

Metaboliti u procjeni sigurnosti molekule kandidata za lijek

Špoljar, Vida

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:293633>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-09**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Vida Špoljar

**Metaboliti u procjeni sigurnosti
molekule kandidata za lijek**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Biokemija lijekova Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za farmaceutsku kemiju pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Monike Barbarić.

Zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Moniki Barbarić na stručnom vodstvu, strpljenju i uloženom trudu prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Hvala Vam, mama, tata i braco, na beskrajnoj ljubavi i podršci zbog koje je svaki moj korak u životu lakši i sretniji. Vaš ponos je moja najveća nagrada.

Hvala mom dečku Igoru za svaku lijepu riječ, obrisanu suzu i trenutke ispunjene ljubavlju koji su uljepšali kraj mog studiranja.

Hvala mojoj Miji koja je sjedila uz mene od osnovnoškolskih do fakultetskih klupa i dijelila sve tuge i radosti.

Hvala mojoj Anamariji za svaku organizacijsku pomoć u pisanju ovog rada, veliko prijateljstvo i podršku.

Hvala mojoj Mariji zbog koje je svako pješačenje na faks bilo kraće, predavanja zabavnija, polaganje ispita lakše i studiranje ljepše.

Svima koji su riječima potpore ili tehničkom podrškom pomogli u izradi ovog rada, veliko hvala.

Volim vas beskrajno.

SADRŽAJ

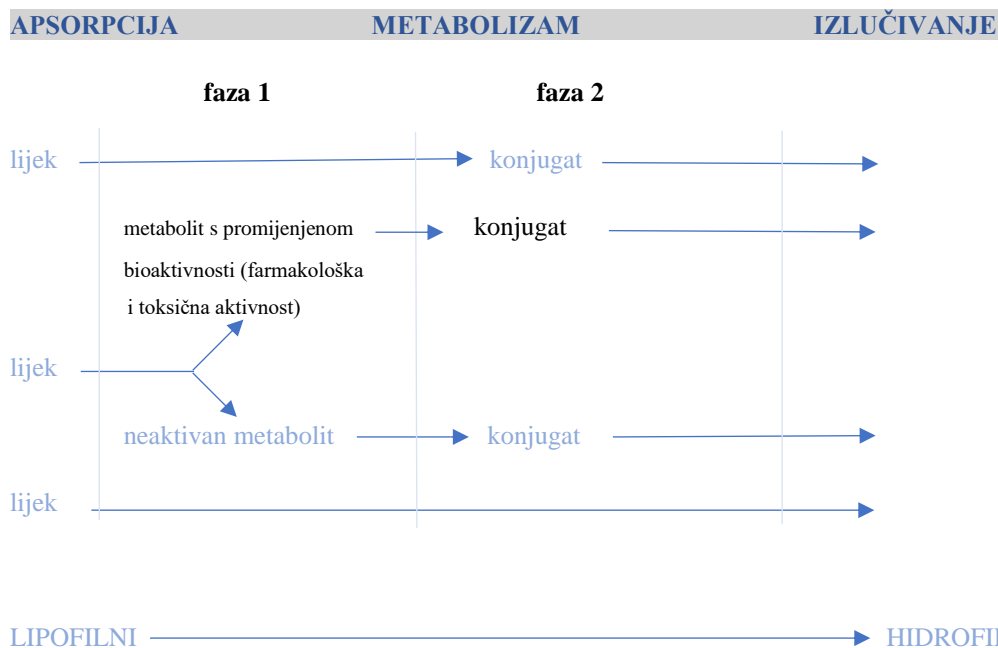
1. UVOD	1
1.1. Reakcije biotransformacije	1
1.2. Molekule kandidati za lijek	2
2. OBRAZLOŽENJE TEME	5
3. MATERIJALI I METODE	6
4. REZULTATI I RASPRAVA	7
4.1. Povijesni pregled istraživanja metabolita	7
4.2. Metode u istraživanju metabolita	9
4.3. Smjernice u istraživanju metabolita	11
4.3.1. Povijesni razvoj smjernica	11
4.3.2. Današnje smjernice	11
4.3.3. Značenje smjernica	14
4.4. In vitro ispitivanja metabolita	14
4.5. In silico metode ispitivanja metabolita	18
4.6. In vivo ispitivanja metabolita	19
4.6.1. Pretklinička ispitivanja metabolita na životinjama	19
4.6.2. Ispitivanja metabolita na ljudima	20
4.6.3. Ispitivanja metabolita na humaniziranim miševima	23
4.7. Metaboliti molekule kandidata za lijek	23
4.7.1. Farmakološki aktivni metaboliti	23
4.7.2. Reaktivni metaboliti	26
4.7.3. Primjeri lijekova s reaktivnim metabolitima	27
4.8. Primjeri ispitivanja metabolita različitih kandidata za lijek	30
5. ZAKLJUČAK	39
6. LITERATURA	40
7. SAŽETAK	44
SUMMARY	45

1.UVOD

Razvoj multidisciplinarnosti koja se bavi ispitivanjem metabolizma molekula započinje u 19. stoljeću zapažanjima kako tvar unesena u organizam prolazi kroz niz biokemijskih promjena te biva izlučena dijelom ili u potpunosti promijenjene molekulske strukture. Tvari koje se unose u organizam, a nisu njegovi prirodni sastojci nazivaju se ksenobiotici. U ksenobiotike osim lijekova ubrajamo i tvari kojima je organizam izložen ili ih uzima iz okoliša poput pesticida, insekticida, dodataka hrani i dr. (Rendić i Medić- Šarić, 2013). Lijekovi su tvari namijenjene liječenju ili sprječavanju bolesti, prilagodbi fizioloških funkcija ili postavljanju medicinske dijagnoze (Graham, 2013). U živom organizmu lijek može imati učinak koji je željen i osnova je terapijskog djelovanja, ali i neželjen koji se smatra nuspojavom. Učinak lijeka ovisi o svojstvima molekule, ali isto tako i o sudbini molekule u organizmu. U svojstva molekule ubrajaju se strukturna i fizikalno- kemijska svojstva kao što su veličina i oblik, polarnost, stereokemija i elektronska svojstva. S druge strane, sudbina molekule lijeka u organizmu predstavlja sumu apsorpcije, distribucije, metaboliziranja i eliminacije poznatih pod akronimom ADME (Administration – Distribution- Metabolism – Excretion). Stoga, metabolizam i nastali metaboliti igraju ključnu ulogu u razvoju molekule kandidata za lijek budući da uvelike imaju utjecaj na djelovanje i sigurnost potencijalnog lijeka u organizmu.

1.1. Reakcije biotransformacije

Apsorpcija i distribucija nakon primjene lijeka ili nekog drugog ksenobiotika može biti olakšana ili smanjena uz transportne proteine. Najvažniji organ u kojem se događa metabolizam je jetra. Reakcijama biotransformacije lijeka u jetri može nastati farmakološki neaktivan metabolit koji se potom eliminira iz organizma ili nastaje aktivni metabolit koji u organizmu posjeduje farmakološku aktivnost koja je u pojedinim slučajevima veća od primijenjenog lijeka. Reakcijama biotransformacije organizam nastoji učiniti spojeve hidrofilnijim kako bi se uspješnije uklonili iz organizma (Slika 1, Katzung i sur., 2011).



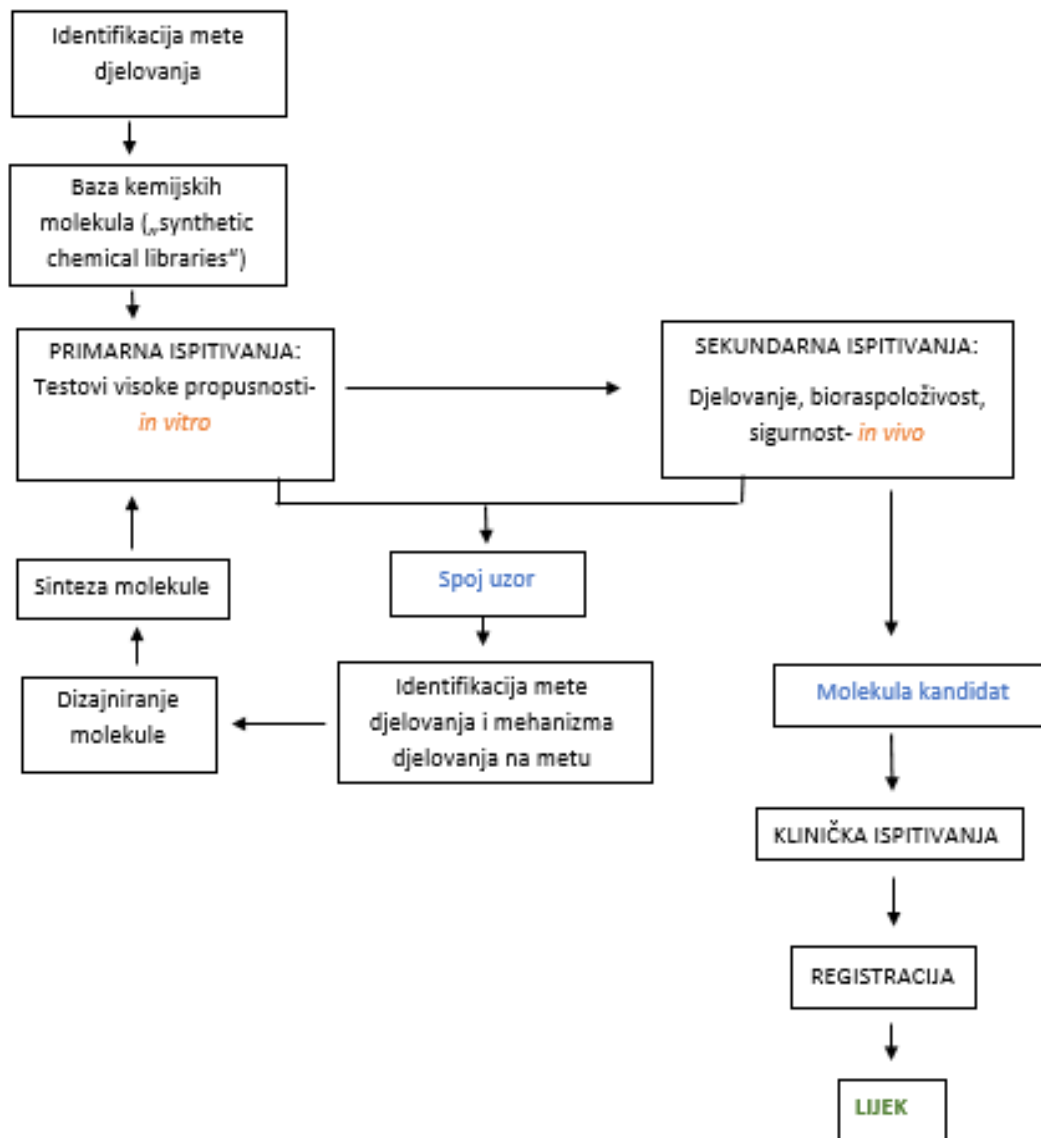
SLIKA 1: Shema metaboliziranja molekule lijeka u organizmu (Preuzeto- Katzung i sur., 2011)

Reakcije biotransformacije u jetri dijele se na dvije faze. Prva faza uključuje reakcije u kojima se modificiraju postojeće funkcionalne skupine spoja ili se u strukturu molekule uvode nove funkcionalne skupine. U reakcije prve faze ubrajaju se reakcije oksidacije, redukcije i hidrolize. Druga faza metaboliziranja uključuje reakcije sulfokonjugacije, glukuronidacije, metilacije, acetilacije, konjugacije s reduciranim glutationom i konjugacije s aminokiselinama. Reakcije prve faze prethode reakcijama druge faze, no postoje izuzeci. Primjer izuzetka je molekula morfina koja izravno stupa u reakciju druge faze, glukuronidaciju. Također, postoje izuzeci kao što su npr. sulfati steroida koji prvo stupaju u reakcije druge faze, a potom u reakcije koje se ubrajaju u prvu fazu (Rendić i Medić- Šarić, 2013).

1.2 Molekule kandidati za lijek

Proces razvoja lijeka je financijski vrlo zahtjevan pothvat koji zahtjeva između 12 i 15 godina predanog rada. Spoj uzor je molekula koja ispoljava traženu farmakološku aktivnost koja može biti slaba, no struktura molekule predstavlja uzor za razvoj analoga s prikladnijom farmakološkom aktivnošću. Glavna pretpostavka je da slične strukture imaju sličan mehanizam djelovanja. Molekula kandidat dobivena modifikacijom spoja uzora ovim procesom nije

završni proizvod (lijek). Dobivena molekula kandidat mora imati barem mikromolarni afinitet vezanja prema meti, a u daljnjem istraživanju potrebno je ispitati svojstva molekula kandidata koja ih čine dobrim ili lošim lijekovima (eng. drugability), odnosno ADMET svojstva.



SLIKA 2: Shema otkrića molekule kandidata i daljnji tijek ispitivanja do registracije kao molekule lijeka

U razvoju lijekova postoje različiti pristupi otkrića nove molekule. Jedan od pristupa je identifikacija mete djelovanja, a potom probiranje molekula iz „synthetic chemical libraries“ odnosno baze kemijskih molekula na temelju farmakološkog učinka naspram identificirane mete djelovanja. Ostali pristupi obuhvaćaju racionalni dizajn lijeka u kojem se kreira molekula na temelju identificiranog mehanizma djelovanja, modifikaciju spoja uzora kako bi farmakokinetika i farmakodinamika bile poboljšane, genetsko inženjerstvo koje koristi gene za proizvodnju proteina ili na primjer primjenu postojećeg registriranog lijeka u novoj indikaciji. Nakon pronalaska velikog broja molekula odgovarajuće strukture, molekule ulaze u fazu probiranja u kojoj se ispituju farmakološka aktivnost i selektivnost prema meti djelovanja *in vitro* ispitivanjima (Katzung i sur., 2011). Takva *in vitro* ispitivanja se nazivaju testovima visoke propusnosti. U fazu probiranja ulazi otprilike između 10000 i 25000 molekula, no dalje u pretklička ispitivanja na životinjama će proći svega 10-25 molekula. Između faze probiranja i prelaska u pretklička ispitivanja, molekule prolaze fazu optimizacije u kojoj se prilagođava struktura kako bi se u konačnici dobila bolja fizikalno- kemijska svojstva, a samim time i bolja farmakokinetika i farmakodinamika. Molekula koja zadovolji u *in vitro* i pretkličkim ispitivanjima postaje molekula kandidat koja dalje ulazi u klinička ispitivanja na čovjeku. U klinička ispitivanja ulazi između 2-5 molekula kandidata, a samo jedna molekula s najboljim rezultatima glede sigurnosti i djelotvornosti će proći registraciju i postati lijek (Hughes i sur.,2011) (Slika 2).

Molekule koje ulaze u pretklička ispitivanja prvo prolaze ispitivanje sigurnosti i učinkovitosti na životinjama. Ispituje se genotoksičnost, reproduktivna toksičnost i provode se sistemska toksikološka ispitivanja. U toksikološkim ispitivanjima na životinjama određuje se maksimalna podnošljiva doza i terapijski raspon doza. Molekule koje pokažu dobru podnošljivost i djelotvornost ulaze u klinička ispitivanja. Klinička ispitivanja se dijele u 3 faze. U prvoj fazi sudjeluje između 25 i 50 zdravih dobrovoljaca te se potvrđuje podnošljivost, sigurnost i farmakokinetika. U drugoj fazi sudjeluje između 100 i 300 pacijenata te se potvrđuje djelotvornost. Zadnja, treća faza, se provodi na većem broju pacijenata, više od 1000, te se potvrđuju djelotvornost i sigurnost. Četvrta faza kliničkog ispitivanja započinje kada se molekula registrira, a obuhvaća prijavljivanje zabilježenih nuspojava prilikom primjene među pacijentima. Registraciju prođe manje od jedne trećine molekula kandidata ispitivanih u kliničkim ispitivanjima (Katzung i sur.,2011).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Znanstvenim i tehnološkim napretkom farmaceutske industrije mogućnosti u razvoju i ispitivanju molekula kandidata uvelike su napredovale. Metabolizmom molekule kandidata nastaju metaboliti s određenom farmakodinamikom i farmakokinetikom te je stoga nužno provesti ispitivanja metabolita kako bi se utvrdilo postoji li potencijalna farmakološka ili toksična aktivnost.

Cilj ovog diplomskog rada je dati sažeti pregled vrlo širokog i kompleksnog područja ispitivanja sigurnosti nastalih metabolita u procesu razvoja molekule kandidata u vidu regulativnih smjernica, korištenih metoda i instrumenata, problema koji se javljaju i otežavaju ispitivanja te načina na koje se isti nastoje riješiti.

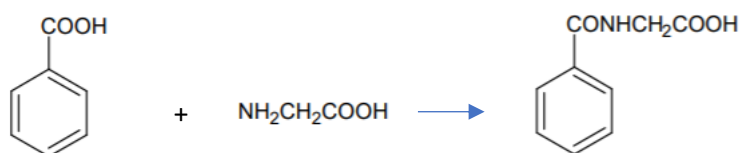
3. MATERIJALI I METODE

Prilikom izrade ovog diplomskog rada korišteni su recentni znanstveni i stručni radovi i knjige. Literatura je pretraživana u bazama podataka ScienceDirect, PubMed, Web of Science (WoS), Scopus i ResearchGate i e-časopisima različitih izdavača. Pretraživanje baza provedeno je pomoću upisivanja ključnih riječi i njihovih kombinacija : *metabolites*, „*MIST*“, *metabolite safety*, *metabolic data*, *metabolism research*, *metabolism studies*, *reactive metabolites* i sl.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Povijesni pregled istraživanja metabolita

1824. godine, Friedrich Wöhler, njemački kemičar poznat po otkriću sinteze uree, započeo je s istraživanjem biotransformacije tvari u organizmu psa. Istraživao je metabolizam benzojeve kiseline i pretpostavio njezinu pretvorbu u hipurnu kiselinu. Justus von Liebig 1829. godine je identificirao i okarakterizirao molekulu hipurne kiseline kao konjugat benzojeve kiseline i glicina (Slika 3). Daljnje istraživanje metabolizma benzojeve kiseline, koja se koristila u liječenju gihta, nastavio je Ure, 1841. godine, proučavajući metabolizam benzojeve kiseline u organizmu čovjeka (www.issx.org).



benzojeva kiselina

glicin

hipurna kiselina

SIKA 3: Prikaz reakcije biotransformacije benzojeve kiseline

U 19. stoljeću dolazi do otkrića primarnih metaboličkih puteva lijeka u organizmu. Značajan doprinos u začecima tog istraživanja dao je Richard Tecwyn Williams, velški biokemičar, koji je 1947. godine objavio knjigu „Detoxification Mechanisms“. U knjizi su opisane faze metabolizma lijekova podijeljene na prvu fazu koja uključuje oksidaciju, redukciju i hidrolizu te drugu fazu koja obuhvaća reakcije konjugacije (Dear i Nedderman, 2016).

Novim znanstvenim dostignućima dolazi do ubrzanog razvoja farmaceutske industrije pri čemu istraživanje metabolizma lijekova te utjecaj nastalih metabolita na živi organizam dobiva na važnosti. Krajem 1960-ih godina započelo se sa dokumentiranjem podataka o metabolizmu lijekova i nastalih metabolita te su postavljeni osnovni kriteriji testiranja sigurnosti lijekova. Prikupljeni podaci o metabolizmu lijekova bili su značajni prilikom budućih odabira kandidata za lijek, tumačenja farmakoloških studija te ispitivanja sigurnosti lijekova. D.L. Azarnoff 1970. godine objavljuje članak „Application of metabolic data to the evaluation of drugs“ (Primjena

podataka o metabolizmu u razvoju lijekova) u kojem je sve veći naglasak na utjecaju metabolizma u razvoju lijekova te razlici u farmakološkim i toksičnim učincima lijekova i njihovih metabolita zbog individualnih razlika u apsorpciji, distribuciji, metabolizmu i eliminaciji. Podaci o metabolizmu lijekova prikupljali su se vrlo brzo, no postavljalo se pitanje relevantnosti dobivenih podataka budući da je u konačnici čovjekov organizam jedini na kojem primjenjivani lijek mora biti učinkovit, a istovremeno i siguran. Razvojem tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (eng. High Performance Liquid Chromatography; HPLC) moguće je razdvajanje organskih molekula te je u razdoblju 1970-ih i 1980-ih omogućeno pomnije istraživanje metabolizma i farmakokinetike lijekova. Paralelno s razvojem HPLC tehnike, razvijala se metoda označavanja lijekova radioaktivnim izotopima (najčešće ^{14}C i ^3H) zbog selektivnosti u detekciji. Temelji ispitivanja sigurnosti lijekova i nastalih metabolita jesu ispitivanja na vrstama koja imaju ADMET što sličniji organizmu čovjeka. Daljnjim razvojem metoda HPLC i tankoslojne kromatografije (eng. Thin Layer Chromatography; TLC) spregnutih sa visoko selektivnim detektorima, postalo je jednostavnije profilirati metabolite u biološkim uzorcima, ali identifikacija metabolita i određivanje njihove kemijske strukture i dalje ostaje zahtjevan izazov. Istraživačka pitanja koja se postavljaju su:

- treba li u obzir uzimati samo one metabolite koji su farmakološki aktivni ili bi se trebali ispitivati svi metaboliti koji nastaju prilikom metaboliziranja molekule kandidata za lijek;
- je li potrebno odrediti strukturu samo metabolitima prisutnim u količini većoj od 10% ukupne tvari povezane s molekulom kandidatom;
- koji je mehanizam biotransformacije metabolita;
- kakva je distribucija metabolita u tkiva i dolazi li do njihove akumulacije?

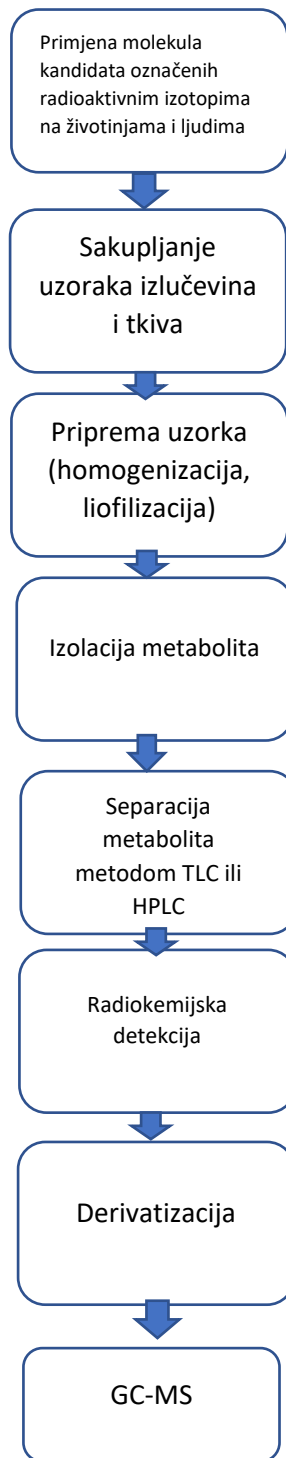
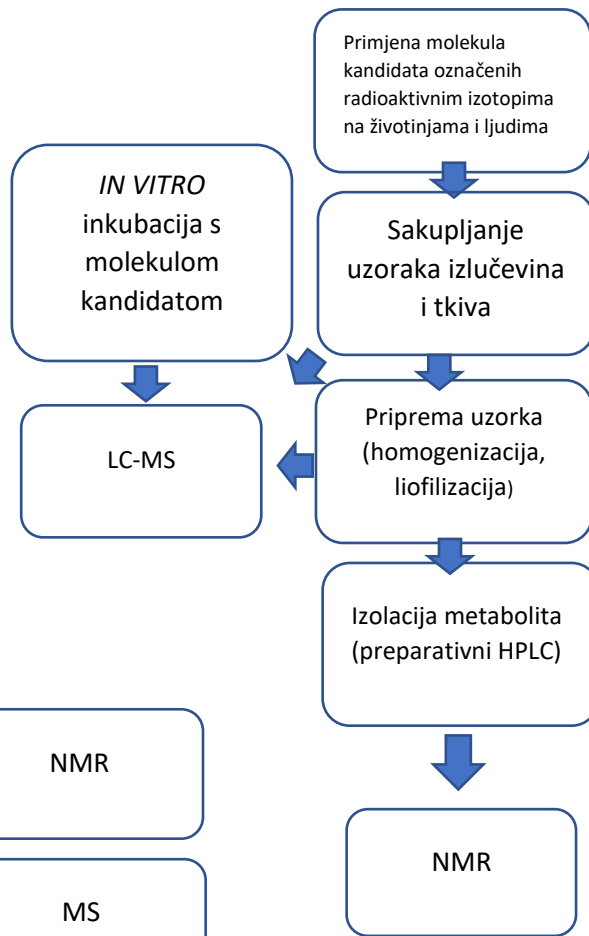
Postavljena pitanja često nisu imala jednoznačan odgovor i postojale su razlike u mišljenjima između različitih skupina znanstvenika. Daljnjim istraživanjem metabolizma različitih spojeva došlo se do zaključka kako metabolizam spojeva nije samo proces detoksifikacije kako se do tada smatralo, već da nastali metaboliti mogu toksično djelovati na organizam. Paracetamol (acetaminofen) je jedan od prvih lijekova za koje je istraživano te dokazno kako metaboliti uzrokuju toksični učinak na jetru (Hinson i sur., 2010).

Ispitivanju toksičnog djelovanja metabolita molekule kandidata u tijelu čovjeka prethodi detekcija i izolacija metabolita iz tijela životinje i određivanje njegove molekulske strukture. Dalje se istražuje metabolizam tvari u tijelu čovjeka pomoću molekula označenih

radioaktivnim izotopima. Primjer jednog od prvih istraživanja u kojem se počeo primjenjivati ovakav princip je istraživanje metabolizma antiaritmika verapamila. Ispitivanje je započelo ubrizgavanjem verapamila označenog radioaktivnim izotopom ^{14}C psima. Metaboliti su ekstrahirani iz psećeg urina te liofiliziranog psećeg izmeta. Potom su pročišćeni tankoslojnom kromatografijom te analizirani plinskom kromatografijom spregnutom s masenom spektroskopijom (eng. Gas chromatography–mass spectrometry; GC-MS). Prema strukturi metabolita zaključeno je da su N- i O- dealkilacija glavni putevi biotransformacije verapamila (McIlhenny, 1971). Razvojem tehnika, a isto tako i novim spoznajama o enzimskim sustavima i metaboličkim procesima u organizmu, metabolizam molekula kandidata i nastale metabolite moguće je učinkovito ispitati te zaključiti o mogućim željenim i neželjenim učincima na organizam (Dear i Nedderman, 2016).

4.2. Metode u istraživanju metabolita

Nuklearna magnetska rezonancija (eng. Nuclear magnetic resonance; NMR) i masena spektroskopija (eng. Mass spectrometry; MS) u današnje vrijeme predstavljaju dominantne metode u određivanju strukture metabolita nakon njihove izolacije iz biološkog uzorka. Nuklearna magnetska rezonancija je analitička metoda koja se temelji na magnetskom momentu jezgara. Jezgra apsorbira energiju promjenom stanja spina. Prvotna apsorpcija, a zatim i emisiju energije zakretanjem spina, bilježi se kao signal u NMR spektru. Detekcija pojedine jezgre odnosno atoma moguća je zbog specifičnosti razlike energije različitih stanja spina između različitih molekula (Pine, 1994). Druga najčešće korištena metoda je masena spektrometrija koja se temelji na ionizaciji molekula. Nastali ioni se potom razdvajaju na temelju razlika u masama. Uz pomoć masene spektrometrije određuju se relativne molekulske mase odnosno moguće je identificirati molekule (Pine, 1994). Razvojem metoda ispitivanja i napretkom tehnologije ubrzalo se otkriće molekula kandidata i razvoj molekule do njezine registracije kao lijeka. Razvoj instrumentalnih metoda ubrzao je proces identifikacije i daljnje istraživanje metabolita (Slika 4). Međutim, problematična i dalje ostaju pretklinička ispitivanja na životinjama koja se nisu previše mijenjala od 1950-ih. Takva ispitivanja se i dalje temelje na davanju visokih doza tvari životinjama i opažanju štetnog djelovanja na organizam. Isto tako, postavlja se pitanje jesu li podaci dobiveni o metabolitima identificiranim u organizmu životinja relevantni i primjenjivi na organizam čovjeka (Dear i Nedderman, 2016).

IDENTIFIKACIJA METABOLITA → 1970-1995**IDENTIFIKACIJA METABOLITA → 1995-DANAS**

SLIKA 4: Usporedba principa ispitivanja metabolizma molekula kandidata u dva različita vremenska perioda: do 1995. godine i od 1995. godine do danas (Preuzeto i prilagođeno- Dear i Nedderman, 2016)

4.3. Smjernice u istraživanju metabolita

4.3.1. Povijesni razvoj smjernica

Vera C. Glocklin u članku „General considerations for studies of the metabolism of drugs and other chemicals“ objavljenom 1982. godine, izražava potrebu izrade smjernica u istraživanju metabolizma molekula prilikom razvoja molekule kandidata do lijeka (Vera C. Glocklin, 1982). Baillie i suradnici 2002. godine u članku „Drug metabolites in safety testing“ sažimaju dugotrajne diskusije i mnogobrojna izražena mišljenja o prvim napisanim smjernicama koje su se referirale na procjenu sigurnosti nastalih metabolita u 3 ključne faze : prije ispitivanja na čovjeku, između faze I (procjena sigurnosti) i faze II (procjena učinkovitosti) te od faze III (provjera efikasnosti te željenih i neželjenih učinka koji nisu zamijećeni u ranijim fazama) pa sve do registracije lijeka (Baillie i sur., 2002). Glavnim metabolitom definirao se onaj čiji je udio $\geq 25\%$ ukupne tvari nastale od molekule kandidata. Članak je doveo do razvoja grane farmaceutске znanosti poznate pod akronimom „MIST“ (The metabolites in safety testing; Metaboliti u ispitivanjima sigurnosti). Glavna pitanja istraživanja sigurnosti metabolita u „MIST“ području bila su:

- kada je najoptimalnije istraživati metabolizam u razvoju molekule kandidata za lijek;
- koji tip istraživanja je najoptimalniji za pojedinu molekulu;
- koji su metaboliti od interesa ispitivanja te postoji li farmakološka aktivnost ispitivanih metabolita koja utječe na djelovanje molekule kandidata?

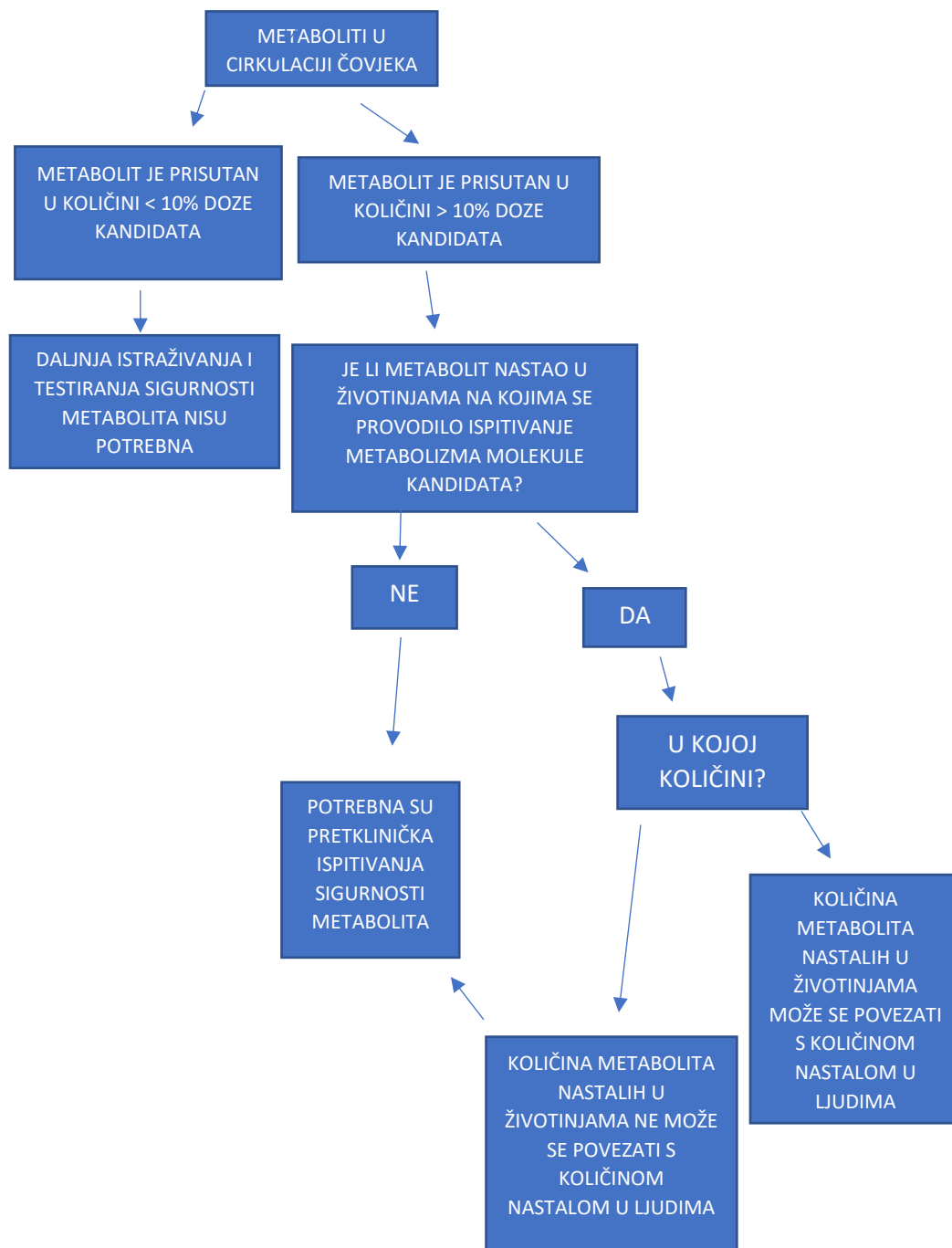
4.3.2. Današnje smjernice

Američka agencija za hranu i lijekove (eng. Food and Drug Administration; FDA) kritizirala je smjernice prema kojoj se istražuju metaboliti čiji je udio $\geq 25\%$ zbog postojanja slučajeva u kojima metaboliti u količini $< 25\%$ u odnosu na druge metabolite prisutne u cirkulaciji mogu biti uzročnici neželjenih učinaka. Primjer takvog slučaja je anestetik halotan i njegov metabolit trifluoroacetil-klorid koji čini manje od 25% metabolita u cirkulaciji povezane s ispitivanim lijekom, a ima značajnu reaktivnost. Nova skica smjernica izdana je 2005. godine od strane FDA pod nazivom „MIST“ smjernice (Slika 5). U „MIST“ smjernicama glavnim metabolitima molekule kandidata su definirani oni koji su prisutni u količini $\geq 10\%$.

Diskutabilno je bilo treba li odrediti točnu koncentraciju pojedinog metabolita ili kao što je do tada bilo prisutno postotnu zastupljenost metabolita u ukupnoj primijenjenoj dozi ili sistemskoj izloženosti kandidata za lijek. Počela se naglašavati važnost koncentracije metabolita, npr. 10% od određene doze značajno ovisi o tome je li početna doza npr. 1 g ili 1 mg. Prema izračunu, 10% od doze koja iznosi 1 g je 1000 puta veća količina metabolita u odnosu na 10% metabolita nastalih nakon primjene tvari u količini od 1 mg.

FDA je na temelju svih rasprava donijela strukturirano stablo odluke u ispitivanju sigurnosti metabolita za cirkulirajuće i izlučene metabolite. U slučaju cirkulirajućih metabolita, prvo se odredi, a potom i uspoređuje struktura metabolita sa strukturom molekule kandidata za lijek. Ukoliko je metabolit strukturom sličan početnoj molekuli kandidata tada je bitno odrediti afinitet vezanja za primarnu metu kojom se ostvaruje farmakološki učinak, ali isto tako i na sekundarne mete zbog mogućeg neželjenog djelovanja. Ukoliko metabolit posjeduje afinitet vezanja manji od 10% u odnosu na molekulu kandidata koja se ispituje tada je važno odrediti slobodnu frakciju. Nakon što se odredi slobodna frakcija tada se ispituje može li metabolit ostvariti do 25% vezanja na receptor. Ukoliko može, tada je bitno odrediti permeabilnost u ciljno tkivo, mehanizam izlučivanja te ispitati metabolit u toksikološkim i kliničkim studijama. S druge strane, ukoliko metabolit strukturno ne slični molekuli kandidatu tada je bitna ukupna koncentracija metabolita u cirkulaciji tj. prelazi li koncentraciju od $1\mu\text{M}$. Ukoliko je ukupna koncentracija veća od $1\mu\text{M}$ bitno je odrediti slobodnu frakciju metabolita. Kada se odredi slobodna frakcija, tada je bitno pronaći odgovor na pitanje zauzima li metabolit više od 10% sekundarnih receptora. Ukoliko zauzima, bitno je ispitati metabolit u toksikološkim i kliničkim studijama. Drugo stablo odluke odnosi se na izlučene metabolite kod kojih je važno odrediti količinu metabolita koja se izlučuje iz organizma te je li metabolit reaktivan. Uz cirkulirajuću i izlučenu količinu metabolita, za procjenu sigurnosti bitna je farmakološka aktivnost metabolita, struktura te mehanizam toksičnosti ukoliko postoji. Konačne FDA „MIST“ smjernice objavljene su 2008. godine. FDA je strogo definirala kako se mora provesti razmatranje sigurnosti metabolita kada je njihov udio više od 10% doze kojoj je čovjek sistemski izložen. Također, propisan je način provedbe studije uz potrebu za provođenjem u najranijoj fazi razvoja molekule do mogućeg lijeka. Definiran je disproporcijski metabolit koji je prisutan samo kod ljudi ili je prisutan kod ljudi u puno većim koncentracijama u odnosu na životinjske modele koji su se koristili u pretkliničkim studijama. Smjernice Međunarodne konferencije o usklađivanju tehničkih zahtjeva za registraciju farmaceutskih proizvoda za primjenu kod ljudi (eng. The International Council for Harmonisation of Technical

Requirements for Pharmaceuticals for Human Use; ICH) objavljene su 2009. godine (Dear i Nedderman, 2016).



SLIKA 5: Stablo odluke u ispitivanju sigurnosti metabolita nastalih metabolizmom kandidata za lijek objavljeno u FDA „MIST“ smjernicama (Preuzeto i prilagođeno- Dear i Nedderman, 2016)

4.3.3. Značenje smjernica

Svrha donesenih FDA „MIST“ smjernica jest usklađivanje načela ispitivanja sigurnosti metabolita unutar znanstvene i regulatorne zajednice te farmaceutske industrije. Smjernice predstavljaju prelazak s diskusije na ključna načela ispitivanja sigurnosti s detaljno definiranom i razrađenom metodologijom i strategijama ispitivanja. Donesene strategije bazirane su na korelaciji postupanja u 3 ključna područja. Prvo područje je kada započeti s ispitivanjem metabolizma tvari i sigurnosti nastalih metabolita u fazama razvoja molekule kandidata za lijek. Drugo je bazirano na usporedbi izloženosti živog organizma nastalim metabolitima dok treće razrađuje alate za kvalitativno i kvantitativno određivanje metabolita.

4.4. *In vitro* ispitivanja metabolita

In vitro postupci istraživanja metabolizma molekula u ranim fazama ispitivanja kandidata za lijek postali su sve značajniji u identifikaciji metaboličkih puteva i nastalih metabolita zbog novih spoznaja o enzimima koji sudjeluju u metabolizmu, novih reagenasa, metoda i tehnika istraživanja. Podaci dobiveni u takvim *in vitro* ispitivanjima se dalje mogu koristiti u razvoju analoga molekule kandidata za lijek kako bi se kreirala molekula s najpovoljnijim svojstvima i najvećim šansama za postizanje zadovoljavajućih rezultata u daljnjim kliničkim ispitivanjima. Prilikom *in vitro* ispitivanja se provode razni testovi, no najpouzdaniji rezultati dobivaju se uz pomoć staničnih kultura.

Jetra je organ s najvećom sposobnošću metaboliziranja stranih tvari u živom organizmu stoga hepatociti predstavljaju vrlo važan *in vitro* sustav. Korištenjem hepatocita kao *in vitro* sustava za proučavanje metabolizma, stvara se slika metaboliziranja molekula kandidata u *in vivo* uvjetima. Za izradu kulture stanica hepatocita koriste se hepatociti više različitih donora stoga dobiveni rezultati uključuju raznolikost u metaboliziranju ovisno o genetskom polimorfizmu pojedinog enzima. Inkubacija obično traje između jednog i četiri sata, no ukoliko se spoj vrlo brzo metabolizira tada se vrijeme inkubacije skraćuje kako bi bili sigurni da se promatraju primarno nastali metaboliti. Metabolizirane molekule te novonastali metaboliti se potom promatraju pomoću HPLC-a spregnutog s masenim spektrometrom (eng. Liquid chromatography–mass spectrometry; HPLC-MS).

Kao *in vitro* sustav koriste se i substancične frakcije. Prednost upotrebe substancičnih frakcija jest u tome što se čuvaju na temperaturi ispod -70°C u dozama manjeg volumena koji je predviđen za jednokratnu upotrebu. Tako čuvane frakcije mogu stajati godinama što čini ovu metodu vrlo praktičnom. Najviše se upotrebljavaju substancične frakcije jetre. Kod upotrebe substancičnih frakcija u istraživanju metabolizma potreban je dodatak koenzima za razliku od *in vitro* sustava hepatocita koji ih već sadrže. Substancične frakcije se pripremaju metodom diferencijalnog centrifugiranja. Prvi korak u pripremi je homogenizacija tkiva, a zatim filtracija i centrifugiranje na maloj brzini kako bi se istaložila jezgra. Supernatant nakon centrifugiranja predstavlja frakciju nazvanu „S-9“ koja je kombinacija mikrosomalne i citosolne frakcije. Frakcija S-9 se rijetko koristi kao *in vitro* model u istraživanju metabolizma. Kada se S-9 podvrgne centrifugiranju velikom brzinom dobije se talog koji je kombinacija mikrosoma, lizosoma i mitohondrija. Ukoliko se želi pripremiti frakcija samo jednog od prethodno navedenih organela, primjenjuje se centrifugiranje s gradijentom gustoće. Supernatant nakon centrifugiranja S-9 velikom brzinom je citosol (Obach i sur., 2016).

Često se kao *in vitro* model za istraživanje metabolizma koristi frakcija mikrosoma stanica jetre. Mikrosomi jetre su izvor prije svega enzima citokroma P450 i UDP-glukuronidiltransferaze (UGT) te se koriste u predviđanju metaboličke sudbine molekule kandidata za lijek (Knights i sur., 2016). Mikrosomi nisu organeli prirodno prisutni u stanicama čovjeka, već su vezikularni mjehurići koji nastaju u laboratorijskim uvjetima prilikom poremećaja endoplazmatskog retikuluma uslijed procesa homogenizacije. Citokrom P450 se prirodno nalazi na unutarnjoj strani endoplazmatskog retikuluma, no prilikom formiranja mikrosoma dolazi s vanjske strane membrane vezikule.

Odabir *in vitro* sustava ovisi o potrebi ispitivanja. Na primjer, ako postoji potreba za ispitivanjem metaboliziranja spoja kandidata u živom organizmu koristiti će se kompleksni *in vitro* sustavi koji uključuju mnogo različitih enzima. S druge strane, ukoliko je potrebno pronaći određeni enzim koji metabolizira molekulu kandidata, prihvatljivo je koristiti jednostavan *in vitro* sustav s manjim brojem enzima, ponekad samo jednim.

Prvi korak u odabiru *in vitro* sustava je da se prema strukturi spoja pretpostavljaju mogući mehanizmi metaboliziranja molekule. Potrebno je dobro poznavati odnos strukturnih komponenti molekule i reaktivnosti iste te na temelju toga pretpostaviti koje bi se reakcije mogle dogoditi u toj molekuli. Primjerice, ukoliko molekula sadrži supstituent koji je alkan

najvjerojatnije će doći do reakcije hidroksilacije enzimima citokroma P450 dok će na primjer kod etera doći do reakcije O- dealkilacije također enzimima citokroma P450.

Prilikom odabira najprikladnijeg *in vitro* sustava prvo se najčešće koristi *in vitro* sustav hepatocita kako bi se identificirali i lokalizirali enzimi koji sudjeluju u metaboliziranju molekule, ali to ne predstavlja pravilo ukoliko se u metaboliziranju molekule uključeni enzimi izvan organa jetre. U slučajevima kada se molekula kandidat metabolizira u crijevima, gdje u mnogim slučajevima sudjeluju bakterije crijevne mikroflore, u koži, plućima ili bubrezima, bitno je spoznati da se radi o metabolizmu izvan organa jetre te koristiti prikladne *in vitro* sustave. Nakon identifikacije enzima i potrebnih kofaktora može se koristiti jednostavniji i specifičniji *in vitro* sustav u daljnjim ispitivanjima.

Primjerice, ukoliko se glavni metabolički put molekule odvija enzimom alkohol dehidrogenazom, tada se kao *in vitro* sustav koristi citosol te bi pogrešno bilo koristiti mikrosome u kojima se taj enzim prirodno ne nalazi. Primjeri enzima, njihov smještaj unutar stanice i potrebni kofaktori prikazani su u tablici 1. Također, bitno je da korišteni sustav sadrži sve enzime koji sudjeluju u metaboliziranju ispitivane molekule.

TABLICA 1: Primjeri enzima koji sudjeluju u metaboliziranju tvari u organizmu, njihova lokacija u stanici te potrebni kofaktori (Preuzeto- Obach i sur., 2016)

ENZIM	LOKACIJA ENZIMA U STANICI	POTREBNI KOFAKTORI
Citokrom P450 (CYP enzimi)	Mikrosomi	NADPH, kisik
Flavin monoooksigenaza (FMO)	Mikrosomi	NAPDH, kisik
Monoamin oksidaza (MAO)	Mitohondriji	Kisik
Alkohol dehidrogenaza	Citosol	NAD
Aldehid dehidrogenaza (ALDH)	Citosol, mitohondriji	NAD, NADP
Ketoreduktaza	Mikrosomi	NADPH
Karboksilesteraza	Mikrosomi, citosol	-
Epoksid hidrolaza	Mikrosomi, citosol	-
UDP-glukuronidil transferaza (UGT)	Mikrosomi	Uridin- difosfat- glukuronska kiselina
Sulfotransferaza(SULT)	Citosol	Fosfoadenozin- fosfosulfat
Acetiltransferaza	Mitohondriji, citosol	Acetil- koenzim A
Glutation-S-transferaza (GST)	Mikrosomi, citosol	Glutation (GSH)
Metiltransferaza(MT)	Mikrosomi, citosol	S-adenozil metionin (SAM)
Molibden oksidaza	Citosol	Kisik

Nakon određivanja metaboličkog puta određuje se klirens tvari. Klirens lijeka predstavlja volumen krvne plazme očišćen od lijeka u jedinici vremena (Katzung i sur.,2011). Uz pomoć *in vitro* sustava koji sadrži mikrosome jetre određuje se klirens molekule kandidata za lijek. Ukoliko je klirens prebrz tada se razvijaju analozi molekule koji će imati manji klirens, a samim time i duže djelovanje.

Ispitivanjima molekule kandidata važno je odrediti koji su metaboliti aktivni. *In vitro* ispitivanjima se identificira potencijal stvaranja aktivnih metabolita u organizmu čovjeka čak i ako je metabolit prisutan u niskim koncentracijama i neće imati aktivnost u *in vivo* uvjetima nakon primjene molekule kandidata za lijek. U *in vitro* ispitivanjima se također traži odgovor na pitanje hoće li nastati metaboliti koji će u živom organizmu imati štetno djelovanje kao na primjer kancerogeno ili hepatotoksično. Takva metabolička aktivnost je izrazito nepoželjna kod nove molekule te se dizajniranjem analoga ona može ukloniti kako bi se dobila sigurnija molekula. Sve veći fokus se stavlja na pitanje hoće li ljudi biti izloženi metabolitima koji nisu uočeni u životinja tijekom ispitivanja. Kako bi se smanjila ta mogućnost, u *in vitro* ispitivanjima provodi se identifikacija metabolita na više *in vitro* modela stanica te se rezultati uspoređuju s identificiranim metabolitima u plazmi životinja ili u njihovim izlučevinama. *In vitro* metode su vrlo značajne jer predstavljaju jednostavniji i jeftiniji način ispitivanja, a s druge strane ključan budući da se kandidat za lijek ne može primijeniti u ispitivanjima na ljudima prije nego što se *in vitro* metodama ne identificiraju metaboliti koji će nastati u ljudi (Obach i sur., 2016).

Postavlja se vrlo bitno pitanje koliko su dobro podaci o metabolitima molekule kandidata za lijek dobiveni *in vitro* istraživanjima primjenjivi za događaje *in vivo* u čovjeku. Hoće li metaboliti *in vivo* biti kvalitativno i kvantitativno jednaki kao u *in vitro* ispitivanjima? Istraživanje napravljeno 2009. godine uključivalo je 17 molekula kandidata, a temelji se na usporedbi podataka dobivenih *in vitro* s podacima *in vivo* ispitivanja molekula kandidata obilježenih radioaktivnim izotopima (Anderson i sur.,2009). *In vitro* metode su davale pouzdane podatke vezane uz identifikaciju i kvantifikaciju glavnih cirkulirajućih metabolita u 41% slučajeva.

Metaboliti dobiveni u *in vitro* ispitivanjima ne moraju u svim slučajevima predstavljati glavne cirkulirajuće metabolite u čovjeka budući da je moguće bubrežno ili pak bilijarno izlučivanje. Na primjer, ukoliko neki metabolit koji nastaje glavnim metaboličkim putem molekule u jetri ima vrlo brz ekstrahepatički metabolizam tada se taj metabolit neće pokazivati

glavnim u cirkulaciji zbog vrlo male ili pak neznatne koncentracije te će doći do neslaganja podataka dobivenih *in vitro* i *in vivo* ispitivanjima. Iste godine je skupina znanstvenika uspoređivala podatke dobivene pomoću tri *in vitro* sustava sa *in vivo* dobivenim podacima uz obilježavanje radioaktivnim izotopima (Dalvie i sur., 2009). Ljudski hepatociti, mikrosomi i S-9 frakcija korišteni su kao *in vitro* sustavi. Pouzdani podaci o glavnim cirkulirajućim metabolitima su u ovom slučaju dobiveni u 46-65% slučajeva ovisno o korištenoj *in vitro* metodi. U ovom ispitivanju dobiveni su podaci da *in vitro* metode daju pouzdane podatke o glavnom metaboličkom putu molekule u 75-92% slučajeva.

Može se zaključiti da podaci dobiveni u *in vitro* sustavima daju dobru predodžbu o *in vivo* događanjima. Međutim, problem nastaje kada se metabolizam molekule događa izvan jetre budući da se u *in vitro* ispitivanjima pretežito koriste sustavi temeljeni na metaboliziranju u jetri.

In vitro sustavi predstavljaju jednostavnu verziju odvijanja metaboličkih procesa te mogu dati netočne podatke zbog kompleksnosti koja se odvija u *in vivo* uvjetima, a koja je ovisna o brojnim faktorima koji se ne mogu simulirati u *in vitro* uvjetima. *In vitro* sustav nikako ne može prikazati situaciju koja se odvija u *in vivo* uvjetima, ali može vrlo dobro usmjeriti daljnja ispitivanja (Jaroch i sur., 2018).

4.5. *In silico* metode ispitivanja metabolita

In silico modeli, koji se primjenjuju u ranoj fazi ispitivanja molekule kandidata, jesu metode ispitivanja u kojima se koriste računalni programi kako bi se predvidjela farmakokinetika i farmakodinamika molekule kandidata u organizmu (Colquitt i sur.,2011). Fiziološki utemeljeno farmakološko modeliranje (eng. Physiologically based pharmacokinetic modelling; PBPK) omogućuje previđanje farmakološkog i toksikološkog djelovanja molekule kandidata u organizmu, predviđa koncentraciju molekule kandidata u cirkulaciji na temelju permeabilnosti u organizmu uzimajući u obzir pasivan i aktivan transport te potencijal interakcija s drugim lijekovima ili hranom. PBPK modeli integriraju podatke o fizikalno-kemijskim svojstvima molekule kandidata te podatke o molekuli kandidatu dobivene u *in vitro* ispitivanjima. Modeli mogu vrlo dobro procijeniti farmakokinetiku i farmakodinamiku na mjestu djelovanja uzimajući u obzir polimorfizam enzima i druge interindividualne razlike između pojedinaca (Jamei i sur.,2013). Najkorišteniji softver u *in silico* ispitivanjima je Simcyp (www.certara.com).

U razvoju molekule kandidata postoje PBPK modeli prilagođeni metabolitima, no prvenstveno dizajnirani za matičnu molekulu. U istraživanju metabolita *in silico* metodama potrebno je uzeti u obzir fiziologiju organizma, fizikalno- kemijska svojstva molekule, mjesto, brzinu i mehanizam nastanka metabolita. U uporabi je PerL model jetre u Simcyp simulatoru, ADAM model koji predviđa raspodjelu, apsorpciju i metabolizam i Mech KiM model bubrega. Težnja je u budućnost razviti modele koji će pomnije previđati sudbinu metabolita u organizmu (Roy i Nandi, 2019).

4.6. *In vivo* ispitivanja metabolita

Molekula kandidata za lijek mora pokazati vrlo dobra svojstva u *in vitro* ispitivanjima kako bi se započelo s *in vivo* ispitivanjima koja su vremenski i financijski vrlo zahtjevna. Nedostatak *in vitro* metoda je nedovoljno predviđanje stvarnih događanja u organizmu. Postoje mnogi primjeri molekula kandidata koji su u *in vitro* sustavima hepatocita pokazivale mali opseg metaboliziranja dok su *in vivo* ispoljavale vrlo brz i opsežan metabolizam. Zato su nužna *in vivo* ispitivanja kojima se određuje kompleksna slika sudbine molekule kandidata u živom organizmu koja se ne može dovoljno dobro predvidjeti *in vitro* ispitivanjima.

4.6.1. Pretklinička ispitivanja metabolita na životinjama

Na životinjskim modelima nastoji se prije svega upoznati farmakokinetika kandidata za lijek. Vrlo je bitno odrediti korelaciju primijenjene doze i učinka molekule kandidata bez toksičnog djelovanja. Također, na životinjama se određuje brzina i putevi eliminacije kandidata iz organizma. *In vivo* ispitivanja na životinjama temelje se na primjeni molekule kandidata obilježene radioaktivnim izotopom.

Jedan od principa ispitivanja je praćenje vremena potrebnog organizmu da se u potpunosti eliminira primijenjena doza molekule kandidata obilježena radioaktivnim izotopom. U takvom ispitivanju se najčešće koriste štakori i psi. Životinje se nakon primijenjene doze stavljaju u kaveze koji odvajaju urin i feces. Uobičajeno je da se uzorci sakupljaju nekoliko dana. Nakon završetka sakupljanja izlučevina od štakora, životinje se žrtvuju te se potom ispituje ostatak radioaktivnog spoja. U slučaju pasa, životinja se ne žrtvuje, već se životinje vraćaju u kaveze za sakupljanje izlučevina te se uzorci sakupljaju primjerice svakih tjedan dana nakon završetka prvog ciklusa sakupljanja. Očekivan rezultat je da se

radioaktivna oznaka eliminira u potpunosti. Odstupanje u dobivenim rezultatima može biti zbog gubitka radioaktivnog spoja u obliku ugljikovog (IV) oksida (CO₂). Uz izlučevine, sakupljaju se i uzorci krvi životinja. Jedna od najčešćih metoda analize uzoraka je LC-MS (eng. Liquid chromatography–mass spectrometry; LC-MS). U slučajevima kada molekula kandidat ima većinsku eliminaciju putem fecesa ili se slabo apsorbira nakon peroralne primjene, u ispitivanjima se sakupljaju uzorci žuči. Rezultati ovakvog tipa ispitivanja prikazuju profil metabolita nastalih metaboliziranjem molekule kandidata, brzinu metabolizma te puteve eliminacije molekule kandidata.

Druga metoda *in vivo* ispitivanja na životinjama je autoradiografija cijelog organizma (eng. Quantitative whole body autoradiography; QWBA) kojom se ispituje raspodjela molekula kandidata u tkiva. QWBA se najčešće provodi na štakorima, a princip ispitivanja je doziranje molekule kandidata obilježene radioaktivnim izotopima ¹⁴C ili ³H. Nakon određenog vremena životinja se žrtvuje i tijelo se brzo zamrzne. Potom se rade presjeci tkiva debljine 30 μm uz pomoć instrumenta mikrotoma. Presjeci se ugrađuju u prikladan nosač te se stavljaju u kontakt s pločama za snimanje obloženih fosforom. Metoda se naziva „phosphor imaging“, a temelji se na luminiscenciji fosfora odnosno emisiji elektromagnetskog zračenja koje je posljedica emisije radioaktivnog zračenja od strane radioaktivnih izotopa kojima su obilježene molekule kandidata. Na opisan način detektiraju se radioaktivni izotopi odnosno molekula kandidat (Leblans i sur., 2011). Intenzitet dobivenih signala se uspoređuje sa standardnom krivuljom dobivenom na temelju snimanja mjesta s poznatom količinom radioaktivnih izotopa. Ovom metodom može se odrediti koncentracija molekule kandidata u pojedinom tkivu.

Prije prve primjene molekule kandidata na čovjeku, „FTIM“ (eng. First Time In Human Study; FTIM), treba biti poznat niz parametara i svojstava nastalih metabolita koji uvelike mogu utjecati na učinkovitost i sigurnost molekule kandidata. U spomenuta svojstva ubrajaju se sistemska izloženost nastalim metabolitima, struktura, potencijal stvaranja reaktivnog metabolita, farmakološka aktivnost metabolita i toksično djelovanje na organizam. Podaci *in vitro* i *in vivo* ispitivanja na životinja prilažu se regulatornim tijelima kao zahtjev za početkom provođenja ispitivanja na čovjeku.

4.6.2. Ispitivanja metabolita na ljudima

Vrlo je bitno da tijekom *in vivo* studija na čovjeku ne postoji rizik za zdrave dobrovoljce ili pacijente. Rizik se smanjuje opsežnim prikupljanjem podataka u *in vitro*, *in silico* i *in vivo*

ispitivanjima na životinjama. Prije početka *in vivo* ispitivanja na čovjeku potrebno je imati uvid u očekivanu sigurnost primjene, opseg metabolizma i raspon doza koje će biti primjenjivane.

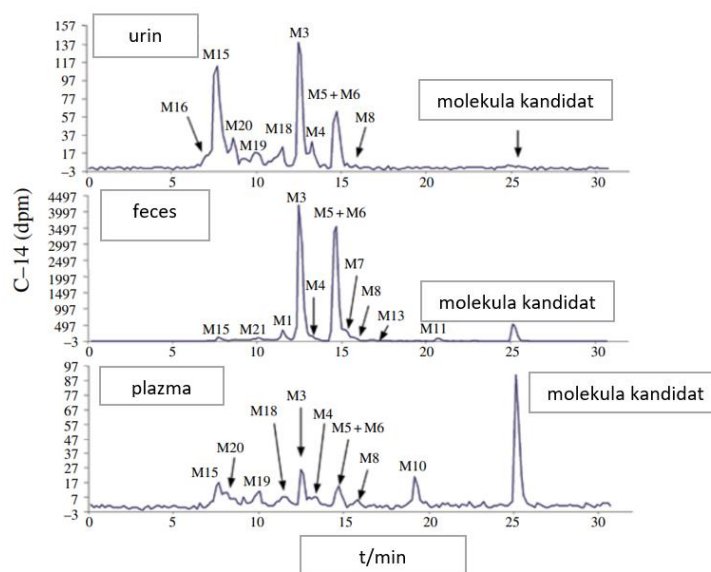
U ranim fazama *in vivo* ispitivanja na ljudima bitno je ispitati eventualno postojanje DHM metabolita (eng. disproportionate human metabolite; DHM) koji nisu bili detektirani u *in vivo* ispitivanjima na životinjama ili su bili detektirani u vrlo maloj količini. DHM metabolitima se smatraju oni koji u ljudskoj cirkulaciji čine $\geq 10\%$ ukupne tvari povezane s molekulom kandidatom (eng. drug related material; DRM). Ukoliko nije detektirana dovoljna izloženost DHM metabolitu kod laboratorijskih životinja korištenih u toksikološkim ispitivanjima (najčešće štakor i pas) tada se nastoji pronaći laboratorijska životinja koja tvori taj metabolit u količini jednakoj ili većoj u odnosu na čovjeka i kod koje bi izloženost metabolitu bila zadovoljavajuća za daljnja ispitivanja sigurnosti. U slučaju da se ne može pronaći laboratorijska životinja koja bi zadovoljavala navedene uvjete DHM metabolit se sintetizira te se sigurnost potom ispituje na laboratorijskoj životinji. Nedostatak ovog pristupa je moguća nedovoljna izloženost DHM metabolitu zbog npr. slabe apsorpcije ili sekundarnog metabolizma (Prueksaritanont i sur., 2006).

In vivo ispitivanja na čovjeku započinju s ispitivanjem u kojem se primjenjuje samo jedna doza po pojedincu (eng. Single Ascending Dose; SAD) i želi se ispitati farmakokinetika molekule kandidata. Pojedinačna doza koja se daje pojedincima se povećava kako bi se ispitala sigurnost i podnošljivost. Ispitanicima se rade pretrage krvi u kojima se određuje maksimalna koncentracija molekule kandidata u plazmi i površina ispod krivulje koncentracija-vrijeme (eng. Area under the curve; AUC). Metaboliti se identificiraju iz uzorka plazme i urina, a potom se uspoređuju s podacima dobivenim u *in vitro* i *in vivo* ispitivanjima na životinjama. Međutim, prema smjernicama FDA, farmakokinetika se ne može procijeniti na temelju samo jedne primijenjene doze po organizmu.

Drugi tip ispitivanja u kojem se pojedincu primjenjuje više doza kandidata za lijek naziva se „MAD“ (eng. Multiple Ascending Dose; MAD). U „MAD“ ispitivanjima primjenjuju se doze koje obuhvaćaju terapijski raspon molekule kandidata. „SAD“ i „MAD“ ispitivanjima nastoji se spoznati farmakokinetika kandidata u živom organizmu.

ADME ispitivanja na čovjeku započinju testovima u kojima se ispituje molekula kandidat neobilježena radioaktivnim izotopom. Takvim tipom ispitivanja nastoji se identificirati i profilirati nastale metabolite. Zatim slijede ispitivanja na čovjeku u kojima se ispituje molekula kandidat obilježena radioaktivnim izotopom, najčešće ^{14}C . Najvažniji uzorak

u takvom tipu ispitivanja je krv. Metaboliti iz uzorka se razdvajaju uz pomoć HPLC, a potom se uzorak analizira AMS uređajem (eng. Accelerator mass spectrometry; AMS). Slika 6 prikazuje primjer HPLC kromatograma uzorka urina, fecesa i krvi molekule kandidata obilježene radioaktivnim izotopom ^{14}C i nastalih metabolita. AMS omogućuje doziranje vrlo malih količina ^{14}C stoga ne postoji opasnost od zračenja. Iz uzorka urina i fecesa se kvantificira radioaktivnost te se dobivaju podaci o brzini i putevima eliminacije molekule kandidata i nastalih metabolita. Dobiveni podaci se uspoređuju s podacima dobivenih u pretkliničkim *in vivo* ispitivanjima na životinjama. U ADME ispitivanjima na čovjeku bitno je točno identificirati sve metabolite kojima je organizam izložen, odrediti profil metabolita u cirkulaciji, identificirati eventualni DHM te procijeniti udio pojedinog metabolita u ukupnom DRM. U ADME ispitivanjima koristi se najveća doza koja će se koristiti u kliničkim ispitivanjima kako bi se dobili podaci o maksimalnoj izloženosti organizma nastalim metabolitima.



Dpm = broj raspada u minuti

SLIKA 6: HPLC profil molekule kandidata i nastalih metabolita obilježenih radioaktivnim izotopom ^{14}C (Preuzeto i prilagođeno- Weidolf i Wilson, 2016)

Izuzev ispitivanja molekula kandidata za lijekove koji se koriste u liječenju malignih bolesti, kliničke studije koje se bave profiliranjem metabolita i ispitivanjima njihove sigurnosti provode se na zdravim dobrovoljcima. Ispitanici su većinom muškarci starosti između 20 i 50 godina koji su u potpunosti zdravi, ne uzimaju drugu terapiju, ne puše, ne konzumiraju alkohol te se ne bave napornom fizičkom aktivnosti tijekom ispitivanja. Stoga, mogući razlog

odstupanja dobivenih podataka u *in vivo* ispitivanjima i događanja u živim organizmima kada se molekula kandidat registrira kao lijek i započne s njenom upotrebom jest taj što su se *in vivo* ispitivanja provodila na ograničenoj populaciji ljudi.

4.6.3. Ispitivanja metabolita na humaniziranim miševima

Budući da se *in vitro* sustavima ljudskih tkiva ne može u potpunosti predvidjeti tijekom događanja u *in vivo* uvjetima, razvijeni su humanizirani miševi. Postoje humanizirani transgeni miševi i kimerni humanizirani miševi. Humanizirani transgeni miševi humanizirani su u jetri ili crijevima i to za receptor arilnih ugljikovodika (eng. aryl hydrocarbon receptor; AhR), konstitutivni androstanski receptor (eng. Constitutive androstane receptor; CAR), peroksisom proliferator aktivirani receptor α (eng. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha; PPAR α) ili PXR (eng. Pregnane X receptor; PXR). Navedeni receptori vrlo su važni u metabolizmu ksenobiotika. Humanizirani transgeni miševi ispoljavaju većinu ljudskih CYP enzima. Nedostatak je što ljudski CYP enzimi u miševima mogu biti manje aktivni u odnosu na čovjekov organizam, a isto tako na rezultate ispitivanja mogu utjecati i prirodno prisutni enzimi miša. Drugi model laboratorijske životinje koji se koristi su kimerni humanizirani miševi koji imaju sadržan aktivator plazminogena tip urokinaze (eng. urokinase-type plasminogen activator; uPA) i rijetku kombiniranu imunodeficienciju (eng. Severe combined immunodeficiency; SCID) (Kitamura i Sugihara, 2014). Navedeni modeli su vrlo učinkoviti u slučajevima postojanja DHM te zbog toga što daju opsežniju i točniju sliku metaboliziranja u odnosu na *in vitro* ispitivanja i *in vivo* preklinička ispitivanja na životinjama.

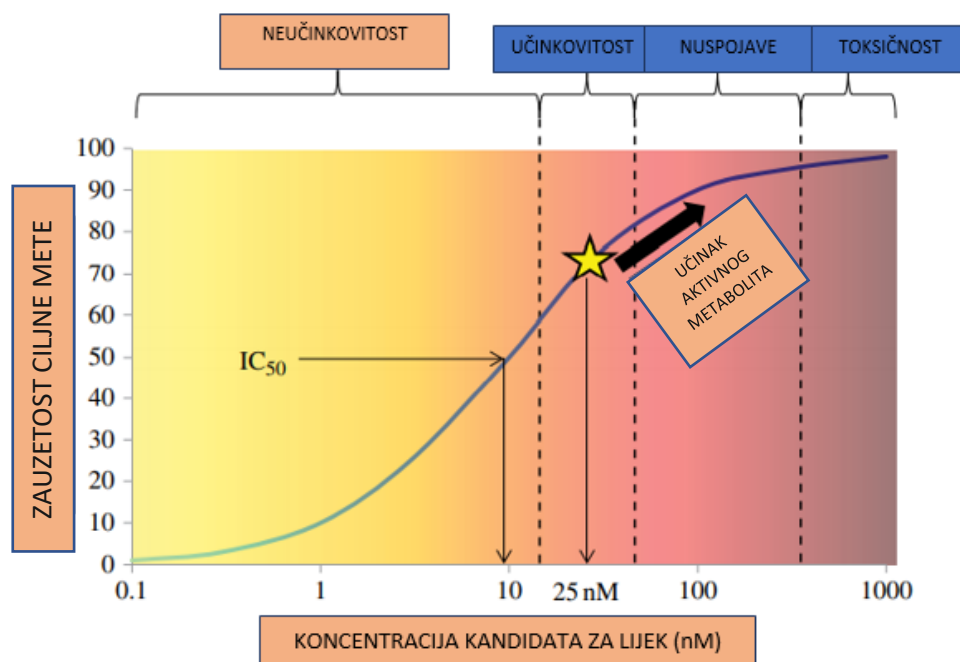
4.7. Metaboliti molekule kandidata za lijek

4.7.1. Farmakološki aktivni metaboliti

Nema točne definicije ili definiranih kriterija kada se metabolit smatra farmakološki aktivnim. U istraživanju farmakološki aktivnih metabolita potrebno je pronaći odgovor na tri ključna pitanja:

- koliki je afinitet vezanja metabolita za ciljni receptor;
- koliki je udio slobodne frakcija metabolita u cirkulaciji;
- prolazi li metabolit do mete djelovanja jednako kao i primijenjeni spoj?

Kako bi se odgovorilo na postavljena pitanja, provodi se usporedba metabolita s molekulom kandidata za lijek. Ukoliko metaboliti nastaju jednostavnim reakcijama poput npr. hidroksilacije ili N-demetilacije tada će doći do manje razlike u fizikalno- kemijskim svojstvima (lipofilnost, veličina molekule, stupanj ionizacije...) u odnosu na molekulu kandidata. U slučaju manje promjene fizikalno- kemijskih svojstava veća je vjerojatnost da će takvi metaboliti biti farmakološki aktivni te u ponekim slučajevima imaju čak dobar potencijal postanka molekulama kandidatima za lijek. S druge strane, reakcijama kao što su sulfokonjugacija, oksidacija ili hidroliza dolazi do većih promjena u molekuli metabolita u odnosu na molekulu kandidata te je manja vjerojatnost farmakološke aktivnosti metabolita.



SLIKA 7: Krivulja djelovanja kandidata za lijek i njegovih metabolita (Preuzeto i prilagođeno- Obach i sur., 2016)

Slika 7 predstavlja krivulju djelovanja kandidata za lijek i njegovih metabolita na ciljnu metu. Vrijednost IC_{50} na slici predstavlja koncentraciju koja zauzima 50% mete djelovanja. Na slici ona iznosi 10 nM. Srednja djelotvorna koncentracija iznosi 25 nM te je tada zauzeto oko 75% mete djelovanja. Na primjeru je vidljivo da postoji niz koncentracija bez nuspojava ili toksičnog djelovanja. Međutim, ukoliko od molekule kandidata nastaje farmakološki aktivni metabolit tada će okupiranost mete djelovanja biti veća te je i veća vjerojatnost nuspojava i toksičnog djelovanja. Zaključak je da ukoliko metabolit uzrokuje 25% ili više okupacije mete djelovanja da se tada treba ispitati farmakokinetika metabolita zbog značajnog doprinosa

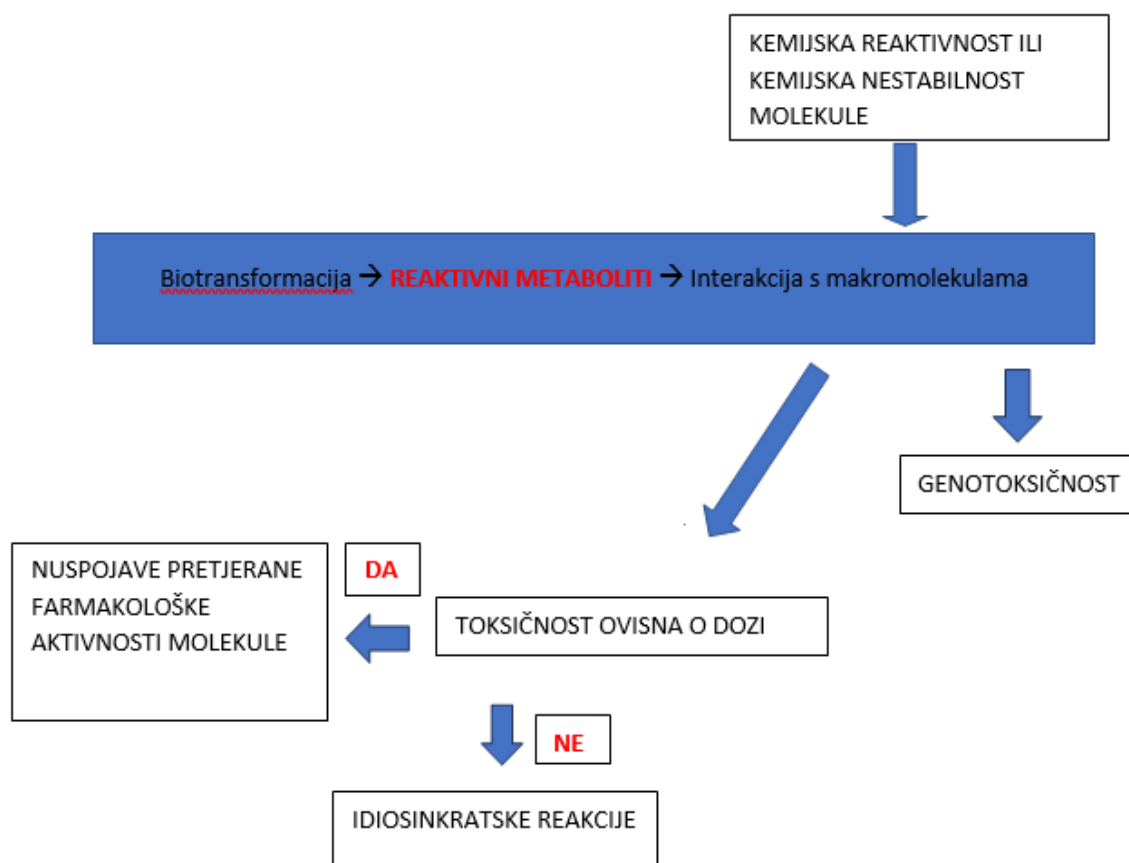
metabolita ukupnom djelovanju. Prvo se provode ispitivanja na laboratorijskim životinjama, a potom i na ljudima. Vrlo je bitno procijeniti sigurnost takvog metabolita te identificirati njegov put metaboliziranja kako ne bi došlo do nesrazmjera između primijenjene doze kandidata i očekivanog učinka na temelju te doze (Obach i sur., 2016).

Postoje dva eksperimentalna pristupa kako detektirati aktivne metabolite kandidata za lijek. U prvom pristupu, koji se koristio kako bi se identificirali metaboliti, provodi se *in vitro* inkubacija i potom analiza HPLC-MS-om. U ovom slučaju je to značajna metoda kako bi se procijenio potencijal aktivnog djelovanja samog metabolita. Dobiveni rezultati takvog testa biti će kromatogram aktivnosti zbog čega se metoda naziva „Activity-Gram“. Ovom metodom se ne može kvantificirati potentnost aktivnog metabolita jer je nepoznato u kojoj je količini aktivni metabolit prisutan, već se samo može odrediti da metabolizmom ispitivane molekule kandidata nastaje aktivni metabolit koji ima potencijal aktivnog djelovanja. Potentnost djelovanja lijeka predstavlja koncentraciju pri kojoj lijek ostvaruje pola (50%) od maksimalnog mogućeg učinka. Metaboliti kojima se ovom metodom detektira farmakološka aktivnost podvrgnu se strukturnoj analizi te im se naknadno u ispitivanjima određuje potentnost djelovanja (Obach i sur., 2016.).

Druga metoda započinje biosintezom metabolita te potom kvantifikacijom pomoću NMR spektroskopije. Prednost metode je što zahtjeva vrlo male količine uzorka metabolita, oko 50 nM, dobivenih *in vitro* inkubacijom. Temelj ovog pristupa je inkubirati molekulu kandidata s ranije detektiranim enzimima koji sudjeluju u njezinom metabolizmu kako bi se dobili metaboliti koji su od interesa istraživanja. Na primjer, ukoliko se utvrdi da se molekula kandidat metabolizira flavin monooksigenazom (FMO), tada se kao *in vitro* sustav koriste mikrosomi uz dodatak koenzima NADPH i kisika. Uz pomoć HPLC odvaja se metabolit koji se želi analizirati. Zatim se određuje struktura NMR metodom. Nakon što se odredi koncentracija, uzorak metabolita poznate koncentracije se dalje koristi u farmakološkim *in vitro* ispitivanjima (Walker i sur., 2014). Rezultati dobiveni ovakvim *in vitro* ispitivanjima daju širu sliku o metabolitima u odnosu na samu identifikaciju te mogu usmjeriti daljnja *in vivo* ispitivanja.

4.7.2 Reaktivni metaboliti

Na slici 8 prikazana je shema mogućeg toksičnog djelovanja molekule kandidata ili nastalog reaktivnog metabolita.



SLIKA 8: Shema toksičnosti reaktivnih metabolita nastalih metabolizmom kandidata za lijek (Preuzeto i prilagođeno- Kenna i Thompson, 2016)

Molekula kandidat u organizmu može biti kemijski reaktivna ili nestabilna molekula koja stupajući u interakcije s makromolekulama uzrokuje toksičnost. S druge strane, molekula kandidat biotransformacijom može prijeći u reaktivni metabolit koji dalje stupa u interakciju s makromolekulama u organizmu. Reaktivni metabolit u svojoj strukturi može imati elektrofilnu skupinu koja se kovalentno veže na nukleofilna mjesta makromolekula unutar stanica kao što su dijelovi nukleinskih kiselina, lipidi ili proteini. Međutim, reaktivni metaboliti mogu i nekovalentnim interakcijama pokrenuti procese unutar stanica koji ispoljavaju toksični učinak na organizam (Attia, 2010). Budući da većina reaktivnih metabolita nastaje u jetri, ponajviše CYP enzimima, reaktivni metaboliti najčešće djeluju hepatotoksično. Mehanizam toksičnog djelovanja reaktivnih metabolita je vrlo složen te uključuje više bioloških procesa. Zbog štetnih

procesa unutar stanica, organizam pokreće procese kojim nastoji popraviti učinjenu štetu. Na primjer, hepatotoksičnost reaktivnih metabolita ovisi o ravnoteži između njihova stvaranja i detoksifikacije konjugacijom s reduciranim oblikom glutationa (Hinson i sur., 2010). Ukoliko reaktivni metabolit uzrokuje promjene u DNA (eng. deoxyribonucleic acid; DNA) unutar stanice, takav tip toksičnosti naziva se genotoksičnost. Ukoliko je genotoksičnost uzrokovana u zametnoj stanici tada jedinka nasljeđuje promijenjenu osobinu. Mutacija u somatskoj stanici najčešće rezultira pojavom karcinoma (Phillips i Arlt, 2009). Toksičnost zbog pretjerane farmakološke aktivnosti molekule javlja se u ovisnosti o dozi i trajanju izloženosti te je ponovljiva u ispitivanjima na životinjama. Primjer je toksičnost paracetamola uočena u pretkliničkim ispitivanjima zbog nastanka reaktivnog metabolita kinon imina uz enzim CYP2E1 (Ramachandran i Jaeschke, 2019). Drugi tip toksičnosti je idiosinkratska toksičnost koja je neovisna o dozi te je uočena samo kod pojedinih osoba kod primjene unutar terapijskog raspona (Utrecht i Naisbitt, 2013). Idiosinkratsku toksičnost nije moguće predvidjeti u pretkliničkim ispitivanjima te se u većini slučajeva otkrije u 3. fazi kliničkih ispitivanja. Takva vrsta toksičnosti je većinom odgovorna za povlačenje lijekova iz upotrebe usprkos registraciji, a uzrokuje ih više faktora koji svaki pojedinačno nisu dovoljno jaki da sami izazovu takav oblik reakcija (Ulrich, 2007). Primjer idiosinkratske toksičnosti je poremećaj agregacije trombocita uzrokovan antidepresivom venlafaksinom (Sarma i Horne, 2006).

4.7.3. Primjeri lijekova s reaktivnim metabolitima

U današnje vrijeme se može predvidjeti potencijal stvaranja reaktivnih metabolita i mogućih idiosinkratskih toksičnih reakcija na temelju strukturnih značajki molekule kandidata. U tablici 2 prikazani su primjeri najčešćih funkcionalnih skupina za koje je potrebno procijeniti rizik od stvaranja toksičnih reakcija. *In silico* metode molekuskog modeliranja predstavljaju dobar alat procjene potencijala stvaranja reaktivnog metabolita na temelju strukture dok se *in vitro* metodama određuje točna struktura reaktivnog metabolita, opseg metabolizma u kojem nastaju te relevantnost njihove prisutnosti u živom organizmu.

TABLICA 2: Primjeri funkcionalnih skupina s potencijalom stvaranja reaktivnih metabolita (Preuzeto i prilagođeno- Kenna i Thompson, 2016)

FUNKCIONALNA SKUPINA	REAKTIVNI METABOLIT	ENZIM
Furan	elektrofil	CYP
Tioamid	elektrofil	CYP
Hidrazin	radikal	CYP
Sulfonilurea	elektrofil	CYP
Anilin	elektrofil	CYP, peroksidaza

Najčešće se previđanje toksičnosti reaktivnih metabolita provodi *in vitro* metodom koja kao medij koristi mikrosome jetre, a temelji se na detekciji konjugata glutationa (GSH), obilježenog radioaktivnim izotopom, i potencijalnih reaktivnih metabolita masenom spektroskopijom (Takakusa i sur., 2009, Soglia i sur., 2006). Reducirani oblik glutationa, GSH, predstavlja slabi nukleofil stoga je nedostatak metode što ne može detektirati jake elektrofile kao što su na primjer imini. Za detekciju jakih elektrofila koristi se *in vitro* sustav mikrosoma jetre u kojem se provodi inkubacija s cijanidima te potom detekcija LC-MS-om. Nedostatak takvih metoda je nemogućnost pouzdane kvantifikacije, no daju zadovoljavajuće rezultate detekcije reaktivnih metabolita. U tablici 3 prikazani su neki od lijekova povučeni nakon registracije zbog toksičnog djelovanja reaktivnih metabolita. Budući da predstavljaju veliku opasnost za zdravlje, bitno je u procesu razvoja molekule kandidata predvidjeti i minimalizirati stvaranje reaktivnih metabolita.

TABLICA 3: Primjeri lijekova povučenih iz primjene zbog toksičnog djelovanja reaktivnih metabolita (Preuzeto i prilagođeno- Park i Smith, 2016)

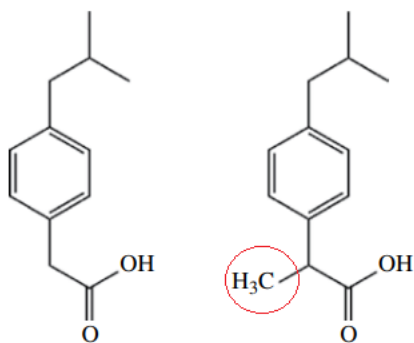
LIJEK	GODINA REGISTRACIJE	GODINA POVLAČENJA
benoksaprofen	1982	1982
bromfenak	1997	1998
nomifenzin	1984	1986
pemolin	1975	2005
remoksi prid	1990	1993
temafloksacin	1992	1992
tienilna kiselina	1979	1982
tolkapon	1998	1998
troglitazon	1997	2000
trovaflokacin	1998	1999
zomepirak	1980	1983

Halotan i izofluran

Halotan i izofluran su inhalacijski anestetici koji se metaboliziraju u aktivni metabolit trifluoroacetyl-klorid. Na primjeru navedenih lijekova uočljiv je utjecaj metabolizma koji rezultira razlikom u toksičnosti idiosinkratskih reakcija. U slučaju halotana veća je razina bioaktivacije, a time postoji i više zabilježenih slučajeva oštećenja jetre (engl. drug-induced liver injury; DILI). Razina bioaktivacije izoflurana je niža stoga je zabilježeno samo nekoliko slučajeva DILI (Kenna, 2013).

Ibuprofen i ibufenak

Ibuprofen je široko rasprostranjen nesteroidni protuupalni lijek dostupan u režimu izdavanja bez liječničkog recepta što potvrđuje njegov sigurnosni profil. Ibufenak je srodan spoj ibuprofenu koji se razlikuje u samo jednoj metilnoj skupini, no povučen je iz upotrebe zbog toksičnosti (Slika 9).



ibufenak

ibuprofen

SLIKA 9: Strukture ibufenaka i ibuprofena

Metabolizmom oba spoja nastaju acil glukuronidi i S-acil-CoA tioesteri. U slučaju ibuprofena, kovalentno povezivanje s proteinima uočeno je samo za konjugate s koenzimom A koji nastaju u vrlo maloj mjeri stoga je toksičnost uzrokovana reaktivnim metabolitima ibuprofena vrlo rijetka. U slučaju ibufenaka konjugat s CoA nastaje u većoj mjeri te češće uzrokuje toksične idiosinkratske reakcije (Darnell i sur., 2015). Acil glukuronidi ibufenaka su i mnogo reaktivniji prema proteinima u odnosu na acil-glukuronide ibuprofena. U ovom slučaju vrlo mala razlika u strukturi između dva spoja uzrokuje veliku razliku u metaboliziranju te u konačnici toksičnom djelovanju na organizam (Kenna i Thompson, 2016).

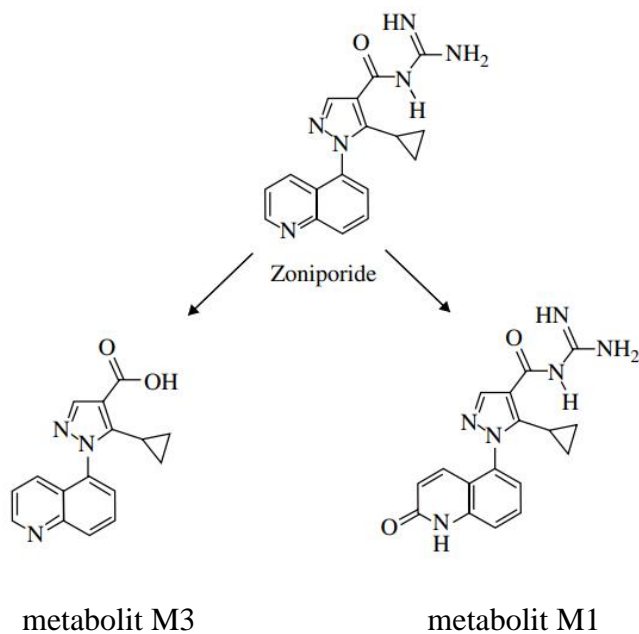
4.8. Primjeri ispitivanja metabolita različitih kandidata za lijek

Regulatorne smjernice donose jasne protokole ispitivanja sigurnosti metabolita kandidata za lijek. Međutim, u praksi se sadržaj smjernica često treba proširiti i pojedini slučaj sagledati sveobuhvatnije. Primjerice, u regulatornim smjernicama je naznačeno kako je potrebno ispitati sigurnost metabolita ukoliko predstavlja više od 10 % tvari povezane s molekulom kandidatom dok se u praksi pokazalo da zastupljenost manja od 10% ne mora značiti i sigurnost u organizmu. Na sljedećim primjerima slučajeva prikazan je tijek ispitivanja sigurnosti metabolita te kako se rješavaju problemi i dolazi do odgovora u praksi.

Zoniporid

Zoniporid je inhibitor izmjenjivača molekula natrija i vodika, NHE-1 (eng. Sodium–hydrogen antiporter 1; NHE-1), koji ima selektivnost prema meti djelovanja 150 puta veću u odnosu na ostale izoforme NHE. Primjenjuje se za smanjenje ishemijske ozljede miokarda

(Tracey i sur.,2003). Ispitivanje sigurnosti metabolita je provedeno po FDA „MIST“ smjernicama. Nakon što su identificirani glavni metaboliti molekule zoniporida u *in vitro* ispitivanjima i *in vivo* ispitivanjima na životinjama, potrebno ih je kvantificirati u životinjskoj i ljudskoj plazmi. Ukoliko je metabolit zastupljen u količini većoj od 10% doze primijenjene molekule zoniporida, potrebno je provesti toksikološka ispitivanja na životinjama. Da bi rezultati toksikoloških ispitivanja na životinjama bili relevantni za čovjeka, potrebno je provjeriti zadovoljava li izloženost ispitivanog metabolita u životinjama izloženost u čovjekovom organizmu. Za određivanje izloženosti metabolitima koristio se radioaktivni izotop ^{14}C kojim je označena molekula zoniporida. Izloženost određenom metabolitu se određivala na temelju postotka radioaktivnosti u cirkulaciji kod ljudi i pretkliničkih životinja. Od životinja su se koristili štakori i psi kojima se intravenozno davao obilježen zoniporid. Sakupljali su se urin, feces i plazma te su metaboliti identificirani i kvantificirani. Ispitivanje izloženosti metabolitima na čovjeku je provedeno na skupini od 4 mladih zdravih muških dobrovoljaca kojima se ^{14}C - zoniporid davao intravenozno infuzijom. U ljudi su također sakupljani urin, feces i plazma. U ispitivanju se primjenjivao Hamiltonov princip određivanja površine ispod krivulje (AUC) koja prikazuje ovisnost koncentracije tvari o vremenu. Uzorkovani su alikvoti plazme svakog pojedinca zasebno te je određivana koncentracija metabolita u određenim vremenskim intervalima (Hamilton i sur., 1981).



SLIKA 10: Struktura zoniporida i cirkulirajućih metabolita M1 i M3 koji predstavljaju većinu nastalih metabolita (Preuzeto- Dalvie i sur.,2016)

U uzorcima plazme 4 ispitanika, ali isto tako i životinja, određena je prosječna zastupljenost zoniporida i metabolita M1 i M3 koji predstavljaju glavne metabolite (Slika 10). Prosječna zastupljenost navedenih tvari određena je na temelju radioaktivnosti u cirkulaciji. Zoniporid je predstavljao 30% radioaktivnosti, metabolit M3 6,4%, a metabolit M1 60%. Prema smjernicama, budući da metabolit M1 čini više od 10% tvari povezane s matičnom molekulom, u ovom slučaju više od 10% određene radioaktivnosti, važno je utvrditi je li izloženost navedenom metabolitu u pretkliničkim ispitivanjima na životinjama približna izloženosti kod ljudi. Ispitivanjima je utvrđeno da je metabolit M1 prisutan u manjoj mjeri kod psa i u sličnoj koncentraciji kod štakora u odnosu na čovjeka. Izloženost pojedinom metabolitu kod ljudi i štakora uspoređivana je na temelju AUC vrijednosti tog metabolita koja se dobije umnoškom ukupne AUC vrijednosti tvari povezane s matičnim lijekom i postotka pojedinog metabolita u krvnoj plazmi. Dobiveno je da je kod ljudi AUC vrijednost metabolita M1 1755ng- ekvivalent/h dok je kod štakora 1642ng- ekvivalent/h. Veličina AUC vrijednosti u ovom ispitivanju je površina ispod krivulje koncentracija - vrijeme u kojoj je koncentracija izražena u nanogramima radioaktivnog izotopa uz pomoću kojeg se detektira metabolit. Nadalje, bitno je ispitati tjelesno opterećenje metabolitom M1. Budući da je u ispitivanjima primjena radioaktivno obilježenog zoniporida bila intravenozna, tjelesno opterećenje se

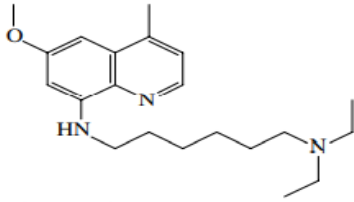
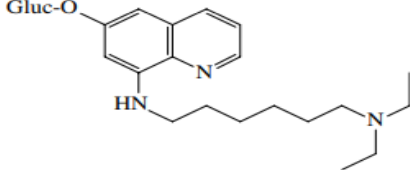
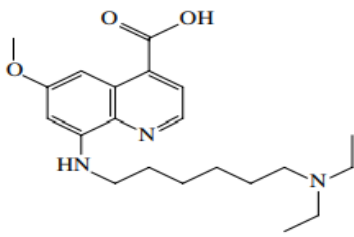
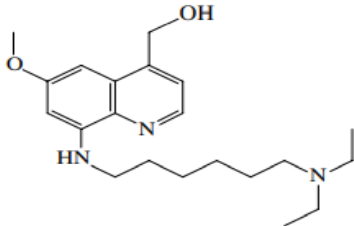
određuje na temelju količine izlučenog metabolita. Količina metabolita u urinu i fecesu računa se sljedećom formulom:

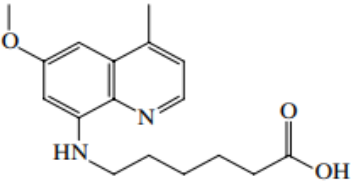
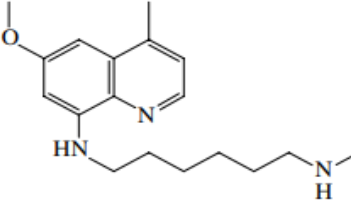
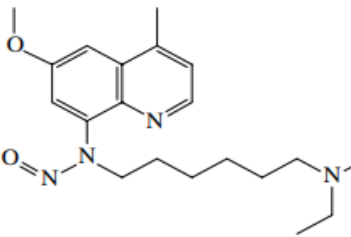
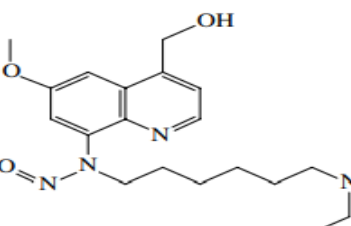
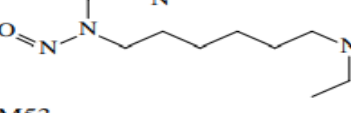
$$M1 \left(\frac{\mu g}{kg} \right) = \text{doza} \left(\frac{mg}{kg} \right) \times \%_{M1 \text{ U URINU/FECESU}}$$

U ispitivanju je dobiveno da nakon primjene doze od 1,14 mg/kg kod ljudi i 10mg/kg kod štakora tjelesno opterećenje metabolitom M1 kod čovjeka je 594 $\mu\text{g}/\text{kg}$, a kod štakora 3500 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Opterećenost organizma štakora metabolitom M1 je 5,9 puta veća nego kod čovjeka ionako je cirkulacijska izloženost metabolitu M1 kod štakora nešto niža. Zaključno, štakori su prikladna vrsta za toksikološko ispitivanje metabolita M1 te daljnje procjene sigurnosti metabolita M1 nakon ispitivanja na štakorima nisu potrebne (Dalvie i sur.,2016).

Sitamakvin

Sitamakvin (eng. Sitamaquine) je analog 8-aminokinolina dizajniran za liječenje visceralne lišmanije. Djeluje na parazit *Leishmania donovani* koji je uzročnik bolesti (Loiseau i sur.,2011). Budući da je molekula kandidata za lijek pokazala slabu genotoksičnost u *in vitro* ispitivanjima na bakterijama i stanicama sisavaca, ispitivanje sigurnosti nije moguće provesti na zdravim dobrovoljcima. Prije ispitivanja na pacijentima s lišmaniozom, provela su se *in vitro* ispitivanja na ljudskim hepatocitima i *in vivo* na životinjama u kojima su detektirana 3 glavna metabolita: M15, M17 i M18. Struktura sitamakvina i detektiranih metabolita i njihov postotak zastupljenosti u plazmi, tijekom 21 dana primjene molekule kandidata, i u urinu tijekom 10 dana primjene prikazan je na slici 11.

Struktura	plazma	urin
	21 dan	10 dana
	DRM* (%)	DRM*(%)
 <p>Sitamaquine</p>	42	8
<p>Gluc-O</p> 	2	3
<p>M5</p> 	— ^b	18
	Nije moguće kvantificirati	
<p>M12</p> 	3	12
<p>M15</p>		

	20	3
M17	11	Nije moguće kvantificirati
	17	Nije moguće kvantificirati
M18	5	25
		
M25		
	Nije moguće kvantificirati	3
M52		
	Nije moguće kvantificirati	30
M53 Other metabolites		

* DRM (eng. drug-related material; DRM) = tvar povezana s molekulom kandidatom

SLIKA 11: Struktura molekule kandidata i metabolita uz postotni DRM u plazmi i urinu (Preuzeto i prilagođeno- Bloomer i sur.,2016)

Nakon provedenih *in vitro* i *in vivo* ispitivanja na životinjama, započela su *in vivo* ispitivanja na pacijentima. Uz pomoć NMR spektroskopije, nakon izolacije, identificirani su i kvantificirani metaboliti u plazmi i urinu. U plazmi pacijenta ključni metaboliti su bili M17 s 20% ukupnog DRM-a, M18 11% DRM-a i M25 17% DRM-a. Budući da su navedeni metaboliti prisutni u količini većoj od 10% DRM-a, potrebna su daljnja ispitivanja. M17 je

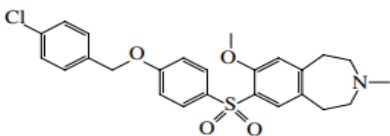
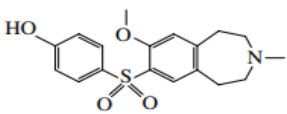
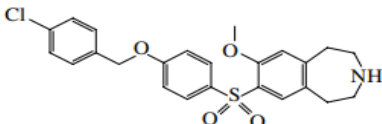
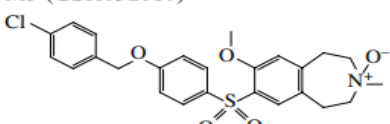
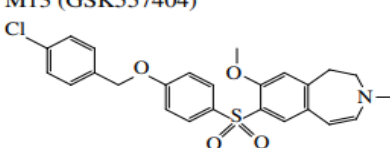
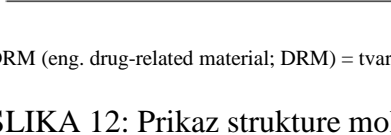
među glavnim metabolitima u plazmi štakora i psa, a M18 samo kod psa stoga je zbog odgovarajuće izloženosti moguće ispitati sigurnost navedenih metabolita na životinjama. U slučaju M25 je izloženost kod životinja manja u odnosu na ljudski organizam stoga se sigurnost nije mogla adekvatno ispitati. U slučaju metabolita M25, razmatrala se struktura koja nema toksikoforne funkcionalne skupine te klinički podaci prikupljeni na više od 400 pacijenata. Zbog prevladavanja koristi u odnosu na rizik, M25 je procijenjen kao siguran metabolit. U plazmi čovjeka je u 5% DRM-a detektiran metabolit M52. M52 je metabolit jedinstven za čovjeka i nije detektiran ni u jednom obliku prijašnjih ispitivanja. M52 je primjer metabolita prisutnog u količini manjoj od 10% DRM-a, no zbog N- nitrozamina u strukturi pokazuje genotoksično i kancerogeno djelovanje zbog čega je nužno daljnje ispitivanje sigurnosti (Brambilla i Martelli, 2007). M52 je sintetiziran te se genotoksičnost ispitivala *in vitro* i *in vivo* na životinjama. Procijenjeno je da rizik ne postoji bez obzira na strukturu (Bloomer i sur.,2016).

SB-773812

SB-773812 je molekula kandidat koja se razvijala kao antipsihotik s mehanizmom djelovanja blokiranja serotoninskih receptora 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C} i 5-HT₆ i dopaminskog receptora D₃. Molekula kandidat je pokazala učinkovitost prilikom ispitivanja na životinjskim modelima.

U *in vitro* ispitivanjima na ljudskim hepatocitima ispitan je metabolički put molekule kandidata u kojima je određeno da su glavni metaboliti M9 koji nastaje N-demetilacijom, M13 N-oksidacijom, M4 O-dealkilacijom i M19 dehidrogenacijom. Metaboliti identificirani *in vitro*, također su identificirani u *in vivo* ispitivanjima na štakorima i psima kojima se primjenjivao SB-773812 označen radioaktivnim izotopom ¹⁴C. U životinja je zabilježen dugi period eliminacije radiooznake, kod štakora 96 sati, a kod psa 312 sati.

Na ljudima su provedena dva tipa *in vivo* ispitivanja kako bi se odredili metabolički putevi i nastali metaboliti. U prvom ispitivanju u prvoj fazi kliničkih studija primjenjivana je jednokratna doza od 56 mg kandidata te se je željela ispitati podnošljivost i sigurnost. Metaboliti su identificirani u plazmi NMR i LC-MS-om. Kao glavni metaboliti identificirani su M4, M9, M13 i M19 (Slika 12).

Struktura molekule kandidata i nastalih metabolita	DRM* (%)	
	1. 56mg 0-144h	2. 16mg 0-72h
 SB-773812	50	38
 SB-773812-OH	20	11
 M4 (SB-791026)	10	12
 M9 (GSK132167)	11	7
 M13 (GSK557404)	9	8
 M19		

DRM (eng. drug-related material; DRM) = tvar povezana s molekulom kandidatom

SLIKA 12: Prikaz strukture molekule kandidata i nastalih metabolita identificiranih u ljudskoj plazmi u dva tipa kliničkih ispitivanja: 1.) jednokratna doza od 56mg, metaboliti identificirani LC-MS; 2.) jednokratna doza od 16mg obilježene s ^{14}C , metaboliti identificirani AMS

Istovremeno je provedeno i drugo *in vivo* ispitivanje, rana ADME studija u kojem je molekula kandidat označena radioaktivnim izotopom ^{14}C , a detekcija se provodila akceleratorском masenom spektrometrijom, AMS. Budući da je dugo poluvrijeme eliminacije, a samim time izloženost organizma molekuli kandidatu i nastalim metabolitima produljena, moguće je koristiti vrlo male doze radioaktivnog izotopa kako zračenje za organizam ne bi bilo preveliko. Upravo iz tog razloga je AMS odlično rješenje budući da može detektirati vrlo male količine radioaktivnih izotopa. U ADME studiji određeno je poluvrijeme eliminacije od 151

sat. Kao i u prvom tipu *in vivo* ispitivanja, glavnim metabolitima identificirani su M4, M9, M13 i M19 (Slika 12). Metaboliti M4, M9 i M13 se akumuliraju u ljudskom organizmu te su odgovorni za produljenu eliminaciju.

Sigurnost detektiranih metabolita ispitivana je dalje u *in vivo* studijama na životinjama. Za metabolit M4, M9 i M13 izloženost metabolitima u životinjama je zadovoljavajuća u usporedbi s onom u čovjeka stoga je ispitivanje sigurnosti moguće provesti na životinjama. Problem se javio kod metabolita M19 čije su razine u organizmu psa i štakora manje u odnosu na one na ljudima. Stoga, za M19 je bilo potrebno pronaći laboratorijsku životinju koja je metabolitu izložena u količini jednakoj ili većoj u odnosu na čovjeka. Ukoliko navedeni pristup ne bi uspio, drugi način je sinteza metabolita i izlaganje životinje istom (Bloomer i sur., 2016).

Razvoj i ispitivanja molekule kandidata SB-773812 su prekinuta zbog fosfolipidoze koju pokazuju molekula kandidat i metabolit M9. Fosfolipidoza uzrokovana lijekovima praćena je unutar staničnom akumulacijom fosfolipida koja remeti stanično funkcioniranje te uzrokuje staničnu smrt (Reasor i Kacew, 2001).

5. ZAKLJUČAK

MIST smjernice iz 2008. godine koje je izdala FDA odražavaju višegodišnju potrebu za regulativom u ispitivanju metabolizma i nastalih metabolita. U procesu ispitivanja molekule kandidata za lijek naglašava se potreba formiranja sveobuhvatnog profila metabolita koji obuhvaća kvantifikaciju, raspodjelu u organizmu i djelovanje bilo jednako farmakološkom djelovanju molekule kandidata ili neželjeno odnosno toksično. Poznavanje navedenih svojstava metabolita i daljnja ispitivanja istih u životinja, a potom i čovjeka, mjera su sigurnosti u budućoj primjeni. Metode i instrumenti koji se koriste uvelike su napredovali, no isto tako postoji velik prostor za napredak. Smjernice ne obuhvaćaju u potpunosti procjenu rizika nastanka i djelovanja reaktivnih metabolita koji su jedan od vodećih razloga povlačenja lijekova nakon registracije zbog idiosinkratskih toksičnih reakcija koje uzrokuju. Također, u budućnosti se očekuju nove spoznaje o poveznici odgovora imunskog sustava i nastalih metabolita. Zaključno, ispitivanje sigurnosti metabolita je vrlo kompleksno područje u farmaceutskoj industriji, znanstvenoj zajednici i regulatornim tijelima koje sveobuhvatnim profilom nastalih metabolita dobivenim u brojnim ispitivanjima doprinosi ukupnoj sigurnosti molekule kandidata kao potencijalnog budućeg lijeka u daljnjoj primjeni na čovjeku.

6. LITERATURA

Anderson S, Luffer-Atlas D, Knadler MP. Predicting circulating human metabolites: how good are we? *Chem Res Toxicol*, 2002, 22(2):243-256

Attia SM. Deleterious effects of reactive metabolites, *Oxid Med Cell Longev*, 2010, 3(4):238-53

Baillie TA, Cayen MN, Fouda H, Gerson RJ, Green JD, Grossman SJ, Klunk LJ, LeBlanc B, Perkins DG, Shipley LA. Drug metabolites in safety testing, *Toxicol Appl Pharmacol*, 2002, 182(3):188-196

Bloomer J, Beaumont C, Dear GJ, North S, Young G. The value of metabolite identification and quantification in clinical studies. Some case studies enabling early assessment of safety in humans: GlaxoSmithKline U: *Metabolite safety in drug development*. Iverson SL, Smith DA, urednici, New Jersey, John Wiley & Sons, 2016, str. 280-285

Brambilla G, Martelli A. Genotoxic and carcinogenic risk to humans of drug-nitrite interaction products. *Mutation Research*, 2007, 635: 17–52.

Certara Simcyp™ PBPK Simulator <https://www.certara.com/software/simcyp-pbpk/>, pristupljeno 29.5.2021.

Colquitt RB, Colquhoun DA, Thiele RH. In silico modelling of physiologic systems, *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*, 2011, 25(4):499-510

Dalvie DK, Obach SR, Kalgutkar AS. Dealing with reality: When is it necessary to qualify and quantify metabolites? Some case studies U: *Metabolite safety in drug development* Iverson SL, Smith DA, urednici, New Jersey, John Wiley & Sons, 2016, str. 261-265

Dalvie DK, Obach SR, Kang P, Prakash C, Loi CM, Hurst S, Nedderman A, Goulet L, Smith E, Bu HZ, Smith DA. Assessment of three human in vitro systems in the generation of major human excretory and circulating metabolites, *Chem Res Toxicol*, 2009, 22(2):357-368

Darnell, M, Breitholtz, K, Isin, EM, Jurva U, Weidolf, L. Significantly different covalent binding of oxidative metabolites, acyl glucuronides, and S-acyl CoA conjugates formed from xenobiotic carboxylic acids in human liver microsomes, *Chemical Research in Toxicology*, 2015, 28(5): 886–896

Dear GJ, Nedderman ANR. "MIST" and other metabolite guidelines in the context of industrial drug metabolism. U: Metabolite safety in drug development. Iverson SL, Smith DA, urednici, New Jersey, John Wiley & Sons, 2016, str. 17-32

Glocklin VC. General considerations for studies of the metabolism of drugs and other chemicals. Drug Metabolism Reviews, 1982, 13(6): 929–939

Graham LP. An Introduction to Medicinal Chemistry. Oxford, Oxford University Press, 2013, str. 1

Hamilton RA, Garnett WR, Kline BJ. Determination of mean valproic acid serum level by assay of a single pooled sample. Clinical Pharmacology and Therapeutics, 1981, 29:408–413

Hinson JA, Roberts DW, James LP. Mechanisms of acetaminophen-induced liver necrosis. Handbook of Experimental Pharmacology, 2010, 196: str. 369-405

Hughes JP, Rees S, Kalindjian SB, Philpott KL. Principles of early drug discovery, Br J Pharmacol, 2011, 162(6):1239-1249

Jamei M, Dickinson GL, Rostami-Hodjegan A. A framework for assessing inter-individual variability in pharmacokinetics using virtual human populations and integrating general knowledge of physical chemistry, biology, anatomy, physiology and genetics: A tale of 'bottom-up' vs 'top-down' recognition of covariates, Drug Metab. Pharmacokinet, 2009., 24(1): 53–75

Jaroch K, Jaroch A, Bojko B. Cell cultures in drug discovery and development: The need of reliable in vitro-in vivo extrapolation for pharmacodynamics and pharmacokinetics assessment. J Pharm Biomed Anal, 2018, 147:297-312

Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. Temeljna i klinička farmakologija, Zagreb, Školska knjiga, 2011, str. 38, 54, 67-73

Kenna GJ. Mechanism, Pathology, and Clinical Presentation of Hepatotoxicity of Anesthetic Agents. U: Drug-Induced Liver Disease. Kaplowitz N, DeLeve L, urednici, Waltham, Academic Press, 2013, str. 403-422

Kenna GJ, Thompson RA. Integrated Reactive Metabolite Strategies. U: Metabolite safety in drug development. Iverson SL, Smith DA, urednici, New Jersey, John Wiley & Sons, 2016, str. 111-129

Kitamura S, Sugihara K. Current status of prediction of drug disposition and toxicity in humans using chimeric mice with humanized liver. *Xenobiotica*, 2014, 4(4): 123–134

Knights KM, Stresser DM, Miners JO, Crespi CL. In Vitro Drug Metabolism Using Liver Microsomes. *Curr Protoc Pharmacol*, 2016, 74:7.8.1-7.8.24

Leblans P, Vandenbroucke D, Willems P. Storage Phosphors for Medical Imaging. *Materials (Basel)*, 2011, 4(6):1034-1086

Loiseau PM, Cojean S, Schrével J. Sitamaquine as a putative antileishmanial drug candidate: from the mechanism of action to the risk of drug resistance, *Parasite*, 2011, 18:115-119

McIlhenny HM. Metabolism of [¹⁴C] verapamil. *J. Med. Chem*, 1971, 14:1178–1184

Obach SR, Kalgutkar AS, Dalvie DK. In Vitro Methods for Evaluation of Drug Metabolism: Identification of Active and Inactive Metabolites and the Enzymes that Generate them. . U: Metabolite safety in drug development. Iverson SL, Smith DA, urednici, New Jersey, John Wiley & Sons, 2016, str. 87-108

Park KB, Smith DA. Mist and the future. U: Metabolite safety in drug development Iverson SL, Smith DA, urednici, New Jersey, John Wiley & Sons, 2016, str. 311

Phillips DH., Arlt VM. Genotoxicity: damage to DNA and its consequences. *EXS*, 2009, 99:87-110

Pine SH. Organska kemija. Zagreb, Školska knjiga, 1994, str. 1065-1066, 1120

Prueksaritanont T, Lin JH, Baillie TA. Complicating factors in safety testing of drug metabolites: kinetic differences between generated and preformed metabolites. *Toxicol. Appl. Pharmacol*, 2006, 217(2):143–152

Ramachandrana A, Jaeschkea H. Acetaminophen Hepatotoxicity. *Semin Liver Dis*, 2019, 39(2): 221–234

Reasor MJ, Kacew S. Drug-induced phospholipidosis: are there functional consequences? *Exp. Biol. Med*, 2001, 226: 825

Rendić S, Medić- Šarić M. Metabolizam lijekova i odabranih ksenobiotika. Zagreb, Medicinska naklada, 2013, str. 3-7,

Roy H, Nandi S. In-Silico Modeling in Drug Metabolism and Interaction: Current Strategies of Lead Discovery. *Curr Pharm Des*, 2019, 25(31):3292-3305

Sarma A, McDonald K. Venlafaxine-induced ecchymoses and impaired platelet aggregation. *European Journal of Haematology*, 2006, 77(6):533-537

Smith DA, Iverson SL. Introduction: History of Metabolite Safety in drug development. U: Metabolite safety in drug development. Iverson SL, Smith DA. , urednici, New Jersey, John Wiley & Sons, 2016, str. 1-4

Soglia JR, Contillo LG, Kalgutkar AS, Zhao S, Hop C, Boyd JG, Cole MJ. A semiquantitative method for the determination of reactive metabolite conjugate levels in vitro utilizing liquid chromatography-tandem mass spectrometry and novel quaternary ammonium glutathione analogues. *Chemical Research in Toxicology*, 2006, 19(3):480-490

Takakusa H, Masumoto H, Makino C, Okazaki O, Sudo K. Quantitative assessment of reactive metabolite formation using 35S-labeled glutathione. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 2009, 24(1): 100–107

Tracey RW, Allen MC, Frazier DE, Fossa AA, Johnson CG, Marala RB, Knight DR, Guzman-Perez A. Zoniporide: a potent and selective inhibitor of the human sodium-hydrogen exchanger isoform 1 (NHE-1), *Cardiovascular Drug Reviews*, 2003, 21:17–32

Utrecht J, Naisbitt DJ. Idiosyncratic adverse drug reactions: current concepts, *Pharmacological Reviews*, 2013, 65(2): 779–808

Ulrich RG. Idiosyncratic toxicity: a convergence of risk factors- *Annual Review of Medicine*, 2007, 58:17–34

Walker GS, Obach RS, Bauman JN, Ryder TF, Smith EB, Spracklin DK. Biosynthesis of drug metabolites and quantitation using NMR spectroscopy for use in pharmacologic and drug metabolism studies. *Drug Metab Dispos*, 2014, 42(10):1627-1639

Weidolf L, Wilson ID. Understanding Drug Metabolism in Humans: In Vivo. U: Metabolite safety in drug development. Iverson SL, Smith DA, urednici, New Jersey, John Wiley & Sons, 2016, str. 141-168

Woehler: The Birth of Metabolism Research, <https://www.issx.org/page/Woehler> , pristupljeno: 20.4.2021.

7. SAŽETAK

Razvoj lijeka obuhvaća niz ispitivanja molekula kandidata od kojih će eventualno jedna, ukoliko se zadovolje zahtjevi djelotvornosti i sigurnosti, proći registraciju i nakon niza godina primjenjivati se u praksi među pacijentima. Metabolizam kandidata za lijek može utjecati na njegov farmakološki ili toksični učinak, stoga se provodi niz ispitivanja kako bi se potvrdila sigurnost metabolita. FDA-MIST smjernice definiraju proceduru ispitivanja nastalih metabolita te nalažu da se ispituje sigurnost glavnih metabolita prisutnih u jednakoj ili većoj količini od 10% spojeva prisutnih u organizmu povezanih s molekulom kandidatom. Međutim, u praksi postoji niz izuzetaka u kojima metaboliti u količini i manjoj od 10% mogu biti potencijalno toksični. Svojstva metabolita u procjeni sigurnosti molekule kandidata za lijek ispituje se različitim metodama *in vitro*, *in silico* i *in vivo*, a njihov razvoj ovisi o napretku različitih tehnika.

SUMMARY

The development of the drug encompasses a series of testing the candidate molecules, out of which perhaps one will, if the conditions of efficiency and safety are satisfied, pass the registration after many years, and be used in practice on patients. Metabolism of drug candidates can greatly influence pharmacological or toxic effect which is why a series of testing is done to confirm their safety. FDA-MIST guidelines determine the testing procedure of the formed metabolites and demand safety testing of the main metabolites present in an equal or larger quantity than 10% of the compounds present in the organism associated with the candidate molecule. However, in practice, there are numerous exceptions in which metabolites whose quantity amounts to less than 10% can be potentially toxic. The properties of metabolites in safety assessment of drug candidate molecules are examined by various methods in vitro, in silico and in vivo and their development depends on the progress of various techniques.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za farmaceutsku kemiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Metaboliti u procjeni sigurnosti molekule kandidata za lijek

Vida Špoljar

SAŽETAK

Razvoj lijeka obuhvaća niz ispitivanja molekula kandidata od kojih će eventualno jedna, ukoliko se zadovolje zahtjevi djelotvornosti i sigurnosti, proći registraciju i nakon niza godina primjenjivati se u praksi među pacijentima. Metabolizam kandidata za lijek može utjecati na njegov farmakološki ili toksični učinak, stoga se provodi niz ispitivanja kako bi se potvrdila sigurnost metabolita. FDA-MIST smjernice definiraju proceduru ispitivanja nastalih metabolita te nalažu da se ispituje sigurnost glavnih metabolita prisutnih u jednakoj ili većoj količini od 10% spojeva prisutnih u organizmu povezanih s molekulom kandidatom. Međutim, u praksi postoji niz izuzetaka u kojima metaboliti u količini i manjoj od 10% mogu biti potencijalno toksični. Svojstva metabolita u procjeni sigurnosti molekule kandidata za lijek ispituje se različitim metodama *in vitro*, *in silico* i *in vivo*, a njihov razvoj ovisi o napretku različitih tehnika.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 45 stranica, 12 grafičkih prikaza, 3 tablice i 44 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: metaboliti, ispitivanje sigurnosti, molekula kandidat

Mentor: **Dr. sc. Monika Barbarić**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Monika Barbarić**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Ivana Perković, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Miranda Sertić, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: srpanj, 2021.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Medicinal Chemistry
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Metabolites in safety assessment of drug candidates

Vida Špoljar

SUMMARY

The development of the drug encompasses a series of testing the candidate molecules, out of which perhaps one will, if the conditions of efficiency and safety are satisfied, pass the registration after many years, and be used in practice on patients. Metabolism of drug candidates can greatly influence pharmacological or toxic effect which is why a series of testing is done to confirm their safety. FDA-MIST guidelines determine the testing procedure of the formed metabolites and demand safety testing of the main metabolites present in an equal or larger quantity than 10% of the compounds present in the organism associated with the candidate molecule. However, in practice, there are numerous exceptions in which metabolites whose quantity amounts to less than 10% can be potentially toxic. The properties of metabolites in safety assessment of drug candidate molecules are examined by various methods in vitro, in silico and in vivo and their development depends on the progress of various techniques.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 45 pages, 12 figures, 3 tables and 44 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Metabolites, safety assessment, drug candidate

Mentor: **Monika Barbarić, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Monika Barbarić, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Ivana Perković, Ph.D. *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Miranda Sertić, Ph.D. *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July, 2021.