

Kan man hämma
P-glykoproteinmedierad
efflux med hjälp av tillsats
av hjälpämne till
läkemedelsberedningen?

Litteraturarbete i galenisk farmaci
VT02
Handledare: Niclas Petri
Maria Pettersson
Per Öhrngren

Innehåll:

INTRODUKTION	3
MDR OCH P-GLYKOPROTEIN	3
MODULATORER	4
LY335979.....	5
XR9576.....	6
MS-209.....	7
VITAMIN E.....	7
FLAVONOIDER.....	8
DISKUSSION	10
SLUTSATS	12
REFERENSER:	14

Introduktion

Ett stort problem idag är utvecklingen av resistens mot cytostatika vid behandling av olika typer av cancer, så kallad "multi-drug resistance" (MDR). MDR orsakas huvudsakligen av ett överuttryck av transportproteinet P-glykoprotein (P-gp) i cancercellerna (Mistry *et al.*, 2001). P-gp är en effluxpump som minskar den intracellulära koncentrationen av xenobiotika, däribland läkemedel, vilket medför en minskad effekt (Tan *et al.*, 2000). Detta framtvingar onödigt stora doser och då detta främst gäller cancerläkemedel resulterar det i många och svåra biverkningar. En dosminskning med bibehållen effekt är önskvärd. En möjlig väg till detta kan vara att blockera P-gp med hjälp av olika modulatorer. Vid en blockering av P-gp kommer även "icke-resistenta" celler att påverkas och en ökad effektivitet av läkemedel kan ses även där (Ikegawa *et al.*, 2002).

MDR och P-glykoprotein

MDR innebär att cancerceller blir resistenta mot läkemedel som används vid kemoterapi. Orsaken till MDR är att cancerceller förvärvar förmågan att uttrycka flera olika transportproteiner, exempelvis "the multidrug-resistance associated proteine" (Tan *et al.*, 2000) MRP1-3 och MRP 5 (van der Kolk *et al.*, 2001), "the lung resistance protein" (LRP), "the breast cancer resistance protein" (BCRP) och P-gp. Av dessa är P-gp det vanligaste och uttrycks normalt i tjocktarm, tunntarm, njurar och lever (Tan *et al.*, 2000).

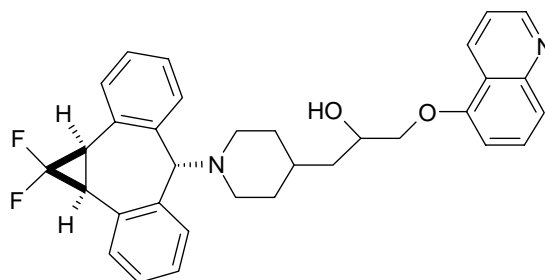
P-gp tillhör ATP-bindande kassettproteinfamiljen (ABC) och är en ATP-beroende effluxpump (Ikegawa *et al.*, 2000) som aktivt pumpar ut xenobiotika ur cellerna till tarmlumen, gallan och urinen (Mistry *et al.*, 2001).

Modulatorer

Man har prövat en mängd olika möjliga substanser för att inhibera P-gp för att på detta sätt hindra efflux. Den första generationens substanser, exempelvis verapamil och cyklosporin, var effektiva hämmare av P-gp. Det krävdes dock höga doser för att få effekt vilket fick många biverkningar som följd. Dessutom påverkades till exempel AUC för doxorubicin och dess metaboliter vid samadministration med cyklosporin A.

Andra och tredje generationens hämmare utgörs av syntetiska substanser med varierande effektivitet. Modulatorerna PSC 833 och VX-710 har effekt men påverkar cytostatikas farmakokinetik i för stor utsträckning. LY335979 och XR9576 har däremot större potential och prövningar pågår (Tan *et al.*, 2000). Förutom syntetiska substanser har även effekt påvisats hos substanser ingående i födoämnen som till exempel apelsinjuice (Ikegawa *et al.*, 2000).

LY335979



Figur 1: Strukturformel för LY335979 tillika 2R-anti-5-{3-[4-(10,11-difluoromethanodibenzo-suber-5-yl)peperazin-1-yl]-2-hydroxypropoxy}quinoline (Starling *et al.*, 1997)

LY335979 är en potent hämmare av P-gp. Studier visar att den är 500-1500 gånger mer potent än cyklosporin A och verapamil. En jämförelse av IC₅₀-värden ger LY335979 en koncentration om 6,79 nM att jämföra med 3,78 µM för cyklosporin A och 10,34 µM för verapamil. Vidare säger studien att LY335979 hämmar efflux av den flouoserande markören DNR vid koncentrationer om 50 nM. Detta är 75 gånger mer potent än cyklosporin A och 120 gånger mer potent än verapamil (Green, *et al.*, 2001).

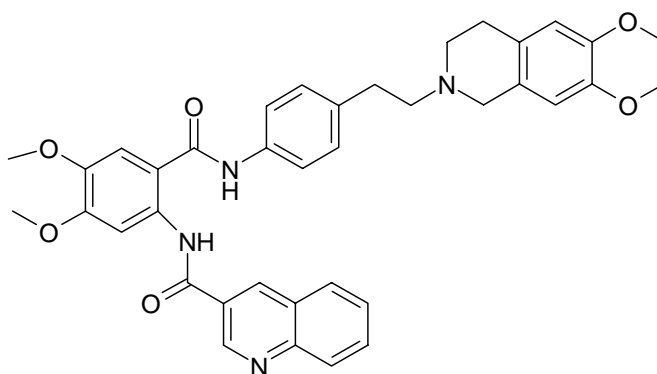
Prekliniska studier talar för att LY335979 inte påverkar farmakokinetiken [på annat sätt än att öka biotillgängligheten](#) för cytotoxiska preparat vid samtidig administrering (Green, *et al.*, 2001). Inte heller verkar det spela någon roll om LY335979 ges som infusion eller peroralt. I ingetdera fallet [har förändringar av andra farmakokinetiska parametrar än biotillgängligheten konstaterats](#) och endast ett fåtal biverkningar har observerats (Tan, *et al.*, 2000).

XR9576

XR9576 är en potent P-gp inhibitor som kan ges som en daglig dos (Tan, *et al.*, 2000) intravenöst eller peroralt. Denna specifika P-gp hämmare är ett derivat från antralinsyra och har visats öka cytotoxiciteten hos doxorubicin, paclitaxel, etoposid och vincristin.

Redan vid så låg koncentration som 25-80 nM XR9576 uppnåddes en total hävning av resistensen och XR9576 anses som en av de mest potenta P-gp hämmarna (Mistry, *et al.*, 2001).

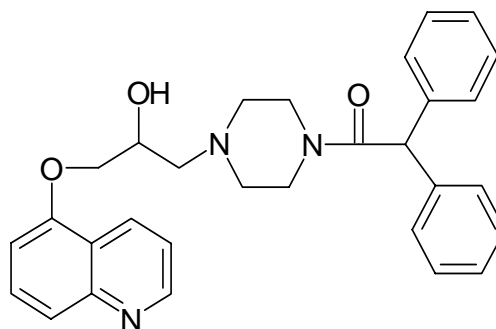
XR9576 gav signifikant reduktion av resistensen mot doxorubicin i de fyra celltyper som testades vid 10 nM. Vid 30 nM gavs en nästan fullständig reduktion, vilket är 10-30 gånger bättre än PSC833. Substansen har ett brett terapeutiskt fönster då det i en *in vitro* studie med humana celler gav att medelkoncentrationen för tillbakagång av resistensen varierade mellan 29-56 nM. Toxiska effekter uppkom dock ej förrän vid 20-48 gånger högre koncentrationer (Mistry, *et al.*, 2001).



Figur 2: Kemisk struktur av XR9576. (Mistry, *et al.*, 2001)

MS-209

MS-209 är ett syntetiskt kinolinderivat och i försök har vistats att MS-209 gör celler mer känsliga för doxorubicin. Vid en koncentration av 10 μM MS-209 var resistensen helt hävd och samma effekt sågs vid flera andra MDR-relaterade läkemedel. Det noterades att ju mer P-gp cellerna uttryckte desto känsligare blev cellerna för vincristin och doxorubicin vid samtidig administration av MS-209 vilket visar på att MS-209 antagligen interagerar med P-gp (Naito *et al.*, 1997).



Figur 3: Kemisk struktur för MS 209
(Suzuki, T., *et al.*, 1997)

Vitamin E

Vattenlösligt vitamin E (d- α -tocoferyl polyetylenglykol 100 succinat, [TPGS]) har i försök visat sig kunna öka absorptionen av cyklosporin genom hämning av efflux till tarmlumen.

Teoretiskt sett skulle TPGS också kunna blockera eliminationen av cyklosporin genom att hämma P-gp transporten av cyklosporin till gallan. Detta är dock ej troligt då TPGS inte orsakar någon förändring av "mean residence time", MRT, och väldigt lite ometaboliserad cyklosporin utsöndras i gallan.

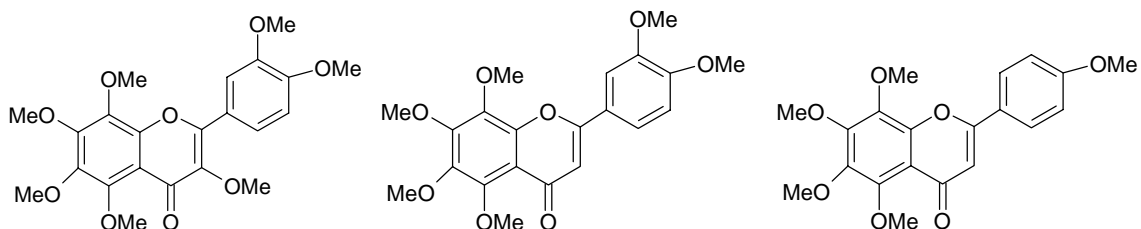
Den ökade biotillgängligheten torde istället bero på att TPGS minskar P-gp:s efflux till tarmlumen. TPGS kan möjligtvis också hämma metabolismen av cyklosporin i mag-tarmkanalen genom hämning av CYP3A.

Genom samtidig administration av TPGS och cyklosporin har en dosminskning på 40-72 % för cyklosporin uppnåtts med en bibehållen målkonzentration. Samadministration förändrar inte C_{max} , t_{max} , eller MRT, men ökar AUC med 45-71 % (Chang *et al.*, 1996).

Flavonoider

Flavonoider finns i många växter, grönsaker och frukter, däribland apelsiner och grapefrukt. Man har funnit att ämnen i apelsinjuice har en inhiberade effekt på P-gp-medierad efflux av vinblastin. Dessa ämnen är metoxyflavonoiderna tangeretin (TNG), nobiletin (NBL) och heptametoxyflavon (HMF).

Etylacetatextrakt från apelsinjuice och grapefruktjuice påverkar upptaget av vincristin genom en ökning på upp till sju gånger. TNG, NBL och HMF visar alla på en koncentrationsberoende ökning av upptaget av vincristin.



Figur 4: Kemiska strukturer av, från vänster, heptametoxyflavon, nobiletin och tangeretin (Ikegawa, *et al.*, 2000)

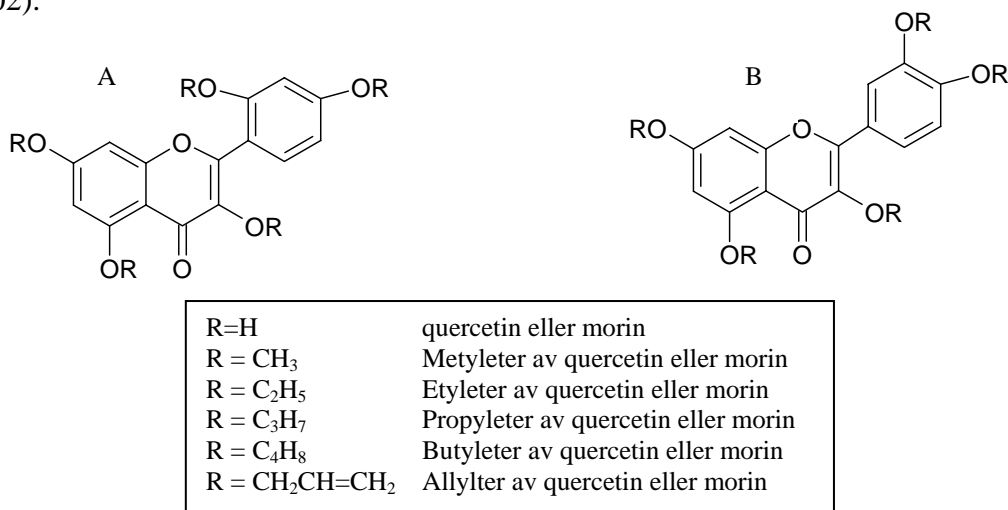
Studien visar att dessa substanser har en hämmande effekt på P-gp och därmed efflux. Beräkningar bekräftar att HMF är lika potent som en första generationens hämmare som verapamil medan NBL är potentare. Dessa medför dock ej samma biverkningsbild som de tidigare prövade hämmarna.

Likheten mellan verapamil och de tre flavoniderna är att de innehåller metoxygrupper. HMF och NBL som har samma eller högre potens som verapamil innehåller flest metoxygrupper, sju respektive sex stycken. TNG som är mindre potent innehåller däremot bara fem metoxygrupper. Detta tyder på att metoxygrupperna spelar en avgörande roll för flavonoidernas effekt (Ikegawa *et al.*, 2000).

Förutom TNG, NBL och HMF har ytterligare ett antal flavonoider hittats i apelsinjuice. Hos dessa har däremot ingen hämmande effekt på P-gp-medierad efflux setts. Detta kan bero på att de saknar denna egenskap men orsaken kan också vara att de förekommer i för liten mängd för att en sådan effekt skall kunna registreras. Möjligheten finns sålunda att andra potenta P-gp-inhibitorer finns i apelsinjuice, om än i små mängder (Ikegawa *et al.*, 2000).

Undersökningar har även gjorts på de eterfierade naturliga flavoniderna morin och quercetin. Bland de prövade derivaten var pentaallyletrar de mest potenta P-gp-inhibitorerna och dessa överträffar cyklosporin A och verapamil. Storleken av alkyloxygruppen verkar ha betydelse där den största hämmande effekten på P-gp-medierad efflux har setts hos pentaallyletrar. Den avtar sedan med ökande storlek på etergruppen enligt följande:

Pentaallyletrar > pentametyletrar > pentaetyletrar > pentapropyletrar > pentabutyletrar.
Man har ännu ej hunnit undersöka hur dessa modifierade flavonoider påverkar farmakokinetiken eller om de kan ha toxisk påverkan på människa (Ikegawa *et al.*, 2002).



Figur 5: Kemiska strukturer av quercetin (A) och morin (B) samt deras derivat.
(Ikegawa, *et al.*, 2002)

Diskussion

Det finns idag en mängd olika modulatorer som inhiberar P-gp. De modulatorer vi beskrivit ovan är bara ett fåtal av de substanser som diskuteras som möjliga komplement till dagens läkemedel för att motverka MDR. För och nackdelar finns hos alla ovanstående men fördelarna överväger i ett flertal fall.

Både LY335979 och XR9576 är markant effektivare än första generationens hämmare men utan att påverka farmakokinetiken, på annat sätt än ökad biotillgänglighet, hos de läkemedel de samadministreras med. De kan båda ges antingen peroralt eller intravenöst och ger endast ett fåtal smärre biverkningar (Green *et al.*, 2001, Mistry *et al.*, 2001). XR9576 skiljer sig från de övriga modulatorerna genom att ha en lång duration, >22 h,

vilket skall jämföras med preparat från första generationen som cyklosporin A och verapamil där effekten avtog markant redan inom en timma (Mistry *et al.*, 2001). En lång duration möjliggör färre administreringstillfällen per dag. Detta tillsammans med möjligheten att administrera i olika former, intravenöst/peroralt, kan troligtvis förbättra följsamheten. Effekterna av att hämma P-gp är applicerbara på alla typer av läkemedel inte bara cytostatika (Tan *et al.*, 2000).

För TPGS är osäkerheten större då man inte är riktigt säker på om effekten beror på hämning av P-gp eller av CYP3A4. Det diskuteras också om en micellbildning kan vara en bidragande orsak till den ökade biotillgängligheten för cyklosporin (Chang *et al.*, 1996).

Etylacetatextrakt av grapefruktjuice och apelsinjuice ökar båda upptaget av läkemedel, troligtvis genom inhibering av P-gp (Ikegawa *et al.*, 2000). Fördelen med apelsinjuice gentemot grapefruktjuice är att metoxyflavonoiderna i apelsinjuice inte hämmar CYP3A4 och därmed inte påverkar farmakokinetiken hos läkemedel (Ikegawa *et al.*, 2002). De undersökta substanserna i grapefruktjuice, flavonocumariner, inhiberar CYP3A4 men ej P-gp. Eftersom etylacetatextraktet av grapefruktjuice har effekt tyder detta på att grapefruktjuice måste innehålla andra substanser, än de idag kända flavonocumarinerna, som kan motverka MDR. Kända flavonoider i grapefruktjuice aktiverar P-gp vid låga koncentrationer. Då ändå en hämning fås av etylacetatextraktet, där dessa förekommer i låg koncentration, tyder detta på förekomst av andra substanser (Ikegawa *et al.*, 2000).

Flera av modulatorerna, framförallt flavonoiderna är naturligt förekommande. Att använda sig av dessa eller enkla derivat därav är att föredra gentemot komplexa syntetiska varianter. Fördelen med att hitta och använda ett födoämne är att det ej behöver genomgå lika rigorösa tester som en ny substans innan det kan användas. Även kostnaderna kommer att bli mindre när man använder ett känt ämne som utgångspunkt. Man slipper de nämnda testerna och anrikningen av ett födoämne ur exempelvis apelsin, torde vara billigare än att syntetisera fram och tillverka en helt ny substans.

Möjligheten att utveckla detta vidare är stor och önskvärt är att undersöka om dessa eller substanser med liknande effekt förekommer i andra livsmedel. För att få fram alternativ till de potenta flavonoiderna bör ytterliggare studier göras på vitamin E.

Som det ser ut idag är kunskapen liten inom detta område, men stor potential tros finnas för denna substans.

Slutsats

Att använda ämnen som kan inhibera P-gp-medierad efflux som hjälpämnen i läkemedel skulle öka biotillgängligheten av läkemedel med affinitet för P-gp markant. De flesta studier är gjorda med avseende på cancerläkemedel och förbättrat resultat har setts i många fall. Vid kemoterapeutisk behandling av cancer tillåts mer biverkningar än inom andra områden. Eftersträvansvärt är dock naturligtvis att hitta modulatorer som ej medför en utökad biverkningsprofil.

Studier av de modulatorer som ej [övriga farmakokinetiska parametrar förutom biotillgängligheten](#) och de naturligt förekommande bör prioriteras. Genom att öka biotillgängligheten kommer variabiliteten vid upptag att minska och doseringen blir säkrare. De alternativ som har lång duration är ur följsamhetssynpunkt att föredra. Om det räcker med ett administreringstillfälle per dag ökar chansen att patienten kommer att ta läkemedlet på rätt sätt.

Trots att de flesta studierna är gjorda på MDR bör dessa modulatorer ha effekt på alla läkemedel, med affinitet för P-gp som administreras via tarmen. Den P-gp-medierade effluxen verkar på de flesta xenobiotika, läkemedel så väl som toxiska substanser ([Tan et al., 2000](#)). En frekvent användning av P-gp-hämmare även inom andra terapioråden än onkologin kan förbättra följsamheten genom att minska kravet på antalet administreringstillfällen.

Slutsatsen blir att det finns stora möjligheter att finna hjälpämnen som kan öka upptaget av läkemedel genom hämning av P-gp-medierad efflux. Om dessa administreras tillsammans med den aktiva substansen i beredningsformen eller om det blir i form av ett berikat livsmedel som läkemedlet skall ta tillsammans med får framtiden utvisa.

Referenser:

Chang, T., Benet, L.Z., Herbert, M.F., 1996. The effect of water-soluble vitamin E on cyclosporine pharmacokinetics in healthy volunteers. *Clinical pharmacology & therapeutics*, 59, 297-303.

Green, L.J., Marder, P., Slapak, C.A., 2001. Modulation by LY335979 of P-glycoprotein function in multidrug-resistant cell lines and human natural killer cells. *Biochemical pharmacology*, 61, 1393-1399.

Ikegawa, T., Ushigome, F., Koyabu, N., Morimoto, S., Shoyama, Y., Naito, M., Tsuruo, T., Ohtani, H., Sawada, Y., 2000. Inhibition of P-glycoprotein by orange juice components, polymethoxyflavones in adriamycin-resistant human myelogenous leukaemia (K562/ADM) cells. *Cancer letters*, 160, 21-28.

Ikegawa, T., Ohtani, H., Koyabu, N., Juichi, M., Iwase, Y., Ito, C., Furukawa, H., Naito, M., Tsuruo, T., Sawada, Y., 2002. Inhibition of P-glycoprotein by flavonoid derivatives in adriamycin-resistant human myelogenous leukaemia (K562/ADM) cells. *Cancer letters*, 177, 89-93.

Mistry, P., Stewart, A.J., Dangerfield, W., Okiji, S., Liddle, C., Bootle, D., Plumb, J.A., Templeton, D., Charlton, P., 2001. *In vitro* and *in vivo* reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by a novel potent modulator, XR9576. *Cancer research*, 61, 749-758.

Natio, M., Tsuruo, T., 1997. New multidrug-resistance-reversing drugs, MS-209 and SDZ PSC 833. *Cancer chemotherapy pharmacology*, 40, 20-24.

Starling, J., Shepad, R., Cao, J., Law, K., Norman, B., Korin, J., Ehlhardt, W.,
Baughman, T., Winter, M., Bell, M., Shih, C., Gruber, J., Elmquist, W., Dantzig, A.,
1997. Pharmacological characterization of LY335979: A potent
cyclopropyldebenzosuberane modulator of P-glycoprotein. *Advanced Enzyme Regul.*,
37, 335-347.

Suzuki, T., Fukazawa, N., San-nohe, K., 1997. Structure-Activity relationship of newly synthesized quinoline derivatives for reversal of multidrug resistance in cancer. *Journal of medical chemistry*, 40, 2047-2052.

Tan, B., Piwinca-Worms, D., Ratner, L., 2000. Multidrug resistance transporters and modulation. *Current opinion in oncology*, 12, 450-458.

Van der Kolok, DM., de Vries, EG., Noordhoek, L., van der Berg, E., van der Pol, MA.,
Muller, M., Vellenga, E., 2001. Activity and expression of the multidrug resistance proteins P-glycoprotein, MRP1, MRP2, MRP3 and MRP5 in de novo and relapsed acute myeloid leukaemia. *Leukemia*, 15(10):1544-53.