

Erläuterungen zum Vorgehen bei der Beurteilung von in vitro Untersuchungen pharmakokinetischer Interaktionen mit Phytopharmaka

Stand 16.01.2004

1	WEGE INTESTINALER RESORPTION	1
2	FUNKTIONEN DES P-GLYKOPROTEIN (PGP).....	2
3	IN VITRO METHODEN ZUR UNTERSUCHUNG VON INTERAKTIONEN ÜBER PGP.....	2
3.1	INHIBITION UND SUBSTRATSPEZIFIKATION	3
3.2	INDUKTION	5
4	FUNKTION DES CYTOCHROM P 450 SYSTEMS.....	5
5	IN VITRO METHODEN ZUR UNTERSUCHUNG VON INTERAKTIONEN IM CYP 450 SYSTEM.....	5
5.1	INHIBITION UND SUBSTRATSPEZIFIKATION	5
5.2	INDUKTION	7
6	IN VITRO METHODEN ZUR UNTERSUCHUNG DER VERSCHIEDENEN MECHANISMEN DER INTERAKTIONEN ÜBER P-GLYKOPROTEIN UND CYTOCHROM P 450 TABELLARISCHE ZUSAMMENFASSUNG	8
7	PROBLEME BEI DER UNTERSUCHUNG VON PHYTOPHARMAKA	9
8	PROBLEME BEI DER EXTRAPOLATION DER DATEN VON IN VITRO BEFUNDEN AUF DIE KLINISCHE SITUATION BEI DURCH PHYTOPHARMAKA INDUZIERTEN WECHSELWIRKUNGEN	10

Aufgabe dieses ergänzenden Hintergrundpapiers ist es, die Eignung, Vor- und Nachteile der verschiedenen beschriebenen in vitro Modelle zur Untersuchung pharmakokinetischer Wechselwirkungen durch Interaktion am P- Glykoprotein und den Cytochrom P 450 Isoenzymen nach Durchsicht der Literatur darzustellen. Schwerpunkt der Darstellung ist eine mögliche Eignung der Modelle für die Prüfung von Phytopharmaka. Angesichts der Komplexität des Themas ist eine umfassende Behandlung nicht beabsichtigt. Gegebenenfalls sind weitere Publikationen und Empfehlungen zu berücksichtigen.

1 Wege intestinaler Resorption

Folgende Wege intestinaler Resorption sind beschrieben:

- Pathway A: passiver transzellulärer Transport (lipophile Moleküle)
- Pathway B: aktiver Transport über spezifischen Carrier
- Pathway C: parazellulärer Transport (kleine hydrophile Moleküle)
- Pathway D: Endocytose (z.B. Transcytose)
- Pathway E: transzellulärer Transport nach Metabolisierung in der Zelle
- Pathway F: Modulator für den parazellulären Transport (tight junctions)
- Pathway G: apikal polarisierter Effluxmechanismus (P-Glykoprotein)

Lipophile Stoffe werden in der Regel schnell und komplett resorbiert. Es wird davon ausgegangen, dass sie ausschließlich über den passiven transzellulären Weg transportiert werden. Hydrophile Stoffe und Peptide verteilen sich schlecht in Zellmembranen. Es wird daher vermutet, dass diese Stoffe durch wassergefüllte Poren des parazellulären Weges durch das intestinale Epithel transportiert werden. Teilweise werden hydrophile Drogen auch auf transzellulärem Wege transportiert oder es erfolgt ein aktiver Transport (z.B. Arbutin aus Bärentraubenblättern). Trotz besserer Löslichkeit hydrophiler Stoffe in der extrazellulären Flüssigkeit im Vergleich zur Membrangängigkeit können fast gleiche Mengen auf transzellulärem und parazellulärem Weg transportiert werden, da die Membranfläche lumenwärts fast das 1000fache der parazellulären Membranfläche beträgt. Manche hydrophilen Stoffe, deren chemische Strukturen Nahrungsmitteln ähneln, können durch aktiven carriervermittelten Transport durch das intestinale Epithel gelangen. Wenn der carriervermittelte Transport gesättigt ist, steigt der Anteil des passiven Transportes

dosisabhängig. Hat die Substanz eine niedrige passive Permeabilität, sinkt nach Sättigung des Carriersystems die absorbierte Menge. Der Carrier kann durch hohe Dosen der Substanz oder durch Nahrungsstoffe gesättigt werden. Pgp ist ein Carriersystem, das den Transport von der Serosa nach der Mucosa vermittelt, in diesen Fällen führt die Sättigung des Carriersystems zum Anstieg der absorbierten Fraktion. Durch die niedrige Kapazität der Transzytose (rezeptorvermittelter, vesikelgebundener Transport von Stoffen durch die Zelle), werden hierüber nur sehr große Moleküle wie z.B. Peptidantigene transportiert. Dieser Weg weist einen weiteren Aspekt auf, der Transport erfolgt in Vesikeln, die viele proteolytische Enzyme enthalten, daher werden z.B. transportierte Proteine angedaut. (z.B. Vit B12 und intrinsic factor; M-Zellen und orale Vaccinen)

2 Funktionen des P-Glykoprotein (Pgp)

Pgp, codiert durch humane MDR1 oder murine *mdr1a/1b* Gene, funktioniert als ein Substanzeffluxtransporter, während Pgp, das durch humanes MDR3 oder murines *mdr2* codiert wird, dem Phospholipidtransport zugeordnet wird.

MDR1 Pgp ist auf der canaliculären Oberfläche der Hepatozyten, der apikalen Oberfläche von tubulären Epithelzellen der Niere, der apikalen Oberfläche von Epithelzellen des Intestinaltraktes (Kuppe der Villi) und der Plazenta, sowie der luminalen Oberfläche kapillarer Endothelzellen im Hirn lokalisiert.

Pgp spielt beim Menschen eine wichtige Rolle bei der Absorption (untersucht an transgenen *mdr1a* single und *mdr1a/1b* double homozygoten knock out Mäusen), Verteilung, beim Metabolismus und bei der Exkretion von Substanzen. Es hat eine breite Substratspezifität. Daher spielen Arzneimittelinteraktionen dann eine Rolle, wenn Substrate und Inducer oder Inhibitoren gleichzeitig gegeben werden.¹ Wegen seiner intrazellulären Lokalisation begrenzt Pgp die zelluläre Aufnahme von Stoffen aus dem Blutkreislauf in Hirn und Plazenta und vom gastrointestinalen Lumen in die Enterozyten. Auf der anderen Seite steigert der Transporter die Elimination von Arzneistoffen aus den Hepatozyten, renalen Tubuli und intestinalen Zellen in die angrenzenden Lumina. Bei intravenöser Gabe von Talindolol wurde im Dünndarmperfusat von 6 gesunden Probanden sezerniertes Talindolol nachgewiesen². Die Mengen von Pgp mRNA steigen vom Magen über Duodenum, Jejunum, Ileum bis zum Colon kontinuierlich an.³ Dies trägt zur Variabilität der Absorption von Drogen bei. Erhebliche interindividuelle Schwankungen (bis zu 8x) in der Expression von Pgp, wahrscheinlich aufgrund eines genetischen Polymorphismus, sind nachgewiesen. Die funktionelle Aktivität von Pgp ist sättigbar, wenn die Konzentration (C) im intestinalen Lumen über K_m liegt. Daher ist die Bedeutung des Pgp für die Absorption bei hohen Dosen gering, es sei denn, es liegt eine geringe Wasserlöslichkeit, eine langsame Freisetzungsrates und ein großes Molekül vor.

Verapamil war der erste Pgp Inhibitor, für den in vitro gezeigt werden konnte, dass er die drug resistance gegenüber Vincristin von MDR Zelllinien überwinden half.

3 In vitro Methoden zur Untersuchung von Interaktionen über Pgp

Die zu klärenden Fragen lauten: Wird die Substanz aktiv oder passiv durch das intestinale Epithel transportiert? Wenn der Transport aktiv ist, muss der Carrier identifiziert werden. In der Regel werden zwei Transportsysteme untersucht: der Dipeptidcarrier und das P-Glykoprotein.

1

¹ Lin JH (2002) *Advanced Drug Delivery Reviews* Vol 55 I: 53-81

² Gramatte T et al. (1999) *Clin Pharmacol Ther* 66:239-245

³ Fojo AT et al. (1987) *Proc Natl Acad Sci* 84:838-844

Es sei darauf hingewiesen, dass es für das Auffinden von Effekten auf eine Beeinflussung des P-Glykoproteins bisher keine allgemein akzeptierte Vorgehensweise gibt (Note for guidance on the investigation of drug interactions CPMP/EWP/560/95). Dennoch sind die am häufigsten beschriebene Methoden Untersuchungen an Caco 2 Zellen und an MDR1 transfizierten Zelllinien. Sie werden im Folgenden mit Vor- und Nachteilen diskutiert.

3.1 Inhibition und Substratspezifikation

Caco-2 Zellen:

Die Zellen eines humanen Colonadenocarcinoms werden als Monolayer auf permeablen Filtern kultiviert, um die Differenzierung von Enterozyten und den transepithelialen Transport von Drogen zu untersuchen. Sie sind geeignet um vier mögliche Wege zu untersuchen, den passiven transzellulären und parazellulären Weg, den carriervermittelten Weg und den Weg durch Transcytose.

Passiver transzellulärer und parazellulärer (Transportmarker: Mannitol) Transport werden im Modell Caco2 Zellen gut im Vergleich zu in vivo Modellen (humanes Jejunum in situ in Doppelballontechnik und Einwegperfusion) dargestellt.^{4,5} Schnell und komplett absorbierte Verbindungen differierten nur um das 2-4 fache zwischen den Modellen, wohingegen langsam und inkomplett absorbierte Verbindungen mit einer 30-80fach langsameren Rate durch Caco2 Monolayer transportiert werden als im humanen Jejunum¹. (geringere Permeabilität des parazellulären Transportweges und größere Absorptionsfläche im Darm durch Mikrovilli).

Passiver Transport in Monolayern ist kaum untersucht, kann aber dienen, um Absorptionsprobleme aufzuzeigen und Absorptionsraten abzuschätzen.

PgP wird auf der Oberseite des konfluenten Monolayers aus CaCo2 Zellen exprimiert. (Fluoreszenzsubstrat des PgP Rhodamin 123 als akzeptierter Marker). Dadurch sind Studien zum vektoriellen transzellulären Transport möglich. PgP ist verantwortlich für den Efflux vieler hydrophober Verbindungen wie Vinblastin und Taxol. MRP2 wird in der apikalen Membran von Caco2 Zellen exprimiert. MRP2 Substrate sind charakterisiert durch ihre anionische Natur. Caco2 Zellen sind auch ein akzeptiertes Modell zur Untersuchung anderer Transporter (MRP, LRP, Dipeptidtransporter).

Bei der Bewertung zu berücksichtigende Gesichtspunkte:

Es handelt sich um eine Tumorzelllinie, daher sind die Resultate nur eingeschränkt übertragbar. Probleme sind: die Variabilität der Zelllinie; der unterschiedliche Selektionsdruck in verschiedenen Labors; d.h. die Ergebnisse aus verschiedenen Labors sind nicht vergleichbar. Die Präparation vom Monolayern ist problematisch. Die Eigenschaften der Zelllinie variieren je nach Zahl der Passagen (Expression der Transporter und Enzyme ändern sich mit der Anzahl der Passagen, Infektionen der Kulturen mit Bakterien und Pilzen), der Zeit in Kultur, dem verwendeten extrazellulären permeablen Filter und dem Zellkulturmedium. Lokale Transportcarrierprobleme sind nicht abbildbar.

Zusammenfassend scheinen Caco2 Monolayer geeignet den Transport von Substanzen über verschiedene Transportwege durch intestinales Epithel vorherzusagen. Die beste Korrelation mit der absorbierten Fraktion in vivo besteht jedoch für passiv transportierte Stoffe auf dem transzellulären Transportweg. Der parazelluläre Transport kleiner hydrophiler Verbindungen ist in Caco2 Zelllayern langsamer als in vivo, möglicherweise, weil die interzellulären Zwischenräume enger sind als in vivo. Problematisch ist, dass die PgP Expression erst komplett ist mit der Konfluenz des Monolayers nach 21-28 Tagen (vgl. 3 Tage bei MDR1 transfizierte MDCK Zellen).

1

⁴ Lennernäs H et al (1996) Int J Pharm 127:103-107

⁵ Amidon GL et al (1995) Pharm Res 12:413-420

MDR 1- transfizierte Zelllinien

Im Folgenden werden bei Durchsicht der Literatur häufig beschriebene Modelle verschiedener Spezies und verschiedener Organzuordnung beschrieben.

MDCK-MDR1: Madin-Darby Canine Kidney cells: in der Nativform exprimiert diese Zelllinie niedrige Level der Effluxpumpe PgP; MDR1 transfiziert, überexprimiert diese Zelllinie das humane MDR1 Gen und stellt damit ein spezifisches Modell für Untersuchungen des PgP vermittelten Transportes dar, da die Nativform zu vernachlässigende Mengen endogener Transporter exprimiert. Die PgP Expression ist auf das 25fache gegenüber der nativen Form gesteigert und 10 fach höher als bei Caco2 Zellen⁶. Nach Inkubation mit Verapamil (PgP Inhibitor) exprimiert MDCK-MDR1 nur niedrige Mengen von Transportproteinen und metabolisierenden Enzymen.⁷ Im Gegensatz zu Caco2 Zellen, die humanen Ursprungs sind, handelt es sich hier um canine Zellen, die als Nierenzellen eine andere Membranzusammensetzung aufweisen als humane Colonicarcinomzellen, daher sind die unterschiedlichen Ergebnisse in den Verfahren erklärlich. Die unterschiedliche Membranzusammensetzung führt zu Unterschieden in der räumlichen Orientierung des PgP in der apikalen Membran, was wiederum zu Unterschieden in der Substrat/Inhibitor Spezifität und zu Unterschieden beim Substratefflux führt.⁸

Bei der Bewertung zu berücksichtigende Gesichtspunkte:

Diese MDR1 transfizierte Zelllinie ist ein nützliches Modell zum qualitativen Screening der PgP Substrataktivität von Drogen, auch wenn die Werte der Kinetikkonstanten K_m , V_{max} und der Affinitätskonstanten K_I verschieden von denen, gewonnen an Caco2 Zellen sind. Verschiedene Substrate: (DNR: Daunorubicin, LDS:LDS751; TMR Tetramethylrosaminchlorid;⁹) DNR und LDS sind sensitiver einigen Inhibitoren gegenüber als die anderen Marker. IC_{50} Werte sind nur vergleichbar wenn der Substratmarker mit angegeben ist, da z.B. Reserpin und Cyclosporin A sich nicht hinsichtlich Ihrer IC_{50} Werte in Bezug auf verschiedene Marker unterscheiden.⁹

LLC-PK1: Schweinenierenepithelzellen

sind zusammen mit MDCK-MDR1 das meist genutzte Modell um die Funktion des renalen PgP zu untersuchen.

NIH3T3/MDR1: transfizierte Mausfibroblasten

exprimieren eine deutlich höhere Dichte von PgP als Caco-2 Zellen.

NIH3T3/G185: transfizierte Mausfibroblasten

überexprimieren das Genprodukt des humanen MDR1 Gens

1

⁶ Gurley BJ (2002) Clin Pharmacol Ther ;72:276-287

⁷ Braun A et al (2000) Eur J pharm Sci 11 (Suppl. 2) 51-60

⁸ Ferte J (2000) Eur J Biochem 267:277-294

⁹ Er-jia Wang et al (2001) Biochem Biophys Res Comm 289:580-585)

Ergänzende Modelle:Rekombinante humane MDR1 Membranen (PgP Membranen)

Die Expression des humanen MDR1 (multidrug resistance) Gens auf kommerziellen Membranpräparationen erzeugt eine vanadatsensitive ATPase, die merklich stimuliert wird von Stoffen, die mit PgP interagieren¹⁰.

3.2 InduktionLS180 Zellen:

Die humane Colonadenocarcinomzelllinie ist nach Selektion auf erhöhte PgP Expression geeignet für Studien zur PgP Induktion. Die Selektion findet z.B. mit Vinblastin statt¹¹. Da Caco2 Zellen erst nennenswerte Mengen PgP Mengen exprimieren, wenn eine Konfluenz des Monolayers erreicht ist, lassen sich LS180 Zellen gut induzieren lassen, eignen sich LS180 Zellen besser für Induktionsuntersuchungen.

4 Funktion des Cytochrom P 450 Systems

Die Entwicklung und Diversifizierung des CYP 450 Systems dient phylogenetisch am ehesten der Entgiftung u.a. durch die Nahrung aufgenommener giftiger Bestandteile Pflanzen. Neben der wichtigsten Funktion der oxidativen Metabolisierung endogener Verbindungen (z.B. Steroide, Neuropeptide) obliegt den Enzymen besonders in Gastrointestinaltrakt die Entgiftung aufgenommener chemischer Verbindungen. Diese xenobiotischen Verbindungen stammen aus der Nahrung, Arzneimitteln, Rauch und jeglicher aufgenommener organischer Verbindung. Nach Schätzungen von Wrighton SA et al¹² hat die CYP 3A Form Teil am Metabolismus von circa 50% aller Arzneimittel, CYP2D6 bis zu 30%, CYP2C 9 bis zu 10%, CYP's 1A2, 2A6, 2E1; 2C19 tragen bei zum Metabolismus von je 1-2 % aller Substanzen. Laut Guengerich 1997 sind 6 Enzyme verantwortlich für mehr als 90% der Oxydation humaner Arzneimittel (1A2, 3A4, 2C9, 2C19, 2D6 und 1E2)¹³

5 In vitro Methoden zur Untersuchung von Interaktionen im CYP 450 System**5.1 Inhibition und Substratspezifikation**humane Lebermikrosomen:

Mikrosomen werden aus Lebergewebe durch Homogenisation und Zentrifugation gewonnen. Sie können bei -80°C eingefroren über Jahre gelagert werden, ohne CYP Aktivität einzubüßen. Um Formspezifität im CYP450 vermittelten Metabolismus zu untersuchen, wurden zwei prinzipielle Herangehensweisen entwickelt. Wenn die Isoenzyme aus humanem Gewebe gewonnen wurden, sind die Isoenzyme in einer natürlichen Mischung enthalten. Es gibt keine Durchschnittsdefinition, der Gehalt von CYP 3A4 z.B. kann um das 10 fache schwanken. Sie exprimieren Phase I Aktivität (oxidative Prozesse), aber nur Teile der Phase II Aktivität

1

¹⁰ Foster BC (2001) (J Pharm Pharmaceut Sci 4(2):176-184¹¹ Wang RW et al (2000) Drug Metabol Dispos 28,360-366¹² Wrighton SA et al (1999) Drug Met Rev 31(1):15-28¹³ Guengerich FP (1997) Adv Pharmacol 43:7-35

(Konjugation der Stoffe mit körpereigenen Molekülen z.B. Glukuronidierung, Sulfatierung, Verbindung mit Glutathion). Sie können nur für kurze Inkubationszeiten (ca 1 Stunde) genutzt werden, d.h. schlecht metabolisierende Drogen sind so nicht zu untersuchen.¹⁴ Sekundärer Metabolismus ist nicht darstellbar. So können die Ergebnisse deutlich von in vivo Befunden abweichen.

Aus diesen Proben kann mRNA für CYP Enzyme isoliert werden, von der mittels Reverser Transcription cDNA produziert wird. Mittels PCR erfolgt die Amplifizierung.

Die cDNA wird z.B. ins Baculovirus/Sf9 Zell Expressionssystem eingebaut: Insektenzellen produzieren rekombinante heterolog exprimierte humane CYP Isoenzyme nach Transfektion der Doppelstrang-DNA durch Baculoviren¹⁵ (siehe cDNA exprimierte CYP Isoformen).

Bei der Bewertung zu berücksichtigende Gesichtspunkte:

Interindividuelle Schwankungen der Enzymausstattung abhängig von genetischem Polymorphismus, ethnischem Hintergrund und Geschlecht sind die Regel. Grund für die interindividuellen Schwankungen kann auch sein, dass die Enzyme bereits durch Arzneimittel oder xenobiotische Verbindungen induziert, inhibiert oder durch Substrate inaktiviert sind. Erkrankungen des Zellspenders können eine Rolle spielen.

Hauptnachteil ist, dass die Inhibitionsparameter, die in vivo Situation nicht akkurat widerspiegeln, da der Einfluss des Drogentransportes nicht betrachtet werden kann.¹⁶ Kofaktoren, die zur Metabolisierung gebraucht werden, müssen zugefügt werden. Manche Enzyme, die sequentiell arbeiten, liegen in verschiedenen Zellkompartimenten.

cDNA exprimierte CYP Isoformen (heterologe komplementäre DNA Expressionsmodelle)

stellen eine reproduzierbare konsistente Quelle einzelner Isoenzyme dar, erlauben die Zuordnung des Metabolismus einer Drogenzubereitung. Sie sind, geeignet für die Untersuchung einer selektiven Inhibition durch die Drogenzubereitungen. (z.B. Baculovirus/Sf9 Zell Expressionssystem: Insektenzellen produzieren rekombinante heterolog exprimierte humane CYP Isoenzyme nach Transfektion der Doppelstrang-DNA durch Baculoviren¹⁷). (Quelle der DNA siehe humane Lebermikrosomen) Das System ist nicht abhängig von den Inkonsistenzen von primären Leberzellkulturen.

Die Inhibition des Metabolismus eines Modellsubstrates durch die Drogenzubereitung kann untersucht werden. Es können K_i Werte erhoben werden, die einen Vergleich mit K_i Werten bekannter klinisch signifikanter Inhibitoren desselben Enzyms ermöglichen.

Zum praktischen Gebrauch muss ein Inhibitor gut charakterisiert sein, von hoher Selektivität (die IC_{50} muss um das Hundertfache niedriger sein, als bei anderen Isoenzymen). Reversible Inhibition kann ein Problem darstellen: der Inhibitor bindet effektiv an die katalytische Seite des Enzyms. Wenn er schlecht metabolisiert wird, verlangsamt er die Aktivität des Enzyms. Irreversible Inhibition entsteht durch den Oxidationsschritt entstandene Metabolite, die die katalytische Aktivität irreversibel hemmen können. Beispiele für geeignete Substrate und Inhibitoren der verschiedenen Isoenzyme des CYP450 finden sich bei Donato et al.¹⁸ Zur Identifikation der einzelnen CYP Isoformen sind inhibierende Antikörper verfügbar. Die Verwendung solcher Antikörper in Verbindung Lebermikrosomen/ rekonstituierten Enzymen erlaubt, die Rolle der verschiedenen CYP Isoformen im metabolischen Abbauweg der Stoffe zu untersuchen, besonders wenn mehrere CYP Enzyme beteiligt sind. Die Spezifität der Antikörper ist zu belegen, nicht immer inhibieren sie die katalytische Wirkung der Enzyme komplett.

1

¹⁴ Donato MT et al (2003) Clin Pharmacokinet 42(2):153-178

¹⁵ Obach RS (2000) JPET Vol. 294, No. 1: 88-95

¹⁶ Donato MT et al (2003) Clin Pharmacokinet 42(2):153-178

¹⁷ Obach RS (2000) JPET Vol. 294, No. 1: 88-95

¹⁸ Donato MT et al (2003) Clin Pharmacokinet 42(2):153-178

Bei der Bewertung zu berücksichtigende Gesichtspunkte:

Es sind im Modell keine anderen Stoffwechselwege vorhanden. Die Identifikation des Enzyms, das am sensitivsten mit einer Hemmung auf die Drogenzubereitung reagiert, erlaubt Vorhersagen welche anderen gleichzeitig gegebenen Substanzen, die über das gleiche Enzym metabolisiert werden, Gegenstand einer Hemmung ihres Metabolismus durch Zufuhr der untersuchten Drogenzubereitung werden. Die Übertragbarkeit der Daten auf die mikrosomale Situation ist nicht gegeben, da dann diverse Stoffwechselwege zur Verfügung stehen. Die derzeit zur Verfügung stehenden Enzyme haben geringe Turnoverraten, daher sind Substrate mit geringer Affinität schwer zu untersuchen. Das Hauptisoenzym verantwortlich für den Metabolismus einer Substanz bestimmt sich durch die intrinsische Clearance (V_{max}/K_m) und den Überschuss des Enzyms. Die Bestimmung einer einzelnen sättigenden Substratkonzentration ist nicht ausreichend, da die Sättigung in vivo meist nicht erreicht wird, da die Konzentrationen in vivo nicht so hoch sind (unter $5\mu\text{M}$ in vitro empfehlenswert).

Ergänzende Modelle:

Im Folgenden werden neuere Ansätze beschrieben, deren Wertigkeit noch nicht abschließend zu beurteilen ist, die jedoch in Detailfragen hilfreich sein können:

Genetisch manipulierte Zellen zur Expression einzelner CYP Gene (CYP engineered Cells):

Die Zellen werden mit einem cDNA Konstrukt das mit einem starken Promotor kombiniert ist transfiziert, um eine stabile hohe Expression eines CYP Isoenzym zu erhalten. Durch Inkubation mit mehreren Zelllinien lässt sich klären, ob die Droge ein Substrat für ein bestimmtes CYP Isoenzym ist.

Bei der Bewertung zu berücksichtigende Gesichtspunkte:

Dieses Modell ist aussagekräftiger als isolierte Isoenzyme oder Mikrosomen Modelle, da die Membranbarrieren funktionieren. Hier reagiert nur ein Isoenzym mit der Substanz, während in primären Hepatozytenkulturen viele reagieren können. Daher ist das System nur zum Screening geeignet.

Immunoquantifizierung:

der Levels vieler arzneimittelmetabolisierender Enzyme mittels spezifischer Antikörper ist möglich und erlaubt die phänotypische Charakterisierung verschiedener Leberproben. (Charakterisierung einer Datenbank; Beschreibung und Vorhersage interindividueller Unterschiede für in vitro Interaktionsstudien; Bestimmung von Speciesunterschieden im Metabolismus verschiedener Verbindungen).

5.2 Induktion**Primäre humane Hepatozyten**

werden aus dem Gewebsverband isoliert durch Kollagenaseperfusion. Monolayerkulturen dienen der Untersuchung der Induktion. Es stehen auch kryopraeservierte erwachsene humane Hepatozyten in Polysaccharidmatrices zur Verfügung, die bei einer Viabilität vom 70-80% im aufgetauten Zustand und einer metabolischen Kapazität der Phase I und Phase II Enzyme von 60% der Ausgangszellen akzeptabel sind, wenn frische Zellen nicht zur Verfügung stehen. Nach 24-72 std. Inkubation mit dem potentiellen Inducer werden die Aktivitäten der CYP Isoformen bestimmt, indem man spezifische Substrate benutzt. Die Ergebnisse zeigen in der Regel einen Anstieg um

das 2-10 fache der Kontrollen für alle Isoformen, CYP 1A2 ist bis zu dem 100 fachen Wert induzierbar. In Kollagenmatrix kultivierte Hepatozyten bewahren ihre Fähigkeit zu reagieren für bis zu 2 Wochen.¹⁹

Bei der Bewertung zu berücksichtigende Gesichtspunkte:

Die Ergebnisse der Stoffwechseluntersuchungen an kultivierten primären Hepatozyten zeigen grosse interindividuelle Varianzen entsprechen aber gut den Untersuchungen des Metabolismus an den Spendern in vivo.²⁰ Genexpression, alle metabolischen Stoffwechselwege, Kofaktoren/Enzyme und Plasmamembranen sind intakt und verfügbar um die Verbindungen von Interesse zu verstoffwechseln. Diese Monolayerkulturen der frischen Hepatozyten sind für Metabolisierungsuntersuchungen geeignet (Verlust von 40% CYP 450 in 24 Std.) und können für je 2-3 Tage benutzt werden, da nach dem anfänglichen Verlust die Enzymgehalte konstant sind. Da die Zellmenge begrenzt ist, werden genomische DNA Sequenzen isoliert und mittels PCR amplifiziert, um genetischen Polymorphismus zu untersuchen.

BC2Zellen, Hep G2 Zellen:

BC2 Zellen (Zelllinie eines humanen Hepatoms), bei denen die Wachstumshemmung bei Kontakt erhalten ist und die in Kultur differenzieren. Die Enzymaktivität von BC2 Zellen ist sehr viel höher als bei Hep G2 Zellen, aber niedriger als bei primären Hepatozyten in Kultur.

Bei der Bewertung zu berücksichtigende Gesichtspunkte:

Sie reflektieren nicht die genauen Stoffwechselwege ihrer Ausgangszellen. Sie haben oft nur geringe und nur teilweise ausgeprägt CYP 450 Expression.

Die vergleichenden Untersuchungen an Lebermikrosomen bzw. Leberzellen von Mensch und Tier erlauben die Beurteilung der Speziesdifferenzen und eine rationale Auswahl der Tiermodelle für weitere tierexperimentelle Untersuchungen.

6 In vitro Methoden zur Untersuchung der verschiedenen Mechanismen der Interaktionen über P-Glykoprotein und Cytochrom P 450 Tabellarische Zusammenfassung

In der Tabelle werden in der Literatur beschriebene Methoden zur in vitro Bestimmung von Arzneimittelinteraktionen an P-Glykoprotein und im CYP 450 System und ihre Eignung zur Bestimmung der Interaktionsmöglichkeiten zugeordnet. Diese Modelle erscheinen für die Untersuchung von in vitro Interaktionen pflanzlicher Zubereitungen prinzipiell geeignet.

Beobachtungsziel	P-Glykoprotein	CYP450
Substratidentifikation	Caco 2 Zellen MDR 1 transfizierte Zelllinien	Humane Lebermikrosomen cDNA exprimierte CYP Isoformen
Induktion	LS 180 Zellen	Primäre humane Hepatozyten HepG2 Zellen LS180 Zellen
Inhibition	Caco 2 Zellen MDR 1 transfizierte Zelllinien	Humane Lebermikrosomen cDNA exprimierte CYP Isoformen

1

¹⁹ Gomez-Lechon MJ et al. (1998) J Cell Physiol 177:553-62

²⁰ Ponsoda X et al. (2001) J Hepatol 34:19-25

Ergänzende Modelle können zur Klärung von Detailfragen hilfreich sein, auch wenn sie nicht zu den häufig genannten Modellen gehören.

In in vitro Versuchen sollten allerdings bevorzugt Bestandteile humaner Zellen oder Gewebe verwendet werden, da die Speciesunterschiede erheblich sind.²¹ Falls keine humanen Modelle zur Verfügung stehen, sollten die erhobenen Daten kritisch im Hinblick auf die Übertragbarkeit auf den Menschen diskutiert werden.

7 Probleme bei der Untersuchung von Phytopharmaka

Folgende Gesichtspunkte müssen bei der Untersuchung pflanzlicher Zubereitungen im Besonderen berücksichtigt und gegebenenfalls diskutiert werden:

- Die Konzentrationen der interagierenden Verbindungen sind in vitro anders als in vivo. Die Gewebespiegel der meisten Inhaltsstoffe sind nicht bekannt.
- Die Konzentration der Prüfsubstanz darf nicht zu hoch gewählt werden. Zu hohe Konzentrationen der Prüfsubstanzen haben sich als Ursache vieler diskrepanter Ergebnisse zwischen in vitro Befunden und in vivo Ergebnissen erwiesen, wobei es sowohl zu falsch positiven aber auch zu falsch negativen Ergebnissen kommen kann. Darüber hinaus kann auch die Konzentration des Substrates, das auf Interaktion mit der Prüfsubstanz getestet wird, die Reaktion beeinflussen. Es erscheint sinnvoll, bei klinisch relevanten Konzentrationen gegen unterschiedliche Konzentrationen des Substrates zu prüfen und verschiedene Enzymverdünnungen einzusetzen (s. u. a. Fischer et al, 1997).
- Bei den Testungen auf mögliche Interaktionen sollten Konzentrationen eingesetzt werden, die relevanten Konzentrationen der Substanzen bzw. pflanzlichen Zubereitungen in vivo entsprechen²² Yuan et al (1999) führen an: "High substrate concentrations have been identified as an underlying reason for many of the inconsistent results between the in vitro findings and the in vivo outcomes."²³
- Zur Berechnung einer sinnvollen Konzentration geht man am besten von einer Resorption von 100% aus, und berücksichtigt das Verteilungsvolumen je nach der Polarität des Extraktes. Die Aufenthaltszeit ist zu bedenken und ein Sicherheitsfaktor von 100 hinzuzufügen.
- Ein weiteres Problem bei der Testung von Phytopharmaka auf Arzneimittelinteraktionen in vitro ist, dass sich nicht wie bei Reinsubstanzen zunächst der Abbauweg der Substanz und damit die hauptsächlich in den Metabolismus involvierten Enzyme bestimmen lassen. Untersuchungen zur Pharmakokinetik fehlen und machen auch keinen Sinn, wenn nicht der wirksame Inhaltsstoff/die wirksamen Inhaltsstoffe eindeutig identifiziert sind. Das bedeutet, für eine Testung sollte der entsprechende Extrakt durch eine Koinkubation mit bekannten Substraten auf eine mögliche Beeinflussung bestimmter Abbauege geprüft werden.
- Geprüft werden sollte dabei der Extrakt, nicht einzelne Inhaltsstoffe, da der Extrakt nicht die Einzelsubstanzen arzneilich eingesetzt wird. Durch eine bessere Löslichkeit der Inhaltsstoffe im Extrakt kann jedoch u.U. auch die Verwendung von höheren Lösungsmittel-Konzentrationen, die für die Lösung der Inhaltsstoffe nötig wäre, entbehrlich werden.
- Eine Untersuchung einzelner Inhaltsstoffe wird als Grundlage der Wirkung des Extraktes in der Regel nicht gefordert, liegt diese jedoch vor, dann sind diese beobachteten Effekte auch für Interaktionen der Extrakte zu prüfen.
- Da die verschiedenen Extrakte in ihrer Zusammensetzung erheblich differieren, sollten zumindest die in vitro Befunde extraktspezifisch erhoben werden. Die Ergebnisse der

1

²¹ Fuhr U et al (1992) Biochem Pharmacol 34: 225-235

²² „GUIDANCE FOR INDUSTRY: Drug metabolism/drug interaction studies in the drug development process: studies in vitro“

²³ Yuan R et al (1999) Clin Pharm Ther 55:9-15

Untersuchungen können für wässrige, wässrig-alkoholische (40-70% (V/V) Methanol oder Ethanol), und lipophile Extrakte in Gruppen übertragen werden, solange keine widersprüchlichen Befunde vorliegen.

- Yuan et al (1999)²⁴ fassen die Erfahrungen der FDA mit in vitro Untersuchungen im Cytochrom P 450 System auf eine metabolische Interaktion zusammen. Sie beschreiben die Verwendung humaner Mikrosomenfraktionen als die am häufigsten eingesetzte und damit auch am besten zu bewertende Methode. Als besonders sinnvoll sehen sie deren Einsatz bei langfristig oral angewendeten Präparaten an. In dem Artikel werden die Substrate und die Referenzinhibitoren für die unterschiedlichen CYP Enzyme aufgeführt. Dabei wird auf wichtige Aspekte hingewiesen, die oft nicht berücksichtigt wurden:
 - Das Ergebnis kann durch die Inkubationsbedingungen wie die Inkubationszeit beeinflusst werden. Da es sich bei den meisten Enzymreaktionen um reversible Michaelis-Menten Reaktionen handelt, sollten Enzymaktivitäten zur konstanten initialen Reaktionsrate bestimmt werden, die Linearität zwischen der Stoffwechselrate und der Inkubationszeit wäre zu prüfen. Für die jeweils eingesetzte Inkubationszeit ist eine Rationale anzugeben (s. auch Thummel and Wilkinson, 1998).
- Gleiches gilt für die Reaktionszeit der Enzyminkubation mit dem definierten Substrat und dem Gesamtextrakt. Die Linearität der Reaktion bei Inkubation mit einem Vielstoffgemisch wäre zu dokumentieren.
- Die Bestimmung der K_i –Werte ist der Bestimmung der IC 50-Werte vorzuziehen, wobei aber auch die Größe des K_i –Wertes keinen absoluten Wert darstellt, sondern in gewissem Umfang vom verwendeten Substrat abhängt.
- Resultate von Inhibitionsstudien sind nützlich, um Interaktionen vorherzusagen, das Verhältnis der Affinität des Inhibitors zur Affinität des Substrates (K_i / K_m) ist verantwortlich für den Metabolismus.
- Die Berücksichtigung des Genotyps oder Phänotyps des Leberspenders (z.B. Langsam-Schnellazetylierer) ist zu beachten. Das Problem lässt sich durch Verwenden eines Pools verschiedener Spender ausgleichen. Dabei kann allerdings das Ausmaß der Interaktionen bei bestimmten Geno-/Phänotypen unterschätzt werden.

Bei der Validierung der Systeme sollten u.a. die obengenannten Punkte berücksichtigt werden. Eine gute Beschreibung der Methode der Testung auf Interaktion an humanen Lebermikrosomen findet sich u.a. bei Fischer et al 1997²⁵, bei Nomeir et al (2001)²⁶, Wang et al (2000)²⁷.

8 Probleme bei der Extrapolation der Daten von in vitro Befunden auf die klinische Situation bei durch Phytopharmaka induzierten Wechselwirkungen

Vorhersagen auf der Grundlage von in vitro Daten sind schwierig und werden kontrovers diskutiert. Es gibt keinen generellen Konsens über die zu nutzenden Parameter und die experimentellen Strategien. In vivo Extrapolation von in vitro erhobenen Daten basiert auf der Bestimmung der in vitro Clearance errechnet von den K_m und V_m Werten aus den in vitro Messungen und zum zweiten aus den in vivo Parametern Lebermasse, Leberblutfluss und ungebundene Fraktion der Droge im Blut.¹²

Probleme sind das in vitro experimentelle Design, der mögliche Anteil extrahepatischen Metabolismus, des aktiven Transportes in der Leber, die interindividuelle Variabilität und die nichtlineare Pharmakokinetik. Zudem adaptiert der Organismus an den Effekt der Arzneimittel

1

²⁴ Yuan R et al (1999) Clin Pharm Ther 55:9-15

²⁵ Fischer U et al (1997) J Clin Pharmacol 37, 1150-1159

²⁶ Nomeir A et al (2001): Drug Metabol Dispos 29, 748-753

²⁷ Wang RW et al (2000) Drug Metabol Dispos 28, 360-366

z.B. durch Enzyminduktion. Außerdem steigt die Expression z.B. von PgP vom Duodenum bis zum Colon kontinuierlich an: d.h. bei unbekanntem Resorptionsort der Vielstoffgemische pflanzlicher Arzneimittel ist ein positiver in vitro Befund nur begrenzt übertragbar.

Die hier erörterten weniger komplexen in vitro Methoden ergeben möglicherweise falsch positive oder falsch negative Ergebnisse für pflanzliche Zubereitungen, weil eine der interagierenden Verbindungen durch eine Komponente aktiviert werden muss, die nur in vivo vorkommt (z.B. ein Inhibitor eines metabolisierenden Enzyms, der an einer Zelllinie untersucht wird, die dieses Enzym verstärkt exprimiert, braucht die Aktivierung durch ein anderes Enzym).

So liegen für Johanniskraut in vitro durchgängig Inhibitionsbefunde an verschiedenen CYP 450 Isoenzymen für verschiedene einzelne Inhaltsstoffe vor (Bi-Apigenin, Hypericin, Hyperforin usw)²⁸. Klinisch handelt es sich aber um eine Induktion des CYP 3A4 durch den Gesamtextrakt. Bei wiederholter Gabe entwickelt sich bei Inhibitoren in vitro häufig eine Enzyminduktion in vivo²⁹.