

Predklinička ispitivanja inhibicijskog i interakcijskog potencijala novih lijekova na razini citokroma P450

MIRZA BOJIĆ

Zavod za farmaceutsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta
Sveučilišta u Zagrebu, A. Kovačića 1, 10000 Zagreb

Uvod

Citokrom P450 superporodica enzima metabolizira 96 % poznatih lijekova od čega najveći dio metaboliziraju CYP3A4/5 (33 %), CYP2D6 (13 %), CYP2C9 (10 %), CYP2C19 (9 %) i CYP1A2 (9 %) (1). Primarna svrha metaboličkih reakcija je prevođenje ksenobiotika u polarnije metabolite s ciljem njihove što učinkovitije eliminacije iz organizma. Neke od karakterističnih reakcija biotransformacija pojedinih citokroma su 6 β -hidroksilacija testosterona (CYP3A4), oksidacija nifedipina (CYP3A4), *O*-demetilacija dekstrometorfana (CYP2D6), alifatska hidroksilacija tolbutamida (CYP2C9), 4'-hidroksilacija *S*-mefenitoina (CYP2C19), *N*³-demetilacija kofeina (CYP1A2), *O*-deetilacija fenacetina (CYP1A2) i druge. (2)

Pojedini lijekovi mogu i inhibirati metaboličku aktivnost citokroma P450. Poznati inhibitori citokroma su antimikotici ketokonazol, itrakonazol, antibiotici eritromicin, troleandomicin, bergamotin i naringenin iz soka grejpa (CYP3A4), antidepresiv fluoksetin, antipsihotik haloperidol, antiaritmik kinidin (CYP2D6), antiulkusni lijek omeprazol, tuberkulostatik izoniazid (CYP2C19), antimikotik flukonazol (CYP2C9), uroantiseptici fluorokinolinskog tipa, antidepresiv fluvoksamin, antiulkusni lijek cimetidin (CYP1A2) i drugi. (2)

Usljed politerapije može doći do interakcija između ksenobiotika, primjerice lijekova međusobno, lijekova i sastojaka prehrane ili biljnih droga. Takve interakcije najčešće su posljedica interferencije s metaboličkim procesima, a posljedica su inhibicije ili indukcije metaboličkih enzima.

Jedan od primjera lijekova koji je zbog brojnih interakcija s drugim ksenobiotcima na razini inhibicije enzima koji sudjeluju u njihovom metabolizmu povučen s tržišta je mibefradil – antihipertenziv, blokator kalcijevih kanala koji je na tržište došao 1997. godine. Iako je u vrijeme registracije bilo poznato da mibefradil inhibira jetrene citrokome P450, potencijal interakcija ostao je podcijenjen. U manje od

godinu dana broj klinički značajnih interakcija mibefradila narastao je na preko 30, te je iz tog razloga 1998. povučen s tržišta. Slučaj mibefradila ukazao je na potrebu rane procjene potencijala inhibicije jetrenih enzima već u fazama predkliničkog razvoja novog lijeka (3).

Potencijal klinički značajnih interakcija posebno postoji kod citokroma P450 podložnih genetskom polimorfizmu kao što su CYP2C9 (varfarin), CYP2C19 (omeprazol) i CYP2D6 (kodein i triciklički antidepresivi) (2).

Cilj ovog rada je opisati enzimске sustave citokroma P450 za praćenje metabolizma lijekova, karakterizaciju sadržaja i aktivnosti citokroma P450 sa svrhom ispitivanja inhibicija enzima citokroma P450, što predstavlja osnovu za ocjenu potencijala metaboličkih interakcija lijek-lijek u predkliničkim ispitivanjima.

Enzimski sustavi za praćenje metabolizma lijekova

Poznata je činjenica da se većina lijekova metabolizira preko enzima citokroma P450 (1), većina predliničkih ispitivanja usmjerena je upravo na ove enzime. U nastavku su opisani enzimski sustavi koji se primjenjuju u ispitivanju inhibicijskog i interakcijskog potencijala. Navedeni sustavi se za potrebe *in vitro* ispitivanja karakteriziraju sadržajem proteina i testovima aktivnosti. Određivanje sadržaja citokroma P450 temeljeno je na apsorpcijskom maksimumu diferencijalnog spektra na 450 nm (otuda i potječe naziv pigment 450 – P450). Za određivanje aktivnosti pojedinih enzima citokroma P450 primjenjuju se različite analitičke tehnike opisane na primjerima hidroksilacije testosterona (tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, HPLC), *O*-demetilacija testosterona (spektrofotometrija) i hidroksilacija kumarina (fluorescencija).

Mikrosomi

Jedan od osnovnih sustava za praćenje metaboličkih reakcija su mikrosomi. Mikrosomalna frakcija se dobiva frakcionim centrifugiranjem, a kao najčešće korišten izvor enzima relevantnih za praćenje metabolizma lijekova koristi se tkivo jetre miševa, štakora ili ljudi. Prednost ovog enzimskog sustava je smještaj enzima citokroma P450 na ostatcima membrana endoplazmatskog retikuluma. Vežanje na membrane omogućuje zauzimanje aktivne konformacije enzima odnosno bolju aktivnost enzima. Mikrosomi se uobičajeno karakteriziraju sadržajem proteina i citokroma P450 (4).

Rekombinantni citokromi P450

Jedan od najčešće korištenih sustava za ekspresiju citokroma P450 je bakterija *Escherichia coli*. Kompetentne bakterijske stanice transformiraju se s plazmidom sa sekvencom citokroma P450 od interesa. Osim bakterijskih sustava često se primjenjuju i bakulovirusni sustavi dobiveni na kulturama stanica insekata (bakulosomi), na kojima mogu biti koekspirirani uz citokrome i NADPH reduktaza odnosno

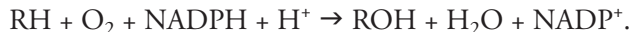
citokrom b_5 . Prednost rekombinantnih sustava je mogućnost primjene čistog enzima za određivanje o metabolizmu ovisne inhibicije/inaktivacije citokroma P450 te mogućnost kvantifikacije doprinosa enzima metabolizmu pojedinih lijekova. Negativna strana su nedostatak potencijalne glikozilacije ukoliko je riječ o bakterijskim sustavima te problematična rekonstitucija nekih citokroma kao što su CYP3A.

Hepatociti

Praćenje metabolizma na hepatocitima daje cjelovitiju informaciju o metabolizmu lijekova jer uključuje i metaboličke produkte reakcija konjugacije. Osim toga na hepatocitima se može pratiti i indukcija citokroma, kao i transport odnosno hepatički klirens. Kako je riječ o *in vitro* staničnim kulturama na njima se mogu pratiti i toksični učinci lijekova.

Inkubacije s enzimima citokroma P450

Citokromi P450 su hemoproteini s feri ionom na aktivnom mjestu vezanom na porfirinski prsten i cisteinski ostatak na apoproteinskom dijelu. Smješteni su na membranama endoplazmatskog retikuluma i mitohondrija, a funkcionalno predstavljaju monooksigenaze koje inkorporiraju hidroksilnu skupinu iz molekuskog kisika u supstrat i vodu (5).



Količina citokroma P450 potrebna za dokazivanje odnosno određivanje metabolita varira od sustava koji se koristi odnosno citokroma na kojem se metabolizam ispituje. Za rekonstituciju CYP3A4 potrebno je koristiti lipide kao što su *L*- α -1,2-dilauroil-*sn*-glicero-3-fosfokolin, fosfatidilserin i *L*- α -1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfokolin. U slučaju bakulosoma i mikrosoma citokromi su eksprimirani na membranama pa nema potrebe za dodavanjem lipida.

pH inkubacijske smjese najčešće se održava na pH 7,4 no enzimska aktivnost treba se optimirati ovisno o supstratu i pH. Fosfatni pufer može sadržavati ione teških metala čiji se utjecaj na enzim i supstrat izbjegava kompleksiranjem s EDTA.

Za enzimsku aktivnost citokroma neophodan je NADPH kao izvor elektrona. NADPH se može primijeniti direktno ili što je mnogo češće, u obliku generirajućeg sustava. Izvor NADPH u *in vitro* uvjetima je glukoza-6-fosfat dehidrogenaza koja prevodi glukoza-6-fosfat u 6-fosfo-glukunolakton i pri tome reducira NADP^+ u NADPH.

Za praćenje metabolizma supstrata odnosno direktne inhibicije generirajući sustav se odmah dodaje u inkubaciju. U nekim slučajevima inhibicije potrebna je prethodna preinkubacija bez NADPH – o vremenu ovisna inhibicija, odnosno s NADPH – o metabolizmu ovisna inhibicija.

Inkubacija se prekida dodatkom jake kiseline ili organskog otapala koji su pogodni za direktnu analizu dok se tekućinsko-tekućinskom ekstrakcijom uzorci analita mogu dodatno ukoncentrirati (6).

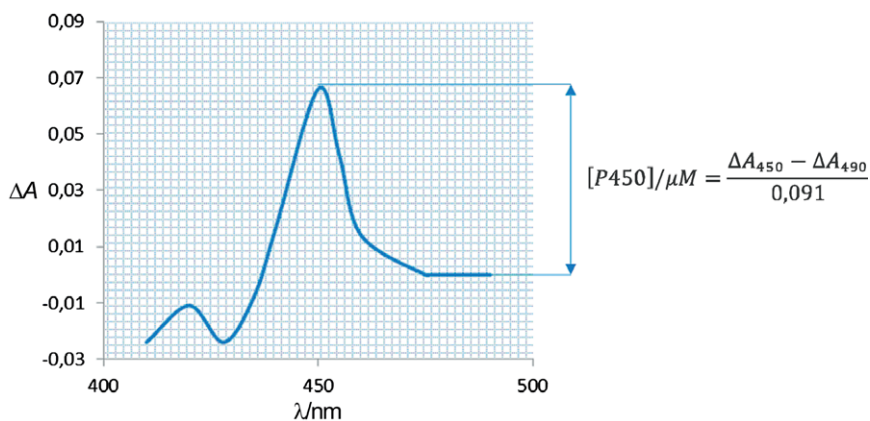
Karakterizacija sadržaja i praćenje aktivnosti enzima citokroma P450

Određivanje sadržaja citokroma P450

Citokromi P450 dobili su naziv po maksimumu koji pokazuju u diferencijalnom spektru kompleksa s ugljikovim monoksidom nakon redukcije u odnosu na reducirani protein na $\lambda = 450$ nm. Upravo su ovim testom Omuro i Sato okarakterizirali citokrom P450 1962. godine (7).

Na opisanim spektralnim promjenama temelji se spektrofotometrijsko određivanje koncentracije citokroma P450. Redukcija se provodi uz natrijev ditionit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$), a ugljikov monoksid se upuhuje samo u jednu od kiveta. Na osnovi apsolutnih spektara izračuna se razlika između spektra sa i bez dodatka ugljikovog monoksida.

Koncentracija citokroma P450 određuje se na osnovi razlike apsorbancija na 450 nm i 490 nm (izosbestična točka) uz ekstinkcijski koeficijent ($\Delta\epsilon_{450/490}$) od $91 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (slika 1).



Slika 1. Diferencijalni spektar citokroma P450

Praćenje metaboličke aktivnosti citokroma P450

Neki citokromi P450 pokazuju iznimnu promiskuitetnost; CYP3A4 metaboliizira većinu ksenobiotika što se donekle može objasniti činjenicom da ovaj enzim ima relativno veliko aktivno mjesto u odnosu na druge citokrome P450. Zbog toga se ispitivanja na CYP3A4 provode barem s dva supstrata kako bi se uočilo dolazi li do inhibicije. Najčešće se kao marker supstrati CYP3A4 primjenjuju nifedipin i testosteron pri čemu se prati nastajanje oksidiranog oblika nifedipina oksidativnom aromatizacijom

dihidropiridinskog prstena, odnosno 6 β -hidroksitestosterona. Uz navedene supstrate primjenjuje se i midazolam. Hidroksilacija metilne skupine midazolama primjenjuje se kao marker reakcija CYP3A4 za određivanje klinički značajnih inhibitora. Valja znati da mikrosomalnu metaboličku aktivnost CYP3A4 nije moguće izdvojiti od CYP3A5, no najčešće ovaj potonji višestruko manje pridonosi ukupnom metabolizmu ksenobiotika.

Neki lijekovi kao što je *S*-mefenitoin mogu biti supstrati različitih citokroma no reakcije koju pojedini citokromi kataliziraju su specifične – *N*-demetilacija CYP2B6 odnosno 4²-hidroksilacija CYP2C19 (tablica 1.). Većinu metaboličkih reakcija marker supstrata moguće je pratiti tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) spregnutom s UV-Vis, fluorescentnim ili detektorima radioizotopa (8). Neke se pak reakcije mogu pratiti kontinuirano u vremenu spektrofotometrijski ili fluorimetrijski u slučaju da metaboliti imaju apsorpcijski maksimum ili fluoresciraju u području neovisnom o drugim komponentama inkubacijske smjese.

Tablica 1. Marker supstrati hepatskih citokroma P450

Citokrom P450	Supstrat	Reakcija	Detekcija
1A2	kofein	<i>N</i> ³ -demetilacija	UVD (273 nm)
	fenacetin	<i>O</i> -deetilacija	UVD (254 nm)
2A6	kumarin	7-hidroksilacija	FLD (338 nm → 458 nm)
2B6	<i>S</i> -mefenitoin	<i>N</i> -demetilacija	UVD (204 nm)
2C8	paklitaksel	6 α -hidroksilacija	UVD (230 nm)
2C9	tolbutamid	hidroksilacija metila	UVD (229 nm)
2C19	<i>S</i> -mefenitoin	4 ² -hidroksilacija	UVD (204 nm)
			UVD (280 nm)
2D6	dekstrometorfan	<i>O</i> -demetilacija	FLD (280 nm → 330 nm)
2E1	klorazoksazon	6-hidroksilacija	UVD (290 nm)
3A4/5	nifedipin	oksidacija	UVD (254 nm)
	testosteron	6 β -hidroksilacija	UVD (240 nm)
	midazolam	1 ² -hidroksilacija	UVD (220 nm)
4A	laurinska kiselina	hidroksilacija	radioizotopi (¹⁴ C, ³ H)

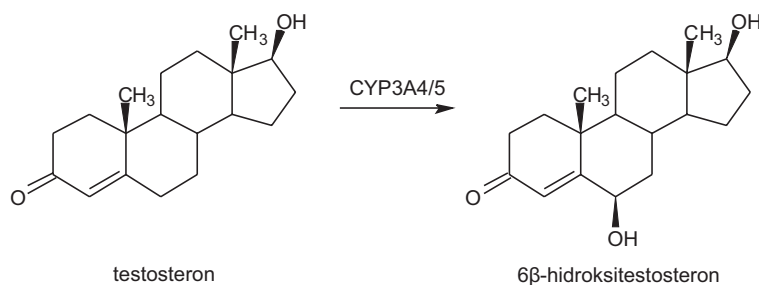
Legenda: UVD – UV-Vis detektor, FLD – fluorescentni detektor

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti u praćenju metaboličke aktivnosti CYP3A4/CYP3A5

Jedna od najčešće korištenih metoda za praćenje metabolizma lijekova je obrnuto fazna tekućinska kromatografija spregnuta s UV-Vis detekcijom. Kod istraživanja

metabolizma novih lijekova identitet metabolita utvrđuje se spektrometrijom masa. Potvrda identiteta se bazira na sintezi metabolita predviđenog spektrometrijom masa.

Najčešće korišteni supstrati CYP3A4/5 su nifedipin i testosteron čiji se metabolizam prati obrnuto faznom tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) na C18 koloni. Prednost ovih marker supstrata u analitičkom smislu je mogućnost izokratne separacije metabolita i supstrata (pokretna faza 64 % metanol + 36 % voda) koja zavisno o veličini čestica u koloni može biti iznimno brza (do desetak minuta na HPLC analitičkim kolonama). Metaboliti se mogu pratiti UV detekcijom na $\lambda = 240$ nm 6 β -hidroksitestosteron (slika 2.) odnosno $\lambda = 254$ nm oksidirani nifedipin (6).

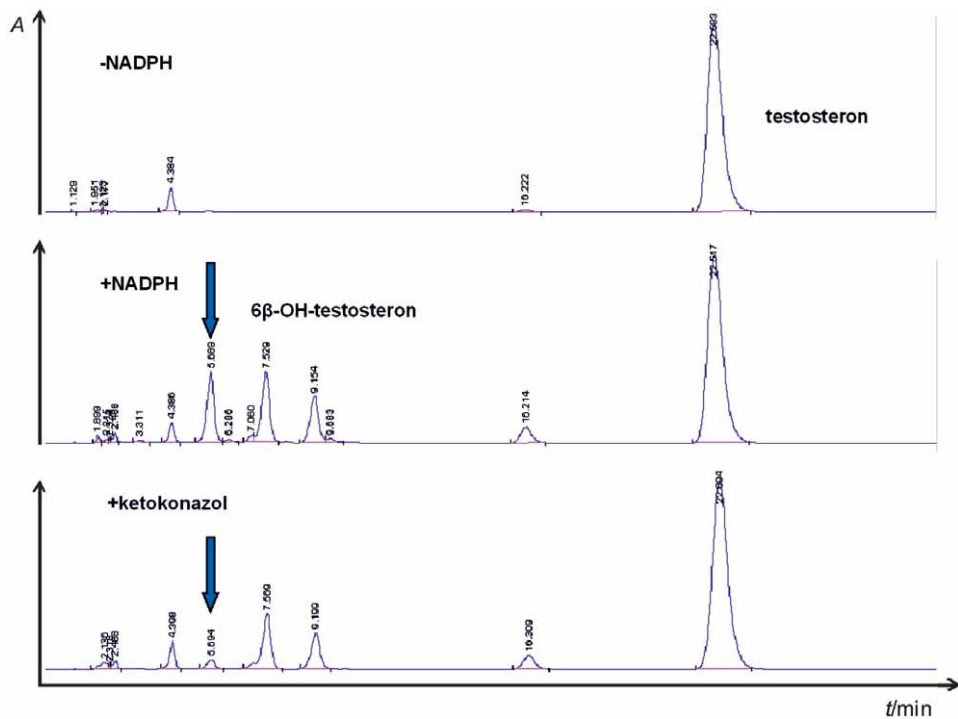


Slika 2. 6 β -Hidroksilacija testosterona

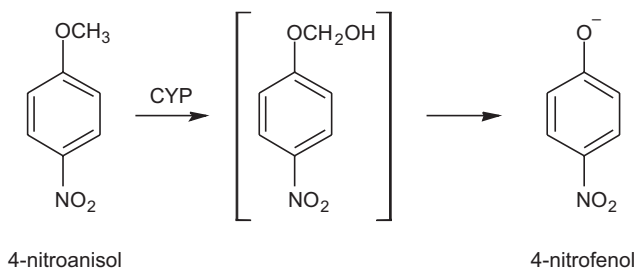
Glavna je uloga metaboličkih reakcija eliminacija strane tvari (ksenobiotika) uvođenjem novih funkcionalnih skupina i konjugacijama. Za očekivati je da metaboliti u slučaju obrnuto fazne kromatografije imaju kraće retencijsko vrijeme od supstrata. Pri provedbi inkubacija supstrat se uvijek dodaje u suvišku kako bi se metabolička aktivnost pratila pri maksimalnoj saturaciji (odnosno brzini, v_{\max}) zbog čega je u kromatogramu dominantan pik supstrata. Na slici 3. prikazani su kromatogrami produkata metabolizma testosterona djelovanjem humanih jetrenih mikrosoma. U slučaju da NADPH (negativna kontrola) nije prisutan nema produkcije metabolita testosterona. Dodatkom koenzima citokroma P450 (NADPH) testosteron se biotransformira u 6 β -hidroksitestosteron. Kako se na humanim jetrenim mikrosomima uz CYP3A4/5 nalaze i drugi enzimi citokroma P450, dolazi do nastanka drugih hidroksi metabolita testosterona. Primjenom ketokonazola kao selektivnog inhibitora CYP3A4/5 uočava se smanjena produkcija 6 β metabolita.

Spektrofotometrijsko praćenje O-demetilacije 4-nitroanisola

UV-Vis spektrofotometrija, ukoliko je moguća, omogućuje kontinuirano praćenje metaboličke reakcije. Jedan od spektrofotometrijskih testova za praćenje opće aktivnosti citokroma, posebice CYP2E1 je O-demetilacija 4-nitroanisola (slika 4.).



Slika 3. 6 β -Hidroksilacija testosterona u praćenju metaboličke aktivnosti enzima CYP3A4/5 tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti spregnute s UV detektorom

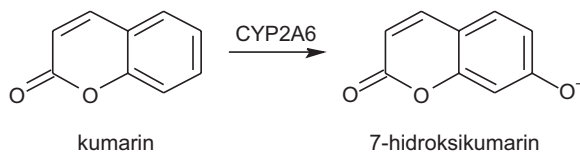


Slika 4. *O*-demetilacija 4-nitroanisola

O-demetilacijom 4-nitroanisola uz oslobađanje formaldehida nastaje nitrofenol. Nitrofenol se pri pH 10 nalazi u ioniziranom obliku i ima apsorpcijski maksimum na $\lambda = 400$ nm. Nestanak supstrata također se može pratiti na $\lambda = 314$ nm. Ovakve metode mogu služiti za praćenje inhibicija odnosno interakcija u probiranju visoke protočnosti (engl. *High Throughput Screening*, HTS) (4).

Praćenje fluorescencije 7-hidroksikumarina u određivanju metaboličke aktivnosti CYP2A6

Hidroksilacija kumarina predstavlja marker reakciju CYP2A6 (slika 5.).



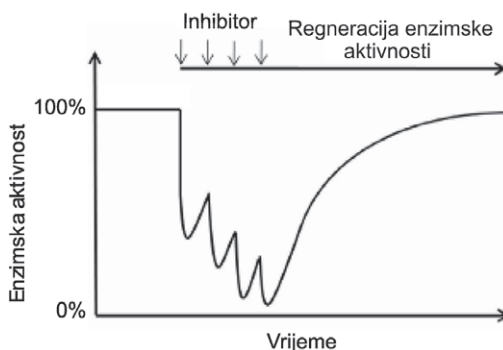
Slika 5. Hidroksilacija kumarina

Kao i u slučaju *O*-demetilacije 4-nitroanisola praćenje produkta je pH ovisno. U deprotoniranom obliku fluorescencija 7-hidroksikumarina (umbeliferona) se potiče svjetlošću $\lambda = 390$ nm, a intenzitet fluorescencije se prati na $\lambda = 460$ nm (4). Kao i spektrofotometrijske metode, fluorescentne metode se mogu primjenjivati u probiranju visoke protočnosti, a karakterizira ih veća osjetljivost.

Inhibicije citokroma P450

Dva su osnovna tipa inhibicije: reverzibilna i ireverzibilna. Reverzibilna inhibicija može se podijeliti na kompetitivnu, nekompetitivnu i akompetitivnu. Kompetitivni inhibitor se natječe sa supstratom u vezanju na aktivno mjesto enzima. Akompetitivnu inhibiciju karakterizira vezanje inhibitora nakon formiranja enzim-supstrat kompleksa. Kada je riječ o citokromima P450 najčešće dolazi do kompetitivne inhibicije ili inhibicije miješanog tipa (nekompetitivna). U slučaju reverzibilnog tipa inhibicije uslijed politerapije cjelokupna enzimaska aktivnost može se uspostaviti izbacivanjem inhibitora iz terapije.

Veći problem, kako u dizajnu novih lijekova, tako i uslijed interakcija lijek-lijek ili lijek-drugi ksenobiotik predstavlja ireverzibilni inhibitori citokroma P450. U



Slika 6. Učinak ireverzibilnog inhibitora na enzimsku aktivnost inhibiranog enzima

slučaju ireverzibilne inhibicije enzimska se aktivnost ne uspostavlja samim prestankom primjene lijeka inhibitora već zahtijeva vrijeme potrebno za sintezu novog enzima.

Vezanje supstrata i inhibitora se, u nekim slučajevima, može pratiti spektrofotometrijski pri čemu dolazi do karakterističnih spektralnih promjena. Inhibitore karakterizira diferencijalni spektar tipa I u kojem se prvo postiže maksimum ≈ 390 nm, a potom minimum na ≈ 420 nm. Supstrate karakterizira diferencijalni spektar tipa II u kojem se prvo postiže minimum na ≈ 410 nm, a potom maksimum na ≈ 430 nm. U slučaju da se supstrat ili inhibitor veže na citokrom P450 uzrokujući spektralne promjene moguće je titracijom supstrata ili inhibitora odrediti konstante vezanja odnosno disocijacije. Analogno utvrđivanju inhibicije citokroma P450 primjenom marker supstrata, primjenom selektivnih inhibitora može se spriječiti metabolizam ispitivanog ksenobiotika. Tako se α -naftoflavon ($1 \mu\text{M}$) koristi za inhibiciju CYP1A2, metoksalen ($2 \mu\text{M}$) za inhibiciju CYP2A6, tiklopidin ($5 \mu\text{M}$) za CYP2B6, kvercetin ($50 \mu\text{M}$) za CYP2C8, sulfafenazol ($5 \mu\text{M}$) za CYP2C9, flukonazol ($10 \mu\text{M}$) za CYP2C19, ketokonazol ($2 \mu\text{M}$) za CYP3A4, kinidin ($2 \mu\text{M}$) za CYP2D6, a 4-metilpirazol ($100 \mu\text{M}$) za inhibiciju CYP2E1. Pri tome valja znati da se selektivnost postiže primjenom odgovarajućih koncentracija inhibitora; u visokim koncentracijama svi pokazuju neselektivnu inhibiciju citokroma.

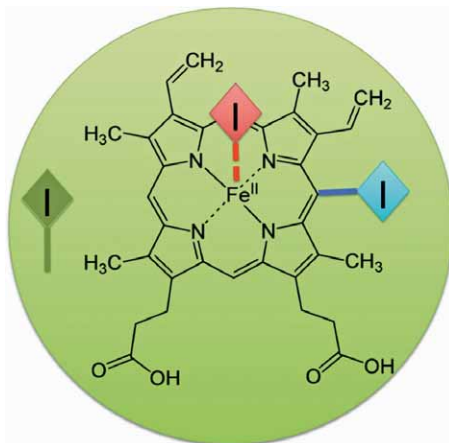
Reverzibilna inhibicija citokroma P450

Direktna inhibicija najčešći je oblik inhibicije citokroma P450 no ne i nužno s najznačajnijim kliničkim posljedicama. Svaki od supstrata može u visokim koncentracijama djelovati kao inhibitor metabolizma drugih lijekova s kojim dijeli metaboličke putove. Cijela slika metaboličkog procesa se dodatno komplicira ukoliko su doze primijenjenog lijeka izrazito visoke pa mogu stupiti u interakcije s različitim citokromima čiji supstrat/inhibitor nisu pri normalnom režimu doziranja odnosno koncentracijama koje se postižu *in vivo*. Da bi se utvrdilo je li neki lijek reverzibilni inhibitor citokroma P450 dovoljno je inkubirati taj lijek s marker supstratom promatranog citokroma P450. Ukoliko nema statistički značajne razlike u nastaloj količini produkta u odnosu na kontrolu bez inhibitora, može se zaključiti da direktne inhibicije nema.

Ireverzibilna inhibicija citokroma P450

Glavna odlika ireverzibilne inhibicije je da zahtijeva vrijeme. Vrijeme potrebno da se inhibicija uoči može biti posljedica sporog prodora inhibitora do aktivnog mjesta enzima kako bi nastao enzim-inhibitor kompleks. U tom slučaju govorimo o vremenu ovisnoj inhibiciji, a ona nije karakteristična za citokrome (9). Najznačajniji oblik inaktivacije citokroma P450 je o metabolizmu ovisna inhibicija koja nastaje kao posljedica reaktivnih metabolita. Nastali intermedijeri mogu se kovalentno vezati na apoprotein ili hem i time inaktivirati enzim. Poseban slučaj predstavlja stvaranje

kompleksa inhibitora s hemskim željezom koje se očituje kao ireverzibilna inhibicija iako se enzim u *in vitro* uvjetima može prevesti u aktivni oblik pa govorimo o kvazi ili pseudo ireverzibilnoj inhibiciji (slika 7.) (10).

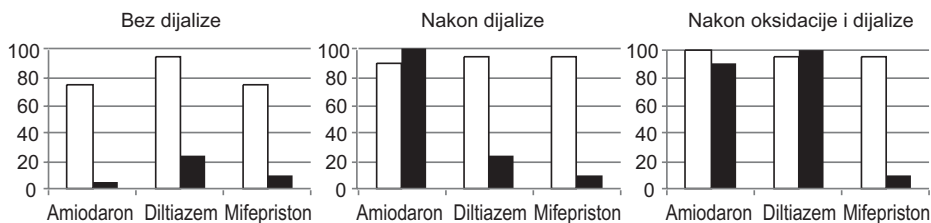


Slika 7. Potencijalna mjesta inaktivacije citokroma P450 kovalentnom modifikacijom hema (plavo), apoproteina (zeleno) ili stvaranjem pseudo ili kvazi ireverzibilnog kompleksa sa željezom (crveno označeni inhibitor – I)

Inhibicija kompleksiranjem s hemskim željezom

Vežanje supstrata na enzim predstavlja prvi korak u katalitičkom ciklusu citokroma P450, nakon čega slijedi prijenos prvog elektrona i redukcija hemskog željeza. Ukoliko nastaje stabilni kompleks s feri oblikom hemskog željeza, enzimska aktivnost moći će se povratiti dijalizom ili ultracentrifugiranjem. Ukoliko pak stabilni kompleks nastaje nakon redukcije željeza onda se za oslobađanje inhibitora fero oblik treba prevesti u feri oblik uz oksidans npr. kalijev heksacijanoferat. I u ovom slučaju dolazi do ponovne uspostave enzimске aktivnosti pa se ovaj tip inhibicije naziva pseudo ili kvazi ireverzibilna inhibicija.

Na slici 8. ilustriran je primjer pseudoireverzibilnog inhibitora CYP3A4 amiodarona. Kada se amiodaron ukloni dijalizom enzimska aktivnost u potpunosti se



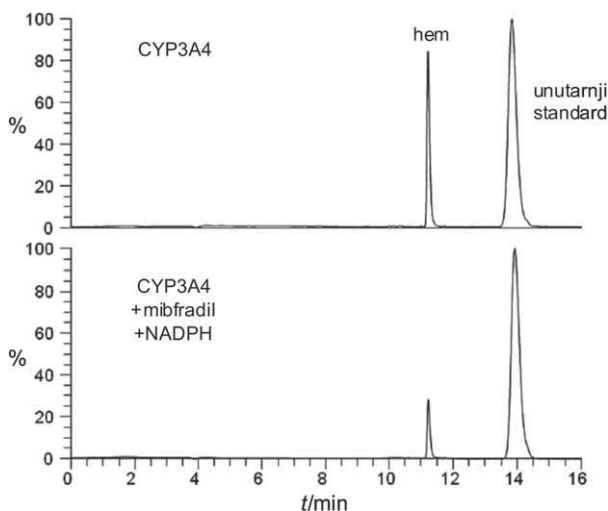
Slika 8. Ostatna aktivnost CYP3A4 iskazana u postotcima u odnosu na kontrolu bez inhibitora, nakon navedenih tretmana (bijeli stupci – bez dodatka NADPH, crni stupci – s dodatkom NADPH)

uspostavlja, te se zaključuje da amiodaron stvara stabilni kompleks s oksidiranim oblikom hemskog željeza. U slučaju diltiazema nastaje kompleks s fero oblikom hemskog željeza pa je za ponovno uspostavljanje enzimske aktivnosti potrebno oksidirati željezo uz kalijev heksacijanoferat. Mifepriston je primjer ireverzibilnog inhibitora, jer ne dolazi do ponovne uspostave enzimske aktivnosti niti nakon oksidacije hemskog željeza (11).

Inaktivacija kovalentnim vezanjem za hem

Čest oblik inaktivacije je kovalentno vezanje reaktivnih intermedijera s protoporfirinskim dijelom hema. Da bi hemski adukti nastali potrebna je prethodna metabolička aktivacija odnosno utrošak NADPH. Nastali hemski adukti mogu se jednostavno dokazati hemokrom-piridin testom. Hem s pridinom u lužnatom daje žuto obojeni kompleks koji se može odrediti spektrofotometrijski na $\lambda = 400$ nm.

Nastali hemski adukti mogu se pratiti i tekućinskom kromatografijom direktnim nanošenjem inkubacije na C4 kolonu za analizu proteina. Pri tome se u pokretnu fazu dodaje trifluoroctena kiselina koja omogućuje odvajanje hema vezanog na cisteinski ostatak apoproteina. Ukoliko nastaje stabilni hemski adukt on se dalje može identificirati spektrometrijom masa, a ukoliko je nastali hemski adukt nestabilan uočiti će se smanjenje količine intaktnog hema (slika 9.) (12).



Slika 9. Smanjenje količine intaktnog hema uslijed inkubacije s mibefradilom. Dodatkom mibefradila u inkubaciju dolazi do uništenja hema što se očituje kako smanjenje površine ispod krivulje u odnosu na kontrolu

Inaktivacija kovalentnim vezanjem za apoprotein

Ukoliko dođe do oslobađanja reaktivnog intermedijera iz aktivnog mjesta isti može neselektivno reagirati s apoproteinskim dijelom enzima. Najjednostavniji način

dokazivanja nastanka kovalentnih adukata je inkubacija s radioaktivnim izotopom (^{14}C , ^3H) obilježenim inhibitorom. Nastali kovalentni adukti se određuju (auto)radiografski nakon separacije gel elektroforezom. Kovalentni adukti mogu se dokazati spektrometrijom masa sa ili bez digestije proteina, a identitet reaktivnog intermedijera se utvrđuje primjenom hvatača slobodnih radikala kao što je glutation (GSH). Takav primjer je nastanak reaktivnog kinonimina diklofenaka i konjugacija reaktivnog oblika s glutationom (13). Nastanak reaktivnih oblika diklofenaka se ne događa u uobičajenim terapijskim dozama u osoba koje ne pate od insuficijencije jetre i bubrega

Procjena interakcijskog potencijala lijek-lijek temeljena na predkliničkim ispitivanjima

U predkliničkim ispitivanjima lijekova kandidata potrebno je provesti ispitivanja potencijala za lijek-lijek interakcije. Najčešće se postupak probira inhibiranih citokroma P450 provodi na humanim jetrenim mikrosomima uz primjenu marker supstrata. Ako se uoči statistički značajna inhibicija potrebno je odrediti konstante inhibicije/inaktivacije (K_i/K_I) i konstantu brzine inaktivacije (k_{inact}).¹

Da bi se procijenio potencijal interakcija lijek-lijek potrebno je izračunati vrijednost parametra značajnosti R na osnovi *in vitro* podataka. Parametar R se izračunava ovisno o tipu inhibicije prema sljedećim formulama:

$$R = 1 + \frac{[I]}{K_i} \text{ za direktnu inhibiciju}$$

$$R = \frac{K_{\text{obs}} + K_{\text{deg}}}{K_{\text{deg}}}, K_{\text{obs}} = k_{\text{inact}} \cdot \frac{[I]}{[I] + K_I} \text{ za vremenski, a time i metabolički ovisnu}$$

inhibiciju.

Pri tome je $[I]$ maksimalna koncentracija inhibitora u plazmi, a K_{deg} konstanta razgradnje citokroma P450 koja ovisno o citokromu iznosi 24 do 72 sata.

Ukoliko je vrijednost parametra R veća od 1,1 (11 u slučaju oralnih inhibitora CYP3A) potrebno je matematičkim modeliranjem predvidjeti farmakokinetiku odnosno promjenu površine ispod krivulje (AUC) nakon primjene marker supstrata. Ukoliko se AUC poveća za više od 25 % primjenom inhibitora u odnosu na kontrolu bez inhibitora potrebno je provesti klinička ispitivanja značajnosti inhibicije uz marker supstrat. U slučaju CYP3A4 primijenit će se oksidacija metilne skupine midazolama (14).

¹ Konstanta inhibicije (K_i) odnosno inaktivacije (K_I) analogna je konstanti K_m u Michaelis-Mentenovoj kinetici i odgovara koncentraciji inhibitora pri polovici brzine inaktivacije. Konstanta brzine inaktivacije (k_{inact}) odgovara v_{max} i predstavlja maksimalnu brzinu inaktivacije pri zasićenju enzima inhibitorom.

Zaključak

Na primjeru mibefradila, ali i niza drugih lijekova kao što su terfenadin, astemizol i drugih povučeni s tržišta, farmaceutska industrija i regulatori izvukli su značajne pouke. Industrija je odgovorila *in vitro* modelima i predikcijskim matematičkim modeliranjem inhibicija citokroma npr. CYP2D6 i CYP2C19 nastojeći izbjeći njihovu inhibiciju u najranijim fazama razvoja jer su ovi enzimi podložni genetskom polimorfizmu. Regulativa je jednako brzo reagirala s neslužbenim inačicama smjernica koje petnaestak godina poslije postaju službene u Europskoj uniji (15).

Preclinical cytochrome P450 inhibition and interaction studies of new drug candidates

by M. Bojić

Abstract

In 1998 mibefradil – an antihypertensive drug, blocker of calcium channel, was withdrawn from the market after more than 30 clinically significant interactions with other xenobiotics were reported in less than a year on the market. As in most cases enzyme involved was from the superfamily of cytochromes P450. In this paper approach in studying cytochromes P450 and drug inhibitions *in vitro* is reviewed. Different types of inhibition are described: direct and time dependent inhibition, and metabolism dependent inactivation. These studies were accepted by pharmaceutical industry for the assessment of potential drug-drug interactions in early stages of drug development, and now are being formalized by regulatory bodies in Europe (2013), Japan (2014) and USA to follow.

1. Rendić SP, Guengerich FP. Survey of Human Oxidoreductases and Cytochrome P450 Enzymes Involved in the Metabolism of Chemicals. *Chem Res Toxicol.* 2015; 28: 38–42.
2. Guengerich FP. Human cytochrome P450 enzymes. U: *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*, 3. izdanje, Ortiz de Montellano PR, urednik, Kluwer Academic/Plenum Press. New York: 2005; 377–531.
3. Po AL, Zhang WZ. What lessons can be learnt from withdrawal of mibefradil from the market? *Lancet.* 1988; 351: 1829–1830.
4. Guengerich FP. Analysis and Characterization of Enzymes and Nucleic Acids Relevant to Toxicology. U: *Hayes' Principles and Methods of Toxicology*, 6. izdanje, Hayes AW, Kruger CL, urednici, CRC Press. Boca Raton. 2014; 1905–1964.
5. Rendić SP, Medić-Šarić M. *Biokemija lijekova*. Zagreb: Medicinska naklada, 2013; 132–157.
6. Sohl CD, Cheng Q, Guengerich FP. Chromatographic assays of drug oxidation by human cytochrome P450 3A4. *Nat Protoc.* 2009; 4: 1252–1257.
7. Bojić M. 50. obljetnica otkrića citokroma P450. *Farm Glas.* 2014; 70: 504–508.

8. Yuan R, Madani S, Wei XX, Reynolds K, Huang SH. Evaluation of cytochrome P450 probe substrates commonly used by the pharmaceutical industry to study in vitro drug interactions. *Drug Metab Dispos.* 2002; 30: 1311–1319.
9. Bojić M, Barbero L, Dolgos H, Freisleben A, Galleman D, Riva S, Guengerich FP. Time- and NADPH-dependent inhibition of cytochrome P450 3A4 by the cyclo-pentapeptide cilengitide: significance of the guanidine group and accompanying spectral changes. *Drug Metab Dispos.* 2014; 42: 1438–1446.
10. Wienkers LC, Heath TG. Predicting in vivo drug interactions from in vitro drug discovery data. *Nat Rev Drug Discov.* 2005; 4: 825–833.
11. Lee JY, Lee SY, Oh SJ, Lee KH, Jung YS, Kim SK. Assessment of drug-drug interactions caused by metabolism-dependent cytochrome P450 inhibition. *Chem Biol Interact.* 2012; 198: 49–56.
12. Foti RS, Rock DA, Pearson JT, Wahlstrom JL, Wienkers LC. Mechanism-based inactivation of cytochrome P450 3A4 by mibefradil through heme destruction. *Drug Metab Dispos.* 2011; 39: 1188–1195.
13. Yu LJ, Chen Y, Deninno MP, O'Connell TN, Hop CE. Identification of a novel glutathione adduct of diclofenac, 4'-hydroxy-2'-glutathion-deschloro-diclofenac, upon incubation with human liver microsomes. *Drug Metab Dispos.* 2005; 33: 484–488.
14. U. S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Drug Interaction Studies – Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing, and Labeling Recommendations (draft guidance), 2012. www.fda.gov
15. European Medicines Agency, Committee for Human Medicinal Products (CHMP). Guideline on the Investigation of Drug Interactions, 2012. www.ema.europa.eu

Primljeno 23. veljače 2015.