

**In silico, in vitro und in vivo Charakterisierung der  
Hemmung ausgewählter Fremdstoff-metabolisierender  
Enzyme des Menschen durch Voriconazol**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

**LISA JUNGE**

aus Köln

Bonn 2015



Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Uwe Fuhr
2. Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Jaehde

Tag der Promotion: 22. Februar 2016

Erscheinungsjahr: 2016





## Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Uwe Fuhr möchte ich für die Überlassung eines spannenden und vielseitigen Themas und seine Diskussionsbereitschaft mit Anregungen und kritischen Kommentaren danken.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. Ulrich Jaehde sehr herzlich für die Übernahme des Koreferats.

Herrn Prof. Dr. Alf Lamprecht und Herrn Prof. Dr. Martin Hellmich danke ich für die Bereitschaft zur Teilnahme an der Prüfungskommission.

Herrn Dr. Sebastian Frechen danke ich für seine großartige Unterstützung und immerwährende Geduld bei der Entwicklung und Ausarbeitung der populationspharmakokinetischen Modelle.

Bei Herrn PD Dr. Carsten Müller und Herrn Dr. Martin Wiesen bedanke ich mich für ihre Ansprechbarkeit bei der Arbeit mit dem von Herrn Müller zur Verfügung gestellten LC-MS/MS-System.

Herrn Prof. Dr. Fritz Sörgel danke ich für die Quantifizierung der Plasmakonzentrationen von Midazolam und Metaboliten im Rahmen der durchgeführten Studie.

Mein besonderer Dank gilt Menschen, die meine Zeit am Institut für Pharmakologie der Uniklinik Köln verschönert haben:

Beginnend mit meinem „ersten“ Büronachbarn Dennis Rokitta, Daria Kraus und Paola di Gion für die tolle Anfangszeit, fachliche und mentale Unterstützung in der Arbeitsgruppe und auch noch nach Beendigung ihrer Tätigkeit am Institut.

Johanna Krüger: einfach dafür, dass sie da ist.

Dominik Dahlinger: mein „zweiter“ Büronachbar in guten wie in schlechten Zeiten.

Franziska Pahlisch und Carola Schäfer danke ich für ihre mentale Unterstützung in Sachen LC-MS/MS, aber natürlich auch darüber hinaus.

Weiterhin danke ich allen anderen dauerhaften und auch temporären Mitarbeitern der AG Fuhr für eine sehr lehrreiche Zeit. Und auch anderen ausgewählten Menschen aus dem Institut für Pharmakologie, die die Zeit unvergesslich gemacht haben.

Schlussendlich danke ich meinen Eltern und meinen Schwestern sowie meinen Freunden außerhalb der Arbeitsgruppe für ihre Unterstützung.





## Inhalt

1	Einleitung .....	1
1.1	Arzneistoffinteraktionen .....	1
1.2	Der Arzneistoffmetabolismus beim Menschen .....	2
1.2.1	Das Cytochrom P450-System des Menschen .....	2
1.2.2	CYP3A .....	4
1.2.3	Das Uridindiphosphat-Glucuronosyltransferasen-System des Menschen .....	7
1.2.4	Bedeutung von Darmwand und Leber im humanen Arzneistoffmetabolismus .....	9
1.3	Enzyminhibition.....	13
1.3.1	Methoden zur Abschätzung des inhibitorischen Potentials von Arzneistoffen.....	14
1.4	Voriconazol.....	17
1.4.1	Untersuchung des inhibitorischen Potentials von Voriconazol anhand des Midazolam-Metabolismus .....	20
2	Ziele der Arbeit.....	23
3	Material und Methoden.....	25
3.1	Material.....	25
3.1.1	Referenzsubstanzen .....	25
3.1.2	Reagenzien .....	25
3.1.3	Hergestellte Puffer und Lösungen .....	26
3.1.4	Geräte.....	27
3.1.5	Verbrauchsmaterialien.....	29
3.1.6	Software .....	29
3.2	Validierung analytischer Methoden.....	29
3.2.1	Selektivität.....	30
3.2.2	Kalibrierbereich und untere Quantifizierungsgrenze (LLOQ) .....	30
3.2.3	Wiederfindung .....	30
3.2.4	Richtigkeit und Präzision .....	31
3.2.5	Stabilität .....	31
3.2.6	Matrixeffekte .....	32
3.3	Populationspharmakokinetische Datenanalyse.....	33
3.3.1	Populationspharmakokinetik .....	33
3.3.2	Physiologisch-basierte pharmakokinetische Modellierung.....	34
3.3.3	Modellentwicklung .....	36
3.3.4	Methoden zur Modellabschätzung.....	39

3.4	Populationspharmakokinetische Reevaluierung einer klinischen CYP3A-Interaktionsstudie.....	43
3.4.1	Studiendesign .....	43
3.4.2	Datenanalyse .....	44
3.5	In vitro Untersuchung der Enzyminhibition durch Voriconazol und Voriconazol-N-oxid .....	48
3.5.1	Enzymkinetische Parameter zur Untersuchung des inhibitorischen Potentials	48
3.5.2	In vitro Untersuchung der Inhibition von CYP3A4.....	51
3.5.3	In vitro Untersuchung der Inhibition von UGT2B4 und UGT2B7 .....	56
3.6	In vivo Studie zur Untersuchung der Inhibition von CYP3A in Darmwand und Leber durch Voriconazol mit einem neuartigen Studiendesign.....	64
3.6.1	Studie .....	64
3.6.2	Entwicklung und Validierung von Quantifizierungsmethoden zur Bestimmung von Voriconazol, Midazolam und ausgewählten Analyten .....	67
3.6.3	Bestimmung von Voriconazol und Voriconazol-N-oxid im Plasma .....	69
3.6.4	Bestimmung von Midazolam, 1'-OH-Midazolam und 4-OH-Midazolam in Urin	71
3.6.5	Bestimmung von Midazolam, 1'-OH-Midazolam und 4-OH-Midazolam in Plasma	75
3.6.6	Populationspharmakokinetische Datenanalyse .....	76
4	Ergebnisse.....	80
4.1	Populationspharmakokinetische Reevaluierung einer klinischen CYP3A-Interaktionsstudie.....	80
4.1.1	Modellentwicklung .....	80
4.1.2	Schätzung der Parameter und Modellbeurteilung.....	86
4.1.3	Anwendung des Modells .....	91
4.2	In vitro Untersuchung der Enzyminhibition durch Voriconazol und Voriconazol-N-oxid .....	94
4.2.1	In vitro Untersuchung der Inhibition von CYP3A4.....	94
4.2.2	In vitro Untersuchung der Inhibition von UGT2B4 und UGT2B7 .....	98
4.3	In vivo Studie zur Untersuchung der Inhibition von CYP3A in Darmwand und Leber durch Voriconazol mit einem neuartigen Studiendesign.....	105
4.3.1	Bestimmung von Voriconazol und Voriconazol-N-oxid im Plasma .....	105
4.3.2	Bestimmung von Midazolam, 1'-OH-Midazolam und 4-OH-Midazolam im Urin	110
4.3.3	Populationspharmakokinetische Datenanalyse .....	115
5	Diskussion .....	129
5.1	Populationspharmakokinetische Reevaluierung einer klinischen CYP3A-Interaktionsstudie.....	129

5.2	In vitro Untersuchung der Enzyminhibition durch Voriconazol und Voriconazol-N-oxid.....	135
5.2.1	In vitro Untersuchung der Inhibition von CYP3A4 .....	135
5.2.2	In vitro Untersuchung der Inhibition von UGT2B4 und UGT2B7 .....	136
5.3	In vivo Studie zur Untersuchung der Inhibition von CYP3A in Darmwand und Leber durch Voriconazol mit einem neuartigen Studiendesign .....	140
5.3.1	Bestimmung von Voriconazol und Voriconazol-N-oxid im Plasma.....	140
5.3.2	Bestimmung von Midazolam, 1'-OH-Midazolam und 4-OH-Midazolam im Urin 141	
5.3.3	Populationspharmakokinetische Datenanalyse.....	142
6	Schlussfolgerung und Ausblick.....	147
7	Zusammenfassung .....	150
8	Literaturverzeichnis.....	152
9	Appendix .....	170



## Abkürzungsverzeichnis

1,4-diOH-MDZ	1,4-Dihydroxymidazolam
1-OH-MDZ	1'-OH-Midazolam
1-OH-MDZ-Gluc	1'-OH-Midazolam- $\beta$ -D-Glucuronid
4-OH-MDZ	4-OH-Midazolam
ACN	Acetonitril
AUC	Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve
AUCR	Verhältnis der inhibierten Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (AUC) über der Basal-AUC
BPR	Blut-Plasma-Verteilungskoeffizient
CE	Kollisionsenergie
CID	Kollisionsinduzierte Dissoziation
CL	Clearance
CLint	intrinsische Clearance
CWRES	Konditionell gewichtete Residuen
CXP	Kollisionszellenausgangspotential
CYP	Cytochrom P450
DP	Declustering-Potential
DZP	Diazepam
EMA	European Medicines Agency
EP	Eichprobe
ESI	Elektrospray-Ionisierung
FDA	Food and Drug Administration
FMO	Flavinmonooxygenase
FOCE	First-order conditional estimation
FOCE-I	First-order conditional estimation with interaction
GOF	Goodness-of-fit
HCOOH	Ameisensäure
HLM	Humane Lebermikrosomen
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatografie
i.v.	intravenös



IIV	interindividuelle Variabilität
int.	intestinal
IOV	Interoccasion-Variabilität
IPRED	individueller Schätzwert
IS	interner Standard
IWRES	individuelle gewichtete Residuen
KET	Ketoconazol
$K_i$	Inhibitionskonstante
KI	Konfidenzintervall
$K_m$	Michaelis-Menten-Konstante
LLOQ	untere Quantifizierungsgrenze (lower limit of quantification)
LRT	Likelihood-Ratio-Test
MBI	mechanismusbasierte Inhibition/Inhibitor
MDZ	Midazolam
MDZ-Gluc	Midazolam-N- $\beta$ -D-Glucuronid
MeOH	Methanol
MF	Matrixfaktor
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
NCA	Noncompartmental approach/nichtkompartimentelle Datenanalyse
NLME	Nonlinear mixed effects modeling
OFV	objektiver Funktionswert (objective function value)
PBPK	physiologisch basierte Pharmakokinetik
P-gp	P-Glykoprotein
PK	Pharmakokinetik
PPB	Plasmaproteinbindung
PRED	Populations-Schätzung
QC	Qualitätskontrolle
RE	relativer Fehler
RSD	relative Standardabweichung
RSE	Relativer Standardfehler
SL	Stammlösung
UDP	Uridin-5'-diphosphat
UDPGA	Uridin-5'-diphosphoglucuronsäure

UGT	UDP-Glucuronosyltransferase
ULOQ	obere Quantifizierungsgrenze (upper limit of quantification)
$V_{max}$	maximale Umsatzgeschwindigkeit eines Enzyms
VPC	Visual predictive check
VRC	Voriconazol
VRC-NO	Voriconazol-N-oxid
WRES	gewichtete Residuen

# 1 Einleitung

## 1.1 Arzneistoffinteraktionen

Wechselwirkungen zwischen Arzneimitteln sind häufig vernachlässigbar, allerdings können sie durch eine Verstärkung oder Abschwächung erwünschter und unerwünschter Wirkungen klinische Relevanz erlangen und somit eine sichere Arzneimitteltherapie gefährden<sup>1,2</sup>. Das Risiko derartiger Interaktionen steigt mit der Anzahl eingenommener Arzneimittel. Daher werden neue Wirkstoffe vor der Zulassung standardmäßig auf ihr Interaktionspotential hin untersucht<sup>3</sup>. Ein möglichst vollständiges Wissen über das Interaktionspotential einer Substanz wird angestrebt, allerdings sind niemals zu allen potentiellen Wechselwirkungen Daten verfügbar<sup>4</sup>, da unzählige Arzneimittelkombinationen möglich sind, nicht alle Mechanismen einer Interaktion verstanden werden bzw. quantitativ gut vorhersagbar sind und auch die interindividuelle Arzneimittelantwort variabel ist. Die Basis zur Beurteilung von Interaktionen, die vor der Marktzulassung eines Arzneistoffs geschaffen wird, kann mit Hilfe der Durchführung weiterer Studien auch nach der Zulassung dazu beitragen, Wechselwirkungen unter Beteiligung des betreffenden Arzneistoffs besser einzuschätzen und so verhindern zu können.

Interaktionen sind möglich auf pharmakokinetischer und pharmakodynamischer Ebene: bei pharmakodynamischen Wechselwirkungen beeinflussen sich Arzneistoffe in ihrer Wirkung unmittelbar. Dies kann durch den Angriff an der gleichen Zielstruktur (meist Rezeptoren) bedingt sein oder durch die gleichzeitige Einwirkung auf ein Organsystem. Bei pharmakokinetisch bedingten Interaktionen kommt es zu einer gegenseitigen Beeinflussung von Arzneistoffen auf der Ebene der Absorption, Distribution, Metabolisierung und/oder Exkretion (ADME-Modell).

Da die enzymatische Biotransformation einen allgemeinen Eliminationsweg von Xenobiotika aus dem menschlichen Körper darstellt, ist die Veränderung der Aktivität Fremdstoffmetabolisierender Enzyme ein Hauptgrund für Arzneistoffinteraktionen<sup>3</sup>. Durch Enzyminhibition oder -induktion kann es zu Veränderungen im eigentlichen Wirkprofil beteiligter Substanzen kommen. Mitunter sind solche Wechselwirkungen erwünscht und bewirken einen therapeutischen Vorteil: beispielsweise wird der Proteaseinhibitor Ritonavir aufgrund seiner inhibierenden Eigenschaften auf das Cytochrom P450-Enzym 3A4 (CYP3A4) als „Booster“ im Präparat Kaletra® mit Lopinavir kombiniert, um dessen schnellen CYP3A4-vermittelten Abbau zu verlangsamen und somit eine Wirkungsverlängerung zu erzielen<sup>5</sup>. Meist überwiegen jedoch die unerwünschten Wirkungen, die durch Interaktionen hervorgerufen werden: So führte die gleichzeitige Gabe des Antimykotikums Ketoconazol und des 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-

Coenzym-A-Reduktaseinhibitors Simvastatin bei einem Patienten mit Prostatakarzinom zu einer schweren Rhabdomyolyse mit daraus resultierendem akuten Nierenversagen, sodass beide Arzneimittel sofort abgesetzt werden mussten<sup>6</sup>.

Das Ausmaß klinisch relevanter Arzneistoffinteraktionen auf Metabolismusebene wird zusätzlich beeinflusst durch interindividuelle Unterschiede im Metabolismus von Xenobiotika, bedingt durch Alter, Krankheiten, Lebensgewohnheiten sowie Expression und Aktivität Fremdstoff-metabolisierender Enzyme an deren wichtigsten Expressionsorten<sup>7,8</sup>. Speziell Cytochrom P450-Enzyme wurden hinsichtlich ihres Potentials für Arzneistoffinteraktionen aufgrund ihres hohen Stellenwertes im Phase I-Metabolismus umfangreich untersucht<sup>9-11</sup>; knapp drei Viertel aller derzeit auf dem Markt befindlichen Arzneistoffe werden durch diese Enzym-Superfamilie umgesetzt<sup>12,13</sup>. Uridindiphosphat-Glucuronosyltransferasen (UGT) als wichtigste Phase II-Enzyme standen bisher weniger im Fokus der Forschung<sup>14,15</sup>. Zusammen sind beide Enzymklassen am Metabolismus von über 85 % der 200 meistverschriebenen Arzneimittel in den USA beteiligt<sup>12</sup>.

Um Arzneistoffinteraktionen in ihrer Ursache zu begreifen und somit zu deren Verhinderung beizutragen, ist zunächst das Verständnis von Mechanismen und Faktoren, die zu Interaktionen führen und deren Ausmaß beeinflussen, von grundlegender Bedeutung.

Von Interesse sind bei metabolisch bedingten Interaktionen Eigenschaften der einzelnen Enzymsysteme (wie Substratspezifität und Lokalisation in der Zelle), Charakteristika des pharmakokinetischen Profils der betreffenden Substanzen und auch Kenntnisse über physiologische Gegebenheiten und Beteiligung der wichtigsten Expressionsorte Arzneistoff-metabolisierender Enzyme, Darmwand und Leber<sup>16-19</sup>, am Gesamtmetabolismus.

## **1.2 Der Arzneistoffmetabolismus beim Menschen**

### **1.2.1 Das Cytochrom P450-System des Menschen**

Die Cytochrom P450 (CYP)-Familie ist das wichtigste Phase I-Enzymsystem des Menschen, die meisten etablierten Arzneistoffe sind CYP-Substrate: sie übernehmen knapp 80% des oxidativen Metabolismus auf dem Markt befindlicher Arzneistoffe und sind für 50% der Gesamtelimination von Arzneistoffen verantwortlich<sup>20</sup>. Dementsprechend sind sie häufig von Arzneistoffinteraktionen betroffen. Die praktisch ubiquitär im Körper vorkommenden Hämproteine sind intrazellulär in der Phospholipidmatrix der Mitochondrien (Typ 1) und des

glatten Endoplasmatischen Reticulums (Typ 2) verschiedener Gewebe lokalisiert. Die mitochondrialen CYP-Enzyme sind hierbei primär in die Synthese und den Metabolismus endogener Substanzen wie Steroidhormonen, Prostaglandinen oder Fettsäurederivaten involviert, die mikrosomalen Formen sind vorwiegend für den Fremdstoffmetabolismus verantwortlich<sup>21</sup>. Typische Biotransformationsreaktionen durch CYP-Enzyme stellen Hydroxylierung, N-, O- und S-Desalkylierung, Sulfoxidation, Epoxidierung, Desaminierung, Desulfurierung, Dehalogenierung und N-Oxidation dar.

Je nach Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz werden die Cytochrome in „Familien“ und „Subfamilien“ eingeteilt. Beträgt die Sequenzhomologie mehr als 40%, spricht man von einer Familie<sup>22</sup>, gekennzeichnet durch die erste arabische Zahl (z.B. CYP3), der nachfolgende Großbuchstabe klassifiziert die Subfamilie (z.B. CYP3A). Hierbei stimmt die Aminosäuresequenz zu mindestens 55% überein. Eine zweite arabische Zahl kennzeichnet das individuelle Enzym (z.B. CYP3A4). Das menschliche Genom umfasst 18 CYP-Familien, die für 57 Enzyme codieren<sup>23</sup>. Im humanen Arzneistoffmetabolismus spielen jedoch nur wenige eine Rolle<sup>24</sup>, welche vor allem Vertreter der Familien CYP1, 2 und 3 umfassen<sup>25</sup>. Während einige CYP-Enzyme den Metabolismus nur weniger ausgewählter Substanzen katalysieren, besitzen andere eine breite Substratspezifität<sup>26</sup>.

Mehr als 50% der über CYP-Enzyme metabolisierten Arzneistoffe werden über CYP3A verstoffwechselt, über CYP2D6 sind es ca. 25%<sup>27</sup>. Weiterhin sind von signifikanter Bedeutung für den Metabolismus einer größeren Zahl von Arzneistoffen CYP2C und CYP1A2<sup>28</sup> (s. Abb. 1.1).

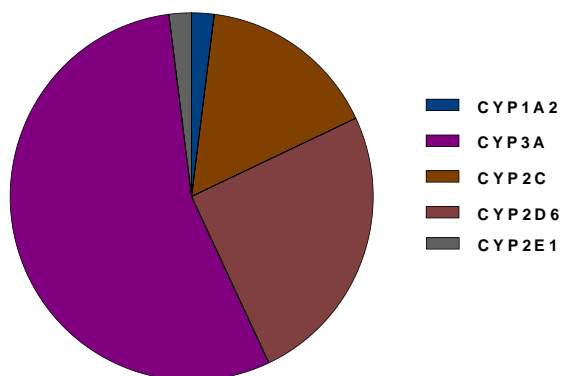


Abb. 1.1 Prozentualer Anteil verschiedener Cytochrom P450-Enzyme am Gesamt-CYP-basierten Arzneistoffmetabolismus im Menschen<sup>27</sup>

Auch andere CYP-Enzyme sind an der Umwandlung von Fremdstoffen beteiligt, ihr Anteil ist jedoch vergleichsweise gering. Die relative Menge eines bestimmten Enzyms steht nicht im

Zusammenhang mit dessen Bedeutung im Fremdstoffmetabolismus<sup>28</sup>: So beträgt die hepatische Expression von CYP2D6 nur ca. 1,7 % von der gesamten hepatischen CYP-Expression<sup>29</sup>, allerdings ist es wie zuvor erwähnt an der Biotransformation von rund einem Viertel aller gängigen Arzneistoffe beteiligt.

Der wichtigste Expressionsort humaner CYP-Enzyme ist die Leber<sup>30-32</sup>, wobei Vertreter dieses Enzymsystems insgesamt vermehrt in solchen Geweben exprimiert werden, die einer hohen Belastung durch Xenobiotika ausgesetzt sind. Hierzu gehört vor allem der Gastrointestinaltrakt, daneben der Respirationstrakt sowie Regionen des Gehirns, die nicht durch die Blut-Hirn-Schranke geschützt sind<sup>30</sup>. Die einzelnen CYP-Enzyme unterscheiden sich dabei ausgeprägt in ihrem mengenmäßigen Vorkommen an den verschiedenen Expressionsorten. In Abb. 1.2 ist der prozentuale Anteil einzelner CYP-Enzyme für die Expressionsorte Leber und Darmwand dargestellt.

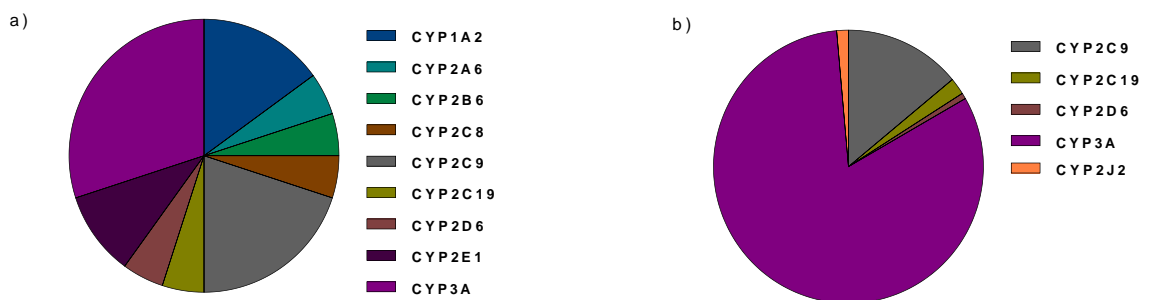


Abb. 1.2 Prozentualer Anteil einzelner Cytochrom P450-Enzyme a) in der Leber und b) im Darm<sup>33</sup>

### 1.2.2 CYP3A

Mit über 30% des gesamten CYP-Vorkommens stellt CYP3A die am häufigsten exprimierte Fremdstoff-metabolisierende CYP-Subfamilie im Menschen dar<sup>25</sup>. Neben Xenobiotika werden auch verschiedene endogene Substanzen wie Androgene, Estrogene, Progesteron oder Vitamin D über CYP3A umgesetzt. Hauptvertreter und am besten untersucht innerhalb der Subfamilie ist CYP3A4, daneben treten CYP3A5, CYP3A7 und CYP3A43 auf. Aufgrund der Schwierigkeit, zwischen den katalytischen Aktivitäten der einzelnen Enzyme zu unterscheiden, der Tatsache, dass in vielen Fällen verschiedene Enzyme nebeneinander in einem Organ exprimiert werden und in vivo der relative Anteil eines Organs am Gesamtmetabolismus nur schwer zu

bestimmen ist, wird der Ausdruck „CYP3A“ häufig als Synonym für Gesamtaktivität und –vorkommen aller genannten CYP3A-Enzyme benutzt. Primär reflektiert er jedoch CYP3A4<sup>34</sup>.

An den für den Arzneistoffmetabolismus wichtigsten Enzym-Expressionsorten Leber und Darmwand ist CYP3A prozentual am häufigsten vertreten, der Anteil von CYP3A gemessen am gesamten CYP-Vorkommen liegt in der Leber bei 35%, im Darm sogar bei 82%<sup>35</sup> (s. Abb. 1.2). Somit kommt CYP3A aufgrund seines dortigen mengenmäßigen Vorkommens eine wesentliche Rolle im First-pass-Metabolismus von Arzneistoffen zu, auch wenn die exprimierte CYP3A-Gesamtmenge in der Darmwand nur etwa 1% von der der Leber beträgt<sup>18,19,36–38</sup>. Die dominierende Beteiligung von CYP3A am Metabolismus endogener und exogener Substanzen ist durch dessen breite Substratspezifität bedingt. An die sehr große Bindungstasche können sowohl sehr kleine Moleküle wie Paracetamol (151 g/mol) als auch solche mit hohem Molekulargewicht wie beispielsweise Cyclosporin A (1201 g/mol) binden<sup>39</sup>. Zusätzlich können mehrere Moleküle gleicher oder unterschiedlicher Struktur an ein Enzym gebunden und umgesetzt werden<sup>40–42</sup>. Durch die Fähigkeit der Bindung mehrerer Moleküle wird bei verschiedenen Substraten das Phänomen einer atypischen Kinetik sowie homotroper als auch heterotroper Kooperativität beobachtet<sup>43,44</sup>. Weiterhin kann es durch die potentielle gleichzeitige Umsetzung von zwei oder mehr Arzneistoffmolekülen einerseits zu einer schnelleren Produktformation (Aktivierung) kommen, andererseits zu einer verringerten Produktbildung (nichtkompetitive Inhibition), abhängig von der Konzentration des Substrats und den Eigenschaften des zweiten oder dritten Liganden<sup>45</sup>.

Die individuelle pharmakologische Wirkung eines CYP3A-Substrats wird weiterhin durch die hohe interindividuelle Variabilität des Enzyms in der hepatischen und intestinalen Expression und Aktivität beeinflusst<sup>36,46</sup>. So variiert die hepatische CYP3A4-Expression zwischen verschiedenen Individuen bis um das 40-fache<sup>34</sup>, und der in vivo-Metabolismus von CYP3A4-Substraten kann um den Faktor 10 schwanken<sup>47</sup>. Dies bedingt interindividuelle Unterschiede in den Plasmakonzentrationen eines betreffenden Arzneistoffs und hierdurch auch eine Variabilität zum einen im Ansprechen auf eine Arzneimitteltherapie, zum anderen im Nebenwirkungsprofil.

CYP3A4 metabolisiert eine Vielzahl an Arzneistoffen unterschiedlichster Substanzklassen: Beispiele hierfür sind Makrolidantibiotika (Erythromycin), Antiarrhythmika (Amiodaron), Benzodiazepine (Midazolam, Triazolam), oder Phosphodiesterase 5-Inhibitoren (Sildenafil)<sup>48</sup>. Auch ist es dem Einfluss verschiedener Inhibitoren und Induktoren ausgesetzt: Bekannte Inhibitoren sind beispielsweise Azolantimykotika wie Ketoconazol, Itraconazol oder Voriconazol, zu den

CYP3A-Induktoren gehören das Antiepileptikum Carbamazepin oder das Antibiotikum Rifampicin.

CYP3A5 wird polymorph exprimiert und ist durchschnittlich bei ca. 20% aller Erwachsenen zu finden, die ethnische Variabilität ist hierbei ausgeprägt: so exprimieren 10-20% der kaukasischen Bevölkerung und mehr als 50% der Afroamerikaner CYP3A5<sup>49,50</sup>. Bei Expression macht es 10-30% der CYP3A4-Menge aus<sup>51</sup>. Wie CYP3A4 wird es vorwiegend in Darmwand und Leber exprimiert, zusätzlich auch signifikant in der Niere<sup>52</sup> und im Magen<sup>53</sup>. Die Substratspezifität überlappt teilweise mit der von CYP3A4 aufgrund ähnlicher Aminosäuresequenzen<sup>54</sup>, was eine Unterscheidung der relativen Verteilung der beiden Enzyme schwierig macht<sup>49</sup>. Allerdings werden einige CYP3A4-Substrate wie beispielsweise Erythromycin und Quinidin nicht über CYP3A5 metabolisiert, es gibt Unterschiede in der Produktregioselektivität<sup>55</sup> und die metabolische Aktivität wird im Vergleich zu CYP3A4 kontrovers diskutiert: Einige Studien führten zu dem Ergebnis einer geringeren metabolischen Aktivität<sup>56</sup>, andere sprechen von gleicher oder sogar höherer<sup>55</sup> metabolischer Kapazität. Einige Induktoren von CYP3A4 rufen keine verstärkte Expression von CYP3A5 hervor<sup>57</sup>.

CYP3A7 wird hauptsächlich in der fetalen Leber exprimiert<sup>58</sup>. Nach der Geburt wird die CYP3A7-Expression signifikant down-reguliert, allerdings wird bei einigen Erwachsenen sowohl in Hepatozyten als auch in Enterozyten weiterhin mRNA gefunden, daneben auch im Endometrium und in der Plazenta<sup>59</sup>. Die Expression wird im Vergleich zu CYP3A4 und CYP3A5 allerdings als vernachlässigbar angesehen.

CYP3A43 ist das zuletzt entdeckte CYP3A-Isoenzym, dessen mRNA vor allem in Prostata und Testes zu finden ist<sup>60</sup>, dort, wo ein ausgeprägter Steroidmetabolismus stattfindet. In der Leber wird es nur geringfügig exprimiert<sup>60</sup>, das Expressionslevel von CYP3A43 entspricht hier nur etwa 0,1% dem von CYP3A4<sup>61</sup>. Die katalytische Aktivität scheint hinsichtlich des klassischen CYP3A4-Substrats Testosteron wesentlich niedriger zu sein<sup>62</sup>, weshalb davon ausgegangen wird, dass die Substratspezifität von CYP3A4 und 3A5 abweicht.

Die zentrale Rolle von CYP3A im Fremdstoffmetabolismus und die daraus resultierende Anfälligkeit für Interaktionen hat bereits zur Marktrücknahme verschiedener Arzneimittel geführt: So kam es zur Marktrücknahme des Calciumkanalblockers Mibefradil aufgrund seiner starken Hemmwirkung auf CYP3A4<sup>63,64</sup> und damit verbundenen schwerwiegenden Wechselwirkungen mit CYP3A4-Substraten wie beispielsweise Lovastatin oder Simvastatin. Ein Beispiel für vom Markt genommene CYP3A-Substrate ist das Prokinetikum Cisaprid wegen ausgeprägter QT-Zeit-Verlängerung<sup>65</sup>.



### 1.2.3 Das Uridindiphosphat-Glucuronosyltransferasen-System des Menschen

Uridindiphosphat-Glucuronosyltransferasen (UGTs) sind mit ca. 30% die quantitativ am häufigsten exprimierte Phase II-Enzyme<sup>15</sup>, die die Bildung von Glucuronid-Konjugaten endogener und exogener Substanzen katalysieren. Sie sind an der Biotransformation von etwa 10% der 200 meistverschriebenen Arzneistoffe in den USA beteiligt<sup>12</sup>. Zur Übertragung von Glucuronsäureresten auf Substrate, die Sauerstoff, Stickstoff, Schwefel oder Carboxylgruppen enthalten, benutzen sie Uridin-5'-diphosphatglucuronsäure (UDPGA)<sup>66,67</sup>. Die Substratspezifität ist aufgrund einer verhältnismäßig breiten Bindungstasche sehr groß; in vitro zeigen UGTs im Vergleich zu CYP-Enzyme relativ hohe  $K_m$ -Werte<sup>12</sup>. Häufig werden Substrate durch eine Überlappung der Substratspezifität über verschiedene UGTs verstoffwechselt<sup>68</sup>. Eine Ausnahme bildet Bilirubin, das fast ausschließlich über UGT1A1 glucuronidiert wird<sup>69,70</sup>. Weitere wichtige endogene Moleküle, die Glucuronidierungsreaktionen unterliegen, sind Steroide (Estradiol, Testosteron), Schilddrüsenhormone und Retinsäure<sup>68</sup>. Verschiedene Substanzen können als Inhibitoren<sup>12,71,72</sup> oder Induktoren<sup>73</sup> von UGTs fungieren, allerdings sind nur wenige Isoform-spezifische bekannt: so hemmt Hecogenin selektiv UGT1A4<sup>74</sup> und Fluconazol UGT2B7<sup>75,76</sup>. Diese Unspezifität, nicht nur im Hinblick auf Inhibitoren wie beispielsweise dem Urikosurikum Probenecid<sup>77</sup>, sondern auch auf Substrate, macht die Durchführung von selektiven in vivo Interaktionsstudien noch immer zu einer Herausforderung<sup>78</sup>.

Die gebildeten  $\beta$ -D-Glucuronide sind meist gut wasserlöslich und werden hierdurch leichter renal bzw. biliär eliminiert als die unkonjugierten Substanzen. Dies bedeutet, dass Glucuronidierungsreaktionen von Xenobiotika in der Regel eine Inaktivierung oder zumindest einen teilweisen Verlust der ursprünglichen Aktivität bewirken. Allerdings gibt es auch pharmakologisch aktive Glucuronide: hierzu gehört Morphin-6-glucuronid, welches eine vergleichbare analgetische Wirksamkeit besitzt wie Morphin selbst<sup>79</sup>.

UGTs werden wie CYP-Enzyme intrazellulär im endoplasmatischen Retikulum exprimiert, sind aber im Gegensatz zu den genannten Phase I-Enzymen nicht zum Cytosol hin, sondern luminal orientiert. Arzneistoffe müssen daher zunächst die Membran des endoplasmatischen Retikulums passieren, in der Regel durch passiven Transport. Die Nomenklatur der UGT-Superfamilie entspricht im Prinzip der der CYP-Enzyme. Im Menschen werden UGT1, UGT2, UGT3 und UGT8 exprimiert, wobei nur UGT1 und UGT2 an der Glucuronidierung endogener und exogener Substanzen beteiligt sind<sup>15</sup>. Es treten drei Subfamilien auf: UGT1A, UGT2A und UGT2B. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie aller UGTs in den C-terminalen 245 Aminosäuren wird der

Carboxylterminus als Bindungsstelle für UDPGA angesehen, während die N-terminale Domäne die nucleophile Substratspezifität bestimmt<sup>67</sup>.

Die Subfamilie UGT1A umfasst neun Mitglieder (UGT1A1, UGT1A3-10). Alle Mitglieder leiten sich von einem aus fünf Exons bestehenden Gen ab, wobei die Exons 2-5 identisch sind; Unterschiede liegen nur im N-Terminus vor<sup>67</sup>. Im Gegensatz dazu werden die einzelnen Enzyme von UGT2B individuell codiert und beinhalten sechs Exons<sup>80</sup>. Insgesamt sind 19 humane Enzyme bekannt<sup>80</sup>, die wichtigsten im humanen Arzneistoffmetabolismus sind UGT1A1, 1A3, 1A4, 1A6, 1A8, 2B4 und 2B7. Den größten Anteil übernimmt UGT2B7<sup>81</sup>. Die UGT-Subfamilien 1A und 2B sind zu ca. 1/7 am gesamten Arzneistoffmetabolismus beteiligt<sup>81</sup>.

Hauptexpressionsorte der UGTs für den Arzneistoffmetabolismus sind wie bei den CYP-Enzymen Leber und Darmwand, daneben treten verschiedene Enzyme signifikant in der Niere auf<sup>67</sup>. Die relativen Anteile verschiedener UGT-Enzyme in der Leber bzw. Gastrointestinaltrakt an der UGT-Gesamtexpression sind in Abb. 1.3 dargestellt. UGT2B7 ist an der Glucuronidierung von 35% der 200 meistverschriebenen Arzneistoffe in den USA beteiligt, weiterhin spielen UGT1A4 und UGT1A1 mit jeweils 20% und 15% eine herausragende Rolle<sup>12</sup>.

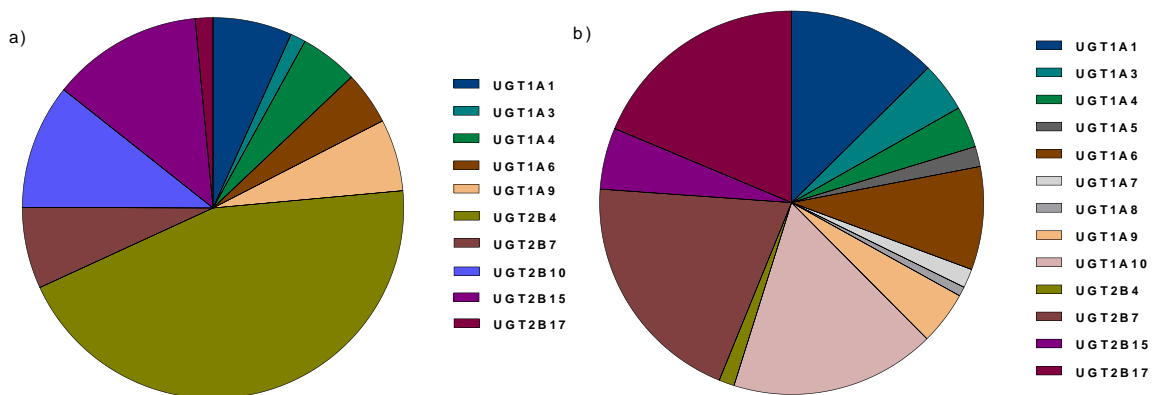


Abb. 1.3 Relative Expression humaner UGT-Enzyme a) in der Leber und b) im Duodenum<sup>82</sup>

Auch bei den UGTs schwankt die Enzymaktivität an den verschiedenen Expressionsorten interindividuell stark<sup>83,84</sup>. Zu erklären ist dies ebenfalls mitunter durch die polymorphe Expression verschiedener Enzyme<sup>85</sup>. Meist sind Polymorphismen bei UGTs jedoch nicht von klinischer Relevanz, da wie bereits erwähnt ein Substrat nur selten ausschließlich durch ein bestimmtes UGT umgesetzt wird<sup>15</sup>.

Nicht nur interindividuell, sondern auch in den verschiedenen Geweben variiert wie bei CYP-Enzymen die Expression der einzelnen UGT-Enzyme. Es gibt unterschiedliche Auffassungen zur

Beteiligung des Dünndarms im Verhältnis zur Leber am Metabolismus: So zeigten Pacifici et al., dass sich in vitro die maximale Umsatzrate der Morphin-Glucuronidierung in Leber und Dünndarm nur um den Faktor 2 unterschied<sup>86</sup>, während auch Unterschiede um den Faktor 10 beobachtet wurden<sup>87</sup>. Einigkeit besteht jedoch darüber, dass der Dünndarm auch bei der UGT-vermittelten präsystemischen Elimination eine wesentliche Rolle spielt<sup>83</sup>.

Insgesamt werden bei humanen UGT-Enzymen aufgrund ihrer breiten Substratspezifität und Überlappung hinsichtlich ihres Substratspektrums weniger Interaktionen beobachtet als bei CYP-Enzymen<sup>12</sup>. Auch die Untersuchung potentieller Interaktionen wird im Vergleich zum Cytochrom P450-System weniger ausführlich vorangetrieben, dies ist jedoch auch bedingt durch das Fehlen spezifischer Inhibitoren und Substrate.

#### **1.2.4 Bedeutung von Darmwand und Leber im humanen Arzneistoffmetabolismus**

Wird eine orale Arzneimitteltherapie durchgeführt, muss der Wirkstoff nach der Resorption in der Darmwand über die Portalvene zunächst die Leber passieren, um den systemischen Kreislauf zu erreichen. Sowohl in der Darmwand als auch in der Leber kann der betreffende Arzneistoff, sofern er Substrat eines dort exprimierten Enzyms ist, präsystemisch eliminiert werden (Abb. 1.4). Der Darmwand kommt hierbei eine besondere Bedeutung zu: beispielsweise reicht die intestinale Extraktion von Midazolam nach oraler Gabe prozentual an die hepatische heran (43% vs. 55%)<sup>18</sup>, und die intestinale intrinsische Clearance von glucuronidiertem Raloxifen<sup>88</sup> und glucuronidiertem Ezetimib<sup>89</sup> übersteigt jeweils in vitro die hepatische.

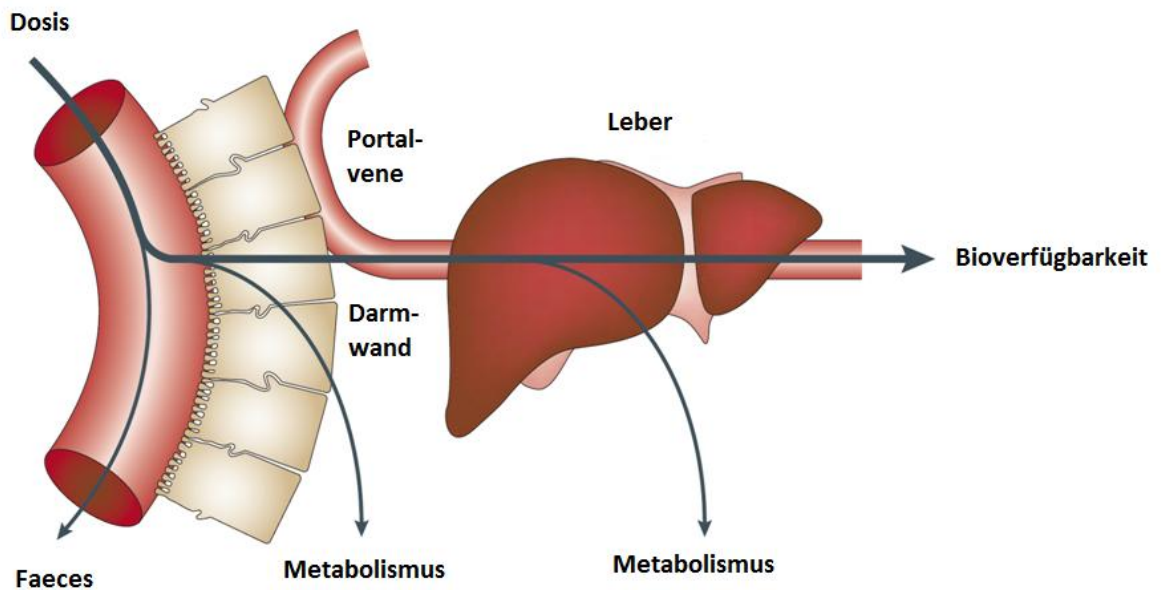


Abb. 1.4 Orte des Arzneistoffmetabolismus einer oral applizierten Substanz (modifiziert nach van de Waterbeemd<sup>90</sup>)

Neben CYP- und UGT-Enzymen sind auch weitere Enzymklassen wie beispielsweise Flavinmonooxygenasen (FMOs), Sulfotransferasen oder Acetyltransferasen an der Arzneistoffextraktion beteiligt, in dieser Arbeit werden allerdings ausschließlich CYPs und UGTs untersucht, sodass im Weiteren nicht mehr auf weitere Enzymklassen eingegangen wird.

Substanzen, die überwiegend parazellulär transportiert werden (in der Regel sehr kleine hydrophile Moleküle), werden weniger extrahiert als solche, die transzellulär transportiert werden. Dies ist in der intrazellulären Lokalisation von CYP-Enzyme und UGTs begründet. Durch die lipophilen Eigenschaften vieler Arzneistoffe tritt sehr häufig transzellulärer Transport auf<sup>91</sup>: Arzneistoffe treten hierbei zunächst auf der apikalen Seite der Zelle in Darmwand oder Leber ein, wandern durch das Cytosol und gehen schließlich über die basolaterale Seite der Zelle ins Blut über<sup>48</sup>. Hierbei werden sie dem Einfluss Fremdstoff-metabolisierender Enzyme im Zellinneren ausgesetzt<sup>27</sup>, wobei sich die physiologischen Eigenschaften der beiden Expressionsorte der wichtigsten Fremdstoff-metabolisierenden Enzyme unterscheiden und damit die Arzneistoffextraktion in unterschiedlichem Ausmaß beeinflussen. Dies wird in den folgenden Abschnitten dargestellt.

#### 1.2.4.1 Darmwand

##### *Physiologie und Morphologie*

Der Dünndarm setzt sich aus drei funktionell unterschiedlichen Regionen zusammen: dem Duodenum, dem Jejunum und dem Ileum. Die Dünndarmwand besteht aus vier Schichten: die Mucosa grenzt an das Darmlumen, hierauf folgen Submucosa, Muscularis und Serosa<sup>27</sup>. Zur optimalen Resorption und auch für die Exkretion und den Metabolismus von Stoffen weist die Darmwand durch Kerckring-Falten, Zotten und Krypten eine ausgeprägte Oberflächenvergrößerung auf. Das Zottenepithel besteht aus hochprismatischen Saumzellen und schleimbildenden Becherzellen. Über die Saumzellen (im Folgenden Enterozyten genannt), die an deren luminalen Seite zu einer weiteren Oberflächenvergrößerung einen Bürstensaum (Mikrovilli) aufweisen, werden Substanzen resorbiert<sup>27</sup>.

Die in der Darmwand lokalisierten Arzneistoff-metabolisierenden Phase I- und II-Enzyme sind in den Spitzen der Mikrovilli lokalisiert, in Richtung der Krypten nimmt die Konzentration ab<sup>29</sup>, sowohl in Becherzellen als auch in den Epithelzellen der Krypten ist keine Enzymaktivität nachweisbar<sup>92</sup>. Während die CYP-Konzentration vom Duodenum und Jejunum über Ileum und Colon hin abnimmt, variiert je nach UGT-Isoform deren Expression in den verschiedenen Darmabschnitten<sup>93</sup>. So ist die Menge an exprimiertem UGT1A4 und UGT2B4 im Colon deutlich höher als im Dünndarm, während UGT2B7 stärker im Dünndarm vertreten ist<sup>82</sup>.

##### *Einflussfaktoren auf die intestinale Arzneistoffextraktion*

Verschiedene Faktoren sind bei der intestinalen Extraktion eines Arzneistoffes von Bedeutung: hierzu gehören Enzymgehalt und die Konzentration des Arzneistoffs am Enzym selbst. Weiterhin beeinflusst bei oraler Applikation eher der mucosale als der intestinale Blutfluss die intrazelluläre Verweildauer einer Substanz und dadurch die Zeit, während der der Stoff den metabolisierenden Enzymen ausgesetzt ist<sup>29</sup>. Aus anatomischer Sicht ist dies auch plausibel, da die Enterozyten allein durch das in der Mucosa fließende Blut versorgt werden<sup>94</sup>, was 5-30% des intestinalen Blutflusses entspricht<sup>95-97</sup>. Dies erhöht wiederum die Aufenthaltsdauer von Arzneistoffen. Bei erhöhtem mucosalem Blutfluss sollte aufgrund einer verminderten Verweildauer der Substanz am Enzym dessen intestinale Extraktion reduziert und hierdurch dessen Bioverfügbarkeit erhöht werden. Auch die Anwesenheit von Nahrung im Darmlumen kann die Resorption, Sekretion und Motilität über lokale Nerven und chemische Substanzen stimulieren: so steigt nach einer Mahlzeit der Blutfluss in Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Chymus 30-130% über den Basalfluss<sup>48</sup>. Weiterhin können speziell kleine Moleküle aus den

aufsteigenden Arteriolen in die räumlich angrenzenden Venolen diffundieren und entkommen somit dem Einfluss metabolisierender Enzyme an den Spitzen der Zotten. Auch dies beeinflusst die intestinale Extraktion. Der Einfluss der Bindung einer Substanz an Proteine auf den intestinalen First-pass-Effekt wird unterschiedlich bewertet: So gehen Fisher und Labissiere davon aus, dass die Plasmaproteinbindung (PPB) bei der systemischen Clearance einer Substanz berücksichtigt werden sollte, nicht jedoch bei der ersten intestinalen Extraktion, da die Substanz in der äußeren Enterozytenschicht, welche CYP-Enzyme und weitere Fremdstoff-metabolisierende Enzyme enthält, noch nicht auf plasmaproteinbindende Komponenten getroffen ist<sup>98</sup>. Andererseits kann nach Hall et al. eine hohe Proteinbindung die Clearance innerhalb der Enterozyten unter der Voraussetzung beeinflussen, dass die Substanz über die systemische Zirkulation zum Ort der Metabolisierung gelangt, was bei der ersten Resorption aus dem Darmlumen jedoch keine Rolle spielt, sodass das Ausmaß des Metabolismus eine Funktion der totalen intrazellulären Konzentration ist. Dies wurde für den Midazolam-Metabolismus via CYP3A von Hall et al. bestätigt<sup>16</sup>. Zu ähnlichen Schlussfolgerungen kamen Yang et al.<sup>99</sup>. Prinzipiell wird davon ausgegangen, dass der Anteil der intestinalen Extraktion nach i.v. Gabe einer Substanz vernachlässigt werden kann; so liegt der Anteil des Dünndarms an der Midazolam-Extraktion nach dessen i.v. Applikation unter 10%<sup>100</sup>. Eine Sättigung des Darmwandmetabolismus ist grundsätzlich möglich, vor allem während der ersten Darmpassage, bei der die lokalen Arzneistoffkonzentrationen im Lumen der Darmwand sehr hoch sind; möglich sind Konzentrationen bis in den mM-Bereich. Verstärkt wird dies durch eine hohe Permeabilität und Löslichkeit der applizierten Substanz<sup>100</sup>. Weiterhin sind zahlreiche Transportproteine wie beispielsweise der Effluxtransporter P-Glykoprotein (P-gp) in der apikalen Membran der Enterozyten<sup>101,102</sup> an der Arzneistoffextraktion beteiligt. Während zahlreiche Untersuchungen zu intestinalen CYP-Enzymen durchgeführt wurden, gibt es weniger Informationen zum relativen Anteil intestinaler UGTs an der Gesamtheit der Glucuronidierungsreaktionen in vivo<sup>103</sup>.

#### **1.2.4.2 Leber**

##### *Physiologie und Morphologie*

Die Leber ist das zentrale Fremdstoff-metabolisierende Organ des Menschen. Die Expression verschiedener Phase I- und II-Enzyme ist im Vergleich zu anderen Organen hier am höchsten<sup>29</sup>. Jeder oral applizierte Arzneistoff muss vor dem Erreichen des systemischen Kreislaufs die Leber passieren. Ein Arzneistoff erreicht mit dem Blut über die Portalvene schlussendlich die Leberläppchen, die das hepatische Gewebe ausmachen. Im Querschnitt erscheinen die Leber-

läppchen sechseckig und haben ein Gefäß in deren Zentrum (Zentralvene). Die Leberläppchen selbst beinhalten die Hepatozyten, welche sternförmig um die Zentralvene angeordnet sind. Zwischen den Hepatozyten verlaufen die Lebersinusoiden, erweiterte Kapillarräume des Lebergewebes, in denen das aus der Peripherie kommende Blut in Richtung der Zentralvene und weiter in die Schaltvenen fließt. Diese gehen in die Sammelvenen über und diese wiederum in die Venae hepaticae<sup>104,105</sup>. Schlussendlich fließt das Blut über die untere Hohlvene ab. Wie die Enterozyten weisen Hepatozyten zahlreiche Mikrovilli für eine optimale Aufnahme von endogenen und exogenen Stoffen auf<sup>106</sup>. Hepatozyten sind polarisierte Zellen: die apikale Membran bildet jeweils mit einer benachbarten Zellmembran ein Gallenkanälchen, in die Gallenflüssigkeit sezerniert wird. Die basolaterale Seite ist für den Stoffaustausch mit dem Blut verantwortlich. Die in dieser Dissertationsarbeit behandelten Fremdstoff-metabolisierenden Enzyme CYPs und UGTs sind innerhalb der Hepatozyten am glatten endoplasmatischen Retikulum speziell zu deren apikaler Seite hin lokalisiert. Neben Diffusion tragen auch zahlreiche Transportproteine zu einem regen Austausch von Stoffen in die Zelle und aus ihr heraus bei<sup>106</sup>.

#### *Einflussfaktoren auf die hepatische Arzneistoffextraktion*

Verschiedene Faktoren, die bereits im Zusammenhang mit der Arzneistoffextraktion im Dünndarm angesprochen wurden, spielen auch im hepatischen Metabolismus eine Rolle. Im Folgenden werden die wichtigsten benannt.

Ein großer Einflussfaktor ist der hepatische Blutfluss. Dieser ist mit rund 1,6 L/min für eine 75 kg schwere Person im Vergleich zum intestinalen Blutfluss (0,300 L/min bei 75 kg) deutlich höher<sup>107</sup>, sodass die Verweilzeit eines Arzneistoffs an den Enzymen in der Leber vergleichsweise kurz ist<sup>100</sup>. Allerdings ist die Permeabilität der Hepatozyten höher als die der Enterozyten, was ein Grund dafür sein könnte, dass der Anteil der intestinalen systemischen Extraktion im Vergleich zur hepatischen vernachlässigbar ist<sup>36</sup>. Auch die Plasmaproteinbindung besitzt Einfluss auf die hepatische Extraktion, da nur ungebundener Arzneistoff in die Hepatozyten aufgenommen und enzymatisch umgesetzt werden kann. Im Gegensatz zum intestinalen First-pass-Effekt spielt dieser Faktor auch bei der ersten Leberpassage eine Rolle<sup>37</sup>.

### **1.3 Enzyminhibition**

Häufig treten Interaktionen infolge einer Enzyminhibition auf<sup>3</sup>. Hierbei wird zwischen verschiedenen Inhibitionstypen unterschieden. Bei der vermutlich am häufigsten auftretenden reversiblen Hemmung<sup>25</sup>, die auf einer schnellen Assoziation und Dissoziation der Substanz mit dem

Enzym beruht, kommt es zu einer Wechselwirkung zwischen Inhibitor und Enzym, bei der der Inhibitor enzymatisch umgesetzt werden kann, aber nicht zwangsläufig umgesetzt werden muss. So ist Quinidin *in vitro*<sup>108,109</sup> und *in vivo*<sup>110</sup> ein potenter CYP2D6-Inhibitor, wird allerdings selbst über CYP3A4 umgesetzt<sup>111–113</sup>. Das Enzym geht bei diesem Hemmtyp aus der Interaktion unverändert hervor und ist weiterhin aktiv. Dieser Inhibitionsmechanismus tritt beispielsweise bei der gleichzeitigen Gabe der Antidepressiva Imipramin und Fluoxetin auf<sup>114</sup>, an deren Metabolismus CYP2D6 beteiligt ist. Die kompetitive Hemmung ist der am weitesten häufigsten auftretende Inhibitionstyp der reversiblen Hemmung und typischerweise ein schnell ablaufender und dosisabhängiger Prozess<sup>25,29</sup>. Die reversible Enzyminhibition kann einerseits in einer erhöhten Bioverfügbarkeit resultieren, andererseits kann auch die Substrat-Clearance vermindert sein. Die Wiederherstellung der Baseline-Clearance des betroffenen Arzneistoffs und der Maximal-effekt der Inhibition hängen hierbei von der Eliminationshalbwertszeit der betroffenen Substanz und des Inhibitors ab.

Ein weiterer Inhibitionsmechanismus ist die sehr stabile Komplexbildung eines enzymatisch gebildeten reaktiven Metaboliten mit dem Enzym. Dieser Hemmtyp ist auch unter dem Begriff mechanismusbasierte Inhibition (*mechanism-based inhibition*, MBI) bekannt. Für die Wiederherstellung der Enzymaktivität ist eine Neuexpression des Enzyms notwendig.<sup>115</sup> Makrolidantibiotika wie Clarithromycin<sup>116</sup> und Erythromycin<sup>117</sup> zeigen dieses Phänomen bei CYP3A4, Paroxetin ist ein MBI von CYP2D6<sup>118</sup>. Ein Beispiel für die nur selten auftretende bzw. wenig untersuchte mechanismusbasierte Inhibition von UGTs ist die kovalente Bindung von Ketoprofenacylglucuronid an UGT2B7 *in vitro*<sup>119</sup>.

Ein dritter Cytochrom P450-spezifischer Hemmmechanismus wird durch die irreversible Bindung einer Imidazol- oder Hydrazinstruktur an das Hämprotein des CYP-Enzyms hervorgerufen. So wird durch die kovalente Bindung des Imidazolrings in Cimetidin eine unselektive Hemmung verschiedener CYP-Enzyme hervorgerufen<sup>120</sup>.

### **1.3.1 Methoden zur Abschätzung des inhibitorischen Potentials von Arzneistoffen**

Zur quantitativen Beurteilung von Arzneistoffinteraktionen können verschiedene Modelle herangezogen werden: Man unterscheidet zwischen statischen sowie dynamischen Modellen, bei den statischen wird weiterhin zwischen einfachen und mechanistischen Modellen differenziert. Die FDA gibt eine gute Übersicht insbesondere zur Charakterisierung einer potentiellen Inhibition von CYP-Enzymen in der Leitlinie „Drug Interaction Studies — Study Design, Data



Analysis, Implications for Dosing, and Labeling Recommendations“<sup>121</sup>. Zur Bewertung der klinischen Relevanz von Arzneistoffinteraktionen während der frühen Entwicklung von neuen Arzneistoffen werden Cut-off-Werte herangezogen. Diese beziehen sich auf das Verhältnis der Flächen unter den Konzentrations-Zeit-Kurven (engl. *area under the curve*, AUC) AUCR eines sensitiven Probesubstrats in An- und Abwesenheit des Inhibitors. Wird der Schwellenwert nicht überschritten, kann gegebenenfalls auf weitere Untersuchungen der Interaktion z.B. durch klinische Studien verzichtet werden.

Zunächst gibt es das einfache statische Modell (Basismodell). Der hiermit ermittelbare R-Wert ist nur abhängig von in vitro Inhibitionsparametern (bei reversibler Inhibition  $K_i$ ) und der maximalen ungebundenen Inhibitorkonzentration  $[I]$ , die in vivo mit der höchsten klinischen Dosis in verschiedenen Geweben erreicht werden kann<sup>121</sup>, s. Gl. 1.1<sup>122</sup>.

$$R = 1 + \frac{I}{K_i} \quad \text{Gl. 1.1}$$

$I$  ist hierbei die Inhibitorkonzentration,  $K_i$  die Inhibitionskonstante. Entsprechende Gleichungen existieren für die „mechanism-based inactivation“.

Überschreitet der R-Wert einen Schwellenwert von 1,1 ist die Wahrscheinlichkeit für eine CYP-Inhibition durch die interagierende Substanz wahrscheinlich<sup>123</sup>. Für oral applizierte Inhibitoren von in der Darmwand ausgeprägt exprimierten Enzymen wie beispielsweise CYP3A sollte die Inhibitorkonzentration nach Gl. 1.2 verwendet werden, da ausgehend vom einfachen statischen Modell die Inhibitorkonzentration in der Darmwand  $I_{\text{gut}}$  die maximale Inhibitorkonzentration besser widerspiegelt als die systemische<sup>124</sup>:

$$[I] = I_{\text{gut}} = \frac{\text{molare Dosis}}{250 \text{ ml}} \quad \text{Gl. 1.2}$$

$I_{\text{gut}}$  ergibt sich aus der applizierten molaren Dosis des Inhibitors mit 250 ml Flüssigkeit<sup>124</sup>. Der Cut-off-Wert liegt in diesem Fall bei 11.

Solch einfache Basismodelle sind allerdings meist nicht in der Lage, genaue Prädiktionen zu liefern und neigen in der Regel zu einer Überschätzung.

Mechanistisch-statische Modelle ermöglichen eine genauere quantitative Vorhersage einer Arzneistoffinteraktion<sup>125</sup>. Hier gehen zusätzliche Informationen des Substrates in das Modell ein. Insbesondere werden Darmwandextraktion sowie Anteile unterschiedlicher Abbauewege des Substrats (die sog. Fraktionen  $f_m$  der systemischen Clearance des Substrats über das betrachtete CYP-Enzym) berücksichtigt. Das vorgeschlagene Modell von Fahmi et al.<sup>125</sup> kombiniert weiterhin verschiedene Interaktionsmechanismen (Induktion und Inhibition) für die interagierenden Substanzen. In Gl. 1.3 ist die Berechnung des Verhältnisses der AUCs mit und ohne dem Einfluss eines potentiellen Inhibitors bei vorliegender reversibler Hemmung dargestellt (abgewandelt nach Fahmi et al. und FDA<sup>121,125</sup>):

$$AUCR = \frac{1}{\left(1 + \frac{[I]_g}{K_i}\right) \cdot (1 - F_g) + F_g} \cdot \frac{1}{\left(1 + \frac{[I]_h}{K_i}\right) \cdot f_m + (1 - f_m)} \quad \text{Gl. 1.3}$$

$F_g$  ist die verfügbare Fraktion nach intestinalem Metabolismus,  $f_m$  ist die Fraktion der systemischen Clearance des Substrats über das betrachtete CYP-Enzym, „g“ und „h“ kennzeichnen Darmwand und Leber. Der Cut-off-Wert liegt in einem Bereich zwischen 0,8 (Induktion) und 1,25 (Inhibition) als Grenze wie beim Bioäquivalenzkriterium<sup>126</sup> und kann zum Ausschluss weiterer Untersuchungen dienen.

So wie einfache statische Modelle liefern auch mechanistische statische Modelle lediglich Punktschätzer einer Interaktion unter der Annahme einer konstanten, also über den Zeitverlauf durchschnittlich vorliegenden oder maximalen Inhibitorkonzentration<sup>126</sup> und denselben in vitro-Inhibitionsparametern innerhalb einer Population, die sich hinsichtlich der Enzymexpression nicht unterscheidet. Da sich durch sich über die Zeit die Inhibitorkonzentration am Enzym verändert und hierdurch auch die Inhibition variabel ist, sowie weiterhin durch interindividuelle Unterschiede in Enzymaktivität und -expression, ergibt sich eine ausgeprägte Unsicherheit in Bezug auf das Ausmaß der Inhibition bei verschiedenen Individuen<sup>125</sup>.

Dynamische Modelle erlauben die Abbildung einer dynamischen Inhibition über den zeitlichen Verlauf durch Berücksichtigung des Konzentrationsprofils des Inhibitors<sup>127</sup> sowie die Auswirkung der Wechselwirkung auf ausgewählte Populationen durch Simulation<sup>128,129</sup>. Bei den dy-

namischen Modellen gibt es verschiedene Ansätze, man unterscheidet *top-down*- von *bottom-up*-Modellen.

Werden beobachtete Daten zur Entwicklung von mehr oder weniger empirischen Kompartiment-Modellen benutzt, spricht man vom *top down*-Ansatz<sup>130</sup>. Dieser ist auch unter dem Namen PopPK-Ansatz bekannt und kann insbesondere zur Identifikation von Kovariaten (Einflussfaktoren auf die Plasmakonzentration wie beispielsweise Komedikation) herangezogen werden, die einen Teil der Variabilität zwischen Individuen erklären können. Der PopPK-Ansatz ist in der Regel allerdings nicht zur Untersuchung des Effekts eines Inhibitors auf andere Substrate als in den Studien eingesetzt geeignet<sup>121</sup>. *Bottom up*-Modelle (physiologisch-basierte pharmakokinetische (PBPK)-Modelle) integrieren dagegen anatomische und physiologische Strukturen in das Modell ebenso wie physikochemische Substanzeigenschaften sowie metabolische Verteilung. In vitro ermittelte metabolische Parameter ( $K_i$ ,  $K_m$ ,  $V_{max}$ ,  $CL_{int}$ ) werden mit physiologischen Populationsparametern (Gewebestruktur, Gewebenvolumen sowie assoziiertem Blutfluss) verknüpft<sup>131</sup>. Mechanistische dynamische Modelle ermöglichen eine individuelle Schätzung der Interaktion durch die Integration interindividueller Variabilitäten (z.B. Unterschiede in Enzymexpression und -aktivität)<sup>125</sup> und dem vollständigen pharmakokinetischen Profil von Substrat und Inhibitor in den Modellalgorithmus. Dies ermöglicht die Schätzung des Ausmaßes des Interaktionspotentials über die Zeit in unterschiedlichen klinischen Szenarien (z.B. unterschiedliche Dosierungen), was wiederum hilfreich bei der Vorhersage von Interaktionen und der Planung von Studien durch die Testung unterschiedlicher Studiendesigns ist.

## 1.4 Voriconazol

Das seit 2002 unter dem Handelsnamen Vfend® auf dem Markt befindliche Voriconazol gehört zu den Triazolantimykotika und hat sich in der Therapie invasiver Aspergillosen, Candidämien (bei nicht neutropenischen Patienten), Fluconazol-resistenten schweren invasiven Candidainfektionen und durch *Scedosporium* spp. und *Fusarium* spp. hervorgerufene schwere Mykosen etabliert<sup>132</sup>. Nach oraler Gabe zeigt es nach schneller und nahezu vollständiger Resorption eine 96%-ige Bioverfügbarkeit<sup>133</sup>. Das Verteilungsvolumen von Voriconazol beträgt 4,6 L/kg Körpergewicht im Steady State, die Plasmaproteinbindung ist mit ca. 58% wenig ausgeprägt<sup>134</sup>. Die terminale Halbwertszeit ist dosisabhängig und beträgt bei der oralen Gabe von 200 mg ca. 6 Stunden<sup>132</sup>.

Antimykotika mit Azolstruktur inhibieren die Cytochrom P450-abhängige 14- $\alpha$ -Sterol-Demethylase (CYP51), welche einen essentiellen Schritt in der Ergosterolbiosynthese katalysiert<sup>135</sup>. Hierdurch kommt es zu einer Akkumulation von 14- $\alpha$ -Methyl-Sterol (=Lanosterol) und damit zu einer verminderten Bildung von Ergosterol, einem essentiellen Zellmembranbestandteil von Pilzen. Die Anhäufung des Zwischenprodukts 14- $\alpha$ -Methyl-Sterol soll weiterhin zu einer Störung der Membranstruktur und –funktion und hierdurch zu einer Hemmung des Pilzwachstums führen<sup>136</sup>. Auf molekularer Ebene greift der nucleophile Stickstoff des Triazolrings am Häm-Eisen des Enzyms an<sup>137</sup>, die Seitenkette des Azols geht eine Wechselwirkung mit der Polypeptidstruktur ein<sup>138</sup>.

Voriconazol zeigt wie alle Azolantimykotika Interaktionen mit verschiedenen CYP-Enzymen des Menschen: es wirkt stark hemmend auf CYP3A, CYP2B6, CYP2C9 und CYP2C19, allerdings ist die Hemmung nicht so ausgeprägt wie bei Ketoconazol oder Itraconazol<sup>139</sup>. Azolantimykotika sind allgemein bekannt als eine „*interactive class of agents*“<sup>4</sup>, neben CYP-Enzymen werden auch weitere Systeme durch Azolantimykotika in ihrer Aktivität beeinflusst: so ist Itraconazol ein P-gp-Inhibitor<sup>140,141</sup>; Ketoconazol, Fluconazol und Itraconazol zeigen zusätzlich inhibitorisches Potential gegenüber verschiedenen UGT-Enzymen<sup>142–147</sup>. Voriconazol scheint in vivo kein Inhibitor von P-gp zu sein<sup>140,141</sup>. Informationen zum inhibitorischen Potential gegenüber UGTs sind für Voriconazol bisher nicht verfügbar.

Voriconazol wird selbst unter anderem über Enzyme des Cytochroms P450-Systems verstoffwechselt: überwiegend sind CYP3A4 und CYP2C19 beteiligt, zu einem geringen Anteil CYP2C9<sup>148</sup>. Bei niedrigen Voriconazol-Konzentrationen (niedriger  $\mu\text{M}$  Bereich) wird das N-oxid in vitro vorwiegend über CYP2C19 gebildet, der  $K_m$ -Wert liegt bei 8,1  $\mu\text{M}$ ; bei höheren Konzentrationen (mM Bereich) spielt CYP3A4 eine bedeutende Rolle ( $K_m$  835  $\mu\text{M}$ )<sup>148</sup>. Daneben ist auch CYP2C9 an der Bildung des N-oxids beteiligt, jedoch nur untergeordnet in Humanen Lebermikrosomen (HLM)<sup>148</sup>.

Neben CYP-Enzymen sind FMOs, hier vorwiegend FMO3<sup>149</sup>, beteiligt. Auch glucuronidierte Produkte werden ausgeschieden (Abb. 1.5). Nur ca. 2% einer Dosis werden unverändert renal eliminiert<sup>134</sup>. Die interindividuelle Variabilität der Pharmakokinetik ist groß, mitunter aus dem Grund, dass das hauptsächlich am Metabolismus beteiligte Enzym CYP2C19<sup>148</sup> einen genetischen Polymorphismus aufweist<sup>150</sup>. Infolge einer Sättigungskinetik ist die Pharmakokinetik von Voriconazol nicht linear, und der Metabolismus ist komplex: durch Biotransformation werden acht verschiedene Metabolite<sup>151</sup> gebildet (s. Abb. 1.5), wobei mit 72% hauptsächlich Voriconazol-N-oxid zirkuliert. Daneben kommt es häufig zu einer

Hydroxylierung des Fluoropyrimidinrings (12% einer Dosis finden sich im Urin wieder) bzw. der Methylgruppe mit sich anschließender Glucuronidierung (16% bzw. 6% einer Dosis werden im Urin wiedergefunden)<sup>134</sup>.

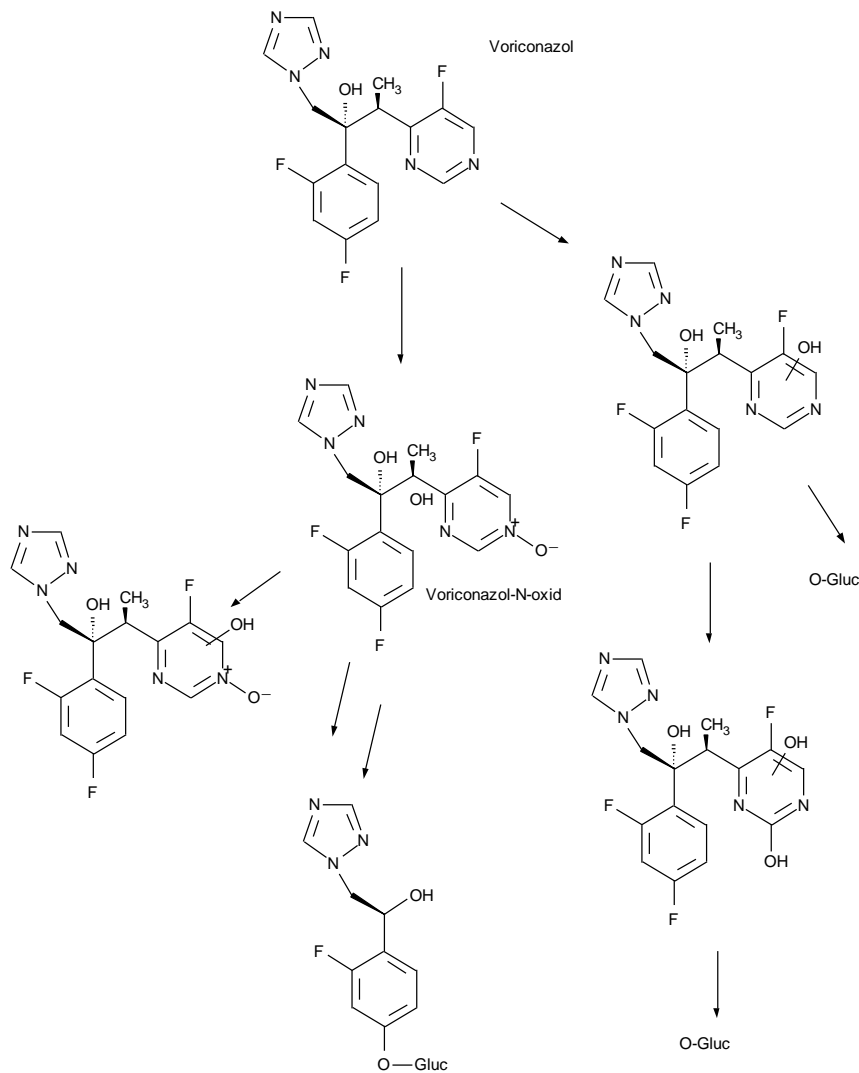


Abb. 1.5 Metabolismus von Voriconazol (modifiziert nach Roffey et al.<sup>134</sup>, Scholz et. al.<sup>152</sup>)

Durch den anteiligen Metabolismus über die genannten Enzyme (mit Ausnahme von CYP2B6) bewirkt Voriconazol eine Hemmung seines eigenen Abbaus. Nach einer Veröffentlichung der US-amerikanischen Arzneimittelzulassungsbehörde Food and Drug Administration (FDA) besitzt der im Plasma zirkulierende Voriconazol-Hauptmetabolit Voriconazol-N-oxid ähnliche inhibitorische Eigenschaften auf das Cytochrom P450-System wie die Muttersubstanz<sup>151</sup>. Ge-

naue Zahlen zur Charakterisierung der CYP-Inhibition durch Voriconazol-N-oxid wurden bisher jedoch nicht publiziert. Allgemein besitzen auch einige Metabolite inhibitorische Eigenschaften, die sich signifikant auf die Pharmakokinetik und –dynamik einer Arzneimitteltherapie auswirken können. So zeigen beispielsweise in vitro verschiedene Metabolite von Itraconazol (u.a. Hydroxyitraconazol, ein bekannter Itraconazol-Metabolit in vivo) ein ähnliches bzw. sogar stärker ausgeprägtes inhibitorisches Potential als Itraconazol selbst<sup>153</sup>, was möglicherweise einen starken Einfluss auf die beobachtete Inhibition von CYP3A4 nach Itraconazol-Gabe in vivo hat.

Da Voriconazol in oralen und parenteralen Formulierungen verfügbar ist, und die hohe orale Bioverfügbarkeit<sup>133</sup> die Möglichkeit bietet, zwischen oraler und i.v. Gabe zu wechseln, wurde die Substanz bereits wiederholt als Modell-Inhibitor in CYP3A-Interaktionsstudien eingesetzt<sup>154,155</sup>, von der FDA wird Voriconazol als in vivo Inhibitor von CYP3A gelistet<sup>156</sup>. Die Tatsache, dass Voriconazol sowohl oral als auch i.v. appliziert werden kann, eröffnet zusätzlich die Option, durch ein passendes Studiendesign genauer zwischen der Aktivität von CYP3A in Darmwand und Leber zu differenzieren. Unklar ist, ob Voriconazol und dessen N-oxid auch hemmend auf Phase II-Enzyme (UGTs) wirken.

#### **1.4.1 Untersuchung des inhibitorischen Potentials von Voriconazol anhand des Midazolam-Metabolismus**

Da Patienten, die systemisch mit Azolantimykotika therapiert werden, in der Regel sehr krank sind und noch weitere Komedikation erhalten, sind sie ohnehin einem erhöhten Interaktionspotential ausgesetzt. Das Verständnis von Prinzipien hinter Arzneistoffinteraktionen ist entscheidend für die Vorhersage potentieller Wechselwirkungen mit neuen, aber auch etablierten Substanzen im klinischen Alltag<sup>4</sup>.

Zu einer genaueren Untersuchung des Inhibitionspotentials von Voriconazol gegenüber CYP3A sowie UGT2B4 und UGT2B7, wichtigen Phase II-Enzymen, wurde Midazolam als Modellsubstrat herangezogen. Midazolam stellt ein etabliertes CYP3A-Substrat dar und wird standardmäßig bei klinischen Studien und in vitro zur Untersuchung von CYP3A eingesetzt<sup>157-161</sup>.

Midazolam ist in zahlreichen oralen und parenteralen Formulierungen auf dem Markt. Nach oraler Gabe wird es schnell und vollständig resorbiert, maximale Plasmakonzentrationen werden innerhalb von 30 Minuten erreicht. Die Plasmaproteinbindung liegt bei 96-98%, das Verteilungsvolumen bei 50-60 L<sup>162</sup>. Midazolam weist eine starke präsystemische Elimination auf.

Nur 30-50% einer applizierten Dosis werden tatsächlich bioverfügbar<sup>154</sup>. Bei der intestinalen Extraktion ist die interindividuelle Variabilität größer als bei der hepatischen; dies verdeutlicht die variable CYP3A-Expression im Darm. Die Eliminationshalbwertszeit liegt zwischen 1,5 und 2,5 Stunden, die Plasmaclearance bei 300-500 mL/min<sup>162</sup>.

Midazolam unterliegt einer ausgeprägten Biotransformation über CYP3A<sup>55,157,163</sup> und UGTs, weniger als 1% einer applizierten Dosis werden unverändert mit dem Harn ausgeschieden<sup>19,164</sup> (s. Abb. 1.6). Hauptsächlich wird 1'-OH-Midazolam gebildet, von dem 60-80% einer applizierten Midazolam-Dosis innerhalb von 24 Stunden als entsprechendes Glucuronid renal eliminiert wird<sup>165</sup>. Der Hauptmetabolit zeigt ebenfalls pharmakodynamische Aktivität<sup>165</sup>, allerdings entspricht diese nur etwa 10% der von Midazolam, und durch die unmittelbare Glucuronidierung nach der Bildung von 1'-OH-Midazolam ist der Effekt vernachlässigbar. Neben 1'-OH-Midazolam entstehen 4-OH-Midazolam sowie 1,4-Dihydroxymidazolam, die ebenfalls zu 3% bzw. 1% einer gegebenen Dosis als Glucuronidkonjugate ausgeschieden werden<sup>165,166</sup>. Bei den Phase II-Reaktionen sind UGT2B4 und UGT2B7 hauptsächlich an der O-Glucuronidierung beteiligt, während UGT1A4 die direkte N-Glucuronidierung katalysiert<sup>167,168</sup>.

Durch die Verwendung von Midazolam als Modellsubstrat eröffnet sich durch dessen CYP- und UGT-vermittelten Metabolismus die zusätzliche Option, den Einfluss von Voriconazol und dessen Hauptmetabolit auf ausgewählte UGTs zu untersuchen. Die Möglichkeit der oralen und i.v. Gabe beider Substanzen ermöglicht zusätzlich eine differenziertere Untersuchung der Enzymaktivitäten an beiden Hauptexpressionsorten Arzneistoff-metabolisierender Enzyme, Darmwand und Leber.

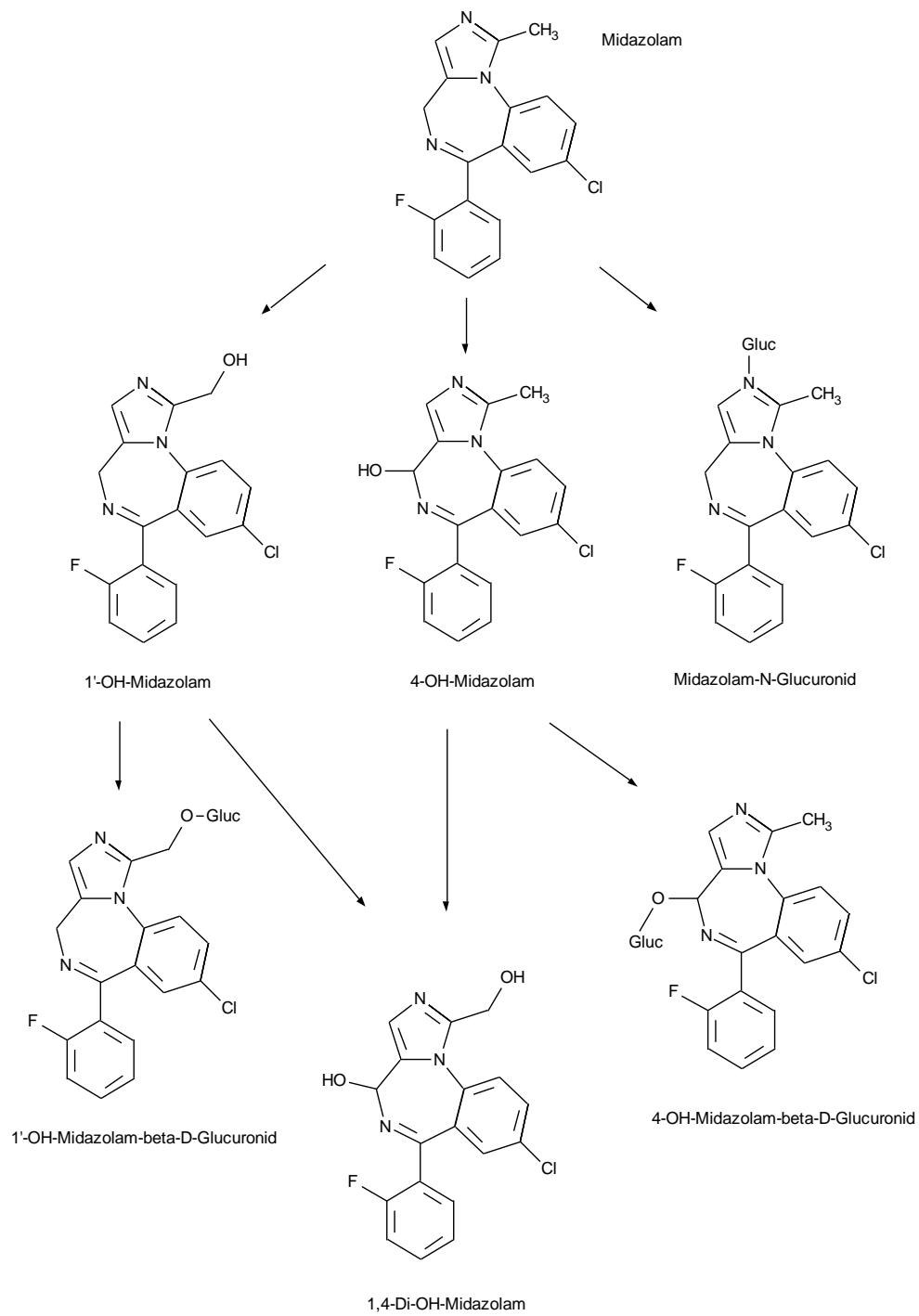


Abb. 1.6 Metabolismus von Midazolam ( nach Hyland et al., Wandel et al., Vossen et al. <sup>168-170</sup>)



## 2 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die detaillierte Untersuchung der Inhibitionseffekte von Voriconazol und Voriconazol-N-oxid auf ausgewählte CYP- und UGT-Enzyme an deren wichtigsten Expressionsorten. Dies diente dazu, die durch Voriconazol im klinischen Alltag hervorgerufene Wechselwirkungen einordnen bzw. verhindern zu können.

Weiterhin sollte überprüft werden, ob Voriconazol inhibierend auf UGT-Enzyme, die quantitativ wichtigsten Phase II-Enzyme, wirkt. Bisher wurde dies nicht untersucht. Folgende Punkte waren daher Teil des Dissertationsprojekts:

Im ersten Teil wurden *in silico* Daten einer klinischen Interaktionsstudie von Saari et al.<sup>154</sup> aus dem Jahre 2006 mit Voriconazol als CYP3A-Inhibitor und Midazolam als etabliertem CYP3A-Substrat mit Hilfe der Software NONMEM® reanalysiert. Diese Reanalyse sollte dazu beitragen, den zeitlichen Verlauf der CYP3A-Inhibition in Darmwand und Leber zu schätzen und somit zwischen der Enzymaktivität an beiden Expressionsorten genauer zu differenzieren. Ziel war die Entwicklung eines semiphysiologischen populationspharmakokinetischen Modells zur Beschreibung der komplexen Interaktion zwischen Midazolam und Voriconazol unter Berücksichtigung gemessener Voriconazol-, Midazolam- und 1'-OH-Midazolam-Konzentrationen.

Aufgrund spärlicher Datenlage wurden im zweiten Teil der Dissertation *in vitro*-Studien durchgeführt, bei denen Midazolam und Voriconazol bzw. Voriconazol-N-oxid mit CYP3A inkubiert wurden, um Inhibitionskonstanten  $K_i$  präzisieren zu können. Ferner wurde untersucht, ob Voriconazol und Voriconazol-N-oxid auch die für die Glucuronidierung von 1'-OH-Midazolam verantwortlichen UGT-Isoenzyme 2B4 und 2B7 hemmen.

Das Studiendesign der veröffentlichten Studie<sup>154</sup> war nicht auf eine quantitative Differenzierung zwischen der CYP3A-Aktivität in Darmwand und Leber ausgelegt. Aus diesem Grund wurde am Institut für Pharmakologie der Uniklinik Köln als Teil dieser Dissertationsarbeit eine klinische Studie mit angepasstem Studiendesign durchgeführt, bei der Voriconazol und Midazolam als kontinuierliche Infusionen in drei verschiedenen Studienphasen appliziert wurden. Im Anschluss an den klinischen Abschnitt der Studie wurden als Teil der Dissertation Quantifizierungsmethoden für Midazolam, 1'-OH-Midazolam, 4-OH-Midazolam, Voriconazol und Voriconazol-N-oxid im Plasma und Midazolam und dessen Metaboliten in Urin entwickelt und validiert. Nachfolgend wurden durch die Quantifizierung von Plasma- und Urinkonzentrationen Daten für die Erstellung eines Modells generiert, das lokale Konzentrationen von Sub-

strat und Inhibitor an beiden Hauptexpressionsorten, Darmwand und Leber, schätzen und das Ausmaß der Interaktion mit einer in vivo Inhibitionskonstante quantifizieren kann.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Referenzsubstanzen

Midazolam-Hydrochlorid	BUFA B.V., Uitgeest, NL
1'-Hydroxymidazolam	Toronto Research Chemicals, Toronto, USA
4-Hydroxymidazolam	Toronto Research Chemicals, Toronto, USA
1'-Hydroxymidazolam- $\beta$ -D-glucuronid	Toronto Research Chemicals, Toronto, USA
Diazepam	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Diclofenac-Na-Salt	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Voriconazol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ketoconazol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Voriconazol- <i>N</i> -oxid	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Labetalol-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

#### 3.1.2 Reagenzien

Ammoniumacetat ( $\geq 99\%$ )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ammoniumformiat ( $\geq 98\%$ )	Fluka Chemie AG, Buchs, CH
Acetonitril (LiChrosolv <sup>®</sup> gradient grade for LC)	Merck KGaA, Darmstadt
Ameisensäure ( $\geq 98\%$ p.a.)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
$\beta$ -Glucuronidase Typ H-1 (3854000 U/g)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
CYP3A4 Supersomes <sup>™</sup>	Corning Inc, Corning, NY, USA
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Humane Lebermikrosomen 20 mg/mL	Corning Inc, Corning, NY, USA
Methanol (ROTISOLV <sup>®</sup> , $\geq 99,95\%$ , LC-MS grade)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
NADPH Solution A	Corning Inc, Corning, NY, USA
NADPH Solution B	Corning Inc, Corning, NY, USA
Natriumchlorid ( $\geq 99,5\%$ )	Merck KGaA, Darmstadt
Milli-Q <sup>®</sup> -Wasser	Millipore, Billerica, USA
Salzsäure	Merck KGaA, Darmstadt

Phosphorsäure (Rotipuran 85%)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
TRIS (Pufferan <sup>®</sup> , ≥ 99,9%, p.a.)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
UGT Reaction Mix Solution A	Corning Inc, Corning, NY, USA
UGT Reaction Mix Solution B	Corning Inc, Corning, NY, USA
UGT2B4 Supersomes™	Corning Inc, Corning, NY, USA
UGT2B7 Supersomes™	Corning Inc, Corning, NY, USA

### 3.1.3 Hergestellte Puffer und Lösungen

Ammoniumacetatpuffer 0,2 mM, pH 4,75

Zur Herstellung von 1 L 0,2 mM Ammoniumacetatpuffer (pH 4,75) wurden 15,46 mg Ammoniumacetat eingewogen und in 1 L Wasser gelöst. Die Einstellung auf einen pH-Wert von 4,75 erfolgte mit Essigsäure (98-99%). Der Puffer wurde bei +4°C gelagert.

Ammoniumformiat-Lösung 10 mM/0,1% Ameisensäure in ACN (50:50) (mobile Phase)

Zur Herstellung von 1 L 10 mM Ammoniumformiat-Lösung wurden 0,63 g Ammoniumformiat in 1L Millipore Wasser gelöst. 1 L 0,1% Ameisensäure (HCOOH) wird erhalten durch die Mischung von 1 mL HCOOH mit 999 mL Acetonitril (ACN). Jeweils 500 mL beider Lösungen wurden miteinander vermischt.

0,1% Ameisensäure (mobile Phase)

Zur Herstellung von 1L 0,1% Ameisensäure (HCOOH) wurde 1 mL HCOOH mit 999 mL Millipore Wasser vermischt.

0,1% Ameisensäure in ACN (mobile Phase)

Zur Herstellung von 1L 0,1% Ameisensäure (HCOOH) wurde 1 mL HCOOH mit 999 mL ACN vermischt.

Natriumchlorid-Lösung 0,2%

Zur Herstellung von 100 mL Natriumchlorid-Lösung 0,2% wurden 0,2 g Natriumchlorid (NaCl) eingewogen und in 100 mL Millipore Wasser gelöst

### β-Glucuronidase-Lösung

Zur Herstellung von β-Glucuronidase-Lösung wurde das lyophilisierte Enzym vom Typ H-1 in 0,2%iger NaCl-Lösung in einer Konzentration von 3200 U/mL gelöst. Die Lösung wurde nach Aliquotierung bis zu ihrer Verwendung bei –20°C gelagert.

### Kaliumphosphatpuffer 0,1M pH 7,5

Um einen 0,1 M Kaliumphosphat – Puffer herzustellen wurden 13,97 g (80,24 mmol) Dikaliumhydrogenphosphat ( $K_2HPO_4$ ) und 2,7 g (19,81 mmol) Kaliumdihydrogenphosphat ( $KH_2PO_4$ ) zunächst in Millipore Wasser gelöst. Hiernach erfolgte die pH-Wert-Einstellung auf 7,5 mit *ortho*-Phosphorsäure und das Auffüllen auf ein Endvolumen von 1 L mit Millipore Wasser.

### Tris-HCl-Puffer 0,1 M pH 7,5

Für die Herstellung von 100 mL eines 0,1 M Tris – HCl-Puffers wurden 1,2114 g Tris zunächst in wenig Millipore Wasser gelöst und durch Zugabe von HCl mit Hilfe eines pH – Meters auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt. Hiernach wurde auf das Endvolumen mit Millipore Wasser aufgefüllt.

## 3.1.4 Geräte

Analysenwaage	Discovery DV215CD, Trögeler Wägetechnik GmbH, Wuppertal
Eismaschine	ZBE 110-35, Ziegra–Eismaschinen, Isernhagen
HPLC-Säulen	<u>Voriconazol/Voriconazol-N-oxid</u> sowie <u>Midazolam/1'-OH-Midazolam/4-OH-Midazolam-Analytik</u> Hypersil Gold (50 x 2,1mm, 5 μm), Thermo Electron, Runcorn, UK Security Guard (4 x 2,0 mm), Phenomenex, Torrance, CA, USA <u>1'-OH-Midazolam-β-D-Glucuronid-Analytik</u> Synergi Polar RP-Säule (250 x 2,0mm, 4μm), Phenomenex, Torrance, CA, USA Security Guard (4 x 2,0 mm), Phenomenex, Torrance, CA, USA <u>Cocktail-Analytik</u> Discovery® RP Amide C16 (50 x 2.1 mm, 5 μm), Supelco Analytical, Bellefonte, USA

Zentrifugen	Security Guard (4 x 2,0 mm), Phenomenex, Torrance, CA, USA Heraeus Labofuge 400 R, Thermo Electron, Dreieich mini Spin plus, Eppendorf, Hamburg Z383K, Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen
pH-Meter	Microprozessor pH 323, WTW GmbH, Weilheim
Pipetten	ErgoOne (2,5 µL, 10 µL, 20 µL, 100 µL, 1 000 µL, 5.000 µL), Starlab GmbH, Hamburg
Kühlschränke	AEG ARCTIS (-20°C), AEG, Frankfurt am Main SANYO VIPTM SERIES (-80°C), SANYO Canada, Inc., Ontario, Canada
Ultraschallbad	Transsonic 780, Elma GmbH & Co. KG, Singen
Vortex-Mixer	Vortex Genie 2, Scientific Industries, New York, USA
Wasseraufbereitung	Milli-Q <sup>®</sup> plus, Millipore, Eschborn
Wasserbad	OLS 200, Grant Instruments, Cambridgeshire, GB
LC-MS/MS-System	<u>Voriconazol/Voriconazol-N-oxid sowie Midazolam/1'-OH-Midazolam/4-OH-Midazolam-Analytik</u> Autosampler: Surveyor Autosampler LC-Pumpe: Surveyor MS Pump MS/MS-Detektor: TSQ-Quantum Steuerungssoftware: Finnigan Xcalibur 1.3 Quantifizierungssoftware: LCQuan 1.2 Thermo Finnigan, San Jose, USA <u>1'-OH-Midazolam-β-D-Glucuronid- und Cocktail-Analytik</u> Autosampler: HTC PAL Autosampler, CTC analytics, Zwingen, BL, CH) LC-Pumpe: Agilent 1200 Pumpe, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA MS/MS-Detektor: API 5000, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA Steuerungs- und Quantifizierungssoftware: Analyst 1.6.2, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

### 3.1.5 Verbrauchsmaterialien

Eppendorf Reagiergefäß (1,5 mL, 2 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Falcon Tubes (15 mL, 50 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Li <sup>+</sup> -Heparin-Monovetten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
SCREW TOP VIAL KIT 1.5 mL	Thermo Fischer Scientifics Inc., Waltham, USA
Urin-Monovetten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Urin-Röhrchen 10mL	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

### 3.1.6 Software

Analyst 1.6.2	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Graphpad Prism 6.01	Graphpad Software Inc., San Diego, CA, USA
LC Quan Version 1.3	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Microsoft Office 2007	Microsoft Corporation, Redmond, USA
NONMEM 7.2.0	ICON Development Solutions, Ellicott City, MD, USA
Perl speaks NONMEM (PsN) 4.2.0	Free Software Foundation, Boston, MA, USA
Pirana 2.9.0	Pirana Software & Consulting BV
R 3.0.2	R Core Team, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, A
Simcyp Version 12	Simcyp Limited, Sheffield, UK
Xcalibur Version 1.3	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA

## 3.2 Validierung analytischer Methoden

Die Validierung einer analytischen Methode dient zur Beschreibung und Dokumentation der Leistungsmerkmale einer Methode. Verschiedene Qualitätskriterien werden hierzu untersucht<sup>171</sup>: Selektivität, Kalibrierbereich und Quantifizierungsgrenze (engl. *lower limit of quantification*, LLOQ), Linearität, Wiederfindung, Richtigkeit, Präzision, Stabilität sowie Matrixeffekte.

### 3.2.1 Selektivität

Bei der Selektivitätsmessung wird untersucht, ob die betreffenden Analyte ohne Störung durch weitere in der Probe enthaltene Stoffe analysiert werden können. Dies bedeutet, dass zu der erwarteten Retentionszeit eines Analyten keine Detektorsignale auftreten, wenn kein Analyt in der Probe enthalten ist. Hierzu werden zum einen Leerproben vermessen (diese enthalten weder Analyt noch internen Standard (IS)), zum anderen solche, die den zu untersuchenden Analyt in der niedrigsten Konzentration enthalten sowie andere potentiell in der Probe enthaltene Stoffe wie andere Analyte in hoher Konzentration. Bei biologischen Matrices wie Urin oder Plasma werden Leerproben sowie Proben mit Matrix aus sechs unterschiedlichen Quellen im Triplikate hergestellt und vermessen. Eine Methode ist selektiv, wenn das Detektorsignal (in diesem Fall die Peakfläche bei der für den jeweiligen Analyt typischen Retentionszeit) für den betreffenden Analyt in der Leerprobe im Vergleich zur Probe weniger als 20% beträgt und für den IS weniger als 5%.

### 3.2.2 Kalibrierbereich und untere Quantifizierungsgrenze (LLOQ)

Zur Erstellung der Kalibriergerade wird in der Regel ein linearer Zusammenhang zur Beschreibung des Verhältnisses zwischen der Konzentration und dem Detektorsignal gewählt. Die Linearität wird anhand von fünf während der Validierung der Quantifizierungsmethode unabhängig voneinander erstellten Kalibriergeraden beurteilt. Der Korrelationskoeffizient der Gerade sollte  $\geq 0,99$  sein. Weiterhin wird im Normalfall ein Wichtungsfaktor für die Datenpunkte ( $1/x$ ) herangezogen, da oft in größeren Kalibrierbereichen (untere und obere Quantifizierungsgrenze (*upper limit of quantification*, ULOQ) unterscheiden sich um mehr als Faktor 10) Homoskedasdität nicht vorliegt. Eine Kalibriergerade wird aus zwei Sätzen Kalibrierproben (EPs) mit mindestens sechs verschiedenen Konzentrationen erstellt. Mindestens 75% der Datenpunkte müssen hierbei folgende Kriterien erfüllen:

- Abweichung  $< 20\%$  vom Sollwert an der LLOQ
- Abweichung  $< 15\%$  vom Sollwert für alle anderen Konzentrationen.

### 3.2.3 Wiederfindung

Die Wiederfindung (engl. *recovery*) beschreibt das Detektorsignal durch eine der Matrix zuge-setzten Substanzmenge im Vergleich zum Detektorsignal durch eine in der Regel einer wässrigen Lösung zuge-setzten Substanzmenge (s. Gl. 3.1).



$$\text{Wiederfindung} = \frac{\overline{x}_{\text{Ist}} (\text{Matrix})}{\overline{x}_{\text{Ist}} (\text{Wasser})} \cdot 100 [\%] \quad \text{Gl. 3.1}$$

Messungen erfolgen jeweils dreifach bei niedriger, mittlerer und hoher Konzentration des Analyten.

### 3.2.4 Richtigkeit und Präzision

Die Richtigkeit (engl. *accuracy*) beschreibt die Übereinstimmung des Messwertes zum nominalen Wert. Die Richtigkeit wird als relativer Fehler (RE) in Prozent angegeben (s. Gl. 3.2) und kann Aufschluss über systematische Fehler geben.

$$RE [\%] = \frac{C_{\text{gemessen}} - C_{\text{nominal}}}{C_{\text{nominal}}} \cdot 100 \quad \text{Gl. 3.2}$$

Die Präzision (engl. *precision*) einer Messmethode beschreibt die Übereinstimmung wiederholter Messungen unter identischen Bedingungen. Somit kann die Reproduzierbarkeit einer Methode überprüft werden. Die Präzision wird als relative Standardabweichung (RSD) in Prozent angegeben (s. Gl. 3.3).

$$RSD [\%] = \frac{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}}{\bar{x}} \cdot 100 \quad \text{Gl. 3.3}$$

Getestet werden Präzision und Richtigkeit innerhalb einer Messung (Intraday-Messung) und an unterschiedlichen Tagen (Interday-Messung).

### 3.2.5 Stabilität

Bei den Stabilitätsmessungen wird untersucht, wie sich unterschiedliche Lagerungsbedingungen auf die Proben und damit auf die Messergebnisse auswirken. Hierzu werden in der Regel folgende Lagerungsbedingungen getestet:

- Stabilität nach Lagerung bei 4°C (dies entspricht der Temperatur im Autosampler)
- Stabilität nach Lagerung bei Raumtemperatur (RT) bzw. für die Probenaufarbeitung typische Temperatur
- Stabilität nach dreimaligem Einfrieren und Auftauen (engl. *freeze-thaw* (FT))

Die so aufgearbeiteten Proben werden gegen frisch aufgearbeitete Proben vermessen und die relative Abweichung der mittleren Ist-Konzentration nach Prüfung der entsprechenden Bedingungen zur mittleren Ist-Konzentration der jeweiligen Referenzproben (DEV) bestimmt (Gl. 3.4):

$$DEV (\%) = \frac{\bar{x}_{Test} - \bar{x}_{Referenz}}{\bar{x}_{Referenz}} \cdot 100 \quad \text{Gl. 3.4}$$

### 3.2.6 Matrixeffekte

Matrixeffekte spielen besonders bei massenspektrometrischen Methoden eine Rolle. Hierbei wird untersucht, ob es zu einer direkten oder indirekten Veränderung im Detektorsignal durch potentiell in der Matrix enthaltene Substanzen kommt. Verwendet wird hierzu Matrix aus mindestens verschiedenen Quellen bei Betrachtung niedriger (maximal 3x LLOQ) und hoher Analytkonzentrationen (nahe der ULOQ). Hierzu wird zunächst der Matrixfaktor (MF) der Analyten und des IS mit unterschiedlichen Matrixquellen bestimmt (s. Gl. 3.5).

$$MF = \frac{\text{mittlere Peakfläche in Anwesenheit der Matrix}}{\text{mittlere Peakfläche in Abwesenheit der Matrix}} \cdot 100 [\%] \quad \text{Gl. 3.5}$$

Hiernach wird ein auf den IS normalisierter Matrixfaktor bestimmt (Gl. 3.6).

$$(\text{auf IS normalisierter MF}) = \frac{MF (\text{Analyt})}{MF (\text{IS})} \quad \text{Gl. 3.6}$$

Die RSD (Gl. 3.7) des auf den IS normalisierten MF (berechnet für die Proben aus sechs verschiedenen Quellen) sollte <15% sein.

$$RSD [\%] = \frac{\text{Standardabweichung des auf IS normalisierten MF}}{\text{mittlerer auf IS normalisierter MF}} \cdot 100 \quad \text{Gl. 3.7}$$

## 3.3 Populationspharmakokinetische Datenanalyse

### 3.3.1 Populationspharmakokinetik

Im Unterschied zur nichtkompartimentellen Datenanalyse (engl. *non-compartmental approach*, NCA) bedient sich die modellbasierte Populationspharmakokinetik der Nutzung von Verteilungsräumen (Kompartimenten), deren Massenflüsse die Übergänge von einem in ein anderes Kompartiment widerspiegeln, um pharmakokinetische Parameter für bestimmte Gruppen von Individuen zu schätzen. Solche Kompartimentmodelle können durch Differentialgleichungen (oder nach Integration durch polyexponentielle Terme) beschrieben werden. Bei der klassischen nicht-kompartimentellen Analyse werden viele Datenpunkte benötigt (sog. *dense data*), eine weitere Voraussetzung ist das Vorliegen einer linearen Pharmakokinetik (PK) des betreffenden Arzneistoffs. Bei der kompartimentellen Datenanalyse im Populationsansatz können je nach verwendeter Methode auch bei nur wenigen vorliegenden Daten (sog. *sparse data*) und nichtlinearem Verhalten einer Substanz Vorhersagen für deren Pharmakokinetik gemacht werden<sup>172</sup>. Weiterhin können auch Daten aus verschiedenen Quellen zusammen ausgewertet werden. Der populationspharmakokinetische Ansatz umfasst ein oder mehrere der folgenden Charakteristika<sup>173</sup>:

- die Erfassung relevanter pharmakokinetischer Informationen von Individuen, die für eine bestimmte Zielpopulation repräsentativ sind
- die Identifizierung und Quantifizierung von Quellen für Variabilität wie beispielsweise interindividuelle oder intraindividuelle Varianzkomponenten
- die Erklärung der Variabilität durch Identifizierung von Faktoren, die das pharmakokinetische Verhalten eines Arzneistoffs beeinflussen (hierzu gehören demografische, umweltbedingte, pathophysiologische oder Medikamenten-assoziierte Faktoren)
- die Quantifizierung der Restvariabilität in einer Population.

Grundlage für die Entwicklung populationspharmakokinetischer Modelle ist der Einsatz gemischter Modelle. Gemischte Modelle setzen sich aus sogenannten fixen (*fixed effects*) und zufälligen Effekten (*random effects*) zusammen. Unter fixen Effekten sind die typischerweise zu erwartenden Werte der pharmakokinetischen Parameter in der Population zu verstehen. Hierzu zählen auch Effekte durch Kovariaten wie Körpergröße, -gewicht oder Geschlecht. Die zufälligen Effekte quantifizieren den Anteil der pharmakokinetischen Variabilität, der nicht durch die fixen Effekte erklärt werden kann. Gemeint ist hiermit die interindividuelle und

intraindividuelle Variabilität einer Population. Allgemein werden zwei Methoden zur Abschätzung von fixen und zufälligen Effekten angewendet: Bei der Two-Stage-Methode werden in einem ersten Schritt die pharmakokinetischen Parameter für jedes Individuum separat abgeschätzt. Im zweiten Schritt werden die Parameter-Schätzer der verschiedenen Individuen in einer deskriptiven statistischen Analyse zur Ermittlung von Populationsmittelwert, Varianz und Kovarianz der Parameter verwendet. Der Einsatz der Two-Stage-Methode erfordert viele Datenpunkte.

Bei nur wenigen vorliegenden Daten können nichtlineare gemischte Modelle (*nonlinear mixed effects modelling*, NLME) eingesetzt werden. Dieser Ansatz kann in einem Schritt die typischen Werte für PK-Parameter eines nichtlinearen Regressionsmodells sowie interindividuelle Unterschiede in der betreffenden Population bestimmen. Zur Parameterschätzung können hierbei verschiedene Algorithmen verwendet werden. Die am meisten verbreitete Methode ist die Maximum Likelihood-Schätzung: durch wiederholtes Verändern der Werte für einzelne Parameter wird schließlich der Wert ausgewählt, der die Beobachtungen am wahrscheinlichsten beschreibt<sup>173</sup>.

Ein weiterer Vorteil des Einsatzes nichtlinearer gemischter Modelle ist die Möglichkeit der Testung verschiedener Studiendesigns (unterschiedliche Applikationsarten oder Dosierungen) durch Simulation. So kann beispielsweise auch untersucht werden, inwieweit sich die zeitlich versetzte Gabe einer Substanz auf die Pharmakokinetik einer anderen Substanz auswirkt. Prinzipiell gilt das soeben Beschriebene auch für die Abschätzung pharmakodynamischer Parameter, was in dieser Dissertationsarbeit jedoch nicht im Fokus stand.

In dieser Arbeit wurde die erstmals von Beal und Sheiner beschriebene NLME-Methode mit der Software NONMEM® verwendet. Ein nichtlineares Regressionsmodell (Populationsmodell) setzt sich aus Strukturmodell, statistischem Modell und optional einem Kovariatenmodell zusammen. Die fixen Effekte werden hierbei durch das Struktur- (und Kovariaten-)modell beschrieben, die zufälligen Effekte durch das statistische Modell.

### **3.3.2 Physiologisch-basierte pharmakokinetische Modellierung**

Durch die Integration physiologischer Elemente können physiologisch-basierte populationspharmakokinetische Modelle (PBPK-Modelle) entwickelt werden, die sich den tatsächlichen Merkmalen des menschlichen Körpers (z.B. hepatischer Blutfluss, Organe als Kompartimente) annähern und physikochemische Eigenschaften der getesteten Substanz (z.B. log P, pKa, Löslichkeit) bzw. in vitro ermittelte Daten wie Proteinbindung oder intrinsische

Clearance ( $CL_{int}$ ) berücksichtigen. Diese Art der Modellierung vereint zwei sich gegenseitig beeinflussende Komponenten und kann hierdurch die in vivo Situation simulieren. Dies wiederum führt zu einer exakteren Abschätzung von Effekten einer Substanz als bei Verwendung klassischer populationspharmakokinetischer Modelle, sodass PBPK-Modellierungen zunehmend in den Fokus in der Arzneistoffentwicklung rücken<sup>174</sup>. Klassischerweise beschreiben PBPK-Modelle die Resorption, Verteilung, Metabolismus und Elimination einer Substanz in einem Organismus mit Hilfe von Massenbilanz-Gleichungen in einem geschlossenen Kreislaufsystem mit Kompartimenten, die Organe repräsentieren<sup>175</sup>. Bei diesen Modellen wird angenommen, dass sie *well-stirred* sind, das heißt, dass die Substanz innerhalb des Organs (z.B. der Leber) gleichmäßig verteilt ist, indem alle Parenchymzellen einer homogenen Arzneistoffkonzentration ausgesetzt sind<sup>29</sup>. Die Verteilung einer Substanz in die verschiedenen Kompartimente ist weniger permeabilitätslimitiert, sondern perfusionslimitiert<sup>175</sup>. Jedes der integrierten Kompartimente hat einen assoziierten Blutfluss, ein bestimmtes Verteilungsvolumen und jede Substanz weist einen definierten Gewebeverteilungskoeffizienten auf.

Die systemisch verfügbare Fraktion  $F_G$  ist das Produkt aus der in die Darmwand resorbierten Fraktion ( $F_a$ ), der Fraktion, die nach der Darmpassage verfügbar ist ( $F_{gut}$ ) und der Fraktion nach der ersten Leberpassage ( $F_H$ ). Die Fraktion  $F_H$  einer Substanz, die der hepatischen Extraktion entgeht, wird mit Gl. 3.8 berechnet:

$$F_H = \frac{Q_H}{Q_H + CL_{int,H} \cdot f_{u,B}} \quad \text{Gl. 3.8}$$

$Q_H$  ist hierbei der hepatische Blutfluss,  $f_{u,B}$  die freie Arzneistofffraktion im Blut,  $CL_{int,B}$  stellt die intrinsische metabolische Clearance der ungebundenen Substanz in der Leber dar<sup>29</sup>. Zur Beschreibung der Arzneistoff-Clearance in der Darmwand wurde das  $Q_{gut}$ -Modell<sup>99</sup> eingesetzt: Dieses ähnelt dem *well-stirred* Modell der Leber, berücksichtigt allerdings, dass sich die Darmwand hinsichtlich ihrer zellulären Zusammensetzung und Lokalisation der Enzyme von der Leber unterscheidet. Aus diesem Grund ist der villöse Blutfluss ( $Q_{villi}$ ) von größerer Bedeutung als der intestinale Gesamtblutfluss. Zur Ermittlung der verfügbaren Fraktion eines Arzneistoffs aus dem Darm  $F_{gut}$  wird Gl. 3.9 herangezogen, wobei sich  $Q_{gut}$  aus Gl. 3.10 ergibt:

$$F_{gut} = \frac{Q_{gut}}{Q_{gut} + f_{u,g} \cdot CL_{int,g}} \quad \text{Gl. 3.9}$$

$$Q_{gut} = \frac{Q_{villi} \cdot CL_{perm}}{Q_{villi} + CL_{perm}} \quad \text{Gl. 3.10}$$

$CL_{perm}$  ist hierbei die Clearance, die die Permeabilität durch den Enterozyten darstellt,  $f_{u,g}$  ist die ungebundene Arzneistoff-Fraktion im Enterozyten,  $Q_{gut}$  ist ein Hybridparameter aus  $CL_{perm}$  und  $Q_{villi}$ <sup>99</sup>.

Bei den in dieser Arbeit entwickelten Modellen handelt es sich nicht um klassische *whole body* PBPK-Modelle wie beispielsweise bei Peters<sup>176</sup>, sondern nur die Organe mit zentraler Bedeutung für die Arzneistoff-Extraktion, Darmwand und Leber, wurden als klassische Kompartimente integriert. Zusätzlich wurde ein Portalvenenkompartiment verwendet, um die physiologischen Prozesse exakter abbilden zu können. Die verschiedenen Blutflüsse wurden ebenso wie weitere physiologische Parameter und physikochemische Eigenschaften der betrachteten Substanzen der Literatur entnommen (s. Tab. 3.1 und Tab. 3.23).

### 3.3.3 Modellentwicklung

#### *Strukturmodell*

Das Strukturmodell gibt den charakteristischen Verlauf der abhängigen Variablen (z.B. gemessene Plasmakonzentrationen) in Bezug auf die unabhängigen Variablen (z.B. Zeit, Dosis) wieder. Der Zusammenhang wird über die Funktion  $f(\Theta_i, x_{ij})$  in Abhängigkeit von unabhängigen Variablen  $x_{ij}$  (z.B. Zeitpunkt  $j$ ) und dem Vektor der Modellparameter  $\Theta$  des  $i$ -ten Individuums modelliert.

#### *Statistisches Modell*

Das statistische Modell beschreibt die zufällige bzw. nicht erklärbare Variabilität der einzelnen PK-Parameter in der Population, also die zufälligen Effekte. Wie bereits erwähnt wird bei den zufälligen Effekten zwischen interindividueller Variabilität (IIV), intraindividuelle Variabilität (Interoccasion-Variabilität, IOV) und Rest- oder Residualvariabilität differenziert.

Die IIV lässt sich auf verschiedene Weise ins Modell integrieren, zu den gängigen Fehlermodellen gehören das additive, das proportionale sowie das exponentielle Fehlermodell. Die Wahl des Fehlermodells hängt von den Eigenschaften der Daten ab. Sehr oft sind die pharmakokinetischen Parameter log-normalverteilt, also rechtsschief verteilt. Aus diesem Grund und auch weil so ausschließlich positive Parameterwerte generiert werden, wird das exponentielle IIV-Modell am häufigsten verwendet (Gl. 3.11):

$$\phi_{ki} = \vartheta_k \cdot e^{\eta_{ki}} \quad \text{Gl. 3.11}$$

$\eta_{ki}$  entspricht der Differenz der natürlichen Logarithmen von  $\phi_{ki}$  und  $\vartheta_k$ , wie in Gl. 3.12 dargestellt:

$$\eta_{ki} = \ln(\phi_{ki}) - \ln(\vartheta_k) \quad \text{Gl. 3.12}$$

Der individuelle k-te Parameter  $\phi_{ki}$  des i-ten Individuums weicht um einen zufälligen Wert  $\eta_{ki}$  vom typischen Parameter  $\vartheta_k$  der Population ab. Es wird angenommen, dass die Abweichungen ( $\eta_{ki}$ ) um den Erwartungswert Null mit einer Varianz von  $\omega_k^2$  verteilt ist, wobei  $\omega_k^2$  ein Diagonalelement der Varianz-Kovarianz-Matrix  $\Omega$  ist. Durch Abschätzung des entsprechenden nichtdiagonalen Elements  $\omega_{k,k+1}$  können Korrelationen von Diagonalelementen der  $\Omega$ -Matrix bestimmt werden. Die Nicht-Diagonalelemente stellen die Kovarianzen dar (s. Gl. 3.13).

$$\Omega = \begin{pmatrix} \omega_k^2 & \\ \omega_{k,k+1} & \omega_{k+1}^2 \end{pmatrix} \quad \text{Gl. 3.13}$$

Auch innerhalb eines Individuums können bei mehrmaliger Applikation der Studienmedikation beispielsweise verschiedene Plasmakonzentrationen gemessen werden, was bei der Abschätzung der PK-Parameter zu unterschiedlichen Werten führen kann. PK-Parameter können sich in Abhängigkeit von der Zeit verändern, z.B. durch den Einfluss von Alter, Krankheitsverlauf oder Komedikation. Die so entstehende zufällige Variabilität kann in ein Modell integriert werden, indem eine zeitabhängige Komponente der Variabilität eine weitere Abweichung vom typischen Wert zulässt<sup>177</sup>. Die intraindividuelle Variabilität (IOV, Variabilität von Applikation zu Applikation) kann in das Modell durch einen zusätzlichen Variabilitätsparameter integriert werden (Gl. 3.14):

$$\phi_{k iq} = \vartheta_k \cdot e^{\eta_{ki} + \kappa_{k iq}} \quad \text{Gl. 3.14}$$

$\phi_{k iq}$  ist der k-te Parameter  $\vartheta_k$  des i-ten Individuums für die q-te Applikation. Der eingefügte Zufallsparameter  $\kappa_{k iq}$  ist mit einer Varianz um den Mittelwert 0 normalverteilt.

Auch die Restvariabilität, die beispielsweise Fehler in der Analytik oder in der Dokumentation der tatsächlichen Probennahmezeitpunkte beinhaltet, kann mit Hilfe verschiedener Fehlermodelle ausgedrückt werden. Das additive, proportionale und das aus beiden soeben erwähnten bestehende kombinierte Fehlermodell werden am häufigsten verwendet. Verändert sich die Varianz über den kompletten Messbereich nicht, kann das additive Fehlermodell angewendet werden (Gl. 3.15):

$$y_{ij} = f(\boldsymbol{\phi}_i, x_{ij}) + \varepsilon_{ij} \quad \text{Gl. 3.15}$$

Steigen die Abweichungen der gemessenen von den geschätzten Werten der abhängigen Variablen proportional zu ihren Werten an, findet das proportionale Fehlermodell Anwendung (Gl. 3.16):

$$y_{ij} = f(\boldsymbol{\phi}_i, x_{ij}) \cdot (1 + \varepsilon_{ij}) \quad \text{Gl. 3.16}$$

Wenn die Differenzen zwischen  $y_{ij}$  und  $f(\boldsymbol{\phi}_i, x_{ij})$  exponentiell in Abhängigkeit von  $f(\boldsymbol{\phi}_i, x_{ij})$  ansteigen, kann der Restfehler mit Hilfe eines exponentiellen Fehlermodells beschrieben werden (Gl. 3.17):

$$y_{ij} = f(\boldsymbol{\phi}_i, x_{ij}) \cdot e^{\varepsilon_{ij}} \quad \text{Gl. 3.17}$$

Ein kombiniertes Fehlermodell wird durch die Verknüpfung von additivem und proportionalem Fehlermodell erhalten (Gl. 3.18):

$$y_{ij} = f(\boldsymbol{\phi}_i, x_{ij}) \cdot (1 + \varepsilon_{1,ij}) + \varepsilon_{2,ij} \quad \text{Gl. 3.18}$$

Sind die Werte der abhängigen Variablen sehr klein, verhält sich dieses Fehlermodell wie ein additives Fehlermodell, bei höheren Werten wie ein proportionales. Grundannahme bei allen vorgestellten Restfehlermodellen ist, dass die Parameter  $\varepsilon_{ij}$  normalverteilt um den Mittelwert 0 und einer Varianz  $\sigma^2$  sind. Die Varianz  $\sigma^2$  wird durch das Populationsmodell abgeschätzt und bildet das Diagonalelement der  $\Sigma$ -Matrix, spiegelt also das Ausmaß der Restvariabilität wider.



### *Kovariatenmodell*

Verschiedene Faktoren können pharmakokinetische Parameter beeinflussen. Dieser Einfluss kann mit Hilfe von Kovariatenmodellen im Gesamtmodell ausgedrückt werden. Hiermit können IIV erklärt werden. Kovariaten werden zu den fixen Effekten gezählt.

### *Gesamtpopulationsmodell*

Durch die Zusammenfassung von Strukturmodell, statistischem und Kovariatenmodell ergibt sich ein allgemeines Gesamtpopulationsmodell (Gl. 3.19):

$$y_{ijq} = f(g(\boldsymbol{\theta}_i, \mathbf{z}_i, \boldsymbol{\eta}_i, \boldsymbol{\kappa}_{iq}) x_{ij}) + \varepsilon_{iqj} \quad \text{Gl. 3.19}$$

Vereinfachend wurden in Gl. 3.19 additive Fehlermodelle angewandt. Der Wert  $y$  des  $i$ -ten Individuums ergibt sich aus der Funktion  $f$  zum  $j$ -ten Zeitpunkt und dem Restfehler  $\varepsilon_{iqj}$ .  $g$  ist eine Funktion, die den Zusammenhang zwischen den Populationswerten, den zufälligen Effekten  $\boldsymbol{\eta}_i$  und  $\boldsymbol{\kappa}_{iq}$  sowie den Kovariaten  $\mathbf{z}_i$  beschreibt.

### **3.3.4 Methoden zur Modellabschätzung**

Die Verwendung von NLME zielt darauf ab, für vorliegende Beobachtungen ein Modell mit Parameter-Werten zu entwickeln, die diese bestmöglich beschreiben. Bei nichtlinearen Modellen gibt es allerdings keine eindeutige Lösung, weshalb ein sich schrittweise in wiederholten Rechengängen der exakten Lösung annäherndes Verfahren benutzt wird, um zu Parameterwerten zu gelangen, die die Daten am wahrscheinlichsten beschreiben. Im verwendeten Programm NONMEM® wird dies durch die globale Minimierung der objektiven Funktion der kleinsten Abweichungsquadrate erreicht. Der Ausdruck ist erweitert um einen Strafterm, der ansteigende Varianzen während der Minimierung berücksichtigt und wird als objektiver Funktionswert (OFV) bezeichnet (Gl. 3.20). Mit Hilfe dieser Funktion können fixe und zufällige Effekte in einem Schritt optimiert werden<sup>178</sup>:

$$OFV = \left[ \frac{(y_i - f(\boldsymbol{\phi}_i, x_i))^2}{var(\mathbf{y}_i)} + \ln(var(\mathbf{y}_i)) \right] \quad \text{Gl. 3.20}$$

$N$  ist die Größe der Population,  $\mathbf{y}_i$  der Beobachtungsvektor des  $i$ -ten Individuums,  $f(\mathbf{y}_i, x_i)$  ist der Schätzvektor und  $var(\mathbf{y}_i)$  die Matrix der Gesamtvarianz der Beobachtungen des  $i$ -ten Individuums. Da die zufälligen Effekte eine Nichtlinearität der OFV herbeiführen, können nur unter

Verwendung iterativer Methoden NLME-Parameter abgeschätzt werden. Verschiedene Algorithmen in NONMEM® können zur Ermittlung des OFV herangezogen werden. Die einfachste Methode ist die *first-order-estimation* (FO)-Methode, bei der eine Taylor-Entwicklung 1. Ordnung bezüglich der Zufallsvektoren  $\boldsymbol{\eta}_i$  um seinen Erwartungswert  $\boldsymbol{\eta}_i=0$  abgeleitet wird. Hierbei wird eine Funktion an einen bestimmten Punkt  $x$  approximiert, indem der Punkt  $x$  selbst und bei multivariaten Funktionen alle partiellen Ableitungen eines umliegenden Punktes berechnet werden. Da mit  $\boldsymbol{\eta}_i=0$  nur Populationsmittelwerte geschätzt werden, muss die interindividuelle Variabilität posthoc bestimmt werden<sup>179</sup>. Eine Weiterentwicklung ist die *first-order conditional estimation*-Methode, bei der eine gleichzeitige Berechnung von Populationswerten und zufälligen Effekten erfolgt. Die Taylorreihe wird hierbei um bedingte Schätzer  $\hat{\boldsymbol{\eta}}_i$  entwickelt, die auf der a posteriori Verteilung aus der vorangegangenen Iteration (empirical bayes estimates, EBE) basieren.

Wird eine Interaktion zwischen  $\eta$  und  $\varepsilon$  zugelassen, gelangt man zur in dieser Arbeit verwendeten Methode, der *first-order conditional estimation with interaction*-Methode (FOCE-I). Der so berechnete Restfehler bezieht sich dann nicht nur auf die Populationswerte, sondern auch auf die individuellen Schätzer<sup>180</sup>.

### Modellevaluation

#### - Objektive Funktion

Zur Berechnung des Objektiven Funktionswertes (OFV) wird in NONMEM® die extended least squares-Methode angewendet, die der Maximum-Likelihood-Methode unter der Annahme entspricht, dass  $\eta_i$  normalverteilt ist<sup>181</sup>. Durch die iterative Veränderung der Werte für die einzelnen Parameter werden schließlich die Werte berechnet, die die vorliegenden Daten mit der maximalen Wahrscheinlichkeit beschreiben. Da sich unter der Voraussetzung einer Normalverteilung der OFV proportional zum Maximum-Likelihood-Schätzer verhält, kann zur Bewertung der Anpassungsgüte (Goodness of Fit, GOF) zweier Modelle der Likelihood-Ratio-Test (LRT) angewendet werden. Voraussetzung hierfür ist, dass die beiden betrachteten Modelle ineinander verschachtelt sind, d.h. dass durch Fixierung eines oder mehrerer Parameter des komplexeren Modells das einfachere Modell erhalten wird<sup>182</sup>. Der Likelihood-Ratio-Test basiert auf dem Verhältnis der Wahrscheinlichkeiten  $L_1/L_2$  der Modelle  $L_1$  und  $L_2$ , und geht davon aus, dass die Verteilung von  $-2\log(L_1/L_2)$  einer  $\chi^2$ -Verteilung folgt (s. Gl. 3.21):

$$LRT = -2LL_1 - (-2LL_2) \quad \text{Gl. 3.21}$$

Die Anzahl der Freiheitsgrade entspricht hierbei der Differenz der Parameteranzahl in den einzelnen Modellen. Beispielsweise unterscheiden sich bei einem Signifikanzniveau  $p = 0,05$  und einem Freiheitsgrad (d.h. die Modelle unterscheiden sich nur in einem Parameter) die verschachtelten Modelle signifikant bei einer Differenz des OFV von 3,84.

- Relativer Standardfehler

Die Präzision jedes Parameter-Schätzwertes wird durch den relativen Standardfehler (RSE) in der Varianz-Kovarianz-Matrix angegeben. Als Faustregel gilt, dass der RSE nicht größer als 50 % sein sollte. In diesem Fall wurde der Parameter aus dem Modell herausgenommen.

- Shrinkage

Die Qualität der individuellen Parameterschätzungen hängt stark von den vorhandenen Daten ab. Bei nur wenigen und uninformativen Daten unterscheiden sich die empirischen Bayes-Schätzer kaum vom Populationsmittelwert. Dies ist bedingt durch eine Verringerung der Varianz der posthoc  $\eta_i$  und ist unter der Bezeichnung  $\eta$ -Shrinkage (s. Gl. 3.22) bekannt. Im Extremfall kann es auch zu Veränderungen in der Verteilung kommen. Gleichermaßen können sich bei schlechter Datenqualität die individuellen geschätzten Konzentrationen (IPRED) den beobachteten annähern, was in einer Verringerung der individuellen gewichteten Residuen (IWRES) gegen 0 resultiert und auch als Overfitting bezeichnet wird<sup>183</sup>. Dieses Phänomen kann mit Hilfe des  $\varepsilon$ -Shrinkage (s. Gl. 3.23) identifiziert und quantifiziert werden. Übersteigt der Wert für  $\varepsilon$ -Shrinkage 20 %, ist die Wahrscheinlichkeit einer vorliegenden Überparametrisierung groß<sup>184</sup>:

$$\eta - Shrinkage = \frac{1 - SD(\eta)}{\omega} \quad \text{Gl. 3.22}$$

$$\varepsilon - Shrinkage = 1 - SD(IWRES) \quad \text{Gl. 3.23}$$

$\eta$ -Shrinkage wird über die Standardabweichung (SD) von  $\eta$  berechnet,  $\omega$  ist die Standardabweichung der Parameterschätzer für verschiedene Individuen.  $\eta$ - und  $\varepsilon$ -Shrinkage werden bei jedem NONMEM®-Lauf ermittelt.

- Bootstrap-Analyse

Um die statistische Richtigkeit und die Präzision der finalen Modellparameter zu ermitteln, werden nicht-parametrische Bootstrap-Analysen durchgeführt<sup>185-187</sup>. Hierbei handelt es sich um eine Resampling-Methode, die auch bei einer geringen Fallzahl eine Modellbeurteilung erlaubt: Aus dem originalen Datensatz werden durch das zufällige Ziehen eines Studienteilnehmers und wieder Zurücklegen 1000 Bootstrap-Datensätze erstellt, wobei dem Umfang der Grundgesamtheit entsprechend häufig gezogen wird. Das heißt, dass einige Individuen mehrmals in einem Bootstrap-Datensatz auftauchen können, andere wiederum gar nicht. Beim Resampling wird angenommen, dass die Beobachtungen in einem Datensatz zufällig variieren und dass diese zufälligen Unterschiede die Unsicherheit eines Parameters bedingen. Unter Anwendung des finalen Modells werden die einzelnen Modellparameter für die neuen Datensätze ermittelt. Der Median der einzelnen geschätzten Parameter von allen 1000 Läufen wird mit dem des Original-Datensatzes verglichen, die 90%-Konfidenzintervalle (KI) werden als das 5. und 95. Perzentil erhalten und den durch NONMEM® ermittelten KI gegenübergestellt.

#### *Grafische Diagnostika*

- Beurteilung von Plots

Zur Auswahl eines bestimmten Modells wurden neben der biologischen Plausibilität visuell verschiedene Plots beurteilt, die die Anpassungsgüte des Modells beschreiben. Betrachtet wurde die Auftragung der typischen vorhergesagten (PRED) oder individuell vorhergesagten Konzentrationen (IPRED) gegen die beobachteten (DV). Hierbei gibt die Identitätslinie die optimale Anpassung an. Weiterhin wurden die gewichteten (WRES) oder individuell gewichteten Residuen (IWRES) gegen PRED bzw. IPRED aufgetragen. Der Wichtungsfaktor stellt die durch das Restfehlermodell ausgegebene Standardabweichung  $\sigma$  dar. WRES und IWRES werden auch bei der Verwendung der FOCE-Methode stets mittels FO-Methode ermittelt, sodass Missspezifikationen des Modells bei falsch berechneten gewichteten Residuen nicht bemerkt werden. Aus diesem Grund werden auch die konditionell gewichteten Residuen (*conditional weighted residuals*, CWRES) herangezogen, die nach der FOCE-Methode approximiert werden. Zur Beurteilung der CWRES wurden diese gegen die typischen vorhergesagten Werte bzw. gegen die Zeit aufgetragen, wobei sie bei guter Anpassung gleichmäßig um den Wert 0 streuen sollten<sup>188</sup>. Die erwähnten grafischen Diagnostika wurden standardmäßig mit jedem NONMEM®-Lauf mit Hilfe der Software PsN erstellt. Zusätzlich wurde auch die Kurvenanpassung der Populations- (PRED) und der individuellen (IPRED) Schätzungen beurteilt.

- Visual predictive check

Ein weiteres grafisches diagnostisches Mittel zur Modellbeurteilung stellt der Visual predictive check (VPC) dar<sup>189-191</sup>. Hierbei wird eine Simulation von beispielsweise 1000 Wiederholungen des originalen Studiendesigns ausgehend von den finalen Parameterschätzern durchgeführt und die Verteilung der Beobachtungen mit der der simulierten Verteilung verglichen<sup>190</sup>. Der Median sowie das 5. und 95. Perzentil der simulierten Daten wurden gegen die Zeit aufgetragen und die beobachteten Daten zum Vergleich hierüber gelegt. Im Idealfall befinden sich bei einer guten Prädiktabilität des Modells 90 % der Werte im Bereich des 90 %-Vorhersageintervalls.

### **3.4 Populationspharmakokinetische Reevaluierung einer klinischen CYP3A-Interaktionsstudie**

Daten einer von Saari et al.<sup>154</sup> im Jahre 2006 durchgeführten klinischen Studie wurden erneut evaluiert. Untersucht wurde hierbei der Effekt von oral appliziertem Voriconazol auf die Pharmakokinetik (und Pharmakodynamik) von intravenös und oral gegebenem Midazolam.

#### **3.4.1 Studiendesign**

Bei der im Crossover-Design durchgeführten Studie erhielten 10 gesunde Probanden im ersten Teil der Studie (Studienphasen A und B) jeweils 0,05 mg/kg Midazolam intravenös und im zweiten Studienteil (Studienphasen C und D) 7,5 mg Midazolam oral. Der Abstand zwischen den einzelnen Studienphasen betrug jeweils eine Woche. In beiden Teilen der Studie gab es eine Kontrollphase (Studienphasen A und C) ohne Voriconazol-Vorbehandlung sowie eine Vorbehandlungsphase mit Voriconazol (Studienphasen B und D) (s. Abb. 3.1).

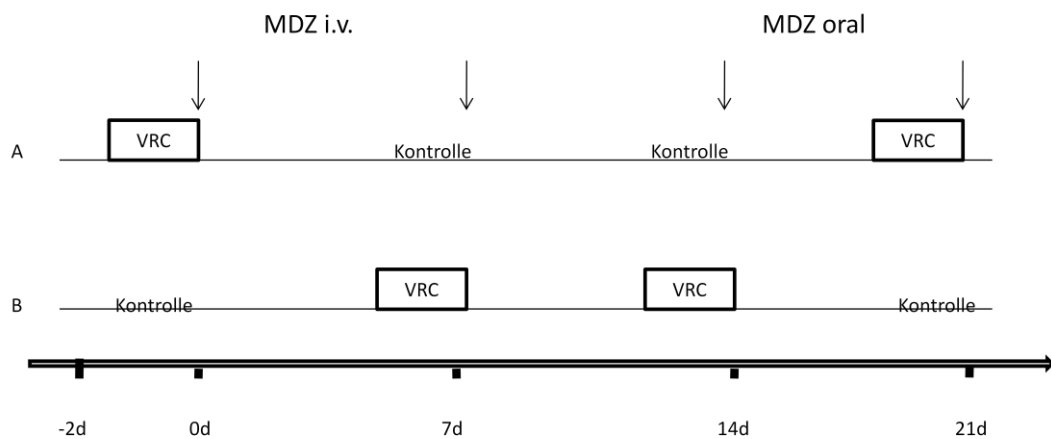


Abb. 3.1 Design der Interaktionsstudie nach Saari et al.<sup>154</sup> In einer vierphasigen randomisierten Studie im Crossoverdesign erhielten 10 Probanden randomisiert (Sequenz A oder B) entweder keine Vorbehandlung mit Voriconazol (Kontrolle) oder orales Voriconazol für 2 Tage (VRC). Die Vorbehandlung bestand an Tag -2 2x 400 mg/Tag und an Tag -1 2x 200 mg/Tag. VRC Voriconazol-Phase; MDZ Midazolam; d Tag. Die Pfeile stehen für die Midazolamapplikation

Die Vorbehandlung mit Voriconazol implizierte die Gabe von 2x 400 mg am ersten und 2x 200 mg am zweiten Tag. Eine Stunde nach der letzten Voriconazol-Gabe wurde Midazolam appliziert.

Blutproben wurden unmittelbar vor sowie 0,25 (nach intravenöser Applikation), 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 6, 8, 12 und 24 h nach Midazolam-Gabe entnommen und die Konzentrationen von Midazolam, 1'-OH-Midazolam sowie Voriconazol im Plasma bestimmt.

## 3.4.2 Datenanalyse

### 3.4.2.1 Modellentwicklung

Zur Schätzung der Parameter wurde die First-order conditional estimation method with interaction (FOCE-I) auf die log-transformierten Plasmakonzentrationen-versus-Zeit-Daten angewandt.

Zunächst wurde ein Modell entwickelt, das nur die Midazolam-Konzentrationen ohne Vorbehandlung mit Voriconazol (Studienphasen A und C) berücksichtigte, in welches darauffolgend die entsprechenden 1'-OH-Midazolam-Konzentrationen aus den o.g. Studienphasen eingefügt wurden. Parallel dazu wurde ein Voriconazol-Modell erstellt. Diese beiden Modelle wurden schlussendlich unter Verwendung des kompletten Datensatzes zur Beschreibung der Interakti-

on von Voriconazol und Midazolam zusammengefügt. Beobachtungen unterhalb der LLOQ wurden *a priori* aufgrund ihres geringen Auftretens (3 %) verworfen.

Um physiologische Kompartimente mit entsprechenden Blutflüssen in das Modell einfügen zu können, wurden die Plasmakonzentrationen durch Multiplikation der Plasmakonzentration mit dem entsprechenden Blut-Plasma-Verteilungskoeffizienten (BPR) in Blutkonzentrationen umgerechnet. Hierbei wurde vereinfacht angenommen, dass diese konstant sind. Für Midazolam liegt der BPR bei 0,66<sup>37,192</sup>, für 1'-OH-Midazolam und Voriconazol wurde der BPR auf 1 gesetzt, da bis dato hierzu keine Literaturwerte zu finden waren.

### Strukturmodell

Für Midazolam, 1'-OH-Midazolam und Voriconazol wurde jeweils zu Beginn das einfachste Strukturmodell getestet wie beispielsweise das Ein-Kompartiment-Modell, um daraufhin physiologische Gegebenheiten einzufügen und so ein semiphysiologisches Modell mit zusätzlichen hypothetischen und physiologischen Kompartimenten wie Leber und Darmwand zu entwickeln. Die verwendeten physiologischen Parameter wurden der Literatur entnommen und sind in Tab. 3.1 dargestellt.

Tab. 3.1 Physiologische und Substanzparameter des semiphysiologischen pharmakokinetischen Modells

Parameter	Wert	Referenz
<b>Midazolam (MDZ)</b>		
$f_{u_{B,MDZ}}$	0.033 <sup>a</sup>	19,192
$f_{u_{G,MDZ}}$	1	99
$BPR_{MDZ}$	0.66	37,192
<b>1'-OH-Midazolam (1-OH-MDZ)</b>		
$f_{u_{B,MET}}$	1	
$f_{u_{GW,MET}}$	1	99
$BPR_{MET}$	1	
<b>Voriconazol (VRC)</b>		
$f_{u_{B,VRC}}$	0.48	134
$f_{u_{G,VRC}}$	1	99
$BPR_{VRC}$	1	
<b>Physiologische Parameter</b>		
$Q_H$ (L/h)	$3.75 \times \text{Körpergewicht}^{0.75}$ (96) <sup>b</sup>	107
$Q_{PV}$ (L/h)	$0.75 \times Q_H$ (72) <sup>b</sup>	193
$Q_{HA}$ (L/h)	$0.25 \times Q_H$ (24) <sup>b</sup>	193
$Q_{intest}$ (L/h)	$0.4 \times Q_H$ (38) <sup>b</sup>	193
$Q_{mucosa}$ (L/h)	$0.8 \times Q_{intest}$ (31) <sup>b</sup>	99
$Q_G$ (L/h)	$0.6 \times Q_{mucosa}$ (18) <sup>b</sup>	99
$V_H$ (L)	1	
$V_{PV}$ (L)	1	
$V_G$ (L)	1	

$f_{u_B}$  ungebundene Fraktion im Blut;  $f_{u_G}$  ungebundene Fraktion in der Darmwand;  $BPR$  Blut-

---

Plasma-Verteilungskoeffizient;  $Q$  Blutfluss von Leber ( $Q_H$ ), Portalvene ( $Q_{PV}$ ), Leberarterie ( $Q_{HA}$ ), Dünndarm ( $Q_{intest}$ ), Darmmucosa ( $Q_{mucosa}$ ), villöser Blutfluss (=Blutfluss der Darmwand) ( $Q_G$ );  $V$  jeweiliges Volumen der Leber ( $V_H$ ), Portalvene ( $V_{PV}$ ), Darmwand ( $V_G$ ).

<sup>a</sup> $f_{uB,MDZ}$  wurde berechnet als die ungebundene Fraktion im Plasma (2%) geteilt durch das Blut/Plasma-Ratio (66%)

<sup>b</sup>Die Werte in runden Klammern entsprechen  $Q$  für eine 75 kg schwere Person

---

Die Populationsmittelwerte und dazugehörigen 90% Konfidenzintervalle wurden als logarithmierte Werte erhalten und mussten am Ende exponenziert werden.

### Stochastisches Modell

Bei der inter- und intraindividuellen Variabilität ging man von einer log-Normalverteilung aus. Aus diesem Grunde wurden die Variabilitäten mit einem linearen Varianzmodell mit den log-transformierten Daten modelliert. Sowohl die inter- als auch die intraindividuelle Variabilität wurde für alle geschätzten Parameter ermittelt, eine Implementierung in das Modell erfolgte beim Erhalt eines stabilen Modells jedoch nur bei einer signifikanten Verringerung des Objektiven Funktionswertes (OFV).

Zur Beschreibung der log-normalverteilten Restvariabilität wurde für alle drei Substanzen ein additives Fehlermodell für die log-transformierten Daten entsprechend Gl. 3.24 verwendet.

$$\log(C_{ij,x}) = \log(\hat{C}_{ij,x}) + \varepsilon_{ij,x} \quad \text{Gl. 3.24}$$

X steht hierbei für die betreffende Substanz (Midazolam, 1'-OH-Midazolam oder Voriconazol),  $C_{ij}$  ist die j-te beobachtete Konzentration des i-ten Individuums,  $\hat{C}_{ij}$  ist die daraus resultierende individuelle geschätzte Konzentration (IPRED),  $\varepsilon_{ij}$  ist eine zufällige, standardnormalverteilte Variable.

### 3.4.2.2 Beurteilung des Modells

Entscheidend für die Auswahl eines bestimmten Modells waren neben der Betrachtung des OFV bei verschachtelten Modellen biologische Plausibilität und grafische Diagnostika wie den Goodness-of-fit-Plots sowie der Kurvenanpassung der Populations- (PRED) und der individuellen (IPRED) Schätzungen. Zur Beurteilung des Informationsgehaltes der individuellen Schätzungen wurde der  $\varepsilon$ -Shrinkage herangezogen. Identifizierbarkeit und Präzision der geschätzten Parameter während der Modellentwicklung wurden durch die Betrachtung der Kovarianzmatrix und der relativen Standardfehler beurteilt.



Zur weiteren Beurteilung wurde eine Bootstrap-Analyse mit 1000 Bootstrap-Datensätzen durchgeführt, um die statistische Richtigkeit und Präzision der finalen Modellparameter zu ermitteln. Weiterhin wurde ein VPC<sup>189</sup> durch die Simulation von 1 000 Wiederholungen des originalen Studiendesigns durchgeführt, um die Eignung des Modells zu bestimmen.

#### Simulationen

Modellbasierte Simulationen unter Nutzung der finalen Schätzungen der fixierten und zufälligen Effektparameter wurden an 1000 virtuellen Probanden durchgeführt. Zunächst wurde eine Simulation des ursprünglichen Studiendesigns durchgeführt, um die mit Hilfe des neu entwickelten Modells geschätzten AUC- und  $C_{max}$ -Werte mit den Werten, die bei der nichtkompartimentellen Auswertung durch Saari et al. ermittelt wurden, zu vergleichen.

Eine weitere Simulation wurde dem Studiendesign von Katzenmaier et al.<sup>155</sup> entsprechend durchgeführt: Hierbei erhielten Probanden neun Tage lang Voriconazol oral, wobei 3 mg Midazolam vor der Behandlung mit Voriconazol, an den Tagen 1, 2, 3, 5, 8 und 9 während der Behandlung, und an Tag 10, 11 und 12 nach Beendigung der Voriconazol-Gabe appliziert wurde. Diese Simulation diente zum Vergleich der von Katzenmaier et al. beobachteten Effekte und den durch das Modell vorhergesagten Werten für die entsprechenden Parameter.

Auch wurde eine Simulation durchgeführt, die den vollständigen zeitlichen Verlauf der CYP3A-Aktivität (repräsentiert durch die Clearance von Midazolam zu 1'-OH-Midazolam) sowohl in der Leber als auch in der Darmwand während und nach einer Gabe von Voriconazol abbildete. Voriconazol wurde hierbei, wie häufig in der Klinik angewandt, in einer Initialdosis von 400 mg und einer Erhaltungsdosis von 2x 200 mg pro Tag appliziert.

Auch der Einfluss der Applikationsart des Inhibitors (oral versus i.v.) auf die CYP3A-Aktivität wurde untersucht, indem in einer Simulation fünf Tage lang Voriconazol 2x täglich als zwei-stündige Infusion verabreicht und danach für weitere fünf Tage auf orale Gabe umgestellt wurde, während Midazolam einmal täglich in einer Dosis von 7,5 mg sechs Stunden nach der morgendlichen Voriconazol-Dosis appliziert wurde. Der Einfluss dieses sogenannten Dose-Staggerings (der zeitlichen Veränderung der Gabe einer Substanz im Verhältnis zur Gabe einer anderen) wurde für die orale und intravenöse Midazolam-Gabe untersucht. Voriconazol wurde hierbei im gerade beschriebenen Applikationsregime verabreicht, wohingegen die Gabe einer einzelnen Midazolam-Dosis an Tag 3 zu verschiedenen Zeiten relativ zur sechsten Voriconazol-Dosis erfolgte. Das Verhältnis der sich so ergebenden AUC-Werte wurde zur Quantifizierung des

Ausmaßes der Inhibition genutzt und Blutentnahmen erfolgten in kurzen Zeitintervallen, um eine möglichst präzise Berechnung der AUC-Werte zu ermöglichen.

### 3.5 In vitro Untersuchung der Enzyminhibition durch Voriconazol und Voriconazol-N-oxid

#### 3.5.1 Enzymkinetische Parameter zur Untersuchung des inhibitorischen Potentials

##### 3.5.1.1 Mittlere inhibitorische Konzentration IC<sub>50</sub>

Die mittlere inhibitorische Konzentration (IC<sub>50</sub>) ist diejenige Inhibitorkonzentration, die eine halbmaximale Hemmung hervorruft. Hierzu wurden jeweils im Triplikat Substratcocktail, HLM, NADPH-regenerierendes System und Inhibitor (Voriconazol bzw. Voriconazol-N-oxid) in fünf verschiedenen Konzentrationen (1, 5, 10, 25 und 100 µM) 10 min lang bei 37°C inkubiert. Da bei der IC<sub>50</sub>-Bestimmung mit Substratkonzentrationen im Bereich der Michaelis-Menten-Konstante K<sub>m</sub> gearbeitet wird, wurde Midazolam in einer finalen Konzentration von 3 µM<sup>194</sup> eingesetzt. Als Kontrollen wurden zusätzlich Proben ohne Enzym (oE) und ohne NADPH-regenerierendes System (oN) inkubiert sowie die enzymatische Basalaktivität bei Proben bestimmt, die nicht inkubiert wurden (oT). Weiterhin wurden auch solche Proben enzymatisch behandelt, die keinen Inhibitor ([I]=0) enthielten.

Zum Abstoppen der enzymatischen Reaktion wurden 200 µL eisgekühltes ACN zum Inkubat hinzupipettiert und 10 Sekunden gevortext. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 14000 rpm wurden 100 µL des Überstands Proben in 120 µL IS (Labetalol 1,83 µM) überführt, erneut gevortext und zentrifugiert. 200 µL des Überstandes wurden hiernach in Glasvials mit Insert überführt und mit Hilfe der LC-MS/MS unter Zuhilfenahme der Analyst Software 1.6.3 quantifiziert<sup>195</sup>. Die Datenanalyse erfolgte mittels nichtlinearer Regression mit Hilfe der Software Graph Pad Prism 6.01 unter Anwendung eines sigmoiden Dosis-Antwort-Modells (Gl. 3.25).

$$V = \left\{ \begin{array}{l} \text{Basislinie} + \frac{V0 - \text{Basislinie}}{1 + \exp\left(\text{Hill} \times \log\left(\frac{[\text{Inhibitor}]}{IC50}\right)\right)}, \text{ in Anwesenheit des Inhibitors} \\ V0, \text{ in Abwesenheit des Inhibitors} \\ \text{Basislinie, bei den Nullproben} \end{array} \right. \quad \text{Gl. 3.25}$$

V ist die Substratumsatzgeschwindigkeit,  $V_0$  ist die Umsatzgeschwindigkeit des Substrats für die entsprechende Substratkonzentration ohne Inhibitoreinfluss (maximaler Umsatz), die Basislinie entspricht dem nominell nicht hemmbaren Anteil der Umsatzrate (oT-Proben) und der Hillfaktor beschreibt die Steilheit der Kurve.

### 3.5.1.2 Inhibitionskonstante $K_i$

Zur Spezifizierung des inhibitorischen Potentials von Voriconazol und Voriconazol-N-oxid wurden nach erfolgter  $IC_{50}$ -Bestimmung die entsprechenden Inhibitionskonstanten ermittelt, da diese eine Differenzierung zwischen verschiedenen Hemmtypen erlaubt. Die Inhibitionskonstante  $K_i$  entspricht der Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes (EI) und ist umso kleiner, je höher die Affinität zwischen Inhibitor und Enzym ist (s. Gl. 3.26).

$$K_i = \frac{[E] \cdot [I]}{[EI]} \quad \text{Gl. 3.26}$$

Jeweils fünf Substrat- und sieben Inhibitorkonzentrationen wurden im Triplikat unter o.g. Bedingungen inkubiert. Für beide Inhibitoren wurden folgende Endkonzentrationen im Inkubat gewählt: 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30 und 100  $\mu\text{M}$ . Die eingesetzten Midazolam-Konzentrationen lagen um dessen  $K_m$ -Wert bei CYP3A4 bei 0,3, 1, 3, 10 und 30  $\mu\text{M}$ . Zusätzlich wurde eine Positivkontrolle ohne Inhibitor für alle Substratkonzentrationen durchgeführt sowie oE-, oN- und oT-Kontrollen inkubiert.

Nach o.g. Aufarbeitung der Proben und Konzentrationsbestimmung mittels LC-MS/MS unter Verwendung der Analyst Software 1.6.3 wurden die enzymkinetischen Parameter  $V_{\max}$  und  $K_m$  sowie der Hemmtyp unter Verwendung der Software GraphPad Prism 6.01 und Microsoft Excel 2007 bestimmt. Grundlage für die verschiedenen Hemmtypen bildet die in Gl. 3.27 dargestellte Michaelis-Menten-Gleichung:

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad \text{Gl. 3.27}$$

Hierbei entspricht  $v$  der Substratumsatzgeschwindigkeit,  $V_{\max}$  der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit,  $[S]$  der Substratkonzentration und  $K_m$  der Michaelis-Menten-Konstante – der Konzentration, bei der die Enzyme mit halbmaximaler Geschwindigkeit arbeiten.

Verschiedene Hemmtypen sind bekannt: Man unterscheidet zwischen reversibler und irreversibler Inhibition. In dieser Arbeit wurde der Fokus auf die reversible Inhibition gelegt, da Voriconazol kein irreversibles Hemmverhalten zeigt<sup>196</sup>.

Bei der reversiblen Inhibition wird zwischen kompetitiver, nichtkompetitiver und unkompetitiver Hemmung unterschieden. Weiterhin kommen Mischformen vor.

Ein kompetitiver Inhibitor bindet an dieselbe Enzym-Bindungsstelle wie das Substrat, somit kommt es zu einer Konkurrenz um die Bindungsstelle. Folgende Gleichung beschreibt die kompetitive Hemmung für eine Substratbindungsstelle am Enzym:

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]} \quad \text{Gl. 3.28}$$

Bei der nichtkompetitiven Hemmung (Gl. 3.29) bindet der Inhibitor an eine andere als die Substratbindungsstelle des Enzyms. Der Inhibitor kann sowohl an freies Enzym als auch an Enzym-Substrat-Komplexe binden.

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S] \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad \text{Gl. 3.29}$$

Bei der unkompetitiven Hemmung (Gl. 3.30) kann der Inhibitor nur an freies Enzym binden.

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S] \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad \text{Gl. 3.30}$$

Die Ermittlung der Inhibitionskonstanten der verschiedenen Hemmtypen erfolgte mittels nichtlinearer Regression unter Verwendung der Software Graph Pad Prism 6.01. Zusätzlich zur Bewertung statistischer Kriterien wurden Dixon-Plots zur Zuordnung zu einem bestimmten Hemmtyp herangezogen. Bei der Dixon-Auftragung handelt es sich um eine grafische Darstellung der linearisierten Michaelis-Menten-Plots. Hierbei wird  $1/v$  (Umsatzrate) gegen die Inhibitorkonzentration aufgetragen.

### 3.5.2 In vitro Untersuchung der Inhibition von CYP3A4

Zur Untersuchung der Inhibition der 1'-Hydroxylierung von Midazolam über CYP3A durch Voriconazol und dessen Metabolit Voriconazol-N-oxid wurden Inkubationsversuche mit HLM und CYP3A4-Supersomes™ durchgeführt. Hierzu wurden zunächst IC<sub>50</sub>-Werte in HLM für Voriconazol und dessen N-oxid bestimmt, um darauffolgend für beide Substanzen jeweils Inhibitionskonstanten K<sub>i</sub> in HLM und CYP3A4-Supersomes™ zu ermitteln. Zur Quantifizierung des gebildeten Metabolit 1'-OH-Midazolam wurde eine in der Arbeitsgruppe etablierte Cocktail-Methode herangezogen, die zum in vitro Screening auf potentielle Inhibitoren der wichtigsten CYPs (CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4) eingesetzt wird<sup>195</sup>. Hierbei wird jeweils der über ein CYP-Isoenzym gebildete Hauptmetabolit eines CYP-spezifischen Arzneistoffsubstrats quantifiziert. Die eingesetzten Substrate sowie die quantifizierten Metabolite sind in Tab. 3.2 zu finden.

Tab. 3.2 Substrate und quantifizierte Metabolite verschiedener CYP-Enzyme der Cocktail-Methode nach <sup>195</sup>

Metabolisierendes CYP-Enzym	Substrat	Hauptmetabolit
CYP1A2	Koffein	Paraxanthin
CYP2B6	Bupropion	2-OH-Bupropion
CYP2C8	Rosiglitazon	N-Desmethylrosiglitazon
CYP2C9	Tolbutamid	4-OH-Tolbutamid
CYP2C19	Omeprazol	5-OH-Omeprazol
CYP3A	Midazolam	1'-OH-Midazolam
CYP2D6	Dextromethorphan	Dextrorphan

Da im Rahmen der Dissertationsarbeit die Untersuchung des inhibitorischen Potentials von Voriconazol und Voriconazol-N-oxid auf das Enzym CYP3A im Vordergrund stand, wurde ausschließlich die Quantifizierung von 1'-OH-Midazolam beleuchtet.

#### 3.5.2.1 Herstellung von Stamm- und Arbeitslösungen

Substrat- und Inhibitor-Stammlösungen

1,11 mg Midazolam-HCl wurde in ACN/H<sub>2</sub>O (20:80) sowie jeweils 2 mg Voriconazol und Voriconazol-N-oxid in ACN/H<sub>2</sub>O (40:60) gelöst, um Stammlösungen mit einer Konzentration von 1 mg/mL bzw. 2 mg/mL zu erhalten. Aus diesen Stammlösungen wurden Verdünnungen mit immer gleichem Lösungsmittelanteil hergestellt, um einheitliche Inkubationsbedingungen zu schaffen und so einen Vergleich der Ergebnisse der Inkubationen mit Voriconazol und

Voriconazol-N-oxid zu ermöglichen. In Tab. 3.3, Tab. 3.4 und Tab. 3.5 sind die Zusammensetzungen der einzelnen Arbeitslösungen zur  $K_i$ -Bestimmung mit entsprechendem organischem Anteil dargestellt. Der Ansatz für die einzelnen Lösungen betrug bei Midazolam 1000  $\mu\text{L}$ , bei Voriconazol und Voriconazol-N-oxid aufgrund des geringeren Verbrauchs 500  $\mu\text{L}$ .

Tab. 3.3 Zusammensetzung der Midazolam-Arbeitslösungen zur Ermittlung des inhibitorischen Potentials von Voriconazol/Voriconazol-N-oxid auf CYP3A4

Analyt	Verdünnung	SL-Konzentration ( $\mu\text{M}$ )	SL ( $\mu\text{L}$ )	ACN/H <sub>2</sub> O	
				(20:80) ( $\mu\text{L}$ )	Anteil ACN (%)
MDZ	V1	400	130 SL	870	20
	V2	120	300 V1	700	
	V3	40	333 V2	667	
	V4	12	300 V3	700	
	V5	4	333 V4	667	

**MDZ** Midazolam; **SL** Stammlösung; **ACN** Acetonitril

Tab. 3.4 Zusammensetzung der Voriconazol-Arbeitslösungen zur Ermittlung des inhibitorischen Potentials auf CYP3A4

Analyt	Verdünnung	SL-Konzentration		H <sub>2</sub> O ( $\mu\text{L}$ )	ACN ( $\mu\text{L}$ )	Anteil ACN (%)
		( $\mu\text{M}$ )	SL ( $\mu\text{L}$ )			
VRC	V1	4000	349,3 SL	144,3	6,4	29,2
	V2	1200	150,0 V1	247,7	102,3	
	V3	400	166,7 V2	235,9	97,4	
	V4	120	150,0 V3	247,7	102,3	
	V5	40	166,7 V4	235,9	97,4	
	V6	12	150,0 V5	247,7	102,3	
	V7	4	166,7 V6	235,9	97,4	

**VRC** Voriconazol; **SL** Stammlösung; **ACN** Acetonitril

Tab. 3.5 Zusammensetzung der Voriconazol-N-oxid-Arbeitslösungen zur Ermittlung des inhibitorischen Potentials auf CYP3A4

Analyt	Verdünnung	SL-Konzentration ( $\mu\text{M}$ )	SL ( $\mu\text{L}$ )	H <sub>2</sub> O ( $\mu\text{L}$ )	Anteil ACN (%)
VRC-NO	VO1	4000	365 SL	135	29,2
	VO2	1200	150,0 V1	247,7	
	VO3	400	166,7 V2	235,9	
	VO4	120	150,0 V3	247,7	
	VO5	40	166,7 V4	235,9	
	VO6	12	150,0 V5	247,7	
	VO7	4	166,7 V6	235,9	

**VRC-NO** Voriconazol-N-oxid; **SL** Stammlösung; **ACN** Acetonitril

Da CYP-Enzyme auf organische Lösungsmittel in ihrer Aktivität sehr empfindlich reagieren, soll ein organischer Anteil von 2 % ACN im Inkubat möglichst nicht überschritten werden <sup>197</sup>. In diesem Fall lag er bei 2,23 % aufgrund von Löslichkeitsproblemen von Voriconazol-N-oxid. Dementsprechend wurde der Lösungsmittelanteil bei Voriconazol angepasst, um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen.

Entsprechend wurden die Arbeitslösungen zur IC<sub>50</sub>-Bestimmung hergestellt, allerdings lagen hier die Konzentrationen der Arbeitslösungen von Voriconazol und Voriconazol-N-oxid bei 4000 µM, 1000 µM, 400 µM, 200 µM und 40 µM.

#### Substratcocktail

Die IC<sub>50</sub>-Bestimmung wurde in HLM unter Verwendung einer etablierten Methode der Arbeitsgruppe <sup>195</sup> durchgeführt, sodass neben CYP3A auch weitere CYP-Enzyme enthalten waren (Tab. 3.2). Für die Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte wurde zur Sicherstellung identischer Inkubationsbedingungen nicht allein Midazolam zur Betrachtung der Inhibition von CYP3A inkubiert, sondern der Substratcocktail.

Zur Herstellung des Substratcocktails wurden zunächst Einzelstammlösungen der verschiedenen Substrate in ACN/H<sub>2</sub>O (20:80) (v/v) hergestellt. Aus diesen wurde durch geeignete Verdünnung die Substratcocktail-Arbeitslösung gewonnen. Die Konzentrationen der Stammlösungen sowie der Konzentrationen der einzelnen Substrate in der Substratcocktail-Arbeitslösung sind in Tab. 3.6 dargestellt.

Tab. 3.6 Konzentrationen der einzelnen CYP-Substrate in der Stammlösung und im Cocktail

<b>Substrat</b>	<b>Konzentration der Stammlösung (mM)</b>	<b>Konzentration im Substratcocktail (µM)</b>
Koffein	100	2933
Bupropion	10	133,3
Rosiglitazon	20	66,7
Tolbutamid	50	893,1
Omeprazol	30	226,6
Midazolam	101,39	26,7
Dextromethorphan	5	40,0

#### Interner Standard Labetalol

Zur Herstellung von 30 mL einer 1,83 µM internen Standard (IS)-Lösung wurden zunächst 1,11 mg Labetalol-Hydrochlorid in 1 mL H<sub>2</sub>O gelöst. Aus dieser Lösung wurden 20,1 µL entnommen und mit 29,9799 mL H<sub>2</sub>O auf 30 mL aufgefüllt.

#### NADPH-regenerierendes System

Das NADPH-regenerierende System setzt sich aus den Lösungen NADPH Regenerating System Solution A und B zusammen. Solution A besteht aus 31 mM NADP<sup>+</sup>, 66 mM Glucose-6-phosphat und 66 mM MgCl<sub>2</sub> in H<sub>2</sub>O. Solution B besteht aus 40 U/mL Glucose-6-phosphat Dehydrogenase in 5 mM Natriumcitrat. Solution A und B wurden in einem Verhältnis von 5:1 vermischt und bis zur Verwendung auf Eis gelagert. Die hergestellte Menge richtete sich nach der Anzahl der Inkubationsproben.

#### Kalibrier- und Qualitätskontrollproben

Die Arbeitslösungen der EPs und QCs wurden entsprechend einer innerhalb der Arbeitsgruppe entwickelten und validierten Quantifizierungsmethode nach Dahlinger et al.<sup>195</sup> hergestellt. Der abgedeckte Konzentrationsbereich umfasste für 1'-OH-Midazolam 0,037-2,70 µM. Die Konzentrationen der aufgearbeiteten QC-Proben lagen bei 0,0111, 0,100, 0,300 und 2,025 µM.

### 3.5.2.2 Probenaufarbeitung

#### Kalibrier- und Qualitätskontrollproben

180 µL Kaliumphosphatpuffer, 10 µL H<sub>2</sub>O, 200 µL ACN und 10 µL der jeweiligen Arbeitslösung wurden in Eppendorf-Gefäßen vorgelegt und für 10 Sekunden gevortext. Hiernach wurde für 10 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. 100 µL des Überstandes wurden in Eppendorf-Gefäße mit 120 µL IS überführt. Nach Vortexen für 10 Sekunden und anschließender Zentrifugation unter oben beschriebenen Einstellungen wurden 200 µL in Glasvials mit Insert überführt und mit der LC – MS/MS quantifiziert.

### 3.5.2.3 Durchführung der Inkubationen

#### Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte von Voriconazol und Voriconazol-N-oxid für CYP3A4

Für die Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte wurden jeweils im Triplikat Substratcocktail, HLM (20 mg/mL), NADPH-regenerierendes System und Inhibitor (Voriconazol bzw. Voriconazol-N-oxid) in fünf verschiedenen Konzentrationen (1, 5, 10, 25 und 100 µM) 10 min lang bei 37 °C inkubiert. Die Zusammensetzung des Inkubats ist in Tab. 3.7 dargestellt.



Tab. 3.7 Zusammensetzung des Inkubats zur IC<sub>50</sub>-Bestimmung

0,1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5	165,5 µL
HLM	2,5 µL
NADPH-regenerierendes System	12 µL
Substratcocktail	15 µL
Voriconazol- bzw. Voriconazol-N-oxid – Stammlösung	5 µL

Durch einen Verdünnungsfaktor von 13,33 wiesen die Substrate entsprechend niedrigere finale Konzentrationen auf, die im Bereich der K<sub>m</sub>-Werte lagen. Bei Midazolam wurde eine finale Konzentration im Inkubat von 3 µM gewählt.

Als Kontrollen wurden zusätzlich Proben ohne Enzym (oE) und ohne NADPH-regenerierendes System (oN) inkubiert sowie die enzymatische Basalaktivität bei Proben bestimmt, bei denen die Enzymreaktion unmittelbar nach Initialisierung abgestoppt wurde (oT). Weiterhin wurden auch solche Proben enzymatisch behandelt, die keinen Inhibitor ([I]=0), dafür aber den entsprechenden Anteil an organischem Lösungsmittel enthielten.

Zum Abstoppen der Reaktion und Proteinpräzipitation wurden 200 µL eisgekühltes ACN zum Inkubat hinzupipettiert, 10 Sekunden gevortext und die Proben einige Minuten bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 14000 rpm bei Raumtemperatur wurden 100 µL des erhaltenen Überstands in 120 µL IS (Labetalol 1,83 µM) überführt, erneut gevortext und wie beschrieben zentrifugiert. 200 µL des Überstandes wurden hiernach in Glasvials mit Insert überführt und mit Hilfe der LC-MS/MS unter Zuhilfenahme der Analyst Software 1.6.3 quantifiziert<sup>195</sup>.

Bestimmung der K<sub>i</sub>-Werte von Voriconazol und Voriconazol-N-oxid für CYP3A4

Nach der Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte wurden die Konzentrationsbereiche der Inhibitoren festgelegt. Insgesamt sieben verschiedene Inhibitorkonzentrationen (0,1 µM, 0,3 µM, 1 µM, 3 µM, 10 µM, 30 µM, 100 µM) wurden im Triplikat mit fünf Substratkonzentrationen um den K<sub>m</sub>-Wert von Midazolam für CYP3A4 inkubiert. Die finalen Konzentrationen im Inkubat lagen bei 0,3 µM, 1 µM, 3 µM, 10 µM und 30 µM. Die Zusammensetzung des Inkubats entsprach hier genau wie die Probenaufarbeitung denen der IC<sub>50</sub>-Bestimmung. Neben der Inkubation mit HLM wurden auch solche mit CYP3A4-Supersomes™ durchgeführt.

#### 3.5.2.4 LC-MS/MS-Bedingungen

Zur Quantifizierung von 1'-OH-Midazolam wurde eine etablierte LC-MS/MS-Methode der Arbeitsgruppe<sup>195</sup> eingesetzt. Verwendet wurde eine API 5000 gekoppelt an eine binäre Agilent

1200 Pumpe und einen HTC PAL Autosampler. Als analytische Säule wurde eine Discovery RP Amide C16 column (5cm × 2.1 mm, 5µM) mit vorgeschalteter Vorsäule vom Typ Security Guard (4,0mm x 2,0mm) verwendet. Das Injektionsvolumen betrug 30 µL. Die Säulentemperatur lag bei 30°C, die Temperatur im Autosampler betrug 4°C. Als mobile Phasen wurden 0.1% HCOOH in H<sub>2</sub>O (Fließmittel A) und 25:75 (v/v) MeOH/ACN mit 0.1% HCOOH (Fließmittel B) verwendet. Es wurde mit einer Flussrate von 300 µL/min gearbeitet, der Fließmittelgradient in Abb. 3.2 dargestellt. Die Massenspektren wurden im positiven ESI-Modus mit einer Scanrate von 0,15 sec/Scan erhalten. Die weiteren Parameter sind der Arbeit von Dahlinger et al.<sup>195</sup> zu entnehmen.

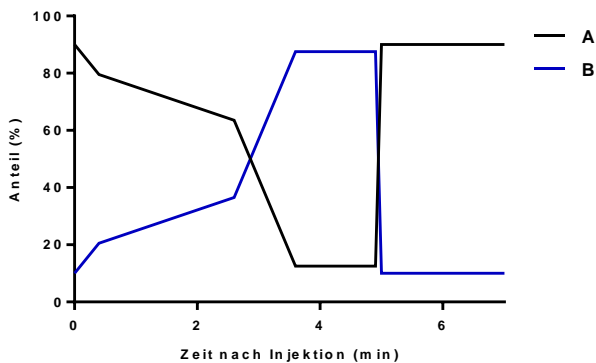


Abb. 3.2 Zeitlicher Verlauf des Fließmittelgradienten der Methode zur Quantifizierung von 1'-OH-Midazolam für die in vitro Versuche

### 3.5.3 In vitro Untersuchung der Inhibition von UGT2B4 und UGT2B7

#### 3.5.3.1 Methodenentwicklung

Die Methode zur Quantifizierung von 1'-OH-Midazolam-β-D-Glucuronid wurde an einer API 5000 entwickelt, welche an eine binäre Agilent 1200 Pumpe und einen HTC PAL Autosampler gekoppelt war. Zur Ionisierung wurde eine Elektrospray-Ionenquelle (ESI) im Positivmodus eingesetzt. Die Datenaquisition und Quantifizierung erfolgte mit Hilfe der Software Analyst 1.6.3.

Zur Entwicklung geeigneter MS/MS-Parameter wurden über zwei Verdünnungsschritte methanolische Lösungen von 1'-OH-Midazolam-β-D-Glucuronid und dem IS Diazepam mit einer jeweiligen Konzentration von 10 ng/mL hergestellt. Zur Verdünnung wurde MeOH benutzt. Im ersten Schritt wurden aus Stammlösungen, die eine Konzentration von jeweils 1 mg/mL aufwiesen, 1'-OH-Midazolam-β-D-Glucuronid- bzw. Diazepam-haltige Lösungen mit einer Kon-

zentration von 5000 ng/mL hergestellt. Aus diesen Verdünnungen wurden Tuning-Lösungen mit einer Konzentration von 10 ng/mL erhalten, welche per Direktinfusion in das Tandem-Massenspektrometer (MS/MS) geleitet wurden. Für beide Analyten wurden die 8 Tochterionenfragmente mit der höchsten Signalintensität detektiert, von denen pro Analyt jeweils die zwei intensivsten Übergänge in die Aquisitionsmethode integriert wurden.

Die MS/MS-Bedingungen wurden durch die Variation von Ionenquellentemperatur, Ionisierungsenergie, Verneblergasstrom, Mantelgasstrom und Hilfsgasstrom optimiert. Weiterhin wurden beim Detektor der Kollisionsgasfluss und die Kollisionsenergie optimiert. Als Gas wurde Stickstoff eingesetzt.

Die chromatografische Trennung der beiden Analyte wurde durch die Variation der Fließmittelzusammensetzung und des Verlaufs des Gradienten, der Fließgeschwindigkeit, der Temperatur der Trennsäule und verschiedener Säulen verbessert.

Zur Probenaufarbeitung bediente man sich einer Proteinfällungsmethode mit ACN, anschließender Zentrifugation und Vermessen des Überstandes. Nach Probeinkubationen und Testung der optimalen Inkubationszeit und Proteinmenge wurden der Kalibrierbereich und die QC-Konzentrationen festgelegt und mit der Validierung begonnen.

### **3.5.3.2 Methodvalidierung**

Zur Quantifizierung von 1'-OH-Midazolam-β-D-Glucuronid wurde ein Konzentrationsbereich von 0,03 – 3 μM gewählt. Die einzelnen Konzentrationen der EPs und QCs sind in Tab. 3.8 und Tab. 3.9 zu finden. Die Validierung der Methode erfolgte in Übereinstimmung mit der EMA Guideline on bioanalytical method validation<sup>171</sup>. Folgende Kriterien wurden bei der Validierung untersucht:

- Selektivität
- Kalibrierbereich und Quantifizierungsgrenze
- Wiederfindung
- Richtigkeit und Präzision (Intraday und Interday)
- Stabilität.

### **3.5.3.3 Herstellung von Stamm- und Arbeitslösungen**

Stammlösungen

Zur Herstellung der Stammlösung von 1'-OH-Midazolam-β-D-Glucuronid wurden zum Erhalt einer 1 mg/mL-Stammlösung 0,25 mg Reinsubstanz in 0,25 mL MeOH gelöst. Zum Erhalt einer

methanolischen Diazepam-haltigen Lösung mit einer Konzentration von 1 mg/mL wurde 1 mg Reinsubstanz in 1 mL MeOH gelöst.

Für die Substratstammlösung wurden 4 mg 1'-OH-Midazolam in 1 mL MeOH gelöst.

Zum Erhalt der Inhibitorstammlösungen wurden Lösungen mit einer Konzentration von jeweils 2 mg/mL hergestellt. Als Lösungsmittel für die Voriconazol-Stammlösung fungierte ACN/H<sub>2</sub>O (20:80 (v/v)), für Voriconazol-N-oxid aufgrund von Löslichkeitsproblemen ACN/H<sub>2</sub>O (40:60 (v/v)), das als Positivkontrolle eingesetzte Diclofenac-Na wurde in H<sub>2</sub>O gelöst.

#### Arbeitslösung Interner Standard Diazepam

Die Herstellung des IS Diazepam 10 ng/mL (35,1 nM) erfolgte in zwei Verdünnungsschritten. Zunächst wurde eine erste Verdünnung mit einer Konzentration von 5000 ng/mL hergestellt, indem 5 µL der Stammlösung auf 1000 µL mit ACN/H<sub>2</sub>O (20:80 (v/v)) aufgefüllt wurden. Aus dieser Verdünnung wurden in einem zweiten Verdünnungsschritt 40 mL der Arbeitslösung 10 ng/mL durch Vermischung von 80 µL der ersten Verdünnung und 39920 µL ACN/H<sub>2</sub>O (20:80 (v/v)) hergestellt.

#### EP-/QC-Arbeitslösungen

Die 1 mg/mL-Stammlösung von 1'-OH-Midazolam-β-D-Glucuronid entspricht einer molaren Konzentration von 1930,9 µM. Aus dieser Lösung wurde jeweils eine Verdünnungsreihe für die EPs und QCs angefertigt, wobei die Konzentration der EP1 und QC1 einander entsprachen und zur Herstellung einer 120 µM Stammlösung (EP1 bzw. QC1) jeweils 31 µL der Stammlösung auf 500 µL mit MeOH aufgefüllt wurden. Hieraus wurden die weiteren Verdünnungen hergestellt (Tab. 3.8 und Tab. 3.9).

Tab. 3.8 Herstellung der Verdünnungsreihe der Kalibrierproben (EP)-Arbeitslösungen

	<b>Konzentration (µM)</b>	<b>EP1 (µL)</b>	<b>EP2 (µL)</b>	<b>EP3 (µL)</b>	<b>EP4 (µL)</b>	<b>EP5 (µL)</b>	<b>EP6 (µL)</b>	<b>MeOH (µL)</b>
EP2	40	167	-	-	-	-	-	333
EP3	20	-	250	-	-	-	-	250
EP4	12	-	-	300	-	-	-	200
EP5	4	-	-	-	167	-	-	333
EP6	2	-	-	-	-	250	-	250
EP7	1,2	-	-	-	-	-	300	200

Tab. 3.9 Herstellung der Verdünnungsreihe der Qualitätskontroll (QC)-Arbeitslösungen

	Konzentration ( $\mu\text{M}$ )	QC1 ( $\mu\text{L}$ )	QC2 ( $\mu\text{L}$ )	QC3 ( $\mu\text{L}$ )	MeOH ( $\mu\text{L}$ )
QC2	20	83	-	-	417
QC3	4	-	100	-	400
QC4	1,2	-	-	150	350

Durch die Aufarbeitung wurde eine Verdünnung der EPs und QCs um den Faktor 40 erreicht, sodass die EP- und QC-Proben 1/40 der Konzentration der Arbeitslösung aufwiesen.

#### Arbeitslösungen zur $K_m$ -Bestimmung

Für die  $K_m$ -Bestimmung wurden aus der Stammlösung von 1'-OH-Midazolam (4 mg/mL bzw. 11703,7  $\mu\text{M}$ ) durch Verdünnung mit  $\text{H}_2\text{O}$  und MeOH Arbeitslösungen fünf unterschiedlicher Konzentrationen hergestellt. Die Zusammensetzung der Arbeitslösungen A1-A5 (Volumen 200  $\mu\text{L}$ ) sowie die finale Konzentration im Inkubat sind in Tab. 3.10 dargestellt. Der MeOH-Anteil der Arbeitslösungen lag bei 22,8%.

Tab. 3.10 Pipettierschema zur Herstellung der Arbeitslösungen von 1'-OH-Midazolam

	Arbeitslösung ( $\mu\text{M}$ )	Stammlösung ( $\mu\text{L}$ )	$\text{H}_2\text{O}$ ( $\mu\text{L}$ )	MeOH ( $\mu\text{L}$ )	Endkonzentration ( $\mu\text{M}$ )
A1	2666	45,6 SL	154,4	0	200
A2	1333	100 A1	88,6	11,4	100
A3	399,9	60,0 A2	126,3	13,7	30
A4	133,3	66,7 A3	120,7	12,6	10
A5	39,99	60,0 A4	126,3	13,7	3

**A** Arbeitslösung; **SL** Stammlösung; **MeOH** Methanol

#### Arbeitslösungen zur $\text{IC}_{50}$ -Bestimmung

Zur Herstellung von 750  $\mu\text{L}$  einer 799,8  $\mu\text{M}$  1'-OH-Midazolam-Lösung (entspricht einer Endkonzentration von 60  $\mu\text{M}$  im Inkubat) wurden 51,3  $\mu\text{L}$  der Stammlösung (4 mg/mL bzw. 11703,7  $\mu\text{M}$ ) mit 682,8  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  und 15,97  $\mu\text{L}$  MeOH vermischt. Der Lösungsmittelanteil der Arbeitslösung lag bei 15%.

Zur Verifizierung einer Inhibition der Isoenzyme UGT2B4 und 2B7 wurde das bekannte UGT2B4- und UGT2B7-Substrat Diclofenac in verschiedenen Konzentrationen mit 1'-OH-Midazolam inkubiert. Hierzu wurden, dem Pipettierschema in Tab. 3.11 entsprechend, aus einer 2 mg/mL Stammlösung in  $\text{H}_2\text{O}$  die Arbeitslösungen D1-5 hergestellt.

Tab. 3.11 Pipettierschema zur Herstellung der Arbeitslösungen von Diclofenac zur IC<sub>50</sub>-Bestimmung

	Arbeitslösung (μM)	Stammlösung (μL)	H <sub>2</sub> O (μL)	Endkonzentration (μM)
D1	4000	63,6 SL	36,4	100
D2	2000	50 D1	50	50
D3	400	20 D2	80	10
D4	40	10 D3	90	1
D5	4	10 D4	90	0,1

**D** Diclofenac-Arbeitslösung; **SL** Stammlösung

Die Pipettierschemata zur Herstellung der Arbeitslösungen von Voriconazol und Voriconazol-N-oxid für die IC<sub>50</sub>-Bestimmung (V1-5 bzw. VO1-5) sind in Tab. 3.12 und Tab. 3.13 dargestellt. Der Ansatz jeder einzelnen Arbeitslösung lag bei 100 μL, der Anteil an MeOH bei 29,2%.

Tab. 3.12 Pipettierschema zur Herstellung der Arbeitslösungen von Voriconazol zur IC<sub>50</sub>-Bestimmung

	Arbeitslösung (μM)	Stammlösung (μL)	H <sub>2</sub> O (μL)	MeOH (μL)	Endkonzentration (μM)
V1	8000	27,9 SL	170,8	1,3	200
V2	4000	50 V1	35,4	14,6	100
V3	1000	25 V2	53,1	21,9	25
V4	400	40 V3	42,5	17,5	10
V5	200	50 V4	35,4	14,6	5
V6	40	20 V5	56,6	23,4	1
V7	4	10 V6	63,7	26,3	0,1

**V** Voriconazol-Arbeitslösung; **SL** Stammlösung; **MeOH** Methanol

Tab. 3.13 Pipettierschema zur Herstellung der Arbeitslösungen von Voriconazol-N-oxid zur IC<sub>50</sub>-Bestimmung

	Arbeitslösung (μM)	Stammlösung (μL)	H <sub>2</sub> O (μL)	MeOH (μL)	Endkonzentration (μM)
VO1	4000	73,1 SL	26,9	0	100
VO2	1000	25,0 VO1	53,1	21,9	25
VO3	400	40,0 VO2	42,5	17,5	10
VO4	200	50,0 VO3	35,4	14,6	5
VO5	40	20,0 VO4	56,6	23,4	1
VO6	4	10,0 VO5	63,7	26,3	0,1

**VO** Voriconazol-N-oxid-Arbeitslösung; **SL** Stammlösung; **MeOH** Methanol

Arbeitslösungen zur  $K_i$ -Bestimmung

Zur Herstellung der Arbeitslösungen von 1'-OH-Midazolam und Voriconazol wurden Verdünnungen entsprechend der Pipettierschemata in Tab. 3.14 und Tab. 3.15 angefertigt.

Tab. 3.14 Pipettierschema zur Herstellung der Arbeitslösungen von 1'-OH-Midazolam zur  $K_i$ -Bestimmung

	Arbeitslösung ( $\mu\text{M}$ )	Stammlösung ( $\mu\text{L}$ )	$\text{H}_2\text{O}$ ( $\mu\text{L}$ )	MeOH ( $\mu\text{L}$ )	Endkonzentration ( $\mu\text{M}$ )
A1	2666	45,6 SL	154	0	200
A2	1333	100 A1	88,6	11,4	100
A3	399,9	60,0 A2	126	13,7	30
A4	133,3	66,7 A3	121	12,7	10
A5	39,99	60,0 A4	126	13,7	3

**A** Midazolam-Arbeitslösung; **SL** Stammlösung; **MeOH** Methanol

Tab. 3.15 Pipettierschema zur Herstellung der Arbeitslösungen von Voriconazol zur  $K_i$ -Bestimmung

	Arbeitslösung ( $\mu\text{M}$ )	Stammlösung ( $\mu\text{L}$ )	$\text{H}_2\text{O}$ ( $\mu\text{L}$ )	MeOH ( $\mu\text{L}$ )	Endkonzentration ( $\mu\text{M}$ )
V1	8000	14 SL	86	0	200
V2	4000	50 V1	43	7	100
V3	2000	50 V2	43	7	50
V4	600	30 V3	60,2	9,8	15
V5	200	33,3 V4	57,4	9,3	5

**V** Voriconazol-Arbeitslösung; **SL** Stammlösung; **MeOH** Methanol

### 3.5.3.4 Probenaufarbeitung

EP- und QC-Proben

Zur Herstellung der EP- bzw. QC-Proben wurden 95  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$ , 100  $\mu\text{L}$  0,1M Trispuffer (pH 7,4), 5  $\mu\text{L}$  der jeweiligen EP- bzw. QC-Arbeitslösung und 200  $\mu\text{L}$  ACN in 1,5 mL Eppendorf-Tubes vermischt und 10 sec gevortext. Aus dieser Lösung wurden 100  $\mu\text{L}$  in 200  $\mu\text{L}$  IS überführt, erneut 10 sec gevortext und hiervon 200  $\mu\text{L}$  in Glasvials mit Insert überführt.

### 3.5.3.5 Durchführung der Inkubationen

$K_m$ - und  $\text{IC}_{50}$ -Bestimmung

Die Zusammensetzung des Inkubats für die  $K_m$ - bzw.  $\text{IC}_{50}$ -Bestimmung mit einem Gesamtvolumen von 100  $\mu\text{L}$  ist Tab. 3.16 und Tab. 3.17 zu entnehmen. Zur  $K_m$ -Bestimmung wurde statt der

Inhibitor-Arbeitslösung 30%-iges MeOH hinzugefügt, um einen gleichen Lösungsmittelanteil im Inkubat und somit identische Inkubationsbedingungen zu gewährleisten.

Bei den Inkubationen mit UGT2B7 lag der Proteingehalt bei 0,1 mg/mL, es wurde 60 min ( $K_m$ -Bestimmung) bzw. 90 min ( $IC_{50}$ -Bestimmung) inkubiert, UGT2B4 wurde in einer Konzentration von 0,2 mg/mL Protein eingesetzt und über 90 min inkubiert. Die Inkubationen zur  $K_m$ - und  $IC_{50}$ -Bestimmung wurden jeweils im Triplikat durchgeführt, die Inkubation zur  $K_i$ -Bestimmung im Duplikat. Die Zusammensetzung der Proben entspricht der in Tab. 3.16.

Tab. 3.16 Zusammensetzung des Inkubats bei den UGT-Studien für Voriconazol und Voriconazol-N-oxid

	UGT2B7	UGT2B4
UGT Reaction Mix solution A ( $\mu$ L)	8	8
UGT Reaction Mix solution B ( $\mu$ L)	20	20
H <sub>2</sub> O ( $\mu$ L)	60	58
Arbeitslösung 1-OH-MDZ ( $\mu$ L)	7,5	7,5
Arbeitslösung VRC-/VRC-NO bzw. MeOH (30%ig) ( $\mu$ L)	2,5	2,5
UGT ( $\mu$ L)	2	4

**1-OH-MDZ** 1'-OH-Midazolam; **VRC** Voriconazol; **VRC-NO** Voriconazol-N-oxid; **MeOH** Methanol

Da der Referenzinhibitor Diclofenac in reinem H<sub>2</sub>O gelöst wurde, wich das Pipettierschema zum Erhalt gleicher Lösungsmittelanteile wie bei Voriconazol und Voriconazol-N-oxid von diesen ab (Tab. 3.17).

Tab. 3.17 Zusammensetzung des Inkubats bei den UGT-Studien für Diclofenac

	UGT2B4	UGT2B4
UGT A ( $\mu$ L)	8	8
UGT B ( $\mu$ L)	20	20
Wasser ( $\mu$ L)	57,5	55,5
SL 1-OH-MDZ ( $\mu$ L)	7,5	7,5
MeOH (29,2:70,8) ( $\mu$ L)	2,5	2,5
Diclofenac-Arbeitslösung ( $\mu$ L)	2,5	2,5
UGT ( $\mu$ L)	2	4

**1-OH-MDZ** 1'-OH-Midazolam; **MeOH** Methanol

Vor der Zugabe von UGT Reaction Mix Solution A wurden die übrigen Komponenten zunächst 10 min bei 37°C im Wasserbad angewärmt. UGT Reaction Mix Solution A enthält den für die enzymatische Reaktion essentiellen Kofaktor Uridindiphosphat-Glucuronsäure (UDPGA), UGT Reaction Mix solution B das porenbildende Antibiotikum Alamethicin sowie MgCl<sub>2</sub> in 250 mM



Tris-HCl (pH 7,5). Alamethicin und MgCl<sub>2</sub> verhindern das Phänomen des Latenzphänomens (geringere Aktivität zu Beginn der Inkubation), das aufgrund der Lokalisation der UGTs zum Lumen des Endoplasmatischen Retikulums zu beobachten ist. Substrate und Kofaktor müssen daher zunächst die mikrosomale Membran durchdringen, um zum Metabolisierungsort zu gelangen; durch die Zugabe porenbildender Agentien wird der Zugang zu den Enzymen erleichtert. Die Inkubation wurde gestartet durch die Zugabe von UDPGA im UGT Reaction Mix Solution A. Das Inkubat enthielt 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 µg/mL Alamethicin, 2 mM UDPGA sowie 50 mM Tris-HCl pH 7,5.

Zum Abbruch der Enzymreaktion wurden 100 µL ACN hinzugegeben, 10 sec gevortext und die Proben bis zur Zentrifugation (10 min, 14000 rpm, Raumtemperatur) auf Eis gelagert. Hiernach wurden 50 µL der Probe in 100 µL IS überführt und erneut gevortext. Zur Messung wurden 130 µL in Glasvials mit Insert überführt.

### 3.5.3.6 LC-MS/MS-Bedingungen

Die entwickelte LC-MS/MS-Methode zur Quantifizierung von 1'-OH-Midazolam-β-D-Glucuronid orientierte sich an bereits veröffentlichten Arbeiten zur Messung der Substanz 1'-OH-Midazolam-β-D-Glucuronid<sup>198,199</sup>. Verwendet wurde eine API 5000 gekoppelt an eine binäre Agilent 1200 Pumpe und einen HTC PAL Autosampler. Jeweils 10 µL einer Probe wurden auf eine Synergi Polar RP-Säule (250 x 2,0mm, 4µm) mit vorgeschalteter Vorsäule vom Typ Security Guard (4,0mm x 2,0mm) gegeben. Die Säulentemperatur lag bei 30°C, die Temperatur der Proben im Autosampler bei 4°C. Als Fließmittel dienten 0,1% HCOOH in H<sub>2</sub>O (A) und 0,1% HCOOH in ACN (B). Folgender Fließmittelgradient wurde verwendet: 0.0-2.0 min A:B 70:30 → 50:50, 2.0-4.0 min A:B 50:50 → 20:80, 4.0-8.0 min A:B 20:80 → 10:90, 8.0-9.0 min A:B 10:90 → 50:50, 9.0-10.0 min A:B 50:50 → 70:30 mit einer Flussrate von 250 µL/min.

Die Massenspektren wurden durch Elektrospray-Ionisation (ESI) im positiven Modus mit 0,150 sec/scan erhalten. Weitere MS/MS-Parameter sind in Tab. 3.18 dargestellt. Stickstoff fungierte als Kollisions-, Mantel-, Vernebler- und Kollisionsgas.

Tab. 3.18 Massenspektrometrische Einstellungen der Quantifizierungsmethode von 1'-OH-Midazolam-β-D-Glucuronid

Parameter	Unit
Kollisionsgas	7
Mantelgas	35
Ion source gas 1/nebulizer gas flow/Verneblergasfluss	25
Ion source gas 2/auxiliary gas flow/Hilfsgasfluss	45

Parameter	Unit
Ion spray voltage	5000
Ionenquellentemperatur	400
Eingangspotential	10

Zur Quantifizierung des Analyten und des IS wurden die in Tab. 3.19 dargestellten Massenübergänge herangezogen.

Tab. 3.19 Massenübergänge der Quantifizierungsmethode von 1'-OH-Midazolam- $\beta$ -D-glucuronid

Analyt	Massenübergang (m/z)	CE (eV)	DP (eV)	CXP (eV)
1-OH-MDZ-Gluc	518,3 $\rightarrow$ 324,1	39	81	14
	518,3 $\rightarrow$ 342,2	37	81	34
DZP	285,3 $\rightarrow$ 193,2	43	121	28
	285,3 $\rightarrow$ 154,0	39	121	20

**1-OH-MDZ-Gluc** 1'-OH-Midazolam- $\beta$ -D-glucuronid; **DZP** Diazepam **CE** Kollisionsenergie; **DP** Declustering Potential; **CXP** Kollisionszellenausgangspotential

Die Retentionszeiten lagen für 1'-OH-Midazolam- $\beta$ -D-Glucuronid bei 4:45 min, für den IS Diazepam bei 7:19 min, die Gesamtlaufzeit der Methode betrug 10,0 min.

Die Datenaquisition und Quantifizierung erfolgte mit Hilfe der Software Analyst 1.6.3. Die Daten wurden als Verhältnis zwischen den erhaltenen Peakflächen für 1'-OH-Midazolam- $\beta$ -D-Glucuronid und jenen für den IS Diazepam ausgedrückt.

## 3.6 In vivo Studie zur Untersuchung der Inhibition von CYP3A in Darmwand und Leber durch Voriconazol mit einem neuartigen Studiendesign

### 3.6.1 Studie

#### 3.6.1.1 Studienpopulation

Nach Genehmigung der Studie durch die unabhängige Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln wurde die Studie mit neuartigem Studiendesign an sechs gesunden nichtrauchenden Probanden durchgeführt. Diese gaben im Vorfeld nach Aufklärung über potentielle Risiken eine schriftliche Einverständniserklärung zur Teilnahme an der Studie ab. Vor und nach Durchführung der Studie wurden die Probanden untersucht. Die Untersuchungen umfassten eine gründliche körperliche Untersuchung, die Messung von Vitalzeichen,

die Anfertigung eines Elektrokardiogramms sowie klinische Labortests. An den Studientagen wurden die Probanden zu definierten Zeitpunkten nach unerwünschten Arzneimittelwirkungen befragt, und auch Blutdruck und Puls wurden regelmäßig gemessen.

Zur Vermeidung potentieller Interaktionen mit dem CYP-System wurden die Probanden dazu angehalten, 72 h vor Infusionsstart alkohol-, grapefruit- und methylxanthinhaltige Nahrungsmittel zu meiden. Weiterhin durften die Probanden keine Medikamente einnehmen.

### **3.6.1.2 Studiendesign**

Bei der durchgeführten Studie handelte es sich um eine offene, randomisierte, dreiphasige Studie im Crossover-Design, bei der Midazolam wie auch in der Studie von Saari et al.<sup>154</sup> als etabliertes CYP3A-Substrat und Voriconazol als Inhibitor eingesetzt wurden.

Beide Substanzen wurden entweder intravenös (i.v.) oder über eine Duodenalsonde direkt in das Darmlumen (intestinal, int.) appliziert. Die Duodenalsonden wurden unter Kurznarkose mit Propofol in der Gastroenterologie der Uniklinik Köln gelegt.

Folgende Studienperioden wurden durchlaufen:

A: Midazolam (i.v.) und Voriconazol (int.)

B: Midazolam (int.) und Voriconazol (i.v.)

C: Midazolam (int.) und Voriconazol (int.)

Zusätzlich wurde bei den Probanden 2, 3 und 4 zusätzlich eine Periode D eingeführt, bei der Voriconazol und Midazolam jeweils i.v. infundiert wurden, da die Duodenalsonden zum Teil nicht durchlässig waren und somit eine gleichmäßige Zufuhr nicht möglich war. Aus diesem Grund wurden auch bestimmte Studienperioden nachgeholt bzw. bei Proband 5 die Studienperiode C wiederholt, da die Duodenalsonde am Verbindungsstück zwischen Perfusorschlauch und Sonde eine kurze Zeit undicht war, und somit eine kontinuierliche Infusion nicht gewährleistet werden konnte. Somit konnte der ursprüngliche Randomisierungsplan nicht eingehalten werden.

Die Infusion erfolgte kontinuierlich und gleichzeitig über zwei Perfusoren. 24 h nach Beginn der Midazolam-Infusion wurden beide Infusionen gestoppt. Geplant waren folgende Infusionsraten:

Midazolam 0-24 h: 0,25 mg/h

Voriconazol 9-16 h: 7,5 mg/h (niedrige Dosis)

Voriconazol 17-24 h: 15 mg/h (hohe Dosis)

Da die Duodenalsonde ein Totvolumen von 7,0 mL aufwies, musste vor dem Start der Midazolam- und Voriconazol-Infusionen ein 7,0 mL-Bolus gegeben werden. Da 50,0 mL der jeweiligen Infusionslösungen hergestellt wurden, mussten die Infusionsraten von Voriconazol erniedrigt werden, da andernfalls das Volumen der Infusionslösung für die angestrebte Infusionsdauer nicht ausgereicht hätte. Die niedrige Dosis von Voriconazol betrug daher schlussendlich 6,4 mg/h (1,3 mL/h), die hohe Dosis lag bei 12,8 mg/h (2,6 mL/h).

Auch die Infusionsrate von Midazolam wurde angepasst, da bei einer geplanten Infusionsrate von 0,25 mg/h ein Volumen von 1,25 mL pro Stunde hätte infundiert werden müssen. Die verwendeten Perfusorpumpen konnten nur auf eine Dezimalstelle eingestellt werden, sodass man sich für eine Infusionsrate von 1,3 mL/h entschied, was 0,26 mg/h entspricht.

Die Gesamtdosis an appliziertem Midazolam entsprach somit nicht 6 mg, sondern 6,24 mg, die Voriconazol-Gesamtdosis lag bei 153,6 mg (statt geplanten 180 mg).

Vom Zeitpunkt einer Stunde vor bis drei Stunden nach Beendigung der Midazolam-Infusion herrschte Flüssigkeitsrestriktion, um die Konzentrationsschwankungen, die durch die Magen-Darm-Passage des Essens ausgelöst werden, zu standardisieren. 1 h vor sowie 1 h, 3 h, 7 h 45 min, 11 h, 13 h, 15 h, 17 h, 19 h, 21 h und 24 h nach Beginn der Midazolam-Infusion erhielten die Probanden jeweils 200 mL Wasser. Weiterhin erhielten die Probanden auch nur zu definierten Zeitpunkten standardisierte Snacks (3 h, 11 h, 15 h und 19 h relativ zum Infusionsstart von Midazolam).

### **3.6.1.3 Blutabnahmen**

Unmittelbar vor und 0.5 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 7 h, 7 h 57 min, 8 h 30 min, 9 h, 10 h, 11 h, 12 h, 13 h, 14 h, 15 h, 15 h 57 min, 16 h 30 min, 17 h, 18 h, 19 h, 20 h, 21 h, 22 h, 23 h, 24 h, 24 h 30 min, 25 h, 26 h, 27 h, 28 h, 32 h und 36 h nach dem Start der Midazolaminfusion wurden in Lithium-Heparin-Monovetten Blutproben entnommen. Nach Zentrifugation bei +4°C und Aliquotierung des Plasmas in Plastikröhrchen wurden die Proben bis zur Quantifizierung bei -80°C gelagert.

### **3.6.1.4 Urinsammlung**

Urin wurde für die Intervalle 0-8 h, 9-16 h, 17-24 h und 25-36 h in 2 L-Plastikgefäßen gesammelt. Hierbei wurde die exakte Dauer des Sammelintervalls dokumentiert. Nach Ermittlung des Volumens wurden die Behälter vor und nach der Befüllung gewogen, wobei von einer middle-

ren Dichte von 1 g/mL Urin ausgegangen wurde. Jeweils 2x 8 mL wurden in Plastikröhrchen aliquotiert und bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

### **3.6.1.5 Herstellung der Infusionslösungen und Ermittlung der tatsächlichen Infusionsraten**

Die Infusionslösungen wurden mit Glucoselösung 5 % als Trägerlösung hergestellt. Verwendete Präparate waren Midazolam Ratiopharm® V 5 mg/5 mL Injektionslösung sowie Vfend® 200 mg Pulver zur Herstellung einer Infusionslösung. Zur Herstellung der Voriconazol-Lösung wurde das Pulver zunächst mit Wasser für Injektionszwecke rekonstituiert. Die Infusionslösungen mit der gewünschten Konzentration (für Midazolam 0,2 mg/mL, für Voriconazol 4 mg/mL) wurden mit Glucoselösung 5% als Träger in einer Perfusorspritze aufgezogen.

Aufgrund der Probleme bei der kontinuierlichen Infusion von Midazolam und Voriconazol konnte eine einheitliche Infusionsrate nicht garantiert werden. Dementsprechend konnte auch nicht davon ausgegangen werden, dass die tatsächlich infundierte Menge der ursprünglich vorgesehenen Dosis (Midazolam 6,24 mg, Voriconazol 153,6 mg) entsprach. Durch Berücksichtigung des Gewichts der Perfusorspritze vor und nach Beendigung der Infusion konnte eine tatsächlich infundierte Menge an Midazolam und Voriconazol ermittelt werden. Im Anhang (Appendix 3) sind die berechneten tatsächlich infundierten Dosen an Voriconazol und Midazolam sowie die sich hieraus ergebenden mittleren Infusionsraten festgehalten.

## **3.6.2 Entwicklung und Validierung von Quantifizierungsmethoden zur Bestimmung von Voriconazol, Midazolam und ausgewählten Analyten**

### **3.6.2.1 Methodenentwicklung**

LC-MS/MS-Methoden zur Quantifizierung von Voriconazol und Voriconazol-N-oxid in Plasma sowie zur Bestimmung von Midazolam, 1'-OH-Midazolam und 4-OH-Midazolam in Urin wurden an einem LC-MS/MS-System von Thermo Finnigan entwickelt. Das System bestand aus einem Surveyor Autosampler, einer Surveyor MS Pumpe und einem TSQ Quantum Triple Quadrupol-Massenspektrometer. Zur Ionisierung wurde die Elektrospray-Ionisation (ESI) verwendet. Die Datenaquisition erfolgte mit Hilfe der Software Xcalibur Version 1.2, zur Quantifizierung bediente man sich der LC Quan Software Version 1.3.

Zunächst wurden methanolische Lösungen der verwendeten Substanzen mit einer jeweiligen Konzentration von 100 ng/mL hergestellt. Per Direktinjektion wurden für jeden einzelnen Analyten mit Hilfe der Quantum-Tune Master Software die vier Tochterionenfragmente mit der höchsten Intensität detektiert. Hiervon wurden wiederum die zwei Übergänge mit der höchsten Intensität ausgewählt, aus denen die Tune-Methode erstellt wurde. Durch Variation von Ionenquellentemperatur, Ionisierungsenergie, Verneblergasstrom, Mantelgasstrom und Hilfgasstrom wurden die MS/MS-Bedingungen optimiert. Weiterhin wurden bezüglich der Detektion Kollisionsgasfluss und Kollisionsenergie optimiert. Als Vernebler- und Mantelgas wurde Stickstoff (Reinheitsgrad 5.0) eingesetzt, Argon (Reinheitsgrad 5.0) bildete das Kollisionsgas.

Die LC-Bedingungen wurden durch die Variation von Säulenmaterial und -temperatur, unterschiedlicher Fließmittelzusammensetzungen, Veränderung des Fließmittelgradienten und der Fließgeschwindigkeit optimiert.

Die im Plasma bzw. Urin enthaltenen Proteine wurden durch die Zugabe von organischem Lösungsmittel gefällt. Nach Zugabe von IS wurde zentrifugiert und hiernach der Überstand zur Quantifizierung in Glasvials mit Insert überführt.

### **3.6.2.2 Methodvalidierung**

Die Validierung der beiden Quantifizierungsmethoden erfolgte in Übereinstimmung mit der EMA Guideline on bioanalytical method validation<sup>171</sup>. Folgende Kriterien wurden bei der Validierung untersucht:

- Selektivität
- Kalibrierbereich und LLOQ
- Wiederfindung
- Richtigkeit und Präzision (Intraday und Interday)
- Stabilität
- Matrixeffekte.

### **3.6.3 Bestimmung von Voriconazol und Voriconazol-N-oxid im Plasma**

#### **3.6.3.1 Herstellung der Stamm- und Arbeitslösungen**

Die Verdünnungen wurden aus methanolischen Stammlösungen hergestellt, die jeweils eine Konzentration von 1mg/mL an Voriconazol, Voriconazol-N-oxid oder Ketoconazol als IS besaßen. Für die Herstellung der Verdünnungen für die EP- und QC-Arbeitslösungen wurden Stammlösungen aus zwei unterschiedlichen Wägungen verwendet.

Durch geeignete Verdünnung mit MeOH wurde eine Arbeitslösung des IS Ketoconazol mit einer Konzentration von 5000 ng/mL hergestellt.

Zur Herstellung einer Lösung, die sowohl Voriconazol als auch Voriconazol-N-oxid in einer Konzentration von 10.000 ng/mL enthielt (was den Konzentrationen EP1 bzw. QC1 entsprach), wurden 10 µL der Voriconazol-Stammlösung und 10 µL der Voriconazol-N-oxid-Stammlösung vermischt und auf 1 000 µL mit ACN aufgefüllt. Hieraus wurden mit Hilfe von ACN die einzelnen Verdünnungen für die EP- und QC-Arbeitslösungen hergestellt. Die Konzentrationen der Arbeitslösungen EP1-EP7 lagen bei 10.000 ng/mL, 5.000 ng/mL, 3.000 ng/mL, 1 000 ng/mL, 500 ng/mL, 300 ng/mL und 100 ng/mL. Die Konzentrationen der Arbeitslösungen QC1-QC4 lagen bei 10.000 ng/mL (QC1), 5.000 ng/mL, 300 ng/mL und 100 ng/mL. Durch eine Verdünnung um den Faktor 10 bei der Aufarbeitung wiesen die Proben eine Konzentration auf, die 1/10 der Konzentration der Arbeitslösungen entsprach.

#### **3.6.3.2 Probenaufarbeitung**

Zur Herstellung der EP-Proben wurden 200 µL Leerplasma mit 20 µL der EP-Arbeitslösung vermischt. Hiernach wurden zur Proteinpräzipitation 380 µL ACN und 20 µL IS (Ketoconazol 5.000 ng/mL) hinzupipettiert. Nach 10-sekündigem Vortexen und anschließender Zentrifugation bei 14.000 rpm über 10 min bei Raumtemperatur wurden 200 µL des Überstandes zur Messung in Glasvials mit Insert überführt. Die Herstellung der QC-Proben erfolgte analog.

200 µL der Studienproben wurden mit 400 µL ACN versetzt, nach Zugabe von 20 µL IS gevortext, 10 min bei 14.000 rpm zentrifugiert und in Glasvials mit Insert überführt.

#### **3.6.3.3 LC-MS/MS-Bedingungen**

Für die Quantifizierung von Voriconazol und Voriconazol-Noxid im Plasma mit Ketoconazol als IS wurde an einer LC-MS/MS-Apparatur der Firma Thermo Finnigan als analytische Trennsäule eine Hypersil Gold (50 x 2,1mm, 5 µm) verwendet. Weiterhin nutzte man zum Schutz der Säule

eine Vorsäule des Typs Security Guard (4 x 2,0 mm). Die Säulentemperatur lag bei 30°C, die Autosamplertemperatur bei 5°C. 20 µL einer Probe wurden unter Verwendung eines *partial loops* auf die Trennsäule gegeben. Fließmittel A bestand aus 0,1% HCOOH in 10 mM Ammoniumformiat/0,1% HCOOH in ACN (50/50 (v/v)), Fließmittel B aus 0,1% HCOOH in ACN (v/v). Voriconazol und Voriconazol-N-oxid sowie der IS wurden während der Verwendung von Fließmittel A eluiert. Der Fließmittelgradient ist Abb. 3.3 zu entnehmen.

Zum Vermeidung einer Blockade der Ionentransferkapillare bei längeren Messzeiten wurde ein Schaltventil (*divert valve*) genutzt, sodass nur zu Zeiten der Elution der Analyte das Eluat mit einer Flussrate von 300 µL/min in das MS/MS-System geleitet wurde. Vorher und nachher wurde der Laufmittelstrom in einen Abfallbehälter geführt. Die Retentionszeiten betragen für Voriconazol-N-oxid 0,61 min, für Voriconazol 0,80 min und für Ketoconazol 0,66 min, die Gesamtlaufzeit der Quantifizierungsmethode betrug 6,0 min.

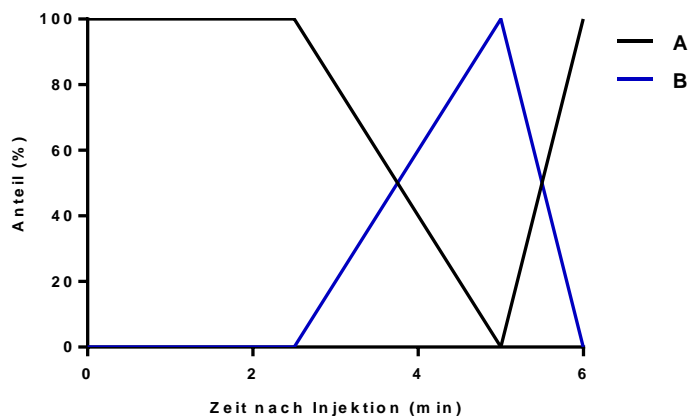


Abb. 3.3 Zeitlicher Verlauf des Fließmittelgradienten der Methode zur Quantifizierung von Voriconazol und Voriconazol-N-oxid in Plasma. A: 0,1% HCOOH in 10 mM Ammoniumformiat/0,1% HCOOH in ACN (50/50 (v/v)); B 0,1% HCOOH in ACN (v/v)

Die Massenspektren wurden durch ESI im Positivmodus mit 0,10 sec/scan erhalten. Die Spannung des ESI-Sprays lag bei 3,4 kV, das Sheath gas wurde auf 30 und das Auxiliary gas auf 3 Hilfseinheiten (*arbitrary units*) gesetzt, der Druck des Kollisionsgases lag bei 1,5 mTorr. Weiterhin wurde zusätzlich zur ESI-Ionisierung eine Spannung von 10 eV zur kollisionsinduzierten Dissoziation eventuell gebildeter Lösungsmittelcluster an die Quelle angelegt. Die Temperatur der Ionenquelle lag bei 350°C.

Folgende Massenübergänge wurden für die einzelnen Analyten in die Aquisitionsmethode integriert (Tab. 3.20):



Tab. 3.20 Massenübergänge der Quantifizierungsmethode von Voriconazol und Voriconazol-N-oxid in Plasma

Substanz	Massenübergang (m/z)	CE (eV)
VRC	350,1→281,2	22
	350,1→127,1	38
VRC-NO	366,1→224,1	20
	366,1→143,1	18
KET	531,2→489,3	34
	531,2→530,3	16

**VRC** Voriconazol; **VRC-NO** Voriconazol-N-oxid; **KET** Ketoconazol; **CE** Kollisionsenergie; **eV** Elektronenvolt  
Die Datenaquisition erfolgte mit Hilfe der Software Xcalibur Version 1.2, zur Quantifizierung die LC Quan Software Version 1.3 herangezogen.

### 3.6.3.4 Messung von Probensequenzen

Alle verfügbaren Plasmaproben eines Probanden, d.h. alle Proben aus den absolvierten Studienperioden, wurden in einer Probensequenz hintereinander quantifiziert. Am Anfang und Ende wurde je eine EP-Reihe vermessen. Der Umfang der Proben mit unbekannter Konzentration schwankte hierbei zwischen 70 und 140. Zur Sicherung der Qualität der Messung wurde jeweils nach 10 Proben mit unbekannter Konzentration eine QC-Probe vermessen. Der Umfang der QC-Probensätze schwankte hierbei zwischen 2 und 4.

## 3.6.4 Bestimmung von Midazolam, 1'-OH-Midazolam und 4-OH-

### Midazolam in Urin

#### 3.6.4.1 Herstellung der Stamm- und Arbeitslösungen

Die Arbeitslösungen wurden aus methanolischen Stammlösungen hergestellt, die jeweils eine Konzentration von 1mg/mL des jeweiligen Analyten bzw. des verwendeten IS Diazepam besaßen. Für die Herstellung der Verdünnungen für die EP- und QC-Arbeitslösungen wurden Stammlösungen aus zwei unterschiedlichen Wägungen verwendet.

Durch geeignete Verdünnung mit MeOH wurde aus der Diazepam-Stammlösung eine Arbeitslösung des IS mit einer Konzentration von 5.000 ng/mL hergestellt.

Die erste Kalibrier-Arbeitslösung (EP1), die eine jeweilige Konzentration von 10.000 ng/mL Midazolam und 4-OH-Midazolam besaß, wurde durch die Mischung von 10 µL Midazolam-Stammlösung und 10 µL 4-OH-Midazolam-Stammlösung mit anschließendem Auffüllen auf 1 000 µL mit MeOH erhalten. Hieraus wurden mit MeOH die einzelnen Verdünnungen für die EP-Arbeitslösungen hergestellt. Die Konzentrationen der Arbeitslösungen (EP1-EP7) lagen bei 10.000 ng/mL (EP1), 3.000 ng/mL, 1 000 ng/mL, 500 ng/mL, 300 ng/mL, 100 ng/mL und 50 ng/mL. Die am höchsten konzentrierte QC-Arbeitslösung (QC1) wurde erhalten, indem jeweils 7,5 µL der Midazolam- und 4-OH-Midazolam-Stammlösung miteinander vermischt und mit MeOH auf 1 000 µL aufgefüllt wurden. Hieraus erfolgte die Herstellung der einzelnen Verdünnungen. Die Konzentrationen der QC-Arbeitslösungen lagen bei 7.500 ng/mL (QC1), 5.000 ng/mL, 150 ng/mL und 50 ng/mL.

Die Herstellung der 1'-OH-Midazolam-Arbeitslösungen erfolgte separat, da diese Substanz in weitaus höheren Mengen mit dem Urin ausgeschieden wird als Midazolam und 4-OH-Midazolam. Zur Herstellung der EP1-Arbeitslösung wurden 100 µL der 1'-OH-Midazolam-Stammlösung auf 1 000 µL mit MeOH aufgefüllt, woraus eine 1'-OH-Midazolam-Konzentration von 100.000 ng/mL resultierte. Von dieser Lösung ausgehend wurden die weiteren Verdünnungen hergestellt. Die Konzentrationen der Arbeitslösungen EP1-7 von 1'-OH-Midazolam lagen bei 100.000 ng/mL, 30.000 ng/mL, 10.000 ng/mL, 3.000 ng/mL, 1 000 ng/mL, 300 ng/mL und 100 ng/mL. Die Arbeitslösung QC1 wurde erhalten, indem 75 µL der Stammlösung auf 1 000 µL mit MeOH aufgefüllt wurden. Die Konzentrationen der hieraus hergestellten Arbeitslösungen QC2-4 lagen bei 50.000 ng/mL, 300 ng/mL und 100 ng/mL.

Durch eine Verdünnung um den Faktor 100 bei der Aufarbeitung wiesen die Proben eine Konzentration auf, die 1/100 der Konzentration der Arbeitslösungen entsprach.

#### **3.6.4.2 Probenaufarbeitung**

Zur Herstellung der EP- und QC-Proben wurden jeweils 3 µL der 1'-OH-Midazolam-Arbeitslösung und der Kombinationslösung von Midazolam und 4-OH-Midazolam mit 44 µL Leerurin vermischt. Weiterhin wurden 250 µL 0,2 M Ammoniumacetatpuffer (pH 4,75), 600 µL MeOH und 100 µL der IS-Arbeitslösung hinzugegeben, 10 Sekunden gevortext und hiernach 10 min mit 14.000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. 200 µL wurden in Glasvials mit Insert überführt und vermessen.

Zur Ermittlung des glucuronidierten Anteils an ausgeschiedenem Midazolam, 1'-OH-Midazolam und 4-OH-Midazolam wurden die Studienproben jeweils einmal einer enzymatischen

Glucuronidspaltung unterworfen und einmal ohne  $\beta$ -Glucuronidasebehandlung aufgearbeitet. Zur Erfassung der freien Substanzen wurden 50  $\mu\text{L}$  der Urinprobe mit 250  $\mu\text{L}$  0,2 M Ammoniumacetatpuffer (pH 4,75) versetzt. Nach der Zugabe von 600  $\mu\text{L}$  MeOH und 100  $\mu\text{L}$  IS wurde gevortext, unter den oben genannten Bedingungen zentrifugiert und in Glasvials mit Insert überführt.

Zur Glucuronidspaltung bediente man sich einer bereits etablierten Methode der AG Fuhr. Hierbei wurden 50  $\mu\text{L}$  Urinprobe mit 125  $\mu\text{L}$  0,2 M Ammoniumacetatpuffer (pH 4,75) und 125  $\mu\text{L}$   $\beta$ -Glucuronidasesuspension (3.200 U/mL) 24 h bei 37°C inkubiert. Zum Abstoppen der enzymatischen Reaktion wurden 600  $\mu\text{L}$  MeOH hinzugegeben, gevortext und das Eppendorf-Gefäß für wenige Minuten auf Eis gelegt. Nach der Zugabe von 100  $\mu\text{L}$  IS wurde erneut gevortext, wie oben beschrieben zentrifugiert und die der Überstand für die Messung in Glasvials mit Insert überführt.

### 3.6.4.3 LC-MS/MS-Bedingungen

Zur quantitativen Erfassung von Midazolam, 1'-OH-Midazolam und 4-OH-Midazolam in Urin wurde an einer LC-MS/MS-Apparatur der Firma Thermo Finnigan als analytische Trennsäule eine Hypersil Gold (50 x 2,1mm, 5  $\mu\text{m}$ ) eingesetzt. Weiterhin nutzte man zum Schutz der Säule eine Vorsäule des Typs Security Guard (4 x 2,0 mm). Die Säulentemperatur lag bei 30°C, die Proben wurden im Autosampler auf 5°C temperiert. 20  $\mu\text{L}$  einer Probe wurden unter Verwendung eines *partial loops* mit einer Fließgeschwindigkeit von 300  $\mu\text{L}/\text{min}$  auf die Trennsäule gegeben. Die Methode enthielt einen Fließmittelgradienten, wobei Fließmittel A aus 0,1% HCOOH in H<sub>2</sub>O bestand, Fließmittel B aus MeOH. Der verwendete Fließmittelgradient ist Abb. 3.4 zu entnehmen.

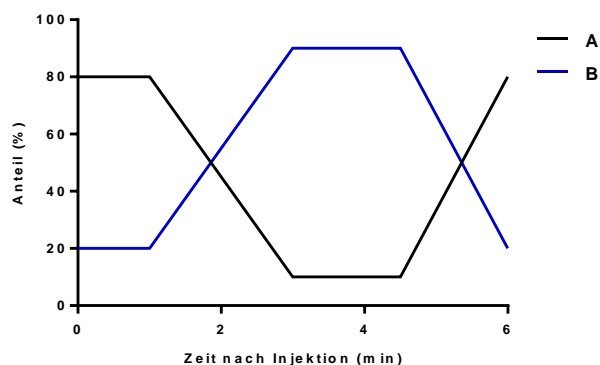


Abb. 3.4 Zeitlicher Verlauf des Fließmittelgradienten der Methode zur Quantifizierung von Midazolam, 1'-OH-Midazolam und 4-OH-Midazolam in Urin. A: 0,1% HCOOH in H<sub>2</sub>O; B: MeOH

Zum Schutz des Detektors vor einer Verstopfung bei längeren Probensequenzen wurde wie in der Methode zur Quantifizierung von Voriconazol und Voriconazol-N-oxid in Plasma ein *divert valve* benutzt, sodass nur zu Zeiten, zu denen die Analyten eluiert wurden, die Probe mit einer Flussrate von 300 µL/min in den Detektor geleitet wurde. Die Retentionszeit lag für Midazolam bei 3,44 min, für 4-OH-Midazolam bei 3,34 min, für 1'-OH-Midazolam bei 3,58 min und für den IS Diazepam bei 4,12 min. Die Gesamtdauer der Methode lag bei 6,5 min.

Die Massenspektren wurden durch Elektrospray-Ionisation (ESI) im Positivmodus mit 0,10 sec/scan erhalten. Die Spannung des ESI-Sprays lag bei 3,4 kV, das Sheath gas wurde auf 30 und das Auxiliary gas auf 3 Hilfseinheiten (*arbitrary units*) gesetzt, der Druck des Kollisionsgases lag bei 1,5 mTorr. Weiterhin wurde eine Spannung von 10 eV zur kollisionsinduzierten Dissoziation (CID) eventuell gebildeter Lösungsmittelcluster an die Quelle angelegt. Die Temperatur der Ionenquelle lag bei 350°C.

Folgende Massenübergänge wurden für die einzelnen Analyten genutzt (Tab. 3.21):

Tab. 3.21 Massenübergänge der Quantifizierungsmethode von Midazolam und Metaboliten in Urin

Substanz	Massenübergang (m/z)	CE (eV)
MDZ	326,0 → 291,0	30
4-OH-MDZ	342,0 → 325,2	28
1-OH-MDZ	342,0 → 324,1	26
DZP	285,0 → 193,1	36

**MDZ** Midazolam, **1-OH-MDZ** 1'-OH-Midazolam; **4-OH-MDZ** 4-OH-Midazolam, **DZP** Diazepam; **CE** Kollisionsenergie; **eV** Elektronenvolt

Die Datenaquisition erfolgte mit Hilfe der Software Xcalibur Version 1.2, zur Quantifizierung bediente man sich der LC Quan Software Version 1.3.

#### 3.6.4.4 Ermittlung der freien und glucuronidierten Anteile

Die entwickelte Methode ermöglicht die quantitative Bestimmung von Midazolam, 1'-OH-Midazolam und 4-OH-Midazolam im Urin. Die freien Anteile der Analyten wurden durch „normale“ Aufarbeitung der Urinproben erfasst. Da der Großteil<sup>165,166</sup> jedoch glucuronidiert renal eliminiert wird, musste zur Erfassung auch dieser Anteile eine enzymatische Deglucuronidierung vorgenommen werden (s. Abschnitt 3.6.4.2). Nach erfolgter

Glucuronidspaltung wurden somit die ursprünglich ungebundenen Anteile als auch die ursprünglich an Glucuronsäure gekoppelten Substanzen quantifiziert. Zur Ermittlung der glucuronidierten Anteile wurde die Differenz nach Gl. 3.31 bestimmt:

$$C_{glucuronidiert} = C_{+Enzym} - C_{-Enzym} \quad \text{Gl. 3.31}$$

Die Konzentration an glucuronidiertem Analyten  $C_{glucuronidiert}$  pro Sammelintervall wird durch die Differenz zwischen dem gemessenen Wert der Probe mit  $\beta$ -Glucuronidase-Behandlung ( $C_{+Enzym}$ ) und der gemessenen Wert der Probe ohne  $\beta$ -Glucuronidase-Behandlung ( $C_{-Enzym}$ ) bestimmt.

#### **3.6.4.5 Messung von Probensequenzen**

Alle erhaltenen Urinproben eines Probanden wurden innerhalb einer Probensequenz quantifiziert. Hierbei wurden zunächst solche Proben vermessen, die nicht mit  $\beta$ -Glucuronidase behandelt worden waren und darauffolgend die Proben nach Glucuronidspaltung. Zu Beginn und am Ende einer Messreihe wurde je eine EP-Reihe vermessen. Der Umfang der Proben mit unbekannter Konzentration schwankte hierbei zwischen 20 und 40. Zur Sicherung der Qualität der Messung wurde jeweils nach maximal 10 Proben mit unbekannter Konzentration eine QC-Probe vermessen.

### **3.6.5 Bestimmung von Midazolam, 1'-OH-Midazolam und 4-OH-**

#### **Midazolam in Plasma**

Die Quantifizierung von Plasmakonzentrationen von Midazolam, 1'-OH-Midazolam und 4-OH-Midazolam erfolgte extern. Zur Vermessung der Proben wurde ein Massenspektrometer vom Typ „API 5000“ von Applied Biosystems mit einem UPLC-Pumpensystem vom Typ „1260 Infinity Binary Pump“ von Agilent Technologies verwendet. Als stationäre Phase diente eine Säule vom Typ „Synergi Polar-RP“ 100 Å (50 x 4,6 mm; 2,5µm) von Phenomenex. In einer Gradientenmethode wurden 0,1% HCOOH in Wasser als Fließmittel A und ACN als Fließmittel B eingesetzt. In Tab. 3.22 ist der Gradient mit der entsprechenden Fließgeschwindigkeit aufgeführt. Das Injektionsvolumen betrug 20 µL.

Tab. 3.22 Fließmittelgradient der Quantifizierungsmethode von Midazolam und Metaboliten in Plasma

Zeit (min)	Fließgeschwindigkeit (µL/min)	A (Vol %)	B (Vol %)
0	1100	45	55
3,1	1100	10	90
3,11	1100	45	55
3,8	1100	45	55

Die untere Quantifizierungsgrenze (LLOQ) lag für Midazolam und 4-OH-Midazolam bei 0,050 ng/mL, für 1'-OH-Midazolam bei 0,051 ng/mL.

### 3.6.6 Populationspharmakokinetische Datenanalyse

Zur Parameterschätzung der entsprechenden Voriconazol- und Midazolam-Modelle fand wie auch bei der Reanalyse der Daten von Saari et al.<sup>154</sup> die FOCE-I-Methode Anwendung. Zunächst wurden empirische Modelle entwickelt, in die darauffolgend physiologische Gegebenheiten integriert wurde (Tab. 3.23). Auch hier wurden die Plasmakonzentrationen unter Verwendung von den substanzspezifischen BPR zur Verwendung physiologischer Blutflüsse in Blutkonzentrationen umgerechnet. Für Midazolam wurde ein BPR von 0,6206<sup>37,192</sup> zugrunde gelegt, für 1'-OH-Midazolam und Voriconazol wurden mit Hilfe von Simcyp ermittelte Werte von 1,17 und 1,23 verwendet. Vor der Ergebnisausgabe erfolgte durch die Division mit BPR eine Rücktransformation zu Plasmakonzentrationen.

Tab. 3.23 Verwendete physiologische und substanzspezifische Parameter des PBPK-Modells der durchgeführten Studie

Parameter	Wert	Referenz
<b>Midazolam (MDZ)</b>		
$f_{a,MDZ}$	1	
$f_{uP,MDZ}$	0,0305	200
$f_{uG,MDZ}$	1	
$BPR_{MDZ}$	0,6206	37,192
$KL_{I,MDZ}$	1	192
<b>1-OH-Midazolam (1-OH-MDZ)</b>		
$f_{uP,1-OH-MDZ}$	1	
$f_{uG,1-OH-MDZ}$	1	
$BPR_{1-OH-MDZ}$	1,17	berechnet mit <sup>200</sup> mit $\log P=2.48$ , $pKa=4.99$ , monoprotische Base
$KL_{I,1-OH-MDZ}$	1	
<b>Voriconazol (VRC)</b>		
$f_{a,VRC}$	1	

Parameter	Wert	Referenz
$f_{u_{P,VRC}}$	0,42	201
$f_{u_{g,VRC}}$	1	
$BPR_{VRC}$	1,23	berechnet mit <sup>200</sup> mit $\log P=1,8$ und $pKa=1,76$ , monoprotische Base (Werte aus <sup>201</sup> )
$KLI_{VRC}$	1,22	202
<b>Physiologische Parameter</b>		
$BSA$ (m <sup>2</sup> )	$KG^{0,425} * Größe^{0,725} * 0,007184$	203
$V_H$ (L)	$0,722 * BSA^{1,176}$	204
$V_{ENT}$ (L)	0,517	200
$CI$ (L/min/ m <sup>2</sup> )	$3 + (-0,01 * (Alter - 20))$	205
$QC$ (L/h)	$CI * 60 * BSA$	205
$Q_{HA}$ (L/h)	$0,065 * QC$	205
$Q_{PV}$ (L/h)	$0,19 * QC$	205
$Q_H$ (L/h)	$Q_{HA} + Q_{PV}$	205
$Q_{VIL}$ (L/h)	$0,06 * QC$	
$Q_{perm}$ (L/h)	88,552	berechnet durch Auflösen der Gleichung $Q_{gut} = Q_{vil} * Q_{perm} / (Q_{vil} + Q_{perm})$ nach $Q_{perm}$ , mit $Q_{gut} = 17,19$ L/h und $Q_{vil} = 0,6 * QC = 21,34$ L/h)
MPPGL (mg Protein/g Leber)	$10^{(1,407 + 0,01579 * Alter - 0,0003824 * Alter^2 + 2,37E-6 * Alter^3)}$	
LDENS (g/l)	1080	205
CYP3A4H (pmol/mg Protein)	137	200
CYP3A4L (pmol)	$CYP3A4H * MPPGL * V_H * LDENS$	
CYP3A4G (pmol/total gut)	66200	200

**MDZ** Midazolam, **1-OH-MDZ** 1'-OH-Midazolam, **VRC** Voriconazol,  $f_{a,MDZ}$  relativer resorbierter Midazolam-Anteil,  $f_{u_{P,MDZ}}$  ungebundene Midazolamfraktion im Plasma,  $f_{u_{g,MDZ}}$  ungebundene Midazolamfraktion im Darm,  $BPR_{MDZ}$  Blut/Plasma-Ratio Midazolam,  $KLI_{MDZ}$  Plasma/Leber-Ratio Midazolam,  $f_{u_{P,1-OH-MDZ}}$  ungebundene 1'-OH-Midazolamfraktion im Plasma,  $f_{u_{g,1-OH-MDZ}}$  ungebundene 1'-OH-Midazolamfraktion im Darm,  $BPR_{1-OH-MDZ}$  Blut/Plasma-Ratio 1'-OH-Midazolam,  $KLI_{1-OH-MDZ}$  Plasma/Leber-Ratio 1'-OH-Midazolam,  $f_{a,VRC}$  relativer resorbierter Voriconazol-Anteil,  $f_{u_{P,VRC}}$  ungebundene Voriconazolfraktion im Plasma,  $f_{u_{g,VRC}}$  ungebundene Voriconazolfraktion im Darm,  $BPR_{VRC}$  Blut-Plasma-Verteilungskoeffizient Voriconazol,  $KLI_{VRC}$  Plasma/Leber-Ratio Voriconazol, **BSA** Körperoberfläche,  $V_H$  Volumen Leber,  $V_{ENT}$  Volumen Darmwand, **CI** kardiales Input, **QC** kardiales Output,  $Q_{HA}$  Blutfluss in der Leberarterie,  $Q_{PV}$  Blutfluss in der Portalvene,  $Q_H$  hepatischer Blutfluss,  $Q_{VIL}$  villöser Blutfluss,  $Q_{perm}$  Permeabilitätsclearance, **MPPGL** mg pro mikrosomales Protein pro g Leber, **LDENS** Leberdichte, **CYP3A4H** hepatischer CYP3A4-Gehalt, **CYP3A4L** hepatische CYP3A4-Menge (bezogen auf die komplette Leber), **CYP3A4G** intestinale CYP3A4-Menge (bezogen auf die komplette Darmwand)

Beobachtungen unterhalb der LLOQ wurden als Konzentrationen, die der Hälfte der für die einzelnen Analyten festgelegten Konzentrationen entsprachen, in den Analysen aufgrund ihres seltenen Auftretens nicht berücksichtigt. Bei den Midazolam-Daten lag die Anzahl an BQL-

Werten bei 0,849%, bei 1'-OH-Midazolam bei 1,55%. Bei Voriconazol lagen 11,2% der Messwerte unterhalb der LLOQ.

#### Strukturmodell

Die Modellentwicklung des Voriconazol-Basismodells unter Verwendung der nicht-log-transformierten Daten erfolgte empirisch zunächst nur unter Berücksichtigung der Plasmakonzentrationen nach i.v. Applikation (Studienphasen 2 und 4). Getestet wurden Ein- und Zweikompartimentmodelle einer Elimination mit Kinetik 1. Ordnung oder einer Michaelis-Menten-Kinetik folgend. Im zweiten Schritt wurden die Voriconazol-Plasmakonzentrationen der Studienphasen 1 und 3 (intestinale Dauerinfusion) in das Modell integriert. Hierauf folgte der Einbau physikochemischer Eigenschaften von Voriconazol sowie physiologischer Gegebenheiten in das Modell, die einzelnen Werte wurden der Literatur entnommen (Tab. 3.23). Nach Entwicklung eines PBPK-Modells wurde Voriconazol-N-oxid empirisch in das bestehende Voriconazol-Modell integriert.

#### Stochastisches Modell

Für die inter- und intraindividuellen Variabilitäten wurde eine Normalverteilung angenommen. Für die interindividuelle Variabilität von Voriconazol wurde ein exponentielles Fehlermodell angewendet, für die intraindividuelle Variabilität wurden ein exponentielles und ein kombiniertes Fehlermodell getestet. Bei Voriconazol-N-oxid wurde bei der interindividuellen Variabilität ein exponentielles Fehlermodell benutzt, zur Ermittlung der intraindividuellen Variabilität ein kombiniertes.

#### Modellevaluation

Zur Modellbeurteilung wurde ein VPC durchgeführt. Weiterhin wurden die Studiendaten von Saari et al.<sup>154</sup> und Katzenmaier et al.<sup>155</sup>, bei denen Voriconazol jeweils oral appliziert wurde, in den Datensatz integriert und die Übertragbarkeit des Modells auf andere Studiendesigns geprüft.

#### Midazolam

##### Strukturmodell

Zur Modellentwicklung wurden die log-transformierten Plasmakonzentrationen verwendet. Zunächst wurden die Midazolam-Plasmakonzentrationen der Studienphasen 1 und 4 (i.v. Dau-



erinfusion) ohne parallele Voriconazol-Zufuhr (h 0-8) zur Testung von Ein- und Zweikompartmentmodellen mit unterschiedlichen Eliminationskinetiken benutzt. Nach Hinzunahme der intestinalen Daten (Studienphasen 2 und 3, h 0-8) wurden eine Resorptionskonstante  $K_a$  und Bioverfügbarkeit geschätzt und daraufhin physiologische Parameter in das Modell eingebaut. Plasmakonzentrationen von 1'-OH-Midazolam wurden als Einkompartment- bzw. Zweikompartmentmodell in das physiologisch basierte Midazolam-Modell integriert. Zusätzlich wurden Urinkonzentrationen von Midazolam- und 1'-OH-Midazolam- $\beta$ -D-Glucuronid sowie freies 1'-OH-Midazolam im Urin durch weitere Kompartimente in das entwickelte Modell eingefügt.

#### Stochastisches Modell

Für die log-transformierten Daten wurde eine Normalverteilung der inter- und intraindividuellen Variabilität angenommen. Für die interindividuelle Variabilität von Midazolam und 1'-OH-Midazolam wurde ein additives Fehlermodell nach log-Transformation der Daten angewendet, das bei Rücktransformation (Exponenzierung) der Daten einem exponentiellen Fehlermodell entspricht. Für die intraindividuelle Variabilität wurde jeweils ein kombiniertes Fehlermodell aus proportionalem und additivem Fehler benutzt.

#### Interaktionsmodell

Nach Entwicklung der Basismodelle für Voriconazol und Midazolam/1'-OH-Midazolam wurden diese durch die Integration einer Inhibition des Midazolam- und 1'-OH-Midazolam-Metabolismus miteinander verknüpft. Unter Einsatz der log-transformierten Daten wurden Inhibitionseffekte auf CYP3A in Darmwand und Leber sowie eine mögliche Hemmung intestinaler und hepatischer UGT-Enzyme getestet. Zusätzlich wurde eine potentielle Hemmung der renalen Clearance von Midazolam (CLR) und 1'-OH-Midazolam (MCLRG) untersucht. Für die Abschätzung der Inhibitionseffekte unter Annahme einer kompetitiven Enzymhemmung durch Voriconazol wurden dessen ungebundenen Gewebekonzentrationen unter Annahme einer gleichmäßigen Verteilung der Substanz im Gewebe (*well-stirred*) zugrunde gelegt.

Zur Modellbeurteilung wurde ein VPC mit 200 Wiederholungen des originalen Studiendesigns durchgeführt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Populationspharmakokinetische Reevaluierung einer klinischen CYP3A-Interaktionsstudie

#### 4.1.1 Modellentwicklung

##### 4.1.1.1 Midazolam-Modell

Die Modellentwicklung des Midazolam-Modells erfolgte schrittweise. Zu Beginn wurden Verteilungscharakteristika durch die Testung konventioneller Ein-, Zwei- und Dreikompartimentmodelle mit Elimination 1. Ordnung bestimmt. Das Dreikompartimentmodell mit einem zentralen und zwei peripheren Kompartimenten mit linearen Verteilungsprozessen wurde aufgrund einer besseren Anpassung dem Zweikompartimentmodell vorgezogen. Der OFV lag beim final ausgewählten Dreikompartimentmodell 132 Punkte niedriger als das entsprechende Zweikompartimentmodell, und die Werte der zusätzlich geschätzten Parameter waren plausibel.

Die Leber wird nach der i.v. Gabe eines Arzneistoffs als Hauptmetabolisierungsort beschrieben<sup>18,19,37,206</sup>. Aus diesem Grund wurde einem Modell von Gordi et al<sup>207</sup> entsprechend ein separates Leberkompartiment eingebaut. Für die hepatische Blutclearance wurde das *well-stirred Modell* (s. Abschnitt 3.3.2) ausgewählt, um die hepatische Verfügbarkeit ( $F_{H, MDZ}$ ) Gl. 4.1 entsprechend auszudrücken:

$$F_{H,MDZ} = 1 - E_{H,MDZ} = 1 - \frac{CL_{int,u,H,MDZ} \cdot fu_{B,MDZ}}{Q_H + CL_{int,u,H,MDZ} \cdot fu_{B,MDZ}} = \frac{Q_H}{Q_H + CL_{int,H} * fu_{B,MDZ}} \quad \text{Gl. 4.1}$$

$E_{H,MDZ}$  ist die hepatische Extraktion,  $CL_{int,H}$  die intrinsische hepatische Clearance basierend auf der ungebundenen Midazolam-Konzentration,  $f_{uB,MDZ}$  ist der publizierte<sup>19,192</sup> ungebundene Midazolam-Anteil im Blut (Tab. 3.1), von dem vereinfachend angenommen wurde, dass dieser konstant bleibt,  $Q_H$  entspricht dem hepatischen Blutfluss, der auf eine allometrische Expression des Körpergewichts gesetzt wurde ( $3,75 \times \text{Körpergewicht}^{0,75}$ )<sup>107</sup>.

Da der intestinale CYP3A-vermittelte Arzneistoffmetabolismus nach oraler Arzneimittelgabe eine zentrale Rolle bei der präsystemischen Elimination spielt<sup>19,37,46</sup>, wurde auch ein Darmwandkompartiment in das Modell eingebaut. Hierbei wurde davon ausgegangen, dass der intestinale Metabolismus den „wahren“ First-pass-Effekt darstellt. Dies bedeutet, dass die CYP-Enzyme in der Darmwand nur während der Arzneistoffresorption zum Gesamtmetabolismus

beitragen, da sie primär in den Spitzen der Villi der Darmzotten lokalisiert sind<sup>53,208</sup>. Die intestinale Verfügbarkeit via Darmwandmucosa ( $F_{G,MDZ}$ ) konnte durch das „ $Q_{Gut}$ “-Modell beschrieben werden, welches die grundlegende Struktur des „well-stirred“-Modells beinhaltet (s. Gl. 4.2).

$$F_{G,MDZ} = 1 - E_{G,MDZ} = 1 - \frac{CL_{int,G} \cdot fu_{G,MDZ}}{Q_{Gut} + CL_{int,G} \cdot fu_{G,MDZ}} = \frac{Q_{Gut}}{Q_{Gut} + CL_{int,G} \cdot fu_{G,MDZ}} \quad \text{Gl. 4.2}$$

$E_{G,MDZ}$  ist die intestinale Extraktion,  $CL_{int,G}$  die intrinsische intestinale Clearance, die auf den ungebundenen Midazolam-Konzentrationen beruht,  $fu_{G,MDZ}$  ist die ungebundene Midazolam-Fraktion in der Darmwand – diese wurde wie allgemein üblich<sup>99</sup> auf unendlich fixiert,  $Q_{Gut}$  war ein Hybridparameter aus dem villösen Blutfluss ( $Q_{villi}$ ) und Arzneistoffpermeabilität (Tab. 3.1)<sup>99</sup>. Für hochpermeable Arzneistoffe wie Midazolam<sup>38</sup> entspricht  $Q_{Gut}$  annäherungsweise  $Q_{villi}$  und kann daher als allometrische Expression des Körpergewichtes bestimmt werden. Interindividuelle Variabilität wurde jeweils für die hepatische und intestinale Clearance in das Modell eingebaut. Das hoch variable Resorptionsprofil von Midazolam konnte am besten durch eine flexible inverse Gauss-Dichte-Funktion  $I(t)$ <sup>209</sup> entsprechend Gl. 4.3 beschrieben werden:

$$I(t) = F_a D \sqrt{\frac{MAT}{2\pi NV^2 t^3}} \exp\left(-\frac{(t - MAT)^2}{2NV^2 MAT t}\right) \quad \text{Gl. 4.3}$$

$F_a$  stellt hierbei den in die Darmwand resorbierten Anteil dar (dieser Wert wurde auf 1 fixiert);  $D$  ist die Dosis,  $MAT$  die mittlere Resorptionszeit,  $NV^2$  die normalisierte Varianz der Gauss-Dichte-Funktion, die für die Form der Kurve verantwortlich ist,  $t$  die Zeit nach der Applikation von Midazolam. Auch Modelle mit abweichenden Resorptionsfunktionen (z.B. Resorption 1. Ordnung mit und ohne Verzögerungszeit (*lag time*), Weibull-Funktion) wurden getestet, zeigten jedoch Unterlegenheit hinsichtlich der Auswahlkriterien für das Modell. Aufgrund der hohen interindividuellen Variabilität und großer Variabilität bei den Behandlungen C und D wurde der typische Wert von  $MAT$  auf 1h fixiert und eine IOV wurde in das Modell integriert.

Um das semiphysiologische Modell für Midazolam zu vervollständigen, wurde ein Portalvenenkompartiment eingefügt, und das zentrale Kompartiment, Leber-, Portalvenen- und Darmwandkompartiment wurden in geeigneter Weise durch die relevanten Blutflüsse miteinander verknüpft. Der Einbau eines zusätzlichen Abbauweges für Midazolam, der von der Inhibition durch Voriconazol nicht beeinflusst wird (verkörpert durch die UGT1A4-vermittelte N-

Glucuronidierung von Midazolam<sup>167,168</sup>), war bei den verfügbaren Daten nicht möglich. Auch die Integration eines fixen Anteils (basierend auf Literaturdaten), der über CYP3A verstoffwechselt wird, verbesserte die Anpassung nicht und wurde zugunsten eines einfacheren Modells mit wenigen fixierten Parametern verworfen.

#### 4.1.1.2 1'-OH-Midazolam-Modell

Für das 1'-OH-Midazolam-Modell wurden die physiologischen Kompartimente aus dem Midazolam-Modell übernommen und mit einem zentralen Kompartiment verbunden. Andere mögliche Abbauege wie beispielsweise die Formation zu 4-OH-Midazolam wurden hierbei nicht berücksichtigt, sodass aufgrund der vorliegenden Daten vereinfachend von einem vollständigen Metabolismus zu 1'-OH-Midazolam ausgegangen wurde. Bevor man zu diesem Entschluss kam, wurde getestet, ob definierte Fraktionen von Midazolam auf anderem Wege metabolisiert wurden als zu 1'-OH-Midazolam. Die Vereinfachung des Modells wird jedoch damit begründet, dass 95% Midazolam in vitro zu 1'-OH-Midazolam metabolisiert werden<sup>194</sup> und dass in vivo 4-OH-Midazolam nicht in nennenswerten Mengen quantifiziert wird<sup>210</sup>. Infolgedessen entsprachen der Input in Darmwand- und Leberkompartiment von 1'-OH-Midazolam der Extraktion von Midazolam in dessen entsprechenden Kompartimenten. Leber und Darmwand konnten erfolgreich als Eliminationsorte durch das „well-stirred“- und das „Q<sub>Gut</sub>“-Modell in das 1'-OH-Midazolam-Modell eingefügt werden (Gl. 4.4 und Gl. 4.5).

$$F_{H,MET} = 1 - E_{H,MET} = 1 - \frac{CL_{met_{int,H}} \cdot fu_{H,MET}}{Q_H + CL_{met_{int,H}} \cdot fu_{H,MET}} = \frac{Q_H}{Q_H + CL_{int,H} * fu_{B,MET}} \quad \text{Gl. 4.4}$$

$$F_{G,MET} = 1 - E_{G,MET} = 1 - \frac{CL_{met_{int,G}} \cdot fu_{G,MET}}{Q_{Gut} + CL_{met_{int,G}} \cdot fu_{G,MET}} = \frac{Q_{Gut}}{Q_{Gut} + CL_{int,G} * fu_{G,MET}} \quad \text{Gl. 4.5}$$

$E_{G,MET}$  und  $E_{H,MET}$  stehen hierbei für die intestinale bzw. hepatische Extraktion,  $CL_{met_{int,G}}$  und  $CL_{met_{int,H}}$  entsprechen der intestinalen bzw. hepatischen Clearance von 1'-OH-Midazolam,  $fu_{G,MET}$  und  $fu_{H,MET}$  sind die ungebundenen 1'-OH-Midazolam -Fraktionen in Darmwand und Blut (beide waren auf den Wert 1 fixiert),  $Q_H$  ist der hepatische Blutfluss,  $Q_{Gut}$  ein Hybridparameter aus villösem Blutfluss ( $Q_{villi}$ ) und Permeabilität ( $CL_{perm}$ ). Für die hepatische Clearance von 1'-OH-Midazolam wurde eine interindividuelle Variabilität integriert.

#### 4.1.1.3 Voriconazol-Modell

Den vorliegenden Daten für die orale Gabe von Voriconazol entsprechend konnte ein Einkompartimentmodell mit einer Elimination 1. Ordnung entwickelt werden. Ein Zweikompartimentmodell lieferte keine zufriedenstellenden Ergebnisse, und auch eine in der Literatur berichtete Michaelis-Menten-Elimination von Voriconazol<sup>211,212</sup> führte zu keiner verbesserten Anpassung der Daten als das lineare Modell. Wie schon bei Midazolam und dessen Metaboliten wurden für Voriconazol semiphysiologische Kompartimente eingebaut, die hepatische Elimination wurde mit Hilfe des „well-stirred“-Modells beschrieben (Gl. 4.6).

$$F_{H,VR C} = 1 - E_{H,VR C} = 1 - \frac{CL_{vr c_{int,H}} \cdot fu_{B,VR C}}{Q_H + CL_{vr c_{int,H}} \cdot fu_{B,VR C}} = \frac{Q_H}{Q_H + CL_{int,H} * fu_{B,VR C}} \quad \text{Gl. 4.6}$$

$E_{H,VR C}$  ist die hepatische Voriconazol-Extraktion,  $CL_{vr c_{int,H}}$  entspricht der hepatischen Clearance,  $fu_{B,VR C}$  ist der ungebundene Voriconazol-Anteil im Blut (fixiert auf den Wert 0,48<sup>134</sup>). Eine mögliche Extraktion von Voriconazol aus der Darmwand konnte aufgrund des Studiendesigns mit ausschließlich oraler Gabe des Inhibitors nicht geschätzt werden. Dies wiederum bedingt jedoch keinen wesentlichen Fehler für das entwickelte Modell, da die Bioverfügbarkeit von Voriconazol mit über 90% als hoch angesehen werden kann<sup>213</sup>. Aus diesem Grund wurde davon ausgegangen, dass die Leber den einzigen Metabolisierungsort für Voriconazol darstellt. Da mit der Sammlung von Plasmaproben erst unmittelbar vor der Midazolam-Gabe begonnen wurde, konnte die Resorptionsphase von Voriconazol aufgrund der Blutabnahmen, die nicht in den unmittelbaren Zeitraum der Voriconazol-Gabe fielen, nicht charakterisiert werden. Man entschied sich daher für die Fixierung der Resorptionskonstante  $k_{a,VR C}$  auf einen Literaturwert ( $3,88 \text{ h}^{-1}$ )<sup>211</sup> für gesunde Probanden. Wegen einer hohen interindividuellen Variabilität führte die Verwendung von IIV auf die intrinsische Clearance  $CL_{vr c_{int,H}}$  und das Verteilungsvolumen  $V_{VR C}$  zu einer signifikanten Verbesserung der Anpassung.

#### 4.1.1.4 Inhibitionsmodell

Die Inhibition des Midazolam-Metabolismus durch Voriconazol wurde sowohl im Darm als auch in der Leber am besten durch einen kompetitiven Hemmtyp beschrieben. Dies konnten auch in vitro-Experimente<sup>196,214</sup> zeigen. Allerdings lieferte eine direkte Verknüpfung der Inhibition mit der ungebundenen Voriconazol-Konzentration in Leber und Darmwand keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Der Einbau eines hypothetischen Enzymkompartiments an beiden

Hauptexpressionsorten von CYP3A in das Modell führte zu einer Senkung des OFV um 76 Punkte. Das hypothetische Enzymkompartiment bewirkt einen lang anhaltenden inhibitorischen Effekt durch eine Quasiakkumulation am Enzym, wo die Hemmung von CYP3A stattfindet. Dies geschieht durch einen stetigen Influx und einen verzögerten Efflux aus diesem Quasikompartiment, wodurch eine in vivo Inhibitionskonstante  $K_{i,MDZ}$  von Voriconazol ermittelt werden konnte, die eine 50%-ige Inhibition der Midazolam-Clearance hervorruft. Die CYP3A-Hemmung wurde somit durch die effektiven Voriconazol-Konzentrationen am jeweiligen Enzymort bestimmt. Die Verteilung von Voriconazol in diese Kompartimente wurde durch eine Geschwindigkeitskonstante 1. Ordnung  $k_{ENZ}$  geregelt, welche den Übergang von ungebundenem Voriconazol aus Leber und Darmwand in die jeweiligen Enzymkompartimente und wieder heraus beschreibt. Mit Hilfe folgender Gleichungen konnten die Midazolam-Clearances in Leber (Gl. 4.7) und Darmwand (Gl. 4.8) beschrieben werden:

$$CL_{int,H} = \frac{CL_{int,H,BL}}{1 + \frac{C_{ES,H,VRC}}{K_{i,MDZ}}} \quad \text{Gl. 4.7}$$

$$CL_{int,G} = \frac{CL_{int,G,BL}}{1 + \frac{C_{ES,G,VRC}}{K_{i,MDZ}}} \quad \text{Gl. 4.8}$$

$CL_{int,H,BL}$  und  $CL_{int,G,BL}$  stellen jeweils die basalen Clearances von Midazolam (ohne den Einfluss von Voriconazol) dar.  $C_{ES,H,VRC}$  und  $C_{ES,G,VRC}$  sind die jeweiligen aktuellen effektiven Inhibitorkonzentrationen von Voriconazol am Enzymort von Darmwand und Leber;  $K_{i,MDZ}$  ist die Inhibitionskonstante von Voriconazol für die Hemmung des Midazolam-Metabolismus. Auch für  $K_{i,MDZ}$  wurde eine interindividuelle Variabilität berücksichtigt, was zu einer weiteren Verminderung des OFV um 133 Punkte führte.

Voriconazol schien weiterhin die Clearance von gebildetem 1'-OH-Midazolam in Leber und Darmwand durch eine kompetitive Hemmung zu erniedrigen, was durch die Inhibitionskonstante  $K_{i,MET}$  ausgedrückt wurde (s. Gl. 4.9 und Gl. 4.10).

$$CL_{met, int,H} = \frac{CL_{met, int,H,BL}}{1 + \frac{C_{ES,H,VRC}}{K_{i,MET}}} \quad \text{Gl. 4.9}$$

$$CL_{met, int, G} = \frac{CL_{int, G, BL}}{1 + \frac{C_{ES, G, VRC}}{K_{i, MET}}}$$

Gl. 4.10

$CL_{met, int, H, BL}$  und  $CL_{met, int, G, BL}$  entsprechen hierbei der intrinsischen Baseline-Clearance in Abwesenheit des Inhibitors Voriconazol in Leber und Darmwand. In Abb. 4.1 ist schematisch das Interaktionsmodell dargestellt. Der Versuch der Ermittlung eines inhibierbaren sowie nicht inhibierbaren Anteils der 1'-OH-Midazolam-Clearance führte zu keinem sinnvollen Ergebnis.

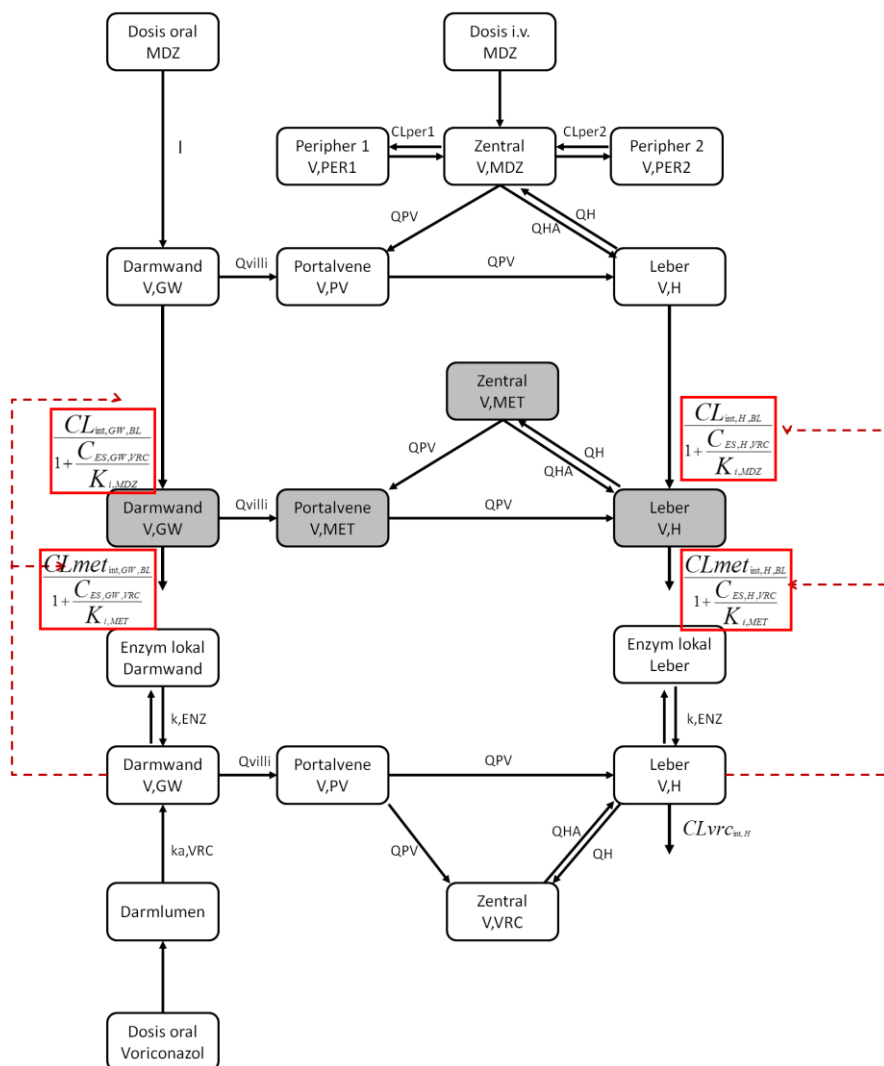


Abb. 4.1 Schematisches Interaktionsmodell von Midazolam, 1'-OH-Midazolam und Voriconazol. **MDZ** Midazolam, **MET** 1'-OH-Midazolam, **VRC** Voriconazol, **IV** intravenös,  $C_{ES, GW, VRC}$  Voriconazolkonzentration am Enzym in der Darmwand,  $C_{ES, H, VRC}$  Voriconazolkonzentration am Enzym in der Leber,  $CL_{int, GW, BL}$  intrinsische Basis-Clearance von Midazolam in der Darmwand,  $CL_{int, H, BL}$  intrinsische Basis-Clearance von Midazolam in der Leber,

$CL_{met,Int,G,BL}$  intrinsische 1'-OH-Midazolam-Clearance in der Darmwand,  $CL_{met,Int,H,BL}$  intrinsische 1'-OH-Midazolam-Clearance in der Leber,  $CL_{VRC,Int,H}$  intrinsische Voriconazol-Clearance in der Leber,  $CL_{PER1}$  Verteilungsclearance in das periphere Kompartiment 1,  $CL_{PER2}$  Verteilungsclearance in das periphere Kompartiment 2,  $I$  Input-Funktion,  $k_{a,VRC}$  Resorptionskonstante von Voriconazol,  $k_{ENZ}$  Geschwindigkeitskonstante des Enzymortes,  $K_{i,MDZ}$  Inhibitionskonstante von Voriconazol für die Hemmung des Midazolam-Metabolismus,  $K_{i,MET}$  Inhibitionskonstante von Voriconazol für die Hemmung des 1'-OH-Midazolam-Metabolismus,  $Q_{villi}$  villöser Blutfluss,  $Q_H$  hepatischer Blutfluss,  $Q_{HA}$  Blutfluss in der Leberarterie,  $Q_{PV}$  Blutfluss in der Portalvene,  $V_{GW}$  Volumen der Darmwand,  $V_H$  Volumen der Leber,  $V_{MDZ}$  Verteilungsvolumen des zentralen Midazolam-Kompartiments,  $V_{MET}$  Verteilungsvolumen des zentralen 1'-OH-Midazolam-Kompartiments,  $V_{PER1}$  Verteilungsvolumen des peripheren Midazolam-Kompartiments 1,  $V_{PER2}$  Verteilungsvolumen des peripheren Midazolam-Kompartiments 2,  $V_{PV}$  Volumen der Portalvene,  $V_{VRC}$  Verteilungsvolumen des zentralen Voriconazol-Kompartiments. Die gestrichelten Pfeile beschreiben am Enzymort den Inhibitionseffekt von Voriconazol auf die hepatische und intestinale Clearances von Midazolam und 1'-OH-Midazolam

#### 4.1.2 Schätzung der Parameter und Modellbeurteilung

In Tab. 4.1 sind die finalen Parameterschätzungen dargestellt. Voriconazol erscheint nach der Reanalyse als starker Inhibitor des Midazolam-Metabolismus mit einer geschätzten in vivo Inhibitionskonstante  $K_{i,MDZ}$  von 0,34  $\mu$ M (119 ng/mL) am Enzymort. Hinsichtlich des Metabolismus von 1'-OH-Midazolam zeigte sich eine schwächere Hemmung mit einem  $K_{i,MET}$  von 1,38  $\mu$ M (481 ng/mL). In Abb. 4.2 sind die Goodness-of-Fit-Plots dargestellt. Speziell die IPREDs waren essentiell für die Beurteilung des Modells wegen eines geringen Ausmaßes von  $\epsilon$ -Shrinkage (< 7 %). Die nahezu normalverteilten CWRES streuten um die Null-Ordinaten. Im Plot CWRES vs. Zeit von Voriconazol konnte ein leichter Trend in Richtung Modellmisspezifikation beobachtet werden, allerdings führten alle getesteten Modelle zu keiner besseren Anpassung.



Tab. 4.1 Pharmakokinetische Parameter des finalen Modells

Parameter (unit)	Definition	NONMEM <sup>a</sup>		Bootstrap	
		Schätzwert	90% KI <sup>b</sup>	Median	90% KI <sup>c</sup>
<b>Schätzwerte für <math>\theta</math></b>					
$CL_{int,H,BL}$ (l/h)	Ungebundene hepatische intrinsische Clearance MDZ	1640	(1459 - 1843)	1651	(1480 - 1921)
$CL_{int,GW,BL}$ (l/h)	Ungebundene intrinsische Darmwand-Clearance MDZ	26.7	(22.7 - 31.4)	26.5	(22.3 - 31.2)
$CL_{PER1}$ (l/h)	Verteilungsclearance zum 1. peripheren MDZ-Kompartiment	9.71	(6.90 - 13.6)	9.55	(6.02 - 13.5)
$CL_{PER2}$ (l/h)	Verteilungsclearance zum 2. peripheren MDZ-Kompartiment	173	(146 - 205)	172	(144 - 207)
$V_{MDZ}$ (l)	Verteilungsvolumen des zentralen MDZ-Kompartiments	20.4	(15.3 - 27.3)	20.0	(15.1 - 27.2)
$V_{PER1}$ (l)	Verteilungsvolumen des 1. peripheren MDZ-Kompartiments	79.1	(63.0 - 99.5)	76.9	(51.3 - 95.0)
$V_{PER2}$ (l)	Verteilungsvolumen des 2. peripheren MDZ-Kompartiments	55.2	(51.1 - 59.6)	55.2	(50.0 - 58.7)
$MAT$ (h)	Mittlere Resorptionszeit von MDZ	1.0	(FIXED)		
$NV$	Normalisierte Varianz der Gauss'schen Dichtefunktion	0.716	(0.571 - 0.897)	0.73	(0.579 - 0.906)
$CLmet_{int,H,BL}$ (l/h)	Ungebundene hepatische intrinsische Clearance 1-OH-MDZ	186	(169 - 204)	187	(171 - 209)
$CLmet_{int,GW,BL}$ (l/h)	Ungebundene intrinsische Darmwand-Clearance 1-OH-MDZ	27.5	(19.7 - 38.2)	26.6	(18.6 - 37.4)
$V_{MET}$ (l)	Verteilungsvolumen des zentralen 1-OH-MDZ-Kompartiments	65.7	(58.8 - 73.4)	66.7	(59.0 - 74.7)
$CLvrc_{int,H}$ (l/h)	Ungebundene hepatische intrinsische Clearance VRC	54.3	(45.1 - 65.3)	54.2	(44.6 - 65.4)
$V_{VRC}$ (l)	Verteilungsvolumen des zentralen VRC-Kompartiments	149	(128 - 174)	148	(129 - 176)
$k_{a,VRC}$ (h <sup>-1</sup> )	Resorptionskonstante VRC	3.88	(FIXED)		
$k_{ENZ}$ (h <sup>-1</sup> )	Geschwindigkeitskonstante von VRC zum Enzymort	0.0834	(0.0566 - 0.123)	0.0758	(0.0362 - 0.114)
$K_{i,MDZ}$ (ng/ml)	Inhibitionskonstante von VRC für die Inhibition von MDZ	119	(97.1 - 146)	118	(94.1 - 145)
$K_{i,MET}$ (ng/ml)	Inhibitionskonstante von VRC für die Inhibition von 1-OH-MDZ	481	(410 - 564)	477	(405 - 570)
<b>Schätzwerte für <math>\omega^2</math></b>					
$IIV CL_{int,H,BL}$ (CV%)	Interindividuelle Variabilität der hepatischen Clearance MDZ	18.3	(12.9 - 22.5)	18.0	(11.8 - 22.8)
$IIV CL_{int,GW,BL}$ (CV%)	Interindividuelle Variabilität der Darmwand-Clearance MDZ	24.0	(14.6 - 30.9)	23.5	(11.4 - 30.8)
$IIV CL_{PER1}$ (CV%)	Interindividuelle Variabilität der peripheren Clearance MDZ	85.5	(58.9 - 110.7)	83.3	(58.5 - 139.7)
$IIV CLmet_{int,H,BL}$ (CV%)	Interindividuelle Variabilität der hepatischen Clearance 1-OH-MDZ	13.3	(7.9 - 17.1)	12.5	(6.9 - 16.6)
$IIV CLvrc_{int,H}$ (CV%)	Interindividuelle Variabilität der hepatischen Clearance VRC	36.0	(22 - 46.6)	33.3	(20.6 - 45.4)
$IIV V_{VRC}$ (CV%)	Interindividuelle Variabilität zentrales Verteilungsvolumen VRC	29.1	(13.2 - 39.5)	27.9	(14.9 - 37.7)
$IIV K_{i,MDZ}$ (CV%)	Interindividuelle Variabilität der Inhibitionskonstante für MDZ	38.8	(15 - 54.3)	35.7	(14.1 - 52.5)
$IOV MAT$ (CV%)	Inter-occasional Variabilität der mittleren Resorptionszeit MDZ	91.4	(51.5 - 128.8)	91.0	(59.9 - 141.6)
<b>Schätzwerte für <math>\sigma^2</math></b>					
$RV MDZ$ (CV%)	Residualvariabilität MDZ	14.5	(13.1 - 15.8)	14.2	(12.7 - 15.6)
$RV MET$ (CV%)	Residualvariabilität 1-OH-MDZ	21.0	(16.3 - 24.8)	20.6	(16.8 - 25.2)
$RV VRC$ (CV%)	Residualvariabilität VRC	23.6	(21.5 - 25.6)	23.1	(20.4 - 25.3)

CV Variationskoeffizient; IIV interindividuelle Variabilität; IOV inter-occasional Variabilität; KI Konfidenzintervall MDZ Midazolam; MET 1'-OH-Midazolam; VRC Voriconazol; RV Residualvariabilität

<sup>a</sup> Werte wurden mit dem finalen Modell geschätzt, welches auf den Original-Datensatz angewendet wurde

<sup>b</sup> Konfidenzintervalle (KI) basieren auf den mit NONMEM erhaltenen Standardfehlern (unter der Annahme einer Normalverteilung der Daten in der log-Domäne des jeweiligen Parameters, berechnet als  $\theta \pm z_{1-\alpha/2} \times SE$  (SE ist der von NONMEM ausgegebene Standardfehler,  $z_{1-\alpha/2}$  ist das 0.95-Perzentil der Standardnormalverteilung)

<sup>c</sup> die nicht-parametrischen Konfidenzintervalle basieren auf den 5%- und 95%-Perzentilen, die durch die Bootstrap-Analyse erhalten wurden

CV% für IIV und IOV wurden berechnet als  $\sqrt{\exp(\omega^2) - 1}$ ; CV% für RV berechnet sich als  $\sqrt{\sigma^2}$ ;

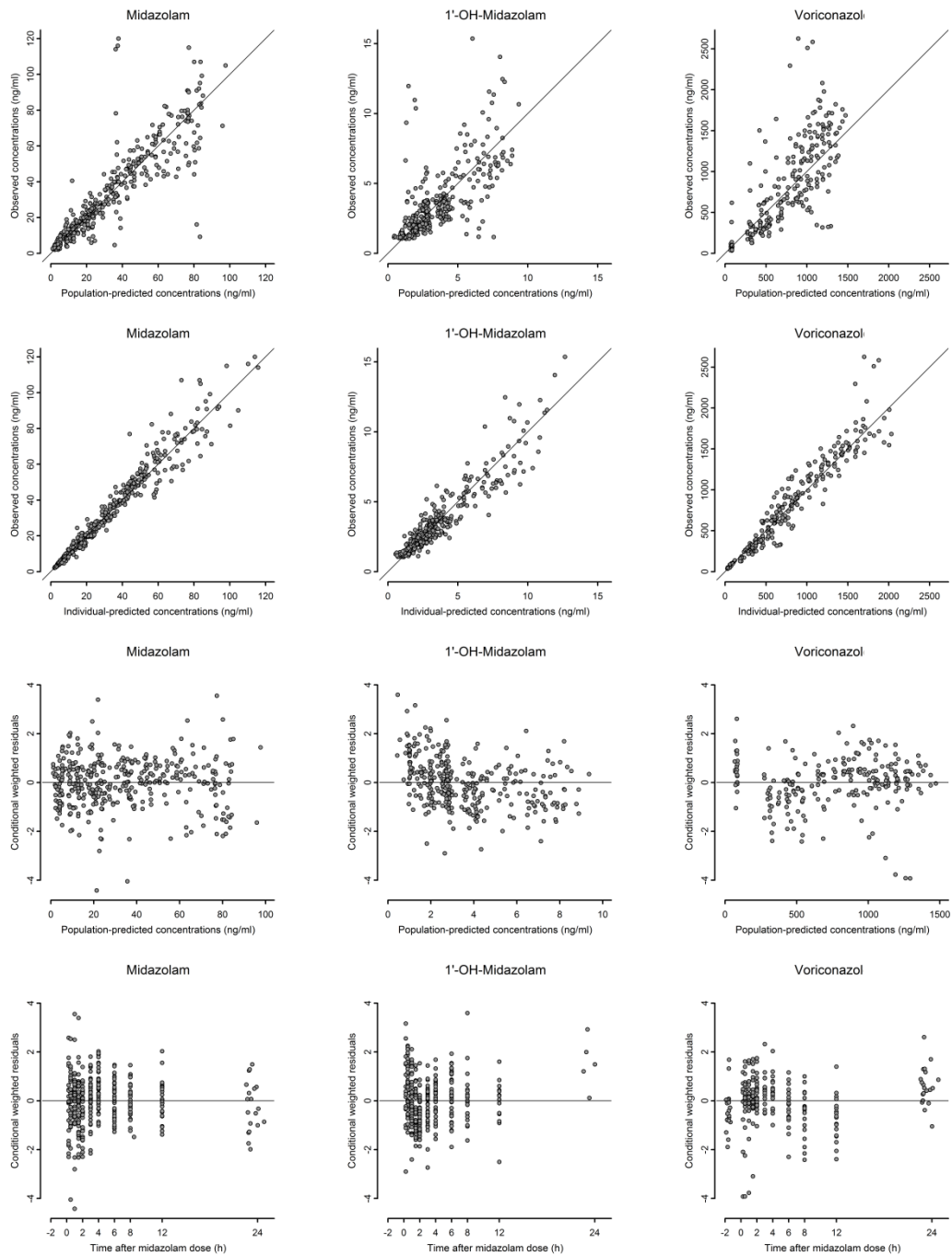


Abb. 4.2 Goodness-of-fit-Plots des finalen Modells der reanalysierten Daten. Von oben nach unten für Midazolam, 1'-OH-Midazolam und Voriconazol: beobachtete Konzentrationen gegen Populationsschätzwerte (PRED), beobachtete Konzentrationen gegen individuelle Schätzwerte (IPRED), konditional gewichtete Residuen (CWRES) gegen Populationsschätzwerte, konditional gewichtete Residuen (CWRES) gegen Zeit nach der Midazolamgabe

In der Gesamtheit beschrieben die PREDs und IPREDs die Daten adäquat. Die offensichtliche Unterschätzung im Plot beobachtete Konzentrationen (DV) vs. PREDs bei Voriconazol beruht auf dem Einfluss der Werte eines einzelnen Probanden.

Die finalen Parameterschätzungen sind den medianen Bootstrapwerten sehr ähnlich. Der relative Fehler wurde als Differenz zwischen dem Bootstrap-Median und der finalen Schätzung für einen Parameter geteilt durch die finale Schätzung des Parameters ermittelt, die Werte für den relativen Fehler lagen zwischen -9,1 und 1,6% (Tab. 4.1). Die nichtparametrischen 90%-Konfidenzintervalle aus der Bootstrap-Analyse stimmten auch mit jenen, die durch die Standardfehler mit NONMEM erhalten wurden, gut überein. Daher zeigte die Bootstrapanalyse eine akzeptable Richtigkeit und unverfälschte Schätzungen. Auch der VPC zeigte die Eignung des Modells und gute Vorhersagbarkeit (Abb. 4.3, Abb. 4.4, Abb. 4.5). Der Median spiegelte den Trend der beobachteten Daten wider, und das 90% Vorhersageintervall deckte die Variabilität der Beobachtungen hinreichend ab. Nur eine Überschätzung in der geschätzten Variabilität hinsichtlich der Hemmung durch Voriconazol konnte nicht behoben werden und wurde daher akzeptiert. Auch wurde eine leichte Überschätzung der 1'-OH-Midazolam-Konzentrationen in Behandlung A am Ende als tolerierbar angesehen.

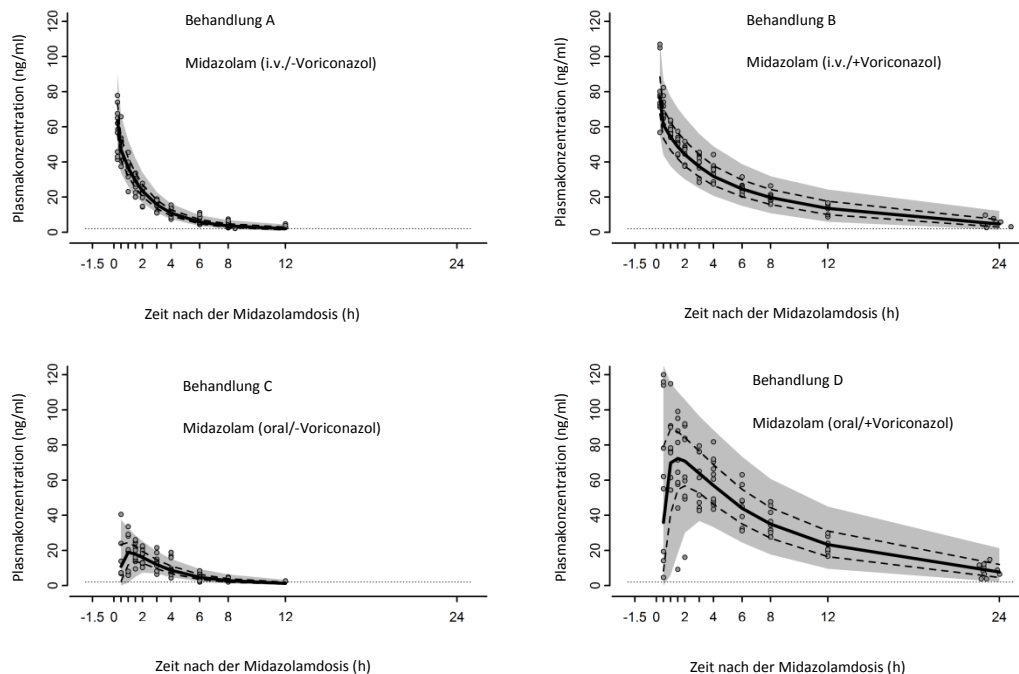


Abb. 4.3 Visual Predictive Check für Midazolam. **Punkte** Beobachtungen, **schattierte Fläche** 90 % Vorhersageintervall, **durchgezogene Linie** Median der simulierten Daten, **gestrichelte Linien** 25. und 75. Perzentil der simulierten Daten, **gepunktete Linie** untere Quantifizierungsgrenze (2 ng/mL). **i.v.** intravenös.

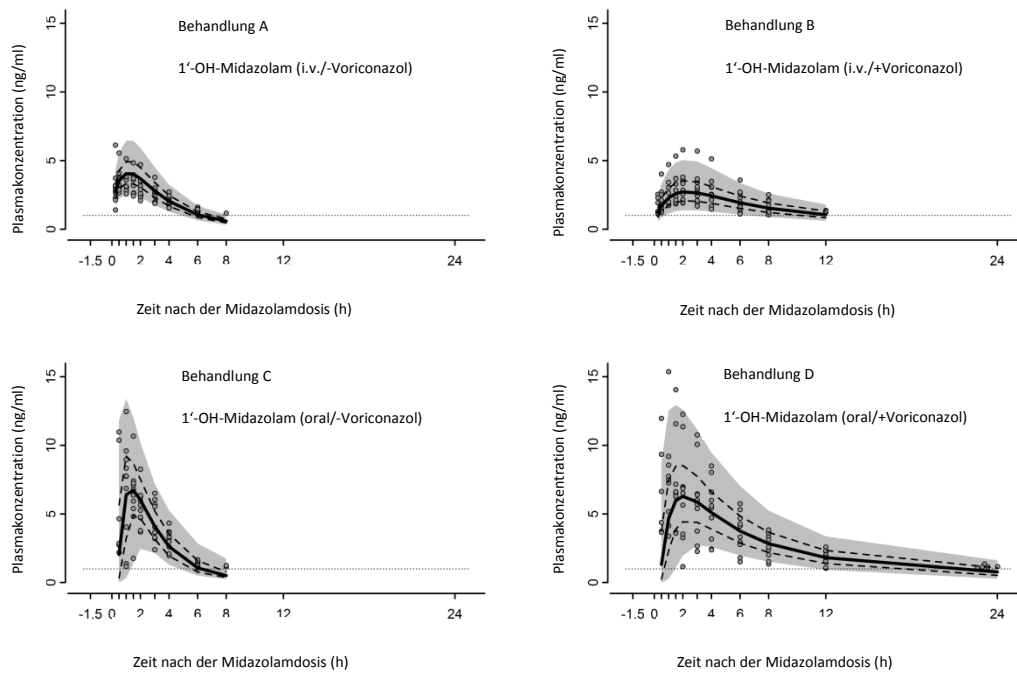


Abb. 4.4 Visual Predictive Check für 1'-OH-Midazolam. **Punkte** Beobachtungen, **schattierte Fläche** 90 % Vorhersageintervall, **durchgezogene Linie** Median der simulierten Daten, **gestrichelte Linien** 25. und 75. Perzentil der simulierten Daten, **gepunktete Linie** untere Quantifizierungsgrenze (1 ng/mL). **i.v.** intravenös.

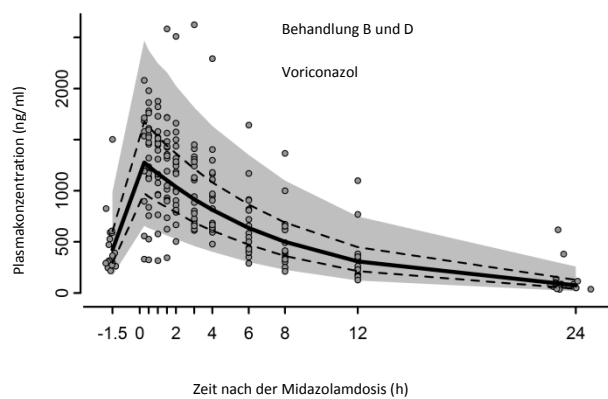


Abb. 4.5 Visual Predictive Check für Voriconazol. **Punkte** Beobachtungen, **schattierte Fläche** 90 % Vorhersageintervall, **durchgezogene Linie** Median der simulierten Daten, **gestrichelte Linien** 25. und 75. Perzentil der simulierten Daten.

### 4.1.3 Anwendung des Modells

Voriconazol hemmte die CYP3A-Aktivität stark. Basierend auf den Daten des ursprünglichen Studiendesigns sagte das finale Modell eine AUCR von 3,3 für die intravenöse und 9,3 für die orale Gabe von Midazolam voraus. Eine differenzierte Unterscheidung zwischen der CYP3A-Aktivität in Darmwand und Leber zeigte einen ausgeprägteren inhibierenden Effekt der intestinalen CYPs. Die hepatische Midazolam-Clearance sank in 1 000 virtuellen Probanden um 80,6 % ( $\pm 7,9$ ), die intestinale sogar maximal um 92,2 % ( $\pm 3,0$ ). Abb. 4.6 bildet den vollständigen zeitlichen Verlauf der CYP3A-Inhibition an beiden betrachteten Expressionsorten ab. Bei der standardmäßigen Gabe von Voriconazol im Originalstudiendesign trat eine maximale Hemmung der CYP3A-Aktivität nach 24,75 h in der Darmwand und nach 29,75 h in der Leber auf. Hinsichtlich der Annahme einer verlängerten Inhibition über die Aufenthaltsdauer von Voriconazol am Enzym hinaus würde es erst vier Tage nach der letzten Dosierung von Voriconazol zu einer vollständigen Erholung der Enzymaktivität kommen.

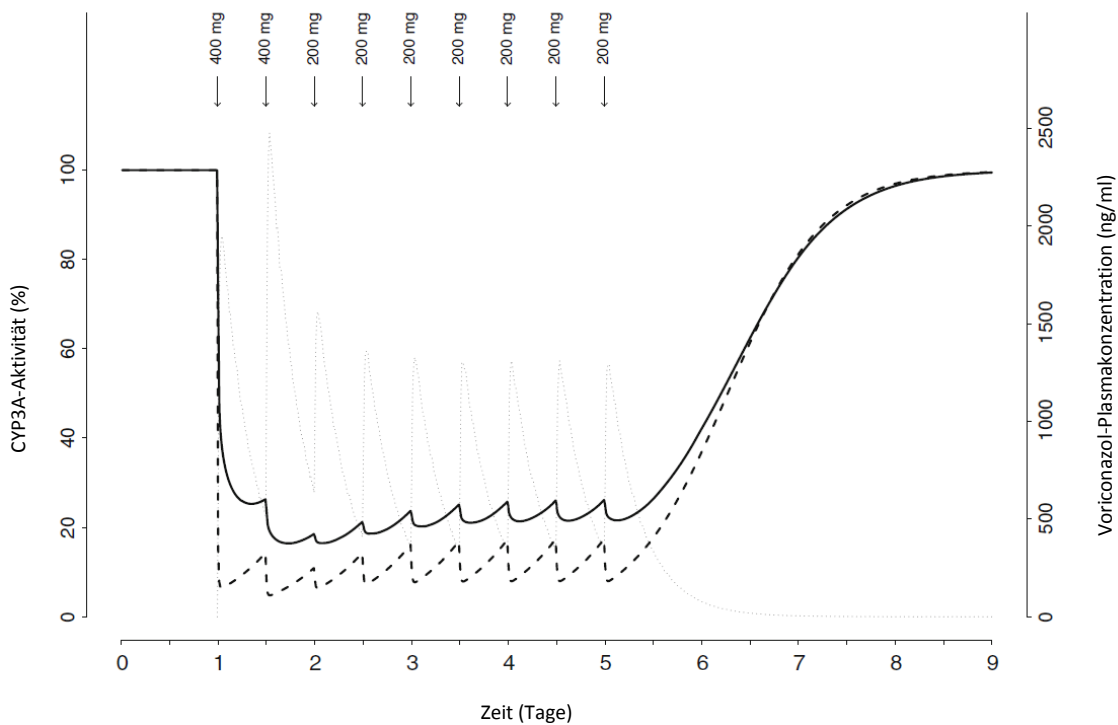


Abb. 4.6 Effekt mehrmaliger oraler Voriconazolapplikation auf die hepatische und intestinale CYP3A-Aktivität. Veränderung der hepatischen (**durchgezogene Linie**) und intestinalen (**gestrichelte Linie**) CYP3A-Aktivität über die Zeit nach mehrmaliger oraler Voriconazolgabe. **Fein gestrichelte Linie** Voriconazol-Plasmakonzentration. **Pfeile** zeigen Dosierungen von Voriconazol an

Die erhaltenen AUCR aus der Simulation des Studiendesigns von Katzenmaier et al.<sup>155</sup> stimmen mit den publizierten in vivo Daten überein (Tab. 4.2). Der Einfluss der Art der Applikation von Voriconazol auf das Ausmaß der Midazolam-Exposition ist in Abb. 4.7 zu sehen. Nachdem von der i.v. Gabe von Voriconazol an Tag 6 auf die orale Gabe gewechselt wurde, erhöhte sich die Aufnahme von Midazolam in den großen Kreislauf um fast das Zweifache (AUC von 0-24 h steigt von 429 ng/mL an Tag 4 auf 829 ng/mL an Tag 10 an).

Tab. 4.2 Veränderungen in der Midazolam-AUC beobachtet von Katzenmaier et al.<sup>155</sup> und simulationsbasierte Vorhersage des Modells

Parameter	Studientag									
	1	2	3	5	8	9	10	11	12	
<i>Beobachtete Werte Katzenmaier et al.</i>										
AUCR	4,38	9,20	9,84	8,46	7,99	8,48	5,64	2,60	1,36	
	(3,58- 5,35)	(7,86- 10,77)	(8,25- 11,74)	(7,09- 10,10)	(6,90- 9,26)	(7,00- 10,26)	(4,41- 7,21)	(2,14- 3,16)	(1,13- 1,65)	
<i>Modellvorhersage (simulationsbasiert)</i>										
AUCR	7,11	11,88	11,99	9,60	8,71	10,10	4,66	1,71	1,17	
	(3,89- 11,72)	(6,30- 20,41)	(5,83- 21,38)	(4,92- 17,51)	(4,71- 15,22)	(5,12- 18,13)	(2,39- 8,91)	(1,27- 2,55)	(1,05- 1,35)	

Ergebnisse der Modellvorhersage wurden durch die Simulation des Studiendesigns von Katzenmaier et al. Für 1 000 virtuelle Individuen erhalten.

Angabe der Werte als Mittelwert  $\pm$  95 % Konfidenzintervall. Voriconazolgabe an Studientag 1 zweimal täglich 400 mg zweimal pro Tag, Tag 2-8 zweimal täglich 200 mg, an Tag 9 200 mg einmal pro Tag. Midazolamgabe (3 mg, oral) vor der Voriconazolgabe und an Tag 1, 2, 3, 5, 8, 9, 10, 11 and 12 einmal täglich 10 Minuten nach der morgendlichen Voriconazoldosis.

**AUCR** Verhältnis der inhibierten Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (AUC) über der Basal-AUC von Midazolam.

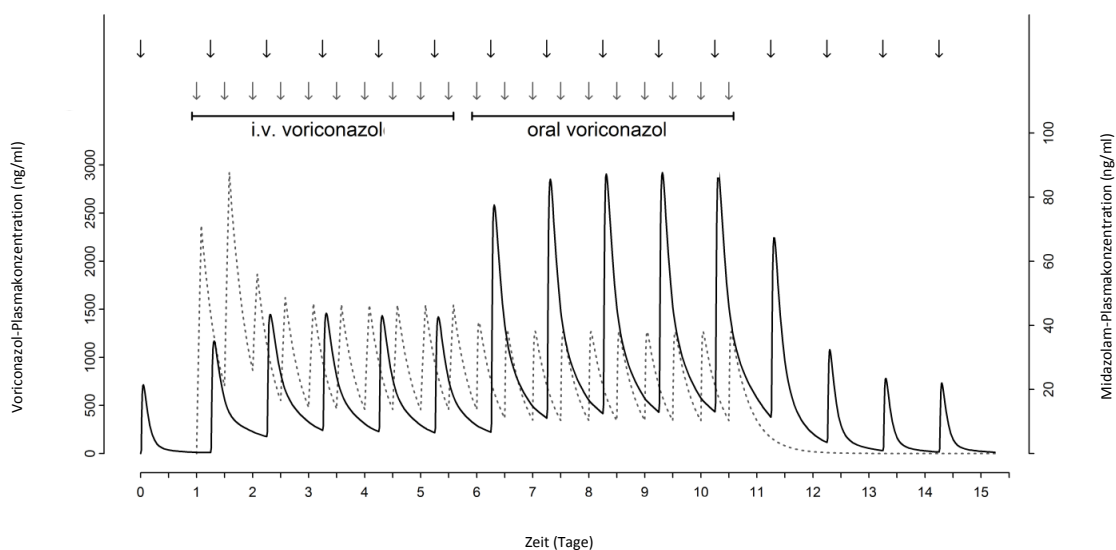


Abb. 4.7 Einfluss des Applikationsweges von voriconazol auf das Ausmaß der Midazolam-Exposition nach dessen oraler Gabe. **Durchgezogene Linie:** Midazolam, **gestrichelte Linie:**

Voriconazol. **Pfeile** stehen für Dosierungen: obere Reihe Midazolam 7,5 mg oral, untere Reihe Voriconazol i.v. Startdosis 400 mg 2x/Tag an Tag 1, i.v. Erhaltungsdosis 200 mg 2x/Tag an Tag 2-6, gefolgt von 200 mg 2x/Tag Erhaltungsdosis oral **i.v.** intravenös

Der Einfluss einer zeitlich versetzten Midazolam-Gabe (sog. Dose-Staggering) zwischen zwei Voriconazol-Dosen war sehr gering, speziell bei i.v. Gabe von Midazolam (Abb. 4.8). Für orales Midazolam war das AUCR dann maximal (10,9-fach), wenn Midazolam 1 h nach der letzten Voriconazol-Dosis gegeben wurde, und minimal bei einer zeitlichen Versetzung der Midazolam-Gabe von 9 h (10,0-fach).

Tab. 4.3 zeigt die Ergebnisse der Modellschätzungen für die AUC und  $C_{max}$  basierend auf den Simulationen im Vergleich zu den Ergebnissen der nicht-kompartimentellen Auswertung<sup>154</sup>.

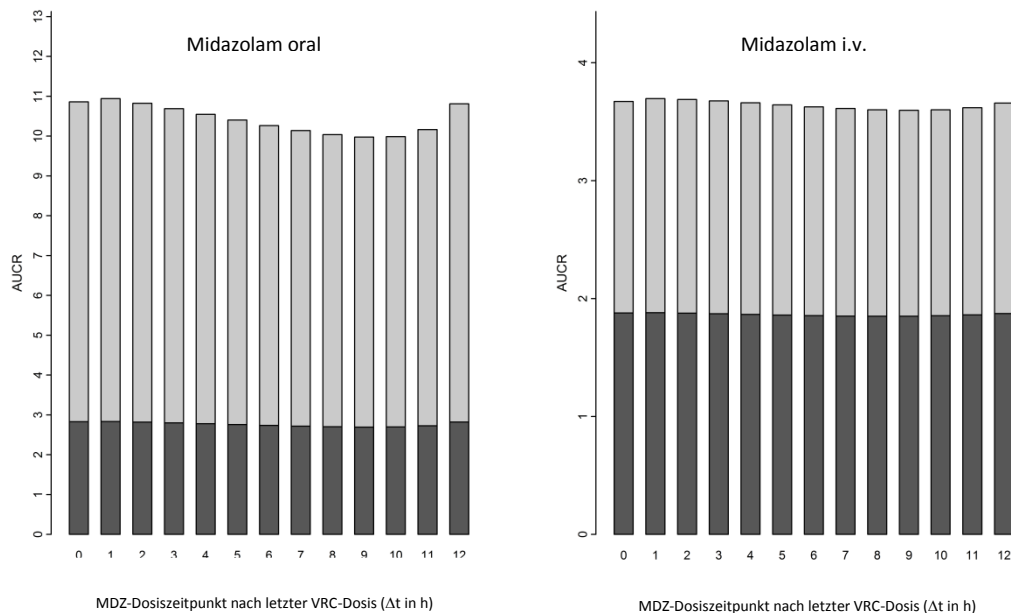


Abb. 4.8 Einfluss von Dose Staggering im Steady State. Effekt von Dose Staggering einer Einzeldosis Midazolam auf das AUCR zwischen zwei oralen Dosen Voriconazol im Steady State, das alle 12 Stunden appliziert wird. Links: Effekt auf AUCR nach i.v. Gabe von Midazolam, rechts: Effekt auf AUCR nach oraler Gabe von Midazolam. **Hellgraue Balken** AUCR von Midazolam, **dunkelgraue Balken** AUCR von 1-OH-Midazolam. **AUCR** Verhältnis der Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (AUC) im inhibierten Zustand gegen Basal-AUC; **MDZ** Midazolam; **VRC** Voriconazol; **i.v.** intravenös

Tab. 4.3 Vergleich der NCA-Ergebnisse (berichtet von Saari et al.<sup>154</sup>) und der Modellvorhersage basierend auf Simulationen

PK Parameter		Behandlung			
		A	B	C	D
<i>Werte aus der NCA-Analyse</i>					
MDZ	AUC <sup>a</sup> (ng · mL <sup>-1</sup> · h)	151 ± 40	534 ± 88	91 ± 30	855 ± 104
	C <sub>max</sub> (ng · mL <sup>-1</sup> )			24,1 ± 7,2	86,6 ± 26,2
1-OH-MDZ	AUC <sup>a</sup> (ng · mL <sup>-1</sup> · h)	16,1 ± 3,20	27 ± 13,1	24,4 ± 5,7	60,8 ± 22,1
	C <sub>max</sub> (ng · mL <sup>-1</sup> )			8,2 ± 2,7	7,7 ± 3,8
<i>Modellvorhersage (basierend auf Simulationen)</i>					
MDZ	AUC <sup>b</sup> (ng · mL <sup>-1</sup> · h)	157 ± 31	522 ± 164	95 ± 24	888 ± 324
	C <sub>max</sub> (ng · mL <sup>-1</sup> )			24,5 ± 9,4	98,9 ± 26,2
1-OH-MDZ	AUC <sup>b</sup> (ng · mL <sup>-1</sup> · h)	21,9 ± 3,24	38 ± 6,5	29,1 ± 5,2	77,7 ± 21,0
	C <sub>max</sub> (ng · mL <sup>-1</sup> )			10,7 ± 3,9	10,8 ± 4,4

Die Daten sind angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung; Behandlung A: Midazolam i.v. (- Voriconazol); B: Midazolam i.v. (+ Voriconazol); C: Midazolam oral (- Voriconazol); D: Midazolam oral (+ Voriconazol)

**MDZ** Midazolam; **1-OH-MDZ** 1'-OH-Midazolam; **AUC** Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve; **C<sub>max</sub>** maximale Konzentration; **NCA** nicht-kompartimentelle Analyse

<sup>a</sup> ermittelt durch klassische NCA (Trapezregel mit Extrapolation nach Unendlich)

<sup>b</sup> ermittelt mit Hilfe der Trapezregel mit kurzen zeitlichen Abständen zwischen den Probenahmen und einer Sammelperiode von 60 Stunden nach der Midazolamgabe

Die Ergebnisse der Modellvorhersage wurden durch die Simulation der Original-Studie für 1000 virtuelle Individuen erhalten

## 4.2 In vitro Untersuchung der Enzyminhibition durch

### Voriconazol und Voriconazol-N-oxid

#### 4.2.1 In vitro Untersuchung der Inhibition von CYP3A4

##### 4.2.1.1 Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte

Voriconazol und Voriconazol-N-oxid inhibieren die CYP3A4-Aktivität in HLM (Abb. 4.9). Für Voriconazol liegt die mittlere inhibitorische Konzentration bei 11,2 µM (7,02-15,4), für Voriconazol-N-oxid ist der Wert ähnlich mit 18,9 µM (4,86-32,9).



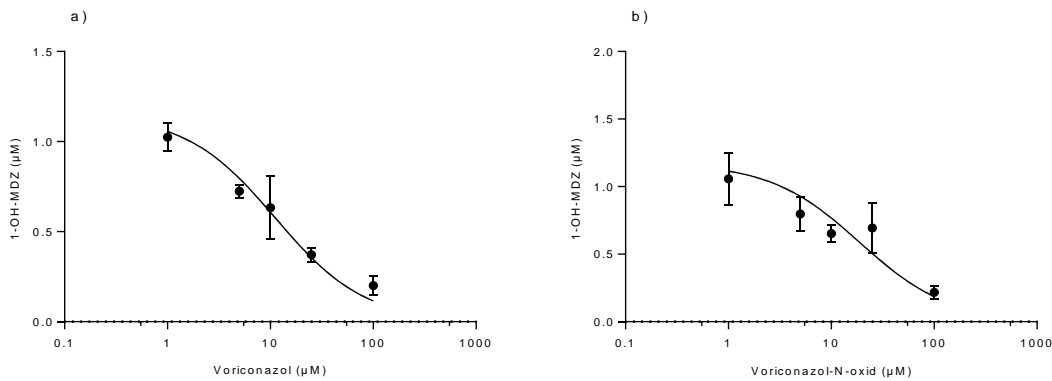
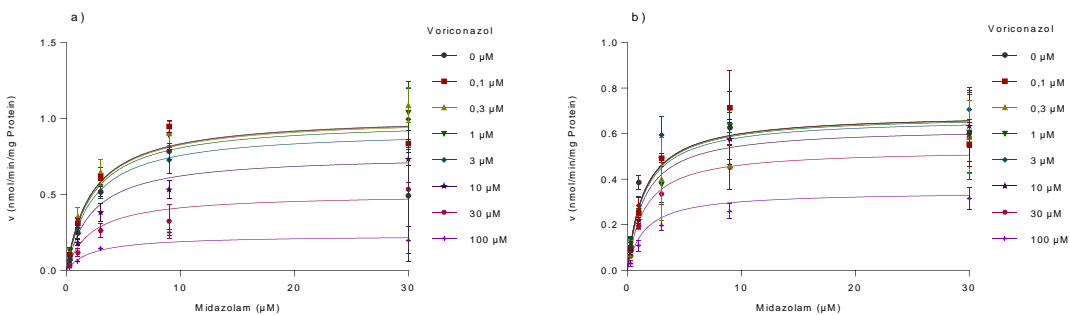


Abb. 4.9 IC<sub>50</sub>-Plot für die Inhibition von CYP3A4 in humanen Lebermikrosomen durch a) Voriconazol und b) Voriconazol-N-oxid

#### 4.2.1.2 Bestimmung der K<sub>i</sub>-Werte

Zur Bestimmung des Inhibitionstyps wurden Inkubationsversuche mit HLM und CYP3A4-Supersomes™ zur Ermittlung der Inhibitionskonstante K<sub>i</sub> durchgeführt. Nach Eingabe der mittels LC-MS/MS ermittelten Daten in Graphpad Prism 6.01 unter Berücksichtigung statistischer Bewertungskriterien wie der Summe der Abstandsquadrate sowie des Determinationskoeffizienten R<sup>2</sup> und der visuellen Beurteilung der Michaelis-Menten- und Dixon-Plots (s. Abb. 4.10 und Abb. 4.12) konnte für Voriconazol in HLM und CYP3A4-Supersomes™ ein nichtkompetitiver Inhibitionstyp nachgewiesen werden (Tab. 4.4).



Michaelis-Menten-Plots der nichtkompetitiven Inhibition von CYP3A4 durch Voriconazol in a) HLM und b) in CYP3A4-Supersomen

Abb. 4.10 Michaelis-Menten-Plot zur Darstellung der nichtkompetitiven Inhibition von CYP3A4 durch Voriconazol in a) humanen Lebermikrosomen und b) CYP3A4-Supersomes™

Tab. 4.4 Ergebnisse der Inkubationen zur Bestimmung des Hemmtyps von Voriconazol und Voriconazol-N-oxid bezüglich der CYP3A4-Aktivität

Inhibitor	System	Hemmtyp	$K_i$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{\text{max}}$ ( $\text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{mg}$ Protein))	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$CL_{\text{int}}$ ( $\mu\text{L}/(\text{min} \cdot \text{mg}$ Protein))
VRC	HLM	nichtkomp.	29,3 (20,2-38,3)	1,02 (0,850-1,09)	2,24 (1,71-2,71)	0,455
	CYP3A4	nichtkomp.	23,8 (11,1-36,5)	0,961 (0,887-1,03)	1,69 (1,23-2,14)	
	HLM	nichtkomp.	27,8 (18,3-37,2)	0,864 (0,800-0,928)	1,71 (1,25-1,56)	
VRC-NO		kompetitiv	2,87 (1,55-4,20)	0,815 (0,758-0,873)	1,20 (0,804-1,60)	0,678
	CYP3A4	nichtkomp.	54,1 (36,0-72,2)	0,637 (0,595-0,679)	1,44 (1,08-1,81)	
		kompetitiv	5,52 (3,05-7,99)	0,604 (0,566-0,641)	1,04 (0,727-1,35)	
KET	HLM	nichtkomp.	0,588 (0,408-0,768)	0,996 (0,916-1,08)	2,22 (1,63-2,80)	0,450

**VRC** Voriconazol; **VRC-NO** Voriconazol-N-oxid; **KET** Ketoconazol; **HLM** humane Lebermikrosomen;  **$K_i$**  Inhibitionskonstante;  **$V_{\text{max}}$**  maximale Enzymumsatzgeschwindigkeit;  **$CL_{\text{int}}$**  intrinsische Clearance. **nichtkomp.** nichtkompetitiv. In Klammern ist das 95 %-Konfidenzintervall angegeben

Für Voriconazol-N-oxid in HLM und CYP3A4-Supersomes™ entsprachen sowohl eine kompetitive als auch nichtkompetitive Hemmung den Daten (Abb. 4.11 und Tab. 4.4). Eine Positivkontrolle mit Ketoconazol als CYP3A-Inhibitor bestätigte die Ergebnisse (Tab. 4.4).

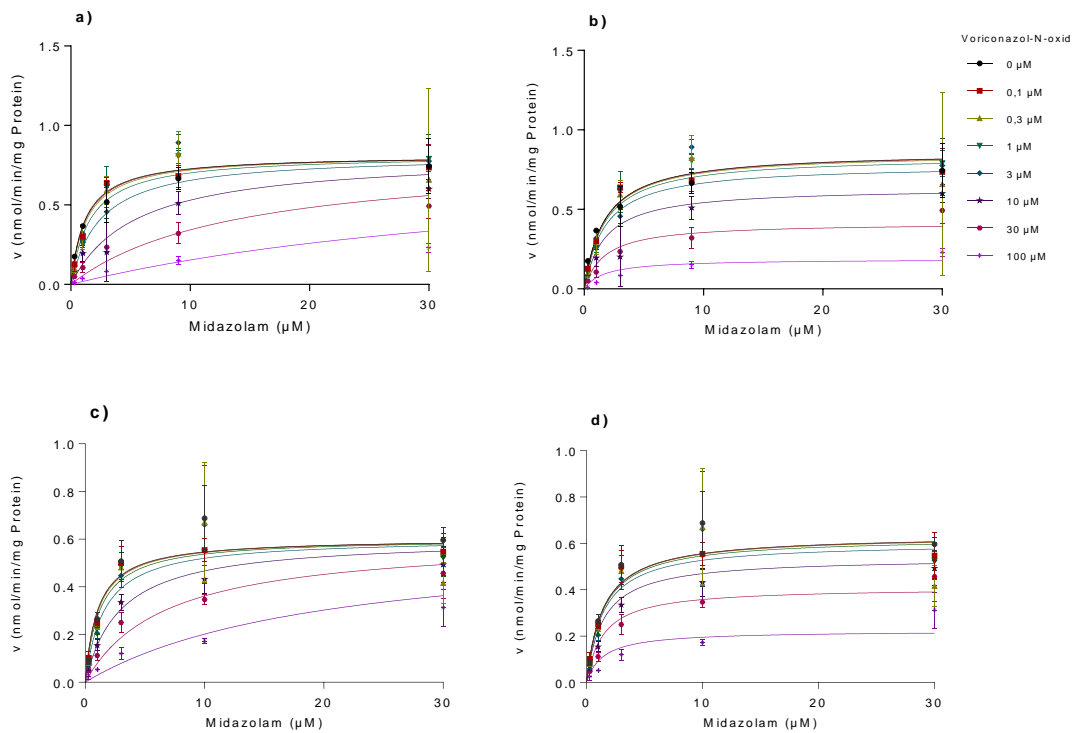


Abb. 4.11 Michaelis-Menten-Plots zur Darstellung der CYP3A4-Inhibition durch Voriconazol-N-oxid. Kompetitive Hemmung in a) HLM und b) CYP3A4-Supersomes™, nichtkompetitive Hemmung in c) HLM und d) CYP3A4-Supersomes™

Weiterhin wurden Dixon-Plots zur visuellen Zuordnung zu einem bestimmten Inhibitionstyp herangezogen (Abb. 4.12).

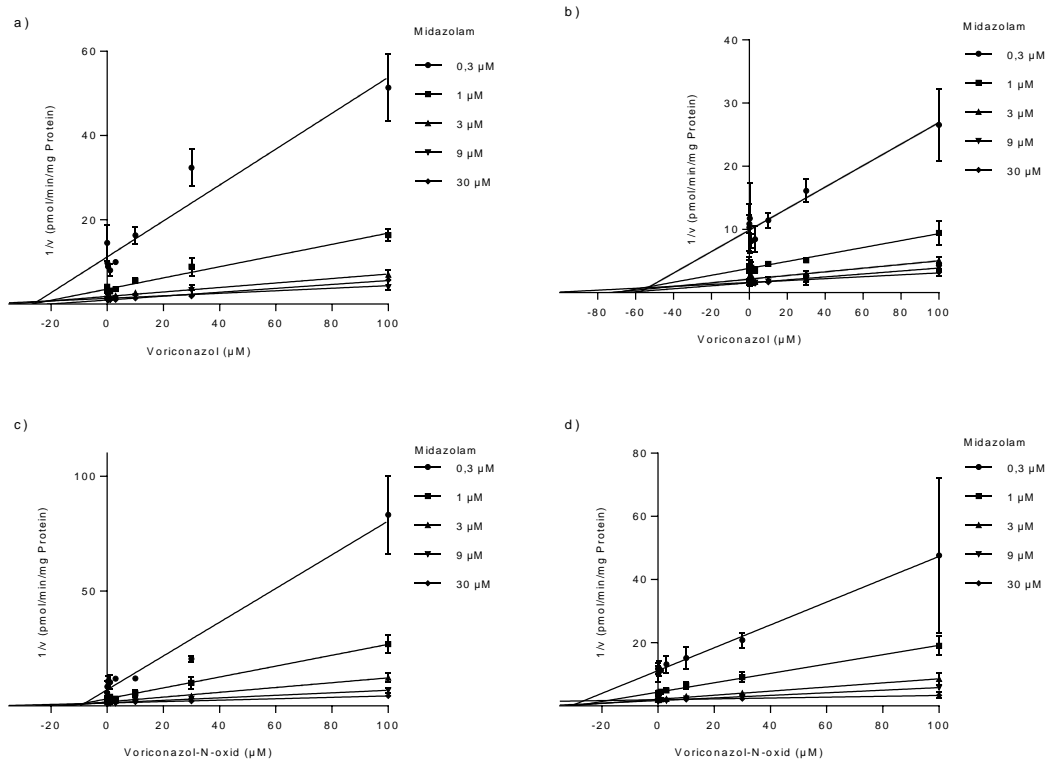


Abb. 4.12 Dixon-Plots der Inhibition der CYP3A4-katalysierten Midazolam-1'-Hydroxylierung durch a) Voriconazol in HLM, b) Voriconazol in CYP3A4-Supersomes™, c) Voriconazol-N-oxid in humanen Lebermikrosomen, d) Voriconazol-N-oxid in CYP3A4-Supersomes™.

Die ermittelten intrinsischen Clearances lagen zwischen 0,450 und 0,678  $\mu\text{L}/(\text{min} \cdot \text{mg Protein})$  (s.Tab. 4.4).

## 4.2.2 In vitro Untersuchung der Inhibition von UGT2B4 und UGT2B7

### 4.2.2.1 Methodvalidierung

#### Selektivität

Die Ergebnisse für die Selektivitätsmessung der neu entwickelten Quantifizierungsmethode sind Tab. 4.5 zu entnehmen.

Tab. 4.5 Ergebnisse der Selektivitätsmessung der Quantifizierungsmethode für 1'-OH-Midazolam-β-D-glucuronid

Analyt	Probe	Konzentration (μM)	mittlere Peakfläche	DEV (%)	Toleranz (%)
1'-OH-MDZ-β-D-Glucuronid	QC4	0,03	167833		
	Leermatrix	0	43	0,0256	<20%
	QC4	0,0351	1193833		
Diazepam (IS)	Leermatrix	0	2002	0,168	<5%

**DEV** prozentuale Abweichung des Mittelwerts der Leerprobe zum Mittelwert von QC4; **QC** Qualitätskontrollprobe

Die relative Abweichung des mittleren Werts der Leerprobe zum mittleren Wert der niedrigsten Qualitätskontrollprobe darf für den Analyten 1'-OH-Midazolam-β-D-Glucuronid maximal 20 % betragen, für den IS maximal 5%. Mit relativen Abweichungen von 0,0256% für 1'-OH-Midazolam-β-D-Glucuronid und 0,168% für den IS ist die Methode als selektiv anzusehen.

#### Kalibrierbereich und LLOQ

Als Kalibrierbereich für die quantitative Bestimmung von 1'-OH-Midazolam-β-D-Glucuronid wurden sieben verschiedene Konzentrationen zwischen 0,03 und 3 μM gewählt. Verwendet wurde eine Wichtung der Datenpunkte von 1/x, und es konnte ein linearer Zusammenhang zwischen dem Detektorsignal und der Konzentration beobachtet werden. Die Linearität des Kalibrierbereichs wurde anhand von sechs Kalibriergeraden (bestehend aus EP1-EP7) überprüft. Als statistische Größe zur Beurteilung des linearen Zusammenhangs wurde jeweils der Korrelationskoeffizient r der einzelnen Kalibriergeraden ermittelt. Die Werte für r lagen zwischen 0,9976 und 0,9998. Zusätzlich wurde die Präzision ermittelt, mit der die Korrelationskoeffizienten ermittelt wurden. Dieser lag bei 0,085%.

Das Signal bei der LLOQ war bei allen Messungen deutlich mehr als fünfmal höher als das Signal einer Leerprobe (Abb. 4.13).

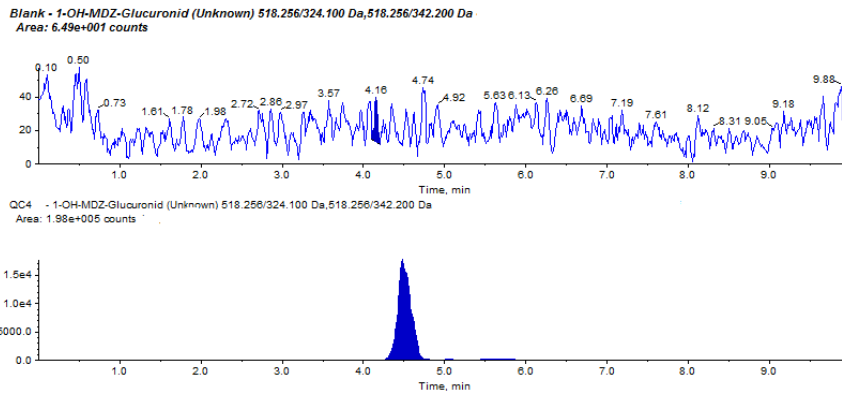


Abb. 4.13 Chromatogramm einer QC4 a) ohne und b) mit 1'-OH-Midazolam- $\beta$ -D-Glucuronid. QC Qualitätskontrolle, Blank Leerprobe

### Wiederfindung

Die Ergebnisse der Recovery-Messung sind in Tab. 4.6 dargestellt.

Tab. 4.6 Mittlere Recovery von 1'-OH-Midazolam- $\beta$ -D-glucuronid in 0,1 M Trispuffer (pH 7,4)

Probe	Soll-Konzentration ( $\mu\text{M}$ )	mittlere Ist-Konzentration Test ( $\mu\text{M}$ )	mittlere Ist-Konzentration Referenz ( $\mu\text{M}$ )	DEV (%)
QC1	3	2,96	3,25	-8,92
QC2	0,5	0,548	0,564	-2,84
QC4	0,03	0,0248	0,028	-11,4

QC Qualitätskontrollprobe; DEV prozentuale Abweichung der mittleren Ist-Konzentration Test zu Referenz; Test 0,1 M Trispuffer pH 7,4 als Matrix; Referenz H<sub>2</sub>O als Matrix

Eine relative Abweichung von maximal 11,4% zeigt, dass die verwendete Matrix keinen nennenswerten Einfluss auf das Detektorsignal hat.

### Richtigkeit und Präzision

Tab. 4.7 Intraday-Messung: Validierte Präzision und Richtigkeit von fünf aufeinanderfolgenden Proben gleicher Konzentration für alle QC-Level von 1'-OH-Midazolam- $\beta$ -D-Glucuronid

Probe	Soll-Konzentration ( $\mu\text{M}$ )	mittlere Ist-Konzentration ( $\mu\text{M}$ )	RE (%)	RSD (%)	Toleranz (%)
QC1	3	0,0263	-12,4	7,52	<20
QC2	0,5	0,106	6,1	5,57	<15
QC3	0,1	0,534	6,73	12	<15
QC4	0,03	2,93	-2,33	13	<15

QC Qualitätskontrollprobe; RE relativer Fehler als Maß für die Richtigkeit; RSD relative Standardabweichung als Maß für die Präzision

Die Intraday-Messung, bei der jeweils fünf QC-Reihen vermessen wurden, zeigte eine maximale Abweichung der ermittelten von den Nominalkonzentrationen von -12,4%. Auch die Präzision der Intraday-Messung lag mit einer RSD von maximal 13,0% im Akzeptanzbereich. Die Gesamtergebnisse sind in Tab. 4.7 zusammengestellt.

Interday-Messung (n=3)

Tab. 4.8 Interday-Messung: Validierte Präzision und Richtigkeit von Proben gleicher Konzentration vermessen an drei verschiedenen Tagen für alle QC-Level von 1'-OH-Midazolam-β-D-Glucuronid

Probe	Soll-Konzentration (μM)	mittlere Ist-Konzentration (μM)	RE (%)	RSD (%)	Toleranz (%)
QC1	3	2,7	-11,2	5,85	<20
QC2	0,5	0,47	-5,12	7,09	<15
QC3	0,1	0,11	10,9	15	<15
QC4	0,03	0,0297	-1,13	10,6	<15

**QC** Qualitätskontrollprobe; **RE** relativer Fehler als Maß für die Richtigkeit; **RSD** relative Standardabweichung als Maß für die Präzision

Die in Tab. 4.8 zusammengefassten Ergebnisse der Messungen zur Ermittlung von Präzision und Richtigkeit an drei verschiedenen Tagen (Interday-Messung) zeigen ähnliche Ergebnisse wie die Intraday-Messung. Sowohl Präzision als auch Richtigkeit erfüllen mit einer maximalen RSD von 15,0% bzw. einem maximalen RE von 11,2 % die Akzeptanzkriterien.

Stabilität

Zur Untersuchung der Stabilität wurden QCs in niedriger und hoher Konzentration bei verschiedenen Temperaturen gelagert. Zum einen wurden sie 24 h bei 4°C aufbewahrt (Autosamplerstabilität). Weiterhin wurden die Proben durch dreimalige Einfrier-Auftau-Phasen extremen Temperaturschwankungen unterworfen. Zuletzt wurden QC-Proben 60 min bei 37°C gelagert, was die Umgebungstemperatur bei den Inkubationen mit UGTs widerspiegeln sollte. Die Proben wurden anschließend zusammen mit frisch aufgearbeiteten Proben vermessen. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Tab. 4.9 zusammengefasst.

Tab. 4.9 Untersuchung der Stabilität von 1'-OH-Midazolam-β-D-Glucuronid (n=3)

Probe	Soll-Konzentration (μM)	DEV (%) FT	DEV (%) RT	DEV (%) 4°C
QC1	3	49,5	-5,9	-5,67
QC4	0,03	119	-2,6	-3,9

**QC** Qualitätskontrollprobe; **DEV** prozentuale Abweichung unterschiedlich gelagerter Proben zu frisch aufgearbeiteten; **FT** freeze-thaw-Stabilität (Stabilität nach dreimaligem Einfrieren und Auftauen); **RT** Stabilität nach Lagerung bei Raumtemperatur; **4°C** Stabilität nach Lagerung bei 4°C (Autosamplerstabilität)

Eine relative Abweichung der unterschiedlich gelagerten zu frisch aufbereiteten Proben von 10% ist erlaubt. Sowohl die bei 4°C als auch bei 37°C gelagerten Proben sind stabil. Die nach dreimaligem Einfrieren bei -20°C und Wiederauftauen vermessenen Proben zeigten im Vergleich zu frisch aufbereiteten und vermessenen Proben deutliche Abweichungen.

#### 4.2.2.2 Bestimmung der $K_m$ -Werte

Die ermittelten Michaelis-Menten-Konstanten für die O-Glucuronidierung von 1'-OH-Midazolam lagen für UGT2B4 bei 62,4  $\mu\text{M}$  (32,3-92,6  $\mu\text{M}$ ), bei UGT2B7 bei 61,5  $\mu\text{M}$  (20,4-103  $\mu\text{M}$ ). In Abb. 4.14 sind die Michaelis-Menten-Kurven dargestellt.

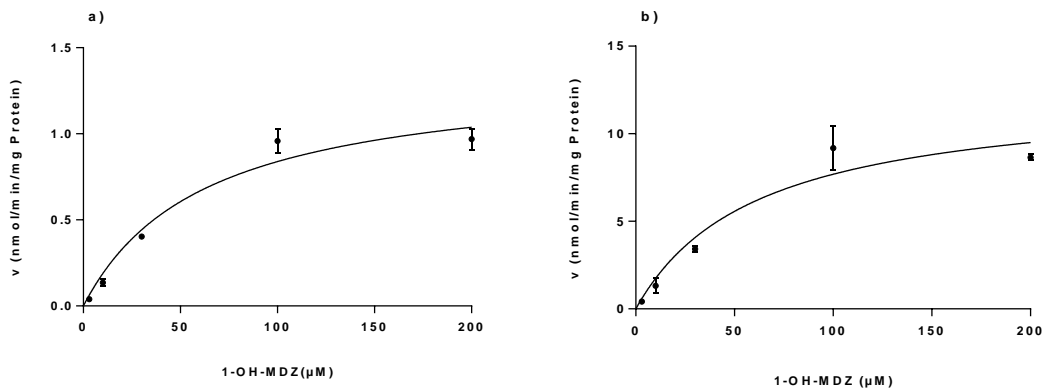


Abb. 4.14 Michaelis-Menten-Plots zur  $K_m$ -Bestimmung der Glucuronidierung von 1'-OH-Midazolam via a) UGT2B4 und b) UGT2B7.  $v$  Umsatzrate, **1-OH-MDZ-Gluc** 1'-OH-Midazolam- $\beta$ -D-glucuronid, **1-OH-MDZ** 1'-OH-Midazolam

Durch die sehr ähnlichen ermittelten Werte der ermittelten  $K_m$  bei UGT2B4 und UGT2B7 wurde für die  $IC_{50}$ -Bestimmung wurde eine 1'-OH-Midazolam-Konzentration von 60  $\mu\text{M}$  festgelegt.

#### 4.2.2.3 Bestimmung der $IC_{50}$ -Werte

Als Positivkontrolle einer UGT-Inhibition wurde zunächst Diclofenac zusammen mit 1'-OH-Midazolam und UGT2B4 bzw. UGT2B7 inkubiert. Es wurde eine deutliche Hemmung beider Enzyme beobachtet (Abb. 4.15). Die ermittelten  $IC_{50}$ -Werte lagen für die Inkubation mit UGT2B4 bei 4,58  $\mu\text{M}$  (2,33-6,82), mit UGT2B7 wurde ein  $IC_{50}$ -Wert von 21,9  $\mu\text{M}$  (10,7-33,0) ermittelt.



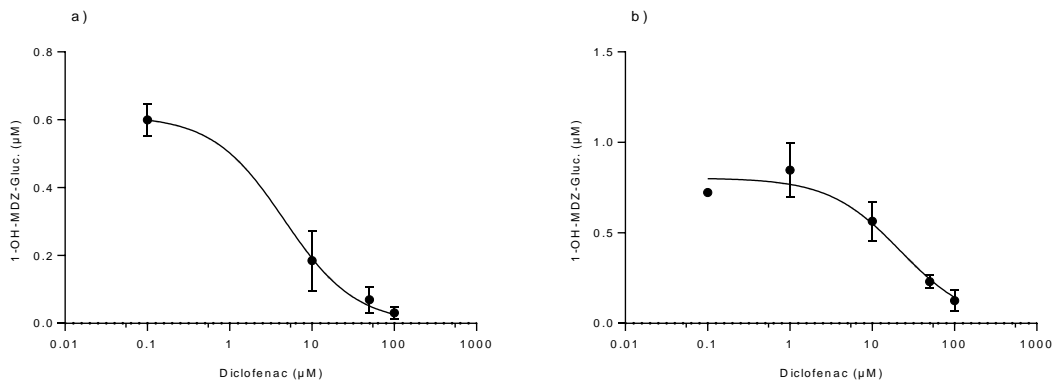


Abb. 4.15 IC<sub>50</sub>-Plot für die Inhibition von a) UGT2B4 und b) UGT2B7 durch Diclofenac. **1-OH-MDZ-Gluc** 1'-OH-Midazolam-β-D-glucuronid

Voriconazol bewirkt eine schwache Hemmung von UGT2B7, der IC<sub>50</sub>-Wert lag bei 192 µM (13,9-370 µM), die höchste eingesetzte Konzentration an Voriconazol betrug 200 µM. Es zeigte sich ein deutlicher inhibitorischer Effekt auf UGT2B4, der IC<sub>50</sub>-Wert von Voriconazol lag hier bei 32,7 µM (11,2-54,3 µM) (Abb. 4.16).

Für Voriconazol-N-oxid konnte weder ein inhibitorischer Effekt auf UGT2B4 noch auf UGT2B7 bei den eingesetzten Konzentrationen von 0,1 – 100 µM nachgewiesen werden (Abb. 4.16).

Da lediglich für Voriconazol ein signifikanter inhibitorischer Effekt auf UGT2B4 beobachtet wurde, wurde nur hierfür eine weitere Inkubation zur K<sub>i</sub>-Bestimmung durchgeführt.

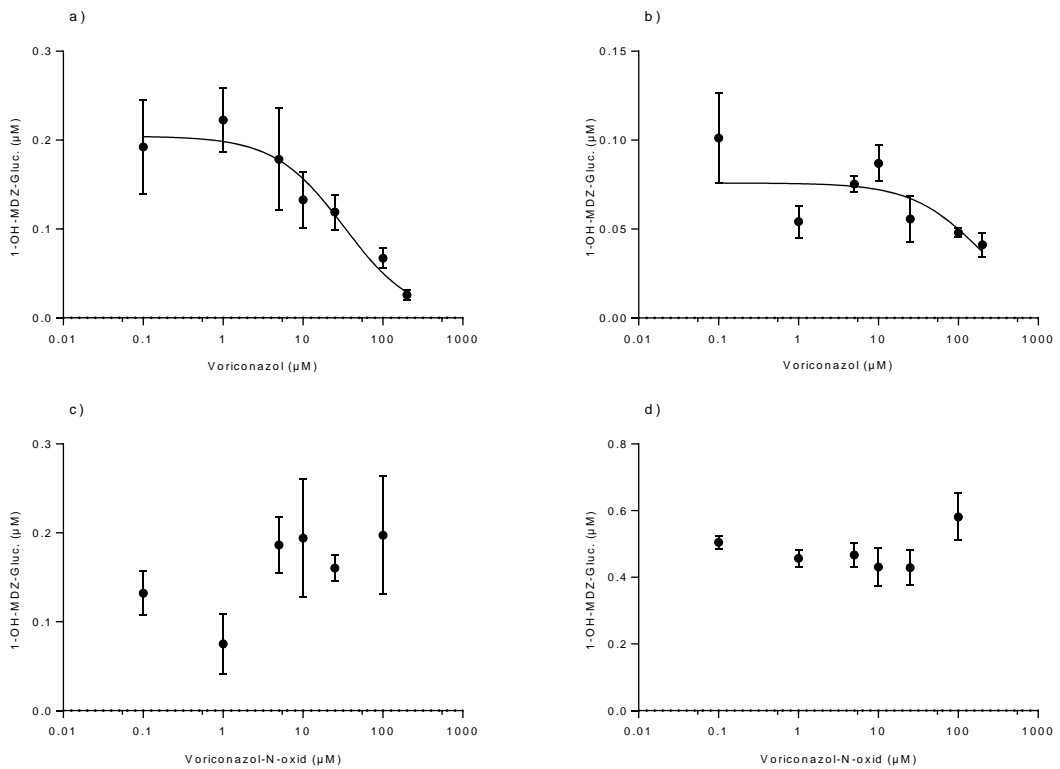


Abb. 4.16 IC<sub>50</sub>-Plot für die Inhibition von a) UGT2B4 und b) UGT2B7 durch Voriconazol und c) UGT2B4 und d) UGT2B7 durch Voriconazol-N-oxid. **1-OH-MDZ-Gluc** 1'-OH-Midazolam-β-D-glucuronid

#### 4.2.2.4 Bestimmung der K<sub>i</sub>-Werte

Nach der Inkubation von jeweils fünf unterschiedlichen Voriconazol- mit fünf unterschiedlichen 1'-OH-Midazolam-Konzentrationen im Duplikat mit 0,2 mg/mL UGT2B4 über 90 min ergab sich eine kompetitive Hemmung mit einem K<sub>i</sub>-Wert von 4,43 µM (1,09-7,80) bzw. eine Inhibition vom nichtkompetitiven Typ mit einem K<sub>i</sub>-Wert von 57,6 µM (37,4-77,7) (Abb. 4.17). Eine genaue Zuordnung zu einem Hemmtyp konnte auch durch die visuelle Beurteilung des Dixon-Plots (Abb. 4.18) nicht getroffen werden.

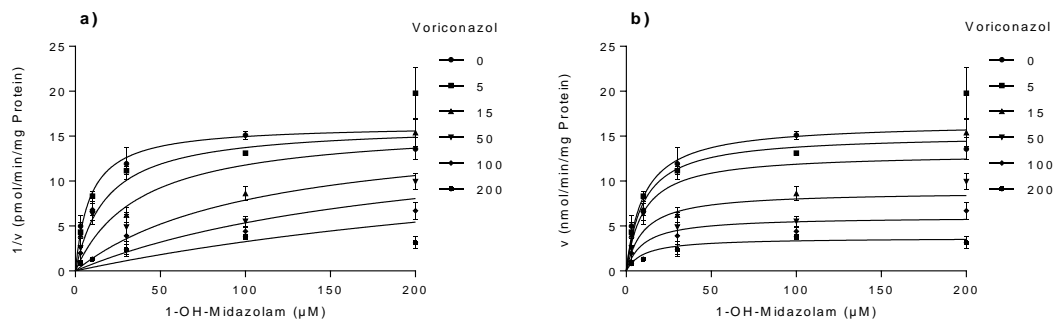


Abb. 4.17 Michaelis-Menten-Plot der a) kompetitiven und b) nichtkompetitiven UGT2B4-Inhibition durch Voriconazol

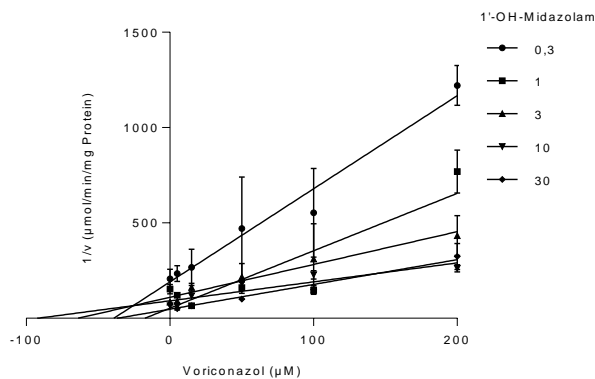


Abb. 4.18 Dixon-Plot der Inhibition der Glucuronidierung von 1'-OH-Midazolam über UGT2B4 durch Voriconazol.  $v$  Umsatzrate

## 4.3 In vivo Studie zur Untersuchung der Inhibition von CYP3A in Darmwand und Leber durch Voriconazol mit einem neuartigen Studiendesign

### 4.3.1 Bestimmung von Voriconazol und Voriconazol-N-oxid im Plasma

#### 4.3.1.1 Methodvalidierung

##### Selektivität

Die Messung von analytfreiem Plasma von sechs verschiedenen Spendern zeigte keine Störsignale zu den Retentionszeiten von Voriconazol, Voriconazol-N-oxid und dem IS Ketoconazol. Die Verwendung von Matrix unterschiedlicher Herkunft zeigte auch bei der Messung von QC-Proben an der LLOQ keinen störenden Einfluss. Zur Überprüfung des potentiellen Einflusses

weiterer in der Probe enthaltenen Substanzen wurden auch solche Proben vermessen, die einen Analyten in der niedrigsten Konzentration enthielt sowie die anderen in einer Studienprobe vorliegenden Analyten in hoher Konzentration. Auch hier konnte kein störender Einfluss beobachtet werden.

#### Kalibrierbereich und LLOQ

Als Kalibrierbereich für die quantitative Bestimmung von Voriconazol und dessen Metabolit wurden sieben verschiedene Konzentrationen zwischen 10 und 1 000 ng/mL gewählt. Die einzelnen EP- und QC-Konzentrationen sind Tab. 4.10 und Tab. 4.11 zu entnehmen.

Tab. 4.10 Konzentrationen der Kalibrierstandards von Voriconazol und Voriconazol-N-oxid in Plasma

EP-Level	VRC (ng/mL)	VRC-NO (ng/mL)
EP1	1000	1000
EP2	500	500
EP3	300	300
EP4	100	100
EP5	50	50
EP6	30	30
EP7	10	10

EP Kalibrierprobe; VRC Voriconazol; VRC-NO Voriconazol-N-oxid

Tab. 4.11 Konzentrationen der Qualitätskontrollproben von Voriconazol und Voriconazol-N-oxid in Plasma

QC-Level	VRC (ng/mL)	VRC-NO (ng/mL)
QC1	1000	1000
QC2	500	500
QC3	30	30
QC4	10	10

QC Qualitätskontrollprobe; VRC Voriconazol; VRC-NO Voriconazol-N-oxid

Mit einer Wichtung von  $1/x$  wurde ein linearer Zusammenhang zwischen dem Detektorsignal und der Konzentration beobachtet. Die Linearität des Kalibrierbereichs wurde anhand von sechs Kalibriergeraden (bestehend aus EP1-EP7) untersucht. Als statistische Größe zur Beurteilung des linearen Zusammenhangs wurde jeweils der Korrelationskoeffizient  $r$  der einzelnen Kalibriergeraden ermittelt. Die Werte für  $r$  lagen für Voriconazol zwischen 0,9965 und 0,9997, für Voriconazol-N-oxid zwischen 0,9979 und 0,9997; gefordert sind Werte  $> 0,99$ . Zusätzlich

wurde die Präzision ermittelt (ausgedrückt als RSD), mit der die Korrelationskoeffizienten ermittelt wurden. Dieser lag für Voriconazol bei 0,118%, für Voriconazol-N-oxid bei 0,081%.

In Abb. 4.19 sind typische Chromatogramme für Voriconazol, Voriconazol-N-oxid und den IS Ketoconazol dargestellt.

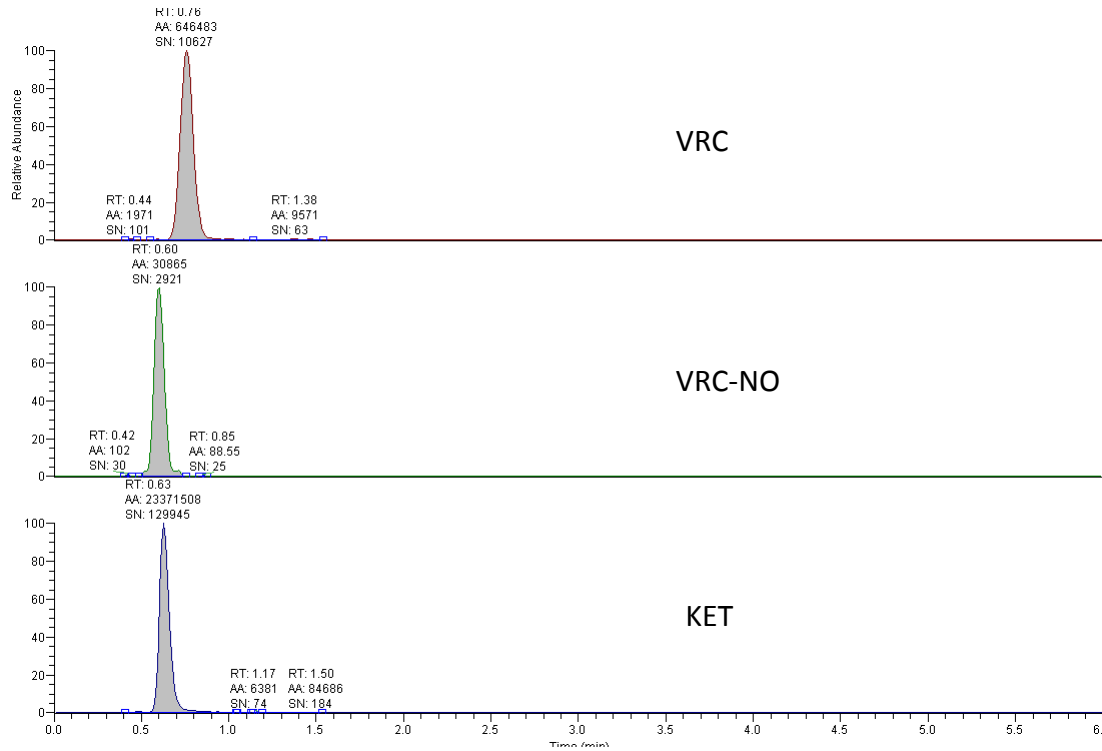


Abb. 4.19 Typisches Chromatogramm der niedrigsten Qualitätskontrollprobe (QC4). **VRC** Voriconazol, **VRC-NO** Voriconazol-N-oxid, **KET** Ketoconazol

### Wiederfindung

Mit der Wiederfindungsmessung wurde der Einfluss unterschiedlicher Matrices auf das Detektorsignal untersucht. Hierzu wurden QCs an der LLOQ, ULOQ und im mittleren Konzentrationsbereich zum Einen in Plasma, zum Anderen in Wasser als Matrix hergestellt und vermessen. Die Ergebnisse sind in Tab. 4.12 dargestellt.

Tab. 4.12 Mittlere Recovery von Voriconazol und Voriconazol-N-oxid in Plasma (n=3)

Analyt	QC-Level	mittlere Wiederfindung (%)
VRC	QC1	3,80
	QC2	6,32
	QC3	27,1
VRC-NO	QC1	-59,9
	QC2	-57,5
	QC3	-55,2

**QC** Qualitätskontrollprobe; **VRC** Voriconazol; **VRC-NO** Voriconazol-N-oxid

Bei Voriconazol-N-oxid wurde in allen QC-Proben mindestens 55% weniger Analyt in Wasser als Matrix wiedergefunden als in Plasma. Bei Voriconazol lag die Abweichung nur für die niedrigste gemessene QC-Konzentration (QC3) über 20%. Die gemessenen QC3-Einzelwerte für Voriconazol in Wasser lagen bei 26,6 ng/mL, 26,8 ng/mL und 26,2 ng/mL.

#### Richtigkeit und Präzision

Tab. 4.13 Intraday-Messung: validierte Präzision und Richtigkeit von fünf aufeinanderfolgenden Proben gleicher Konzentration für alle QC-Level von Voriconazol und Voriconazol-N-oxid

Analyt	Probe	Soll-Konzentration (µM)	mittlere Ist-Konzentration (µM)	RE (%)	RSD (%)	Toleranz (%)
VRC	QC1	1000	940	-6	6,8	<15
	QC2	500	521	4,1	4,5	<15
	QC3	30	33,5	10,8	4,6	<15
	QC4	10	10,6	6	7,9	<20
VRC-NO	QC1	1000	960	-4	6,1	<15
	QC2	500	523	4,6	5,7	<15
	QC3	30	32,9	8,9	4,6	<15
	QC4	10	10,7	6,9	13,9	<20

**QC** Qualitätskontrollprobe; **RE** relativer Fehler als Maß für die Richtigkeit; **RSD** relative Standardabweichung als Maß für die Präzision, **VRC** Voriconazol; **VRC-NO** Voriconazol-N-oxid

Die Intraday-Messung, bei der jeweils fünf QC-Proben einer entsprechenden Konzentration vermessen wurden, zeigte eine maximale Abweichung der ermittelten von der Nominalkonzentration von 10,8% für den Analyten Voriconazol und 8,90% für Voriconazol-N-oxid. Die Präzision der Intraday-Messung lag mit einer RSD von maximal 7,90% für Voriconazol und 13,9% für Voriconazol-N-oxid im Akzeptanzbereich. Die Gesamtergebnisse sind in Tab. 4.13 zusammengestellt.

Tab. 4.14 Interday-Messung: validierte Präzision und Richtigkeit von Proben gleicher Konzentration für alle QC-Level von Voriconazol und Voriconazol-N-oxid an drei aufeinanderfolgenden Tagen

Analyt	Probe	Soll-Konzentration ( $\mu\text{M}$ )	mittlere Ist-Konzentration ( $\mu\text{M}$ )	RE (%)	RSD (%)	Toleranz (%)
VRC	QC1	1000	992	3,3	9,5	<15
	QC2	500	538	7,5	5,5	<15
	QC3	30	29,9	7,2	12,1	<15
	QC4	10	9,9	13,3	6,3	<20
VRC-NO	QC1	1000	981	-1,9	4,9	<15
	QC2	500	526	5,1	5,06	<15
	QC3	30	31,6	5,4	9,46	<15
	QC4	10	9,31	-6,9	3,6	<20

**QC** Qualitätskontrollprobe; **RE** relativer Fehler als Maß für die Richtigkeit; **RSD** relative Standardabweichung als Maß für die Präzision, **VRC** Voriconazol; **VRC-NO** Voriconazol-N-oxid

Die in Tab. 4.14 zusammengefassten Ergebnisse der Messungen zur Ermittlung von Präzision und Richtigkeit an drei verschiedenen Tagen (Interday-Messung) zeigten für beide Analyten ähnliche Ergebnisse wie die Intraday-Messung. Bei Voriconazol lag die maximale RSD bei 12,1% und die maximale RE bei 13,3%, bei Voriconazol-N-oxid betrug die maximale RSD 6,90% und die maximale RE 9,46%.

#### Stabilität

Die Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchungen sind in Tab. 4.15 zusammengefasst.

Tab. 4.15 Untersuchung der Stabilität von Voriconazol und Voriconazol-N-oxid in Plasma (n=3)

Analyt	Probe	Soll-Konzentration	DEV (%) FT	DEV (%) RT	DEV (%) 4°C
		( $\mu\text{M}$ )			
VRC	QC1	1000	0,1	-2,58	2,1
	QC3	30	2,26	-0,58	1,95
VRC-NO	QC1	1000	12,3	0,09	12,4
	QC3	30	5,64	2,96	4,41

**VRC** Voriconazol; **VRC-NO** Voriconazol-N-oxid; **QC** Qualitätskontrollprobe; **DEV** prozentuale Abweichung unterschiedlich gelagerter Proben zu frisch aufgearbeiteten; **FT** freeze-thaw-Stabilität (Stabilität nach dreimaligem Einfrieren und Auftauen); **RT** Stabilität bei Raumtemperatur; **4°C** Stabilität bei 4°C (Autosamplerstabilität)

Eine Methode gilt für einen Analyten dann als stabil, wenn die relative Abweichung der unterschiedlich gelagerten zu frisch aufgearbeiteten Proben nicht mehr als 10% beträgt.

Voriconazol war bei allen Lagerungsbedingungen stabil, Voriconazol-N-oxid zeigte bei der höchsten Konzentration größere relative Abweichungen für die Freeze-thaw-Zyklen und die Lagerung bei 4°C.

#### Matrixeffekte

Die Ergebnisse der Untersuchung des Einflusses von Plasma unterschiedlicher Quellen auf die gemessenen Konzentrationen von Voriconazol, Voriconazol-N-oxid sowie Ketoconazol sind in Tab. 4.16 dargestellt.

Tab. 4.16 Ionensuppression durch Plasma auf Signale von Voriconazol, Voriconazol-N-oxid und Ketoconazol (n=3)

Analyt	QC-Level	Konzentration (ng/mL)	DEV (%)	Toleranz (%)
VRC	QC3	30	3,71	
	QC1	1000	4,61	<15
VRC-NO	QC3	30	1,86	
	QC1	1000	0,0256	
KET	QC3	500	8,44	<15
	QC1	500	3,62	

**KET** Ketoconazol; **VRC** Voriconazol; **VRC-NO** Voriconazol-N-oxid; **QC** Qualitätskontrollprobe; **DEV** relative Abweichung der mittleren Ist-Konzentration zur mittleren Ist-Konzentration der jeweiligen Referenzproben

### 4.3.2 Bestimmung von Midazolam, 1'-OH-Midazolam und 4-OH-

#### Midazolam im Urin

##### 4.3.2.1 Methodvalidierung

###### Selektivität

Die Messung von analytfreiem Urin sechs verschiedener Spender zeigte keine Störsignale zu den Retentionszeiten von Midazolam, 1'-OH-Midazolam, 4-OH-Midazolam und dem IS Diazepam. Die Verwendung von Matrix verschiedener Herkunft zeigte bei der Messung der Einzelsubstanzen keinen störenden Einfluss. Zur Überprüfung des potentiellen Einflusses weiterer in der Probe enthaltenen Substanzen wurden auch solche Proben vermessen, die einen Analyten in der niedrigsten Konzentration enthielt sowie die anderen in einer Studienprobe vorliegenden Analyten in hoher Konzentration. Auch hier konnte kein störender Einfluss beobachtet werden.



## Kalibrierbereich und LLOQ

Der Kalibrierbereich für die quantitative Bestimmung lag für Midazolam und 4-OH-Midazolam zwischen 0,5 und 100 ng/mL und für 1'-OH-Midazolam aufgrund höheren erwarteten Konzentrationen im Urin zwischen 1 und 1 000 ng/mL. Die Konzentrationen der einzelnen Kalibrierproben sind in Tab. 4.17 dargestellt, die Konzentration der niedrigsten QC-Probe entspricht der Konzentration der EP7.

Tab. 4.17 Konzentrationen der Kalibrierstandards von Midazolam und Metaboliten in Urin

EP-Level	MDZ (ng/mL)	1-OH-MDZ (ng/mL)	4-OH-MDZ (ng/mL)
EP1	100	1000	100
EP2	30	300	30
EP3	10	100	10
EP4	5	30	5
EP5	3	10	3
EP6	1	3	1
EP7	0,5	1	0,5

EP Kalibrierprobe; MDZ Midazolam; 1-OH-MDZ 1'-OH-Midazolam; 4-OH-MDZ 4-OH-Midazolam

Zur Qualitätskontrolle der Messungen und für die Festlegung des LLOQ wurden QC-Proben in den untenstehenden Konzentrationen hergestellt (Tab. 4.18):

Tab. 4.18 Konzentrationen der Qualitätskontrollproben von Midazolam und Metaboliten

QC-Level	MDZ (ng/mL)	1-OH-MDZ (ng/mL)	4-OH-MDZ (ng/mL)
QC1	75	750	75
QC2	50	500	50
QC3	1,5	3	1,5
QC4	0,5	1	0,5

QC Qualitätskontrollprobe; MDZ Midazolam; 1-OH-MDZ 1'-OH-Midazolam; 4-OH-MDZ 4-OH-Midazolam

Über den gesamten Konzentrationsbereich wurde unter Verwendung des Wichtungsfaktors  $1/x$  Linearität zwischen Detektorsignal und der eingesetzten Konzentration nachgewiesen. Die Linearität des Kalibrierbereichs wurde anhand von sechs Kalibriergeraden untersucht. Als statistische Größe zur Beurteilung des linearen Zusammenhangs wurde jeweils der Korrelationskoeffizient  $r$  der einzelnen Kalibriergeraden ermittelt. Die Werte für  $r$  lagen für Midazolam zwischen 0,9978 und 0,9997, für 1'-OH-Midazolam zwischen 0,9997 und 0,9999 und für 4-OH-Midazolam zwischen 0,9982 und 0,9999; gefordert sind Werte  $> 0,99$ . Zusätzlich wurde die Präzision für  $r$  ermittelt. Diese lag für Midazolam bei 0,0712%, für 1'-OH-Midazolam bei 0,0881% und für 4-OH-Midazolam bei 0,0724%.

In Abb. 4.20 ist ein typisches Chromatogramm für die jeweils niedrigste QC-Konzentration der Analyten und des IS dargestellt.

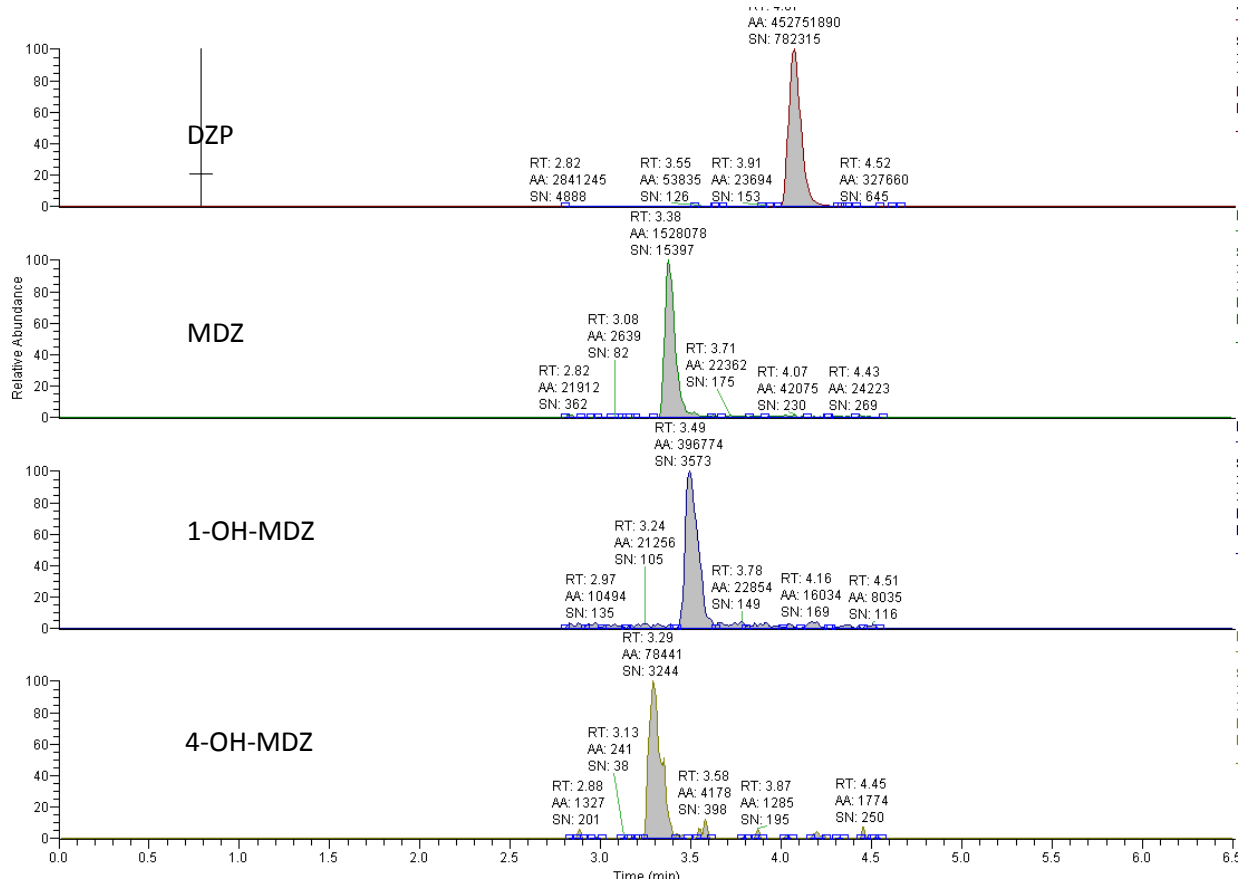


Abb. 4.20 Typisches Chromatogramm der niedrigsten Qualitätskontrollprobe (QC4). **MDZ** Midazolam; **1-OH-MDZ** 1'-OH-Midazolam, **4-OH-MDZ** 4-OH-Midazolam; **DZP** Diazepam

### Wiederfindung

Zur Untersuchung der Wiederfindung der verschiedenen Analyte in Urin wurden Proben niedriger, mittlerer und hoher Konzentration zum einen in Urin aufgearbeitet, zum anderen in Wasser. Die Ergebnisse der Wiederfindungsmessung sind in Tab. 4.19 dargestellt.

Tab. 4.19 Mittlere Recovery von Midazolam und Metaboliten in Urin (n=3)

Analyt	QC-Level	mittlere Wiederfindung (%)
MDZ	QC1	6,54
	QC2	4,20
	QC3	547
1-OH-MDZ	QC1	-4,33
	QC2	5,51
	QC3	2,48
4-OH-MDZ	QC1	-11,1
	QC2	-1,24
	QC3	-4,32

**QC** Qualitätskontrollprobe; **MDZ** Midazolam; **1-OH-MDZ** 1'-OH-Midazolam, **4-OH-MDZ** 4-OH-Midazolam  
Richtigkeit und Präzision

Für Midazolam, 1'-OH-Midazolam und 4-OH-Midazolam wurden Präzision und Richtigkeit innerhalb einer Messreihe sowie an verschiedenen Tagen ermittelt. Zur Ermittlung von Präzision und Richtigkeit innerhalb einer Messung wurden alle QC-Konzentrationsbereiche jeweils fünfmal aufgearbeitet und vermessen (Intraday). Für die Interday-Messung wurde jede QC-Konzentration an drei verschiedenen Tagen aufgearbeitet und vermessen und die Variabilitäten berechnet. Die Ermittlung von Präzision und Richtigkeit erfolgte hierbei jeweils nach der Probenaufarbeitung ohne eine vorangegangene Glucuronidspaltung. Die Ergebnisse sind in Tab. 4.20 und Tab. 4.21 dargestellt.

Tab. 4.20 Intraday-Messung: validierte Präzision und Richtigkeit von fünf aufeinanderfolgenden Proben gleicher Konzentration für alle QC-Level von Midazolam und Metaboliten in Urin

Analyt	QC-Level	Soll-Konzentration (µM)	mittlere Ist-Konzentration (µM)	RE (%)	RSD (%)	Toleranz (%)
MDZ	QC1	75	73,7	-1,8	8,9	<15
	QC2	50	47,6	-4,76	4,1	<15
	QC3	1,5	1,61	7,3	14,8	<15
	QC4	0,5	0,547	9,43	3,1	<20
1-OH-MDZ	QC1	750	841,2	12,1	4,9	<15
	QC2	500	504	1,4	6,9	<15
	QC3	3	3,17	5,8	5,1	<15
	QC4	1	1,17	17,2	3,3	<20
4-OH-MDZ	QC1	75	74,3	-0,9	12,5	<15
	QC2	50	47,2	-5,6	3,5	<15
	QC3	1,5	1,44	-3,8	9,3	<15
	QC4	0,5	0,428	-14,4	4,7	<20

**MDZ** Midazolam; **1-OH-MDZ** 1'-OH-Midazolam; **4-OH-MDZ** 4-OH-Midazolam; **QC** Qualitätskontrollprobe; **RE** relativer Fehler als Maß für die Richtigkeit; **RSD** relative Standardabweichung als Maß für die Präzision

Tab. 4.21 Interday-Messung: validierte Präzision und Richtigkeit von Qualitätskontrollproben gleicher Konzentration an drei verschiedenen Tagen für alle QC-Level von Midazolam und Metaboliten in Urin

Analyt	QC-Level	Soll-Konzentration ( $\mu\text{M}$ )	mittlere Ist-Konzentration ( $\mu\text{M}$ )	RE (%)	RSD (%)	Toleranz (%)
MDZ	QC1	75	75,8	1,1	5,9	<15
	QC2	50	48,7	-2,5	6,33	<15
	QC3	1,5	1,55	3,2	3,12	<15
	QC4	0,5	0,545	9	7,62	<20
1-OH-MDZ	QC1	750	847	13	5,95	<15
	QC2	500	535	7	6,51	<15
	QC3	3	3,3	9,9	5,25	<15
	QC4	1	1,1	9,8	12,6	<20
4-OH-MDZ	QC1	75	79,1	6,2	6,7	<15
	QC2	50	49,2	-1,6	2,41	<15
	QC3	1,5	1,34	-10,8	3,99	<15
	QC4	0,5	0,424	-15,2	4,92	<20

**MDZ** Midazolam; **1-OH-MDZ** 1'-OH-Midazolam; **4-OH-MDZ** 4-OH-Midazolam; **QC** Qualitätskontrollprobe; **RE** relativer Fehler als Maß für die Richtigkeit; **RSD** relative Standardabweichung als Maß für die Präzision

#### Stabilität

Zur Untersuchung der Stabilität wurden QCs in niedriger (maximal 3x LLOQ) und hoher Konzentration bei verschiedenen Temperaturen gelagert. Zum einen wurden sie 24 h bei 4°C aufbewahrt, um die Temperatur im Autosampler zu imitieren. Weiterhin wurden die Proben durch dreimalige Einfrier-Auftau-Phasen extremen Temperaturschwankungen (-20°C – Raumtemperatur (20°C)) unterworfen. Zuletzt wurden aufgearbeitete QC-Proben hoher und niedriger Konzentration 24 h bei 37°C im Wasserbad gelagert, um die Inkubationszeit der enzymatischen Deglucuronidierung nachzuahmen. Die so erhaltenen Proben wurden zusammen mit frisch aufgearbeiteten Proben vermessen. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Tab. 4.22 zusammengefasst.

Tab. 4.22 Untersuchung der Stabilität von Midazolam und Metaboliten in Urin (n=3)

Analyt	QC-Level	Soll-	DEV (%) FT	DEV (%) 37°C	DEV (%) 4°C
		Konzentration (µM)			
MDZ	QC1	75	-7,9	-7,9	-0,65
	QC3	1,5	-4,5	-4,5	-4,5
1-OH-MDZ	QC1	750	-2,6	-0,47	2,3
	QC3	3	1,5	1,5	5,3
4-OH-MDZ	QC1	75	2,1	-9,9	3,5
	QC3	1,5	-0,21	-5,1	10,6

**MDZ** Midazolam; **1-OH-MDZ** 1'-OH-Midazolam; **4-OH-MDZ** 4-OH-Midazolam; **QC** Qualitätskontrollprobe; **DEV** Abweichung; **FT** freeze-thaw-Stabilität (Stabilität nach dreimaligem Einfrieren und Auftauen); **37 °C** Stabilität bei Inkubation über 24 h bei 37 °C; **4°C** Stabilität bei 4°C (Autosamplerstabilität)

#### Matrixeffekte

Die Ergebnisse der Untersuchung des Einflusses von Plasma unterschiedlicher Quellen auf die gemessenen Konzentrationen sind in Tab. 4.23 dargestellt.

Tab. 4.23 Ionensuppression durch Urin auf Signale von Midazolam und Metaboliten (n=3)

Analyt	QC-Level	Konzentration (ng/mL)	DEV (%)	Toleranz (%)
MDZ	QC3	1,5	37	
	QC1	75	10,5	
1-OH-MDZ	QC3	3	10,6	
	QC1	750	9	<15
4-OH-MDZ	QC3	1,5	13,7	
	QC1	75	11,3	
DZP	QC3	500	8,28	
	QC1	500	5,99	

**KET** Ketoconazol; **VRC** Voriconazol; **VRC-NO** Voriconazol-N-oxid; **QC** Qualitätskontrollprobe; **DEV** relative Abweichung der mittleren Ist-Konzentration zur mittleren Ist-Konzentration der jeweiligen Referenzproben

### 4.3.3 Populationspharmakokinetische Datenanalyse

#### Voriconazol-Basismodell

Die Testung von Ein- und Zweikompartimentmodellen der i.v. Daten von Voriconazol lieferte mit einem um 86 Punkte erniedrigten OFV eine wesentlich bessere Anpassung der Daten unter Verwendung eines Zweikompartimentmodells. Nach der Integration der Voriconazol-Plasmakonzentrationen der Studienphasen 1 und 3 (intestinale Applikation) wurde die Resorption in der Darmwand mit einer Kinetik 1. Ordnung modelliert. Zur Differenzierung des First-pass-Effektes an den beiden Hauptexpressionsorten von CYP3A wurden physiologische Kom-

partimente eingebaut<sup>216,217</sup> und das vorhandene Modell durch die Integration physiologischer Parameter und physikochemischer Eigenschaften von Voriconazol (s. Tab. 3.23) in ein minimales PBPK-Modell umstrukturiert. Wie bei der Reanalyse (s. Abschnitt 4.1) fanden das *well-stirred* Modell für die Leber und das  $Q_{\text{gut}}$ -Modell für den Darm Anwendung. Ausgehend von einer nichtlinearen Eliminationskinetik von Voriconazol<sup>211,212,218</sup> wurden zunächst nur für die Leber als Hauptexpressionsort Fremdstoff-metabolisierender Enzyme  $K_m$  und  $V_{\text{max}}$  ( $K_{m,L}$  und  $V_{\text{max},L}$ ) geschätzt. Zusätzlich wurde eine Fraktion (FG) an Voriconazol geschätzt, die nicht dem First-pass-Metabolismus im Darm unterliegt. Die Bioverfügbarkeit von Voriconazol wird in der Literatur allgemein als sehr hoch angegeben<sup>132</sup>, sodass der Darmwandmetabolismus als vernachlässigbar angesehen werden kann. Die explorative Analyse der generierten Studiendaten zeigte mit einem Punktschätzer von 30 % jedoch eine niedrige Bioverfügbarkeit an. Eine Fixierung von  $F_G = 1$  (dies entspricht einer intestinalen Verfügbarkeit von 100%) führte zu einer Verschlechterung des OFV um 300 Punkte im Vergleich zu einem geschätzten Wert für  $F_G$ . Variationen der getesteten Modelle beinhalteten eine nichtlineare Elimination auch in der Darmwand durch die zusätzliche Abschätzung von  $K_{m,G}$  und  $V_{\text{max},G}$ . Weiterhin wurde ein Modell mit identischem  $K_m$ -Wert für Darmwand und Leber, aber zwei unterschiedlichen  $V_{\text{max}}$  getestet. Das finale Modell beinhaltete eine separate Schätzung von  $V_{\text{max}}$  für Darmwand und Leber, wobei bei der interindividuellen Variabilität beide Parameter korrelierten (Tab. 4.24). Ein identischer  $K_m$ -Wert für Darmwand und Leber erwies sich gegenüber separat geschätzten Werten als signifikant überlegen (verminderter OFV um 5 Punkte). Die Residualvariabilität wurde mit einem kombinierten Fehlermodell beschrieben.

Tab. 4.24 Pharmakokinetische Parameter des Voriconazol-Basismodells

Parameter (Einheit)	Definition	Wert	95 % KI
<b>Schätzwerte für <math>\theta</math></b>			
$V_{SS}$ (L)	Verteilungsvolumen zentrales Kompartiment im Steady State	383,75	320 - 460
$V_{\text{per}}$ (L)	Verteilungsvolumen des peripheren Kompartiments	232,76	186 - 291
$CL_{\text{per}}$ (L/h)	Verteilungsclearance zum peripheren Kompartiment	35,16	30,8 - 40,1
$V_{\text{max VRC}}$ ( $\mu\text{mol/L/h}$ )	Maximale Reaktionsgeschwindigkeit hepatische CYPs	29,37	19,4 - 44,5
$V_{\text{max,G,VRC}}$ ( $\mu\text{mol/L/h}$ )	Maximale Reaktionsgeschwindigkeit intestinale CYPs	8,50	5,72 - 12,6
$K_m$ ( $\mu\text{mol/L}$ )	$K_m$ -Wert für Leber und Darmwand	0,12	0,094 - 0,147
$K_a$ ( $\text{h}^{-1}$ )	Resorptionskonstante	0,75	0,600 - 0,933
<b>Schätzwerte für <math>\omega^2</math></b>			
IIV $V_{\text{max}}$ (CV %)	interindividuelle Variabilität der maximalen CYP-Reaktionsgeschwindigkeit in der Leber	22,60	-3,86 - 49,1
Korrelation (CV %)		16,60	-5,55 - 38,8

Parameter (Einheit)	Definition	Wert	95 % KI
IIV $V_{\max,G}$ (CV %)	interindividuelle Variabilität der maximalen CYP-Reaktionsgeschwindigkeit in der Darmwand	20,60	-4,88 - 46,1
<b>Schätzwerte für <math>\sigma^2</math></b>			
RV $SD_{\text{prop}}$ (CV %)	Residualvariabilität proportional	1,23	1,17 - 1,21
RV $SD_{\text{add}}$ (CV %)	Residualvariabilität additiv	0,01	0,0100 - 0,0150

**CV** Variationskoeffizient; **IIV** interindividuelle Variabilität; **RV** Residualvariabilität

<sup>a</sup>Konfidenzintervalle (KI) basieren auf den mit NONMEM erhaltenen Standardfehlern (unter der Annahme einer Normalverteilung der Daten in der log-Domäne des jeweiligen Parameters, berechnet als  $\theta \pm z_{1-\alpha/2} \times SE$  ( $SE$  ist der von NONMEM ausgegebene Standardfehler,  $z_{1-\alpha/2}$  ist das 0.975-Perzentil der Standardnormalverteilung)

Eine interindividuelle Variabilität in der maximalen Umsatzgeschwindigkeit der am Voriconazol-Metabolismus beteiligten CYP-Enzyme in Darmwand und Leber zeigte vergleichsweise hohe Standardfehler an, wurde aufgrund der geringen Anzahl an Probanden jedoch akzeptiert.

Nach Entwicklung eines Modells für Voriconazol wurden dessen Parameterschätzer fixiert und ein empirisches Einkompartimentmodell für Voriconazol-N-oxid integriert. Der Metabolismus von Voriconazol ist komplex: die Bildung acht unterschiedlicher Metabolite wird beschrieben<sup>151</sup>, von denen der jeweilige Anteil der Bildung jedoch nicht genau bekannt ist. In der durchgeführten Studie wurden neben Voriconazol ausschließlich Plasmakonzentrationen des Hauptmetaboliten Voriconazol-N-oxid gemessen. Aus diesem Grund wurde empirisch eine Fraktion  $F_m$  der Umsetzung von Voriconazol zu Voriconazol-N-oxid in der Leber auf 100% gesetzt, wodurch ein verzerrtes Verteilungsvolumen um den wahren unbekanntem Wert von  $F_m$  erhalten wurde. Darauf folgend wurde eine relative Fraktion der Voriconazol-Dosis zu  $F_m$  in der Leber geschätzt, die im Darm direkt zu Voriconazol-N-oxid metabolisiert wird. Im letzten Schritt wurden alle Parameter geschätzt. Das erhaltene Modell wurde dahingehend erweitert, dass Voriconazol-N-oxid den Metabolismus von Voriconazol inhibiert, da der gebildete Metabolit ähnliche inhibitorische Eigenschaften auf CYP-Enzyme besitzt wie Voriconazol selbst<sup>151</sup>. Dies führte allerdings nicht zu einer Verbesserung der Anpassung und wurde verworfen.

#### Beurteilung und Anwendung des Modells

Zur Untersuchung der Extrapolierbarkeit des Modells wurde ein Datensatz erstellt, der neben den Daten der durchgeführten Studie Beobachtungen aus zwei weiteren Studien enthielt<sup>154,155</sup>, um einen größeren Konzentrationsbereich von Voriconazol und Voriconazol-N-oxid abzudecken. Zur Untersuchung der Hypothese, dass bei geringen applizierten Mengen (kontinuierli-

che Zufuhr von insgesamt 153 mg Voriconazol über 16 h) der Darmwandmetabolismus nicht gesättigt ist und somit die Bioverfügbarkeit im Verhältnis zu therapeutischen Dosen (200 mg Erhaltungsdosis) vermindert ist, wurde ein Datensatz, zusammengeführt aus allen drei Studien, auf das entwickelte Modell angewendet. Geschätzt wurden zwei Werte für  $K_a$ : einer für die neu durchgeführte Studie, ein gemeinsamer zweiter für die beiden anderen Studien (Saari et al.<sup>154</sup> und Katzenmaier et al.<sup>155</sup>). Dadurch, dass Voriconazol in der neu durchgeführten direkt an den Ort der Resorption infundiert wurde und in diesem Fall die Resorption unmittelbar vonstattengeht, sollte hier der geschätzte Wert für  $K_a$  deutlich höher sein als jener für die beiden anderen Studien, bei der Voriconazol in Tablettenform gegeben wurde. In diesem Fall musste der Arzneistoff zunächst aus der Darreichungsform freigesetzt werden, bevor er nach einer gewissen zeitlichen Verzögerung an den Resorptionsort gelangen konnte. Das Ergebnis lieferte unerwartete Werte: Demnach lief die Resorption schneller bei oraler Gabe von Voriconazol in den Studien von Saari und Katzenmaier ab und war verlangsamt für die Studie mit neuartigem Studiendesign. Die alleinige Anwendung der Daten der Studien von Saari und Katzenmaier führte im Vergleich zur neuen Studie zur Schätzung eines niedrigeren  $K_a$ -Wertes aus vorherigen Läufen. Weiterhin konnte die geschätzte Clearance, die sich bei der Verwendung des kombinierten Datensatzes ergab, die Elimination von Voriconazol nach Gabe therapeutischer Dosen nicht beschreiben, die Elimination verlief hier stark verlangsamt. Bei der alleinigen Anwendung der Daten aus der neuen Studie lieferte die geschätzte Clearance jedoch einen plausiblen Wert. Aus diesem Grund wurden weitere Clearances getestet, die vor allem bei hohen Konzentrationen mit einem hohen  $K_m$ -Wert relevant werden, was jedoch nur zu einer Verminderung des OFV um 9 Punkte führte. Somit war die Implementierung konstanter und sättigbarer Clearances für Darmwand und Leber nicht erfolgreich ebenso wie die Fixierung von  $K_a$  der Studie mit neuartigem Studiendesign auf einen hohen Wert und Schätzung des zweiten  $K_a$ -Wertes. Hierbei fiel vielmehr die starke Veränderung verschiedener Parameterschätzungen von Voriconazol auf, was auf ein instabiles Modell hindeutet. Auch die Implementierung eines inhibitorischen Effektes von Voriconazol-N-oxid auf den Voriconazol-Metabolismus lieferte keinen höheren  $K_a$ -Wert für die Studie, bei der die Substanzen direkt in das Darmlumen appliziert wurden im Vergleich zu den beiden weiteren Studien.

#### Midazolam- und 1'-OH-Midazolam-Basismodell

Analog zu Voriconazol wurde für die log-transformierten Daten von Midazolam und den Metaboliten 1'-OH-Midazolam ein semiphysiologisches Modell unter Verwendung des *well-stirred*



und  $Q_{\text{gut}}$ -Modells zur Beschreibung der hepatischen bzw. intestinalen Clearance entwickelt. Die physiologischen Kompartimente waren jeweils mit einem zentralen Kompartiment für Midazolam und 1'-OH-Midazolam verknüpft. Da die Schätzung der Resorptionskonstante  $K_a$  außerordentlich hohe Punktschätzer ergab, wurde der Parameter aufgrund der unmittelbaren Midazolam-Resorption in die Darmwand nach dessen Austritt aus der Duodenalsonde auf einen sehr hohen Wert ( $e^{10}=22.026\text{h}^{-1}$ ) fixiert. Ein zusätzlich eingebautes Enterozytenkompartiment führte zu keiner signifikanten Verbesserung der Anpassung.

Zu Beginn wurde die Schätzung jenes Anteils von 1'-OH-Midazolam getestet, der nach dessen Bildung das zentrale Metabolitkompartiment erreicht. Auch wurde der zweite quantifizierte Metabolit 4-OH-Midazolam mit einem zentralen Kompartiment in das Modell integriert und für die Bildung beider Substanzen verschiedene Fraktionen der verfügbaren Anteile in Darmwand und Leber sowie der Niere geschätzt. Da für 4-OH-Midazolam die gemessenen Urinkonzentrationen durchgehend unterhalb der Quantifizierungsgrenze von 0,5 ng/mL (= 1,46 nmol/L) lagen, und in vivo der Anteil an 4-OH-Midazolam im Metabolismus von Midazolam im Vergleich zu 1'-OH-Midazolam nur eine untergeordnete Rolle spielt<sup>210</sup>, wurde für den Einbau der vorliegenden Urindaten 4-OH-Midazolam vollständig aus dem Modell entfernt. Vereinfachend wurden somit nur 1'-OH-Midazolam und der hieraus entstehende Metabolit 1'-OH-Midazolam- $\beta$ -D-Glucuronid in das Modell integriert.

Zur Implementierung der Urindaten wurde eine Kombination aus einem zentralen und einem Urinkompartiment sowie ein direkter Übergang aus der Leber bzw. dem zentralen Kompartiment von Midazolam bzw. 1'-OH-Midazolam über eine renale Clearance in das Glucuronid-Urinkompartiment getestet. Geschätzt wurden verschiedene Clearances zur Beschreibung der Metabolisierung von Midazolam im Darm via CYP (CLGC) zu 1'-OH-Midazolam und via UGT zum entsprechenden Glucuronid (CLGG), und zur Darstellung der 1'-OH-Midazolam-Glucuronidierung unmittelbar nach der Bildung aus Midazolam in der Darmwand (MCLG) bzw. in der Leber (MCLL). Zuletzt wurden renale Glucuronidierungsreaktionen berücksichtigt (MCLRG, MCLRF (im Urin ausgeschiedenes unkonjugiertes 1'-OH-Midazolam)).

Das finale Basismodell berücksichtigte die Plasma- und Urindaten von Midazolam und 1'-OH-Midazolam ohne Voriconazol-Einfluss (h 0 – 8). Bei der intestinalen Applikation (Studienphase 1 und 4) gelangte Midazolam zunächst in ein hypothetisches Dosiskompartiment. Der Metabolismus von Midazolam wurde hierbei über verschiedene Clearances, die die einzelnen Abbauege via CYPs und UGTs beschreiben, definiert: Ein Teil der applizierten Dosis wird hiernach unmittelbar in der Darmwand glucuronidiert und gelangt mit einer Clearance CLGG in das

Midazolam-N-Glucuronid-Urinkompartiment. Ein anderer Teil wird in der Darmwand über CYP3A hydroxyliert (CLGC) und führt zur Bildung von 1'-OH-Midazolam. Das auf diese Weise gebildete 1'-OH-Midazolam kann entweder in die Portalvene gelangen (CLGC) oder wird unmittelbar nach der Bildung via Glucuronidierung weiter biotransformiert (MCLG), gelangt hierbei in das zentrale 1'-OH-Midazolam-β-D-Glucuronid-Kompartiment und von da aus in das 1'-OH-Midazolam-Glucuronid-Urinkompartiment. Da keine Konzentrationen von 1'-OH-Midazolam-β-D-Glucuronid im Plasma gemessen wurden, war für das zentrale 1'-OH-Midazolam-β-D-Glucuronid-Kompartiment die Schätzung eines Verteilungsvolumens nicht möglich. Es handelt sich hier um ein hypothetisches Kompartiment, dessen Integration jedoch zu besseren Schätzwerten führte als eine direkte Clearance in das entsprechende Urinkompartiment. Der Übergang vom zentralen in das Urinkompartiment von 1'-OH-Midazolam-β-D-Glucuronid wurde mit einer Geschwindigkeitskonstante ( $K_{1OHG}$ ) beschrieben.

Das in die Portalvene gelangte 1'-OH-Midazolam erreicht über dessen Leberkompartiment entweder unverändert das zentrale 1'-OH-Midazolam-Kompartiment oder über eine Glucuronidierungsreaktion mit einer Clearance  $M_{CLL}$  das zentrale 1'-OH-Midazolam-β-D-Glucuronid-Kompartiment. Auch eine renale Clearance von unkonjugiertem 1'-OH-Midazolam in ein Urinkompartiment ( $M_{CLRF}$ ) wurde integriert sowie eine renale Glucuronidierung ( $M_{CLRG}$ ).

Analog zu 1'-OH-Midazolam gelangt unverändertes Midazolam über die Portalvene in das entsprechende Leberkompartiment und von da aus in das zentrale Midazolam-Kompartiment. Hieraus kann es wiederum mit einer Clearance  $CLL_G$  ins Midazolam-N-Glucuronid-Urinkompartiment gelangen oder über eine renale Clearance (CLR) glucuronidiert werden. Es wurde eine intrinsische Clearance für Darmwand und Leber geschätzt.

Die für den Midazolam-Metabolismus essentielle hepatische 1'-Hydroxylierung wurde durch den Übergang vom Midazolam- in das 1'-OH-Midazolam-Leberkompartiment beschrieben. Für die log-transformierten Daten wurde eine Normalverteilung der inter- und intraindividuellen Variabilität angenommen. Für die interindividuelle Variabilität von Midazolam und 1'-OH-Midazolam wurde ein additives Fehlermodell nach log-Transformation der Daten angewendet, das bei Rücktransformation der Daten einem exponentiellen Fehlermodell entspricht. Für die intraindividuelle Variabilität wurde jeweils ein kombiniertes Fehlermodell aus proportionalem und additivem Fehler benutzt.

## Inhibitionsmodell

Die Voriconazol- und Midazolam/1'-OH-Midazolam-Modelle wurden unter Verwendung der log-transformierten Daten zusammengeführt (Abb. 4.21). Da in der Literatur<sup>196,214</sup> wie schon in vorherigen Abschnitten beschrieben eine kompetitive CYP3A-Hemmung durch Voriconazol beschrieben wird und auch in der Reanalyse (s. Abschnitt 4.1) sich ein kompetitiver Hemmtyp zur Beschreibung des Effekts von Voriconazol auf die CYP3A-Aktivität gut eignete, wurde auch hier von einer kompetitiven Hemmung von CYP3A sowie beteiligter UGTs ausgegangen. Eine direkte Verknüpfung des inhibitorischen Effekts der ungebundenen Voriconazol-Konzentrationen auf die CYP-Aktivität in Darmwand und Leber wurde integriert, ebenso wurden eine UGT-Hemmung und eine Aktivitätsverminderung der UGT-Enzyme in der Niere durch Voriconazol getestet. Der geschätzte  $K_i$ -Wert zur Quantifizierung der CYP3A-Inhibition lag bei 0,4266  $\mu\text{mol/L}$  (Tab. 4.25). Die Schätzung von Inhibitionskonstanten bezogen auf die Glucuronidierung in Darmwand, Leber und Niere lieferte keine plausiblen Ergebnisse, sodass sie aus dem Modell entfernt wurden. Ein  $\eta$ -Shrinkage lag mit 29,2% nur knapp oberhalb des maximalen Akzeptanzwertes von 20%.

Die in Abb. 4.22 dargestellten Goodness-of-Fit-Plots zeigen speziell für Voriconazol eine zum Teil ausgeprägte Unterschätzung der IPREDs. Die Auftragung der CWRES gegen PRED für Midazolam und Voriconazol deuten auf eine Missspezifikation des Modells hin, ebenso die Auftragung CWRES gegen Zeit nach dem Start der Midazolam-Infusion. Der durchgeführte VPC bestätigt eine prinzipielle Eignung des Voriconazol-Modells (Abb. 4.23). Bei intestinaler Voriconazol-Infusion ist die Variabilität höher als bei kontinuierlicher i.v. Gabe. Dies wird an den breiten und stark überlappenden 90%-Konfidenzintervallen für die Zeit der Infusion und auch danach deutlich. Speziell ein Proband zeigte bei der intestinalen Voriconazol-Infusion deutlich höhere Plasmakonzentrationen als die übrigen Studienteilnehmer. Der Median der Midazolam-Plasmakonzentrationen in Studienperiode 2 (Midazolam int./Voriconazol i.v.) (Abb. 4.24) liegt von h 0-16 durchgehend unterhalb des geschätzten 90% Konfidenzintervalls. Für 1'-OH-Midazolam wird dieses Phänomen noch ausgeprägter beobachtet (Abb. 4.25). Insgesamt verdeutlichen die überlappenden Konfidenzintervalle noch einmal die ausgeprägte interindividuelle Variabilität, die durch die geringe Anzahl an Studienteilnehmern nur unvollständig charakterisiert werden kann.

Tab. 4.25 Geschätzte Parameter des finalen Interaktionsmodells

Parameter	Definition	Wert
<b>Schätzwerte für <math>\theta</math></b>		
$CL_{int,L,MDZ}$ (L/h)	Ungebundene hepatische intrinsische Clearance MDZ	2,208
$V_{MDZ}$ (L)	Verteilungsvolumen des zentralen MDZ-Kompartiments	239,9
CLGC (L/h)	MDZ-Clearance via CYP in der Darmwand	19,98
CLLC (L/h)	MDZ-Clearance via CYP in der Leber	1290
CLGG (L/h)	MDZ-Clearance via UGT in der Darmwand	0,0679
CLLG (L/h)	MDZ-Clearance via UGT in der Leber	0,0043
$K_{a,MDZ}$ ( $h^{-1}$ )	Resorptionskonstante MDZ	22026 FIX
$V_{1-OH-MDZ}$ (L)	Verteilungsvolumen des zentralen 1-OH-MDZ-Kompartiments	149,9
MCLG (L/h)	1-OH-MDZ-Clearance via UGT in der Darmwand	8,70E+92
MCLL (L/h)	1-OH-MDZ-Clearance via UGT in der Leber	9,583
MCLRG (L/h)	renale 1-OH-MDZ-Clearance via UGT	160,8
MCLRF (L/h)	renale 1-OH-MDZ-Clearance unverändert	2,145
CLR (L/h)	renale MDZ-Clearance via UGT	0,0765
$K_{1OHG}$ ( $h^{-1}$ )		0
$V_{ss,VRC}$ (L)	Verteilungsvolumen des zentralen VRC-Kompartiments	368,7
$V_{per,VRC}$ (L)	Verteilungsvolumen des peripheren VRC-Kompartiments	217
$K_{a,VRC}$ ( $h^{-1}$ )	Resorptionskonstante VRC	0,8228
$K_{m,VRC}$ ( $\mu\text{mol/L}$ )	$K_m$ -Wert VRC für Leber und Darmwand	0,1165
$V_{max,VRC}$ ( $\mu\text{mol/L/h}$ )	Maximale Reaktionsgeschwindigkeit hepatische CYP3A	33,12
$V_{max,G,VRC}$ ( $\mu\text{mol/L/h}$ )	Maximale Reaktionsgeschwindigkeit intestinale CYP3A	6,488
$K_{i,CYP}$ ( $\mu\text{mol/L}$ )	Inhibitionskonstante von VRC für die Inhibition von MDZ	0,4266
<b>Schätzwerte für <math>\omega_2</math></b>		
IIV $CL_{int}$ L (CV %)	interindividuelle Variabilität der intrinsischen hep. CL MDZ	0,001
IIV $V_{max,VRC}$ (CV %)	interindividuelle Variabilität der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit von CYP3A in der Leber	0,173
IIV $V_{max,VRC}$ und $V_{max,G,VRC}$ korreliert (CV %)	Korrelation	0,207
IIV $V_{max,G,VRC}$ (CV %)	interindividuelle Variabilität der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit von CYP3A in der Darmwand	0,357
<b>Schätzwerte für <math>\omega_2</math></b>		
RV MDZ Plasma (CV %)	Residualvariabilität MDZ im Plasma	0,129
RV 1-OH-MDZ Plasma (CV %)	Residualvariabilität 1-OH-MDZ im Plasma	0,122
RV 1-OH-MDZ frei Urin (CV %)	Residualvariabilität 1-OH-MDZ im Urin	0,775
RV 1-OH-MDZ-Gluc Urin (CV %)	Residualvariabilität 1-OH-MDZ-Gluc im Urin	0,464
RV MDZ-Gluc. Urin (CV %)	Residualvariabilität MDZ-Gluc. im Urin	0,708
RV VRC Plasma (CV %)	Residualvariabilität VRC im Plasma	0,057

CV Variationskoeffizient; IIV interindividuelle Variabilität; MDZ Midazolam; 1-OH-MDZ 1-OH-Midazolam; 1-OH-MDZ-Gluc 1'-OH-Midazolam- $\beta$ -D-glucuronid; RV Residualvariabilität; VRC Voriconazol

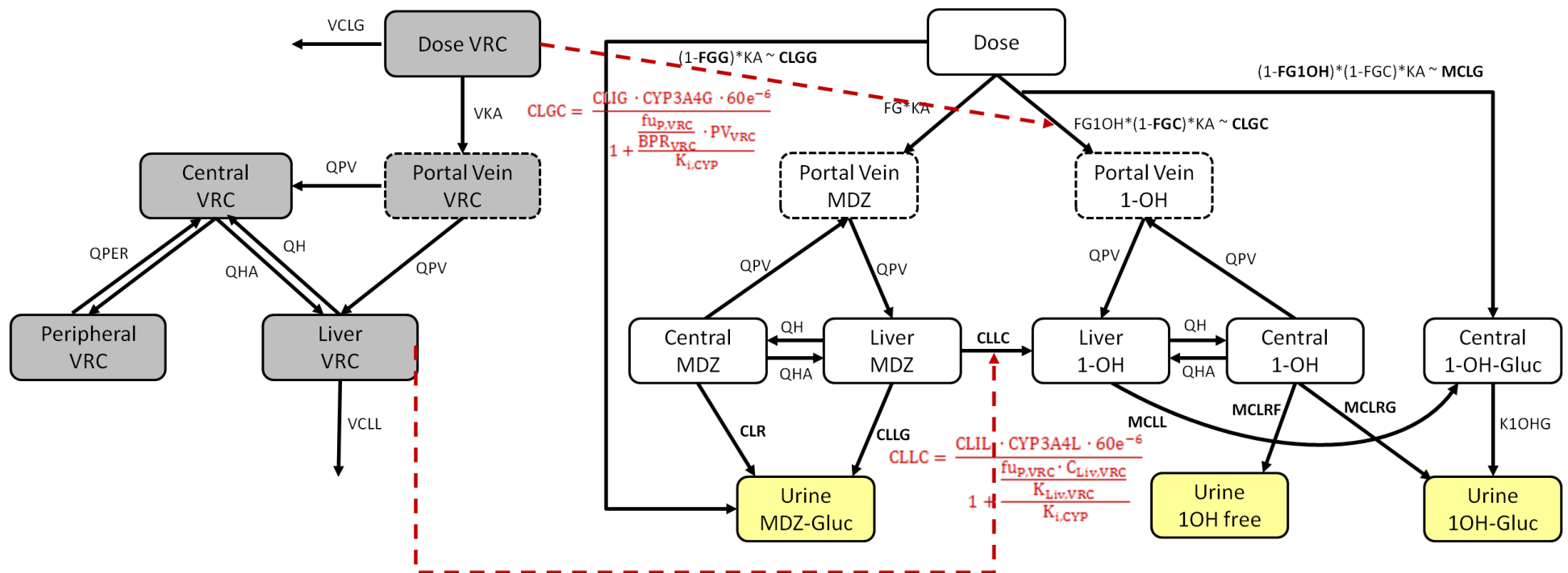


Abb. 4.21 Schematisches pharmakokinetisches Interaktionsmodell von Midazolam, 1'-OH-Midazolam und Voriconazol. **MDZ** Midazolam; **1-OH** 1'-OH-Midazolam, **VRC** Voriconazol; **MDZ-Gluc** Midazolam-N-glucuronid; **1OH frei** freies 1'-OH-Midazolam im Urin; **1OH-Gluc** 1'-OH-Midazolam-β-D-glucuronid; **VKA** Resorptionskonstante Voriconazol; **KA** Resorptionskonstante Midazolam; **VCLG** intestinale Voriconazol-Clearance; **VCLL** hepatische Voriconazol-Clearance; **QPER** Verteilungsclearance zum peripheren Voriconazol-Kompartiment; **QHA** Blutfluss in der Leberarterie, **QH** Blutfluss in der Leber; **QPV** Blutfluss in der Portalvene; **FGG** Anteil an Midazolam, das keiner intestinalen Glucuronidierung unterliegt; **CLGG** intestinale Midazolam-Clearance via UGT; **CLLC** hepatische Midazolam-Clearance via CYP; **CLLG** intestinale Midazolam-Clearance via CYP; **CLLC** hepatische Midazolam-Clearance via UGT; **FG1OH** Anteil an 1'-OH-Midazolam, das keiner intestinalen Glucuronidierung unterliegt, **FG** Midazolamfraktion, die aus dem Darm systemisch verfügbar wird; **FGC** intestinale Midazolamfraktion, die nicht über CYP metabolisiert wird; **CLR** renale Midazolam-Clearance via UGT; **MCLL** hepatische 1'-OH-Midazolam-Clearance via UGT; **MCLRg** renale 1'-OH-Midazolam-Clearance via UGT; **MCLRf** renale Clearance von unkonjugiertem 1'-OH-Midazolam; **K1OHg** Geschwindigkeitskonstante Übergang zentrales – Urinkompartiment 1'-OH-Midazolam-β-D-glucuronid; **CLIG** intrinsische Clearance in der Darmwand; **CLIL** intrinsische Clearance in der Leber; **CYP3A4G** intestinaler CYP3A4-Gehalt; **CYP3A4L** hepatischer CYP3A4-Gehalt; **f<sub>u,p,VRC</sub>** ungebundene Voriconazol-Fraktion im Plasma, **C<sub>Liv,VRC</sub>** hepatische Voriconazolkonzentration; **BPR<sub>VRC</sub>** Blut/Plasma-Ratio Voriconazol; **PV<sub>VRC</sub>** Voriconazolkonzentration der Portalvene; **K<sub>i,CYP</sub>** Plasma/Leber-Verteilungskoeffizient Voriconazol; **K<sub>i,CYP</sub>** Inhibitionskonstante von Voriconazol für die Inhibition des Midazolammetabolismus via CYP.

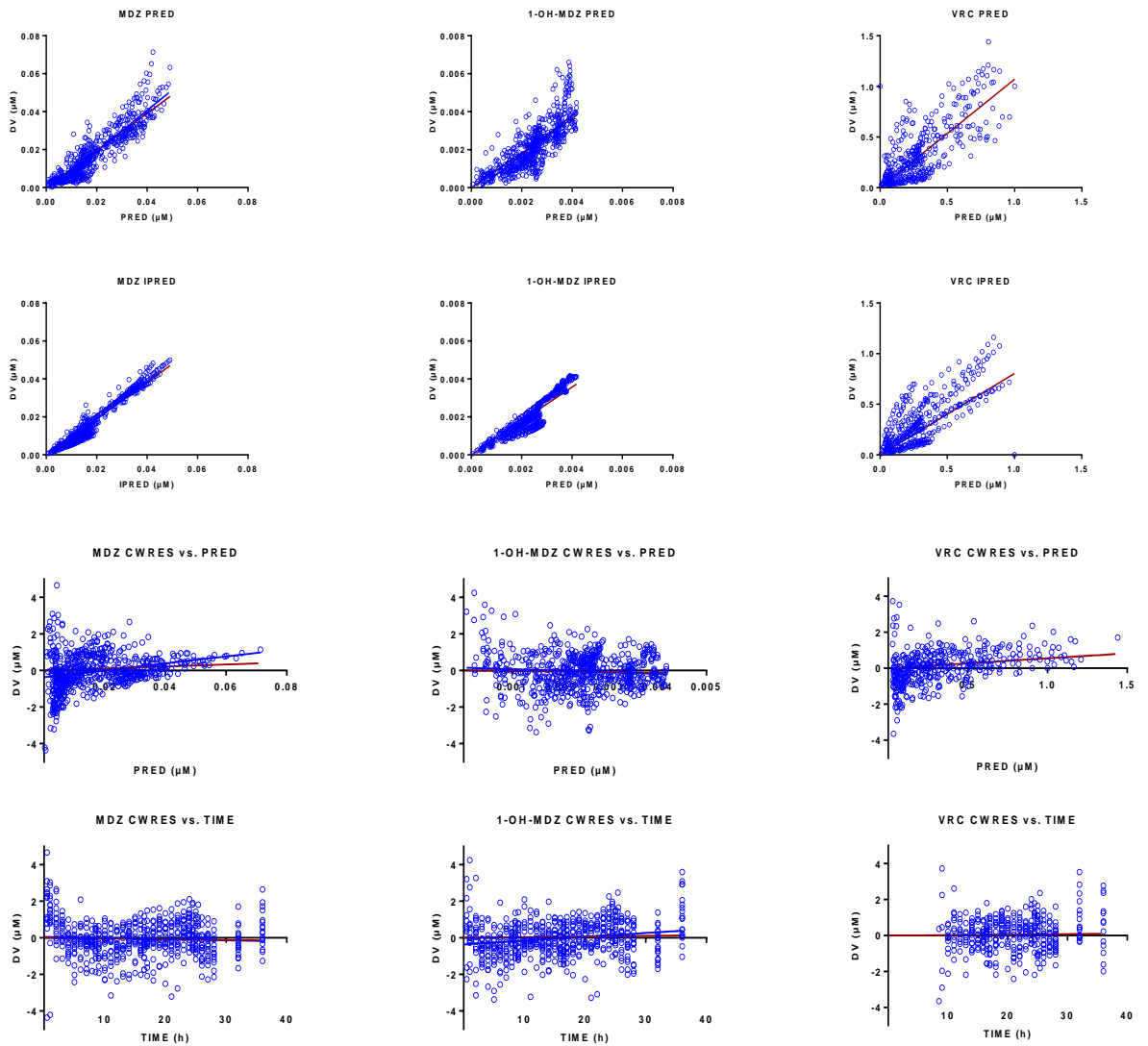


Abb. 4.22 Goodness-of-fit-Plots des finalen Interaktionsmodells. Von oben nach unten für Midazolam (**MDZ**), 1'-OH-Midazolam (**1-OH-MDZ**) und Voriconazol (**VRC**): beobachtete Konzentrationen (**DV**) gegen Populationsschätzwerte (**PRED**), beobachtete Konzentrationen (**DV**) gegen Populationsschätzwerte (**PRED**), beobachtete Konzentrationen (**DV**) gegen individuelle Schätzwerte (**IPRED**), konditional gewichtete Residuen (**CWRES**) gegen Populationsschätzwerte, konditional gewichtete Residuen (**CWRES**) gegen Zeit nach dem Start der Midazolaminfusion.

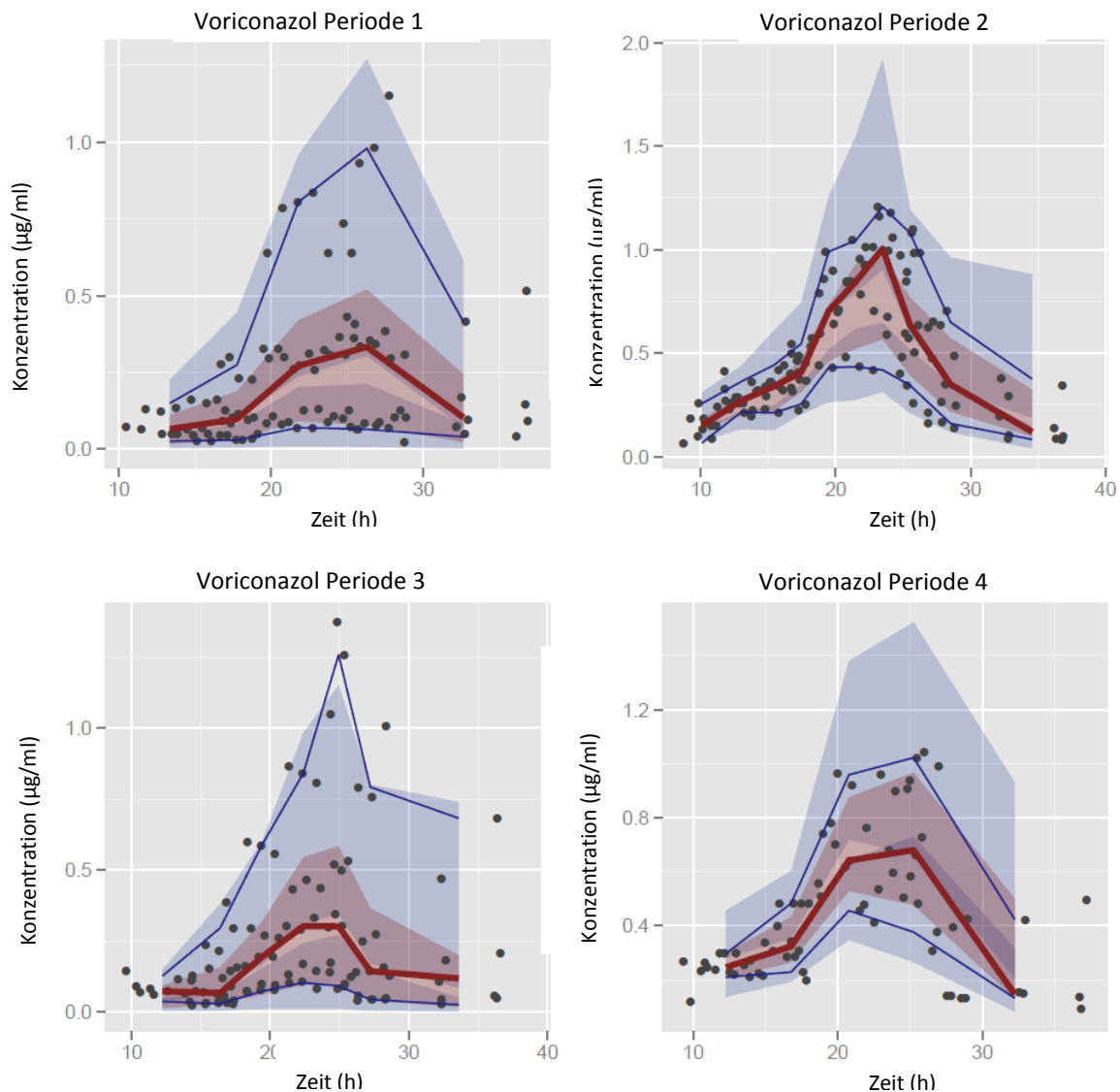


Abb. 4.23 Visual Predictive Check für Voriconazol im finalen Modell. **Periode 1:** Midazolam i.v./Voriconazol int., **Periode 2:** Midazolam int./Voriconazol i.v., **Periode 3:** Midazolam int./Voriconazol int., **Periode 4:** Midazolam i.v./Voriconazol i.v.; i.v. intravenös. int. intestinal. Plasmakonzentrationen in µM. **Punkte** Beobachtungen, **schattierte Fläche** 90 % Vorhersageintervall, **rote Linie** Median der simulierten Daten, **blaue Linien** 5. und 95. Perzentil der simulierten Daten

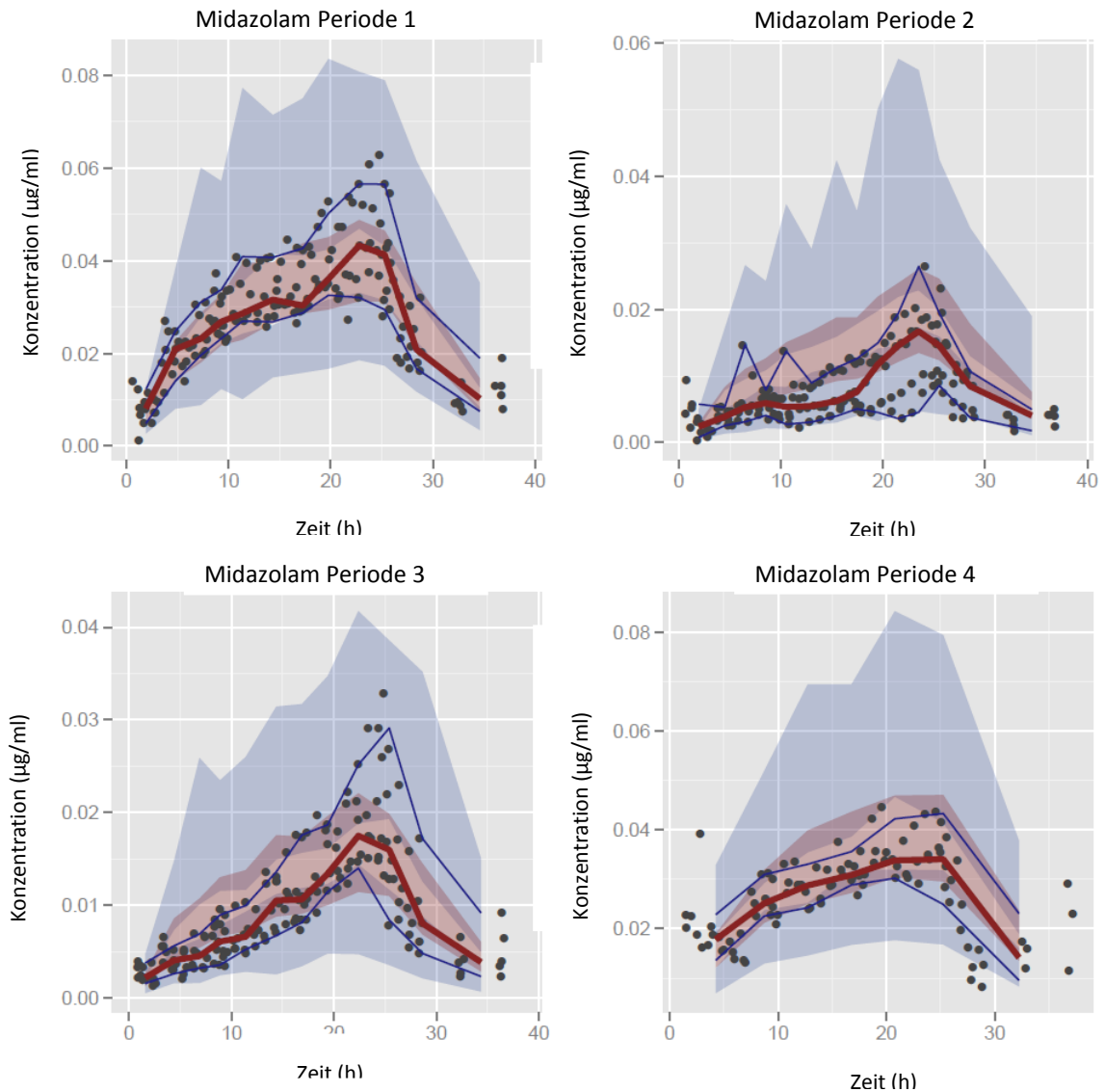


Abb. 4.24 Visual Predictive Check für Midazolam im finalen Modell. **Periode 1:** Midazolam i.v./Voriconazol int., **Periode 2:** Midazolam int./Voriconazol i.v., **Periode 3:** Midazolam int./Voriconazol int., **Periode 4:** Midazolam i.v./Voriconazol i.v.; i.v. intravenös. int. intestinal. Plasmakonzentrationen in µM. **Punkte** Beobachtungen, **schattierte Fläche** 90 % Vorhersageintervall, **rote Linie** Median der simulierten Daten, **blaue Linien** 5. und 95. Perzentil der simulierten Daten



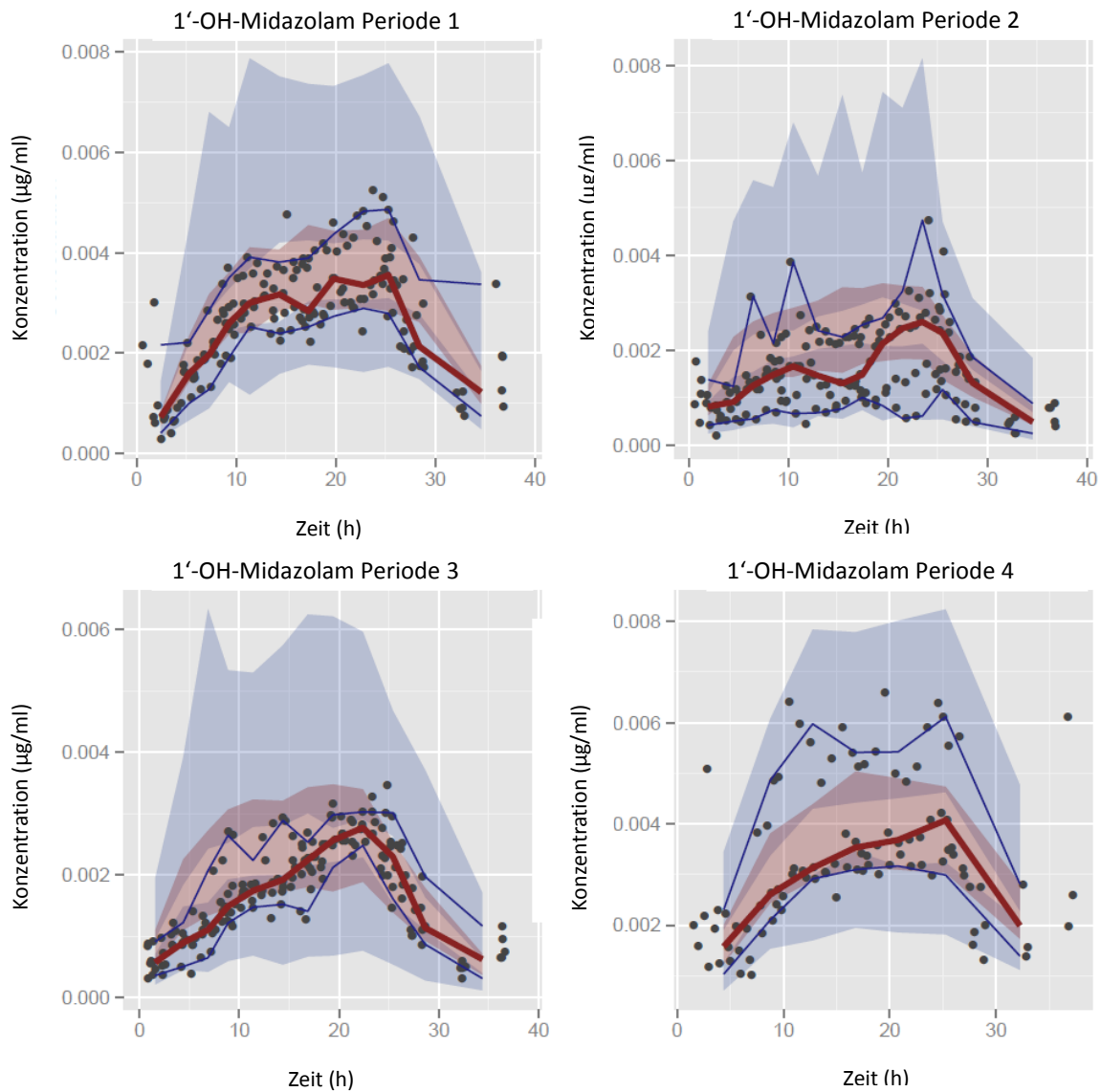


Abb. 4.25 Visual Predictive Check für 1'-OH-Midazolam im finalen Modell. **Periode 1:** Midazolam i.v./Voriconazol int., **Periode 2:** Midazolam int./Voriconazol i.v., **Periode 3:** Midazolam int./Voriconazol int., **Periode 4:** Midazolam i.v./Voriconazol i.v.; **i.v.** intravenös. **int.** intestinal. Plasmakonzentrationen in µM. **Punkte** Beobachtungen, **schattierte Fläche** 90 % Vorhersageintervall, **rote Linie** Median der simulierten Daten, **blaue Linien** 5. und 95. Perzentil der simulierten Daten

In Tab. 4.26 sind die AUC-Ratios des entwickelten Interaktionsmodells und der nichtkompartimentellen Datenanalyse dargestellt.

Tab. 4.26 AUC-Ratios des finalen Interaktionsmodells und der nichtkompartimentellen Datenanalyse

		Periode A	Periode B	Periode C	Periode D
AUCR Original-	VRC low dose	1,84 (1,67-2,00)	1,56 (1,28-1,84)	2,13 (1,93-2,34)	1,64 (1,34-1,92)
	VRC high dose	2,35 (2,21-2,49)	2,72 (1,87-3,56)	4,25 (1,36-4,72)	1,98 (1,63-2,32)
AUCR					
finales Modell	VRC low dose	2,07 (1,94-2,19)	2,16 (2,05-2,27)	2,09 (2,00-2,19)	1,93 (1,84-2,01)
	VRC high dose	2,63 (2,29-2,97)	3,19 (2,86-3,52)	2,88 (2,54-3,21)	2,26 (2,02-2,50)

Angabe der Daten als Mittelwert (95 % Konfidenzintervall)

**AUCR** Verhältnis der Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (area under the curve, AUC) inhibiert zur Kontrolle

**VRC** Voriconazol; Infusion von 6,4 mg/h (low dose) bzw. 12,8 mg/h (high dose) Voriconazol über jeweils 8 Stunden

Periode A: Midazolam i.v./Voriconazol intestinal; Periode B: Midazolam intestinal/Voriconazol i.v.;

Periode C: Midazolam intestinal/Voriconazol intestinal; Periode D: Midazolam i.v./Voriconazol i.v.

## 5 Diskussion

### 5.1 Populationspharmakokinetische Reevaluierung einer klinischen CYP3A-Interaktionsstudie

Zur Beschreibung der Pharmakokinetik von Midazolam, 1'-OH-Midazolam und Voriconazol aus Studiendaten von Saari et al.<sup>154</sup> wurde durch die Verknüpfung eines Dreikompartimentmodells für Midazolam und jeweils Einkompartimentmodellen für 1'-OH-Midazolam und Voriconazol mit physiologischen Kompartimenten (Darmwand, Portalvene, Leber) ein semiphysiologisches Modell entwickelt. Sowohl Bootstrap-Analyse als auch VPC bestätigten hierbei Präzision und Richtigkeit der geschätzten Parameter und die Vorhersagekraft für andere Modelle. Die allgemeine Eignung des basalen Midazolam-Modells konnte mit der guten Übereinstimmung der geschätzten intrinsischen intestinalen und hepatischen Clearance und in vitro-Experimenten gezeigt werden: basierend auf drei Studien mit HLM und humanen intestinalen Mikrosomen<sup>37,38,219</sup> wurden intrinsische Clearances von 422 und 238  $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$  Protein in der Leber und der Darmwand erhalten. Nach einer Korrektur für die unterschiedlichen Mengen an CYP3A an den verschiedenen Expressionsorten (155 pmol/mg Protein in der Leber und 50 pmol/mg Protein in der Darmwand)<sup>36,220</sup> und Scaling nach der Durchschnittsmenge von CYP3A in den verschiedenen Organen (70,5 nmol CYP3A im Darm<sup>36</sup> und 9,207 nmol CYP3A in der Leber (unter der Annahme von 33 mg Protein/g Leber<sup>221</sup> und einem Gesamtgewicht der Leber von 1.800 g<sup>107</sup>) erhält man Werte von 1505 und 20,1 L/h für die hepatische und intestinale in vivo Clearance. Diese kommen den Werten des entwickelten Modells sehr nahe (1640 und 26,7 L/h).

Das Modell konnte erfolgreich den zeitlichen Verlauf der Inhibition von hepatischer und intestinaler CYP3A-Aktivität darstellen. Die Inhibition wurde dynamisch modelliert und berücksichtigte alle vorliegenden Konzentrationen des Inhibitors, wobei die Inhibition durch einen kompetitiven Hemmtyp am besten beschrieben werden konnte. In vitro wurde dieser Inhibitionsmechanismus bestätigt<sup>196,214</sup>. Leider konnte eine Inhibition, die sich an den sich über die Zeit verändernden Voriconazol-Konzentrationen orientierte, in Darm und Leber nicht direkt den zeitlichen Inhibitionsverlauf abbilden. Ein zeitabhängiges CYP3A-Inaktivierungsmodell durch Voriconazol wurde diskutiert, allerdings gibt es keine Publikationen, die hierauf hindeuten<sup>196</sup>. Nur die Implementierung empirischer „Inhibitionskompartimente“, die die effektiven Voriconazol-Konzentrationen für die reversible Hemmung an den jeweiligen CYP3A-Expressionsorten widerspiegeln, ermöglichte die angemessene Schätzung eines in vivo  $K_i$ , der

sich auf die Voriconazol-Konzentrationen am Enzym selbst bezieht. Hierbei ist die Verteilung von ungebundenem Voriconazol zwischen Leber bzw. Darmwand und dem Ort der Hemmung vom konventionellen Gewebe/Blut-Verteilungskoeffizienten zu unterscheiden. Ein Wert von  $0,08 \text{ h}^{-1}$  für die Konstante 1. Ordnung  $K_{\text{ENZ}}$ , welche den Übergang von freiem Voriconazol zu den jeweiligen Inhibitionskompartimenten reguliert, deutet auf eine Quasiakkumulation im Sinne eines stetigen Influx in und eines verzögerten Efflux aus dem Enzymkompartiment heraus hin. Hieraus kann man schließen, dass Voriconazol eine verzögerte CYP3A-Inhibition hervorruft, und zwar zu einem Zeitpunkt, an dem Inhibitorkonzentrationen kaum mehr messbar sind. Diese Hypothese kann durch verschiedene Studien unterstützt werden: Zum einen wurde für Ketoconazol ein stochastisches Modell für die Inhibition der Midazolam-Clearance entwickelt, welches eine Akkumulation von Ketoconazol am Inhibitionsort, CYP3A, in den Hepatozyten vorschlägt<sup>222</sup>. Zum anderen wurde der zeitliche Verlauf der CYP3A-Inhibition durch Voriconazol anhand der Midazolam-Clearance bereits von Katzenmaier et al.<sup>155</sup> untersucht, und hierbei blieb der hemmende Effekt von Voriconazol nach starkem Absinken von dessen Plasmakonzentrationen ( $< 0,1 \text{ } \mu\text{g/mL}$ ) erhalten. Weiterhin ist der durch das Modell erhaltene  $K_{i,\text{MDZ}}$ -Wert für die Inhibition des Midazolam-Metabolismus mit  $0,34 \text{ } \mu\text{M}$  ( $= 119,1 \text{ ng/mL}$ ) in vitro-Ergebnissen sehr ähnlich. Auch durch die Simulation des Studiendesigns von Katzenmaier et al.<sup>155</sup> konnte ein verlängerter Hemmeffekt bestätigt werden. Hierbei stimmten die Änderungen in der AUC speziell während der Voriconazol-Behandlung und teilweise auch nach Beendigung der Gabe gut mit den publizierten Ergebnissen überein (Tab. 4.2).

Insgesamt muss allerdings berücksichtigt werden, dass die hinter allem stehenden physiologischen Mechanismen einer potentiellen Akkumulation und der daraus resultierenden verlängerten Inhibition möglicherweise ein komplexes biologisches Wechselspiel widerspiegelt und mit der vorliegenden Datenanalyse nur empirisch zu beschreiben ist. Hierzu gehören die intrazelluläre unspezifische Bindung an zelluläre Bestandteile, der sättigbare Efflux aus dem Enzymkompartiment und potentiell hemmende Metabolite.

Von Voriconazol-N-oxid, dem hauptsächlich zirkulierenden Metabolit von Voriconazol war bis zur Durchführung weiterer Versuche nur bekannt, ein ähnliches inhibitorisches Potential wie Voriconazol zu besitzen. Effekte, die auf Voriconazol-N-oxid zurückzuführen sind, bleiben aufgrund fehlender Daten unklar. Voriconazol-N-oxid könnte mitverantwortlich sein für die verlängerte Inhibition, insbesondere deshalb, da die Voriconazol-N-oxid-Konzentrationen in der Studie von Katzenmaier et al.<sup>155</sup> die von Voriconazol einen Tag nach der letzten Voriconazol-

Dosis überstiegen. So konnte der Einfluss von Metaboliten auf Arzneimittelinteraktionen bereits für andere inhibitorische Azol-Antimykotika wie für Itraconazol gezeigt werden<sup>223</sup>.

Nur durch die Berücksichtigung der 1'-OH-Midazolam-Konzentrationen konnte der zeitliche Verlauf der Inhibition von Midazolam adäquat beschrieben und die Schätzung von  $K_{ENZ}$  stabilisiert werden. Dies zeigt, dass die Berücksichtigung gebildeter Metabolite neue Charakteristika einer in vivo Inhibition offenbaren kann. Gleichzeitig konnten auch die 1'-OH-Midazolam-Daten nur unter der Berücksichtigung der Inhibition der 1'-OH-Midazolam-Elimination durch Voriconazol angepasst werden. Das entwickelte Modell suggeriert, dass fast die komplette hepatische und intestinale Clearance inhibiert wurde, da die Darstellung einer partiellen Inhibition der reinen intrinsischen Clearances im Modell nicht realisierbar war. Dies wiederum kann nicht durch eine einfache CYP3A-Inhibition erklärt werden, da die Bildung von 1,4-Di-OH-Midazolam aus 1'-OH-Midazolam über CYP3A nur eine untergeordnete Rolle spielt. So werden im Urin mehr als 70% einer applizierten Midazolam-Dosis als 1'-OH-Midazolam- $\beta$ -D-Glucuronid wiedergefunden<sup>165</sup>. In vitro Untersuchungen konnten zeigen, dass 1'-OH-Midazolam hauptsächlich über UGT2B4 und UGT2B7 glucuronidiert wird<sup>199</sup>. In der Literatur war bis dato kein Hinweis auf ein solches Verhalten von Voriconazol zu finden, allerdings wird die aufgestellte Hypothese dadurch unterstützt, dass Ketoconazol, Itraconazol und Fluconazol inhibierend auf verschiedene UGTs, inklusive UGT2B4 und 2B7, wirken<sup>142-145</sup>. Daher könnten der Effekt, Nebenwirkungen und Toxizität von Arzneistoffen, die über UGT2B metabolisiert werden, signifikant durch die gleichzeitige Voriconazol-Gabe beeinflusst werden.

Insgesamt zeigten die Daten eine hohe Variabilität. Präzision und Richtigkeit der die interindividuelle Variabilität beschreibenden Parameter waren entsprechend niedrig. Die interindividuelle Variabilität in der hepatischen Clearance von Midazolam reflektiert die bereits erwähnte Variabilität in der vorhandenen CYP3A-Menge und -Aktivität in der Leber bei verschiedenen Individuen<sup>220</sup>. Die Implementierung einer unabhängigen interindividuellen Variabilität in der intestinalen Midazolam-Clearance ergab sich als Konsequenz daraus, dass die hepatische und intestinale CYP3A-Menge nur wenig korrelieren sowie eine voneinander unabhängige Regulierung zeigen<sup>19,37,46,53,224</sup> und dass der intestinale Metabolismus als wichtiger Faktor für die interindividuelle Variabilität identifiziert werden konnte<sup>19,33,37</sup>. Interindividuelle Variabilität liegt wohl auch bei UGT2B vor<sup>225,226</sup> und konnte im Modell als ein Term für die 1'-OH-Midazolam-Clearance ausgedrückt werden. In Übereinstimmung mit publizierten Daten<sup>212,227-229</sup> zeigt Voriconazol eine starke Variabilität in seiner Pharmakokinetik, höchstwahrscheinlich aufgrund seines ausgeprägten Metabolismus über CYP2C19, CYP2C9 und CYP3A4. Aber auch nach Be-

rücksichtigung dieser Gegebenheiten durch den Einbau von interindividueller Variabilität für Voriconazol in das Modell konnten die Plasmakonzentrationen des Inhibitors bei einem Individuum weiterhin nicht adäquat beschrieben werden. Möglicherweise ist dieses Individuum ein *poor metabolizer* für CYP2C19. Aufgrund einer hierdurch bedingten erhöhten Voriconazol-Exposition sind solche *poor metabolizer* anfälliger für Arzneistoffinteraktionen zwischen Voriconazol und Substanzen mit CYP3A vermitteltem Metabolismus<sup>230</sup>.

Obwohl das Modell die interindividuelle Variabilität sowohl in der Clearance des Inhibitors als auch von Midazolam berücksichtigt, konnte die Variabilität im Ausmaß der Inhibition bei den einzelnen Individuen nicht vollständig erklärt werden. Nur die Einführung einer potentiellen interindividuellen Variabilität beim  $K_{i,MDZ}$  führte zu einer verbesserten Anpassung der Daten. Die Variabilität (CV = 39 %) sollte hierbei mindestens zu einem gewissen Teil aus Unterschieden in der Expression von CYP3A4 und CYP3A5 resultieren<sup>31</sup>, wobei die Affinität von Azolantimykotika zu CYP3A4 bei in vitro Untersuchungen höher erscheint als zu CYP3A5<sup>214,231</sup>, und analog hierzu Individuen mit einer Expression des CYP3A5-Wildtyps scheinbar weniger empfänglich für eine Inhibition sind<sup>170</sup>. Natürlich spielen auch weitere Faktoren eine Rolle<sup>232</sup>. So zeigen neuere Studien, dass eine direkte N-Glucuronidierung von Midazolam über UGT1A4 einen Teil der Midazolam-Clearance sowohl in vitro<sup>167,233</sup> als auch in vivo<sup>168</sup> ausmacht (mit Anteilen von 1-6 %). Da zumindest Ketoconazol UGT1A4 nicht inhibiert<sup>167,234</sup>, kann man zu dem Schluss kommen, dass möglicherweise bei einer vorliegenden CYP3A-Inhibition ein metabolischer Shift von der 1'-Hydroxylierung zur N-Glucuronidierung stattfindet. Unter Berücksichtigung funktioneller Polymorphismen von UGT1A4<sup>235</sup> könnte die interindividuelle Variabilität in der direkten N-Glucuronidierung von Midazolam unter einer verminderten CYP3A-Clearance das Ausmaß der beobachteten Wechselwirkung<sup>167,168</sup> signifikant beeinflussen. Dies könnte eine weitere Erklärung für die ausgeprägte beobachtete sowie geschätzte Variabilität sein, auch wenn ein solcher Shift in dem entwickelten Modell nicht berücksichtigt werden konnte.

Die Untersuchung des Einflusses des Applikationsortes des Inhibitors auf Substrate mit signifikantem First-pass-Effekt konnte eindrucksvoll den Einfluss der intestinalen CYP3A-Inhibition auf das Gesamtausmaß von Arzneistoffinteraktionen zeigen (s. Abb. 4.7): die Exposition von oral appliziertem Midazolam verdoppelte sich nahezu, nachdem Voriconazol nicht mehr i.v., sondern oral gegeben wurde. Bei einer stationären Behandlung könnte die i.v. Gabe von Voriconazol eine bessere Alternative zur oralen Applikation für die Therapie invasiver Aspergillosen darstellen. Dies könnte sich beispielsweise bei Transplantationspatienten positiv auswirken, die mit Tacrolimus behandelt werden, da hier der therapeutische Bereich unbe-

dingt eingehalten werden muss, um auf der einen Seite eine Transplantatabstoßung zu verhindern und auf der anderen Seite starke Nebenwirkungen zu verhindern. Die Eignung der Vorhersage von Substratkonzentrationen durch das Modell spiegelt sich auch in einem veröffentlichten Case Report wider, welcher einen um 66% erhöhten Tacrolimuspiegel zeigt, nachdem Voriconazol von i.v. auf orale Gabe umgestellt wurde<sup>236</sup>. Dose-Staggering hat sich zur Minimierung von ausgeprägten Wechselwirkungen in verschiedenen klinischen Situationen als erfolgreich erwiesen<sup>99,237</sup>. Allerdings zeigten die durchgeführten Simulationen (s. Abb. 4.8) nur einen sehr geringen Effekt, wenn Midazolam oral vergleichsweise spät innerhalb eines 12 h-Intervalls zwischen zwei Voriconazol-Dosen gegeben wurde. So war nahezu kein Effekt für i.v. appliziertes Midazolam zu erkennen. Dies wiederum könnte jedoch durch die vorgeschlagene verlängerte Inhibition von CYP3A durch Voriconazol am Enzym erklärt werden und impliziert, dass ein Dose-Staggering beim erreichten Steady-State von Voriconazol kaum noch einen positiven Effekt im Sinne einer Verringerung des Ausmaßes einer Arzneistoffinteraktion hat.

In der Reanalyse entsprachen die sekundären pharmakokinetischen Parameter (AUC,  $C_{max}$ ) denen der nichtkompartimentellen Datenanalyse<sup>154</sup> und spiegeln somit die Validität des entwickelten Modells wider (s. Tab. 4.3). Basierend auf der FDA-Klassifikation von in vivo-Inhibitoren von CYP-Enzymen zeigten beide Analysen, dass orales Voriconazol einen starken CYP3A-Inhibitor für oral appliziertes Midazolam darstellt ( $\geq 5$ -facher Anstieg der AUC) und für i.v. gegebenes Midazolam ein moderater Inhibitor ist ( $\geq 2$ -fach, aber  $\leq 5$ -fach)<sup>225</sup>.

Das physiologisch-basierte Modell bildet den Inhibitionsprozess präzise und mechanistisch ab. Hierbei konnte es den zeitlichen Verlauf der Inhibition auch nach der Voriconazol-Behandlung darstellen, indem es die Veränderlichkeit des Inhibitionsprozesses mit einer klaren Differenzierung zwischen intestinaler und hepatischer CYP3A-Aktivität über die Zeit berücksichtigte. Hieraus ergeben sich im Vergleich zu kürzlich vorgeschlagenen in vivo basierten Methoden für die Vorhersage verschiedener über CYP3A4 vermittelten Wechselwirkungen<sup>160,238</sup> verschiedene Vorteile. Die aufgeführten Publikationen zeichnen sich durch ihre Einfachheit und Praktikabilität aus, um schnell umfassende Vorhersagen für eine Reihe von Inhibitoren machen zu können, da für die Schätzungen einzig zwei Parameter, die sich aus dem Anstieg der AUC ergeben, benötigt werden: das Verteilungsverhältnis von CYP3A4 zur oralen Clearance von Substraten und das Inhibitionsverhältnis  $IR_{CYP3A4}$  von Inhibitoren. Allerdings berücksichtigt diese Methode keine exakte Differenzierung zwischen intestinalem und hepatischem Metabolismus, weshalb die Interaktion zwischen Voriconazol und Midazolam für die i.v. Gabe von Midazolam überschätzt wurde. Nachteile des neuen Modells sind die lange Laufzeit und die Notwendigkeit

vorhandener individueller Daten hinsichtlich der Substrat-, Inhibitor- und Metabolitkonzentrationen.

Ein weiterer Nachteil des semiphysiologischen Modells ist, dass die Annahme komplexerer Prozesse und die Fixierung bestimmter Parameter auf zufällige Werte möglicherweise zu einer Modellmisspezifikation führen. Beispielsweise bleibt der Einfluss von einem angenommenen konstanten BPR und die Fixierung verschiedener Parameter auf den Wert 1 unklar. Verschiedene *in vivo*-Prozesse wurden vernachlässigt, z.B. wird beim *well-stirred* Modell angenommen, dass die Clearance ausschließlich perfusionslimitiert ist, also konventionelle Gewebe/Blut-Verteilungskoeffizienten nicht berücksichtigt werden und die interindividuelle Variabilität bei verschiedenen Parametern unberücksichtigt bleibt, was wiederum in Fehlern bei der Schätzung der interindividuellen Variabilität anderer Parameter resultiert. Hierzu trägt auch die geringe Anzahl an an der Studie teilnehmenden Probanden mit ausgeprägter interindividueller Variabilität bei. Diese Variabilität führte zu Ungenauigkeiten der jeweiligen Schätzungen hinsichtlich Präzision und Richtigkeit. Die Resorption von Voriconazol konnte aufgrund des Studiendesigns nicht geschätzt werden, da während der Voriconazol-Behandlung keine Blutentnahmen erfolgten. Schon aus diesem Grund entsteht eine Missspezifikation des Voriconazol-Modells, da  $C_{max}$  von Voriconazol nicht adäquat erfasst werden konnte. Trotz des physiologisch-basierten Ansatzes konnten nur empirische Kompartimente, die einen stetigen Influx zum und verzögerten Efflux des Inhibitors vom Inhibitionsort (Enzym) weg die Daten am besten beschreiben. Wichtig wäre die Untersuchung, ob der Hauptmetabolit Voriconazol-N-oxid durch seine potentielle Hemmaktivität für eine verlängerte Inhibition verantwortlich sein könnte, denn in verschiedenen anderen Studien konnte einen Einfluss von gebildeten Metaboliten auf die Ausprägung der Hemmung gezeigt werden (beispielsweise Itraconazol<sup>127,170</sup> oder Diltiazem<sup>239</sup>). Insgesamt konnte im Zuge der Modellentwicklung gezeigt werden, dass zusätzliche Informationen (z.B. der CYP3A5/CYP2C19-Genotyp oder die Bestimmung verschiedener Substrat- und Inhibitor-metabolite in Plasma/Urin/Faeces) das Modell weiterentwickeln und verbessern könnten. Auch wenn das entwickelte Modell die Generierung valider Vorhersagen zeigen konnte und wichtige klinische Bedeutung hat, könnten weitere Studien (z.B. flexibles Dosierungsdesign, verschiedene Applikationswege von Substrat und Inhibitor) Defizite des bisherigen Modells verringern. Denn der Mechanismus der verlängerten Inhibition ist unklar und auch die Überschätzung der Variabilität in der Voriconazol-Inhibition ein Manko des Modells.



## 5.2 In vitro Untersuchung der Enzyminhibition durch Voriconazol und Voriconazol-N-oxid

### 5.2.1 In vitro Untersuchung der Inhibition von CYP3A4

Veröffentlichte die Hemmung der 1'-Hydroxylierung von Midazolam betreffende  $K_i$ -Werte von Voriconazol bestätigen den ausgeprägten inhibitorischen Effekt auf CYP3A<sup>196,214</sup>, welcher keine Zeitabhängigkeit zeigt<sup>196</sup>. Die berichteten  $K_i$ -Werte betragen 0,66  $\mu\text{M}$  bei Vorliegen eines kompetitiven Hemmtyps und 2,97  $\mu\text{M}$  bei nichtkompetitiver Hemmung<sup>196</sup>. In einer weiteren Publikation wurde zwischen CYP3A4 und dem polymorph exprimierten CYP3A5 differenziert – die kompetitive Hemmung konnte hier mit 0,15  $\mu\text{M}$  bei Verwendung von rekombinantem CYP3A4 bzw. 0,20  $\mu\text{M}$  mit rekombinantem CYP3A5 quantifiziert werden<sup>214</sup>. Für Voriconazol-N-oxid, dem Hauptmetaboliten von Voriconazol, wurde ein vergleichbares inhibitorisches Potential beschrieben, allerdings ohne Angabe von Werten<sup>151</sup>. Die in vitro ermittelte mittlere inhibitorische Konzentration von Voriconazol-N-oxid lag mit 18,9  $\mu\text{M}$  in der gleichen Größenordnung wie die von Voriconazol ( $\text{IC}_{50} = 11,2 \mu\text{M}$ ). Dies entspricht publizierten  $\text{IC}_{50}$ -Werten von Voriconazol für die Hemmung des Metabolismus unterschiedlicher CYP3A-Substrate, welche zwischen 2,90  $\mu\text{M}$  (Midazolam)<sup>214</sup> und 10,5  $\mu\text{M}$  (Nifedipin)<sup>240</sup> liegen. Die Ergebnisse der Inkubationen zur  $K_i$ -Ermittlung entsprachen einer nichtkompetitiven Hemmung von CYP3A für Voriconazol als Inhibitor. Mit Werten von 29,3  $\mu\text{M}$  (HLM) und 23,8  $\mu\text{M}$  (CYP3A4-Supersomes™) konnte nur eine schwache Aktivitätsminderung von CYP3A gezeigt werden, die aber in vitro mit einem publizierten Wert von 2,97  $\mu\text{M}$  einer nichtkompetitiven Hemmung<sup>196</sup> nach der Klassifikation des inhibitorischen Potentials von Substanzen einem moderaten Inhibitors entspricht und nicht den Erwartungen eines potenten Inhibitors, welche in vivo bestätigt werden konnten<sup>241,215</sup>. Ein ähnliches Phänomen trat bei Venkataramanan et al.<sup>242</sup> auf, bei dem die in vitro ermittelte Hemmung deutlich unter den in vivo Beobachtungen für die Hemmung von CYP3A mit Tacrolimus als Substrat lag.

Die verminderte 1'-Hydroxylierung von Midazolam durch Voriconazol-N-oxid konnte mit einem kompetitiven als auch nichtkompetitiven Hemmtyp in HLM und CYP3A4-Supersomes™ beschrieben werden. Bei vorliegender kompetitiver Inhibition wurde eine moderate Hemmung beobachtet. Bei nichtkompetitiver Hemmung war die CYP3A4-Inhibition schwach ausgeprägt. Die ermittelten Inhibitionskonstanten von Voriconazol und Voriconazol-N-oxid liegen für einen nichtkompetitiven Hemmtyp in der gleichen Größenordnung. Durch die in vitro-Studie konnte erstmals das inhibitorische Potential des Voriconazol-Hauptmetaboliten quantifiziert werden.

Da dieses dem von Voriconazol sehr ähnelt, könnte in vivo nach Applikation von Voriconazol ein nicht unwesentlicher Teil der CYP3A-Inhibition von Voriconazol-N-oxid getragen werden, da mindestens gleich hohe Plasmakonzentrationen wie bei Voriconazol selbst beobachtet werden<sup>155,243</sup>. Dies spielt insbesondere bei Vorliegen des Genotyps CYP2C19\*1\*1 „*extensive metabolizer*“ oder CYP2C19\*17 („*ultrarapid metabolizer*“) eine Rolle, da Voriconazol im  $\mu\text{M}$  Bereich zu einem wesentlichen Anteil über CYP2C19 N-oxidiert wird<sup>149</sup>. Da in bereits weiter oben genannten Publikationen Voriconazol sowohl in vitro<sup>196</sup> als auch in vivo<sup>154,244</sup> als starker CYP3A-Inhibitor eingestuft werden konnte, könnte auch bei Voriconazol-N-oxid das in vitro ermittelte Ausmaß der CYP3A-Inhibition in vivo deutlich übertroffen werden.

### **5.2.2 In vitro Untersuchung der Inhibition von UGT2B4 und UGT2B7**

Für verschiedene Azolantimykotika, darunter Ketoconazol<sup>142-145</sup>, Itraconazol<sup>144</sup> und Fluconazol<sup>145</sup>, ist die inhibitorische Wirkung auf die an der O-Glucuronidierung von Midazolam bzw. dessen Metaboliten beteiligten UGT-Isoenzyme 2B4 und 2B7<sup>198,199</sup> bekannt. Für Voriconazol wurde eine derartige Inhibition bisher nicht untersucht bzw. bis zum Jahre 2008 nicht nachgewiesen<sup>4</sup>, allerdings war zu diesem Zeitpunkt das inhibitorische Potential auf UGTs von Itraconazol und Fluconazol auch noch nicht bekannt. Im Zuge der Reanalyse der publizierten Studie von Saari et al.<sup>154</sup> wurde die Hypothese einer Inhibition von UGT2B4 und UGT2B7 durch Voriconazol aufgestellt (s. Abschnitt 5.1), da die ausgeprägte Inhibition von hepatischer und intestinaler Clearance nicht ausschließlich durch eine CYP3A-Hemmung erklärt werden konnte. Aus diesem Grund und auch zum Erhalt eines exakteren Bildes des inhibitorischen Potentials von Voriconazol und Voriconazol-N-oxid auf Midazolam-metabolisierende UGTs wurde eine potentielle Inhibition von Voriconazol und auch Voriconazol-N-oxid auf die Isoenzyme UGT2B4 und 2B7 untersucht. Da Midazolam zu weniger als 1% unverändert eliminiert wird und mehr als 70% einer Dosis in Form des Glucuronids von 1'-OH-Midazolam eliminiert werden<sup>19</sup>, spielen neben CYP3A auch UGT2B4 und UGT2B7 im Metabolismus von Midazolam eine zentrale Rolle. Allgemein könnte sich eine Inhibition dieser Enzyme auf pharmakologischen Effekt, Nebenwirkungen und Toxizität von über UGT2B verstoffwechselte Arzneistoffe auswirken. Im Falle des Midazolam-Metabolismus weist gebildetes 1'-OH-Midazolam pharmakologische Aktivität auf<sup>165</sup>, im Normalfall wird es jedoch unmittelbar nach der Bildung glucuronidiert und damit inaktiviert<sup>165</sup>. Durch eine Inhibition glucuronidierender Enzyme könnte es im Extremfall also zu einer Akkumulation kommen, die sich bei gleichzeitiger CYP3A-

Inhibition und damit einer Verlangsamung des Phase I-Metabolismus von Midazolam pharmakodynamisch auswirken könnte.

#### Quantifizierungsmethode zur Bestimmung von 1'-OH-Midazolam- $\beta$ -D-Glucuronid

Zur Quantifizierung des Ausmaßes einer potentiellen Inhibition von UGT2B4 und 2B7 durch Voriconazol und Voriconazol wurde zunächst eine LC-MS/MS-Methode für 1'-OH-Midazolam  $\beta$ -D-Glucuronid entwickelt und validiert. Bei der Methodenentwicklung orientierte man sich an Publikationen, in denen die Quantifizierung von 1'-OH-Midazolam  $\beta$ -D-Glucuronid bereits beschrieben wurde<sup>198,199</sup>. Letztendlich konnte eine selektive und robuste LC-MS/MS-Methode entwickelt werden. Die untersuchten Qualitätskriterien Selektivität, Kalibrierbereich und LLOQ, Linearität, Wiederfindung, Richtigkeit und Präzision entsprachen den Akzeptanzkriterien internationaler Regularien zur Validierung analytischer Methoden<sup>171</sup> für den Analyten 1'-OH-Midazolam- $\beta$ -D-Glucuronid und den internen Standard Diazepam. Mehrmaliges Einfrieren und Auftauen von Proben ist aufgrund hoher Abweichungen der QCs zu vermeiden. Durch die einfache Aufarbeitung der Proben durch Proteinfällung mit organischem Lösungsmittel konnte eine zeiteffektive und kostensparende Methode entwickelt werden. Durch Verdünnung der inkubierten Proben zum Einen durch die Proteinfällung und einem zweiten Verdünnungsschritt durch Überführung in IS-Lösung mit sich jeweils anschließender Zentrifugation wurde zudem die Matrixbelastung der Proben niedrig gehalten. Der im Zuge von Vorversuchen festgelegte Konzentrationsbereich (0,03-3,0  $\mu$ M) war für die Quantifizierung der der inkubierten Proben adäquat und die gemessenen Konzentrationen an gebildetem 1'-OH-Midazolam- $\beta$ -D-Glucuronid lagen stets innerhalb des Kalibrierbereichs.

#### Untersuchung des inhibitorischen Potentials von Voriconazol und Voriconazol-N-oxid

Publizierte  $K_m$ -Werte für die UGT2B4 vermittelte Glucuronidierung von 1'-OH-Midazolam werden mit 33  $\mu$ M<sup>199</sup> und 15,9  $\mu$ M<sup>198</sup> angegeben, die veröffentlichten  $K_m$ -Werte für die O-Glucuronidierung über UGT2B7 liegen bei 32  $\mu$ M<sup>199</sup> bzw. 35,5  $\mu$ M<sup>198</sup>. Zur Verifizierung dieser Werte wurden  $K_m$ -Bestimmungen mit entsprechenden UGT-Supersomes™ durchgeführt. Der erhaltene Wert lag für die O-Glucuronidierung von 1'-OH-Midazolam über UGT2B4 bei 62,4  $\mu$ M, bei der Inkubation mit UGT2B7 bei 61,5  $\mu$ M. Diese Werte sind untereinander wie auch die publizierten Werte für die einzelnen UGTs recht ähnlich und weichen nur um den Faktor 2 von den Literaturwerten ab. Für die Versuche zur  $IC_{50}$ -Bestimmung wurde daher ein Wert von 60  $\mu$ M festgelegt.

Um den inhibitorischen Einfluss organischer Lösungsmittel im Inkubat zu berücksichtigen, welcher zu einer falsch-positiven bzw. auch stärkeren Inhibition der UGTs bewirken kann, und um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse für die einzelnen Inhibitoren zu gewährleisten, wurde bei allen Inkubationen (Diclofenac (Positivkontrolle), Voriconazol, Voriconazol-N-oxid) auf den maximal tolerierten Methanolgehalt von 2% standardisiert. Aufgrund dieses Grenzwertes konnte Voriconazol bis zu einer finalen Konzentration von 200  $\mu\text{M}$  inkubiert werden, bei Voriconazol-N-oxid lag die höchstmögliche Konzentration im Inkubat aufgrund von begrenzter Löslichkeit bei 100  $\mu\text{M}$ . Für Voriconazol-N-oxid wurde im eingesetzten Konzentrationsbereich (0,1 – 100  $\mu\text{M}$ ) keinerlei inhibitorischer Effekt auf UGT2B4 und UGT2B7 beobachtet (Abb. 4.16). Voriconazol bewirkte mit einem  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 192  $\mu\text{M}$  eine nur schwach ausgeprägte Hemmung von UGT2B7. Auf UGT2B4 konnte jedoch ein stärkerer inhibitorischer Effekt durch Voriconazol nachgewiesen werden, der  $\text{IC}_{50}$ -Wert lag bei 32,7  $\mu\text{M}$ . Im klinischen Alltag liegen Voriconazol-Konzentrationen häufig im Bereich 0,5-5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ <sup>245</sup>, die Variabilität ist jedoch hoch: so werden auch Konzentrationen über 12,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  beobachtet<sup>246</sup>, die mit einem stark erhöhten Risiko für Nebenwirkungen einhergehen. In Patienten gemessene Voriconazol-Konzentrationen liegen somit deutlich unterhalb der in vitro ermittelten  $\text{IC}_{50}$ -Konzentration, sodass die nachgewiesene Hemmwirkung praktisch keine klinisch relevante UGT-Hemmung hervorrufen sollte. Zu beachten ist allerdings, dass in vivo nach der Applikation während der ersten Darm- und Leberpassage die Konzentration des Inhibitors am Enzym erheblich höher ist als gemessene Plasmakonzentrationen, und dies wiederum eine Verminderung der Enzymaktivität bewirken könnte, insbesondere wenn man die Hypothese einer verlängerten CYP-Inhibition durch Voriconazol auf UGTs überträgt (s. Abschnitt 5.1). Aus diesem Grund wurde eine Inkubation zur  $K_i$ -Bestimmung durchgeführt. Die Inkubation mit UGT2B4 zeigte eine nichtkompetitive Hemmung mit einem  $K_i$ -Wert von 57,6  $\mu\text{M}$  bzw. eine Inhibition vom kompetitiven Typ mit einem  $K_i$ -Wert von 4,43  $\mu\text{M}$  an. UGT2B4 wird im Gegensatz zum ebenfalls untersuchten UGT2B7 nur geringfügig im Gastrointestinaltrakt exprimiert<sup>82</sup>, Radomska-Pandya et al. konnten überhaupt keine UGT2B4-Expression im Darm nachweisen<sup>247</sup>. UGT2B4 wird dafür sehr ausgeprägt in der Leber exprimiert<sup>248</sup>. In einer Publikation wird die Expression von UGT2B4 bezogen auf die totale Menge an RNA im hepatischen Gewebe als ca. 9-fach höher angegeben als von UGT2B7, welches in Leber, Dünn- und Dickdarm sowie den Nieren zu finden ist<sup>249,250</sup>. Geht man davon aus, dass der intestinale First-pass-Metabolismus nicht nur bei CYPs, sondern auch bei UGTs einen ausgeprägten Anteil an der gesamten präsystemischen Elimination besitzt, spielt im intestinalen Metabolismus von Midazolam hauptsächlich UGT2B7 eine

Rolle, da die Affinitäten zu den individuellen Enzymen UGT2B4 und 2B7 aufgrund ähnlicher  $K_m$ -Werte vergleichbar sind und die UGT1A4-vermittelte N-Glucuronidierung von Midazolam prozentual nur einen geringen Anteil am Gesamtmetabolismus ausmacht<sup>167</sup>. Bei der in vitro Untersuchung des inhibitorischen Potentials von Voriconazol und Voriconazol-N-oxid konnte nur eine ausgesprochen schwache Hemmung von UGT2B7 gezeigt werden, woraus geschlossen werden kann, dass praktisch nur in der Leber der Phase II-Metabolismus von Midazolam bzw. dessen Metaboliten durch die Aktivitätsminderung von UGT2B4 gehemmt werden sollte, insbesondere unter der Berücksichtigung der hohen hepatischen Expression von UGT2B4<sup>248</sup>. Die im Zuge der Reanalyse aufgestellte Hypothese, dass die fast vollständige Inhibition der hepatischen und intestinalen Midazolam-Clearance zum Teil durch eine Voriconazol-vermittelte Hemmung von UGT2B-Enzymen erklärt werden kann, konnte mit den vorliegenden in vitro Ergebnissen zumindest für die Darmwand nicht bestätigt werden.

Das inhibitorische Potential von Voriconazol (und Voriconazol-N-oxid) auf UGT1A4, das die N-Glucuronidierung von Midazolam bzw. 1'-OH-Midazolam und 4-OH-Midazolam katalysiert, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht, weshalb über einen potentiellen Shift von der O- zur N-Glucuronidierung unter Voriconazol-Einfluss keine Aussage gemacht werden kann. Durch die Tatsache, dass Midazolam zunächst hauptsächlich in Phase I-Reaktionen hydroxyliert wird und nur sehr geringer prozentualer Anteil von Midazolam direkt N-glucuronidiert werden<sup>167</sup>, sollte die Auswirkung auf den Metabolismus selbst gering sein, da Glucuronidierungsreaktionen im Metabolismus von Midazolam hauptsächlich am Sauerstoff stattfinden<sup>165</sup>. In der Guideline der FDA zu Arzneistoffinteraktionen<sup>251</sup> wird eine Untersuchung von Interaktionen mit UGTs dann empfohlen, wenn die Glucuronidierung zu mehr als 25% am Gesamtmetabolismus einer Substanz beteiligt ist. Dies ist bei Midazolam zwar der Fall, allerdings wird es hauptsächlich als 1'-OH-Midazolam- $\beta$ -D-Glucuronid eliminiert. Nur 1-2% werden in vivo als Midazolam-N-Glucuronid renal ausgeschieden<sup>168</sup>, die Extrapolation von in vitro-Daten führt zu Werten einer maximalen Ausscheidung des N-Glucuronids von 6%<sup>233</sup>. Dennoch wäre eine zusätzliche Untersuchung einer UGT1A4-Inhibition durch Voriconazol und Voriconazol-N-oxid sinnvoll, um das Bild des inhibitorischen Potentials bezüglich des Midazolam-Metabolismus zu vervollständigen.

## **5.3 In vivo Studie zur Untersuchung der Inhibition von CYP3A in Darmwand und Leber durch Voriconazol mit einem neuartigen Studiendesign**

### **5.3.1 Bestimmung von Voriconazol und Voriconazol-N-oxid im Plasma**

Zur Quantifizierung von Voriconazol und Voriconazol-N-oxid in Plasma konnte eine selektive LC-MS/MS-Methode internationalen Regularien entsprechend<sup>171</sup> validiert werden. Der Kalibrierbereich lag für beide Analyten zwischen 10 und 1 000 ng/mL, zur Bestimmung der Plasmakonzentrationen von Voriconazol und Voriconazol-N-oxid in der durchgeführten klinischen Studie erwies sich der gewählte Konzentrationsbereich als angemessen. Nur wenige Probandenproben mussten verdünnt erneut vermessen werden, um innerhalb der Kalibriergrenzen zu liegen. Die ermittelten Werte nach Verdünnung zeigten zu keiner Zeit eine Abweichung um mehr als 15% zu denen ohne Verdünnung. Insgesamt handelt es sich mit einer LLOQ von 10 ng/mL um eine sensitive Methode, bei der Mehrheit der veröffentlichten Quantifizierungsmethoden von Voriconazol in Plasma liegt die LLOQ bei 50 ng/mL<sup>252–254</sup>. Chromatografische und massenspektrometrische Interferenzen der Analyten und des internen Standards Ketoconazol mit anderen Stoffen konnten während der Validierung der Methode und auch während der Vermessung von ca. 1 000 Plasmaproben nicht nachgewiesen werden. Die Stabilität von Voriconazol konnte sowohl für die Lagerung bei Raumtemperatur, bei 4 °C als auch nach dreimaligem Einfrieren und Wiederauftauen mit einer maximalen Abweichung von 2,6 % gezeigt werden, für Voriconazol-N-oxid lagen die Abweichungen nach Einfrieren und Auftauen sowie nach der Lagerung bei 4 °C für die höchste QC-Konzentration (1 000 ng/mL) mit knapp 12% leicht oberhalb der eigentlich maximal tolerierten Abweichung von 10%. Dies wurde jedoch als tolerierbar angesehen. Weiterhin zeigte Voriconazol-N-oxid eine hohe Abweichung bei der Wiederfindungsmessung. In Wasser lag die Recovery bei 50%. Eine direkte Übertragbarkeit der Methode auf andere Matrices wie beispielsweise Urin ist somit nicht gegeben.

Bei der Probenaufarbeitung bediente man sich einer einfachen und zeiteffektiven Proteinfällungsmethode, zum Schutz vor Verunreinigung des Massenspektrometers und damit zur Gewährleistung längerer Laufzeiten bei längeren Probensequenzen wurde das *divert valve* benutzt. Insgesamt handelt es sich um eine robuste Quantifizierungsmethode, bei der durch das lange Nachspülen der Säule eine Gewährleistung gegen ein Verschleppungsphänomen gege-

ben ist, die zur routinemäßigen und zeiteffektiven Quantifizierung von Voriconazol und Voriconazol-N-oxid geeignet ist.

### 5.3.2 Bestimmung von Midazolam, 1'-OH-Midazolam und 4-OH-

#### Midazolam im Urin

Die Methode zur simultanen Quantifizierung von Midazolam und dessen Metaboliten 1'-OH-Midazolam und 4-OH-Midazolam in Urin erwies sich als selektiv und sensitiv und konnte wie auch die Methode zur Quantifizierung von Voriconazol und Voriconazol-N-oxid in Plasma den Anforderungen internationaler Regularien<sup>171</sup> zur Methodvalidierung entsprechend validiert werden. Der Konzentrationsbereich, für den Linearität nachgewiesen werden konnte, lag für Midazolam und 4-OH-Midazolam zwischen 0,5 und 100 ng/mL, für 1'-OH-Midazolam wurde aufgrund vermehrter Bildung<sup>165</sup> ein Konzentrationsbereich von 1-1000 ng/mL gewählt. Hierdurch konnten sowohl freie als auch glucuronidierte Analyte (nach Deglucuronidierung) erfasst werden, sodass keine Probe oberhalb der oberen Quantifizierungsgrenze lag und nach Verdünnung nachvermessen werden musste. Durch die 20-fache Verdünnung der Urinproben mit MeOH wurde die Matrixbelastung der Proben extrem gering gehalten, und auch hier wurde zum Schutz des Massenspektrometers das *divert valve* genutzt. Die enzymatische Deglucuronidierung wurde einer bereits entwickelten Methode entsprechend durchgeführt, wobei Inkubationszeit sowie Enzymgehalt zur Überprüfung einer vollständigen Deglucuronidierung vor der Validierung und Aufarbeitung der Studienproben gegen andere Zeiten bzw. Enzymgehalte getestet wurden. Bei der Stabilitätsmessung bei 4°C wurde für 4-OH-Midazolam eine Abweichung von 10,6% für die niedrigste vermessene QC-Probe beobachtet. Aufgrund der geringfügigen Abweichung zur eigentlich erlaubten Maximalabweichung von 10% wurde dies jedoch als tolerierbar angesehen.

Insgesamt konnte eine Methode entwickelt werden, die zur Quantifizierung von Midazolam und dessen wichtigsten Metaboliten im Urin geeignet ist und einen routinemäßigen hohen Probendurchsatz erlaubt. Allerdings wäre eine niedrigere LLOQ für 4-OH-Midazolam von Vorteil gewesen, da alle vermessenen Proben, sowohl ohne als auch mit durchgeführter  $\beta$ -Glucuronidasebehandlung unterhalb der LLOQ lagen.

### 5.3.3 Populationspharmakokinetische Datenanalyse

Ziel der Interaktionsstudie von Voriconazol und Midazolam mit einem neuartigen Studiendesign war die differenzierte Beschreibung des Inhibitionseffekts von Voriconazol auf den Midazolam-Metabolismus im Hinblick auf die Hemmung von CYP3A und weiterer am Metabolismus beteiligter Enzyme. Es gelang die Entwicklung eines minimalen PBPK-Inhibitionsmodells, bei dem jeweils Einkompartimentmodelle für Midazolam, 1'-OH-Midazolam und Voriconazol mit physiologischen Kompartimenten verknüpft wurden. Eine Voriconazol-vermittelte CYP3A-Inhibition des Midazolam-Metabolismus in Darmwand und Leber konnte erfolgreich integriert werden. Der Einbau eines Inhibitionseffekts auf UGT-Enzyme lieferte jedoch keine plausiblen Ergebnisse. In vitro (s. Abschnitt 4.2.2) zeigte Voriconazol einen Hemmeffekt auf UGT2B4. Dieses Isoenzym wird nur geringfügig im Dünndarm exprimiert, dafür sehr ausgeprägt in der Leber<sup>247</sup>, weshalb es selbst bei einer Inhibition dieses Isoenzym aufgrund der „Ausweichmöglichkeit“ UGT2B7 nicht zu einer signifikanten Aktivitätsminderung der O-Glucuronidierung im Darm kommen sollte. Zu UGT1A4, das die N-Glucuronidierung von Midazolam katalysiert, werden gegensätzliche Aussagen bezüglich dessen intestinaler Expression gemacht: Während Ohno et al.<sup>247</sup> im Menschen nur die hepatische Expression nachweisen konnten, wurde in anderen Studien eine duodenale Expression gezeigt<sup>83,255</sup>. Manko genannter Arbeiten ist allerdings die begrenzte Anzahl an untersuchten Geweben. Die Beteiligung von UGT1A4 am Phase II-Metabolismus von Midazolam ist niedrig, so werden in vivo nach oraler Gabe durchschnittlich 2% als Midazolam-Glucuronid eliminiert, nach i.v. Applikation ist es ca. 1% mehr<sup>168</sup>. Die geschätzte basale intestinale Clearance von Midazolam-N-glucuronid im entwickelten Interaktionsmodell ist mit einem Punktschätzer von 0,0679 L/h entsprechend niedrig. Erstaunlich ist jedoch die noch geringere Basal-Clearance in der Leber (0,0043 L/h), da allgemein die UGT-Aktivität in der Leber größer zu sein scheint als im Gastrointestinaltrakt<sup>83</sup>. Dies könnte ein Hinweis auf eine Missspezifikation des Modells sein, jedoch ist die Ursache hierfür unklar. In vitro konnte eine N-Glucuronidierung von 1'-OH-Midazolam nachgewiesen werden<sup>199</sup>, in vivo wurde 1'-OH-Midazolam-N-Glucuronid bisher jedoch nicht nachgewiesen<sup>168</sup>. Es wird daher angenommen, dass eine Inhibition von UGT1A4 durch Voriconazol sich im Gesamtmodell vermutlich nicht signifikant bemerkbar machen würde. Da der in vitro ermittelte IC<sub>50</sub>-Wert von Voriconazol für die O-Glucuronidierung von 1'-OH-Midazolam durch UGT2B7 bei ca. 200 µM lag (s. Abschnitt 4.2.2.3) und solche hohen Konzentrationen systemisch nicht erreicht werden, ist eine UGT2B7-Hemmung in der Darmwand unwahrscheinlich. Das basale Midazolam-Modell zeigt mit Werten von 1290 L/h und 19,98 L/h für



die geschätzten CYP3A-vermittelten intrinsischen Clearances in Leber und Darmwand eine gute Übereinstimmung mit den entsprechenden ermittelten Werten aus der Reanalyse (1640 L/h und 26,7 L/h) und in vitro-Studien. Mit dem entwickelten Modell wird die Hypothese aufgestellt, dass aufgrund des gegen unendlich laufenden Wertes für die intestinale 1'-OH-Midazolam-Glucuronidierung in der Darmwand dort gebildetes 1'-OH-Midazolam unmittelbar weitermetabolisiert wird. Dementsprechend würde alles im Plasma messbare 1'-OH-Midazolam ausschließlich in der Leber gebildet. Da aufgrund der fehlenden Messwerte für die Glucuronide von Midazolam und Metaboliten im Plasma keine Volumina für zentrale Glucuronidkompartimente geschätzt werden konnten, beschrieb die Geschwindigkeitskonstante  $K_{10HG}$  den Übergang von 1'-OH-Midazolam- $\beta$ -D-Glucuronid in das entsprechende Urinkompartiment. Die hepatische und intestinale Clearance von gebildetem Midazolam-N-Glucuronid ist im Vergleich zur Clearance von 1'-OH-Midazolam- $\beta$ -D-Glucuronid recht niedrig, wobei die intestinale Clearance bei beiden Analyten wie bereits erwähnt deutlich größer ist als die der Leber.

Für das Voriconazol-Basismodell wurde eine nichtlineare Eliminationskinetik<sup>132,211</sup> für Darmwand und Leber verwendet. Die maximale Umsatzgeschwindigkeit  $V_{max}$  von CYP3A in der Leber war mit einem Wert von 29,37  $\mu\text{mol/L/h}$  erwartungsgemäß deutlich höher als in der Darmwand (8,50  $\mu\text{mol/L/h}$ ). Ausgehend von der Annahme, dass die Aktivität der Enzyme an beiden Expressionsorten gleich sein sollte<sup>35</sup>, wurde ein gemeinsamer  $K_m$ -Wert für Leber und Darmwand geschätzt.

Der zeitliche Verlauf der Inhibition der CYP3A-Aktivität konnte unter Verwendung aller gemessenen Voriconazol-Konzentrationen (i.v. und intestinale Infusion) abgebildet werden. Vorausgesetzt wurde hier ein kompetitiver Hemmmechanismus<sup>196,214</sup>. Das Ausmaß der Inhibition orientierte sich hierbei an den sich über die Zeit verändernden Voriconazol-Konzentrationen, der ermittelte  $K_i$ -Wert zur Quantifizierung der Hemmung der 1'-Hydroxylierung von Midazolam lag bei 0,4266  $\mu\text{M}$  (= 149,0 ng/mL) und bestätigte somit einen ausgeprägten inhibitorischen Effekt auf die CYP3A-Aktivität, der sowohl in vitro (s. Abschnitt 4.2.1) als auch bei der Reanalyse (s. Abschnitt 4.1.1.4) ermittelt werden konnte. Nicht alle Probanden konnten alle Studienphasen durchlaufen, eine zusätzliche Studienperiode D (Midazolam i.v./Voriconazol i.v.) wurde nur aufgrund von Infusionsproblemen bei der intestinalen Dauerinfusion durchgeführt. Diese Studienperiode wurde insgesamt nur von drei Probanden durchlaufen. An Studienperiode A (Midazolam i.v./Voriconazol int.) nahmen ebenso wie an Periode B (Midazolam int./Voriconazol i.v.) jeweils fünf Probanden teil, Periode C (Midazolam int./Voriconazol int.)

wurde mit allen geplanten Probanden abgeschlossen. Dementsprechend war die Datendichte zusätzlich zur niedrigen Probandenzahl noch einmal mehr verringert. Interindividuelle Variabilität wurde aufgrund variierender Enzymmengen in der Leber bei der intrinsischen hepatischen Clearance von Midazolam berücksichtigt, weiterhin wurden interindividuelle Unterschiede in der Clearance von Voriconazol beachtet.

Voriconazol unterliegt einem komplexen Metabolismus via CYPs<sup>134,148</sup>, UGTs<sup>134</sup> und FMOs<sup>149</sup> unter Bildung verschiedener Metabolite. An der Bildung von Voriconazol-N-oxid sind in vitro-Untersuchungen zufolge zu ca. 75% CYPs beteiligt und zu ca. 25% FMOs<sup>149</sup>. Vor allem die Beteiligung unterschiedlicher Genotypen des polymorph exprimierten CYP2C19 am Voriconazol-Metabolismus besitzt einen großen Einfluss auf die gemessenen Plasmakonzentrationen<sup>148</sup>. Nach Roffey et al. werden ca. 21% einer applizierten Dosis als Voriconazol-N-oxid eliminiert<sup>134</sup>. Allerdings sind weitere Metabolisierungsschritte möglich, z.B. via UGT oder durch Ringspaltung. Dies lässt die Vereinfachung eines festgelegten Anteils an der Voriconazol-N-oxid-Bildung nicht zu, was jedoch für die Integration in das Modell notwendig gewesen wäre. Auch ein inhibitorischer Effekt von Voriconazol-N-oxid auf den Voriconazol-Metabolismus wurde in das Modell integriert. Durch das in vitro IC<sub>50</sub>-Screening auf verschiedene CYP-Enzyme konnte das inhibitorische Potential von Voriconazol-N-oxid nachgewiesen werden. Unter anderem wurden neben CYP3A auch CYP2C9 und CYP2C19 in ihrer Aktivität gehemmt (s. Appendix 1a und 1b). Dies hätte die Integration eines inhibitorischen Effektes des Metaboliten auf die Muttersubstanz Voriconazol als auch auf Midazolam plausibel gemacht, allerdings wurde keine Verbesserung der Datenanpassung beobachtet. Aus diesem Grund und auch weil der genaue Anteil der Bildung von Voriconazol-N-oxid unbekannt ist, wurde bei der Zusammenführung von Midazolam und Voriconazol in einem Modell Voriconazol-N-oxid nicht berücksichtigt.

Durch den VPC wurde die schlechte Anpassung der Daten von intestinal appliziertem Midazolam (Studienperioden 2 und 3) im Gesamtmodell deutlich. Gleiches galt für 1'-OH-Midazolam. Auch wenn innerhalb dieser Studienphasen häufiger Probleme bei der kontinuierlichen Zufuhr auftraten, kann dies nicht der einzige Grund dafür sein, dass die Beobachtungen nur unzureichend vorhergesagt werden konnten. Die fehlerhafte Schätzung kann möglicherweise auch darin begründet liegen, dass es nicht möglich war, Inhibitionseffekte auf andere Enzyme als CYP-Enzyme zu legen, die in vivo möglicherweise auftreten. Weiterhin lagen die integrierten Urinkonzentrationen sehr häufig unterhalb der unteren Quantifizierungsgrenze, was möglicherweise einen systematischen Fehler im Modell erzeugte.

Die geschätzte Inhibition des Midazolam-Metabolismus durch Voriconazol stimmte gut mit der tatsächlichen Aktivitätsminderung von CYP3A überein, was ein Vergleich des AUCR des Interaktionsmodells und der nichtkompartimentellen Datenanalyse zeigt (Tab. 4.26).

Ein großes Defizit des entwickelten Modells ist dessen fehlende Extrapolierbarkeit. Allgemein wird die Bioverfügbarkeit von Voriconazol als sehr hoch angegeben<sup>132</sup>. Dies kann in einer Enzymsättigung speziell im Darm begründet sein, welche bei der Gabe therapeutischer Dosen (200 mg Erhaltungsdosis oral) aufträte. Der geschätzte  $K_m$ -Wert ist mit  $0,1165 \mu\text{M}$  ( $= 33 \text{ ng/mL}$ ) sehr niedrig, sodass die Enzymsättigung nach dem Modell sehr schnell erreicht wird. In der durchgeführten Studie wurden über eine Dauer von 16 h insgesamt 153 mg Voriconazol kontinuierlich infundiert, was einer Infusionsrate von  $6,8 \text{ mg/h}$  entspricht. Da möglicherweise eine wie bei der Gabe therapeutischer Dosen entstehende Sättigung von Voriconazol-metabolisierenden Enzymen nicht erreicht wird, können nichtlineare Prozesse in Darmwand und Leber hierbei nicht ausgeschlossen werden. Dies wiederum hätte dann eine verminderte Bioverfügbarkeit zur Folge. Tatsächlich ergab die nichtkompartimentelle Analyse eine Bioverfügbarkeit von rund 30% für Voriconazol. Daher empfahl sich die Berücksichtigung physiologischer Prozesse unter Entwicklung eines semiphysiologischen Modells, um diese nichtlinearen Prozesse an beiden Hauptexpressionsorten Arzneistoff-metabolisierender Enzyme differenzierter zu betrachten. Zur Überprüfung der Extrapolierbarkeit des Voriconazol-Modells wurden zusätzlich zu den in der Studie generierten Daten Beobachtungen aus zwei weiteren Studien (nach Saari et al.<sup>154</sup> und Katzenmaier et al.<sup>155</sup>) herangezogen, um einen größeren Konzentrationsbereich von Voriconazol und Voriconazol-N-oxid abzudecken. Voriconazol wurde in den genannten Studien oral in therapeutischen Dosen appliziert, was aufgrund von Mehrfachgaben zum Auftreten höherer Plasmakonzentrationen führte. Um die unterschiedlichen Dosierungen separat zu betrachten bzw. eine mögliche Enzymsättigung in der Darmwand bei der Gabe höherer Dosen zu berücksichtigen, wurden zwei Resorptionskonstanten geschätzt. Die Resorption lief laut Modell bei oraler Gabe von Voriconazol in den Studien von Saari und Katzenmaier schneller ab als bei der im Rahmen der Dissertation durchgeführten Studie, bei der das aus der Sonde austretende Voriconazol unmittelbar resorbiert werden müsste. Dieses Phänomen spricht gegen die entwickelte Hypothese bzw. für das Vorliegen eines systematischen Fehlers innerhalb des Modells. Da Voriconazol im klinischen Alltag nicht in so niedrigen Dosen appliziert wird wie in der durchgeführten Studie, liefert der möglicherweise hierbei ungehemmte Voriconazol-Metabolismus keine neuen klinischen Erkenntnisse. Möglich ist wie bereits erwähnt die Beteiligung anderer metabolischer Abbauege, die aufgrund der vorhandenen Da-

ten und der Komplexität im Voriconazol-Metabolismus jedoch nicht untersucht werden konnten. Auch nichtlineare Verteilungsphänomene können trotz fehlender Hinweise in der Literatur nicht komplett ausgeschlossen werden.

Der Punktschätzer für  $K_a$  bei einer niedrigen Voriconazol-Dosis betrug  $0,8228 \text{ h}^{-1}$  im Inhibitionsmodell der Studie 1 und ähnelt damit Werten für  $K_a$  anderer populationspharmakokinetischer Voriconazol-Modelle nach oraler Applikation<sup>201,212,218</sup>. Dies zeigt, dass der ermittelte Wert für  $K_a$  die intestinale Voriconazol-Resorption nach dessen Austritt aus der Sonde im Duodenum zwar zu niedrig geschätzt wird, die Daten jedoch gut beschrieben werden. Das Problem ist also in der Schätzung eines so niedrigen  $K_a$ -Wertes bei der Studie mit intestinaler Voriconazol-Gabe begründet.

Möglicherweise ist die Schätzung zweier  $K_a$ -Werte mit solch unterschiedlichen Konzentrationsbereichen nicht sinnvoll, da so geringe Voriconazol-Dosen wie in der zuletzt durchgeführten Studie im klinischen Alltag keine Rolle spielen, und das Modell ursprünglich allein dazu gedacht war, eine genauere Differenzierung zwischen dem intestinalen und hepatischen Arzneistoffmetabolismus vorzunehmen.

Insgesamt konnte ein Modell entwickelt werden, das neben Midazolam-, 1'-OH-Midazolam- und Voriconazol-Plasmakonzentrationen auch Urinkonzentrationen der Glucuronide von Midazolam und 1'-OH-Midazolam sowie freies 1'-OH-Midazolam im Urin berücksichtigte. Die Inhibition anderer metabolischer Abbauege von Midazolam als von CYP3A durch Voriconazol konnte nicht umgesetzt werden, auch wenn in vitro-Versuche das inhibitorische Potential von Voriconazol zumindest auf UGT2B4 nachweisen konnten und somit eine Inhibition der Midazolam- bzw. 1'-OH-Midazolam-Glucuronidierung in der Leber hätte möglich sein sollen. Möglicherweise spielt im sehr niedrigen Dosisbereich bei der Resorption der Voriconazol-Metabolismus eine Rolle, der bei der Gabe therapeutischer Dosen aufgrund von Enzymsättigung v.a. im Darm vernachlässigbar ist. Hierdurch kann es zu einer Verschiebung des Verhältnisses von Voriconazol/Voriconazol-N-oxid-Plasmakonzentrationen kommen. So ist in der durchgeführten Studie  $C_{\text{max}}$  von Voriconazol-N-oxid deutlich höher als von Voriconazol, was in anderen Studien, bei der höhere Voriconazol-Dosen appliziert wurden, nicht bestätigt wird<sup>155</sup>. Insgesamt ist der Metabolismus von Voriconazol so komplex, dass die vorliegenden Daten nicht ausreichen, um ihn adäquat beschreiben zu können und ein universell anwendbares Voriconazol-Modell, unabhängig von der Höhe applizierter Dosen, aufzubauen. Zusätzlich müsste eine Massenbilanz zu Voriconazol vorliegen, um exakte Vorhersagen machen zu können.

## 6 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Reevaluierung von Daten einer klinischen Interaktionsstudie mit Voriconazol als CYP3A-Inhibitor und Midazolam als etabliertem CYP3A-Substrat führte unter Verwendung der Software NONMEM® zur Entwicklung eines semiphysiologischen populationspharmakokinetischen Modells, das die komplexe Interaktion an den beiden wichtigsten Expressionsorten Fremdstoff-metabolisierender Enzyme, Darmwand und Leber, mechanistisch gut abbilden konnte. Das Modell bestätigte das Ergebnis der zunächst durchgeführten nichtkompartimentellen Analyse, nämlich das starke inhibitorische Potential von Voriconazol gegenüber CYP3A. Durch Extrapolierbarkeit des Modells (Variationen im Studiendesign wie beispielsweise eine i.v. statt orale Gabe von Voriconazol wurden simuliert und führten zu plausiblen Ergebnissen) kann das Modell ergänzend zur klassischen nichtkompartimentellen Auswertung klinischer Studien und meist auf in vitro Daten basierenden Simulationsmodellen zur Gewinnung von Informationen aus klinischen Interaktionsstudien eingesetzt werden. Die nichtkompartimentelle Analyse beschreibt in der Regel nur einen mittleren inhibitorischen Effekt (bedingt durch das verwendete Studiendesign), und die in vitro-in vivo Extrapolation liefert teilweise irreführende Ergebnisse. Im Gegensatz dazu liefert das entwickelte Modell ein vollständiges Bild der CYP3A-vermittelten Arzneistoffinteraktion zwischen Voriconazol und Midazolam unter Berücksichtigung der Substrat- und Inhibitorkonzentrationen am CYP3A-Enzym in Darmwand und Leber. Das Modell suggeriert, dass Voriconazol ein Inhibitor nicht nur von CYP-Enzymen darstellt (und die Inhibition durch eine Quasiakkumulation am Enzym lange andauert), sondern auch von am Midazolam-Metabolismus beteiligten UGT-Enzymen der Subfamilie 2B. Diese Hypothese und Limitationen des Studiendesigns wurden im Rahmen von in vitro Interaktionsstudien und einer weiteren klinischen Studie untersucht bzw. umgangen.

Eine Limitation war das inhibitorische Potential des nicht berücksichtigten Hauptmetaboliten von Voriconazol, Voriconazol-N-oxid, das ähnlich ausgeprägt sein sollte wie das seiner Muttersubstanz, wozu allerdings keine genauen Daten publiziert wurden (Stand 06/2015). Infolgedessen und auch weil die Datenlage zur Inhibition der 1'-Hydroxylierung durch Voriconazol relativ spärlich war, wurde in vitro die Hemmung der CYP3A4-Aktivität durch Voriconazol und Voriconazol-N-oxid quantifiziert. Im Ergebnis zeigte Voriconazol-N-oxid eine vergleichbare inhibitorische Wirkung auf CYP3A4, allerdings war die Hemmung durch beide eingesetzten Inhibitoren im Vergleich zu publizierten Daten weniger stark ausgeprägt und zeigte eine starke Variabilität in den Daten, wobei hier berücksichtigt werden muss, dass die Ergebnisse oftmals stark von den Inkubationsbedingungen abhängig sind. Die Untersuchung des Interaktionspo-

tentials von Voriconazol und Voriconazol-N-oxid bezüglich UGT2B4 und UGT2B7 stützte die in der Reevaluation aufgestellte Hypothese einer UGT2B-Hemmung durch Voriconazol, in der Tat konnte ein schwaches (bei nichtkompetitiver Hemmung) bis moderates (bei kompetitiver Hemmung) inhibitorisches Potential von Voriconazol auf UGT2B4 nachgewiesen werden. Da UGT2B4 hauptsächlich in der Leber exprimiert wird, und die ermittelte Inhibitionskonstante keine ausgeprägte Hemmung anzeigt, sollte das Interaktionspotential mit UGT2B4-Substraten im klinischen Alltag dennoch gering sein, vor allem, da die meisten Arzneistoffe nicht nur über ein einziges UGT-Enzym umgesetzt werden. Dennoch ist die Kenntnis der Hemmwirkung von Voriconazol und dessen N-oxid auf UGT-Enzyme, die mengenmäßig die wichtigsten Phase II-Enzyme darstellen, von Bedeutung, vor allem bei Substanzen, die zum großen Teil glucuronidiert ausgeschieden werden. Eine Untersuchung des inhibitorischen Potentials von Voriconazol und Voriconazol-N-oxid auf UGT1A4, dem UGT, das die N-Glucuronidierung von Midazolam katalysiert, hätte die Untersuchung des inhibitorischen Potentials auf am Midazolam-Metabolismus beteiligten Enzymen vollständig gemacht, wurde jedoch im Rahmen dieser Dissertationsarbeit nicht untersucht. Für eine exaktere Darstellung der komplexen Vorgänge der Wechselwirkung zwischen Voriconazol und Midazolam empfiehlt sich die Untersuchung auch dieses Enzyms.

Limitationen im Design der Studie, deren Ergebnisse mittels der Software NONMEM<sup>®</sup> reevaluiert wurden, waren zum Einen die ausschließlich orale Gabe des Inhibitors Voriconazol, die nur eine unzureichende Differenzierung der Inhibition in Leber und Darmwand ermöglichte. Weiterhin wurden Midazolam und Voriconazol nicht gleichzeitig appliziert, sondern zeitlich versetzt. Eine kontinuierliche Gabe direkt ins Darmlumen hätte zusätzlich den zeitlichen Verlauf der Inhibition in Darmwand und Leber exakter abbilden können, da Konzentrationschwankungen resultierend aus unterschiedlichen Magenentleerungszeiten so umgangen worden wären. Aus diesem Grund wurde eine weitere Studie mit einem Studiendesign durchgeführt, bei der Voriconazol und Midazolam in verschiedenen Studienphasen gleichzeitig und kontinuierlich entweder i.v. oder intestinal über eine Duodenalsonde infundiert wurden. Aus dem Plasma wurden Midazolam, 1'-OH-Midazolam, 4-OH-Midazolam, Voriconazol und Voriconazol-N-oxid quantifiziert, Midazolam und dessen Metabolite wurden ebenfalls im Urin gemessen. Hieraus sollte unter der Entwicklung eines minimalen PBPK-Modells eine detailliertere bzw. umfassendere Beschreibung der Inhibition von Midazolam-metabolisierenden Enzymen durch Voriconazol und auch Voriconazol-N-oxid möglich gemacht werden. Die Implementierung der Daten aller quantifizierten Substanzen gestaltete sich jedoch komplexer als ange-

nommen; so konnte Voriconazol-N-oxid und dessen inhibierender Effekt auf CYP3A nicht in das Modell integriert werden, und auch die Berücksichtigung der UGT2B4-Hemmung durch Voriconazol lieferte keine plausiblen Ergebnisse. Die Urinkonzentrationen von Voriconazol und Voriconazol-N-oxid wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht quantifiziert, da ursprünglich die Auswirkung von Voriconazol auf den Midazolam-Metabolismus im Fokus stand. Es ist nicht ausgeschlossen, dass Urindaten von Voriconazol und Voriconazol-N-oxid die Implementierung von Voriconazol-N-oxid in das gegebene Modell ermöglicht hätten. In jedem Fall würden Urindaten dazu beitragen, den Voriconazolmetabolismus exakter abzubilden, weshalb sich eine Nachmessung der Urinwerte empfehlen würde. In der Zukunft soll ein Modell entwickelt werden, das alle Daten, die aus dieser Studie gewonnen werden können, enthält, sowie die Ergebnisse der in vitro-Studien berücksichtigt, um ein exakteres Bild der Interaktion von Voriconazol mit Midazolam-metabolisierenden Phase I- und II-Enzymen zu erhalten.

## 7 Zusammenfassung

Zur Präzisierung des inhibitorischen Potentials des etablierten Antimykotikums Voriconazol auf ausgewählte, den Midazolam-Metabolismus betreffende Enzyme wurden Inhibitionsstudien *in vitro* und *in vivo* durchgeführt, um Interaktionen unter Beteiligung von Voriconazol im klinischen Alltag vorhersagen und verhindern zu können.

Durch die Reevaluierung einer Studie mit 10 Probanden, bei der der Effekt von oral appliziertem Voriconazol auf die Pharmakokinetik und –dynamik von *i.v.* und oral gegebenem Midazolam untersucht wurde, konnte mit Hilfe der Software NONMEM® ein semiphysiologisches Modell entwickelt werden, das gleichzeitig die Pharmakokinetik von Midazolam, dem Hauptmetabolit 1'-OH-Midazolam und Voriconazol beschrieb. Der zeitliche Verlauf der kompetitiven Inhibition der CYP3A-Aktivität an dessen wichtigsten Expressionsorten für den humanen Arzneistoffmetabolismus, Darmwand und Leber, konnte durch die Implementierung empirischer Inhibitionskompartimente dargestellt werden und resultierte in einer lang andauernden ausgeprägten Hemmung der CYP3A-Aktivität an beiden Expressionsorten. Die aufgestellte Hypothese einer möglichen Inhibition von am Phase II-Metabolismus von Midazolam beteiligten UGT-Enzymen 2B4 und 2B7 durch Voriconazol wurde *in vitro* nach Entwicklung und Validierung einer sensitiven LC-MS/MS-Methode untersucht. Eine Voriconazol-vermittelte moderate (bei kompetitiver Hemmung) bzw. schwache Hemmung (bei nichtkompetitiver Hemmung) von UGT2B4 konnte nachgewiesen werden, der zusätzlich untersuchte hauptsächlich zirkulierende Metabolit Voriconazol-N-oxid zeigte keine Hemmwirkung auf die untersuchten UGT-Enzyme. Durch Inhibitionsstudien mit CYP3A4 konnte erstmals *in vitro* das inhibitorische Potential von Voriconazol-N-oxid gegenüber dem wichtigsten Phase I-Enzym quantifiziert werden: Voriconazol-N-oxid zeigte eine vergleichbare Hemmwirkung auf CYP3A4 wie seine Muttersubstanz, was sich potentiell auf den klinischen Alltag auswirken könnte.

Für eine differenziertere Betrachtung der dynamischen Veränderung der Aktivität von am Midazolam-Metabolismus beteiligten Enzymen durch Voriconazol wurde eine Studie mit sechs Probanden mit einem neuartigen Studiendesign durchgeführt: in unterschiedlichen Studienperioden wurden Midazolam und Voriconazol gleichzeitig und kontinuierlich entweder *i.v.* oder intestinal über Duodenalsonden appliziert. Mit Hilfe von im Rahmen der Dissertationsarbeit entwickelten und validierten LC-MS/MS-Quantifizierungsmethoden für Voriconazol und Voriconazol-N-oxid im Plasma und Midazolam, 1'-OH-Midazolam, 4-OH-Midazolam im Urin (die Plasmakonzentrationen wurden extern vermessen) wurden Daten für die Analyse mit NONMEM® generiert. Hierbei sollte ein minimales physiologisch-basiertes



pharmakokinetisches (PBPK-) Modell entwickelt werden, das die Ergebnisse der vorherigen Untersuchungen mit einschloss. Schlussendlich gelang die Entwicklung eines Modells für Midazolam, 1'-OH-Midazolam und Voriconazol unter zusätzlicher Berücksichtigung von Urinkonzentrationen von Phase II-Metaboliten von Midazolam und 1'-OH-Midazolam sowie freiem 1'-OH-Midazolam. Die Implementierung des inhibitorischen Effekts von Voriconazol-N-oxid in das Modell war erfolglos ebenso wie eine UGT-Inhibition durch Voriconazol. Die ausgeprägte kompetitive Hemmung von intestinalem und hepatischem CYP3A bei der Reanalyse der publizierten Daten konnte durch die Auswertung der Daten dieser Studie erneut bestätigt werden.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Pirmohamed M, James S, Meakin S, Green C, Scott AK, Walley TJ et al. Adverse drug reactions as cause of admission to hospital: prospective analysis of 18 820 patients. *BMJ*. 2004;329(7456):15-19.
2. Davies EC, Green CF, Taylor S, Williamson PR, Mottram DR, Pirmohamed M. Adverse drug reactions in hospital in-patients: a prospective analysis of 3695 patient-episodes. *PLoS One*. 2009;4(2):e4439.
3. Lin JH, Lu AY. Role of pharmacokinetics and metabolism in drug discovery and development. *Pharmacol Rev*. 1997;49(4):403-449.
4. Nivoix Y, Leveque D, Herbrecht R, Koffel JC, Beretz L, Ubeaud-Sequier G. The enzymatic basis of drug-drug interactions with systemic triazole antifungals. *Clin Pharmacokinet*. 2008;47(12):779-792.
5. Hsu A, Granneman GR, Bertz RJ. Ritonavir. Clinical pharmacokinetics and interactions with other anti-HIV agents. *Clin Pharmacokinet*. 1998;35(4):275-291.
6. Watkins JL, Atkinson BJ, Pagliaro LC. Rhabdomyolysis in a Prostate Cancer Patient Taking Ketoconazole and Simvastatin: Case Report and Review of the Literature (February). *Ann Pharmacother*. 2011.
7. Hunt CM, Westerkam WR, Stave GM. Effect of age and gender on the activity of human hepatic CYP3A. *Biochem Pharmacol*. 1992;44(2):275-283.
8. Thummel KE, Lin YS. Sources of interindividual variability. *Methods Mol Biol*. 2014;1113:363-415.
9. Magro L, Moretti U, Leone R. Epidemiology and characteristics of adverse drug reactions caused by drug-drug interactions. *Expert Opin Drug Saf*. 2012;11(1):83-94.
10. Dresser GK, Spence JD, Bailey DG. Pharmacokinetic-pharmacodynamic consequences and clinical relevance of cytochrome P450 3A4 inhibition. *Clin Pharmacokinet*. 2000;38(1):41-57.
11. Michalets EL. Update: clinically significant cytochrome P-450 drug interactions. *Pharmacotherapy*. 1998;18(1):84-112.
12. Williams JA, Hyland R, Jones BC, Smith DA, Hurst S, Goosen TC et al. Drug-drug interactions for UDP-glucuronosyltransferase substrates: a pharmacokinetic explanation for typically observed low exposure (AUC<sub>i</sub>/AUC) ratios. *Drug Metab Dispos*. 2004;32(11):1201-1208.13.
13. Wienkers LC, Heath TG. Predicting in vivo drug interactions from in vitro drug discovery data. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4(10):825-833.

14. Liu W, Kulkarni K, Hu M. Gender-dependent differences in uridine 5'-diphosphoglucuronosyltransferase have implications in metabolism and clearance of xenobiotics. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2013;9(12):1555-1569.
15. Jancova P, Anzenbacher P, Anzenbacherova E. Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2010;154(2):103-116.
16. Hall SD, Thummel KE, Watkins PB, Lown KS, Benet LZ, Paine MF et al. Molecular and physical mechanisms of first-pass extraction. *Drug Metab Dispos*. 1999;27(2):161-166.
17. Mizuma T. Kinetic impact of presystemic intestinal metabolism on drug absorption: experiment and data analysis for the prediction of in vivo absorption from in vitro data. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2002;17(6):496-506.
18. Paine MF, Shen DD, Kunze KL, Perkins JD, Marsh CL, McVicar JP et al. First-pass metabolism of midazolam by the human intestine. *Clin Pharmacol Ther*. 1996;60(1):14-24.
19. Thummel KE, O'Shea D, Paine MF, Shen DD, Kunze KL, Perkins JD et al. Oral first-pass elimination of midazolam involves both gastrointestinal and hepatic CYP3A-mediated metabolism. *Clin Pharmacol Ther*. 1996;59(5):491-502.
20. Wilkinson GR. Drug metabolism and variability among patients in drug response. *N Engl J Med*. 2005;352(21):2211-2221.
21. Szczesna-Skorupa E, Kemper B. Influence of protein-protein interactions on the cellular localization of cytochrome P450. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2008;4(2):123-136.
22. Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K. Allgemeine Und Spezielle Pharmakologie Und Toxikologie. 9. Auflage. München: Elsevier GmbH; 2005.
23. Hasler JA. Pharmacogenetics of cytochromes P450. *Mol Asp Med*. 1999;20(1-2):12-24,25-137.
24. Zanger UM, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther*. 2013;138(1):103-141.
25. Lin JH, Lu AY. Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. *Clin Pharmacokinet*. 1998;35(5):361-390.
26. Rokitta D, Fuhr U. Comparison of enzyme kinetic parameters obtained in vitro for reactions mediated by human CYP2C enzymes including major CYP2C9 variants. *Curr Drug Metab*. 2010;11(2):153-161.
27. Doherty MM, Charman WN. The mucosa of the small intestine: how clinically relevant as an organ of drug metabolism? *Clin Pharmacokinet*. 2002;41(4):235-253.
28. Ingelman-Sundberg M. Human drug metabolising cytochrome P450 enzymes: properties and polymorphisms. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2004;369(1):89-104.

29. Shen DD, Kunze KL, Thummel KE. Enzyme-catalyzed processes of first-pass hepatic and intestinal drug extraction. *Adv Drug Deliv Rev.* 1997;27(2-3):99-127.
30. Ding X, Kaminsky LS. Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2003;43:149-173.
31. Lin JH, Lu AY. Interindividual variability in inhibition and induction of cytochrome P450 enzymes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001;41:535-567.
32. Watkins PB. Drug metabolism by cytochromes P450 in the liver and small bowel. *Gastroenterol Clin North Am.* 1992;21(3):511-526.
33. Paine MF, Hart HL, Ludington SS, Haining RL, Rettie AE, Zeldin DC. The human intestinal cytochrome P450 "pie." *Drug Metab Dispos.* 2006;34(5):880-886.
34. Thummel KE, Wilkinson GR. In vitro and in vivo drug interactions involving human CYP3A. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1998;38:389-430.
35. Galetin A, Gertz M, Houston JB. Potential role of intestinal first-pass metabolism in the prediction of drug-drug interactions. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2008;4(7):909-922.
36. Paine MF, Khalighi M, Fisher JM, Shen DD, Kunze KL, Marsh CL et al. Characterization of interintestinal and intrainestinal variations in human CYP3A-dependent metabolism. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997;283(3):1552-1562.
37. Gorski JC, Jones DR, Haehner-Daniels BD, Hamman MA, O'Mara Jr. EM, Hall SD. The contribution of intestinal and hepatic CYP3A to the interaction between midazolam and clarithromycin. *Clin Pharmacol Ther.* 1998;64(2):133-143.
38. Gertz M, Harrison A, Houston JB, Galetin A. Prediction of human intestinal first-pass metabolism of 25 CYP3A substrates from in vitro clearance and permeability data. *Drug Metab Dispos.* 2010;38(7):1147-1158.
39. Combalbert J, Fabre I, Fabre G, Dalet I, Derancourt J, Cano JP et al. Metabolism of cyclosporin A. IV. Purification and identification of the rifampicin-inducible human liver cytochrome P-450 (cyclosporin A oxidase) as a product of P450III A gene subfamily. *Drug Metab Dispos.* 1989;17(2):197-207.
40. Hosea NA, Miller GP, Guengerich FP. Elucidation of distinct ligand binding sites for cytochrome P450 3A4. *Biochemistry.* 2000;39(20):5929-5939.
41. Fernando H, Rumfeldt JA, Davydova NY, Halpert JR, Davydov DR. Multiple substrate-binding sites are retained in cytochrome P450 3A4 mutants with decreased cooperativity. *Xenobiotica.* 2011;41(4):281-289.
42. Kapelyukh Y, Paine MJ, Marechal JD, Sutcliffe MJ, Wolf CR, Roberts GC. Multiple substrate binding by cytochrome P450 3A4: estimation of the number of bound substrate molecules. *Drug Metab Dispos.* 2008;36(10):2136-2144.
43. Guengerich FP. Cytochrome P-450 3A4: regulation and role in drug metabolism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1999;39:1-17.

44. Hutzler JM, Tracy TS. Atypical kinetic profiles in drug metabolism reactions. *Drug Metab Dispos.* 2002;30(4):355-362.
45. Korzekwa KR, Krishnamachary N, Shou M, Ogai A, Parise RA, Rettie AE et al. Evaluation of atypical cytochrome P450 kinetics with two-substrate models: evidence that multiple substrates can simultaneously bind to cytochrome P450 active sites. *Biochemistry.* 1998;37(12):4137-4147.
46. Von Richter O, Burk O, Fromm MF, Thon KP, Eichelbaum M, Kivisto KT. Cytochrome P450 3A4 and P-glycoprotein expression in human small intestinal enterocytes and hepatocytes: a comparative analysis in paired tissue specimens. *Clin Pharmacol Ther.* 2004;75(3):172-183.
47. Lown KS, Thummel KE, Benedict PE, Shen DD, Turgeon DK, Berent S et al. The erythromycin breath test predicts the clearance of midazolam. *Clin Pharmacol Ther.* 1995;57(1):16-24.
48. Thelen K, Dressman JB. Cytochrome P450-mediated metabolism in the human gut wall. *J Pharm Pharmacol.* 2009;61(5):541-558.
49. Lamba JK, Lin YS, Schuetz EG, Thummel KE. Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002;54(10):1271-1294.
50. Schuetz EG, Relling MV, Kishi S, Yang W, Das S, Chen P et al. PharmGKB update: II. CYP3A5, cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 5. *Pharmacol Rev.* 2004;56(2):159.
51. Guengerich FP. *Human Cytochrome P450 Enzymes.* 2nd ed. (Ortiz de Montellano PR, ed.). New York: Plenum Press; 1995.
52. Haehner BD, Gorski JC, Vandenbranden M, Wrighton SA, Janardan SK, Watkins PB et al. Bimodal distribution of renal cytochrome P450 3A activity in humans. *Mol Pharmacol.* 1996;50(1):52-59.
53. Kolars JC, Lown KS, Schmiedlin-Ren P, Ghosh M, Fang C, Wrighton SA et al. CYP3A gene expression in human gut epithelium. *Pharmacogenetics.* 1994;4(5):247-259.
54. Lee SJ, Goldstein JA. Functionally defective or altered CYP3A4 and CYP3A5 single nucleotide polymorphisms and their detection with genotyping tests. *Pharmacogenomics.* 2005;6(4):357-371.
55. Gorski JC, Hall SD, Jones DR, VandenBranden M, Wrighton SA. Regioselective biotransformation of midazolam by members of the human cytochrome P450 3A (CYP3A) subfamily. *Biochem Pharmacol.* 1994;47(9):1643-1653.
56. Patki KC, Von Moltke LL, Greenblatt DJ. In vitro metabolism of midazolam, triazolam, nifedipine, and testosterone by human liver microsomes and recombinant cytochromes p450: role of cyp3a4 and cyp3a5. *Drug Metab Dispos.* 2003;31(7):938-944.
57. Schuetz JD, Beach DL, Guzelian PS. Selective expression of cytochrome P450 CYP3A mRNAs in embryonic and adult human liver. *Pharmacogenetics.* 1994;4(1):11-20.
58. Hakkola J, Raunio H, Purkunen R, Saarikoski S, Vähäkangas K, Pelkonen O et al. Cytochrome P450 3A expression in the human fetal liver: evidence that CYP3A5 is expressed in only a limited number of fetal livers. *Biol Neonate.* 2001;80(3):193-201.

59. Schuetz JD, Kauma S, Guzelian PS. Identification of the fetal liver cytochrome CYP3A7 in human endometrium and placenta. *J Clin Invest*. 1993;92(2):1018-1024.
60. Gellner K, Eiselt R, Hustert E, Arnold H, Koch I, Haberl M et al. Genomic organization of the human CYP3A locus: identification of a new, inducible CYP3A gene. *Pharmacogenetics*. 2001;11(2):111-121.
61. Westlind A, Malmebo S, Johansson I, Otter C, Andersson TB, Ingelman-Sundberg M et al. Cloning and tissue distribution of a novel human cytochrome p450 of the CYP3A subfamily, CYP3A43. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;281(5):1349-1355.
62. Domanski TL, Finta C, Halpert JR, Zaphiropoulos PG. cDNA cloning and initial characterization of CYP3A43, a novel human cytochrome P450. *Mol Pharmacol*. 2001;59(2):386-392.
63. Krayenbühl JC, Vozech S, Kondo-Oestreicher M, Dayer P. Drug-drug interactions of new active substances: mibefradil example. *Eur J Clin Pharmacol*. 1999;55(8):559-565.
64. SoRelle R. Withdrawal of Posicor from market. *Circulation*. 1998;98(9):831-832.
65. Paakkari I. Cardiotoxicity of new antihistamines and cisapride. *Toxicol Lett*. 2002;127(1-3):279-284.
66. Bock KW, Kohle C. UDP-glucuronosyltransferase 1A6: structural, functional, and regulatory aspects. *Methods Enzym*. 2005;400:57-75.
67. Tukey RH, Strassburg CP. Human UDP-glucuronosyltransferases: metabolism, expression, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2000;40:581-616.
68. Radomska-Pandya A, Czernik PJ, Little JM, Battaglia E, Mackenzie PI. Structural and functional studies of UDP-glucuronosyltransferases. *Drug Metab Rev*. 1999;31(4):817-899.
69. Kadakol A, Ghosh SS, Sappal BS, Sharma G, Chowdhury JR, Chowdhury NR. Genetic lesions of bilirubin uridine-diphosphoglucuronate glucuronosyltransferase (UGT1A1) causing Crigler-Najjar and Gilbert syndromes: correlation of genotype to phenotype. *Hum Mutat*. 2000;16(4):297-306.
70. Bosma PJ, Seppen J, Goldhoorn B, Bakker C, Oude Elferink RP, Chowdhury JR et al. Bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 is the only relevant bilirubin glucuronidating isoform in man. *J Biol Chem*. 1994;269(27):17960-17964.
71. Aceves Baldó P, Anzures-Cabrera J, Bentley D. In vivo evaluation of drug-drug interactions linked to UGT inhibition: the effect of probenecid on dalcetrapib pharmacokinetics. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2013;51(3):215-218.
72. Smith PC, Langendijk PN, Bosso JA, Benet LZ. Effect of probenecid on the formation and elimination of acyl glucuronides: studies with zomepirac. *Clin Pharmacol Ther*. 1985;38(2):121-127.
73. Soars MG, Petullo DM, Eckstein JA, Kasper SC, Wrighton SA. An assessment of udp-glucuronosyltransferase induction using primary human hepatocytes. *Drug Metab Dispos*. 2004;32(1):140-148.

74. Uchaipichat V, Mackenzie PI, Elliot DJ, Miners JO. Selectivity of substrate (trifluoperazine) and inhibitor (amitriptyline, androsterone, canrenoic acid, hecogenin, phenylbutazone, quinidine, quinine, and sulfapyrazone) "probes" for human udp-glucuronosyltransferases. *Drug Metab Dispos.* 2006;34(3):449-456.
75. Uchaipichat V, Winner LK, Mackenzie PI, Elliot DJ, Williams JA, Miners JO. Quantitative prediction of in vivo inhibitory interactions involving glucuronidated drugs from in vitro data: the effect of fluconazole on zidovudine glucuronidation. *Br J Clin Pharmacol.* 2006;61(4):427-439.
76. Donato MT, Montero S, Castell J V, Gómez-Lechón MJ, Lahoz A. Validated assay for studying activity profiles of human liver UGTs after drug exposure: inhibition and induction studies. *Anal Bioanal Chem.* 2010;396(6):2251-2263.
77. Uchaipichat V, Mackenzie PI, Guo XH, Gardner-Stephen D, Galetin A, Houston JB et al. Human UDP-glucuronosyltransferases: isoform selectivity and kinetics of 4-methylumbelliferone and 1-naphthol glucuronidation, effects of organic solvents, and inhibition by diclofenac and probenecid. *Drug Metab Dispos.* 2004;32(4):413-423.
78. Harper TW, Brassil PJ. Reaction phenotyping: current industry efforts to identify enzymes responsible for metabolizing drug candidates. *AAPS J.* 2008;10(1):200-207.
79. Klepstad P, Kaasa S, Borchgrevink PC. Start of oral morphine to cancer patients: effective serum morphine concentrations and contribution from morphine-6-glucuronide to the analgesia produced by morphine. *Eur J Clin Pharmacol.* 2000;55(10):713-719.
80. Mackenzie PI, Bock KW, Burchell B, Guillemette C, Ikushiro S, Iyanagi T et al. Nomenclature update for the mammalian UDP glycosyltransferase (UGT) gene superfamily. *Pharmacogenet Genomics.* 2005;15(10):677-685.
81. Wu B, Kulkarni K, Basu S, Zhang S, Hu M. First-pass metabolism via UDP-glucuronosyltransferase: a barrier to oral bioavailability of phenolics. *J Pharm Sci.* 2011;100(9):3655-3681.
82. Rowland A, Miners JO, Mackenzie PI. The UDP-glucuronosyltransferases: their role in drug metabolism and detoxification. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013;45(6):1121-1132.
83. Strassburg CP, Kneip S, Topp J, Obermayer-Straub P, Barut A, Tukey RH et al. Polymorphic gene regulation and interindividual variation of UDP-glucuronosyltransferase activity in human small intestine. *J Biol Chem.* 2000;275(46):36164-36171.
84. Fisher MB, Vandenbranden M, Findlay K, Burchell B, Thummel KE, Hall SD et al. Tissue distribution and interindividual variation in human UDP-glucuronosyltransferase activity: relationship between UGT1A1 promoter genotype and variability in a liver bank. *Pharmacogenetics.* 2000;10(8):727-739.
85. Wang Z, Wong T, Hashizume T, Dickmann LZ, Scian M, Koszewski NJ et al. Human UGT1A4 and UGT1A3 conjugate 25-hydroxyvitamin D3: metabolite structure, kinetics, inducibility, and interindividual variability. *Endocrinology.* 2014;155(6):2052-2063.
86. Pacifici GM, Bencini C, Rane A. Presystemic glucuronidation of morphine in humans and rhesus monkeys: subcellular distribution of the UDP-glucuronosyltransferase in the liver and intestine. *Xenobiotica.* 1986;16(2):123-128.

87. Cappiello M, Giuliani L, Pacifici GM. Distribution of UDP-glucuronosyltransferase and its endogenous substrate uridine 5'-diphosphoglucuronic acid in human tissues. *Eur J Clin Pharmacol.* 1991;41(4):345-350.
88. Kemp DC, Fan PW, Stevens JC. Characterization of raloxifene glucuronidation in vitro: contribution of intestinal metabolism to presystemic clearance. *Drug Metab Dispos.* 2002;30(6):694-700.
89. Ghosal A. Identification of human UDP-glucuronosyltransferase enzyme(s) responsible for the glucuronidation of ezetimibe (ZETIA). *Drug Metab Dispos.* 2004;32(3):314-320.
90. Van de Waterbeemd H, Gifford E. ADMET in silico modelling: towards prediction paradise? *Nat Rev Drug Discov.* 2003;2(3):192-204.
91. Bergström CAS. Computational models to predict aqueous drug solubility, permeability and intestinal absorption. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2005;1(4):613-627.
92. Murray GI, Barnes TS, Sewell HF, Ewen SW, Melvin WT, Burke MD. The immunocytochemical localisation and distribution of cytochrome P-450 in normal human hepatic and extrahepatic tissues with a monoclonal antibody to human cytochrome P-450. *Br J Clin Pharmacol.* 1988;25(4):465-475.
93. Ritter JK. Intestinal UGTs as potential modifiers of pharmacokinetics and biological responses to drugs and xenobiotics. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2007;3(1):93-107.
94. Klippert P, Borm P, Noordhoek J. Prediction of intestinal first-pass effect of phenacetin in the rat from enzyme kinetic data--correlation with in vivo data using mucosal blood flow. *Biochem Pharmacol.* 1982;31(15):2545-2548.
95. Mailman D. Effects of vasoactive intestinal polypeptide on intestinal absorption and blood flow. *J Physiol.* 1978;279:121-132.
96. Svanvik J. Mucosal blood circulation and its influence on passive absorption in the small intestine. An experimental study in the cat. *Acta Physiol Scand Suppl.* 1973;385:1-44.
97. Micflikier AB, Bond JH, Sircar B, Levitt MD. Intestinal villus blood flow measured with carbon monoxide and microspheres. *Am J Physiol.* 1976;230(4):916-919.
98. Fisher MB, Labissiere G. The role of the intestine in drug metabolism and pharmacokinetics: an industry perspective. *Curr Drug Metab.* 2007;8(7):694-699.
99. Yang J, Jamei M, Yeo KR, Tucker GT, Rostami-Hodjegan A. Prediction of intestinal first-pass drug metabolism. *Curr Drug Metab.* 2007;8(7):676-684.
100. Fagerholm U. Prediction of human pharmacokinetics--gut-wall metabolism. *J Pharm Pharmacol.* 2007;59(10):1335-1343.
101. Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(21):7735-7738.



102. Greiner B, Eichelbaum M, Fritz P, Kreichgauer HP, von Richter O, Zundler J et al. The role of intestinal P-glycoprotein in the interaction of digoxin and rifampin. *J Clin Invest.* 1999;104(2):147-153.
103. Cubitt HE, Houston JB, Galetin A. Relative importance of intestinal and hepatic glucuronidation-impact on the prediction of drug clearance. *Pharm Res.* 2009;26(5):1073-1083.
104. Ekataksin W, Kaneda K. Liver microvascular architecture: an insight into the pathophysiology of portal hypertension. *Semin Liver Dis.* 1999;19(4):359-382.
105. Lamers WH, Hilberts A, Furt E, Smith J, Jonges GN, van Noorden CJ et al. Hepatic enzymic zonation: a reevaluation of the concept of the liver acinus. *Hepatology.* 1989;10(1):72-76.
106. Faller A, Schünke M. *Der Körper Des Menschen.* 14. ed. Stuttgart: Thieme; 2004.
107. Brown RP, Delp MD, Lindstedt SL, Rhomberg LR, Beliles RP. Physiological parameter values for physiologically based pharmacokinetic models. *Toxicol Ind Heal.* 1997;13(4):407-484.
108. VandenBrink BM, Foti RS, Rock DA, Wienkers LC, Wahlstrom JL. Prediction of CYP2D6 drug interactions from in vitro data: evidence for substrate-dependent inhibition. *Drug Metab Dispos.* 2012;40(1):47-53.
109. McKillop D, Wild MJ, Butters CJ, Simcock C. Effects of propofol on human hepatic microsomal cytochrome P450 activities. *Xenobiotica.* 1998;28(9):845-853.
110. Abdul Manap R, Wright CE, Gregory A, Rostami-Hodjegan A, Meller ST, Kelm GR et al The antitussive effect of dextromethorphan in relation to CYP2D6 activity. *Br J Clin Pharmacol.* 1999;48(3):382-387.
111. Galetin A, Brown C, Hallifax D, Ito K, Houston JB. Utility of recombinant enzyme kinetics in prediction of human clearance: impact of variability, CYP3A5, and CYP2C19 on CYP3A4 probe substrates. *Drug Metab Dispos.* 2004;32(12):1411-1420.
112. Galetin A, Ito K, Hallifax D, Houston JB. CYP3A4 substrate selection and substitution in the prediction of potential drug-drug interactions. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;314(1):180-190.
113. Nielsen TL, Rasmussen BB, Flinois JP, Beaune P, Brosten K. In vitro metabolism of quinidine: the (3S)-3-hydroxylation of quinidine is a specific marker reaction for cytochrome P-4503A4 activity in human liver microsomes. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999;289(1):31-37.
114. Wille SM, Cooreman SG, Neels HM, Lambert WE. Relevant issues in the monitoring and the toxicology of antidepressants. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2008;45(1):25-89.
115. Sekiguchi N, Higashida A, Kato M, Nabuchi Y, Mitsui T, Takanashi K et al. Prediction of drug-drug interactions based on time-dependent inhibition from high throughput screening of cytochrome P450 3A4 inhibition. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2009;24(6):500-510.
116. Abduljalil K, Kinzig M, Bulitta J, Horkovics-Kovats S, Sörgel F, Rodamer M et al. Modeling the autoinhibition of clarithromycin metabolism during repeated oral administration. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(7):2892-2901.

117. Akiyoshi T, Ito M, Murase S, Miyazaki M, Guengerich FP, Nakamura K et al. Mechanism-based inhibition profiles of erythromycin and clarithromycin with cytochrome P450 3A4 genetic variants. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2013;28(5):411-415.
118. Lim KS, Cho JY, Jang JJ, Kim BH, Kim J, Jeon JY et al. Pharmacokinetic interaction of flecainide and paroxetine in relation to the CYP2D6\*10 allele in healthy Korean subjects. *Br J Clin Pharmacol.* 2008;66(5):660-666.
119. Terrier N, Benoit E, Senay C, Lopicque F, Radomska-Pandya A, Magdalou J et al. Human and rat liver UDP-glucuronosyltransferases are targets of ketoprofen acylglucuronide. *Mol Pharmacol.* 1999;56(1):226-234.
120. Somogyi A, Muirhead M. Pharmacokinetic interactions of cimetidine 1987. *Clin Pharmacokinet.* 1987;12(5):321-366.
121. Guidance for Industry. Drug interaction studies - Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing and Labeling Recommendations. 2012. <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm292362.pdf>. Accessed March 23, 2015.
122. Bjornsson TD, Callaghan JT, Einolf HJ, Fisher V, Gan L, Grimm S et al. The conduct of in vitro and in vivo drug-drug interaction studies: a Pharmaceutical Research and Manufacturers of America (PhRMA) perspective. *Drug Metab Dispos.* 2003;31(7):815-832.
123. Huang S-M, Temple R, Throckmorton DC, Lesko LJ. Drug interaction studies: study design, data analysis, and implications for dosing and labeling. *Clin Pharmacol Ther.* 2007;81(2):298-304.
124. Zhang L, Zhang YD, Zhao P, Huang S-M. Predicting drug-drug interactions: an FDA perspective. *AAPS J.* 2009;11(2):300-306.
125. Fahmi OA, Hurst S, Plowchalk D, Cook J, Guo F, Youdim A et al. Comparison of different algorithms for predicting clinical drug-drug interactions, based on the use of CYP3A4 in vitro data: predictions of compounds as precipitants of interaction. *Drug Metab Dispos.* 2009;37(8):1658-1666.
126. Vieira MLT, Kirby B, Ragueneau-Majlessi I, Galetin A, Chien JY, Einolf HJ et al. Evaluation of various static in vitro-in vivo extrapolation models for risk assessment of the CYP3A inhibition potential of an investigational drug. *Clin Pharmacol Ther.* 2014;95(2):189-198.
127. Guest EJ, Rowland-Yeo K, Rostami-Hodjegan A, Tucker GT, Houston JB, Galetin A. Assessment of algorithms for predicting drug-drug interactions via inhibition mechanisms: comparison of dynamic and static models. *Br J Clin Pharmacol.* 2011;71(1):72-87.
128. Einolf HJ. Comparison of different approaches to predict metabolic drug-drug interactions. *Xenobiotica.* 37(10-11):1257-1294.
129. Rostami-Hodjegan A, Tucker GT. Simulation and prediction of in vivo drug metabolism in human populations from in vitro data. *Nat Rev Drug Discov.* 2007;6(2):140-148.
130. Jamei M, Dickinson GL, Rostami-Hodjegan A. A framework for assessing inter-individual variability in pharmacokinetics using virtual human populations and integrating general knowledge of physical chemistry, biology, anatomy, physiology and genetics: A tale of "bottom-up" vs "top-down" recognition. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2009;24(1):53-75.

131. Boulenc X, Barberan O. Metabolic-based drug-drug interactions prediction, recent approaches for risk assessment along drug development. *Drug Metabol Drug Interact.* 2011;26(4):147-168.
132. Fachinformation Vfend. 2014. <http://www.fachinfo.de>. Accessed March 23, 2015.
133. Purkins L, Wood N, Ghahramani P, Greenhalgh K, Allen MJ, Kleinermans D. Pharmacokinetics and safety of voriconazole following intravenous- to oral-dose escalation regimens. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(8):2546-2553.
134. Roffey SJ, Cole S, Comby P, Gibson D, Jezequel SG, Nedderman AN et al. The disposition of voriconazole in mouse, rat, rabbit, guinea pig, dog, and human. *Drug Metab Dispos.* 2003;31(6):731-741.
135. Koltin Y, Hitchcock CA. The search for new triazole antifungal agents. *Curr Opin Chem Biol.* 1997;1(2):176-182.
136. Kelly SL, Lamb DC, Corran AJ, Baldwin BC, Kelly DE. Mode of action and resistance to azole antifungals associated with the formation of 14 alpha-methylergosta-8,24(28)-dien-3 beta,6 alpha-diol. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;207(3):910-915.
137. Hitchcock CA, Dickinson K, Brown SB, Evans EG, Adams DJ. Interaction of azole antifungal antibiotics with cytochrome P-450-dependent 14 alpha-sterol demethylase purified from *Candida albicans*. *Biochem J.* 1990;266(2):475-480.
138. Xiong Q, Hassan SA, Wilson WK, Han XY, May GS, Tarrand JJ et al Cholesterol import by *Aspergillus fumigatus* and its influence on antifungal potency of sterol biosynthesis inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(2):518-524.
139. Brüggemann RJ, Alffenaar JW, Blijlevens NM, Billaud EM, Kosterink JG, Verweij PE et al. Clinical relevance of the pharmacokinetic interactions of azole antifungal drugs with other coadministered agents. *Clin Infect Dis.* 2009;48(10):1441-1458.
140. Cone LA, Himelman RB, Hirschberg JN, Hutcheson JW. Itraconazole-related amaurosis and vomiting due to digoxin toxicity. *West J Med.* 1996;165(5):322.
141. Jalava KM, Partanen J, Neuvonen PJ. Itraconazole decreases renal clearance of digoxin. *Ther Drug Monit.* 1997;19(6):609-613.
142. Takeda S, Kitajima Y, Ishii Y, Nishimura Y, Mackenzie PI, Oguri K et al Inhibition of UDP-glucuronosyltransferase 2b7-catalyzed morphine glucuronidation by ketoconazole: dual mechanisms involving a novel noncompetitive mode. *Drug Metab Dispos.* 2006;34(8):1277-1282.
143. Langdon G, Davis J, Layton G, Chong CL, Weissgerber G, Vourvahis M. Effects of ketoconazole and valproic acid on the pharmacokinetics of the next generation NNRTI, lersivirine (UK-453,061), in healthy adult subjects. *Br J Clin Pharmacol.* 2012;73(5):768-775.
144. Walsky RL, Bauman JN, Bourcier K, Giddens G, Lapham K, Negahban A et al Optimized assays for human UDP-glucuronosyltransferase (UGT) activities: altered alamethicin concentration and utility to screen for UGT inhibitors. *Drug Metab Dispos.* 2012;40(5):1051-1065.

145. Raungrut P, Uchaipichat V, Elliot DJ, Janchawee B, Somogyi AA, Miners JO. In vitro-in vivo extrapolation predicts drug-drug interactions arising from inhibition of codeine glucuronidation by dextropropoxyphene, fluconazole, ketoconazole, and methadone in humans. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010;334(2):609-618.
146. Debruyne D, Ryckelynck JP. Clinical pharmacokinetics of fluconazole. *Clin Pharmacokinet.* 1993;24(1):10-27.
147. Sahai J, Gallicano K, Pakuts A, Cameron DW. Effect of fluconazole on zidovudine pharmacokinetics in patients infected with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis.* 1994;169(5):1103-1107.
148. Hyland R, Jones BC, Smith DA. Identification of the cytochrome P450 enzymes involved in the N-oxidation of voriconazole. *Drug Metab Dispos.* 2003;31(5):540-547.
149. Yanni SB, Annaert PP, Augustijns P, Bridges A, Gao Y, Benjamin DK Jr et al. Role of flavin-containing monooxygenase in oxidative metabolism of voriconazole by human liver microsomes. *Drug Metab Dispos.* 2008;36(6):1119-1125.
150. Weiss J, Ten Hoevel MM, Burhenne J, Walter-Sack I, Hoffmann MM, Rengelshausen J et al. CYP2C19 genotype is a major factor contributing to the highly variable pharmacokinetics of voriconazole. *J Clin Pharmacol.* 2009;49(2):196-204.
151. Jeu L, Piacenti FJ, Lyakhovetskiy AG, Fung HB. Voriconazole. *Clin Ther.* 2003;25(5):1321-1381.
152. Scholz I, Oberwittler H, Riedel KD, Burhenne J, Weiss J, Haefeli WE et al. Pharmacokinetics, metabolism and bioavailability of the triazole antifungal agent voriconazole in relation to CYP2C19 genotype. *Br J Clin Pharmacol.* 2009;68(6):906-915.
153. Isoherranen N, Kunze KL, Allen KE, Nelson WL, Thummel KE. Role of itraconazole metabolites in CYP3A4 inhibition. *Drug Metab Dispos.* 2004;32(10):1121-1131.
154. Saari TI, Laine K, Leino K, Valtonen M, Neuvonen PJ, Olkkola KT. Effect of voriconazole on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of intravenous and oral midazolam. *Clin Pharmacol Ther.* 2006;79(4):362-370.
155. Katzenmaier S, Markert C, Riedel KD, Burhenne J, Haefeli WE, Mikus G. Determining the time course of CYP3A inhibition by potent reversible and irreversible CYP3A inhibitors using a limited sampling strategy. *Clin Pharmacol Ther.* 2011;90(5):666-673.
156. Drug Development and Drug Interactions: Tables of Substrates, Inhibitors and Inducers. 2014. <http://www.fda.gov/drugs/developmentapprovalprocess/developmentresources/druginteractionslabeling/ucm093664.htm>. Accessed March 24, 2015.
157. Kronbach T, Mathys D, Umeno M, Gonzalez FJ, Meyer UA. Oxidation of midazolam and triazolam by human liver cytochrome P450III A4. *Mol Pharmacol.* 1989;36(1):89-96.
158. Streetman DS, Bertino Jr. JS, Nafziger AN. Phenotyping of drug-metabolizing enzymes in adults: a review of in-vivo cytochrome P450 phenotyping probes. *Pharmacogenetics.* 2000;10(3):187-216.

159. Fuhr U, Jetter A, Kirchheiner J. Appropriate phenotyping procedures for drug metabolizing enzymes and transporters in humans and their simultaneous use in the “cocktail” approach. *Clin Pharmacol Ther.* 2007;81(2):270-283.
160. Ohno Y, Hisaka A, Suzuki H. General framework for the quantitative prediction of CYP3A4-mediated oral drug interactions based on the AUC increase by coadministration of standard drugs. *Clin Pharmacokinet.* 2007;46(8):681-696.
161. Friedman EJ, Fraser IP, Wang YH, Bergman AJ, Li CC, Larson PJ et al Effect of different durations and formulations of diltiazem on the single-dose pharmacokinetics of midazolam: how long do we go? *J Clin Pharmacol.* 2011;51(11):1561-1570.
162. Fachinformation Midazolam ratiopharm. 2014. <http://www.fachinfo.de>. Accessed March 23, 2015.
163. Heizmann P, Ziegler WH. Excretion and metabolism of 14C-midazolam in humans following oral dosing. *Arzneimittelforschung.* 1981;31(12a):2220-2223.
164. Smith MT, Eadie MJ, Brophy TO. The pharmacokinetics of midazolam in man. *Eur J Clin Pharmacol.* 1981;19(4):271-278.
165. Heizmann P, Eckert M, Ziegler WH. Pharmacokinetics and bioavailability of midazolam in man. *Br J Clin Pharmacol.* 1983;16 Suppl 1:43S - 49S.
166. Dundee JW, Halliday NJ, Harper KW, Brogden RN. Midazolam. A review of its pharmacological properties and therapeutic use. *Drugs.* 1984;28(6):519-543.
167. Klieber S, Hugla S, Ngo R, Arabeyre-Fabre C, Meunier V, Sadoun F et al. Contribution of the N-glucuronidation pathway to the overall in vitro metabolic clearance of midazolam in humans. *Drug Metab Dispos.* 2008;36(5):851-862.
168. Hyland R, Osborne T, Payne A, Kempshall S, Logan YR, Ezzeddine K et al. In vitro and in vivo glucuronidation of midazolam in humans. *Br J Clin Pharmacol.* 2009;67(4):445-454.
169. Wandel C, Böcker R, Böhrer H, Browne A, Rügheimer E, Martin E. Midazolam is metabolized by at least three different cytochrome P450 enzymes. *Br J Anaesth.* 1994;73(5):658-661.
170. Vossen M, Sevestre M, Niederalt C, Jang IJ, Willmann S, Edginton AN. Dynamically simulating the interaction of midazolam and the CYP3A4 inhibitor itraconazole using individual coupled whole-body physiologically-based pharmacokinetic (WB-PBPK) models. *Theor Biol Med Model.* 2007;4:13.
171. Guideline on bioanalytical method validation. 2011. [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2011/08/WC500109686.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf). Accessed March 23, 2015.
172. Sheiner LB, Rosenberg B, Marathe V V. Estimation of population characteristics of pharmacokinetic parameters from routine clinical data. *J Pharmacokinet Biopharm.* 1977;5(5):445-479.
173. Ette EI, Williams PJ. Population pharmacokinetics I: background, concepts, and models. *Ann Pharmacother.* 2004;38(10):1702-1706.

174. Emoto C, Fukuda T, Cox S, Christians U, Vinks AA. Development of a Physiologically-Based Pharmacokinetic Model for Sirolimus: Predicting Bioavailability Based on Intestinal CYP3A Content. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*. 2013;2:e59.
175. Karlsson FH, Bouchene S, Hilgendorf C, Dolgos H, Peters SA. Utility of in vitro systems and preclinical data for the prediction of human intestinal first-pass metabolism during drug discovery and preclinical development. *Drug Metab Dispos*. 2013;41(12):2033-2046.
176. Peters SA. Evaluation of a generic physiologically based pharmacokinetic model for lineshape analysis. *Clin Pharmacokinet*. 2008;47(4):261-275.
177. Karlsson MO, Sheiner LB. The importance of modeling interoccasion variability in population pharmacokinetic analyses. *J Pharmacokinet Biopharm*. 1993;21(6):735-750.
178. Boeckmann A, Sheiner LB, Beal SL. NONMEM Users Guide - Part V Introductory Guide. 2011.
179. Beal SL, Sheiner LB. NONMEM Users Guide - Part VII: Conditional Estimation Methods. 1998.
180. Wang Y. Derivation of various NONMEM estimation methods. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*. 2007;34(5):575-593.
181. Beal SL, Sheiner LB. NONMEM Users Guide - Part I: Basic Guide. 1989.
182. Fisher D, Shafer S. *Fisher/Shafer NONMEM Workshop Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Analysis with NONMEM: Basic Concepts*; 2007.
183. Savic RM, Karlsson MO. Importance of shrinkage in empirical bayes estimates for diagnostics: problems and solutions. *AAPS J*. 2009;11(3):558-569.
184. Karlsson MO, Savic RM. Diagnosing model diagnostics. *Clin Pharmacol Ther*. 2007;82(1):17-20.
185. Ette EI. Stability and performance of a population pharmacokinetic model. *J Clin Pharmacol*. 1997;37(6):486-495.
186. Parke J, Holford NH, Charles BG. A procedure for generating bootstrap samples for the validation of nonlinear mixed-effects population models. *Comput Methods Programs Biomed*. 1999;59(1):19-29.
187. Lindbom L, Pihlgren P, Jonsson EN. PsN-Toolkit--a collection of computer intensive statistical methods for non-linear mixed effect modeling using NONMEM. *Comput Methods Programs Biomed*. 2005;79(3):241-257.
188. Hooker AC, Staats CE, Karlsson MO. Conditional weighted residuals (CWRES): a model diagnostic for the FOCE method. *Pharm Res*. 2007;24(12):2187-2197.
189. Post TM, Freijer JI, Ploeger BA, Danhof M. Extensions to the visual predictive check to facilitate model performance evaluation. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*. 2008;35(2):185-202.
190. Holford NH. The visual predictive check - superiority to standard diagnostic (Rorschach) plots. 2005;2015. <http://www.page-meeting.org/?abstract=738>.

191. Karlsson MO, Holford NH. A tutorial on visual predictive checks. 2008;2015(23.03.2015). <http://www.page-meeting.org/?abstract=1434>.
192. Ito K, Ogihara K, Kanamitsu S, Itoh T. Prediction of the in vivo interaction between midazolam and macrolides based on in vitro studies using human liver microsomes. *Drug Metab Dispos*. 2003;31(7):945-954.
193. Williams LR, Leggett RW. Reference values for resting blood flow to organs of man. *Clin Phys Physiol Meas*. 1989;10(3):187-217.
194. von Moltke LL, Greenblatt DJ, Schmider J, Duan SX, Wright CE, Harmatz JS et al. Midazolam hydroxylation by human liver microsomes in vitro: inhibition by fluoxetine, norfluoxetine, and byazole antifungal agents. *J Clin Pharmacol*. 1996;36(9):783-791.
195. Dahlinger D, Duechting S, Nuecken D, Sydow K, Fuhr U, Frechen S. Development and Validation of an In Vitro, Seven-in-One Human Cytochrome P450 Assay for Evaluation of Both Direct and Time-Dependent Inhibition. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2015.
196. Jeong S, Nguyen PD, Desta Z. Comprehensive in vitro analysis of voriconazole inhibition of eight cytochrome P450 (CYP) enzymes: major effect on CYPs 2B6, 2C9, 2C19, and 3A. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(2):541-551.
197. Rokitta D, Pfeiffer K, Streich C, Gerwin H, Fuhr U. The effect of organic solvents on enzyme kinetic parameters of human CYP3A4 and CYP1A2 in vitro. *Toxicol Mech Methods*. 2013;23(8):576-583.
198. Seo KA, Bae SK, Choi YK, Choi CS, Liu KH, Shin JG. Metabolism of 1'- and 4-hydroxymidazolam by glucuronide conjugation is largely mediated by UDP-glucuronosyltransferases 1A4, 2B4, and 2B7. *Drug Metab Dispos*. 2010;38(11):2007-2013.
199. Zhu B, Bush D, Doss GA, Vincent S, Franklin RB, Xu S. Characterization of 1'-hydroxymidazolam glucuronidation in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos*. 2008;36(2):331-338.
200. Simcyp Simulator. Simcyp Limited, Sheffield, UK. 2012.
201. Damle B, Varma M V, Wood N. Pharmacokinetics of voriconazole administered concomitantly with fluconazole and population-based simulation for sequential use. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(11):5172-5177.
202. Rodgers T, Rowland M. Mechanistic approaches to volume of distribution predictions: understanding the processes. *Pharm Res*. 2007;24(5):918-933.
203. Du Bois D, Du Bois EF. A formula to estimate the approximate surface area if height and weight be known. 1916. *Nutrition*. 1989;5(5):303.
204. Johnson TN, Tucker GT, Tanner MS, Rostami-Hodjegan A. Changes in liver volume from birth to adulthood: a meta-analysis. *Liver Transpl*. 2005;11(12):1481-1493.
205. Howgate EM, Rowland Yeo K, Proctor NJ, Tucker GT, Rostami-Hodjegan A. Prediction of in vivo drug clearance from in vitro data. I: impact of inter-individual variability. *Xenobiotica*. 2006;36(6):473-497.

206. Park GR, Manara AR, Dawling S. Extra-hepatic metabolism of midazolam. *Br J Clin Pharmacol*. 1989;27(5):634-637.
207. Gordi T, Xie R, Huong N V, Huong DX, Karlsson MO, Ashton M. A semiphysiological pharmacokinetic model for artemisinin in healthy subjects incorporating autoinduction of metabolism and saturable first-pass hepatic extraction. *Br J Clin Pharmacol*. 2005;59(2):189-198.
208. Murray GI, Barnes TS, Sewell HF, Ewen SW, Melvin WT, Burke MD. The immunocytochemical localisation and distribution of cytochrome P-450 in normal human hepatic and extrahepatic tissues with a monoclonal antibody to human cytochrome P-450. *Br J Clin Pharmacol*. 1988;25(4):465-475.
209. Weiss M. A novel extravascular input function for the assessment of drug absorption in bioavailability studies. *Pharm Res*. 1996;13(10):1547-1553.
210. Mandema JW, Tuk B, van Steveninck AL, Breimer DD, Cohen AF, Danhof M. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of the central nervous system effects of midazolam and its main metabolite alpha-hydroxymidazolam in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther*. 1992;51(6):715-728.
211. Hope WW. Population pharmacokinetics of voriconazole in adults. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;56(1):526-531.
212. Karlsson MO, Lutsar I, Milligan PA. Population pharmacokinetic analysis of voriconazole plasma concentration data from pediatric studies. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(3):935-944.
213. Theuretzbacher U, Ihle F, Derendorf H. Pharmacokinetic/pharmacodynamic profile of voriconazole. *Clin Pharmacokinet*. 2006;45(7):649-663.
214. Yamazaki H, Nakamoto M, Shimizu M, Murayama N, Niwa T. Potential impact of cytochrome P450 3A5 in human liver on drug interactions with triazoles. *Br J Clin Pharmacol*. 2010;69(6):593-597.
215. Saari TI, Laine K, Leino K, Valtonen M, Neuvonen PJ, Olkkola KT. Effect of voriconazole on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of zolpidem in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol*. 2007;63(1):116-120.
216. Sun H, Pang KS. Physiological modeling to understand the impact of enzymes and transporters on drug and metabolite data and bioavailability estimates. *Pharm Res*. 2010;27(7):1237-1254.
217. Pang KS, Morris ME, Sun H. Formed and preformed metabolites: facts and comparisons. *J Pharm Pharmacol*. 2008;60(10):1247-1275.
218. Dolton MJ, Mikus G, Weiss J, Ray JE, McLachlan AJ. Understanding variability with voriconazole using a population pharmacokinetic approach: implications for optimal dosing. *J Antimicrob Chemother*. 2014;69(6):1633-1641.
219. Nishimuta H, Sato K, Mizuki Y, Yabuki M, Komuro S. Prediction of the intestinal first-pass metabolism of CYP3A substrates in humans using cynomolgus monkeys. *Drug Metab Dispos*. 2010;38(11):1967-1975.



220. Rowland Yeo K, Rostami-Hodjegan A, Tucker GT. Abundance of cytochromes P450 in human liver: a meta-analysis. *Br J Clin Pharmacol*. 2004;57(5):687-688.
221. Wilson ZE, Rostami-Hodjegan A, Burn JL, Tooley A, Boyle J, Ellis SW et al. Inter-individual variability in levels of human microsomal protein and hepatocellularity per gram of liver. *Br J Clin Pharmacol*. 2003;56(4):433-440.
222. Chien JY, Lucksiri A, Ernest 2nd CS, Gorski JC, Wrighton SA, Hall SD. Stochastic prediction of CYP3A-mediated inhibition of midazolam clearance by ketoconazole. *Drug Metab Dispos*. 2006;34(7):1208-1219.
223. Templeton IE, Thummel KE, Kharasch ED, Kunze KL, Hoffer C, Nelson WL et al. Contribution of itraconazole metabolites to inhibition of CYP3A4 in vivo. *Clin Pharmacol Ther*. 2008;83(1):77-85.
224. Lown KS, Kolars JC, Thummel KE, Barnett JL, Kunze KL, Wrighton SA et al. Interpatient heterogeneity in expression of CYP3A4 and CYP3A5 in small bowel. Lack of prediction by the erythromycin breath test. *Drug Metab Dispos*. 1994;22(6):947-955.
225. Congiu M, Mashford ML, Slavin JL, Desmond P V. UDP glucuronosyltransferase mRNA levels in human liver disease. *Drug Metab Dispos*. 2002;30(2):129-134.
226. Fisher MB, Vandenbranden M, Findlay K, Burchell B, Thummel KE, Hall SD et al. Tissue distribution and interindividual variation in human UDP-glucuronosyltransferase activity: relationship between UGT1A1 promoter genotype and variability in a liver bank. *Pharmacogenetics*. 2000;10(8):727-739.
227. Han K, Bies R, Johnson H, Capitano B, Venkataramanan R. Population pharmacokinetic evaluation with external validation and Bayesian estimator of voriconazole in liver transplant recipients. *Clin Pharmacokinet*. 2011;50(3):201-214.
228. Pascual A, Csajka C, Buclin T, Bolay S, Bille J, Calandra T et al. Challenging recommended oral and intravenous voriconazole doses for improved efficacy and safety: population pharmacokinetics-based analysis of adult patients with invasive fungal infections. *Clin Infect Dis*. 2012;55(3):381-390.
229. Han K, Capitano B, Bies R, Potoski BA, Husain S, Gilbert S et al. Bioavailability and population pharmacokinetics of voriconazole in lung transplant recipients. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(10):4424-4431.
230. Shi HY, Yan J, Zhu WH, Yang GP, Tan ZR, Wu WH et al. Effects of erythromycin on voriconazole pharmacokinetics and association with CYP2C19 polymorphism. *Eur J Clin Pharmacol*. 2010;66(11):1131-1136.
231. Gibbs MA, Thummel KE, Shen DD, Kunze KL. Inhibition of cytochrome P-450 3A (CYP3A) in human intestinal and liver microsomes: comparison of  $K_i$  values and impact of CYP3A5 expression. *Drug Metab Dispos*. 1999;27(2):180-187.
232. Greenblatt DJ, Venkatakrisnan K, Harmatz JS, Parent SJ, von Moltke LL. Sources of variability in ketoconazole inhibition of human cytochrome P450 3A in vitro. *Xenobiotica*. 2010;40(10):713-720.
233. Kilford PJ, Stringer R, Sohal B, Houston JB, Galetin A. Prediction of drug clearance by glucuronidation from in vitro data: use of combined cytochrome P450 and UDP-

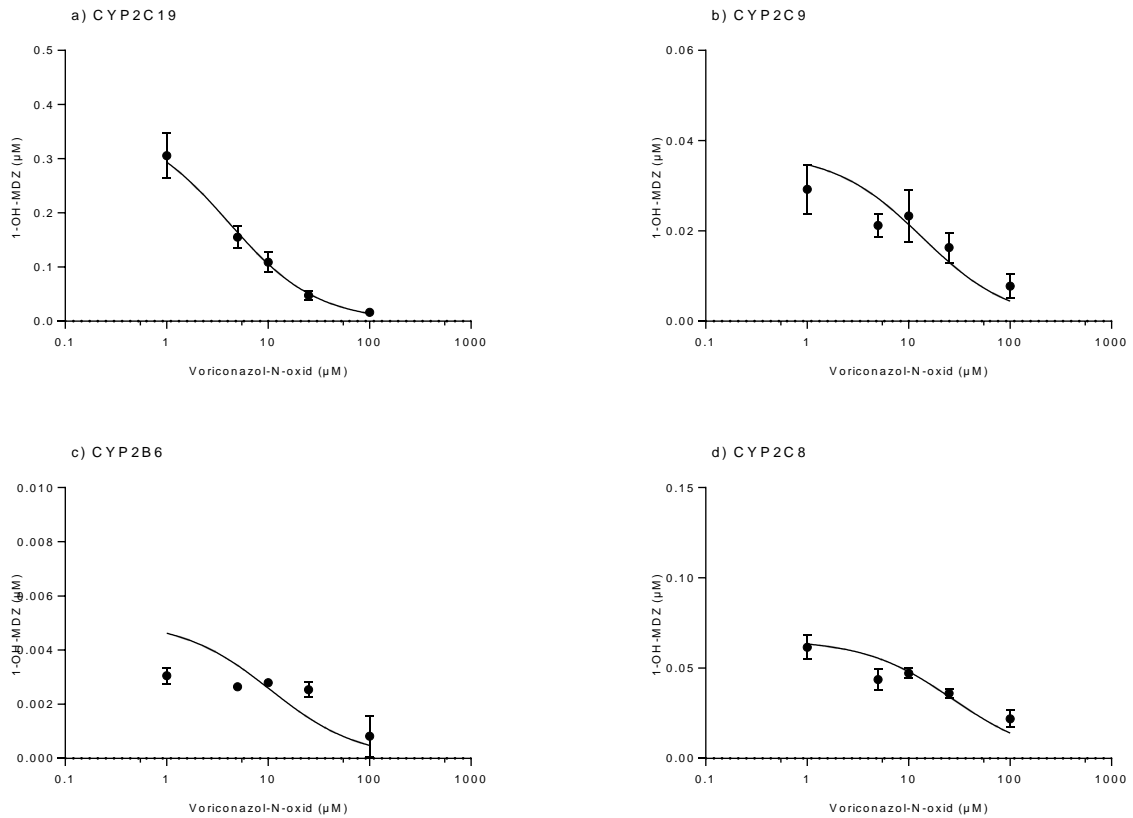
- glucuronosyltransferase cofactors in alamethicin-activated human liver microsomes. *Drug Metab Dispos.* 2009;37(1):82-89.
234. Liu Y, She M, Wu Z, Dai R. The inhibition study of human UDP-glucuronosyltransferases with cytochrome P450 selective substrates and inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2011;26(3):386-393.
235. Ehmer U, Vogel A, Schutte JK, Krone B, Manns MP, Strassburg CP. Variation of hepatic glucuronidation: Novel functional polymorphisms of the UDP-glucuronosyltransferase UGT1A4. *Hepatology.* 2004;39(4):970-977.
236. Spriet I, Grootaert V, Meyfroidt G, Debaveye Y, Willems L. Switching from intravenous to oral tacrolimus and voriconazole leads to a more pronounced drug-drug interaction. *Eur J Clin Pharmacol.* 2013;69(3):737-738.
237. Fang J, McKay G, Hubbard JW, Hawes EM, Midha KK. Dose staggering as a strategy to reduce drug-drug interactions due to reversible enzyme inhibition between orally administered drugs with high first pass effect: a computer simulation study. *Biopharm Drug Dispos.* 2000;21(7):249-259.
238. Hisaka A, Kusama M, Ohno Y, Sugiyama Y, Suzuki H. A proposal for a pharmacokinetic interaction significance classification system (PISCS) based on predicted drug exposure changes and its potential application to alert classifications in product labelling. *Clin Pharmacokinet.* 2009;48(10):653-666.
239. Rowland Yeo K, Jamei M, Yang J, Tucker GT, Rostami-Hodjegan A. Physiologically based mechanistic modelling to predict complex drug-drug interactions involving simultaneous competitive and time-dependent enzyme inhibition by parent compound and its metabolite in both liver and gut - the effect of diltiazem on the time. *Eur J Pharm Sci.* 2010;39(5):298-309.
240. Niwa T, Shiraga T, Takagi A. Effect of antifungal drugs on cytochrome P450 (CYP) 2C9, CYP2C19, and CYP3A4 activities in human liver microsomes. *Biol Pharm Bull.* 2005;28(9):1805-1808.
241. Hagelberg NM, Nieminen TH, Saari TI, et al. Voriconazole drastically increases exposure to oral oxycodone. *Eur J Clin Pharmacol.* 2009;65(3):263-271. doi:10.1007/s00228-008-0568-5.
242. Venkataramanan R, Zang S, Gayowski T, Singh N. Voriconazole inhibition of the metabolism of tacrolimus in a liver transplant recipient and in human liver microsomes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(9):3091-3093.
243. Amsden JR, Gubbins PO, McConnell S, Anaissie E. Steady-state pharmacokinetics of oral voriconazole and its primary metabolite, N-oxide voriconazole, pre- and post-autologous peripheral stem cell transplantation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(7):3420-3423.
244. Grun B, Krautter S, Riedel KD, Mikus G. Inhibition of the active principle of the weak opioid tilidine by the triazole antifungal voriconazole. *Br J Clin Pharmacol.* 2009;68(5):712-720.
245. Pascual A, Calandra T, Bolay S, Buclin T, Bille J, Marchetti O. Voriconazole therapeutic drug monitoring in patients with invasive mycoses improves efficacy and safety outcomes. *Clin Infect Dis.* 2008;46(2):201-211.

246. Trifilio S, Pennick G, Pi J, Zook J, Golf M, Kaniecki K et al. Monitoring plasma voriconazole levels may be necessary to avoid subtherapeutic levels in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Cancer*. 2007;109(8):1532-1535.
247. Radomska-Pandya A, Little JM, Pandya JT, Tephly TR, King CD, Barone GW et al. UDP-glucuronosyltransferases in human intestinal mucosa. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1394(2-3):199-208.
248. Ohno S, Nakajin S. Determination of mRNA expression of human UDP-glucuronosyltransferases and application for localization in various human tissues by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Drug Metab Dispos*. 2009;37(1):32-40.
249. Parquet M, Pessah M, Sacquet E, Salvat C, Raizman A, Infante R. Glucuronidation of bile acids in human liver, intestine and kidney. An in vitro study on hyodeoxycholic acid. *FEBS Lett*. 1985;189(2):183-187.
250. Girard C, Barbier O, Veilleux G, El-Alfy M, Belanger A. Human uridine diphosphate-glucuronosyltransferase UGT2B7 conjugates mineralocorticoid and glucocorticoid metabolites. *Endocrinology*. 2003;144(6):2659-2668.
251. Guideline on the Investigation of Drug Interactions. 2012. [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2012/07/WC500129606.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2012/07/WC500129606.pdf).
252. Xiong X, Duan J, Zhai S, Wang L, Lan X. Fast and reliable determination of voriconazole in human plasma by LC-APCI-MS/MS. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2010;74(10):2151-2153.
253. Xiong X, Zhai S, Duan J. Validation of a fast and reliable liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) with atmospheric pressure chemical ionization method for simultaneous quantitation of voriconazole, itraconazole and its active metabolite hydroxyitraconazole in h. *Clin Chem Lab Med*. 2013;51(2):339-346.
254. Araujo B V, Conrado DJ, Palma EC, Dalla Costa T. Validation of rapid and simple LC-MS/MS method for determination of voriconazole in rat plasma. *J Pharm Biomed Anal*. 2007;44(4):985-990.
255. Kaivosari S, Toivonen P, Hesse LM, Koskinen M, Court MH, Finel M. Nicotine glucuronidation and the human UDP-glucuronosyltransferase UGT2B10. *Mol Pharmacol*. 2007;72(3):761-768.

# 9 Appendix

## Appendix 1a

IC<sub>50</sub>-Plots zur Darstellung des inhibitorischen Potentials von Voriconazol-N-oxid auf weitere CYP-Enzyme als CYP3A



## Appendix 1b

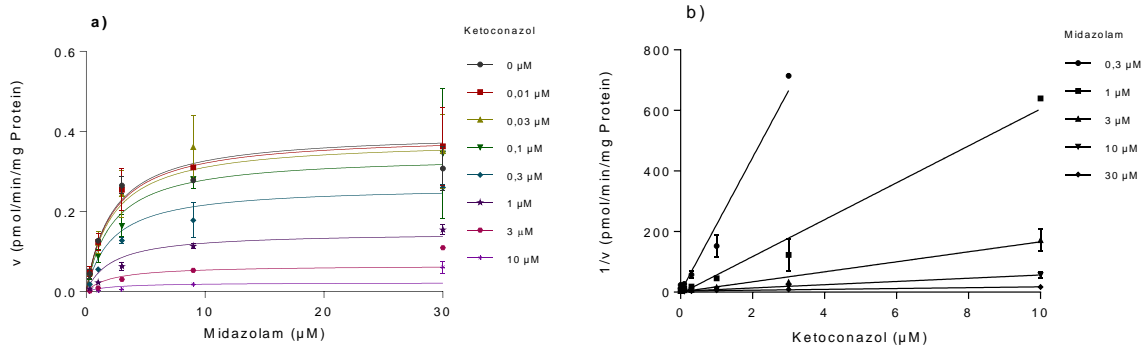
Inhibitorisches Potential von Voriconazol-N-oxid auf verschiedene CYP-Enzyme

Enzym	IC <sub>50</sub> (µM)	95 % KI
CYP2C19	4,07	2,70-5,44
CYP2C9	13,6	3,46-23,7
CYP2B6	10,6	-0,0164-21,7
CYP2C8	27,3	7,87-46,7

IC<sub>50</sub> mittlere inhibitorische Konzentration; KI Konfidenzintervall

## Appendix 2a

Grafische Darstellung der CYP3A4-Inhibition durch Ketoconazol. a) Michaelis-Menten-Plot b) Dixon-Plot



## Appendix 2b

Enzymkinetische Parameter der nichtkompetitiven Hemmung der 1'-Hydroxylierung von CYP3A4 durch Ketoconazol

Parameter	Wert	95 % KI
$V_{\text{max}}$ (nmol/(min*mg Protein))	0,398	0,366-0,430
$K_m$ ( $\mu\text{mol/L}$ )	2,22	1,68-2,80
$K_i$ ( $\mu\text{mol/L}$ )	0,588	0,408-0,768

### Appendix 3

Tatsächlich infundierte Voriconazol-Mengen und –Infusionsraten

Proband Nr.	Periode	infundierte Menge (mg)	Infusionsrate (mg/h)	
1	1	48,9 low dose	6,11	
		96,7 high dose	12,2	
	2	56,3 low dose	7,05	
		113 high dose	14,1	
	3	43,2 low dose	5,40	
		86,3 high dose	10,8	
2	1	53,9 low dose	6,74	
		108 high dose	13,5	
	2	55,1 low dose	6,91	
		109 high dose	13,8	
	3	56,7 low dose	7,10	
		114 high dose	14,2	
	4	45,5 low dose	7,38	
		118 high dose	14,8	
	3	1	54,0 low dose	6,80
			109 high dose	13,6
		2	47,4 low dose	7,90
			121 high dose	15,8
3		53,3 low dose	6,66	
		107 high dose	13,3	
4		49,3 low dose	7,34	
		117 high dose	14,7	
4		3	56,9 low dose	7,13
			113 high dose	14,2
		4	56,7 low dose	7,08
			112 high dose	14,2
	1	56,8 low dose	7,11	
		114 high dose	14,2	
5	2	45,5 low dose	5,69	
		88,0 high dose	11,4	
	3	55,4 low dose	6,92	
		110 high dose	13,8	
	3	55,4 low dose	6,94	
		111 high dose	13,9	
6	1	52,2 low dose	6,53	
		99,3 high dose	13,1	
	2	52,3 low dose	6,54	
		105 high dose	13,1	
	3	47,0 low dose	6,71	
		107 high dose	13,4	

Tatsächlich infundierte Midazolam-Mengen und –Infusionsraten

Proband Nr.	Periode	infundierte Menge (mg)	Infusionsrate (mg/h)
1	1	6,58	0,274
	2	6,25	0,26
	3	6,39	0,266
2	1	6,00	0,25
	2	6,71	0,28
	3	6,59	0,274
3	4	6,11	0,254
	1	6,00	0,25
	2	6,44	0,268
4	3	6,34	0,264
	4	7,11	0,296
	3	6,24	0,26
5	4	6,56	0,29
	1	6,47	0,27
	2	6,24	0,26
6	3	6,60	0,275
	3	6,46	0,269
	1	7,39	0,308
6	2	6,32	0,263
	3	5,51	0,23

**Appendix 4a** Modellentwicklung Midazolam und Metabolite

Run #	Analyt	Applikation	Modell	IIV	OFV	Problem
100	MDZ	h 0-8, i.v. (P)	MDZ 1-CMT	CL	-86,846	
101	MDZ	h 0-8, i.v. (P) + int. (P)	MDZ 1-CMT, Kinetik 1. Ordnung, $K_a$	CL	-162,162	nicht zu Ende gelaufen, da $K_a$ unheimlich groß ( $3E+10$ )
101b	MDZ	h 0-8, i.v. (P) + int. (P)	MDZ 1-CMT, Kinetik 1. Ordnung, $K_a$ fixiert,	CL, BIO	-162,277	
102	MDZ	h 0-8, i.v. (P) + int. (P)	MDZ 1-CMT, Kinetik 1. Ordnung, $K_a$ fixiert, "Umleitung"	CL, BIO	-156,614	
102b	MDZ	h 0-8, i.v. (P)	MDZ 2-CMT, Leber-/Enterozytenkomp.	$V_{p_{ss}}$ , $CL_{int,H}$	-170,514	IIV für beide Parameter über 100%
102c	MDZ	h 0-8, i.v. (P)	MDZ 1-CMT, Leber-/Enterozytenkomp.	$V_{p_{ss}}$ , $CL_{int,H}$	-158,642	IIV für beide Parameter über 100%
103	MDZ	h 0-8, i.v. (P) + int. (P)	MDZ 2-CMT, Kinetik 1. Ordnung, $K_a$ fixiert, "Umleitung"	CL, BIO	-164,326	IIV für CL 77%
104	MDZ	h 0-8, i.v. (P) + int. (P)	MDZ 1-CMT, Kinetik 1. Ordnung, $K_a$ fixiert, "Umleitung"	CL, BIO, V	-164,208	IIV für BIO 62,7%
106	MDZ	h 0-8, i.v. (P) + int. (P)	MDZ 2-CMT, Kinetik 1. Ordnung, $K_a$ fixiert, "Umleitung"	CL, BIO, V, QPER, VPER	-174,513	alles geht ins periphere Kompar- timent
111	MDZ, 1- OH-MDZ	h 0-8, i.v. (P) + int. (P)	MDZ 1-CMT, Kinetik 1. Ordnung, $K_a$ fixiert, "Umleitung", 1-OH-MDZ 1-CMT, FMET	CL, BIO	-321,29	
111b	MDZ, 1- OH-MDZ	h 0-8, i.v. (P) + int. (P)	s. Run 111, proportionales Restfehlermodell	CL, BIO	-4338,778	
111c	MDZ, 1- OH-MDZ	h 0-8, i.v. (P) + int. (P)	s. Run 111, kombiniertes Restfehlermodell	CL, BIO	-4410,474	
111k	MDZ, 1- OH-MDZ	h 0-8, i.v. (P) + int. (P)	s. Run 111	CL, BIO, FMET	-328.726	IIV für CL 112%, für BIO 71%, für FMET 77%
111l	MDZ, 1- OH-MDZ	h 0-8, i.v. (P) + int. (P)	s. Run 111	CL, BIO, $CL_{1-OH}$	-350.126	IIV für CL 131%, für BIO 73%
111m	MDZ, 1- OH-MDZ	h 0-8, i.v. (P) + int. (P)	s. Run 111	CL, BIO, FMET,	-350.124	kein Kovarianzschritt, gleicher



Run #	Analyt	Applikation	Modell	IIV	OFV	Problem
111n	OH-MDZ MDZ, 1- OH-MDZ	int. (P) h 0-8, i.v. (P) + int. (P)	s. Run 111	CL <sub>1-OH</sub> CL, BIO, CL <sub>1-OH</sub>	-372.294	OFV wie bei 111l alle IIV über 100%, peripheres Verteilungsvolumen von 1-OH- MDZ viel zu hoch, praktisch keine Elimination
112	MDZ, 1- OH-MDZ	h 0-8, i.v. (P) + int. (P)	Original-DV, MDZ 1-CMT, Kinetik 1. Ordnung, K <sub>a</sub> fixiert, "Umleitung", 1-CMT 1-OH-MDZ, FMET, kombiniertes Restfehlermodell	CL, BIO, CL <sub>1-OH</sub>	-4484.572	s. Run 111n
113	MDZ, 1- OH-MDZ	h 0-8, i.v. (P) + int. (P)	MDZ 1-CMT, Kinetik 1. Ordnung, K <sub>a</sub> fixiert, "Umleitung", 1-CMT 1-OH-MDZ, FMET, mit "Pseudoleber"	CL, BIO	-331.589	
113b	MDZ, 1- OH-MDZ	h 0-8, i.v. (P) + int. (P)	MDZ 1-CMT, Kinetik 1. Ordnung, K <sub>a</sub> fixiert, "Umleitung", 1-CMT 1-OH-MDZ, FMET, mit "Pseudoleber"	CL, BIO	-331.002	nach und nach wurden physiolo- gische Gegebenheiten eingebaut, um zu testen, wie sich der geschätzte Wert für FMET verän- dert: zunächst VD_LI (FMET = 22%) eingebaut, dann CYP3A4- Amount (FMET=20%), danach MDZ-BPR (FMET = 0.03%), zum Schluss BPR frei geschätzt (2.17) - -> FMET verändert sich durch Variation von BPR stark, ist also nicht identifizierbar
120	MDZ, 1- OH-MDZ, 4-OH- MDZ	h 0-8, i.v. (P) + int. (P)	MDZ 1-CMT, Kinetik 1. Ordnung, K <sub>a</sub> fixiert, "Umleitung", 1-CMT 1-OH-MDZ, 1-CMT 4-OH- MDZ, Einbau von Fraktionen: FG1OH, FG4OH geschätzt; FM1OH geschätzt, FM4OH=1- FM1OH; FMG1OH geschätzt, FMG4OH=1- FMG1OH	CL, BIO, CL1OH	-567.768	kein Kovarianzschritt

Run #	Analyt	Applikation	Modell	IIV	OFV	Problem
121	MDZ, 1-OH-MDZ, 4-OH-MDZ	h 0-8, i.v. (P) + int. (P)	MDZ 1-CMT, Kinetik 1. Ordnung, $K_a$ fixiert, "Umleitung", 1-CMT 1-OH-MDZ, 1-CMT 4-OH-MDZ, Einbau von Fraktionen: FG1OH, FG4OH geschätzt; FM1OH geschätzt, FM4OH=1-FM1OH, ohne FMG1OH	CL, BIO, CL1OH	-567.768	kein Kovarianzschritt
122	MDZ, 1-OH-MDZ, 4-OH-MDZ	h 0-8, i.v. (P) + int. (P)	MDZ 1-CMT, Kinetik 1. Ordnung, $K_a$ fixiert, "Umleitung", 1-CMT 1-OH-MDZ, 1-CMT 4-OH-MDZ, Einbau von Fraktionen: FG1OH geschätzt (FG1OH=FG4OH); FM1OH geschätzt (FM4OH=1-FM1OH), ohne FMG1OH; V4OH=V1OH	CL, BIO	-530.032	IIV für CL 73%, für BIO 63%
122a	MDZ, 1-OH-MDZ, 4-OH-MDZ	h 0-8, i.v. (P) + int. (P)	MDZ 1-CMT, Kinetik 1. Ordnung, $K_a$ fixiert, "Umleitung", 1-CMT 1-OH-MDZ, 1-CMT 4-OH-MDZ, eigenes Verteilungsvolumen für 4-OH-MDZ, alle Fraktionen geschätzt	CL, BIO, CL <sub>1-OH</sub>	-532.579	kein Kovarianzschritt, praktisch wie Run 120
122b	MDZ, 1-OH-MDZ, 4-OH-MDZ	h 0-8, i.v. (P) + int. (P)	MDZ 1-CMT, Kinetik 1. Ordnung, $K_a$ fixiert, "Umleitung", 1-CMT 1-OH-MDZ, 1-CMT 4-OH-MDZ, eigenes Verteilungsvolumen für 4-OH-MDZ, FM1OH=FM4OH, FG1OH=FG4OH	CL, BIO	-530.031	kein Kovarianzschritt
122c	MDZ, 1-OH-MDZ, 4-OH-MDZ	h 0-8, i.v. (P) + int. (P)	MDZ 1-CMT, Kinetik 1. Ordnung, $K_a$ fixiert, "Umleitung", 1-CMT 1-OH-MDZ, 1-CMT 4-OH-MDZ, eigenes Verteilungsvolumen für 4-OH-MDZ, FM1OH=FM4OH, FG1OH und FG4OH geschätzt	CL, BIO	-547.057	
122d	MDZ, 1-OH-MDZ, 4-OH-MDZ	h 0-8, i.v. (P) + int. (P)	MDZ 1-CMT, Kinetik 1. Ordnung, $K_a$ fixiert, "Umleitung", 1-CMT 1-OH-MDZ, 1-CMT 4-OH-MDZ, eigenes Verteilungsvolumen für 4-OH-MDZ, FM1OH und FM4OH geschätzt, FG1OH=FG4OH	CL, BIO	0	Verteilungsvolumen 4-OH-MDZ geht gegen 0, abgebrochen

Run #	Analyt	Applikation	Modell	IIV	OFV	Problem
200	MDZ, 1-OH-MDZ	h 0-8, i.v. (P) + int. (P), 1-OH-MDZ (U), 1-OH-MDZ-Gluc (U)	MDZ 1-CMT, Kinetik 1. Ordnung, $K_a$ fixiert, "Umleitung", 1-CMT 1-OH-MDZ, 1-OH-MDZ Urinkompartiment, 1-OH-MDZ zentrales Kompartiment + Urinkompartiment	CL, BIO	-329.736	
200a	MDZ, 1-OH-MDZ	h 0-8, i.v. (P) + int. (P), 1-OH-MDZ (U), 1-OH-MDZ-Gluc (U)	s. Run 200, zusätzliches Transitmodell, um Verzögerung im Übergang von 1-OH-MDZ-Gluc ins Urinkompartiment zu erreichen	CL, BIO	-338.735	kein Kovarianzschritt, Transitmodell funktioniert nicht
201	MDZ, 1-OH-MDZ	h 0-8, i.v. (P) + int. (P), 1-OH-MDZ (U), 1-OH-MDZ-Gluc (U)	s. Run 200 ohne zentrales 1-OH-MDZ-Gluc Kompartiment	CL, BIO	-314.109	
202	MDZ, 1-OH-MDZ	h 0-8, i.v. (P) + int. (P), 1-OH-MDZ (U), 1-OH-MDZ-Gluc (U)	s. Run 201, ohne FPG1OH	CL, BIO	-220	IIV bei CL 227%, bei BIO 72%
210	MDZ, 1-OH-MDZ	h 0-8, i.v. (P) + int. (P), MDZ-Gluc (U), 1-OH-MDZ (U), 1-OH-MDZ-Gluc (U)	MDZ 1-CMT, Kinetik 1. Ordnung, $K_a$ fixiert, "Umleitung", MDZ-Gluc-Kompartiment zentral und Urin, 1-CMT 1-OH-MDZ, 1-OH-MDZ Urinkompartiment, 1-OH-MDZ-Gluc Urinkompartiment	CL, BIO	-313.813	RE von $K_{m,G}$ 1013%, nicht identifizierbar
211	MDZ, 1-OH-MDZ	h 0-8, i.v. (P) + int. (P), 1-OH-MDZ (U), 1-OH-MDZ-Gluc (U)	MDZ 1-CMT, Kinetik 1. Ordnung, $K_a$ fixiert, "Umleitung", nur MDZ-Gluc-Kompartiment Urin, 1-CMT 1-OH-MDZ, 1-OH-MDZ Urinkompartiment, 1-OH-MDZ-Gluc Urinkompartiment, kein zentrales 1-OH-MDZ-Gluc Kompartiment	CL, BIO	-313.813	zentrales MDZ-Gluc-Kompartiment bringt keine Verbesserung des Modells, $K_{m,G}$ aus Run 210 war sowieso nicht identifizierbar
220	MDZ, 1-OH-MDZ	h 0-8, i.v. (P) + int. (P), 1-OH-	MDZ 1-CMT, Kinetik 1. Ordnung, $K_a$ fixiert, "Umleitung", nur MDZ-Gluc-Kompartiment	CL, BIO		abgebrochen, FM1OH läuft gegen 1, V1OH gegen 0, Schwierig

Run #	Analyt	Applikation	Modell	IIV	OFV	Problem
	4-OH-MDZ	MDZ (U), 1-OH-MDZ-Gluc (U)	Urin, 1-CMT 1-OH-MDZ, 1-OH-MDZ Urinkompartiment, 1-OH-MDZ-Gluc Urinkompartiment, kein zentrales 1-OH-MDZ-Gluc Kompartiment, 4-OH-MDZ eingebaut (V4OH=V1OH)			keit der Implementierung von 4-OH-MDZ in das Modell, das Urinkonzentrationen enthält, da für 4-OH-MDZ keine Werte oberhalb der LLOQ ermittelt werden konnten
300	MDZ, 1-OH-MDZ	h 0-8, i.v. (P) + int. (P) , 1-OH-MDZ (U), 1-OH-MDZ-Gluc (U)	PBPK in run 211 eingebaut, ohne zentrales MDZ-Gluc-Kompartiment, CLR für 1-OH-MDZ-Gluc, Unterscheidung zwischen CLGG und CLLG (Clearance der Glucuronide in Darmwand und Leber)	CL <sub>CypG</sub> , CL <sub>CypL</sub>	-342.704	kein Kovarianzschritt, K1OHG im Vergleich zu vorherigen Runs viel kleiner, viel zu hoher Wert für M_CLG,
301	MDZ, 1-OH-MDZ	h 0-8, i.v. (P) + int. (P) , 1-OH-MDZ (U), 1-OH-MDZ-Gluc (U)	PBPK in run 211 eingebaut, ohne zentrales MDZ-Gluc-Kompartiment, ohne CLR für 1-OH-MDZ-Gluc, Unterscheidung zwischen CLGG und CLLG (Clearance der Glucuronide in Darmwand und Leber)	CL <sub>CypG</sub> , CL <sub>CypL</sub>	-333.0.8	kein Kovarianzschritt
302	MDZ, 1-OH-MDZ	h 0-8, i.v. (P) + int. (P) , 1-OH-MDZ (U), 1-OH-MDZ-Gluc (U)	PBPK in run 211 eingebaut, ohne zentrales MDZ-Gluc-Kompartiment, ohne CLR für 1-OH-MDZ-Gluc, Unterscheidung zwischen CLGG und CLLG (Clearance der Glucuronide in Darmwand und Leber), renale Glucuronidierung von 1OH geht zunächst zentral	CL <sub>CypG</sub> , CL <sub>CypL</sub>		kein Kovarianzschritt
310	MDZ, 1-OH-MDZ	h 0-8, i.v. (P) + int. (P) , 1-OH-MDZ (U), 1-OH-MDZ-Gluc (U)	PBPK in run 211 eingebaut	CL <sub>CypG</sub> , CL <sub>CypL</sub>	-327.914	
311	MDZ, 1-OH-MDZ	h 0-8, i.v. (P) + int. (P) , 1-OH-MDZ (U), 1-OH-	PBPK in run 211 eingebaut, kein MCLG (keine Glucuronidierung von 1-OH-MDZ im Darm)	CL <sub>CypG</sub> , CL <sub>CypL</sub>		

Run #	Analyt	Applikation	Modell	IIV	OFV	Problem
312	MDZ, 1-OH-MDZ	h 0-8, i.v. (P) + int. (P), 1-OH-MDZ (U), 1-OH-MDZ-Gluc (U)	PBPK-Modell mit Enterozytenkompartiment für 1-OH-MDZ	$CL_{CypG}, CL_{CypL}$		M_CLG immer noch sehr hoch → alles in der Darmwand aus MDZ gebildete 1-OH-MDZ wird direkt glucuronidiert und nicht aufgenommen; im Plasma gemessenes 1-OH-MDZ entsteht ausschließlich in der Leber aus MDZ
313	MDZ, 1-OH-MDZ	h 0-8, i.v. (P) + int. (P), 1-OH-MDZ (U), 1-OH-MDZ-Gluc (U)	PBPK-Modell, FG1OH direkt schätzen	$CL_{CypG}, CL_{CypL}, M\_CLG$		
314	MDZ, 1-OH-MDZ	h 0-8, i.v. (P) + int. (P), 1-OH-MDZ (U), 1-OH-MDZ-Gluc (U)	PBPK-Modell, M_BPR=1.17	$CL_{CypG}, CL_{CypL}, M\_CLG$		
314b	MDZ, 1-OH-MDZ	h 0-8, i.v. (P) + int. (P), 1-OH-MDZ (U), 1-OH-MDZ-Gluc (U)	PBPK-Modell, M_BPR=1.17, mit $Q_{gut}$ statt $Q_{vil}$ für MDZ			
315	MDZ, 1-OH-MDZ	h 0-8, i.v. (P) + int. (P), 1-OH-MDZ (U), 1-OH-MDZ-Gluc (U)	PBPK-Modell, M_BPR=1.24			

**MDZ** Midazolam, **1-OH-MDZ** 1'-OH-Midazolam, **4-OH-MDZ** 4-OH-Midazolam, **MDZ-Gluc** Midazolam-N-glucuronid, **1-OH-MDZ-Gluc** 1'-OH-Midazolam-β-D-glucuronid, **BIO** Bioverfügbarkeit Midazolam, **BPR** Blut-Plasma-Verteilungskoeffizient Midazolam, **CL** Clearance, **CL<sub>Cyp,G</sub>** Midazolam-Clearance durch CYP in der Darmwand, **CL<sub>Cyp,L</sub>** Midazolam-Clearance durch CYP in der Leber, **CL<sub>UGT</sub>** Midazolam-Clearance durch UGT in der Darmwand, **CL<sub>int,H</sub>** intrinsische hepatische Clearance Midazolam, **CL<sub>LG</sub>** Midazolam-Clearance durch UGT in der Leber, **CL<sub>1-OH</sub>** 1'-OH-Midazolam-Clearance, **CL<sub>PER</sub>** Clearance des peripheren Midazolam-Kompartiments, **CLR** renale Midazolam-Clearance, **CMT** Kompartiment, **FM1OH/FM4OH** Fraktion an 1'-OH-Midazolam/4-OH-Midazolam, die der Metabolisierung entgeht, **FG1OH/FG4OH** Fraktion an 1'-OH-Midazolam/4-OH-Midazolam, der aus dem Darm verfügbar wird, **FMG1OH/FMG4OH** Fraktion an 1'-OH-Midazolam/4-OH-Midazolam, die metabolisiert wird, **IIV** interindividuelle Variabilität, **int.** intestinal, **i.v.** intravenös, **K<sub>a</sub>** Resorptionskonstante Midazolam, **K<sub>m,G</sub>** Michaelis-Menten-Konstante Darmwand, **K1OHG** Geschwindigkeitskonstante des Übergangs von 1'-OH-Midazolam-β-D-glucuronid aus dessen zentralem in das Urinkompartiment, **M\_BPR** Blut-Plasma-Verteilungskoeffizient 1'-OH-Midazolam, **M\_CLG** 1'-OH-Midazolam-Clearance aus der Darmwand/durch UGT, **OFV** Objective function value, **P** Plasma, **Q<sub>PER</sub>** periphere Midazolam-Clearance, **Q<sub>gut</sub>** Blutfluss Darmwand, **Q<sub>vil</sub>** villöser Blutfluss, **RE** Restfehler, **U** Urin, **V** Verteilungsvolumen Midazolam, **V1OH/V4OH** Verteilungsvolumen 1'-OH-Midazolam/4-OH-Midazolam, **VD-LI** Lebervolumen, **V<sub>PER</sub>** peripheres Verteilungsvolumen Midazolam, **V<sub>ps</sub>** peripheres Verteilungsvolumen Midazolam im Steady-State

**Appendix 4b** Modellentwicklung Voriconazol empirisch

Run #	Analyte	Applikation	Modell	IIV	OFV
1	VRC	i.v. (P)	VRC 1-CMT Elimination Kinetik 1. Ordnung	V, CL	-233,003
1b	VRC	i.v. (P)	VRC 1-CMT, nichtlineare Elimination (MM)	V, $V_{max_{ax}}$ , $K_m$	-231,366
2	VRC	i.v. (P)	VRC 2-CMT Elimination Kinetik 1. Ordnung	V, CL	-311,491
3	VRC	i.v. (P)	VRC 2-CMT Elimination Kinetik 1. Ordnung	V, V2, CL, Q	-302,105
4	VRC	i.v. (P)	VRC 2-CMT, nichtlineare Elimination (MM)	V, $V_{max_{ax}}$	-292,733
21	VRC	i.v. (P) + int. (P)	VRC 2-CMT, nichtlineare Elimination (MM)	V, $V_{max_{ax}}$	-279,392
22	VRC	i.v. (P) + int. (P)	VRC 2-CMT, nichtlineare Elimination (MM)	$V_{max_{ax}}$ , $K_a$ , BIO	-532,768
5b	VRC, VRC-NO	i.v. (P)	VRC 2-CMT Elimination Kinetik 1. Ordnung, VRC-NO 1-CMT (ohne ID4)	V, CL	-591,711
7b	VRC, VRC-NO	i.v. (P)	VRC 2-CMT nichtlineare Elimination (MM), VRC-NO 1-CMT (ohne ID4)	$V_{max_{ax}}$ , N_CL	-628,009
7c	VRC, VRC-NO	i.v. (P)	VRC 2-CMT nichtlineare Elimination (MM), VRC-NO 1-CMT (ohne ID4)	$V_{max_{ax}}$ , N_CL korreliert	-629,227
7d	VRC, VRC-NO	i.v. (P)	VRC 2-CMT nichtlineare Elimination (MM), VRC-NO 1-CMT (ohne ID4)	$V_{max_{ax}}$	-569,173
9	VRC, VRC-NO	i.v. (P)	VRC 2-CMT nichtlineare Elimination (MM), VRC-NO 1-CMT nichtlineare Elimination (MM) (ohne ID4)	V, $V_{max_{ax}}$ , N_CL	-623,37
10	VRC, VRC-NO	i.v. (P)	VRC 2-CMT Elimination MM + Kinetik 1. Ordnung, VRC-NO 1-CMT (ohne ID4)	CL2	-376,011
11	VRC, VRC-NO	i.v. (P)	VRC 2-CMT Elimination MM + Kinetik 1. Ordnung, VRC-NO 1-CMT (ohne ID4)	N_CL	-628,068

**VRC** Voriconazol, **VRC-NO** Voriconazol-N-oxid, **BIO** Bioverfügbarkeit, **CMT** Kompartiment, **CL** Clearance, **CL2** periphere Clearance, **int.** intestinal, **i.v.** intravenös, **Ka** Resorptionskonstante, **K<sub>m</sub>** Michaelis-Menten-Konstante, **MM** Michaelis-Menten-Kinetik, **N\_CL** Clearance Voriconazol-N-oxid, **P** Plasmakonzentration, **Q** periphere Clearance, **V** Verteilungsvolumen, **V2** peripheres Verteilungsvolumen, **V<sub>max<sub>ax</sub></sub>** maximale Umsatzgeschwindigkeit

#### Appendix 4c Modellentwicklung Voriconazol PBPK

Run #	Analyte	Applikation	Modell	IIV	OFV
1	VRC	i.v. (P)	VRC 2-CMT + Leberkompartiment (PBPK)	CL, $V_{ss}$	-336,36
2	VRC	i.v. (P)	VRC 1-CMT + Leberkompartiment (PBPK)	CL, $V_{ss}$	-250,851
3	VRC	i.v. (P)	VRC 2-CMT + Leberkompartiment (PBPK), nichtlineare Elimination (MM)	$V_{ss}$ , $V_{max}$ , $K_m$	-364,693
4	VRC	i.v. (P)	VRC 2-CMT + Leberkompartiment (PBPK), Elimination 1. Ordnung	$V_{ss}$ , $V_{max}$ , $K_m$	-349,741
5	VRC	i.v. (P) + int. (P)	VRC 2-CMT + Leberkompartiment (PBPK), Resorption folgt Kinetik 1. Ordnung ( $K_a$ ), nichtlineare Elimination (MM)	$V_{ss}$ , $V_{max}$ , $K_m$	-676,617
14	VRC	i.v. (P) + int. (P)	Daten nicht log-transformiert, VRC 2-CMT + Leberkompartiment (PBPK), Resorption folgt Kinetik 1. Ordnung ( $K_a$ ), nichtlineare Elimination (MM), BPR=1,23, KLI=1,22, $K_m$ und $V_{max}$ jeweils für Darmwand und Leber geschätzt	$V_{max}$	-1955,263
14b	VRC	i.v. (P) + int. (P)	s. Run 14	$V_{max}$ , $K_{m,G}$	-2040,446
14d	VRC	i.v. (P) + int. (P)	s. Run 14	$V_{max}$ , $V_{max,G}$	-2056,804
15	VRC	i.v. (P) + int. (P)	s. Run 14	$V_{max}$	-1901,451
17	VRC	i.v. (P) + int. (P)	s. Run 14, $K_{m,G} = K_m$	$V_{max}$ , $V_{max,G}$ korreliert	-2061,695
20	VRC, VRC-NO	i.v. (P) + int. (P)	Werte aus Run 17 fixiert; 1-CMT VRC-NO (ohne PBPK), FRAC = Fraktion, die im Darm aus der VRC-Dosis direkt zu VRC-NO metabolisiert wird		-2815,426
21	VRC, VRC-NO	i.v. (P) + int. (P)	Werte aus Run 17 fixiert; 1-CMT VRC-NO (ohne PBPK), FRAC = Fraktion, die im Darm aus der VRC-Dosis direkt zu VRC-NO metabolisiert wird	N_CL	-3025,491
22	VRC, VRC-NO	i.v. (P) + int. (P)	s. Run 21, alle Werte geschätzt	$V_{max}$ , $V_{max,G}$ korreliert, N_CL	-3059,92

VRC Voriconazol, VRC-NO Voriconazol-N-oxid, BPR Blut-Plasma-Verteilungskoeffizient, CMT Kompartiment, CL Clearance, int. intestinal, i.v. intravenös,  $K_a$  Resorptionskonstante, KLI Plasma-Leber-Verteilungskoeffizient,  $K_m$  Michaelis-Menten-Konstante Leber,  $K_{m,G}$  Michaelis-Menten-Konstante Darmwand, MM Michaelis-Menten-Kinetik, N\_CL Clearance Voriconazol-N-oxid, P Plasmakonzentration,  $V_{ss}$  Verteilungsvolumen im Steady-State,  $V_{max}$  maximale Umsatzgeschwindigkeit der hepatischen Enzyme,  $V_{max,G}$  maximale Umsatzgeschwindigkeit der Enzyme in der Darmwand

**Appendix 4d** Modelltestung Voriconazol 3 Studien PBPK

Run #	Analyte	Applikation	Modell	IIV	OFV	Problem
1	VRC	i.v. (P), int. (P), oral (P)	Daten nicht log-transformiert, 3 Studien, 2-CMT, jeweils eine sättigbare Clearance in Darmwand und Leber, ein $K_m$ für beide Expressionsorte, $K_{a1}$ für Resorption in VoriMida-Studie (Studie 0), $K_{a2}$ für Resorption in Saari-Studie (1) und Katzenmaier-Studie (2)	$V_{max} + V_{max,G}$ korreliert	-1949,741	Da bei der VoriMida-Studie direkt in den Darm appliziert wurde, sollte der erhaltene $K_{a1}$ viel höher sein als $K_{a2}$ , der für die Resorption von VRC in den anderen beiden Studien ermittelt wurde, bei denen VRC oral gegeben wurde, bei der es also eine zeitliche Verzögerung bis zur Resorption gibt; das erhaltene Ergebnis ist jedoch genau umgekehrt; IIV $V_{max,G}$ 289,7% nicht konvergiert, schlechte IPREDS
1b	VRC	oral (P)	Daten nicht log-transformiert, 2 Studien (Studie 1 + 2), 2-CMT, $V_{max}$ jeweils für Darmwand und Leber geschätzt, ein $K_m$ für beide Expressionsorte, $K_{a2}$	$V_{max} + V_{max,G}$ korreliert	3,099	nicht konvergiert, Problem s. Run 1
2	VRC	i.v. (P), int. (P), oral (P)	s. Run 1, BPR=1,23, KLI=1,22 (vorher KLI=1), $V_{max}$ jeweils für Darmwand und Leber geschätzt, $K_{m,G} = K_m$	$V_{max} + V_{max,G}$ korreliert	-1966,682	nicht konvergiert, Problem s. Run 1
3	VRC	oral (P)	s. Run 1b, VRC 1-CMT, $K_{m,G} = K_m$	$V_{max} + V_{max,G}$ korreliert, $CL_{co,L}$	43,963	nicht konvergiert
4	VRC	i.v. (P), int. (P), oral (P)	Daten nicht log-transformiert, 3 Studien, 2-CMT, jeweils eine sättigbare und eine konstante Clearance in Darmwand und Leber, $K_{m,G} = K_m$ , $K_{a1}$ für Resorption in Studie 0, $K_{a2}$ für Resorption in Studie 1 und 2	$V_{max} + V_{max,G}$ korreliert, $CL_{co,L}$ , $CL_{co,G}$	-1970,371	nicht konvergiert, IIV $CL_{co,G}$ 3000 %
5	VRC	i.v. (P), int. (P), oral (P)	Daten nicht log-transformiert, 3 Studien, 2-CMT, sättigbare Clearance in Darmwand, 1 sättigbare und 1 konstante Clearance in der Leber, $K_{m,G} = K_m$ zusammen, $K_{a1}$ für Resorption	$V_{max} + V_{max,G}$ korreliert, $CL_{co,L}$	-1958,383	s. Run 1



Run #	Analyte	Applikation	Modell	IIV	OFV	Problem
6	VRC	i.v. (P), int. (P), oral (P)	in Studie 0, $K_{a2}$ für Resorption in Studie 1 und 2 Daten nicht log-transformiert, 3 Studien, 2-CMT, eine sättigbare Clearance in Darmwand, 2 sättigbare Clearances in der Leber, jeweils ein $K_m$ für Darmwand und Leber, $K_{a1}$ für Resorption in Studie 0, $K_{a2}$ für Resorption in Studie 1 und 2	$V_{max} + V_{max,G}$ korreliert	-1958,079	s. Run 1
100	VRC	i.v. (P), int. (P), oral (P)	Daten nicht log-transformiert, 3 Studien, 2-CMT, jeweils eine sättigbare Clearance in Darmwand und Leber, $K_{m,G} = K_m$ , $K_{a1}$ für Resorption in Studie 0, $K_{a2}$ für Resorption in Studie 1 und 2, Darmclearance nur bei Studie 0 aktiv	$V_{max} + V_{max,G}$ korreliert, $V_{max,G}$ nur bei Studie 0 aktiv	-1927,652	s. Run 1
101	VRC	i.v. (P), int. (P), oral (P)	s. Run 100, ohne Darmwandmetabolismus für Studie 1 und 2	$V_{max} + V_{max,G}$ korreliert, $V_{max,G}$ nur bei Studie 0 aktiv	-1934,592	s. Run 1
102	VRC	i.v. (P), int. (P), oral (P)	s. Run 101, separate $K_m$ für Leber und Darmwand	$V_{max} + V_{max,G}$ korreliert, $V_{max,G}$ nur bei Studie 0 aktiv	-1939,897	s. Run 1
103	VRC	i.v. (P), int. (P), oral (P)	s. Run 101, mit sättigbarer peripherer CL	$V_{max} + V_{max,G}$ korreliert, $V_{max,G}$ nur bei Studie 0 aktiv	-1955,526	s. Run 1
104	VRC	i.v. (P), int. (P), oral (P)	s. Run 101, zwei Verteilungsvolumen für das periphere VRC-CMT (eines für Studie 0, das andere für Studie 1+2)	$V_{max} + V_{max,G}$ korreliert, $V_{max,G}$ nur bei Studie 0 aktiv	-1943,731	s. Run 1

Run #	Analyte	Applikation	Modell	IIV	OFV	Problem
1000	VRC, VRC-NO	i.v. (P), (P), oral (P)	int. Daten nicht log-transformiert, 3 Studien, VRC 2-CMT, jeweils eine sättigbare Clearance in Darmwand und Leber, $K_{m,G} = K_m$ , $K_{a1}$ für Resorption in Studie 0, $K_{a2}$ für Resorption in Studie 1 und 2, Hemmung des VRC-Metabolismus durch VRC-NO in der Leber (N_KLI)	$V_{max} + V_{max,G}$ korreliert	c	s. Run 1
1001	VRC, VRC-NO	i.v. (P), (P), oral (P)	int. s. Run 1000, Hemmung durch VRC-NO in der Leber und im Darm (N_KIL=N_KIG)	$V_{max} + V_{max,G}$ korreliert	c	s. Run 1
1002	VRC, VRC-NO	i.v. (P), (P), oral (P)	int. s. Run 1000, Hemmung durch VRC-NO in der Leber und im Darm, eigene $K_i$ -Werte für Darmwand und Leber geschätzt	$V_{max} + V_{max,G}$ korreliert	c	s. Run 1

**VRC** Voriconazol, **VRC-NO** Voriconazol-N-oxid, **BPR** Blut-Plasma-Verteilungskoeffizient, **CMT** Kompartiment, **CL** Clearance, **CL<sub>co,L</sub>** konstante Voriconazol-Clearance in der Leber, **CL<sub>co,G</sub>** konstante Voriconazol-Clearance in der Darmwand, **int.** intestinal, **i.v.** intravenös, **K<sub>a</sub>** Resorptionskonstante, **KLI** Plasma-Leber-Verteilungskoeffizient, **K<sub>m</sub>** Michaelis-Menten-Konstante Leber, **K<sub>m,G</sub>** Michaelis-Menten-Konstante Darmwand, **N\_KIG** Inhibitionskonstante Voriconazol-N-oxid in der Darmwand, **N\_KIL** Inhibitionskonstante Voriconazol-N-oxid in der Leber, **P** Plasmakonzentration, **V<sub>max</sub>** maximale Umsatzgeschwindigkeit der hepatischen Enzyme, **V<sub>max,G</sub>** maximale Umsatzgeschwindigkeit der Enzyme in der Darmwand

#### Appendix 4e Modellentwicklung Voriconazol-Midazolam-Interaktion

Run #	Analyte	Applikation	Modell	IIV	OFV
400	MDZ, 1-OH-MDZ, VRC	i.v./int.	CYP-Inhibition durch VRC (Hemmung auf CLGC, CLLC)	Clint L (0.00154), Clint G (0.728)	-1954,46
401	MDZ, 1-OH-MDZ, VRC	i.v./int.	Inhibition auf CYP, UGT und renale Clearance	Clint L (0.00079), Clint G (0.824)	-1988,542
402	MDZ, 1-OH-MDZ, VRC	i.v./int.	Inhibition auf CYP, UGT und renale Clearance, FG1OH=1 (keine Glucuronidierung von 1-OH-MDZ im Darm)	Clint L (0.00936), Clint G (0.272)	-1398,981
403	MDZ, 1-OH-MDZ, VRC	i.v./int.	Inhibition auf CYP, UGT und renale Clearance, $K_a$ VRC auf hohen Wert fixiert	Clint L (0.00047), Clint G (0.837)	-1916,507
404	MDZ, 1-OH-MDZ, VRC	i.v./int.	s. Run 400, $K_a$ VRC auf hohen Wert fixiert	Clint L (0.00149), Clint G (0.717)	-1874,264

**MDZ** Midazolam, **1-OH-MDZ** 1'-OH-Midazolam, **VRC** Voriconazol, **CLGC** Midazolam-Clearance durch CYP in der Darmwand, **CLLC** Midazolam-Clearance durch CYP in der Leber, **FG1OH** 1'-OH-Midazolam-Anteil, der nicht in der Darmwand glucuronidiert wird, **Clint G** intrinsische Clearance in der Darmwand, **Clint L** intrinsische Clearance in der Leber, **Clint G** intrinsische Clearance in der Darmwand, **int.** intestinal, i.v. intravenös,  $K_a$  Resorptionskonstante

## Appendix 5

### NONMEM Codes

#### Appendix 5a *Pharmakokinetisches Modell der Daten von Saari et. al*

```
;; 2. Description: VORIMIDA LOG Metabolite 3-CMT: KIC, MET indi-  
rekt(L,G), MB
```

```
$SIZES          PD=100 PDT=100 MAXFCN=10000000 LNP4=8000 LVR=60
```

```
$PROB VORIMIDA LOG Midazolam/Voriconazole
```

```
$INPUT ID PHAS PER ORIGTIME TAFD VORI AMT RATE PLASMA CMT MDV EVID  
AGE WGHT HGHT PLUS L2=DROP DSGR RTME EVID2=DROP MDV2=DROP LGCP HCT  
BLOOD DV TIME NMTIME STR1 STR2
```

```
; DV is LGBLOOD
```

```
$DATA vorimida_data.csv IGNORE=# WIDE ;
```

```
VoriMida.FULL.DSGR.LOG.BLOOD.VCP.csv
```

```
;IGNORE=(CMT.EQ.3)
```

```
;-----
```

```
;UNITS          |
```

```
; Time - hours  |
```

```
; Dose - mcg    |
```

```
; Cp - ng/ml = mcg/L |
```

```
; Clearances - L/hour |
```

```
; Volumes - L      |
```

```
;-----
```

```
$SUBROUTINE ADVAN6 TOL=6 ; Set up differential equation mode
```

```
$MODEL
```

```
COMP (VOPORTAL) ; 1 VRC Portalvene
```

```
COMP (CENTRAL) ; 2 MDZ zentral
```

```
COMP (METAB) ; 3 1-OH-MDZ zentral
```

```
COMP (VORIDEP) ; 4 VRC Darmwand
```

```
COMP (VORICEN) ; 5 VRC zentral
```

```
COMP (VORILIV) ; 6 VRC Leber
```

```
COMP (LIVER) ; 7 MDZ Leber
```

```
COMP (GUTWALL) ; 8 MDZ Darmwand
```

```
COMP (VORIGW) ; 9 VRC Darmwand
```

```
COMP(PORTAL)      ;      10 MDZ Portalvene
COMP(PERI2)       ;      11 MDZ peripher 2
COMP(PERIPHER)    ;      12 MDZ peripher
COMP(METPORT)     ;      13 1-OH-MDZ Portalvene
COMP(METLIV)      ;      14 1-OH-MDZ Leber
COMP(METGW)       ;      15 1-OH-MDZ Darmwand
COMP(CYPLIV)      ;      16 Enzyme Site Leber
COMP(CYPGUT)      ;      17 Enzyme Site Darmwand
```

```
$PK
```

```
; MU Model
```

```
MU_1 = THETA(1) ; CLINT0 intrinsische ungebundene hepatische CL MDZ
MU_2 = THETA(2) ; CLINTG0 intrinsische ungebundene Darmwand-CL MDZ
MU_3 = THETA(3) ; CLPER periphere Verteilungsclearance MDZ
MU_4 = THETA(4) ; CLPER2 periphere Verteilungsclearance 2 MDZ
MU_5 = THETA(5) ; VCEN zentrales Verteilungsvolumen MDZ
MU_6 = THETA(6) ; VPER peripheres Verteilungsvolumen MDZ
MU_7 = THETA(7) ; VPER2 peripheres Verteilungsvolumen 2 MDZ
MU_8 = THETA(8) ; MAT mittlere Resorptionszeit
MU_9 = THETA(9) ; CV
MU_10 = THETA(10) ; CLMETH0 intrinsische ungebundene hepatische CL 1-
OH-MDZ
MU_11 = THETA(11) ; CLMETG0 intrinsische ungebundene Darmwand-CL 1-OH-
MDZ
MU_12 = THETA(12) ; VMET zentrales Verteilungsvolumen 1-OH-MDZ
MU_13 = THETA(13) ; VOCLINT intrinsische ungebundene CL VRC
MU_14 = THETA(14) ; V5 zentrales Verteilungsvolumen VRC
MU_15 = THETA(15) ; VOKA Resorptionskonstante VRC
MU_16 = THETA(16) ; KI Inhibitionskonstante für MDZ
MU_17 = THETA(17) ; KIMET Inhibitionskonstante für 1-OH-MDZ
MU_18 = THETA(18) ; KIC Transferrate zu Enzyme Site
```

```
; Definition Kovariaten
```

```
WGHTCL = (WGHT/76)**(0.75); Einfluss Körpergewicht auf CL
```

```
WGHTVOL = (WGHT/76); Einfluss Körpergewicht auf V
```

```
; Basis-Parameter für IOV
```

```
PER1=0
```

```
PER2=0
```

```

PER3=0
PER4=0
IF (PER.EQ.1) PER1=1
IF (PER.EQ.2) PER2=1
IF (PER.EQ.3) PER3=1
IF (PER.EQ.4) PER4=1

; Berechnung Time After Dose and Time of Dose für orale Dosen
; Make sure values are 0 for each subject and with the beginning of
each period
IF (NEWIND.LE.1.OR.EVID.EQ.3) THEN
DOSE=0
TDOS=0
VODOSE=0
VOTDOS=0
ENDIF
;Remember dose and time of dose
IF (AMT.GT.0.AND.CMT.EQ.1) THEN
DOSE=AMT
TDOS=TIME
ENDIF
IF (AMT.GT.0.AND.CMT.EQ.4) THEN
VODOSE=AMT
VOTDOS=TIME
ENDIF
;Time after dose for every record
;TAD=TIME-TDOS
;VOTAD=TIME-VOTDOSE

; physiologische Basis-Parameter
QH = 3.75*WGHT**0.75 ; hepatischer Blutfluss (Chien et al . 2006,
Brown et al. 1997)
QPV = 0.75*QH ; Blutfluss Portalvene
QHA = 0.25*QH ; Blutfluss Leberarterie
QINTEST = QH*0.1/0.25 ; Blutfluss Darmwand (Williams et Leggett, Clin
Phys Physiol Meas. 1989)
QG = 0.8*0.6*QINTEST ; villöser Blutfluss Mucosal gut flow QVILI
(Yang et al., Curr Drug Metab 2007)

```

FU = 0.02 ; ungebundene MDZ-Fraktion im Plasma in Gesunden  
 (Ito et al. 2003, Lown et al. 1995: 0.022, Thummel et al. 1996: 0.02,  
 Trouvin et al. 1988: 0.019)

RATIO = 0.66 ; MDZ BPR (Ito et al. 2003, Gorski et al. 1996)

FUB = FU/RATIO ; ungebundene Blutfraktion MDZ ist 0.033

FUG = 1 ; ungebundene Fraktion in der Darmwand (Annahme  
 = 1, Yang et al., Curr Drug Metab 2007)

VOFU = 0.42 ; ungebundene VRC-Fraktion im Plas-  
 ma (Theuretzbacher et al. 2006)

VORATIO = 1 ; Annahme = 1

FM = 0.9 ; über CYP3A4 metabolisierte VRC-Fraktion

VH = 1 ; 2.8 ; Volumen leber (Ito et al., Drug Metab and Disp  
 2003, Zhang et al., Drug Metab and Disp. 2009)

VGW = 1 ; 0.25 ; Volumen Darmwand (Ito et al., Drug Metab and  
 Disp 2003, Zhang et al., Drug Metab and Disp. 2009)

VPV = 1 ; 0.07 ; Volumen Portalvene (Ito et al., Drug Metab and  
 Disp 2003, Zhang et al., Drug Metab and Disp. 2009)

; MDZ PK-Modell

D2 = 0.0333333 ; Infusionsdauer (2 Minuten)

CLINT0 = EXP(MU\_1 + ETA(1)) ; intrinsische ungebundene hepatische CL  
 MDZ

CLINTG0 = EXP(MU\_2 + ETA(2)) ; intrinsische ungebundene Darmwand-CL  
 MDZ

CLPER = EXP(MU\_3 + ETA(3)) \*WGHTCL ; periphere Verteilungsclearance  
 MDZ

CLPER2 = EXP(MU\_4 + ETA(4)) ; periphere Verteilungsclearance 2 MDZ

VCEN = EXP(MU\_5 + ETA(5)) ; zentrales Verteilungsvolumen MDZ

VPER = EXP(MU\_6 + ETA(6)) \*WGHTVOL ; peripheres Verteilungsvolumen  
 MDZ

VPER2 = EXP(MU\_7 + ETA(7)) ; \*WGHTVOL ; peripheres Verteilungsvolumen  
 2 MDZ

MAT = EXP(MU\_8 + ETA(8)) \*EXP(PER3\*ETA(19)+PER4\*ETA(20)) ; Mittlere  
 Resorptionszeit

CV = EXP(MU\_9 + ETA(9)) ; CV

F1 = 0

```

KCP = CLPER/VCEN
KPC = CLPER/VPER
KCP2 = CLPER2/VCEN
KP2C = CLPER2/VPER2

; 1-OH-MDZ-Modell
CLMETH0 = EXP(MU_10 + ETA(10)) *WGHTCL ; intrinsische ungebundene he-
patische Clearance 1-OH-MDZ
CLMETG0 = EXP(MU_11 + ETA(11)) *WGHTCL ; intrinsische ungebundene
Darmwand-Clearance 1-OH-MDZ
VMET = EXP(MU_12 + ETA(12)) *WGHTVOL ; zentrales Verteilungsvolumen 1-
OH-MDZ

; VRC-Modell
VOCLINT = EXP(MU_13 + ETA(13)) *WGHTCL ; intrinsische ungebundene he-
patische Clearance VRC
V5 = EXP(MU_14 + ETA(14)) *WGHTVOL ; zentrales Verteilungsvolumen VRC
VOKA = EXP(MU_15 + ETA(15)) ; Resorptionskonstante VRC

; DDI Model
KI = EXP(MU_16 + ETA(16)) ; KI/IC50 in der Leber für MDZ
KIMET = EXP(MU_17 + ETA(17)) ; KI/IC50 in der Leber für 1-OH-MDZ
KIC = EXP(MU_18 + ETA(18)) ; Transferrate zu Enzyme Site

$DES
IF (DOSE.GT.0) THEN
TAD=T-TDOS
ELSE
TAD=0
ENDIF
IF (VODOSE.GT.0) THEN
VOTAD=T-VOTDOS
ELSE
VOTAD=0
ENDIF

I = 0
IF (TAD.GT.0) THEN

```



```
FA1= MAT/(6.28*TAD*TAD*TAD*CV*CV)
FA2= FA1**0.5
FA3= (MAT-TAD)*(MAT-TAD)/(2*CV*CV*MAT*TAD)
I = DOSE*FA2*EXP(-FA3)
ENDIF
```

```
CONVOLIV = VOFU*A(6)/VH
CONVOGUT = A(9)/VGW
```

```
; MDZ: kompetitive Inhibition in der Leber
INHNB = 1+A(16)/KI
CLINT = CLINT0*1/INHNB
; Well-stirred Leber-Modell MDZ
EH = FUB*CLINT/(QH+FUB*CLINT)
FH = 1-EH
CLH = QH*FUB*CLINT/(QH+FUB*CLINT)
```

```
; MDZ: kompetitive Inhibition in der Darmwand
INHNBG = 1+A(17)/KI
CLINTG = CLINTG0*1/INHNBG
; Well-stirred Darmwand-Modell MDZ
EG = FUG*CLINTG/(QG+FUG*CLINTG)
FG = 1-EG
CLG = QG*FUG*CLINTG/(QG+FUG*CLINTG)
```

```
; 1-OH-MDZ: kompetitive Inhibition in der Leber
INHBMET = 1+A(16)/KIMET
CLMETH = CLMETH0*1/INHBMET ;
; Well-stirred Leber-Modell 1-OH-MDZ
METEH = 1*CLMETH/(QH+1*CLMETH)
METFH = 1-METEH
```

```
; 1-OH-MDZ: kompetitive Inhibition in der Darmwand
INHBMETG = 1+A(17)/KIMET
CLMETG = CLMETG0*1/INHBMETG ;
; Well-stirred Darmwand-Modell 1-OH-MDZ
METEG = 1*CLMETG/(QG+1*CLMETG)
METFG = 1-METEG
```

```

; Well-stirred Leber-Modell VRC
VOEH = VOFU*VOCLINT/(QH+VOFU*VOCLINT)
VOFH = 1-VOEH
VOCLH = QH*VOFU*VOCLINT/(QH+VOFU*VOCLINT)

;MDZ
DADT(8) = I - EG*QG/VGW*A(8) - FG*QG/VGW*A(8) ; MDZ Darmwand
DADT(10) = FG*QG/VGW*A(8) - QPV/VPV*A(10) + QPV/VCEN*A(2) ; MDZ
Portalvene
DADT(7) = QHA/VCEN*A(2) + QPV/VPV*A(10) - EH*QH/VH*A(7) -
FH*QH/VH*A(7) ; MDZ Leber
DADT(2) = KPC*A(12) - KCP*A(2) - (QHA/VCEN + QPV/VCEN)*A(2) +
FH*QH/VH*A(7) + KP2C*A(11) - KCP2*A(2) ; MDZ zentral
DADT(12) = KCP*A(2) - KPC*A(12) ; MDZ peripher
DADT(11) = KCP2*A(2) - KP2C*A(11) ; MDZ peripher 2

;VRC
DADT(4) = -VOKA*A(4) ; VRC Resorption
DADT(9) = VOKA*A(4) - QG/VGW*A(9) - KIC*CONVOGUT + KIC*A(17) ; VRC
Darmwand
DADT(1) = QG/VGW*A(9) - QPV/VPV*A(1) + QPV/V5*A(5) ; VRC Portalvene
DADT(6) = QPV/VPV*A(1) + QHA/V5*A(5) - VOEH*QH/VH*A(6) -
VOFH*QH/VH*A(6) - KIC*CONVOLIV + KIC*A(16) ; VRC Leber
DADT(5) = VOFH*QH/VH*A(6) - (QHA/V5 + QPV/V5)*A(5) ; VRC zentral

;1-OH-MDZ
DADT(13) = METFG*QG/VGW*A(15) - QPV/VPV*A(13) + QPV/VMET*A(3) ; 1-OH-
MDZ Portalvene
DADT(14) = EH*QH/VH*A(7) + QPV/VPV*A(13) + QHA/VMET*A(3) -
METEH*QH/VH*A(14) - METFH*QH/VH*A(14) ; 1-OH-MDZ Leber
DADT(15) = EG*QG/VGW*A(8) - METEG*QG/VGW*A(15) - METFG*QG/VGW*A(15) ;
1-OH-MDZ Darmwand
DADT(3) = METFH*QH/VH*A(14) - (QHA/VMET + QPV/VMET)*A(3) ; 1-OH-MDZ
DADT(16) = KIC*CONVOLIV - KIC*A(16); Enzym Site Leber
DADT(17) = KIC*CONVOGUT - KIC*A(17), Enzym Site Darmwand

$ERROR
CON2=A(2)/VCEN
CON5=A(5)/V5

```

```
CON3=A (3) /VMET
IPRED=0
IF (CON2.GT.0.AND.CMT.EQ.2) THEN
IPRED=LOG (CON2)
IWRES=DV-IPRED
Y = IPRED + EPS (1)
ENDIF
IF (CON5.GT.0.AND.CMT.EQ.5) THEN
IPRED=LOG (CON5)
IWRES=DV-IPRED
Y = IPRED + EPS (2)
ENDIF
IF (CON3.GT.0.AND.CMT.EQ.3) THEN
IPRED=LOG (CON3)
IWRES=DV-IPRED
Y = IPRED + EPS (3)
ENDIF

C1=A (1) /VPV
C2=A (2) /VCEN
C3=A (3) /VMET
C4=A (4)
C5=A (5) /V5
C6=A (6) /VH
C7=A (7) /VH
C8=A (8) /VGW
C9=A (9) /VGW
C10=A (10) /VPV
C11=A (11) /VPER2
C12=A (12) /VPER
C13=A (13) /VPV
C14=A (14) /VH
C15=A (15) /VGW
C16=A (16)
C17=A (17)

EXPBLOOD = 0
EXPPLASMA = 0
IF (IPRED.NE.0) EXPBLOOD = EXP (IPRED)
```

IF(IPRED.NE.0.AND.CMT.EQ.2) EXPPLASMA= EXP(IPRED)/RATIO  
IF(IPRED.NE.0.AND.CMT.EQ.5) EXPPLASMA= EXP(IPRED)/VORATIO

\$THETA

(-10 7) ; THETA1 is CLINT  
(-10 4) ; THETA2 is CLINTG  
(-10 2) ; THETA3 is CLPER  
(-10, 5) ; THETA4 is CLPER2  
(-10 4) ; THETA5 is VCEN  
(-10 5) ; THETA6 is VPER  
(-10, 4) ; THETA7 is VPER2  
(0) FIX ; THETA8 is MAT  
(-10 -0.5) ; THETA9 is CV  
(-10 5) ; THETA10 is CLMETH0  
(-10 3) ; THETA11 is CLMETG0  
(-10 4) ; THETA12 is VMET  
(-10 5) ; THETA13 is VOCLINT  
(-10 6) ; THETA14 is V5  
(1.355835) FIX ; THETA15 is VOKA (Hope, Antimicrob. Agents Chemother.  
2012) 1.355835; Damle et al. 2011 1.047319  
(-10 5) ; THETA16 is KI  
(-10 5) ; THETA17 is KIMET  
(-20 -2.5) ; THETA18 is KIC

\$OMEGA BLOCK(1) 0.25 ; OMEGA1 applies to CLINT  
\$OMEGA BLOCK(1) 0.25 ; OMEGA2 applies to CLINTG  
\$OMEGA BLOCK(1) 0.25 ; OMEGA3 applies to CLPER  
\$OMEGA BLOCK(1) 0 FIX ; OMEGA4 applies to CLPER2  
\$OMEGA BLOCK(1) 0 FIX ; OMEGA5 applies to VCEN  
\$OMEGA BLOCK(1) 0 FIX ; OMEGA6 applies to VPER  
\$OMEGA BLOCK(1) 0 FIX ; OMEGA7 applies to VPER2  
\$OMEGA BLOCK(1) 0 FIX ; OMEGA8 applies to MAT  
\$OMEGA BLOCK(1) 0 FIX ; OMEGA9 applies to CV  
\$OMEGA BLOCK(1) 0.25 ; OMEGA10 applies to CLMETH  
\$OMEGA BLOCK(1) 0 FIX ; OMEGA11 applies to CLMETG  
\$OMEGA BLOCK(1) 0 FIX ; OMEGA12 applies to VMET  
\$OMEGA BLOCK(2)  
0.25 ; OMEGA13 applies to VOCLINT  
0.1 0.25 ; OMEGA14 applies to V5

\$OMEGA BLOCK(1) 0 FIX ; OMEGA15 applies to VOKA  
\$OMEGA BLOCK(1) 0.25 ; OMEGA16 applies to KI LIVER  
\$OMEGA BLOCK(1) 0 FIX; OMEGA18 applies to KIMET  
\$OMEGA BLOCK(1) 0 FIX; OMEGA19 applies to KIC

;IOV for MAT

\$OMEGA BLOCK(1) 0.10 ; OMEGA20 applies to IOV for MAT  
\$OMEGA BLOCK(1) SAME ; OMEGA21 applies to IOV for MAT

\$SIGMA

0.1 ; SIGMA1 applies to MDZ  
0.1 ; SIGMA2 applies to VRC  
0.1 ; SIGMA3 applies to 1-OH-MDZ

\$ESTIMATION NSIG=2 SIGL=6 MAX=9999 PRINT=1 METHOD=1 INTER NOABORT  
MSFO=run5.msf NOPRIOR=1 ; PARAFILE=ON FOCE method  
\$COVA MATRIX=R SIGL=8 TOL=8 UNCONDITIONAL PRINT=E ; PARAFILE=ON  
;\$SIM (1) ONLYSIM

\$TABLE

ID TIME ORIGTIME RTIME TAFD NMTIME  
IPRED  
PER VORI  
AMT RATE  
CMT MDV EVID STR1 STR2  
CWRES IWRES  
PLASMA EXPPLASMA BLOOD EXPBLOOD  
NOPRINT ; Don't include in the output file (i.e., "OUTPUT")  
ONEHEADER ; Don't add a new header after 900 lines  
FILE=sdtab5 ; Name of the output file

\$TABLE

ID TIME PER TAFD CMT  
CLINT0 CLINTG0 CLPER CLPER2 VCEN VPER VPER2 MAT CV  
CLMETH0 CLMETG0 VMET  
VOCLINT V5 VOKA  
KI KIMET KIC  
CLINT CLH EH FH  
CLINTG CLG EG FG

CLMETH METEH METFH  
CLMETG METEG METFG  
VOCLH VOEH VOFH  
ETA1 ETA2 ETA3 ETA4 ETA5 ETA6 ETA7 ETA8 ETA9 ETA10  
ETA11 ETA12 ETA13 ETA14 ETA15 ETA16 ETA17 ETA18 ETA19 ETA20  
TAD VOTAD DOSE VODOSE I WGHT  
NOPRINT ; Don't include in the output file (i.e., "OUTPUT")  
ONEHEADER ; Don't add a new header after 900 lines  
FILE=patab5 ; Name of the output file

\$TABLE  
ID AGE WGHT HGHT HCT  
QH QPV QHA QINTEST QG FU RATIO FUB FUG VOFU VORATIO  
NOPRINT ; Don't include in the output file (i.e., "OUTPUT")  
ONEHEADER ; Don't add a new header after 900 lines  
FILE=cotab5 ; Name of the output file

\$TABLE  
ID DSGR  
NOPRINT ; Don't include in the output file (i.e., "OUTPUT")  
ONEHEADER ; Don't add a new header after 900 lines  
FILE=catab5 ; Name of the output file

\$TABLE  
CWRES PER TIME TAFD CMT MDV  
NOPRINT ; Don't include in the output file (i.e., "OUTPUT")  
ONEHEADER ; Don't add a new header after 900 lines  
FILE=cwtab5 ; Name of the output file

\$TABLE  
ID PER TIME TAFD CMT C1 C2 C3 C4 C5 C6 C7 C8 C9 C10 C11 C12 C13 C14  
C15 C16 C17  
NOPRINT ; Don't include in the output file (i.e., "OUTPUT")  
ONEHEADER ; Don't add a new header after 900 lines  
FILE=mytab5 ; Name of the output file

**Appendix 5b Pharmakokinetisches Modell der Daten der in vivo Studie zur Untersuchung der Inhibition von CYP3A in Darmwand und Leber durch Voriconazol mit einem neuartigen Studiendesign**

```
$SIZES          PD=100 PDT=100 MAXFCN=10000000 LNP4=8000 LVR=60
$PROB VORIMIDA LOG Midazolam/Voriconazole

$INPUT
ID PER NMTIME TAFD TIME ; TIME is TIME_AFTER_FIRST_EVENT
EVID MGAMT=DROP MGRATE=DROP AMT RATE CMT PLASMADV=DROP
MOLDV DV ; DV is LOGMOLDV
BQL FLAG MISSING EXTRA EXTRAPER WGHT HGHT AGE UVOL STRAT

$DATA Nonmem_data_pbpk_urine.csv IGNORE=@ WIDE
IGNORE=(DV.EQ.-99,BQL.EQ.1,MISSING.EQ.1,EXTRAPER.EQ.1)
; DV.EQ.-99: Predose Voriconazol-Messungen (nach dem Start der
Midazolam-Infusion, aber vor dem Start der Voriconazol-Infusion)
; BQL.EQ.1: Konzentrationen unterhalb der LLOQ (skipped here)
; MISSING.EQ.1: geplante, aber nicht durchgeführte (fehlende) Messun-
gen,
; EXTRAPER.EQ.1: wiederholte Studienperiode wegen Fehler bei der
Durchführung (nur die wiederholte Periode wird in die Berechnung mit
einbezogen)

; IGNORE=(CMT.EQ.3,CMT.EQ.4) ; ignore voriconazole doses
IGNORE=(FLAG.EQ.3,FLAG.EQ.5,FLAG.EQ.6,FLAG.EQ.8,FLAG.EQ.11) ; MDZ-4OH,
VRC-NO, einige Urinmessungen

;-----
; UNITS          |
; Time - hours   |
; Dose - mcg     |
; Cp - ng/ml = mcg/L |
; Clearances - L/hour |
; Volumes - L    |
;-----

$SUBROUTINE ADVAN13 TOL=6 ; Set up differential equation mode
```

```

$MODEL
COMP (DOSECMT) ; 1
COMP (CENTRAL) ; 2
COMP (VODOSE) ; 3
COMP (VOCEN) ; 4
COMP (DUMMY, INITIALOFF) ; 5
COMP (MFUR, INITIALOFF) ; 6
COMP (1OHFUR) ; 7
COMP (4OHFUR, INITIALOFF) ; 8
COMP (MGLUR) ; 9
COMP (1OHGLUR) ; 10
COMP (4OHGLUR, INITIALOFF) ; 11
COMP (1OHGLC) ; 12

; PBPK-Kompartimente
COMP (LIVER) ; 13 Mida LIV
COMP (1OHLIV) ; 14 1-OH LIV

COMP (1OHCEN) ; 15
COMP (4OHCEN, INITIALOFF) ; 16

; Voriconazol-Kompartimente
COMP (PERIPH) ;
COMP (VOLIV) ;

$PK

IF (NEWIND.LE.1.AND.EVID.EQ.3) THEN
DOSE=0
START=-99
ENDE=-99
RATE0=0
TDOSE=-99
ENDIF
;Remember dose and time of dose
IF (AMT.GT.0.AND.CMT.EQ.1) THEN
DOSE=AMT

```



```

START=TIME
ENDE=TIME+DOSE/RATE
RATE0=RATE
ENDIF
IF (AMT.GT.0) THEN
TDOSE = TIME
ENDIF

; MU Model
MU_1 = THETA(1) ;      zentrales Verteilungsvolumen MDZ
MU_2 = THETA(2) ;      intrinsische hepatische MDZ-Clearance
MU_3 = THETA(3) ;      intrinsische intestinale MDZ-Clearance
MU_4 = THETA(4) ;      zentrales Verteilungsvolumen 1-OH-MDZ
MU_5 = THETA(5) ;      K1OHG
MU_6 = THETA(6) ;      UGT-vermittelte intestinale MDZ-Clearance
MU_7 = THETA(7) ;      CYP-vermittelte intestinale 1-OH-MDZ-Clearance
MU_8 = THETA(8) ;      UGT-vermittelte hepatische MDZ-Clearance
MU_9 = THETA(9) ;      CYP-vermittelte hepatische 1-OH-MDZ-Clearance
MU_10 = THETA(10) ;    UGT-vermittelte renale 1-OH-MDZ-Clearance
MU_11 = THETA(11) ;    renale 1-OH-MDZ-Clearance
MU_12 = THETA(12) ;    renale MDZ-Clearance
MU_13 = THETA(13) ;    Resorptionskonstante MDZ

MU_14 = THETA(14) ;    zentrales Verteilungsvolumen VRC
MU_15 = THETA(15) ;    peripheres Verteilungsvolumen VRC
MU_16 = THETA(16) ;    periphere Verteilungsclearance VRC
MU_17 = THETA(17) ;    VMAX,L VRC
MU_18 = THETA(18) ;    VMAX,G VRC
MU_19 = THETA(19) ;    KM VRC
MU_20 = THETA(20) ;    Resorptionskonstante VRC
MU_21 = THETA(21) ;    KI CYP VRC

; Basic Parameters for IOV
PER1=0
PER2=0
PER3=0
PER4=0
IF (PER.EQ.1) PER1=1
IF (PER.EQ.2) PER2=1

```

IF(PER.EQ.3) PER3=1

IF(PER.EQ.4) PER4=1

; Basic physiological Parameters

BSA = WGHT\*\*0.425\*HGHT\*\*0.725\*0.007184 ; Du Bois and Du Bois  
1916, body surface area

VD\_LI = 0.722\*BSA\*\*1.176 ; Volumen Leber (Johnson)

VD\_EN = 0.517 ; Volumen Darmwand (Simcyp)

CI = 3 + (-0.01\*(AGE-20)) ; kardialer Index (Howgate)

QC = CI\*60\*BSA ; kardiales Output (Howgate)

Q\_HA = 0.065\*QC ; Blutfluss Leberarterie (Simcyp)

Q\_PV = 0.19\*QC ; Blutfluss Portalvene (Simcyp)

Q\_H = Q\_HA+Q\_PV ; hepatischer Blutfluss (Simcyp)

Q\_VIL = 0.06\*QC ; villöser Blutfluss (Simcyp)

FUP = 0.0305 ; ungebundene MDZ-Fraktion im Plasma (Simcyp)

BPR = 0.6206 ; BPR MDZ

V\_FUP = 0.42 ; ungebundene VRC-Fraktion im Plasma

(Voriconazol- Datenblatt)

V\_BPR = 1.23 ; BPR VRC (ermittelt mit Simcyp mit logP=1.8,  
pKA=1.76, monoprotic base

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21876043>)

M\_FUP = 0.19 ; ungebundene 1-OH-MDZ-Fraktion im Plasma (ermit-  
telt mit Simcyp mit logP=2.48, pKA=4.99, monoprotic base)

M\_BPR = 1.17 ; BPR 1-OH-MDZ (ermittelt mit Simcyp mit  
logP=2.48, pKa=4.99, monoprotic base)

K\_LI = 1 ; MDZ Leber/Plasma-Verteilungskoeffizient

V\_KLI = 1.22 ; VRC Leber/Plasma-Verteilungskoeffizient (ermit-  
telt mit Simcyp mit Hilfe der Methode nach Rodgers et al.)

M\_KLI = 1 ; 1-OH-MDZ Leber/Plasma-Verteilungskoeffizient

FA = 1 ; resorbierte MDZ-Fraktion aus dem Darm

V\_FA = 1 ; resorbierte VRC-Fraktion aus dem Darm

FUG = 1 ; ungebundene MDZ-Fraktion im Darm

V\_FUG = 1 ; ungebundene VRC-Fraktion im Darm

M\_FUG = 1 ; ungebundene 1-OH-MDZ-Fraktion im Darm

PERM = 88.552 ; Permeabilitäts clearance (ermittelt durch Auflö-  
sung der Gleichung  $QGUT=Q\_VIL*PERM/(Q\_VIL+PERM)$  mit  $QGUT=17.19$  und  
 $Q\_VIL=0.6*QC=21.34$  (Simcyp)

```

QGUT      = Q_VIL*PERM/(Q_VIL+PERM) ; Nominaler Blutfluss im Darm

MPPGL     = 10**(1.407+0.01579*AGE-0.0003824*AGE**2+2.37E-6*AGE**3) ; mg
microsomal Protein / g Leber
LDENS     = 1080 ; g/L Leberdichte

C3A4H     = 137 ; CYP3A4-Gehalt in der Leber (pmol/mg protein)
C3A4L     = C3A4H*MPPGL*VD_LI*LDENS      ; CYP3A4-Menge in der Leber
(pmol/mg * mg/g * 1 * g/l = pmol)

C3A4G     = 66200 ; CYP3A4-Menge in der Darmwand (pmol /total gut)
(Simcyp PopRep: 66327.4921875)
CLIL      = EXP(MU_2 + ETA(2)) ; microL/min/pmol
CLIG      = EXP(MU_2 + ETA(3)) ; microL/min/pmol

V         = EXP(MU_1 + ETA(1)) ; Vd Steady State MDZ PLASMA
KA        = EXP(MU_13 + ETA(13)) ; Resorptionskonstante mit Kinetik 1.
Ordnung für die MDZ aus dem Darm in die Portalvene

V1OH     = EXP(MU_4 + ETA(4)) ; Vd Steady State 1-OH-MDZ PLASMA
K1OHG    = EXP(MU_5 + ETA(5)); Eliminationskonstante für 1-OH-MDZ-Gluc
aus dem zentralen 1-OH-MDZ-Gluc-Kompartiment

; VORICONAZOLE
V_VSS    = EXP(MU_14 + ETA(14)) ; Vd Steady State VRC
VD_PE    = EXP(MU_15 + ETA(15)) ; peripheres Verteilungsvolumen VRC
V_VDT    = (V_VSS/V_BPR-VD_LI*V_KLI/V_BPR-VD_PE) ; zentrales Verteilungsvolumen VRC

; prevent that central volume becomes negative during estimation:
IF(V_VDT.GT.0) THEN
V_VDC    = V_VDT
ELSE
V_VDC    = 1
ENDIF

Q_PER    = EXP(MU_16 + ETA(16)) ; periphere Verteilungsclearance VRC
V_VM     = EXP(MU_17 + ETA(17)) ; Vmax in der Leber VRC
V_KM     = EXP(MU_19 + ETA(19)) ; Km in der Leber VRC

```

V\_KA = EXP(MU\_20 + ETA(20)) ; Resorptionskonstante VRC (bei den einzelnen Studien/Formulierungen unterschiedlich)

V\_MV = EXP(MU\_18 + ETA(18)) ; Vmax in der Darmwand VRC  
V\_MK = V\_KM ; Km in der Darmwand (entspricht Km in der Leber)

; INTERAKTION

CY\_KI = EXP(MU\_21 + ETA(21))

PA6 = EXP(MU\_6 + ETA(6))

PA7 = EXP(MU\_7 + ETA(7))

PA8 = EXP(MU\_8 + ETA(8))

PA9 = EXP(MU\_9 + ETA(9))

PA10 = EXP(MU\_10 + ETA(10))

PA11 = EXP(MU\_11 + ETA(11))

PA12 = EXP(MU\_12 + ETA(12))

\$DES

; IF(T.GE.START.AND.T.LE.ENDE) THEN

; ZERORATE = DOSE/(ENDE-START)

; ELSE

; ZERORATE = 0

; ENDIF

; VORICONAZOL

V\_DOS = A(3) ; VRC-Menge in Dosiskompartiment

V\_CEN = A(4)/V\_VDC ; VRC-Konzentration zentrales Kompartiment

V\_LIV = A(18)/VD\_LI ; VRC-Konzentration Leber-Kompartiment

V\_PER = A(17)/VD\_PE ; VRC-Konzentration peripheres Kompartiment

; ++++++

; PORTAL VEIN

; ++++++

; für die Differentialgleichung des Portalvenen-Kompartiments werden Steady-State-Bedingungen angenommen:

```

; dPV/dt = 0 = Q_PV*V_CEN + V_FG*V_KA*V_DOS - Q_PV*V_PV
; Solve for V_PV:
; V_PV = (Q_PV*V_CEN + V_FG*V_KA*V_DOS)/Q_PV

; die aus dem Darm verfügbare Fraktion V_FG ist auch eine Funktion von
V_PV:
; V_FG = Q_VIL/(V_CLG*V_FUG + Q_VIL) with V_CLG = V_MV/(V_MK +
V_FUG*V_PV);
; zusammen erhält man für V_PV:
; V_PV = (Q_PV*V_CEN + (Q_VIL/((V_MV/(V_MK + V_FUG*V_PV))*V_FUG +
Q_VIL))*V_KA*V_DOS)/Q_PV
; dies kann wieder nach V_PV aufgelöst werden (z.B. mit Wolfram Al-
pha):
; P = (Q C+(G a D)/((V f)/(K+f P)+G))/Q, auflösen nach P ----> die Lö-
sung:
; P = (sqrt((a D f G+C f G Q-f Q V-G K Q)^2+4 f G Q (a D G K+C f Q V+C
G K Q))+a D f G+C f G Q-f Q V-G K Q)/(2 f G Q) and f G Q!=0 and
sqrt((a D f G+C f G Q-f Q V-G K Q)^2+4 f G Q (a D G K+C f Q V+C G K
Q))+a D f G+C f G Q+f Q V+G K Q!=0
; im NONMEM-Code:
FA1 = (V_KA*V_DOS*Q_VIL+V_CEN*Q_VIL*Q_PV-Q_VIL*V_MK*Q_PV-
Q_PV*V_FUG*V_MV)**2
FA2 =
4*Q_VIL*Q_PV*(V_KA*V_DOS*Q_VIL*V_MK+V_CEN*Q_VIL*V_MK*Q_PV+V_CEN*Q_PV*V
_FUG*V_MV)
FA3 = V_KA*V_DOS*Q_VIL+V_CEN*Q_VIL*Q_PV-Q_VIL*V_MK*Q_PV-
Q_PV*V_FUG*V_MV
V_PV = (SQRT(FA1+FA2)+FA3)/(2*Q_VIL*Q_PV)

;+++++

V_CLL = V_VM/(V_KM + V_FUP*V_LIV/V_KLI) ; intrinsische hepatische
VRC-Clearance
V_CLG = V_MV/(V_MK + V_FUG*V_PV) ; intrinsic VRC-Darm-
Clearance (not needed in the ODEs)

V_FH = Q_H/(V_CLL*V_FUP/V_BPR + Q_H) ; aus der Leber verfügbare
VRC-Fraktion

```

V\_FG = Q\_VIL/(V\_CLG\*V\_FUG + Q\_VIL) ; aus der Darmwand verfügbare VRC-Fraktion (not needed in the ODEs)

ROUT = V\_CLL\*V\_FUP\*V\_LIV/V\_KLI ; rate out (of liver) (not needed in the ODEs)

;Voriconazol ODEs

DADT(3) = -V\_KA\*V\_DOS ; dDoseCMT/dt

DADT(4) = (Q\_H\*V\_LIV/(V\_KLI/V\_BPR) - Q\_H\*V\_CEN + Q\_PER\*V\_PER - Q\_PER\*V\_CEN) ; dCEN/dt

DADT(17) = (Q\_PER\*V\_CEN - Q\_PER\*V\_PER) ; dPER/dt

DADT(18) = (Q\_HA\*V\_CEN + Q\_PV\*V\_PV - Q\_H\*V\_LIV/(V\_KLI/V\_BPR) - V\_CLL\*V\_FUP\*V\_LIV/V\_KLI) ; dLIV

; Darmwand-Clearances

CLGC = CLIG\*C3A4G\*60\*1E-6/(1+(V\_FUP/V\_BPR\*V\_PV)/CY\_KI) ; MDZ CL

Darmwand CYP (microL/min/pmol \* pmol = L/h)

CLGG = (PA6) ; MDZ CL Darmwand UGT

CLG = CLGC + CLGG ; MDZ CL Darmwand (CYP + UGT)

M\_CLG = (PA7) ; 1-OH-MDZ CL Darmwand UGT

; Leber-Clearances

CLLC = CLIL\*C3A4L\*60\*1E-6/(1+(V\_FUP\*V\_LIV/V\_KLI)/CY\_KI) ; MDZ CL Leber CYP (microL/min/pmol \* pmol/mg \* mg/g \* l \* g/l = L/h)

CLLG = (PA8) ; CL Leber UGT

CLL = CLLC + CLLG ; CL Leber (CYP + UGT)

M\_CLL = (PA9) ; 1-OH-MDZ CL Leber UGT

; Renale Clearances

CLR = (PA12) ; MDZ renale CL UGT

MCLRG = (PA10) ; 1-OH-MDZ renale CL UGT

MCLRF = (PA11) ; 1-OH-MDZ renale CL unkonjugiert

M\_CLR = MCLRG + MCLRF; 1-OH-MDZ renale CL (UGT + unkonjugiert)

; MDZ-Fraktionen

FMGL = CLLG/(CLLG+CLLC) ; zu Glucuronid metabolisierte MDZ-Fraktion über die Leber

FMGG = CLGG/(CLGG+CLGC) ; zu Glucuronid metabolisierte MDZ-Fraktion über die die Darmwand

FG = QGUT/((CLGG+CLGC)\*FUG + QGUT); aus dem Darm verfügbare MDZ-Fraktion

FGC = (QGUT+CLGG\*FUG)/((CLGC+CLGG)\*FUG + QGUT); aus dem Darm verfügbare MDZ-Fraktion via CYP: EG =

(CLGG+CLGC)\*FUG/(QGUT+(CLGG+CLGC)\*FUG) -> EGC =

CLGC\*FUG/(QGUT+(CLGG+CLGC)\*FUG) -> FGC = 1-EGC

FGG = (QGUT+CLGC\*FUG)/((CLGC+CLGG)\*FUG + QGUT) ; aus dem Darm verfügbare MDZ-Fraktion via UGT

FH = Q\_H/((CLLC+CLLG)\*FUP + Q\_H) ; verfügbare MDZ-Fraktion nach Leberpassage

FHC = (Q\_H+CLLG\*FUP)/((CLLC+CLLG)\*FUP + Q\_H) ; verfügbare MDZ-Fraktion nach Leberpassage via CYP

FHG = (Q\_H+CLLC\*FUP)/((CLLC+CLLG)\*FUP + Q\_H) ; verfügbare MDZ-Fraktion nach Leberpassage via UGT

CLH = Q\_H\*(1-FH) ; MDZ-Organ clearance Leber

CLGW = QGUT\*(1-FG) ; MDZ-Organ clearance Darmwand

; Fractions 1-OH-Midazolam

FG1OH = QGUT/(M\_CLG\*M\_FUG + QGUT) ; 1-OH-MDZ-Fraktion, die der Glucuronidierung in der Darmwand entkommt

FH1OH = Q\_H/(M\_CLL\*M\_FUG + Q\_H) ; 1-OH-MDZ-Fraktion, die der hepatischen Glucuronidierung entkommt

MCLH = Q\_H\*(1-FH1OH) ; 1-OH-MDZ-Organ clearance Leber

MCLGW = QGUT\*(1-FG1OH) ; 1-OH-MDZ-Organ clearance Darmwand

; MDZ

CEN = A(2)/V

LIV = A(13)/VD\_LI

PV = (Q\_PV\*CEN+FG\*KA\*A(1))/Q\_PV

; 1-OH-MDZ

M\_CEN = A(15)/V1OH

M\_LIV = A(14)/VD\_LI

```

M_PV = (Q_PV*M_CEN+FG1OH*(1-FGC)*KA*A(1))/Q_PV

DADT(1) = - KA*A(1) ; MDZ Dosis
DADT(2) = (Q_H*LIV/(K_LI/BPR) - Q_H*CEN - CLR*CEN) ; MDZ
zentral
DADT(15) = (Q_H*M_LIV/(M_KLI/M_BPR) - Q_H*M_CEN - M_CLR*M_CEN); 1-OH-
MDZ zentral
DADT(16) = 0 ; 4-OH-MDZ zentral
DADT(5) = 0 ; DUMMY
DADT(6) = 0 ; MDZ unkonjugiert Urin
DADT(7) = MCLRf*M_CEN ; 1-OH-MDZ unkonjugiert Urin
DADT(8) = 0 ; 4-OH MDZ unkonjugiert Urin
DADT(9) = CLR*CEN + CLLG*FUP*LIV/K_LI + (1-FGG)*KA*A(1) ; MDZ-Gluc
Urin
DADT(10) = K1OHG*A(12) + MCLRg*M_CEN ; 1-OH-MDZ-Gluc Urin
DADT(11) = 0 ; 4-OH-Gluc Urin
DADT(12) = (1-FG1OH)*(1-FGC)*KA*A(1) + M_CLL*M_FUP*M_LIV/M_KLI -
K1OHG*A(12) ; 1-OH-Gluc zentral

DADT(13) = (
Q_H*LIV/(K_LI/BPR) - CLL*FUP*LIV/K_LI) ; MDZ Leber
DADT(14) = (CLLC*FUP*LIV/K_LI + Q_HA*M_CEN + Q_PV*M_PV -
Q_H*M_LIV/(M_KLI/M_BPR) - M_CLL*M_FUP*M_LIV/M_KLI) ; 1-OH-MDZ Leber

MASSBAL =
A(1)+A(2)+A(6)+A(7)+A(8)+A(9)+A(10)+A(11)+A(12)+A(13)+A(14)+A(15)+A(16
) ; Massenbilanz

$ERROR
CM = A(2)/V/BPR ; MDZ Plasmakonzentration
C1OH = A(15)/V1OH/M_BPR ; 1-OH-MDZ Plasmakonzentration
;C4OH = A(4)/V4OH ; 1-OH-MDZ Plasmakonzentration
U1OH = A(7) ; unkonjugiertes 1-OH-MDZ im Urin
UGM = A(9) ; MDZ-Gluc im Urin
UG1OH = A(10) ; 1-OH-MDZ-Gluc im Urin
CV = A(4)/V_VDC/V_BPR ; VRC Plasmakonzentration

IPRED=0
IPLASMA = 0

```



```

IURINE = 0
IF (CM.GT.0.AND.FLAG.EQ.1) THEN
  IPRED=LOG (CM)
  IPLASMA = CM
  IWRES=(DV-IPRED)/SQRT (SIGMA (1,1))
  Y = IPRED + EPS (1)
ENDIF
IF (C1OH.GT.0.AND.FLAG.EQ.2) THEN
  IPRED=LOG (C1OH)
  IPLASMA = C1OH
  IWRES=(DV-IPRED)/SQRT (SIGMA (2,2))
  Y = IPRED + EPS (2)
ENDIF
IF (U1OH.GT.0.AND.FLAG.EQ.7) THEN
  IPRED=LOG (U1OH)
  IURINE = U1OH
  IWRES=(DV-IPRED)/SQRT (SIGMA (3,3))
  Y = IPRED + EPS (3)
ENDIF
IF (UG1OH.GT.0.AND.FLAG.EQ.10) THEN
  IPRED=LOG (UG1OH)
  IURINE = UG1OH
  IWRES=(DV-IPRED)/SQRT (SIGMA (4,4))
  Y = IPRED + EPS (4)
ENDIF
IF (UGM.GT.0.AND.FLAG.EQ.9) THEN
  IPRED=LOG (UGM)
  IURINE = UGM
  IWRES=(DV-IPRED)/SQRT (SIGMA (5,5))
  Y = IPRED + EPS (5)
ENDIF
IF (CV.GT.0.AND.FLAG.EQ.4) THEN
  IPRED=LOG (CV)
  IPLASMA = CV
  IWRES=(DV-IPRED)/SQRT (SIGMA (6,6))
  Y = IPRED + EPS (6)
ENDIF

$THETA

```

(-15, 4.9) ; 1 V  
(-10, 1.42) ; 2 CLINT L  
(-10, 2) FIX ; 3 CLINT G  
(-15, 4.93) ; 4 V1OH  
(-30, -3.38) ; 5 K1OHG  
(-30, -2.7) ; 6 CLGG  
(-30, 27.3) ; 7 M\_CLG  
(-30, 1.14) ; 8 CLLG  
(-30, 5.43) ; 9 M\_CLL  
(-30, 5.29) ; 10 MCLRG  
(-30, 1.33) ; 11 MCLRF  
(-30, -6.06) ; 12 CLR  
(-10, 10) FIX ; 13 KA

(-15, 5.94) ; 14 VSS  
(-15, 5.43) ; 15 VPER  
(-15, 3.55) ; 16 Q  
(-15, 3.44) ; 17 VM  
(-15, 2.12) ; 18 VM G  
(-15, -2.06) ; 19 KM  
(-15, -0.247) ; 20 KA1

(-15, -1) ; 21 KI CYP

\$OMEGA BLOCK(1) 0 FIX ; 1 V  
\$OMEGA BLOCK(1) 0.0154 ; 2 CLINT L  
\$OMEGA BLOCK(1) 0.193 ; 3 CLINT G  
\$OMEGA BLOCK(1) 0 FIX ; 4 V1OH  
\$OMEGA BLOCK(1) 0 FIX ; 5 K1OHG  
\$OMEGA BLOCK(1) 0 FIX ; 6 CLGG  
\$OMEGA BLOCK(1) 0 FIX ; 7 M\_CLG  
\$OMEGA BLOCK(1) 0 FIX ; 8 CLLG  
\$OMEGA BLOCK(1) 0 FIX ; 9 M\_CLL  
\$OMEGA BLOCK(1) 0 FIX ; 10 MCLRG  
\$OMEGA BLOCK(1) 0 FIX ; 11 MCLRF  
\$OMEGA BLOCK(1) 0 FIX ; 12 CLR  
\$OMEGA BLOCK(1) 0 FIX ; 13 KA

\$OMEGA BLOCK(1) 0 FIX ; 14 VSS VRC

\$OMEGA BLOCK(1) 0 FIX ; 15 VPER VRC  
\$OMEGA BLOCK(1) 0 FIX ; 16 Q VRC  
\$OMEGA BLOCK(2) 0.234 ; 17 VM VRC  
0.05 0.198 ; 18 VM G VRC  
\$OMEGA BLOCK(1) 0 FIX ; 19 KM VRC  
\$OMEGA BLOCK(1) 0 FIX ; 20 KA VRC  
\$OMEGA BLOCK(1) 0 FIX ; 21 KI CYP

\$SIGMA

0.2 ; SIGMA1 MDZ  
0.2 ; SIGMA2 1-OH-MDZ  
0.2 ; SIGMA3 unkonjugiertes 1-OH-MDZ Urin  
0.2 ; SIGMA4 1-OH-Gluc Urin  
0.2 ; SIGMA5 MDZ-Gluc Urin  
0.2 ; SIGMA6 VRC

\$ESTIMATION NSIG=2 SIGL=6 MAX=9999 PRINT=1 METHOD=1 INTER NOABORT  
MSFO=run400.msf NOPRIOR=1 ; PARAFILE=ON FOCE 1OHhod  
\$COVA MATRIX=R SIGL=8 TOL=8 UNCONDITIONAL PRINT=E ; PARAFILE=ON

;\$SIM (1) ONLYSIM

\$TABLE

ID  
FG FGC FGG FH FHC FHG  
FG1OH FH1OH  
FMGL FMGG  
CLH CLGW CLR MCLH MCLGW M\_CLR  
V\_FH V\_FG V\_CLL V\_CLG  
NOPRINT ; Don't include in the output file (i.e., "OUTPUT")  
ONEHEADER ; Don't add a new header after 900 lines  
FIRSTONLY  
NOAPPEND  
FILE=lisatab400 ; Name of the output file

\$TABLE

ID TIME NMTIME  
IPRED IPLASMA IURINE MASSBAL  
CM C1OH U1OH UG1OH UGM CV

LIV PV M\_LIV M\_PV V\_LIV V\_PV  
PER EXTRAPER  
AMT RATE START ENDE  
CMT FLAG MDV EVID  
CWRES IWRES  
NOPRINT ; Don't include in the output file (i.e., "OUTPUT")  
ONEHEADER ; Don't add a new header after 900 lines  
FILE=sdtab400 ; Name of the output file

\$TABLE

ID TIME PER CMT  
V V1OH K1OHG KA V CLIL CLIG  
CLGC CLGG CLG M\_CLG  
CLLC CLLG CLL M\_CLL  
CLR MCLRG MCLRF M\_CLR  
V\_VSS V\_VDC VD\_PE V\_CLL V\_CLG V\_VM V\_KM V\_MV V\_MK Q\_PER V\_KA V\_FG V\_FH  
ETA1 ETA2 ETA3 ETA4 ETA5 ETA6 ETA7 ETA8 ETA9 ETA10  
ETA11 ETA12 ETA13 ETA14 ETA15 ETA16 ETA17 ETA18 ETA19 ETA20  
NOPRINT ; Don't include in the output file (i.e., "OUTPUT")  
ONEHEADER ; Don't add a new header after 900 lines  
FILE=patab400 ; Name of the output file

\$TABLE

ID WGHT HGHT AGE  
NOPRINT ; Don't include in the output file (i.e., "OUTPUT")  
ONEHEADER ; Don't add a new header after 900 lines  
FILE=cotab400 ; Name of the output file

\$TABLE

ID  
NOPRINT ; Don't include in the output file (i.e., "OUTPUT")  
ONEHEADER ; Don't add a new header after 900 lines  
FILE=catab400 ; Name of the output file

\$TABLE

CWRES PER TIME CMT MDV EVID  
NOPRINT ; Don't include in the output file (i.e., "OUTPUT")  
ONEHEADER ; Don't add a new header after 900 lines  
FILE=cwtab400 ; Name of the output file