

APLICACION CLINICA DE LOS PRINCIPIOS FARMACOCINETICOS DE LOS BISFOSFONATOS

EMILIO J.A. ROLDÁN, OSCAR QUATTROCCHI, GRACIELA L. ARAUJO, ENRIQUE PICCINNI

Departamentos de Desarrollo Analítico y de Farmacología Clínica, Gador SA, Buenos Aires.

Resumen Los bisfosfonatos son un grupo de agentes osteotrópicos que pueden interactuar con el metabolismo esquelético de distintas maneras, aunque sus características cinéticas son similares cuando se los administra en dosis proporcionales y se evalúan por métodos semejantes. Su administración por vía oral es efectiva, aunque presentan una baja absorción (biodisponibilidad: 0.3-5%). Se distribuyen rápidamente siendo captados por las proteínas del plasma, el esqueleto, y eliminados por vía renal en pocos minutos. La fracción retenida en hueso permanece por períodos muy prolongados aunque aparentemente en un compartimiento inactivo. El riesgo de liberación a una biofase activa estará relacionado con la potencia del compuesto. En las dosis clínicas no son retenidos por tejidos blandos justificando la ausencia de efectos colaterales extraesqueléticos. Los niveles en plasma tienen escasa relación con la actividad farmacológica por lo que los esquemas posológicos deben guiarse mas por el uso de marcadores bioquímicos de la enfermedad ósea que por las variables cinéticas corrientes. Únicamente la insuficiencia renal induce a modificar las dosis establecidas.

Palabras clave: bisfosfonatos, biodisponibilidad, farmacocinética

Los bisfosfonatos (BP's) son un grupo de compuestos utilizados para la prevención y tratamiento de alteraciones del metabolismo óseo. Tienen en común con los pirofosfatos inorgánicos su afinidad por el tejido esquelético y su potencialidad para interactuar con la mineralización del mismo. Desde el punto de vista farmacodinámico los BP's presentan importantes diferencias entre sí en cuanto al mecanismo de acción, potencia y efectividad¹. Contrariamente, las características cinéticas de todos ellos son bastante similares, pudiéndose decir que se trata de compuestos entre escasamente solubles y solubles, de baja absorción, rápida captación esquelética, metabolismo mínimo o nulo y rápida eliminación². En este informe se describen los principales datos cinéticos de los BP's mejor conocidos, con especial referencia a la interpretación clínica de las variables descritas.

Vías de administración, solubilidad y biodisponibilidad.

Los BP's de primera generación como etidronato (EHDP) y clodronato (Cl_2MDP) y los de segunda generación, con un grupo amino terminal en la cadena alquílica, como pamidronato (APD) y alendronato (ABD), son compuestos prácticamente insolubles en fases lipídicas y de baja solubilidad en fases acuosas (Figura 1). Por sus características químicas, pueden formar complejos con iones metálicos y precipitar en medios biológicos, ya sea por formación de una sal de calcio insoluble o por formación del ácido bisfosfónico de menor solubilidad que la sal. La única excepción es el olpadronato (Me_2APD), bisfosfonato de tercera generación, que presenta una solubilidad relativamente mayor. Estas características son importantes porque únicamente las moléculas en solución pueden difundir y atravesar la barrera intestinal. Puede observarse que el "estado iónico" del BP está relacionado con el pH

Dirección Postal: Dr Emilio Roldán, Gador SA, Darwin 429, 1414 Buenos Aires, Argentina.

$\begin{array}{c} \text{PO}_3\text{H}^- \\ \\ \text{R}_2-\text{C}-\text{R}_1 \\ \\ \text{PO}_3\text{H}^- \end{array}$	Bisfosfonato		R ₁	R ₂
	EHDP	Etidronato	OH	CH ₃
	Cl ₂ MDP	Clodronato	Cl	Cl
	APD	Pamidronato	OH	(CH ₂) ₂ .NH ₂
	ABP	Alendronato	OH	(CH ₂) ₃ .NH ₂
	Me2APD	Olpadronato	OH	(CH ₃) ₂ .N(CH ₃) ₂

Figura 1: Estructura química de los bisfosfonatos

del medio. A mayor pH corresponde mayor ionización, y menor absorción del BP por vía oral (Hein y col., datos no publicados). Las tablas 1 y 2 resumen los datos cinéticos clínicos publicados.

Al administrarse por vía oral sólo se absorben en una pequeña fracción, estimada en promedio entre el 0,3 y el 5% de la cantidad administrada³⁻⁷. Estas cifras presentan una gran variabilidad interindividual. No obstante la escasa absorción, las dosis dadas por vía oral son suficientes para modular efectivamente el metabolismo óseo.

Las formulaciones farmacéuticas constituyen un elemento clave para disminuir la reactividad del BP en el medio digestivo (entendiendo reactividad como la tendencia a la desestabilización y precipitación, y con ello la posibilidad de irritar la mucosa en el sitio de precipitación) y mejorar la absorción de los BP's. La micronización de las partículas de los BP's constituye otro recurso que parece aportar algunas ventajas adicionales⁸.

Una vía de administración alternativa es la intravenosa, ya que la administración parenteral

Tabla 1: Biodisponibilidad y algunos datos cinéticos disponibles de los principales bisfosfonatos (BP's) administrados a humanos por vía oral. (*) calculado para 70 Kg.

BP's (dosis en mg)	forma	método	biod (%)	Vd (L)	Cl _r (ml/min)*	T _{1/2} β (h)
EHDP ₄₀₀	tabletas	^{99m} Tc	2-5	-	106	-
APD ₁₀₀	cápsulas	HPLC	1	-	-	-
APD ₁₅₀	tabletas	HPLC	< 1	-	-	-
Me ₂ APD ₅₀	solución	^{99m} Tc	3	14-38	16-34	12
ABD ₁₀	tabletas	HPLC	< 1	-	-	-
CL ₂ MDP ₄₀₀	cápsulas	¹⁴ C	1-4	20	-	13

Referencias: biod = biodisponibilidad respecto a la misma droga administrada por vía I.V.; Vd = volumen de distribución; Cl_r = depuración renal de la droga; T_{1/2}β = vida media de eliminación plasmática.

Tabla 2: Perfil farmacocinético de los principales bisfosfonatos (BP's) administrados a humanos por vía intravenosa. (*) calculado para 70 Kg. (**) en dosis como trazador.

BP's (dosis en mg)	velocidad infusión(hs)	método (L)	Vd (h)	T _{1/2} β (ml/min*)	Cl _r
APD _{2.6} **	0.16	^{99m} Tc	-	2.5	-
APD ₆₀	1-4	HPLC	-	0.4	74
ABD ₁₀	2	¹⁴ C	28	-	73
Me2APD ₅	0.16	^{99m} Tc	50-64	9-10	79

Referencias: Idem Tabla 1

favorece en general la "estabilización" *in situ* del fármaco. Por este mismo motivo, la administración intravenosa debe ser realizada siempre por infusión muy lenta (entre 1 a 4 horas).

Absorción y distribución.

La fracción absorbida o la cantidad administrada por vía intravenosa es rápidamente captada por las proteínas plasmáticas en aproximadamente un 30%⁹. El otro compartimiento de captación rápida lo constituyen los tejidos «duros» o mineralizados. No se ha descrito la acumulación en tejidos «blandos» humanos. El APD administrado por vía intravenosa difunde rápidamente con un $T_{1/2}$ de 21 minutos¹⁰. A las 2 horas de administrar ^{99m}Tc APD a mujeres sanas o con enfermedad de Paget por vía intravenosa, se observa la presencia del trazador en el esqueleto (principalmente en los huesos axiales, epífisis de huesos apendiculares, en los maxilares y también en los «focos» pagéticos), algo menos puede verse en riñón y bastante en vejiga, no detectándose en otros órganos (figura 1).

Los modelos experimentales aportan mas datos, pero pueden presentar diferencias respecto de los hallazgos clínicos y de las dosis estudiadas. Además, suelen ser llevados a cabo con dosis proporcionalmente mayores que las utilizadas en humanos. La administración de ^{99m}Tc APD en ratas revela cierta predominancia de actividad en riñón e hígado, desde donde el trazador es eliminado con una $T_{1/2}$ muy rápida. En conejos, en ayunas, se observa una lenta absorción (de 6-8 horas) cuando se lo administra por vía oral. Con esta técnica empero, la intensa actividad digestiva del trazador enmascara la medición de otros órganos. El pasaje a leche materna no ha sido formalmente estudiado pero se ha detectado ocasionalmente la presencia de actividad en glándula mamaria y leche de conejas (Mondelo N y col, datos no publicados) por lo que debe presumirse que la eliminación por esa vía es factible. Los estudios experimentales llevados a cabo con ^{14}C revelan diferencias en la distribución de EHDP, Cl_2MDP y APD en los tejidos blandos, siendo similar el grado de captación ósea de todos ellos¹¹. El APD, a dosis altas, puede ser captado por bazo e hígado en mayor proporción¹².

Afinidad por el esqueleto.

Se trata de compuestos altamente selectivos, que no se fijan en todo el esqueleto sino en las superficies donde el mineral está expuesto, en una magnitud que depende del metabolismo óseo. La administración de ^{99m}Tc APD en ratones revela una relación de captación tejidos duros/tejidos blandos de 6-7 veces¹³. Aplicando la misma técnica por administración intravenosa¹⁰ en humanos se ha descrito una relación de hasta 17 veces a la 5^a hora.

La captación esquelética parece ser el factor cinético más importante relacionado con la actividad clínica. Concordantemente, las variables cinéticas del Me_2APD no se correlacionan con el peso o superficie corporal sino con los marcadores de metabolismo óseo (tabla 3). A mayor actividad metabólica corresponde mayor captación, lo cual se ve reflejado por la retención corporal total y el volumen de distribución ($r = 0.7$ a 0.8 con los niveles plasmáticos de fosfatasa alcalina y 0.75 a 0.8 con los niveles urinarios de hidroxiprolina)⁷. La mayor distribución es sólo aparente, en realidad el

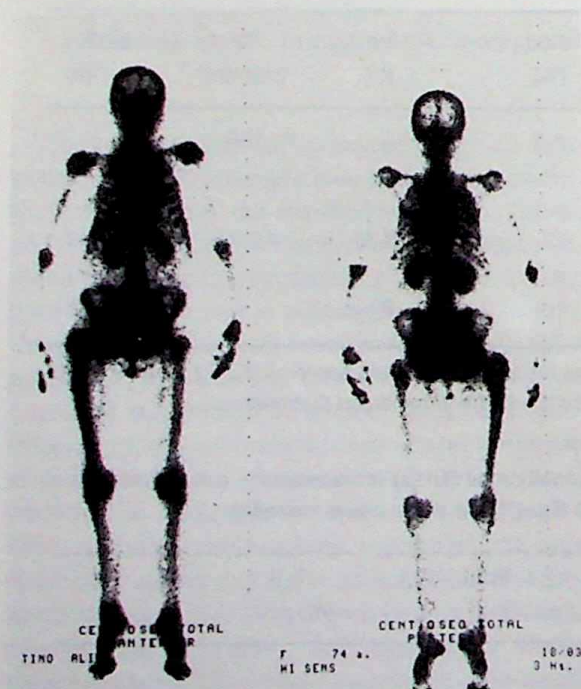


Figura 2: Captación esquelética observada por centellografía en una mujer con enfermedad de Paget (actividad predominante en la tibia derecha) a las 3 horas de la administración de ^{99m}Tc APD (Centellokit®). (Gentileza de Degrossi OJ et al.)

Tabla 3: Análisis de regresión lineal múltiple entre variables cinéticas, antropomorfométricas, de metabolismo óseo y proteínas plasmáticas, calculadas luego de administrar ^{99m}Tc olpadronato por vía oral (50 mg) o I.V. (5 mg).

Variables cinéticas del ^{99m}Tc -Olpadronato													
		Post administración I.V.						Post administración oral					
	n	C_{24}	AUC_{0-24}	Vd_{ss}	Cl_p	$T_{1/2\beta}$	RCT %	C_{24}	AUC_{0-24}	Vd_{ss}	Cl_p	$T_{1/2\beta}$	C_{max}
Antropométricas													
Edad	11	-.04	-.20	.34	.06	.05	.33	-.16	-.11	.56	.04	-.41	-.22
Peso corporal	11	-.03	.02	.04	.16	-.21	-.03	-.38	-.30	.27	.23	-.41	-.38
Peso relativo	11	.05	.20	-.12	.09	-.29	.02	-.32	-.23	-.01	-.02	-.28	-.29
Superficie corporal	11	-.15	-.10	.05	-.19	-.21	-.12	-.40	-.32	.40	.36	-.39	-.39
Metabolismo Oseo													
Fosfatasa alcalina	11	.12	-.25	.68	.04	.56	.81	.53	.46	.11	-.21	-.11	.44
Hidroxiprolina	11	.19	-.17	.46	-.14	.56	.54	.16	.17	.74	.58	-.31	.10
PTH	5	-.11	-.28	.32	.06	.13	.40	.80	.82	-.62	-.83	.05	.81
Prot. plasmáticas													
Albumina	6	-.03	.31	-.75	-.20	-.50	.21	-.77	-.65	.65	.82	.12	-.68
α_1	6	.55	.52	-.49	-.49	.36	-.14	-.44	-.51	.45	-.13	.11	-.50
α_2	6	.09	-.07	-.10	-.16	.64	-.57	-.29	-.42	-.05	-.00	.39	-.33
β	6	-.62	-.43	-.29	.49	-.46	.59	-.41	-.42	.74	-.14	.96	-.32
γ	6	.14	.11	.28	-.14	-.02	-.30	.33	.43	-.63	.38	-.77	.32



Correlación alta y significativa



Correlación alta pero no significativa en esta muestra

Referencias: C_{24} = Concentración a las 24 horas pos dosis; AUC_{0-24} = área bajo la curva de concentraciones desde la hora 0 a la 24; Vd_{ss} = volumen de distribución estimado es estado estacionario; Cl_p = depuración plasmática de la droga; $T_{1/2\beta}$ = vida media de eliminación plasmática; RCT = tasa de retención corporal a las 24 horas; C_{max} = pico máximo de concentración plasmática.

compuesto se adsorbe más al esqueleto y en proporción se «diluye» más en el plasma.

La adsorción a los cristales de hidroxiapatita parece estar influida por la estructura «tridente» de los grupos hidroxilos ligados a la porción P-C-P. El radical R_1 influye entonces en la unión a dichos cristales. Así el EHDP, APD, ABP y Me_2APD , todos con igual R_1 (-OH) tienen la misma afinidad

por la hidroxiapatita. El Cl_2MDP es 10 veces menos afín ($R_1 = -Cl$)¹⁴.

El BP puede ser «despegado» de los cristales de hidroxiapatita si disminuye el pH local, tal como sucede cuando se activa la resorción¹⁵. Sin embargo es probable que la mayor parte quede atrapada en el nuevo tejido mineralizado conformando un compartimiento inactivo. Una eventual

nueva resorción puede re-exponer al BP y liberar una cierta cantidad de moléculas, dependiendo de su potencia farmacológica el grado de actividad consecuente. La vida ósea media varía desde 300 días para el APD hasta 10 años para el ABP¹⁶, según se ha calculado en modelos experimentales. Los estudios con marcadores del metabolismo óseo revelan que, al menos con APD no hay riesgo de acumular un efecto inhibidor de la resorción en las terapias a largo plazo¹⁷. Esto concuerda con la idea de que la vida media prolongada no constituye un factor de riesgo con este derivado.

Metabolismo y excreción.

La estructura P-C-P es estable, no conociéndose enzimas que la metabolicen. Por lo general los bisfosfonatos son excretados por vías urinarias sin modificar. Sin embargo no puede excluirse que ocurran procesos de glucuronización en forma limitada. El APD se elimina por simple filtración glomerular. En la excreción del Cl_2MDP , contrariamente están involucrados mecanismos activos por lo que este bisfosfonato, administrado en dosis altas, ha sido ocasionalmente relacionado con daño renal. Dada la posible acumulación de Cl_2MDP se sugiere administrar un 75% de la dosis si el clearance de creatinina está reducido a 50-80 ml/min, un 50-75% de la dosis si es de 12-50 ml/min y el 50% si es menor a 12 ml/min¹⁸.

Importancia de la cinética en la efectividad de los BP's.

La descripción convencional de la farmacocinética de los BP's es de poca ayuda para tratar de establecer los esquemas posológicos mas convenientes. Efectivamente, la escasa correlación entre farmacocinética y farmacodinamia, ha motivado que la terapéutica humana se sustente mas en las relaciones dosis-respuesta que en las curvas de concentración sanguínea¹⁹. Independientemente de la cantidad disponible en los compartimientos sanguíneos o de tejidos blandos, interesa saber cuanto del BP's administrado es captado por la fracción mineral expuesta del esqueleto siendo tal la definición de biofase de estos compuestos. Sin embargo, hasta hoy no ha sido posible estimar dicho comparti-

miento en humanos. El hecho que la captación de BP's marcados con $^{99\text{m}}\text{Tc}$, disminuya luego de tratamientos antiresorptivos resulta concordante⁷. El estudio de la biodisponibilidad individual permite detectar casos de resistencia a la absorción oral. En la práctica clínica, las preparaciones inyectables surgieron como una alternativa válida, en aquellos casos en los cuales había una resistencia aparente a la dosificación oral. Por otra parte, con APD oral no se encuentran diferencias significativas en el nivel plasmático cuando la dosis administrada varía entre 150 y 300 mg/día²⁰, lo cual minimiza el valor clínico de la dosis dada, salvo en los casos más extremos.

Importancia de la cinética en la toxicidad de los BP's.

En cuanto a la tolerabilidad sistémica, los estudios cinéticos resultan útiles para demostrar la ausencia de interacciones entre los BP's y los principales órganos. La escasa potencialidad de interferir con sistemas enzimáticos del hígado y del riñón y la no acumulación en tejidos blandos cuando se administran dosis repetidas son datos cinéticos que explican la virtual ausencia de efectos colaterales extradigestivos. Sin embargo, el hecho de que algunos nuevos BP's contengan grupos aromáticos o halógenos en su estructura sugiere la utilización de mecanismos metabólicos y de eliminación adicionales, indicando la necesidad de adoptar, en estos casos, mayores precauciones.

Discusión y Conclusiones.

Los datos aquí presentados provienen en su mayoría de estudios independientes, ante la ausencia de comparaciones paralelas publicadas. Cuando se utiliza el $^{99\text{m}}\text{Tc}$ como trazador, debe considerarse que el compuesto marcado es un dímero y no una molécula aislada. No obstante cuando se tiene la precaución de evitar la formación de Tc libre, los resultados experimentales comparando $^{99\text{m}}\text{Tc}$ con ^{14}C son semejantes¹⁸.

Los datos cinéticos de los BP's tienen mas utilidad en el estudio de su tolerabilidad que en la determinación de los esquemas terapéuticos.

La vía de administración preferida para los tratamientos crónicos es la oral. La baja absorción

de estos compuestos no es un inconveniente salvo para el caso del EHDP, cuyo bajo margen de seguridad aconseja evitar el uso diario de esta droga más allá de unas pocas semanas. Entre los restantes, el APD es el BP que mas se ha utilizado para el tratamiento en seres humanos.

El tratamiento con dosis única diaria no debe entenderse como una exposición continua a estas drogas con su biofase, sino como una dosificación en micropulsos. Esto significa que la pequeña fracción de droga que se absorbe, si bien lo hace en forma variable, es rápidamente captada por la superficie mineral expuesta en los sitios de resorción, cuya superficie total depende a su vez de la velocidad de recambio óseo. Así se entiende porque las hipercalcemias malignas severas y los enfermos severos de Paget requieren mayores dosis. Por otra parte los BP's se eliminan rápidamente de los restantes compartimentos centrales no dando lugar a redistribución, completando la idea de administración en pulso.

Estas características se describen principalmente con EHDP, Cl_2MDP , APD, Me_2APD y ABP y no pueden extrapolarse para otros BP's, sobre todo los de cadena lateral extendida o aromática, aún en investigación y cuyas biotransformación, conjugación e incluso retención prolongada en algún tejido blando puede ocurrir.

Los datos cinéticos indican la ausencia de correlación entre variables antropomorfométricas y las variables cinéticas de olpadronato⁸. Es decir que el tamaño de la dosis diaria debe considerarse según el grado de la enfermedad y no la superficie o el peso corporal del paciente.

La reactividad de los bisfosfonatos está relacionada con la severidad de los efectos colaterales digestivos, en el sitio de inyección o en el de excreción. La droga precipita en medios de pH bajo o al combinarse con calcio e irrita las mucosas digestivas en el sitio de precipitación. Esto es mas frecuente con los amino-BP's, el APD y el ABP. En el caso del APD este problema es resuelto con formulaciones gastrorresistentes como la de Aminomux⁹, que además de presentar las partículas de BP suspendidas en un medio oleoso resisten la disgregación en un pH bajo, propio del estómago, y liberan su contenido al llegar a zonas de mayor pH, al atravesar el píloro. Por medio de este u otro recurso farmacotécnico, las formas farmacéuticas modernas han reducido sustancialmente la severidad de los síntomas di-

gestivos hasta expresiones tolerables en la mayoría de los tratamientos prolongados. Por otra parte, la mayor potencia de algunos BP's como por ejemplo el ABP, permite su utilización en dosis significativamente menores, disminuyendo así la incidencia de irritación gástrica y permitiendo utilizar formas farmacéuticas simples. El Me_2APD posee un grupo amino terminal dimetilado, resultando en una molécula de igual potencia que el ABP pero unas 10 veces mas soluble que éste, reduciendo aún más el riesgo de irritación de los tejidos expuestos.

Summary

Clinical evaluation of bisphosphonate's pharmacokinetic principles

Bisphosphonates are a group of osteotropic substances able to modulate bone metabolism in different ways. They all display similar pharmacokinetic characteristics when administered in proportional dosages and assessed by similar methods. With the exception of olpadronate which is soluble in water, bisphosphonates have poor solubility, and may easily precipitate in the digestive media. In spite of their low digestive absorption (Bioavailability: 0.3-5%), they are effectively administered by oral route. Once in plasma they distribute rapidly, being uptaken by mineralized tissues, plasma proteins or eliminated by renal filtration in few minutes. The fraction retained in bones may be stored for long periods (from months up to 10 years depending on the compound) in an apparent inactive compartment. The risks of newly released molecules may be related to the potency of the drug. Within the clinical range of doses, bisphosphonates are not retained in soft tissues. This may explain the lack of extraskeletal collateral effects. Plasma blood levels are scarcely related to the clinical activity. Therefore, dosage may be guided better by biochemical markers of the bone disease than by the standard kinetic variables. On the other hand, dose is independent from age and/or body weight. Only renal impairment may induce additional dose adjustments.

Bibliografía

1. Roldán EJA. Los bisfosfonatos: Estructura química, farmacología y toxicología de los bisfosfonatos de 1^{ra}, 2^{da} y 3^a generación. *Rev Arg Endocrinol Metab* 1987; 24:2-8.
2. Fleisch H. Bisphosphonate in bone disease. From the

- laboratory to the patient. The Partenon Publishing Group Ltd., Carnforth, 1995.
3. Daley Yates PT, Dodwell DJ, Pongchaidecha M, Coleman RE, Howel A. The clearance and bioavailability of pamidronate in patients with breast cancer and bone metastases. *Calcif Tissue Int* 1991; 49:433-435.
 4. Fogelman I, Smith L, Mazess R, Wilson MA, Bevan JA. Absorption of oral diphosphonate in normal subjects. *Clin Endocrinol* 1986; 24:57-62.
 5. Reginster JYL. Oral tiludronate: pharmacological properties and potential usefulness in Paget's disease of bone and osteoporosis. *Bone* 1992; 13:351-354.
 6. Yakatan GJ, Poynor WJ, Talbert RL, et al. Clodronate kinetics and bioavailability. *Clin Pharmacol Ther* 1982; 31:402-410.
 7. Degrossi OJ, Ortiz M, Degrossi EB, et al. Bone scanning, serum kinetics and bioavailability of ^{99m}Tc sodium olpadronate in patients with Paget's bone disease or osteoporosis. *Eur J Clin Pharmacol* 1995; 48: 489-494.
 8. Spivacow R, Roldán EJA, Zanetti D, Piccinni E, Zanchetta JR. Tolerabilidad de los bisfosfonatos orales en pacientes con osteoporosis y otras osteopatías médicas. *Medicina (Buenos Aires)* 1997; 57 (Supl. I): 114-8.
 9. Daley Yates PT, Cal JC, Cockshott A, Pongchaidecha M, Gilchrist K. Plasma protein binding of APD: role of calcium and transferrin. *Chem Biol Interactions* 1992; 81:79-89.
 10. Degrossi OJ, Oliveri P, García del Río H, Labriola R, Artagaveytia D, Degrossi EB. Technetium - ^{99m}MDP as a bone scanning agent. *J Nucl Med* 1985; 26:1135-1139.
 11. Mönkkönen J, Koponen HM, Ylitalo P. Comparison of the distribution of three bisphosphonate in mice. *Pharmacol Toxicol* 1989; 65: 294-298.
 12. Leyvraz S, Hess V, Flesch G, et al. Pharmacokinetics of pamidronate in patients with bone metastases. *J Nat Cancer Inst* 1992; 84: 788-792.
 13. Fogelman I, Lazarus C. Comparison of the pharmacokinetics of ^{14}C -labelled APD and ^{99m}Tc -labelled APD in the mouse. *Calcif Tissue Int* 1989; 45: 198-199.
 14. van Beek E, Hoekstra M, van de Ruit M, Lowick C, Papapoulos S. Structural requirements for bisphosphonate actions in vitro. *J Bone Miner Res* 1994; 9: 1875-1882.
 15. Sato M, Grasser W, Endo N, et al. Bisphosphonate action. *J Clin Invest* 1991; 88: 2095-2105.
 16. Gertz BJ, Holland SD, Kline WF, Matuszewski BK, Porras AG. Clinical pharmacology of alendronate sodium. *Osteoporosis Int* 1993; 3 (supl): S13-16.
 17. Valkema R, Papapoulos V, Pauwels EKJ, Bijvoet OLM, Papapoulos SE. No evidence of cumulative effect of low dose APD on bone remodelling during four year continuous treatment in osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1987; 4 (Supl): S370.
 18. Saha H, Castren-Kortekangas P, Ojanen S et al. Pharmacokinetics of clodronate in renal failure. *J Bone Miner Res* 1994; 9: 1953-1958.
 19. Papapoulos SE, Hoekman K, Lowik CWGM, Vermeij P, Bijvoet OLM. Application of an in vitro model and a clinical protocol in the assessment of the potency of a new bisphosphonate. *J Bone Miner Res* 1989; 4:775-781.
 20. Hyldstrup L, Flesch G, Hauffe SA. Pharmacokinetic evaluation of pamidronate after oral administration: A study on dose proportionality, absolute bioavailability, and effect of repeated administration. *Calcif Tissue Int* 1993; 53: 287-300.