

monostory_24_22

MTA Doktori Értekezés Tézisei

**Citokróm P450 enzimekhez köthető gyógyszer-metabolizmus a gyógyszerbiztonság
tükrében: az *in vitro* megközelítéstől a klinikai alkalmazásig**

Monostory Katalin

Természettudományi Kutatóközpont
Enzimológiai Intézet

Budapest
2022

monostory_24_22

Bevezetés és célkitűzés

A biztonságos és hatékony gyógyszeres terápia kialakítása egyaránt érdeke a betegnek és a klinikusnak, de a fejlesztőnek/gyártónak és a gyógyszer-engedélyező hatóságnak is. A gyógyszerbiztonság megteremtésének része a gyógyszerek farmakokinetikai viselkedésének és metabolizmusának feltérképezése, valamint a gyógyszerek lebontásában, enzimatis, főként a citokróm P450 (CYP) enzimekhez köthető átalakításában mutatkozó egyéni különbségek és a farmakokinetikai kölcsönhatások feltárása. Mindehhez olyan *in vitro* modellek fejlesztése szükséges, amelyek megbízhatóan képesek megbecsülni már a korai gyógyszerfejlesztési fázisban a gyógyszerjelöltek *in vivo* farmakokinetikai sajátosságait, valamint a klinikai alkalmazás során várható polimorf metabolizmust és farmakokinetikai kölcsönhatásokat. A modern gyógyszerfejlesztésnek fontos részét képezi a gyógyszerjelölttel kapcsolatban felmerülő olyan kérdések tisztázása, mint hogy 1) a metabolizmusában mely enzimek vesznek részt, 2) és a gyógyszerjelölt lehet-e forrása metabolikus gyógyszer-kölcsönhatásoknak, például gátolja-e valamelyik CYP enzim működését, vagy indukálja-e valamely CYP enzim transzkripcióját.

A gyógyszeres terápia során jelentkező nem-kívánt mellékhatások, vagy a főhatás elmaradása részben a gyógyszer-metabolizmus eltéréseiből vagy megváltozásából fakadhatnak. Az inter-individuális eltérések hátterében elsősorban a gyógyszer-metabolizmust katalizáló enzimek genetikai polimorfizmusa áll. Az enzimaktivitás és/vagy expresszió változáshoz vezető variánsok miatt a beteg gyógyszer-lebontó képessége gyengébb (vagy fokozottabb) lehet a populáció többi tagjához viszonyítva. A genotípus azonban csak annak a lehetőségét határozza meg, hogy normál vagy megváltozott működőképességű (csökkent vagy teljesen működésképtelen, esetleg fokozott aktivitású) enzim expresszálódjon; a nem-genetikai tényezők (pl. gyógyszeres kezelések, dohányzás, alkoholfogyasztás) jelentős mértékben módosíthatják a genotípus alapján becsülhető gyógyszer-metabolizáló képességet. Ezt a jelenséget hívjuk fenokonverciónak. A klinikai gyakorlatban viszonylag gyakori a multidrog terápia, amely elkerülhetetlenül magában hordozza a gyógyszer-kölcsönhatások, így a farmakokinetikai interakciók lehetőségét. A genetikai polimorfizmusok és a gyógyszer-interakciók vagy egyéb nem-genetikai tényezők (pl. életkor, megbetegedések) miatt megváltozott gyógyszer-metabolizáló képesség egyben a nem-kívánt hatások kockázatát is növeli. Ezért a személyre szabott gyógyszeres terápiák kialakításához szükség van olyan megoldásokra és módszerekre, amelyek a genetikai variánsok azonosítása mellett megbízhatóan jelzik a beteg gyógyszer-metabolizáló képességét az adott időpontban.

Az értekezés alapját képező kutatómunka során három egymásra épülő kérdéskörre fókuszáltam, amelynek eredményei hozzájárulhatnak a biztonságos gyógyszerhasználathoz.

1. Mivel a gyógyszerbiztonság megteremtése már a gyógyszerfejlesztés során elkezdődik, célul tűztem ki a gyógyszer-hatóanyagok farmakokinetikai viselkedésének, metabolizmusának és gyógyszer-interakciós sajátosságainak meghatározására alkalmas *in vitro* módszerek meghonosítását, a vizsgálatokhoz szükséges májmodellek beállítását és finomítását, valamint alkalmazását fejlesztés alatt álló gyógyszerjelöltek és klinikai használatban lévő gyógyszerek jellemzésére.
2. A biztonságos gyógyszerhasználat alapjaihoz tartozik a gyógyszer-metabolizmust katalizáló enzimek működését befolyásoló tényezők megismerése, ezért központi

szerepet kapott a CYP enzimek aktivitására érdemben kiható genetikai polimorfizmusok és a fenokonverziót eredményező faktorok azonosítása is.

3. Végül a betegek gyógyszer-metabolizáló képességének valós idejű jellemzésére helyeztem a hangsúlyt. Egy olyan diagnosztikai eljárás kidolgozását céloztam meg és a klinikai gyakorlatban való használhatóságát igyekeztem igazolni, amely fontos eszköze lehet a személyre szabott gyógyszeres kezeléseknek és az elvárásoknak megfelelő gyógyszerbiztonság megteremtésének.

Vizsgálati módszerek

1. Gyógyszer-hatóanyagok farmakokinetikai, metabolizmus és gyógyszer-interakciós sajátosságainak vizsgálata

Az *in vitro* vizsgálatokhoz laboratóriumi állatokból (patkány, egér, kutya, nyúl) és humán májszövetből izolált primer májsejteket és mikroszóma frakciót használtunk. Forgalomban lévő pszichofarmakonok és fejlesztés alatt álló gyógyszerjelöltek (LK-935, LK-980) primer hepatocita szuszpenzióban meghatározott farmakokinetikai viselkedése (felezési idő, „intrinsic clearance”) alapján becsültük az *in vivo* várható paramétereket (hepatikus „clearance”, máj extrakciós határfoka, biohasznosulás) (D1-3). A LK-935 és a panomifen metabolit-profilját primer hepatocitákban, illetve máj mikroszómában határoztuk meg (D2, D4). A farmakokinetikai gyógyszer-kölcsönhatások értékeléséhez az enzim-térképezést humán máj mikroszóma preparátumon CYP-szelektív gátlószerekkel végeztük (LK-935, deramciklan, *p*-nitrofenol, 7-hidroxi-4-trifluorometil-kumarin, paracetamol), míg a CYP-gátló és indukáló sajátosság megállapítása mikroszómában (deramciklan, tiamulin), illetve hepatocitákban (LK-935, LK-980, GYKI-47261) történt ismert CYP-gátló és indukáló hatóanyagokkal összehasonlításban (D2, D3, D5-10).

2. A CYP genetikai polimorfizmusok és a CYP fenokonverzió vizsgálata

Humán májszövet minták CYP-szelektív enzimaktivitásait (CYP1A: 7-etoxiresorufin *O*-deetiláz; CYP1A2: fenacetin *O*-dealkiláz; CYP2B6: *S*-mefenitoin *N*-demetiláz; CYP2C9: tolbutamid 4-hidroxiláz; CYP2C19: *S*-mefenitoin 4'-hidroxiláz; CYP2D6: dextrometorfan *O*-demetiláz; CYP2E1: klórozoxazon 6-hidroxiláz és 7-etoxikumarin *O*-dealkiláz; CYP3A4: nifedipin oxidáz, midazolam 1'- és 4-hidroxiláz) összevetettük a májszövet donorok CYP genotípusaival, valamint a májszövetben és a perifériás leukocitákban mérhető CYP mRNS expresszióval. A CYP allélvariánsokat, illetve a CYP expressziót PCR („polymerase chain reaction”) alapú módszerekkel, saját tervezésű vagy kereskedelmi forgalomban kapható tesztekkel határoztuk meg. (D11-16, D20, D21)

A dexametazon és a dehidroepiandrosteron CYP expressziót és aktivitást módosító hatását patkány, egér (vad-típusú CAR+/+ és CAR-hiányos CAR-/-) és humán primer májsejteken, „egy-sejt-réteg” kultúrában tanulmányoztuk. A CYP indukció mechanizmusának megállapítására a humán PXR (pregnán X receptor) aktiválást HuH7 (humán máj daganat) sejtvonalban, míg a CAR (konstitutív androsztán receptor) sejtmagba történő transzlokációját hCAR-t expresszáló egér primer májsejteken vizsgáltuk. (D17-19)

3. A gyógyszer-metabolizáló képességhez igazított személyre szabott terápia

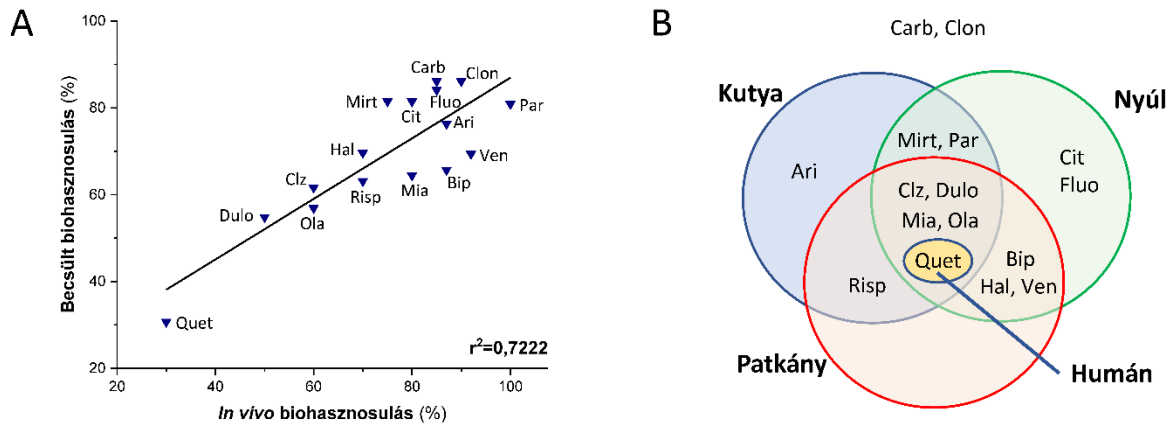
A betegek gyógyszer-metabolizáló képességét a CYP-státusz (CYP genotípus és leukocita CYP expresszió) alapján értékeltük (CYPtestTM, D20-29). A személyre szabott terápia lehetőségeit

szervátültetésen átesett betegeknél (Semmelweis Egyetem), epilepsziás gyermekeknél (Heim Pál Gyermekgyógyászati Intézet Madarász utcai Gyermekkórház) és pszichiátriai betegeknél (Semmelweis Egyetem) vizsgáltuk. A ciklosporin, takrolimusz és valproát vérszinteket immunesszé technikával, míg az aripiprazol, klozapin és klonazepam, valamint metabolitjaik vérszint meghatározása LC-MS/MS módszerrel történt. Összefüggést kerestünk a CYP-státusz és a gyógyszer, illetve metabolit vérszintek, valamint a terápiás hatáshoz szükséges dózisingény között. Továbbá májtranszplantált betegeknél és epilepsziával kezelt gyermekeknél elemeztük a CYP3A-státuszhoz, illetve a CYP2C9-státuszhoz igazított takrolimusz és valproát terápia előnyeit.

Eredmények és értékelésük

A gyógyszerek farmakokinetikai, metabolizmus és gyógyszer-interakciós sajátosságainak feltérképezése, a gyógyszer-metabolizmust befolyásoló genetikai és nem-genetikai természetű tényezők azonosítása, a betegek gyógyszer-metabolizáló képességének megállapítása és az ismeretek alapján kialakítható személyre szabott terápia alkalmazása nagyban hozzájárul a biztonságos gyógyszerhasználathoz, a mai kor „primum nil nocere” alapkövetelményéhez. Az értekezés e területen végzett kutatómunkámat összegezte három egymásra épülő részben bemutatva.

A preklinikai vizsgálatok ma már elképzelhetetlenek *in vitro* májmodellek (primer hepatociták, máj mikroszóma modell) nélkül, amelyek a maguk korlátai ellenére értékes információt szolgáltatnak a gyógyszerjelöltek farmakokinetikai viselkedéséről, a metabolizmus útvonalairól, a metabolizmust katalizáló enzimekről és a lehetséges farmakokinetikai gyógyszer-interakciókról. A MTA Kémiai Kutatóközpont Farmakobiokémiai Osztályán Magyarországon elsőként honosítottuk meg, majd a Metabolikus Gyógyszer-kölcsönhatások Kutatócsoportban továbbfejlesztettük az *in vitro* májmodell alapú, többszintű vizsgálati rendszert, amellyel számos fejlesztés alatt álló hatóanyagról nyertünk információt. Az értekezésben a koleszterinszint-csökkentő LK-935 és LK-980 (Lek Pharmaceuticals d.d.), az anxiolitikumként fejlesztett deramciklan és az ösztrogén receptor antagonistá panomifen (EGIS Gyógyszergyár ZRt), valamint az AMPA antagonistá GYKI-47261 (IVAX Gyógyszerkutató Intézet Kft) hatóanyagokkal végzett munkáinkat ismertettem (**D2-5**, **D9**). Bemutattuk, hogy a primer hepatociták egyszerű modellt jelentenek és jól alkalmazhatók az *in vitro* farmakokinetikai viselkedés tanulmányozására, a laboratóriumi állatok és az ember hepatocitái közti farmakokinetikai és metabolit-profil különbségek feltárására, valamint az *in vivo* várható farmakokinetikai paraméterek becslésére. Az *in vitro* - *in vivo* becslés megbízhatóságát forgalomban lévő pszichofarmakonok humán hepatocitákban mutatott farmakokinetikai viselkedése alapján prediktálható és a klinikai vizsgálatok során kapott biohasznosulási adatok jó egyezésével igazoltuk (1. ábra) (**D1**). A laboratóriumi állatokból és humán májszövetből izolált hepatocitákban tapasztalt „clearance” érték eltérések azonban arra hívták fel a figyelmet, hogy a faji különbségekkel számolni kell az állatról emberre történő extrapoláció során. A gyógyszerbiztonság megteremtésének szintén részét képezi a hatóanyagok farmakokinetikai gyógyszer-interakciós sajátosságainak feltárása (a metabolizmusban részt vevő enzimek azonosítása, CYP-gátló és indukáló képesség meghatározása), amely rávilágíthat a klinikai alkalmazás során várható polimorf metabolizmusra és a multidrog terápia okozta farmakokinetikai eltérésekre.



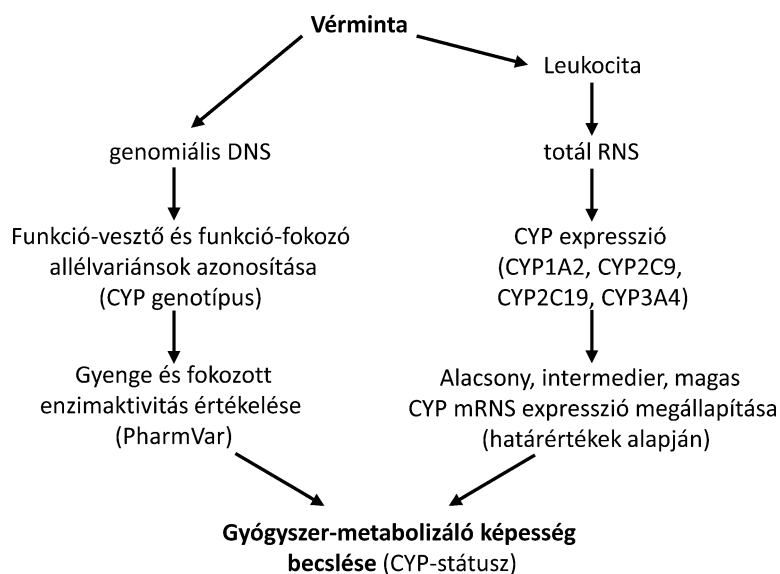
1. ábra: Tizenhat pszichofarmakon primer hepatocitákon meghatározott farmakokinetikai viselkedése alapján becült *in vivo* paraméterek: A) az *in vitro* humán farmakokinetikai paraméterekből becült biohasznosulás (F) összevetése a klinikai vizsgálatokból származó biohasznosulás adatokkal; B) a máj extrakciós hatásfoka alapján patkányban, kutyaiban, nyúlban és emberben magas extrakciójának ($E > 0,7$) minősített hatóanyagok. Ari aripirazol, Bip biperiden, Carb karbamazepin, Cit citalopram, Clon klonazepam, Clz klozapin, Dulo duloxetin, Fluo fluoxetin, Hal haloperidol, Mia mianserin, Mirt mirtazapin, Ola olanzapin, Par paroxetin, Quet kvetiapin, Risp risperidon, Ven venlafaxin

Bemutattuk azt is, hogy ezen *in vitro* módszerek nemcsak a gyógyszerfejlesztés során, de a már forgalomban lévő hatóanyagok mellékhatás mechanizmusának felderítésében is segítséget jelentenek (D6-8, D10). A paracetamol túladagolás miatt bekövetkező májkárosodás kivédésének lehetséges módját, - a toxikus *N*-acetil-*p*-benzokinonimin metabolit képződés visszaszorítását CYP2E1-gátló hatóanyagokkal, - vázoltuk fel, amely alapján a 4-metilpirazolt sikerrel alkalmazták paracetamol mérgezés kezelésében betegeknél. Feltártuk az állatgyógyászatban használt két antibiotikum, a tiamulin és a monensin együttes alkalmazása során fellépő toxicitás hátterét (a tiamulin gátolja a monensin metabolizmusát). A tiamulin CYP3A-gátló (és indukáló) sajátosságára, mint potenciális gyógyszer-interakciók forrására az EFSA (European Food Safety Authorities) külön figyelmeztet a monensinről készült összefoglaló munkákban.

A **gyógyszer-metabolizmusban megfigyelhető jelentős egyéni eltérések**, elsősorban a metabolizmust katalizáló enzimek genetikai polimorfizmusaira vezethetők vissza, míg az átmenetileg fellépő fenokonverzió éppen az időszakossága miatt a gyógyszeres terápiák „Achilles sarkát” jelenti. Ezért első lépésként az egyes allélvariánsok enzimaktivitást befolyásoló hatását fontos meghatározni, amelynek eredményei a PharmVar (Pharmacogene Variation) adatbázisban folyamatosan gyűlnek. A *CYP1A2* allélvariánsok enzimaktivásra és expresszióra gyakorolt hatásának vizsgálata során kapott új eredményekkel magunk is bővítettük a genotípus-fenotípus összefüggéseket (1. a *CYP1A2*IV* variáns *CYP1A2* aktivitást és expressziót növelő hatása volt valószínűsíthető; 2. a dohányzás minden olyan *CYP1A2* allélvariánsnál, amely hordozta a -163A mutációt, fokozott *CYP1A2* expressziót váltott ki) (D11). Ugyanakkor a nem-genetikai tényezők okozta módosulások feltárása egyfajta kihívást jelent. A CYP-szelektív hatások tisztázása már a preklinikai gyógyszer-interakciós tulajdonságok felmérése során elkezdődik, míg a hatásmechanizmus felderítése a kölcsönhatások megértését és esetleg további kölcsönhatások felismerését is elősegíti (pl. 1. a

dexametazon poszt-transzkripció mechanizmussal csökkentette a CYP1A1 indukcióját humán májsejtekben, míg a CYP1A2 indukciót nem módosította; 2. a dehidroepiandroszteron a CYP1A1 indukciót nem befolyásolta, a CYP1A2 indukciót azonban visszaszorította androgén receptor-függő módon; 3. a dehidroepiandroszteron aktiválta a CAR-t és ezzel minden olyan *CYP* gén expresszióját és aktivitását is növelte, amely CAR szabályzás alatt áll) (D17-19). Nem teljesen kézenfekvő, de szintén számolni kell a nem *CYP*-szelektív hatásokkal is, mint a krónikus alkoholfogyasztás vagy az amoxicillin+klavulánsav kezelés, amelyek jelentősen csökkenthetik a *CYP* gének expresszióját. Tovább színesíti a képet, hogy amint azt kimutattuk a genotípus-fenotípus eltérés („mismatch”) mértéke az egyes *CYP* enzimeknél igencsak különböző (D11-16). A két véglet: a CYP2D6, amelynél a genotípus viszonylag jól tükrözi a CYP2D6 aktivitást és a CYP1A2, ahol sokkal inkább a CYP1A2 expresszió, mint a genetikai háttér határozza meg az enzimaktivitást.

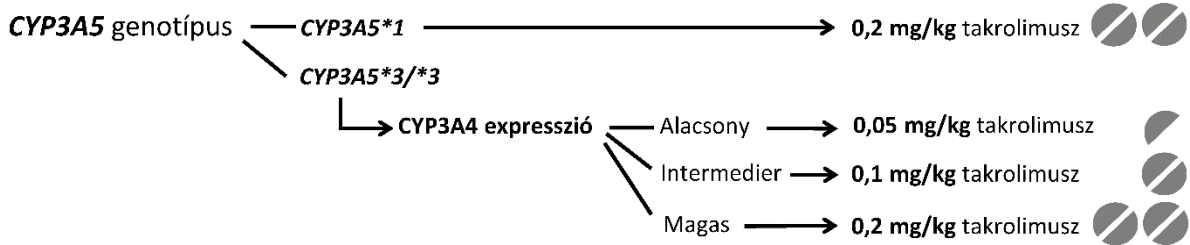
Általánosan érvényes, minden egyes hatóanyag személyre szabott dozírozásának meghatározására alkalmas szabályszerűség felállítása meglehetősen nehéz vállalkozás, bár nem is feltétlenül ez a cél. Sokkal lényegesebb, hogy a szűk terápiás indexű hatóanyagokra vonatkozóan, a hosszan tartó gyógyszeres kezelésekhöz, esetleg multidrog terápiához készüljön iránymutatás, ahol a személyre szabott gyógyszeres kezelés jelentősen javíthatja a gyógyszerek hatékonyságát és csökkentheti a mellékhatások kockázatát. Számos hatóanyaggal kapcsolatban a CPIC (Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium) ajánlást fogalmazott meg a betegek farmakogenetikai sajátosságaihoz (főként *CYP* enzimek genetikai polimorfizmusaihoz) igazított dozírozásra, amelynek gondolatmenetét egészítettük ki a leukocita *CYP* expresszió alapján történő aktuális *CYP* aktivitás becslésével (**CYPtest™**) (2. ábra). A betegek gyógyszer-metabolizáló képességének (*CYP*-státusz) értékelése két lépcsőben történik, a klinikai következményekkel járó polimorf *CYP* allélok azonosításával határozzuk meg a *CYP* genotípust, majd a leukocita *CYP* mRNS expresszióval együtt következtetünk az aktuális *CYP* enzimaktivitásra (fenotípusra) (D20, D21).



2. ábra: **CYPtest™**: a gyógyszer-metabolizáló képesség becslése vérmintából

A *CYP*-státusz alapján becsült gyógyszer-metabolizáló képesség visszatükröződött a transzplantált betegek kalcineurin inhibitor vérszintjében (májátültetésen átesett betegek

ciklosporin vérszintje, máj- és szívtranszplantált betegek takrolimusz vérkoncentrációja), epilepsiával kezelt gyermekek valproát vérszintjében, pszichiátriai betegek aripiprazol, klozapin vagy klonazepam vérkoncentrációjában, amely lehetővé tette a terápiás vérszint kialakulásához szükséges optimális hatóanyag dózis megállapítását is (3. ábra) (D22-29).



3. ábra: A átültetésre kerülő máj CYP3A-státusza (*CYP3A5* genotípus és *CYP3A4* mRNS expresszió) alapján **májtranszplantált betegeknél** javasolható takrolimusz adagolás.

A CYP-státuszhoz igazított takrolimusz, illetve valproát terápia számos előnyt jelentett a betegek számára a klasszikus klinikai gyakorlathoz (vérszint-alapú takrolimusz adagolás, tünet-alapú valproát dozírozás) képest: a takrolimusz gyorsabb stabil terápiás vérszintjének beállítása, a beültetett szerv kilökődésének és a vesekárosodás kockázatának csökkenése; a valproát terápiás tartományát átlépő vérkoncentráció kialakulásának csökkenése, az abnormálisan magas alkalikus foszfátáz szintek, valamint a hiperammonemia kialakulásának csökkenése (D24, D26). Tettez érthetjük továbbá a gyógyszer-metabolizmust módosító nem-genetikai természetű tényezőket is. Ékes példáját láttuk az életkor (gyermekkor vs felnőttkor) miatt bekövetkezett valproát-metabolizmus eltolódásának a *CYP2C9* enzim irányába (D25), a veseelégtelenség (megbetegedés) miatt jelentkező CYP expresszió visszaszorulásának (D21), a *CYP2D6* gátlás (risperidonnal, metoprolollal, propranolollal) miatt kialakult aripiprazol vérszint emelkedésnek a vad-típusú *CYP2D6*1* allélt hordozó betegeknél (D27), a metilprednizolon dózis-redukció okozta *CYP3A4* indukció mérséklődés miatt bekövetkezett takrolimusz vérszint emelkedésnek (D23), vagy a dohányzás miatt kialakult *CYP1A2* expresszió emelkedésének a *CYP1A2*-163A mutációt hordozó pszichiátriai betegeknél (D11).

Az értekezésben azokat a munkákat mutattam be, amelyek rávilágítanak, hogy a gyógyszerbiztonság megteremtése már a fejlesztés korai, preklinikai időszakában elkezdődik és végigkíséri a hatóanyagok életútját a forgalomba hozatal után is a betegágyánál. A személyre szabott gyógyszeres terápia kialakítása komplex feladat, amelynek során figyelemmel kell lennünk a hatóanyagok farmakokinetikai viselkedésén és gyógyszer-interakciós sajátosságain túl a betegek gyógyszer-metabolizáló képességére is. Az észszerűen módosított dozírozás pedig csökkentheti a mellékhatás kockázatot és javíthatja a gyógyszerek hatékonyságát is.

Új tudományos eredmények

- Primer májmodellek (hepatocita és máj mikroszóma modell) alkalmazhatóságát igazoltuk gyógyszer-hatóanyagok farmakokinetikai viselkedésének becslésére, metabolit-profil és metabolizmus útvonalak (metabolit szerkezetek) meghatározására és farmakokinetikai gyógyszer-interakciók feltérképezésére. **(D1-5, D9)**

 - A primer májsejt modellen nyert *in vitro* farmakokinetikai paraméterek ($t_{1/2}$ felezési idő, Cl_{int} „intrinsic clearance”) alapján becsülhetők az *in vivo* paraméterek (Cl_H máj „clearance”, E máj extrakciós hatásfok, F biohasznosulás). A pszichofarmakon modell vegyületek esetén a humán hepatocitákból becsült és a klinikai vizsgálatokból ismert biohasznosulás jó egyezést mutatott, azaz jó a primer májsejt modell *in vivo* predikciós értéke. **(D1)**
 - Májmodellek alkalmazásával feltártuk a koleszterinszint-csökkentő LK-935 és az ösztrogén receptor antagonistá panomifen metabolikus útvonalait. A LK-935 humán metabolizmusa során a központi nitrogén dealkilációja (propil, illetve hidroxietilpiridin oldallánc lehasadása), valamint a molekula hidroxilezése (propil-oldalláncon, piridin-gyűrűn) következett be. A panomifen metabolitok a hidroxietil-aminoetoxi oldallánc rövidülésével és 4-hidroxilezéssel jöttek létre. A humán-specifikus panomifen metabolit (oldalláncon kialakuló kettőskötés) képződése nem tekinthető előnyösnek, mert a laboratóriumi állatokon végzett toxikológiai vizsgálatokban nem nyerhető információ a hatásáról. **(D2, D4)**
 - Enzim-térképezéssel azonosítottuk a LK-935 metabolizmusát katalizáló CYP3A4 és CYP2C9 enzimet, továbbá az anxiolitikum deramciklan átalakításában domináns szerepet játszó CYP2E1-et, amely a klinikai alkalmazás során várható farmakokinetikai különbségeket valószínűsíti **(D2, D5)**. Igazoltuk, hogy a CYP2E1 aktivitás jellemzésére használt *p*-nitrofenol hidroxilezését elsődlegesen a CYP2A6 és a CYP2C19 katalizálja, így nem tekinthető CYP2E1-szelektív szubsztrátnak **(D6)**. A CYP2C9-szelektív szubsztrátnak tartott 7-metoxi-4-trifluormetil-kumarinról megállapítottuk, hogy *O*-demetilezését egyéb enzimek (CYP2E1, CYP2C19, CYP2B6) is végzik, ami megkérdőjelezi a CYP2C9-szelektivitását **(D7)**.
 - Humán hepatocitákban a LK-935 fokozta a CYP3A4 expresszióját és aktivitását, amelynek hátterében a PXR-aktiválás áll, így hasonlóan egyéb koleszterinszint-csökkentőkhöz gyógyszer-interakciók forrása lehet. Ugyanakkor a LK-980 nem okozott CYP3A4 indukciót, ami előnyt jelenthet a LK-935-tel szemben **(D2, D3)**. Az AMPA antagonistá GYKI-47261-ről kimutattuk, hogy stabilizálta a CYP2E1 enzimfehérjét, a CYP2E1 mRNS expressziót azonban nem befolyásolta; azaz képes a CYP2E1 látszólagos indukcióját kiváltani, ami a CYP2E1-szubsztrátok fokozott metabolizmusát okozhatja **(D9)**.
- Magyarázatul szolgáltunk az állatgyógyászatban alkalmazott tiamulin+monensin kombináció során fellépő súlyos mellékhatások kialakulására. A tiamulin kettős hatást gyakorolt a patkány CYP3A enzimekre, indukálta a CYP3A expressziót és közvetlenül gátolta a CYP3A működést. A monensinnel való kölcsönhatásban és a toxikus tünetek kialakulásában azonban inkább a CYP3A gátlásnak van meghatározó szerepe **(D10)**.
- Kimutattuk, hogy a paracetamol mérgezéshez vezető reaktív *N*-acetil-*p*-benzokinonimin (NAPQI) képződés visszaszorítása CYP2E1 és CYP2A6 enzimaktivitást gátló hatóanyagokkal (pl. 4-metilpirazol, diszulfiram) lehetséges, azonban a klinikai gyakorlatban alkalmazott cimetidin erre a célra nem megfelelő, mivel nem csökkenti a NAPQI termelődést **(D8)**.

4. A gyógyszer-metabolizmust befolyásoló *CYP* allélvariánsok alapján meghatározott genotípusból az egyes *CYP* enzimeknél eltérő mértékben következtethetünk a *CYP* enzimaktivitásra (0-67%). A *CYP* genotípus-fenotípus eltérésekért („mismatch”) a fenokonverziót kiváltó nem-genetikai tényezők lehetnek felelősek (15-34%). Kimutattuk, hogy a *CYP*-szelektív gátlás és indukciós hatások mellett számolni kell a nem *CYP*-specifikus hatásokkal, mint a krónikus alkoholfogyasztás és az amoxicillin+klavulánsav kezelés, amelyek szignifikánsan csökkentették számos *CYP* enzim expresszióját és aktivitását **(D11-16)**.
5. Megállapítottuk, hogy a *CYP1A2* genotípus alapján kevéssé lehet következtetni a *CYP1A2* fenotípusra, bár a *CYP1A2*IV* variáns *CYP1A2* aktivitást és expressziót növelő hatása valószínűsíthető volt. Ugyanakkor a dohányzás minden olyan *CYP1A2* allélvariánsnál, amely hordozta a -163A SNP-t (rs762551), fokozott *CYP1A2* expressziót váltott ki. Igazoltuk, hogy a gyakorinak tartott *CYP1A2*IF* allél valójában ritkán fordul elő a kaukázusi fehér populációban ($\leq 0,4\%$), amelyet azzal magyaráztunk, hogy a *CYP1A2*IF*-re jellemző -163C>A SNP más SNP-kkel kapcsolatosan jelentkezik egyéb *CYP1A2* allélvariánsokban (pl. *CYP1A2*IL*, *CYP1A2*IM*, *CYP1A2*IV*, *CYP1A2*IW*). **(D11)**
6. A szintetikus szteroid dexametazon (glukokortikoid) és az endogén szteroid dehidroepiandroszteron (hormon prekursor) *CYP* expressziót módosító hatásában számos eltérést és hasonlóságot mutattunk ki:
 - Humán májsejtekben a dexametazon a *CYP1A2* indukciót nem befolyásolta, azonban a *CYP1A1* indukcióját mérsékelte, csökkentette a *CYP1A1* fehérje expressziót és aktivitást, míg a *CYP1A1* transzkripcióját nem módosította. A dehidroepiandroszteron a *CYP1A1* indukcióra nem volt hatással, viszont a *CYP1A2* indukcióját mérsékelte az androgén receptor aktiválásán keresztül a *CYP1A2* mRNS degradációjának fokozásával. **(D17, D18)**
 - A dexametazon *CYP1A1* indukciót módosító aktivitásában különbség volt megfigyelhető a patkány és az ember között. Patkány májsejtekben a dexametazon a *CYP1A1* induktor 3-metilkolantrén hatását potenciózta, addig humán májsejtekben épp ellenkezőleg, enzimfehérje szinten redukálta a *CYP1A1* expressziót. **(D17)**
 - A dehidroepiandroszteronról igazoltuk, hogy szemben a dexametazonnal, képes a CAR-t aktiválni, amely hozzájárult a *CYP2B6*, *CYP2C9*, *CYP2C19* és *CYP3A4* enzimek indukciójához. **(D19)**
7. A betegek gyógyszer-metabolizáló képességének becslésére a klinikai gyakorlatban is alkalmazható diagnosztikai eljárást dolgoztunk ki (*CYPtest*TM), amellyel a *CYP* enzimek aktivitását befolyásoló genetikai polimorfizmusok, valamint az aktuális leukocita *CYP* expresszió mértéke alapján értékeljük a *CYP* metabolizáló fenotípust **(D20, D21)**. A leukocitákban lévő mRNS expresszió jól tükrözte a máj *CYP1A2*, *CYP2C9*, *CYP2C19* és *CYP3A4* enzimaktivitását, a leukocita *CYP2B6* és *CYP2D6* expressziót azonban nem találtuk alkalmasnak a máj *CYP2B6* és *CYP2D6* enzimaktivitásainak becslésére **(D20)**. A máj *CYP2D6* aktivitása viszonylag jó egyezéssel becsülhető a *CYP2D6* genotípus alapján **(D16)**, a *CYP1A2* aktivitást a leukociták *CYP1A2* mRNS expressziójából állapítjuk meg **(D11, D20)**, míg *CYP2C9*, *CYP2C19* és *CYP3A4/5* enzimaktivitásokra a *CYP* genotípus és a leukocita *CYP* mRNS expresszió együttes értékelésével következtethetünk **(D20)**.
8. Végstádiumú veseelégtelenségben szenvedő betegek nagy részénél (51-77%-ánál) a *CYP1A2*, *CYP2C9*, *CYP2C19* és *CYP3A4* expresszió szignifikáns csökkenését mutattunk ki,

amely közvetlen bizonyítékot szolgáltatott a vesebetegeknél megfigyelt, CYP enzimekhez köthető romló gyógyszer-metabolizmusra. (D21)

9. Májtranszplantált betegeknél szoros összefüggést mutattunk ki a beültetett donor máj CYP3A-státusza (*CYP3A5* genotípus és *CYP3A4* mRNS expresszió) és a recipienseknél mérhető normalizált (dózis/testtömeggel) ciklosporin, illetve takrolimusz vérszintek között a korai posztoperatív időszakban. A CYP3A-státusz alapján mind a ciklosporin, mind a takrolimusz terápiás vérszint eléréséhez szükséges dózis módosítására tettünk javaslatot, intermedier *CYP3A4* mRNS expressziójú (*CYP3A5**3/*3 genotípusú) szerv átültetését követően a kalcineurin inhibitor dóziséigény megegyezett a klinikai protokoll által javasolt kezdő dózissal (takrolimusz: 0,1 mg/kg; ciklosporin: 10 mg/kg), azonban a dózis 50%-os csökkentésére volt szükség az alacsony *CYP3A4* expressziójú (*CYP3A5**3/*3 genotípusú) májgrafttal transzplantált betegeknél, míg a magas *CYP3A4* expresszió vagy a *CYP3A5**1 allél a dózis emelését igényelte (ciklosporin kezdő dózisének 30-40%-os emelése, takrolimusz kezdő dózisének 2-szeresre emelése) (D22). A vérszint-alapú takrolimusz dozírozáshoz képest a májgraft CYP3A-státuszához igazított takrolimusz terápia lerövidítette a stabil terápiás vérszint beállításának idejét, valamint csökkentette a hibás dozírozásból fakadó akut kilökődési epizódok számát és a vesetoxicitás kockázatát is (D24).
10. Szívátültetésen átesett betegek CYP3A-státuszának függvényében szignifikáns takrolimusz vérszint és dóziséigény különbségeket állapítottunk meg, hasonlóan a májtranszplantált betegekhez. A kezdő takrolimusz dózis (0,1 mg/kg) módosítását javasoltuk minden esetben (alacsony *CYP3A4* expressziójú betegeknél 20%-os csökkentés, intermedier *CYP3A4* expresszió esetén 40%-os dózis emelés, *CYP3A5**1 allélt hordozó betegeknél 2,4-szeres emelés). Kimutattuk, hogy a transzplantációt követően alkalmazott magas metilprednizolon dózis a *CYP3A4*-indukáló képesség miatt jelentősen javította az alacsony posztoperatív *CYP3A4* expressziót már az első hónap végére, míg a metilprednizolon dózis redukiójával párhuzamosan fokozatosan nőtt a dózis/testtömeggel normalizált takrolimusz vérszint a *CYP3A5**3/*3 genotípusú betegeknél. A metilprednizolon dózis változtatások azonban nem okoztak szignifikáns takrolimusz vérszint változást a *CYP3A5**1 allélt hordozó betegeknél, ami a *CYP3A4* és *CYP3A5* eltérő indukálhatóságára utal. (D23)
11. A valproát gyermekeknél domináns *CYP2C9* metabolizmusát és a *CYP2C9*-státusz (*CYP2C9* genotípus és *CYP2C9* expresszió) alapján történő valproát-metabolizáló képesség becslés alkalmazhatóságát igazoltuk epilepsziás gyermekeknél. A *CYP2C9*-státusz és a valproát vérszint között kimutatott összefüggés alkalmas volt a fenntartó dózis megállapítására (két polimorf *CYP2C9* allélt hordozóknak alternatív terápia; heterozigóta *CYP2C9* genotípusúaknak 50%-kal csökkentett, 10-20 mg/kg dózis; *CYP2C9* vad genotípusú alacsony *CYP2C9* expressziójú betegeknél csökkentett, 10-20 mg/kg dózis, intermedier *CYP2C9* expressziójúaknak normál 30-40 mg/kg dózis, magas expressziójúaknak >40 mg/kg dózis javasolt). A *CYP2C9*-státuszához igazított valproát terápia hozzájárult a valproát vérszint pontosabb beállításához és a valproát kezeléshez köthető mellékhatások, mint a kóros alkalikus foszfátáz szint és az abnormálisan magas ammónia vérkoncentráció kockázatának csökkenéséhez. (D25, D26)
12. A pszichiátriai betegeknél alkalmazott aripiprazol antipszichotikum vérszintjének kialakulásában és a fő metabolit dehidroaripiprazol képződésében domináns *CYP2D6* enzim

működését a párhuzamosan használt risperidon antipszichotikum, illetve a mellékhatás (akathisia) mérséklésére alkalmazott metoprolol és propranolol gátolta és aripiprazol vérszint emelkedést idézett elő azoknál, akik legalább egy vad-típusú *CYP2D6*1* allélt hordoztak. A risperidon és 9-hidroxi metabolitja gátolta mind a dehidroaripiprazol, mind a hidroxiaripiprazol képződését, azaz a risperidon metabolizmusával nem szűnt meg a *CYP2D6*-gátló hatás. A metoprolol és a propranolol csak a farmakológiailag aktív dehidroaripiprazol képződését blokkolta és így az aripiprazol metabolizmusát az inaktiválódást eredményező útvonalak felé terelte. (D27)

13. Az antipszichotikum klozapin vérszint kialakulásában az alacsony *CYP1A2* expresszió mellett a *CYP3A4* aktivitás előtérbe kerülhetett. Kimutattuk továbbá a *CYP3A5* jelentőségét is; a vad-típusú *CYP3A5*1* allélt hordozó betegeknél alacsony normalizált klozapin vérszintek jelentkeztek függetlenül a *CYP3A4* expresszió mértékétől. (D28)
14. A hangulat-stabilizálóként alkalmazott (GABAerg gátlás fokozó) klonazepam terápia során a 7-amino-klonazepam metabolit felhalmozódását mutattuk ki *CYP3A4* intermedier expressziójú és *NAT2* lassú acetiláló fenotípusú betegeknél. Felhívtuk a figyelmet arra, hogy a 7-amino-klonazepam a lassú acetiláció miatt nem képes tovább alakulni, ami a klonazepam hatását gyengítheti, vagy a terápia leállításkor megvonási tünetekhez vezethet. (D29)

Az értekezés alapjául szolgáló publikációk (* levelező szerző)

- D1 Tóth K, Sirok D, Kiss Á, Mayer A, Pátfalusi M, Hirka G, **Monostory K***: Utility of *in vitro* pharmacokinetic data in prediction of *in vivo* hepatic clearance of psychopharmacs. *Microchem J* 136: 193-199, 2018.
doi: 10.1016/j.microc.2016.10.028 IF: 3,206
- D2 **Monostory K***, Pascussi J-M, Szabó P, Temesvári M, Köhalmy K, Acimovic J, Kocjan D, Kuzman D, Wilzewski B, Bernhardt R, Kóbori L, Rozman D: Drug-interaction potential of 2-((3,4-(dichlorophenethyl(propyl)amino)-1-(pyridin-3-yl)ethanol (LK-935), the novel non-statin type cholesterol lowering agent. *Drug Metab Dispos* 37: 375-385, 2009. doi: 10.1124/dmd.108.023887 IF: 3,743
- D3 Ačimovič J, Korošec T, Seliškar M, Bjorkhem I, **Monostory K**, Szabó P, Pascussi J-M, Belic A, Urleb U, Kocjan D, Rozman D: Inhibition of sterol delta 7-reductase (DHCR7) and other post-lanosterol enzymes by LK-980, a novel inhibitor of cholesterol synthesis. *Drug Metab Dispos* 39: 39-46, 2011. doi:10.1124/dmd.110.035840 IF: 3,733
- D4 **Monostory K***, Jemnitz K, Vereczkey L, Czira G: Species differences in metabolism of panomifene, an analogue to tamoxifen. *Drug Metab Dispos* 25: 1370-1378, 1997. PMID: 9394026 IF: 2,356
- D5 **Monostory K***, Köhalmy K, Hazai E, Vereczkey L, Kóbori L: Role of *CYP2E1* in deramciclane metabolism. *Drug Metab Dispos* 33: 1717-1722, 2005. doi: 10.1124/dmd.105.003772 IF: 4,015
- D6 **Monostory K***, Hazai E, Vereczkey L: Inhibition of cytochrome P450 enzymes participating in *p*-nitrophenol hydroxylation by drugs known as *CYP2E1* inhibitors. *Chem-Biol Interact* 147: 331-340, 2004. doi: 10.1016/j.cbi.2004.03.003 IF: 2,789

- D7 Porrogi P, Kóbori L, Kóhalmy K, Gulyás J, Vereczkey L, **Monostory K***: Limited applicability of 7-methoxy-4-trifluoromethylcoumarin as CYP-selective substrate. *Pharmacol Rep* 60: 972-979, 2008. PMID: 19211991 IF: 2,167
- D8 Hazai E, Vereczkey L, **Monostory K***: Reduction of toxic metabolite formation of acetaminophen. *Biochem Biophys Res Commun* 291: 1089-1094, 2002. doi: 10.1006/bbrc.2002.6541 IF: 2,935
- D9 Tamási V, Hazai E, Porsmyr-Palmertz M, Ingelman-Sundberg M, Vereczkey L, **Monostory K***: GYKI-47261, a new AMPA antagonist is a CYP2E1 inducer. *Drug Metab Dispos* 31:1310-1314, 2003. doi: 10.1124/dmd.31.11.1310 IF: 3,652
- D10 Szűcs G, Tamási V, Laczay P, **Monostory K***: Biochemical background of toxic interaction between tiamulin and monensin. *Chem-Biol Interact* 147: 151-161, 2004. doi: 10.1016/j.cbi.2003.12.003 IF: 2,789
- D11 Fekete F, Mangó K, Minus A, Tóth K, **Monostory K***: CYP1A2 mRNA expression rather than genetic variants indicate hepatic CYP1A2 activity. *Pharmaceutics* 14: 532, 2022. doi: 10.3390/pharmaceutics14030532 IF: 6,525
- D12 Mangó K, Kiss ÁF, Fekete F, Erdős R, **Monostory K***: CYP2B6 allelic variants and non-genetic factors influence CYP2B6 enzyme function. *Sci Rep* 12: 2984, 2022. doi: 10.1038/s41598-022-07022-9 IF: 4,996
- D13 Fekete F, Mangó K, Déri M, Incze E, Minus A, **Monostory K***: Impact of genetic and non-genetic factors on hepatic CYP2C9 expression and activity in Hungarian subjects. *Sci Rep* 11: 17081, 2021. doi: 10.1038/s41598-021-96590-3 IF: 4,996
- D14 Kiss Á, Vaskó D, Déri M, Tóth K, **Monostory K***: Combination of CYP2C19 genotype with non-genetic factors evoking phenoconversion improves phenotype prediction. *Pharmacol Rep* 70: 525-532, 2018. doi: 10.1016/j.pharep.2017.12.001 IF: 2,761
- D15 Temesvári M, Paulik J, Kóbori L, **Monostory K***: High-resolution melting curve analysis to establish CYP2C19*2 single nucleotide polymorphism: comparison with hydrolysis SNP analysis. *Mol Cell Probes* 25: 130-133, 2011. doi: 10.1016/j.mcp.2011.01.003 IF: 2,078
- D16 Kiss Á, Tóth K, Juhász C, Temesvári M, Paulik J, Hirka G, **Monostory K***: Is CYP2D6 phenotype predictable from CYP2D6 genotype? *Microchem J* 136: 209-214, 2018. doi: 10.1016/j.microc.2016.10.018 IF: 3,206
- D17 **Monostory K***, Kóhalmy K, Prough, RA, Kóbori L, Vereczkey L: The effect of synthetic glucocorticoid, dexamethasone on CYP1A1 inducibility in adult rat and human hepatocytes. *FEBS Lett* 579: 229-235, 2005. doi: 10.1016/j.febslet.2004.11.080 IF: 3,415
- D18 Belic A, Tóth K, Vrzal R, Temesvári M, Porrogi P, Orbán E, Rozman D, Dvorak Z, **Monostory K***: Dehydroepiandrosterone post-transcriptionally modifies CYP1A2 induction involving androgen receptor. *Chem-Biol Interact* 203: 597-603, 2013. doi: 10.1016/j.cbi.2013.04.002 IF: 2,982
- D19 Kóhalmy K, Tamási V, Kóbori L, Sárváry E, Pascussi J-M, Porrogi P, Rozman D, Prough RA, Meyer UA, **Monostory K***: Dehydroepiandrosterone induces human CYP2B6 through the constitutive androstane receptor. *Drug Metab Dispos* 35: 1495-1501, 2007. doi: 10.1124/dmd.107.016303 IF: 3,907

- D20 Temesvári M, Kóbori L, Paulik J, Sárváry E, Belic A, **Monostory K***: Estimation of drug-metabolizing capacity by cytochrome P450 genotyping and expression. *J Pharmacol Exp Therap* 341: 294-305, 2012. doi: 10.1124/jpet.111.189597
IF: 3,891
- D21 Déri M, Kiss Á, Tóth K, Paulik J, Sárváry E, Kóbori L, **Monostory K***: End-stage renal disease reduces the expression of drug-metabolizing cytochrome P450s. *Pharmacol Rep* 72: 1695-1705, 2020. doi: 10.1007/s43440-020-00127-w
IF: 3,024
- D22 **Monostory K***, Tóth K, Kiss Á, Háfra E, Csikány N, Paulik J, Sárváry E, Kóbori L: Personalizing calcineurin inhibitor therapy by adjusting to donor CYP3A-status in liver transplant patients. *Brit J Clin Pharmacol* 80: 1429-1437, 2015. doi: 10.1111/bcp.12747
IF: 3,830
- D23 Déri M, Szakál-Tóth Zs, Fekete F, Mangó K, Incze E, Minus A, Merkely B, Sax B, **Monostory K***: CYP3A-status is associated with blood concentration and dose-requirement of tacrolimus in heart transplant recipients. *Sci Rep* 11: 21389, 2021. doi: 10.1038/s41598-021-00942-y
IF: 4,996
- D24 Csikány N, Kiss Á, Déri M, Fekete F, Minus A, Tóth K, Temesvári M, Sárváry E, Bihari L, Gerlei Zs, Kóbori L, **Monostory K***: Clinical significance of personalized tacrolimus dosing by adjusting to donor CYP3A-status in liver transplant recipients. *Brit J Clin Pharmacol* 87: 1790-1800, 2021. doi: 10.1111/bcp.14566
IF: 3,716
- D25 Tóth K, Búdi T, Kiss Á, Temesvári M, Háfra E, Nagy A, Szever Z, **Monostory K***: Phenoconversion of CYP2C9 in epilepsy limits the predictive value of CYP2C9 genotype in optimizing valproate therapy. *Per Med* 12: 199-207, 2015. doi: 10.2217/PME.14.82
IF: 1,000
- D26 Búdi T, Tóth K, Nagy A, Szever Z, Kiss Á, Temesvári M, Háfra E, Garami M, Tapodi A, **Monostory K***: Clinical significance of CYP2C9-status guided valproic acid therapy in children. *Epilepsia* 56: 849-855, 2015. doi: 10.1111/epi.13011
IF: 4,706
- D27 Kiss Á, Menus Á, Tóth K, Déri M, Sirok D, Gabri E, Belic A, Csukly G, Bitter I, **Monostory K***: Phenoconversion of CYP2D6 by inhibitors modifies aripiprazole exposure. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 270: 71-82, 2020. doi: 10.1007/s00406-018-0975-2
IF: 5,276
- D28 Tóth K, Csukly G, Sirok D, Belic A, Kiss Á, Háfra E, Déri M, Menus Á, Bitter I, **Monostory K***: Potential role of patients' CYP3A-status in clozapine pharmacokinetics. *Int J Neuropsychopharmacol* 20: 529-537 (pyx019), 2017. doi: 10.1093/ijnp/pyx019
IF: 4,712
- D29 Tóth K, Csukly G, Sirok D, Belic A, Kiss Á, Háfra E, Déri M, Menus Á, Bitter I, **Monostory K***: Optimization of clonazepam therapy adjusted to patient's CYP3A-status and NAT2 genotype. *Int J Neuropsychopharmacol* 19: pyw083, 2016. doi: 10.1093/ijnp/pyw083
IF: 4,712