

Page de garde

Université de Montréal

**Prédiction des impacts pharmacocinétiques des
interactions médicamenteuses impliquant les
CYP3A et les glycoprotéines-P:
Développement de modèles physiologiques et analyse
de sensibilité**

Par
Frédérique Fenneteau

Faculté de Pharmacie

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures et postdoctorales
en vue de l'obtention du grade de docteur
en sciences pharmaceutiques
option technologie pharmaceutique

Novembre 2009

© Frédérique Fenneteau, 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

Prédiction des impacts pharmacocinétiques des interactions médicamenteuses
impliquant des CYP3A et les glycoprotéines-P :
développement de modèles physiologiques et analyse de sensibilité

Présentée par

Frédérique Fenneteau

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Pr. Daniel Lévesque, Ph.D
Président-rapporteur

Pr. Fahima Nekka, Ph.D
Directrice de recherche

Pr. Jacques Turgeon, Ph.D
Co-directeur de recherche

Pr. Robert Tardif, Ph.D
Membre du jury

Dr. Thierry Lavé, Ph.D
Examineur externe

Pr. Patrick du Souich, Ph.D
Représentant du doyen de la FESP

Résumé

Les propriétés pharmacocinétiques d'un nouveau médicament et les risques d'interactions médicamenteuses doivent être investigués très tôt dans le processus de recherche et développement. L'objectif principal de cette thèse était de concevoir des approches prédictives de modélisation du devenir du médicament dans l'organisme en présence et en absence de modulation d'activité métabolique et de transport.

Le premier volet de recherche consistait à intégrer dans un modèle pharmacocinétique à base physiologique (PBPK), le transport d'efflux membranaire gouverné par les glycoprotéines-P (P-gp) dans le cœur et le cerveau. Cette approche, basée sur des extrapolations *in vitro-in vivo*, a permis de prédire la distribution tissulaire de la dompéridone chez des souris normales et des souris déficientes pour les gènes codant pour la P-gp. Le modèle a confirmé le rôle protecteur des P-gp au niveau cérébral, et a suggéré un rôle négligeable des P-gp dans la distribution tissulaire cardiaque pour la dompéridone.

Le deuxième volet de cette recherche était de procéder à l'analyse de sensibilité globale (ASG) du modèle PBPK précédemment développé, afin d'identifier les paramètres importants impliqués dans la variabilité des prédictions, tout en tenant compte des corrélations entre les paramètres physiologiques. Les paramètres importants ont été identifiés et étaient principalement les paramètres limitants des mécanismes de transport à travers la membrane capillaire.

Le dernier volet du projet doctoral consistait à développer un modèle PBPK apte à prédire les profils plasmatiques et paramètres pharmacocinétiques de substrats de CYP3A administrés par voie orale à des volontaires sains, et de quantifier l'impact d'interactions médicamenteuses métaboliques (IMM) sur la pharmacocinétique de ces substrats. Les prédictions des profils plasmatiques et des paramètres pharmacocinétiques des substrats des CYP3A ont été très comparables à ceux mesurés lors d'études cliniques. Quelques écarts ont été observés entre les prédictions et les profils plasmatiques cliniques mesurés lors d'IMM. Cependant, l'impact de ces inhibitions sur

les paramètres pharmacocinétiques des substrats étudiés et l'effet inhibiteur des furanocoumarins contenus dans le jus de pamplemousse ont été prédits dans un intervalle d'erreur très acceptable.

Ces travaux ont contribué à démontrer la capacité des modèles PBPK à prédire les impacts pharmacocinétiques des interactions médicamenteuses avec une précision acceptable et prometteuse.

Mots Clés : Modèle pharmacocinétique à base physiologique; Interactions médicamenteuses; P-glycoprotéine; Cytochromes P450 3A; Analyse de sensibilité

Abstract

Early knowledge of pharmacokinetic properties of a new drug candidate and good characterization of the impact of drug-drug interaction (DDI) on those properties is of crucial importance in the process of drug research and development. The main objective of this thesis consisted in the conception of PBPK models able to predict the drug disposition in the absence and presence of metabolic and transport activity modulation.

The first part of this work aimed to develop a PBPK model that incorporates the efflux function of P-gp expressed in various tissues, in order to predict the impact of P-gp activity modulation on drug distribution. This approach, based on *in vivo-in vitro* extrapolation for estimating the transport-related parameters, allowed the prediction of domperidone distribution in heart and brain of wild-type mice and P-gp deficient mice. The model pointed out the protective function of P-gp in brain whereas it showed the negligible protective effect of P-gp in heart.

The second part of the project aimed to perform the global sensitivity analysis of the previous PBPK model, in order to investigate how the uncertainty and variability of the correlated physiological parameters influence the outcome of the drug distribution process. While a moderate variability of the model predictions was observed, this analysis confirmed the importance for a better quantitative characterization of parameters related to the transport processes through the blood-tissue membrane. Accounting for the input correlation allowed the delineation of the true contribution of each input to the variability of the model outcome.

The last part of the project consisted in predicting the pharmacokinetics of selected CYP3A substrates administered at a single oral dose to human, alone or with an inhibitor. Successful predictions were obtained for a single administration of the CYP3A substrates. Some deviations were observed between the predictions and *in vivo* plasma profiles in the presence of DDI. However, the impact of inhibition on the PK parameters of the selected substrates and the impact of grapefruit juice-mediated inhibition on the

extent of intestinal pre-systemic elimination were predicted within a very acceptable error range.

Overall, this thesis demonstrated the ability of PBPK models to predict DDI with promising accuracy.

Keywords: Physiologically based pharmacokinetic model, drug interactions, P-glycoprotein, cytochromes P450 3A, sensitivity analysis

Table des matières

Résumé	iv
Abstract	vi
Table des matières	viii
Liste des tableaux	xiv
Liste des figures	xv
Liste des abréviations	xxii
Dédicace	xxvii
Remerciements	xxviii
Avant-propos	1
CHAPITRE I	4
REVUE DE LITTÉRATURE	5
1 Le LADME : principes, mécanismes et méthodes de prédiction	5
1.1 Libération et absorption orale du principe actif	5
1.1.1 Solubilité	5
1.1.2 Vitesse de dissolution	8
1.1.3 Glycoprotéines-P	9
1.1.4 Fraction absorbée et Perméabilité intestinale	12
1.1.5 Autres facteurs	14
1.1.6 Système de Classification Biopharmaceutique	15
1.2 Métabolisme et éliminations présystémiques	17
1.2.1 Rôle des cytochromes P450 dans le métabolisme intestinal et hépatique	17
1.2.2 Éliminations présystémiques intestinales	19
1.2.3 Métabolisme hépatique	21
1.3 Distribution	25
1.3.1 Méthodes d'extrapolation et allométrie	26
1.3.2 Approches basées sur la structure (QSPR)	26
1.3.3 Approches physiologiques	27
1.3.4 Rôle des transporteurs dans la distribution	29
1.4 Élimination rénale et biliaire	31
1.4.1 Élimination rénale	31
1.4.2 Élimination biliaire	32
2 Interactions médicamenteuses : mécanismes et quantification	33
2.1 Interactions au niveau de l'absorption	33
2.1.1 Changements physicochimiques	33
2.1.2 Changements physiologiques	33
2.1.3 Changements biochimiques	34
2.2 Interactions médicamenteuses métaboliques	34
2.2.1 Inhibitions enzymatiques	35
2.2.2 Induction enzymatique	40

2.2.3	Méthodes de prédiction des interactions métaboliques	41
2.3	Interactions au niveau de la distribution	44
2.4	Interactions au niveau de l'élimination rénale et biliaire	45
3	La modélisation pharmacocinétique comme outil d'analyse et de prédiction	47
3.1	Approche non-compartmentale	47
3.1.1	Description	47
3.2	Modèle compartimental classique	49
3.2.1	Description	49
3.2.2	Estimation des paramètres	52
3.2.3	Avantages et Limitations	54
3.3	Modèles pharmacocinétiques de population	55
3.3.1	Description	55
3.3.2	Avantages et Limitations	58
3.4	Modèles pharmacocinétiques à base physiologique	59
3.4.1	Bref historique et origines	59
3.4.2	Représentation conceptuelle	60
3.4.3	Structure du modèle	62
3.4.4	Modèles tissulaires	64
3.4.5	Estimation des paramètres physiologiques, physicochimiques et biochimiques	68
3.4.6	Simulation, analyse et raffinement du modèle	69
3.4.7	Avantages et Limitations	70
3.4.8	Utilisation des PBPK dans le processus de recherche et développement de médicaments	72
3.5	Validation des modèles pharmacocinétiques	72
3.6	Utilisation des modèles PK pour caractériser l'absorption orale des xénobiotiques	73
3.6.1	Degré d'ionisation	74
3.6.2	Bilans de matières macroscopiques ou microscopiques	74
3.6.3	Modèles dynamiques	75
3.7	Utilisation des modèles PK dans les études d'interactions médicamenteuses	79
4	Analyse de sensibilité	81
4.1	Analyses de sensibilité locales	82
4.1.1	Analyse de sensibilité différentielle	82
4.1.2	Mesure de la sensibilité locale	83
4.1.3	Index de sensibilité	84
4.1.4	Avantages et inconvénients des méthodes locales	84
4.2	Analyse de sensibilité globale	84
4.2.1	Définition : Variabilité versus incertitude d'un paramètre	85
4.2.2	Analyse d'incertitude : Échantillonnage aléatoire	86
4.2.3	Analyse de sensibilité	87
4.3	Analyses de sensibilité dans le domaine PK/PD	92
4.3.1	Définitions	92
4.3.2	Choix de la méthode d'AS et exemples d'application	92
5	Objectifs de la thèse	95
6	Bibliographie	97

CHAPITRE II.	111
ASSESSING DRUG DISTRIBUTION IN TISSUES EXPRESSING P-GLYCOPROTEIN THROUGH PHYSIOLOGICALLY BASED PHARMACOKINETIC MODELING: MODEL STRUCTURE AND PARAMETER DETERMINATION	112
Abstract	113
1 Background	114
2 Method	116
2.1 Structure of the PBPK model	116
2.2 Tissue-distribution models	117
2.2.1 Well-stirred model (WS)	118
2.2.2 Mechanistic Transport-Based (MTB) models	120
2.3 Mouse-related parameters	123
2.4 Distribution-related parameters required for the MTB model	123
2.4.1 Step I: Estimation of in vitro diffusion and P-gp efflux rates of a P-gp substrate through Caco-2 monolayer	124
2.4.2 Step II: In vitro-in vivo extrapolation of drug diffusion velocity and P-gp efflux rate parameters	124
2.4.3 Step III: Calculation of the permeability-surface area product (PSA_t) and P-gp-mediated efflux clearance ($CL_{P-gp,t}$) of the P-gp substrate into mice brain and heart.	127
2.5 Assessing drug distribution in tissues expressing P-gp	128
3 Results	129
3.1 Estimation of metabolic parameters	129
3.2 Estimation of distribution parameters for WS and MTB models	129
3.3 WS Model	132
3.4 MTB Models: Accounting only for P-gp Efflux Activity in Heart and Brain	133
4 Discussion	135
5 Conclusion	137
6 Abbreviations	138
7 Competing Interests	139
8 Author's Contribution	139
9 Acknowledgements	139
References	140

CHAPITRE III	143
ASSESSING DRUG DISTRIBUTION IN TISSUES EXPRESSING P-GLYCOPROTEIN THROUGH PHYSIOLOGICALLY BASED PHARMACOKINETIC MODELING: A GLOBAL SENSITIVITY ANALYSIS FOR THE IDENTIFICATION OF IMPORTANT MODEL PARAMETERS	144
Abstract	145
1 Introduction	147
2 Methods	149
2.1 PBPK Model for the Prediction of P-gp Substrates Disposition	149
2.1.1 Brief model presentation	149
2.1.2 Choice of Input and Output Parameters	151
2.1.3 Determination of Mean Values and Coefficients of Variations of the Input Parameters	152
2.1.4 Correlation factors between input parameters	154
2.2 GSA/PRCC Methodology	154
2.2.1 Input Parameters Distribution	154
2.2.2 Random Sampling of Input parameters: Monte-Carlo Simulations	155
2.2.3 Analysis of Output Parameters and Input-Output Correlations: Uncertainty and Sensitivity	155
2.2.4 Example of PRCC calculation	156
2.2.5 Software	157
3 Results	158
3.1 Impact of the Variability and Uncertainty of Input Parameters on Concentration Time Profiles in the Presence or Absence of P-gp Activity	158
3.2 Impact of the Variability and Uncertainty of Input Parameters on the Prediction Imprecision of C_{last} and C_{max} in Heart, Brain, Liver and Plasma in the presence and absence of P-gp activity	162
3.3 Sensitivity Analysis: Identification of Important Model Parameters through Calculation of Partial Rank Correlation Coefficients (PRCC)	164
4 Discussion	174
5 Conclusion	177
6 Acknowledgments	177
APPENDIX	178
REFERENCES	183

CHAPITRE IV	187
PHYSIOLOGICALLY BASED PREDICTIONS OF THE IMPACT OF INHIBITION OF INTESTINAL AND HEPATIC METABOLISM ON HUMAN PHARMACOKINETICS OF CYP3A SUBSTRATES	188
Abstract	189
List of abbreviations	191
1 Introduction	192
2 Methods	194
2.1 Selection Criteria for Drug Models	194
2.2 WB-PBPK Model Structure	197
2.3 The Distribution Process Modeling Within the WB-PBPK Model	198
2.4 The Absorption Process Modeling Within the WB-PBPK Model	202
2.4.1 Structure of the GIT	202
2.4.2 Dissolution Rate in the GIT	202
2.4.3 Drug Solubility in the GIT	202
2.4.4 Drug Diffusion Velocity through the Gut Membrane	203
2.5 Hepatic Intrinsic Clearance and Gut Extraction Ratio	204
2.6 Drugs Used as CYP3A Inhibitors: Their Influence on the Intrinsic Clearance of CYP3A Substrates	206
2.7 Estimation of Time-Dependent Concentration of Inhibitor in Gut and Liver	210
2.8 Differential Equations of the WB-PBPK Model	211
2.9 Estimation of PK Parameters	214
2.10 Uncertainty Analysis: Monte-Carlo Simulation	214
2.11 WB-PBPK Model Simulation	216
3 Results	217
3.1 Plasma Profiles of the Selected Drugs in the Presence or Absence of Metabolic Interactions	217
3.2 Prediction of PK Parameters in the Presence or Absence of Metabolism-based Inhibition	227
3.3 Prediction of the Impact of Metabolic Drug Interactions on Drug PK Parameters	227
3.4 Extent of Absorption, Pre-systemic Elimination, and Oral Bioavailability in the Presence or Absence of Metabolic Interaction	231
3.4.1 Midazolam (Figure 8A)	231
3.4.2 Alprazolam (Figure 8B)	232
3.4.3 Triazolam (Figure 8C)	233
3.4.4 Simvastatin (Figure 8D)	234
4 Discussion	235
5 Acknowledgment	243
APPENDIX	244
A.1 Inhibitors Plasma Profiles	245
A.1.1 Saquinavir Plasma Profile	245
A.1.2 Ketoconazole Plasma Profile	245
A.1.3 Diltiazem Plasma Profile	247
A.1.4 Itraconazole Plasma Profile	247
A.1.5 Grapefruit juice component	248
References	249

CHAPITRE V	257
DISCUSSION GÉNÉRALE	258
1 Prédiction de la distribution tissulaire d'un substrat de P-gp au moyen d'un modèle PBPK	258
2 Identification des paramètres importants du modèle : Analyse globale de sensibilité	262
3 Prédiction des profils et paramètres pharmacocinétiques de substrats de CYP3A administrés à des volontaires sains, en présence ou en absence d'interaction médicamenteuse métabolique	266
4 Conclusions	270
Références	272

Liste des tableaux

CHAPITRE II

Table I. Input physiological parameters..... 121

Table II. Related parameters of the P-gp substrates used to establish linear regressions allowing the in vitro-in vivo extrapolation of diffusion and P-gp mediated efflux rates. Data were extracted from Collett and coworkers (Collett, Tanianis-Hughes et al. 2004).
..... 125

Table III. Additional physiological parameters required for the MTB tissue models applied to brain and heart..... 127

Table IV. Physico-chemical parameters of domperidone 128

CHAPITRE III

Table I. Mean values and coefficients of variation of the input parameters used in the GSA..... 153

Table II. Descriptive statistics of C_{max} , and C_{last} of domperidone predicted in mice tissues in the presence (P-gp⁺) or absence (P-gp⁻) of P-gp activity, after running 1000 Monte-Carlo simulations of the PBPK model. The MTB model has been applied to brain and heart tissues whereas the WS model to liver and plasma..... 163

Table A 1. Matrix of correlation between input parameters approximated by the Newton method and used to perform the Monte-Carlo random sampling..... 179

CHAPITRE IV

Table I. Drug Related parameters used in the human WB-PBPK model..... 196

Table II. Human Physiologic Paramters..... 199

Table III. The calculated partition coefficient (Ptp) in human tissues and organs of MDZ, TRZ, APZ and SMV 201

Table IV. Protocol description of the Clinical Studies Reproduced Using the WB-PBPK Model 208

Table V. Description of Input Parameters studied in the uncertainty analysis. 215

Liste des figures

CHAPITRE I

Figure 1. 1. Principaux transporteurs membranaires ABC intestinaux.....	10
Figure 1. 2. Schéma de culture de monocouche cellulaire de Caco-2. Les P-gp sont exprimées sur la face apicale des cellules. A droite, la PappBA est mesurée en présence d'inhibiteur de P-gp, et résulte seulement du processus de diffusion simple; à gauche, la PappBA résulte des processus de diffusion et d'efflux gouverné par les P-gp.....	14
Figure 1. 3. Répartition des cytochromes P450 dans le petit intestin et le foie chez l'humain, basée sur l'immunoquantification (inspiré de Paine et al., 2006).....	19
Figure 2. 1. Illustration des mécanismes de l'inhibition réversibles par compétition. S1 est le substrat de faible affinité, E l'enzyme, P le produit de la réaction enzymatique, S2 le substrat de forte affinité, ES1 et ES2 les complexes enzyme-substrat.....	35
Figure 2. 2. Illustration des mécanismes de l'inhibition non- compétitive. S1 est le substrat, E l'enzyme, P le produit de la réaction enzymatique de S1, I l'inhibiteur, ES1 le complexe enzyme-substrat, EI le complexe enzyme-inhibiteur, et EIS1 le complexe enzyme-inhibiteur-substrat.....	37
Figure 2. 3. Illustration des mécanismes de l'inhibition incompétitive. S1 est le substrat, E l'enzyme, P le produit de la réaction enzymatique de S1, I l'inhibiteur, et EIS1 le complexe enzyme-inhibiteur-substrat	38
Figure 3. 1. Représentation schématique des paramètres pharmacocinétiques déterminés par la méthode d'analyse non-compartmentale	49
Figure 3. 2. Illustration d'un modèle PK bicompartimental dans le cas a) d'une administration IV et b) d'une administration orale.....	51
Figure 3. 3. Modèle mono-compartmental adapté à un bolus intraveineux.....	53
Figure 3. 4. Évolution du nombre de publications sur les modèles PBPK dans le domaine pharmaceutique (adaptée de Edgington et al., 2008).	60
Figure 3. 5. Représentation schématique d'un modèle PBPK à 14 compartiments. Q représente le débit sanguin aux tissus/organes, CLHep est la clairance hépatique.....	61

Figure 3. 6. Structure du modèle PBPK développé par Haddad (figure extraite de Haddad, Béliveau et al. 2001) dans le cas d'inhalation d'un mélange de composés organiques volatils chez l'humain.....	63
Figure 3. 7. Structure du modèle PBPK développé par Poulin (figure extraite de Poulin and Theil 2002) dans le cas d'administration intraveineuse de diazepam, propranolol ou d'ethoxybenzamide chez le rat.....	64
Figure 3. 8. Représentation schématique du modèle tissulaire à perfusion limitante pour un tissu excréteur.	65
Figure 3. 9. Représentation schématique d'un modèle à perméabilité limitante entre A) l'espace vasculaire et l'espace extravasculaire, B) l'espace vasculaire, extracellulaire, et cellulaire. C_v est la concentration vasculaire, C_{ev} la concentration extravasculaire,.....	67
Figure 3. 10. Illustration de l'évolution des modèles dynamiques compartimentaux d'absorption intestinale.....	78
Figure 4. 1. Représentation schématique d'une analyse de sensibilité globale d'un modèle.....	85
Figure 4- 2: Exemple de fonction membre de la biodisponibilité orale d'un médicament (inspiré de (Gueorguieva, Nestorov et al. 2004).....	87

CHAPITRE II

Figure 1. Schematic representation of the procedures used to develop the whole-body PBPK model applied to the mouse (30g BW) following a 5mg/kg IV injection of domperidone.....	117
Figure 2. Diagram of the mechanistic transport-based tissue model that considers the passive transport of the drug, the P-gp mediated efflux transport, additional efflux transport and/or influx transport	122
Figure 3. Log-Log relationship between the amount of hepatic CYP450 and the body weight of various mammalian species. Data from Craigmill et al., 2002 (Craigmill and Cortright 2002).....	130
Figure 4. Illustration of the three-step procedure developed to estimate in vivo apparent diffusion and P-gp efflux rates of domperidone through capillary membrane of the mouse brain and heart.	1

Figure 5. Prediction of tissue concentration of domperidone using the WS model (black line) in any tissue/organ included in the PBPK model. Tissue concentration measured in WT mice (black lozenge) and KO mice (black circle) after IV administration of 5mg/kg of domperidone. BLQ = Below Limit of Quantification 132

Figure 6. Prediction of tissue concentration of domperidone in WT (black line) and KO (black dashed line) mice using the mechanistic transport based tissue model with passive and P-gp mediated efflux transports for heart and brain. Tissue concentration measured in WT mice (black lozenge) and KO mice (black circle) after IV administration of 5mg/kg of domperidone. BLQ= Below Limit of Quantification. 133

Figure 7. Prediction of brain concentration of domperidone in WT (black line) and KO (black dashed line) mice using the MTB tissue model with passive transport, P-gp mediated efflux transport and additional efflux transport model for brain. Tissue concentration measured in WT mice (black lozenge) and KO mice (black circle) after IV administration of 5mg/kg of domperidone. BLQ= Below Limit of Quantification..... 134

CHAPITRE III

Figure 1 : Domperidone concentration time profiles predicted in mice tissues, in the presence or absence of P-gp activity, after performing Monte Carlo simulations of the PBPK model. Drug distribution in brain tissue is supposed to be governed by diffusion and P-gp mediated efflux rates. The black line represents the median concentration-time profile predicted in the presence of P-gp activity in tissues. The grey lines represent the 5th (bottom) and 95th percentiles (upper) of concentration-time profile predicted in the presence of P-gp activity. The black dashed line represents the median concentration-time profile predicted in the absence of P-gp activity. The grey dashed lines represent the 5th (bottom) and 95th percentiles (upper) of concentration time profile predicted in the absence of P-gp activity. The full diamond and empty circle represent domperidone concentration measured in WT and KO mice respectively. Drug distribution in heart and brain tissues was represented by the MTB model whereas drug distribution in plasma and liver were represented by a WS model. Inserts present the predicted tissue profiles in semi-log scale..... 160

Figure 2: Domperidone concentration time profiles predicted in mice brain tissue, in the presence or absence of P-gp activity, after performing Monte Carlo simulations of the PBPK model. Drug distribution in brain is supposed to be governed by the diffusion, P-gp mediated efflux, and additional transporters mediated efflux. The black line represents the median concentration-time profile predicted in the presence of P-gp activity in tissues. The grey lines represent the 5th (bottom) and 95th percentiles (upper) of concentration-time profile predicted in the presence of P-gp activity. The black dashed line represents the median concentration-time profile predicted in the absence of P-gp activity. The grey dashed lines represent the 5th (bottom) and 95th percentiles (upper) of concentration-time profile predicted in the absence of P-gp activity. The full

diamond and empty circle represent domperidone concentration measured in WT and KO mice respectively. Inserts present the predicted tissue profiles in semi-log scale. .161

Figure 3. Scatter plots of relationships of the eighteen input parameters versus C_{\max} predicted in mice liver.....	165
Figure 4. PRCC between each of the eighteen input parameters and C_{\max} or C_{last} of domperidone predicted in mice liver.....	167
Figure 5. PRCC between each of the eighteen input parameters and C_{last} of domperidone predicted in mice plasma.....	168
Figure 6. PRCC between each of the eighteen input parameters and C_{\max} or C_{last} of domperidone predicted in heart tissue in the presence or absence of P-gp activity.....	169
Figure 7. PRCC between each of the eighteen input parameters and C_{\max} and C_{last} of domperidone predicted in brain tissue in the presence or absence of P-gp activity.	170
Figure 8. Exploratory analysis of those input parameters lacking a priori information and their effect on variability of C_{\max} and C_{last} predicted in mice tissues.....	172
Figure 9. Exploratory analysis of those input parameters lacking a priori information and their effect on identification and ranking of important parameters involved in the imprecision of C_{\max} predicted in mice tissues in the presence of P-gp activity.....	173
Figure A 1. Framework of the PBPK model proposed to account for transporters activity in heart and brain tissues.....	180
Figure A 2. Mechanism-based Tissue Model proposed and applied to heart and brain tissues.....	181

CHAPITRE IV

Figure 1. PBPK model framework and the GIT model used in the simulations.....	197
Figure 2A-B. Semi-logarithmic representation of the concentration-time profiles after oral administration of A) 7.5 mg or B) 15 mg of MDZ to healthy volunteers. The black line represents the predicted mean value of the concentration-time profile, and the dashed lines are the 5 th and 95 th percentiles obtained after running Monte-Carlo simulations. The symbols are the mean (\pm SD) MDZ concentrations measured during	

clinical studies in healthy volunteers. The inserts are the concentration-time profiles presented in normal scale.....218

Figure 2C-D. Semi-logarithmic representation of the concentration-time profiles after oral administration of MDZ to healthy volunteers C) 15 mg of MDZ + GFJ; D) 7.5 mg MDZ+ SQV pretreatment. The black line represents the predicted mean value of the concentration-time profile, and the dashed lines are the 5th and 95th percentiles obtained after running Monte-Carlo simulations. The symbols are the mean (\pm SD) MDZ concentrations measured during clinical studies in healthy volunteers. The inserts are the concentration-time profiles presented in normal scale.....219

Figure 2E. Semi-logarithmic representation of the concentration-time profiles after oral administration of MDZ to healthy volunteers E) 7.5 mg MDZ + ITZ pretreatment. The black line represents the predicted mean value of the concentration-time profile, and the dashed lines are the 5th and 95th percentiles obtained after running Monte-Carlo simulations. The symbols are the mean (\pm SD) MDZ concentrations measured during clinical studies in healthy volunteers (Kupferschmidt, Ha et al. 1995; Backman, Kivisto et al. 1998; Palkama, Ahonen et al. 1999; Saari, Laine et al. 2006). The inserts are the concentration-time profiles presented in normal scale.....220

Figure 3A-B. Semi-logarithmic representation of the concentration-time profiles after oral administration of A) 1 mg APZ; B) 1 mg APZ + KTZ pretreatment to healthy volunteers. The black line represents the predicted mean value of the concentration-time profile, and the dashed lines are the 5th and 95th percentiles obtained after running Monte-Carlo simulations. The symbols are the mean (\pm SD) MDZ concentrations measured during clinical studies in healthy volunteers (Greenblatt, Wright et al. 1998; Greenblatt, von Moltke et al. 2000) . The inserts are the concentration-time profiles presented in normal scale.....221

Figure 4A-B. Semi-logarithmic representation of the concentration-time profiles after oral administration of A) 0.125 mg; B) 0.25 mg TRZ to healthy volunteers. The black line represents the predicted mean value of the concentration-time profile, and the dashed lines are the 5th and 95th percentiles obtained after running Monte-Carlo simulations. The symbols are the mean (\pm SD) MDZ concentrations measured during clinical studies in healthy volunteers (Kroboth, McAuley et al. 1995; von Moltke, Greenblatt et al. 1996; Greenblatt, Wright et al. 1998). The inserts are the concentration-time profiles presented in normal scale.....222

Figure 4C. Semi-logarithmic representation of the concentration-time profiles after oral administration of 0.125 mg TRZ+ KTZ pretreatment to healthy volunteers. The black line represents the predicted mean value of the concentration-time profile, and the dashed lines are the 5th and 95th percentiles obtained after running Monte-Carlo simulations. The symbols are the mean (\pm SD) MDZ concentrations measured during clinical studies in healthy volunteers (Kroboth, McAuley et al. 1995; von Moltke, Greenblatt et al. 1996; Greenblatt, Wright et al. 1998). The inserts are the concentration-time profiles presented in normal scale.....223

Figure 5A-B. Semi-logarithmic representation of the concentration-time profiles after oral administration of A) 20 mg; B) 40 mg of SMV to healthy volunteers; The black line represents the predicted mean value of the concentration-time profile, and the dashed lines are the 5th and 95th percentiles obtained after running Monte-Carlo simulations. The symbols are the mean (\pm SD) MDZ concentrations measured during clinical studies in healthy volunteers (Neuvonen, Kantola et al. 1998; Mousa, Brater et al. 2000; Jacobson 2004; Lilja, Neuvonen et al. 2004; Simard, Michaud et al. 2004; Sunkara, Reynolds et al. 2007). The inserts are the concentration-time profiles presented in normal scale.224

Figure 5C-D. Semi-logarithmic representation of the concentration-time profiles after oral administration of C) 40 mg SMV+ GFJ D) 20 mg SMV+ DTZ to healthy volunteers. The black line represents the predicted mean value of the concentration-time profile, and the dashed lines are the 5th and 95th percentiles obtained after running Monte-Carlo simulations. The symbols are the mean (\pm SD) MDZ concentrations measured during clinical studies in healthy volunteers (Neuvonen, Kantola et al. 1998; Mousa, Brater et al. 2000; Jacobson 2004; Lilja, Neuvonen et al. 2004; Simard, Michaud et al. 2004; Sunkara, Reynolds et al. 2007). The inserts are the concentration-time profiles presented in normal scale.225

Figure 5E. Semi-logarithmic representation of the concentration-time profiles after oral administration of E) 40mg SMV + ITZ to healthy volunteers. The black line represents the predicted mean value of the concentration-time profile, and the dashed lines are the 5th and 95th percentiles obtained after running Monte-Carlo simulations. The symbols are the mean (\pm SD) MDZ concentrations measured during clinical studies in healthy volunteers (Neuvonen, Kantola et al. 1998; Mousa, Brater et al. 2000; Jacobson 2004; Lilja, Neuvonen et al. 2004; Simard, Michaud et al. 2004; Sunkara, Reynolds et al. 2007). The inserts are the concentration-time profiles presented in normal scale.226

Figure 6A-B. Comparison of *in silico* versus *in vivo* parameters estimated after oral administration of MDZ, APZ, TRZ or SMV alone (empty circle) or with a CYP3A inhibitor (black Square). A) C_{\max} predicted vs C_{\max} observed; B) t_{\max} predicted vs t_{\max} observed228

Figure 6C-D. Comparison of *in silico* versus *in vivo* parameters estimated after oral administration of MDZ, APZ, TRZ or SMV alone (empty circle) or with a CYP3A inhibitor (black Square). C) $AUC_{0-t_{\text{last}}}$ predicted vs $AUC_{0-t_{\text{last}}}$ observed; D) $t_{1/2}$ predicted vs $t_{1/2}$ observed;229

Figure 6E. Comparison of *in silico* versus *in vivo* parameters estimated after oral administration of MDZ, APZ, TRZ or SMV alone (empty circle) or with a CYP3A inhibitor (black Square; E) CL_{tot}/F predicted vs CL_{tot}/F observed.230

Figure 7. Predicted versus measured ratios between PK parameters obtained under conditions of metabolic interaction and without any interactions: \blacklozenge $AUC_{0-t_{\text{last}}}$; \blacktriangle CL_{tot}/F ; \times $t_{1/2}$; \square t_{\max} ; \circ C_{\max} . Dotted lines are the 2-fold-error range; dashed lines are the three-fold error range.230

Figure 8A. Extent of absorption (F_{abs}), fraction of MDZ that does not undergo the intestinal (F_g) and hepatic (F_h) metabolisms, and oral bioavailability (F) predicted by the PBPK model in the absence or the presence of metabolism-based inhibition. The red stars are the corresponding published parameters. ⁽²⁷⁾(Kupferschmidt, Ha et al. 1995) ; ⁽²⁹⁾(Palkama, Ahonen et al. 1999) ; ⁽⁷³⁾(Thummel, O'Shea et al. 1996); ⁽⁸⁹⁾(Lave, Dupin et al. 1997); ⁽⁹⁰⁾(Shitara and Sugiyama 2006)232

Figure 8B. Extent of absorption (F_{abs}), fraction of APZ that does not undergo the intestinal (F_g) and hepatic (F_h) metabolisms, and oral bioavailability (F) predicted by the PBPK model in the absence or the presence of metabolism-based inhibition. The red stars are the corresponding published parameters. ⁽⁶⁰⁾ (Smith, Kroboth et al. 1984); ⁽³⁶⁾ (Venkatakrishnan, Obach et al. 2007); ⁽¹³⁾ (Galetin, Hinton et al. 2007); ⁽³⁷⁾ (Greenblatt and Wright 1993)233

Figure 8C. Extent of absorption (F_{abs}), fraction of TRZ that does not undergo the intestinal (F_g) and hepatic (F_h) metabolisms, and oral bioavailability (F) predicted by the PBPK model in the absence or the presence of metabolism-based inhibition. The red stars are the corresponding published parameters. ⁽¹³⁾ (Galetin, Hinton et al. 2007); ⁽³¹⁾ (Kroboth, McAuley et al. 1995).....234

Figure 8D. Extent of absorption (F_{abs}), fraction of TRZ that does not undergo the intestinal (F_g) and hepatic (F_h) metabolisms, and oral bioavailability (F) predicted by the PBPK model in the absence or the presence of metabolism-based inhibition. The red stars are the corresponding published parameters. ⁽³⁵⁾ (Mousa, Brater et al. 2000) ; ⁽⁹¹⁾ (Cheng, Schwartz et al. 1994).....235

Figure A 1. Plasma concentration-time profile of SQV after an oral administration of 1200 mg TID, which was simulated using WNL® and used to estimate the time-dependent inhibition factors.....246

Figure A 2. Plasma concentration-time profile of KTZ after an oral administration 200 mg BID, which was simulated using WNL® and used to estimate the time-dependent inhibition factors.246

Figure A 3. Plasma concentration-time profile of DTZ after 5 days of an oral administration of 120 mg BID, which was simulated using WNL® and used to estimate the time-dependent inhibition factors.....247

Figure A 4. Plasma-concentration-time profile of ITZ after 4 days of a 200 mg QD oral administration, which was simulated using WNL® and used to estimate the time-dependent inhibition factors.....248

Figure A 5. Concentration-time profile of DHB in the gut membrane after one glass of GFJ, which was simulated with the present PBPK model and used to estimate the time-dependent inhibition factor in the gut.249

Liste des abréviations

Symbole	Unité	Définition
A	μm^2	Surface du solide
ABC	---	Transporteurs ATP dépendant (ATP-Binding Cassette)
ACAT	---	Modèle d'absorption intestinale avancé (Advanced Compartmental Absorption Transit)
ANC	---	Analyse Non Compartmentale
APZ	---	Alprazolam
AS	---	Analyse de Sensibilité
ASG	---	Analyse Globale de Sensibilité
ASC	mg/L/h	Aire Sous la Courbe
ASC _{oral}	mg/L/h	Aire Sous la Courbe après administration orale
ASC _{0-T}	mg/L/h	Aire Sous la Courbe calculée entre t=0 et le dernier temps de prélèvement
ASC _{0-∞}	mg/L/h	Aire Sous la Courbe calculée entre t=0 et l'infini
ASMC	mg/L/h ²	Aire sous la courbe du premier moment
A1	mg	Quantité de principe actif dans le compartiment central
A2	mg	Quantité de principe actif dans le compartiment périphérique
BCRP	---	Breast Cancer Resistance Protein
BHE	---	Barrière Hémato Encéphalique
BSC	---	Biopharmaceutics Classification System
BDDSC	---	Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System
BP	---	Ratio sang-plasma (Blood-Plasma ratio)
BPM	---	Bonnes Pratiques de Modélisation
BW	kg	Poids corporel
C	mg/mL	Concentration en protéines microsomales
C	---	Matrice de corrélation augmentée (Chapitre I-4)
Caco-2	---	Cellules de Carcinome de Colon Humain
CAT	---	Modèle d'absorption intestinale (Compartmental Absorption Transit)
C _{art}	mg/L ou nMol	Concentration artérielle
CC	---	Coefficient de Corrélation simple
CL	L/min	Clairance systémique
CL _{cr}	L/min	Clairance de la créatinine
CL _H	L/min	Clairance hépatique
CL _{H,B}	L/min	Clairance hépatique sanguine
CL _{in,OT}	L/min	Clairance d'influx
CL _{int}	L/min	Clairance intrinsèque lors d'une IMM
CL _{int,G}	L/min	Clairance intrinsèque intestinale
CL _{int,H,vivo}	L/min	Clairance intrinsèque hépatique
CL _{perm}	L/min	Clairance de perméabilité membranaire
C _{max}	mg/L ou nMol	Concentration maximale
C _{max,gut}	mg/L ou nMol	Concentration maximale dans la veine porte hépatique
C _{max,plasma}	mg/L ou nMol	Concentration maximale plasmatique
CL _{out,OT}	L/min	Clairance d'efflux gouvernée par un transporteur différent des P-gp

CV	---	Coefficient de Variation
CYP3A	---	Sous famille des cytochromes 3A
CYP450	---	Cytochrome P450
D	$\mu\text{m}^2/\text{s}$	Vitesse de diffusion
Do	mg	Dose administrée
DDI	---	Drug-Drug Interactions
Diff	cm/min	Vitesse de diffusion
DHB	---	6',7'- dihydroxybergamotine
DR	mg/min	Vitesse de dissolution (Dissolution Rate)
DTZ	---	Diltiazem
D _{vo:w}	---	Coefficient de partage huile d'olive-eau
EFAST	---	Test étendu de sensibilité des amplitudes de Fourier (Extended Fourier Amplitude Sensitivity Test)
E _H	---	Coefficient d'extraction hépatique
E _{max}	---	Induction maximale enzymatique
F	---	Biodisponibilité
F _{abs}	---	Fraction de principe actif absorbée
F _{assif}	---	Fasted-State Simulated Intestinal Fluid
FAST	---	Test de sensibilité des amplitudes de Fourier (Fourier Amplitude Sensitivity Test)
FDA	---	Food and Drug Administration
F _{essif}	---	Fed-State Simulated Intestinal Fluid
F _G	---	Fraction de principe actif qui échappe aux éliminations présystémiques intestinales
F _G	---	Fraction de principe actif qui échappe aux éliminations présystémiques hépatiques
f _{inhib}	---	Facteur d'inhibition
f _m	---	Fraction de médicament qui est éliminée par voie métabolique
f _{mCYP}	---	Fraction de la clairance totale due à la voie métabolique inhibée
FO	---	Méthode de premier ordre (First Order method)
FOCE	---	Méthode de premier ordre avec estimés conditionnels (First Order Conditionnal Estimate method)
FOSI	---	Index de sensibilité de premier ordre (First Order Sensitivity Index)
f _{uB}	---	Fraction libre de principe actif dans le sang
f _{uG}	---	Fraction libre de principe actif dans les entérocytes
f _{up}	---	Fraction libre de principe actif dans le plasma
f _{umic}	---	Fraction libre microsomale
f _{ut}	---	Fraction libre tissulaire
GFJ	---	Jus de pamplemousse (Grapefruit Juice)
GSA	---	Global Sensitivity Analysis
GSE	---	General Solubility Equation
h	μm	Épaisseur de la couche de diffusion
I	---	Index d'erreur normalisé des modèles PBPK
[I]	μMol	Concentration d'inhibiteur
IMM	---	Interaction Médicamenteuse Métabolique
ITZ	---	Itraconazole
IVIVC	---	Corrélation <i>in vitro</i> - <i>in vivo</i>
IVIVE	---	Extrapolation <i>in vitro</i> - <i>in vivo</i>

ka	min-1	Constante de vitesse d'absorption
K _{cat}	nmol/min/mg	Vitesse catalytique
Kd	min ⁻¹	Constante de vitesse de dissolution
K _{degr}	min ⁻¹	Vitesse de dégradation enzymatique
ke	h ⁻¹	Constante de vitesse d'élimination
Ki	μMol	Constante d'inhibition
K _{inact}	min ⁻¹	Vitesse d'inactivation
K _m	μMol	Constante d'affinité
KO	---	Souris mutées des gènes <i>mdr1a/1b</i> (Knockout mice)
K _{synth}	min-1	Vitesse de synthèse enzymatique
KTZ	---	Ketoconazole
k ₁₂	min-1	Constance de transfert du compartiment central vers le compartiment périphérique
k ₁₀	min-1	Constance de vitesse d'élimination depuis le compartiment central
k ₂₁	min-1	Constance de transfert du compartiment périphérique vers le compartiment central
LADME	---	Libération Absorption Distribution Métabolisme Élimination
LHS	---	Échantillonnage d'Hypercube Latin (Latin Hypercube Sampling)
MBI	---	Mechanism-Based Inhibition
MDCKII	---	Madin-Darby canine kidney II
MDR	---	Multi-Drug Resistance
MDZ	---	Midazolam
MIC	---	Complexe métabolique intermédiaire (Metabolic Intermediate Complex)
ML	---	Métaboliseur lent
mp	°C	Point de fusion
MR	---	Métaboliseur rapide
MRP	---	Multi Resistance Protein
MRT	---	Temps de résidence moyen (Mean Residence Time)
MTB	---	Modèle tissulaire basé sur les processus mécanistiques de transport (Mechanistic Transport Based model)
MW	g/mol	Poids moléculaire
NAD	---	Approche de la moyenne naïve des données (Naive Average Data)
NaTC	---	Taurocholate de sodium
NONMEM	---	Modèle Non-Linéaire à Effets Mixtes (Non-Linear Mixed Effect Model)
NPD	---	Approche de regroupement naïf des données (Naive Pooling Data)
OAT	---	Transporteurs d'anions organiques (Organic Anion Transporters)
OCT	---	Transporteurs de canions organiques (Organic Cation Transporters)
ODE	---	Equation différentielle ordinaire (Ordinary Differential Equation)
P	---	Pourcentage de la valeur typique d'un paramètre
Papp	cm/s	Perméabilité apparente
Papp _{AB}	cm/s	Perméabilité apparente mesurée du côté apical vers le côté basolatéral

Papp _{BA}	cm/s	Perméabilité apparente mesurée du côté basolatéral vers le côté apical
PAMPA	---	Parrallele Artificial Membrane Permeability Assay
PBPK	---	Physiologically Based Pharmacokinetic
PBSF	---	Physiologically Based Scaling Factor
PCC	---	Coefficient de Corrélacion Partiel (Partial Correlation Coefficient)
P _{diff}	cm/s	Diffusion simple estimée à partir de la perméabilité apparente
P _{efflux}	cm/s	Vitesse d'efflux gouverné par les transporteurs actifs
P _{eff}	cm/s	Perméabilité Effective
P-gp	---	Glycoprotéine-P
PK	---	Pharmacokinetic
P _{o:w}	---	Coefficient de partage octanol-eau
PRCC	---	Coefficient de Corrélacion Partiel des Rangs (Partial Rank Correlation Coefficient)
PSA	L/min	Permeability Surface Area product
P _{tp}	---	Coefficient de partage tissu-plasma
P _{tp,u}	---	Coefficient de partage tissu-plasma du composé non-lié
Q	L/min	Débit sanguin aux organes/tissus
Q _c	L/min	Débit cardiaque
Q _H	L/min	Débit hépatique
Q _{gut}	L/min	Débit intestinal hybride
Q _{muc}	L/min	Débit sanguin aux entérocytes
QSPR	---	Quantitative Structure-Pharmacokinetic Relationship
RCC	---	Coefficient de Corrélacion des Rangs (Rank Correlation Coefficient)
r	μm	Rayon des particules
r _{yx}	---	Coefficient de corrélation simple entre la variable y et le paramètre x
[S]	μMol	Concentration de substrat
SI	---	Index de sensibilité
SLC	---	Transporteurs membranaires de type <i>Solute Carrier</i>
SMV	---	Simvastatine
Sol	μMol	Solubilité totale
Sol _{bile}	μMol	Solubilité molaire dans les micelles biliaires
Sol _{buffer}	μMol	Solubilité molaire dans une solution tampon
Sol _{IF}	μMol	Solubilité du composé dans le fluide intestinal
Sol _{int}	μMol	Solubilité intrinsèque
SQV	---	Saquinavir
SR	---	Ratio de solubilité molaire micelle/ solubilité molaire tampon
TGI	---	Tractus Gastro-intestinal
TOSI	---	Index de sensibilité total (Total Order Sensitivity Index)
TRZ	---	Triazolam
t _{max}	min	Temps requis pour atteindre C _{max}
V _{d,area}	L	Volume de distribution estimé à partir de l'aire sous la courbe
V _{if}	mL	Volume du fluide intestinal
V _{max,}	nmol/min/mg	Vitesse maximale de biotransformation
V _{max}	nmol/min/mg	Vitesse maximale de biotransformation altérée par une IMM
V _{nlp}	L	Volume de lipide neutre dans le plasma
V _{nlt}	L	Volume de lipide neutre dans le tissu
V _{php}	L	Volume de phospholipide dans le plasma

V_{pht}	L	Volume de phospholipide dans le tissu
V_{p}	L	Volume plasmatique
V_{ss}	L ou L/kg	Volume de distribution à l'équilibre
V_{t}	L	Volume tissulaire
V_{wp}	L	Volume d'eau plasmatique
V_{wt}	L	Volume d'eau tissulaire
WS	---	Modèle parfaitement mélangé (Well-Stirred)
x_{ij}	---	Constantes du modèle pharmacocinétique
X_{diss}	mg	Quantité de composé dissout
X_{sol}	mg	Quantité de composé sous forme solide
y_{ij}	---	Vecteur de valeurs prédites
ΔS_{f}	J/mol.C	Entropie molaire de fusion
ε_{ij}	---	Erreur résiduelle du modèle
ρ	g/mL	Densité des particules de principe actif
κ_i	---	Variabilité inter-occasionnelle d'un modèle pharmacocinétique de population
η_i	---	Variabilité interindividuelle d'un modèle pharmacocinétique de population
Φ_i	---	Paramètres du modèle pharmacocinétique

Dédicace

*À mes parents, Michel et Régine,
qui m'ont appris à repousser mes limites
et surtout, à ne jamais baisser les bras.*

*« Le bonheur de demain n'existe pas.
Le bonheur, c'est tout de suite ou jamais.
Ce n'est pas organiser, enrichir, dorer, capitonner la vie,
mais savoir la goûter à tout instant »*

René Barjavel

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier ma directrice de recherche, Pr. Fahima Nekka pour la confiance et le soutien inestimable que vous m'avez accordés tout au long de ce périple doctoral. Fahima, je vous remercie pour votre intégrité scientifique et morale, et votre détermination à toute épreuve.

Je voudrais également remercier Pr. Jacques Turgeon pour son appui dans mon changement de projet doctoral, et nos rencontres enrichissantes.

Je remercie les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer cette thèse. Soyez assurés de ma respectueuse considération.

Merci au Dr Jun Li pour son support scientifique et tes commentaires très pertinents tout au long de mon doctorat.

J'aimerais également remercier le Dr. Patrick Poulin, pour sa collaboration dans la dernière partie de ma thèse. Son expertise, sa rigueur scientifique et son dynamisme exceptionnel sont une réelle source d'inspiration.

Je suis aussi très reconnaissante envers le Pr. Jean-Louis Brazier qui m'a donné la chance d'enseigner au sein de la faculté. Ce fut un plaisir et un honneur de travailler en votre compagnie

Merci à mes collègues de laboratoire : Denis Gohore Bi pour nos discussions scientifiques et philosophiques, Olivier Barrière pour ton support informatique, et Lucie Couture pour m'avoir fourni des données animales.

Merci aussi à tous ceux que je croisais régulièrement au 3^{eme} étage, et plus particulièrement Pr. Daniel Lévesque, Pr. Marc Servant, JF Clément, François Gaudreault, et Samer Mouksassi. Nos brèves (et parfois moins brèves) discussions de couloir m'ont permis de parler autrement qu'en code Matlab, et me remontaient bien souvent le moral.

Tout ce travail ne se serait certainement pas fait sans l'appui inconditionnel de mes amis, qui ont partagé mes joies, mes tristesses, et mes angoisses. Tout d'abord, merci à Morgan Le Garrec et Virginie Fourier de m'avoir ouvert les portes de « La Maison du Bonheur » aussi bien pour célébrer les bonnes nouvelles que partager les inquiétudes. Vous avez la recette miracle pour me remonter le moral: du confit de canard et un petit Brouilly☺. Merci aussi à Dorothée Le Garrec pour ton amitié, ta joie de vivre, et tous les bons moments passés ensemble. Merci aussi de m'avoir accordé ta confiance et permis de travailler à Labopharm. Ce fut une expérience inoubliable. Merci à Brice Kolko, Corina Nagy, Pierre Beaucage, Martine Goyet, Anastasia Polito, Rod et Vanessa Cheong de m'avoir sortie de mon doctorat pour aller courir, rouler, ou nager. Merci à Lucie Beaulieu de m'avoir accueillie au fin fond de ta Gaspésie natale pendant ma rédaction. L'air du large fut très inspirant. Un grand merci à Dobey pour ton aide, tes conseils, ta présence, et ton amitié. Je n'en serais certainement pas là si tu n'avais pas cru en moi plus que je ne croyais en moi.

Je n'aurais pas parcouru tout ce chemin sinueux sans l'amour, le support, et les sacrifices faits par mes parents, Michel et Régine. Vous m'aviez toujours dit d'aller le plus loin possible dans mes études. Et bien, ça y est, je pense que c'est désormais « mission accomplie ». Les mots me manquent pour vous témoigner de ma reconnaissance et de mon amour.

Enfin, un merci tout particulier, à mon conjoint, Jean-François Marceau, qui a fait preuve de patience, de compréhension et d'amour tout au long de ma thèse. Merci d'avoir supporté mon humeur massacrant quand la courbe rouge ne voulait pas se superposer aux points bleus. Tout simplement merci.

Avant-propos

L'innocuité et l'efficacité de tout nouveau médicament doivent faire l'objet d'une investigation adéquate durant les phases de recherche et développement préclinique et clinique. Ces investigations doivent notamment porter sur les propriétés pharmacocinétiques du médicament et sur les interactions médicamenteuses qu'il pourrait occasionner ou subir. En effet, le taux de succès mitigé quant au nombre de nouveaux médicaments (ou entités chimiques) qui atteignent la phase clinique de développement est attribué en partie aux mauvaises propriétés pharmacocinétiques du principe actif (Hou, Wang et al. 2006). En outre, une fois commercialisé, le principe actif peut être l'objet ou la cause d'interactions médicamenteuses sévères pouvant mener à son retrait du marché ou à la restriction d'utilisation (Wienkers and Heath 2005).

Les principaux mécanismes responsables des interactions médicamenteuses sont de nature métabolique et de transport, impliquant les cytochromes P450 (CYP450), et des transporteurs membranaires, tels que les glycoprotéines-P (P-gp) (Lazarou, Pomeranz et al. 1998). Ces enzymes et transporteurs sont présents dans plusieurs organes, dont l'intestin, le foie, les poumons, les reins, la barrière hémato-encéphalique et placentaire, et également dans le cœur. Ainsi lors d'interactions médicamenteuses et selon les propriétés pharmacologiques des médicaments en présence, des effets pharmacodynamiques indésirables, voire même dangereux, ont été observés (Lazarou, Pomeranz et al. 1998). Compte tenu du temps et des investissements financiers engagés lors du développement des médicaments, il devient impératif pour les compagnies pharmaceutiques et les professionnels de la santé de développer une méthode de caractérisation et de prédiction de la pharmacocinétique du principe actif et des phénomènes d'interaction.

Des méthodes *in vitro*, allométriques, ou basées sur la structure moléculaire ont été développées pour prédire non seulement le comportement pharmacocinétique des nouvelles entités chimiques mais aussi les risques d'interactions médicamenteuses. Cependant, ces approches statiques ont tendance à manquer de précision et d'exactitude.

L'objectif général de cette thèse est donc de concevoir une approche prédictive du devenir du médicament dans l'organisme en présence et en absence d'interaction médicamenteuse métabolique et de transport. Plus spécifiquement, le premier objectif de cette thèse est de prédire l'impact de la modulation de l'activité des P-gp sur la distribution tissulaire d'un substrat de ce transporteur au moyen d'un modèle pharmacocinétique à base physiologique. La deuxième partie de cette thèse a pour but d'identifier, à l'aide d'une analyse de sensibilité globale du modèle, les paramètres importants impliqués dans la variabilité et l'incertitude des prédictions du modèle. Finalement, étant donné que la majorité des interactions médicamenteuses sont de nature métabolique et impliquent la principale sous-famille des CYP450, les CYP3A, le dernier objectif est de caractériser la pharmacocinétique des substrats de CYP3A administrés par voie orale chez l'humain et de quantifier l'impact des inhibitions métaboliques sur la pharmacocinétique de ces substrats au moyen d'un modèle physiologique.

Nous décrivons dans un premier temps, les principes et méthodes d'estimation et de prédiction des paramètres pharmacocinétiques existants à ce jour (Chapitre I-1). Nous exposerons ensuite les différents types d'interactions médicamenteuses pharmacocinétiques et expliquerons les méthodes de prédiction de l'impact des interactions sur la pharmacocinétique des médicaments développées à ce jour (Chapitre I-2). Par la suite, nous décrivons les modèles pharmacocinétiques utilisés à des fins de caractérisation du devenir du médicament dans l'organisme (Chapitre I-3). Nous terminerons cette introduction par les méthodes d'analyse de sensibilité des modèles pharmacocinétiques (Chapitre I-4). La seconde partie de la thèse présente les trois publications issues de ces travaux de doctorat. Enfin, la dernière partie consiste en une discussion générale des résultats et des perspectives de recherche.

Les publications sont présentées selon la séquence suivante :

Fenneteau F., Turgeon J., Couture L., Michaud V., Li J., Nekka F. (2009), Assessing drug distribution in tissues expressing P-glycoprotein through physiologically based pharmacokinetic modeling: model structure and parameter determination. *Theor. Biol. Med. Model.*, **6**, 2 :14

Fenneteau F., Li J., Nekka F., Assessing drug distribution in tissues expressing P-glycoprotein through physiologically based pharmacokinetic modeling: identification of important parameters through global sensitivity analysis. *J. PK. PD.* Oct 22 [Epub Ahead of print]

Fenneteau F., Poulin P., Nekka F. (2009), Physiologically based predictions of the impact of intestinal and hepatic metabolism on human pharmacokinetics of CYP3A substrates. *J. Pharm. Sci.* May 28 [Epub Ahead of print]

CHAPITRE I

REVUE DE LITTÉRATURE

1 Le LADME : principes, mécanismes et méthodes de prédiction

Dans ce chapitre, seront exposés les principes des mécanismes impliqués dans chacune de ces phases du devenir du médicament, c'est-à-dire, la libération, l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'élimination (LADME). Les diverses approches développées permettant de quantifier ces mécanismes seront aussi présentées.

1.1 Libération et absorption orale du principe actif

Parmi les voies d'administration non-invasives, la voie orale est la route privilégiée pour la plupart des médicaments commercialisés ou dans le processus de recherche et développement. Cependant, il est reconnu que plusieurs facteurs physicochimiques, physiologiques et biochimiques affectent l'absorption intestinale des principes actifs tels que la solubilité, la vitesse de dissolution, la perméabilité membranaire, le gradient de pH le long du tractus gastro-intestinal (TGI), le temps de vidange gastrique, la vitesse de transit intestinal, la présence de sels biliaires et de bactéries, et le transport actif.

1.1.1 Solubilité

Idéalement, le principe actif devrait présenter des bonnes propriétés de dissolution et de perméabilité pour pouvoir être totalement (ou presque) absorbé dans le tractus gastro-intestinal. Cependant, dans le processus de recherche et développement, les nouveaux composés sélectionnés sont souvent peu solubles.

L'estimation de la solubilité d'un composé dans la lumière intestinale requiert plusieurs étapes. Il faut tout d'abord estimer la solubilité intrinsèque du composé, nécessaire pour l'obtention du profil de solubilité pH-dépendant. À partir de ce profil, il est possible de calculer la solubilité du composé dans le fluide intestinal à chaque position dans le TGI.

La solubilité intrinsèque (Sol_{int}) d'un composé représente la concentration limite maximale de sa forme non-ionisée (Sugano, Okazaki et al. 2007). Il est possible d'estimer Sol_{int} à partir de différentes approches qui sont soit fondées sur la structure atomique du composé (*Quantitative Structure-Property Relationship, QSPR*), ou sur des propriétés physiques et thermodynamiques du composé (*General Solubility Equation, GSE*).

L'approche QSPR tente de trouver une corrélation entre la solubilité intrinsèque d'un composé et ses propriétés physicochimiques et moléculaires, telles que la liaison hydrogène aux sites acides ou basiques, la dipolarité, et la polarisabilité de la molécule, le nombre de sites donneurs ou accepteur de liaison hydrogène, et de groupe amines non-conjugués (Abraham and Le 1999). Cette approche peu intuitive requiert de nombreux descripteurs moléculaires difficilement estimables sans l'utilisation de logiciels commerciaux (Hou and Wang 2008).

L'approche GSE a été développée par Yalkowski et Valvani (Yalkowsky and Valvani 1980). Elle implique une équation qui permet de calculer la solubilité intrinsèque d'un composé, en fonction de ses propriétés physiques et thermodynamiques:

$$\text{Log } Sol_{int} = -\text{Log}P_{ow} - 1.11 \frac{\Delta S_f (mp - 25)}{1364} + 0.54 \quad (1)$$

où mp est le point de fusion du composé ($^{\circ}C$), ΔS_f son entropie molaire de fusion ($J/mol.C$), et P_{ow} est son coefficient de partage octanol-eau. ΔS_f prend la valeur de 3.5 pour des molécules sphériques, 13.5 pour des molécules rigides, ou de $13.5+2.5(n-5)$ si la molécule a une quantité d'atome non-hydrogène (n) supérieure à 5 dans une chaîne flexible (Yalkowsky and Valvani 1980). Bien que cette approche nécessite des mesures expérimentales, sa simplicité d'application et son degré de précision satisfaisant en font une méthode de choix dans le domaine pharmaceutique.

Chez un humain à jeun, le gradient de pH le long du TGI varie de 1 (estomac) à 7.5 (iléon). Sachant que les substances ionisées sont plutôt hydrophiles alors que les substances non-ionisées sont plutôt lipophiles et traversent plus facilement les membranes biologiques constituées de bicouche lipidique, il est important d'estimer le degré d'ionisation du principe actif déjà en solution en fonction du pH intestinal. Le

degré d'ionisation des substances protoactives, estimé à partir des équations d'Handerson-Hasselbalch, dépend de la constante d'acidité du principe actif (pKa) et du pH du milieu. Dans le cas d'un acide faible, on peut écrire à partir de l'équilibre de dissociation que :

$$\frac{[\text{ionisé}]}{[\text{non-ionisé}]} = \frac{[\text{A}^-]}{[\text{AH}]} = 10^{(\text{pH}-\text{pKa})} \quad (2)$$

Pour une base faible, on écrira plutôt :

$$\frac{[\text{ionisé}]}{[\text{non-ionisé}]} = \frac{[\text{BH}^+]}{[\text{B}]} = 10^{(\text{pKa}-\text{pH})} \quad (3)$$

À partir de la solubilité intrinsèque, on peut estimer la solubilité totale du composé (Sol), qui correspond à la concentration de composé en solution en équilibre avec le composé sous forme solide. En reprenant les équations d'Handerson-Hasselbalch, on peut écrire que la solubilité totale dépend du pH intestinal et de la constante de dissociation du composé (ka), telle que :

$$\text{Sol} = \text{Sol}_{\text{eq.int}} (1 + \alpha) \quad (4)$$

avec $\alpha = 10^{\text{pKa}} / 10^{\text{pH}}$ pour un acide faible, et $\alpha = 10^{\text{pH}} / 10^{\text{pKa}}$ pour une base faible.

Pour les composés peu solubles dans l'eau, il est important d'estimer leur solubilité dans un milieu qui va refléter les propriétés du fluide intestinal. Les micelles biliaires présentes dans le fluide intestinal sont composées d'acides biliaires et de phospholipides, qui contribuent à augmenter la solubilité des composés peu solubles dans le TGI. On définit SR comme étant le ratio de la solubilité molaire du composé dans les micelles biliaires (Sol_{bile}) et sa solubilité molaire dans une solution tampon (Sol_{buffer}), tel que SR = (Sol_{bile}/Sol_{buffer}). Mithani et collaborateurs (Mithani, Bakatselou et al. 1996) ont développé une approche d'estimation de la solubilité des composés à partir de la concentration en sels biliaires dans le TGI et du coefficient de partage octanol-eau (P_{ow}) du composé, telle que :

$$\text{Log SR} = 0.75 \log P_{\text{ow}} + 2.27 \quad (5)$$

À partir de SR, ces auteurs ont montré qu'il est possible d'estimer la solubilité du composé dans le fluide intestinal (Sol_{IF}), tel que:

$$Sol_{IF} = Sol_{buffer} + Sol_{bile} \times MW \times [NaTC] \quad (6)$$

où MW est le poids moléculaire du principe actif, et [NaTC] est la concentration biliaire en taurocholate de sodium exprimé en nMol. Afin de prendre en compte l'effet du pH intestinal sur la solubilité du composé dans le fluide intestinal, Sol_{buffer} est donc approximé par la solubilité du composé (Sol) définie précédemment.

Les sels biliaires présents dans le fluide intestinal facilitent la dissolution des principes actifs peu solubles dans l'eau. Leur concentration varie en fonction de l'état de jeûne des individus. Dans le jéjunum, on mesure une concentration de 3mM chez un individu à jeun (Perez de la Cruz Moreno, Oth et al. 2006) alors que cette concentration varie de 5 à 15 mM chez un individu à l'état postprandial. Dressman et collaborateurs ont composé des milieux intestinaux qui reproduisent le fluide jéjunal d'un individu à jeun (*Fasted-State Simulated Intestinal Fluid, FaSSIF*) ou postprandial (*Fed-State Simulated Intestinal Fluid, FeSSIF*) (Dressman, Amidon et al. 1998; Vertzoni, Fotaki et al. 2004). Ces fluides simulés diffèrent notamment par leur pH, et leur composition en phosphatidylcholine, NaTC, et autres sels. Bien que leur composition soit une simplification de celle du fluide luminal, leur utilisation peut aider à prédire la dissolution *in vivo* et l'absorption de composés faiblement solubles, des acides faibles lipophiles, des bases faibles, et des composés neutres (Vertzoni, Fotaki et al. 2004). Les fluides intestinaux simulés sont grandement utilisés dans l'industrie pharmaceutique pour évaluer les propriétés de dissolution et de solubilité de nouvelles entités chimiques.

1.1.2 Vitesse de dissolution

La vitesse de dissolution (*Dissolution Rate, DR*) du composé dans le fluide intestinal est caractérisée par le détachement de la molécule de la surface solide et la diffusion de la molécule à travers la couche limite entourant la surface du solide. Dans la plupart des cas, la deuxième étape est l'élément limitant de la vitesse de dissolution (Sugano, Okazaki et al. 2007). Cette vitesse de dissolution (mg/s), dérivée de la loi de Fick, est gouvernée par la différence entre la concentration de composé dissout et la solubilité du

composé dans le milieu. Le profil de dissolution dépend de la solubilité à la surface du composé et la solubilité dans le milieu. Elle est représentée par l'équation de Noyes-Whitney, telle que :

$$DR = \frac{dX_{sol}}{dt} = \frac{A(t) \times D}{h(t)} \times \left(\frac{X_{diss}}{V_{IF}} - Sol_{IF} \right) = -Kd \times X_{sol} \quad (7)$$

où

- X_{sol} est la quantité de composé sous forme solide (mg)
- X_{diss} est la quantité de composé dissout (mg)
- V_{IF} est le volume du fluide intestinal (mL)
- $A(t)$ est la surface du solide (μm^2)
- $h(t)$ est l'épaisseur de la couche de diffusion (μm)
- et D est la vitesse de diffusion du composé dans le milieu ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)

Kd est la constante de vitesse de dissolution définie par

$$Kd = \frac{3D}{\rho \times r(t) \times h(t)} \times \left(Sol_{IF} - \frac{X_{diss}}{V_{IF}} \right) \quad (8)$$

où ρ est la densité des particules de principe actif (g/mL) et r le rayon des particules (μm) (Agoram, Woltosz et al. 2001). Si D , ρ , r et h ne sont pas connus, il est possible d'estimer Kd à partir des valeurs moyennes de ces paramètres tel que $D = 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{min}$, $\rho = 1 \text{ g/mL}$, $r = 5 \mu\text{m}$, et $h = 30 \mu\text{m}$ respectivement (Peters and Hultin 2008).

1.1.3 Glycoprotéines-P

Chez l'humain, les transporteurs ABC impliqués dans le transport d'efflux des médicaments sont surtout les transporteurs de type MDR1 ou P-glycoprotéine (P-gp), MRP2 (*Multi Resistance Protein*), et BCRP (*Breast Cancer Resistance Protein*) (Figure 1. 1). Ces transporteurs d'efflux réduisent la perméabilité effective des composés à travers la muqueuse intestinale, surtout pour les composés dont la vitesse de diffusion s'apparente à la vitesse d'efflux. En effet, un composé avec une perméabilité effective jéjunale supérieure à $1.5 \times 10^{-4} \text{ cm/s}$ sera complètement absorbé peu importe le mécanisme de transport impliqué dans l'absorption intestinale (Cao, Yu et al. 2005; Lennernas 2007).

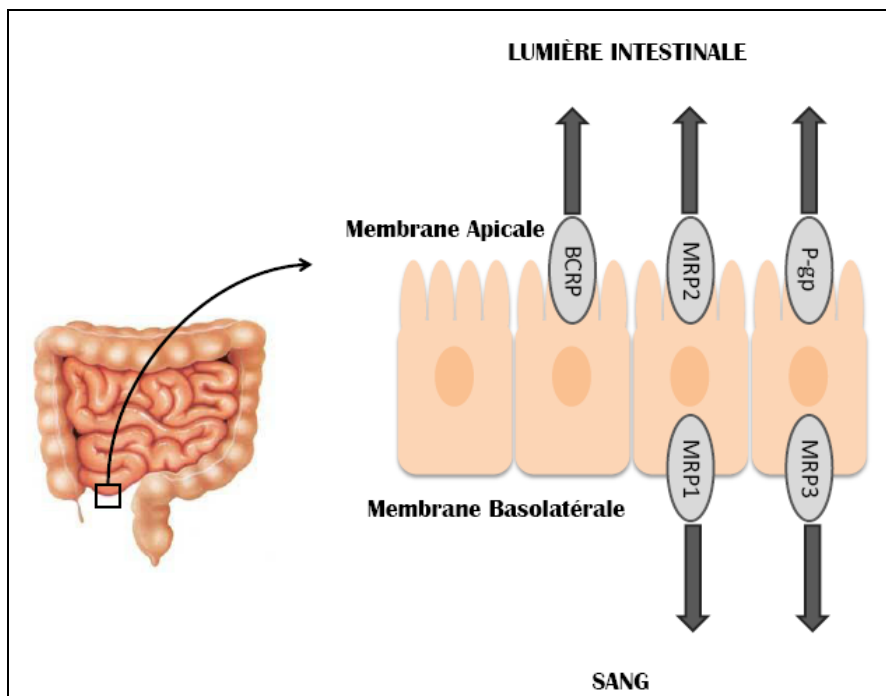


Figure 1. 1. Principaux transporteurs membranaires ABC intestinaux

Les P-gp sont des protéines d'efflux transmembranaires initialement identifiées dans les cellules tumorales, puis dans les tissus normaux. Présentes du côté apical des cellules épithéliales, les P-gp limitent non seulement l'absorption intestinale, mais aussi l'accumulation de xénobiotiques dans certains tissus comme le cerveau, le placenta, les poumons, l'utérus, le cœur, et les testicules, et facilitent l'élimination biliaire et rénale de plusieurs médicaments (cf le Chapitre 1.3 4). Ces protéines ont un large éventail de substrats parmi les médicaments, tels que des agents anticancéreux (vinblastine, paclitaxel, topotecan, imatinib), antirétroviraux (saquinavir, ritonavir), antiémétiques (dompéridone, ondansetron), antibiotiques (erythromycine, valinomycine), des glycosides cardiotoniques (digoxine) pour n'en nommer que quelques uns. La plupart des substrats de P-gp sont des bases hydrophobes qui diffusent facilement à travers les membranes. Par conséquent, le rôle protecteur des P-gp sera d'autant plus substantiel que leur vitesse d'efflux est du même ordre de grandeur que la vitesse de diffusion du substrat à travers la membrane.

Les P-gp présentent une mutation silencieuse au niveau de l'exon 26 du gène *MDR1*, qui change de manière significative l'expression de la P-gp dans les tissus (Eichelbaum, Fromm et al. 2004). Les individus homozygotes pour ce polymorphisme (homozygotes TT) ont une expression deux fois plus faible du *MDR1* que les homozygotes CC au niveau du duodénum (Hoffmeyer, Burk et al. 2000). Par exemple, des concentrations plasmatiques de digoxine significativement plus élevées ont été trouvées chez des individus homozygotes TT que chez les individus homozygotes CC (Ayrton and Morgan 2001). De plus, une distribution de ce polymorphisme a été rapportée entre les différentes ethnies. La fréquence des individus homozygotes TT dans la population de race noire est de 6% comparativement à une fréquence de 25 à 30% chez les américains caucasiens. Dans l'ensemble de la population, une grande différence d'expression de la P-gp (8 à 10 fois) a été observée dans les différents tissus (Eichelbaum, Fromm et al. 2004). La variabilité interindividuelle dans l'expression des P-gp explique donc en partie les larges variabilités observées dans l'absorption intestinale de certains médicaments (ex : cyclosporine) (Lown, Mayo et al. 1997).

Au niveau intestinal, les P-gp expulsent dans la lumière intestinale les composés qui ont diffusé à travers la membrane apicale de cet épithélium. Chez l'humain, l'expression des P-gp augmente progressivement le long du TGI (Mouly and Paine 2003; Thorn, Finnstrom et al. 2005). Ces transporteurs contribuent à diminuer la fraction absorbée, et par le fait même la biodisponibilité orale de certains composés moyennement perméables. Ceci a été mis en évidence à partir d'expériences réalisées sur des souris mutées. Les aires sous la courbe (ASC) des concentrations plasmatiques de paclitaxel, saquinavir et tacrolimus furent supérieures d'un facteur 6.4, 6.5 et 8.2 respectivement, par rapport à celles mesurées chez les souris normales (Sparreboom, van Asperen et al. 1997; Kim, Fromm et al. 1998; Yokogawa, Takahashi et al. 1999). Bien que l'augmentation de l'ASC ne reflète pas seulement l'inhibition des P-gp intestinales (puisque ces transporteurs participent aussi à l'excrétion rénale et biliaire), il est raisonnable de penser qu'une fraction de cette augmentation est due à l'absence de P-gp intestinales. La saturation de ces transporteurs contribuerait à la non-linéarité de l'absorption intestinale de plusieurs composés administrés à de fortes doses, comme le

talinolol (Wetterich, Spahn-Langguth et al. 1996) et la fexofénadine (Robbins, Castles et al. 1998).

1.1.4 Fraction absorbée et Perméabilité intestinale

Les quatre propriétés d'un principe actif qui assurent une bonne absorption intestinale forment une règle standard communément appelée *Lipinski's Rule of Five* (Lipinski, Lombardo et al. 1997). D'après cette règle, un principe actif sera bien absorbé s'il présente moins de 5 donneurs de liaison hydrogène (groupements OH et NH), moins de 10 accepteurs de liaison hydrogène (N et O), un poids moléculaire inférieur à 500, et un LogP inférieur à 5. Cette loi s'applique aux composés pour lesquels les processus de transport actif n'influencent pas l'absorption intestinale. Cependant, la perméabilité effective (P_{eff}) d'un médicament, qui est un indicateur de la vitesse de transport à travers la muqueuse intestinale, résulte non seulement des processus de transports passifs (diffusion trans-cellulaire et la diffusion para-cellulaire) mais aussi du transport actif. P_{eff} est un des paramètres clé de l'absorption intestinale des médicaments et de la détermination de la biodisponibilité orale. Lennernas a mis en évidence une relation entre la fraction absorbée (F_{abs}) et P_{eff} d'un médicament : une P_{eff} supérieure à 1×10^{-4} cm/s indique qu'au moins 80% du principe actif sera absorbée à travers la muqueuse intestinale (Lennernas, 2007).

Bien qu'il soit possible de déterminer directement la P_{eff} d'un principe actif chez l'humain au moyen de technique de perfusion *in situ*, cette technique très invasive nécessite l'anesthésie du patient. Par contre, plusieurs études précliniques ont démontré que les rats et les singes sont de bons modèles animaux pour estimer F_{abs} chez l'humain, particulièrement pour des composés à perméabilité élevée (Chiou and Barve 1998; Chiou and Buehler 2002; Zhao, Abraham et al. 2003).

Il existe des corrélations *in vivo-in vitro* (IVIVC) qui permettent d'exprimer P_{eff} chez l'humain à partir de la perméabilité apparente (P_{app}), avec un r^2 variant de 0.78 à 0.82 pour les principes actifs dont le transport actif ou la diffusion passive est prédominant, respectivement (Sun, Lennernas et al. 2002). La perméabilité apparente d'un composé est évaluée *in vitro* sur des monocouches cellulaires, telles que les Caco-2 (Human Colonic Carcinoma cell line), mais aussi sur une membrane artificielle nommée PAMPA

(*Parallele Artificial Membrane Permeability Assay*). L'utilisation des membranes PAMPA est facile et ne requiert pas de tissus biologiques, éliminant ainsi une source de variabilité dans les mesures expérimentales. De bonnes corrélations hyperboliques ont été obtenues entre F_{abs} et la perméabilité mesurées à travers la membrane PAMPA, pour des principes actifs pour lesquels la diffusion simple était le principal mécanisme d'absorption. Les mesures PAMPA tendent néanmoins à surestimer F_{abs} des principes actifs dont l'absorption dépend aussi bien de la diffusion simple que du transport d'efflux actif (Dressman, Thelen et al. 2008).

Une alternative (ou un complément) aux PAMPA est le recours aux monocouches cellulaires de type Caco-2. Artursson et collaborateurs ont montré l'existence d'une corrélation entre l'absorption orale et la perméabilité à travers les Caco-2 (Artursson and Karlsson 1991) pour des composés qui ont de bonnes propriétés de solubilité et de perméabilité (Classe I). Les cellules Caco-2 sont cultivées sur des membranes poreuses et forment une monocouche cellulaire présentant des caractéristiques morphologiques, enzymatiques et de transport semblables à celles des entérocytes. Ces monocouches cellulaires ont la particularité d'exprimer des transporteurs d'efflux membranaires, tels que les P-gp. Ainsi, il devient possible d'évaluer leur implication dans l'absorption intestinale des composés à partir de mesures de P_{app} unidirectionnelles ou bidirectionnelles, c'est-à-dire depuis la face apicale à la face basolatérale (P_{appAB}) et/ou depuis la face basolatérale à la face apicale (P_{appBA}) (Figure 1. 2).

On peut estimer P_{appAB} et P_{appBA} à partir du transport d'efflux actif gouverné par les P-gp (P_{effluxAB} , P_{effluxBA}) et la diffusion simple (P_{diffAB} , P_{diffBA}) tel que :

$$P_{\text{app AB}} = P_{\text{diff AB}} - P_{\text{efflux AB}} \quad (9)$$

$$P_{\text{app BA}} = P_{\text{diff BA}} - P_{\text{efflux BA}} \quad (10)$$

Notons cependant que l'utilisation des cellules Caco-2 est associée à une forte variabilité inter-laboratoire.

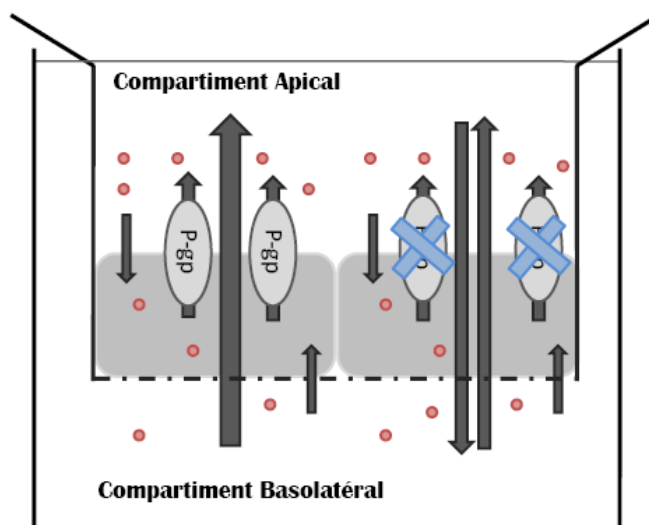


Figure 1. 2. Schéma de culture de monocouche cellulaire de Caco-2. Les P-gp sont exprimées sur la face apicale des cellules. A droite, la PappBA est mesurée en présence d'inhibiteur de P-gp, et résulte seulement du processus de diffusion simple; à gauche, la PappBA résulte des processus de diffusion et d'efflux gouverné par les P-gp.

L'utilisation d'inhibiteurs de P-gp (GW918, PSC833, GF120918) permet d'estimer $P_{diff_{AB}}$ et $P_{diff_{BA}}$. La différence arithmétique entre P_{app} et P_{diff} approxime la contribution du transport d'efflux sur la perméabilité apparente du composé (Troutman and Thakker 2003; Troutman and Thakker 2003b).

D'autre part, il a aussi été mentionné qu'un ratio entre $P_{app_{BA}}$ et $P_{app_{AB}}$ supérieur à 1 suggère l'implication de transporteurs d'efflux dans le passage membranaire intestinal du composé (Faassen, Vogel et al. 2003). Cependant, certains composés très perméables pourront afficher un ratio de $P_{app_{BA}}/P_{app_{AB}}$ proche de 1 car leur grande perméabilité primera sur l'effet de l'efflux, et pourrait contribuer à la saturation des transporteurs.

1.1.5 Autres facteurs

D'autres facteurs physiologiques et biologiques peuvent affecter la vitesse et la quantité du principe actif absorbé, tels que :

- la vidange gastrique qui affecte le temps d'apparition du principe actif dans la circulation systémique. Le temps de vidange gastrique augmente avec le volume du repas, avec la teneur en lipides du repas, en protéines, et avec l'acidité du repas.
- le temps de transit intestinal qui affecte directement la quantité de principe actif absorbé.
- la flore intestinale qui diffère en composition dans le TGI et devient plus concentrée vers l'iléum et le colon. Les bactéries intestinales possèdent des activités enzymatiques capables de métaboliser certains principes actifs. Leurs réactions métaboliques peuvent aussi bien contribuer à diminuer la quantité absorbée qu'à l'augmenter (par ex : salicine en alcool salicylique). Les bactéries ont la capacité d'hydrolyser des composés glucuroconjugés ou sulfoconjugés et donc contribuer au cycle entérohépatique de certains principes actifs.

1.1.6 Système de Classification Biopharmaceutique

Les études d'Amidon et collaborateurs ont montré que la solubilité et la perméabilité des principes actifs sont les paramètres clés de l'absorption intestinale des médicaments (Sinko, Leesman et al. 1991; Oh, Curl et al. 1993). En 1995, ces auteurs ont alors proposé un Système de Classification Biopharmaceutique (*Biopharmaceutics Classification System, BCS*) dont le principe repose sur ces deux propriétés du médicament (Amidon, Lennernas et al. 1995). Le BCS a été approuvé par l'agence réglementaire américaine des aliments et des médicaments (*Food and Drug Administration, FDA*) depuis l'an 2000.

Le BCS répertorie les médicaments en quatre classes selon leur solubilité et perméabilité, tel que :

- *Classe I : Perméabilité élevée - Solubilité élevée.* Bien que ces composés soient bien absorbés, ils peuvent néanmoins avoir une faible biodisponibilité à cause des éliminations présystémiques. L'élément limitant de l'absorption intestinale de ces composés est leur vitesse de dissolution et de libération de la forme pharmaceutique ou le temps de vidange gastrique si la dissolution est rapide.

Dans ce cas particulier, la FDA utilise le BCS pour justifier la dérogation de démonstration de bioéquivalence pour les médicaments de Classe I.

- *Classe II : Perméabilité élevée - Faible solubilité.* La fraction absorbée de ces composés est limitée par leur solubilité. Par conséquent le profil de dissolution de ces médicaments doit être correctement caractérisé.
- *Classe III : Faible Perméabilité - Solubilité élevée.* L'élément limitant de l'absorption intestinale est la perméabilité membranaire. Des variabilités interindividuelles dans la vitesse d'absorption et de la quantité absorbée sont généralement observées pour cette classe de médicaments. Dans le cas d'une dissolution rapide, ces variabilités seront alors reliées aux différences interindividuelles dans le transit intestinal, le contenu luminal, et la perméabilité membranaire.
- *Classe IV : Faible Perméabilité - Faible solubilité.* Ces composés sont généralement mal absorbés, et présentent une faible biodisponibilité orale. Une grande variabilité interindividuelle est observée dans l'absorption intestinale.

Ce système de classification (BCS) peut être utilisé pour extraire des informations très pertinentes quant aux voies d'élimination, aux effets des transporteurs actifs impliqués dans l'absorption orale, à l'impact des éliminations présystémiques sur la biodisponibilité orale, à l'effet de la nourriture, et aux types d'interactions médicamenteuses. Wu et Benet ont donc proposé de modifier le BCS afin de prendre en compte l'effet des éliminations (*Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System, BDDCS*). Leur proposition repose sur le fait que les composés de Classe I et II ont une grande perméabilité qui résulte de leur propriété lipophile. Par conséquent, ces composés sont principalement éliminés par des voies métaboliques. D'autre part, les composés de Classe III et IV sont plus hydrophiles. Ils seront plutôt éliminés par les voies rénales et biliaires sous forme inchangée. Wu et Benet mentionnent que la différence de perméabilité entre les classe I-II et III-IV se reflète donc dans l'accès aux enzymes de métabolisme.

1.2 Métabolisme et éliminations présystémiques

1.2.1 Rôle des cytochromes P450 dans le métabolisme intestinal et hépatique

Le métabolisme enzymatique des composés endogènes et exogènes consiste à rendre hydrosoluble une molécule liposoluble, afin d'en favoriser l'élimination rénale et/ou biliaire. Le métabolisme peut être divisé en deux phases distinctes et complémentaires:

- les transformations métaboliques de Phase I qui regroupent les réactions d'oxydation, de réduction et d'hydrolyse. Ces sont des réactions cataboliques irréversibles.
- les transformations métaboliques de Phase II qui consistent en des réactions de conjugaison (conjugués d'acide glucuronique, glutathion, sulfate) qui sont réversibles.

Les principaux acteurs des réactions de phase I sont des enzymes appartenant à la superfamille des cytochromes P450 (CYP450). Ces derniers forment une superfamille d'enzymes de type 'hémoprotéines' responsables de la biotransformation de composés endogènes et exogènes, incluant les agents thérapeutiques. Les CYP450 catalysent des réactions de mono-oxygénation qui forment des métabolites inactifs, actifs ou réactifs. Chez l'humain, on retrouve majoritairement les CYP450 dans les organes de métabolisme tels que le foie et les intestins, mais aussi dans d'autres tissus et organes, à un plus faible niveau d'expression, comme les poumons (Foth 1995; Hukkanen, Pelkonen et al. 2002), les reins (Amet, Berthou et al. 1997), le cerveau (Ravindranath, Bhamre et al. 1995), le cœur (Thum and Borlak 2000), et la peau (Baron, Wiederholt et al. 2008).

Les CYP450 sont classés en familles (premier chiffre), sous-familles (lettre) et isoformes (chiffre final). Les principaux CYP450 humains hépatiques impliqués dans le métabolisme de plus de 80% des médicaments appartiennent aux familles 1, 2, et 3 : CYP1A2, CYP2A6 (rôle mineur), CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, et CYP3A4, CYP3A5 et CYP3A7 (foie fœtal). Les CYP450 n'ont pas de spécificité de substrat; ils peuvent être induits ou inhibés par des substances exogènes (le site internet <http://www.medicine.iupui.edu/clinpharm/ddis/table.asp>, présente des tableaux détaillés des substrats, inducteurs, et inhibiteurs des CYP450 humains).

Les CYP2C9, 2C19, 2D6 et 3A5 présentent un polymorphisme génétique variable selon les ethnies. En effet, pour le CYP2C9, six variants alléliques ont été identifiés dont le CYP2C9*3 qui cause une réduction de 80% de l'activité enzymatique. Un sujet porteur de cet allèle est qualifié de métaboliseur lent (ML) des substrats du CYP2C9. Environ 7% des caucasiens et 2% des africains portent un génotype de ML du CYP2C9. Une différence inter-raciale marquée dans la distribution du polymorphisme du CYP2C19 a été aussi observée : environ 2 à 6% des caucasiens, 2 à 8% des africains et 14 à 23% des asiatiques sont des ML (Hasler, Estabrook et al. 1999). Ainsi, la clairance métabolique du diazépam est significativement plus faible chez les asiatiques que les caucasiens, ce qui expliquerait pourquoi les médecins orientaux prescrivent de plus faibles doses de diazépam aux asiatiques (Hasler, Estabrook et al. 1999). Bien que représentant seulement 5% des cytochromes hépatiques, le CYP2D6 est associé au métabolisme de plus de 50 médicaments (Hasler, Estabrook et al. 1999). Le phénotypage à la débrisoquine a montré l'existence d'un polymorphisme génétique séparant la population en métaboliseurs lents et rapides (MR). Ce polymorphisme est dû principalement à l'allèle défectueuse CYP2D6*4 chez les ML. La distribution de ce polymorphisme montre une variabilité inter-ethnique importante : 5 à 10% des caucasiens, moins de 1% des asiatiques et jusqu'à 19% des africains sont ML. De plus, seulement chez les caucasiens, on distingue un sous-groupe parmi les MR: les métaboliseurs ultra-rapides. Les conséquences cliniques d'un tel polymorphisme résultent en une capacité métabolique des substrats du CYP2D6 de 2 à 5 fois supérieure chez les MR par rapport aux ML. Les ML atteignent donc des concentrations plasmatiques identiques aux MR avec une dose de médicament de 50 à 80% plus faible (Hasler, Estabrook et al. 1999). La fréquence d'individus présentant une forte expression du CYP3A5 varie elle aussi selon les ethnies : 55% chez les Africains, 33% chez les Japonais et de 10 à 25% chez les caucasiens.

La sous-famille des CYP3A est cliniquement la plus importante car elle est majoritaire dans le foie (Shimada, Yamazaki et al. 1994; Thummel, O'Shea et al. 1996) et dans l'intestin grêle (Paine, Hart et al. 2006) (Figure 1. 3). Cet sous-famille joue donc un rôle prédominant dans l'effet de premier passage intestinal et hépatique. Les CYP3A4 ne présentent pas de polymorphisme génétique, mais plutôt une large distribution unimodale de leur expression (Wojnowski 2004), leur niveau d'expression hépatique du

CYP3A4 pouvant varier jusqu'à 90 fois entre les sujets. De plus, quasiment 60% des médicaments sont substrats de cette isoforme, ce qui explique le nombre important d'interactions médicamenteuses recensées avec ce cytochrome.

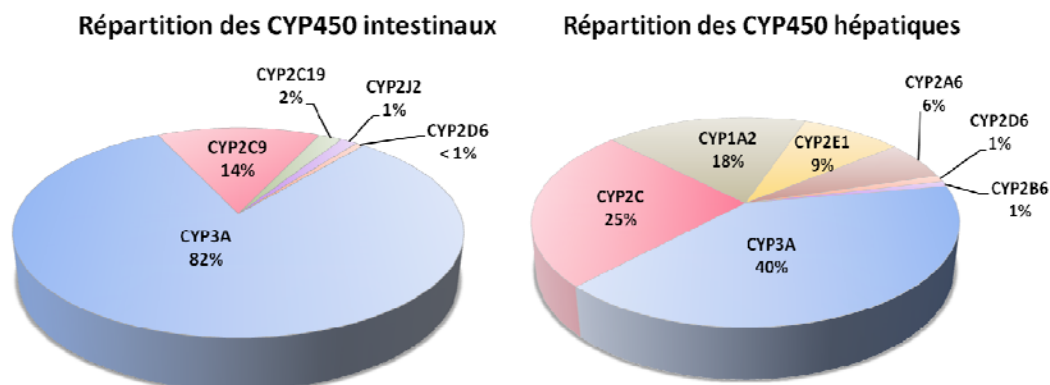


Figure 1. 3. Répartition des cytochromes P450 dans le petit intestin et le foie chez l'humain, basée sur l'immunoquantification (inspiré de Paine et al., 2006)

La quantité entérocytaire de CYP3A varie de manière décroissante le long du petit intestin, avec environ 31, 23, et 17 pmol/mg de protéine microsomale au niveau du duodénum, du jéjunum et de l'iléon, respectivement (Paine, Khalighi et al. 1997). Cette 'répartition stratégique' permet aux cytochromes de métaboliser les xénobiotiques dès leur entrée dans le TGI où ils sont à leur plus forte concentration. Même si une concentration de protéines de CYP3A plus élevée a été mesurée dans les entérocytes que dans les hépatocytes d'un même sujet (Von Richter, Burk et al. 2004), la quantité totale moyenne de CYP3A intestinaux humains reste très inférieure à celle estimée dans le foie : environ 70 nmol de CYP3A intestinaux (Paine, Khalighi et al. 1997; Von Richter, Burk et al. 2004) contre presque 8 000 nmol de CYP3A hépatiques (Yang, Tucker et al. 2004).

1.2.2 Éliminations présystémiques intestinales

Le métabolisme intestinal via les CYP3A peut contribuer à la faible biodisponibilité de certains principes actifs. Par exemple, une étude pharmacocinétique sur des volontaires sains a montré la similitude du ratio d'extraction intestinal et hépatique du midazolam

(env. 43 and 55%, respectivement), expliquant ainsi sa faible biodisponibilité orale (Paine, Shen et al. 1996; Thummel, O'Shea et al. 1996).

Il est intéressant de noter que plusieurs études ont aussi suggéré le rôle conjoint des P-gp et CYP3A4/5 intestinaux dans l'effet de premier passage intestinal des médicaments (Johnson, Charman et al. 2001; Cummins, Jacobsen et al. 2002; Cummins, Salphati et al. 2003; Kivisto, Niemi et al. 2004), hypothèse renforcée par le nombre de substrats que les P-gp et les CYP3A4/5 ont en commun. Les P-gp contribueraient à prolonger l'exposition des xénobiotiques aux CYP3A dans les entérocytes (Johnson, Charman et al. 2001).

Si l'hypothèse de l'entière absorption est émise ($F_{abs}=1$), alors il est possible d'estimer la fraction de principe actif qui échappe aux éliminations présystémiques intestinales (F_G) à partir de données pharmacocinétiques intraveineuses et orales (F_{orale} étant estimée par : $F_{orale} = F_{abs} \times F_G \times F_H$ où F_H est la fraction qui échappe à l'effet de premier passage hépatique). Cependant, généralement seuls les principes actifs de Classe I, et ceux qui n'ont pas (ou peu) d'affinité pour les transporteurs d'efflux intestinaux, peuvent répondre à cette simplification. De plus, ces données PK n'étant pas disponibles dans les phases précliniques de développement, une approche basée sur les données *in vitro* est préférablement requise.

Kato et collaborateurs ont établi une corrélation entre la clairance intrinsèque hépatique *in vivo* ($CL_{int,H,vivo}$) et le facteur $F_{abs} \times F_G$ à partir de 14 principes actifs substrats de CYP3A4 (Kato, Chiba et al. 2003). Cette approche semi-quantitative suggère qu'une valeur de $CL_{int,H,vivo}$ supérieure à 100 mL/min/kg sera associée à de plus faibles valeurs de $F_{abs} \times F_G$. Bien que cette approche ait permis de définir un indicateur qualitatif de la fraction absorbée qui échappe aux éliminations présystémiques intestinales, elle ne permet pas de quantifier F_G .

Parmi les méthodes de prédiction de F_G , celle qui est le plus souvent utilisée est une approche semi-mécanistique reposant sur le principe du modèle parfaitement mélangé tel que:

$$F_G = 1 - \frac{f_{u_G} \times CL_{int,G}}{f_{u_G} \times CL_{int,G} + Q_{muc}} = \frac{Q_{muc}}{f_{u_G} \times CL_{int,G} + Q_{muc}} \quad (11)$$

où Q_{muc} est le débit sanguin aux entérocytes (environ 250 mL/min), $CL_{\text{int,G}}$ la clairance intrinsèque intestinale, et f_{uG} la fraction libre de principe actif dans les entérocytes. Certains auteurs ont négligé f_{uG} résultant en une faible estimation de l'extraction intestinale pour 12 composés étudiés (Shen, Kunze et al. 1997).

La clairance intrinsèque est définie telle que :

$$CL_{\text{int}} = \frac{V_{\text{max}}}{K_m + [S]} \quad (12)$$

avec K_m la constante d'affinité (μMol) et V_{max} la vitesse maximum de biotransformation (nmol/min/mg protéine microsomale) du substrat, $[S]$ la concentration de substrat présent au niveau des entérocytes. Si $[S] \ll K_m$ alors, la clairance intrinsèque devient le ratio V_{max}/K_m . Cependant, les fortes concentrations entérocytaires de principe actif peuvent provoquer une saturation enzymatique ($[S] > K_m$), dans lequel cas, l'équation Eq. 1.12 doit s'appliquer.

Il a été proposé de remplacer Q_{muc} utilisé dans l'équation Eq.1.11 par un paramètre hybride Q_{gut} qui reflète à la fois la perméabilité membranaire au niveau des entérocytes ($CL_{\text{perm}} = P_{\text{eff}} \times A$, $A = 0.66\text{m}^2$) et le débit sanguin aux villis (Q_{villi}) (Yang, Jamei et al. 2007), tel que

$$Q_{\text{gut}} = \frac{Q_{\text{villi}} \times CL_{\text{perm}}}{Q_{\text{villi}} + CL_{\text{perm}}} \quad (13)$$

Lorsque la fraction libre prend une valeur unitaire, Yang et collaborateurs ont montré que les valeurs de F_G prédites à partir du modèle « Q_{gut} » étaient très similaires aux valeurs observées avec 16 principes actifs.

1.2.3 Métabolisme hépatique

L'estimation quantitative de la clairance hépatique sanguine ($CL_{\text{H,B}}$) est d'une importance considérable, puisque le foie est l'organe principal de métabolisme. La clairance hépatique correspond au volume de sang épuré par le foie par unité de temps (unité de débit). Autrement dit, elle représente une capacité d'élimination de l'organe

épurateur. La $CL_{H,B}$ dépend principalement de trois facteurs : le débit hépatique (Q_H), la clairance intrinsèque hépatique ($CL_{int,H,vivo}$) et la fraction libre de principe actif dans le sang (f_{u_B}). Parmi les approches proposées pour caractériser la clairance hépatique, on retient surtout le modèle parfaitement mélangé (*Well stirred model*) et le modèle de tubes parallèles (*Parallel Tube model*). Les deux approches ont des hypothèses communes qui sont que (i) seule la fraction libre de principe actif traverse les membranes et que (ii) la vitesse de distribution est limitée par le débit hépatique (pas de barrière diffusionnelle).

Le modèle parfaitement mélangé appliqué au tissu hépatique a tout d'abord été établi par Rowland (Rowland, Benet et al. 1973). Ce modèle repose sur les hypothèses additionnelles suivantes: (iii) le principe actif se distribue de manière instantanée et homogène dans le foie, et (iv) l'équilibre de distribution est si rapide que la concentration libre de médicament dans le sang veineux est en équilibre avec la concentration libre dans le foie. Selon ce modèle, l'expression de la clairance hépatique sanguine s'écrit:

$$CL_{H,B} = E_H \times Q_H = \frac{f_{u_B} \times CL_{int,H,vivo} \times Q_H}{f_{u_B} \times CL_{int,H,vivo} + Q_H} \quad (14)$$

où E_H est le coefficient d'extraction hépatique ($0 < E_H < 1$).

Dans le modèle à tubes parallèles, on considère que (ii) le foie est composé d'un grand nombre de cylindres identiques et parallèles, et que (iv) les enzymes sont distribuées uniformément le long de ces cylindres. Par conséquent, la concentration de principe actif diminue de façon exponentielle à l'intérieur de l'organe. La clairance hépatique s'écrit:

$$CL_{H,B} = Q_H \times \left[1 - \exp\left(-CL_{int,H,vivo} \times \frac{f_{u_B}}{Q_H}\right) \right] \quad (15)$$

Quelque soit l'approche ci-dessus utilisée pour estimer la $CL_{H,B}$

- si l'extraction hépatique du principe actif est élevée ($E_H \geq 0.7$) alors, $CL_{H,B}$ est de l'ordre de grandeur du débit sanguin hépatique
- si l'extraction hépatique du principe actif est faible ($E_H \leq 0.3$) alors, $CL_{H,B}$ est de l'ordre de grandeur de $f_{u_B} \times CL_{int,H,vivo}$

Pang et Rowland ont comparé le modèle à perfusion limitante et le modèle des tubes parallèles appliqué au foie (Pang and Rowland 1977). Aucune différence majeure n'est observée entre les deux approches pour les médicaments à très forte ou très faible extraction hépatique. Cependant, pour les médicaments dont l'extraction hépatique est intermédiaire, quelques différences entre les prédictions des modèles ont été observées et relèvent directement des facteurs affectant l'extraction hépatique, c'est-à-dire le débit hépatique, la liaison aux protéines plasmatiques, et la clairance intrinsèque. Ito et Houston (2004) ont d'ailleurs confirmé des différences d'estimation de la clairance hépatique entre les deux méthodes. Il faut cependant noter que la simplicité et la qualité des prédictions du modèle parfaitement mélangé en ont fait un modèle très utilisé et privilégié pour caractériser la clairance hépatique.

Il est encore difficile de prédire avec un bon degré de précision et d'exactitude la $CL_{int,H,vivo}$ à partir de $CL_{int,H,vitro}$. Les trois approches acceptables en termes de précision et d'exactitude de l'extrapolation *in vitro-in vivo* (*In Vitro-In Vivo Extrapolation, IVIVE*) sont la pondération de $CL_{int,H,vitro}$ par un facteur :

- empirique (*SF*): cette méthode est basée sur un ajustement des données connues de $CL_{int,H,vivo}$ et de $CL_{int,H,vitro}$. Elle dépend entièrement de l'ensemble de données utilisé (Zuegge, Schneider et al. 2001; Ito and Houston 2005).
- physiologique (*Physiologically Based Scaling Factor, PBSF*): PBSF correspond à la quantité totale de microsomes hépatiques. Elle donne un degré de précision très satisfaisant mais a tendance à sous estimer $CL_{int,H,vivo}$ (Zuegge, Schneider et al. 2001; Ito and Houston 2005).
- ou mixte : ce facteur est basé sur le PBSF et sur des données précliniques mesurées chez le rat tel que $PBSF \times CL_{int,Rat,vivo} / CL_{int,Rat,vitro}$. Elle élimine le biais observé avec la méthode physiologique, mais rajoute de l'imprécision (Zuegge, Schneider et al. 2001; Ito and Houston 2005).

La décision d'incorporer la liaison aux protéines plasmatiques dans la prédiction de la clairance hépatique suscite la controverse. En effet, bien que la philosophie de la pharmacocinétique physiologique repose sur l'hypothèse que seule la fraction libre de

principe actif peut être métabolisée et distribuée dans les tissus, les travaux de Ito et Houston montrent que considérer la concentration totale réduit le biais de la prédiction de la clairance mais au prix d'une perte de précision (Ito and Houston 2005) .

À ceci s'ajoute une autre problématique concernant la liaison du principe actif aux protéines microsomales. En effet, dans les études *in vitro* effectuées à partir de microsomes hépatiques, certains principes actifs peuvent se lier non-spécifiquement à la matrice. Par conséquent les paramètres cinétiques estimés doivent être corrigés pour tenir compte de la fraction libre microsomale ($f_{u_{mic}}$). La clairance hépatique sanguine s'écrit alors :

$$CL_{H,B} = \frac{f_{u_B}/f_{u_{mic}} \times CL_{int,H,vivo} \times Q_H}{f_{u_B}/f_{u_{mic}} \times CL_{int,H,vivo} + Q_H} \quad (16)$$

Afin de simplifier l'équation ci-dessus, la tentation est grande de faire l'hypothèse d'égalité entre f_{u_B} et $f_{u_{mic}}$. Cependant, les liaisons du principe actif dans ces deux matrices (sang et microsomes) ont peu de chance d'être équivalentes surtout pour les bases et les acides, puisque les sites de liaison principaux dans le plasma et les microsomes sont différents ([albumine] vs [protéine microsomale + lipides], respectivement) (Ito and Houston 2005). Si la fraction libre microsomale n'a pas été directement mesurée, il existe une méthode d'estimation de $f_{u_{mic}}$ proposée par Austin et collaborateurs (Austin, Barton et al. 2002) :

$$f_{u_{mic}} = \left(C \times 10^{0.56 \text{LogP/D} - 1.41} + 1 \right)^{-1} \quad (17)$$

où C la concentration en protéines microsomales (mg/mL), LogP/D correspond au LogP de la molécule basique ou au LogD_{7.4} pour une molécule acide ou neutre.

L'estimation de la clairance hépatique reste donc associée à un certain degré d'incertitude multifactorielle dont les sources peuvent être reliées (i) à la méthode IVIVE utilisée, (ii) au design expérimental, (iii) à la liaison aux protéines plasmatiques et microsomales, (iv) à l'aspect statique des systèmes *in vitro* qui est à l'opposé de l'aspect dynamique des systèmes *in vivo*, (v) aux facteurs non considérés par les méthodes *in vitro* mais existant *in vivo* tels que les métabolismes extra-hépatiques, la présence de transporteurs et la variabilité interindividuelle de la capacité métabolique (Lave, Coassolo et al. 1999).

1.3 Distribution

Le volume de distribution (V_{ss}) caractérise la capacité d'un principe actif à se distribuer dans le corps une fois qu'il a atteint la circulation systémique. V_{ss} décrit la relation entre la concentration systémique et la quantité de principe actif dans le corps à l'état d'équilibre. Bien que le volume de distribution réel (physiologiquement parlant) d'un principe actif est relié à l'eau corporelle et ne peut dépasser approximativement 58% du poids corporel, le volume de distribution apparent d'un principe actif peut être bien supérieur à cette valeur physiologique.

La distribution d'un principe actif dépend en partie de ses propriétés lipophiles, de son degré d'ionisation, de sa liaison aux protéines plasmatiques et tissulaires. Généralement, les acides faibles se lient plutôt à l'albumine plasmatique, et auront tendance à avoir une plus faible distribution tissulaire que les composés basiques. Les bases faibles et les composés neutres se lient plutôt à l' α 1-glycoprotéine, mais aussi à l'albumine. Les bases faibles liposolubles sont grandement distribuées du fait de leur grande affinité pour les phospholipides acides tissulaires. De plus, elles ont tendance à s'accumuler dans les composés cellulaires (mitochondries et lysosomes) à la suite de la séquestration d'ions résultant des différences de pH cellulaire (Rodgers, Leahy et al. 2005).

La distribution n'est pas nécessairement instantanée et peut dépendre de la vitesse de dissociation du composé avec les protéines plasmatiques et tissulaires (Berezhkovskiy 2004). Une faible dissociation des protéines tissulaires peut conduire à un grand V_{ss} , alors qu'une faible dissociation des protéines plasmatiques peut limiter la distribution (Berezhkovskiy 2004). La distribution du composé est aussi dépendante des mécanismes de transport à travers les membranes vasculaires et cellulaires. Les composés avec une faible perméabilité seront plus sensibles à l'effet des transporteurs membranaires que ceux qui ont une forte perméabilité membranaire (Fagerholm 2007).

Il existe plusieurs méthodes d'estimation du volume de distribution dont (i) les méthodes d'extrapolation et méthodes allométriques, (ii) les approches *in silico* basées sur la relation quantitative PK-structure (*Quantitative Structure-Pharmacokinetic Relationship*, *QSPR*), et (iii) les approches physiologiques. Toutes ces méthodes

considèrent que la vitesse de dissociation est rapide et que le principal processus de transport est la diffusion simple.

1.3.1 Méthodes d'extrapolation et allométrie

Les méthodes d'extrapolation des données animales peuvent se baser sur :

- le ratio de fraction libre plasmatique mesurée chez l'humain et l'animal pour procéder à la mise à l'échelle directe (*direct scaling*) de $V_{SS, \text{humain}}$ à partir de $V_{SS, \text{animal}}$. Il semblerait que l'exactitude et la précision de cette approche dépendent de l'espèce animale utilisée (Sui, Sun et al. 2008).
- une relation log-log du type : $V_{SS, \text{humain}} = A \times V_{SS, \text{animal}}^B$ ou le V_{SS} humain et animal peuvent être pondérés par la fraction libre tissulaire estimée chez l'humain et l'animal, respectivement (Boxenbaum 1982).

L'extrapolation à l'humain doit être interprétée avec prudence à cause des différences intrinsèques entre les espèces en termes de composition tissulaire, et de la nature et activité des transporteurs.

L'approche allométrique établit une relation inter-espèces entre le poids corporel (ou la surface corporelle) et les capacités fonctionnelles et structurales des organes, telle que:

$V_{ss} = A \times BW^B$ où BW est le poids corporel, et A et B sont les paramètres de la relation allométrique. Cette approche est associée à un large degré d'imprécision relié aux différences inter-espèces dans la liaison aux protéines et la liaison aux globules rouges, dans les compositions tissulaires, et la nature des transporteurs membranaires (Fagerholm 2007).

1.3.2 Approches basées sur la structure (QSPR)

Les approches basées sur le QSPR utilisent des paramètres reliés à la structure moléculaire du composé (MW , LogP , nombre de liaisons hydrogènes, nombre d'atomes de carbones aromatiques, etc.) pour estimer le volume de distribution à l'aide de régressions linéaires (Wajima, Fukumura et al. 2003; Ghafourian, Barzegar-Jalali et al. 2004). Plus particulièrement, Lombardo et collaborateurs ont développé un modèle prédictif basé sur une équation de régression linéaire exprimant la fraction libre

tissulaire en fonction de paramètres reliés au médicament, tels que LogD expérimental, la fraction ionisée à pH 7.4 et la fraction libre plasmatique (f_{u_p}) (Lombardo, Obach et al. 2002). En utilisant l'équation de Oie-Tozer¹, il devient facile d'estimer V_{ss} chez l'humain, sans avoir recours à des données pharmacocinétiques animales (Oie and Tozer 1979). L'avantage de ces approches est qu'elles ne nécessitent pas d'études animales. Cependant, leur précision est généralement comparable aux approches allométriques (Fagerholm 2007).

1.3.3 Approches physiologiques

Les approches physiologiques sont des approches mécanistiques qui se basent sur le principe que le volume de distribution d'un principe actif dépend des volumes plasmatiques (V_p) et tissulaires (V_t) du mammifère, ainsi que des propriétés physicochimiques du principe actif.

La prédiction ou la mesure directe de la fraction libre tissulaire (f_{u_t}) a été utilisée pour estimer V_{ss} , puisque (Gibaldi and Perrier 1982):

$$V_{ss} = V_p + \sum (f_{u_p} / f_{u_t}) \times V_t \quad (18)$$

Certains auteurs ont supposé que la moyenne des ' f_{u_t} ' calculés pour diverses espèces animales pouvait approximer les f_{u_t} chez l'humain, et ont prédit ainsi le V_{ss} d'un composé chez l'humain à partir de l'équation de Oie-Toizer (Obach, Baxter et al. 1997). Par la suite, la relation entre V_{ss} et f_{u_t} a été exprimée en fonction de coefficients de partage tissu-plasma du composé (P_{tp}) tel que:

$$V_{ss} = V_p + \sum P_{tp} \times V_t \quad (19)$$

¹ L'équation de Oie-Tozer s'écrit tel que : $V_{ss} = V_p (1 - R_{E/I} + f_{u_p} V_p (VE/V_p - R_{E/I}) + f_{u_p}/f_{u_t} VR$ avec V_p le volume plasmatique (0.043 L/kg), VE le volume des fluides extracellulaires (0.151 L/kg), $R_{E/I}$ le ratio de protéines extracellulaires/intracellulaires (1.4 pour l'albumine), VR volume physique dans lequel se distribue le principe actif auquel on retranche le volume extracellulaire (0.380 L/kg).

Bjorkman et collaborateurs (Bjorkman 2002) ont prédit avec un bon degré de précision le V_{ss} des médicaments acides et basiques à partir des P_{tp} mesurés dans les muscles ($P_{tp_{muscle}}$) et dans les tissus adipeux ($P_{tp_{fat}}$). Dans le cas d'une base, les P_{tp} des poumons et des tissus adipeux sont approximés par $P_{tp_{fat}}$, et tous les autres P_{tp} par $P_{tp_{muscle}}$. Dans le cas d'un composé acide, tous les P_{tp} sont approximés par $P_{tp_{muscle}}$, sauf le tissu adipeux.

Au même moment, Poulin et Theil (Poulin and Theil 2000; Poulin, Schoenlein et al. 2001; Poulin and Theil 2002) ont développé une méthode d'estimation de V_{ss} basée sur la prédiction (et non la mesure expérimentale) des P_{tp} chez les rats et les humains. Leur approche requiert des paramètres reliés au médicament facilement estimables *in vitro*, tels que pK_a , $P_{o:w}$, le coefficient de partage huile d'olive-eau ($D_{vo:w}$), et f_{u_p} . Les équations mécanistiques développées reposent sur les hypothèses suivantes :

- le plasma et les tissus sont composés principalement de lipides neutres, phospholipides, et d'eau
- la distribution du composé dans les lipides neutres peut être approximée à partir de $D_{vo:w}$
- la distribution tissulaire est gouvernée principalement par la diffusion passive
- la distribution tissulaire est instantanée et homogène

Les équations d'estimation des coefficients de partage tissu :plasma par la méthode Poulin et Theil s'écrivent comme suit :

Tissus non-adipeux

$$P_{tp} = \frac{P_{o:w} \times (V_{nlt} + 0.3V_{pht}) + (V_{wt} + 0.7V_{pht})}{P_{o:w} \times (V_{nlp} + 0.3V_{php}) + (V_{wp} + 0.7V_{php})} \times \frac{f_{u_p}}{f_{u_t}} \quad (20)$$

Tissu adipeux

$$P_{tp_{adip}} = \frac{D_{vo:w} \times (V_{nlt} + 0.3V_{pht}) + (V_{wt} + 0.7V_{pht})}{D_{vo:w} \times (V_{nlp} + 0.3V_{php}) + (V_{wp} + 0.7V_{php})} \times \frac{f_{u_p}}{1} \quad (21)$$

avec

$$f_{u_t} = \frac{1}{1 + 0.5 \times (1 - f_{u_p}) / f_{u_p}} \quad (22)$$

où V_{nlt} et V_{nlp} représentent le volume de lipide neutre dans le tissu et le plasma respectivement, V_{pht} et V_{php} représentent le volume de phospholipide dans le tissu et le plasma respectivement, V_{wt} et V_{wp} représentent le volume d'eau tissulaire et plasmatique respectivement.

Cette approche, initialement développée pour les composés neutres, ne prend pas en compte certains mécanismes de distribution tels que la liaison spécifique du composé aux macromolécules, la perméabilité membranaire, et la présence de transporteurs, ce qui expliquerait certaines déviations observées. Très récemment, Rodgers et Rowland, ont amélioré l'approche de Poulin, en incluant l'effet des interactions ioniques avec les membranes lipidiques chargées, et le phénomène de séquestration d'ions. Ils ont développé des équations permettant d'estimer les coefficients de partage tissu-plasma du composé non-lié ($P_{tp,u}$) pour les molécules acides, neutres, des bases très faibles et des zwitterions, ainsi que pour des bases faibles ou modérées (Rodgers, Leahy et al. 2005; Rodgers and Rowland 2006; Rodgers and Rowland 2007). Une meilleure précision des prédictions obtenues à partir de l'approche de Rodgers et Rowland a été obtenue pour les bases modérées et fortes.

1.3.4 Rôle des transporteurs dans la distribution

Les transporteurs membranaires jouent un rôle important dans la distribution tissulaire d'un médicament puisqu'ils peuvent favoriser l'entrée ou la sortie d'un xénobiotique du milieu intracellulaire. Il a été récemment observé que les transporteurs hépatiques et rénaux peuvent affecter la valeur du V_{ss} de certains principes actifs (Grover and Benet 2009). Les transporteurs exprimés dans les autres tissus influencent plutôt la quantité accumulée dans les tissus (Grover and Benet 2009).

Il existe deux principaux groupes de protéines impliqués dans le transport des médicaments :

- les protéines de transport de type SLC (*uptake transporters, solute carriers SLC*): les *SLC* facilitent l'entrée ou la sortie de la cellule de nombreux

composés. Ils comprennent les transporteurs d'anions organiques (*Organic Anion Transporters, OAT*) et les transporteurs de cations organiques (*Organic Cation Transporters, OCT*). Ce sont des transporteurs ATP-indépendants. On les retrouve dans de nombreux tissus et principalement au niveau des tubules rénaux, des hépatocytes, des entérocytes, de la barrière hémato-encéphalique (BHE), et de la barrière du plexus choroïde (Kusuhara and Sugiyama 2005; Kusuhara and Sugiyama 2009)

- les protéines de transport associées à la résistance aux médicaments de type ATP-Binding Cassette (*Transporteurs ABC*) : ces transporteurs peuvent exporter les xénobiotiques contre un gradient de concentration depuis le milieu intracellulaire jusqu'au milieu vasculaire, grâce à l'énergie produite par l'hydrolyse de l'ATP. Ils jouent un rôle important dans la défense cellulaire contre l'accumulation de xénobiotiques. Parmi les 50 transporteurs ABC découverts chez l'humain, les principaux transporteurs impliqués dans la distribution tissulaire ou l'excrétion sont les MDR1 (ABCB1) ou glycoprotéine-P (P-gp), les MRP1 à MRP9 (ABCC), et les BRCP (*Breast Cancer Resistance Protein*) (ABCG2). Les transporteurs ABC sont exprimés dans de nombreux tissus incluant les poumons, les intestins, le foie, les reins, la barrière hémato-encéphalique et le plexus-choroïde, les testicules, et le placenta (Funk 2008) (de Lange and Danhof 2002; Feng 2002; Golden and Pollack 2003; de Lange 2004; Pardridge 2005; Szakacs, Varadi et al. 2008). Les P-gp et les ABCG2 sont exprimés aussi dans le cœur (Meissner, Sperker et al. 2002; Weiss and Kang 2002; Couture, Nash et al. 2006; Solbach, König et al. 2006).

La génération d'animaux transgéniques a mis en évidence le rôle excréteur et protecteur des transporteurs dans la distribution tissulaire des xénobiotiques (Schinkel, Smit et al. 1994; Schinkel, Wagenaar et al. 1995; Schinkel, Mayer et al. 1997). A ce jour, il existe des souris déficientes des gènes codant pour la P-gp (*mdr1a et mdr1b*) (Schinkel, Mayer et al. 1997), du gène codant pour le BCRP (Jonker, Buitelaar et al. 2002), et/ou des gènes *mrp1* (Wijnholds, de Lange et al. 2000), *mrp3* (Belinsky, Dawson et al. 2005) et *mrp4* (Assem, Schuetz et al. 2004). En absence d'expression des transporteurs d'efflux, les accumulations de xénobiotiques dans les tissus peuvent être associées à une

meilleure efficacité pharmacologique (van Asperen, van Tellingen et al. 1997; Breedveld, Plum et al. 2005), mais aussi à un risque de toxicité accru (Schinkel, Smit et al. 1994; Schinkel, Wagenaar et al. 1995; Schinkel, Wagenaar et al. 1996; Smit, Huisman et al. 1999; van Asperen, van Tellingen et al. 1999). Il a été montré que l'absence de P-gp augmente les concentrations intracardiaques de certains médicaments, comme la vinblastine (Schinkel, Smit et al. 1994; van Asperen, van Tellingen et al. 1999) ou la doxorubicine (van Asperen, van Tellingen et al. 1999). La surexpression des gènes codant pour la P-gp au niveau du myocarde chez des souris a mis en évidence le rôle de ce transporteur dans la détoxification du cœur. En effet, l'administration de doxorubicine, reconnu pour sa toxicité cardiaque irréversible, a causé des changements dégénératifs cardiaques chez les souris normales, mais pas chez les souris mutées (Dell'Acqua, Polishchuck et al. 1999).

La BHE est une barrière physiologique très importante, qui protège le cerveau contre la pénétration des composés endogènes et exogènes. Les cellules endothéliales de la BHE forment des jonctions serrées qui créent une réelle barrière physique entre le tissu cérébral et la circulation systémique. La diffusion des composés lipophiles libres présents dans le sang est aussi limitée par la présence d'une barrière biochimique composée de transporteurs d'efflux membranaires exprimés au niveau de la BHE, comme les P-gp et les BCRP (Kusuhara and Sugiyama 2001; Golden and Pollack 2003; Misra, Ganesh et al. 2003). Des études réalisées avec des souris déficientes du gène codant pour la P-gp ont démontré une accumulation de xénobiotique dans le cerveau de 10 à 100 fois supérieure chez les souris mutées que chez les souris normales (Schinkel, Smit et al. 1994; Schinkel, Wagenaar et al. 1995; Schinkel, Wagenaar et al. 1996; Polli, Jarrett et al. 1999).

1.4 Élimination rénale et biliaire

1.4.1 Élimination rénale

Les processus impliqués dans l'excrétion rénale sont la filtration glomérulaire, la sécrétion et réabsorption tubulaire gouvernées par la diffusion simple et le transport

actif. Les transporteurs impliqués dans la sécrétion rénale des médicaments sont les P-gp, MRP et des OATP, localisés au niveau apical de l'épithélium rénal.

La prédiction de la clairance rénale et la clairance de sécrétion rénale chez l'humain se base sur l'approche allométrique (Tahara, Kusuhara et al. 2006), qui parfois requiert un facteur de correction pour améliorer les prédictions (Mahmood 1998).

1.4.2 Élimination biliaire

Alors que les transporteurs d'influx participent à la 'Phase 0' du métabolisme hépatique en favorisant l'exposition du xénobiotique aux enzymes de métabolisme, les transporteurs d'efflux (OATP et ABC) participent quant à eux à l'excrétion hépatobiliaire, récemment nommée 'phase III' de l'élimination hépatique, en transportant les xénobiotiques et/ou leurs métabolites depuis les hépatocytes vers les sinusoides hépatiques et le canal biliaire. Les méthodes allométriques semblent les plus appropriées pour prédire la clairance biliaire des médicaments (Mahmood 2005), malgré une certaine déviation due aux différences inter-espèces dans les transporteurs et dans le débit biliaire. Par contre, peu de travaux ont été effectués dans le but de développer une approche IVIVE de la clairance biliaire chez les animaux et les humains, et ceci est en partie causé par le manque d'accessibilité à des données *in vivo* (Sasaki, Suzuki et al. 2004; Fagerholm 2008).

Les facteurs importants affectant l'ADME d'un principe actif et leur méthode d'estimation ont été présentés dans les chapitres précédents. Dans la prochaine section, nous exposerons les types d'interactions qui peuvent affecter les différentes phases gouvernant le devenir du médicament dans l'organisme, ainsi que les approches développées pour estimer leur impact sur les paramètres pharmacocinétiques.

2 Interactions médicamenteuses : mécanismes et quantification

2.1 Interactions au niveau de l'absorption

Les mécanismes d'interactions médicamenteuses affectant l'absorption orale des médicaments impliquent des changements physiologiques, physicochimiques, et biochimiques.

2.1.1 *Changements physicochimiques*

Les changements de pH gastriques ou intestinaux affectant la dissolution et la solubilité des médicaments peuvent aussi bien réduire que favoriser l'absorption intestinale. La formation de complexes par ions métalliques (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+} , Fe^{2+} , Fe^{3+}) réduit la quantité absorbable du principe actif tels que les quinolones et tétracyclines (Dressman, Bass et al. 1993).

2.1.2 *Changements physiologiques*

Une diminution du temps de vidange gastrique accélère la vitesse d'absorption intestinale (Dressman, Bass et al. 1993). Par exemple, l'administration de métoclopramide ou érythromycine augmente la vitesse d'absorption de l'acétaminophène (Boivin, Carey et al. 2003), alors que la propanthéline diminue cette vitesse, sans pour autant affecter la quantité absorbée (Hayes 1981). Une augmentation de la motilité intestinale peut réduire la quantité de principe actif absorbée (Dressman, Bass et al. 1993) en diminuant le temps de résidence dans la lumière intestinale et le temps de contact avec le site d'absorption.

Théoriquement, quand le débit intestinal est l'étape limitante de l'absorption de certains composés lipophiles, une modulation de ce débit due à une vasoconstriction ou vasodilatation pourrait affecter l'absorption intestinale de ces composés. Cependant, ceci n'a pas été encore prouvé formellement.

2.1.3 Changements biochimiques

Une modulation de l'activité ou de l'expression des transporteurs membranaires intestinaux affecte l'absorption intestinale des principes actifs moyennement perméables (Wu and Benet 2005). L'impact des interactions impliquant les P-gp sur l'absorption intestinale ont été reportées aussi bien à partir d'expériences in vitro que d'études in vivo (Yu 1999; Spahn-Langguth and Langguth 2001; Perloff, von Moltke et al. 2002; Wandel, Kim et al. 2002). Par exemple, la biodisponibilité orale de digoxine est augmentée en présence de talinolol (inhibition compétitive) (Westphal, Weinbrenner et al. 2000). L'administration concomitante de jus de pamplemousse double la concentration plasmatique maximale de talinolol administré à des rats (Spahn-Langguth and Langguth 2001). Westphal et collaborateurs ont démontré l'induction des P-gp par la rifampicine chez l'humain, diminuant de manière significative les concentrations de talinolol après administration orale ou intraveineuse (Westphal, Weinbrenner et al. 2000).

2.2 Interactions médicamenteuses métaboliques

Des interactions médicamenteuses métaboliques (IMM) peuvent se produire lorsque deux composés sont co-administrés chez un même individu, et que l'un des deux composés altère le métabolisme de l'autre. Cette modification métabolique peut se traduire par une augmentation ou une diminution de la biodisponibilité orale, de la clairance systémique et des concentrations plasmatiques du médicament. Les IMM sont les interactions pharmacocinétiques les plus souvent associées aux risques sévères de toxicité ou de perte d'efficacité pharmacologique (Lazarou, Pomeranz et al. 1998). Les conséquences de certaines IMM ont même mené au retrait du marché de plusieurs médicaments depuis les dix dernières années (Wienkers and Heath 2005).

Il existe différents types d'interactions enzymatiques : les inhibitions et les inductions enzymatiques. Alors que l'inhibition est un processus immédiat, l'induction enzymatique requiert un certain délai avant d'être effective.

2.2.1 Inhibitions enzymatiques

Certains composés ont la capacité de réduire l'activité catalytique d'une isoenzyme, et ainsi provoquer l'accumulation de substrats de cette isoenzyme dans l'organisme. Il existe deux grandes catégories d'inhibition enzymatique : les inhibitions réversibles et les inhibitions irréversibles (ou quasi-irréversibles). Parmi les inhibiteurs réversibles, on retrouve des inhibiteurs compétitifs, non-compétitifs ou incompétitifs. Les types d'inhibitions métaboliques les plus fréquemment observés sont les inhibitions compétitives et les inhibitions irréversibles.

2.2.1.1 Inhibition par compétition

Un inhibiteur compétitif est un substrat (S_2) de l'isoenzyme qui présente une affinité (K_m) plus forte pour le site de liaison enzymatique où se fixe normalement l'autre substrat (S_1) (Figure 2. 1).

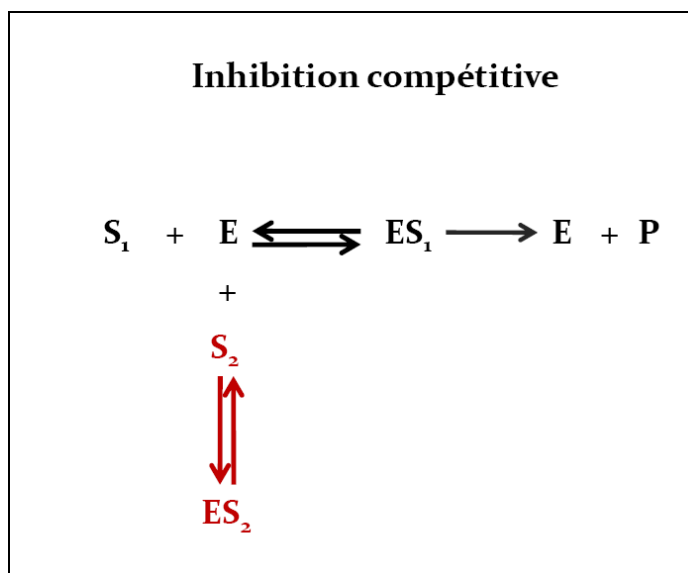


Figure 2. 1. Illustration des mécanismes de l'inhibition réversible par compétition. S_1 est le substrat de faible affinité, E l'enzyme, P le produit de la réaction enzymatique, S_2 le substrat de forte affinité, ES_1 et ES_2 les complexes enzyme-substrat

L'inhibiteur réduit le nombre de sites enzymatiques disponibles pour métaboliser S_1 . Ceci se traduit par une augmentation de la constante d'affinité apparente de S_1 ($K_m'(S_1)$), telle que :

$$K_m'(S_1) = \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \times K_m(S_1) \quad (2.1)$$

avec $[I]$ la concentration d'inhibiteur, K_i la constante d'inhibition qui correspond ici au K_m de l'inhibiteur. En fait, $1/K_i$ est une mesure de la puissance l'inhibiteur.

Lors d'une interaction compétitive, le V_{max} demeure inchangé. La clairance intrinsèque CL_{int} pour le substrat S_1 s'écrit donc :

$$CL_{int}' = \frac{V_{max}}{K_m' + [S_1]} \quad (2.2)$$

D'après l'équation ci-dessus, on voit qu'une forte concentration de substrat pourrait renverser l'inhibition compétitive. Parmi les inhibiteurs compétitifs de l'isoenzyme CYP3A4, on retrouve des antifongiques comme la ketoconazole et l'itraconazole, la quinidine, testostérone, terféndine, et la ciclosporine.

2.2.1.2 Inhibition non-compétitive

L'inhibiteur non-compétitif se lie sur un site enzymatique différent de celui du substrat, et sur le complexe enzyme-substrat entraînant une formation d'un complexe enzyme-substrat-inhibiteur qui ralentit la fonction catalytique de l'enzyme.

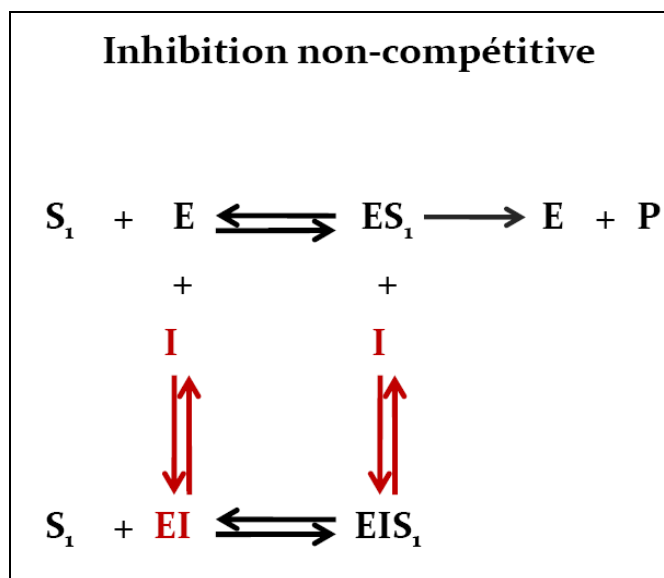


Figure 2. 2. Illustration des mécanismes de l'inhibition non-compétitive. S1 est le substrat, E l'enzyme, P le produit de la réaction enzymatique de S1, I l'inhibiteur, ES1 le complexe enzyme-substrat, EI le complexe enzyme-inhibiteur, et EIS1 le complexe enzyme-inhibiteur-substrat

Par conséquent, une forte concentration de substrat ne renversera pas l'inhibition non-compétitive. Ce type d'inhibition est appelé aussi inhibition mixte. La constante d'affinité K_m est inchangée alors que la vitesse de biotransformation du substrat est diminuée selon :

$$V_{\max}' = \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)^{-1} \times V_{\max} \quad (2.3)$$

La clairance intrinsèque s'écrit donc

$$CL_{\text{int}}' = \frac{V_{\max}'}{K_m + [S_1]} \quad (2.4)$$

2.2.1.3 Inhibition incompétitive

L'inhibiteur incompétitif se lie au complexe enzyme-substrat pour former un complexe enzyme-substrat-inhibiteur inactif. Ce type d'inhibition diminue à la fois le V_{\max} et le K_m du substrat par un facteur $(1 + [I]/K_i)$.

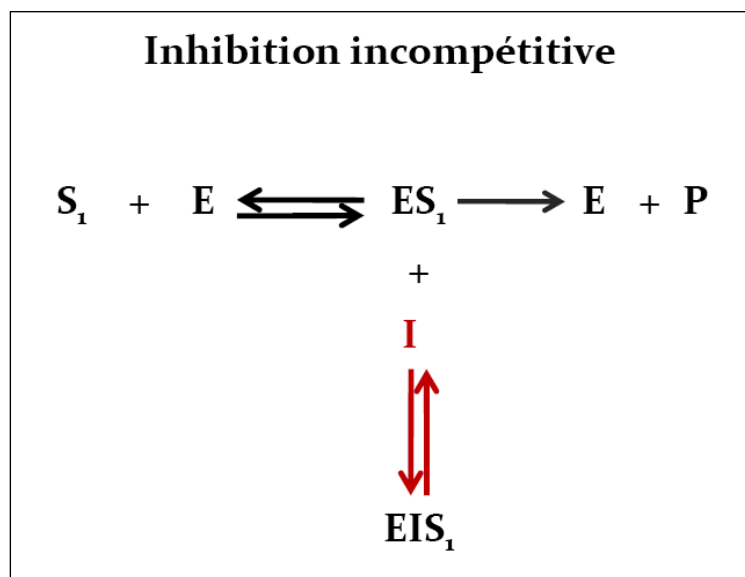


Figure 2. 3. Illustration des mécanismes de l'inhibition incompétitive. S1 est le substrat, E l'enzyme, P le produit de la réaction enzymatique de S1, I l'inhibiteur, et EIS1 le complexe enzyme-inhibiteur-substrat

La clairance intrinsèque du substrat s'écrit

$$CL_{int}' = \frac{V_{max}'}{K_m' + [S_1]} \quad (2.1)$$

avec K_m' et V_{max}' tels que décrit par les équations 2.1 et 2.3 respectivement.

Si la concentration de substrat est négligeable face à K_m' , l'inhibition incompétitive n'affectera pas la clairance intrinsèque du substrat. Ce type d'inhibition est peu courant dans le métabolisme des médicaments.

2.2.1.4 Inhibitions irréversibles

Les inhibiteurs irréversibles (*Mechanism-Based Inactivators, MBI*) font partie de la classe d'inhibiteurs dépendants du temps (*Time Dependent Inhibitors, TDI*). Les MBI peuvent (i) soit former une liaison covalente avec l'enzyme de manière irréversible, (ii) être des substrats de l'isoenzyme dont les métabolites forment un complexe métabolique

intermédiaire (*Metabolic Intermediate Complex, MIC*) qui inactivent l'isoenzyme de manière quasi-irréversible. Cependant, dans les conditions physiologiques, il est presque impossible de renverser une inhibition quasi-irréversible (Venkatakrishnan, Obach et al. 2007). Contrairement aux inhibitions réversibles, les inhibitions gouvernées par les MBI sont des inhibitions multifactorielles, qui dépendent de la concentration d'inhibiteur, du temps d'incubation avec l'inhibiteur, et de la présence de NADPH (nicotidamide adenine dinucleotide phosphate hydrogen)(Zhou, Yung Chan et al. 2005).

On rappelle que la vitesse maximale de biotransformation, V_{max} , est exprimée par la vitesse catalytique K_{cat} pondérée par la quantité enzymatique qui est fonction de la vitesse de synthèse enzymatique K_{synth} et de la vitesse de dégradation enzymatique K_{degr} , selon la relation

$$V_{max} = K_{cat} \times \left(\frac{K_{synth}}{K_{degr}} \right) \quad (2.2)$$

En présence de l'inactivateur, la vitesse de dégradation de l'enzyme augmente. Elle dépend alors de la vitesse d'inactivation K_{inact} , de la concentration d'inhibiteur et de la constante d'inhibition, tel que :

$$K_{degr}' = K_{degr} + \frac{[I] \times K_{inact}}{[I] + K_i} \quad (2.3)$$

Ainsi, la vitesse maximale de biotransformation lors d'une inhibition irréversible devient :

$$V_{max}' = V_{max} \times \left(1 + \frac{[I] \times K_{inact}}{K_{degr} \times ([I] + K_i)} \right)^{-1} \quad (2.4)$$

donc, la clairance intrinsèque du substrat s'écrit

$$CL_{int}' = \frac{V_{max}}{K_m} \times \left(1 + \frac{K_{inact} / K_{degr}}{\left(1 + K_i / [I] \right)} \right)^{-1} \quad (2.5)$$

Une particularité des MBI est que l'effet inhibiteur de l'inactivateur perdure même après l'élimination de l'inhibiteur de l'organisme (Kanamitsu, Ito et al. 2000). Il a été reconnu que plusieurs inhibitions cliniquement significatives impliquant les CYP450 pouvant occasionner l'apparition de torsades de pointe (Dresser, Spence et al. 2000; Michalets and Williams 2000), de rhabdomyolyses (Williams, Sykora et al. 2001), d'hypotension (Anderson and Nawarskas 2001; Simonsen 2002), ou d'ataxie (Patsalos, Froscher et al. 2002), sont en fait reliées à des inhibitions irréversibles. Parmi les inactivateurs de l'isoenzyme CYP3A4, on retrouve des antibactériens (clarithromycine, érythromycine, isoniazide), des agents anticancéreux (tamoxifène, irinotecan), des antihypertenseurs (dihydralazine, verapamil, diltiazem), et des extraits de plantes (bergamotine, glabridine) (Wang, Jones et al. 2004; Zhou, Yung Chan et al. 2005). Cependant, toutes les inhibitions irréversibles ne sont pas néfastes et peuvent parfois être désirées. Par exemple, l'administration concomitante de saquinavir permet d'augmenter considérablement la biodisponibilité du ritonavir.

2.2.2 Induction enzymatique

En stimulant la transcription du gène associé à l'enzyme, un inducteur enzymatique entraîne une augmentation de la concentration intracellulaire de l'enzyme induite. Ceci se traduit par une élévation significative de l'activité enzymatique totale. La conséquence d'une induction enzymatique est une élévation de la clairance métabolique du substrat, et une diminution de ses concentrations plasmatiques, surtout notable si ce dernier avait une faible extraction hépatique.

Lors d'une induction enzymatique, V_{max} augmente proportionnellement à la quantité d'enzymes produites. La vitesse de la synthèse enzymatique K_{synth} est donc dépendante de la concentration d'inducteur $[Ind]$, l'induction maximale (E_{max}) et de la concentration d'inducteur qui provoque la moitié de l'effet inducteur maximum ($EC_{50,I}$), telle que :

$$K_{synth}' = K_{synth} \times \left(1 + \frac{E_{max} \times [Ind]}{[Ind] + EC_{50,I}} \right) \quad (2.6)$$

et

$$V_{\max}' = K_{\text{cat}} \times \left(\frac{K'_{\text{synth}}}{K_{\text{degr}}} \right) \quad (2.7)$$

Parmi les inducteurs du CYP3A4, on retrouve la rifampicine, le phénobarbital, la carbamazépine, certains antirétroviraux, et le millepertuis.

2.2.3 Méthodes de prédiction des interactions métaboliques

Telles que proposé par Rowland et Matin en 1973, les méthodes de prédiction de l'amplitude des IMM reposent sur le calcul du ratio d'ASC des concentrations plasmatiques avant (ASC_{oral}) et après la survenue de l'interaction (ASC_{oral}') (Rowland and Matin 1973). Le ratio d'ASC est exprimé en fonction des clairances intrinsèques hépatiques estimées avec interaction (CL_{int}') ou sans (CL_{int}).

Si on suppose que :

- (i) l'IMM n'affecte pas
 - a. la fraction de médicament absorbée,
 - b. la fraction libre de médicament dans le sang
- (ii) f_m est la fraction de médicament qui est éliminée par voie métabolique
- (iii) $f_{m_{\text{CYP}}}$ est la fraction de la clairance totale due à la voie métabolique inhibée (Ito, Hallifax et al. 2005)

alors, le ratio d'ASC s'écrit comme :

$$\frac{ASC_{\text{oral}}'}{ASC_{\text{oral}}} = \frac{1}{\left(f_m \times f_{m_{\text{CYP}}} \times \frac{CL_{\text{int}}'}{CL_{\text{int}}} + (1 - f_m \times f_{m_{\text{CYP}}}) \right)} \quad (2.8)$$

Si on tient compte de l'impact de l'inhibition des CYP3A4 intestinaux lors de l'IMM (Ito, Iwatsubo et al. 1998) alors :

$$\frac{ASC_{\text{oral}}'}{ASC_{\text{oral}}} = \frac{F_G'}{F_G} \times \frac{1}{\left(f_m \times f_{m_{\text{CYP}}} \times \frac{CL_{\text{int}}'}{CL_{\text{int}}} + (1 - f_m \times f_{m_{\text{CYP}}}) \right)} \quad (2.9)$$

avec

$$\frac{F_G'}{F_G} = \frac{CL_{int_G'}}{CL_{int_G}} \quad (2.10)$$

où F_G et F_G' sont les fractions de la dose administrée qui échappent aux éliminations présystémiques intestinales en absence et en présence d'IMM, respectivement. Les CL_{int_G} sont calculées comme présenté aux équations Eq.2.1, Eq. 2.3 ou Eq.2.9 en remplaçant I par I_G .

Bien que l'approche de prédiction des ratios d'ASC ait donné des résultats comparables aux ratios d'ASC mesurés pour de nombreux couples substrat/inhibiteur, des déviations ont été observées avec cette approche. En fait, l'incertitude dans l'estimation des paramètres tels que K_{inact} , K_i , et K_{degr} pourrait être un facteur explicatif de ces déviations (Venkatakrishnan, Obach et al. 2007). Par exemple, l'estimation de K_i à partir de microsomes hépatiques peut être biaisée si l'inhibiteur est lié aux microsomes (Venkatakrishnan, Obach et al. 2007). En ignorant cette liaison, la valeur de K_i est sous-estimée. Il est possible de corriger la valeur de K_i à partir des méthodes d'estimation de la fraction libre microsomale $f_{u_{mic}}$ (Austin, Barton et al. 2002).

Une autre source de biais est la valeur utilisée pour caractériser la concentration d'inhibiteur $[I]$ *in vivo*. Le choix du meilleur descripteur de $[I]$ semble problématique et non-standard lorsqu'on désire faire l'IVIVE de l'effet de l'IMM sur l'ASC. Intuitivement, la concentration disponible au site enzymatique dans le foie serait la valeur la plus appropriée pour appliquer l'IVIVE. Cependant, cette valeur n'étant pas disponible *in vivo*, plusieurs descripteurs de $[I]_h$ ont été proposés tels que :

- la concentration plasmatique moyenne ou maximale,
- la concentration libre plasmatique (moyenne ou maximale) (Obach, Walsky et al. 2007),
- la concentration maximum (totale ou libre) dans la veine porte hépatique, estimée telle que $C_{max} = C_{max,plasma} + D_o \times F_{abs} \times ka / Q_H$ (Kanamitsu, Ito et al. 2000).

Comme dans la plupart des cas l'inhibiteur est administré par voie orale, le foie et l'intestin vont être exposés à des concentrations d'inhibiteur supérieures à celles

mesurées dans la circulation systémique. Par conséquent, la concentration libre à l'entrée du foie semble être l'estimé le plus réaliste de la concentration maximale d'inhibiteur dans les hépatocytes qui peut se lier aux enzymes (Kanamitsu, Ito et al. 2000). Cependant, les résultats des travaux d'Obach et collaborateurs (Obach, Walsky et al. 2007) ont plutôt suggéré l'utilisation de la concentration maximale libre plasmatique pour une meilleure précision de prédictions de l'IMM gouvernée par un MBI. Notons que l'utilisation de la concentration libre plasmatique semble plus difficilement justifiable si l'inhibiteur est substrat de transporteurs d'influx hépatiques.

La concentration d'inhibiteur suggérée pour estimer F_G/F_G' est la concentration maximale dans la veine porte hépatique (Kanamitsu, Ito et al. 2000; Rostami-Hodjegan and Tucker 2004) ($C_{\max, \text{gut}} = D_0 \cdot F_{\text{abs}} \cdot ka/Qg$).

Certains principes actifs, comme le ritonavir, présentent à la fois des propriétés d'induction et d'inhibition du CYP3A4 (Fahmi, Boldt et al. 2008). Certains auteurs ont donc proposé de prendre en compte ces propriétés mixtes de modulation enzymatique dans l'estimation du ratio d'ASC (Fahmi, Boldt et al. 2008). À la lumière de leurs prédictions, les auteurs suggèrent d'utiliser la concentration plasmatique moyenne totale d'inhibiteur et de négliger l'effet de premier passage intestinal (Fahmi, Boldt et al. 2008) pour une meilleure précision de prédiction de l'IVIVE.

Au lieu de choisir un descripteur statique de la concentration d'inhibiteur dans le foie et/ou les intestins, il est aussi possible de choisir un descripteur dynamique de ces concentrations. En effet, en étudiant les IMM via un modèle pharmacocinétique à base physiologique, il serait alors possible et approprié d'utiliser le profil complet de concentration de l'inhibiteur (Chien, Mohutsky et al. 2003; Yang, Kjellsson et al. 2003; Vossen, Sevestre et al. 2007). Le débat reste cependant ouvert quant aux choix de la concentration dans la veine porte hépatique (Yang, Kjellsson et al. 2003) ou tissulaire (Vossen, Sevestre et al. 2007), et quant à l'inclusion ou non de la fraction libre.

2.3 Interactions au niveau de la distribution

Les interactions médicamenteuses au niveau de la distribution peuvent impliquer un déplacement de liaison aux protéines plasmatiques/tissulaires du substrat par un autre composé de plus forte affinité pour les protéines (compétition pour le site de liaison). Cependant, les interactions médicamenteuses cliniquement significatives affectant la liaison aux protéines plasmatiques sont rares et concernent plutôt les médicaments très fortement liés aux protéines plasmatiques, avec un faible volume de distribution, et étant éliminés très lentement, ou ayant un index thérapeutique très étroit (warfarine-clozapine) (Shapiro and Shear 2002). De plus, une grande concentration de médicament est nécessaire pour produire le déplacement de liaison.

Les polymorphismes génétiques ou les IM affectant l'activité ou l'expression des transporteurs ABC peuvent avoir une conséquence pharmacocinétique locale et/ou globale. En faisant une revue de littérature sur les interactions médicamenteuses affectant les transporteurs, Grover et Benet (Grover and Benet 2009) ont récemment observé que :

- l'inhibition de l'activité des transporteurs d'influx membranaires hépatiques tend à augmenter V_{ss} , alors que l'inhibition de l'activité des transporteurs d'efflux membranaires hépatiques tend à diminuer V_{ss}
- l'inhibition de l'activité des transporteurs d'influx membranaires au niveau des tubules rénaux n'affecte pas V_{ss} , alors que l'inhibition des transporteurs d'efflux au niveau des tubules rénaux tend à augmenter V_{ss}

L'effet de la modulation d'activité des transporteurs exprimés dans les autres tissus que les tissus hépatiques et rénaux (BHE, cœur, poumons par exemple) ne semble pas affecter de manière significative la valeur de V_{ss} (Grover and Benet 2009). A ce jour, aucun effet significatif de l'induction des transporteurs membranaires sur la valeur de V_{ss} n'a été rapporté.

Par contre, la modulation de l'activité des transporteurs peut avoir un impact sur la quantité de principe actif accumulée dans les tissus surtout si le composé est faiblement perméable, et peut être associée à des effets indésirables. Par exemple, l'administration concomitante de l'opéramide (substrat de P-gp) et de quinidine (inhibiteur de P-gp) à des

volontaires sains s'est traduite par une dépression respiratoire et ce, même à des niveaux de concentrations plasmatiques de lopéramide similaires à celles mesurées sans quinidine (Sadeque, Wandel et al. 2000). Ces résultats suggèrent fortement que l'inhibition de P-gp au niveau de la BHE par la quinidine a provoqué une augmentation de quantité de lopéramide dans le système nerveux central. Dans certains cas, l'interaction avec les transporteurs d'efflux membranaires est souhaitée pour augmenter la quantité de principe actif dans les tissus. Les cellules tumorales expriment les P-gp et autres transporteurs d'efflux tels que MRP1 et BCRP. Par conséquent, plusieurs inhibiteurs de P-gp ont été introduits depuis les années 1990 afin de faciliter les traitements de chimiothérapie, dont le valsopodar (PSC833), l'élacridar (GF120918) (Aszalos 2007).

2.4 Interactions au niveau de l'élimination rénale et biliaire

Les processus de transport gouvernant l'élimination rénale et hépatobiliaire sont les principales sources des interactions médicamenteuses affectant l'excrétion des médicaments (Bonate, Reith et al. 1998).

Au niveau rénal, on distingue quatre grandes sources d'IM :

- le déplacement de la fraction libre plasmatique d'un principe actif éliminé majoritairement par filtration glomérulaire est associé à une augmentation de la clairance rénale de ce composé
- l'altération de la sécrétion tubulaire résulte en une variation de la clairance rénale. Par exemple, le probénécide inhibe les OATP responsables de la sécrétion tubulaire de plusieurs médicaments, tels que la fexofenadine (Yasui-Furukori, Uno et al. 2005), ou les pénicillines. Aussi, la modulation d'activité des P-gp exprimées au niveau des tubules rénaux par le Valsopodar a été associée à une diminution de 75% la clairance rénale de la digoxine (Kovarik, Rigaudy et al. 1999)
- l'altération du pH urinaire ou plasmatique peut se traduire par une augmentation ou une diminution l'élimination rénale.
- l'altération de la réabsorption active tubulaire augmente l'élimination rénale.

3 La modélisation pharmacocinétique comme outil d'analyse et de prédiction

La pharmacocinétique (PK) est une discipline introduite par Dost en 1953 qui a pour objet l'étude qualitative et quantitative du devenir spatio-temporel du médicament dans l'organisme auquel il est administré. Elle permet de décrire les différentes étapes que subit le médicament depuis la libération de son principe actif jusqu'à sa disposition au site d'action ainsi qu'à son élimination sous forme inchangée ou de métabolites. La modélisation PK repose sur la description mathématique de l'évolution des concentrations plasmatiques et/ou tissulaires d'un xénobiotique qui résulte des processus de LADME. La modélisation PK joue un rôle important tout au long du processus de développement de médicament, depuis les études précliniques jusqu'aux études cliniques de phase III puisqu'elle permet non seulement d'explorer et de comprendre les mécanismes impliqués dans le devenir du médicament, d'extraire les données PK nécessaires pour l'adaptation posologique, mais aussi d'identifier les sources de variabilité au sein d'une population de patients (Balant and Gex-Fabry 2000).

Les approches de modélisation PK, présentées dans ce chapitre, sont l'analyse PK non-compartimentale (3.1), compartimentale classique (3.2), de population (3.3), et physiologique (3.4). Elles se distinguent par la présence et la signification des compartiments, ainsi que par les méthodes d'estimation des paramètres requis et prédits par le modèle. L'utilisation de la modélisation PK dans le processus de développement de médicament, dans la caractérisation de l'absorption intestinale, et des interactions médicamenteuse métaboliques seront aussi abordées dans ce chapitre.

3.1 Approche non-compartimentale

3.1.1 Description

Le passage d'un médicament à travers le corps peut être considéré comme un processus stochastique, sujet à des fluctuations aléatoires. L'analyse non-compartimentale (ANC) utilise les moments statistiques de cette variable aléatoire en considérant la courbe

concentration-temps comme une courbe de distribution statistique (Gibaldi and Perrier 1982). L'exposition d'un xénobiotique dans l'organisme est représentée par le premier moment statistique, communément appelé 'l'aire sous la courbe (ASC_{∞}) des concentrations plasmatiques' d'un xénobiotique. L' ASC_{∞} est la somme de l' ASC_{0-T} et de l' ASC extrapolée. L' ASC_{0-T} est déterminée par la méthode linéaire ou log-linéaire des trapèzes entre le temps $t = 0$ et le dernier temps d'échantillonnage, $t = T$. L' ASC extrapolée correspond à la dernière concentration plasmatique mesurée divisée par la constante de vitesse terminale d'élimination (k_e). Le deuxième moment est le temps de résidence moyen (*mean residence time, MRT*) du xénobiotique dans l'organisme. Le MRT est estimé à partir du ratio entre l' ASC_{∞} et l'aire sous la courbe du premier moment ($ASMC_{\infty}$) obtenu après une administration intraveineuse. Le MRT est une mesure statistique du temps moyen que passe une molécule dans l'organisme. Ce temps résulte directement des phénomènes simultanés de distribution, métabolisme et d'élimination.

À partir du calcul des moments statistiques, il est possible de déterminer les paramètres de clairance systémique (CL) et de volume de distribution à l'équilibre (V_{ss}) du xénobiotique, dans le cas d'une administration intraveineuse, tel que :

$$CL = \frac{D_0}{ASC_{\infty}} \quad (3.1)$$

$$V_{ss} = CL \times MRT \quad (3.2)$$

où D_0 représente la dose administrée.

Dans le cas d'une administration orale, on estime la clairance systémique apparente (CL/F) et le volume de distribution apparent ($V_{d_{area}}/F$), tels que :

$$CL / F = D_0 / ASC_{\infty} \quad (3.3)$$

$$V_{d_{area}} / F = D_0 / ASC_{\infty} \times 1/k_e \quad (3.4)$$

où F est la biodisponibilité du principe actif.

La demie-vie apparente d'élimination du médicament est estimé tel que : $t_{1/2} = \ln(2)/k_e$. La concentration maximale (C_{max}) et le temps correspondant à C_{max} (t_{max}) sont visuellement déduits du profil de concentrations plasmatiques observé (Figure 3. 1).

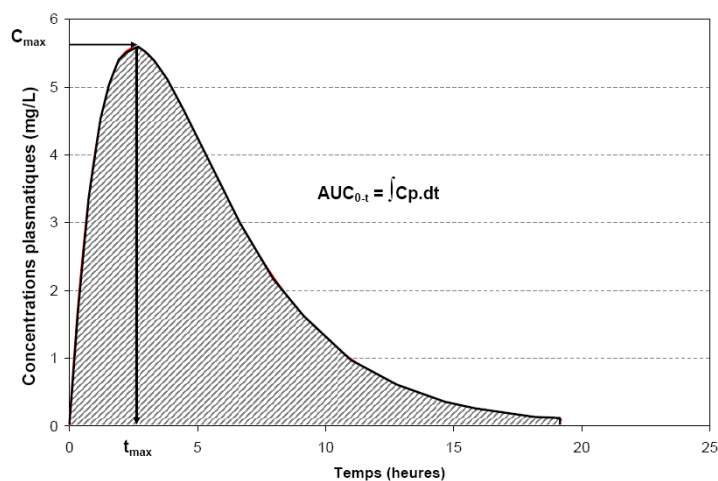


Figure 3. 1. Représentation schématique des paramètres pharmacocinétiques déterminés par la méthode d'analyse non-compartimentale

Essentiellement utilisée en pharmacocinétique préclinique et clinique de phase I qui impliquent des populations homogènes, l'approche non-compartimentale permet d'extraire rapidement et simplement les paramètres PK du xénobiotique étudié à partir du profil de concentration plasmatique. La fiabilité de détermination des paramètres PK repose sur l'estimation adéquate de l' ASC_{∞} et de k_e , qui à leur tour dépendent entièrement de la qualité et de la quantité des données plasmatiques disponibles dans la phase terminale d'élimination. Par conséquent, les coefficients de variation des paramètres PK sont de l'ordre de 20 à 60%. Il n'est pas possible de prédire l'évolution temporelle des concentrations plasmatiques, de caractériser la PK des principes actifs ayant une élimination non-linéaire, ou de faire des corrélations PK/PD directes au moyen de cette approche. Celle-ci n'est pas non plus applicable aux administrations multiples.

3.2 Modèle compartimental classique

3.2.1 *Description*

Les modèles compartimentaux classiques sont utilisés en pharmacocinétique préclinique et clinique pour décrire et reproduire l'évolution temporelle des concentrations plasmatiques (Gibaldi and Perrier 1982). Ces modèles reposent sur le principe que les xénobiotiques se distribuent dans un ou plusieurs compartiments, dont un compartiment

central et un ou plusieurs compartiments périphériques : le xénobiotique est transféré d'un compartiment à un autre selon des constantes de transfert, et est généralement éliminé au niveau du compartiment central (Figure 3.2). Quelques modèles ont aussi considéré une élimination périphérique, mais leur application est restreinte par l'accessibilité aux données expérimentales (Laurin, Nekka et al. 1999).

Ces compartiments interconnectés ont une signification physiologique et anatomique limitée. Leur volume apparent peut être largement supérieur au volume corporel. Le compartiment central représente en général le sang, les fluides extracellulaires et les tissus et les organes hautement perfusés comme le foie, les reins et les poumons. Ce compartiment est considéré comme étant homogène puisque les tissus hautement perfusés s'équilibrent instantanément avec la circulation systémique. Les compartiments périphériques quant à eux, représentent les tissus plus faiblement perfusés, comme les tissus adipeux, les muscles et la peau. L'équilibre entre la concentration de médicament libre dans la circulation systémique et les tissus périphériques est donc atteint plus lentement. Les vitesses d'échange entre les compartiments peuvent être linéaires d'ordre 1 (diffusion passive), linéaires d'ordre 0 (diffusion active à vitesse constante) ou non-linéaire pour un processus saturable. Les modèles PK compartimentaux comportent en général un, deux, voire trois compartiments, mais rarement plus au risque de faire face à un problème d'identifiabilité du modèle (Gabrielsson and Weiner 2000) (Dartois, Brendel et al. 2007).

La Figure 3. 2 illustre la structure d'un modèle pharmacocinétique à deux compartiments dans le cas d'une administration intraveineuse, et dans le cas d'une administration orale, avec une élimination d'ordre 1 depuis le compartiment central.

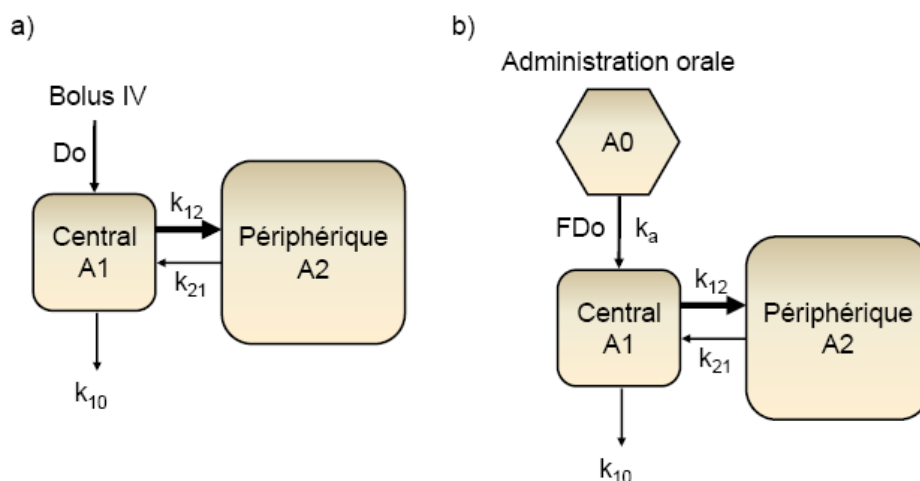


Figure 3. 2. Illustration d'un modèle PK bicompartimental dans le cas a) d'une administration IV et b) d'une administration orale

Les équations décrivant ces modèles reposent sur un bilan de matière autour de chaque compartiment. Les quantités de xénobiotique dans le compartiment central et périphérique sont définies, par les variables A_1 et A_2 , respectivement. A_0 correspond à la quantité de xénobiotique absorbable (à $t=0$, $A_0=D_0$). Ces quantités sont régies par le système d'équations différentielles ordinaires (ODE) suivant :

$$\frac{dA_0}{dt} = -\text{Input} \quad (3.5)$$

$$\frac{dA_1}{dt} = \text{Input} + k_{21}A_2 - k_{12}A_1 - k_{10}A_1 \quad (3.6)$$

$$\frac{dA_2}{dt} = k_{12}A_1 - k_{21}A_2 \quad (3.7)$$

où k_{12} et k_{21} sont les constantes de transfert, k_{10} est la constante de vitesse d'élimination depuis le compartiment central, et k_a la constante de vitesse d'absorption. Dans le cas d'un bolus IV, 'Input' prend une valeur nulle, alors que pour une administration orale, 'Input' prend la valeur de $F \times D_0 \times k_a$. Cette fonction peut aussi prendre une forme beaucoup plus générale reflétant la prise effective du médicament (Li and Nekka 2007). Selon la complexité du système d'équation différentielle, ce dernier peut se résoudre analytiquement par la méthode d'intégration de Laplace, ou numériquement en utilisant un solveur d'ODE. Par exemple, l'expression de l'évolution temporelle de la

concentration plasmatique C_p d'un xénobiotique administré par voie intraveineuse (bolus) ayant la PK bi-compartimentale exposée précédemment est décrite par la somme de termes exponentiels suivante :

$$C_p = (ae^{-\alpha t} + be^{-\beta t}) + \varepsilon_j \quad (3.8)$$

où le premier terme représente le processus de distribution du xénobiotique dans le compartiment périphérique, et le second exprime la phase d'élimination depuis le compartiment central. Les paramètres a et b correspondent aux concentrations plasmatiques dans le compartiment central au début des phases de distribution et d'élimination, respectivement. Les paramètres α et β définissent les pentes de chacune des phases. Les paramètres a , b , α et β sont exprimés en fonction des constantes de transfert k_{12} , k_{21} , et de la constante d'élimination k_{10} (Gibaldi and Perrier 1982).

3.2.2 Estimation des paramètres

De manière générale, le modèle PK permettant d'estimer les paramètres PK d'un individu 'i' peut être écrit tel que :

$$y_{ij} = f(\Phi_i, x_{ij}) + \varepsilon_{ij} \quad (3.9)$$

où y_{ij} est le vecteur de valeurs prédites des y_i (concentrations plasmatiques C_p) à chaque temps j à l'aide de 'f' qui est une fonction non linéaire reliant les paramètres Φ_i (ie CL, Vd, etc.), le vecteur de constantes connues x_{ij} (ie Do, temps d'échantillonnage, poids corporel) et les prédictions y_{ij} . L'erreur résiduelle à chaque temps j , c'est à dire l'écart entre les prédictions et les observations est représentée par ε_{ij} ($\sim N(0, \sigma^2)$). Cette erreur est associée aux erreurs de mesure et aux erreurs du modèle (Figure 3. 3). Le modèle d'erreur homoscédastique (Eq. 3.9) est applicable si on présume que l'erreur associée à chaque mesure de concentration est identique pour chaque valeur de y_j (terme d'erreur additif).

Le modèle d'erreur peut aussi être hétéroscédastique, c'est-à-dire que l'erreur résiduelle est proportionnelle à la valeur du paramètre. Le modèle PK individuel s'écrit alors :

$$y_j = f_j(\Phi_j, x_j) \times (1 + \varepsilon_j) \quad (3.10)$$

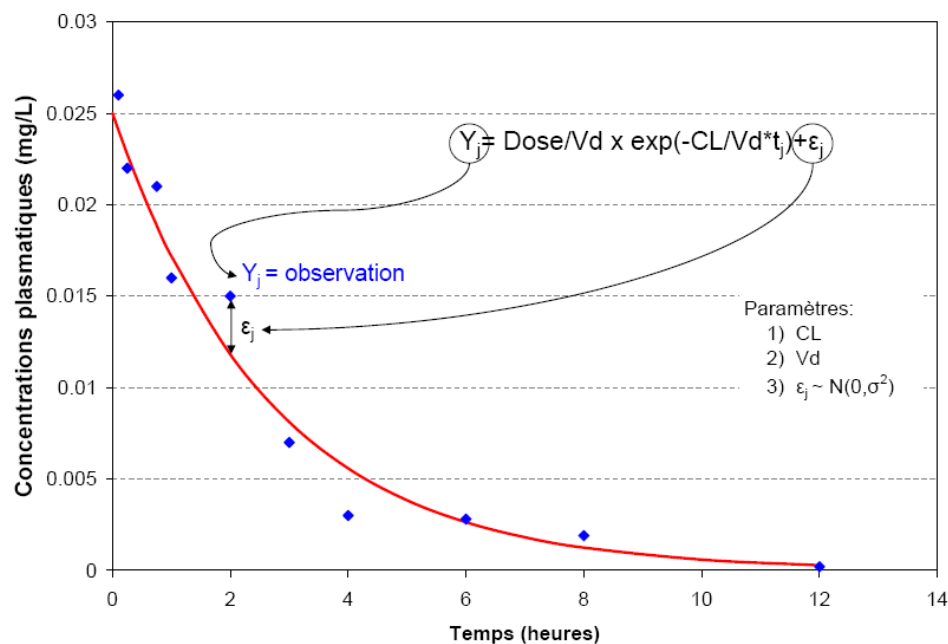


Figure 3. 3. Modèle mono-compartmental adapté à un bolus intraveineux

L'estimation des paramètres PK repose sur une approche individuelle de l'analyse des données plasmatiques/urinaires. Les profils de concentrations plasmatiques obtenus pour chaque sujet sont étudiés un à un, indépendamment des autres sujets. Les paramètres sont obtenus selon le meilleur ajustement du modèle aux données plasmatiques et/ou urinaires à partir de méthodes de minimisation des erreurs telles que le critère de vraisemblance maximum (*Maximum Likelihood*), des moindres carrés ordinaires (*Ordinary Least Squares, OLS*), des moindres carrés pondérés (*Weighted Least Squares, WLS*), ou des moindres carrés généralisés (*Generalized Least Squares, GLS*) (Gabrielsson and Weiner 2000).

Lors de l'analyse compartimentale, plusieurs modèles sont testés (deux versus trois compartiments, présence ou absence de poids, avec délai ou sans délai) et le choix du meilleur modèle repose sur des considérations visuelles et statistiques telles que (Gabrielsson and Weiner 2000):

- l'analyse des résidus qui est importante pour valider la structure du modèle et le choix des poids
- l'analyse des coefficients de variation qui évalue la précision du modèle
- la matrice de corrélation entre les paramètres
- le 'Condition Number' qui est une mesure de la stabilité du modèle
- le test F pour les modèles emboîtés avec le même schéma de pondération
- le critère d'Akaike et le critère de Schwartz qui permettent de comparer deux modèles ayant le même schéma de pondération.

3.2.3 Avantages et Limitations

L'accessibilité aux logiciels dédiés, tels que Winnonlin® et Kinetica® a facilité l'utilisation et l'application des modèles PK classiques dans la communauté pharmaceutique. Ces modèles sont utilisés comme première étape de la caractérisation des propriétés PK d'un nouveau médicament lors des études précliniques et cliniques de phase I, pour lesquelles les sujets sont des animaux identiques, des volontaires sains ou groupe de volontaires sélectionnés selon des critères restrictifs et précis. L'approche compartimentale permet la détermination de plusieurs paramètres PK, quelque soit la voie d'administration, et le schéma posologique (dose unique, dose multiple...). Une fois validé, le modèle PK classique permet de prédire, sur une base individuelle, l'impact d'un changement de dose sur certains paramètres PK (C_{max} , C_{eq} , C_o) à condition que cette dose soit comprise à l'intérieur d'un intervalle de dose déjà caractérisé. Cette approche permet aussi d'adapter les posologies pour une PK linéaire, et de faire le design d'études précliniques ou cliniques (puisque l'analyse de sensibilité du modèle basé sur le calcul des dérivées partielles permet de déterminer le moment optimal de l'échantillonnage des données).

Comme le choix du meilleur modèle pharmacocinétique se fait *a posteriori* et repose sur des critères statistiques et de meilleur ajustement, la structure et la robustesse du modèle final dépendent principalement de la qualité des données expérimentales (*data-based model*). L'approche PK classique est restreinte dans ses possibilités d'extrapolations intra et inter-espèces, de l'adulte à l'enfant, ou ses extrapolations à d'autres

xénobiotiques administrés, etc. Il est aussi difficile de caractériser et prédire la toxicocinétique des xénobiotiques chez l'humain, et d'estimer la concentration du xénobiotique et/ou de ses métabolites au site d'action.

3.3 Modèles pharmacocinétiques de population

3.3.1 *Description*

La principale différence entre les modèles pharmacocinétiques classiques et de population réside dans la méthode d'estimation des paramètres PK. Alors que l'analyse PK classique adopte une approche individuelle indépendante des autres sujets et requiert un échantillonnage plasmatique et/ou urinaire relativement intense et quasi-identique pour chaque sujet, l'approche de population cherche à extraire les paramètres pharmacocinétiques des données éparées collectées de manière aléatoire chez de nombreux patients représentatifs de la population cible. Comme il est possible de réaliser l'analyse PK à partir de peu de données collectées dans un grand bassin de population, cette approche est donc utilisée majoritairement lors des phases IIb et III des études cliniques. Elle permet aussi d'effectuer des études dans les populations spéciales, comme les populations gériatriques et pédiatriques, pour lesquelles un échantillonnage intensif est éthiquement prohibé. Elle répond aussi au besoin d'adaptation posologique individualisée requis pour le soin direct aux patients (*direct patients care*).

La principale particularité de l'approche de population réside dans le fait qu'elle quantifie différents niveaux de variabilité pharmacocinétique tout en cherchant à expliquer ces sources de variabilités. Ces dernières peuvent être de nature interindividuelle (η_i), résiduelle (ϵ_i), et parfois inter-occasionnelle (κ_{ik}).

La variabilité interindividuelle quantifie l'écart entre un paramètre typique d'une population et celui d'un individu avec $\eta_i \sim N(0, \omega^2)$, ω^2 quantifiant la variabilité interindividuelle. La nature de cette variabilité peut être liée à des facteurs démographiques (âge, sexe, race, etc.), environnementaux (cigarette, diète, exposition aux substances chimiques, etc.), génétiques (polymorphisme génétique du CYP2D6, 2C9, 2C19, etc.), physiologiques (poids corporel), physiopathologiques, ou autres (cycle circadien,

posture, activité, etc.). Tous ces facteurs de variabilité interindividuelle peuvent définir les covariables θ du modèle de population.

La variabilité résiduelle ε_i , fait référence à la variabilité non expliquée d'un paramètre associée par exemple aux erreurs de mesure, erreurs du modèle, etc. Elle quantifie l'écart entre la valeur prédite par le modèle et la valeur observée pour un individu. L'ampleur de cette variabilité doit être convenablement caractérisée puisqu'en découle la sécurité d'utilisation du médicament administré à une population cible ($\varepsilon_i \sim N(0, \sigma^2)$).

Il est aussi possible de considérer une variabilité inter-occasion κ_i (ou variabilité intra-individuelle) qui quantifie l'écart des valeurs des paramètres PK d'un individu 'i' entre chaque prise unique 'k', chaque cycle d'administration, ou période d'étude dans une étude croisée ($\kappa_{ik} \sim N(0, \omega_{iov}^2)$) (Karlsson, Beal et al. 1995).

De manière générale, l'équation d'un modèle de population à effets mixtes s'écrira de la manière suivante:

$$y_i = f((\theta \pm \eta_i), x_i) + \varepsilon_i \quad (3.11)$$

où y_i est la concentration prédite chez le sujet i, f est le modèle compartimental, θ la moyenne typique de population du paramètre pharmacocinétique, η_i la variabilité inter-individuelle associée à θ , x_i les données d'entrée (dose, temps de prélèvement..), et ε_i la variabilité résiduelle. Souvent, la variabilité résiduelle inclut la variabilité inter-occasion.

L'analyse de population requiert une excellente compréhension des modèles individuels et de population pour choisir l'analyse de population appropriée aux données collectées. Ainsi, le choix de la meilleure méthode d'analyse de population dépend à la fois de l'objectif de l'étude PK et du type de données collectées. Parmi ces méthodes, on retrouve l'approche de la moyenne naïve des données (*Naive average data approach, NAD*), l'approche de regroupement des données (*Naive pooling data, NPD*), l'approche en deux étapes (*Two-stage approach*), et l'approche optimale à une étape (*One stage approach*) ou appelée aussi approche de modèle non-linéaire à effets mixtes (*Non-linear mixed effect model*).

L'approche de la moyenne naïve des données consiste à calculer un profil moyen des concentrations au cours du temps pour créer un 'individu moyen'. Cette méthode très simple peut être utilisée lorsque les données PK sont obtenues dans un environnement contrôlé (même temps d'échantillonnage, même dose, etc..) sur des individus 'homogènes' (études précliniques surtout). Cependant, recourir à la moyenne des concentrations plasmatiques produit généralement une 'image' erronée du profil de concentration plasmatique et tend à cacher les sources de variabilité interindividuelle. Le NAD donne un estimé biaisé des paramètres PK et est associé à une perte d'information considérable.

L'approche du regroupement des données regroupe toutes les données de chaque individu pour obtenir un seul individu. Une analyse PK classique est ensuite effectuée sur l'ensemble des données. Cette approche néglige la corrélation entre les observations d'un même sujet, et ne distingue pas la variabilité inter et intra individuelle.

L'approche en deux étapes peut être standard, globale, itérative ou bayésienne. Les paramètres PK sont tout d'abord estimés séparément pour chaque individu (étape 1), à partir desquels sont déduits les paramètres PK de la population (étape 2). Ces méthodes requièrent des données riches, et nécessitent de faire autant d'analyses PK qu'il y a de sujets dans l'étude. Comme l'erreur sur l'estimation des paramètres individuels n'est pas quantifiée, la variabilité interindividuelle des paramètres PK est souvent surestimée.

Les modèles non-linéaires à effets mixtes (Non-Linear Mixed Effects Model, NONMEM), proposés par Sheiner et Beal en 1972 consistent à analyser toutes les données (riches ou éparées) collectées chez tous les individus de l'étude en une seule étape. Le modèle structural est identique pour chaque individu. Les paramètres PK sont considérés comme des variables aléatoires dont on estime la distribution. Cette approche de population repose sur des modèles compartimentaux non-linéaires dits à 'effets mixtes' car ils sont composés d'effets fixes θ et d'effets aléatoires. En effet, les profils PK d'un médicament dans une population donnée sont modélisés à partir de paramètres définis par une valeur typique d'un individu (effet fixe), et des variabilités interindividuelle, inter-occasionnelle ou résiduelle (effets aléatoires) associées à ces

effets fixes. En identifiant des covariables continues (ex : clairance de la créatinine, CLCr) ou catégorielles (ex : sexe, race) qui peuvent expliquer les variabilités interindividuelles des paramètres PK, il devient possible d'individualiser les posologies. Par exemple, la clairance d'un médicament pour un individu 'i' peut être définie comme suit : $CL_i = \theta_1 + \theta_2 \times CL_{Cri} + \eta_i$ avec θ_1 et θ_2 des covariables du modèle.

Le but de l'étude PK est d'estimer les valeurs de θ , Ω (matrice de covariance des ω^2) et Σ (matrice de covariance des σ^2) afin que les concentrations prédites aient le maximum de vraisemblance avec les concentrations observées. Il existe plusieurs méthodes d'estimation des paramètres de modèles non-linéaires à effets mixtes qui diffèrent principalement dans la forme et l'ordre d'approximation de la vraisemblance qui sont la méthode de premier ordre 'FO' (*First-Order*), la méthode de premier ordre avec des estimés conditionnels FOCE (*First-Order Conditional Estimate*), et la méthode d'estimation de LAPLACE.

De nombreux logiciels d'analyse et de simulation de pharmacocinétique de population ont été développés ces trente dernières années. Cette thèse ayant nécessité essentiellement le logiciel de programmation Matlab®, ces outils de modélisation ont été très peu utilisés et seront juste cités. Le premier logiciel, NONMEM® a été développé par les pionniers de la modélisation PK de population, Lewis Sheiner et Stuart Beal. Officiellement approuvé par les agences réglementaires, NONMEM® est devenu l'outil de modélisation le plus utilisé actuellement dans la communauté scientifique. Il existe aussi d'autres logiciels, tels que WinNonMix® (Pharsight), MONOLIX® (Lavielle et Mesa), et NLME (Pinheiro).

3.3.2 Avantages et Limitations

L'approche de population est de plus en plus utilisée dans le processus de développement du médicament, allant de la phase I à IV, car elle permet d'extraire les paramètres PK d'un médicament administré à une population spéciale, et ce, à partir de données riches, éparses, ou très éparses. Ces modèles sont particulièrement pertinents pour proposer des ajustements de posologie en fonction des covariables identifiées, et pour simuler des essais cliniques. Cette approche requiert un contrôle de qualité 'serré'

des données où toutes les informations de l'étude clinique doivent être correctement documentées (doses, temps d'administration, temps de prélèvements, covariables). De plus, l'analyse devient d'autant plus fastidieuse que la variabilité des données est large. L'analyse de données est une étape très complexe et chronophage qui requiert une expertise particulièrement rare sur le marché.

3.4 Modèles pharmacocinétiques à base physiologique

3.4.1 *Bref historique et origines*

Les modèles pharmacocinétiques à base physiologique (*Physiologically Based Pharmacokinetic, PBPK*) sont des modèles mathématiques déterministes et mécanistiques proposés pour la première fois par Teorell (Teorell 1937). Ils ont été développés plus intensivement en toxicologie et en analyse des risques dans les années 90, notamment par les équipes de Boggen (Bogen 1988; Bogen and McKone 1988; Tomlin, Brown et al. 1993), Matthew (Matthew, Brennan et al. 1993), O'Flaherty, Travis, Andersen (Ramsey and Andersen 1984; Fisher, Whittaker et al. 1990; Andersen 1995; Lilly, Andersen et al. 1998), Clewell (Fisher, Whittaker et al. 1990; Clewell 1995) Tardif et Krishnan (Krishnan, Clewell et al. 1994; Haddad and Krishnan 1998; Haddad, Tardif et al. 1999; Haddad, Tardif et al. 1999).

Bien que la première application dans le domaine pharmaceutique date du début des années 70 (Bischoff, Dedrick et al. 1970), ce n'est qu'au début des années 2000 que les modèles physiologiques ont été plus intensivement appliqués à ce domaine. Ceci s'explique non seulement par la mise en marché de logiciels dédiés tels que PKSim® (Bayer), SIMCYP®, et GastroPlus™, mais aussi grâce aux travaux de Patrick Poulin (Poulin and Theil 2000; Poulin, Schoenlein et al. 2001; Poulin and Theil 2002; Poulin and Theil 2002) qui ont permis pour la première fois l'estimation *a priori* de la distribution tissulaire des xénobiotiques en fonction de leurs propriétés physico-chimiques et de la composition tissulaire des mammifères. Très récemment, l'utilisation des modèles PBPK s'est élargie puisqu'elle fut aussi proposée comme un outil de design d'étude pharmacocinétique de population (Chenel, Bouzom et al. 2008). La Figure 3. 4 illustre la constante évolution du nombre de publications sur les modèles PBPK dans le

domaine pharmaceutique. La moyenne de publication pour chaque décennie est aussi indiquée, passant de 6 à 36 publications/an entre les années 1980 et 2000.

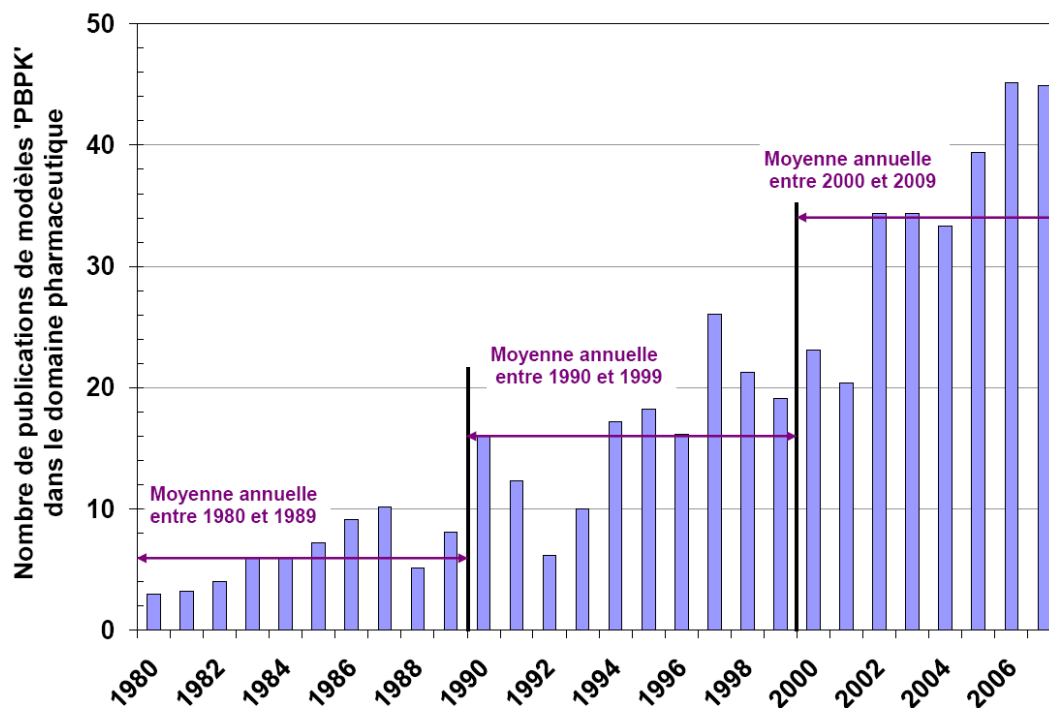


Figure 3. 4. Évolution du nombre de publications sur les modèles PBPK dans le domaine pharmaceutique (adaptée de Edginton et al., 2008).

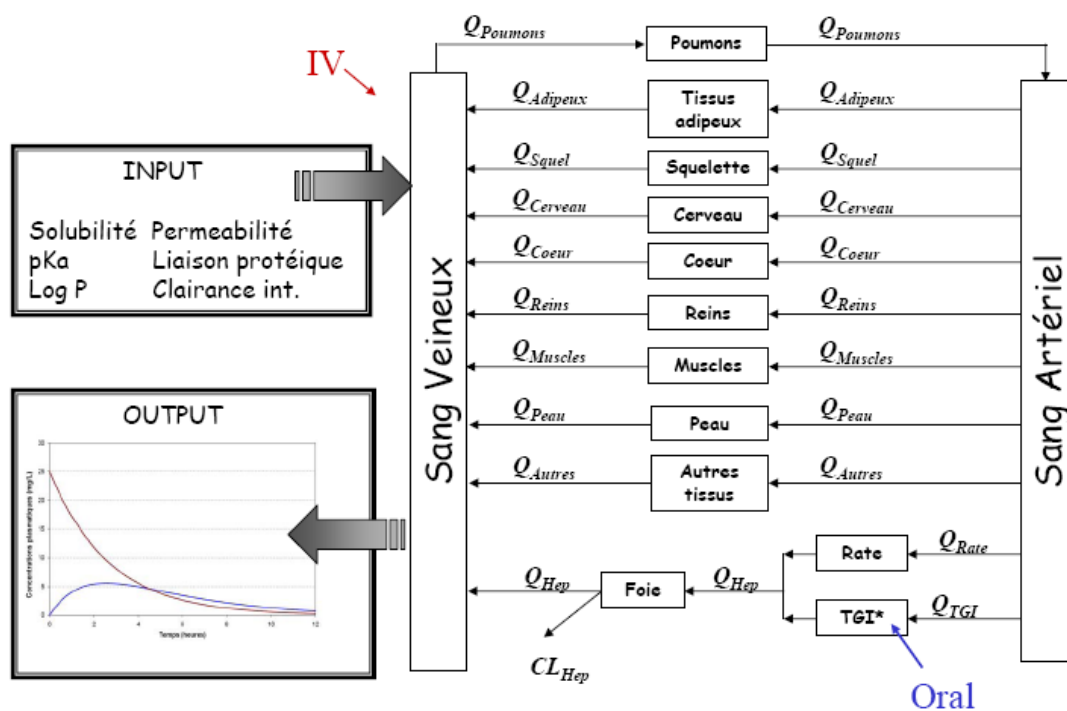
3.4.2 Représentation conceptuelle

L'objectif de la modélisation pharmacocinétique à base physiologique est d'évaluer la relation entre la dose potentielle d'exposition à un xénobiotique et la concentration plasmatique et/ou tissulaire de cette substance, en se basant sur une réalité biologique et physiologique, et en tenant compte des processus dynamiques de l'ADME. Pour ce faire, l'organisme (corps humain ou animal) est modélisé par un ensemble de compartiments qui représentent un tissu, un organe, ou un ensemble de tissus dynamiquement identiques (*lumping*) (Nestorov, Aarons et al. 1998). Les différents compartiments sont interconnectés par le réseau sanguin, et le débit sanguin aux organes/tissus (Q) (Figure 3. 5). La structure des modèles PBPK est donc prédéterminée et indépendante de la substance chimique étudiée puisqu'elle est basée sur l'anatomie et

la physiologie de l'organisme et non sur l'étude *a posteriori* des données expérimentales (Nestorov 2003).

L'élaboration de ces modèles requiert une grande connaissance de l'anatomie et de la physiologie de l'animal étudié (poids et volume des organes, débit sanguins, etc.), ainsi que des caractéristiques physicochimiques du xénobiotique (coefficient de partage, fraction liée aux protéines plasmatiques et tissulaires, etc.) (Krishnan and Andersen 2001).

Le développement du modèle se déroule en trois étapes majeures, c'est-à-dire, (i) la détermination de la structure globale du modèle PBPK et des modèles tissulaires, (ii) la détermination des équations du modèle et (iii) l'estimation des paramètres. Ensuite, viennent les étapes de simulation, d'analyse et de raffinement du modèle.



*TGI: Tractus Gastro-Intestinal

Figure 3. 5. Représentation schématique d'un modèle PBPK à 14 compartiments. Q représente le débit sanguin aux tissus/organes, CL_{Hep} est la clairance hépatique

3.4.3 Structure du modèle

Cette première étape permet de déterminer quels tissus, fluides et organes doivent être inclus ou exclus dans la structure du modèle. Ce choix repose sur l'importance de leur rôle dans la pharmacocinétique et la pharmacodynamie de la substance étudiée. De manière générale, certains organes et tissus sont toujours inclus dans les modèles PBPK, comme les organes d'élimination et de métabolisme (foie, reins), le sang veineux et artériel, et les tissus adipeux dans le cas d'un composé liposoluble. Par ailleurs, il peut s'avérer pertinent d'ajouter d'autres tissus dans le modèle, selon :

- les voies d'administration ou de pénétration du xénobiotique (tractus gastro-intestinal, peau, poumons...)
- le ou les sites d'action du xénobiotique
- la contribution significative de ces tissus dans le bilan de matière (tissus adipeux, tissus hautement perfusés)
- la disponibilité des données tissulaires

Afin de simplifier la structure du modèle en réduisant le nombre de compartiments, certains tissus présentant des caractéristiques physiologiques semblables peuvent être regroupés (*'lumping'*) dans un même compartiment, si bien entendu, ces tissus ne sont pas des sites d'administration, des sites d'action du xénobiotique, ou un site d'élimination important. Par exemple, les tissus richement perfusés et les tissus faiblement perfusés peuvent être rassemblés en deux compartiments distincts (Figure 3.6). Cette simplification doit conserver le comportement cinétique du xénobiotique et préserver la 'nature physiologique' du modèle. Le regroupement d'organes est une procédure itérative effectuée différemment selon le type de connexion des tissus/organes dans le modèle PBPK entier (*full model*):

- (i) les tissus/organes placés en parallèle dans la structure du modèle complexe sont regroupés selon leurs propriétés cinétiques similaires (même temps de résidence moyen, même ordre de grandeur de vitesse de perfusion)
- (ii) un tissu connecté en série (par exemple : les poumons) est relié à un compartiment placé en aval ou en amont (ex : sang veineux ou au sang artériel) si et seulement si l'équilibre est rapide entre les tissus.

Cette transformation structurale est effectuée au moyen de fonctions de transfert exprimées en ratio de transformées de Laplace des concentrations de sortie (output) et d'entrée (input). La fonction de transfert de compartiments placés en parallèle est la somme des fonctions de transfert individuelles, alors, que la fonction de transfert des compartiments placés en série est le produit des fonctions de transfert individuelles (Nestorov, Aarons et al. 1998). Les figures suivantes sont des exemples de structure de modèles PBPK adaptée aux besoins de l'étude (Haddad, Béliveau et al. 2001; Poulin and Theil 2002).

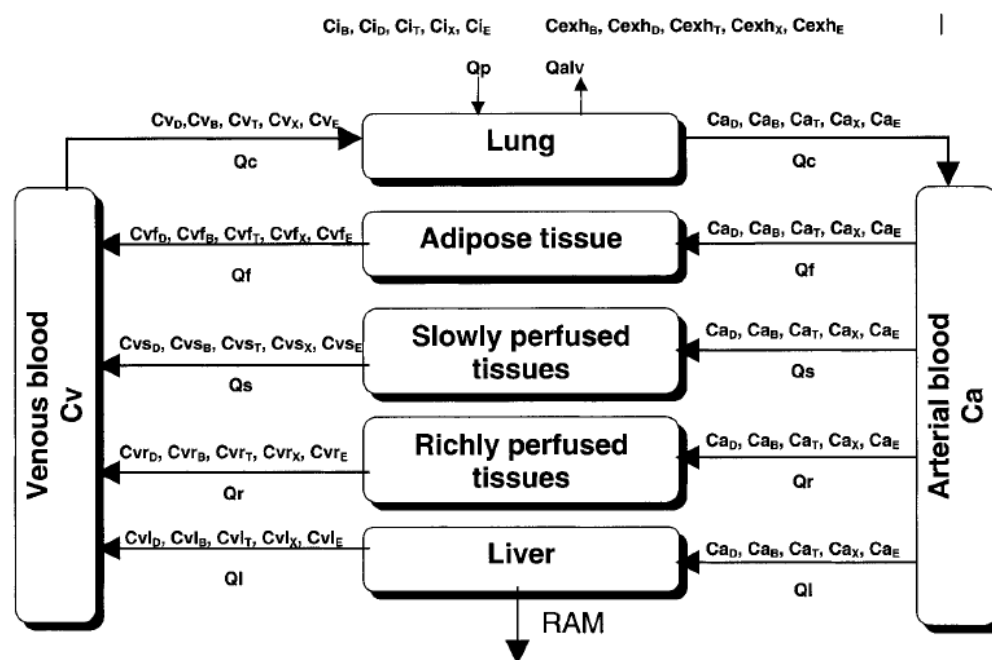


Figure 3. 6. Structure du modèle PBPK développé par Haddad (figure extraite de Haddad, Béliveau et al. 2001) dans le cas d'inhalation d'un mélange de composés organiques volatils chez l'humain.

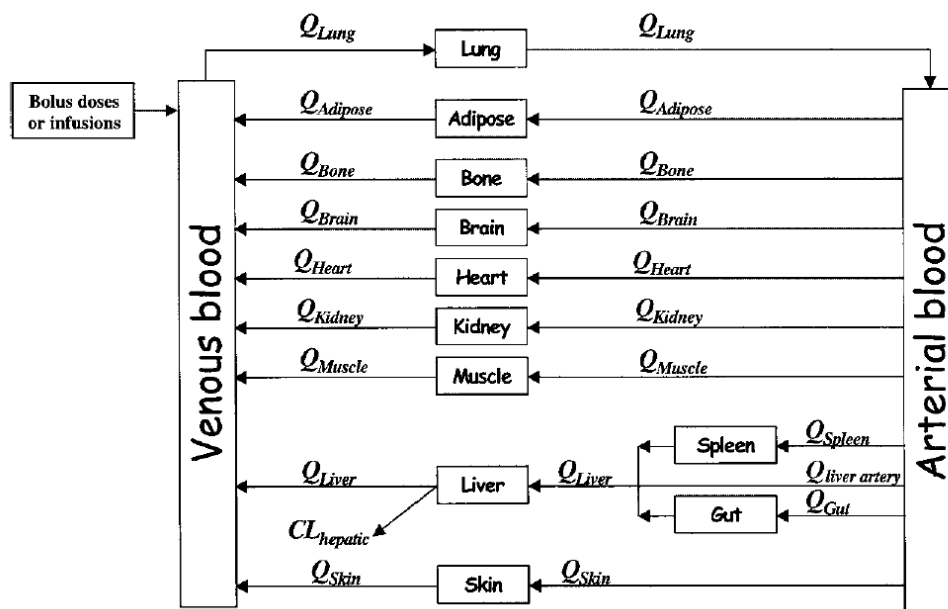


Figure 3. 7. Structure du modèle PBPK développé par Poulin (figure extraite de Poulin and Theil 2002) dans le cas d'administration intraveineuse de diazepam, propranolol ou d'ethoxybenzamide chez le rat.

3.4.4 Modèles tissulaires

Afin de caractériser la variation temporelle de la quantité de composés exogènes dans les compartiments, un bilan de masse est effectué autour de chaque compartiment du modèle. Ce bilan de masse est généralement décrit selon un processus de distribution dont l'élément limitant est soit la perfusion sanguine au tissu, soit la vitesse de diffusion du composé à travers la membrane vasculaire, extravasculaire ou cellulaire. Des modèles de dispersion et de tubes parallèles ont aussi été proposés pour reproduire la distribution hépatique des xénobiotiques, mais leur complexité en a réduit l'application dans la modélisation PBPK. Dans la présente section, nous exposerons donc seulement les modèles à perfusion limitante et à perméabilité limitante.

3.4.4.1 Modèle à perfusion limitante

La manière la plus simple de représenter la distribution tissulaire d'un xénobiotique est de considérer que ce dernier se distribue instantanément et de manière homogène dans le tissu (ie, nombre de dispersion D_N tend vers l'infini). Aucun gradient de concentration n'est considéré dans le tissu. Ainsi, la concentration libre de médicament dans le sang

veineux est en équilibre avec la concentration libre à l'intérieur du tissu. L'élément limitant de la distribution tissulaire est donc le débit sanguin au tissu (Q_T). Le bilan de masse repose alors sur un modèle à perfusion limitante (*Well stirred model*), tel que présenté à la Figure 3. 8 et par l'équation 3.12.

L'équation différentielle décrivant la distribution tissulaire dans le cas d'un modèle à perfusion limitante pour un tissu non-excréteur ($E_h = 0$) ou un tissu excréteur ($0 < E_h < 1$) est :

$$\frac{dC_T}{dt} = \frac{Q_T}{V_T} \left((1 - E_h) \times C_{art} - \frac{C_T}{P_{tp}/BP} \right) \quad (3.12)$$

où BP est le ratio sang-plasma, V_T est le volume tissulaire, C_{art} est la concentration artérielle de xénobiotique, et C_T est la concentration tissulaire.

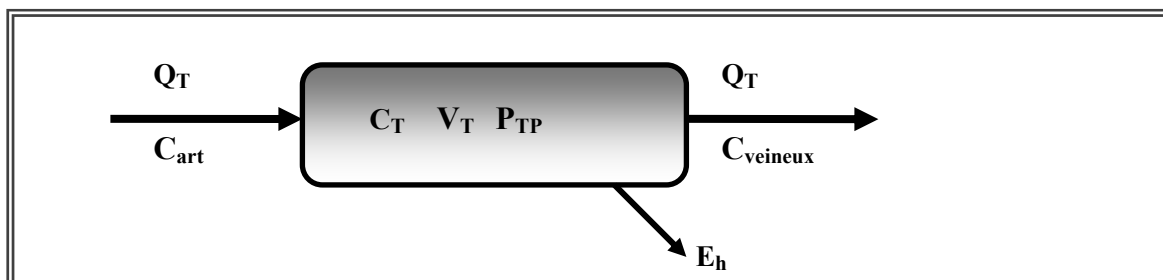


Figure 3. 8. Représentation schématique du modèle tissulaire à perfusion limitante pour un tissu excréteur.

Bien que cette représentation soit la moins physiologique parmi celles présentées dans cette section, elle demeure l'approche la plus souvent utilisée en raison de sa simplicité mathématique et des prédictions satisfaisantes. Le résultat de cette simulation est une première approximation de la distribution tissulaire, qui par la suite, peut être raffinée avec d'autres types de modèles tissulaires si la différence entre les profils prédits et observés s'avère significative (Albanese, Banks et al. 2001).

3.4.4.2 Modèle à perméabilité limitante

Le modèle tissulaire à perméabilité limitante considère que la distribution du composé exogène dans le tissu est limitée par sa vitesse de diffusion (Diff) au niveau de la membrane des capillaires, de la membrane cellulaire ou des deux membranes. Le

compartiment tissulaire peut être divisé en deux sous-compartiments qui représentent les tissus vasculaires et extravasculaires (Figure 3. 9 A). Il peut aussi être divisé en trois compartiments représentant le tissu cellulaire, extracellulaire et extravasculaire (Figure 3. 9 B).

Le modèle à perméabilité limitante a été appliqué à la distribution d'acide 2,4-dichlorophenoxyacétique dans le cerveau de rats (Kim, Sandberg et al. 2001), de digoxin dans le cerveau des souris normales ou déficiente du gène *mdr1a/b* (Kawahara, Sakata et al. 1999) ou encore la distribution d'acide p-phenylbenzoïque chez la rate gestante et son fœtus (Kawahara, Nanbo et al. 1998). Kawai et coll (Kawai, Mathew et al. 1998) ont aussi utilisé ce modèle pour caractériser la distribution tissulaire de cyclosporine A dans les tissus des rats, et pour tester l'hypothèse de non-linéarité de la liaison aux protéines tissulaires.

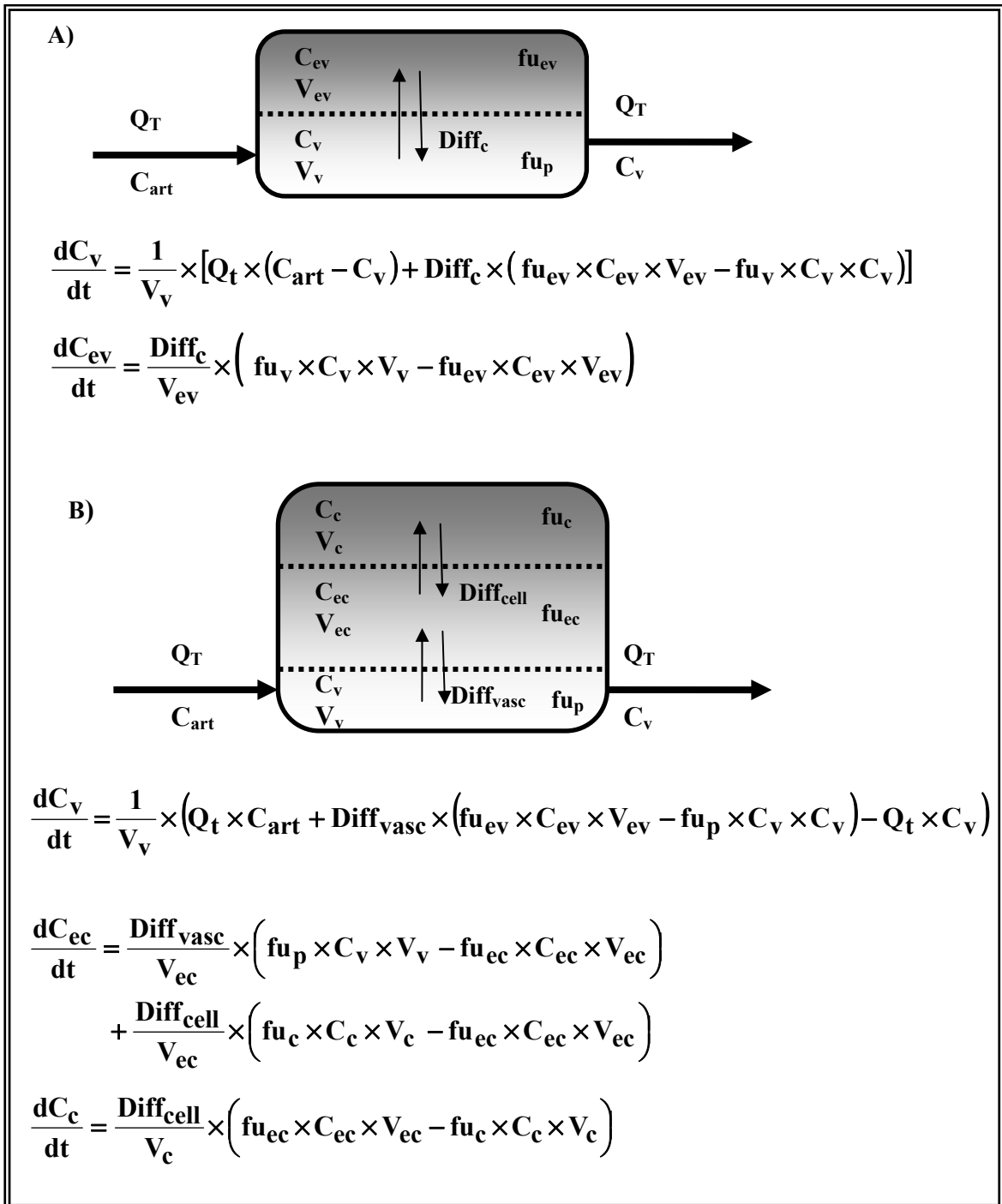


Figure 3. 9. Représentation schématique d'un modèle à perméabilité limitante entre A) l'espace vasculaire et l'espace extravasculaire, B) l'espace vasculaire, extracellulaire, et cellulaire. C_v est la concentration vasculaire, C_{ev} la concentration extravasculaire,

3.4.5 Estimation des paramètres physiologiques, physicochimiques et biochimiques

3.4.5.1 Paramètres physiologiques

Les paramètres physiologiques requis par les modèles PBPK font référence au poids corporel, au débit cardiaque, aux débits sanguins vers les tissus/organes, aux volumes tissulaires, et à la composition tissulaire en eau, lipides, et phospholipides. Si le médicament est administré par voie orale, les paramètres reliés au temps de vidange gastrique et de transit intestinal seront aussi requis. Ces valeurs typiques de paramètres sont généralement disponibles dans la littérature pour plusieurs mammifères allant de la souris à l'humain (Brown, Delp et al. 1997), et aussi pour des populations pédiatriques et gériatriques (Clewell, Teegarden et al. 2002; Price, Haddad et al. 2003; Thompson, Johns et al. 2009). Lorsque ces informations ne sont pas disponibles dans la littérature scientifique, il est possible de les estimer à partir de méthodes allométriques (Brown, Delp et al. 1997; Lindstedt and Schaeffer 2002) ou empiriques (Price, Haddad et al. 2003). Les méthodes allométriques permettent de calculer les paramètres physiologiques, physicochimiques et même pharmacocinétiques en exprimant généralement, de façon non-linéaire, le paramètre d'intérêt en fonction du poids corporel (BW), ou du débit cardiaque (Q_c) de l'animal étudié. Ainsi, on obtient par exemple, des équations de la forme :

$$\begin{cases} V_t = aBW^b \\ Q_t = \alpha Q_c^\beta \end{cases} \quad (3.13)$$

où a , b , α et β sont des paramètres déterminés de manière empirique.

Le dernier recours d'estimation des paramètres physiologiques reste la détermination en laboratoire. Dans certains cas, les valeurs de composition tissulaires non disponibles chez l'humain sont approximées avec celles du rat (Kawai, Mathew et al. 1998).

3.4.5.2 Paramètres physico-chimiques

Les paramètres physicochimiques du xénobiotique, utilisés directement ou indirectement dans les équations différentielles des modèles PBPK, sont les coefficients de partage octanol-eau et huile d'olive-eau (LogP , LogPow), le degré d'ionisation (pKa), la solubilité dans l'eau (Sol), la perméabilité apparente à travers les membranes de type

Caco-2 (P_{app}), la fraction libre dans le sang (f_{up}), et le coefficient de partage sang-plasma (BP). Ces paramètres sont généralement disponibles dans la littérature ainsi que dans les banques de données comme DrugBank (Wishart, Knox et al. 2006). Il existe aussi des logiciels basés sur le QSAR tels que Episuite, qui permettent d'estimer le LogP des composés.

3.4.5.3 Paramètres biochimiques

Les paramètres biochimiques sont reliés à la biotransformation enzymatique des xénobiotiques, comme les paramètres de Michaelis-Menten (V_{max} et K_m), le nombre de cytochromes hépatiques et intestinaux, ainsi que les constantes d'inhibition métaboliques K_i dans le cas d'interactions médicamenteuses métaboliques. Ces paramètres sont essentiels à la caractérisation de la clairance intrinsèque et de la clairance hépatique ou intestinale du xénobiotique. Les paramètres michaeliens sont estimables à partir d'expériences *in vitro* réalisées au moyen de microsomes hépatiques/intestinaux ou d'hépatocytes. La quantification des cytochromes intestinaux humains a été réalisée par Paine et coll (Paine, Hart et al. 2006). Le nombre de cytochromes hépatiques a aussi été quantifié chez certains animaux utilisés pour les études précliniques (Craigmill and Cortright 2002).

3.4.6 Simulation, analyse et raffinement du modèle

Une fois que la structure du modèle est établie, les équations écrites, et les paramètres déterminés, l'étape suivante est la programmation du modèle mathématique dans un langage propre aux logiciels de programmation (Matlab®, C++, etc.), de simulation (STELLA, ADSIM, etc.) ou dans un tableur (Excel®). Le modèle mathématique est résolu selon un algorithme approprié (Runge-Kutta, Euler, Gear). Il existe aussi des logiciels dédiés, tels que PKSIM®, SIMCYP®, ou GastroPlus™, pour lesquels il suffit de choisir la structure du modèle appropriée, et d'attribuer les valeurs typiques aux paramètres du modèle. Ces logiciels présentent l'avantage notable de ne pas requérir la phase de programmation du système d'ODE caractérisant le modèle puisqu'ils sont basés sur le principe de « boîte-noire ». Cependant, l'accès restreint aux fichiers de code

limite les adaptations de la programmation nécessaires pour modéliser de nouveaux processus mécanistiques, réduisant ainsi la flexibilité d'utilisation.

Krishnan et Haddad (Krishnan, Haddad et al. 1995) ont proposé d'appliquer un « index d'erreur normalisé » I afin d'évaluer l'erreur des modèles PBPK. Cet index quantifie l'écart entre les valeurs observées (Y_i) et les valeurs prédites (\hat{Y}_i), tel que :

$$I = \frac{\sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (\hat{Y}_i - Y_i)^2}}{\sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N Y_i^2}} \quad (3.14)$$

Lorsque I tend vers zéro, les prédictions du modèle s'approchent des valeurs observées. Par contre, I n'indique pas le sens des erreurs, c'est à dire, si le modèle surestime ou sous-estime les concentrations observées, ni ne donne d'indications quant aux sources d'erreurs. Par conséquent, il est conseillé de coupler le calcul de l'index avec une inspection visuelle afin de raffiner le modèle si un écart notable est observé entre les simulations et les observations. Dans le cas où la prédiction du modèle ne reproduit pas les observations pharmacocinétiques, une explication mécanistique devra être donnée et testée en modifiant les hypothèses du modèle. Dans ce cas, le raffinement peut porter sur (i) la valeur d'un paramètre, ou (ii) un processus qui avait été négligé ou qui était inconnu (Albanese, Banks et al. 2001). L'écart observé ne veut pas nécessairement dire que le modèle est faux, mais que les processus qui décrivent le devenir du xénobiotique dans le corps sont incomplets ou mal estimés.

3.4.7 *Avantages et Limitations*

Bien que les outils computationnels aient été grandement améliorés depuis l'époque de Teorell, le frein principal à l'utilisation des modèles PBPK reste la quantité d'informations requises (données, paramètres, connaissances) et la complexité de la structure des modèles. Par conséquent, l'approche physiologique est souvent perçue comme étant chronophage dans le domaine pharmaceutique. De plus, le manque d'accessibilité aux données humaines nécessaires à la validation des prédictions freine l'acceptation de l'approche physiologique dans le milieu pharmaceutique. Le manque de

procédures standards d'élaboration des modèles PBPK, ainsi que les disparités des méthodes expérimentales permettant de mesurer certains paramètres physiologiques, physicochimiques ou biochimiques, ont aussi été rapportés par plusieurs (Nestorov 2003; Lüpfer et Reichel 2005). Pour pallier ce manque, Loizou et collaborateurs (Loizou, Spendiff et al. 2008), ont récemment publié une première version des bonnes pratiques de modélisations (BPM) physiologiques appliquées à l'analyse des risques. Ces BPM portent sur le développement, la caractérisation, la documentation, et l'évaluation des modèles PBPK.

Malgré ces limitations, l'approche PBPK présente des avantages non négligeables par rapport aux autres approches présentées dans ce chapitre. En études précliniques, l'utilisation de modèles physiologiques permet d'avoir recours à moins d'animaux que les modèles PK classiques. De plus, les résultats des prédictions permettent de confirmer ou d'infirmer la validité des processus mécanistiques (et/ou des paramètres) de l'ADME pris en compte dans le modèle, permettant ainsi de le raffiner. Ainsi, ces modèles peuvent servir de support de connaissance pendant le processus de la recherche et développement. Ils contribuent à démontrer aux agences réglementaires l'étendue de la compréhension des processus qui régissent le devenir du xénobiotique dans une population cible. Cette compréhension est d'autant plus importante que le composé manifeste des caractéristiques PK inhabituelles (comme par exemple une PK fortement non-linéaire). Ces modèles permettent de déterminer la quantité de xénobiotiques et/ou de métabolites dans les tissus cibles. Bien que peu d'études aient été publiées à ce jour, les modèles PBPK peuvent aussi être utilisés à des fins d'adaptation posologique en fonction des changements physiologiques des populations cibles (personnes âgées, enfants, obèses) (Bjorkman 2005; Willmann, Hohn et al. 2007) et des changements pathologiques (cirrhose) (Edginton and Willmann 2008). Chaque tissu inclus dans le modèle peut être modélisé séparément de l'ensemble du corps humain et ensuite réinséré dans le modèle PBPK global. Une fois la structure du modèle établie, il est possible de faire des extrapolations entre les espèces, les tissus, les voies d'administration, et les médicaments ou substances chimiques (Nestorov 2003).

3.4.8 Utilisation des PBPK dans le processus de recherche et développement de médicaments

L'industrie pharmaceutique (ie Roche-Hoffman, Bayer et AstraZeneca) commence à donner une place non-négligeable à la modélisation PBPK en égard à ses capacités prédictives et à son caractère mécanistique. Actuellement, la modélisation PBPK est essentiellement utilisée à la fin des études précliniques pour aider à la sélection de dose administrée pour la première fois chez l'humain (*'first-in-man'*). Les modèles PBPK ont partiellement remplacé les approches allométriques critiquées pour leur manque de précision (Bonate and Howard 2000) lorsque utilisées pour les mises à l'échelle pharmacocinétiques inter-espèces. Lavé et coll. ont aussi récemment démontré le meilleur potentiel prédictif inter-espèce des modèles PBPK par rapport aux approches allométriques (Jones, Parrott et al. 2006).

Dans les études cliniques, les modèles PBPK sont utilisés pour extrapoler les résultats d'études de phase I à des groupes de patients (Phase II) (Bjorkman, Wada et al. 2001). Cependant, l'élément limitant de cette utilisation demeure la quantification des changements physiologiques associés à certaines maladies.

L'ajout de cet outil de compréhension, de prédiction et d'extrapolation dans le processus de développement du médicament a été aussi encouragé par les agences réglementaires européennes qui requièrent désormais un Plan d'Investigation Pédiatrique dans les soumissions de nouvelles entités pharmaceutiques, et ce avant la fin de la Phase I des essais cliniques.

3.5 Validation des modèles pharmacocinétiques

Quelque que soit la nature du modèle pharmacocinétique, il est important de procéder à l'étape de validation surtout si le modèle est utilisé à des fins prédictives (Dartois, Brendel et al. 2007). La première étape de la validation des modèles consiste en l'analyse visuelle des prédictions versus les observations (Goodness-of-Fit), l'estimation de l'incertitude des paramètres prédits via les intervalles de confiance et les erreurs standards, et l'exploration de l'effet des 'outliers' sur les prédictions.

Une validation interne des modèles peut être réalisée à partir d'un jeu de données ré-échantillonné dans le jeu de données initial qui a servi à la construction du modèle (Bootstrap). Pour une validation plus robuste du modèle, il est préférable d'effectuer une validation externe à partir d'un autre jeu de données, ou à partir d'un sous-ensemble des données initiales différent du jeu de données utilisées pour la construction du modèle.

Après l'étape de validation du modèle, vient l'étape d'analyse de sensibilité qui permet d'identifier les paramètres ayant le plus grand impact sur la qualité des prédictions du modèle. Les notions d'analyse de sensibilité seront abordées en détail au Chapitre 4 de cette introduction de thèse.

Dans les chapitres précédents ont été décrits les principes d'ADME, les interactions médicamenteuses et les modèles pharmacocinétiques. Les paragraphes suivants seront donc consacrés à l'utilisation de ces modèles dans la caractérisation de l'absorption orale des xénobiotiques, ainsi que dans la simulation et prédiction des interactions médicamenteuses.

3.6 Utilisation des modèles PK pour caractériser l'absorption orale des xénobiotiques

En pharmacocinétique, la phase d'absorption est caractérisée par la constante de vitesse 'ka' qui reflète la vitesse à laquelle le principe actif passe de la lumière intestinale à la circulation systémique, en passant par la veine porte hépatique. Bien que 'ka' soit généralement ajusté aux données plasmatiques à l'aide un processus d'ordre un (Staats, Fisher et al. 1991; Suttle, Pollack et al. 1992; Higaki, Yamashita et al. 2001), l'absorption intestinale peut aussi être représentée par un processus d'ordre zéro, de type Michaelis-Menten, ou un processus séquentiel d'ordre zéro et d'ordre un (Holford, Ambros et al. 1992). Certains modèles ont été utilisés à des fins de caractérisation de l'absorption de principes actifs qui présentaient des doubles pics dans leur profil plasmatique (Higaki, Yamashita et al. 2001; Yin, Tomlinson et al. 2003). Cependant, cet ajustement tend à ignorer la mécanistique physiologique du processus d'absorption, et à en restreindre la compréhension.

L'absorption orale des médicaments est un processus très complexe impliquant de nombreux facteurs physicochimiques, physiologiques, ainsi que des facteurs reliés à la formulation du médicament affectant à la fois la quantité absorbée et la vitesse d'absorption (Gibaldi.,1991). De nombreuses recherches ont été effectuées pour intégrer les connaissances physiologiques, biochimiques, et physiques à la modélisation de l'absorption intestinale. On distingue trois catégories d'approches de modélisation de l'absorption intestinale (Yu, Lipka et al. 1996).

3.6.1 Degré d'ionisation

La première approche repose sur le calcul du degré d'ionisation (*pH partitioning*) et du potentiel d'absorption (*Absorption Potential, AP*) développé par Dressman (Dressman, Amidon et al. 1985). Cette dernière ne se base pas uniquement sur le degré d'ionisation du principe actif, mais prend en compte aussi sa solubilité, son coefficient de partage, et la dose administrée. Ces méthodes sont indépendantes des variables spatio-temporelles. Elles sont utilisées comme première estimation de la quantité de principe actif absorbée (Macheras and Symillides 1989).

3.6.2 Bilans de masse macroscopiques ou microscopiques

Cette deuxième catégorie regroupe des modèles d'absorption intestinale (*Macroscopic Mass Balance Approach and Microscopic Mass Balance Approach*) développés à l'état d'équilibre. Ces modèles intègrent la composante spatiale dans l'estimation de la fraction absorbée. En effet, le tractus intestinal est représenté comme un cylindre de rayon R , de longueur L et de surface d'échange $2\pi RL$. Un bilan de masse est effectué pour caractériser l'absorption du principe actif à travers la membrane intestinale, en utilisant la perméabilité effective du principe actif, et la solubilité du principe actif, et ce, à différentes échelles. L'approche macroscopique est plus simple à réaliser et donne des résultats similaires à ceux des modèles microscopiques pour les composés fortement solubles. D'abord développée par Amidon et al (Amidon et al, 1988), l'approche macroscopique a ensuite été complétée pour prendre en compte l'effet de la solubilité du médicament (Sinko, Leesman et al. 1991), et de la dégradation intestinale enzymatique et chimique (Sinko, Leesman et al. 1993). Willmann et coll ont récemment proposé une

approche de modélisation continue de l'absorption intestinale des composés neutres, acides ou basiques (Willmann, Schmitt et al. 2003; Willmann, Schmitt et al. 2004). Ce modèle tient compte des effets du changement de pH, de diamètre, de surface d'échange effective dans la lumière intestinale ainsi que de l'effet de la solubilité et de la perméabilité des composés sur la fraction de médicament absorbée. Leur approche permet d'illustrer au moyen de diagrammes, la relation entre la fraction absorbée et la perméabilité ou la solubilité des composés. Cette approche basée principalement sur l'hypothèse de diffusion passive des composés à travers la membrane épithéliale intestinale doit être ajustée en conséquence si le xénobiotique s'avère être un substrat de transporteurs d'efflux ou d'influx intestinaux.

3.6.3 Modèles dynamiques

Les modèles dynamiques forment la troisième catégorie des approches de modélisation de l'absorption intestinale. Ils s'avèrent plus complets que les deux approches précédentes puisqu'ils prennent en compte les variables spatio-temporelles impliquées dans le processus d'absorption. Ainsi, il est possible d'estimer à la fois la fraction absorbée et la vitesse d'absorption. Fait intéressant, ils peuvent être reliés à un modèle pharmacocinétique pour estimer l'évolution temporelle des concentrations plasmatiques. Les modèles dynamiques comprennent les modèles de dispersion, de réacteur mélangé, et les modèles d'absorption et de transit (*Compartmental Absorption Transit model, CAT model; Advanced Compartmental Absorption Transit model, ACAT*).

Souvent utilisés en ingénierie, les modèles de dispersion furent les premiers modèles dynamiques appliqués à la caractérisation et la prédiction de l'absorption intestinale. L'hypothèse sous-jacente est que le principe actif se déplace longitudinalement dans la lumière intestinale représentée par un tube uniforme, et selon une vitesse axiale constante, une dispersion constante et un profil de concentration radial constant. L'équation différentielle caractérisant le processus de dispersion implique des dérivées partielles première et seconde ($\delta C / \delta t$, $\delta C / \delta z$ et $\delta^2 C / \delta z^2$). Bien qu'il existe une solution analytique pour des cas simples, cette équation se résout de manière numérique par des méthodes de discrétisation spatio-temporelle.

Le deuxième type de modèles dynamiques, initialement proposé par Goodacre et Murray (Goodacre and Murray 1981) est le modèle à réacteur mélangé (*mixing tank model*) qui représente le tractus intestinal à partir d'un ou de plusieurs compartiments connectés en série selon une cinétique de transfert inter-compartimentale linéaire. Goodacre et Murray ont exprimé la vitesse d'absorption en termes de résistance de transfert de matière dans la phase aqueuse entourant les particules de principe actif, et dans la phase lipidique de la membrane intestinale. Cependant, leur modèle est axé sur l'aspect physique du phénomène d'absorption, et les facteurs physiologiques, biochimiques ont été ignorés.

Par la suite, le concept de *mixing tank model* a été repris et modifié par d'autres auteurs et appliqué à des principes actifs peu solubles (Dressman and Fleisher 1986), ou présentant des doubles pics d'absorption (Oberle and Amidon 1987). Bien que cette méthode soit simple et intuitive, elle ne présente pas de base physiologique suffisamment solide pour être reliée à une quelconque partie de l'intestin grêle. En effet, les études effectuées avec cette méthode s'avèrent inconsistantes quant au nombre de compartiments utilisés pour représenter l'absorption intestinale (Dressman and Fleisher 1986; Oberle and Amidon 1987; Staats, Fisher et al. 1991). Sachant que le nombre de compartiments affecte le résultat de la simulation d'absorption et de transit intestinal, il était important de déterminer ce nombre pour donner une signification physiologique à cette approche tout en ayant une bonne capacité de prédiction du temps de transit intestinal et de l'absorption intestinale. Yu et al ont développé un modèle de transit compartimental (*Compartmental Transit Model*) à partir duquel ils ont pu déterminer que sept compartiments étaient nécessaires pour reproduire le temps de transit intestinal moyen dans le cas d'une molécule non absorbable et non dégradable dans la lumière intestinale (Yu, Crison et al. 1996). Ces compartiments peuvent être reliés à la physiologie de l'intestin grêle puisque la première moitié du 1^{er} compartiment représente le duodénum, la deuxième moitié du 1^{er} compartiment ainsi que le 2^{eme} et le 3^{eme} compartiment représentent le jéjunum, et le reste représente l'iléum. Par la suite, ces auteurs ont complété leur approche en considérant le mécanisme d'absorption intestinale, et ont proposé le model CAT (*Compartmental Absorption Transit model*) qui fait partie de la troisième catégorie de modèles dynamiques. Cependant, le modèle CAT surestime la fraction absorbée pour des principes actifs ayant de fortes éliminations

présystémiques intestinales, puisqu'il ignore les enzymes de métabolisme intestinal (Agoram, Woltosz et al. 2001).

Un modèle avancé, l'ACAT (*Advanced CAT model*) pallie cette faiblesse, en décrivant non seulement le transit intestinal et l'absorption du principe actif, mais aussi le relargage depuis sa forme pharmaceutique, sa dissolution, sa dégradation luminale, et son métabolisme. Le modèle ACAT considère différents états physiques du principe actif (solide, dissout, non-dissout, ionisé, dégradé, métabolisé, absorbé) et requiert 8 compartiments (7 pour l'intestin grêle + 1 pour le colon) pour représenter la forme solide, 8 autres pour la forme relarguée, et 8 autres pour la forme absorbée. La Figure 3. 10 illustre l'évolution des modèles dynamiques depuis le premier '*mixing tank*' jusqu'au modèle ACAT. Ce dernier, par son côté mécanistique, se rapproche beaucoup de la réalité physiologique et est intégré dans la modélisation PBPK via les logiciels PKsim® et Gastro-plus™ (Simulations Plus). D'autres modèles mécanistiques, tels que STELLA® (Grass 1997), IDEA™ (LION Biosciences) ou GITA (Kimura and Higaki 2002) ont aussi été proposés mais n'ont pas eu de retentissement comparable à celui de l'ACAT.

Les modèles PBPK-ACAT ont été utilisés pour étudier l'effet de la prise d'un repas (Jones, Parrott et al. 2006), ou de l'altération du temps de vidange gastrique causée par certains médicaments (Peters and Hultin 2008) sur le profil d'absorption de principes actifs. Peters a aussi illustré l'utilité du modèle PBPK-ACAT pour identifier des mécanismes non-considérés initialement dans la PK orale d'un principe actif, comme l'implication potentielle de transports actifs, de mécanismes de saturation, de métabolisme extra-hépatique, de délai de vidange gastrique, etc (Peters 2008). Les processus non-linéaires de métabolisme intestinal et de transport d'influx et d'efflux, ainsi que l'effet des aliments, ont été incorporé dans le modèle ACAT, en ajustant des données plasmatiques (Agoram, Woltosz et al. 2001).

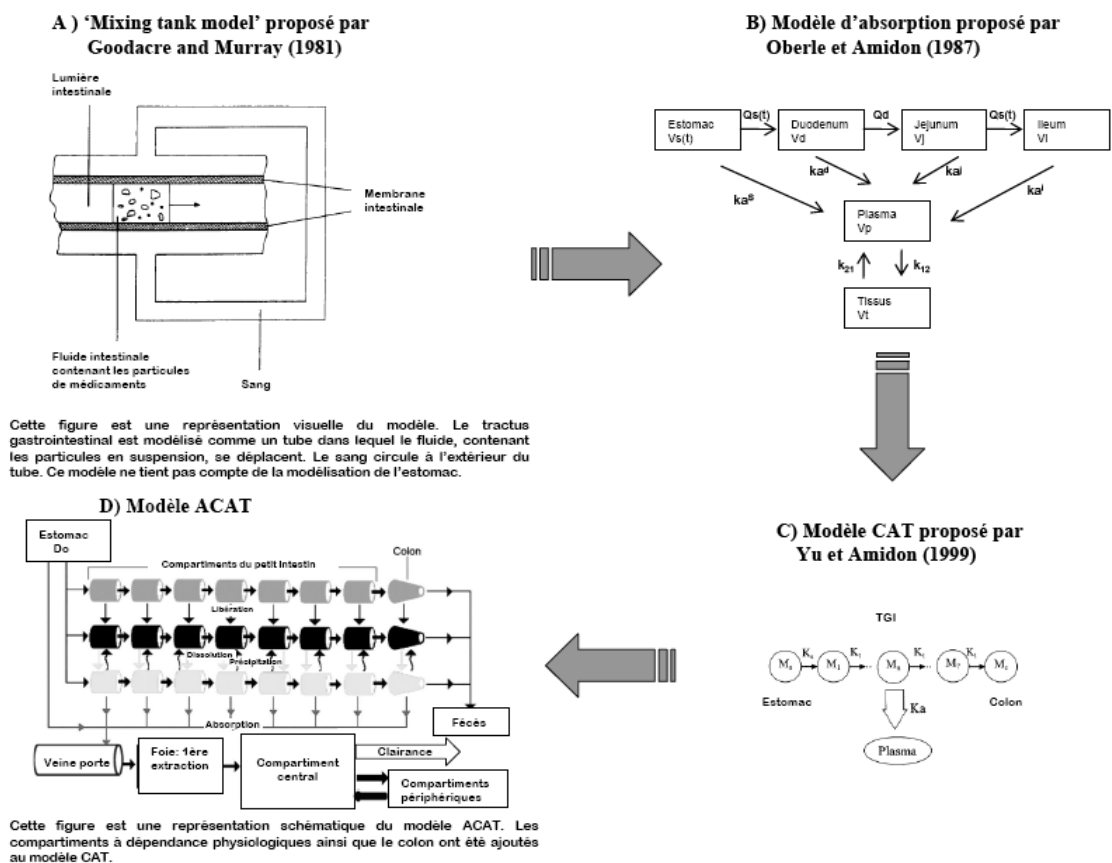


Figure 3. 10. Illustration de l'évolution des modèles dynamiques compartimentaux d'absorption intestinale.

Très récemment, les processus de transport actif et de métabolisme intestinal ont été intégrés dans un modèle de type CAT pour modéliser l'absorption intestinale de substrats de CYP3A et de P-gp (Badhan, Penny et al. 2008). Pour ce faire, les auteurs ont considéré la distribution longitudinale des CYP3A et des P-gp dans les entérocytes jumelée à l'activité métabolique des CYP3A et la vitesse d'efflux des P-gp. Ces activités furent estimées à partir des données *in vitro* de clairance intrinsèque microsomale et de ratio d'efflux des P-gp (ratio de P_{appAB} et P_{appBA}). Ce modèle reste à être intégré dans un modèle PBPK complet pour valider la façon dont leur approche d'absorption intestinale se reflète sur le profil de concentration plasmatique.

3.7 Utilisation des modèles PK dans les études d'interactions médicamenteuses

Parmi les différents types d'IM énumérées au Chapitre 2 de cette introduction de thèse, ce sont surtout les IM métaboliques (IMM) hépatiques qui font l'objet d'études prédictives. La prédiction du ratio d'AUC utilisant un K_i estimé à partir d'une seule concentration plasmatique de l'inhibiteur a longtemps été prisée dans l'industrie pharmaceutique pour évaluer les risques d'IM. Même si cette approche a été modifiée pour tenir compte de certains facteurs importants impliqués dans la caractérisation des IM, comme la fraction de principe actif métabolisé par la voie métabolique modulée (Brown, Ito et al. 2005), ou l'effet de premier passage intestinal (Galetin, Hinton et al. 2007), elle néglige la fraction libre dans les microsomes hépatiques et dans le sang, la concentration effective au site enzymatique, et les variations temporelles de concentrations d'inhibiteurs. Par conséquent, il était fréquent d'obtenir des prédictions de type 'faux-négatifs' ou 'faux-positifs' avec cette méthode (Kato, Tachibana et al. 2003). L'utilisation de modèles PK compartimentaux physiologiques, classiques ou de population est une alternative intéressante pour pallier les lacunes précédemment énoncées. La modélisation pharmacocinétique étend l'étude des IM métaboliques au delà du ratio d'AUC puisqu'elle permet de comprendre et de tester les mécanismes sous-jacents des IM et de reproduire et prédire leur impact sur les profils plasmatiques des substrats. Les IMM simulées par des modèles PK peuvent être des inductions (Huitema, Mathôt et al. 2001), inhibitions réversibles ou irréversibles (Shibata, Gao et al. 2002) (Vossen, Sevestre et al. 2007). Le but ultime de l'application de ces modèles se tourne vers (i) l'amélioration du design des études cliniques des IM (ii) la maximisation des connaissances sur le nouveau composé, et (iii) la maximisation des bénéfices thérapeutiques via l'adaptation posologique réalisée en quantifiant les changements d'exposition à un principe actif causés par une modulation d'activité enzymatique.

L'intégration des simulations pharmacocinétiques d'IM dans le développement clinique peut être effectuée de la façon suivante: (i) optimisation séparée du modèle PK développé pour le substrat et du modèle PK développé pour l'inhibiteur (*basal state*) (ii) liaison des deux modèles PK au niveau du site enzymatique, pour prédire l'effet de l'interaction médicamenteuse sur le profil plasmatique du substrat (*inhibitory state*). Ces optimisations reposent sur l'ajustement de données cliniques dans le but d'extraire les

paramètres du modèle tels que K_m , V_{max} , et CL du substrat et de l'inhibiteur (Kanamitsu, Ito et al. 2000) (Chien, Luksiri et al. 2006) (Vossen, Sevestre et al. 2007) (Kato, Shitara et al. 2008).

Quelques auteurs (Chien, Luksiri et al. 2006; Vossen, Sevestre et al. 2007) ont récemment proposé une approche permettant d'améliorer l'approximation effectuée à partir de la concentration plasmatique/hépatique moyenne ou maximale d'inhibiteur, en tenant compte des variations dynamiques de la concentration libre de l'inhibiteur dans le tissu hépatique, au moyen d'un modèle de population (Chien, Luksiri et al. 2006) ou physiologique (Vossen, Sevestre et al. 2007). Cette approche a permis d'obtenir de très bonnes reproductions des concentrations observées de midazolam en présence d'itraconazole (Vossen, Sevestre et al. 2007) ou en présence de ketoconazole (Chien, Luksiri et al. 2006). Avec l'approche PBPK, Vossen a aussi tenu compte de l'effet inhibiteur des métabolites de l'itraconazole sur les concentrations plasmatiques du midazolam et de ses métabolites (Vossen, Sevestre et al. 2007).

Plusieurs études de modélisation des IM sont appliquées à une administration intraveineuse (Vossen, Sevestre et al. 2007) ou pulmonaire du substrat (Haddad, Tardif et al. 1999; Haddad, Tardif et al. 1999; Haddad, Charest-Tardif et al. 2000; Haddad, Béliveau et al. 2001). Lorsque l'étude est appliquée à une administration orale, l'impact de l'IM métabolique dans les enterocytes était négligé pour les substrats des CYP3A (Kanamitsu, Ito et al. 2000), malgré le fait que l'impact significatif de l'inhibition de ces cytochromes sur la PK et l'effet pharmacologique de certains principes actifs aient été relevés (Thummel, O'Shea et al. 1996). Les travaux de Kato et coll. (Kato, Shitara et al. 2008) ont confirmé la pertinence d'inclure l'inhibition intestinale métabolique dans les modèles PK pour plusieurs substrats des CYP3A lorsqu'on désire mener des études prédictives sur les IM.

4 Analyse de sensibilité

"There are no knowns. There are things we know we know. There are known unknowns - that is to say, there are things that we now know we don't know, but there are also unknown unknowns—the ones we do not know we don't know. So when we do the best we can and we pull all this information together, and we then say, well that's basically what we see as the situation, that is really only the known knowns and the known unknowns. And each year, we discover a few more of those unknown unknowns"

Extrait du discours de Ronald Rumsfeld, Secrétaire à la Défense des Etats-Unis
lors d'une rencontre des Ministres de la Défense de l'OTAN, juin 2002

L'utilité d'un modèle réside principalement dans sa capacité de représenter un système complexe aussi fidèlement que possible tout en faisant des choix d'inclusion et d'exclusion de mécanismes et de paramètres selon leur influence sur le système. Malgré la complexité des systèmes biologiques, une approche parcimonieuse est toujours à privilégier afin de réduire le nombre d'hypothèses, de variables et de paramètres, les derniers étant souvent difficiles à mesurer expérimentalement. L'élaboration d'un modèle mathématique est donc sujette à différentes sources d'incertitudes : les incertitudes épistémiques qui résultent de la transformation du phénomène réel en modèle mathématique, avec le problème inhérent d'incomplétude de l'information disponible, et l'incertitude aléatoire qui, elle, repose sur les incertitudes des valeurs des paramètres décrivant les processus mécanistiques. Que l'objectif du modèle soit exploratoire ou décisionnel, il est primordial de déterminer l'impact de ces incertitudes sur les prédictions du modèle. Une fois le développement du modèle achevé, l'étape ultérieure consiste donc à procéder à une analyse de sensibilité (AS) du modèle qui consiste en l'étude qualitative ou quantitative de l'effet d'une perturbation d'un ou plusieurs paramètres du modèle sur la variation des variables prédites (Saltelli, Ratto et al. 2005). Effectuer une AS permet de répondre aux questions suivantes : 1) est-ce que le modèle répond logiquement aux variations de ses paramètres? 2) quel paramètre contribue le plus aux incertitudes des variables prédites? 3) quel paramètre requiert des recherches additionnelles afin de diminuer son incertitude et par conséquent réduire l'incertitude des variables prédites? 4) quel paramètre a peu d'influence sur les

variables prédites et pourrait être moins bien caractérisé sans nuire à la qualité des prédictions ?

Les deux principales approches d'AS utilisées dans le domaine pharmacocinétique et toxicocinétique sont les AS locales et les AS globales. Dans les paragraphes suivants, les méthodes locales et globales seront décrites de manière non-exhaustive mais suffisante pour en comprendre la portée et la différence. Quelques exemples d'AS appliquées sur des modèles pharmacocinétiques seront aussi présentés.

Définissons tout d'abord un modèle général qui sera repris comme un exemple d'application des AS. Soit $Y = f(X)$ avec X le vecteur de n paramètres du modèle tel que $X = (X_1, X_2, \dots, X_n)$, où $i = 1, \dots, n$, et Y est la variable scalaire prédite.

4.1 Analyses de sensibilité locales

Le concept de l'AS locale est basé sur la mesure de l'impact d'une perturbation d'un des paramètres du modèle (X_i , $i = 1, \dots, n$) sur la variable prédite (Y), tout en fixant les autres paramètres (X_j , $j \neq i$) à leur valeur typique ('*One-at-a-time sensitivity analysis*'). Ces AS locales reposent sur le calcul différentiel direct ou indirect d'un index de sensibilité.

4.1.1 Analyse de sensibilité différentielle

Un coefficient de sensibilité ϕ_i est défini comme étant le ratio entre la variation de la variable prédite et la variation d'un des paramètres du modèle. Si la forme analytique de la variable prédite Y est connue, alors la manière la plus directe d'estimer le coefficient de sensibilité est de calculer les dérivées partielles de la variable prédite Y par rapport à un paramètre X_i , en maintenant les autres paramètres fixés à leur valeur nominale, tel que :

$$\phi_i = \frac{\partial Y}{\partial X_i} \left(\frac{X_i}{Y} \right) \quad (4.1)$$

Le ratio X_i/Y introduit dans le calcul de ϕ_i permet d'obtenir un coefficient de sensibilité adimensionnel. Notons que le calcul de ϕ_i n'est valide que si les dérivées partielles de Y d'ordre supérieure sont négligeables et que les X_i ne sont pas corrélés (Hamby 1994).

Cette approche différentielle directe n'est valide que pour de petites perturbations des paramètres (ΔX_i) (Hamby 1994). Par conséquent, elle devient inappropriée lorsque les paramètres varient selon des intervalles plus 'réalistes'.

4.1.2 Mesure de la sensibilité locale

Une méthode plus simple consiste à faire varier un paramètre à la fois, de fixer les autres paramètres, et de mesurer la variation de la variable prédite après chaque simulation du modèle. La variation du paramètre peut correspondre à un certain pourcentage P de sa valeur nominale (1%, 10%), tel que

$$\Phi_i = \frac{\Delta Y / Y}{1 \pm P} \quad (4.2)$$

où ΔY est la variation de la variable prédite à la suite de la perturbation de X_i .

Un test de sensibilité plus puissant consiste à faire varier le paramètre X_i de ± 1 , voire ± 4 écarts-types et de mesurer l'influence de cette large variation sur les prédictions du modèle.

Il existe aussi une analyse de variabilité fondée sur l'estimation du coefficient de variation du paramètre prédit ($CV(Y)$) à partir des coefficients de sensibilité et de la variabilité des paramètres (CV_i) du modèle (Vaderman 1994), telle que :

$$CV(Y) = \sqrt{\sum_i (\Phi_i^2 \times CV_i)} \quad (4.3)$$

Cette analyse de variabilité a été appliquée par la suite aux modèles PBPK (Licata, Dekant et al. 2001; Sweeney, Gargas et al. 2003). L'avantage de cette approche est qu'elle ne nécessite pas la connaissance de la fonction de densité de probabilité des paramètres. Cependant, elle s'avère inappropriée pour les modèles fortement non-linéaires (Licata, Dekant et al. 2001).

4.1.3 Index de sensibilité

Le calcul de l'index de sensibilité (SI) consiste à attribuer les valeurs minimale et maximale connues de X_i et de mesurer la différence de la valeur de la variable prédite (Hamby 1994), tel que :

$$SI_i = \frac{Y_{\max} - Y_{\min}}{Y_{\max}} \quad (4.4)$$

où Y_{\max} est la valeur de Y obtenue lorsque X_i est à sa valeur maximum, et Y_{\min} la valeur de Y obtenue lorsque X_i est à sa valeur minimum.

4.1.4 Avantages et inconvénients des méthodes locales

Les méthodes d'AS locales présentent l'avantage d'être simples à utiliser. Elles s'appliquent surtout pour des modèles linéaires (Frey and Patil 2002). Elles permettent d'étudier l'effet d'un paramètre à la fois sur les variables prédites et de vérifier qu'un modèle répond correctement et logiquement aux variations successives de ses paramètres à l'intérieur d'un intervalle connu. Cependant, ces méthodes ne sont pas adaptées pour des modèles non-linéaires et négligent les corrélations existantes ou potentielles entre les paramètres du modèle (Frey and Patil 2002). De plus, seule une faible fraction de l'espace possible de variation des paramètres est couverte par ces méthodes, ce qui limite l'étude de sensibilité à un aperçu local de l'impact de la variabilité des paramètres sur la variabilité des prédictions (Saltelli 2004).

4.2 **Analyse de sensibilité globale**

Contrairement aux AS locales, une AS globale est effectuée en variant simultanément tous les paramètres du modèle. L'AS globale s'effectue en deux étapes : une analyse d'incertitude, suivie d'une analyse de sensibilité (Figure 4. 1). L'analyse d'incertitude est basée sur un échantillonnage aléatoire des paramètres du modèle à partir de leur fonction de distribution. Chaque simulation utilise une valeur différente des paramètres d'entrée. Ainsi, la variabilité et l'incertitude des paramètres se propagent dans les variables simulées. Cette analyse d'incertitude permet de générer les paramètres statistiques descriptifs des variables prédites (variance, écart-type, moyenne, médiane, percentiles). L'analyse de sensibilité, quant à elle, identifie les paramètres importants du

modèle en évaluant l'impact de la variabilité ou de l'incertitude des paramètres sur la variabilité des prédictions, ou en quantifiant la force de la relation entre un paramètre d'entrée et une variable prédite.

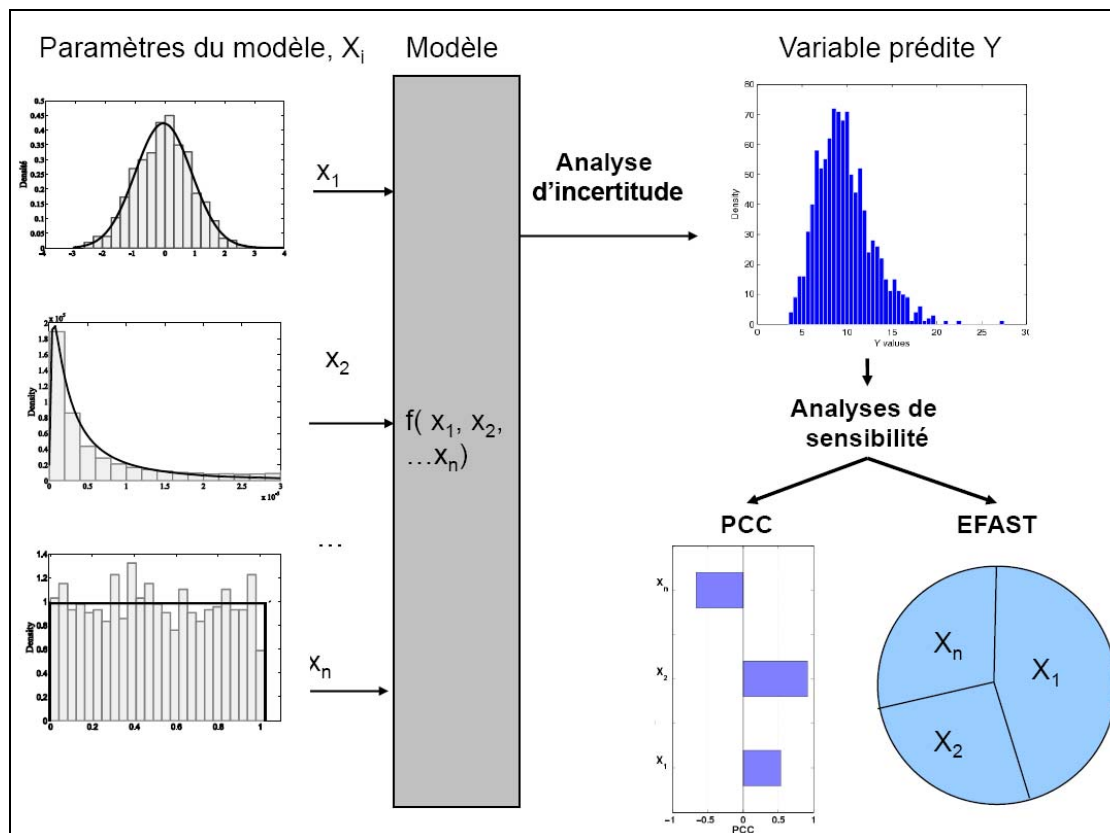


Figure 4. 1. Représentation schématique d'une analyse de sensibilité globale d'un modèle

Dans les paragraphes suivants seront décrites les méthodes d'analyses d'incertitude ainsi que les méthodes d'analyse de sensibilité couramment utilisées pour évaluer les modèles mathématiques développés dans le domaine de la santé.

4.2.1 Définition : Variabilité versus incertitude d'un paramètre

Il est important de rappeler la différence entre la variabilité et l'incertitude d'un paramètre. Telle que définie par Nestorov (Nestorov, Aarons et al. 1997; Nestorov 2001), la variabilité d'un paramètre est inhérente au phénomène naturel de variation. La variabilité ne peut pas être modifiée ou réduite en augmentant la taille de la population. Par contre, l'incertitude d'un paramètre réfère à l'erreur commise lors de l'estimation de

la ‘vraie’ valeur de ce paramètre. L’incertitude est donc une propriété reliée à la connaissance d’un système et aux hypothèses posées. Par conséquent, il est possible de diminuer l’incertitude d’un paramètre avec une meilleure caractérisation du système.

4.2.2 Analyse d’incertitude : Échantillonnage aléatoire

Les deux principales méthodes utilisées pour effectuer un échantillonnage aléatoire des paramètres du modèle sont les méthodes de ‘Monte Carlo’ (*Monte Carlo Sampling*) et de l’hypercube latin (*Latin Hypercube Sampling*, noté *LHS*). Pour effectuer un échantillonnage aléatoire de Monte-Carlo, n valeurs de X_i ($i = 1, \dots, n$) sont choisies aléatoirement à partir de la fonction de distribution de X_i définie *a priori*.

Contrairement à la méthode de Monte-Carlo qui est totalement aléatoire, le LHS est un processus stratifié basé sur la division équiprobable de la fonction de distribution de X_i en N strates. À chaque itération du modèle, une strate puis une valeur de X_i à l’intérieur de cette strate sont choisies au hasard. Une fois qu’une strate a été utilisée, elle ne le sera plus par la suite, permettant ainsi une couverture complète et rapide de toute la fonction de distribution de X_i . Le LHS requiert moins d’itérations que la méthode Monte-Carlo pour atteindre le même niveau de précision de l’estimation des variables prédites (Marino, Hogue et al. 2008).

Les paramètres étudiés dans une AS peuvent être quantitativement définis par leur fonction de densité de probabilité de type normale, log-normale, uniforme, etc. Cependant, il n’est pas toujours possible d’avoir une connaissance aussi raffinée de leur distribution. Dans ce cas, il est possible de caractériser leur incertitude en utilisant la théorie des ensembles flous (*fuzzy set theory*). Un nombre flou (*fuzzy number*) est défini par un intervalle et une fonction membre (*membership function*) qui représente un niveau de certitude des valeurs possibles du paramètre à l’intérieur de cet intervalle. Cette théorie permet d’attribuer à un paramètre incertain un ensemble de valeurs possibles déterminées de manière subjective selon la connaissance approximative de ce paramètre. L’allure des fonctions membres des nombres flous peut être triangulaire, trapézoïdale, symétrique, asymétrique, en forme de cloche, etc. et dépend de la connaissance *a priori* des valeurs probables des paramètres.

Par exemple, un investigateur pourrait suspecter que la biodisponibilité orale d'un principe actif est certainement comprise entre 0.4 et 0.7 pour une population donnée (fonction membre =1), mais n'a aucune chance d'être au dessus de 0.8 et en dessous de 0.3 (fonction membre =0). A partir de ces informations semi-qualitatives, il est possible d'attribuer des valeurs floues à la biodisponibilité de ce principe actif selon la distribution présentée à la Figure 4.2.

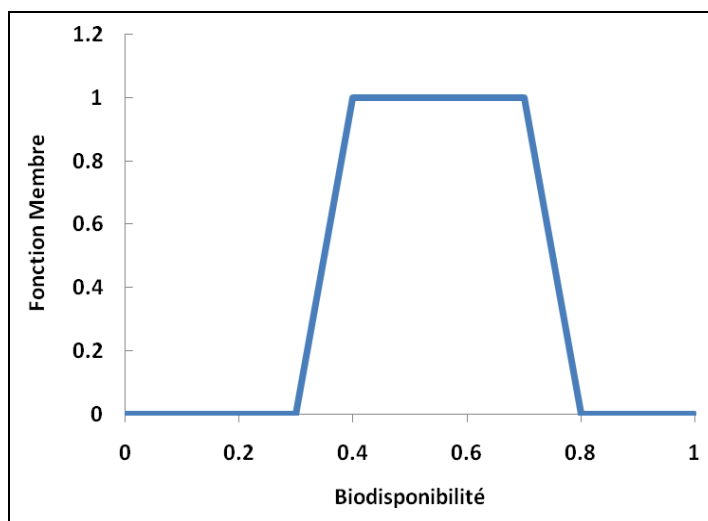


Figure 4.2. Exemple de fonction membre de la biodisponibilité orale d'un médicament (inspiré de (Gueorguieva, Nestorov et al. 2004))

4.2.3 Analyse de sensibilité

Une fois que la variabilité des paramètres prédits a été générée par les méthodes d'échantillonnage aléatoires, il est nécessaire d'identifier les principaux paramètres d'entrée impliqués dans la variabilité des prédictions du modèle. Les principales approches utilisées pour effectuer une analyse de sensibilité sont basées sur l'échantillonnage (*sampling-based approaches*) ou sur la décomposition des variances (*variance-based approaches*).

4.2.3.1 Approches basées sur l'échantillonnage

Ces approches peuvent aussi bien être qualitatives que quantitatives. Une analyse exploratoire d'AS est effectuée en premier lieu à partir d'un diagramme de dispersion (*scatter plot*) des valeurs des variables prédites en fonction des valeurs des paramètres générés aléatoirement suite aux simulations Monte-Carlo ou LHS. Ces diagrammes permettent de déterminer visuellement et rapidement le degré de corrélation et de linéarité de la relation entre les paramètres et les variables du modèle. Ils peuvent aussi révéler des relations non-linéaires, monotones ou non-monotones et ainsi, aider à choisir adéquatement les méthodes quantitatives à utiliser par la suite dans l'AS. Cependant, l'analyse visuelle des corrélations par *scatter plots* ne permet pas de déceler l'effet de la corrélation entre deux paramètres X1 et X2 sur les corrélations entre Y et X1 ainsi que Y et X2. Seules des méthodes quantitatives peuvent identifier et résoudre ce problème de corrélation (Oberguggenberger, King et al. 2008). Ces méthodes reposent sur le calcul de coefficients de corrélation qui expriment la force de la relation entre les paramètres et les variables prédites. Ces coefficients de corrélation peuvent être des coefficients de corrélation simple (CC), partiels (*Partial Correlation Coefficient*, noté PCC), ou des coefficients dits non-paramétriques calculés à partir des rangs des paramètres et des variables (*Rank Correlation Coefficient* noté RCC ; *Partial Rank Correlation Coefficient*, noté PRCC).

Une estimation quantitative de la corrélation linéaire est déterminée par le coefficient de corrélation ($\in [-1, 1]$) entre un paramètre X_i et une variable dépendante Y . Ce coefficient de corrélation est défini par le coefficient de Pearson, r , tel que :

$$CC=r = \frac{\sum_{j=1}^N (X_{ij} - \bar{X}_i)(Y_j - \bar{Y})}{\left[\sum_{j=1}^N (X_{ij} - \bar{X}_i)^2 \sum_{j=1}^N (Y_j - \bar{Y})^2 \right]^{1/2}} \quad (4.5)$$

où N est le nombre de valeurs de X_i générées aléatoirement. L'utilisation du coefficient de Pearson repose sur l'hypothèse d'une relation linéaire entre les paramètres du modèle et les variables prédites. Aussi, l'utilisation du CC suppose que les paramètres du modèle ne sont pas corrélés et qu'elle ne corrige pas les effets possibles des autres paramètres sur Y .

Les fortes corrélations entre les paramètres du modèle peuvent grandement influencer la corrélation entre un paramètre et une variable prédite. Dans ce cas, la méthode de calcul des coefficients de corrélation partiels (PCC) doit être utilisée, si toutefois la relation entre les variables et les paramètres s'avère linéaire. Cette méthode mesure la force de la relation linéaire entre les valeurs d'un paramètre X_i et d'une variable Y du modèle lorsque l'influence sur le paramètre X_i et la variable Y de tous les autres paramètres du modèle est éliminée. Par exemple, soient x_1 et x_2 , deux paramètres du modèle fortement corrélés, et y la variable prédite, telle que $y = f(x_1, x_2)$. Le calcul de la corrélation partielle (PCC) entre les valeurs de y et x_1 considérant les effets de x_2 sur y et sur x_1 ($r_{yx1|x2}$) s'effectue comme suit (Iman and Conover 1980):

$$r_{yx1|x2} = \frac{r_{yx1} - r_{yx2} \cdot r_{x1x2}}{\left[(1 - r_{yx2}^2) \cdot (1 - r_{x1x2}^2) \right]^{1/2}} \quad (4.6)$$

avec r_{yx1} la corrélation simple entre la valeur de la variable prédite y et le paramètre x_1 , r_{yx2} la corrélation simple entre la variable prédite y et le paramètre x_2 , et r_{x1x2} la corrélation simple entre les paramètres x_1 et x_2 . La valeur absolue du PCC, située entre 0 et 1, indique la force de la relation entre la variable et le paramètre. Elle reflète l'importance de la contribution de la variabilité et de l'incertitude du paramètre sur la variabilité et l'incertitude des prédictions. D'autre part, le signe du PCC est un indicateur qualitatif de la relation entre le paramètre et la variable prédite : une valeur positive de PCC indique que la valeur de la variable prédite augmente avec l'augmentation de la valeur du paramètre, alors qu'une valeur négative indique que la valeur de la variable prédite diminue avec l'augmentation de la valeur du paramètre.

Plus le nombre de paramètres du modèle est élevé, plus la méthode de calcul de PCC telle que présentée précédemment (Eq. 4.6) devient complexe. La méthode matricielle de calcul de PCC reconnue pour sa robustesse est alors privilégiée (Mishra 2004). Pour ce faire, une matrice de corrélation augmentée, C , est construite telle que :

$$C = \begin{bmatrix} 1 & r_{12} & \dots & r_{1n} & r_{1y} \\ r_{21} & 1 & \dots & r_{2n} & r_{2y} \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ r_{n1} & r_{n2} & \dots & 1 & r_{ny} \\ r_{y1} & r_{y2} & \dots & r_{yn} & 1 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A & B \\ B^T & 1 \end{bmatrix} \quad (4.7)$$

où A est la matrice de corrélation entre les paramètres du modèle ayant pour éléments $r_{ij} = CC$, et B le vecteur de corrélation entre les paramètres et la variable prédite, formée par les éléments $r_{j,y} = CC$. Le PCC entre les paramètres X_j et la variable prédite Y est calculé à partir de la matrice inverse (C^{-1}) de C tel que :

$$PCC[Y, X_j] = -\frac{C_{jy}^{-1}}{\sqrt{C_{jj}^{-1} C_{yy}^{-1}}} \quad (4.8)$$

La signification statistique d'une valeur non-nulle de PCC est testée en utilisant un test t bilatéral de Student ($p < 0.001$).

Les coefficients de corrélation CC et PCC trouvent leur légitimité dans la linéarité du modèle. Si cette hypothèse n'est pas vérifiée, mais que la relation entre les paramètres et la variable prédite est monotone, les paramètres autant que les variables doivent être transformés en données non-paramétriques en utilisant la transformation des rangs. Cette approche linéarise une relation non-linéaire monotone entre les paramètres et les variables du modèle. Par exemple, les N valeurs de X_i générées doivent être triées par ordre croissant. Le rang 1 est attribué à la plus petite valeur de X_i , et le rang N à la plus grande valeur. On procède de la même manière pour les valeurs de Y. Ainsi, étudier la relation entre X_i et Y reviendra à comparer leur classement par rang.

Le calcul du coefficient de corrélation des rangs (RCC) de Spearman, ρ , est basé sur la même équation que celle utilisée pour calculer le coefficient de Pearson (Eq. 1.3.4) en utilisant les rangs des paramètres au lieu de leurs valeurs. Le calcul du RCC est approprié si les paramètres du modèle ne sont pas corrélés. Dans le cas inverse, la méthode de calcul du coefficient de corrélation partielle des rangs (PRCC) doit être utilisée. Cette méthode est basée sur le calcul du PCC présenté à l'équation 4.8 mais appliqué sur les rangs des paramètres et des variables prédites. Saltelli et Sobol (Saltelli

and Sobol 1995) suggèrent d'interpréter avec prudence les conclusions d'une AS d'un modèle multi-dimensionnel réalisée avec la transformation par les rangs car une corrélation entre les rangs ne se traduit pas nécessairement en une corrélation entre les valeurs brutes des paramètres et des variables du modèle. Cependant, pour les modèles simples, cette approche s'est avérée plus robuste que l'approche paramétrique car elle n'est pas influencée par l'échelle des valeurs des paramètres et car elle réduit les effets des valeurs extrêmes (Saltelli and Sobol 1995; Mishra 2004) (Hamby 1994; Helton and Davis 2002).

4.2.3.2 Méthodes basées sur la décomposition des variances

Ces approches ne font pas d'hypothèse quant à la linéarité ou la monotonie de la relation entre les paramètres et les variables du modèle. Parmi ces méthodes, on peut citer la méthode de Sobol' (développée par Sobol', 1993), le *Fourier Amplitude Sensitivity Test* (noté *FAST*) (Cukier, Fortuin et al. 1973; Cukier, Schaibly et al. 1975; Cukier, Levine et al. 1978), et le *Extended Fourier Amplitude Sensitivity Test* (noté *EFAST*) (Saltelli, Tarantola et al. 1999). Leur philosophie repose sur la détermination de la fraction de la variance totale de la variable prédite pouvant être expliquée par la variance de chaque paramètre du modèle. Ces méthodes estiment un index de sensibilité de premier ordre (*First Order Sensitivity Index FOSI*) qui représente la seule contribution de la variance d'un paramètre dans la variance totale d'une variable prédite. Il est possible de prendre en compte les corrélations entre les paramètres du modèle en calculant l'index de sensibilité d'ordre supérieur. Un indice de sensibilité total (*Total Order Sensitivity Index TOSI*) permet de mesurer la sensibilité de la variance de Y par rapport à un paramètre et aux interactions de ce paramètre avec les autres paramètres du modèle.

La méthode de Sobol' permet, à partir de la variance de l'espérance conditionnelle de Y, d'estimer la contribution de chaque paramètre à la variabilité totale du paramètre prédit. La décomposition de la variance utilisée par la méthode FAST repose sur la décomposition en fréquences de la variance des paramètres. La façon dont la fréquence d'un paramètre se propage dans les prédictions du modèle sert d'estimé de la sensibilité du modèle face à ce paramètre. Saltelli et Bollado (1998) ont montré que la méthode

FAST est plus efficace que celle de Sobol' en termes de temps de calcul mais qu'elle est sujette à un biais attribuable aux choix des fréquences. Ces auteurs ont donc proposé la méthode EFAST qui combine l'efficacité de FAST avec la capacité de la méthode de Sobol' à calculer les effets totaux. EFAST présente l'avantage de ne pas dépendre du modèle et d'être très robuste.

Les approches basées sur l'échantillonnage, et celles basées sur la décomposition des variances quantifient donc différemment la relation entre les paramètres et les variables prédites: la première mesure la force de cette relation, alors que la seconde quantifie la fraction de la variance de la variable prédite expliquée par la variance du paramètre. Bien que le coût computationnel puisse être élevé, Marino et collaborateurs ont suggéré d'utiliser ces deux approches simultanément afin d'effectuer une AS complète d'un modèle (Marino et al., 2008).

4.3 Analyses de sensibilité dans le domaine PK/PD

4.3.1 Définitions

Nestorov et collaborateurs (Nestorov, Aarons et al. 1997) ont introduit les concepts d'auto-sensibilité (*auto-sensitivity*) et de sensibilité croisée (*cross-sensitivity*) pour les modèles PBPK. L'auto-sensibilité fait référence à la sensibilité d'un paramètre prédit dans un compartiment donné par rapport à un paramètre propre à ce compartiment. A l'opposé, la sensibilité croisée fait référence à la sensibilité d'un paramètre prédit dans un compartiment donné par rapport à un paramètre propre à un autre compartiment. Par exemple, Nestorov et collaborateurs ont montré que les concentrations hépatiques de barbiturates sont sensibles au débit hépatique (auto-sensitivity) et au débit sanguin intestinal (cross-sensitivity) (Nestorov, Aarons et al. 1997).

4.3.2 Choix de la méthode d'AS et exemples d'application

Le choix du type d'analyse de sensibilité dépend fortement des objectifs de l'étude, et des questions auxquelles l'investigateur veut trouver des éléments de réponse. La

structure du modèle et le nombre de paramètres jouent aussi un rôle décisif sur le choix de la méthode d'AS (Saltelli, Ratto et al. 2005).

Le type d'analyse de sensibilité le plus fréquemment utilisé dans le domaine PK/PD est l'AS locale des modèles compartimentaux classiques et des modèles physiologiques. Les investigateurs s'intéressent à isoler l'effet de la variation d'un paramètre sur les variations des prédictions. L'analyse repose essentiellement sur le calcul d'indices de sensibilité ou coefficients de sensibilité normalisés qui sont estimés à des temps précis ou sur un intervalle de temps donné en faisant varier un paramètre à la fois, d'un certain pourcentage de sa valeur typique (Nestorov, Aarons et al. 1997; Evans and Andersen 2000) (Licata, Dekant et al. 2001; Tardif, Droz et al. 2002; Sweeney, Gargas et al. 2003) (Hamelin, Charest-Tardif et al. 2005). Certains auteurs (Yokley and Evans 2007) ont tenté d'utiliser l'AS locale à des fins décisionnelles concernant le choix structural d'un modèle PBPK développé pour caractériser la PK de trichloréthylène chez l'humain. Cependant, les conclusions de leur étude ne sont pas probantes et les auteurs suggèrent qu'une AS globale permettrait de faire un choix plus éclairé du modèle structural.

Dans certains cas, une analyse d'incertitude basée sur les simulations de type Monte Carlo est effectuée en complément d'une AS locale afin d'estimer les statistiques descriptives des variables prédites en fonction des variabilités physiologique et biologique inhérentes à une population donnée (Tardif, Droz et al. 2002; Hamelin, Charest-Tardif et al. 2005). La méthode de Monte-Carlo fut aussi utilisée pour générer une population virtuelle de volontaires sains, et ce, à partir des données anthropométriques et physiologiques d'une population donnée (Willmann, Hohn et al. 2007). Cette population virtuelle a servi de point de départ pour une modélisation PBPK populationnelle dont le but était d'évaluer l'influence de la variabilité interindividuelle sur la PK intraveineuse de certains principes actifs comme le paclitaxel et la ciprofloxacine.

Les AS locales ne permettent pas d'étudier l'effet simultané de la variabilité des paramètres, de tenir compte de l'incertitude dans l'estimation des paramètres, et ne s'appliquent pas aux modèles non-linéaires (Brochot, Smith et al. 2007). Par conséquent, l'utilisation des méthodes globales d'AS devient graduellement plus fréquente dans le

domaine de la modélisation PBPK puisque ces approches permettent de surmonter ces difficultés et d'avoir une vue globale de l'impact de la variabilité et de l'incertitude des paramètres sur la précision des prédictions.

Brochot et al (Brochot, Smith et al. 2007) ont appliqué la méthode EFAST à leur modèle PBPK pour améliorer le design expérimental d'une étude toxicologique sur l'exposition au butadiène chez les humains. Gueorguieva et al. (Gueorguieva, Nestorov et al. 2005) ont proposé une méthode d'AS globale basée sur la théorie des nombres flous jumelée à la méthode EFAST afin d'étudier l'impact de l'incertitude de certains paramètres des modèles PK/PD. Ils ont appliqué cette approche à un modèle PK/PD développé pour le naratriptan utilisé pour le traitement de migraine aiguë. En démontrant que les prédictions de leur modèle n'étaient pas affectées par les paramètres incertains, les auteurs ont donc conclu qu'un simple modèle dose-réponse donnerait des résultats similaires à ceux obtenus avec leur modèle PK/PD appliqué au naratriptan. Par la suite, ces auteurs ont montré que l'AS globale pouvait être utilisée pour étudier l'incertitude structurale des modèles pharmacocinétiques (Gueorguieva, Nestorov et al. 2006). La méthode EFAST fut donc utilisée pour réduire la dimensionnalité et la complexité d'un modèle physiologique appliqué au diazépam.

Il n'est pas rare d'avoir des corrélations plus ou moins fortes entre certains paramètres physiologiques et biologiques. Par exemple, le débit cardiaque est fortement corrélé au poids corporel (Brown, Delp et al. 1997), et le volume des tissus est corrélé à la taille du mammifère (Willmann, Hohn et al. 2007). Bernillon et Bois (Bernillon and Bois 2000) ont relevé que négliger ces corrélations pourrait biaiser l'interprétation des résultats d'une AS réalisée sur un modèle physiologique. Cependant, aucune étude publiée jusqu'à présent n'a considéré l'effet de ces corrélations sur la précision des prédictions d'un modèle PBPK. Cette thèse se veut un pas vers cette direction.

5 Objectifs de la thèse

Les propriétés pharmacocinétiques du médicament et les risques d'interactions médicamenteuses doivent être investiguées très tôt dans le processus de recherche et développement. Les principaux mécanismes reconnus responsables des interactions médicamenteuses sont des inhibitions impliquant les CYP450 et les transporteurs membranaires, tels que les P-gp. Lors d'interactions médicamenteuses et selon les propriétés pharmacologiques des médicaments en présence, des effets pharmacodynamiques indésirables, voire même dangereux, ont été observés. Le caractère statique des approches de prédictions de l'impact des interactions métaboliques ne donne qu'une vision restreinte de la problématique. Le recours aux modèles PBPK est donc plus adapté pour caractériser les mécanismes sous-jacents du devenir du médicament dans l'organisme, et d'identifier les éléments limitants des phénomènes gouvernant l'ADME. Cependant, cette identification néglige les corrélations connues entre les paramètres physiologiques pouvant être une source de mauvaise interprétation des résultats.

Par conséquent, l'objectif principal de cette thèse est de concevoir une approche de modélisation prédictive du devenir du médicament dans l'organisme en présence et en absence d'interaction médicamenteuse métabolique et de transport.

Plus spécifiquement, la première partie de cette thèse consiste à prédire l'impact de la modulation de l'activité des P-gp sur la distribution tissulaire d'un substrat de ce transporteur au moyen d'un modèle PBPK.

La deuxième partie de cette thèse a pour but d'identifier, à l'aide d'une analyse de sensibilité globale du modèle, les paramètres importants impliqués dans la variabilité et l'incertitude des prédictions du modèle.

Enfin, étant donné que la majorité des interactions médicamenteuses sont de nature métabolique et impliquent les CYP3A, la troisième et dernière partie de cette thèse a pour objectif de prédire la pharmacocinétique des substrats de CYP3A administrés par

voie orale chez l'humain et de quantifier l'impact des inhibitions métaboliques sur la PK de ces substrats au moyen d'un modèle PBPK.

6 Bibliographie

- Abraham, M. H. and J. Le (1999). "The correlation and prediction of the solubility of compounds in water using an amended solvation energy relationship." J Pharm Sci **88**(9): 868-80.
- Agoram, B., W. Woltosz, et al. (2001). "Predicting the impact of physiological and biochemical processes on oral drug bioavailability." Adv. Drug Deliv. Rev. **50**(S): 41-67.
- Albanese, R. A., H. T. Banks, et al. (2001). Physiologically Based Pharmacokinetic Models for the Transport of Trichloroethylene in Adipose Tissue, Air Force Research Laboratory, Brooks AFB, San Antonio, TX.
- Amet, Y., F. Berthou, et al. (1997). "Cytochrome P450 4A and 2E1 expression in human kidney microsomes." Biochem Pharmacol **53**(6): 765-71.
- Amidon, G. L., H. Lennernas, et al. (1995). "A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability." Pharm Res **12**(3): 413-20.
- Andersen, M. E. (1995). "Physiologically based pharmacokinetic models in the study of the disposition and biological effects of xenobiotics and drugs." Toxicol. Lett. **82/83**: 341-348.
- Anderson, J. and J. Nawarskas (2001). "Cardiovascular drug-drug interactions." Cardiol. clin. **19**(2).
- Artursson, P. and J. Karlsson (1991). "Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells." Biochem Biophys Res Commun **175**(3): 880-5.
- Assem, M., E. G. Schuetz, et al. (2004). "Interactions between hepatic Mrp4 and Sult2a as revealed by the constitutive androstane receptor and Mrp4 knockout mice." J Biol Chem **279**(21): 22250-7.
- Aszalos, A. (2007). "Drug-drug interactions affected by the transporter protein, P-glycoprotein (ABCB1, MDR1) II. Clinical aspects." Drug Discov Today **12**(19-20): 838-43.
- Austin, R. P., P. Barton, et al. (2002). "The influence of nonspecific microsomal binding on apparent intrinsic clearance, and its prediction from physicochemical properties." Drug Metab Dispos **30**(12): 1497-503.
- Ayrton, A. and P. Morgan (2001). "Role of transport proteins in drug absorption, distribution and excretion." Xenobiotica **31**(8/9): 469-497.
- Badhan, R., J. Penny, et al. (2008). "Methodology for development of a physiological model incorporating CYP3A and P-glycoprotein for the prediction of intestinal drug absorption." J Pharm Sci.
- Balant, L. and M. Gex-Fabry (2000). "Modelling during drug development." Eur. J. Pharm. Biopharm. **50**: 13-26.
- Baron, J. M., T. Wiederholt, et al. (2008). "Expression and function of cytochrome p450-dependent enzymes in human skin cells." Curr Med Chem **15**(22): 2258-64.
- Belinsky, M. G., P. A. Dawson, et al. (2005). "Analysis of the in vivo functions of Mrp3." Mol Pharmacol **68**(1): 160-8.

- Berezhkovskiy, L. M. (2004). "Determination of volume of distribution at steady state with complete consideration of the kinetics of protein and tissue binding in linear pharmacokinetics." *J Pharm Sci* **93**(2): 364-74.
- Bernillon, P. and F. Bois (2000). Statistical issues in Toxicokinetic Modeling: a bayesian perspective. *Mathematical modeling in environmental health Studies*.
- Bischoff, K. B., R. L. Dedrick, et al. (1970). "Preliminary Model for Methotrexate Pharmacokinetics." *J. Pharm. Sci.* **59**(2): 149-153.
- Bjorkman, S. (2002). "Prediction of the volume of distribution of a drug: which tissue-plasma partition coefficients are needed?" *J Pharm Pharmacol* **54**(9): 1237-45.
- Bjorkman, S. (2005). "Prediction of drug disposition in infants and children by means of physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modelling: theophylline and midazolam as model drugs." *Br J Clin Pharmacol* **59**(6): 691-704.
- Bjorkman, S., D. R. Wada, et al. (2001). "Prediction of the disposition of midazolam in surgical patients by a physiologically based pharmacokinetic model." *J Pharm Sci* **90**(9): 1226-41.
- Bogen, K. T. (1988). "Pharmacokinetics for regulatory risk analysis: the case of trichloroethylene." *Regul Toxicol Pharmacol* **8**(4): 447-66.
- Bogen, K. T. and T. E. McKone (1988). "Linking indoor air and pharmacokinetic models to assess tetrachloroethylene risk." *Risk Anal* **8**(4): 509-20.
- Boivin, M. A., M. C. Carey, et al. (2003). "Erythromycin accelerates gastric emptying in a dose-response manner in healthy subjects." *Pharmacotherapy* **23**(1): 5-8.
- Bonate, P. L. and D. Howard (2000). "Prospective allometric scaling: does the emperor have clothes?" *J Clin Pharmacol* **40**(6): 665-70; discussion 671-6.
- Bonate, P. L., K. Reith, et al. (1998). "Drug interactions at the renal level. Implications for drug development." *Clin Pharmacokinet* **34**(5): 375-404.
- Boxenbaum, H. (1982). "Interspecies scaling, allometry, physiological time, and the ground plan of pharmacokinetics." *J Pharmacokinet Biopharm* **10**(2): 201-27.
- Breedveld, P., D. Pluim, et al. (2005). "The effect of Bcrp1 (Abcg2) on the in vivo pharmacokinetics and brain penetration of imatinib mesylate (Gleevec): implications for the use of breast cancer resistance protein and P-glycoprotein inhibitors to enable the brain penetration of imatinib in patients." *Cancer Res.* **65**(7): 2577-2582.
- Brochet, C., T. J. Smith, et al. (2007). "Development of a physiologically based toxicokinetic model for butadiene and four major metabolites in humans: global sensitivity analysis for experimental design issues." *Chem Biol Interact* **167**(3): 168-83.
- Brown, H. S., K. Ito, et al. (2005). "Prediction of in vivo drug-drug interactions from in vitro data: impact of incorporating parallel pathways of drug elimination and inhibitor absorption rate constant." *Br J Clin Pharmacol* **60**(5): 508-18.
- Brown, R. P., M. D. Delp, et al. (1997). "Physiologically parameter values for physiologically based pharmacokinetic models." *Toxicol. Ind. Health* **13**(4): 407-483.
- Cao, X., L. X. Yu, et al. (2005). "Permeability dominates in vivo intestinal absorption of P-gp substrate with high solubility and high permeability." *Mol Pharm* **2**(4): 329-40.
- Chenel, M., F. Bouzom, et al. (2008). "Drug-drug interaction predictions with PBPK models and optimal multiresponse sampling time designs: application to midazolam and a phase I compound. Part 1: comparison of uniresponse and

- multiresponse designs using PopDes." J Pharmacokinet Pharmacodyn **35**(6): 635-59.
- Chien, J. Y., A. Lucksiri, et al. (2006). "Stochastic prediction of CYP3A-mediated inhibition of midazolam clearance by ketoconazole." Drug Metab Dispos **34**(7): 1208-19.
- Chien, J. Y., M. A. Mohutsky, et al. (2003). "Physiological approaches to the prediction of drug-drug interactions in study populations." Curr Drug Metab **4**(5): 347-56.
- Chiou, W. L. and A. Barve (1998). "Linear correlation of the fraction of oral dose absorbed of 64 drugs between humans and rats." Pharm Res **15**(11): 1792-5.
- Chiou, W. L. and P. W. Buehler (2002). "Comparison of oral absorption and bioavailability of drugs between monkey and human." Pharm Res **19**(6): 868-74.
- Clewell, H. J. (1995). "The application of physiologically based pharmacokinetic modeling in human health risk assessment of hazardous substances." Toxicol. Lett. **79**(1-3): 207-217.
- Clewell, H. J., J. Teeguarden, et al. (2002). "Review and evaluation of the potential impact of age- and gender-specific pharmacokinetic differences on tissue dosimetry." Crit Rev Toxicol **32**(5): 329-89.
- Couture, L., J. A. Nash, et al. (2006). "The ATP-binding cassette transporters and their implication in drug disposition: a special look at the heart." Pharmacol. Rev. **58**(2): 244-258.
- Craigmill, A. L. and K. A. Cortright (2002). "Interspecies considerations in the evaluation of human food safety for veterinary drugs." AAPS Pharm. Sci. **4**(4): E34.
- Cukier, R. I., C. M. Fortuin, et al. (1973). "Study of the sensitivity of coupled reaction systems to uncertainties in rate coefficients: I. Theory." J. Chem. Phys. **59**: 3873-3878.
- Cukier, R. I., H. B. Levine, et al. (1978). "Nonlinear sensitivity analysis of multiparameter model systems." J. Comput. Phys. **26**: 1-42.
- Cukier, R. I., J. H. Schaibly, et al. (1975). "Study of the sensitivity of coupled reaction systems to uncertainties in rate coefficients. III. Analysis of the approximations." J. Chem. Phys. **63**: 1140-1149.
- Cummins, C. L., W. Jacobsen, et al. (2002). "Unmasking the dynamic interplay between intestinal P-glycoprotein and CYP3A4." J Pharmacol Exp Ther **300**(3): 1036-45.
- Cummins, C. L., L. Salphati, et al. (2003). "In vivo modulation of intestinal CYP3A metabolism by P-glycoprotein: studies using the rat single-pass intestinal perfusion model." J Pharmacol Exp Ther **305**(1): 306-14.
- Dartois, C., K. Brendel, et al. (2007). "Overview of model-building strategies in population PK/PD analyses: 2002-2004 literature survey." Br J Clin Pharmacol **64**(5): 603-12.
- de Lange, E. C. (2004). "Potential role of ABC transporters as a detoxification system at the blood-CSF barrier." Adv Drug Deliv Rev **56**(12): 1793-809.
- de Lange, E. C. and M. Danhof (2002). "Considerations in the use of cerebrospinal fluid pharmacokinetics to predict brain target concentrations in the clinical setting: implications of the barriers between blood and brain." Clin Pharmacokinet **41**(10): 691-703.
- Dell'Acqua, G., R. Polishchuck, et al. (1999). "Cardiac resistance to adriamycin in transgenic mice expressing a rat alpha-cardiac myosin heavy chain/human multiple drug resistance 1 fusion gene." Hum Gene Ther **10**(8): 1269-79.

- Dresser, G. K., J. D. Spence, et al. (2000). "Pharmacokinetic-pharmacodynamic consequences and clinical relevance of cytochrome P450 3A4 inhibition." Clin Pharmacokinet **38**(1): 41-57.
- Dressman, J. B., G. L. Amidon, et al. (1985). "Absorption potential: estimating the fraction absorbed for orally administered compounds." J Pharm Sci **74**(5): 588-9.
- Dressman, J. B., G. L. Amidon, et al. (1998). "Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: immediate release dosage forms." Pharm Res **15**(1): 11-22.
- Dressman, J. B., P. Bass, et al. (1993). "Gastrointestinal parameters that influence oral medications." J Pharm Sci **82**(9): 857-72.
- Dressman, J. B. and D. Fleisher (1986). "Mixing-tank model for predicting dissolution rate control or oral absorption." J Pharm Sci **75**(2): 109-16.
- Dressman, J. B., K. Thelen, et al. (2008). "Towards quantitative prediction of oral drug absorption." Clin Pharmacokinet **47**(10): 655-67.
- Edginton, A. N. and S. Willmann (2008). "Physiology-based simulations of a pathological condition: prediction of pharmacokinetics in patients with liver cirrhosis." Clin Pharmacokinet **47**(11): 743-52.
- Eichelbaum, M., M. F. Fromm, et al. (2004). "Clinical aspects of the MDR1 (ABCB1) gene polymorphism." Ther Drug Monit **26**(2): 180-5.
- Evans, M. V. and M. E. Andersen (2000). "Sensitivity analysis of a physiological model for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD): assessing the impact of specific model parameters on sequestration in liver and fat in the rat." Toxicol Sci **54**(1): 71-80.
- Faassen, F., G. Vogel, et al. (2003). "Caco-2 permeability, P-glycoprotein transport ratios and brain penetration of heterocyclic drugs." Int. J. Pharm. **263**(1-2): 113-122.
- Fagerholm, U. (2007). "Prediction of human pharmacokinetics--evaluation of methods for prediction of volume of distribution." J Pharm Pharmacol **59**(9): 1181-90.
- Fagerholm, U. (2008). "Prediction of human pharmacokinetics-biliary and intestinal clearance and enterohepatic circulation." J Pharm Pharmacol **60**(5): 535-42.
- Fahmi, O. A., S. Boldt, et al. (2008). "Prediction of Drug-Drug Interactions from in Vitro Induction Data: Application of the Relative Induction Score Approach Using Cryopreserved Human Hepatocytes." Drug Metab Dispos.
- Feng, M. R. (2002). "Assessment of blood-brain barrier penetration: in silico, in vitro and in vivo." Curr Drug Metab **3**(6): 647-57.
- Fisher, J. W., T. A. Whittaker, et al. (1990). "Physiologically based pharmacokinetic modeling of the lactating rat and nursing pup: a multiroute exposure model for trichloroethylene and its metabolite, trichloroacetic acid." Toxicol Appl Pharmacol **102**(3): 497-513.
- Foth, H. (1995). "Role of the lung in accumulation and metabolism of xenobiotic compounds--implications for chemically induced toxicity." Crit Rev Toxicol **25**(2): 165-205.
- Frey, H. C. and S. R. Patil (2002). "Identification and review of sensitivity analysis methods." Risk Anal **22**(3): 553-78.
- Funk, C. (2008). "The role of hepatic transporters in drug elimination." Expert Opin Drug Metab Toxicol **4**(4): 363-79.
- Gabrielsson, J. and D. Weiner (2000). Pharmacokinetic and pharmacodynamic Data Analysis: Concepts and applications.

- Galetin, A., L. K. Hinton, et al. (2007). "Maximal inhibition of intestinal first-pass metabolism as a pragmatic indicator of intestinal contribution to the drug-drug interactions for CYP3A4 cleared drugs." Curr Drug Metab **8**(7): 685-93.
- Ghafourian, T., M. Barzegar-Jalali, et al. (2004). "Quantitative structure-pharmacokinetic relationship modelling: apparent volume of distribution." J Pharm Pharmacol **56**(3): 339-50.
- Gibaldi, M. and D. Perrier (1982). Pharmacokinetics. New York and Basel.
- Golden, P. L. and G. M. Pollack (2003). "Blood-brain barrier efflux transport." J. Pharm. Sci. **92**(9): 1739-1753.
- Goodacre, B. C. and P. J. Murray (1981). "A mathematical model of drug absorption." J Clin Hosp Pharm **6**(2): 117-33.
- Grass, G. M. (1997). "Simulation Models to predict oral drug absorption from in vitro data." Adv. Drug Deliv. Rev. **23**: 199-219.
- Grover, A. and L. Z. Benet (2009). "Effects of Drug Transporters on Volume of Distribution." AAPS J.
- Gueorguieva, I., I. A. Nestorov, et al. (2005). "Uncertainty analysis in pharmacokinetics and pharmacodynamics: application to naratriptan." Pharm Res **22**(10): 1614-26.
- Gueorguieva, I., I. A. Nestorov, et al. (2006). "Reducing whole body physiologically based pharmacokinetic models using global sensitivity analysis: diazepam case study." J Pharmacokinet Pharmacodyn **33**(1): 1-27.
- Haddad, S., M. Béliveau, et al. (2001). "A PBPK Modeling-Based Approach to account for interactions in the health Risk Assessment of Chemical Mixtures." Toxicol. Sci. **63**: 125-131.
- Haddad, S., G. Charest-Tardif, et al. (2000). "Physiologically Based Modeling of the Maximal Effect of Metabolic Interactions on the Kinetics of Components of Complex Chemical Mixtures." J. Toxicol. Environ. Health (part A) **61**: 209-223.
- Haddad, S. and K. Krishnan (1998). "Physiological Modeling of Toxicokinetic Interactions: Implications for Mixtures risk Assessment." Environ. Health Perspect. **106**(Suppl 6): 1377-1384.
- Haddad, S., R. Tardif, et al. (1999). "A modelin approach to account for toxicokinetic interactions in the calculation of biological hazard index for chemical mixtures." Toxicol. Lett. **108**: 303-308.
- Haddad, S., R. Tardif, et al. (1999). "Physiological Modeling of the Toxicokinetic Interactions in a Quaternary Mixture of Aromatic Hydrocarbons." Toxicol. Appl. Pharmacol. **161**: 249-257.
- Hamby, D. M. (1994). "A Review of Techniques for Parameters Sensitivity Analysis of Environmental Models." Env. Monitoring. Assess. **32**: 135-154.
- Hamelin, G., G. Charest-Tardif, et al. (2005). "Physiologically based modeling of n-hexane kinetics in humans following inhalation exposure at rest and under physical exertion: impact on free 2,5-hexanedione in urine and on n-hexane in alveolar air." J Occup Environ Hyg **2**(2): 86-97; quiz D6-7.
- Hasler, J. A., R. Estabrook, et al. (1999). "Human Cytochrome P450." Molecular Asp. Med. **20**: 1-137.
- Hayes, A. H., Jr. (1981). "Therapeutic implications of drug interactions with acetaminophen and aspirin." Arch Intern Med **141**(3 Spec No): 301-4.
- Helton, J. C. and F. J. Davis (2002). "Illustration of sampling-based methods for uncertainty and sensitivity analysis." Risk Anal **22**(3): 591-622.

- Higaki, K., S. Yamashita, et al. (2001). "Time-dependent oral absorption models." J Pharmacokinet Pharmacodyn **28**(2): 109-28.
- Hoffmeyer, S., O. Burk, et al. (2000). "Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: Multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo." Proc. Natl. Acad. Sci. **97**(7): 3473-3478.
- Holford, N. H., R. J. Ambros, et al. (1992). "Models for describing absorption rate and estimating extent of bioavailability: application to cefetamet pivoxil." J Pharmacokinet Biopharm **20**(5): 421-42.
- Hou, T. and J. Wang (2008). "Structure-ADME relationship: still a long way to go?" Expert Opin Drug Metab Toxicol **4**(6): 759-770.
- Hou, T., J. Wang, et al. (2006). "Recent advances in computational prediction of drug absorption and permeability in drug discovery." Curr Med Chem **13**(22): 2653-67.
- Huitema, A. D. R., R. A. A. Mathôt, et al. (2001). "A Mechanism-Based Pharmacokinetic Model for the Cytochrome P450 Drug-Drug interaction between Cyclophosphamide and ThioTEPA and the Autoinduction of Cyclophosphamide." J. Pharmacokinet. Pharmacodyn. **28**(3): 211-229.
- Hukkanen, J., O. Pelkonen, et al. (2002). "Expression and regulation of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 (CYP) enzymes in human lung." Crit Rev Toxicol **32**(5): 391-411.
- Iman, R. L. and W. J. Conover (1980). "Small Sample Sensitivity Analysis Techniques for Computer-Models, with an Application to Risk Assessment." Comm. Stats. Part A-Theory and Meth. **9**(17): 1749.
- Ito, K., D. Hallifax, et al. (2005). "Impact of parallel pathways of drug elimination and multiple cytochrome P450 involvement on drug-drug interactions: CYP2D6 paradigm." Drug Metab Dispos **33**(6): 837-44.
- Ito, K. and J. B. Houston (2005). "Prediction of human drug clearance from in vitro and preclinical data using physiologically based and empirical approaches." Pharm Res **22**(1): 103-12.
- Ito, K., T. Iwatsubo, et al. (1998). "Prediction of Pharmacokinetic Alterations Caused by Drug-Drug Interactions: Metabolic Interaction in the Liver." Pharmacol. Rev **50**(3): 387-411.
- Johnson, B. M., W. N. Charman, et al. (2001). "The impact of P-glycoprotein efflux on enterocyte residence time and enterocyte-based metabolism of verapamil." J Pharm Pharmacol **53**(12): 1611-9.
- Jones, H. M., N. Parrott, et al. (2006). "A novel strategy for physiologically based predictions of human pharmacokinetics." Clin Pharmacokinet **45**(5): 511-42.
- Jones, H. M., N. Parrott, et al. (2006). "Predicting pharmacokinetic food effects using biorelevant solubility media and physiologically based modelling." Clin Pharmacokinet **45**(12): 1213-26.
- Jonker, J. W., M. Buitelaar, et al. (2002). "The breast cancer resistance protein protects against a major chlorophyll-derived dietary phototoxin and protoporphyria." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(24): 15649-54.
- Kanamitsu, S., K. Ito, et al. (2000). "Prediction of in vivo interaction between triazolam and erythromycin based on in vitro studies using human liver microsomes and recombinant human CYP3A4." Pharm Res **17**(4): 419-26.

- Karlsson, M. O., S. L. Beal, et al. (1995). "Three new residual error models for population PK/PD analyses." J Pharmacokinet Biopharm **23**(6): 651-72.
- Kato, M., K. Chiba, et al. (2003). "The intestinal first-pass metabolism of substrates of CYP3A4 and P-glycoprotein-quantitative analysis based on information from the literature." Drug Metab Pharmacokinet **18**(6): 365-72.
- Kato, M., Y. Shitara, et al. (2008). "The Quantitative Prediction of CYP-mediated Drug Interaction by Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling." Pharm Res.
- Kato, M., T. Tachibana, et al. (2003). "Evaluation of methods for predicting drug-drug interactions by Monte Carlo simulation." Drug Metab Pharmacokinet **18**(2): 121-7.
- Kawahara, M., T. Nanbo, et al. (1998). "Physiologically based pharmacokinetic prediction of p-phenylbenzoic acid disposition in the pregnant rat." Biopharm Drug Dispos **19**(7): 445-53.
- Kawahara, M., A. Sakata, et al. (1999). "Physiologically based pharmacokinetics of digoxin in mdr1a knockout mice." J Pharm Sci **88**(12): 1281-7.
- Kawai, R., D. Mathew, et al. (1998). "Physiologically based pharmacokinetics of cyclosporine A: extension to tissue distribution kinetics in rats and scale-up to human." J Pharmacol Exp Ther **287**(2): 457-68.
- Kim, C. S., J. A. Sandberg, et al. (2001). "Quantitative exposure assessment: application of physiologically-based pharmacokinetic (PBPK) modeling of low-dose, long-term exposures of organic acid toxicant in the brain." Environ. Toxicol. Pharmacol. **9**(4): 153-160.
- Kim, R. B., M. F. Fromm, et al. (1998). "The drug transporter P-glycoprotein limits oral absorption and brain entry of HIV-1 protease inhibitors." J Clin Invest **101**(2): 289-94.
- Kimura, T. and K. Higaki (2002). "Gastrointestinal transit and drug absorption." Biol Pharm Bull **25**(2): 149-64.
- Kivisto, K. T., M. Niemi, et al. (2004). "Functional interaction of intestinal CYP3A4 and P-glycoprotein." Fundam Clin Pharmacol **18**(6): 621-6.
- Kovarik, J. M., L. Rigaudy, et al. (1999). "Longitudinal assessment of a P-glycoprotein-mediated drug interaction of valsopodar on digoxin." Clin Pharmacol Ther **66**(4): 391-400.
- Krishnan, K. and M. E. Andersen (2001). Physiologically based Pharmacokinetic Modeling in Toxicology. Principles and Methods of Toxicology. A. W. Hayes. Philadelphia: 193-241.
- Krishnan, K., H. J. Clewell, 3rd, et al. (1994). "Physiologically based pharmacokinetic analyses of simple mixtures." Environ Health Perspect **102 Suppl 9**: 151-5.
- Krishnan, K., S. Haddad, et al. (1995). "A simple index for representing the discrepancy between simulations of physiological pharmacokinetic models and experimental data." Toxicol Ind Health **11**(4): 413-22.
- Kusuhara, H. and Y. Sugiyama (2001). "Efflux transport systems for drugs at the blood-brain barrier and blood-cerebrospinal fluid barrier (Part 2)." Drug Discov Today **6**(4): 206-212.
- Kusuhara, H. and Y. Sugiyama (2005). "Active efflux across the blood-brain barrier: role of the solute carrier family." NeuroRx **2**(1): 73-85.
- Kusuhara, H. and Y. Sugiyama (2009). "In vitro-in vivo extrapolation of transporter-mediated clearance in the liver and kidney." Drug Metab Pharmacokinet **24**(1): 37-52.

- Laurin, J., F. Nekka, et al. (1999). "Assuming peripheral elimination: its impact on the estimation of pharmacokinetic parameters of muscle relaxants." J Pharmacokinet Biopharm **27**(5): 491-512.
- Lave, T., P. Coassolo, et al. (1999). "Prediction of Hepatic Metabolic Clearance based on Interspecies Allometric Scaling Techniques and In Vitro- In Vivo Correlations." Clin Pharmacokinet **36**(3): 211-231.
- Lazarou, J., B. H. Pomeranz, et al. (1998). "Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a meta-analysis of prospective studies." JAMA **279**(15): 1200-1205.
- Lennernas, H. (2007). "Intestinal permeability and its relevance for absorption and elimination." Xenobiotica **37**(10-11): 1015-51.
- Li, J. and F. Nekka (2007). "A pharmacokinetic formalism explicitly integrating the patient drug compliance." J Pharmacokinet Pharmacodyn **34**(1): 115-39.
- Licata, A. C., W. Dekant, et al. (2001). "A physiologically based pharmacokinetic model for methyl tert-butyl ether in humans: implementing sensitivity and variability analyses." Toxicol Sci **62**(2): 191-204.
- Lilly, P. D., M. E. Andersen, et al. (1998). "A physiologically Based Pharmacokinetic Description of the Oral Uptake, Tissue Dosimetry, and rates of Metabolism of Bromodichloromethane in the Male Rat." Toxicol. Appl. Pharmacol. **150**: 205-217.
- Lindstedt, L. and P. J. Schaeffer (2002). "Use of allometry in predicting anatomical and physiological parameters of mammals." Lab Anim **36**(1): 1-19.
- Lipinski, C. A., F. Lombardo, et al. (1997). "Experimental and Computational Approches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings." Adv Drug Deliv Rev **23**(3): 3-25.
- Loizou, G., M. Spendiff, et al. (2008). "Development of good modelling practice for physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment: the first steps." Regul Toxicol Pharmacol **50**(3): 400-11.
- Lombardo, F., R. S. Obach, et al. (2002). "Prediction of volume of distribution values in humans for neutral and basic drugs using physicochemical measurements and plasma protein binding data." J Med Chem **45**(13): 2867-76.
- Lown, K. S., R. R. Mayo, et al. (1997). "Role of intestinal P-glycoprotein (mdr1) in interpatient variation in the oral bioavailability of cyclosporine." Clin Pharmacol Ther **62**(3): 248-60.
- Lüpfert, C. and A. Reichel (2005). "Development and Application of Physiologically based Pharmacokinetic-Modelling Tools to Support Drug Discovery." Chem. Biodiv. **2**: 1462-1486.
- Macheras, P. E. and M. Y. Symillides (1989). "Toward a quantitative approach for the prediction of the fraction of dose absorbed using the absorption potential concept." Biopharm Drug Dispos **10**(1): 43-53.
- Mahmood, I. (1998). "Interspecies scaling of renally secreted drugs." Life Sci **63**(26): 2365-71.
- Mahmood, I. (2005). "Interspecies scaling of biliary excreted drugs: a comparison of several methods." J Pharm Sci **94**(4): 883-92.
- Marino, S., I. B. Hogue, et al. (2008). "A methodology for performing global uncertainty and sensitivity analysis in systems biology." J Theor Biol **254**(1): 178-96.

- Matthew, D., B. Brennan, et al. (1993). "Disposition of azole antifungal agents. I. Nonlinearities in ketoconazole clearance and binding in rat liver." Pharm Res **10**(3): 418-22.
- Meissner, K., B. Sperker, et al. (2002). "Expression and localization of P-glycoprotein in human heart: effects of cardiomyopathy." J. Histochem. Cytochem. **50**(10): 1351-1356.
- Michalets, E. L. and C. R. Williams (2000). "Drug interactions with cisapride: clinical implications." Clin Pharmacokinet **39**(1): 49-75.
- Mishra, S. (2004). Sensitivity Analysis with Correlated Inputs- an Environmental Risk Assessment Example. Proceedings of the 2004 Crystal Ball User Conference.
- Misra, A., S. Ganesh, et al. (2003). "Drug delivery to the central nervous system: a review." J Pharm Pharm Sci **6**(2): 252-73.
- Mithani, S. D., V. Bakatselou, et al. (1996). "Estimation of the increase in solubility of drugs as a function of bile salt concentration." Pharm Res **13**(1): 163-7.
- Mouly, S. and M. F. Paine (2003). "P-glycoprotein Increases from proximal to distal regions of human small intestine." Pharm. Res. **20**(10): 1595-1599.
- Nestorov, I. (2001). "Modelling and simulation of variability and uncertainty in toxicokinetics and pharmacokinetics." Toxicol. Lett. **120**: 411-420.
- Nestorov, I. (2003). "Whole Body Pharmacokinetic Models." Clin Pharmacokinet **42**(10): 883-908.
- Nestorov, I., L. Aarons, et al. (1998). "Lumping whole body physiologically based pharmacokinetic models." Pharmacokinet. Biopharm. **26**: 21-46.
- Nestorov, I. A., L. J. Aarons, et al. (1997). "Physiologically based pharmacokinetic modeling of a homologous series of barbiturates in the rat: a sensitivity analysis." J Pharmacokinet Biopharm **25**(4): 413-47.
- Obach, R. S., J. G. Baxter, et al. (1997). "The prediction of human pharmacokinetic parameters from preclinical and in vitro metabolism data." J Pharmacol Exp Ther **283**(1): 46-58.
- Obach, R. S., R. L. Walsky, et al. (2007). "Mechanism-based inactivation of human cytochrome p450 enzymes and the prediction of drug-drug interactions." Drug Metab Dispos **35**(2): 246-55.
- Oberguggenberger, M., J. King, et al. (2008). "Classical and Imprecise Probability Methods for Sensitivity Analysis in Engineering: A Case Study." Int J Approx Reasoning **in press**.
- Oberle, R. L. and G. L. Amidon (1987). "The influence of variable gastric emptying and intestinal transit rates on the plasma level curve of cimetidine; an explanation for the double peak phenomenon." J Pharmacokinet Biopharm **15**(5): 529-44.
- Oh, D. M., R. L. Curl, et al. (1993). "Estimating the fraction dose absorbed from suspensions of poorly soluble compounds in humans: a mathematical model." Pharm Res **10**(2): 264-70.
- Oie, S. and T. N. Tozer (1979). "Effect of altered plasma protein binding on apparent volume of distribution." J Pharm Sci **68**(9): 1203-5.
- Paine, M. F., H. L. Hart, et al. (2006). "The human intestinal cytochrome P450 "pie"." Drug Metab Dispos **34**(5): 880-6.
- Paine, M. F., M. Khalighi, et al. (1997). "Characterization of Interintestinal and Intraintestinal variations in Human CYP3A4-dependent Metabolism." J. Pharmacol. Exp. Ther. **283**(3): 1552-1562.

- Paine, M. F., D. D. Shen, et al. (1996). "First-pass metabolism of midazolam by the human intestine." Clin Pharmacol Ther **60**(1): 14-24.
- Pang, K. S. and M. Rowland (1977). "Hepatic clearance of drugs. I. Theoretical considerations of a "well-stirred" model and a "parallel tube" model. Influence of hepatic blood flow, plasma and blood cell binding, and the hepatocellular enzymatic activity on hepatic drug clearance." J Pharmacokinet Biopharm **5**(6): 625-53.
- Pardridge, W. M. (2005). "The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development." NeuroRx **2**(1): 3-14.
- Patsalos, P. N., W. Froscher, et al. (2002). "The importance of drug interactions in epilepsy therapy." Epilepsia **43**(4): 365-85.
- Perez de la Cruz Moreno, M., M. Oth, et al. (2006). "Characterization of fasted-state human intestinal fluids collected from duodenum and jejunum." J Pharm Pharmacol **58**(8): 1079-89.
- Perloff, M. D., L. L. von Moltke, et al. (2002). "Fexofenadine transport in Caco-2 cells: inhibition with verapamil and ritonavir." J Clin Pharmacol **42**(11): 1269-74.
- Peters, S. A. (2008). "Evaluation of a generic physiologically based pharmacokinetic model for lineshape analysis." Clin Pharmacokinet **47**(4): 261-75.
- Peters, S. A. and L. Hultin (2008). "Early identification of drug-induced impairment of gastric emptying through physiologically based pharmacokinetic (PBPK) simulation of plasma concentration-time profiles in rat." J Pharmacokinet Pharmacodyn **35**(1): 1-30.
- Polli, J. W., J. L. Jarrett, et al. (1999). "Role of P-glycoprotein on the CNS disposition of amprenavir (141W94), an HIV protease inhibitor." Pharm Res **16**(8): 1206-12.
- Poulin, P., K. Schoenlein, et al. (2001). "Prediction of Adipose Tissue:Plasma Partition Coefficients for Structurally Unrelated Drugs." J. Pharm. Sci. **90**(4): 436-447.
- Poulin, P. and F. Theil (2000). "A priori Prediction of Tissue:Plasma Partition Coefficients of Drugs to Facilitate the Use of Physiologically-Based Pharmacokinetic Models in Drug Discovery." J. Pharm. Sci. **89**(1): 16-35.
- Poulin, P. and F. Theil (2002). "Prediction of Pharmacokinetics Prior to In vivo Studies. I. Mechanism-Based Prediction of Volume of Distribution." J. Pharm. Sci. **91**(1): 129-155.
- Poulin, P. and F. Theil (2002). "Prediction of Pharmacokinetics prior to in Vivo Studies. II. Generic Physiologically Based Pharmacokinetic Models of Drug Disposition." J. Pharm. Sci. **91**(5): 1358-1370.
- Price, K., S. Haddad, et al. (2003). "Physiological modeling of age-specific changes in the pharmacokinetics of organic chemicals in children." J Toxicol Environ Health A **66**(5): 417-33.
- Ramsey, J. C. and M. E. Andersen (1984). "A physiologically based description of the inhalation pharmacokinetics of styrene in rats and humans." Toxicol Appl Pharmacol **73**(1): 159-75.
- Ravindranath, V., S. Bhamre, et al. (1995). "Xenobiotic metabolism in brain." Toxicol Lett **82-83**: 633-8.
- Robbins, D. K., M. A. Castles, et al. (1998). "Dose proportionality and comparison of single and multiple dose pharmacokinetics of fexofenadine (MDL 16455) and its enantiomers in healthy male volunteers." Biopharm Drug Dispos **19**(7): 455-63.

- Rodgers, T., D. Leahy, et al. (2005). "Physiologically based pharmacokinetic modeling 1: predicting the tissue distribution of moderate-to-strong bases." J Pharm Sci **94**(6): 1259-76.
- Rodgers, T. and M. Rowland (2006). "Physiologically based pharmacokinetic modelling 2: predicting the tissue distribution of acids, very weak bases, neutrals and zwitterions." J Pharm Sci **95**(6): 1238-57.
- Rodgers, T. and M. Rowland (2007). "Mechanistic approaches to volume of distribution predictions: understanding the processes." Pharm Res **24**(5): 918-33.
- Rostami-Hodjegan, A. and G. Tucker (2004). "'in Silico' simulation to assess the 'in-vivo' consequences of 'in-vitro' metabolic drug-drug interactions." Drug Discovery Today: Technologies **1**(4): 441:448.
- Rowland, M., L. Z. Benet, et al. (1973). "Clearance concepts in pharmacokinetics." J Pharmacokinet Biopharm **1**(2): 123-36.
- Rowland, M. and S. Matin (1973). "Kinetics of Drug-Drug Interactions." J. Pharmacokinet. Biopharm. **1**(6): 553-567.
- Sadeque, A. J., C. Wandel, et al. (2000). "Increased drug delivery to the brain by P-glycoprotein inhibition." Clin Pharmacol Ther **68**(3): 231-7.
- Saltelli, A. (2004). Sensitivity Analysis in Practice: A Guide to Assessing Scientific Models.
- Saltelli, A., M. Ratto, et al. (2005). "Sensitivity analysis for chemical models." Chem Rev **105**(7): 2811-28.
- Saltelli, A. and I. M. Sobol (1995). "About the use of Rank Transformation in Sensitivity Analysis of Model Output." Reliability Engineering and System Safety **50**: 225:239.
- Saltelli, A., S. Tarantola, et al. (1999). "A Quantitative Model-Independent Method for Global Sensitivity Analysis of Model Output." Am. Stat. Assoc. Am. Soc. Quality **41**(1): 39:56.
- Sasaki, M., H. Suzuki, et al. (2004). "Prediction of in vivo biliary clearance from the in vitro transcellular transport of organic anions across a double-transfected Madin-Darby canine kidney II monolayer expressing both rat organic anion transporting polypeptide 4 and multidrug resistance associated protein 2." Mol Pharmacol **66**(3): 450-9.
- Schinkel, A. H., U. Mayer, et al. (1997). "Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking mdr1-type (drug transporting) P-glycoproteins." Proc. Natl. Acad. Sci. **94**: 4028-4033.
- Schinkel, A. H., J. J. Smit, et al. (1994). "Disruption of the mouse mdr1a P-glycoprotein gene to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs." Cell **77**(4): 491-502.
- Schinkel, A. H., E. Wagenaar, et al. (1996). "P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs." J Clin Invest **97**(11): 2517-24.
- Schinkel, A. H., E. Wagenaar, et al. (1995). "Absence of the mdr1a P-Glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin, and cyclosporin A." J Clin Invest **96**(4): 1698-705.
- Shapiro, L. and N. Shear (2002). "Drug interactions: Proteins, pumps, and P-450s." J. Am. Acad. Dermatol. **47**(4): 467-488.
- Shen, D. D., K. L. Kunze, et al. (1997). "Enzyme-catalyzed processes of first-pass hepatic and intestinal drug extraction." Adv Drug Deliv Rev **27**(2-3): 99-127.

- Shibata, N., W. Gao, et al. (2002). "Drug interactions between HIV protease inhibitors based on physiologically-based pharmacokinetic model." J Pharm Sci **91**(3): 680-9.
- Shimada, T., H. Yamazaki, et al. (1994). "Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians." J Pharmacol Exp Ther **270**(1): 414-23.
- Simonsen, U. (2002). "Interactions between drugs for erectile dysfunction and drugs for cardiovascular disease." Int J Impot Res **14**(3): 178-88.
- Sinko, P. J., G. D. Leesman, et al. (1991). "Predicting Fraction Dose absorbed in Human Using a Macroscopic Mass Balance approach." Pharm. Res. **8**(8): 979-988.
- Sinko, P. J., G. D. Leesman, et al. (1993). "Mass balance approaches for estimating the intestinal absorption and metabolism of peptides and analogues: theoretical development and applications." Pharm Res **10**(2): 271-5.
- Smit, J. W., M. T. Huisman, et al. (1999). "Absence or pharmacological blocking of placental P-glycoprotein profoundly increases fetal drug exposure." J Clin Invest **104**(10): 1441-7.
- Solbach, T. F., J. Konig, et al. (2006). "ATP-binding cassette transporters in the heart." Trends Cardiovasc Med **16**(1): 7-15.
- Spahn-Langguth, H. and P. Langguth (2001). "Grapefruit juice enhances intestinal absorption of the P-glycoprotein substrate talinolol." Eur J Pharm Sci **12**(4): 361-7.
- Sparreboom, A., J. van Asperen, et al. (1997). "Limited oral bioavailability and active epithelial excretion of paclitaxel (Taxol) caused by P-glycoprotein in the intestine." Proc. Natl. Acad. Sci. **94**: 2031-2035.
- Staats, D. A., J. W. Fisher, et al. (1991). "Gastrointestinal absorption of xenobiotics in physiologically based pharmacokinetic models. A two-compartment description." Drug Metab Dispos **19**(1): 144-8.
- Sugano, K., A. Okazaki, et al. (2007). "Solubility and dissolution profile assessment in drug discovery." Drug Metab Pharmacokinet **22**(4): 225-54.
- Sui, X., J. Sun, et al. (2008). "Predicting the volume of distribution of drugs in humans." Curr Drug Metab **9**(6): 574-80.
- Sun, D., H. Lennernas, et al. (2002). "Comparison of human duodenum and Caco-2 gene expression profiles for 12,000 gene sequences tags and correlation with permeability of 26 drugs." Pharm Res **19**(10): 1400-16.
- Suttle, A. B., G. M. Pollack, et al. (1992). "Use of a pharmacokinetic model incorporating discontinuous gastrointestinal absorption to examine the occurrence of double peaks in oral concentration-time profiles." Pharm Res **9**(3): 350-6.
- Sweeney, L. M., M. L. Gargas, et al. (2003). "Physiologically based pharmacokinetic model parameter estimation and sensitivity and variability analyses for acrylonitrile disposition in humans." Toxicol. Sci. **71**(1): 27-40.
- Szakacs, G., A. Varadi, et al. (2008). "The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox)." Drug Discov Today **13**(9-10): 379-93.
- Tahara, H., H. Kusuhara, et al. (2006). "Is the monkey an appropriate animal model to examine drug-drug interactions involving renal clearance? Effect of probenecid

- on the renal elimination of H₂ receptor antagonists." J Pharmacol Exp Ther **316**(3): 1187-94.
- Tardif, R., P. O. Droz, et al. (2002). "Impact of human variability on the biological monitoring of exposure to toluene: I. Physiologically based toxicokinetic modelling." Toxicol Lett **134**(1-3): 155-63.
- Teorell, T. (1937). "Kinetics of Distribution of Substances Administered to the Body." Arch. Int. Pharmacodyn. **57**: 2005-225.
- Thompson, C. M., D. O. Johns, et al. (2009). "Database for physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling: physiological data for healthy and health-impaired elderly." J Toxicol Environ Health B Crit Rev **12**(1): 1-24.
- Thorn, M., N. Finnstrom, et al. (2005). "Cytochromes P450 and MDR1 mRNA expression along the human gastrointestinal tract." Br J Clin Pharmacol **60**(1): 54-60.
- Thum, T. and J. Borlak (2000). "Gene expression in distinct regions of the heart." Lancet **355**(9208): 979-83.
- Thummel, K. E., D. O'Shea, et al. (1996). "Oral first-pass elimination of midazolam involves both gastrointestinal and hepatic CYP3A-mediated metabolism." Clin Pharmacol Ther **59**(5): 491-502.
- Tomlin, J., N. Brown, et al. (1993). "The effect of liquid fibre on gastric emptying in the rat and humans and the distribution of small intestinal contents in the rat." Gut **34**(9): 1177-81.
- Troutman, M. D. and D. R. Thakker (2003). "Efflux ratio cannot assess P-glycoprotein-mediated attenuation of absorptive transport: asymmetric effect of P-glycoprotein on absorptive and secretory transport across Caco-2 cell monolayers." Pharm Res **20**(8): 1200-9.
- Troutman, M. D. and D. R. Thakker (2003b). "Novel experimental parameters to quantify the modulation of absorptive and secretory transport of compounds by P-glycoprotein in cell culture models of intestinal epithelium." Pharm Res **20**(8): 1210-24.
- Vaderman, S. B. (1994). Statistics for Engineering Problem Solving. Boston, PWS Pub. Co.
- van Asperen, J., O. van Tellingen, et al. (1999). "Comparative pharmacokinetics of vinblastine after a 96-hour continuous infusion in wild-type mice and mice lacking *mdr1a* P-glycoprotein." J Pharmacol Exp Ther **289**(1): 329-33.
- van Asperen, J., O. van Tellingen, et al. (1997). "Enhanced oral bioavailability of paclitaxel in mice treated with the P-glycoprotein blocker SDZ PSC 833." Br J Cancer **76**(9): 1181-3.
- van Asperen, J., O. van Tellingen, et al. (1999). "Increased accumulation of doxorubicin and doxorubicinol in cardiac tissue of mice lacking *mdr1a* P-glycoprotein." Br. J. Cancer **79**: 108-113.
- Venkatakrishnan, K., R. S. Obach, et al. (2007). "Mechanism-based inactivation of human cytochrome P450 enzymes: strategies for diagnosis and drug-drug interaction risk assessment." Xenobiotica **37**(10-11): 1225-56.
- Vertzoni, M., N. Fotaki, et al. (2004). "Dissolution media simulating the intraluminal composition of the small intestine: physiological issues and practical aspects." J Pharm Pharmacol **56**(4): 453-62.

- Von Richter, O., O. Burk, et al. (2004). "Cytochrome P450 3A4 and P-glycoprotein expression in human small intestinal enterocytes and hepatocytes: A comparative analysis in paired tissue specimen." Clin. Pharmacol. Ther. **75**(3): 172-183.
- Vossen, M., M. Sevestre, et al. (2007). "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 **4**: 13.
- Wajima, T., K. Fukumura, et al. (2003). "Prediction of human pharmacokinetics from animal data and molecular structural parameters using multivariate regression analysis: volume of distribution at steady state." J Pharm Pharmacol **55**(7): 939-49.
- Wandel, C., R. Kim, et al. (2002). "Interaction of morphine, fentanyl, sufentanil, alfentanil, and loperamide with the efflux drug transporter P-glycoprotein." Anesthesiology **96**(4): 913-20.
- Wang, Y. H., D. R. Jones, et al. (2004). "Prediction of Cytochrome P450 3A inhibition by verapamil enantiomers and their metabolites." Drug Met. Disp. **32**(2): 259-266.
- Weiss, M. and W. Kang (2002). "P-glycoprotein inhibitors enhance saturable uptake of idarubicin in rat heart: pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling." J Pharmacol Exp Ther **300**(2): 688-94.
- Westphal, K., A. Weinbrenner, et al. (2000). "Oral Bioavailability of digoxin is enhanced by talinolol: Evidence for involvement of intestinal P-glycoprotein." Clin. Pharmacol. Ther. **68**(1): 6-12.
- Westphal, K., A. Weinbrenner, et al. (2000). "Induction of P-glycoprotein by rifampin increases intestinal secretion of talinolol in human beings: A new type of drug/drug interaction." Clin. Pharmacol. Ther. **68**(4): 345-355.
- Wetterich, U., H. Spahn-Langguth, et al. (1996). "Evidence for intestinal secretion as an additional clearance pathway of talinolol enantiomers: concentration- and dose-dependent absorption in vitro and in vivo." Pharm Res **13**(4): 514-22.
- Wienkers, L. C. and T. G. Heath (2005). "Predicting in vivo drug interactions from in vitro drug discovery data." Nat Rev Drug Discov **4**(10): 825-33.
- Wijnholds, J., E. C. de Lange, et al. (2000). "Multidrug resistance protein 1 protects the choroid plexus epithelium and contributes to the blood-cerebrospinal fluid barrier." J Clin Invest **105**(3): 279-85.
- Williams, R. O., 3rd, M. A. Sykora, et al. (2001). "Method to recover a lipophilic drug from hydroxypropyl methylcellulose matrix tablets." AAPS PharmSciTech **2**(2): E8.
- Willmann, S., K. Hohn, et al. (2007). "Development of a physiology-based whole-body population model for assessing the influence of individual variability on the pharmacokinetics of drugs." J Pharmacokinet Pharmacodyn **34**(3): 401-31.
- Willmann, S., W. Schmitt, et al. (2003). "A physiologic model for simulating gastrointestinal flow and drug absorption in rats." Pharm Res **20**(11): 1766-71.
- Willmann, S., W. Schmitt, et al. (2004). "A physiological Model for the Estimation of the Fraction Dose Absorbed in Humans." J. Med. Chem. **47**: 4022-4031.
- Wishart, D., C. Knox, et al. (2006). "DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration." Nucleic Acids Res **34**(1): D668-72.
- Wojnowski, L. (2004). "Genetics of the variable expression of CYP3A in humans." Ther Drug Monit **26**(2): 192-9.

- Wu, C. Y. and L. Z. Benet (2005). "Predicting drug disposition via application of BCS: transport/absorption/ elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system." Pharm Res **22**(1): 11-23.
- Yalkowsky, S. H. and S. C. Valvani (1980). "Solubility and partitioning I: Solubility of nonelectrolytes in water." J Pharm Sci **69**(8): 912-22.
- Yang, J., M. Jamei, et al. (2007). "Prediction of intestinal first-pass drug metabolism." Curr Drug Metab **8**(7): 676-84.
- Yang, J., M. Kjellsson, et al. (2003). "The effects of dose staggering on metabolic drug-drug interactions." Eur J Pharm Sci **20**(2): 223-32.
- Yang, J., G. T. Tucker, et al. (2004). "Cytochrome P450 3A expression and activity in the human small intestine." Clin Pharmacol Ther **76**(4): 391.
- Yasui-Furukori, N., T. Uno, et al. (2005). "Different effects of three transporting inhibitors, verapamil, cimetidine, and probenecid, on fexofenadine pharmacokinetics." Clin Pharmacol Ther **77**(1): 17-23.
- Yin, O. Q., B. Tomlinson, et al. (2003). "A modified two-portion absorption model to describe double-peak absorption profiles of ranitidine." Clin Pharmacokinet **42**(2): 179-92.
- Yokley, K. A. and M. V. Evans (2007). "An example of model structure differences using sensitivity analyses in physiologically based pharmacokinetic models of trichloroethylene in humans." Bull Math Biol **69**(8): 2591-625.
- Yokogawa, K., M. Takahashi, et al. (1999). "P-glycoprotein-dependent disposition kinetics of tacrolimus: studies in *mdr1a* knockout mice." Pharm Res **16**(8): 1213-8.
- Yu, D. K. (1999). "The contribution of P-glycoprotein to pharmacokinetic Drug-Drug interaction." J. Clin. Pharmacol. **39**: 1203-1211.
- Yu, L. X., J. R. Crison, et al. (1996). "Compartmental transit and dispersion model analysis of small intestinal transit flow in humans." Int. J. Pharm **140**: 111-118.
- Yu, L. X., E. Lipka, et al. (1996). "Transport approaches to the biopharmaceutical design of oral drug delivery systems: prediction of intestinal absorption." Adv Drug Deliv Rev **19**(3): 359-76.
- Zhao, Y. H., M. H. Abraham, et al. (2003). "Evaluation of rat intestinal absorption data and correlation with human intestinal absorption." Eur J Med Chem **38**(3): 233-43.
- Zhou, S., S. Yung Chan, et al. (2005). "Mechanism-based inhibition of cytochrome P450 3A4 by therapeutic drugs." Clin Pharmacokinet **44**(3): 279-304.
- Zuegge, J., G. Schneider, et al. (2001). "Prediction of Hepatic Metabolic Clearance: Comparison and Assessment of Prediction Models." Clin. Pharmacokinet. **40**(7): 553-563.

CHAPITRE II

**ASSESSING DRUG DISTRIBUTION IN TISSUES
EXPRESSING P-GLYCOPROTEIN THROUGH
PHYSIOLOGICALLY BASED
PHARMACOKINETIC MODELING:
MODEL STRUCTURE AND PARAMETER
DETERMINATION**

Frédérique Fenneteau¹, Jacques Turgeon¹, Lucie Couture^{1,2}, Véronique Michaud¹, Jun Li^{3,4},
Fahima Nekka^{1,3}.

¹ Faculté de Pharmacie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

² Charles River Laboratories Preclinical Services Montréal Inc., Montréal, Québec, Canada

³ Centre de Recherche Mathématiques, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

⁴ Pharsight, Montréal, Québec, Canada

Corresponding author

Fahima Nekka

C.P. 6128, Succursale Centre Ville

Montréal, Québec

H3C 3J7

Publié dans Journal of Theoretical Biology and Medicine, 2009, Janv 15, Vol 6, Issue 2

Abstract

Background: The expression and activity of P-glycoproteins due to genetic or environmental factors may have a significant impact on drug disposition, drug effectiveness or drug toxicity. Hence, characterization of drug disposition over a wide range of conditions of these membrane transporters activities is required to better characterize drug pharmacokinetics and pharmacodynamics. This work aims to improve our understanding of the impact of P-gp activity modulation on tissue distribution of P-gp substrate.

Methods: A PBPK model was developed in order to examine activity and expression of P-gp transporters in mouse brain and heart. Drug distribution in these tissues was first represented by a well-stirred (WS) model and then refined by a mechanistic transport-based (MTB) model that includes P-gp mediated transport of the drug. To estimate transport-related parameters, we developed an original three-step procedure that allowed extrapolation of *in vitro* measurements of drug permeability to the *in vivo* situation. The model simulations were compared to a limited set of data in order to assess the model ability to reproduce the important information of drug distributions in the considered tissues.

Results: This PBPK model brings insights into the mechanism of drug distribution in non eliminating tissues expressing P-gp. The MTB model accounts for the main transport mechanisms involved in drug distribution in heart and brain. It points out to the protective role of P-gp at the blood-brain barrier and represents thus a noticeable improvement over the WS model.

Conclusions Being built prior to *in vivo* data, this approach brings an interesting alternative to fitting procedures, and could be adapted to different drugs and transporters.

The physiological based model is novel and unique and brought effective information on drug transporters.

1. Background

The most studied ATP binding cassette (ABC) membrane transporters is the P-glycoprotein (P-gp), which is a multidrug resistance (MDR) protein encoded by the ATP-binding cassette B1 (ABCB1) gene. The important role of P-gp in drug absorption and excretion in intestine, kidney and liver, has been revealed through reduction of absorption of orally administered drugs and promotion of urinary and biliary excretion (Ayrton and Morgan 2001; Fromm 2003). Furthermore, P-gp transporters have a regulator function by limiting penetration of drugs in brain, heart, placenta, ovaries, and testes tissues. This has been shown *in vivo* on wild type (WT), *mdr1a(-)* and *mdr1a/1b(-/-)* knockout (KO) mice, which are mice lacking genes encoding for drug-transporting P-gp (Schinkel, Mayer et al. 1997). Indeed, higher levels of radioactivity were measured in various tissues of simple or double mutated mice compared to WT mice, after IV or oral administration of different P-gp substrates (Schinkel, Smit et al. 1994; Schinkel, Mol et al. 1995; Schinkel, Wagenaar et al. 1995; Schinkel, Mayer et al. 1997; van Asperen, van Tellingen et al. 1999; Muramatsu, Johnson et al. 2004). It has been demonstrated that modulation of the expression and/or activity of these transporters due to genetic or environmental factors may have a significant impact on drug disposition, drug effectiveness or drug toxicity (Harris, Jang et al. 2003; McCabe 2004; Greenblatt and von Moltke 2005). Hence, characterization of drug disposition over a wide range of conditions of ABC membrane transporters activities is required to better characterize drug pharmacokinetics and pharmacodynamics.

Among pharmacokinetic modeling approaches, the physiologically based pharmacokinetic (PBPK) approach is now progressively used at various stages of drug discovery and development. PBPK models are developed to predict xenobiotic disposition throughout a mammalian body. By characterizing the kinetic processes of the drug, it is possible to predict its distribution inside tissues, organs and fluids of the body. The whole-body PBPK model involving tissues and organs connected via the vascular system mimics the anatomical structure of the mammal being studied. Generally, tissue distribution of drugs can be represented either by the perfusion rate limited (also called

well-stirred) model, or the permeability rate limited model. The former assumes an instantaneous and homogenous drug distribution in tissues, whereas the latter represents the tissue as two or three well-stirred compartments which are separated by a capillary and/or cellular membrane where a permeability rate limited transfer occurs (Nestorov 2003). However, the membrane permeability may not be the only factor contributing towards limitation of drug distribution within a tissue. The influx or efflux activity of ABC transporters can be another important factor involved in drug distribution and should be considered as such in PBPK modeling.

In drug research and development, predicting drug disposition prior to *in vivo* studies is a major challenge (Luttringer, Theil et al. 2003). Within this context, the hypothesis-driven strategy adopted here is to build a data-independent model that minimizes recourse to data fitting and exploits *in vitro* data information. Indeed, the spirit of PBPK modeling is deeply rooted in the independence of the model building on the output data representing the process to be described. It is based on the integration within a whole entity of drug specific characteristics with a structural mode which can be more or less detailed in terms of tissues and organs to be included. As relevant knowledge of the physiological, morphological, and physicochemical data becomes available, the possibility exists for efficient use of limited data in order to reasonably describe the pharmacokinetics of specific compounds under a variety of conditions (Rowland, Balant et al. 2004). With this in mind, the whole-body PBPK model developed herein aims to shed light, prior to *in vivo* experiments, on drug distribution in tissues expressing P-gp transporters. For this purpose, we adopt a step by step procedure which led us to the final PBPK model applied to mice, which accounts for the P-gp-mediated efflux transport in heart, and brain tissues. We first use the WS model to represent the drug distribution in each tissue. Then, to account for both passive and active transports, a mechanistic transport-based (MTB) model is developed for heart and brain. In order to estimate transport-related parameters all the while minimizing data fitting, we developed a method to extrapolate *in vitro* measurements of drug permeability of P-gp substrates through endothelial cells monolayers to the *in vivo* situation. This allowed the estimation of those parameters related to apparent passive and active transport of the drug through blood-tissue membrane of brain and heart.

To appreciate the reliability of the knowledge that the model provides in terms of elucidating the impact of the modulation of P-gp activity on drug distribution, we had access to WT and KO tissue concentrations of domperidone, an antiemetic drug associated with cardiac toxicity (Cameron, Reyntjens et al. 1985; Osborne, Slevin et al. 1985; Quinn, Parkes et al. 1985). The choice of this drug model was motivated by previous *in vitro* results (Faassen, Vogel et al. 2003), which suggested that domperidone could be highly transported by P-gp. While this data set cannot be considered rich enough to validate the developed PBPK model, it can at least show that, the model simulations lie within realistic values by capturing points in the main strategic regions of the tissue concentration profiles, namely at the maximum concentration and the elimination phase.

2. Method

2.1 Structure of the PBPK model

The present investigation focuses on P-gp substrate distribution in heart and brain tissue where this transporter has a protective function. Our whole body PBPK model included these tissues as well as core tissues, organs and fluids, namely liver, arterial and venous blood, along with the adipose tissue because of its involvement in the disposition of lipophilic drugs. To make the model readily usable for subsequent updates and future experimental data, we also included bone, gut, lung, kidneys, muscle skin and spleen in the PBPK structure (Figure 1).

The PBPK model is mathematically formulated as a set of ordinary differential equations of mass balance that represents the time dependent variation of the drug concentration in each tissue. We systematically performed an overall mass balance of the whole-body PBPK model to assure that mass conservation laws are respected.

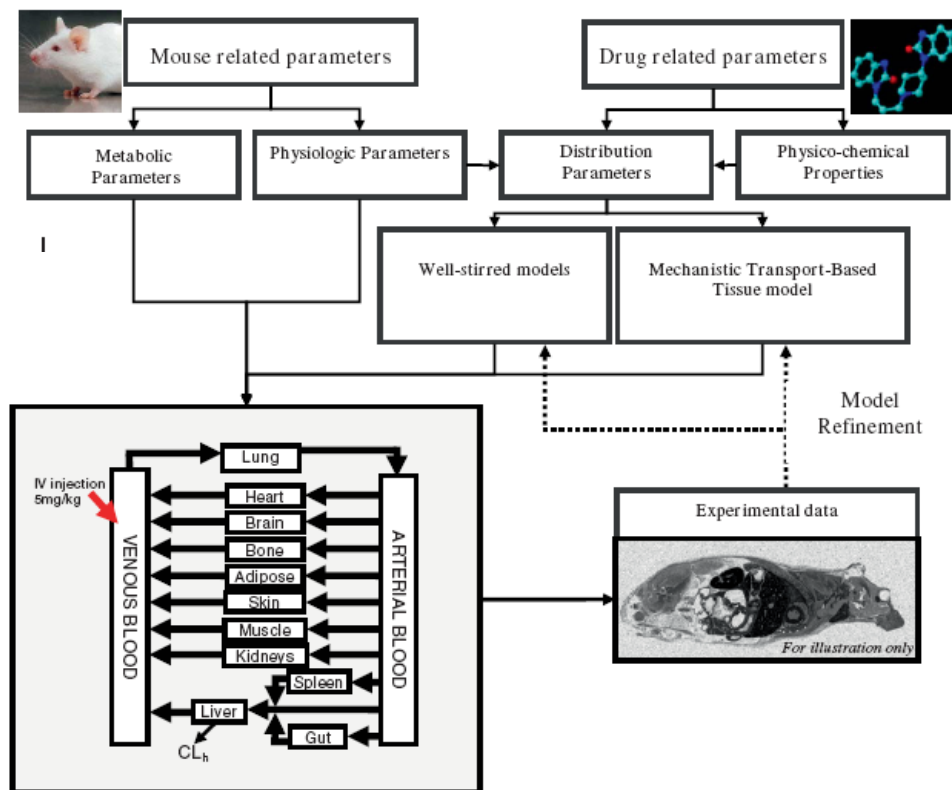


Figure 1. Schematic representation of the procedures used to develop the whole-body PBPK model applied to the mouse (30g BW) following a 5mg/kg IV injection of domperidone

2.2 Tissue-distribution models

The parameters used in the equations presented in this section refer to concentration (C), volume (V), blood flow to tissue (Q), tissue:plasma partition coefficient (P_{tp}), blood:plasma ratio (BP), unbound fraction of drug (f_u), clearance (CL), and permeability-surface area product (PSA). The subscripts refer to cardiac output (co), tissue (t), kidneys (k), spleen (sp), gut (g), plasma (p), liver (li), lung (lg), heart (ht), arterial blood (ab), venous blood (vb), blood in equilibrium with tissue (bl), venous blood living tissue (v,t), unbound fraction (u), bound fraction (b), intracellular water (iw), extracellular water (ew), neutral lipid (nl), neutral phospholipid (np), and microsomal binding (mic). Some subscripts refer to active transport processes, such as P-gp mediated transport (P-gp), as well as other transporters (OT) such as influx transporters (in,OT) and additional efflux transporters (out, OT).

2.2.1 *Well-stirred model (WS)*

At this first step of model development, the whole-body PBPK model is based on perfusion limited model of disposition. The uptake rate of the drug into tissues is limited by the flow rate to tissue rather than the diffusion rate across cell membranes (Pang and Rowland 1977). In this case, the unbound concentration of drug in tissue is in equilibrium with the unbound drug in the outgoing blood. The application of a WS model requires the tissue-to-plasma partition coefficient (P_{tp}) of each tissue included in the PBPK model as input parameters. By definition, these partition coefficients were calculated as:

$$P_{tp,t} = \frac{C_T}{C_p} = \frac{C_{ut}}{C_{up}} \frac{fu_p}{fu_t} = fu_p \times Kp_u \quad (1)$$

where Kp_u is the unbound tissue-to plasma partition coefficient (Rodgers, Leahy et al. 2005) calculated from the tissue-composition-based approach developed by Rodgers et al. (Rodgers, Leahy et al. 2005).

The hepatic elimination is determined from intrinsic clearance (CL_{int}), such as

$$CL_{int} = \frac{V_{max(P450)}}{K_m(P450)} \times N_{CYP450} \quad (2)$$

where $V_{max(P450)}$ and $K_m(P450)$ are the Michaelis Menten parameters of drug biotransformation measured in mice hepatic pooled microsomes, and N_{CYP450} (nmol) is the amount of mice hepatic cytochrome P450.

The conventional description of hepatic extraction ratio (E_h) corresponds to $(CL_{int} \times fu_p/fu_{mic}) / (CL_{int} \times fu_p/fu_{mic} + Q_h)$ for a well-stirred liver model (Obach 1999), where fu_{mic} is the fraction of drug unbound to hepatic microsomes which can be estimated as follows for a basic drug (Austin, Barton et al. 2002):

$$fu_{mic} = (C_{mic} \times 10^{0.56 \cdot \text{Log}P - 1.41} + 1)^{-1} \quad (3)$$

where C_{mic} is the microsomal protein concentration (20 mg microsomal protein/mL herein), and $\text{Log}P$ is the octanol:water partition coefficient of the drug.

The mass balance equations of the WS model applied to the tissues included in the PBPK model are (Poulin and Theil 2002)

non-eliminating tissues

$$V_t \times \frac{dC_t}{dt} = Q_t \times (C_{ab} - C_{v,t}) \quad (4)$$

eliminating tissues (liver)

$$V_{li} \times \frac{dC_{li}}{dt} = (Q_{li} - Q_{sp} - Q_g) \times C_{ab} + Q_{spl} \times C_{v,spl} + Q_g \times C_{v,g} - \frac{fu_p}{fu_{mic}} CL_{int} \times C_{v,li} - Q_{li} \times C_{v,li} \quad (5)$$

where CL_{int} and fu_{mic} are estimated from equation 2 and 3 respectively.

arterial blood

$$V_{ab} \times \frac{dC_{ab}}{dt} = Q_{co} \times (C_{v,lg} - C_{ab}) \quad (6)$$

venous blood

$$V_{vb} \times \frac{dC_{vb}}{dt} = \sum_t (Q_t \times C_{v,t}) - Q_{co} \times C_{vb} \quad (7)$$

lung

$$V_{lg} \times \frac{dC_{lg}}{dt} = Q_{co} \times (C_{vb} - C_{v,lg}) \quad (8)$$

with

$$C_{v,x} = \frac{C_x \times BP}{P_{tp,x}} \quad (9)$$

where x stands for t, sp, li and lg.

2.2.2 Mechanistic Transport-Based (MTB) models

We propose a transport-based tissue model to mechanistically investigate drug distribution in non-eliminating tissues expressing active transporters. This tissue model accounts for apparent passive diffusion and active transports of the drug at the blood-tissue membrane. Since only limited transport-related information is available within extra-and intra-cellular space of a tissue, it has been resumed by the transport occurring at the capillary membrane. This choice has the advantage to minimize the recourse to fitting procedures of transport-related parameters that would have been required in a three sub-compartmental tissue model. Thus, we assigned the term ‘apparent’ to the transport-related parameters and divided the tissue in two well-stirred compartments representing the vascular and extravascular tissues, separated by a capillary membrane where apparent diffusion and apparent active transports of the unbound drug occur. The fraction of drug unbound to tissue was calculated from the total tissue concentration C_T estimated from the method developed by Rodgers and Rowland (Rodgers, Leahy et al. 2005). Indeed, C_T can be expressed in terms of the unbound concentration in intracellular and extracellular water, and of the drug concentration bound to neutral lipid and phospholipids, such as (Rodgers, Leahy et al. 2005):

$$C_T = C_{u,iw} \times f_{iw} + C_{u,ew} \times f_{ew} + C_{b,nl} \times f_{nl} + C_{b,np} \times f_{np} \quad (10)$$

The unbound drug fraction in tissues (f_{u_t}) was calculated by rearranging Equation 10, such as

$$f_{u_t} = \frac{C_{u_t}}{C_T} = \frac{f_{iw} \times C_{u,iw} + f_{ew} \times C_{u,ew}}{C_T} \quad (11)$$

Remembering that $C_{u,ew}$ equals to the unbound concentration in plasma ($C_{u,p}$), and $C_{u,iw}$ for a monoprotic base is given by (Rodgers, Leahy et al. 2005):

$$C_{u,iw} = C_{u,p} \times \frac{X}{Y} \quad (12)$$

with

$$X = 1 + 10^{(pK_a - pH_{iw})} \quad (13)$$

$$Y = 1 + 10^{(pK_a - pH)} \quad (14)$$

Table I. Input physiological parameters

Tissues	Tissue Composition (% of wet tissue weight)				Physiological Data			
	Intra Cellular Water	Extra Cellular Water	Neutral Lipids	Phospho- -lipids	Blood Flow Rate (% of Q _c) ^a	Volume (% of BW)	Unbound Fraction to Tissue ^b	Partition Coefficient ^c (P _{tp})
Adipose ^d	0.017	0.1350	0.853	0.002	0.07	0.0700	0.0079	1.7258
Bone +ROB [*]	0.346	0.1000	0.220	0.0005	0.218	0.0799	0.0327	2.0582
Brain	0.620	0.1620	0.031	0.05	0.031	0.0165	0.0463	2.5722
Gut	0.475	0.2820	0.032	0.015	0.141	0.0253	0.0166	6.2541
Heart	0.456	0.3200	0.017	0.014	0.066	0.0038	0.0212	4.8909
Kidney	0.483	0.2730	0.0148	0.0341	0.110	0.0135	0.0104	10.019
Liver	0.573	0.1610	0.0138	0.0303	0.161	0.042	0.0120	9.2366
Lung	0.446	0.3360	0.0218	0.0162	0.005	0.0073	0.0125	8.2560
Muscle	0.630	0.0790	0.0167	0.0273	0.159	0.384	0.0290	3.9387
Skin	0.291	0.3820	0.0239 ^d	0.0180 ^d	0.058	0.1653	0.0156	5.1585
Spleen	0.579	0.2070	0.012	0.0107	0.002 ^c	0.0035	0.0184	6.3008
Plasma	---	---	0.096	0.0032	---	---	---	---
Arterial blood	---	---	---	---	---	0.0272 ^d	---	---
Venous blood	---	---	---	---	---	0.0544 ^d	---	---

^aThe mouse cardiac output value was estimated from the following allometric equation: $Q_c = 0.235 \times BW^{0.75}$; ^b Calculated from equation (7). ^c Calculated from equation (1) using the method of Rodgers and Rowland (Rodgers, Leahy et al. 2005) ^d Rat value (Poulin and Theil 2002); * ROB: rest of body

Then, using equations 1, 11 and 12, f_{u_t} can be expressed as:

$$f_{u_t} = \frac{f_{iw} \times \left(\frac{X}{Y} \right) + f_{ew}}{Kp_u} \quad (15)$$

where f_{iw} is the fractional tissue volume of intracellular water and f_{ew} fractional tissue volume of extracellular water. We used published tissue specific data (Rodgers, Leahy et al. 2005), and assumed that the tissue composition in protein is the same among rodent (Table I).

The active transports include, but are not limited to, apparent P-gp mediated efflux of the unbound drug from tissue to blood. This general mechanistic transport-based model can also account for additional efflux ($CL_{out,OT}$) and/or influx ($CL_{in,OT}$) transporters. We first only consider the contribution of apparent passive diffusion and P-gp mediated

transport in both tissues, setting thus to 0 the terms $CL_{in,OT}$ and $CL_{out,OT}$. The transport-based tissue model can also be used to investigate the involvement of additional transporters by setting to non-zero values the parameters $CL_{in,OT}$ and $CL_{out,OT}$. Compared to P-gp, there is limited knowledge for other transporters in terms of their activity and expression in mammalian tissues (Couture, Nash et al. 2006). Hence, influx and/or efflux clearances of non P-gp transporters can be extracted from the best fit of tissue-concentration data.

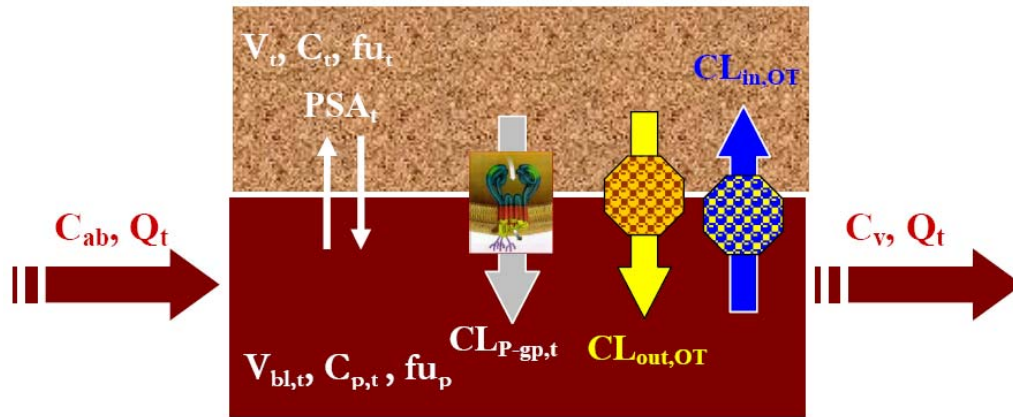


Figure 2. Diagram of the mechanistic transport-based tissue model that considers the passive transport of the drug, the P-gp mediated efflux transport, additional efflux transport and/or influx transport

The general mass balance equations defining the mechanistic transport-based model applied to heart and brain tissues (Figure 2) are described below:

Extravascular compartment (tissue)

$$\begin{aligned}
 V_t \times \frac{dC_t}{dt} = & \text{PSA}_t \times (fu_p \times C_{p,t} - fu_t \times C_t) \\
 & - fu_t \times C_t \times (CL_{P-gp,t} + CL_{out,OT}) \\
 & + fu_p \times C_{p,t} \times CL_{in,OT}
 \end{aligned} \tag{16}$$

Vascular compartment (blood)

$$\begin{aligned}
 V_{bl,t} \times \frac{dC_{v,t}}{dt} = & Q_t \times (C_{ab} - C_{v,t}) + \\
 & PSA_t \times (fu_t \times C_t - fu_p \times C_{p,t}) \\
 & + fu_t \times C_t \times (CL_{Pgp,t} + CL_{out,OT}) - fu_p \times C_{p,t} \times CL_{in,OT}
 \end{aligned} \tag{17}$$

2.3 Mouse-related parameters

Mouse tissue composition, tissue volume, and blood-flow rate into tissue were extracted from the literature (Brown, Delp et al. 1997; Poulin and Theil 2000; Poulin, Schoenlein et al. 2001); they are listed in Table I.

The total amount of hepatic cytochrome P450 in mouse, N_{CYP450} , was estimated by developing a log-log regression analysis that relates the total amount of N_{CYP450} of different mammalian species to their liver weight (Craigmill and Cortright 2002).

2.4 Distribution-related parameters required for the MTB model

The volume of blood in equilibrium with brain and heart tissues ($V_{bl,t}$) and the exchange surface area of the mouse blood-brain barrier were directly extracted from the literature (Kaliss and Pressman 1950; Bosse and Wassermann 1970; Khor, Bozigian et al. 1991; Pan and Kastin 2001; Cisternino, Mercier et al. 2004; Garberg, Ball et al. 2005; Park and Sinko 2005). Surface area (S_t) per gram of cardiac tissue, only available for humans or quantifiable from human data (Berne and Sperelakis 1979; Riviere 1999), were applied to mice. As the estimation of permeability-surface area product (PSA_t) and P-gp efflux ($CL_{P-gp,t}$) clearance of a P-gp substrate through blood-tissue membrane is a crucial information, we have developed the following three-step procedure to estimate these parameters for mouse brain and heart tissue.

2.4.1 Step I: Estimation of *in vitro* diffusion and P-gp efflux rates of a P-gp substrate through Caco-2 monolayer

Assuming the drug is mainly transported by P-gp and used at a dose below the transporters saturation limit, then apical to basolateral apparent permeability ($P_{app,ab}$) of drugs through Caco-2 monolayers results from the difference between apparent drug diffusion velocity ($P_{diff,in-vitro}$) and apparent P-gp efflux rate ($P_{P-gp,in-vitro}$). Basolateral to apical apparent permeability ($P_{app,ba}$) is the result of the additive action of the drug diffusion velocity along with P-gp efflux transport. Assuming that P-gp efflux rate is independent of the direction of diffusion, the *in vitro* estimation of the parameters of apparent drug diffusion and apparent P-gp efflux rates ($P_{diff,in-vitro}$ and $P_{P-gp,in-vitro}$) are calculated as follows:

$$P_{diff, in-vitro} = \frac{1}{2} \left(P_{app,ba} + P_{app,ab} \right) \quad (18)$$

$$P_{Pgp, in-vitro} = \frac{1}{2} \left(P_{app,ba} - P_{app,ab} \right) \quad (19)$$

where $P_{app,ba}$ and $P_{app,ab}$ values can be either directly measured through Caco-2 cells monolayers, or extracted from the literature.

2.4.2 Step II: *In vitro-in vivo* extrapolation of drug diffusion velocity and P-gp efflux rate parameters

We extrapolated *in vitro* P-gp efflux rate and diffusion velocity of P-gp substrates to the *in vivo* situation (Table II), applying linear regressions procedures to data published by Collett et al. (Collett, Tanianis-Hughes et al. 2004). Some data presented in Table II are also extracted literature (PubChem ; Mayer, Wagenaar et al. 1996; Sparreboom, van Asperen et al. 1997; Kim, Fromm et al. 1998; Beaumont, Harper et al. 2000; Jonker, Smit et al. 2000; Wishart, Knox et al. 2006).

Table II. Related parameters of the P-gp substrates used to establish linear regressions allowing the in vitro-in vivo extrapolation of diffusion and P-gp mediated efflux rates. Data were extracted from Collett and coworkers (Collett, Tanianis-Hughes et al. 2004).

	MW	LogP	P _{app,ab} ^{a,c} cm/s	P _{app,ba} ^{a,c} cm/s	V _{max} (P-gp) /K _m (P-gp) ^{a,c} cm/s	P _{diff,vitro} cm/s	P _{diff,vivo} ^b cm/s	P _{P-gp, vitro} cm/s	RAUC _{corr} ^b
Paclitaxel	854	3	2.1 x10 ⁻⁶	8.61 x10 ⁻⁶	2.1 x10 ⁻⁵	5.36x10 ⁻⁶	3.04x10 ⁻⁵	3.26x10 ⁻⁶	3.26
Digoxin	789	2.2	1.1 x10 ⁻⁶	7.15 x10 ⁻⁶	1.3 x10 ⁻⁵	4.13x10 ⁻⁶	3.08x10 ⁻⁵	3.03x10 ⁻⁶	1.03
Saquinavir	670	3.8	2.2 x10 ⁻⁶	1.21 x10 ⁻⁵	2.3 x10 ⁻⁵	7.15x10 ⁻⁶	2.77x10 ⁻⁵	4.95x10 ⁻⁶	6.5
Topotecan	421	0.8	1 x10 ⁻⁶	3.5 x10 ⁻⁶	1.2 x10 ⁻⁵	2.25x10 ⁻⁶	2.35x10 ⁻⁵	1.25x10 ⁻⁶	2*
Verapamil	454	4.7	1.5 x10 ⁻⁵	1.5 x10 ⁻⁵	0*	1.5 x10 ⁻⁵	NA	0*	NA
Talinolol	363.5	2.9	1.5 x10 ⁻⁶	1.5 x10 ⁻⁵	1.5 x10 ⁻⁵	6.0 x10 ⁻⁶	NA	4.50x10 ⁻⁶	NA
Rifampicin	822	2.7	2.0 x10 ⁻⁶	8.4 x10 ⁻⁶	2.2 x10 ⁻⁵	5.2 x10 ⁻⁶	NA	3.20x10 ⁻⁶	NA
UK 224,671	544	1.8	3.0 x10 ⁻⁷	8.4 x10 ⁻⁶	9.1 x10 ⁻⁶	3.2 x10 ⁻⁶	9.43x10 ⁻⁶	2.88x10 ⁻⁶	32**

^a In Caco-2 experiments, the used drug concentration reported in Collett and coworkers.(Collett, Tanianis-Hughes et al. 2004) are 7.5 μM for saquinavir , 20 μM for verapamil and rifampicin, 30 μM for paclitaxel and digoxin, 40 μM for topotecan, talinolol and UK 224,671

^b In *in vivo* experiments, the dose administered to mice reported in Collett and coworkers (Collett, Tanianis-Hughes et al. 2004) are 10 mg/kg of paclitaxel, 0.2 mg/kg of digoxin, 5 mg/kg of saquinavir and rifampicin, 2 mg/kg of UK 224,671, and 1 mg/kg of topotecan. Doses of verapamil and talinolol were not available.

^c pH 7.5 used in Caco-2 experiments(Collett, Tanianis-Hughes et al. 2004)

* No secretion ; ** assuming that RAUC reflects plasma ratio(Collett, Tanianis-Hughes et al. 2004)

The authors measured P_{app,ba} and P_{app,ab} of some drugs through Caco-2 cells monolayer as well as P_{app,ab} in the presence of a P-gp inhibitor (GF 120918). They determined the Michaelis-Menten kinetic parameters of active efflux transport, V_{max}(efflux) and K_m(efflux), of these drugs. Moreover, they compared oral plasma area under the curve (AUC) of these compounds in WT and KO mice. In order to consider only the effect of P-gp on intestinal absorption of drugs, we corrected the ratio of drug AUC_{oral} between species by removing the effect of P-gp involved in renal and biliary clearance on AUC_{oral}. We first estimated the effect (E_{IV-P-gp}) of the absence of P-gp on AUC_{IV} measured after IV injection, such as:

$$E_{IV-P-gp} = (AUC_{iv(KO)} - AUC_{iv(WT)}) / AUC_{iv(KO)} \quad (20)$$

Then, the corrected ratio of oral AUC between both mice strains is calculated as follows:

$$\begin{aligned}
 R_{AUC_{oral,corr}} &= AUC_{oral, KO,corr} / AUC_{oral,WT}, \\
 &= E_{IV-P_{gp}} \times AUC_{oral, KO} / AUC_{oral,WT}
 \end{aligned}
 \tag{21}$$

This ratio reflects the effect of P-gp mediated efflux in gut absorption

$$R_{AUC_{corr}} = \frac{AUC_{oral, KO, corr}}{AUC_{oral, WT}} \approx \frac{F_{abs, KO}}{F_{abs, WT}} \approx \frac{P_{diff, in-vivo}}{P_{diff, in-vivo} - P_{P_{gp}, in-vivo}}
 \tag{22}$$

where F_{abs} is the fraction of absorbed drug through the gastro-intestinal tract.

Then, we estimated *in vivo* diffusion velocity of these P-gp substrates through gut membrane from $R_{AUC,corr}$ value that we mechanistically approximated as follows:

$$P_{diff, in-vivo} \approx \frac{R_{AUC_{corr}}}{R_{AUC_{corr}} - 1} \times P_{P_{gp}, in-vivo} \equiv \frac{R_{AUC_{corr}}}{R_{AUC_{corr}} - 1} \times \frac{V_{max}(P-gp)}{K_m(P-gp)}
 \tag{23}$$

where $P_{P-gp, vivo}$ is approximated by the ratio $V_{max}(P-gp)/K_m(P-gp)$.

We used the reported *in vitro* values of $P_{app,a-b}$ and $P_{app,b-a}$, obtained in the presence and absence of P-gp inhibitor, to estimate $P_{diff, in-vivo}$ and $P_{P-gp, in-vivo}$ for each compound. Then, using S-Plus®, we assessed the correlations between *in vivo* $V_{max}(P-gp)/K_m(P-gp)$ and $P_{P-gp, in-vivo}$, and between $P_{diff, in-vivo}$ and $P_{diff, in-vitro}$ values of the drugs. These correlations are used to estimate apparent *in vivo* efflux rate of domperidone from $P_{P-gp, in-vitro}$ calculated in Step I.

As the tight junctions of the epithelium of the BBB contribute to the reduction of drug diffusion through this membrane, the diffusion velocity of the P-gp substrate under study through BBB was not estimated from measurement of apparent permeability through Caco-2 cells, but from *in vitro* measurement of its permeability through bovine brain capillary endothelial cells monolayer. This permeability value has been assigned a weight factor of 150, as suggested by Pardridge and coworkers (Pardridge, Triguero et al. 1990) for *in vitro* permeability compared to *in vivo* permeability values measured in rats.

2.4.3 Step III: Calculation of the permeability-surface area product (PSA_t) and P-gp-mediated efflux clearance ($CL_{P-gp,t}$) of the P-gp substrate into mice brain and heart.

The P-gp mediated efflux clearance has been found to be tissue-dependent (Makhey, Guo et al. 1998). Thus, P-gp expression levels in various tissues of WT mice (Muramatsu, Johnson et al. 2004) were used in our work to account for this tissue specificity. Since the Caco-2 cells line derives from human colon carcinoma and its characteristics are similar to intestinal epithelial cells, the intestinal tissue was chosen as the reference tissue for P-gp expression level. In each of the other mice tissues, the P-gp expression level has been estimated as a fraction of mice intestine P-gp expression ($F_{P-gp,t}$) and presented in Table III (Muramatsu, Johnson et al. 2004).

We estimated $CL_{P-gp,t}$ and PSA_t both expressed in L/min:

$$CL_{P-gp,t} = \frac{V_{\max} (P-gp)}{K_m (P-gp)} \times S_t \times F_{P-gp,t} \quad (24)$$

$$PSA_t = P_{\text{diff, in-vivo}} \times S_t \quad (25)$$

Table III. Additional physiological parameters required for the MTB tissue models applied to brain and heart

Tissue	V_{bl}^a (mL/100g tissue)	S_t^b (dm ² /g tissue)	$F_{P-gp,t}^c$	$CL_{P-gp,t}^d$ (L/min)	PSA_t^e (L/min)	$Cl_{out,OT}^f$ (L/min)
Brain	2 ^g	2 ^h	0.42	3.71×10 ⁻⁴	3.56×10 ⁻⁵	2.8×10 ⁻⁴
Heart	20 ⁱ	11.8 ^j	0.26	2.61×10 ⁻⁴	1.2×10 ⁻³	---

^a Volume of blood in equilibrium with tissue; ^b Exchange surface area ; ^c Relative fraction of mdr1a/1b mRNA expression in mice tissues compared to that in intestine, calculated from published data (Muramatsu, Johnson et al. 2004). We calculated the ratio of multidrug resistance PCR product to that of β -actin in each organ and we related these ratios to that obtained in mice intestine tissue.

^d P-gp efflux clearance; ^e Permeability-Surface area product ; ^f Parameter fitted to in vivo tissue concentrations; ^g Intermediate value of published values: 1.6uL/g brain (Cisternino, Mercier et al. 2004); 0.94 ug/g (Park and Sinko 2005) ; 3ug/g (Kaliss and Pressman 1950) ; ^h Intermediate value of those published (1.50-2.40 dm²/g tissue) (Pan and Kastin 2001; Garberg, Ball et al. 2005); ⁱ Rat value (Khor, Bozigian et al. 1991). Same ratio was found in guinea pigs (Bosse and Wassermann 1970); ^j Human data applied to mice: Surface area of cardiac capillaries (Berne and Sperelakis 1979)

2.5 Assessing drug distribution in tissues expressing P-gp

To investigate the ability of the developed PBPK model to assess the impact of P-gp activity modulation, we used tissue concentration of ^3H -domperidone measured in adult male FVB WT and *mdr1a/1b* (-/-) KO mice after an IV injection at the target dose of 5mg/kg. Blood, plasma, cerebral and cardiac tissue concentrations were available at 4 and 120 min post dose, while WT liver concentrations were available at 4, 7, 15, 30, 60 and 120 min post-dose. While the accessible data set in heart and brain tissues was limited in terms of the number of time points, it had the potential of asserting the quality of the model in those most strategic and informative regions of the lineshape, ie, near the peak concentration and at the elimination phase. We have also exploited a full data set available for WT liver to encompass the important aspect of hepatic disposition. The domperidone physicochemical characteristics required as input parameters to the model are extracted from literature (Barone 1999) (Heykants, Knaeps et al. 1981) and presented in Table IV.

Table IV. Physico-chemical parameters of domperidone

Physico-chemical parameters	Values	References
Molecular weight	426	(Barone 1999)
pKa	7.89	(Barone 1999)
Octanol-Water partition coefficient (LogP)	3.35	EPIsuite (2005)
Olive oil:water partition coefficient (LogP')	1.77 ^a	(Poulin, Schoenlein et al. 2001)
Fraction unbound to plasma protein ($f_{u,p}$)	0.08	(Heykants, Knaeps et al. 1981)
Blood:plasma ratio (BP)	0.92	(Heykants, Knaeps et al. 1981)

^a Calculated from $\text{LogP}' = (1.115 \times \text{LogP} - 1.35)$ (Poulin, Schoenlein et al. 2001)

3. Results

3.1 Estimation of metabolic parameters

Since the drug was administered intravenously, the liver was considered as the only site of clearance by metabolism. We extrapolated N_{CYP450} to a value of 14 nmol for a 30g BW mouse from the log-log regression calculated from published data (Craigmill and Cortright 2002) and presented in Figure 3. The kinetic parameters of domperidone biotransformation, $K_m(\text{P450})$ and $V_{\text{max}(\text{P450})}$, were estimated to 130 μM and 4.6 nmol/nmolP450/min, respectively.

3.2 Estimation of distribution parameters for WS and MTB models

The tissue-to-plasma partition coefficients of domperidone determined by the tissue-composition-based-approach (Rodgers, Leahy et al. 2005) are listed in Table I. Results of the three-step procedure developed above to estimate PSA_t and $\text{CL}_{\text{P-gp,t}}$ rates of domperidone through blood-tissue membrane are presented in Figure 4. Positive linear correlations ($V_{\text{max}(\text{P-gp})}/K_m(\text{P-gp}) = 4.75 \times P_{\text{P-gp},in-vitro}$, $R^2 = 0.92$, no intercept, S-Plus®) were found between $V_{\text{max}(\text{P-gp})}/K_m(\text{P-gp})$ and $P_{\text{P-gp},in-vitro}$ as well as between $P_{\text{diff},in-vivo}$ and $P_{\text{diff},in-vitro}$. ($P_{\text{diff},in-vivo} = 5.1 \times P_{\text{diff},in-vitro}$, $R^2 = 0.89$, no intercept, S-Plus®). These correlations were used to estimate $P_{\text{diff},in-vivo}$ and $V_{\text{max}(\text{P-gp})}/K_m(\text{P-gp})$ of domperidone from $P_{\text{P-gp},in-vitro}$ and $P_{\text{diff},in-vitro}$ calculated in Step I. Finally, the third step gave rise to values of PSA_t , and $\text{CL}_{\text{P-gp,t}}$ that we reported in Table II along with values of S_t and $F_{\text{P-gp,t}}$.

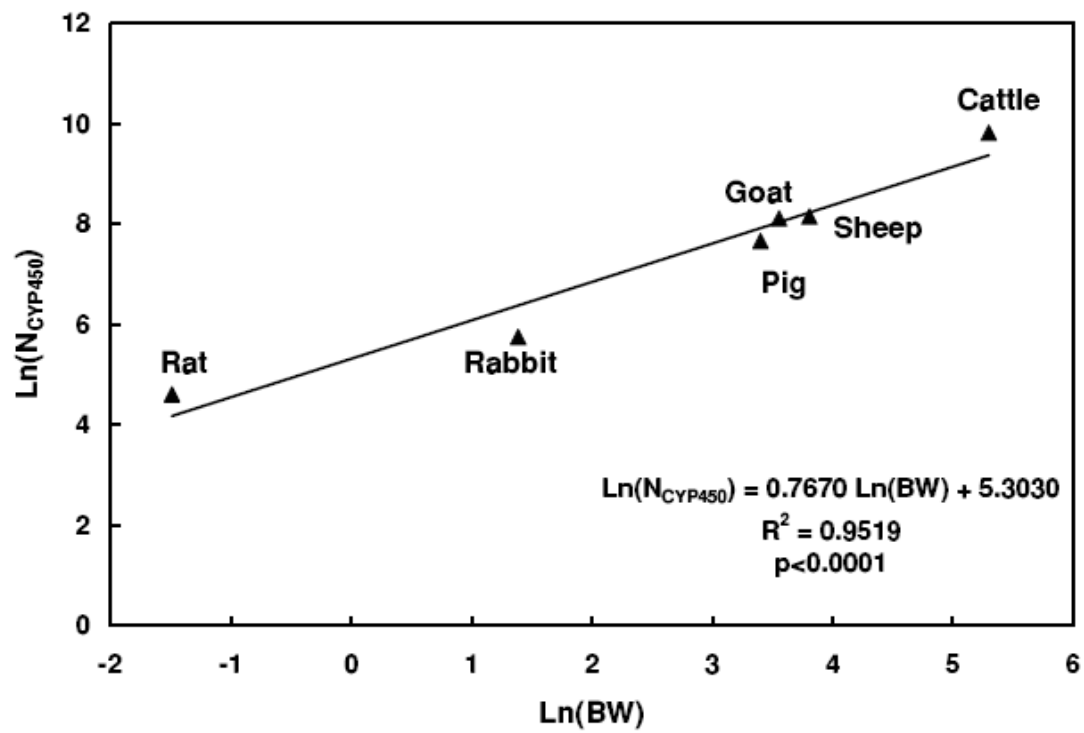


Figure 3. Log-Log relationship between the amount of hepatic CYP450 and the body weight of various mammalian species. Data from Craigmill et al., 2002 (Craigmill and Cortright 2002)

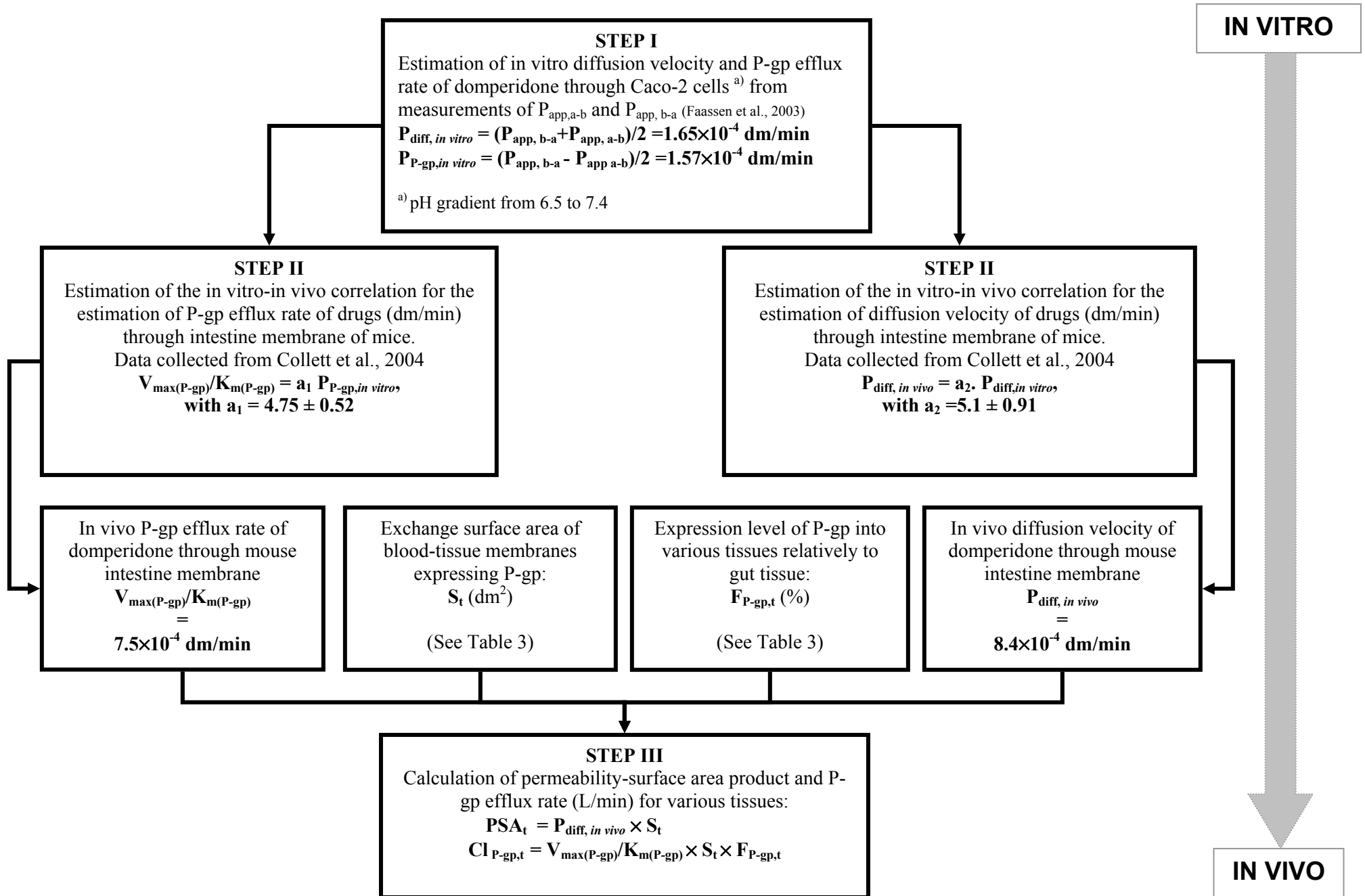


Figure 4. Illustration of the three-step procedure developed to estimate in vivo apparent diffusion and P-gp efflux rates of domperidone through capillary membrane of the mouse brain and heart.

3.3 WS Model

The concentration-time profiles of domperidone simulated in tissues using the WS model are presented in Figure 5. Only tissues for which experimental data were available are shown. The WS model successfully simulated the time-concentration profile of domperidone in hepatic tissue, indicating that the drug disposition in the main eliminating organ was adequately characterized. However, the WS model tends to overestimate domperidone concentrations in heart and brain tissues, which is likely to be related to a poor estimation of tissue-to-plasma partition coefficients for these tissues. The most important over-prediction of drug concentration is obtained in brain tissue. The predicted peak concentration in this tissue, regardless of the mice strain, was 8.5 mg/L, compared to a maximum measured concentration less than 0.03 mg/L and 0.22 mg/L, for WT mouse and KO mouse, respectively. As, by definition, this model is not suited to account for both active and passive transport mechanisms effect on drug distribution, a MTB model is applied to heart and brain tissues.

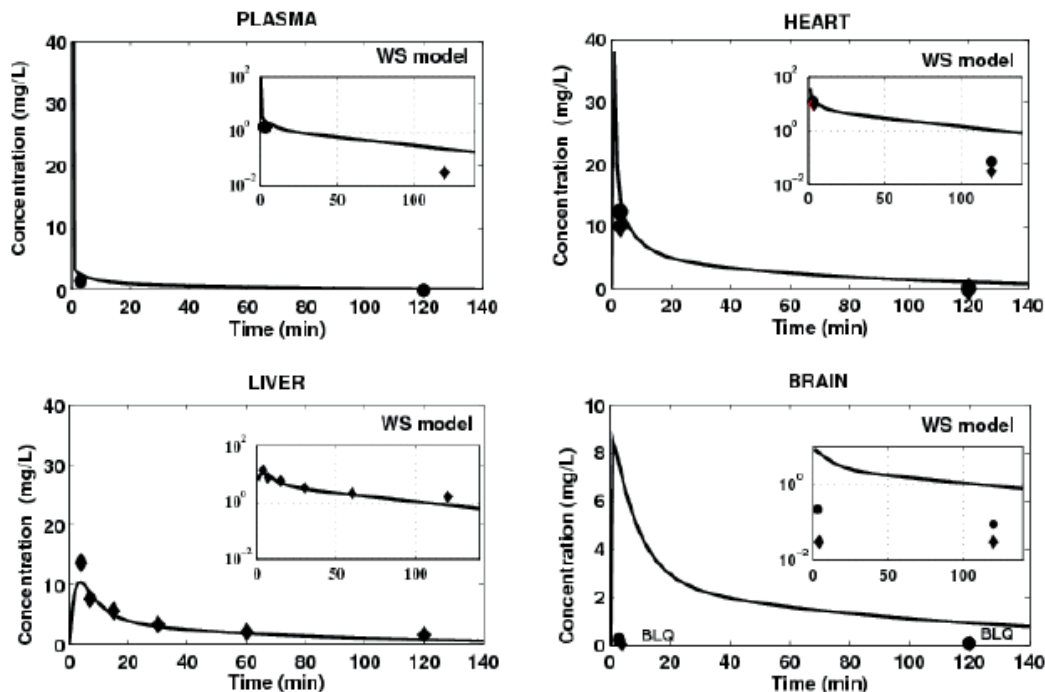


Figure 5. Prediction of tissue concentration of domperidone using the WS model (black line) in any tissue/organ included in the PBPK model. Tissue concentration measured in WT mice (black lozenge) and KO mice (black circle) after IV administration of 5mg/kg of domperidone. BLQ = Below Limit of Quantification

3.4 MTB Models: Accounting only for P-gp Efflux Activity in Heart and Brain

P-gp has a protective function by limiting drug accumulation into heart and brain tissues (Ayrton and Morgan 2001; Fromm 2003). Therefore, we applied the MTB model to these tissues, and the WS model to all other tissues. The PBPK simulation results are illustrated in Figure 6. While the simulated effect of P-gp tends to be slightly lower than the observed one, the MTB model captures the peak concentration of domperidone for both mice strains in heart tissue. These results suggest that the apparent diffusion, rather than active transport, is the main transport mechanism of drug distribution in heart tissue.

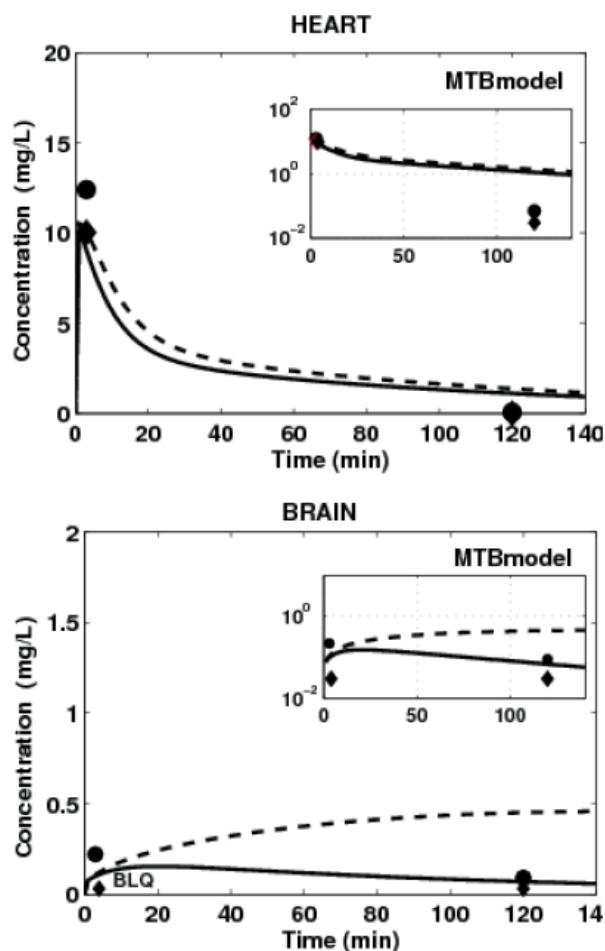


Figure 6. Prediction of tissue concentration of domperidone in WT (black line) and KO (black dashed line) mice using the mechanistic transport based tissue model with passive and P-gp mediated efflux transports for heart and brain. Tissue concentration measured in WT mice (black lozenge) and KO mice (black circle) after IV administration of 5mg/kg of domperidone. BLQ= Below Limit of Quantification.

The MTB model significantly improves the WS model results in brain tissue, but it still tends to overestimate domperidone terminal concentration. In light of the above results, we were tempted to consider involvement of additional efflux membrane transporters in domperidone distribution in brain tissue (Figure 7). We derived its efflux clearance $CL_{out,OT}$ by keeping diffusion and P-gp-mediated efflux parameters identical to those used for the brain MTB model while varying $CL_{out,OT}$ parameter in order to fit simulated profiles to the available brain concentrations. In this case, the simulated concentration-time curves capture those terminal time points measured in brain tissue of both mice strains, but fail to reproduce the time-point concentration at 2 min post-dose. The trend of drug concentration profile in brain tissue simulated in the absence of P-gp activity but in the presence of additional efflux transporter is now in accordance with *in vivo* data (Figure 7, dashed line). When compared to the WS model simulations, these results suggest that the apparent passive and active transport mechanisms are limiting processes of drug distribution in brain tissue.

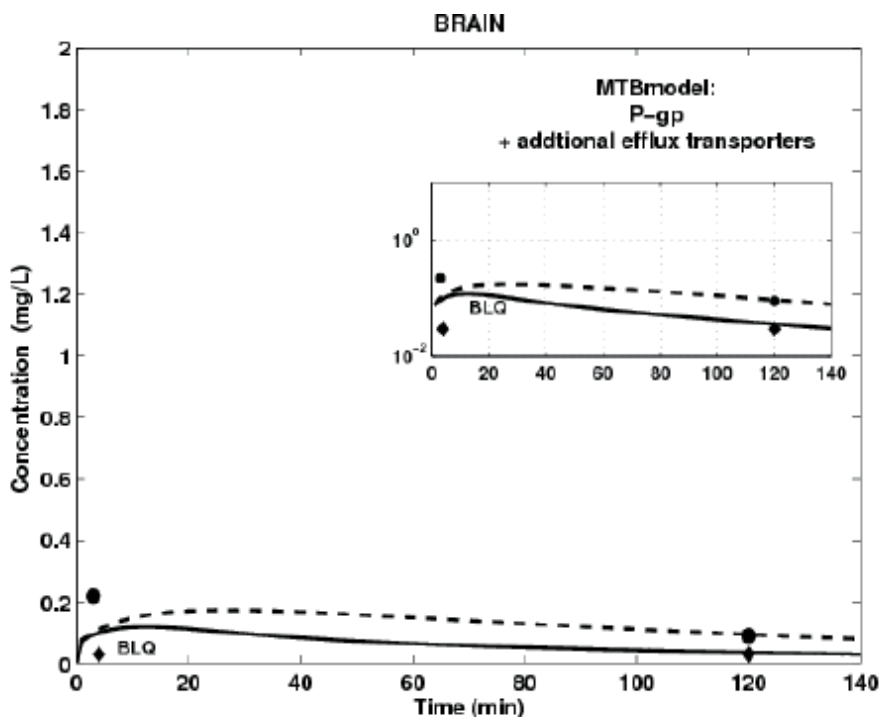


Figure 7. Prediction of brain concentration of domperidone in WT (black line) and KO (black dashed line) mice using the MTB tissue model with passive transport, P-gp mediated efflux transport and additional efflux transport model for brain. Tissue concentration measured in WT mice (black lozenge) and KO mice (black circle) after IV administration of 5mg/kg of domperidone. BLQ= Below Limit of Quantification.

The PBPK model that has been retained at the end of the modeling process comprises the MTB model for heart and brain tissues, and the WS model for all other tissues. When applied to heart tissue, the MTB model involves apparent passive diffusion and P-gp-mediated transports. For brain, the MTB model involves apparent passive diffusion, P-gp mediated transports and a potential additional efflux transport. However, this assumption should be further studied through a sensitivity analysis and additional *in vitro* and *in vivo* experiments.

4. Discussion

The whole-body PBPK model developed herein aimed to shed light, prior to *in vivo* experiments, on drug distribution in tissues expressing ABC transporters, by including apparent active and passive transport processes. The model integrates the latest knowledge on the most studied ABC membrane transporters expressed in various tissues and organs. This is done by extrapolating *in vitro* drug permeability measurements across cells monolayers to *in vivo* conditions. This was performed with a three-step procedure proposed and developed herein, which allowed the estimation of the drug transport-related parameters without having recourse to data fitting. The proposed approach has to be used and interpreted with some caution in terms of the considered hypothesis and extrapolations. First, additional to P-gp, Caco-2 system can also express other transporters such as MRP and OATPs (Seithel, Karlsson et al. 2006; Hayeshi, Hilgendorf et al. 2008). Hence, the *in vitro* estimated active transport rate may include the contribution of these additional transporters. However, it may be possible to isolate the effect of P-gp by adding a specific P-gp inhibitor, when performing Caco-2 experiments. Moreover, we have performed the *in vitro*-*in vivo* regression analysis of apparent diffusion and efflux transport by using a restricted data set (Collett, Tanianis-Hughes et al. 2004). Once additional information regarding Caco-2 essays and *in vivo* experiments using KO and WT mice becomes available for additional compounds, the quality and robustness of this analysis can be improved, reducing thus the uncertainty pertaining to the extrapolation procedure outside the range of permeability and drug efflux used for the correlation.

This study focused on the mechanisms of drug distribution in non-eliminating tissues expressing P-gp transporters, namely brain and heart. It was also prompted by the need to improve the ability of the PBPK approach to predict the impact of P-gp activity modulation on tissue distribution of P-gp substrates. Indeed, while the clinical importance of cardio-active agents in terms of efficacy and toxicity is well acknowledged, kinetics of drug transport into the myocardium has drawn little attention so far. Since many cardiovascular active compounds are subject to drug transport by ABC transporters, their expression in heart may strongly influence therapeutic or cardiotoxic effects (Couture, Nash et al. 2006). However, the protective function of P-gp in heart tissue was not obvious from the present results.

Moreover, the multiplicity of drug transporters along with their complex nature at the BBB prevent a better understanding of the penetration mechanism of lipophilic compounds through this barrier (Golden and Pollack 2003). Few physiologically based models have been developed to characterize drug distribution in brain tissues, mainly because of the complex anatomy of the central nervous system and the unavailability of physiological parameters (Kim, Sandberg et al. 2001; de Lange 2004). Whereas the mechanisms involved in drug disposition into brain are not fully understood, some authors (de Lange and Danhof 2002) have raised the potential benefit of using physiologically based compartment models to determine the rate of entry of drugs into and their distribution over the brain compartment. The proposed PBPK model pointed out to the protective function of P-gp against drug accumulation, which effect adds to the existing passive transport at the BBB.

So far, standard PBPK models have been generally composed of compartments that assume perfusion-rate limited (WS), permeability-rate limited, or sometimes, dispersion-rate limited models, the latter have not been discussed here. The WS principle was applied in this work as a first approximation model of drug distribution in each tissue included in our PBPK model. The main drawback of the WS model is its inability to capture the effect of transporters activity on P-gp substrate disposition. In such a case, its application can underpredict or overpredict drug concentration in target tissues (Poulin and Theil 2002). This has been confirmed in the present study where the main deviation

between the model predictions and the measured concentration of domperidone was observed in the brain tissue. This deviation can be attributed to the bias in the estimated brain-to-plasma partition coefficient value (Poulin and Theil 2000) since this coefficient does not account for active transport processes. Indeed, a significant overestimation of this parameter has already been noticed for another P-gp substrate, diazepam (Poulin and Theil 2002), and this bias translated into an overestimation of the brain concentration-time profile by at least a factor of three. However, this has neither been observed for ethoxybenzamide, a non-P-gp substrate, nor for propranolol (Poulin and Theil 2002), a P-gp substrate (Yang, Kim et al. 2000). In the case of propranolol, P-gp was probably saturated (Polli, Wring et al. 2001; Stephens, O'Neill et al. 2002) at the concentrations used (Poulin and Theil 2002), such that the diffusion process prevails on P-gp efflux transport. All this suggests that the WS model does not adequately describe disposition of P-gp substrate drugs in tissues where P-gp, when not saturated, have a significant protective function. Hence, it is natural to consider transport-based mechanisms as the next step in modeling domperidone distribution within the brain. These transport mechanisms can occur at the capillary or at the cellular membrane (Nestorov 2003). The cellular level of tissue subdivision can be used to investigate the impact of transporters activity modulation in drug distribution by including an influx/efflux clearance term at the cellular membrane (Kawahara, Sakata et al. 1999). However, this cellular subdivision asks for an increased amount of information which is rarely accessible without recurring to fitting procedures (Nestorov 2003) (Kawahara, Sakata et al. 1999). In the proposed MTB model, we divided non-eliminating tissues in two sub-compartments separated by the capillary membrane, where apparent passive diffusion and active transports occur, minimizing thus physiological information needed for passive and P-gp mediated active transports. This approach brings additional informative elements around the mechanisms involved in drug distribution within non eliminating tissues expressing P-gp.

5. Conclusion

This paper was devoted to set up the fundamental mechanisms underlying distribution of drugs when active transporters are involved. The latest knowledge on P-gp transporters

in heart and brain has been integrated. The proposed PBPK model has been defined for a mouse with average physiologic parameters, extrapolated within species and using *in vitro-in vivo* correlations. The next logical step in this process of model development will be to explore the behaviour of this PBPK model in terms of uncertainty and variability of its parameters. With the progress in acquiring quantitative knowledge on transporters, the procedure proposed in this work could be adapted for different drugs and transporters by taking into account their intrinsic characteristics.

6 Abbreviations

The abbreviations of the parameters used herein refer to: ATP Binding Cassette Transporters (ABC transporters); blood-brain barrier (BBB); blood-plasma ratio (BP); Body weight (BW in g); drug concentration (C in mg/L); clearance (CL in L/min); cytochrome P450 (CYP450); hepatic extraction coefficient (Eh); fraction of expression level of a transporter in a tissue (F); unbound fraction of drug (f_u); affinity constant (Km in μM); knockout-mice (KO); mechanistic transport-based model (MTB); amount of cytochrome P450 (N_{CYP450} in nmol); apical to basolateral apparent permeability through the Caco-2 monolayer ($P_{\text{app,ab}}$ in dm/min); basolateral to apical apparent permeability through the Caco-2 monolayer ($P_{\text{app,ba}}$ in dm/min); physiologically based pharmacokinetic (PBPK); in vitro diffusion velocity of the drug through the Caco-2 monolayer ($P_{\text{diff,in vitro}}$ in dm/min); P-glycoprotein (P-gp); in vitro P-gp efflux rate ($P_{\text{P-gp,in vitro}}$ in dm/min); tissue-plasma partition coefficient (P_{tp}); permeability-surface area product (PSA in L/min); blood flow (Q in L/min); ratio of corrected plasma AUC measurements between WT and KO mice ($R_{\text{AUC,corr}}$); exchange surface area separating vascular space from extravascular space (S_t in dm^2); volume (V in L); maximum velocity of CYP450 biotransformation ($V_{\text{max(P450)}}$ in nmol/nmolP450/min); maximum velocity of P-gp mediated efflux ($V_{\text{max(P-gp)}}$ in nmol/hr/cm²); well-stirred model (WS); wild-type mice (WT).

The subscripts used refer to : arterial blood (ab); gut (g); liver (li); lung (lg); heart (ht); kidneys (k); spleen (sp); venous blood (vb); plasma (p); tissue (t); blood in equilibrium

with tissue (bl,t); other influx transporters (in,OT); other efflux transporters (out,OT); intrinsic clearance (int); microsomes (mic).

7 Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests.

8 Author's Contribution

FF has conducted the whole study including the results, outline, writing, and editing of the manuscript. The conception of this work has been conducted under the main supervision of FN who has been involved in the writing and revising this paper for its intellectual content. JT assured the co-supervision and access to experimental data collected on WT and KO mice, mainly provided by LC. VM contributed to measurement of Michaelis-Menten parameters of domperidone biotransformation in mice liver microsomes. JL contributed to the critic of the results and contents.

9 Acknowledgements

This work has been supported by FRSQ and FQRNT grants held by Frederique Fenneteau. The Mathematical Centre of Excellence (MITACS) is also acknowledged for their support. Financial support of the NSERC is held by Dr. Fahima Nekka.

References

- Austin, R. P., P. Barton, et al. (2002). "The influence of nonspecific microsomal binding on apparent intrinsic clearance, and its prediction from physicochemical properties." Drug Metab Dispos **30**(12): 1497-503.
- Ayrton, A. and P. Morgan (2001). "Role of transport proteins in drug absorption, distribution and excretion." Xenobiotica **31**(8/9): 469-497.
- Barone, J. A. (1999). "Domperidone: A peripherally Acting Dopamine₂-receptor antagonist." Ann. Pharmacol. **33**: 429-440.
- Beaumont, K., A. Harper, et al. (2000). "The role of P-glycoprotein in determining the oral absorption and clearance of the NK2 antagonist, UK-224,671." Eur J Pharm Sci **12**(1): 41-50.
- Berne, R. M. and N. Sperelakis (1979). Handbook of physiology : the Cardiovascular System
- Bosse, J. A. and O. Wassermann (1970). "On the blood content of guinea-pig tissues." Pharmacology **4**(5): 273-7.
- Brown, R. P., M. D. Delp, et al. (1997). "Physiologically parameter values for physiologically based pharmacokinetic models." Toxicol. Ind. Health **13**(4): 407-483.
- Cameron, H. A., A. J. Reyntjens, et al. (1985). "Cardiac arrest after treatment with intravenous domperidone." Br. Med. J. **290**: 160.
- Cisternino, S., C. Mercier, et al. (2004). "Expression, up-regulation, and transport activity of the multidrug-resistance protein Abcg2 at the mouse blood-brain barrier." Cancer Res. **64**(9): 3296-3301.
- Collett, A., J. Tanianis-Hughes, et al. (2004). "Predicting P-glycoprotein effects on oral absorption: correlation of transport in Caco-2 with drug pharmacokinetics in wild-type and mdr1a(-/-) mice in vivo." Pharm. Res. **21**(5): 819-826.
- Couture, L., J. A. Nash, et al. (2006). "The ATP-binding cassette transporters and their implication in drug disposition: a special look at the heart." Pharmacol. Rev. **58**(2): 244-258.
- Craigmill, A. L. and K. A. Cortright (2002). "Interspecies considerations in the evaluation of human food safety for veterinary drugs." AAPS Pharm. Sci. **4**(4): E34.
- de Lange, E. C. (2004). "Potential role of ABC transporters as a detoxification system at the blood-CSF barrier." Adv Drug Deliv Rev **56**(12): 1793-809.
- de Lange, E. C. and M. Danhof (2002). "Considerations in the use of cerebrospinal fluid pharmacokinetics to predict brain target concentrations in the clinical setting: implications of the barriers between blood and brain." Clin Pharmacokinet **41**(10): 691-703.
- Episuite. (2005). "U.S Environmental Protection Agency: Exposure Assessment Tools and Models." from <http://www.epa.gov/opptintr/exposure/pubs/episuite.htm>
- Faassen, F., G. Vogel, et al. (2003). "Caco-2 permeability, P-glycoprotein transport ratios and brain penetration of heterocyclic drugs." Int. J. Pharm. **263**(1-2): 113-122.
- Fromm, M. F. (2003). "Importance of P-glycoprotein for drug disposition in humans." Eur. J. Clin. Invest. **33**(suppl. 2): 6-9.
- Garberg, P., M. Ball, et al. (2005). "In vitro models for the blood-brain barrier." Toxicol In Vitro **19**(3): 299-334.
- Golden, P. L. and G. M. Pollack (2003). "Blood-brain barrier efflux transport." J. Pharm. Sci. **92**(9): 1739-1753.
- Greenblatt, D. J. and L. L. von Moltke (2005). "Interaction of warfarin with drugs, natural substances, and foods." J. Clin. Pharmacol. **45**(2): 127-132.
- Harris, R. Z., G. R. Jang, et al. (2003). "Dietary effects on drug metabolism and transport." Clin. Pharmacokinet. **42**(13): 1071-1088.

- Hayeshi, R., C. Hilgendorf, et al. (2008). "Comparison of drug transporter gene expression and functionality in Caco-2 cells from 10 different laboratories." Eur J Pharm Sci.
- Heykants, J., A. Knaeps, et al. (1981). "On the pharmacokinetics of domperidone in animals and man. I. Plasma levels of domperidone in rats and dogs. Age related adsorption and passage through the blood brain barrier in rats." Eur. J. Drug Met. Pharmacokinet. **6**(1): 27-36.
- Jonker, J. W., J. W. Smit, et al. (2000). "Role of breast cancer resistance protein in the bioavailability and fetal penetration of topotecan." J Natl Cancer Inst **92**(20): 1651-6.
- Kaliss, N. and D. Pressman (1950). "Plasma and blood volumes of mouse organs, as determined with radioactive iodoproteins." Proc Soc Exp Biol Med **75**(1): 16-20.
- Kawahara, M., A. Sakata, et al. (1999). "Physiologically based pharmacokinetics of digoxin in *mdr1a* knockout mice." J Pharm Sci **88**(12): 1281-7.
- Khor, S., H. Bozigan, et al. (1991). "Potential error in the measurement of tissue to blood distribution coefficients in physiological pharmacokinetic modeling. Residual tissue blood. II. Distribution of phencyclidine in the rat." Drug Metab Dispos **19**(2): 486-90.
- Kim, C. S., J. A. Sandberg, et al. (2001). "Quantitative exposure assessment: application of physiologically-based pharmacokinetic (PBPK) modeling of low-dose, long-term exposures of organic acid toxicant in the brain." Environ. Toxicol. Pharmacol. **9**(4): 153-160.
- Kim, R. B., M. F. Fromm, et al. (1998). "The drug transporter P-glycoprotein limits oral absorption and brain entry of HIV-1 protease inhibitors." J Clin Invest **101**(2): 289-94.
- Luttringer, O., F. Theil, et al. (2003). "Physiologically Based Pharmacokinetic (PBPK) Modeling of Disposition of Epiroprim in Humans." J. Pharm. Sci. **92**(10): 1990-2007.
- Makhey, V. D., A. Guo, et al. (1998). "Characterization of the regional intestinal kinetics of drug efflux in rat and human intestine and in Caco-2 cells." Pharm. Res. **15**(8): 1160-1167.
- Mayer, U., E. Wagenaar, et al. (1996). "Substantial excretion of digoxin via the intestinal mucosa and prevention of long term digoxin accumulation in the brain by *mdr1a* P-glycoprotein." Br. J. Pharmacol. **119**(5): 1038-44.
- McCabe, B. J. (2004). "Prevention of food-drug interactions with special emphasis on older adults." Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care **7**(1): 21-26.
- Muramatsu, T., D. R. Johnson, et al. (2004). "Age-related differences in vincristine toxicity and biodistribution in wild-type and transporter-deficient mice." Oncol. Res. **14**(7-8): 331-343.
- Nestorov, I. (2003). "Whole Body Pharmacokinetic Models." Clin Pharmacokinet **42**(10): 883-908.
- Obach, R. S. (1999). "Prediction of human clearance of twenty-nine drugs from hepatic microsomal intrinsic clearance data: an examination of in vitro half-life approach and non specific binding to microsomes." Drug. Met. Disp. **27**(11): 1350-1359.
- Osborne, R. J., M. L. Slevin, et al. (1985). "Cardiotoxicity of intravenous domperidone." Lancet: 385.
- Pan, W. and A. J. Kastin (2001). "Upregulation of the transport system for TNF α at the blood-brain barrier." Arch. Physiol. Biochem. **109**(4): 350-3.
- Pang, K. S. and M. Rowland (1977). "Hepatic clearance of drugs. I. Theoretical considerations of a "well-stirred" model and a "parallel tube" model. Influence of hepatic blood flow, plasma and blood cell binding, and the hepatocellular enzymatic activity on hepatic drug clearance." J Pharmacokinet Biopharm **5**(6): 625-53.
- Pardridge, W. M., D. Triguero, et al. (1990). "Comparison of in vitro and in vivo models of drug transcytosis through the blood brain barrier." J. Pharmacol. Exp. Ther. **253**(2): 884-891.
- Park, S. and P. J. Sinko (2005). "P-glycoprotein and multidrug resistance-associated proteins limit the brain uptake of saquinavir in mice." J Pharmacol Exp Ther **312**(3): 1249-56.
- Polli, J. W., S. A. Wring, et al. (2001). "Rational use of in vitro P-glycoprotein assays in drug discovery." J. Pharmacol. Exp. Ther. **299**(2): 620-628.

- Poulin, P., K. Schoenlein, et al. (2001). "Prediction of Adipose Tissue:Plasma Partition Coefficients for Structurally Unrelated Drugs." J. Pharm. Sci. **90**(4): 436-447.
- Poulin, P. and F. Theil (2000). "A priori Prediction of Tissue:Plasma Partition Coefficients of Drugs to Facilitate the Use of Physiologically-Based Pharmacokinetic Models in Drug Discovery." J. Pharm. Sci. **89**(1): 16-35.
- Poulin, P. and F. Theil (2002). "Prediction of Pharmacokinetics prior to in Vivo Studies. II. Generic Physiologically Based Pharmacokinetic Models of Drug Disposition." J. Pharm. Sci. **91**(5): 1358-1370.
- PubChem "www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov."
- Quinn, N., D. Parkes, et al. (1985). "Cardiotoxicity of domperidone." lancet.
- Riviere, J. E. (1999). Comparative Pharmacokinetics: Principles, Techniques, and Applications. Raleigh, North Carolina, Blackwell Publishing Limited.
- Rodgers, T., D. Leahy, et al. (2005). "Physiologically based pharmacokinetic modeling 1: predicting the tissue distribution of moderate-to-strong bases." J Pharm Sci **94**(6): 1259-76.
- Rowland, M., L. Balant, et al. (2004). "Physiologically based pharmacokinetics in drug development and regulatory science: a workshop report (Georgetown University, Washington, DC, May 29-30, 2002)." AAPS PharmSci. **6**(1): E6.
- Schinkel, A. H., U. Mayer, et al. (1997). "Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking mdr1-type (drug transporting) P-glycoproteins." Proc. Natl. Acad. Sci. **94**: 4028-4033.
- Schinkel, A. H., C. A. Mol, et al. (1995). "Multidrug resistance and the role of P-glycoprotein knockout mice." Eur J Cancer **31A**(7-8): 1295-8.
- Schinkel, A. H., J. J. Smit, et al. (1994). "Disruption of the mouse mdr1a P-glycoprotein gene to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs." Cell. **77**(4): 491-502.
- Schinkel, A. H., E. Wagenaar, et al. (1995). "Absence of the mdr1a P-Glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin, and cyclosporin A." J Clin Invest **96**(4): 1698-705.
- Seithel, A., J. Karlsson, et al. (2006). "Variability in mRNA expression of ABC- and SLC-transporters in human intestinal cells: comparison between human segments and Caco-2 cells." Eur J Pharm Sci **28**(4): 291-9.
- Sparreboom, A., J. van Asperen, et al. (1997). "Limited oral bioavailability and active epithelial excretion of paclitaxel (Taxol) caused by P-glycoprotein in the intestine." Proc. Natl. Acad. Sci. **94**: 2031-2035.
- Stephens, R. H., C. A. O'Neill, et al. (2002). "Resolution of P-glycoprotein and non P-glycoprotein effects on drug permeability using intestinal tissue from mdr1a(-/-) mice." Br. J. Pharmacol. **135**(8): 2038-2046.
- van Asperen, J., O. van Tellingen, et al. (1999). "Increased accumulation of doxorubicin and doxorubicinol in cardiac tissue of mice lacking mdr1a P-glycoprotein." Br. J. Cancer **79**: 108-113.
- Wishart, D., C. Knox, et al. (2006). "DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration." Nucleic Acids Res **34**(1): D668-72.
- Yang, J. J., K. J. Kim, et al. (2000). "Role of P-glycoprotein in restricting propranolol transport in cultured rabbit conjunctival epithelial cell layers." Pharm. Res. **17**(5): 533-538.

CHAPITRE III

**ASSESSING DRUG DISTRIBUTION IN TISSUES
EXPRESSING P-GLYCOPROTEIN THROUGH
PHYSIOLOGICALLY BASED
PHARMACOKINETIC MODELING:
A GLOBAL SENSITIVITY ANALYSIS FOR THE
IDENTIFICATION OF IMPORTANT MODEL
PARAMETERS**

Frédérique Fenneteau¹, Jun Li^{1,2}, Fahima Nekka¹

¹ Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, CP 6128, Succ. Centre Ville, Montreal, Québec, H3C 3J7 Canada

² Centre de Recherche en Mathématiques., Université de Montréal, CP 6128, Succ. Centre Ville, Montreal, Québec, H3C 3J7 Canada

Corresponding author:

Fahima Nekka

C.P. 6128, Succursale Centre Ville

Montréal, Québec

H3C 3J7

Article publié en ligne dans le

Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics, 2009 Oct 22. [Epub ahead of print]

Abstract

Background: The structural complexity of a PBPK model is usually accompanied with significant uncertainty in estimating its input parameters. In the last decade, the global sensitivity analysis (GSA), which takes the variability of all input parameters simultaneously as well as their correlations, has gained a wide attention as a powerful probing technique to identify and control biological model uncertainties. However, the current sensitivity analysis techniques used in PBPK modeling often place the correlation between these input parameters in a second place.

Objectives: We introduce a new strategy in the PBPK modeling field to investigate how the uncertainty and variability of correlated physiological parameters influence the outcomes of the drug distribution process based on a model we recently developed to explain and predict drug distribution in tissues expressing P-glycoprotein (P-gp). As direct results, we will also identify the most important input parameters having the largest contribution to the variability and uncertainty of model outcomes.

Method: We combined multivariate random sampling with a ranking procedure. Monte-Carlo simulations were performed on the PBPK model with eighteen input parameters. Log-normal distributions were assumed for these parameters according to literature and their reported correlations were also included. A multivariate sensitivity analysis was then performed to identify the input parameters with the greatest influence on model predictions. The partial rank correlation coefficients (PRCC) were calculated to establish the input-output relationships.

Results: A moderate variability of predicted C_{last} and C_{max} was observed in liver, heart and brain tissues in the presence or absence of P-gp activity. The major statistical difference in model outcomes of the predicted median values has been obtained in brain tissue. PRCC calculation confirmed the importance for a better quantitative characterisation of parameters related to the passive diffusion and active transport of the unbound drug through the blood-tissue membrane in heart and brain. This approach has also identified as important parameters those related to the drug metabolism for the prediction of model outcomes in liver and plasma.

Conclusion: The proposed Monte-Carlo/PRCC approach was aimed to address the effect of inputs correlation in a PBPK model. It allowed the identification of important input parameters that require additional attention in research for strengthening the

physiological knowledge of drug distribution in mammalian tissues expressing P-gp, thereby reducing the uncertainty of model predictions.

Keywords: PBPK; GSA; Input Correlation; PRCC; Brain; Heart; Transporters;

1. Introduction

Recently, the progress in *in silico/in vitro* based methodologies has allowed the physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling to be intensively used through the whole process of drug discovery and development (Norris, Leesman et al. 2000; Theil, Guentert et al. 2003; Rowland, Balant et al. 2004; Peters and Hultin 2008). PBPK models integrate physicochemical and *in vitro* pharmacokinetic data within a framework of ADME processes. In contrast to classical pharmacokinetic (PK) models, PBPK models have the merit to reflect the ADME processes in the whole organism. The tissues, organs or lumped tissues are correspondingly represented by compartments with realistic physiology, biochemistry and physical characteristics, being connected through blood flows. This structure, which is based on the mammalian anatomy and physiology, is usually associated with a large number of mammalian-related and drug-related parameters. Depending on the information available for the disposition process, these parameters are usually set to their expected values or fitted to experimental data (Peters 2008; Peters and Hultin 2008). As a consequence, the structural complexity of a PBPK model and its descriptive and predictive power are submitted to significant uncertainty that may exist in the estimation of input parameters (Blower and Dowlatabadi 1994). To get the best benefit from a PBPK model, an uncertainty analysis (UA) is necessary to assess the predicted output variability likely to be generated by the variability or uncertainty in estimating the input parameters. Further, a sensitivity analysis (SA) can be performed to assess how variations in model outputs can be apportioned, qualitatively and quantitatively, to different input sources (Saltelli and Chan 2000; Marino, Hogue et al. 2008). Indeed, a SA allows identification of the parameters contributing the most to prediction imprecision and quantifies the effect of input parameters alteration on the predicted output parameters (Blower and Dowlatabadi 1994).

The local sensitivity analysis, also called ‘one-factor-at-a-time’ analysis is the uncertainty and sensitivity analysis most performed in PBPK modeling (Tardif, Droz et al. 2002; Sweeney, Gargas et al. 2003; Evans, Dowd et al. 2008; Nong, Taylor et al. 2008). In this deterministic approach, only one input at-a-time is varied to a given percentage of its expected values (Hamby 1994) or varied to extreme physiologically meaningful values, while keeping all other parameters fixed to their expected values.

The change in model output is quantified through a sensitivity index (Sweeney, Gargas et al. 2003; Chan, Morisawa et al. 2006) or some normalized sensitivity coefficients (Evans and Andersen 2000; Tardif, Droz et al. 2002), which are all based on the concept of partial derivatives of the output. Whereas the local sensitivity analysis is simple to implement, neither the whole possible range of parameters is covered, nor are the correlations among these parameters considered. A probabilistic approach, namely global sensitivity analysis (GSA), has been proposed to remedy to these limitations. This approach is based on all possible input parameter values, which are simulated according to their distribution functions and possible correlations (Kamboj, Cheng et al. 2005). This random sampling of inputs generates output distributions to be used in assessing model uncertainties (Hamby 1994). In order to identify the important input parameters and quantify their importance on model outcomes, the correlation (CC), rank correlation (RCC), partial correlation (PCC) or partial rank correlation (PRCC) coefficients can be calculated according to the linearity or monotonicity properties of the input-output relationship, as well as to the correlation between inputs (Hamby 1994; Helton and Davis 2002). Whereas CC and PCC both provide a measure of the strength of the input-output relationship, PCC makes correction for possible linear effects of all other inputs in the analysis. These correlations are based on the determination of linear relationships, and typically perform poorly when the underlying relationships are non-linear (Helton and Davis 2002). When relationships are non linear but still monotonic, the rank transformation is used to linearize the input-output relationships and the RCC and PRCC are obtained instead of CC and PCC respectively. The use of rank transformed data results in an analysis based on the strength of the monotonic relationship rather than on the strength of linear relationships (Helton and Davis 2002). Among these approaches, PRCC was identified as the most appropriate and powerful method to estimate the input-output correlation when non-linear monotonic relationships are suspected, and inputs are correlated (Hamby 1994; Saltelli and Chan 2000). The PRCC calculating method within the context of SA was first developed in risk analysis (Iman and Conover 1980; Iman, Helton et al. 1981; Iman, Helton et al. 1981), and further applied to probabilistic models of disease transmission (Blower and Dowlatabadi 1994), and to deterministic models of hydrologic transport processes (Seuntjens, Mallants et al. 2002). Though PBPK model

parameters are generally correlated (Brown, Delp et al. 1997), the PRCC method has not been used.

In the present work, through a GSA based on Monte-Carlo simulations along with PRCC calculation, we aim to investigate the influence of uncertainty and variability of several correlated physiological parameters on the variability of the outcomes of a recently developed PBPK model (Fenneteau, Turgeon et al. 2009). This model aimed to explain and predict the drug distribution in mice tissues for which P-glycoprotein (P-gp) has a protective function, namely heart and brain. Another objective is to identify the most important input parameters contributing to the output prediction imprecision by quantifying the strength of these input-output relationships.

2. Methods

The following terms are used in this work: The '*Input parameter X_i* ' refers to the drug- or physiology-related parameters used in the equations of the PBPK model; the '*output parameter Y_i* ' refers to model response that are predicted by the PBPK model; the '*variability*' refers to variations due to inherent factors or natural causes of the system and '*uncertainty*' refers to variations caused by errors in assumptions and observations of the system (Nestorov 2001).

2.1 PBPK Model for the Prediction of P-gp Substrates Disposition

2.1.1 Brief model presentation

The general framework of the PBPK model including schematic representation of tissue model structures is illustrated in the Appendix as well as the system of ordinary differential equations (ODE) involved. For more information, we refer the reader to the original publication of the model (Fenneteau, Turgeon et al. 2009).

P-glycoprotein (P-gp) is a multidrug resistance protein of the family of the ATP binding cassette membrane transporters. It has an important role in drug absorption and excretion by reducing the absorption of orally administered drugs and promotion of urinary and biliary excretion (Ayrton and Morgan 2001; Fromm 2003). Furthermore, P-gp transporters have a regulator function which limits the penetration of drugs in brain,

heart, placenta, ovaries, and testes. The modulation of the expression and/or activity of this transporter due to genetic or environmental factors may have a significant impact on drug disposition, drug effectiveness or drug toxicity (Harris, Jang et al. 2003; McCabe 2004; Greenblatt and von Moltke 2005). To better characterize drug pharmacokinetics and pharmacodynamics, accurate prediction of drug disposition over a wide range of conditions of P-gp is required. For this purpose, we developed a PBPK model which integrated P-gp activity and expression in tissue-model structures of mice. The proposed method was based on extrapolation from in vitro measurements of apparent permeability of P-gp substrates through Caco-2 cells ($P_{app,ab}$ and $P_{app,ba}$) and brain bovine endothelial cells (Pe_{BCEC}). This method allowed estimation of parameters related to drug diffusion using tissue membranes exchange surface area (ESA_t) as well as the activity and expression ($Gen_{mdr1,t}$) of P-gp in brain and heart tissues. To appreciate the reliability of the model information for elucidating the impact of the modulation of P-gp activity on drug distribution, we used tissue concentrations of domperidone available for wild-type (WT) mice and P-gp deficient mice (also called *mdr1a/1b(-/-)* knockout (KO) mice), an antiemetic drug associated with cardiac toxicity (Cameron, Reyntjens et al. 1985; Osborne, Slevin et al. 1985; Quinn, Parkes et al. 1985). The choice of this drug model was motivated by previous in vitro results (Faassen, Vogel et al. 2003), which suggested that domperidone could be highly transported by P-gp. Model predictions were in accordance with these tissue concentrations and the reported PK of the drug.

The PBPK model was defined for a mouse with typical physiologic parameters values, mainly extrapolated within species or using in vitro-in vivo correlations. Accuracy of model predictions is often complicated by the variability and uncertainty in experimental data used to estimate input parameter values (Nestorov 2001). As a result, additional investigations are required to explore the complexity of this inherent variability and uncertainty in the model outcomes. The model predictions suggested the involvement of additional efflux transporters in the domperidone distribution in brain tissue. However, this assumption needs to be challenged with a sensitivity analysis of the model. Such analysis will first determine the explanatory power that diffusion and P-gp mediated efflux rates alone may have in discriminating between in vivo data and the brain tissue model predictions. If in vivo brain concentrations are still not included within the

predicted concentrations range, this will point out to the relevance of considering additional efflux transporters in the brain tissue model.

2.1.2 Choice of Input and Output Parameters

The output model parameters are the maximum drug concentration (C_{\max}) in heart, brain and liver, and the concentration at 120 minutes post-dose (C_{last}) in heart, brain, liver, and plasma. The input parameters selected for the GSA are the parameters involved in the PBPK model equations and in the expression of primary parameters. For instance, the cardiac output (Q_c) and body weight (BW) of the mouse were selected because they were related to blood flow and volume of tissues, respectively. Similarly, the amount of hepatic CYP450 (N_{CYP450}), the *in vitro* intrinsic clearance ($CL_{\text{int,vitro}} = V_{\max(\text{P450})}/K_{\text{m}(\text{P450})}$) and the unbound microsomal fraction ($f_{\text{u,mic}}$) are included in the GSA since they are involved in the expressions of hepatic clearance and extraction ratio. Similarly, Pe_{BCEC} , $P_{\text{app,ab}}$, $P_{\text{app,ba}}$, ESA_t , and $Gen_{\text{mdr1,t}}$ appear in the expressions of diffusion velocity and mediated P-gp efflux clearance of domperidone in heart and brain tissues (Fenneteau, Turgeon et al. 2009). The mean values of ESA_t and $Gen_{\text{mdr1,t}}$ are considered tissue-dependent. For sake of simplicity, the impact of their uncertainty and variability on the model predictions was performed by weighting their mean values with their respective normalised factors, $f_{\text{ESA,t}}$ and $f_{\text{mdr1,t}}$, which are assumed to be log-normally distributed. Moreover, since only the unbound fraction of the drug can actively or passively be transported in and out of tissues, it is reasonable to suspect that an alteration of this fraction may influence the variation of the model outputs. Thus, unbound fractions of drug in plasma ($f_{\text{u,p}}$), brain and heart tissues ($f_{\text{u,B}}$ and $f_{\text{u,H}}$) were also selected for the SA. The volumes of blood in heart ($V_{\text{bl,H}}$) and brain ($V_{\text{bl,B}}$) as well as the drug partition coefficient (LogP) are also included in the GSA. Since the tissue:plasma partition coefficient (P_{tp}) is used to estimate drug concentration in well-stirred tissues, this parameter is also accounted for in the GSA through a log-normally distributed weighting factor f_{Ptp} .

2.1.3 Determination of Mean Values and Coefficients of Variations of the Input Parameters

Mean values and coefficients of variation (CV) of the input parameters are presented in Table I. They were directly measured from *in vitro* experiments, calculated from concentration-time data, or extracted from the literature. We used the mean value and CV of $CL_{int,vitro}$ that we previously determined (Fenneteau, Turgeon et al. 2009). A 25% CV of the hepatic CYP450 amount has been estimated from published values available for various mammalian (Dalvi, Nunn et al. 1987; Dalvi 1988). In our previous work, we assumed that $P_{app,ab}$ results from the difference between diffusion and efflux processes through Caco-2 cells, whereas $P_{app,ba}$ from the summation of both processes. Thus, the variability of $P_{app,ba}$ and $P_{app,ab}$ are both related to the variability of the diffusion and efflux processes. As we supposed that these processes are independent of the drug transfer direction through cells monolayers, the variability of $P_{app,ba}$ is assumed to be similar to the variability of $P_{app,ab}$ whose value is extracted from the literature (Faassen, Vogel et al. 2003). The uncertainty in estimating LogP using KOWWIN was approximated to 20 % of the mean value (Sakuratani, Kasai et al. 2006). A CV of 15% was considered for $f_{u,mic}$ according to the reported average deviation of the method used to estimate $f_{u,mic}$ (Austin, Barton et al. 2002). The reported variability of Pe_{BCEC} is about 20% (Jolliet, Nion et al. 2007). Since no information was available for the variability of $f_{u,H}$, $f_{u,B}$, f_{Ptp} , f_{ESA} , and f_{mdr1} we chose a 20% of CV as a reference value, and then considered a large variation within a range of 5-100%. This will allow exploration of CV effect on both outputs variability and identification of important model parameters.

Table I. Mean values and coefficients of variation of the input parameters used in the GSA

#	Model Parameter (unit)	Symbol	Mean	CV %	Ref
1	Body weight (Kg)	BW	0.03	6.7	[1] [2]
2	Unbound fraction of drug in plasma (%)	f_{u_p}	8.0	10.0	[3]
3	Amount of CYP450 in liver (nmol)	N_{CYP450}	$14^{[35]}$	25.0	[2] [4] [5]
4	In vitro intrinsic clearance (L/min.nmol P450)	$CL_{int,vitro}$	3.6×10^{-5}	11	[1]
5	Octanol-water partition coefficient	LogP	3.4	20	[6]
6	Apical to Basolateral Apparent Permeability (dm/min)	P_{appAB}	8.9×10^{-6}	40 ^a	[1]
7	Basolateral to Apical Apparent Permeability (dm/min)	P_{appBA}	3.2×10^{-4}	1.1 ^a	[1]
8	Factor of variation of the exchange surface area	f_{ESA}	1	20 ^b	---
9	Factor of variation of the genetic expression of P-gp	f_{mdr1}	1	20 ^b	---
10	Cardiac output (L/min)	Q_c	1.4×10^{-2}	20.4	[7]
11	Volume of blood in equilibrium with brain tissue (L)	$V_{bl,B}$	9.9×10^{-6}	4	[8]
12	Volume of blood in equilibrium with heart tissue (L)	$V_{bl,H}$	2.3×10^{-5}	1	[9]
13	Unbound fraction of drug in heart (%)	f_{u_H}	2.1 ^c	20 ^b	---
14	Unbound fraction of drug in brain (%)	f_{u_B}	4.6 ^c	20 ^b	---
15	Factor of variation of tissue:plasma partition coefficient	f_{Ptp}	1	20 ^b	---
16	Unbound microsomal fraction (%)	$f_{u_{mic}}$	1.7 ^d	15	[10]
17	Permeability through brain bovine endothelial cells (dm/min)	Pe_{BCEC}	44.9×10^{-9}	19	[11]

^a The variance of P_{appBA} is assumed to be the same as the variance estimated for P_{appAB}

^b First fixed at 20%, and then varied within a large range to explore the effect of variation of this parameter on the output.

^c Estimated from the Rodgers and Rowland approach (Rodgers, Leahy et al. 2005) for bases as described in (Fenneteau, Turgeon et al. 2009)

^d Estimated from the Austin model (Austin, Barton et al. 2002): $f_{u_{mic}} = 1/(C_{mic} * 10^{(0.56 * \text{LogP} - 1.41)} + 1)$ where C_{mic} is the microsomal protein concentration (20 mg microsomal protein/mL herein)

[1] Fenneteau et al., 2009 ; [2] Dalvi et al., 1987 ; [3] Zhang and Rundell, 2006; [4] Sakuratani et al., 2006 ; [5] Saltelli, 2002 ; [6] Austin et al., 2002 ; [7] Brown et al., 1997 ; [8] Gueorguieva et al., 2005 ; [9] Gueorguieva et al., 2006 ; [10] Jolliet et al., 2007 ; [11] Summerfield et al., 2007 ;

2.1.4 Correlation factors between input parameters

Some of the above mentioned input parameters are known to be highly correlated whereas some others are not. The correlation factor, ρ_{ij} , between these correlated input parameters was estimated from published data: $\rho_{\text{NCYP450,BW}} = 0.95$ (Dalvi, Nunn et al. 1987); $\rho_{\text{QC,BW}} = 0.99$ (Brown, Delp et al. 1997); $\rho_{\text{Ptp,fup}} = 1$; $\rho_{\text{fuB,LogP}} = 0.64$ (Summerfield, Read et al. 2007); $\rho_{\text{CLint,vitro, LogP}} = 0.74$ (Davis, Webborn et al. 2000); $\rho_{\text{logP, fup}} = 0.34$ (Davis, Webborn et al. 2000) . No significant correlation has been reported or suspected between the remaining parameters. Their correlation factors were set to zero. The variability of the large number of input parameters as well as their correlation may lead to the formation of a symmetric matrix based on these correlation factors that is not positive semi-definite. However, one of the correlation matrix properties is to be positive semi-definite. To find the corresponding correlation matrix of input parameters, we used an algorithm recently developed (Houduo and Defeng 2006) which has been proved to have a fast convergence and high efficiency. This Newton-type method, called the quadratically convergent Newton method, gives, in terms of Frobenius norm, the closest correlation matrix to a given symmetric matrix.

2.2 GSA/PRCC Methodology

2.2.1 Input Parameters Distribution

The biologically and physiologically-related input parameters are generally assumed to be log-normally distributed because of their skewed distribution and non-negative values (Zhang and Popp 1994; Limpert 2001). A variable X_i is said to be log-normally distributed if its logarithmic transformation $Z_i = \ln(X_i)$ is normally distributed. If Z_i has mean μ_i , and standard deviation σ_i , then X_i can be defined through the relationship:

$$\sigma_i = \sqrt{\ln\left(\frac{\text{Var}(X_i)}{E(X_i)^2} + 1\right)} \quad (1)$$

and

$$\mu_i = \ln(E(X_i)) - \frac{\sigma_i}{2} \quad (2)$$

where $\text{Var}(X_i)$ and $E(X_i)$ represent the variance and the expected value of X_i , respectively.

2.2.2 Random Sampling of Input parameters: Monte-Carlo Simulations

Once the correlation matrix of input parameters is obtained, we can estimate the covariance matrix of pairs of variables Z_i, Z_j as follows (Law and Kelton 2000):

$$\text{Cov}(Z_i Z_j) = \rho_{ij} \times \sigma_i \times \sigma_j \quad (3)$$

where ρ_{ij} is the correlation factor between the input parameters i and j .

From the covariance matrix, it is possible to perform Monte Carlo simulations ($N_{MC}=1000$) to randomly generate different N_{MC} values of Z_i from their distributions $N(\mu_i, \sigma_i)$, while taking into account the parameters correlation through the covariance matrix. Then, the input parameters of the PBPK model can be obtained as: $X_i = \exp(Z_i)$. These N_{MC} randomly generated vectors are used to build distribution functions of the output parameters.

2.2.3 Analysis of Output Parameters and Input-Output Correlations: Uncertainty and Sensitivity Analysis

The N_{MC} observations of each output parameter define a range of probable model outcomes. Their distribution functions are characterized by descriptive statistics. In order to perform the SA, we then calculate the input-output correlation coefficients. Since some of the input parameters are correlated and non-linear input-output relationships suspected, a non-parametric test of ranked data is required. Therefore the PRCC method is used to evaluate the statistical input-output relationships. PRCC provides measure of the strength of the monotonic relationship between one output and one input after the linear effects on the output of remaining inputs are discounted. On the one hand, the magnitude of the PRCC indicates the importance of the uncertainty in estimating the input parameter value in contributing to the imprecision in the output parameter prediction (Blower and Dowlatabadi 1994; Saltelli and Chan 2000), which will allow a classification (ranking) procedure of input parameters. On the other hand, the sign of the PRCC indicates the qualitative relationship between the input and output

parameters: a positive PRCC value indicates that the predicted parameter increases with the input value, whereas a negative PRCC indicates that it decreases with an increase of the input value.

Since a large number of input parameters could be involved, the matrixial method for PRCC calculation (Saltelli and Chan 2000) is recommended. This method has proved to be more efficient than building the required sequence of regression model between input and output parameters (Saltelli and Chan 2000). The augmented correlation matrix between output parameters, y , and input parameters x_j , (with $j = 1, \dots, n$) is expressed as:

$$C = \begin{bmatrix} 1 & r_{12} & \dots & r_{1n} & r_{1y} \\ r_{21} & 1 & \dots & r_{2n} & r_{2y} \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ r_{n1} & r_{n2} & \dots & 1 & r_{ny} \\ r_{y1} & r_{y2} & \dots & r_{yn} & 1 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A & B \\ B^T & 1 \end{bmatrix} \quad (4)$$

where A is the input-input correlation matrix with elements $r_{ij} = \text{RCC}$ (Seuntjens, Mallants et al. 2002), and B the input-output correlation vector with element $r_{j,y} = \text{RCC}$ (Seuntjens, Mallants et al. 2002). PRCC between inputs X_j and one output Y can be calculated from the elements of the inverse matrix of C (C^{-1}) as follows:

$$\text{PRCC}[Y, X_j] = -\frac{C_{jy}^{-1}}{\sqrt{C_{jj}^{-1} C_{yy}^{-1}}} \quad (5)$$

The significance of a non-zero PRCC value was tested using a two-sided Student's t-test (Blower and Dowlatabadi 1994) (Marino, Hogue et al. 2008) ($p < 0.001$).

2.2.4 Example of PRCC calculation

We consider the relation $y=f(x_1, x_2, x_3)$ where $x_{j=1 \text{ to } 3}$ are the model input parameters, and y is the model outcome. If the correlation matrix between inputs is defined by A such as:

$$A = \begin{bmatrix} 1 & 0.8 & 0.1 \\ 0.8 & 1 & 0.2 \\ 0.1 & 0.2 & 1 \end{bmatrix}$$

and if the correlation vector B between the model outcome y and each input parameters x_j is defined as follows

$$B = \begin{bmatrix} 0.75 \\ 0.9 \\ 1 \end{bmatrix}$$

then the augmented correlation matrix C (Eq.4) is expressed as:

$$C = \begin{bmatrix} 1 & 0.8 & 0.1 & 0.75 \\ 0.8 & 1 & 0.2 & 0.9 \\ 0.1 & 0.2 & 1 & 0.3 \\ 0.75 & 0.9 & 0.3 & 1 \end{bmatrix}$$

The inverse matrix of C is such as:

$$C^{-1} = \begin{bmatrix} 2.80 & -1.80 & 0.26 & -0.62 \\ -1.80 & 6.54 & 0.26 & -4.62 \\ 0.26 & 0.26 & 1.15 & -0.77 \\ -0.62 & -4.62 & -0.77 & 5.85 \end{bmatrix}$$

According to the equation 5, the PRCC between y and x_1 is calculated by:

$$PRCC[yx_1] = -\frac{-0.62}{\sqrt{2.80 \cdot 5.85}} = 0.15$$

In a similar way, we calculated PRCC between y and x_2 and x_3 as 0.74 and 0.29, respectively, indicating that x_2 is the most influential parameter on model outcome y, followed by x_3 and x_1 .

2.2.5 Software

The commercial software package Matlab® (The Mathworks, Inc.) and the Statistic Matlab® toolbox were used during model development, simulation and global sensitivity analysis.

3. Results

After performing Monte-Carlo simulations, we obtained N_{MC} concentration-time profiles in various mice tissues. Based on these results, we visually evaluated the impact of uncertainty and variability of input parameters. A quantitative evaluation was then followed through descriptive statistics of model outcomes and calculation of the strength of input-output relationships (PRCC). We also performed an exploratory analysis by varying the coefficient of variation of uncertain parameters to evaluate the robustness of the GSA in terms of identification and ranking of most important inputs.

3.1 Impact of the Variability and Uncertainty of Input Parameters on Concentration Time Profiles in the Presence or Absence of P-gp Activity

The median values as well as the 95th and 5th percentiles of the N_{MC} concentration-time profiles obtained for plasma, liver, heart and brain tissues are presented in Figure 1. We observe that the variability and uncertainty of input parameters mainly affect domperidone concentration-time profiles in liver, brain, and heart tissues, whereas no clear impact on concentration profiles in plasma could be obtained.

Compared to the predicted drug concentrations when P-gp activity is absent, the presence of P-gp activity led to lower concentrations range in brain tissue (Figure 1). The obtained concentration levels are in accordance with the known important protective function of P-gp at the BBB since a modulation of their activity can lead to significant alteration of drug distribution in this tissue (Mayer, Wagenaar et al. 1996; Tanigawara 2000; Golden and Pollack 2003; de Lange 2004). However, the range of predicted concentration-time profiles in brain tissue in the absence of P-gp activity still tend to overestimate the final concentration of domperidone measured in KO mice. This suggests that the uncertainty in estimating drug diffusion velocity and P-gp mediated efflux clearance of the drug through the BBB does not explain, alone, the discrepancy between predicted and measured concentrations in mice brain tissue.

Hence we considered the involvement of other efflux processes at the BBB in the brain tissue model. As the exact nature of these transporters is unknown, the mean value of their efflux clearance ($CL_{out,OT}$) was adjusted to the experimental data. This additional input parameter is then included in the SA, with a mean value of 2.8×10^{-4} L/min and a coefficient of variation fixed to 20% of the mean value. The CV will be further varied within the range of [5-100%] to study its effect on both outputs variability and the identification of important model parameters. As the estimation of the transporters-mediated efflux clearances were previously based on proportionality with the blood-tissue exchange surface area (Fenneteau, Turgeon et al. 2009), we assumed a correlation factor between $CL_{out,OT}$ and brain exchange surface area, and set its value to 0.7. The derived percentiles of concentration time profiles in brain tissue, in the presence and absence of P-gp activity, are now in accordance with *in vivo* trends (Figure 2). The final concentration measured in brain mice is included within the 5th and 95th percentiles of the predicted concentrations. In the results presented in the next sections, the involvement of these additional transporters in drug distribution is accounted for.

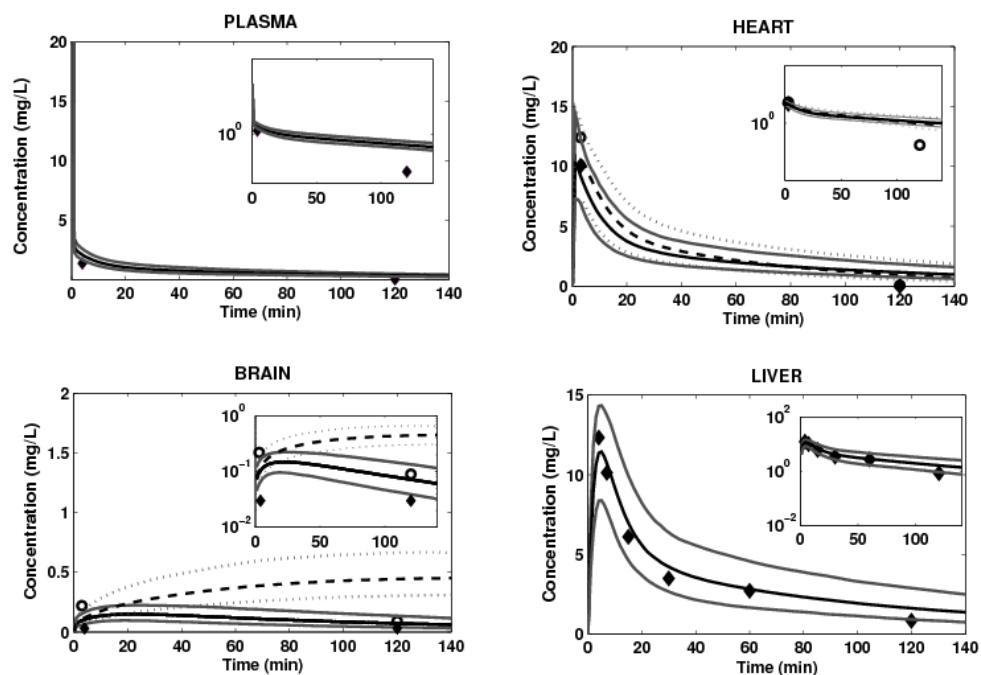


Figure 1. Domperidone concentration-time profiles predicted in mice tissues, in the presence or absence of P-gp activity, after performing Monte Carlo simulations of the PBPK model. Drug distribution in brain tissue is supposed to be governed by diffusion and P-gp mediated efflux rates. The black line represents the median concentration time profile predicted in the presence of P-gp activity in tissues. The grey lines represent the 5th (bottom) and 95th percentiles (upper) of concentration time profile predicted in the presence of P-gp activity. The black dashed line represents the median concentration time profile predicted in the absence of P-gp activity. The grey dashed lines represent the 5th (bottom) and 95th percentiles (upper) of concentration time profile predicted in the absence of P-gp activity. The full diamond and empty circle represent domperidone concentration measured in WT and KO mice respectively. Drug distribution in heart and brain tissues was represented by the MTB model whereas drug distribution in plasma and liver were represented by a WS model. Inserts present the predicted tissue profiles in semi-log scale.

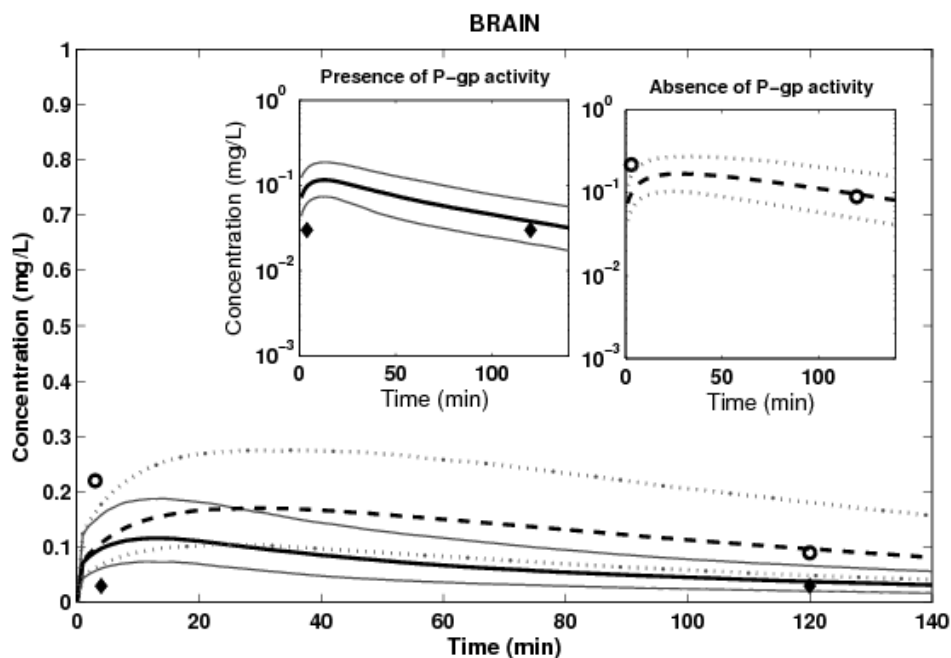


Figure 2. Domperidone concentration-time profiles predicted in mice brain tissue, in the presence or absence of P-gp activity, after performing Monte Carlo simulations of the PBPK model. Drug distribution in brain is supposed to be governed by the diffusion, P-gp mediated efflux, and additional transporters mediated efflux. The black line represents the median concentration time profile predicted in the presence of P-gp activity in tissues. The grey lines represent the 5th (bottom) and 95th percentiles (upper) of concentration time profile predicted in the presence of P-gp activity. The black dashed line represents the median concentration time profile predicted in the absence of P-gp activity. The grey dashed lines represent the 5th (bottom) and 95th percentiles (upper) of concentration time profile predicted in the absence of P-gp activity. The full diamond and empty circle represent domperidone concentration measured in WT and KO mice respectively. Inserts present the predicted tissue profiles in semi-log scale.

3.2 Impact of the Variability and Uncertainty of Input Parameters on the Prediction Imprecision of C_{last} and C_{max} in Heart, Brain, Liver and Plasma in the presence and absence of P-gp activity

We used the Monte-Carlo sampling technique to explore the effect of the variability and uncertainty in estimating input parameters on the prediction precision of C_{max} and C_{last} in liver, heart, brain and plasma. This uncertainty analysis was performed by assuming various conditions of P-gp activity in heart and brain tissues. The correlation matrix of input parameters approximated by the Newton method was presented in the Appendix. The descriptive statistics of these predicted parameters are reported in Table II.

The variability and uncertainty of the input parameters generated a variability ranging from 15.2 to 29 % for C_{max} and from 19.3 to 38.3 % for C_{last} (Table II). Previous sensitivity analysis have qualified as very low, moderate, or high a CV of model outcome of 5%, 30%, and above 50%, respectively (Bois 2000; Seuntjens, Mallants et al. 2002; Covington, Robinan Gentry et al. 2007). Accordingly, our results indicate that the prediction imprecision of our PBPK model is low to moderate, and suggest an acceptable degree of uncertainty in the estimation of input parameters. The sensitivity analysis will shed light on the individual contribution of input parameters to these prediction imprecisions (next section). A statistical difference in median values has been obtained in heart and brain for both conditions of P-gp activity. However, the major difference is observed in brain tissue, where the predicted mean, median, 5th and 95th percentiles were remarkably lower in the absence of P-gp activity.

Table II. Descriptive statistics of C_{\max} , and C_{last} of domperidone predicted in mice tissues in the presence ($P\text{-gp}^+$) or absence ($P\text{-gp}^-$) of P-gp activity, after running 1000 Monte-Carlo simulations of the PBPK model. The MTB model has been applied to brain and heart tissues whereas the WS model to liver and plasma.

Model Outcomes	Brain		Heart		Liver	Plasma	
	$P\text{-gp}^+$	$P\text{-gp}^-$	$P\text{-gp}^+$	$P\text{-gp}^-$			
C_{\max} (mg/L)	Mean	0.12	0.18	10.6	11.2	11.6	Na
	CV(%)	29.0	28.9	20	18.4	15.2	Na
	5th percentile	0.07	0.11	7.5	8.2	8.6	Na
	Median	0.12*	0.17*	10.3*	11.1*	11.6	Na
	95th percentile	0.19	0.28	14.5	15.0	14.4	Na
C_{last} (mg/L)	Mean	0.04	0.10	1.21	1.47	1.7	0.4
	CV(%)	25.0	38.3	28.6	26.7	34.8	19.3
	5th percentile	0.02	0.05	0.74	0.93	0.9	0.3
	Median	0.04*	0.10*	1.17*	1.42*	1.7	0.4
	95th percentile	0.07	0.18	1.88	2.20	2.9	0.5

* $p < 0.01$ Kruskal-Wallis test for equality of medians between WT and KO mice

3.3 Sensitivity Analysis: Identification of Important Model Parameters through Calculation of Partial Rank Correlation Coefficients (PRCC)

An exploratory analysis usually starts with visual inspection of scatter-plots of individual inputs with respect to model outputs in order to check for potential non-monotonicity of the input-output relationship. An example of this input-output monotonic relationship is shown in Figure 3 for each of the eighteen input parameters involved in the PBPK model with respect to C_{\max} predicted in liver. (Monotonic relationships have been obtained for the other input-output scatter plots. Not shown). The scatter plots of predicted hepatic C_{\max} versus BW, N_{CYP450} , $CL_{\text{int-vitro}}$, and LogP clearly exhibit monotonic decreasing trends, whereas an increasing monotonic relationship is observed for hepatic C_{\max} versus $f_{\text{u,mic}}$ and Q_c . Barely discernible monotonic relationships are observed between C_{\max} in liver and the remaining parameters. Visual inspection of Figure 3 suggests that predicted hepatic C_{\max} correlates with BW as well as N_{CYP450} . However, since these two physiological inputs are highly correlated, these two input-output correlations are not intrinsically independent and can directly be explained by the correlation between BW and N_{CYP450} . The PRCC calculation will allow identifying which of these two inputs is the most important one in predicting C_{\max} in liver. The same observation can be done for BW and Q_c with respect to C_{\max} predicted in liver.

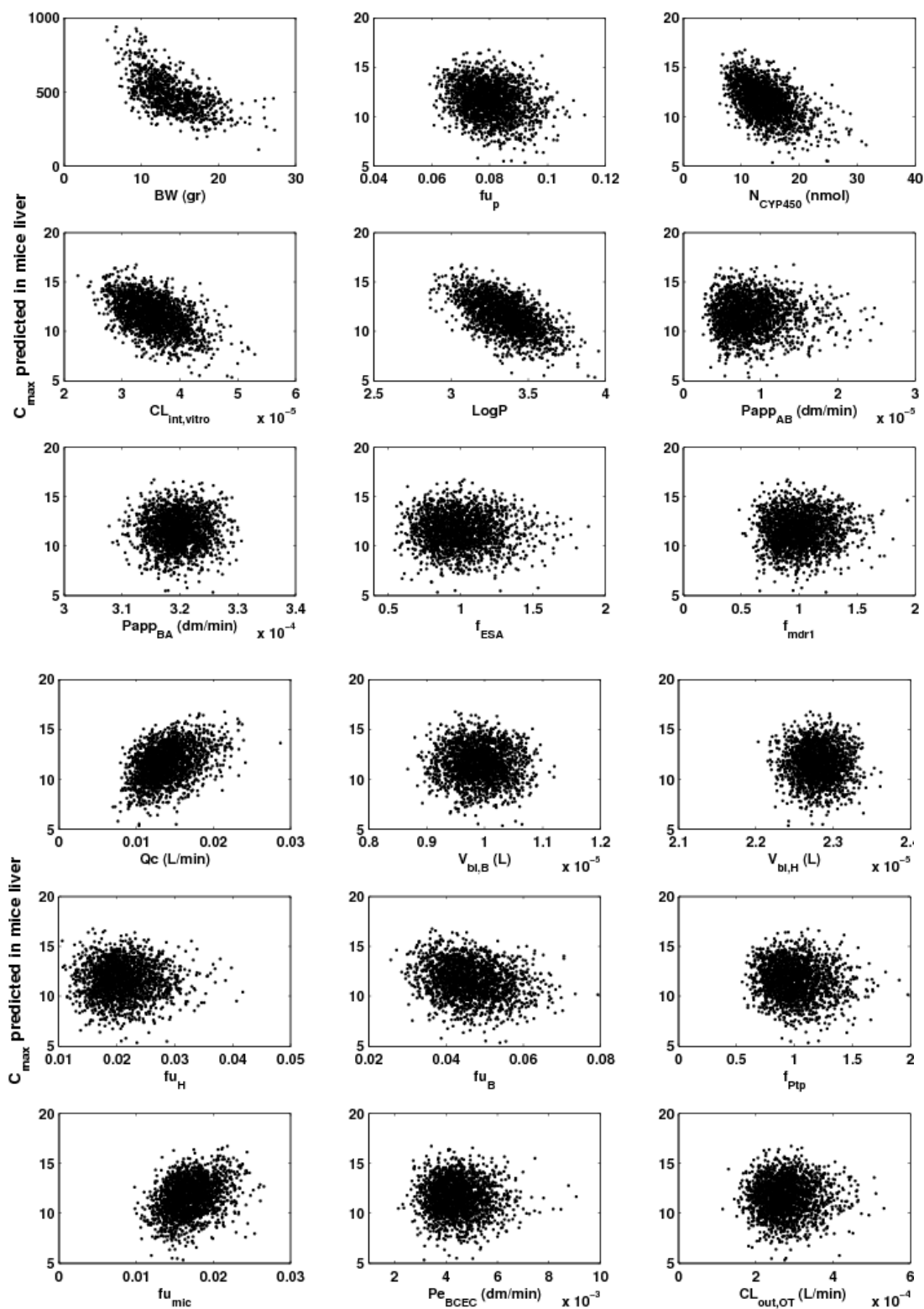


Figure 3. Scatter plots of relationships of the eighteen input parameters versus C_{\max} predicted in mice liver

In Figures 4-7, we report, in the increasing order, the important model parameters identified through PRCC calculation for the imprecision of C_{\max} and C_{last} in liver, brain, heart tissue and C_{last} in plasma.

Liver: As shown in Figure 4, $f_{\text{u,mic}}$ was identified as the most important parameter involved in the variability of C_{\max} , and C_{last} predicted in liver with PRCC values varying from 0.86 to 0.91. The input parameters N_{CYP450} and $CL_{\text{int,vitro}}$ are among the four most important parameters involved in the variability of model outcomes in this tissue with PRCC values of about -0.55 and -0.40 respectively. Q_c has been identified as the third most important parameter involved in the variability of C_{\max} . These results are in accordance with the scatter plot previously presented (Figure 3). However, despite the visual correlation observed between BW and C_{\max} in liver (Figure 3), this relationship remains negligible in terms of strength ($\text{PRCC} < -0.01$). This indicates that the visual correlation between BW and C_{\max} can be explained through the input correlations of BW and Q_c as well as BW and N_{CYP450} . The PRCC results shows that the model outcomes predicted in liver are mainly sensitive to metabolism-related parameters.

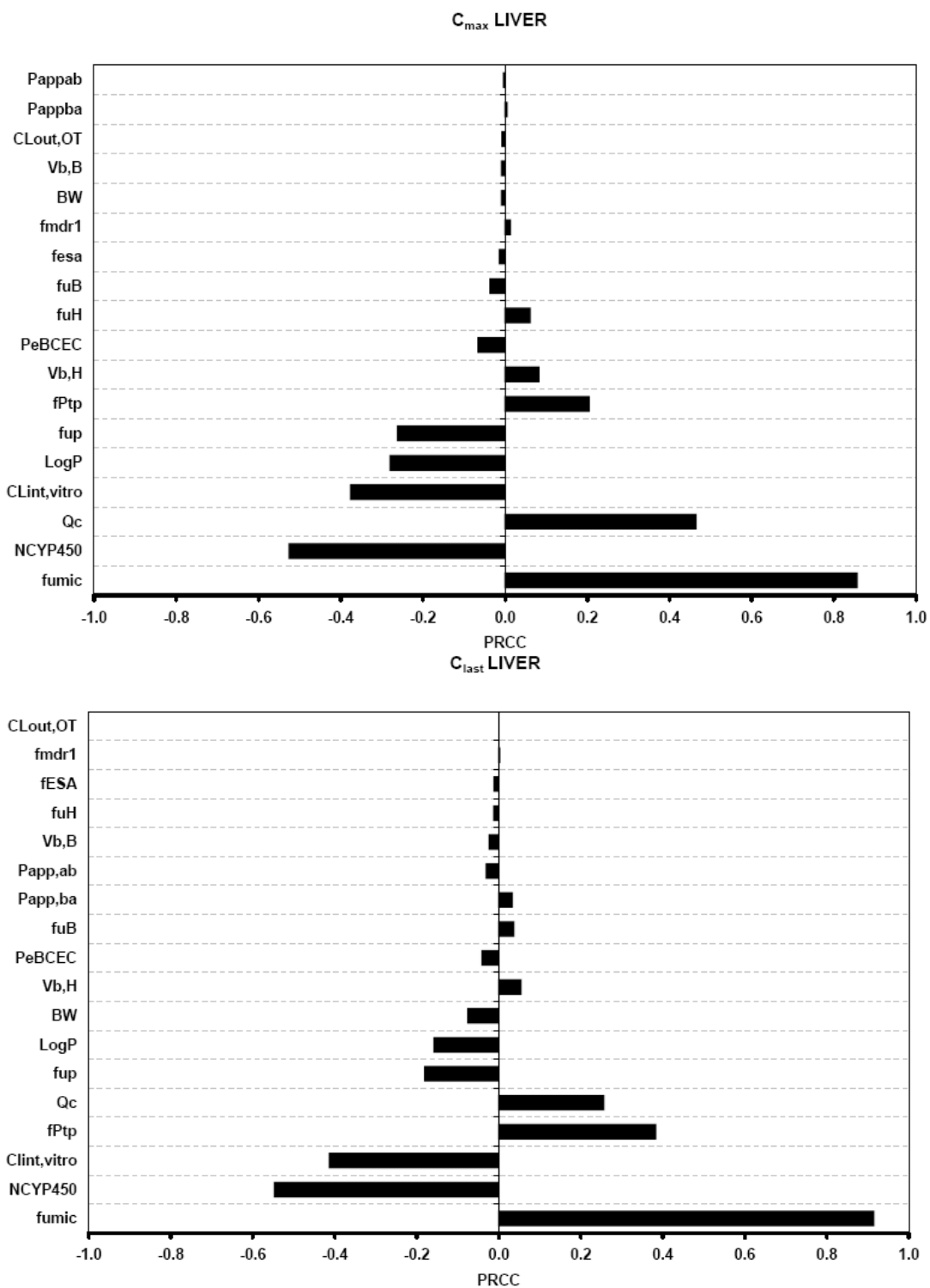


Figure 4. PRCC between each of the eighteen input parameters and C_{\max} or C_{last} of domperidone predicted in mice liver.

The same observation was made for plasma for which $f_{u,mic}$, $CL_{int,vitro}$ and N_{CYP450} were found to be the most critical input parameters in terms of their impact on C_{last} imprecision (Figure 5).

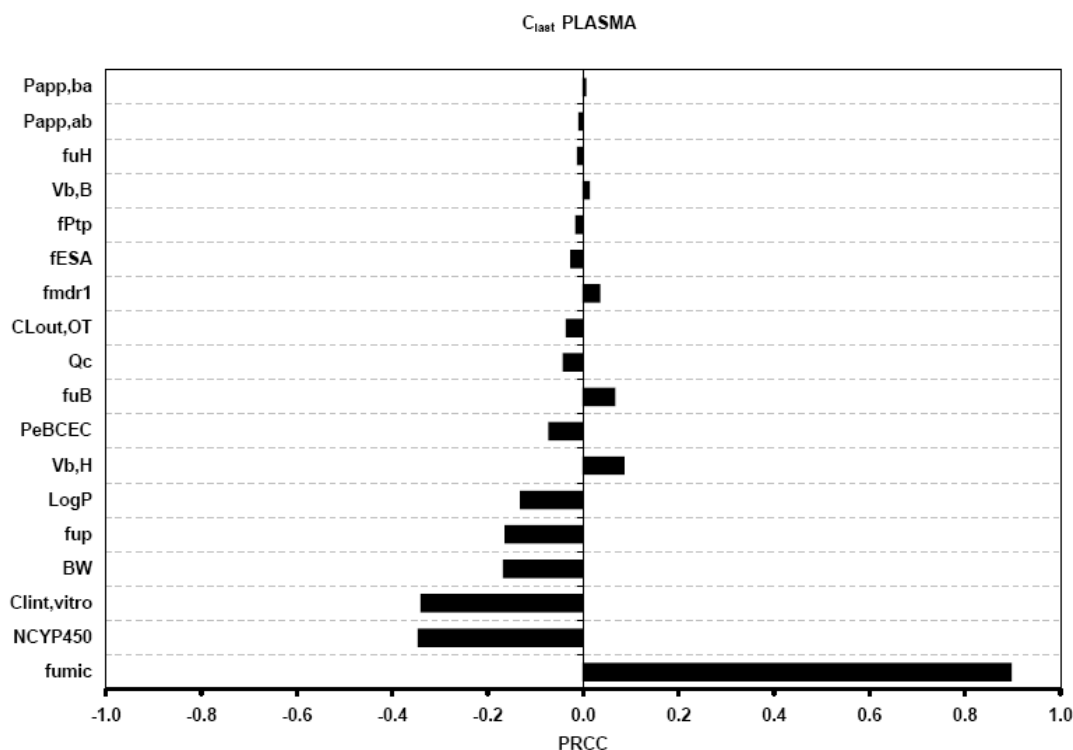


Figure 5. PRCC between each of the eighteen input parameters and C_{last} of domperidone predicted in mice plasma

Heart: The blood-tissue exchange surface area, the unbound fraction of drug in heart tissue and the cardiac output were identified as the most important input parameters for the prediction imprecision of C_{max} in heart for both conditions of P-gp activity, with PRCC values of about 0.95 for f_{ESA} , -0.75 for f_{uH} and -0.55 for Qc (Figure 6). The precision of f_{uH} and $f_{u,mic}$ are crucial in estimating C_{last} of domperidone in this tissue for both conditions of P-gp activity, with a PRCC value of at least -0.93 for f_{uH} and 0.75 for $f_{u,mic}$. C_{last} predicted in heart tissue is also affected by the precision in estimating the P-gp genetic expression.

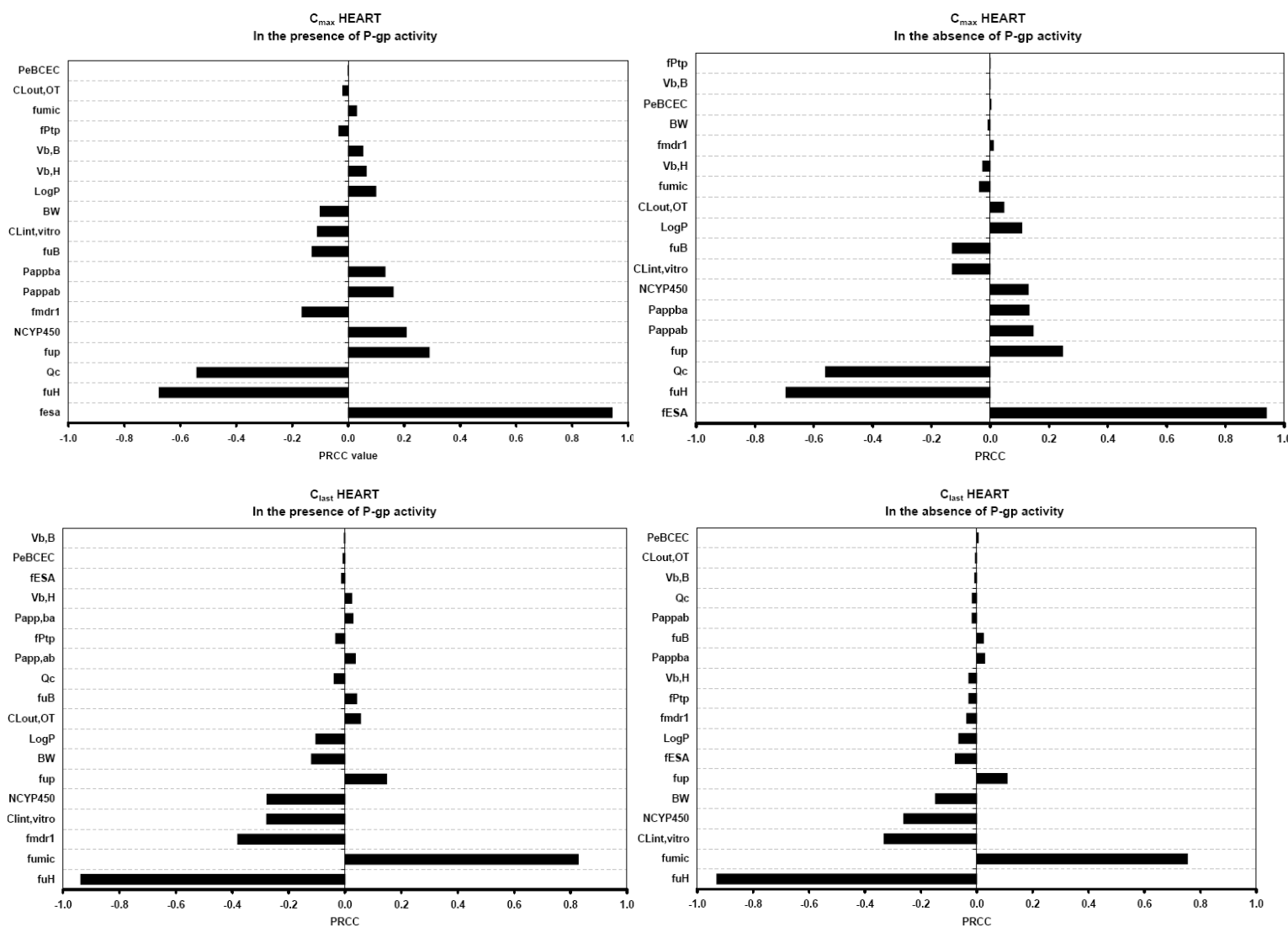


Figure 6. PRCC between each of the eighteen input parameters and C_{max} or C_{last} of domperidone predicted in heart tissue in the presence or absence of P-gp activity.

Brain: The apparent permeability of domperidone measured through brain capillary cells monolayer, Pe_{BCEC} , is ranked at the first or second position among the most important parameters involved in C_{max} and C_{last} variability predicted in brain tissue for both conditions of P-gp activity with PRCC values above 0.80 (Figure 7). Similarly to heart tissue, f_{uB} and f_{ESA} are also important model parameters when predicting model outcomes in both conditions of P-gp activity. The genetic expression of P-gp in this tissue is another crucial parameter in estimating C_{max} and C_{last} in brain, with a PRCC value varying from -0.57 to -0.77. Interestingly, the parameter related to the additional

transporter, $CL_{out,OT}$, was the fourth most influential parameter on the imprecision of C_{last} in brain tissue in the presence of P-gp activity, and had a significant impact in all model outcomes in this tissue in the absence of P-gp activity with PRCC values ranging from -0.46 to -0.88.

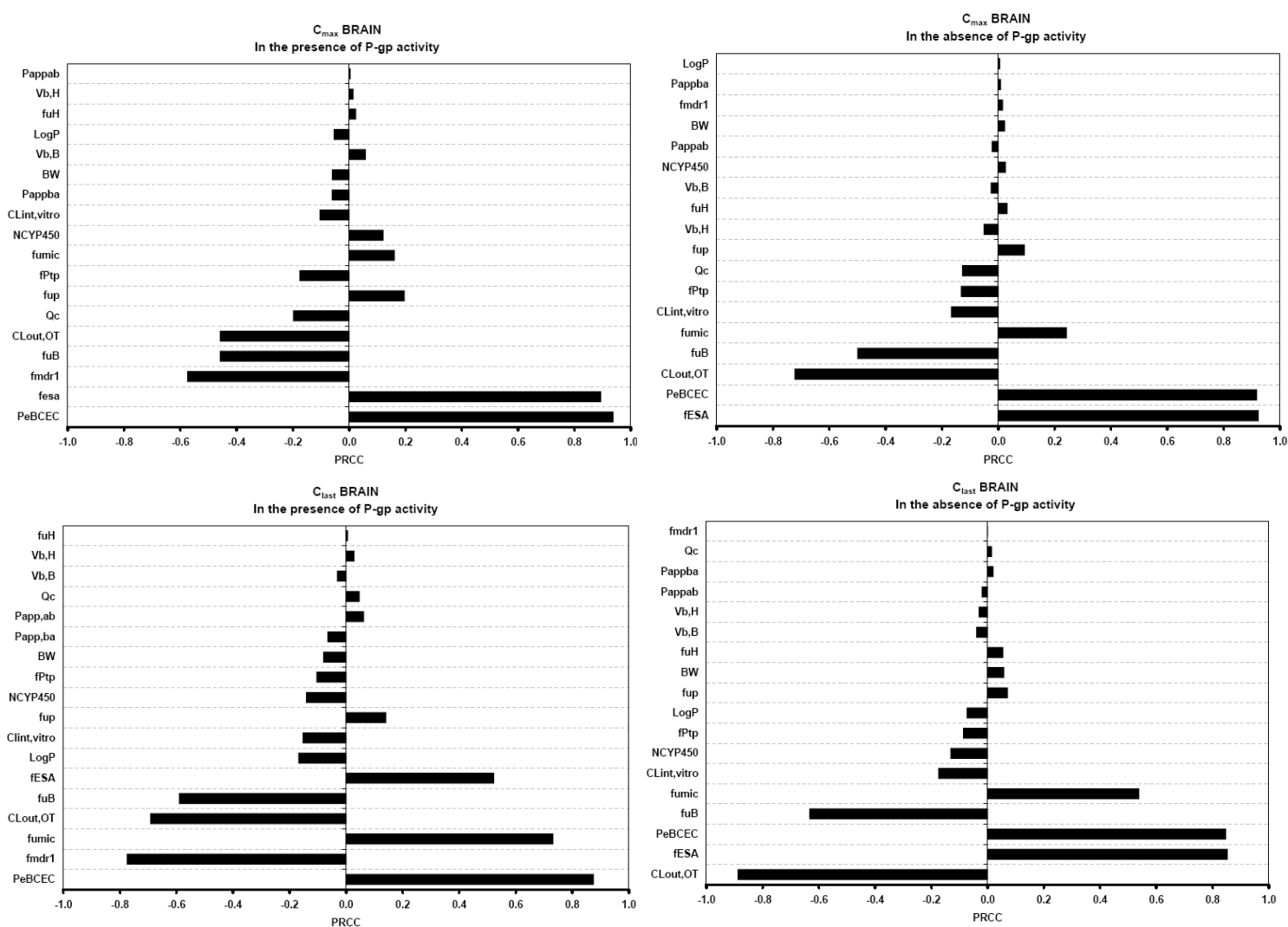


Figure 7. PRCC between each of the eighteen input parameters and C_{max} and C_{last} of domperidone predicted in brain tissue in the presence or absence of P-gp activity.

As mentioned before, information on some input parameters, namely the unbound fraction of drug in heart and brain, the blood-tissue exchange surface area, tissue:plasma

partition coefficient, efflux clearance of the additional transporters expressed at the BBB, and the genetic expression of P-gp in tissues, was not available. The above results have been obtained using a CV of these parameters fixed to 20% (Table I). To investigate effects of these parameters changes on model outcomes variability and on the identification of important inputs, we have undergone an exploratory analysis by assigning a hypothetical but large range of variation. We used a CV of [5-100%] to perform additional Monte-Carlo simulations coupled with PRCC calculations. The lowest outcomes variability is observed in plasma for which tissue model outcomes slightly increase with the inputs CV (Figure 8). Whereas the variability of C_{last} and AUC remains stable with the increase of input CV up to 40% in liver tissue, this variability linearly increases with the input CV above 40%. All model outcomes predicted in brain and heart tissues are also sensitive to the CV of the uncertain input parameters. These behaviours were expected since, as shown above, the PRC approach has identified f_{uH} , f_{uB} , f_{ESA} , f_{mdr1} , $CL_{out,OT}$ as being the most critical parameters for the prediction imprecision in heart and brain tissues.

The ranking is relatively stable since only a slight interchange was observed with respect to the change in CVs of the uncertain input parameters (Figure 9 as a typical example), which indicates the robustness of the PRCC method. For example, increasing the CV of the uncertain parameters up to 20% will rank Pe_{BCEC} and f_{esa} at the first and second position of the most important inputs involved in imprecision of C_{max} predicted in WT mice brain tissue. The increase of uncertain parameters CV above 40% switches the ranking of f_{ESA} and Pe_{BCEC} . However, this kind of slight interchange does not influence the findings of the GSA study, keeping the most important parameters unchanged ($|PRCC| > 0.5$). A similar behaviour has been observed for the other model outcomes (not shown here). This shows that the magnitude of the uncertainty of some input parameters does not significantly influence the overall conclusion of the present GSA.

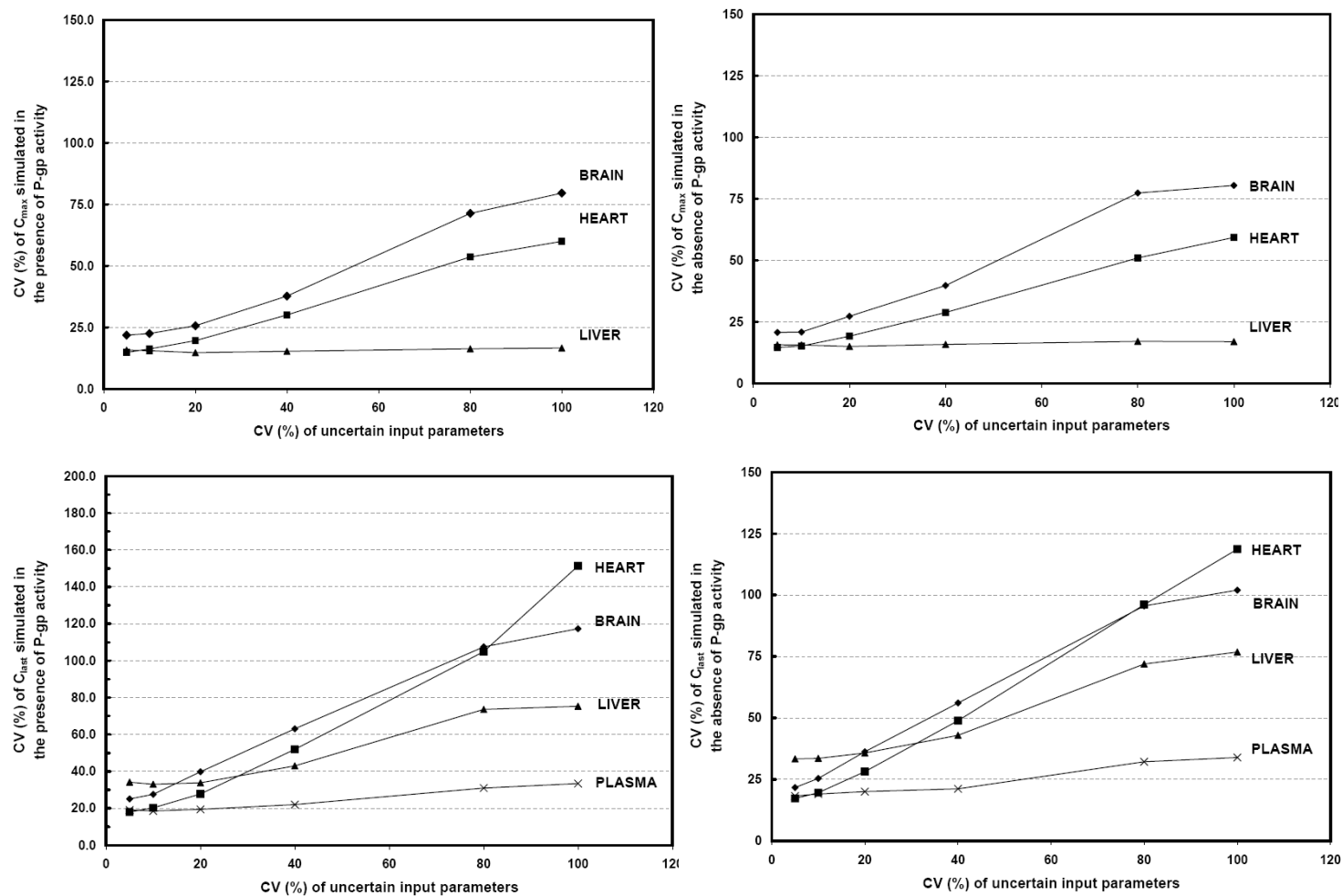


Figure 8. Exploratory analysis of those input parameters lacking a priori information and their effect on variability of C_{max} and C_{last} predicted in mice tissues.

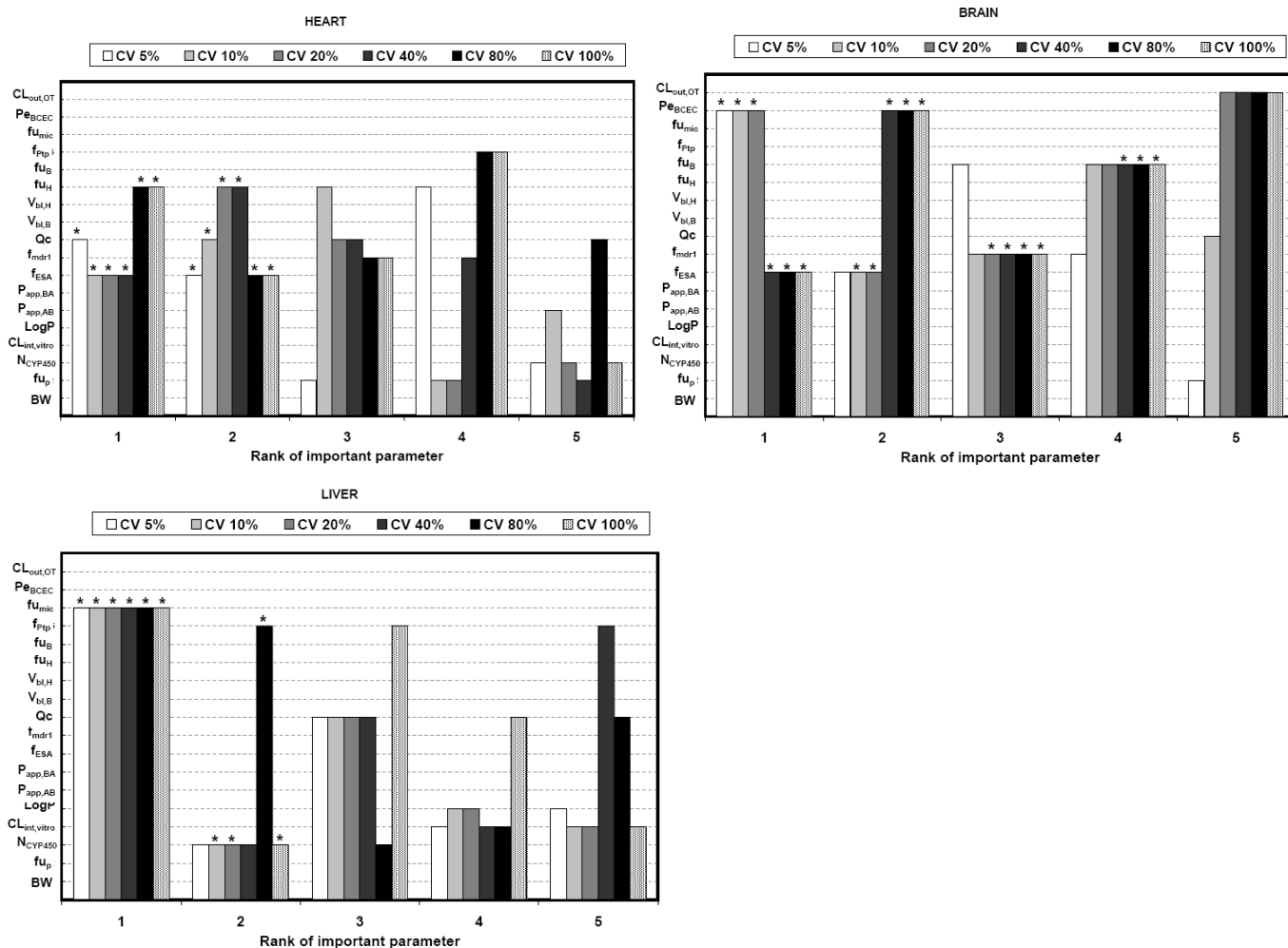


Figure 9. Exploratory analysis of those input parameters lacking a priori information and their effect on identification and ranking of important parameters involved in the imprecision of C_{max} predicted in mice tissues in the presence of P-gp activity.

4. Discussion

In a previous work (Fenneteau, Turgeon et al. 2009), we have proposed a PBPK model to improve our understanding and prediction of a P-gp substrate disposition. For this, we included the relevant tissues and organs in the model structure, and those parameters that accounted for P-gp activity and expression in mouse brain and heart tissues. Model parameters, expressed as mean values, were mainly extrapolated from *in vitro* measurements, or directly taken from literature. However, depending on the available information and knowledge about the physiological or biochemical process, these values can vary within a range of known or potential values. Thus, the success of model prediction highly depends on the estimation precision of these input parameters. For this purpose, an uncertainty and sensitivity analysis is usually performed to investigate the influence of parameters uncertainty and variability on the variability of the model outcomes and to identify the most important input parameters contributing to the output prediction imprecision. Sensitivity analyses in PBPK modeling and toxicokinetic studies have generally been limited to local analysis where one parameter is perturbed at a time while keeping the others at their nominal values (Tardif, Droz et al. 2002; Sweeney, Gargas et al. 2003). Whereas this method is relatively easy to apply for parameter sensitivity analysis, it is more relevant to globally consider parameter sensitivity for complex models comprising numerous inputs with large variability and uncertainty (Hamby 1994; Helton and Davis 2002; Saltelli 2002; Zhang and Rundell 2006). In the PK modeling field, application of GSA has also gained attention in recent years. For example, a global approach has been performed to explore the sensitivity of a PK/PD model to uncertain input parameters of a compartmental model (Gueorguieva, Nestorov et al. 2005), to reduce the dimensionality and complexity of a whole body PBPK model for diazepam in rats (Gueorguieva, Nestorov et al. 2006), or to identify important input parameters of a PBPK model for experimental design issues (Brochot, Smith et al. 2007). While the input factors are often correlated in biological and physiological systems, the sensitivity analysis generally carried out in PBPK modeling does not account for these correlations. The current work introduces in PBPK modeling the GSA approach to address these limitations by incorporating the effect of correlations among inputs parameters using Monte-Carlo simulations and PRCC calculations. When applied to our model, a moderate variability in model outcomes was observed in liver, heart, and

brain tissues and explained through the identification of the most important model parameters. Nestorov proposed the *auto-sensitivity* concept to refer to the sensitivity of a model outcome in a specific tissue with respect to its own parameters, and the *cross-sensitivity* for the sensitivity of a model outcome in a tissue with respect to another tissue parameters (Nestorov, Aarons et al. 1997). In our analysis, an auto-sensitivity of C_{\max} and C_{last} predicted in brain and heart compartments was observed with respect to those secondary parameters used to estimate apparent diffusion and apparent efflux of unbound drug through the blood-tissue membrane, namely f_{ESA} , f_{uH} , f_{uB} , f_{up} , f_{mdr1} and Pe_{BCEC} . These findings also illustrate the cross-sensitivity of prediction in these tissues with respect to parameters related to hepatic metabolism, such as f_{umic} . This shows that imprecision of model outcomes in heart and brain are, to a certain extent, related to upstream metabolism processes. We also observed an auto-sensitivity for liver and a cross-sensitivity for plasma with respect to these metabolism-related parameters (ie f_{umic} , N_{CYP450} , $CL_{\text{int vitro}}$, f_{up}). These results are consistent with previous studies which identified Michaelis-Menten parameters of drug biotransformation among the important parameters for liver and plasma concentrations (Sweeney, Gargas et al. 2003; Brochot, Smith et al. 2007).

The unbound fraction of drug in tissues, f_{u} , which was identified as a crucial parameter of transport-based model, has already been experimentally measured in mice brain with a coefficient of variation of 11% (Wan, Rehngren et al. 2007). However, it is still difficult to accurately estimate, *a priori*, this parameter from tissue composition and intrinsic properties of the drug with a similar exactitude. Indeed, a two-to-three-fold error of partition coefficient values, used for the calculation of f_{ut} , is judged acceptable. Since one of the purposes of PBPK modeling is to predict drug disposition prior to *in vivo* experiments (Poulin and Theil 2002; Poulin and Theil 2002; Peters and Hultin 2008; Fenneteau, Turgeon et al. 2009), this difficulty is likely to constraint the power of the prediction of PBPK models. The present findings confirm that imprecision of *a priori* methods of input parameters estimation has to be accounted for in predictive PBPK modeling.

The sensitivity of brain to the permeability surface area (PSA) has been identified by Nestorov and others through a sensitivity analysis of a PBPK model for homologous series of barbiturates in the rat (Nestorov, Aarons et al. 1997). These authors used a permeability rate limited model for brain tissue where the capillary membrane permeability was assumed to be the limiting factor. Our transport-based model expressed PSA using secondary parameters, namely the apparent permeability of drug through brain endothelial cells and blood-tissue surface area. The GSA performed on our model gave similar results to those obtained by Nestorov and co-authors, but identified more precisely these secondary parameters as the two most important parameters involved in C_{max} imprecision. Our uncertainty analysis suggested that additional transporters may have an efflux function in domperidone distribution in brain tissue. $CL_{out,OT}$ was found to be an important parameter, especially when P-gp activity is absent. However, involvement of these additional transporters needs further investigation for more evidence. The present work points out to issues that need to be pursued to get a deeper quantitative and qualitative knowledge about passive diffusion and active transport processes involved in drug distribution in brain tissue.

Interestingly, though correlations of BW with model outcomes have been observed (Figure 3), the BW for which the variability spreads proportionally to the tissue volumes variability was not identified among the important parameters of C_{max} and C_{last} of the studied tissues. By accounting for the several correlations of BW with other inputs, Monte-Carlo/PRCC approach allowed estimating the true contribution of BW. This result confirms the benefit of using global sensitivity approaches (Helton and Davis 2002; Saltelli 2002; Zhang and Rundell 2006) when neglecting input correlations can be misleading. Indeed, performing a LSA through a normalized sensitivity coefficient also identified BW among the most important parameters (rank 1 or 2) in the prediction imprecision of C_{last} for all tissues (not shown herein). This LSA result suggests that BW tends to be of higher importance than mechanistic parameters directly involved in drug distribution in brain and heart tissues, such as the unbound fraction of drug in tissue, *mdr1* expression, in vitro drug diffusion rate or efflux rate. However, it is unlikely that such a common parameter can be more influential on drug distribution within a specific tissue than its intrinsic limiting factors of distribution. LSA is still appropriate for less complex studies such as when the focus is put on isolated uncertain inputs.

In this study, we have shown that the PRCC calculation was able to delineate the most influential input parameters among those correlated on model outcome variability. Therefore, it is a good practice to adopt the PRC method in order to perceive the real input-output relationships of a PBPK model. It is worth mentioning, that the methodology of GSA for correlated inputs presented herein is not drug specific and can thus be transferred to other drugs and species. The ranking results of the present GSA can serve as reference for PBPK models with similar structures and drugs having similar physicochemical, metabolism, distribution properties, and which transport-related parameters are of the same order of magnitude.

5. Conclusion

In the present work, a GSA accounting for the correlation between input parameters has been introduced and performed on a PBPK model we previously developed by considering the role of P-gp transporters in specific tissues. This approach allowed identification of those parameters whose estimations highly influence prediction of the outcomes of our PBPK model. These parameters are related to the passive diffusion and active transport of the unbound drug through the blood-tissue membrane. Additional research on these parameters is required for strengthening the physiological knowledge of drug distribution in mammalian tissues expressing P-gp.

6 Acknowledgments

This work has been supported by FRSQ through PhD scholarship held by Frédérique Fenneteau. FCAR and MITACS are also acknowledged for their support. Financial support of the NSERC is held by Dr. Fahima Nekka.

APPENDIX

The general framework of the PBPK model retained at the end of the modeling process (Fenneteau, Turgeon et al. 2009) is presented in Figure A1. This PBPK model comprises a mechanistic transport based (MTB) model for heart and brain tissues, and a well-stirred WS model for all other tissues. The MTB model is illustrated in Figure A2. When applied to heart tissue, the MTB model involves apparent passive diffusion and P-gp-mediated transports. For brain, the MTB model involves apparent passive diffusion, P-gp mediated transports and a potential additional efflux transport. However, this assumption should be further studied through a sensitivity analysis and additional *in vitro* and *in vivo* experiments.

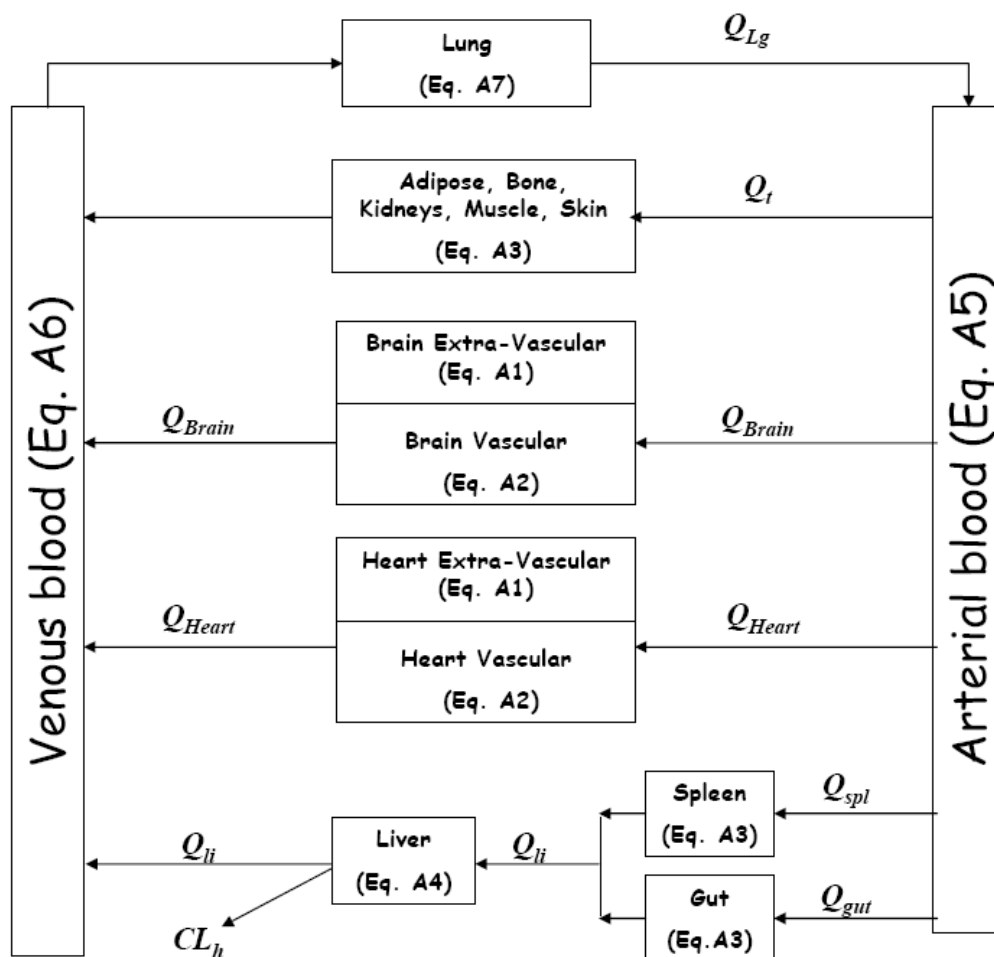


Figure A 1. Framework of the PBPK model proposed to account for transporters activity in heart and brain tissues.

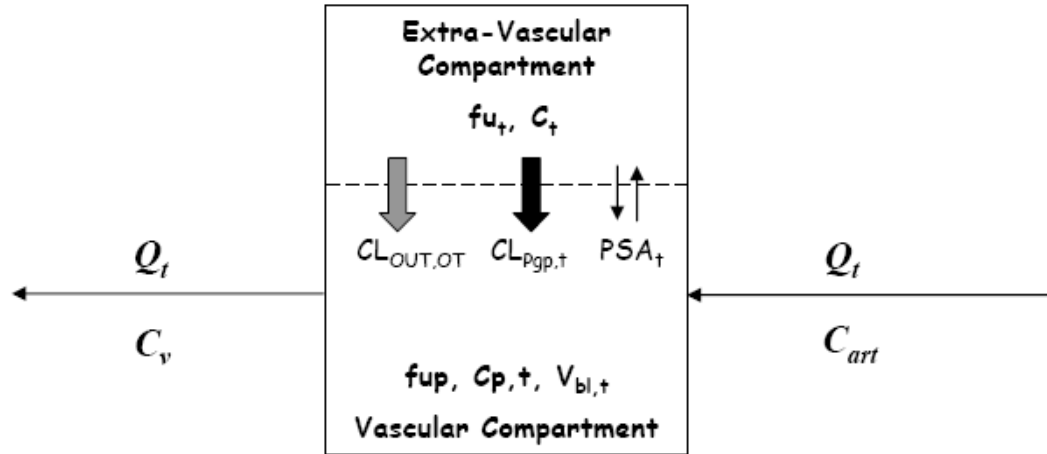


Figure A 2. Mechanism-based Tissue Model proposed and applied to heart and brain tissues.

The parameters used in the figures and equations presented in this section refer to concentration (C), volume (V), blood flow to tissue (Q), tissue:plasma partition coefficient (P_{tp}), blood:plasma ratio (BP), unbound fraction of drug (f_u), clearance (CL), and permeability-surface area product (PSA). The subscripts refer to cardiac output (co), tissue (t), kidneys (k), spleen (sp), gut (g), plasma (p), liver (li), lung (lg), heart (h), arterial blood (ab), venous blood (vb), blood in equilibrium with tissue (bl), venous blood living tissue (v,t), unbound fraction (u), bound fraction (b), intracellular water (iw), extracellular water (ew), neutral lipid (nl), neutral phospholipid (np), and microsomal binding (mic). Some subscripts refer to active transport processes, such as P-gp mediated transport (P-gp), as well as other transporters (OT) such as influx transporters (in,OT) and additional efflux transporters (out, OT).

Extravascular Space of Brain or Heart

$$V_t \times \frac{dC_t}{dt} = PSA_t \times (f_{u_p} \times C_{p,t} - f_{u_t} \times C_t) - f_{u_t} \times C_t \times (CL_{Pgp,t} + CL_{out,OT}) \quad (A1)$$

Vascular Space of Brain and Heart

$$V_{bl,t} \times \frac{dC_{v,t}}{dt} = Q_t \times (C_{ab} - C_{v,t}) + PSA_t \times (f_{u_t} \times C_t - f_{u_p} \times C_{p,t}) + f_{u_t} \times C_t \times (CL_{Pgp,t} + CL_{out,OT}) \quad (A2)$$

where $CL_{out,OT}$ represents the efflux clearance of the drug due to additional transporter. This parameter was adjusted to experimental data for brain tissue, whereas it was set to 0 for heart tissue.

Other non-eliminating tissues

$$V_t \times \frac{dC_t}{dt} = Q_t \times (C_{ab} - C_{v,t}) \quad (A3)$$

eliminating tissues (liver)

$$V_{li} \times \frac{dC_{li}}{dt} = (Q_{li} - Q_{sp} - Q_g) \times C_{ab} + Q_{spl} \times C_{v,spl} + Q_g \times C_{v,g} - \frac{fu_p}{fu_{mic}} CL_{int} \cdot C_{v,li} - Q_{li} \times C_{v,li} \quad (A4)$$

where $CL_{int} = V_{max}/K_m * N_{CYP450}$ and fu_{mic} is the fraction unbound to liver microsomes.

arterial blood

$$V_{ab} \times \frac{dC_{ab}}{dt} = Q_{co} \times (C_{v,lg} - C_{ab}) \quad (A5)$$

venous blood

$$V_{vb} \times \frac{dC_{vb}}{dt} = \sum_t (Q_t \times C_{v,t}) - Q_{co} \times C_{vb} \quad (A6)$$

Lung

$$V_{lg} \times \frac{dC_{lg}}{dt} = Q_{co} \times (C_{vb} - C_{v,lg}) \quad (A7)$$

with

$$C_{v,x} = \frac{C \times BP}{P \cdot tp, x} \quad (A8)$$

where x stands for t, sp, li and lg.

REFERENCES

- Austin, R. P., P. Barton, et al. (2002). "The influence of nonspecific microsomal binding on apparent intrinsic clearance, and its prediction from physicochemical properties." Drug Metab Dispos 30(12): 1497-503.
- Ayrton, A. and P. Morgan (2001). "Role of transport proteins in drug absorption, distribution and excretion." Xenobiotica 31(8/9): 469-497.
- Blower, S. M. and H. Dowlatabadi (1994). "Sensitivity and Uncertainty Analysis of Complex Models of Disease Transmission: An HIV Model, as an Example." International Statistical Review 62(2): 229-243
- Bois, F. Y. (2000). "Statistical analysis of Fisher et al. PBPK model of trichloroethylene kinetics." Environ Health Perspect 108 Suppl 2: 275-82.
- Brochot, C., T. J. Smith, et al. (2007). "Development of a physiologically based toxicokinetic model for butadiene and four major metabolites in humans: global sensitivity analysis for experimental design issues." Chem Biol Interact 167(3): 168-83.
- Brown, R. P., M. D. Delp, et al. (1997). "Physiologically parameter values for physiologically based pharmacokinetic models." Toxicol. Ind. Health 13(4): 407-483.
- Cameron, H. A., A. J. Reyntjens, et al. (1985). "Cardiac arrest after treatment with intravenous domperidone." Br. Med. J. 290: 160.
- Chan, M. P., S. Morisawa, et al. (2006). "A physiologically based pharmacokinetic model for endosulfan in the male Sprague-Dawley rats." Environ Toxicol 21(5): 464-78.
- Covington, T. R., P. Robinan Gentry, et al. (2007). "The use of Markov chain Monte Carlo uncertainty analysis to support a Public Health Goal for perchloroethylene." Regul Toxicol Pharmacol 47(1): 1-18.
- Dalvi, R. R. (1988). "Comparative in vitro and in vivo drug metabolism in major and minor food-producing species." Vet Hum Toxicol 30 Suppl 1: 22-5.
- Dalvi, R. R., V. A. Nunn, et al. (1987). "Hepatic cytochrome P-450 dependent drug metabolizing activity in rats, rabbits and several food-producing species." J Vet Pharmacol Ther 10(2): 164-8.
- Dalvi, R. R., V. A. Nunn, et al. (1987). "Studies on comparative drug metabolism by hepatic cytochrome P-450-containing microsomal enzymes in quail, ducks, geese, chickens, turkeys and rats." Comp Biochem Physiol C 87(2): 421-4.
- Davis, A. M., P. J. Webborn, et al. (2000). "Robust assessment of statistical significance in the use of unbound/intrinsic pharmacokinetic parameters in quantitative structure-pharmacokinetic relationships with lipophilicity." Drug Metab Dispos 28(2): 103-6.
- de Lange, E. C. (2004). "Potential role of ABC transporters as a detoxification system at the blood-CSF barrier." Adv Drug Deliv Rev 56(12): 1793-809.
- Evans, M. V. and M. E. Andersen (2000). "Sensitivity analysis of a physiological model for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD): assessing the impact of specific model parameters on sequestration in liver and fat in the rat." Toxicol Sci 54(1): 71-80.
- Evans, M. V., S. M. Dowd, et al. (2008). "A physiologically based pharmacokinetic model for intravenous and ingested dimethylarsinic acid in mice." Toxicol Sci 104(2): 250-60.
- Faassen, F., G. Vogel, et al. (2003). "Caco-2 permeability, P-glycoprotein transport ratios and brain penetration of heterocyclic drugs." Int. J. Pharm. 263(1-2): 113-122.

- Fenneteau, F., J. Li, et al. (2008). "Assessing Drug Distribution in Tissues Expressing P-glycoprotein Using Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling: Identification of Important Model Parameters through Global Sensitivity Analysis." Submitted to J Pharmacokinet Pharmacodyn.
- Fenneteau, F., J. Turgeon, et al. (2009). "Assessing Drug Distribution in Tissues Expressing P-glycoprotein through Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling: Model Structure and Parameters Determination." Accepted by JTBIOMED.
- Fenneteau, F., J. Turgeon, et al. (2009). "Assessing drug distribution in tissues expressing P-glycoprotein through physiologically based pharmacokinetic modelling: model structure and parameters determination." Theor Biol Med Model 6: 2:14.
- Fromm, M. F. (2003). "Importance of P-glycoprotein for drug disposition in humans." Eur. J. Clin. Invest. 33(suppl. 2): 6-9.
- Golden, P. L. and G. M. Pollack (2003). "Blood-brain barrier efflux transport." J. Pharm. Sci. 92(9): 1739-1753.
- Greenblatt, D. J. and L. L. von Moltke (2005). "Interaction of warfarin with drugs, natural substances, and foods." J. Clin. Pharmacol. 45(2): 127-132.
- Gueorguieva, I., I. A. Nestorov, et al. (2005). "Uncertainty analysis in pharmacokinetics and pharmacodynamics: application to naratriptan." Pharm Res 22(10): 1614-26.
- Gueorguieva, I., I. A. Nestorov, et al. (2006). "Reducing whole body physiologically based pharmacokinetic models using global sensitivity analysis: diazepam case study." J Pharmacokinet Pharmacodyn 33(1): 1-27.
- Hamby, D. M. (1994). "A Review of Techniques for Parameters Sensitivity Analysis of Environmental Models." Env. Monitoring. Assess. 32: 135-154.
- Harris, R. Z., G. R. Jang, et al. (2003). "Dietary effects on drug metabolism and transport." Clin. Pharmacokinet. 42(13): 1071-1088.
- Helton, J. C. and F. J. Davis (2002). "Illustration of sampling-based methods for uncertainty and sensitivity analysis." Risk Anal 22(3): 591-622.
- Houduo, Q. and S. Defeng (2006). "A Quadratically Convergent Newton Method for Computing the Nearest Correlation Matrix." SIAM J. Matrix Anal. Appl. 28(2): 360-385.
- Iman, R. L. and W. J. Conover (1980). "Small Sample Sensitivity Analysis Techniques for Computer-Models, with an Application to Risk Assessment." Comm. Stats. Part A-Theory and Meth. 9(17): 1749.
- Iman, R. L., J. C. Helton, et al. (1981). "An Approach to Sensitivity Analysis Techniques for Computer Models. 2. Ranking of Input Variables, Response-Surface Validation, Distribution Effect, and Technique Synopsis." J. Qual. Technol. 13(4): 232.
- Iman, R. L., J. C. Helton, et al. (1981). "An Approach to Sensitivity Analysis Techniques for Computer Models. I. Introduction, Input Variable Selection, and Preliminary Variable Assessment " J. Qual. Technol. 13(3): 174.
- Jolliet, P., S. Nion, et al. (2007). "Evidence of lowest brain penetration of an antiemetic drug, metopimazine, compared to domperidone, metoclopramide and chlorpromazine, using an in vitro model of the blood-brain barrier." Pharmacol Res 56(1): 11-7.
- Kaliss, N. and D. Pressman (1950). "Plasma and blood volumes of mouse organs, as determined with radioactive iodoproteins." Proc Soc Exp Biol Med 75(1): 16-20.
- Kalvass, J. C. and T. S. Maurer (2002). "Influence of nonspecific brain and plasma binding on CNS exposure: implications for rational drug discovery." Biopharm Drug Dispos 23(8): 327-38.
- Kamboj, S., J. J. Cheng, et al. (2005). "Deterministic vs. probabilistic analyses to identify sensitive parameters in dose assessment using RESRAD." Health Phys 88(5 Suppl): S104-9.

- Khor, S., H. Bozigian, et al. (1991). "Potential error in the measurement of tissue to blood distribution coefficients in physiological pharmacokinetic modeling. Residual tissue blood. II. Distribution of phencyclidine in the rat." Drug Metab Dispos 19(2): 486-90.
- Law, A. M. and W. D. Kelton (2000). Simulation Modeling and Analysis. Boston, Mc. Graw Hill.
- Limpert, E. (2001). "Log-normal Distribution across the Sciences: Keys and Clues." Biosciences 51(5): 341.
- Marino, S., I. B. Hogue, et al. (2008). "A methodology for performing global uncertainty and sensitivity analysis in systems biology." J Theor Biol 254(1): 178-96.
- Mayer, U., E. Wagenaar, et al. (1996). "Substantial excretion of digoxin via the intestinal mucosa and prevention of long term digoxin accumulation in the brain by mdr1a P-glycoprotein." Br. J. Pharmacol. 119(5): 1038-44.
- McCabe, B. J. (2004). "Prevention of food-drug interactions with special emphasis on older adults." Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care 7(1): 21-26.
- Nestorov, I. (2001). "Modelling and simulation of variability and uncertainty in toxicokinetics and pharmacokinetics." Toxicol. Lett. 120: 411-420.
- Nestorov, I. A., L. J. Aarons, et al. (1997). "Physiologically based pharmacokinetic modeling of a homologous series of barbiturates in the rat: a sensitivity analysis." J Pharmacokinet Biopharm 25(4): 413-47.
- Nong, A., M. D. Taylor, et al. (2008). "Manganese tissue dosimetry in rats and monkeys: accounting for dietary and inhaled Mn with physiologically-based pharmacokinetic modeling." Toxicol Sci.
- Norris, D. A., G. D. Leesman, et al. (2000). "Development of predictive pharmacokinetic simulation models for drug discovery." J. controlled. release 65: 55-62.
- Osborne, R. J., M. L. Slevin, et al. (1985). "Cardiotoxicity of intravenous domperidone." Lancet: 385.
- Peters, S. A. (2008). "Evaluation of a generic physiologically based pharmacokinetic model for lineshape analysis." Clin Pharmacokinet 47(4): 261-75.
- Peters, S. A. and L. Hultin (2008). "Early identification of drug-induced impairment of gastric emptying through physiologically based pharmacokinetic (PBPK) simulation of plasma concentration-time profiles in rat." J Pharmacokinet Pharmacodyn 35(1): 1-30.
- Poulin, P. and F. Theil (2002). "Prediction of Pharmacokinetics Prior to In vivo Studies. I. Mechanism-Based Prediction of Volume of Distribution." J. Pharm. Sci. 91(1): 129-155.
- Poulin, P. and F. Theil (2002). "Prediction of Pharmacokinetics prior to in Vivo Studies. II. Generic Physiologically Based Pharmacokinetic Models of Drug Disposition." J. Pharm. Sci. 91(5): 1358-1370.
- Quinn, N., D. Parkes, et al. (1985). "Cardiotoxicity of domperidone." lancet.
- Rodgers, T., D. Leahy, et al. (2005). "Physiologically based pharmacokinetic modeling 1: predicting the tissue distribution of moderate-to-strong bases." J Pharm Sci 94(6): 1259-76.
- Rowland, M., L. Balant, et al. (2004). "Physiologically based pharmacokinetics in drug development and regulatory science: a workshop report (Georgetown University, Washington, DC, May 29-30, 2002)." AAPS PharmSci. 6(1): E6.
- Sakuratani, Y., K. Kasai, et al. (2006). "Comparison of Predictivities of Log P Calculation Models Based on 132 Simple Organic Compounds." QSAR Comb. Sci. 26(1): 109-116.
- Saltelli, A. (2002). "Sensitivity analysis for importance assessment." Risk Anal 22(3): 579-90.
- Saltelli, A. and K. S. Chan, E.M. (2000). Sensitivity Analysis.

- Seuntjens, P., D. Mallants, et al. (2002). "Sensitivity analysis of physical and chemical properties affecting field-scale cadmium transport in a heterogeneous soil profile." Journal of Hydrology 264(1-4): 185-200.
- Summerfield, S. G., K. Read, et al. (2007). "Central nervous system drug disposition: the relationship between in situ brain permeability and brain free fraction." J Pharmacol Exp Ther 322(1): 205-13.
- Sweeney, L. M., M. L. Gargas, et al. (2003). "Physiologically based pharmacokinetic model parameter estimation and sensitivity and variability analyses for acrylonitrile disposition in humans." Toxicol. Sci. 71(1): 27-40.
- Tanigawara, Y. (2000). "Role of P-glycoprotein in drug disposition." Ther. Drug. Monit. 22(1): 137-140.
- Tardif, R., P. O. Droz, et al. (2002). "Impact of human variability on the biological monitoring of exposure to toluene: I. Physiologically based toxicokinetic modelling." Toxicol Lett 134(1-3): 155-63.
- Theil, F., T. Guentert, et al. (2003). "Utility of physiologically based pharmacokinetic models to drug development and rational drug discovery candidate selection." Toxicol. Lett. 138: 29-49.
- Wan, H., M. Rehngren, et al. (2007). "High-throughput screening of drug-brain tissue binding and in silico prediction for assessment of central nervous system drug delivery." J Med Chem 50(19): 4606-15.
- Zhang, C. L. and F. A. Popp (1994). "Log-normal distribution of physiological parameters and the coherence of biological systems." Medical Hypotheses 43(1): 11-16.
- Zhang, Y. and A. Rundell (2006). "Comparative study of parameter sensitivity analyses of the TCR-activated Erk-MAPK signalling pathway." Syst Biol (Stevenage) 153(4): 201-11.

CHAPITRE IV

PHYSIOLOGICALLY BASED PREDICTIONS OF THE IMPACT OF INHIBITION OF INTESTINAL AND HEPATIC METABOLISM ON HUMAN PHARMACOKINETICS OF CYP3A SUBSTRATES

Frederique Fenneteau¹, Patrick Poulin², Fahima Nekka^{1,3}.

¹ Faculté de Pharmacie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

² Consultant, 4009 rue Sylvia Daoust, Québec city, Canada, G1X 0A6

³ Centre de Recherche Mathématiques, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Corresponding author: Fahima Nekka

C.P. 6128, Succursale Centre Ville

Montréal, Québec

H3C 3J7

Article publié en ligne dans
Journal of Pharmaceutical Sciences, 2009

Abstract

The first objective of the present study was to predict the pharmacokinetics of selected CYP3A substrates administered at a single oral dose to human. The second objective was to predict pharmacokinetics of the selected drugs in presence of inhibitors of the intestinal and/or hepatic CYP3A activity.

We developed a whole-body physiologically-based pharmacokinetics (WB-PBPK) model accounting for presystemic elimination of midazolam (MDZ), alprazolam (APZ), triazolam (TRZ), and simvastatin (SMV). The model also accounted for concomitant administration of the above-mentioned drugs with CYP3A inhibitors, namely ketoconazole (KTZ), itraconazole (ITZ), diltiazem (DTZ), saquinavir (SQV), and a furanocoumarin contained in grape-fruit juice (GFJ), namely 6',7'-dihydroxybergamottin (DHB). Model predictions were compared to published clinical data. An uncertainty analysis was performed to account for the variability and uncertainty of model parameters when predicting the model outcomes. We also briefly report on the results of our efforts to develop a global sensitivity analysis and its application to the current WB-PBPK model.

Considering the current criterion for a successful prediction, judged satisfied once the clinical data are captured within the 5th and 95th percentiles of the predicted concentration-time profiles, a successful prediction has been obtained for a single oral administration of MDZ and SMV. For APZ and TRZ, however, a slight deviation toward the 95th percentile was observed especially for C_{\max} but, overall, the *in vivo* profiles were well captured by the PBPK model. Moreover, the impact of DHB-mediated inhibition on the extent of intestinal pre-systemic elimination of MDZ and SMV has been accurately predicted by the proposed PBPK model. For concomitant administrations of MDZ and ITZ, APZ and KTZ, as well as SMV and DTZ, the *in vivo* concentration-time profiles were accurately captured by the model. A slight deviation was observed for SMV when co-administered with ITZ, whereas more important deviations have been obtained between the model predictions and *in vivo* concentration-time profiles of MDZ co-administered with SQV. The same observation was made for TRZ when administered with KTZ. Most of the pharmacokinetic parameters predicted by the PBPK model were successfully predicted within a two-fold error range either in the absence or presence of metabolism-based inhibition. Overall, the present study

demonstrated the ability of the PBPK model to predict DDI of CYP3A substrates with promising accuracy.

Keywords: physiological model; pharmacokinetics; oral absorption; first-pass effect; cytochrome P450; drug interactions; inhibition.

List of abbreviations

ADME	Absorption, distribution, metabolism, elimination
APZ	Alprazolam
$AUC_{0-t_{last}}$	Area under the plasma curve from time 0 to the time corresponding to the last measured concentration
CL_{INT}	Intrinsic clearance
CL_{tot}/F	Total drug clearance
C_{max}	Peak plasma concentration
CYP3A	Cytochrome P450 3A
DHB	6',7'-dihydroxybergamottin
DTZ	Diltiazem
F	Oral bioavailability
F_{abs}	Fraction of absorbed drug through the epithelial gut membrane
f_{inhib}	Inhibition factor
F_g	Fraction of drug that does not undergo intestinal presystemic elimination
F_h	Fraction of drug that does not undergo hepatic first pass effect
GFJ	Grapefruit juice
ITZ	Itraconazole
k_{degrad}	First-order rate of enzyme degradation
K_i	Inhibition constant
k_{inact}	Pseudo-first order apparent inactivation rate elicited by the inhibitor.
$K_{i,u}$	Unbound inhibition constant
K_m	Michaelis-Menten constant
KTZ	Ketoconazole
MDZ	Midazolam
WB-PBPK	Whole-Body Physiologically Based Pharmacokinetic
P_{tp}	Tissue:plasma partition coefficient
SMV	Simvastatin
t_{max}	Time to C_{max}
TRZ	Triazolam
$t_{1/2}$	Half-life of the drug
V_{max}	Maximum rate of drug biotransformation

1. Introduction

Early knowledge of properties of absorption, distribution, metabolism and elimination (ADME) of potential drug candidates is of major importance for the selection process during drug development and reduction of cost and time loss related to the selection failure (Grass and Sinko 2002). As the oral drug delivery is the preferred route of administration, the oral bioavailability (F) is one of the main pharmacokinetic (PK) properties accounting for drug selection (Schneider, Coassolo et al. 1999). The oral bioavailability depends on the extent of drug absorption as well as on intestinal and hepatic presystemic elimination. The main subset of cytochrome P450 (CYP450) family involved in presystemic elimination is the CYP3A isoenzymes which account for nearly 30% of the total hepatic CYP450 and approximately 70% of the total intestinal amount in humans (Michaletts 1998; Schuetz 2004). Knowing that several marketed drugs are substrates for CYP3A4, drug interactions related to CYP3A4-mediated metabolism are very common and can lead to serious adverse effects and clinical toxicity (Guengerich 1999). The majority of the reported cases of drug-drug interactions (DDI) have been caused by metabolism-based inhibition of one CYP3A4 substrate by another xenobiotic (Ishigam, Uchiyama et al. 2001). For all these reasons, early characterization of the pharmacokinetic and clinical consequences of DDI represents a major aspect to be addressed in drug development (Huang, Lesko et al. 1999; Huang and Lesko 2004; Chien, Lucksiri et al. 2006).

Within this context, it is necessary to develop quantitative tools to investigate the impact of metabolism-based inhibition on drug pharmacokinetics. While allometric scaling approaches have been extensively used in the last decade, their success is still limited when extrapolating mammalian pharmacokinetic data to human. These limitations are mainly attributed to the fact that allometric methods do not particularly account for the biochemical differences across species (Gueorguieva, Nestorov et al. 2004; Jones, Parrott et al. 2006). Moreover, characterization of DDI is often restricted to the information provided by the area under the curve (AUC), usually estimated before and after drug interaction using the alteration in the intrinsic clearance (Ishigam, Uchiyama

et al. 2001; Obach, Walsky et al. 2005; Chien, Luksiri et al. 2006). While this static approach has recently been improved to account for important processes involved in mechanistic models of drug interaction, such as the gut wall metabolism (Galetin, Hinton et al. 2007), the temporal aspect of the inhibitor kinetics remains neglected. Significant efforts are increasingly being made to adopt the physiologically based (PB) approach for the investigation of drug PK and drug-drug interactions (Schneider, Coassolo et al. 1999; Rowland, Balant et al. 2004; Rodgers, Leahy et al. 2005; Jones, Parrott et al. 2006; Jones, Parrott et al. 2006; Rodgers and Rowland 2006). Therefore, some authors have recently considered the dynamical changes of the hepatic concentration of the inhibitor for the simulation of PK profile of intravenously administered midazolam (MDZ) using PBPK modeling (Vossen, Sevestre et al. 2007). However, these authors had recourse to clinical data to optimize the input parameters involved in this specific PBPK model of DDI. Several PBPK models rely on those fitting procedures of human concentration-time profiles to correct for poor *in vitro-in vivo* correlations when performing predictions in human (Cong, Doherty et al. 2000; Kanamitsu, Ito et al. 2000; Ploeger, Mensinga et al. 2000; Bjorkman, Wada et al. 2001; Bjorkman 2005; Vossen, Sevestre et al. 2007; Peters 2008). Others resort to commercial software, which have the advantage of being user-friendly, but they have limited extension to more complex situations to encompass additional PK processes (Jones, Parrott et al. 2006; Peters 2008).

The novel aspects of the present study are (i) the integration of *in-vitro*-based prediction methods of ADM into a whole-body-PBPK (WB-PBPK), (ii) the use of the WB-PBPK modeling to predict DDI, by accounting for dynamical changes in inhibitor concentration in both gut and liver tissues, and (iii) the application of this methodology to several inhibitors and particularly to a furanocoumarin contained in grape-fruit juice (GFJ) for which no investigation has been made so far in PBPK modeling. The first objective of the current study was to predict the PK of selected CYP3A substrates administered at a single oral dose to healthy volunteers. The second objective was to predict pharmacokinetics of the selected drugs in presence of inhibitors of the intestinal and/or hepatic CYP3A activity. The developed WB-PBPK model also accounts for variability and uncertainty of some input parameters related to intrinsic properties of the

drug, its formulation, and human physiology through an uncertainty analysis. We also report the results of our effort to develop a global sensitivity analysis applied to the WB-PBPK model presented herein in a companion paper (Fenneteau and Nekka).

2. Methods

2.1 Selection Criteria for Drug Models

Targeting the main objective, four compounds have been selected for investigation based on the following criteria:

- The main isoenzymes of metabolism involved in drug biotransformation are the CYP3A.
- No relevant active transport is involved in drug absorption through the intestinal membrane.
- The main route of systemic elimination is the hepatic metabolism.
- The selected drugs cover a wide range of bioavailability.
- Availability of clinical concentration-time profile of the drug administered alone or in concomitance with an inhibitor of CYP3A to healthy volunteers.
- Availability of *in vitro* data of enzymatic metabolism parameters K_m and V_{max} obtained in human liver microsomes.

Using this selection process, we retained three benzodiazepines, namely midazolam (MDZ), alprazolam (APZ), and triazolam (TRZ), along with a statin, namely simvastatin (SMV) (Kroboth, McAuley et al. 1995; Kupferschmidt, Ha et al. 1995; von Moltke, Greenblatt et al. 1996; Greenblatt, Wright et al. 1998; Neuvonen, Kantola et al. 1998; Palkama, Ahonen et al. 1999; Mousa, Brater et al. 2000; Lilja, Neuvonen et al. 2004; Saari, Laine et al. 2006). The drug characteristics are presented in Table I.

MDZ is a short acting benzodiazepine widely used for preoperative sedation, induction, and maintenance of anaesthesia. This drug is also used for sedation of patients in intensive care units. MDZ is mainly metabolised by CYP3A isoforms in the liver into 4-OH-MDZ and α -OH-MDZ. The fraction of MDZ metabolized by CYP3A is $f_{m_{cyp}}=0.93$ (Venkatakrishnan, Obach et al. 2007). Previous clinical studies have revealed that the

concomitant use of CYP3A inhibitors significantly increases plasma concentrations and sedative effects of MDZ (Kupferschmidt, Ha et al. 1995; Palkama, Ahonen et al. 1999; Saari, Laine et al. 2006).

APZ is widely used for the treatment of anxiety and panic disorder. This benzodiazepine structure is similar to MDZ. APZ is biotransformed almost exclusively by CYP3A isoforms into inactive metabolites, namely 4-OH-APZ and α -OH-APZ (Greenblatt and Wright 1993; von Moltke, Greenblatt et al. 1994; Gorski, Jones et al. 1999).

TRZ is an oral hypnotic drug frequently used as a sleeping pill. Like MDZ and APZ, TRZ is biotransformed by CYP3A isoforms in 4-OH-TRZ and 1-OH-TRZ, two metabolites with less pharmacological activity than the parent drug (Kronbach, Mathys et al. 1989; Rawden, Carlile et al. 2005).

SMV is a HMG-CoA reductase inhibitor, a lipid-lowering agent widely used in the treatment of hypercholesterolemia. SMV is extensively metabolized in the human liver through biotransformation primarily mediated by CYP3A isoforms and to a less extent by CYP2C8 and 2C9. SMV is also metabolized by carboxylesterases in the gut wall and liver into the active metabolite, SMV-acid. High plasma concentrations of SMV increase the risk of musculoskeletal adverse effects. Indeed, myopathies and rhabdomyolysis with acute renal failure have been associated with concomitant use of SMV and CYP3A inhibitors (Zocor®, monography).

To investigate the ability of the WB-PBPK model to predict plasma concentration-time profiles under *in vivo* conditions, the model simulations were compared to clinical data available in healthy volunteers, in the presence or absence of CYP3A metabolic inhibition. In the following sections, the human PBPK model is presented for the above-mentioned CYP3A substrates. Furthermore, the resulting WB-PBPK model simulations for these substrates orally co-administered with drug inhibitors are also presented.

Table I. Drug related parameters used in the human WB-PBPK model

	Midazolam	Alprazolam	Triazolam	Simvastatin
Physico-chemical properties				
MW	362.25	308	343.2	418.57
pKa	6.0 ^h	2.4 ⁱ	2 ⁱ	neutral
LogP	2.95 ^j	2.09 ⁱ	2.42 ⁱ	4.68 ^j
Solubility (Sol _{buffer}) in mg/mL (pH)	0.082 (6.8) ^{g,v}	0.04 (6.8) ^k	0.0183 (6.8) ^a	0.0014 ^l
BP	0.55 ⁿ	0.78 ^{m,o}	0.62 ^{m,o}	0.58 ^b
fup	0.037 ⁱ	0.27 ⁱ	0.13 ⁱ	0.05 ^p
f _{m_{cyp}} ^c	0.93 ^q	0.74 ^q	0.95 ^q	0.92 ^q
Melting point (mp) in °C	153 ^r	228 ^r	233 ^r	135 ^r
Microsomal biotransformation				
	1-OH-MDZ^m	4'-OH-APZ^m	1-OH-TRZ^m	3'-hydroxy-SMV^p
Km1 (uM)	12	607	82	20.9
Vmax1(nmol/min/mg micr. prot)	0.40	2.1	0.53	2.07
		1'-OH-APZ^m	4-OH-TRZ^m	6'-exomethylene-SMV^p
Km2 (uM)		560	409	36.2
Vmax2 (nmol/min/mg micr. prot)		0.13	2.1	1.29
				3'-5'-Dihydrodiol SMV^p
Km3 (uM)	na	na	na	35
Vmax3 (nmol/min/mg micr. prot)	na	na	na	2.53
n (sigmoidicity factor)	na	1.3	na	n.a
In vitro Hepatic Intrinsic Clearance^d	$\Sigma(V_{maxi}/K_{mi})$	$\frac{\Sigma(V_{maxi}/K_{mi})}{x(n-1)/(nx(n-1)^{(1/n)})}$	$\Sigma(V_{maxi}/K_{mi})$	$\Sigma(V_{maxi}/K_{mi})$
In vitro Intestinal Intrinsic Clearance^d	$\Sigma(V_{maxi}/K_{mi})$	$\frac{\Sigma(V_{maxi}/K_{mi})}{x(n-1)/(nx(n-1)^{(1/n)})}$	$\Sigma(V_{maxi}/K_{mi})$	$\Sigma(V_{maxi}/K_{mi})$
Apparent permeability (Caco-2 cells)				
PappAB (cm/s)	18.7 x 10 ^{-6 s}	1.2 x 10 ^{-4 t}	2 x 10 ^{-4 u}	6.4 x 10 ^{-6 f}
PappBA (cm/s)	18.7 x 10 ^{-6 s}	na ^e	3.3 x 10 ^{-4 u}	15.6 x 10 ^{-6 f}

^a APLOGS estimation;

^b estimated according to BP = (fup+1)*(1-Ht) with Ht the hematocrit fraction in blood (=0.45);

^c fraction of drug metabolized by CYP3A;

^d mL/min/mg microsomal protein;

^e we assumed that Papp_{AB} ≈ Papp_{BA};

^f apical-to-basolateral and basolateral-to-apical apparent permeability of SMV through Caco-2 cells are not available in the literature. Consequently, we used published apparent permeability of cerivastatin through Caco-2 cells (Kivisto, Zuckunft et al. 2004). This statin has MW and LogP similar to those of SMV, and is not highly transported by P-gp mediated efflux. These data are used as order of magnitude of Papp_{AB} and Papp_{BA} for SMV.

^g www.wipo.int;

^h (Rodgers and Rowland 2006); ⁱ (Rodgers and Rowland 2007); ^j (2005); ^k (Williams, Sykora et al. 2001); ^l (Serajuddin, Ranadive et al. 1991); ^m ⁴¹; ⁿ ⁴⁶; ^o (Obach 1999); ^p (Prueksaritanont, Gorham et al. 1997); ^q (Venkatakrishnan, Obach et al. 2007); ^r (Wishart, Knox et al. 2006); ^s (Cummins, Jacobsen et al. 2004); ^t (Thomas, Brightman et al. 2008); ^u (von Moltke, Granda et al. 2004); ^v (Poulin and Theil 2002; Rawden, Carlile et al. 2005)

2.2 WB-PBPK Model Structure

The human WB-PBPK framework is presented in Figure 1. The generic WB-PBPK model includes the 14 compartments commonly reported in the literature, namely adipose, bone, brain, gut, heart, kidneys, liver, lung, muscle, skin, spleen, and stomach (Poulin and Theil 2002; Jones, Parrott et al. 2006; Peters 2008). These compartments are linked together by the arterial and venous blood. The drug distribution in these tissues is assumed to occur instantaneously and homogeneously, i.e. it is limited by blood flow rate to tissue (Poulin and Theil 2002). All tissues and organs are considered as well-stirred tissues. A mass balance is systematically performed on the overall system.

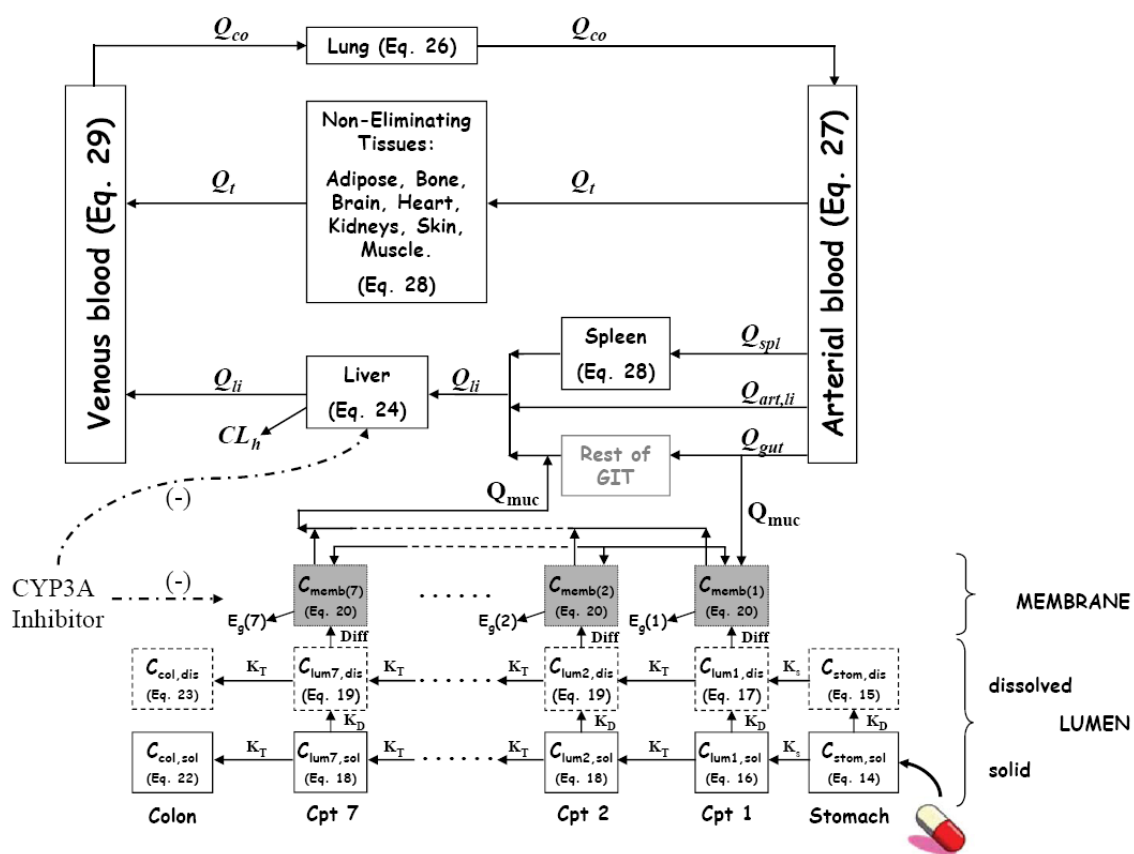


Figure 1. PBPK model framework and the GIT model used in the simulations.

2.3 The Distribution Process Modeling Within the WB-PBPK Model

Inaccurate prediction of the extent of drug distribution can be inherited by some model outcomes (e.g C_{\max} , AUC, $t_{1/2}$), justifying a careful modeling of the distribution process. The *in vivo* K_p 's for tissue:plasma ratios, and hence the resulting volume of distribution at steady-state (V_{ss}) were calculated with established tissue composition-based equations for which the principles and assumptions are presented in the works of Poulin and Theil (Poulin and Theil 2000; Poulin, Schoenlein et al. 2001; Poulin and Theil 2002) and Rodgers and Rowland (Rodgers and Rowland 2006; Rodgers and Rowland 2007). The equations published by Rodgers and Rowland were used for the estimation of the tissue:plasma partition coefficient of the three benzodiazepines, whereas those of Poulin and Theil for the statins. Even though Rodgers' model is well adapted for basic drugs, it turns out that for a drug having a $\log P$ greater than 4.5 (which is the case of SMV alone), this method may provide unrealistic values of K_p and V_{ss} (i.e., more than 50L/kg) (results not shown). The physicochemical parameters of the CYP3A substrates considered in this work are presented in Table I. The physiological parameters and tissue composition data required for the PBPK model are presented in Table II. The calculated partition coefficients of the studied drugs are presented in Table III.

Table II. Human Physiologic Parameters

Tissues	TISSUE COMPOSITION (% of wet tissue weight)						PHYSIOLOGICAL DATA		
	Water ^a	Intra-cellular Water ^a	Extra-cellular Water ^a	Neutral Lipids ^a	Neutral Phospho-lipids ^a	Tissue-Plasma Albumin Ratio ^b	Tissue-Plasma Lipoprotein Ratio ^b	Blood flow rate (fraction of Qc) ^c	Volume ^d (fraction of BW)
Adipose	0.144	0.017	0.135	0.853	0.0016	0.049	0.068	0.05	0.178
Bone +RoB^c	0.417	0.346	0.1	0.0174	0.0016	0.1	0.05	0.13	0.218
Brain	0.753	0.62	0.162	0.0391	0.0015	0.048	0.041	0.12	0.02
Heart	0.568	0.456	0.32	0.0135	0.0106	0.157	0.16	0.04	0.05
Kidney	0.672	0.483	0.273	0.0121	0.024	0.13	0.137	0.19	0.004
Liver	0.642	0.573	0.161	0.0135	0.0238	0.086	0.161	0.25	0.026
GIT^f	0.738	0.475	0.282	0.0375	0.0124	0.158	0.141	0.17	0.172
Spleen	0.562	0.579	0.207	0.0071	0.0107	0.097	0.207	0.02	0.004
Hepatic artery	---	---	---	---	---	---	---	0.06	---
Lung	0.574	0.446	0.336	0.0215	0.0123	0.212	0.168	0.025	0.008
Muscle	0.745	0.63	0.079	0.022	0.0078	0.064	0.059	0.17	0.400
Skin	0.658	0.291	0.382	0.0603	0.0044	0.277	0.096	0.05	0.037
Plasma	0.95	---	---	0.0032	0.0021	---	---	---	0.046
Blood cells	0.63	0.603	---	0.0012	0.0033	---	---	---	0.0365
Arterial blood	---	---	---	---	---	---	---	---	0.027
Venous blood	---	---	---	---	---	---	---	---	0.054
Gut mucosa	---	---	---	---	---	---	---	0.046 ^g	---

^a Rat tissue (Rodgers and Rowland 2006) composition used for all tissues but muscles, plasma, and blood cells for which human data (Rodgers and Rowland 2007) were used. These water tissue compositions were used to estimate the tissue-plasma partition coefficient of simvastatin from the Poulin and Theil approach (Poulin and Theil 2000; Poulin, Schoenlein et al. 2001);

^b Rat value (Rodgers, Leahy et al. 2005; Rodgers and Rowland 2006);

^c From Brown et al, 1997 (Brown, Delp et al. 1997); Qc was calculated using the allometric equation: $Qc = 0.235 \cdot BW^{0.75}$ with a mean BW of 70 kg (Brown, Delp et al. 1997)

^d From Brown et al, 1997 (Brown, Delp et al. 1997): fractions already adjusted for the tissue density: 0.92 for adipose, 1.71 for bone, 1 for plasma and 1.04 for all other tissues;

^e RoB: Rest of Body

^f the GIT was subdivided as follows : stomach volume represents 0.21% of human BW, small intestine represents 0.91 % of human BW, and large intestine represents 0.53% of human BW.

^g (Fagerholm 2007)

Table III. The calculated partition coefficient (P_{tp}) in human tissues and organs of MDZ, TRZ, APZ and SMV

	Tissue:plasma partition coefficient (P_{tp})			
	MDZ^a	APZ^a	TRZ^a	SMV^b
Adipose	2.65	2.39	2.59	7.35
Bone	0.71	0.82	0.78	9.22
Brain	1.36	1.61	1.52	8.43
Gut	1.59	1.79	1.73	6.65
Heart	0.83	0.97	0.91	2.04
Kidney	0.87	1.02	0.96	3.17
Liver	0.89	1.05	0.99	5.25
Lung	1.15	1.30	1.24	0.71
Muscle	0.90	1.09	1.02	3.22
Skin	2.29	2.50	2.47	3.94
Spleen	0.61	0.75	0.68	3.23
Blood cells^c	0.00	0.51	0.51	0.04
V_{ss} (L/kg)^d	1.22	1.31	1.30	5.27
V_{ss} <i>in vivo</i> (L/kg)	1.40 ^f	0.60 ^f	0.70 ^f	---
V_{area} <i>in vivo</i> (L/kg)	---	---	---	5.13 ^g
CL_{tot} IV predicted (L/hr/Kg)^e	0.47	0.08	0.20	---
CL_{tot} IV <i>in vivo</i> (L/hr/Kg)	0.46 ^h	0.04 ⁱ	0.16 ^j	---

^a Calculated from the approach for very weak bases developed by Rodgers and Rowland (Rodgers and Rowland 2006)

^b Calculated from the approach developed by Poulin and Theil (Poulin and Theil 2000; Poulin, Schoenlein et al. 2001)

^c Calculated from $EP = (Ht-1+BP)/Ht$ where EP is the erythrocyte:plasma partitioning, Ht is the hematocrit content (= 0.45) and BP is the blood:plasma ratio.

^d Calculated from $V_{ss} = V_p + V_{BC} * P_{tp(blood\ cells:plasma)} + \sum V_t * P_{tp}$ where V_p is the plasma volume, V_{BC} the blood cell volume, V_t the tissue volume, and P_{tp} the tissue:plasma partition coefficient (Sawada, Hanano et al. 1984).

^e CL_{tot} predicted by PBPK modeling for IV bolus of 0.05mg/kg of MDZ, 1mg of APZ, 0.25mg of TRZ.

^f (Rodgers and Rowland 2007); ^g (McKenney, Swearingen et al. 2006); ^h (Palkama, Ahonen et al. 1999); ⁱ (Smith, Kroboth et al. 1984); ^j (Kroboth, McAuley et al. 1995)

2.4 The Absorption Process Modeling Within the WB-PBPK Model

2.4.1 Structure of the GIT

A nine-compartment absorption model based on the Advanced Compartmental Absorption and Transit (ACAT) model was applied to the gastro-intestinal tract (GIT) compartment (Agoram, Woltosz et al. 2001) (Figure 1). The first compartment is the stomach, the last one is the colon, and the seven remaining compartments represent the small intestine (SI). The gastric emptying rate (K_S) and the small intestine transit rate (K_T) are set to 0.1 min^{-1} and 0.035 min^{-1} , respectively (Yu and Amidon 1999). The total lumen volume was calculated according to the following equation: $V_{\text{lum,tot}} = \pi LR^2$, where R ($= 1.75 \text{ cm}$) is the mean radius lumen (Iwatsubo, Hirota et al. 1997) and L ($= 680 \text{ cm}$) the total small intestine length (DeSesso and Jacobson 2001). As the small intestine is divided in seven compartments ($N= 7$), the lumen volume and membrane volume of each compartment were obtained by dividing the total lumen volume and gut volume by the number of SI compartments. The pH gradient along the GIT has been set to 3 for the stomach and 5, 6.1, 6.3, 6.5, 6.7, 7.0, and 7.2 for the seven compartments.

2.4.2 Dissolution Rate in the GIT

Once the drug is swallowed, the tablet starts dissolving at a dissolution rate K_d driven by the difference between the drug solubility (S_{ol}) and the concentration of the dissolved drug (C_i). For any given gastro-intestinal compartment i ($i=1$ to 8), K_D was calculated as follows: $K_D = 3 \times D \times (S_{ol} - C_i) / (\rho \times r \times T)$, where D is the diffusion coefficient of the drug (default value $= 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{min}$), ρ is the effective drug particle radius (default value $= 5 \mu\text{m}$), r is the drug particle density (default value $= 1 \text{ g/mL}$), and T is the diffusion layer thickness (default value $= 30 \mu\text{m}$) (Peters 2008).

2.4.3 Drug Solubility in the GIT

An important determinant of drug absorption from the gastrointestinal tract is the rate at which the drug goes into solution. While the bioavailability of drugs can be compromised, particularly current lipophilic drugs that are poorly-soluble in water

(Table I), this may offset the potentially limiting effects of dissolution in the intestine. Therefore, it is essential to estimate drug solubility in a biorelevant medium other than water. Mithani and coworkers (Mithani, Bakatselou et al. 1996) have developed an approach to estimate the solubility of drugs as a function of bile salt concentration based on the physicochemical properties of the compound. The bile salt concentration of 4 nM of sodium taurocholate ([NaTC]) is similar to that in Fassif medium (Sugano, Okazaki et al. 2007). It was assumed that the estimated solubility in the bile salt solution is similar to that in Fassif, which should provide a dissolution rate of poorly-soluble drugs similar to that of *in vivo* conditions. The solubility ratio (SR) is defined as the ratio of the molar solubility in bile micelles (Sol_{bile}) to that in an aqueous buffer (Sol_{buffer}): $SR = Sol_{bile}/Sol_{buffer}$. Furthermore, Mithani and coworkers (Mithani, Bakatselou et al. 1996) have put forward a relation between the octanol:water partition coefficient and the molar solubility ratio of a drug, expressed as $LogSR = 0.75 \times LogP + 2.27$. Using the two relations, Sol_{bile} can be expressed as: $Sol_{bile} = SR \times Sol_{buffer} \times MW_{water}/MW_{rx}$, where MW_{water} refers to the water molecular weight and MW_{rx} to the drug molecular weight. Finally, the drug solubility (expressed in mg/L) in the intestinal fluid (Sol_{IF}) can be calculated as: $Sol_{IF} = Sol_{water} + Sol_{bile} \times MW_{rx} \times [NaTC]$ with [NaTC] expressed in nM. The effect of intestinal pH on predicted drug solubility was also accounted for using the theoretical pH-solubility relation for bases expressed as: $Sol_{water} = Sol_{int} \times (1 + 10^{-pH}/10^{-pKa})$ with Sol_{int} being the intrinsic equilibrium solubility calculated from the Yalkowsky and Valvani equation (Yalkowsky and Valvani 1980): $LogSol_{int} = 0.54 - 0.01 \times (mp - 25) - LogP$, where mp is the drug melting point expressed in Celsius (Table I). For neutral compounds such as SMV, the water solubility was estimated by: $Sol_{water} = Sol_{int}$.

2.4.4 Drug Diffusion Velocity through the Gut Membrane

The fraction of unionized drug in each of the intestinal compartments was calculated using Henderson-Hasselbalch equations based on drug pKa and intestinal lumen pH. The apparent permeability of drug through a Caco-2 cells monolayer, measured from the apical to basolateral ($Papp_{ab}$) and from the basolateral to apical side ($Papp_{ba}$) (see Table I), was scaled up by the intestinal exchange surface area (ESA) to estimate the apparent diffusion velocity (Diff) of the drug through the intestinal membrane of any compartment (N=7 compartments), such as: $Diff = 0.5 \times (Papp_{ab} + Papp_{ba}) \times ESA/N$, with the

total exchange surface area estimated to 120 m² (Grassi, Grassi et al. 2007). Since Papp_{ab} and Papp_{ba} of SMV through Caco-2 cells were not available in the literature, we used published apparent permeability of cerivastatin through Caco-2 cells (Kivisto, Zukunft et al. 2004). The MW and LogP of this statin are similar to those of SMV, and this drug is not highly transported by P-gp mediated efflux. The resulting apparent diffusion velocity value will be allowed to vary over a wide range while performing the sensitivity analysis in order to test the influence of this parameter on the PBPK model predictions (companion paper).

2.5 Hepatic Intrinsic Clearance and Gut Extraction Ratio

The liver and gut are considered to be the main eliminating organs. We do not assume any renal elimination of the drug under its unchanged form. The hepatic elimination is determined from human microsomal intrinsic clearance (CL_{int, vitro}) that we extracted from the literature, and expressed in mL/min/mg microsomal protein. The conventional description of hepatic extraction ratio (E_h) corresponds to (CL_{int} × fu_p/fu_{mic})/(CL_{int} × fu_p/fu_{mic} + Q_h) for a well-stirred liver model¹³. A recent work of Obach¹³ demonstrated that neglecting the microsomal binding (fu_{mic}) (i.e. E_h = (CL_{int} × fu_p)/(CL_{int} × fu_p + Q_h)), yields very poor estimates of E_h *in vivo* when using the *in vitro* determined CL_{int} for several lipophilic bases and neutral compounds, which are the types of drugs investigated in the current study. Obach¹³ has also shown that neglecting all binding in plasma and liver subfractions (i.e., E_h = CL_{int}/(CL_{int} + Q_h)) gives reasonable estimates of E_h for these types of drugs. The main reason for such an observation is still not fully understood. Hence, for each drug considered here, we used the simplified version of the previous equation to estimate E_h. For this reason, the *in vitro* intrinsic clearance is scaled-up to the *in vivo* situation (CL_{INT} in L/min) by considering the liver volume (V_{li}) and an hepatic scaling factor (SF_{li}) of 30.5 mg microsomal protein/g of human liver (Howgate, Rowland Yeo et al. 2006) in the human PBPK model:

$$CL_{INT} = CL_{int,vitro} \cdot SF_{li} \cdot V_{li} = \sum \frac{V_{max}}{K_m} \cdot SF_{li} \cdot V_{li} \quad (1)$$

The model also requires the total amount of CYP3A (≈ 70 nmol) (Paine, Khalighi et al. 1997) expressed in the small intestine to calculate the presystemic gut extraction ratio (E_g). We adapted the known decreasing distribution of the CYP3A expression along the

human small intestine (duodenum, jejunum, ileum) (Paine, Hart et al. 2006) to the seven compartments included in the gut model. The amount of intestinal CYP3A expressed in each gut compartment i , ($A_{CYP3A,g,i}$) was estimated to : 22.5,15.9,11.2, 7.9, 5.6, 4.0, 2.8 nmol respectively. The intestinal intrinsic clearance ($CL_{INT,g,i}$) is determined from microsomal intrinsic clearance previously calculated and scaled-up to intestinal tissue by considering **1**) an intestinal scaling factor (SF_g) of 23 pmol CYP3A/mg microsomal protein(Thummel, O'Shea et al. 1996) and **2**) the amount of intestinal CYP3A expressed in each gut compartment :

$$\begin{aligned} CL_{INT,g,i} &= CL_{int,vitro} \cdot SF_g \cdot A_{CYP3A,g,i} \\ &= \sum \frac{V_{max}}{K_m} \cdot SF_g \cdot A_{CYP3A,g,i} \end{aligned} \quad (2)$$

The assumption that $CL_{int,vitro}$ (expressed per pmol of CYP) is the same in gut and liver has been made, supported by the observation that the rates of formation of verapamil metabolites in human liver microsomes were not significantly different from those measured in intestinal microsomes (Yang, Tucker et al. 2004; Howgate, Rowland Yeo et al. 2006). Consequently, the presystemic extraction ratio (E_g) in the intestinal compartments was estimated as follows:

$$E_{g(i)} = \frac{CL_{INT,g,i}}{CL_{INT,g,i} + Q_{muc,i}} \quad (3)$$

where $Q_{muc,i}$ corresponds to the blood flow to intestinal mucosa of any given intestinal compartment(Fagerholm 2007). The total Q_{muc} is estimated to 0.250mL/min (Thummel, O'Shea et al. 1996).

CL_{tot} of the three benzodiazepines predicted by the PBPK model after IV bolus is similar to the CL_{tot} observed by others (Smith, Kroboth et al. 1984; Kroboth, McAuley et al. 1995; Palkama, Ahonen et al. 1999), suggesting that the direct scaling of hepatic clearance adopted herein is appropriate (Table III).

2.6 Drugs Used as CYP3A Inhibitors: Their Influence on the Intrinsic Clearance of CYP3A Substrates

The CYP3A inhibitors used in the clinical studies presented in Table 4 are itraconazole (ITZ), ketoconazole (KTZ), diltiazem (DTZ), saquinavir (SQV), and a furanocoumarin contained in grapefruit juice (GFJ), namely 6',7'-dihydroxybergamottin (DHB). We investigated the PK of the following concomitant administrations 1) MDZ with GFJ, ITZ and SQV, respectively; 2) APZ with KTZ; 3) TRZ with KTZ; and 4) SMV with GFJ, ITZ, and DTZ, respectively. More details on the exposure scenarios are presented in Table IV.

The antifungal drugs, ITZ and KTZ, are competitive inhibitors of CYP3A4, whereas the other drugs are mechanism-based inhibitors (inactivation) (www.druginteraction.org ; Zhou, Yung Chan et al. 2005). As the non-specific binding of inhibitor in human liver microsomes leads to higher estimation of the inhibition constant K_i , it may contribute to the underestimation of the inhibition effect (Ishigam, Uchiyama et al. 2001; Isoherranen, Kunze et al. 2004). Consequently, this non-specific binding has been taken into account when making *in vitro-in vivo* predictions. Thus, in the following calculation of intrinsic clearance, we had recourse to the unbound inhibition constant $K_{i,u}$ such as: $K_{i,u} = f_{u,mic} \times K_i$, where $f_{u,mic}$ is the unbound fraction of inhibitor to liver microsomes. Values of $f_{u,mic}$ and K_i were extracted from the literature and are presented in Table 4. When not directly available in the literature, the values of $f_{u,mic}$ were estimated from the equation developed by Austin and coworkers (Austin, Barton et al. 2002).

Table IV. Protocol description of the Clinical Studies Reproduced Using the WB-PBPK Model

	MIDAZOLAM			ALPRAZOLAM	TRIAZOLAM			SIMVASTATIN		
Authors	Kupferschmidt et al., 1995	Backman et al., 1998	Palkama et al., 1999	Greenblatt et al., 1998	Kroboth et al., 1995	Von Moltke et al., 2004	Greenblatt et al., 1998	Lilja et al., 2004	Neuvonen et al., 1998	Mousa et al., 2000
Brand Name	Dormicum®	Dormicum®	Dormicum®	na ^a	Halcion	na ^a	na ^a	Zocor®	Zocor®	na ^a
Dose	15 mg	15 mg	7.5 mg	1 mg	0.25 mg	0.125 mg	0.25mg	40 mg	40 mg	20 mg
Inhibitor Brand	DHB^b Hitchcock	Itraconazole Sporanox®	Saquinavir Fortovase®	Ketoconazole na ^a	na^a na ^a	Ketoconazole na ^a	Ketoconazole na ^a	DHB^b Valio Ltd	Itraconazole Sporanox®	Diltiazem Cardizem SR
Pretreatment	200 mL of GFJ	200 mg QD for 4 days	1200 mg TID for 5 days	200mg BID for 2 days	na ^a	200mg BID	200mg BID for 2 days	200 mL for 2 days	200mg QD for 4 days	120 mg BID for 2 weeks
MW,I^c	na ^a	705 ^j	670 ^j	531 ^j		531 ^j	53149	na ^a	705 ^j	414 ^j
fup,I^d	na ^a	0.036 ^k	0.02 ^j	0.01 ^j		0.01 ^j	0.0149	na ^a	0.036 ^k	0.15 ^j
fu_{mic}^e	0.48 ⁱ	0.083 ^k	0.38	0.32		0.32	0.32	0.4877	0.083 ^k	0.72
Ki (μMol)^f	3.5 ⁱ	0.0157 ^k	0.35 ^k	0.046 ⁱ		0.006 ^l	0.00678	3.5 ^j	---	3.3 ^l
Ki,u (uMol)^g	1.68	0.0013 ^k	0.13	0.015		0.002	0.002	1.68	0.00345 ^m	2.39
Kinact (min)^h	0.31 ⁱ	na ^a	0.17 ^k	na ^a		na ^a	na ^a	0.3177	na ^a	0.07 ^l

^a na : not available ;

^b the inhibitory effect of grapefruit juice was attributed to one of the most abundant furanocoumarins contained in GFJ, namely, 6',7'-dihydroxybergamottin (DHB). MW,I, fu_{mic}, Ki, Ki,u and Kinact are those of DHB;

^c molecular weight of the inhibitor;

^d fraction unbound of inhibitor in plasma;

^e unbound fraction to microsomes, when not directly available in the literature, it was estimated from the equation developed by Austin and coworkers⁷⁹ : fu_{mic} = 1/(C_{mic} x 10^{0.56xLog¹⁰PD - 1.41}+1) with C_{mic} = 1mg/mL;

^f inhibition constant;

^g unbound inhibition constant: Ki,u = Ki * fu_{mic} ;

^h pseudo first order apparent inactivation rate elicited by the inhibitor.

ⁱ Paine et al., 2005; ^j Wishart et al.,2006; ^k Isoherranen et al.,2004; ^l Fahmi et al., 2008; ^m Ishigam et al., 2001;

In the presence of competitive inhibitors, the *in vitro* intrinsic clearance of the CYP3A substrate becomes:

$$CL_{int,vitro}' = \frac{V_{max}}{K_m \cdot \left(1 + \frac{[I]_u}{K_{i,u}}\right)} = \frac{V_{max}}{\alpha \cdot K_m} \quad (4)$$

$$\text{with } \alpha = \left(1 + \frac{[I]_u}{K_{i,u}}\right) \quad (5)$$

where $[I]_u$ represents the inhibitor unbound concentration in the eliminating organ. The value of $K_{i,u}$ for KTZ and ITZ are presented in Table IV.

In the presence of time-dependent inactivation, the *in vitro* intrinsic clearance of the CYP3A substrate becomes:

$$CL_{int,vitro}' = \frac{V'_{max}}{K_m} \quad (6)$$

$$\text{with } V'_{max} = \frac{V_{max}}{\left(1 + \frac{[I]_u \cdot k_{inact}}{k_{degrad} \cdot ([I]_u + K_{i,u})}\right)} = \frac{V_{max}}{\beta} \quad (7)$$

$$\text{with } \beta = 1 + \frac{[I]_u \cdot k_{inact}}{k_{degrad} \cdot ([I]_u + K_{i,u})} \quad (8)$$

$$\text{then } CL_{int,vitro}' = \frac{V_{max}}{\beta \cdot K_m} \quad (9)$$

where k_{degrad} is the first-order rate of enzyme degradation, and k_{inact} represents the pseudo-first order apparent inactivation rate elicited by the inhibitor. The degradation rate for CYP3A was set to 0.019hr^{-1} and 0.029hr^{-1} in the liver and intestine, respectively (Venkatakrishnan, Obach et al. 2007; Fahmi, Maurer et al. 2008). The value of $K_{i,u}$ and k_{inact} for DTZ, SQV and DHB are presented in Table IV.

2.7 Estimation of Time-Dependent Concentration of Inhibitor in Gut and Liver

The concentration of inhibitor in gut and liver is considered to be time-dependent. We assumed that the unbound inhibitor concentration in liver and intestine can be approximated by the unbound concentration profile in plasma (Fahmi, Maurer et al. 2008) obtained according to the clinical studies protocol (Table IV), such as:

$$[I]_u(t) = f_{u,p,I} \cdot C_{p,I}(t) \quad (10)$$

where $f_{u,p,I}$ refers to the unbound fraction of inhibitor in plasma (Table IV), and $C_{p,I}$ represents the plasma concentration of inhibitor.

If we define a time-dependent inhibition factor, $f_{inhib}(t)$, which can take the values of α (Equation 5) or β (Equation 8) according to the inhibitor nature (ie, competitive vs mechanism-based inhibitor), the Equation 5 for a competitive inhibitor becomes:

$$f_{inhib}(t) = \alpha(t) = \left(1 + \frac{[I]_u(t)}{K_{i,u}} \right) \quad (11)$$

Similarly, the Eq 8 for a mechanism-based inhibitor becomes:

$$f_{inhib}(t) = \beta(t) = 1 + \frac{[I]_u(t) \cdot k_{inact}}{k_{degrad} \cdot ([I]_u(t) + K_{i,u})} \quad (12)$$

Consequently, the intrinsic clearance of the CYP3A substrate in the presence of a metabolism-based inhibitor can be expressed as:

$$CL_{int,vitro}' = \frac{V_{max}}{f_{inhib}(t) \cdot K_m} \quad (13)$$

In order to account for the metabolism-based inhibition, the CYP3A substrates intrinsic clearance in liver and gut, CL_{INT} and $CL_{INT,g,i}$, previously expressed as a function of $CL_{int,vitro}$ (Equation 1 and 2), were estimated in terms of $CL_{int,vitro}'$ (Equation 13).

When available, the plasma concentration-time profiles of the inhibitors involved in Equation 10 are extracted from the clinical study presented in Table IV (Greenblatt, Wright et al. 1998; Saari, Laine et al. 2006). Otherwise, they are obtained from

additional publications (Hardin, Graybill et al. 1988; Lefebvre, Lacasse et al. 1994; Kaukonen, Olkkola et al. 1997; Grub, Bryson et al. 2001) according to the PK protocols presented in Table IV. Using Winnonlin® (Pharsight Corp, Mountain View, California), we fitted inhibitor plasma profiles to obtain the parameters of the compartmental model which are used in an ordinary differential equations system. This allowed the time-dependent inhibition factors to be estimated (Equation 10). The simulated inhibitors profiles are presented in the Appendix.

2.8 Differential Equations of the WB-PBPK Model

The differential equations of the PBPK model (Figure 1) are presented below where C refers to the drug concentration; E the extraction ratio; NI the non-ionized fraction in the lumen, Diff the diffusion velocity, BP blood-to-plasma ratio, P_{tp} the plasma-tissue partition coefficient, Q the blood flow to tissue, K_S the gastric emptying rate constant; K_T the intestinal transit rate constant; K_D the dissolution rate constant; and A is the amount of drug. The subscripts refer to stomach (stom), lumen (lum), membrane (memb), mucous (muc), solid form (sol), dissolved form (dis), gut (g), liver (li), arterial (art), colon (col), spleen (spl), lung (lg), cardiac output (co), venous (v), blood (bl), tissue (t), and metabolised (metab).

Stomach: Solid and Dissolved Drug

$$\frac{dC_{\text{stomsol}}}{dt} = -K_S \cdot C_{\text{stomsol}} - K_D \cdot C_{\text{stomsol}} \cdot (\text{Sol} - C_{\text{stomdis}}) \quad (14)$$

$$\frac{dC_{\text{stomdis}}}{dt} = -K_S \cdot C_{\text{stomdis}} + K_D \cdot C_{\text{stomsol}} \cdot (\text{Sol} - C_{\text{stomdis}}) \quad (15)$$

Small Intestine: Solid and Dissolved Drug in the Lumen – First Compartment

$$\begin{aligned} \frac{dC_{\text{lum(1),sol}}}{dt} = & \frac{1}{V_{\text{lum(1)}}} K_S \cdot C_{\text{stom,sol}} - K_T \cdot C_{\text{lum(1),sol}} \\ & - K_D \cdot C_{\text{lum(1),sol}} \cdot (\text{Sol} - C_{\text{lum(1),dis}}) \end{aligned} \quad (16)$$

$$\begin{aligned} \frac{dC_{\text{lum}(1),\text{dis}}}{dt} = & -\frac{1}{V_{\text{lum}(1)}} K_S \cdot C_{\text{stom},\text{dis}} - K_T \cdot C_{\text{lum}(1),\text{dis}} \\ & + K_D \cdot C_{\text{lum}(1),\text{sol}} \cdot (\text{Sol} - C_{\text{lum}(1),\text{dis}}) \\ & - \frac{1}{V_{\text{lum}(1)}} (\text{NI}_{\text{lum}(1)} \cdot \text{Diff} \cdot C_{\text{lum}(1),\text{dis}}) \end{aligned} \quad (17)$$

Small Intestine: Solid and Dissolved Drug in the Lumen – Compartments $i= 2$ to 7

$$\begin{aligned} \frac{dC_{\text{lum}(i),\text{sol}}}{dt} = & K_T \cdot (C_{\text{lum}(i-1),\text{sol}} - C_{\text{lum}(i),\text{sol}}) \\ & - K_D \cdot C_{\text{lum}(i),\text{sol}} \cdot (\text{Sol} - C_{\text{lum}(i),\text{dis}}) \end{aligned} \quad (18)$$

$$\begin{aligned} \frac{dC_{\text{lum}(i),\text{dis}}}{dt} = & K_T \cdot (C_{\text{lum}(i-1),\text{dis}} - C_{\text{lum}(i),\text{dis}}) \\ & + K_D \cdot C_{\text{lum}(i),\text{sol}} \cdot (\text{Sol} - C_{\text{lum}(i),\text{dis}}) \\ & - \frac{1}{V_{\text{lum}(i)}} (\text{NI}_{\text{lum}(i)} \cdot \text{Diff} \cdot C_{\text{lum}(i),\text{dis}}) \end{aligned} \quad (19)$$

Small Intestine: Membrane – Compartments $i= 1$ to 7

$$\begin{aligned} V_{\text{memb}(i)} \cdot \frac{dC_{\text{memb}(i)}}{dt} = & (1 - E_{g(i)}) \cdot (\text{NI}_{\text{lum}(i)} \cdot \text{Diff} \cdot C_{\text{lum}(i),\text{dis}} + C_{\text{art}} \cdot Q_{g(i)}) \\ & - Q_{\text{muc}(i)} \cdot \frac{C_{\text{memb}(i)} \cdot \text{BP}}{P_{\text{tp,g}}} \end{aligned} \quad (20)$$

where $E_{g(i)}$ is estimated from Equation 3.

Amount of Metabolised Drug in the Gut Membrane, $i=1$ to 7

$$\frac{dA_{\text{metab}(i)}}{dt} = E_{g(i)} \cdot (\text{NI}_{\text{lum}(i)} \cdot \text{Diff} \cdot C_{\text{lum}(i),\text{dis}} + C_{\text{art}} \cdot Q_{g(i)}) \quad (21)$$

Colon: Solid and Dissolved Drug in the Lumen

$$V_{\text{lum,col}} \frac{dC_{\text{col,sol}}}{dt} = V_{\text{lum}(7)} \cdot K_T \cdot C_{\text{lum}(7),\text{sol}} \quad (22)$$

$$V_{\text{lum,col}} \frac{dC_{\text{col,dis}}}{dt} = V_{\text{lum}(7)} \cdot K_T \cdot C_{\text{lum}(7),\text{dis}} \quad (23)$$

Liver: Tissue Concentration

$$\begin{aligned}
V_{li} \frac{dC_{li}}{dt} = & (Q_{li} - Q_{spl} - Q_g) \cdot C_{art} + Q_{spl} \cdot \frac{C_{spl} \cdot BP}{P_{tp,spl}} \\
& + Q_g \cdot \frac{BP \cdot \sum_{i=1:7} C_{memb(i)}}{P_{tp,g}} - Q_{li} \cdot \frac{C_{li} \cdot BP}{P_{tp,li}} - CL_{INT} \cdot \frac{BP \cdot C_{li}}{P_{tp,li}}
\end{aligned} \tag{24}$$

where CL_{INT} is estimated from $CL_{int,vitro}$ or alternatively from $CL'_{int,vitro}$ (Equation 13) when the effect of a CYP3A inhibitor is accounted for.

Liver: Eliminated Amount

$$\frac{dA_{metab(li)}}{dt} = CL_{INT} \cdot \frac{BP \cdot C_{li}}{P_{tp,li}} \tag{25}$$

Lung

$$V_{lg} \frac{dClg}{dt} = Q_{co} \cdot \left(C_{v,bl} - \frac{C_{lg} \cdot BP}{P_{tp,lg}} \right) \tag{26}$$

Arterial Blood

$$V_{art,bl} \frac{dC_{art}}{dt} = Q_{co} \cdot \left(\frac{C_{lg} \cdot BP}{P_{tp,lg}} - C_{art} \right) \tag{27}$$

Non Eliminating Tissues

$$V_t \frac{dC_t}{dt} = Q_t \cdot \left(C_{art} - \frac{C_t \cdot BP}{P_{tp,t}} \right) \tag{28}$$

Venous Blood

$$V_{v,bl} \frac{dC_{v,bl}}{dt} = \sum_{t \neq gut} Q_t \cdot \frac{C_t \cdot BP}{P_{pt,t}} - Q_{co} \cdot C_{v,bl} \tag{29}$$

2.9 Estimation of PK Parameters

Non-compartmental analysis of the predicted and clinical plasma profiles of the studied drugs was performed in order to estimate the corresponding pharmacokinetic parameters, namely the area under the curve ($AUC_{0-t_{last}}$), peak plasma concentration (C_{max}), time to reach C_{max} (t_{max}), half-life ($t_{1/2}$), apparent oral clearance (Cl_{tot}/F) and apparent volume of distribution (V_d/F) (Winnonlin®, Pharsight Corp, Mountain View, Calif).

The oral bioavailability (F) was estimated using the fraction of absorbed drug (F_{abs}), the fraction of drug that does not undergo intestinal metabolism (F_g), and the fraction of drug that does not undergo hepatic metabolism (F_h), calculated through mass balance around the gut and liver compartments of the PBPK model. The fraction of absorbed drug was calculated as follows: $F_{abs} = (Do - A_{col}) / Do$, where Do is the administered dose and A_{col} is the drug amount remaining in the colon compartment (fecal excretion). The fraction of drug that does not undergo the intestinal presystemic elimination was calculated as: $F_g = (F_{abs} \times Do - A_{met,g}) / (F_{abs} \times Do)$, with $A_{met,g}$ being the amount of drug metabolised by the intestinal CYP3A. Finally, the drug fraction that does not undergo the hepatic elimination was calculated as: $F_h = 1 - A_{met,h} / A_{in,h}$, where $A_{met,h}$ is the amount of drug metabolised by hepatic CYP3A, and $A_{in,h}$ the amount of incoming drug to liver. The bioavailability was predicted as follows: $F = F_{abs} \times F_g \times F_h$. The impact of metabolic interaction on PK parameters was estimated by dividing each PK parameter predicted in the presence of metabolic inhibition, by this parameter when predicted in the absence of inhibition.

2.10 Uncertainty Analysis: Monte-Carlo Simulation

An uncertainty analysis of the whole PBPK model developed here has been performed in order to investigate the influence of uncertainty and variability of several physiological and drug-related parameters on the variability of the model outcomes. The mean values and variation of these inputs are presented in Table V. The input parameters (X_i) are assumed to be log-normally distributed, such as $Z_i = \ln(X_i)$ is normally

distributed with mean μ_i , and standard deviation σ_i . From the covariance matrix, it is possible to perform Monte-Carlo simulations ($N_{MC}=1000$) to randomly generate different N_{MC} values of Z_i from their distribution functions $N(\mu_i, \sigma_i)$ (Bonate 2001). Then, the input parameters of the PBPK model can be obtained as: $X_i = \exp(Z_i)$. The N_{MC} input vectors were used to generate the output distribution functions (i.e., $AUC_{0-tlast}$, C_{max} , CL_{tot}/F , V_d/F , $t_{1/2}$, F_{abs} , F_g , F_h and F). Percentiles of concentration-time profile of CYP3A substrates are obtained through the uncertainty analysis.

Table V. Description of Input Parameters studied in the uncertainty analysis.

#	Model Parameter (unit)	Symbol	Mean Value	CV %
1	Body weight (Kg)	BW	70	15 ^e
2	Cardiac output (L/min)	Q_c	5.2	5 ^e
3	CYP3A4 hepatic microsomal content (nmol/mg microsomal protein)	Amicros	30.5	8 ^f
4	Amount of CYP3A in gut membrane (nmol)	$N_{bP450,G}$	70 ^g	75
5	Gastric emptying rate (min^{-1})	K_s	0.1	10
6	Small Intestine (SI) Transit Time (min^{-1})	K_t	0.035	10
7	Affinity Constant (μM)	K_m	See Table I	50 ^a
8	Maximum velocity of biotransformation (nmol/nmol P450/min)	V_{max}	See Table I	50 ^a
9	Unbound fraction of drug in plasma (%)	f_{up}	See Table I	10 ^b
10	Dissolution Rate	K_d	See Table I	25 ^c
11	Drug Solubility in the intestinal fluid	Sol	See Table I	25 ^c
12	Drug Diffusion through the gut membrane	Diff	See Table I	25 ^c
13	Unbound inhibition constant	$K_{i,u}$	See Table II	25 ^c
14	Weighting factor for $[I]_u$ ^d	α	1	50 ^c

^a estimated from K_m and V_{max} reported in the literature for the present studied drugs

^b estimated at 10% from Kalvass et al (Kalvass and Maurer 2002)

^c fixed

^d this factor is used to vary the concentration of inhibitor estimated in intestinal and hepatic tissues from inhibitor plasma concentration.

^e (Brown, Delp et al. 1997)

^f (Howgate, Rowland Yeo et al. 2006)

^g (Paine, Khalighi et al. 1997)

2.11 WB-PBPK Model Simulation

Simulation scenarios mimicked the same conditions of the clinical protocols presented in Table IV. The plasma concentration-time profiles predicted for MDZ, APZ, TRZ, and SMV administered alone to healthy volunteers (mean BW of 70kg) were presented. The plasma concentration-time profiles of those drugs administered with the inhibitors were also showed. The derived PK parameters of MDZ, APZ, TRZ, and SMV in the presence or absence of inhibitors are compared to those parameters estimated from clinical data. A companion paper will present a global sensitivity analysis (GSA) of the whole PBPK model developed here with the objective to identify the most important input parameters contributing to the prediction imprecision due to their degree of uncertainty and variability. We briefly report the main result of this effort in the discussion section. The modeling simulations were performed using the text-based programming software Matlabv7.01®. The mass balance differential equations for each tissue included in the model were solved using the ODE15s algorithm integrated in Matlab®.

3. Results

3.1 Plasma Profiles of the Selected Drugs in the Presence or Absence of Metabolic Interactions

A model prediction is considered successful when the 5th and 95th percentiles of predicted concentration-time profiles capture the clinical data. According to this criterion, a successful prediction was obtained for a single oral administration of 7.5 and 15 mg of MDZ (Figures 2A and 2B), as well as for a single oral administration of 20 and 40 mg of SMV (Figures 5A and 5B). A slight deviation of C_{\max} toward the 95th percentile was observed for a single oral administration of 1 mg of APZ (Figure 3A) and for a single oral administration of 0.125 and 0.25 mg of TRZ (Figure 4A and 4B). In the latter case, the predictions are in accordance with Kroboth data (Kroboth, McAuley et al. 1995) for an oral administration of 0.25 mg of TRZ, but tend to underestimate the Greenblatt's clinical data (Greenblatt, Wright et al. 1998) (Figure 4B).

The predicted impact of inhibition of DHB contained in GFJ on the absorption phase of MDZ captured well the *in vivo* situation (Kupferschmidt, Ha et al. 1995) (Figure 2C). A lag time was observed between the clinical and predicted profile for the concomitant administration of SMV and GFJ (Figure 5C). However, the predicted increase of extent of absorption is in accordance with the *in vivo* observation (Lilja, Neuvonen et al. 2004).

In the presence of both intestinal and hepatic metabolism-based inhibition, the clinical plasma concentration-time profiles were generally well captured by the PBPK model for concomitant administrations of MDZ and ITZ (Figure 2E), APZ and KTZ (Figure 3B) as well as SMV and DTZ (Figure 5D). The PBPK model simulation overestimated the plasma concentration-time profile of MDZ administered with SQV (Figure 2D), whereas it underestimated the plasma concentration-time profile of TRZ administered with KTZ (Figure 4C). When SMV is administered with ITZ, the observed elimination is faster than the predicted one, leading to a deviation between the predicted and observed profiles (Figure 5E).

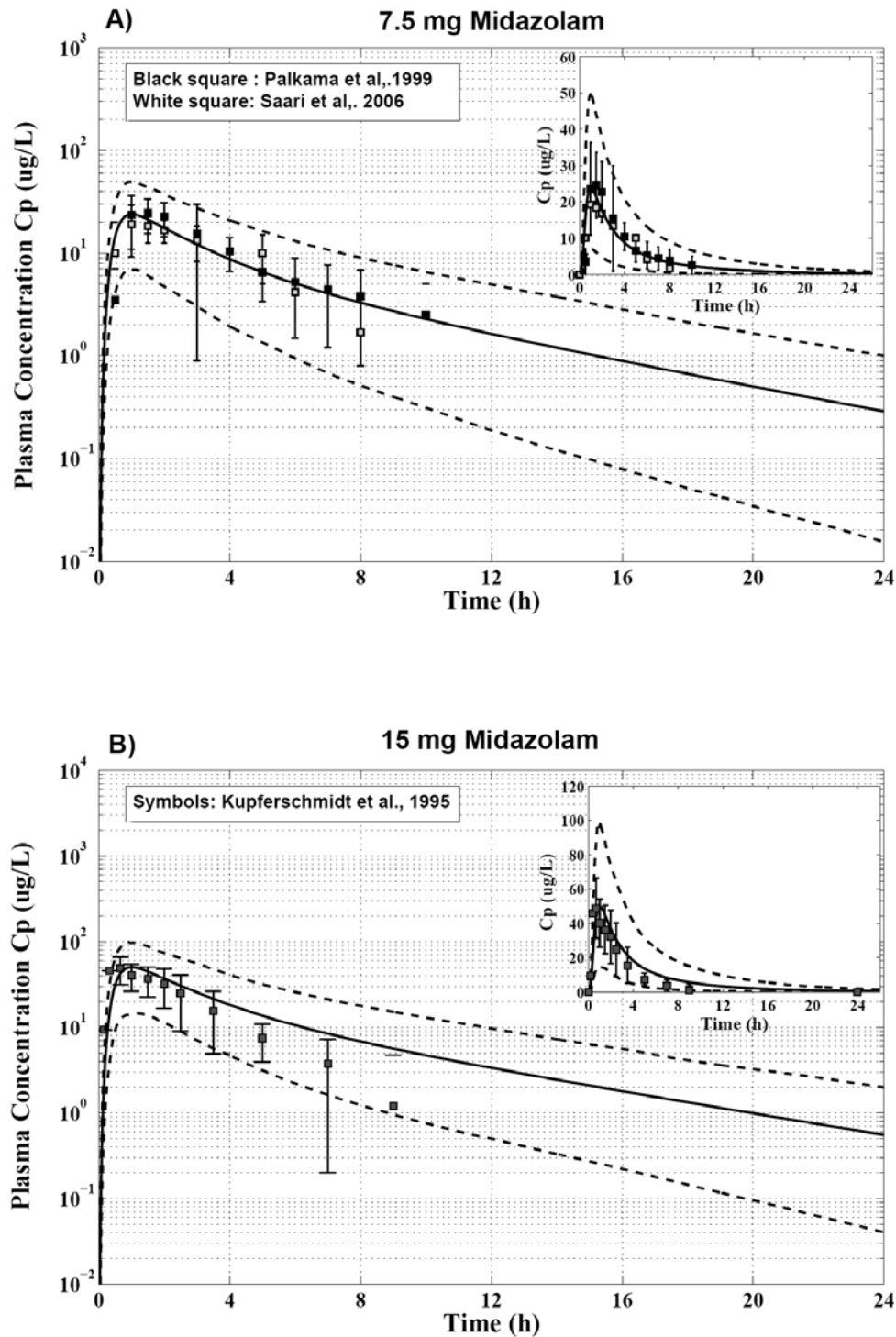


Figure 2A-B. Semi-logarithmic representation of the concentration-time profiles after oral administration of **A)** 7.5 mg or **B)** 15 mg of MDZ to healthy volunteers. The black line represents the predicted mean value of the concentration-time profile, and the dashed lines are the 5th and 95th percentiles obtained after running Monte-Carlo simulations. The symbols are the mean (\pm SD) MDZ concentrations measured during clinical studies in healthy volunteers. The inserts are the concentration-time profiles presented in normal scale.

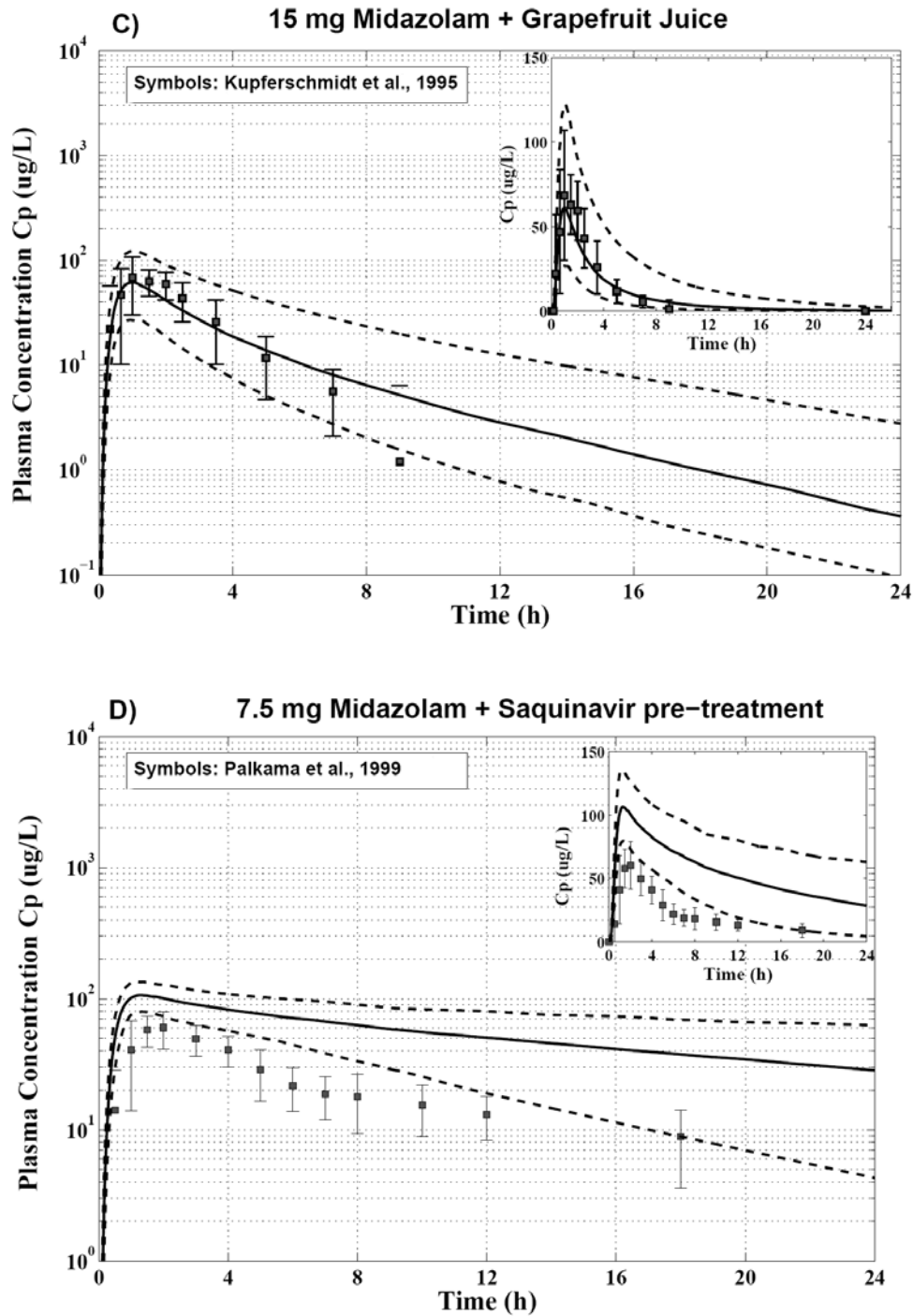


Figure 2C-D. Semi-logarithmic representation of the concentration-time profiles after oral administration of MDZ to healthy volunteers **C)** 15 mg of MDZ + GFJ; **D)** 7.5 mg MDZ+ SQV pretreatment. The black line represents the predicted mean value of the concentration-time profile, and the dashed lines are the 5th and 95th percentiles obtained after running Monte-Carlo simulations. The symbols are the mean (\pm SD) MDZ concentrations measured during clinical studies in healthy volunteers. The inserts are the concentration-time profiles presented in normal scale.

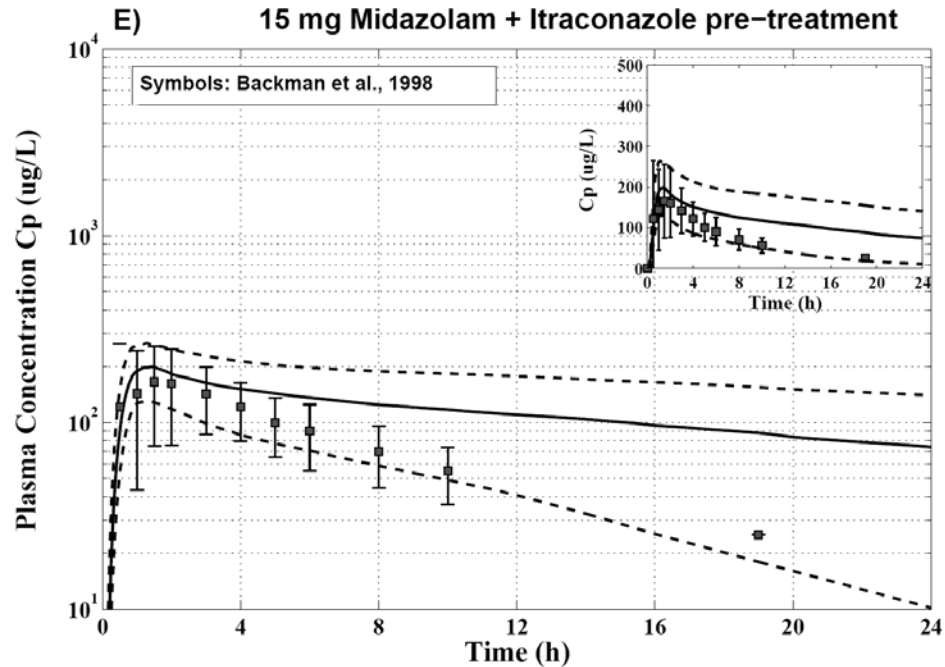


Figure 2E. Semi-logarithmic representation of the concentration-time profiles after oral administration of MDZ to healthy volunteers **E)** 7.5 mg MDZ + ITZ pretreatment. The black line represents the predicted mean value of the concentration-time profile, and the dashed lines are the 5th and 95th percentiles obtained after running Monte-Carlo simulations. The symbols are the mean (\pm SD) MDZ concentrations measured during clinical studies in healthy volunteers (Kupferschmidt, Ha et al. 1995; Backman, Kivisto et al. 1998; Palkama, Ahonen et al. 1999; Saari, Laine et al. 2006). The inserts are the concentration-time profiles presented in normal scale.

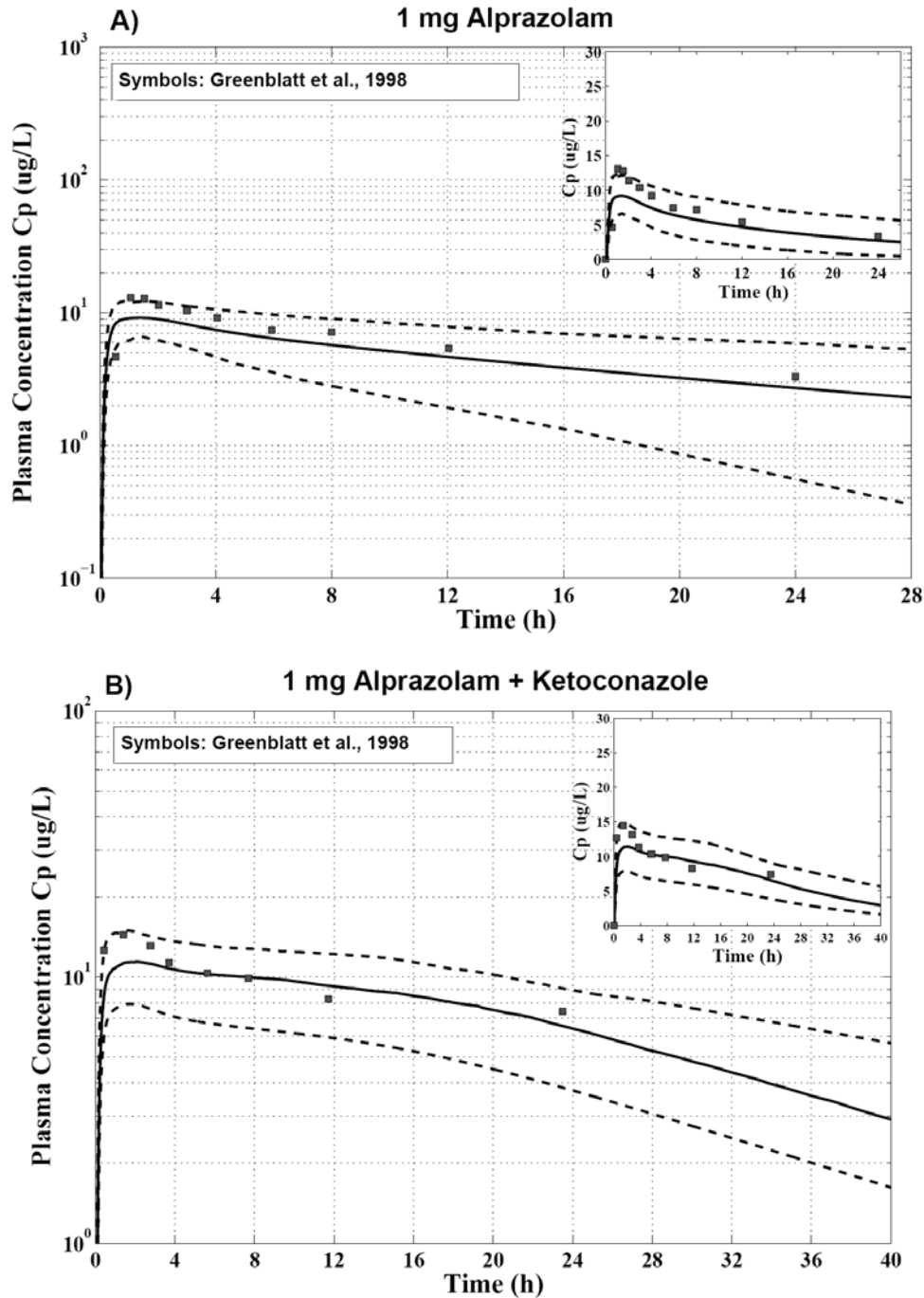


Figure 3A-B. Semi-logarithmic representation of the concentration-time profiles after oral administration of **A)** 1 mg APZ; **B)** 1 mg APZ + KTZ pretreatment to healthy volunteers. The black line represents the predicted mean value of the concentration-time profile, and the dashed lines are the 5th and 95th percentiles obtained after running Monte-Carlo simulations. The symbols are the mean (\pm SD) MDZ concentrations measured during clinical studies in healthy volunteers (Greenblatt, Wright et al. 1998; Greenblatt, von Moltke et al. 2000). The inserts are the concentration-time profiles presented in normal scale.

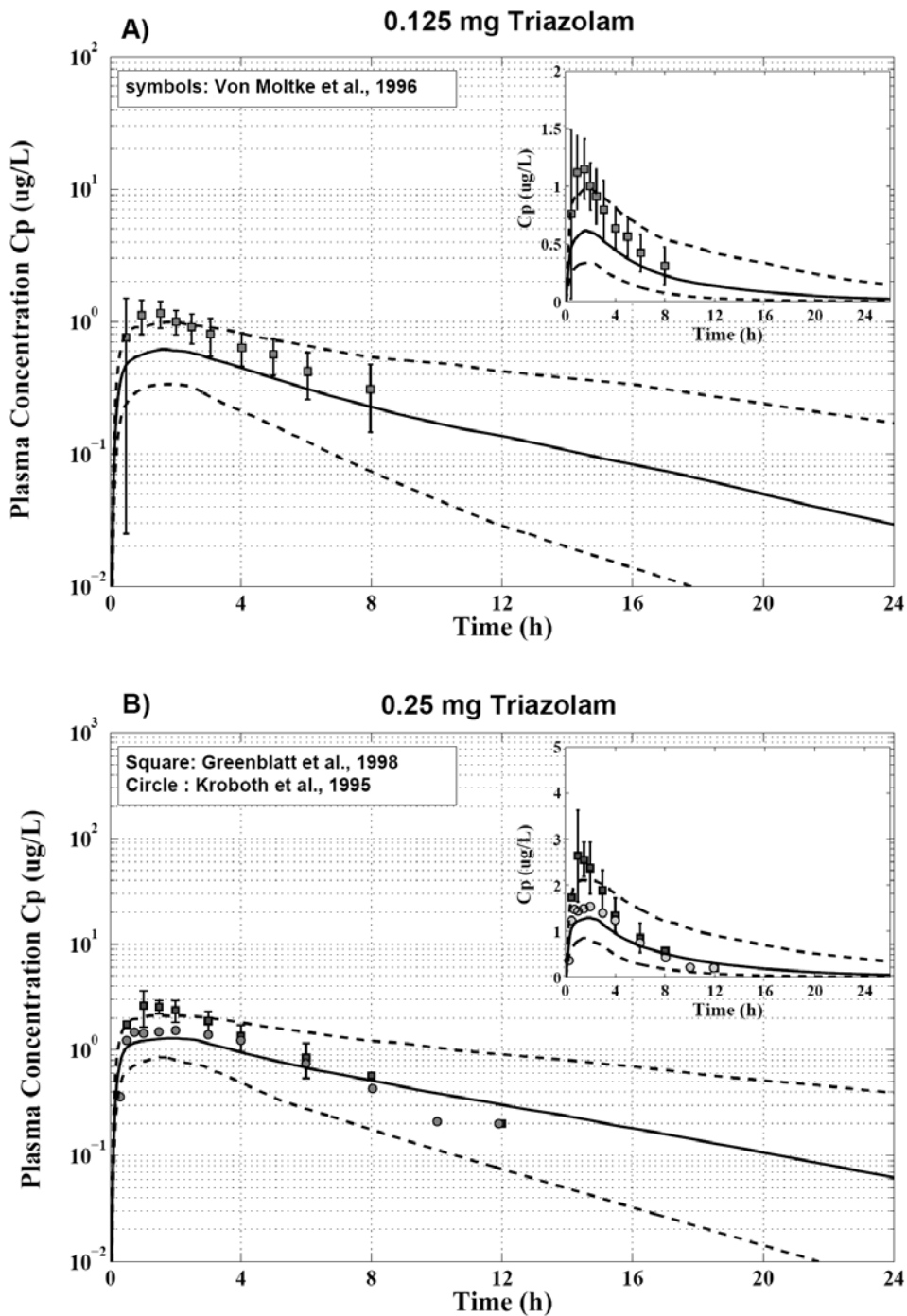


Figure 4A-B. Semi-logarithmic representation of the concentration-time profiles after oral administration of **A)** 0.125 mg; **B)** 0.25 mg TRZ to healthy volunteers. The black line represents the predicted mean value of the concentration-time profile, and the dashed lines are the 5th and 95th percentiles obtained after running Monte-Carlo simulations. The symbols are the mean (\pm SD) MDZ concentrations measured during clinical studies in healthy volunteers (Kroboth, McAuley et al. 1995; von Moltke, Greenblatt et al. 1996; Greenblatt, Wright et al. 1998). The inserts are the concentration-time profiles presented in normal scale.

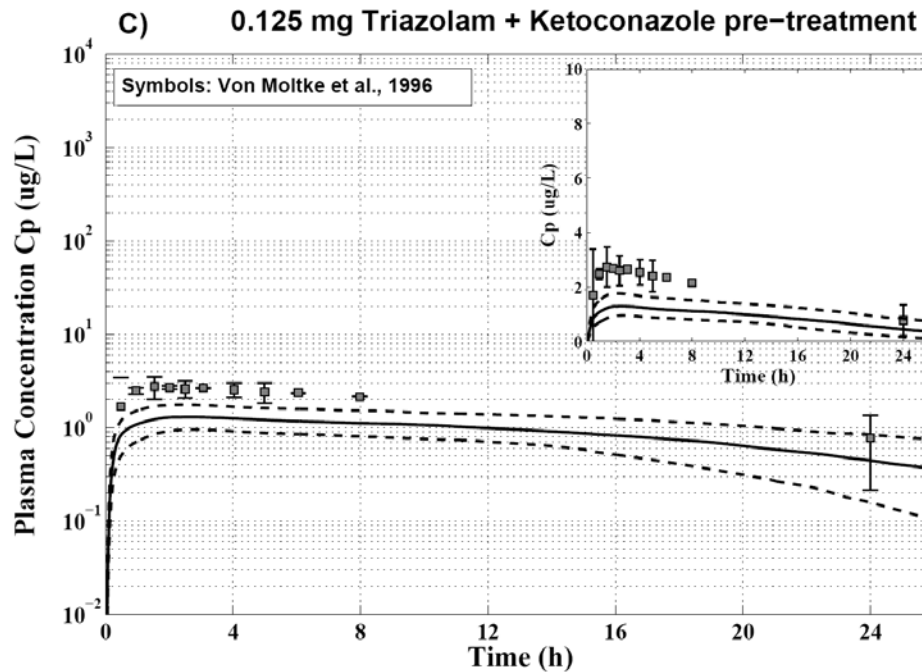


Figure 4C. Semi-logarithmic representation of the concentration-time profiles after oral administration of 0.125 mg TRZ+ KTZ pretreatment to healthy volunteers. The black line represents the predicted mean value of the concentration-time profile, and the dashed lines are the 5th and 95th percentiles obtained after running Monte-Carlo simulations. The symbols are the mean (\pm SD) MDZ concentrations measured during clinical studies in healthy volunteers (Kroboth, McAuley et al. 1995; von Moltke, Greenblatt et al. 1996; Greenblatt, Wright et al. 1998). The inserts are the concentration-time profiles presented in normal scale.

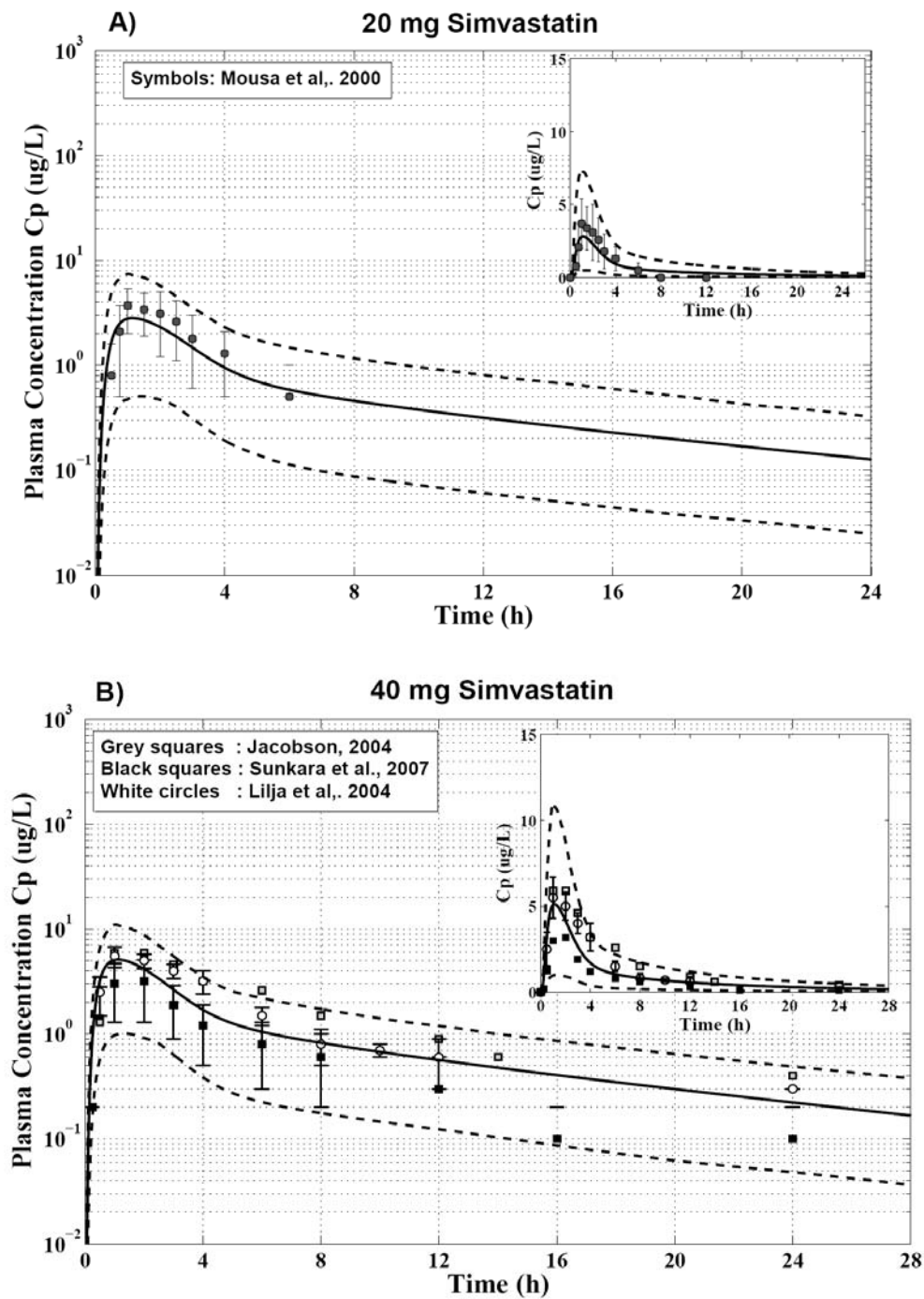


Figure 5A-B. Semi-logarithmic representation of the concentration-time profiles after oral administration of **A)** 20 mg; **B)** 40 mg of SMV to healthy volunteers; The black line represents the predicted mean value of the concentration-time profile, and the dashed lines are the 5th and 95th percentiles obtained after running Monte-Carlo simulations. The symbols are the mean (\pm SD) MDZ concentrations measured during clinical studies in healthy volunteers (Neuvonen, Kantola et al. 1998; Mousa, Brater et al. 2000; Jacobson 2004; Lilja, Neuvonen et al. 2004; Simard, Michaud et al. 2004; Sunkara, Reynolds et al. 2007). The inserts are the concentration-time profiles presented in normal scale.

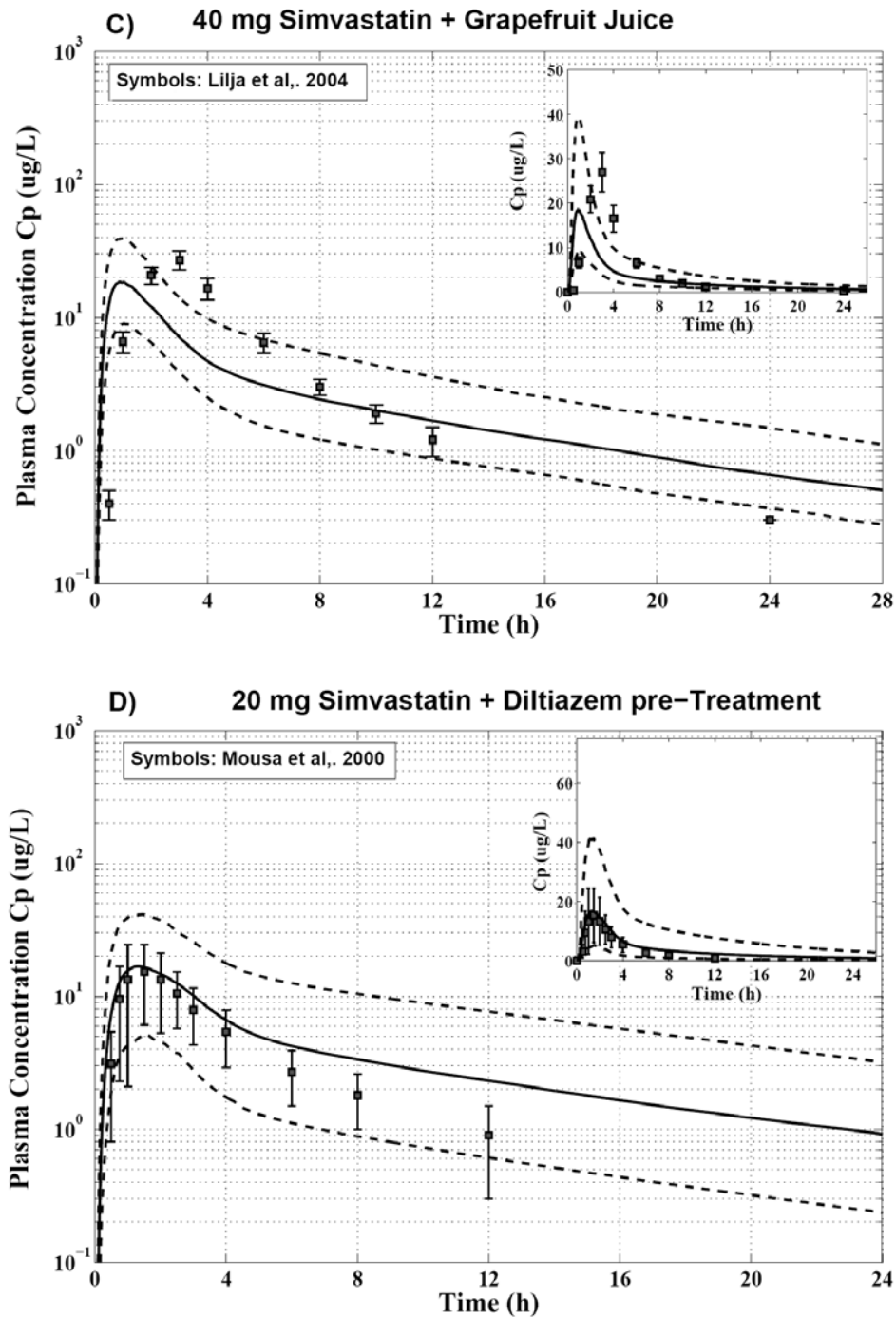


Figure 5C-D. Semi-logarithmic representation of the concentration-time profiles after oral administration of **C)** 40 mg SMV+ GFJ **D)** 20 mg SMV+ DTZ to healthy volunteers. The black line represents the predicted mean value of the concentration-time profile, and the dashed lines are the 5th and 95th percentiles obtained after running Monte-Carlo simulations. The symbols are the mean (\pm SD) MDZ concentrations measured during clinical studies in healthy volunteers (Neuvonen, Kantola et al. 1998; Mousa, Brater et al. 2000; Jacobson 2004; Lilja, Neuvonen et al. 2004; Simard, Michaud et al. 2004; Sunkara, Reynolds et al. 2007). The inserts are the concentration-time profiles presented in normal scale.

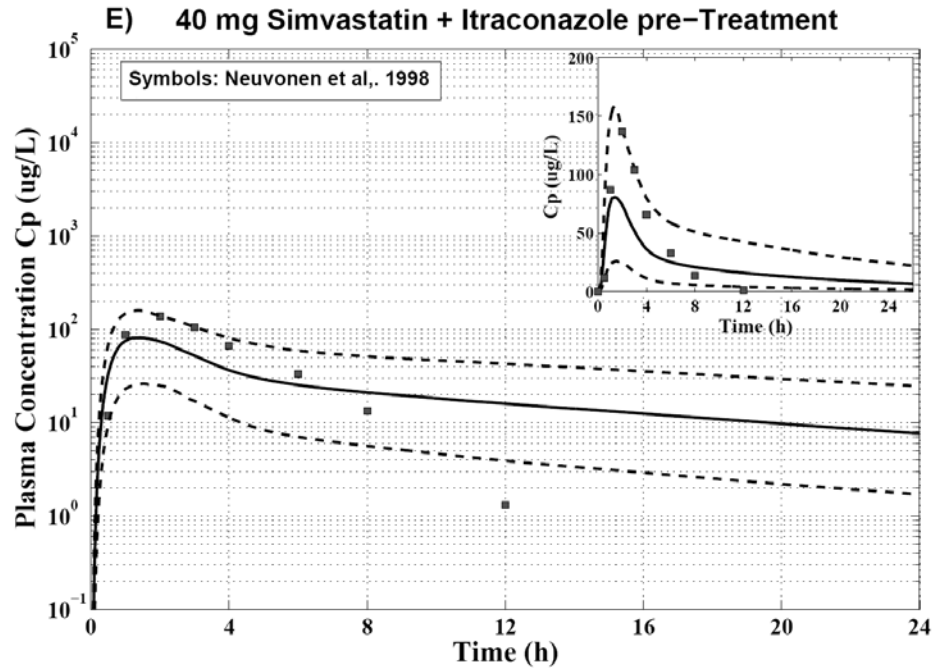


Figure 5E. Semi-logarithmic representation of the concentration-time profiles after oral administration of **E)** 40mg SMV + ITZ to healthy volunteers. The black line represents the predicted mean value of the concentration-time profile, and the dashed lines are the 5th and 95th percentiles obtained after running Monte-Carlo simulations. The symbols are the mean (\pm SD) MDZ concentrations measured during clinical studies in healthy volunteers (Neuvonen, Kantola et al. 1998; Mousa, Brater et al. 2000; Jacobson 2004; Lilja, Neuvonen et al. 2004; Simard, Michaud et al. 2004; Sunkara, Reynolds et al. 2007). The inserts are the concentration-time profiles presented in normal scale.

3.2 Prediction of PK Parameters in the Presence or Absence of Metabolism-based Inhibition

According to our criteria for a successful parameter prediction represented with a deviation of less than two-fold error, most of the PBPK model parameters (64/78), namely $AUC_{0-t_{last}}$, C_{max} , t_{max} , $t_{1/2}$, and CL_{tot}/F , were successfully predicted when compared to those estimated from clinical studies (Figure 6A-E). Five predicted parameters fall outside the three-fold error range. These deviations are observed for CL_{tot}/F of MDZ administered with SQV or ITZ (Figure 6E), $t_{1/2}$ of MDZ administered with ITZ, $t_{1/2}$ of SMV in the presence of ITZ, and $t_{1/2}$ of APZ in the presence of KTZ (Figure 6D). A slight deviation towards the upper limit of the two- and three-fold error ranges was observed when predicting the half-life of most compounds.

3.3 Prediction of the Impact of Metabolic Drug Interactions on Drug PK Parameters

We recall that the ratio between a PK parameter predicted under conditions of metabolism-based inhibition and the same parameter when the drug is administered alone was used to quantify the impact of metabolic interactions. Among the 38 ratios considered, 29 were included within the two-fold error range while only four of them fall outside the three-fold error range (Figure 7). The main deviations were observed for CL_{tot}/F of MDZ when administered with SQV or ITZ, for $t_{1/2}$ of MDZ with ITZ, and $t_{1/2}$ of APZ with KTZ. Overall, the above results showed the ability of the present WB-PBPK model to accurately simulate the degree of metabolic interactions that affected CYP3A-mediated presystemic eliminations of different drugs.

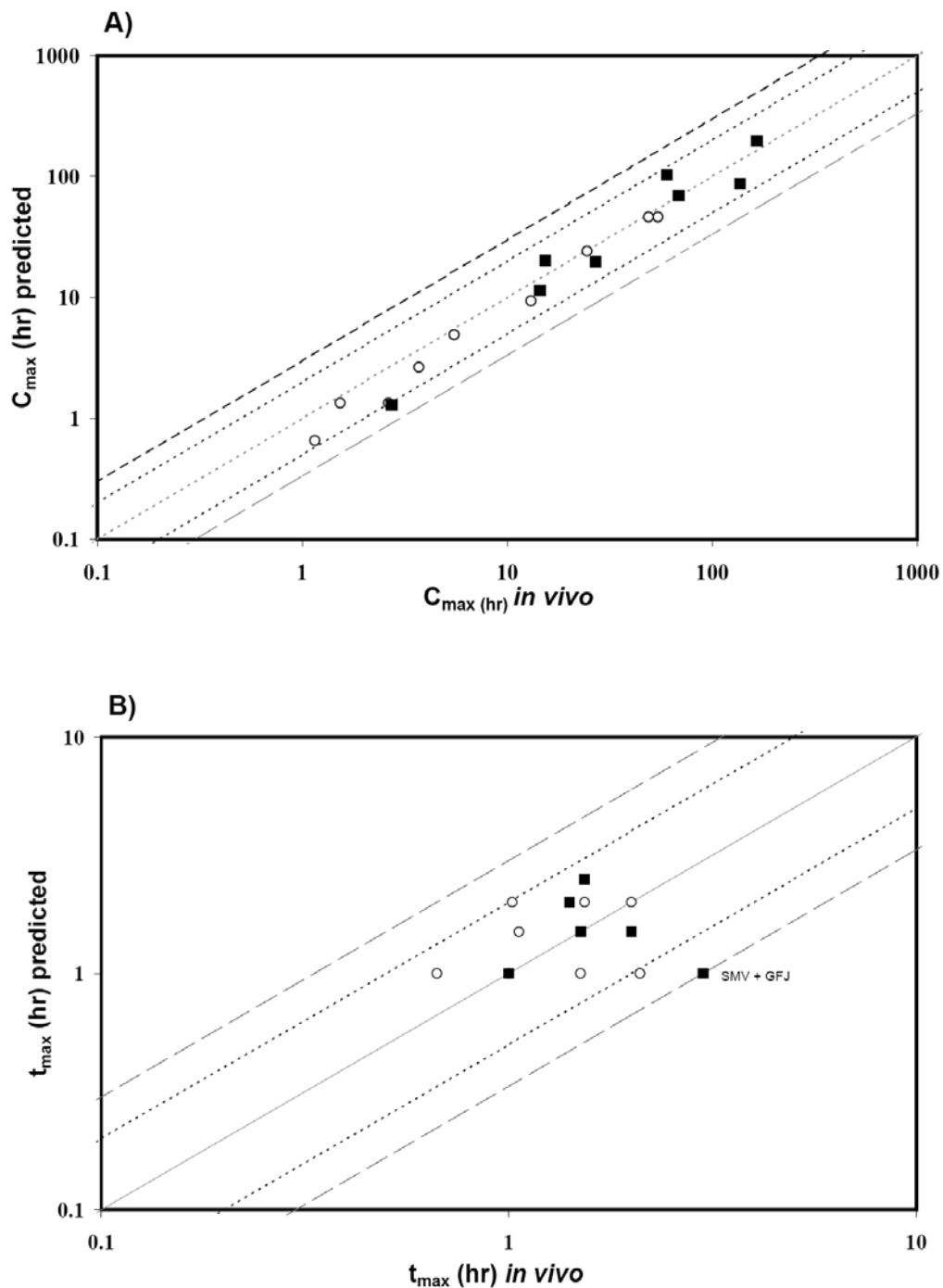


Figure 6A-B. Comparison of *in silico* versus *in vivo* parameters estimated after oral administration of MDZ, APZ, TRZ or SMV alone (empty circle) or with a CYP3A inhibitor (black Square). **A)** C_{max} predicted vs C_{max} observed; **B)** t_{max} predicted vs t_{max} observed

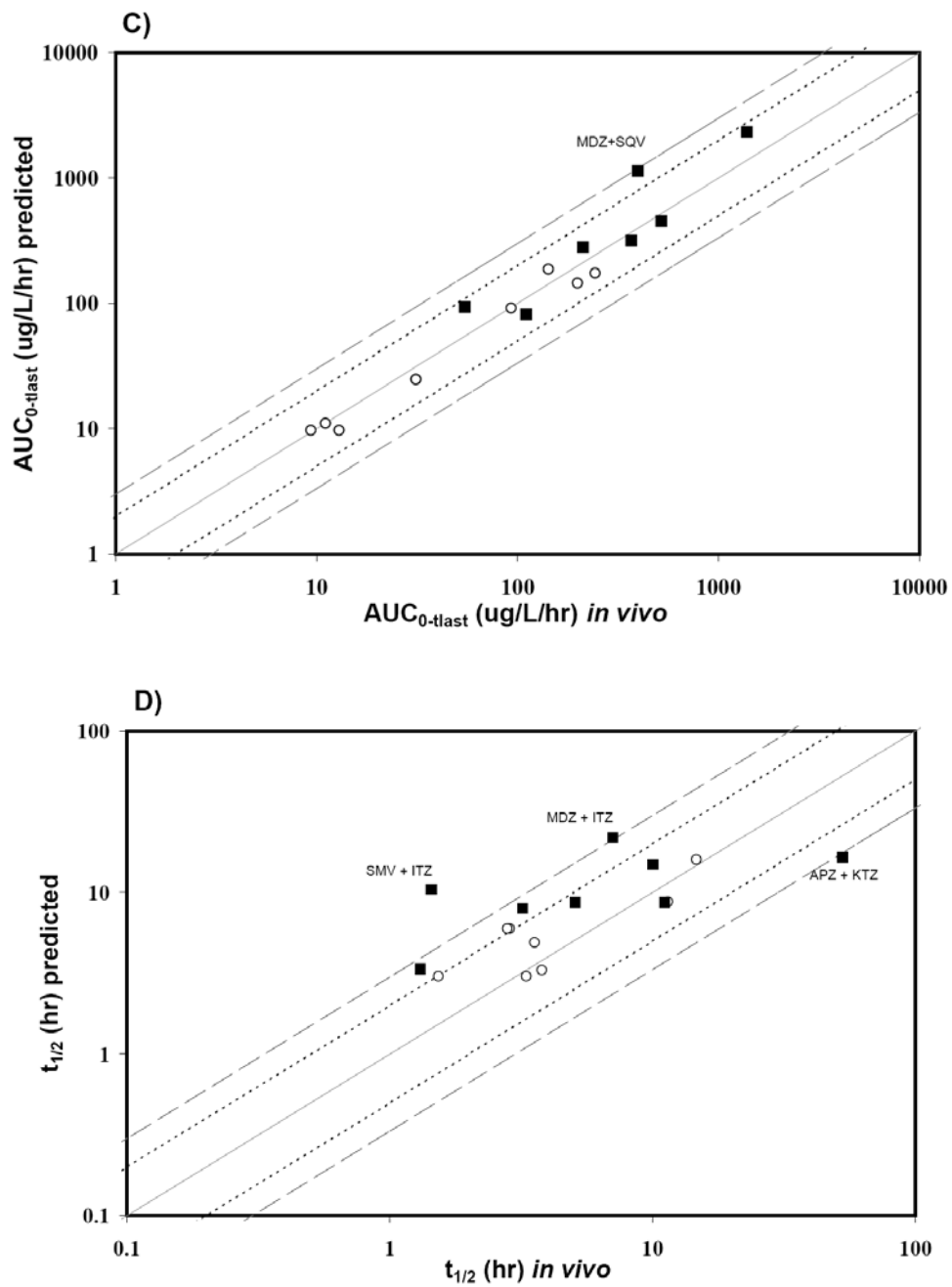


Figure 6C-D. Comparison of *in silico* versus *in vivo* parameters estimated after oral administration of MDZ, APZ, TRZ or SMV alone (empty circle) or with a CYP3A inhibitor (black Square). **C)** $AUC_{0-t_{last}}$ predicted vs $AUC_{0-t_{last}}$ observed; **D)** $t_{1/2}$ predicted vs $t_{1/2}$ observed;

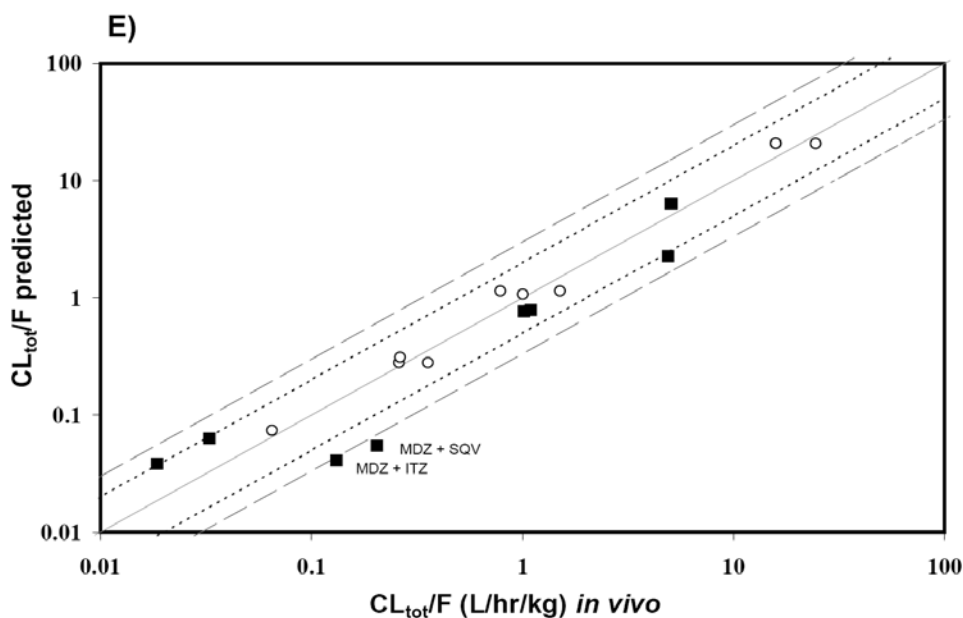


Figure 6E. Comparison of *in silico* versus *in vivo* parameters estimated after oral administration of MDZ, APZ, TRZ or SMV alone (empty circle) or with a CYP3A inhibitor (black Square; **E**) CL_{tot}/F predicted vs CL_{tot}/F observed.

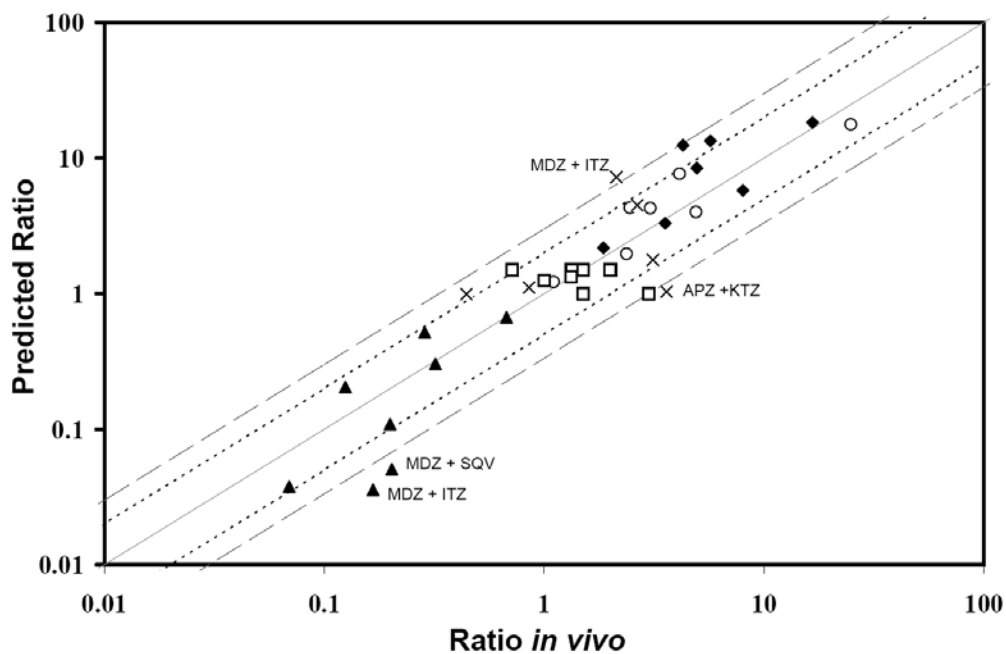


Figure 7. Predicted versus measured ratios between PK parameters obtained under conditions of metabolic interaction and without any interactions: \blacklozenge $AUC_{0-t_{last}}$; \blacktriangle CL_{tot}/F ; \times $t_{1/2}$; \square t_{max} ; \circ C_{max} . Dotted lines are the 2-fold-error range; dashed lines are the three-fold error range.

3.4 Extent of Absorption, Pre-systemic Elimination, and Oral Bioavailability in the Presence or Absence of Metabolic Interaction

The WB-PBPK model locally applied to the GIT and liver compartments allowed us to predict the drug extent of absorption (F_{abs}), as well as the drug fractions that do not undergo intestinal and hepatic presystemic elimination, ie F_g and F_h , respectively (Figure 8A-D). Using these fractions, we predicted the oral bioavailability of the drugs administered alone or with a CYP3A inhibitor. Interestingly, all predicted values of F were accurately predicted by the model as demonstrated below.

3.4.1 Midazolam (Figure 8A)

MDZ alone

The model predicted that more than 90% of the administered dose of MDZ was absorbed through the human GIT, which is similar to the *in vivo* situation (Paine, Shen et al. 1996; Thummel, O'Shea et al. 1996). The predicted results showed that $65 \pm 14\%$ and $44 \pm 13\%$ of MDZ will not undergo intestinal and hepatic metabolism, respectively. These predictions are similar to F_g and F_h estimated *in vivo*, ie F_g of about 56% (Paine, Shen et al. 1996; Thummel, O'Shea et al. 1996) and F_h between 46% and 56% (Thummel, O'Shea et al. 1996) (Lave, Dupin et al. 1997). Finally, the WB-PBPK model gave an accurate prediction of F ($27\% \pm 12\%$) considering the reported range of 24 to 41% (Kupferschmidt, Ha et al. 1995; Thummel, O'Shea et al. 1996; Palkama, Ahonen et al. 1999).

MDZ + Inhibitor

The intestinal metabolism inhibition by DHB contained in GFJ increased F_g of MDZ by a factor of 1.5, leading to an increase of the oral bioavailability up to 40%. This result is comparable to the oral bioavailability ($35 \pm 3\%$) reported by Kupferschmidt and coworkers (Kupferschmidt, Ha et al. 1995). For both intestinal and hepatic metabolism inhibitions, the model predicted an increase of F_g and F_h to 93% when MDZ is administered with ITZ or SQV. Hence, the MDZ oral bioavailability increased to 80% in both situations. This result is similar to the increase of bioavailability reported by Palkama and coworkers (Palkama, Ahonen et al. 1999).

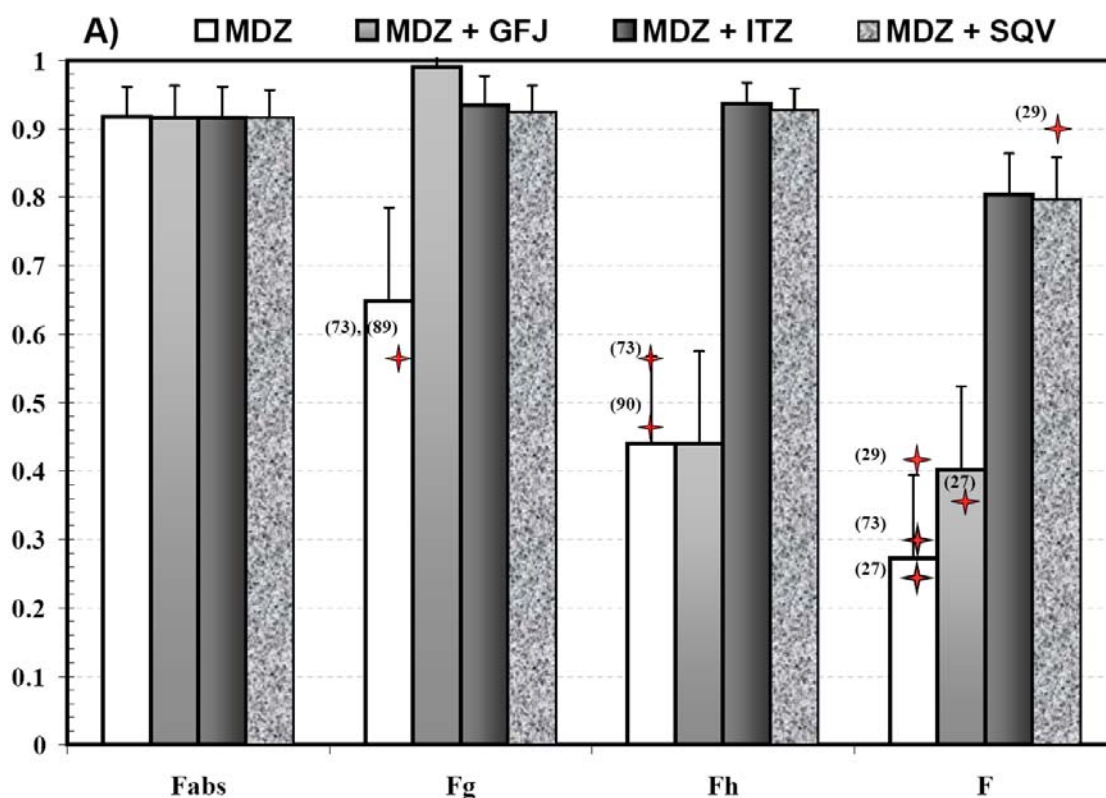


Figure 8A. Extent of absorption (F_{abs}), fraction of MDZ that does not undergo the intestinal (F_g) and hepatic (F_h) metabolisms, and oral bioavailability (F) predicted by the PBPK model in the absence or the presence of metabolism-based inhibition. The red stars are the corresponding published parameters. ⁽²⁷⁾(Kupferschmidt, Ha et al. 1995); ⁽²⁹⁾(Palkama, Ahonen et al. 1999); ⁽⁷³⁾(Thummel, O'Shea et al. 1996); ⁽⁸⁹⁾(Lave, Dupin et al. 1997); ⁽⁹⁰⁾(Shitara and Sugiyama 2006)

3.4.2 Alprazolam (Figure 8B)

APZ alone:

The predicted F_{abs} is in accordance with the reported value (Smith, Kroboth et al. 1984). The WB-PBPK model also provided an accurate estimation of F_g ($92\% \pm 5\%$), F_h ($92\% \pm 5\%$), and F ($78\% \pm 7\%$) in comparison to F_g of 99% (Venkatakrishnan, Obach et al. 2007), F_h of 94% (Galetin, Hinton et al. 2007) and F , which ranges from 85 to 88% (Smith, Kroboth et al. 1984; Greenblatt and Wright 1993).

APZ + Inhibitor

APZ was not highly affected by pre-systemic elimination inhibition since this drug does not undergo major intestinal and hepatic metabolism. Therefore, the PBPK model predicted a slight increase of the oral bioavailability from 77 to 85%, which is consistent

with the small increase of C_{\max} observed by Greenblatt and coworkers (ref 30) (Greenblatt, Wright et al. 1998).

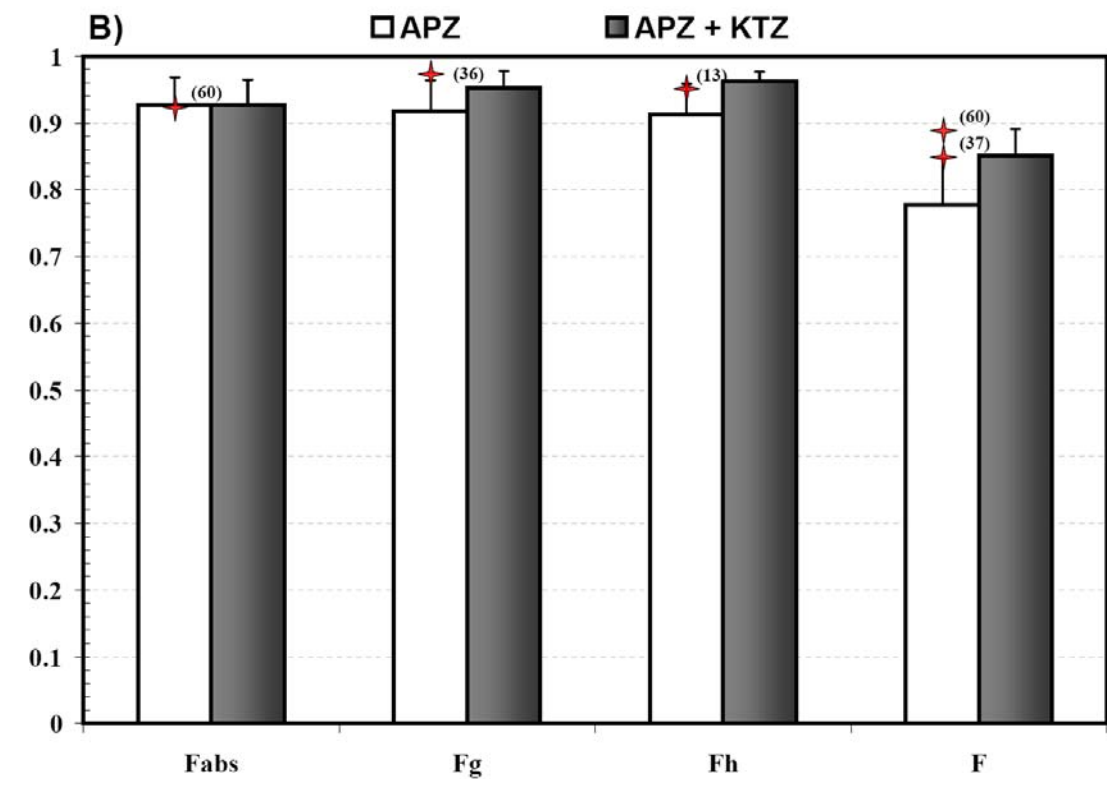


Figure 8B. Extent of absorption (F_{abs}), fraction of APZ that does not undergo the intestinal (F_{g}) and hepatic (F_{h}) metabolisms, and oral bioavailability (F) predicted by the PBPK model in the absence or the presence of metabolism-based inhibition. The red stars are the corresponding published parameters. ⁽⁶⁰⁾ (Smith, Kroboth et al. 1984); ⁽³⁶⁾ (Venkatakrishnan, Obach et al. 2007); ⁽¹³⁾ (Galetin, Hinton et al. 2007); ⁽³⁷⁾ (Greenblatt and Wright 1993)

3.4.3 Triazolam (Figure 8C)

TRZ alone

The predicted F_{abs} ($83 \pm 6\%$) is very comparable to the reported values ranging from 80 to 86% (Kroboth, McAuley et al. 1995; Galetin, Hinton et al. 2007). The PBPK model also gave an acceptable estimation of F_{g} , F_{h} and F when compared to the reported values (Kroboth, McAuley et al. 1995; Galetin, Hinton et al. 2007).

TRZ + Inhibitor

The inhibition of intestinal and hepatic metabolism led to an increase of F_{g} and F_{h} up to 94%, resulting in an increase of the oral bioavailability from 57 to 74%. This is in

accordance with the significant increase of C_{\max} reported by others after KTZ pretreatment (von Moltke, Greenblatt et al. 1996; Greenblatt, Wright et al. 1998).

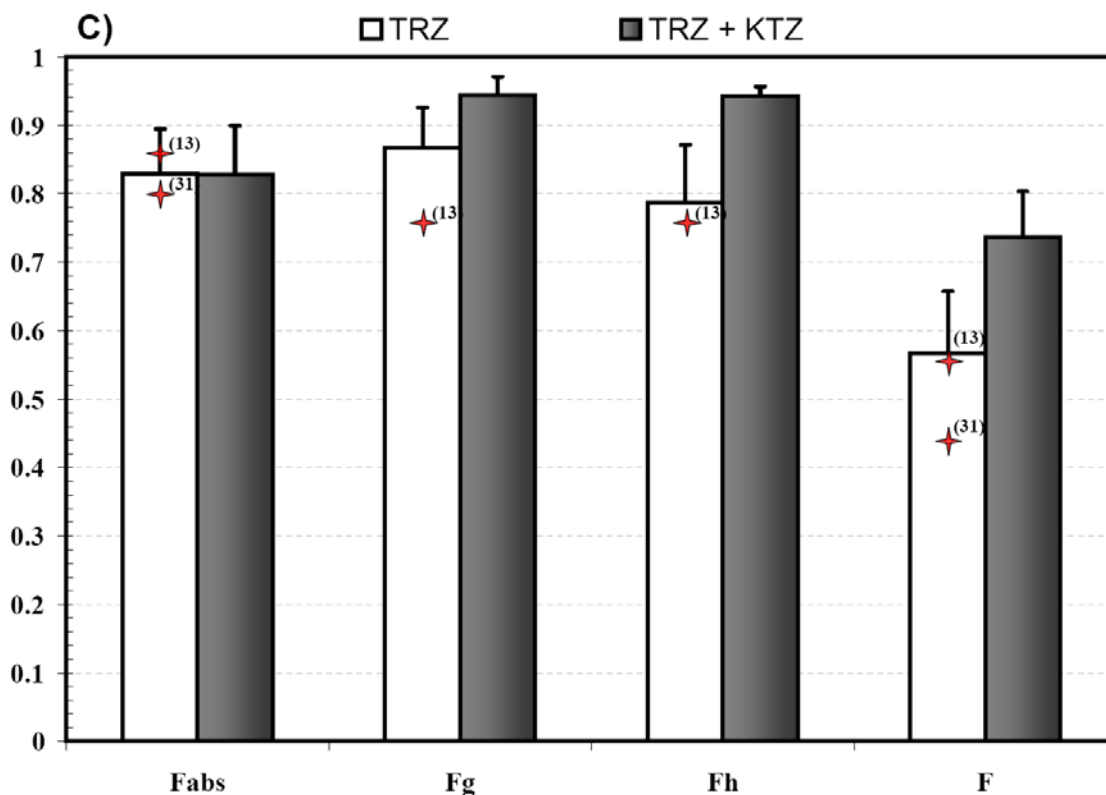


Figure 8C. Extent of absorption (F_{abs}), fraction of TRZ that does not undergo the intestinal (F_g) and hepatic (F_h) metabolisms, and oral bioavailability (F) predicted by the PBPK model in the absence or the presence of metabolism-based inhibition. The red stars are the corresponding published parameters. ⁽¹³⁾ (Galetin, Hinton et al. 2007); ⁽³¹⁾ (Kroboth, McAuley et al. 1995)

3.4.4 Simvastatin (Figure 8D)

SMV alone

The fraction of SVM absorbed through the GIT was estimated to 91% of the administered dose. This result is higher than the range of 60 to 80% reported by some authors (Shitara and Sugiyama 2006), but is comparable to an *in vivo* value of 93% reported by others (Cheng, Schwartz et al. 1994; Mousa, Brater et al. 2000). The resulting predicted F was only of 3 %, which is in accordance with the reported value of 5% or less (Shitara and Sugiyama 2006).

SMV + Inhibitor

The PBPK model predictions showed that SMV is significantly affected by the DHB-mediated inhibition of the intestinal metabolism because the predicted F_g almost tripled. Consequently, the predicted oral bioavailability increased from 3 to 9%. This is comparable to the reported 3.9 fold increase of C_{max} of SMV when co-administered with GFJ (Lilja, Neuvonen et al. 2004).

Considering a metabolic inhibition in both the intestine and liver after ITZ or DTZ pretreatment, F_g almost doubled and F_h increased by a factor ranging from 3 to 5, leading to an oral bioavailability of SMV ranging from 17 to 36%. These results are in accordance with the relevant increase of SMV C_{max} by a factor of 3.6 to 10-fold. (Neuvonen, Kantola et al. 1998; Mousa, Brater et al. 2000)

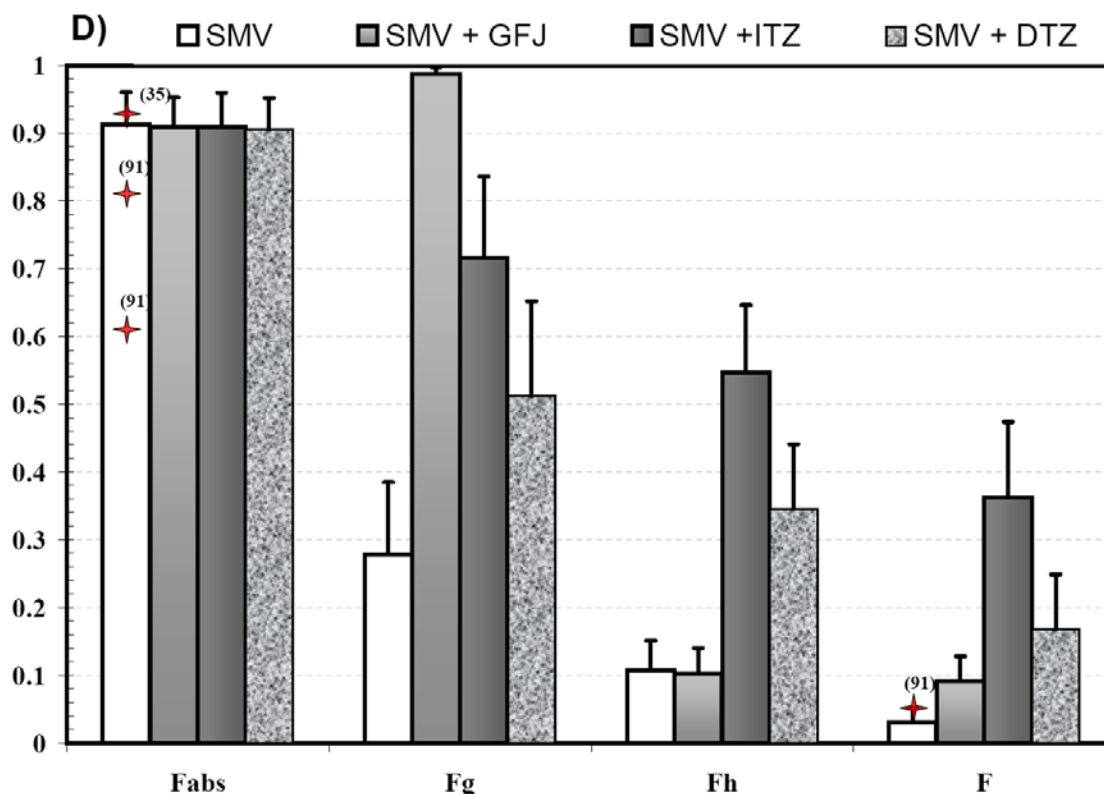


Figure 8D. Extent of absorption (F_{abs}), fraction of TRZ that does not undergo the intestinal (F_g) and hepatic (F_h) metabolisms, and oral bioavailability (F) predicted by the PBPK model in the absence or the presence of metabolism-based inhibition. The red stars are the corresponding published parameters. ⁽³⁵⁾ (Mousa, Brater et al. 2000) ; ⁽⁹¹⁾ (Cheng, Schwartz et al. 1994)

4. Discussion

Characterization of pharmacokinetics in different organs and under various conditions of drug use in humans is highly desirable (Meno-Tetang, Li et al. 2006). However, this is

still a major challenge in drug development in terms of the information available and the complexity of the mechanisms involved, particularly when the objective is to predict the oral absorption. The present work is an additional step in this direction, with the aim to undertake an analysis of the impact of metabolism-based inhibition on the human pharmacokinetics of orally administered CYP3A substrates. For this purpose, we have developed a WB-PBPK model for the oral administration of four drugs mainly eliminated by CYP3A and probably not strong substrates of efflux transporters present in the enterocytes. Using available *in vitro* data and the appropriate human physiology, we have predicted the plasma concentration-time profile and PK parameters of these drugs when administered alone. We also have investigated the effect of several CYP3A inhibitors, namely ketoconazole (KTZ), itraconazole (ITZ), diltiazem (DTZ), saquinavir (SQV), and 6',7'-dihydroxybergamottin (DHB), a furanocoumarin contained in grapefruit juice (GFJ), on the PK properties and profiles of the CYP3A substrates. An uncertainty analysis has also been performed to provide the range of possible plasma concentrations and parameters within which experimental data are likely to be included.

Considering the current criterion for a successful prediction, satisfied when the clinical data are captured within the 5th and 95th percentiles of the predicted concentration-time profiles, the *in vivo* profiles were generally well captured by the WB-PBPK model. Indeed, a successful prediction was obtained for a single oral administration of MDZ and SMV. For APZ and TRZ, the plasma concentration-time course was slightly underestimated. As the fraction absorbed and the oral bioavailability of these drugs were predicted with an acceptable level of accuracy, this underestimation can potentially be explained by a difference between their predicted and observed volume of distribution (TRZ: 1.3 vs 0.7 L/kg, respectively; APZ: 1.3 vs 0.6 L/kg, respectively). For concomitant administration of MDZ and ITZ, TRZ and KTZ, as well as SMV and DTZ, the *in vivo* concentration-time profiles were accurately predicted using the WB-PBPK model. A slight deviation was observed for SMV when administered with ITZ. However, more important deviations were observed between the WB-PBPK model predictions and the *in vivo* concentration-time profiles of MDZ co-administered with SQV as well as TRZ with KTZ. The PK parameters derived from the plasma profiles obtained after a single dose of MDZ, APZ, TRZ and SMV were generally in good

accordance with the clinical data (Kroboth, McAuley et al. 1995; Kupferschmidt, Ha et al. 1995; von Moltke, Greenblatt et al. 1996; Greenblatt, Wright et al. 1998; Neuvonen, Kantola et al. 1998; Palkama, Ahonen et al. 1999; Mousa, Brater et al. 2000; Lilja, Neuvonen et al. 2004; Saari, Laine et al. 2006). The only exception is the prediction of $t_{1/2}$ for most of the drugs for which the deviation is toward the upper two-fold error range. This is particularly observed for SMV half-life (Figure 6D) and possibly attributable to the omission of other elimination routes for SMV by carboxylesterases. Indeed, urinary and biliary excretions were not accounted for in this work, because the drugs considered here are mainly eliminated by hepatic metabolism. Although an allometric approach can be used for urinary excretion via glomerular filtration (Theil, Guentert et al. 2003) (Lin 1998), appropriate quantitative prediction methods and/or *in vitro* input parameters are still needed at early stages of drug development to predict the renal and biliary excretions.

To our knowledge, this is the first time that GFJ-mediated inhibition is investigated using a PBPK modeling approach. Furanocoumarins present in GFJ are important CYP3A4 inhibitors and have been proposed as the main components responsible for GFJ-drug interactions. The two most abundant furanocoumarins measured in GFJ are bergamottin (BG) and DHB. It has been shown that BG is both a substrate-dependent reversible inhibitor and substrate-independent mechanism-based inhibitor, whereas DHB is a substrate independent reversible inhibitor and mechanism-based inhibitor (Paine, Criss et al. 2005). It has also been found that two furanocoumarin dimmers contained in GFJ, GF-I-4 and GF-I-1, are more potent CYP3A4 inhibitors than BG and DHB. However, these two furanocoumarins are present at a concentration well below those reported to significantly inhibit CYP3A4 activity *in vitro* (Kakar, Paine et al. 2004). A recent study has shown that DHB appears to be the furanocoumarin that contributes most to the GFJ inhibitory effect (Kakar, Paine et al. 2004). Based on this, we modeled the intestinal CYP3A inhibitory effect of DHB contained in GFJ. The impact of the intestinal CYP3A inhibition by this GFJ component on the extent of absorption of MDZ and SMV has been well captured by the PBPK model.

Based on a single parameter such as the intestinal effective permeability (Amidon, Sinko et al. 1988), the absorption potential (Dressman, Amidon et al. 1985) or Caco-2-cells monolayer permeability (Artursson and Karlsson 1991), previous studies have proposed a method for the prediction of the extent of drug absorption (F_{abs}). More recently, methods incorporating two parameters such as apparent permeability coefficients and solubility (Willmann, Schmitt et al. 2004) (Thomas, Brightman et al. 2008) have been used to estimate the extent of absorption for a wide drug selection. In the present work, based on the ACAT approach, dynamic processes for the GIT transit rate, drug dissolution, solubility in fassif medium, and diffusion velocity of the non-ionized drug through the gut membrane have been included in the WB-PBPK model and used as a predictive tool for the extent of drug absorption. Also the extent of absorption was estimated using apparent permeability through Caco-2 cells monolayer. Since the investigated drugs are probably not strong substrates of efflux transporters, we assumed that passive diffusion was the main transport process occurring at the gut membrane (Lennernas 1998). The extent of absorption was accurately estimated for all drugs suggesting that the recourse to default values of the ACAT parameters involved in drug dissolution in the intestinal lumen (D , ρ , r , and T used to calculate K_d) is an acceptable approach for the drugs investigated here. The recourse to calculation of solubility in biorelevant medium other than water was also essential for lipophilic drugs poorly-soluble in water. Indeed, the use of water solubility alone did not permit, in the present study, to properly characterize the absorption process of the current drugs (results not shown). Some authors also mentioned that it is important to systematically characterize the kinetic of dissolution of the drug in an *intestinal-like solution* rather than in aqueous solution, specially for poorly soluble compounds (Jones, Parrott et al. 2006).

Similarly to liver, CYP3A4 is the most abundant CYP450 isoenzymes expressed in the small intestine, with a large inter-individual variation (Paine, Hart et al. 2006). This variation is likely to be translated into inter-individual variations of the plasma concentration-time profiles and oral bioavailability. Even though some CYP3A4 substrates PK profiles and parameters have previously been predicted with a relatively good degree of accuracy using physiological models into which only the hepatic metabolism was considered, this should not be generalized to all CYP3A4

substrates (Jones, Parrott et al. 2006). Indeed, Paine and coworkers had to include human intestinal microsomes data to accurately predict the oral clearance of midazolam (Paine, Shen et al. 1996). The present results support the fact that intestinal gut wall metabolism requires careful consideration for most CYP3A substrates investigated in the present study and should be considered when developing predictive PBPK modeling tools.

For orally administered drugs, CYP3A4-mediated biotransformation and P-glycoprotein (P-gp) mediated active efflux are potentially two major determinants of their bioavailability. The considerable overlap of P-gp and CYP3A4 substrates gives rise to low oral bioavailability of these drugs. Furthermore, inhibition of both P-gp-mediated efflux and CYP3A4-mediated gut wall metabolism can lead to significant increase of drug bioavailability (Sparreboom, van Asperen et al. 1997; Malingre, Richel et al. 2001). In the present study, we restricted the drug selection to CYP3A substrates which are probably not strong P-gp substrates. While the quantitative prediction of P-gp efflux function in ADME is still at the beginning (Badhan, Penny et al. 2009; Fenneteau, Turgeon et al. 2009), these approaches remain to be compared with clinical cases where drug interactions modulate P-gp activity.

The microsomal fraction or hepatocytes data have been widely used to predict the hepatic clearance in human under *in vivo* condition (Lave, Dupin et al. 1997; Paine, Khalighi et al. 1997; Obach 1999; Naritomi, Terashita et al. 2001; Ito and Houston 2005; Blanchard, Hewitt et al. 2006). These two types of data are of different nature since metabolic data obtained from hepatocytes include both phases of drug metabolism as well as active and passive transports, whereas those obtained from microsomal fraction are specific to one enzymatic system, for example CYP450 family (Grass and Sinko 2002). As a consequence it has been mentioned that intrinsic clearance estimated from microsomal data tends to underestimate the human hepatic clearance of acids, bases and neutral drugs (Fagerholm 2007). This was not significantly observed in this present study, since the basic drugs considered in the PBPK model are mainly eliminated by CYP3A isoenzymes ($f_{m_{CYP}} > 0.75$).

The inhibition of drug-metabolizing enzyme activities can occur through two main mechanisms: reversible (competitive) inhibition and mechanism-based inhibition. Silverman (Silverman 1995) defined the mechanism-based enzyme inhibitor as an unreactive compound whose structure resembles that of the substrate or product of the target enzyme, and which undergoes a catalytic transformation by the enzyme to a species that, prior to release from the active site, inactivates the enzyme. Some reports found that using reversible inhibition data led to an underestimation of drug-drug interactions for those drugs which are mechanism-based inactivators of the enzyme (Obach, Walsky et al. 2005). As a result, methods of *in vitro-in vivo* extrapolation of DDI have been recently proposed for the mechanism-based inactivators (Obach, Walsky et al. 2007; Fahmi, Maurer et al. 2008). Based on *in vitro data* of inhibition studies with the appropriate CYP3A substrate and inhibitor (Fahmi, Maurer et al. 2008) we estimated the time-dependent inhibition factors in the gut and liver related to the substrate-inhibitor couple. This approach gave accurate predictions of the impact of DDI on the plasma concentration-time courses, especially when the unbound inhibition constants were accounted for. While prediction of mechanism-based interactions relies on the estimation and knowledge of a large number of drug-related and physiology-related parameters generally associated to a certain degree of uncertainty (Venkatakrisnan, Obach et al. 2007), the current PBPK model provided relatively accurate predictions of the impact of such drug interactions. Finally, some inhibitors, such as SQV are also known to be inducers of CYP3A4. Suggestions to account for their induction properties when estimating the overall inhibition factor have been made (Fahmi, Maurer et al. 2008) which would have lead to a decrease of this inhibitory factor. The resulting observation is likely to be a decrease of the plasma concentration-time profile of the CYP3A substrates administered with SQV. This could explain the deviation observed between the PBPK prediction and clinical data of MDZ when administered with SQV (Figure 2D). Further refinement of the PBPK model can be performed to account for this simultaneous induction of CYP3A by SQV.

It has been proved that metabolites of ITZ, ie OH-ITZ, keto-ITZ and ND-ITZ are also potent inhibitors of CYP3A under *in vitro* condition. Recent *in vivo* studies have demonstrated that ITZ is the major inhibitor of CYP3A4, followed by ND-ITZ which may contribute up to 30-40% of the overall inhibition at steady state (Templeton,

Thummel et al. 2008). Considering the inhibitory effect of ITZ alone, the present PBPK model was accurate for MDZ but probably not for SMV (Figure 5E) that undergoes higher first pass effect than MDZ. Accounting for the inhibitory effect of the metabolites of ITZ on SMV could possibly enhance the prediction of the PBPK model (Vossen, Sevestre et al. 2007).

The use of the present PBPK model requires several assumptions about the parameterisation of the processes involved in drug dissolution, absorption, metabolism, and inhibition. In order to account for the variability of the input parameters, we have performed an uncertainty analysis using the Monte-Carlo approach. This gave rise to an envelope of possible drug plasma profiles defined by the 5th and 95th percentile of the predicted one. However, it is also relevant to identify which parameters are important in contributing to the prediction imprecision. Consequently, we performed a global sensitivity analysis (GSA) which will be presented in a companion paper¹. Based on a methodology we recently proposed and applied for PBPK modeling¹¹⁷, this GSA identified the Michaelis-Menten parameters and amount of CYP3A among the most sensitive parameters involved in the precision of $AUC_{0-t_{last}}$, $t_{1/2}$, C_{max} , $CL_{tot/F}$, F_g , F_h and F . The fraction of absorbed drug is mainly affected by the transit time in the small intestine and the drug dissociation rate. The dissociation rate affected the precision of the oral bioavailability of low metabolised drugs, such as APZ and TRZ. In the case of a metabolism-based inhibition, the inhibitor concentration in tissues is also an important input parameter involved in the prediction precision of $AUC_{0-t_{last}}$, $t_{1/2}$, $CL_{tot/F}$, F_g , F_h and F .

PBPK modeling can be used in preclinical development to help for dose selection in human by considering the key physiological determinants of the interspecies scaling. An *in vitro*-based framework can be used to perform simulations at the early stage of drug discovery in order to assist the drug selection process. The selected drug can be challenged with *in vivo* data at a later stage. Using a data set of 19 drugs, it has recently been shown that PBPK modeling is relatively more accurate than allometric scaling (Jones, Parrott et al. 2006). In drug development, PBPK models can potentially be used in the extrapolation from healthy volunteers to children (Price, Haddad et al.

2003), elderly (Bjorkman, Wada et al. 2001) and patients (Edginton and Willmann 2008). However, the latter is still rarely performed since the physiological changes related to the disease state remains difficult to quantify (Edginton and Willmann 2008). Anthropometric studies using this approach were also performed in Phase I with respect to the effect of weight, body composition, and body mass index (Willmann, Hohn et al. 2007). The present study is also a good demonstration of the usefulness of PBPK modeling for DDI estimation in drug development. While the actual use of PBPK modeling in drug discovery does not reflect its full potential (Edginton, Theil et al. 2008), the recent efforts made by the industry and regulatory agencies to integrate PBPK modeling in the drug development workflow make us believe that this approach will gain the place it deserves in the near future.

In summary, a WB-PBPK model was developed to gain insight in the prediction of DDI of CYP3A substrates when a drug is orally administered to humans either alone or with a CYP3A inhibitor. Tested on a set of four CYP3A substrates, the PBPK model was able to capture their plasma concentration-time profiles after a single oral administration. Furthermore, the prediction of their PK parameters was obtained with an acceptable degree of accuracy for the drug discovery (e.g., the oral bioavailability, and the fraction of drug that undergoes intestinal and hepatic metabolism). Therefore, the present PBPK model can potentially be used for the prediction of oral absorption, first pass effect, and pharmacokinetics of CYP450 substrates with and without potent inhibitors. Its predictive power can be further enhanced with the availability of drug-related data and additional knowledge on physiological and transport processes involved in the intestinal absorption.

5 Acknowledgment

The authors would like to thank Liah Fereydoonzaad for her assistance with this work. This work has been supported by FRSQ through PhD scholarship held by Frédérique Fenneteau. FCAR and MITACS are also acknowledged for their support. Financial support of the NSERC is held by Dr. Fahima Nekka.

APPENDIX

A.1 Inhibitors Plasma Profiles

The plasma concentration profile of the inhibitors corresponding to the clinical study protocol presented in Table 2, was extracted from the current literature when available (Greenblatt, Wright et al. 1998; Saari, Laine et al. 2006), otherwise it was obtained from additional publications (Grub, Bryson et al. 2001) (Lefebvre, Lacasse et al. 1994) (Kaukonen, Olkkola et al. 1997) with respect to PK protocols presented in Table 2. Using Winnonlin® (Pharsight Corp, Mountain View, California), we fitted the plasma concentration-time course of the inhibitors to obtain the parameters resulting to the compartmental analysis. These parameters were also used in an ordinary differential equations system to reproduce the inhibitor time-dependent concentration. These concentration profiles were used to estimate the time-dependent inhibition factor as described in Equations 11-12.

A.1.1 Saquinavir Plasma Profile

The SQV pre-treatment consisted in 1200 mg TID for 3 to 5 days (Palkama, Ahonen et al. 1999). However, the plasma concentration-time profile of SQV was not reported in this citation (Palkama, Ahonen et al. 1999). Consequently, we had recourse to data published by Grub and coworkers (Grub, Bryson et al. 2001), which report a pharmacokinetic study of SQV after 1200 mg administered three-time a day for a period of seven days. The fitted data are presented in Figure A1.

The simulated AUC (= 2.2 mg/L.hr) and mean plasma concentration ($C_{\text{mean}}=365$ ng/mL) are comparable to that observed by Palkama et al. (Palkama, Ahonen et al. 1999) (AUC = 3.1 ± 3 mg/L.hr and $C_{\text{mean}} = 297$ ng/mL).

A.1.2 Ketoconazole Plasma Profile

The KTZ pre-treatment consisted in 200 mg BID for 2 days (Greenblatt, Wright et al. 1998). The plasma concentration-time profiles of KTZ resulting to a concomitant administration with MDZ were provided by Greenblatt and coworkers (Greenblatt, Wright et al. 1998) and illustrated in Figure A2.

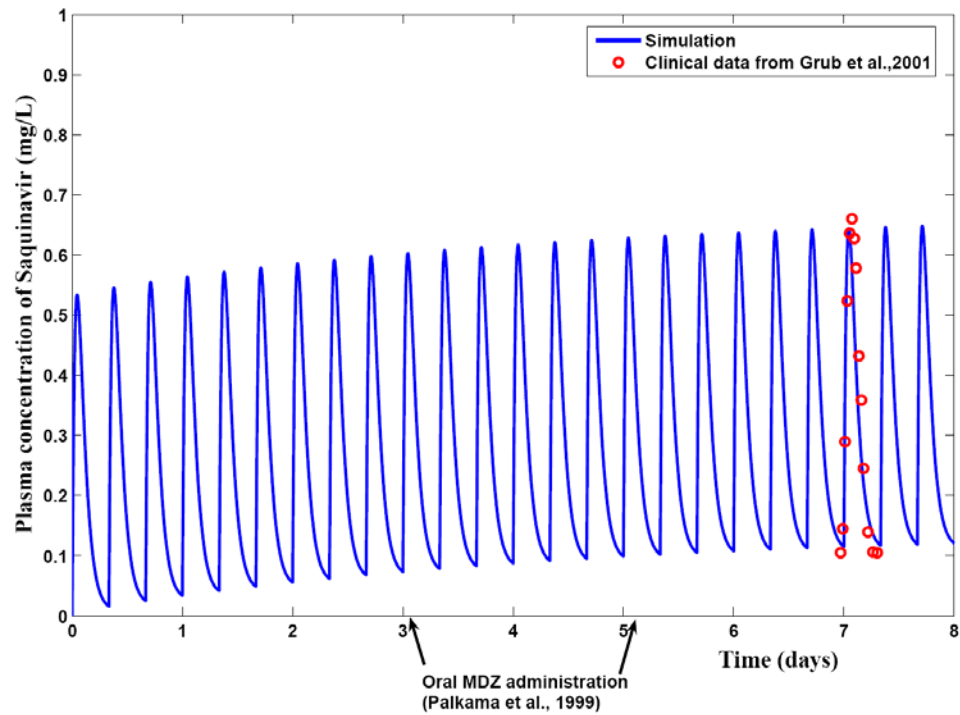


Figure A 1. Plasma concentration-time profile of SQV after an oral administration of 1200 mg TID, which was simulated using WNL® and used to estimate the time-dependent inhibition factors.

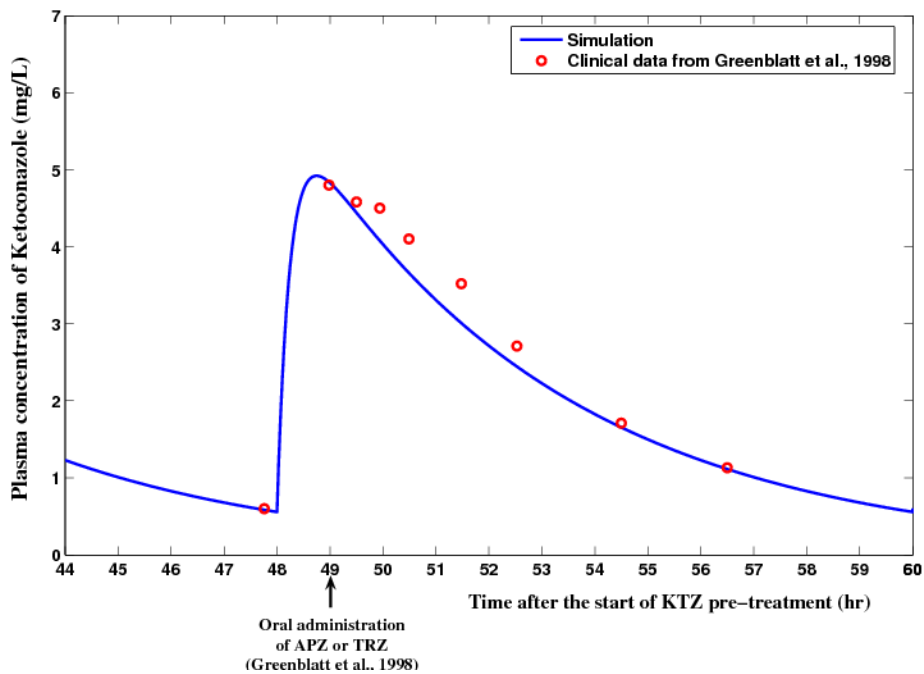


Figure A 2. Plasma concentration-time profile of KTZ after an oral administration 200 mg BID, which was simulated using WNL® and used to estimate the time-dependent inhibition factors.

A.1.3 Diltiazem Plasma Profile

The plasma concentration-time profile of DTZ slow release (SR) after two weeks of pre-treatment of 120 mg BID of DTZ SR was not available in the work of Mousa and coworkers (Mousa, Brater et al. 2000). Consequently, we have used the plasma concentration-time course of DTZ SR after 5 days of a 120 mg BID administration published by Lefebvre and coworkers (Lefebvre, Lacasse et al. 1994). We have assumed that the steady state was already reached after 5 days of pre-treatment (half-life of DTZ SR \approx 8.2hr (Ochs and Knuchel 1984)). While the fit obtained is not perfect, it indicates an order of magnitude of DTZ concentration that has to be included in the PBPK model (Figure A3).

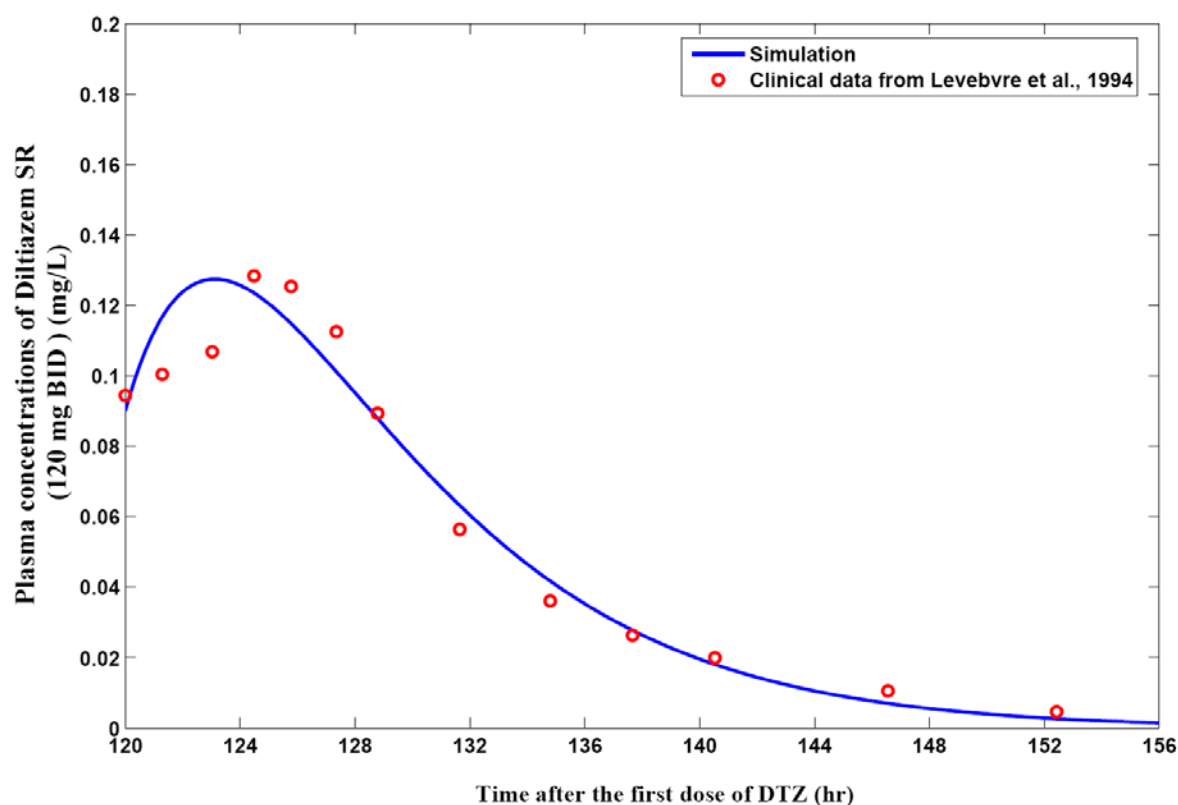


Figure A 3. Plasma concentration-time profile of DTZ after 5 days of an oral administration of 120 mg BID, which was simulated using WNL® and used to estimate the time-dependent inhibition factors.

A.1.4 Itraconazole Plasma Profile

Neuvonen and coworkers did not illustrate the plasma concentration-time profile of ITZ after 4 days of 200 mg QD pretreatment (Neuvonen, Kantola et al. 1998).

Consequently, we have used the plasma concentration-time course of ITZ after 4 days of a 200 mg QD administration published by Kaukonen and coworkers (Kaukonen, Olkkola et al. 1997). The range of concentration ($C_{\min} = 0.156$ and $C_{\max} = 0.42$ mg/L) and AUC (6.3 mg/L.hr) simulated are similar to those obtained by Neuvonen and coworkers ($C_{\min} = 0.13$ mg/L, $C_{\max} = 0.51$ mg/L, AUC = 6.1mg/L.hr). The plasma concentration- time profile is presented in Figure A4.

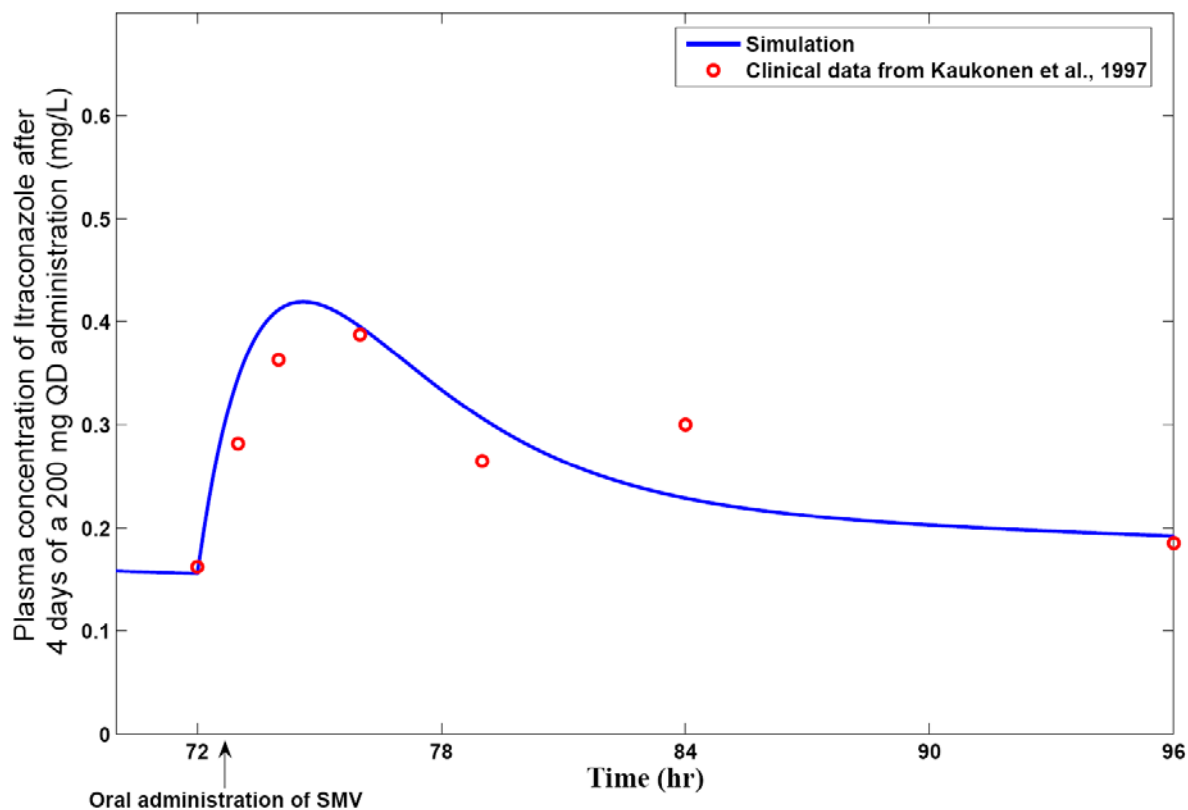


Figure A 4. Plasma-concentration-time profile of ITZ after 4 days of a 200 mg QD oral administration, which was simulated using WNL® and used to estimate the time-dependent inhibition factors.

A.1.5 Grapefruit juice component

A recent study has shown that 6',7'-dihydroxybergamottin (DHB) might be the furanocoumarin that mostly contributes to the GFJ inhibitory effect (Kakar, Paine et al. 2004). The concentration of DHB in GFJ has been reported to be about 43 μ Mol (Kakar, Paine et al. 2004). DHB has a MW of 372.40, and a LogP of 2.6 (Paine, Criss et al. 2004) and is soluble in water (0.5mg/ml). The inhibitory parameters of DHB, ie, K_i and K_{inact} measured in the intestinal human microsomes are 3.5 μ M and 0.31 min⁻¹ respectively (Paine, Criss et al. 2005), with 48% of DHB unbound to the intestinal

microsomal proteins (Paine, Criss et al. 2004). Contrarily to the other inhibitors investigated in the present study, no plasma concentration-time profile of DHB was available (or detectable). In order to estimate the concentration of DHB in the gut membrane, we have simulated the oral absorption of DHB through the GIT using the present PBPK model. We have assumed that the DHB diffusion rate through the apical gut membrane is of the same order of magnitude as the diffusion rate estimated for the other investigated drugs (10^{-4} dm/min). The concentration-time profile of DHB in the whole gut membrane is presented in Figure A5. This profile was used to predict the inhibitory effect of GFJ on MDZ and SMV PK.

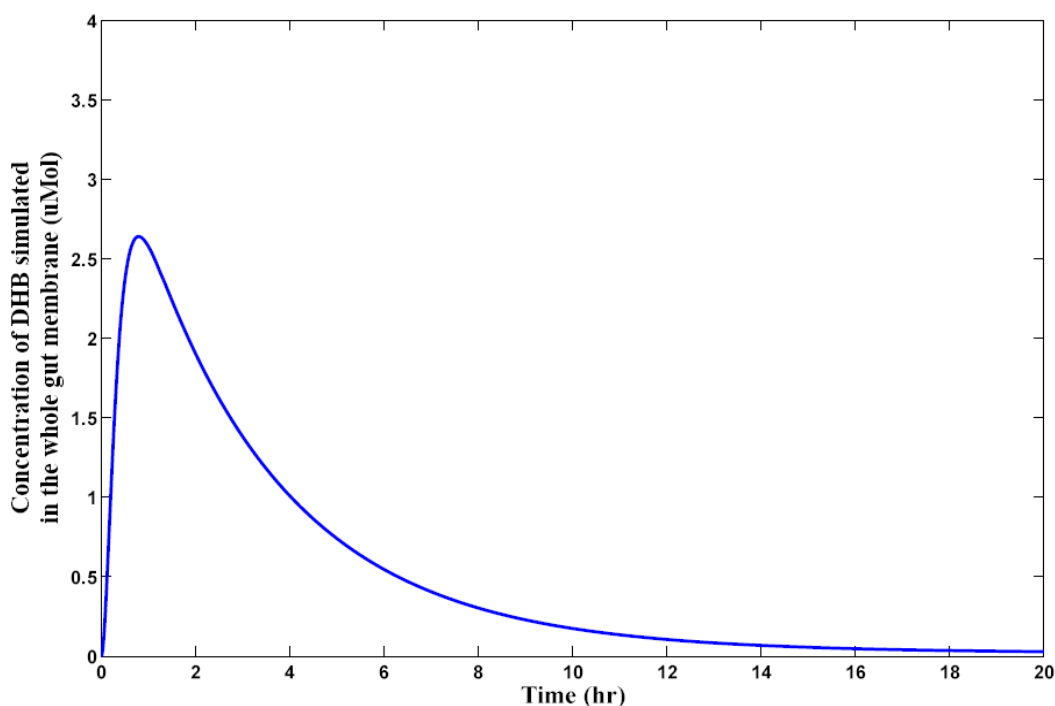


Figure A 5. Concentration-time profile of DHB in the gut membrane after one glass of GFJ, which was simulated with the present PBPK model and used to estimate the time-dependent inhibition factor in the gut.

References

- Agoram, B., W. Woltosz, et al. (2001). "Predicting the impact of physiological and biochemical processes on oral drug bioavailability." *Adv. Drug Deliv. Rev.* 50(S): 41-67.
- Amidon, G. L., P. J. Sinko, et al. (1988). "Estimating human oral fraction dose absorbed: a correlation using rat intestinal membrane permeability for passive and carrier-mediated compounds." *Pharm Res* 5(10): 651-4.

- Artursson, P. and J. Karlsson (1991). "Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells." Biochem Biophys Res Commun 175(3): 880-5.
- Austin, R. P., P. Barton, et al. (2002). "The influence of nonspecific microsomal binding on apparent intrinsic clearance, and its prediction from physicochemical properties." Drug Metab Dispos 30(12): 1497-503.
- Backman, J. T., K. T. Kivisto, et al. (1998). "The area under the plasma concentration-time curve for oral midazolam is 400-fold larger during treatment with itraconazole than with rifampicin." Eur J Clin Pharmacol 54(1): 53-8.
- Badhan, R., J. Penny, et al. (2009). "Methodology for development of a physiological model incorporating CYP3A and P-glycoprotein for the prediction of intestinal drug absorption." J Pharm Sci 98(6): 2180-97.
- Bjorkman, S. (2005). "Prediction of drug disposition in infants and children by means of physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modelling: theophylline and midazolam as model drugs." Br J Clin Pharmacol 59(6): 691-704.
- Bjorkman, S., D. R. Wada, et al. (2001). "Prediction of the disposition of midazolam in surgical patients by a physiologically based pharmacokinetic model." J Pharm Sci 90(9): 1226-41.
- Blanchard, N., N. J. Hewitt, et al. (2006). "Prediction of hepatic clearance using cryopreserved human hepatocytes: a comparison of serum and serum-free incubations." J Pharm Pharmacol 58(5): 633-41.
- Bonate, P. L. (2001). "A brief introduction to Monte Carlo simulation." Clin Pharmacokinet 40(1): 15-22.
- Brown, R. P., M. D. Delp, et al. (1997). "Physiologically parameter values for physiologically based pharmacokinetic models." Toxicol. Ind. Health 13(4): 407-483.
- Cheng, H., M. S. Schwartz, et al. (1994). "Metabolic disposition of simvastatin in patients with T-tube drainage." Drug Metab Dispos 22(1): 139-42.
- Chien, J. Y., A. Lucksiri, et al. (2006). "Stochastic prediction of CYP3A-mediated inhibition of midazolam clearance by ketoconazole." Drug Metab Dispos 34(7): 1208-19.
- Cong, D., M. Doherty, et al. (2000). "A New Physiologically based, segregated-flow Model to explain route dependent intestinal metabolism." Drug. Met. Disp. 28(2): 224-235.
- Cummins, C. L., W. Jacobsen, et al. (2004). "CYP3A4-transfected Caco-2 cells as a tool for understanding biochemical absorption barriers: studies with sirolimus and midazolam." J Pharmacol Exp Ther 308(1): 143-55.
- DeSesso, J. M. and C. F. Jacobson (2001). "Anatomical and physiological parameters affecting gastrointestinal absorption in humans and rats." Food Chem. Toxicol. 39: 209-228.
- Dressman, J. B., G. L. Amidon, et al. (1985). "Absorption potential: estimating the fraction absorbed for orally administered compounds." J Pharm Sci 74(5): 588-9.
- Edgington, A. N., F. P. Theil, et al. (2008). "Whole body physiologically-based pharmacokinetic models: their use in clinical drug development." Expert Opin Drug Metab Toxicol 4(9): 1143-52.
- Edgington, A. N. and S. Willmann (2008). "Physiology-based simulations of a pathological condition: prediction of pharmacokinetics in patients with liver cirrhosis." Clin Pharmacokinet 47(11): 743-52.
- Episuite. (2005). "U.S Environmental Protection Agency: Exposure Assessment Tools and Models." from <http://www.epa.gov/opptintr/exposure/pubs/episuite.htm>
- Fagerholm, U. (2007). "Prediction of human pharmacokinetics--gut-wall metabolism." J Pharm Pharmacol 59(10): 1335-43.

- Fagerholm, U. (2007). "Prediction of human pharmacokinetics--improving microsomal-based predictions of hepatic metabolic clearance." J Pharm Pharmacol 59(10): 1427-31.
- Fahmi, O. A., T. S. Maurer, et al. (2008). "A combined model for predicting CYP3A4 clinical net drug-drug interaction based on CYP3A4 inhibition, inactivation, and induction determined in vitro." Drug Metab Dispos 36(8): 1698-708.
- Fenneteau, F. and F. Nekka "Physiologically Based Predictions of the Impact of Inhibition of Intestinal and Hepatic Metabolism on Human Pharmacokinetics Behaviour of CYP3A Substrates: Identification of Important Model Parameters." In Progress.
- Fenneteau, F., J. Turgeon, et al. (2009). "Assessing drug distribution in tissues expressing P-glycoprotein through physiologically based pharmacokinetic modelling: model structure and parameters determination." Theor Biol Med Model 6: 2:14.
- Galetin, A., L. K. Hinton, et al. (2007). "Maximal inhibition of intestinal first-pass metabolism as a pragmatic indicator of intestinal contribution to the drug-drug interactions for CYP3A4 cleared drugs." Curr Drug Metab 8(7): 685-93.
- Gorski, J. C., D. R. Jones, et al. (1999). "Biotransformation of alprazolam by members of the human cytochrome P4503A subfamily." Xenobiotica 29(9): 931-44.
- Grass, G. M. and P. J. Sinko (2002). "Physiologically-Based pharmacokinetic simulation modelling." Adv. Drug Deliv. Rev. 54: 433-451.
- Grassi, M., G. Grassi, et al. (2007). Understanding Drug Release and Absorption Mechanisms: A physical and Mathematical Approach, Boca Raton : Taylor & Francis.
- Greenblatt, D. J., L. L. von Moltke, et al. (2000). "Alprazolam-ritonavir interaction: implications for product labeling." Clin Pharmacol Ther 67(4): 335-41.
- Greenblatt, D. J. and C. E. Wright (1993). "Clinical pharmacokinetics of alprazolam. Therapeutic implications." Clin Pharmacokinet 24(6): 453-71.
- Greenblatt, D. J., C. E. Wright, et al. (1998). "Ketoconazole inhibition of triazolam and alprazolam clearance: differential kinetic and dynamic consequences." Clin Pharmacol Ther 64(3): 237-47.
- Grub, S., H. Bryson, et al. (2001). "The interaction of saquinavir (soft gelatin capsule) with ketoconazole, erythromycin and rifampicin: comparison of the effect in healthy volunteers and in HIV-infected patients." Eur J Clin Pharmacol 57(2): 115-21.
- Guengerich, F. P. (1999). "Cytochrome P-450 3A4: regulation and role in drug metabolism." Annu Rev Pharmacol Toxicol 39: 1-17.
- Gueorguieva, I., I. A. Nestorov, et al. (2004). "Development of a whole body physiologically based model to characterise the pharmacokinetics of benzodiazepines. 1: Estimation of rat tissue-plasma partition ratios." J Pharmacokinet Pharmacodyn 31(4): 269-98.
- Hardin, T. C., J. R. Graybill, et al. (1988). "Pharmacokinetics of itraconazole following oral administration to normal volunteers." Antimicrob Agents Chemother 32(9): 1310-3.
- Howgate, E. M., K. Rowland Yeo, et al. (2006). "Prediction of in vivo drug clearance from in vitro data. I: impact of inter-individual variability." Xenobiotica 36(6): 473-97.
<http://www.caymanchem.com/msdss/10009598m.pdf>.
- Huang, S. M. and L. J. Lesko (2004). "Drug-drug, drug-dietary supplement, and drug-citrus fruit and other food interactions: what have we learned?" J Clin Pharmacol 44(6): 559-69.
- Huang, S. M., L. J. Lesko, et al. (1999). "Assessment of the quality and quantity of drug-drug interaction studies in recent NDA submissions: study design and data analysis issues." J Clin Pharmacol 39(10): 1006-14.
- Ishigam, M., M. Uchiyama, et al. (2001). "Inhibition of in vitro metabolism of simvastatin by itraconazole in humans and prediction of in vivo drug-drug interactions." Pharm Res 18(5): 622-31.

- Isoherranen, N., K. L. Kunze, et al. (2004). "Role of itraconazole metabolites in CYP3A4 inhibition." Drug Metab Dispos 32(10): 1121-31.
- Ito, K. and J. B. Houston (2005). "Prediction of human drug clearance from in vitro and preclinical data using physiologically based and empirical approaches." Pharm Res 22(1): 103-12.
- Iwatsubo, T., N. Hirota, et al. (1997). "Prediction of in vivo drug metabolism in the human liver from in vitro metabolism data." Pharmacol. Ther. 73(2): 147-171.
- Jacobson, T. A. (2004). "Comparative pharmacokinetic interaction profiles of pravastatin, simvastatin, and atorvastatin when coadministered with cytochrome P450 inhibitors." Am J Cardiol 94(9): 1140-6.
- Jones, H. M., N. Parrott, et al. (2006). "A novel strategy for physiologically based predictions of human pharmacokinetics." Clin Pharmacokinet 45(5): 511-42.
- Jones, H. M., N. Parrott, et al. (2006). "Predicting pharmacokinetic food effects using biorelevant solubility media and physiologically based modelling." Clin Pharmacokinet 45(12): 1213-26.
- Kakar, S. M., M. F. Paine, et al. (2004). "6'7'-Dihydroxybergamottin contributes to the grapefruit juice effect." Clin Pharmacol Ther 75(6): 569-79.
- Kalvass, J. C. and T. S. Maurer (2002). "Influence of nonspecific brain and plasma binding on CNS exposure: implications for rational drug discovery." Biopharm Drug Dispos 23(8): 327-38.
- Kanamitsu, S., K. Ito, et al. (2000). "Prediction of in vivo interaction between triazolam and erythromycin based on in vitro studies using human liver microsomes and recombinant human CYP3A4." Pharm Res 17(4): 419-26.
- Kaukonen, K. M., K. T. Olkkola, et al. (1997). "Itraconazole increases plasma concentrations of quinidine." Clin Pharmacol Ther 62(5): 510-7.
- Kivisto, K. T., J. Zunft, et al. (2004). "Characterisation of cerivastatin as a P-glycoprotein substrate: studies in P-glycoprotein-expressing cell monolayers and *mdr1a/b* knock-out mice." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 370(2): 124-30.
- Kroboth, P. D., J. W. McAuley, et al. (1995). "Triazolam pharmacokinetics after intravenous, oral, and sublingual administration." J Clin Psychopharmacol 15(4): 259-62.
- Kronbach, T., D. Mathys, et al. (1989). "Oxidation of midazolam and triazolam by human liver cytochrome P450III A4." Mol Pharmacol 36(1): 89-96.
- Kupferschmidt, H. H., H. R. Ha, et al. (1995). "Interaction between grapefruit juice and midazolam in humans." Clin Pharmacol Ther 58(1): 20-8.
- Lave, T., S. Dupin, et al. (1997). "The Use of Human Hepatocytes to Select Compounds Based on their Expected Hepatic Extraction Ratios in Humans." Pharm. Res. 14(2): 152-155.
- Lefebvre, M., Y. Lacasse, et al. (1994). "Pharmacokinetics and pharmacodynamics of a slow-release formulation of diltiazem after the administration of a single and repeated doses to healthy volunteers." Biopharm Drug Dispos 15(3): 227-42.
- Lennernas, H. (1998). "Human intestinal permeability." J Pharm Sci 87(4): 403-10.
- Lilja, J. J., M. Neuvonen, et al. (2004). "Effects of regular consumption of grapefruit juice on the pharmacokinetics of simvastatin." Br J Clin Pharmacol 58(1): 56-60.
- Lin, J. H. (1998). "Applications and limitations of interspecies scaling and in vitro extrapolation in pharmacokinetics." Drug Met. Disp. 26(12): 1202-1212.
- Malingre, M. M., D. J. Richel, et al. (2001). "Coadministration of cyclosporine strongly enhances the oral bioavailability of docetaxel." J Clin Oncol 19(4): 1160-6.
- McKenney, J. M., D. Swearingen, et al. (2006). "Study of the pharmacokinetic interaction between simvastatin and prescription omega-3-acid ethyl esters." J Clin Pharmacol 46(7): 785-91.

- Meno-Tetang, G. M., H. Li, et al. (2006). "Physiologically based pharmacokinetic modeling of FTY720 (2-amino-2[2-(4-octylphenyl)ethyl]propane-1,3-diol hydrochloride) in rats after oral and intravenous doses." Drug Metab Dispos 34(9): 1480-7.
- Michalets, E. L. (1998). "Update: clinically significant cytochrome P-450 drug interactions." Pharmacotherapy 18(1): 84-112.
- Mithani, S. D., V. Bakatselou, et al. (1996). "Estimation of the increase in solubility of drugs as a function of bile salt concentration." Pharm Res 13(1): 163-7.
- Mousa, O., D. C. Brater, et al. (2000). "The interaction of diltiazem with simvastatin." Clin Pharmacol Ther 67(3): 267-74.
- Naritomi, Y., S. Terashita, et al. (2001). "Prediction of Human Hepatic Clearance from in vivo animal experiments and in vitro metabolic studies with liver microsomes from animals and humans." Drug Met. Disp. 29(10): 1316-1324.
- Neuvonen, P. J., T. Kantola, et al. (1998). "Simvastatin but not pravastatin is very susceptible to interaction with the CYP3A4 inhibitor itraconazole." Clin Pharmacol Ther 63(3): 332-41.
- Obach, R. S. (1999). "Prediction of human clearance of twenty-nine drugs from hepatic microsomal intrinsic clearance data: an examination of in vitro half-life approach and non specific binding to microsomes." Drug. Met. Disp. 27(11): 1350-1359.
- Obach, R. S., R. L. Walsky, et al. (2007). "Mechanism-based inactivation of human cytochrome p450 enzymes and the prediction of drug-drug interactions." Drug Metab Dispos 35(2): 246-55.
- Obach, R. S., R. L. Walsky, et al. (2005). "In vitro cytochrome P450 inhibition data and the prediction of drug-drug interactions: qualitative relationships, quantitative predictions, and the rank-order approach." Clin Pharmacol Ther 78(6): 582-92.
- Ochs, H. R. and M. Knuchel (1984). "Pharmacokinetics and absolute bioavailability of diltiazem in humans." Klin Wochenschr 62(7): 303-6.
- Paine, M. F., A. B. Criss, et al. (2004). "Two major grapefruit juice components differ in intestinal CYP3A4 inhibition kinetic and binding properties." Drug Metab Dispos 32(10): 1146-53.
- Paine, M. F., A. B. Criss, et al. (2005). "Two major grapefruit juice components differ in time to onset of intestinal CYP3A4 inhibition." J Pharmacol Exp Ther 312(3): 1151-60.
- Paine, M. F., H. L. Hart, et al. (2006). "The human intestinal cytochrome P450 "pie"." Drug Metab Dispos 34(5): 880-6.
- Paine, M. F., M. Khalighi, et al. (1997). "Characterization of Interintestinal and Intraintestinal variations in Human CYP3A4-dependent Metabolism." J. Pharmacol. Exp. Ther. 283(3): 1552-1562.
- Paine, M. F., D. D. Shen, et al. (1996). "First-pass metabolism of midazolam by the human intestine." Clin Pharmacol Ther 60(1): 14-24.
- Palkama, V. J., J. Ahonen, et al. (1999). "Effect of saquinavir on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of oral and intravenous midazolam." Clin Pharmacol Ther 66(1): 33-9.
- Peters, S. A. (2008). "Evaluation of a generic physiologically based pharmacokinetic model for lineshape analysis." Clin Pharmacokinet 47(4): 261-75.
- Peters, S. A. (2008). "Identification of Intestinal Loss of a Drug through Physiologically Based Pharmacokinetic Simulation of Plasma Concentration-Time Profiles." Clin Pharmacokinet 47(4): 245-59.
- Ploeger, B., T. Mensinga, et al. (2000). "A human physiologically-based model for glycyrrhizic acid, a compound subject to presystemic metabolism and enterohepatic cycling." Pharm Res 17(12): 1516-25.
- Poulin, P., K. Schoenlein, et al. (2001). "Prediction of Adipose Tissue:Plasma Partition Coefficients for Structurally Unrelated Drugs." J. Pharm. Sci. 90(4): 436-447.

- Poulin, P. and F. Theil (2000). "A priori Prediction of Tissue:Plasma Partition Coefficients of Drugs to Facilitate the Use of Physiologically-Based Pharmacokinetic Models in Drug Discovery." J. Pharm. Sci. 89(1): 16-35.
- Poulin, P. and F. Theil (2002). "Prediction of Pharmacokinetics Prior to In vivo Studies. I. Mechanism-Based Prediction of Volume of Distribution." J. Pharm. Sci. 91(1): 129-155.
- Poulin, P. and F. Theil (2002). "Prediction of Pharmacokinetics prior to in Vivo Studies. II. Generic Physiologically Based Pharmacokinetic Models of Drug Disposition." J. Pharm. Sci. 91(5): 1358-1370.
- Price, K., S. Haddad, et al. (2003). "Physiological modeling of age-specific changes in the pharmacokinetics of organic chemicals in children." J Toxicol Environ Health A 66(5): 417-33.
- Prueksaritanont, T., L. M. Gorham, et al. (1997). "In vitro metabolism of simvastatin in humans [SBT]identification of metabolizing enzymes and effect of the drug on hepatic P450s." Drug Metab Dispos 25(10): 1191-9.
- Rawden, H. C., D. J. Carlile, et al. (2005). "Microsomal prediction of in vivo clearance and associated interindividual variability of six benzodiazepines in humans." Xenobiotica 35(6): 603-25.
- Rodgers, T., D. Leahy, et al. (2005). "Physiologically based pharmacokinetic modeling 1: predicting the tissue distribution of moderate-to-strong bases." J Pharm Sci 94(6): 1259-76.
- Rodgers, T. and M. Rowland (2006). "Physiologically based pharmacokinetic modelling 2: predicting the tissue distribution of acids, very weak bases, neutrals and zwitterions." J Pharm Sci 95(6): 1238-57.
- Rodgers, T. and M. Rowland (2007). "Mechanistic approaches to volume of distribution predictions: understanding the processes." Pharm Res 24(5): 918-33.
- Rowland, M., L. Balant, et al. (2004). "Physiologically based pharmacokinetics in drug development and regulatory science: a workshop report (Georgetown University, Washington, DC, May 29-30, 2002)." AAPS PharmSci. 6(1): E6.
- Saari, T. I., K. Laine, et al. (2006). "Effect of voriconazole on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of intravenous and oral midazolam." Clin Pharmacol Ther 79(4): 362-70.
- Sawada, Y., M. Hanano, et al. (1984). "Prediction of the volumes of distribution of basic drugs in humans based on data from animals." J Pharmacokinet Biopharm 12(6): 587-96.
- Schneider, G., P. Coassolo, et al. (1999). "Combining in Vitro and in Vivo Pharmacokinetic Data for Prediction of Hepatic Drug Clearance in Humans by Artificial Neural Networks and Multivariate Statistical Techniques." J. Med. Chem. 42: 5072-5076.
- Schuetz, E. G. (2004). "Lessons from the CYP3A4 promoter." Mol Pharmacol 65(2): 279-81.
- Serajuddin, A. T., S. A. Ranadive, et al. (1991). "Relative lipophilicities, solubilities, and structure-pharmacological considerations of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors pravastatin, lovastatin, mevastatin, and simvastatin." J Pharm Sci 80(9): 830-4.
- Shitara, Y. and Y. Sugiyama (2006). "Pharmacokinetic and pharmacodynamic alterations of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors: drug-drug interactions and interindividual differences in transporter and metabolic enzyme functions." Pharmacol Ther 112(1): 71-105.
- Silverman, R. B. (1995). "Mechanism-based enzyme inactivators." Methods Enzymol 249: 240-83.
- Simard, C., V. Michaud, et al. (2004). "Identification of the cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of domperidone." Xenobiotica 34(11/12): 1013-1023.

- Smith, R. B., P. D. Kroboth, et al. (1984). "Pharmacokinetics and pharmacodynamics of alprazolam after oral and IV administration." Psychopharmacology (Berl) 84(4): 452-6.
- Sparreboom, A., J. van Asperen, et al. (1997). "Limited oral bioavailability and active epithelial excretion of paclitaxel (Taxol) caused by P-glycoprotein in the intestine." Proc. Natl. Acad. Sci. 94: 2031-2035.
- Sugano, K., A. Okazaki, et al. (2007). "Solubility and dissolution profile assessment in drug discovery." Drug Metab Pharmacokinet 22(4): 225-54.
- Sunkara, G., C. V. Reynolds, et al. (2007). "Evaluation of a pharmacokinetic interaction between valsartan and simvastatin in healthy subjects." Curr Med Res Opin 23(3): 631-40.
- Templeton, I. E., K. E. Thummel, et al. (2008). "Contribution of itraconazole metabolites to inhibition of CYP3A4 in vivo." Clin Pharmacol Ther 83(1): 77-85.
- Theil, F., T. Guentert, et al. (2003). "Utility of physiologically based pharmacokinetic models to drug development and rational drug discovery candidate selection." Toxicol. Lett. 138: 29-49.
- Thomas, S., F. Brightman, et al. (2008). "Simulation modelling of human intestinal absorption using Caco-2 permeability and kinetic solubility data for early drug discovery." J Pharm Sci 97(10): 4557-74.
- Thummel, K. E., D. O'Shea, et al. (1996). "Oral first-pass elimination of midazolam involves both gastrointestinal and hepatic CYP3A-mediated metabolism." Clin Pharmacol Ther 59(5): 491-502.
- Venkatakrishnan, K., R. S. Obach, et al. (2007). "Mechanism-based inactivation of human cytochrome P450 enzymes: strategies for diagnosis and drug-drug interaction risk assessment." Xenobiotica 37(10-11): 1225-56.
- von Moltke, L. L., B. W. Granda, et al. (2004). "Interaction of triazolam and ketoconazole in P-glycoprotein-deficient mice." Drug Metab Dispos 32(8): 800-4.
- von Moltke, L. L., D. J. Greenblatt, et al. (1994). "Inhibitors of alprazolam metabolism in vitro: effect of serotonin-reuptake-inhibitor antidepressants, ketoconazole and quinidine." Br J Clin Pharmacol 38(1): 23-31.
- von Moltke, L. L., D. J. Greenblatt, et al. (1996). "Triazolam biotransformation by human liver microsomes in vitro: effects of metabolic inhibitors and clinical confirmation of a predicted interaction with ketoconazole." J Pharmacol Exp Ther 276(2): 370-9.
- Vossen, M., M. Sevestre, et al. (2007). "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 4: 13.
- Williams, R. O., 3rd, M. A. Sykora, et al. (2001). "Method to recover a lipophilic drug from hydroxypropyl methylcellulose matrix tablets." AAPS PharmSciTech 2(2): E8.
- Willmann, S., K. Hohn, et al. (2007). "Development of a physiology-based whole-body population model for assessing the influence of individual variability on the pharmacokinetics of drugs." J Pharmacokinet Pharmacodyn 34(3): 401-31.
- Willmann, S., W. Schmitt, et al. (2004). "A physiological Model for the Estimation of the Fraction Dose Absorbed in Humans." J. Med. Chem. 47: 4022-4031.
- Wishart, D., C. Knox, et al. (2006). "DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration." Nucleic Acids Res 34(1): D668-72.
- www.druginteraction.org.
- Yalkowsky, S. H. and S. C. Valvani (1980). "Solubility and partitioning I: Solubility of nonelectrolytes in water." J Pharm Sci 69(8): 912-22.
- Yang, J., G. T. Tucker, et al. (2004). "Cytochrome P450 3A expression and activity in the human small intestine." Clin Pharmacol Ther 76(4): 391.

- Yu, L. X. and G. L. Amidon (1999). "A compartmental absorption and transit model for estimating oral drug absorption." Int. J. Pharm. 186: 119-125.
- Zhou, S., S. Yung Chan, et al. (2005). "Mechanism-based inhibition of cytochrome P450 3A4 by therapeutic drugs." Clin Pharmacokinet 44(3): 279-304.

CHAPITRE V

DISCUSSION GÉNÉRALE

Les travaux effectués dans le cadre de ce projet doctoral avaient pour objectif général le développement de modèles pharmacocinétiques aptes à prédire le devenir du médicament dans l'organisme en présence et en absence de modulation d'activité métabolique et de transport. La philosophie adoptée reposait sur l'utilisation d'approches mécanistiques où l'établissement des modèles intègre les mécanismes de base et les informations connues (mechanism-based model) plutôt que sur l'ajustement des données précliniques ou cliniques par un modèle empirique (data-based model).

Le premier volet de recherche consistait à incorporer dans un modèle PBPK, le transport d'efflux membranaire gouverné par les P-gp dans les tissus non excréteurs, tels que le cœur et le cerveau, afin de prédire l'impact d'une modulation d'activité de ce transporteur sur la distribution tissulaire d'un substrat de P-gp. Le deuxième volet de cette recherche consistait à procéder à l'analyse de sensibilité globale (ASG) du modèle PBPK précédemment développé, afin d'identifier les paramètres importants du modèle et d'en évaluer le rôle dans la qualité de prédiction, tout en tenant compte de leur corrélation. Enfin, le dernier volet du projet doctoral consistait à développer un modèle PBPK apte à prédire les profils plasmatiques et les paramètres pharmacocinétiques de substrats de CYP3A administrés par voie orale à des volontaires sains, en absence et en présence d'interactions médicamenteuses métaboliques (IMM).

1. Prédiction de la distribution tissulaire d'un substrat de P-gp au moyen d'un modèle PBPK

Avec les percées récentes dans l'identification et le rôle des transporteurs membranaires, il devient évident que les composés se distribuent non seulement par diffusion passive, mais aussi par transport actif via des transporteurs d'influx ou d'efflux, tels que les transporteurs ABC et les SLC. Parmi les transporteurs ABC, les P-gp sont les transporteurs d'efflux transmembranaires les plus étudiés à ce jour, notamment à cause

de leur rôle important dans l'ADME de certains principes actifs (par ex : vinblastine, paclitaxel, digoxine), en diminuant leur absorption intestinale et en favorisant leur métabolisme, leur excrétion biliaire et rénale. De plus, ces transporteurs contribuent à la détoxification tissulaire, en favorisant l'excrétion des xénobiotiques depuis le tissu vers la circulation systémique. Comme l'efficacité et la toxicité des médicaments sont en partie reliées à leur concentration tissulaire, une modulation de l'activité des P-gp peut se traduire par une baisse de l'efficacité ou une augmentation de la toxicité tissulaire des médicaments (Harris, Jang et al. 2003; McCabe 2004; Greenblatt and von Moltke 2005). Par conséquent, la caractérisation de la distribution tissulaire des substrats de P-gp en fonction de l'activité de ces transporteurs est requise pour une meilleure compréhension et prédiction de leur PK/PD. L'objectif de ce premier volet de recherche fut de développer un modèle PBPK apte à prédire l'impact de la présence et l'absence de P-gp sur la distribution cardiaque et cérébrale de substrats de ces transporteurs.

En modélisation PBPK, la distribution tissulaire est généralement représentée par un modèle à perfusion limitante ou à perméabilité limitante à deux voire trois sous-compartiments. Dans le premier cas, la distribution tissulaire est supposée instantanée et homogène. Dans le deuxième cas, la distribution est limitée par la perméabilité de la membrane vasculaire ou cellulaire. Comme un des buts de notre démarche était de minimiser le recours à l'ajustement de données et d'utiliser les connaissances actualisées pour prédire le devenir tissulaire du principe actif, nous avons proposé un modèle de distribution tissulaire à perméabilité limitante à deux compartiments (Mechanism Transport Based model). Ainsi, considérer deux sous-compartiments au lieu des trois généralement utilisés pour modéliser la distribution au niveau intracellulaire permettait de réduire la quantité de paramètres à déterminer *a priori*. Cette simplification structurale implique que la modélisation mécanistique de la distribution cardiaque et cérébrale de substrat de P-gp soit caractérisée par des phénomènes dits 'apparents'. La détermination des paramètres fut effectuée à partir d'une méthode d'extrapolation IVIVC qui intègre les données issues d'expériences *in vitro* en rapport à la distribution tissulaire du médicament selon le type de tissus, et selon l'expression et l'activité des transporteurs membranaires. Ces paramètres correspondent à la vitesse de diffusion apparente à travers l'épithélium tissulaire (D_t) et la clairance d'efflux apparente due à

l'activité des P-gp (Cl_{P-gp}). À partir de ces valeurs de paramètres relatifs au transport tissulaire, nous avons montré qu'il était possible de prédire le devenir d'un substrat de P-gp dans le cœur et le cerveau de souris normales et de souris déficientes en gènes *mdr1a* et *mdr1b* responsables de l'expression des P-gp.

Ce modèle PBPK fut appliqué au cas d'une administration d'un bolus intraveineux de dompéridone (5mg/kg) à des souris normales et à des souris mutées. Le modèle à perfusion limitante n'était pas approprié pour caractériser la distribution cérébrale de la dompéridone, puisque les concentrations prédites furent largement supérieures (x40) à celles mesurées *in vivo* chez les deux lignées de souris. Comme la BHE exprime les P-gp, mais présente aussi la particularité d'être formée de jonctions serrées qui limitent la perméabilité du principe actif à travers la BHE, l'application d'un modèle basé sur les mécanismes de transport s'avère plus adéquate que celle d'un modèle à perfusion limitante. En tenant compte de la faible perméabilité de la dompéridone à travers la BHE et de la clairance d'efflux des P-gp, les concentrations prédites en présence et en absence de P-gp étaient en accord avec celles mesurées dans le cerveau des souris normales et des souris mutées. Cependant, les concentrations cérébrales prédites en absence de P-gp tendaient à surestimer la concentration mesurée à 120 min post-dose, suggérant l'implication d'un transporteur d'efflux additionnel au niveau de la BHE. De nombreux transporteurs membranaires sont exprimés au niveau de la BHE, dont les BCRP, MRP, OATP et OCT (Golden and Pollack 2003). Bien qu'il soit reconnu que les P-gp jouent un plus grand rôle protecteur que les autres transporteurs au niveau de la BHE (Breedveld, Pluim et al. 2005), il n'en demeure pas moins que les BCRP aient un rôle non négligeable dans cette fonction (Cisternino, Mercier et al. 2004; Breedveld, Pluim et al. 2005). Les similarités structurales et de substrats observées entre les P-gp et les BCRP suggèrent que ces deux transporteurs confèrent une protection semblable et complémentaire au niveau de la BHE (Litman, Druley et al. 2001; Schinkel and Jonker 2003; Cisternino, Mercier et al. 2004; Breedveld, Pluim et al. 2005; Breedveld, Beijnen et al. 2006). Des investigations doivent cependant être effectuées pour valider l'hypothèse d'affinité de la dompéridone pour les BCRP.

Dans notre étude, le modèle basé sur les mécanismes de transport (MTB) a permis de prédire un faible effet protecteur des P-gp contre l'accumulation de dompéridone dans le tissu cardiaque. Ceci fut aussi observé autant chez les souris normales que les souris mutées. Ce résultat s'explique en partie par le fait que, pour le composé étudié, notre approche IVIVC estime que la vitesse de diffusion apparente à travers la membrane vasculaire est supérieure (d'un facteur 10) à la vitesse d'efflux apparente gouvernée par les P-gp. Ainsi, même en absence de P-gp, la différence de principe actif accumulé dans le tissu reste mineure.

La différence de concentration tissulaire, observée ou simulée, en présence ou en absence de P-gp fut relativement faible pour un médicament qui semblait, *a priori*, être un très bon modèle de substrat de P-gp *in vitro*, avec des ratios de perméabilité apparente AB-BA allant de 3 à 33 (Schinkel, Wagenaar et al. 1996; Faassen, Vogel et al. 2003). En fait, l'impact de l'absence des P-gp a surtout été mis en évidence lors de l'absorption orale de dompéridone chez des souris normales et des souris mutées (Schinkel, Wagenaar et al. 1996). A des doses orales de dompéridone variant de 20-80 mg/kg, les souris mutées présentaient des symptômes d'extrême passivité et un manque de mouvements spontanés, alors que les souris normales ne présentaient pas ces symptômes. Aucune différence de symptômes n'a été relevée entre les deux lignées de souris à des doses de 5 à 10 mg/kg. Ceci suggère une augmentation des concentrations cérébrales de dompéridone chez les souris mutées due non seulement à l'absence de P-gp au niveau de la BHE mais surtout à l'élévation des concentrations systémiques attribuée à l'absence de P-gp intestinales. Par conséquent, les perturbations des phénomènes en aval de la distribution joueraient aussi un rôle prédominant dans la distribution tissulaire de dompéridone. Dans notre étude, aucune différence notable de concentrations plasmatiques entre les deux lignées de souris ne fut observée puisque la dompéridone était administrée par voie IV à une faible dose (5 mg/kg) et que ce principe actif est principalement éliminé par métabolisme hépatique (Heykants, Knaeps et al. 1981; Meuldermans, Hurkmans et al. 1981). Ces observations pourraient donc expliquer en partie la faible augmentation de la concentration de dompéridone au niveau des tissus cérébraux et cardiaques des souris mutées, et ce malgré le fait que la dompéridone soit un bon substrat des P-gp *in vitro*.

L'approche proposée pour déterminer les paramètres de diffusion et d'efflux doit être utilisée et interprétée avec précaution compte tenu des hypothèses et des extrapolations effectuées. L'extraction des données *in vitro* a été réalisée à partir de données mesurées sur des monocouches cellulaires de Caco-2. Bien que ces monocouches cellulaires expriment majoritairement des P-gp, elles peuvent aussi exprimer d'autres types de transporteurs d'efflux tels que les MRP et OATP (Seithel, Karlsson et al. 2006; Hayeshi, Hilgendorf et al. 2008). Alors, une attention particulière doit être portée lors de l'application de notre approche à des substrats de ces transporteurs. Pour une conclusion plus probante, il faudra isoler la fraction de la perméabilité apparente gouvernée par les P-gp de la fraction expliquée par l'activité des autres transporteurs. D'autre part, la qualité éparse des données *in vivo* nous limite en termes de validation quantitative du modèle tissulaire proposé. Cependant, ces données démontrent que des valeurs réalistes des points stratégiques tels que C_{\max} et C_{last} ont été bien captés par le modèle, reflétant ainsi une bonne caractérisation mécanistique de la distribution tissulaire.

En conclusion, ce premier volet de recherche a démontré qu'il était possible d'intégrer, dans un modèle PBPK, les dernières connaissances concernant les P-gp afin de prédire les mécanismes qui régissent la distribution tissulaire des médicaments. Ce modèle a été développé pour une souris avec des paramètres physiologiques moyens, et a nécessité le recours à des extrapolations IVIVC pour la détermination des paramètres de transport, ce qui résulte en un certain degré d'incertitude. De plus, une étude exploratoire a semblé indiquer l'implication d'un autre transporteur d'efflux au niveau de la BHE dans la distribution cérébrale de la dompéridone. Par conséquent, le deuxième volet de la présente thèse fut de procéder à l'analyse de sensibilité du modèle afin d'étudier les répercussions des incertitudes et variabilités des paramètres du modèle sur la précision des prédictions, et de tester la validité des hypothèses émises.

2. Identification des paramètres importants du modèle : Analyse globale de sensibilité

Dans le domaine PBPK, il est d'usage d'effectuer essentiellement des analyses de sensibilité locales (LSA), où la valeur d'un seul paramètre du modèle est variée dans un

certain intervalle tout en fixant les autres paramètres à leurs valeurs typiques. L'effet indépendant de chaque paramètre sur les prédictions du modèle est ensuite quantifié par un index de sensibilité. Ainsi, le paramètre possédant le plus grand index est identifié comme le paramètre le plus influant sur la variabilité des prédictions. Bien que cette approche soit simple d'usage, elle ne procure qu'une évaluation locale de l'impact des variations. De plus, il arrive souvent que les paramètres physiologiques et biologiques soient fortement corrélés, comme le sont par exemple le poids corporel et le débit cardiaque (Brown, Delp et al. 1997). Cependant, aucune étude d'analyse de sensibilité n'a jusque-là considéré l'effet de ces corrélations sur la qualité des prédictions dans le contexte de la modélisation pharmacocinétique à base physiologique. Il est de plus en plus reconnu que négliger ces corrélations peut mener à des interprétations erronées sur la base de l'analyse de sensibilité (Bernillon and Bois 2000).

Afin de procéder à une analyse globale de sensibilité (ASG) du modèle PBPK précédemment développé et considérer les corrélations entre les paramètres impliqués, nous avons introduit dans le domaine de la modélisation physiologique, une stratégie ASG basée sur la méthode de Monte-Carlo et sur l'estimation, à travers le calcul des PRCC, de la force de la relation monotone entre les paramètres d'entrée et de sortie du modèle. Cette méthodologie a permis de caractériser et d'analyser les propriétés statistiques des paramètres prédits, d'identifier les paramètres importants, et de juger de la robustesse du modèle.

Les paramètres d'entrée sélectionnés pour cette ASG sont ceux impliqués dans les phénomènes métaboliques et dans la distribution tissulaire. Nous avons aussi considéré les paramètres pour lesquels nous disposons d'une information limitée ainsi que ceux ayant servi pour l'estimation de paramètres primaires, i.e les paramètres secondaires. Parmi l'ensemble des paramètres d'entrée inclus (18), huit d'entre eux présentaient des corrélations moyennes à fortes avec des facteurs de corrélation allant de 0.34 à 0.99. Les paramètres prédits considérés dans l'ASG sont les concentrations maximales (C_{\max}) et les concentrations prédites à 120 min post-dose (C_{last}) dans le cœur, le foie, le cerveau, et le plasma. Cette analyse de sensibilité, réalisée sur les prédictions des concentrations cérébrales de dompéridone, a renforcé l'hypothèse de l'implication potentielle de

transporteurs d'efflux additionnels au niveau de la BHE dans l'excrétion du principe actif vers la circulation systémique.

L'analyse d'incertitude du modèle, basée sur les simulations de Monte-Carlo, a mis en évidence une variabilité faible à modérée des prédictions du modèle (de 15.2 à 29% pour les C_{\max} , et de 19.3 à 38.3% pour les C_{last}). Les calculs de PRCC ont permis d'identifier les paramètres importants impliqués dans la précision des prédictions de C_{\max} et C_{last} dans les différents tissus qui se résument comme suit:

- dans le foie, les paramètres importants sont ceux reliés au métabolisme hépatique, tels que la fraction liée aux microsomes, le nombre de CYP450, et la clairance intrinsèque *in vitro*
- dans le cœur, les paramètres reliés aux mécanismes apparents de transport de la fraction libre de principe actif à travers la membrane vasculaire se sont révélés les plus importants, tels que la surface d'échange, la fraction libre tissulaire et le débit cardiaque. La fraction libre microsomale a aussi été identifiée comme faisant partie de ces paramètres pour son rôle dans la précision de C_{last}
- dans le cerveau, se sont ceux qui sont reliés aux mécanismes apparents de transport de la fraction libre de principe actif à travers la BHE, tels que la perméabilité *in vitro*, la surface d'échange de la BHE, l'expression des P-gp, la fraction libre tissulaire, et la présence du transporteur additionnel

A la lumière de ces résultats, les éléments limitants des mécanismes gouvernant la distribution tissulaire du médicament ou ceux gouvernant son élimination se sont révélés jouer un rôle important dans la qualité des prédictions du modèle développé. Un autre résultat qui mérite d'être mentionné est que le poids corporel (BW) n'a pas été identifié par cette GSA comme étant un paramètre important du modèle, et ce, même si la variabilité de ce paramètre se propage dans l'estimation des volumes tissulaires. Cette observation est d'autant plus intéressante que nous avons aussi procédé à une LSA sur le modèle PBPK, afin d'en comparer les résultats à ceux de la GSA. Contrairement à cette dernière, la LSA a clairement fait ressortir le BW parmi les paramètres importants impliqués dans l'estimation de C_{last} suggérant ainsi qu'il est plus important comme paramètre que les mécanismes gouvernant la distribution tissulaire. Cependant, il est peu probable qu'un paramètre global tel que le BW soit plus influent que les facteurs

intrinsèques limitants de la distribution tissulaire. En considérant les corrélations existantes entre le BW et d'autres paramètres du modèle, l'ASG réalisée dans le cadre de cette thèse a permis d'estimer la vraie contribution du BW sur la variabilité des prédictions. Ces résultats illustrent donc le biais possible d'interprétation d'une AS lorsqu'elle est effectuée sans tenir compte des corrélations entre les paramètres d'entrée du modèle. Les résultats de cette analyse globale peuvent aussi guider les études futures dans le but de cibler les efforts pour améliorer la valeur prédictive du modèle. En effet, lorsque des paramètres sont identifiés parmi les plus importants du modèle, il est alors nécessaire de caractériser leur valeur typique et leurs propriétés statistiques afin de réduire l'imprécision des prédictions.

Il est important de préciser que les conclusions d'une analyse de sensibilité ne sont valides que pour le même modèle structural appliqué à un xénobiotique ayant le même ordre de grandeur de paramètres de transport, et d'incertitude que celui étudié (Nestorov, Aarons et al. 1997). Il est donc risqué de vouloir généraliser les conclusions d'une AS d'un modèle à un autre, sans égard à la structure du modèle et de son contexte d'application. Ceci est d'autant plus difficile que les résultats de l'AS dépendent aussi des paramètres inclus dans l'analyse et que, selon le contexte, on peut être intéressé par un ensemble de paramètres plutôt qu'un autre. Ceci dit et à la lumière des résultats de cette étude et de celles précédemment publiées, on peut dresser un portrait global (et par conséquent intuitif) des tendances qui ressortent le plus souvent lors de l'application d'une analyse de sensibilité aux modèles PBPK. De façon générale, les paramètres importants s'avèrent être reliés au métabolisme (quantité de cytochromes, K_m , V_{max}), à la distribution tissulaire (coefficients de partage, surface d'échanges, perméabilité membranaire, activité des transporteurs), au débit cardiaque et au volume tissulaire (Nestorov, Aarons et al. 1997; Evans and Andersen 2000; Tardif, Droz et al. 2002; Hamelin, Charest-Tardif et al. 2005; Brochot, Smith et al. 2007). Comme l'identification des paramètres importants tend très souvent vers les paramètres limitants des processus étudiés dans le modèle, il semble légitime de questionner la pertinence de faire une analyse de sensibilité complexe. À notre avis, il serait important de faire cette GSA si l'élaboration du modèle est basée, en partie, sur des hypothèses relatives aux mécanismes majeurs du LADME (comme dans notre étude). Si les mécanismes

modélisés sont standards, alors, il semblerait plus approprié de se limiter à une analyse d'incertitude qui complète la qualité prédictive du modèle.

3. Prédiction des profils et paramètres pharmacocinétiques de substrats de CYP3A administrés à des volontaires sains, en présence ou en absence d'interaction médicamenteuse métabolique

Avant sa première utilisation chez l'homme, il est très souhaitable, et souvent impératif, de bien caractériser les propriétés pharmacocinétiques d'un médicament. Dans cette optique, des efforts de recherche sont déployés à différents niveaux, autant en expérimentation *in vitro* qu'animales. Toutefois, une caractérisation pharmacocinétique complète, *a priori*, demeure un défi difficile à relever, en termes d'accessibilité aux informations et données physiologiques ainsi que de la complexité des processus régissant le LADME. La voie orale étant la voie privilégiée pour l'administration des médicaments, il devient important d'estimer *a priori* leur biodisponibilité orale. Or, la majorité des principes actifs sont des substrats des CYP3A4/5. Ces isoenzymes sont les enzymes exprimées en plus grande quantité dans les entérocytes et les hépatocytes, et participent grandement aux éliminations présystémiques intestinales. Elles sont aussi impliquées dans la majorité des interactions médicamenteuses métaboliques. Par conséquent, il est d'un intérêt majeur de prédire assez tôt dans le processus de recherche et développement, l'impact pharmacocinétique des interactions médicamenteuses.

Le dernier volet de cette thèse consistait donc à développer un modèle PBPK pour être en mesure de prédire (avant le 'First-in-Man') les profils de concentrations plasmatiques ainsi que les paramètres pharmacocinétiques de substrats des CYP3A administrés par voie orale chez des volontaires sains, dans le cas où ces substrats sont administrés seuls ou en présence d'un inhibiteur métabolique. Le choix des principes actifs a été fondé sur les critères suivants : (i) l'accessibilité des données de métabolisme *in vitro* et des données cliniques d'interactions médicamenteuses, (ii) le rôle négligeable des transporteurs membranaires dans l'absorption intestinale, (iii) ces principes actifs devaient être principalement métabolisés par les isoenzymes CYP3A4, et (iv) ils devaient couvrir un large intervalle de biodisponibilité orale. Ainsi, trois benzodiazépines et un agent anticholestérolémiant ont été retenus comme principes

actifs modèles pour cette étude: le midazolam (MDZ), le triazolam (TRZ), l'alprazolam (APZ) et la simvastatine (SMV).

La structure du modèle PBPK, de type 'whole-body', fut connectée à un modèle intestinal de type ACAT. Nous avons adopté une modélisation dynamique de l'absorption intestinale des différents principes actifs en tenant compte des phases de libération, de dissolution, d'ionisation dans le tractus gastro-intestinal (TGI), de la phase de diffusion à travers l'épithélium intestinal, ainsi que de l'effet de premier passage intestinal gouverné par les CYP3A. Dans ce modèle, nous avons considéré que l'élimination des principes actifs se fait essentiellement par métabolisme hépatique. La distribution tissulaire des principes actifs a été basée sur le principe de perfusion limitante, et le volume de distribution fut estimé à partir des méthodes développées par Rogers et Rowland (Rogers, Leahy et al. 2005), ainsi que Poulin et Theil (Poulin and Theil 2000; Poulin and Theil 2002)

Afin de considérer les variabilités interindividuelles physiologiques et biochimiques connues, des simulations Monte-Carlo ont été réalisées, et ont généré des intervalles de concentrations possibles et des intervalles de valeurs pour chaque paramètre PK prédit. Pour cela, nous avons utilisé les paramètres statistiques des paramètres impliqués dans le modèle, à savoir le poids corporel, le débit cardiaque, la quantité de CYP3A intestinaux et hépatiques, la vitesse de vidange gastrique, le temps de transit intestinal, les paramètres de biotransformation de Michaelis-Menten, la fraction libre plasmatique, la vitesse de dissolution, et la solubilité dans le fluide intestinal.

En effectuant des bilans de masse autour des compartiments intestinaux et hépatiques, de très bonnes prédictions ont été obtenues pour la fraction absorbée de principe actif (Fabs), la fraction de principe actif échappant aux éliminations présystémiques intestinales (Fg) et hépatiques (Fh), et par conséquent, pour la biodisponibilité orale des quatre principes actifs. Ceci indique que le modèle PBPK développé capte adéquatement les mécanismes majeurs impliqués dans l'absorption intestinale et les effets de premier passage intestinaux et hépatiques des principes actifs étudiés.

La prédiction des profils plasmatiques est jugée satisfaisante lorsque les 5^{ième} et 95^{ième} percentiles de ces profils simulés enveloppent les données cliniques. En se basant sur ce critère, de très bonnes prédictions des profils plasmatiques ont été obtenues pour les administrations orales de MDZ et de SMV. Une faible sous-estimation des profils plasmatiques fut obtenue pour le TRZ et l'APZ, expliquée en partie par la surestimation de leur volume de distribution. Les paramètres PK ($t_{1/2}$, CL_{tot}/F , $AUC_{0-tlast}$, C_{max} et t_{max}) du MDZ, TRZ, APZ et SMV ont aussi été très bien prédits avec des valeurs comprises dans un intervalle d'erreur double (« two-fold error range »). Ainsi, le modèle a servi à prédire les propriétés pharmacocinétiques des quatre substrats de CYP3A avec un bon niveau de précision.

En utilisant le modèle PBPK développé, nous avons par la suite prédit l'effet d'une administration concomitante d'un inhibiteur des CYP3A sur les profils plasmatiques et les paramètres pharmacocinétiques du MDZ, APZ, TRZ et SMV. Pour ce faire, nous avons considéré les variations dynamiques des concentrations intestinales et hépatiques des inhibiteurs. Cette étude est la première du genre à prédire, sans avoir recours à des ajustements de données, l'impact de l'inhibition des CYP3A intestinaux par les furanocoumarins contenus dans le jus de pamplemousse sur les profils plasmatiques et paramètres PK de substrats de CYP3A.

Nous avons sélectionné les inhibiteurs à partir des études cliniques publiées sur les interactions médicamenteuses impliquant le MDZ, APZ, TRZ et SMV. Ce sont donc des inhibiteurs compétitifs, tels que l'itraconazole (ITZ) et le kétoconazole (KTZ), ainsi que des inhibiteurs irréversibles comme le diltiazem (DTZ), le saquinavir (SQV), et la 6'-7'-dihydroxybergamotine (DHB). Parmi les furanocoumarins détectés dans le jus de pamplemousse, le DHB semble être l'inhibiteur des CYP3A responsable de l'augmentation des concentrations plasmatiques rapportée lors de consommation de ce jus avec des substrats de CYP3A (Kakar, Paine et al. 2004). En utilisant le modèle d'absorption intestinal développé, et à partir de données collectées dans la littérature, nous avons simulé le profil de concentrations de DHB au niveau des entérocytes qui pourrait potentiellement être observé après avoir consommé un verre de jus de pamplemousse. Cette approche nous a permis d'illustrer, de quantifier et de prédire avec

précision les conséquences pharmacocinétiques de la consommation simultanée d'un verre de jus de pamplemousse à l'administration de MDZ ou de SMV.

La validation des valeurs prédites de F_{abs} , F_g , F_h et F n'a pas pu être effectuée puisque lors d'interaction médicamenteuse métabolique (IMM), ces données sont rarement disponibles dans la littérature. Cependant, les $AUC_{0-tlast}$ et les C_{max} prédits en présence d'IMM sont en accord avec ceux obtenus à la suite des études cliniques, suggérant une bonne caractérisation de l'impact des IMM sur l'absorption intestinale des médicaments étudiés.

Lorsque comparée aux données cliniques, l'allure des profils plasmatiques prédits a été jugée très satisfaisante pour le MDZ administré avec le DHB ou avec l'ITZ, ainsi que pour la SMV administrée avec le DHB. Les paramètres pharmacocinétiques ont été aussi très bien prédits lors d'IMM, avec 27/37 paramètres compris à l'intérieur de l'intervalle d'erreur double. Par contre, des écarts dans l'allure des profils plasmatiques et dans l'estimation des paramètres PK (notamment $t_{1/2}$) ont été observés pour les administrations concomitantes de SQV ou ITZ. Elles peuvent s'expliquer en partie par le fait que les propriétés d'induction du CYP3A4 par le SQV n'ont pas été considérées dans notre modèle, tout autant que les propriétés d'inhibition de l'activité des CYP3A4 par les métabolites de l'ITZ. Par conséquent, des modifications du modèle d'inhibition pourraient être effectuées afin de prendre en compte (i) les effets mixtes de modulation d'activité enzymatique observés pour certains composés, et (ii) l'effet inhibiteur ou inducteur additionnel des métabolites formés.

L'effet des P-gp intestinales sur l'absorption orale des principes actifs étudiés est négligeable *in vivo*. Par conséquent, le rôle protecteur de ces transporteurs transmembranaires n'a pas été considéré lors du développement du modèle PBPK appliqué à l'humain. Il serait néanmoins nécessaire d'inclure l'effet de ces transporteurs pour prédire l'absorption orale de substrats de P-gp de Classe III ou IV. L'approche développée récemment par Badham et collaborateurs pourrait d'ailleurs compléter le modèle PBPK proposé dans ce dernier volet de cette thèse (Badham, Penny et al. 2009).

4. Conclusions

En conclusion, les apports majeurs de cette thèse ont été (i) d'incorporer dans un modèle pharmacocinétique à base physiologique l'effet protecteur des P-gp exprimées au niveau de la BHE et du cœur à partir de données *in vitro*, (ii) de prédire la distribution tissulaire d'un substrat de P-gp dans le cœur, et le cerveau de souris normales et de souris déficientes des gènes codant pour la P-gp, (iii) d'introduire pour la première fois dans le domaine PBPK une approche d'analyse de sensibilité globale qui tient compte de l'effet des corrélations de paramètres du modèle sur l'identification des paramètres importants, (iv) de prédire, sans ajustement de données, les profils plasmatiques et les paramètres pharmacocinétiques, incluant la biodisponibilité orale, de substrats de CYP3A administrés à des volontaires sains, (v) de prédire l'impact d'interactions médicamenteuses métaboliques sur les profils plasmatiques et les paramètres pharmacocinétiques, incluant la biodisponibilité orale, de substrats de CYP3A administrés à des volontaires sains, et (vi) de prédire, sans ajustement de données, l'impact de l'interaction médicamenteuse métabolique due aux furanocoumarins contenus dans le jus de pamplemousse sur les profils plasmatiques et les paramètres pharmacocinétiques de substrats de CYP3A administrés à des volontaires sains.

Ces travaux de recherche illustrent la capacité prédictive des modèles PBPK, et démontrent qu'une traduction mathématique de la compréhension mécanistique des phénomènes inhérents au devenir du médicament permet d'anticiper les impacts d'une altération d'un de ces mécanismes. Contrairement à la plupart des études PBPK publiées, nous n'avons pas utilisé de logiciels commerciaux qui proposent des boîtes-noires pour des fins de modélisation. En effet, nous pouvions ainsi jouir d'une grande flexibilité de conceptualisation des modèles, de l'intégration des mécanismes physiologiques jugés importants, et d'avoir une totale maîtrise de ces concepts régissant l'ADME et exprimables dans un langage mathématique. Il est à noter que la capacité prédictive du modèle PBPK humain développé dans la dernière partie de ces travaux de recherche est actuellement en phase de comparaison avec les logiciels commerciaux, par des experts du consortium PhRMA qui regroupe les compagnies pharmaceutiques, le milieu académique, et les agences réglementaires.

Il est aussi important de mentionner que la capacité prédictive des PBPK représente bien plus qu'une alternative aux procédures d'ajustement de données généralement d'usage dans les processus de recherche et de développement préclinique et clinique. L'époque de clivage des approches de modélisation pharmacocinétique tend à céder la place à une philosophie de fusion de ces approches, et ce, pour une meilleure caractérisation des différents processus de pharmacocinétique et une amélioration des design d'études cliniques. Malgré l'évidence de l'utilité de la modélisation dans l'amélioration et l'accélération et la réduction des coûts liés aux processus de développement du médicament, l'étendue de son application dans le milieu est encore restreinte, et ce, pour des raisons de perception de la modélisation comme étant un investissement supplémentaire de temps. Cependant, cette perception tend à se renverser avec l'accumulation de cas où le recours à la modélisation a largement contribué à l'acceptation des nouvelles drogues ou nouvelles utilisations de celles-ci par la FDA. On peut citer les exemples de Roche et de Novartis qui ont fait de la Modélisation et Simulation (M&S) un département dédié et complémentaire au département classique de Biostatistiques. Dans ce contexte, cette thèse peut être vue comme un pas additionnel vers le développement d'approches prédictives de la thérapie individualisée. En effet, en intégrant dans un modèle pharmacocinétique les différences interindividuelles génétiques et physiologiques, ainsi que l'effet des facteurs environnementaux, il serait possible, à plus long terme, d'adapter les posologies en conséquence.

Références

- Badhan, R., J. Penny, et al. (2009). "Methodology for development of a physiological model incorporating CYP3A and P-glycoprotein for the prediction of intestinal drug absorption." *J Pharm Sci* **98**(6): 2180-97.
- Bernillon, P. and F. Bois (2000). Statistical issues in Toxicokinetic Modeling: a bayesian perspective. *Mathematical modeling in environmental health Studies*.
- Breedveld, P., J. H. Beijnen, et al. (2006). "Use of P-glycoprotein and BCRP inhibitors to improve oral bioavailability and CNS penetration of anticancer drugs." *Trends Pharmacol Sci* **27**(1): 17-24.
- Breedveld, P., D. Pluim, et al. (2005). "The effect of Bcrp1 (Abcg2) on the in vivo pharmacokinetics and brain penetration of imatinib mesylate (Gleevec): implications for the use of breast cancer resistance protein and P-glycoprotein inhibitors to enable the brain penetration of imatinib in patients." *Cancer Res.* **65**(7): 2577-2582.
- Brochot, C., T. J. Smith, et al. (2007). "Development of a physiologically based toxicokinetic model for butadiene and four major metabolites in humans: global sensitivity analysis for experimental design issues." *Chem Biol Interact* **167**(3): 168-83.
- Brown, R. P., M. D. Delp, et al. (1997). "Physiologically parameter values for physiologically based pharmacokinetic models." *Toxicol. Ind. Health* **13**(4): 407-483.
- Cisternino, S., C. Mercier, et al. (2004). "Expression, up-regulation, and transport activity of the multidrug-resistance protein Abcg2 at the mouse blood-brain barrier." *Cancer Res.* **64**(9): 3296-3301.
- Evans, M. V. and M. E. Andersen (2000). "Sensitivity analysis of a physiological model for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD): assessing the impact of specific model parameters on sequestration in liver and fat in the rat." *Toxicol Sci* **54**(1): 71-80.
- Faassen, F., G. Vogel, et al. (2003). "Caco-2 permeability, P-glycoprotein transport ratios and brain penetration of heterocyclic drugs." *Int. J. Pharm.* **263**(1-2): 113-122.
- Golden, P. L. and G. M. Pollack (2003). "Blood-brain barrier efflux transport." *J. Pharm. Sci.* **92**(9): 1739-1753.
- Greenblatt, D. J. and L. L. von Moltke (2005). "Interaction of warfarin with drugs, natural substances, and foods." *J. Clin. Pharmacol.* **45**(2): 127-132.
- Hamelin, G., G. Charest-Tardif, et al. (2005). "Physiologically based modeling of n-hexane kinetics in humans following inhalation exposure at rest and under physical exertion: impact on free 2,5-hexanedione in urine and on n-hexane in alveolar air." *J Occup Environ Hyg* **2**(2): 86-97; quiz D6-7.
- Harris, R. Z., G. R. Jang, et al. (2003). "Dietary effects on drug metabolism and transport." *Clin. Pharmacokinet.* **42**(13): 1071-1088.
- Hayeshi, R., C. Hilgendorf, et al. (2008). "Comparison of drug transporter gene expression and functionality in Caco-2 cells from 10 different laboratories." *Eur J Pharm Sci.*
- Heykants, J., A. Knaeps, et al. (1981). "On the pharmacokinetics of domperidone in animals and man. I. Plasma levels of domperidone in rats and dogs. Age related adsorption and passage through the blood brain barrier in rats." *Eur. J. Drug Met. Pharmacokinet.* **6**(1): 27-36.
- Kakar, S. M., M. F. Paine, et al. (2004). "6'7'-Dihydroxybergamottin contributes to the grapefruit juice effect." *Clin Pharmacol Ther* **75**(6): 569-79.
- Litman, T., T. E. Druley, et al. (2001). "From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance." *Cell Mol Life Sci* **58**(7): 931-59.
- McCabe, B. J. (2004). "Prevention of food-drug interactions with special emphasis on older adults." *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **7**(1): 21-26.

- Meuldermans, W., R. Hurkmans, et al. (1981). "On the pharmacokinetics of domperidone in animals and man. III Comparative study on the excretion and metabolism of domperidone in rats, dogs and man." Eur. J. Drug Met. Pharmacokinet. **6**(1): 49-60.
- Nestorov, I. A., L. J. Aarons, et al. (1997). "Physiologically based pharmacokinetic modeling of a homologous series of barbiturates in the rat: a sensitivity analysis." J Pharmacokinet Biopharm **25**(4): 413-47.
- Poulin, P. and F. Theil (2000). "A priori Prediction of Tissue:Plasma Partition Coefficients of Drugs to Facilitate the Use of Physiologically-Based Pharmacokinetic Models in Drug Discovery." J. Pharm. Sci. **89**(1): 16-35.
- Poulin, P. and F. Theil (2002). "Prediction of Pharmacokinetics Prior to In vivo Studies. I. Mechanism-Based Prediction of Volume of Distribution." J. Pharm. Sci. **91**(1): 129-155.
- Rodgers, T., D. Leahy, et al. (2005). "Physiologically based pharmacokinetic modeling 1: predicting the tissue distribution of moderate-to-strong bases." J Pharm Sci **94**(6): 1259-76.
- Schinkel, A. H. and J. W. Jonker (2003). "Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview." Adv. Drug Deliv. Rev. **55**: 3-29.
- Schinkel, A. H., E. Wagenaar, et al. (1996). "P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs." J Clin Invest **97**(11): 2517-24.
- Seithel, A., J. Karlsson, et al. (2006). "Variability in mRNA expression of ABC- and SLC-transporters in human intestinal cells: comparison between human segments and Caco-2 cells." Eur J Pharm Sci **28**(4): 291-9.
- Tardif, R., P. O. Droz, et al. (2002). "Impact of human variability on the biological monitoring of exposure to toluene: I. Physiologically based toxicokinetic modelling." Toxicol Lett **134**(1-3): 155-63.

ANNEXES

Accord des coauteurs

Permission de l'éditeur

Demande autorisation rédaction par article