

VU Research Portal

Interplay between phase I and phase II biotransformation of drugs

Vredenburg, G.

2015

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

Vredenburg, G. (2015). *Interplay between phase I and phase II biotransformation of drugs: In vitro approaches to study the formation and fate of reactive metabolites.*

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Deel I: introductie

Een belangrijke oorzaak voor het falen van geneesmiddelen tijdens de ontwikkeling of tijdens het gebruik is het optreden van Adverse Drug Reactions (ADRs), een verzamelnaam voor verschillende giftige bijwerkingen. Van deze bijwerkingen zijn de zogenaamde idiosyncratische reacties (IDRs) bijzonder lastig te voorspellen. Zij komen maar zelden voor, maar zijn meestal wel zeer ernstig van aard. De vorming van chemisch reactieve metabolieten, afbraakproducten die bij sommige geneesmiddelen ontstaan in het lichaam, lijkt een cruciale rol te spelen bij het ontstaan van dergelijke bijwerkingen.

Wanneer een geneesmiddel in het lichaam wordt opgenomen, kan het verschillende biochemische reacties ondergaan om het molecuul beter oplosbaar in water te maken. Hierdoor kan het lichaam deze lichaamsvreemde stoffen beter uitscheiden. Dit proces wordt “metabolisme” of “biotransformatie” genoemd. Het menselijk lichaam bevat verschillende enzymen (specifieke eiwitten) die deze reacties kunnen uitvoeren. Fase I enzymen kenmerken zich door het introduceren van een nieuwe functionele groep op het geneesmiddelmolecuul. Fase II enzymen kunnen het geneesmiddelmolecuul koppelen aan grotere lichaamseigen stoffen die goed wateroplosbaar zijn. Meestal zijn de afbraakproducten van het geneesmiddel (de metabolieten) onschadelijk. Soms ontstaan er echter ook afbraakproducten die schadelijk zijn voor de cel: reactieve metabolieten.

Reactieve metabolieten kunnen binden aan eiwitten en het DNA waardoor ze verschillende cellulaire processen verstoren. Het samenspel tussen de vorming (bioactivatie) en de afbraak (inactivatie) in het menselijk lichaam bepaalt de hoeveelheid en het uiteindelijke lot van deze reactieve metabolieten, en uiteindelijk ook het toxische effect. Kennis van de verschillende routes die betrokken zijn bij de afbraak van geneesmiddelen kan helpen om het ontstaan van ADRs te verklaren en te voorspellen. Onderzoek naar dit geneesmiddelmetabolisme kan bovendien bijdragen aan de ontwikkeling van “personalized medicine”: farmaceutische gezondheidszorg toegespitst op de (genetische) eigenschappen van de individuele patiënt.

Het algemene doel van dit proefschrift was om het samenspel (of “interplay”) tussen verschillende enzymen betrokken bij de afbraak van geneesmiddelen te bestuderen, alsmede de mogelijke effecten daarvan op geneesmiddeltoxiciteit. In dit proefschrift worden enkele nieuwe methoden beschreven om het vormen en afbreken van reactieve geneesmiddelmetabolieten te bestuderen. Deze methoden maken deels gebruik van genetisch gemodificeerde bakkersgist als cellulair modelsysteem, of gebruiken combinaties van geïsoleerde individuele enzymen buiten de cel.

Hoofdstuk 1 beschrijft kort de mogelijke rol van chemisch reactieve metabolieten bij het ontstaan van ADRs en IDRs. De vier verschillende fasen van geneesmiddelmetabolisme en transport worden besproken. Hun gezamenlijke functie (m.a.w. de balans tussen bioactivatie, inactivatie en transport) bepaalt de uiteindelijke blootstelling van het lichaam aan chemisch reactieve metabolieten. Drie specifieke enzymfamilies krijgen daarbij extra aandacht: cytochrome P450 (CYP), NADPH quinone oxidoreductase 1 (NQO1) en glutathione S-transferase (GST). Hun mogelijke rol bij het vormen

en/of opruimen van reactieve geneesmiddelmetabolieten is samengevat. Ook komen de mogelijke effecten van bekende genetische polymorfismen van deze enzymen (verschillende genetische variaties binnen de menselijke populatie, vaak met een verschillende activiteit) aan bod.

Vervolgens geeft hoofdstuk 1 een overzicht van de verschillende *in vitro* (“reageerbuis”) systemen die kunnen worden toegepast bij het bestuderen van geneesmiddelmetabolisme en toxiciteit. Zoals met elk model zien we dat de beschikbare modelsystemen een compromis vormen: waar eenvoudig toepasbare cellulaire modellen slechts een beperkte voorspellende waarde hebben, benaderen complexere maar minder gebruiksvriendelijke modellen het menselijk lichaam doorgaans veel beter. Verschillende *in vitro* alternatieven voor menselijk leverweefsel, doorgaans beschouwd als het meest ideale modelsysteem, worden gepresenteerd. Zo behandelt hoofdstuk 1 onder andere het gebruik van extracellulaire bioactivatie, genetisch gemodificeerde cellijnen en *in silico* (“computer”) modellen om *in vitro* data te extrapoleren naar de *in vivo* (“in het lichaam”) situatie. Tot slot wordt het doel van dit proefschrift geïllustreerd met enkele bestaande voorbeelden van studies die het samenspel tussen enzymatische activatie, inactivatie en transport van geneesmiddelen bestuderen.

Deel II: gist als cellulair model om metabolisme en toxiciteit van geneesmiddelen te bestuderen

Deel II van dit proefschrift beschrijft de genetische modificatie van de bakkergist *Saccharomyces cerevisiae* als een eenvoudig en kosteneffectief cellulair modelsysteem om de toxiciteit van geneesmiddelmetabolisme te bestuderen. **Hoofdstuk 2** toont de expressie van een mutant van het bacteriële CYP BM3 in deze gistsoort. Deze mutant (BM3 M11) was eerder ontwikkeld om het menselijke oxidatieve metabolisme van verschillende geneesmiddelen met hoge activiteit na te bootsen. Met dit gistmodel bleek het mogelijk een van de menselijke metabolieten van de pijnstiller diclofenac, 4'-hydroxydiclofenac, te vormen. Doorgaans wordt aangenomen dat de verdere oxidatie van 4'-hydroxydiclofenac tot reactieve quinone imines een belangrijke rol speelt in de toxiciteit van diclofenac. Inderdaad resulteerde het BM3 M11 metabolisme van diclofenac in gist in een remming van de groei en een verhoogde vorming van reactieve zuurstofradicalen (“reactive oxygen species”, of kortweg “ROS”). Opvallend genoeg bleek echter dat directe blootstelling van de gistcellen aan 4'-hydroxydiclofenac geen toxiciteit tot gevolg had. Dit laatste wijst er op dat andere reactieve metabolieten dan de quinone imines mogelijk betrokken zijn bij de toxiciteit van diclofenac in gist.

Het BM3 M11 gistmodel bleek met enige aanpassing ook gebruikt te kunnen worden voor het bestuderen van de interplay tussen bioactivatie en inactivatie van geneesmiddelen. Een belangrijke inactivatie route voor reactieve metabolieten is de binding aan glutathion (GSH). Deze glutathion conjugatie kan spontaan plaatsvinden in de cel, maar de reactie kan ook worden versneld door glutathion S-transferase (GST) enzymen. **Hoofdstuk 3** toont de succesvolle co-expressie van het bioactivatie enzym CYP BM3 M11 met drie verschillende humane GSTs (A1-1, M1-1 en P1-1). Om dit nieuwe gistsysteem te testen is clozapine gebruikt, een veelgebruikt antipsychoticum dat echter soms kan leiden tot ernstige leverschade en een levensbedreigende daling van het aantal witte

bloedcellen. Bioactivatie van clozapine door CYP enzymen leidt o.a. tot de vorming van een reactief nitrenium ion dat verantwoordelijk wordt gehouden voor de toxiciteit van clozapine. Het nitrenium ion kan echter onschadelijk worden gemaakt door binding met GSH, al dan niet gekatalyseerd door GST enzymen. Hoewel clozapine in wild-type gist al giftig bleek, nam de celgroei aanzienlijk af door de expressie van CYP BM3 M11. Bovendien nam de vorming van ROS in de gistcellen toe door de blootstelling aan clozapine. Co-expressie van GST P1-1 beschermde tegen de remming van de groei veroorzaakt door clozapine terwijl twee andere GST enzymen (A1-1 en M1-1) daar niet toe in staat waren. Mogelijk is dit het gevolg van de verschillende soorten GSH-conjugaten die de verschillende GSTs van clozapine kunnen vormen. GST P1-1 was echter niet in staat de toegenomen ROS productie terug te dringen. Dit impliceert dat de remming van de groei door blootstelling aan clozapine niet het gevolg is van de verhoogde vorming van ROS. De verhoogde ROS productie bleek niet te worden veroorzaakt door schade aan de mitochondriën, zoals eerder wel het geval was bij blootstelling van gist aan diclofenac (hoofdstuk 2).

Deel III: vorming en ontgiftiging van (reactieve) geneesmiddelmetabolieten met behulp van recombinante enzymen

Deel III van het proefschrift richt zich op het gebruik van geïsoleerde enzymen in plaats van genetisch gemodificeerde (gist)cellen om geneesmiddelmetabolisme te onderzoeken. In **hoofdstuk 4** is onderzocht in hoeverre menselijk NQO1 in staat is reactieve quinone imine metabolieten van geneesmiddelen onschadelijk te maken. Gebaseerd op eerdere onderzoeken met NQO1 en het reactieve metaboliet van paracetamol (NAPQI) zijn soortgelijke reactieve metabolieten van twee andere pijnstillers bestudeerd: mefenaminezuur en diclofenac. Om deze reactieve metabolieten te maken werden paracetamol en de 4'- en 5-hydroxymetabolieten van mefenaminezuur en diclofenac afgebroken met gezuiverd CYP BM3 M11. De ontstane reactieve quinone imines werden met GSH gevangen en gemeten. Toevoeging van geïsoleerd NQO1 resulteerde in een zeer sterke afname in de vorming van de GSH-conjugaten. Dit is een duidelijke indicatie dat NQO1 in staat is de quinone imines te reduceren naar de beginstoffen. Bovendien bleek dat dit beschermde effect van NQO1 zeer sterk was. Zelf wanneer de GSH-conjugatie werd versterkt door het toevoegen van geïsoleerd humaan GST P1-1 bleek NQO1 de tegengestelde reactie zeer effectief te kunnen katalyseren. In sommige bevolkingsgroepen heeft bijna de helft van de mensen de inactieve NQO1*2 mutant. Deze mensen zijn mogelijk minder goed in staat de reactieve metabolieten van deze geneesmiddelen te ontgiften, waardoor zij wellicht een verhoogd risico lopen op bijwerkingen.

De vorming van reactieve afbraakproducten van geneesmiddelen is meestal een onbedoeld effect. Maar soms berust de werking van een geneesmiddel juist op het vormen van een reactief metaboliet. Een bekend voorbeeld zijn de antikanker medicijnen cyclofosfamide en ifosfamide. In **hoofdstuk 5** is bekeken of mutanten van het enzym CYP BM3 in staat zijn om deze twee geneesmiddelen te activeren tot hun werkzame metabolieten. Twee van de 39 mutanten, M11 en M11 L437S, bleken de gewenste 4-hydroxylering met hoge activiteit te katalyseren. Bovendien katalyseerden zij niet tot nauwelijks de N-dechloroethylering, een route die leidt tot de vorming van bijproducten die nier-

en zenuwschade veroorzaken. De vorming van de actieve 4-hydroxymetabolieten kenmerkte zich in een initiële snelle fase en een tweede langzamere lineaire fase. Het is echter de vraag of deze tweefasen kinetiek ook in de cel plaatsvindt en wat hiervan het gevolg is. De activiteit van de geïdentificeerde mutanten is tot op heden de hoogste ooit gerapporteerd voor cyclophosphamide en ifosfamide. Daarnaast waren de gevormde metabolieten inderdaad in staat om humane cellen (van een U2OS kankercellijn) te doden. Het BM3 enzym kan potentieel met behulp van “gene-directed prodrug enzyme therapy” in een tumorcel tot expressie worden gebracht, waardoor bioactivatie van cyclophosphamide of ifosfamide vooral lokaal in de tumor plaatsvindt. Hierdoor is de kans kleiner dat gezond weefsel in aanraking komt met de reactieve metabolieten en neemt de kans op bijwerkingen af.

Stabiele geneesmiddelmetabolieten zijn waardevol binnen het geneesmiddelenonderzoek. Ze kunnen bijvoorbeeld gebruikt worden als uitgangsstof voor nieuwe geneesmiddelen, direct toegevoegd worden aan cellen om hun biologische effecten te onderzoeken, of als vergelijkingsstof dienen bij toxiciteitsstudies. De chemische synthese van stabiele geneesmiddelmetabolieten is doorgaans echter lastig en kostbaar gezien de complexe molecuulstructuur. **Hoofdstuk 6** presenteert een alternatief voor deze chemische synthese: het gebruik van genetisch gemodificeerde cellen om metabolieten te produceren. Door CYP BM3 mutanten in gist en *Escherichia coli* bacteriën tot expressie te brengen bleek het mogelijk metabolieten van het steroïde norethisteron te produceren. *E. coli* bleek hierbij het meest efficiënt en resulteerde in een opbrengst op gram-schaal.

Conclusie

Dit proefschrift beschrijft verschillende *in vitro* methoden om de vorming en afbraak van chemisch reactieve metabolieten en hun rol in geneesmiddeltoxiciteit te bestuderen. Na vorming van deze reactieve metabolieten door CYP enzymen spelen enzymen als humane GSTs en NQO1 een rol in de daaropvolgende detoxificatie. De resultaten uit dit onderzoek laten zien dat het katalytische samenspel tussen fase I en fase II metabolisme een significante invloed kan hebben op de blootstelling van de cel aan reactieve metabolieten. Daarmee bepaalt deze interplay mogelijk ook de toxicologische uitkomst: het ontstaan van ADRs en IDRs. Daarnaast kunnen de ontwikkelde strategieën helpen om het mechanisme van bioactivatie en bioinactivatie te ontrafelen dat ten grondslag ligt aan de toxiciteit van een geneesmiddel. Wanneer de betrokken enzymen bekend zijn, kunnen patiënten gescreend worden op mogelijke genetische polymorfismen die wellicht een verhoogd risico op bijwerkingen met zich meebrengen. Zodoende komt “personalized medicine” een stap dichterbij.

Hoewel de *in vivo* relevantie altijd bestudeerd dient te worden in een meer complex cellulair model systeem, dragen deze nieuwe *in vitro* methoden bij aan het begrijpen en voorspellen van het lot van chemisch reactieve metabolieten in het menselijk lichaam.