

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ

Державний експертний центр

**ДОСЛІДЖЕННЯ IN VITRO ВЗАЄМОДІЇ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ,
ОПОСЕРЕДКОВАНОЇ ІЗОФЕРМЕНТАМИ ЦИТОХРОМУ P450**

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Київ – 2023

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ

Державний експертний центр

Схвалено на засіданні

науково-експертної ради

ДП «ДЕЦ МОЗ України»

(протокол №_19_ від 26.10.2023 р.)

**ДОСЛІДЖЕННЯ IN VITRO ВЗАЄМОДІЇ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ,
ОПОСЕРЕДКОВАНОЇ ІЗОФЕРМЕНТАМИ ЦИТОХРОМУ P450**

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Київ – 2023

Автори

Головенко Микола Якович, академік НАМН України, доктор біологічних наук, професор

Бабенко Михайло Миколайович, кандидат фармацевтичних наук

Ларіонов Віталій Борисович, доктор біологічних наук, старший науковий співробітник

Жукова Надія Олександрівна, кандидат фармацевтичних наук

Ткаченко Євгенія Василівна, кандидат фармацевтичних наук

Валіводзь Ірина Петрівна, кандидат біологічних наук

Рецензенти:

Кресюн Валентин Йосипович, академік НАМН України, доктор медичних наук, професор

Бухтіарова Тетяна Анатоліївна, член –кор. НАМН України, доктор медичних наук, старший науковий співробітник

Список скорочень

ВЛЗ: взаємодія лікарських засобів

ДМСО: диметилсульфоксид

МПК: метаболітно-проміжний комплекс ферментів СYP

ЛЗ – лікарський засіб

Фк/Фд: фармакокінетичний/ фармакодинамічний зв'язок для субстратних кінцевих точок

ШКТ: шлунково-кишковий тракт

AUC: площа під фармакокінетичною кривою

С_{max}: максимальна концентрація сполуки в плазмі

С_{min}: мінімальна концентрація сполуки в плазмі

СYP: цитохром Р-450

СYPFe²⁺: відновлена форма ферменту

СYPFe³⁺: окислена форма ферменту

ЕС₅₀: концентрація, що викликає половину максимального ефекту

Е: фермент

ЕS: фермент-субстратний комплекс

f_{u mic} : фракція незв'язаного препарату з мікросомами

I: інгібітор

IC₅₀: напівмаксимальна інгібуюча концентрація

I_{gut}: концентрація взаємодіючого препарату в кишковому просвіті, розрахована як доза/250 мл

I_{max,u}: максимальна незв'язана концентрація лікарського засобу, що взаємодіє, у рівноважному стані.

k_{deg}: константа швидкості розпаду ферментів першого порядку

KI: концентрація інгібітора, яка дає половину максимальної швидкості інактивації.

K_i: константа гальмування ферменту сполукою

k_{inact}: максимальна швидкість інактивації СYP при насиченій концентрації інгібітора

K_{i,u}: константа незв'язаного інгібування, визначеної *in vitro*.

K_m: константа Міхаеліса

k_{obs}: спостережувана константа швидкості першого порядку інактивації

МВІ механізм орієнтована інактивація (Mechanism-based inactivation)

NADPH: нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат (відновлена форма)

РВРК: фізіологічно орієнтована фармакокінетика

РХR: прегнан-Х-рецептори

R: відношення AUC за наявності та відсутності інгібіторів, передбачене базовими моделями

S: субстрат ферменту

S9: супернатант після 9000 g центрифугування

TDI: Залежне від часу інгібування (time-dependent inhibition)

V_{max} : максимальна швидкість ферментативної реакції

ЗМІСТ

Список скорочень

1 ВСТУП

1.1 Мета

1.2 Правова база та відповідні рекомендації.

1.3. Сфера застосування.

2. Класифікація біохімічних механізмів інгібування препаратами активностей ізоферментів СYP.

2.1. Індукція.

2.2. Інгібування ізоферментів СYP.

2.3.Зворотне (Reversible) гальмування.

2.4.Інгібування на основі механізму орієнтованої інактивації (Mechanism-based inactivation, MBI).

2.5.Квазінезворотне гальмування.

2.6.Незворотна інактивація СYP.

2.7. Залежне від часу інгібування (Time-dependent CYP inhibition, TDI).

2.8.Зв'язування інгібіторів з білками мікросомної мембрани.

3. Загальні підходи щодо вибору дизайну досліджень.

3.1. Фенотипування реакцій ізоферментів СYP.

3.2. Маркерні реакції *in vitro* для специфічних ферментів.

3.3. Вибір тестової системи.

3.4.Застосування специфічних інгібіторів.

4.Аналіз та інтерпретація даних.

4.1. Аналітичні методи.

4.2. Визначення кінетичних параметрів в умовах TDI.

4.2.1. Визначення IC_{50} , K_i , K_{inact} та $[I]/K_i$.

4.2.2.Прогнозування ризику взаємодії лікарських засобів.

5.Загальні висновки щодо інгібуючого потенціалу нового лікарського засобу, отриманого в досліджах *in vitro*.

6. Рекомендації щодо дослідження ВЛЗ в організмі людини.

6.1. Шлях введення.

6.2. Вибір дози.

6.4. Кінцеві точки дослідження.

6.4.1. Фармакокінетичні кінцеві точки.

6.4.2. Фармакодинамічні кінцеві точки.

6.4.3. Розмір вибірки та статистична обробка.

6.4.4. Маркування препаратів щодо ВЛЗ.

1 ВСТУП

Взаємодія лікарських засобів (ВЛЗ) є процесом, у якому одночасне застосування двох або більше препаратів змінює фармакологічну дію кожного з них. З терапевтичної точки зору розрізняють клінічно доцільні (корисні) ВЛЗ та недоцільні (шкідливі). При корисних - відзначається посилення терапевтичних ефектів (за винятком надмірної дії ліків) та/або нівелювання побічних реакцій. У медичній практиці дуже часто для лікування одного захворювання застосовують комбінації препаратів із різними механізмами дії, що дозволяє досягти належного лікувального ефекту при призначенні невисоких доз окремих препаратів та, одночасно зменшити ризики розвитку небажаних реакцій [1]. Широко застосовується цей принцип при лікуванні артеріальної гіпертензії, серцевої недостатності, бронхіальної астми тощо.

Клінічно недоцільне ВЛЗ характеризується ослабленням основного терапевтичного впливу (часто це сприймається як неефективність), появою несподіваних ефектів та/або збільшенням ризику розвитку побічних дій. Цей тип взаємодії безпосередньо пов'язують із підвищеним ризиком розвитку небажаних, зокрема серйозних побічних реакцій і є безпосередньою причиною розвитку від 16,6 до 59,1% несприятливих ефектів терапії. У найближчому майбутньому прогнозується збільшення таких показників, що зумовлено наступними причинами: а) населення у світі старіє, збільшується частка літніх хворих, які мають декілька супутніх захворювань, що передбачає одночасне призначення різних груп препаратів. б) збільшується практика надання спеціалізованої медичної допомоги, і кожний спеціаліст, призначаючи лікарські засоби не завжди оцінює загальний обсяг терапії. в) постійно збільшується кількість препаратів, які пацієнти купують в аптеках самостійно – така практика самолікування суттєво підвищує ризики несприятливої ВЛЗ.

У клінічній фармакології ВЛЗ поділяють на: фармацевтичну, фармакодинамічну та фармакокінетичну. Фармацевтична взаємодія відбувається поза організмом хворого та обумовлена фізико-хімічними реакціями. Можливість фізичної чи хімічної взаємодії сприяє тому, що значна

частина препаратів є несумісними і їх одночасний прийом веде до інактивації одного, а іноді і усіх компонентів.

При фармакодинамічній взаємодії один препарат впливає на реалізацію фармакологічного ефекту іншого. Виділяють пряму та непрямую фармакодинамічну взаємодію. У прямій фармакодинамічній взаємодії беруть участь ЛЗ зі схожими механізмами дії і відбувається вона на рівні рецепторів, медіаторів або ефекторних органів. При непрямій фармакодинамічній взаємодії препарати мають різні механізми дії та незалежно впливають на різні органи та тканини, що утворюють частину однієї і тієї ж фізіологічної системи.

При фармакокінетичній взаємодії під впливом одного ЛЗ змінюється концентрація в крові іншого ЛЗ та/або його активного метаболіту. Вона може відбуватися на всіх етапах транспортування ліків в організмі (всмоктуванні, розподілі, метаболізмі та нирковій екскреції). Характерним для цього виду взаємодії є первісна зміна концентрації препарату в крові, що в результаті призводить до зміни його ефекту.

Більшість клінічно значущих фармакокінетичних взаємодій відбувається на етапі метаболізму лікарських засобів у печінці, що каталізується відповідними мікросомними ферментами, що містять цитохром Р-450 (СYP). Основним результатом такої трансформації є інактивація ЛЗ та виведення їх з організму (у вигляді водорозчинних метаболітів через нирки або у вигляді кон'югатів із жовчю через ШКТ). Значно рідше відбувається підвищення фармакологічної активності препарату у результаті печінкового метаболізму, наприклад, при утворенні активних метаболітів або у разі призначення проліків. Активність СYP може змінюватися під впливом препаратів. Ті препарати, що підвищують активність ферментів, називають індукторами, і вони зазвичай зменшують ефективність взаємодіючих препаратів. Інгібітори печінкового метаболізму, зменшуючи активність печінкових ферментів, підвищують ризики розвитку токсичних реакцій з боку взаємодіючих препаратів.

Отже, з поширеністю поліпрагмазії, [2] ці взаємодії стали значно частішими, що провокує виникнення серйозних побічних ефектів та поширення захворюваності і навіть смертності. Тестування у клініці усіх комбінацій взаємодії між новими препаратами з уже відомими, або навпаки, є неможливим, так як цей процес потребує значної кількості часу та матеріальних витрат. Тому дослідження *in vitro* стали важливими інструментом вивчення молекулярних механізмів ВЛЗ з метою вибору сполук з безпечним або контрольованим профілем взаємодії лікарських засобів, а також для того, щоб допомогти в майбутньому ефективній розробці та оптимізації взаємодії лікарських засобів під час клінічних досліджень.

Проблема ВЛЗ на етапі метаболізму вивчається на рівні ізоферментів CYP, серед яких найбільш важливими та добре вивченими є: CYP1A2, CYP2B6, CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1, CYP3A4. Для кожного з них описано структуру та фізико-хімічні властивості субстратів, інгібіторів та індукторів [3]. Знання цієї інформації дозволяє сьогодні більш точно прогнозувати результати взаємодії на етапі метаболізму. При цьому слід враховувати, що ізоферменти CYP можуть мати перехресну специфічність, щодо субстратів, інгібіторів та індукторів.

1.1 Мета

В розроблених Методичних рекомендаціях представлено підходи та експериментальні методи, які є необхідними для оцінки потенціалу фармакокінетичної взаємодії між новими лікарськими засобами та ЛЗ, які вже представлено на ринку. Потенціал ВЛЗ, зазвичай, досліджують *in vitro* і, якщо потрібно у подальшому, визначають *in vivo* і використовуються для прогнозування цих процесів на основі задіяних механізмів. Рекомендації розроблено на основі клінічної значущості взаємодій та можливості коригування дози або моніторингу лікування. Методичні рекомендації відповідають настанові [4] і у них зроблено акцент на опис міжнародно визнаних принципів та підходів до проведення окремих досліджень *in vitro* в

стратегії розробки нових лікарських препаратів. Окрім того передбачається, що представлені в рекомендаціях положення будуть сприяти експертизі досліджень за рахунок забезпечення широкого розуміння загальних принципів, загальних підходів та визначення відповідних термінів.

Оцінка потенціалу ВЛЗ досліджуваного нового препарату складається із трьох основних напрямків: а) визначення основних шляхів виведення препарату; б) оцінки внеску ферментів і транспортерів у розподіл препарату; в) характеристики впливу препарату на ферменти та транспортери. Ця оцінка часто починається з експериментів *in vitro* для виявлення потенційних чинників, що впливають на розподіл в організмі ліків, щоб з'ясувати потенційні механізми ВЛЗ та отримати кінетичні параметри для використання в подальших дослідженнях. Результати експериментів *in vitro*, разом із клінічними фармакокінетичними даними, надають інформацію про механізми, що можуть свідчити про необхідність правильного дизайну майбутніх клінічних досліджень.

Виходячи з того, що рекомендації вперше представлено в Україні і більшість питань, які розглядаються в них, мають свою наукову специфіку та характерні терміни, тому зазначене викладено нами у першій частині для подальшого розуміння матеріалу. З цією метою було використано наступну оглядову інформацію [5-8]. Безперечно, рекомендації можуть періодично оновлюватися в міру розвитку наукової галузі ВЛЗ.

1.2 Правова база та відповідні рекомендації.

ВЛЗ є поширеною проблемою під час лікування і призводить до великої кількості госпіталізацій у результаті важливих з медичної точки зору, іноді серйозних або навіть смертельних побічних явищ. Можливість ВЛЗ враховується при оцінці співвідношення користь/ризик лікарського засобу і може негативно вплинути на цей баланс через збільшення частоти побічних явищ або зниження ефективності. У цих Методичних рекомендаціях викладено комплексний та систематичний підхід до оцінки потенціалу ВЛЗ

під час розробки препарату та запропоновано інформацію для лікаря, яку слід враховувати під час клінічних випробувань та подальшого використання. Першу рекомендацію щодо ВЛЗ прийнято Комітетом з лікарських засобів людини (Committee for Human Medicinal Products, CHMP) у 1997 році. Протягом останніх 25 років досягнуто значного наукового прогресу, тому сьогодні клінічно значущі фармакокінетичні взаємодії лікарських засобів можна передбачити на основі обмеженої кількості добре розроблених, механістично заснованих досліджень *in vitro*.

Основною настановою ЄС є «Guideline on the investigation of drug interactions CPMP/EWP/560/95/Rev. 1 Corr. 2**», що вміщує основні положення, які удосконалювались протягом останніх років:

- Guideline on the role of pharmacokinetics in the development of medicinal products in the paediatric population (EMA/CHMP/EWP/147013/2004)
- Guideline on the evaluation of the pharmacokinetics of medicinal products in patients with impaired hepatic function (CPMP/EWP/2339/02)
- Note for guidance on the evaluation of the pharmacokinetics of medicinal products in patients with impaired renal function (CHMP/EWP/225/02)
- A guideline on summary of product characteristics (SmPC) September 2009 (Eudralex vol 2C)
- Guideline on reporting the results of population pharmacokinetic analyses (EMA/CHMP/EWP/185990/2006)
- Guideline on the use of pharmacogenetic methodologies in the pharmacokinetic evaluation of medicinal products. (EMA/CHMP/37646/2009)
- Guideline on the clinical investigation of the pharmacokinetics of therapeutic proteins (EMA/CHMP/89249/2004).
- Note for guidance on Modified Release Oral and Transdermal Dosage Forms: Section 2 (Pharmacokinetic and Clinical Evaluation) (CPMP/EWP/280/96)
- Note for guidance on nonclinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals ICH M3, CPMP/ICH/286/95

- Note for Guidance on General Considerations for Clinical Trials (ICH E8, CPMP/ICH/291/95) Guideline on the investigation of drug interactions CPMP/EWP/560/95/Rev. 1 Corr. 2** Page 6/59

- Note for Guidance on Guideline for Good Clinical Practice (ICH E6, CPMP/ICH/135/95)

- Structure and Contents on Clinical Study Reports (ICH E3, CPMP/ICH/137/95).

На теперішні день регуляторні органи ряду країн світу, такі як Управління з контролю за харчовими продуктами та лікарськими засобами США (FDA, food and drug administration), Європейська агенція з лікарських засобів (EMA, European medicines agency) та Агенція лікарських засобів та засобів медичного призначення Японії (PMDA, Pharmaceuticals and medical devices agency) схвалили використання досліджень метаболізму *in vitro* для оцінки потенціалу ВЛЗ нових хімічних речовин, які планують до реєстрації. Протягом останніх років науковий прогрес у цій галузі був швидким, завдяки складним моделям *in vitro* та програмам прогнозування *in silico*. Щоб відобразити цей науковий прогрес, FDA, EMA та PMDA випустили оновлені проекти керівництв/інструкцій[4, 9, 10] у яких викладено перелік досліджень *in vitro* необхідних для інтерпретації ВЛЗ. Однак, зазначені керівництва не наполягають на виконанні усіх експериментальних випробувань і вітають використання різноманітних методологічних підходів, за умови, що вони базуються на добре перевірених і науково обґрунтованих моделях. Основною зміною останніх рекомендацій FDA та PMDA, які відповідають EMA, є пропозиція використовувати тільки незв'язані концентрації досліджуваних препаратів, а не загальну кількість для розрахунку граничних значень R у ВЛЗ. Ця зміна полегшує подання нормативних документів та забезпечує максимальну гнучкість у використанні методів під час оцінки ВЛЗ. Рекомендується оцінювати інгібування ферментів СУР за допомогою методів *in vitro*, і пропонують однотипний дизайн дослідження. Зокрема, рекомендовано групу хімічних субстратів та інгібіторів, які є селективними

для ізоформ СУР (неодмінно СУР1А2, 2В6, 2С8, 2С9, 2С19, 2D6 та 3А4). Серед показників інгібування запропоновано визначати константу гальмування, відому як K_i для зворотних інгібіторів та відношення $K_i/kinact$ (константа інгібування та максимальна швидкість інактивації) для інгібіторів на основі механізму орієнтованої інактивації (МВІ). Регуляторні органи також рекомендують використовувати той самий підхід для оцінки залежного від часу інгібування (time-dependent inhibition, TDI), що стає дедалі важливішим компонентом тестування ВЛЗ. Показник TDI використовується як маркер потенційного гальмування на основі МВІ і це явище викликає більше занепокоєння, ніж зворотне інгібування, оскільки МВІ у більшості випадків є незворотним. Тому інгібуючий ефект МВІ зазвичай є більш тривалим, ніж у зворотних інгібіторів, оскільки організм повинен синтезувати додаткову кількість білка СУР, для подолання інгібування. Усі питання стосовно вивчення інгібування СУР препаратами повністю узгоджено між усіма трьома агентствами, і всі вони пропонують використовувати співвідношення внутрішнього кліренсу метаболізуючого ферменту за відсутності та присутності інгібітору для визначенням R.

1.3. Сфера застосування

Сфера дії рекомендацій полягає в тому, щоб надати рекомендації щодо оцінки можливого потенціалу ВЛЗ та як перенести отримані результати у відповідні побажання щодо лікування. Такі питання як взаємодія препаратів з терапевтичними білками (біомішенями), фармацевтична взаємодія ліків та вплив препаратів на клінічні лабораторні тести, в методичних рекомендаціях не обговорюються.

Методичні рекомендації, в цілому, зосереджені на підходах *in vitro* при оцінці потенціалу взаємодії між досліджуваними препаратами, виходячи з їх можливості інгібувати (гальмувати) активність СУР. Окрім того, рекомендації містять міркування щодо вибору експериментальних систем *in vitro* та умов проведення експерименту і пояснення щодо стратегій використання

відповідних фармакокінетичних моделей для прогнозування взаємодії препаратів.

Сфера застосування забезпечується наступними науковими положеннями:

- адекватною оцінкою безпеки та ефективності препарату, яка базується на профілі його метаболізму та внеску процесу в загальне виведення.

- Дослідження метаболічної взаємодії між лікарськими засобами дає можливість прогнозувати наскільки досліджуваний агент впливає на метаболічне виведення ліків які вже існують на ринку і, навпаки, чи препарати на ринку можуть впливати на метаболічне виведення нового препарату.

- Навіть препарати, які істотно не піддаються метаболізму, можуть мати важливий вплив на метаболізм інших препаратів. З цієї причини досліджуються метаболічні взаємодії між лікарськими засобами, навіть тоді коли метаболізм досліджуваної сполуки не впливає на екскрецію.

- У деяких випадках метаболічні дослідження ВЛЗ не можуть бути інформативними, якщо метаболіти та пролікарські засоби не ідентифіковані та не описано їх фармакологічні властивості.

- Конкретна мета досліджень метаболічної взаємодії між лікарськими засобами полягає в тому, щоб визначити, чи є взаємодія достатньо значною, щоб коригувати дози самого препарату або препаратів, з якими він може бути використаний, чи вимагатиме взаємодія додаткового терапевтичного моніторингу.

- Концентрації вихідного препарату в крові або плазмі та/або його активних метаболітів (системна експозиція) можуть забезпечити важливий зв'язок між дозою препарату (експозицією) та бажаними та/або небажаними ефектами препарату. З цієї причини, розробка чутливих і специфічних методів аналізу лікарського засобу та його ключових метаболітів має вирішальне значення для вивчення процесу метаболізму і взаємодії між препаратами.

- Для препаратів пресистемний або системний кліренс яких відбувається головним чином шляхом метаболізму є важливим джерелом міжсуб'єктної та внутрішньосуб'єктної варіабельності.

- Вплив досліджуваного препарату на метаболізм інших ліків і вплив інших ліків на метаболізм досліджуваного препарату слід визначати на відносно ранніх стадіях розробки ліків, щоб клінічні наслідки взаємодій можна було якомога повніше оцінити в наступних клінічних дослідженнях.

2. Класифікація біохімічних механізмів інгібування препаратами активностей ізоферментів CYP.

Основними механізмами клінічно значущих ВЛЗ є індукція та інгібування ізоферментів CYP. Поряд із цими термінами в науковій літературі та відповідних настановах [4, 9, 10] зустрічаються і інші поняття, які стосуються проблем ВЛЗ. Сюди слід віднести оборотне та необоротне інгібування, квазінезворотне гальмування активностей CYP, залежне від часу інгібування, інгібування на основі механізму орієнтованої інактивації. Усі вони мають відповідні біохімічні характеристики, які використовуються для проведення необхідних досліджень ВЛЗ залежних від ізоформ CYP.

2.1. Індукція.

Ефект індукції полягає в простому збільшенні кількості присутнього CYP в клітинах людини і прискоренні окислення та кліренсу лікарського засобу. На відміну від інгібування CYP, яке є майже негайною реакцією, індукція CYP є повільним регуляторним процесом, який може знижувати концентрацію препарату в плазмі та змінити його ефективність залежно від часу. Проте метаболіти, що утворюються під час біотрансформації, можуть бути хімічно активними, тому індукція ферментів часом призводить до підвищення токсичності препаратів. Передбачити час індукції ферменту досить проблематично так як практично невідомо період напіввиведення препарату та оборот ферменту, які і визначають час індукції. Ускладнюючим чинником є швидкість індукції, яка залежить від часу, необхідного для розпаду

ферменту та синтезу нового, оскільки гени CYP активуються за участю ядерних рецепторів PXR (прегнан-Х-рецептори), які під дією ліганду (препарату), як правило, або транслокуються із цитоплазми в ядро, або активуються безпосередньо у ядрі, де вони утворюють гетеродімери зі своїми ядерними партнерами та взаємодіють із генами-мішенями. Звідси вивчення індукції CYP *in vitro* є мало інформативним для висновків щодо ВЛЗ.

2.2. Інгібування ізоферментів CYP

Найбільш частим механізмом клінічно значущих ВЛЗ є пригнічення ізоферментів CYP. При цьому спостерігається зниження метаболізму комплексу препарат-субстрат інгібованого ізоферменту, що призводить до збільшення концентрації даної сполуки у плазмі та її токсичної дії [11]. Процес зниження активності CYP внаслідок безпосередньої його взаємодії з лікарським засобом починається з першої дози інгібітору, а початок і кінець інгібування корелюють з періодом напіввиведення залучених препаратів.

Механізми інгібування CYP можна розділити на дві окремі категорії: а) зворотне пригнічення та б) механізм - орієнтована інактивація (Mechanism-based inactivation, MBI), яку також називають суїцидальним інгібуванням, залежним від часу експозиції (TDI). Як правило, і з точки зору механіки зворотне інгібування виникає в результаті конкуренції в активному центрі CYP, тоді як MBI має місце після утворення реакційноздатних метаболітів.

2.3.Зворотне (Reversible) гальмування

Зворотне гальмування припускає швидку асоціацію та дисоціацію між лікарськими засобами та ферментами. Після інкубації з утворенням комплексу фермент-інгібітор активність фермента відновлюється при видаленні інгібітора. Таке інгібування по механізму може бути конкурентним, неконкурентним та безконкурентним [12].

Конкурентне пригнічення виникає тоді коли субстрат (S) та інгібітор (I) конкурують за одне й те саме місце на ферменті (E). Цей тип гальмування призведе до збільшення K_m і незмінного V_{max} . Для неконкурентного

інгібування інгібітор має інший сайт зв'язування порівняно з субстратом і має можливість зв'язуватися як з вільним ферментом, так і з комплексом фермент-субстрат (ES). Отже, неконкурентний інгібітор може або пригнічувати зв'язування субстрату з ферментом, або перешкоджати утворенню продукту комплексом ES. У присутності неконкурентного інгібітора реакція не досягне тієї самої швидкості (тобто V_{max} зменшиться, але K_m для субстрату-зонда не зміниться). Для змішаного гальмування відбувається як конкурентне, так і неконкурентне гальмування, тому K_m збільшується, а V_{max} зменшується. Безконкурентне інгібування спостерігають у тому випадку, коли інгібітор зворотно взаємодіє з ферментом тільки після утворення фермент-субстратного комплексу, тобто безконкурентний інгібітор не зв'язується з ферментом у відсутності субстрату. Інгібітор полегшує приєднання субстрату, а потім, зв'язуючись, інгібує фермент.

2.4.Інгібування на основі механізму орієнтованої інактивациї (Mechanism-based inactivation, MBI).

Зазначений механізм припускає біоактивацію лікарського засобу до електрофільного реакційноздатного проміжного продукту, який утворюється в одному циклі каталітичного процесу CYP і залежить від тривалості часу, тому MBI зазвичай ототожнюють з TDI. Більш того, MBI демонструє NADPH-та залежне від концентрації інгібування. У порівнянні зі зворотним гальмуванням, MBI частіше призводить до несприятливих ВЛЗ, оскільки інактивованій CYP має бути заміненим знову синтезованим ферментом, щоб відновити свою активність *in vivo*. Хоча TDI і MBI часто використовуються як взаємозамінні терміни, між ними існує наукова відмінність. TDI – це кінетично визначене явище, при якому інгібування збільшується, коли досліджувана сполука інкубується з ферментом перед додаванням субстрату. Показник MBI, однак, є підмножиною TDI і механістично визначеним явищем, в якому фермент діє на субстрат, утворюючи хімічно реакційноздатний проміжний продукт, який згодом інактивує фермент. Інгібітори CYP на основі MBI поділяються на дві категорії, а саме: а) квазінезворотні та б) справжні

незворотні інгібітори і обидва вони призводять до утворення реакційноздатних проміжних продуктів реакцій. У випадку квазінезворотніх інгібіторів, реакційноздатні проміжні продукти координуються з атомом заліза гему, що сприяє утворенню каталітично неактивного метаболітно-проміжного комплексу (МПК) ферментів СУР. Навпаки, реакційноздатні проміжні продукти, що утворюються в результаті метаболізму справжніх незворотніх інактиваторів, ковалентно реагують із амінокислотним залишком активного центру в апопротеїні та/або алкілюють/арилатують порфірин гему, що призводить до остаточного руйнування гему. У деяких випадках фрагменти гему, що утворилися, можуть призвести до модифікації білка. Специфічність МВІ для ферменту визначається в основному диференційною афінністю зв'язування молекул субстрату в активному центрі СУР та/або його орієнтацією в активному центрі. Зазначимо, що активний центр СУР3А4 є містким і тому може вміщувати невеликі молекули в кількох орієнтаціях [13], а звідси викликають специфічне МВІ, в той час як існує дуже мало прикладів МВІ, що продукуються більш специфічним ізоферментом СУР2D6.

2.5. Квазінезворотне гальмування

СУР є сімейством гемовмісних ферментів, у яких гемове залізо перебуває у окисленому стані (Fe^{3+}), але відновлюючись до Fe^{2+} , фермент здатний зв'язувати ліганди, такі як кисень або монооксид вуглецю. Навпаки, ціанід та інші іонні ліганди переважно зв'язуються із СУР, який знаходиться в окисленому стані, оскільки негативно заряджений ціанід легше зв'язується з іоном Fe^{3+} [14]. Значна кількість сполук піддається метаболічній активації ферментами СУР з утворенням проміжних продуктів реакцій, які формують щільні нековалентні комплекси з СУРFe^{2+} та створенням метаболітно-проміжного комплексу (МПК). Цей комплекс є каталітично неактивним і залізна форма ферменту більше не здатна зв'язувати СО. Однак, у деяких випадках комплекси гем-ліганд можуть змінити свої властивості, звідси і

термін «квазінезворотний». Так обробка мікросом печінки $K_3Fe(CN)_6$ окислює залізо до стану Fe^{3+} і витісняє проміжний продукт метаболізму з активного центру, що призводить до реактивації СУР. Проте, в ситуаціях *in vivo* МПК є настільки стабільним, що він стає недоступним для метаболізму ліків, а синтез ферментів *de novo* є єдиним засобом, за допомогою якого можна відновити активність. Такі лікарські засоби як похідні аміну та гідразину призводять до інактивації ферментів СУР через МПК.

2.6. Незворотна інактивація СУР

На відміну від квазінезворотних інгібіторів, класична незворотна інактивація зазвичай передбачає утворення ковалентного зв'язку між метаболітом і ферментом, що в деяких випадках може призвести до утворення гаптену та викликати аутоімунну відповідь і гостру гепатотоксичність [15]. Реакційноздатні метаболіти, які утворюються в активному центрі СУР, можуть викликати справжнє незворотне інгібування за допомогою двох механізмів: а) викликати пряме алкілування/арилування простетичної групи гему, що призводить до деградації гему; б) метаболіти можуть ковалентно реагувати з нуклеофільною амінокислотою в активному центрі апопротеїну. Загалом, модифікація групи гема спричиняє інактивацію СУР, тоді як ковалентна зміна білка призводить до втрати каталітичної активності лише за умови модифікації незамінних амінокислот [16]. Експериментально ці два незворотних механізми можна диференціювати, визначивши, чи може інактивований фермент все ще зв'язуватися з СО. Інактивований апопротеїн зберігає здатність зв'язуватися з СО, що вказує на те, що гем не є модифікованим. Варто зазначити, що ці біоактивовані проміжні продукти не призведуть до інактивації СУР, якщо вони вивільняються з активного центру у вигляді стабільних метаболітів. Після вивільнення з активного центру СУР (без інактивації ферменту) в розчин вони можуть реагувати з відновленим глутатіоном, H_2O та/або іншими клітинними складовими, у тому числі і ДНК.

У тому випадку коли молекула інгібітору викликає стійкі зміни, модифікацію функціональних груп ферменту або їх руйнування, то такий тип

інгібування називається незворотним. Незворотне гальмування виникає, коли утворений комплекс фермент-інгібітор практично не дисоціює. У багатьох випадках спостерігається перетворення інгібітору в хімічно реакційноздатний проміжний продукт, який утворює ковалентний зв'язок з ферментом, інактивуючи його назавжди. Для ферментів CYP незворотне інгібування може бути нековалентним, яке відбувається через комплекси метаболіту міцно зв'язаного із залізом простетичної групи гема (квазінеоборотне інгібування). Незворотна інактивація, незалежно від того, чи відбувається вона через утворення ковалентних зв'язків або комплексів заліза, є основним механізмом деяких значних ВЛЗ, наприклад, інактивації пароксетином CYP2D6, дилтіаземом CYP3A4 та тієліновою кислотою CYP2C9.

2.7. Залежне від часу інгібування (Time-dependent CYP inhibition, TDI)

Хоча терміни - залежне від часу інгібування (TDI) та інгібування на основі механізму МВІ часто використовуються як взаємозамінні, з наукової точки зору між ними існує чітка різниця. Інгібування, що залежить від часу, визначається як взаємодія, при якій спостерігається посилене інгібування, в умовах попереднього інкубування сполуки з системою метаболізму перед додаванням субстрату. Інгібування на основі МВІ конкретно відноситься до підмножини залежного від часу інгібування, яке визначає інактивацію ферменту хімічно реактивним метаболітом. Керівництво FDA щодо лікарських взаємодій [4] рекомендує оцінювати залежне від часу інгібування для досліджуваних препаратів. Задля цього, одну концентрацію досліджуваної сполуки попередньо інкубують з NADPH і мікросомами печінки людини протягом 30 хвилин. Якщо досліджувана сполука є інгібітором, що залежить від часу, то він активується в присутності NADPH і зв'язується з активним центром ферменту. Після стадії попередньої інкубації аліквоту розбавляють у 10 разів буфером, що містить субстрат, специфічний для ізоформи CYP, а потім проводиться друга інкубація. Розбавляючи досліджувану сполуку в 10

разів для остаточної інкубації з маркерним субстратом, будь-яке потенційне зворотне інгібування зводиться до мінімуму. Потенціал зворотного інгібування також зменшується при використанні високої концентрації субстрату, специфічного для ізоформи CYP (зазвичай $5 \times K_m$).

Результати залежних від часу досліджень можна використовувати разом із даними зворотного інгібування для визначення природи гальмування. Потужне незворотне інгібування, зазвичай, вважається несприятливим і може перешкоджати подальшому впровадженню в медичну практику сполуки. У той же час, спосіб інтерпретації даних залежить від конкретних умов. Наприклад, залежне від часу інгібування може не мати фармакологічних наслідків, якщо концентрація інгібітору в дослідженнях *in vitro* є набагато вищою за очікувану концентрацію *in vivo*. Якщо сполуку визначено як інгібітор, що залежить від часу, то можна провести більш детальні дослідження для розрахунку K_i та K_{inact} для подальшої характеристики ступеня інгібування.

Отже, використовуючи дані TDI, можна розрізнити зворотне та незворотне інгібування.

Інгібітори CYP класифікують також за потенцією їх дії, тобто за величиною середнього впливу на пероральний кліренс препарату-зонду для ферменту, коли інгібітор вводять у найвищій терапевтичній дозі. [4]. Сильний інгібітор викликає > 5 -кратне збільшення значень AUC у плазмі або зниження перорального кліренсу на $\geq 80\%$, помірний інгібітор викликає > 2 -кратне збільшення AUC у плазмі або $50 - 80\%$ пригнічення перорального кліренсу, слабкий інгібітор спричиняє збільшення AUC у плазмі в $1,25-2$ рази або $\leq 50\%$ пригнічення перорального кліренсу. Залежно від застосовуваного препарату-зонду та його біодоступності збільшення AUC може бути різним. Особливо це стосується субстратів підродини CYP3A через різний ступінь метаболізму першого проходження через кишечник.

2.8. Зв'язування інгібіторів з білками мікросомної мембрани.

Кінетичні дослідження *in vitro*, найчастіше з мікросомами печінки людини, дозволяють визначити максимальну швидкість (V_{max}) і константу Міхаеліса (K_m) для метаболічного шляху. За лінійних умов відношення V_{max} до K_m являє собою внутрішній метаболічний кліренс, який є мірою ефективності метаболізму ліків у печінці і є ключовим параметром для екстраполяції кінетичних даних *in vitro* на метаболічний кліренс *in vivo*. Хоча цей підхід є досить успішним, іноді виникають великі розбіжності між печінковим кліренсом, передбаченим за даними *in vitro*, і тим, що виміряли *in vivo*, при цьому значення *in vivo* зазвичай вище, ніж передбачено. Зазначене може бути пояснено наступним: а) внеском метаболітів, утворених позапечінковими тканинами, б) недостовірним припущенням про концентраційну рівновагу лікарського засобу між кров'ю та гепатоцитом, в) нерепрезентативні зразки печінки було використано в дослідженнях *in vitro*, в) відсутністю даних, які характеризують фракцію незв'язаного препарату. Незв'язаний препарат у плазмі *in vivo* знаходиться у рівновазі з його незв'язаною частиною у цитозолі гепатоцитів, який має доступ до активних центрів СУР, що відповідає показнику концентрації *in vitro* в мікросомній фракції. Більшість лікарських засобів є ліпідорозчинними органічними сполуками, які неспецифічно зв'язуються з ліпідно-білковим середовищем мікросомної мембрани. Незважаючи на це, у більшості випадків використовують загальну, а не незв'язану концентрацію препарату в кінетичних експериментах для визначення K_m і K_i . Це призводить до переоцінки цих параметрів та недооцінки кліренсу препарату *in vivo* та ступеня інгібування. У деяких випадках використовують поправочний коефіцієнт, де враховують фракцію незв'язаного препарату ($f_{u_{mic}}$), і припускають, що цей показник не залежить від концентрації субстрату. Таке дослідження характеризує неспецифічне зв'язування низки слабких кислот і основ з мікросомами печінки людини з різними фізико-хімічними характеристиками ($\log D_{7.4}$ і ступінь іонізації).

Методи аналізу зв'язування препарату з білками плазми людини та розрахунки відповідних кінетичних параметрів представлено нами в статті [17].

3. Загальні підходи щодо вибору дизайну досліджень.

Гальмування активностей СYP препаратами рекомендовано [4, 9, 10] здійснювати прямим та TDI методами. Пряме інгібування, яке є зворотним пригніченням і його оцінюють шляхом вимірювання активності ферменту в присутності зростаючої концентрації інгібітору без етапу попередньої інкубації. Це класичний аналіз інгібування *in vitro*, який у разі позитивного результату дає значення IC₅₀.

У стандартному зворотному аналізі інгібування СYP слід використовувати субстрати, метаболічну матрицю людини та кофактор NADPH. Аналіз, розробленим аналітичним методом, відстежує утворення метаболітів субстратів у відсутності та присутності сполуки, що вивчається (можливого інгібітору). Умови інкубації є наступними: концентрація білка повинна становити $\leq 0,1$ мг/мл, час преінкубації (при наявності та відсутності NADPH) - 30 хвилин, час інкубації маркерного субстрату - 5 хвилин. Усі аналізи мають здійснюватися у трьох повторностях на сполуку та мати позитивний контроль інгібітору. Вихід даних складається з генерування константи гальмування або значення IC₅₀, яке визначаються з семи концентрацій інгібітору.

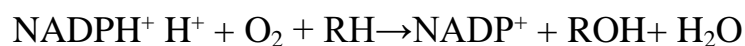
Відповідна тривалість експозиції залежить від необхідності визначити ефект взаємодії. Якщо дослідження має на меті з'ясувати, чи є досліджуваний препарат інгібітором і залежить від часу експозиції, достатньо визначити 80% ефекту гальмування. Якщо дослідження взаємодії буде використане для рекомендацій щодо дозування, необхідно визначити справжній максимальний ефект.

Дизайн досліджень ВЛЗ *in vitro* повинен мати наступні складові: фенотипування реакцій ізоферментів СYP, маркерні реакції *in vitro* для

ізоферментів, вибір тестової системи, застосування специфічних інгібіторів (позитивний контроль).

3.1. Фенотипування реакцій ізоферментів СYP

Ферменти, які вміщують СYP каталізують окислювальний метаболізм різноманітних невеликих молекул лікарських засобів наступної стехіометрії:



де RH є субстратом (лікарський засіб), що окислюється, а ROH – гідроксильований метаболіт. Каталітична активність СYP пов'язана з окислювально-відновними білками-партнерами, які переносять електрони від NADPH до гемопротеїнового центру гема [18]. Разом, усі СYP приймають участь у 95% повідомлених окислень і відновлень більшості хімічних речовин. Відносну кількість ізоферментів СYP в печінці людини було визначено [19] як: СYP1A2 (13%), 2A6 (4%), 2C19 (20%), 2D6 (2%), 2E1 (7%) і 3A4 (30%).

Фенотипування реакції полягає у визначенні ізоформи ферменту, який бере участь у метаболічній реакції. Перш ніж розпочати ці дослідження, фенотипування, в ідеалі, слід спочатку визначити метаболічний профіль препарату у людини *in vitro* (ідентичність утворених метаболітів та їх кількісне значення) та оцінити відносний внесок кожного ферменту в загальний кліренс. У тому випадку, коли СYP-опосередковані реакції відіграють лише незначну роль у загальному кліренсі (менше 25%) препарату то він не підлягає подальшому вивченню, як це рекомендовано у настанові. [20]. Слід мати на увазі, що в скринінгових дослідженнях фармакокінетики *in vitro* оцінюються лише первинні метаболічні шляхи лікарського засобу і не обов'язковими є визначення їх *in vivo*. Рекомендується досліджувати метаболізм нових хімічних сполук в максимально повній системі *in vitro*. [21] Свіжоізолювані гепатоцити, теоретично, є найкращим вибором для проведення таких експериментів, навіть якщо з технічних причин перевага віддається мікросомам (характеристика, доступність, наявність мембран тощо)

3.2. Маркерні реакції *in vitro* для специфічних ізоферментів CYP.

Доведено [22], що із 110 широко використовуваних препаратів 66% метаболізуються одним або кількома ізоферментами CYP: 44% – CYP3A4; 41% – CYP2D6; 26% – CYP2C19; 9% – CYP1A2 і 4% – CYP2C9. Тому на ранніх стадіях процесу розробки ліків рекомендується використовувати ці ізоформи для рутинної оцінки можливого ВЛЗ.

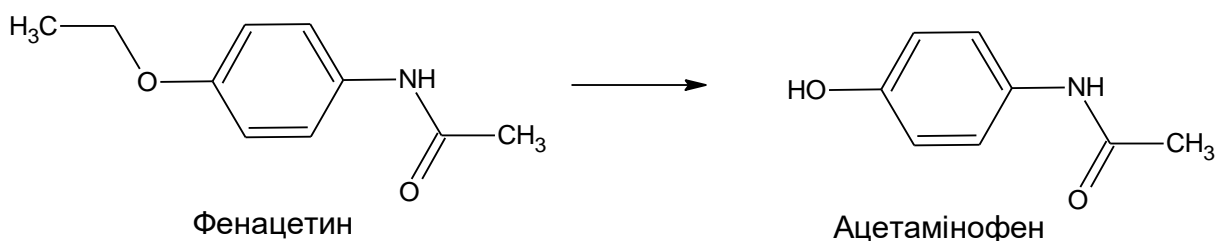
Для ізоферментів CYP характерною є субстратна специфічність, тобто здатність зв'язуватися та трансформувати молекули певної форми, заряду та з відповідними гідрофільними/гідрофобними характеристиками [23]. Деякі з них мають також субстратну стереоспецифічність, наприклад, CYP2C9 метаболізує S-варфарин, а CYP1A2 і CYP3A4 R-варфарин. Більшість же ізоферментів виявляють широку субстратну специфічність, тобто кожен ізофермент може метаболізувати значну кількість лікарських засобів.

Для багатьох ізоферментів CYP спостерігається характерний поліморфізм генів, що може обумовлювати міжіндивідуальні відмінності у швидкості метаболізму препаратів та деяких ВЛЗ. Наявність одонуклеотидних поліморфізмів у гені, що кодує певний ізофермент, може призводити до синтезу ферментів із зміненою активністю, що впливає на показники фармакокінетики.

Ферментативну активність CYP необхідно оцінювати за допомогою селективного субстрату, «маркеру метаболічної активності», тобто препарату (або речовини), який ідеально метаболізується одним ізоферментом CYP. Такий фармакокінетичний маркер повинен характеризувати процеси абсорбції, розподілу, метаболізму та екскреції і відповідати за перебіг його метаболізму, а не за інтенсивність перфузії печінки, зв'язування з білками або виведенням незміненого препарату. Тому регулюючі органи в усьому світі рекомендують оцінку *in vitro* потенціалу досліджуваного препарату інгібувати наступні специфічні ферменти CYP та їх добре перевірених ферментних маркерних реакцій: [24]:

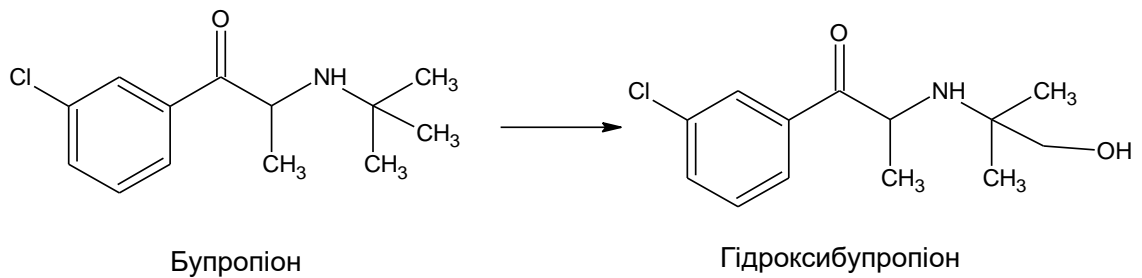
CYP1A2 експресується в печінці і становить приблизно 13%-15% від загального вмісту CYP, що сприяє метаболізму приблизно 4% препаратів, які знаходяться в обігу. Фермент переважно окислює ароматичні вуглеводні, а також гетероциклічні та ароматичні аміни і відіграє важливу роль у метаболізмі кількох клінічно важливих препаратів (анальгетики, жарознижуючі, антипсихотичні, антидепресанти, протизапальні та серцево-судинні).

O-деетилювання фенацетину є високоспецифічною реакцією індексу активності CYP1A2 *in vitro* систем, печінкової тканини.



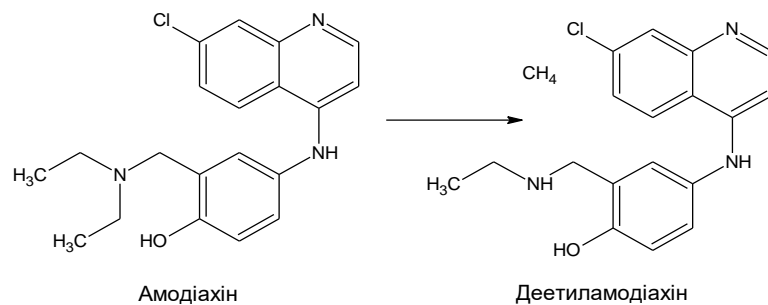
Двофазний метаболізм фенацетину мікросомними фракціями печінки людини та щура має низьке та високе значення K_m тому ці показники часто відносяться до високо- або низькоафінних.

CYP2B6 експресується в печінці і становить менше 1% загального вмісту CYP. Бупропіон, циклофосфамід, ефавіренц, іфосфамід і метадон є субстратами CYP2B6. Такі препарати, як фенобарбітал, фенітоїн і рифампін, індукують його активність, а тиотепра і тиклопідин пригнічують. Існує широка міжсуб'єктна варіабельність експресії CYP2B6 і в даний час оцінюється роль генетичного поліморфізму в цьому явищі. Бупропіон часто використовується як пробний препарат у фармакокінетичних дослідженнях оцінки активності CYP2B6.

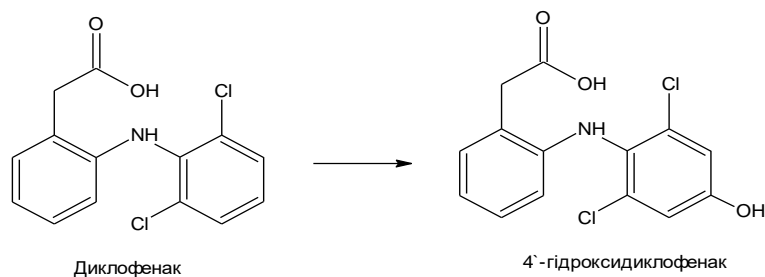


Цей препарат є амінокетоном і в організмі людини метаболізується до фармакологічно активного основного метаболіту гідроксибупропіону з K_m 89 - 130 мкМ.

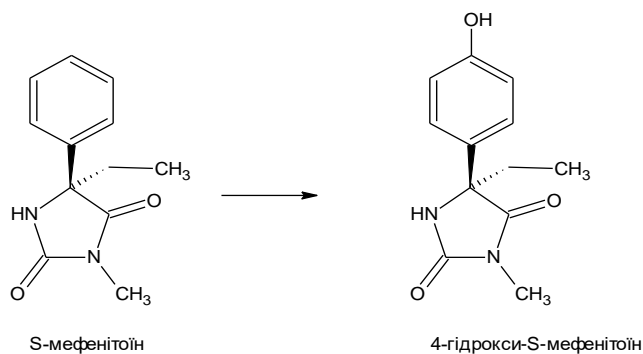
CYP2C8 становить приблизно 7% загального вмісту печінки і відіграє життєво важливу роль у метаболізмі піоглітазону, аміодарону, паклітакселу, хлорохіну, верапамілу та ібупрофену. Він також метаболізує у незначній мірі флувастатин, амітриптилін, диклофенак, омепразол та карбамазепін. Метаболізм амодіахіну до деетиламодіахіну використовується як індекс активності CYP2C8 *in vitro*.



CYP2C9 є основною ізоформою підродини CYP2C, яка становить приблизно 20% вмісту білка CYP в мікосоміях печінки людини. Фермент приймає участь у метаболізмі близько 10% клінічно важливих лікарських засобів, зокрема НПЗП, антидепресантів, антидіабетичних засобів, ліпідознижувальних препаратів та пероральних антикоагулянтів. Існують значні відмінності в активності CYP2C9 у популяції, здебільшого через однонуклеотидні поліморфізми в ферменті, які є вирішальними генетичними елементами, що обумовлюють індивідуальні відмінності в метаболізмі ліків. Диклофенак є широко використовуваним лікарським субстратом для дослідження метаболічної активності CYP2C9, оскільки гідроксилювання диклофенаку до 4¹-гідроксиметаболіту в основному каталізується цією ізоформою.

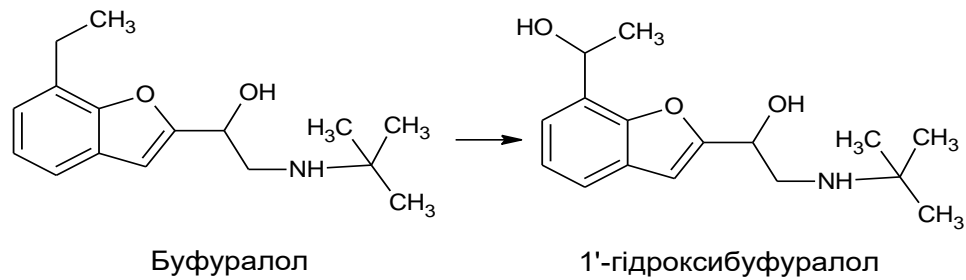


CYP2C19 становить близько 16% загального вмісту печінки і приймає участь у метаболізмі багатьох клінічно значущих препаратів, таких як бензодіазепіни, інгібітори протонної помпи, селективні інгібітори зворотного захоплення серотоніну, трициклічні антидепресанти та є важливим для метаболічної активації пролікарського засобу клопідогрелю. Зондовими субстратами для оцінки активності CYP2C19 є цефекоксид, лозартан, напроксен, пенітоїн та толбутамід. (S)-мефенітоїн є найбільш чутливим субстратом порівняно з (S)- або (R)-омепразолом або (S)-флуоксетином.:



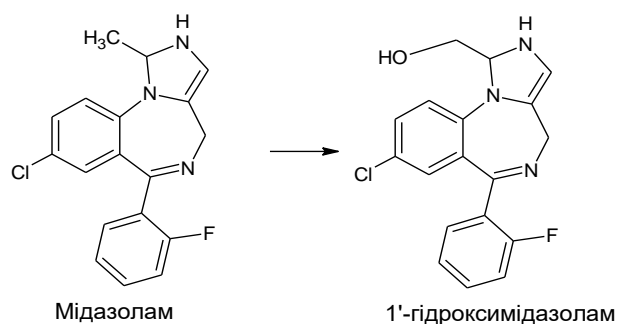
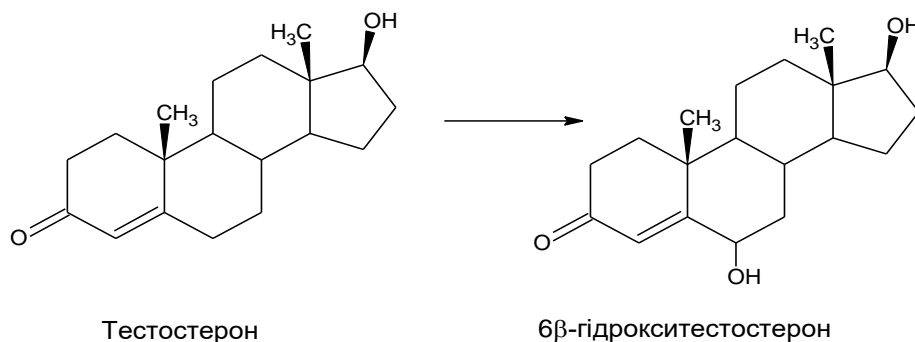
CYP2D6 людини відіграє основну роль у метаболізмі до 25% ліків, які широко застосовуються в клінічній практиці (антиаритмічні засоби, антидепресанти, нейролептики, бета-блокатори та анальгетики), хоча на його частку припадає лише 2% - 4% усіх CYP печінки людини. CYP2D6 є поліморфною ізоформою, тому значна увага приділяється ферменту та його потенціалу для клінічно значущих ВЛЗ.

Серед субстратів CYP2D6, буфуралол є найбільш належним для доклінічних досліджень *in vitro*. Експресія CYP2D6 є предметом генетичного поліморфізму, внаслідок чого різні білки CYP2D6, сильно варіюють у людей.



CYP3A каталізують метаболізм приблизно половини препаратів, які використовуються в медичній практиці. Оскільки ці ферменти локалізовані в печінці та стінках кишечника, вони впливають на метаболізм першого проходження, біодоступність при пероральному прийомі та екскрецію ліків. Крім того, індукція та гальмування активностей CYP3A вважаються важливими показниками терапевтичної ефективності та токсичності низки препаратів. Відповідно взаємодії на рівні CYP3A є частою причиною виражених ВЛЗ. Тому для мінімізації ризику клінічно значущих взаємодій необхідно раннє виявлення потенційних інгібіторів CYP3A4.

Класичними маркерами метаболічної активності CYP3A людини є тестостерон і мідазолам. Ці препарати вважаються високоспецифічними, оскільки жодні інші CYP людини не сприяють значному їх метаболізму. Основним продуктом метаболізму тестостерону є 6 β -гідрокситестостерон, а мідазоламу 1'-ОН мідазолам.



У тому випадку, коли досліджуваний препарат не зазнає значного метаболізму за допомогою зазначених СYP, необхідно визначити які додаткові ферменти можуть сприяти його трансформації. Вони можуть відноситися до СYP2A6, СYP2J2, СYP4F2 і СYP2E1 або до інших ферментів фази I (альдегідоксидази, моноаміноксидази, флавінмонооксигенази, ксантиноксидази та алкоголь/альдегіддегідрогеназ). Ферментами II фази, можуть бути UDP глюкуронозилтрансферази та сульфотрансферази.

3.3. Вибір тестової системи.

Біологічні матриці печінки експериментальних тварин по своїм метаболічним характеристикам значно відрізняються від людських тому не рекомендується їх використання в дослідженнях ВЛЗ. При виборі біологічної матриці людини враховують її зручність у використанні та доступність системи. Для оцінки потенціалу лікарської взаємодії досліджуваного препарату рекомендовано використовувати різні печінкові системи *in vitro*, зокрема:

1. Фракції субклітинної тканини печінки людини, такі як відновлені мікосомні системи, супернатанти після 9000 g центрифугування гомогенату печінки (S9) і цитозоль (з додаванням відповідних кофакторів за необхідності).

2. Рекombінантні ферменти СYP людини у різних системах експресії. Ферменти, експресованих кДНК використовуються для оцінки внеску кожного СYP у кліренс препарату. Значною перевагою таких рекombінантних СYP людини є те, що вони містять один ізольований фермент, що виключає проблему селективності хімічних інгібіторів або антитіл, які використовуються в дослідженнях. Експерименти можна проводити в мікропланшетах і вони є придатними для повної автоматизації, що робить їх повністю адаптованими до програм скринінгу. Тим не менш, мікосомне середовище (ліпіди, апопротеїни, рівень цитохрому b5 та NADPH цитохром c-редуктази) відрізняється в системі СYP, що експресується кДНК і залежить від рівня в мікосомах печінки людини. Ці відмінності можуть впливати на кількість оборотів (V_{max}) для даного ферменту, хоча спорідненість (K_m) СYP

цілком порівнянна між рекомбінантними ферментами та мікросомами печінки людини. Цей зв'язок між рекомбінантним СУР і мікросомами печінки людини можна отримати, використовуючи коефіцієнт відносної активності (RAF) для кожного СУР і він є фактором екстраполяції з простої системи, що експресує лише один фермент, до мікросом людини, що містить суміш ферментів. Розраховується цей показник з використанням V_{max} реакції або шляхом оцінки внутрішнього кліренсу (Clint).

3. Тканини печінки людини (свіжопідготовлені гепатоцити та кріоконсервовані гепатоцити), які зберігають архітектуру ферментів і містять повний набір ферментів фази I та фази II, що метаболізують лікарські засоби. Незважаючи на те, що основна увага у більшості рекомендацій [4, 9, 10] зосереджена на ізоферментах СУР і метаболізмі в печінці, вони рекомендують враховувати можливості метаболізму сполук ферментами фази II та процеси метаболізму, що відбуваються в позапечінкових тканинах, якщо це стосується досліджуваних препаратів.

3.4. Застосування специфічних інгібіторів

Для забезпечення надійного результату в процесі фенотипування необхідно використовувати специфічні інгібітори СУР та чітко визначених умов [25]. Концентрація субстрату має бути нижчою або дорівнювати K_m , а концентрація інгібітора має забезпечувати селективність та адекватну дію. Для інтерпретації може бути використаний діапазон концентрацій інгібіторів. Необхідно, щоб умови їх використання були перевірені раніше, щоб забезпечити достовірну відповідь. Наприклад, деякі специфічні інгібітори мають дуже низьку метаболічну стабільність (наприклад, кумарин, потенційний інгібітор СУР2A6), і вони не виявляють жодного інгібуючого потенціалу в типових умовах інкубації, оскільки повністю метаболізуються. Внесок конкретного СУР може бути визначений безпосередньо відсотком інгібування метаболізму препарату. Найпоширеніші інгібітори СУР, які використовуються позитивними контролем, наведені в таблиці 1.

Таблиця 1.

Субстрати та інгібітори для аналізів інгібування ізоферментів CYP

Фермент	Субстрат	Метаболіт	Зворотні інгібітори	TDI інгібітори
CYP1A2	Фенацетин	Ацетамінофен	Альфа-нафтофлавон	Фурафілін
CYP2B6	Бупропіон	4-ОН Бупропіон	Вориконазол	Депреніл
CYP2C8	Амодіахін	N-деетиламодіахін	Кверцетин	Фенелзин
CYP2C9	Диклофенак	4'-ОН Диклофенак	Сульфафеназол	Тілова кислота
CYP2C19	S-мефенітоїн	4'-ОН-мефенітоїн	Нооткатон	(S)-флуоксетин
CYP2D6	Декстрометорфан	Декстрорфан	Хінідин	Пароксетин
CYP3A4	Тестостерон	6 β -ОН Тестостерон	Кетоконазол	Тролеандоміцин
CYP3A4	Мідазолам	3-ОН Мідазолам	Кетоконазол	Верапаміл

Під час раннього скринінгу досліджуються лише основні CYP (1A2, 2C9, 2C19, 2D6 і 3A4), при цьому 3A4 і 2D6 є першими, оскільки вони найбільш часто приймають участь у метаболізмі ліків. Пізніше необхідно досліджувати участь інших CYP, що дає можливість визначити вплив специфічних інгібіторів на кожну метаболічну реакцію.

4. Аналіз та інтерпретація даних.

Для оцінки активності того чи іншого CYP використовуються відповідні тести, в основу яких покладено принципи визначення концентрації сполуки, що вивчається (за втратою відповідної кількості) або основного метаболіту (продукту реакції), який утворюється в процесі ферментативного каталізу. Так активність CYP1A2 вимірюється по концентраціям амінофенону та ацетамінофенону, який утворюється в інкубаційному середовищі. Як і у інших фармакокінетичних дослідженнях, де має місце визначення концентрації сполуки, необхідно валідувати таку аналітичну процедуру.

4.1. Аналітичні методи

Концентрації метаболітів аналізують в супернатанті за допомогою різноманітних аналітичних методів, серед яких найбільш поширеними є

рідина хроматографія з детектуванням тандемною мас-спектрометрією (LC–MS/MS).

4.2. Визначення кінетичних параметрів в умовах TDI

Регуляторні органи [4, 9, 10] вимагають проведення досліджень *in vitro* для визначення інгібуючого потенціалу сполуки та механізму процесу у три основних етапи: а) визначення кінетичних параметрів реакцій: IC_{50} , K_i , K_{inact} та $[I]/K_i$; б) встановлення типу гальмування (досліди, що залежать від часу, з оцінкою механізму гальмування). в) прогнозу ризику ВЛЗ (екстраполяція даних, отриманих *in vitro* на ситуацію *in vivo*).

Для визначення типу інгібування СYP зазвичай використовують графік Лайнуівера-Берка, отриманий для даного субстрату за відсутності та у присутності інгібітору. Зміна константи Міхаеліса (K_m) ферменту і максимальної швидкості реакції (V_{max}) дозволяє віднести інгібітор до відповідного типу (розділ 3.2). Точна оцінка гальмівного потенціалу та типу гальмування отримується шляхом визначення константи гальмування K_i . Стандартний підхід полягає у використанні різних концентрацій субстрату (близько K_m) та інгібітору (близько K_i) з фіксованою кількістю ферменту протягом інкубації. [26]. Альтернативним методом є програма SDK, у якій потрібна наявність лише двох субстратів і двох концентрацій інгібіторів [27]. Не зважаючи на те, що цей підхід є більш швидким, ніж звичайний Міхаеліса-Ментен, обидва експерименти забирають занадто багато часу, щоб їх використовувати на ранніх стадіях розробки ліків і проводитиметься лише за необхідності та для обмеженої кількості СYP.

4.2.1. Визначення IC_{50} , K_i , K_{inact} та $[I]/K_i$.

Дані про інгібування ферментів часто представлені як IC_{50} , тобто цей показник є концентрацією інгібітору, яка викликає 50% гальмування активності СYP за даних експериментальних умов [28]; K_i — константа інгібування (константа дисоціації комплексу інгібітор-фермент), визначена

кінетичним аналізом ферменту (наприклад, графік Діксона); і K_{inact} , константа інгібування, що залежить від часу інкубації сполуки, визначеною на основі механізму МВІ. Позитивне інгібування, яке є дозозалежним з активністю нижче ніж 50% від негативного контролю, потребує подальших експериментів для визначення K_i для кращої оцінки інгібуючого потенціалу *in vivo*. Крім того, необхідно провести дослідження для визначення K_{inact} , щоб оцінити, чи діє інгібітор через ковалентне зв'язування з активним центром ферменту, що призводить до незворотного інгібування, залежного від часу експерименту.

Для визначення IC_{50} в експерименті використовують тільки одну концентрацію субстрату, яка відповідає або нижче показника K_m індексної реакції та інкубують з кількома концентраціями інгібітору. Задля скринінгу значної кількості сполук розроблено [29] спрощений метод з використанням систем, які вміщують експресовані кДНК селективних флуорогенних зондів і проводяться у 96 лункових мікропланшетах. Він має значну перевагу, оскільки є повністю автоматизованим (розділ 3.3). На цій ранній стадії інгібуючий потенціал нових препаратів вивчається лише з використанням основних СУР (тобто 1A2, 2C9, 2C19, 2D6 і 3A4). Щоб уникнути проблем з розчинністю сполук, використовують 0,5% (максимальну кінцеву концентрацію) ДМСО. Для підтвердження достовірності аналізу слід використовувати позитивний контроль (таблиця 1). При інкубації декількох концентрацій сполуки, що вивчається, можна розрахувати IC_{50} . Через низькі концентрації інгібіторів, що інкубуються, можна оцінити лише IC_{50} нижче 25 мМ, що дає змогу розрізнити сполуки як: потужні ($IC_{50} < 1$ мМ), граничні (1 мМ $< IC_{50} < 10$ мМ) або слабкі ($IC_{50} > 10$ мМ) інгібітори.

Показник IC_{50} зазвичай визначають шляхом побудови графіка відносної активності (активність у присутності інгібітора у відсотках від активності негативного контролю, а потім оцінюють концентрацію, що дає 50% відносної активності, використовуючи метод лінійної регресії. Можна також розрахувати IC_{50} на основі співвідношення між концентраціями інгібіторів і

відсотком контрольної активності за допомогою програми нелінійної регресії, такої як SCIENTIST (Micromath, Солт-Лейк-Сіті, Юта) [30]. K_i можна визначити за допомогою графіка Діксона. K_i також можна оцінити за допомогою програмного забезпечення нелінійного регресійного аналізу, такого як SYSTAT [31]. Більшість інгібіторів СYP діють через зворотні (конкурентні чи неконкурентні механізми), за допомогою яких їх інгібіторний потенціал можна оцінити за значеннями IC_{50} або K_i . Термодинамічна константа інгібування K_i є рекомендованим FDA параметром для дослідження клінічного потенціалу ВЛЗ, пов'язаного з СYP [4]. Застосування субстратів у концентраціях, близьких до K_m реакції дозволяє використовувати половину вимірних значень IC_{50} , для оцінки K_i на основі рівняння Ченга-Пруссоффа [32]:

$$K_i = IC_{50} / (1 + [S] / K_m).$$

де, K_i - активність зв'язування інгібітора з реакційним субстратом,

IC_{50} - функціональна активність інгібітора,

$[S]$ - концентрація реакційного субстрату,

K_m - концентрація субстрату, при якій активність ферменту (або сполуки, інгібіювання якої досліджується) дорівнює 50% від максимальної. Попри те, що значення IC_{50} може бути різним в досліджах, які є залежними від експериментальних умов, K_i відноситься до сталих величин, тобто є константою інгібіювання препаратом.

Задля визначення цього показника, аналіз потрібно починати з попередньої інкубації досліджуваної сполуки в кількох концентраціях (плюс контрольна проба), вибраних для досягнення шкали показників (від відсутності інактивації до максимальної інактивації), у різні часи інкубації (у тому числі 0 хв), з мікросомами печінки людини та NADPH. Після аліквоту попередньої інкубації розбавляють у 10 разів буфером, що містить NADPH та субстрат, специфічний для ізоформи СYP, а потім проводять другу інкубацію для утворення метаболітів маркерного субстрату. Етап розведення та застосування субстратів у концентраціях у 5-10 разів вищих за K_m допомагає мінімізувати швидкість прямого інгібування. Реакцію припиняють, зразки

центрифугують і відбирають супернатант для аналізу. Після отриманих даних концентрації продукту реакції (метаболіту), виражають у % та розраховують k_{inact} і K_I за допомогою аналізу нелінійної регресії згідно з таким рівнянням:

$$k_{obs} = k_{inact} \times [I] / (K_I + [I])$$

де k_{obs} — спостережувана константа швидкості першого порядку інактивації ферменту сполукою. Показник k_{inact} має максимальну швидкість інактивації, коли $[I]$ досягає нескінченності, а K_I є концентрацією інгібітора, для якого $k_{obs} = 0,5 \times k_{inact}$.

Значення $[I]/K_I$ є важливим параметром для прогнозування потенційного ВДП, де $[I]$ є середнім показником C_{max} у стаціонарному стані препарату. Значення $[I]/K_I > 0,1$ свідчить про можливий потенціал ВДП *in vivo*. При детальному визначенні кінетичних параметрів ферментативної реакції при різних концентраціях інгібітору та субстрату отримують значення K_I та можливий механізм інгібування.

4.2.2. Прогнозування ризику взаємодії лікарських засобів.

Керівництво FDA щодо лікарських взаємодій [4] рекомендує визначати показники K_{inact} і K_I у тому випадку, коли у попередніх дослідженнях перед інкубацією *in vitro* спостерігається будь-яке залежне від часу зменшення початкової швидкості утворення продукту реакції. У цьому випадку розрахункове значення R (відношення AUC за наявності та відсутності інгібіторів, передбачене базовими моделями) перевищує 1,1 вважається позитивним і, таким чином, може вимагати подальших досліджень *in vivo*:

Для базових моделей необхідно розрахувати співвідношення властивих значень кліренсу субстрату - зонду у відповідній ферментативній реакції за відсутності та за наявності взаємодіючого препарату. Це співвідношення позначається як R_1 для зворотного інгібування. Окрім того, слід також розрахувати показник $R_{1,gut}$ для CYP3A [33].

$$R_1 = 1 + (I_{max,u} / K_{i,u})$$

$$R_{1,gut} = 1 + (I_{gut} / K_{i,u})$$

де, $I_{\max,u}$ — це максимальна незв'язана концентрація лікарського засобу, що взаємодіє, у рівноважному стані.

I_{gut} — це концентрація взаємодіючого препарату в кишковому просвіті, розрахована як доза/250 мл.

$K_{i,u}$ — константа незв'язаного інгібування, визначеної *in vitro*.

При цьому, I та K_i повинні бути виражені в одній одиниці (наприклад, в молярній одиниці концентрації).

У тому випадку, коли відсутні дані зв'язування сполуки з білками, незв'язану фракцію в плазмі слід встановити на 1% (фракція незв'язаної в плазмі тобто $f_{u,p} = 0,01$).

Для базових моделей TDI необхідно розрахувати також показник R_2 :

$$R_2 = (k_{\text{obs}} + k_{\text{deg}}) / k_{\text{deg}}$$

$$\text{де } k_{\text{obs}} = (k_{\text{inact}} \times 50 \times I_{\max,u}) / (K_{i,u} + 50 \times I_{\max,u}),$$

k_{obs} — спостережувана (очевидна швидкість першого порядку) інактивація ураженого ферменту.

k_{deg} — уявна константа швидкості розпаду першого порядку ураженого ферменту.

$K_{i,u}$ — концентрація незв'язаного інгібітору, що викликає напівмаксимальну інактивацію.

k_{inact} — константа максимальної швидкості інактивації.

$I_{\max,u}$ — це максимальна незв'язана концентрація лікарського засобу, що взаємодіє, у рівноважному стані.

Якщо $R_1 \geq 1,02$, $R_2 \geq 1,25$ або $R_{1,\text{gut}} \geq 11$, то потрібно додатково дослідити потенціал ВЛЗ шляхом використання механічних моделей або проведення клінічного дослідження взаємодії препаратів з чутливим індексним субстратом. У тому випадку коли прогнозоване співвідношення площі під кривою «концентрація в плазмі – час» (AUCR) чутливого індексного субстрату в присутності та відсутності досліджуваного препарату становить $\geq 1,25$ на основі статичних або динамічних механічних моделей (наприклад, моделі РВРК), слід провести клінічне дослідження.

Для оцінки можливості досліджуваного препарату інгібувати активність кількох ізоферментів CYP, їх пріоритетність впливу на ВЛЗ визначають методами *in vivo* на основі впорядкованих за рангом R1, R2 або прогнозованих значень AUCR, з урахуванням параметрів інгібування *in vitro*. Якщо дослідження *in vivo* одного ферменту не показує взаємодії, визначати внесок *in vivo* інших CYP з нижчими потенціалами (наприклад, менший R або AUCR) не потрібно. Однак, якщо це дослідження *in vivo* демонструє позитивну взаємодію між препаратом і субстратом CYP із значним індексом, необхідно провести додаткові дослідження *in vivo* для інших CYP, починаючи з CYP із наступним найбільшим значенням R або AUCR. Крім того, можна використовувати механістичну динамічну модель, щоб пересвідчитись про необхідність додаткових досліджень.

5. Загальні висновки щодо інгібуючого потенціалу нового лікарського засобу, отриманого в досліджах *in vitro*.

Описані вище дослідження дозволяють оцінити ВЛЗ, але точне прогнозування ефектів, які будуть мати місце *in vivo* можливе лише після ретельної та науково обґрунтованої інтерпретації даних. В настановах [4, 9, 10] приведено алгоритми визначення ВЛЗ, яке необхідно провести в досліджах *in vitro* та *in vivo*. Узагальнені висновки з цього приводу представлені на рисунку 1.

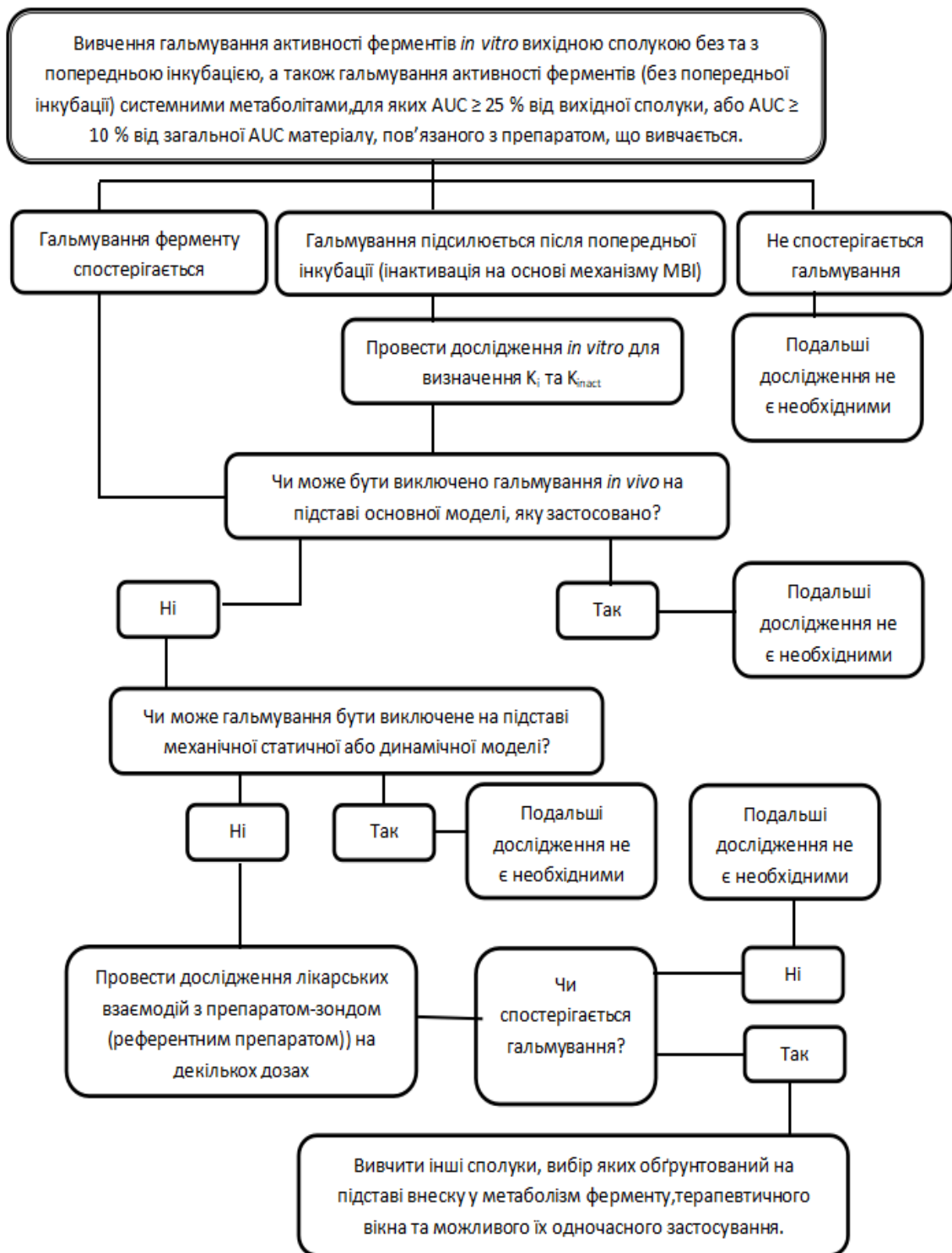


Рис. 1. Алгоритм досліджень можливого гальмування активності ізоферментів CYP лікарськими засобами задля визначення ВЛЗ.

В роботі [3] також наведено можливі варіанти подальших досліджень, які базуються на отриманих результатах *in vitro*.

По-перше, як необхідно інтерпретувати дані відносно препарату, що є субстратом CYP? У даному випадку під словом препарат мається на увазі нова сполука, яка вивчається.

1. У випадку, коли препарат не утворює метаболітів мікросомами або гепатоцитами печінки, це означає, що печінковий метаболізм не приймає участі в кліренсі сполуки, тому одночасне введення препарату з іншими не будуть впливати на ВЛЗ.

2. Якщо препарат метаболізується, але не ізоформами CYP, то слід розглядати у кожному окремому випадку, які із ферментів, що метаболізують його, приймають у цьому участь.

3. Препарат, який метаболізується переважно однією ізоформою CYP, дуже ймовірно матиме взаємодію з іншими ліками, які взаємодіють з цією ізоформою. Особливо це стосується потужних інгібіторів CYP3A4 та CYP2C8. Церивастатин, субстрат CYP2C8, був знятий з ринку в серпні 2001 року після повідомлень про летальні взаємодії з інгібітором CYP2C8 гемфіброзілом [34].

4. Препарат метаболізується кількома ізоформами CYP і, зазвичай, вважається, що він не може мати серйозних взаємодій із специфічним інгібітором однієї із ізоформ CYP, оскільки метаболічний кліренс може здійснюватися неушкодженими шляхами. У той же час, важливо розуміти, що якщо лікарський засіб метаболізується різними ізоформами, він може мати значні лікарські взаємодії з індукторами ізоформ з високою здатністю до метаболізму препарату. Прикладом є протигрибковий препарат тербінафін, який було охарактеризовано [35] за допомогою мікросом печінки людини і показано його метаболізм ізоферментами CYP1A2, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 та CYP3A4, що дозволило авторам зробити висновок про незначний потенціал взаємодії тербінафіну з іншими сполуками. Оскільки тербінафін є конкурентним інгібітором CYP2D6, експериментально було доведено, що він може приймати участь у ВЛЗ.

По-друге, як необхідно інтерпретувати дані відносно препарату, що є інгібітором CYP?

1. Якщо препарат не гальмує активність СYP мікросом та гепатоцитів, то вважається, що він не має потенціалу спричиняти ВЛЗ *in vivo*. На даний момент не існує прикладів інгібіторів ферментів *in vivo*, які не є інгібіторами *in vitro*.

2. Препарат є потужним інгібітором якщо викликає дозозалежне та >50% гальмування активностей однієї або кількох ізоформ СYP у відповідних концентраціях. Враховуючи те, що фізіологічне значення процесу інгібування визначається показником [I]/K_i, і якщо воно становить 0,1 або вище, то може викликати ВДП *in vivo*. Рекомендується, щоб параметри [I]/K_i, отримані з безклітинних систем (мікросом і СYP), підтверджувалися показниками з інтактними гепатоцитами задля більш точного прогнозуванню ефектів *in vivo*. Якщо результати з гепатоцитами співпадають з даними для безклітинних систем, необхідно провести дослідження *in vivo*, щоб оцінити потенціал ВДП у людини.

3. Якщо інгібування не залежить від часу, воно не характеризується механізмом орієнтованої інактивації (МВІ).

4. При наявності інгібування залежного від часу необхідно провести дослідження *in vivo* для подальшого визначення його потенціалу ВДП.

5. У деяких випадках для додаткової безпеки препарату необхідним є визначення його гепатотоксичного потенціалу, оскільки залежні від часу інгібітори СYP викликають ідіосинкразію.

6. Рекомендації щодо дослідження ВЛЗ в організмі людини.

Якщо на підставі профілю метаболітів, результатів доклінічних досліджень або відомостей про схожість з відомими препаратами, які мають ВЛЗ, настійно рекомендовано [36] у рамках клінічної розробки провести вивчення лікарських взаємодій у людини. Дослідження ВЛЗ проводяться за участю здорових добровольців або пацієнтів, якщо їх участь бажана для оцінки фармакодинамічних кінцевих точок, коли лікарські препарати є сильно токсичними (наприклад, протипухлинний препарат). Зазвичай, у таких

дослідженнях використовується перехресний дизайн. До початку проведення клінічного дослідження необхідно мати результати доклінічних та раніше проведених клінічних досліджень, що підтверджують безпеку запланованого клінічного дослідження у людини. На підставі отриманих результатів, з метою забезпечення безпеки учасників клінічних досліджень, необхідно змінювати заплановані та проведені в даний час клінічні дослідження. Отже, основним принципом послідовно проведених досліджень ВЛЗ є вплив результатів попередніх досліджень на планування наступних. Доза, інтервали дозування, кількість доз, способи та час супутнього застосування препаратів повинні бути заплановані таким чином, щоб імітувати клінічні умови. Ступінь взаємодії (інгібування) класифікується зі зміни абсорбції одного з досліджуваних лікарських препаратів та розраховується як площа під фармакокінетичною кривою (AUC) речовини.

6.1. Шлях введення

Шлях введення, обраний для дослідження метаболічної взаємодії між лікарськими засобами, є важливим. Для досліджуваного агента, який використовується або як взаємодіючий лікарський засіб, або як субстрат, шлях введення, як правило, має бути запланованим у маркуванні продукту. Коли розробляється кілька шляхів, то необхідність проведення метаболічних досліджень взаємодії між лікарськими засобами усіма шляхами має ґрунтуватися на очікуваному механізмі взаємодії та подібності відповідних профілів концентрація-час для вихідного метаболіту або метаболітів. Якщо на ринок будуть надходити лише пероральні лікарські форми, зазвичай не будуть потрібні дослідження з внутрішньовенними препаратами, хоча інформація про пероральне та внутрішньовенне дозування може бути корисною для визначення відносного внеску змін у всмоктуванні та/або пресистемному кліренсі до загального ефекту, який спостерігається при ВЛЗ. Іноді певні способи введення можуть знизити корисність інформації з дослідження. Наприклад, внутрішньовенне дослідження не виявить взаємодії для будь-

якого субстрату, який демонструє високий коефіцієнт екстракції, або для препаратів із низькою печінковою екстракцією, де кишкова активність СYP3A4 помітно змінює біодоступність. Для схваленого препарату, який використовується як субстрат або взаємодіючий препарат, шлях введення буде залежати від доступних на ринку форм, які в більшості випадків будуть пероральними.

6.2. Вибір дози

Як для субстрату (досліджуваного препарату або схваленого препарату), так і для взаємодіючого препарату (досліджуваного препарату або схваленого препарату) тестування повинно максимізувати можливість виявлення взаємодії. З цієї причини слід використовувати максимальну заплановану або затверджену дозу та найкоротший інтервал між прийомами взаємодіючого препарату (інгібіторів). З міркувань безпеки для субстратів можуть знадобитися дози, нижчі від тих, що застосовуються клінічно, і вони можуть бути більш чутливими до ефекту взаємодіючого препарату.

6.4. Кінцеві точки дослідження.

Керівництво FDA щодо встановлення ВДП перорального препарату вимагає надання відповідних фармакокінетичних та фармакодинамічних параметрів для базових рівнів, з урахуванням необхідних первинних та у випадку необхідності вторинних кінцевих точок.

6.4.1. Фармакокінетичні кінцеві точки.

Первинними кінцевими точками у фармакокінетичних дослідженнях препарату (субстрату СYP) мають бути наступні показники: площа під кривою «концентрація-час» (AUC) від нульового часу до останньої кількісно визначеної концентрації (AUC_{last}) і максимальна концентрація в плазмі (C_{max}). Вторинними фармакокінетичними кінцевими точками є кліренс, об'єм розподілу та період напіввиведення. У деяких випадках ці показники також можуть представляти інтерес для інгібітора або індуктора, зокрема, коли

дослідження оцінює можливу перехресну взаємодію між обома досліджуваними препаратами. Щоб продемонструвати адекватність стратегії дозування задля досягнення майже рівноважного стану до та під час взаємодії необхідно визначити показник мінімальної концентрації (C_{min}). У деяких випадках розуміння зв'язку між дозою, рівнями концентрації в крові та відповіддю може викликати необхідність визначення певних фармакокінетичних показників та/або параметрів. І навпаки, якщо клінічний результат більше пов'язаний зі ступенем всмоктування, показника AUC буде достатнім. Як і у всіх фармакокінетичних дослідженнях частота відбору проб має бути достатньою для точного визначення відповідних показників та/або параметрів для вихідної речовини та метаболітів. Для субстрату, будь то досліджуваний препарат чи схвалений препарат, визначення фармакокінетики основних активних метаболітів є важливим. Оскільки ця інструкція зосереджена на метаболічних взаємодіях між лікарськими засобами, визначення зв'язування з білками *in vivo* вважається не важливим, за винятком інтерпретації даних.

6.4.2. Фармакодинамічні кінцеві точки.

Фармакокінетичних показників зазвичай достатньо для вивчення ВЛЗ, хоча фармакодинамічні показники іноді можуть надати додаткову корисну інформацію. Це може статися, коли фармакокінетичний/ фармакодинамічний (Фк/Фд) зв'язок для субстратних кінцевих точок не встановлено, або коли фармакодинамічні зміни не є наслідком лише фармакокінетичних взаємодій, наприклад, адитивний серцево-судинний ефект хінідину та трициклічних антидепресантів [37]. У тому випадку, коли схвалений препарат досліджується як субстрат, фармакодинамічний вплив, якого сприяє зміні показників C_{max} та AUC, спричиненої досліджуваною взаємодією, має бути відомий з інших досліджень взаємодії схваленого препарату, хоча це не завжди так. для старих препаратів.

6.4.3. Розмір вибірки та статистична обробка.

Як для досліджуваних препаратів, так і для схвалених препаратів, якщо вони використовуються як субстрати та/або як взаємодіючі препарати в дослідженнях ВЛЗ, бажаною метою аналізу є визначення клінічної значущості цього процесу. У даному випадку робиться припущення про незмінність співвідношення $ФК/ФД$, а зміни, що виникають, оцінюються шляхом порівняння фармакокінетичних показників системної експозиції, які є необхідними для визначення зв'язку між дозою (експозицією) та терапевтичним результатом. Результати досліджень ВЛЗ слід представляти у вигляді 90% довірчого інтервалу між середнім геометричним співвідношенням спостережуваних фармакокінетичних показників із (S+I) і без взаємодіючого препарату (S). Довірчі інтервали забезпечують оцінку розподілу спостережуваних показників системної експозиції співвідношення S+I проти S окремо та передають ймовірність величини взаємодії [38].

Якщо ВЛЗ чітко присутня (наприклад, порівняння вказує на удвічі або більше підвищення показників системної експозиції для S+I), необхідно надати конкретні рекомендації щодо клінічної значущості взаємодії на основі показника доза-відповідь та/або залежність $ФК/ФД$ для досліджуваного агента або схвалених препаратів, що використовуються в дослідженні. Ця інформація має стати основою для звітування про результати дослідження та для надання рекомендацій щодо дози, коригування режиму дозування, запобіжних заходів, попереджень або протипоказань будь-якого препарату (досліджуваного) або схваленого. FDA визнає, що інформація про залежність від дози та/або $ФК/ФД$ іноді може бути неповною або недоступною, особливо для схвалених препаратів, які використовуються як S. По-друге, розробник препарату може зробити конкретні заяви у вкладкиші про те, що взаємодії між ліками не очікується. У цих випадках він повинен мати можливість рекомендувати конкретні межі відсутності ефекту або інтервали клінічної еквівалентності для взаємодії між ліками. Межі відсутності ефекту визначають інтервал, у межах

якого зміна вимірювання системної експозиції вважається клінічно незначущою.

6.4.4. ВЛЗ при маркуванні препаратів.

Настанови [4,8,9], які було використано для створення Методичних рекомендацій, наголошують, що усю відповідну інформацію про метаболічні шляхи ферментативних реакцій, структуру метаболітів та фармакокінетичну взаємодію препарату слід вміщувати у розділі клінічна фармакологія. Наслідки метаболізму та взаємодії слід розміщувати в розділах застереження/попередження, протипоказання і дозування та застосування, відповідно.

Перелік використаних джерел

1. Malone D, Hines L, Graff J. The Good, the Bad, and the Different: A Primer on Aspects of Heterogeneity of Treatment Effects. *J Manag Care Pharm.* 2014; 20(6): 555-563.
2. Routledge P, O'Mahony M, Woodhouse W. Adverse drug reactions in elderly patients. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2004; 57: 121–126.
3. Thomayant Prueksaritanont, Xiaoyan Chu, Christopher Gibson, Donghui Cui, Ka Lai Yee, Jeanine Ballard, Tamara Cabalu, Jerome Hochman. Drug–Drug Interaction Studies: Regulatory Guidance and An Industry Perspective. *The AAPS Journal*, 2013; 15(3): 629-646.
4. In Vitro Drug Interaction Drug Interaction Studies – Cytochrome P450 Enzyme and Transporter Mediated Drug Interactions Final – Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Food and Drug Administration (FDA), Rockville, MD, January 2020.
5. Kamel A, Harriman S. Inhibition of cytochrome P450 enzymes and biochemical aspects of mechanism-based inactivation (MBI). *Drug Discovery Today Technologies.* 2013; 10(1): 177-189.
6. Bjornsson T, et al. The conduct of in vitro and in vivo drug–drug interaction studies: a perspective of the Pharmaceutical Research and Manufacturers of America. *Drug Metab. Dispos.* 2003; 31: 815–832.
7. Thomayant Prueksaritanont,1 Xiaoyan Chu, Christopher Gibson, Donghui Cui,1 Ka Lai Yee, Jeanine Ballard, Tamara Cabalu, Jerome Hochman. Drug–Drug Interaction Studies: Regulatory Guidance and An Industry Perspective. *The AAPS Journal.* 2013; 15(3): 629-645.
8. Drug–drug interactions in pharmaceutical development. Edited by A. P. LI. Wiley-Interscience. A John Wiley & Sons, Inc., Publication. 2008. 244p.
- 9 Guideline on the Investigation of Drug Interactions, European Medicines Agency, 21 June 2012, CPMP/EWP/560/95/Rev. 1 Corr. 2**, Committee for Human Medicinal Products (CHMP) – finalized 2013.

10. Ministry of Labor and Welfare. Guideline on drug interaction for drug development and appropriate provision of information, notification No.0723-4, pharmaceutical evaluation division, pharmaceuticals safety and environmental Health bureau, Japan. July 23, 2018. <https://www.pmda.go.jp/files/000228122.pdf>
11. Hakkola J, Hukkanen J, Turpeinen M, Pelkonen O. Inhibition and induction of CYP enzymes in humans: an update. *Archives of Toxicology*. 2020; 94: 3671–3722.
12. Lin J; Lu Y. Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. *Clin. Pharmacokinet*. 1998; 35: 361–390.
13. Shou M, R, Cui D, Korzekwa K, Baillie T, Rushmore T. A kinetic model for the metabolic interaction of two substrates at the active site of cytochrome P450 3A4. *J. Biol. Chem*. 2001; 276:2256–2262.
14. Correia M, Ortiz de Montellano P. Inhibition of cytochrome P450 enzymes. In *Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry*. Kluwer Academic/Plenum Publishers. 2005; 247–322.
15. Li A. A review of the common properties of drugs with idiosyncratic hepatotoxicity and the ‘multiple determinant hypothesis’ for the manifestation of idiosyncratic drug toxicity. *Chem.Biol. Interact*. 2002;142:7–23
16. Ortiz de Montellano P. Suicide substrate for drug metabolizing enzymes: mechanisms and biological consequences. In *Progress in Drug Metabolism*, (Vol. 11). Gibson, G.G., ed., Taylor & Francis. 1988; 99–148,
17. Golovenko M. Ya., Reder A. S., Larionov V. B., Andronati S. A., Akisheva A. S. Cross-species differential plasma protein binding of Propoxazepam, a novel analgesic agent. *Biopolymers and Cell*. 2021; 37(6): 459–468.
18. Головенко Н.Я. Механизмы реакций метаболизма ксенобиотиков в биологических мембранах. Киев, Наукова думка. 1981, 220с.
19. Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, Guengerich FP. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther*. 1994; 270(1):414-423.

20. Golovenko M, Reder A, Larionov V, Andronati S. Metabolic profile and mechanisms reaction of receptor GABA-targeted propoxazepam in human hepatocytes. *Biotechnologia Acta*. 2022; 15(1): 25-33.
21. Bjornsson T; Callaghan J; Einolf H; Fischer V, Gan L, Grimm S; Kao J, King S, Miwa G; Ni L. *Drug Metab. Dispos.* 2003; 31: 815–832.
22. Stringer R, Strain-Damerell C, Nicklin P, Houston J. Evaluation of recombinant cytochrome P450 enzymes as an *in vitro* system for metabolic clearance predictions. *Drug Metab Dispos.* 2009; 37(5):1025-1034.
23. Pandit N, Robert K, Soltis P. *Introduction to the Pharmaceutical Sciences: An Integrated Approach*. 2nd ed. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins, 2012; 277.
24. Riley R, Grime K. “Metabolic screening *in vitro*: metabolic stability, CYP inhibition and induction. *Drug Discov. Today Technol.* 2004; 1(4): 365–372,
25. Pelkonen O; Maenpaa J; Taavitsainen P; Rautio A; Raunio H. Inhibition and induction of human cytochrome P450 (CYP) enzymes. *Xenobiotica* 1998; 28: 1203–1253.
26. FDA Preliminary concept paper: Drug Interaction Studies: Study Design, Data Analysis, and Implications for Dosing and Labeling (for discussion purposes only, 1 Oct, 2004). <http://www.fda.gov/> (accessed May 2006)
27. Hutzler J, Tracy T, Atypical kinetic profiles in drug metabolism reactions. *Drug Metab. Dispos.* 2002; 30: 355–362.
28. Madan A.; Usuki E; Burton L; Ogilvie B; Parkinson A. *Drugs and Pharmaceutical Sciences*. In *Drug–Drug Interactions*; Rodriguez, A.D., Ed.; Marcel Dekker: New York. 2002; 1(116): 217–294.
29. Crespi C, Miller V, Stresser D. Design and application of fluorometric assays for human cytochrome P450 inhibition. *Methods Enzymol.* 2002; 357: 276–284.
30. Chiba M, Jin L, Neway W, Vacca J, Tata J, Chapman K, Lin H. P450 interaction with farnesyl-protein transferase inhibitors. Metabolic stability, inhibitory potency, and P450 binding spectra in human liver microsomes. *Drug Metab Disp.* 2001;29:1–3.

31. Wen X, Wang S, Backman J, Kivisto K, Neuvonen P. Gemfibrozil as an inhibitor of human cytochrome P450 2C9. *Drug Metab Disp* 200;29:1359–1361.
32. Cheng Y, Prusoff H. Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol*. 1973; 22 (23): 3099–3108.
33. Vieira, M. L., Kirby, B., Ragueneau-Majlessi, I., Galetin, A., Chien, J. Y., Einolf, H. J., Fahmi, O. A., Fischer, V., Fretland, A., Grime, K., Hall, S. D., Higgs, R., Plowchalk, D., Riley, R., Seibert, E., Skordos, K., Snoeys, J., Venkatakrishnan, K., Waterhouse, T., Obach, R. S., ... Huang, S. M. (2014). Evaluation of various static in vitro-in vivo extrapolation models for risk assessment of the CYP3A inhibition potential of an investigational drug. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 95(2), 189–198. <https://doi.org/10.1038/clpt.2013.187>
34. Backman T, Kyrklund C, Neuvonen M, Neuvonen J. Gemfibrozil greatly increases plasma concentrations of cerivastatin. *Clin Pharmaol Ther* 2002;72:685–691.
35. Vickers A, Sinclair J, Zollinger M, Heitz F, Glanzel U, Johanson L, Fischer V. Multiple cytochrome P450s involved in the metabolism of terbinafine suggest a limited potential for drug-drug interactions. *Drug Metab Dispos* 1999;27: 1029–1038.
36. Guidance for Industry In Vivo Drug Metabolism/Drug Interaction Studies — Study Design, Data Analysis, and Recommendations for Dosing and Labeling. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Biologics Evaluation and Research (CBER) November 1999 Clin/Pharm.
37. Bigger J, Kantor J, Glassman A, Perl J. Cardiovascular effects of tricyclic antidepressant drugs. In: Lipton MA, DiMascio A, Killam KF (eds) *Psychopharmacology: a generation of progress*. Raven Press, New York. 1978; 1033–1046.

38. Schuirmann D. A Comparison of the Two One-Sided Tests Procedure and the Power Approach for Assessing the Bioequivalence of Average Bioavailability. *J. Pharmacokin. and Biopharm.* 1987; 15: 657-680.