

Terapeutisk plasmakoncentration i relation till *in vitro* potens

Amelie Lind



Självständigt arbete i veterinärmedicin, 15 hp

Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2013:24

Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Uppsala 2013



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Terapeutisk plasmakoncentration i relation till *in vitro* potens

Therapeutic plasma concentration in relation to *in vitro* potency

Amelie Lind

Handledare:

Johan Gabrielsson, SLU, Institutionen för Farmakologi o toxikologi

Examinator:

Eva Tydén, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Omfattning: 15 hp

Kurstitel: Självständigt arbete i veterinärmedicin

Kurskod: EX0700

Program: Veterinärprogrammet

Nivå: Grund, G2E

Utgivningsort: SLU Uppsala

Utgivningsår: 2013

Omslagsbild: Amelie Lind

Serienamn, delnr: Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2013:24
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, SLU

On-line publicering: <http://epsilon.slu.se>

Nyckelord: *In vitro* potens, *in vivo* potens, kvot, terapeutisk plasmakoncentration, kliniskt effektiv koncentration, etablerade läkemedelssubstanser, läkemedelsutveckling.

Key words: *In vitro* potency, *in vivo* potency, ratio, therapeutic plasma concentration, effective concentration, marketed drugs, drug discovery.

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	1
Summary	2
Inledning.....	3
Frågeställningar.....	4
Material och metoder	5
Litteraturöversikt.....	6
<i>In vitro</i> potens.....	6
Tidigare studier som jämför terapeutisk plasmakoncentration med <i>in vitro</i> potens	6
Några typexempel ur litteraturen.....	7
Lidokain	7
Morfin.....	7
Metadon.....	8
Tolbutamid	8
Diazoxide	9
Milrinon.....	9
Amrinon	10
Difenhydramin	10
Dobutamin.....	10
Resultat.....	11
Diskussion	13
Litteraturförteckning	15

SAMMANFATTNING

Tidigt i läkemedelsutvecklingen är det centralt att välja ut substanser som har potential att bli väl fungerande läkemedel. En faktor som tas stor hänsyn till är substansens *in vitro* potens. Det finns få studier kring hur *in vitro* potensen förhåller sig till terapeutisk plasmakoncentration av det färdiga läkemedlet hos patienten, men ett vanligt antagande är att den terapeutiska plasmakoncentrationen är en till tre gånger högre än *in vitro* potensen. I min litteraturstudie har jag fokuserat på följande frågeställningar:

- Hur förhåller sig *in vitro* potens till terapeutisk plasmakoncentration?
- Är det sätt som läkemedelsindustrin tolkar *in vitro* potens till terapeutisk plasmakoncentration optimalt?

In vitro potens-data och terapeutisk plasmakoncentration samlades in för nio etablerade läkemedelssubstanser. En kvot mellan terapeutisk plasmakoncentration och *in vitro* potens beräknades. Som modell för jämförelsen stod Göransson (2012) examensarbete i farmaci som beräknade samma kvot för 150 etablerade läkemedel. Eftersom denna litteraturstudie endast omfattar några få substanser kan inte heller resultatet tolkas ensamt, utan endast i det sammanhang som Göransson (2012) studie ger. Resultatet tyder på att de flesta läkemedel är mer potenta *in vivo* än *in vitro*. Detta innebär att en mer flexibel syn på *in vitro* potens tidigt i läkemedelsutvecklingen antagligen skulle kunna förhindra att bra substanser sållas bort i onödan.

SUMMARY

An early step in the drug discovery process is to find out which compounds have the potential to become well-functioning drugs and therefore are suitable for further research. One factor that is considered is the *in vitro* potency of the compound. Few studies have described the relationship between *in vitro* potency and therapeutic plasma concentration. However, a common assumption is that the therapeutic plasmaconcentration is one to three times higher than the *in vitro* potency. The aim of this essay was to study this relationship by focusing on the following questions:

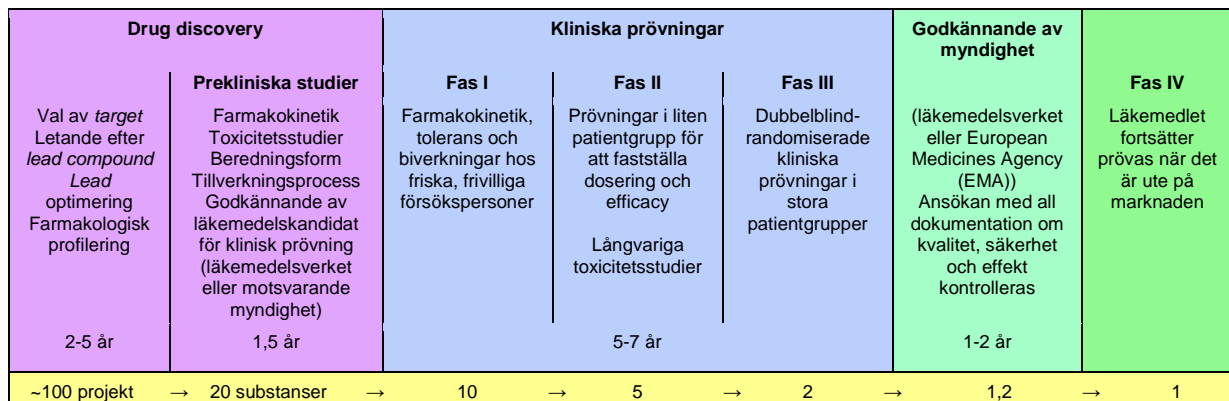
- How does therapeutic plasmaconcentration relate to *in vitro* potency?
- Is the way the pharmaceutical industry interprets *in vitro* potency optimal?

Therapeutic plasma concentration and *in vitro* potency data was collected for nine marketed drugs. A ratio between the two was calculated. A master's thesis by Göransson (2012) made a similar comparison for 150 marketed drugs. Since nine substances are too few to draw any conclusions, it can only be correctly interpret in the context of Göransson's study. The conclusion is that many drugs are more potent *in vivo* than *in vitro*, which means that drug discovery would probably benefit from a more flexible view on *in vitro* potency.

INLEDNING

Idag finns bra läkemedel som har räddat många människors och djurs liv och förhindrat mycket lidande. Trots det är behovet av nya, bättre läkemedel något som aldrig kommer att försvinna. Läkemedelsutveckling är en process som kräver mycket tid, pengar och kunskap. I sin strävan att komma fram till godkända läkemedel och samtidigt undvika alltför höga kostnader gör läkemedelsföretagen sitt bästa för att sälla bra läkemedelskandidater från dåliga så tidigt som möjligt (Kola & Landis, 2004).

Läkemedelsutvecklingen sker i flera steg vilket illustreras i Figur 1. Denna litteraturstudie berör i första hand det första steget, *drug discovery*. Eftersom bra svenska översättningar saknas används här engelska ord för vissa begrepp. *Drug discovery* börjar med att man försöker hitta ett lämpligt *target* för läkemedlet att verka på, exempelvis en receptor eller ett enzym (Rang & Dale, 2012). Sedan letar man efter *hits*, dvs. substanser som har önskad effekt på *target*. Idag sker detta ofta genom *high throughput screening* som kan testa tiotusentals substanser per dag. Av dessa väljer man ut en eller flera *lead compound*. *In vitro* potens, ett mått på substansens benägenhet att binda till *target*, är en viktig faktor i valet av *lead compound*. Ett problem är att substanser som har den önskade effekten på sin *target* ofta har andra egenskaper som påverkar farmakokinetiken ogynnsamt, exempelvis för hög molekylvikt eller är för polära (Rang & Dale, 2012; Gleeson *et al.*, 2011). Därefter följer *lead* optimering, där olika varianter av substansen studeras för att förbättra bland annat potens, selektivitet och farmakokinetiska egenskaper, innan substansen går vidare till dokumenterande prekliniska och kliniska prövningar (Rang & Dale, 2012).



Figur 1. Läkemedelsutveckling, modifierad efter Rang & Dale (2012). Läkemedelsutveckling tar lång tid och få av projekten tar sig ända fram till målet: ett godkänt läkemedel för försäljning.

En viktig del i läkemedelsutvecklingen är att fastställa terapeutisk plasmakoncentration hos patienter, vilket är grundläggande för att bestämma dos och dosintervall. Med terapeutisk plasmakoncentration menas den koncentration i plasma som ger önskad farmakologisk effekt. Denna kan även kallas kliniskt effektiv koncentration eller *in vivo* potens men för tydlighetens skull används här genomgående terapeutisk plasmakoncentration. Eftersom det är oetiskt, dyrt och opraktiskt att fastställa detta i kliniska studier på människor eller djur försöker man göra detta i studier på celler *in vitro* (latin för 'i glas', dvs. utanför kroppen). Genom beräkningar

på *in vitro* potens och farmakokinetiska egenskaper försöker man skatta den terapeutiska dosen (Göransson, 2012).

In vitro potens fastställs genom att studera affiniteten för substansen till *target*. Denna anges ofta som ett IC_{50} -värde, vilket är den koncentration då 50% av alla *target* är bundna till substansen. Ett vanligt antagande inom läkemedelsindustrin är ju högre *in vitro* potens, desto större sannolikhet att substansen kan bli ett effektivt läkemedel som kan ges i låga doser (Gleeson *et al.*, 2011). Ett annat vanligt antagande är att den terapeutiska koncentrationen (korrigerad för plasmaproteinbindning) vanligen är en till tre gånger högre än *in vitro* potensen (McGinnity *et al.*, 2007). Det finns dock få studier som ligger till grund för dessa antaganden utan de baseras framför allt på teoretiska resonemang (Göransson, 2012). Detta leder till att jag i min litteraturstudie har fokuserat på följande frågeställningar:

Frågeställningar

- Hur förhåller sig *in vitro* potens till terapeutisk plasmakoncentration?
- Tolkar läkemedelsindustrin *in vitro* potens till terapeutisk plasmakoncentration på ett optimalt sätt?

In vitro potens-data och terapeutisk plasmakoncentration samlades in för nio etablerade läkemedelssubstanser. En kvot mellan terapeutisk plasmakoncentration och *in vitro* potens beräknades. Som modell för jämförelsen stod Göranssons (2012) examensarbete i farmaci som beräknade samma kvot för 150 etablerade läkemedel. Eftersom denna litteraturstudie endast omfattar några få substanser kan inte resultatet tolkas ensamt, utan skall vägas in i Göranssons (2012) material.

MATERIAL OCH METODER

Jämförelsen mellan *in vitro* potens och terapeutisk plasmakoncentration gjordes genom att beräkna kvoten terapeutisk plasmakoncentration/*in vitro* potens för nio substanser (Ekvation 1). Terapeutisk plasmakoncentration korrigerades för plasmaproteinbindning, dvs. samma metod som Göransson (2012) använde.

$$Kvot = \frac{f_u \cdot C_{in\ vivo}}{MW} \cdot \frac{I}{IC_{50, in\ vitro}} \quad (1)$$

$C_{in\ vivo}$	Terapeutisk koncentration i plasma hos patienten (enhet: $g \cdot L^{-1}$)
f_u	Fria fraktionen i plasma
$IC_{50, in\ vitro}$	<i>In vitro</i> potens, kan vara IC_{50} , EC_{50} , K_d eller K_i (enhet: $mol \cdot L^{-1}$)
$Kvot$	Kvoten mellan terapeutisk koncentration <i>in vivo</i> och <i>in vitro</i> potens
Mw	Molvikt (enhet: $g \cdot mol^{-1}$)

När litteraturvärden för $C_{in\ vivo}$, $IC_{50, in\ vitro}$ eller f_u angavs som ett intervall användes medelvärdet av detta intervall. I vissa fall fanns $IC_{50, in\ vitro}$ -värden för flera olika *target*, då valdes antingen huvud-*target* för substansens farmakologiska verkan, eller ett medelvärde av flera *target*.

Den terapeutiska koncentrationen och fria fraktionen f_u hämtades ur *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics* (Hardman *et al.*, 1995). Artiklar innehållande *in vitro* potens fanns i IUPHAR Database (2013). Referensartikeln togs sedan fram med hjälp av Web of Knowledge eller PubMed. Även molvikter hittades i IUPHAR Database (2013).

Göranssons (2012) referenslista var en utgångspunkt för att hitta fler artiklar om läkemedelsutveckling i allmänhet och jämförelse terapeutisk koncentration/*in vitro* potens i synnerhet. Artiklarna hittades genom sökningar i Web of Knowledge och PubMed. För viss läkemedelsinformation användes även Rang & Dale (2012) och FASS.se.

LITTERATURÖVERSIKT

In vitro potens

In vivo potens är ett mått på läkemedelsaktivitet som uttrycks som den koncentration av en läkemedelssubstans som behövs för att ge 50 % av den maximala läkemedelseffekten. Ett potent läkemedel ger alltså önskad effekt även vid låga koncentrationer. *In vivo* potensen beror bland annat på substansens benägenhet att binda till *target* (Neubig *et al.*, 2003) som ofta är en receptor men även kan vara t.ex. ett enzym eller en jonkanal (Rang & Dale, 2012). Denna bindningsbenägenhet kallas affinitet och jämföras ofta med *in vitro* potensen.

Ett vanligt mått på *in vitro* affiniteten är IC_{50} (50% av *maximal inhibitory concentration*) (Neubig *et al.*, 2003). Måttet talar om vilken koncentration som krävs för att binda 50% av *target* och ett lågt IC_{50} -värde innebär alltså hög potens och hög affinitet. EC_{50} kan också användas och innebär den koncentration av en agonist som ger 50% av maximal effekt. Affiniteten kan även uttryckas som K (dissociationskonstanten), vilken till skillnad från IC_{50} och EC_{50} är oberoende av koncentrationen av *target*. K kan förtydligas med olika nedsänkta bokstäver. Med K_d menas dissociationskonstanten mätt direkt i en *binding assay* med en märkt form av substansen (Neubig *et al.*, 2003). Med K_i menas dissociationskonstanten mätt i en inhibitionsstudie, vanligen en kompetitiv radioligand-bindingsstudie. Både IC_{50} och K har vanligen enheten $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. IC_{50} kan omvandlas till K_i med hjälp av Cheng-Prusoffs formel (ekvation 2) (Cheng & Prusoff, 1973).

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{S}{K_d}} \quad (2)$$

S Koncentrationen av den radiomärkta liganden
 K_d Radioligandens dissociationskonstant

Tidigare studier som jämför terapeutisk plasmakoncentration med *in vitro* potens

Gleeson *et al.* (2011) har gjort en omfattande analys av 261 orala läkemedel som jämförs med avseende på rekommenderad dos och *in vitro* potens. Det gjordes en linjär regressionsanalys och determinationskoefficienten r^2 var 0.26. Detta kan grovt tolkas som att ca 30 % av variationen i dosen kan förklaras med *in vitro*-potensen. Resten av variationen kan förklaras med parametrar som absorption och metabolism. Gleeson *et al.* (2011) analyserar även *in vitro* potens i förhållande till molekylmassa och lipofilitet. Hög molekylmassa och lipofilitet ökar sannolikheten att en substans har dålig permeabilitet och/eller löslighet i vatten, vilket försämrar dess chanser att bli ett väl fungerande oralt läkemedel (Lipinski *et al.*, 1997). Gleeson *et al.* (2011) fann att det föreligger ett ogynnsamt förhållande mellan å ena sidan *in vitro* potens och å andra sidan molekylmassa och lipofilitet. Substanser med hög *in vitro* potens är således mer sannolika att ha hög molekylmassa och lipofilitet. Dessa substanser är också ofta svårlösliga.

Göransson (2012) jämför terapeutisk koncentration och *in vitro* potens för 150 läkemedelssubstanser (samtliga godkända läkemedel i USA eller EU) på samma sätt som beskrivits i material och metoder. Göransson fann en korrelation mellan terapeutisk plasmakoncentration och *in vitro* potens, men att denna är relativt svag. Enligt Göranssons resultat är medelkvoten mellan terapeutisk plasmakoncentration och *in vitro* potens 5.08, medianen 0.17 och för en majoritet (>70%) av substanserna ligger kvoten under 1. Spridningen är stor (standardavvikelsen 21.07). Resultaten av analysen presenteras bland annat som ett frekvensdiagram (figur 2).

Några typexempel ur litteraturen

Nedan följer en kort beskrivning av de nio insamlade substanserna ur litteraturen och vilken typ av *in vitro* potens som användes för jämförelsen. I Tabell 1 sammanfattas substansdata och kvoten av terapeutisk plasmakoncentration och *in vitro* potens. I Figur 2 är kvoten grupperad och inplacerad i Göranssons (2012) diagram över frekvens av olika kvoter.

Lidokain

Lidokain används som lokalanestetikum inom både human- och veterinärmedicin (FASS, 2011a, Nuss *et al.*, 1995). Inom humanmedicin används det även som ett antiarytmikum. Verkningsmekanismen är bindning av natriumjonkanaler i nerver, hjärta och skelettmuskler, vilket hämmar transporten av natriumjoner över cellmembranet. Låga doser räcker för att behandla arytmier medan betydligt högre doser krävs för att uppnå anestesi (Nuss *et al.*, 1995).

In vitro potens för lidokain beskrivs av Nuss *et al.* (1995) och det värde som används för beräkning av kvoten av terapeutisk plasmakoncentration och *in vitro* potens är $K_d = 16 \pm 1 \mu\text{M}$ (Tabell 1). Detta är mätt på inaktiverade humana hjärtnatriumkanaler (hH1- β_1). Eftersom detta värde jämförs med terapeutisk plasmakoncentration för behandling av arytmier gör det inget att affiniteten till andra natriumkanaler inte beaktas. Lidokain verkar framförallt på hH1- β_1 i inaktiverat tillstånd (och inte aktiverat/deaktiverat), varför inte affiniteten till aktiverat/deaktiverat tillstånd togs hänsyn till. Kvoten mellan den fria terapeutiska plasmakoncentrationen och K_d -värdet blir 0.30 (Ekvation 3).

$$Kvot_{lidokain} = \frac{0.3 \cdot 3.75 \cdot 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}}{234.17 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}} \cdot \frac{1}{16 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}} \approx 0.30 \quad (3)$$

Morfin

Morfin är en opioid med analgetisk och sederande effekt. Det finns flera typer av opiatreceptorer (bland andra μ , κ och δ) i nervsystemet och morfin verkar som agonist på samtliga (Rang & Dale, 2012). Morfin har många kända biverkningar, däribland andningsdepression, psykiska besvär, illamående och kräkningar. Substansen är beroendeframkallande och toleranseffekt förekommer, då patienten måste ta allt högre doser för att uppnå samma effekt vid kontinuerlig behandling (FASS, 2009a).

Toll *et al.* (1998) har undersökt hur morfin binder till klonade humana opiatreceptorer (μ , κ och δ) på CHO-celler (Chinese Hamster Ovary). K_i för μ är $1.1 \cdot 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, för κ $46.9 \cdot 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ och för δ $140.0 \cdot 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. I Tabell 1 anges ett medelvärde av dessa tre. Kvoten mellan den fria terapeutiska plasmakoncentrationen och K_i -värdet (medelvärdet) blir 2.4 (Ekvation 4).

$$Kvot_{\text{morfin}} = \frac{0.65 \cdot 65 \cdot 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}}{285.14 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}} \cdot \frac{1}{63 \cdot 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}} \approx 2.4 \quad (4)$$

Metadon

Metadon ett narkotiskt analgetikum som tillhör opioiderna precis som morfin (FASS, 2013). Den skiljer sig från morfin genom att inte ha en lika sederande effekt. Den är en agonist till alla tre opiatreceptorerna.

K_i för μ är $0.6 \cdot 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, för κ $323.5 \cdot 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ och för δ $132.2 \cdot 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (Toll *et al.*, 1998). I Tabell 1 anges ett medelvärde av dessa tre. Kvoten mellan den fria terapeutiska plasmakoncentrationen och K_i -värdet (medelvärdet) blir 0.82 (Ekvation 5).

$$Kvot_{\text{metadon}} = \frac{0.11 \cdot 350 \cdot 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}}{309.21 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}} \cdot \frac{1}{152 \cdot 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}} \approx 0.82 \quad (5)$$

Tolbutamid

Tolbutamid tillhör gruppen sulfonureider och används mot diabetes mellitus typ II. Sulfonureider stimulerar insulinproduktion hos β -celler i pankreas endokrina del, vilket sänker blodglukoshalten. De blockerar kaliumkanaler i β -cellernas plasmamembran vilket leder till depolarisering, inflöde av Ca^{2+} och insulinsekretion (Rang & Dale, 2012). De läkemedel som innehöll tolbutamid är avregistrerade i FASS (FASS, 2013), vilket troligen beror på att studier har antytt att allvarliga biverkningar (bland annat ökad risk för död i kardiovaskulära sjukdomar) kan uppstå efter några års användning (Rang & Dale, 2012).

Affinitet för tolbutamid till kaliumkanalen $K_{ir6.2}$ mätt som IC_{50} är $32 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (Inagaki *et al.*, 1995)(Tabell 1). Detta uppmättes på $K_{ir6.2}$ från möss fästa på COSm6-celler (derivat av fibroblastceller från grön markatta, *Cercopithecus aethiops sabaeus*). Kvoten mellan den fria terapeutiska plasmakoncentrationen och IC_{50} -värdet blir 0.74 (Ekvation 6).

$$Kvot_{\text{tolbutamid}} = \frac{0.04 \cdot 160 \cdot 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}}{270.1 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}} \cdot \frac{1}{32 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}} \approx 0.74 \quad (6)$$

Diazoxide

Diazoxide binder och aktiverar kaliumkanaler så att de öppnas. I pankreas β -celler innebär det att insulinsekretionen hämmas vilket ökar glukosnivåerna i blodet. I glatt muskulatur, tex. i kärlväggar, leder aktiveringen av kaliumkanaler indirekt till att muskulaturen relaxeras (Rang & Dale, 2012).

Inagaki *et al.* (1995) har beskrivit *in vitro* potens för diazoxide till kaliumkanalen $K_{ir}6.2$. EC_{50} -värdet är $60 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (Tabell 1). Detta uppmättes på $K_{ir}6.2$ från möss fästa på COSm6-celler (derivat av fibroblastceller från grön markatta, *Cercopithecus aethiops sabaesus*). Kvoten mellan den fria terapeutiska plasmakoncentrationen och EC_{50} -värdet blir 0.15 (Ekvation 7).

$$Kvot_{diazoxide} = \frac{0.06 \cdot 35 \cdot 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}}{229.99 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}} \cdot \frac{1}{60 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}} \approx 0.15 \quad (7)$$

Milrinon

Milrinon används som kortvarig behandling vid vänstersidig hjärtsvikt då annan behandling inte är lämplig eller inte ger resultat. Substansen verkar genom att hämma fosfodiesteras fraktion III (PDE3) i hjärt- och kärlmuskulatur, vilket ökar mängden intracellulärt cAMP. I hjärtat ökar det koncentration av kalciumjoner vilket ökar kontraktionskraften och i perifer kärlbädd ger det en relaxion av glatt muskulatur vilket dilaterar kärlen. Läkemedlet ges som bolusdos och/eller infusion och används även på spädbarn. Vanligaste biverkningen är ventrikulära artymier (FASS, 2011b).

Affinitet för milrinon till humana PDE3 och andra fosfodiesteraser undersöktes i en studie av Sudo *et al.* (2000). Milrinon inhiberar även vissa andra fosfodiesteraser till viss del, men eftersom denna verkan är relativt svag valdes att endast använda affiniteten till PDE3 för beräkning av kvoten av terapeutisk plasmakoncentration och *in vitro* potens. Det finns två subtyper av PDE3: PDE3A och PDE3B. Milrinon inhiberar båda men endast PDE3A finns i kardiovaskulär vävnad och därför används IC_{50} för PDE3A ($0.45 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) för beräkning av kvoten (Tabell 1). Kvoten mellan den fria terapeutiska plasmakoncentrationen och IC_{50} -värdet blir 0.63 (Ekvation 8).

$$Kvot_{milrinon} = \frac{0.3 \cdot 200 \cdot 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}}{211.07 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}} \cdot \frac{1}{0.45 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}} \approx 0.63 \quad (8)$$

Amrinon

Amrinon används och verkar på i princip samma sätt som milrinon, men behöver ges i större doser för att ge samma effekt (Hamada *et al.*, 1999).

IC_{50} för PDE3A är $16,7 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (Sudo *et al.*, 2000) (Tabell 1). Kvoten mellan den fria terapeutiska plasmakoncentrationen och IC_{50} -värdet blir 0.69 (Ekvation 9).

$$Kvot_{amrinon} = \frac{0.58 \cdot 3.7 \cdot 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}}{187.22 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}} \cdot \frac{1}{16.7 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}} \approx 0.69 \quad (9)$$

Difenhydramin

Difenhydramin ingår i gruppen etanolaminer och används vid allergiska tillstånd. Substansen hämmar histamins effekter genom kompetitiv antagonism på H_1 -receptorer men inte på H_2 som framförallt finns i magslemhinnan (FASS, 2009b).

In vitro potens för difenhydramin till humana H_1 -receptorer har undersökts av Booth *et al.* (2002). I en kompetitiv radioligandbindingsstudie som använde humana H_1 -receptorer fästa till CHO-cellmembran bestämdes K_i till $13.5 \cdot 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (Tabell 1). Kvoten mellan den fria terapeutiska plasmakoncentrationen och K_i -värdet blir 1.9 (Ekvation 11).

$$Kvot_{difenhydramin} = \frac{0.22 \cdot 30 \cdot 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}}{255.16 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}} \cdot \frac{1}{13.5 \cdot 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}} \approx 1.9 \quad (11)$$

Dobutamin

Dobutamin används vid allvarlig hjärtsvikt orsakad av nedsatt kontraktilitet i hjärtmuskulaturen. Substansen ökar hjärtats kontraktionskraft genom agonistisk verkan på hjärtats β_1 - och i viss mån α_1 -receptorer. Kontraktilitetsökningen ger ökad slagvolym och hjärtminutvolym. Vid högre doser ökar även hjärtfrekvensen. Läkemedlet administreras som en infusion (FASS, 2006).

In vitro potens för dobutamid till β_1 -receptorer beskrivs av Isogaya *et al.* (1999). K_i -värde bestämdes i en kompetitiv radioligandbindingsstudie med klonade humana β_1 -receptorer fästa på COS-7-cellmembran (derivat av fibroblastceller från grön markatta, *Cercopithecus aethiops sabaeus*). Medelvärde av K_i från 3-4 experiment var $3.2 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (Tabell 1). Kvoten mellan den fria terapeutiska plasmakoncentrationen och K_i -värdet blir 44 (Ekvation 12). Data för fri fraktion kunde inte hittas i litteraturen och sattes till ett.

$$Kvot_{dobutamid} = \frac{1 \cdot 42.5 \cdot 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}}{301.17 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}} \cdot \frac{1}{3.2 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}} \approx 44 \quad (12)$$

Resultat

Tabell 1 sammanfattar de data som insamlats om substanserna och de kvoter som räknats ut enligt Ekvation 1. I Figur 2 är kvoterna grupperade och inplacerade i Göransson's (2012) stapeldiagram över frekvenser av kvoter.

Tabell 1. Molvikt, *in vitro* potens, uttryck för *in vitro* potens, fri fraktion, terapeutisk plasma koncentration, kvot terapeutisk plasmakoncentration/*in vitro* potens, verkningsmekanism och referenser.

Substans	Molvikt ($g \cdot mol^{-1}$)	<i>In vitro</i> potens ($10^{-6} mol \cdot L^{-1}$)	Uttryck för <i>in vitro</i> potens	Fri frak- tion (f_u)	Terapeutisk plasma- koncentration ($g \cdot L^{-1}$)	Kvot: terapeutisk plasma- koncentration/ <i>in vitro</i> potens	Verknings- mekanism	Referens (<i>in vitro</i> potens)
Lidokain	234.17	16	K_d	0.3	$3.75 \cdot 10^{-3}$	0.30	Antagonist	Nuss <i>et al.</i> , 1995
Morfin	285.14	0.063 *	K_i	0.65	$65 \cdot 10^{-6}$	2.4	Agonist	Toll <i>et al.</i> , 1998
Metadon	309.21	0.15 *	K_i	0.11	$350 \cdot 10^{-6}$	0.82	Agonist	Toll <i>et al.</i> , 1998
Tolbut- amid	270.1	0.32 ***	IC_{50}	0.04	$160 \cdot 10^{-3}$	0.74	Antagonist	Inagaki <i>et al.</i> , 1995
Diaz- oxide	229.99	60 ***	EC_{50}	0.06	$35 \cdot 10^{-3}$	0.15	Agonist	Inagaki <i>et al.</i> , 1995
Milrinon	211.07	0.45	IC_{50}	0.30	$200 \cdot 10^{-6}$	0.63	Enzym- hämmare	Sudo <i>et al.</i> , 2000
Amrinon	187.2**	16.7	IC_{50}	0.58	$3.7 \cdot 10^{-3}$	0.69	Enzym- hämmare	Sudo <i>et al.</i> , 2000
Difenhy- dramin	255.16	0.014	K_i	0.22	$30 \cdot 10^{-6}$	1.9	Antagonist	Booth <i>et al.</i> , 2002
Dobut- amin	301.17	3.2	K_i	1.00 ****	$42.5 \cdot 10^{-3}$	44	Agonist	Isogaya <i>et al.</i> , 1999

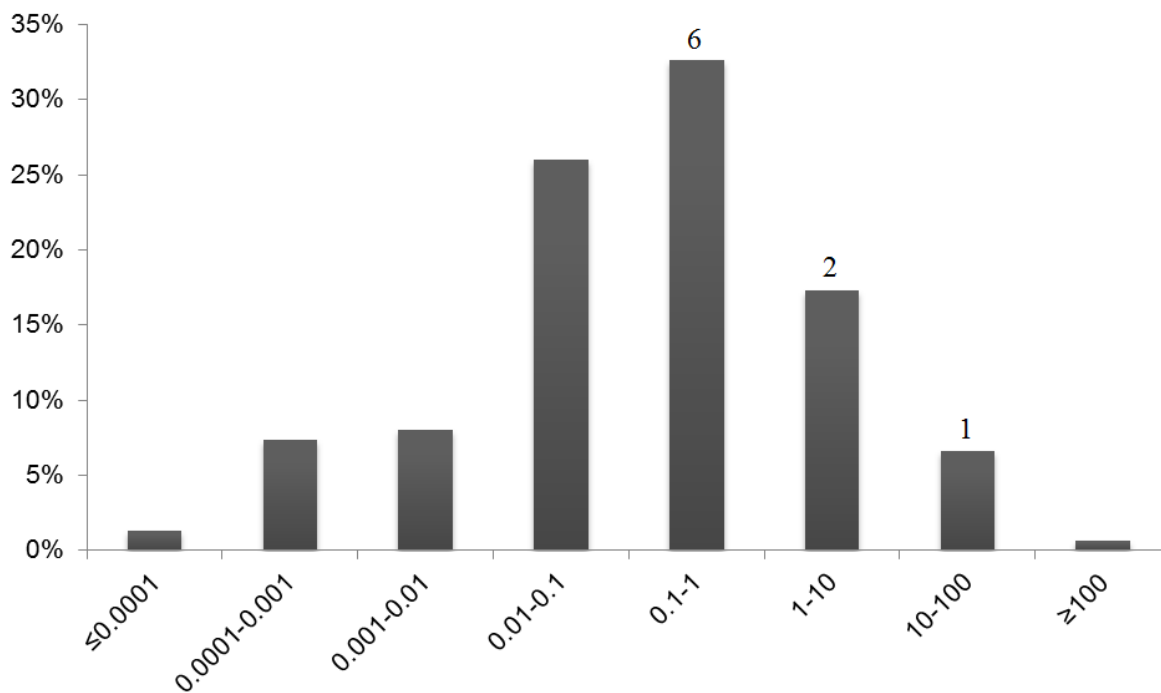
Terapeutisk plasmakoncentration och fri fraktion är hämtade ur Hardman et al. (1995). Molvikt är hämtad från IUPHAR (2013). Kvoten är beräknad enligt Ekvation 1.

* medelvärde för 3 receptorer.

** uppgift från Pubchem Compound (2013)

*** target baserat på musdata

****fri fraktion kunde inte hittas och sattes till ett



Figur 2. Frekvens (%) av terapeutisk plasmakoncentration i relation till in vitro potens från Göransson (2012) för alla substanser i hans examensarbete ($n=150$). Värdena har sorterats in i grupper av intervall av 10-potenser. Siffrorna över staplarna indikerar det antal förekommande substanser i respektive intervall som ingår i denna litteraturstudie.

DISKUSSION

Denna studie, tillsammans med Göranssons (2012), har visat att tolkningen av *in vitro* potens är ett område inom läkemedelsutvecklingen som förtjänar mer uppmärksamhet. Tendensen att kvoten mellan terapeutisk plasmakoncentration och *in vitro* potens är mindre än man tidigare trott gör det rimligt att anta att en flexiblere syn på *in vitro* potens skulle ge bättre möjligheter att utveckla goda läkemedel.

Det är inte helt enkelt att jämföra terapeutisk plasmakoncentration och *in vitro* potens och det är nästan oundvikligt att göra vissa förenklingar. Flera faktorer kan ha påverkat resultatet i denna och Göranssons (2012) studie. Affinitetsvärdet hämtades från enskilda källor och påverkas därmed av alla felkällor i respektive studie. Temperatur, *target*-koncentration och andra fysikaliska och kemiska faktorer under det specifika försöket påverkar resultatet. För några substanser har resultat från försök på receptorer från djur jämförts med terapeutisk koncentration på människa. Även om det är i princip samma receptor så kan artskillnader vara av stor betydelse (Rang & Dale, 2012).

I beräkningen av kvoten mellan terapeutisk plasmakoncentration och *in vitro* potens användes antingen substansens affinitet till ett huvud-*target* eller ett medelvärde för några olika *target*. I verkligheten interagerar läkemedelssubstanser ofta med flera olika *target*, även i de fall där ett huvud-*target* anses stå för huvuddelen av den farmakologiska effekten (Gleeson *et al.*, 2011). I de fall ett medelvärde har använts tar det inte hänsyn till förekomsten av olika *target*, om de reagerar på olika sätt eller olika starkt eller i vilka vävnader de förekommer.

Metabolism är en annan viktig faktor som inte har tagits hänsyn till. I många fall metaboliseras läkemedelssubstanser till aktiva metaboliter, ibland till och med mer aktiva än modersubstansen (Göransson, 2012). Att ta hänsyn till alla metaboliter och deras farmakologiska aktivitet i en studie av denna typ skulle kräva mycket arbete men säkert vara intressant om man lyckades strukturera upp det på ett meningsfullt sätt.

Resultatet från min analys av nio substanser visar att kvoten mellan terapeutisk plasmakoncentration och *in vitro* potens är ganska konstant. Sex av nio substanser gav kvoter mellan 0.15 och 0.82. Nio substanser är dock för litet material att dra några långtgående slutsatser. Vissa av substanserna verkar på liknande sätt på samma receptorer (morfin och metadon respektive milrinon och amrinon) vilket ökar risken att resultatet inte är representativt för alla läkemedelssubstanser. I jämförelse med Göranssons resultat (2012) (figur 2) ligger mina kvoter kring ett något högre medelvärde. I denna studie har terapeutisk plasmakoncentration hämtats från Goodman & Gilman (1995) och är alltså ett klinisk etablerat värde. Göransson däremot simulerade terapeutisk plasmakoncentration utifrån bland annat dosering och farmakokinetiska data. En rad förenklade antaganden gjordes i simuleringen, vilket skulle kunna resultera i att den terapeutiska plasmakoncentrationen i Göranssons beräkningar skiljer sig något från de faktiska.

Göranssons (2012) resultat, kompletterade med nio substanser från denna studie, stämmer inte särskilt väl överens med tumregeln att den terapeutiska plasmakoncentrationen (korrigerad för

plasmaproteinbindning) vanligen är en till tre gånger högre än *in vitro* potensen (McGinnity *et al.*, 2007). Eftersom en majoritet (>70%) av substanserna i Göranssons (2012) studie har en kvot som är mindre än ett så skulle en lämpligare tumregel kunna vara att terapeutisk plasmakoncentration vanligen är mindre än *in vitro* potensen. Synen på *in vitro* potens som ett mått på ett läkemedels terapeutiska plasmakoncentration bör hanteras mer flexibelt.

Vid en första anblick kan det vara förvånande att terapeutisk plasmakoncentration *in vivo* är lägre än *in vitro* potens. Detta kan dock förklaras på flera sätt. *In vitro* potensen talar om vilken koncentration som krävs för att binda 50% av *target*. I många fall kan det räcka att binda en betydligt mindre andel för att uppnå den önskade farmakologiska effekten. En läkemedelssubstans kan exempelvis binda en receptor som i sin tur utlöser en kaskadreaktion som ger den önskade farmakologiska effekten (Göransson, 2012). Metabolism spelar också in här, dvs. aktiva metaboliter bidrar till att skifta läkemedlets potens *in vivo*.

Vilka följder får då detta för läkemedelsutvecklingen? *In vitro* potens mäts tidigt i sökandet efter läkemedelskandidater och god potens är ett kriterium för vidare utveckling. Generellt sett försöker man hitta substanser som är så potenta som möjligt och många substanser sorteras ut på grund av för låg *in vitro* potens. Detta blir särskilt intressant men tanke på studien av Gleeson *et al.* (2011) som visar att *in vitro* potensen är ogynnsamt kopplad till egenskaper som påverkar möjligheten för en substans att bli ett oralt läkemedel. För höga krav på *in vitro* potensen riskerar alltså att i onödan sälla bort substanser som har goda farmakokinetiska egenskaper och som hade kunnat bli väl fungerande läkemedel. Mer forskning på området skulle kunna ge nya, mer flexibla tumregler som skulle öka möjligheterna att utveckla nya läkemedel.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Booth, R. G., Moniri, N. H., Bakker, R. A., Choksi, N. Y., Nix, W. B., Timmerman, H. and Leurs, R. (2002). A novel phenylaminotetralin radioligand reveals a subpopulation of histamine H₁ receptors. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 302, 328-336.
- Cheng, Y. & Prusoff, W. H. (1973). Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochemical Pharmacology*, 22, 3099-3108.
- FASS. Dobutamin Hameln. [online] (2006). Tillgänglig:
http://www.fass.se/LIF/produktfakta/artikel_produk.t.jsp?NplID=20050413000016&DocTypeID=3&UserTypeID=0 [2013-03-21]
- FASS. Desentol. [online] (2009b). Tillgänglig:
http://www.fass.se/LIF/produktfakta/artikel_produk.t.jsp?NplID=19511024000016&DocTypeID=3&UserTypeID=0 [2013-03-21]
- FASS. Morfin Meda. [online] (2009a). Tillgänglig:
http://www.fass.se/LIF/produktfakta/artikel_produk.t.jsp?NplID=19730831000051&DocTypeID=3&UserTypeID=0 [2013-03-08]
- FASS. Xylocain. [online] (2011a). Tillgänglig:
http://www.fass.se/LIF/produktfakta/artikel_produk.t.jsp?NplID=19540628000016&DocTypeID=4&UserTypeID=1 [2013-03-08]
- FASS. Corotrop. [online] (2011b). Tillgänglig:
http://www.fass.se/LIF/produktfakta/artikel_produk.t.jsp?NplID=19900202000038&DocTypeID=3&UserTypeID=0 [2013-03-08]
- FASS. Metadon Abcur. [online] (2013). Tillgänglig:
http://www.fass.se/LIF/produktfakta/artikel_produk.t.jsp?NplID=20090112000023&DocTypeID=3&UserTypeID=0 [2013-03-08]
- FASS. Substanssökning Tolbutamid. [online] (2013). Tillgänglig:
http://www.fass.se/LIF/produktfakta/substance_products.jsp?substanceId=IDE4POBWU9320VERT1 [2013-03-23]
- Gleeson, M. P., Hersey, A., Montanari, D., *et al.* (2011). Probing the links between in vitro potency, ADMET and physicochemical parameters. *Nature Reviews Drug discovery*, 10, 197-208
- Goodman, L. S., Gilman, A., Hardman, J. G., Gilman, A. G., Limbird, L. E. (1995). *Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics*. 9. uppl. New York. McGraw-Hill Education.
- Göransson, F. (2012). *Quantitative comparisons of drug concentrations – clinically, preclinically, in vivo and in vitro*. Licentiatavhandling. Göteborgs universitet.
- Hamada, Y., Kawachi, K., Yamamoto, T., Nakata, T., Kashu, Y., Sato, M., Watanabe, Y. (1999). Effects of single administration of a phosphodiesterase III inhibitor during cardiopulmonary bypass: comparison of milrinone and amrinone. *Japanese circulation journal*, 63, 605–609.
- Inagaki, N., Gono, T., Clement, J.P., Namba, N., Inazawa, J., Gonzalez, G., Aguilar-Bryan, L., Seino, S., Bryan, J. (1995). Reconstitution of IKATP: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science*, 270, 1166-70.

- Isogaya, M., Sugimoto, Y., Tanimura, R., Tanaka, R., Kikkawa, H., Nagao, T., Kurose, H. (1999). Binding pockets of the beta(1)- and beta(2)-adrenergic receptors for subtype-selective agonists. *Molecular Pharmacology*, 56, 875-885.
- IUPHAR Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification (International Union of Basic and clinical Pharmacology). IUPHAR Database [online] (2013). Tillgänglig: <http://www.iuphar-db.org/>. 2013-03-05.
- Kola, I., Landis, J. (2004). Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nature Reviews Drug Discovery*, 3, 711-715
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., Feeney, P. J. (1997). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced drug delivery reviews*, 23, 3-25.
- McGinnity, D. F., Collington, J., Austin, R. P., Riley, R. J. (2007). Evaluation of human pharmacokinetics, therapeutic dose and exposure predictions using marketed oral drugs. *Current Drug Metabolism*, 8, 463-479.
- Neubig, R. R., Spedding, M., Kenakin, T. & Christopoulos, A. (2003). International union of pharmacology committee on receptor nomenclature and drug classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology. *Pharmacological Reviews*, 55, 597-606.
- Nuss, HB., Tomaselli, GF., Marbán, E. (1995). Cardiac sodium channels (hH1) are intrinsically more sensitive to block by lidocaine than are skeletal muscle (μ 1) channels. *J. Gen. Physiol.*, 106, 1193-209.
- Pubchem Compound. Amrinone - Compound Summary. [online] (2013). Tillgänglig: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=3698> [2013-03-23]
- Rang, H. P., Dale, M., Ritter, J. M., Flower, R. J., Henderson, G. (2012). *Rang and Dale's pharmacology*. 7. uppl. Edinburgh. Churchill Livingstone.
- Sudo, T., Tachibana, K., Toga, K., Tochizawa, S., Inoue, Y., Kimura, Y., Hidaka, H. (2000). Potent effects of novel anti-platelet aggregatory cilostamide analogues on recombinant cyclic nucleotide phosphodiesterase isozyme activity. *Biochemical Pharmacology*, 59, 347-356.
- Toll, L., Berzetei-Gurske, I. P., Polgar, W. E., Brandt, S. R., Adapa, I. D., Rodriguez, L., Schwartz, R. W., Haggart, D., O'Brien, A., White, A., Kennedy, J. M., Craymer, K., Farrington, L., Auh, J. S. (1998). Standard binding and functional assays related to medications development division testing for potential cocaine and opiate narcotic treatment medications. *NIDA Res Monogr*, 178, 440-66.