

Univerza v Ljubljani
Fakulteta za računalništvo in informatiko

Maja Somrak

**Računalniško modeliranje zdravljenja s
produkcijo biološkega zdravila v tarčnem
tkivu**

DIPLOMSKA NALOGA
NA UNIVERZITETNEM ŠTUDIJU

prof. dr. Miha Mraz
MENTOR

Ljubljana, 2013

© 2013, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za računalništvo in informatiko

Rezultati diplomskega dela so intelektualna lastnina Fakultete za računalništvo in informatiko Univerze v Ljubljani. Za objavlanje ali izkoriščanje rezultatov diplomskega dela je potrebno pisno soglasje Fakultete za računalništvo in informatiko ter mentorja.¹

¹V dogovorju z mentorjem lahko kandidat diplomsko delo s pripadajočo izvorno kodo izda tudi pod katero izmed alternativnih licenc, ki ponuja določen del pravic vsem: npr. Creative Commons, GNU GPL.



Št. naloge: 01914 / 2013
Datum: 2.4.2013

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za računalništvo in informatiko izdaja naslednjo nalogo:

Kandidat: **MAJA SOMRAK**

Naslov: **RAČUNALNIŠKO MODELIRANJE ZDRAVLJENJA S PRODUKCIJO
BIOLOŠKEGA ZDRAVILA V TARČNEM TKIVU
COMPUTATIONAL MODELLING OF TREATMENT WITH IN SITU
BIOLOGICAL DRUG PRODUCTION**

Vrsta naloge: Diplomsko delo univerzitetnega študija

Tematika naloge:

Kandidat naj v svojem delu analizira obstoječe pristope za farmakokinetično modeliranje zdravljenja in razširi le-te na nov pristop modeliranja, ki zajema tudi proces produkcije zdravilne učinkovine v tarčnem tkivu. Na podlagi vzpostavljenega pristopa k modeliranju naj naredi primerjavo med ustaljenimi postopki zdravljenja in zdravljenja z dostavnim sistemom, ki omogoča in situ produkcijo zdravilne učinkovine. Primerjava naj bo opravljena na vzorčnih primerih zdravljenja hepatitisa C in ishemije miokarda z biološkimi zdravili.

Mentor:

prof. dr. Miha Mraz

Dekan:

prof. dr. Nikolaj Zimic



IZJAVA O AVTORSTVU DIPLOMSKEGA DELA

Spodaj podpisana izjavljam, da sem avtorica dela, da slednje ne vsebuje materiala, ki bi ga kdorkoli predhodno že objavil ali oddal v obravnavo za pridobitev naziva na univerzi ali drugem visokošolskem zavodu, razen v primerih kjer so navedeni viri.

S svojim podpisom zagotavljam, da:

- sem delo izdelala samostojno pod mentorstvom prof. dr. Mihe Mraza,
- so elektronska oblika dela, naslov (slov., angl.), povzetek (slov., angl.) ter ključne besede (slov., angl.) identični s tiskano obliko in
- soglašam z javno objavo elektronske oblike dela v zbirki "Dela FRI".

— Maja Somrak, Ljubljana, oktober 2013.

Univerza v Ljubljani
Fakulteta za računalništvo in informatiko

Maja Somrak

Računalniško modeliranje zdravljenja s produkcijo biološkega zdravila v tarčnem tkivu

POVZETEK

Računalniško modeliranje ima v procesu razvoja zdravil čedalje večji pomen. Pripomore k reduciranju števila potrebnih laboratorijskih eksperimentov in ponuja prvotno oceno rezultatov terapije.

V diplomski nalogi obravnavamo modeliranje farmakokinetike zdravilnih učinkovin pri različnih vrstah terapij. Predstavimo fiziološko zasnovan razdelčni farmakokinetični model, ki kvantitativno opisuje procese zdravila v telesu s sistemom navadnih diferencialnih enačb. Model razvijemo za standardne načine aplikacije zdravil in ga razširimo na model z vključenim procesom produkcije. Z razširjenim modelom lahko izvajamo simulacije za terapijo, pri kateri se uporablja dostavni sistem zdravil, ki omogoča lokalno proizvajanje zdravilne učinkovine (biološkega zdravila) v obolelem tkivu. Razširjeni model med drugim omogoča napovedovanje potrebne produkcije zdravilne učinkovine, da bi tovrstna terapija zagotavljala želen terapevtski učinek.

Navadni in razširjeni model razvijemo za dva primera zdravljenj. Prvi preučevani primer je zdravljenje hepatitisa C, drugi pa zdravljenje ishemične bolezni srca. Primerjava rezultatov modelov nam omogoča kvantitativno in kvalitativno ovrednotenje terapij z vidika učinkovitosti, lokalizacije zdravilne učinkovine in ocene obsežnosti sistemskih neželenih učinkov.

Ključne besede: farmakokinetika, fiziološki model, razdelčni model, model s produkcijo, Matlab

University of Ljubljana
Faculty of Computer and Information Science

Maja Somrak

Computational modelling of treatment with *in situ* biological drug production

ABSTRACT

Computer modelling is increasingly important part of drug development process. It helps to reduce the number of required experiments and provide initial evaluation of therapy outcomes.

In this thesis, we focus on modelling pharmacokinetics of therapeutic substances for different therapy approaches. We present a physiologically based compartmental pharmacokinetic model, which quantitatively describes drug processes in the body using a system of ordinary differential equations. We develop a model for standard types of drug administration and expand it to include the process of production. With the expanded model we can simulate therapy, which uses a drug delivery system for *in situ* production of a specific biological drug. The expanded model predicts the necessary drug production rate for the therapy to ensure the desired therapeutic effect.

We develop both the basic and the expanded model for two study cases. The first study case evaluates treatments of hepatitis C; the second treatments of ischaemic heart disease. A result comparison enables quantitative and qualitative therapy evaluation in terms of efficiency, drug localization and degree of systemic adverse effects.

Key words: pharmacokinetics, physiological model, compartmental model, model with *in situ* production, Matlab

ZAHVALA

Za pomoč in usmerjanje pri izdelavi diplomske naloge se zahvaljujem mentorju prof. dr. Mihi Mrazu in dr. Mihi Moškoni. Za dodatno pomoč, nasvete in pridobljene izkušnje se zahvaljujem mentorjem in sočlanom slovenske iGEM 2012 ekipe, saj velik del predstavljenega dela izhaja iz idej in znanja, pridobljenega tekom omenjenega skupinskega projekta. Za podporo v času študija se zahvaljujem družini.

— Maja Somrak, Ljubljana, oktober 2013.

KAZALO

Povzetek	i
Abstract	iii
Zahvala	v
1 Uvod	1
2 Modeliranje farmakokinetike zdravilnih učinkovin	5
2.1 Fiziološki farmakokinetični model	6
2.2 Farmakokinetični procesi	9
2.2.1 Absorpcija	9
2.2.2 Porazdeljevanje	10
2.2.3 Biotransformacija	11
2.2.4 Ekskrecija	12
2.3 Farmakokinetična študija	12
2.4 Parametri modela	14
2.4.1 Fiziološki parametri	15
2.4.2 Biokemijski parametri	15
2.5 Struktura modela	16
2.5.1 Generična struktura	16
2.5.2 Optimizacija strukture	17
2.5.3 Združevanje in ločevanje razdelkov	19
2.6 Validacija modela	21
3 Farmakokinetični model z upoštevanjem procesa produkcije	25
3.1 Lokalno zdravljenje	25

3.1.1	Sistemi in lokalni učinek	26
3.1.2	Terapija z lokalno produkcijo zdravilne učinkovine	26
3.2	Razširitev farmakokinetičnega modela	27
3.2.1	Vključevanje procesa produkcije	29
3.2.2	Določanje particijskega koeficienta za tarčno tkivo	31
4	Zgledi implementacij modelov	37
4.1	Hepatitis C: modeliranje zdravljenja z interferonom	38
4.1.1	Osnovni model	38
4.1.2	Model za subkutano terapijo	44
4.1.3	Model za terapijo z lokalno produkcijo v jetrih	47
4.1.4	Rezultati	48
4.2	Ishemija miokarda: modeliranje terapije z anakinro	53
4.2.1	Osnovni model	54
4.2.2	Model za subkutano terapijo	58
4.2.3	Model s produkcijo	59
4.2.4	Rezultati	60
4.3	Realizacija modelov	63
5	Zaključek	73
	Literatura	75

1 Uvod

Raziskave in razvoj zdravil, vse od preizkušanja potencialnih terapevtskih učinkovin do formalne odobritve zdravila, je dolgotrajen proces, katerega stroški se za originatorja v povprečju ocenjujejo na milijardo ameriških dolarjev. Večino stroškov predstavljajo klinične študije, kjer so zdravilne učinkovine testirane na pacientih z namenom ovrednotenja učinkovitosti terapije in odkrivanja obsega ter intenzitete stranskih učinkov. Kasneje, ko se v procesu razvoja zdravila izkaže, da potencialna terapija ne dosega zaželenih rezultatov, več časa in denarja bo porabljenega zaman. Da bi čim prej predvideli, ali je neka terapija obetavna ali ne, vse več farmacevtskih podjetij vključuje računalniško modeliranje farmakokinetike in farmakodinamike že v začetni fazi razvoja zdravil.

Farmakološki modeli so v veliki meri odvisni od poznavanja kompleksnih fizioloških mehanizmov in biokemijskih interakcij. V njih je zajeto tudi obsežno število bioloških parametrov, katerih vrednosti velikokrat ni mogoče izmeriti neposredno, tako iz tehničnih kot etičnih razlogov. Kljub temu da so računalniški modeli le grobe aproksimacije realnih sistemov, pa je njihova uporaba široka. Predstavljajo preprosto in cenejšo alternativo kliničnim testom in čeprav jih ne morejo v celoti nadomestiti, lahko občutno zmanjšajo

število potrebnih laboratorijskih poskusov.

Modeli v farmakološki uporabi so nepogrešljivi pri validaciji mehanizmov, poglobljanju razumevanja fizikalno-kemijskih procesov in biokemijskih interakcij, nemalokrat pa izpostavijo tudi neintuitivne izide farmakokinetičnih procesov. Med drugim omogočajo ekstrapoliranje z živalskih vrst, napovedovanje interindividualnega odziva, študije bioekvivalence, primerjavo terapij, izbiro optimalnega zdravila glede na pričakovani odziv za predlagana zdravila, predikcijo parametrov in načrtovanje odmerkov in optimalnih režimov odmerjanja.

Najbolj razširjena pristopa modeliranja sta t.i. farmakokinetično in farmakodinamično modeliranje. *Farmakokinetični model* zajema vpliv telesa na zdravilo, rezultati pa so praviloma predstavljeni v obliki poteka koncentracij zdravilnih učinkovin skozi čas. *Farmakodinamični model*, ki opisuje vpliv zdravila na telo in predstavlja rezultate v obliki terapevtskega učinka v odvisnosti od koncentracije zdravilnih učinkovin. Farmakokinetični in farmakodinamični model sta korelirana preko koncentracije in ju lahko združimo v t.i. *farmakokinetično-farmakodinamični model*. Rezultat farmakokinetično-farmakodinamičnega modela je potek terapevtskega učinka v času.

S podobnim problemom evaluacije perspektivne terapije smo se srečali tudi v slovenski ekipi projekta iGEM 2012. Ideja projekta je bila razviti dostavni sistem zdravil, ki bi omogočal lokalno produkcijo zdravilne učinkovine v obolelem tkivu. Dostavni sistem, ki sestoji iz mikrokapsul, znotraj katerih so vsebovane tako spremenjene celice, da lahko kontinuirano proizvajajo nek terapevtski protein - biološko zdravilo. Dostavni sistem bi se uporabljal za *in situ* terapijo, pri čemer bi ob začetku terapije pacientu mikrokapsule vnesli v telo, in sicer neposredno na prizadeto mesto. Predvideva se, da bi tak dostavni sistem vzdrževal stabilne koncentracije terapevtika v telesu, pri čemer naj bi bil terapevtik tudi bolj lokaliziran v samem zdravljenem tkivu.

Da bi se prepričali, ali je terapija z lokalno produkcijo resnično boljša od obstoječih metod, smo uporabiti pristope farmakokinetičnega modeliranja. V diplomskem delu smo se tako osredotočili na razvoj ustreznih modelov za primerjavo obstoječih terapij in potencialne terapije z lokalno produkcijo.

V drugem poglavju je razložen splošen pristop k modeliranju farmakokinetike zdravilnih učinkovin. Osredotočamo se na fiziološki razdelčni model in razložimo razlike med različnimi fiziološkimi nivoji, na katerih lahko modeliramo. Kratko povzeti so ključni

fiziološki in biokemijski parametri ter predstavljeni farmakokinetični procesi, s katerimi telo vpliva na zdravilo: absorpcija, porazdeljevanje, biotransformacija in izločanje. Opisane so predpostavke, aproksimacije in omejitve, s katerimi se srečujemo pri načrtovanju farmakokinetičnih modelov. Opisana je generična struktura fiziološkega razdelčnega modela in postopek njene optimizacije pri razvoju modela za specifično uporabo. Na koncu poglavja je opisana validacija modela, pri čemer so izpostavljena pravila za preverjanje matematične konsistentnosti in biološke verodostojnosti.

V tretjem poglavju je razložen naš pristop k razširitvi osnovnega fiziološkega farmakokinetičnega modela na model s procesom lokalne produkcije zdravilne učinkovine v tarčnem tkivu. Opisana so izhodišča za vključevanje produkcije v model in matematična formulacija procesa. Obrazloženo je definiranje novega particijskega koeficienta za tarčno tkivo pri procesu produkcije.

V četrtem poglavju je opisana implementacija tako navadnega kot razširjenega modela na dveh primerih zdravljenja z biološkimi zdravili. Prvi primer je zdravljenje hepatitisa C z interferonom α , pri čemer je na podlagi podatkov iz obstoječih študij razvit model za uveljavljeno subkutano terapijo. Rezultati modela so primerjani z rezultati novega razvitega modela za *in situ* terapijo v jetrih. Po podobnem postopku sta primerjani subkutana terapija in terapijo z *in situ* produkcijo na primeru zdravljenja ishemije miokarda z biološkim zdravilom anakinro.

V petem poglavju so strnjeni rezultati modeliranja in naše ugotovitve. Opisana je opravljena uporaba modela ter možnosti za njegove izboljšave.

Vsebina naloge je bila v veliki meri predstavljena tekom projekta iGEM 2012. Delo je javno dostopno na spletni strani projekta [1], deloma pa je bilo objavljeno tudi v zborniku [2].

2 Modeliranje farmakokinetike zdravilnih učinkovin

Temeljni cilji modeliranja v farmakologiji je opredelitev medsebojnega vpliva zdravilne učinkovine in organizma. Modeli lahko služijo tudi kot orodje za preverjanje in dodaten vpogled v biokemične in biofizikalne procese, ki potekajo v telesu (v nadaljevanju proučevani biološki sistem oziroma sistem) po aplikaciji zdravila. Vse pogosteje se tovrstni modeli uporabljajo tudi za napovedovanje kinetike in dinamike v bioloških sistemih za situacije, ki eksperimentalno še niso bile preizkušene. Da bi lahko dosegli čim večjo zanesljivost napovedi, je potrebno model ustrezno formulirati na podlagi analize mehanizmov in pridobiti potrebne vrednosti parametrov modeliranega biološkega sistema. Modeliranje bioloških sistemov je zaradi njihove izredne kompleksnosti in nepopolnega poznavanja vseh vpletenih mehanizmov preveč zapleteno, da bi lahko zgradili model, ki bi povsem odražal realnost. Pogosto se tudi dogaja, da je pri modeliranju potrebno vrednosti ključnih bioloških parametrov zgolj oceniti, saj njihovih vrednosti ni možno natančno izmeriti bodisi iz tehničnih ali etičnih razlogov [3]. Tekom same izdelave modela moramo zato skleniti določene kompromise in upoštevati omejeno verodostojnost generiranih rezultatov. Zavedati se moramo, da je simulacijski rezultat modela vedno le

aproximacija realnih procesov z omejeno natančnostjo. Kako zelo se želimo z modelom približati dejanskemu biološkemu sistemu, pa je odvisno tudi od cilja oziroma namena računalniškega modeliranja – pomembno je, da z modelom zadostimo namenu, vendar se ne spuščamo v večje podrobnosti, kot je to potrebno in smiselno [4].

2.1 Fiziološki farmakokinetični model

Polno poimenovanje modela, na katerega se osredotočamo v delu, je *fiziološko zasnovan farmakokinetični razdelčni model celotnega telesa* (angl. *whole body physiologically based compartmental pharmacokinetic model* - PBPK model) [5]. Model najbolje opišemo tako, da razložimo pomen vsakega pridevnika v poimenovanju.

Farmakokinetični model (angl. *pharmacokinetic model* - PK model) opisuje vpliv telesa na zdravilo. Definiran je kot kvantitativni opis procesov, skozi katere gre zdravilna učinkovina po vstopu v telo. Pri farmakokinetičnem modeliranju nas zanimajo koncentracije zdravilne učinkovine v telesnih prostorih (to so tkiva, organi ali skupina tkiv in organov, pa tudi telesne tekočine kot sta kri in urin) v času po aplikaciji zdravila. Farmakokinetičnega modela ne smemo zamenjevati s farmakodinamičnim modelom (angl. *pharmacodynamic model* - PD model) ki, ravno obratno, opisuje vpliv zdravila na telo. Farmakodinamični modeli se osredotočajo na povezovanje koncentracije zdravilne učinkovine z učinkom, ki je lahko zaželen (terapevtski učinek, angl. *therapeutic effect*) ali pa tudi neželen (angl. *adverse effect*).

Razdelčni model (angl. *compartmental model*, tudi *multicompartmental model*) [3, 5] je model, pri katerem obravnavamo modelirani sistem kot sistem, sestavljen iz medsebojno povezanih razdelkov. Zdravilna učinkovina se pretaka v razdelke in iz njih naprej v druge razdelke, razdelki pa so lahko povezani tudi z zunanostjo. V razdelkih praviloma učinkovine ne nastajajo in ne izginjajo, hitrosti procesov pa so ponavadi 1. reda [6]. Razdelčni modeli so velikokrat empirični, kar pomeni, da izhajajo iz poznanih podatkov in meritev, vendar ne opisujejo vzročnih mehanizmov [7].

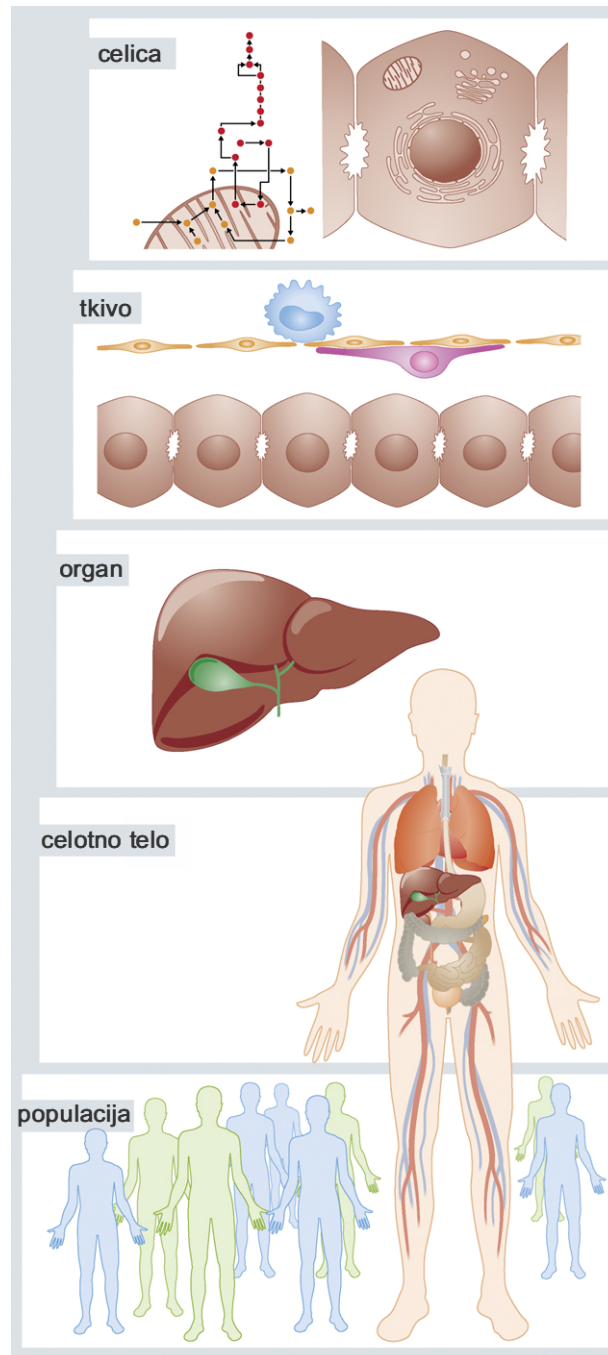
Fiziološki model (angl. *physiological model*) [6] izhaja iz razdelčnega modela, le da razdelki predstavljajo telesne prostore, povezave med njimi pa so skladne s fiziologijo telesa. Hitrosti procesov v modelu so odvisne od pretokov skozi telesne prostore. Tudi ostali parametri razdelkov izhajajo iz realnih lastnosti telesnih prostorov. Fiziološki modeli, ki napovedujejo obnašanje biološkega sistema na podlagi poznanih zakonitosti njegovega

delovanja, so mehanistično zasnovani [3, 7]. Mnogokrat fiziološki modeli vključujejo tako elemente mehanističnega, kot tudi empiričnega modeliranja (t.i. hibridni modeli) [3].

Pri modelih **celotnega telesa** so razdelki, ki predstavljajo organe ali tkiva, povezani v celoto in predstavljajo zaključen biološki sistem. Nivo celotnega telesa je le eden izmed fizioloških nivojev, na katerih lahko modeliramo farmakokinetiko zdravilne učinkovine (glej sliko 2.1).

Farmakokinetiko lahko modeliramo na enem ali *več nivojih* [8]:

- celični nivo (angl. *cellular level*): model na celičnem nivoju zaobjema interakcije zdravilne učinkovine znotraj biološke celice; na nivoju celic se modelira metabolne poti učinkovin ali npr. izražanje genov [1, 9];
- nivo tkiva (angl. *tissue level*): na nivoju tkiva modeliramo farmakokinetiko zdravilne učinkovine v skupini celic enake vrste; ta način modeliranja je primeren za simuliranje vezave zdravilne učinkovine na receptorje, ki so ali specifični za neko vrsto tkiva ali se v nekem tkivu nahajajo v večji gostoti;
- nivo organa (angl. *organ level*): posamezen organ lahko razdelimo na več razdelkov, ki ustrezajo tkivom, iz katerih sestoji organ; tak primer je delitev razdelka kože na razdelek povrhnjice, razdelek usnjice in razdelek podkožja; konkreten model zajema postopno porazdeljevanje zdravilne učinkovine preko posameznih razdelkov plasti kože [10]; za vsakega izmed razdelkov je mogoče spremljati prisotno koncentracijo zdravilne učinkovine;
- nivo celotnega organizma (angl. *whole body level*): model na nivoju celotnega organizma zajema medsebojno povezane razdelke organov; model napoveduje obnašanje preučevanega biološkega sistema kot celote; pri tem je model celotnega organizma načeloma definiran za povprečnega predstavnika vrste, katero se modelira [8, 9, 11]; kadar je v modelih proučevani organizem človek, je povprečni predstavnik navadno definiran kot zdrav, 70 ali 80 kg težak odrasel moški [10, 12, 13];
- populacijski nivo (angl. *population level*): vključuje modifikacije modela celotnega organizma za modeliranje farmakokinetike pri različnih subpopulacijah; specifične skupine, ki so še posebej zanimive, so recimo otroci, bolniki z odpovedjo ledvic ali določene etnične skupine, za katere je značilna prisotnost ali odsotnost določenih genov, ki vplivajo na potek biotransformacije določenih učinkovin [8, 9, 11].



Slika 2.1 Fiziološki nivoji farmakokinetičnega modeliranja [8].

Modele na različnih nivojih lahko integriramo skupaj v povezan večnivojski model. Podatki z nižjega nivoja včasih omogočajo, da opustimo določene predpostavke in približke

modela [14]. Izračuni vrednosti parametrov nižjega nivoja se lahko uporabijo kot vhodni parametri na višjem nivoju, medtem ko rezultati simulacije na višjem nivoju predstavljajo omejitve za vrednosti parametrov na nižjem nivoju [9]. Večnivojski modeli so načeloma bolj modularni in imajo višjo ločljivost [15]. Nekateri večnivojski modeli omogočajo tudi boljše modeliranje procesov trajanja reda minut v primerjavi s procesi trajanja reda tednov [16]. Omenjeni primeri predstavljajo le nekatere možne pridobitve pri integraciji večnivojskih modelov.

2.2 Farmakokinetični procesi

Farmakokinetični procesi so tisti procesi, skozi katere gre zdravilna učinkovina po vstopu v telo. Ti so absorpcija (angl. *absorption*), porazdelitev (angl. *distribution*), biotransformacija (angl. *metabolism*) in ekskrecija (angl. *excretion*), ki jih skupno krajše imenujemo tudi procesi ADME [5, 11, 14]. S temi procesi je neposredno povezan tudi izraz *izločanje* (angl. *elimination*), ki se nanaša na odstranjevanje zdravilne učinkovine iz telesa, preko biotransformacije in ekskrecije skupaj.

2.2.1 Absorpcija

Od načina aplikacije zdravila (angl. *route of administration* - ROA) je odvisno, kako hitro in v kakšni meri se zdravilna učinkovina pojavi v krvnem obtoku, preko katerega se bo širila naprej po telesu.

Zdravilo je lahko aplicirano na različne načine, med katerimi so najpogostejši [17]:

- peroralno (angl. *per oral* - PO), zdravilo se daje skozi usta;
- intravenozno (angl. *intravenous* - IV), injiciranje zdravila neposredno v veno;
- subkutano (angl. *subcutaneous* - SC), injiciranje zdravila v podkožje;
- intramuskularno (angl. *intramuscular* IM), injiciranje zdravila v mišico, idr.

Pri injiciranju zdravila neposredno v vensko kri je zdravilna učinkovina takoj in v celoti prisotna v krvnem obtoku. Pri ostalih vrstah aplikacije se mora zdravilna učinkovina iz prebavnega trakta (pri PO aplikaciji) ali mesta injiciranja (pri SC ali IM aplikaciji) najprej absorbirati v kri.

Absorpcija je odvisna od mnogih faktorjev:

- od apliciranega odmerka zdravila (angl. *administered dose*),
- od biološke razpoložljivosti (angl. *bioavailability*), t.j. deleža odmerka zdravila, ki lahko preide v kri,
- prekrvavljenosti mesta injiciranja (pri SC ali IM aplikaciji),
- sočasnega zaužitja drugih snovi (pri PO aplikaciji), idr.

Kadar odmerek zdravila ni v celoti razpoložljiv sistemskemu obtoku (krvnemu obtoku), govorimo o nepopolni absorpciji. Slednjo je možno modelirati na več načinov, med katerimi je najpogosteje uporabljeno zmanjšanje odmerka zdravila, glede na delež nepopolne absorpcije [3].

Absorpcija lahko poteka ves čas sorazmerno z neko konstanto, t.i. absorpcijsko konstanto K_a , v eni stopnji z začetkom takoj po aplikaciji pri $t = 0$ ali z začetnim zamikom τ , kjer je za $t \leq \tau : K_a = 0$. Absorpcijo se modelira v dveh stopnjah v primeru, ko linearni potek celotnega procesa absorpcije ne odraža najbolje. Ob aplikaciji zdravila lahko pride na mestu injiciranja do nasičenja ali drugih okoliščin, zaradi katerih absorpcija določen čas takoj po aplikaciji ne poteka linearno. V tem primeru poteka absorpcija v prvi fazi kot proces 0. reda, določen s konstanto K_0 . Slednja odraža količino zdravilne učinkovine, ki v enoti časa preide iz razdelka, ki predstavlja mesto injiciranja, v razdelek venske krvi. Ko se zadosten del aplicirane zdravilne učinkovine absorbira v razdelek krvi, poteka nadaljnja absorpcija sorazmerno s koncentracijo preostale zdravilne učinkovine na mestu injiciranja. V drugi fazi je proces linearen, torej 1. reda. Intenzivnost absorpcije tedaj določa konstanta K_1 .

2.2.2 Porazdeljevanje

Porazdeljevanje učinkovin znotraj organizma ni izoliran proces, temveč rezultat kompleksnega sistema interakcij. Porazdelitev zdravilne učinkovine je odvisna od mnogih lastnosti same molekule zdravilne učinkovine kot so topnost, pH, afiniteta na receptorje in plazemske proteine, prehodnost skozi membrane, idr. [1, 2, 9]. Posledično je porazdeljevanje pogosto modelirano posredno z uporabo *particijskih koeficientov* (glej podpoglavje 2.4.2), ki proces opisujejo z uporabo razmerij koncentracij zdravilne učinkovine med razdelki telesnih prostorov in razdelkom krvi. Določanje vrednosti particijskih koeficientov

pogosto ni niti preprosto, niti povsem zanesljivo [1, 2]. Razlog delno tiči v tem, da se za izvajanje meritev uporabljajo različne tehnološke metode, katerih rezultati med seboj pogosto odstopajo. Meritve se zaradi etičnih razlogov izvajajo na drugih vrstah, kar med drugim otežuje tudi validacijo [5]. Privzema se, da so particijski koeficienti pri ljudeh in ostalih sesalcih za isto vrsto tkiva primerljivi [1, 2, 5].

Če kompleksen sistem mehanizmov, ki vplivajo na porazdeljevanje zdravilne učinkovine, nekoliko poenostavimo, lahko identificiramo tri ključne faktorje, ki določajo hitrost in obseg porazdeljevanja:

- dostava zdravilne učinkovine s krvjo;
- prehajanje iz razdelka krvi v razdelke telesnih prostorov;
- vezava v odvisnosti od afinitete *učinkovina-tkivo* [6].

Fiziološko gledano je prehajanje vsakršnih učinkovin iz krvi v tkivo v veliki meri odvisno od prepustnosti kapilar tkiva. Razdelki, ki predstavljajo tkiva, katerih kapilare so manj prepustne, imajo načeloma manjše porazdelitvene koeficiente, saj je prehajanje zdravilne učinkovine iz razdelka krvi v razdelek takega tkiva zmanjšano. S prehodnostjo imamo opraviti tudi, ko govorimo o permeabilnosti celičnih membran ali propustnosti barier med razdelkom krvi in razdelkom nekega organa [18]. Ena takih barier je na primer hematoencefalna bariera, ki je za določene zdravilne učinkovine neprehodna. V tem primeru se zdravilna učinkovina iz razdelka krvi v razdelek možganov ne porazdeljuje.

T.i. afiniteta *učinkovina-tkivo* ni realna biološka lastnost, temveč le predstavlja mero, ki posredno odraža, ali se na primer zdravilna učinkovina veže predvsem na proteine v plazmi (manjša afiniteta *učinkovina-tkivo* za vse razdelke) ali se kopiči v razdelku določenega telesnega prostora (večja afiniteta *učinkovina-tkivo* za določeni razdelek).

2.2.3 Biotransformacija

Biotransformacija (angl. *biotransformation*, tudi *metabolism*) je proces, pri katerem se v telesu učinkovina kemijsko spremeni. Večinoma poteka biotransformacija v jetrih, je pa to odvisno od posamezne učinkovine. Pri biotransformaciji lahko nastanejo aktivni ali neaktivni presnovki (angl. *metabolites*). Pri biotransformaciji, pri kateri nastanejo aktivni presnovki, ki predstavljajo dejansko zdravilno učinkovino, je prvotna učinkovina

le prekursor zdravila. Pri zdravilih, ki že v osnovi vsebujejo zdravilno učinkovino, pri biotransformaciji nastanejo neaktivni presnovki.

Process biotransformacije je večinoma nelinearen, pogosto pa ga lahko opišemo z *Michaelis-Menten kinetiko* [19], kjer je hitrost reakcije v določena po enačbi

$$v = \frac{V_{max} \cdot C}{K_m + C} = -\frac{dC}{dt}. \quad (2.1)$$

Pri tem je V_{max} maksimalna hitrost reakcije, K_m pa Michaelisova konstanta, ki ustreza koncentraciji prvotne učinkovine, pri kateri je $v = \frac{V_{max}}{2}$. Koncentracija C je trenutna koncentracija prvotne učinkovine, medtem ko sta V_{max} in K_m konstanti, katerih vrednosti se pogosto določajo *in vivo*.

2.2.4 Ekskrecija

Ekskrecija je izločanje učinkovine ali njenih presnovkov iz telesa. Največkrat poteka preko ledvic, lahko pa tudi preko kože ali dihal [20]. Velikost očiščanja (angl. *clearance*) je teoretični volumen krvi, ki se v enoti časa izčisti učinkovine. Intenzivnost očiščevanja je v modelu podana z eliminacijsko konstanto K_{el} .

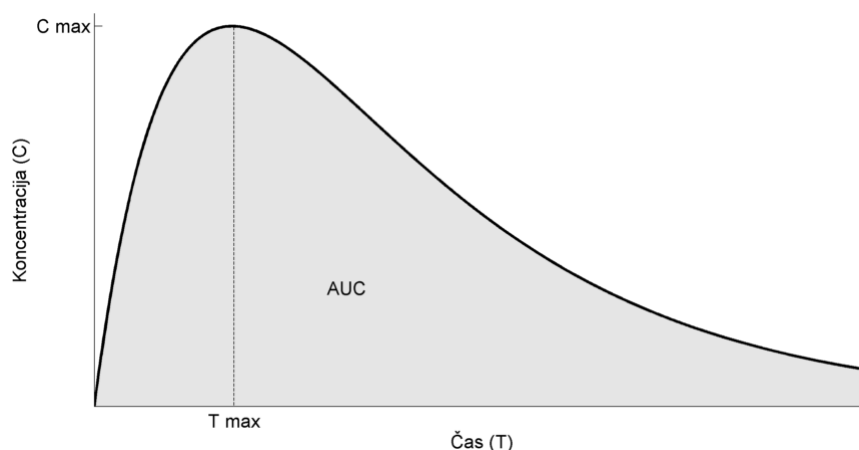
2.3 Farmakokinetična študija

Pri farmakokinetični študiji proučujemo hitrost in obseg predhodno opisanih procesov absorpcije, porazdeljevanja, biotransformacije in ekskrecije. Obnašanje zdravilne učinkovine v telesu je pri farmakokinetičnem modeliranju opisano s časovnim potekom koncentracije zdravilne učinkovine, t.i. farmakokinetičnim profilom zdravilne učinkovine za neko terapijo [6]. Simulacija modela terapije producira rezultate v obliki grafov koncentracije v času (glej sliko 2.2), in sicer lahko izračunamo ločen potek koncentracije zdravilne učinkovine za vsak telesni prostor, ki je v modelu definiran s samostojnim razdelkom.

Glavna cilja farmakokinetičnih študij sta sam razvoj farmakokinetičnega modela - *modeliranje* - in dejanska uporaba implementiranega farmakokinetičnega modela - *simuliranje*.

Na začetku načrtovanja moramo definirati sam namen modeliranja. Različni nameni, za katere se razvija farmakokinetične modele, so med drugim [6, 13, 21]:

- ugotavljanje kinetike in mehanizmov procesov ADME,



Slika 2.2 Farmakokinetični (PK) profil zdravila je podan kot graf, ki prikazuje potek koncentracije zdravilne učinkovine skozi čas. PK profil se v osnovi izmeri ali izračuna za koncentracijo zdravilne učinkovine v krvi. V primeru ko zdravilo ni aplicirano direktno v kri ampak preko drugih poti - peroralno, subkutano, intramuskularno itd. - lahko na grafu opazimo, da maksimalna koncentracija terapevtika (na sliki označena s C_{max}) ni prisotna ob aplikaciji ($T = 0$), temveč ob času T_{max} . V takem primeru nam graf že na prvi pogled razkrije, da gre pri danem načinu aplikacije zdravilna učinkovina najprej skozi proces absorpcije v razdelek krvi. Kumulativna količina zdravilne učinkovine znotraj telesa je enaka integralu krivulje koncentracije v času (na sliki označeno s sivo). V tem kontekstu je integral pogosto v literaturi poimenovan s kratico *AUC* (angl. *Area Under the Curve*, območje pod krivuljo).

- iskanje vrednosti neznanih parametrov modela,
- napovedovanje poteka koncentracije zdravilne učinkovine v izbranih razdelkih telesnih prostorov,
- načrtovanje ali prilagoditev odmerkov in režima odmerjanja,
- vrednotenje in primerjava različnih režimov terapij,
- ugotavljanje stopnje lokalizacije zdravilne učinkovine.

Pri načrtovanju modela se je dobro držati t.i. vodila *varčnosti in verodostojnosti* (angl. *parsimony and plausibility*) [13], ki pravi, naj bo model čim bolj poenostavljen, a hkrati dovolj kompleksen, da z ustrezno natančnostjo posnema obnašanja realnega sistema. Vse poenostavitve, aproksimacije in predpostavke, ki se jih tekom načrtovanja modeliranja poslužujemo, moramo dokumentirati, še preden se lotimo samega razvoja modela. Prav tako je pomembno zabeležiti tudi omejitve, ki se jim pri modeliranju ne moremo izogniti.

Predpostavke in aproksimacije so pogosto sledeče [3, 14]:

- proučevani biološki sistem sestoji iz strogo ločenih razdelkov,

- prehajanje med razdelki je možno le po definiranih povezavah,
- homogenost razdelkov,
- gostota človeškega telesa ustreza 1 kg/L,
- vrednosti parametrov se nanašajo na povprečnega odraslega,
- porazdelitveni koeficienti se s časom ne spreminjajo,
- vrednosti fizioloških parametrov so neodvisne od zdravilne učinkovine.

Omejitve modela so sledeče [11, 14]:

- pomanjkljivo poznavanje farmakokinetičnih procesov,
- pomanjkanje biokemijskih meritev ali pa so na voljo le za sorodne (zdravilne) učinkovine,
- vprašljiva zanesljivost fizioloških parametrov, katerih vrednosti so bile merjene na drugih vrstah in naknadno ekstrapolirane na človeka,
- nekonsistentnost podatkov, hkrati dostopnih v različnih virih.

Ko so dokumentirane aproksimacije in poenostavitve modela, sledi sam razvoj modela. Vsak farmakokinetični **model je definiran s parametri in strukturo**, na podlagi katere formalizirano zapišemo interakcije v modelu. V podpoglavjih, ki sledijo, so opisani parametri, uporabljeni v PBPK modelih in postopek določanja strukture PBPK modelov.

2.4 Parametri modela

V grobem se parametri delijo na dve skupini – na fiziološke parametre, ki se nanašajo na modelirani organizem, in biokemijske parametre, ki se nanašajo na zdravilno učinkovino.

V farmacevtski industriji se trenutno uporabljajo PBPK modeli z nekaj sto parametri in okoli sto enačbami. Več kot 90% uporabljenih parametrov je fizioloških in predstavljajo nevariabilni del modela. Za test potencialno zdravilnih učinkovin na istem organizmu se v modelu spreminjajo zgolj parametri učinkovine, teh parametrov pa je za posamično učinkovino le okoli 10 [9].

2.4.1 Fiziološki parametri

Večina parametrov fizioloških farmakokinetičnih modelov se nanaša na sam organizem (angl. *physiological parameters*) [11, 13]. Ti parametri so lahko reprezentativni za celotno vrsto (miš, podgana, človek itd.) ali pa se med posameznimi pripadniki iste vrste razlikujejo. Tovrstne parametre delimo v dve skupini:

- **Parametri, ki se nanašajo na vrsto organizma** (angl. *species specific parameters*) [5, 11, 22] predstavljajo zgolj povprečne vrednosti parametrov v celotni populaciji. Taki parametri so na primer porazdelitev pretoka skozi posamezne organe Q_i in njihovi relativni volumni V_i .
- **Parametri, ki se nanašajo na individualne organizme** (angl. *individual specific parameters*) [9, 11] so specifični za različne subpopulacije ali posameznike. Sem spadajo telesna teža BW , telesni volumen BV (izpeljan iz BW , na podlagi predpostavk iz poglavja 2.3), srčni iztis Q_c ter variabilni relativni volumni organov in tkiv (na primer delež maščobnega tkiva). Vrednosti teh parametrov lahko izredno variirajo med posamezniki, saj so odvisni od mnogih dejavnikov, med drugim spola, starosti, renalne funkcije, ravni povprečne ali trenutne fizične aktivnosti in prehrane [1, 9, 10].

2.4.2 Biokemijski parametri

Biokemijski parametri (angl. *biochemical parameters*, pogosto tudi *chemical* - ali *compound specific parameters*) [5, 11, 13, 22] se nanašajo na izbrano kemijsko substanco. Pod izrazom kemijska substanca imamo v kontekstu farmakokinetičnega modeliranja ponavadi v mislih zdravilno učinkovino (angl. *therapeutic substance*), ni pa to nujno. Modelira se lahko tudi farmakokinetiko drugih učinkovin, na primer polutantov (angl. *pollutant*). V skupino biokemijskih parametrov spadajo parametri, ki so povezani s hitrostjo absorpcije in izločanja substance, ter parametri, ki opisujejo njeno porazdeljevanje v organizmu.

Pri zdravilnih učinkovinah so nekateri izmed pripadajočih parametrov odvisni od vrste aplikacije zdravila. Med te spadata konstanti za absorpcijo 0. reda K_0 in absorpcijo 1. reda K_1 , ki določata intenzivnost prehajanja zdravila v kri. V kontekstu absorpcije je pomembna tudi biološka razpoložljivost zdravila F . Biološka razpoložljivost je delež prvotnega odmerka zdravila, ki je sistemskemu obtoku na voljo ($0 \leq F \leq 1$) in je prav tako odvisna od vrste aplikacije. Z izločanjem povezana parametra sta eliminacijska

konstanta K_{el} in razpolovna doba zdravilne učinkovine $t_{1/2}$.

Posebna vrsta parametrov so **particijski koeficienti** (angl. *partition coefficients*), ki jih označujemo $P_{tkivo:krvi}$. Definirani so kot razmerja koncentracij zdravilne učinkovine med razdelkom nekega tkiva (ali organa) in razdelkom krvi [13, 22]

$$P_{tkivo:krvi} = \frac{C_{tkivo}}{C_{krvi}}. \quad (2.2)$$

Particijski koeficienti so parametri, izpeljani z namenom, da olajšajo opisovanje porazdeljevanja zdravilne učinkovine znotraj telesa. Njihove vrednosti so pogosto težko točno določljive, vendar lahko pomembno vplivajo na rezultate simulacije.

Vrednosti parametrov, ki se nanašajo na zdravilno učinkovino, so večinoma pridobljeni preko *in vitro* testov, ekstrapolacije eksperimentalnih *in vivo* vrednosti z živali na ljudi, ali pa so izračunane na podlagi posebnih predikcijskih algoritmov [11].

2.5 Struktura modela

2.5.1 Generična struktura

Najpogosteje je za PBPK modeliranje uporabljen razdelčni model (angl. *compartmental model*). Tak model je sestavljen iz enega ali več razdelkov. Vsak razdelek fiziološkega razdelčnega modela predstavlja določen telesni prostor [3, 5, 11, 14, 15, 22]. Najbolj preprosti farmakokinetični modeli sestojijo iz enega samega razdelka, ki predstavlja celoten organizem. Dvorazdelčni modeli so razdeljeni na centralni razdelek, ki ustreza krvi in bolje prekravljenim tkivom, sekundarni razdelek pa periferiji, oziroma slabše prekravljenim tkivom. Najbolj informativni so fiziološko zasnovani modeli iz več razdelkov.

Vsak razdelek je kvantitativno opisan s parametri telesnega prostora, katerega predstavlja. Za vsak razdelek so načeloma definirani vsaj trije taki parametri:

- volumen V [l], t.j. volumen telesnega prostora;
- pretok Q [l h⁻¹], ki ustreza volumnu krvi, ki gre v enoti časa skozi telesni prostor;
- količina A [ng] ali koncentracija zdravilne C [ng l⁻¹] učinkovine, ki se v telesnem prostoru nahaja ob nekem določenem trenutku.

Razdelki so med seboj povezani preko vaskularnega sistema, ki je običajno razdeljen na razdelka arterijske in venske krvi. Razdelka krvi sta osnova za transport zdra-

vilne učinkovine po sistemu in predstavljata povezave med razdelki kot poti za prenos učinkovine [3]. Zdravilo lahko v telo vstopa direktno v razdelek ob aplikaciji ali produkciji in se iz njega odstranjuje prek biotransformacije in z izločanjem. Na teh temeljih je zasnovana ideja PBPK modela.

Generični večprostorni fiziološki model izhaja iz literature [5, 11–13, 15, 23–25] in je prikazan na sliki 2.3. Pri optimizirani strukturi izhajamo iz generične, pri čemer upoštevamo vodila, omenjena v nadaljevanju.

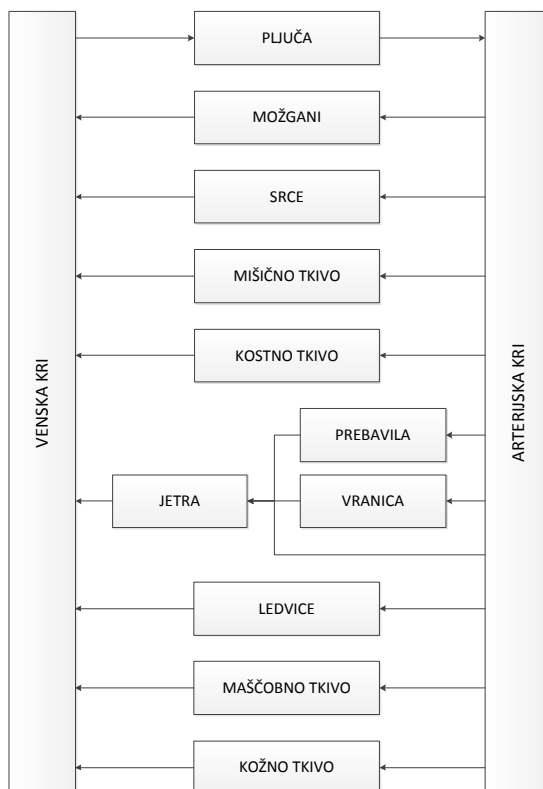
2.5.2 Optimizacija strukture

Pri optimiziranju generične strukture moramo upoštevati lastnosti modelirane učinkovine in namen, za katerega se model razvija [3, 11]. Kompleksnost modela mora biti primerna tudi glede na količino dostopnih podatkov o učinkovini in njihovi zanesljivosti.

Izbire ustrezne strukture modela torej ne pogojuje zgolj narava biološkega sistema, ampak tudi specifične učinkovine. Posamezna učinkovina se lahko v nekaterih tkivih nalaga ali pa zaradi velikosti same molekule niti ne prehaja v določena druga tkiva. Ob poznavanju biokemijskih in fizikalno-kemijskih lastnosti učinkovine lahko poenostavimo ali združimo sestavne dele, ki imajo na farmakokinetiko zdravila zanemarljiv vpliv. Velja tudi obratno – smiselno je vključiti dodatne elemente, v kolikor ti pomembno vplivajo na obnašanje proučevanega biološkega sistema. Za vsak primer zdravilne učinkovine in vrste terapije je zato potrebno določiti relevantne komponente realnega sistema.

Izhodišča za izbiro optimizirane strukture modela so sledeča [5, 13]:

- identifikacija gradnikov, izbira splošnega razdelčnega modela, iz katerega izhajamo;
- razdelek krvi običajno delimo na dva razdelka, arterijsko in vensko kri; razdelka sta pomembna, ker so preko njiju ostali razdelki povezani v celoto;
- pot vstopa zdravila v telo (angl. *route of administration* – ROA) in z njo povezana absorpcija – ključne razdelke v modelu obravnavamo posebej;
- razdelkom, v katerih potekajo procesi izločanja, namenimo dodatno pozornost; to so razdelki, v katerih se učinkovina biotransformira, in razdelki, iz katerih se zdravilo izloča; procesa biotransformacije in ekskrecije pogosto modeliramo ločeno, v nekaterih primerih pa ju smemo obravnavati kot enoten proces izločanja znotraj enega razdelka;



Slika 2.3 PBPK diagram modela z generično strukturo [5, 11–13, 15, 23–25].

- transport zdravilne učinkovine po telesu: določanje obsega razdelkov tkiv, v katere se zdravilo raznaša;
- particioniranje koncentracij $C_{tkivo} : C_{kri}$, ki določajo, v kakšni meri se zdravilna učinkovina porazdeljuje po posameznih razdelkih tkiv, glede na njeno koncentracijo v razdelku krvi; na podlagi relativnih razmerij koncentracij, v katerih poteka porazdeljevanje zdravilne učinkovine, določene razdelke obravnavamo ločeno ali pa jih združujemo v skupaj; pri tem moramo upoštevati, da so združeni razdelki sorodni tudi po drugih lastnostih, kot na primer perfuziji (glej enačbo 2.3);
- tkiva, v katerih se zdravilna učinkovina nalaga, je pogosto smiselno obravnavati s samostojnimi razdelki;
- posebej obravnavamo razdelek, ki predstavlja tarčno tkivo ali organ, ki ga zdravimo z izbranim zdravilom; slednje pride v poštev le, v kolikor je obolen del telesa (npr.

organ) in sistemsko zdravljenje, t.j. zdravljenje celotnega organizma, ni potrebno;

- vključevanje t.i. eksperimentalnih razdelkov za tkiva in organe, ki s stališča samih PK procesov niso bistvena, a so bile na njih izvedene meritve v referenčnih študijah; vključimo jih lahko kot dodatne razdelke, ki pripomorejo pri verifikaciji rezultatov simulacije z empiričnimi podatki.

2.5.3 Združevanje in ločevanje razdelkov

Pri določanju optimizirane strukture specifičnega razdelčnega modela je poleg identifikacije ključnih razdelkov pozornost potrebno nameniti tudi manj pomembnim delom. Model lahko namreč poenostavimo, tako da skupaj združimo razdelke, ki so si med seboj podobni, a na obnašanje sistema nimajo bistvenega vpliva.

Pri PBPK modeliranju se pri poenostavljanju modela poslužujemo t.i. tehnike združevanja razdelkov (angl. *lumping*) [11, 12, 22, 26]. Kompleksnost modela manjšamo tako, da manj relevantne razdelke grupiramo na osnovi podobnih farmakokinetičnih lastnosti. Pomembno je, da združujemo le sorodne razdelke, a tudi ločimo tiste, ki predstavljajo tkiva ali organe, ki se farmakokinetično bistveno razlikujejo med seboj [13]. Paziti moramo namreč, da kljub reduciranju dimenzij modela obdržimo čim več informacij o realnem biološkem sistemu. Posledice neustreznega združevanja razdelkov so nekonsistentnosti in napake pri predikciji obnašanja sistema [26].

Eden izmed najbolj pogosto uporabljenih kriterijev za združevanje razdelkov je *perfuzija* razdelka R_i definirana z enačbo [27]

$$R_i = \frac{Q_i}{V_i}, \quad (2.3)$$

kjer se Q_i nanaša na pretok krvi, ki teče skozi razdelek i z volumnom V_i .

Če želimo združiti dva razdelka iz množice vseh razdelkov κ , je najbolje poiskati taka razdelka i in j , katerih razlika v perfuziji je najmanjša [22, 26]

$$i, j \in \kappa : \min_{i \neq j} |R_i - R_j|. \quad (2.4)$$

Ob poznavanju zdravilne učinkovine upoštevamo particijski koeficient P_i za vsakega izmed razdelkov i , ki določa porazdelitev zdravilne učinkovine po razdelkih. Če se zdravilna učinkovina v različnih tkivih razporeja bolj enakomerno, je razlika med njihovimi

particijskimi koeficienti manjša. Ob upoštevanju porazdeljevanja zdravilne učinkovine lahko razširimo kriterij iz enačbe (2.4) [22] na

$$i, j \in \kappa : \min_{i \neq j} \left| \frac{Q_i}{P_i \cdot V_i} - \frac{Q_j}{P_j \cdot V_j} \right|, \quad (2.5)$$

ali

$$i, j \in \kappa : \min_{i \neq j} \left(\sqrt{\left[\frac{|R_i - R_j|}{\max_{\forall i, j \in \kappa} |R_i - R_j|} \right]^2 + \left[\frac{|P_i - P_j|}{\max_{\forall i, j \in \kappa} |P_i - P_j|} \right]^2} \right). \quad (2.6)$$

Pri združevanju dveh razdelkov i in j v nov razdelek, so parametri združenega razdelka sledeči:

$$V_{ij} = V_i + V_j, \quad (2.7)$$

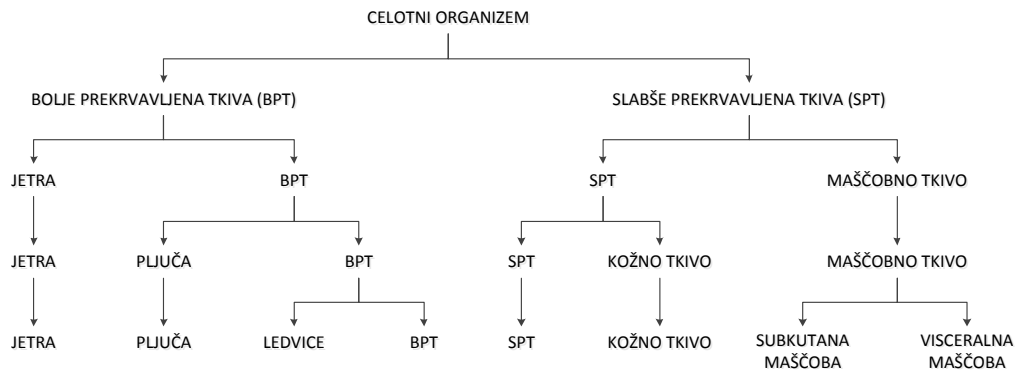
$$Q_{ij} = Q_i + Q_j, \quad (2.8)$$

$$P_{ij} = P_i \cdot \frac{V_i}{V_i + V_j} + P_j \cdot \frac{V_j}{V_i + V_j}. \quad (2.9)$$

Gledano fiziološko z vidika perfuzije tkiv so v splošnem tkiva lahko predstavljena v razdelku slabše prekrvavljenih tkiv, pogosto označenem s kratico SPT (angl. *slowly perfused tissue*) ali v razdelku bolje prekrvavljenih tkiv (angl. *rapidly perfused tissue*), krajše BPT. Med slednje v splošnem štejemo ledvice, jetra, pljuča in prebavila. Med slabše prekrvavljena tkiva spadajo mišično, kožno in maščobno tkivo.

Obratne metode razdruževanja razdelkov (angl. *splitting*) [22] se poslužujemo, kadar so določena tkiva predstavljena z enim skupnim razdelkom, čeprav so si farmakokinetično različna do te mere, da rezultati simulacije modela pomembno odstopajo od obnašanja realnega sistema. Poleg delitve farmakokinetično različnih tkiv v ločene razdelke je dobro definirati dodatne razdelke, ki predstavljajo mesta vstopa in izstopa zdravila iz organizma. Potrebno je določiti poseben razdelek za tarčno tkivo, če je zdravljenje lokalno in ne obsega celotnega organizma. Primer ločevanja razdelkov ponazarja slika 2.4.

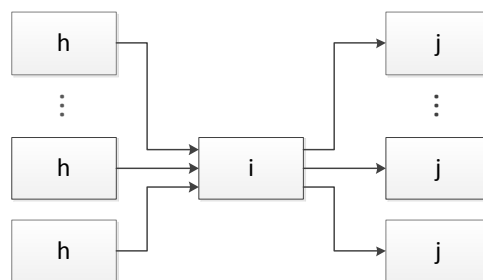
Po definiranju končne strukture modela moramo formalizirati interakcije modela v obliki ravnotežnih enačb. Sistem enačb sestoji predvsem iz navadnih diferencialnih enačb in nekaj pripadajočih pogojev pri nelinearnih procesih.



Slika 2.4 Postopno združevanje razdelkov poteka v smeri puščic, kot pri primeru zgoraj. V vsakem naslednjem koraku se loči razdelek, znotraj katerega so združeni organi, ki se v trenutnem koraku med seboj farmakokinetično najbolj razlikujejo. V obratni smeri, kot jo nakazujejo puščice, poteka združevanje razdelkov tkiv glede na relevantne lastnosti [22].

2.6 Validacija modela

Ko ima model določene vrednosti parametrov, izbrano strukturo in izpeljane ravnotežne enačbe, se je potrebno dokončno prepričati, da zadovoljivo predstavlja realni biološki sistem in da je matematično konsistenten [4, 13, 21]. V nadaljevanju opisane lastnosti in zakonitosti morajo nujno veljati za model, sicer zanj ne moremo reči, da je verodostojen.



Slika 2.5 Iz vseh razdelkov h se pretaka zdravilna učinkovina v razdelek i in se iz njega pretaka naprej v vse razdelke j .

Razdelki v modelu so povezani z usmerjenimi povezavami, pri čemer puščice določajo smer gibanja zdravilne učinkovine s krvjo. Spreminjanje količine zdravilne učinkovine A_i v posameznem razdelku i splošno opisuje enačba

$$\frac{dA_i}{dt} = \sum_h (A_{hi}) - \sum_j (A_{ij}) = \sum_h (Q_{hi} \cdot C_h) - \sum_j (Q_{ij} \cdot C_i). \quad (2.10)$$

Pri tem velja, da je koncentracija zdravilne učinkovine C_i enaka razmerju med njeno količino A_i in volumnom razdelka V_i , v katerem se zdravilna učinkovina nahaja.

$$C_i = \frac{A_i}{V_i}. \quad (2.11)$$

Količina zdravilne učinkovine A_{hi} , ki v nekem času pripotuje iz razdelka h v razdelek i je odvisna od koncentracije zdravilne učinkovine C_h v razdelku h in od pretoka iz razdelka h proti i , ki ga označujemo s Q_{hi} . Enačba je po [3] sledeča:

$$A_{hi} = Q_{hi} \cdot C_h. \quad (2.12)$$

Analogno velja za A_{ij} , količino zdravilne učinkovine, ki se pretaka iz razdelka i v razdelek j . Enačbo (2.10) lahko preprosto razložimo kot pravilo, ki pravi, da je sprememba količine zdravilne učinkovine v i -tem razdelku A_i , enaka količini zdravilne učinkovine, ki se v razdelek i pretaka neposredno iz razdelkov h (seštevek količin A_{hi}) zmanjšana za količino zdravilne učinkovine, ki se iz razdelka i pretaka naprej v razdelke j (seštevek količin A_{ij} , glej sliko 2.5).

Pri zaprtih sistemih velja, da je vsota vseh vhodnih tokov $\sum_h Q_{hi}$ v razdelek enaka vsoti vseh izhodnih tokov $\sum_j Q_{ij}$ iz tega razdelka. Ker sta skupni vhodni in skupni izhodni tok razdelka enaka, lahko z eno samo vrednostjo Q_i opišemo krvni pretok skozi razdelek i :

$$\sum_h Q_{hi} = Q_i(\text{skupni vhodni tok}) = \sum_j Q_{ij} = Q_i(\text{skupni izhodni tok}) = Q_i. \quad (2.13)$$

Da bo model matematično in biološko verodostojen, moramo upoštevati tudi sledeče:

- volumen telesa BV je enak skupni vsoti volumnov vseh razdelkov i :

$$\sum_i V_i = BV, \quad (2.14)$$

- razmerja pretokov skozi razdelke z vidika celotnega sistema določa enačba

$$Q_c = Q_{ven} = Q_{art} = Q_{pljuča} = \sum_i Q_i, \quad (2.15)$$

ki nam pove, da je srčni iztis Q_c enak pretoku skozi razdelka krvi (Q_{ven} in Q_{art}), pretoku skozi razdelek pljuč ($Q_{pljuča}$) in vsoti pretokov skozi preostale razdelke ($\sum_i Q_i$);

- iz nobenega razdelka i se ne more izločiti več zdravilne učinkovine, kot je je na voljo (konsistentne vrednosti K_{el});

$$\forall i \in \kappa : A_i \geq 0. \quad (2.16)$$

- kumulativna količina zdravilne učinkovine v modeliranem sistemu je konstantna, če sistem sam učinkovine ne proizvaja ali porablja [13] in v kolikor lahko beležimo količino izločene zdravilne učinkovine; za ta namen lahko v model vpeljemo dodaten eliminacijski razdelek, v katerem se akumulira iz telesa izločena zdravilna učinkovina; velja enačba

$$D = F \cdot D + (1 - F) \cdot D = \sum_i A_i + A_{elim} + (1 - F) \cdot D, \quad (2.17)$$

vsota celotne izločene količine zdravilne učinkovine A_{elim} in preostale količine zdravilne učinkovine v vseh razdelkih fizioloških prostorov skupaj $\sum_i A_i$ mora biti v vsakem trenutku enaka biološko razpoložljivi (F) količini začetnega odmerka zdravilne učinkovine D .

Čeprav se zdijo naštetosti zakonitosti samoumevne, lahko služijo kot kriterij za validacijo pri dodajanju novih razdelkov v model. Tkivo ali organ, ki ga želimo predstaviti z novim razdelkom, je predhodno že predstavljeno znotraj nekega drugega razdelka (na primer SPT ali BPT), zato moramo ob ločevanju novega razdelka poskrbeti, da ustrezno popravimo tudi vrednosti tistega razdelka, iz katerega novi izhaja.

3 Farmakokinetični model z upoštevanjem procesa produkcije

Eden glavnih ciljev našega dela je ovrednotenje potencialne terapije z lokalno produkcijo zdravilne učinkovine znotraj obolelega tkiva ali organa pred terapijami s klasičnimi vrstami aplikacije (glej podpoglavje 2.2.1). V ta namen moramo implementirati farmakokinetični model za terapijo z novim dostavnim sistemom, ki omogoča *in situ* produkcijo zdravilne učinkovine. Modelov, ki bi vključevali tudi produkcijo zdravilne učinkovine v telesu, v proučevani literaturi nismo zasledili, zato smo sklenili nadgraditi temeljni PBPK model. Razširjen farmakokinetični model tako poleg procesov ADME upošteva tudi proces produkcije in morebitne spremembe v porazdeljevanju zdravilne učinkovine, ko le-ta v krvni obtok uhaja iz tkiva, v katerem se proizvaja.

3.1 Lokalno zdravljenje

Preden opišemo razširitev modela za terapijo z lokalno produkcijo, moramo najprej podati izhodišča za samo terapijo in jo kratko opisati.

3.1.1 Sistemski in lokalni učinek

V splošnem velja, da se učinek zdravilne učinkovine povečuje z večanjem njene koncentracije, čeprav korelacija ni povsem linearna. Zdravilna učinkovina, ki preide v razdelka arterijske in venske krvi se lahko dalje porazdeljuje v ostale organe in tkiva v telesu. Večji kot je relativni delež zdravilne učinkovine, ki preide v krvni oziroma sistemski obtok, večji bo *sistemski učinek* zdravilne učinkovine, torej učinek na celoten organizem. Pri zdravljenju bolezni, ki prizadanejo celo telo, je sistemski učinek zaželen (npr. pri zdravljenju sepse). Pri zdravljenju lokalno omejenih obolenj pa je ravno nasprotno, saj želimo, da se zdravilna učinkovina zadržuje in učinkuje le na mestu, kjer je zdravljenje potrebno. V tem primeru želimo *lokalni učinek*. Ali bo učinek zdravilne učinkovine lokalen ali sistemski v veliki meri zavisi od poti vstopa zdravila v telo [19]. Pri določenih lokalno omejenih boleznih se v praksi uporabljajo terapije, pri katerih je zdravilni učinek zaradi vrste aplikacije sistemski. Kljub temu da je zdravljenje bolezni lahko uspešno, pa so lahko drugi sistemski učinki obsežni in škodljivi. Za primere obolenj, ki so lokalno omejena, bi bilo tako bolj ustrezno lokalno zdravljenje; na primer takšno, pri katerem se zdravilna učinkovina proizvaja znotraj obolelega tkiva ali organa.

3.1.2 Terapija z lokalno produkcijo zdravilne učinkovine

Predlagana terapija z lokalno oziroma *in situ* produkcijo zdravilne učinkovine temelji na posebnem dostavnem sistemu, ki bi kontinuirano tvoril zdravilno učinkovino. Dostavni sistem sestoji iz t.i. mikrokapsul, te pa vsebujejo posebne celice, ki so sposobne več ali manj konstantno proizvajati določen terapevtski protein - zdravilno učinkovino. Zaradi svoje velikosti se mikrokapsule ne bi mogle širiti preko drugih delov telesa, ampak bi obstale na mestu, kamor bi bile aplicirane - v t.i. *tarčno tkivo*. Tak dostavni sistem bi uporabljali za produkcijo znanih zdravilnih učinkovin, ki se pri kliničnem delu že uporabljajo in katerih terapevtski (zdravilni) učinki so potrjeni.

Ena izmed glavnih predvidenih prednosti terapije z *in situ* produkcijo bi bila maksimizacija deleža zdravilne učinkovine, ki ostane lokaliziran v obolelem delu telesa. Ker je lokalni učinek odvisen od koncentracije zdravilne učinkovine na obolelem delu, bi za doseg enakega terapevtskega učinka najverjetneje potrebovali manjše kumulativne količine zdravilne učinkovine. Posledica manjših količin in s tem tudi koncentracij zdravilne učinkovine v preostalih delih telesa pa bi bila zmanjšanje sistemskih učinkov. Da bi predvidevanja o prednostih *in situ* terapije lahko najhitreje potrdili ali ovrgli, hipotezo

testiramo z uporabo farmakokinetičnega modela.

3.2 Razširitev farmakokinetičnega modela

Farmakokinetični model s produkcijo izhaja iz temeljnega modela, predstavljenega v poglavju 2. Kot razkrije že ime, je v modelu poleg procesov absorpcije, porazdeljevanja in izločanja upoštevan proces produkcije zdravilne učinkovine. Učinkovina se neprekinjeno in s konstantno intenzivnostjo proizvaja v razdelku tarčnega tkiva. V nadaljevanju se izraz *tarčno tkivo* lahko nanaša na zdravljen tkivo ali zdravljeni organ. Konstanta produkcije K_{prod} [$ng\ h^{-1}$] določa povprečno količino zdravilne učinkovine, ki se v nekem določenem času proizvede in sprosti iz mikrokapsul v tarčno tkivo.

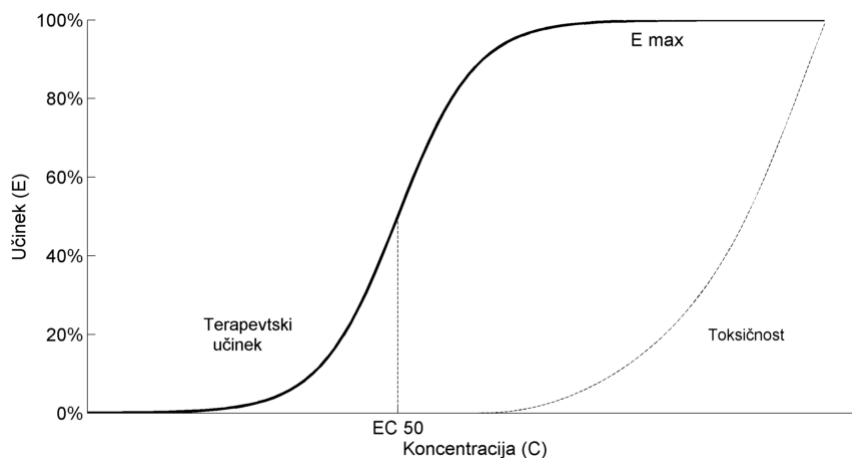
Ker zdravilna učinkovina vstopa v telo s procesom produkcije, je modeliranje procesa absorpcije odvečno, vendar vseeno lahko pride do določene razlike pri porazdeljevanju zdravilne učinkovine iz razdelka tarčnega tkiva v razdelek krvi. Porazdeljevanje lahko poteka enako z vidika nespremenjenih vrednosti vseh particijskih koeficientov, kakršne so pri IV ali SC aplikaciji, v drugih primerih pa zdravilna učinkovina iz razdelka tarčnega tkiva v razdelek krvi prehaja omejeno in se particijski koeficient za razdelek tarčnega tkiva spremeni.

Ker naj bi se dostavni sistem uporabljal za zdravilne učinkovine, ki se že uporabljajo pri kliničnem delu, vendar pri drugih vrstah aplikacij, je farmakodinamika - vpliv zdravila na telo - načeloma poznana. Iz obstoječih raziskav lahko pridobimo nekatere podatke kot na primer vrednost koncentracije EC_{50} za izbrano zdravilno učinkovino. EC_{50} (angl. *half maximal effective concentration*) je koncentracija zdravilne učinkovine, pri kateri je terapevtski učinek E enak polovici maksimalnega terapevtskega učinka $E_{max} = 100\%$ [28]. Dejanski terapevtski učinek pri neki koncentraciji C pa lahko izračunamo z enačbo [29]

$$E = \frac{C}{EC_{50} + C}. \quad (3.1)$$

Relacijo terapevtskega učinka v odvisnosti od koncentracije imenujemo *farmakodinamični profil* zdravila, katerega prikazuje tudi graf na sliki 3.1.

Za oceno potrebne produkcije, ki v modelih predstavlja nepoznani parameter, izhajamo iz ciljne oziroma želene (angl. *desired*, oznaka d) koncentracije zdravilne učinkovine C_d v tarčnem tkivu. Koncentracija C_d je za želeno stopnjo terapevtskega učinka E_d enaka



Slika 3.1 Farmakodinamični (PD) profil opisuje vpliv telesa na zdravilo. V to so zajeti tako zaželeni (terapevtski) učinki, kot tudi toksični učinki. Neprekinjena krivulja prikazuje terapevtski odziv, pri čemer vrednost EC_{50} označuje koncentracijo, pri kateri želeni učinek ustreza polovici maksimalnega terapevtskega učinka $E_{max} = 100\%$ ($0 \leq E \leq 1$). V desno zamaknjena krivulja s prekinjeno črto, ki je sicer podobna krivulji terapevtskega učinka, predstavlja toksičnost zdravilne učinkovine [28].

efektivni koncentraciji EC_d , ki je določena na osnovi enačbe 3.2. Zagotavljati je potrebno namreč ustrezno produkcijo, da bo terapevtski učinek primerljiv z obstoječimi terapijami z isto zdravilno učinkovino.

$$EC_d = \frac{E_d \cdot EC_{50}}{1 - E_d} \quad (3.2)$$

Pri tem je pomemben podatek tudi delež časa želenega učinkovanja zdravila. Tega določimo kot razmerje med časom t_e , pri katerem koncentracija zdravilne učinkovine presega ciljno koncentracijo oziroma efektivno koncentracijo EC_d in časom med dvema odmerkoma, periodo odmerjanja t_p . Interval t_p je za terapijo s produkcijo, kjer je produkcija kontinuirana, poljubna, za terapije s standardnimi vrstami aplikacije pa strogo določen z režimom zdravljenja.

Preden se lotimo razširitve modela strnjeno povzemimo cilje modeliranja terapije s produkcijo:

- ocena potrebne produkcije zdravilne učinkovine K_{prod} ; izhodišče je produkcija, ki zadošča za doseg ciljne koncentracije zdravilne učinkovine v razdelku tarčnega tkiva;
- kvalitativna ocena pojavitve neželenih učinkov v primerjavi s sorodnimi obstoječimi

terapijami; primerjava na osnovi nivojev in nihanj koncentracije zdravilne učinkovine v razdelkih, ki ne predstavljajo tarčnega tkiva, oziroma vsaj za razdelek krvi;

- ocena relativne lokalizacije; določitev deleža kumulativne količine zdravilne učinkovine v telesu, ki se nahaja v tarčnem tkivu;
- ocena relativnega deleža časa v posameznem dozirnem intervalu, v katerem je nivo koncentracije zdravilne učinkovine nad nivojem koncentracije, ki zagotavlja želeno stopnjo terapevtskega učinka E_d .

Seznam predpostavk in poenostavitev farmakokinetičnega modela iz poglavja 2.3 za model s produkcijo razširimo s sledečimi točkami:

- število mikroenkapsuliranih celic, ki proizvajajo zdravilno učinkovino se s časom ne spreminja (razraščanje celic je omejeno s stenami mikrokapsule);
- mikrokapsule zaradi svoje velikosti ne potujejo po telesu, temveč ostanejo lokalizirane v tkivu, v katerega so aplicirane;
- mikrokapsule so v tkivu, v katerega so aplicirane, homogeno razporejene.

Morebitna dodatna omejitev pri simulaciji novega modela je lahko nepoznavanje koncentracije EC_{50} , pri čemer se moramo poslužiti manj zanesljivih oziroma natančnih metod, recimo z ujemanjem površine pod krivuljo koncentracije zdravila AUC (glej podpoglavje 2.3) v razdelku tarčnega tkiva pri terapiji s produkcijo in uveljavljeni terapiji s standardnimi aplikacijami.

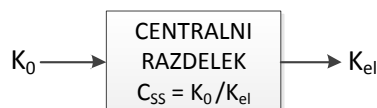
3.2.1 Vključevanje procesa produkcije

Ustrezen kvantitativen opis procesa produkcije je ključen za modeliranje *in situ* terapije. V zasnovi te terapije ni odmerka v klasičnem smislu, niti procesa absorpcije. V literaturi [19] smo sicer našli opisan proces, ki je z matematičnega vidika ekvivalenten produkciji zdravilne učinkovine, vsaj za enorazdelčni model. Proces, iz katerega smo izhajali, je kontinuirana infuzija, saj se pri tem - tako kot pri produkciji - v časovni enoti poveča količina zdravilne učinkovine v sistemu za neko točno določeno vrednost. Podobno kot pri navadni infuziji tudi pri večrazdelčnem modelu prihaja dotok učinkovine izven sistema neposredno v razdelek krvi. Pri produkciji sistem sam ustvarja nove količine zdravilne učinkovine v razdelku tarčnega tkiva.

Osnovni zapis spreminjanja koncentracije pri kontinuirani infuziji lahko zapišemo z enačbo (3.3). Proces simbolično prikažemo pri enorazdelčnem modelu, kjer v razdelek vstopa učinkovina s procesom 0. reda in iz njega izstopa s procesom 1. reda. Po dovolj dolgem času se vzpostavi dinamično ravnovesje (angl. *steady-state*) in koncentracija učinkovine se ustali na točno določeni vrednosti C_{ss} (glej enačbo 3.4). Takšen preprost enorazdelčni model kontinuirane infuzije je predstavljen tudi na sliki 3.2.

$$\frac{dC}{dt} = K_0 - K_{el} \cdot C, \quad (3.3)$$

$$C_{ss} = \lim_{t \rightarrow \infty} C = \frac{K_0}{K_{el}}. \quad (3.4)$$



Slika 3.2 Enorazdelčni model kontinuirane infuzije [19].

Iz tega smo izhajali pri vključevanju matematično sorodnega procesa produkcije v naš večrazdelčni model nove terapije. Produkcija je namreč prav tako proces 0. reda, produkcijska konstanta K_{prod} pa ustreza količini novonastale substance na enoto časa. V osnovi je za naše namene modeliranja potrebno tarčno tkivo obravnavati v ločenem razdelku, v katerega vodi kontinuiran vhodni tok novonastale učinkovine. Vključevanje razdelka s produkcijo v model je prikazan na sliki 3.3.

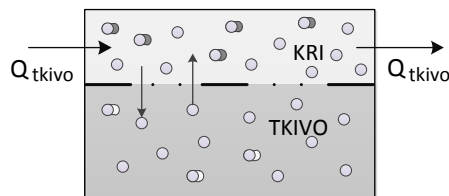


Slika 3.3 Vključevanje razdelka s kontinuirano produkcijo v model. Na sliki je predstavljen princip vključitve produkcije v model, brez prikaza ostalih razdelkov in eliminacije. Zdravilna učinkovina se proizvaja v razdelku tarčnega tkiva, ki je povezan z razdelkom krvi, oziroma sistemskim obtokom. Posledično iz razdelka tarčnega tkiva uhaja zdravilna učinkovina in se s krvjo raznaša po sistemu (telesu).

Ravnovesna koncentracija zdravilne učinkovine v razdelku tarčnega tkiva C_{tkivo} mora biti enaka ali le nekoliko višja od koncentracije, ki v razdelku tarčnega tkiva zagotavlja zaželeno stopnjo zdravilnega učinka E_d . Imenujmo to koncentracijo zdravilne učinkovine ciljna terapevtska koncentracija C_d . S simulacijami modela bomo tako lahko poiskali vrednost produkcijske konstante K_{prod} , ki je potrebna za doseg želeno koncentracije zdravilne učinkovine $C_{tkivo} \geq C_d$ za razdelek tarčnega tkiva.

3.2.2 Določanje particijskega koeficienta za tarčno tkivo

Za zdravilno učinkovino, katere porazdeljevanje modeliramo, particijske koeficiente prikrbimo ali izračunamo na podlagi meritev obstoječih raziskavah. V osnovi je tak pristop povsem zadovoljiv, vendar se moramo zavedati, da so izmerjene in ekstrapolirane vrednosti koeficientov določene na podlagi porazdeljevanja učinkovine iz razdelka krvi v razdelke ostalih telesnih prostorov. Za modeliranje terapij s klasičnimi vrstami aplikacije je to primerno, pri novi terapiji, kjer se zdravilna učinkovina producira v tarčnem tkivu, pa temu ni nujno tako. Zdravilo se v določenih primerih porazdeljuje v enakih razmerjih, če ob produkciji uhaja iz razdelka tarčnega tkiva v razdelek krvi ali če po SC ali IV aplikaciji prehaja iz krvi v tarčno tkivo. V nekaterih primerih se lahko porazdeljuje drugače.



Slika 3.4 Prikaz porazdelitve učinkovine med razdelkoma krvi in tkiva. Količina zdravilne učinkovine v vsakem delu je na sliki simbolično prikazana s pikami. Na porazdelitev vplivajo: (1) dostava učinkovine s krvjo, pretok Q_{tkivo} , (2) prehodnost med krvjo in tkivom za izbrano učinkovino, kjer je prehod označen kot črtkana črta med svetlim razdelkom krvi in temnim delom, ki predstavlja tkivo, ter (3) afiniteto na receptorje in druge proteine - vezana učinkovina na sliki prekriva piko druge barve, ki predstavlja snov, na katero se učinkovina veže.

Za razdelek, v katerem se lokalno proizvaja zdravilna učinkovina, smo morali določiti nov particijski koeficient $P'_{tkivo:krvi}$. Pri iskanju novega koeficienta sicer skorajda ni bilo na voljo drugih podatkov, ki bi nam olajšali računanje njegove vrednosti. Našli smo le nekatere opisne podatke, na podlagi katerih smo lahko okvirno sklepali npr. o prehodnosti

učinkovine iz krvi v tkiva ali obratno. Prav tako v literaturi nismo našli konkretnih vrednosti afinitet proučevanih zdravilnih učinkovin za vezave s plazemskimi beljakovinami in receptorji, vrednosti o gostoti receptorjev preko tkiv, itd.

Kot rešitev smo si zamislili pristop, ki bi poznane lastnosti vseeno vzel v obzir, čeprav niso kvantitativno definirane. Lahko namreč določimo vsaj interval možnih vrednosti za nov particijski koeficient. Ob upoštevanju opisno podanih lastnosti za nek specifičen primer (znano tkivo in učinkovino) lahko ocenimo, na katerem delu intervala se vrednost koeficienta $P'_{tkivo:krvi}$ najverjetneje nahaja.

Če na porazdelitev torej vplivajo prehodnost, afiniteta in pretok, slednji pa v naših modelih ni omejujoč faktor, moramo preučiti dve robni situaciji:

1. *Porazdeljevanje zdravilne učinkovine, ki je odvisno skoraj izključno od t.i. afinitete učinkovina-tkivo (vezave učinkovine na receptorje ali druge proteine):* Prehodnost med razdelkom krvi in razdelkom nekega tkiva ne predstavlja omejitve. Zdravilna učinkovina se bo v ravnotežnem stanju porazdelila enako ne glede na to, ali bi bil prvotni odmerek apliciran IV ali SC in bi se učinkovina porazdeljevala iz razdelka krvi v razdelek tkiva ali pa bi se producirala v znotraj razdelka tkiva in od tam prehajala v razdelek krvi (slika 3.6). Če poenostavimo, lahko zapišemo nov particijski koeficient, ki opisuje razmerje koncentracij zdravilne učinkovine med razdelkom nekega tkiva in razdelkom krvi kot

$$P'_{tkivo:krvi} = P_{tkivo:krvi}. \quad (3.5)$$

2. *Porazdeljevanje zdravilne učinkovine je omejeno predvsem s prehodnostjo med razdelkoma krvi in tkiva:* V tem primeru je ključno v katerem razdelku se zdravilna učinkovina prvotno nahaja. Particijski koeficient za razdelek tkiva v tem primeru ni več enak, kar lahko pokažemo tudi s sledečim primerom:

Primer 1. *Če obravavamo primer, pri katerem je prehodnost zdravilne učinkovine med razdelkoma krvi in tkiva popolnoma onemogočena, bi se zgodilo naslednje: pri IV ali SC aplikaciji zdravila, bi bila v razdelku krvi prisotna koncentracija zdravilne učinkovine $C_{kri} > 0$, pri čemer bi bila koncentracija v razdelku tkiva C_{tkivo} enaka nič. Koeficient lahko zapišemo kot*



(a) Ravnotežno razmerje koncentracij pri IV ali SC aplikaciji, $P_{tkivo:kri}$. (b) Ravnotežno razmerje koncentracij pri lokalni produkciji v tkivu, $P'_{tkivo:kri}$.

Slika 3.5 Porazdeljevanje pri omejeni prehodnosti, glede na vrsto aplikacije zdravila. Ne glede na aplikacijo zdravilne učinkovine (na sliki označeno s puščico Z.U.) bo ob zadostni perfuziji in prosti prehodnosti ravnotežno razmerje koncentracij zdravilne učinkovine približno enako, $P \approx P'$.

$$P_{tkivo:kri} = \frac{C_{tkivo}}{C_{kri}} = \frac{0}{x} = 0. \quad (3.6)$$

Ob predpostavki, da je tudi pri omejeni prehodnosti nov koeficient enak, ($P'_{tkivo:kri} = P_{tkivo:kri}$) bi naredili napako. Izračun bi pokazal, da je vrednost ravnotežne koncentracije zdravilne učinkovine v razdelku tkiva enaka nič ($C_{tkivo} = P_{tkivo:kri} \cdot C_{kri} = 0 \cdot x = 0$), čeprav bi se v omejenem volumnu razdelka tkiva nahajala količina zdravilne učinkovine $A_{tkivo} > 0$ in bi morala biti tudi koncentracija $C_{tkivo} > 0$. Zaradi popolnoma omejenega prehoda med razdelkoma je koncentracija zdravilne učinkovine v razdelku krvi pravzaprav tista, ki ostane enaka nič, nov koeficient pa je v takem primeru

$$P'_{tkivo:kri} = \frac{C_{tkivo}}{C_{kri}} = \frac{y}{0} = \infty. \quad (3.7)$$

Podani primer je sicer ekstremen, a vendar prikazuje, da pri omejeni prehodnosti nov particijski koeficient vsekakor ne ostane enak kot pri IV in SC aplikaciji, torej $P'_{tkivo:kri} \neq P_{tkivo:kri}$. Pri omejeni prehodnosti je koeficient razmerij za razdelek tkiva, znotraj katerega se producira zdravilna učinkovina, pravzaprav obratno sorazmeren s koeficientom za isti razdelek tkiva, če bi zdravilna učinkovina prehajala vanj iz razdelka krvi (po IV ali SC aplikaciji)

$$P'_{tkivo:kri} = [P_{tkivo:kri}]^{-1}. \quad (3.8)$$



(a) Ravnotežno razmerje koncentracij pri IV ali SC aplikaciji, $P_{tkivo:kri}$. (b) Ravnotežno razmerje koncentracij pri lokalni produkciji v tkivu, $P'_{tkivo:kri}$.

Slika 3.6 Spremenjeno porazdeljevanje pri omejeni prehodnosti glede na vrsto aplikacije zdravila. Pri aplikaciji zdravilne učinkovine (na sliki označeno s puščico Z.U.), kjer je zdravilna učinkovina najprej razpoložljiva v razdelku krvi in od tam prehaja naprej v razdelek zdravljenega tkiva (a), bo pri omejeni prehodnosti med razdelkoma drugačna, kot če bi se zdravilna učinkovina producirala v razdelku tkiva in čez prehod z omejeno prepustnostjo uhajala v razdelek krvi (b). Posledica drugačne porazdelitve bo tudi razlika v particijskih koeficientih P in P' za dotični razdelek tkiva.

Simbolično je porazdelitev zdravilne učinkovine za tak primer prikazana na sliki 3.6.

Če upoštevamo obe robni situaciji (porazdeljevanje zdravilne učinkovine odvisno izključno od prehodnosti med razdelkoma in porazdeljevanje zdravilne učinkovine odvisno le od afinitete), potem lahko določimo začetek in konec intervala, znotraj katerega se nahaja nov particijski koeficient $P'_{tkivo:kri}$. Vrednost $P'_{tkivo:kri}$ določa novo razmerje ravnotežnih koncentracij za razdelek tkiva, v katerem se producira zdravilna učinkovina. Za vse ostale razdelke tkiv se koeficienti ne spreminjajo. V primeru, ko je porazdeljevanje v razdelku izbranega tkiva omejeno s kombinacijo prehodnosti in afinitete, se vrednost nahaja nekje med enim in drugim koncem intervala, podanega z enačbo

$$P_{tkivo:kri} > 1 : \quad P'_{tkivo:kri} \in \left[\frac{1}{P_{tkivo:kri}}, P_{tkivo:kri} \right], \quad (3.9)$$

$$0 < P_{tkivo:kri} < 1 : \quad P'_{tkivo:kri} \in \left[P_{tkivo:kri}, \frac{1}{P_{tkivo:kri}} \right]. \quad (3.10)$$

Ko imamo interval možnih vrednosti za $P'_{tkivo:kri}$ glede na prepustnost prehajanja zdravilne učinkovine med razdelkoma krvi in tkiva izberemo več vrednosti $P'_{tkivo:kri}$ na enem ali drugem koncu intervala ter za izbrane vrednosti izvedemo simulacije. V konkretnih primerih se pri določanju dela intervala upošteva recimo velikosti molekul zdravilne učinkovine in fiziologijo tarčnih tkiv, v katerih bi se zdravilna učinkovina proizvajala. V tkivih, kjer so prisotne sinusoidne kapilare, je prepustnost večja in učinkovine lažje prehajajo iz krvi v tkivo, particijski koeficient razdelka, ki predstavlja tako tkivo pa bo

enak $P'_{tkivo:kri} \approx P_{tkivo:kri}$. Drugače je pri tkivih s kontinuiranimi kapilarami, kjer je prehajanje obravnavanih zdravilnih učinkovin zelo omejeno. V slednjem primeru bo nov particijski koeficient, ki se nanaša na razdelek takega tkiva, enak $P'_{tkivo:kri} \approx \frac{1}{P_{tkivo:kri}}$.

V tem delu poglavja je določanje spremenjenega particijskega koeficienta razloženo v splošnem. V konkretnem modelu s produkcijo pa se ta sprememba lahko pojavi samo v razdelku tarčnega tkiva. Zdravilna učinkovina v vse ostale razdelke tkiv in organov namreč še vedno prehaja prek razdelka krvi, enako kot pri IV ali SC aplikaciji, zato ostanejo particijski koeficienti ostalih razdelkov nespremenjeni.

4 Zgledi implementacij modelov

Z razširjenim farmakokinetičnim modelom želimo oceniti, ali je zdravljenje z lokalno produkcijo zdravilne učinkovine za določena lokalna obolenja bolj ustrezno od obstoječih metod. V ta namen moramo rezultate simulacij modela ovrednotiti glede na rezultate simulacij modelov ustaljenih vrst zdravljenja za isto bolezen.

Modeli proučevanih terapij so si torej enaki glede izbrane zdravilne učinkovine, razlikujejo pa se v sami aplikaciji zdravila oziroma dostavnem sistemu. Posledično se terapije razlikujejo tudi v odmerkih, časovnem intervalu med dvema odmerkoma, absorpcijskem ali produkcijskem procesu in biološko razpoložljivostjo zdravilne učinkovine.

Prav omenjene razlike med terapijami predstavljajo tiste elemente, ki jim moramo pri sami implementaciji modelov nameniti največjo pozornost, saj so osnova za diferenciacijo simulacijskih rezultatov na podlagi katerih primerjamo obravnavane terapije.

Končni model smo implementirali za dva različna primera. Pri prvem primeru preučujemo različne terapije zdravljenja hepatitisa C z zdravilno učinkovino *interferonom* α . Pri tem primerjamo rezultate simulacije modela dveh standardnih terapij s simulacijskimi rezultati modela s produkcijo, ki opisuje zdravljenje z *in situ* produkcijo. Drugi primer

je zastavljen na enak način, le da primerjamo zdravljenja ishemije miokarda z zdravilno učinkovino *anakinro*.

4.1 Hepatitis C: modeliranje zdravljenja z interferonom

Prvi proučevani primer lokalnega zdravljenja z *in situ* produkcijo zdravilne učinkovine je zdravljenje hepatitisa C s terapevtskim proteinom interferonom α . V klinični praksi je najbolj razširjena subkutana terapija, za katero se uporabljata zdravili *Roferon A* in *Intron A*. Že samo subkutano injiciranje je za paciente relativno neprijetno, celotno zdravljenje pa je tudi časovno potratno, saj morajo pacienti trikrat tedensko obiskovati terapije, ki se izvajajo več mesecev skupaj. Kljub temu da je tako zdravljenje velikokrat uspešno, se pogosto pojavijo obsežni neželeni sistemski učinki (npr. utrujenost, glavobol, bruhanje in psihiatrične bolezni), ki so korelirani z viškom koncentracije (angl. *concentration peak*) interferona v telesu v urah po aplikaciji zdravila.

Za zdravljenje hepatitisa C bi bila terapija z lokalno produkcijo interferona znotraj jeter primerna iz več razlogov. Pri tem bi bila potrebna le ena aplikacija mikroenkapsuliranih celic v jetra ob začetku terapije, interferon pa bi se nato kontinuirano produciral in sproščal iz mikrokapsul v jetrno tkivo. Na ta način bi zmanjšali število potrebnih obiskov pri zdravniku in invazivnih posegov v telo. Predvidevamo, da bi bil interferon pri taki terapiji bolj lokaliziran v jetrih kot pri subkutani terapiji, predvsem pa upamo na ublažitev velikih nihanj koncentracij interferona v telesu in s tem omejitev neželenih sistemskih učinkov. Da bi preverili naša predvidevanja, moramo modelirati tako terapijo z lokalno produkcijo kot standardno subkutano terapijo in primerjati rezultate simulacij.

4.1.1 Osnovni model

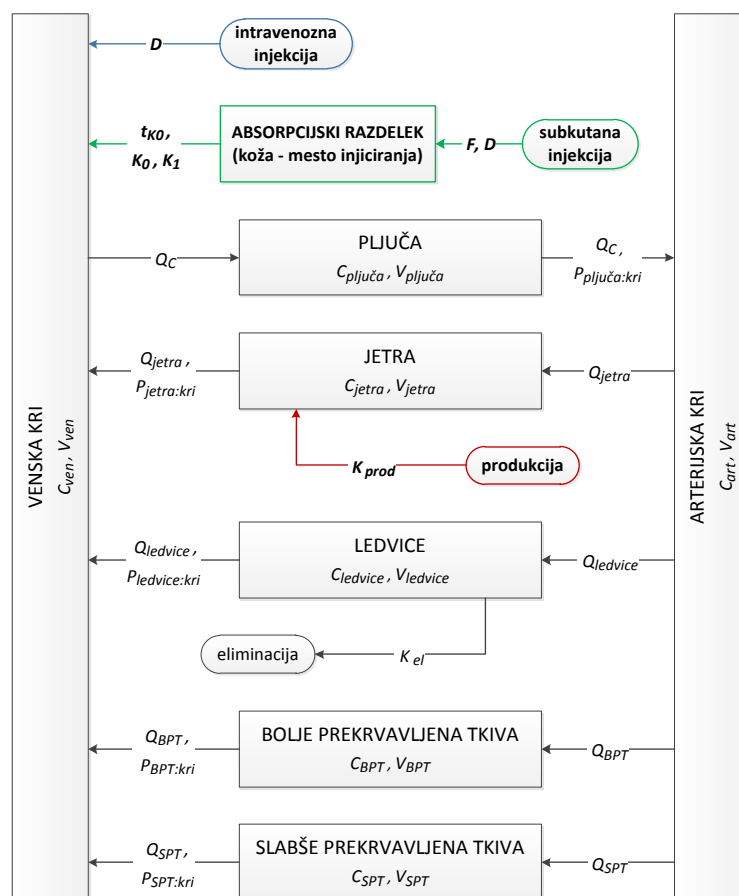
Pri načrtovanju modelov terapij smo izhajali iz obstoječih kliničnih raziskav [30–33]. Kot je omenjeno v začetku tega poglavja in v podpoglavju 2.4, je večina strukture in parametrov za oba modela terapij enaka. Najbolj smiselno je, da najprej načrtujemo osnovni model, ki bo skupen za obe terapiji in ga nato naknadno diferenciramo za vsako terapijo posebej.

Struktura

Pri izbiri osnovne strukture modela, ki je skupna obravnavanim interferonskim modelom terapij, smo si pomagali s podatki iz literature [1, 32, 34, 35]. Sledeče lastnosti interferona α , fiziološke značilnosti in značilnosti bolezni so nam služile kot kriterij za izbiro osnovne strukture modela:

1. Interferon α se v večjih koncentracijah nahaja v jetrih, ledvicah in pljučih.
2. Interferonska molekula je topna v vodi in posledično slabo porazdeljena v maščobno tkivo (nižje koncentracije).
3. Koža in mišično tkivo vsebujejo nizke koncentracije interferona, ki se lahko primerjajo s koncentracijami v maščobnem tkivu.
4. Koža, mišičevje in maščobno tkivo imajo podobno, nizko perfuzijo.
5. Interferonska molekula načeloma ne prehaja čez hematoencefalno bariero.
6. Prebavila, vranica in srce imajo visoko perfuzijo in v ravnovesnem stanju srednje, primerljive vrednosti koncentracij interferona.
7. Interferon se primarno in skoraj izključno izloča iz ledvic, biotransformacija v jetrih je minimalna.
8. Hepatitis C je virusna infekcija, ki prizadane jetra.

Na podlagi zbranih informacij (točke 1, 7 in 8) smo definirali ločene razdelke za jetra, ledvice in pljuča, ostala boljše prekrvavljena tkiva so združena v razdelek RPT (točka 6). Koža, mišično in maščobno tkivo so združeni v razdelku manj prekrvavljenih tkiv, SPT (točke 2, 3 in 4). Možganov ni potrebno modelirati posebej (točka 5). Ohranjena sta ločena razdelka arterijske in venske krvi. Skupna eliminacija interferona je v model vključena kot enoten proces pri ledvicah (točka 7). Osnovna, torej skupna struktura modelov, ki je enaka vsem terapijam, je na sliki 4.1 prikazana v sivi barvi.



Slika 4.1 Večrazdelčni PBPK model za interferonske terapije. Osnovna struktura je pri vseh terapijah enaka - osnovni gradniki so označeni sivo. Pravokotni gradniki so razdelki, ki predstavljajo telesne prostore, zaobljeni pa točke vstopa in izstopa zdravila iz telesa. Glavna razlika terapij s stališča strukture so ravno gradniki, ki predstavljajo pot vstopa zdravila v telo. Za vsako posamezno terapijo so specifični gradniki označeni z različnimi barvami: modra se nanaša na intravenozno terapijo, zelena na standardno subkutano terapijo in rdeča na terapijo z mikroenkapsuliranimi celicami, ki v jetrih lokalno producirajo terapevtik [1, 2].

Neposredno iz strukture in notranjih povezav lahko izpeljemo ravnotežne enačbe, ki opisujejo farmakokinetične procese. Ker se različne interferonske terapije ločijo predvsem po načinu aplikacije zdravila, ki je povezana s procesoma absorpcije in produkcije, sta procesa porazdeljevanja in izločanja zdravilne učinkovine tudi pri različnih interferonskih terapijah več ali manj enaka. Ravnotežne enačbe, ki opisujejo porazdeljevanje in izločanje, so tako del osnovnega skupnega modela.

Porazdeljevanje

Zdravilna učinkovina (interferon α) iz razdelka venske krvi potuje v razdelek pljuč, iz katerega teče naprej v razdelek arterijske krvi, kot to opisujeta sledeči enačbi

$$\frac{dC_{pljuča}}{dt} = \frac{Q_{pljuča}}{V_{pljuča}} \cdot \left(C_{ven} - \frac{C_{pljuča}}{P_{pljuča:kri}} \right), \quad (4.1)$$

$$\frac{dC_{art}}{dt} = \frac{1}{V_{art}} \cdot \left(\frac{Q_{pljuča} \cdot C_{pljuča}}{P_{pljuča:kri}} - Q_{art} \cdot C_{art} \right). \quad (4.2)$$

V ostale razdelke (tkiv in organov) priteče zdravilna učinkovina iz razdelka arterijske krvi, in iz njih teče naprej v razdelek venske krvi. Oblika enačbe je splošna za razdelke, ki predstavljajo slabo prekrvavljena tkiva, bolje prekrvavljena tkiva, jetra in ledvice:

$$\frac{dC_{SPT}}{dt} = \frac{Q_{SPT}}{V_{SPT}} \cdot \left(C_{art} - \frac{C_{SPT}}{P_{SPT:kri}} \right), \quad (4.3)$$

$$\frac{dC_{BPT}}{dt} = \frac{Q_{BPT}}{V_{BPT}} \cdot \left(C_{art} - \frac{C_{BPT}}{P_{BPT:kri}} \right), \quad (4.4)$$

$$\frac{dC_{jetra}}{dt} = \frac{Q_{jetra}}{V_{jetra}} \cdot \left(C_{art} - \frac{C_{jetra}}{P_{jetra:kri}} \right). \quad (4.5)$$

V razdelku venske krvi se združuje tok iz vseh razdelkov organov in tkiv, z izjemo razdelka pljuč, po enačbi

$$\frac{dC_{ven}}{dt} = \frac{1}{V_{ven}} \cdot \left(\sum_{\substack{i \in \kappa, \\ i \neq pljuča, \\ i \neq art}} \left(\frac{Q_i \cdot C_i}{P_{i:kri}} \right) - Q_{ven} \cdot C_{ven} \right). \quad (4.6)$$

Izločanje

Razdelek ledvic pri vseh treh terapijah predstavlja mesto, kjer se interferon α izloča iz telesa. Kot že omenjeno, na spremembo koncentracije v ledvicah vpliva tudi porazdeljevanje, zadnji člen v enačbi 4.7 za razdelek ledvic pa se nanaša na izločanje.

$$\frac{dC_{ledvice}}{dt} = \frac{Q_{ledvice}}{V_{ledvice}} \cdot \left(C_{art} - \frac{C_{ledvice}}{P_{ledvice:kri}} \right) - K_{el} \cdot \frac{C_{ledvice}}{V_{ledvice} \cdot P_{ledvice:kri}} \quad (4.7)$$

Parametri

Fiziološki parametri se za modele različnih terapij ne spreminjajo (glej podpoglavje 2.4), so torej del osnovnega modela. Vrednosti parametrov so povzete po [12]. Minutni volumen srca je privzet na 5.58 L/min in je ekvivalenten v modelih uporabljenemu srčnemu iztisu $Q_c = 335 \text{ L/h}$. Velikosti pretokov ostalih organov so odvisne od samega srčnega iztisa, zato jih pri modeliranju določamo kot relativne deleže vrednosti Q_c . Vrednosti pretokov so zbrane v tabeli 4.1.

Tabela 4.1 Pretoki razdelkov telesnih prostorov

Razdelek	Oznaka parametra	Delež vrednosti srčnega iztisa Q_c
pljuča	$Q_{pljuča}$	1,0
venska kri	Q_{ven}	1,0
arterijska kri	Q_{art}	1,0
jetra	Q_{jetra}	0,25
ledvice	$Q_{ledvice}$	0,19
bolje prekrvavljena tkiva	Q_{BPT}	0,18
slabše prekrvavljena tkiva	Q_{SPT}	0,38

Pri srednji telesni teži $BW = 70 \text{ kg}$ in gostoti telesa $\rho = 1 \text{ kg/L}$, je povprečni volumen telesa $BV = 70 \text{ L}$, volumni razdelkov ostalih organov in tkiv pa so določeni kot relativni deleži celotnega telesnega volumna. Uporabljene vrednosti so zbrane v tabeli 4.2.

Tabela 4.2 Volumni razdelkov telesnih prostorov

Razdelek	Oznaka parametra	Delež celotnega volumna telesa BV
pljuča	$V_{pljuča}$	0,008
venska kri	V_{ven}	0,0557
arterijska kri	V_{artri}	0,0243
jetra	V_{jetra}	0,026
ledvice	$V_{ledvice}$	0,0044
bolje prekrvavljena tkiva	V_{BPT}	0,0516
slabše prekrvavljena tkiva	V_{SPT}	0,83

Vrednosti EC_{50} in konstanta eliminacije K_{el} sta podani v tabeli 4.3.

Tabela 4.3 Ostale vrednosti parametrov, ki se nanašajo na interferon α

Parameter	Oznaka parametra	Srednja vrednost
koncentracija interferona α za dosego polovice maksimalnega terapevtskega učinka	EC_{50}	0,375 IU ml ⁻¹ [36]
eliminacijska konst. ▷ pri nekomprimirani renalni funkciji ▷ za dializne paciente	K_{el} oz. CL/F	36,5 l h ⁻¹ [30] 13,2 l h ⁻¹ [30]

Particijski koeficienti

Iz obstoječih raziskav [33, 37] smo pridobili podatke o particijskih koeficientih za interferon α , vendar so posamezne vrednosti odstopale tudi za red velikosti 10x. Meritve raziskav dodatno odstopajo zaradi uporabe različnih tehnoloških metod. Kljub vsemu so si izsledki raziskav okvirno enotni glede porazdeljevanja (koncentracije C v razdelkih tkiv):

$$C_{ledvice} > C_{jetra} > C_{pljuča} > C_{BPT} > C_{kri} > C_{SPT}. \quad (4.8)$$

Določili smo nekaj naborov vrednosti particijskih koeficientov, kjer so posamezne vrednosti relativno variirale, simulacijske vrednosti pa smo zbrali v tabeli 4.4.

Pri tem moramo poudariti, da se pri računanju plazmatskih koncentracij, vrednosti $P_{tkivo:kri}$ preračunajo za $P_{tkivo:plazma}$. Za molekulo interferona, ki se nahaja v krvi zgolj v plazmi, ne pa tudi v krvnih telescih, velja, da je količina interferona v plazmi in krvi enaka. Kri sestoji iz plazme in krvnih telesc v razmerju 4:3 in od tu izpeljemo relacijo

$$P_{kri:plazma} = \frac{C_{kri}}{C_{plazma}} = \frac{A_{kri} \cdot (1/(4+3))}{A_{kri} \cdot (1/4)} = \frac{4}{7} = 0,57, \quad (4.9)$$

na podlagi katere lahko določimo koeficiente $P_{tkivo:plazma}$ in sicer

Tabela 4.4 Particijski koeficienti interferona za izbrane razdelke telesnih prostorov

Razdelek	Oznaka parametra	Vrednost
pljuča	$P_{pljuča:kri}$	2,3
jetra	$P_{jetra:kri}$	2,5
ledvice	$P_{ledvice:kri}$	15
bolje prekrvavljena tkiva	$P_{BPT:kri}$	2,2
slabše prekrvavljena tkiva	$P_{SPT:kri}$	0,27

$$P_{tkivo:plazma} = P_{tkivo:kri} \cdot P_{kri:plazma} = 0,57 \cdot P_{kri:plazma}. \quad (4.10)$$

4.1.2 Model za subkutano terapijo

Pri terapiji za subkutano terapijo izhajamo iz osnovnega modela v katerem dopolnimo strukturo in določimo vrednosti vseh dodatnih parametrov, ki so povezani z režimom odmerjanja in absorpcijskim procesom.

Dopolnitve strukture

Pri subkutani terapiji je v trenutku $t = 0$ v izredno majhen volumen kože injiciran določen odmerek interferona D , hkrati pa je v večinskem deležu kožnega tkiva količina zdravilne učinkovine nična. Iz tega majhnega volumna na mestu injiciranja poteka nadaljnja absorpcija zdravilne učinkovine v krvni obtok. Da bi bil dotični model čim bolj reprezentativen, smo se odločili ločiti mesto injiciranja od preostalega kožnega tkiva. Vpeljemo absorpcijski razdelek, ki predstavlja del kožnega tkiva, v katerem se ob aplikaciji nahaja odmerek interferona. Volumen absorpcijskega razdelka V_{abs} je sicer zanemarljivo majhen v primerjavi s celotnim volumnom kože oziroma s celotnim volumnom razdelka slabše prekrvavljenih tkiv, kamor je všteta tudi koža. To ugotovitev lahko izrazimo z relativnim volumnom absorpcijskega razdelka pV_{abs}

$$pV_{abs} = \frac{V_{abs}}{V_{SPT}} \cong 0. \quad (4.11)$$

Točen volumen absorpcijskega razdelka ni poglavitni, nujno je le, da je razdelek obravnavan ločeno. Posledično lahko poenostavimo, da je $pV = 0$ in $V_{abs} = 0$. Volumna razdelka SPT tako ni potrebno manjšati za V_{abs} , v absorpcijskem razdelku pa moramo

posledično računati s količino interferona A_{abs} namesto s koncentracijo C_{abs} (koncentracija pri ničnem volumnu bi bila namreč vedno neskončna). Dopolnitve osnovne strukture modela za subkutano interferonsko terapijo so na sliki 4.1 označene v zeleni barvi.

Pri subkutanem apliciranju interferona nepopolno absorpcijo modeliramo s sorazmernim zmanjšanjem odmerka [3]. Ob času $t = 0$ je v absorpcijskem razdelku tako prisotna le biološko razpoložljiva količina subkutano apliciranega odmerka interferona α , torej le količina, ki je sistemu na voljo

$$A_{abs} = F \cdot D. \quad (4.12)$$

Na podlagi raziskave Chatelut [30], kjer je bil postavljen enorazdelčni model na osnovi meritev na 10 pacientih z normalno renalno funkcijo, se odločimo modelirati absorpcijo kot dvostopenjski proces. Pri tem preide iz absorpcijskega razdelka v razdelek venske krvi v času absorpcije 0. reda količina interferona, ki ustreza vrednosti A_0 , in v času absorpcije 1. reda količina A_1 .

$$A_0 = F_0 \cdot F \cdot D_{SC}, \quad (4.13)$$

$$A_1 = (1 - F_0) \cdot F \cdot D_{SC}, \quad (4.14)$$

$$A_{abs} = A_0 + A_1. \quad (4.15)$$

Sprememba količine interferona v absorpcijskem razdelku je v modelu opisana z enačbami

$$0 < t < t_{K0} : \quad \frac{dA_{abs}}{dt} = -K_0, \quad (4.16)$$

$$t_{K0} \leq t \leq t_{K1} : \quad \frac{dA_{abs}}{dt} = -K_1 \cdot A_{abs}, \quad (4.17)$$

$$t_{K1} < t : \quad \frac{dA_{abs}}{dt} = 0. \quad (4.18)$$

Ob času $t = t_{K1}$ se iz absorpcijskega razdelka v kri absorbira vsa biološko razpoložljiva količina odmerka in se absorpcija zaključi ($A_{abs} = 0$).

Dopolnitve ravnotežnih enačb pri absorpciji upoštevajo še količino interferona, ki iz absorpcijskega razdelka prehaja v razdelek krvi, po enačbah

$0 < t < t_{K0}$:

$$\frac{dC_{ven}}{dt} = \frac{1}{V_{ven}} \cdot \left(\sum_{\substack{i \in \kappa, \\ i \neq \text{pljuča}, \\ i \neq \text{art}}} \left(\frac{Q_i \cdot C_i}{P_{i:kri}} \right) - Q_{ven} \cdot C_{ven} \right) + K_0 \cdot \frac{1}{V_{ven}}, \quad (4.19)$$

$t_{K0} \leq t \leq t_{K1}$:

$$\frac{dC_{ven}}{dt} = \frac{1}{V_{ven}} \cdot \left(\sum_{\substack{i \in \kappa, \\ i \neq \text{pljuča}, \\ i \neq \text{art}}} \left(\frac{Q_i \cdot C_i}{P_{i:kri}} \right) - Q_{ven} \cdot C_{ven} \right) + K_1 \cdot \frac{A_{abs}}{V_{ven}}, \quad (4.20)$$

$t_{K1} < t$:

$$\frac{dC_{ven}}{dt} = \frac{1}{V_{ven}} \cdot \left(\sum_{\substack{i \in \kappa, \\ i \neq \text{pljuča}, \\ i \neq \text{art}}} \left(\frac{Q_i \cdot C_i}{P_{i:kri}} \right) - Q_{ven} \cdot C_{ven} \right). \quad (4.21)$$

Dopolnitve parametrov

Režim odmerjanja je za izbrano subkutano terapijo podan v tabeli 4.5.

Tabela 4.5 Režim odmerjanja za subkutano terapijo z interferonom

Parameter	Oznaka parametra	Vrednost
odmerek interferona α	D	3 MIU oz. 11100 ng [35], 15000 ng [30]
perioda odmerjanja	t_p	2 dni
biološka razpoložljivost	F	$\geq 80\%$

Z absorpcijskim procesom povezani parametri so zbrani v tabeli 4.6.

Absorpcijska konstanta za absorpcijo 0. reda K_0 ni podana. Iz znanih parametrov jo izračunamo z enačbo

$$K_0 = \frac{F_0 \cdot F \cdot D}{t_{K0}}. \quad (4.22)$$

Tabela 4.6 Vrednosti parametrov za modeliranje dvostopenjske absorpcije [30]

Parameter	Oznaka parametra	Srednja vrednost
trajanje absorpcije 0. reda	t_{K0}	2,5 h
delež biološko razpoložljivega odmerka, absorbiranega v času absorpcije 0. reda	F_0	0,24
absorpcijska konst. za absorpcijo 1. reda	K_1	0,13 h ⁻¹ [38], 0,18 h ⁻¹

4.1.3 Model za terapijo z lokalno produkcijo v jetrih

Tudi model za terapijo z lokalno produkcijo interferona v jetrih izjaha iz osnovnega modela interferonskega zdravljenja hepatitisa, ki je opisan v podglavju 4.1.1.

Dopolnitve strukture

Pri lokalni terapiji se interferon konstantno proizvaja v mikroenkapsuliranih celicah, homogeno razporejenih in statično lociranih znotraj jetrnega tkiva. Produkcijo za lokalno terapijo vključimo kot proces kontinuiranega vhodnega toka interferona neposredno v razdelek jeter

$$\frac{dC_{jetra}}{dt} = \frac{Q_{jetra}}{V_{jetra}} \cdot \left(C_{art} - \frac{C_{jetra}}{P_{jetra:kri}} \right) + K_{prod} \cdot \frac{1}{V_{jetra}}. \quad (4.23)$$

pri čemer konstanta K_{prod} ustreza povprečni količini interferona, ki se v nekem določenem času proizvede in sprosti iz mikrokapsul v jetrno tkivo. Dopolnitev strukture je na sliki 4.1 označena z rdečo barvo.

Dopolnitve parametrov

Glede na karakteristike tarčnega, torej jetrnega tkiva (sinusoidne kapilare itd.), in ugotovitve v poglavju 3.2.2 določimo, da se particijski koeficient za razdelek tarčnega tkiva, torej razdelek jeter, ne spremeni

$$P'_{jetra:kri} = P_{jetra:kri}. \quad (4.24)$$

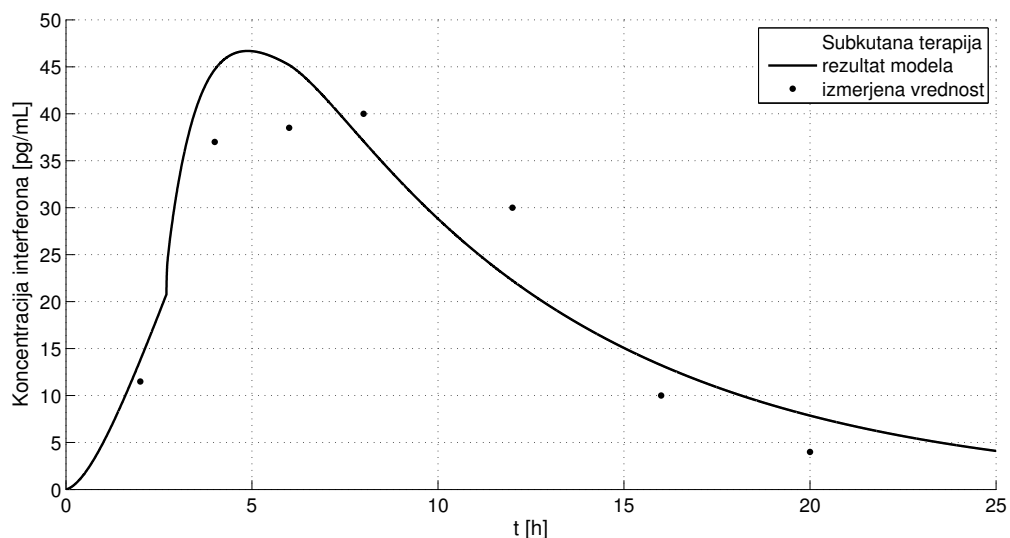
Neznana vrednost parametra pri modelu s produkcijo je velikost konstante K_{prod} , ki pa mora za želen terapevtski učinek E_d v jetrih zagotavljati učinkovito koncentracijo

interferona EC_d . Koncentracija EC_d je določena z enačbo za efektivno koncentracijo EC_d 3.2.

Z modeliranjem moramo poiskati temu primerno vrednost produkcije K_{prod} [$ng\ h^{-1}$].

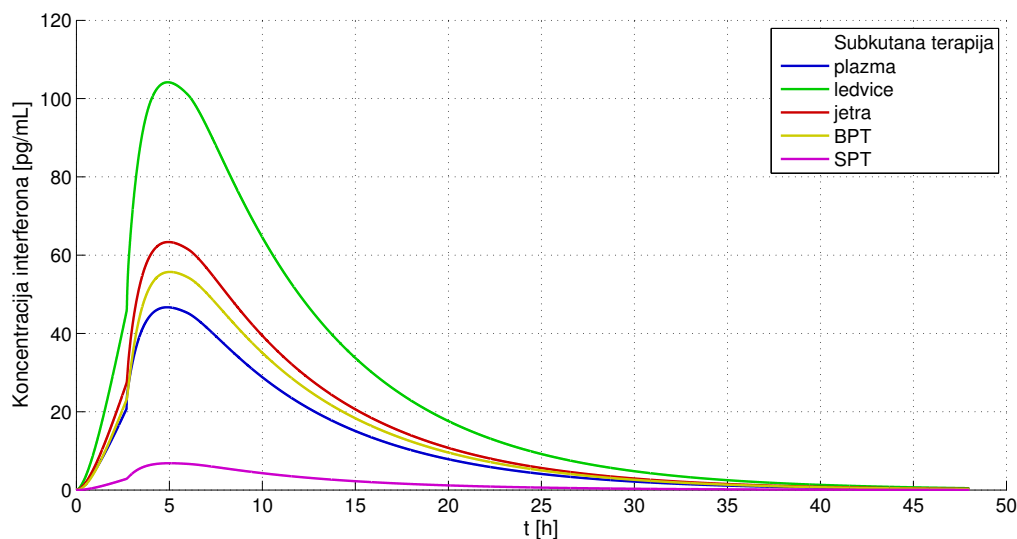
4.1.4 Rezultati

Najprej simuliramo subkutano terapijo z interferonom pri izbranih parametrih in primerjamo rezultat z meritvami plazemskih koncentracij pri pacientu (glej sliko 4.2). Rezultati se sicer ne prilegajo v popolnoma, vendar v dovolj veliki meri, da model zadovoljivo posnema obnašanje modeliranega sistema. Deloma je vzrok razlike v prileganju poenostavitev modela, deloma pa je odstopanje posledica interindividualne variabilnosti med pacienti.



Slika 4.2 Primerjava plazemskih koncentracij interferona v urah po subkutanem injiciranju odmerka D. Prikazan je rezultat modela v primerjavi z merjenimi vrednostmi na enem pacientu [30]. V študiji je bil postavljen enorazdelčni model, iz katerega smo izhajali, razvit na osnovi meritev pri 10 pacientih z nekomprimirano renalno funkcijo. V študiji so sicer dostopne meritve le za enega pacienta, ki so predstavljene na tem grafu.

Modeliranje subkutane terapije z večrazdelčnim modelom omogoča tudi napovedovanje vrednosti za ostale razdelke tkiv in organov, ki nas zanimajo (glej sliko 4.3). Na sliki 4.4 je poleg poteka plazemske koncentracije interferona prikazan potek koncentracije interferona v jetrih, za čas med dvema odmerkoma t_p , ki je za obravnavano subkutano terapijo v splošnem 48 h (glej sliko 4.6). Model ustrezno ponazarja porast koncentracije



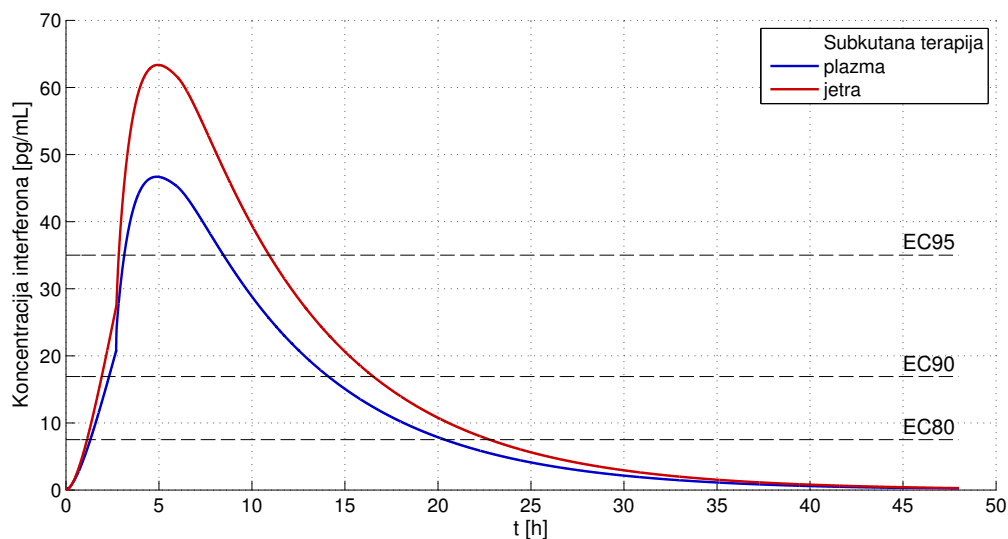
Slika 4.3 Potek koncentracij interferona v različnih razdelkih tkiv in organov po apliciranju subkutanega odmerka, pri simulaciji našega modela. Na podlagi vrednosti plazemskih koncentracij interferona in večrazdelčnega modela lahko napovedujemo koncentracije v drugih delih telesa.

interferona v plazmi s časom do najvišje koncentracije t_{max} , ki je za interferon α ocenjen na 3 do 12 h [32]. Rezultat modela se sklada z ugotovitvami o razpolovnem času interferona v telesu, $t_{1/2} = 5$ h [32].

Tabela 4.7 Efektivne koncentracije interferona α

Stopnja učinka	Oznaka koncentracije	Vrednost
E_{50} , 50% E_{max}	EC_{50}	$0,375 U ml^{-1}$ [36] = $1,875 pg ml^{-1}$ [30]
E_{80} , 80% E_{max}	EC_{80}	$7,5 pg ml^{-1}$
E_{90} , 90% E_{max}	EC_{80}	$16,9 pg ml^{-1}$
E_{95} , 95% E_{max}	EC_{80}	$35 pg ml^{-1}$

Glede na stopnjo želenega terapevtskega učinka E_d , lahko določimo potrebno efektivno koncentracijo EC_d . Terapevtske koncentracije interferona so za stopnje želenega terapevtskega učinka E_{80} , E_{90} ali E_{95} izračunane na podlagi vrednosti EC_{50} in zbrane v tabeli 4.7. Prikazane so tudi na grafu 4.4, kjer lahko za določeno stopnjo terapevtskega učinka že s samega grafa približno ocenimo, kolikšen del časa koncentracija interferona v jetrih posamezne efektivne koncentracije presega. Čas med dvema odmerkoma, za kate-

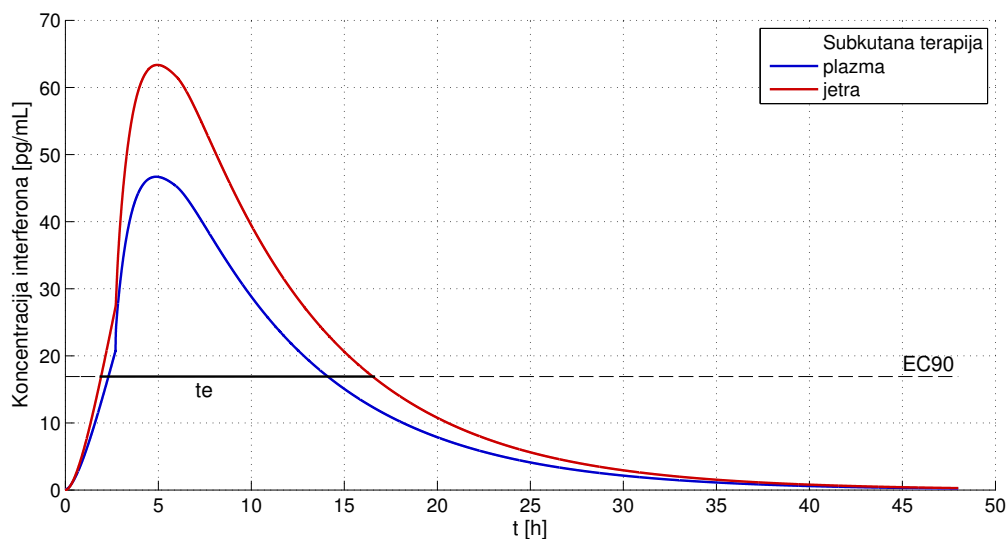


Slika 4.4 Primerjava koncentracije interferona v plazmi in jetrih, kot jih podaja naš model. Z EC_{80} , EC_{90} in EC_{95} so označene koncentracije interferona, ki zagotavljajo terapevtski učinek, ki ustreza 80%, 90% in 95% maksimalnega terapevtskega učinka E_{max} .

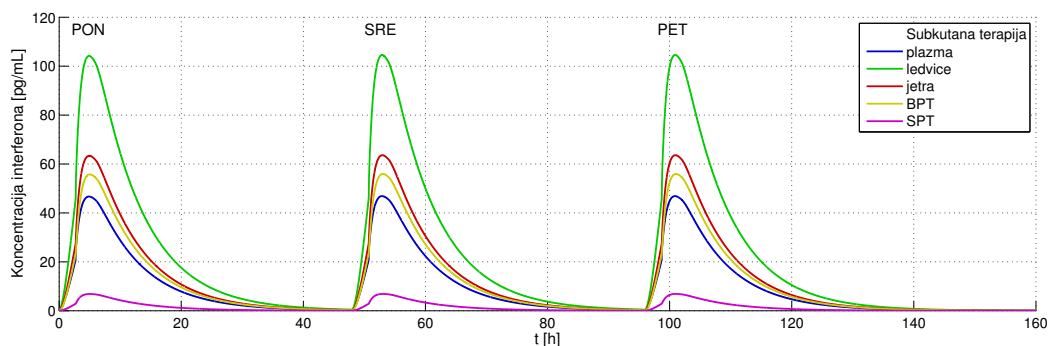
rega koncentracija v tarčnem tkivu presega efektivno koncentracijo za želen terapevtski učinek označimo s t_e in je za 90% E_{max} oziroma za E_{90} prikazan na sliki 4.5. Razmerje časov t_e in t_p lahko uporabimo kot mero za uporabnost terapije za dosego nekega želenega učinka.

Za modeliranje terapije z *in situ* produkcijo interferona v jetrih moramo določiti želeno koncentracijo interferona v razdelku jeter. Ker je koncentracija EC_{95} že relativno visoka in bi bila lahko povezana s pojavitvijo neželenih stranskih učinkov, se odločimo modelirati terapijo za ciljni koncentraciji v jetrih $EC_{90} = 16,9 \text{ pg ml}^{-1}$ in $EC_{80} = 7,5 \text{ pg ml}^{-1}$.

Rezultate modeliranja terapije s produkcijo interferona v jetrih primerjamo z rezultati subkutane produkcije za izbran interval $t = t_p = 48 \text{ h}$. Produkcija interferona, ki v jetrih zagotavlja koncentracijo interferona EC_{90} , ustreza 200 ng h^{-1} . Kumulativna količina interferona pri dotični vrednosti produkcije v 48 h znaša 9600 ng. Produkcija, ki v jetrih zagotavlja koncentracijo interferona EC_{80} , je 90 ng h^{-1} , kumulativna količina interferona, ki se proizvede v 48 h pa je približno 4300 ng. V obeh primerih je skupna količina interferona pri terapiji s produkcijo znatno manjša od velikosti odmerka, ki se uporablja pri subkutanem injiciranju. Ob tem se pri terapiji s produkcijo ustrezne intenzivnosti, z izjemo v urah po neposrednem začetku produkcije v telesu, koncentracija

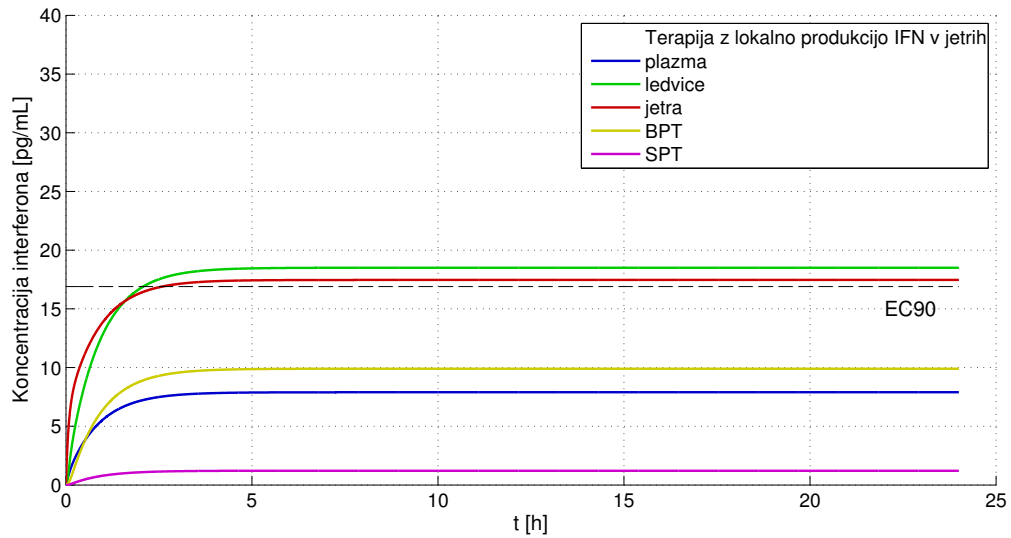


Slika 4.5 Čas učinkovanja t_e (označen z neprekinjeno črto) interferona pri določeni stopnji terapevtskega učinka E_{90} , za subkutano terapijo. Vrednost t_e ustreza času, pri katerem vrednost interferona presega vrednost EC_{90} v intervalu med dvema odmerkoma $t_p = 48$ h.

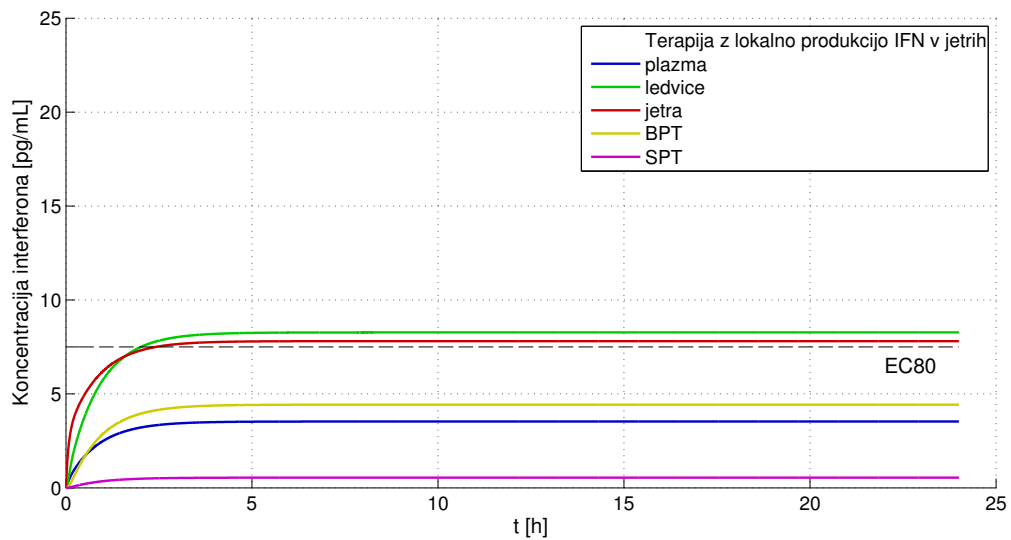


Slika 4.6 Potek subkutane terapije v obdobju enega tedna. Ponovni odmerki zdravila si dvakrat tedensko sledijo v razmaku 48 h in enkrat tedensko v razmaku 72 h [31].

interferona v jetrnem tkivu ne spusti pod načrtovani nivo koncentracije EC_{80} oziroma EC_{90} . Za terapijo s produkcijo je posledično razmerje med časom učinkovanja t_e in časom celotnega trajanja terapije t_p (ki lahko traja tudi več mesecev) v praksi enako, $t_e \approx t_p$. Če primerjamo s subkutano terapijo, je za posamezen interval odmerjanja $t_p = 48$ h, razmerje $t_e : t_p$ za izbran terapevtski učinek E_{80} približno enak $t_e : t_p \approx 1 : 2$, za E_{90} pa je še manjši in sicer $t_e : t_p \approx 1 : 3$ (glej sliko 4.4). Pomanjkljivost subkutane terapije je po eni strani v tem, da koncentracija interferona v telesu po približno 30



Slika 4.7 Prikaz koncentracij interferona α (IFN) v razdelkih telesnih prostorov po apliciranju mikroenkapsuliranih celic, oziroma po začetku kontinuirane produkcije ob času $t = 0$. Ob konstantni produkciji v jetrih se koncentracija interferona ustali na določenem nivoju. V primeru, prikazanem na grafu, je bila izbrana ciljna koncentracija v jetrih $EC_{90} = 16,9 \text{ pg ml}^{-1}$, kateri ustreza produkcija interferona v celicah $K_{prod} = 200 \text{ ng h}^{-1}$.



Slika 4.8 Prikaz koncentracij interferona α (IFN) v razdelkih telesnih prostorov po začetku kontinuirane produkcije ob času $t = 0$. Koncentracija interferona v jetrih se ustali na $EC_{80} = 7,5 \text{ pg ml}^{-1}$ in se ne spreminja pri zagotavljeni kontinuirani produkciji v jetrih $K_{prod} = 90 \text{ ng h}^{-1}$.

h od aplikacije upade do te mere, da je terapevtski učinek povsem zanemarljiv, a po drugi strani v urah neposredno po aplikaciji zdravila koncentracije interferona izrazito

narastejo in prihaja do t.i. koncentracijskih viškov, ki so korelirani z neželenimi učinki. Pri simulaciji modelov terapije z lokalno produkcijo je razvidno, da tu do podobnih nihanj ne prihaja in da je ravnovesna koncentracija konstantna in stabilna. Izračuni, pa tudi grafi, razkrivajo še eno prednost terapije s produkcijo pred ustaljenimi metodami - večjo lokalizacijo interferona. Lokalizacijo neke učinkovine lahko v splošnem opišemo z razmerjem med količino učinkovine v izbranem razdelku (razdelku tarčnega tkiva) in kumulativno količino učinkovine v celotnem telesu ob ravnovesnem stanju. Enačba je sledeča:

$$\lambda = \frac{A_{tt}}{\sum_{i \in \kappa} A_i}. \quad (4.25)$$

Pri obravnavani subkutani terapiji in proučevani terapiji z lokalno produkcijo interferona je relativna lokalizacija interferona enaka

$$\lambda = \left[\frac{A_{jetra}}{A_{telo}} \right], \quad (4.26)$$

$$\lambda_{SC} = 0,11, \quad (4.27)$$

$$\lambda_{PROD} = 0,18. \quad (4.28)$$

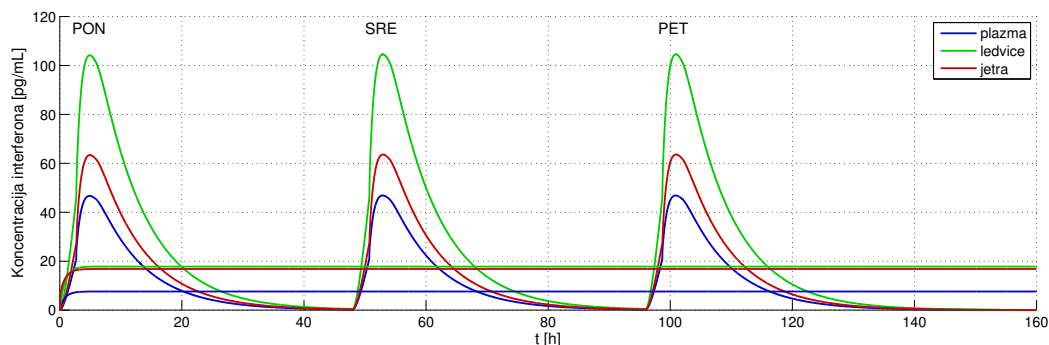
Pri subkutani administraciji se ob ravnovesnem stanju v jetrih nahaja 11% celotne količine interferona, prisotne v telesu. Pri terapiji s produkcijo v jetrih je ta delež 18%, kar pomeni, da slednja terapija dosega večje lokaliziranje interferona in manjši obseg (neželenih) sistemskih učinkov. V splošnem tudi velja, da se s povečevanjem deleža lokalizacije, pri isti koncentraciji v tarčnem tkivu, hkrati zmanjšuje kumulativna količina učinkovine v telesu. V predstavitvi rezultatov naših modelov smo to sicer že izpostavili na prejšnjih straneh.

Rezultati modeliranja za subkutano terapijo in terapijo s produkcijo interferona so prikazani na sliki 4.9

4.2 Ishemija miokarda: modeliranje terapije z anakinro

Drugi primer proučevanja lokalnega zdravljenja z *in situ* produkcijo zdravilne učinkovine je zdravljenje ishemijske miokarda s terapevtskim proteinom anakinro.

Anakinra se v klinični praksi pod imenom *Kineret* trenutno uporablja za zdravljenje revmatoidnega artritisa, že več let pa potekajo klinične študije njene uporabe tudi za



Slika 4.9 Prikaz poteka koncentracij interferona za obe obravnavani terapiji, za čas enega tedna. Koncentracija v jetrih je pri terapiji s produkcijo določena z EC_{90} .

zdravljenje ishemijske miokarda. Dotedanje opravljene raziskave so temeljile na odmerkih in aplikaciji, enakih kot se že uporabljajo pri artritisu. Pri modeliranju smo si tako pomagali z raziskavami, ki opisujejo farmakokinetiko zdravila *Kineret* za subkutane odmerke s 100 mg zdravilne učinkovine (anakinre).

Alternativa subkutani terapiji bi bila lahko terapija z *in situ* produkcijo anakinre v prizadetem miokardu. Pri operativnem posegu srca bi lahko v tkivo ishemičnega miokarda injicirali mikrokapsule, ki bi nato lokalno proizvajale anakinro. Ob primerjavi rezultatov obeh modelov lahko ocenimo primernost obeh terapij za nadaljni razvoj in uporabo v klinični praksi.

4.2.1 Osnovni model

Pri načrtovanju modelov terapij smo izhajali iz objavljenih izsledkov raziskav [39–41]. Tudi pri različnih terapijah z anakinro je prvi korak pri razvoju modelov določitev osnovne strukture modela, ki je skupna vsem terapijam. Podani so tudi fiziološki in biokemijski parametri, ki smo jih uporabili pri modeliranju.

Struktura

Na podlagi sledečih ugotovitev smo določili kriterije pri definiranju strukture modela:

1. Anakinra se v večjih koncentracijah nahaja v jetrih, ledvicah in pljučih.
2. Anakinra se v mišičnem tkivu nahaja v nizkih koncentracijah.
3. V koži in ostalih slabše prekrvavljenih tkivih so koncentracije anakinre še nižje.

4. Molekula anakinre v izredno majhni meri prehaja v cerebrospinalno tekočino.
5. Prebavila, vranica in srce imajo visoko perfuzijo in v ravnovesnem stanju srednje, primerljive vrednosti koncentracij anakinre.
6. Anakinra se vglavnem izloča prek ledvic, biotransformacija v jetrih je minimalna.
7. Tarčno tkivo zdravljenja je ishemični, infarktni del miokarda in ne celotno srce.

Na podlagi zbranih informacij (točke 1, 5 in 6) smo definirali ločene razdelke za jetra, ledvice in pljuča, ostala boljše prekrvavljena tkiva so združena v razdelek RPT (točka 5). Mišično tkivo je obravnavano ločeno od preostalega dela SPT (točki 2 in 3). Možganov, v katere se anakinra slabo porazdeljuje ni potrebno modelirati posebej (točka 4). Ohranjena sta ločena razdelka arterijske in venske krvi. Skupna eliminacija interferona je v model vključena kot enoten proces pri ledvicah (točka 6). Osnovna, torej skupna struktura modelov, ki je enaka vsem terapijam, je na sliki 4.10 prikazana v sivi barvi.

Porazdeljevanje in izločanje

Večina enačb za porazdeljevanje in izločanje je analognih enačbam osnovnega modela za zdravljenje hepatitisa C z interferonom, ki so opisane v podpoglavju 4.1.1. Na tej točki smo zgolj zapisali sistem enačb, ki definirajo osnovni model za zdravljenje ishemijskega miokarda z anakinro. Dodani sta enačbi za računanje koncentracije v srčnem tkivu C_{srce} in koncentracije v mišičnem tkivu $C_{mišice}$, podrobna razlaga samega izpeljevanja enačb pa je na voljo v podpoglavju 4.1.1. Enačbe osnovnega modela so sledeče:

$$\frac{dC_{pljuča}}{dt} = \frac{Q_{pljuča}}{V_{pljuča}} \cdot \left(C_{ven} - \frac{C_{pljuča}}{P_{pljuča:kri}} \right), \quad (4.29)$$

$$\frac{dC_{art}}{dt} = \frac{1}{V_{art}} \cdot \left(\frac{Q_{pljuča} \cdot C_{pljuča}}{P_{pljuča:kri}} - Q_{art} \cdot C_{art} \right), \quad (4.30)$$

$$\frac{dC_{ven}}{dt} = \frac{1}{V_{ven}} \cdot \left(\sum_{\substack{i \in \kappa, \\ i \neq pljuča, \\ i \neq art}} \left(\frac{Q_i \cdot C_i}{P_{i:kri}} \right) - Q_{ven} \cdot C_{ven} \right), \quad (4.31)$$

$$\frac{dC_{srce}}{dt} = \frac{Q_{srce}}{V_{srce}} \cdot \left(C_{art} - \frac{C_{srce}}{P_{srce:kri}} \right), \quad (4.32)$$

$$\frac{dC_{mišice}}{dt} = \frac{Q_{mišice}}{V_{mišice}} \cdot \left(C_{art} - \frac{C_{mišice}}{P_{mišice:kri}} \right), \quad (4.33)$$

$$\frac{dC_{SPT}}{dt} = \frac{Q_{SPT}}{V_{SPT}} \cdot \left(C_{art} - \frac{C_{SPT}}{P_{SPT:kri}} \right), \quad (4.34)$$

$$\frac{dC_{BPT}}{dt} = \frac{Q_{BPT}}{V_{BPT}} \cdot \left(C_{art} - \frac{C_{BPT}}{P_{BPT:kri}} \right), \quad (4.35)$$

$$\frac{dC_{jetra}}{dt} = \frac{Q_{jetra}}{V_{jetra}} \cdot \left(C_{art} - \frac{C_{jetra}}{P_{jetra:kri}} \right), \quad (4.36)$$

$$\frac{dC_{ledvice}}{dt} = \frac{Q_{ledvice}}{V_{ledvice}} \cdot \left(C_{art} - \frac{C_{ledvice}}{P_{ledvice:kri}} \right) - K_{el} \cdot \frac{C_{ledvice}}{V_{ledvice} \cdot P_{ledvice:kri}}. \quad (4.37)$$

Parametri

Fiziološki in nekateri bioparametri za izbrane razdelke so zbrani v tabelah 4.8, 4.9 in 4.10. Biokemijski parametri so zbrani v tabelah 4.11 in 4.12.

Tabela 4.8 Osnovni fiziološki parametri

Parameter	Oznaka	Vrednost
srčni iztis	Q_c	5,58 L/min = 335 L/h
telesni volumen	BV	80 L [42]

Particijski koeficienti

Iz obstoječih raziskav [42, 43] smo pridobili podatke, na podlagi katerih smo lahko določili particijske koeficiente anakinre.

Pri računanju plazmatskih koncentracij se tudi tu vrednosti $P_{tkivo:kri}$ ustrezno preračunajo za $P_{tkivo:plazma}$.

Tabela 4.9 Pretoki razdelkov telesnih prostorov

Razdelek	Oznaka parametra	Delež vrednosti srčnega iztisa Q_c
pljuča	$Q_{pljuča}$	1,0
venska kri	Q_{ven}	1,0
arterijska kri	Q_{art}	1,0
jetra	Q_{jetra}	0,25
ledvice	$Q_{ledvice}$	0,19
srce	Q_{srce}	0,047
bolje prekrvavljena tkiva	Q_{BPT}	0,133
mišično tkivo	$Q_{mišice}$	0,105
slabše prekrvavljena tkiva	Q_{SPT}	0,275

Tabela 4.10 Volumni razdelkov telesnih prostorov

Razdelek	Oznaka parametra	Delež celotnega volumna telesa BV
pljuča	$V_{pljuča}$	0,008
venska kri	V_{ven}	0,0557
arterijska kri	V_{artri}	0,0243
jetra	V_{jetra}	0,026
ledvice	$V_{ledvice}$	0,0044
srce	V_{srce}	0,0047
bolje prekrvavljena tkiva	V_{BPT}	0,0469
mišično tkivo	$V_{mišice}$	0,37
slabše prekrvavljena tkiva	V_{SPT}	0,46

Tabela 4.11 Ostale vrednosti parametrov, ki se nanašajo na anakinro

Parameter	Oznaka parametra	Srednja vrednost
koncentracija interferona α za doseg polovice maksimalnega terapevtskega učinka	EC_{50}	6,8 ng ml ⁻¹ [39]
eliminacijska konst.	K_{el} oz. CL/F	10,2 l h ⁻¹ [42]

Tabela 4.12 Partijski koeficienti anakinre za izbrane razdelke telesnih prostorov

Razdelek	Oznaka parametra	Srednja vrednost
pljuča	$P_{pljuča:kri}$	0,4
jetra	$P_{jetra:kri}$	0,8
ledvice	$P_{ledvice:kri}$	9
bolje prekrvavljena tkiva	$P_{BPT:kri}$	2,2
slabše prekrvavljena tkiva	$P_{SPT:kri}$	0,23
mišično tkivo	$P_{mišice:kri}$	0,25
srce	$P_{srce:kri}$	0,2

4.2.2 Model za subkutano terapijo

Dopolnitve ravnotežnih enačb pri absorpciji so enake kot pri modeliranju subkutane terapije z interferonom v podpoglavju 4.1.2. Modeliramo dvostopenjsko absorpcijo anakinre:

$$0 < t < t_{K0} :$$

$$\frac{dC_{ven}}{dt} = \frac{1}{V_{ven}} \cdot \left(\sum_{\substack{i \in \kappa, \\ i \neq pljuča, \\ i \neq art}} \left(\frac{Q_i \cdot C_i}{P_{i:kri}} \right) - Q_{ven} \cdot C_{ven} \right) + K_0 \cdot \frac{1}{V_{ven}} \quad (4.38)$$

$$t_{K0} \leq t \leq t_{K1} :$$

$$\frac{dC_{ven}}{dt} = \frac{1}{V_{ven}} \cdot \left(\sum_{\substack{i \in \kappa, \\ i \neq pljuča, \\ i \neq art}} \left(\frac{Q_i \cdot C_i}{P_{i:kri}} \right) - Q_{ven} \cdot C_{ven} \right) + K_1 \cdot \frac{A_{abs}}{V_{ven}} \quad (4.39)$$

$t_{K1} < t$:

$$\frac{dC_{ven}}{dt} = \frac{1}{V_{ven}} \cdot \left(\sum_{\substack{i \in \kappa, \\ i \neq \text{pljuča}, \\ i \neq \text{art}}} \left(\frac{Q_i \cdot C_i}{P_{i:kri}} \right) - Q_{ven} \cdot C_{ven} \right) \quad (4.40)$$

Dopolnitve parametrov

Režim odmerjanja je za izbrano subkutano terapijo podan v tabeli 4.13.

Tabela 4.13 Režim odmerjanja za subkutano terapijo z anakinro [42]

Parameter	Oznaka parametra	Vrednost
odmerek anakinre	D	100 mg
perioda odmerjanja	t_p	24 h
biološka razpoložljivost	F	$\geq 95\%$

Z absorpcijskim procesom povezani parametri so zbrani v tabeli 4.14.

Tabela 4.14 Nastavitvene vrednosti parametrov za modeliranje dvostopenjske absorpcije

Parameter	Oznaka parametra	Srednja vrednost
trajanje absorpcije 0. reda	t_{K0}	2,8 h
delež biološko razpoložljivega odmerka, absorbiranega v času absorpcije 0. reda	F_0	0,25
absorpcijska konst. za absorpcijo 1. reda	K_1	0,12 h ⁻¹

4.2.3 Model s produkcijo

Dopolnitve strukture

Pri lokalni terapiji se anakinra konstantno proizvaja v delu ishemičnega srčnega tkiva. Ločimo razdelek zdravega srca in ishemičnega, tarčnega tkiva ter vključimo proces produkcije

$$\frac{dC_{srce}}{dt} = \frac{(1-p) \cdot Q_{srce}}{(1-p) \cdot V_{srce}} \cdot \left(C_{art} - \frac{C_{srce}}{P_{srce:kri}} \right), \quad (4.41)$$

$$\frac{dC_{tt}}{dt} = \frac{p \cdot Q_{srce}}{p \cdot V_{srce}} \cdot \left(C_{art} - \frac{C_{tt}}{P_{tt:kri}} \right) + \frac{K_{PROD}}{p \cdot V_{srce}}, \quad (4.42)$$

kjer predstavlja vrednost p del ishemičnega tkiva glede na celoten volumen srca, $0 < p < 1$, $V_{tt} = p \cdot V_{srce}$. Konstanta K_{prod} [mcg h^{-1}] ustreza povprečni količini anakinre, ki se v nekem določenem času proizvede in sprosti iz mikrokapsul v tarčno tkivo. Dopolnitev strukture je na sliki 4.10 označena z rdečo barvo.

Dopolnitve parametrov

Glede na karakteristike tarčnega tkiva srčne mišice (kontinuirane kapilare itd.) in ugotovitve v poglavju 3.2.2, določimo, da je particijski koeficient za razdelek tarčnega tkiva obratno sorazmeren s particijskim koeficientom za srce,

$$P_{tt:kri} = [P_{srce:kri}]^{-1}. \quad (4.43)$$

Vrednost ciljne koncentracije v tarčnem tkivu ob produkciji je tudi tu enaka efektivni koncentraciji EC_d za želen terapevtski učinek v tarčnem tkivu in je izračunan po enačbi 4.43. Vrelikost produkcije K_{prod} se določa z modeliranjem.

4.2.4 Rezultati

Najprej simuliramo subkutano terapijo z anakinro pri izbranih nastavitvenih parametrih in primerjamo rezultat z meritvami plazemskih koncentracij pri pacientu (glej sliko 4.11). Prileganje rezultatov modela na podatke je dobro; model ustrezno ponazarja porast koncentracije anakinre v plazmi s časom do najvišje koncentracije $C_{max} = 750$ do 780 ng ml^{-1} ob času $t_{max} = 4$ h [42]. Rezultat modela se prav sklada z ugotovitvami o razpolovnem času anakinre v telesu, $t_{1/2} = 5.2$ h [42].

Z modelom za subkutano terapijo lahko dodatno prikažemo še potek koncentracije v tarčnem tkivu - ishemičnem miokardu. Pri subkutani aplikaciji je koncentracija v zdravem delu srca in v ishemičnem miokardu enaka, njen potek je prikazan na sliki 4.12.

Za izbran terapevtski učinek E_{80} ali E_{90} na podlagi EC_{50} določimo efektivni koncentraciji $EC_{80} = 27,2$ ng ml^{-1} in $EC_{90} = 61,2$ ng ml^{-1} . Efektivna koncentracija služi kot ciljna

koncentracija v ishemičnem miokardu (tarčnem tkivu) in določa potrebno produkcijo. Za E_{80} znaša potrebna produkcija $K_{PROD} = 1,2 \text{ mcg h}^{-1}$, za E_{90} pa je $K_{PROD} = 2,75 \text{ mcg h}^{-1}$. Kumulativne količine zdravilne učinkovine anakinre preračunamo za cel čas med dvema odmerkoma pri subkutani terapiji. Pri lokalni produkciji anakinre za primer zelenega učinka E_{80} kumulativna količina znaša 28,8 mcg, za E_{90} pa 66 mcg, kar je bistveno manj kot je vsebovano v dnevnem odmerku za subkutano injiciranje (100 mg). Slednje je posledica izredno nizke lokalizacije zdravila pri subkutani terapiji, ki je razvidna tudi z grafa na sliki 4.14.

Pri terapiji z lokalno produkcijo bi bilo morda intuitivno predvidevati, da bo tudi v tem primeru lokalizacija zdravilne učinkovine še vedno razmeroma nizka za tarčno tkivo. Vendar temu ni nujno tako - za terapijo z lokalno produkcijo model pokaže, da se v relativno majhnem delu miokarda, kjer se tvori anakinra, nahaja skoraj ves delež količine, ki je v nekem trenutku prisotna v telesu. Majhna količina, ki se s krvjo raznese po celem telesu, se hitro izloči iz telesa, koncentracije v ostalih tkivih pa so skorajda nične.

Točne vrednosti relativne lokalizacije λ so odvisne od posameznega primera, za katerega modeliramo in so precej odvisne od vrednosti p , v splošnem pa lahko na podlagi rezultatov modelov zaključimo, da je

$$1 \approx \lambda_{PROD} \gg \lambda_{SC} \geq 0 \quad (4.44)$$

pri zdravljenju ishemiije miokarda z zdravilno učinkovino anakinra. Lokalizacija zdravila je razvidna tudi z grafa 4.15

Modeliranje terapije s produkcijo napove kontinuirane nivoje koncentracije anakinre v tarčnem tkivu. Ob vzpostavitvi ravnovesnega stanja bi koncentracije anakinre vedno dosegale nivo, potreben za zelen terapevtski učinek. Pri terapiji s produkcijo, kjer je čas zdravljenja t_p od nekaj dni do nekaj mesecev je terapija učinkovita skorajda ves čas zdravljenja, saj se z večanjem t_p (in posledičnim večanjem t_e) razmerje $t_e : t_p$ približuje vrednosti 1. Čas učinkovanja t_e , ki pri subkutani terapiji presega izbrano efektivno koncentracijo EC za čas med dvema odmerkoma t_p , je v tem primeru relativno manjši. Za terapevtski učinek E_{80} je razmerje časov $t_e : t_p \approx 3 : 5$ in za E_{90} je $t_e : t_p \approx 1 : 4$. Na podlagi vseh rezultatov naših modelov lahko zaključimo, da je terapija z lokalno produkcijo v več pogledih bolj primerna za samo zdravljenje bolezni kot alternativna

subkutana terapija.

4.3 Realizacija modelov

Vsi modeli so implementirani v okolju **Matlab**. Kot zgled je prikazan del kode za implementacijo subkutane terapije pri anakinri.

V modelu najprej definiramo fiziološke parametre.

```
% telesna teza [kg] -> privzamemo 1 kg/L gostota, BV = BW [L]
BW = 80;

% volumni
V_art      = 0.0243 * BW;
V_ven      = 0.0557 * BW;
V_jetra    = 0.026 * BW;
V_ledvice  = 0.0044 * BW;
V_pljuca   = 0.008 * BW;
V_bpt      = 0.047 * BW;
V_misice   = 0.38 * BW;
V_srce     = 0.0046 * BW;
V_spt      = 0.45 * BW;

% srcni iztis 334.8 L/h ali 5.58 L/min
Qc = 335;

% pretoki:
Q_art      = Qc;
Q_ven      = Qc;
Q_pljuca   = Qc;

% velja: sum(Q_i) = Qc
Q_jetra    = 0.25 * Qc;
Q_ledvice  = 0.19 * Qc;
Q_bpt      = 0.133 * Qc;
Q_misice   = 0.105 * Qc;
Q_spt      = 0.275 * Qc;
Q_srce     = 0.047 * Qc;
```

Dodatno definiramo parametre, ki se nanašajo na zdravilo učinkovino (particijski koeficienti, konstantne, npr. K_{el}) in na aplikacijo zdravila (v tem primeru so to parametri, ki definirajo absorpcijo).

```

% particijski koeficienti za anakinro
P_Bpljuca = 0.4;
P_jetraB = 0.8;
P_ledviceB = 9;
P_bptB = 0.23;
P_misiceB = 0.25;
P_srceB = 0.25;
P_sptB = 0.02;

% odmerek D v [mcg]
D = 100000;
F = 0.95;
% biorazpolozljiv odmerek
UT = F * D;

% absorbcija
tk0 = 2.8;
Fz = 0.25;
k0 = (Fz*UT)/tk0;
k1 = 0.12;

% eliminacija
kel = 10.2;

```

Porazdeljevanje zdravilne učinkovine med razdelki bomo opisali z intenzivnostmi prehajanja med razdelki. Intenzivnost k_{ij} prehajanja med razdelkoma i in j najprej izračunamo.

```

% venska kri -> pljuca
k23 = Q_ven/V_ven;

% pljuca -> arterijska kri
k34 = Q_pljuca / (V_pljuca * P_Bpljuca);

% arterijska kri -> jetra
k45 = Q_jetra/V_art;

% jetra -> venska kri
k52 = Q_jetra / (V_jetra * P_jetraB);

% arterijska kri -> ledvice
k46 = Q_ledvice/V_art;

```

```

% ledvice -> venska kri
k62 = Q_ledvice / (V_ledvice * P_ledviceB);

% arterijska kri -> bpt
k47 = Q_bpt/V_art;

% bpt -> venska kri
k72 = Q_bpt / (V_bpt * P_bptB);

% arterijska -> misice
k48 = Q_misice/V_art;

% misice -> venska kri
k82 = Q_misice / (V_misice * P_misiceB);

% arterijska kri -> srce
k49 = Q_srce/V_art;

% srce -> venska kri
k92 = Q_srce / (V_srce * P_srceB);

% arterijska kri -> spt
k410 = Q_spt/V_art;

% spt -> venska kri
k102 = Q_spt / (V_spt * P_sptB);

```

Določimo sistem diferencialnih enačb, ki opisujejo model. Za izračun v Matlabu uporabimo t.i. "ode solver", v tem konkretnem primeru *ode45*.

```

% absorpcijski razdelek
if y(1) <= 0
    dy(1) = 0;
elseif (t < tk0)
    % proces 0. reda
    dy(1) = -k0;
else
    % proces 1. reda
    dy(1) = -k1*y(1);
end

```

```
% razdelek venske krvi
if ((t<tk0) && y(1)>=0)
    dy(2)= k0 - k23*y(2) + k52 * y(5) + k62 * y(6) + k72 * y(7) + k82 * y
        (8) + k92 * y(9) + k102 * y(10);
elseif y(1)>=0
    dy(2)= k1*y(1) - k23*y(2) + k52 * y(5) + k62 * y(6) + k72 * y(7) + k82
        * y(8) + k92 * y(9) + k102 * y(10);
else
    dy(2)= - k23*y(2) + k52 * y(5) + k62 * y(6) + k72 * y(7) + k82 * y(8) +
        k92 * y(9) + k102 * y(10);
end

%pljuca
dy(3) = k23 * y(2) - k34 * y(3);

%arterijska kri
dy(4) = k34 * y(3) - k45 * y(4) - k46 * y(4) - k47 * y(4) - k48 * y(4) -
    k49 * y(4) - k410 * y(4);

%jetra
dy(5) = k45 * y(4) - k52 * y(5);

%ledvice
dy(6)= k46 * y(4) - k62 * y(6) - kel*y(6);

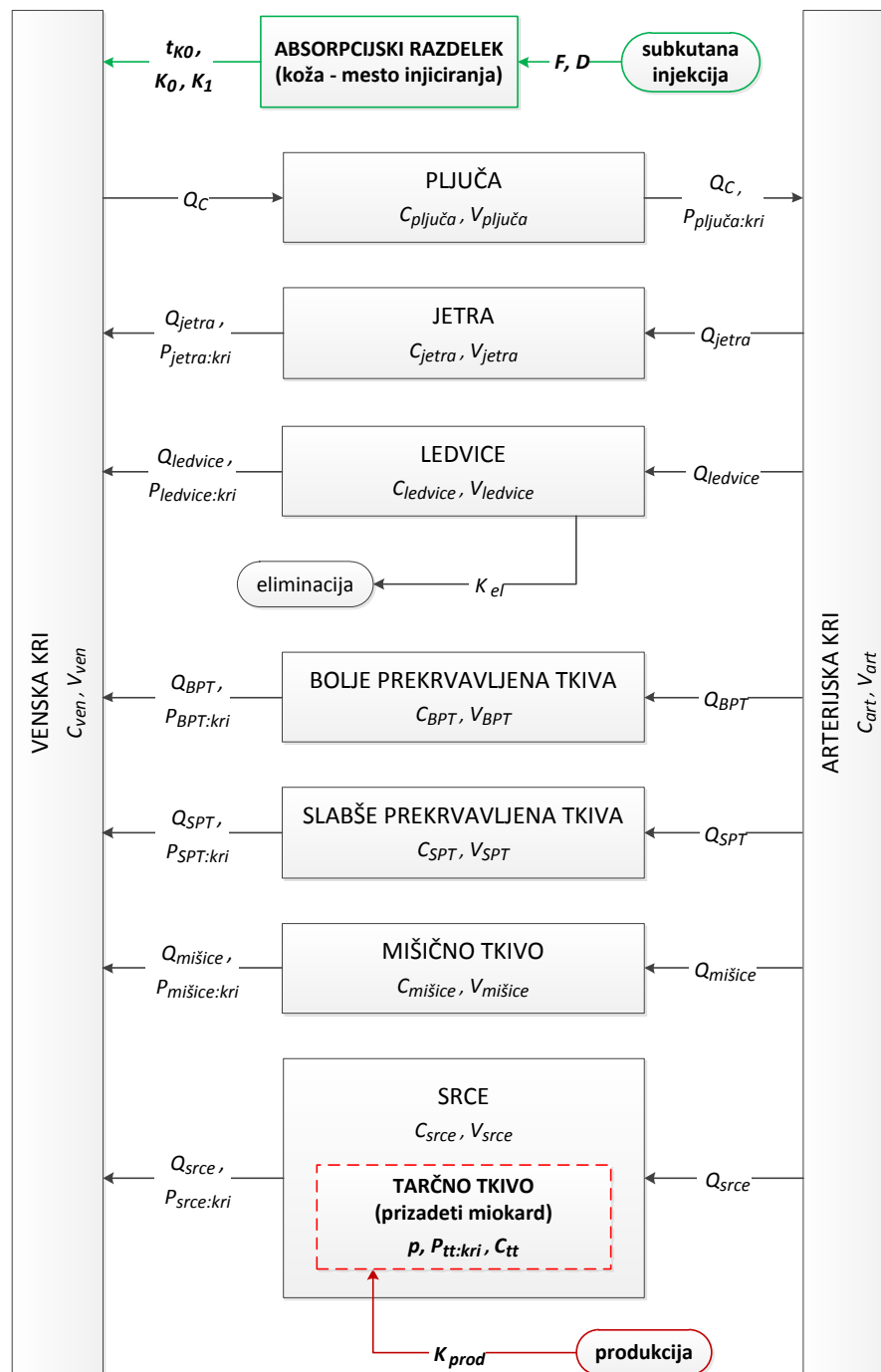
%bpt
dy(7) = k47 * y(4) - k72 * y(7);

%misice
dy(8) = k48 * y(4) - k82 * y(8);

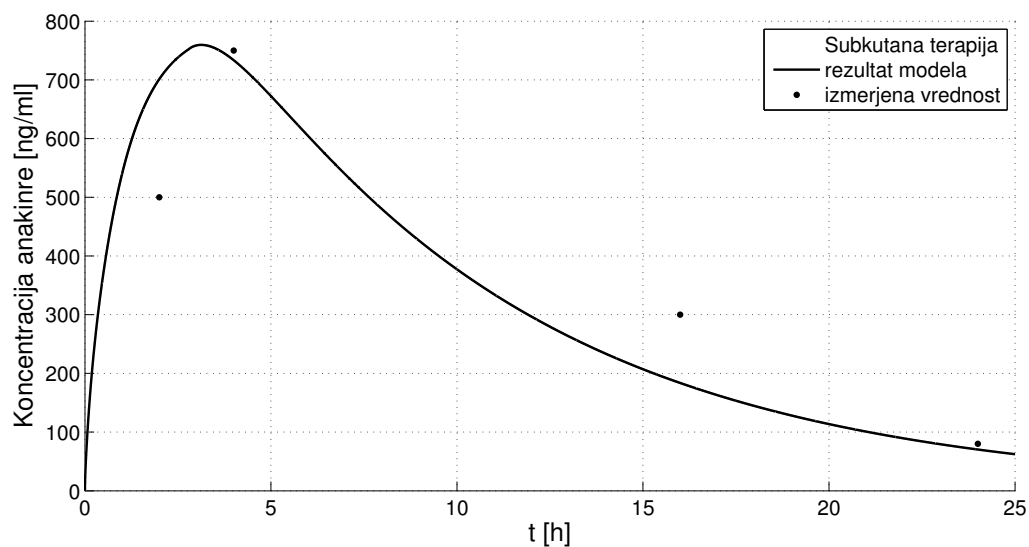
%srce
dy(9) = k49 * y(4) - k92 * y(9);

%spt
dy(10) = k410 * y(4) - k102 * y(10);
```

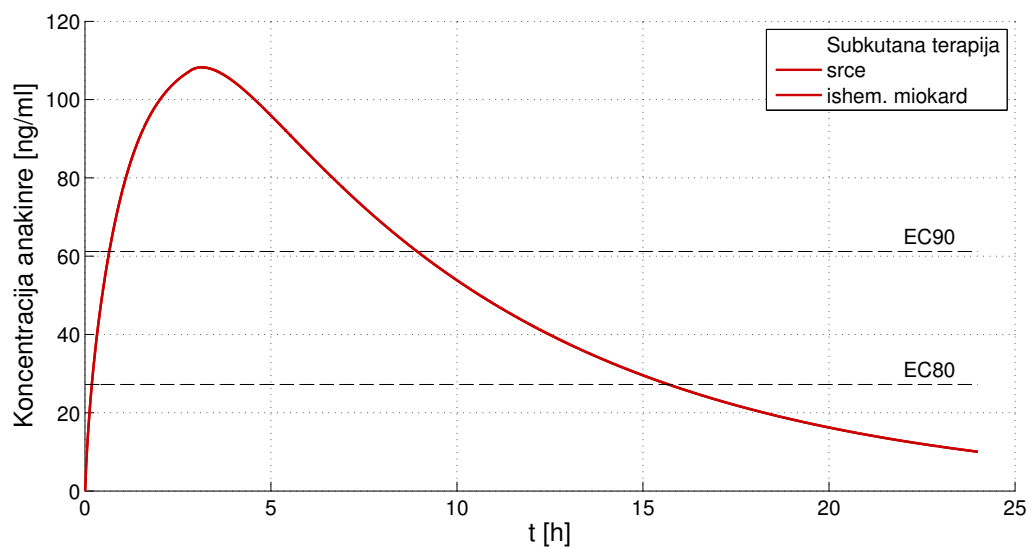
```
% eliminacijski razdelek  
dy(11)= kel*y(6);
```



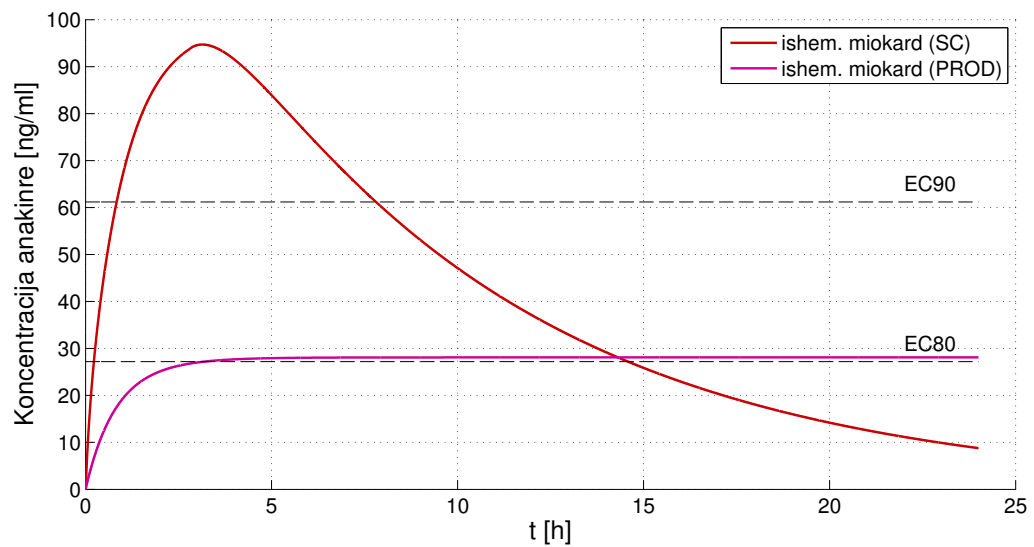
Slika 4.10 Večrazdelčni PBPK model za zdravljenje ishemije miokarda z anakinro. Razdelki in povezave, ki se nanašajo na osnovno strukturo so tudi tu označeni sivo. Za subkutano terapijo so bili dodani gradniki (razdelki in povezave), ki so na diagramu prikazani v zeleni barvi. Rdeče obarvani so gradniki, ki so bili uporabljeni pri razširitvi modela za proces z lokalno produkcijo anakinre v ishemičnem delu miokarda [1, 2].



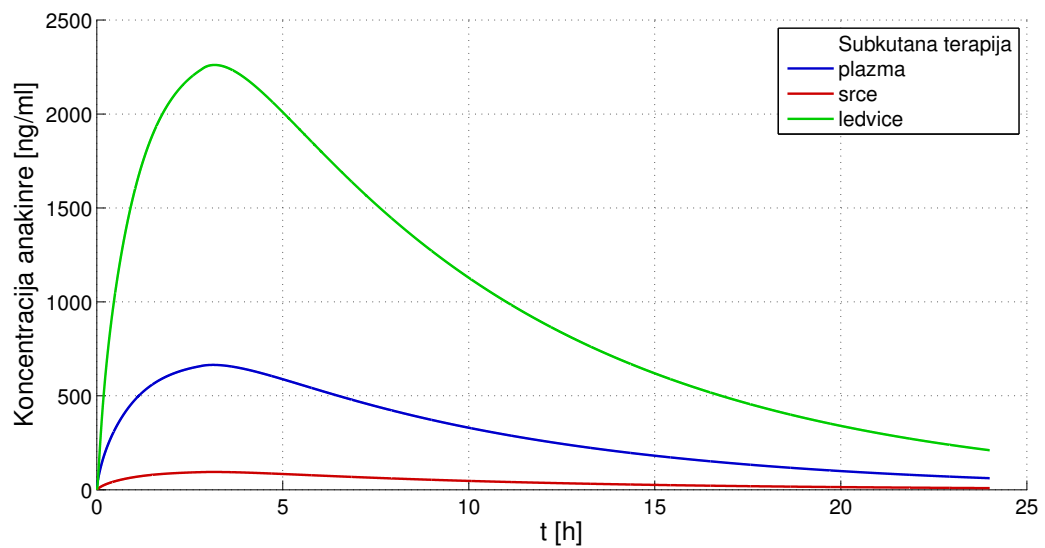
Slika 4.11 Primerjava plazemskih koncentracij anakinre v urah po subkutanem injiciranju odmerka 100 mg. Prikazan je rezultat modela v primerjavi s povprečno vrednostjo meritev na šestih pacientih [42].



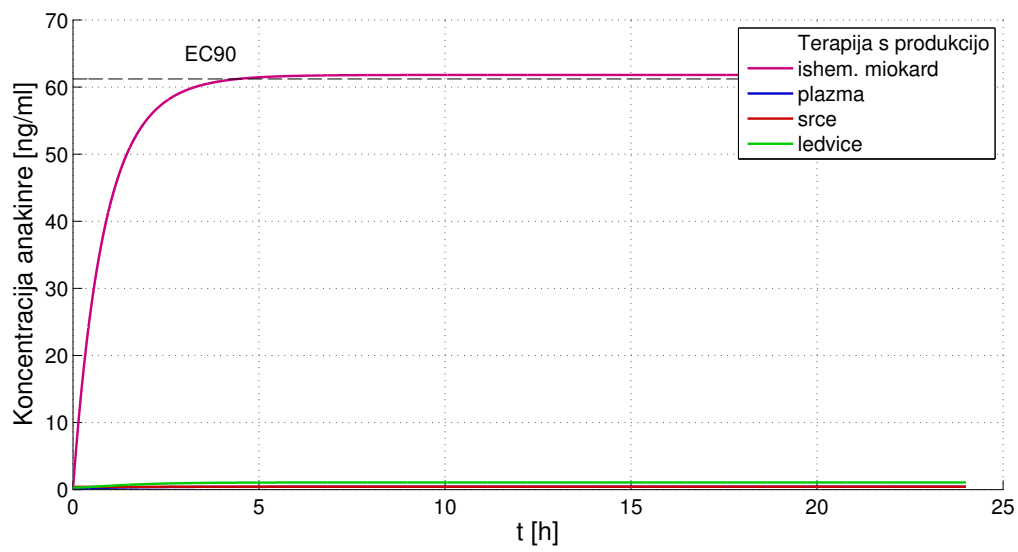
Slika 4.12 Pri subkutani aplikaciji je koncentracija anakinre vedno enaka v zdravem in ishemičnem delu srca. Na sliki je viden potek koncentracije anakinre v razdelku srca in tudi ishemičnega (tarčnega) tkiva. Za primer na sliki predstavlja ishemično tkivo 10% celotnega srca. Graf prikaže potek spremembe koncentracije zdravilne učinkovine za čas med dvema odmerkoma $t_p = 24$ h.



Slika 4.13 Primerjava poteka koncentracije anakinre v tarčnem tkivu (ishemičnem miokardu) po enkratnem subkutanem apliciranju (SC) v primerjavi s produkcijo (PROD) z začetkom ob istem času $t = 0$. Ravnovesni nivo koncentracije se pri terapiji s produkcijo preko časa obdrži, pri subkutani administraciji pa upade in se celoten potek ponovi vsakih 24 h.



Slika 4.14 Potek koncentracij anakinre po subkutani aplikaciji za čas med dvema odmerkoma 24 h.



Slika 4.15 Potek koncentracij anakinre pri terapiji s produkcijo, za čas 24 h po začetku produkcije. Delež ishemičnega tkiva je 10% dela celotnega volumna srca ($p = 0.1$).

5 Zaključek

V diplomski nalogi je predstavljen osnovni pristop k modeliranju farmakokinetike zdravilnih učinkovin, ki smo ga dodatno razširili za namene modeliranja potencialne nove terapije z *in situ* produkcijo zdravilne učinkovine v zdravljenem organu. Z modelom smo se želeli prepričati o smotrnosti vpeljave take terapije v prakso in rezultate primerjali z rezultati modeliranja terapij s standardnimi vrstami aplikacij zdravil.

Opisali smo izhodišča in pristope k farmakokinetičnem modeliranju. Ob upoštevanju določenih predpostavk, aproksimacij in omejitev smo zasnovali model za zdravljenje s specifično zdravilno učinkovino in ga dodatno diferencirali za izbrane terapije. Model smo razširili z vključitvijo procesa produkcije in izračunali prilagojene particijske koeficiente za tkivo, v katerem poteka produkcija.

Kvantitativno in kvalitativno smo primerjali rezultate modelov izbranih terapij za dva proučevana primera, zdravljenje hepatitisa C in ishemije miokarda z biološkimi zdravili interferonom α in anakinro. Model nam je omogočil vpogled v terapije z več vidikov - vpeljava večih razdelkov v fiziološki model nam je razkrila poteke koncentracij za posamezna tkiva in omogočila oceno relativne lokalizacije zdravilne učinkovine pri različnih terapi-

jah. Za izbran želen terapevtski učinek v obolelem organu smo ocenili čas učinkovanja v relaciji s periodo odmerjanja oziroma trajanjem terapije s produkcijo. Kvalitativno smo opisali nihanja koncentracij in izračunali kumulativne količine zdravilne učinkovine za različne aplikacije. Nenazadnje smo z modelom določili tudi konkretno vrednost produkcije zdravilne učinkovine, ki bi bila potrebna za dosego želenega terapevtskega učinka. Pridobljene rezultate je možno uporabiti za izračun teoretične količine mikrokapsul, ki bi jih morali aplicirati ob začetku izvajanju tovrstne terapije. V primeru, da bi terapija prešla v klinično prakso, bi model lahko uporabili za načrtovanje prilagojenih odmerkov apliciranih mikrokapsul, glede na različna patološka stanja določenih pacientov (npr. pacienti z renalno disfunkcijo, pacienti s cirozo, itd.). Modeliranje bi lahko služilo tudi tekom samega procesa zdravljenja, za določanje nivoja koncentracije zdravilne učinkovine v tarčnem tkivu na podlagi izmerjenih plazemskih koncentracij posameznega pacienta.

Nadaljne izboljšave modela bi lahko vzele v obzir tudi delitev in odmiranje celic znotraj mikrokapsul, morebitno raznašanje mikrokapsul po telesu ter poškodovanje ali uničenje mikrokapsul s celicami. Simulacije teh procesov bi lahko izvedli za čas trajanja načrtovanih večmesečnih terapij in predvideli pričakovano življensko dobo tovrstnega dostavnega (produkcijskega) sistema zdravil. Z vidika izboljšav samega fiziološkega modela bi lahko ločeno obravnavali procese porazdeljevanja, torej difuzije in prehajanja zdravilne učinkovine skozi membrane, pa tudi vezavo zdravilne učinkovine na receptorje in druge beljakovine. Tak pristop je ob pomanjkanju zanesljivih podatkov sicer lahko precej vprašljiv, zato se moramo pri vsakem nadaljnjem koraku nadgradnje modela prepričati, da so razširitve verodostojne in tudi upravičene z vidika uporabnosti.

LITERATURA

- [1] iGEM 2012 Team Slovenia, "Switch IT: Inducible Therapeutics," 2012. Dostopno na: <http://2012.igem.org/Team:Slovenia>.
- [2] M. Somrak, M. Moškon, D. Vučko, B. Pirš, M. Mraz, R. Jerala, "Pharmacokinetic model for the evaluation of a proposed drug delivery system," v zborniku *Proceedings of 5th Jožef Stefan International Postgraduate School Students' Conference*, (Ljubljana), Jožef Stefan International Postgraduate School, 2013.
- [3] A. Mrhar, "Računalniška simulacija nelinearnih farmakokinetičnih modelov pri razvoju optimalnih zdravil," doktorska disertacija, Univerza E. Kardelja, VTO Farmacija, Ljubljana, 1983.
- [4] P. L. Bonate, *Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Modeling and Simulation*. Springer, 2nd ed., 2011.
- [5] I. Nestorov, "Whole body pharmacokinetic models," *Clinical Pharmacokinetics*, št. 42, zv. 3, str. 883–908, 2003.
- [6] F. za farmacijo, "Študijsko gradivo pri predmetu Biofarmacija s farmakokinetiko." Dostopno na: <http://relay.ffa.uni-lj.si/bf/Zasebni/Uni/BF/>.
- [7] K. M. A. Abduljalil, "Advanced population pharmacokinetic modelling to quantify selected characteristics of drugs," doktorska disertacija, University of Bonn, Faculty of Mathematics and Natural Science, Bonn, 2010.
- [8] L. Kuepfer, "Towards whole-body systems physiology," *Molecular Systems Biology* 6:409, 2010.

- [9] M. Krauss, S. Schaller, S. Borchers, R. Findeisen, J. Lippert, L. Kuepfer, "Integrating Cellular Metabolism into a Multiscale Whole-Body Model," *PLoS Comput Biol*, št. 8, zv. 10, 2012.
- [10] A. Roy, P. G. Georgopoulos, *Mechanistic Modeling of Transport and Metabolism in Physiological Systems*.
- [11] F. Khalil, S. L  er, "Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling: Methodology, Applications, and Limitations with a Focus on Its Role in Pediatric Drug Development," *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011.
- [12] D. G. Levitt, R. C. Schoemaker, "Human physiologically based pharmacokinetic model for ACE inhibitors: ramipril and ramiprilat," *BMC Clinical Pharmacology*, št. 6, zv. 1, 2006.
- [13] S. C. Gad, *Preclinical Development Handbook: ADME and Biopharmaceutical Properties*. Wiley, 2008.
- [14] L. Aarons, "Physiologically based pharmacokinetic modelling: a sound mechanistic basis is needed," *British Journal of Clinical Pharmacology*, 2005.
- [15] M. von Kleist, C. Kloft, W. Huisinga, "Combining systems biology with physiologically based pharmacokinetics to support the understanding of drug effects," 2011.
- [16] W. Materi, D. S. Wishart, "Computational systems biology in drug discovery and development: methods and applications," *Drug Discovery Today*, št. 12, zv. 7/8, 2007.
- [17] S. A. Peters, *Physiologically-Based Pharmacokinetic (PBPK) Modeling and Simulations: Principles, Methods, and Applications in the Pharmaceutical Industry*. Wiley, 2012.
- [18] L. F. Chasseaud, *Process of Absorption, Distribution, and Excretion*.
- [19] D. Bourne, *A First Course in Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*.
- [20] B. S. Beckett, *Biology: A Modern Introduction*. Oxford University Press, 3 ed., 1986.

- [21] R. G. Sargent, "Verification and validation of simulation models," v zborniku *Proceedings of the 2011 Winter Simulation Conference*, 2011.
- [22] M. Reddy, R. S. Yang, M. E. Andersen, H. J. Clewell III, *Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling: Science and Applications*. Wiley-Interscience, 1 ed., 2005.
- [23] H. M. Jones, I. B. Gardner, K. J. Watson, "Modelling and PBPK Simulation in Drug Discovery," *The AAPS Journal*, št. 11, zv. 1, 2009.
- [24] R. Kawai, D. Mathew, C. Tanaka, M. Rowland, "Physiologically based pharmacokinetics of cyclosporine A: extension to tissue distribution kinetics in rats and scale-up to human," *J Pharmacol Exp Ther.*, št. 287, zv. 2, 1998.
- [25] R. Albanese, H. Banks, E. M.V., L. Potter, "Physiologically based pharmacokinetic models for the transport of trichloroethylene in adipose tissue," *Bull Math Biol.*, št. 64, zv. 1, 2002.
- [26] I. Nestorov, L. Aarons, P. Arundel, M. Rowland, "Lumping of whole-body physiologically based pharmacokinetic models," *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, št. 26, zv. 1, 1998.
- [27] H. J. Clewell, *Development and Evaluation of PBPK Models*, 2011.
- [28] J. T. DiPiro, W. J. Spruill, W. E. Wade, R. A. Blouin, J. M. Pruemer, *Concepts in Clinical Pharmacokinetics*. American Society of Health-System Pharmacists, 5 ed., 2010.
- [29] K. A. Powers, N. M. Dixit, R. M. Ribeiro, P. Golia, A. H. Talal, A. S. Perelson, "Modeling Viral and Drug Kinetics: Hepatitis C Virus Treatment with Pegylated Interferon Alfa-2b," *Seminars in Liver Disease*, št. 23, 2003.
- [30] E. Chatelut, L. Rostaing, N. Grégoire, J. Payen, A. Pujol, J. Izopet, G. Houin, others, "A pharmacokinetic model for alpha interferon administered subcutaneously," *British journal of clinical pharmacology*, št. 47, str. 365–371, 1999.
- [31] P. Marcellin, N. Boyer, "Chronic viral hepatitis," *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, št. 17, zv. 2, str. 259–275.

- [32] S. Thitinan, J. T. McConville, "Interferon alpha delivery systems for the treatment of hepatitis C," *International Journal of Pharmaceutics*, 2008.
- [33] O. Bohoslawec, P. W. Trown, R. J. Wills, "Pharmacokinetics and tissue distribution of recombinant human alpha A, D, A/D(Bgl), and I interferons and mouse alpha-interferon in mice," *Journal of Interferon Research*, št. 6, 1986.
- [34] DrugBank, "Open Data Drug & Drug Target Database." Dostopno na: <http://www.drugbank.ca/>.
- [35] Hoffman-La Roche Inc., *Roferon-A*, 2002.
- [36] T. Koyamaa, N. Sakamotoa, et al., "Divergent activities of interferon-alpha subtypes against intracellular hepatitis C virus replication," *Hepatology Research*, 2006.
- [37] T. G. Johns, J. A. Kerry, B. A. J. Veitch, "Pharmacokinetics, Tissue Distribution, and Cell Localization of [³⁵S] Methionine-labeled Recombinant Human and Murine Alpha Interferons in Mice," *Cancer Res*, 1990.
- [38] E. Radwanski, G. Perentesis, S. Jacobs, "Pharmacokinetics of interferon alpha-2b in healthy volunteers," *J Clin Pharmacol*, 1987.
- [39] E. Dahlén, K. Barchan, D. Herrlander, et al., "Development of interleukin-1 receptor antagonist mutants with enhanced antagonistic activity in vitro and improved therapeutic efficacy in collagen-induced arthritis," *J Immunotoxicol.*, 2008.
- [40] Swedish Orphan Biovitrum Biovitrum, *Kineret*, 2001.
- [41] C. Cawthorne, C. Prenant, A. Smigova, P. Julyan, R. Maroy, K. Herholz, N. Rothwell, et al., "Biodistribution, pharmacokinetics and metabolism of interleukin-1 receptor antagonist (IL-1RA) using [¹⁸F]-IL1RA and PET imaging in rats. British journal of pharmacology ," *Br J Pharmacol*, št. 162, 2011.
- [42] B. B. Yang, S. Baughman, J. T. Sullivan, "Pharmacokinetics of anakinra in subjects with different levels of renal function," *Clinical pharmacology and therapeutics*, št. 74, 2003.
- [43] D. Kim, B. Reitz, D. Carmichael, D. Bloedow, "Kidney as a major clearance organ for recombinant human interleukin-1 receptor antagonist," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, št. 84, zv. 5, 1995.