UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI COLLEGIUM MEDICUM WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY

Zakład Biochemii Farmaceutycznej



Modelowanie metodami *in vitro* metabolizmu wyselekcjonowanych związków o zdefiniowanej aktywności w ośrodkowym układzie nerwowym

Paulina Kubowicz-Kwaśny

Rozprawa doktorska

Promotor Dr hab. Elżbieta Pękala, prof. UJ

KRAKÓW 2016

Serdecznie dziękuję Pani Profesor **Elżbiecie Pękali** za wszelką pomoc, nieustanną mobilizację, a także cenne uwagi i wskazówki udzielane podczas prowadzenia badań oraz pisania pracy. Składam serdeczne podziękowania osobom, które przyczyniły się do powstania tej pracy:

Panu Profesorowi **Henrykowi Maronie** oraz Pani Doktor **Annie Waszkielewicz**, za współpracę, przekazanie związków do badań, udostępnienie programu komputerowego MetaSite 5.0.3. oraz cenne uwagi merytoryczne,

Pani Doktor **Monice Marcinkowskiej** Panu Doktorowi habilitowanemu **Marcinowi Kołaczkowskiemu**, oraz Panu Doktorowi habilitowanemu **Pawłowi Zajdlowi** za współpracę, przekazanie związków do badań oraz cenne uwagi merytoryczne,

Panu Doktorowi **Pawłowi Żmudzkiemu** oraz Pani Doktor **Agnieszce Cios** za pomoc w odkrywaniu tajników wiedzy chromatograficznej.

Pracownikom, Doktorantom oraz **Magistrantom** Zakładu Biochemii Farmaceutycznej za stworzenie niezapomnianej atmosfery pracy.

Wyniki i metodologia przedstawione w pracy doktorskiej zostały opublikowane w następujących pracach:

Paulina Kubowicz, Henryk Marona, Elżbieta Pękala "Synthesis, anticonvulsant activity and metabolism of 4-chlor-3-methylphenoxyethylamine derivatives of trans-2-aminocyclohexan-1-ol" Chirality. 2015 Feb;27(2):163-9.

Kamil Piska, Dorota Żelaszczyk, Marek Jamrozik, Paulina Kubowicz-Kwaśny, Elżbieta Pękala "Cunninghamella Biotransformation - Similarities to Human Drug Metabolism and Its Relevance for the Drug Discovery Process" Curr Drug Metab. 2016;17(2):107-17.

Badania zawarte w pracy doktorskiej były częściowo finansowane w ramach następujących projektów:

Opracowanie innowacyjnej grupy związków o aktywności stabilizującej potencjał błony komórkowej Europejski Fundusz Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka. POIG.01.01.02-12-012/09-00

Biomimetyki długołańcuchowych pochodnych arylopiperazyny (LCAP) - pochodne amin alicyklicznych jako nowa klasa ligandów dla receptorów monoaminergicznych. Grant NCN 2012/05/B/NZ7/03076

Szczególne podziękowania składam

moim kochanym Rodzicom Halinie i Zdzisławowi oraz

najcierpliwszemu Człowiekowi na świecie – mojemu Mężowi Rafałowi.

Bez Was nie osiągnęłabym tego, co mam, a to co bym osiągnęła nie miało by znaczenia ...

Specjalne słowa pragnę skierować do lepszej cząstki mnie -

Kubusiu – dziękuję, że jesteś ...

Spis treści

Lista skrótów	9
Streszczenie	11
Abstract	13
1. Wstęp	15
1.1. Metabolizm leków	15
1.2. Alternatywne metody badania metabolizmu	32
1.2.1. Badania in silico	32
1.2.2. Badania in vitro	34
1.2.3. Badania in situ i ex vivo	46
2. Założenia i cel pracy	48
3. Badania własne	51
3.1. Badania <i>in silico</i>	51
3.2. Badania <i>in vitro</i>	61
3.2.1. Badania mikrobiologiczne	61
3.3.2. Badania z wykorzystaniem frakcji wątrobowych	64
3.3. Inhibicja cytochromu P450	84
4. Dyskusja i wnioski	88
5. Materiały i metody	95
5.1. Materiały	95
5.1.1. Badane związki	95
5.1.2. Mikroorganizmy	95
5.1.3. Frakcje wątrobowe	95
5.1.4. Pożywki mikrobiologiczne	95
5.1.5. Odczynniki chemiczne i biologiczne	96
5.1.6. Aparatura	96
5.2. Metody	97
5.2.1. Przygotowanie roztworów	97
5.2.2. Przygotowanie buforów	100
5.2.3. Przygotowanie pożywek	100
5.2.4. Biotransformacja w modelu Cunninghamella	101
5.2.5. Biotransformacja z wykorzystaniem mikrosomów wątrobowych	101

5.2.6. Biotransformacja z wykorzystaniem frakcji S9 wątroby ludzkiej	102
5.2.7. Badania inhibicji CYP2D6 z wykorzystaniem mikrosomów ludzkich	103
5.2.8. Metody analityczne monitorujące przebieg biotransformacji	103
5.3. Programy komputerowe	104
6. Podsumowanie	105
7. Literatura	107
Spis Tabel	118
Spis Rysunków	118

Lista skrótów

ADME	akronim odzwierciedlający w skrócie losy leku w organizmie (A – absorption
	(wchłanianie),D – distribution (rozmieszczenie),M – metabolism (metabolizm),Ł –
4.01	excretion (wydaianie)
	aripiprazoi
AIP	
AZI	3'-azido-2',3'-dideoksytymidyny
BCRP	(ang. Breast Cancer Resistant Protein) białko odporności raka piersi
BUF	buturalol
СНО	(ang. Chinese Hamster Ovary) linia komórkowa wyprowadzona z jajnika chomika
	chińskiego
Cl _{int}	Klirens wewnętrzny
CSL	(ang. Corn Steep Liquor) wodny namok kukurydziany
СҮР	izoenzymy cytochromu P450 (np. CYP2A1 – pierwsza liczba arabska określa rodzinę, litera – podrodzinę, druga liczba arabska – poszczególne białko lub gen
DMS	kolonia mikroorganizmów Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DMSO	dimetylosulfotlenek
ECVAM	Europejskie Centrum Walidacji Metod Alternatywnych
EDTA	kwas wersenowy
FMO	monooksygenaza flawinowa
HEK-293	linia embrionalnych ludzkich komórek nerki
HLM	(ang. Human Liver Microsomes) ludzkie wątrobowe mikrosomy
HMG-CoA	reduktaza 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-koenzymu A
LCAP	długołańcuchowe pochodne aryopiperazyn
LC-MS/MS	wysokosprawna chromatografia cieczowa połączona ze spektrometrią masową
LEW	lewalorfan
MAO	monoaminooksydaza
MAOI	inhibitory monoaminooksydazy
MDCK	<i>(ang. Madin-Darby canine kidney)</i> komórki psiej nerki Madin Darby
MES	test maksymalnego elektrowstrząsu
Met	test drgawek w modelu chemicznym (drgawki wywołane podaniem pentetrazolu)
MLM	(ang. Mouse Liver Microsomes) mysie wątrobowe mikrosomy
MS	spektrometria masowa
NADPH	fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (forma zredukowana)
NAPD+	fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (forma utleniona)
NAPQI	N-acetylo-4-benzochinonoimina
NAT	N-acetylotransferaza
NRRL	licencjonowana kolonia mikroorganizmów
	Northern Regional Research Laboratory
OH-BUF	hydroksybufuralol
OUN	Ośrodkowy Układ Nerwowy

PAH	policykliczne aromatyczne węglowodory
PDA	(ang. <i>Potato Dextrose Agar</i>) pożywka glukozowo ziemniaczana
PI	indeks terapeutyczny
PPI	inhibitory pompy protonowej
RLM	(ang. Rat Liver Microsomes)szczurze wątrobowe mikrosomy
SULT	sulfotransferazy
t _{1/2}	okres półtrwania
TLC	(ang. Thin-Layer Chromatography) chromatografia cienkowarstwowa
UDP	urydyno-5'-difosforan
UDPGA	kwasu urydyno-5'-difosfo-D-glukuronowego
ZOL	zolpidem

Streszczenie

Badania nad biotransformacją leków do lat osiemdziesiątych ubiegłego wieku prowadzono wykorzystując zwierzęta laboratoryjne. Według Europejskiego Centrum Walidacji Metod Alternatywnych do różnego rodzaju testów poświęca się nawet do 10 milionów zwierząt rocznie, z czego ponad 60% do badań w fazie przedklinicznej. Oprócz względów humanitarnych argumentami przemawiającymi przeciwko badaniom *in vivo* są względy ekonomiczne, czas potrzebny na ich przeprowadzenie oraz jedynie 50 % szansa na odzwierciedlenie wyników uzyskanych w modelach zwierzęcych w późniejszych badaniach z udziałem ludzi. Zwłaszcza we wczesnych fazach rozwoju leku bardziej stosowne i odpowiednie wydają się tzw. metody alternatywne spełniające kryteria wprowadzonej przez Russela i Burcha zasady 3R (replacement, reduction, refinement). W filozofię zasady 3R wpisują się badania biotransformacji *in silico* oraz *in vitro,* w tym badania z wykorzystaniem mikroorganizmów oraz wątrobowych frakcji subkomórkowych.

Projekt realizowany w ramach pracy doktorskiej objął badania nad biotransformacją dwunastu wyselekcjonowanych, zróżnicowanych pod względem strukturalnym związków otrzymanych w Zakładzie Chemii Bioorganicznej Katedry Chemii Organicznej oraz w Zakładzie Chemii Leków Katedry Chemii Farmaceutycznej UJ CM o potwierdzonej aktywności w obrębie ośrodkowego układu nerwowego w modelach na zwierzętach. Wśród związków badanych były pochodne aminoalkanolowe (**1**_(a-c)-**3**) o aktywności przeciwdrgawkowej i przeciwbólowej, pochodne aripiprazolu (**4-7**) obdarzone działaniem antypsychotycznym oraz pochodne zolpidemu (**8-10**) z aktywnością nasenną oraz antypsychotyczną. Badania biotransformacji przeprowadzono stosując model *in silico* (program MetaSite) oraz *in vitro*, w tym model mikrobiologiczny (**3** różne gatunki grzyba strzępkowego *Cunninghamella elegans, echinulata, blakesleeana*), jak również model mikrosomów wątrobowych (mysz, szczur, człowiek) oraz frakcji S9. Postęp reakcji monitorowano wykorzystując metodę LC/MS.

Na podstawie uzyskanych wyników opisano kierunki przemian biotransformacyjnych oraz struktury metabolitów testowanych związków ($\mathbf{1}_{(a-c)}$ -**10**), wytypowano enzymy uczestniczące w ich powstawaniu, oszacowano stabilność metaboliczną wyznaczając okres półtrwania $t_{1/2}$ oraz klirens wewnętrzny Cl_{int}, wykryto różnice międzygatunkowe dotyczące kierunków przemian i ich szybkości (związek **7**). Interakcje typu lek-lek z najważniejszymi izoenzymami

CYP450 ustalono dla związku **2**, który okazał się inhibitorem mieszanym CYP2D6 (K_i =1.701 μ M).

Analiza otrzymanych wyników pozwoliła na wysunięcie wniosków dotyczących pewnych zależności pomiędzy lipofilowością, a stabilnością badanych połączeń. Wysoką trwałością metaboliczną charakteryzowały się związki **2** i **3** oraz **8-10**, których lipofilowość mieściła się w zakresie log P 2.16-3.0, związki o log P > 3 wykazywały stabilność od średniej do niskiej. Związki lipofilowe o log P > 4 (**4** i **5**) preferowały biotransformację polegającą na rozpadzie cząsteczki macierzystej na drodze N-dealkilacji, O-dealkilacji lub rzadziej C-dealkilacji, pozostałe struktury o niższym niż log P (**1**_(a-c),-**3**,**7**,**9**) preferowały biotransformację, która odbywała się na drodze przemian oksydacyjnych nie związanych z rozpadem cząsteczki macierzystej testowanego związku.

Otrzymane wyniki mają charakter aplikacyjny, pozwoliły wyłonić spośród badanej puli związki stabilne metabolicznie (**6,8,10**) przyczyniając się w ten sposób do racjonalnej selekcji testowanych połączeń o zdefiniowanej aktywności w ośrodkowym układzie nerwowym do dalszych badań. Z kolei wytypowanie ugrupowań podatnych na działanie enzymów biotransformacyjnych w związkach niestabilnych metabolicznie (**1**_(a-c),**4**,**5**,**7**) przyczyniło się do podjęcia modyfikacji strukturalnych przez współpracujące grupy syntetyków w celu uzyskania struktur wykazujących wyższą trwałość.

Słowa kluczowe: biotransformacja, cytochrom P450, inhibicja enzymatyczna, metody alternatywne badania metabolizmu

Abstract

Studies on the biotransformation of drugs were carried out using laboratory animals from the eighties of the last century. According to the European Centre of the Validation of Alternative Methods in various tests up to 10 million animals per year are killed, more than 60 % of these - in the preclinical phase of drug testing. Apart from humanitarian reasons, economic considerations, time and only 50 % chance to reflect the results obtained in animal models in later studies involving people are the other aspects against *in vivo* studies . Especially in the early stages of drug development alternative methods are more relevant and appropriate . These models meet the criteria introduced by Russell and Burch called 3R criteria (replacement, reduction, refinement). *In silico* and *in vitro* biotransformation studies, which include research using microorganisms and liver subcellular fractions are complient with 3R principle.

The project conducted within the doctoral thesis applied research on the biotransformation of twelve selected structure obtained in the Department of Bioorganic Chemistry, Chair Organic Chemistry and in the Department of Medicinal Chemistry, Chair Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Jagiellonian University Medical College. Selected structures had proven activity in the central nervous system in animal models. Among the compounds investigated were aminoalkanol derivatives ($1_{(a-c)}$ -3) with analgesic and anticonvulsant activity, derivatives of aripiprazole (4-7) endowed with antipsychotic activity and derivatives of zolpidem (8-10) with hypnotic and antipsychotic activity. Biotransformation studies were carried out using the *in silico* (MetaSite software) and *in vitro* models. Microbial model (3 different species of filamentous fungus *Cunninghamella elegans, echinulata, blakesleeana*) as well as liver microsomes model (mouse, rat, human) and S9 fraction were used in *in vitro* studies. The progress of the reaction was monitored using LC/MS method.

Based on the obtained results we were able to define the biotransformation pathways, structure of the metabolites of the tested compounds ($1_{(a-c)}$ -10) and enzymes involved in their formation. Moreover the metabolic stability, half-life $t_{0.5}$ and internal clearance Cl_{int} were determined. Interspecies differences in the rate of metabolism and biotransformation pathways were identified in case of the compound **7**. Drug-drug interactions of the major

CYP450 isoenzymes were determined for compound **2**, which proved to be a mixed inhibitor of CYP2D6 (Ki = 1.701μ M).

Obtained results enabled us to determine some lipophilicity – stability dependence in case of tested compounds. Compounds **2**, **3** and **8-10** were characterized by high metabolic stability and had lipophilicity in the range of log P 2.16-3.0, while compounds with log P > 3 had lower stability. Compounds with log P > 4 (**4** and **5**) were characterized by the N-dealcylation, O-dealcylation and less frequently C-dealcylation manner of biotransformation, while structures with lower log P ($1_{(a-c)}$,-3,7,9) preferred oxidative metabolism not associated with the degradation of the structure.

The obtained results are very applicable. They allowed us to choose the most stable compounds (6,8,10), which contributes to the rational selection of test connections with a defined activity in the central nervous system for further testing. Moreover, predicting moieties susceptible to the biotransformation enzymes in the unstable compounds ($1_{(a-c)},4,5,7$) contribute to make structural modifications to create more stable connections.

Key words: biotransformation, cytochrome P450, enzymatic inhibition, alternative methods to study metabolism

1. Wstęp

1.1. Metabolizm leków

Zdolność organizmu ludzkiego do metabolizmu (biotransformacji) ksenobiotyków i ich eliminacji jest naturalnym procesem, który wymaga udziału wielu szlaków enzymatycznych i białek transportowych. W roku 1947 Roger Williams przedstawił w swojej monografii *"Detoxyfication Mechanism"* biotransformację, jako proces etapowy przebiegający w dwóch fazach – funkcjonalizacji (faza I) oraz koniugacji (faza II). Obecnie wyróżnia się dodatkowo III fazę w trakcie, której następuje czynny (energozależny) przezbłonowy transportu leków skierowany do światła jelita (1).

Głównym celem przemian biotransformacyjnych jest przekształcenie ksenobiotyków w metabolity o zwiększonej hydrofilowości, które w wyniku reakcji sprzęgania w II fazie tworzą koniugaty bardzo dobrze rozpuszczalne w wodzie, dlatego mogą być łatwo eliminowane z organizmu, przyczyniając się w ten sposób do detoksyfikacji wielu leków lub innych ksenobiotyków.

Metabolizm ksenobiotyków zachodzi w każdej tkance, jednakże to gładkie retikulum endoplazmatyczne komórek wątroby jest miejscem, gdzie jego intensywność jest największa. Wynika to z kilku czynników. Pierwszym z nich jest fakt, iż w wątrobie stężenie enzymów metabolizujących jest najwyższe. Kolejnym – umiejscowienie wątroby, które sprawia, że jest ona organem perfundowanym przez ksenobiotyki w pierwszej kolejności po wchłonięciu z jelit.

Poza wątrobą leki są metabolizowane również w innych narządach takich jak: nerki, płuca, skóra, mózg, łożysko, krew oraz przewód pokarmowy. Przykładem związków metabolizowanych w skórze są powierzchniowo stosowane środki dermatologiczne występujące w postaci estrów. Ich skórny metabolizm przebiega na drodze hydrolizy (2). Do związków metabolizowanych w przewodzie pokarmowym zalicza się L-dopę (3) oraz etanol (4). Cyklezonid, glikokortykosteroid podawany drogą wziewną, jest metabolizowany w płucach (5), a remifentanyl, wybiórczy agonista receptora opioidowego μ , jest biotransformowany przez esterazy krwi (6; 7). Spośród wymienionych organów najważniejszą

15

rolę odgrywają jelito cienkie, nerki oraz płuca. Jednakże w porównaniu do wątroby udział tych organów w procesie biotransformacji jest znacznie mniejszy i stanowi jedynie 10-20 %.

Reakcje I fazy biotransformacji

Do procesów I fazy metabolizmu zalicza się utlenianie, redukcję oraz hydrolizę. Szczególne znaczenie dla metabolizmu mają procesy utleniania, w których udział biorą oksygenazy (8). Spośród nich szczególne znaczenie mają monooksygenazy. Są to enzymy, które katalizują reakcje polegające na wbudowaniu jednego atomu tlenu w związek obcy, podczas gdy drugi atom zostaje zredukowany z wytworzeniem wody przy udziale NAD(P)H.

Schemat **reakcji utleniania** ksenobiotyku przy udziale jednego z najważniejszych enzymów, monooksygenazy cytochromu P450 - przedstawia Rysunek 1.



Rysunek 1. Mechanizm utleniania leku (L) przy współudziale monooksygenazy CYP450 (na podstawie (8)).

Substrat L-H zostaje związany z trójwartościowym żelazem obecnym w centrum aktywnym monooksygenazy CYP450 (I). W kolejnym kroku następuje redukcja żelaza do drugiego stopnia utlenienia przy jednoczesnym utlenieniu NADPH (fosforanu dinukleotydu

nikotynamidoadeninowego (II). Po związaniu tlenu cząsteczkowego (III) i przyjęciu kolejnego elektronu (IV) powstaje trzeciorzędowy kompleks (V), który ulega rozpadowi do hydroksylowanego substratu (VI).

 $L-H + O_2 + NADPH + H^+ => L-OH + H_2O + NADP^+$

Największe znacznie dla oksydatywnej biotransformacji leków mają monooksygenazy zawierające hemoproteinę o typie cytochromu P450 (**CYP450**). CYP450 katalizuje hydroksylację związków aromatycznych i alifatycznych, epoksydację wiązań podwójnych, oksydatywną dealkilację związków N-, O- i S-alkilowych, oksydatywną deaminację oraz utlenianie tioeterów i amin do sulfotlenków i hydroksyloamin.

Cytochrom P450 zawdzięcza swoją nazwę dzięki zdolności pochłaniania światła przy około 450 nm (9). Jest białkiem transmembranowym posiadającym sześć podjednostek. W centrum aktywnym enzymu znajduje się jon żelaza, który połączony jest z czterema atomami azotu pierścienia porfirynowego i dwoma osiowymi ligandami, z których jednym jest grupą tiolową cysteiny (Rys.2).



Rysunek 2. Cytochrom P450.

Cytochrom P450 występuje zarówno u roślin, zwierząt jak i ludzi. U ssaków jest obecny we wszystkich typach komórek z wyjątkiem czerwonych krwinek i mięśni szkieletowych. Największe ilości CYP450 występują w wątrobie, jednakże udało się wykazać ich obecność również w przewodzie pokarmowym, płucach i mózgu. Ze względu na różnorodność izoenzymatyczmą CYP450 podzielono na rodziny, gdzie podobieństwo w budowie zachodzi w przynajmniej 40 % (np. CYP3). Dalszy podział uwzględnia podrodziny, gdzie podobieństwo

sięga 55 % (np. CYP3A) (10). Dodatkowa cyfra arabska (CYP3A**4**) występuje, gdy została zidentyfikowana więcej niż jedna podrodzina.

U człowieka potwierdzono występowanie 18 rodzin i 43 podrodzin cytochromu P450, z czego siedem jest odpowiedzialnych za udział w metabolizmie ponad 90 % wszystkich leków obecnie stosowanych w terapii. Do najważniejszych podrodzin zalicza się: CYP1A2, CYP2C9, CYP2C18, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 oraz CYP3A4 (11) (Wykres 1 i 2; Tabela 1, str.17).



Wykres 1. Najważniejsze izoenzymy CYP450.



Wykres 2. Procentowy udział izoenzymów CYP450 uczestniczących w metabolizmie leków.

Tabela 1. Główne izoenzymy CYP450 odpowiedzialne za metabolizm ksenobiotyków i ich substraty (na podstawie (8)).

Enzym	Substrat
CYP1A2	Amitryptylina, estradiol, flwoksamina, haloperidol, klomipramina, klozapina, kofeina, meksyletyna, naproksen, olanapina, ondansetron, propranolol, ropiwakaina, takryna, teofilina, werapamil, zolmitryptan,
CYP2A6	Nikotyna
CYP2B6	Bupropion, cyklofosfamid, efawirenz, ifosfamid, metadon
CYP2C8	Cerywastatyna, paklitaksel, repaglinid
CYP2C9	Amitryptylina, celekoksyb, diklofenak, fenprokumon, floksetyna, flwastatyna, glibenklamid, glipizyd, ibuprofen, irbesartan,losartan, meloksykam, naproksen, piroksykam, roziglitazon, tamoksyfen, tolbutamid, warfaryna
CYP2C19	Amitryptylina, citalopram, klomipramina, cyklofosfamid, diazepam, fenobarbital, fenytoina, heksobarbital, imipramina, indometacyna, lanzoprazol, moklobemid, nelfiawir, omeprazol, pantoprazol, prymidon, progesteron, proguanil, propranolol, rabeprazol, tenipozyd, warfaryna
CYP2D6	Alprenolol, amitryptylina, chloropromazyna, dekstrometorfan, dezypramina, fluoksetyna, fluwoksamina, haloperidol, imipramina, karwedilol, klomipramina, kodeina, meksyletyna, metoprolol, nortryptylina, ondasetron, paroksetyna, perfenazyna, propafenon, risperidon, tamoksyfen, tiomolol, tiorydazyna, tramadol
CYP2E1	Enflran, etanol, halotan, izoflran, sewoflran, teofilina
СҮРЗА4	Alprazolam, alfentanyl, amlodypina, astemizol, atorwastatyna, buspiron, klarytromycyna, chinidyna, cyklosporyna, dekstrometorfan, diazepam, diltiazem, docetaksel, domperidon, eplerenon, erytromycyna, estradiol, felodypina, fentanyl, haloperidol, imatynib, indinawir, irinotekan, lerkanidypina, lidokaina, lowastatyna, metadon, midazolam, nelfiawir, nifedypina, nisoldypina, nitrendypina, ondasetron, paklitaksel, progesteron, propranolol, ritonawir,

sakwinawir, sildenafi, simwastatyna, sirolimus, takrolimus, tamoksyfen, terfenadyna, testosteron, triazolam, werapamil, winkrystyna, zolpidem

Innym typem monooksygenaz, spoza układu CYP450, zaangażowanym w utlenianie ksenobiotyków są monooksygenazy flawinowe (FMO) zawierające flawoproteidy. Przekształcają one drugorzędowe aminy w hydroksyloaminy, a trzeciorzędowe aminy w N-tlenki. Specyficzność powinowactwa FMO do substratów jest znacznie niższa, niż w przypadku CYP450.

Do innych enzymów biorących udział w reakcjach utleniania należą także: dehydrogenaza alkoholowa, oksydaza aldehydowa i monoaminooksydaza (MAO). Są odpowiedzialne za przekształcenie alkoholi do aldehydów (dehydrogenaza alkoholowa), aldehydów w kwasy (oksydaza aldehydowa) oraz amin biogennych (12).

Utlenianie ksenobiotyku to tylko jeden z typów reakcji, jakim ulegają substraty w trakcie I fazy biotransformacji. Inną drogą przemian składającą się na I fazę metabolizmu są reakcje redukcji i hydrolizy.

Reakcje redukcji odgrywają znacznie zmniejszą rolę niż procesy utleniania. Przykładami leków ulegających tej przemianie są chloramfenikol (lek przeciwbakteryjny), częściowo metabolizowany przez wątrobową nitroreduktazę oraz nitrogliceryna (wazodilatator). Reakcje redukcji dotyczą głównie grup azowych oraz nitrowych i prowadzą do powstania odpowiednich amin.

Ważnym procesem I fazy biotransformacji jest **hydroliza**, która zachodzi przy udziale esteraz, amidaz, epoksydohydrataz, glikozydaz oraz glukuronidaz. Przykłady reakcji I fazy metabolizmu zestawiono w Tabeli 2 (str.21-23).

Typ reakcji	Przykłady substratów	Równanie reakcji
		Utlenianie
Utlenianie aldehydów i alkoholi	Alkohol benzylowy, piroksydyna	$R \xrightarrow{OH} R \xrightarrow{R} R \xrightarrow{O} R \xrightarrow{O} OH$
Utlenianie łańcuchów alifatycznych	Barbiturany	$R \xrightarrow{CH_3} R \xrightarrow{OH} + \xrightarrow{R} \xrightarrow{HO} OH HO$
Oksydacyjna N- dealkilacja	Efedryna, lidokaina, metamfetamina	$R^{1} \rightarrow R^{2}$ $R^{1} \rightarrow R^{1} \rightarrow R^{2} \rightarrow R^{2} \rightarrow 0$ H
Oksydacyjna deaminacja	Histamina, meskalina, noradrenalina	$R \xrightarrow{\text{NH}_2} R \xrightarrow{\text{O}} R \xrightarrow{\text{H}} + \text{NH}_3$
Oksydacyjna O-dealkilacja	Kodeina, meskalina, papaweryna	R^2 O R^2 R^2 R^2 R^2 R^2 R^2
Utlenianie aminy aromaty- cznej	Pochodne aniliny	$R \xrightarrow{ }{ } R \xrightarrow{ } $
N-oksydacja	Imipramina	$R^{1}-N^{R^{2}}_{R^{3}} \longrightarrow R^{1}-N^{+}-R^{3}$
S-oksydacja	Fenotiazyny	$R^{1}-S' \xrightarrow{R^{2}} R^{1}-S \xrightarrow{R^{2}} R^{2} \xrightarrow{R^{1}-S} R^{1}-S \xrightarrow{R^{2}} O \xrightarrow{R^{1}-S} O O O O O O O O O O O O O O O O O O O$

Tabela 2. Typy reakcji chemicznych zachodzących w I fazie biotransformacji leków (na podstawie (8)).

Desulfatacja	Tiobarbiturany, paration	R^{1} S R^{1} R^{2}
		$R^{1} \xrightarrow{P} R^{3} \xrightarrow{R^{2}} R^{1} \xrightarrow{P} R^{3}$ $R^{1} \xrightarrow{P} R^{3}$ H $R^{1} \xrightarrow{P} R^{3}$ H H $R^{1} \xrightarrow{P} R^{3}$ H
Epoksydacja	Aldryna, karbam- azepina	$R^1 \xrightarrow{R^2} \xrightarrow{R^2} O$
Hydroksy- lacja substancji aromaty- cznych	Chlorpromazyna, fenotiazyna, propranolol	$HO \xrightarrow{R} \xrightarrow{HO} \xrightarrow{R}$

Redukcja

Aldehydy	Wodzian chloralu	$R \xrightarrow{O}_{H} \xrightarrow{R \xrightarrow{OH}} OH$
Związki azowe	Salazosulfa- pirydyna	$R^{1} \qquad \qquad$
Grupy nitrowe	Nitrazepam	$R \xrightarrow{II} NO_2 \xrightarrow{NH_2} R \xrightarrow{II}$
De- halogenacja	Halotan	$R^{1} \xrightarrow{R^{2}} R^{3} \xrightarrow{R^{2}} R^{1} \xrightarrow{R^{3}} R^{3}$

Hydroliza			
Estry	Kwas acetylo- salicylowy, kokaina, petydyna, prokaina	$0 \xrightarrow{R^{1}} R^{2} \xrightarrow{R^{2}} R^{1} \xrightarrow{COOH} H \xrightarrow{R^{2}}$	
Amidy kwasowe	Prokainamid	$O \xrightarrow{R^1} NH^2 \xrightarrow{R^2} R^1 \xrightarrow{COOH} H_2N^2$	
Glikozydy	Glikozydy nasercowe, glikozydy antranilowe	$R^{2}_{0} \qquad R^{1} \qquad R^{2}_{0} \qquad R^{2}_{0$	
Epoksydy	Metabolit karbamazepiny	$R^{1} \xrightarrow{R^{2}} R^{4} \xrightarrow{R^{3}} R^{3} \xrightarrow{R^{1}} R^{1} \xrightarrow{R^{2}} R^{4} \xrightarrow{R^{3}} R^{3}$	
Inne			
Dekarboksy- lacja	Histydyna, lewodopa, α-metyldopa	R^{1} R^{2} R^{1} R^{2} R^{1} R^{2} R^{2	

Reakcje II fazy biotransformacji

W trakcie reakcji II fazy metabolizmu następuje sprzęganie z aminokwasami (glicyną), kwasem glukuronowym, czy siarkowym, aktywowanym kwasem octowym lub S-adenozylometioniną (13) (Tabela 3, str.23,24). Reakcje sprzęgania, jak wszystkie reakcje biosyntezy, wymagają energii, której źródłem jest ATP (adenozyno-5'-trifosforan).

Zazwyczaj w trakcie II fazy biotransformacji następuje wprowadzenie do cząsteczki substratu grupy kwasowej, która znacznie zwiększa hydrofilność ksenobiotyku. Wyjątkiem są reakcje sprzęgania z kwasem octowym i proces metylacji.

Rolą II fazy metabolizmu jest dezaktywacja związków. Jednakże wykazano, iż w trakcie tych procesów mogą powstawać również związki aktywne, jak np. hemiester hydroksylowanego triamterenu (lek moczopędny, oszczędzający potas) z kwasem siarkowym oraz C-17 glukuroniany estrogenu i androgenów. Warto dodać, że produkty reakcji II fazy metabolizmu, mogą także przedłużać działanie leku – taką sytuację obserwuje się w przypadku morfiny, jej metabolit – 6-glukuronian działa przeciwbólowo tak, jak związek macierzysty.



Przykłady substratów	Czynnik sprzęgający	Reakcja chemiczna
Alkohole, aminy, fenole, sulfomamidy	Kwas UDP- glukuronowy	$HOOC \longrightarrow O \longrightarrow O - P - P - Urydyna + HO - R \longrightarrow HO^{(1)} OH OH$ $HOOC \longrightarrow O \longrightarrow O - R + HO^{(1)} O - R + HO^{(1)} O - R + OH^{(1)} OH + OH^{(1)} OH^{(1)} OH + OH^{(1)} OH^{($
Aminy aromatyczne,	Siarczan	$HO - R \longrightarrow HO_3S - O - R$ $H_2N - R \longrightarrow HO_3S - NH - R$
Kwas benzoesowy*, kwas izonikotynowy*	Glicyna	HOOC-R + HOOC NH ₂ \rightarrow R NH COOH

Kwas indoilooctowy*, kwas fenylooctowy*	Glutamina	HOOC-R + NH_2 HOOC-R + NH_2 HOOC-NH R O NH2
Izoniazyd, sulfonamidy	Kwas octowy	$H_2N-R \longrightarrow H_3C NH^R$
Metadon, nikotynamid, noradrenalina	N-metylacja z SAM	$R^{2} \xrightarrow{R^{1}} SAM \xrightarrow{R^{1}} N \xrightarrow{R^{1}} CH_{3}$ $R^{2} \xrightarrow{R^{2}} R \xrightarrow{SAM} (N \xrightarrow{R^{2}} R$ $R^{2} \xrightarrow{R^{2}} R$ $R^{2} \xrightarrow{R^{2}} R$
Katecholamina	O-metylacja z SAM	$HO \xrightarrow{R} SAM H_3C \xrightarrow{O} HO \xrightarrow{R} HO$

* Sprzęganie zachodzi po aktywacji kwasu za pomocą ATP i koenzymu A, SAM-S-adenozylometionina.

Efektem biotransformacji może być powstanie:

- aktywnych metabolitów z nieaktywnego substratu (proleki) (A)
- metabolitów nieaktywnych (B)
- metabolitów o właściwościach toksycznych (C)
- metabolitów o innym działaniu farmakologicznym (D)

(A) Proleki to substancje o działaniu leczniczym, które rozwijają w pełni swoją aktywność dopiero w chwili, gdy ulegną przemianom metabolicznym w organizmie, natomiast same nie są aktywne, lub ich aktywność jest wielokrotnie niższa niż substancji czynnej (14). Proleki ulegają takim samym przemianom metabolicznym, jak inne substancje, jednak w ich przypadku w I fazie biotransformacji dochodzi do bioaktywacji. Proleki są tak konstruowane, aby posiadały dodatkowy fragment strukturalny i dopiero po zadziałaniu enzymów metabolizujących dochodzi do uwalniania struktury aktywnej.

Jednym z przykładów proleków jest lowastatyna, inhibitor HMG-CoA (reduktaza 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-koenzymu A), lek obniżający poziom cholesterolu. Związek ten posiada w swej strukturze pierścień laktonowy, który pod wpływem działania karboksyesteraz obecnych w plazmie, mikrosomach wątrobowych i cytozolu hepatocytów ulega hydrolizie do kwasu lowastatynowego zawierającego ugrupowanie hydroksykwasowe. Dopiero w tej formie lowastatyna wykazuje aktywność farmakologiczną i hamuje aktywność HMG-CoA. Ten aktywny metabolit przechodzi dalszą biotransformację przy udziale CYP3A4. Podwójna hydroksylacja zachodząca również w I fazie metabolizmu prowadzi do powstania nowych, aktywnych metabolitów (15) (Rys.3, str.27).

Wiązanie estrowe jest często wykorzystywane przy projektowaniu i tworzeniu proleków. Dzieje się tak, dlatego, że w warunkach organizmu (roztwór wodny, temperatura 37°C, pH w zakresie 5-8) wiązanie estrowe R¹–CO-O-R² jest zazwyczaj stabilne, ale podlega łatwej hydrolizie pod wpływem esteraz, których aktywność wewnątrz komórek jest wysoka. Estryfikacja jest wykorzystywana między innymi do syntezy proleków nukleozydowych. Nukleozydy posiadają grupy hydroksylowe, a niektóre z nich, szczególnie grupa –OH w pozycji 5′ - łatwo ulegają estryfikacji. Przykładami takich proleków są estry 3′-azido-2′,3′- dideoksytymidyny (AZT). AZT jest inhibitorem odwrotnej transkryptazy wirusa HIV, który ze względu na swoją słabą penetrację przez błony biologiczne wykazywał niską skuteczność terapii, dlatego zsyntetyzowano ponad 200 estrów, spośród których ciekawymi właściwościami charakteryzowały się m.in. związki z długołańcuchowymi nienasyconymi kwasami alifatycznymi. Cechowała je nie tylko znacznie lepsza penetracja przez błony biologiczne, ale również wyższa aktywność przeciwwirusowa (16). Innym przykładem są estry monofosforanu AZT (MP-AZT). Dzięki zastosowaniu estryfikacji oprócz zwiększenia

przenikalności przez błony udało się także uchronić lek przed działaniem enzymów defosforylujących obecnych na powierzchni komórek i w płynach zewnątrzkomórkowych (17).



(hydroksymetabolit)

Rysunek 3. Aktywacja proleku (lowastatyny) do aktywnych metabolitów.

Konstruowanie proleków jest także bardzo zasadne w przypadku leków nieodpornych na kwaśne środowisko żołądka. Enzymy I fazy uwalniają aktywną formę dopiero w środowisku o wyższym, nieszkodliwym dla leku pH.

Przykładem tego typu stosowanych proleków w farmakoteriapii są inhibitory pompy protonowej (PPI). Jeden z nich, omeprazol, jest produkowany w postaci granulek dojelitowych w specjalnych żelatynowych kapsułkach. Taka formulacja chroni wrażliwy na środowisko kwaśne prolek, który wchłaniany jest dopiero w jelicie cienkim (18). Ponieważ omeprazol jest słabą zasadą, akumuluje się w komórkach okładzinowych, gdzie ulega protonacji i jest przekształcany do swojej aktywnej formy sulfonamidowej. Dopiero po tej modyfikacji może nierozerwalnie związać się z pompą protonową (H⁺/K⁺-ATPazę) i zablokować wydzielanie przez komórki okładzinowe kwasu solnego. Bezpieczeństwo działania omeprazolu wynika z jego wybiórczego działania. Jedynie komórki okładzinowe żołądka posiadają na tyle kwaśne pH, aby

prolek przekształcił się w swoją aktywną formę sulfonamidową. Środowisko innych H⁺/K⁺-ATPaz nie umożliwia tego przekształcenia (19; 20).

W trakcie I fazy biotransformacji jak już wspomniano zachodzą reakcje utleniania (21), redukcji oraz hydrolizy (22). Reakcje te prowadzą do aktywacji proleków, natomiast w przypadku innych związków mogą skutkować powstaniem nieaktywnych metabolitów. Mówimy wówczas o dezaktywacji leków (B).

Metadon, silnie działający lek przeciwbólowy o charakterze agonisty opioidowego jest stosowany w leczeniu zespołu abstynencji od alkaloidów opium (23). Związek ten jest metabolizowany głównie w wątrobie do N-demetylowej, *nieaktywnej* pochodnej przez CYP3A4 (24; 25). Innym przykładem dezaktywacji leku w I fazie biotransformacji jest przekształcenie letrozolu, niesterydowego inhibitora aromatazy powodującego zahamowanie biosyntezy estrogenów, do *nieaktywnego* metabolitu – karbinolu.

Dezaktywacja wprowadzonego do organizmu ksenobiotyku może mieć miejsce również w trakcie II fazy biotransformacji. Spektakularnym przykładem takiego procesu jest metabolizm paracetamolu (acetaminofenu). Związek ten podlega sprzęganiu z resztą kwasu siarkowego i glukuronowego. W efekcie tego procesu tworzą się nieaktywne siarczany i glukuroniany, które wydalane są z moczem. Około 5 % paracetamolu jest eliminowane w postaci niezmienionej przez nerki (26). 3 % acetaminofenu jest utleniane przez CYP2A6 i CYP2B1 do 3-hydroksy-acetaminofenu, który po metylacji do 3-metoksy- acetaminofenu, jest sprzęgany z wytworzeniem glukuronianów oraz siarczanów i wydalany z moczem. W przypadku wysycenia powyższych szlaków metabolicznych, bądź przedawkowania leku (>10g/dzień) paracetamol jest utleniany przez CYP2E1 do toksycznego metabolitu – *N*-acetylo-4-benzochinonoiminy (NAPQI). Związek ten jest utleniaczem reagującym z grupami tiolowymi (–SH) w zredukowanym glutationie. Gdy dojdzie do wyczerpania zapasów glutationu NAPQI wchodzi w reakcję z białkami hepatocytów i uszkadza wątrobę. Głównym miejscem uszkodzenia jest centralna część zrazików, gdzie występuje największe stężenie CYP2E1, a najmniejsze glutationu (27).

Reakcje biotransformacji mogą także prowadzić do powstania związków o charakterze toksycznych metabolitów (C), które mogą odpowiadać za wiele działań niepożądanych tego typu przemiany reprezentuje petydyna, lek przeciwbólowy z grupy opioidów o agonistycznym

w odniesieniu do receptorów µ morfinopodobnym mechanizmie działania. Związek ten metabolizowany jest w wątrobie poprzez hydrolizę wiązania estrowego i demetylację. Produktem metabolizmu jest norpetydyna, która wykazuje 50 % aktywności przeciwbólowej petydyny oraz ma działanie neurotoksyczne i odpowiada za działania niepożądane ze strony OUN pojawiające się po stosowaniu leku. Do skutków tych możemy zaliczyć drgawki oraz zaburzenia oddychania (28). Ze względu na powstawanie norpetydyny akumulującej się w organizmie, petydyny nie powinno się stosować długotrwale.

Reakcje zachodzące w trakcie biotransformacji mogę również prowadzić do powstania metabolitów, które posiadają inne właściwości farmakologiczne niż związki macierzyste (D). Taką przemianą charakteryzuje się iproniazyd, lek o działaniu przeciwdepresyjnym, hamujący nieselektywnie monoaminooksydazę. Związek ten podany pacjentom cierpiącym na gruźlicę jest przekształcany przez enzymy bakterii *Mycobacterium tuberculosis* w izoniazyd – lek przeciwtuberkulostatyczny (29).

W Tabeli 4 zebrano i przedstawiono leki, które ulegają przekształceniu do metabolitów o zróżnicowanej aktywności farmakologicznej (A – proleki, B-metabolity nieaktywne, C - metabolity toksyczne, D – metabolity o innym działaniu farmakologicznym).

Lek	Metabolit	Aktywność farmakologiczna metabolitu (X)	Literatura
Aksetyl ceruroksymu	Cefuroksym	Antybiotyk (A)	(30)
Azatiopryna	Merkaptopuryna	Immunosupresant i cytostatyk (A)	(31)
Cyklezonid	lzobutyryl cyklezoniudu	Wziewny glikokortykosteroid (A)	(32)
Enalapryl	Enalaprylat	Inhibitor konwertazy angiotensyny (A)	(33)
Etylobursztynian erytromycyny	Erytomycyna	Antybiotyk (A)	(34; 35)

Tabela 4. Aktywność farmakologiczna metabolitów wybranych leków.

Klofibrat	Kwas klofibrynowy	Hipolipemiczna (A)	(36)
Kortyzon	Hydrokortyzon	Przeciwzapalna, glikokortykosteroid (A)	(37; 38)
Lewodopa	Dopamina	Przeciw parkinsonowa (A)	(39)
Omeprazol	Sulfenamid omeprazolu	Inhibitor pompy protonowej (A)	(40)
Perindopryl	Perindoprylat	Hipotensyjna (A)	(41)
Piwampicylina	Ampicylina	Antybiotyk (A)	(42; 43)
Półbursztynian metyloprednizolonu	Metylo- prednizolon	Przeciwzapalna, immunosupresyjna (A)	(44)
Proguanil	Cykloguanil	Inhibitor reduktazy dihydrofolianowej (A)	(45)
Prednizon	Prednizolon	Przeciwzapalna (A)	(46)
Zydowudyna	Trifosforan zydowudyny	Przeciwwirusowa (A)	(47)
Paracetamol	Imina N-acetylo p-benzochinonu	Analgetyk, antypiretyk (B, C)	(48)
Halotan	Kwas tri- fluorooctowy	Anestetyk (C)	(49)
Metoksyfluran	Fluor	Anestetyk (C)	(50)
Paration	Paraokson	Inhibitor acetylocholinesterazy (C)	(51)

Sulfonamidy	Pochodne acetylowe	Bakteriostatyczna, odkażająca (C)	(52)
Amitryptylina	Nortryptylina	Antydepresant (D)	(53; 54)
Diazepam	Nordiazepam, Oksazepam	Anksjolityczna, miorelaksacyjna, sedatywna, nasenna (D)	(55)
Dekaonian flufenazyny	Flufenazyna	Antywytwórcza, antyautystycznym, aktywizująca (D)	(56)
Imipramina	Dezmetyl- imipramina	Antydepresant (D)	(57)
Heroina	Morfina	Analgetyk opioidowy (D)	(58)
Propranolol	4-hydroksy- propranolol	Hipotensyjna (D)	(59)

A – proleki, B-metabolity nieaktywne, C – metabolity toksyczne, D – metabolity o innym działaniu farmakologicznym

1.2. Alternatywne metody badania metabolizmu

Badania biotransformacji przez lata były wykonywane z wykorzystaniem zwierząt laboratoryjnych (*in vivo*). Jednakże już w latach 80-tych ubiegłego wieku przedsięwzięto działania mające na celu ograniczenie liczby zwierząt używanych w badaniach przedklinicznych (60). Według Europejskiego Centrum Walidacji Metod Alternatywnych (ECVAM) w krajach Unii Europejskiej do testów poświęca się nawet do 10 milionów zwierząt rocznie, z czego ponad 60 % do badań związanych z medycyną. Oprócz względów humanitarnych, argumentami przemawiającymi przeciwko badaniom *in vivo* są względy ekonomiczne, czas konieczny na ich przeprowadzenie oraz jedynie 50 % szansa na odzwierciedlenie wyników uzyskanych u zwierząt w późniejszych badaniach z udziałem ludzi (61-63).

W odpowiedzi na te ograniczenia opracowane zostały na całym świecie techniki mające umożliwić analizę dużej ilości nowych substancji (64). Metody te, w skrócie nazywane alternatywnymi metodami badania metabolizmu, modyfikowane są i udoskonalane pod kątem konkretnych potrzeb badawczych przez jednostki naukowe i przemysłowe na całym świecie (65). Spełniają one kryteria wprowadzonej w 1959 roku przez Russel'a i Burch'a zasady 3R, która zaleca:

- replacement zastępowanie doświadczeń na zwierzętach metodami *in vitro* (hodowle komórkowe, tkankowe) oraz wykorzystywanie zwierząt o niższym stopniu rozwoju ewolucyjnego;
- reduction zmniejszanie liczby zwierząt poprzez lepsze wykorzystanie metod statystycznych;
- refinement zmienianie procedur eksperymentalnych na takie, które przysparzają zwierzętom mniej cierpień.

W filozofię zasady 3R wpisują się badania *in silico* oraz *in vitro,* w tym badania z wykorzystaniem mikroorganizmów, frakcji subkomórkowych i linii komórkowych.

1.2.1. Badania in silico

Na etapie projektowania/modyfikowania nowych substancji niezwykle cenna jest wiedza o ewentualnych miejscach szczególnie podatnych na działanie enzymów metabolizujących. Informacja ta umożliwia zastosowanie modyfikacji strukturalnych cząsteczki, które doprowadzą do powstania związku bardziej stabilnego metabolicznie, bądź ułatwią przekształcenie nowo zsyntetyzowanego proleku w aktywną biologicznie formę.

Określenie stabilności metabolicznej poprzez poznanie miejsc wrażliwych na działanie enzymów biotransformujących wymaga skomplikowanych badań, nierzadko związanych z zastosowaniem izotopów pierwiastków oraz wykorzystaniem dużych ilość badanego związku. Badania te jednak są bardzo ważne, gdyż mogą zmienić losy nowej cząsteczki. Adekwatnym przykładem jest historia selektywnego antagonisty receptora 5HT_{2A} zsyntetyzowany przez Rowley'ego i współpracowników (Rys.4).



Rysunek 4. 3-(4-fluoro-piperydyn-3-ylo)-2-fenylo-1H-indol.

* - miejsce ataku enzymatycznego.

Profil farmakokinetyczny 3-(4-fluoro-piperydyn-3-ylo)-2-fenylo-1H-indolu, jego biodostępność na poziomie 18 % i okres półtrwania wynoszący zaledwie 1,4 h sprawiły, iż pomimo interesujących właściwości farmakologicznych nie był brany pod uwagę do dalszych badań. Jednakże wytypowanie miejsca ataku enzymatycznego (*) i jego modyfikacja poprzez podstawienie w tą pozycję atomu fluoru spowodowały zwiększenie stabilności metabolicznej i znaczną poprawę biodostępności (80 %) oraz wydłużenie okresu półtrwania do 12 h. Ten jeden przykład ilustruje ogromną wagę i znaczenie badań nad stabilnością metaboliczną nowych kandydatów na lek (66).

W odpowiedzi na konieczność szybkiego wstępnego oszacowania stabilności metabolicznej dużej ilości projektowanych cząsteczek o potencjale biologicznym powstało bardzo dużo programów komputerowych opartych o działanie różnych algorytmów. Jednym z takich programów, stworzonym przez firmę Molecular Discover Ltd., bazującym na strukturze 2D substratu i 3D enzymu jest MetaSite. Program ten umożliwia z 85 % precyzją określenie

miejsca reakcji biotransformacji w zależności od wybranego cytochromu i z 80 % dokładnością wskazuje właściwy izoenzym CYP450 odpowiedzialny za metabolizm danej cząsteczki (67).

Analiza tych informacji umożliwia znalezienie miejsc ataku enzymatycznego dla dużej grupy związków w sposób szybki i niewymagający dodatkowych syntez chemicznych. Daje to możliwość zwiększenia stabilności metabolicznej przez modyfikacje chemiczne i prowadzenie dalszych badań jedynie dla związków o wysokiej stabilności oraz wykluczenie syntezy związków, które mogą się przekształcać w toksyczne metabolity.

Innym ciekawym programem, umożliwiającym przewidywanie struktur powstających metabolitów, bez analizy izoenzymów CYP P450, jest Metabolizer (ChemAxon). Program ten opracowuje wyniki na podstawie zgromadzonych bibliotek reakcji metabolicznych. Natomiast program MetabolExpert, będący modułem systemu Pallas (CompuDrug) jest oprogramowaniem regułowym z otwarta bazą danych, która może być w każdym momencie uaktualniana i modyfikowana przez użytkownika w celu otrzymania najbardziej optymalnych wyników. Umożliwia on analizę metabolitów powstających u roślin, zwierząt oraz w wyniku fotodegradacji. Program Meteor to system stworzony przez firmę Lhasa Ltd. będący bazą danych dotyczących zależności między struktura, a kierunkami biotransformacji danej cząsteczki. Zasady działania, na których opiera się Meteor oparte są na bardzo ogólnych desktryptorach, a nie na szczegółowych reakcjach zapisanych w bazie danych. Program posiada w swej bazie 350 różnych reakcji biotransformacji (I i II faza metabolizmu). Przewiduje nie tylko metabolity, ale również określa prawdopodobieństwo ich wystąpienia in vivo. Innym rodzajem programu jest system BioFrontier/P450 (Fujitsu). Umożliwia on uzyskiwanie różnorodnych informacji o cytochromach P450, miejscach ich występowania, właściwościach i charakterystycznych typach katalizowanych reakcji.

1.2.2. Badania in vitro

Badania mikrobiologiczne

Dzięki przeprowadzonym badaniom nad procesami metabolicznymi, katalizowanymi przez mikroorganizmy dobrze poznano właściwości oksydoredukcyjne bakterii oraz grzybów i stwierdzono, że procesy biotransformacji przebiegające u tych organizmów przypominają reakcje biotransformacji zachodzące w komórkach ssaków. Łatwa i tania hodowla, liczne enzymy, możliwość wykorzystania większych stężeń substancji badanej skłaniają do wykorzystywania mikroorganizmów w celach badania metabolizmu leków.

Szczególnie ważnym i atrakcyjnym jest model grzyba strzępkowego *Cunninghamella*. Mikroorganizm ten posiada zdolność do przeprowadzania reakcji biotransformacji szeregu związków w sposób regio- i stereoselektywny – analogiczny do zaobserwowanego u ssaków. Zdolność ta wynika z faktu, że grzyby z rodzaju *Cunninghamella* posiadają system monooksygenaz cytochromu P450 analogiczny do ssaczych, dokładniej do cytochromów z rodziny CYP51 (68). Lisowska i Długoński (69) w swojej pracy wykazali, iż biotransfromację aniliny prowadzoną przez *C. blakesleeana* można przyspieszyć dodając induktorów CYP450 (m.in. fenobarbital, alkohol etylowy). Natomiast dodatek inhibitorów CYP2C9 oraz 2D6 znacznie spowolnia biotransformację (69-72).

Spośród rodzaju *Cunninghamella* gatunkami najczęściej wykorzystywanymi do mikrobiologicznej biotransformacji leków są: *Cunninghamella echinulata, Cunninghamella elegans, Cunninghamella blakesleeana.* Gatunki te są w stanie metabolizować szereg ksenobiotyków wykorzystując enzymy zarówno I fazy, jak i fazy II. Szczególne zastosowanie znalazły w badaniach metabolizmu związków aromatycznych. Enzymy cytochromu P450 obecne w *C. elegans* zostały wykorzystane w celu neutralizacji zanieczyszczeń policyklicznymi aromatycznymi węglowodorami (PAH) (73). Wśród produktów tych reakcji można znaleźć fenole, epoksydy dihydrodioli, chinony, które następnie mogą być związane z kwasem glukuronowym bądź kwasem siarkowym. Produkty metabolizmu grzybów są mniej toksyczne niż PAH, które są czynnikami mutagennym i kancerogennym. Dzięki tej aktywności *C. elegans* wykorzystywana jest w procesie bioremediacji gleb, wód i osadów (74).

Cytochrom *C. elegans* ma również zdolność do hydroksylacji, N-oksydacji oraz N-demetylacji trójcyklicznych antydepresantów, jak amitryptylina (75), metabolizmu pochodnych fenotiazyn przez N-demetylację, sulfoksydację, N-oksydację oraz aromatyczną hydroksylację oraz biotransformacji flurbiprofenu do 4'-hydroksyflurbiprofenu (76), *C. blakesleeana* prowadzi również reakcje przekształcające dekstrometorfan do dekstrorfanu (77). Reakcje te w organizmie człowieka prowadzone są przez różne izoenzymy CYP – flurbiprofen jest metabolizowany przez CYP2C9, a dekstrometorfan przez CYP2D6. Wskazuje to, iż rodzaj *Cunninghamella*, albo posiada enzym o bardzo szerokim spektrum substratowym, albo ilość enzymów obecnych w tym mikroorganizmie jest bardzo duża. Fungal Genomics Project

prowadzony na Uniwersytecie Concordia w Montrealu dowiódł, po zsekwencjonowaniu genomu C. elegans, istnienia podobieństw do CYP, jednakże homologia nie występuje na wysokim poziomie, a fragmenty otrzymane po translacji zawierają kodony STOP. Badania biotransformacji wyjaśniające znaczne podobieństwo ksenobiotyków pomiędzy Cunninghamella, a organizmami wyższymi, w tym człowiekiem, nie zostały jeszcze w pełni ukończone, jednakże niezaprzeczalnie podobieństwo jest bardzo wysokie i chętnie wykorzystywane przez badaczy analizujących metabolizm nowych substancji (78). Zdecydowanie mniej autorów wspomina o podobieństwie w kierunkach biotransformacji II fazy metabolizmu pomiędzy Cunninghamella, a człowiekiem. Niewątpliwie jednak we frakcji cytozolowej i mikrosomalnej C. elegans zaobserwowano aktywność enzymów II fazy metabolizmu takich, jak S-transferazy, arylosulfotransferazy, UDP-glukozylo – i glukuronozylo transferazy (79).

Zostało udowodnione, iż mikroorganizm *Cunninghamella* posiada zdolność do biotransformacji ksenobiotyków w sposób analogiczny do człowieka. Istnieją prace opisujące, iż procesy metaboliczne prowadzone przez tego grzyba strzępkowego dostarczają nowych związków, często bardzo trudnych do otrzymania przy wykorzystaniu syntezy chemicznej. Dlatego też w trakcie badań nad rozwojem leków mikroorganizmy z rodzaju Cunninghamella znajdują zastosowanie w produkcji metabolitów o właściwościach mniej toksycznych niż leki macierzyste. Przykładowo C. blakesleeana posiada zdolność do przekształcenia terfenadyny oraz ebastyny (leki antyhistaminowe) do ich metabolitów (odpowiednio feksofenadyna zachowaniu i ebastyna), które charakteryzują się, przy pierwotnego działania farmakologicznego, znacznie niższą kardiotoksycznością. Użycie mikroorganizmu do ich otrzymania zamiast klasycznej syntezy przyniosło tak duże korzyści, iż zostało opatentowane (80).

Wykorzystywana jest również zdolność mikroorganizmów do przeprowadzania reakcji w sposób stereo- i regioselektywny. *Cunninghamella echinulata* NRRL 1384 została wykorzystana do uzyskania lizofiliny (enancjomer *R*) metabolitu pentoksyfiliny. Wykazano, iż lizofilna – podobnie jak lek macierzysty – jest inhibitorem fosfodiesterazy. Jednakże jej synteza chemiczna jest długotrwała, wieloetapowa i przebiega z niską wydajnością. Wykorzystanie *Cunninghamella echinulata* NRRL 1384 umożliwia uzyskanie lizofiliny z wydajnością 50 % przy wysokiej czystości enancjomerycznej (ee 93 %) (81).

36
Innym przykładem wykorzystania mikroorganizmu *Cunninghamella* jest regioselektywna N-demetylacja pochodnej tebainy. W wyniku tej reakcji uzyskuje się półprodukty do syntezy buprenorfiny. Procesy te prowadzone są również z wykorzystaniem *Cunninghamella echinulata* NRRL 1384. Dzięki zmodyfikowaniu warunków hodowli oraz zmianie odstępów czasowych przy dodawaniu substratu udało się uzyskać wydajność na poziomie 94 % (82).

Cunninghamella to nie jedyny mikroorganizm wykorzystywany w trakcie badań biotransformacji. Modele bakteryjne, takie jak *Streptomyces* spp. oraz *Bacillus* spp., posiadają – w odróżnieniu od grzybów – enzymy niezwiązane z błoną, co znacznie ułatwia ich izolację i oczyszczanie. *Streptomyces griseus* posiada zdolność do ekspresji CYP105D1, nazywanego dawniej P450soy. Nazwa ta wywodzi się z faktu, iż mikroorganizm hodowany jest na podłożu wzbogaconym w soję. Obecność tego enzymu wyjaśnia, zaobserwowaną przez Sariaslani i Rosazze zdolność *S. griseus* do biotransformacji etoksykumaryny w kierunku 7-hydroksykumaryny oraz 7-hydroksy-6-metoksykumaryny (83). Wyizolowanie i oczyszczenie tego polipeptydu (84), a następnie jego ekspresja w komórkach *Escherischia coli* umożliwiło stworzenie systemu zdolnego do produkcji metabolitów ksenobiotyków, w tym leków. Potwierdzone zostało, iż CYP105D1 ma zdolność do prowadzenia reakcji demetylacji erytromycyny oraz hydroksylacji benzo[*a*]pyrenu, testosteronu oraz warfaryny, jak również biotransformacji ketokonazolu i imidazolu w sposób analogiczny do tego, który ma miejsce w organizmie człowieka. Tak szerokie spektrum substratowe charakteryzuje bardzo niewiele enzymów, przykładem może być ludzki enzym CYP3A4 (85).

Spośród gatunku *Bacillus - B. megaterius* posiada CYP102A1, który u formy dzikiej odpowiada za hydroksylację kwasów tłuszczowych (86). Białko to ma zdolność do transformacji substratów dla izoenzymów CYP3A4, CYP2E1 oraz CYP1A2 w sposób analogiczny z reakcjami zachodzącymi w organizmie człowieka. Wartość Km dla tych reakcji również nie odbiega od tej wyznaczonej u ludzi (87). Modyfikacje przeprowadzone na CYP102A1 umożliwiły stworzenie modyfikowanych białek zdolnych do wytworzenia 12 z 13 metabolitów werapamilu powstających w organizmie człowieka (88). Różne warianty enzymu dostępne są komercyjnie w postaci płytki 96-dołkowej (Microcyp) umożliwiają w sposób szybki poznanie prawdopodobnej drogi biotransformacji nowej substancji w organizmie człowieka.

Wspomniana metoda badania metabolizmu wykorzystująca nadekspresję odpowiednich enzymów biotransformujących w *E. coli,* czy drożdżach jest popularna już od ponad dwóch

37

dekad i jest źródłem kluczowych enzymów prowadzących metabolizm ksenobiotyków (89). Do stworzenia systemu ekspresyjnego z wykorzystaniem *E. coli* konieczna jest modyfikacja N-końca białka w celu dodania aktywności reduktazy CYP oraz zwiększenia ekspresji enzymu. Stworzenie systemu ekspresyjnego z wykorzystaniem drożdży *Saccharomyces cerevisiae* nie wymaga tych modyfikacji. W literaturze można znaleźć porównania różnych systemów ekspresyjnych do tworzenia enzymów metabolizujących leki. Przykładowo, Cornelissen i wsp. porównali zdolność *E.coli, S.cerevisiae* i *Pseudomonas putida* do ekspresji CYP1A1 poprzez analizę reakcji deetylacji 7-etoksyrezorufiny. Najwyższą aktywnością charakteryzował się CYP1A1, który uzyskano w komórkach *E. coli* (90). Z drugiej strony, badania Geiera wskazują, że dla CYP2D6 odpowiedniejszym organizmem do ekspresji jest *Pichia pastoris*, nie *E.coli* (91). Dowodzi to, iż każdy z izoenzymów musi być traktowany indywidualnie, niemożliwe jest stworzenie jednego systemu produkcji, działającego z porównywalnie wysoką wydajnością i efektywnością dla każdej z odmian CYP.

Do produkcji metabolitów na skalę preparatywną służą również z powodzeniem inne mikroorganizmy oprócz wspomnianej wcześniej *Cunninghamella*. *Escherischia coli,* u której przeprowadzono ekspresję CYP3A4, CYP2C9 oraz CYP1A2 wykazywała zdolność do produkcji 59 mg 6β-hydroksytestosteronu z zaledwie 1 litra mieszaniny reakcyjnej (92), a *Schizosaccharomyces pombe* umożliwiła uzyskanie 2.8 g 4'-hydroksydiklofenaku z 6 litrowej hodowli. Co ciekawe, *S.pombe* może być również wykorzystana do produkcji metabolitów II fazy, jeśli w trakcie modyfikacji został wprowadzony gen odpowiedzialny za ekspresję UDP-glikozylotransferazy.

Badania z wykorzystaniem subkomórkowych frakcji wątrobowych

Do modeli *in vitro,* które wykorzystuje się w badaniach biotransformacji należą również frakcje S9, cytozolowa oraz mikrosomalna wątroby (Rys.5, str.39).



Rysunek 5. Procedury umożliwiające izolację składników subkomórkowych wątroby.

Frakcja S9 zawiera enzymy mikrosomalne (CYP) i cytozolowe (monooksygenazy flawinowe, karboksyesterazy, UDP – glukuronylotransferazy, sulfo-, metylo-, sulfonylo-, acetylo-transferazy), nie posiada natomiast części mitochondrialnej (93; 94). Jej nazwa pochodzi od szybkości wirowania (9000g) użytej w trakcie jej pozyskiwania. Zawartość części mikrosomalnej i cytozolowej umożliwia prowadzenie badań w zakresie I i II fazy biotransformacji. Aktywność enzymatyczna frakcji S9 jest niestety dość niska (około 20-25 % aktywności mikrosomów), ale umożliwia otrzymanie metabolitów nawet wtedy, gdy nie powstają one przy użyciu frakcji mikrosomalnej. Należy przy tym pamiętać, iż użycie 5-krotnie większej ilości frakcji S9 może spowodować wiązanie leku z białkami, co wpłynie na wynik eksperymentu.

Cytozol jest pozyskiwany, jako supernatant z frakcji S9 - zawiera grupę rozpuszczalnych enzymów metabolizujących leki. Zaliczyć do nich możemy sulfotransferazy (SULT), N-acetylotransferazę (NAT), transferazę glutationu oraz oksydazę ksantynową. Frakcja cytozolowa została wykorzystana do analizy regioselektywnej sulfatacji fitoestrogenu daidzeiny i genisteiny. Wykorzystano tu wyizolowany z cytozolu i oczyszczony SULT. Udowodniono, iż SULT1A1 odgrywa znaczącą rolę w monosulfatacji fitoestrogenów i determinuje regioselektywność tej reakcji (95).

Mikrosomy ludzkie lub zwierzęce, będące źródłem wszystkich enzymów cytochromu P450, są pozyskiwane dzięki ultraszybkiemu wirowaniu gradientowemu (104000g). Frakcja mikrosomalna odpowiedzialna jest za prowadzenie reakcji I fazy biotransformacji badanego ksenobiotyku, na którą składają się reakcje utleniania, redukcji oraz hydrolizy (96). Przy użyciu tego modelu istnieje również możliwość przeprowadzenia reakcji II fazy metabolizmu, takich jak glukuronidacja. Konieczna jest wówczas obecności egzogennych kofaktorów - NADPH lub kwasu urydyno-5'-difosfo-D-glukuronowego (UDPGA) (97). Dodanie ich jest niezbędne, gdyż zostają one utracone podczas pozyskiwania mikrosomów na drodze ultraszybkiego wirowania. Mikrosomy wątrobowe to model najczęściej wykorzystywany przez badaczy. W celu wyeliminowania różnic osobniczych wynikających z różnego wieku, stanu zdrowia i płci pośmiertnych dawców mikrosomów, do badań używane są często komercyjnie dostępne, zbiorcze mieszaniny pochodzące od różnych dawców. Zaletami badań z użyciem tego modelu jest ich stosunkowo niski koszt, łatwość użycia oraz możliwość przechowywania. W stanie zamrożonym (-80°C) mikrosomy mogą być magazynowane przez wiele lat (98), a rozmrożona porcja przechowywana na lodzie przez okres mniej niż 2h może być ponownie zamrożona i użyta w przyszłości bez ryzyka utraty aktywności enzymatycznej (99). Di i współpracownicy wykonywali eksperymenty przez okres 50 dni, w odstępach jednotygodniowych korzystając z tej samej porcji odpowiednio przechowywanych mikrosomów. Wyniki charakteryzowały się bardzo dobrą powtarzalnością (100). Problem ujawniający się podczas badań z wykorzystaniem mikrosomów dotyczy rozpuszczalników. Rozpuszczalniki organiczne powszechnie używane do rozpuszczenia badanych związków lipofilowych – hamują aktywność enzymatyczną CYP450. Tak popularny rozpuszczalnik, jak DMSO (dimetylosulfotlenek) nawet w stężeniu 0.1 % hamuje aktywność enzymatyczną frakcji mikrosomalnej i powoduje otrzymanie wyników sugerujących fałszywie wysoko stabilne związki (100). Ze względu na wysoką wrażliwość mikrosomów zaleca się stosowanie metanolu, bądź acetonitrylu w stężeniu nie większym niż 0.2 %. Podobnie wrażliwa na użyte rozpuszczalniki jest frakcja S9.

Badania z wykorzystaniem frakcji wątrobowych różnych gatunków (myszy, szczurów, psa, małp, człowieka) umożliwiają określenie różnic międzygatunkowych w metabolizmie danego ksenobiotyku. Wyniki te mogą być wykorzystane w dalszych badaniach *in vivo*. Porównanie

wyników otrzymanych przy udziale mikrosomów myszy i szczurów z mikrosomami ludzkimi daje wskazówki do przeprowadzenia badań *in vivo* na odpowiednio dobranym gatunku gryzonia.

Badania z wykorzystaniem linii komórkowych

Badania metabolizmu mogą być również prowadzone bezpośrednio w komórkach pozyskanych od ludzi. Są to między innymi hodowle pierwotnych hepatocytów ludzkich (101). Hodowle te wykazują ekspresję enzymów zarówno fazy I jak i II metabolizmu. Są również w stanie odtworzyć profil metaboliczny leku podobny do otrzymanego *in vivo*. Cechy te sprawiają, że pierwotne hodowle hepatocytów są bardzo popularne w badaniach metabolizmu i toksyczności ksenobiotyków. Lek dostaje się do komórki hepatocytu w sposób bierny bądź może być pobierany w sposób aktywny z wykorzystaniem transporterów, takich jak polipeptyd kotransportujący taurocholan-Na⁺ (NTCP), czy polipeptyd transportujący organiczne aniony (OATP). Po pobraniu leku jego stężenie w komórce wzrasta, przeciwdziałają temu transportery takie, jak glikoproteina P, białka oporności wielolekowej (MRP)) wypompowujące ksenobiotyk poza przestrzeń komórki (102).

Hodowle pierwotnych hepatocytów ludzkich mogą być prowadzone w zawiesinie bądź na plastikowej powierzchni pokrytej kolagenem (*sandwich*). Jednakże hodowla w zawiesinie charakteryzuje się jedynie 4-godzinną żywotnością, w porównaniu do 7-10 dniowej żywotności hodowli typu *sandwich*. Dłuższa żywotność komórek jest konieczna w trakcie badań indukcji cytochromu P450, gdzie analizowany związek ma spowodować transkrypcję genów, a następnie translację. Wykorzystanie hepatocytów ludzkich stanowi złoty standard w badaniu indukcji CYP450 (103). Lu i wsp. zmodyfikowali hodowlę *sandwich* dodając warstwę matrigel'u na powierzchnię hepatocytów. Zmiana ta umożliwiła tworzenie "kanalików żółciowych" pomiędzy hepatocytami. Po inkubacji z komórkami wątroby część związku zostaje wydalona do kanalików żółciowych, a reszta pozostaje w medium bądź w hepatocytach. Złącza szczelinowe występujące pomiędzy hepatocytami zostają otwarte, gdy pożywka nie zawiera wapnia (zawiera EDTA, kwas wersenowy). Umożliwia to uwolnienie związku z kanalików żółciowych do medium i analizę ilościową eliminacji (E) związku do żółci – ważnego aspektu badań ADME.

Niestety, oprócz krótkiej żywotności hepatocytów w zawiesinie, hodowla tych komórek ma również inne wady. Zaliczyć do nich trzeba niestabilność fenotypową, nieregularny dostęp do komórek wątroby ludzkiej, jak również zmienność funkcjonalną w zależności od dawcy. Idealnym rozwiązaniem mogłyby być linie komórkowe wyprowadzone z hepatocytów ludzkich (przykładowo HepG2 oraz Mz-Hep-1) ze swoim stabilnym fenotypem, łatwością w hodowli i dostępnością (104). Problemem jest jednak fakt, iż komórki tych linii w niewielkim stopniu metabolizują leki, co spowodowane jest niską ekspresją enzymów cytochromu P450. Przyczyny tego faktu mogą być różne - niedobór specyficznych czynników transkrypcyjnych odpowiedzialnych za ekspresję genów cytochromu P450, bądź nadmiar represorów transkrypcji. Niewykluczony jest również wpływ alternatywnego splicingu. Obiecującymi wydawać się mogą eksperymenty polegające na dostarczeniu odpowiednich, wątrobowo specyficznych, czynników transkrypcyjnych przy użyciu wektorów adenowirusowych. Linia HepG2, najczęściej używana linia ludzkich komórek wątroby, może być przykładem potwierdzającym zasadność tych eksperymentów. Przy użyciu wektorów adenowirusowych wprowadzających czynniki transkrypcyjne udało się podnieść ekspresję izoenzymów CYP3A4 oraz CYP2C w komórkach HepG2. W porównaniu do hodowli pierwotnych, komórki te posiadają jednak znacznie mniejsze ilości enzymów cytochromu P450, nierzadko wykrywalne jedynie w tak czułych metodach, jak RT- PCR.

Nowo wyprowadzoną linią komórkową pochodzącą od HepG2 jest WGA. WGA cechuje ekspresja CYP2B6, co sprawiło, iż została zaproponowana jako model do badania regulacji ekspresji genów izoenzymu CYP2B6 przez fenobarbital (104).

Kolejną, stosowaną w badaniach metabolizmu, linią komórkową jest BC2 (105). Jest to linia wyprowadzona z ludzkiego raka wątroby. Wykazuje ona ekspresję mRNA dla izoenzymów CYP1A1, CYP 1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C9, CYP2E1 oraz CYP3A4. Co więcej, wykazano, iż BC2 reagują zwiększeniem aktywności cytochromu P450 w odpowiedzi na fenobarbital, rifampicynę czy deksametazon (induktory enzymatyczne).

Wychodząc naprzeciw potrzebom firm farmaceutycznych, choć nie tylko, stworzono nieśmiertelne hepatocyty (106). Dokonano tego przez transformację ludzkich komórek wątroby plazmidem kodującym geny nieśmiertelności, bądź tworząc hybrydy komórek wątroby z komórkami hybrydoma. Niestety, choć niektóre z funkcji hepatocytów pozostały niezmienne po transformacji, ekspresja enzymów cytochromu P450 była na tak niskim poziomie, iż uniemożliwiało to badanie metabolizmu ksenobiotyków.

Postęp biologii molekularnej otworzył drzwi do ekspresji genów ludzkich enzymów odpowiedzialnych za metabolizm leków, w komórkach organizmów, które tych enzymów nie posiadały. Dzięki inżynierii genetycznej możliwą stała się transfekcja komórek bakterii, drożdży, owadów czy też komórek ssaczych genami odpowiedzialnymi za ekspresję enzymów cytochromu P450 takich, jak: CYP1A1, 1A2, 2A6, 2B6, 2B8, 2C6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 oraz 3A4 (107). Ekspresja tych genów została potwierdzona metodą RT-PCR. Komórki, które zostały poddane transformacji cechowały się właściwościami charakterystycznymi dla mikrosomów wątroby człowieka, a poziom aktywności enzymów cytochromu P450 nie odbiegał od poziomu prezentowanego w hepatocytach ludzkich. Stransfekowane linie komórkowe wykazywały również ekspresję innych genów zaangażowanych w metabolizm leków. Były to geny dla Stransferazy glutationu (GST) oraz UDP-glukuronylotransferazy (UGT). Linie komórkowe posiadające ludzkie enzymy metabolizujące ksenobiotyki są wykorzystywane również, jako czynniki identyfikujące enzymy wątrobowe odpowiedzialne za metabolizm konkretnego leku. Inkubacja ksenobiotyku z pojedynczą linią komórkową pozwala na określenie izoenzymu, bądź izoenzymów, odpowiedzialnych za generowanie metabolitów badanej substancji. Zaletą tej metody jest zarówno możliwość przedłużenia inkubacji, aż do 24 godzin, co umożliwia badanie związków wolno metabolizowanych, jak również analizowanie metabolizmu prowadzonego przez izoformy enzymu P450 występujące w niższych stężeniach. Ekspresja ludzkich enzymów cytochromu P450 znalazła również zastosowanie w badaniu interakcji pomiędzy dwoma, lub większą ilością, równocześnie stosowanych leków. Badania te wydają się być niewątpliwie zasadne, ponieważ monoterapia jest niezwykle rzadko stosowaną formą farmakoterapii. Brak informacji na temat oddziaływania ksenobiotyku na enzymy mikrosomalne wątroby może doprowadzić do przekroczenia dawki bezpiecznej leku (w przypadku inhibicji CYP450), bądź do obniżenia stężenia leku w organizmie do poziomu, przy którym lek nie posiada aktywności terapeutycznej (w przypadku indukcji CYP450) (108). Przykłady inhibitorów i induktorów CYP zaangażowanych w metabolizm leków zostały podane w Tabeli 5 (109).

lzoenzym CYP	Inhibitor	Induktor
CYP1A1	α-naftoflawon	Policykliczne wodorowęglany

Tabela 5. Inhibitory i induktory najważniejszych izoenzymów CYP450 uczestniczących w biotransformacji leków.

CYP1A2	α–naftoflawon, cymetydyna, cyprofloksacyna, fluwoksamina, propranolol, werapamil	β–naftoflawon, omeprazol, tytoń
CYP2B6	Kurkuma, sertralina, tiklopidyna	Fenobarbital, fenytoina, karbamazepina, rifampicyna
СҮР2С9	Apigenina, diklofenak, flukonazol, kwas walproinowy, mykonazol, sulfafenazol,	Fenobaribital, rifampicyna
CYP2C18 CYP2C19	Chloramfenikol, felbamat, fluoksetyna, fluwoksamina, ketokonazol, moklobemid, topiramat,	Karbamazepina, kwas acetylosalicylowy, noretysteron, prednizon
CYP2D6	Bupropion, chinidyna, citalopram, escitalopram, fluoksetyna, haloperidol, paroksetyna, sertralina, terbinafina	Deksametazon, glutetymid, rifampicyna
СҮРЗА4	Allopurinol, amiodaron, chloramfenikol, cyklosporyna, cymetydyna, diltiazem, erytromycyna, flukonazol, fluoksetyna klarytromycyna, ketokonazol, imatinib, indinawir, itrakonazol, izoniazyd, nefazodon, nifendypina, rytonawir, tomoksyfen, werapamil	Efawirenz, fenobarbital, fenytoina, kapsaicyna, karbamazepina, kwercetyna, modafinil, pioglitazon, rifampicyna troglitazon

Wyłonienie induktorów dla danego izoenzymu CYP450 jest procesem bardziej złożonym, niż wyselekcjonowanie inhibitorów. Indukcja enzymatyczna polega na wzroście biosyntezy konkretnego białka CYP w odpowiedzi na stymulujący reagent. Proces ten jest rezultatem zwiększenia intensywności transkrypcji specyficznych genów i wiąże się z syntezą de novo mRNA, białek i potranslacyjną modyfikacją enzymu. Jednakże badając metabolizm leków wykazujących indukcję enzymów rozważyć należy również mechanizm stabilizacji mRNA, bądź białek, a nie jedynie stymulację transkrypcji.

Badanie induktorów metabolizmu jest o tyle trudne, że wymaga idealnego systemu komórkowego, pozbawionego defektów. Obecnie komórkami, które wykorzystuje się w tym celu są pierwotne hodowle hepatocytów ludzkich oraz fragmenty wątroby człowieka.

Biotransformacja leku może prowadzić do powstania związku o toksyczności znacznie przekraczającej toksyczność związku macierzystego. Aspekt toksyczności nie może być badany na liniach komórkowych wątrobiaka, gdyż komórki te wykazują biotransformacje na bardzo niskim poziomie. Hepatotoksyczność może natomiast być badana przy użyciu dwóch modeli *in vitro* komórek WIF-B9, które są linią komórkową uzyskaną przez fuzję szczurzego wątrobiaka z ludzkimi fibroblastami oraz hodowli pierwotnej hepatocytów (110). Cytotoksyczność związków była porównywana w obu modelach komórkowych, a wykazane różnice zależały zwykle od zdolności danego modelu do ekspresji poszczególnych izoenzymów P450, głównie CYP3A. Nie ulega wątpliwości, iż komórki zmodyfikowane dzięki osiągnięciom inżynierii genetycznej mogą dostarczyć wielu odpowiedzi na pytania dotyczące toksyczności zależnej od metabolizmu i mechanizmów obrony przez substancjami szkodliwymi. Ograniczeniami, na chwilę obecną, są trudności w stransfekowaniu komórek więcej niż dwoma genami kodującymi izoenzymy cytochromu P450. Ograniczenie to sprawia, iż nadal złotym standardem są komórki ludzkich hepatocytów, które dostarczają kompletnych informacji dotyczących metabolizmu leku *in vivo*.

Układy transportowe odgrywają ważną rolę w rozmieszczeniu leków, ich wzajemnych interakcjach i toksyczności. Od niedawna procesy transportu na zasadzie antyportu przez błony komórkowe przy udziale P-glikoproteiny określa się, jako III fazę biotransformacji ksenobiotyków. W trakcie badań przedklinicznych determinuje się czy nowa substancja jest substratem czy/i inhibitorem wybranego transportera. Służą do tego między innymi unieśmiertelnione linie komórkowe Caco-2 pochodzące z gruczolakoraka jelita grubego nieżyjącego już mężczyzny. Charakteryzują się one wzrostem adherentnym oraz mają zdolność do tworzenia rąbka szczoteczkowego, czyli systemu mikrokosmków na powierzchni komórki. Dodatkowo, tak jak w przypadku enterocytów komórki te wytwarzają ścisłe połączenia między sobą oraz systemy transportujące substancje takie jak np. P-glikoproteina (P-gp), czy białko odporności raka piersi (BCRP). Model wykorzystujący Caco-2 jest najpopularniejszym modelem służącym do badania substratów/inhibitorów P-gp. Komórki Caco-2 są hodowane w odpowiednich komorach, aż osiągną stan pełnej konfluencji umożliwiający dyfuzję substancji jedynie przez komórkę lub połączenia międzykomórkowe (111). Linia ta zawiera niski poziom endogennych białek cytochromu P450. W 1996 r opisano po raz pierwszy dwie transgeniczne linie Caco-2 z nadekspresją izoenzymu CYP2A6 oraz CYP3A4. Linię Caco-2 można uznać za jedną z najpopularniejszych ludzkich linii nowotworowych stosowanych do badania leków – ich wchłaniania i transportu do wnętrza komórki oraz metabolizmu.

Innymi modelami służącymi do badania transportu ksenobiotyków są transfekowane linie komórkowe takie, jak: CHO (linia komórkowa wyprowadzona w 1957 roku z jajnika chomika chińskiego), HEK-293 (linia embrionalnych ludzkich komórek nerki) oraz MDCK (komórki psiej nerki Madin Darby). Powyższe linie dzięki nadekpresji konkretnych transporterów mogą być użyte w trakcie badań przedklinicznych leków (112; 113).

Dodatkowo stosowane są również hodowle pierwotne hepatocytów oraz błony pęcherzyków pozyskiwane bezpośrednio z wątroby, które w sposób naturalny zawierają duże stężenie transporterów ksenobiotyków.

1.2.3. Badania in situ i ex vivo

Odmienny typ badań reprezentuje metodyka *in situ* prowadzona bezpośrednio w perfundowanej wątrobie. Model taki najdokładniej oddaje absorpcję, transport, biotransformację i wydalenie leku ze względu na zachowanie struktury, białek transportowych i innych – poza hepatocytami – komórek wątroby. Niezaburzone pozostają również interakcje komórka-komórka i komórka – przestrzeń pozakomórkowa. Po zakończonym eksperymencie tkanka wraz z żółcią może być przebadana na obecność analizowanego ksenobiotyku i jego metabolitów. Badania te dostarczają informacji o efekcie pierwszego przejścia, stopnia wiązania z białkami, stopnia pobierania leku z płynu perfundującego i ilości leku wydalonego w transporcie kanalikowym. Istnieją 2 modele – pierwszy, w którym wątroba pozostawiana jest w organizmie i drugi – gdzie następuje jej izolacja. Ze względu na brak wpływu innych organów model drugi jest szerzej wykorzystywany. Preparaty izolowanej wątroby dostępne są komercyjnie (Harvard Apparatus, Holliston). Istotne znaczenie ma również skład użytego płynu perfundującego – najczęściej zawiera on albuminę lub/oraz erytrocyty. Przy takim składzie perfuzatu należy wspomnieć o możliwości zmiany wyników poprzez wiązanie leku z białkami (114; 115).

Na pograniczu metod *in vivo* i *in vitro* znajdują się metody *ex vivo*. W trakcie takich eksperymentów lek podawany jest zwierzęciu, a następnie organ (np. wątroba) jest pozyskiwany i odpowiednio opracowywany (np. izoluje się mikrosomy). Analizuje się zmianę

poziomu białek transportowych oraz enzymów po podaniu badanego leku. Informacje te są następnie korelowane ze zmianami patologicznymi, które zaszły jeszcze w trakcie życia zwierzęcia (116; 117).

Wyniki otrzymane z badań *in silico* i *in vitro* na bardzo wczesnym etapie badań przedklinicznych nowo zsyntetyzowanych związków stanowią doskonałe źródło informacji naukowej zarówno dla chemików jak i farmakokinetyków oraz farmakologów. A możliwość uzyskania wyników w sposób szybki, stosunkowo tani oraz zgodny z zasadą 3R tłumaczy także wzrastającą popularność wykorzystania metod alternatywnych w badaniach metabolizmu związków będących kandydatami na lek.

Badania *in vitro* oraz *in silico* nigdy nie oddadzą złożoności reakcji i mechanizmów charakteryzujących cały organizm, jednakże przez swą prostotę, umożliwiają naszkicowanie kierunków metabolizmu danego ksenobiotyku. Pozwalają odpowiedzieć na pytanie czy powstające metabolity zawierają ugrupowania powszechnie uważane za toksyczne, pomagają wytypować izoenzymy cytochromu P450 odpowiedzialne za metabolizm oraz określić stabilność metaboliczną danej cząsteczki. Dodatkowo mogą posłużyć do wskazania miejsca ataków enzymatycznych w obrębie nowo zsyntetyzowanej struktury.

2. Założenia i cel pracy

Rozwój badań nad nowym, oryginalnym lekiem trwa wiele lat, jest procesem żmudnym i wymaga nie tylko zaangażowania potencjału intelektualnego wielu specjalistów, ale także wiąże się z dużymi nakładami finansowymi.

Pierwszy etap badań podstawowych podczas procesu badawczo-rozwojowego nowego produktu leczniczego obejmuje zdefiniowanie celu terapeutycznego oraz wybór spośród ogromnej ilości nowo zsyntetyzowanych substancji tzw. hitu, wchodzącego z celem molekularnym w skuteczną i pożądaną interakcję. Kolejny etap badań obejmuje modyfikację i optymalizację substancji aktywnej z typowaniem struktury wiodącej, czyli tzw. kandydata na lek, który w ramach badań przedklinicznych jest weryfikowany w zakresie aktywności farmakologicznej, farmakokinetycznej i farmakodynamicznej w różnych modelach zwierzęcych *in vitro* i *in vivo*. W ramach fazy badań przedklinicznych konieczne jest także przeprowadzenie badań toksykologicznych (dwa różne gatunki zwierząt – gryzonie, psy) oraz oceniających wpływ na karcynogenezę i układ rozrodczy.

W celu szybkiej i skutecznej oceny różnych parametrów farmakologicznych i farmakokinetycznych dla dużej ilości nowych związków aktywnych biologicznie na etapie badań przedklinicznych dopuszcza się i zaleca stosowanie testów *in silico* oraz *in vitro,* które mogą się przyczynić do skrócenia czasu trwania badań nad nowym lekiem, a wszędzie gdzie jest to tylko możliwe, oszczędzą życie zwierząt laboratoryjnych.

W następnym etapie wyselekcjonowany kandydat na lek musi podlegać badaniom klinicznym obejmującym 3 fazy, które polegają na testowaniu go u ludzi, najpierw w grupie zdrowych ochotników (I faza), w kolejności w grupie około 1000 starannie wyselekcjonowanych chorych (II faza), a ostatecznie w dużej populacji (kilku do kilkunastu tysięcy) pacjentów w wielu różnych ośrodkach badawczych na świecie. Pozytywne zakończenie III fazy badań klinicznych determinuje przygotowanie wniosku o rejestrację nowego środka leczniczego.

Celem badań realizowanych w ramach pracy doktorskiej jest udział w programie poszukującym kandydatów na lek na etapie badań przedklinicznych w grupie pochodnych aminoalkanoli (związki $1_{(a-c)}$ -3) o aktywności przeciwdrgawkowej i przeciwbólowej, pochodnych aripiprazolu (związki 4-7) obdarzonych działaniem przeciwpsychotycznym oraz pochodnych zolpidemu (związki 8-10) o aktywności nasennej oraz przeciwpsychotycznej.

48



Związki $\mathbf{1}_{(a-c)}$ -**10** charakteryzują się zróżnicowana strukturą, lecz wszystkie cechuje znaczna lipofilowość (log P 2.16-5.03), wykazują specyfikę działania w poszczególnych grupach chemicznych. Ich cechą wspólną jest działanie w obrębie ośrodkowego układu nerwowego potwierdzone w badaniach na zwierzętach doświadczalnych (myszy, szczury).

W tym projekcie udział w badaniach przedklinicznych związków **1**_(a-c)-**10** będzie polegał na oszacowaniu ich stabilności metabolicznej oraz na ustaleniu przebiegu procesu biotransformacji poprzez określenie struktury metabolitów i enzymów odpowiedzialnych za ich powstawanie. Cele badawcze zostaną zrealizowane poprzez zastosowanie wybranych technik alternatywnych *in silico* oraz *in vitro*, które umożliwiają większą przepustowość badań.

Do wstępnego wytypowania metabolitów związków **1**_(a-c)-**10** metodami *in silico* wykorzystany zostanie komercyjny program MetaSite. Badania biotransformacji *in vitro* zostaną wykonane z zastosowaniem różnych modeli badawczych. Zaplanowano wykorzystanie modelu mikrosomów wątrobowych różnych gatunków ssaków (mysz, szczur, człowiek), frakcji S9 oraz modelu mikrobiologicznego *Cunninghamella*.

Na podstawie uzyskanych wyników planowane jest:

- oszacowanie stabilności metabolicznej poprzez wyznaczenie okresu półtrwania (t_{1/2}) oraz klirensu wewnętrznego (Cl_{int})
- określenie ścieżki biotransformacyjnej dla testowanych związków 1(a-c)-10
- wytypowanie enzymów odpowiedzialnych za przebieg biotransformacji poszczególnych związków
- ocena wpływu związku **2** na CYP2D6

Bardzo interesującym zadaniem badawczym będzie także porównanie wyników otrzymanych metodami *in silico* oraz *in vitro*.

Wydaje się, że w ten sposób zaplanowane badania nad biotransformacją związków $\mathbf{1}_{(a-c)}$ -10 pozwolą na krytyczną weryfikację i wybór najbardziej właściwej metody testowania metabolizmu poza ustrojem zwierząt doświadczalnych i ludzi.

3. Badania własne

Przedmiotem badań były związki 1(a-c)-10 wykazujące aktywność w centralnym układzie nerwowym (118-122). Związki 1_(a-c)-3 to pochodne aminoalkanolowe, odpowiednio 2-aminocykloheksan-1-olu o działaniu antyepileptycznym, oraz 2-aminobutan-1-olu i 2-aminopropn-1-olu wykazujące działanie analgetyczne w bólu neuropatycznym. Związki 4-7 to z kolei pochodne sulfonamidowe z potwierdzoną aktywnością przeciwpsychotyczną. Struktury **4-6** są zbliżone budową do aripiprazolu, częściowego agonisty receptora D₂ oraz receptora serotoninowego 5HT_{1A}, stosowanego w leczeniu schizofrenii i epizodów maniakalnych w przebiegu choroby afektywnej dwubiegunowej. Związek 7 również posiadał multireceptorowe działanie w stosunku do receptorów serotoninowych oraz receptora Związki **4-7** posiadają zarówno dopaminowego. profil przeciwdepresyjny, jak i przeciwpsychotyczny ustalony w testach na zwierzętach. Ostatnią grupą analizowanych związków 8-10 były pochodne zolpidemu. Lek ten reprezentuje ważną klasę substancji szeroko stosowanych w lecznictwie. Pochodne imidazo[1,2-a]pirydyny wykorzystywane są jako leki przeciwdrgawkowe, przeciwnowotworowe, przeciwbakteryjne oraz uspakajające. Analizowane struktury **8-10** posiadały profil antypsychotyczny.

Realizując zdefiniowane cele badawcze dla wytypowanych związków $1_{(a-c)}-10$ charakteryzujących się aktywnością w obrębie centralnego układu nerwowego podjęto próby ustalenia przebiegu ich biotransformacji przy użyciu metod *in silico* oraz *in vitro*.

3.1. Badania in silico

W pierwszym etapie biotransformację związków **1**_(a-c)-**10** symulowano przy użyciu programu MetaSite, który umożliwia wyznaczenie względnego prawdopodobieństwa zajścia reakcji przy konkretnym ugrupowaniu z udziałem najważnejszych izoenzymów cytochromu P450 takich jak: CYP1A1, CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 oraz CYP3A5. Typuje również miejsca w cząsteczce najbardziej podatne na atak enzymów biotransformacyjnych.

W przypadku związków **1**_(a-c) (odpowiednio enancjomery *R* i *S* oraz racemat) program MetaSite wytypował grupę metylową (C19) połączoną z pierścieniem aromatycznym, jako najbardziej wrażliwą na przemiany biotransformacyjne i zaproponował ścieżkę metaboliczną z uwzględnieniem udziału w reakcjach odpowiednich izoenzymów CYP450. Na Rysunku 6 przedstawiono metabolity **M1-M5**. **M1-M3** powstawały w wyniku reakcji utleniania grupy metylowej katalizowanej działaniem CYP1A2, CYP2C19, CYP2D6 oraz CYP2E1, natomiast **M4** i **M5** powstawały na drodze dealkilacji w wyniku działania CYP2B6. Program nie wykazał różnic w przebiegu biotransformacji dla enancjomerów i racematu.



Rysunek 6.Symulacja ścieżki metabolicznej pochodnych 2-aminocykloheksan-1-olu $(\mathbf{1}_{(a-c)})$ programem MetaSite.

Dla związków **2** i **3** program MetaSite wytypował identyczne ścieżki biotransformacji (Rys.7,8, str.53,54). **M1-M3** powstawały na drodze tych samych przemian, jak w przypadku metabolitów związków **1**_(a-c). Dodatkowo, związki **2** i **3** pod wpływem CYP2C9 i CYP3A5 ulegały hydroksylacji dając **M4**. Natomiast działanie CYP3A4 skutkowało rozpadem cząsteczki macierzystej związków **2** i **3** do **M5** i **M6**.



Rysunek 7. Symulacja ścieżki metabolicznej dla związku 2 programem MetaSite.



Rysunek 8. Symulacja ścieżki metabolicznej dla związku 3 programem MetaSite.

Dla aripiprazolu oraz związków **4-6** będących jego analogami wyniki symulacji biotransformacji przedstawiono na Rysunkach 9-11 (str.55-57). Dla leku oraz dla jego nowo zsyntetyzowanych pochodnych atomem najbardziej podatnym na atak izoenzymów CYP450 był atom węgla w łączniku alkilowym (C16). W wyniku biotransformacji związek macierzysty ulegał rozpadowi do **M1** - 7-butoksy-3,4-dihydrochinolino-2(1*H*)-onu oraz **M4** 1-(2,3-dichlorofenylo)piperazyny. **M1** kolejno ulegał stopniowemu utlenianiu do **M2** i **M3**. Ta sama grupa izoenzymów (CYP1A2, CYP2B6, CYP2C19, CYP2E1, CYP3A5) była odpowiedzialna za procesy biotransformacyjne zachodzące przy atomie azotu w pierścieniu piperazyny (N17) prowadzące do powstania **M7**-

M10. Jednakże, dla pochodnych aripiprazolu reakcje te zachodziły z dwukrotnie niższym prawdopodobieństwem. Przemiany katalizowane przez CYP2C9 skutkowały rozpadem związków **4-6** oraz leku referencyjnego do **M5** i **M6**. Ten sam izoenzym katalizował hydroksylację pierścienia aromatycznego prowadząc do powstania **M11**.





Rysunek 9. Atomy węgla najbardziej wrażliwe na atak enzymatyczny wskazane przez MetaSite dla aripiprazolu i jego pochodnych.



Rysunek 10. Symulacja ścieżki metabolicznej dla aripiprazolu programem MetaSite.



Rysunek 11. Symulacja ścieżki metabolicznej dla związku 4 programem MetaSite.

Związek **7** odbiegający ogólną strukturą od pochodnych aripiprazolu charakteryzował się odmienną ścieżką biotransformacyjną zaproponowaną przez MetaSite (Rys.12). Najważniejszymi przemianami były reakcje utlenienia atomu siarki (S25), S-dealkilacji (C26) oraz hydroksylacji w pierścieniu aromatycznym (C24). W dwóch pierwszych typach reakcji uczestniczyły izoenzymy CYP2B6, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6 oraz CYP3A4, natomiast proces dealkilacji katalizował CYP1A2.



Dla zolpidemu oraz związków **8-10** będących jego pochodnymi wyniki symulacji metabolizmu przedstawiono na Rysunku 13 i 14 (str.59,60).

Program MetaSite dla zolpidemu i jego pochodnych wytypował powstanie 5 metabolitów, które zostały utworzone na drodze hydroksylacji grup metylowych oraz N-dealkilacji. Efektem działania izoenyzmu CYP3A4 była hydroksylacja w ugrupowaniu dimetyloaminy (M1) oraz N-dealkilacja w tym samym miejscu cząsteczki. Natomiast reakcje katalizowane przez CYP1A1, CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYPD6, CYP2E1 oraz CYP3A5 prowadziły do powstania **M3** - *N*,*N*-dimetyloacetamidu 2-{2-[4-(hydroksymetylo) fenylo]-6-metyloimidazo[1,2-*a*]pirydyn-3-ylu}, który następnie ulegał utlenieniu do aldehydu (M4) oraz kwasu karboksylowego (M5). Dla związku 9 analiza *in silico* wykazała obecność takich samych metabolitów, jak dla zolpidemu, natomiast związki 8 i 10 posiadające atom fluoru podstawiony do pierścienia benzenu w miejsce grup metylowych, nie posiadały w swojej ścieżce biotransformacyjnej metabolitów M3-M5. Wyróżniono dla nich jedynie 2 miejsca wrażliwe na atak enzymatyczny – grupy metylowe dimetyloaminy.



Rysunek 13. Atomy węgla najbardziej wrażliwe na atak enzymatyczny wskazane przez MetaSite dla zolpidemu i jego pochodnych.



M5 kwas -{3-[2-(dimetyloamino)-2-etoksy] -6-metylimidazo[1,2-*a*]pirydin-2-yl}benzoesowy

Rysunek 14. Symulacja ścieżki metabolicznej dla zolpidemu i jego pochodnych zaproponowana przez MetaSite.

3.2. Badania in vitro

W celu zweryfikowania wysymulowanych metodami *in silico* ścieżek biotransformacyjnych dla związków **1**_(a-c)-**10** oraz w celu ilościowego oszacowania ich stabilności metabolicznej w kolejnym etapie przeprowadzono badania *in vitro* wykorzystujące dwa modele - mikrobiologiczny oraz mikrosomów wątrobowych.

3.2.1. Badania mikrobiologiczne

W badaniach wykorzystano trzy gatunki grzyba strzępkowego *Cunninghamella: C. echinulata 1384, C. elegans 1908 oraz C. blakesleeana 1906.* Mikroorganizm ten jest znany z posiadania zarówno systemu monooksygenaz cytochromu P450, jak i enzymów II fazy metabolizmu o właściwościach zbliżonych do ssaczych. Biotransformację związków **1**_(a-c)-**3** oraz **8-10** prowadzono w hodowli płynnej na pożywce CSL. Przebieg biotransformacji monitorowano z wykorzystaniem techniki TLC oraz LC-MS/MS.

Analiza chromatogramów i widm masowowych dla związków **1**_(a-c) w próbach kontrolnych (dzień 0) wykazała obecność tylko jednego piku o m/z=284 (Rys.15, str.62), który odpowiadał masie molekularnej związków wyjściowych Mw=283. Po 7-dniowej biotransformacji przy użyciu szczepu *C. blakesleeana 1906* związki macierzyste ulegały biotransformacji w 95 % (Rys.16, str.62,63), natomiast w obecności pozostałych dwóch szczepów w 85 %. Obserwowano pojawienie się dodatkowego piku pochodzącego od metabolitu **M1** o czasie retencji równym 3.07 min i m/z=300. Na podstawie analizy fragmentacyjnej MS/MS zaproponowano jego strukturę, która odpowiadała wzorowi sumarycznemu C₁₅H₂₂ClNO₃. Przedłużenie biotransformacji do 10 dni nie skutkowało powstaniem innych dodatkowych metabolitów. Otrzymano analogiczne rezultaty dla każdego z enancjomerów oraz racematu.



Rysunek 15. Chromatogram (a) oraz widmo MS (b) związku $\mathbf{1}_{c}$ w próbie kontrolnej w modelu mikrobiologicznym biotransformacji.





Rysunek 16. Chromatogram (a), widma MS (b) oraz analiza fragmentacyjna MS/MS metabolitu **M1** (c) po 7 dniach biotransformacji związku **1**_c w modelu mikrobiologicznym.

Analizę mikrobiologiczną biotransformacji przeprowadzono również dla związków 2 oraz 3. Użyto tych samych gatunków *Cunninghamella*. Związki 2 i 3 wykazały bardzo wysoką stabilność metaboliczną. Związek 2 tylko w 20 % ulegał biotransformacji do metabolitu M1 o m/z=157, będącym produktem C-dealkilacji (Rys.17). Natomiast związek 3 w modelu mikrobiologicznym nie podlegał żadnym transformacjom, wykazał 100 % stabilność metaboliczną.

Związki **8-10** oraz zolpidem wykazały także całkowitą stabilność w modelu biotransformacji z użyciem mikroorganizmu *Cunninghamella*.



Rysunek 17. Chromatogram (a) oraz widma MS (b) związku 2 i M1 po 7 dniach biotransformacji w modelu mikrobiologicznym.

3.3.2. Badania z wykorzystaniem frakcji wątrobowych

Frakcje mikrosomalne

W badaniach związków $\mathbf{1}_{(a-c)}$ -**10** wykorzystano frakcje mikrosomalne dwóch gatunków gryzoni: myszy i szczurów, oraz mikrosomy ludzkie. Frakcja mikrosomalna będąca bogatym źródłem izoenzymów cytochromu P450 daje możliwość zbadania przebiegu biotransformacji w zakresie I fazy. Biotransformację związków $\mathbf{1}_{(a-c)}$ -**10** oraz leków referencyjnych (aripiprazolu i zolpidemu) prowadzono w 0.1 M roztworze buforu fosforanowo-potasowego pH 7.4, stosując system regeneracyjny NADPH. We wszystkich przeprowadzonych eksperymentach stężenie białka mikrosomalnego wynosiło 0.8 mg/ml, a stężenie związku badanego 20 µM. Standardowo inkubację prowadzono przez 60 min, tylko dla związków **4-7** w trzech odstępach czasowych: 10, 20 i 30 min. Przebieg biotransformacji monitorowano metodą LC-MS/MS rejestrując i analizując chromatogramy oraz widma MS z poszczególnych eksperymentów poszukując w nich obecności pików odpowiadających związkom macierzystym oraz ich metabolitom.

Analiza chromatogramów i widm masowych otrzymanych po zakończeniu biotransformacji dla związków 1(a-c) wykazała obecność, obok związku macierzystego, metabolitu M1 - 2-({2-[4chloro-3-(hydroksymetylo)fenoksy]etylo}amino)cykloheksanolu, powstałego na drodze hydroksylacji. Dodatkowo metabolizm w obecności mikrosomów enancjomeru R ($\mathbf{1}_a$) prowadził do powstania kwasu 2-chloro-5-{2-[(2hydroksycykloheksylo)amino]etoksy}benzoesowego (M2), natomiast podczas biotransformacji enancjomeru S ($\mathbf{1}_{b}$) powstawał jedynie **M1**. Podczas biotransformacji racematu (związek 1_c) powstawał zarówno M1 jak i M2 (Rys.18-20, str.65,66). Chromatogramy oraz widma masowe pochodzące z biotransformacji $\mathbf{1}_{(a-c)}$ w obecności mikrosomów pochodzących od różnych gatunków były analogiczne.

M2 był dominującym wśród metabolitów, które powstawały podczas biotransformacji $\mathbf{1}_{(a \ i \ c)}$. Po analizie fragmentacyjnej MS/MS ustalono jego strukturę (Rys.21, str.67), która odpowiadała wzorowi sumarycznemu C₁₅H₂₀ClNO₄.

64



Rysunek 18. Chromatogram (a) oraz widma MS (b) związku $\mathbf{1}_a$ i jego metabolitów po 60 min biotransformacji w modelu mikrosomów szczurzych.



Rysunek 19. Chromatogram (a) oraz widma MS (b) związku $\mathbf{1}_b$ i **M1** po 60 min biotransformacji w modelu mikrosomów szczurzych. a)





Rysunek 20. Chromatogram (a) oraz widma MS (b) związku $\mathbf{1}_{c}$ i jego metabolitów po 60 min biotransformacji w modelu mikrosomów szczurzych.



Rysunek 21. Widmo MS/MS wraz z analizą fragmentacyjną dla **M2** związków 1_a i 1_c .

Związek **2** także i w tym modelu był bardzo stabilny, ulegał tylko w 22 % biotransformacji do **M1-M3** (Rys.22), a jeszcze wyższą stabilność wykazał związek **3**, który jedynie w 5 % ulegał przemianie w metabolit **M1** będący produktem hydroksylacji grup metylowych (Rys.23, str.68). Chromatogramy oraz widma masowe pochodzące z biotransformacji **2** i **3** w obecności mikrosomów pochodzących od różnych gatunków były analogiczne.





Rysunek 22. Chromatogram (a) oraz widma MS (b) związku 2 i jego metabolitów po 60 min biotransformacji w modelu mikrosomów ludzkich.



Rysunek 23. Chromatogram (a) oraz widma MS (b) związku **3** i jego metabolitu po 60 min biotransformacji w modelu mikrosomów ludzkich.

W przypadku zolpidemu oraz jego bardzo bliskiego fluorowego analogu, związku **9**, 60 minutowa inkubacja w obecności mikrosomów prowadziła do powstania analogicznego rodzaju metabolitów **M1**, będących produktem hydroksylacji związków macierzystych. Ich przekształcenie w estry podczas przygotowania próbek do analizy LC/MS było konieczne, aby można było oznaczyć w jednej próbce obok siebie zarówno związki macierzyste jak i ich metabolity (127). Zolpidem ulegał biotransformacji w 40 %, natomiast związek **9** wykazał stabilność na poziomie 90 % (Rys.24,25, str.69,70). Związki **8** oraz **10** były całkowicie stabilne metabolicznie, nie identyfikowano żadnych metabolitów. Chromatogramy oraz widma masowe pochodzące z biotransformacji związków **8-10** w obecności mikrosomów pochodzących od różnych gatunków nie wykazały różnic. Fragmentacja MS/MS pozwoliła na ustalenie struktury związków **M1** dla zolpidemu i związku **9** (Rys. 26, 27, str.70,71).



Rysunek 24. Chromatogram (a) oraz widma MS (b) zolpidemu i jego metabolitu po 60 min biotransformacji w modelu mikrosomów ludzkich.



Rysunek 25. Chromatogram (a) oraz widma MS (b) związku **9** i jego metabolitu po 60 min biotransformacji w modelu mikrosomów ludzkich.



Rysunek 26. Widmo MS/MS wraz z analizą fragmentacyjną dla **M1** zolpidemu.



Rysunek 27. Widmo MS/MS wraz z analizą fragmentacyjną dla M1 związku 9.

Kolejnym etapem badań była analiza biotransformacji aripiprazolu i jego pochodnych (związki
4-7) w obecności mikrosomów. Badania przeprowadzono w trzech różnych odstępach czasowych: 10, 20 i 30 minut.

Analiza otrzymanych wyników dla związków **4-6** była niezwykle interesująca. Pochodne charakteryzujące się dużym podobieństwem strukturalnym wykazały ogromne zróżnicowanie w stabilności metabolicznej.

Związek **5** - N-(3-(4-(2,3-dichlorofenylo)piperazyn-1-ylo)propylo)chinolino-7-sulfonamid okazał się najmniej stabilny. W chromatogramie i widmie już po 5 minutowej inkubacji nie identyfikowano nawet śladowych ilości związku macierzystego, stwierdzono natomiast obecność 1-(2,3-dichlorofenylo)piperazyny (**M1**) (Rys.28, 29, str.73,74).

Z kolei związek **4** - N-(3-(4-(2,3-dichlorofenylo)piperazyn-1-ylo)butylo)chinolino-7-sulfonamid będący najbliższym analogiem aripiprazolu, po 30 minutowej biotransformacji ulegał metabolizmowi w 95 % generując metabolity: 1-(2,3-dichlorofenylo)piperazynę (**M1**), 4-[4-

(2,3-dichlorofenylo)piperazyn-1-ylo]butan-1-ol (**M2**) oraz kwas 4-[4-(2,3dichlorofenylo)piperazyn-1-ylo]butanowy (**M3**) (Rys.30-32, str.75,76). Dla aripiprazolu (7-[4-[4-(2,3-dichlorofenylo)piperazyn-1-ylo]butoksy]-3,4-dihydro-1*H*chinolin-2-on), leku referencyjnego, obserwowano mniej intensywnie postępującą biotransformację. Po 30 minutowej inkubacji 50 % leku ulegało przekształceniu w metabolity: 1-(2,3-dichlorofenylo)piperazynę (**M1**), 4-[4-(2,3-dichlorofenylo)piperazy-1-ylo]butoksy]-1Hchinolin-2-on (**M2**) oraz 4-[4-(2,3-dichloro-4-hydroksyfenylo)piperazy-1-ylo]butoksy]-3,4dihydro-1H-chinolin-2-on (**M3**). Struktury tych metabolitów były identyczne z opisywanymi w literaturze (Rys.33-35, str.77-78).

Dla związku **6** - N-(3-(4-(2,3-dichlorofenylo)piperazyn-1-ylo)butylo)izochinolino-7sulfonamidu stwierdzono najwyższą stabilność metaboliczną. Po 30 min reakcji biotransformacji nie stwierdzono ubytku związku macierzystego, w środowisku reakcji nie zidentyfikowano metabolitów (Rys.36, str.79).

Chromatogramy oraz widma masowe pochodzące z biotransformacji związków **4-6** w obecności mikrosomów pochodzących od różnych gatunków były analogiczne.

Jak wcześniej wspomniano wyniki biotransformacji dla związków **4-6** były rejestrowane w 3 różnych odstępach czasowych, dlatego można było wyznaczyć okres półtrwania (t_{1/2}) oraz klirens wewnętrzny (Cl_{int}), określający maksymalną, nieograniczoną przepływem wewnętrznym zdolność wątroby do metabolizowania leku i opisany wzorem:

$$Cl_{int} (\mu l/mg/\min) = \frac{\frac{objętość próbki(\mu l)}{ilość proteiny w próbce (mg)} \cdot 0.693}{t_{1/2}}$$
(117)

Wartości tych parametrów zaprezentowano w Tabeli 6 (str.73). Cl_{int} jest zobietywizowanym, szczególnie ważnym parametrem, ponieważ na podstawie jego wielkości można oszacować czy testowany związek będzie ulegał efektowi pierwszego przejścia. Tylko niewielkie wartości klirensu (Cl_{int} < 8.6 µl/mg/min) świadczą o tym, że ten efekt nie występuje lub jest minimalny.
	% pozostałości związku macierzystego *	t _{1/2} [min]	Cl _{int} [µl/mg/min]	Metabolity
ARI	50	30	28.9	M1-M3
4	5	7.5	115.5	M1-M3
5	0	-	-	M1
6	100	-	-	-
7	Онім	17 _{HLM}	50.9 _{HLM}	M2 _{HLM}
	1 _{rlm}	5rlm	173.2 _{RLM}	M1,M2 _{RLM}
	8 _{MLM}	6 _{MLM}	144.4 _{MLM}	M1,M2 _{MLM}

Tabela 6. Stabilność metaboliczna związków 4-7 oraz aripiprazolu w modelu mikrosomów wątrobowych (MLM, RLM, HLM).

* % pozostałego związku macierzystego po 30 min inkubacji z mikrosomami



Rysunek 28. Chromatogram (a) oraz widmo MS (b) dla związku **5** po 30 min biotransformacji w modelu mikrosomów ludzkich.



Rysunek 29. Analiza MS/MS dla **M1** związku **5**.



Rysunek 30. Chromatogram a) oraz widma MS b) dla związku **4** oraz jego metabolitów po 30 min biotransformacji w modelu mikrosomów ludzkich.



Rysunek 31. Analiza MS/MS dla M2 związku 4.



Rysunek 32. Analiza MS/MS dla M3 związku 4.



Rysunek 33. Chromatogram (a) oraz widma MS (b) dla aripiprazolu i jego metabolitów po 30 min biotransformacji w modelu mikrosomów ludzkich.



Rysunek 34. Analiza MS/MS dla **M2** aripirpazolu.



Rysunek 35. Analiza MS/MS dla **M3** aripiprazolu.



Rysunek 36. Chromatogram (a) oraz widmo MS (b) dla związku 6 po 30 min biotransformacji w modelu mikrosomów ludzkich.

Szczególnie interesujące były wyniki otrzymane podczas biotransformacji w obecności mikrosomów dla związku **7** - 4-fluoro-N-(1-{2-[metylsulfanyl)fenoksy]etyl}pirolidyn-3-ylo) benzenosulfonamidu. Zaobserwowano różnice międzygatunkowe w tempie i kierunkach przebiegu reakcji. Inkubacja z mikrosomami mysimi bądź szczurzymi prowadziła do otrzymania dwóch metabolitów, **M1** oraz **M2**, odpowiednio o strukturze sulfonu lub sulfotlenku (Rys.37, str.80). Natomiast w przypadku biotransformacji z udziałem HLM zidentyfikowano tylko **M2** (Rys.38, str.81). Wyniki wykazały także zróżnicowanie gatunkowe w aspekcie stabilności metabolicznej, co znajduje często potwierdzenie w wielu danych literaturowych. Związek **7** wykazywał 3-krotnie wyższą stabilność w obecności mikrosomów ludzkich w porównaniu do stabilności wykazanej w obecności mikrosomów gryzoni (Tabela 6, str.73).



Rysunek 37. Chromatogram (a) oraz widma MS (b) dla związku **7** i jego metabolitów po 30 min biotransformacji w modelu mikrosomów mysich.



Rysunek 38. Chromatogram (a) oraz widma MS (b) dla związku **7** i jego metabolitu po 30 min biotransformacji w modelu mikrosomów ludzkich.

Frakcja S9

W celu porównania efektywności biotransformacji w zależności od użytego modelu frakcji wątrobowych dla związków $\mathbf{1}_{(a-c)}$ przeprowadzono dodatkowo analizę biotransformacji wykorzystując frakcje S9 (Rys.39-41, str.82,83). W przypadku obu enancjomerów i racematu powstawał jedynie metabolit z grupą hydroksymetylenową (**M1**). Podobnie jak w przypadku frakcji mikrosomalnej w zależności od użytej w eksperymencie formy enancjomerycznej zaobserwowano zróżnicowaną podatność związków na metabolizm. Enancjomer *R* ($\mathbf{1}_a$) ulegał 50 % biotransformacji, racemat ($\mathbf{1}_c$) - 30 %, natomiast enancjomer *S* ($\mathbf{1}_b$) był najbardziej trwały i ulegał metabolizmowi jedynie w 10 %.



Rysunek 39. Chromatogram (a) oraz widma MS (b) dla związku $\mathbf{1}_a$ i jego metabolitu po 90 min biotransformacji w modelu frakcji S9.



Rysunek 40. Chromatogram (a) oraz widmo MS (b) dla związku $\mathbf{1}_{b}$ i jego metabolitu po 90 min biotransformacji w modelu frakcji S9.



Rysunek 41. Chromatogram (a) oraz widmo MS (b) dla związku **1c** i jego metabolitu po 90 min biotransformacji w modelu frakcji S9.

3.3. Inhibicja cytochromu P450

Hamowanie metabolizmu, w którym pośredniczą izoenzymy cytochromu P450, zachodzi często w wyniku interakcji pomiędzy różnymi lekami. Związek, który hamuje enzym biorący udział w metabolizmie leku może blokować jego biotransformację. Konsekwencją takiego działania jest podwyższone stężenie tego leku we krwi, co może spowodować wystąpienie i nasilenie działań niepożądanych. Wyselekcjonowanie spośród badanych połączeń inhibitorów lub induktorów enzymów cytochromu P450 pozwala na ustalenie interakcji typu lek-lek dla nowych substancji terapeutycznych. Interakcje potencjalnego leku z najważniejszymi izoenzymami CYP450 zbadano i opisano na przykładzie związku **2**.

W eksperymentach przesiewowych ustalono, że spośród 8 najważniejszych izoenzymów CYP450: CYP1A2, CYP2A6, , CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4 związek 2, 2-{[2-(2-chloro-6-metylfenoksy) etylo]amino}butan-1-ol, wchodził w interakcję jedynie z CYP2D6. Badania inhibicji cytochromu CYP2D6 przez związek 2 przeprowadzono w obecności ludzkich mikrosomów wątrobowych oraz bufuralolu, który był substratem i ulegał reakcji hydroksylacji skutkującej powstaniem hydroksybufuralolu (123). Obecność w środowisku 2 reakcji związku 0 charakterze inhibitora enzymatycznego powoduje zahamowanie/zablokowanie tej reakcji, co objawia się spadkiem/ zanikiem powstawania hydroksybufuralolu.

Przebieg reakcji przekształcenia bufuralolu pod wpływem CYP2D6 monitorowano przyrostem stężenia produktu reakcji - 4-hydroksybufuralolu. W związku z tym w pierwszym etapie opracowano chromatograficzną metodę jego oznaczania. Krzywą wzorcową dla 4-hydroksybufuralolu przygotowano w zakresie $0.25 - 3.5 \mu$ M (Wykres 3, str. 85). Siłę zależności pola pod krzywą od zastosowanego stężenia 4-hydroksybufuralolu zbadano testem Spearmana wyznaczając współczynnik R² = 0,99874352.

Przedstawioną linię trendu opisuje następujące równanie:

y = 6105129,359x + 500673

Przykładowy chromatogram substratu i produktu otrzymanego w reakcji katalizowanej przez CYP2D6 przedstawiono na Rysunku 42 (str. 85).



Stężenie OH-BUF [μM]	Pole powierzchni pod pikiem
3.50	19181875
2.28	14602728
1.52	9569406
0.76	4900634
0.25	2357267
	1

Wykres 3. Krzywa wzorcowa 4-hydroksybufuralolu.

```
a)
HANNEL A
             INJECT 15-12-04 48:17:18 STORED TO BIN #
                                                         9
                                                  3.92
           6.16
ATA SAVED TO BIN #
                     9
 b)
UTHNNEL A
               INJECT
                        28-09-04 01:54:49 STORED TO BIN #
                                                               12
          4 80
    3.89
                13.35
DATA SAVED TO BIN #
                      12
```

Rysunek 42. Przykładowy chromatogram dla a) 4-hydroksybufuralolu b) bufuralolu.

W celu wyznaczenia parametrów kinetycznych reakcji hydroksylacji katalizowanej przez CYP2D6 wykonano szereg badań dla czterech stężeń bufuralolu (30 μM, 20 μM, 15 μM, 7.5 μM) bez udziału związku **2** lub w jego obecności w różnych stężeniach (20 μM, 10 μM, 5 μM, 2.5 μM, 1 μM) przy stałej koncentracji mikrosmów ludzkich. Przebieg wszystkich reakcji monitorowano rejestrując zmiany w zakresie powstawania produktu tej reakcji, czyli 4-hydroksybufuralolu.

Analiza wielkości pola powierzchni pod pikiem oraz krzywej wzorcowej dla 4-hydroksybufuralolu umożliwiła określenie stężenia powstającego produktu (hydroksybufuralolu), który następnie przeliczono na szybkość reakcji (ilość wytworzonego produktu) i podano w jednostce nmol/mg proteiny/min. Wyniki przedstawiono w Tabeli 7.

	Bufuralol [S]			
Związek 2 [I]	30 µM	20 μΜ	15 μΜ	7.5 μΜ
0.014	0.051257	0.033499	0.034267	0.04007
Ο μίνι	(0)	(0)	(0)	(0)
20	0.024881	0.010484	0.010459	0.000234
20 μΜ	(51.46)	(68.70)	(69.48)	(99.42)
	0.026306	0.02344	0.011476	0.005732
10 μΜ	(48.68)	(30.03)	(66.51)	(85.94)
	0.032268	0.024298	0.01785	0.010202
5 μΜ	(37.05)	(27.47)	(47.91)	(74.97)
	0.043405	0.025312	0.027912	0.014623
2.5 μΜ	(15.32)	(24.44)	(18.55)	(64.13)
	0.045293	0.026957	0.02887	0.018821
1 μΜ	(11.64)	(19.53)	(15.75)	(53.83)

Tabela 7. Inhibicja reakcji hydroksylacji bufuralolu przez związek **2**.

Wartości pogrubione przedstawiają szybkość reakcji (v) wyrażoną w nmol/mg proteiny/min, wartości w nawiasach przedstawiają procent inhibicji reakcji w stosunku do reakcji przeprowadzonej przy braku związku **2**.

Wykorzystując program GraphPad Prism 5 na podstawie równania Michealisa-Menten wykreślono krzywe zależności szybkości reakcji (v) od stężenia substratu (bufuralolu, [S]) dla pięciu użytych stężeń potencjalnego inhibitora lub bez jego obecności w środowisku reakcji (związek 2, [I]) (Wykres 4, str.87).



Wykres 4. Zależność szybkości reakcji (v) od stężenia bufuralolu [S] dla pięciu różnych stężeń związku 2 [I] w modelu inhibicji mieszanej.

Wykorzystano regresję nieliniową oraz model inhibicji komeptycyjnej (Równanie 1), niekompetycyjnej (Równanie 2) lub mieszanej (Równanie 3). Typ inhibicji najlepiej opisujący własności związku **2** został wybrany przez porównanie wartości R² uzyskanych w trzech modelach

$$v = \frac{V_{max}}{\left(1 + (K_m/S)(1 + I/K_i)\right)}$$

Równanie 1. Inhibicja kompetycyjna

$$v = \frac{V_{max}}{\left((1 + I/K_i)(1 + K_m/S)\right)}$$

Równanie 2. Inhibicja niekompetycyjna

$$v = \frac{V_{max}}{(K_m/S)(1 + I/K_i) + (1 + I/\alpha K_i)}$$

Równanie 3. Inhibicja mieszana

Gdzie v – szybkość reakcji, v_{max} – szybkość maksymalna, K_m – stała Miechaelisa-Menten, K_i – stała inhibicji, S - stężenie substartu.

Dla modelu kompetycyjnego dopasowanie wynosiło R² = 0.8083, a stała K_i = 2.828 μ M, niekompetycyjnego R² = 0.7199, a stała K_i = 8.846 μ M, w modelu inhibicji mieszanej R² = 0.9308 a K_i = 1.701 μ M.

Ze względu na najlepsze dopasowanie związek 2 uznano za inhibitor typu mieszanego.

4. Dyskusja i wnioski

Badania biotransformacji są przeprowadzane dla substancji, które mogą stanowić potencjalne leki. Są ważnym etapem badań przedklinicznych, które określają izoenzymy cytochromu P450 zaangażowane w metabolizm, szlaki biotransformacyjne oraz opisują struktury powstających metabolitów, stabilność związków, potencjalne interakcje lekowe oraz różnice międzygatunkowe w przebiegu biotransformacji.

Wyniki w zakresie badań metabolizmu dostarczają cennej wiedzy, którą można wykorzystać do modyfikacji i optymalizacji struktur wiodących w celu poprawy ich stabilności metabolicznej. Stosowane do niedawna modele badania biotransformacji opierały się głównie na wykorzystaniu zwierząt laboratoryjnych, jednakże charakteryzują się szeregiem wad i czynników limitujących. Zdarza się również, wcale nierzadko, że metabolizm danego leku wykazuje różnice międzygatunkowe i badania przeprowadzone na różnych gatunkach ssaków nie znajdują potwierdzenia w modelach ludzkich (11). Mając powyższe na uwadze w ramach pracy testowano głównie alternatywne metody badania biotransformacji bez udziału zwierząt.

W badaniach *in silico* (MetaSite), którym poddano związki **1**_(a-c)-**10** oraz leki referencyjne zostały naszkicowane ścieżki przemian biotransformacyjnych sugerujące prawdopodobieństwo zajścia reakcji oraz udział poszczególnych izoenzymów cytochromu P450 w przemianach metabolicznych. Na podstawie symulacji MetaSite wykazano, że reakcje hydroksylacji we fragmencie alkilowym (-CH₃) w związkach **1**_(a-c)-**3** oraz **8-10** z następującą po nich dalszą oksydacją były prowadzone przez izoenzymy CYP1A2, 2C19, 2D6 oraz 2E1. Związki **2**, **3**, **7-10** podlegały dodatkowo dealkilacji pod wpływem CYP3A4, a związki **4-7** degradowały na drodze dealkilacji prowadzonej przez CYP2B6. Zwłaszcza biotransformacja na drodze N-dealkilacji pod wpływem CYP3A4 jest bardzo charakterystyczna dla różnych pochodnych arylopiperazyn, w tym aripiprazolu i była już niejednokrotnie opisywana w literaturze (125).

Badania *in vitro* nad biotransformacją związków **1**_(a-c) potwierdziły identyczny kierunek przemian zgodny z tym, co wykreował program MetaSite. Głównym, wspólnym metabolitem dla tych związków zidentyfikowanym w metodzie mikrosomalnej oraz modelu *Cunninghamella* był **M1**-2-({2-[4-chloro-3-(hydroksymetylo)fenoksy]etylo}amino)cykloheksan

-ol. **M1** był podobny do opisanego w literaturze (126) metabolitu meksyletyny, która wykazuje zbieżność w dużym fragmencie strukturalnym ze związkami $\mathbf{1}_{(a-c)}$. Lek ten, tak jak badane pochodne 2-aminocykloheksan-1-olu, jest w głównej mierze metabolizowany przez CYP1A2 (Tabela 1, str.19)(124).

Interesujące wyniki otrzymano analizując związki $\mathbf{1}_{(a-c)}$ przy użyciu mikrosomów wątrobowych. Enancjomer R ($\mathbf{1}_a$) by metabolizowany do metabolitów **M1** oraz **M2** - kwasu 2-chloro-5-{2-[(2hydroksycykloheksylo)amino]etoksy}benzoesowego. Strukture M2 wytypował również MetaSite. Co ciekawe, w metodzie in vitro dla drugiego enancjomeru (1b) nie udało się potwierdzić obecności metabolitu o strukturze kwasowej. Fakt ten może wskazywać na wybiórczość reakcji biotransformacji w obecności mikrosomów w zależności od użytego enancjomeru. Istnienie różnych dróg metabolizmu dla $\mathbf{1}_{(a-c)}$ zdaje się mieć związek z wynikami badań farmakologicznych przeprowadzonych w National Institute of Neurological Disorders and Stroke, National Institutes of Health (Rockville, USA). W badaniach tych wykazano, iż 1a R) charakteryzował (enancjomer się znacznie korzystniejszymi parametrami antyepileptycznymi oraz niższą neurotoksycznością w porównaniu do związku 1_b (120), co sugeruje, iż M2 może posiadać aktywność przeciwdrgawkową

Związki **2** i **3** charakteryzowały się wysoka stabilnością metaboliczną zarówno w modelu *Cunninghamella* jak i analizie wykorzystującej mikrosomy wątrobowe. Produkty biotransformacji związków **2** i **3** otrzymane w modelach *in vitro* oraz wysymulowane przez MetaSite nie wykazały istnienia metabolitów o identycznych strukturach.

Otrzymane wyniki biotransformacji mikrosomalnej dotyczące trzech głównych metabolitów aripiprazolu były tożsame z opisanymi w literaturze (125) oraz wysymulowanymi przez program MetaSite. Zidentyfikowano zarówno dichlorofenylopiperazynę, jak i hydroksyaripiprazol oraz dehydroaripirpazol. Związki **4** i **5** w modelu mikrosomalnym ulegały biotransformacji do dichlorofenylopiperazyny, której obecność sugerował także MetaSite. Jednakże w badaniu *in silico* wytypowano wiele nowych, dodatkowych metabolitów, których nie stwierdzono w badaniu *in vitro*. Związek **6** w metodzie *in vitro* nie ulegał biotransformacji, nie zidentyfikowano żadnego metabolitu.

W grupie pochodnych aripiprazolu udało się zauważyć, iż skrócenie łańcucha węglowego obniża stabilność związku, podczas gdy zamiana chinoliny (związki **4** oraz **5**) na izochinolinę

89

(związek **6**) ją podwyższa. Różnice w biotransformacji **4-6** wydają się mieć związek nie tylko ze strukturą, która determinuje ich lipofilowość, ale także z aktywnością biologiczną analizowanych połączeń. Najmniej stabilny związek **5** charakteryzował się najsilniej zaznaczoną komponentą przeciwdepresyjną, podczas, gdy najstabilniejszy **6** to cząsteczka o wyraźnej aktywności przeciwpsychotycznej (118). Czy aktywność biologiczna badanych struktur związana jest tak bezpośrednio z biotransformacją? Trudno stwierdzić jednoznaczniena tym etapie, jednak wyniki zachęcają niewątpliwie do dalszych badań.

Ciekawe obserwacje poczyniono również w zakresie stabilności i kierunków biotransformacji dla związku 7. Potwierdziły one opisywane często w literaturze różnice międzygatunkowe w przebiegu metabolizmu. Stwierdzono, że dla mikrosomów gryzoni okres półtrwania związku 7 wynosił 5 i 6 minut, odpowiednio dla MLM i RLM. Natomiast, gdy wykorzystano mikrosomy ludzkie, t_{1/2} dla związku **7** był trzykrotnie wyższy i wynosił 17 minut. W zależności od gatunku użytych w trakcie badań mikrosomów obserwowano zróżnicowanie wśród powstających metabolitów związku 7. W przypadku stosowania MLM i RLM zanotowano powstanie metabolitów o cechach sulfotlenku i sulfonu, natomiast HLM prowadziły biotransformację związku 7 tylko do powstania metabolitu o cechach sulfotlenku. Powstający metabolit o strukturze sulfonu jest bardzo podobny do metabolitu fentionu - cząsteczki zbliżonej budową do 7, gdzie wspólnym elementem strukturalnym jest fragment metylomerkaptofenoksyalkilowy (126).

W trakcie biotransformacji mikrosomalnej zolpidemu i 9 powstawały metabolity hydroksymetylenowe. Metabolit ZOL _ *N*,*N*-dimetyloacetamid 2-{2-[4-(hydroksymetylo)fenylo]-6-metyloimidazo[1,2-*a*]pirydyn-3-yl} otrzymany podczas biotransformacji mikrosomalnej był identyczny z opisanym w literaturze oraz wysymulowanym przez program MetaSite (127). Zamiana dwóch grup metylowych na atomy fluoru w związku 8 oraz grupy metylowej związanej z układem aromatycznym w związku 10 spowodowała, że badane połaczenia nie mieściły się w spektrum substratowym enzymów mikrosomalnych. Badania z wykorzystaniem mikrosomów wątrobowych potwierdziły wyniki analizy MetaSite wskazujące, iż głównym miejscem ataku enzymów prowadzących biotransformację zolpidemu i jego pochodnych jest grupa metylowa związana z pierścieniem aromatycznym. Zamiana tego ugrupowania na atom fluoru blokuje powstawanie metabolitów związków 8 i 10, które są pochodnymi zolpidemu.

90

Zestawienie otrzymanych metabolitów dla związków $\mathbf{1}_{(a-c)}$ -**10**, aripiprazolu oraz zolpidemu z komputerowo obliczonymi wartościami log P pozwoliło na wysunięcie wniosków dotyczących zależności pomiędzy lipofilowością, a stabilnością badanych połączeń.

 Otrzymane wyniki wskazują, że związki lipofilowe o log P > 4 preferują w trakcie przemian biotransformacyjnych metabolizm polegający na rozpadzie cząsteczki macierzystej, najczęściej na drodze N-dealkilacji, O-dealkilacji lub rzadziej C-dealkilacji. Pozostałe struktury, o niższym log P, faworyzują biotransforamcję, która odbywa się na drodze przemian oksydacyjnych niezwiązanych z rozpadem cząsteczki.

2. Wysoką trwałością w badaniach biotransformacyjnych charakteryzowały się związki, których lipofilowość mieściła się w zakresie log P 2.16 -3.0. Związki charakteryzujące się log P
3 wykazywały stabilność metaboliczną od średniej do niskiej, z wyjątkiem związku 6 (log P 5.31), który był całkowicie stabilny w rozpatrywanych modelach biotransformacyjnych (Tabel 9).

Związek	log P	Główny metabolit	Model badawczy	Stabilność
1(a-c)	3.12		in silico, Cunninghamella, MLM, RLM, HLM frakcja S9	niska
		HO O OH CH ₃	in silico	
2	2.83		Cunninghamella	wysoka
		HO O OH HO CI	MLM, RLM, HLM	

Tabela 8. Zależność pomiędzy lipofilowością badanych związków, a stabilnością metaboliczną.

		он он он он он он он он он он	in silico Cunninghamella	
3	2.22	OH OH OH OH OH	MLM, RLM, HLM	wysoka
ARI	5.6	$H_{N} \xrightarrow{C_{i}} C_{i}$ $H_{i} \xrightarrow{C_{i}} C_{i}$	in silico, MLM, RLM, HLM	średnia
4	5.03		in silico, MLM, RLM, HLM	niska
5	4.73		in silico, MLM, RLM, HLM	niska
6	5.31	brak metabolitów	in silico, MLM, RLM, HLM	wysoka
7	3.75	$O = S \xrightarrow{CH_3} O \xrightarrow{NH_3} O \xrightarrow{NH_5} O \xrightarrow{F}$	in silico, MLM, RLM, HLM	niska
ZOL	3.00	$H_{3}C$ OH OH $H_{3}C$ OH $H_{3}C$ $N-CH_{3}$ $H_{3}C$ $N-CH_{3}$ $H_{3}C$ $N-CH_{3}$ $H_{3}C$	in silico, MLM, RLM, HLM	wysoka
8	2.68	brak metabolitów	in silico, MLM, RLM, HLM	wysoka



Wysoka: 80-100 % związku nie podlegało biotransformacji; Średnia: 40-80 % związku nie podlegało biotransformacji; Niska: 0-40 % związku nie podlegało biotransformacji

Współczesna farmakoterapia bardzo rzadko opiera się na monoterapii. Powszechna politerapia powoduje znaczne niebezpieczeństwo wystąpienia działań niepożądanych. Efekty te mogą być skutkiem interakcji lek-lek, jak również lek-pożywienie. Szczególne niebezpieczeństwo pojawia przypadku stosowania zwłaszcza leków się w przeciwnowotworowych, antyepileptycznych, antypsychotycznych oraz posiadających niski indeks terapeutyczny. W związku z tym badania inhibicji i indukcji cytochromu P450 włączone są w panel badań przedklinicznych. Związek 2 został wytypowany spośród ogromnej puli aminoalkanoli, jako kandydat na lek w terapii bólu neuropatycznego (128; 129), dlatego też dla tej struktury przeprowadzone zostały badania nad ewentualnymi interakcjami lekowymi, na podstawie których stwierdzono iż wykazuje on cechy inhibitora CYP2D6 typu mieszanego. Implikuje to możliwość wchodzenia związku 2 w interakcje in vivo z innymi lekami metabolizowanymi przez ten sam izoenzym cytochromu P450. Fakt ten w żaden sposób nie wyklucza dalszych badań nad tym potencjalnym lekiem przeciwbólowym. Znane i stosowane leki, takie jak chociażby fluoksetyna, paroksetyna czy lewomepromazyna, są również klasyfikowane, jako inhibitory CYP2D6, a jednak posiadają ustaloną pozycję w lecznictwie.

Wnioski:

1. Przeprowadzone analizy pozwoliły na stwierdzenie, iż nie istnieje jeden, idealny model do przeprowadzenia badań przedklinicznych nowych kandydatów na lek w aspekcie badań biotransformacji.

2. Model *Cunninghamella* pomimo swej prostoty i możliwości otrzymywania metabolitów w stosunkowo dużych (nawet półpreparatywnych) ilościach ma swoje ograniczenia, ponieważ generuje jedynie ograniczoną ilość metabolitów.

3. Program MetaSite wykazuje bardzo dużą przydatność w szacunkowym przewidywaniu kierunków biotransformacji w grupie badanych związków.

4. W większości przypadków, zwłaszcza dla związków o małej stabilności metabolicznej struktury głównych metabolitów wysymulowanych i tych otrzymanych przy użyciu modeli *in vitro* były identyczne.

5. Modele *in vitro*, zwłaszcza modele mikrosomalne, dają możliwość ilościowego oszacowania stabilności metabolicznej na podstawie wyznaczonego czasu półtrwania dla testowanego związku czy jeszcze w postaci bardziej zindywidualizowanego parametru, jakim jest klirens wewnętrzny. Na jego podstawie można dodatkowo wnioskować czy potencjalny kandydat na lek będzie ulegał efektowi pierwszego przejścia.

Zatem ostateczne odpowiedzi na pytania dotyczące kierunków biotransformacji i stabilności metabolicznej dają tylko badania przeprowadzane w fazie klinicznej dla starannie i rygorystycznie wyselekcjonowanego kandydata na lek.

5. Materiały i metody

5.1. Materiały

5.1.1. Badane związki

- Związki 1_(a-c) (Katedra Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych UJ CM)
 - $\mathbf{1}_{a}$ 1*R*,2*R* 2-*trans*-{[2-(4-chlor-3-metylfenoksy) etylo]amino}cykloheksan-1-ol $\mathbf{1}_{b}$ - 1*S*,2*S* 2-*trans*-{[2-(4-chlor-3-metylfenoksy) etylo]amino}cykloheksan-1-ol $\mathbf{1}_{c}$ - 1*RS*,2*RS* 2-*trans*-{[2-(4-chlor-3-metylfenoksy) etylo]amino}cykloheksan-1-ol
- Związki 2 i 3 (Zakład Chemii Bioorganicznej, Katedra Chemii Organicznej UJ CM)

2- 2-{[2-(2-chloro-6-metylfenoksy) etylo]amino}butan-1-ol
3- 2-{[2-(2,6-dimetylfenoksy) etylo]amino}propan-1-ol

 Związki 4-10, aripiprazol, zolpidem (Zakład Chemii Leków, Katedra Chemii Farmaceutycznej UJ)

4 - N-(3-(4-(2,3-dichlorofenylo)piperazyn-1-ylo)butylo)chinolino-7-sulfonamid
5 - N-(3-(4-(2,3-dichlorofenylo)piperazyn-1-ylo)propylo)chinolino-7-sulfonamid
6 - N-(3-(4-(2,3-dichlorofenylo)piperazyn-1-ylo)butylo)izochinolino-7-sulfonamid
7 - 4-fluoro-N-(1-{2-[metylsulfanyl]fenoksy]etyl}pirolidyn-3-ylo) benzenosulfonamid
8 - 2-[6-fluoro-2-(4-metylofenylo)imidazo[1,2-*a*]pirydyn-3-ylo]-*N*,*N*-dimetyloacetamid
9 - 2-[6-fluoro-2-(4-fluorofenylo)imidazo[1,2-*a*]pirydyn-3-ylo]-*N*,*N*-dimetyloacetamid
10 - 2-[6-metylo-2-(4-fluorofenylo)imidazo[1,2-*a*]pirydyn-3-ylo]-*N*,*N*-dimetyloacetamid
Aripiprazol -7-[4-[4-(2,3-dichlorofenylo)piperazyn-1-ylo]butoksy]-3,4-dihydro-1*H*-chinolin-2-on (ARI)
Zolpidem - 2-[6-metylo-2-(4-metylofenylo)imidazo[1,2-*a*]pirydyn-3-ylo]-*N*,*N*-dimetyloacetamid

5.1.2. Mikroorganizmy

- *Cunninghamella echinulata* NRRL 1384 (Northern Regional Research Laboratory) (University of Liverpool, Wielka Brytania)
- *Cunninghamella blakesleeana 1906* DMSZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismem Und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Niemcy)
- *Cunninghamella elegans 1908* DMSZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismem Und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Niemcy)

5.1.3. Frakcje wątrobowe

- Mikrosomy (Sigma-Aldrich) mysie (MLM) szczurze (RLM) ludzkie (HLM)
- Frakcja S9 z ludzkich hepatocytów (Sigma-Aldrich)

5.1.4. Pożywki mikrobiologiczne

• CSL (Corn Steep Liquor) - wodny namok kukurydziany (Sigma-Aldrich)

 PDA (potato, dextrose, agar) - pożywka glukozowo-ziemniaczana (BioShop) o składzie (na 1000 ml wody) :

Odwodniony wyciąg ziemniaczany 4 g Dekstroza 20 g Agar 15 g

5.1.5. Odczynniki chemiczne i biologiczne

- Woda do biologii molekularnej, Bio Mol (Eppendorf)
- Glukoza (Chempur)
- Żel krzemionkowy 0.2 mm (Merck)
- Octan etylu (Chempur)
- Metanol (Chempur)
- Toluen (Chempur)
- Wodorotlenek potasu (Sigma-Aldrich)
- Kwas nadchlorowy (VII) (Sigma-Aldrich)
- 1 M diwodorofosforan potasu KH₂PO₄ (Sigma-Aldrich)
- 1M wodorofosforan potasu K₂HPO₄ (Sigma-Aldrich)
- TRIZMA (Sigma-Aldrich)
- Chlorek magnezu MgCl₂ (Sigma-Aldrich)
- Chlorek potasu KCl (Sigma-Aldrich)
- Fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego, forma utleniona (NADP⁺) (Sigma-Aldrich)
- Glukozo-6-forforan (Sigma-Aldrich)
- Dehydrogenaza glukozo-6-forforanu z *Saccharomyces cerevisiae* (200 U/mg białka) (Sigma-Aldrich)
- Lewalorfan (LEW) (Sigma-Aldrich)
- Bufuralol (BUF) (Sigma-Aldrich)
- Hydroksybufuralol (OH-BUF) (Sigma-Aldrich)

5.1.6. Aparatura

- Mini-wytrząsarka (Thermomixer compact, Eppendorf)
- Nawiew laminarny (Polon)
- Sterylizator (2100 Classic, PrestigeMedical)
- Wirówka (typ 5415R, Eppendorf)
- Wytrząsarka Elpin (typ 358A, Polon)

5.2. Metody

5.2.1. Przygotowanie roztworów

1.25 % roztwory związków **1_(a-c)-3, 8-10**

Roztwory podstawowe związków $1_{(a-c)}$ -**3**, **8-10** stosowane do badań mikrobiologicznych przygotowano przez rozpuszczenie 12.5 mg odważonego na wadze analitycznej związku i rozpuszczenie w wodzie do badań molekularnych. W przypadku związku 1_c do uzyskania klarownego roztworu konieczne było dodanie 1.5 µl 3.5 M HCl.

• 10 mM roztwory podstawowe związków **1**_(a-c)-10, BUF, OH-BUF oraz LEW

10 mM roztwory podstawowe badanych związków stosowane do badań z użyciem frakcji wątrobowych przygotowano przez odważenie na wadze analitycznej związku i rozpuszczenie w wodzie do badań molekularnych.

• 0.3 mM roztwór roboczy BUF

0.3 mM roztwór bufuralolu przygotowano przez 33,33-krotne rozcieńczenie 30 µl roztworu podstawowego o stężeniu 10 mM 0.1 M roztworem buforu fosforanowo – potasowego o pH 7.4 do objętości 1 ml.

• 0.2 mM roztwory robocze związków 1(a-c)-10, BUF oraz OH-BUF

0.2 mM roztwory robocze stosowane do badań z użyciem frakcji wątrobowych przygotowano przez rozcieńczenie 20 μl 10 mM roztworu podstawowego 0.1 M roztworem buforu fosforanowo – potasowego o pH 7.4 do objętości 1 ml.

• 0.15 mM roztwór roboczy BUF

0.15 mM roztwór bufuralolu przygotowano przez 2-krotne rozcieńczenie 500 μl roztworu roboczego o stężeniu 0.3 mM 0.1 M roztworem buforu fosforanowo – potasowego o pH 7.4 do objętości 1 ml.

• 0.1 mM roztwór roboczy związku 2

0.1 mM roztwór związku **2** przygotowano przez 2-krotne rozcieńczenie 500 μl roztworu roboczego o stężeniu 0.2 mM 0.1 M roztworem buforu fosforanowo – potasowego o pH 7.4 do objętości 1 ml.

• 0.075 mM roztwór roboczy BUF

0.075 mM roztwór bufuralolu przygotowano przez 2-krotne rozcieńczenie 500 µl roztworu roboczego o stężeniu 0.15 mM 0.1 M roztworem buforu fosforanowo – potasowego o pH 7.4 do objętości 1 ml.

0.05 mM roztwór roboczy związku **2**

0.05 mM roztwór związku **2** przygotowano przez 2-krotne rozcieńczenie 500 μl roztworu roboczego o stężeniu 0.1 mM 0.1 M roztworem buforu fosforanowo – potasowego o pH 7.4 do objętości 1 ml.

• 0.025 mM roztwór roboczy związku 2

0.025 mM roztwór związku **2** przygotowano przez 2-krotne rozcieńczenie 500 μl roztworu roboczego o stężeniu 0.05 mM 0.1 M roztworem buforu fosforanowo – potasowego o pH 7.4 do objętości 1 ml.

0.01 mM roztwór roboczy związku **2**

0.01 mM roztwór związku **2** przygotowano przez 2.5-krotne rozcieńczenie 500 μl roztworu roboczego o stężeniu 0.2 mM 0.1 M roztworem buforu fosforanowo – potasowego o pH 7.4 do objętości 1 ml.

• 3.5 µM roztwór roboczy OH-BUF

3.5 μM roztwór hydroksybufuralolu przygotowano 2-etapowo. W pierwszym etapie otrzymano roztwór 0.1 mM przez 100-krotne rozcieńczenie 100 μl roztworu podstawowego o stężeniu 10 mM 0.1 M roztworem buforu fosforanowo – potasowego o pH 7.4 do objętości 1 ml. A następnie 28.5-krotne rozcieńczenie 35 μl 0.1 mM roztworu roboczego roztworem buforu fosforanowo – potasowego o pH 7.4 do objętości 1 ml.

2.28 μM roztwór OH-BUF

2.28 μM roztwór roboczy hydroksybufuralolu przygotowano przez 1.5-krotne rozcieńczenie 500 μl roztworu roboczego o stężeniu 3.5 μM 0.1 M roztworem buforu fosforanowo – potasowego o pH 7.4 do objętości 1 ml.

• 1.52 μM roztwór OH-BUF

1.52 μM roztwór roboczy hydroksybufuralolu przygotowano przez 1.5-krotne rozcieńczenie 500 μl roztworu roboczego o stężeniu 2.28 μM 0.1 M roztworem buforu fosforanowo – potasowego o pH 7.4 do objętości 1 ml.

0.76 μM roztwór OH-BUF

 $0.76 \,\mu$ M roztwór roboczy hydroksybufuralolu przygotowano przez 2-krotne rozcieńczenie 500 μ l roztworu roboczego o stężeniu 1.52 μ M 0.1 M roztworem buforu fosforanowo – potasowego o pH 7.4 do objętości 1 ml.

• 0.25 µM roztwór roboczy OH-BUF

 $0.25 \ \mu$ M roztwór hydroksybufuralolu przygotowano przez 3-krotne rozcieńczenie 500 μ l roztworu roboczego o stężeniu 0.76 μ M 0.1 M roztworem buforu fosforanowo – potasowego o pH 7.4 do objętości 1 ml.

Roztwory podstawowe związków przechowywano w zamrażarce (-20°C), natomiast roztwory robocze przechowywano w lodówce (4°C) przez okres 4 tygodni.

• 0.2 M roztwór diwodorofosforanu potasu (KH₂PO₄)

Do cylindra miarowego odmierzano pipetą 2 ml 1 M roztworu diwodorofosforanu i uzupełniano wodą destylowaną do objętości 10 ml.

• 0.2 M roztwór wodorofosoranu potasu (K₂HPO₄)

Do cylindra miarowego odmierzano pipetą 2 ml 1 M roztworu wodorofosforanu i uzupełniano wodą destylowaną do objętości 10 ml.

1 M roztwór wodorotlenku potasu

Odważono 0.56 g KOH do falkonu i rozpuszczono w 10 ml wody destylowanej.

• 50 mM roztwór chlorku magnezu

Odważano 5.9 mg MgCl_2 i rozpuszczono w 1239 μl 0.05 M buforu TRIS.

1.15 % roztwór KCl

Odważano 11.5 mg KCl i rozpuszczono w 1 ml 0.05 M buforu TRIS.

• System regeneracyjny NADPH

W 1500 μl 0.1 M buforu fosforanowo-potasowego o pH 7.4 rozpuszczano 3.875 mg NADP⁺ oraz 3.875 mg glukozo-6-fosforanu. Następnie do mieszaniny dodano 4.67 μl dehydrogenazy glukozo-6-fosforanowej (200 U/mg białka).

5.2.2. Przygotowanie buforów

• 0.1 M bufor fosforanowo-potasowy (pH 7.4)

Odmierzano 8.1 ml 0.2 M roztworu KH₂PO₄ oraz 1.9 ml 0.2 M roztworu K₂HPO₄ i zmieszano. Otrzymany roztwór o pH 6.4 doprowadzano do pH 7.4 poprzez dodanie 800 μl 1 M roztworu KOH. Pomiaru pH dokonano za pomocą elektrody chlorosrebrowej.

• 0.05 M bufor Tris o pH 7.4

Odważano 0.605 g odczynnika TRIZMA i uzupełniano wodą destylowaną do objętości 100 ml.

5.2.3. Przygotowanie pożywek

• Przygotowanie pożywki stałej PDA

W kolbie o pojemności 500 ml umieszczano 3 g komercyjnej pożywki PDA. Następnie wlewano 150 ml wody podwójnie demineralizowanej. Szyjkę kolby zamykano folią aluminiową i umieszczono w autoklawie. Pożywkę wyjaławiano w temperaturze 121°C przez 15 minut. Po wysterylizowaniu pożywkę rozlewano w komorze z nawiewem laminarnym na szalki Petriego, odmierzając po 10 ml pożywki do każdej szalki.

Przygotowanie pożywki płynnej CSL

Do kolby o pojemności 1000 ml odważano 4 g wodnego namoku kukurydzianego. Następnie dodawano 4 g glukozy, po czym do kolby odmierzano 200 ml wody destylowanej i mieszano wszystkie składniki. Pożywkę wyjaławiano w autoklawie w temperaturze 121°C przez 15 min po uprzednim zabezpieczeniu szyjki kolby folią aluminiową.

5.2.4. Biotransformacja w modelu Cunninghamella

Zakładanie hodowli na PDA

Szalki z wcześniej przygotowanym i wyjałowionym podłożem PDA zaszczepiano sporami odpowiednich szczepów *Cunninghamella*, zawieszanymi w 100 μl jałowej wody destylowanej. Zawiesinę zarodników jednolicie rozprowadzano po podłożu za pomocą głaszczki. Hodowle inkubowano w pokoju termostatowanym, w temperaturze 30°C przez okres 7 dni.

Zakładanie hodowli na CSL

Hodowle sporujące, wyhodowane na szalce Petriego na podłożu stałym PDA, zwilżano 1000 μl jałowej wody do badań molekularnych. Następnie pobierano 200 μl zawieszonych w wodzie zarodników i zaszczepiano nimi kolbę z pożywką płynna CLS (25 ml). Hodowle inkubowano na wytrząsarce (200 rpm) w pokoju termostatowanym w temperaturze 30°C przez okres dwóch dni.

• Hodowla biotransformacyjna

Po 48 godzinach inkubacji do hodowli płynnych *Cunninghamella* dodawano roztworów badanych związków (0.5 mg/1 ml pożywki). Hodowle biotransformacyjne inkubowano w pokoju termostatowanym na wytrząsarce (200 rpm) w temperaturze 30°C na okres 7 dni. Po tym czasie oddzielano grzybnię, a płynna hodowlę zadawano 20 ml octanu etylu i wytrząsano przez 48 h. Następnie warstwę organiczną odwadniano siarczanem sodu i pozostawiano do odparowania. Jej suchą pozostałość poddawano dalszej analizie. Wszystkie badania wykonano dwukrotnie.

5.2.5. Biotransformacja z wykorzystaniem mikrosomów wątrobowych

Do probówek odmierzano kolejno 115 µl buforu fosforanowo potasowego (0.1 M, pH = 7.4), 25 µl roztworu roboczego badanego związku (0.2 mM) oraz frakcję mikrosomalną zawierająca odpowiednio mysie, szczurze bądź ludzkie mikrosomy (10 µl). Mieszaniny inkubowano przez 15 minut w temperaturze 37°C, wytrząsając na wytrząsarce (300 rpm). Następnie do probówek dodawano 100 µl systemu regeneracyjnego NADPH i ponownie inkubowano w temperaturze 37°C nieustannie wytrząsając przez 10, 20 oraz 30 min dla związków **4-7,ARI** oraz 60 min dla pozostałych związków. Po inkubacji do mieszanin dodawano po 8 µl lewalorfanu (wzorca wewnętrznego), a następnie próbki przenoszono na lód. W dalszej kolejności mieszaniny zakwaszano 25 µl 70° kwasu nadchlorowego w celu deprotenizacji. Następnie próbki wirowano przez 10 minut w temperaturze 4°C przy 13000 rpm. Z każdej z probówek pobierano 200 µl nadsączu i zadawano 500 µl octanu etylu. Tak przygotowaną próbkę wytrząsano przy 1300 rpm przez 15 min. Fazę organiczną zbierano i pozostawiano do odparowania, a następnie poddawano analizie LC-MS/MS. Próbki odniesienia (ślepe) wykonywano w sposób analogiczny, jednak zamiast frakcji regeneracyjnej dodawano 100 µl buforu. Finalne stężenia składników mieszaniny biotransformacyjnej zawarto w Tabeli 9. Wszystkie badania wykonano przynajmniej dwukrotnie.

Składnik	Stężenie końcowe
Bufor fosforanowo -potasowy	0.1 M
Związek badany	20 µM
Mikrosomy wątrobowe	0.8 mg/ml
System regeneracyjny NADPH	75,5 mg/ml NADP⁺, 75,5
	mg/ml glukozo-6-fosforanu,
	360 U dehydrogenazy glukozo
	fosforanowo-potasowej
Lewalorfan	24 μM

Tabela 9. Skład mieszaniny biotransformacyjnej w modelu mikrosomalnym.

5.2.6. Biotransformacja z wykorzystaniem frakcji S9 wątroby ludzkiej

Badania wykonano dla związków **1**_(a-c). Do probówek odmierzano kolejno 4.7 μl roztworu 1.15 % KCl w buforze 0.05 M TRIS, 20 μl roztworu MgCl₂ w buforze 0.05 M TRIS, 35.4 μl 0.2 mM roztworu badanego związku, 20 μl proteiny S9 (2 mg/ml), 20 μl roztworu glukozo-6-fosforanu oraz 100 μl systemu regeneracyjnego NADPH. Probówkę inkubowano 90 minut w temperaturze 37°C, następnie przenoszono na lód, dodawano 25 μl 70° kwasu nadchlorowego i wirowano 10 minut w temperaturze 4 °C przy 13000 rpm. Z każdej z probówek pobierano nadsącz, który zadawano 500 μl octanu etylu. Tak przygotowaną próbkę wytrząsano przy 1300 rpm przez 15 min. Fazę organiczną zbierano i pozostawiano do odparowania, a następnie poddawano analizie LC-MS/MS. Wszystkie badania wykonano przynajmniej dwukrotnie.

5.2.7. Badania inhibicji CYP2D6 z wykorzystaniem mikrosomów ludzkich

Do eppendorfów dodawano kolejno 0.1 M bufor fosforanowo-potasowy (pH 7.4), związek **2**, mikrosomy ludzkie oraz bufuralol (substrat dla reakcji katalizowanych przez CYP2D6). Związek **2** użyto w następujących stężeniach: 1 μ M, 2.5 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, natomiast bufuralol w stężeniach: 7.5 μ M, 15 μ M, 20 μ M, 30 μ M. Po 15-minutowej inkubacji dodawano frakcję regeneracyjną NADPH. Reakcję prowadzano przez 60 min w temperaturze 37^oC, przy ciągłym wytrząsaniu (300 rpm). Po inkubacji próbki przenoszono na lód i zadawano 25 μ l 70° kwasu nadchlorowego. Następnie próbki wirowano w temperaturze 4°C przy 13000 rpm. 200 μ l powstałego nadsączu przenoszono do nowych eppendorfów i poddawano analizie HPLC. Badania wykonano dwukrotnie.

5.2.8. Metody analityczne monitorujące przebieg biotransformacji

• Chromatografia cienkowarstwowa (TLC)

Obserwację postępu reakcji biotransformacji w modelu mikrobiologicznym wykonywano za pomocą chromatografii cienkowarstwowej stosując płytki aluminiowe firmy Merck pokryte żelem krzemionkowym o grubości 0.2 mm. Próbki pobrane z hodowli w objętości 500 µl zadawano rozpuszczalnikiem organicznym, wytrząsano. Na płytki nakładano fazę organiczną. Jako układ rozwijający zastosowano mieszaninę metanol : toluen (1 : 1). Powstałe plamy obserwowano w świetle UV, stosowano również inkubacje w komorze z parami jodu.

• Chromatografia cieczowa (LC)

Do śledzenia postępu reakcji przekształcenia bufuralolu w 4-hydroksybufuralol wykorzystano chromatograf cieczowy firmy Thermo Separation Products Inc., USA. Użyto kolumny chromatograficznej LiChrospher® 100 RP-18 o wymiarach 250 mm x 4 mm i wielkości wypełnienia ziarna 5 µm, z fazą ruchomą o składzie bufor fosforanowo potasowy (pH 3.0, 10mM) : metanol (1:1), którą przed uzyciem filtrowano przez sączek 0.45 µm (Supelco, Germany) i odgazowywano. Szybkość przepływu eluentu przez kolumnę wynosiła 1ml/min. Użyto dozownika firmy Rheodyne model 7125, z pętlą o pojemności 20 µl, oraz integratora typu SP 4400 Chrom Jet. W metodzie stosowano detektor fluorescencyjny typu SpectraSystem FL3000. Długość fali wzbudzenia wynosiła 252 nm, natomiast długość fali emisji – 302 nm (130; 131).

 Wysokosprawna chromatografia cieczowa połączona z detektorem masowym (LC-MS/MS)

Próbki pozyskane z hodowli mikrobiologicznych, badań mikrosomalnych oraz frakcji S9 po odbiałczeniu poddawano analizie LC-MS/MS z wykorzystaniem aparatu Waters ACQUITY (Waters Corporation, Milford, MA, USA). Rozdzielanie chromatograficzne prowadzono przy użyciu kolumny Acquity UPLC BEH C18, 2.1 x 100 mm i wielkości cząstek 1.7 um. Kolumnę utrzymywano w temperaturze 40°C i eluowano z zastosowaniem gradientu od 95 % do 0 % eluentu A w ciągu 10 minut, z szybkością przepływu 0.3 ml/min. Eluent A: woda/kwas mrówkowy (0.1 % v/v); eluent B: acetonitryl/kwas mrówkowy (0.1 % v/v). Wstrzykiwano po 10 μl każdej próbki. Chromatogramy rejestrowano przy użyciu detektora Waters eλ PDA. Widma były analizowane w zakresie 200-700 nm z rozdzielczością 1.2 nm i częstotliwością próbkowania 20 punktów/s. Ustawienia detekcji spektrometru masowego MS Waters TQD były następujące: temperatura źródła 150°C, temperatura kapilary 350°C, przepływ gazu do desolwacji 600 l/h, przepływ gazu na cone'ie 100 l/h, kapilary potencjał kapilary 3.00 kV, potencjał cone'a 20 V. Azot stosowano zarówno, jako gaz do nebulizacji jak i gaz suszący. Dane otrzymano w trybie skanowania w zakresie od 50 do 1000 m/z w odstępach czasowych równych 0.5 s; Sumowano 8 skanów, aby uzyskać ostateczne widmo. Fragmentację przeprowadzano metodą CID (Collisionally Activated Dissociation) przy energii zderzeń 30 eV. Widma jonów fragmentacyjnych uzyskano przez skanowanie w zakresie od 50 do 500 m/z. Jako oprogramowanie do analizy danych używano MassLynx V 4.1 (Waters).

5.3. Programy komputerowe

Program MetaSite software, wersja 2.1.0. (2005) oraz 5.0.3. (2014), Molecular Discovery wykorzystano w badaniach biotransformacji. Program ACD/ChemSketch (Freeware) 2012 użyto do teoretycznego wyznaczenia log P, natomiast obliczenia i wykresy wykonano przy pomocy programu GraphPad Prism 5 (GraphPad, Software, San Diego, CA).

6. Podsumowanie

Poszukiwanie nowych związków o charakterze potencjalnych leków obejmuje długotrwałe i żmudne postępowanie, które prowadzi się w kilku etapach badań przedklinicznych oraz trzech fazach badań klinicznych. Przy wprowadzaniu substancji aktywnych do kliniki znaczenie ma nie tylko ustalenie mechanizmu działania, ale także losów potencjalnego leku od momentu jego podania, aż do osiągnięcia celu terapeutycznego (receptor, enzym). Przed wprowadzeniem substancji leczniczych do badań klinicznych konieczna jest szczegółowa wiedza w zakresie poszczególnych parametrów ADME, którym podlega lek uwalniany z postaci farmaceutycznej w organizmie. Niezwykle istotnym i ważnym procesem jest biotransformacja leków, która może mieć różne konsekwencje. W jej wyniku mogą powstawać metabolity bardziej lub mniej aktywne od struktury macierzystej. Może powstawać związek o zupełnie innym profilu aktywności – w tym o działaniu toksycznym.

Do niedawna do badań nad metabolizmem wykorzystywano tylko modele zwierzęce. Jednakże znaczne koszty, czas oraz problemy etyczne sprawiły, iż obecnie światowe standardy badań nad biotransformacją skłaniają się, przede wszystkim na wczesnym etapie rozwoju leku, w stronę metod alternatywnych – szybszych, tańszych oraz ochraniających zwierzęta laboratoryjne. Do metod tych zalicza się zarówno badania *in silico* (analizy komputerowe), jak i *in vitro* (badania mikrobiologiczne, na liniach oraz frakcjach komórkowych).

Zgodnie z założonymi celami badawczymi i wychodząc naprzeciw światowym standardom w ramach pracy oceniono przydatność wybranych modeli alternatywnych do badania biotransformacji ksenobiotyków. Wśród metod znalazły się program komputerowy MetaSite (metoda *in silico*) oraz dwa modele *in vitro* – grzyba strzępkowego *Cunninghamella* oraz różnych frakcji wątrobowych (frakcja mikrosomalna i S9).

W ramach pracy przetestowano 12 nowych struktur oraz 2 leki referencyjne (zolpidem i aripiprazol). Badane związki wykazywały wysoką aktywność w ośrodkowym układzie nerwowym potwierdzoną w modelach zwierzęcych oraz charakteryzowały się także znaczną lipofilowością (log P od 2.16 do 5.6) warunkująca im przechodzenie bariery krew-mózg. Na postawie otrzymanych wyników wyselekcjonowano związki o wysokiej stabilności

105

metabolicznej – **2,3,6,8-10** – oraz takie, które podlegały intensywnym procesom biotransformacyjny – związki **1**_(a-c),**4,5,7**. Dla poszczególnych związków (**1**_(a-c)-**5,7,9**) opisano ścieżki metaboliczne (enzymy oraz struktury metabolitów). Wykazano, że stabilność metaboliczna oraz ewentualne kierunki przemian biotransformacyjnych w grupie badanych związków mają duży związek z wartością log P. Ustalono także, ze związek **2**, który jest kandydatem na nowy lek o działaniu znoszącym ból neuropatyczny jest inhibitorem CYP2D6 typu mieszanego (K_i=1.701 µM).

Żadna z testowanych metod nie okazała się idealna i nie może zastąpić badań *in vivo* potencjalnego kandydata na lek. Niemniej wszystkie przedstawione metody są cennym, szybkim i tanim narzędziem skriningowym, które można z powodzeniem stosować na wczesnym etapie prowadzenia badań nad rozwojem nowego leku.

7. Literatura

[1] Xu, C., Li, C. Y., and Kong, A. N., "Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics," *Arch.Pharm.Res.*, Vol. 28, No. 3, **2005**, pp. 249-268.

[2] Svensson, C. K., "Biotransformation of drugs in human skin," *Drug Metab Dispos.*, Vol. 37, No. 2, **2009**, pp. 247-253.

[3] Camargo, S. M., Vuille-dit-Bille, R. N., Mariotta, L., Ramadan, T., Huggel, K., Singer, D., Gotze, O., and Verrey, F., "The molecular mechanism of intestinal levodopa absorption and its possible implications for the treatment of Parkinson's disease," *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, Vol. 351, No. 1, **2014**, pp. 114-123.

[4] Seitz, H. K. and Poschl, G., "The role of gastrointestinal factors in alcohol metabolism," *Alcohol Alcohol*, Vol. 32, No. 5, **1997**, pp. 543-549.

[5] Nave, R., Fisher, R., and Zech, K., "In Vitro metabolism of ciclesonide in human lung and liver precision-cut tissue slices," *Biopharm.Drug Dispos.*, Vol. 27, No. 4, **2006**, pp. 197-207.

[6] Davis, P. J., Stiller, R. L., Wilson, A. S., McGowan, F. X., Egan, T. D., and Muir, K. T., "In vitro remifentanil metabolism: the effects of whole blood constituents and plasma butyrylcholinesterase," *Anesth.Analg.*, Vol. 95, No. 5, **2002**, pp. 1305-7, table.

[7] Park, G. R., "Molecular mechanisms of drug metabolism in the critically ill," *Br.J.Anaesth.*, Vol. 77, No. 1, **1996**, pp. 32-49.

[8] Farmakologia i toksykologia Mutschlera III wyd. Ernst Mutschler, Gerd Geisslinger, Heyo K. Kroemer, Peter Ruth, Monika Schaefer-Korting; Wrocław **2012**

[9] Nebert, D. W. and Russell, D. W., "Clinical importance of the cytochromes P450," *Lancet*, Vol. 360, No. 9340, **2002**, pp. 1155-1162.

[10] Guengerich, F. P., "Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity," *Chem.Res.Toxicol.*, Vol. 14, No. 6, **2001**, pp. 611-650.

[11] de Groot, M. J., "Designing better drugs: predicting cytochrome P450 metabolism," *Drug Discov.Today*, Vol. 11, No. 13-14, **2006**, pp. 601-606.

[12] Jakoby, W. B. and Ziegler, D. M., "The enzymes of detoxication," *J.Biol.Chem.*, Vol. 265, No. 34, **1990**, pp. 20715-20718.

[13] Jancova, P., Anzenbacher, P., and Anzenbacherova, E., "Phase II drug metabolizing enzymes," *Biomed.Pap.Med.Fac.Univ Palacky.Olomouc.Czech.Repub.*, Vol. 154, No. 2, **2010**, pp. 103-116.

[14] Stella, V. J., Charman, W. N., and Naringrekar, V. H., "Prodrugs. Do they have advantages in clinical practice?," *Drugs*, Vol. 29, No. 5, **1985**, pp. 455-473.

[15] Vyas, K. P., Kari, P. H., Pitzenberger, S. M., Halpin, R. A., Ramjit, H. G., Arison, B., Murphy, J. S., Hoffman, W. F., Schwartz, M. S., Ulm, E. H., and ., "Biotransformation of lovastatin. I. Structure elucidation of in vitro and in vivo metabolites in the rat and mouse," *Drug Metab Dispos.*, Vol. 18, No. 2, **1990**, pp. 203-211.

[16] Kawaguchi, T., Ishikawa, K., Seki, T., and Juni, K., "Ester prodrugs of zidovudine," *J.Pharm.Sci.*, Vol. 79, No. 6, **1990**, pp. 531-533.

[17] Liotard, J. F., Mehiri, M., Di, G. A., Boggetto, N., Reboud-Ravaux, M., Aubertin, A. M., Condom, R., and Patino, N., "AZT and AZT-monophosphate prodrugs incorporating HIVprotease substrate fragment: synthesis and evaluation as specific drug delivery systems," *Antivir.Chem.Chemother.*, Vol. 17, No. 4, **2006**, pp. 193-213.

[18] Missaghi, S., Young, C., Fegely, K., and Rajabi-Siahboomi, A. R., "Delayed release film coating applications on oral solid dosage forms of proton pump inhibitors: case studies," *Drug Dev.Ind.Pharm.*, Vol. 36, No. 2, **2010**, pp. 180-189.

[19] Sachs, G., Shin, J. M., Briving, C., Wallmark, B., and Hersey, S., "The pharmacology of the gastric acid pump: the H+,K+ ATPase," *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.*, Vol. 35, **1995**, pp. 277-305.

[20] Sachs, G., Shin, J. M., and Howden, C. W., "Review article: the clinical pharmacology of proton pump inhibitors," *Aliment.Pharmacol.Ther.*, Vol. 23 Suppl 2, **2006**, pp. 2-8.

[21] Wang, L., Zhang, D., Raghavan, N., Yao, M., Ma, L., Frost, C. E., Maxwell, B. D., Chen, S. Y., He, K., Goosen, T. C., Humphreys, W. G., and Grossman, S. J., "In vitro assessment of metabolic drug-drug interaction potential of apixaban through cytochrome P450 phenotyping, inhibition, and induction studies," *Drug Metab Dispos.*, Vol. 38, No. 3, **2010**, pp. 448-458.

[22] Isin, E. M. and Guengerich, F. P., "Complex reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes," *Biochim.Biophys.Acta*, Vol. 1770, No. 3, **2007**, pp. 314-329.

[23] Dole, V. P. and Nyswander, M. E., "Heroin addiction--a metabolic disease," *Arch.Intern.Med.*, Vol. 120, No. 1, **1967**, pp. 19-24.

[24] Nilsson, M. I., Meresaar, U., and Anggard, E., "Clinical pharmacokinetics of methadone," *Acta Anaesthesiol.Scand.Suppl*, Vol. 74, **1982**, pp. 66-69.

[25] Moody, D. E., Alburges, M. E., Parker, R. J., Collins, J. M., and Strong, J. M., "The involvement of cytochrome P450 3A4 in the N-demethylation of L-alpha-acetylmethadol (LAAM), norLAAM, and methadone," *Drug Metab Dispos.*, Vol. 25, No. 12, **1997**, pp. 1347-1353.

[26] Zhao, L. and Pickering, G., "Paracetamol metabolism and related genetic differences," *Drug Metab Rev.*, Vol. 43, No. 1, **2011**, pp. 41-52.
[27] McGill, M. R. and Jaeschke, H., "Metabolism and disposition of acetaminophen: recent advances in relation to hepatotoxicity and diagnosis," *Pharm.Res.*, Vol. 30, No. 9, **2013**, pp. 2174-2187.

[28] Clark, R. F., Wei, E. M., and Anderson, P. O., "Meperidine: therapeutic use and toxicity," *J.Emerg.Med.*, Vol. 13, No. 6, **1995**, pp. 797-802.

[29] Suarez, J., Ranguelova, K., Jarzecki, A. A., Manzerova, J., Krymov, V., Zhao, X., Yu, S., Metlitsky, L., Gerfen, G. J., and Magliozzo, R. S., "An oxyferrous heme/protein-based radical intermediate is catalytically competent in the catalase reaction of Mycobacterium tuberculosis catalase-peroxidase (KatG)," *J.Biol.Chem.*, Vol. 284, No. 11, **2009**, pp. 7017-7029.

[30] Ishibiki, K., Inoue, S., Suzuki, F., Okumura, K., Takeda, K., and Toshimitsu, Y., "[Investigation of adsorption, metabolism and excretion of cefuroxime axetil in volunteers of gastrectomized patients]," *Jpn.J.Antibiot.*, Vol. 43, No. 2, **1990**, pp. 337-344.

[31] Stocco, G., Pelin, M., Franca, R., De, I. S., Cuzzoni, E., Favretto, D., Martelossi, S., Ventura, A., and Decorti, G., "Pharmacogenetics of azathioprine in inflammatory bowel disease: a role for glutathione-S-transferase?," *World J.Gastroenterol.*, Vol. 20, No. 13, **2014**, pp. 3534-3541.

[32] Mutch, E., Nave, R., McCracken, N., Zech, K., and Williams, F. M., "The role of esterases in the metabolism of ciclesonide to desisobutyryl-ciclesonide in human tissue," *Biochem.Pharmacol.*, Vol. 73, No. 10, **2007**, pp. 1657-1664.

[33] Holenarsipur, V. K., Gaud, N., Sinha, J., Sivaprasad, S., Bhutani, P., Subramanian, M., Singh, S. P., Arla, R., Paruchury, S., Sharma, T., Marathe, P., and Mandlekar, S., "Absorption and cleavage of enalapril, a carboxyl ester prodrug, in the rat intestine: in vitro, in situ intestinal perfusion and portal vein cannulation models," *Biopharm.Drug Dispos.*, **2015**.

[34] Derrick, C. W. and Dillon, H. C., Jr., "Streptococcal pharyngitis therapy. A comparison of two erythromycin formulations," *Am.J.Dis.Child*, Vol. 133, No. 11, **1979**, pp. 1146-1148.

[35] Beumer, H. M., Dubourg, A. Y., and Soetens, A., "Erythromycin succinate in the treatment of acute exacerbations of chronic bronchitis," *Eur.J.Clin.Pharmacol.*, Vol. 13, No. 1, **1978**, pp. 25-27.

[36] Lucker, P. W., Wetzelsberger, K., Erking, W., and Donike, M., "[Metabolism and pharmacokinetics of etofylline clofibrate, new antilipemic]," *Arzneimittelforschung.*, Vol. 30, No. 11b, **1980**, pp. 2045-2053.

[37] CASPI, E. Y., LEVY, H., and HECHTER, O. M., "Cortisone metabolism in liver. II. Isolation of certain cortisone metabolites," *Arch.Biochem.Biophys.*, Vol. 45, No. 1, **1953**, pp. 169-182.

[38] Hintzpeter, J., Stapelfeld, C., Loerz, C., Martin, H. J., and Maser, E., "Green tea and one of its constituents, Epigallocatechine-3-gallate, are potent inhibitors of human 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1," *PLoS.One.*, Vol. 9, No. 1, **2014**, pp. e84468. [39] Di, S. A., Sozio, P., Cerasa, L. S., and Iannitelli, A., "L-Dopa prodrugs: an overview of trends for improving Parkinson's disease treatment," *Curr.Pharm.Des*, Vol. 17, No. 32, **2011**, pp. 3482-3493.

[40] Shin, J. M. and Kim, N., "Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the proton pump inhibitors," *J.Neurogastroenterol.Motil.*, Vol. 19, No. 1, **2013**, pp. 25-35.

[41] Devissaguet, J. P., Ammoury, N., Devissaguet, M., and Perret, L., "Pharmacokinetics of perindopril and its metabolites in healthy volunteers," *Fundam.Clin.Pharmacol.*, Vol. 4, No. 2, **1990**, pp. 175-189.

[42] Bartzatt, R. and Malesa, C., "Analysis of an ampicillin propyl ester prodrug which inhibits the growth of Escherichia coli," *Biotechnol.Appl.Biochem.*, Vol. 36, No. Pt 2, **2002**, pp. 89-93.

[43] Winther, L., Baptiste, K. E., and Friis, C., "Pharmacokinetics in pulmonary epithelial lining fluid and plasma of ampicillin and pivampicillin administered to horses," *Res.Vet.Sci.*, Vol. 92, No. 1, **2012**, pp. 111-115.

[44] Derendorf, H., Mollmann, H., Rohdewald, P., Rehder, J., and Schmidt, E. W., "Kinetics of methylprednisolone and its hemisuccinate ester," *Clin.Pharmacol.Ther.*, Vol. 37, No. 5, **1985**, pp. 502-507.

[45] Watkins, W. M., Mberu, E. K., Nevill, C. G., Ward, S. A., Breckenridge, A. M., and Koech, D. K., "Variability in the metabolism of proguanil to the active metabolite cycloguanil in healthy Kenyan adults," *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.*, Vol. 84, No. 4, **1990**, pp. 492-495.

[46] Gambertoglio, J. G., Frey, F. J., Holford, N. H., Birnbaum, J. L., Lizak, P. S., Vincenti, F., Feduska, N. J., Salvatierra, O., Jr., and Amend, W. J., Jr., "Prednisone and prednisolone bioavailability in renal transplant patients," *Kidney Int.*, Vol. 21, No. 4, **1982**, pp. 621-626.

[47] Saboulard, D., Naesens, L., Cahard, D., Salgado, A., Pathirana, R., Velazquez, S., McGuigan, C., De, C. E., and Balzarini, J., "Characterization of the activation pathway of phosphoramidate triester prodrugs of stavudine and zidovudine," *Mol.Pharmacol.*, Vol. 56, No. 4, **1999**, pp. 693-704.

[48] Allegaert, K., Peeters, M. Y., Beleyn, B., Smits, A., Kulo, A., van, C. K., Deprest, J., de, H. J., and Knibbe, C. A., "Paracetamol pharmacokinetics and metabolism in young women," *BMC.Anesthesiol.*, Vol. 15, **2015**, pp. 163.

[49] Habibollahi, P., Mahboobi, N., Esmaeili, S., Safari, S., Dabbagh, A., and Alavian, S. M., "Halothane-induced hepatitis: A forgotten issue in developing countries: Halothane-induced hepatitis," *Hepat.Mon.*, Vol. 11, No. 1, **2011**, pp. 3-6.

[50] Mazze, R. I., "Methoxyflurane revisited: tale of an anesthetic from cradle to grave," *Anesthesiology*, Vol. 105, No. 4, **2006**, pp. 843-846.

[51] Benke, G. M., Cheever, K. L., Mirer, F. E., and Murphy, S. D., "Comparative toxicity, anticholinesterase action and metabolism of methyl parathion and parathion in sunfish and mice," *Toxicol.Appl.Pharmacol.*, Vol. 28, No. 1, **1974**, pp. 97-109.

[52] Shear, N. H., Spielberg, S. P., Grant, D. M., Tang, B. K., and Kalow, W., "Differences in metabolism of sulfonamides predisposing to idiosyncratic toxicity," *Ann.Intern.Med.*, Vol. 105, No. 2, **1986**, pp. 179-184.

[53] Bae, S. K., Yang, K. H., Aryal, D. K., Kim, Y. G., and Lee, M. G., "Pharmacokinetics of amitriptyline and one of its metabolites, nortriptyline, in rats: little contribution of considerable hepatic first-pass effect to low bioavailability of amitriptyline due to great intestinal first-pass effect," *J.Pharm.Sci.*, Vol. 98, No. 4, **2009**, pp. 1587-1601.

[54] Breyer-Pfaff, U., "The metabolic fate of amitriptyline, nortriptyline and amitriptylinoxide in man," *Drug Metab Rev.*, Vol. 36, No. 3-4, **2004**, pp. 723-746.

[55] Riss, J., Cloyd, J., Gates, J., and Collins, S., "Benzodiazepines in epilepsy: pharmacology and pharmacokinetics," *Acta Neurol.Scand.*, Vol. 118, No. 2, **2008**, pp. 69-86.

[56] Dreyfuss, J., Ross, J. J., Jr., Shaw, J. M., Miller, I., and Schreiber, E. C., "Depot fluphenazine enanthate and decanoate: comparative rates of release in dogs," *J.Pharm.Pharmacol.*, Vol. 27, No. 10, **1975**, pp. 791-792.

[57] Coutts, R. T., Su, P., Baker, G. B., and Daneshtalab, M., "Metabolism of imipramine in vitro by isozyme CYP2D6 expressed in a human cell line, and observations on metabolite stability," *J.Chromatogr.*, Vol. 615, No. 2, **1993**, pp. 265-272.

[58] Aderjan, R. E. and Skopp, G., "Formation and clearance of active and inactive metabolites of opiates in humans," *Ther.Drug Monit.*, Vol. 20, No. 5, **1998**, pp. 561-569.

[59] Cormier, M., Ledger, P. W., Marty, J. P., and Amkraut, A., "In vitro cutaneous biotransformation of propranolol," *J.Invest Dermatol.*, Vol. 97, No. 3, **1991**, pp. 447-453.

[60] Flecknell, P., "Replacement, reduction and refinement," *ALTEX.*, Vol. 19, No. 2, **2002**, pp. 73-78.

[61] Flecknell, P. A., "Refinement of animal use--assessment and alleviation of pain and distress," *Lab Anim*, Vol. 28, No. 3, **1994**, pp. 222-231.

[62] Jia, L. and Liu, X., "The conduct of drug metabolism studies considered good practice (II): in vitro experiments," *Curr.Drug Metab*, Vol. 8, No. 8, **2007**, pp. 822-829.

[63] Richmond, J., "Refinement, reduction, and replacement of animal use for regulatory testing: future improvements and implementation within the regulatory framework," *ILAR.J.*, Vol. 43 Suppl, **2002**, pp. S63-S68.

[64] Raunio, H., Taavitsainen, P., Honkakoski, P., Juvonen, R., and Pelkonen, O., "In vitro methods in the prediction of kinetics of drugs: focus on drug metabolism," *Altern.Lab Anim*, Vol. 32, No. 4, **2004**, pp. 425-430.

[65] Goldberg, A. M. and Frazier, J. M., "Alternatives to animals in toxicity testing," *Sci.Am.*, Vol. 261, No. 2, **1989**, pp. 24-30.

[66] Rowley, M., Hallett, D. J., Goodacre, S., Moyes, C., Crawforth, J., Sparey, T. J., Patel, S., Marwood, R., Patel, S., Thomas, S., Hitzel, L., O'Connor, D., Szeto, N., Castro, J. L., Hutson, P. H., and MacLeod, A. M., "3-(4-Fluoropiperidin-3-yl)-2-phenylindoles as high affinity, selective, and orally bioavailable h5-HT(2A) receptor antagonists," *J.Med.Chem.*, Vol. 44, No. 10, **2001**, pp. 1603-1614.

[67] Cruciani, G., Carosati, E., De, B. B., Ethirajulu, K., Mackie, C., Howe, T., and Vianello, R., "MetaSite: understanding metabolism in human cytochromes from the perspective of the chemist," *J.Med.Chem.*, Vol. 48, No. 22, **2005**, pp. 6970-6979.

[68] Wang, R. F., Cao, W. W., Khan, A. A., and Cerniglia, C. E., "Cloning, sequencing, and expression in Escherichia coli of a cytochrome P450 gene from *Cunninghamella elegans*," *FEMS Microbiol.Lett.*, Vol. 188, No. 1, **2000**, pp. 55-61.

[69] Lisowska, K., Szemraj, J., Rozalska, S., and Dlugonski, J., "The expression of cytochrome P-450 and cytochrome P-450 reductase genes in the simultaneous transformation of corticosteroids and phenanthrene by *Cunninghamella elegans*," *FEMS Microbiol.Lett.*, Vol. 261, No. 2, **2006**, pp. 175-180.

[70] Lisowska, K., Dlugonski, J., Freeman, J. P., and Cerniglia, C. E., "The effect of the corticosteroid hormone cortexolone on the metabolites produced during phenanthrene biotransformation in *Cunninghamella elegans*," *Chemosphere*, Vol. 64, No. 9, **2006**, pp. 1499-1506.

[71] Lisowska, K. and Dlugonski, J., "Concurrent corticosteroid and phenanthrene transformation by filamentous fungus *Cunninghamella elegans*," *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.*, Vol. 85, No. 1, **2003**, pp. 63-69.

[72] Lisowska, K. and Dlugonski, J., "Removal of anthracene and phenanthrene by filamentous fungi capable of cortexolone 11-hydroxylation," *J.Basic Microbiol.*, Vol. 39, No. 2, **1999**, pp. 117-125.

[73] Zhang, D., Yang, Y., Leakey, J. E., and Cerniglia, C. E., "Phase I and phase II enzymes produced by *Cunninghamella elegans* for the metabolism of xenobiotics," *FEMS Microbiol.Lett.*, Vol. 138, No. 2-3, **1996**, pp. 221-226.

[74] Keum, Y. S., Lee, H. R., Park, H. W., and Kim, J. H., "Biodegradation of bisphenol A and its halogenated analogues by *Cunninghamella elegans* ATCC36112," *Biodegradation.*, Vol. 21, No. 6, **2010**, pp. 989-997.

[75] Zhang, D., Evans, F. E., Freeman, J. P., Duhart, B., Jr., and Cerniglia, C. E., "Biotransformation of amitriptyline by *Cunninghamella elegans*," *Drug Metab Dispos.*, Vol. 23, No. 12, **1995**, pp. 1417-1425.

[76] Amadio, J., Gordon, K., and Murphy, C. D., "Biotransformation of flurbiprofen by *Cunninghamella species*," *Appl.Environ.Microbiol.*, Vol. 76, No. 18, **2010**, pp. 6299-6303.

[77] Lin, L., Huang, H., Zhang, P., Qi, X., and Zhong, D., "Microbial transformation of dextromethorphan by *Cunninghamella blakesleeana* AS 3.153," *Chem.Pharm.Bull.(Tokyo)*, Vol. 55, No. 4, **2007**, pp. 658-661.

[78] Murphy, C. D., "Drug metabolism in microorganisms," *Biotechnol.Lett.*, Vol. 37, No. 1, **2015**, pp. 19-28.

[79] Zhang, D., Yang, Y., Leakey, J. E., and Cerniglia, C. E., "Phase I and phase II enzymes produced by *Cunninghamella elegans* for the metabolism of xenobiotics," *FEMS Microbiol.Lett.*, Vol. 138, No. 2-3, **1996**, pp. 221-226.

[80] Mazier, C., Jaouen, M., Sari, M. A., and Buisson, D., "Microbial oxidation of terfenadine and ebastine into fexofenadine and carebastine," *Bioorg.Med.Chem.Lett.*, Vol. 14, No. 21, **2004**, pp. 5423-5426.

[81] Pekala, E., Kochan, M., and Carnell, A. J., "Microbial transformation of hydroxy metabolites of 1-oxohexyl derivatives of theobromine by *Cunninghamella echinulata* NRRL 1384," *Lett.Appl.Microbiol.*, Vol. 48, No. 1, **2009**, pp. 19-24.

[82] Abel, A. M., Allan, G. R., Carnell, A. J., and Davis, J. A., "A novel regiospecific N to O-methyl transferase activity in the biotransformation of a thebaine derivative with *Cunninghamella echinulata* NRRL 1384," *Chem.Commun.(Camb.)*, No. 16, **2002**, pp. 1762-1763.

[83] Sariaslani, F. S. and Rosazza, J. P., "Novel Biotransformations of 7-Ethoxycoumarin by *Streptomyces griseus*," *Appl.Environ.Microbiol.*, Vol. 46, No. 2, **1983**, pp. 468-474.

[84] Trower, M. K., Sariaslani, F. S., and O'Keefe, D. P., "Purification and characterization of a soybean flour-induced cytochrome P-450 from *Streptomyces griseus*," *J.Bacteriol.*, Vol. 171, No. 4, **1989**, pp. 1781-1787.

[85] Taylor, M., Lamb, D. C., Cannell, R., Dawson, M., and Kelly, S. L., "Cytochrome P450105D1 (CYP105D1) from *Streptomyces griseus*: heterologous expression, activity, and activation effects of multiple xenobiotics," *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, Vol. 263, No. 3, **1999**, pp. 838-842.

[86] Narhi, L. O. and Fulco, A. J., "Characterization of a catalytically self-sufficient 119,000-dalton cytochrome P-450 monooxygenase induced by barbiturates in *Bacillus megaterium*," *J.Biol.Chem.*, Vol. 261, No. 16, **1986**, pp. 7160-7169.

[87] Di, N. G., Fantuzzi, A., Sideri, A., Panicco, P., Sassone, C., Giunta, C., and Gilardi, G., "Wild-type CYP102A1 as a biocatalyst: turnover of drugs usually metabolised by human liver enzymes," *J.Biol.Inorg.Chem.*, Vol. 12, No. 3, **2007**, pp. 313-323.

[88] Sawayama, A. M., Chen, M. M., Kulanthaivel, P., Kuo, M. S., Hemmerle, H., and Arnold, F. H., "A panel of cytochrome P450 BM3 variants to produce drug metabolites and diversify lead compounds," *Chemistry.*, Vol. 15, No. 43, **2009**, pp. 11723-11729.

[89] Gonzalez, F. J. and Korzekwa, K. R., "Cytochromes P450 expression systems," *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.*, Vol. 35, **1995**, pp. 369-390.

[90] Cornelissen, S., Julsing, M. K., Schmid, A., and Buhler, B., "Comparison of microbial hosts and expression systems for mammalian CYP1A1 catalysis," *J.Ind.Microbiol.Biotechnol.*, Vol. 39, No. 2, **2012**, pp. 275-287.

[91] Geier, M., Braun, A., Emmerstorfer, A., Pichler, H., and Glieder, A., "Production of human cytochrome P450 2D6 drug metabolites with recombinant microbes--a comparative study," *Biotechnol.J.*, Vol. 7, No. 11, **2012**, pp. 1346-1358.

[92] Vail, R. B., Homann, M. J., Hanna, I., and Zaks, A., "Preparative synthesis of drug metabolites using human cytochrome P450s 3A4, 2C9 and 1A2 with NADPH-P450 reductase expressed in *Escherichia coli*," *J.Ind.Microbiol.Biotechnol.*, Vol. 32, No. 2, **2005**, pp. 67-74.

[93] Wang, Q., Jia, R., Ye, C., Garcia, M., Li, J., and Hidalgo, I. J., "Glucuronidation and sulfation of 7-hydroxycoumarin in liver matrices from human, dog, monkey, rat, and mouse," *In Vitro Cell Dev.Biol.Anim*, Vol. 41, No. 3-4, **2005**, pp. 97-103.

[94] Jancova, P., Anzenbacher, P., and Anzenbacherova, E., "Phase II drug metabolizing enzymes," *Biomed.Pap.Med.Fac.Univ Palacky.Olomouc.Czech.Repub.*, Vol. 154, No. 2, **2010**, pp. 103-116.

[95] Nakano, H., Ogura, K., Takahashi, E., Harada, T., Nishiyama, T., Muro, K., Hiratsuka, A., Kadota, S., and Watabe, T., "Regioselective monosulfation and disulfation of the phytoestrogens daidzein and genistein by human liver sulfotransferases," *Drug Metab Pharmacokinet.*, Vol. 19, No. 3, **2004**, pp. 216-226.

[96] Knaak, J. B., al-Bayati, M. A., Raabe, O. G., and Blancato, J. N., "Development of in vitro Vmax and Km values for the metabolism of isofenphos by P-450 liver enzymes in animals and human," *Toxicol.Appl.Pharmacol.*, Vol. 120, No. 1, **1993**, pp. 106-113.

[97] Fisher, M. B., Campanale, K., Ackermann, B. L., VandenBranden, M., and Wrighton, S. A., "In vitro glucuronidation using human liver microsomes and the pore-forming peptide alamethicin," *Drug Metab Dispos.*, Vol. 28, No. 5, **2000**, pp. 560-566.

[98] Bjornsson, T. D., Callaghan, J. T., Einolf, H. J., Fischer, V., Gan, L., Grimm, S., Kao, J., King, S. P., Miwa, G., Ni, L., Kumar, G., McLeod, J., Obach, R. S., Roberts, S., Roe, A., Shah, A., Snikeris, F., Sullivan, J. T., Tweedie, D., Vega, J. M., Walsh, J., and Wrighton, S. A., "The conduct of in vitro and in vivo drug-drug interaction studies: a Pharmaceutical Research and Manufacturers of America (PhRMA) perspective," *Drug Metab Dispos.*, Vol. 31, No. 7, **2003**, pp. 815-832.

[99] Pearce, R. E., McIntyre, C. J., Madan, A., Sanzgiri, U., Draper, A. J., Bullock, P. L., Cook, D. C., Burton, L. A., Latham, J., Nevins, C., and Parkinson, A., "Effects of freezing, thawing, and storing human liver microsomes on cytochrome P450 activity," *Arch.Biochem.Biophys.*, Vol. 331, No. 2, **1996**, pp. 145-169.

[100] Di, L., Kerns, E. H., Hong, Y., Kleintop, T. A., McConnell, O. J., and Huryn, D. M., "Optimization of a higher throughput microsomal stability screening assay for profiling drug discovery candidates," *J.Biomol.Screen.*, Vol. 8, No. 4, **2003**, pp. 453-462.

[101] Donato, M. T., Lahoz, A., Castell, J. V., and Gomez-Lechon, M. J., "Cell lines: a tool for in vitro drug metabolism studies," *Curr.Drug Metab*, Vol. 9, No. 1, **2008**, pp. 1-11.

[102] Shitara, Y., Li, A. P., Kato, Y., Lu, C., Ito, K., Itoh, T., and Sugiyama, Y., "Function of uptake transporters for taurocholate and estradiol 17beta-D-glucuronide in cryopreserved human hepatocytes," *Drug Metab Pharmacokinet.*, Vol. 18, No. 1, **2003**, pp. 33-41.

[103] Lu, C. and Li, A. P., "Species comparison in P450 induction: effects of dexamethasone, omeprazole, and rifampin on P450 isoforms 1A and 3A in primary cultured hepatocytes from man, Sprague-Dawley rat, minipig, and beagle dog," *Chem.Biol.Interact.*, Vol. 134, No. 3, **2001**, pp. 271-281.

[104] Rencurel, F., Stenhouse, A., Hawley, S. A., Friedberg, T., Hardie, D. G., Sutherland, C., and Wolf, C. R., "AMP-activated protein kinase mediates phenobarbital induction of CYP2B gene expression in hepatocytes and a newly derived human hepatoma cell line," *J.Biol.Chem.*, Vol. 280, No. 6, **2005**, pp. 4367-4373.

[105] Gomez-Lechon, M. J., Donato, T., Jover, R., Rodriguez, C., Ponsoda, X., Glaise, D., Castell, J. V., and Guguen-Guillouzo, C., "Expression and induction of a large set of drugmetabolizing enzymes by the highly differentiated human hepatoma cell line BC2," *Eur.J.Biochem.*, Vol. 268, No. 5, **2001**, pp. 1448-1459.

[106] Castell, J. V., Jover, R., Martinez-Jimenez, C. P., and Gomez-Lechon, M. J., "Hepatocyte cell lines: their use, scope and limitations in drug metabolism studies," *Expert.Opin.Drug Metab Toxicol.*, Vol. 2, No. 2, **2006**, pp. 183-212.

[107] Yoshitomi, S., Ikemoto, K., Takahashi, J., Miki, H., Namba, M., and Asahi, S., "Establishment of the transformants expressing human cytochrome P450 subtypes in HepG2, and their applications on drug metabolism and toxicology," *Toxicol.In Vitro*, Vol. 15, No. 3, **2001**, pp. 245-256.

[108] Singh, S. S., "Preclinical pharmacokinetics: an approach towards safer and efficacious drugs," *Curr.Drug Metab*, Vol. 7, No. 2, **2006**, pp. 165-182.

[109] Brandon, E. F., Raap, C. D., Meijerman, I., Beijnen, J. H., and Schellens, J. H., "An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons," *Toxicol.Appl.Pharmacol.*, Vol. 189, No. 3, **2003**, pp. 233-246.

[110] Biagini, C. P., Boissel, E., Borde, F., Bender, V. E., Bouskila, M., Blazy, F., Nicaise, L., Mignot, A., Cassio, D., and Chevalier, S., "Investigation of the hepatotoxicity profile of chemical entities using Liverbeads and WIF-B9 in vitro models," *Toxicol.In Vitro*, Vol. 20, No. 6, **2006**, pp. 1051-1059.

[111] Oswald, S., Grube, M., Siegmund, W., and Kroemer, H. K., "Transportermediated uptake into cellular compartments," *Xenobiotica*, Vol. 37, No. 10-11, **2007**, pp. 1171-1195.

[112] Baba, K., Minatoguchi, S., Sano, H., Kagawa, T., Murata, I., Takemura, G., Hirano, T., Ohashi, H., Takemura, M., Fujiwara, T., and Fujiwara, H., "Involvement of apoptosis in patients with diabetic nephropathy: A study on plasma soluble Fas levels and pathological findings," *Nephrology.(Carlton.)*, Vol. 9, No. 2, **2004**, pp. 94-99.

[113] Matsushima, S., Maeda, K., Kondo, C., Hirano, M., Sasaki, M., Suzuki, H., and Sugiyama, Y., "Identification of the hepatic efflux transporters of organic anions using double-transfected Madin-Darby canine kidney II cells expressing human organic anion-transporting polypeptide 1B1 (OATP1B1)/multidrug resistance-associated protein 2, OATP1B1/multidrug resistance 1, and OATP1B1/breast cancer resistance protein," *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, Vol. 314, No. 3, **2005**, pp. 1059-1067.

[114] Mehendale, H. M., "Uptake and disposition of chlorinated biphenyls by isolated perfused rat liver," *Drug Metab Dispos.*, Vol. 4, No. 2, **1976**, pp. 124-132.

[115] Compagnon, P., Clement, B., Campion, J. P., and Boudjema, K., "Effects of hypothermic machine perfusion on rat liver function depending on the route of perfusion," *Transplantation*, Vol. 72, No. 4, **2001**, pp. 606-614.

[116] Mudra, D. R., Desino, K. E., and Desai, P. V., "In silico, in vitro and in situ models to assess interplay between CYP3A and P-gp," *Curr.Drug Metab*, Vol. 12, No. 8, **2011**, pp. 750-773.

[117] Bortolotti, A., Traina, G. L., Guaitani, A., Marzi, E., Latini, R., Young, J. F., and Bonati, M., "In vivo and perfused liver caffeine kinetics in the rat," *Res.Commun.Chem.Pathol.Pharmacol.*, Vol. 69, No. 3, **1990**, pp. 285-295.

[118] Zajdel, P., Subra, G., Bojarski, A. J., Duszynska, B., Tatarczynska, E., Nikiforuk, A., Chojnacka-Wojcik, E., Pawlowski, M., and Martinez, J., "Novel class of arylpiperazines containing N-acylated amino acids: their synthesis, 5-HT1A, 5-HT2A receptor affinity, and in vivo pharmacological evaluation," *Bioorg.Med.Chem.*, Vol. 15, No. 8, **2007**, pp. 2907-2919.

[119] Kolaczkowski, M., Marcinkowska, M., Bucki, A., Sniecikowska, J., Pawlowski, M., Kazek, G., Siwek, A., Jastrzebska-Wiesek, M., Partyka, A., Wasik, A., Wesolowska, A., Mierzejewski, P., and Bienkowski, P., "Novel 5-HT6 receptor antagonists/D2 receptor partial agonists targeting behavioral and psychological symptoms of dementia," *Eur.J.Med.Chem.*, Vol. 92, **2015**, pp. 221-235.

[120] Kubowicz, P., Marona, H., and Pekala, E., "Synthesis, anticonvulsant activity and metabolism of 4-chlor-3-methylphenoxyethylamine derivatives of trans-2-aminocyclohexan-1-ol," *Chirality*, Vol. 27, No. 2, **2015**, pp. 163-169.

[121] Pekala, E., Waszkielewicz, A. M., Szneler, E., Walczak, M., and Marona, H., "Synthesis and anticonvulsant activity of trans- and cis-2-(2,6-dimethylphenoxy)-N-(2- or 4hydroxycyclohexyl)acetamides and their amine analogs," *Bioorg.Med.Chem.*, Vol. 19, No. 22, **2011**, pp. 6927-6934.

[122] Waszkielewicz, A., Szkaradek, N., Pekala, E., Galzarano, F., and Marona, H., "The study of the lipophilicity of some aminoalkanol derivatives with anticonvulsant activity," *Biomed.Chromatogr.*, Vol. 24, No. 12, **2010**, pp. 1365-1372.

[123] Narimatsu, S., Takemi, C., Kuramoto, S., Tsuzuki, D., Hichiya, H., Tamagake, K., and Yamamoto, S., "Stereoselectivity in the oxidation of bufuralol, a chiral substrate, by human cytochrome P450s," *Chirality*, Vol. 15, No. 4, **2003**, pp. 333-339.

[124] Nakajima, M., Kobayashi, K., Shimada, N., Tokudome, S., Yamamoto, T., and Kuroiwa, Y., "Involvement of CYP1A2 in mexiletine metabolism," *Br.J.Clin.Pharmacol.*, Vol. 46, No. 1, **1998**, pp. 55-62.

[125] Caccia, S., "N-dealkylation of arylpiperazine derivatives: disposition and metabolism of the 1-aryl-piperazines formed," *Curr.Drug Metab*, Vol. 8, No. 6, **2007**, pp. 612-622.

[126] Kitamura, S., Suzuki, T., Kadota, T., Yoshida, M., Ohashi, K., and Ohta, S., "In vitro metabolism of fenthion and fenthion sulfoxide by liver preparations of sea bream, goldfish, and rats," *Drug Metab Dispos.*, Vol. 31, No. 2, **2003**, pp. 179-186.

[127] Von Moltke, L. L., Greenblatt, D. J., Granda, B. W., Duan, S. X., Grassi, J. M., Venkatakrishnan, K., Harmatz, J. S., and Shader, R. I., "Zolpidem metabolism in vitro: responsible cytochromes, chemical inhibitors, and in vivo correlations," *Br.J.Clin.Pharmacol.*, Vol. 48, No. 1, **1999**, pp. 89-97.

[128] Waszkielewicz, A. M., Gunia, A., Sloczynska, K., and Marona, H., "Evaluation of anticonvulsants for possible use in neuropathic pain," *Curr.Med.Chem.*, Vol. 18, No. 28, **2011**, pp. 4344-4358.

[129] Waszkielewicz, A. M., Cegla, M., Zeslawska, E., Nitek, W., Sloczynska, K., and Marona, H., "N-[(2,6-Dimethylphenoxy)alkyl]aminoalkanols-their physicochemical and anticonvulsant properties," *Bioorg.Med.Chem.*, Vol. 23, No. 15, **2015**, pp. 4197-4217.

[130] Kronbach, T., Mathys, D., Gut, J., Catin, T., and Meyer, U. A., "High-performance liquid chromatographic assays for bufuralol 1'-hydroxylase, debrisoquine 4-hydroxylase, and dextromethorphan O-demethylase in microsomes and purified cytochrome P-450 isozymes of human liver," *Anal.Biochem.*, Vol. 162, No. 1, **1987**, pp. 24-32.

[131] Mankowski, D. C., "The role of CYP2C19 in the metabolism of (+/-) bufuralol, the prototypic substrate of CYP2D6," *Drug Metab Dispos.*, Vol. 27, No. 9, 1999, pp. 1024-1028.

Spis Tabel

1. Główne izoenzymy CYP450 odpowiedzialne za metabolizm ksenobiotyków i ich substraty	19
2. Typy reakcji chemicznych zachodzących w I fazie biotransformacji leków	21
3. Reakcje II fazy biotransformacji.	24
4. Aktywność farmakologiczna metabolitów wybranych leków.	29
5. Inhibitory i induktory najważniejszych izoenzymów CYP450 uczestniczących w biotransformacji leków	43
6. Stabilność metaboliczna związków 4-7 oraz aripiprazolu w modelu mikrosomów wątrobowych	73
7. Inhibicja reakcji hydroksylacji bufuralolu przez związek 2	86
8. Zależność pomiędzy lipofilowością badanych związków, a stabilnością metaboliczną	91
9. Skład mieszaniny biotransformacyjnej w modelu mikrosomalnym	102

Spis Rysunków

1. Mechanizm utleniania leku (L) przy współudziale monooksygenazy CYP450	16
2. Cytochrom P450	17
3. Aktywacja proleku (lowastatyny) do aktywnych metabolitów	27
4. 3-(4-fluoro-piperydyn-3-ylo)-2-fenylo-1H-indol.	33
5. Procedury umożliwiające izolację składników subkomórkowych wątroby	39
6.Symulacja ścieżki metabolicznej pochodnych 2-aminocykloheksan-1-olu (1(a-c)) programem MetaSite	52
7. Symulacja ścieżki metabolicznej dla związku 2 programem MetaSite	53
8. Symulacja ścieżki metabolicznej dla związku 3 programem MetaSite	54
9. Atomy węgla najbardziej wrażliwe na atak enzymatyczny wskazane przez MetaSite dla aripiprazolu i je	ego
pochodnych	55
10. Symulacja ścieżki metabolicznej dla aripiprazolu programem MetaSite	56
11. Symulacja ścieżki metabolicznej dla związku 4 programem MetaSite	57
12. Symulacja ścieżki metabolicznej dla związku 7 programem MetaSite	58
13. Atomy węgla najbardziej wrażliwe na atak enzymatyczny wskazane przez MetaSite dla zolpidemu i je	go
pochodnych	59
14. Symulacja ścieżki metabolicznej dla zolpidemu i jego pochodnych zaproponowana przez MetaSite	60
15. Chromatogram (a) oraz widmo MS (b) związku 1_{c} w próbie kontrolnej w modelu mikrobiologiczny	ym
biotransformacji	62
16. Chromatogram (a), widma MS (b) oraz analiza fragmentacyjna MS/MS metabolitu M1 (c) po 7 dnia	ach
biotransformacji związku 1_{c} w modelu mikrobiologicznym	63
17. Chromatogram (a) oraz widma MS (b) związku 2 i M1 po 7 dniach biotransformacji w mode	elu
mikrobiologicznym	63
18. Chromatogram (a) oraz widma MS (b) związku 1_a i jego metabolitów po 60 min biotransformacji w mode	elu
mikrosomów szczurzych	65
19. Chromatogram (a) oraz widma MS (b) związku 1_{b} i M1 po 60 min biotransformacji w modelu mikrosomo	ów
szczurzych	66
20. Chromatogram (a) oraz widma MS (b) związku 1_c i jego metabolitów po 60 min biotransformacji w mode	elu
mikrosomów szczurzych	66
21. Widmo MS/MS wraz z analizą fragmentacyjną dla M2 związków 1_a i 1_c	67
22. Chromatogram (a) oraz widma MS (b) związku 2 i jego metabolitów po 60 min biotransformacji w mode	elu
mikrosomów ludzkich	68
23. Chromatogram (a) oraz widma MS (b) związku 3 i jego metabolitu po 60 min biotransformacji w mode	elu
mikrosomów ludzkich	68
24. Chromatogram (a) oraz widma MS (b) zolpidemu i jego metabolitu po 60 min biotransformacji w mode	elu
mikrosomów ludzkich	69

25. Chromatogram (a) oraz widma MS (b) związku 9 i jego metabolitu po 60 min biotransformacji w modelu
mikrosomów ludzkich
26. Widmo MS/MS wraz z analizą fragmentacyjną dla M1 zolpidemu70
27. Widmo MS/MS wraz z analizą fragmentacyjną dla M1 związku 9
28. Chromatogram (a) oraz widmo MS (b) dla związku 5 po 30 min biotransformacji w modelu mikrosomów
ludzkich
29. Analiza MS/MS dla M1 związku 5
30. Chromatogram a) oraz widma MS b) dla związku 4 oraz jego metabolitów po 30 min biotransformacji w
modelu mikrosomów ludzkich75
31. Analiza MS/MS dla M2 związku 4
32. Analiza MS/MS dla M3 związku 4
33. Chromatogram (a) oraz widma MS (b) dla aripiprazolu i jego metabolitów po 30 min biotransformacji w
modelu mikrosomów ludzkich77
34. Analiza MS/MS dla M2 aripirpazolu
35. Analiza MS/MS dla M3 aripiprazolu
36. Chromatogram (a) oraz widmo MS (b) dla związku 6 po 30 min biotransformacji w modelu mikrosomów
ludzkich
37. Chromatogram (a) oraz widma MS (b) dla związku 7 i jego metabolitów po 30 min biotransformacji w modelu
mikrosomów mysich
38. Chromatogram (a) oraz widma MS (b) dla związku 7 i jego metabolitu po 30 min biotransformacji w modelu
mikrosomów ludzkich
39. Chromatogram (a) oraz widma MS (b) dla związku 1ª i jego metabolitu po 90 min biotransformacji w modelu
frakcji \$9
40. Chromatogram (a) oraz widmo MS (b) dla związku 1 _b i jego metabolitu po 90 min biotransformacji w modelu
frakcji \$9 83
41. Chromatogram (a) oraz widmo MS (b) dla związku 1c i jego metabolitu po 90 min biotransformacji w modelu
frakcji S9
42. Przykładowy chromatogram dla a) 4-hydroksybufuralolu b) bufuralolu