

Vizsgálati módszer fejlesztése atorvastatin és rosuvastatin folyadékkromatográffal kapcsolt tandem tömegspektrométerrel történő vizsgálatához, és a módszer alkalmazása populációs gyógyszerkinetikai modellek megalkotásához

A klinikai laboratórium alapvető szerepének demonstrálása a precíziós
farmakoterápiákban

Karvaly Gellért Balázs¹, Kovács Krisztián¹, Heigerné Holczer Tünde¹, Karádi István²,
Zsáry András², Vásárhelyi Barna¹



¹Semmelweis Egyetem Laboratóriumi Medicina Intézet

²Semmelweis Egyetem III. sz. Belgyógyászati Klinika



Klinikai problémák az atorvastatin és a rosuvastatin kezelések során

- A statinok világszerte a legtöbbször felírt szerek közé tartoznak, arany standard készítmények az emelkedett kardiovaszkuláris rizikóval társuló dyslipidaemia gyógyszeres kezelése során
- mellékhatások (myalgiák, myopathiák) miatt a betegek 40-75%-a hagyja el a kezelést 2 éven belül, még koronáriás szívbetegeknél is 50% feletti ez az arány
- hepatikus transzaminázok és a CK emelkedése gyakori
- A kezelés a 2-es típusú diabetes mellitus rizikóját jelentős mértékben növeli

Firchett DH, Hegele RA, Verma S. Circulation 2015;131:e389.


Crandall JP, Mather K, Rajpathak SN et al. BMJ Open Diab Res Care 2017;5:e000438.

Toth PP, Patti AM, Giglio RV et al. Am J Cardiovasc Drugs 2018;18:157.



REVIEW ARTICLE

Management of Statin Intolerance in 2018: Still More Questions Than Answers

Peter P. Toth^{1,2} · Angelo Maria Patti³ · Rosaria Vincenza Giglio³ ·
Dragana Nikolic³ · Giuseppa Castellino³ · Manfredi Rizzo³ · Maciej Banach^{4,5,6} 

A gyógyszeres kezelések gyógyszerkinetikai modellek segítségével egyénre szabhatók a Pmetrics™ és a BestDose™ alkalmazások használatával



Laboratory of Applied Pharmacokinetics and Bioinformatics
Optimizing drug therapy for populations and individuals

USC University of Southern California

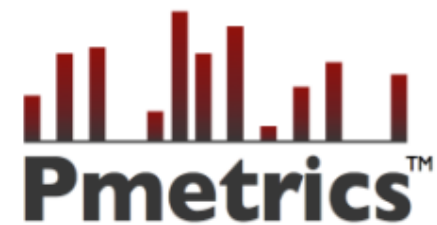
Children's Hospital
LOS ANGELES
We Treat Kids Better

[Home](#) [Research](#) [Training](#) [Forum](#) [Software](#) [Publications](#) [About](#) [Follow](#)

Thank you for your interest in LAPK software.

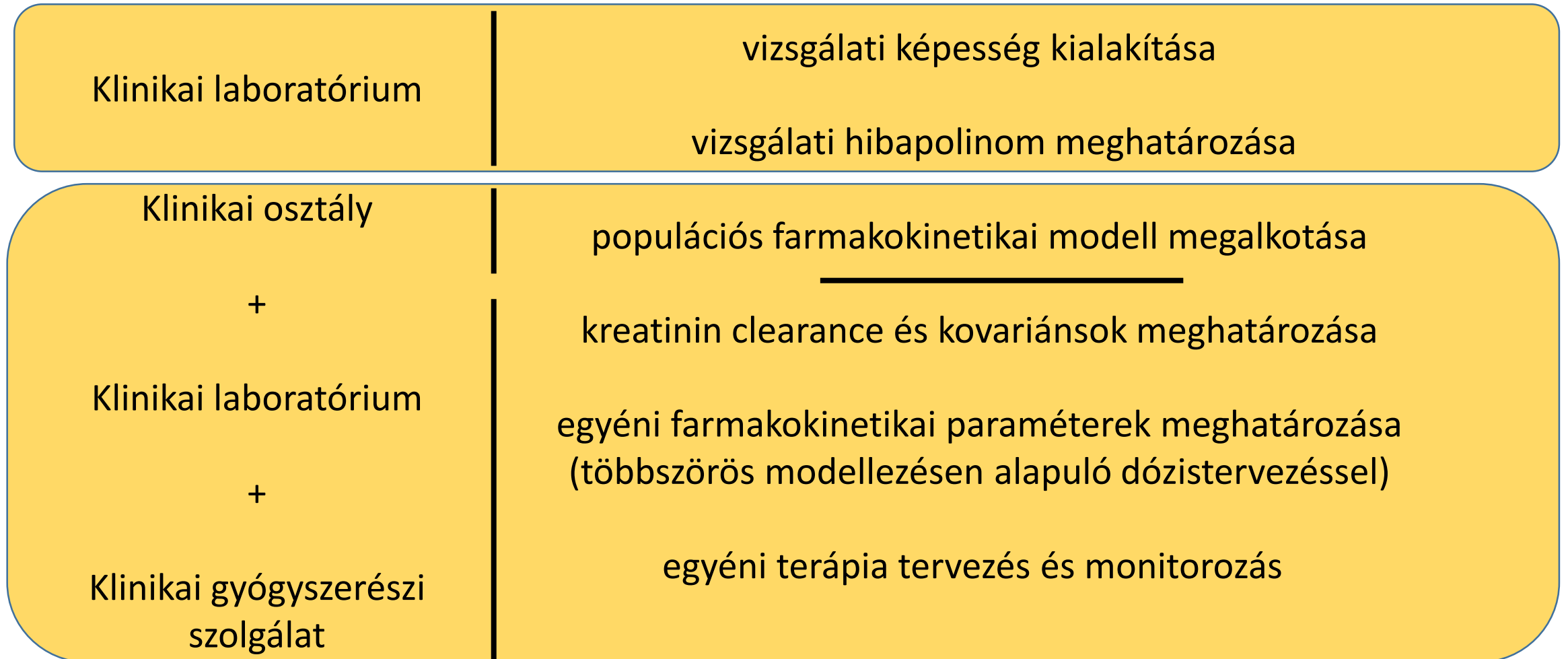


BestDose optimizes dosing for an individual patient using non-parametric, multiple-model Bayesian adaptive control. This is primarily a clinical tool designed for use by physicians and pharmacists.



Pmetrics is an R package for non-parametric and parametric population modeling and simulation. This is primarily a pharmacometric research tool designed for scientists. Population models built using Pmetrics can be added to BestDose for use in patient care.

A gyógyszerkinetikai információkon alapuló terápia individualizálás folyamata



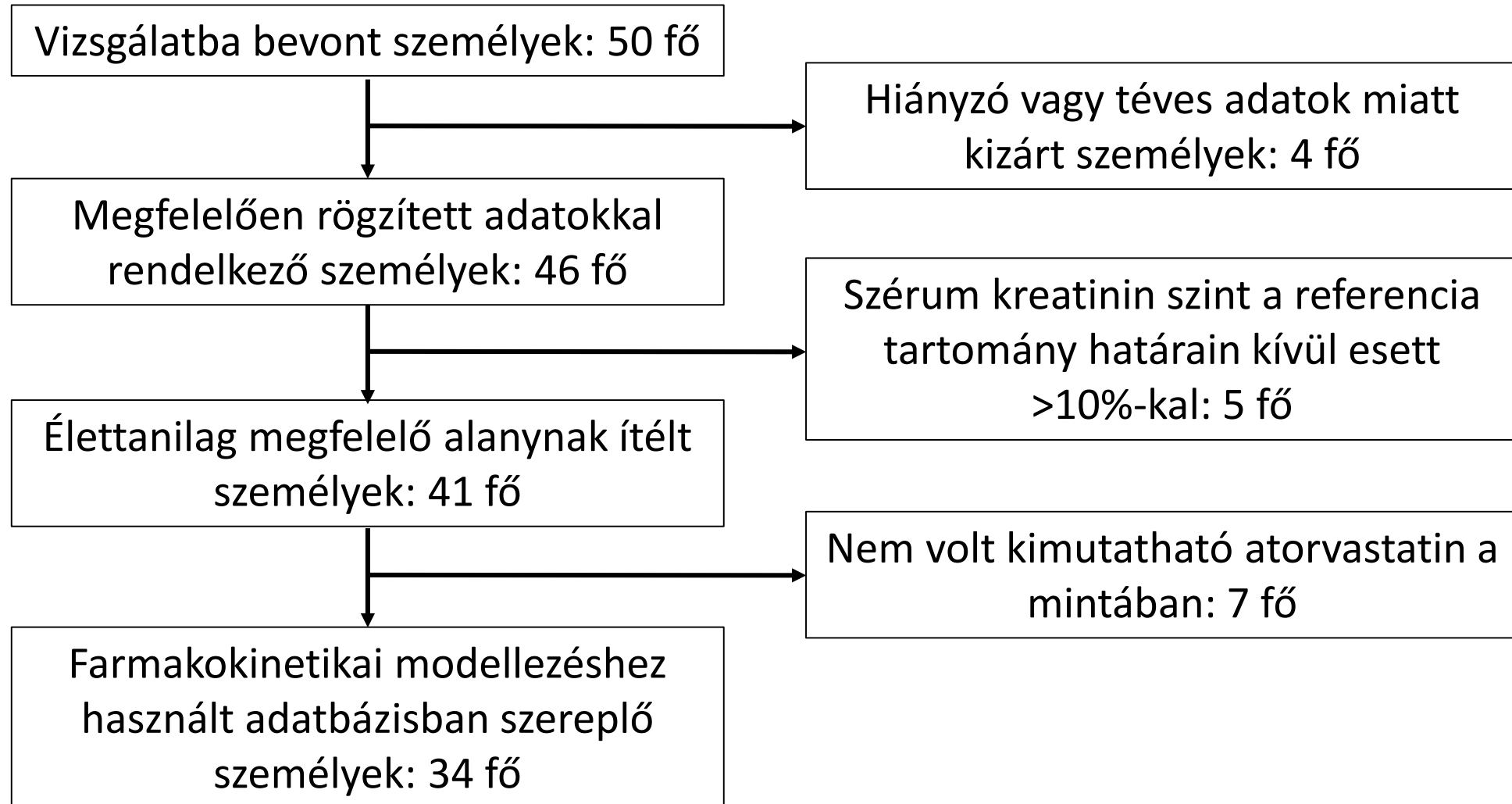
Célkitűzések

- vizsgálati módszer fejlesztése és validálása a European Medicines Agency előírásai szerint
- a modellezéshez szükséges vizsgálati hibapolinomok meghatározása
- a későbbi egyénre szabott kezelések alapjául szolgáló populációs farmakokinetikai modellek megalkotása

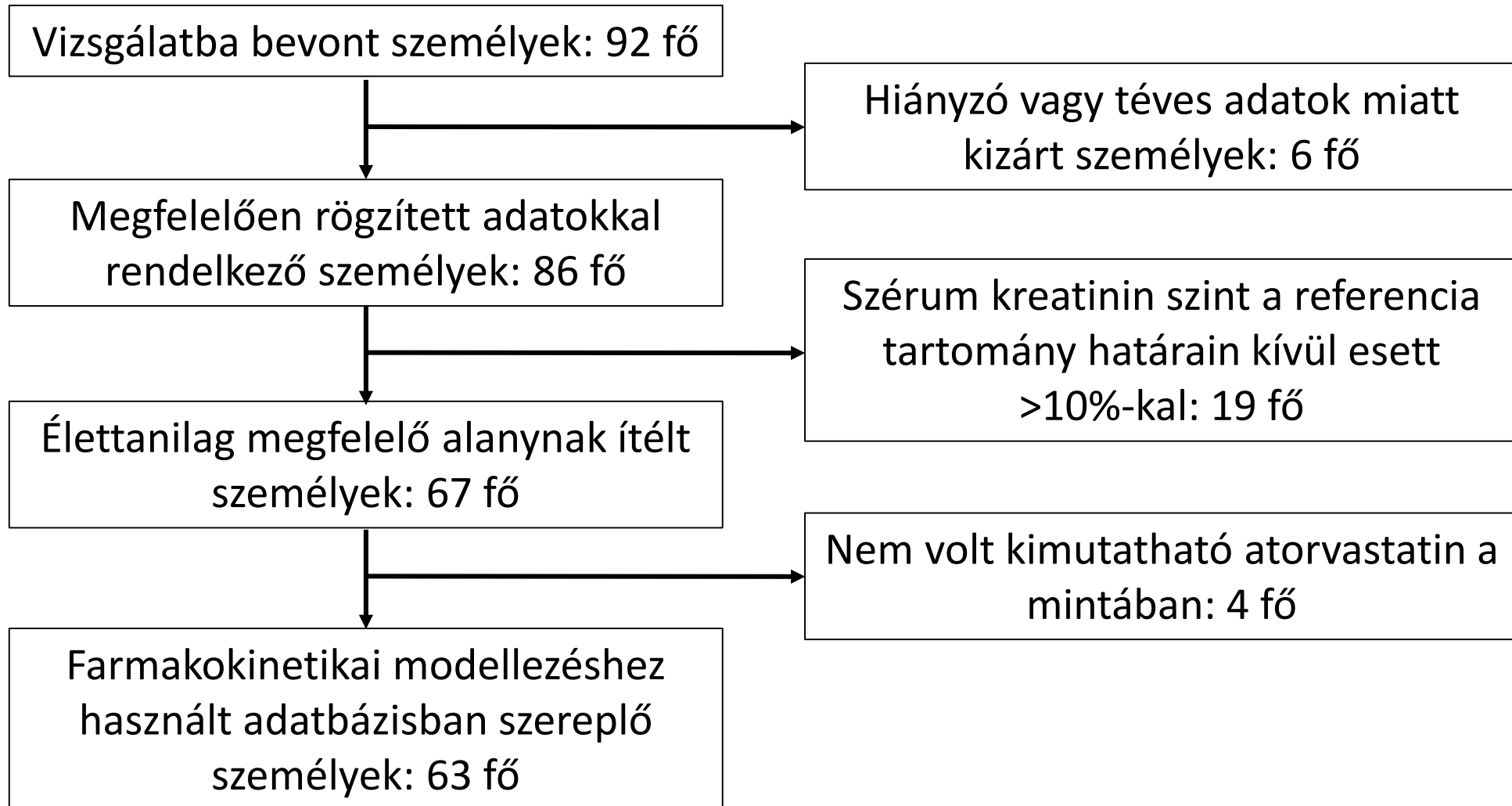
A kutatás keretei

- A kutatás címe: Nagy intenzitású statinok szérumban koncentrációjának követésén alapuló személyre szabott terápiás algoritmusok kifejlesztése
- Időtartam: 2017 október 1 – 2020 december 31.
- Kutatás vezető: Prof. Karádi István
- Résztvevők: SE III. sz. Belgyógyászati Klinika, SE Laboratóriumi Medicina Intézet

A vizsgálatból történő kizáráásra vonatkozó döntési fa - atorvastatin



A vizsgálatból történő kizárásra vonatkozó döntési fa - rosuvastatin



A vizsgálatba bevont személyek fontosabb jellemzői

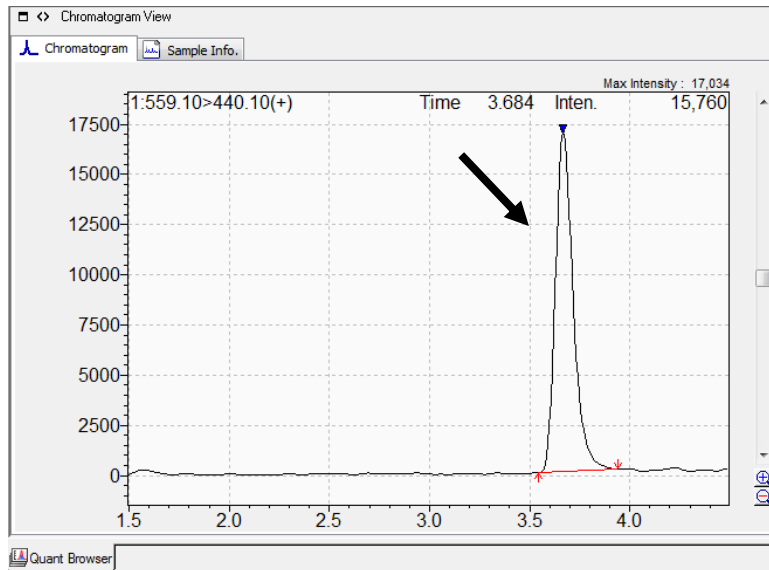
	atorvastatin, medián (tartomány)		rosuvastatin, medián (tartomány)	
	férfi (n=10)	nő (n=24)	férfi (n=31)	nő (n=32)
életkor	69 (47-77)	72 (48-86)	71 (43-89)	73 (43-85)
szérum kreatinin ($\mu\text{mol/l}$)	77 (58-87)	66 (43-92)	83 (68-109)	66 (42-92)
LDL-koleszterin (mmol/l)	2,21 (1,5-3,29)	2,25 (1,52-3,77)	2,20 (1,44-4,26)	2,28 (1,25-3,80)
HDL-koleszterin (mmol/l)	1,17 (0,89-1,62)	1,32 (0,77-2,01)	1,17 (0,75-2,28)	1,30 (1,15-1,99)
triglicerid (mmol/l)	1,05 (0,52-2,57)	1,30 (0,70-6,14)	1,53 (0,78-4,07)	1,32 (0,81-4,13)
összkoleszterin (mmol/l)	3,80 (2,40-4,80)	4,15 (2,90-5,90)	3,70 (2,80-6,30)	4,20 (2,70-6,10)

Vizsgálati módszer

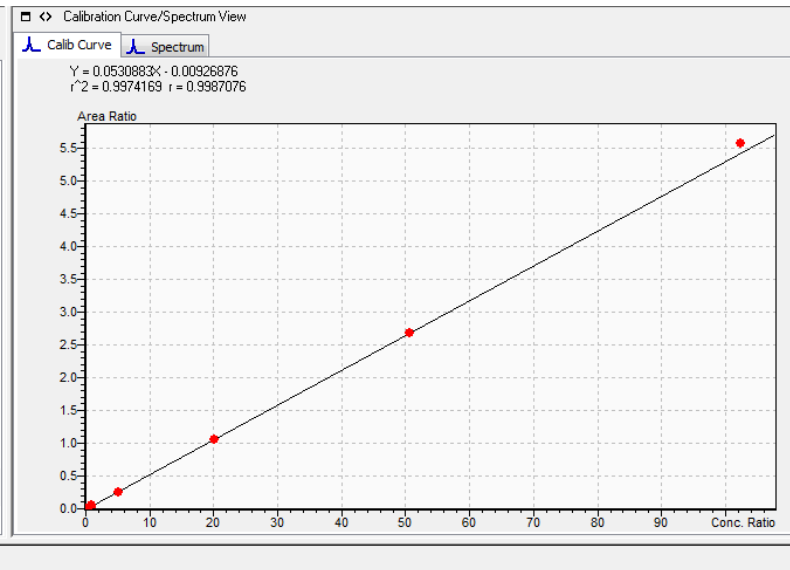
- gyári kit, kalibrátor, kontroll nem elérhető
- kalibráció: atorvastatinnal, rosuvastatinnal adalékolt liofilezett szérum minták
- belső standard (IS): $^2\text{H}_5$ -atorvastatin, $^{13}\text{C}, ^2\text{H}_4$ -rosuvastatin
- preanalitika:
 - minta: 1 cső natív szérum
 - tárolás: -75 °C
 - deproteinizáció: 50 μl minta+100 μl IS oldat (acetonitril), kicsapás után a felülúszóban végezzük a mérést

Vizsgálati módszer

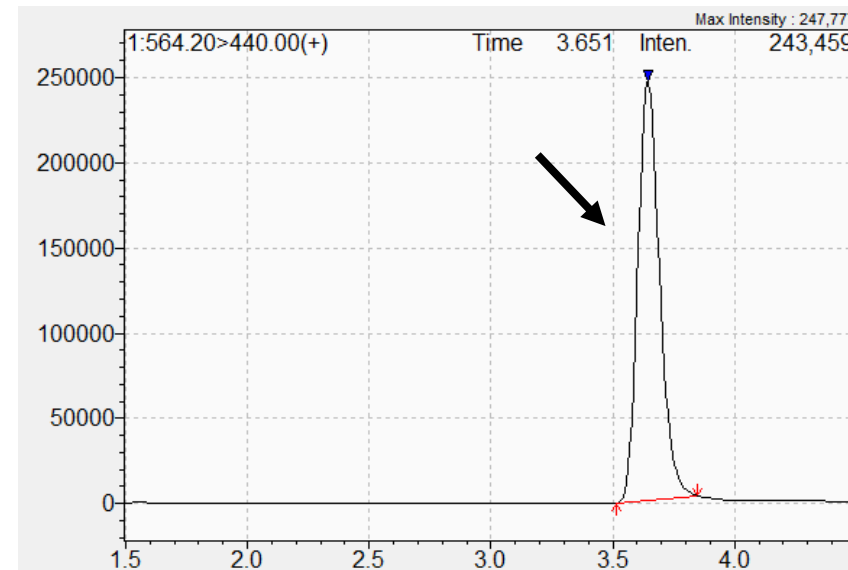
- analízis: Shimadzu Nexera ultrahatékonyágú folyadékkromatográffal kapcsolt LCMS-8060 tömegspektrométer
- állófázis: Phenomenex Kinetex XB-C18 50x2.1 mm, 1.7 μm , 40 °C
- mozgó fázis: víz (0.1% hangyasav) – metanol 0.1% hangyasav) 45:55
- gradiens program: 4,00 min – 15:85; 4,01 min – 45:55.
- kalibrált koncentráció tartomány: 0,5-100 ng/ml



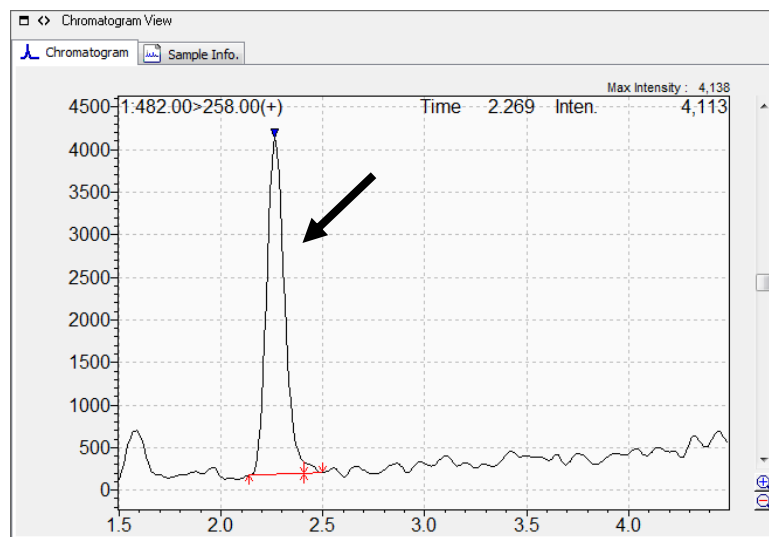
1 ng/ml atorvastatin (szérum)



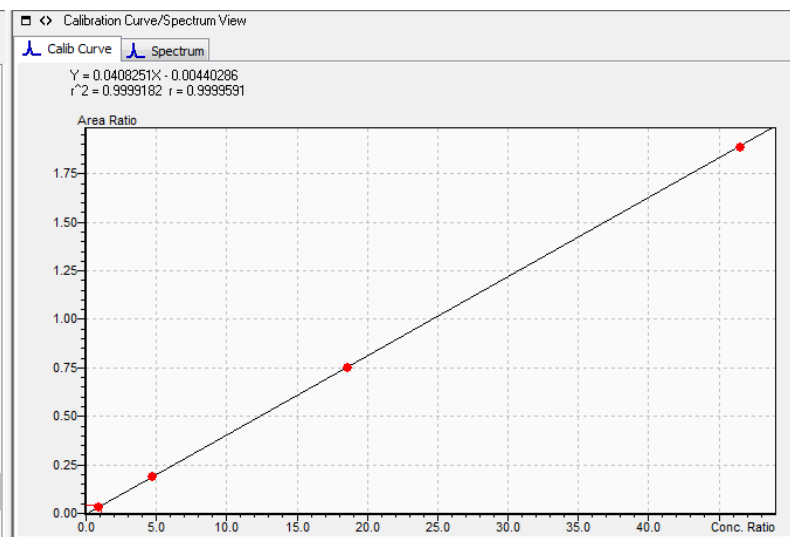
atorvastatin kalibrációs egyenes



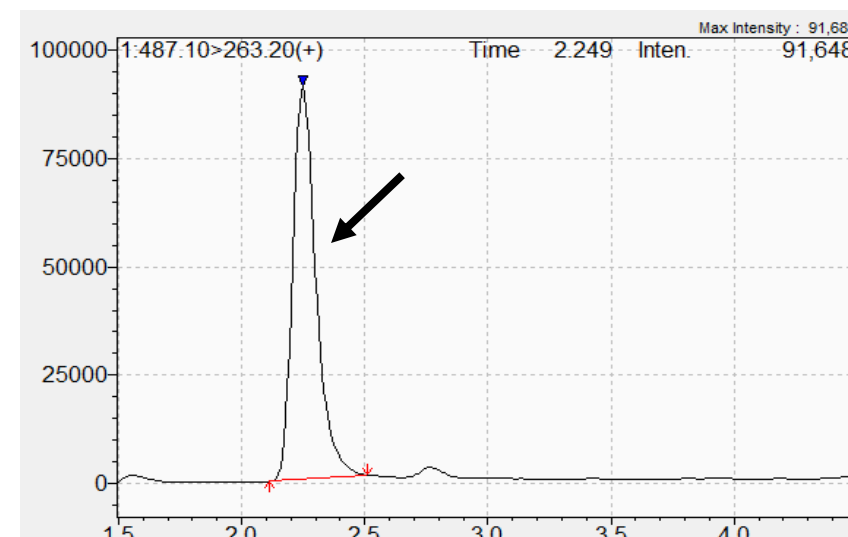
10 ng/ml D₅-atorvastatin (szérum)



1 ng/ml rosuvastatin (szérum)

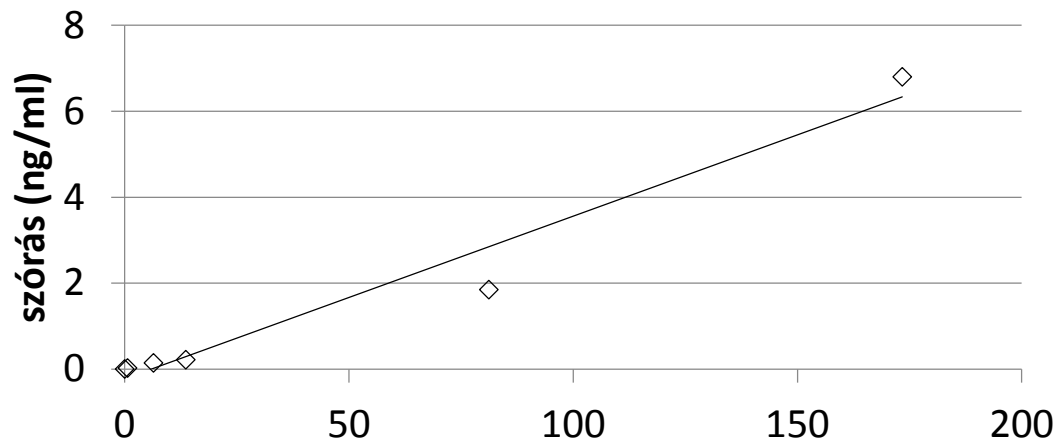


rosuvastatin kalibrációs egyenes

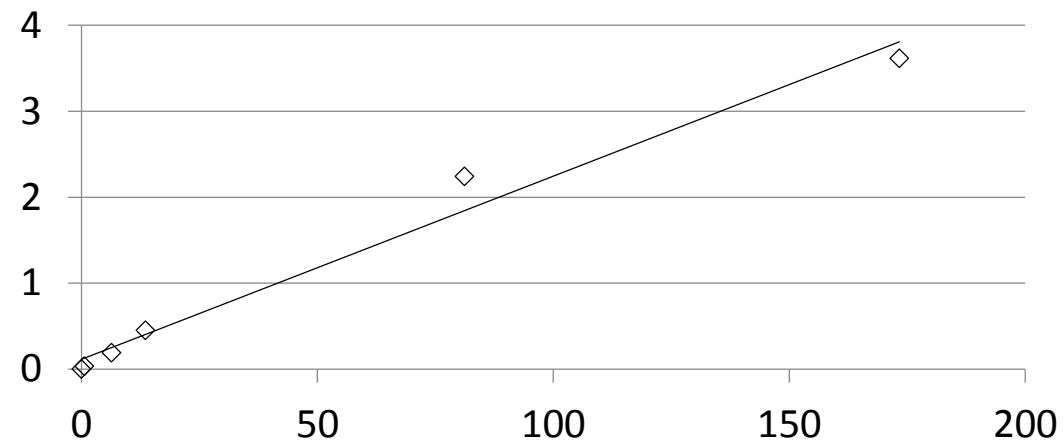


10 ng/ml ¹³C,²H₄-rosuvastatin (szérum)

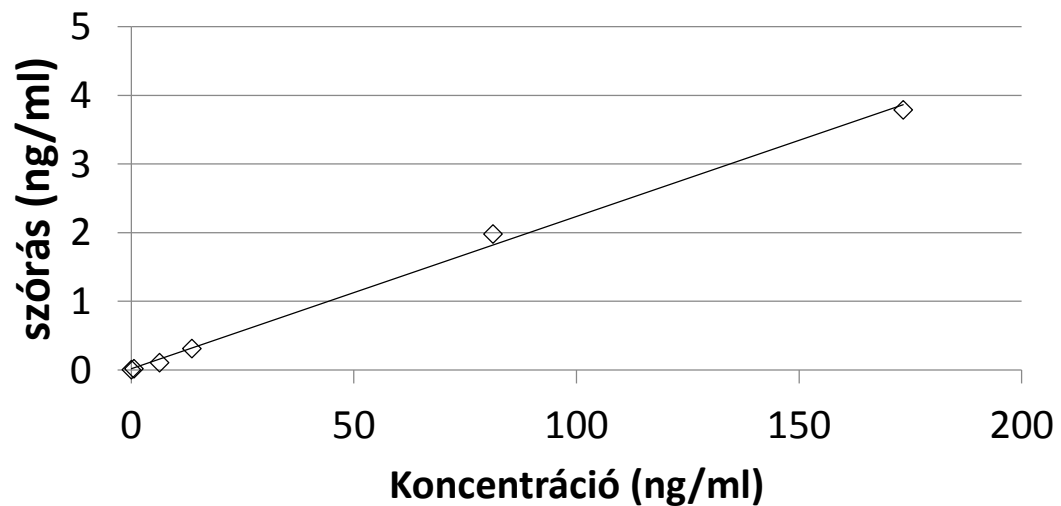
atorvastatin – szérum minták



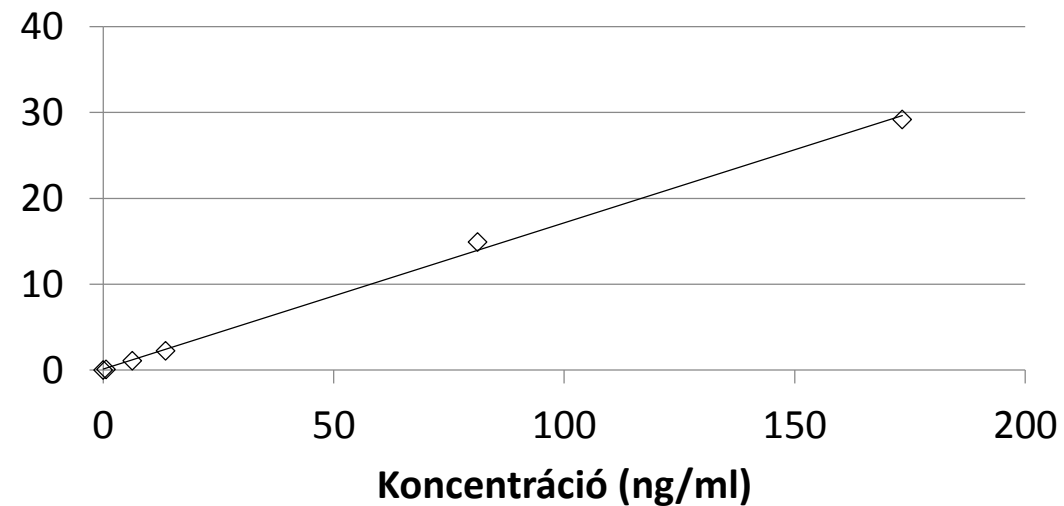
atorvastatin – hiperbilirubinémiás szérum



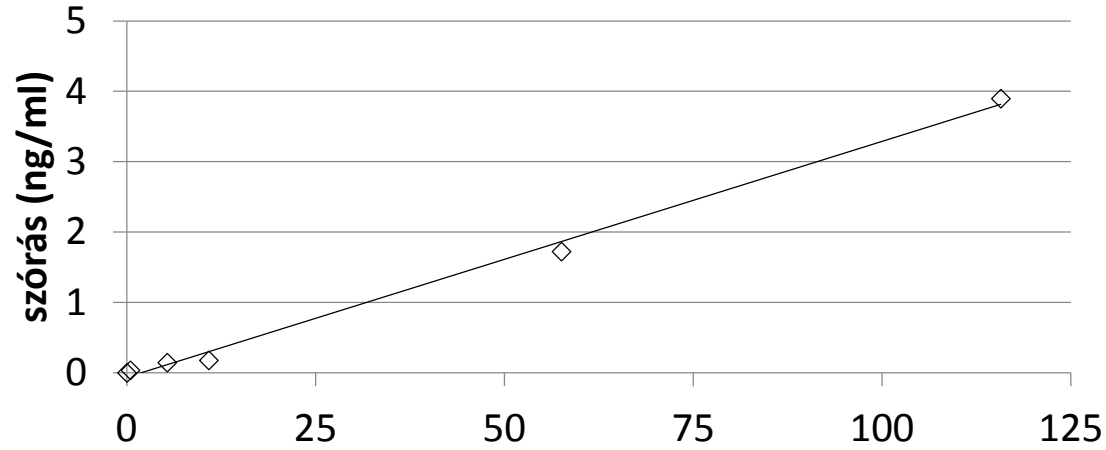
atorvastatin – hemolizált szérum



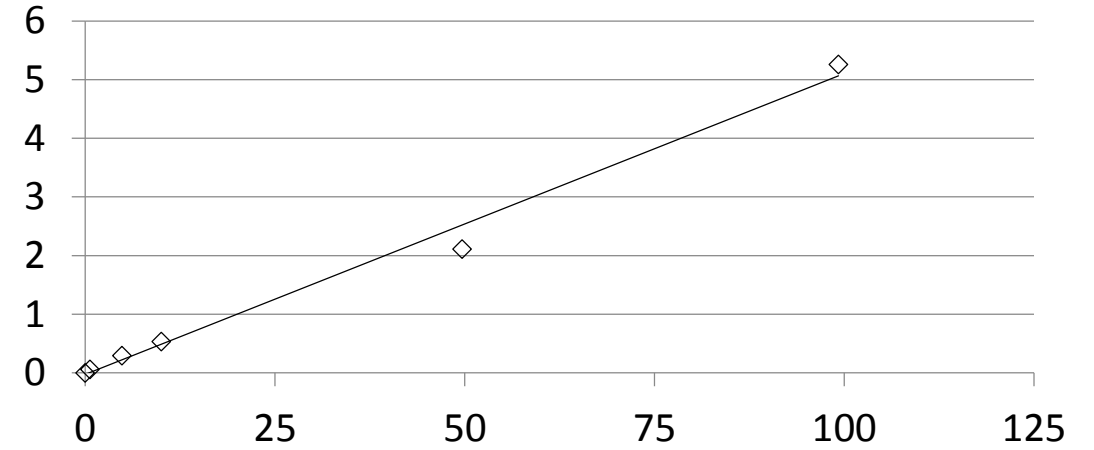
atorvastatin – lipémiás szérum



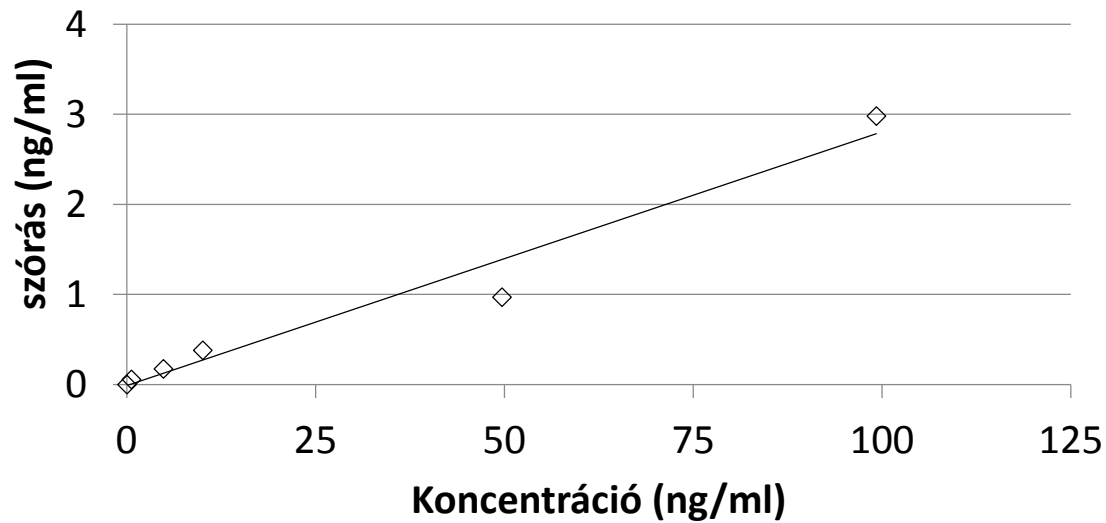
rosuvastatin – szérum minták



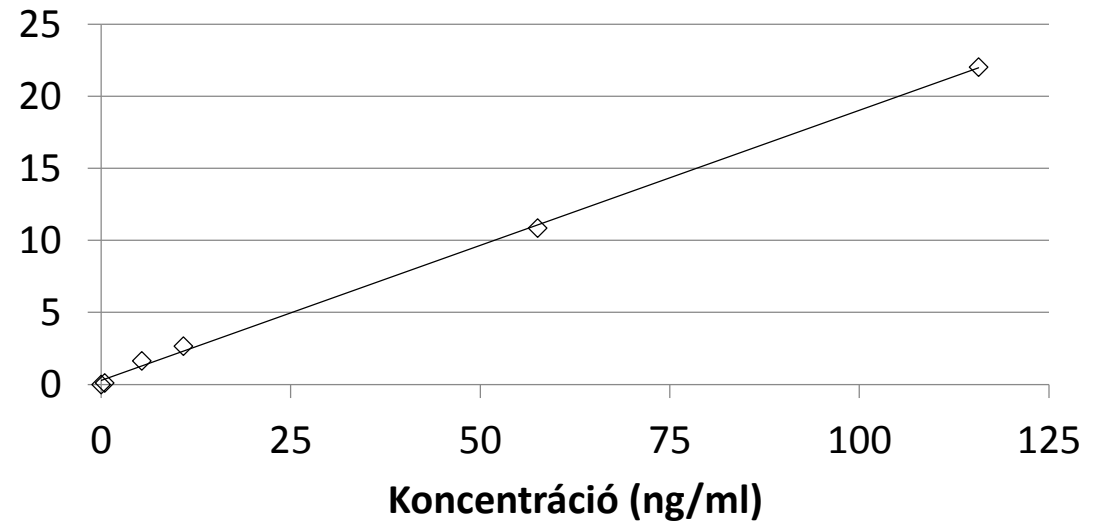
rosuvastatin - hiperbilirubinémiás szérum



rosuvastatin - hemolizált szérum



rosuvastatin – lipémiás szérum

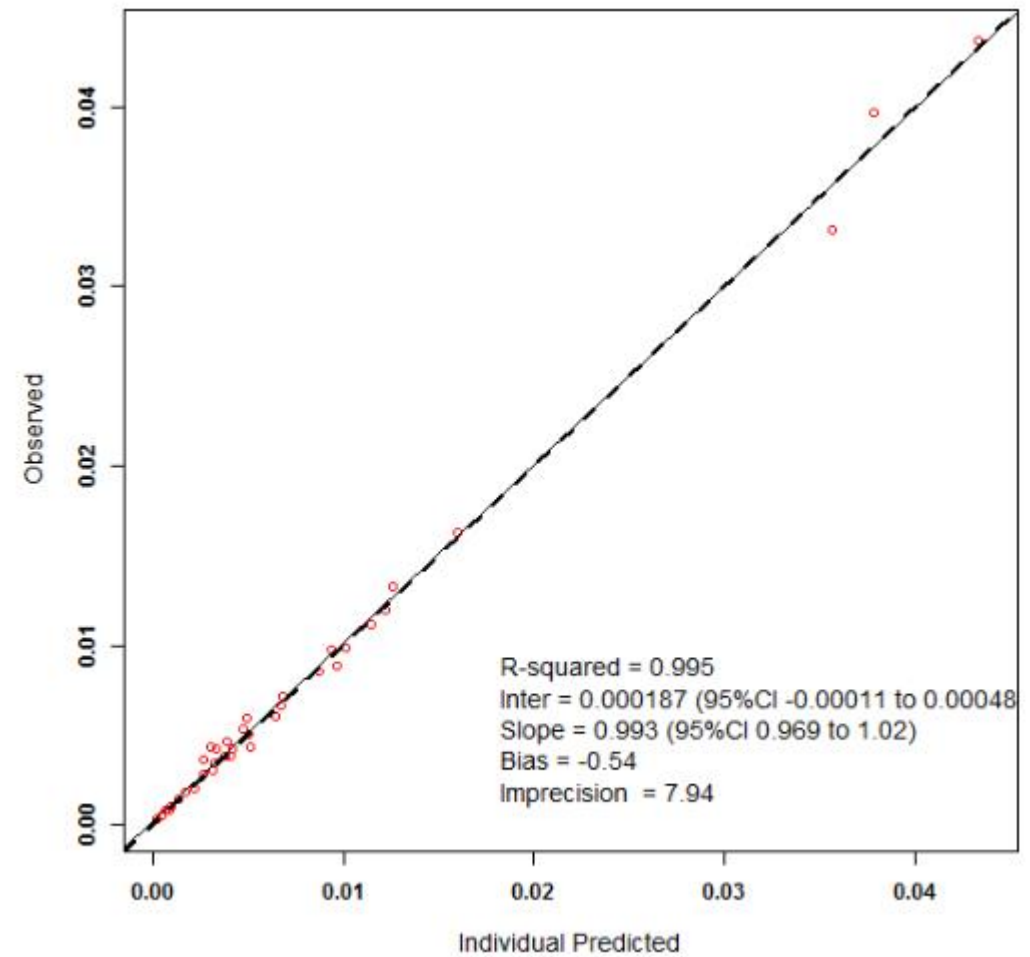
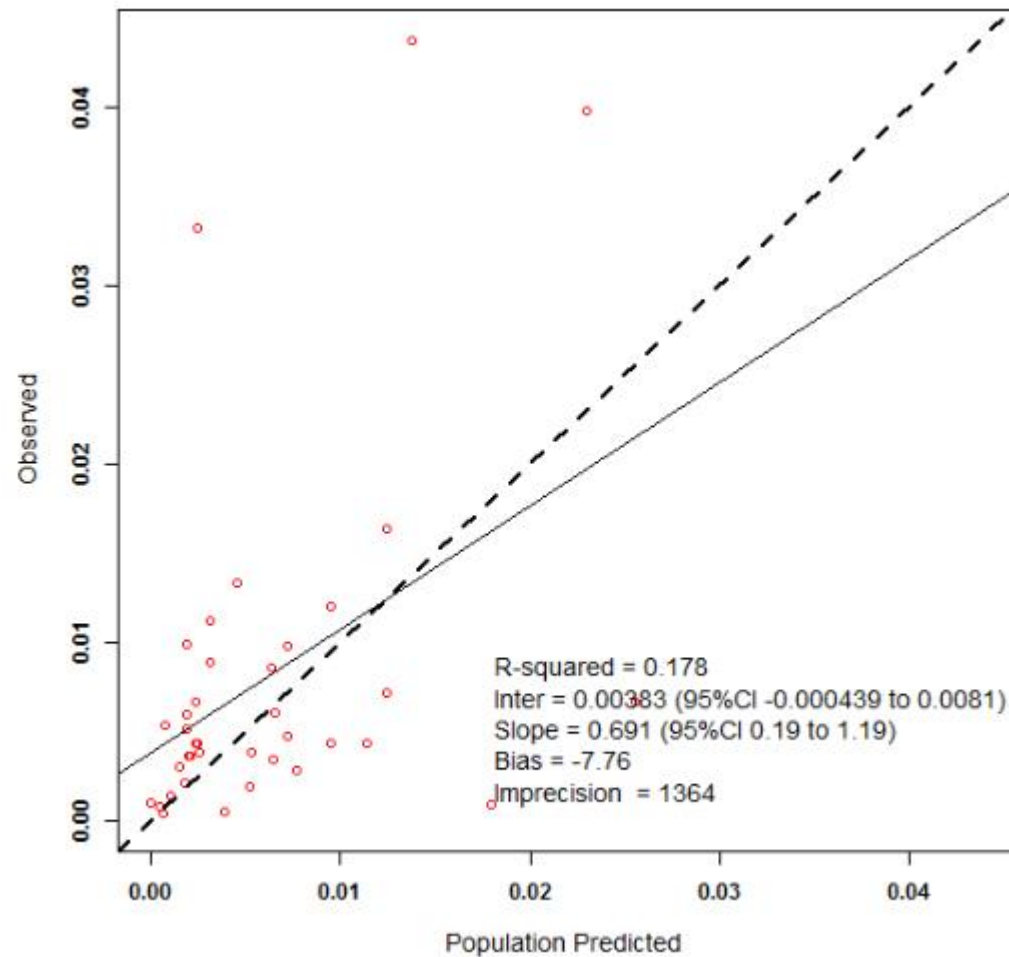


Lineáris hibafüggvények vizsgálata

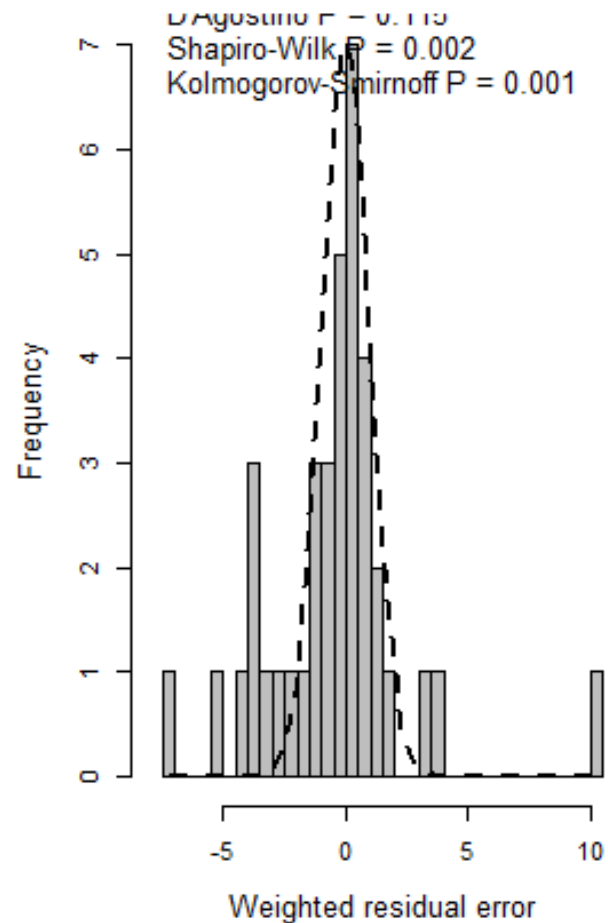
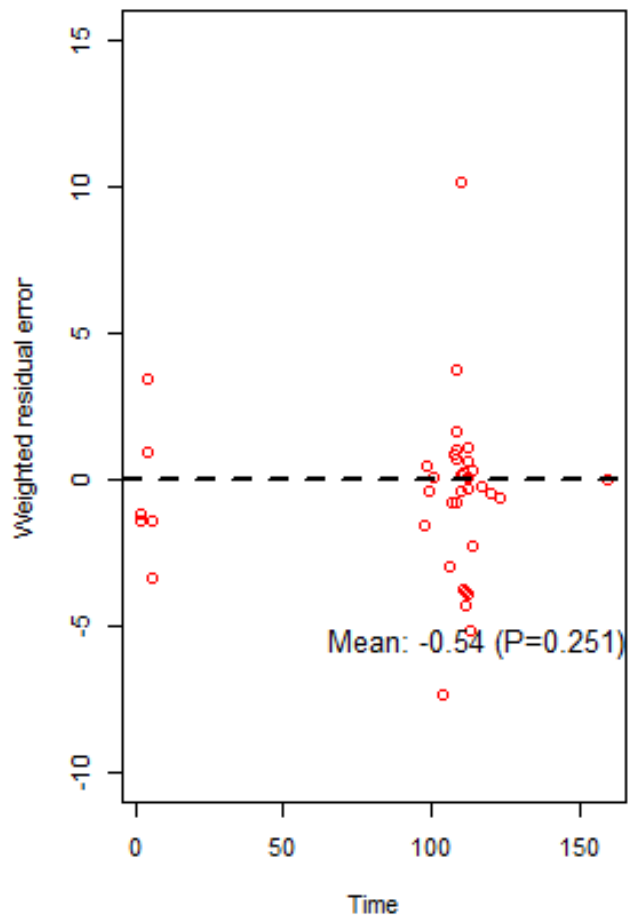
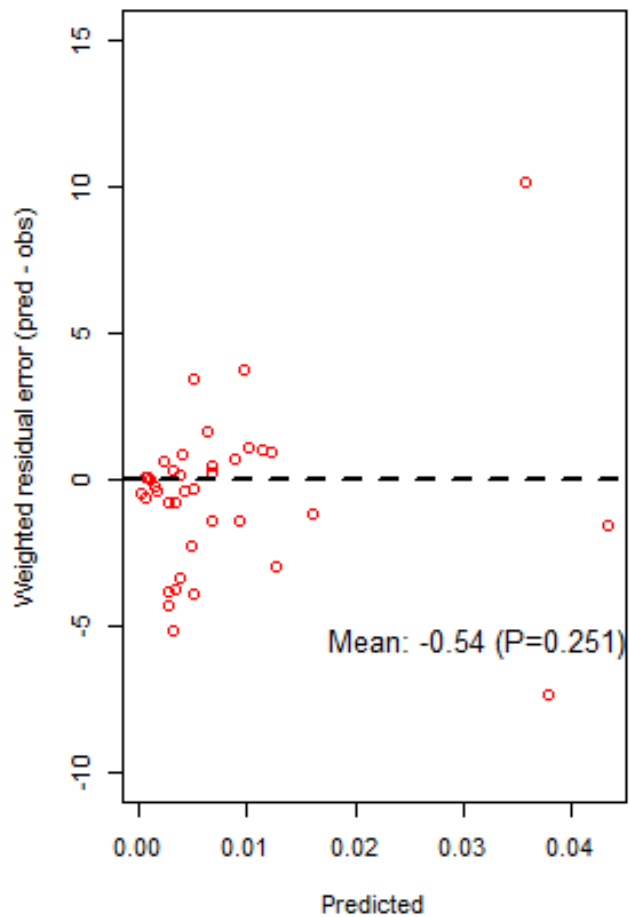
	Atorvastatin	Rosuvastatin
<i>Szérum</i>		
egyenlet	0.0379x-0.2289	0.06x-0.0655
r ²	0.9628	0.9955
<i>Hemolizált szérum</i>		
egyenlet	0.0222x-0.00192	0.0282x-0.0138
r ²	0.9971	0.9648
<i>Icterikus szérum</i>		
egyenlet	0.0213x+0.1148	0.0513x-0.0295
r ²	0.9802	0.9897
<i>Lipaemiás szérum</i>		
egyenlet	0.1704x+0.1054	0.1875x+0.2726
r ²	0.9983	0.9988

szintek száma: 6, minták száma szintenként: 8

Atorvastatin populációs farmakokinetikai modellje (egyrekeszes)



Atorvastatin populációs farmakokinetikai modellje (egyrekeszes)

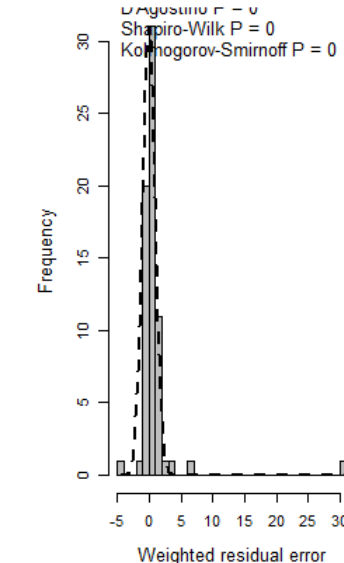
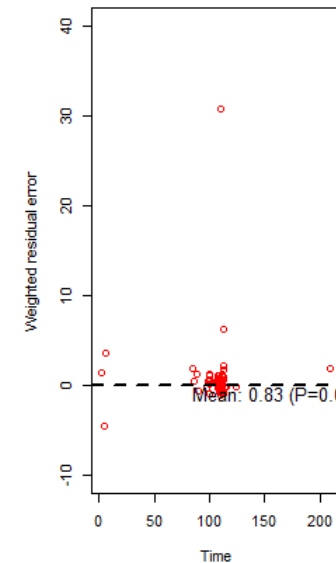
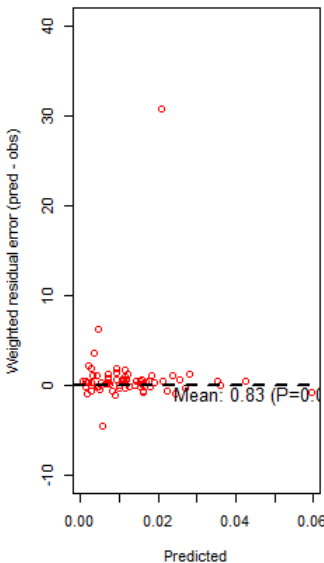
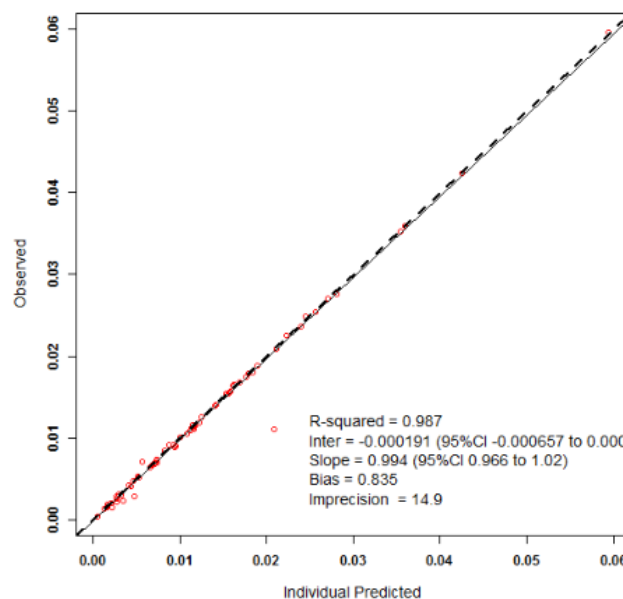
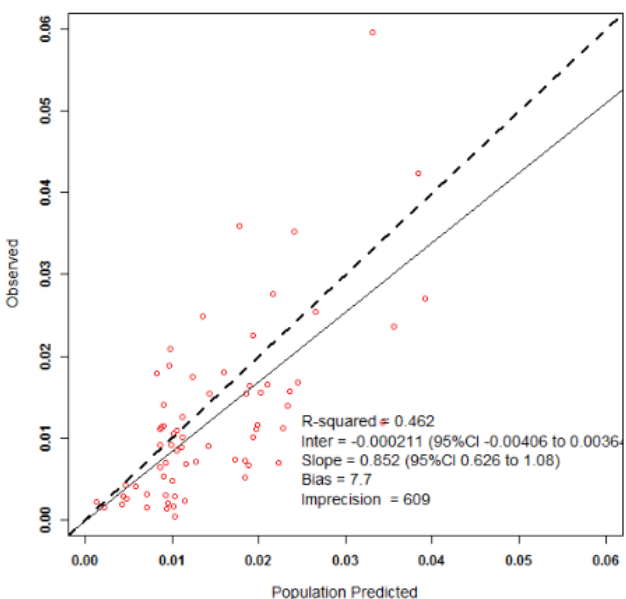
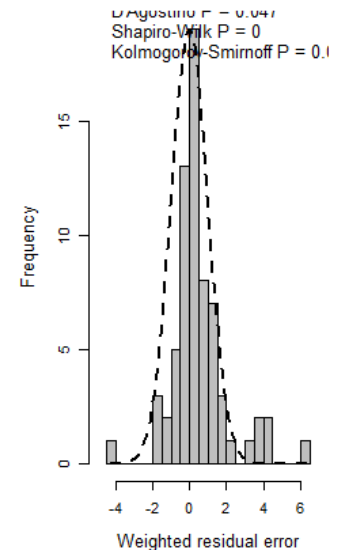
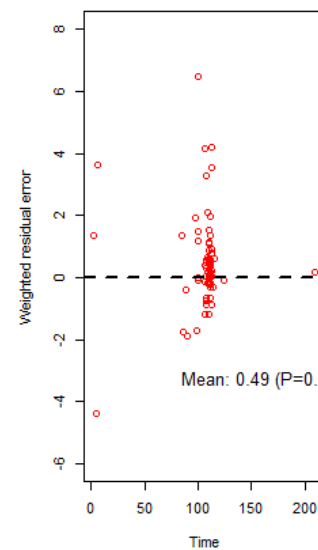
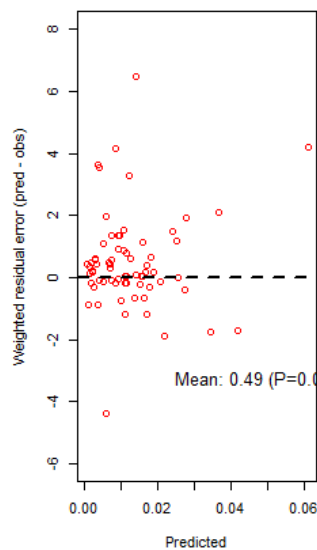
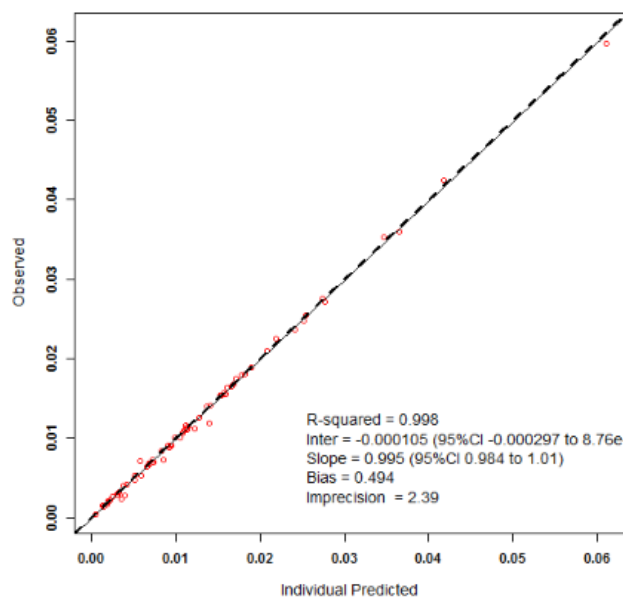
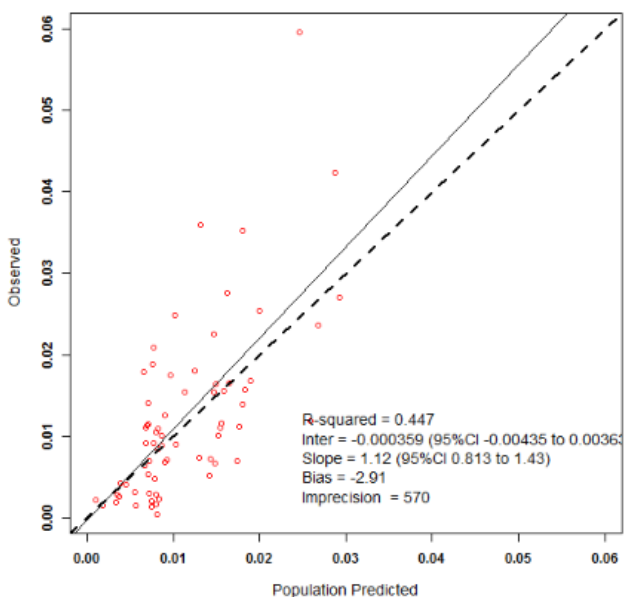


Az atorvastatin irodalmi és kísérletünkben kapott farmakokinetikai paramétereinek összehasonlítása

jellemző	Irodalom	Saját modell
felszívódási sebességi állandó (K_a)	3,5 h ⁻¹	3,54 (1,15-4,72) [†] h ⁻¹
biohasznosulás	12 %	21,8 (18,9-28,2) %
látszólagos megoszlási térfogat	381 l	277,9 (229,4-466,0) l
eliminációs féleletidő ($t_{1/2}$)	14 h	4,86 (4,24-8,38) h

[†] medián (első kvartilis – harmadik kvartilis)

Rosuvastatin populációs farmakokinetikai modellje



A rosuvastatin irodalmi és kísérletünkben kapott farmakokinetikai paramétereinek összehasonlítása

jellemző	szakirodalmi adatok	Saját modell	
		egyrekeszes modell	kétrekeszes modell
felszívódási sebességi állandó (K_a)	0,37 h ⁻¹	0,07 (0,05-0,11) [†] h ⁻¹	17,8 (4,9-25,6) h ⁻¹
biohasznosulás	20 %	73 (65-75) %	34 (32-35) %
látszólagos megoszlási térfogat	134 l	14,3 (11,0-15,0) l	96,1 l (82,4-100,1)
eliminációs féleletidő ($t_{1/2}$)	19 h	0,15 (0,14-0,16) h	2,52 h (1,72-2,73)

[†] medián (első kvartilis – harmadik kvartilis)

Összefoglalás

- LC-MS/MS vizsgálati módszer került bevezetésre az atorvastatin és a rosuvastatin szérumban történő meghatározására
- meghatároztuk a vizsgálati hibapolinomot szérumban, hemolizált, hiperbilirubinémiás és lipémiás mintákban
 - az így nyert információk fontos kiegészítéssel szolgálnak az EMA előírások szerint végzett validálás eredményeihez
 - az eljárás alkalmas a mátrix interferenciák megítélésére
 - az atorvastatin és a rosuvastatin vizsgálata a bemutatott módszer esetében lipaemiás mintákban nagyobb bizonytalansággal terhelt
- nemparaméteres populációs farmakokinetikai modelleket alkottunk az atorvastatinnal és a rosuvastatinnal történő egyénre szabott kezelésekhez; a farmakokinetikai paraméterek statisztikai megfelelő egyezést mutatnak az irodalmi adatokkal
- a bemutatott folyamat demonstrálja, hogy a klinikai laboratórium kulcsszerepet tölt be a precíziós farmakoterápiában

Magyar Laboratóriumi Diagnosztikai Társaság 59. Nagygyűlése
Pécs, 2018 augusztus 30 – szeptember 1.



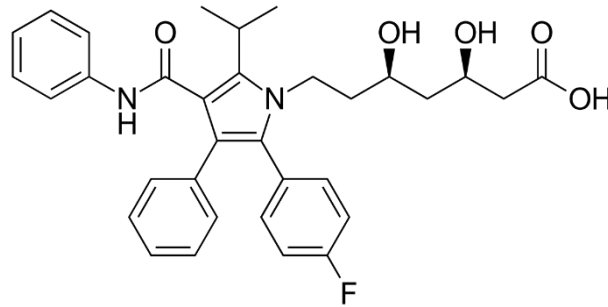
Köszönöm a figyelmet!

karvaly.gellert_balazs@med.semmelweis-univ.hu

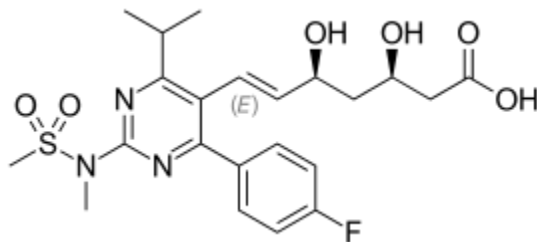
(1) 235-1600/56561. mellék

A kutatást részben a Nemzeti Bionika Program keretében (1336/2017. Korm. rendelet) végeztük, a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal támogatásával.

- **atorvastatin**: p.os 5-80 mg filmtabletta – több mint 100 készítmény van forgalomban

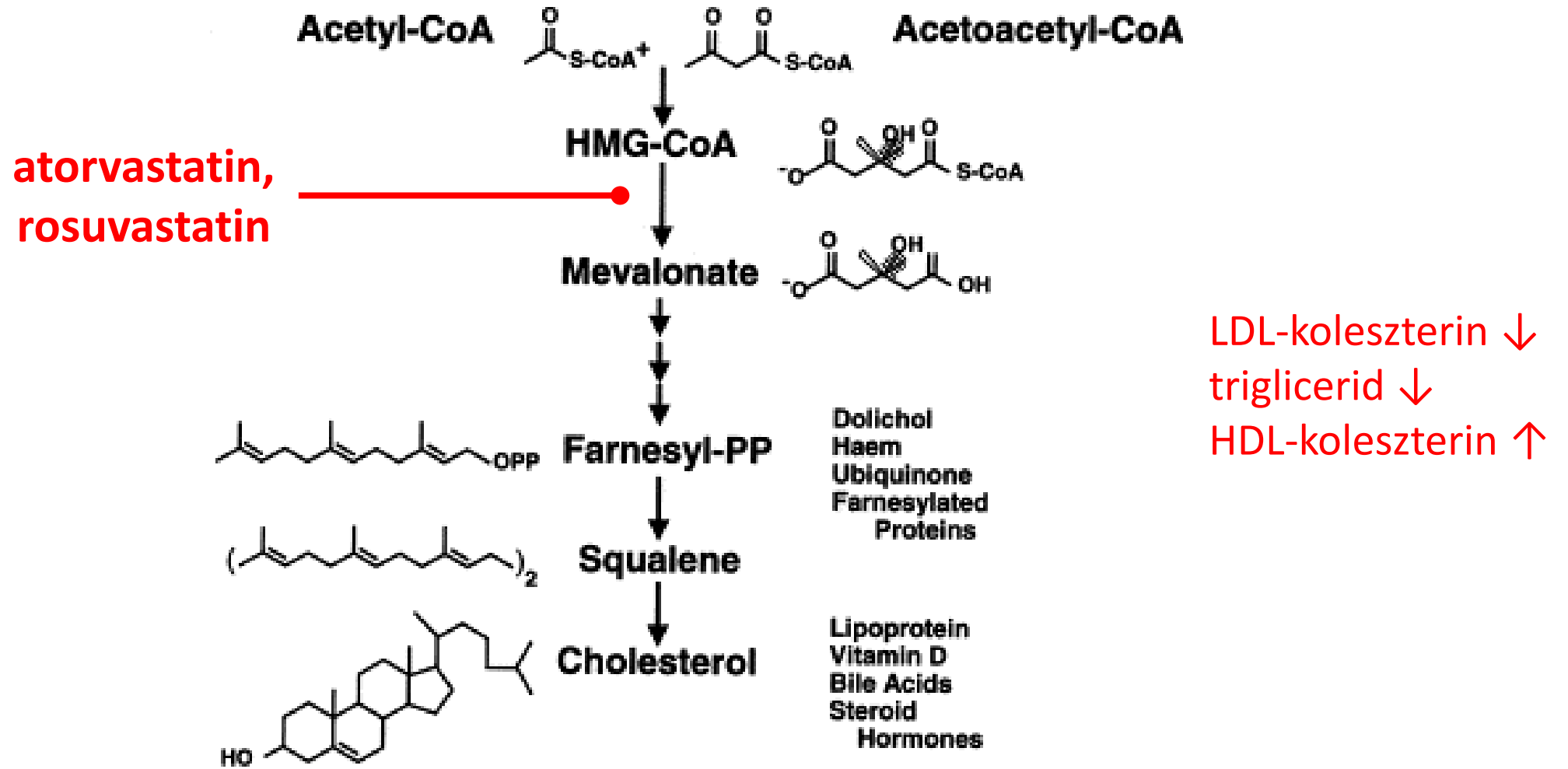


- **rosuvastatin**: p.os 5-40 mg filmtabletta – kb. 90 készítmény van forgalomban



Az atorvastatin és rosuvastatin populációs farmakokinetikai modellek megalkotásának általános szempontjai

- a legtöbb bevont személy 1 alkalommal adott mintát
- rögzített adatok: utolsó bevett dózis, a bevétel időpontja, a mintavétel időpontja
- kizárási kritériumok:
 - bármely adat hiánya
 - hibás adatfelvételre utaló érték
 - referencia tartomány (ffi: 59-104 $\mu\text{mol/l}$, nő: 45-84 $\mu\text{mol/l}$) határain >10%-kal kívül eső szérum kreatinin szint
- egyrekeszes modelleket készítettünk



Az atorvastatin és a rosuvastatin fontosabb gyógyszerészeti jellemzői

jellemző	atorvastatin	rosuvastatin
log P	6,36	0,13
Felszívódási sebességi állandó (K_a)	3,5 h ⁻¹	0,368 h ⁻¹
CL/F	116 l/h	264 l/h
V_c /F	3250 l/h	1170 l/h
fehérjekötés	>98 %	kb. 90 %
maximális koncentráció eléréséig szükséges időtartam	1-2 h	5 h
biohasznosulás	12 %	20 %
látszólagos megoszlási térfogat	381 l	134 l
eliminációs féléletidő	14 h	19 h

Aoyama T et al. Biol Pharm Bull 2010;33:1082.
Narwal R et al. Clin Pharmacokinet 2010;49:693.
<https://www.ogyei.gov.hu/gyogyszeradatbazis/>
<https://www.drugbank.ca/>

Tömegspektrométer beállítások

általános beállítások

Paraméter	Beállított érték
porlasztó gázáram	3 l/min
szárító gázáram	6 l/min
fűtő gázáram	12 l/min
interface hőmérséklet	350 °C
fűtőblokk hőmérséklet	400 °C
desolvation line hőmérséklet	250 °C

IS: belső standard

vegyületspecifikus beállítások

Paraméter	Atorvastatin	Rosuvastatin
célion-átmenet	559.1>440.1	482.0>258.0
Q1 bias	-26 V	-22 V
CE	-23 V	-35 V
Q3 bias	-22 V	-13 V
dwel time	50 ms	50 ms
IS célion-átmenet	564.2>440.0	487.1>263.2
Q1 bias	-26 V	-22 V
CE	-23 V	-35 V
Q3 bias	-22 V	-13 V
dwel time	50 ms	50 ms