



# A FLURALANER FARMAKOKINETIKÁJA KUTYÁKBAN EGYSZERI PER OS VAGY INTRAVÉNÁS ADÁST KÖVETŐEN

Susanne Kilp<sup>1\*</sup>, Diana Ramirez<sup>2</sup>, Mark J. Allan<sup>1</sup>, Rainer K. A. Roepke<sup>1</sup> és Martin C. Nuernberger<sup>1</sup>

\* Levelező szerző: susanne.kilp@msd.de

<sup>1</sup> MSD Animal Health Innovation GmbH, Zur Propstei, 55270 Schwabenheim, Németország;

<sup>2</sup> Harlan Laboratories, Centro Industrial Santiga, c/Argenters, 6, 08130 Santa Perpètua de Mogoda Barcelona, Spanyolország.

## ÖSSZEFOGLALÁS

**Háttér:** A fluralaner egy új szisztémás rovar- és atkaölő vegyület. A jelen vizsgálatok célja az volt, hogy Beagle kutyákban egyszeri szájon át vagy intravénásan (iv.) történő adást követően vizsgálja a fluralaner farmakokinetikai tulajdonságait.

**Módszerek:** A rágótabletta formájában 12,5, 25 vagy 50 mg/testsúlykilogramm (tskg) dózisban szájon át vagy intravénás oldatként 12,5 mg/tskg dózisban iv. alkalmazott fluralaner 24 Beagle kutyának való beadását követően az állatoktól a kezelés utáni 112. napig plazmamintákat vettünk. A fluralaner plazmakoncentrációit HPLC-MS/MS módszerrel határoztuk meg. A farmakokinetikai paramétereket nem-kompartmentes módszerekkel számítottuk ki.

**Eredmények:** A szájon át történő alkalmazás után a vizsgált szer átlagosan 1 napon belül elérte a maximális plazmabeli koncentrációt ( $C_{max}$ ). Egyszeri szájon át és iv. történő beadást követően a fluralaner akár a 112. napig is mennyiségileg meghatározható volt a plazmában. A fluralaner látszólagos felezési ideje 12–15 nap, átlagos tartózkodási ideje pedig 15–20 nap volt. A fluralaner látszólagos megoszlási térfogata 3,1 l/kg, clearance-értéke pedig 0,14 l/kg/nap volt.

**Következtetések:** Az egyetlen dózisban szájon át adott fluralaner jól felszívódik és hosszú eliminációs felezési idővel, hosszú átlagos tartózkodási idővel, viszonylag nagy látszólagos megoszlási térfogattal és alacsony clearance-szel rendelkezik. E farmakokinetikai jellemzők segítenek megmagyarázni a fluralaner hosszan tartó hatását a bolhák és a kullancsok ellen egyszeri szájon át történő adást követően.

**Kulcsszavak:** Fluralaner, farmakokinetika, kutya, szájon át, intravénás

## HÁTTÉR

EA fluralaner egy új, kutyáknak 12 hetes időközönként szájon át adható, rágótabletta formájában készített szisztémás rovar- és atkairtó vegyület, amely hatékony és tartós ölő hatást nyújt a kutyák több bolha- és kullancsfaja ellen.<sup>1,2</sup>

A fluralaner a vegyületek új osztályába tartozik, melynek lényeges tulajdonsága az izoxazolin szerkezet.<sup>2,3</sup> Molekulatömege 556,29,  $\log P_{ow}$  értéke (oktanol/víz partíciós koefficiense) 5,35, és erősen kötődik a plazmafehérjékhez.

A fluralaner a neuronok ligandvezérelt („kapuzott”) kloridcsatornáinak [ $\gamma$ -aminovajsav- (GABA-) és L-glutamát-vezérelte kloridcsatornáinak] erős hatású inhibitora, amely jelentős szelektivitást mutat az ízeltlábú neuronok iránt az emlős neuronokkal szemben.<sup>2,3</sup> *In vivo* vizsgálatok eredményei szerint kutyáknak egyetlen per os dózisban adva a fluralaner 12 hétig fennálló bolha- és kullancsölő aktivitást biztosít.<sup>1</sup> A fluralaner egy innovatív, nagyon hatékony és hosszú időn át ható ektoparazitaellenes szer kutyák számára.

## MÓDSZEREK

Kutyáknak szájon át történő beadásra 13,64% (súlyszázalék) fluralanert tartalmazó rágótablettákat készítettünk. Az intravénás alkalmazásra szánt vizsgálati anyag egy 2,5 mg fluralaner/ml tartalmú oldat volt egy 10% (súlyszázalék) injekciós vizet tartalmazó polietilén-glikol (PEG) 200 (90 súlyszázalék) vivőanyagban.

Egészséges kan és szuka Beagle kutyákat egy zárt teremben, szigetelt padozatú egyedi rekeszekben tartottunk a fluralaner (*per os* vagy *iv.*) beadása után 5 vagy 6 héten át az állatok közötti esetleges keresztzennyeződés elkerülése érdekében. Ezt követően a kutyákat hármass csoportokban tartottuk úgy, hogy mindig az azonos kezelési csoportba tartozó és azonos ivarú egyedek kerültek egy csoportba. A terem hőmérsékletét folyamatosan ellenőriztük és 15–21°C között tartottuk, a relatív páratartalom 40–70%, a légcsereszám óránként 10–20 volt, a megvilágítási program pedig egy 12 órás fluoreszkáló fény/12 óra sötétség ciklust követett. A kutyákat naponta egyszer, reggel etettük meg egy standard kutyatáppal, ivóvíz pedig *ad libitum* elérhető volt a számukra. A fluralaner *per os* beadásának napján a kutyák a napi eleségadagjuk felét rövid idővel a kezelés előtt, a másik felét pedig rögtön a kezelés után kapták meg, mert a fluralanertartalmú rágótabletták táplálékkal együtt adása esetén megnő a vegyület biohasznosulása.

A *per os* alkalmazás utáni szisztémás expozíció arányának és mértékének, valamint a szájon át adott dózis arányosságának meghatározása érdekében három kezelési csoport alkalmazásával egy párhuzamos csoportos vizsgálatot végeztünk. A kutyák 12,5, 25 vagy 50 mg/tskg (céldózis) fluralanert kaptak szájon át; a középső dózis (25 mg/tskg) felelt meg a minimálisan ajánlott kezelési dózishoz.<sup>1</sup> Egy külön vizsgálatban, melynek során 6 Beagle 12,5 mg/tskg fluralanert kapott lassú infúzióban, további farmakokinetikai paramétereket – teljes test clearance és megoszlási térfogat – határoztunk meg. A cikk további részében megadott dózisarányok minden esetben mg fluralaner/tskg mértékegységben vannak kifejezve.

A kutyákat mindkét vizsgálat során véletlenszerűen soroltuk kezelési csoportokba (3 kutya/ivar/csoport), ivar szerint elkülönítve és testsúly szerinti blokkos elrendezésben a kiegyensúlyozott eloszlás biztosítása érdekében. Mindkét vizsgálat megfelelt a Helyes Laboratóriumi Gyakorlat alapelveinek.<sup>5</sup> Az állatokkal kapcsolatos munka megfelelt a vonatkozó nemzeti jogszabályoknak, és azt a Harlan Laboratories S.A. Állatkísérleti Etikai Bizottsága jóváhagyta.

Az egyedi *per os* dózisokat az egyedi testsúlyok és a tabletták névleges fluralaner-tartalma alapján határoztuk meg. A kutyák egész tablettákat kaptak

egyedi 112,5 mg, 250 mg vagy 500 mg fluralanertartalmú tabletták formájában, vagy a tabletták kombinációját kapták a számított céldózishoz közeli dózis elérése érdekében. A szájon át történő beadáshoz a számított céldózist tartalmazó tablettákat a kutya nyelvhatára helyezettük. Az intravénás injekció dózistérfofogatait az egyedi testsúlyok alapján határoztuk meg, és az intravénás beadás állandó sebességű infúzióban, 5 perc alatt történt, egy automata injekciós rendszer (KDS Model 200, KD Scientific Inc., Holliston, Egyesült Államok). Az injekció óránkénti sebessége körülbelül 12-szerese volt az adott dózistérfofogatnak annak a biztosítása érdekében, hogy a teljes dózis 5 percen belül beadható legyen.

A tabletták *per os* beadása előtt, majd 2, 4 és 8 órával, illetve 1, 2, 3, 4, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84, 91, 98, 105 és 112 nappal azt követően, valamint az intravénás beadás után 15 perccel, 2, 4 és 8 órával, valamint 1, 2, 3, 4, 7, 14, 21, 28, 35, 49, 63, 77, 91 és 112 nappal a torkolati vénából (v. jugularis) nátrium-citrátos csövekbe vérmintákat vettünk. A plazmát centrifugálással elválasztottuk, majd steril műanyag csövekben fagyasztva tároltuk az elemzésig. A kutyákat a szer beadása után egy órán át szoros megfigyelés alatt tartottuk, majd azt követően naponta egyszer ellenőriztük.

A plazmamintákat a fehérje acetonitriles kicsapásával extraháltuk és 0,1%-os hangyasavval hígítottuk. Az így kapott oldat mennyiségi elemzését automatizált szilárd fázisú extrakcióval, majd tömegspektrometriás kimutatással kombinált folyadékromatográfiával (online SPE-HPLC-MS/MS) végeztük. A fluralaner meghatározására használt módszer lineáris tartománya 10,0–2500 ng/ml, az alsó meghatározási határérték (LLOQ) pedig 10,0 ng/ml volt. A fluralaner farmakokinetikai paramétereit nem-kompartmentes módszerekkel határoztuk meg, a WinNonlin® Professional Version 5.3 validált szoftver (Pharsight Corporation, California, Egyesült Államok) használatával. A maximális plazmabeli koncentráció ( $C_{max}$ ) és a maximális plazmakoncentráció eléréséhez szükséges idő ( $t_{max}$ ) megfigyelt értékek voltak. Az eliminációs felezési időt ( $t_{1/2}$ ) lineáris regresszióval számítottuk ki, a szemilogaritmusos plazmakoncentráció–idő görbe terminális részének lejtését használva. A koncentráció/idő görbe alatti területet (AUC) a 0 időponttól az utolsó mérhető koncentrációig ( $AUC_{0 \rightarrow t_1}$ ) a lineáris trapezoid szabály alkalmazásával számítottuk ki. A 0 időponttól a végtelenre extrapolált AUC-t ( $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ ) az  $AUC_{(-t)} + C_t / \lambda_z$  képlet alapján számítottuk ki, ahol a  $C_t$  a  $t$  időpontban mért plazmakoncentráció, a  $\lambda_z$  pedig a görbe terminális (log-lineáris) szakaszával összefüggő elsőrendű aránykonstans. Az *iv.* alkalmazást követő, a terminális szakaszon alapuló látszólagos megoszlási térfogatot ( $V_z$ ) a következő

képlet alapján számítottuk ki:  $Adag/\lambda_z \times AUC$ . Az iv. alkalmazás utáni teljes test clearance (Cl) kiszámítása a Dózis/AUC képlettel történt. A szájon át történő beadást követő biohasznosulás (F%) kiszámítása az átlagos  $AUC_{(0 \rightarrow \infty)}$  alkalmazásával, az  $(AUC_{[0 \rightarrow \infty]} \text{ per os} / AUC_{[0 \rightarrow \infty]} \text{ iv.}) \times (\text{Dózis iv.} / \text{Dózis per os}) \times 100$  képlettel történt. A végtelenre extrapolált átlagos tartózkodási időt (MRT) az AUMC/AUC arányként számítottuk ki, ahol az AUMC az első pillanat görbéje alatti terület. A dózis arányosságát a  $C_{max}$  és az  $AUC_{(0 \rightarrow t)}$  expozíciós paraméterekre vizsgáltuk. E célból a dózisa normalizált (névleges dózis) értékeket egy megfelelő varianciaanalízises (ANOVA) regressziós modellel elemeztük. A tesztek kétoldalúak voltak, az alkalmazott szignifikanciaszint 0,05 volt. Minden adatot számtani átlag  $\pm$  szórás értékeként fejeztünk ki, kivéve, ahol ettől eltérő kifejezett utalás szerepel.

### EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

Mindhárom, egyenként hat-hat kutyából álló csoport (életkor: 1–2 év; testsúly: 7,8–11,4 kg) állatai szájon át fluralanert kaptak a három céldózis egyikének megfelelő adagban (12,5, 25 vagy 50 mg/kg). E dózisokat teljes tabletták beadásával értük el, és így minden egyes kutya a céldózis körüli mennyiségben kapta a fluralanert. E tartomány a 12,5 mg/kg-os dózis esetében 12,0–14,6 mg/kg, a 25 mg/kg-os céldózis esetében 25,0–28,8 mg/kg, az 50 mg/kg-os céldózis esetében pedig 42,2–53,2 mg/kg közé esett. A fluralaner szájon át történő beadását követően egyetlen kutyánál sem jelentkeztek klinikai tünetek vagy mellékhatások.

A fluralaner plazmakoncentrációi a beadás után átlagosan 1 napon belül érték el a  $C_{max}$  értéket, majd az idő előrehaladtával fokozatosan csökkentek néhány alacsonyabb másodlagos csúcscsal, melyek a szer újbóli megoszlására vagy a keringésbe való visszakörülésére – például enterohepatikus recirkulációra – utalhatnak. Az átlagos plazmabeli csúcskoncentrációk dóziszfüggő módon emelkedtek. A plazmakoncentráció/idő görbék terminális szakasza csaknem párhuzamos lefutású volt: a két alacsonyabb dóziscsoportban ugyanannál a koncentrációnál nagy egyedek közötti változékonyságot mutatkozott, a nagy dózissal kezelt csoportban pedig magasabb koncentrációnál kisebb egyedek közötti változékonyságot lehetett megfigyelni. A fluralaner a kezelés után akár 122 napon át mennyiségileg meghatározható volt a plazmában ( $>10$  ng/ml), ami a szer hosszan tartó szisztémás perzisztenciájára utal (1. ábra). Az iv. kezelt csoportban (12,5 mg/kg) az 5 perces

infúziót követően a fluralaner nagyon lassú eliminációját lehetett megfigyelni. A fluralaner plazmabeli koncentrációja az összes kutyában az idő függvényében csökkent, néhány alacsonyabb másodlagos csúcscsal, melyek a szer újbóli megoszlására vagy a keringésbe való visszakörülésére – például enterohepatikus recirkulációra – utalhatnak.

A fluralaner a plazmában a beadás után akár 112 napon át mennyiségileg meghatározható volt, ami arra utal, hogy intravénás beadást követően kutyákban hosszú idejű szisztémás perzisztenciát mutatott (2. ábra).

A fluralaner koncentráció/idő adataiból számított nem-kompartmentes farmakokinetikai paraméterek az 1. táblázatban szerepelnek.

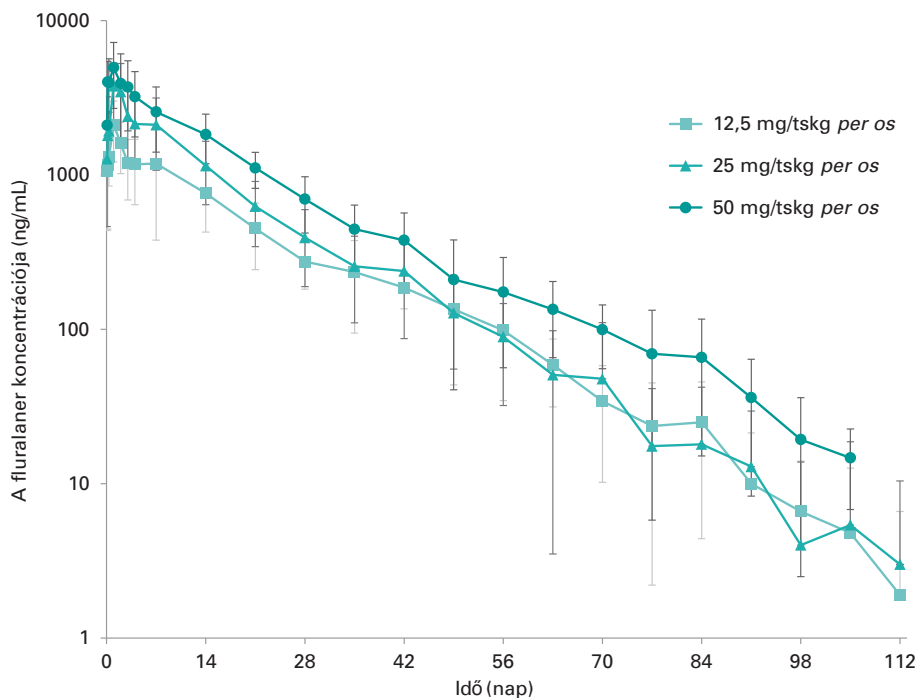
Az iv. infúziót követően a fluralaner átlagos teljes plazma-clearance értéke 0,14 l/kg/nap, a fluralaner átlagos látszólagos megoszlási térfogata pedig 3,1 l/kg volt.

Az átlagos felezési idő (15 nap) és az átlagos tartózkodási idő (20 nap) arra utal, hogy az iv. infúziót követően lassú az eliminációs folyamat. E paraméterek hasonlóan bizonyultak a különböző dózisú *per os* beadást követően meghatározott értékekhez, ami arra utal, hogy az eliminációs kinetika függetlennek tűnik a dózistól és a beadás módjától.

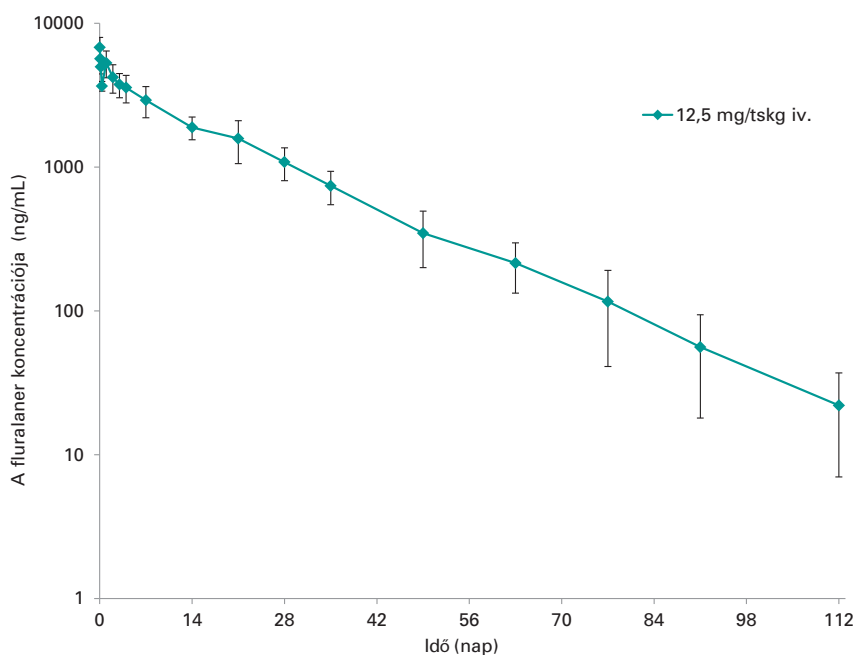
Mivel az érrendszerben csak a meg nem kötött gyógyszerek érhetők el a szervezetből való eltávolítást végző szervek számára az eliminációhoz, a terminális felezési időt a látszólagos megoszlási térfogat és a clearance határozza meg.<sup>7-9</sup> A kutya teljes testének víztérfogatát (körülbelül 0,6 l/kg) figyelembe véve<sup>6</sup>, a fluralaner iv. infúzióban történő alkalmazást követően viszonylag nagy látszólagos szöveti eloszlást ( $V_z=3,1$  l/kg) mutat, a plazmafehérjékhez történő magas szintű kötődése ellenére.

A fluralaner esetében az elimináció legfőbb útvonala valószínűleg a májon keresztül történő elimináció, mivel a vegyület nagymértékű kötődése a plazmafehérjékhez arra utal, hogy a vesefiltráció útján történő elimináció csekély mértékű; ezért feltehető, hogy a plazma-clearance egyenértékű a máj-clearance-szel. Tekintettel arra, hogy a kutya esetében a májba áramló vérmennyiség fiziológiai körülmények között mintegy 44,5 l/kg/nap<sup>6,7</sup>, a fluralaner máj-clearance-e pedig 0,14 l/kg/nap, a máj-extrakciós arány a becslések szerint alacsony (0,3%). A fluralaner hosszan tartó szisztémás hozzáférhetőségét (hasznosíthatóságát) kutyában a viszonylag magas szintű szöveti eloszlással párosuló alacsony clearance magyarázhatja.

1. ábra: A fluralaner plazmakoncentrációi (átlag ± szórás) kutyákban egyszeri *per os* alkalmazást követően. Az LLOQ (10 ng/ml) alatti értékeket az átlagok kiszámításához nullára állítottuk.



2. ábra: A fluralaner plazmakoncentrációi (átlag ± szórás) kutyákban egyszeri *iv.* alkalmazást követően. Az LLOQ (10 ng/ml) alatti értékeket az átlagok kiszámításához nullára állítottuk.



A *per os* gyógyszerforma biohasznosulása alacsonyabb *per os* dózisok alkalmazásakor kissé magasabb (34±16%, 26±11% és 20±8% a 12,5, 25 és 50 mg/tskg dózisok esetében).

Az egyes dóziscsoportok között azonban nem voltak statisztikailag szignifikáns különbségek a dóziszra

normalizált expozíciós paraméterek, az  $AUC_{(0 \rightarrow t)}$  és a  $C_{max}$  tekintetében (ANOVA,  $p=0,165$  az  $AUC_{(0 \rightarrow t)}$  és  $p=0,206$  a  $C_{max}$  esetében), így nincs semmi bizonyíték arra, hogy a fluralaner által a 12,5 mg/kg és 50 mg/kg közötti dózistartományban mutatott dózisarányosságra vonatkozó nullhipotézis ne lenne igaz.

1. táblázat: A fluralaner plazmabeli farmakokinetikai paramétereit kutyákban egyszeri *per os* vagy egyszeri iv. alkalmazást követően

Paraméterek	<i>Per os</i> 12,5 mg/kg n=6	<i>Per os</i> 12,5 mg/kg n=6	<i>Per os</i> 12,5 mg/kg n=6	Intravénás 12,5 mg/kg n=6
C <sub>max</sub> (ng/ml)	2144±860	3948±1734	5419±2086	7109±908
t <sub>max</sub> <sup>a</sup> (nap)	1 (tartomány: 0,08–2)	1 (tartomány: 1–2)	1 (tartomány: 0,17–3)	n. a.
AUC <sup>(0–112. nap)</sup> (nap*ng/ml)	29 665±13 858	46 115±18 932	70 171±26 412	87 198±11 835
AUC <sup>(0–∞)</sup> (nap*ng/ml)	29 922±13 808	46 416±18 929	70 531±26 529	87 779±12 004
t <sub>1/2</sub> (nap)	13±1	12±3	14±1	15±2
MRT (nap)	19±2	15±4	17±3	20±3
Cl (l/kg/nap)	n. a.	n. a.	n. a.	0,14±0,02
V <sub>z</sub> (l/kg)	n. a.	n. a.	n. a.	3,1±0,5

<sup>a</sup> Medián; a többi érték átlag ± szórás.  
n. a. = nem alkalmazható.

## KÖVETKEZTETÉSEK

Az egyetlen dózisban szájon át adott fluralaner jól felszívódik és hosszú eliminációs felezési idővel, hosszú átlagos tartózkodási idővel, viszonylag nagy látszólagos megoszlási térfogattal és alacsony clearance értékkel rendelkezik. E farmakokinetikai jellemzők segítenek megmagyarázni az egyetlen *per os* dózisban adott fluralaner hosszan tartó bolha- és kullancsellenes hatását kutyákban.

### Az előírások betartásával kapcsolatos nyilatkozat

E vizsgálatot Spanyolországban folytattuk le az illetékes szabályozó hatóságok engedélyének megszerzését követően.

### Összeférhetlenségi nyilatkozat

Diana Ramirez kivételével minden szerző a Merck/MSD Animal Health alkalmazottja.

### A szerzők hozzájárulása

SK, DR, MJA, RKAR és MCN egyaránt részt vett a vizsgálat megtervezésében és a vizsgálati terv összeállításában, a vizsgálat felügyeletében és az eredmények értékelésében. A kéziratot SK állította össze, és annak végleges változatát minden szerző ellenőrizte és jóváhagyta.

**Beérkezett:** 2013. december 18.

**Közlésre elfogadva:** 2014. február 26.

**A megjelenés dátuma:** 2014. március 7.

doi:10.1186/1756-3305-7-85

**E cikket a következőképpen kell idézni:** Kilp *et al.*: Pharmacokinetics of fluralaner in dogs following a single oral or intravenous administration [A fluralaner farmakokinetikája kutyákban egyszeri *per os* vagy intravénás adást követően]. Parasites & Vectors 2014 7:85.

## Irodalom

- Rohdich N, Roepke RKA, Zschiesche E: A randomized, blinded, controlled and multi-centered field study comparing the efficacy and safety of Bravecto™ (fluralaner) against Frontline™ (fipronil) in flea- and tick-infested dogs [Randomizált, vak, kontrollós és multicentrikus terepi vizsgálat a Bravecto™ (fluralaner) és a Frontline™ (fipronil) hatékonyságának és ártalmatlanságának összehasonlítására]. Parasit Vectors 2014, 7:83.
- Gassel M, Wolf C, Noack S, Williams H, Ilg T: The novel isoxazoline ectoparasiticide fluralaner: selective inhibition of arthropod  $\gamma$ -aminobutyric acid- and L-glutamate-gated chloride channels and insecticidal/ acaricidal activity [Az új izoxazolin ektoparazitoid vegyület, a fluralaner: az ízeltlábúak  $\gamma$ -aminovajsav- és L-gutamát-vezérelte kloridcsatornáinak szelektív gátlása és az inszektoid/akaroid hatás]. Insect Biochem Mol Biol 2014, 45:111–124.
- Ozoe Y, Asahi M, Ozoe F, Nakahira K, Mita T: The antiparasitic isoxazoline A1443 is a potent blocker of insect ligand-gated chloride channels [Az izoxazolin A1443 nevű antiparazitikum hatékonyan blokkolja a rovarok ligandvezérelt kloridcsatornáit]. Biochem Biophys Res Commun 2010, 391:744–749.
- Walther FM, Allan MJ, Roepke RKA, Nuernberger MC: The effect of food on the pharmacokinetics of oral fluralaner in dogs [A táplálék hatása a *per os* adott fluralaner farmakokinetikájára kutyákban]. Parasit Vectors 2014, 7:84.
- OECD: Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring No.1. OECD Principles of Good Laboratory Practice (as revised in 1997) [A Helyes Laboratóriumi Gyakorlat Alapelvei és Betartásának Ellenőrzése Sorozat, 1. szám (átdolgozva 1997-ben)]. Paris: OECD Environmental Health and Safety Publications [OECD Környezet-egészségügyi és Környezetbiztonsági Közlemények], ENV/MC/ CHEM (98)17; 1998.
- Davies B, Morris T: Physiological parameters in laboratory animals and humans [A laboratóriumi állatok és az ember élettani paramétereit]. Pharm Res 1993, 10(7):1093–1095.
- Toutain PL, Bousquet-Mélou A: Clearance [Clearance]. J Vet Pharmacol Ther 2004, 27:415–425.
- Toutain PL, Bousquet-Mélou A: Plasma terminal half life [Terminális felezési idő a plazmában]. J Vet Pharmacol Ther 2004, 27:427–439.
- Toutain PL, Bousquet-Mélou A: Volumes of distribution [Megoszlási térfogatok]. J Vet Pharmacol Ther 2004, 27:441–453.