

## Značaj izučavanja metabolizma u razvoju novih lekova: *in vitro* pristup

Rakić-Ignjatović Anita<sup>1</sup>, Miljković Branislava<sup>2</sup>,  
Ilić Marija<sup>1</sup>, Pokrajac Milena<sup>2</sup>, Prostran Milica<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Agencija za lekove i medicinska sredstva Srbije

<sup>2</sup>Institut za farmakokinetiku, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu

<sup>3</sup>Institut za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

---

### Kratak sadržaj

Upotreba eksperimentalnih životinja i *in vitro* modela životinjskog porekla u pretkliničkim studijama metabolizma lekova je u velikoj meri potisnuta *in vitro* eksperimentalnim modelima poreklom od humanih tkiva. Danas se najviše koriste komercijalno dostupni preparati ljudske jetre, kao što su rekombinantni enzimi/transgenske ćelijske linije, subcelularne frakcije (mikrozomi, citozol i S9 frakcija) i primarni hepatociti. Primenom ovih modela u toku pretkliničke faze razvoja novog leka ispituje se stepen metaboličke transformacije leka, vrši se fenotipizacija metaboličkih reakcija (identifikacija specifičnog/ih enzima uključenih u I i II fazu metabolizma leka), određivanje metaboličkog profila (*metabolic fingerprinting* - identifikacija i određivanje strukture krajnjih produkata metabolizma leka) i razmatra se potencijal za stupanje u interakcije sa drugim lekovima, sa aspekta inhibicije i indukcije metaboličkih enzima. Primena *in vitro* - *in vivo* korelacije uz dobro razumevanje farmakokinetičkih principa omogućava predviđanje metabolizma i interakcija lekova *in vivo* na osnovu dobijenih *in vitro* podataka. Rezultati brojnih *in vitro* eksperimenata imaju značajnu ulogu u identifikaciji/optimizaciji vodećeg kandidata za novi lek. Dobro dizajnirane *in vitro* studije omogućavaju smanjenje broja kliničkih ispitivanja kod ljudi, koja se sprovode u kasnijim fazama razvoja leka.

**Ključne reči:** metabolizam, *in vitro* modeli, interakcije lekova, *in vitro* - *in vivo* ekstrapolacija

---

## 1. Osnovni principi metabolizma lekova

Metabolizam (biotransformacija) leka je značajan faktor koji determiniše njegov ukupan terapijski i bezbednosni profil. Primarno se odvija u jetri, ali i u mnogim drugim tkivima, uključujući bubrege, kožu, pluća, intestinalni trakt, mozak... Reakcije metabolizma se dele u dve faze: reakcije I faze (oksidacija, redukcija i hidroliza) i reakcije II faze (reakcije konjugacije). Biotransformacija leka se može odvijati posredstvom reakcija I ili II faze, ili kombinacijom reakcija obe faze. Većina enzima odgovornih za metabolizam lekova učestvuje i u biotransformaciji drugih ksenobiotika, kao i različitih endogenih supstanci (1-3).

Citohrom P450 (CYP450) ima centralnu ulogu u oksidativnom metabolizmu lekova i odgovoran je za 70-80% ukupnog metabolizma I faze. CYP450 je zajednički termin za veliku familiju hem-tiolatnih proteina (ima ih više od 50), koji su primarno smešteni u glatkom endoplazmatskom retikulumu hepatocita. Pojedinačni enzimi - izoenzimi su prema sličnosti u strukturi grupisani u familije i podfamilije. Kod čoveka postoji ukupno 17 familija, od kojih su familije 1, 2 i 3 uključene u metabolizam ksenobiotika. Postoje značajne interindividualne razlike u aktivnosti ovih enzima, budući da je ona rezultat kompleksne interakcije spoljašnjih (ishrana, alkohol, pušenje, lekovi, različite supstance iz okruženja) i unutrašnjih faktora (fiziološki, patološki, genetički). Od unutrašnjih, najveći uticaj imaju genetički faktori, jer je većina izoenzima odgovornih za metabolizam lekova genetički polimorfna (4). Mnogi lekovi reakcijama I faze formiraju farmakološki aktivne metabolite, sa istom ili promenjenom aktivnošću u odnosu na polazni lek. Farmakokinetički profil aktivnog metabolita se takođe može razlikovati, npr. u pogledu distribucije ili klirensa (5).

Reakcije II faze se odvijaju prenošenjem odgovarajućeg endogenog molekula, odnosno dela tog molekula sa koenzima donora (kofaktora) na supstrat. Ove reakcije katalizuju enzimi transferaze. Transferaze uključene u metabolizam lekova kod čoveka su: uridin 5' difosfo - glukuronoziltransferaza (UDP-glukuronoziltransferaza, UGT), *N*-acetil transferaza (NAT), glutation *S*-transferaza (GST), sulfotransferaza (ST) i metiltransferaza (MT). Ovi enzimi imaju značajnu ulogu u detoksikaciji i/ili stimulaciji izlučivanja leka iz organizma. UGT učestvuje u metabolizmu najvećeg broja lekova/primarnih metabolita, pa se smatra najvažnijim enzimom II faze. Kod ljudi je do danas identifikovano 15 funkcionalno aktivnih izoenzima UGT, koji su klasifikovani u dve familije: UGT1 i UGT2 (1,3,6).

Unutar ćelije, primarno mesto lokalizacije enzima uključenih u metabolizam lekova je membrana glatkog endoplazmatskog retikuluma

(CYP450, UGT, pojedine MT) i citozol (rastvorljivi enzimi: ST, GST, NAT, pojedine MT) (1,3).

Iako kaskada metaboličkih reakcija često dovodi do detoksikacije i olakšava izlučivanje leka iz organizma, visoko reaktivni intermedijeri koji mogu nastati u toku ovih procesa su u većini slučajeva toksičniji od nepromenjenog leka i imaju potencijal vezivanja za makromolekule u organizmu, kao što su proteini ili DNK. Jedna od mogućih posledica ovakvog delovanja je trajno oštećenje DNK (razvoj mutacija), što za rezultat ima iniciranje procesa hemijske karcinogeneze (7). Uprkos opšteprihvaćenom stavu da se većina reaktivnih intermedijera i toksičnih metabolita leka formira u toku reakcija prve faze metabolizma, sve je veći broj primera koji potvrđuju da i reakcije druge faze mogu proizvesti toksične metabolite (primer su acilglukuronidi, koji nastaju metabolizmom lekova koji sadrže karboksilnu grupu, kao što su mnogi nesteroidni antiinflamatorni lekovi, valproinska kiselina, antihiperlipidemiци - klofibrat i gemfibrozil) (8-10).

Razumevanje kinetike formiranja aktivnih metabolita značajno je ne samo sa aspekta predviđanja terapijskog efekta, već i tumačenja toksičnosti pojedinih lekova. Stoga, od suštinskog je značaja uključivanje studija metabolizma u najraniju fazu procesa razvoja novog leka. Danas je proučavanje metabolizma prisutno u svim fazama razvojnog procesa - od otkrića novog terapijskog agensa do postregistracionog praćenja leka (2,5,7).

## **2. Proučavanje metabolizma lekova u pretkliničkoj fazi - *in vitro* ispitivanja**

Tokom poslednjih godina došlo je do značajnih promena u pretkliničkim studijama metabolizma lekova. Osnovna karakteristika ovih promena je sve manja upotreba eksperimentalnih životinja i *in vitro* modela životinjskog porekla, koji su danas u velikoj meri potisnuti *in vitro* eksperimentalnim modelima poreklom od humanih tkiva (6). Naime, osnovni problem kod studija na eksperimentalnim životinjama je ograničena mogućnost ekstrapolacije rezultata na čoveka, usled velike razlike u metaboličkim putevima među vrstama. Zbog kvalitativnih i kvantitativnih razlika u metabolizmu leka između eksperimentalnih životinja i ljudi, životinje nisu optimalan model za ovu vrstu ispitivanja, naročito kada je reč o procesu razvoja novog leka, o čijem se metabolizmu kod ljudi vrlo malo zna (1,7).

Kako jetra ima centralnu ulogu u biotransformaciji lekova i drugih ksenobiotika, za ispitivanje metabolizma lekova *in vitro* primarno se koriste različiti preparati humane jetre, ali se mogu koristiti i tkiva drugih organa u kojima se odvija metabolizam lekova (npr. intestinum i mozak) (1,6).

Eksperimenti koji se izvode primenom ovih modela imaju za cilj identifikaciju enzima I i/ili II faze uključenih u metabolizam leka/kandidata za novi lek, kao i sveobuhvatno određivanje metaboličkog profila (*metabolic fingerprinting*). Takođe, ispituju se brzina, stepen i mehanizmi inhibicije ili indukcije metaboličkih puteva. Na osnovu ovih studija mogu se doneti važni zaključci o različitim aspektima dispozicije leka, uključujući efekat prvog prolaza, poluvreme eliminacije, biološku raspoloživost, kao i potencijal stupanja u interakcije sa drugim lekovima (6).

## 2.1. Vrste *in vitro* modela

U toku poslednjih nekoliko decenija razvijeni su *in vitro* modeli različitog stepena složenosti: od izolovanih (rekombinantnih) metaboličkih enzima, do intaktne perfuzovane jetre.

Danas su najviše u upotrebi komercijalno dostupni preparati ljudske jetre (1): rekombinantni enzimi/transgenske ćelijske linije, subcelularne frakcije, kao što su mikrozomi, citozol i S9 frakcija i primarni hepatociti (režnjevi humane jetre se koriste u određenim metaboličkim ispitivanjima, ali ovi modeli još uvek nisu komercijalno dostupni) (2,6). Za dobijanje pomenutih modela koristi se jetra koja nije pogodna za transplantaciju ili iseći jetre dobijeni biopsijom. Da bi se osigurala maksimalna vitalnost ćelija jetre odnosno, u slučaju dobijanja subcelularnih frakcija, maksimalna enzimaska aktivnost, neophodno je da se uzorak (jetra ili isečak jetre) posle resekcije procesuiraju što je pre moguće (2).

### 2.1.1. Rekombinantni humani enzimi/transgenske ćelijske linije

U cilju ispitivanja katalitičke aktivnosti i uloge pojedinih enzima u metaboličkim reakcijama, nekada su korišćeni prečišćeni enzimi izolovani iz odgovarajućih ljudskih ili životinjskih tkiva (1,7). Međutim, postoje mnoge otežavajuće okolnosti u ovom pristupu. Pre svega, proces prečišćavanja može biti veoma težak i složen, ako je u pitanju razdvajanje specifičnih enzima sa sličnim fizičko-hemijskim svojstvima, kao što je slučaj kod izoenzima CYP450. Osim toga, uvek postoji rizik da prečišćeni protein nije u potpunosti homogen, zbog čega rezultati metaboličkih ispitivanja mogu biti varijabilni (7).

Danas se humani metabolički enzimi dobijaju isključivo primenom rekombinantne DNK tehnologije. Ovaj pristup podrazumeva heterolognu ekspresiju humanih enzima u različitim ćelijskim sistemima, koji imaju malu endogenu aktivnost ispitivanog enzima (1,7). U tu svrhu vrši se izolovanje iRNK iz tkiva humane jetre i uz pomoć enzima reverzna transkriptaza sintetiše se komplementarna DNK (cDNK) specifična za ispitivani enzim. Izolovanje određene cDNK iz ćelije i njena amplifikacija vrši se primenom tehnike *RT-PCR* (*reverse transcription-polymerase chain reaction*), a ona se potom, uz

pomoć virusnog vektora, inkorporira u genom ćelije sisara, kvasca (*S. cerevisiae*), određene bakterije (najčešće *E. coli*) ili insekta (ekspresija je posredovana *baculovirus*-om - grupa od preko 500 virusa, koji isključivo inficiraju ćelije insekata). Ovakav pristup, za razliku od tehnike direktnog izolovanja i prečišćavanja enzima, omogućava upotrebu minimalne količine tkiva, a prevaziđeni su i drugi nedostaci pomenute starije metode (7,12).

Sličan pristup predstavlja i rekombinantna ekspresija humanih enzima I i/ili II faze metabolizma u ćelijskim linijama. Do danas su svi poznati izoenzimi CYP450 uključeni u metabolizam lekova uspešno eksprimirani u ćelijskim linijama (transgenske ćelijske linije), koje su komercijalno dostupne za ispitivanja (npr. V79 ćelijska linija kineskog hrčka i ćelijska linija humanog hepatoma - Hep G2). Transgenske ćelijske linije, kao i rekombinantni enzimi, omogućavaju proučavanje pojedinačnih enzimskih reakcija. Danas su komercijalno dostupni i različiti genotipovi izoenzima CYP450 (npr.: CYP2C9\*1, CYP2C9\*2 i CYP2C9\*3), što omogućava procenu različitih polimorfizama na puteve biotransformacije leka (2,6).

Za katalitičku aktivnost enzima (kada se kao modeli koriste rekombinantni enzimi odnosno, transgenske ćelijske linije) neophodan je dodatak egzogenog kofaktora (NADPH-regenerišući sistem za CYP450, odnosno UDPGK za aktivnost UGT; videti 2.1.2.) (2,6).

### **2.1.2. Mikrozomi humane jetre**

Mikrozomi humane jetre se dobijaju od hirurški odstranjenog tkiva jetre višestrukom primenom tehnike diferencijalnog centrifugiranja. Mikrozomi se sastoje od vezikula endoplazmatskog retikuluma hepatocita i bogat su izvor većine enzima I faze, uključujući CYP450, i pojedinih enzima II faze (UGT, određene MT). Iz navedenog razloga, mikrozomi se dosta koriste u *in vitro* studijama metabolizma lekova. Osim toga, oni su relativno jednostavni za upotrebu i mogu se čuvati na temperaturi od -80° C i do nekoliko godina. Za monoooksigenaznu aktivnost izoenzima CYP450, inkubacija se mora vršiti u prisustvu NADPH-regenerišućeg sistema, koji obezbeđuje energiju neophodnu za aktivnost CYP450. Za aktivnost UGT, u reakciju se mora uključiti UDP-glukuronska kiselina (UDPGK), kao donor glukuronil grupe (2,6).

Za karakterizaciju kinetike metabolizma leka i proučavanje stepena enzimske inhibicije, kao i identifikaciju specifičnih CYP450/UGT metaboličkih puteva (fenotipizacija metaboličkih reakcija), najčešće se koriste mikrozomi poreklom od većeg broja donora tkiva jetre ( $n > 20$ ), jer su ovakvi pulovi mikrozoma najbolji indikator prosečne, odnosno populacione vrednosti brzine i stepena metabolizma leka. Osim humanih, komercijalno su dostupni i mikrozomi različitih životinjskih vrsta, a njihova upotreba olakšava izbor

najadekvatnijeg eksperimentalnog modela za *in vivo* studije metabolizma leka, u okviru pretkliničke faze (2,6).

Uprkos brojnim prednostima, upotreba mikrozoma u *in vitro* metaboličkim ispitivanjima ima i nekoliko ograničenja: različit stepen vezivanja leka za proteine plazme, u odnosu na vezivanje za mikrozomnu frakciju; visok sadržaj izoenzima CYP450 i UGT i odsustvo kompeticije sa drugim enzimima za metaboličke puteve, što za rezultat ima veći stepen biotransformacije u mikrozomima u odnosu na intaktne ćelijske sisteme; odsustvo drugih enzima, npr. NAT, ST, GST i citozolnih kofaktora, može dovesti do odsustva formiranja pojedinih metabolita. Stoga, iako mikrozomi humane jetre pružaju validnu kvalitativnu informaciju i omogućavaju praćenje metabolizma velikog broja molekula, početnu optimizaciju studija u toku razvoja novog leka, kao i procenu potencijalnih lek-lek interakcija, neophodan je oprez pri ekstrapolaciji dobijenih rezultata na *in vivo* uslove (2,6).

### **2.1.3. Citozolna frakcija humane jetre**

Citozolna frakcija jetre sadrži rastvorljive enzime II faze metabolizma lekova: NAT, ST, GST i pojedine MT, uključujući tiopurin-metil transferazu (TPMT). Kao i mikrozomi, dobija se diferencijalnim centrifugiranjem homogenata jetre. Da bi se postigla katalitička aktivnost enzima II faze, neophodan je dodatak egzogenih kofaktora. Metabolički kapacitet ovih enzima može da se proučava odvojeno ili istovremeno, u zavisnosti od dodatog kofaktora (2,6).

### **2.1.4. S9 frakcija humane jetre**

S9 frakcija sadrži i citozolnu i mikrozomnu frakciju ćelija jetre. Dobija se centrifugiranjem supernatanta koji je odvojen nakon inicijalnog centrifugiranja homogenizovanih ćelija/tkiva jetre (mikrozomi se dobijaju daljim procesom centrifugiranja S9 frakcije, kojim se odvaja citozolna od mikrozomne frakcije). U poređenju sa mikrozomima i citozolom, S9 frakcija pruža kompletniji prikaz metaboličkog profila, s obzirom da sadrži enzime obe faze (2,6).

Osnovni nedostatak ovog sistema je niža ukupna metabolička aktivnost u poređenju sa mikrozomima i citozolom, zbog čega koncentracije pojedinih metabolita mogu biti ispod limita detekcije. Za katalitičku aktivnost enzima I i II faze i ovde je neophodan dodatak egzogenih kofaktora (videti 2.1.2. i 2.1.3) (2,6).

S9 frakcija jetre se često koristi u kombinaciji sa Amesovim testom, koji predstavlja jednostavnu i brzu *in vitro* metodu za detekciju mutagenog potencijala jedinjenja i ima značajnu ulogu u procesu razvoja novog leka. Kako mnogi prokarcinogeni ostaju neaktivni u odsustvu enzimske transformacije,

neophodno je prisustvo metaboličkog aktivacionog sistema, odnosno S9 frakcije jetre, da bi se ispitala genotoksičnost ne samo nepromenjenog leka, već i njegovih metabolita (2).

#### **2.1.5. Hepatociti**

Primarni hepatociti predstavljaju veoma popularan i široko primenjivan model u studijama metabolizma lekova, zbog vrlo dobre *in vitro-in vivo* korelacije. Hepatociti različitih životinjskih vrsta se izoluju iz jetre primenom tradicionalne kolagenaza-perfuzione metode. Međutim, za primenu ove metode potrebna je intaktna jetra, a humana jetra nije dostupna u ovom obliku. Zbog toga je razvijena metoda koja omogućava dobijanje primarnih hepatocita iz delova humane jetre, a koja predstavlja modifikaciju tradicionalne kolagenaza-perfuzije (2). Kada se jednom izoluju, hepatociti se mogu držati u suspenziji, gde ostaju vitalni svega nekoliko sati, ili se mogu čuvati u obliku jednoslojne kulture, najduže 4 nedelje (2,6).

Primarne kulture humanih hepatocita prevazilaze određene nedostatke mikrozoma (npr. uzima se u obzir i uticaj transporta leka i metabolita kroz ćelijske membrane, s obzirom da je aktivnost transportnih proteina očuvana, a kako regulatorni mehanizmi ostaju funkcionalni nekoliko dana nakon izolacije i kultivisanja ćelija, primenom ovih modela može se proceniti ushodna/nishodna regulacija metaboličkih enzima) (2,6). Međutim, poznato je da kod kultivisanih hepatocita dolazi do postepenog gubitka specifičnih funkcija, sa naročito izraženim smanjenjem ekspresije izoenzima CYP450. Ispitivane su različite metode kultivisanja u cilju očuvanja specifičnih karakteristika hepatocita u toku produženog čuvanja u kulturi (2,6).

Jedna od velikih prednosti izolovanih hepatocita u odnosu na režnjeve jetre i perfuzovanu jetru je mogućnost kriokonzervacije. Pokazano je da kriokonzervisani hepatociti zadržavaju aktivnost većine enzima I i II faze. Zbog razvoja uspešnih tehnika kriokonzervacije, humani hepatociti su danas komercijalno dostupni (2).

#### **2.1.6. Režnjevi jetre**

Osnovne prednosti režnjeva jetre kao modela za *in vitro* metabolička ispitivanja su odsustvo upotrebe digestivnih enzima, zbog čega je očuvana struktura lobusa jetre, kao i multicelularna organizacija, što omogućava procenu biotransformacije leka i u drugim tipovima ćelija (npr. Kupferovim), kao i izučavanje uticaja međućelijskih interakcija na metabolizam leka i regulaciju metaboličkih enzima. Takođe, trodimenzionalna organizacija ćelija omogućava normalno funkcionisanje transportnih puteva leka (2,6).

Nedostaci ovih modela su neadekvatna penetracija medijuma u unutrašnjost reznja, oštećenje ćelija po ivicama reznja (u kojima je i biotransformacija promjenjena), kao i kratak period vitalnosti (do 5 dana). Naime aktivnost izoenzima CYP450 u reznjevima jetre je kratkotrajna, što je verovatno posledica slabe difuzije hranljivih materija i kiseonika u unutrašnjost tkiva. Sa druge strane, pokazalo se da je dugotrajno čuvanje reznjeva jetre u tačnom azotu komplikovano i još uvek nije razvijen optimalan protokol za kriokonzervaciju. Zbog toga ne postoje komercijalno dostupni reznjevi jetre (2,6).

Neadekvatna penetracija medijuma u unutrašnjost reznja je verovatan uzrok generalno nižih vrednosti intrinzičkog klirensa određenih upotrebom reznjeva jetre, u odnosu na vrednosti izmerene upotrebom hepatocita (6).

### **2.1.7. Izolovana perfuzovana jetra**

Iako izolovana perfuzovana jetra kao model za *in vitro* ispitivanja metabolizma lekova najbolje oslikava stvarnu *in vivo* situaciju, u ovim studijama se isključivo koristi intaktna jetra životinjskog porekla. Humana jetra nije dostupna za ovu vrstu ispitivanja, a jetra životinjskog porekla često ne predstavlja adekvatan model za proučavanje biotransformacije leka kod čoveka. Ovaj veliki nedostatak ograničava primenu perfuzovane životinjske jetre, koja predstavlja model izbora samo za studije metabolizma lekova u kojima je neophodno prisustvo žučne sekrecije (2).

## **2.2. Primena *in vitro* modela u ispitivanju metabolizma i studijama interakcija lekova**

### **2.2.1. Ispitivanje stepena metaboličke transformacije leka**

Ispitivanje stepena metaboličke transformacije leka (*metabolic stability studies*) predstavlja procenu podložnosti leka reakcijama biotransformacije i smatra se merom intrinzičkog klirensa ( $CL_{int}$ ) leka. Obično se sprovodi u ranoj pretkliničkoj fazi i uključuje merenje brzine i stepena metaboličke transformacije leka (prati se redukcija nivoa nepromenjenog leka u toku vremena). Ovo ispitivanje olakšava predviđanje stepena presistenskog metabolizma i sekundarnih parametara, kao što su biološka raspoloživost i poluvreme eliminacije leka. Najčešće se izvodi primenom mikrozoma humane jetre, jer oni sadrže najvažnije enzime I i II faze metabolizma (ukoliko je izuzev UGT značajno i prisustvo drugih enzima II faze, koristi se S9 frakcija) (6).



### **2.2.2. Određivanje metaboličkog profila**

Određivanje metaboličkog profila (*metabolic fingerprinting/ profiling*) se vrši primenom hepatocita ili mikrozoma humane jetre. Ove studije imaju za cilj utvrđivanje metaboličkih puteva ispitivanog jedinjenja i identifikaciju svih nastalih metabolita. Za razliku od ispitivanja stepena metaboličke transformacije leka, u kome se prati samo ukupna biotransformacija leka, određivanje metaboličkog profila omogućava detaljniji i specifičniji uvid u metabolizam ispitivanog jedinjenja (6).

### **2.2.3. Fenotipizacija metaboličkih reakcija**

Često se označava kao „enzimsko mapiranje” (*enzyme mapping*), a uključuje identifikaciju enzima odgovornih za biotransformaciju leka. Ovaj postupak može biti prilično komplikovan, u zavisnosti od broja uključenih enzima. Stoga, da bi se potvrdila uloga određenog enzima u metabolizmu leka, uglavnom se kombinuje veći broj pristupa, uključujući: korelacionu analizu, hemijsku ili antitelima posredovanu inhibiciju metaboličkih enzima i primenu rekombinantnih enzima (6,13).

#### **A. Korelaciona analiza**

Ovaj pristup se bazira na statističkoj analizi u cilju utvrđivanja korelacije između brzine metabolizma ispitivanog jedinjenja i probne supstance (specifični supstrat ispitivanog enzima; Tabele I i II), primenom mikrozoma humane jetre sa različitim, poznatim aktivnostima klinički relevantnih izoenzima CYP450 i UGT. Kako bi se povećala pouzdanost statističke analize, potrebno je koristiti veći broj preparata mikrozoma, poreklom od različitih donora (obično,  $n = 16-20$ ). Međutim, postoje određena ograničenja (npr.: široko preklapanje supstratne specifičnosti između različitih izoenzima CYP450 i njihova relativna zastupljenost mogu značajno doprineti lažno pozitivnim ili negativnim rezultatima, kao i neadekvatan eksperimentalni dizajn), koja čine korelacionu analizu manje pouzdanom metodom u identifikaciji metaboličkih enzima, u odnosu na druga dva pristupa (inhibiciju metaboličkih enzima i primenu rekombinantnih enzima) (6,13).

**Tabela I:** Probne supstance (supstrati) izoenzima CYP450 za *in vitro* ispitivanja metabolizma i interakcija lekova (2,6,14,15)

**Table I:** Substrates of CYP450 isoenzymes for *in vitro* investigations of drug metabolism and interactions (2,6,14,15)

Izoenzim CYP450	Probne supstance i reakcije katalizovane izoenzimom	
	Preporučene	Prihvatljive
CYP1A2	<u>fenacetin</u> O-deetilovanje	<u>7-etoksirezorufin</u> O-deetilovanje <u>teofilin</u> N-demetilovanje <u>kofein</u> 3-N-demetilovanje
CYP2A6	<u>kumarin</u> 7-hidroksilacija <u>nikotin</u> C-oksidacija	
CYP2B6	<u>bupropion</u> hidroksilacija <u>efavirenc</u> hidroksilacija	<u>S-mefenitoin</u> N-demetilovanje
CYP2C8	<u>taksol</u> 6-hidroksilacija	<u>rosiglitazon</u> para-hidroksilacija
CYP2C9	<u>S-varfarin</u> 7-hidroksilacija <u>diklofenak</u> 4'-hidroksilacija <u>tolbutamid</u> metilhidroksilacija	<u>flurbiprofen</u> 4'-hidroksilacija <u>fenitoin</u> -4-hidroksilacija
CYP2C19	<u>S-mefenitoin</u> 4'-hidroksilacija	<u>omeprazol</u> 5-hidroksilacija <u>fluoksetin</u> O-dealkilovanje
CYP2D6	<u>bufuralol</u> 1'-hidroksilacija <u>dekstrometorfan</u> O-demetilovanje	<u>debrizokvin</u> 4-hidroksilacija
CYP2E1	<u>hlorzoksazon</u> 6-hidroksilacija	<u>p-nitrofenol</u> 3-hidroksilacija <u>laurinska kiselina</u> 11-hidroksilacija
CYP3A4	<u>midazolam</u> 1-hidroksilacija <u>testosteron</u> 6β-hidroksilacija	<u>eritromicin</u> N-demetilovanje <u>dekstrometorfan</u> N-demetilovanje <u>triazolam</u> 4-hidroksilacija <u>terfenadin</u> C-hidroksilacija <u>nifedipin</u> oksidacija

**Tabela II:** Probne supstance (supstrati) izoenzima UGT za *in vitro* ispitivanja metabolizma i interakcija lekova (6)

**Table II:** Substrates of UGT isoenzymes for *in vitro* investigations of drug metabolism and interactions (6)

UGT	Probne supstance
1A1	bilirubin
1A3	26,26,26,27,27,27-heksafluoro-1 $\alpha$ ,25-dihidroksivitamin D <sub>3</sub>
1A4	trifluperazin ili tamoksifen
1A6	1-naftol
1A9	propofol
2B4	hiodeoksiholna kiselina
2B7	morfin
2B15	androstandiol

#### B. Hemijska/antitelima posredovana inhibicija metaboličkih enzima

Koriste se mikrozomi humane jetre, a inkubacija se vrši u prisustvu jedinjenja koje specifično inhibira određeni metabolički enzim (hemijska inhibicija; Tabela III), ili u prisustvu inhibitornog antitela specifičnog za ispitivani enzim. Kako hemijski inhibitori često nisu dovoljno selektivni, primena potentnih, specifičnih antitela (poli- ili monoklonskih) na različite izoenzime CYP450/UGT predstavlja najpouzdaniji pristup u identifikaciji enzima. Ipak, i pored jasnih prednosti u odnosu na sve ostale pristupe, primena monoklonskih antitela je ograničena njihovom visokom cenom (6,13). Za razliku od izoenzima CYP450, za sada nisu poznati specifični hemijski inhibitori izoenzima UGT, pa se isključivo koriste inhibitorna antitela, dobijena od heterologno eksprimiranih i prečišćenih UGT antigena.

**Tabela III:** Specifični hemijski inhibitori i induktori izoenzima CYP450 za *in vitro* ispitivanja metabolizma i interakcija lekova (2,6,14,15)

**Table III:** Specific chemical inhibitors and inducers of CYP450 isoenzymes for *in vitro* investigations of drug metabolism and interactions (2,6,14,15)

Izoenzim CYP450	Inhibitori		Induktori	
	Preporučeni	Prihvatljivi	Preporučeni	Prihvatljivi
CYP1A2	furafilin	α-naftoflavin	omeprazol β-naftoflavin	lansoprazol
CYP2A6	tranilcipromin metoksalen	pilokarpin triptamin	deksametazon	pirazol
CYP2B6		sertralin klopidogrel tiklopidin fenciklidin	fenobarbiton	fenitoin
CYP2C8	montelukast kvercetin	trimetoprim gemfibrozil rosiglitazon pioglitazon	rifampicin	fenobarbiton
CYP2C9	sulfafenazol	flukonazol fluvoksamin fluoksetin	rifampicin	fenobarbiton
CYP2C19		tiklopidin nootkaton	rifampicin	
CYP2D6	hinidin		ni jedan identifikovan	
CYP2E1		dietilditiokarbamat klometiazol	ni jedan identifikovan	
CYP3A4	ketokonazol itrakonazol	azamulin troleandomicin verapamil	rifampicin	fenobarbiton fenitoin troglitazon taksol deksametazon

### C. Primena rekombinantnih enzima

Većina klinički relevantnih CYP450 i UGT je klonirana i individualno ekspimirana u različitim ćelijskim linijama. Međutim, rekombinantni enzimi često imaju drugačiji katalitički potencijal, a u ćelijama nisu ekspimirani u koncentracijama koje odražavaju njihove stvarne nivoe u mikrozomima humane jetre. Stoga, cDNK-ekspimirani sistemi mogu samo da potvrde učešće određenog enzima u metabolizmu leka, a ne daju informaciju o stepenu uključenosti enzima, odnosno relativnom doprinosu enzima ukupnoj biotransformaciji leka. Mogućnost da se ovo ograničenje prevaziđe je određivanje  $K_m$  i  $V_{max}$  vrednosti za svaki aktivan enzim, na osnovu čega se može izračunati vrednost  $CL_{int}$  ( $V_{max} / K_m$ ) za svaku od reakcija. Tako se na osnovu intrinzičkog klirensa i relativne zastupljenosti svih izoformi u mikrozomima humane jetre, može proceniti relativan doprinos različitih izoenzima CYP450 metabolizmu ispitivanog leka (6,13).

#### 2.2.4. Ispitivanje interakcija lekova

Istovremena primena lekova je česta situacija u kliničkoj praksi. Kod kombinovane terapije uvek postoji mogućnost stupanja lekova u interakcije farmakokinetičkog ili farmakodinamičkog tipa. Interakcije lekova na nivou metabolizma su najčešće farmakokinetičke interakcije, koje za rezultat imaju indukciju ili inhibiciju metaboličkih enzima, sa potencijalno značajnim efektima na efikasnost i bezbednost primenjene terapije (5).

Danas se *in vitro* tehnike često koriste za predviđanje potencijalnih interakcija kandidata za nove lekove. Međutim, postoji nekoliko faktora koje treba razmotriti pri primeni ovog pristupa. Pre svega, od esencijalnog je značaja tačna identifikacija enzimskih sistema uključenih u metabolizam leka i procena relativnog doprinosa metaboličkih puteva koji su inhibirani/indukovani u ukupnoj eliminaciji leka. Do klinički značajnih interakcija najčešće dolazi kada se lekovi metabolizuju posredstvom istog enzimskog sistema, a metabolička reakcija koja je predmet interakcije predstavlja glavni put eliminacije leka. Veoma je važno da se u ovakvim *in vitro* ispitivanjima supstrat i inhibitor/induktor upotrebe u klinički relevantnim koncentracijama. Naime, selektivnost inhibitora za određene metaboličke enzime je koncentraciono zavisna. Tako hinidin, koji je specifičan inhibitor CYP2D6, u koncentracijama 5-10  $\mu\text{M}$  ispoljava maksimalni inhibitorski efekat na CYP2D6-katalizovane metaboličke reakcije. Pri većim koncentracijama ( $> 20 \mu\text{M}$ ), ovaj lek inhibira i CYP3A4 (5).

#### 2.2.4.1. Studije inhibicije metaboličkih enzima

Proces inhibicije može biti reverzibilan i ireverzibilan. Najčešći tip inhibicije je posledica reverzibilne interakcije leka ili metabolita sa enzimom i ovaj proces je odgovoran za većinu farmakokinetičkih interakcija *in vivo* (16).

Mnogi lekovi i drugi ksenobiotici inhibiraju aktivnost izoenzima CYP450, zbog njihove široke supstratne specifičnosti. Inhibitorni procesi su relativno česti u kliničkoj praksi. Najčešće posledice inhibicije metaboličkih enzima su smanjeni klirens leka i njegovo produženo delovanje. Međutim, ovi efekti su uglavnom relativno kratkotrajni, jer se usled difuzije smanjuje koncentracija inhibitora u okolini enzima, a funkcija enzima posledično regeneriše (16). Pri dovoljno visokoj koncentraciji, gotovo svi supstrati deluju kao reverzibilni kompetitivni inhibitori metaboličkih enzima (6).

Studije inhibicije metaboličkih enzima se sprovode iz dva osnovna razloga: da bi se utvrdilo da li istovremena primena poznatih inhibitora izoenzima CYP450/UGT utiče na promenu metabolizma leka, kao i radi procene inhibitornog potencijala samog ispitivanog leka (u cilju procene mogućnosti stupanja u interakcije sa istovremeno primenjivanim lekovima). U tu svrhu najviše se primenjuju mikrozomi humane jetre, iako se mogu upotrebiti i cDNK-ekspimirani enzimi i hepatociti (6).

Ispitivano jedinjenje se inkubira u prisustvu i odsustvu poznatog CYP450 (Tabela III) odnosno, UGT-specifičnog inhibitora. Obično se supstrat i inhibitor koriste u nekoliko različitih koncentracija, kako bi se procenila koncentraciona zavisnost i omogućilo određivanje konstante inhibicije ( $K_i$ ). Sa druge strane, određivanje  $IC_{50}$  (koncentracija inhibitora koja je potrebna da izazove 50% inhibicije enzima) je jednostavnije, pošto se ovi eksperimenti sprovode sa fiksnom koncentracijom supstrata. Vrednosti  $IC_{50}$  su korisne za poređenje inhibitornog potencijala strukturno sličnih jedinjenja (6). Međutim,  $K_i$  vrednosti su značajnije za uspostavljanje *in vitro-in vivo* korelacije, jer omogućavaju određivanje indeksa inhibicije ( $I_i$ ), koji predstavlja odnos intrinzičkog klirensa u odsustvu i prisustvu inhibitora (1).

Za ispitivanje inhibitornog potencijala kandidata za lek, mikrozomi humane jetre (odnosno, cDNK ekspimirani sistemi ili hepatociti) se inkubiraju sa enzim-specifičnim probnim supstancama (Tabele I i II). Prati se metabolizam probne supstance u prisustvu i odsustvu ispitivanog jedinjenja i određuju se  $IC_{50}$  i  $K_i$  reakcije (6).

#### 2.2.4.2. Studije indukcije metaboličkih enzima

Izloženost lekovima i drugim ksenobiotičima može za rezultat imati indukciju metaboličkih enzima. Indukcija najverovatnije predstavlja adaptivni odgovor organizma, u cilju prevencije toksičnog delovanja ksenobiotika (16).

Najčešći mehanizam indukcije izoenzima CYP450 je aktivacija transkripcije, koja kao krajnji rezultat ima pojačanu sintezu enzima (17). Regulacija ekspresije enzima posredovana je specifičnim nuklearnim receptorima: receptorom za aromatične ugljovodonike (*aryl hydrocarbon receptor* - *ARH*), pregnan X receptorom (*PXR*), konstitutivno aktivnim receptorom (*constitutively active receptor* - *CAR*, naziva se i *constitutive androstane receptor*) i receptorom za glukokortikoide (*glucocorticoid receptor-GR*) (18).

Indukcija metaboličkih enzima može smanjiti toksičnost ksenobiotika ubrzanjem procesa detoksikacije, ili je povećati usled pojačanog formiranja reaktivnih metabolita (6). Jaki induktori metaboličkih enzima, kao što je npr. karbamazepin, mogu istovremeno potencirati metabolizam nepromenjenog leka i njegovog glavnog metabolita, smanjujući na taj način koncentracije oba jedinjenja u sistemskej cirkulaciji (19). Ove reakcije su vremenski-zavisne, jer je za razvoj induktivnog efekta uvek potrebno određeno vreme (19, 19a). Značajno smanjenje koncentracije aktivne komponente, usled indukcije njenog metabolizma, može za posledicu da ima i izostanak terapijskog odgovora, ukoliko se režim doziranja leka ne prilagodi.

Studije indukcije metaboličkih enzima sprovode se iz dva osnovna razloga: radi procene indukcionog potencijala samog ispitivanog leka, kao i procene mogućnosti indukcije metabolizma ispitivanog leka drugim, istovremeno primenjivanim lekovima. Ispitivanja indukcije metaboličkih enzima sprovode se primenom eksperimentalnih životinja ili primarnih ljudskih hepatocita. Međutim, kako indukcija metaboličkih enzima pokazuje značajne varijabilnosti među vrstama, primarni ljudski hepatociti predstavljaju najbolji model za ove studije. Indukcija metaboličkih enzima može se pratiti određivanjem nivoa iRNK specifične za ispitivani enzim (ukoliko se indukcija odvija mehanizmom aktivacije transkripcije), određivanjem nivoa proteina (ispitivanog enzima) ili ispitivanjem katalitičke aktivnosti enzima (6).

Indukcija enzima se može uočiti *in vitro* kao porast katalitičke aktivnosti ćelija u odgovoru na stimulus, što je obično rezultat povećane količine enzima prisutnog u ćeliji. Primarni hepatociti se inkubiraju sa ispitivanim jedinjenjem ili specifičnim potentnim induktorom (pozitivna kontrola; specifični induktori izoenzima CYP450 su prikazani u Tabeli III) u intervalu 24-96 h (obično 72 h). Aktivnost izoenzima u intaktnim hepatocitima se određuje primenom

specifičnih probnih supstanci (Tabele I i II) i poredi sa netretiranim, kontrolnim uzorkom (negativna kontrola). Pored merenja katalitičke aktivnosti primenom specifičnih probnih supstanci, mere se promene u nivoima imunoreaktivnih proteina *Western blot* analizom, primenom CYP450/UGT - specifičnih antitela. Kako većina klinički relevantnih enzima (CYP1A2, 2C8, 2C9, 3A4, UGT izoenzimi) zahteva transkripcionu aktivaciju gena, vrši se i poređenje nivoa CYP/UGT-specifičnih iRNK u tretiranim i kontrolnim ćelijama (primenom *RT-PCR* i *Northern blot* analize) (6,14).

Otkriće ključne uloge nuklearnih receptora u regulaciji indukcije CYP450/UGT dovela je do razvoja novog pristupa u studijama indukcije metaboličkih enzima, nazvanog *cell-based reporter gene assay*. U ovim ispitivanjima određuje se sposobnost ispitivanog jedinjenja da izvrši aktivaciju nuklearnog receptora (npr. *PXR*) uključenog u transkripcionu regulaciju metabolizma leka. Osnovna prednost ovog pristupa je mogućnost da se za kratko vreme ispita potencijal aktivacije *PXR* ili *CAR* za veliki broj različitih jedinjenja (6).

### 2.2.5 *In vitro - in vivo* ekstrapolacija (IVIVE)

Jedan od osnovnih ciljeva ispitivanja metabolizma leka *in vitro* je kvantitativno predviđanje *in vivo* metabolizma na osnovu *in vitro* podataka. Koncept intrinzičkog klirensa ( $CL_{int}$ ) predstavlja osnovu za ekstrapolaciju *in vitro* podataka na *in vivo* uslove. *In vitro-in vivo* ekstrapolacija se zasniva na korelaciji između  $CL_{int}$  određenog *in vitro* i *in vivo* farmakokinetičkih parametara, kao što su ukupni (sistemski) klirens ( $CL$ ), poluvreme eliminacije ( $t_{1/2}$ ) i koncentracija leka u stanju ravnoteže ( $C^{SS}$ ) (20).

Ukoliko je primarni put eliminacije leka metabolizam u jetri, ukupni klirens je približno jednak hepatskom klirensu ( $CL_H$ ), koji se može izraziti sledećom jednačinom:

$$CL_H = Q_H \cdot E = Q_H \cdot (f_u \cdot CL_{int} / Q_H + f_u \cdot CL_{int})$$

gde je  $Q_H$  protok krvi kroz jetru,  $E$  hepatski ekstrakcioni odnos,  $f_u$  frakcija slobodnog, nevezanog leka u plazmi, a  $CL_{int}$  predstavlja meru metaboličke aktivnosti u jetri (5,21).

Kako presistemski metabolizam u jetri reflektuje hepatski  $CL_{int}$ , sistemski bioraspoloživost se može izraziti:

$$F = 1 - E = Q_H / Q_H + f_u \cdot CL_{int}$$



Izbor strukturnog modela koji će predstavljati odnos između  $CL_{int}$  i *in vivo* farmakokinetičkih parametara zavisi od odnosa metaboličkog klirensa u hepatocitima ( $f_u \cdot CL_{int}$ ) prema  $Q_H$  (19). Lekovi se mogu klasifikovati u zavisnosti od toga da li je njihov  $CL_H$  ograničen kapacitetom jetre (*enzyme-limited*; nizak  $CL_H$ ) ili protokom krvi kroz jetru (*flow-limited*; visok  $CL_H$ ). Ukoliko je  $f_u \cdot CL_{int} \ll Q_H$ ,  $CL_H$  je direktno proporcionalan  $f_u$  i  $CL_{int}$  (5,21):

$$CL_H = f_u \cdot CL_{int}$$

Tako će promena (smanjenje ili porast)  $CL_{int}$  prouzrokovana metaboličkom inhibicijom ili indukcijom za rezultat imati gotovo proporcionalnu promenu  $CL_H$  leka sa niskim klirensom (5,21).

Sa druge strane, ukoliko je  $f_u \cdot CL_{int} \gg Q_H$ ,  $CL_H$  je ograničen protokom krvi kroz jetru, odnosno:

$$CL_H = Q_H$$

U ovom slučaju, promena  $CL_{int}$  prouzrokovana inhibicijom ili indukcijom će imati malo efekta na  $CL_H$  leka sa visokom vrednošću klirensa (5,21). Kod ovih lekova neophodno je koristiti kompleksnije modele za uspostavljanje *in vitro-in vivo* korelacije.

### 2.3. Značaj metaboličkih ispitivanja *in vitro*

Rezultati mnoštva opisanih *in vitro* metaboličkih eksperimenata imaju značajnu ulogu u identifikaciji/optimizaciji vodećeg kandidata za novi lek i odbacivanju jedinjenja koja mogu biti problematična sa stanovišta bezbednosti (formiranje toksičnih metabolita) ili stupanja u nepovoljne interakcije sa drugim lekovima. Dalje, primena *in vitro* metoda omogućava značajno smanjenje obima *in vivo* studija interakcija lekova koje se sprovode u okviru kliničke faze razvoja leka. Od najvećeg značaja je svakako činjenica da dobro dizajnirane *in vitro* studije omogućavaju smanjenje broja kliničkih ispitivanja kod ljudi, koja se sprovede u kasnijim fazama razvoja leka. Takođe, *in vitro* studije metabolizma lekova se često sprovode i za one lekove koji su već odobreni za terapijsku primenu. Studije su u ovoj fazi neophodne zbog novih saznanja vezanih za faktore koji regulišu metabolizam kao što su: identifikacija genetičkog polimorfizma na nivou metaboličkih enzima ili transportera, prisustvo novih ksenobiotika koji mogu da utiču na metabolizam postojećih lekova, kao i prijave idiosinkratskih reakcija u toku postregistracionog praćenja bezbednosti leka (6).

## Literatura

1. Pokrajac M. Farmakokinetika. 3. dopunjeno izd. Beograd: Birograf, 2007:63-124.
2. Brandon F.A.E., Raap C.D., Meijerman I., Beijnen J.H., Schellens J.H.M. An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2003; 189: 233-46.
3. Parkinson A. Biotransformation of xenobiotics. In: Casarett and Doull's *Toxicology: The Basic Science of Poisons*, 5<sup>th</sup> ed. McGraw-Hill Comp., Inc. 1996: 113-186.
4. Rakić A., Miljković B., Pokrajac M. Genetički polimorfizam izoenzima citohroma P450. *Arh. Farm.* 2004; 1-2: 61-76.
5. Lin J.H., Lu A.Y.H. Role of pharmacokinetics and metabolism in drug discovery and development. *Pharmacol. Rev.* 1997; 49:403-49.
6. Hariparsad N., Sane R.S., Strom S.C., Desai P.B. In vitro methods in human biotransformation research: Implications for cancer chemotherapy. *Toxicol. In Vitro* 2006; 20: 135-53.
7. Friedberg T., Wolf R.C. Recombinant DNA technology as an investigative tool in drug metabolism research. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1996; 22: 187-213.
8. White R.E. Short and Long-term projections about the use of drug metabolism in drug discovery and development. *Drug Metab. Dispos.* 1998; 26: 1213-16.
9. Bailey M.J., Dickinson R.G. Chemical and immunochemical comparison of protein adduct formation of four carboxylate drugs in rat liver and plasma. *Chem. Res. Toxicol.* 1996; 9 (3): 659-66.
10. Sallustio B.C., Harkin L.A., Mann M.C., Krivickas S.J., Burcham, P.C. Genotoxicity of acyl glucuronide metabolites formed from clofibrilic acid and gemfibrozil: a novel role for phase - II - mediated bioactivation in the hepatocarcinogenicity of the parent aglycones. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1997; 147: 459-64.
11. Pokrajac M. Farmakokinetika - Priručnik za praktičnu nastavu. 3.izd. Beograd: Birograf, 2008.
12. Guengerich F.P., Parikh A., Johnson E.F., Richardson T.H., Von Wachenfeldt C., Cosme J. i sar. Heterologous expression of human drug-metabolizing enzymes. *Drug Metab. Dispos.* 1997; 25 (11): 1234-41.
13. Lu A.Y.H., Regina W.W., Lin.J.H. Cytochrome P450 in vitro reaction phenotyping: a re-evaluation of approaches used for P450 isoform identification. *Drug Metab.Dispos.* 2003; 31: 345-50.
14. Food and Drug Administration: Guidance for Industry. Drug Interaction Studies- Study Design, Data Analysis, and Implications for Dosing and Labelling, September 2006 (<http://www.fda.gov/cder/guidance/6695dft>).
15. Pelkonen O., Mäenpää J., Taavitsainen P., Rautio A., Raunio H. *Xenobiotica* 1998; 28:1203-53.

16. Hasler J.A., Estabrook R., Murray M., Pikuleva I., Waterman M., Capdevila J. et al. Human cytochrome P450. *Mol. Asp. Med.* 1999; 20: 1-137.
17. Badyal D.K., Dadhich A.P. Cytochrome P450 and drug interactions. *Indian J. Pharmacol.* 2001; 33: 248-259.
18. Hukkanen J. Xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 enzymes in human lung. *Acta. Univ. Oul. D* 2000; 621:24-31.
19. Rakic Ignjatovic A, Miljkovic B, Todorovic D, Timotijevic I, Pokrajac M. Moclobemide monotherapy vs. combined therapy with valproic acid or carbamazepine in depressive patients: a pharmacokinetic interaction study. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2009; 67(2):199-208.
- 19a. Rakic Ignjatovic A, Miljkovic B, Todorovic D, Timotijevic I, Pokrajac M. Evaluation of Single-Point Sampling Strategies for the Estimation of Moclobemide Exposure in Depressive Patients. *J. Clin. Pharmacol.* 2010; doi:10.1177/0091270010372105.
20. Leemann TD, Dayer P. Quantitative prediction of in vivo drug metabolism and interactions from in vitro data. In: Pacifici GM, Fracchia GN. eds. *Advances in Drug Metabolism in Man*. Brussels: Directorate-General Science, Research and Development, European Commission 1995:785-819.
21. Lin J.H., Lu A.Y.H. Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. *Clin. Pharmacokinet.* 1998; 35:361-90.

# **Role of metabolism in drug development: *in vitro* studies**

**Rakić Ignjatović Anita<sup>1</sup>, Miljković Branislava<sup>2</sup>,  
Ilić Marija<sup>1</sup>, Pokrajac Milena<sup>2</sup>, Prostran Milica<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Medicines and Medical Devices Agency of Serbia

<sup>2</sup>Department of Pharmacokinetics, Faculty of Pharmacy, University of  
Belgrade

<sup>3</sup>Department of Pharmacology, Clinical Pharmacology and Toxicology,  
Faculty of Medicine, University of Belgrade

---

## **Summary**

In recent years there has been a significant paradigm shift in pre-clinical drug metabolism studies. Most importantly, this has included a reduced reliance on animal models and increased use of human tissues (i.e. human liver microsomes and other subcellular fractions, primary culture of human hepatocytes, recombinant human enzymes/transgenic cell lines). During the pre-clinical phase of drug development such studies assess the metabolic stability, reaction phenotyping (elucidation of specific enzyme(s) involved in phase I and II metabolism), metabolic fingerprinting (identification and structural determination of the metabolic end products) and drug interaction issues pertaining to enzyme inhibition and induction. Such studies are now increasingly being used for qualitative and quantitative prediction of drug biotransformation in humans and in the identification of likely determinants of metabolism following drug administration to humans, including possible drug interactions. Results from a multitude of such experiments help in identifying/optimizing a lead compound and rejecting compounds that are likely to be problematic with regards to causing toxicity or adverse drug-drug interactions. Therefore, well designed *in vitro* methodologies are vital to reducing the number of human trials during the late stages of drug development.

**Key words:** metabolism, *in vitro* models, drug interactions,  
*in vitro-in vivo* extrapolation

---