

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MITJA PIŠLAR

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MITJA PIŠLAR

**RAZVOJ IN VREDNOTENJE MATEMATIČNEGA
MODELA TARČNO POSREDOVANE
FARMAKOKINETIKE TER NJегоVIH APROKSIMACIJ**

**DEVELOPMENT AND EVALUATION OF A
MATHEMATICAL MODEL OF TARGET-MEDIATED
DRUG DISPOSITION AND ITS APPROXIMATIONS**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2010

Diplomsko nalogo sem opravljal na Fakulteti za farmacijo, na katedri za biofarmacijo, pod mentorstvom doc. dr. Iztoka Grabnarja in somentorstvom asist. dr. Igorja Locatellija.

Mentorju doc. dr. Iztoku Grabnarju in somentorju asist. dr. Igorju Locatelliju se iskreno zahvaljujem za nasvete in pomoč pri delu ter nastajanju diplomske naloge.

Posebno se zahvaljujem svoji družini za vso podporo in spodbudo tekom celotnega študija. Iskrena hvala gre tudi Petri in prijateljem za nasvete pri izdelavi diplomske naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvom doc. dr. Iztoka Grabnarja in somentorstvom asist. dr. Igorja Locatellija.

Mitja Pišlar

Ljubljana, 2010

KAZALO VSEBINE

| | |
|---|-----|
| POVZETEK | iii |
| SEZNAM OKRAJŠAV | v |
| 1 UVOD | 1 |
| 1.1 Farmakokinetika | 2 |
| 1.1.1 Linearna in nelinearna farmakokinetika | 3 |
| 1.1.2 Farmakokinetika bioloških učinkovin | 6 |
| 1.2 Model tarčno posredovane farmakokinetike..... | 9 |
| 1.3 Aproksimacije modela tarčno posredovane farmakokinetike..... | 11 |
| 1.3.1 Model z aproksimacijo ravnotežnega stanja vezave..... | 11 |
| 1.3.2 Model z aproksimacijo stacionarnega stanja vezave | 13 |
| 1.3.3 Model z Michaelis-Mentenovo aproksimacijo | 14 |
| 1.4 Eritropoetin | 17 |
| 1.5 Farmakokinetični/farmakodinamični (PK/PD) modeli..... | 20 |
| 1.5.1 Model posrednega odgovora življenjske dobe | 21 |
| 2 NAMEN DELA..... | 24 |
| 3 METODE | 25 |
| 3.1 Programska oprema | 25 |
| 3.2 Razvoj modelov v programskem okolju ADAPT 5..... | 26 |
| 3.3 Simulacije in primerjava odzivov uporabljenih PK modelov..... | 28 |
| 3.3.1 Veljavnost predpostavke QE- in QSS-modela | 29 |
| 3.3.2 Veljavnost predpostavke MM-modela | 30 |
| 3.4 Ocenjevanje parametrov TMDD-, QE-, QSS- in MM-modela..... | 30 |
| 3.5 Simulacija verižnega PD modela za rekombinantni humani eritropoetin | 31 |
| 4 REZULTATI IN RAZPRAVA | 36 |
| 4.1 Simulacije in primerjava odzivov uporabljenih PK modelov..... | 36 |
| 4.2 Ocenjevanje parametrov TMDD-, QE-, QSS- in MM-modela..... | 51 |

| | | |
|-----|---|----|
| 4.3 | Simulacija verižnega PD modela za rekombinantni humani eritropoetin | 55 |
| 5 | SKLEPI | 60 |
| 6 | LITERATURA..... | 61 |
| 7 | PRILOGE..... | 63 |
| 7.1 | Priloga A..... | 63 |
| 7.2 | Priloga B | 63 |
| 7.3 | Priloga C | 72 |
| 7.4 | Priloga Č | 73 |
| 7.5 | Priloga D..... | 75 |

POVZETEK

Za farmakokinetiko učinkovin biološkega izvora je značilno, da vezava učinkovine na tarčo poteka v tako velikem obsegu, da značilno vpliva na časovni potek koncentracije v plazmi. Model tarčno posredovane farmakokinetike (TMDD) je matematični model, ki mehanistično dobro opiše dogajanje učinkovine v organizmu. Prilagajanje modela eksperimentalnim podatkom in ocenjevanje vrednosti parametrov je pogosto težko izvedljivo, saj model vsebuje veliko parametrov. Problem identifikacije predstavljajo parametri, ki določajo kinetiko vezave učinkovine na tarčo, saj ta vezava poteka veliko hitreje kot ostali farmakokinetični procesi. V izogib teh problemov so bili razviti modeli, ki kinetiko vezave učinkovine na njen receptor aproksimirajo do ravnotežnega stanja (QSS, QE in MM). V diplomski smo s pomočjo teh 4 modelov simulirali plazemske koncentracije eritropoetina na podganah, kjer smo modelom spreminjali vrednosti parametrov in med seboj primerjali njihove odzive. Izkazalo se je, da je QSS-model najbolj primeren za opis TMDD-kinetike. Ugotovili smo, da je zaradi visoke internalizacije kompleksa učinkovina-receptor QE-model bistveno odstopal od TMDD-modela, medtem ko je MM-model odstopal od TMDD-modela pri vrednostih faktorja γ nad 0,2.

Modele smo prilagajali podatkom, ki smo jih pridobili s simulacijo TMDD-modela. Pri tem smo uporabili vrednosti parametrov iz ocen, ki jih je dobil Woo s sodelavci pri raziskavi farmakokinetike rekombinantnega humanega eritropoetina na podganah. Modeli z aproksimacijo ravnotežnega stanja pri ocenjevanju parametrov niso dali boljših rezultatov v primerjavi s TMDD-modelom, čeprav vsebujejo parameter manj. Pri tem so bile ocene parametrov linearnih procesov, katerim je podvržena učinkovina, bolj določene v primerjavi s parametri, ki določajo kinetiko receptorja in kompleksa učinkovina-receptor.

Eritropoetin poveča koncentracijo eritrocitov v krvnem obtoku in njegov učinek nastopi z zamikom. Na primeru podgan smo zamik v učinku eritropoetina opisali z modelom posrednega odgovora življenjske dobe. Uporabljeni model je imel dve dodatni predpostavki, in sicer da so vse celice imele enako življenjsko dobo in da so retikulociti v celoti dozoreli v kostnem mozgu oziroma da so v kri prišli šele, ko so se razvili do stopnje eritrocita. V model smo vključili tudi negativno povratno zanko, ki ob povečani koncentraciji hemoglobina v krvi zavira rast in nastajanje predhodnikov eritrocitov. S pomočjo simulacij smo ugotovili, da vrednost inhibicijskega parametra IC_{50} negativne povratne zanke vpliva na padec koncentracije eritrocitov pod bazno linijo po preteku življenjske dobe novonastalih

eritrocitov, medtem ko ne vpliva na absolutni padec koncentracije eritrocitov po preteku življenjske dobe novonastalih eritrocitov. Parametra IC_{50} prav tako ne vpliva na maksimalne koncentracije eritrocitov v krvnem obtoku.

SEZNAM OKRAJŠAV

| | |
|-------------|--|
| BIC | Bayesov oziroma Schwarzov informacijski kriterij (ang. Bayesian information criterion, Schwarz criterion – SC) |
| Δ Hb | sprememba koncentracije hemoglobina v krvi |
| C_p | koncentracija učinkovine v centralnem prostoru |
| C_{tot} | celotna koncentracija učinkovine v centralnem prostoru |
| CV | koeficient variacije |
| D | odmerek |
| DDE | zakasnitvene diferencialne enačbe (ang. delay differential equations) |
| E | prostor eritrocitov |
| E_0 | začetna koncentracija eritrocitov – bazna linija |
| Epo | eritropoetin |
| EpoR | receptor za eritropoetin |
| HB | hemoglobin |
| IC_{50} | koncentracijska sprememba hemoglobina v krvi, pri kateri je inhibicija razvoja in rasti predhodnikov eritrocitov 50 % maksimalne |
| IU | mednarodne enote (ang. international unit) |
| k_{12} | konstanta hitrosti prehoda iz centralnega v stranski prostor |
| k_{21} | konstanta hitrosti prehoda iz stranskega v centralni prostor |
| K_D | disociacijska konstanta ravnotežnega stanja vezave (QE) |
| k_{deg} | konstanta hitrosti razgradnje prostega receptorja |
| k_{el} | konstanta hitrosti eliminacije učinkovine |
| k_{in} | konstanta hitrosti prehoda celic v prostor |
| k_{int} | konstanta hitrosti internalizacije kompleksa učinkovina-receptor |
| K_M | Michaelis-Mentenova konstanta |
| k_{off} | konstanta hitrosti disociacije učinkovine z receptorja |
| k_{on} | konstanta hitrosti vezave učinkovine na receptor |
| k_{out} | konstanta hitrosti zapuščanja celic iz prostora |
| k_{sin} | konstanta hitrosti sinteze receptorja |
| K_{ss} | disociacijska konstanta stacionarnega stanja vezave (QSS) |
| LIDR | posredni odgovor življenjske dobe (ang. lifespan based indirect response) |
| LOQ | meja kvantifikacije (ang. limit of quantification) |

| | |
|-----------|---|
| MCH | koncentracija hemoglobina v eritrocitih |
| ML | metoda največjega verjetja (ang. maximum likelihood) |
| MM-model | model z Michaelis-Mentenovo aproksimacijo |
| ODE | navadne diferencialne enačbe (ang. ordinary differential equations) |
| O_{NLL} | objektivna funkcija |
| OV | osnovna vrednost |
| P_1 | prostor usmerjene matične celice eritroblastne vrste |
| P_2 | prostor eritroblastov in retikulocitov |
| PD | farmakodinamika |
| PK | farmakokinetika |
| PK/PD | farmakokinetični/farmakodinamični |
| QE-model | model z aproksimacijo ravnotežnega stanja vezave |
| QSS-model | model z aproksimacijo stacionarnega stanja vezave |
| R | receptor – koncentracija receptorja |
| R_0 | začetna koncentracija prostega receptorja |
| rHuEpo | rekombinantni človeški eritropoetin (ang. recombinant human erythropoietin) |
| R_{tot} | koncentracija celotnega receptorja |
| SC_{50} | koncentracija eritropoetina, pri kateri je učinek delovanja 50 % maksimalnega |
| S_{max} | maksimalna stimulacija eritropoetina na razvoj in rast predhodnikov eritrocitov |
| t | čas |
| T_E | življenjska doba eritrocitov |
| TMDD | tarčno posredovana farmakokinetika (ang. target mediated drug disposition) |
| T_{P1} | življenjska doba usmerjene matične celice eritroblastne vrste |
| T_{P2} | seštevek življenjske dobe eritroblastov in retikulocitov |
| U | prosta učinkovina |
| UBI | učinkovine biološkega izvora |
| UR | kompleks učinkovina-receptor |
| U_s | stranski prostor učinkovine |
| V_p | volumen centralnega prostora proste učinkovine |
| V_{max} | maksimalna hitrost |

1 UVOD

Pri raziskovanju naravnih pojavov, od enostavnega prostega pada pa vse do kompleksnih vremenskih razmer, si v znanosti pomagamo z modeli. Model je poenostavljen abstrakten zapis kompleksnega realnega procesa, ki še vedno ohranja njegove bistvene značilnosti. Definiran je s strukturo in parametri. Struktura modela je opisana z matematičnimi enačbami, ki določajo povezavo med odvisnimi spremenljivkami (koncentracija, temperatura, električni tok itd.) in neodvisnimi spremenljivkami (čas in prostor). Koeficienti teh enačb določajo parametre modela. Razvoj, analiza ter vrednotenje ustreznosti in pravilnosti modela imenujemo modeliranje. Modeliramo lahko kakršenkoli fizikalni, kemijski, biološki, sociološki ali ekonomski pojav. Omogoča nam boljše razumevanje realnega sistema oziroma procesa, to je spoznavanje njegovih pomembnih lastnosti in zakonitosti. Prav tako nam nudi možnost napovedovanja, optimizacije procesa in v določenih primerih spremembo poteka in vodenje realnega sistema (1).

V praksi se največkrat uporablja kombinirano modeliranje, ki vključuje tako teoretično kot eksperimentalno modeliranje. Pri teoretičnem modeliranju razvijemo strukturo modela, ki temelji na poglobljenem in detajlnem poznavanju modeliranega procesa. Eksperimentalno modeliranje pa služi pri identifikaciji parametrov. Z ustreznim prileganjem odziva modela odzivu sistema (tj. eksperimentalnim podatkom) ob enakih vhodnih signalih lahko ocenjujemo parametre modela. Pri modeliranju stremimo k enostavnosti modelov. Splošne predpostavke in zanemarjanja morajo biti dobro argumentirane, da opravičimo aproksimacije realnega sistema ali kompleksnega modela. Pri tem moramo narediti kompromis med uporabnostjo in točnostjo modela. Preveč poenostavljeni modeli so presplošni in netočni, preveč detajlni in kompleksni modeli pa so univerzalni in neuporabni (2).

Modele moramo ustrezno vrednotiti, kar pomeni, da jih ocenimo, ali se obnašajo zadovoljivo podobno modeliranemu procesu. Vrednotenje je zahteven proces, saj ne obstaja noben sistematičen postopek ali algoritem. Realni sistem, osnova za vrednotenje modelov, ni popolnoma znan, eksperimentalni podatki vsebujejo slučajne in sistematične napake. Modele vrednotimo s prilagajanjem odzivov modela eksperimentalnim podatkom, z ocenjevanjem parametrov in z analizo občutljivosti parametrov. Pri tem si pomagamo z različnimi kriteriji prilagajanja in raznimi statističnimi orodji. Primernost modelov ugotavljamo tudi glede na njihovo natančnost, preciznost, robustnost, opisno stvarnost, splošnost in uspešnost (2).

1.1 Farmakokinetika

Farmakokinetika je veda, ki raziskuje in vrednoti kinetiko oziroma gibanje učinkovin v organizmu. Učinkovine so v telesu v dinamičnem ravnotežju, kjer so podvržene različnim procesom (3):

- absorpciji (pri intravaskularni aplikaciji učinkovina temu ni podvržena),
- porazdeljevanju ali distribuciji in
- eliminaciji, to je ekskreciji in metabolizmu.

Ti biološki procesi potekajo sočasno in so zapleteni, zato si pri opisu farmakokinetike učinkovine v organizmu pomagamo z modeliranjem. Farmakokinetično modeliranje se uporablja pri (3):

- napovedovanju koncentracije učinkovin (npr. v plazmi, tkivu in urinu),
- izračunu optimalnega režima odmerjanja,
- ocenitvi možnosti akumulacije učinkovine ali njenih metabolitov,
- primerjavi biološke uporabnosti različnih farmacevtskih oblik,
- ugotavljanju fiziološkega ali patofiziološkega vpliva na farmakokinetiko,
- raziskovanju možnih interakcij med učinkovinami.

V farmaciji se večinoma uporabljajo prostorski farmakokinetični modeli, saj so enostavni in zelo uporabni. V manjši meri se srečujemo s fiziološkimi in empiričnimi.

I. PROSTORSKI MODEL

Prostorski farmakokinetični model poenostavlja biološki organizem do enega ali več prostorov z definiranimi volumni. V prostoru je učinkovina homogeno porazdeljena. Prostori so si med seboj v dinamičnem ravnotežju (učinkovine prehajajo med prostori) in za njih velja zakonitost o ohranitvi mase. Model prikazuje odprt sistem, saj učinkovina lahko zapusti prostor (eliminacija iz sistema). Njegova slabost je, da prostori niso anatomsko definirani. Centralni prostor okvirno predstavlja kri in dobro prekrvavljene organe s prepustnim kapilarnim endotelijem (npr. jetra in ledvica). Po aplikaciji zdravila učinkovina navadno prehaja v centralni prostor, od koder se nato porazdeli v stranske prostore, ki ponazarjajo slabo prekrvavljene organe (npr. koža in maščobno tkivo). Eliminacija učinkovine večinoma poteka iz centralnega prostora, redko pa iz stranskih prostorov. Slednje je predvsem značilno za nekatere učinkovine biološkega izvora. Linearni prostorni model matematično opišemo s končno mnogimi diferencialnimi enačbami (1):

$$\frac{dm_i}{dt} = \sum_j^n k_{ji} * m_j(t) - \sum_j^n k_{ij} * m_i(t) - k_{i0} * m_i(t) + v_i(t) \quad \text{Enačba 1}$$

Enačba 1 je splošna diferencialna enačba za prostor i . $m_i(t)$ označuje količino učinkovine v prostoru i v času t . Podobno velja $m_j(t)$ za prostor j . Parametri k_{ij} so hitrostne konstante prehoda učinkovine iz i -tega prostora v j -ti prostor, parametri k_{ji} pa so hitrostne konstante prehoda učinkovine iz j -tega prostora v i -ti prostor. k_{i0}

predstavlja hitrostno konstanto eliminacije učinkovine iz i -tega prostora, $v_i(t)$ pa

označuje hitrost vnosa učinkovine v prostor i v času t (1, 3).

II. EMPIRIČNI MODEL

Model ne raziskuje in ne poda mehanizma delovanja sistema, temveč zgolj opisuje eksperimentalne podatke. Dobimo ga s prilagajanjem empirične enačbe podatkom. Ta model je primeren, ko imamo zelo malo podatkov o sistemu (3).

III. FIZIOLOŠKI MODEL

Fiziološki farmakokinetični model temelji na perfuziji organa in difuziji učinkovine iz krvi v organ. Model opisuje gibanje učinkovine po telesu, kjer so koncentracije v krvi in v organih definirane. Privzem učinkovine v organ je hiter in razmerje med koncentracijo v venozni krvi in organu je konstantno. Model je bolj mehanističen od prostornega in bolje opisuje farmakokinetiko učinkovine v organizmu. Uporaba modela je zelo omejena, saj je pridobivanje eksperimentalnih podatkov (koncentracija učinkovine v arteriji specifičnega organa, koncentracija učinkovine v določenem organu, pretok krvi v določenem organu itd.) problematično (3).

1.1.1 Linearna in nelinearna farmakokinetika

Modele lahko razdelimo po tem, ali so linearni ali nelinearni.

I. LINEARNI MODELI

Za linearne modele velja zakon superpozicije ali natovarjanja, ki jo lahko opišemo z naslednjo enačbo:

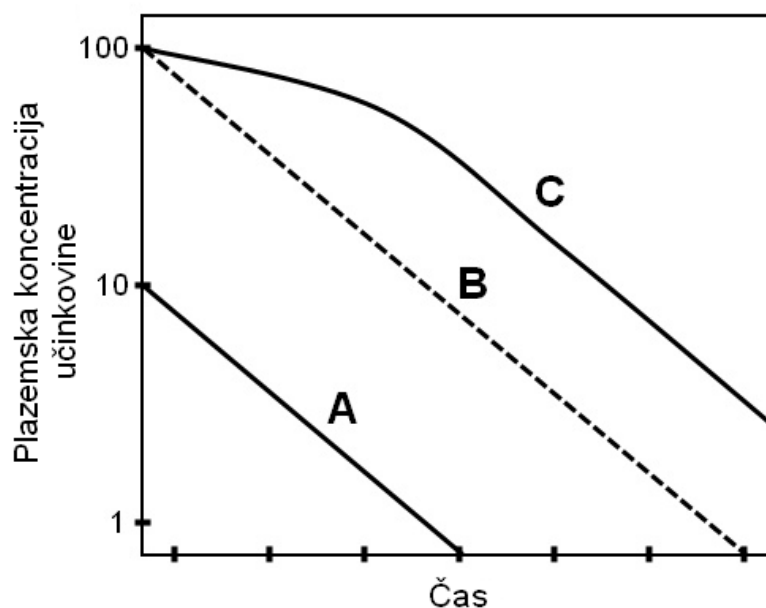
$$F(x_1 + x_2 + \dots + x_n) = F(x_1) + F(x_2) + \dots + F(x_n) \quad \text{Enačba 2}$$

V enačbi 2 x_i ($i = 1, 2, \dots, n$) označuje vhodni signal ali vhodno spremenljivko, $F(x_i)$ ($i = 1, 2, \dots, n$) pa označuje izhodni signal ali odgovor na vhodno spremenljivko. Za

superpozicijo torej velja, da je odziv vsote vhodnih signalov enak vsoti odzivov vsakega vhodnega signala posebej. Za linearne farmakokinetične modele je značilno, da se parametri modela ne spreminjajo s časom, ne s spreminjanjem količine odmerka in režima odmerjanja učinkovine. Značilno je tudi, da je hitrost eliminacije sorazmerna koncentraciji učinkovine v telesu in da sta koncentracija ter površina pod plazemsko koncentracijsko krivuljo (ang. area under the plasma concentration-time curve – AUC) sorazmerni apliciranemu odmerku. Učinkovine prehajajo med prostori oziroma pri fiziološkem modelu med organi po kinetiki 1. reda.

II. NELINEARNI MODELI

Nelinearnih sistemov ne moremo opisati s kinetiko 1. reda. Za njih načelo superpozicije ne velja. Nelinearno kinetiko izražajo predvsem sistemi, ki imajo omejeno kinetično kapaciteto. To velja za procese, v katerih so vključeni encimi, receptorji ali transporterji. Ob določeni koncentraciji učinkovine (liganda), ko je presežena kapaciteta in je proces nasičen, se farmakokinetika učinkovine spremeni. Površina pod plazemsko koncentracijsko krivuljo je nesorazmerna z odmerkom. Očistek in v določenih primerih tudi volumen distribucije pa nista enaka pri vseh odmerkih. Na podlagi aplikacije majhnega odmerka ne moremo napovedovati kinetike večjega odmerka učinkovine v organizmu, kot tudi ne moremo sklepati na terapevtski in toksični učinek zdravila. Na sliki 1 je prikazan primer učinkovine, ki ima nasitljivo kinetiko eliminacije (3).



Slika 1: Plazemski koncentracijski profil učinkovine po intravenski aplikaciji. Učinkovina ima nasitljivo eliminacijo. Krivulji A in C predstavljata večji in manjši odmerek iste učinkovine. Krivulja B označuje plazemski profil učinkovine, ki se odstranjuje po kinetiki 1. reda – linearna kinetika (3).

Pri intravenski aplikaciji majhnega odmerka proces eliminacije ni nasičen, zato ga lahko opišemo z enačbo 1. reda (krivulja A). Ob predpostavki, da je kinetika učinkovine linearna, bi napovedovali podoben odziv za večji odmerek (krivulja B). Linearnost kinetike je pri majhnem odmerku zgolj navidezna. Pri večjem odmerku iste učinkovine je namreč eliminacija nasičena in dejanski odziv nelinearen (krivulja C) (3).

Nelinearno encimsko kinetiko lahko opišemo z Michaelis-Mentenovo enačbo:

$$\frac{dC_p}{dt} = -\frac{V_{max} \cdot C_p}{K_m + C_p} \quad \text{Enačba 3}$$

V_{max} označuje maksimalno hitrost eliminacije učinkovine iz sistema, K_m je konstanta, ki predstavlja koncentracijo učinkovine, pri kateri je hitrost eliminacije enaka polovici V_{max} . C_p označuje koncentracijo učinkovine v plazmi. Michaelis-Mentenovi konstanti, V_{max} in K_m , sta odvisni od specifične interakcije med učinkovino in encimom, ki sodeluje v farmakokinetičnem procesu. Enačbo 3 lahko pri določenih pogojih poenostavimo. V primeru, da je $C_p \ll K_m$, dobimo:

$$\frac{dC_p}{dt} = -\frac{V_{max}}{K_m} \cdot C_p \quad \text{Enačba 4a}$$

Pri nizkih koncentracijah učinkovine lahko torej eliminacijo učinkovine opišemo s kinetiko 1. reda – enačba 4a. Pri večjih koncentracijah učinkovine, ko je $C_p \gg K_m$, lahko Michaelis-Mentenovo kinetiko poenostavimo do:

$$\frac{dC_p}{dt} = -V_{max} \quad \text{Enačba 4b}$$

Eliminacija v tem primeru poteka po kinetiki 0. reda. Hitrost eliminacije je omejena na V_{max} in ni sorazmerna s koncentracijo učinkovine. Pri večjih odmerkih ali pri večkratni aplikaciji učinkovin z nelinearno farmakokinetiko so plazemske koncentracije zaradi omejene eliminacije previsoke, kar lahko privede do toksičnih učinkov (3).

1.1.2 Farmakokinetika bioloških učinkovin

V farmaciji se vedno več raziskav nanaša na biološka zdravila. Delimo jih na (4):

- tradicionalna biološka zdravila, ki so pridobljena z izolacijo ali s klasično biotehnologijo (učinkovine iz rastlin, antibiotiki, steroidi, kri in krvni pripravki, naravni človeški in živalski hormoni),
- biološka zdravila, pridobljena s sintezo (sintezni peptidi),
- genska zdravila (geni, protismiselne molekule DNA, ribocimi, RNAi),
- monoklonska protitelesa (pridobljena s hibridomsko biotehnologijo) in
- rekombinantna ali biotehnološka zdravila (pridobljena z rekombinantno tehnologijo).

Učinkovine biološkega izvora (UBI) lahko podobno delimo kot biološka zdravila. V nadaljevanju bodo UBI predstavljale predvsem proteine oziroma glikoproteine, pridobljene z rekombinantno tehnologijo (npr. monoklonska protitelesa, citokinini, rastni faktorji). V primerjavi s sinteznimi učinkovinami majhne molekulske mase imajo UBI od 100 do 1000-krat večjo molekulske maso in kompleksno 3D-strukturo, ki jo lahko razdelimo na primarno, sekundarno, terciarno in kvartarno strukturo. UBI so proizvedene s pomočjo živih organizmov in za njih je značilno, da so zaradi razlik v posttranslacijskih modifikacijah pogosto heterogene (5).

Podobno kot učinkovine majhne molekulske mase so tudi UBI podvržene vsem farmakokinetičnim procesom (absorpciji, distribuciji in eliminaciji), vendar se farmakokinetika UBI bistveno razlikuje zaradi svoje kompleksne strukture, velike molekulske mase ter podobnosti z endogenimi peptidi in proteini.

I. ABSORPCIJA – APLIKACIJA – DOSTAVNE POTI

Navadno učinkovine biološkega izvora pri peroralni aplikaciji nimajo terapevtskega učinka zaradi premajhne biološke uporabnosti. K temu prispeva velika encimska aktivnost v prebavnem traktu, razpad učinkovine zaradi pH, predsistemski metabolizem, gastrointestinalni mukus in enterociti, ki predstavljajo absorpcijsko bariero. Kljub velikim številom raziskav in poskusov s sočasnim apliciranjem absorpcijskih pospeševalcev, transporterjev, inhibitorjev peptidaz ter poskusov vgradnje UBI v nano- ali mikrodolge imajo peroralne aplikacije nizko biološko uporabnost. Običajno se UBI aplicirajo intravensko (i.v.), podkožno (s.c.) in intramuskularno (i.m.). *Depo* odmerek lahko apliciramo podkožno in intramuskularno, vendar je UBI v določeni meri podvržena lokalnemu predsistemskemu metabolizmu. Temu se izognemo pri i.v. aplikaciji. Absorpcija pri podkožni in intramuskularni aplikaciji ni odvisna le od molekulske mase UBI, temveč tudi od globine injiciranja, pretoka krvi na mestu injiciranja, telesne aktivnosti, temperature in morebitnega sočasnega jemanja drugih spojin. Podkožna in intramuskularna biološka uporabnost UBI je zaradi proteolize na mestu nanosa manjša kot biološka uporabnost učinkovin majhne molekulske mase. Kinetiko absorpcije podkožno apliciranih UBI lahko pogosto opišemo s kombinacijo modelov 0. in 1. reda. Učinkovina biološkega izvora se lahko absorbira v sistemski krvni obtok z difuzijo skozi krvne kapilare (kinetika 0. reda) in skozi limfatični sistem (kinetika 1. reda). Poznamo še druge aplikacijske poti, kot so nazalna, inhalacijska in transdermalna. Te se redkeje uporabljajo, vendar se to področje zelo razvija (5, 6, 7).

II. DISTRIBUCIJA

Distribucija učinkovin biološkega izvora je po navadi omejena na plazmo oziroma zunajcelično tekočino (ekstracelularna tekočina), saj imajo zaradi velike molekulske mase omejeno mobilnost skozi membrane. Na distribucijo vplivajo predvsem fizikalno-kemične lastnosti (naboj, lipofilnost itd.), morebitna vezava na proteine in morebiten aktivni transport učinkovine v določeno tkivo. Vezava na ekstravaskularne ter intravaskularne proteine in aktivni privzem v tkiva bistveno povečata navidezni volumen porazdelitve (volumen distribucije – V_d). Procesi, kot so specifična ali nespecifična vezava na proteine, aktiven transport v tkivo, vezava na receptor, kateri sledi endocitoza, in nasitljiv mehanizem eliminacije, so razlog nelinearne farmakokinetike UBI (5, 6, 7).

III. ELIMINACIJA

Podobno kot endogeni peptidi in proteini se UBI izločajo iz telesa predvsem s katabolnim metabolizmom ali katabolizmom. Za večino UBI so druge eliminacijske poti zanemarljive (npr. ekskrecija v urin in žolč). Eliminacija ni omejena le na jetra, ledvica ali prebavni trakt, saj so proteolitični encimi (proteaze in peptidaze) prisotni po celem telesu (vaskularni endotelij, kri itd.). Proteaze in peptidaze se lahko nahajajo tudi znotraj celice. V tem primeru se UBI s prenosom v celico dodatno metabolizirajo. Natančna preiskava metabolizma UBI je dokaj zahtevna, saj so podobne endogenim makromolekulam. Imajo enako metabolno pot, kjer nastane mnogo število peptidnih fragmentov ali oligopeptidov. Končni produkti metabolizma so aminokislina, ki so nato na voljo za *de novo* biosintezo endogenih strukturnih ali funkcionalnih proteinov (6, 7).

V ledvicah poznamo tri eliminacijske poti:

- Po glomerulni filtraciji se UBI reabsorbirajo v endocit proksimalnega tubula, kjer prihaja do hidrolize peptidnih vezi in nastanejo oligopeptidi ter aminokislina.
- Po glomerulni filtraciji se UBI metabolizirajo na površini ščetkastega obrobka endocitov (brush border). Temu sledi absorpcija metabolitov.
- UBI, ki niso podvržene glomerulni filtraciji, se izločijo iz peritubularnih kapilar in se nato skozi bazolateralno membrano absorbirajo v endocit, kjer se metabolizirajo.

Stopnja glomerulne filtracije je odvisna od velikosti, njene konformacije in od naboja makromolekule. Večja kot je molekulska masa učinkovine, manjši delež se filtrira. Kapilarne stene v glomerulu so negativno nabite, zato se v večji meri filtrirajo pozitivno nabite učinkovine. Hepatična eliminacija je prisotna v manjši meri. Značilna je za določene UBI oziroma za endogene peptide in proteine, ki imajo s pomočjo specifičnih transporterjev ali receptorjev olajšan transport v hepatocite (6, 7).

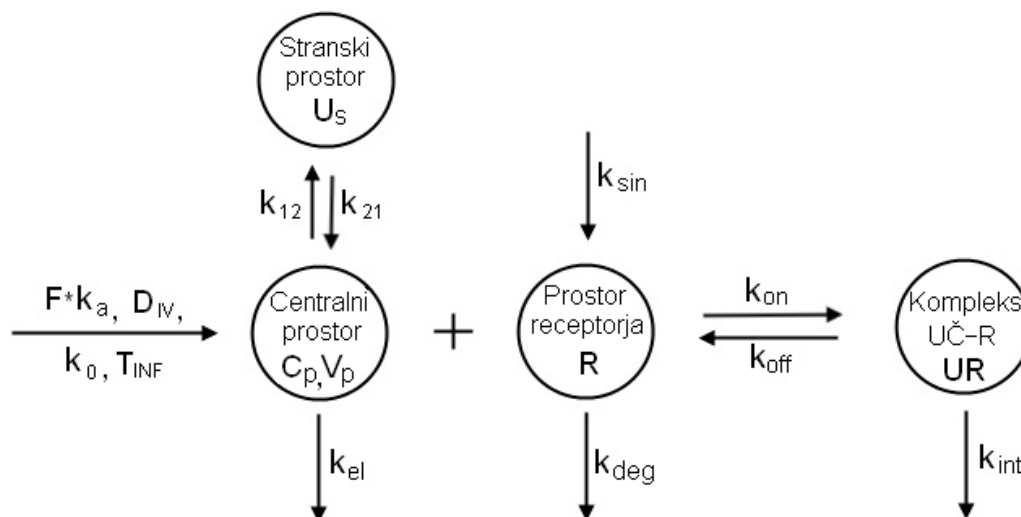
Podoben metabolizem kot v jetrih lahko poteka tudi v tarčni celici. UBI se z visoko afiniteto veže na receptor tarčne celice. Nastali kompleks učinkovina-receptor (UR) se nato prenese v notranjost celice, kjer se metabolizira. Število receptorjev je omejeno in sam proces je nasitljiv, zato je lahko že v terapevtskih koncentracijah izražena nelinearna farmakokinetika (6, 7).

Na farmakokinetiko UBI vpliva tudi morebitna imunogenost. Tvorijo se protitelesa, ki se vežejo na UBI. Pri tem se lahko poveča očistek, lahko se popolnoma nevtralizira učinek in

lahko pride do toksičnosti imunskega odgovora. Znano je, da ekstravaskularna administracija UBI v večji meri povzroča tvorbo protiteles kot intravaskularna (5).

1.2 Model tarčno posredovane farmakokinetike

Model tarčno posredovane farmakokinetike ali TMDD (ang. target-mediated drug disposition) je farmakokinetični model, s katerim lahko opišemo kinetiko učinkovin, za katere je značilna nelinearna farmakokinetika. Mehanistično opiše kinetiko učinkovine, ki se z visoko afiniteto in v velikem obsegu, relativno na terapevtski odmerek, veže na svojo tarčo oziroma receptor. Model vključuje tudi eliminacijo kompleksa učinkovine in njene tarče (npr. endocitoza in metabolizem kompleksa učinkovine in receptorja, ki se izraža na površini celice). Za uspešno uporabo modela je potrebno, da zgoraj opisani procesi niso prekriti oziroma maskirani z drugimi nelinearnimi procesi (npr. nespecifična vezava učinkovine na plazemski protein). Poleg nasitljive vezave učinkovine na receptor model vključuje tudi druge linearne procese, ki se lahko dogajajo v telesu (8).



Slika 2: Shema splošnega modela tarčno posredovane farmakokinetike (TMDD). Vnos učinkovine v centralni prostor C_p z volumnom V_p lahko poteka z ekstravaskularno aplikacijo ($F \cdot k_a$), intravaskularno injekcijo (D_{IV}) in infuzijo (T_{INF}) ter z endogeno sintezo (k_0). Učinkovina se lahko porazdeli v stranski prostor (U_s) s hitrostnima konstantama k_{12} in k_{21} ter eliminira iz sistema s hitrostno konstanto k_{el} . Veže se lahko s prostim receptorjem (R) in skupaj tvorita kompleks učinkovina-receptor (UR). Kompleks lahko disociira nazaj do učinkovine in prostega receptorja s hitrostno konstanto k_{off} ali pa se metabolizira oziroma internalizira v celico s hitrostno konstanto k_{int} . Receptor se sintetizira s konstantno hitrostjo (k_{sin}) in razgradi s hitrostno konstanto k_{deg} .

Na sliki 2 je shematsko prikazan TMDD-model, ki omogoča, da učinkovina pride v centralni prostor s kinetiko 1. reda (npr. peroralna ali subkutana aplikacija – $F \cdot k_a$), z enkratnim bolusom (npr. intravenska injekcija – D_{IV}), ali s kinetiko 0. reda (npr. endogena sinteza učinkovine – k_0 ali intravenska infuzija – T_{INF}). Centralni prostor učinkovine (C_p) je definiran z volumnom (V_p). V njem je prosta učinkovina izražena s koncentracijo. Lahko se

porazdeli v stranski prostor (k_{12} in k_{21}) ali se izloči iz sistema s hitrostno konstanto eliminacije (k_{el}). Oba procesa potekata s kinetiko 1. reda. Prosta učinkovina se lahko veže s prostim receptorjem (R) in tvori kompleks učinkovina-receptor (UR). Vezave poteka s kinetiko 2. reda s hitrostno konstanto k_{on} . Nastali kompleks disociira nazaj do učinkovine in prostega receptorja ali pa se metabolizira oziroma v primeru, da je tarča membranski receptor, se kompleks najprej prenese v notranjost celice z endocitozo (internalizacija), kjer se nato metabolizira. Oba procesa potekata s hitrostnima konstantama prvega reda (k_{off} in k_{int}). R se sintetizira s konstantno hitrostjo (kinetika 0. reda – k_{sin}) in razgradi s hitrostno konstanto prvega reda (k_{deg}).

Model je matematično definiran z diferencialnimi enačbami 5–8:

$$\frac{dC_p}{dt} = In(t) - (k_{21} + k_{12}) * C_p(t) + k_{21} * \frac{U_s(t)}{V_p} - k_{on} * R(t) * C_p(t) + k_{off} * UR(t)$$

Enačba 5

$$\frac{dU_s}{dt} = k_{12} * C_p(t) * V_p - k_{21} * U_s(t)$$

Enačba 6

$$\frac{dR}{dt} = k_{sin} - k_{deg} * R(t) - k_{on} * R(t) * C_p(t) + k_{off} * UR(t)$$

Enačba 7

$$\frac{dUR}{dt} = k_{on} * R(t) * C_p(t) - (k_{off} + k_{int}) * UR(t)$$

Enačba 8

Prosta učinkovina (C_p), prosti receptor (R) in kompleks učinkovina-receptor (UR) so izraženi z molarnimi koncentracijami (mol/L ali M). Učinkovina v stranskem prostoru (U_s) pa je izražena v molih (mol). V enačbi 5 predstavlja $In(t)$ hitrost dovajanja učinkovine v sistem na enoto volumna centralnega prostora. Model je možno dograditi s poljubnim modelom absorpcije. V primeru, da ni prisotne endogene učinkovine, so začetni pogoji (v času $t = 0$) zgornjih diferencialnih enačb navedeni z naslednjimi enačbami:

$$C_p(0) = \frac{D}{V_p}; \quad U_s(0) = 0; \quad R(0) = R_0 = \frac{k_{sin}}{k_{deg}}; \quad UR(0) = 0 \quad \text{Enačbe 9(a, b, c, d)}$$

Morebitni vnos učinkovine v obliki intravenske injekcije (ang. bolus) zabeležimo z začetnim pogojem (enačba 9a). Odmerek D predstavlja odmerek učinkovine (ang. dose), ki jo vnesemo v centralni prostor, izražen v molih (mol). R_0 predstavlja začetno koncentracijo receptorja.

TMDD-model je fleksibilen, saj lahko vanj vključimo ali izključimo določene procese odvisno od farmakološkega mehanizma učinkovine. V primeru, da je farmakološka tarča vezavni protein, nastali kompleks ni podvržen metabolizmu ali internalizaciji, zato spremenimo parameter k_{int} na vrednost nič. Podobno je možno tudi, ko se učinkovina ne porazdeljuje v stranski prostor. V tem primeru s spremembo k_{12} in k_{21} na vrednost nič model ne upošteva porazdelitve učinkovine v druga tkiva itd. (8).

Model ima tudi omejitve, saj določenih procesov, ki se lahko odvijajo v organizmu, ne posnema popolnoma. Predpostavke tega modela so (9):

- vezava učinkovine in tarče je enostavna (ni prisotne alosterije in kooperativnosti, nastali kompleks je sestavljen iz ene molekule učinkovine in ene molekule tarče),
- učinkovina je zelo specifična in se ne veže na druge receptorje,
- vezava učinkovine na receptor poteka le v centralnem prostoru,
- distribucija med prostori je linearen proces,
- pri eliminaciji kompleksa ni vključen proces ponovne uporabe tarče, kot je na primer recikliranje Brambellovega receptorja (neonatalni receptor regije Fc IgG),
- imunski odgovor na učinkovino ni vključen,
- kinetiki nastajanja in eliminacije receptorja sta konstantni in nista odvisni od ostalih mehanizmov.

1.3 Aproksimacije modela tarčno posredovane farmakokinetike

Zgoraj opisani model tarčno posredovane farmakokinetike s hitrostnima konstantama k_{on} in k_{off} vrednoti termodinamiko vezave učinkovine na njegovo tarčo in njeno disociacijo iz kompleksa UR. V primerjavi z ostalimi procesi, kot so distribucija in eliminacija učinkovine ter nastanek in metabolizem tarče, je hitrost te vezave in disociacije navadno veliko hitrejša. Ravnotežje med procesom vezave in disociacije nastopi relativno hitro, praktično v trenutku, zato iz eksperimentalnih podatkov dobimo omejene informacije o tem procesu in posledično težko ocenimo vrednosti parametrov k_{on} in k_{off} (10).

Model TMDD vsebuje 10 parametrov. Identifikacija teh parametrov je pogosto nezanesljiva ali celo neizvedljiva, zato so razvili aproksimacijske modele, ki imajo manj parametrov in temeljijo na dodatnih predpostavkah.

1.3.1 Model z aproksimacijo ravnotežnega stanja vezave

V primerjavi z ostalimi procesi sta hitrost vezave učinkovine (U) na receptor (R) in njena disociacija z receptorja hitra, zato kompleks učinkovina-receptor (UR) relativno hitro doseže ravnotežno stanje. Model z aproksimacijo ravnotežnega stanja vezave (ang. quasi-equilibrium – QE ali rapid binding) predpostavlja, da je UR v vsakem trenutku v ravnotežju z U in R. Za ravnotežje je značilno, da je hitrost vezave učinkovine na receptor enaka hitrosti disociacije kompleksa (10):

$$k_{on} * C_p * R - k_{off} * UR = 0 \quad \text{Enačba 10}$$

Enačbo 10 preuredimo do:

$$\frac{C_p * R}{UR} = \frac{k_{off}}{k_{on}} = K_D \quad \text{Enačba 11}$$

K_D predstavlja disociacijsko ravnotežno konstanto. Vključitev enačbe 11 v sistem enačb 5–8 lahko z uvedbo novih spremenljivk C_{tot} in R_{tot} (enačbi 12a in 12b) poenostavimo in znižamo število enačb.

$$C_{tot} = C_p + UR \quad \text{Enačba 12a}$$

$$R_{tot} = R + UR \quad \text{Enačba 12b}$$

C_{tot} označuje celotno koncentracijo učinkovine v centralnem prostoru, tako prosto kot vezano na receptor, medtem ko R_{tot} pomeni celotno koncentracijo receptorja v centralnem prostoru, tako prostega kot vezanega z učinkovino. Matematično opišemo QE-model s tremi diferencialnimi 13–15 in eno algebrasko enačbo 16:

$$\frac{dC_{tot}}{dt} = In(t) - k_{inc} * C_{tot}(t) - (k_{el} + k_{12} - k_{inc}) * C_p(t) + k_{21} * \frac{U_s(t)}{V_p} \quad \text{Enačba 13}$$

$$\frac{dU_s}{dt} = k_{12} * C_p(t) * V_p - k_{21} * U_s(t) \quad \text{Enačba 14}$$

$$\frac{dR_{tot}}{dt} = k_{sin} - (k_{inc} - k_{deg}) * (C_{tot}(t) - C_p(t)) - k_{deg} * R_{tot}(t) \quad \text{Enačba 15}$$

$$C_p(t) = 1/2 * [(C_{tot}(t) - R_{tot}(t) - K_D) + \sqrt{(C_{tot}(t) - R_{tot}(t) - K_D)^2 + 4 * K_D * C_{tot}}] \quad \text{Enačba 16}$$

Do enačbe 13 smo prišli s seštevanjem enačb 5 in 8, na drugi strani pa smo s seštevanjem enačb 7 in 8 dobili enačbo 15. Enačba 14 je ekvivalentna enačbi 6. Izpeljava enačbe 16 je razložena v prilogi A. S pomočjo enačb 11 in 12b dobimo naslednji izraz za UR:

$$UR = \frac{R_{tot} * C_p}{K_D + C_p} \quad \text{Enačba 17}$$

Ob vključitvi v enačbo 13 in 15 dobimo:

$$\frac{dC_{tot}}{dt} = In(t) - (k_{el} + k_{12}) * C_p(t) - k_{inc} * \left(\frac{R_{tot}(t) * C_p(t)}{K_D + C_p(t)} \right) + k_{21} * \frac{U_s(t)}{V_p} \quad \text{Enačba 18}$$

$$\frac{dR_{tot}}{dt} = k_{sin} - (k_{inc} - k_{deg}) * \left(\frac{R_{tot}(t) * C_p(t)}{K_D + C_p(t)} \right) - k_{deg} * R_{tot}(t) \quad \text{Enačba 19}$$

QE-model lahko torej opišemo tudi s enačbami 14, 16, 18 in 19. Začetni pogoji (v času $t = 0$) so v primeru neprisotnosti endogene učinkovine naslednji:

$$C_{tot}(0) = \frac{D}{V_p}; \quad U_s(0) = 0; \quad R_{tot}(0) = R_0 = \frac{k_{sin}}{k_{deg}} \quad \text{Enačbe 20 (a, b, c)}$$

Podobno kot v enačbi 9a D predstavlja odmerek učinkovine, ki jo vnesemo v centralni prostor v obliki intravenske injekcije (10).

1.3.2 Model z aproksimacijo stacionarnega stanja vezave

QE-model ima z enačbo 11 definirano ravnotežje kompleksa učinkovina-receptor. Kinetika internalizacije (k_{int}) kompleksa ni upoštevana pri izračunu ravnotežja, zato se pri visokih vrednostih k_{int} TMDD-model zelo razlikuje od QE-modela. Ta postane pristranski in ni dober za opis realnega sistema. Model z aproksimacijo stacionarnega stanja vezave (ang. quasi-steady-state – QSS) podobno kot QE-model predpostavlja, da je kompleks učinkovina-receptor (UR) v ravnotežju, a pri tem upošteva tudi kinetiko internalizacije. Slednje imenujemo stacionarno stanje, kjer je predpostavljeno, da je hitrost vezave učinkovine na receptor enaka hitrosti disociacije in internalizacije UR (11):

$$k_{on} * C_p * R - (k_{off} + k_{int}) * UR = 0 \quad \text{Enačba 21}$$

Enačbo preuredimo do:

$$\frac{C_p * R}{UR} = \frac{k_{off} + k_{int}}{k_{on}} = K_{ss} \quad \text{Enačba 22}$$

K_{ss} je konstanta stacionarnega stanja vezave učinkovine na receptor, disociaciji učinkovine z receptorja in internalizaciji kompleksa UR. Podobno kot pri QE-modelu tudi za QSS-model velja:

$$C_p(t) = 1/2 * \left[(C_{tot}(t) - R_{tot}(t) - K_{ss}) + \sqrt{(C_{tot}(t) - R_{tot}(t) - K_{ss})^2 + 4 * K_{ss} * C_{tot}(t)} \right] \quad \text{Enačba 23}$$

$$UR = \frac{R_{tot} * C_p}{K_{ss} + C_p} \quad \text{Enačba 24}$$

$$\frac{dC_{tot}}{dt} = In(t) - (k_{el} + k_{12}) * C_p(t) - k_{int} * \left(\frac{R_{tot}(t) * C_p(t)}{K_{ss} + C_p(t)} \right) + k_{21} * \frac{U_p(t)}{V_p} \quad \text{Enačba 25}$$

$$\frac{dR_{tot}}{dt} = k_{sin} - (k_{int} - k_{deg}) * \left(\frac{R_{tot}(t) * C_p(t)}{K_{ss} + C_p(t)} \right) - k_{deg} * R_{tot}(t) \quad \text{Enačba 26}$$

Enačbe 23–26 so vzporedne enačbam 16–19. Razlikujejo se v tem, da je namesto konstante K_D uporabljena konstanta K_{ss} . Porazdeljevanje učinkovine v stranski prostor poteka enako kot pri QE-modelu. Določeno je z enačbo 14. Za matematični opis QSS-modela potrebujemo torej 3 diferencialne (enačba 14, 25 in 26) ter 1 algebrasko enačbo (enačba 23). Modela QE in QSS se razlikujeta le pri izračunu konstante K_D oziroma K_{ss} . QE-model lahko obravnavamo kot poseben primer QSS-modela, in sicer ko je parameter k_{int} zanemarljivo

majhen v primerjavi s parametrom k_{off} , tedaj se vrednost konstante K_{ss} približuje vrednosti

konstante K_D ().

1.3.3 Model z Michaelis-Mentenovo aproksimacijo

V primerjavi s QSS-modelom je model z Michaelis-Mentenovo aproksimacijo (MM) bolj enostaven. Podobno kot QSS-model privzame, da je kompleks UR v stacionarnem stanju, ki je določeno z enačbo 22. Dodatno pa MM-model privzame, da je diferencial koncentracije proste učinkovine enak diferencialu koncentracije celotne tako vezane kot nevezane učinkovine:

$$\frac{dC_p}{dt} = \frac{dC_{tot}}{dt} \quad \text{Enačba 27}$$

Če predpostavko o stacionarnem stanju QSS-modela (enačba 21) vnesemo v diferencialno enačbo kompleksa UR (enačba 8), ki je osnovna za TMDD-model, dobimo, da je diferencial

kompleksa UR enak nič $\left(\frac{dUR}{dt} = 0\right)$. Ko slednje upoštevamo pri diferenciaciji enačbe 12a $\left(\frac{dC_{tot}}{dt} = \frac{dC_p}{dt} + \frac{dUR}{dt}\right)$, dobimo enačbo 27. Njeno desno stran zamenjamo z enačbo 25, ki je značilna za QSS-model. Za MM-model tako velja (11):

$$\frac{dC_p}{dt} = In(t) - (k_{off} + k_{12}) * C_p(t) - k_{int} * \left(\frac{R_{tot}(t) * C_p(t)}{K_{ss} + C_p(t)}\right) + k_{21} * \frac{U_s(t)}{V_p} \quad \text{Enačba 28}$$

V enačbo 28 lahko vnesemo spremenljivko V_{max} in parameter K_m , za katera velja:

$$V_{max}(t) = R_{tot}(t) * k_{int} \quad \text{Enačba 29a}$$

$$K_m = K_{ss} = \frac{k_{off} + k_{int}}{k_{on}} \quad \text{Enačba 29b}$$

MM-model je torej opisan s sistemom 3 navadnih diferencialnih enačb:

$$\frac{dC_p}{dt} = In(t) - (k_{off} + k_{12}) * C_p(t) - \frac{V_{max}(t) * C_p(t)}{K_m + C_p(t)} + k_{21} * \frac{U_s(t)}{V_p} \quad \text{Enačba 30}$$

$$\frac{dU_s}{dt} = k_{12} * C_p(t) * V_p - k_{21} * U_s(t) \quad \text{Enačba 31}$$

$$\frac{dR_{tot}}{dt} = k_{int} - (k_{int} - k_{deg}) * \left(\frac{R_{tot}(t) * C_p(t)}{K_m + C_p(t)}\right) - k_{deg} * R_{tot}(t) \quad \text{Enačba 32}$$

Pri tem veljajo začetni pogoji:

$$C_p(0) = \frac{D}{V_p}; \quad U_s(0) = 0; \quad R_{tot}(0) = R_0 = \frac{k_{int}}{k_{deg}} \quad \text{Enačbe 33(a, b, c)}$$

Z razliko od parametra V_{\max} pri splošni Michaelis-Mentenovi kinetiki V_{\max} v MM-modelu ni konstantna, temveč se časovno spreminja, saj je odvisna od spremenljivke $R_{\text{tot}}(t)$ ($V_{\max} = f(R_{\text{tot}}(t))$). Vsi obravnavani modeli so povzeti v tabeli I.

Tabela I: Matematičen zapis in obravnavani parametri razvitih farmakokinetičnih modelov.

| PK model | Matematični zapis modela | Parametri modela | Izpeljave |
|----------|--|---|-----------|
| TMDD | $\bullet \frac{dC_p}{dt} = I_n(t) - (k_{el} + k_{12}) * C_p(t) + k_{21} * \frac{U_2(t)}{V_p} - k_{on} * R(t) * C_p(t) + k_{off}$ $\bullet \frac{dU_2}{dt} = k_{12} * C_p(t) * V_p - k_{21} * U_2(t)$ $\bullet \frac{dR}{dt} = k_{int} - k_{deg} * R(t) - k_{on} * R(t) * C_p(t) + k_{off} * UR(t)$ $\bullet \frac{dUR}{dt} = k_{on} * R(t) * C_p(t) - (k_{off} + k_{int}) * UR(t)$ | $k_{el}, V_p,$ $k_{on}, k_{off},$ $k_{deg}, k_{int},$ $k_{12}, k_{21},$ R_0 | / |

| | | | |
|------------|--|--|------------------------------------|
| <p>QE</p> | <ul style="list-style-type: none"> • • • • | <p> $k_{el}, V_p,$ $K_D, k_{deg},$ $k_{int}, k_{12},$ k_{21}, R_0 </p> | $p = \frac{k_{off}}{k_{on}}$ |
| <p>QSS</p> | <ul style="list-style-type: none"> • • • • | <p> $k_{el}, V_p,$ $K_{SS}, k_{deg},$ $k_{int}, k_{12},$ k_{21}, R_0 </p> | $\frac{k_{off} + k_{deg}}{k_{on}}$ |

| | | | |
|-----------------------|------------|--|--|
| MM^a | • • | $\frac{dR_{tot}}{dt} = k_{int} - (k_{tot} - k_{deg}) * \left(\frac{R_{tot}(t) * C_p(t)}{K_m + C_p(t)} \right) - k_{deg} * R_{tot}(t)$ | $k_{el}, V_p,$ $K_m, k_{deg},$ $k_{int}, k_{12},$ k_{21}, R_0 |
|-----------------------|------------|--|--|

^a - V_{max} je izražen kot $R_{tot}(t) * k_{int}$.

1.4 Eritropoetin

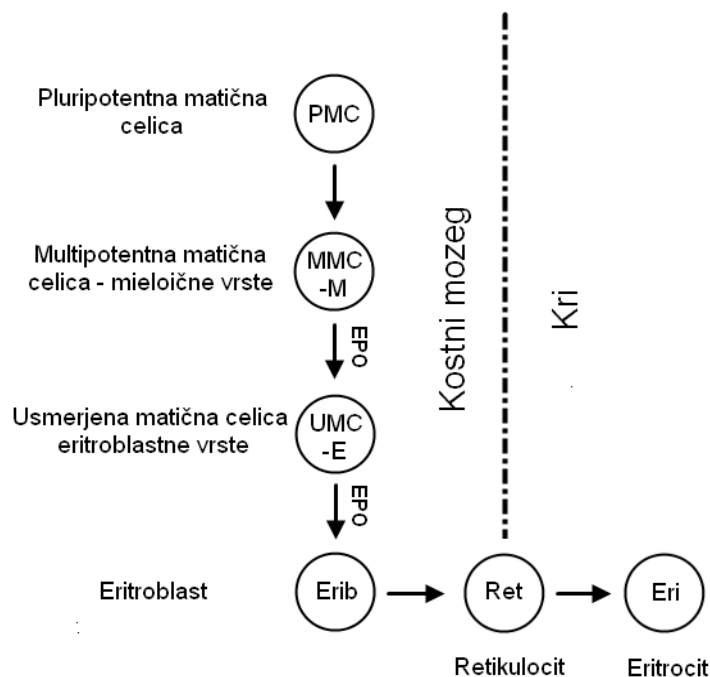
Eritropoetin (Epo) je hematopoetski rastni faktor, ki ga uvrščamo tako med citokinine kot med hormone. Stimulira in regulira eritropoezo, to je proces nastajanja eritrocitov ali rdečih krvnih celic. Pri tem potekata dva procesa hkrati: delitev (proliferacija) in dozorevanje (diferenciacija) predhodnikov eritrocitov. Eritrociti v telesu opravljajo nalogo prenašanja kisika iz pljuč v periferna tkiva in ogljikovega dioksida iz tkiv v pljuča. V povprečju ima odrasla oseba $2,3 * 10^{13}$ eritrocitov in njihova življenjska doba je približno 120 dni. V človeškem telesu dnevno nastane 2,5 milijard eritrocitov (12, 13).

Epo je glikoprotein s 165-aminokislinsko dolgo polipeptidno verigo, na kateri so 4 glikozilacijska mesta (3 preko dušikovega in 1 preko kisikovega atoma) in dve disulfidni vezi. Sladkorji zavzamejo 38 % masni delež molekulske mase eritropoetina in med drugim vsebujejo sialično kislino, ki daje molekuli kisle lastnosti (4).

Biološka razpolovna doba endogenega eritropoetina je 4–6 ur. Večinoma se sintetizira v ledvicah, in sicer v peritubularnih intersticijskih celicah korteksa in zgornjega dela medule ledvic. V manjši meri se sintetizira tudi v jetrih. Slednja pot je pomembna pri fetusu. Epo ni shranjen v veziklih, ki bi se ob morebitnem dražljaju sprostil, temveč je *de novo* sintetiziran. Proces nastajanja je odvisen in reguliran s koncentracijo kisika v okolici celic proizvajalk. Hipoksija spodbuja sintezo eritropoetina, na drugi strani pa jo povečana koncentracija kisika zavira. V povprečju se v človeški plazmi koncentracija eritropoetina giblje od 10 do 30 mIU/mL. Ob hipoksičnih stanjih pa se koncentracije povečajo za 100–1000-krat (4, 12).

Poleg eritropoetina na eritropoezo vpliva veliko rastnih in diferenciacijskih dejavnikov ter citokininov. Zaradi tega je mehanizem regulacije dokaj zapleten. Na sliki 3 je prikazan proces

zorenja in diferenciacije od pluripotentne matične celice do eritrocita. Epo deluje predvsem na usmerjene matične celice eritroblastne vrste (UMC-E) in eritroblaste. Je nujno potreben za preživetje teh celic. Z vezavo na receptorje za eritropoetin (EpoR) preprečuje apoptozo celic in pospešuje njihovo diferenciacijo, proliferacijo ter zorenje (14). Poleg eritropoeze ima Epo še druge fiziološke učinke, kot je povečana produkcija endotelija, povečan nivo izločanja renina, angiogeneza, hipertenzija, proliferacija gladkih mišičnih celic vaskularnega endotelija in nevrozaščitno ter kardioprotektivno delovanje. Ugotovljeno je, da imajo tudi endoteljske, živčne in mielomske celice izražene receptorje na celični površini (4, 12).



Slika 3: Razvoj eritrocitov iz pluripotentne matične celice: Pluripotentna matična celica (PMC) se razvije v multipotentno matično celico mieloide vrste (MMC-M) (ang. myeloid stem cell), ki se nato postopoma razvije v usmerjeno matično celico eritroblastne oziroma rdeče vrste (UMC-E) (ang. colony-forming unit erythroid – CFU-E). V naslednji stopnji razvoja nastane eritroblast (Erib), ki je skupno ime za pronormoblast, bazofilni normoblast, polikromatični normoblast in ortokromatični normoblast. Ortokromatični normoblast izloči jedro in dozori v retikulocit (Ret), ki po določenem času pride v kri. V krvi retikulocit približno po enem dnevu dozori v eritrocit (Eri) (13).

EpoR spada v naddružino hematopoetskih citokinskih receptorjev. Je glikoziliran in fosforiliran transmembranski protein z molekularno maso od 72 do 78 kDa. V največji meri je izražen na površini usmerjenih matičnih celic eritroblastne vrste (UMC-E) in proeritroblastih. Število EpoR se tekom diferenciacije in zorenja eritroidne celice zmanjšuje. V končni stopnji retikulociti in eritrociti nimajo izraženih nobenih receptorjev za eritropoetin. Epo poveže dva EpoR, da tvorita homodimer. Spremeni se konformacijska struktura receptorja znotraj celice,

kar je pomembno za aktivacijo številnih signalnih poti (npr. JAK-2-tirozin-kinazo in STAT5) (4, 14).

Eritropoetin se v klinične namene uporablja pri:

- zdravljenju anemij (kronična odpoved ledvic, nekateri tumorji, prezgodnje rojstvo, okužba s HIV, kemoterapija in/ali radioterapija itd.),
- avtolognih transfuzijah (Epo poveča koncentracijo hemoglobina nad normalno vrednost),
- potencialnem zdravljenju akutne odpovedi ledvic, poškodbah živčnih celic in srčnem infarktu (4).

Z odkritjem gena za eritropoetin in z razvojem biotehnološkega inženiringa so se odprle nove možnosti za zdravljenje anemij in drugih bolezni, povezanih z motnjo eritropoeze. Poznamo več rekombinantnih eritropoetinov (rEpo):

- rEpo alfa, beta in delta (skupno ime epoetini),
- darbepoetin alfa oziroma novi eritropoezo-stimulirajoči protein (ang. novel erythropoiesis stimulating protein – NESP) in
- stalni aktivator eritropoetinskega receptorja ali CERA (ang. continuous erythropoietin receptor activator).

Epoetini se med seboj razlikujejo v izoobliki iste biološke učinkovine. Razlikujejo se v zgradbi sladkornih verig in posledično tudi v farmakokinetičnih in farmakodinamičnih lastnostih. Darbepoetin alfa je analog eritropoetina. S pomočjo točkovne mutageneze so spremenili genski zapis za rEpo tako, da so na osnovno polipeptidno verigo uvedli dodatni dve N-glikozilacijski mesti. S tem ima darbepoetin alfa 6 glikozilacijskih mest in zaradi tega je v primerjavi z epoetini hiperglikoziliran. Te strukturne lastnosti mu v primerjavi z epoetinom omogočajo večjo učinkovitost, saj ima 3-krat daljšo biološko razpolovno dobo in vsaj 2-krat večjo površino pod plazemsko koncentracijsko krivuljo (AUC) pri intravenski aplikaciji (4, 15). CERA je rekombinantno pridobljeni epoetin beta, na katerega je kovalentno vezan linearni metoksi-polietilenglikol. V primerjavi z epoetinom beta ima 45-krat nižjo afiniteto za EpoR. Z nižjo afiniteto je tudi delež učinkovine vezane na receptor nižji, zato se v manjši meri internalizira ter metabolizira. To mu omogoča daljšo razpolovno dobo in zato ima večjo učinkovitost (16).

Mehanizem metabolizma in eliminacije eritropoetina še vedno ni v celoti raziskan. Večji delež plazemskega očistka eritropoetina predstavlja privzem v eritroidne matične celice in ostale celice, ki imajo izražene EpoR. Po vezavi eritropoetina na EpoR se kompleks Epo-

EpoR prenese v celico in razgradi. V določeni meri se Epo metabolizira in/ali izloči tudi v jetrih in ledvicah (15, 17).

1.5 Farmakokinetični/farmakodinamični (PK/PD) modeli

Farmakodinamični modeli opisujejo farmakološki in tudi toksikološki učinek zdravila. V primeru, da so plazemske koncentracije učinkovine v stacionarnem stanju, lahko z dokaj enostavnimi farmakodinamičnimi modeli, kot so model stalnega učinka, linearni model, logaritemski model, model maksimalnega učinka in sigmoidni model maksimalnega učinka, vrednotimo in analiziramo delovanje učinkovin. Če zaradi določenih razlogov ne moremo doseči stacionarnega stanja, lahko povezavo med posameznim odmerkom, koncentracijo učinkovine v plazmi in njenim učinkom določamo s pomočjo farmakokinetičnega/farmakodinamičnega modeliranja (ang. pharmacokinetic/pharmacodynamic – PK/PD modeling) (18).

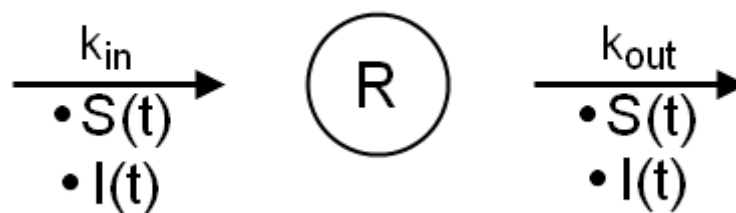
Glede na farmakokinetični profil lahko učinek nastopi tudi z zamikom, kar se odraža s histerezo pri podajanju odvisnosti učinka od koncentracije učinkovine. V tem primeru povezavo med koncentracijo učinkovine in njenim farmakološkim odgovorom obravnavamo z vidika 4 pristopov:

I. POSREDNA ALI NEPOSREDNA POVEZAVA

Vrednoti in analizira kinetiko nastopa koncentracijskega ravnotežja med plazmo in prostorom učinka (ang. effect compartment). Če se ravnotežje hitro vzpostavi, lahko uporabimo model neposredne povezave med učinkom in koncentracijo učinkovine v plazmi. V nasprotnem primeru v PK/PD model vnesemo hipotetični prostor učinka, ki je s centralnim prostorom povezan s kinetiko prvega reda (18).

II. POSREDNI ALI NEPOSREDNI ODGOVOR

Če so postreptorski procesi za nastanek odgovora hitri, farmakološki odgovor na učinkovino v prostoru učinka nastopi takoj – neposredni odgovor. Korelacijo med učinkom in koncentracijo učinkovine opišemo z zgoraj naštetimi farmakodinamičnimi modeli. Pri posrednih odgovorih postreptorski procesi potekajo počasneje, zato se pojavi časovni zamik med delovanjem učinkovine v prostoru učinka in njenim učinkom. Posredne farmakološke odgovore obravnavamo kot stimulacijo ali inhibicijo fizioloških procesov, kot sta nastajanje in eliminacija mediatorja fiziološkega odgovora. Na sliki 4 je prikazana splošna shema posrednega odgovora učinkovine.



Slika 4: Splošna shema posrednega odgovora. k_{in} označuje hitrostno konstanto 0. reda in določa kinetiko nastajanja mediatorja fiziološkega odgovora. k_{out} je hitrostna konstanta 1. reda in predstavlja proces njegovega odstranjevanja. R označuje fiziološki odgovor. Učinkovina lahko deluje na nastajanje mediatorja s stimulacijo ($S(t)$) ali inhibicijo ($I(t)$). Lahko pa podobno deluje na njegovo odstranjevanje.

Delovanje učinkovine merimo z opazovanjem fiziološkega odgovora (R), ki ga lahko opišemo z naslednjim matematičnim izrazom:

$$\frac{dR}{dt} = k_{in} \cdot S(t) + I(t) - k_{out} \cdot R(t) + S(t) + I(t) \quad \text{Enačba 34}$$

V enačbi 34 predpostavimo, da je fiziološki odgovor posledica procesa nastajanja (kinetika 0. reda – k_{in}) in odstranjevanja mediatorja (kinetika 1. reda – k_{out}). Učinkovina deluje na nastajanje mediatorja, tako da ga poveča ($k_{in} \cdot S(t)$) ali zniža ($k_{in} \cdot I(t)$), lahko pa deluje na odstranjevanje mediatorja, podobno ga lahko poveča ($k_{out} \cdot R(t) + S(t)$) ali zniža ($k_{out} \cdot R(t) + I(t)$) (18).

III. MEHKA ALI TRDA POVEZAVA

Mehka povezava velja za PK/PD modele, ki smo jih določili s pomočjo farmakokinetičnih in farmakodinamičnih eksperimentalnih podatkov. Za trdo povezavo velja, da PK/PD modeliramo s pomočjo farmakokinetičnih in *in vitro* farmakoloških podatkov. Slednje pa nato potrdimo z *in vivo* farmakodinamičnimi eksperimentalnimi podatki (18).

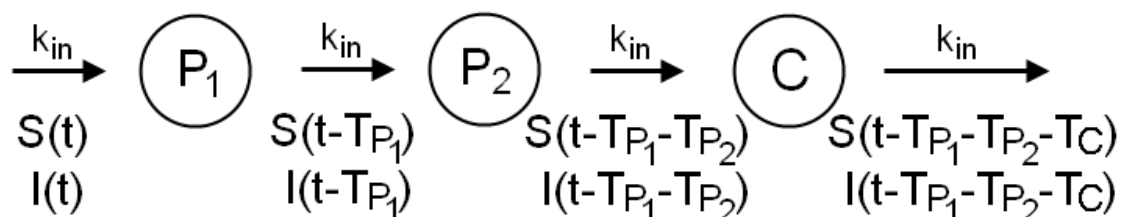
IV. ČASOVNO ODVISNA ALI ČASOVNO NEODVISNA POVEZAVA

Organizem na delovanje učinkovine lahko razvije toleranco ali senzibilizacijo, ki se odraža s spremenjenimi parametri. Parametri, kot so E_{max} , k_{in} in k_{out} , izkazujejo časovno odvisnost, zaradi tega pravimo časovno odvisna povezava. Pri časovno neodvisni povezavi pa so ti parametri konstantni in organizem ne razvije tolerance oziroma senzibilizacije (18).

1.5.1 Model posrednega odgovora življenjske dobe

Za opis zakasnjene farmakološkega delovanja učinkovine, ki vpliva na rast in posredno na populacijo zrelih celic (označene s črko C), so Krzyzanski in sodelavci razvili

farmakokinetični/farmakodinamični model posrednega odgovora življenjske dobe (ang. lifespan based indirect response – LIDR) (19). Dodatno ima lahko model vključene prostore, ki opisujejo stopnje zorenja in delitve predhodnikov celic C (označeni s črko P). Na sliki 5 je prikazan primer, kako celice med razvojem verižno prehajajo med prostori. Število prostorov (P in C) ter mesto delovanja učinkovine je odvisno od fiziologije zorenja posameznih vrst celic in njenih predhodnikov, od mehanizma delovanja učinkovine in od same kompleksnosti modela. Pri enostavnih modelih uporabimo namreč manjše število predhodnih prostorov.



Slika 5: Primer modela posrednega odgovora življenjske dobe z 2 prostoroma predhodnikov celic C (P_1 , P_2) in z 1 prostorom zrelih celic C. Celice nastajajo oziroma prihajajo v prostor s hitrostno konstanto 0. reda (k_{in}). Prostor zaradi dozorevanja in staranja zapustijo z enako kinetiko $k_{in}(t-T)$, kot so prišle v prostore s časovnim zamikom T (T_{P1} , T_{P2} , T_C). Na sliki je prikazan primer, ko učinkovina deluje (stimulativno ali inhibicijsko) le na nastajanje predhodnikov P_1 . Učinek se na populaciji celic C odraža s časovnim zamikom $T = T_{F1} + T_{F2}$. V primeru stimulacije je kinetika $k_{in} * S(t - T_{F1} - T_{F2})$, v primeru inhibicije pa $k_{in} * I(t - T_{F1} - T_{F2})$. Po času T_C , ki predstavlja življenjsko dobo, celice z enako kinetiko, kot so prišle, tudi zapustijo prostor C s kinetiko $k_{in} * S(t - T_{F1} - T_{F2} - T_C)$ ali $k_{in} * I(t - T_{F1} - T_{F2} - T_C)$.

Model posrednega odgovora življenjske dobe privzame, da celice ne zapuščajo prostorov s kinetiko 1. reda kot pri splošnem modelu posrednega odgovora, temveč jih zapuščajo zaradi zorenja in prehoda v druge prostore ali zaradi staranja odmrejo. Torej kinetika zapuščenja celic iz prostorov (k_{out}) je enaka kinetiki prihajanja v prostore pred časom T ($k_{out}(t) = k_{in}(t - T)$). Matematično opišemo prostor C z diferencialno enačbo 35:

$$\frac{dC}{dt} = k_{in}(t) - k_{in}(t - T_C) \quad \text{Enačba 35}$$

T_C v enačbi 35 predstavlja čas zadrževanja celice v prostoru C. Model predpostavlja, da celice prihajajo v prostore s kinetiko 0. reda (k_{in}) in da je čas zadrževanja celice v prostorih za vse celice enak. Za začetno stanje (C_0), ko ni prisotne učinkovine, velja naslednje:

$$\frac{dC_0}{dt} = k_{in}(t) - k_{in}(t - T_C) = 0 \quad \text{Enačba 36}$$

Če bi se v določenem trenutku ustavilo prihajanje celic v prostor C, bi celice (C_0) s kinetiko k_{in} zapustile prostor v času T_C . Vrednost začetne koncentracije (C_0) je zato enaka:

$$C_0 = k_{tm} * T_C \quad \text{Enačba 37}$$

V modelu LIDR učinkovine delujejo tako, da s stimulacijo $S(t)$ povečajo ali z inhibicijo $I(t)$ zmanjšujejo prihajanje celic v prostor C:

$$\frac{dC}{dt} = k_{tm} * S(t) * I(t) - k_{tm} * S(t - T_C) * I(t - T_C) \quad \text{Enačba 38}$$

Po času zadrževanja T_C celice z enako kinetiko, kot so prihajale v prostor, ga tudi zapuščajo. To opišemo z zakasnitveno funkcijo stimulacije $S(t - T_C)$ in inhibicije $I(t - T_C)$. Za stimulacijo in inhibicijo se uporablja model maksimalnega učinka:

$$S(t) = 1 + \frac{S_{max} * C(t)}{SC_{50} + C(t)} \quad \text{Enačba 39}$$

$$I(t) = 1 - \frac{I_{max} * C(t)}{IC_{50} + C(t)} \quad \text{Enačba 40}$$

$C(t)$ predstavlja koncentracijo učinkovine v času t , S_{max} označuje največji možni učinek stimulansa, SC_{50} in IC_{50} predstavljata koncentracijo stimulansa in inhibitorja, ko je učinek enak polovici maksimalnega. Maksimalni učinek inhibitorja je popolna ustavitev prihajanja celic ($I_{max} = 1$) (19).

2 NAMEN DELA

V programskem okolju ADAPT 5 bomo implementirali model tarčno posredovane farmakokinetike (TMDD), model aproksimacije ravnotežnega stanja vezave (QE), model aproksimacije stacionarnega stanja vezave (QSS) in model Michaelis-Mentenove aproksimacije (MM). S temi modeli bomo simulirali plazemske koncentracijske profile rekombinantnega humanega eritropoetina na podganah. S spreminjanjem vrednosti parametrov bomo skušali ugotoviti, v katerih primerih poenostavljeni modeli odstopajo od kinetike TMDD in vzroke za to.

S simulacijo TMDD-modela bomo pridobili eksperimentalne podatke. Pri tem bomo uporabili ocene parametrov, ki so jih dobili Woo in sodelavci pri modeliranju kinetike humanega rekombinantnega eritropoetina na podganah (22). Na podlagi teh eksperimentalnih podatkov bomo s programskim paketom ADAPT 5 z metodo največjega verjetja (ML) ocenjevali parametre vseh 4 modelov. Izvedli bomo dve simulaciji z različno porazdeljenimi časi vzorčenja. Primerjali bomo, kako eksperimentalni podatki in modeli vplivajo na ocenjevanje parametrov.

S povezavo QSS-modela in modela posrednega odgovora življenjske dobe (LIDR) bomo razvili PK/PD model za eritropoetin na podganah. Skušali bomo ugotoviti vpliv enkratnega odmerka rekombinantnega humanega eritropoetina na koncentracijo eritrocitov v krvnem obtoku. Ob tem bomo spremljali vpliv velikosti odmerka in različne vrednosti inhibicijskega parametra IC_{50} na koncentracijo eritrocitov.

3 METODE

3.1 Programska oprema

Programsko opremo uporabljamo kot orodje pri modeliranju naravnih pojavov. V pomoč nam je predvsem pri reševanju matematičnih modelov z numeričnimi metodami. Pri diplomski nalogi smo uporabljali programski paket ADAPT 5, ki je namenjen modeliranju farmakokinetičnih in farmakodinamičnih sistemov. Z njim je možno izvajati tako individualno PK/PD analizo kot populacijsko PK/PD analizo. Program je zelo fleksibilen, saj raziskovalcu omogoča prosto pisanje modelov, ki so lahko primerni za posamezno analizo. Sistem navadnih diferencialnih enačb modela rešuje numerično s pomočjo vgrajene funkcije LSODA (ang. Livermore Solver for Ordinary Differential equation with Automatic method switching for stiff and nonstiff problems), robustnim programom, ki samodejno ugotavlja, ali je sistem diferencialnih enačb tog ali ne in temu primerno izbere algoritem za numerično integracijo (20).

Za ocenjevanje parametrov modela ima ADAPT 5 možnost izbire različnih statističnih metod, kot so:

- utežena metoda najmanjših kvadratov (ang. weighted least squares – WLS),
- metoda največjega verjetja (ang. maximum likelihood – ML),
- metoda posplošenih najmanjših kvadratov (ang. generalized least squares – GLS),
- metoda maksimalne posteriorne verjetnosti (ang. maximum a posteriori probability – MAP) (20).

Pri ocenjevanju parametrov smo uporabili metodo največjega verjetja – ML, za katero je značilno, da določi tisto vrednost parametra modela, ki najverjetneje opiše eksperimentalne podatke. Postavljena je funkcija verjetja (ang. likelihood function), ki prikazuje verjetje, da so dani eksperimentalni podatki rezultat določenega parametra θ , v odvisnosti od parametra θ . Parameter θ je običajno vektor z n elementi θ_i ($i = 1, 2, 3, \dots, n$), zato je verjetnostna funkcija prikazana kot površina nad n -dimenzionalnim prostorom. Metoda ML določi tiste vrednosti parametra modela, ki imajo maksimalno funkcijo verjetja (21).

V programu ADAPT 5 metoda ML deluje tako, da poišče minimum negativnega naravnega logaritma funkcije verjetja (ang. negative log likelihood – O_{NLL}):

$$O_{NLL} = l * m * \ln(2 * \pi) / 2 + \frac{1}{2} * \sum_{i=1}^l \sum_{j=1}^m \left[\frac{(z_i(t_j) - y_i(\theta, t_j))^2}{g_i(y_i(\theta, t_j), \beta)} + \ln g_i(y_i(\theta, t_j), \beta) \right]$$

Enačba 41

V enačbi 41:

- l predstavlja število odzivov i (y_i , z_i , g_i itd.),
- m predstavlja število eksperimentalnih podatkov oziroma število meritev j za določen odziv (t_j),
- $y_i(\theta, t_j)$ predstavlja odziv modela v času t_j , ki je odvisen od vektorja parametrov θ . Vektor θ predstavlja nabor parametrov modela (α) in nabor začetnih vrednosti (c) ($\theta = [\alpha | c]^T$),
- $z_i(t_j)$ predstavlja dobljene eksperimentalne podatke, katere smatramo kot vsoto odziva modela $y_i(\theta, t_j)$ in slučajne (naključne) napake $e_i(t_j)$,
- $g_i(y_i(\theta, t_j), \beta)$ predstavlja funkcijo variance slučajne napake, ki je vnesena v model in je odvisna od odziva modela $y_i(\theta, t_j)$ ter vektorja parametrov β (20).

Minimalizacija objektivne funkcije O_{NLL} poteka po Nelder-Mead Simplex algoritmu. Potrebno je določiti začetne vrednosti parametrov, da jih nato algoritem z iteracijo spreminja, dokler ni dosežen minimum. Kriterij za ustavitev Nelder-Mead iterativnega postopka je določen z enačbo 42:

$$\left| \frac{O_{NLL}(\theta_k) - 1}{O_{NLL}(\theta_{k-1})} \right| \leq MZ \quad \text{Enačba 42}$$

MZ je minimalna zahteva, ki ima v osnovni konfiguraciji ADAPT-a vrednost 10^{-6} . Pri iterativnem spreminjanju parametrov je postavljena omejitev, da so parametri vedno pozitivni (20).

3.2 Razvoj modelov v programskem okolju ADAPT 5

V okolju ADAPT 5 smo implementirali TMDD-, QE-, QSS- in MM-farmakokinetični model za eritropoetin kot modelno učinkovino. Navedeni so v prilogi B. V modelih so količine podane na enoto telesne mase. Pri vnosu učinkovine v sistem smo vnesli pretvorbo količinskih enot, in sicer iz mednarodnih enot (IU) v nanomole (nmol). Pri podajanju odziva plazemske koncentracije proste učinkovine pa smo pretvorili iz nanomolov na liter [nmol/L] v mednarodne enote na mililiter [mIU/mL]. Enote smo spremenili s pomočjo specifične aktivnosti eritropoetina, ki znaša 160.000 IU/mg proteina, in molekulske mase eritropoetina, ki je 30,4 kDa (22). Pri tem smo dobili naslednjo zvezo:

$$1 \text{ nmol} = 4864 \text{ IU}$$

Enačba 43

Intraindividualno variabilnost smo opisali s Gaussovo porazdelitvijo verjetnosti (normalna gostota verjetnosti). Uporabili smo naslednjo funkcijo rezidualne variance:

$$V_i = (SD_{\text{inter}} + SD_{\text{slope}} * y_i)^2 \quad \text{Enačba 44}$$

V enačbi 44 predstavlja V_i funkcijo variance – $g_i(y_i(\theta, t_j), \beta)$. SD_{inter} označuje aditivno variabilnost, SD_{slope} pa proporcionalno. Oba parametra sta vključena v vektorju β . Z y_i je izražen odziv farmakokinetičnega modela.

Parametri obravnavanih modelov so naslednji:

- k_{el} – hitrostna konstanta eliminacije,
- V_p – volumen centralnega prostora na kilogram telesne mase,
- k_{on} in k_{off} – hitrostni konstanti vezave in disociacije učinkovine na/z receptorja pri TMDD-modelu,
- K_D – konstanta ravnotežja pri QE-modelu,
- K_{ss} – konstanta stacionarnega stanja pri QSS-modelu,
- K_m – konstanta Michaelis-Mentenove kinetike pri MM-modelu,
- k_{deg} – hitrostna konstanta razgradnje oziroma metabolizma (ang. degradation) prostega receptorja,
- k_{int} – hitrostna konstanta internalizacije,
- k_{12} in k_{21} – hitrostni konstanti prehoda učinkovine iz centralnega v stranski prostor in obratno ter
- R_0 – začetna koncentracija prostega receptorja v času $t = 0$.

Pri modeliranju nismo vključili endogene sinteze učinkovine, saj je koncentracija endogenega eritropoetina pri podganah zelo nizka. Woo in sodelavci ga v raziskavi z analizo metodo, ki je imela mejo kvantifikacije (LOQ) 2 mIU/mL, niso zaznali. Tudi koncentracije vnesene učinkovine so zelo visoke, kar nam omogoča zanemarjenje endogene učinkovine. Začetne

vrednosti matematičnih modelov smo zato določili z $C_p(0) = \frac{D}{V_p}$, $U_s(0) = 0$, $R(0) = R_0$ in $UR(0) = 0$. Konstanto sinteze receptorja (k_{sin}) smo obravnavali kot sekundarni parameter, in sicer $k_{\text{sin}} = k_{\text{deg}} * R_0$.

3.3 Simulacije in primerjava odzivov uporabljenih PK modelov

Na podlagi v programu ADAPT 5 implementiranih modelov (TMDD, QE, QSS in MM) smo simulirali farmakokinetične profile eritropoetina na podganah za 4 različne odmerke (10, 100, 1350 in 4050 mednarodnih enot na kilogram telesne mase – IU/kg). Osnovne vrednosti (OV) parametrov in LOQ smo privzeli iz raziskave, kjer so Woo in sodelavci vrednotili farmakokinetiko in farmakodinamiko rHuEpo na podganah z modelom tarčno posredovane farmakokinetike (22). Osnovne vrednosti so navedene v tabeli II. Izvedli smo kombinacijo simulacij, kot prikazuje tabela III. Odzive modelov smo med seboj primerjali in ugotavljali, v katerih primerih odstopajo od osnovnega TMDD-modela. Za lažjo primerjavo smo profile odzivov simulirali brez intraindividualne varabilnosti (varianci napake smo določili vrednost nič – $y_i(t) = \hat{y}_i(t; \theta, \epsilon) = \hat{y}_i(t; \theta)$). Pri modelih z osnovnimi parametri smo dodatno opazovali, kakšen je odziv spremenljivk, kot so koncentracija kompleksa rHuEpo-EpoR, koncentracija prostega receptorja EpoR in koncentracija celotnega receptorja EpoR.

Tabela II: Osnovni parametri, ki smo jih uporabili za simulacijo farmakokinetičnih profilov TMDD-modela in njegovih aproksimacij. Privzeti so iz študije, ki so jo izvedli Woo in sodelavci (22).

| Osnovne vrednosti farmakokinetični parametrov (OV): | | | |
|---|---------|-----------------------------------|----------|
| k_{el} [1/h] | 0,2256 | V_p [L/kg] | 0,05694 |
| k_{on} [L/nmol/h] | 11,32 | k_{off} [1/h] | 1,297 |
| K_D [nmol/L] | 0,1146 | K_{ss}, K_m [nmol/L] | 0,1873 |
| k_{deg} [1/h] | 0,1133 | k_{int} [1/h] | 0,8228 |
| k_{12} [1/h] | 0,2092 | k_{21} [1/h] | 0,1721 |
| R_0 [nmol/L] | 0,06320 | k_{sin} [nmol/L/h] ^a | 0,007161 |

a – Sekundarni parameter.

Tabela III: Vrednosti parametrov relativno na osnovno vrednost (OV), ki smo jih uporabili za primerjavo odzivov modelov. Parametrov V_p , k_{12} in k_{21} nismo spreminjali, zato imajo pri vsaki simulaciji osnovno vrednost.

| Simulacija: | K_{el} [OV] | K_{on} [OV] | K_{off} [OV] | K_{deg} [OV] | K_{int} [OV] | R_0 [OV] |
|-------------|---------------|---------------|----------------|----------------|----------------|------------|
| 1: | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 2: | 0,5 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 3: | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 4: | 1 | 0,1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 5: | 1 | 10 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 6: | 1 | 1 | 0,1 | 1 | 1 | 1 |
| 7: | 1 | 1 | 10 | 1 | 1 | 1 |
| 8: | 1 | 1 | 1 | 0,5 | 1 | 1 |
| 9: | 1 | 1 | 1 | K_{int} | 1 | 1 |
| 10: | 1 | 1 | 1 | 1 | 0,1 | 1 |
| 11: | 1 | 1 | 1 | 1 | 0,5 | 1 |
| 12: | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 |
| 13: | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0,5 |

| | | | | | | |
|-----|---|---|---|---|---|----|
| 14: | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 |
| 15: | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 10 |

Plazemske profile smo simulirali vse do časa 120 ur, kjer smo dobili 10.000 opazovanih točk. Na grafih so podane koncentracije le do 100 ur, saj v večini primerov v tem času pade koncentracija učinkovine pod mejo kvantifikacije in ni smotno podajati njene koncentracije za kasnejše čase.

3.3.1 Veljavnost predpostavke QE- in QSS-modela

Modela sta osnovana na predpostavki, da kinetika vezave učinkovine na receptor v primerjavi z drugimi linearnimi procesi poteka zelo hitro in zato privzamemo, da je kompleks – UR neprestano v ravnotežju z učinkovino in receptorjem. Za QE velja enačba 11, za QSS pa enačba 22. t_0 je enak srednjemu času zadrževanja učinkovine v centralnem prostoru (z upoštevanjem le linearne eliminacije) (23):

$$t_0 = \frac{1}{k_{el}} \quad \text{Enačba 45}$$

Če začetno koncentracijo učinkovine določimo s $C_p(0) = C_0 = \frac{D_0}{V_p}$, prehaja receptor iz prostora R v prostor UR s kinetiko $C_0 * k_{on}$. Srednji čas (τ_v) zadrževanja receptorja v prostoru R po aplikaciji odmerka D_0 je izračunan z enačbo 46 (10):

$$\tau_v = \frac{1}{C_0 * k_{on}} \quad \text{Enačba 46}$$

Če velja $\tau_v \ll t_0$, potem vezava učinkovine na receptor poteka hitreje kot eliminacija učinkovine. Sklepamo, da je to osnovni pogoj za uporabo QE- in QSS-modela. S faktorjem ϵ sta obravnavani ti dve kinetiki (vezava učinkovine na receptor in linearna eliminacija učinkovine):

$$\epsilon = \frac{\tau_v}{t_0} = \frac{k_{el}}{C_0 * k_{on}} \quad \text{Enačba 47}$$

Faktor ϵ lahko uporabimo kot kriterij za izbiro modela, vendar ga pri *in vivo* študijah večkrat težko določimo, saj je definiran s parametroma V_p in k_{on} , ki sta pogosto neznanata (10).

QE- in QSS-modela se razlikujeta pri določanju ravnotežja UR. QSS-model pri tem upošteva kinetiko internalizacije, medtem ko je QE ne upošteva. Primerjali smo vrednosti parametra k_{int} s k_{off} in jih podali v tabeli VI.

Drugi pogoj, ki zagotavlja natančnost obeh modelov, je po singularni perturbacijski teoriji ta, da mora biti koncentracija prostega receptorja nižja oziroma kvečjemu primerljiva koncentraciji proste učinkovine. Če koncentracija prostega receptorja preseže koncentracijo

proste učinkovine, napovedi QE- in QSS-modelov niso natančne, zato je potrebno uporabiti splošen TMDD-model (10).

3.3.2 Veljavnost predpostavke MM-modela

MM-model izhaja iz QSS-modela. Dodatno predpostavlja, da je $\frac{dC_{tot}}{dt} = \frac{dC_p}{dt}$ (enačba 27)

(11). Predpostavka velja pod pogojem, da je člen $\frac{R_{tot} * K_{ss}}{(K_{ss} + C_p)^2}$ v enačbi 48 dovolj majhen, da ga lahko zanemarimo (24).

$$\frac{dC_p}{dt} = \frac{In(t) - (k_{el} + k_{12}) * C_p(t) - \left(\frac{k_{int} * R_{tot}(t)}{K_{ss} + C_p(t)} \right) * C_p(t) + k_{21} * \frac{U_p(t)}{V_p}}{1 + \frac{R_{tot}(t) * K_{ss}}{(K_{ss} + C_p(t))^2}}$$

Enačba 48

Enačba 48 je izpeljana v prilogi C in velja le ob pogoju, da je $\frac{dR_{tot}}{dt} = 0$ oziroma da je

$k_{int} * R_{tot}(t) \gg \left| \frac{dR_{tot}}{dt} \right|$. Določili smo faktor γ , za katerega velja:

$$\frac{R_{tot} * K_{ss}}{(K_{ss} + C_p)^2} = \gamma$$

Enačba 49

Če je $\gamma \ll 1$, potem lahko imenovalc v enačbi 48 zaokrožimo na 1. Enačba se poenostavi v enačbo 30, ki je uporabljena v MM-modelu. Faktor γ je veliko manjši od 1, ko (24):

$$R_{tot} \ll K_{ss}, \quad R_{tot} \ll C_p \quad \text{ali} \quad K_{ss} \ll C_p \quad \text{Enačbe 50 (a, b, c)}$$

Če velja $R_{tot} \ll K_{ss}$ in $\frac{dR_{tot}}{dt} = 0$, sklepamo, da je MM-model enak QSS pri vseh koncentracijah učinkovine (24).

3.4 Ocenjevanje parametrov TMDD-, QE-, QSS- in MM-modela

Za 10 podgan smo simulirali plazemske koncentracije rekombinantnega humanega eritropoetina s TMDD-modelom, v katerega smo vnesli osnovne vrednosti parametrov (tabela II). Simulacijo smo izvedli za intravenski odmerek 100 in 1350 IU/kg. Varianca odziva je bila določena s funkcijo, ki je predstavljena v enačbi 44. Določili smo $SD_{inter} = 0$ in $SD_{slope} = 0,2$. Slednje pomeni, da se napaka eksperimentalnih podatkov porazdeljuje s koeficientom variacije 20 %. Dobljeni simulirani odzivi so v obliki 12 vzorčnih točk, ki predstavljajo eksperimentalne podatke za ocenjevanje parametrov modela. Pri odmerku 1350 IU/kg smo postavili vzorčne točke pri 1., 2., 4., 6., 8., 12., 24., 32., 40., 48., 60. in 72. uri po

aplikaciji odmerka. Pri odmerku 100 IU/kg pa smo jih postavili pri 1., 2., 4., 6., 8., 10., 12., 18., 24., 32., 40. in 42. uri po aplikaciji odmerka, saj plazemske koncentracije rHuEpo pri kasnejših časih padejo pod mejo kvantifikacije (2 mIU/mL) (1. način vzorčenja). V programu ADAPT 5 smo s TMDD-, QE-, QSS- ter MM-modelom iz izračunanih povprečij eksperimentalnih podatkov ocenjevali vrednosti parametrov. Ocenjevali smo za vsak odmerek posebej in pri tem uporabili statistično metodo največjega verjetja (ML). Simulirali smo tudi eksperimentalne podatke, ki vsebujejo več razporejenih vzorčnih točk na začetku aplikacije. Za oba odmerka je vzorčenje potekalo pri 5. in 30. minuti ter pri 1., 2., 4., 6., 8., 12., 18., 24., 32. in 40. uri po aplikaciji (2. način vzorčenje). Na podlagi teh podatkov smo z ocenjevanjem vrednosti parametrov ugotavljali, kako drugačna razporeditev vzorčnih točk vpliva na vrednosti parametrov modelov. Začetne vrednosti parametrov smo določili z 10 % odstopanjem in vsem modelom postavili enake začetne vrednosti. Izjema so parametri, ki so značilni le za posamezne modele (K_D za QE, K_{SS} za QSS in K_M za MM). Te smo znižali za enako relativno vrednost (10 %).

Med seboj smo tudi primerjali, kateri model najbolje opiše simulirane eksperimentalne podatke. Za merilo skladnosti modela z eksperimentalnimi podatki smo uporabili Bayesov informacijski kriterij (BIC) ali Schwarzov kriterij (SC). Določen je z enačbo 51:

$$BIC = 2 * O_{NLL} + (p + q) * \ln(l + m) \quad \text{Enačba 51}$$

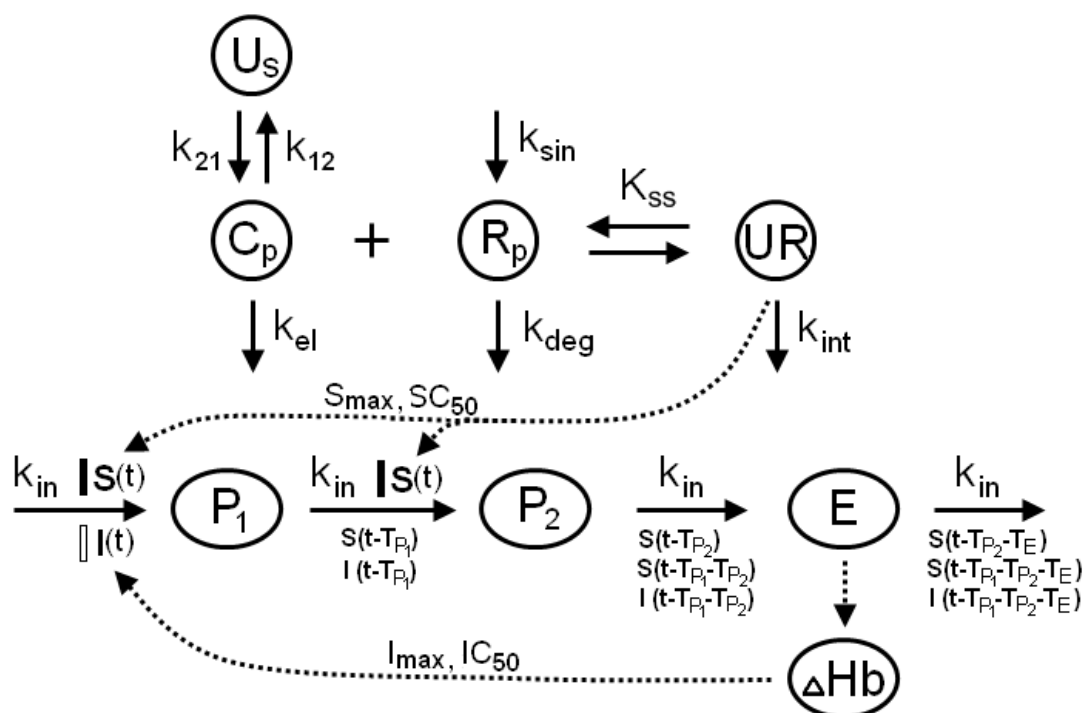
V njej O_{NLL} označuje objektivno funkcijo, ki smo jo z metodo ML uporabili za ocenjevanje parametrov; p označuje število parametrov modela (θ); q število parametrov funkcije variance (β); l predstavlja število odzivov in m predstavlja število eksperimentalnih podatkov oziroma število meritev za določen odziv (20). Ocenam parametrov smo izračunali relativno napako ocene in koeficient variacije (ang. coefficient of variation – CV %). Vrednosti so podane v prilogi Č. Na podlagi ocenjenih vrednosti smo simulirali plazemske profile in na sliki 18 grafično primerjali odzive modelov z eksperimentalnimi podatki.

3.5 Simulacija verižnega PD modela za rekombinantni humani eritropoetin

Razvili smo farmakokinetični/farmakodinamični (PK/PD) model za rekombinantni humani eritropoetin (rHuEpo), kjer smo povezali QSS-asproksimacijo farmakokinetike eritropoetina z modelom posrednega odgovora življenjske dobe. Prikazan je na sliki 6. Da smo se izognili togim diferencialnim enačbam, smo namesto osnovnega TMDD za farmakokinetični model

izbrali QSS-model. Določili smo ga, ker se je najbolje izkazal pri simulaciji TMDD in je enako dobro ocenil parametre kot ostali dve aproksimaciji.

Na sliki 6 C_p označuje koncentracijo prostega rHuEpo v centralnem prostoru [nmol/L]. Ta lahko prehaja v stranski prostor U_s s hitrostnima konstantama k_{12} in k_{21} (1. red) in lahko se eliminira s hitrostno konstanto k_{el} (1. red). rHuEpo se lahko veže na prosti EpoR (R) in skupaj tvorita kompleks rHuEpo-EpoR (UR). QSS-model predpostavlja, da so vse tri količine, rHuEpo, prosti EpoR in kompleks rHuEpo-EpoR, v stacionarnem stanju, ki je določeno s konstanto K_{ss} . EpoR se sintetizira s konstantno hitrostjo ($k_{sin} - 0.$ red) in se metabolizira s hitrostno konstanto k_{deg} (1. red). Kompleks UR lahko disociira nazaj do rHuEpo in prostega receptorja ali pa vstopa v celico (hitrostna konstanta k_{int}).



Slika 6: PK/PD model simulacije farmakološkega odgovora rekombinantnega humanega eritropoetina (rHuEpo). Iz centralnega prostora (C_p) se lahko učinkovina porazdeli v stranski prostor (U_s) s hitrostnima konstantama k_{12} in k_{21} ter eliminira iz sistema s hitrostno konstanto k_{el} . Veže se lahko s prostim receptorjem (R_p) in skupaj tvorita kompleks učinkovina-receptor (UR). K_{ss} predstavlja konstanto stacionarnega stanja kompleksa UR. Receptor se sintetizira s konstantno hitrostjo (k_{sin}) in se razgradi s k_{deg} . Kompleks UR se lahko metabolizira oziroma internalizira v celico s hitrostno konstanto k_{int} . Farmakološki učinek rHuEpo je posredovan s kompleksom UR. Slednji stimulira prihajanje celic eritropoetske vrste v prostoru P_1 in P_2 . Celice verižno prehajajo med prostori s hitrostno konstanto k_{in} . Število eritrocitov (E) vpliva na spremembo koncentracije hemoglobina v krvi (ΔHb), ta pa inhibira prihajanje celic v prostor P_1 .

Model posrednega odgovora življenjske dobe (LIDR) je sestavljen iz treh prostorov:

- P_1 – predhodniki eritroblastnih celic, kot je na primer usmerjena matična celica eritropoetske vrste (UMC-E),
- P_2 – v njem so združeni eritroblasti in retikulociti ter
- E – zreli eritrociti.

Kinetiko nastajanja celic in prehoda celic med prostori opisuje hitrostna konstanta 0. reda k_{in} . Za eritropoezno delovanje smo vzeli kompleks rHuEpo-EpoR (UR), ki stimulatивно deluje tako na nastajanje celic v prostoru P_1 kot na prehod celic iz prostora P_1 v prostor P_2 . Na nastajanje predhodnikov eritroblastov smo vključili inhibitorno delovanje hemoglobina (Hb), ki na eritropoezo vpliva preko negativne povratne zanke. Pri tem smo retikulocitni hemoglobin zanemarili.

Matematični model farmakokinetike smo opisali z enačbami QSS-modela (enačbe 14, 23, 25 in 26). Farmakodinamiko pa smo vrednotili z enačbo:

$$\frac{dE}{dt} = k_{in} * S(t - T_{P_2}) * S(t - T_{P_1} - T_{P_2}) * I(t - T_{P_1} - T_{P_2}) - k_{in} * S(t - T_{P_2} - T_E) * S(t - T_P) \quad \text{ba} \quad \text{Enačba 52}$$

V enačbi 52 predstavlja E prostor eritrocitov z začetno vrednost E_0 . Njegovo vrednost smo obravnavali z enotami 10^4 celic/ μ L. T_{P_1} , T_{P_2} in T_E predstavljajo čas zadrževanja celice v urah v prostoru P_1 , P_2 in E. Stimulacijo in inhibicijo eritropoeze smo opisali z modelom maksimalnega učinka:

$$S(t) = 1 + \frac{S_{max} * UR(t)}{SC_{50} + UR(t)} \quad \text{Enačba 53a}$$

$$I(t) = 1 - \frac{I_{max} * \Delta Hb(t)}{IC_{50} + \Delta Hb(t)} \quad \text{Enačba 53b}$$

S_{max} označuje maksimalno možno stimulacijo, I_{max} pa maksimalno inhibicijo, ki ima vrednost 1. SC_{50} in IC_{50} sta konstanti modela maksimalnega učinka, ki predstavljata koncentraciji (SC_{50} – koncentracija rHuEpo, IC_{50} – sprememba koncentracije hemoglobina od bazne linije), ko je učinek enak polovici maksimalnega. Spremembo koncentracije hemoglobina (ΔHb) smo izračunali po enačbi:

$$\Delta Hb(t) = \frac{1}{1000} * MCH * \Delta E(t) \quad \text{Enačba 54}$$

MCH predstavlja koncentracijo hemoglobina v eritrocitih in zanjo smo predpostavili, da je konstantna. Podana je v pg/celico. Hemoglobin je izražen v g/dL.

Izvedli smo simulacijo vpliva eritropoetina na eritrocite v krvi na primeru podgan. Simulirali smo 4 odmerke: 10, 100, 1350 in 4050 IU/kg. S spreminjanjem vrednosti inhibicijskega parametra IC_{50} smo dodatno ocenjevali vpliv tega parametra na spremembo koncentracije eritrocitov v krvi.

Vrednosti parametrov za simulacijo eritropoeze smo dobili v študiji, kjer so z osnovnim TMDD- in QE-farmakokinetičnim modelom ter modelom LIDR analizirali delovanje rHuEpo na podganah. Izvedli so jo Woo in sodelavci (22, 25). Parametri so navedeni v tabeli IV. V

študiji so za določanje eritropoetina uporabili metodo z mejo kvantifikacije 2 mIU/mL in pri tem niso zaznali endogenega eritropoetina, zato smo ga pri modeliranju zanemarili (25). Za lažjo analizo smo privzeli, da na eritropoezo vplivata le eritropoetin in sprememba koncentracije hemoglobina preko negativne povratne zanke. Ostale faktorje, ki vplivajo na koncentracijo eritrocitov, kot so razvoj, rast podgan in efekt vzorčenja, smo zanemarili. Simulirali smo odzive brez intraindividualnih napak.

Tabela IV: Parametri simulacije farmakokinetičnega/farmakodinamičnega modela za rekombinantni humani eritropoetin na podganah. Vrednosti so povzete iz študij, ki so jih opravili Woo in sodelavci (22, 25).

| Farmakokinetični parametri: | | Farmakodinamični parametri: | |
|-----------------------------------|----------|--|--------------------------|
| k_{el} [1/h] | 0,22560 | T_{p1} [h] | 42,97 (\approx 2 dni) |
| V_p [L/kg] | 0,05694 | T_{p2} [h] | 75,35 (\approx 3 dni) |
| K_{ss} [nmol/L] | 0,18726 | T_E [h] | 1440 (= 60 dni) |
| k_{deg} [1/h] | 0,11330 | E_0 [10^4 celic/ μ L] | 612,78 |
| k_{int} [1/h] | 0,82280 | S_{max} | 3,480 |
| k_{12} [1/h] | 0,20920 | SC_{50} [nmol/L] | 0,0017 |
| k_{21} [1/h] | 0,17210 | IC_{50} [g/dL] | 1,790 |
| R_0 [nmol/L] | 0,06320 | MCH [pg/celico] | 20,00 |
| k_{sin} [nmol/L/h] ^a | 0,007161 | k_{in} [10^4 celic/ μ L/h] ^a | 0,4255 |

a – Sekundarni parameter.

Enačba 52 spada v skupino zakasnitvenih diferencialnih enačb (ang. delay differential equations – DDE). Od navadnih diferencialnih enačb (ang. ordinary differential equations – ODE) se razlikujejo v tem, da so poleg neodvisne spremenljivke (čas – t) in rešitve diferencialne enačbe ($y(t)$) odvisne tudi od pretekle rešitve diferencialne enačbe ($y(t-T)$). V našem primeru je ta zakasnitev (T) v DDE konstantna. Splošna oblika zakasnitvenih diferencialnih enačb je (26):

$$\frac{dy}{dt} = f(t, y(t), y(t-T)), \quad t > 0 \quad \text{Enačba 55a}$$

$$y(t) = \Phi(t), \quad -T \leq t \leq 0 \quad \text{Enačba 55b}$$

T označuje konstantni zamik. $\Phi(t)$ predstavlja začetno funkcijo, ki je potrebna za rešitev zakasnitvene diferencialne enačbe. DDE smo s pomočjo metode korakov pretvorili v sistem navadnih diferencialnih enačb (26). Za prvi interval $[\underline{t}_0, \underline{t}_0 + T]$ velja:

$$\frac{dy}{dt} = f(t, y(t), \Phi(t-T)) \quad \text{Enačba 56a}$$

$$y(\underline{t}_0) = [\Phi(\underline{t}_0)] \quad \text{Enačba 56b}$$

V drugem intervalu $[\underline{t}_0 + T, \underline{t}_0 + 2T]$ dobimo sistem dveh diferencialnih enačb:

$$\frac{dy_1}{dt} = f((t-T), y_1(t), \Phi(t-2T)) \quad \text{Enačba 57a}$$

$$\frac{dy_2}{dt} = f(t, y_2(t), y_1(t)) \quad \text{Enačba 57b}$$

$$y_1(t_0 + T) = [\Phi(t_0)] \quad \text{Enačba 58a}$$

$$y_2(t_0 + T) = y(t_0 + T) \quad \text{Enačba 58b}$$

$y_1(t)$ predstavlja $y(t-T)$ in $y_2(t)$ predstavlja rešitev zakasnitvene diferencialne enačbe ($y(t)$) v drugem intervalu. Podobno pretvorbo DDE v ODE naredimo za naslednje intervale, kjer za vsak nadaljnji interval dodamo navadno diferencialno enačbo. Metoda korakov tako za interval n $[t_0 + (n-1)T, t_0 + nT]$ določi n navadnih diferencialnih enačb:

$$\frac{dy_i}{dt} = f(t - (n-1)T, y_i(t), y_{i-1}(t)), \quad i = 1, 2, 3, \dots, n \quad \text{Enačba 59a}$$

$$y_i(t_0 + (n-1)T) = y(t_0 + (n-1)T), \quad i = 1, 2, 3, \dots, n \quad \text{Enačba 59b}$$

Pri tem velja, da je $y_1(t) = y(t - (n-1)T)$ za $i = 1, 2, 3, \dots, n$, $y_0(t) = \Phi(t - nT)$ in $y_0(t_0 + (n-1)T) = \Phi(t_0 - T)$. Število navadnih diferencialnih enačb se večja z vsakim naslednjim intervalom. Število intervalov pa je odvisno od časa opazovanja sistema (t_K – končen čas) in od dolžine intervalov (T). V prilogi D je dodan zapis modela v programskem okolju ADAPT 5. Modelirani sistem smo opazovali skozi čas 2000 ur (približno 80 dni), za kar smo potrebovali 192 navadnih diferencialnih enačb.

S spreminjanjem inhibicijskega parametra IC_{50} , ki v modelu določa stopnjo hemoglobinske inhibicije razvoja in rasti predhodnikov eritrocitov, smo ugotavljali njegov vpliv na koncentracijo eritrocitov v krvi. V preglednici V so navedene vrednosti, pri katerih smo izvedli simulacije. Odzive modela smo med seboj grafično primerjali. V primeru $IC_{50} = 179,0 \frac{g}{dL}$ pri simulaciji odmerka 100 IU/kg program LSODA ni uspel numerično integrirati diferencialnih enačb, zato smo za ponazoritev vpliva IC_{50} v tem primeru odmerek 100 IU/kg nadomestili z 92 IU/kg.

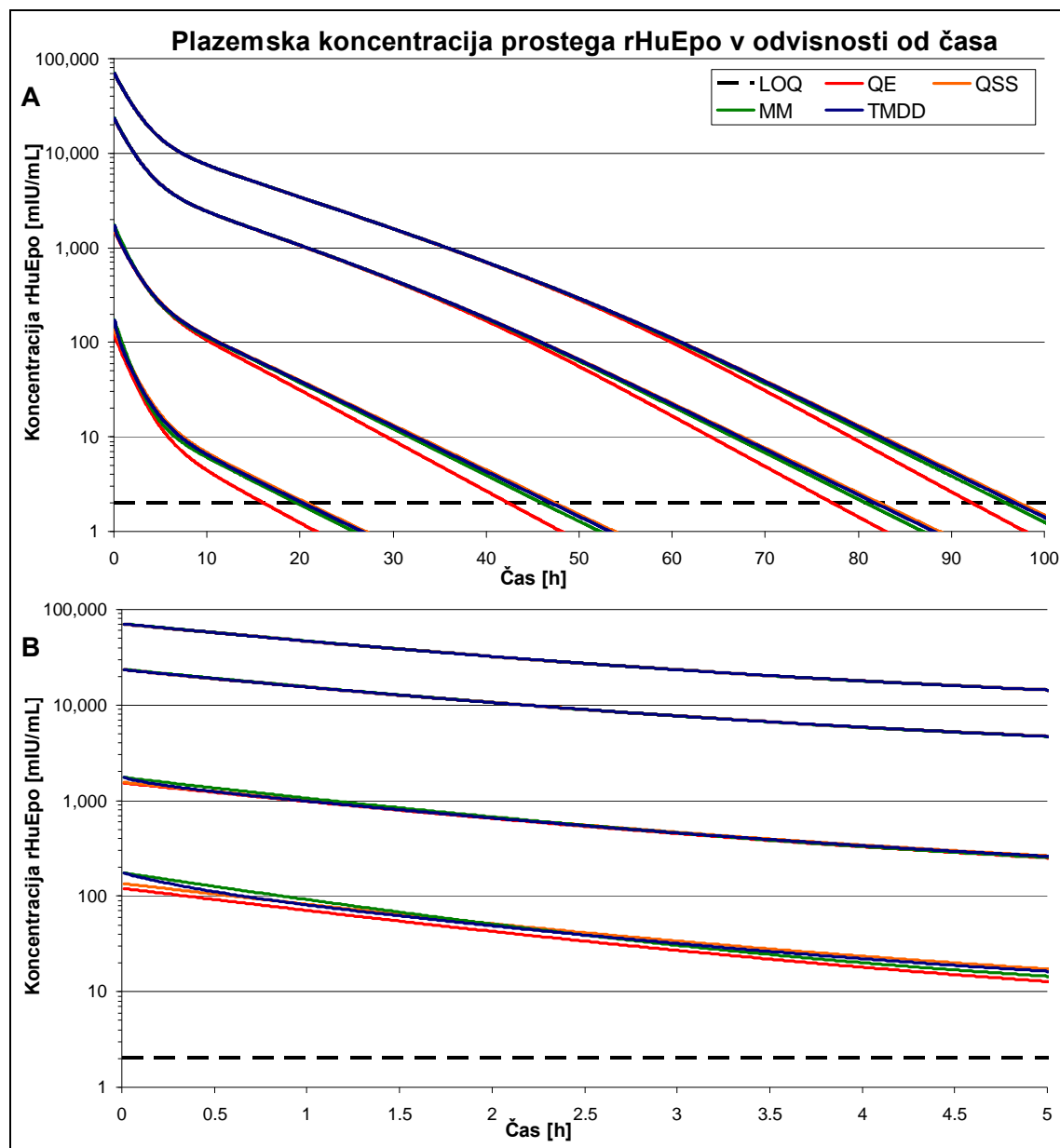
Tabela V: Vrednosti parametra IC_{50} , ki smo jih uporabili za simulacijo PK/PD modela za eritropoetin. OV – osnovna vrednost parametra. Ocenjena je bila na eksperimentalnih podatkih, ki so jih dobili na podganah (25).

| Parameter IC_{50} | | | |
|---------------------|------------|---------------|----------------|
| 1. (50 % OV): | 2. (OV): | 3. (10 * OV): | 4. (100 * OV): |
| 0,895 g/dL | 1,790 g/dL | 17,90 g/dL | 179,0 g/dL |

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 *Simulacije in primerjava odzivov uporabljenih PK modelov*

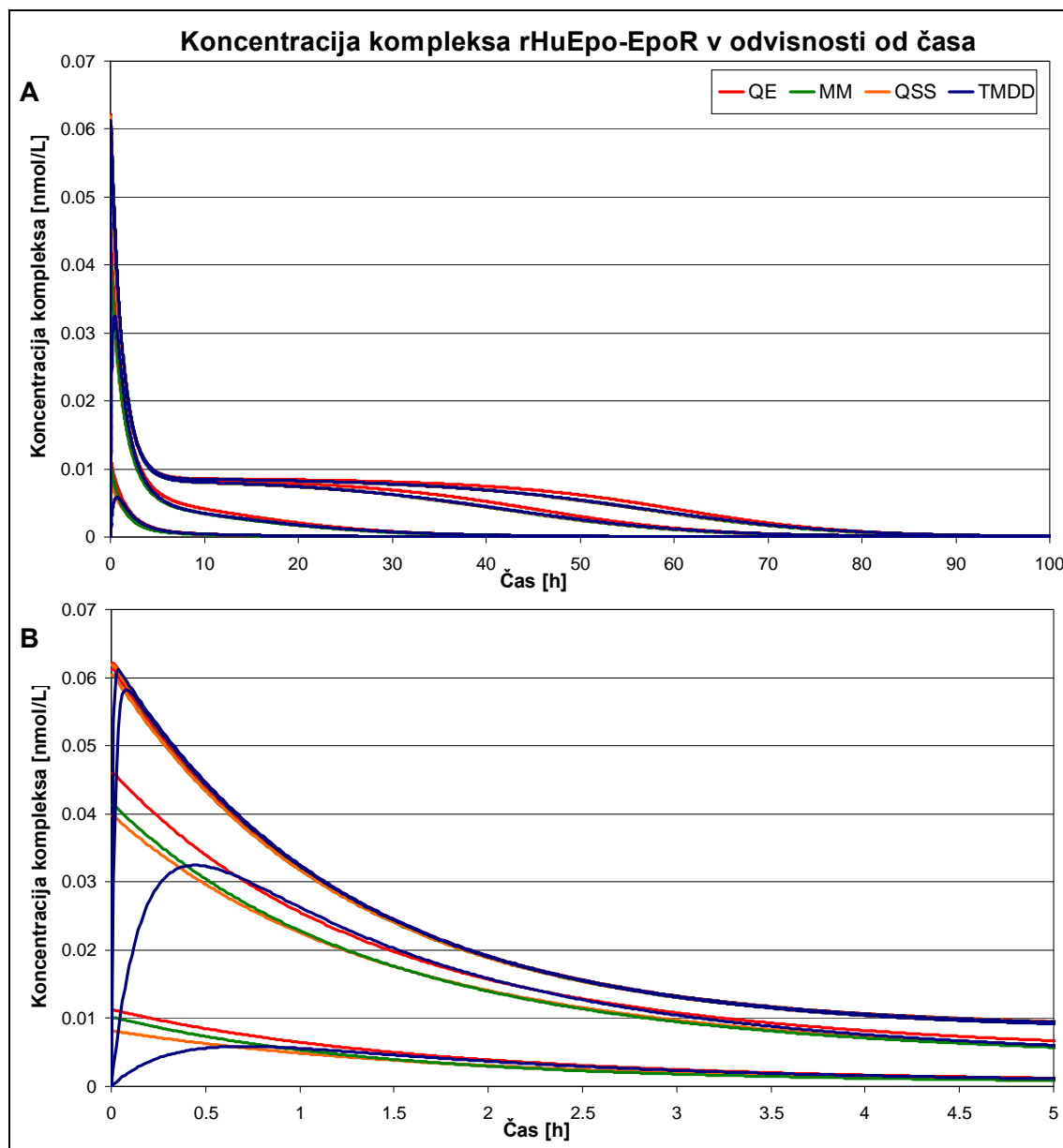
Za enkratno intravensko aplicirane odmerke 10, 100, 1350 in 4050 IU/kg rekombinatnega humanega eritropoetina smo na podganah simulirali odziv TMDD-, QE-, QSS- in MM-modela z osnovnimi parametri (tabela II). Farmakokinetiko smo opazovali s plazemsko koncentracijo proste učinkovine (slika 7), s koncentracijo kompleksa učinkovina-receptor (slika 8), s koncentracijo prostega receptorja (slika 9) in s koncentracijo celotnega receptorja (slika 10), vse v odvisnosti od časa.



Slika 7: Plazemski koncentracijski profil rHuEpo, pridobljen z različnimi modeli (TMDD, QE, QSS in MM) z osnovnimi parametri za odmerke 10, 100, 1350 in 4050 IU/kg. Graf A prikazuje koncentracijo v času 100 ur, medtem ko graf B v času 5 ur. LOQ označuje mejo kvantifikacije.

Učinkovina se v kratki začetni fazi dokaj hitro veže na receptor, zato se njena plazemska koncentracija zniža. Na logaritemski skali (slika 7B) to opazimo le za nižja dva odmerka, kjer se TMDD-krivulja zniža na nivo QE-, QSS- in MM-krivulj, medtem ko pri večjih odmerkih tega ne opazimo. Pri visokih koncentracijah so namreč na logaritemski skali majhne spremembe neopazne. V nadaljevanju nastopi dinamično ravnotežje kompleksa rHuEpo-EpoR. Ravnotežje nastopi v času, ki je obratno sorazmeren od količine apliciranega odmerka. Slednje je bolj razvidno na sliki 8B. QE-, QSS- in MM-modeli ne vrednotijo začetne faze vezave, ampak hipotetično privzamejo, da je ravnotežje že vzpostavljeno, zato prikazujejo nižjo koncentracijo učinkovine, kot je v resnici. Pri nastopu ravnotežja se ti modeli

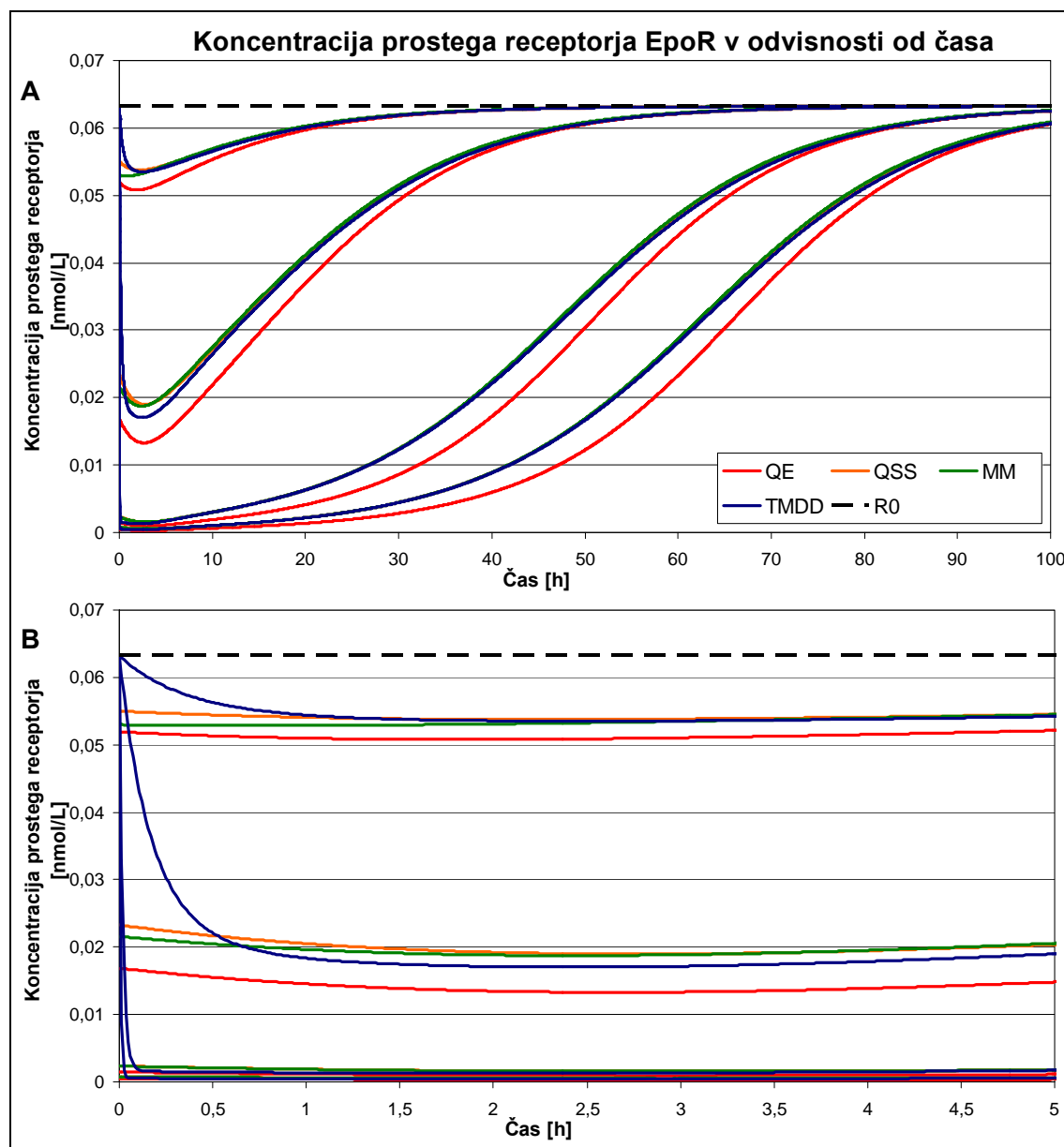
asimptotično približujejo TMDD-modelu. V naslednji stopnji koncentracija relativno hitro pada zaradi linearnega porazdeljevanja učinkovine v stranski prostor. Ko se tudi pri porazdeljevanju v stranski prostor vzpostavi dinamično ravnotežje, plazemska koncentracija rHuEpo počasneje pada. Na sliki 7A je prikazana kinetika od začetka aplikacije do 100 ur, kjer je vidna nelinearna farmakokinetika učinkovine. V terminalni fazi je QE-model ne opiše dobro. Ta se od TMDD-krivulje razlikuje, ko koncentracija učinkovine pade pod 140 mIU/mL oziroma pod 0,029 nmol/L. Pri tej koncentraciji učinkovine je koncentracija receptorja višja od $le-te$, zato pogoj singularne perturbacijske teorije, da je koncentracija učinkovine višja oziroma primerljiva z receptorjem, preneha veljati. Osnovna hipoteza QE-modela (enačbi 10 in 11) ne velja, saj je hitrostna konstanta internalizacije bistveno večja ($\frac{k_{int}}{k_{off}} = 0,63$; glej tabelo VI). Pri vrednotenju ravnotežne koncentracije kompleksa UR jo QSS- in MM-modela upoštevata. Kljub temu da ima faktor ε vrednost 0,55 (kar ni veliko manjše od 1), dobro opišeta časovni profil plazemske koncentracije učinkovine. MM-model v terminalni fazi (pri odmerkih 100, 1350 in 4050 IU/kg), ko se koncentracija učinkovine spusti pod 40 mIU/mL, rahlo odstopa od TMDD-modela. Pri tem se faktor γ dvigne nad 0,2, zato enačba 28 (MM-model) napačno opiše potek koncentracije učinkovine.



Slika 8: Koncentracije kompleksa rHuEpo-EpoR v odvisnosti od časa, pridobljene z različnimi modeli (TMDD, QE, QSS in MM) z osnovnimi parametri za odmerke 10, 100, 1350 in 4050 IU/kg. Graf A prikazuje koncentracijo v času 100 ur, medtem ko graf B v času 5 ur.

Pri podajanju koncentracije kompleksa učinkovine in receptorja v odvisnosti od časa nazorno opazimo, kako TMDD-krivulja opiše začetno vezavo učinkovine na receptor, medtem ko ostali modeli tega ne opišejo (slika 8B). Podobno kot pri plazemski koncentraciji učinkovine se QE-, QSS-, MM-modeli asimptotično približujejo TMDD-modelu, ko nastopi dinamično ravnotežje kompleksa. Vzorčenje pri eksperimentalnih študijah običajno ne poteka tako hitro, da bi dobili koncentracijo učinkovine pred vezavo na receptor, zato so ti podatki napačni za ocenjevanje začetne koncentracije in posledično je tudi volumen distribucije precenjen (27). Z uporabo aproksimacijskih modelov lahko zaobidemo ta problem. Pri aplikaciji nižjih dveh odmerkov krivulji QSS in MM podcenita začetno ravnotežno

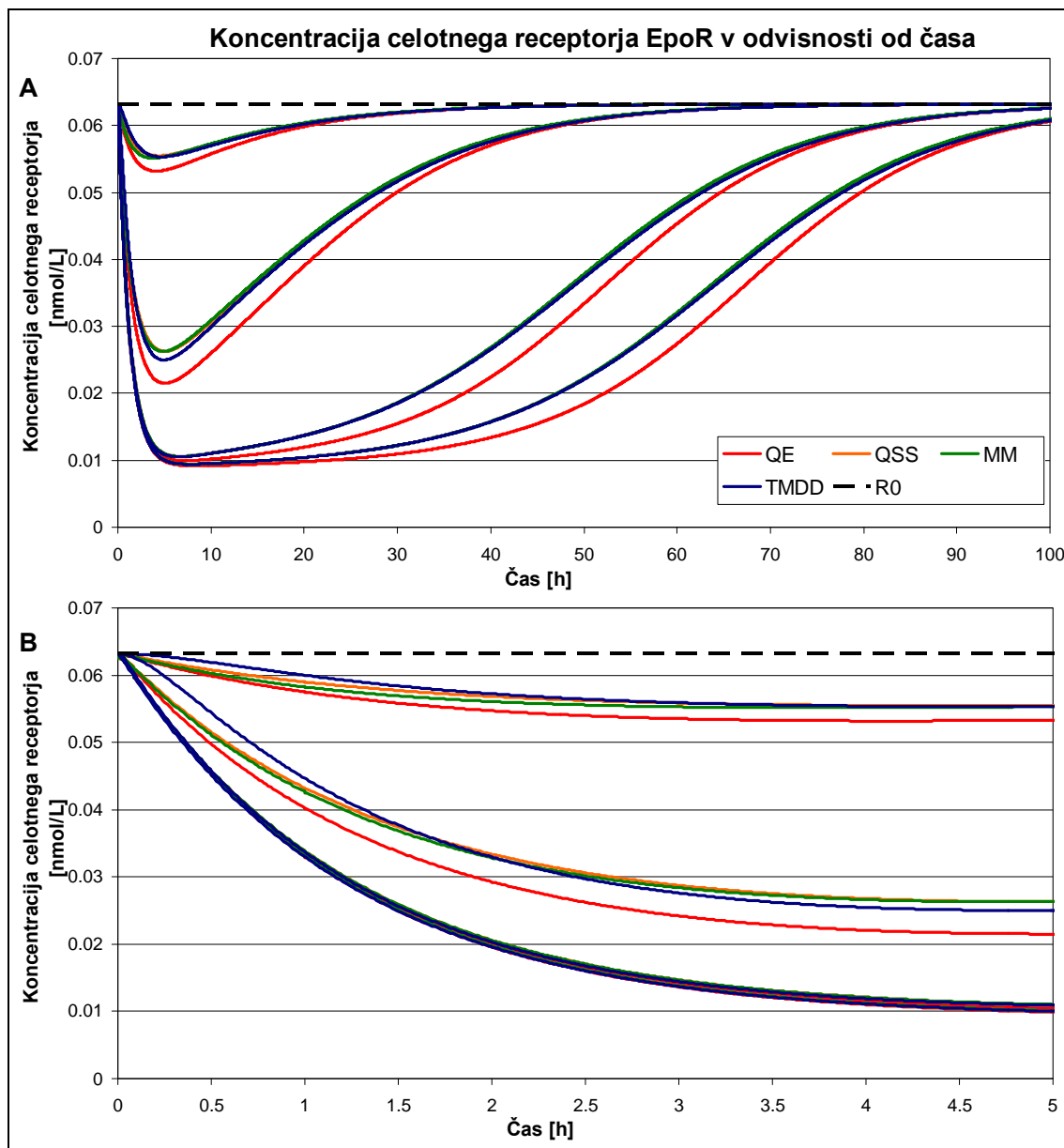
koncentracijo kompleksa, medtem ko jo QE opiše dobro (slika 8B). Pri kasnejših časih (slika 8A) pa QSS- in MM-model za vse 4 odmerke dobro posnemata TMDD-kinetiko, medtem ko se od nje QE-model razlikuje.



Slika 9: Koncentracije prostega receptorja (EpoR) v odvisnosti od časa, pridobljene z različnimi modeli (TMDD, QE, QSS in MM) z osnovnimi parametri za odmerke 10, 100, 1350 in 4050 IU/kg. Graf A prikazuje koncentracijo v času 100 ur, medtem ko graf B v času 5 ur. R_0 označuje začetno koncentracijo receptorja.

Koncentracija prostega receptorja po aplikaciji odmerka strmo pade zaradi hitre vezave z rekombinantnim humanim eritropoetinom do ravnotežne vrednosti (slika 9). Nato se postopoma vrne nazaj do začetne vrednosti vzporedno z nižanjem koncentracije liganda. Proces je odvisen od količine apliciranega odmerka. Pri večjih odmerkih se koncentracija prostega receptorja spusti do nižjih vrednosti (ravnotežje nastopi pri nižjih vrednosti) in se kasneje dvigne nazaj na začetno vrednost. Tako kot za prosto učinkovino in za kompleks tudi

v tem primeru QE-model pri vseh odmerkih odstopa od TMDD-modela in prikazuje nižjo koncentracijo prostega receptorja kot sicer.



Slika 10: Koncentracije celotnega receptorja (EpoR) v odvisnosti od časa, pridobljene z različnimi modeli (TMDD, QE, QSS in MM) z osnovnimi parametri za odmerke 10, 100, 1350 in 4050 IU/kg. Graf A prikazuje koncentracijo v času 100 ur, medtem ko graf B v času 5 ur. R_0 označuje začetno koncentracijo receptorja.

Koncentracija celotnega receptorja se po aplikaciji odmerka niža, ker se kompleks rHuEpo-EpoR hitreje izloča iz sistema kot prosti receptor in pri tem ostane kinetika nastajanja receptorja (k_{sin}) enaka (slika 10). Vzrok za to je večja hitrostna konstanta internalizacije kompleksa od hitrostne konstante razgradnje prostega receptorja ($k_{int} > k_{deg}$). Po dosegu minimuma koncentracija celotnega receptorja ponovno postopoma naraste, saj se zaradi zmanjševanja koncentracije učinkovine povečuje število prostih receptorjev in posledično se kinetika eliminacije vseh receptorjev zniža nazaj na začetni nivo. Koncentracija celotnega

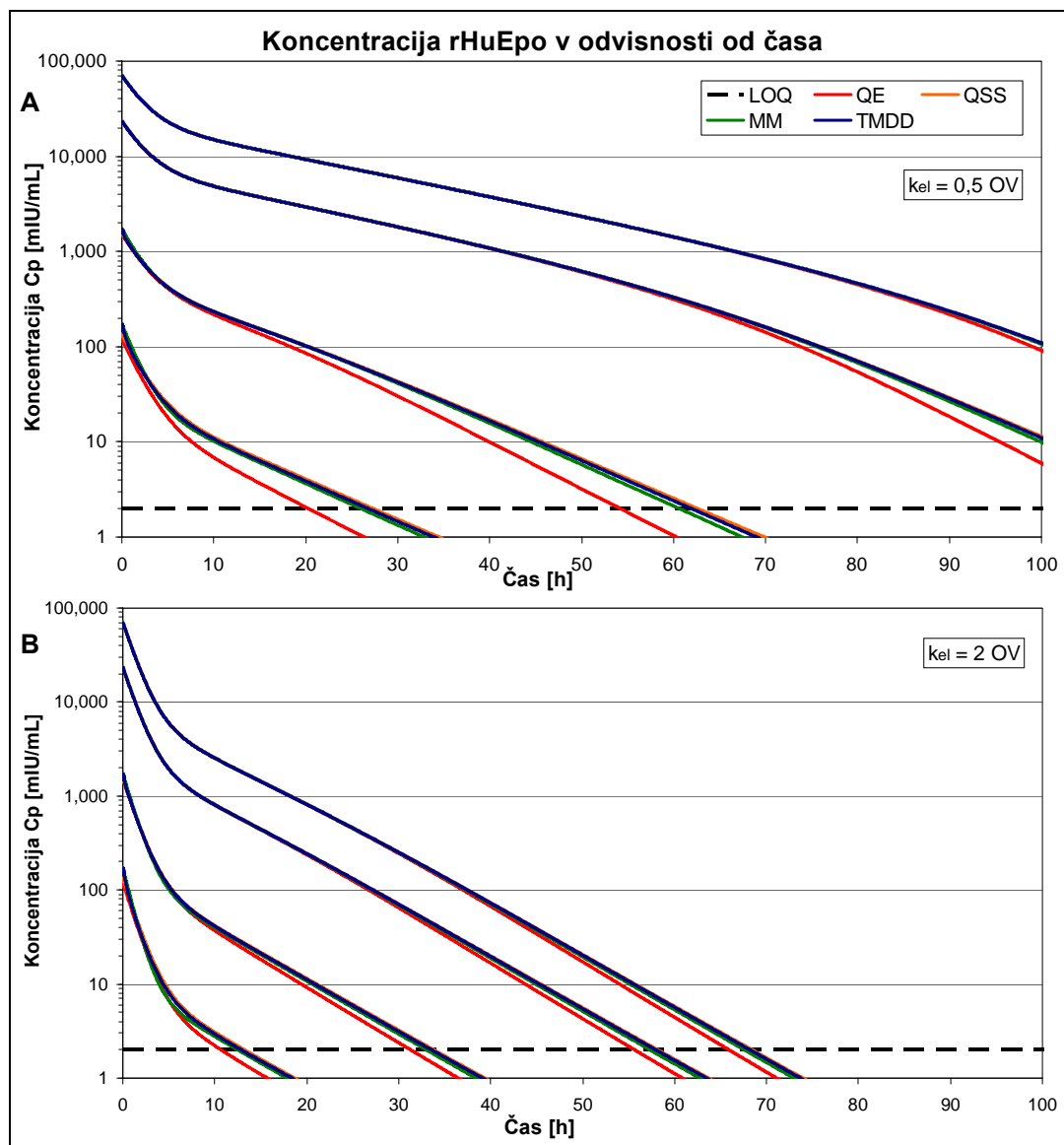
receptorja se dvigne nazaj na začetno ravnotežje $R_0 = \frac{k_{\text{on}}}{k_{\text{off}}}$. QE-model ponovno odstopa od pravih vrednosti, saj ocenjuje prenizke koncentracije celotnega receptorja.

Parametre modelov smo spreminjali tako, da smo poleg osnovne kombinacije z osnovnimi vrednostmi parametrov dobili dodatnih 14 različnih kombinacij. Navedene so v preglednici III. Za vsako kombinacijo smo izračunali faktor ϵ (tabela VI) in izvedli simulacijo plazemske koncentracije rekombinantnega eritropoetina v odvisnosti od časa za TMDD-, QE-, QSS- in MM-model. Odzive smo primerjali z odzivom, ki smo ga dobili z modelom z osnovnimi parametri.

Tabela VI: Izračunane vrednosti ϵ ter razmerje med vrednostima hitrostnih konstant k_{int} in k_{off} so podani za vsako kombinacijo. Vrednosti so zaokrožene na 4 oziroma na 2 decimalki.

| Simulacija: | ϵ : | | | | $k_{\text{int}}/k_{\text{off}}$: |
|----------------|--------------|-----------|------------|------------|-----------------------------------|
| | 10 IU/kg | 100 IU/kg | 1350 IU/kg | 4050 IU/kg | |
| 1 ^a | 0,5520 | 0,0552 | 0,0041 | 0,0014 | 0,63 |
| 2 | 0,2760 | 0,0276 | 0,0020 | 0,0007 | 0,63 |
| 3 | 1,1039 | 0,1104 | 0,0082 | 0,0027 | 0,63 |
| 4 | 5,5196 | 0,5520 | 0,0409 | 0,0136 | 0,63 |
| 5 | 0,0552 | 0,0055 | 0,0004 | 0,0001 | 0,63 |
| 6 | 0,5520 | 0,0552 | 0,0041 | 0,0014 | 6,34 |
| 7 | 0,5520 | 0,0552 | 0,0041 | 0,0014 | 0,06 |
| 8 | 0,5520 | 0,0552 | 0,0041 | 0,0014 | 0,63 |
| 9 | 0,5520 | 0,0552 | 0,0041 | 0,0014 | 0,63 |
| 10 | 0,5520 | 0,0552 | 0,0041 | 0,0014 | 0,32 |
| 11 | 0,5520 | 0,0552 | 0,0041 | 0,0014 | 0,06 |
| 12 | 0,5520 | 0,0552 | 0,0041 | 0,0014 | 1,27 |
| 13 | 0,5520 | 0,0552 | 0,0041 | 0,0014 | 0,63 |
| 14 | 0,5520 | 0,0552 | 0,0041 | 0,0014 | 0,63 |
| 15 | 0,5520 | 0,0552 | 0,0041 | 0,0014 | 0,63 |

^a – simulirani so modeli z osnovnimi vrednostmi parametrov

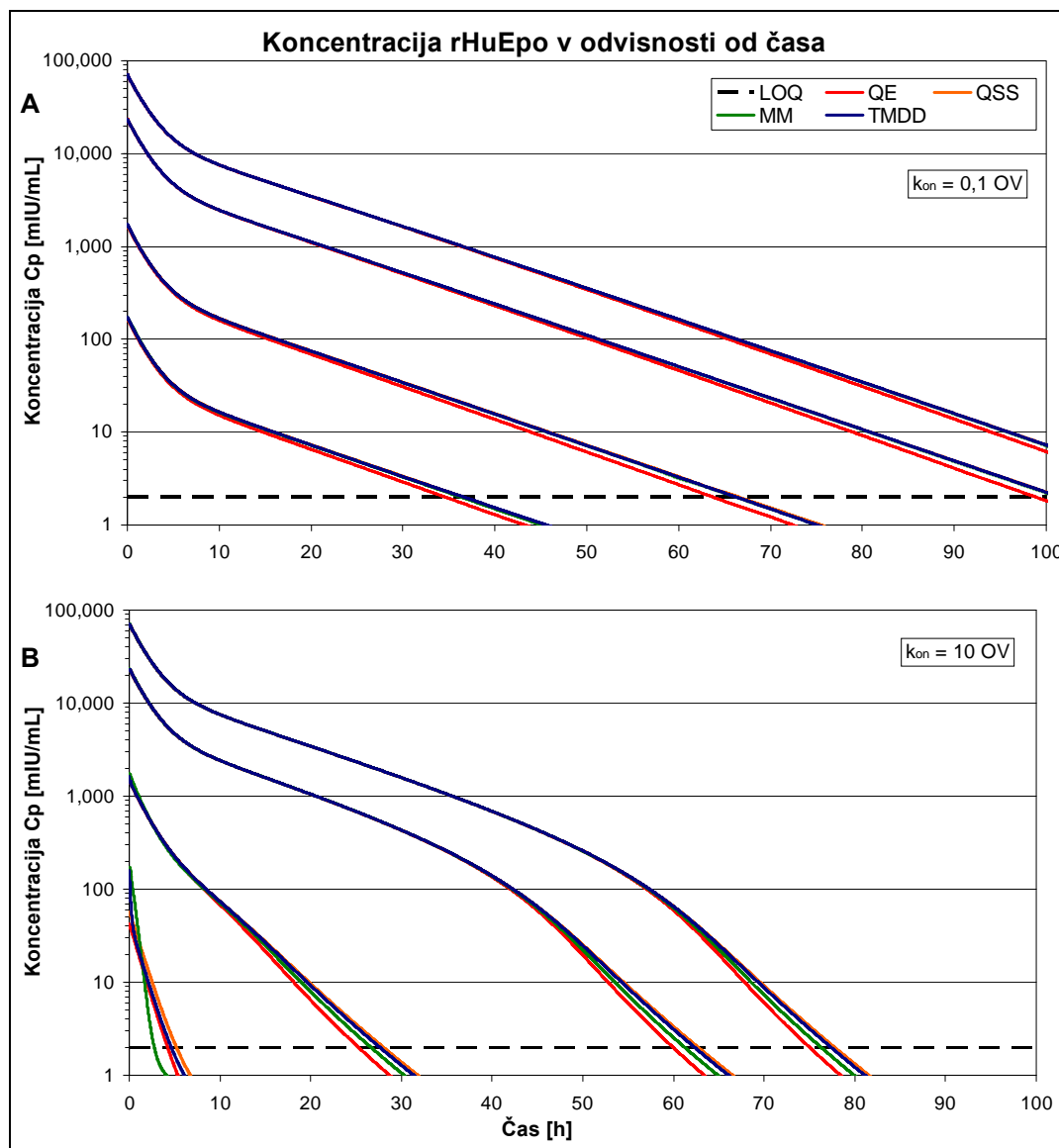


Slika 11: Plazemske koncentracije rHuEpo, ki smo jih dobili s simulacijo TMDD-, QE-, QSS- in MM-modela. Na grafu A je podan odziv modelov z 2. kombinacijo parametrov ($k_{el} = 0,5 \text{ OV}$), na grafu B pa s 3. kombinacijo ($k_{el} = 2 \text{ OV}$). Simulaciji smo izvedli za odmerke 10, 100, 1350 in 4050 IU/kg. LOQ označuje mejo kvantifikacije.

Sprememba hitrostne konstante eliminacije močno vpliva na kinetiko učinkovine. Slednje vidimo na sliki 11A, kjer je k_{el} znižan na 50 % osnovne vrednosti, in na sliki 11B, kjer je k_{el} zvišan na 200 % osnovne vrednosti. V primerjavi s sliko 7A so nakloni krivulj močno spremenjeni, zato sklepamo, da je model občutljiv na linearno eliminacijo (k_{el}), kar je ugotovil tudi Abraham s sodelavci v raziskavi, kjer so analiziral občutljivost QE-modela (28). Dodatno navaja, da je odziv modela občutljiv tudi na druge parametre linearne kinetike, kot so V_p , k_{12} in k_{21} . V naši raziskavi teh parametrov nismo spreminjali.

Pri nižjih vrednostih parametra k_{el} je delež učinkovine, podvržene nelinearnim procesom, večji, zato je na profilih plazemske koncentracije učinkovine izražena večja nelinearnost. Pri 2. kombinaciji parametrov se QE-model bolj razlikuje od TMDD-modela in

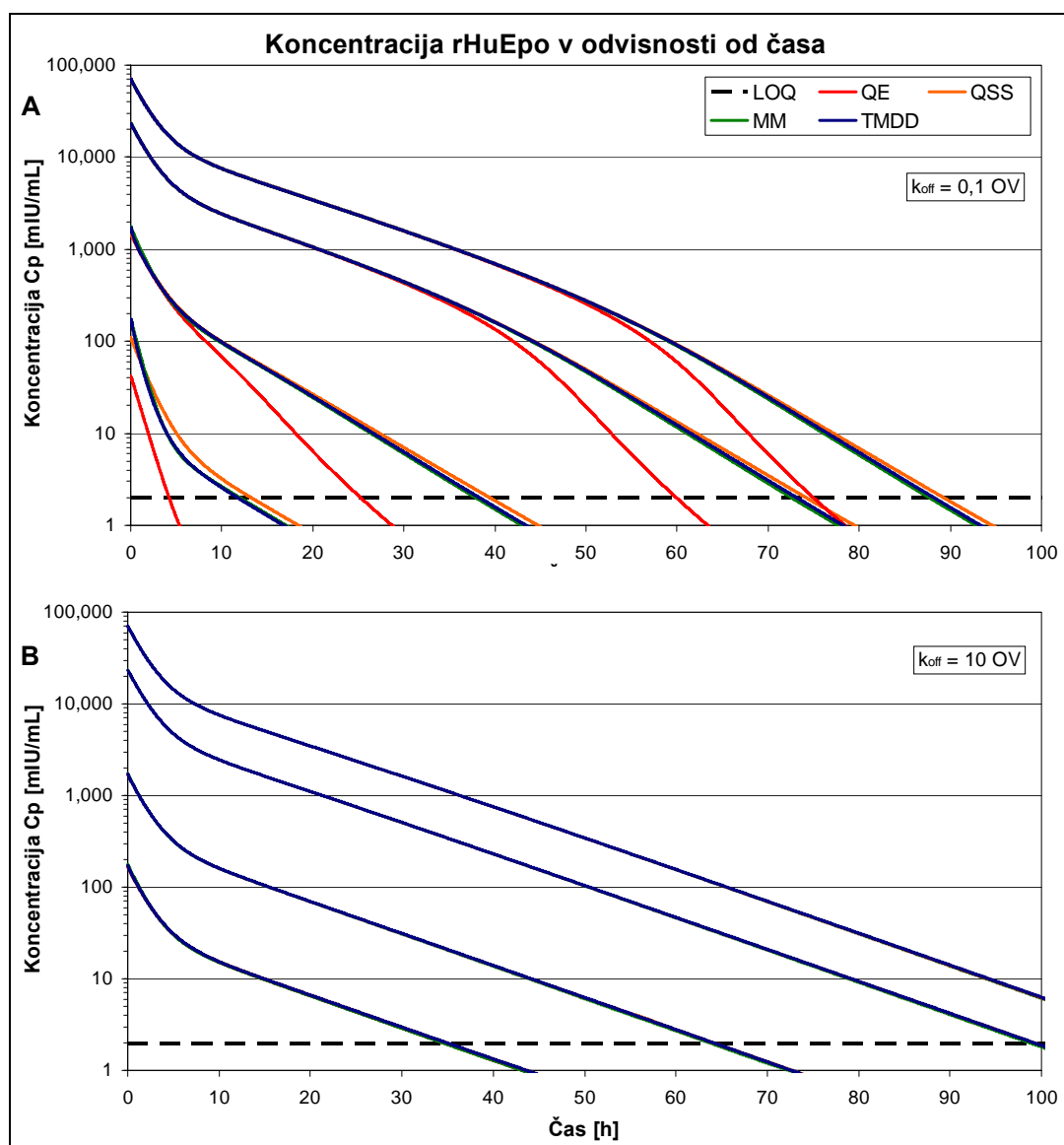
ta razlika nastopi prej kot pri kombinaciji z osnovnimi parametri (slika 11A). Na drugi strani pa je pri večjih vrednostih k_{el} delež učinkovine, ki je podvržena nelinearnim procesom, manjši. Razlike med QE- in TMDD-modelom so izražene v manjši meri (slika 11B). Pri tem so krivulje podobne 2-faznim profilom, kar je značilno za učinkovine z dvoprostorno linearno kinetiko. Opazili smo, da so vrednosti faktorja ε v 2. primeru, kjer je razlika med QE- in TMDD-modelom večja, nižje kot v 3. primeru, kjer je razlika med QE- in TMDD-modelom manjša. To je v nasprotju s trditvijo, da so napake QE-modela proporcionalne faktorju ε (10).



Slika 12: Plazemske koncentracije rHuEpo, ki smo jih dobili s simulacijo TMDD-, QE-, QSS- in MM-modela. Na grafu A je podan odziv modelov s 4. kombinacijo parametrov ($k_{on} = 0,1$ OV), na grafu B pa s 5. kombinacijo ($k_{on} = 10$ OV). Simulacije smo izvedli za odmerke 10, 100, 1350 in 4050 IU/kg. LOQ označuje mejo kvantifikacije.

V 4. in 5. primeru smo spreminjali parameter k_{on} , ki določa hitrost vezave učinkovine na receptor. Slika 12A prikazuje plazemske profile proste učinkovine z nižanim k_{on} za faktor 10. Pri nižjem k_{on} se manjši delež učinkovine veže na receptor, zato se nasičenost nelinearnih

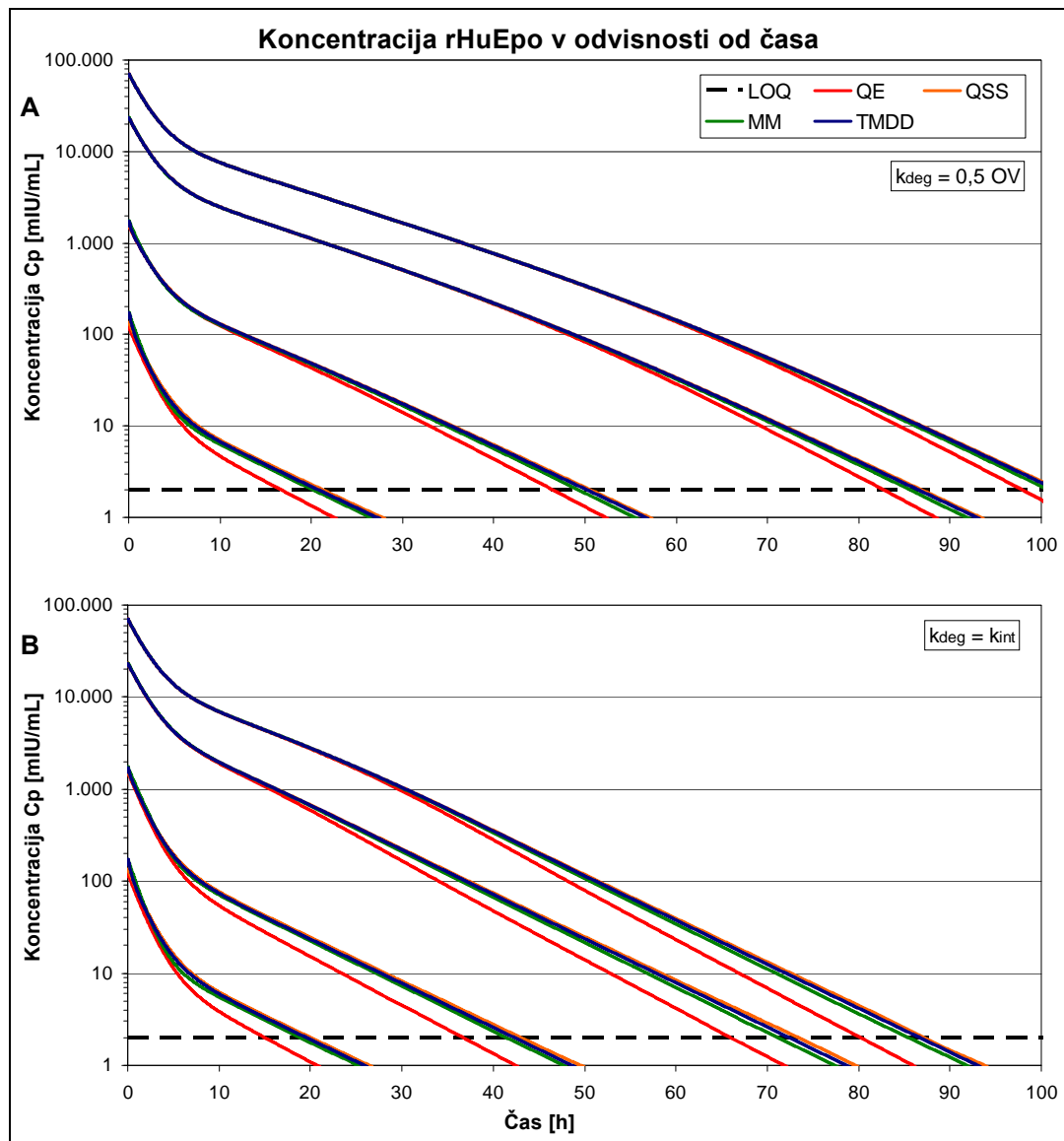
procesov težje izrazi v plazemskih profilih. V 4. kombinaciji je k_{on} tako nizek, da imajo krivulje linearno obliko, podobno kot v 2. primeru. Pri odmerku 10 IU/kg je vrednost faktorja ε višja od 5 (hitrost vezave učinkovine na receptor je v primerjavi z eliminacijo zelo nizka), a vseeno QE-model bolje opiše TMDD-krivuljo kot pri 1. kombinaciji, kjer je $\varepsilon \approx 0,5$. Sklepamo, da faktor ε ni zanesljiv pokazatelj odstopanja QE-modela od TMDD. V 5. primeru je delež učinkovine, podvržene nelinearnim procesom, zelo velik, saj je parameter k_{on} 10-krat večji od osnovne vrednosti. Na sliki 12B vidimo, da pri odmerku 10 IU/kg QE-, QSS- in MM-modeli odstopajo od TMDD-modela. Pri večjih odmerkih pa odstopajo le v terminalnem delu, ko pade koncentracija pod 85 mIU/mL. Pri tem se faktor γ dvigne nad vrednost 0,2.



Slika 13: Plazemske koncentracije rHuEpo, ki smo jih dobili s simulacijo TMDD-, QE-, QSS- in MM-modela. Na grafu A je podan odziv modelov s 6. kombinacijo parametrov ($k_{off} = 0,1 \text{ OV}$), na grafu B pa s 7. kombinacijo ($k_{off} = 10 \text{ OV}$). Simulacije smo izvedli za odmerke 10, 100, 1350 in 4050 IU/kg. LOQ označuje mejo kvantifikacije.

Pri 6. kombinaciji smo 10-krat znižali parameter k_{off} , zato velja $k_{\text{off}} \ll k_{\text{int}}$ (glej tabelo VI). Na sliki 13A vidimo, da QE-model pričakovano zelo odstopa od kinetike TMDD-modela. Njegova predpostavka, da vezava rHuEpo na EpoR in njuna disociacija potekata zelo hitro v primerjavi z ostalimi procesi, ne drži. Internalizacija kompleksa rHuEpo-EpoR namreč poteka veliko hitreje kot disociacija. Kljub temu da je $\frac{k_{\text{int}}}{k_{\text{off}}} \approx 6$, pa QE-model dobro opiše TMDD-krivuljo pri koncentracijah učinkovine, višjih od 300 mIU/mL. Pri teh vrednostih parametrov, razen QSS-model pri odmerku 10 IU/kg, QSS- in MM-model dobro posnemata TMDD-model.

V 7. primeru je $k_{\text{int}} \ll k_{\text{off}}$, saj smo k_{off} povečali za faktor 10. Na sliki 13B je prikazano, da vsi modeli, vključno s QE, dobro opišejo TMDD-model. Hitrostna konstanta disociacije kompleksa k_{off} vpliva podobno kot pri 4. kombinaciji k_{on} . Večja k_{off} zmanjša delež učinkovine, ki je podvržena nelinearni kinetiki, zato so krivulje modelov podobne linearni dvoprostorni farmakokinetiki.

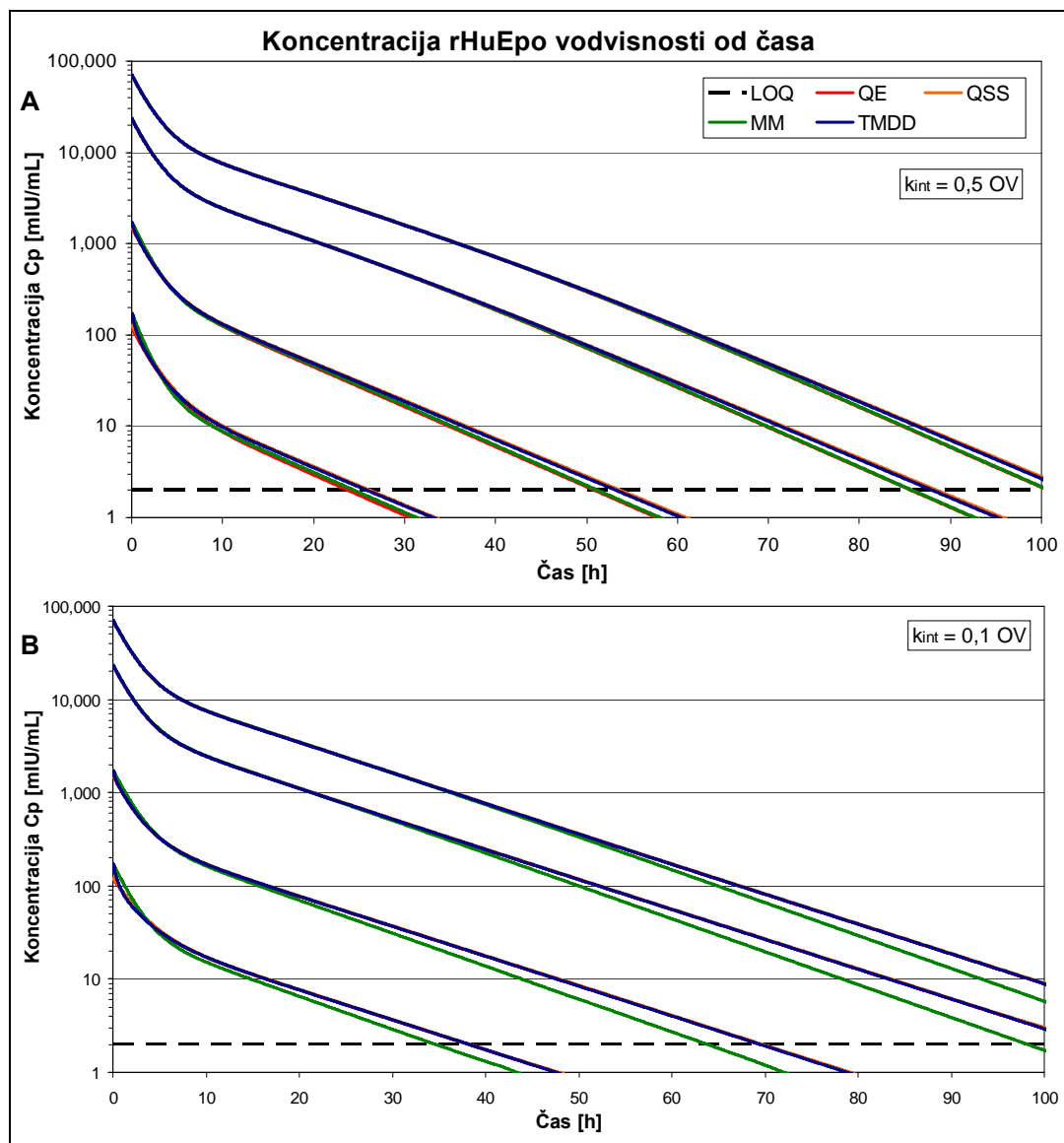


Slika 14: Plazemske koncentracije rHuEpo, ki smo jih dobili s simulacijo TMDD-, QE-, QSS- in MM-modela. Na grafu A je podan odziv modelov z 8. kombinacijo parametrov ($k_{deg} = 0,5 \text{ OV}$), na grafu B pa z 9. kombinacijo ($k_{deg} = k_{int}$). Simulacije smo izvedli za odmerke 10, 100, 1350 in 4050 IU/kg. LOQ označuje mejo kvantifikacije.

V 8. primeru smo znižali kinetiko razgradnje receptorja (slika 14A). Medtem ko je začetno število receptorjev enako, zaradi postavke, da je kinetika sinteze receptorja določena kot sekundarni parameter, in sicer $k_{sin} = R_0 * k_{deg}$, je tudi k_{sin} enako znižana kot k_{deg} . Z nižjo sintezo in razgradnjo receptorja ga je manj na voljo za vezavo in posledično za internalizacijo, zato je obseg učinkovine, ki je podvržena nelinearni kinetiki, manjša. Na sliki 14A je opaziti, da QE-, QSS- in MM-modeli podobno opišejo TMDD-kinetiko kot pri simulaciji profilov z osnovnimi parametri. Razlika je v tem, da se v 8. primeru učinkovina dlje časa zadržuje v organizmu.

Pri 9. kombinaciji smo povečali razgradnjo receptorja (k_{deg}) do vrednosti hitrostne konstante internalizacije (k_{int}) (slika 14B). Za to kombinacijo je značilno, da je koncentracija

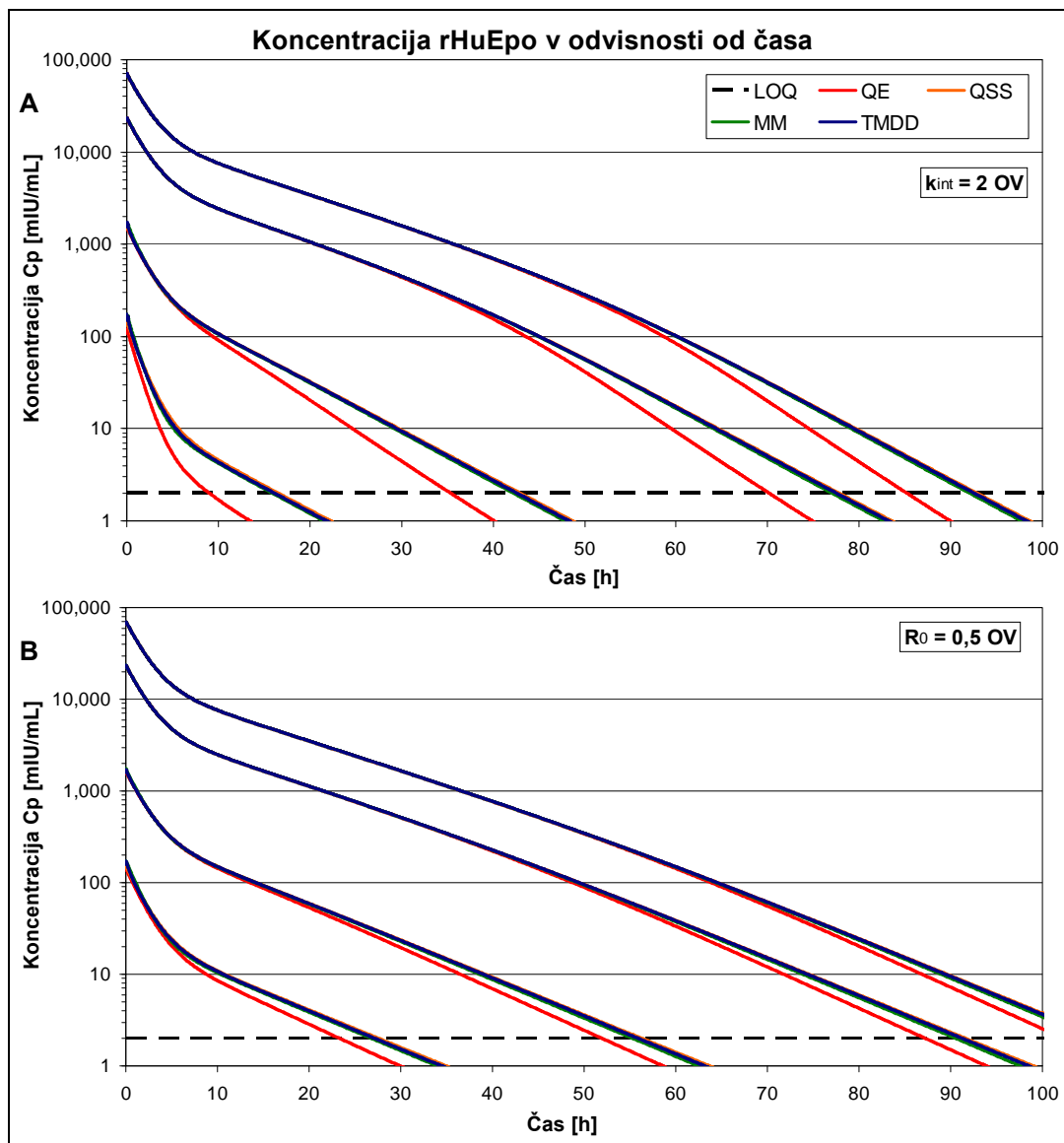
celotnega receptorja ves čas konstantna in enaka R_0 (24). Povečana sinteza in razgradnja receptorja povečata obseg internalizacije, zato se učinkovina hitreje izloča iz sistema. QE-model od TMDD-modela bolj odstopa kot pri simulaciji profilov z osnovnimi parametri, čeprav imajo parametri K_D , K_{SS} , R_0 in faktor ε enako vrednost. QSS- in MM-model zanemarljivo malo odstopata.



Slika 15: Prikazana sta grafa plazemske koncentracije rHuEpo, ki smo jih dobili s simulacijo TMDD-, QE-, QSS- in MM-modela. Na grafu A je podan odziv modelov z 10. kombinacijo parametrov ($k_{int} = 0,5$ OV), na grafu B pa z 11. kombinacijo ($k_{int} = 0,1$ OV). Simulacije smo izvedli za odmerke 10, 100, 1350 in 4050 IU/kg. LOQ označuje mejo kvantifikacije.

Za 10. in 11. primer smo zmanjšali parameter k_{int} na 50 % oziroma na 10 % osnovne vrednosti. V obeh primerih se odziv MM-modela razlikuje od odziva TMDD-modela. Manjši kot je parameter k_{int} , večja je ta razlika. MM-model odstopa, ko pade koncentracija učinkovine pod 120 mIU/mL pri 10. kombinaciji in pod 450 mIU/mL pri 11. kombinaciji. Ko padejo koncentracije učinkovine pod te vrednosti, se tudi faktor γ dvigne nad 0,2. V 10.

primeru QE-model ni dober za opis TMDD-kinetike (slika 15A), kar pojasnjuje visoka vrednost k_{int} , ki v primerjavi s k_{off} ni zanemarljivo majhna ($\frac{k_{int}}{k_{off}} = 0,32$). V 11. primeru pa QE dobro opiše TMDD-model (slika 15B), saj je vrednost k_{int} dovolj nizka ($\frac{k_{int}}{k_{off}} = 0,06$). Faktor ε je v obeh primerih enak osnovni vrednosti, zato ne vpliva na spremembo značilnosti QE-modela. Pri obeh kombinacijah parametrov se QSS-model zelo dobro prilega TMDD-profilu.

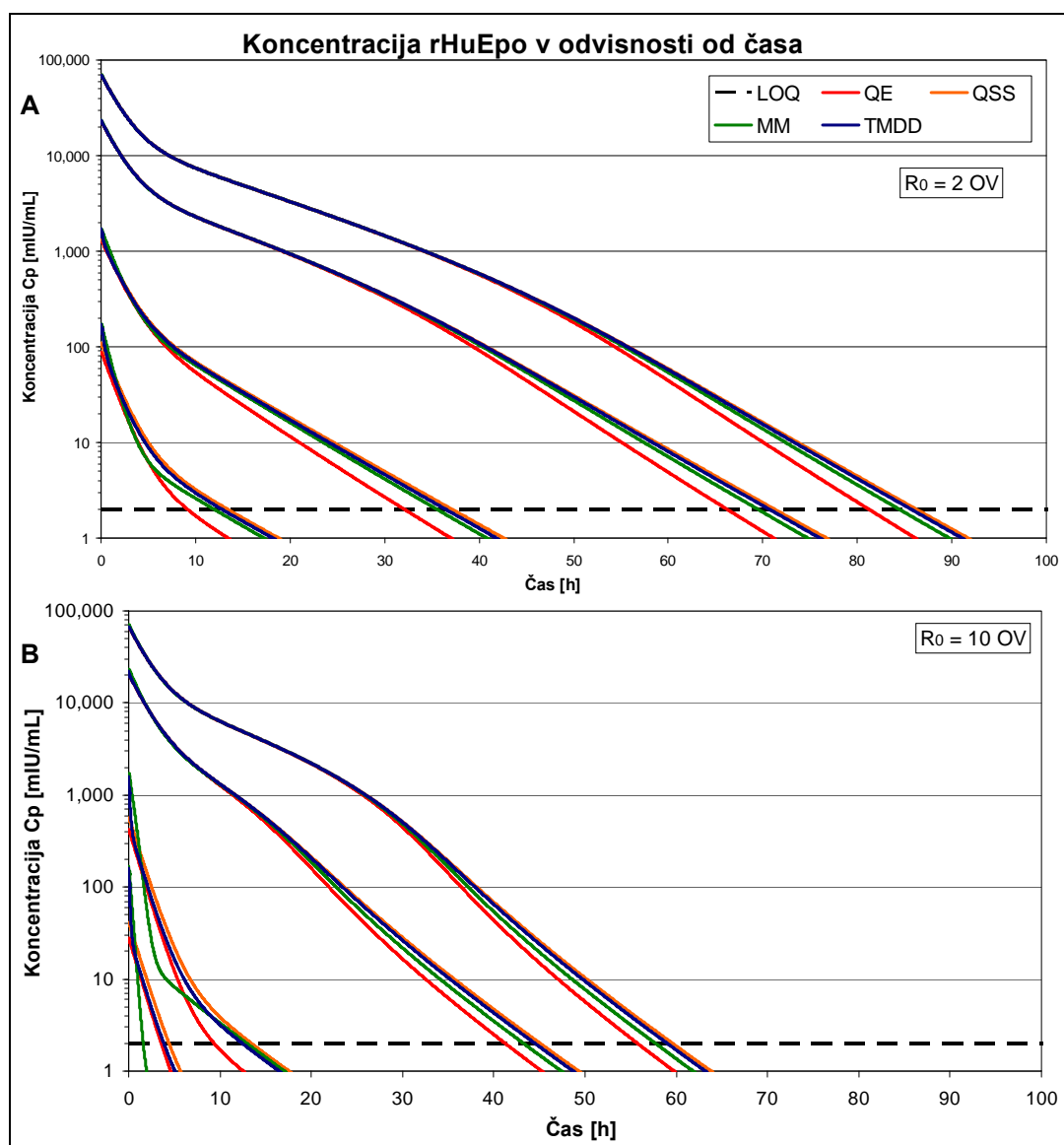


Slika 16: Plazemske koncentracije rHuEpo, ki smo jih dobili s simulacijo TMDD-, QE-, QSS- in MM-modela. Na grafu A je podan odziv modelov z 12. kombinacijo parametrov ($k_{int} = 2$ OV), na grafu B pa s 13. kombinacijo ($R_0 = 0,5$ OV). Simulacije smo izvedli za odmerke 10, 100, 1350 in 4050 IU/kg. LOQ označuje mejo kvantifikacije.

Hitrostno konstanto internalizacije k_{int} smo pri 12. kombinaciji povečali za 100 %. Na sliki 16A opazimo, da je stopnja nelinearnosti večja. QE-model pričakovano odstopa od TMDD-modela, saj je $k_{int} \approx k_{off}$ (glej tabelo VI). MM-model bolje opiše TMDD kot pri osnovnih

parametrih. Pri večjem k_{int} je K_{ss} večji, zato je vrednost faktorja γ nižja. QSS-model je enako dober kot pri osnovnih parametrih.

Za 13. kombinacijo smo znižali začetno koncentracijo prostega receptorja R_0 za 50 %. Pri nespremenjeni hitrostni konstanti razgradnje velja, da je konstanta sinteze receptorja tudi znižana. Za posledico ugotavljamo, da je število receptorjev za vezavo z učinkovino in nadaljnjo eliminacijo manjše. Na sliki 16B opazimo, da se je čas zadrževanja učinkovine v telesu podaljšal, saj je s tarčo posredovana eliminacija učinkovine nižja. Podobno kot v primeru z osnovnimi parametri QE-model odstopa od TMDD-modela. QSS in MM imata pri simulaciji enake profile kot TMDD-model.



Slika 17: Plazemske koncentracije rHuEpo, ki smo jih dobili s simulacijo TMDD-, QE-, QSS- in MM-modela. Na grafu A je podan odziv modelov s 14. kombinacijo parametrov ($R_0 = 2$ OV), na grafu B pa s 15. kombinacijo ($R_0 = 10$ OV). Simulacije smo izvedli za odmerke 10, 100, 1350 in 4050 IU/kg. LOQ označuje mejo kvantifikacije.

Simulirali smo modele, kjer smo povečali začetno koncentracijo receptorjev R_0 . V primeru 14 smo jo povečali za faktor 2 (slika 17A), v primeru 15 pa za 10 (slika 17B). Pri 14. primeru vidimo, da MM-model dobro opiše TMDD-kinetiko za vse odmerke eritropoetina razen za 10 IU/kg. Za ta odmerek velja, da je začetna koncentracija receptorja R_0 večja od začetne koncentracije učinkovine C_0 in da je faktor γ konstantno približno enak 0,6. V 15. primeru pa vidimo, da MM odstopa od TMDD-kinetike tudi pri aplikaciji odmerka 100 IU/kg. V tem primeru namreč velja, da je tudi pri aplikaciji 100 IU/kg $R_0 > C_0$ in γ je konstantno večji od 1. Iz tega lahko potrdimo sklep, ki sta ga postavila Gibiansky in Gibiansky, da MM-model velja, ko je začetna koncentracija učinkovine večja od začetne koncentracije receptorja (9). Podobno velja tudi pogoj, da je $\gamma \ll 1$, ki so ga postavili Yan in sodelavci (24). Na sliki 17A in B vidimo, da QE-model v terminalni fazi ponovno odstopa pri obeh simuliranih primerih. Nasprotno kot v 13. primeru je tukaj več receptorjev na voljo za vezavo in eliminacijo, zato je večji delež učinkovine podvržene nelinearnim procesom.

QE-model se je izkazal za najmanj primernega predvsem zato, ker pri izračunu ravnotežne koncentracije kompleksa UR ne upošteva hitrostne konstante internalizacije. Od ostalih plazemskih koncentracijskih profilov se je razlikoval predvsem, ko je bilo razmerje med k_{int} in k_{off} visoko. QSS-model pri vrednotenju ravnotežja kompleksa UR upošteva kinetiko internalizacije in je pri izvajanju simulacij tudi najboljše posnel TMDD-plazemske koncentracijske profile. MM-model je bil pri tem tudi uspešen, razen pri nižjih vrednostih parametra k_{int} .

Vrednosti faktorja ε niso bile sorazmerne z odstopanjem QE- in QSS-modela od TMDD-modela v celotnem časovnem območju, ko so bile koncentracije učinkovine nad mejo kvantifikacije. Faktor primerja le začetno kinetiko vezave učinkovine na receptor z njeno eliminacijo, zato je primeren za ugotavljanje, kako QE- in QSS-model opišeta začetno kinetiko učinkovine (23). Faktor γ je bil pri vseh izvedenih simulacijah dober pokazatelj primernosti uporabe MM-modela. Razlike v odzivih MM- in TMDD-modela so sovpadale z dvigom vrednosti faktorja γ nad 0,2.

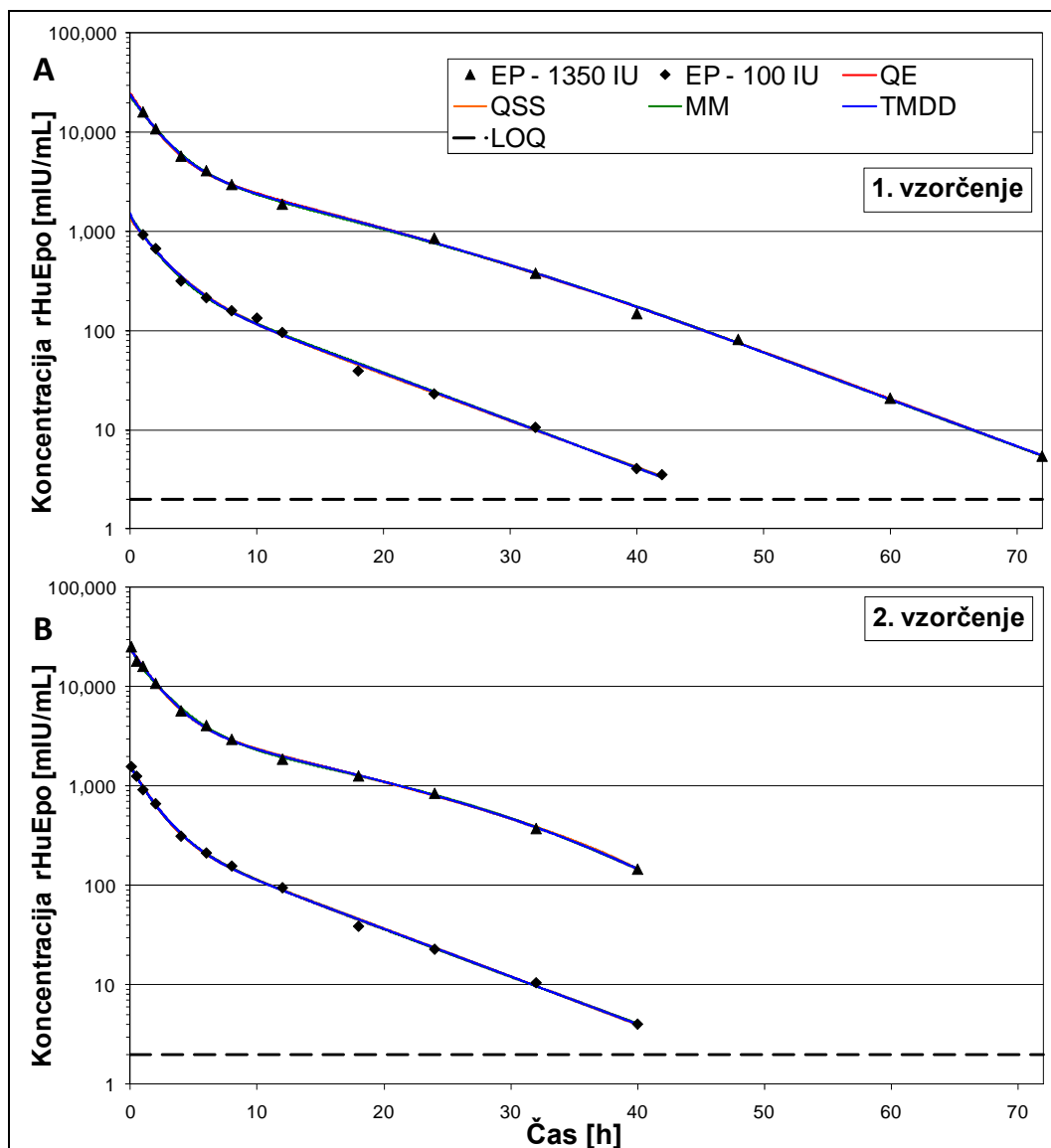
4.2 Ocenjevanje parametrov TMDD-, QE-, QSS- in MM-modela

Identifikacija parametrov TMDD-modela je pogosto neizvedljiva oziroma zelo težavna, posebej pri majhnem številu eksperimentalnih podatkov in v primerih, ko imamo podatke le o koncentraciji učinkovine brez podatkov o koncentraciji kompleksa (učinkovina-receptor) ali receptorja (9). To velja tudi v našem primeru, kjer smo imeli simulirane koncentracije učinkovine le ob 12 različnih časih. V praksi je neizvedljivo pridobiti podatke o koncentraciji

receptorjev EpoR oziroma kompleksa rHuEpo-EpoR, ker je le-ta v kostnem mozgu na membranah celic predhodnikov eritrocitov. Zaradi tega smo pri simulaciji za eksperimentalne podatke izbrali le plazemsko koncentracijo rHuEpo.

Rezultati ocenjevanja parametrov s prilagajanjem modela eksperimentalnim podatkom z metodo največjega verjetja so podani v prilogi Č. Pri aplikaciji odmerka 100 IU/mL je bil Bayesov informacijski kriterij (BIC) nižji kot pri odmerku 1350 IU/mL, saj nanj vpliva vrednost objektivne funkcije. Ta vrednost je med drugim odvisna tudi od variance napake napovedovanja koncentracije modelov, ki je proporcionalna koncentraciji učinkovine. Kriterij je bil pri 2. načinu vzorčenja, kjer je bilo vzorčenje postavljeno bolj na začetku, večji kot pri 1. načinu. QE-, QSS- in MM-modeli so imeli podobne vrednosti BIC. Pri 2. načinu vzorčenja pri aplikaciji odmerka 1350 IU/mL je imel MM-model izjemoma nižjo vrednost BIC (168) od ostalih (275). Vrednost objektivne funkcije (O_{NLL}) je bila pri vseh modelih približno enaka, medtem ko je bil BIC pri TMDD-modelu večji v primerjavi z ostalimi modeli. Pri izračunu vrednosti Bayesovega informacijskega kriterija se dodatno število parametrov kaznuje, zato so je vrednost BIC razlikovala med TMDD in ostalimi modeli. Na drugi strani se pri izračunu vrednosti O_{NLL} ne upošteva število parametrov in je zato pri vseh modelih približno enaka.

Na sliki 18 sta prikazana grafa s podanimi eksperimentalnimi podatki in s simuliranimi odzivi modelov, ki smo jih dobili na podlagi ocenjenih parametrov. Vsi simulirani profili dobro opisujejo eksperimentalne podatke.



Slika 18: Plazemska koncentracija rekombinantnega humanega eritropoetina (rHuEpo) v odvisnosti od časa. Na grafu A je 1. način vzorčenja, na graf B pa 2. način. Kvadrati (100 IU/kg) in trikotniki (1350 IU/kg) predstavljajo eksperimentalne podatke, ki smo jih dobili s simulacijo TMDD-modela z osnovnimi parametri (tabela II). Krivulje (TMDD, QE, QSS in MM) predstavljajo iz ocen parametrov simulirane modele. LOQ označuje mejo kvantifikacije (2 mIU/mL).

Pri TMDD-modelu smo ocenjevali 10 parametrov, pri QE-, QSS- in MM-modelu pa 9. Zaradi velikega števila parametrov in malo stopenj prostosti (pri TMDD 2 in pri ostalih 3 stopnje prostosti) nismo dobili dobrih ocen parametrov. Tudi koeficienti variacije (CV) dobljenih parametrov so bili večinoma večji od 100 %. Bolj točne in natančne ocene parametrov smo dobili iz eksperimentalnih podatkov z več vzorčnimi točkami.

Ugotovili smo, da na splošno modeli pri večjem odmerku (1350 IU/kg) bolje ocenijo parametre linearnih procesov, kot so k_{el} , k_{12} in k_{21} , ter V_p , medtem ko pri aplikaciji nižjega odmerka (100 IU/kg) lahko z uporabljenimi modeli bolje ocenimo parametre nelinearnih procesov, kot so k_{on} , k_{off} , R_0 , K_{ss} in K_m . Pri višjem odmerku so namreč ti procesi nasičeni in zaradi tega je njihova ocena slabša.

Hitrostna konstanta eliminacije (k_{el}) je bila v večini primerov dobro ocenjena. Najbolje sta jo ocenila QE- in QSS-modela pri 1. načinu vzorčenja ob aplikaciji večjega odmerka. Pri tem vzorčenju so bili podatki enakomerno razporejeni vse do 72. ure. Volumen porazdelitve (V_p) je bil pri 2. načinu vzorčenja dobro ocenjen, čeprav je bila standardna napaka ocene velika ($CV > 100\%$). Parametra k_{deg} in k_{int} sta bila slabo ocenjena. Njuni koeficienti variacije so bili vsi višji od 100% in v mnogih primerih tudi višji od 1000% . Izjema je le pri 1. načinu vzorčenja, kjer je MM-model pri odmerku 1350 IU/kg ocenil parameter k_{deg} s koeficientom variacije 18% . Hitrostni konstanti porazdelitve učinkovine v stranski prostor (k_{12} in k_{21}) sta bili bolje ocenjeni. Odstopanja od osnovne vrednosti in CV so bila majhna predvsem pri večjem odmerku 1350 IU/kg ob 1. načinu vzorčenja. Začetna koncentracija receptorja (R_0) je bila tudi slabo ocenjena. Z uporabo modelov smo jo bolje ocenili pri aplikaciji nižjega odmerka. TMDD-model je nenatančno ocenil parametra k_{on} in k_{off} . Njune končne ocene so se od pravih vrednosti bolj razlikovale, kot so se razlikovale nastavljene začetne vrednosti ocenjevanja. Tudi pri 2. vzorčenju, kjer je več vzorčnih točk postavljenih na začetek, kjer poteka vezava učinkovine na receptor, nismo dobili boljših rezultatov. Po primerjavi smo ugotovili, da sta njuni oceni boljši pri odmerku 100 IU/kg . Pri 1. načinu vzorčenja je TMDD-model bolje ocenil konstanto disociacije (K_D) kot QE-model, pri 2. načinu pa se je pri tem bolje izkazal QE-model. Vse ocene K_D so imele visok CV. Tudi konstanta stacionarnega stanja ter Michaelis-Mentenova konstanta (K_{ss} in K_m) sta bili ocenjeni nenatančno.

Gibiansky in Gibiansky pripisujeta razlog za slabo identifikacijo tradicionalnemu načinu vzorčenja (9). Vzorčenje ni ustrezno postavljeno za ocenjevanje hitrih vezavnih procesov, zato bi bilo potrebno pogosteje vzorčiti v začetnem času, ko poteka vezava učinkovine na receptor (9). Pri 2. vzorčenju, ki vsebuje več na začetku razporejenih točk, smo bolje ocenili parametra k_{on} in k_{off} , pa vendar ta ocena ni bila zadovoljivo dobra. Sklepamo, da je za dobro oceno teh parametrov potrebno postaviti dodatne vzorčne točke na sam začetek aplikacije.

Priporočena sta dva načina modeliranja učinkovin, ki izkazujejo tarčno posredovano farmakokinetiko:

- I. Gibiansky in sodelavci so postavili algoritem za izbiro najbolj primerne modela. Pri njem se s TMDD-modelom najprej ocenjuje parametre modela in na podlagi teh vrednosti se z vsemi modeli (TMDD, QE, QSS in MM) izvede simulacijo. Najprimernejši model je izbran na podlagi primerjave simuliranih krivulj. V primeru, da imata 2 modela podoben odziv, se privzame bolj enostavni model. Če se pri določenem odmerku izkaže, da je drugi model bolj primeren kot pri ostalih odmerkih,

potem lahko pri modeliranju tega določenega odmerka uporabimo najprimernejši model (11).

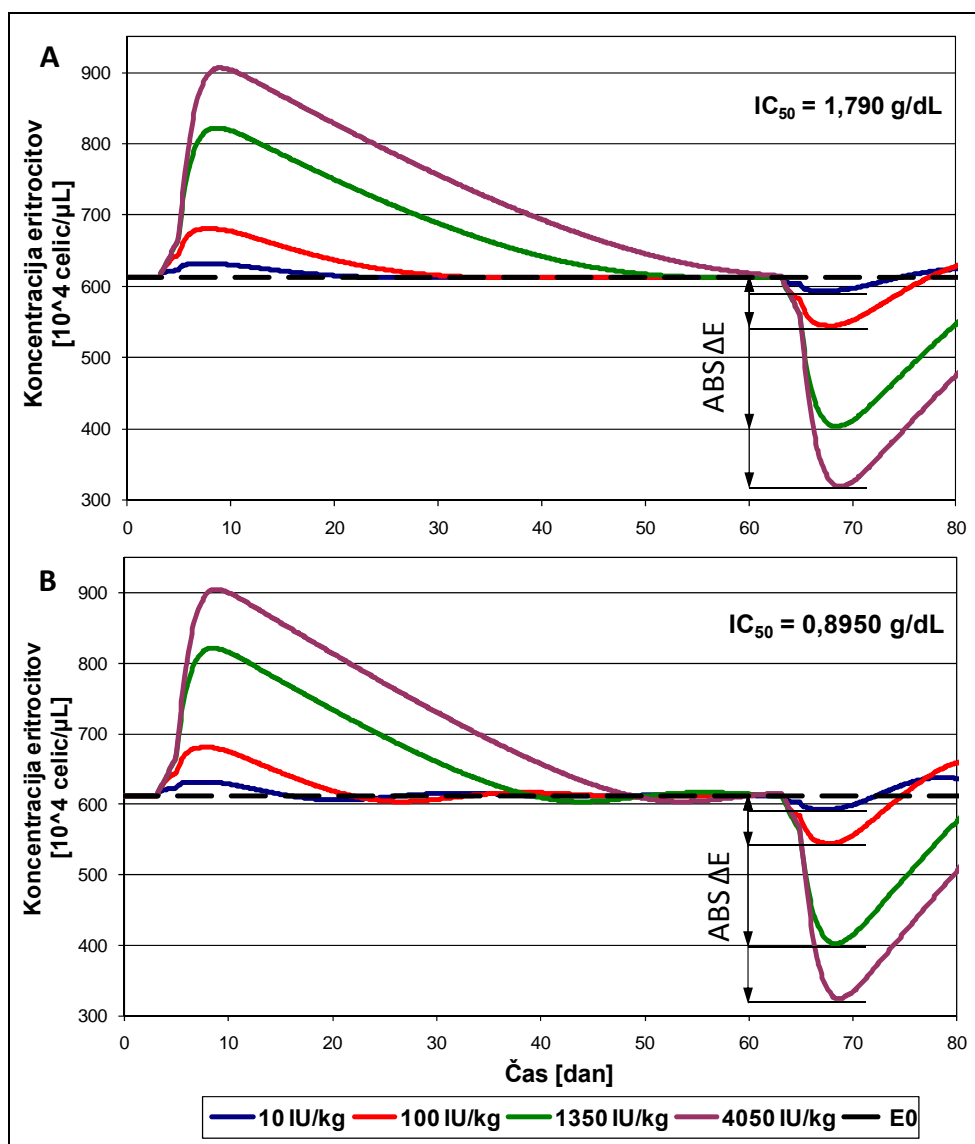
- II. Yan in sodelavci so podali smernico, kjer naj bi se parametri ocenjevali iz eksperimentalnih podatkov z vsemi modeli (TMDD, QE, QSS in MM). Nato modele med seboj primerjamo z informacijskim kriterijem in s koeficienti variacije. Izbran naj bo model, ki poda oceno parametra z zadovoljivo natančnostjo in najnižjim informacijskim kriterijem (24).

4.3 Simulacija verižnega PD modela za rekombinantni humani eritropoetin

Pri simulaciji verižnega farmakodinamičnega modela smo obravnavali le zrele rdeče krvne celice (eritrocite), medtem ko smo nezrele (retikulocite) vključili v predprostor P_2 . Pri tem smo zanemarili tudi vpliv retikulocitov na krvno koncentracijo hemoglobina. Ti dve poenostavitvi sta bili potrebni, ker smo bili pri modeliranju v programskem okolju ADAPT 5 omejeni na 200 navadnih diferencialnih enačb. Poenostavili smo tudi, da na bazno linijo eritrocitov v krvi ne vplivajo rast in razvoj podgan ter pogosto vzorčenje krvi. S temi predpostavkami model ne prikazuje točnega realnega sistema, ampak ponazarja le približek.

Na sliki 19 je prikazan simuliran efekt rHuEpo na koncentracijo eritrocitov v krvi na podganah. Po aplikaciji odmerka se po približno 75-ih urah poveča število eritrocitov. Časovni zamik delovanja eritropoetina je posledica rasti predhodnikov eritrocitov. Koncentracija eritrocitov se dvigne do maksimuma, ki je odvisen od količine apliciranega odmerka. Odmerek 10, 100, 1350 in 4050 IU/kg vsak posebej dvigne koncentracijo eritrocitov s 600 na 632, 681, 822 in 906 10^4 celic na mikroliter krvi. Po doseženi maksimalni koncentraciji eritrocitov počasi pada nazaj proti začetni vrednosti oziroma bazni liniji. To je posledica znižane eritropoeze oziroma nižje kinetike prihajanja eritrocitov v krvni obtok zaradi inhibitornega delovanja povišane koncentracije hemoglobina. Pri tem ostane kinetika odstranjevanja eritrocitov iz krvnega obtoka zaradi odmiranja nespremenjena. Po približno 63 dneh (9 tednov) zasledimo dodaten strm padec koncentracije eritrocitov, in sicer pod začetno bazno linijo. Do te reakcije pride zaradi odmiranja po preteku življenjske dobe tistih novonastalih eritrocitov, ki so zaradi spodbujene eritropoeze v veliki količini prišli v krvni obtok. Podobno kot pri dvigu koncentracije eritrocitov je obseg znižanja števila eritrocitov v krvi odvisen od količine apliciranega odmerka. V naslednji stopnji je koncentracija hemoglobina zelo nizka, zato je njegova eritropoezna inhibicija zelo znižana, kar spodbudi

diferenciacijo in proliferacijo predhodnikov eritrocitov. To opazimo s ponovnim dvigom koncentracije eritrocitov k začetni vrednosti. Simulirani model določa, da imajo vsi eritrociti enako življenjsko dobo, vendar v realnosti temu ni tako. Za opis zadrževanja celic v prostoru bi bilo primerneje uporabiti stohastični model, kot ga je razvil Krzyzanski s sodelavci, ki bi življenjsko dobo eritrocitov opisal s porazdelitveno funkcijo (29).

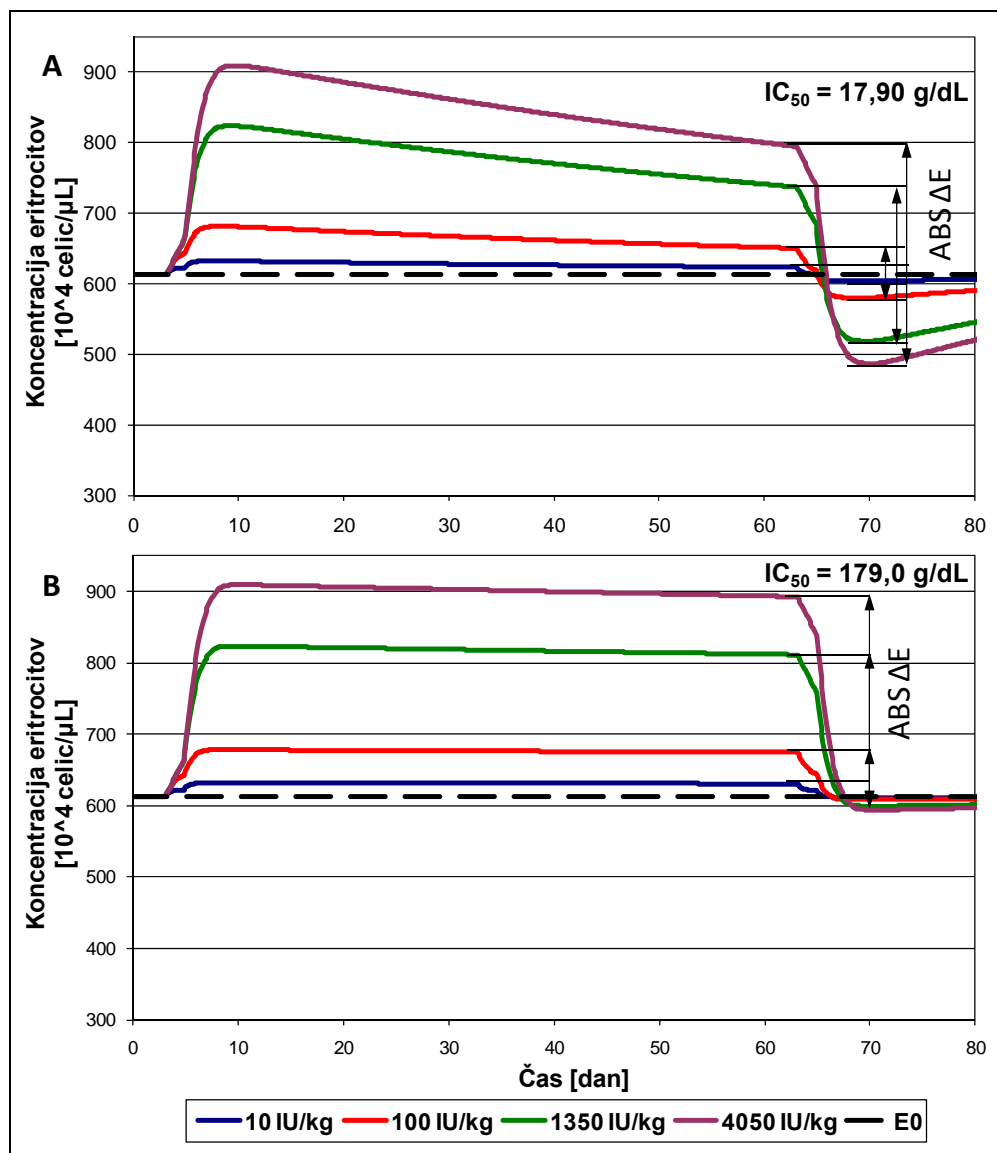


Slika 19: Odziv eritrocitov na odmere 10, 100, 1350 in 4050 IU/kg rekombinantnega humanega eritropoetina na podganah. Graf A prikazuje simulacijo za parameter IC_{50} z osnovno vrednostjo, B pa za 50 % osnovne vrednosti. E_0 označuje bazno linijo eritrocitov (ang. red blood cell), $ABS \Delta E$ pa označuje absolutno znižanje koncentracije eritrocitov.

Tudi Piron in sodelavci so v svoji študiji po prenehanju terapije, kjer so podganam tekom 20 dni vsak dan injicirali 130 IU/kg rekombinantnega eritropoetina, opazili znižanje retikulocitov in hematokrita pod bazno linijo (30). Število retikulocitov se je zmanjšalo na 50 % začetne vrednosti, hematokrit pa na 80 %. V študiji je ta anemija nastopila po 25 dneh (približno 600 ur) in hematokrit se je postopoma obnovil šele po 60 dneh (približno 1500 ur),

kar je v časovnem neskladju z našo simulacijo. Vzroke za znižanje hematokrita pripisujejo zmanjšani eritropoezni aktivnosti. Slednje je v nasprotju z našimi rezultati, kjer nižja eritropoezna aktivnost povzroči postopno znižanje števila eritrocitov k bazni liniji, medtem ko smo znižanje pod bazno linijo pripisali povečanemu odmiranju eritrocitov v krvi. Razlike med to študijo in našim modelom pripisujemo temu, da smo mi privzeli parametre iz druge študije, ki so jo izvedli Woo in sodelavci (22). V njej so podganam aplicirali enkratni odmerek in eritropoezno aktivnost spremljali le 24 dni.

Woo in sodelavci so eritropoezno inhibicijo privzeli za posledico povišane koncentracije hemoglobina v krvi, a kljub temu dopuščajo možnost prisotnosti tudi drugih mehanizmov, ki povzročajo znižanje eritropoezne aktivnosti (22). V naš model smo vključili le inhibitorni mehanizem povišane koncentracije hemoglobina. Parameter IC_{50} določa jakost inhibicijskega delovanja in predstavlja koncentracijsko spremembo hemoglobina, ki za polovico zmanjša nastajanje predhodnikov eritrocitov. Nižja vrednost parametra ima za posledico večjo inhibicijo, zato se povečane koncentracije eritrocitov hitreje vrnejo nazaj na začetni nivo (slika 19). Za višje vrednosti IC_{50} , kjer je jakost inhibicije nižja, velja pa nasprotno. Koncentracije eritrocitov se pri višjih IC_{50} počasneje znižujejo nazaj do bazne linije. Pri 100-kratni povečani vrednosti parametra IC_{50} je ta povratna inhibicija skoraj neopazna (slika 20).



Slika 20: Odziv eritrocitov na odmerek 10, 100, 1350 in 4050 IU/kg rekombinantnega humanega eritropoetina na podganah. Graf A prikazuje simulacijo za parameter IC_{50} z 10-kratno, B pa za 100-kratno vrednost osnovne vrednosti. E_0 označuje bazno linijo eritrocitov (ang. red blood cell), $ABS \Delta E$ pa označuje absolutno znižanje koncentracije eritrocitov. Na grafu B je z rdečo črto prikazan odziv odmerka 92 IU/kg.

Na slikah 19 in 20 so prikazane koncentracije eritrocitov za različne vrednosti parametra IC_{50} . Na absolutni obseg znižanja koncentracije eritrocitov v krvi po preteku življenjske dobe ($ABS \Delta E$) ne vplivajo vrednosti IC_{50} (tabela VII). Obseg padca eritrocitov pod bazno linijo pa je odvisen od parametra IC_{50} (tabela VIII). Vpliv IC_{50} na maksimalne koncentracije eritrocitov je zanemarljivo majhen. V preglednici IX so navedene najvišje vrednosti, ki jih doseže koncentracija eritrocitov.

Tabela VII: Absolutni obseg znižanja koncentracije eritrocitov v krvnem obtoku (ABS ΔE), ki se pojavi po preteku življenjske dobe novonastalih eritrocitov. Vrednosti so podane v enotah 10^4 celic/ μ L krvi in zaokrožene na eno decimalnko.

| Odmerek [IU/kg]: | Vrednost IC ₅₀ [g/dL]: | | | |
|------------------|-----------------------------------|--------|--------|--------------------|
| | 0,895 | 1,790 | 17,90 | 179,0 |
| 10 | -19,1 | -19,1 | -19,7 | -19,2 |
| 100 | -69,1 | -68,1 | -70,3 | -65,8 ^a |
| 1350 | -210,3 | -208,7 | -218,1 | -212,1 |
| 4050 | -292,2 | -295,5 | -307,3 | -298,6 |

a – Podatek je naveden za odmerek 92 IU/kg.

Tabela VIII: Obseg padca koncentracije eritrocitov pod bazno linijo po preteku življenjske dobe novonastalih eritrocitov. Vrednosti so podane v enotah 10^4 celic/ μ L krvi in zaokrožene na eno decimalnko.

| Odmerek [IU/kg]: | Vrednost IC ₅₀ [g/dL]: | | | |
|------------------|-----------------------------------|--------|--------|-------------------|
| | 0,895 | 1,790 | 17,90 | 179,0 |
| 10 | -19.5 | -19.1 | -9.6 | -1.2 |
| 100 | -68.1 | -68.0 | -33.2 | -4.3 ^a |
| 1350 | -211.0 | -209.5 | -94.3 | -13.5 |
| 4050 | -289.0 | -293.7 | -126.3 | -18.8 |

a – Naveden je podatek za odmerek 92 IU/kg.

Tabela IX: Maksimalne koncentracije eritrocitov v krvnem obtoku. Vrednosti so podane v enotah 10^4 celic/ μ L krvi in zaokrožene na eno decimalnko.

| Odmerek [IU/kg]: | Vrednost IC ₅₀ [g/dL]: | | | |
|------------------|-----------------------------------|-------|-------|--------------------|
| | 0,895 | 1,790 | 17,90 | 179,0 |
| 10 | 631,8 | 631,8 | 631,8 | 631,8 |
| 100 | 680,8 | 680,8 | 680,8 | 678,2 ^a |
| 1350 | 822,0 | 822,3 | 823,1 | 823,4 |
| 4050 | 905,3 | 906,5 | 908,7 | 909,3 |

a – Naveden je podatek za odmerek 92 IU/kg.

5 SKLEPI

S simuliranjem plazemskih profilov rHuEpo smo ugotovili, da se je QSS-model od izbranih modelov za opis kinetike učinkovin, za katere je značilna tarčno posredovana farmakokinetika, izkazal kot najprimernejši. Z izjemo primerov z nizkimi vrednostmi k_{int} ali v primerih, ko je koncentracija receptorja večja od koncentracije učinkovine, je bil tudi MM-model uspešen pri opisu TMDD-kinetike. Ob tem smo ugotovili, da je MM-model odstopal od TMDD-modela, ko je bila vrednost faktorja γ nad 0,2. Na drugi strani QE-model ni ustrezno posnel TMDD-krivulje, saj je bila hitrostna konstanta internalizacije kompleksa rHuEpo-EpoR relativno visoka.

S prilagajanjem modelov eksperimentalnim podatkom z metodo največjega verjetja smo dobili ocene parametrov modelov z visokimi koeficienti variacije. Vrednosti hitrostnih konstant linearnih farmakokinetičnih procesov so bile bolje ocenjene v primerjavi z ostalimi. Informacijski kriterij BIC je bil približno enak pri QE-, QSS- ter MM-modelu in večji pri TMDD-modelu. To je predvsem posledica tega, ker ima TMDD-model, v primerjavi z ostalimi, dodaten parameter, ki smo ga ocenjevali. Kljub tej razliki pri QE-, QSS- in MM-modelu nismo dobili boljših ocen parametrov kot pri TMDD-modelu. Krivulje, ki so bile pridobljene s simulacijo modelov z ocenjenimi parametri, so dobro opisale eksperimentalne podatke.

Na podganah smo izvedli simulacijo spremembe koncentracije eritrocitov po aplikaciji enkratnega odmerka rHuEpo z razvitim farmakokinetičnim/farmakodinamičnim modelom. Zaradi zorenja in rasti predhodnikov eritrocitov je učinek eritropoetina nastopil z zamikom. Po preteku življenjske dobe novonastalih eritrocitov je prišlo do nenadnega znižanja koncentracije eritrocitov pod bazno linijo. Količina apliciranega odmerka je vplivala na maksimalno koncentracijo eritrocitov, medtem ko vrednost inhibicijskega parametra IC_{50} nanjo ni imela vpliva. PK/PD model je dokaj poenostavljen, saj v njem ni vključen prostor retikulocitov v krvi in predpostavlja, da imajo vse celice enako življenjsko dobo. Nadaljnji razvoj modela bi lahko usmerili k vključitvi prostora retikulocitov in k stohastičnim modeliranjem življenjske dobe eritrocitov.

6 LITERATURA

1. Bogataj M, Kerec M, Grabnar I, Primožič S, Mrhar A: Vaje iz biofarmacije s farmakokinetiko – skripta, 2000.
2. Karba R: Modeliranje procesov, Fakulteta za elektrotehniko, Ljubljana, 1999: 1–31.
3. Shargel L, Wu-pong S, Yu A. B. C.: Applied biopharmaceutics & pharmacokinetics, 5th edition, McGraw-Hill, New York, 2005: 1–19, 219–222.
4. Štrukelj B, Kos J: Biološka zdravila, od gena do učinkovine, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007: 4–24, 284–307.
5. Baumann A: Early development of therapeutic biologics – Pharmacokinetics: *Curr Drug Metab* 2006; 7: 15–21.
6. Tang L, Persky AM, Hochhaus G, Meibohm B: Pharmacokinetic aspect of biotechnology products. *J Pharm Sci* 2004; 93: 2184–2204.
7. Meibohm B: Pharmacokinetics and pharmacodynamics of biotech drugs, Wiley-VCH, Chichester, 2006: 17–43.
8. Mager D, Jusko W: General pharmacokinetic model for drugs exhibiting target-mediated drug disposition. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 2001; 28: 507–532.
9. Gibiansky L, Gibiansky E: Target-mediated drug disposition model: approximations, identifiability of model parameters and applications to the population pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of biologics. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2009; 5: 803–812.
10. Mager DE, Krzyzansky W: Quasi-equilibrium pharmacokinetic model for drugs exhibiting target-mediated drug disposition. *Pharm Res* 2005; 22: 1589–1596.
11. Gibiansky L, Gibiansky E, Kakkar T, Ma P: Approximations of the target-mediated drug disposition model and identifiability parameters. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 2008; 35: 573–591.
12. Walsh G: Biopharmaceuticals: biochemistry and biotechnology, Wiley, Chichester, 2003: 264–273.
13. Kocijančič A, Mrevlje F, Štajer D: *Interna medicina, Littera Picta*, Ljubljana, 2005: 1172–1176.
14. Fisher JW: Erythropoietin: physiology and pharmacology update. *Exp Biol Med* 2003; 228: 1–14.
15. Macdougall IC, Gray SJ, Elston O, Breen C, Jenkins B, Browne J, Egrie J: Pharmacokinetics of novel erythropoiesis stimulating protein compared with epoetin alfa in dialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 2392–2395.

16. O'Mara NB, Kapoian T: Continuous erythropoiesis receptor activator (CERA) – An erythropoiesis-stimulating agent for the treatment of anemia in patients with chronic kidney disease. *Formulary* 2007; 42: 233–244.
17. Jelkmann W: Molecular biology of erythropoietin. *Intern Med* 2004; 43: 649–659.
18. Meibohm B, Derendorf H: Basic concepts of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) modelling. *Int J Clin Pharmacol Ther* 1997; 35: 401–413.
19. Krzyzanski W, Ramakrishnan R, Jusko WJ: Basic pharmacodynamic models for agents that alter production of natural cells. *J Pharmacokinet Biopharm* 1999; 27: 467–489.
20. D'Argenio DZ, Schumitzky A: ADAPT 5 – User's guide: Pharmacokinetic/pharmacodynamic system analysis software. Biomedical Simulations Resource, Los Angeles, 2008.
21. Myung IJ: Tutorial on maximum likelihood estimation. *J Math Psychol* 2003; 47: 90–100.
22. Woo S, Krzyzanski W, Jusko WJ: Target-mediated pharmacokinetic and pharmacodynamic model of recombinant human erythropoietin (rHuEPO). *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 2007; 34: 849–868.
23. Marathe A, Krzyzanski W, Mager DE: Numerical validation and properties of a rapid binding approximation of a targeted drug disposition pharmacokinetic model. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 2009; 36: 199–219.
24. Yan X, Mager DE, Krzyzanski W: Selection between Michaelis-Menten and target-mediated drug disposition pharmacokinetic models. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 2010; 37: 25–47.
25. Woo S, Krzyzanski W, Jusko WJ: Pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling of recombinant human erythropoietin after intravenous and subcutaneous administration in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 319: 1297–1306.
26. Bellen A, Zennaro M: Numerical methods for delay differential equations, Clarendon Press, Oxford, 2003: 54–56.
27. Peletier LA, Gabrielsson J: Dynamics of target-mediated drug disposition. *Eur J Pharm Sci* 2009; 38: 445–464.
28. Abraham AK, Krzyzanski W, Mager DE: Partial derivative-based sensitivity analysis of models describing target-mediated drug disposition. *AAPS J* 2007; 9: E181–E189.
29. Krzyzanski W, Woo S, Jusko WJ: Pharmacodynamic models for agents that alter production of natural cells with various distributions of lifespan. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 2006; 33: 125–166.
30. Piron M, Loo M, Gothot A, Tassin F, Fillet G, Beguin Y: Cessation of intensive treatment with recombinant human erythropoietin is followed by secondary anemia. *Blood* 2001; 97: 442–448.

7 PRILOGE

7.1 Priloga A

V enačbi 12a izrazimo UR:

$$UR = C_{tot} - C_p \quad \text{Enačba A1}$$

Če v enačbo 12b vključimo enačbo A1 in nato izrazimo spremenljivko R, pridemo do naslednjega:

$$R = R_{tot} - UR = R_{tot} - (C_{tot} - C_p) \quad \text{Enačba A2}$$

Ko v enačbi 11 zamenjamo spremenljivki UR in R z desnima stranema enačb A1 in A2, dobimo naslednjo veljavnost:

$$K_D = \frac{C_p * [R_{tot} - (C_{tot} - C_p)]}{C_{tot} - C_p} \quad \text{Enačba A3}$$

Enačbo preoblikujemo v kvadratno obliko:

$$C_p^2 - (C_{tot} - R_{tot} - K_D) * C_p - K_D * C_{tot} = 0 \quad \text{Enačba A4}$$

Splošna rešitev kvadratne enačbe A4 je:

$$C_{p1,2} = \frac{(C_{tot} - R_{tot} - K_D) \pm \sqrt{(C_{tot} - R_{tot} - K_D)^2 + 4 * K_D * C_{tot}}}{2} \quad \text{Enačba A5}$$

Ker velja $K_D > 0$ in $C_{tot} \geq 0$, je enačba 16 edina ne negativna rešitev.

7.2 Priloga B

I. Osnovni model tarčno posredovane farmakokinetike (TMDD-model):

```

Subroutine SYMBOL
  Implicit None

  Include 'globals.inc'
  Include 'model.inc'

CC
C-----C
C   Enter as Indicated                               C
C-----C

      NDEqs   = 5 ! Enter # of Diff. Eqs.
      NSParam = 9 ! Enter # of System Parameters.
      NVparam = 2 ! Enter # of Variance Parameters.
      NSecPar = 3 ! Enter # of Secondary Parameters.
      NSecOut = 0 ! Enter # of Secondary Outputs (not used).
      Ieqsol  = 1 ! Model type: 1 - DIFFEQ, 2 - AMAT, 3 - OUTPUT only.
      Descr   = ' TMDD model simulacija '

CC
C-----C
C   Enter Symbol for Each System Parameter (eg. Psym(1)='Kel') C
C-----C
      Psym(1)='Kel'
      Psym(2)='Vp'
      Psym(3)='Kon'
      Psym(4)='Koff'

```



```

Psym(5)='Kdeg'
Psym(6)='Kint'
Psym(7)='Kpt'
Psym(8)='Ktp'
Psym(9)='Ka'

CC
C-----C
C   Enter Symbol for Each Variance Parameter {eg: PVsym(1)='Sigma'}   C
C-----C
      PVsym(1)='SDinter' !odsek
      PVsym(2)='SDslope' !naklon

CC
C-----C
C   Enter Symbol for Each Secondary Parameter {eg: PSsym(1)='CLt'}   C
C-----C
      PSsym(1)='Kd'
      PSsym(2)='Kss'
      PSsym(3)='Ksyn'

C-----C
C-----C
C
      Return
      End

C#####C

      Subroutine DIFFEQ(T,X,XP)
      Implicit None

      Include 'globals.inc'
      Include 'model.inc'

      Real*8 T,X(MaxNDE),XP(MaxNDE)

      Real*8 Kel,Vp,Kon,Koff,Kdeg,Kint,Kpt,Ktp,Ka
      Real*8 Ksyn

C
C   R(1) in X(5) imata enote IU na enoto telesne teže (TT)

CC
C-----C
C   Enter Differential Equations Below {e.g. XP(1) = -P(1)*X(1)}   C
C-----C
      Kel=P(1) ! enote: [1/h]
      Vp=P(2) ! enote: [L] na enoto telesne teže!
      Kon=P(3) ! enote: [L/nmol*1/h]
      Koff=P(4) ! enote: [1/h]
      Kdeg=P(5) ! enote: [1/h]
      Kint=P(6) ! enote: [1/h]
      Kpt=P(7) ! enote: [1/h]
      Ktp=P(8) ! enote: [1/h]
      Ka=P(9) ! enote: [1/h]

      Ksyn=IC(2)*Kdeg

      XP(1)=(R(1)+Ka*X(5))/4864.-(Kel+Kpt)*X(1)+Ktp*X(4)
      § -Kon*X(1)*X(2)+Koff*X(3)
      !X(1)=prosta ucinkovina na enoto TT [nmol]

      XP(2)=Ksyn-Kdeg*X(2)-Kon*X(1)/Vp*X(2)+Koff*X(3)/Vp
      !X(2)=konc. prostega recept na enoto TT [nmol/L]

      XP(3)=Kon*X(1)*X(2)-(Koff+Kint)*X(3)
      !X(3)=Kompleks UC-RE na enoto TT [nmol]

      XP(4)=Kpt*X(1)-Ktp*X(4)
      !X(4)=ucinkovina v stranskem prostoru na enoto TT [nmol]

      XP(5)=-Ka*X(5)
      !X(5)=prostor absorpcije na enoto TT [IU]

C-----C

```

```

C-----C
C
C      Return
C      End
C#####C

C      Subroutine OUTPUT(Y,T,X)
C      Implicit None

C      Include 'globals.inc'
C      Include 'model.inc'

C      Real*8 Y(MaxNOE),T,X(MaxNDE)

CC
C-----C
C      Enter Output Equations Below   {e.g.  Y(1) = X(1)/P(2) }
C-----C

C      Y(1) = X(1)*4864/P(2)
C      !Y(1)=konc. proste ucinkovine [mIU/mL]

C-----C
C-----C
C
C      Return
C      End
C#####C

C      Subroutine VARMOD(V,T,X,Y)
C      Implicit None

C      Include 'globals.inc'
C      Include 'model.inc'

C      Real*8 V(MaxNOE),T,X(MaxNDE),Y(MaxNOE)

CC
C-----C
C      Enter Variance Model Equations Below
C      {e.g.  V(1) = (PV(1) + PV(2)*Y(1))**2 }
C-----C
C      Yn=Odziv, podatki z napako
C      E= Napaka, s povprečjem nič in varianco V(1)
C
C      Yn(1)= E(1) + Y(1)

C      V(1) = (PV(1) + PV(2)*Y(1))**2

C-----C
C-----C
C
C      Return
C      End

```

II. Model z aproksimacijo ravnotežnega stanja vezave (QE-model):

```

Subroutine SYMBOL
Implicit None

Include 'globals.inc'
Include 'model.inc'

CC
C-----C
C      Enter as Indicated
C-----C

NDEqs  = 4   ! Enter # of Diff. Eqs.
NSParam = 8   ! Enter # of System Parameters.
NVparam = 2   ! Enter # of Variance Parameters.
NSecPar = 1   ! Enter # of Secondary Parameters.

```

```

NSecOut = 0 ! Enter # of Secondary Outputs (not used).
Ieqsol = 1 ! Model type: 1 - DIFFEQ, 2 - AMAT, 3 - OUTPUT only.
Descr = ' Quasi-equilibrium approximation of TMDD '

CC
C-----C
C   Enter Symbol for Each System Parameter (eg. Psym(1)='Kel')           C
C-----C
C   Psym(1)='Kel'
C   Psym(2)='Vp'
C   Psym(3)='KD'
C   Psym(4)='Kdeg'
C   Psym(5)='Kint'
C   Psym(6)='Kpt'
C   Psym(7)='Ktp'
C   Psym(8)='Ka'

CC
C-----C
C   Enter Symbol for Each Variance Parameter {eg: PVsym(1)='Sigma'}      C
C-----C
C   PVsym(1)='SDinter' !odsek
C   PVsym(2)='SDslope' !naklon

CC
C-----C
C   Enter Symbol for Each Secondary Parameter {eg: PSsym(1)='CLt'}      C
C-----C
C   PSsym(1)='Ksyn'

C-----C
C-----C
C
C   Return
C   End

C#####C

C   Subroutine DIFFEQ(T,X,XP)
C   Implicit None

C   Include 'globals.inc'
C   Include 'model.inc'

C   Real*8 T,X(MaxNDE),XP(MaxNDE)

C   Real*8 Kel,Vp,KD,Kdeg,Kint,Kpt,Ktp,Ka
C   Real*8 Cp,Ksyn

CC
C-----C
C   Enter Differential Equations Below {e.g. XP(1) = -P(1)*X(1)}      C
C-----C
C
C   CP = koncentracija proste ucinkivine v centralnem prostoru [nmol/L]
C   R(1)= hitrost infuzije ucinkovine na enoto TT [IU/h]
C   B = količina ucinkovine na enoto TT [nmol]
C   PAZI:v prostor 4 podaj kolicino v [IU] v prosotor 1,2,3 pa v [nmol]!
C
C
C   Kel=P(1)           ! enote: [1/h]
C   Vp=P(2)           ! enote: [L]
C   KD=P(3)           ! enote: [nmol/L]
C   Kdeg=P(4)         ! enote: [1/h]
C   Kint=P(5)         ! enote: [1/h]
C   Kpt=P(6)          ! enote: [1/h]
C   Ktp=P(7)          ! enote: [1/h]
C   Ka=P(8)           ! enote: [1/h]

C   Ksyn=IC(2)*Kdeg

C   Cp=0.5*((X(1)/Vp-X(2)-KD)+SQRT((X(1)/Vp-X(2)-KD)**2+4*KD*X(1)/Vp))

```

```

XP(1)=(R(1)+Ka*X(4))/4864.-Kint*X(1)-(Kel+Kpt-Kint)
$      *Cp*Vp+Ktp*X(3)
      !X(1)= centralni prostor celotne učinkovine na enoto TT [nmol]

XP(2)=(Ksyn-Kdeg*X(2))-((Kint-Kdeg)*(X(1)/Vp-Cp))
      !X(2)= centralni prostor vseh receptorjev na enoto TT [nmol/L]

XP(3)=Kpt*Cp*Vp-Ktp*X(3)
      !X(3)= stranski prostor na enoto TT [nmol]

XP(4)=-Ka*X(4)
      !X(4)= prostor absorpcije na enoto TT [IU]

C-----C
C-----C
C
      Return
      End

C#####C

      Subroutine OUTPUT(Y,T,X)
      Implicit None

      Include 'globals.inc'
      Include 'model.inc'

      Real*8 Y(MaxNOE),T,X(MaxNDE)

CC
C-----C
C   Enter Output Equations Below      {e.g.  Y(1) = X(1)/P(2) }      C
C-----C

      Y(1)=0.5*4864*(X(1)/P(2)-X(2)-P(3)+SQRT(((X(1)/P(2)-X(2)-P(3))**2)
$      +4*P(3)*X(1)/P(2)))
      !Y(1)=konc. proste ucinkovine [mIU/mL]

C-----C
C-----C
C
      Return
      End

C#####C

      Subroutine VARMOD(V,T,X,Y)
      Implicit None

      Include 'globals.inc'
      Include 'model.inc'

      Real*8 V(MaxNOE),T,X(MaxNDE),Y(MaxNOE)

CC
C-----C
C   Enter Variance Model Equations Below      C
C      {e.g.  V(1) = (PV(1) + PV(2)*Y(1))**2 }      C
C-----C
C
C      Yn(1)= E(1) + Y(1)
C
C      Yn=Odziv, podatki z napako
C      E= Napaka, s povprečjem nič in varianco V(1)
C      Y(1)= Odziv modela

      V(1) = (PV(1) + PV(2)*Y(1))**2

C-----C
C-----C
C

```

```

Return
End

```

III. Model z aproksimacijo stacionarnega stanja vezave (QSS-model):

```

Subroutine SYMBOL
Implicit None

Include 'globals.inc'
Include 'model.inc'

CC
C-----C
C   Enter as Indicated                                     C
C-----C

NDEqs   = 4   ! Enter # of Diff. Eqs.
NSParam = 8   ! Enter # of System Parameters.
NVparam = 2   ! Enter # of Variance Parameters.
NSecPar = 1   ! Enter # of Secondary Parameters.
NSecOut = 0   ! Enter # of Secondary Outputs (not used).
Ieqsol  = 1   ! Model type: 1 - DIFFEQ, 2 - AMAT, 3 - OUTPUT only.
Descr   = ' Quasi-steady-state approximation of TMDD '

CC
C-----C
C   Enter Symbol for Each System Parameter (eg. Psym(1)='Kel') C
C-----C
Psym(1)='Kel'
Psym(2)='Vp'
Psym(3)='Kss'
Psym(4)='Kdeg'
Psym(5)='Kint'
Psym(6)='Kpt'
Psym(7)='Ktp'
Psym(8)='Ka'

CC
C-----C
C   Enter Symbol for Each Variance Parameter {eg: PVsym(1)='Sigma'} C
C-----C
PVsym(1)='SDinter' !odsek
PVsym(2)='SDslope' !naklon

CC
C-----C
C   Enter Symbol for Each Secondary Parameter {eg: PSsym(1)='CLt'} C
C-----C
PSsym(1)='Ksyn'

C-----C
C-----C
C
Return
End

C#####C

Subroutine DIFFEQ(T,X,XP)
Implicit None

Include 'globals.inc'
Include 'model.inc'

Real*8 T,X(MaxNDE),XP(MaxNDE)

Real*8 Kel,Vp,Kss,Kdeg,Kint,Kpt,Ktp,Ka
Real*8 Cp,Ksyn,RC,Rp ! Rp=prost receptor

CC
C-----C

```



```

CC
C-----C
C   Enter Variance Model Equations Below                               C
C   {e.g. V(1) = (PV(1) + PV(2)*Y(1))**2 }                           C
C-----C-----C
C
C       Yn(1)= E(1) + Y(1)
C
C       Yn=Odziv, podatki z napako
C       E= Napaka, s povprečjem nič in varianco V(1)
C       Y(1)= Odziv modela

       V(1) = (PV(1) + PV(2)*Y(1))**2

C-----C
C-----C
C
C       Return
C       End

```

IV. Model z Michaelis-Mentenovo aproksimacijo (MM-model):

```

       Subroutine SYMBOL
       Implicit None

       Include 'globals.inc'
       Include 'model.inc'

CC
C-----C
C   Enter as Indicated                                               C
C-----C-----C

       NDEqs   = 4   ! Enter # of Diff. Eqs.
       NSParam = 8   ! Enter # of System Parameters.
       NVparam = 2   ! Enter # of Variance Parameters.
       NSecPar = 1   ! Enter # of Secondary Parameters.
       NSecOut = 0   ! Enter # of Secondary Outputs (not used).
       Ieqsol  = 1   ! Model type: 1 - DIFFEQ, 2 - AMAT, 3 - OUTPUT only.
       Descr   = ' Michaelis-Menten approximation of TMDD '

CC
C-----C
C   Enter Symbol for Each System Parameter (eg. Psym(1)='Kel')       C
C-----C-----C

       Psym(1)='Kel'
       Psym(2)='Vp'
       Psym(3)='Km'
       Psym(4)='Kdeg'
       Psym(5)='Kint'
       Psym(6)='Kpt'
       Psym(7)='Ktp'
       Psym(8)='Ka'

CC
C-----C
C   Enter Symbol for Each Variance Parameter {eg: PVsym(1)='Sigma'}   C
C-----C-----C

       PVsym(1)='SDinter' !odsek
       PVsym(2)='SDslope' !naklon

CC
C-----C
C   Enter Symbol for Each Secondary Parameter {eg: PSsym(1)='CLt'}   C
C-----C-----C
       PSsym(1)='CLt'

C-----C
C-----C
C

```

```

Return
End

C#####C

Subroutine DIFFEQ(T,X,XP)
Implicit None

Include 'globals.inc'
Include 'model.inc'

Real*8 T,X(MaxNDE),XP(MaxNDE)

Real*8 Kel,Vp,Kdeg,Kint,Kpt,Ktp,Ka,Km
Real*8 Ksyn,Vmax

CC
C-----C
C  Enter Differential Equations Below  {e.g.  XP(1) = -P(1)*X(1) }  C
C-----c-----C

Kel=P(1)  ! enote: [1/h]
Vp=P(2)  ! enote: [L]
Km=P(3)  ! enote: [nmol/L]
Kdeg=P(4) ! enote: [1/h]
Kint=P(5) ! enote: [1/h]
Kpt=P(6)  ! enote: [1/h]
Ktp=P(7)  ! enote: [1/h]
Ka=P(8)   ! enote: [1/h]

Ksyn=IC(2)*Kdeg
Vmax=X(2)*Kint  ! enote: [nmol/L/h]

XP(1)=(R(1)+Ka*X(4))/4864.-(Kel+Kpt)*X(1)-Vmax*X(1)*Vp
$ / (Km*Vp+X(1))+Ktp*X(3)
!X(1)=množina proste ucinkovine na enoto TT [nmol] v centralnem prostoru

XP(2)=Ksyn-Kdeg*X(2)-(Kint-Kdeg)*X(2)*X(1)/(Km*Vp+X(1))
!X(2)=centralni prostor vseh receptorjev na enoto TT [nmol/L]

XP(3)=Kpt*X(1)-Ktp*X(3)
!X(3)= stranski prostor na enoto TT [nmol]

XP(4)=-Ka*X(4)
!X(4)= prostor absorpcije na enoto TT [IU]

C-----C
C-----C
C

Return
End

C#####C

Subroutine OUTPUT(Y,T,X)
Implicit None

Include 'globals.inc'
Include 'model.inc'

Real*8 Y(MaxNOE),T,X(MaxNDE)

CC
C-----C
C  Enter Output Equations Below  {e.g.  Y(1) = X(1)/P(2) }  C
C-----c-----C

Y(1) = X(1)/P(2)*4864
!Y(1)=konc. proste ucinkovine [mIU/mL]

C-----C
C-----C

```



```

C
  Return
  End

C#####C

  Subroutine VARMOD(V,T,X,Y)
  Implicit None

  Include 'globals.inc'
  Include 'model.inc'

  Real*8 V(MaxNOE),T,X(MaxNDE),Y(MaxNOE)

CC
C-----C
C   Enter Variance Model Equations Below                               C
C     {e.g. V(1) = (PV(1) + PV(2)*Y(1))**2 }                          C
C-----C

C           Yn(1)= E(1) + Y(1)
C
C   Yn=Odziv, podatki z napako
C   E= Napaka, s povprečjem nič in varianco V(1)
C   Y(1)= Odziv modela

  V(1) = (PV(1) + PV(2)*Y(1))**2

C-----C
C-----C
C
  Return
  End

```

7.3 Priloga C

Če vključimo predpostavko QSS-modela (enačba 24) v enačbo 12a, dobimo:

$$C_{tot} = C_p + \frac{R_{tot} * C_p}{K_{ss} + C_p} \quad \text{Enačba C1}$$

Enačbo C1 odvajamo po času:

$$\frac{dC_{tot}}{dt} = \frac{dC_p}{dt} + \frac{R_{tot}(t) * K_{ss}}{(K_{ss} + C_p(t))^2} * \frac{dC_p}{dt} + \frac{C_p(t)}{K_{ss} + C_p(t)} * \frac{dR_{tot}}{dt} \quad \text{Enačba C2}$$

V enačbi C2 izrazimo $\frac{dC_p}{dt}$:

$$\frac{dC_p}{dt} = \frac{\frac{dC_{tot}}{dt} - \frac{C_p(t)}{K_{ss} + C_p(t)} * \frac{dR_{tot}}{dt}}{1 + \frac{R_{tot}(t) * K_{ss}}{(K_{ss} + C_p(t))^2}} \quad \text{Enačba C3}$$

Spremenljivko $\frac{dC_{tot}}{dt}$ zamenjamo z desno stranjo enačbe 25, ki velja za QSS-model, da pridemo do naslednjega:

$$\frac{dC_p}{dt} = \frac{\ln(t) - (k_{el} + k_{12}) * C_p(t) - \left(\frac{k_{int} R_{tot}(t) + \frac{dR_{tot}}{dt}}{K_{ss} + C_p(t)} \right) * C_p(t) + k_{21} * \frac{U_p(t)}{V_p}}{1 + \frac{R_{tot}(t) * K_{ss}}{(K_{ss} + C_p(t))^2}}$$

Enačba C4

Če privzamemo, da je koncentracija celotnega receptorja konstantna ($\frac{dR_{tot}}{dt} = 0$) oziroma je absolutna vrednost njenega diferenciala veliko manjša od njene vrednosti:

$$k_{int} * R_{tot}(t) \gg \left| \frac{dR_{tot}}{dt} \right|,$$

Enačba C5

lahko zanemarimo $\frac{dR_{tot}}{dt}$ v enačbi C4 in dobimo enačbo 48.

7.4 Priloga Č

Tabela X: Rezultati prilaganja modelov (TMDD, QE, QSS, MM) eksperimentalnim podatkom, ki smo jih dobili pri 1. načinu vzorčenja pri aplikaciji odmerka 100 IU/kg. Parametri imajo navedene osnovne vrednosti (OV) in izračunane relativne napake ocen parametrov. V oklepajih smo podali koeficient variacije ocen parametrov. Navedene so tudi vrednosti objektivne funkcije (O_{NLL}) in Bayesov informacijski kriterij (BIC).

| Parameter | OV | TMDD | QE | QSS | MM |
|---------------|--------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| O_{NLL} | / | 37,2 | 36,4 | 36,6 | 36,7 |
| BIC | / | 99 | 95 | 96 | 96 |
| k_{el} | 0,2256 [1/h] | -0,19 (>100) | -0,02 (>100) | 0,22 (>100) | -0,11 (>100) |
| V_p | 0,05694 [L] | 0,16 (28) | 0,15 (75) | 0,14 (>100) | 0,23 (34) |
| k_{deg} | 0,1133 [1/h] | -0,08 (>100) | 1,01 (>100) | -0,25 (>100) | 0,88 (>100) |
| k_{int} | 0,8228 [1/h] | 0,22 (>100) | -0,63 (>100) | -0,84 (>100) | 0,12 (>100) |
| k_{12} | 0,2092 [1/h] | -0,24 (84) | -0,16 (>100) | -0,33 (>100) | -0,14 (>100) |
| k_{21} | 0,1721 [1/h] | -0,09 (>100) | 0,13 (>100) | 0,13 (33) | 0,06 (40) |
| R_0 | 0,0632 [nmol/L] | 0,03 (14) | -0,31 (>100) | 0,17 (>100) | -0,46 (>100) |
| K_D | 0,1146 [nmol/L] | -0,02 (>100) | -0,34 (>100) | / | / |
| K_{ss}, K_m | 0,18726 [nmol/L] | 0,16 (>100) | / | 0,15 (>100) | -0,07 (>100) |
| k_{on} | 11,32 [L/nmol*1/h] | -0,15 (>100) | / | / | / |
| k_{off} | 1,297 [1/h] | -0,18 (>100) | / | / | / |
| SD_{slope} | 0,06 | 0,30 (21) | 0,20 (21) | 0,21 (21) | 0,25 (21) |

/ – parameter ni izvedljiv oziroma ni izračunljiv.

Tabela XI: Rezultati prilaganja modelov (TMDD, QE, QSS, MM) eksperimentalnim podatkom, ki smo jih dobili pri 1. načinu vzorčenja pri aplikaciji odmerka 1350 IU/kg. Parametri imajo navedene osnovne vrednosti (OV) in izračunane relativne napake ocen parametrov. V oklepajih smo podali koeficient variacije ocen parametrov. Navedene so tudi vrednosti objektivne funkcije (O_{NLL}) in Bayesov informacijski kriterij (BIC).

| Parameter | OV | TMDD | QE | QSS | MM |
|---------------|--------------------|--------------|--------------|-------------|--------------|
| O_{NLL} | / | 62,4 | 62,4 | 62,3 | 62,8 |
| BIC | / | 150 | 147 | 147 | 148 |
| k_{el} | 0,2256 [1/h] | -0,05 (>100) | 0,03 (25) | -0,04 (22) | -0,07 (24) |
| V_p | 0,05694 [L] | -0,02 (>100) | -0,06 (12) | -0,04 (17) | 0,03 (10) |
| k_{deg} | 0,1133 [1/h] | 0,47 (>100) | -0,27 (>100) | 0,10 (>100) | 0,42 (18) |
| k_{int} | 0,8228 [1/h] | 0,12 (>100) | -0,59 (>100) | 0,62 (>100) | -0,13 (>100) |
| k_{12} | 0,2092 [1/h] | 0,02 (23) | 0,09 (21) | 0,05 (18) | -0,11 (18) |
| k_{21} | 0,1721 [1/h] | -0,10 (57) | -0,01 (29) | -0,09 (24) | -0,15 (29) |
| R_0 | 0,0632 [nmol/L] | 0,46 (>100) | 1,01 (>100) | 1,14 (>100) | 0,21 (>100) |
| K_D | 0,1146 [nmol/L] | -0,01 (>100) | -0,13 (>100) | / | / |
| K_{ss}, K_m | 0,18726 [nmol/L] | 0,20 (>100) | / | 1,42 (66) | -0,21 (39) |
| k_{on} | 11,32 [L/nmol*1/h] | -0,27 (>100) | / | / | / |
| k_{off} | 1,297 [1/h] | -0,28 (>100) | / | / | / |
| SD_{slope} | 0,06 | 0,08 (21) | 0,08 (20) | 0,07 (20) | 0,08 (20) |

/ – parameter ni izvedljiv oziroma ni izračunljiv.

Tabela XII: Rezultati prilaganja modelov (TMDD, QE, QSS, MM) eksperimentalnim podatkom, ki smo jih dobili pri 2. načinu vzorčenja pri aplikaciji odmerka 100 IU/kg. Parametri imajo navedene osnovne vrednosti (OV) in izračunane relativne napake ocen parametrov. V oklepajih smo podali koeficient variacije ocen parametrov. Navedene so tudi vrednosti objektivne funkcije (O_{NLL}) in Bayesov informacijski kriterij (BIC).

| Parameter | OV | TMDD | QE | QSS | MM |
|---------------|--------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| O_{NLL} | / | 42,8 | 42,3 | 43,3 | 42,4 |
| BIC | / | 110 | 107 | 109 | 107 |
| k_{el} | 0,2256 [1/h] | 0,08 (>100) | 0,37 (8) | -0,03 (>100) | -0,53 (>100) |
| V_p | 0,05694 [L] | 0,07 (12) | -0,02 (43) | -0,03 (>100) | 0,08 (7) |
| k_{deg} | 0,1133 [1/h] | 0,14 (>100) | 0,27 (>100) | 0,43 (>100) | 1,82 (>100) |
| k_{int} | 0,8228 [1/h] | 0,78 (>100) | -0,86 (>100) | -0,12 (>100) | 1,40 (>100) |
| k_{12} | 0,2092 [1/h] | -0,10 (53) | -0,08 (>100) | 0,16 (>100) | 0,23 (>100) |
| k_{21} | 0,1721 [1/h] | 0,09 (>100) | 0,25 (>100) | 0,06 (>100) | -0,04 (>100) |
| R_0 | 0,0632 [nmol/L] | -0,18 (>100) | -0,24 (>100) | 0,15 (>100) | 0,07 (>100) |
| K_D | 0,1146 [nmol/L] | 1,27 (>100) | -0,46 (>100) | / | / |
| K_{ss}, K_m | 0,18726 [nmol/L] | 1,77 (>100) | / | -0,11 (>100) | 0,50 (>100) |
| k_{on} | 11,32 [L/nmol*1/h] | -0,50 (>100) | / | / | / |
| k_{off} | 1,297 [1/h] | 0,14 (>100) | / | / | / |
| SD_{slope} | 0,06 | 0,05 (21) | 0,02 (20) | 0,08 (21) | 0,00 (20) |

/ – parameter ni izvedljiv oziroma ni izračunljiv.

Tabela XIII: Rezultati prilaganja modelov (TMDD, QE, QSS, MM) eksperimentalnim podatkom, ki smo jih dobili pri 2. načinu vzorčenja pri aplikaciji odmerka 1350 IU/kg. Parametri imajo navedene osnovne vrednosti (OV) in izračunane relativne napake ocen parametrov. V oklepajih smo podali koeficient variacije ocen parametrov. Navedene so tudi vrednosti objektivne funkcije (O_{NLL}) in Bayesov informacijski kriterij (BIC).

| Parameter | OV | TMDD | QE | QSS | MM |
|---------------|--------------------|--------------|--------------|--------------|-------------|
| O_{NLL} | / | 76,2 | 76,2 | 76,4 | 72,6 |
| BIC | / | 177 | 175 | 175 | 168 |
| k_{el} | 0,2256 [1/h] | -0,10 (>100) | -0,12 (>100) | -0,02 (63) | -0,42 (83) |
| V_p | 0,05694 [L] | -0,04 (>100) | -0,05 (>100) | -0,05 (>100) | -0,11 (6) |
| k_{deg} | 0,1133 [1/h] | 0,77 (>100) | 0,26 (>100) | -0,21 (>100) | -0,59 (18) |
| k_{int} | 0,8228 [1/h] | -0,87 (>100) | 0,74 (>100) | 1,23 (>100) | 3,96 (>100) |
| k_{12} | 0,2092 [1/h] | 0,07 (70) | 0,08 (55) | 0,03 (46) | 0,07 (35) |
| k_{21} | 0,1721 [1/h] | -0,21 (57) | -0,23 (>100) | -0,12 (62) | -0,43 (37) |
| R_0 | 0,0632 [nmol/L] | 0,57 (>100) | 1,48 (>100) | 0,86 (>100) | 14,77 (34) |
| K_D | 0,1146 [nmol/L] | -0,98 (>100) | 0,13 (>100) | / | / |
| K_{ss}, K_m | 0,18726 [nmol/L] | -0,97 (>100) | / | -0,93 (>100) | 4,53 (>100) |
| k_{on} | 11,32 [L/nmol*1/h] | 2,11 (>100) | / | / | / |
| k_{off} | 1,297 [1/h] | -0,93 (>100) | / | / | / |
| SD_{slope} | 0,06 | -0,24 (20) | -0,24 (20) | 0,22 (20) | 0,44 (20) |

/- parameter ni izvedljiv oziroma ni izračunljiv.

7.5 Priloga D

Razviti farmakokinetični/farmakodinamični model v programu ADAPT 5:

```

Subroutine SYMBOL
Implicit None

Include 'globals.inc'
Include 'model.inc'

CC
C-----C
C   Enter as Indicated                               C
C-----C-----C

NDEqs   = 192 ! Enter # of Diff. Eqs.
          ! NDeqa = Neq*NdelTp2*2*NdelTrbc
NSParam = 16  ! Enter # of System Parameters.
NVparam = 0   ! Enter # of Variance Parameters.
NSecPar = 2   ! Enter # of Secondary Parameters.
NSecOut = 0   ! Enter # of Secondary Outputs (not used).
Ieqsol  = 1   ! Model type: 1 - DIFFEQ, 2 - AMAT, 3 - OUTPUT only.
Descr   = ' Insert Model File Description '

CC
C-----C
C   Enter Symbol for Each System Parameter (eg. Psym(1)='Kel') C
C-----C-----C
Psym(1)='Kel'
Psym(2)='Vp'
Psym(3)='Kss'
Psym(4)='Kdeg'
Psym(5)='Kint'
Psym(6)='Kpt'
Psym(7)='Ktp'

```

```

Psym(8)='Tp1'
Psym(9)='Tp2'
Psym(10)='Trbc'
Psym(11)='Nrbc0'
Psym(12)='Smax'
Psym(13)='SC50'
Psym(14)='IC50'
Psym(15)='MCH0'
Psym(16)='Rtot0'

CC
C-----C
C   Enter Symbol for Each Variance Parameter {eg: PVsym(1)='Sigma'}   C
C-----C

CC
C-----C
C   Enter Symbol for Each Secondary Parameter {eg: PSSym(1)='CLt'}   C
C-----C
      PSSym(1)='Ksyn'
      PSSym(2)='Kin'

C-----C
C-----C
C
      Return
      End

C#####C

      Subroutine DIFFEQ(T,X,XP)
      Implicit None

      Include 'globals.inc'
      Include 'model.inc'

      Real*8 T,X(MaxNDE),XP(MaxNDE)

      Real*8 Kel,Vp,Kss,Kdeg,Kint,Kpt,Ktp
      Real*8 Ksyn
      Real*8 Tp1,Tp2,Trbc,Kin,Smax,SC50,IC50,MCH0

      Integer i,j,k,Neq
      Integer NdelTp1,NdelTp2,NdelTrbc
      Parameter (NdelTp1=12,NdelTp2=12,NdelTrbc=2,Neq=4)
      Real*8 Nrbc0,Rtot0

      Real*8 Ctot(0:NdelTp1,0:NdelTp2,0:NdelTrbc)
      Real*8 dCtotdt(0:NdelTp1,0:NdelTp2,0:NdelTrbc)
      Real*8 At(0:NdelTp1,0:NdelTp2,0:NdelTrbc)
      Real*8 dAtdt(0:NdelTp1,0:NdelTp2,0:NdelTrbc)
      Real*8 Rtot(0:NdelTp1,0:NdelTp2,0:NdelTrbc)
      Real*8 dRtotdt(0:NdelTp1,0:NdelTp2,0:NdelTrbc)
      Real*8 Nrbc(0:NdelTp1,0:NdelTp2,0:NdelTrbc)
      Real*8 dNrbcdt(0:NdelTp1,0:NdelTp2,0:NdelTrbc)

      Real*8 Cp(0:NdelTp1,0:NdelTp2,0:NdelTrbc)
      Real*8 RC(0:NdelTp1,0:NdelTp2,0:NdelTrbc)

C
C   Neq = numbers of diff. equations in one period
C
C   NdelTp1 = numbers of Tp1 delays
C   NdelTp2 = numbers of Tp2 delays
C   NdelTrbc = numbers of Trbc delays
C
C   Ctot = total concentration of the EPO in plasma [nmol/L]
C   At = amount of the EPO in tissue [nmol]
C   Rtot = total concentration of receptors (EPOR) [nmol/L]
C   Nrbc = number of RBC in plasma [10E4/mikroL]
C           (razlika med Nrbc in Nrbc0 oziroma bazno linijo)
C
C   dCtotdt = derivativie of Cp
C   dAtdt = derivativie of At
C   dRtotdt = derivativie of Rtot
C   dNrbcdt = derivativie of Nrbc

```

```

C
C   Cp = concentration of free EPO in plasma [nmol/L]
C   RC = concentration of bound receptors (EPO-EPOR) [nmol/L]
C
C   Odmerek je vključen kot začetna vrednost Ctot prostora!
C   Odmerek pretvori v nmole in s pomočjo Vp izračunaj Ctot0!
C   Enote začetne vrednosti Ctot so [nmol/L].
C
C   Stimulacija: S(t)= (1+(Smax*RC(t))/(SC50+RC(t)))
C   Inhibicija: I(t)= (1-(Imax*Hb(t))/(IC50+Hb(t)))
C
C   Smax; maksimalna stimulacija
C   SC50; koncentracija RC pri kateri je dosežena 1/2 max stimulacije
C   Imax=1; maksimalna inhibicija;
C   IC50; koncentracija Hb pri kateri je dosežena 1/2 max inhibicije
C   MCH0; koncentracija hemoglobina v celici [pg/celico]
C   Predpostavimo, da je konc. MCH0 konstantna
C   Rtot0 = Začetna koncentracija prostega receptorja (EPOR) - bazna linija!!
C
C   Hb; koncentracija hemoglobina [g/dL]
C   Hb(t) = MCH0*Nrbc(t)/1000.0
C
C   Nrbc0; začetno število eritrocitov v krvi - bazna linija!!
C   Predpostavimo, da je bazna linija konstantna
C   enote: [10E4/mikroL]
C
CC
C-----C
C   Enter Differential Equations Below {e.g. XP(1) = -P(1)*X(1)} C
C-----C
C
C   Kel=P(1) ! enote: [1/h]
C   Vp=P(2) ! enote: [L]
C   Kss=P(3) ! enote: [nmol/L]
C   Kdeg=P(4) ! enote: [1/h]
C   Kint=P(5) ! enote: [1/h]
C   Kpt=P(6) ! enote: [1/h]
C   Ktp=P(7) ! enote: [1/h]
C
C   Tp1=P(8) ! enote: [h]
C   Tp2=P(9) ! enote: [h]
C   Trbc=P(10) ! enote: [h]
C   Nrbc0=P(11) ! enote: [10E4/mikroL]
C   Smax=P(12) ! brez enot
C   SC50=P(13) ! glede na konc. RC; enote: [nmol/L]
C   IC50=P(14) ! Glede na konc. Hb; enote: [g/dL]
C   MCH0=P(15) ! enote: [pg/cell]
C   Rtot0=P(16) ! enote: [nmol/L]
C
C   Ksyn=Rtot0*Kdeg ! enote: [nmol/(L*h)]
C   !Ksyn; konstanta sinteze receptorjev (EPOR) - sekundarni parameter
C
C   Kin=Nrbc0/Trbc ! enote: [10E4/(mikroL*h)]
C   !Kin; nicti red nastanka RET - sekundarni parameter
C
C   "Zadnje" prostore fiksiramo na 0 oz. na začetne vrednosti!
C   Tako potrebujemo manj diferencialnih enačb!
C
C
C   Do j=0, NdelTp2
C     Do i=0, NdelTp1
C       Ctot(i,j,NdelTrbc)=0.0D0
C       At(i,j,NdelTrbc)=0.0D0
C       Rtot(i,j,NdelTrbc)=Rtot0
C       Nrbc(i,j,NdelTrbc)=0.0D0
C     EndDo
C   EndDo
C
C   Do k=0, NdelTrbc
C     Do i=0, NdelTp1
C       Ctot(i,NdelTp2,k)=0.0D0
C       At(i,NdelTp2,k)=0.0D0
C       Rtot(i,NdelTp2,k)=Rtot0
C       Nrbc(i,NdelTp2,k)=0.0D0
C     EndDo
C   EndDo
C
C   Do k=0, NdelTrbc
C     Do j=0, NdelTp2

```

```

    Ctot(NdelTp1,j,k)=0.0D0
    At (NdelTp1,j,k)=0.0D0
    Rtot(NdelTp1,j,k)=Rtot0
    Nrbc(NdelTp1,j,k)=0.0D0
  EndDo
EndDo

C
C Pri vsakem času določimo vrednost prostorov Ctot(i,j,k),
C At(i,j,k), Rtot(i,j,k), Nrbc(i,j,k)
C
C !POZOR!: Zato,ker nekaterih elementov i-te demenzije ne potrebujemo, sem
C tiste, ki potrebujemo določil s pogojem: i=j-1 ali i=j
C Tako se stevilo diferencialnih enacb zmanjša za faktor: 2/NdelTp1
C

Do k=0,NdelTrbc-1
  Do j=0,NdelTp2-1
    Do i=0,NdelTp1-1
      IF(i+1.EQ.j .OR. i.EQ.j) THEN
        IF(t.LT. i*Tp1+j*Tp2+k*Trbc) THEN
          Ctot(i,j,k)=0.0D0
          At(i,j,k) =0.0D0
          Rtot(i,j,k)=Rtot0
          Nrbc(i,j,k)= 0.0D0
        ELSE
          Ctot(i,j,k) =X(1+j*Neq+(j-i)*Neq*NdelTp2+k*Neq*NdelTp2*2)

          At (i,j,k) =X(2+j*Neq+(j-i)*Neq*NdelTp2+k*Neq*NdelTp2*2)

          Rtot(i,j,k) =X(3+j*Neq+(j-i)*Neq*NdelTp2+
          $ k*Neq*NdelTp2*2)+Rtot0
          Nrbc(i,j,k)=X(4+j*Neq+(j-i)*Neq*NdelTp2+
          $ k*Neq*NdelTp2*2)
        ENDIF
      ENDIF
    ENDDO
  ENDDO
EndDo

C
C Za vse Cp(i,j,k) in CR(i,j,k) z eksplisitno enačbo določimo vrednost
C

Do k=0,NdelTrbc
  Do j=0,NdelTp2
    Do i=0,NdelTp1
      IF(i+1.EQ.j .OR. i.EQ.j) THEN
        IF(t.LT. i*Tp1+j*Tp2+k*Trbc) THEN
          Cp(i,j,k)=0.0D0
          RC(i,j,k)=0.0D0
        ELSE
          Cp(i,j,k)=(Ctot(i,j,k)-Rtot(i,j,k)-Kss+SQRT(
          $ (Ctot(i,j,k)-Rtot(i,j,k)-Kss)**2+4*Ctot(i,j,k)*Kss))/2
          !Cp = Prosta učinkovina v centralnem prostoru [nmol/L]

          RC(i,j,k) = Rtot(i,j,k)*Cp(i,j,k)/(Kss+Cp(i,j,k))
          !RC=X(4+n*6)=konc. kompleksa UC-RE na enoto TT [nmol/L]
        ENDIF
      ENDIF
    ENDDO
  ENDDO
EndDo

C
C Pri vsakem času določimo vrednost odvodov prostorov Ctot(i,j,k),
C At(i,j,k), Rtot(i,j,k), Nrbc(i,j,k)
C
C
C
C Do k=0,NdelTrbc-1
  Do j=0,NdelTp2-1
    Do i=0,NdelTp1-1
      IF(i+1.EQ.j .OR. i.EQ.j) THEN
        IF(t.LT. i*Tp1+j*Tp2+k*Trbc) THEN
          dCtotdt(i,j,k) =0.0D0
          dAtdt(i,j,k) =0.0D0
        ENDIF
      ENDIF
    ENDDO
  ENDDO
EndDo

```

```

        dRtotdt(i,j,k) =0.0D0
        dNrbcdt(i,j,k) =0.0D0
    ELSE
        dCtotdt(i,j,k)=-Kint*RC(i,j,k)-(Kel+Kpt)*Cp(i,j,k)
        +Ktp/Vp*At(i,j,k)
        !Ctot=X(1+n*4)=konc. celotne ucinkovine na enoto TT [nmol/L]
        dAtdt(i,j,k)=Kpt*Vp*Cp(i,j,k)-Ktp*At(i,j,k)
        !At=X(2+n*4)=ucinkovina v stranskem prostoru na enoto TT [nmol]
        dRtotdt(i,j,k)= Ksyn-Kdeg*Rtot(i,j,k)-Kint*RC(i,j,k)
        +Kdeg*RC(i,j,k)
        !Rtot=X(3+n*4)=konc. celotnega receptorja na enoto TT [nmol/L]

        dNrbcdt(i,j,k)=Kin*(1+(Smax*RC(i,j+1,k)/(SC50+
        RC(i,j+1,k))))*(1+(Smax*RC(i+1,j+1,k)/(SC50+
        RC(i+1,j+1,k))))*(1-(MCH0*Nrbc(i+1,j+1,k)/(IC50
        *1000+MCH0*ABS(Nrbc(i+1,j+1,k)))))-Kin*(1+(Smax*
        RC(i,j+1,k+1)/(SC50+RC(i,j+1,k+1))))*(1+
        (Smax*RC(i+1,j+1,k+1)/(SC50+RC(i+1,j+1,k+1))))*
        (1-(MCH0*Nrbc(i+1,j+1,k+1)/(IC50*
        1000+MCH0*ABS(Nrbc(i+1,j+1,k+1))))))
        !Nrbc=X(4+n*4)=stevilo eritrocitov v krvi [10E4cell/mikroL]

    ENDIF
    ENDDO
    ENDDO
    ENDDO
    ENDDO

C
C Pri vsakem času določimo vrednost odvodov vseh prostorov X
C (torej določimo vse XP) iz vrednosti dCtotdt(i,j,k),
C dAtdt(i,j,k), dRtotdt(i,j,k), in dNrbcdt(i,j,k) pri danem času!
C

    Do k=0,NdelTrbc-1
    Do j=0,NdelTp2-1
    Do i=0,NdelTp1-1
    IF(i+1.EQ.j .OR. i.EQ.j) THEN
        XP(1+j*Neq+(j-i)*Neq*NdelTp2+k*Neq*NdelTp2*2)
        = dCtotdt(i,j,k)
        XP(2+j*Neq+(j-i)*Neq*NdelTp2+k*Neq*NdelTp2*2)
        = dAtdt(i,j,k)
        XP(3+j*Neq+(j-i)*Neq*NdelTp2+k*Neq*NdelTp2*2)
        = dRtotdt(i,j,k)
        XP(4+j*Neq+(j-i)*Neq*NdelTp2+k*Neq*NdelTp2*2)
        = dNrbcdt(i,j,k)

    ENDIF
    ENDDO
    ENDDO
    ENDDO

C-----C
C-----C
C
    Return
    End

C#####C

    Subroutine OUTPUT(Y,T,X)
    Implicit None

    Include 'globals.inc'
    Include 'model.inc'

    Real*8 Y(MaxNOE),T,X(MaxNDE)
    Real*8 RC(0:4),Cp(0:4)

CC
C-----C
C Enter Output Equations Below {e.g. Y(1) = X(1)/P(2) } C

```



```
! Kinetika zapuscanja celic iz prostora Nrbc(t). [brez enot]

C-----C
C-----C
C
  Return
  End

C#####C

  Subroutine SPARAM(PS,P,IC)
  Implicit None

  Include 'globals.inc'

  Real*8 PS(MaxNSECP), P(MaxNSP+MaxNDE), IC(MaxNDE)

CC
C-----C
C  Enter Equations Defining Secondary Paramters          C
C    { e.g. PS(1) = P(1)*P(2)    }                          C
C-----C
  PS(1)=P(16)*P(4)
  PS(2)=P(11)/P(10)

C
C-----C
C-----C
C
  Return
  End
```