(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 743 949**

(51) Int. CI.:

C12Q 1/26 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.12.2014 PCT/EP2014/076748**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **11.06.2015 WO15082694**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.12.2014 E 14806674 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2019 EP 3077527**

(54) Título: **Microsomas inhibidos de forma irreversible para CYP450 y su uso en el fenotipado enzimático de rutas metabólicas**

(30) Prioridad:

05.12.2013 EP 13306674
05.12.2013 US 201361912186 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.02.2020

(73) Titular/es:

LES LABORATOIRES SERVIER (100.0%)
35, rue de Verdun
92284 Suresnes Cedex, FR

(72) Inventor/es:

CARADEC, FABRICE;
PARMENTIER, YANNICK y
POTHIER, CORINNE

(74) Agente/Representante:

AZNÁREZ URBIETA, Pablo

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Microsomas inhibidos de forma irreversible para CYP450 y su uso en el fenotipado enzimático de rutas metabólicas

Campo técnico de la invención

La invención pertenece al campo de la investigación y el desarrollo de productos y métodos para la evaluación de interacciones medicamentosas de nuevos medicamentos. La presente invención se refiere a un método para preparar microsomas aislados inhibidos de forma irreversible para un citocromo P450 humano específico (CYP450) que se utilizarán para cuantificar la contribución de esta enzima en el metabolismo de principios activos.

La eficacia y la toxicidad de un medicamento pueden modificarse mediante la administración de otro compuesto: un medicamento, un contaminante ambiental, alimentos. Estas son interacciones medicamentosas (DDI: Drug Drug Interactions, por sus siglas en inglés). Existen diferentes tipos de mecanismos de interacción, siendo el más importante la interacción metabólica, que pertenece al grupo de interacciones farmacocinéticas.

Por interacción medicamentosa metabólica se entiende, entre otras cosas, que un medicamento A puede alterar el metabolismo de un medicamento B coadministrado, ya sea acelerando el metabolismo de B (activación o inducción) o reduciéndolo (inhibición o supresión). Esta interacción medicamentosa metabólica dará como resultado un programa de desarrollo de un nuevo fármaco, por un lado, la identificación de las enzimas involucradas en el metabolismo del principio activo y, por otro lado, el potencial inhibidor o inductor de dicho principio activo.

El hígado es el sitio principal del metabolismo de los medicamentos. El hepatocito contiene enzimas metabólicas esenciales, incluyendo los citocromos P450 (CYP450). Por tanto, los citocromos P450 son la diana principal en la predicción de interacciones medicamentosas.

Para predecir el riesgo de interacciones medicamentosas, es necesario identificar y determinar la contribución de cada enzima en el metabolismo del principio activo: esto es el fenotipado de las reacciones enzimáticas.

Para estimar la contribución de cada enzima en el metabolismo del principio activo, se pueden implementar diferentes métodos para fenotipar las rutas metabólicas.

El uso de una librería de microsomas hepáticos humanos caracterizados puede ayudar a identificar las enzimas involucradas en el metabolismo de un principio activo. Este método requiere una caracterización previa de la actividad enzimática de los principales CYP450 de al menos quince lotes individuales de microsomas hepáticos humanos. Cada uno de los quince lotes de microsomas se incuba con el principio activo para determinar la correlación entre su tasa metabólica y la actividad de cada citocromo P450 de estos mismos microsomas. Dado que el uso de librerías de microsomas no permite una determinación cuantitativa de las enzimas involucradas, la correlación es difícil de lograr.

También se emplean enzimas recombinantes para estimar la contribución relativa de cada citocromo P450 en el metabolismo del principio activo. Dado que el nivel de expresión del citocromo P450 en el sistema recombinante es diferente, a menudo mucho más alto, que en los microsomas hepáticos humanos nativos, es necesario incorporar un factor de corrección para extrapolar la contribución de cada CYP450 en los microsomas recombinantes relativo a los microsomas humanos (factor de corrección = Factor de Actividad Relativa). Este factor de corrección debe calcularse midiendo experimentalmente la actividad enzimática de cada CYP450 ensayado, por un lado, en los microsomas humanos nativos y, por otro lado, en los microsomas recombinantes. Este enfoque hace posible evaluar de forma indirecta y selectiva y semicuantitativamente la contribución relativa de cada enzima en el metabolismo del principio activo. Sin embargo, por sus características intrínsecas, estas enzimas recombinantes difieren de las enzimas encontradas en los microsomas hepáticos (secuencia de proteínas truncadas, entorno de membrana distinto, acoplamiento diferente entre los citocromos b5 y P450, ausencia de competencia entre diferentes CYP450).

Para una estimación cuantitativa del metabolismo del principio activo se emplean inhibidores biológicos, tales como anticuerpos monoclonales, dirigidos contra una enzima, después de la incubación conjunta del principio activo con los microsomas hepáticos humanos (versus un control sin anticuerpo). Sin embargo, un número nada despreciable de los anticuerpos utilizados muestra falta de especificidad y capacidad de inhibición. Finalmente, esta técnica es difícil de implementar para el fenotipado de rutas metabólicas.

Los inhibidores químicos de CYP450 permiten determinar la contribución de cada citocromo P450 directamente por el porcentaje de inhibición del metabolismo del principio activo cuando la inhibición es total y específica de la enzima estudiada. Los inhibidores pueden unirse de forma reversible o no reversible a la enzima. Se emplean en co-incubación o pre-incubación con el principio activo y los microsomas hepáticos humanos (versus una condición de control sin inhibidor), modelo representativo de las vías oxidativas del metabolismo de los principios activos.

El nivel de inhibición asociado a los inhibidores reversibles de tipo competitivo (los más frecuentes) depende de las condiciones de incubación, tales como el tiempo de incubación y la concentración del sustrato. Además, muchos inhibidores de CYP450 normalmente utilizados para estudios de fenotipado no son específicos para un solo CYP450 (por ejemplo Ketoconazol, quercetina ...). En consecuencia, los inhibidores reversibles no son adecuados para fenotipar los citocromos P450.

Para superar los inconvenientes de estos métodos, se emplean inhibidores no reversibles o irreversibles con el fin de obtener un método cuantitativo robusto y representativo de las condiciones *in vivo*. Se dice que la inhibición es irreversible en la medida en que la enzima nunca encuentra su actividad, se llama inhibición "suicidio". Los citocromos P450 oxidan los inhibidores no reversibles en metabolitos intermedios que se unen irreversiblemente a las enzimas. Este proceso se denomina MBI, por Mechanism-Based Inhibition, ya que la molécula inicial no es inhibidora, pero requiere al menos un ciclo catalítico de la enzima antes de activarse como metabolito reactivo, que se une covalentemente a dicha enzima. La inhibición de MBI se caracteriza por una inhibición irreversible del citocromo P450 estudiado y no depende de la concentración del sustrato. Estos inhibidores siguen una cinética de primer orden con las siguientes constantes: k_{inact}, corresponde a la tasa máxima de inactivación de la enzima, y K_I, corresponde a la concentración de inhibidor a la mitad de la tasa máxima de inactivación.

Se deben cumplir varias condiciones para obtener una inhibición total de CYP450 usando un inhibidor irreversible:

1) es necesario utilizar una concentración de inhibidor no reversible suficiente (dependiendo de su K_I);
2) dependiendo de su k_{inact}, el tiempo de preincubación del inhibidor con los microsomas hepáticos debería ser suficiente para conllevar suficientes ciclos de inactivación catalítica;
3) el tiempo de pre-incubación no debe provocar el agotamiento de un inhibidor suicida de manera que su concentración sea demasiado baja como para inhibir completamente P450.

Si la inhibición de CYP450 es completa y específica (no se inhibe ningún otro P450), entonces es posible determinar cuantitativamente la participación de cada citocromo P450 en el metabolismo de un principio activo. El esquema experimental utilizado es el siguiente:

Secuencia		Microsomas hepáticos	Condiciones pre-incubación → [NADPH] 't' Θ'	Microsomas inhibidos irreversiblemt.	Condiciones incubación → [NADPH] 't' Θ'	f(t) = [PA]
Ensayo PA	ensayo	+ MBI		+ PA		
	control	- MBI		+ PA		
Control+ sustrato específico	ensayo	+ MBI		+ sustrato		
	control	- MBI		+ sustrato		

A pesar de las ventajas mencionadas anteriormente, el uso de MBI de acuerdo con este esquema experimental tiene ciertas restricciones que limitan su interés:

- Por un lado, las condiciones de incubación del principio activo estudiado dependen de las condiciones óptimas de pre-incubación del inhibidor no reversible (concentración de proteínas microsomales, porcentaje de disolvente orgánico). De hecho, para medir con precisión el porcentaje de inhibición del metabolismo del principio activo, este último debe incubarse en las llamadas condiciones iniciales (la linealidad de la velocidad del metabolismo en función del tiempo y las concentraciones de proteínas, porcentaje de disolvente que no puede exceder un cierto nivel). Sin embargo, para obtener una inhibición máxima y específica en este esquema experimental lineal, el inhibidor debe incubarse previamente bajo las condiciones *in vitro* de concentración de proteínas o disolventes compatibles con la incubación del principio activo.
- Por otro lado, el tiempo de pre-incubación altera la actividad enzimática de los CYP450 de los microsomas que tienen una vida media *in vitro* de aproximadamente 70 a 90 minutos. Por ejemplo, se observa una pérdida de actividad enzimática CYP2D6 de hasta un 26% durante una pre-incubación de 30 minutos, de hasta un 35% para una pre-incubación de 40 minutos y de un 46% para una pre-incubación de 60 minutos. En consecuencia, la duración de la secuencia continua de pre-incubación de MBI y de la incubación del fármaco candidato impuesta por el esquema experimental es así incompatible con la vida media *in vitro* de los CYP450 de los microsomas.
- Finalmente, es habitual que los inhibidores irreversibles para un CYP450 también muestren una inhibición reversible para uno o más CYP450 (por ejemplo el inhibidor MBI de CYP1A2 es también un inhibidor competitivo de CYP2C19 y el inhibidor MBI de CYP2B6 es también un inhibidor competitivo de CYP2A6 y 3A4). Sin embargo, el esquema experimental lineal anterior no permite eliminar satisfactoriamente, para un estudio de fenotipado *in*

vitro, la parte libre restante del inhibidor puede actuar de manera competitiva con otros CYP450. Una dilución del preincubado puede disminuir la concentración de inhibidor libre, con ello menor inhibición reversible no específica, sin embargo, disminuirá de facto la concentración de proteínas microsomales, de modo que el metabolismo del principio activo durante la incubación será demasiado bajo para ser detectado.

En consecuencia, las dificultades para compatibilizar las condiciones de incubación del inhibidor irreversible, por un lado, y el principio activo, por otro lado, son tales que rara vez es posible utilizar este esquema experimental lineal.

Además, durante este esquema experimental lineal, es necesario agregar dos series de incubaciones adicionales (con y sin inhibidor irreversible) con un sustrato específico de CYP450 testado como control positivo que valida el efecto del inhibidor. Por tanto, esto requiere cuantificar no sólo el principio activo, sino también todos los sustratos específicos, y en cada cado analizando la mayor cantidad de CYP450, lo que aumenta considerablemente la experimentación.

Dadas las desventajas respectivas de los métodos de fenotipado de las reacciones enzimáticas involucradas en el metabolismo de un principio activo, un estudio *in vitro* para dicho fenotipado de reacciones enzimáticas requiere superar las desventajas de los diversos métodos descritos previamente.

Descripción detallada de la invención

La presente invención tiene como objetivo proporcionar una estrategia alternativa que permita superar los problemas inherentes a la implementación de un estudio de fenotipado de las reacciones enzimáticas involucradas en el metabolismo de un principio activo mediante el uso de microsomas aislados inhibidos irreversiblemente.

Esta invención tiene como objeto un método para preparar microsomas aislados y conservados que comprenden un citocromo P450 (CYP450) inhibido irreversiblemente para su uso extemporáneo y que comprende las siguientes etapas:

- inhibición irreversible del citocromo P450;
- concentración de proteínas microsomales, y
- conservación de los microsomas aislados.

Por inhibidor no reversible, inhibidor irreversible, inhibidor MBI, inhibición irreversible o inhibición suicida se entiende un inhibidor capaz de unirse de forma covalente a una enzima; la enzima así inhibida no puede recuperar su actividad funcional inicial. Más específicamente, un inhibidor MBI (Mechanism Based Inhibition) no forma directamente un enlace irreversible con la enzima, pero uno de sus metabolitos intermedios reactivos se une covalentemente a la enzima.

El objetivo según la invención tiene como objeto, por un lado, filtrar las proteínas microsomales de otros productos presentes en la preparación, principalmente el inhibidor irreversible en exceso que queda libre, así como los disolventes; por otro lado, concentrar los microsomas diluidos en la etapa de pre-incubación.

El objetivo relativo a las proteínas microsomales según la invención puede obtenerse por filtración y centrifugación. La función de la filtración en la etapa de concentración se consigue mediante una membrana con un umbral de corte de entre 10.000 Dalton y 40.000 Dalton, preferiblemente de 30.000 Dalton. La función de concentración en la etapa de concentración se lleva a cabo mediante un sistema que permite la concentración, por ejemplo un sistema Centricon®, sometido a una centrifugación de 3.000g a 4.000g durante 60 a 90 minutos, preferiblemente durante 80 minutos. Al final de esta etapa, el Centricon® se revierte y se centrifuga de 800 a 1.000g durante 2 a 10 minutos, preferentemente durante 5 minutos.

Para mejorar la separación y la concentración de las proteínas microsomales, se puede llevar a cabo una etapa adicional de ultracentrifugación en las siguientes condiciones: 80.000 a 150.000g durante aproximadamente 60 minutos.

La concentración de las proteínas microsomales también se puede mejorar repitiendo al menos dos veces la secuencia: filtración y concentración, descritas anteriormente.

La etapa de concentración de las proteínas microsomales según la invención también se puede realizar mediante ultracentrifugaciones sucesivas. Se requieren al menos dos ultracentrifugaciones sucesivas en las siguientes condiciones: 80.000g a 150.000g durante 60 a 90 minutos.

La invención se refiere a un método de preparación de microsomas aislados inhibidos irreversiblemente donde se realizan una o más etapas de lavado. Este método de preparación de los microsomas aislados comprende etapas de lavado antes y/o después de la etapa de concentración de las proteínas microsomales. Por ejemplo, el método según la invención comprende las siguientes etapas:

- inhibición irreversible de un citocromo P450;

- lavado;
- concentración de proteínas microsomales;
- lavado de proteínas microsomales.

El método de acuerdo con la invención también puede comprender las etapas siguientes:

- inhibición irreversible de un citocromo P450;
- concentración de proteínas microsomales;
- lavado de proteínas microsomales,

o las siguientes etapas:

- inhibición irreversible del citocromo P450;
- lavado;
- concentración de proteínas microsomales.

Por lavado se entiende una etapa de enjuague y eliminación de las fracciones no microsomales. La etapa de lavado también puede consistir en disponer el concentrado de microsomas en un tampón Tris HCl a pH 7,4.

Al final del método de preparación de los microsomas irreversiblemente aislados de acuerdo con la invención, los microsomas están a una concentración de 10 mg/ml a 30 mg/ml, más específicamente de 17 mg/ml a 25 mg/ml y preferentemente de 20 mg/ml. Las proteínas microsomales son así concentradas en un factor de 5 a 15.

El método de preparación de microsomas aislados inactivados de acuerdo con la presente invención comprende una etapa final de conservación de los microsomas. La etapa de conservación de los microsomas preferentemente consiste en una etapa de crio-conservación, consistente en enfriar a muy baja temperatura (aproximadamente de -196ºC), en presencia o ausencia de soluciones crio-protectoras, de los microsomas aislados y purificados con el fin de suspender toda actividad biológica. Esta etapa de conservación está destinada a facilitar el uso extemporáneo de los microsomas inactivados y aislados según la invención. El uso de los microsomas aislados puede tener lugar desde unos pocos días hasta varios meses después de su preparación. La etapa de conservación no altera las propiedades estructurales y funcionales de los microsomas.

Preferentemente, la etapa de conservación es una etapa de congelación. La congelación de los microsomas aislados e inhibidos irreversiblemente se lleva a cabo a -80ºC.

Los microsomas utilizados en el método de preparación son microsomas de hígado humano, de rata, ratón, cerdo o mono. Preferiblemente, los microsomas se derivan de hígados humanos que contienen el grupo de las enzimas P450. Con el fin de considerar la variabilidad interindividual, los microsomas provienen de múltiples donantes para conformar un conjunto (pool) de microsomas.

Los citocromos P450 son una amplia familia de isoenzimas constituida por 18 subfamilias (CYP1, CYP2, CYP3, CYP4, CYP5, CYP7, CYP8, CYP11, CYP17, CYP19, CYP20, CYP21, CYP24, CYP26, CYP27, CYP39, CYP46, CYP51). La presente invención se refiere a un método para preparar microsomas aislados cuyo citocromo P450 inhibido irreversiblemente se selecciona de entre las familias de citocromos CYP1, CYP2, CYP3 y CYP4.

El citocromo P450 inhibido irreversiblemente se selecciona de entre CYP1A1, CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP2J2, CYP3A4, CYP3A5 y CYP4F2.

Preferentemente, el citocromo P450 inhibido irreversiblemente se selecciona de entre CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 y CYP3A4.

Entre los inhibidores no reversibles utilizados en el método de preparación de microsomas de acuerdo con la invención, se pueden mencionar, a título no limitativo:

CYP	**Inhibidores MBI**	**Parámetros *in vitro* (Literatura)**	
		K_I (µM)	***k inact (min-1)***
1A2	furafilina	3-6	0,27-0,87
2A6	8 MetOxiPsoraleno	0,3-1,9	0,5-2,1
	Mentofurano	0,84-2,5	0,22-0,25
	Esporaleno	0,6	0,3
2B6	Tiotepa	4,8-50	0,1-0,2
	Fenciclidina	10	0,01
2C8	Gemfibrozil gluc.	20	0,21

2C9	Ac. tienílico	0,13-20	0,05-2
	Suprofeno	3,7-26	0,07-0,09
2C19	Fluoxetina	0,2-54	0,06-0,1
	Clopidogrel	0,5-14,3	0,056-0,35
	Ticlopidina	1,65-87	0,19-0,032
	Protopina	7,1	0,24
2D6	Paroxetina	0,8-9,32	0,17
	MDMA	23	0,18
	EMTPP	5,5	0,09
2E1	Dietil ditio carbamato	12,2	0,02
	Fenetil isotiocianato	9,98	0,33
3A4	Troleandomicina	2,4	0032
	Diltiazem	8,7	0005
	Azamulin	0,2	0,7

La descripción también se refiere a los microsomas aislados como tales que comprenden un citocromo P450 inhibido irreversiblemente.

Los microsomas aislados según la descripción comprenden un citocromo inhibido irreversiblemente seleccionado de entre las familias de citocromos CYP1, CYP2, CYP3 y CYP4.

La descripción se refiere a microsomas aislados donde el citocromo a inhibir irreversiblemente se selecciona de la siguiente lista: CYP1A1, CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP2J2, CYP3A4, CYP3A5 y CYP4F2.

Más particularmente, la descripción se refiere a microsomas aislados donde el citocromo a inhibir irreversiblemente se selecciona de la siguiente lista: CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 y CYP3A4.

Preferentemente, los microsomas aislados inhibido irreversiblemente según la descripción son crioconservados o crioprotegidos.

La presente descripción también se refiere a los microsomas aislados inhibidos irreversiblemente en una forma congelada para uso extemporáneo después de descongelación.

Los microsomas aislados se obtienen de acuerdo con los métodos de preparación descritos en la presente solicitud de patente.

La descripción se refiere al uso de microsomas aislados inhibidos irreversiblemente en el fenotipado de reacciones enzimáticas implicadas en el metabolismo de un principio activo a evaluar.

La descripción también se refiere a un método de fenotipado de reacciones enzimáticas implicadas en el metabolismo de un principio activo. Este método de fenotipado comprende las etapas siguientes:

- incubación de los microsomas aislados e inhibidos irreversiblemente según la invención con un principio activo a evaluar;
- medida de la contribución del citocromo P450 inhibido irreversiblemente involucrado en el metabolismo del principio activo.

La incubación se lleva a cabo en presencia del principio activo con, por un lado, microsomas hepáticos aislados inhibidos irreversiblemente según la invención y, por otro lado, con microsomas hepáticos aislados y no inhibidos preparados según la invención (control). La incubación es controlada ya sea en un tiempo de incubación final o de forma de cinética, es decir, varios tiempos de incubación.

En cada momento de la incubación, se cuantifican el principio activo y/o sus metabolitos.

La actividad metabólica (A) del principio activo se mide mediante el aclaramiento metabólico intrínseco (en el caso de la cinética) o mediante la tasa de desaparición del principio activo sin cambios o la aparición de metabolitos (si se considera un solo tiempo final de incubación) en ambas condiciones, inhibido (actividad Ai) y no inhibido (control con la actividad A).

El porcentaje de inhibición de la actividad metabólica del principio activo se calcula de la siguiente manera: porcentaje de inhibición = (A-Ai)/A. El porcentaje de inhibición calculado se corresponde directamente con la contribución del citocromo P450 inhibido irreversiblemente involucrado en el metabolismo del principio activo.

Finalmente, la descripción se refiere a un kit de fenotipado que comprende:

- los microsomas aislados e inhibidos irreversiblemente de acuerdo con la invención;
- los microsomas de control.

Por microsomas de control se entienden microsomas que han experimentado el método de preparación según la invención en ausencia del inhibidor irreversible.

Preferentemente, el kit de fenotipado comprende, por una parte, los microsomas aislados inhibidos irreversiblemente y crioconservados y, por otra parte, los microsomas de control, pudiendo éstos también estar crioconservados.

Figura 1: Porcentaje de inhibición de la actividad del citocromo P450 en microsomas de CYP1A2 inhibidos irreversiblemente. Las actividades específicas estudiadas para cada CYP450 corresponden a las actividades de fenacetina-O-desacetilasa (CYP1A2, incubación de fenacetina a 4,5 µM), cumarina-7-hidroxilasa (CYP2A6, incubación de cumarina a 2 µM), bupropion-hidroxilasa (2B6, incubación de bupropiona a 50 µM), paclitaxel-6α-hidroxilasa (2C8, incubación de paclitaxel 4 µM), diclofenaco-4'-hidroxilasa (2C9, incubación de diclofenaco 4 µM), omeprazol-5-hidroxilasa (2C19, incubación de omeprazol a 5 µM), dextrometorfano-O-desmetilasa (2D6, incubación dextrometorfano 5 µM), clorzoxazona-6-hidroxilasa (2E1, incubación de clorzoxazona 40 µM) y testosterona-6β-hidroxilasa, midazolam-1'-hidroxilasa y nifedipina-reductasa (3A4, incubación de testosterona a 30 µM, midazolam a 0,5 µM, nifedipina a 10 µM). El porcentaje de inhibición se obtiene comparando las actividades de P450 en microsomas inhibidos irreversiblemente con furafilina y en los microsomas de control.

Figura 2: Impacto de la furafilina 5 µM y 10 µM en microsomas hepáticos humanos y en microsomas recombinantes para CYP1A2.

Figura 3: Porcentaje de inhibición de la actividad del citocromo P450 en microsomas CYP3A4 inhibidos irreversiblemente. Las actividades específicas estudiadas para cada CYP450 corresponden a aquellas descritas en la Figura 1. El porcentaje de inhibición se obtiene comparando las actividades de P450 en microsomas inhibidos irreversiblemente por azamulina y en microsomas de control.

Figura 4: Metabolismo de la nifedipina y midazolam por CYP3A4 y CYP3A5 (microsomas recombinantes).

Figura 5: Porcentaje de inhibición de la actividad de midazolam en Km y Vmax en microsomas CYP3A4 inhibidos irreversiblemente.

Figura 6: Porcentaje de inhibición de la actividad del citocromo P450 en microsomas los CYP2C8 inhibidos irreversiblemente. Las actividades específicas estudiadas para cada CYP450 corresponden a las descritas en la Figura 1, añadiendo la actividad de amodiaquina-hidroxilasa (2C8, incubación de amodiaquina a 0,5 µM). El porcentaje de inhibición se obtiene comparando las actividades de P450 en los microsomas inhibidos irreversiblemente por gemfibrozil-glucurónido y en los microsomas de control.

Figura 7: Porcentaje de inhibición de la actividad de amodiaquina incubada a concentraciones correspondientes a Km y Vmáx de la reacción dependiente de 2C8 de hidroxilación de amodiaquina en microsomas CYP2C8 inhibidos irreversiblemente.

Figura 8: Porcentaje de inhibición de la actividad de diclofenaco incubado a concentraciones correspondientes a Km y Vmáx de la reacción dependiente de 2C9 de 4' hidroxilación de diclofenaco en microsomas CYP2C9 inhibidos irreversiblemente.

Figura 9: Porcentaje de inhibición de la actividad del citocromo P450 en microsomas CYP2C9 inhibidos irreversiblemente. Las actividades específicas estudiadas para cada CYP450 corresponden a las descritas en la Figura 1. El porcentaje de inhibición se obtiene comparando las actividades de P450 en microsomas inhibidos irreversiblemente por ácido tienílico y en los microsomas de control.

Figura 10: Porcentaje de inhibición de la actividad del citocromo P450 en microsomas de CYP2D6 inhibidos irreversiblemente. Las actividades específicas estudiadas para cada CYP450 corresponden a las descritas en la Figura 1. El porcentaje de inhibición se obtiene comparando las actividades de P450 en microsomas inhibidos irreversiblemente por paroxetina y en microsomas de control.

Figura 11: Porcentaje de inhibición de la actividad del citocromo P450 en microsomas de CYP2B6 inhibidos irreversiblemente. Las actividades específicas estudiadas para cada CYP450 corresponden a las actividades de fenacetina-O-desacetilasa (CYP1A2, incubación de fenacetina a 200 µM), cumarina-7-hidroxilasa (CYP2A6, incubación de cumarina a 20 µM), bupropion-hidroxilasa (2B6, incubación de bupropiona a 100 µM), amodiaquina-desetilasa (2C8, incubación de amodiaquina a 20 µM), diclofenaco-4'-hidroxilasa (2C9, incubación de diclofenaco 200 µM), S-mefenitoin-hidroxilasa (2C19, incubación de S-mefenitoína a 60 µM), dextrometorfano-O-desmetilasa (2D6, incubación dextrometorfano 100 µM), clorzoxazona-6-hidroxilasa (2E1, incubación de clorzoxazona 200 µM) y testosterona-6β-hidroxilasa, midazolam-1'-hidroxilasa y nifedipina-reductasa (3A4, incubación de testosterona a 75 µM, midazolam a

50 µM, nifedipina a 50 µM). El porcentaje de inhibición se obtiene comparando las actividades de P450 en microsomas inhibidos irreversiblemente con tioTEPA y en los microsomas de control.

Figura 12: Porcentaje de inhibición de la actividad CYP1A2 en función de diferentes tiempos de conservación a -80ºC.

Figura 13: Cinética de desaparición de mirtazapina en los microsomas aislados inhibidos irreversiblemente CYP1A2 (A), 3A4 (B), 2D6 (C) y los controles (n=3).

Figura 14: Porcentaje de inhibición del aclaramiento intrínseco de mirtazapina en el kit de microsomas aislados inhibidos irreversiblemente en comparación con sus controles homólogos.

Figura 15: Cinética de desaparición de loperamida en los microsomas aislados inhibidos irreversiblemente 3A4 (A) et 2C8 (B) y sus controles homólogos (n=3).

Figura 16: Porcentaje de inhibición del aclaramiento intrínseco de loperamida en el kit de microsomas aislados inhibidos irreversiblemente en comparación con sus controles homólogos.

Figura 17: Cinética de desaparición de bupropiona en el microsoma aislado inhibido irreversiblemente 2B6 y su control homólogo (n=3).

Figura 18: Porcentaje de inhibición del aclaramiento intrínseco de bupropiona en el kit de microsomas aislados inhibidos irreversiblemente en comparación con sus controles homólogos.

Figura 19: Cinética de desaparición de ibuprofeno en el microsoma aislado inhibido irreversiblemente 2C9 y su control homólogo (n=3).

Figura 20: Porcentaje de inhibición del aclaramiento intrínseco de ibuprofeno en el kit de microsomas aislados inhibidos irreversiblemente en comparación con sus controles homólogos.

Figura 21: Cinética de desaparición de celecoxib en el microsoma aislado inhibido irreversiblemente 2C9 y su control homólogo (n=3).

Figura 22: Porcentaje de inhibición del aclaramiento intrínseco de celecoxib en el kit de microsomas aislados inhibidos irreversiblemente en comparación con sus controles homólogos.

Figura 23: Cinética de desaparición de pioglitazona en el microsoma aislado inhibido irreversiblemente 2C8 y su control homólogo (n=3).

Figura 24: Porcentaje de inhibición del aclaramiento intrínseco de pioglitazona en el kit de microsomas aislados inhibidos irreversiblemente en comparación con sus controles homólogos.

Figura 25: Cinética de desaparición de bortezomib en el microsoma aislado inhibido irreversiblemente 3A4 y su control homólogo (n=3).

Figura 26: Porcentaje de inhibición del aclaramiento intrínseco de bortezomib en el kit de microsomas aislados inhibidos irreversiblemente en comparación con sus controles homólogos.

Figura 27: Cinética de desaparición de repaglinida en el microsoma aislado inhibido irreversiblemente 2C8 y su control homólogo (n=3).

Figura 28: Porcentaje de inhibición del aclaramiento intrínseco de repaglinida en el kit de microsomas aislados inhibidos irreversiblemente en comparación con sus controles homólogos.

Figura 29: Cinética de desaparición de sertalina en el microsoma aislado inhibido irreversiblemente 2B6 y su control homólogo (n=3).

Figura 30: Porcentaje de inhibición del aclaramiento intrínseco de sertalina en el kit de microsomas aislados inhibidos irreversiblemente en comparación con sus controles homólogos.

Ejemplo 1: Preparación de microsomas aislados inactivados irreversiblemente

Material biológico

Los microsomas se derivan de hígados humanos que contienen todas las enzimas P450. Proceden de un pool de microsomas, ya que provienen de varios donantes con el fin de tener en cuenta la variabilidad interindividual.

Incubación de microsomas

Para cada preparación de lotes de microsomas inhibidos irreversiblemente, se prepara un lote de control en las mismas condiciones, con la diferencia de que el inhibidor irreversible se reemplaza por un volumen equivalente de disolvente.

El inhibidor no reversible del citocromo P450 estudiado (o el disolvente, para el lote de control) se incuba con los microsomas en un tampón Tris/HCl pH 7,4 y $MgCl_2$ bajo agitación a 37ºC. La preparación generalmente se precalienta durante 5 a 10 minutos y luego se agrega NADPH para comenzar la reacción enzimática. En el momento t, el medio de reacción se coloca durante unos minutos en hielo antes de pasar a la etapa de concentración. Los complejos enzima-inhibidor covalentemente enlazados se forman durante la incubación de los microsomas con el inhibidor irreversible. El citocromo P450 estudiado es inhibido de forma irreversible, completa y específica.

Filtración y concentración de microsomas desactivados irreversiblemente

La muestra resultante de la incubación de los microsomas con el inhibidor no reversible del citocromo P450 estudiado se filtra. Esta etapa de filtración de proteínas se puede realizar con una membrana con un umbral de corte de 10.000 a 40.000 Dalton. Se utiliza un sistema Centricon® para realizar esta etapa de filtración.

A veces son necesarios uno o más pasos de lavado para facilitar la eliminación del inhibidor irreversible que queda libre. La muestra se centrifuga a entre 3.000g a 4.000g durante 80 minutos, después a entre 800 y 1.000g durante 5 minutos. La muestra puede someterse a una serie de centrifugaciones para optimizar la concentración de las proteínas microsomales.

Si es necesario, la muestra de microsomas concentrada se ultracentrifuga para mejorar aún más la concentración de proteínas. La ultracentrifugación se lleva a cabo en un rango de condiciones comprendidas entre 80.000g durante 4 horas a 150.000g durante 45 minutos, preferentemente a 100.000g durante 1 hora.

El concentrado de proteínas se recoge en un tampón Tris/HCl a pH 7,4, luego se divide en alícuotas y se congela a -80ºC.

Al final de esta preparación, se obtienen microsomas aislados inactivados irreversiblemente que pueden usarse de forma extemporánea para el fenotipado de reacciones enzimáticas involucradas en el metabolismo de un principio activo.

Ejemplo 2: Condiciones de inhibición de los principales citocromos P450 y validación de microsomas inhibidos irreversiblemente en los sustratos específicos de citocromos P450

CYP1A2

La furafilina es uno de los inhibidores de MBI del citocromo CYP1A2.

Las condiciones experimentales para la inhibición máxima de MBI por la furafilina en CYP1A2 son las siguientes:

- proteínas microsomales a 2 mg/ml;
- furafilina a 10 µM;
- tiempo de incubación de 30 minutos.

Después de la incubación de fenacetina, sustrato específico de CYP1A2, a 4,5 µM (concentración menor o igual a su Km) con microsomas previamente inhibidos de acuerdo con las condiciones anteriores, el porcentaje de inhibición de la actividad de fenacetina-desacetilasa (CYP1A1/CYP1A2-dependiente) es del 83% (Figura 1). Cabe señalar que el 17% restante del metabolismo se debe a la actividad residual de la fenacetina-desacetilasa vinculada al CYP1A1 y no a la falta de inhibición del CYP1A2. De hecho, se sabe que la fenacetina incubada en condiciones de no saturación (< 5 µM) es metabolizada principalmente por CYP1A2 y parcialmente por CYP1A1.

La furafilina preincubada durante 30 minutos, 5 µM a 10 µM, con CYP1A2 humano recombinante provoca una inhibición del 100% de la actividad puramente CYP1A2 de la fenacetina, demostrando así su poder de inhibición máximo en las condiciones seleccionadas (Figura 2).

Cuando se incuba la fenacetina a una concentración muy superior a su Km para CYP1A2 en presencia de microsomas inhibidos irreversiblemente y del grupo de control preparado de acuerdo con las condiciones anteriores, el porcentaje de inhibición de la actividad de fenacetina-desacetilasa (CYP1A1/CYP1A2-dependiente) sigue siendo de alrededor del 80%. Este resultado demuestra que la inhibición de CYP1A2 por la furafilina no se ve afectada por un exceso de sustrato y que no es detectable una inhibición de tipo competitivo.

Los sustratos específicos para los otros CYP450 principales (CYP2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 y 3A4) se incubaron en presencia del lote de microsomas hepáticos humanos inhibido irreversiblemente para la furafilina y el lote de control en las condiciones definidas. arriba para demostrar la especificidad de la furafilina. Se observa que la actividad de los otros CYP450 mayoritarios permanece sin cambio.

El conjunto de los resultados demuestra que los microsomas aislados e inhibidos de forma irreversible y específica frente al CYP1A2 según la invención pueden emplearse para medir la contribución de CYP1A2 en el metabolismo de un principio activo o de un medicamento candidato.

CYP3A4

La azamulina es uno de los inhibidores MBI del citocromo CYP3A4.

Las condiciones experimentales para la inhibición máxima de MBI por azamulina en CYP3A4 son las siguientes:

- proteínas microsomales a 2 mg/ml;
- azamulina a 5 µM;
- tiempo de incubación de 15 minutos.

Después de la incubación de midazolam 0,5 µM, testosterona 30 µM y nifedipina 10 µM (concentraciones menores o iguales a la Km de los sustratos), sustratos específicos para CYP3A4, en presencia de microsomas inhibidos irreversiblemente y el lote de control preparado de acuerdo con las condiciones detalladas anteriormente, los porcentajes de inhibición de las actividades midazolam-1'-hidroxilasa, testosterona-6β-hidroxilasa y nifedipina-reductasa (dependientes de CYP3A4/CYP3A5) son del 81%, 96% y 83% respectivamente (Figura 3). Cabe señalar que el 19%, 4%, 17% del metabolismo restante para cada una de estas actividades está relacionado con la actividad de CYP3A5 y no con un defecto de inhibición de CYP3A4. De hecho, se sabe que los tres sustratos específicos (y más particularmente nifedipina y midazolam) son metabolizados principalmente por CYP3A4, pero también por CYP3A5. En particular, la figura 4 muestra el metabolismo de nifedipina por los microsomas recombinantes (bactosomas) CYP3A4 y CYP3A5. La azamulina preincubada durante 15 minutos a 5 µM con CYP3A4 humano recombinante provoca una inhibición del 92% de la actividad puramente CYP3A4 del midazolam, lo que demuestra su poder de inhibición máximo en las condiciones seleccionadas. Cuando se incuban sustratos específicos de CYP3A4 (ejemplo de midazolam) a una concentración mucho mayor que su Km para CYP3A4 con microsomas previamente preparados de acuerdo con la presente invención, el porcentaje de inhibición de las actividades dependientes de CYP3A4 permanece sin cambios (Figura 5). Este resultado demuestra que la inhibición de CYP3A4 por la azamulina no se ve afectada por un exceso de sustrato y que es detectable una inhibición competitiva.

Los sustratos específicos para los otros CYP450 mayoritarios (CYP1A2, CYP2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6 y 2E1) se incubaron en presencia del lote de microsomas de hígado humano inhibidos irreversiblemente por la azamulina y el grupo de control bajo las condiciones definidas anteriormente para demostrar la especificidad de azamulina. La Figura 3 muestra que la actividad de los otros CYP450 mayoritarios permanece sin cambios entre el lote de microsomas humanos inhibidos irreversiblemente y el grupo de control, demostrando que la azamulina es específica para la actividad del CYP3A4.

El conjunto de resultados demuestra que los microsomas aislados e inhibidos irreversiblemente frente al CYP3A4 de acuerdo con la invención pueden usarse para medir la contribución de CYP3A4 en el metabolismo de un principio activo o de un medicamento candidato.

CYP2C8

El gemfibrozil-glucurónido es uno de los inhibidores MBI del citocromo CYP2C8. Las condiciones experimentales para la inhibición máxima de MBI por el gemfibrozil-glucurónido en CYP2C8 son las siguientes:

- proteínas microsomales a 2 mg/ml;
- gemfibrozil-glucurónido a 30 µM;
- tiempo de incubación de 30 minutos.

Después de la incubación de amodiaquina a 0,5 µM o de paclitaxel a 4 µM (concentraciones menores o iguales a la Km de los dos sustratos para CYP2C8), sustratos específicos para CYP2C8, en presencia de microsomas inhibidos irreversiblemente y del grupo de control preparado de acuerdo con la presente invención, el porcentaje de inhibición de las actividades de amodiaquina (CYP2C8) y paclitaxel-hidroxilasa (dependiente de CYP2C8) fue del 88% y 100%, respectivamente (Figura 6).

Cuando la amodiaquina se incuba a una concentración muy superior a su Km para CYP2C8 en las mismas condiciones que las descritas anteriormente, el porcentaje de inhibición de la actividad de amodiaquina-hidroxilasa permanece sin cambios (Figura 7). Este resultado demuestra que la inhibición de CYP2C8 por amodiaquina no se ve afectada por un exceso de sustrato y que no es detectable una inhibición competitiva.

Los sustratos específicos de los otros CYP450 mayoritarios se incubaron en las condiciones definidas anteriormente para demostrar la especificidad del gemfibrozil-glucurónido. La figura 6 muestra que la actividad de los otros CYP450 mayoritarios permanece sin cambios, excepto por una ligera inhibición de CYP2C19 entre el lote de microsomas humanos inhibido de forma irreversible y el lote de control, lo que demuestra que el gemfibrozil-glucurónido es muy específico para la actividad de CYP2C8.

El conjunto de estos resultados demuestra que los microsomas aislados e inhibidos irreversiblemente frente a la actividad de CYP2C8 según la invención pueden usarse para medir la contribución de CYP2C8 en el metabolismo de un principio activo o de un medicamento candidato.

CYP2C9

El ácido tienílico es uno de los inhibidores MBI del citocromo CYP2C9.

Las condiciones experimentales para la inhibición máxima de MBI por el ácido tienílico en CYP2C9 son las siguientes:

- proteínas microsomales a 2 mg/ml;
- ácido tienílico a 10 µM;
- tiempo de incubación de 20 minutos.

Después de la incubación de diclofenaco, sustrato específico de CYP2C9, a 4 µM (concentración menor o igual a la Km del sustrato para CYP2C9) y 100 µM (concentración muy por encima de su Km para CYP2C9) en presencia de microsomas inhibidos irreversiblemente y el grupo de control preparado de acuerdo con la presente invención, la inhibición de la actividad de diclofenaco-hidroxilasa (dependiente de CYP2C9) es casi total, siendo la inhibición del 92% y 88% respectivamente (Figura 8). Este resultado demuestra que no sólo la inhibición de CYP2C9 es total, sino que no se ve afectada por un exceso de sustrato y que no es detectable una inhibición competitiva.

Los sustratos específicos para los otros CYP450 mayoritarios se incubaron en las condiciones definidas anteriormente para demostrar la especificidad del ácido tienílico. La Figura 9 muestra que la actividad de los otros CYP450 mayoritarios permanece sin cambios entre el lote de microsomas inhibido irreversiblemente y el lote de control, lo que demuestra que el ácido tienílico es muy específico para la actividad de CYP2C9.

El conjunto de estos resultados demuestra que los microsomas aislados e inhibidos irreversiblemente frente a la actividad de CYP2C9 de acuerdo con la invención pueden usarse válidamente para medir la contribución de CYP2C9 en el metabolismo de un principio activo o de un medicamento candidato.

CYP2D6

La paroxetina es uno de los inhibidores MBI del citocromo CYP2D6.

Las condiciones experimentales para la inhibición máxima de MBI por paroxetina en CYP2D6 son las siguientes:

- proteínas microsomales a 2 mg/ml;
- paroxetina a 50 µM;
- tiempo de incubación de 30 minutos.

Después de la incubación de dextrometorfano, sustrato específico de CYP2D6, a 5 µM (concentración menor o igual a la Km del sustrato) y 50 µM (concentración muy por encima de su Km para CYP2D6) en presencia de microsomas inhibidos irreversiblemente y el lote de control preparado de acuerdo con la presente invención, la inhibición de la actividad de la dextrometorfano-O-desmetilasa (dependiente de CYP2D6) es casi total, del 96% (Figura 10). Este resultado demuestra que la inhibición de CYP2D6 es completa, que no se ve afectada por un exceso de sustrato y que no es detectable una inhibición competitiva.

Los sustratos específicos de los otros CYP450 mayoritarios se incubaron en las condiciones definidas anteriormente para demostrar la especificidad de la paroxetina. La figura 10 muestra que, entre todas las demás actividades de CYP450, sólo la actividad de bupropiona-hidroxilasa dependiente de CYP2B6 se inhibe en un 91%, además de CYP2D6, lo que demuestra que la paroxetina no es totalmente específica para la actividad de CYP2D6.

El conjunto de estos resultados demuestra que los microsomas preparados de acuerdo con la invención permiten inhibir completamente y casi específicamente la actividad de CYP2D6. Por tanto, pueden usarse para medir la contribución de CYP2D6 / CYP2B6 en el metabolismo de un nuevo candidato a medicamento.

CYP2B6

La tioTEPA es uno de los inhibidores MBI del citocromo CYP2B6.

Las condiciones experimentales para la inhibición máxima de MBI por tioTEPA en CYP2B6 son las siguientes:

- proteínas microsomales a 2 mg/ml;
- tioTEPA a 50 µM;
- tiempo de incubación de 30 minutos.

Después de la incubación de bupropiona, sustrato específico de CYP2B6, a 100 µM, en presencia de microsomas inhibidos irreversiblemente y el lote de control preparado de acuerdo con la presente invención, la inhibición de la actividad de la bupropiona-hidroxilasa (dependiente de CYP2B6) es casi total, del 92% (Figura 11). Este resultado demuestra que

la inhibición de CYP2B6 es completa, que no se ve afectada por un exceso de sustrato y que no es detectable una inhibición competitiva.

Los sustratos específicos de los otros CYP450 mayoritarios se incubaron en las condiciones definidas anteriormente para demostrar la especificidad de la tioTEPA. La figura 11 muestra que, entre todas las demás actividades de CYP450, sólo la actividad de cumarina-hidroxilasa dependiente de CYP2A6 se inhibe en un 64%, además de CYP2B6, lo que demuestra que la tioTEPA no es totalmente específica para la actividad de CYP2B6.

El conjunto de estos resultados demuestra que los microsomas preparados de acuerdo con la invención permiten inhibir completamente y casi específicamente la actividad de CYP2B6. Por tanto, pueden usarse para medir la contribución de CYP2B6/ CYP2A6 en el metabolismo de un nuevo candidato a medicamento.

Ejemplo 3: Estabilidad de la inhibición de los citocromos P450 en microsomas aislados inhibidos irreversiblemente y conservados por congelación

Los microsomas aislados de hígados humanos inhibidos irreversiblemente por CYP1A2 una vez concentrados y conservados a -80ºC según la invención se incuban durante 15 minutos con fenacetina (4,5 µM), sustrato específico de CYP1A2, a 1 mg/ml. Se midieron los porcentajes de inhibición para los microsomas obtenidos de acuerdo con la invención y se conservaron a -80ºC durante 48 horas, un mes y un mes y medio (Figura 12). Se observa que las etapas de concentración, congelación-descongelación no alteran la inhibición de MBI de CYP1A2 por la furafilina. Las etapas de congelación y descongelación no tienen influencia en la estabilidad de la inhibición irreversible de los citocromos P450.

Ejemplo 4: Kit de microsomas aislados inhibidos irreversiblemente para el fenotipado enzimático de rutas metabólicas de xenobióticos

Nueve principios activos (mirtazapina, loperamida, bupropiona, ibuprofeno, celecoxib, pioglitazona, bortezomib, repaglinida, sertralina) se ensayaron en un kit de microsomas aislados inhibidos irreversiblemente de acuerdo con la invención para el fenotipado enzimático de las vías metabólicas de dichos nueve xenobióticos. Los nueve principios activos se ensayaron de acuerdo con el método de fenotipado de reacciones enzimáticas de acuerdo con la invención y que comprende las siguientes etapas:

- incubación de los microsomas aislados e inhibidos irreversiblemente de acuerdo con la invención con un principio activo a evaluar;
- medida de la contribución del citocromo P450 inhibido irreversiblemente implicado en el metabolismo del principio activo.

Cada principio activo se incubó a 0,1 µM a 37ºC en tampón Tris/HCl (0,1 mM, pH 7,4) suplementado con $MgCl_2$ 5 mM, por un lado con microsomas hepáticos aislados inhibidos irreversiblemente por CYP450 1A2, 2B6, 2C8, 2C9, 2D6 y 3A4 y, por otro lado, con microsomas hepáticos aislados y no inhibidos ni preparados según la invención (control homólogo). La reacción se inició por la adición de NADPH 1 mM. La incubación se siguió como una cinética. A tiempos de incubación de 7 min, 17 min, 30 min y después 60 min, se tomó una alícuota de incubación (100 µl) y se detuvo la reacción enzimática añadiendo a esta alícuota un volumen de disolvente (100 µl de metanol), colocándose en hielo durante 10 minutos.

En cada tiempo de incubación, se cuantificó el principio activo por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada a espectrometría de masas (MS).

La actividad metabólica (A) del principio activo se midió por el aclaramiento metabólico intrínseco del principio activo sin cambios en las dos condiciones, inhibido (actividad Ai) y no inhibido (control con la actividad A).

El porcentaje de inhibición calculado (porcentaje de inhibición = (A-Ai)/A) se corresponde directamente con la contribución del citocromo P450 inhibido irreversiblemente implicado en el metabolismo del principio activo.

Mirtazapina

La mirtazapina se incubó en las condiciones descritas anteriormente con una concentración de proteína microsomal de 2 mg/ml para una medida óptima de su aclaramiento intrínseco. En presencia de microsomas de control (no inhibidos ni preparados según la invención), se midió un aclaramiento intrínseco de 3,9 a 7,8 ml/min/g de proteína. En comparación con los microsomas de control, se demostró una inhibición del aclaramiento intrínseco de mirtazapina en un 41%, 36% y 24% en presencia de microsomas hepáticos aislados inhibidos irreversiblemente para CYP450 1A2, 2D6 y 3A4, respectivamente (Figuras 13 y 14). No se observó una inhibición significativa del aclaramiento intrínseco de mirtazapina en presencia de microsomas hepáticos aislados inhibidos irreversiblemente para CYP450 2B6, 2C8, 2C9. Por inhibición significativa se entiende un aclaramiento intrínseco de menos del 25%, que representa el umbral de variabilidad observado

en las medidas de aclaramiento en microsomas hepáticos. Como resultado, el metabolismo oxidativo de la mirtazapina implica los CYP450 1A2, 2D6 y 3A4 respectivamente al 41%, 36% y 24%.

Después de la incubación de mirtazapina 2,5 a 1.000 µM en presencia de microsomas recombinantes que sobreexpresan los CYP450 humanos mayoritarios y después de medir el factor de corrección adaptado para cada uno de estos CYP450, Störmer et al. (Metabolism of the antidepressant mirtazapine in vitro: contribution of cytochromes P-450 1A2, 2D6 and 3A4. Drug Metab Dispos. 2000; 28(10): 1168-1175) demostraron que los CYP450 1A2, 2D6 y 3A4 estaban implicados respectivamente al 41%, 39% y 23% en el metabolismo de la mirtazapina. Los resultados obtenidos con el kit de microsomas aislados inhibidos irreversiblemente según la invención corroboran los resultados obtenidos por Störmer et al. (Tabla 1).

El kit de acuerdo con la presente invención permite deducir la implicación de los CYP450 en el metabolismo oxidativo de mirtazapina mediante la simple comparación del aclaramiento intrínseco en presencia de microsomas hepáticos aislados inhibidos irreversiblemente para CYP450 y microsomas de control.

En contraste, el uso de microsomas recombinantes que sobreexpresan CYP450 humano para el fenotipado de las rutas enzimáticas de mirtazapina requiere una medida indirecta, que requiere caracterizar cada actividad de CYP450 en mirtazapina, por un lado, y, por otro lado, en sustratos específicos primero en microsomas recombinantes que sobreexpresan CYP450 humano y en segundo lugar en microsomas hepáticos humanos para medir el factor de corrección.

Tabla 1: Porcentaje de implicación de CYP450 en el metabolismo oxidativo de mirtazapina obtenido a partir del kit de microsomas aislados inhibidos irreversiblemente según la invención y con enzimas recombinantes humanas (Stormer et al.)

	Porcentaje de implicación de CYP450 en el metabolismo oxidativo de mirtazapina	
CYP450 implicado	Kit de microsomas aislados	Datos esperados*
CYP1A2	41	41
CYP2D6	36	39
CYP3A4	24	23
*Störmer et al (2000) para el modelo de enzimas humanas recombinantes		

Loperamida

La loperamida se incubó de acuerdo con las condiciones descritas anteriormente con una concentración de proteínas microsomales de 2 mg/ml para una medida óptima de su aclaramiento intrínseco. En presencia de microsomas de control (no inhibidos y preparados según la invención), se midió un aclaramiento intrínseco de 14,5 a 17,2 ml/min/g de proteína. En comparación con los microsomas de control, se demostró una inhibición del aclaramiento intrínseco de loperamida del 53% y 40% en presencia de los microsomas hepáticos aislados irreversiblemente inhibidos para CYP450 3A4 y 2C8 respectivamente (Figuras 15 y 16). No se observó una inhibición significativa del aclaramiento intrínseco de loperamida en presencia de los microsomas hepáticos aislados irreversiblemente inhibidos para CYP450 1A2, 2B6, 2C9, 2D6. Por inhibición significativa se entiende un aclaramiento intrínseco de menos del 25%, que representa el umbral de variabilidad observado en las medidas de aclaramiento en microsomas hepáticos. En consecuencia, el metabolismo oxidativo de la loperamida implica a los CYP450 3A4 y 2C8 respectivamente al 53% y 40%.

Un estudio en un voluntario sano demuestra que la administración oral de gemfibrosil, 600 mg, inhibidor de CYP2C8, aumenta en un factor de 2,2 la exposición (AUC) en loperamida coadministrada vía oral a 4 mg (Niemi et al. Itraconazole, gemfibrozil and their combination markedly raise the plasma concentrations of loperamide. Eur J Clin Pharmacol. 2006; 62: 463-472). Este aumento de la exposición corresponde a una implicación de CYP2C8 estimada en un 55% del aclaramiento total de la loperamida. En este mismo estudio *in vivo*, la co-administración de loperamida, 4 mg, con 100 mg de itraconazol, un inhibidor de CYP3A4, mostró un aumento de la exposición en un factor de 3,8 veces, que corresponde aproximadamente al 74% del aclaramiento total de la loperamida.

Además, Tayrouz et al. (Ritonavir increases loperamide plasma concentrations without evidence for Pglycoprotein involvement. Clin Pharmacol Ther. 2001 Nov;70(5):405-14) demuestran en voluntarios sanos que la co-administración de loperamida, 16 mg, con 600 mg del inhibidor de CYP3A4 ritonavir , inducen un aumento en la exposición en un factor 2,65, correspondiente al 62% del aclaramiento total de la loperamida.

Los resultados obtenidos con el kit de microsomas aislados inhibidos irreversiblemente de acuerdo con la invención (Tabla 2) son corroborados por los datos descritos en la situación clínica por Niemi et al. y Tayrouz et al.

Tabla 2: Porcentaje de implicación de CYP450 en el metabolismo oxidativo de la loperamida obtenido a partir del kit de microsomas aislados inhibidos irreversiblemente según la invención y en voluntarios sanos (Niemi et al.; Tayrouz et al.)

	Porcentaje de implicación de CYP450 en el metabolismo oxidativo de loperamida		
CYP450 implicado	Kit de microsomas aislados	Datos esperados[1]	Datos esperados[2]
CYP2C8	40	55	
CYP3A4	53	74	62
[1] de Niemi et al (2006) en estudio *in vivo* con voluntarios sanos [2] de Tayrouz et al (2001) en estudio *in vivo* con voluntarios sanos			

Bupropiona

La bupropiona se incubó de acuerdo con las condiciones descritas anteriormente con una concentración en proteínas microsomales de 2 mg/ml para una medida óptima de su aclaramiento intrínseco. En presencia de microsomas de control (no inhibidos y preparados según la invención), se midió un aclaramiento intrínseco de 6,7 a 10,6 ml/min/g de proteínas. En comparación con los microsomas de control, se demostró una inhibición del aclaramiento intrínseco de bupropiona del 89% en presencia de los microsomas hepáticos aislados irreversiblemente inhibidos para CYP450 2B6 (Figuras 17 y 18). También se observó una inhibición del aclaramiento intrínseco de bupropiona del 84% en presencia de los microsomas hepáticos aislados irreversiblemente inhibidos para CYP2D6. Al igual que la paroxetina, un inhibidor MBI de CYP2D6 que no es específico y también inhibe CYP2B6, se puede deducir que la inhibición de CYP2D6 es en realidad la de CYP2B6.

No se observó una inhibición significativa del aclaramiento intrínseco de bupropina en presencia de los microsomas hepáticos aislados inhibidos irreversiblemente para CYP450 1A2, 2C8, 2C9 y 3A4. Por inhibición significativa se entiende un aclaramiento intrínseco de menos del 25%, que representa el umbral de variabilidad observado en las medidas de aclaramiento en microsomas hepáticos. En consecuencia, el metabolismo oxidativo de la bupropiona implica al CYP450 2B6 al 89%.

La FDA propone a la bupropiona como el sustrato más sensible para el CYP2B6 en estudios de interacción *in vivo* en humanos (FDA Website on Drug Development and Drug Interactions, http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm and http://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/DevelopmentResources/DruginteractionsLabeling/ucm080499.htm).

Los resultados obtenidos con el kit de microsomas aislados inhibidos irreversiblemente según la invención se corroboran con los datos descritos por la FDA.

Tabla 3: Porcentaje de implicación de CYP450 en el metabolismo oxidativo de la bupropiona obtenido a partir del kit de microsomas aislados inhibidos irreversiblemente según la invención

	% de implicación de CYP450 en el metabolismo oxidativo de bupropiona	
CYP450 implicado	Kit de microsomas aislados	Datos esperados[1]
CYP2B6	89	mayoritario
* de FDA (sustrato sensible CYP2B6		

Ibuprofeno

El ibuprofeno se incubó de acuerdo con las condiciones descritas anteriormente con una concentración de proteínas microsomales de 0,25 mg/ml para una medida óptima de su aclaramiento intrínseco. En presencia de microsomas de control (no inhibidos y preparados según la invención), se midió un aclaramiento intrínseco de 31 a 54 ml/min/g de proteína. En comparación con los microsomas de control, se demostró una inhibición del aclaramiento intrínseco de ibuprofeno del 90% en presencia de los microsomas hepáticos aislados irreversiblemente inhibidos para CYP450 2C9 (Figuras 19 y 20).

No se observó una inhibición significativa del aclaramiento intrínseco de ibuprofeno en presencia de los microsomas hepáticos aislados irreversiblemente inhibidos para CYP450 1A2, 2B6, 2D6, 2C8 y 3A4. Por inhibición significativa se entiende un aclaramiento intrínseco de menos del 25%, que representa el umbral de variabilidad observado en las medidas de aclaramiento en microsomas hepáticos. En consecuencia, el metabolismo oxidativo del ibuprofeno implica al CYP450 2C9 al 90%.

Después de la incubación de ibuprofeno a 3 mM en presencia de microsomas recombinantes que expresan los CYP450 humanos mayoritarios y después de medir el factor de corrección adaptado para cada uno de estos CYP450, McGinnity et al. (Automated définition of the enzymology of drug oxidation by the major human drug metabolizing cytochrome P450s. Drug Metab Dispos. 2000 Nov;28(11): 1327-34) demostraron que el CYP450 2C9 estaba implicado al 90% en el metabolismo del ibuprofeno. Los resultados obtenidos con el kit de microsomas aislados inhibidos irreversiblemente según

la invención se corroboran con los datos descritos por McGinnity et al. (Tabla 4). Así, el kit de acuerdo con la presente invención establece la implicación de los CYP450 en el metabolismo oxidativo del ibuprofeno mediante una simple comparación entre los aclaramientos intrínsecos de los microsomas según la invención y los microsomas de control. Por otro lado, el uso de microsomas recombinantes impone medidas indirectas que requieren la multiplicación de las manipulaciones.

Además, un estudio en voluntarios sanos demuestra que la administración oral de fluconazol, 400 mg, aumenta la exposición (AUC) del ibuprofeno coadministrado vía oral a 400 mg en un 83% ((Hynninen et al. Effects of the Antifungals Voriconazole and Fluconazole on the Pharmacokinetics of S-(+)- and R-(-)-Ibuprofen. Antimicrob Agents Chemother. Jun 2006; 50(6): 1967-1972). Lazar et al. (Drug interactions with fluconazole. Rev Infect Dis. 1990 MarApr;12 Suppl 3:S327-33) han demostrado que el fluconazol, un inhibidor de CYP2C9, provoca un aumento en la exposición del 109% del sustrato tolbutamida, conocido por ser sensible a CYP2C9 (fm = 80%, Brown et al., Prediction of in vivo drug-drug interactions from in vitro data: impact of incorporating parallel pathways of drug elimination and inhibitor absorption rate constant. Br J Clin Pharmacol. 2005 Nov; 60(5):508-18). El aumento de la exposición de ibuprofeno y tolbutamida es muy similar después de la co-administración del mismo inhibidor en humanos, pudiendo concluir que la contribución de CYP2C9 en el metabolismo de estas dos moléculas es muy similar. Los resultados obtenidos con el kit de la presente invención se confirman (Tabla 4) y demuestran la excelente representatividad de este modelo *in vitro* en comparación con la situación en clínica.

Tabla 4: Porcentaje de implicación de CYP450 en el metabolismo oxidativo del ibuprofeno obtenido a partir del kit de microsomas aislados inhibidos irreversiblemente según la invención, en enzimas recombinantes humanas ((McGinnity et al.) y en situación *in vivo* en sujetos sanos (Hynninen et al., Lazar et al. et Brown et al.)

	% de implicación de CYP450 en el metabolismo oxidativo de ibuprofeno				
CYP450 implicado	Kit de microsomas aislados	Datos esperados[1]	Datos esperados[2]	Datos esperados[3]	Datos esperados[4]
CYP2C9	90	91	45	52	(80)
[1] de McGinnity et al (2000) en modelo de enzimas recombinantes humanas [2] de Hynninen et al (2006) [3] de Lazar JD et al (1990) [4] de H.S. Brown et al (2005)					

Celecoxib

El celecoxib se incubó de acuerdo con las condiciones descritas anteriormente con una concentración de proteínas microsomales de 2 mg/ml para una medida óptima de su aclaramiento intrínseco. En presencia de microsomas de control (no inhibidos y preparados según la invención), se midió un aclaramiento intrínseco de 13,4 a 18,9 ml/min/g de proteína. En comparación con los microsomas de control, se demostró una inhibición del aclaramiento intrínseco de celecoxib del 81% en presencia de los microsomas hepáticos aislados irreversiblemente inhibidos para CYP450 2C9 (Figuras 21 y 22). No se observó una inhibición significativa del aclaramiento intrínseco de celecoxib en presencia de los microsomas hepáticos aislados irreversiblemente inhibidos para CYP450 1A2, 2B6, 2D6, 2C8 y 3A4. Por inhibición significativa se entiende un aclaramiento intrínseco de menos del 25%, que representa el umbral de variabilidad observado en las medidas de aclaramiento en microsomas hepáticos. En consecuencia, el metabolismo oxidativo del celecoxib implica al CYP450 2C9 al 81%.

Un estudio en voluntarios sanos demuestra que la administración oral repetida de fluconazol, 200 mg, aumenta en un 134% la exposición (AUC) al celecoxib co-administrado vía oral a 200 mg (NDA020998 1998-12-31 Pharmacia).

El aumento en la exposición de celecoxib y tolbutamida mencionado anteriormente (Lazar et al.) es muy similar después de la co-administración de fluconazol en humanos, pudiendo concluirse que la contribución de CYP2C9 en el metabolismo de estos dos principios activos son muy similares. Brown et al. demostraron para la tolbutamida una implicación de CYP2C9 del 80%. Los resultados obtenidos con el kit de microsomas aislados inhibidos irreversiblemente según la invención demuestran la buena representatividad de este modelo *in vitro* en comparación con la situación en clínica (Tabla 5).

Tabla 5: Porcentaje de implicación de CYP450 en el metabolismo oxidativo del celecoxib obtenido a partir del kit de microsomas aislados inhibidos irreversiblemente según la invención y en situación *in vivo* en sujetos sanos (NDA020998, Lazar et al. et Brown et al.)

	% de implicación de CYP450 en el metabolismo oxidativo de celecoxib			
CYP450 implicado	Kit de microsomas aislados	Datos esperados[1]	Datos esperados[2]	Datos esperados[3]
CYP2C9	81	57	52	(80)
[1] de NDA020998 1998-12-31 (Pharmacia)				

[2] de Lazar JD et al (1990) [3] de H.S. Brown et al (2005)

Pioglitazona

La pioglitazona se incubó de acuerdo con las condiciones descritas anteriormente con una concentración de proteínas microsomales de 0,2 mg/ml para una medida óptima de su aclaramiento intrínseco. En presencia de microsomas de control (no inhibidos y preparados según la invención), se midió un aclaramiento intrínseco de 43 a 70 ml/min/g de proteína. En comparación con los microsomas de control, se demostró una inhibición del aclaramiento intrínseco de la pioglitazona del 69% en presencia de los microsomas hepáticos aislados irreversiblemente inhibidos para CYP450 2C8 (Figuras 23 y 24).

No se observó una inhibición significativa del aclaramiento intrínseco de pioglitazona en presencia de los microsomas hepáticos aislados irreversiblemente inhibidos para CYP450 1A2, 2B6, 2D6, 2C9 y 3A4. Por inhibición significativa se entiende un aclaramiento intrínseco de menos del 25%, que representa el umbral de variabilidad observado en las medidas de aclaramiento en microsomas hepáticos. En consecuencia, el metabolismo oxidativo de la pioglitazona implica al CYP450 2C9 al 69%.

Un estudio en voluntarios sanos demuestra que la administración oral de gemfibrosil 600 mg, un inhibidor de CYP2C8, aumenta en un 239% la exposición (AUC) de la pioglitazona coadministrada vía oral a 3 mg (Deng et al., Effect of gemfibrozil on the pharmacokinetics of pioglitazone. Eur J Clin Pharmacol, 2005, 61, 831-6). Este aumento en la exposición corresponde a una implicación de CYP2C8 estimada en el 71% del aclaramiento total de la pioglitazona. Los resultados obtenidos con el kit de acuerdo con la invención corroboran así los datos descritos por Deng et al. en situación clínica (Tabla 6).

Tabla 6: Porcentaje de implicación de CYP450 en el metabolismo oxidativo de la pioglitazona obtenido a partir del kit de microsomas aislados inhibidos irreversiblemente según la invención y en situación *in vivo* (Deng et al.)

	% de implicación de CYP450 en el metabolismo oxidativo de pioglitazona	
CYP450 implicado	Kit de microsomas aislados	Datos esperados[1]
CYP2C9	69	71
[1] de Deng LJ et al., 2005, estudio *in vivo*		

Bortezomib

El bortezomib se incubó de acuerdo con las condiciones descritas anteriormente con una concentración de proteínas microsomales de 1,5 mg/ml para una medida óptima de su aclaramiento intrínseco. En presencia de microsomas de control (no inhibidos y preparados según la invención), se midió un aclaramiento intrínseco de 6,9 a 11 ml/min/g de proteína. En comparación con los microsomas de control, se demostró una inhibición del aclaramiento intrínseco del bortezomib del 73% en presencia de los microsomas hepáticos aislados irreversiblemente inhibidos para CYP450 3A4 (Figuras 25 y 26).

No se observó una inhibición significativa del aclaramiento intrínseco de bortezomib en presencia de los microsomas hepáticos aislados irreversiblemente inhibidos para CYP450 1A2, 2B6, 2D6, 2C8 y 2C9. Por inhibición significativa se entiende un aclaramiento intrínseco de menos del 25%, que representa el umbral de variabilidad observado en las medidas de aclaramiento en microsomas hepáticos. En consecuencia, el metabolismo oxidativo del bortezomib implica al CYP450 3A4 al 73%. Uttamsingh et al. (Relative contributions of the five major human cytochromes p450, 1A2, 2C9, 2C19, 2D6, and 3A4, to the hepatic metabolism of the proteasome inhibitor bortezomib. Drug Metab Dipos 2005, 33 (11):1723-1728) han demostrado que un anticuerpo monoclonal anti-CYP 3A4 inhibe el 79% del metabolismo del bortezomib (2 µM) por los microsomas hepáticos humanos. Los resultados obtenidos con el kit descrito en la presente invención corroboran así los datos descritos por Uttamsingh et al. (Tabla 7)

Tabla 7: Porcentaje de implicación de CYP450 en el metabolismo oxidativo de bortezomib obtenido a partir del kit de microsomas aislados inhibidos irreversiblemente según la invención y a partir de microsomas hepáticos humanos inhibidos por anticuerpos monoclonales específicos en situación *in vivo* (Uttamsingh et al.)

	% de implicación de CYP450 en el metabolismo oxidativo de bortezomib	
CYP450 implicado	Kit de microsomas aislados	Datos esperados[1]
CYP3A4	73	79
[1] de Uttamsingh et al. (20059 en modelo de microsomas hepáticos humanos (usando anticuerpos monoclonales)		

Repaglinida

La repaglinida se incubó de acuerdo con las condiciones descritas anteriormente con una concentración de proteínas microsomales de 2 mg/ml para una medida óptima de su aclaramiento intrínseco. En presencia de microsomas de control (no inhibidos y preparados según la invención), se midió un aclaramiento intrínseco de 38,4 a 48,9 ml/min/g de proteína. En comparación con los microsomas de control, se demostró una inhibición del aclaramiento intrínseco de la repaglinida del 80% en presencia de los microsomas hepáticos aislados irreversiblemente inhibidos para CYP450 2C8 (Figuras 27 y 28). No se observó una inhibición significativa del aclaramiento intrínseco de repaglinida en presencia de los microsomas hepáticos aislados irreversiblemente inhibidos para CYP450 1A2, 2B6, 2D6, 2C9 y 3A4. Por inhibición significativa se entiende un aclaramiento intrínseco de menos del 25%, que representa el umbral de variabilidad observado en las medidas de aclaramiento en microsomas hepáticos. En consecuencia, el metabolismo oxidativo de la repaglinida implica al CYP450 3A4 al 80%.

Un estudio con voluntarios sanos demuestra que la administración oral de gemfibrosil (hasta 900 mg), un inhibidor de CYP2C8, aumenta 8,3 veces la exposición (AUC) a repaglinida coadministrada vía oral a 0,25 mg (Honkalammi J. et al., Dose-Dependent Interaction between gemfibrozil and repaglinide in humans: strong inhibition of CYP2C8 with subtherapeutic gemfibrozil doses. Drug Metab Dispos, 2011, 39, 1977-1986). Este aumento de la exposición corresponde a una implicación estimada del CYP2C8 del 88% en el aclaramiento total de la repaglinida. Los resultados obtenidos con el kit de microsomas aislados inhibidos irreversiblemente según la invención se corroboran con los datos descritos en situación clínica por Honkalammi J. et al. (Tabla 8).

Tabla 8: Porcentaje de implicación de CYP450 en el metabolismo oxidativo de repaglidina obtenido a partir del kit de microsomas aislados inhibidos irreversiblemente según la invención y en situación *in vivo* en sujetos sanos (Honkalammi J. et al.)

	% de implicación de CYP450 en el metabolismo oxidativo de repaglinida	
CYP450 implicado	Kit de microsomas aislados	Datos esperados[1]
CYP2C8	80	88
[1]de Honkalammi J. et al, 2011		

Sertralina

La sertralina se incubó de acuerdo con las condiciones descritas anteriormente con una concentración de proteínas microsomales de 0,2 mg/ml para una medida óptima de su aclaramiento intrínseco. En presencia de microsomas de control (no inhibidos y preparados según la invención), se midió un aclaramiento intrínseco de 52,5 a 70,5 ml/min/g de proteína. En comparación con los microsomas de control, se demostró una inhibición del aclaramiento intrínseco de la sertralina del 58% en presencia de los microsomas hepáticos aislados irreversiblemente inhibidos para CYP450 2B6 (Figuras 29 y 30). También se observó una inhibición del aclaramiento intrínseco de la sertralina de un 64% en presencia de los microsomas hepáticos aislados irreversiblemente inhibidos para CYP2D6. Dado que la paroxetina, un inhibidor MBI de CYP2D6, no es específica y también inhibe CYP2B6, se puede concluir que la inhibición de CYP2D6 es en realidad la de CYP2B6.

No se observó una inhibición significativa del aclaramiento intrínseco de sertralina en presencia de microsomas hepáticos aislados inhibidos irreversiblemente para los CYP450 1A2, 2C8, 2C9 y 3A4. Por inhibición significativa se entiende un aclaramiento intrínseco de menos del 25%, que representa el umbral de variabilidad observado en las medidas de aclaramiento en microsomas hepáticos. En consecuencia, el metabolismo oxidativo de la sertralina implica al CYP450 2B6 al 58%.

Después de la incubación de sertralina en presencia de microsomas hepáticos humanos e inhibidores específicos de CYP450, Obach S et al. ((Sertraline is metabolized by multiple cytochrome P450 enzymes, monoamine oxidases, and glucuronyl transferases in human: an in vitro study. Drug Metab Dispos. 2005 Feb;33(2):262-70) demostraron que, entre los CYP450 mayoritarios, CYP2B6 contribuye más al metabolismo de la sertralina, con una implicación del 15 al 65% (60% en un pool de hígados humanos). Los resultados obtenidos con el kit descrito según la presente invención son corroborados por los resultados descritos por Obach S et al. (Tabla 9).

Tabla 9: Porcentaje de implicación de CYP450 en el metabolismo oxidativo de sertralina obtenido a partir del kit de microsomas aislados inhibidos irreversiblemente según la invención y en microsomas hepáticos humanos en presencia o ausencia de inhibidores específicos de CYP450 (Obach S et al.)

	% de implicación de CYP450 en el metabolismo oxidativo de sertralina	
CYP450 implicado	Kit de microsomas aislados	Datos esperados[1]
CYP2B6	58	15 a 65-60
[1]de Obach S et al (2004) en microsomas hepáticos humanos +/- inhibidor específico de CYP450		

Los resultados obtenidos muestran que la contribución de las enzimas implicadas en el metabolismo de los principios activos seleccionados, medidos *in vitro* con el kit de fenotipado, son muy similares o idénticos a los estimados o medidos a partir de datos *in vivo* y/o de datos de otros modelos *in vitro*. La validación del kit de microsomas crioconservados, aislados e inhibidos irreversiblemente en el marco de un fenotipado enzimático de las rutas metabólicas de un xenobiótico en comparación con datos clínicos demuestra la representatividad de este modelo *in vitro* comparado con la situación *in vivo* en humanos.

Además, la adquisición de una medida directa de la contribución enzimática en el metabolismo de un principio activo permite no solo un ahorro de tiempo y una facilidad de interpretación, sino también evita los errores inherentes a la multiplicación de manipulaciones para el implementación de otros modelos *in vitro.*

REIVINDICACIONES

1. Método para la preparación de microsomas aislados y conservados, que comprenden un citocromo P450 (CYP450) inhibido irreversiblemente, para su utilización extemporánea, caracterizado porque comprende las etapas a) a c) en el orden siguiente;

a) inhibición irreversible de un citocromo P450;
b) concentración de proteínas microsomales; y
c) conservación de microsomas aislados.

2. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende una o más etapas de lavado.

3. Método según la reivindicación 2, caracterizado porque las etapas de lavado se llevan a cabo antes y/o después de la etapa de concentración de proteínas microsomales.

4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque la concentración de los microsomas se realiza por filtración/centrifugación o ultracentrifugación.

5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque los microsomas se concentran a una concentración de 10 mg/ml a 30 mg/ml.

6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque la etapa de conservación es la congelación.

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque los microsomas son microsomas hepáticos humanos.

8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque el citocromo P450 inhibido irreversiblemente se selecciona de las familias CYP1, CYP2 y CYP3.

9. Método según la reivindicación 8, caracterizado porque el citocromo P450 se selecciona de la lista de los citocromos siguientes: CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4.

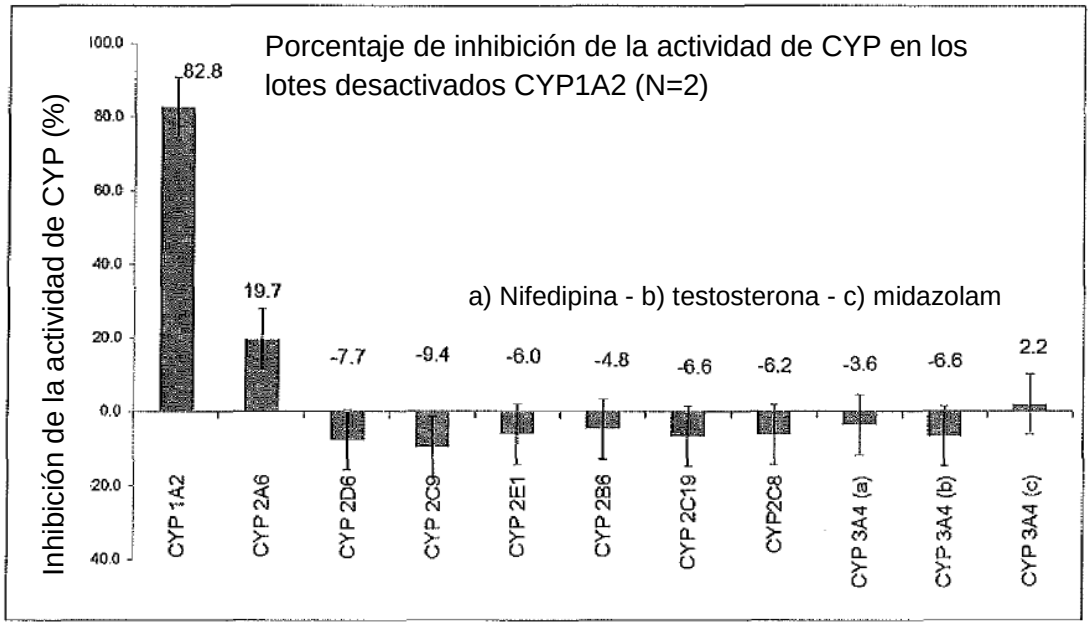
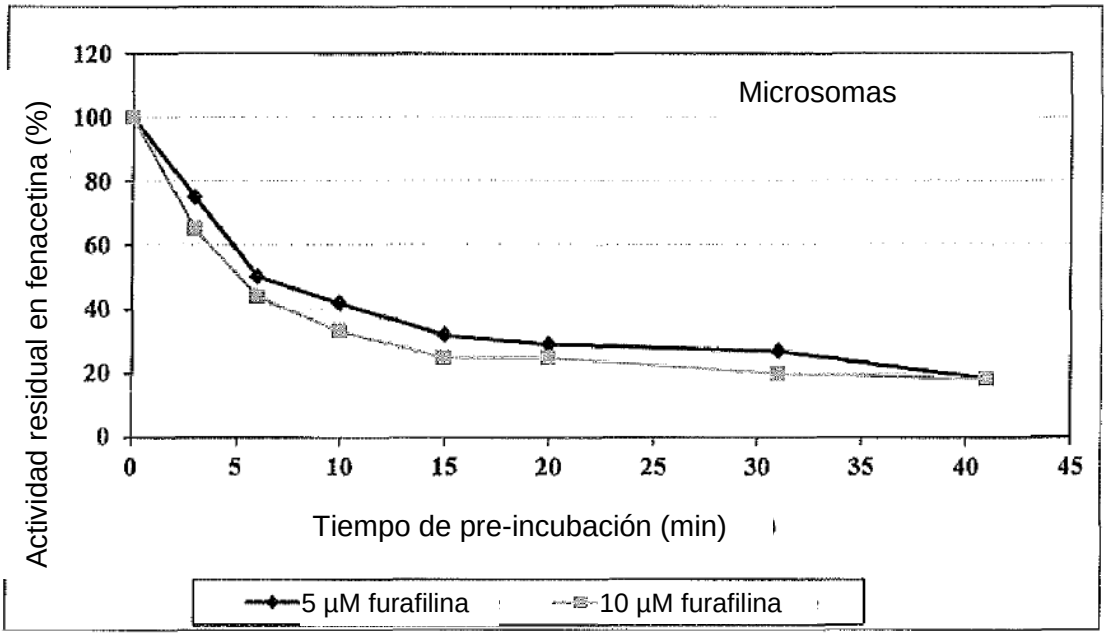


Figura 1: Porcentaje de inhibición de la actividad de citocromos P450 en los microsomas inhibidos irreversiblemente CYP1A2



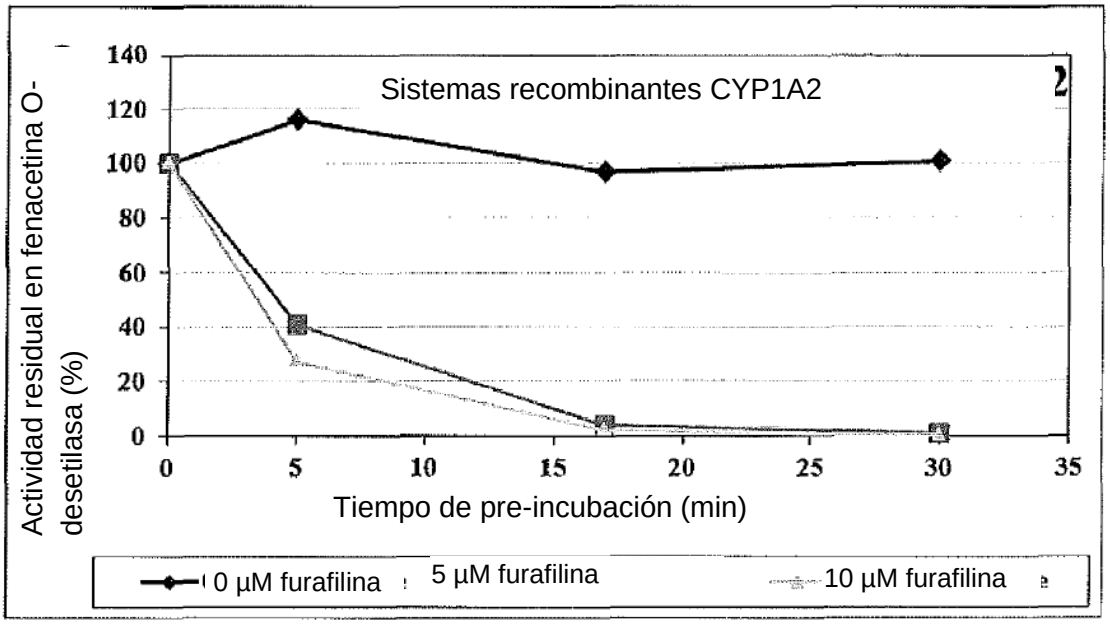


Figura 2: Impacto de la furafilina 5 µM y 10 µM en los microsomas hepáticos humanos y en los microsomas recombinantes para el CYP1A2

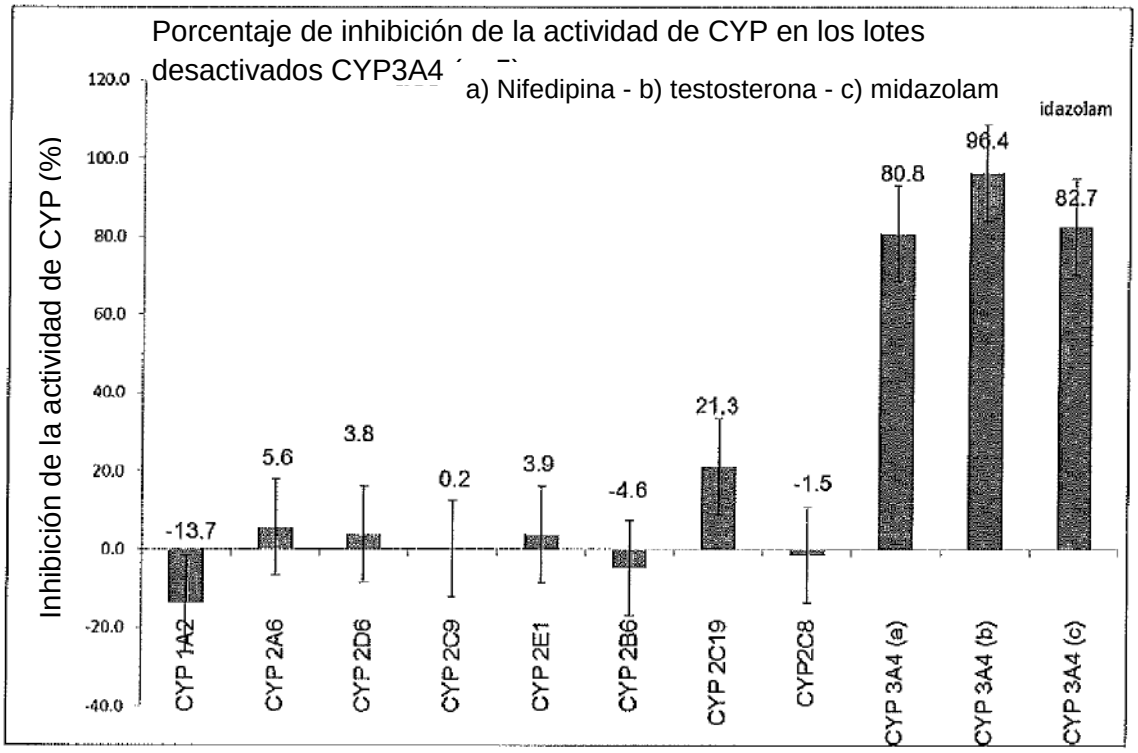


Figura 3: Porcentaje de inhibición de la actividad de citocromos P450 en los microsomas inhibidos irreversiblemente CYP3A4

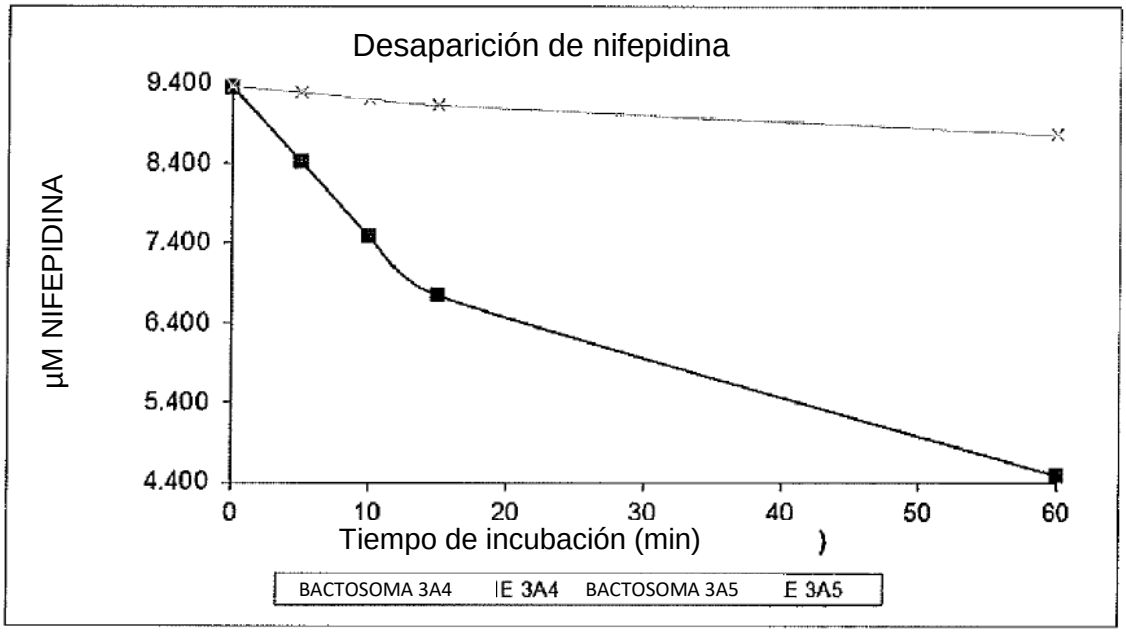


Figura 4: Metabolismo de la nifepidina por el CYP3A4 y el CYP3A5 (microsomas recombinantes)

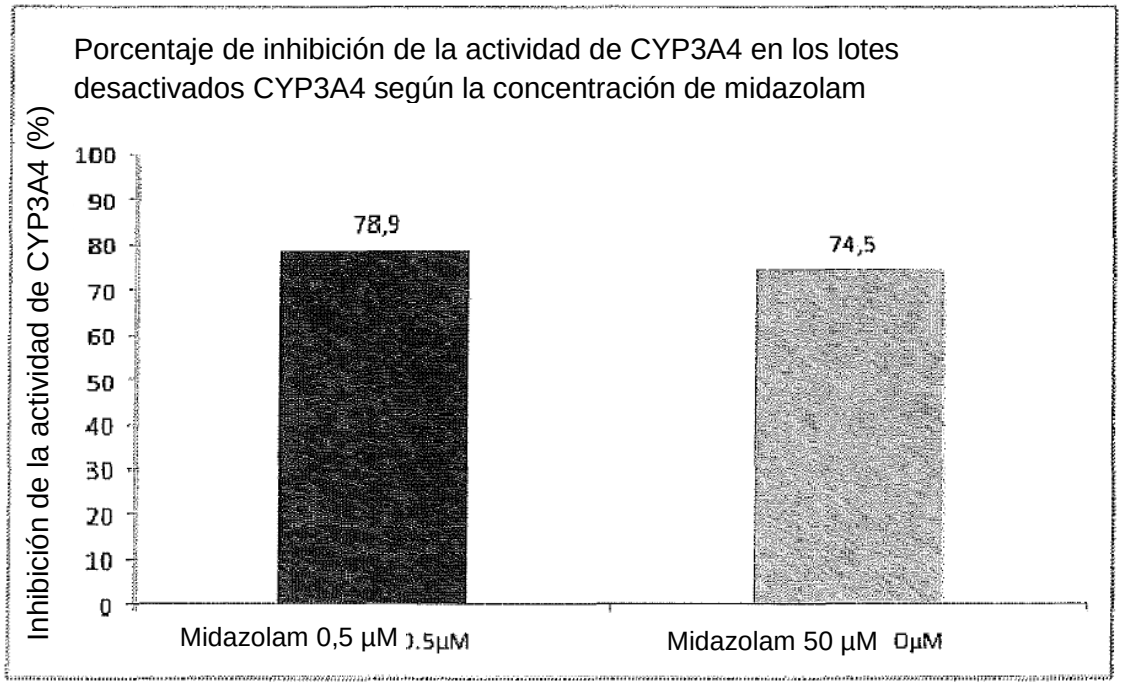


Figura 5: Porcentaje de inhibición de la actividad midazolam en Km y Vmax en los microsomas inhibidos irreversiblemente CYP3A4

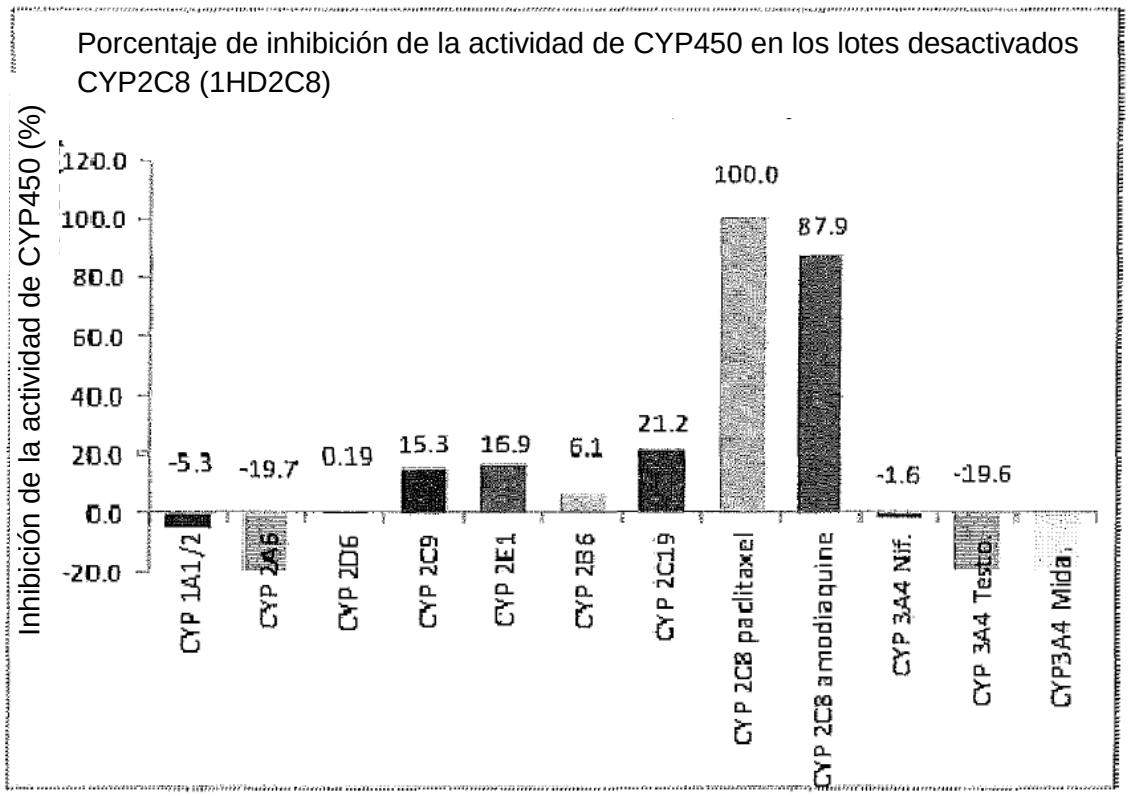


Figura 6: Porcentaje de inhibición de la actividad de citocromos P450 en los microsomas inhibidos irreversiblemente CYP2C8

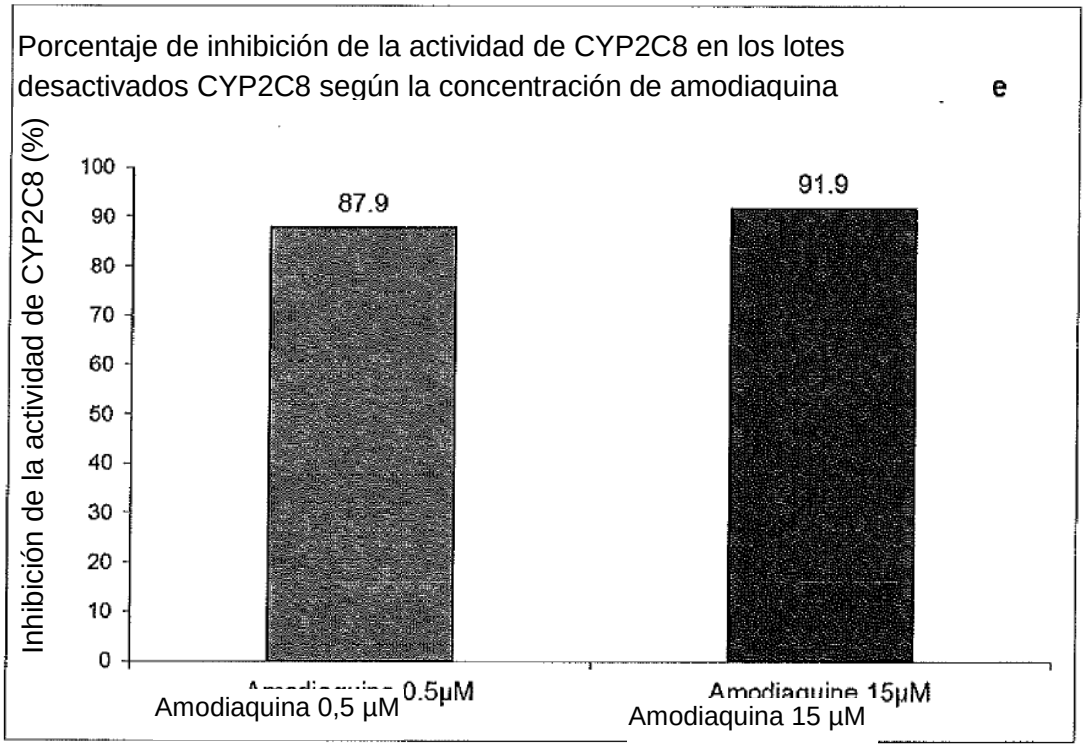


Figura 7: Porcentaje de inhibición de la actividad de amodiaquina en Km y Vmax en los microsomas inhibidos irreversiblemente CYP2C8

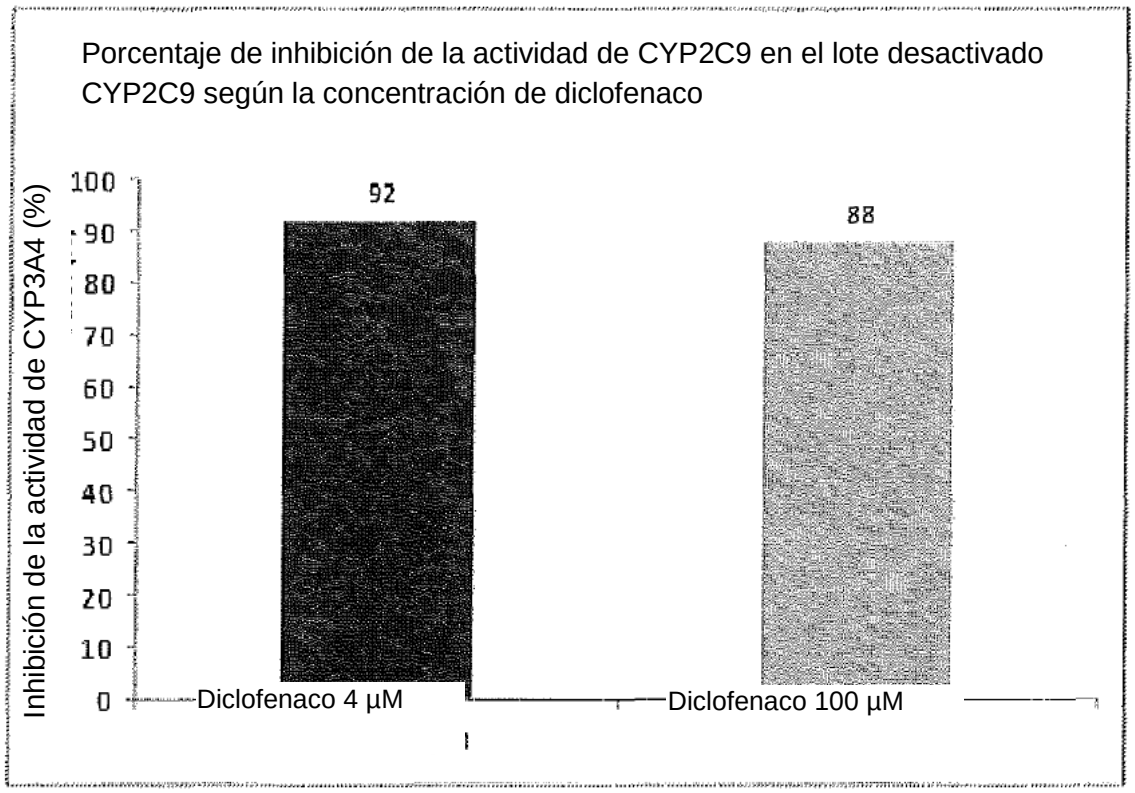


Figura 8: Porcentaje de inhibición de la actividad de diclofenaco en Km y Vmax en los microsomas inhibidos irreversiblemente CYP2C9

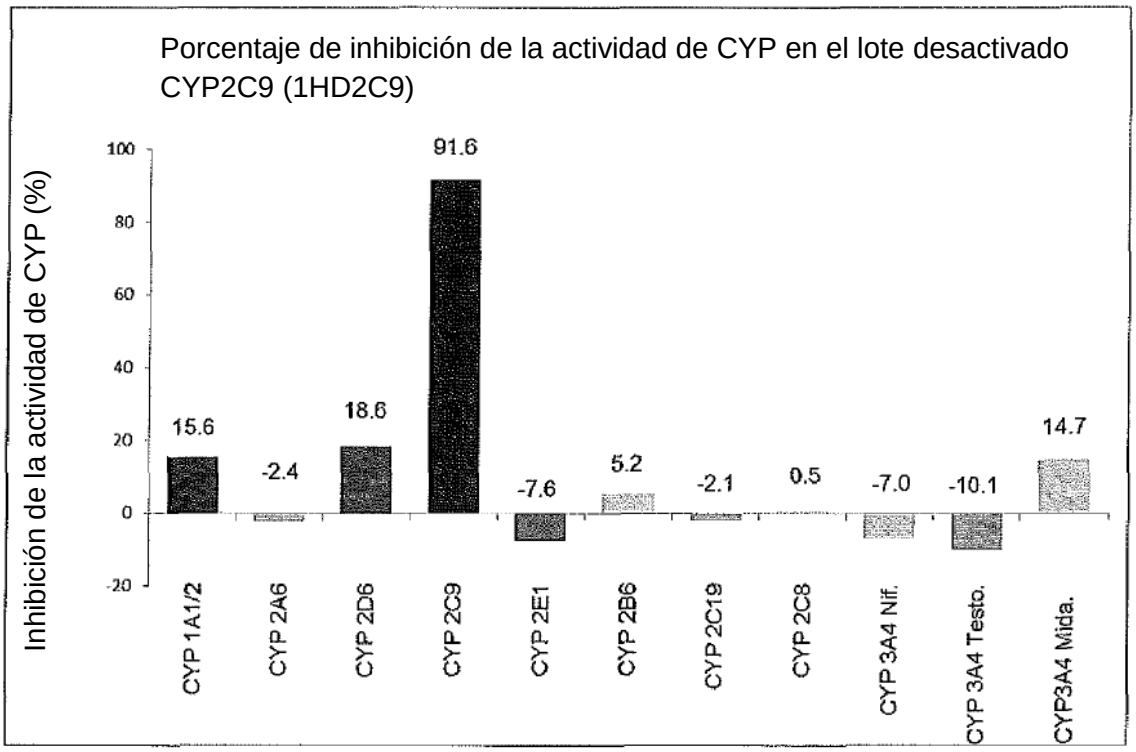


Figura 9: Porcentaje de inhibición de la actividad de citocromos P450 en los microsomas inhibidos irreversiblemente CYP2C9

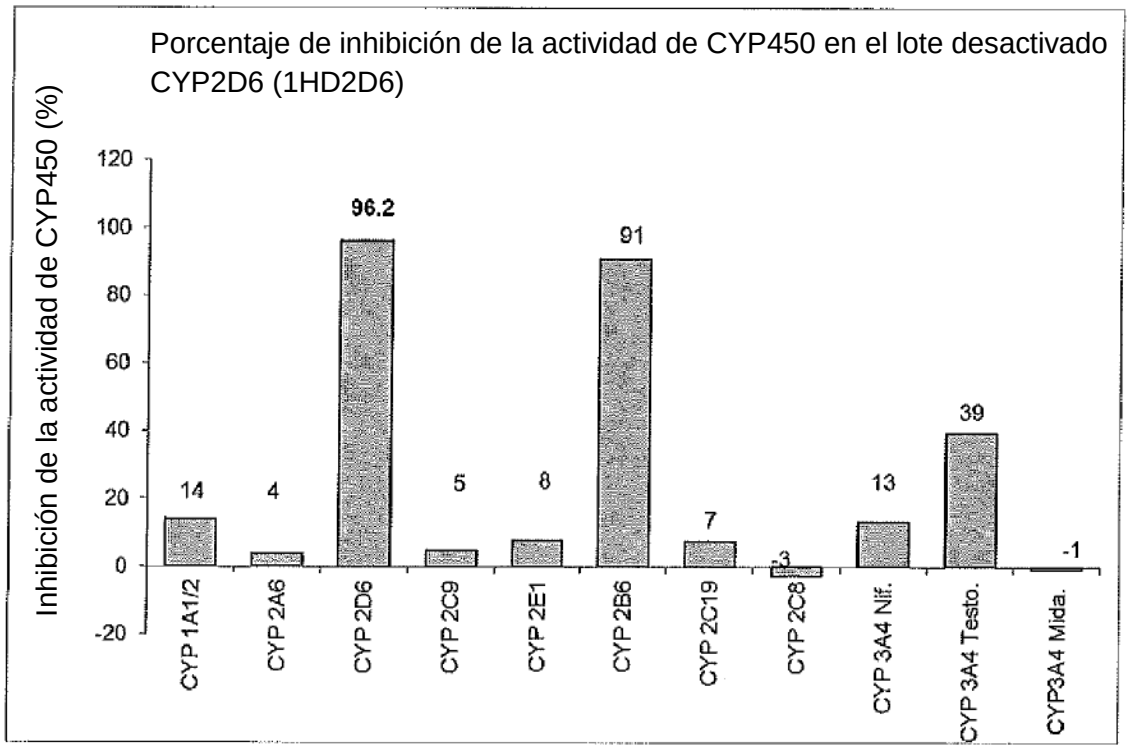


Figura 10: Porcentaje de inhibición de la actividad de citocromos P450 en los microsomas inhibidos irreversiblemente CYP2D6

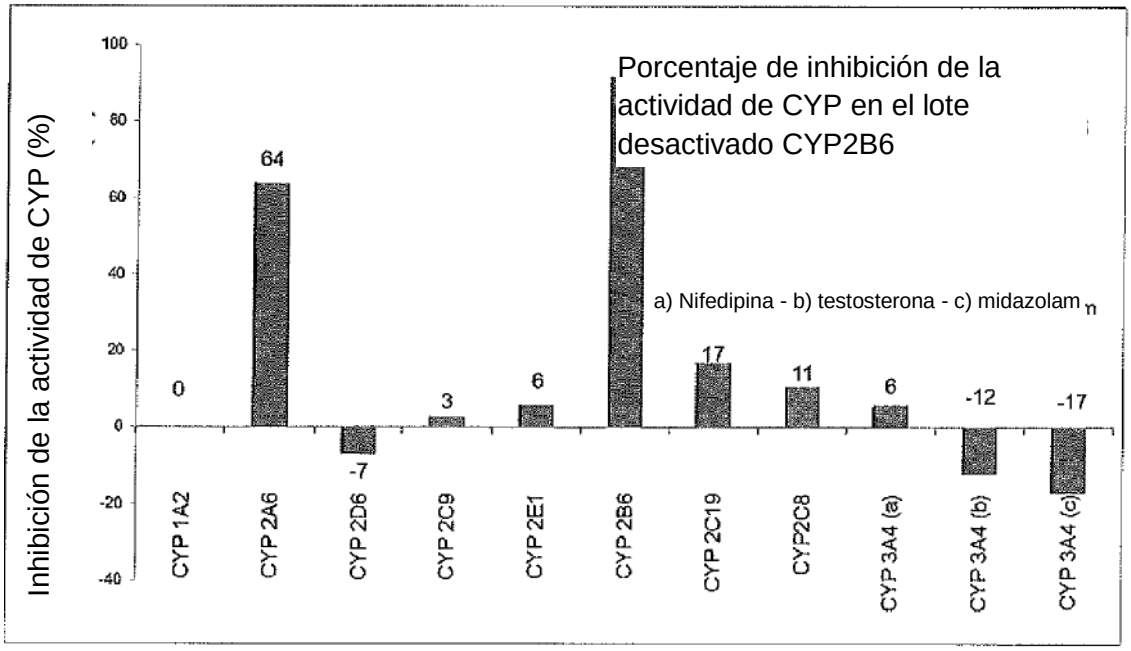


Figura 11: Porcentaje de inhibición de la actividad de citocromos P450 en los microsomas inhibidos irreversiblemente CYP2B6

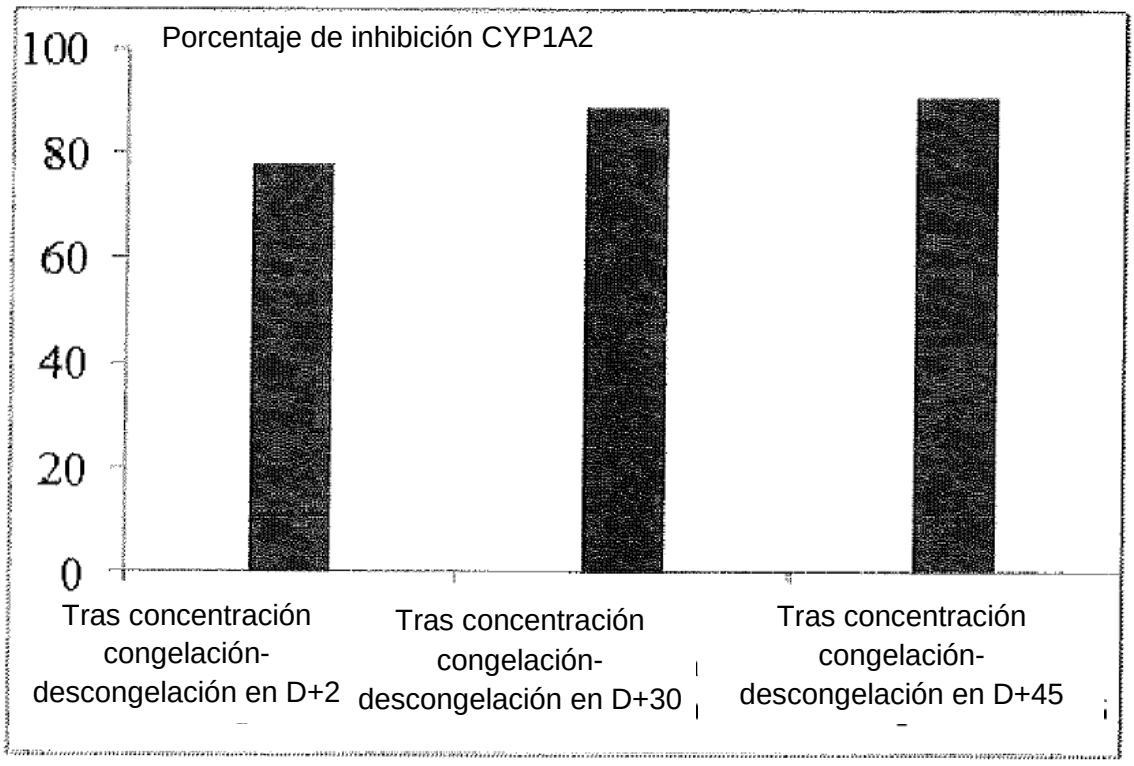
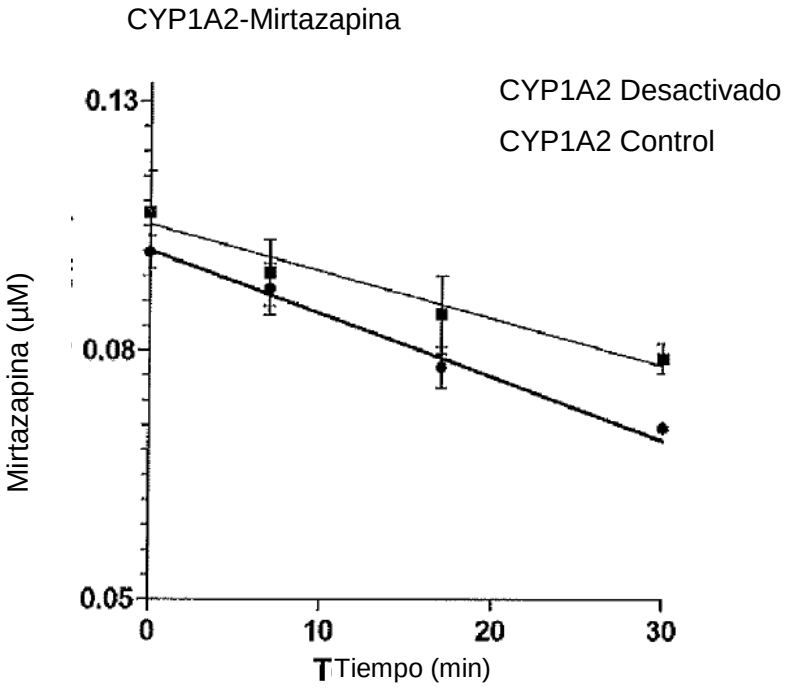
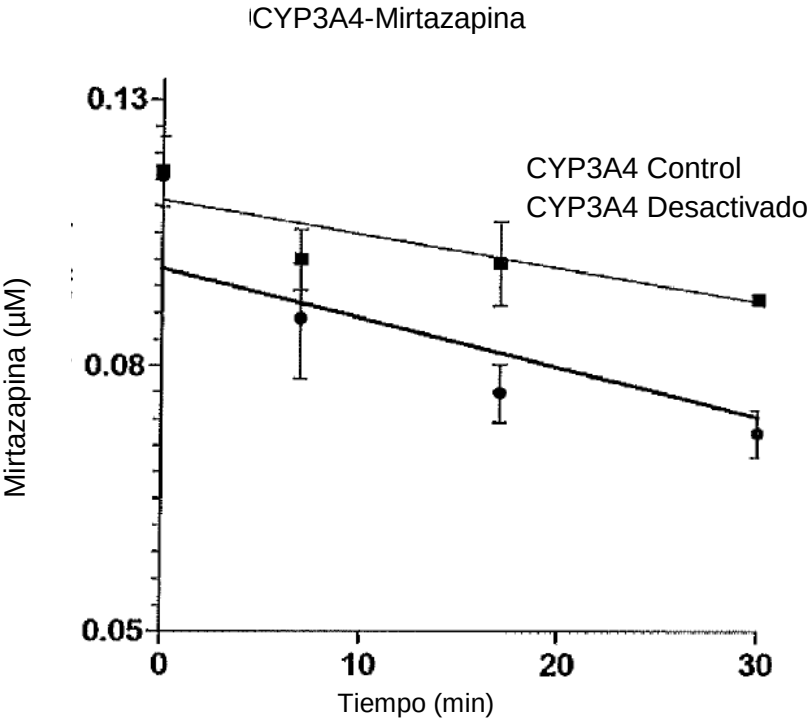


Figura 12: Porcentaje de inhibición de la actividad de CYP1A2 en función de diferentes tiempos de conservación a -80ºC

A


CYP1A2-Mirtazapina
CYP1A2 Desactivado
CYP1A2 Control
Mirtazapina (µM)
0.13
0.08
0.05
0
10
20
30
Tiempo (min)

B


CYP3A4-Mirtazapina
CYP3A4 Control
CYP3A4 Desactivado
Mirtazapina (µM)
0.13
0.08
0.05
0
10
20
30
Tiempo (min)

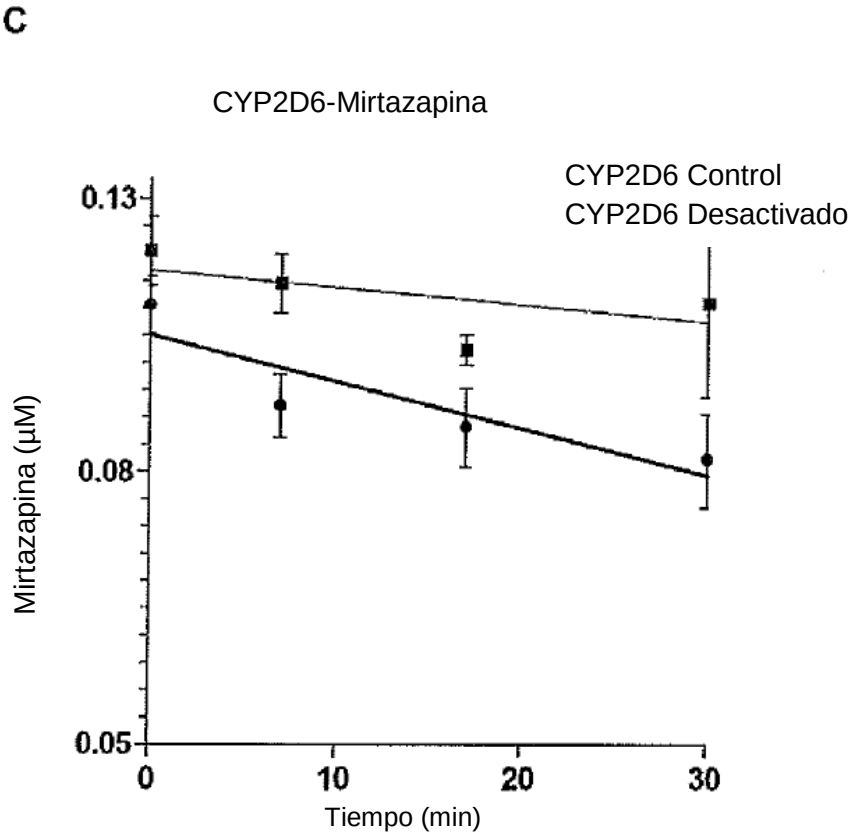


Figura 13: Cinética de desaparición de la mirtazapina en microsomas aislados inhibidos irreversiblemente CYP1A2 (A), 3A4 (B), 2D6 (C) y sus controles (n=3)

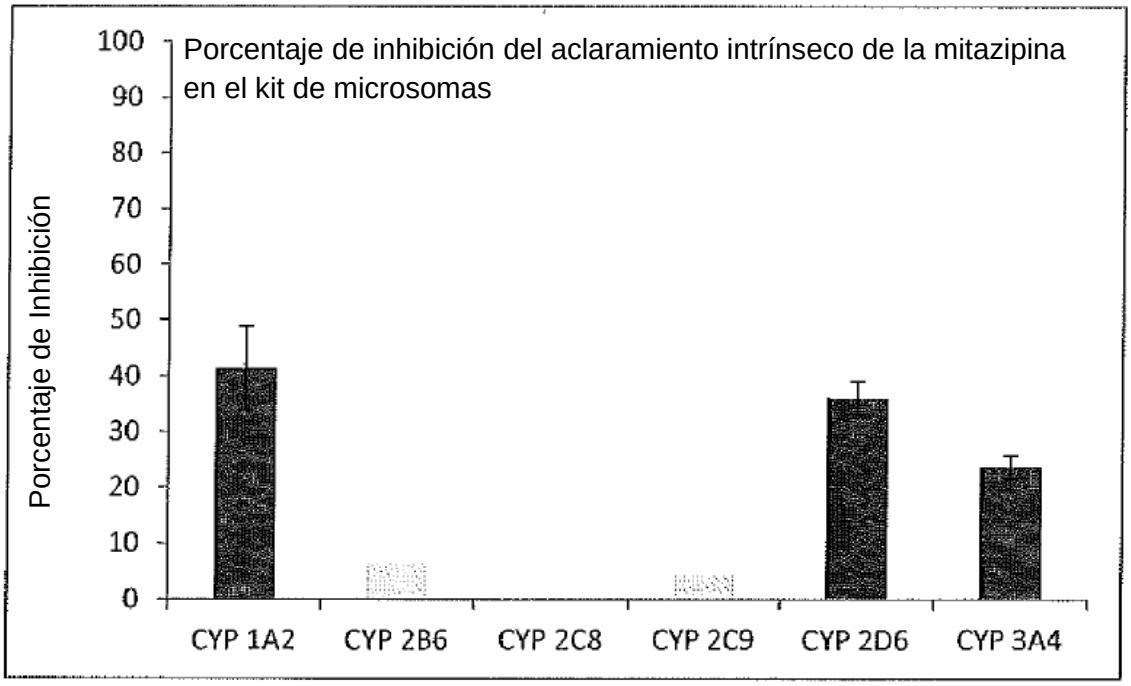
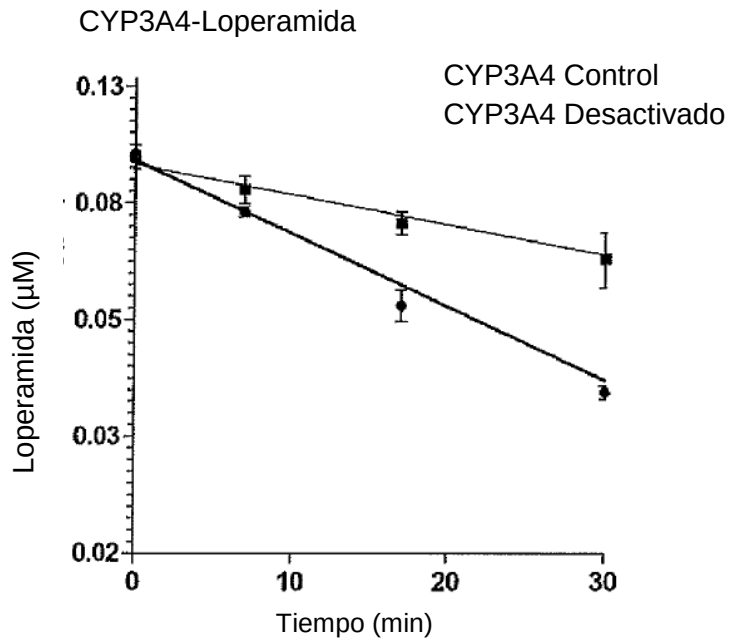


Figura 14: Porcentaje de inhibición del aclaramiento intrínseco de la mitazipina en el kit de microsomas aislados inhibidos irreversiblemente en comparación con sus controles homólogos

A



B

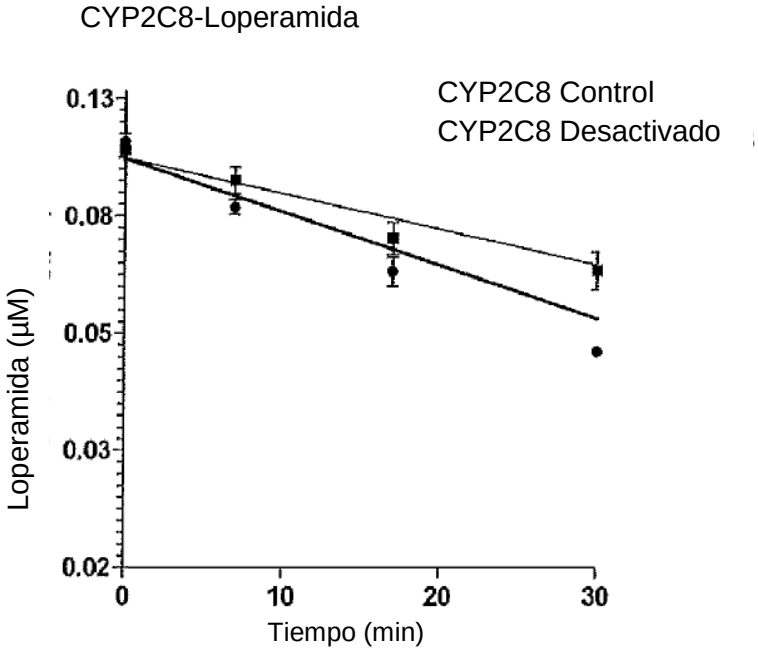


Figura 15: Cinética de desaparición de la loperamida en microsomas aislados inhibidos irreversiblemente 3A4 (A) y 2C8 (B) y sus controles homólogos (n=3)

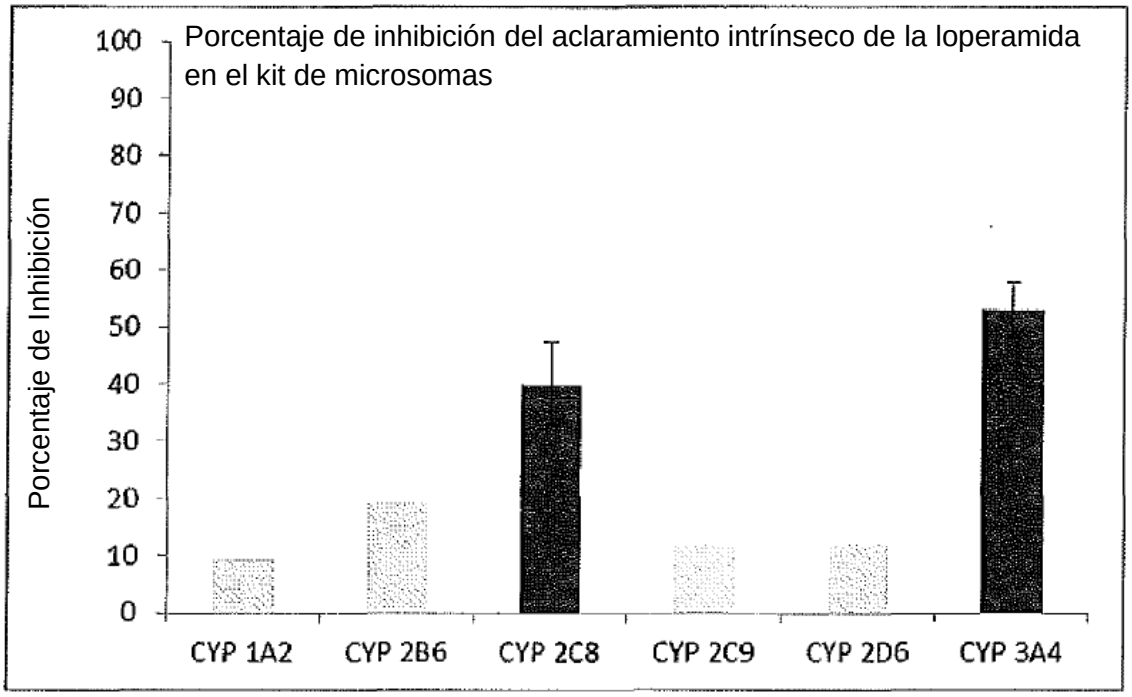


Figura 16: Porcentaje de inhibición del aclaramiento intrínseco de la loperamida en el kit de microsomas aislados inhibidos irreversiblemente en comparación con sus controles homólogos

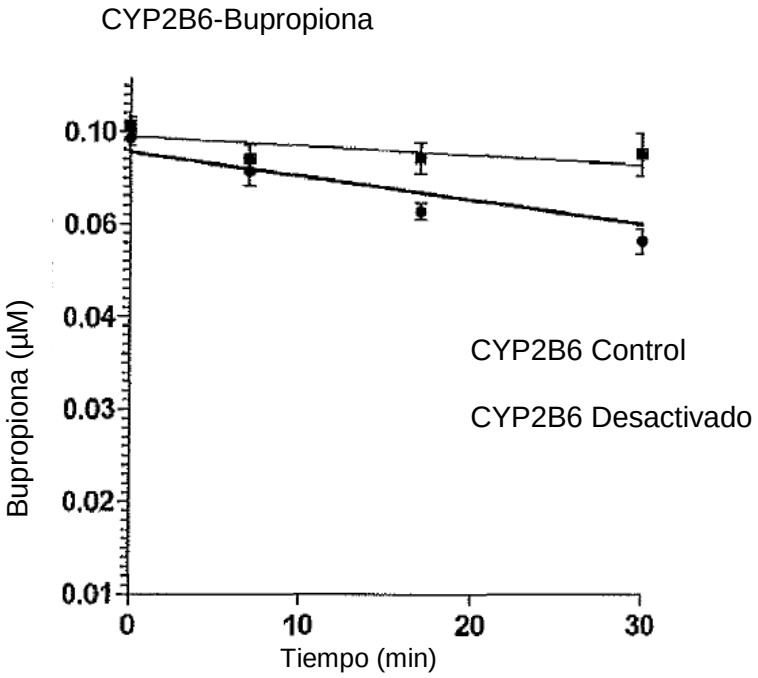


Figura 17: Cinética de desaparición de la bupropiona en microsomas aislados inhibidos irreversiblemente 2B6 y su control homólogo (n=3)

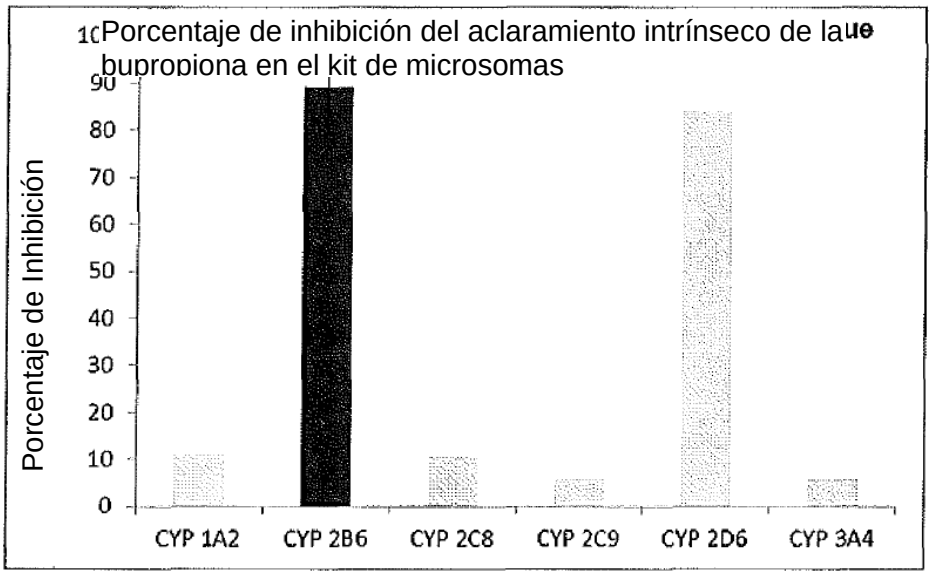


Figura 18: Porcentaje de inhibición del aclaramiento intrínseco de la bupropiona en el kit de microsomas aislados inhibidos irreversiblemente en comparación con sus controles homólogos

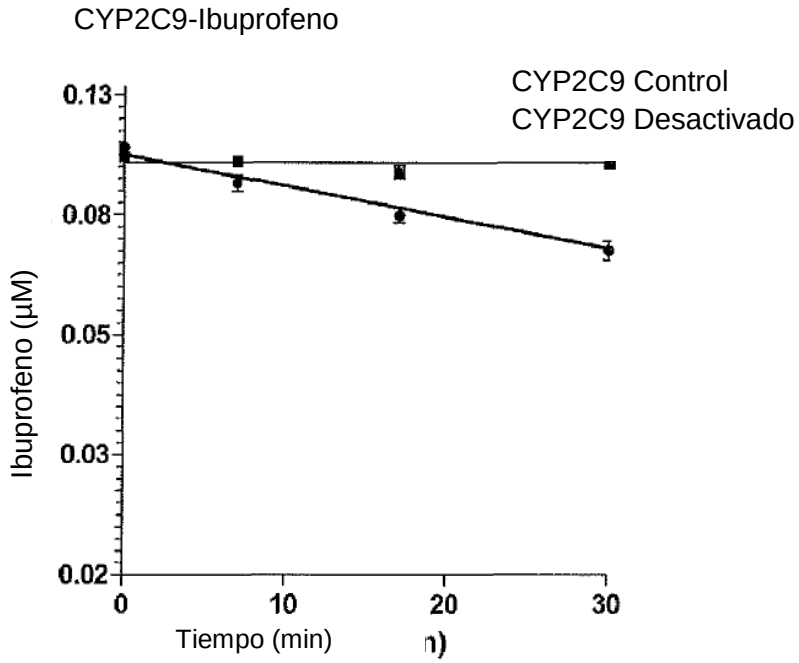


Figura 19: Cinética de desaparición del ibuprofeno en microsomas aislados inhibidos irreversiblemente 2C9 y su control homólogo (n=3)

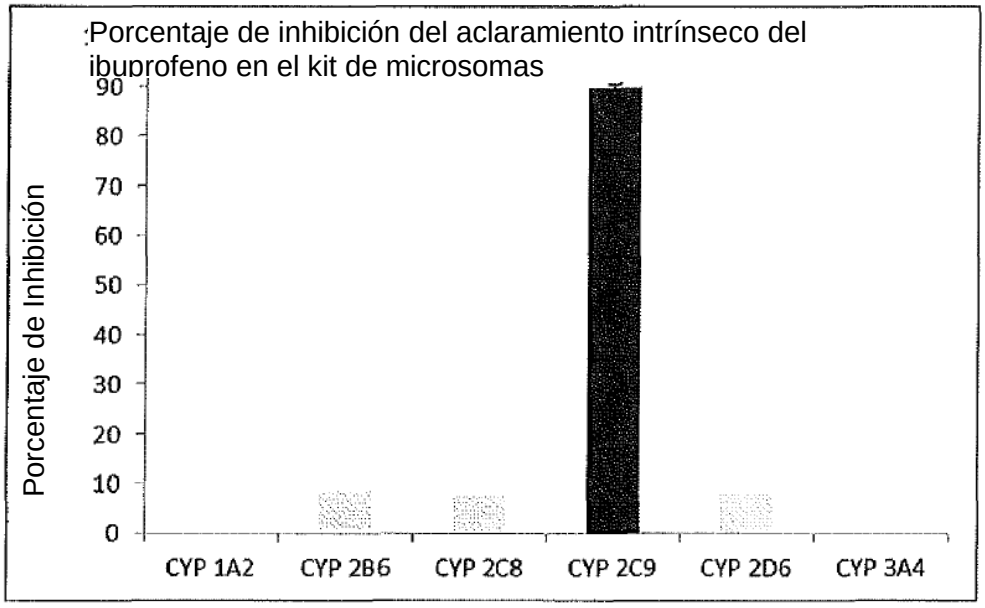


Figura 20: Porcentaje de inhibición del aclaramiento intrínseco del ibuprofeno en el kit de microsomas aislados inhibidos irreversiblemente en comparación con sus controles homólogos

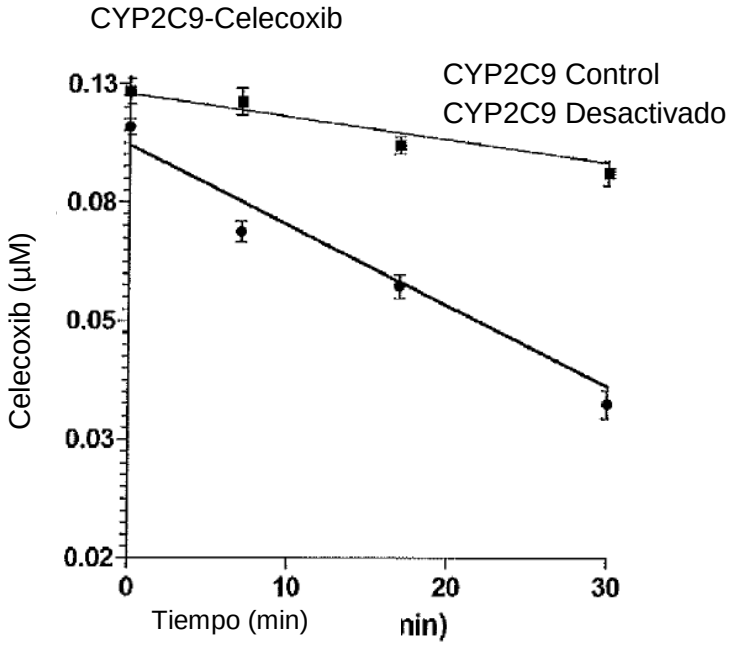


Figura 21: Cinética de desaparición del celecoxib en microsomas aislados inhibidos irreversiblemente 2C9 y su control homólogo (n=3)

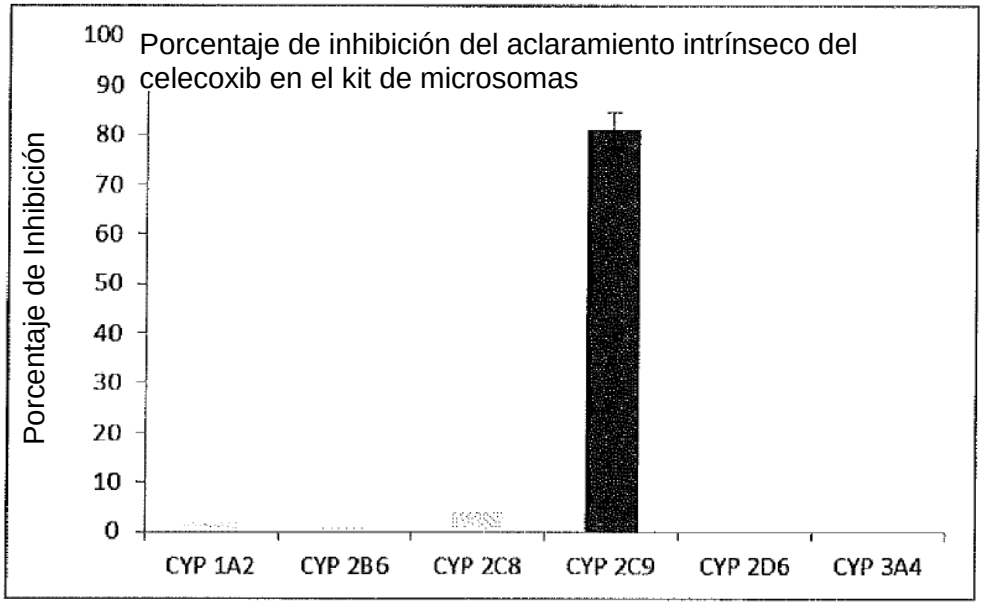


Figura 22: Porcentaje de inhibición del aclaramiento intrínseco del celecoxib en el kit de microsomas aislados inhibidos irreversiblemente en comparación con sus controles homólogos

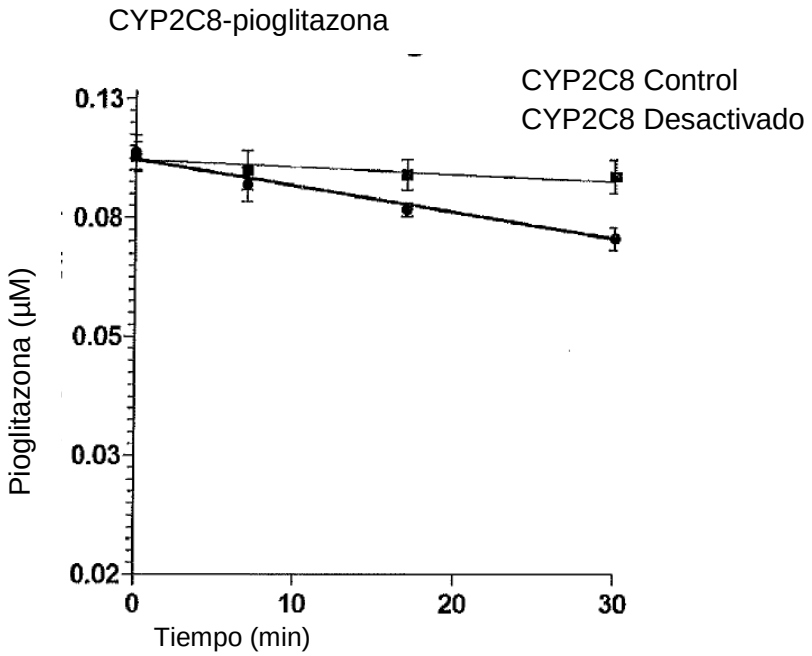


Figura 23: Cinética de desaparición de la pioglitazona en microsomas aislados inhibidos irreversiblemente 2C8 y su control homólogo (n=3)

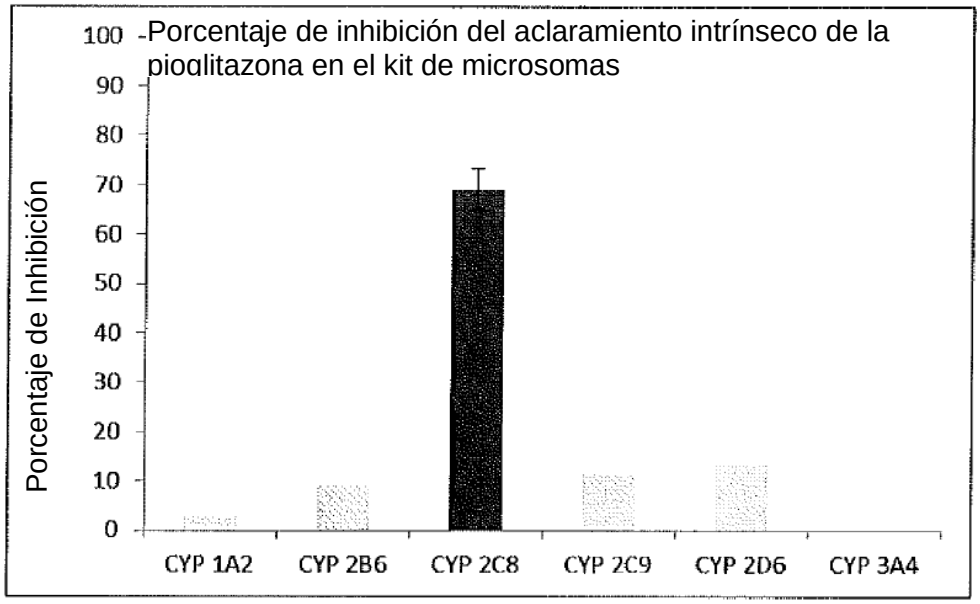


Figura 24: Porcentaje de inhibición del aclaramiento intrínseco de la pioglitazona en el kit de microsomas aislados inhibidos irreversiblemente en comparación con sus controles homólogos

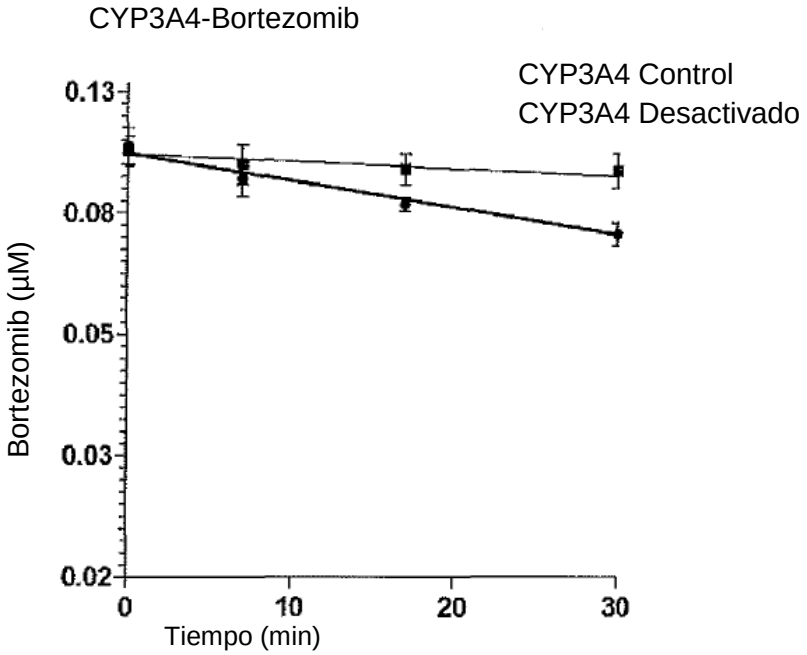


Figura 25: Cinética de desaparición de bortezomib en microsomas aislados inhibidos irreversiblemente 3A4 y su control homólogo (n=3)

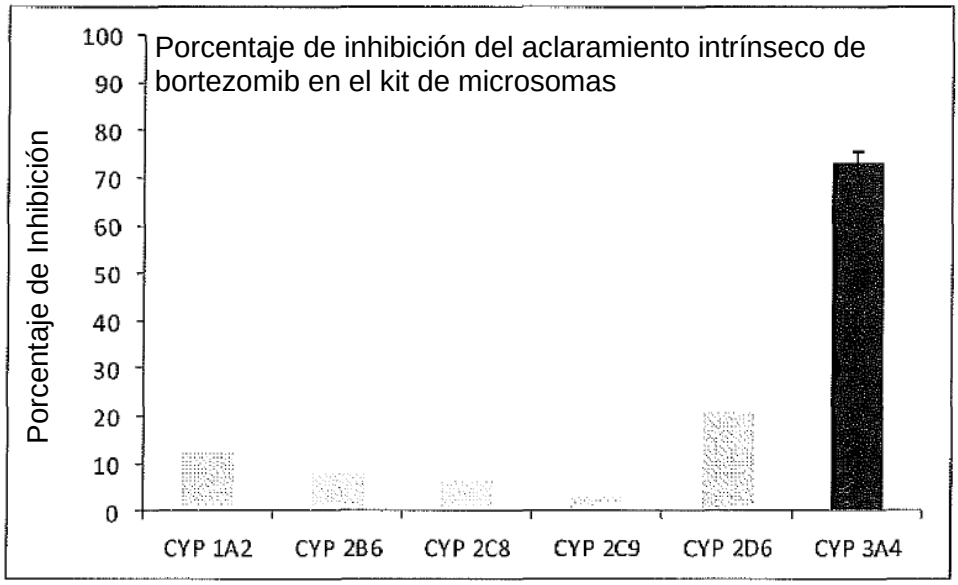


Figura 26: Porcentaje de inhibición del aclaramiento intrínseco de bortezomib en el kit de microsomas aislados inhibidos irreversiblemente en comparación con sus controles homólogos

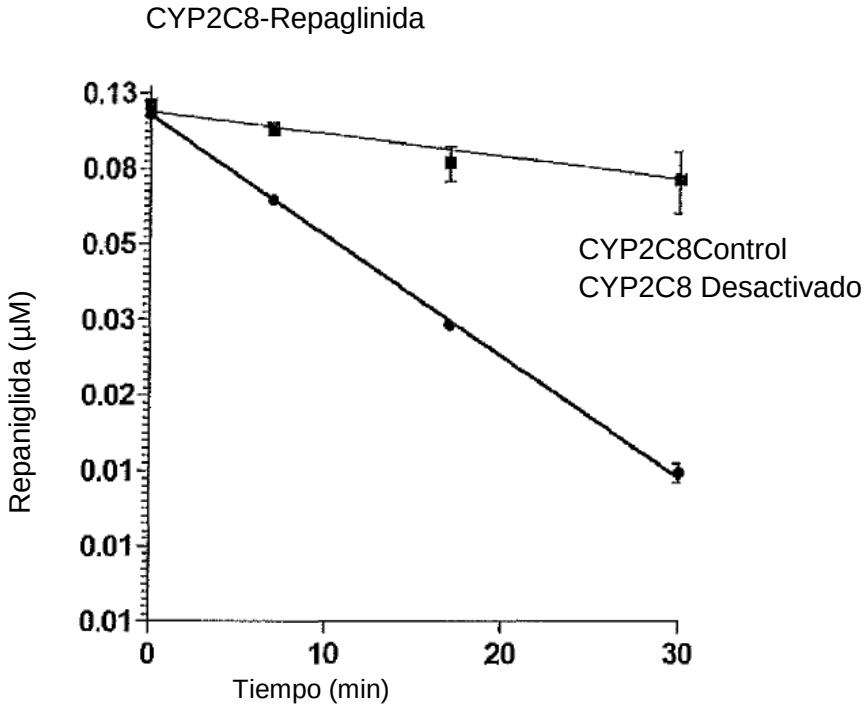


Figura 27: Cinética de desaparición de repaglinida en microsomas aislados inhibidos irreversiblemente 2C8 y su control homólogo (n=3)

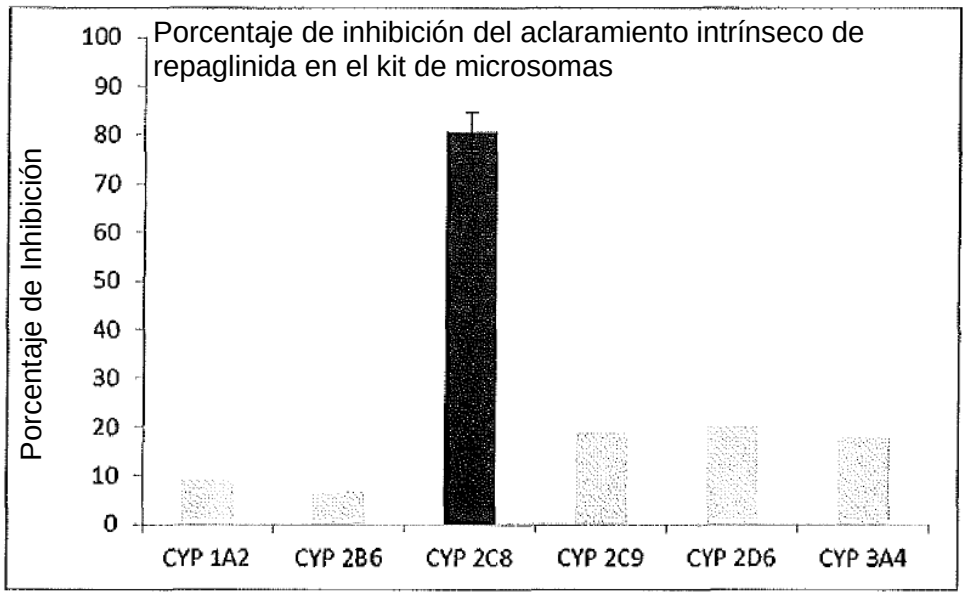


Figura 28: Porcentaje de inhibición del aclaramiento intrínseco de la repaglinida en el kit de microsomas aislados inhibidos irreversiblemente en comparación con sus controles homólogos

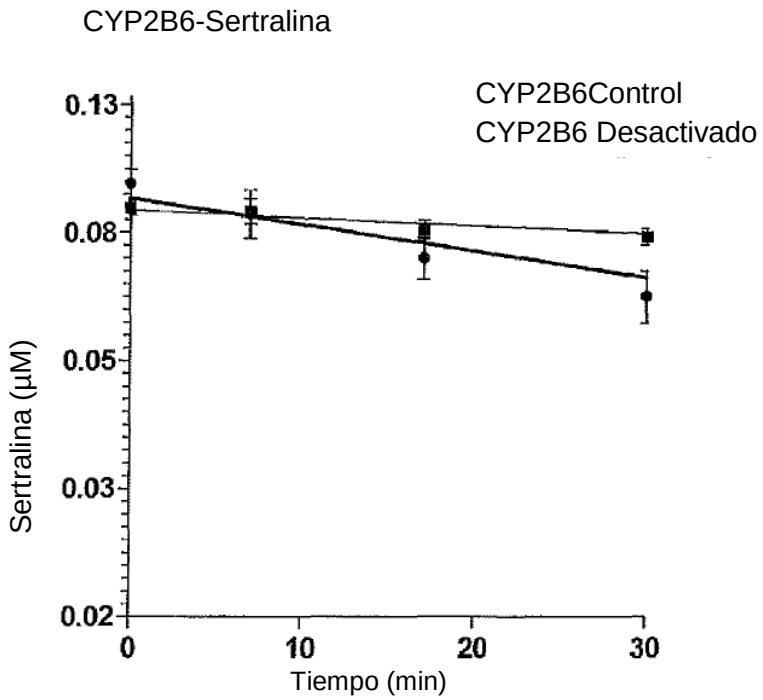


Figura 29: Cinética de desaparición de sertalina en microsomas aislados inhibidos irreversiblemente 2B6 y su control homólogo (n=3)

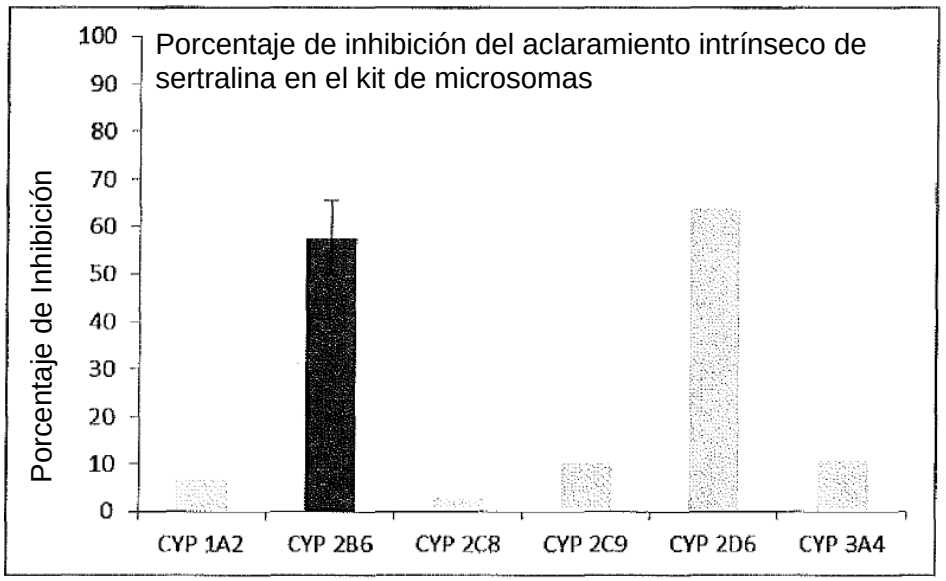


Figura 30: Porcentaje de inhibición del aclaramiento intrínseco de la sertralina en el kit de microsomas aislados inhibidos irreversiblemente en comparación con sus controles homólogos