

Utvikling av en farmakokinetisk populasjonsmodell for mykofenolatmofetil i levertransplanterte pasienter

Leung Ming Yu



Masteroppgave for graden Master i farmasi
Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk institutt,
Det matematisk- naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2016

Utvikling av en farmakokinetisk populasjonsmodell for mykofenolatmofetil i levertransplanterte pasienter

Leung Ming Yu



Masteroppgave for graden Master i farmasi
Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk institutt,
Det matematisk- naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2016

Copyright Leung Ming Yu

2016

Utvikling av en farmakokinetisk populasjonsmodell for mykofenolatmofetil i levertransplanterte pasienter

Leung Ming Yu

<http://www.duo.uio.no>

Trykk: Representralen, Universitetet i Oslo

Abstract

Background: Mycophenolate mofetil (MMF, CellCept®) is an immunosuppressive prodrug, which rapidly metabolize to the active metabolite mycophenolic acid (MPA) in the human body. MPA is used prophylactically against graft rejection after organ transplantation (kidney, liver, heart), usually in combination with a calcineurin inhibitor and/or corticosteroids. There are large individual differences in plasma concentration after oral administration of MMF. A low plasma concentration of MPA increases the risk of graft rejection, whereas high concentrations may cause a variety of unwanted side effects. A key factor contributing to the large differences in the pharmacokinetics of MPA between individuals is enterohepatic recirculation (EHC) of MPA.

Goal: The aim of this thesis was to develop a non-parametric pharmacokinetic population model for MMF, with special emphasis on EHC of MPA, in liver transplant recipients co-administered with tacrolimus and steroids.

Methods: Data rich pharmacokinetic investigations were performed at repeated times, up to three weeks after transplantation, in 16 liver transplant recipients. Fifty-six 12-hour time/concentration curves, in total 723 MPA plasma concentrations, formed the basic data material for the model development. The modeling was performed in Pmetrics version 1.3.1. An appropriate structural model that described EHC was developed and patient covariates tested for inclusion in the model.

Results: A 5-compartment model with 1. order kinetics and lag time in the absorption phase fitted the data well at the individual level. EHC was modeled applying a separate “gallbladder compartment”, where secretion of MPA back to the gastrointestinal tract (“gall bladder emptying”) was governed by a time parameter. Model reabsorption from the “intestine compartment” was able to describe secondary peaks in the MPA plasma concentration versus time curves. The coefficient of determination for the individual observed versus predicted plots, with and without covariates, was $R^2 = 0.946$ and $R^2 = 0.967$, respectively. Additionally, bias (-0.0694 and -0.138) and imprecision (2.32 and 1.15) were low for both models. However, the models have poor predictive power at the population level, and will not

perform well in predicting the pharmacokinetics of new patients. The model with covariates performed slightly better with $R^2 = 0.329$, bias = 0.746 and imprecision = 15.9. The model without covariates had $R^2 = 0.228$, bias = 1.26 and imprecision = 22.5.

Conclusion: The population model described EHC of MPA in liver transplant recipients at the individual level. However, the model has poor predictive power at the population level. Rich kinetic data from a greater pool of patients should be included and a special aim to detect covariates relevant to timing and degree of individual EHC should be the future focus of the further development of the model.

Sammendrag

Bakgrunn

Mykofenolatmofetil (MMF, CellCept®) er et immunosuppressivt prodrug som i kroppen raskt metaboliseres til den aktive metabolitten mykofenolsyre (MPA). MPA brukes profylaktisk mot avstøtning etter organtransplantasjon (nyre, lever, hjerte), som oftest i kombinasjon med en kalsinevrinhemmer og/eller kortikosteroider. Det er store individuelle forskjeller i plasmakonsentrasjon etter oral administrasjon av MMF. Lav plasmakonsentrasjon av MPA øker risikoen for avstøtning av det transplanterte organet, mens for høye konsentrasjoner kan gi en rekke uønskede bivirkninger. En sentral faktor som bidrar til de store forskjellene i farmakokinetikken til MPA mellom individer er enterohepatisk resirkulasjon (EHC) av MPA.

Mål

Målet med denne oppgaven var å utvikle en ikke-parametrisk farmakokinetisk populasjonsmodell for MMF, med fokus på EHC av MPA, hos levertransplanterte som i tillegg blir behandlet med takrolimus og steroider.

Metode

Det ble utført detaljerte 12-timers farmakokinetikkundersøkelser hos 16 levertransplanterte pasienter (inntil 3 uker posttransplantasjon). Dette resulterte i 56 tids-/konsentrasjonskurver, med til sammen 723 konsentrasjonsmålinger, som dannet datagrunnlaget for populasjonsmodelleringen. Modelleringen ble utført i Pmetrics versjon 1.3.1. Det ble utviklet en passende strukturell modell som kunne beskrive EHC hos testsubjektene.

Resultater

En 5-kompartimentmodell med 1. ordens kinetikk og lagtid i absorpsjonsfasen gav en god beskrivelse av farmakokinetikken til MMF på individnivå. EHC ble modellert ved hjelp av et eget galleblærekompartiment, der sekresjon av MPA tilbake til gastrointestinaltrakten ble kontrollert av parameterestimert tid. Reabsorpsjon fra tykktarmkompartiment klarte å beskrive sekundære toppler i MPA konsentrasjon-/tidskurver. De individuelle observerte versus predikerte plottene med og uten kovariater hadde henholdsvis $R^2 = 0.946$ og $R^2 = 0.967$. Begge hadde i tillegg lave verdier og *bias* (-0.0694 og -0.138) og *imprecision* (2.32 og 1.15).

Imidlertid var modellenes prediksjonsevne svak på populasjonsnivå, og begge vil ha utfordringer med å predikere nye pasienter. Modellen med kovariater gjorde det best med $R^2 = 0.329$, *bias* = 0.746 og *imprecision* = 15.9. Modellen uten kovariater hadde $R^2 = 0.228$, *bias* = 1.26 og *imprecision* = 22.5.

Konklusjon

Populasjonsmodellen klarte å beskrive EHC av MPA hos levertransplanterte på individnivå. Imidlertid vil modellen ha store utfordringer ved prediksjon av nye pasienter på populasjonsnivå. Rike kinetikkdata fra flere pasienter bør inkluderes og fokus på kovariater som kan predikere individuelle EHC bør testes ut i den videre modellutviklingen.

Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo i perioden august 2015 til mai 2016.

Jeg vil gjerne takke mine veiledere, professor Anders Åsberg og professor Stein Bergan for et flott og lærerikt år som avslutning på farmasistudiet. Spesielt takk til Anders Åsberg for god veiledning og råd underveis i modelleringsarbeidet og ikke minst god hjelp i skriveprosessen.

Jeg vil også takke hele kull 2016 for en fantastisk studietid, og spesielt takk til «Guttegruppa» for mange fine turer i løpet av disse fem årene.

Jeg vil rette en stor takk til familie og venner som har støttet og oppmuntret meg gjennom studietiden. Takk for at dere alltid stiller opp for meg! Sist, men ikke minst vil jeg takke min samboer og medstudent Siri Malene Valle for all hjelp, støtte og motivasjon gjennom studietiden.

Blindern, mai 2016.

Leung Ming Yu

Forkortelser

Ac-MPAG	Acyl-fenolglukuronidet av mykofenolat
ADME	Absorpsjon, distribusjon, metabolisme og ekskresjon
AGE	Alder
AIC	<i>Akaike Information Criterion</i>
ALBUMIN	Konsentrasjon av plasmaalbumin
AUC	Arealet under konsentrasjon-/tidskurven
CL	<i>Clearance</i>
CL_{CR}	Kreatinin-clearance
EGFR	Estimert glomerulær filtrasjonsrate fra CKD-EPI-formel, justert for kroppsoverflate (Du Bois formel)
EHC	Enterohepatisk resirkulasjon
GFR	Glomerulær filtrasjonsrate
GI	Gastrointestinal
GOF	<i>Goodness of fit</i>
IC	<i>Initial conditions</i>
IMPDH	Inosin-5'-monofosfatdehydrogenase
KI	Konfidensintervall
LSS	<i>Limited sampling strategy</i>
MMF	Mykofenolatmofetil
MPA	Mykofenolat/mykofenolsyre
MPAG	Fenolglukuronidet av mykofenolat
MRP2	<i>Multidrug resistance protein 2</i>
NCA	<i>Non-compartment analysis</i>
NPAG	<i>Nonparametric Adaptive Grid</i>
OP-plott	Observert versus predikert konsentrasjonsplott
SD	Standardavvik
TACKONS	Takrolimuskonsentrasjon
TDM	Terapeutisk legemiddelmonitorering
UGT	Uridin difosfat glukuronyl transferase
V_d	Distribusjonsvolum
WGT	Kroppsvekt

Innholdsfortegnelse

1	Innledning	1
1.1	Grunnleggende farmakokinetikk	1
1.2	Variasjon i farmakokinetikk	5
1.2.1	Årsaker til farmakokinetisk variasjon	5
1.3	Farmakokinetiske beregninger	6
1.3.1	Non-compartment analysis	6
1.3.2	Farmakokinetisk populasjonsmodellering	6
1.3.3	Parametrisk versus ikke-parametrisk modellering	7
1.4	Terapeutisk legemiddelmonitorering	8
1.5	Mykofenolsyre	9
1.5.1	Indikasjon og bruksområder	9
1.5.2	Virkningsmekanisme	9
1.5.3	Farmakokinetiske egenskaper	10
1.5.4	Individuelle forskjeller i farmakokinetikken til MPA	12
1.6	Mål for oppgaven	13
2	Materialer og metoder	14
2.1	Pasientdata	14
2.2	Pmetrics	15
2.2.1	Nonparametric Adaptive Grid	15
2.2.2	Inputfil	18
2.2.3	Modellfil	18
2.3	Utvikling av farmakokinetisk populasjonsmodell	19
2.3.1	Strukturell modell	19
2.3.2	Modellering av enterohepatisk resirkulering	22
2.3.3	Modellering av forsinkelse i absorpsjon	23
2.3.4	Modellparametere	24
2.3.5	Kovariater	25
2.4	Validering	26
2.4.1	Intern validering	26
2.4.2	Ekstern validering	26
2.4.3	Statistikk	27
3	Resultater	28
3.1	Strukturelle modeller	28
3.2	Testing av kovariater	29
3.3	Resultater fra endelige modeller	31
3.3.1	Endelig modell uten kovariater	31
3.3.2	Endelig modell med kovariater	34
4	Diskusjon	41
4.1	Pasientdata	41
4.2	Valg av strukturell modell	42
4.2.1	Tidligere populasjonsmodeller med EHC	42
4.2.2	Valg av betingelse for tidspunkt for EHC	45
4.2.3	Forsinkelse i absorpsjon	46
4.3	Valg av modellparametere	47
4.4	Valg av kovariater	49
4.5	Modell uten kovariater versus modell med kovariater	51
4.5.1	Individuelle observerte versus predikerte konsentrasjoner	51
4.5.2	Populasjonspredikerte versus observerte konsentrasjoner	52

4.6	Validering.....	52
4.7	Videre arbeid med populasjonsmodellen.....	53
5	Konklusjon.....	55
	Litteraturliste	56
	Vedlegg.....	63

1 Innledning

1.1 Grunnleggende farmakokinetikk

I farmakoterapien er det ønskelig å oppnå optimal balanse mellom klinisk effekt og bivirkninger. For å oppnå dette må den optimale dosen og doseringsintervallet for den enkelte pasient finnes. Dette vil være avhengig av både de farmakokinetiske og farmakodynamiske egenskapene hos individet. Farmakokinetikk omtales ofte som de prosessene kroppen utøver på legemidlet, mens farmakodynamikk handler om de farmakologiske effektene legemidlet utøver på kroppen, både ønskede effekter og uønskede bivirkninger [1]. Farmakodynamisk variasjon ser på forholdet mellom mengde legemiddel i systemisk sirkulasjon, eller mer presist mengde legemiddel ved ”target”, og farmakologisk respons [2]. Et eksempel er to individer med forskjellige plasmakonsentrasjoner av warfarin, men med samme kliniske effekt (målt ved *international normalized ratio*). I denne masteroppgaven er det farmakokinetikken som er hovedfokuset, og farmakodynamiske effekter vil i liten grad bli diskutert eller omtalt.

En definisjon på farmakokinetikk er beskrivelsen av sammenhengen mellom gitt dose og resulterende konsentrasjon gjenfunnet i plasma og vev [3]. En annen definisjon er kvantifiseringen av legemiddel og tilhørende metabolitter i kroppen over en tidsperiode, og videre bruke denne informasjonen i utviklingen av passende modeller som kan beskrive de observerte målingene og predikere fremtidige utfall [4]. Enkelt forklart blir det tatt blodprøver av pasienten i et tidsintervall etter inntatt dose (for eksempel en oral dose) og målt konsentrasjonen av legemiddel ved disse tidspunktene (og eventuelt andre relevante målinger) i blod. Ved å trekke en linje mellom alle målingene, får man en plasmakonsentrasjon versus tidskurve som viser hvordan legemidlet først akkumuleres i kroppen, før det så elimineres. Fra denne kurven kan man også estimere den totale systemiske eksponeringen kroppen utsettes for fra én administrert dose, ofte kalt for ”arealet under konsentrasjon-/tidskurven” (AUC). Denne enkle øvelsen gir en viss ide om hvor raskt legemidler absorberes, tiden det tar til maksimal plasmakonsentrasjon oppnås, hvor mye legemiddel som er i kroppen til enhver tid, legemidlets halveringstid og eliminasjonshastigheten.

Mer formelt kan denne eksponeringen av legemiddel i plasma kvantifiseres ved å beregne AUC, som bestemmes ut fra en rekke prosesser: absorpsjon, distribusjon, metabolisme og ekskresjon (ADME). Under følger en kort beskrivelse av de ulike prosessene [3, 5]:

Absorpsjon

Før et legemiddel eksponeres for det systemiske kretsløpet, må det absorberes etter administrering. Absorpsjonen følger ofte en 1. ordens kinetikk, det vil si at absorpsjonsraten er konstant og proporsjonal med gjenværende legemiddel tilgjengelig for absorpsjon. Absorpsjonsraten angis ofte som K_a . Biotilgjengeligheten angir hvor stor andel av administrert dose som kommer over i systemisk sirkulasjon. Ved intravenøs administrering vil hele dosen være umiddelbart tilgjengelig. Ved peroral administrasjon er det virkestoffets fysikalsk-kjemiske egenskaper og legemidlets formulering som bestemmer hvor raskt og hvor mye som gjenfinnes i plasma. Oppløsningshastigheten til formuleringen, stabilitet av virkestoffet i ventrikkel, transport over cellemembraner (enten ved passiv diffusjon eller aktiv transport via proteintransportører) og transittid i tarm er alle faktorer som har innflytelse over legemidlets biotilgjengelighet (listen er ikke uttømmende). Som følge av ovennevnte faktorer, vil det ofte være en viss forsinkelsestid fra inntak av legemidlet til absorpsjon kan observeres ved konsentrasjonsmålinger. De fleste legemidler gitt peroralt vil hovedsakelig absorberes i tyntarmen. Dette skyldes tyntarmens store overflateareal og lang kontakttid med legemidlet. Noen legemidler kan også absorberes fra tykktarmen, blant annet mykofenolat (MPA). Etter absorpsjon transporteres legemiddelet via portåren til leveren. Graden av presystemisk metabolisme i tarm og lever avgjør hvor stor andel av administrert legemiddel som går over i den systemiske sirkulasjonen. Det er først når legemidlet når systemisk sirkulasjon, at det kan utøve sin farmakologiske effekt på ”target”.

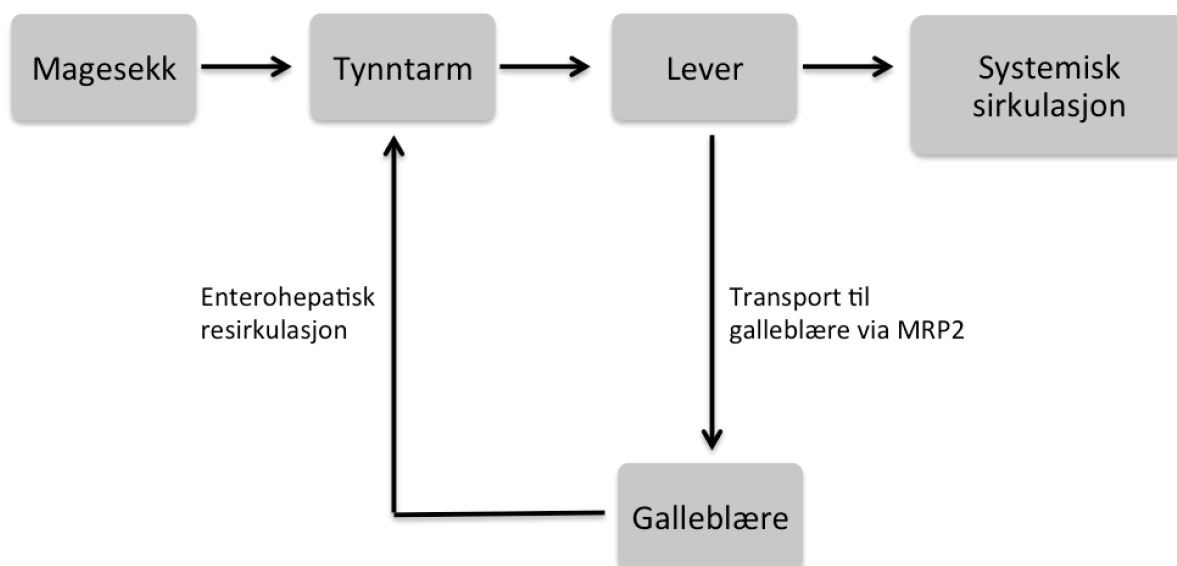
Distribusjon

Når legemidlet har kommet over i systemisk sirkulasjon, vil det skje en distribusjon av legemidlet fra plasma til vev, altså transport av legemiddel til og fra sirkulasjonen. Distribusjonen skjer normalt via passiv diffusjon, men for enkelte legemidler vil det også kunne fordeles ved hjelp av aktiv transport. Det vil etter hvert oppstå en likevekt mellom legemiddel i plasma og legemiddel i vev. Et nyttig begrep er distribusjonsvolum (V_d): V_d er en teoretisk størrelse og angir forholdet mellom mengde legemiddel i vev og plasma ved likevekt. V_d er et ufysiologisk volum og kan være på flere hundre liter. Legemidler med høy binding til plasmaproteiner har lav V_d . Legemidler med lav binding til plasmaproteiner har

ofte en høy V_d fordi en større mengde legemiddel er distribuert ut og bundet til vev. Graden av binding angis ofte som fri fraksjon, et tall mellom 0 og 1. Et legemiddel med lav binding har fri fraksjon nærmere 1, mens et legemiddel med høy bindingsgrad vil ha en fri fraksjon nærmere 0. Det er den frie fraksjon av legemidlet som kan utøve farmakologisk effekt.

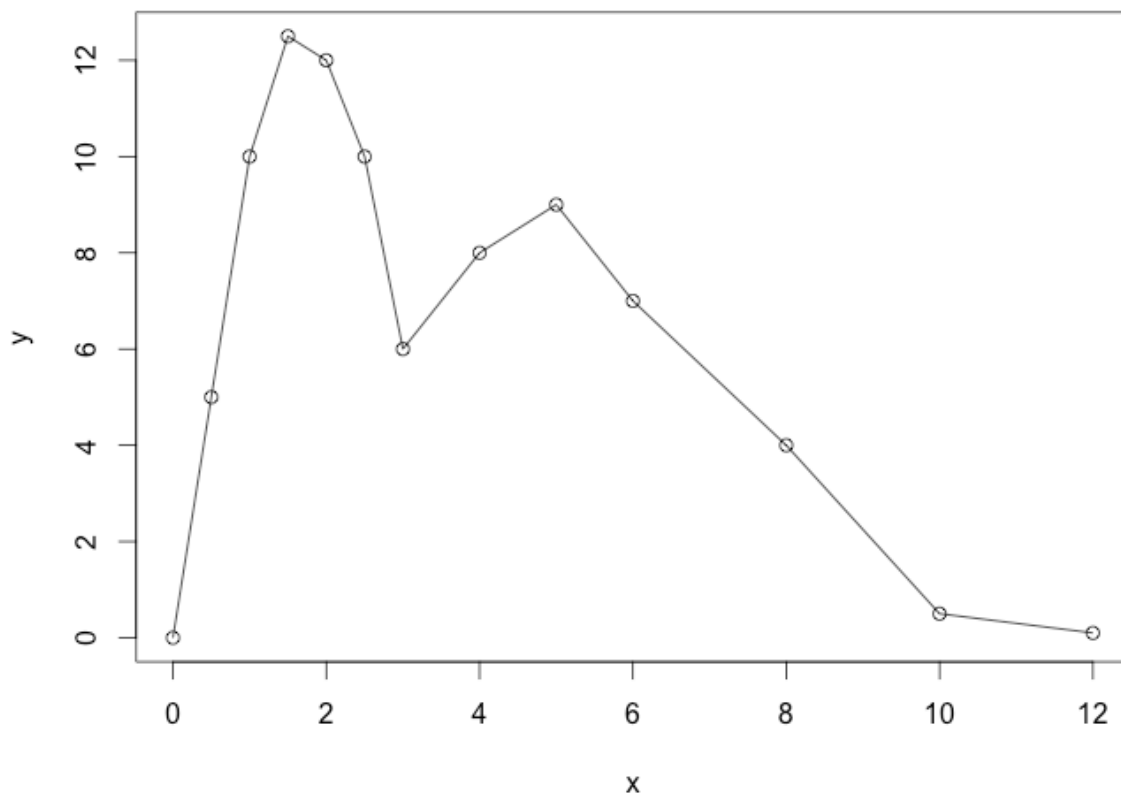
Metabolisme (biotransformasjon)

Legemiddelmetabolisme kan forekomme i flere organer i kroppen, men leveren (hepatisk metabolisme) utgjør den klart største eliminasjonsveien for fettløselige legemidler. Det skilles mellom fase 1- og fase 2-metabolisme. Fase 1-metabolisme er en kjemisk omdannelse (hydroksylering, demetylering, osv.) av legemiddelsubstans til metabolitt. Fase 2-metabolisme består av konjugering av et mer vannløselig molekyl. Både fase 1- og fase 2-metabolisme har til hensikt å gjøre metabolitten mer vannløselig, slik at den kan skilles ut med urinen via nyrene. Noen fase 2-metabolitter blir transportert over til galleblæren, som deretter skilles ut med gallen tilbake til tynntarmen/duodenum. En andel av legemiddelet kan reabsorberes tilbake til systemisk sirkulasjon, såkalt enterohepatisk resirkulasjon (EHC), mens resten elimineres fra kroppen (se figur 1.1). MPA er et kjent legemiddel som undergår EHC.



Figur 1.1. Skjematisk oversikt av enterohepatisk resirkulasjon. MRP2: *multidrug resistance protein 2*.

Legemidler som undergår EHC får en karakteristisk sekundær topp i konsentrasjon-/tidskurven ved hver galletømming, se figur 1.2. Effekten av en galletømming blir i praksis som å innta en ny dose av legemidlet.



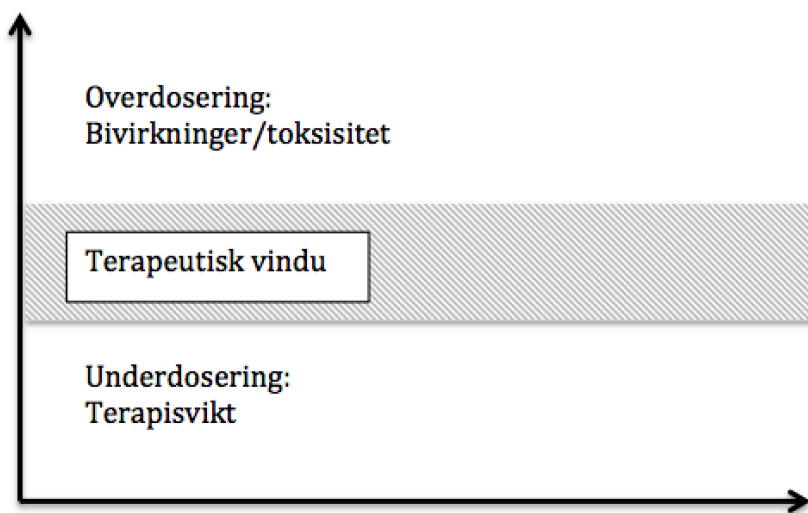
Figur 1.2: Illustrasjonsfigur av plasmakonsentrasjon versus tidskurve med sekundær topp forårsaket av enterohepatisk resirkulasjon. X-akse: tid; Y-akse: plasmakonsentrasjon.

Ekskresjon

Ekskresjon av uforandret (vannløselig) legemiddelsubstans skjer hovedsakelig i nyrene. Ved alvorlig skade i nyrene vil dette kunne føre til økt eksponering av legemiddel i sirkulasjonen dersom dosen ikke tilpasses, da nyrenes evne til å skille ut legemiddel reduseres. Noen substanser kan også transporteres fra leveren til galleblæren og skilles ut med gallen [6]. Flere faktorer kontrollerer sekresjon av galle. Én faktor av betydning er matinntak. Aminosyrer og fettsyrer fra maten vil i duodenum stimulere til sekresjon av peptidet kolecystokinin. Kolecystokinin fører til sammentrekning og tømming av galleblæren [7].

1.2 Variasjon i farmakokinetikk

Den klassiske tankegangen om at én dose passer for alle, forutsetter at det er et bredt terapeutisk vindu. Da oppnås god klinisk effekt, samtidig som bivirkninger holdes relativt beskjedne. Men selv om den kliniske effekten er den samme, kan det være store individuelle forskjeller i doseringen av legemidlet. Dette skyldes variasjon i farmakokinetikken (og -dynamikken), noe som kan resultere i blant annet ulike plasmakonsentrasjoner for samme dose. For legemidler med et smalt terapeutisk vindu, er det lett å komme over i toksiske doser eller få en suboptimal klinisk effekt, se figur 1.3.



Figur 1.3. Illustrasjon av sammenhengen mellom plasmakonsentrasjon og farmakologisk respons.
X-akse: tid; Y-akse: plasmakonsentrasjon.

Farmakokinetisk variasjon ser på forholdet mellom gitt dose legemiddel og mengde legemiddel gjenfunnet i systemisk sirkulasjon. Et eksempel på farmakokinetisk variasjon er to individer som får samme dose, men med ulik målt plasmakonsentrasjon.

1.2.1 Årsaker til farmakokinetisk variasjon

Det er mange faktorer som kan bidra til farmakokinetisk variasjon. Matinntak, genetisk polymorfisme, etnisitet, underliggende sykdom, samtidig medisinering av andre legemidler og andre (miljø)faktorer [6, 8-10] kan alle bidra til farmakokinetisk variasjon mellom (og innad) individer. I tillegg har kroppen ofte flere metabolismeveier for ett legemiddel. Ved hemming av én metabolismevei, kan biotransformasjonen bli forskjøvet til den andre metabolismeveien [11], noe som ytterligere kompliserer farmakokinetikken.

1.3 Farmakokinetiske beregninger

1.3.1 Non-compartment analysis

Det er flere måter å analysere farmakokinetikken til et legemiddel. Den mest fundamentale og klassiske metoden er den såkalte ”*non-compartment analysis*” (NCA). NCA-konseptet går ut på å beregne AUC ut fra en rekke konsentrasjonsmålinger over tid. Ved å trekke en rett linje mellom hvert målepunkt og deretter dele opp hele kurven i mindre trapeser, kan AUC enkelt beregnes [12]. Ut fra disse målingene og hvilken dose som er administrert, kan det videre estimeres en rekke parametere (*clearance*, halveringstid, m.m.). NCA er derfor en rask, enkel og robust metode for å gjøre noen innledende beregninger, før man eventuelt går videre med mer avanserte analyser. Fordelen med NCA er at det er enkelt å regne ut AUC for et sett observasjoner og resultatet er enkelt for andre å replisere. Det er heller ikke nødvendig å gjøre antagelser om hvilken orden kinetikken følger, noe som forenkler beregningen [12]. I tillegg er det ikke nødvendig med spesialisert/proprietær programvare. Ulempen er at det er tid- og kostnadskrevenende å skaffe fullstendige kinetikkprofiler (over 12 timer) med 10 – 12 målinger/observasjoner. Ofte vil konsentrasjonsmålingene være mer intensive de første timene etter administrasjon av legemiddel, og mer sparsommelige lenger ut i tidsforløpet. Viktige endringer i farmakokinetikken sent i tidsforløpet vil dermed kanskje ikke bli oppdaget. I tillegg er NCA veldig enkel og kan ikke besvare mer kompliserte farmakokinetiske spørsmål.

1.3.2 Farmakokinetisk populasjonsmodellering

Populasjonsfarmakokinetikk kan defineres som studien av variasjon i plasmakonsentrasjon mellom individer i en gitt populasjon, for en gitt relevant dose legemiddel. Målet er å beskrive farmakokinetikken i- og variasjonen mellom pasienter. Identifisering av faktorer som påvirker absorpsjon, distribusjon, metabolisme og eliminasjon/ekskresjon, kan hjelpe modellen til å forklare individuelle forskjeller i plasmakonsentrasjon [13-15].

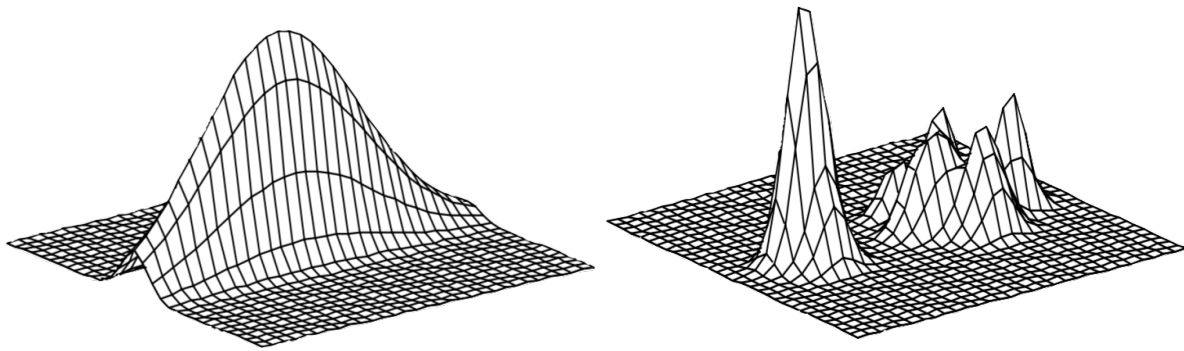
Ved å bygge ut modellen med flere kompartments og inkorporere relevante kovariater, oppnås det en mer avansert modell med større prediksjonsevne. Fordelen over NCA med slike farmakokinetiske populasjonsmodeller, er at kovariater kan brukes til å bedre modellens evne til å beskrive farmakokinetikken. I tillegg til fullstendige kinetikkprofiler, kan det også benyttes datamaterialer der det er en ubalanse i dataene eller få data fra hvert individ. Selv datasett der kun ett datapunkt fra hver pasient er samlet inn kan benyttes, men med få

datapunkter fra hvert individ kreves et større antall pasienter i datasettet. Dermed har ikke denne metoden de samme begrensingene som NCA, og det kan utnyttes flere typer pasientmaterialer som bedre representerer pasientpopulasjonen. All data, fra tradisjonelle farmakokinetiske studier til rutineprøver, kan i utgangspunktet benyttes i farmakokinetiske populasjonsmodeller [8, 13, 14, 16, 17].

På grunn av de mange ulike faktorene som kan påvirke farmakokinetikken, vil det nesten alltid være en viss inter- og intraindividuell variasjon. Farmakokinetisk populasjonsmodellering tar sikte på å analysere populasjonsdata, og på den måten avdekke om det finnes korrelasjoner mellom pasientkarakteristika og farmakokinetikken til et bestemt legemiddel.

1.3.3 Parametrisk versus ikke-parametrisk modellering

Det finnes flere avanserte modelleringsprogrammer/verktøy som kan brukes ved populasjonsmodellering (NONMEM, AdeptII, WinNonMix, Pmetrics, m.m.). Ett viktig prinsipielt skille i populasjonsmodellering er distinksjonen mellom parametrisk og ikke-parametrisk modellering, se figur 1.4 for eksempel. Ikke-parametrisk modellering gjør ingen underliggende antagelser om distribusjonen til modellparametere (for eksempel normalfordeling), og er dermed bedre i stand til å oppdage/beskrive for eksempel bimodale fordelinger (eksempel: ”*slow metabolizers*” versus ”*fast metabolizers*”). I farmakokinetikken finnes det flere eksempler der en parameter ikke følger normalfordelingen, noe som er den vanligste antakelsen om distribusjon.



Figur 1.4: Illustrasjonsfigur på ulike distribusjoner. Forskjellen mellom parametriske (til venstre) og ikke-parametriske (til høyre) fordeling, modifisert fra Jelliffe et al. [18].

Når populasjonsmodellen er ferdigstilt er det også mulig å beregne optimale tidspunkter for prøvetaking, der tidsintervallet kan bestemmes av brukeren. Dersom modellen klarer å predikere en tilfredsstillende AUC med kun noen få konsentrasjonsmålinger (såkalt *limited sampling strategy*, (LSS)), kan dette gi en besparelse i både tid og kostnader. Helsepersonell og sengeposter kan frigjøres og pasienter slipper å oppholde seg på sykehuset i unødvendig lang tid.

1.4 Terapeutisk legemiddelmonitorering

Terapeutisk legemiddelmonitorering (TDM) er måling og overvåking av legemiddelkonsentrasjoner i blod/plasma med den hensikt å individualisere og optimalisere legemiddeldosen og den tilhørende terapeutiske effekten [19-21]. For at TDM skal være hensiktsmessig, må det være en sammenheng mellom plasmakonsentrasjonen til et legemiddel og terapeutisk (eventuelt toksisk) respons [22, 23]. Selv om det er en sterk sammenheng mellom plasmakonsentrasjon og respons, er det likevel ikke alltid nødvendig med TDM. Dersom det terapeutiske vinduet er bredt, kan det være akseptabelt med store individuelle forskjeller i plasmakonsentrasjoner, så lenge den ønskede kliniske effekten oppnås. Et område der det kan være aktuelt med TDM, er for legemidler med et smalt terapeutisk vindu og der konsekvensene av å havne utenfor terapeutiske målkonsentrasjoner er alvorlige. Et godt eksempel på dette er bruk av immunsuppressiva etter en organtransplantasjon. Terapisvikt kan føre til avstøtning og tap av allograftet, og det er derfor ytterst viktig å opprettholde terapeutiske målkonsentrasjoner, både for å unngå avstøtning og for å holde potensielle bivirkninger så lavt som mulig. For immunsuppressiva er det vanligste

å måle såkalte C_0 eller ”trough”-konsentrasjoner (plasmakonsentrasjonen rett før administrering av ny dose). Avhengig om C_0 -verdien er innenfor terapeutisk målområde eller ikke, justeres doser deretter. Det er altså en korrelasjon mellom C_0 -verdien og AUC. Det er blitt påvist en sammenheng mellom AUC og terapeutisk utfall/effekt [24-27]. Det er ofte ønskelig med intensive kinetikkundersøkelser med mange konsentrasjonsmålinger. På grunn av høy kostnads- og tidsbruk, er det ikke alltid praktisk gjennomførbart i klinikken. Derfor brukes surrogater som C_0 , C_2 , 3-punktsmålinger m.m. for å estimere AUC.

En farmakokinetisk populasjonsmodell som klarer å beskrive korrelasjonen mellom populasjonskarakteristika og farmakokinetiske egenskaper ved legemiddelet, kan være et nyttig klinisk verktøy. Optimalisering av doseringsregimer (både doseintervall og -mengde) kan bidra til bedre farmakoterapi.

1.5 Mykofenolsyre

1.5.1 Indikasjon og bruksområder

Mykofenolatmofetil (MMF, CellCept®) er et immunosuppressivt prodrug som i kroppen raskt metaboliseres til den aktive metabolitten mykofenolsyre (MPA). MPA brukes profylaktisk mot avstøtning etter organtransplantasjon (nyre, lever, hjerte), som oftest i kombinasjon med en kalsinevrinhemmer og kortikosteroider [28-30]. Standard induksjonsterapi i Norge etter levertransplantasjon er 1 gram MMF to ganger daglig i tillegg til prednisolon og takrolimus. Ved høy immunologisk risiko, legges det til 20 mg Simulect® (basiliximab) ved dag 0 og dag 4 [31].

1.5.2 Virkningsmekanisme

MPA er en potent, selektiv, ikke-konkurrerende og reversibel inhibitor av inosin-5'-monofosfatdehydrogenase (IMPDH). Dette enzymet er det hastighetsbestemmende trinnet i *de novo* syntesen av guanosinnukleotid som er en nødvendig bestanddel i proliferasjonen av T- og B-lymfocytter. Aktiverte lymfocytter uttrykker type II-isoformen av IMPDH, som har fem ganger høyere affinitet til MPA, i motsetning til de fleste andre celletyper som uttrykker type I-isoformen av IMPDH. Andre celletyper har i tillegg alternative synteseveier av puriner som lymfocytene mangler. Dette er den viktigste immunosuppressive effekten til MPA [28, 32, 33].

1.5.3 Farmakokinetiske egenskaper

Absorpsjon

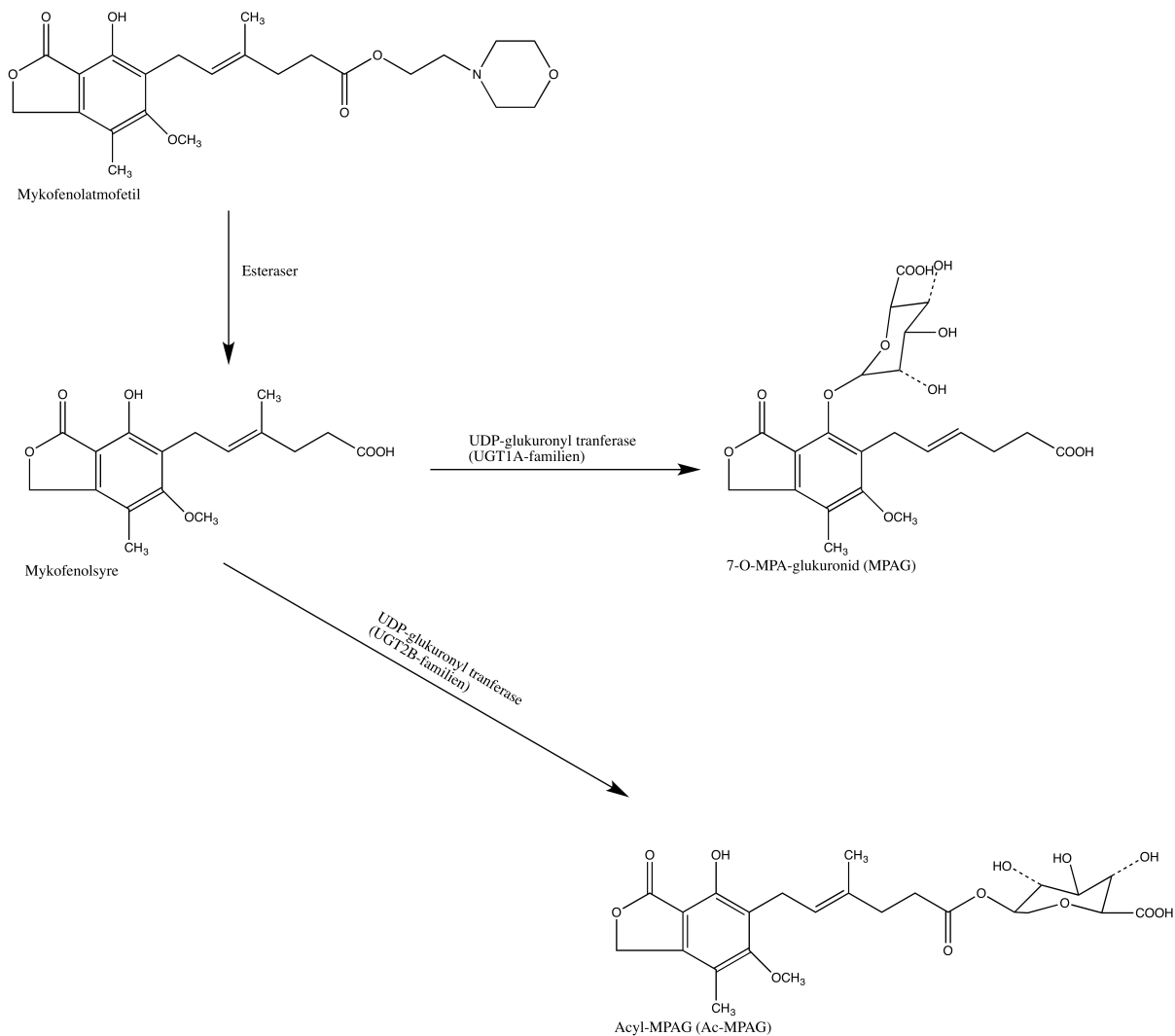
MMF absorberes raskt etter oral administrasjon og gjennomgår en fullstendig presystemisk metabolisme til den aktive metabolitten MPA. Biotilgjengeligheten av MPA er tidligere målt til ca. 94 % i forhold til intravenøs administrering [28, 34].

Distribusjon

MPA har en høy grad av proteinbinding til plasmaalbumin [28, 35]. På grunn av enterohepatisk resirkulasjon kan en sekundær topp i plasmakonsentrasjonen av MPA observeres 6 – 12 timer etter dosering [28, 34, 36].

Metabolisme

MPA metaboliseres hovedsakelig av uridin difosfat glukuronyl transferase (UGT) til det inaktive fenolglukuronidet av MPA (MPAG) [28]. Spesielt isoform UGT1A9 har vist seg å være av betydning, men også andre isoformer (UGT1A8 og UGT1A10) har blitt påvist å ha en effekt på metabolismen av MPA [37]. UGT finnes både i lever, nyrer og i tarmen, men leveren er den klart største bidragsyteren med hensyn på metabolisme av MPA til MPAG [38]. En viss andel MPA blir også metabolisert til den aktive metabolitten acyl-MPAG (Ac-MPAG) via UGT2B-familien. Det er antatt at Ac-MPAG står for noen av bivirkningene forårsaket av MPA (diaré og leukopeni) [28]. Figur 1.5 viser hovedmetabolismeveiene til MMF.



Figur 1.5: Hovedmetabolismeveier for MMF. MPAG er en inaktiv metabolitt som skilles ut med urinen. Ac-MPAG er en aktiv metabolitt som antas å stå for noen av bivirkningene forårsaket av MMF.

Enterohepatisk resirkulasjon

En andel MPAG kan undergå EHC der MPAG tilbakeføres, via galleblæren, til tarmen og dekonjugeres tilbake til MPA. Hormonelle signalstoffer fører til en sammentrekning og tømming av galleblæren ut til duodenum [7]. Gram-negative bakterier i kolon har høy glukuronidaseaktivitet og står antakeligvis for det meste av dekonjugeringen av MPAG tilbake til MPA [6, 39, 40]. Dermed kan MPA reabsorberes tilbake til systemisk sirkulasjon [28, 36]. Gjennomsnittlig bidrag til AUC_{∞} er ca. 40 % med et spenn på 10 – 60 % [36]. Ut fra dette må det bety at det skjer en betydelig absorpsjon også i kolon. Sekundær topp i AUC ses ofte etter 6 – 12 timer etter administrasjon [28, 34, 36].

Hesselink og kollegaer har vist at MPAG skilles ut til galleblæren via en proteintransportør, *multidrug resistance protein 2* (MRP2) som finnes i hepatocytene [41]. Samtidig

koadministrering med ciklosporin er blitt vist å hemme MRP2, med påfølgende nedsatt plasmakonsentrasjon av MPA [41-43]. Denne hemmende effekten på EHC er ikke blitt observert ved koadministrering med takrolimus [41, 43, 44].

Eliminasjon

Over 90 % av administrert dose gjenfinnes i urinen og 6 % i feces, mesteparten som MPAG. Under 1 % skilles ut som MPA i urinen [28, 36].

1.5.4 Individuelle forskjeller i farmakokinetikken til MPA

Det er store individuelle forskjeller i farmakokinetikken til MPA etter oralt opptak [24, 45]. En faktor av betydning som bidrar til store forskjeller mellom individer, er EHC av MPA [24, 36]. Graden av EHC reguleres av blant annet matinntak, genetikk, underliggende sykdom, samtidig medisinerings av andre legemidler og andre (miljø)faktorer [6, 8, 9]. Disse faktorene kan selvfølgelig påvirke ADME direkte og ikke kun via EHC. I denne oppgaven er hovedfokuset EHC av MPA, og det er dette modellen forsøker å beskrive.

I motsetning til en del andre vanlige immunsuppressiva (ciklosporin, takrolimus, sirolimus), er det foreløpig ingen konsensus om hvordan TDM av MPA bør gjennomføres. Noen studier har vist en sammenheng mellom C_0 -konsentrasjoner og AUC [26, 46-48], mens andre studier igjen har ikke klart å vise en slik sammenheng [27, 49-53]. En konsensusrapport fra 2010, der 47 eksperter fra hele verden var samlet for å diskutere blant annet TDM av MPA, kom fram til at TDM basert på LSS for å estimere AUC_{0-12} er bedre enn TDM basert på C_0 -konsentrasjoner [54]. Flere studier har vist at LSS gir en bedre prediksjon av AUC_{0-12} enn C_0 -målinger [50-52, 55-58]. På Rikshospitalet benyttes en LSS der AUC_{0-12} estimeres ut fra tre konsentrasjonsmålinger (C_0 , $C_{0.5}$ og C_2). Anbefalt terapeutisk område er 30 – 60 mg•h/L de 30 første dagene etter transplantasjon [27, 59].

1.6 Mål for oppgaven

Målet med denne oppgaven var å utvikle en ikke-parametrisk farmakokinetisk populasjonsmodell som beskriver EHC av MPA hos levertransplanterte som blir behandlet med takrolimus og steroider i tillegg til MMF. Det skulle utvikles en passende strukturell modell, og en rekke kovariater skulle testes ut i modellen.

2 Materialer og metoder

2.1 Pasientdata

Pasientdata fra 16 levertransplanterte ble benyttet som datagrunnlag for utvikling av populasjonsmodellen. Dataene var fra en studie gjennomført ved Oslo Universitetssykehus HF, Rikshospitalet, der hensikten var å beskrive intra- og interindividuell variasjon i farmakokinetikken til MPA og takrolimus [60]. Det ble utført detaljerte 12-timers farmakokinetikkundersøkelser av hver av pasientene 2 – 4 ganger (undersøkelse I – IV) i den tidlige fasen etter transplantasjon (inntil tre uker). Ved hver undersøkelse ble det tatt blodprøver før (0 timer) og ca. 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 6, 8, 10 og 12 timer etter administrasjon av morgendosen av MMF. Median antall dager etter transplantasjon for undersøkelse I - IV var henholdsvis 4, 9, 14 og 19.5 dager. Tilsammen ble det målt 56 12-timers kinetikkprofiler, som inkluderte totalt 724 blodkonsentrasjoner av MPA, fra de levertransplanterte pasientene. 723 av disse ble benyttet videre i inputfilen (for nærmere beskrivelse, se avsnitt 2.2.2). Alle pasientene ble administrert 1 gram MMF (CellCept™, tabletter, filmdrasjerte 500 mg) morgen og kveld. I tillegg brukte pasientene prednisolon og takrolimus som del av den immunosuppressive behandlingen. Pasientkarakteristika og demografiske data er oppsummert i tabell 2.1 under. For en mer komplett beskrivelse av pasientkarakteristika, demografiske data og inklusjons- og eksklusjonskriterier, refereres det til Sæves og kolleger [60].

Tabell 2.1. Pasientkarakteristika og demografiske data (n = 16)

Pasientkarakteristika	Gjennomsnitt	SD	Median	Intervall
Kjønn (mann/kvinne)	10/6	-	-	-
MMF dose (mg/døgn)	2000	-	2000	-
Alder (år)	52.2	14.7	57	19 - 69
Vekt (kg)	78	15.2	80.5	54.9 - 111.6
Høyde (cm)	176.8	9.4	174.5	160 - 189.5
Takrolimuskonsentrasjon ^b (µg/L)	9.9	6.5	8.4	0 - 42.8
Plasma kreatinin (µmol/L)	73.1	34.9	63	34 - 249
eGFR ^a (mL/min)	107.2	29.6	111.2	29.8 - 181.2
Plasma albumin (g/L)	31.3	4.7	30	20 - 40

a: Estimert glomerulær filtrasjonsrate fra CKD-EPI-formel og Du Bois formel for kroppsoverflate.

b: Gjennomsnitt-/medianverdier fra alle blodprøvene fra kinetikkundersøkelsene.

2.2 Pmetrics

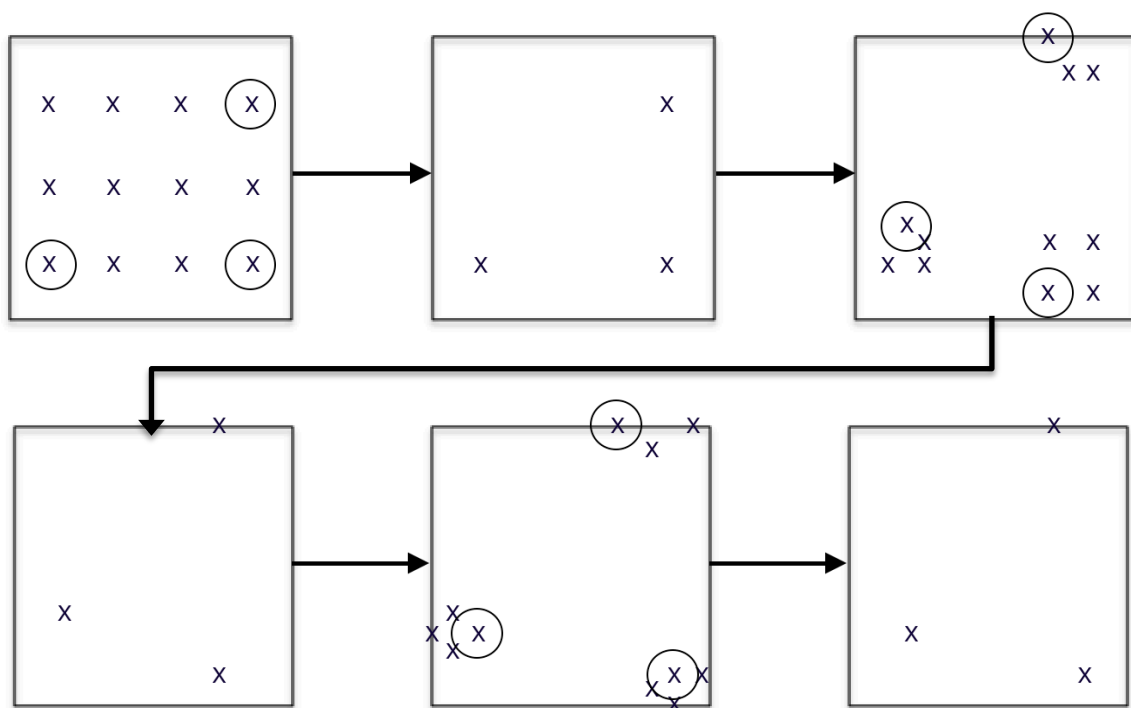
Pmetrics er en tilleggsmodul til R [61, 62]. R er et ”*open source*” programmeringsspråk og -miljø som benyttes til statistisk databehandling og grafisk fremstilling av data [63]. Pmetrics er et bibliotek med metoder og funksjoner som brukes til modellering av både parametrisk og ikke-parametrisk farmakokinetisk-farmakodynamisk populasjonsmodellering og simulering. I denne oppgaven ble Pmetrics versjon 1.3.1 og R 3.1.2 GUI 1.65 benyttet for å bygge opp populasjonsmodellen. I tillegg ble RStudio versjon 0.98.1091 brukt som brukergrensesnitt i arbeidet med modellbyggingen. Alle programmene ble kjørt i Mac OS X El Capitan versjon 10.11.1.

2.2.1 Nonparametric Adaptive Grid

Pmetrics benytter en beregningsmetode kalt *Nonparametric Adaptive Grid* (NPAG), som lager en ”*non-parametric mixed effect*” modell. NPAG bruker en såkalt ”*non-parametric maximum likelihood*”-tilnærming, som i korthet går ut på å estimere den eksakte distribusjonen til parameterne i populasjonen med høyest sannsynlighet. ”*Non-parametric*” vil si at NPAG ikke gjør noen antakelser om formen til de underliggende parameterdistribusjonene, som for eksempel normaldistribusjonen. Dette gjør det lettere å oppdage uventede, ikke-normale eller multimodale subpopulasjoner [18, 64]. I teorien vil derfor ikke-parametrisk modellering ha en fordel over parametrisk modellering i de tilfeller der man har for eksempel en multimodal distribusjon av modellparametere [62, 65]. Den største ulempen med ikke-parametrisk modellering er den manglende evnen til å bestemme konfidensintervallet (KI) for parameterdistribusjonen [17, 64].

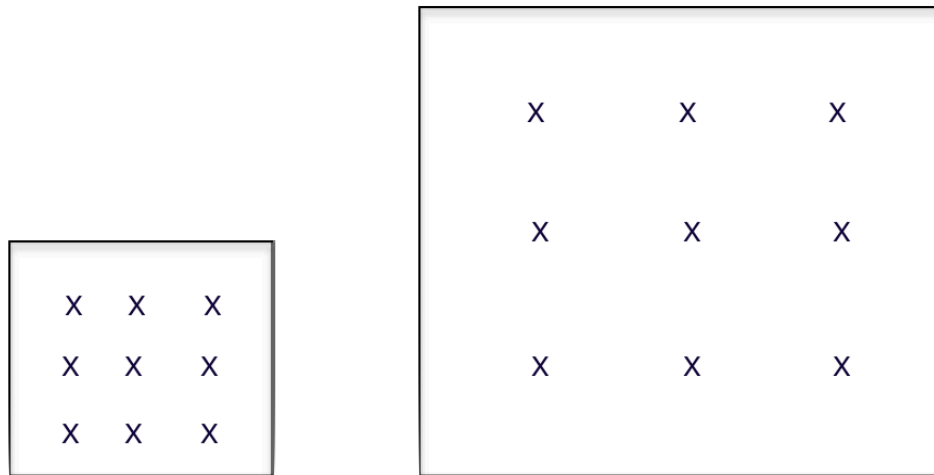
”*Adaptive Grid*”-metoden er måten Pmetrics finner den parametervektoren med høyest sannsynlighet (”*maximum likelihood*”) som beskriver dataene, se figur 2.1. Forenklet kan det tenkes at et todimensjonalt rutenett representerer alle kombinasjonsmulighetene til parametervektoren, bestående av to parametere (tre parametere vil kreve en tredimensjonal kube, og fire eller flere parametere representeres i en teoretisk hyperkube). Det blir kastet ut et gitt antall støttepunkter (”*grid points*”) i rutenettet: $n \times 80\,021$, der n er avhengig av antall tilfeldige parametere. For hvert støttepunkt estimerer Pmetrics en tilhørende sannsynlighetsvekt. Støttepunkter med en lav sannsynlighet blir forkastet, og man sitter igjen med et sett sannsynlige støttepunkter. Fra dette nye, mindre settet av støttepunkter, estimerer Pmetrics nye sannsynlighetsvekter ved å lete i nærheten av de gjenværende støttepunktene.

De minst sannsynlige støttepunktene blir forkastet og prosessen gjentas til det ikke lenger er mulig å finne en høyere sannsynlighet ("maximum likelihood"). Da har modellen konverget. Antall støttepunkter m som står igjen (maksimalt antall er $m = \text{antall testsubjekter}$) og sykluser det tar før modellen konvergerer varierer og er avhengig av kvaliteten på inputdata og kompleksiteten til modellen. Kjøretiden kan derfor ta fra noen minutter for de enkleste, til flere døgn for mer komplekse modeller. Estimater fra den konvergente modellen er det mest sannsynlige gitt foreliggende data [64].



Figur 2.1. Illustrasjon av Adaptive Grid-metoden. Todimensjonal fremstilling av modell med to parametere (en parameter langs X-aksen og den andre langs Y-aksen). X= støttepunkter, O = mest sannsynlige støttepunkter. Når Pmetrics finner de mest sannsynlige verdiene for vektoren av parametere, fjernes de mindre sannsynlige punktene. Pmetrics søker nye punkttestimater rundt de mest sannsynlige punktene fra forrige iterasjon. Slik fortsetter det til modellen har konverget og vi sitter igjen med det mest sannsynlige estimatet.

"Mixed effect" henviser til at modellen bruker både tilfeldige og faste effekter. Tilfeldige effekter består av ulike verdier av modellparametrene (for eksempel K_a , K_e , osv.). For hver parameter angis et intervall av verdier som parameteren kan ha (det er også mulig å angi en fast verdi, men da blir det ikke lenger tilfeldig). Jo mindre intervall, jo mer sannsynlig er det at NAPG-metoden klarer å finne det mest sannsynlige estimatet, gitt det samme antall støttepunkter (høyere tetthet av støttepunkter initialt). For vide parameterintervaller øker sannsynligheten for å potensielt regne seg bort fra den sanne verdien, se figur 2.2 for illustrasjon.



Figur 2.2. Illustrasjon på initial tetthet av støttepunkter. Til venstre: modell med to parametere (en parameter langs X-aksen og den andre langs Y-aksen); X=støttepunkt. Til høyre: samme modell, men med utvidede intervaller for begge parameterne og dermed lavere tetthet. Større rom mellom støttepunktene øker sannsynligheten for å regne seg bort fra det beste estimatet.

Den faste effekten består av feilmodellen. Feilmodellen er bygget opp av et sett med standardavvik som beregnes ut fra pasientdata, og er et mål på datakvaliteten/variasjonen i datasettet (*assay error*). Dette gjøres (helst) av analyselaben som håndterte pasientprøvene [62]. I tillegg bruker feilmodellen enten en *gamma*- eller *lambda*-verdi, som er et uttrykk for annen målestøy, som for eksempel feil måletidspunkt eller feilspesifiserte doser. Lavere verdier av *lambda/gamma* betyr mindre støy. I denne oppgaven er det blitt benyttet en *lambda*-modell, som er en additiv feilmodell for å fange opp øvrig støy (*environmental error*). *Gamma*-modellen er en multiplikativ feilmodell [66].

Pmetrics og NPAG krever to filer for å starte: en inputfil med alle pasientdata fra de tilhørende kinetikkprofilene og en modellfil som beskriver den strukturelle modellen, med tilhørende differensialligninger som beskriver massetransporten av legemiddel mellom og ut av de ulike kompartments.

2.2.2 Inputfil

Inputfilen til Pmetrics ble bygget opp i Excel™ og R. Rådata ble gitt som excel-filer. Disse ble konvertert til CSV-filer (*comma separated values*) som så ble lastet inn i R for videre bearbeiding. Den endelige inputfilen ble opprettet ved hjelp av funksjonen `PMwriteMatrix()` i Pmetrics. Inputfilen måtte oppfylle en rekke krav som er nærmere spesifisert i brukermanualen [66].

Inputfilen besto av pasientdata fra de målte kinetikkprofilene. Det var 16 unike pasienter og hver av pasientene var inne til kinetikundersøkelse 2 – 4 ganger, noe som gav totalt 56 kinetikkprofiler. Pasientene var kodet med ID-nummer. 1.1, 1.2, 1.3 og 1.4 betyr den samme pasienten ved fire ulike undersøkelser. 2.1, 2.2 osv. betyr pasient nummer 2 ved ulike undersøkelser, og tilsvarende helt opp til pasient 16. I denne modellen ble alle 56 kinetikkprofiler modellert som uavhengige observasjoner. Eksempler på data er MMF- og takrolimusdoser, tidspunkter for måling/prøvetaking, plasmakonsentrasjon av MMF og takrolimus, kreatinin- og albuminkonsentrasjoner m.m. For en oversikt over alle pasientdata, se vedlegg 1.

2.2.3 Modellfil

Modellfilen er en enkel tekstfil som i Pmetrics blir konvertert til en Fortran-modellfil. All kode i modellfilen følger dermed vanlig Fortran-syntaks. Modellfilen er strukturert i 12 blokker: *"Primary variables"*, *"Covariates"*, *"Bolus inputs"*, *"Initial conditions"*, *"F"* (*bioavailability*), *"Lag time"*, *"Differential equations"*, *"Outputs"*, *"Error"* og *"Extra"*. For en nærmere beskrivelse av de ulike blokkene og eksempler på utførelsen, refereres det til brukermanualen [66]. Minimumskrav for at en modell skal kjøre, er blokkene:

- *"Primary variables"*: modellparametere som enten estimeres av Pmetrics (ut fra et brukerdefinert intervall) eller faste parameterverdier som fastsettes av brukeren.
- *"Outputs"*: utdata, mengde legemiddel i kompartiment n ved de gitte tidspunktene.
- *"Error"*: parametere som Pmetrics benytter for å bygge opp feilmodellen (1.-, 2.- eller 3. grads polynom).

Modeller med 3 eller flere kompartments krever differensialligninger for å beskrive massetransport mellom kompartments.

2.3 Utvikling av farmakokinetisk populasjonsmodell

I denne oppgaven er massetransporten av MPA og dens metabolitter blitt sett på som én entitet i modellen. Ved å behandle MPA, MPAG og Ac-MPAG som en og samme enhet, forenkles modellen vesentlig uten at masseregnskapet påvirkes. Det er kun i selve modellen denne forenklingen er gjort. I teksten skilles det på de ulike entitetene og deres farmakologiske effekter. Videre er det forutsatt at farmakokinetikken følger en 1. ordens kinetikk, og all modellering er gjort med dette som underliggende betingelse.

I modellutviklingsprosessen ble *Akaike Information Criterion (AIC)*-, *bias*-, *imprecision*- og R^2 -verdier, samt ”*goodness of fit*” (GOF)-plott benyttet som kriterier for valg av modell. AIC er et verktøy for å sammenligne ulike modeller (ulike parametere og/eller struktur) med hverandre og en lavere AIC-verdi antyder en bedre modell. Ludden og kollegaer har vist at AIC kan være et godt verktøy for modellsammenligning [67]. *Bias* sier noe om hvor langt unna estimatet vårt er fra den sanne (eller referanse-) verdien, mens *imprecision* angir spredningen til estimatet vårt. Det er ønskelig med så lav *bias* og *imprecision* som mulig.

Av tidshensyn ble de innledende modellene ikke kjørt til konvergens, men til 100 sykluser. Estimatenes er derfor ikke nødvendigvis de beste/mest sannsynlige, men kan brukes i modellutviklingsprosessen.

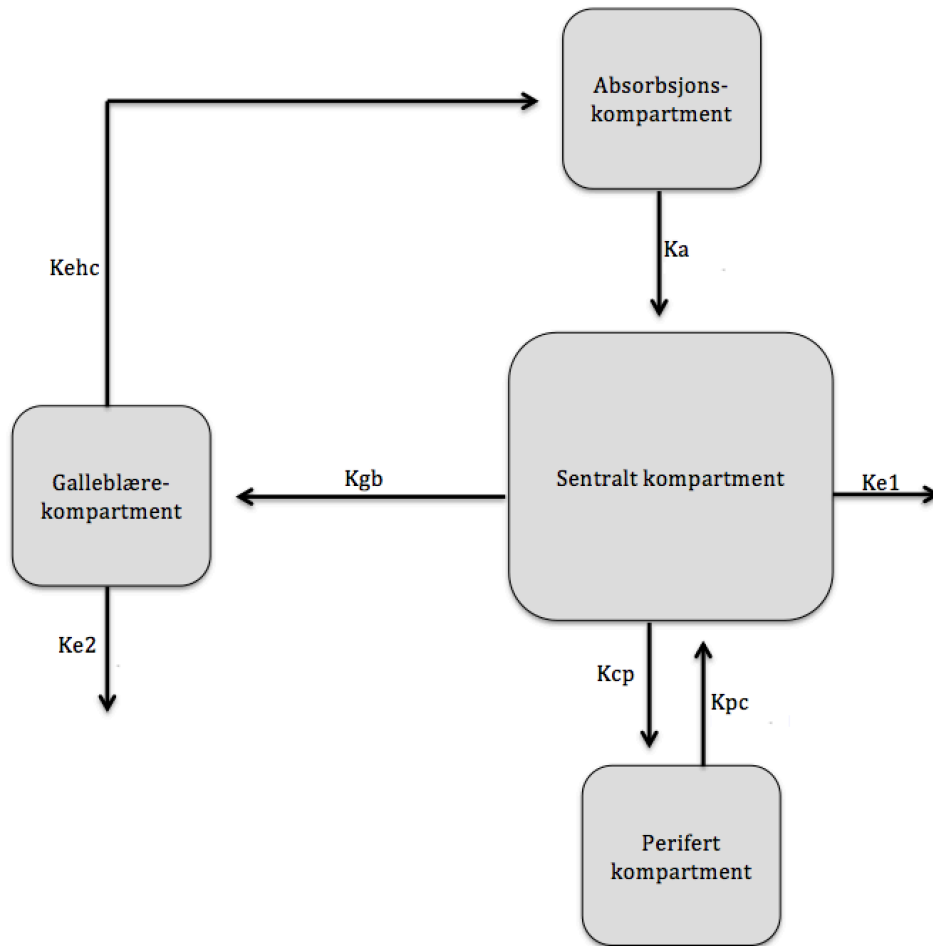
2.3.1 Strukturell modell

Det er flere fremgangsmåter å bygge opp en populasjonsmodell. Utgangspunktet baserer seg ofte på kjente eller teoretiske sammenhenger mellom farmakokinetikken til aktuelt legemiddel og kunnskap om kroppens fysiologiske prosesser med eller uten sykdom. På bakgrunn av denne informasjonen gjøres det en vurdering på modellstrukturen, og i tillegg hvilke parametere og kovariater som best beskriver farmakokinetikken til populasjonen. En modell kan være en ”ren” matematisk modell som ikke har noen direkte fysiologisk sammenheng med hvordan kroppen og legemidlet interagerer, men som allikevel klarer å beskrive sluttresultatet gitt ved sammenhengen mellom dose, tid og plasmakonsentrasjoner (AUC for en gitt dose). En annen tilnærming er å lage en modell som prøver å etterligne kroppens fysiologiske prosesser, noe som kan gjøre modellen mer intuitiv. Samtidig risikeres det at modellen kan bli for kompleks, avhengig av hvilke fysiologiske aspekter det er ønskelig å modellere. Dette er avveininger som må tas hensyn til i modelloppbyggingen.

I denne oppgaven ble det valgt en fysiologisk tilnærming i modelleringen av EHC av MPA. Med utgangspunkt i litteraturen og kunnskap om farmakokinetikken til MPA, ble grunnstrukturen i populasjonsmodellen i første omgang basert på fire kompartments (figur 2.3):

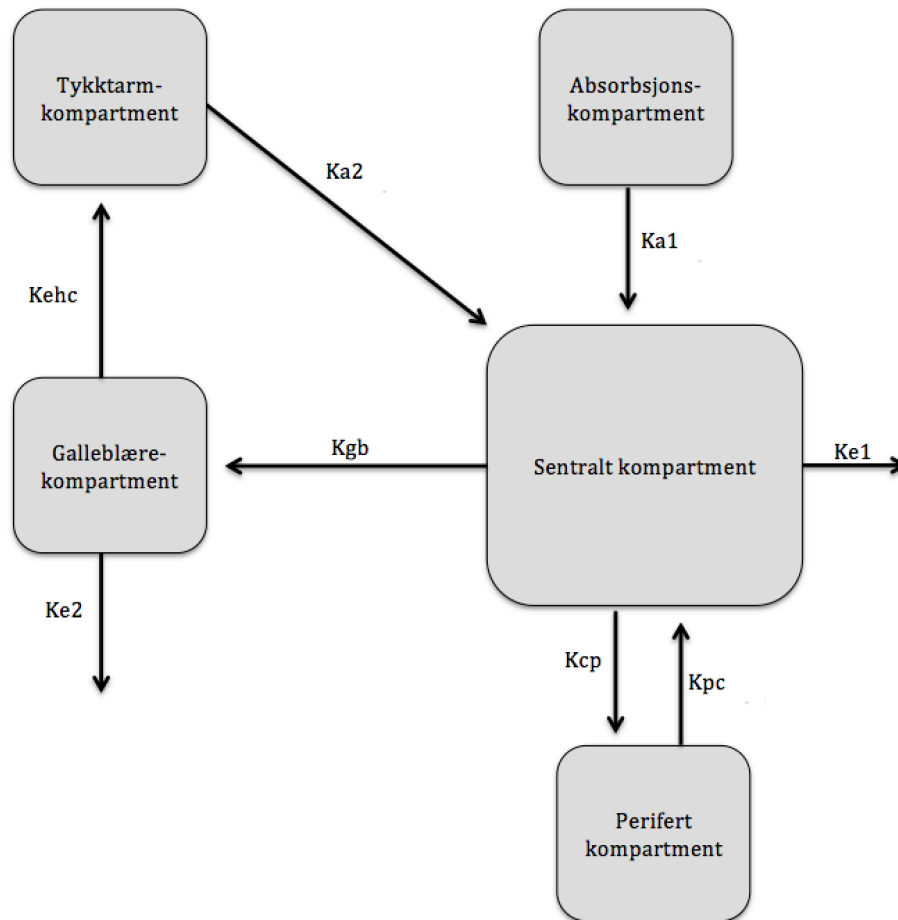
- *Absorpsjonskompartiment*: reservoir av inntatt dose der MPA absorberes fra.
- *Sentralt kompartiment*: en representasjon av systemisk sirkulasjon og organer med høy blodgjennomstrømning, blant annet lever. MPA måles i dette kompartimentet og eliminasjon av MPA skjer via metabolisme til metabolitten MPAG i dette kompartimentet.
- *Perifert kompartiment*: muskel- og fettvev og andre perifere komponenter i kroppen.
- *Galleblærekompartiment*: reservoir av metabolitten MPAG, som senere kan skilles ut til tarmen og dekonjugeres tilbake til MPA og reabsorberes. Noe eliminasjon vil også forekomme fra dette kompartimentet da ikke all MPAG som blir skilt ut i tarmen vil bli reabsorbent.

I denne modellen skjer reabsorpsjon av MPA fra samme absorpsjonskompartiment som ved administrering av oralt MMF, og med samme absorpsjonshastighetsrate.



Figur 2.3. Grunnstruktur 1. K_a : absorpsjonshastighetsrate; K_{cp} : overføringshastighetsrate fra sentralt- til perifert kompartiment; K_{pc} : overføringshastighetsrate fra perifert- til sentralt kompartiment; K_{gb} : overføringshastighetsrate fra sentralt- til galleblærekompartiment; K_{e1} : eliminasjonshastighetsrate fra sentralt kompartiment; K_{e2} : eliminasjonshastighetsrate fra galleblærekompartiment; K_{ehc} : overføringshastighetsrate fra galleblære- til absorpsjonskompartiment.

En annen strukturell modell bygger på samme grunnstruktur som modellen over, men introduserer et nytt kompartiment (figur 2.4). Dette kompartimentet modellerer inn reabsorpsjon via tykktarmen, med en egen tilhørende absorpsjonshastighetsrate.



Figur 2.4. Grunnstruktur 2. Ka1: absorpsjonshastighetsrate; Kcp: overføringshastighetsrate fra sentralt- til perifert kompartiment; Kpc: overføringshastighetsrate fra perifert- til sentralt kompartiment; Kgb: overføringshastighetsrate fra sentralt- til galleblærekompartiment; Ke1: eliminasjonshastighetsrate fra sentralt kompartiment; Ke2: eliminasjonshastighetsrate fra galleblærekompartiment; Kehc: overføringshastighetsrate fra galleblære- til tykktarmkompartiment; Ka2: absorpsjonshastighetsrate fra tykktarmkompartiment.

Som i grunnstruktur 1, blir en andel MPAG transportert fra sentralt kompartiment over til galleblærekompartiment. Men i stedet for at MPAG transporteres tilbake til start/absorpsjonskompartiment, blir det nå transportert til tykktarmkompartiment hvor det skjer en dekonjugering av MPAG tilbake til MPA. Herfra kan MPA reabsorberes tilbake til sentralt kompartiment og det systemiske kretsløpet.

2.3.2 Modellering av enterohepatisk resirkulering

Både grunnstruktur 1 og 2 har inkorporert EHC inn i modellstrukturen.

Modell med EHC

Tidsbestemt EHC ble kontrollert ved hjelp av to estimerte tidsparametere T1 og T2:

$$+IF(T.GT.T1.AND.T.LT.T2) \text{ Kehc0} = \text{Kehc} \quad \text{Uttrykk (i)}$$

der $T =$ ”kontinuerlig” tid, $T1 =$ tid for åpning av galleblære, $T2 =$ tid for lukking av galleblære og $\text{Kehc} =$ overføringshastighetskonstanten fra galleblære- til absorpsjonskompartiment. Med lukket galleblære som utgangspunkt, kontrolleres åpning og påfølgende lukking av galleblæren av $T1$ og $T2$. Tidsintervallet mellom $T1$ og $T2$ er altså den tiden galleblæren er åpen og EHC kan observeres. Utenfor dette tidsintervallet vil galleblæren være lukket og $\text{Kehc0} = 0$. $T1$ og $T2$ er selv brukerdefinerte tidsintervaller som Pmetrics bruker for å beregne de mest sannsynlige åpnings- og stengetidene, gitt våre kinetikkdata.

Modell med to EHC

Farmakokinetikk er et komplekst samspill mellom legemiddel og kroppens fysiologiske funksjoner. Det kan derfor observeres opptil flere EHC-topper i løpet av en 12-timers periode. For å modellere to EHC-topper, ble flere sett tidsintervall undersøkt; $T3$ til $T4$ osv.:

$$+IF(T.GT.T1.AND.T.LT.T2) \text{ Kehc0} = \text{Kehc} \quad \text{Uttrykk (i)}$$

$$+IF(T.GT.T3.AND.T.LT.T4) \text{ Kehc0} = \text{Kehc} \quad \text{Uttrykk (ii)}$$

Denne metoden gir mulighet for prediksjon av to EHC i modellen. Mellom $T2$ og $T3$ vil galleblæren være lukket.

EHC i grunnmodell 2

Erfaringene fra modellutviklingen fra grunnstruktur 1 ble videreført til grunnstruktur 2. De samme metodene for modellering av EHC ble overført til grunnstruktur 2.

2.3.3 Modellering av forsinkelse i absorpsjon

Det er en viss forsinkelsestid fra inntak av MPA til absorpsjon kan observeres. Dette ble testet ut i modellen ved hjelp av både Erlang-distribusjon i absorpsjonsfasen og ved hjelp av en lagtidparameter.

Erlang-distribusjon

Erlang-distribusjon modelleres ved at en rekke transitkompartments med den samme overføringshastighetskonstanten K_t kobles sammen før legemidlet blir absorbert inn i det

sentrale kompartmentet. Disse transitkompartimentene simulerer forsinkelsestid før absorpsjon til sentralt kompartment [68]. I likhet med konseptet distribusjonsvolum, har ikke transitkompartments noen fysiologisk betydning, men er kun et statistisk/matematisk verktøy for å simulere/beskrive forsinkelse i absorpsjon. Modeller ble testet med 1, 2, 3, 4 og 5 transitkompartments.

Lagtidparameter

Lagtid er et tidsrom som defineres av brukeren ved modelloppbyggingen. Lagtiden bestemmer når absorpsjonen starter etter administrasjon av legemiddel. Parameteren kan defineres som en konstant eller som et intervall. I det første tilfellet vil alle individer ha den samme forsinkelsestiden, mens i det andre tilfellet vil Pmetrics selv finne den optimale forsinkelsestiden innen det gitte intervallet for hvert enkelt individ basert på tilgjengelig kinetikkdata.

2.3.4 Modellparametere

Modellparametere defineres av brukeren i modellfilen. Maksimalt antall parametere er 32. Gitt den strukturelle modellen, ble en rekke primære modellparametere testet ut. Alle primære parametere ble angitt med intervaller, og de eksakte verdiene ble estimert av NPAG. Intervallene kan utvides eller innskrenkes, avhengig av resultatene fra modellkjøringene og kroppens fysiologiske begrensninger. Siden oral biotilgjengelighet av MMF ikke var tilgjengelig, er V_d uttrykt som tilsynelatende V_d (V_d/F). Som forklart i avsnitt 2.2.1, er det ønskelig med et så presist parameterintervall som mulig for å maksimere sannsynligheten for at NPAG skal finne det beste estimatet. Dette er en tidkrevende prosess, da hver endring krever en ny NPAG-kjøring. Tabell 2.2 gir en oversikt over alle primære modellparametere og hva de uttrykker:

Tabell 2.2. Oversikt over alle primære modellparametere.

Primære parametere	Beskrivelse (benevning)
Ke1	Eliminasjonshastighetsrate, eliminasjon fra sentral kompartiment (h^{-1})
Ke2	Eliminasjonshastighetsrate, eliminasjon fra galleblæren (h^{-1})
V0	Tilsynelatende distribusjonsvolum (L)
Ka1	Absorpsjonshastighetsrate, absorpsjon fra tynntarm (h^{-1})
Ka2	Absorpsjonshastighetsrate, absorpsjon fra tykktarm (h^{-1})
Kcp	Overføringshastighetsrate, distribusjon av MPA fra sentralt til perifert kompartiment (h^{-1})
Kpc	Overføringshastighetsrate, distribusjon av MPA fra perifert til sentralt kompartiment (h^{-1})
Kgb	Overføringshastighetsrate, distribusjon av MPAG fra lever til galleblære (h^{-1})
Kehc	Overføringshastighetsrate, distribusjon av MPAG fra galleblære tilbake til GI (h^{-1})
T1	Tid for tømning av galleblære (h)
T2	Tid for lukking av galleblære (h)
T3	Tid for tømning av galleblære (h)
T4	Tid for lukking av galleblære (h)
Tlag1	Forsinkelse i absorpsjonen etter administrasjon av oral dose (h)

2.3.5 Kovariater

Valg av kovariater som ble undersøkt i denne analysen var basert på kjente eller teoretisk sannsynlige sammenhenger mellom kovariat og farmakokinetikken til MPA, samt resultater fra tidligere publiserte populasjonsstudier [39, 44, 69-72]. Kriterier for inkludering av kovariater til modellen var AIC-verdier og GOF-plott med tilhørende R^2 -verdi, samt individuelle predikerte AUC-plott. Dersom modellen som helhet ble bedre, kunne en kovariat bli inkludert videre i modellutviklingen selv om den ikke hadde en signifikant effekt på modellen. I likhet med bestemmelse av optimale parameterverdier, er det en tidkrevende prosess å finne alle mulige sammenhenger mellom kovariater og farmakokinetikken til MPA (utforming av ligninger der kovariaten inngår). Alle endringer krever ny NAPG-kjøring. Inkludering av en ny kovariat kan også påvirke eksisterende parameterverdier, som da må

korrigeres. Alle kovariatene i tabell 2.3 med unntak av IC ble sentralisert med følgende fremgangsmåte:

Sentralisert kovariat = individets kovariatverdi dividert på populasjonsgjennomsnittsverdi.

Tabell 2.3. Oversikt over alle kovariater som ble testet i modellutviklingsprosessen.

Kovariat	Beskrivelse
IC	<i>Initial conditions</i> (mg/L). Angir hvor mye legemiddel som var i kroppen før ny dose ble administrert.
WGT	Kroppsvekt (kg). Denne ble undersøkt og testet mot alle hastighetsrater (absorpsjon-, eliminasjon- og overføring). I tillegg ble WGT testet mot distribusjonsvolum.
TACKONS	Takrolimuskonsentrasjon ($\mu\text{g/L}$). Det ble undersøkt om denne kunne påvirke eliminasjonen av MPA.
EGFR	Estimert glomerulær filtrasjonsrate (mL/min). Basert på CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration) formelen, justert for kroppsoverflate ved Du Bois formel. Estimeres fra pasientenes plasmakreatinin, kjønn, alder, vekt og høyde. Det ble undersøkt om EGFR hadde en påvirkning på eliminasjonen av MPA.
AGE	Alder (år). Det ble undersøkt om AGE påvirker eliminasjonen av MPA.
ALBUMIN	Konsentrasjon av plasmaalbumin (g/L). Denne ble undersøkt for påvirkning av distribusjonsvolum og eliminasjon av MPA.

2.4 Validering

2.4.1 Intern validering

Den interne validering av modellen ble gjort ved bruk av *bias* og *imprecision*, samt observerte versus predikerte populasjonsplott (OP-plott) og individuelle AUC-plott.

2.4.2 Ekstern validering

På grunn av oppgavens omfang og tidsbegrensninger, i tillegg til mangel på et passende datasett til ekstern validering, ble denne delen ikke utført.

2.4.3 Statistikk

På grunn av den ikke-parametriske tilnærmingen i denne modelleringsoppgaven, var det ikke nødvendig å teste data for normalitet. Alle andre statistiske beregninger var utført i R 3.1.2.

3 Resultater

3.1 Strukturelle modeller

Tabell 3.1 viser resultatene (individuelt observerte versus predikerte konsentrasjoner) fra de innledende kjøringene fra utvalgte sentrale modeller i modellutviklingsforløpet.

Modell 1 med grunnstruktur 1 med fire kompartments (absorpsjons-, sentralt-, perifert- og galleblærekompartment), men uten spesifikke betingelser for åpning og lukking av galleblære, klarte ikke å beskrive EHC. Individuelle AUC-plott viste at modellen kun predikerte én topp, og flere av plottene viste en oppadgående kurve etter 12 timer.

Etter innføringen av uttrykk (i) og (ii), klarte modellene (modell 2 – 5) med grunnstruktur 1 å beskrive EHC. Inkludering av forsinkelse i absorpsjon (transitkompartments og/eller lagtidparameter) forbedret modellene (modell 3 – 5) ytterligere. Modell 6 med grunnstruktur 2 (tillegg av eget tykktarmkompartment) med samme betingelser for åpning og lukking av galleblære, samt forsinkelse i absorpsjon klarte også å beskrive EHC.

Modell 1 uten betingelser for åpning og lukking av EHC gjorde det dårligst med høyest AIC-verdi og laveste forklaringsevne (R^2 -verdi). Modellen blir gradvis bedre ved å introdusere betingelser for EHC og forsinkelse i absorpsjonen. Modell 6 med eget tykktarmkompartment og tilhørende absorpsjonshastighetsrate ga det beste resultatet. Videre modellutvikling ble derfor basert på grunnstruktur 2.

Tabell 3.1. Innledende resultater. Individuelt observerte versus predikerte konsentrasjoner.

Modell	R2	Slope	Bias	Imprecision	AIC	Beskrivelse
1	0.894	1.03	0.0834	0.957	1918	Grunnstruktur 1, EHC via galleblære tilbake til absorpsjonskompartment. Ingen spesifikke betingelser for åpning og lukking av galleblære.
2	0.915	0.987	-0.0864	0.876	1759	Grunnstruktur 1. Åpning og lukking av galleblære.
3	0.925	1.03	-0.026	0.804	1653	Grunnstruktur 1. 2 ganger åpning og lukking av galleblære. Transitabsorpsjon
4	0.92	1.02	-0.0781	1.09	1630	Grunnstruktur 1. 2 ganger åpning og lukking av galleblære. Lagtid i absorpsjon
5	0.934	0.985	-0.0753	0.793	1540	Grunnstruktur 1. 2 ganger åpning og lukking av galleblære. Lagtid og transitabsorpsjon
6	0.953	1.01	-0.0599	0.776	1488	Grunnstruktur 2, EHC via galleblære til tykktarmkompartment og tilbake til sentral kompartment. Lagtid i absorpsjon.

3.2 Testing av kovariater

Tabell 3.2 viser resultater fra et utvalg modeller fra kovariattesting etter at den strukturelle modellen var bestemt. Etter inkludering av ny kovariat i modellen, ble det etter endt NPAG-kjøring justert parameterintervaller og/eller måten kovariaten påvirket farmakokinetikken til MPA. I tabellen under er kun de modellene med lavest AIC for hver kovariat tatt med.

Tabell 3.2. Oversikt over utvalgte modeller fra kovariattesting (laveste AIC).

Modell	Kovariat	Beskrivelse	AIC	Bias ^a	Imprecision ^a
7	WGT	$V = V_0 * WGT^{**0.75}$	1433	-0.0679	0.748
8	IC	$X(2) = V_0 * IC$	1586	-0.0431	0.751
9	WGT + IC	$V = V_0 * WGT^{**0.75}$ $X(2) = V * IC$	1404	-0.057	0.754
10	WGT + IC	$Ke1c = (Ke1 / (WGTc^{**0.25}))$ $Ke2c = (Ke2 / (WGTc^{**0.25}))$ $V = V_0 * WGTc$ $X(2) = V * IC$	1456	-0.0381	0.749
11 ^b	WGT	$Ke1c = Ke1 / WGTc$ $Ke2c = Ke2 / WGTc$	1404	-0.11	0.659
12 ^b	WGT	$Ka1c = Ka1 / WGTc$ $Ka2c = Ka2 / WGTc$	1447	-0.0558	0.719
13 ^b	WGT	$Kcp / WGTc$ $Kpc / WGTc$	1464	-0.0568	0.751
14 ^b	TACKONS	$Ke1c = Ke1 / TACc$ $Ke2c = Ke2 / TACc$	1516	-0.118	1.4
15 ^b	WGT + TACKONS	$Ke1c = (Ke1 / TACc) / (WGTc^{**0.25})$ $Ke2c = (Ke2 / TACc) / (WGTc^{**0.25})$	1507	-0.08	1.36
16 ^b	EGFR	$Ke1c = Ke1 * EGFRc$ $Ke2c = Ke2 * EGFRc$	1514	-0.0895	0.794
17 ^b	AGE	$Ke1c = Ke1 / AGEc$ $Ke2c = Ke2 / AGEc$	1522	-0.0324	0.72
18 ^b	ALBUMIN	$Ke1c = Ke1 / ALBc$ $Ke2c = Ke2 / ALBc$	1474	-0.0885	1.51

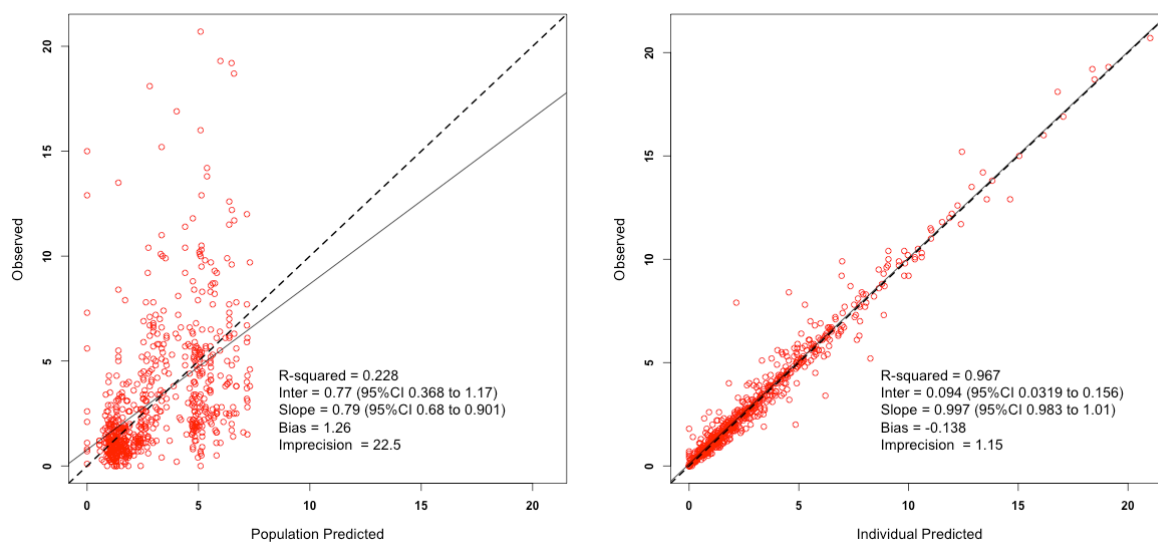
a: Verdiene er rapportert fra de individuelle predikerte resultatene.

b: Modellen inneholder parameterestimaterne $V = V_0 * WGTc$ og $X(2) = V * IC$ fra modell 10, men ikke tatt med i beskrivelsen.

3.3 Resultater fra endelige modeller

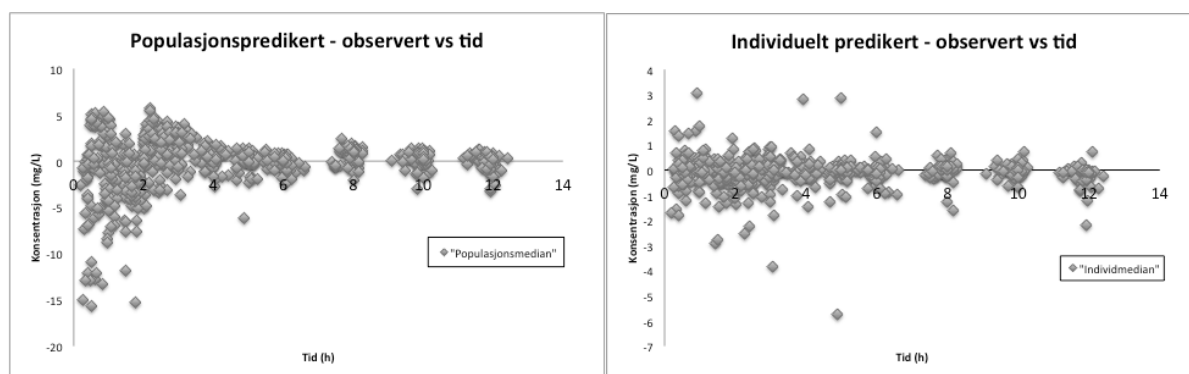
3.3.1 Endelig modell uten kovariater

Modellen uten kovariater (se vedlegg 2 for fullstendig modellfil) konvergente etter 11.287 sykluser med 56 støttepunkter. Figur 3.1 under viser observerte versus predikerte konsentrasjonsplott (OP-plott). Populasjons OP-plottet hadde en lav R^2 -verdi = 0.228 og høy *imprecision* = 22.5. Individ OP-plottet viste veldig gode resultater og hadde en R^2 -verdi = 0.967 i tillegg til lave verdier av *bias* og *imprecision*, henholdsvis -0.138 og 1.15. Individ OP-plottet viste en svak, ikke-signifikant tendens til overprediksjon med en helning på 0.977; 95 % KI (0.983 – 1.01).



Figur 3.1. Endelig modell uten kovariater. Populasjon OP-plott (t.v.) og individ OP-plott (t.h.).

Figur 3.2 viser Bland-Altman plott der differansen mellom observert og predikert konsentrasjon ble plottet mot tid etter administrasjon av MMF. For de populasjonspredikerte konsentrasjonene var det en tendens til underprediksjon de første to timene etter administrering, selv om modellen totalt sett overpredikerer. Det så også ut til å være en større variasjon de 2-3 første timene (absorpsjonsfasen) sammenlignet med resten av tidsforløpet. De individuelt predikerte konsentrasjonene viste en lavere og mer stabil variasjon over hele tidsforløpet, men med enkelte avvik.



Figur 3.2. Bland-Altman plott. Differansen mellom observert og predikert konsentrasjon mot tid.

Populasjonsparameterne fra den endelige modellen uten kovariater vises under i tabell 3.3. Det var stor variasjon mellom støttepunktene for mange av parameterne. For noen få parametere var det også en betydelig forskjell mellom aritmetisk gjennomsnitt og median. Det viste seg distribusjonen var sterkt høyreskjev for disse parameterne, noe som forklarer den store forskjellen i gjennomsnitt og median.

Tabell 3.3. Populasjonsparameterne for endelig modell uten kovariater.

Parameter	Gjennomsnitt	SD	CV(%)	Median
Ke1	0.496	0.745	150.068	0.201
Ke2	1.049	1.484	141.487	0.651
V0	29.484	20.517	69.586	25.861
Ka1	3.216	2.705	84.130	2.120
Ka2	6.975	3.762	53.933	9.961
Kcp	5.078	2.749	54.128	5.042
Kpc	2.251	2.862	127.143	1.212
Kgb	3.071	2.186	71.196	3.086
T1	2.597	1.334	51.349	1.933
T2	3.627	1.278	35.251	3.284
T3	7.618	1.306	17.141	7.519
T4	11.078	1.346	12.147	11.740
Kehc	25.678	7.136	27.790	29.979
Tlag1	0.426	0.234	54.915	0.392

Tabell 3.4 og 3.5 viser resultatene fra alle 56 observerte versus predikerte AUC_{0-12} . For de observerte konsentrasjonene hadde testsubjektene et aritmetisk gjennomsnitt og median på henholdsvis 27.0 -og 23.9 mg h/L. De tilsvarende estimatene for de predikerte individuelle AUC_{0-12} var 26.7- og 24.9 mg h/L for modellen uten kovariater.

Tabell 3.4. Observert AUC₀₋₁₂ og predikert AUC₀₋₁₂ (endelige modell uten kovariater) for alle subjektene.
AUC ble estimert med funksjonen makeAUC i Pmetrics og beregnet etter trapesmetoden (lineær).

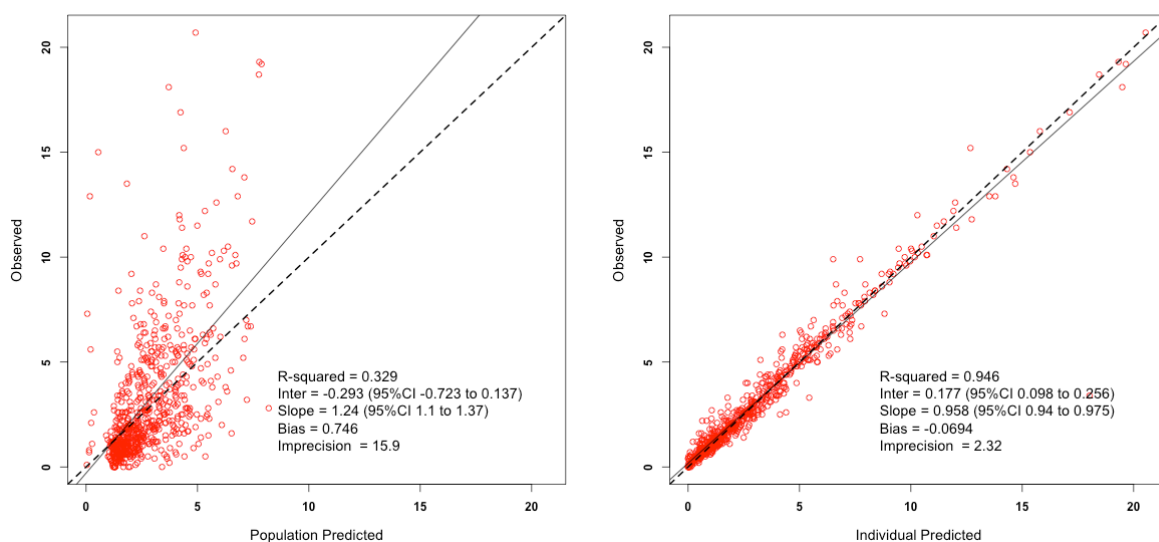
ID	Observed AUC ₀₋₁₂ (mg h/L)	Predicted AUC ₀₋₁₂ (mg h/L)	Avvik (%)	ID forts.	Observed AUC ₀₋₁₂ (mg h/L) forts.	Predicted AUC ₀₋₁₂ (mg h/L) forts.	Avvik (%) forts.
1.1	11.30	10.58	-6.3%	9.1	23.58	21.22	-10.0%
1.2	15.68	11.63	-25.8%	9.2	27.12	25.23	-7.0%
2.1	34.04	35.99	5.7%	9.3	33.38	34.49	3.3%
2.2	40.76	40.42	-0.8%	9.4	33.86	32.80	-3.1%
2.3	46.63	47.53	1.9%	10.1	32.77	31.29	-4.5%
2.4	49.77	59.42	19.4%	10.2	35.79	32.12	-10.2%
3.1	31.64	31.82	0.6%	10.3	56.27	51.34	-8.8%
3.2	32.14	31.30	-2.6%	11.1	17.86	18.82	5.4%
3.3	33.66	33.57	-0.3%	11.2	18.28	18.35	0.4%
3.4	18.69	19.52	4.4%	11.3	22.39	23.56	5.2%
4.1	24.10	25.49	5.8%	12.1	19.10	16.28	-14.8%
4.2	15.71	17.28	10.0%	12.2	14.10	13.59	-3.6%
4.3	14.30	15.26	6.7%	12.3	29.49	28.77	-2.4%
4.4	14.52	12.46	-14.1%	13.1	26.08	25.49	-2.2%
5.2	17.72	21.18	19.5%	13.2	23.55	24.24	2.9%
5.3	23.44	22.59	-3.6%	13.3	35.33	34.39	-2.7%
5.4	23.73	21.48	-9.5%	13.4	40.80	38.41	-5.9%
6.1	31.99	30.19	-5.6%	14.1	26.46	27.30	3.2%
6.2	32.51	34.24	5.3%	14.2	35.15	31.92	-9.2%
6.3	36.43	35.19	-3.4%	14.3	37.87	35.11	-7.3%
6.4	53.81	52.60	-2.2%	15.1	32.63	32.44	-0.6%
7.1	8.40	8.99	7.0%	15.2	23.12	22.96	-0.7%
7.2	12.27	13.00	6.0%	15.3	19.34	17.55	-9.3%
7.3	18.51	18.92	2.2%	15.4	29.39	29.69	1.0%
7.4	22.89	25.64	12.0%	16.1	23.22	22.64	-2.5%
8.1	16.85	21.23	26.0%	16.2	18.77	20.03	6.7%
8.2	20.77	20.61	-0.8%	16.3	21.20	20.07	-5.3%
8.3	27.29	24.60	-9.9%	16.4	22.83	21.35	-6.4%

Tabell 3.5. Sammendrag individuelle AUC₀₋₁₂ fra endelig modell uten kovariater.

	Observed (mg h/L)	Predicted (mg h/L)
Max	56.3	59.4
Min	8.4	9.0
Average	27.0	26.7
Median	23.9	24.9
SD	10.5	10.6

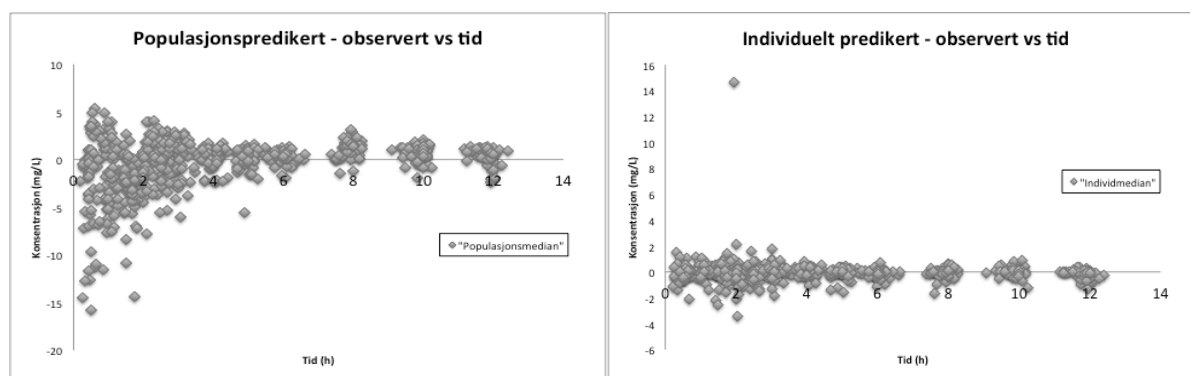
3.3.2 Endelig modell med kovariater

Den endelige modellen med kovariater (se vedlegg 2 for fullstendig modellfil) konvergente etter 11.075 sykluser med 56 støttepunkter. Figur 3.3 under viser de endelige resultatene fra populasjonsmodellen med kovariater. Modellen med kovariater gjorde det noe bedre enn modellen uten kovariater på populasjonsnivå. Imidlertid vil begge modellene ha utfordringer med prediksjon av nye pasienter på populasjonsnivå. Individuelle prediksjoner var gode, med $R^2 = 0.946$, $bias = -0.0694$ og $imprecision = 2.32$. Individ OP-plottet viste at modellen hadde gode prediksjoner, men gav en svak overprediksjon (helning = 0.958; 95 % KI (0.94 – 0.975)).



Figur 3.3. Endelig modell med kovariater. Populasjon OP-plott (t.v.) og individ OP-plott (t.h.).

Bland-Altman plottet for populasjonspredikerte konsentrasjoner viste samme mønster som for modellen uten kovariater, med større variasjon i begynnelsen som flatet ut med tiden (figur 3.4). Også denne modellen viste en tendens til underprediksjon de første 3 timer etter administrasjon av MMF. De individuelt predikerte konsentrasjonene hadde samme mønster som for modellen uten kovariater. Den ekstreme uteliggeren/overprediksjonen tilhørte pasient 6.3.



Figur 3.4. Bland-Altman plott. Differansen mellom observert og predikert konsentrasjon mot tid.

Tabell 3.6 viser populasjonsparameterne for den endelige modellen med kovariater. I likhet med modellen uten kovariater, var det stor variasjon i parameterverdiene mellom støttepunktene.

Tabell 3.6. Populasjonsparametere for endelig modell med kovariater.

Parameter	Gjennomsnitt	SD	CV (%)	Median
Ke1	0.521	0.825	158.436	0.154
Ke2	1.170	1.646	140.633	0.660
V0	32.147	20.575	64.002	31.215
Ka1	2.675	1.850	69.170	1.878
Ka2	6.828	3.871	56.690	9.670
Kcp	4.160	2.606	62.634	4.619
Kpc	2.440	3.309	135.646	0.633
Kgb	2.415	1.908	79.010	1.735
T1	2.537	1.279	50.425	1.919
T2	3.362	1.230	36.595	3.163
T3	7.760	1.401	18.060	7.581
T4	10.982	1.483	13.505	11.658
Kehc	25.203	7.681	30.478	29.974
Tlag1	0.499	0.393	78.609	0.389

Tabell 3.7 og 3.8 viser resultatene fra alle 56 observerte versus predikerte AUC_{0-12} . For de observerte konsentrasjonene hadde testsubjektene et aritmetisk gjennomsnitt og median på henholdsvis 27.0- og 23.9 mg h/L. De tilsvarende estimatene for de predikerte individuelle AUC_{0-12} var 27.7- og 24.6 mg h/L for modellen med kovariater.

Tabell 3.7. Observert AUC₀₋₁₂ og predikert AUC₀₋₁₂ (endelig modell med kovariater) for alle subjektene.
AUC ble estimert med funksjonen makeAUC i Pmetrics og beregnet etter trapesmetoden (lineær).

ID	Observed AUC ₀₋₁₂ (mg h/L)	Predicted AUC ₀₋₁₂ (mg h/L)	Avvik (%)	ID forts.	Observed AUC ₀₋₁₂ (mg h/L) forts.	Predicted AUC ₀₋₁₂ (mg h/L) forts.	Avvik (%) forts.
1.1	11.30	10.25	-9.3%	9.1	23.58	24.03	1.9%
1.2	15.68	13.95	-11.0%	9.2	27.12	31.77	17.2%
2.1	34.04	34.95	2.7%	9.3	33.38	32.85	-1.6%
2.2	40.76	39.33	-3.5%	9.4	33.86	63.65	88.0%
2.3	46.63	55.24	18.5%	10.1	32.77	32.01	-2.3%
2.4	49.77	53.98	8.5%	10.2	35.79	34.80	-2.8%
3.1	31.64	31.38	-0.8%	10.3	56.27	54.17	-3.7%
3.2	32.14	33.62	4.6%	11.1	17.86	19.31	8.1%
3.3	33.66	32.51	-3.4%	11.2	18.28	19.19	4.9%
3.4	18.69	18.90	1.1%	11.3	22.39	26.34	17.6%
4.1	24.10	23.90	-0.8%	12.1	19.10	15.85	-17.0%
4.2	15.71	17.24	9.8%	12.2	14.10	12.89	-8.6%
4.3	14.30	14.55	1.8%	12.3	29.49	22.99	-22.0%
4.4	14.52	12.78	-12.0%	13.1	26.08	26.87	3.0%
5.2	17.72	16.59	-6.4%	13.2	23.55	20.47	-13.1%
5.3	23.44	22.91	-2.2%	13.3	35.33	31.85	-9.8%
5.4	23.73	25.64	8.0%	13.4	40.80	39.44	-3.3%
6.1	31.99	33.72	5.4%	14.1	26.46	31.50	19.0%
6.2	32.51	34.72	6.8%	14.2	35.15	37.37	6.3%
6.3	36.43	47.67	30.8%	14.3	37.87	39.23	3.6%
6.4	53.81	50.18	-6.7%	15.1	32.63	30.86	-5.4%
7.1	8.40	7.91	-5.8%	15.2	23.12	21.23	-8.2%
7.2	12.27	13.85	12.9%	15.3	19.34	17.96	-7.1%
7.3	18.51	19.71	6.5%	15.4	29.39	23.93	-18.6%
7.4	22.89	24.91	8.8%	16.1	23.22	24.28	4.5%
8.1	16.85	16.98	0.8%	16.2	18.77	18.24	-2.8%
8.2	20.77	22.20	6.9%	16.3	21.20	19.34	-8.8%
8.3	27.29	26.73	-2.1%	16.4	22.83	21.33	-6.5%

Tabell 3.8. Sammendrag AUC₀₋₁₂ fra endelig modell med kovariater.

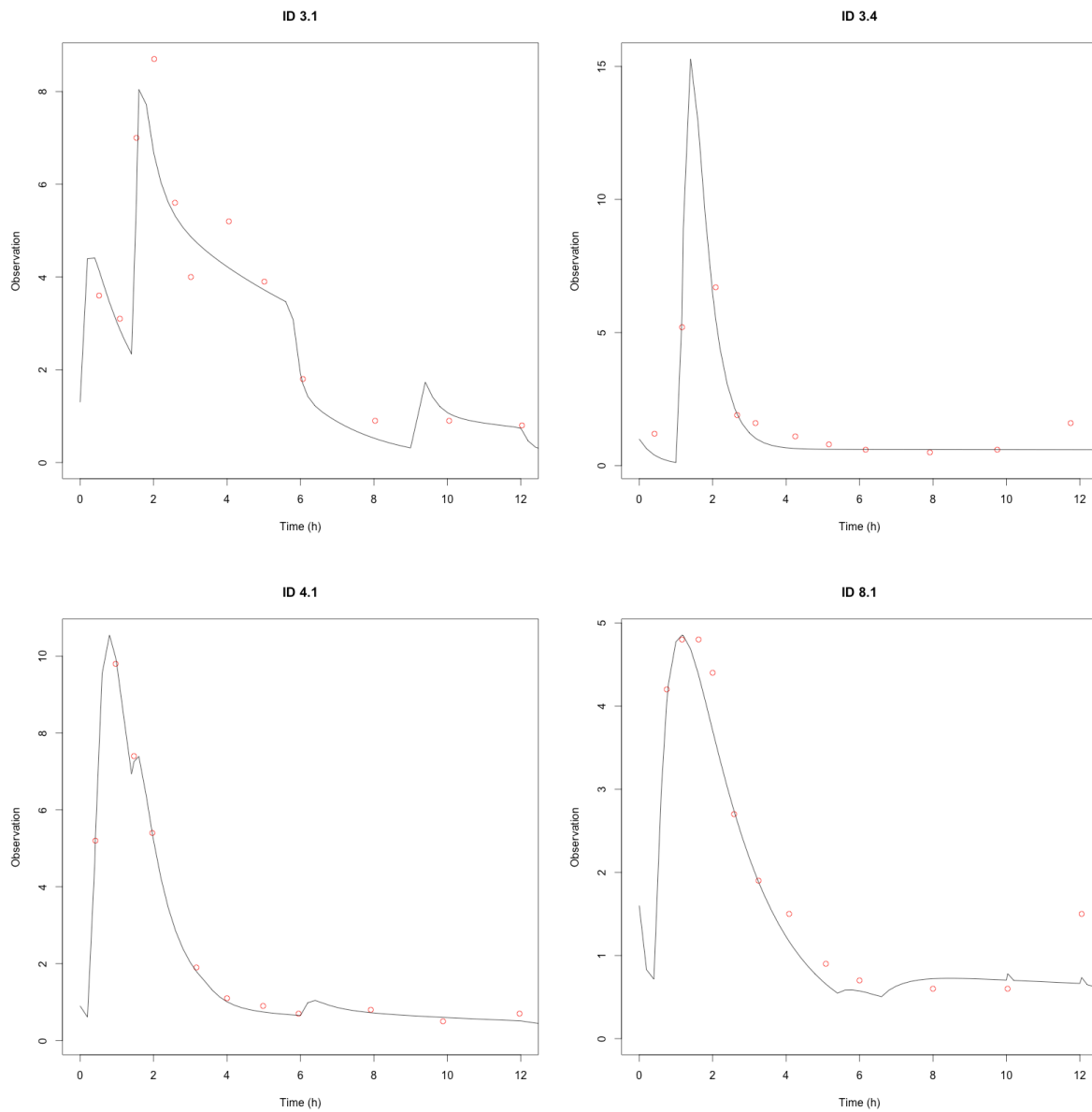
	Observed AUC ₀₋₁₂ (mg h/L)	Predicted AUC ₀₋₁₂ (mg h/L)
Max	56.3	63.6
Min	8.4	7.9
Gjennomsnitt	27.0	27.7
Median	23.9	24.6
SD	10.5	12.2

Tabell 3.9 viser at det var lite som skilte mellom modellenes individuelle prediksjoner. Begge hadde relativt høye SD, men dette skyldtes den store variasjonen i observasjonene og ikke modellens prediksjonsevne.

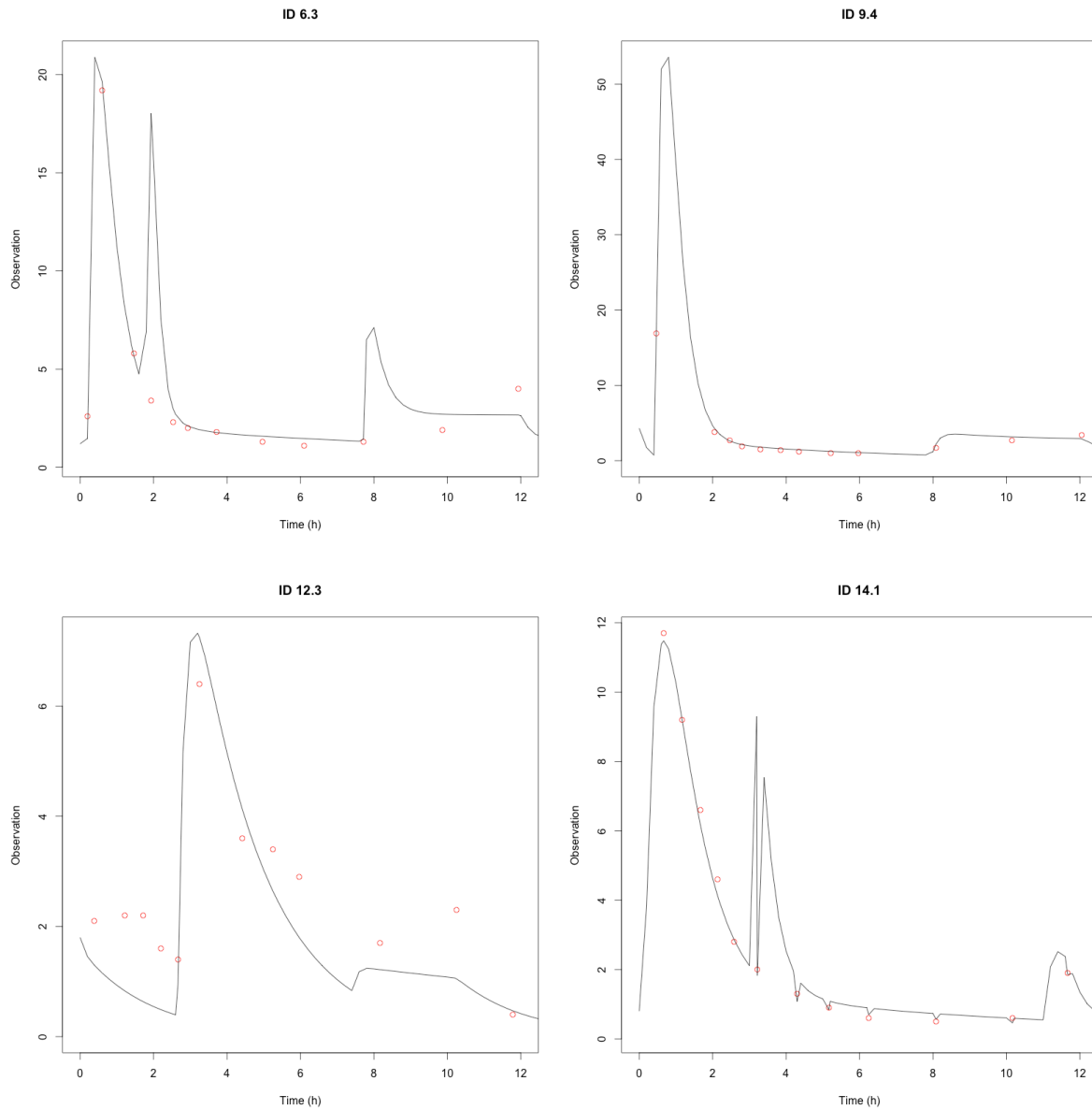
Tabell 3.9. Sammenligning mellom individuelle observerte og predikerte AUC_{0-12}

	Observert AUC_{0-12} (mg h/L)	Predikert AUC_{0-12} (mg h/L)	
		Uten kovariater	Med kovariater
Max	56.3	59.4	63.6
Min	8.4	9.0	7.9
Gjennomsnitt	27.0	26.7	27.7
Median	23.9	24.9	24.6
SD	10.5	10.6	12.2

Figur 3.5 og 3.6 viser henholdsvis de fire beste og dårligste prediksjonene for testsubjektene fra modellen med kovariater. Best/dårligst var basert på prosentvis avvik mellom predikert og observert AUC_{0-12} beregnet etter trapesmetoden, i tillegg til visuell sjekk av plottene.

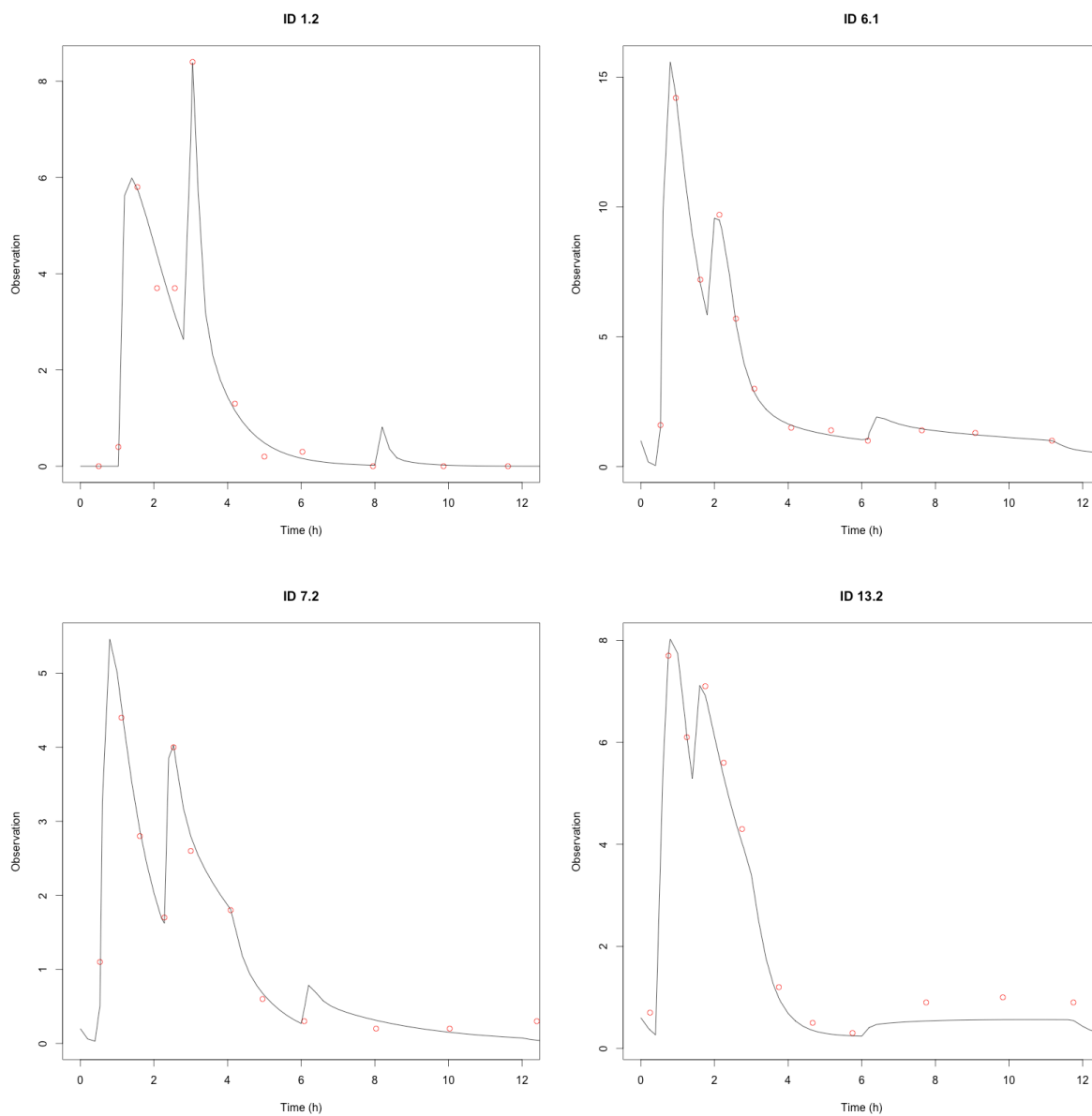


Figur 3.5. De fire beste individuelle predikerte AUC_{0-12} -plottene (svart kurve). Basert på avvik mellom predikert og observert AUC_{0-12} . Sirklene er de faktisk observerte konsentrasjonene.



Figur 3.6. De fire dårligste individuelle predikerte AUC_{0-12} -plottene (svart kurve). Basert på avvik mellom predikert og observert AUC_{0-12} . Sirklene er de faktisk observerte konsentrasjonene.

Det ble totalt 56 individuelle predikerte AUC_{0-12} -plott. Ikke alle viste EHC og tilhørende sekundære topper. Figur 3.7 viser fire eksempler på hvordan EHC så ut hos testsubjektene.



Figur 3.7. Eksempler på individuelle predikerte AUC_{0-12} -plottene (svart kurve) med observert EHC. Sirkelene er de faktisk observerte konsentrasjonene.

4 Diskusjon

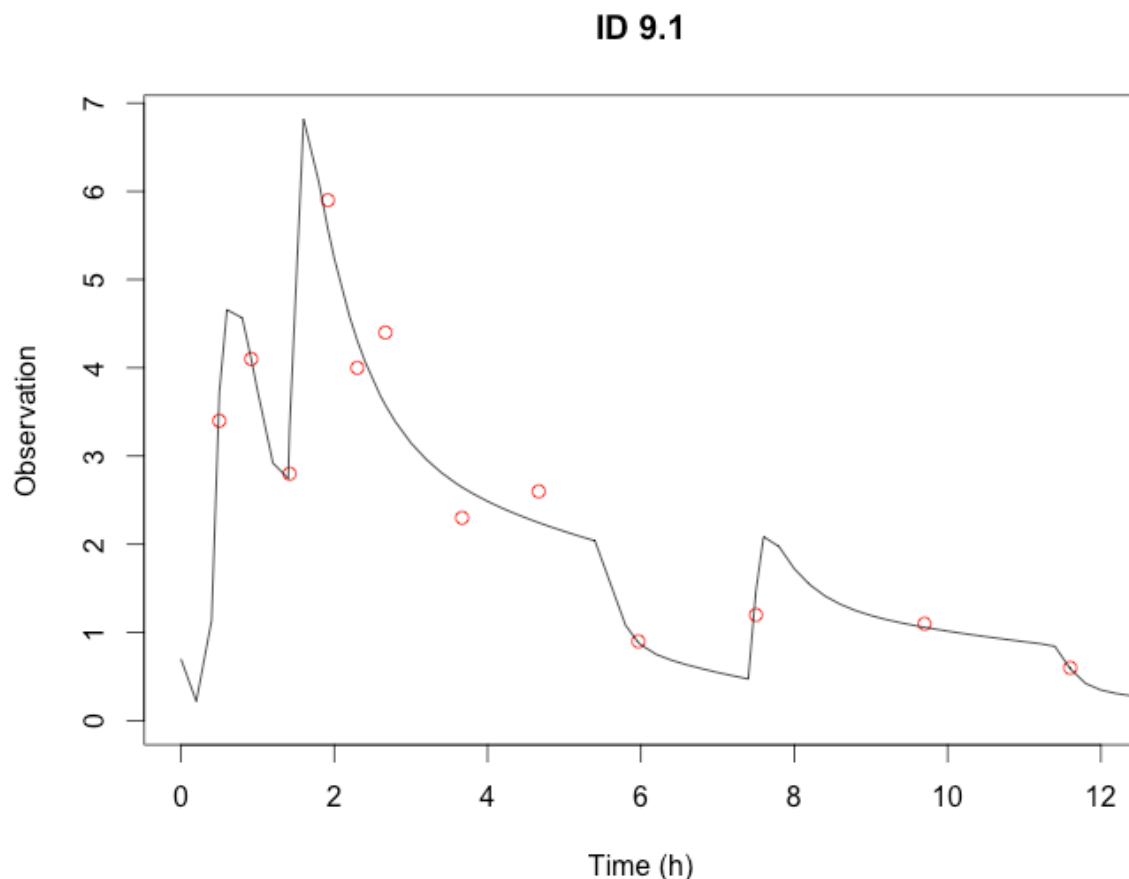
Både populasjonsmodellen med og uten kovariater klarte å beskrive EHC hos levertransplanterte pasienter som ble koadministrert med takrolimus og prednisolon. Modellen med kovariater vil som forventet være bedre på å predikere MPA konsentrasjon hos pasienter før blodkonsentrasjoner er inkludert for den enkelte pasient. Individuelle prediksjoner når alle MPA konsentrasjoner var tilgjengelige, var likeverdige mellom modellen med og uten kovariater. Det var stor variasjon i parameterverdier mellom testsubjektene. Så vidt undertegnede bekjent, er dette den første ikke-parametriske populasjonsmodellen som forsøker å beskrive farmakokinetikken til MPA med EHC hos levertransplanterte. Resultatene fra denne modelleringsoppgaven viste at det var mulig å beskrive flere EHC-topper hos individet, men at det fremdeles gjenstår en del arbeid med hensyn på å finne kovariater som vil kunne forklare individuell tidspunkt og grad av EHC.

4.1 Pasientdata

Enkelte av kinetikkprofilene viste seg å være meget volatile, med tilsynelatende uregelmessige fall og stigninger i konsentrasjonsmålingene over tid (se figur 4.1 for eksempel). Om dette skyldes unøyaktigheter i prøveopparbeiding osv., eller om det er et uttrykk for den komplekse kinetikken til MPA, vites ikke. Av denne grunn ble derfor alle observasjonene med ett unntak benyttet i arbeidet med modelloppbyggingen. Siste observasjon for pasient 11.2 ble fjernet fra datasettet. Grunnen til dette var at det ble målt en konsentrasjon på 9.9 mg/L 12 timer etter doseadministrasjon, noe som var den høyeste konsentrasjonsmålingen for denne pasienten. Forklaringen på dette var at pasienten fikk administrert 1 g MMF én time tidligere enn normal doseringstidspunkt, og var derfor ikke sammenlignbar med resten av datamaterialet der dosene ble gitt med 12 timers intervaller.

Datagrunnlaget for modellen kommer fra kun 16 levertransplanterte pasienter. Det er dermed ikke sikkert at utvalget vårt er representativt for hele populasjonen. Mangel på korrelasjon mellom kovariat og modellparametere i utviklingsprosessen kan skyldes for få testsubjekter. Bullingham og kolleger fant i sine forsøk at sekundær topp i AUC som regel kom mellom 6 og 12 timer etter administrering [36]. For våre kinetikkdata, er det nettopp i dette tidsrommet

at konsentrasjonsmålingene er mest sparsommelige med to timer mellom hver måling. Det hadde vært ønskelig med noen kinetikkprofiler med rikere data fra dette tidsrommet.



Figur 4.1. Eksempel på volatile konsentrasjonsmålinger. Sirklene er de faktiske observerte konsentrasjonene. Den sorte kurven er den predikerte kurven fra den endelige modellen med kovariater.

4.2 Valg av strukturell modell

4.2.1 Tidligere populasjonsmodeller med EHC

I denne oppgaven var målet å beskrive EHC av MPA hos levertransplanterte pasienter. Både litteraturen og data fra denne oppgaven viste at mange pasienter undergikk EHC. Et PubMed-søk (per 01.02.2016) med følgende nøkkelord ”*population pharmacokinetics*”, ”*mycophenolic acid*”, ”*mycophenolate mofetil*”, ”*model*” og ”*liver transplant*” ga ni treff. Av disse omhandlet fem artikler levertransplanterte. Populasjonsmodeller funnet inkluderte 2-kompartimentmodell med 1. ordens kinetikk og forsinkelsestid [73], 1-kompartimentmodell med 1. ordens kinetikk [74] og multiple lineære regresjonsmodeller [52, 58]. Felles for disse

modellene var at de ble laget for å predikere den totale AUC_{0-12} , og ingen beskrev EHC eksplisitt.

En oversiktsartikkel av Sherwin og kollegaer fra 2011 så på utviklingen av farmakokinetiske populasjonsmodeller for MPA i organtransplanterte og ved autoimmun sykdom [70]. De fleste populasjonsmodellene var bygget opp med data fra nyretransplanterte pasienter. Ingen av modellene var utviklet med tanke på levertransplanterte pasienter.

Selv om tidligere populasjonsmodeller har klart å predikere AUC på en tilfredsstillende måte, er det få som faktisk har modellert inn predikasjon av EHC-topp. Funaki utviklet en 3-kompartments populasjonsmodell (GI-, sentralt- og galleblærekompartment) som klarte å beskrive én EHC-topp [75]. Sam og kolleger utviklet en 6-kompartments populasjonsmodell (GI-, sentralt-, perifert-, MPAG-, Ac-MPAG- og galleblærekompartment), som differensierte mellom MPA, MPAG og Ac-MPAG, og som også klarte å beskrive én EHC-topp [76]. Prémaud og kolleger utviklet en ufysiologisk 1-kompartiment, dobbel *gamma* absorpsjonsfase-modell som også klarte å beskrive EHC [77]. Jiao og kolleger utviklet en 5-kompartiment modell (GI-, sentralt-, perifert-, MPAG- og galleblærekompartment) med predikasjon av to EHC-topper over 24 timer [78]. Alle ovennevnte populasjonsmodellene var laget med pasientdata fra nyretransplanterte.

Den strukturelle modellen med et ekstra kompartment for tykktarm (modell 6, grunnstruktur 2), ga bedre estimater enn den strukturelle modellen der resirkulasjon av MPA gikk tilbake til det opprinnelige absorpsjonskompartiment (modell 5, grunnstruktur 1). Basert på dette resultatet, ble det derfor valgt å gå videre med grunnstruktur 2 i modellutviklingen, selv om det var en mer ressurskrevende modell å håndtere i Pmetrics. Dette var mer i tråd med den virkelige fysiologiske prosessen av EHC. Selv om galle sekreseres i tynntarmen, er det først i tykktarmen at MPAG dekonjugeres tilbake til MPA av bakterielle glukuronidaser [6, 39, 40]. Det er teoretisk sannsynlig at absorpsjonshastighetsraten vil være forskjellig fra tynntarmen.

Strukturelt sett, var det store likheter mellom Jiao og kollegers modell [78] og modellen i denne oppgaven. Den største forskjellen var at Jiao og kolleger hadde modellert inn MPAG som en separat entitet. I tillegg hadde de et eget MPAG-kompartiment. Ved å se bort fra ”navnelappene” på de ulike kompartments, var modellstrukturene nesten identiske. Unntaket var at reabsorpsjonen hos Jiao og kolleger skjedde fra kompartimentet 1 (”*Gut*”), mens det i

denne modellen skjedde fra kompartiment 5 ("Tykktarm"). Hos Jiao og kolleger var absorpsjonshastighetsraten den samme etter administrasjon av oral dose og reabsorpsjon ved EHC. I denne modellen ble reabsorpsjonshastigheten bestemt av en egen separat (langsommere) absorpsjonshastighetsrate. I likhet med modellen fra denne oppgaven, klarte deres modell å predikere individuelle MPA konsentrasjoner godt, mens det var større utfordringer ved prediksjon av nye pasienter der det ikke forelå kjente MPA konsentrasjoner fra før. Det er så vidt undertegnede bekjent ingen andre som modellerer med et eget tykktarmkompartiment med tilhørende absorpsjonshastighetsrate. Det mest vanlige er EHC tilbake til det opprinnelige absorpsjonskompartimentet eller en mer ufysiologisk tilnærming der EHC håndteres av en dobbel *gamma*-distribusjon i absorpsjonsfasen.

Det ble ikke modellert forsinkelsestid i absorpsjonen fra tykktarm- til sentralt kompartiment i denne oppgaven. På grunn av begrensninger i Pmetrics er det ikke mulig å ha to ulike lagtidparametere for samme legemiddel. Løsningen ville vært en strukturell endring i modellen med n antall transitkompartiments mellom tykktarmkompartiment og sentralt kompartiment. Dette kan ha en stor konsekvens på kjøringstiden til modellen. Tillegget av et tykktarmkompartiment alene krever allerede en ytterligere differensialligning for å beskrive massetransporten av MPA og lengre kjøretid, så dette ble ikke prioritert i denne fasen av modellutviklingen.

Fordelen med et eget galleblærekompartiment som fungerer som et depot for akkumulering av MPAG, er at det er anatomisk korrekt fra et fysiologisk perspektiv. I tillegg gir det mulighet for prediksjon av individuelle AUC som eksplisitt beskriver EHC. Dette gir et godt utgangspunkt for videre modellering og utforskning av parametere og kovariater som beskriver farmakokinetikken til MPA. Alle tidligere modeller funnet i litteraturen med eksplisitt beskrivelse av EHC i AUC [33, 75, 76] har inkludert et galleblærekompartiment (med unntak av Prémaud og kolleger [77]). Modellering med flere eksplisitte rom gjør det også lettere å oppdage eventuelle sammenhenger mellom ulike parametere og kovariater. Svakheten med denne modellen er at det kun er massetransporten av MPA som estimeres. Viktige mekanismer i konjugeringen av MPA til MPAG og dekonjugering tilbake til MPA kan ikke avdekkes med denne modellen da denne metabolitten ikke er målt i pasientene.

4.2.2 Valg av betingelse for tidspunkt for EHC

Flere faktorer kontrollerer sekresjon av galle. Matinntak ser ut til å være en faktor av betydning [6, 7, 79]. Oversikt over matinntak (type, tid osv.) var ikke tilgjengelig i datamaterialet til denne oppgaven og derfor kunne ikke den potensielle sammenhengen mellom matinntak og galletømming modelleres. Fullstendig oversikt over matinntak kan i teorien gi en mer presis betingelse for tømming av galle, og dermed en modell med høyere prediksjonsevne. Det er imidlertid flere argumenter mot dette. Ideelt sett skulle alle pasientene gått på den samme dietten for å unngå at ulike typer mat gir ulik påvirkning av galletømming. Dette vil være meget vanskelig å gjennomføre, samt både tid- og kostnadskrevende. Et annen ulempe med å bruke tidspunkt for matinntak/type mat som kovariat, er at det blir vanskelig å teste ut modellen på andre pasientdata/populasjoner. Dette fordi Pmetrics krever at samtlige testsubjekter må ha en verdi for alle kovariater, enten faktiske eller interpolerte. Dermed utelukkes majoriteten av tilgjengelig pasientdata. Ideelt sett skulle blodprøvene hatt en kvantifiserbar markør som korrelerer med galletømming.

Det ble testet ut flere ulike tidspunkter for åpning og lukking av galleblæren. Tidsintervallene ble i første omgang basert på tidligere forskning [6, 34, 36]. Imidlertid viste våre data at flere pasienter gjennomgikk multiple EHC. For å beskrive flere EHC-topper, måtte modellen utvides med flere "tids-switcher". Modeller med én, to og tre EHC ble testet ut, og resultatene fra preliminnære kjøringene uten konvergens viste at modellen med to EHC beskrev data best. Igjen, en kovariat som for eksempel tidspunkt for matinntak, kunne håndtere dette bedre. Én kovariat kan dermed håndtere et vilkårlig antall EHC basert på pasientdata, noe som er mer hensiktsmessig enn å hardkode et definert antall EHC i selve modellfilen. Andre modeller har benyttet alternative metoder for galletømming. Jiao og kolleger hadde faste tidspunkter for galletømming 4 og 10 timer etter administrasjon av dosen, som igjen var betinget i tidspunkter for måltider [78]. Sam og kolleger hadde i sin modell galletømming etter 8 timer, med en varighet på 1.5 timer og konstant hastighetsrate. Tidspunktet for galletømming var basert på tid til observert sekundær topp i konsentrasjon-/tidskurven og tidspunkt for matinntak relativt til doseringstidspunkt [76]. Begge var basert på deres respektive datamaterialer, og prediksjon av nye pasienter/andre subpopulasjoner kan by på utfordringer. Funaki modellerte EHC med " t_{gap} ", som var tidspunkt for galletømming (som en bolus). Det kom ikke fram i artikkelen hvordan " t_{gap} " ble beregnet [75].

En annen svakhet ved måten denne modellen håndterte EHC, var at den antok enten åpen eller lukket galleblære. I lukket tilstand vil det ikke skje noen overføring av MPA. I virkeligheten er det ikke nødvendigvis slik at galle sekreses som en bolus slik modellen håndterer det, men at det skjer en kontinuerlig, men liten utsiving av galle mellom hver galletømming. En mulig løsning er å implementere en ny parameter som styrer overføringshastighetsraten fra galleblære- til tykktarmkompartiment. Ulempen med en ytterligere parameter er faren for overparameterisering og ”*over-fitting*” av våre pasientdata.

4.2.3 Forsinkelse i absorpsjon

MMF metaboliseres i kroppen raskt til MPA og absorpsjon skjer normalt raskt etter oralt inntak [28, 34]. Dette bekreftes av kinetikkprofilene, der man observerte at absorpsjonen skjedde raskt og mange av testsubjektene oppnådde C_{\max} innen én time. Forsinkelsestiden i absorpsjonen av MPA ble forsøkt testet ut med både Erlang-distribusjon (2 – 5 kompartments) og lagtidparameter (0 – 5 timer). Begge metodene klarte å beskrive forsinkelsen i absorpsjon på en tilfredsstillende måte (evaluert ved hjelp av AIC-verdi og individuelle AUC-plott), men modellene med Erlang-distribusjon krevde en betraktelig lengre kjøretid. Det ble tilslutt også testet ut en modell med både Erlang-distribusjon og lagtidparameter samtidig.

Et fåtall av populasjonsmodellene i litteraturen hadde ikke modellert inn forsinkelse i absorpsjonen [76, 80]. Flertallet av populasjonsmodellene hadde derimot med en parameter for forsinkelse i absorpsjonen [55, 56, 75, 78, 81-84]. Initiale tester i modellutviklingsprosessen viste at modellen ble bedre, både når det ble testet med Erlang-distribusjon og/eller lagtid, se tabell 3.1.

Fordelen med Erlang-distribusjon er at det gir en jevnere og mer realistisk beskrivelse av absorpsjonsforløpet enn en lagtidparameter. Ulempen er at det er ressurskrevende med flere transitkompartments og dette kan øke kjøringstiden til modellen betraktelig. Forsinkelse i absorpsjon modellert ved en lagtidparameter er det vanligste [70]. Fordelen med å bruke en parameter er at det er intuitivt enkelt å forstå, og det krever mindre ressurser av modelleringsprogrammet.

Fra de individuelle GOF-plottene ble det observert relativt små forskjeller mellom de ulike modellene enten det ble benyttet Erlang-distribusjon (modell 3), lagtidparameter (modell 4) eller begge deler (modell 5). Selv om modell 5 hadde laveste AIC, var både R^2 -verdi, *bias* og *imprecision* nesten like mellom modellene. Med tanke på bruk av dataressurser ble videre modellutvikling basert på lagtidparameter. Dette ble begrunnet med at det var liten forskjell i modellenes prediksjonsevne, men en god del å spare med tanke på maskinkraft. De endelige modellene brukte fire døgn på en NPAG-kjøring (ble kjørt til konvergens). Modell 6 var basert på grunnstruktur 2 med et ekstra tykktarmkompartiment. I tillegg til den høyeste numeriske R^2 -verdien, hadde modell 6 den klart laveste AIC-verdien.

4.3 Valg av modellparametere

Som nevnt tidligere i avsnitt 2.2.1, vil det være mest hensiktsmessig med intervaller som ikke er unødvendig vide. For vide intervaller øker sannsynligheten for at NPAG ikke finner det beste/mest sannsynlige estimatet. En annen begrensning i parameterintervaller er kroppens egne fysiologiske grenser. Selv om det er mulig å sette K_e til 100, er det fysiologisk urealistisk.

NPAG kan håndtere maksimalt 32 parametere i modellfilen. Det er imidlertid ikke slik at det er best med flest mulige parametere, da dette kan føre til en "overtilpasning" av modellen til det foreliggende datasettet. Ved modellsammenligning, er AIC utformet slik at modellen blir automatisk "nedgradert/straffet" for hver parameter som legges til. Dette er for å unngå overparameterisering av modellen og dermed høyere ekstern validitet. Det vil derfor kun lønne seg å ha med parametere som totalt sett gir en bedre modell. Eksempelvis ble det i modellutviklingsprosessen benyttet "eksponent"-parametere for å skalere effekten på utvalgte kovariaters innvirkning på modellen (ikke vist i tabell 3.2). I teorien kan dermed NPAG selv finne den optimale skaleringen tilpasset hvert enkelt individ. Kjøringer viste at modellene resulterte i høyere AIC-verdier og dårligere modeller. Disse parameterne ble derfor ikke inkludert i den videre modellutviklingen.

Tabell 4.1 sammenligner noen sentrale populasjonsparametere fra de endelige modellene, med og uten kovariater, med andre modeller funnet i litteraturen. CL/F-verdier for modellene med og uten kovariater ble beregnet ved å multiplisere $Ke1$ med $V0$. Den store forskjellen

mellom medianen og gjennomsnittsverdien for CL/F tydet på at distribusjonen til Ke1 ikke var normalfordelt. En nærmere undersøkelse av de 56 støttepunktene som danner grunnlag for populasjonsparameterne, viste at distribusjonen av Ke1 var sterkt høyreskjev. Fordelen med ikke-parametrisk modellering er nettopp det at det ikke gjøres noen antakelser om parameterne distribusjoner. Modellestimatene vil derfor ikke påvirkes av skjeve distribusjoner.

Stort sett sammenfaller våre parameterverdier med de som er funnet fra tidligere utviklede populasjonsmodeller. Prémaud og kolleger brukte en ufysiologisk 1-kompartiment, dobbel *gamma* absorpsjonsfase-modell [77]. Dette kan muligens forklare noe av den store forskjellen i CL/F. Populasjonsmodellen utviklet av van Hest og kolleger [83] hadde en markant høyere sentralt V_d enn de andre modellene. I deres modell er kreatinin-clearance (CL_{CR}) og plasmaalbuminnivå kovariater i estimatet av sentralt V_d . CL_{CR} er et estimat for glomerulær filtrasjonsrate (GFR) og nyrefunksjon. Lav CL_{CR} , og plasmaalbumin gir høyere sentralt V_d . Sammenlignet med våre pasientdata, har de en gjennomgående lavere estimert GFR (47 mL/min versus 107 mL/min, vår estimert GFR er estimert fra CKD-EPI formelen). I tillegg ble det i denne oppgaven benyttet kroppsvekt, og ikke estimert GFR og plasmaalbumin i formelen for V_d . Strukturmessig var våre modeller heller ikke sammenlignbare (2-kompartiment modell uten EHC versus 5-kompartiment modell med EHC).

Tabell 4.1. Sammenligning av sentrale modellparametere. Sammenligning mellom utvalgte farmakokinetiske populasjonsmodeller med EHC. [] angir SD der ingenting annet er oppgitt.

Modell	CL/F (L/h)	V _{sentral} /F (L)	K _a (h ⁻¹)	Tlag (h)
Endelig modell u/kovariater ^a	14.6/5.2	29.5/25.9 [20.5]	3.22/2.12 [2.71]	0.426/0.392 [0.234]
Endelig modell m/kovariater ^a	16.7/4.8	32.1/31.2 [20.6]	2.68/1.88 [1.85]	0.499/0.389 [0.393]
Funaki [75] ^b	25-46	31.6-142	0.409-13.70	0.412
Prémaud et al. [77]	Dag 3: 40.16 [18.87] Dag 7: 42.85 [15.21] Dag 30: 34.05 [13.8]	-	-	-
Jiao et al. [78] ^c	10.2 [5.7]	12.5 [8.3]	3.53 [12.4]	0.096 [15.8]
Sam et al. [76] ^c	10.6 [11.1]	25.9 [34.9]	0.67 [24.8]	-
Le Guellec et al. [57] ^d	15.5	36	-	-
van Hest et al. [83] ^d	33 [5.4]	91 [7.2]	4.1 [6.8]	0.21 [1.3]
van Hest et al. [84] ^d	23 [2]	69 [6]	4 [7]	0.24 [1]

a: Oppgitt som henholdsvis aritmetisk gjennomsnitt og median.

b: Forfatteren oppgir en rekke verdier på bakgrunn av ulike kovariater. Ikke oppgitt snittverdi.

c: Verdiene i [] er %RSE.

d: Ikke modellert inn eksplisitt EHC. Verdiene i [] er CV%.

4.4 Valg av kovariater

Den klassiske 2-trinnsprosedyren for kovariattesting er den såkalte ”forward inclusion/backward elimination”-metoden. Dette gjøres ved at én kovariat testes av gangen, og alle kovariater med en signifikant effekt på modellen inkluderes (forward inclusion) i en ”mellom-modell”. Deretter tas en og en kovariat ut av ”mellom-modellen”. Dersom eliminering av en kovariat gir en signifikant forverring av modellen, beholdes kovariatene i den endelige modellen. Kovariatene som ikke gir en signifikant forverring av modellen, kommer ikke med i den endelige modellen (backward elimination). Selv om én kovariat alene ikke gir en signifikant bedring i modellen, kan flere kovariater samtidig kunne gi en bedre modell. Effekten av kovariater på modellen kan altså være avhengig av hverandre. Ved å bruke ”forward inclusion/backward elimination”-metoden er det en risiko for å miste kovariater som i virkeligheten korrelerer med en eller flere av modellparameterne [85]. Det ble derfor besluttet å gå bort fra de rigide inklusjons- og eksklusjonskriteriene basert på ”forward inclusion/backward elimination”.

WGT og IC var de eneste kovariatene som ga en bedring i modellens prediksjonsevne. Inkludering av IC i modellen gjorde at vi kunne se bort fra steady-state problematikken, siden vi alltid har C₀-konsentrasjonen. Ingen av de andre kovariatene forbedret modellen, målt ved bedring i AIC-, og R²-verdier, samt individuelle AUC-plott. Selv om GOF-plottene og R²-verdiene var relativt like/stabile ved utforskning av de ulike kovariatene, ga alle bortsett fra

WGT, en forverring i AIC-verdiene. Den endelige modellen ble derfor en 5-kompartiment modell der WGT påvirker V_d og K_{ehc} (overføringshastighetsraten fra galleblære- til tykktarmkompartiment). Modellen kjørte i Pmetrics, men konvergente ikke etter 9997 sykluser, som er maksimalt antall sykluser som kan kjøres i Pmetrics med NPAG-metoden. Modellen måtte dermed kjøres videre basert på resultatet fra forrige kjøring. Den endelige modellen konvergente etter 11.075 sykluser, noe som tok fire døgn.

Funaki [75] og Payen og kolleger [81] fant en signifikant positiv korrelasjon mellom kroppsvekt og tilsynelatende sentral V_d . Jiao og kolleger fant også en positiv korrelasjon mellom kroppsvekt og V_d , men da til det perifere MPA-kompartimentet [78]. van Hest og kolleger fant derimot i sin modell at kjønn korrelerte positiv med tilsynelatende V_d , mens CL_{CR} , og plasmaalbumin hadde en negativ korrelasjon med tilsynelatende V_d [83, 84]. Noen modeller har også vist en korrelasjon mellom kroppsvekt og CL [57, 78].

Takrolimuskonsentrasjon, estimert GFR, alder og plasmaalbumin ble også testet i modellutviklingsprosessen, men ingen av kovariatene styrket modellen. Andre studier har vist en korrelasjon mellom takrolimus- og MPA-plasmakonsentrasjoner [72, 86]. Plasmaalbumin har tidligere blitt vist å korrelere med CL [39, 83, 84], og det samme har estimert GFR [56, 83, 84].

Farmakokinetisk populasjonsmodellering er en kompleks prosess. Både funn fra tidligere studier og fra denne modelleringsoppgaven viste at det ikke finnes én korrekt fremgangsmåte å modellere på. En grunn til denne store variasjonen i parametere/kovariater er bruken av ulike strukturelle modeller. Avhengig av modellstrukturen, kreves ulike kombinasjoner av parametere og kovariater. De ulike modelleringsverktøyene har også ulike underliggende algoritmer for å estimere populasjons- og individuelle prediksjoner. Alt annet likt, vil ulike algoritmer gi mer eller mindre avvik i resultatene. En annen viktig årsak til variasjonen i resultatene er pasientgrunnlaget. Faktorer som tid etter transplantasjon og type organtransplantasjon kan ha betydning for resultatet. I denne oppgaven var pasientdata fra nylig levertransplanterte (inntil 3 uker posttransplantasjon). De andre populasjonsmodellene med EHC var alle modellert med data fra nyretransplanterte, og tid etter transplantasjon varierte fra noen dager til flere år. Pasientenes helsetilstand kan også ha en innvirkning på fysiologiske prosesser i kroppen. Antall pasienter kan være en begrensende faktor. Populasjonsmodelleringsstudier har ofte et lite antall pasienter og det kan derfor være

vanskelig å få en robust modell som kan håndtere ulike endringer i pasientkarakteristika og/eller ekstreme uteliggere. Tilslutt, kvaliteten på data vil være avgjørende for sluttresultatet. Dårlige data kan ikke kompenseres med en bedre modell. Den endelige modellen med kovariater i denne oppgaven hadde en λ -verdi på 0.2, noe som tyder på lite målestøy i inputdata.

Videre er det en rekke potensielle kovariater som ikke er blitt undersøkt i denne oppgaven, men som kan ha innflytelse på farmakokinetikken til MPA. Matinntak [6, 7, 79], indusering av UGT ved koadministrering av kortikosteroider [69], UGT-polymorfisme [87, 88], *organic anion-transporting polypeptide*-polymorfisme [89], IMPDH-polymorfisme [90], etnisitet [10] og substanser som inhiberer MDR2 [41] er alle mulige kandidater som kan hjelpe til med å beskrive farmakokinetikken til MPA.

4.5 Modell uten kovariater versus modell med kovariater

Figur 3.1 og 3.3 fra henholdsvis avsnitt 3.2.1 og 3.2.2 viste at det var lite som skilte mellom modellene med og uten kovariater når det gjaldt de individuelle prediksjonene. Populasjonsprediksjonene ble imidlertid bedre ved inkludering av vekt som kovariat. Resultatene er oppsummert i tabell 4.2 under.

Tabell 4.2. Oppsummering modell med og uten kovariater.

	Pop. R^2	Pop. <i>bias</i>	Pop. <i>imp.</i>	Ind. R^2	Ind. <i>bias</i>	Ind. <i>imp.</i>
Modell	0.228	1.26	22.5	0.967	-0.138	1.15
u/kovariater						
Modell	0.329	0.746	15.9	0.946	-0.0694	2.32
m/kovariater						
Forkortelser: pop = populasjon; ind = individ; imp = imprecision						

4.5.1 Individuelle observerte versus predikerte konsentrasjoner

Begge modellene hadde lave verdier av *bias* og *imprecision*. Modellen med kovariater hadde en lavere *bias* enn modellen uten (-0,0694 mot -0,138), men hadde imidlertid en høyere *imprecision* (2.32 mot 1.15). Modellen uten kovariater hadde en marginalt høyere $R^2 = 0.967$ mot $R^2 = 0.946$. En grundig gjennomgang av de individuelle AUC-plottene avslørte at for individ 2.3, 3.4, 9.4 og 10.3, var det en overestimering av C_{\max} i modellen med kovariater.

Tabell 3.7 viser at differansen mellom observert og predikert AUC_{0-12} var henholdsvis 18.5, 1.1, 88.0 og -3.7 prosentpoeng. For individ 5.4, 6.3, 7.1 og 14.1 predikerer modellen feilaktig sekundære topper i AUC. Differensen her mellom observert og predikert AUC_{0-12} er henholdsvis 8.0, 30.8, -5.8 og 19.0 prosentpoeng. Tabell 3.9 viste at begge modellene predikerte AUC_{0-12} bra i gjennomsnitt. Modellen med kovariater hadde større maksimal- og minimumsprediksjoner, noe som ble reflektert i større SD og *imprecision*. Det lyktes ikke å finne årsakene til disse feilpredikeringene.

Vedrørende de ”falske” sekundære toppene i AUC som følge av EHC: AUC_{0-12} for de observerte konsentrasjonsmålingene ble estimert med trapesmetoden (lineær). Dersom de observerte konsentrasjonsmålingene ikke kommer tett nok i tid, kan det i teorien tenkes at man ”mister” sekundære topper som følge av EHC. En populasjonsmodell kan i teorien estimere slike topper. Imidlertid bør datagrunnlaget inneholde informasjon fra tidspunkter som avviker fra studieoppsettet for å dekke hele tidsintervallet 0 – 12 timer. Kovariater som korrelerer med EHC/galletømming vil også hjelpe med prediksjon av slike topper.

4.5.2 Populasjonspredikerte versus observerte konsentrasjoner

Når det kommer til de populasjonspredikerte versus observerte konsentrasjonene, gjorde modellen med kovariater det bedre enn modellen uten. Modellen med kovariater hadde høyere R^2 -verdi, og lavere *bias* og *imprecision*. Kvalitativt var dette et forventet resultat, da kovariater vil bidra til å bedre identifisere og beskrive kinetikken til nye pasienter på populasjonsnivå. Imidlertid var prediksjonsevnen svak, så modellen egner seg ikke til dette formålet ved nåværende tidspunkt. Videre utforskning av andre kovariater som kan bidra til å redusere den uforklarte variasjonen mellom individene, kan styrke modellen ytterligere.

4.6 Validering

Den interne valideringen ble gjort ved av sammenligning av *bias* og *imprecision*, samt GOF-plott. Disse kan gi en god indikasjon på om modellens estimerer ligger nær de sanne/referanseverdiene, samt spredningen rundt disse. En modell med lave verdier av *bias* og *imprecision* er robust mot uteliggere og andre endringer i pasientkarakteristika.

Andre metoder for intern validering er bootstrapping, jackknife-metoden og datasplitting. På grunn av få pasienter ($n = 16$) og lite datamateriale, ble ikke datasplitting gjennomført. Både bootstrapping og jackknife-metoden er svært ressurskrevende og derfor ikke egnet i denne masteroppgaven på grunn av maskinvare- og tidsbegrensinger.

Ekstern validering tester overførbarheten til modellen til andre individer som ikke var inkludert i modellutviklingen. Dette er et viktig prinsipp ved evaluering av nye populasjonsmodeller. Observerte verdier fra en ny subpopulasjon av levertransplanterte valideres opp mot modellens predikerte verdier. Slik kan en eventuell ”*over-fitting*” av data fra originaldatasettet avdekkes.

4.7 Videre arbeid med populasjonsmodellen

Modellering av komplekse farmakokinetiske modeller er en tid- og ressurskrevende prosess. Dette innebærer at modellutviklingen vil være preget av ulike begrensninger. En viktig begrensning i denne oppgaven var at modellene ikke kunne kjøres til konvergens hver gang. Kompleksiteten til modellene ga en kjøretid på fire døgn og krevde over 10 000 sykluser før modellkonvergering. Hver endring i én parameter, kovariat eller andre endringer i modellfilen krever en ny kjøring, og antall kjøring blir dermed raskt høyt. I denne oppgaven ble det testet over 100 versjoner av ulike modeller, og det var derfor ikke tid til fullstendige kjøring. Det ble derfor kun brukt 100 sykluser i de innledende søkene etter beste strukturelle modell og vurdering av kovariater. Senere ble de modellene med størst potensiale kjørt helt til konvergens, før de ble testet mot hverandre for å finne den mest passende modellen. Ulempen med ufullstendige kjøring er at estimatet som danner grunnlaget for videre modellutviklingen ikke nødvendigvis er det mest sannsynlige gitt foreliggende data. Dersom estimatet er feil, kan dette gi feilaktig inkludering/ekskludering av kovariater og andre modellelementer i modellutviklingsprosessen. Dette vil kunne resultere i en suboptimal modell.

Den endelige modellen med og uten kovariater viste en god individuell beskrivelse av AUC med tilhørende EHC. Modellen kan tjene som grunnlag for videre utforskning av kovariater som kan bedre modellens prediksjonsevne for nye pasienter uten kjente MPA

konsentrasjoner. Særlig tid for matinntak kan være en viktig predikator av EHC. Videre må modellen valideres eksternt før den eventuelt kan benyttes i klinikken.

5 Konklusjon

Populasjonsmodellen klarte å beskrive EHC av MPA hos levertransplanterte på individnivå. Den endelige modellen, både med og uten kovariater, viste at de individuelle predikerte AUC_{0-12} var gode. Imidlertid vil begge disse modellene ha store utfordringer med å predikere MPA konsentrasjoner i nye pasienter, før noen målte MPA konsentrasjoner er kjent fra disse. Modellen med kovariater hadde imidlertid en noe bedre prediksjonsevne enn modellen uten på populasjonsnivå. Rike kinetikkdata fra flere pasienter bør inkluderes og flere kovariater bør testes ut, spesielt med tanke på tidspunkt og grad av EHC, før modellen vil kunne gi tilfredsstillende eksterne valideringsresultater.

Litteraturliste

1. Slordal L, Spigset O. Grunnleggende farmakokinetikk - absorpsjon. Tidsskrift for Den norske legeforening. 2005;125(7):886-7.
2. Rowland M, Tozer T. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics: Concepts and applications. 4th ed. Philadelphia: Wolters Kluwert/Lippincott Williams & Wilkins; cop. 2011. s. 36-40, 529
3. Spigset O. Norsk legemiddelhåndbok - G2 Farmakokinetikk og doseringsprinsipper 2013 [Sitert 2016-02-24]. Tilgjengelig fra: <http://legemiddelhandboka.no/Generelle/88526>.
4. Rowland M, Tozer T. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics: Concepts and applications. 4th ed. Philadelphia: Wolters Kluwert/Lippincott Williams & Wilkins; cop. 2001. s. 26
5. Rowland M, Tozer T. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics: Concepts and applications. 4th ed. Philadelphia: Wolters Kluwert/Lippincott Williams & Wilkins; cop. 2011. s. 28-30
6. Roberts MS, Magnusson BM, Burczynski FJ, Weiss M. Enterohepatic Circulation. Clin Pharmacokinet. 2012;41(10):751-90.
7. Shier D. Hole's Essentials of Human Anatomy & Physiology. New York: McGraw-Hill; 2012. s. 641
8. Whiting B, Kelman AW, Grevel J. Population pharmacokinetics. Theory and clinical application. Clin Pharmacokinet. 1986;11(5):387-401.
9. Rowland M, Tozer T. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics: Concepts and applications. 4th ed. Philadelphia: Wolters Kluwert/Lippincott Williams & Wilkins; cop. 2011. s. 8-10, 339-41
10. Ling J, Shi J, Jiang Q, Jiao Z. Population pharmacokinetics of mycophenolic acid and its main glucuronide metabolite: a comparison between healthy Chinese and Caucasian subjects receiving mycophenolate mofetil. European journal of clinical pharmacology. 2015;71(1):95-106.
11. Gasche Y, Daali Y, Fathi M, Chiappe A, Cottini S, Dayer P, et al. Codeine intoxication associated with ultrarapid CYP2D6 metabolism. The New England journal of medicine. 2004;351(27):2827-31.
12. Gabrielsson J, Weiner D. Non-compartmental analysis. Methods in molecular biology (Clifton, NJ). 2012;929:377-89.
13. Aarons L. Population pharmacokinetics: theory and practice. Br J Clin Pharmacol. 1991;32(6):669-70.
14. Ette EI, Williams PJ. Population pharmacokinetics I: background, concepts, and models. The Annals of pharmacotherapy. 2004;38(10):1702-6.
15. Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Population Pharmacokinetics: U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER); 1999 [Sitert 2016-03-31]. Tilgjengelig fra: <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm072137.pdf>.

16. Sheiner LB, Rosenberg B, Melmon KL. Modelling of individual pharmacokinetics for computer-aided drug dosage. *Computers and Biomedical Research*. 1972;5(5):441-59.
17. Kiang TK, Sherwin CM, Spigarelli MG, Ensom MH. Fundamentals of population pharmacokinetic modelling: modelling and software. *Clin Pharmacokinet*. 2012;51(8):515-25.
18. Jelliffe R, Schumitzky A, Van Guilder M, Wang X, Leary R. Population Pharmacokinetic Models: Parametric and Nonparametric Approaches. 2000 [Sisert 2016-03-31]. Tilgjengelig fra: http://www.lapk.org/pubsinfo/written_tutorials.php.
19. Johannessen SI, Landmark CJ. Value of therapeutic drug monitoring in epilepsy. *Expert review of neurotherapeutics*. 2008;8(6):929-39.
20. Touw DJ, Neef C, Thomson AH, Vinks AA. Cost-effectiveness of therapeutic drug monitoring: a systematic review. *Ther Drug Monit*. 2005;27(1):10-7.
21. Spector R, Park GD, Johnson GF, Vesell ES. Therapeutic drug monitoring. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 1988;43(4):345-53.
22. Rowland M, Tozer T. *Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics: Concepts and applications*. 4th ed. Philadelphia: Wolters Kluwert/Lippincott Williams & Wilkins; cop. 2011. s. 536-38, 45
23. Johnston A, Holt DW. Immunosuppressant drugs--the role of therapeutic drug monitoring. *Br J Clin Pharmacol*. 2001;52 Suppl 1:61s-73s.
24. Hale MD, Nicholls AJ, Bullingham RES, Hené R, Hoitsma A, Squifflet J-P, et al. The pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship for mycophenolate mofetil in renal transplantation. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 1998;64(6):672-83.
25. van Gelder T, Hilbrands LB, Vanrenterghem Y, Weimar W, de Fijter JW, Squifflet JP, et al. A RANDOMIZED DOUBLE-BLIND, MULTICENTER PLASMA CONCENTRATION CONTROLLED STUDY OF THE SAFETY AND EFFICACY OF ORAL MYCOPHENOLATE MOFETIL FOR THE PREVENTION OF ACUTE REJECTION AFTER KIDNEY TRANSPLANTATION. *Transplantation*. 1999;68(2):261-6.
26. Shaw LM, Korecka M, Venkataramanan R, Goldberg L, Bloom R, Brayman KL. Mycophenolic Acid Pharmacodynamics and Pharmacokinetics Provide a Basis for Rational Monitoring Strategies. *American Journal of Transplantation*. 2003;3(5):534-42.
27. van Gelder T, Meur YL, Shaw LM, Oellerich M, DeNofrio D, Holt C, et al. Therapeutic Drug Monitoring of Mycophenolate Mofetil in Transplantation. *Therapeutic Drug Monitoring*. 2006;28(2):145-54.
28. Summary of product characteristics - CellCept 2015 [Sisert 2015-10-22]. Tilgjengelig fra: http://www.ema.europa.eu/docs/no_NO/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000082/WC500021864.pdf.
29. Protokoll for nyre-, pancreas- og øycelle-transplantasjon [Protokoll]. Norsk Nyremedisinsk forening; [Sisert 2015-10-22]. Tilgjengelig fra: <http://www.nephro.no/>.
30. Mykofenolat [Sisert 2016-03-01]. Tilgjengelig fra: <http://anx.no/mykofenolat/>.
31. Protokoll - levertransplantasjon [Protokoll]. 2015 [Sisert 2016-03-01]. Tilgjengelig fra: http://www.oslo-universitetssykehus.no/omoss_/avdelinger_/transplantasjonsmedisin_.

32. Allison AC, Eugui EM. Mechanisms of Action of Mycophenolate Mofetil in Preventing Acute and Chronic Allograft Rejection. *Transplantation*. 2005;80(2):S181-S90.
33. Allison AC, Eugui EM. Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. *Immunopharmacology*. 2000;47(2-3):85-118.
34. Bullingham R, Monroe S, Nicholls A, Hale M. Pharmacokinetics and bioavailability of mycophenolate mofetil in healthy subjects after single-dose oral and intravenous administration. *Journal of clinical pharmacology*. 1996;36(4):315-24.
35. Nowak I, Shaw LM. Mycophenolic acid binding to human serum albumin: characterization and relation to pharmacodynamics. *Clinical chemistry*. 1995;41(7):1011-7.
36. Bullingham RS, Nicholls A, Kamm B. Clinical Pharmacokinetics of Mycophenolate Mofetil. *Clin Pharmacokinet*. 1998;34(6):429-55.
37. Mackenzie PI. Identification of uridine diphosphate glucuronosyltransferases involved in the metabolism and clearance of mycophenolic acid. *Ther Drug Monit*. 2000;22(1):10-3.
38. Bowalgaha K, Miners JO. The glucuronidation of mycophenolic acid by human liver, kidney and jejunum microsomes. *Br J Clin Pharmacol*. 2001;52(5):605-9.
39. Staatz C, Tett S. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Mycophenolate in Solid Organ Transplant Recipients. *Clin Pharmacokinet*. 2007;46(1):13-58.
40. Sperker B, Backman JT, Kroemer HK. The role of beta-glucuronidase in drug disposition and drug targeting in humans. *Clin Pharmacokinet*. 1997;33(1):18-31.
41. Hesselink DA, Van Hest RM, Mathot RAA, Bonthuis F, Weimar W, De Bruin RWF, et al. Cyclosporine Interacts with Mycophenolic Acid by Inhibiting the Multidrug Resistance-Associated Protein 2. *American Journal of Transplantation*. 2005;5(5):987-94.
42. Smak Gregoor PJ, van Gelder T, Hesse CJ, van der Mast BJ, van Besouw NM, Weimar W. Mycophenolic acid plasma concentrations in kidney allograft recipients with or without cyclosporin: a cross-sectional study. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 1999;14(3):706-8.
43. van Gelder T, Klupp J, Barten MJ, Christians U, Morris RE. Comparison of the effects of tacrolimus and cyclosporine on the pharmacokinetics of mycophenolic acid. *Ther Drug Monit*. 2001;23(2):119-28.
44. Naito T, Shinno K, Maeda T, Kagawa Y, Hashimoto H, Otsuka A, et al. Effects of calcineurin inhibitors on pharmacokinetics of mycophenolic acid and its glucuronide metabolite during the maintenance period following renal transplantation. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2006;29(2):275-80.
45. Weber LT, Shipkova M, Armstrong VW, Wagner N, Schütz E, Mehls O, et al. The Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Relationship for Total and Free Mycophenolic Acid in Pediatric Renal Transplant Recipients: A Report of the German Study Group on Mycophenolate Mofetil Therapy. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2002;13(3):759-68.
46. Borrows R, Chusney G, Loucaidou M, James A, Lee J, Tromp JV, et al. Mycophenolic Acid 12-h Trough Level Monitoring in Renal Transplantation: Association with Acute Rejection and Toxicity. *American Journal of Transplantation*. 2006;6(1):121-8.

47. Aw MM, Brown NW, Itsuka T, Gonde CE, Adams JE, Heaton ND, et al. Mycophenolic acid pharmacokinetics in pediatric liver transplant recipients. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society.* 2003;9(4):383-8.
48. Todorova EK, Huang S-HS, Kobrzynski MC, Filler G. What is the inpatient variability of mycophenolic acid trough levels? *Pediatric Transplantation.* 2015;19(7):669-74.
49. Cattaneo D, Gaspari F, Ferrari S, Stucchi N, Del Priore L, Perico N, et al. Pharmacokinetics help optimizing mycophenolate mofetil dosing in kidney transplant patients. *Clinical transplantation.* 2001;15(6):402-9.
50. Pawinski T, Hale M, Korecka M, Fitzsimmons WE, Shaw LM. Limited sampling strategy for the estimation of mycophenolic acid area under the curve in adult renal transplant patients treated with concomitant tacrolimus. *Clinical chemistry.* 2002;48(9):1497-504.
51. Le Guellec C, Buchler M, Giraudeau B, Le Meur Y, Gakoue JE, Lebranchu Y, et al. Simultaneous estimation of cyclosporin and mycophenolic acid areas under the curve in stable renal transplant patients using a limited sampling strategy. *European journal of clinical pharmacology.* 2002;57(11):805-11.
52. Chen H, Gu Z, Chen B, Mao H, Zhang W, Fan Q. Models for the prediction of mycophenolic acid area under the curve using a limited-sampling strategy and an enzyme multiplied immunoassay technique in Chinese patients undergoing liver transplantation. *Clinical therapeutics.* 2008;30(12):2387-401.
53. Kuypers DR, Claes K, Evenepoel P, Maes B, Coosemans W, Pirenne J, et al. Long-term changes in mycophenolic acid exposure in combination with tacrolimus and corticosteroids are dose dependent and not reflected by trough plasma concentration: a prospective study in 100 de novo renal allograft recipients. *Journal of clinical pharmacology.* 2003;43(8):866-80.
54. Kuypers DR, Le Meur Y, Cantarovich M, Tredger MJ, Tett SE, Cattaneo D, et al. Consensus report on therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid in solid organ transplantation. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN.* 2010;5(2):341-58.
55. Musuamba F, Rousseau A, Bosmans J-L, Senessaël J-J, Cumps J, Marquet P, et al. Limited Sampling Models and Bayesian Estimation for Mycophenolic Acid Area under the Curve Prediction in Stable Renal Transplant Patients Co-Medicated with Cyclosporin or Sirolimus. *Clin Pharmacokinet.* 2009;48(11):745-58.
56. de Winter BCM, Neumann I, van Hest RM, Gelder Tv, Mathot RAA. Limited Sampling Strategies for Therapeutic Drug Monitoring of Mycophenolate Mofetil Therapy in Patients With Autoimmune Disease. *Therapeutic Drug Monitoring.* 2009;31(3):382-90.
57. Le Guellec C, Bourgoïn H, Büchler M, Le Meur Y, Lebranchu Y, Marquet P, et al. Population Pharmacokinetics and Bayesian Estimation of Mycophenolic Acid Concentrations in Stable Renal Transplant Patients. *Clin Pharmacokinet.* 2004;43(4):253-66.
58. Chen H, Peng C, Yu Z, Shen B, Deng X, Qiu W, et al. Pharmacokinetics of mycophenolic acid and determination of area under the curve by abbreviated sampling strategy in Chinese liver transplant recipients. *Clin Pharmacokinet.* 2007;46(2):175-85.

59. Shaw LM, Holt DW, Oellerich M, Meiser B, van Gelder T. Current Issues in Therapeutic Drug Monitoring of Mycophenolic Acid: Report of a Roundtable Discussion. *Therapeutic Drug Monitoring*. 2001;23(4):305-15.
60. Saeves I, Line PD, Bremer S, Vethe NT, Tveit RG, Meltevik TJ, et al. Tacrolimus exposure and mycophenolate pharmacokinetics and pharmacodynamics early after liver transplantation. *Ther Drug Monit*. 2014;36(1):46-53.
61. Pmetrics [Sitert 2016-02-01]. Tilgjengelig fra: <http://www.lapk.org/pmetrics.php>.
62. Neely MN, van Guilder MG, Yamada WM, Schumitzky A, Jelliffe RW. Accurate detection of outliers and subpopulations with Pmetrics, a nonparametric and parametric pharmacometric modeling and simulation package for R. *Ther Drug Monit*. 2012;34(4):467-76.
63. The R Project for Statistical Computing [Sitert 2016-02-01]. Tilgjengelig fra: <https://www.r-project.org/>.
64. Tatarinova T, Neely M, Bartroff J, van Guilder M, Yamada W, Bayard D, et al. Two general methods for population pharmacokinetic modeling: non-parametric adaptive grid and non-parametric Bayesian. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*. 2013;40(2):189-99.
65. Bustad A, Terziivanov D, Leary R, Port R, Schumitzky A, Jelliffe R. Parametric and nonparametric population methods: their comparative performance in analysing a clinical dataset and two Monte Carlo simulation studies. *Clin Pharmacokinet*. 2006;45(4):365-83.
66. Pmetrics - User Manual [Brukermanual]. Laboratory of Applied Pharmacokinetics & Bioinformatics; 2015 [Sitert 2015-07-15]. Tilgjengelig fra: <http://www.lapk.org/pmetrics.php>.
67. Ludden TM, Beal SL, Sheiner LB. Comparison of the Akaike Information Criterion, the Schwarz criterion and the F test as guides to model selection. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*. 1994;22(5):431-45.
68. Savic R, Jonker D, Kerbusch T, Karlsson M. Implementation of a transit compartment model for describing drug absorption in pharmacokinetic studies. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*. 2007;34(5):711-26.
69. Cattaneo D, Perico N, Gaspari F, Gotti E, Remuzzi G. Glucocorticoids interfere with mycophenolate mofetil bioavailability in kidney transplantation. *Kidney international*. 2002;62(3):1060-7.
70. Sherwin CT, Fukuda T, Brunner H, Goebel J, Vinks A. The Evolution of Population Pharmacokinetic Models to Describe the Enterohepatic Recycling of Mycophenolic Acid in Solid Organ Transplantation and Autoimmune Disease. *Clin Pharmacokinet*. 2011;50(1):1-24.
71. van Hest RM, Mathot RAA, Pescovitz MD, Gordon R, Mamelok RD, van Gelder T. Explaining Variability in Mycophenolic Acid Exposure to Optimize Mycophenolate Mofetil Dosing: A Population Pharmacokinetic Meta-Analysis of Mycophenolic Acid in Renal Transplant Recipients. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2006;17(3):871-80.
72. Zucker K, Tsaroucha A, Olson L, Esquenazi V, Tzakis A, Miller J. Evidence that tacrolimus augments the bioavailability of mycophenolate mofetil through the inhibition of mycophenolic acid glucuronidation. *Ther Drug Monit*. 1999;21(1):35-43.

73. Langers P, Press RR, Inderson A, Cremers SC, den Hartigh J, Baranski AG, et al. Limited sampling model for advanced mycophenolic acid therapeutic drug monitoring after liver transplantation. *Ther Drug Monit.* 2014;36(2):141-7.
74. Barau C, Furlan V, Debray D, Taburet AM, Barrail-Tran A. Population pharmacokinetics of mycophenolic acid and dose optimization with limited sampling strategy in liver transplant children. *Br J Clin Pharmacol.* 2012;74(3):515-24.
75. Funaki T. Enterohepatic Circulation Model for Population Pharmacokinetic Analysis. *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 1999;51(10):1143-8.
76. Sam W-J, Akhlaghi F, Rosenbaum SE. Population Pharmacokinetics of Mycophenolic Acid and Its 2 Glucuronidated Metabolites in Kidney Transplant Recipients. *The Journal of Clinical Pharmacology.* 2009;49(2):185-95.
77. Prémaud A, Debord J, Rousseau A, Le Meur Y, Toupance O, Lebranchu Y, et al. A Double Absorption-Phase Model Adequately Describes Mycophenolic Acid Plasma Profiles in De Novo Renal Transplant Recipients Given Oral Mycophenolate Mofetil. *Clin Pharmacokinet.* 2005;44(8):837-47.
78. Jiao Z, Ding J-j, Shen J, Liang H-q, Zhong L-j, Wang Y, et al. Population pharmacokinetic modelling for enterohepatic circulation of mycophenolic acid in healthy Chinese and the influence of polymorphisms in UGT1A9. *British Journal of Clinical Pharmacology.* 2008;65(6):893-907.
79. Howard PJ, Murphy GM, Dowling RH. Gall bladder emptying patterns in response to a normal meal in healthy subjects and patients with gall stones: ultrasound study. *Gut.* 1991;32(11):1406-11.
80. Cremers S, Schoemaker R, Scholten E, Den Hartigh J, König-Quartel J, Van Kan E, et al. Characterizing the role of enterohepatic recycling in the interactions between mycophenolate mofetil and calcineurin inhibitors in renal transplant patients by pharmacokinetic modelling. *British Journal of Clinical Pharmacology.* 2005;60(3):249-56.
81. Payen S, Zhang D, Maisin A, Popon M, Bensman A, Bouissou F, et al. Population Pharmacokinetics of Mycophenolic Acid in Kidney Transplant Pediatric and Adolescent Patients. *Therapeutic Drug Monitoring.* 2005;27(3):378-88.
82. Shum B, Duffull SB, Taylor PJ, Tett SE. Population pharmacokinetic analysis of mycophenolic acid in renal transplant recipients following oral administration of mycophenolate mofetil. *British Journal of Clinical Pharmacology.* 2003;56(2):188-97.
83. van Hest R, van Gelder T, Vulto A, Mathot RA. Population Pharmacokinetics of Mycophenolic Acid in Renal Transplant Recipients. *Clin Pharmacokinet.* 2005;44(10):1083-96.
84. van Hest RM, van Gelder T, Bouw R, Goggin T, Gordon R, Mamelok RD, et al. Time-dependent clearance of mycophenolic acid in renal transplant recipients. *Br J Clin Pharmacol.* 2007;63(6):741-52.
85. Wahlby U, Jonsson EN, Karlsson MO. Comparison of stepwise covariate model building strategies in population pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis. *AAPS pharmSci.* 2002;4(4):E27.
86. Kaplan B, Meier-Kriesche HU, Minnick P, Bastien MC, Sechaud R, Yeh CM, et al. Randomized calcineurin inhibitor cross over study to measure the pharmacokinetics of co-administered enteric-coated mycophenolate sodium. *Clinical transplantation.* 2005;19(4):551-8.

87. van Schaik RHN, van Agteren M, de Fijter JW, Hartmann A, Schmidt J, Budde K, et al. UGT1A9 -275T>A/-2152C>T Polymorphisms Correlate With Low MPA Exposure and Acute Rejection in MMF/Tacrolimus-Treated Kidney Transplant Patients. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2009;86(3):319-27.
88. Fukuda T, Goebel J, Cox S, Maseck D, Zhang K, Sherbotie JR, et al. UGT1A9, UGT2B7 and MRP2 genotypes can predict mycophenolic acid pharmacokinetic variability in pediatric kidney transplant recipients. *Therapeutic drug monitoring*. 2012;34(6):671-9.
89. Picard N, Yee SW, Woillard JB, Lebranchu Y, Le Meur Y, Giacomini KM, et al. The role of organic anion-transporting polypeptides and their common genetic variants in mycophenolic acid pharmacokinetics. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2010;87(1):100-8.
90. Wang J, Yang JW, Zeevi A, Webber SA, Girnita DM, Selby R, et al. IMPDH1 Gene Polymorphisms and Association With Acute Rejection in Renal Transplant Patients. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2008;83(5):711-7.

Vedlegg

Vedlegg 1 Inputfil (44 første av 723 observasjoner)

MID	EVID	TIME	DUR	DOSE	ADDL	II	INPUT	OUT	OUTED	C0	C1	C2	C3	WGT	HGT	AGE	SEX	KREATININ	ALBUMIN	IC	TACDOSE	TACKONS	EGR	IC2	PREDDOSE	PREDKONS	IC3	TXTIME
1.1	1	0.00	0	1000	.	.	.	1	0.2	0	.	.	.	102.4	189.5	37	0	47	33	0.2	4	0.00477	179.2460192	0.00477	35	0.18445	0.18445	3
1.1	1	0	0.33	0	.	.	.	0	0.1	1	.	.	.	102.4	189.5	37	0	47	33	0.2	4	0.00517	179.2460192	0.00477	35	0.19107	0.18445	3
1.1	1	0	0.83	0	.	.	.	0	1.1	1	.	.	.	102.4	189.5	37	0	47	33	0.2	4	0.00737	179.2460192	0.00477	35	0.26624	0.18445	3
1.1	1	0	1.17	0	.	.	.	0	5.7	1	.	.	.	102.4	189.5	37	0	47	33	0.2	4	0.01551	179.2460192	0.00477	35	0.39696	0.18445	3
1.1	1	0	1.67	0	.	.	.	0	7.8	1	.	.	.	102.4	189.5	37	0	47	33	0.2	4	0.01461	179.2460192	0.00477	35	0.42961	0.18445	3
1.1	1	0	2.17	0	.	.	.	0	3.1	1	.	.	.	102.4	189.5	37	0	47	33	0.2	4	0.01382	179.2460192	0.00477	35	0.34797	0.18445	3
1.1	1	0	2.67	0	.	.	.	0	1.6	1	.	.	.	102.4	189.5	37	0	47	33	0.2	4	0.01038	179.2460192	0.00477	35	0.33567	0.18445	3
1.1	1	0	3.50	0	.	.	.	0	1.2	1	.	.	.	102.4	189.5	37	0	47	33	0.2	4	0.00807	179.2460192	0.00477	35	0.28989	0.18445	3
1.1	1	0	5.50	0	.	.	.	0	0	1	.	.	.	102.4	189.5	37	0	47	33	0.2	4	0.00576	179.2460192	0.00477	35	0.18364	0.18445	3
1.1	1	0	7.67	0	.	.	.	0	0	1	.	.	.	102.4	189.5	37	0	47	33	0.2	4	0.00435	179.2460192	0.00477	35	0.11135	0.18445	3
1.1	1	0	9.67	0	.	.	.	0	0	1	.	.	.	102.4	189.5	37	0	47	33	0.2	4	0.00349	179.2460192	0.00477	35	0.06277	0.18445	3
1.1	1	0	11.58	0	.	.	.	1	0	0	.	.	.	98.5	189.5	37	0	44	37	0	5	0.00382	179.2460192	0.00477	35	0.04312	0.18445	3
1.2	0	0.50	0	0	0	1	.	.	.	98.5	189.5	37	0	44	37	0	5	0.01025	181.1572025	0.00861	15	0.04199	0.03477	10
1.2	0	1.03	0	0	0.4	1	.	.	.	98.5	189.5	37	0	44	37	0	5	0.01242	181.1572025	0.00861	15	0.07753	0.03477	10
1.2	0	1.55	0	0	5.8	1	.	.	.	98.5	189.5	37	0	44	37	0	5	0.01419	181.1572025	0.00861	15	0.11615	0.03477	10
1.2	0	2.08	0	0	3.7	1	.	.	.	98.5	189.5	37	0	44	37	0	5	0.01521	181.1572025	0.00861	15	0.13996	0.03477	10
1.2	0	2.57	0	0	3.7	1	.	.	.	98.5	189.5	37	0	44	37	0	5	0.01458	181.1572025	0.00861	15	0.12082	0.03477	10
1.2	0	3.05	0	0	8.4	1	.	.	.	98.5	189.5	37	0	44	37	0	5	0.01755	181.1572025	0.00861	15	0.17086	0.03477	10
1.2	0	4.20	0	0	1.3	1	.	.	.	98.5	189.5	37	0	44	37	0	5	0.0141	181.1572025	0.00861	15	0.15819	0.03477	10
1.2	0	5.00	0	0	0.2	1	.	.	.	98.5	189.5	37	0	44	37	0	5	0.01275	181.1572025	0.00861	15	0.13521	0.03477	10
1.2	0	6.03	0	0	0.3	1	.	.	.	98.5	189.5	37	0	44	37	0	5	0.01166	181.1572025	0.00861	15	0.11377	0.03477	10
1.2	0	7.95	0	0	0	1	.	.	.	98.5	189.5	37	0	44	37	0	5	0.00969	181.1572025	0.00861	15	0.07144	0.03477	10
1.2	0	9.87	0	0	0	1	.	.	.	98.5	189.5	37	0	44	37	0	5	0.00866	181.1572025	0.00861	15	0.04634	0.03477	10
1.2	0	11.62	0	0	0	1	.	.	.	98.5	189.5	37	0	44	37	0	5	0.00769	181.1572025	0.00861	15	0.02975	0.03477	10
2.1	1	0.00	0	1000	.	.	.	1	2.2	0	.	.	.	61	167	36	1	55	34	2.2	4	0.00395	112.6905265	0.00395	25	0.16308	0.16308	4
2.1	1	0	0.58	0	.	.	.	0	7	1	.	.	.	61	167	36	1	55	34	2.2	4	0.00641	112.6905265	0.00395	25	0.3209	0.16308	4
2.1	1	0	1.00	0	.	.	.	0	10.3	1	.	.	.	61	167	36	1	55	34	2.2	4	0.01159	112.6905265	0.00395	25	0.481	0.16308	4
2.1	1	0	1.67	0	.	.	.	0	6.7	1	.	.	.	61	167	36	1	55	34	2.2	4	0.01317	112.6905265	0.00395	25	0.5431	0.16308	4
2.1	1	0	2.03	0	.	.	.	0	9.9	1	.	.	.	61	167	36	1	55	34	2.2	4	0.01109	112.6905265	0.00395	25	0.43467	0.16308	4
2.1	1	0	2.62	0	.	.	.	0	4.9	1	.	.	.	61	167	36	1	55	34	2.2	4	0.01045	112.6905265	0.00395	25	0.34701	0.16308	4
2.1	1	0	3.25	0	.	.	.	0	2.9	1	.	.	.	61	167	36	1	55	34	2.2	4	0.00857	112.6905265	0.00395	25	0.27439	0.16308	4
2.1	1	0	4.08	0	.	.	.	0	2.7	1	.	.	.	61	167	36	1	55	34	2.2	4	0.008	112.6905265	0.00395	25	0.25835	0.16308	4
2.1	1	0	5.08	0	.	.	.	0	1.8	1	.	.	.	61	167	36	1	55	34	2.2	4	0.00732	112.6905265	0.00395	25	0.20868	0.16308	4
2.1	1	0	6.05	0	.	.	.	0	2	1	.	.	.	61	167	36	1	55	34	2.2	4	0.00589	112.6905265	0.00395	25	0.17893	0.16308	4
2.1	1	0	8.00	0	.	.	.	0	1.7	1	.	.	.	61	167	36	1	55	34	2.2	4	0.00468	112.6905265	0.00395	25	0.1168	0.16308	4
2.1	1	0	10.05	0	.	.	.	0	1.1	1	.	.	.	61	167	36	1	55	34	2.2	4	0.0041	112.6905265	0.00395	25	0.06959	0.16308	4
2.1	1	0	12.08	0	.	.	.	0	1.1	1	.	.	.	61	167	36	1	55	34	2.2	4	0.00354	112.6905265	0.00395	25	0.15013	0.16308	4
2.2	1	0.00	0	1000	.	.	.	1	2.3	0	.	.	.	59.7	167	36	1	50	31	2.3	4	0.0077	115.2204354	0.0077	25	0.03584	0.03584	7
2.2	1	0	0.45	0	.	.	.	0	3.6	1	.	.	.	59.7	167	36	1	50	31	2.3	4	0.00912	115.2204354	0.0077	25	0.16176	0.03584	7
2.2	1	0	0.87	0	.	.	.	0	6.1	1	.	.	.	59.7	167	36	1	50	31	2.3	4	0.02024	115.2204354	0.0077	25	0.21331	0.03584	7
2.2	1	0	1.43	0	.	.	.	0	9.9	1	.	.	.	59.7	167	36	1	50	31	2.3	4	0.02763	115.2204354	0.0077	25	0.23098	0.03584	7
2.2	1	0	1.92	0	.	.	.	0	6.9	1	.	.	.	59.7	167	36	1	50	31	2.3	4	0.0244	115.2204354	0.0077	25	0.21624	0.03584	7
2.2	1	0	2.38	0	.	.	.	0	6.4	1	.	.	.	59.7	167	36	1	50	31	2.3	4	0.0195	115.2204354	0.0077	25	0.19029	0.03584	7

Vedlegg 2 Endelige modellfiler

Modell uten kovariater

```
#Pri
Ke1, 0.001, 10
Ke2, 0.001, 10
V0, 0.01, 80
Ka1, 1, 10
Ka2, 1, 10
KCP, 0.001, 10
KPC, 0.001, 10
Kgb, 0.001, 10
T1, 1, 6
T2, 1, 6
T3, 6, 12
T4, 6, 12
Kehc, 5, 30
Tlag1, 0, 3

#Sec
Kehc0 = 0
+IF(T.GT.T1.AND.T.LT.T2) Kehc0 = Kehc
+IF(T.GT.T3.AND.T.LT.T4) Kehc0 = Kehc

#Lag
TLAG(1) = Tlag1

#Dif
XP(1) = -Ka1*X(1)
XP(2) = Ka1*X(1) + KPC*X(3) + Ka2*X(5) - (KCP + Kgb + Ke1)*X(2)
XP(3) = KCP*X(2) - KPC*X(3)
XP(4) = Kgb*X(2) - (Kehc0 + Ke2)*X(4)
XP(5) = Kehc0*X(4) - Ka2*X(5)

#Out
Y(1) = X(2)/V0

#Err
L=0.0616335579
0.0616335579,0.0516923639,0.004213010,-0.0001082492
```


Modell med kovariater

```
#Pri
Ke1, 0.001, 10
Ke2, 0.001, 10
V0, 0.01, 80
Ka1, 1, 10
Ka2, 1, 10
KCP, 0.001, 10
KPC, 0.001, 10
Kgb, 0.001, 10
T1, 1, 6
T2, 1, 6
T3, 6, 12
T4, 6, 12
Kehc, 5, 30
Tlag1, 0, 3

#Cov
WGT
HGT
AGE
SEX
KREATININ
ALBUMIN
IC
TACDOSE
TACKONS
EGFR

#Sec
WGTc = WGT/78
V = V0*WGTc

Kehc0 = 0
+IF(T.GT.T1.AND.T.LT.T2) Kehc0 = Kehc/WGTc
+IF(T.GT.T3.AND.T.LT.T4) Kehc0 = Kehc/WGTc

#Ini
X(2) = IC*V

#Lag
TLAG(1) = Tlag1
TLAG(5) = Tlag2

#Dif
XP(1) = -Ka1*X(1)
XP(2) = Ka1*X(1) + KPC*X(3) + Ka2*X(5) - (KCP + Kgb + Ke1)*X(2)
XP(3) = KCP*X(2) - KPC*X(3)
XP(4) = Kgb*X(2) - (Kehc0 + Ke2)*X(4)
XP(5) = Kehc0*X(4) - Ka2*X(5)

#Out
Y(1) = X(2)/V

#Err
L=0.0616335579
0.0616335579,0.0516923639,0.004213010,-0.0001082492
```