

Új vizsgálati irányzatok a farmakokinetika és gyógyszermetabolizmus kutatásban

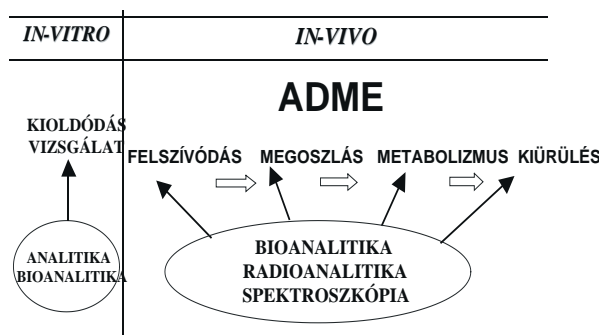
KLEBOVICH Imre

Semmelweis Egyetem Gyógyszerészeti Intézet, Hőgyes E. u. 7., 1092 Budapest

1. Bevezetés

A XXI. század gyógyszerkutatásában a farmakokinetika és a gyógyszermetabolizmus kiemelt szerephez jutott. Egyedüli tudomány terület, amely a felfedező kutatástól a törzskönyvezés utáni vizsgálatokig a gyógyszer innováció teljes K+F vertikumát átfogja. A kapott információ eszenciálisan hozzájárul az új farmakon alapvető biztonsági, hatásmechanizmus, dózis-hatás, dózis-kiválasztás, interakciók, aktív metabolitok, stb. területeinek megismeréséhez. Így a farmakokinetika, illetve gyógyszermetabolizmus különböző területei^{1,2} átvitt értelemben egy „állandó kapocs”-nak nevezhetők a farmakon szervezetbeni sorsa, koncentráció-idő változásai és azok elméleti és gyakorlati terápiás vonatkozásai között. A testidegen anyagok – a xenobiotikumok – (a gyógyszerek is) szervezetbeni sorsának kvantitatív és kvalitatív nyomon követését az **ADME** betűszóval lehet jellemezni.

A farmakokinetikai és metabolizmus kutatásban az analitikai és bioanalitikai, radioanalitikai, valamint a metabolitok szerkezetkutatásához alkalmazott spektroszkópiai módszerek tematikus összefoglalását szemlélteti az 1. Ábra.



1. Ábra. Analitikai/bioanalitikai módszerek összefoglaló sémája az *in-vitro* kioldódás és *in-vivo* ADME vizsgálatokban

2. Farmakokinetika és metabolizmus kutatásban alkalmazott módszerek és új vizsgálati irányzatok

A különböző típusú farmakokinetikai, metabolitkinetikai és toxikokinetikai vizsgálatokat csak a szigorú hatósági előírások és szabályozások alapján kidolgozott és validált bioanalitikai módszerekkel lehet végezni, amelyek az évek során jelentősen változtak, általában szigorodtak³.

A szervezetben lejátszódó részletes **ADME** folyamatokat csak a különböző biológiai mátrixokból, bioanalitikai módszerekkel kapott kvalitatív (pl. szerkezetazonosítás) és kvantitatív információval (koncentráció-idő függvényből számított farmakokinetikai paraméterek) lehet leírni.

Az extra igényekhez (érzékenység, szelektivitás, stb.) csak igen korszerű bioanalitikai, elválasztástechnikai, radiokromatográfiás, spektroszkópiai módszerekkel felelhetünk meg, amelyek jelentős átstrukturálódáson estek át az elmúlt néhány évben. Az itt alkalmazható metodikák jelentősen eltérnek a klasszikus „szubsztancia analitikában” használt szélesebb palettájú vizsgálati, detektálási lehetőségektől, mivel a kémiai jel/zaj viszony szignifikánsan különbözik a biológiai mátrixokban (plazma, vizelet, széklet, nyál, epe, szövet, stb).

Az 1. és 2. Táblázat összefoglalja a XXI. században a farmakokinetikai és metabolit kutatásban alkalmazott legfontosabb bioanalitikai, radioanalitikai és spektroszkópiai módszereket.

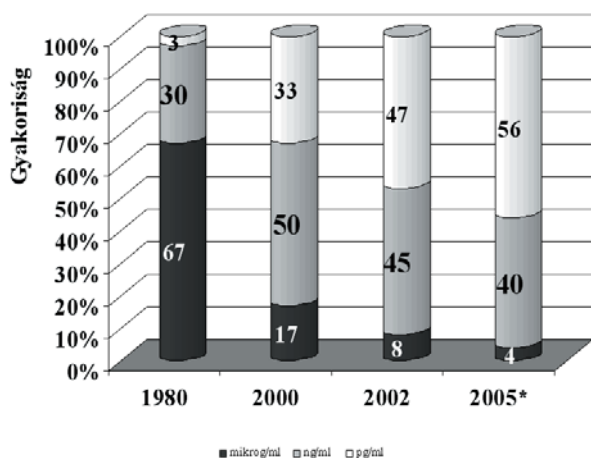
1. Táblázat. A farmakokinetikai gyakorlatban alkalmazott legfontosabb bioanalitikai technikák és detektálási módjai⁴

Technikák	Detektálási mód
I. Gázkromatográfia	FID
GC	NPD
	ECD
	RD
	MSD (P/N-EI, P/N-CI)
II. Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia	UV, DAD
HPLC	FLD
	EC
	RD
	RD-MS
	MSD (ESI, APCI, APPI)
	MS/MS (ESI, APCI, APPI)
III. Kapilláris elektroforézis	UV, DAD
CE	FLD
	MSD
IV. Kapillár elektrochromatográfia	DAD
CEC	FLD

Egyre hatékonyabb, korszerűbb gyógyszerek kerülnek törzskönyvezésre, azaz az alkalmazott dózis alacsonyabb lett és ennek következtében a szisztémás keringésbe jutó hatóanyag és a keletkező metabolit(ok) koncentrációja is jelentősen csökkent. Mindezek a tendenciák, a farmakokinetikai és metabolizmus vizsgálatokat végzőket egyre érzékenyebb és specifikusabb bioanalitikai, elválasztástechnikai, radioanalitikai (³H-, ¹⁴C-) és

*Klebovich Imre. Tel./Fax: (1)-217-0914; e-mail: klebovich@hogyes.sote.hu

szerkezetkutató módszerek fejlesztésére készítették. Ezt lehetővé tette az elmúlt időszak igen intenzív műszer fejlesztési trendje, a kapcsolt technikák intenzív elterjedése: LC-MS/MS, LC-NMR, OPLC-RD, stb.), amely átütő eredményeket hozott a bioanalitika, radioanalitika, így a farmakokinetika és a metabolitok szerkezetkutatása területén⁴⁻⁶. A világon jelenleg törzskönyvezett legjelentősebb forgalmú hatóanyagok közül a legfontosabb 50 készítménynek, többmint 56 %-a csak igen alacsony plazmakoncentrációt (fg/ml, pg/ml) ér el emberben, további 40%-a a ng/ml átlagos plazmakoncentráció tartományba esik. Csak a készítmények 4%-ának a vérszintje esik a magasnak számító µg/ml koncentráció-tartományba. A 2. Ábra szemlélteti az elmúlt 25 év "drámai vérszint-változását" a legjelentősebb 50 hatóanyag esetén⁷.



2. Ábra. A világon törzskönyvezett legjelentősebb 50 gyógyszer-készítmény plazmaszintjeinek (LLOQ) megoszlása emberben (*2005 áprilisi adat)

Ezek a plazmakoncentráció arányok jelentősen változtak az elmúlt 25 év alatt, amely következménye a vegyületek egyre javuló farmakológiai hatékonyságának (alacsony dózis), valamint a programozott hatóanyag leadású retard készítmények jelentős elterjedésének a terápiában (alacsonyabb C_{max} plazmakoncentráció) (3. Táblázat).

Ezért a ma farmakokinetikai gyakorlatában a legtöbb korszerű bioanalitikai módszer kidolgozásánál igen nagy érzékenységet (fg/ml, pg/ml, ng/ml) és szelektivitást biztosító módszert (pl. LC/MS/MS) szükséges alkalmazni.

A fenti okok és az analitikai kémia intenzív fejlődése átstrukturálta a századforduló környékén a „rutinban” alkalmazott nagy érzékenységű bioanalitikai módszerek tárházát.

A világ vezető nagy „CRO”-inak (contract research organisation) statisztikai adatai (2004)⁸ alapján, a különböző kapcsolt MS technikákat alkalmazzák (78%) messze a leggyakrabban: LC-MS/MS 58%; LC-MS 10%; GC-MS 8%; CE-MS 2%. Ezt követi a kissé háttérbe szorult HPLC

(15%) technika: HPLC-UV/DAD 9%; HPLC-FLD 4%; HPLC-EC 2%. A korábban jelentős gázkromatográfia is nagymértékben veszített (7%) a gyakoriságából: GC-NPD 4%; GC-ECD 2%. Az egyéb alkalmazott módszerek közül a kapilláris elektroforézis (CE) és a RIA mintegy 3%-ot képvisel az alkalmazott technikák gyakoriságában.

2. Táblázat. A XXI. század kezdetének metabolizmus kutatásában alkalmazott vizsgáló módszerek komplex összefoglalása

Metabolitok izolálása, elválasztása és szerkezetkutatása	Módszer
I. On-line kapcsolt technikák	<ul style="list-style-type: none"> • GC-MS (P/N-EI; P/N-CI) • GC-FTIR • LC-MS (ESI; APCI; APPI) • LC-MS/MS (ESI; APCI; APPI; TOF; TOF/TOF; Ion Trap; PDA) • LC-NMR • LC-NMR-MS/MS • OPLC-RD • OPLC-RD-MS/MS • OPLC-RD-NMR
II. Off-line technikák	<ul style="list-style-type: none"> • NMR • Nanoprobe®-NMR • FAB-MS(-MS) • EI-MS • MALDI • OPLC-DAR-FAB/MS/MS
III. „Kvázi” on-line technika	<ul style="list-style-type: none"> • Szerkezetkutatásban különféle technikák kombinációjának alkalmazása
IV. Különböző spektroszkópiai módszerek kombinációja	<ul style="list-style-type: none"> • Folyadék scintillációs spektroszkópia (LSC) • Tradicionális film kontakt autoradiográfia • Teljes test autoradiográfia • Nukleáris égetés • RIA • DAR • PIT Foszfor imaging technikák (radioluminográfia)
V. Speciális nukleáris technikák	<ul style="list-style-type: none"> • Egyensúlyi dialízis (fehérjekötődés) • Enzimes hidrolízis (metabolizmus) • Kombinált eljárások (metabolizmus)
VI. Egyéb technikák	

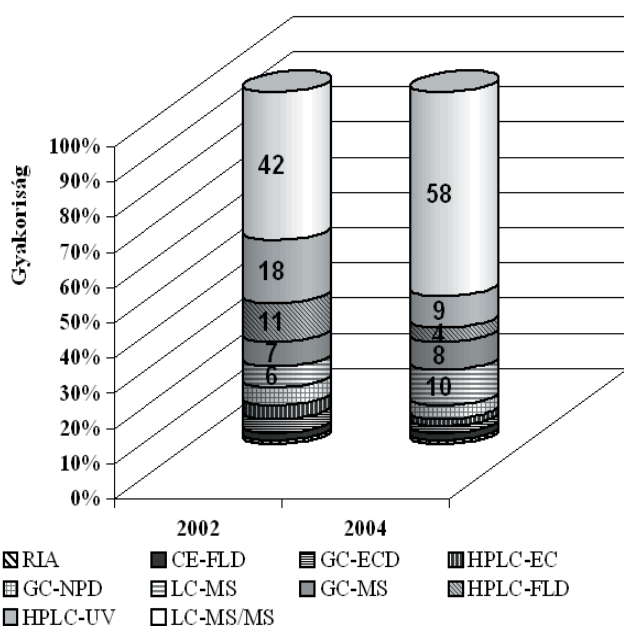
3. Táblázat. Extrém alacsony plazmakoncentrációk lehetséges okai

Farmakológiai aspektus:

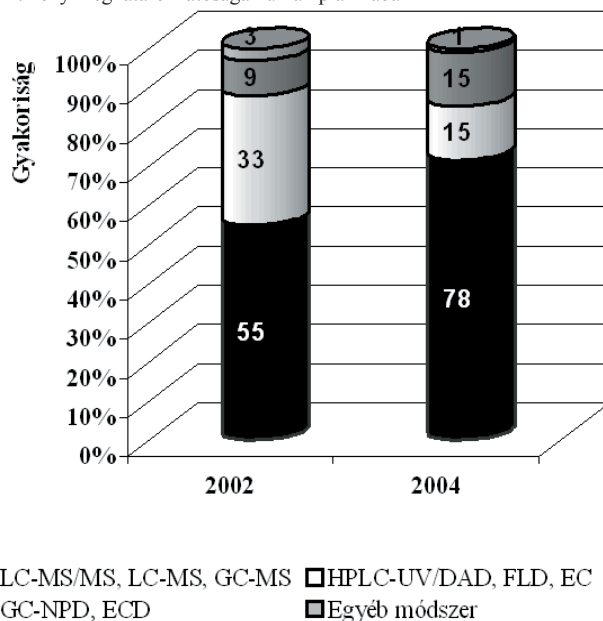
- Nagy farmakológiai hatékonyság (alacsony dózis)
- Alacsony biológiai hasznosíthatóság (F)
- Intenzív metabolizáció (First-pass metabolizmus)
- Jelentős szöveti kötődés (V_d)
- Igen erős kötődés a plazmafehérjékhez (albumin, α_1 -AGP, globulin)

Gyógyszer-technológiai aspektus:

- Programozott hatóanyagleadású retard készítmények



3. Ábra. A világon törzskönyvezett legjelentősebb 500 gyógyszer-készítmény meghatározhatósága human plazmában



4. Ábra. A human farmakokinetikai gyakorlatban alkalmazott human bioanalitikai módszerek megoszlása

A mai farmakokinetikai gyakorlatban a különböző GC/MS, de elsősorban az LC/MS/MS technika már „elsőprő” gyakoriságú tendenciát mutat. A „CRO”-k jelen vizsgálati gyakorlata mutatja, hogy az LC/MS/MS technikát különböző ionizációs módjaival (ESI, APCI és APPI), már nem csak az extrém érzékenyséű (fg/ml, pg/ml) metodikáknál alkalmazzák, hanem az ng/ml és $\mu\text{g/ml}$ nagyságrendű koncentráció tartományban is, mivel relatíve érzékeny, szelektív, gyors és olcsóbb a hagyományos GC és HPLC technikákhoz képest.

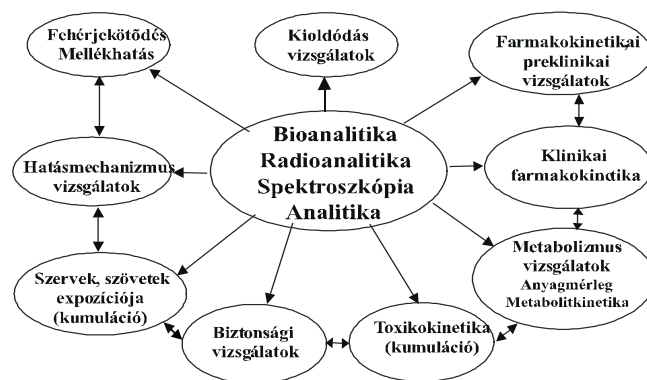
A 3. és 4. Ábra jól demonstrálja, hogy a XXI. század első évtizedének elején két év alatt a HPLC-MS/MS technika 42%-ról 58%-ra „drámaian” előretört az alkalmazásban. Ha az összes MS kapcsolt technikákat szemléljük a változás még szembetűnőbb, két év alatt 55%-ról 78%-ra emelkedett a farmakokinetikai gyakorlatban alkalmazott gyakoriságuk.

Az utóbbi években újra felértékelődött a radiokémiai on-line többféle detektálású kapcsolt technika (HPLC-RD; GC-RD; OPLC-RD), amely komplex képet ad az anyavegyület és a metabolit(ok) farmakokinetikai, metabolitkinetikai viselkedéséről, továbbá az off-line TLC/OPLC-DAR/Foszfor imaging kapcsolt technikák, amelyek esszenciálisak a metabolit izolálás és tisztítás területén. A teljestest autoradiográfiás, valamint az off-line OPLC-RD vizsgálatok napjainkban szinte kizárólagosan csak a radioluminográfia (PIT) és/vagy a DAR technikával végezhetőek^{9,10}.

A metabolit kutatásban az alkalmazott metodikák változása még szembetűnőbb. A ma ismert összes „kapcsolt technikát” alkalmazzák a metabolit izolációban, tisztításban és a metabolit szerkezetazonosításában (2. Táblázat).

3. Összefoglalás

Az originális gyógyszerek igen sokrétű, komplex preklinikai és klinikai aspektusai bizonyítják, hogy a teljes innovációs időszak alatt (K + F) szükséges a különböző típusú farmakokinetikai és metabolizmus vizsgálatok végzése¹¹⁻¹³, amihez a bioanalitikai és spektroszkópiai módszerek egész tárházát kell alkalmazni¹⁴. A farmakokinetika és gyógyszermetabolizmus kutatása tipikusan multidiszciplináris területet ölel fel, ami az originális gyógyszervegyületek esetében csak igen jelentős szellemi, valamint anyagi ráfordítással lehetséges.



5. Ábra. Bioanalitikai módszerek és a gyógyszerkutatás kapcsolata

Összefoglalásképpen a 4. táblázat bemutatja, hogy egy originális gyógyszervegyülettel végzett preklinikai és klinikai farmakokinetikai és metabolizmus vizsgálatok a törzskönyvezést milyen alapvető információval segítik.

A bemutatott bioanalitikai, spektroszkópai módszerek nélkül az alábbi esszenciális információk (ADME, biztonsági, terápiás, hatásmechanizmus, mellékhatás, stb.) nem lennének elérhetőek.

4. Táblázat. Bioanalitikai módszerek által kapott farmakokinetikai és metabolizmus információk, amelyek hozzájárulnak a törzskönyvezéshez

- Gyógyszer sorsának kvalitatív és kvantitatív nyomon követése a szervezetben: ADME, ADME_{TOX}
- Dózis - hatás kapcsolat megismerése
- Dózis kiválasztás segítése
- Inter- és intra- individuális különbségek bizonyítása
- Gyógyszer interakciók feltérképezésének segítése: gyógyszer-gyógyszer, gyógyszer-étel, -alkohol, -nikotin, -drog, stb.
- Mellékhatások megismerésének segítése
- Farmakológiailag aktív metabolitok és farmakokinetikájuk megismerése
- Metabolitok esetleges sztereoizomériájának bizonyítása

Mindez alátámasztja a farmakokinetikai és gyógyszermetabolizmus vizsgálatok¹⁵⁻¹⁷ évek óta tartó jelentős szakmai felértékelődését, súlyát és ezzel párhuzamosan egyre növekvő költség- és idő-igényét.

Hivatkozások

1. Meibohm, B.; Derendorf, H. *J. Pharm. Sci.* **2002**, *91*, 18-31.
2. Bertrand, M.; Jackson, P.; Walter, B. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2000**, *Suppl. 2*, S61-S72.
3. CDER/FDA. *Guidance for Industry, Bioanalytical Method*

New bioanalytical investigation trends in pharmacokinetics and drug metabolism research

Complex and comprehensive preclinical and clinical aspects of new chemical entities (original drugs), prove that different types of pharmacokinetic and metabolism studies are essential in the course of the whole innovation period (research and development), and for these purposes the application of bioanalytical and spectroscopic methods are of great importance. **ADME** (Absorption, Distribution, Metabolism, Elimination) processes of organs can be exclusively described by qualitative (structure identification) and quantitative bioanalytical information (pharmacokinetic parameters determined from concentration vs. time) derived from different species and their various biological matrices (plasma, serum, saliva, bile, feces, tissue, mother milk, microsome, hepatocytes...) where the chemical signal/noise ratio could be significantly different. The investigation of pharmacokinetics and drug metabolism is a typical multidisciplinary field of drug research. Since more and more efficient drugs are marketing authorized, the applied doses decreased and consequently the concentration of actives and the resulting metabolites is considerably decreasing.

Validation, Food and Drug Administration (FDA), Rockville, **2001**.

4. Evans, G. Ed.; *A handbook of bioanalysis and drug metabolism*, CRC Press, Boca Raton, **2004**.
5. Korfmacher, W.A., Ed.; *Using mass spectrometry for drug metabolism studies*, CRC Press, Boca Raton, **2005**.
6. Cazes, J., Ed.: *Encyclopedia of Chromatography*, Marcel Dekke: New York, **2001**.
7. Script adatai alapján, **2000, 2002, 2004, 2005**.
8. USA és Kanadai vezető CRO-k adatai alapján, **2000, 2002, 2004**.
9. Klebovich, I. *Application of planar chromatography and digital autoradiography in metabolism research*. In: Nyiredy, Sz., Ed.; *Planar Chromatography – A Retrospective View for the Third Millennium*, Springer Scientific Publisher: Budapest, **2001**; pp 293-311.
10. Hazai, I.; Klebovich, I. *Thin-Layer Radiochromatography*, In: Sherma, J.; Fried, B., Eds.; *Handbook of Thin-Layer Chromatography*, 3rd Edition, Marcel Dekker, Inc., New York, 2003; pp 339-360.
11. Gachályi B.; Lakner G.; Borvendég J., Eds.; *Klinikai farmakológia a gyakorlatban. A humán gyógyszerfejlesztés módszertana*, Springer Scientific Publisher: Budapest, **2003**.
12. Klebovich I. *Gyógyszer sorsa a szervezetben: Farmakokinetika és gyógyszermetabolizmus*, In: Dinya E. Ed.; *Klinikai gyógyszerfejlesztés. A molekulatervezéstől a betegágyig*, Medicina Könyvkiadó: Budapest, **2005**. pp.265-300.
13. Broker, M.; Kreuter, J. *Pharmaceutics, Modern Drugs*, CRC Press, Boca Raton, **2005**.
14. Poole, C.F. *The Essence of Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, **2002**.
15. Schoenwald, R.D. *Pharmacokinetics in drug discovery and development*, CRC Press, Boca Raton, **2002**.
16. Worsfold, P.J.; Townshend, A.; Poole, C.F. *Encyclopedia of Analytical Science, Volume 10, Second Edition*, Elsevier, Amsterdam, **2004**.
17. CDER/FDA. *Exposure response relationship: Guidance for industry*, Food and Drug Administration (FDA), Rockville, MD, **2003**.

These tendencies inspired the experts dealing with pharmacokinetic and metabolism investigations, to develop more sensitive and specific bioanalytical, separation techniques, radioanalytical (³H-, ¹⁴C-) (LSC, GC-RD, HPLC-RD, on-line-OPLC-RD, Digital Autoradiography DAR, Phosphor Imaging Technique PIT / Radioluminography) and structural investigation methods. The latter was enabled with the intensive spreading of hyphenated techniques (LC-MS/MS, LC-NMR, OPLC-RD...), which resulted in great achievements in the field of bioanalytics, radioanalytics and consequently in pharmacokinetics and metabolism research. In the everyday pharmacokinetic practice, GC/MS, and principally the LC/MS/MS techniques are the most frequently applied methods. According to up-to-date CRO investigations, the LC/MS/MS technique with its different ionization methods (ESI, APCI and APPI) is used not only for determination of extreme sensitive concentrations (fg/ml, pg/ml), but in ng/ml and µg/ml concentration range, as well.