA, Schwan AL. A convenient synthesis of  $^{13}\text{C}_4$ -Leflunomide and its primary metabolite  $^{13}\text{C}_4$ -A77 1726. *J Label Compd Radiopharm.* 2003; 46: 613-622.
29. Vučićević et al. Population Pharmacokinetic Model of Carbamazepine Derived From Routine Therapeutic Drug Monitoring Data. *The Drug Monit.* 2007; vol.29, no.6: 1-8.
30. Hallan S, Astor B, Lydersen S. Estimating glomerular filtration rate in the general population the second Health Survey of Nord-Trondelag (HUNT II). *Nephrol Dial Transplant.* 2006;21:1525-1533.
31. Cognigen Corporation. Nonmem Users Net Archive. Dostopno na: <http://www.cognigencorp.com/nonmem/nm/99jan172006.html>. Datum: 04.03.2008.
32. Ette EI, Williams PJ, Lane JR. Population pharmacokinetics III: Design, Analysis, and Application of Population Pharmacokinetic Studies. *Ann Pharmacother.* 2004; 38: 2136-2144.
33. Povzetek glavnih značilnosti zdravila. Arava. Sanofi-Aventis. US. Dostopno na: <http://www.products.sanofi-aventis.us/arava/arava.pdf>. Datum: 04.03.2008.