

Isabel Katharina Ruth Wustrow

Dr. med.

In vitro Identifizierung der Cytochrom P450 Isoenzyme, die für die N-Demethylierung des aktiven Opioidmetaboliten Nortilidin verantwortlich sind

Promotionsfach: Klinische Pharmakologie

Doktorvater: Prof. Dr. med. Dipl. Phys. Gerd Mikus

TLD wurde 1970 von der Firma Gödecke mit dem Handelsnamen Valoron[®] N als niedrig potent wirksames Opioid gegen starke und sehr starke Schmerzen zugelassen. TLD gilt als ein Prodrug, das erst zum analgetisch wirksamen NT metabolisiert wird und dann weiter zum analgetisch unwirksamen BNT abgebaut wird. Die erste N-Demethylierungsreaktion wird bekannterweise von den Cytochrom P450 Isoenzymen CYP3A4 und CYP2C19 katalysiert, während die zweite N-Demethylierungsreaktion bisher nicht untersucht ist. Das Ziel dieser Studie war es, die Enzyme des Metabolismus von NT zu BNT zu identifizieren und die Kinetik der Reaktion zu bestimmen. Da es sich wiederum um eine N-Demethylierungsreaktion handelte, wurde davon ausgegangen, dass sie erneut von CYP Isoenzymen katalysiert wird. NT und auch TLD wurden jeweils mit Mikrosomen inkubiert und der gebildete Metabolit mittels HPLC und Tandem-Massenspektrometrie identifiziert und quantifiziert. Es zeigte sich, dass die zweite Reaktion auch einer Michaelis-Menten-Kinetik mit $K_m = 141.6 \pm 15 \mu\text{M}$ und $V_{\max} = 46.2 \pm 3 \text{ nmol/mg/h}$ folgt und auch von CYP Isoenzymen durchgeführt wird. Im Vergleich dazu sind die Michaelis-Menten-Parameter der TLD N-Demethylierung $K_m = 36 \pm 13 \mu\text{M}$ und $V_{\max} = 85 \pm 18 \text{ nmol/mg/h}$. Um die verantwortlichen Isoenzyme zu identifizieren, wurden die

Reaktionen mit bekannten CYP Inhibitoren durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass sowohl die bereits bekannten Isoenzyme CYP3A4, sowie CYP2C19 gehemmt wurden, aber auch CYP2B6 durch Efavirenz. Diese Ergebnisse wurden in Inkubationsversuchen mit rekombinanten CYPs (Bactosomen) von CYP3A4, CYP2C19 und CYP2B6 bestätigt. Es zeigte sich zusätzlich, dass auch der Tilidinmetabolismus über CYP2B6 katalysiert wird. Für beide Reaktionsschritte konnte anhand der Kinetikparameter und der intrinsischen Clearance festgestellt werden, dass die Isoenzyme in der Reihenfolge CYP2B6 > CYP2C19 > CYP3A4 für den Stoffwechsel verantwortlich sind. In den berechneten intrinsischen Clearances zeigt sich, dass der Abbau von TLD ($CL = 0.039 \text{ ml/min/mg}$) schneller erfolgt als der Abbau von NT (0.0054 ml/min/mg), sodass letzterer der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Tilidinmetabolismus ist.

In weiteren Versuchen wurde das Inhibitionspotential von TLD, NT und BNT auf CYP2B6 und von BNT auf CYP3A4, CYP2C19, sowie CYP2D6 im Vergleich zu bekannten Inhibitoren getestet. Es zeigte sich, dass BNT alle außer CYP2C19 schwach inhibiert. Am ehesten wäre von einem Interaktionspotential mit CYP2D6 auszugehen, da hier die IC_{50} -Werte innerhalb der Plasmakonzentrationen lagen. Sowohl die Literatur, als auch die Ergebnisse zeigen, dass weitere Metaboliten des Tilidinstoffwechsels existieren müssen. Deshalb wurden Urinproben von Probanden, die TLD oral erhalten hatten, mittels Produkt-Scans auf weitere Metaboliten untersucht. Am ehesten handelt es sich dabei um polarere Moleküle, wie zum Beispiel Hydroxide der bisher bekannten Metaboliten. Zur weiteren Bestimmung würden jedoch die Reinsubstanzen zur Identifizierung durch Quantifizierung benötigt. Zusammenfassend zeigte unsere Studie, dass NT von den gleichen Isoenzymen metabolisiert wird, wie TLD. Zusätzlich zu CYP3A4 und CYP2C19 konnte auch CYP2B6 als wichtiger enzymatischer Abbauweg identifiziert werden. Aufgrund der

vorliegenden Ergebnisse wird durch die präzisere Kenntnis der Pharmakokinetik von TLD ein besseres Verständnis für etwaige Arzneimittelinteraktionen ermöglicht.