



## Сравнение и идентификация метаболического профиля препарата Бициклол у крыс, собак и людей *in vitro* и *in vivo*

Ху М 1, Ли И 2, Вы Ф 2, Бай Ж 1, Вентилятор Х 1, Чжао С 1, Всу У 1, Ван Б 1, Ху Дж 1, Ли И 1

### Информация об авторе

Европейский журнал фармацевтических наук: Официальный журнал Европейской федерации фармацевтических наук, 18 августа 2020 г., 154: 105518

DOI: 10.1016 / j.ejps.2020.105518 PMID: 32818657

### Абстракт:

Бициклол, новый гепатопротекторный препарат, широко используемый для лечения хронического вирусного гепатита и лекарственного поражения печени (ЛПП). Однако его метаболические характеристики еще предстоит изучить, особенно на людях. Текущее исследование было направлено на определение основных метаболитов и специфических метаболизирующих ферментов, участвующих в метаболизме бициклола *in vitro* и *in vivo*, с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией с орбитальной ловушкой Q-Exactive (HPLC-Q-Exactive Orbitrap / MS). После инкубации с микросомами печени и перорального введения крысам, собакам и людям было идентифицировано в общей сложности девять метаболитов бициклола, включая М1 (продукт гидролизата сложного метилового эфира), М2-М3 (деметилированный бициклол), М4-М5 (деметокси или дегидроксиметил бициклол), М6 (глюкуронидированный бициклол) и М7-М9 (глюкуронидные конъюгаты метаболитов). Среди этих метаболитов М2 и М3 были основными метаболитами фазы I, главным образом опосредованными CYP2C19 и CYP3A4, в то время как М6 был доминирующим метаболитом фазы II, катализируемым главным образом UGT2B4. В этом исследовании наблюдались межвидовые метаболические различия между крысами, собаками и людьми. У людей и собак М6 (глюкуронидированный бициклол) был самым распространенным циркулирующим метаболитом (выше, чем исходное лекарство) в крови после перорального приема, в то время как исходный препарат был самым высоким у крыс. М4 и М5 были метаболитами, специфичными для крыс, тогда как М1 и М9 отсутствовали у собак *in vivo*. Метаболизм бициклола был продемонстрирован как деметилирование и глюкуронирование, опосредованное множественными ферментами, метаболизирующими лекарственные средства, у разных видов. Наши результаты впервые систематически прояснили участки метаболизма и пути биотрансформации бициклола у человека.

**Ключевые слова:** бициклол; ВЭЖХ-Q-Exactive Orbitrap / MS; Метаболический путь; Профили метаболитов.

**Сокращения:** ЛПП - лекарственное поражение печени; HPLC-Q-Exactive Orbitrap / MS, высокоэффективная жидкостная хроматография в сочетании с массой Q-Exactive orbitrap спектрометрия; DDIs, лекарственные взаимодействия; CYP, цитохром P450; УГЦ, УДФ-глюкуронозилтрансферазы; HLMs - микросомы печени человека; DLMs - микросомы печени собак; RLMs - микросомы печени крысы; rCYP, рекомбинантный цитохром P450 человека; rUGT, рекомбинантные UDP-глюкуронозилтрансферазы человека; DETC, Диэтилдитиокарбамат; HESI, источник ионов с подогревом электрораспылением; НАДФН, гидрат тетранатриевой соли β-никотинамидадениндинуклеотида, восстановленный 2'-фосфатом; UDPGA, уридин-5'-дифосфоглюкуроновая кислота; SD, стандартное отклонение.

*\* Авторы, ответственные за переписку.*

*Адреса электронной почты: wangbaolian@imm.ac.cn (Б. Ван), hujp@imm.ac.cn (Дж. Ху).*

*1 Эти авторы внесли равный вклад в эту работу.*

*Европейский журнал фармацевтических наук 154 (2020) 105518*

*Доступно онлайн 18 августа 2020 г.*

*0928-0987 / © 2020 Elsevier B.V. Все права защищены.*

## 1. Введение

Бициклом (4, 4'-диметокси-5, 6, 5', 6'-бис (диметилендиокси) -2'- гидроксиметил-2-метоксикарбонил бифенил), первый в своем классе гепатопротектор, впервые был одобрен в Китае с 2004 года для терапии хронических вирусных гепатитов (Лю, 2009). В настоящее время он также широко применяется при других заболеваниях печени, таких как лекарственное поражение печени (ЛПП), что является частым побочным эффектом для более чем 1000 терапевтических препаратов и может привести к печеночной недостаточности и даже смерти (Leise et al., 2014; Shen и др., 2019). Хотя его фармакологическая роль широко исследована, на сегодняшний день метаболические характеристики бициклола еще не были систематически изучены, особенно у людей. Метаболизм лекарств и фармакокинетические исследования играют важную роль на всех этапах от открытия лекарств до постмаркетингового наблюдения (Колдуэлл, 2011). Описание характеристик метаболизма может предоставить полезные данные для выяснения механизма действия и токсичности, а также рациональное клиническое применение. Предыдущее исследование в нашей лаборатории выделило два O-деметилованных метаболита бициклола, 4-ОН и 4'-ОН бициклом с использованием микросом печени человека, но нет информации о метаболизме бициклола *in vivo*. Учитывая ограничения в чувствительности детектора и наличие неизвестных метаболических путей. В это время некоторые метаболиты не обнаруживаются, но даже эти метаболиты могут способствовать эффективности исходного соединения, также и его токсичности (Ter Heine, 2009). Поэтому эксперименты по характеристике метаболического профиля бициклола необходимо для тщательного рассмотрения безопасности и эффективности лекарств. В этом исследовании, помимо определения метаболита бициклола, это необходимо для дальнейшего определения ферментов, влияющих на метаболизм и участвующих в его производстве, которое может помочь предсказать влияние генетических полиморфизмов и потенциальный риск лекарственного взаимодействия (DDI) (Winborn et al., 2018). Доклинические исследования показали метаболизм бициклола, он был CYP-зависимым, а CYP3A4 – с высокой экспрессией в стенках кишечника и печени, как и полагали, был основным изоферментом (Tan et al., 2008a; Tan et al., 2008b). Однако неясно, действуют ли другие ферменты, участвующие в метаболизме бициклола, особенно в производстве неизвестных метаболитов.

Таким образом, цель нашего настоящего исследования - изучить метаболические профили и метаболический путь бициклола у крыс, собак и человека *in vitro* и *in vivo*, а также провести сравнительные исследования метаболизма бициклола между животными и человеком, который обеспечит надежные данные для оценки потенциального риска лекарственного взаимодействия (DDI) и углубить наше всестороннее понимание безопасности и эффективности бициклола.

## 2. Материалы и методы

### 2.1. Химия и реактивы

Бициклом, стандарты метаболитов M2 и M3 (чистота: 99,8%) были предоставлены компанией Beijing Union Pharm (Пекин, Китай). Микросомы печени человека (HLM) и микросомы печени собаки (DLM) были приобретены в Научно-исследовательском институте болезней печени (Шанхай) Co., Ltd (Шанхай, Китай). Микросомы печени крысы (RLM) были приготовлены в нашей лаборатории методом дифференциального ультрацентрифугирования (Wu et al., 2017). Рекombинантный цитохром человека P450 (rCYP1A1, 1A2, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, 2J2, 3A4, 4A11, 4F12, 4F2, 4F3, 4F12) и рекombинантный человеческие UGT (rUGT1A1, 1A3, 1A4, 1A6, 1A7, 1A8, 1A9, 1A10, 2B4, 2B7, 2B10, 2B15 и 2B17) были приобретены у BD Gentest (Уоберн, Массачусетс, США). Ацетонитрил и метанол для ВЭЖХ были приобретены в компании Merck (Дармштадт,

Германия). Сверхчистая H<sub>2</sub>O был создан с помощью системы Milli-Q Gradient (Millipore Co., Billerica, США). Прочие коммерчески доступные реагенты были приобретены у Sigma-Aldrich. (Сент-Луис, Миссури, США).

## 2.2. Животные

Были получены взрослые крысы Sprague-Dawley массой 200 ~ 220 г от Beijing Vital River Experimental Animal Co., Ltd (Пекин, Китай. Номер лицензии: SCXK 2016-0006). Крыс содержали в течение 12 ч. Цикл свет / темнота 12 ч при 20 ~ 25 ° С и относительной влажности 50 ~ 60% в пластиковые клетки. Собаки породы бигль весом 6-7 кг были приобретены у Beijing Mar-should biotechnology Co., Ltd (Пекин, Китай. Лицензия номер: SCXK 2016-0001). Собак биглей выращивали в одиночной клетке с потреблением свободной воды при цикле 12 ч свет / 12 ч темнота при 18 ~ 22 ° С и при относительной влажности 50 ~ 60% суточный диапазон температуры составлял 3 ° С, время вентиляции 10 ~ 20 часов, скорость воздушного потока 0,1 ~ 0,2 м / с, аммиак концентрация ≤ 14 мг / м<sup>3</sup>, шум ≤ 60 дБ, освещение животных 100 ~ 200 лк. Клетки чистили дважды в день и дезинфицировали каждые две недели. Животных не кормили на ночь со свободным доступом к воде до даты эксперимента.

## 2.3. Исследования *in vitro*

### 2.3.1. Инкубация бициклола с микросомами печени крысы, собаки и человека

Микросомы печени крысы, собаки или человека (конечная концентрация белка 0,5 мг / мл) предварительно инкубировали с NADPH-регенерирующей системой содержащей 0,1 М глюкозо-6-фосфата, 4 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,011 М β-НАДФ и 10 ед / мл глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в буфере Tris-HCl (50 мМ, pH 7,4) в общем объеме 200 мкл при 37 ° С в течение 5 минут в водяной бане со встряхиванием с последующим добавлением бициклола (конечная концентрация 1 мкМ или 10 мкМ), чтобы инициировать реакцию. Тогда реакции прекращали добавлением 400 мкл замороженного ацетонитрила в разное время интервалы (0, 15, 30, 45, 60, 90 и 120 мин). Инкубация без НАДФН или субстрат служили в качестве холостого контроля. Смесь встряхивали в течение 30 секунд с последующим центрифугированием при 14000 об / мин в течение 5 мин дважды. А 5 мкл супернатанта вводили в HPLC-Q-Exactive Orbitrap / MS. для анализа. Метаболическая стабильность бициклола в микросомах печени была оценена путем определения оставшегося количества субстрата в каждой инкубация. Все эксперименты проводились в трех повторениях, и каждый параллельный образец работал независимо в тех же условиях.

### 2.3.2. Инкубация бициклола с rCYPs

Чтобы определить CYP, участвующие в метаболизме бициклола, 15 коммерчески доступные рекомбинантные CYP450 человека (rCYP1A1, 1A2, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, 2J2, 3A4, 4A11, 4F12, 4F2, 4F3, 4F12) были использованы в анализе rCYPs. Бициклол (5 мкМ) инкубировали отдельно с 50 пмоль / мл rCYPs, содержащими систему, генерирующую НАДФН, рядом с стороны в течение 120 минут при 37 ° С. Все остальные условия инкубации и образец процедуры подготовки были такими же, как описано в разделе 2.3.1. (Инкубация бициклола с микросомами печени крысы, собаки и человека). Инкубация без НАДФН служила в качестве холостого контроля и выборочного контроля. Субстраты CYPs-зонда использовали в качестве положительного контроля для проверки пригодности системы. Затем образование метаболиты бициклола контролировалось.

### 2.3.3. Эксперименты по ингибированию CYP в HLM

Селективные химические ингибиторы использовались для проверки участия CYP в HLM. Бициклол (5 мкМ) инкубировали с HLM 0,5 мг / мл в присутствии низкой и высокой концентрации селективного CYP450 ингибитор ферментов, относящийся к их значениям K<sub>i</sub> в реакционной смеси содержащая NADPH-генерирующую систему в течение 120 мин при 37 ° С. Фурафиллин (2, 50 мкМ), хинидин (1, 10 мкМ), сульфафеназол (2, 10 мкМ), тиклопидин (5, 25 мкМ), кетоконазол (5, 50 мкМ), EDTC (1,10 мкМ) использовали в качестве селективный ингибитор CYP1A2, 2D6, 2C9, 2C19, 3A4, 2E1 соответственно. Параллельные инкубации с носителем вместо селективных ингибиторов считались контролем, а зондовые субстраты (Mi et al., 2017) для каждого изофермента, использовались в качестве группы положительного контроля. Все остальные инкубации, условия и процедуры подготовки образцов были такими же как описано в разделе 2.3.1 (Инкубация бициклола с крысой, собакой и микросомами печени человека). Оценивали процент ингибирования на основе каждого образованного метаболита и рассчитывали в соответствии со следующими

уравнениями:  $I\% = (P_0 - P_i) / P_0 \times 100$ , где  $I\%$  представляет собой процент ингибирования, а  $P_0$  и  $P_i$  представляли продукцию каждого из метаболит в отсутствие и в присутствии ингибитора соответственно (Mi et al., 2017).

#### 2.3.4. Инкубация бициклола с r UGT

Для определения UGT, участвующих в метаболизме бициклола, 13 коммерчески доступные рекомбинантные человеческие UGT (rUGT1A1, 1A3, 1A4, 1A6, 1A7, 1A8, 1A9, 1A10, 2B4, 2B7, 2B10, 2B15 и 2B17) были используются в анализе глюкуронизации. Вкратце, бициклол, 4-ОН и 4'-ОН бициклол (5 мкМ) инкубировали отдельно в rUGT 0,2 мг / мл в течение 120 мин в присутствии системы, генерирующей 5 мМ UDPGA (Словак и др., 2017). Все остальные условия инкубации и процедуры подготовки проб были такими же, как описано в разделе 2.3.1 (инкубация бициклола с микросомами печени крысы, собаки и человека). Инкубация без UDPGA служили холостыми контролями и субстратами UGTs-зонда были использованы в качестве положительного контроля для проверки пригодности системы. Потом отслеживали глюкуронидированные метаболиты.

#### 2.4. Фармакокинетические исследования *in vivo*

Чтобы исследовать профили метаболитов бициклола *in vivo*, крыс перорально введенный бициклол, суспендированный в 0,5% Na-СМС (50 мг / кг), гончие собакам давали перорально таблетки бициклола (75 мг) после ночного голодания. Примерно 0,2 мл крови для крыс по суборбитальному венозному сплетению, 0,5 мл крови для гончих собак по вене передних конечностей собирали в гепаринизированном виде в полиэтиленовые пробирки 1,5 мл или центрифужные пробирки 5 мл при 0 мин, 5 мин, 15 мин, 30 мин, 1 ч, 2 ч, 4 ч, 6 ч, 8 ч, 12 ч, 24 ч, 30 ч, 36 ч, 48 ч, 60 ч. Плазму отделяли центрифугированием при 8000 об / мин в течение 5 мин и до анализа хранили при  $-80^\circ \text{C}$ . 100 мкл плазмы смешивали с 300 мкл ацетонитрила, каждую смесь встряхивали в течение 30 с с последующим центрифугированием при 14000 об / мин в течение 5 мин дважды. Аликвота 5 мкл каждого супернатанта вводили в систему HPLC-Q-Exactive Orbitrap / MS для анализа. Эксперименты на животных проводили в соответствии с надлежащими принципами Китая по уходу за животными, которые соответствуют международным общепринятым принципам ухода за экспериментальными животными и их использованием.

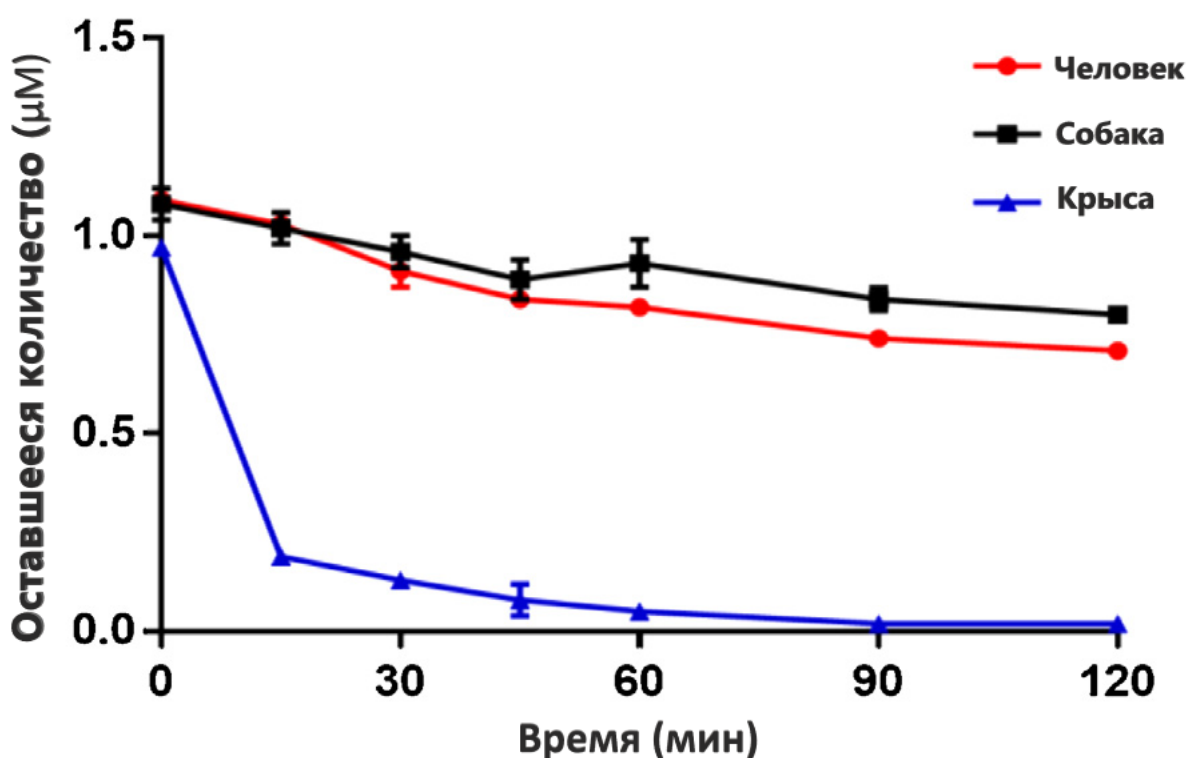
Человеческую плазму здоровых взрослых добровольцев после перорального приема таблеток бициклола (75 мг) предоставил Пекинский университет и Первая больница (Пекин, Китай) с получением письменного согласия добровольцев. Протокол исследования одобрен этическим комитетом научной комиссии Первой больницы Пекинского университета, и она соответствует положениям Хельсинкской декларации. То есть, здоровые взрослые добровольцы принимали таблетки бициклол (75 мг) перорально после ночного голодания. Примерно 3 мл крови было взято из переднекубитальной вены в чистые гепаринизированные центрифужные пробирки объемом 5 мл при предварительной дозе и через 0,5 ч 1 ч, 2 ч, 3 ч, 4 ч, 6 ч, 8 ч, 10 ч, 12 ч, 16 ч, 20 ч, 24 ч, 30 ч, 36 ч, 48 ч и через 60 часов после перорального приема. Плазма была отделены центрифугированием при 8000 об / мин в течение 5 мин и хранятся при  $-80^\circ \text{C}$  до анализа. Обработку образца проводили, как указано выше, затем вводили в систему HPLC-Q-Exactive Orbitrap / MS для анализа.

#### 2.5. Условия ЖХ-МС / МС

HPLC-Q-Exactive Orbitrap / MS состоит из бинарного менеджера растворителей, автоматический пробоотборник для геодезистов, жидкостный насос для геодезистов, масс-спектрометр с орбитальной ловушкой оснащен подогреваемым источником ионов с электрораспылением (HESI) и программное обеспечение Tracefinder (4.1 Quan general) для сбора и анализа данных. Разделение производилось на Zorbax SB-C18 (2,1 мм × 100 мм) мм, 3,5 мкм, Agilent Corporation, Калифорния, США). Подвижная фаза состояла из растворителя А (0,1% муравьиной кислоты в воде) и растворителя В (0,1% муравьиной кислоты в метаноле). Аналиты были элюированы при скорости потока 0,2 мл / мин, со следующим градиентным элюирования: от 0 до 2 мин, 10% В; линейный увеличить до 98% В за 8 мин; 98% В в течение 5 мин, уменьшение до 10% В в 0,1 мин; и стабилизация при начальных условиях в течение 5 мин. Q-Exactive орбитальный масс-спектрометр работал в режиме положительных ионов с HESI. Температура капилляров была установлена на уровне  $320^\circ \text{C}$ , а напряжение распыления - на уровне 3500В. Защитный газ и вспомогательный газ подавались азотом при 35 и 10 фунтов на квадратный дюйм.

В настоящем исследовании была использована стратегия идентификации метаболитов. Во-первых, сканирование полной массы с высоким разрешением и сканирование dd-MS2 были получены в режиме положительных ионов. Во-вторых, фильтр массового дефекта (МДФ) функция и программа вычитания фона были применены для пост активации обработки данных с целью получения точной массы потенциальных метаболиты. В-третьих, метаболиты идентифицировали сравнением их точных масс и хроматографического времени удерживания с аутентичными стандартами (Li et al., 2019). Благодаря стабильной структура бициклола, характерной фрагментации для количественное определение даже при относительно более высокой энергии столкновения. Таким образом, (полу) количественное определение проводилось при параллельном мониторинге реакции (PRM) режима, бициклол и его метаболиты отслеживались по их молекулярным ионам как в Q1, так и в Q3 с 10 эВ нижней ограниченной энергии столкновения во втором квартале.

## Метаболическая стабильность in vitro



**Рисунок 1.** Метаболическая стабильность бициклола в RLM, DLM и HLM. Бициклол (1 мкМ) инкубировали отдельно в RLM, DLM и HLM (0,5 мг белка / мл) для 120 мин. Данные выражены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение (SD) трех самостоятельных экспериментов.

### 3. Результаты

#### 3.1. Метаболическая стабильность бициклола в микросомах печени крысы, собак и человека

Метаболическая стабильность бициклола в микросомах печени была изучена и рассмотрена для оценки степени процесса биотрансформации до скрининга и определения его метаболитов в системе кровообращения. Незначительное снижение уровня бициклола наблюдалось во всех холостых контролях без НАДФН, что указывает на ферментативный метаболизм бициклола in vitro. В присутствии НАДФН концентрация бициклола в RLM, DLM и HLM постепенно уменьшались с увеличением времени инкубации. Метаболический процент бициклола составил 98,3% у RLM, 25,3% у DLM и 35,1% в HLM за 120 минут инкубации, что указывает на очевидны видовые различия в метаболической стабильности бициклола. Как показано на рисунке 1, бициклол был намного более стабильным в HLM и DLM, чем в RLM. Судя по всему, это была собака породы бигль, - бициклол метаболизируется в той же степени, что и человека, что предполагает, что собака породы бигль может быть подходящей моделью для изучения человека фармакокинетики бициклола in vivo.

### 3.2. Идентификация метаболитов бициклола у крыс, собак и людей *in vitro* и в естественных условиях

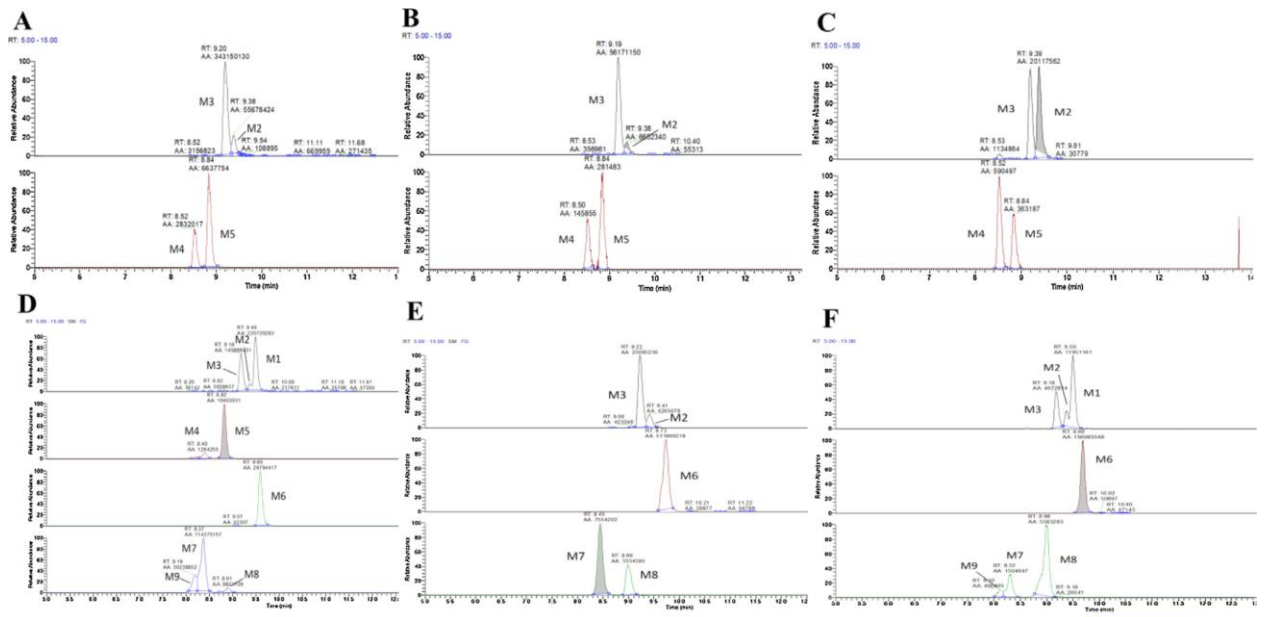
Всего девять метаболитов (M1 – M9) бициклола могут быть обнаружены в микросомы печени крысы, собаки и человека и / или плазме после перорального введения (таблица 1 и рис. 2). Деметилированный бициклом M2 и M3 (m / z 399) и деметокси или дегидроксиметилбициклом M4 и M5 (m / z 361) можно было обнаружить после инкубации бициклола с RLM, DLM и HLM. Для циркулирующих метаболитов *in vivo*, кроме M2 и M3, глюкуронидированный бициклом M6 (m / z 589) и глюкуронидные конъюгации деметилированных продуктов M7 и M8 (m / z 575) также могут обнаруживаются в плазме крыс, собак и людей после перорального приема бициклола. Интересно, что M4 и M5 были метаболитами *in vivo*, специфичными для крыс, в то время как M1 (m / z 399) и M9 (m / z 575) были обнаружены только у крыс и людей, но не собак. Предполагалось, что производство M1 может быть связано с гидролизом метоксикарбонильной группы, а M9 считался в виде его глюкуронидного конъюгата. Помимо межвидовых различий в типах метаболитов бициклола, также была разница в количестве продукции метаболитов. Например, у крыс уровень M3 был выше, чем у родительских препарат и M2, в то время как уровень исходного препарата у собак и людей был намного выше, чем у M3 и M2. Даже у собак и людей произведенные количества M3 и M2 также были разными. Для глюкуронида конъюгата, площадь пика глюкуронидированного бициклола M6 у собак и людей были явно выше, чем M7 и M8, в то время как M7 был самым высоким у крыс. Эти наблюдаемые различия могут быть тесно связаны с экспрессия и способностью метаболизации лекарств ферментами разных видов животных и человека. Помимо M2 и M3, профили других метаболитов (M9 не определен количественно из-за следового количества) были показаны как площади пиков из-за их недоступных чистых стандартов. Результаты представлены на рисунках 3 и 4.

Метаболит	Химическая формула	Measured M/Z	Погрешность массы (ppm)	Крыса In vitro	Крыса In vivo	Собака In vitro	Собака In vivo	Человек In vitro	Человек In vivo
Bicyclol	C19H18O9	413.0836a	-1.65	√	√	√	√	√	√
M1	C18H16O9	399.0680a	-1.75		√				√
M2	C18H16O9	399.0679a	-1.50	√	√	√	√	√	√
M3	C18H16O9	399.0681a	-2.00	√	√	√	√	√	√
M4	C17H14O9	361.0920b	- 0.55	√	√	√		√	
M5	C17H14O9	361.0917b	-0.28	√	√	√		√	
M6	C25H26O15	589.1153a	-1.87		√		√		√
M7	C24H24O15	575.1001a	-1.04		√		√		√
M8	C24H24O15	575.1001a	-1.04		√		√		√
M9	C24H24O15	575.1001a	-1.04		√				√

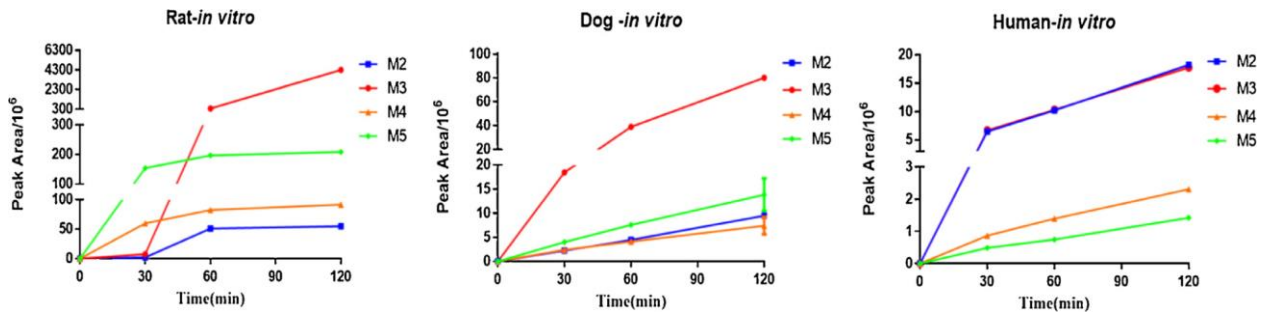
**Таблица 1.** Идентификация метаболитов бициклола *in vitro* и *in vivo*. Примечание: a: [M + Na] +, b: [M + H] +.

### 3.3. Идентификация ферментов CYP, участвующих в метаболизме бициклола через rCYPs

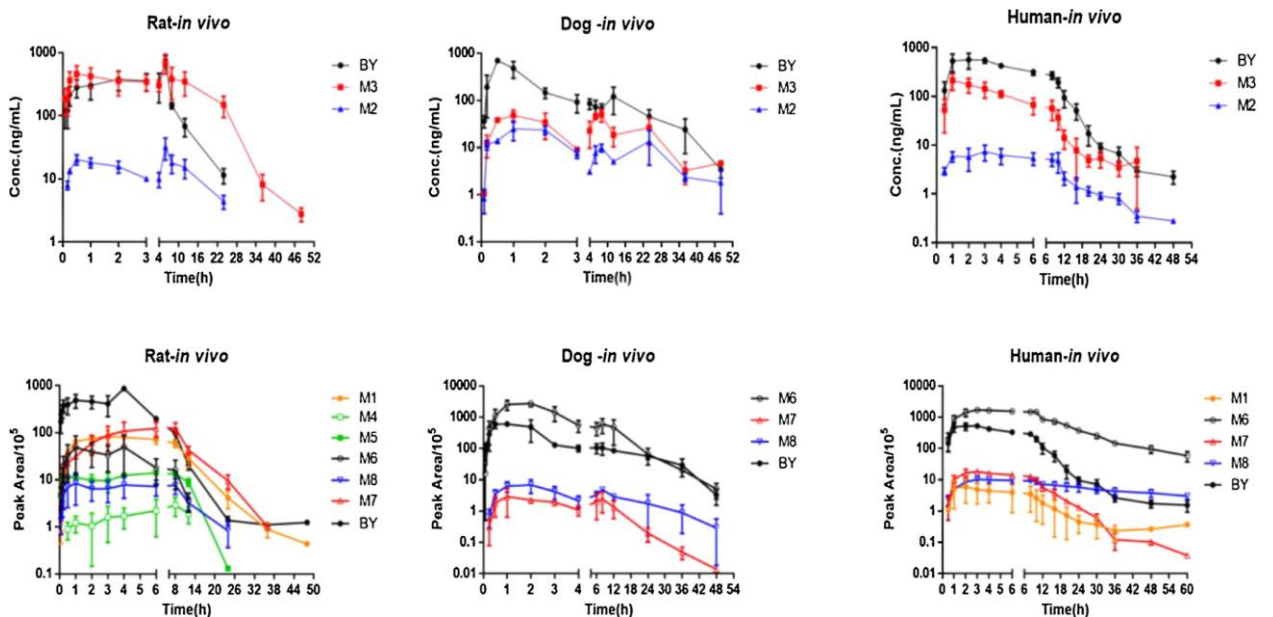
В этом исследовании 15 рекомбинантных систем CYP человека были применены к определению, какие rCYP участвуют в метаболизме бициклола. Как показано в Рис. 5, CYP2C19 показал замечательную каталитическую активность как для M2 и производство M3, за которым следуют CYP3A4 для M2 и CYP1A1 для M3, в то время как CYP1A2, 2C8, 2C9 и 3A5 также способствовали M2 и M3 поколение в меньшей степени. Что касается M4 и M5, CYP3A4 в сочетании с CYP2C8, 2C19 катализируют их образование. Кроме того, CYP3A5, 2J2, 1A1 и 2C9 также частично участвовали в образовании M4. Эти результаты показали, что деметилирование или деметоксилирование бициклола проведено с помощью каталитической реакции множественных CYP, тогда как CYP2C19, CYP3A4 / 5 и CYP1A1 играет важную роль в метаболизме бициклола.



**Рисунок 2.** ЖХ-МС хроматограммы экстрагированного ионного тока основных метаболитов бициклола, продуцируемых *in vitro* в А) RLM, В) DLM, С) HLM и *in vivo* у D) крыс, Е) собак, Е) люди.



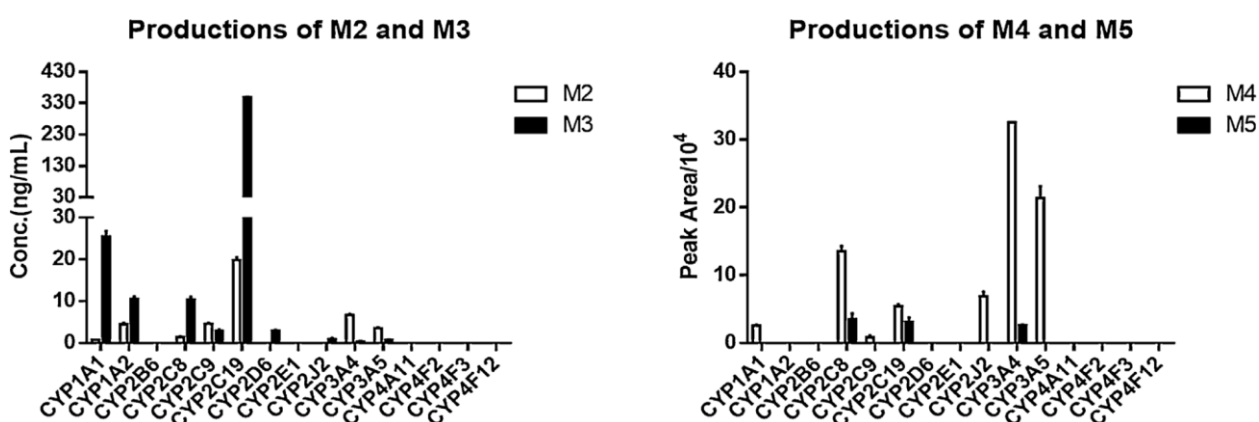
**Рисунок 3.** Профили площади и времени пиков метаболитов бициклола в RLM, DLM и HLM. Бициклол (10 мкМ) инкубировали в RLM, DLM и HLM (0,5 мг белка / мл) для 120 мин. Данные выражены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение (SD) трех независимых экспериментов.



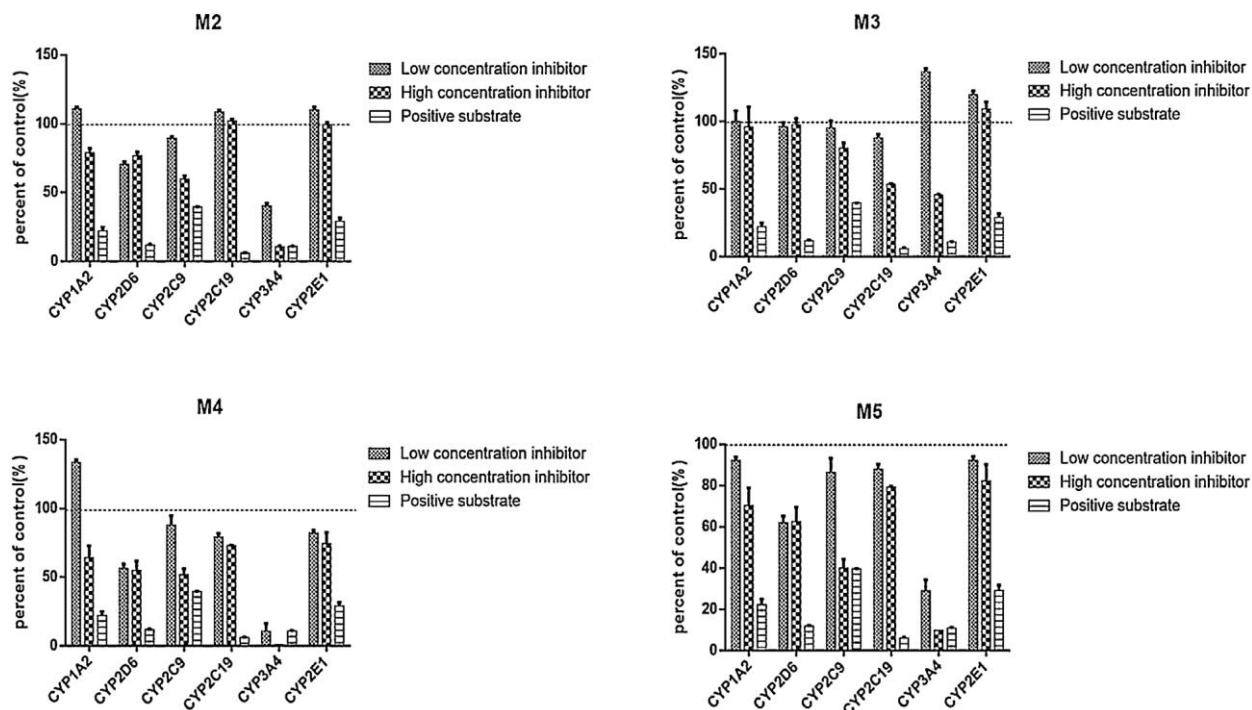
**Рисунок 4.** Профили концентрации в плазме / площади пика бициклола и его метаболитов после однократного перорального введения крысам (50 мг / кг), собакам (75 мг) и людям (75 мг). Данные выражены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение (SD) трех независимых экспериментов.

### 3.5. Идентификация ферментов UGT, участвующих в глюкуронизации бициклола и его деметилированных метаболитов

Для определения ферментов UGT, ответственных за глюкуронизацию бициклола и его деметилированных метаболитов, 13 коммерческих rUGTs были использованы в этом анализе. Среди этих rUGT UGT2B4 показал высокий уровень каталитической активности для образования глюкуронидированного бициклола, с последующей UGT1A4 и 2B15, в то время как ни один из других ферментов не генерировал обнаруживаемое количество глюкуронидированного бициклола. Используя тот же набор rUGTs, глюкуронирование деметилированного бициклола M2 и M3 были исследовали при той же концентрации. После инкубации M2 и M3 был глюкуронизирован с образованием M8 и M7 соответственно. Удержание времени M7 и M8 соответствовали анализам, наблюдаемым *in vivo*. Соответственно, структуры M7 и M8 были идентифицированы. UGT1A9 показали значительный влияние на воспроизведение M7, за которым последовали UGT1A8, 1A3, 1A1, 1A10, а UGT2B15, 1A7 и 2B17, которые играли второстепенная роль. Что касается M8, то его производство в основном катализировалось UGT1A3 и UGT1A1, 1A8, 1A10 с меньшим вкладом. Другие ферменты не показали каталитической способности к глюкуронизации M2 или показали ее слабую и M3 (рис.7). В совокупности эти результаты показали, что UGT2B4, 1A9 и 1A3 были определены как основные ферменты, участвующие в глюкуронизации бициклола и его деметилированные метаболиты.

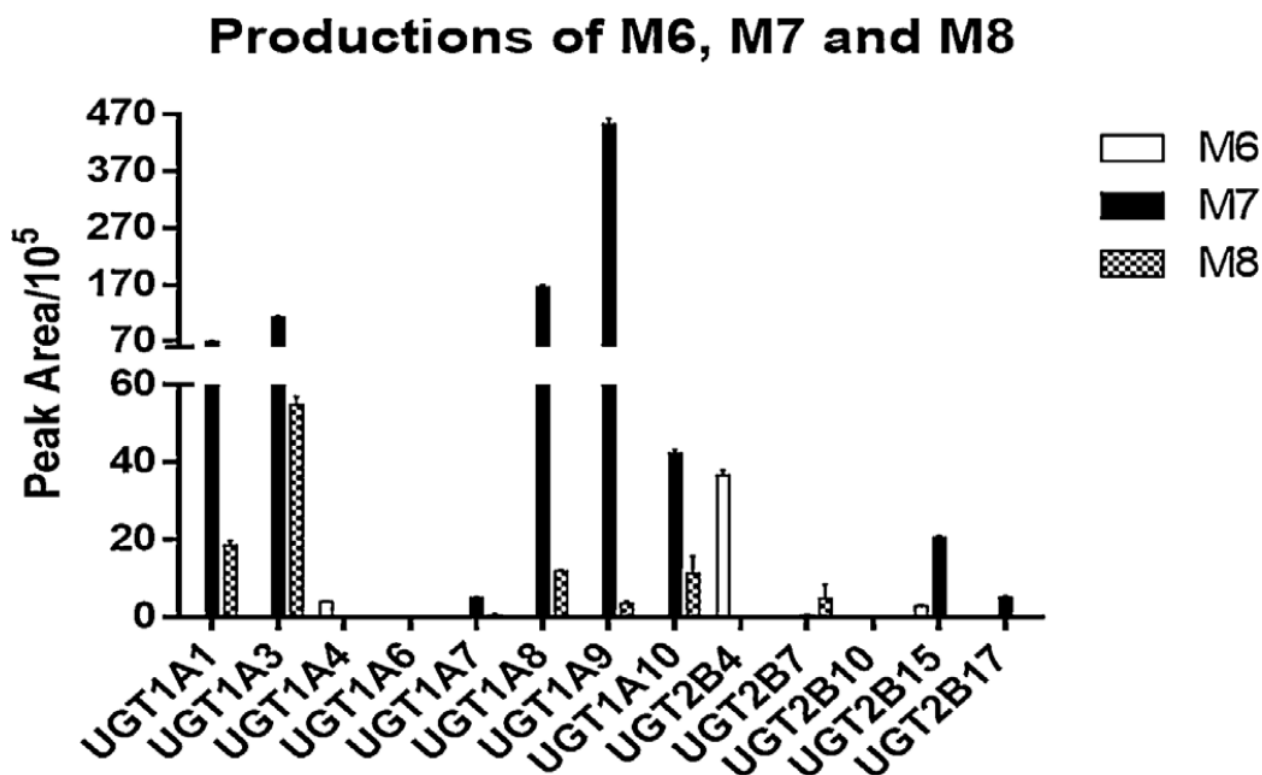


**Рисунок 5.** Метаболизм бициклола в панели rCYP. Бициклол (5 мкМ) инкубировали с каждым изоферментом (50 пмоль белка / мл) в присутствии НАДФН, генерирующего систему в течение 120 мин при 37 ° С. Продукция метаболитов бициклола выражалась как среднее ± стандартное отклонение (SD) трех независимых экспериментов.





**Рисунок 6.** Влияние селективных ингибиторов CYPs на образование метаболитов бициклола в объединенных HLM. Бициклол (5 мкМ) инкубировали с HLM (0,5 мг белка / мл) в присутствии или отсутствии ингибиторов фермента CYP при 37 ° С в течение 120 мин. Каждая полоса представляет собой среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение (SD) трех независимых экспериментов.



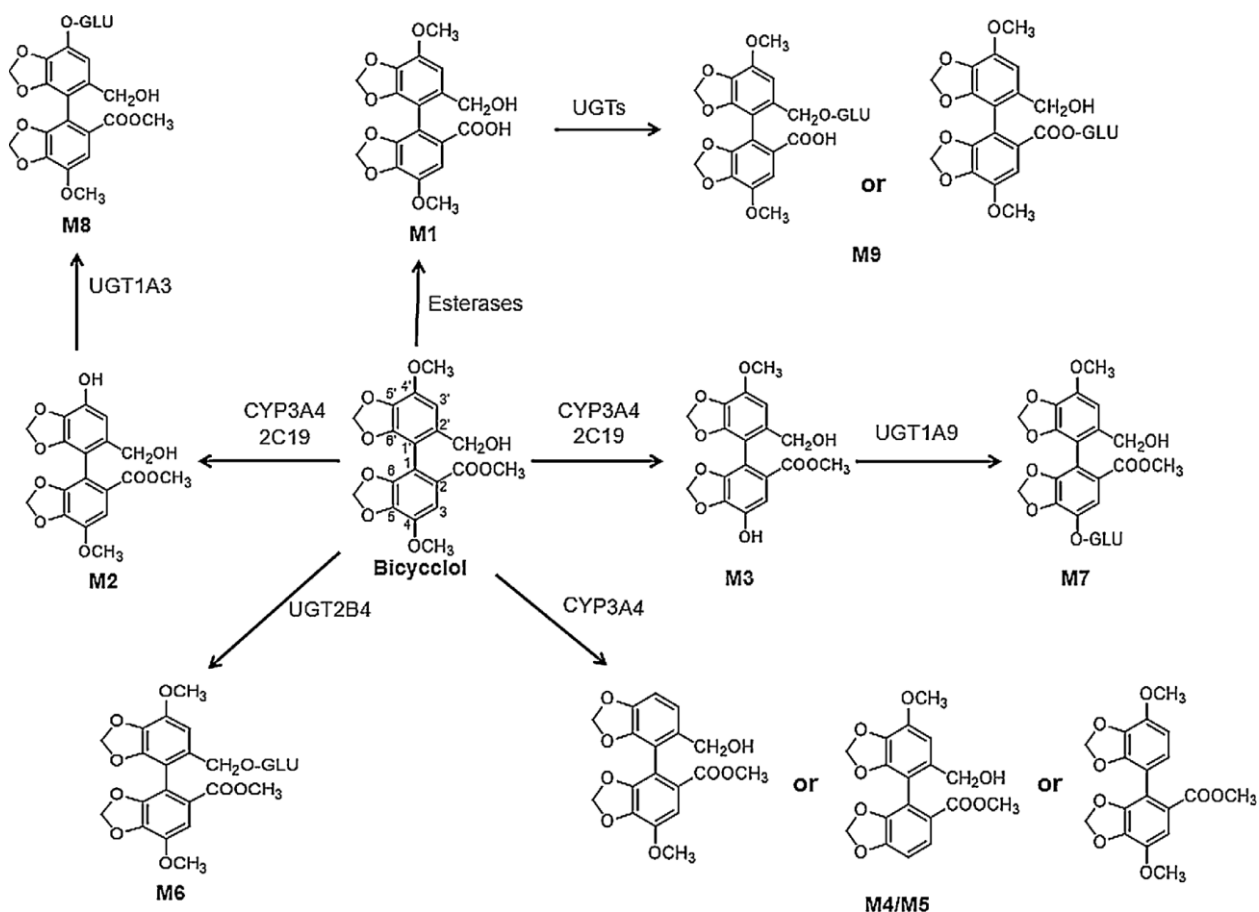
**Рисунок 7.** Изготовления M6, M7 и M8 в панели рУГЦ. Бициклол, M2 или M3 (5 мкМ) инкубировали с каждым изоферментом (0,2 мг белка / мл) в течение 120 мин при 37 ° С. Каждая полоса представляет собой среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение (SD) трех определений.

#### 4. Обсуждение результатов:

Профилирование метаболитов может предоставить полезную информацию для прогнозирования фармакокинетические свойства лекарственных препаратов-кандидатов и оценка возможность лекарственного взаимодействия (DDI). Определение метаболитов как у экспериментальных животных, так и людей, - очень важны шаги в оценке основного риска и могут, в свою очередь, направлять рациональный дизайн соединений, чтобы избежать образования реактивных или токсичных метаболиты (Wu et al., 2017). Бициклол, как гепатопротектор, хотя одобрен для продажи, его метаболические характеристики подлежат дальнейшему изучению, особенно на людях. В нашем настоящем исследовании в общей сложности было обнаружено девять метаболитов бициклола метаболизированными микросомами печени *in vitro* и плазма *in vivo* у крыс, собак и людей. Метаболиты M2 и M3, основные метаболиты фазы I, были обнаружен при *m/z* 399.0680, что соответствует монодеметилированному производству (-14 Да от родительского). По сравнению с аутентичными стандартами, они были проверены как 4'-гидроксибициклол и 4-гидроксибициклол, которые были зарегистрированы с более слабой гепатопротекторной активностью, чем бициклол (Лю, 2009). В то время как M1, как и M2 и M3, также был обнаружен на *m/z* 399.0680 (-14 Да от родительского). Исходя из структуры бициклола, кроме метокси, связанного в положениях C4 и C4', существует карбометокси группа в C2 бициклола. Таким образом, M1 предположительно был связан с гидролизом карбометокси.

M4 и M5, два метаболита без определенной структуры, были обнаружены при *m/z* 361.0920 (-30 Да от родительского), было предварительно обнаружено, что это деметокси или дегидроксиметил-продукты бициклол. Сообщалось о деметоксилировании, хотя и редко у крыс. Например, иризолидон, группа C4'-ОНЗ

может быть активной группой, обладающая мощным ингибирующим действием на рост *Helicobacter pylori* (HP), претерпел деметокси-реакцию в положении C4' у крыс (Zhang et al., 2013). В наших исследованиях *in vivo* также наблюдались M4 и M5 у крыс, но не у людей и собак. Находясь в микросомах печени (инкубация), хотя M4 и M5 были продуцированы у всех видов, выше производство в RLM, чем в DLM и HLM, но для этого вида различия деметоксилирования, как его производного, требует дальнейшего изучения. Учитывая, что бициккол содержит одну карбинольную группу в C2', таким образом, глюкуроноидное начального соединения, если оно произойдет, может произойти только при этой позиции. M6, прямой O-глюкуроноид бициклола, был обнаружен при *m/z* 589,1145 (+176 Да от родителя) у всех видов *in vivo*. У собак и у людей глюкуроноидированный бициккол M6 был наиболее распространенным циркулирующим метаболитом (выше, чем у исходных препаратов) в крови после перорального приема, в то время как исходный препарат был самым высоким у крыс. Помимо глюкуронизации бициклола, деметилированные метаболиты M2 и M3 были далее преобразованы в M8 и M7 (на 176 Да выше, чем у M2 и M3) соответственно у всех видов *in vivo*. Что касается метаболита M9, как и M7, M8, как предполагалось, должны были образоваться в результате глюкуронизации M1 (на 176 Да выше, чем у M1). Учитывая конструктивные характеристики M1, это глюкуроноирование может происходить в C2'-карбиноле или C2- карбоксильный фрагментах. В совокупности продемонстрирован метаболизм бициклола как деметилирование и глюкуроноирование у животных и человека. Затем в этом процессе участвовали ферменты, метаболизирующие лекарственные препараты далее идентификацию.



**Рисунок 8.** Предполагаемые метаболические пути бициклола *in vitro* и *in vivo* (GLU: глюкуроновая кислота).

Цитохромы P450 (CYP), наиболее важный для метаболизма лекарственных препаратов, представляет метаболизирующие семейство ферментов, которые, как известно, участвуют в более чем 70% фазы I метаболизм лекарственных препаратов и других липофильных ксенобиотиков (Неберт и Дальтон, 2006). В суперсемействе CYPs, CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19, CYP1A2, CYP2D6 и CYP2E1 составляют примерно 78,7% всего CYP и вовлечены в 95% CYP-опосредованных реакций (Mi et al., 2017; Зангер и Шваб, 2013). В нашем настоящем исследовании идентификация CYP, участвующие в метаболизме бициклола, были обнаружены в гуманизированных системах, включая рекомбинантные CYP человека и объединенные HLM с селективные химические ингибиторы. В анализах *rCYPs* был идентифицирован CYP2C19 как основная изоформа,

ответственная за образование М2 и М3 на исследуемую концентрацию субстрата. В то время как в тестах на селективные ингибиторы CYPs, кетоконазол (ингибитор CYP3A4) заметно уменьшил образование М2 и М3, что указывает на то, что CYP3A4 может иметь более высокую каталитическую активность, чем CYP2C19 в реакции деметилирования бициклола. Но также сообщалось, что кетоконазол может снизить метаболическую активность CYP2C19 в HLM, но механизм ингибирования неясен (Zhang et al., 2002; Klose et al., 1999). Таким образом, CYP2C19 и CYP3A4 считались основными ферментами, ответственными за деметилирование бициклола у человека. CYP2C19, что составляет 6,8% от общего числа CYP, подвержен генетическому полиморфизму у человека (Zanger et al., 2013; Blaisdell et al., 2002). CYP2C19 \* 2, который встречается почти исключительно в популяции Казахстана и CYP2C19 \* 3, который встречается в основном у азиатов, - это два наиболее важные нулевые аллели у людей и приводящие к препарату PM и EM фенотипов (Zanger et al., 2013), что позволяет лучше понять индивидуальные изменчивости плазменного воздействия бициклола и его метаболитов. У крыс CYP2C11 и человека CYP2C19 являются преобладающими изоформами. CYP2C11 в печени крыс, составлял до 50% от общего содержания CYP (Martignoni et al., 2006), что помогает нам понять различия метаболических видов, что М3 был веществом с самой высокой концентрацией у крыс, но не у людей после однократного перорального приема бициклола. Среди всех CYP именно CYP3A4, на долю которого приходится 30,2% общее количество CYP, является наиболее важной изоформой и участвует в метаболизме примерно 60% наркотиков (Zanger and Schwab, 2013). CYP3A4 человека имеет гибкий кармашек для крепления субстрата, в который помещаются различные типы субстратов (Ohkura et al., 2009). Как количество перорально вводимых лекарств, бициклол катализирует CYP3A4 с образованием деметилированных метаболитов. Когда бициклол был в сочетании с другими субстратами CYP3A4, - в клинике следует принимать во внимание лекарственные взаимодействия (DDI).

UDP-глюкуронозилтрансферазы (УГТ), первичная фаза II эндоплазматической ретикулум-связанные ферменты, является членом надсемейства катализируя конъюгацию глюкуроновой кислоты к ксенобиотикам с полярными группами за содействие их разминированию (Оно и Накаджин, 2009; Ян и др., 2017). Медикаментозная глюкуронизация как важный клиренс и путь детоксикации составляет более 35% всех лекарственных фаз II метаболической реакции (Zhu et al., 2015; Boer et al., 2016). У обоих людей и грызуны, два функциональных семейства UGT, UGT1 и UGT2, являются известно (Shiratani et al., 2008). Наши результаты показали, что несколько UGT ферменты опосредуют производство глюкуронирования бициклола и его два деметилированных метаболита с использованием анализа рекомбинантных человеческих UGT. UGT2B4, как основной фермент, участвующий в генерации М6, количественно подтверждено, что это наиболее выраженная изоформа у человеческой печени (Ohno, Nakajin, 2009), но не обнаруживается у крыс (Yang et al., 2017), что может дать некоторое объяснение относительно низкой генерации М6 у крыс по сравнению с людьми. Пока формирование М7 в основном опосредован через UGT1A9, за которым следует UGT1A8. UGT1A9, несмотря на наиболее распространенную изоформу UGT в почках человека, он слабо экспрессируется в печени человека (Ohno, Nakajin, 2009). Тогда как UGT1A9 у крыс не обнаруживался во всех тканях (Shelby et al., 2003). Что касается UGT1A8, напротив, был наиболее экспрессируемой изоформой у крыс (Shelby et al., 2003), в то время как в печени человека не обнаруживается (Оно и Накаджин, 2009). Таким образом можно частично объяснить, что М7 был самым высоким из всех глюкуронидных конъюгатов у крыс. Для М8 его производство было катализовано в основном UGT1A3, который слабо экспрессируется в печени человека, но имеет широкое распространение у крыс (Ohno, Nakajin, 2009; Shelby et al., 2003 г.). Учитывая, что печень является основным фактором глюкуронизации, глюкуронидный конъюгат бициклола считался главным образом опосредованным UGT2B4 в сочетании с UGT1A9 и 1A3 у человека. Безусловно, М6, М7 и М8 могут генерироваться в следовых количествах в различных тканях, такие как желудок, толстая кишка и желчные протоки из-за широкого распространения УГТ у человека (Tukey and Strassburg, 2000). Хотя большинство глюкуронидных конъюгатов лишены фармакологической активности, в некоторых сообщениях говорилось о фармакологических эффектах глюкуронидированного родителя, таких как морфин (Gong et al., 1991), дигоксин (Scholz and Schmitz, 1984), кверцетин (Day et al., 2000) и флавоноиды (Wong et al., 2009), Таким образом, биологическая активность М6 требует дальнейшего изучения, исследование из-за его избытка в системе кровообращения человека. В заключение, в этом исследовании мы впервые использовали *in vitro* и *in vivo* анализы для систематического исследования метаболических характеристик бициклола среди разных видов (рис. 8). Наши результаты показали 4- или 4'- метокси, 2'-карбинол и 2-карбометокси группа считались основные участки метаболизма бициклола. Ферменты, метаболизирующие множество лекарственных средств, такие как CYP и UGT, участвовали в O-деметилировании и глюкуронизации бициклола. Эти

результаты предоставят полезную информацию для прогнозирования или предотвращения потенциального метаболического взаимодействия (DDI) в клинике.

*Заявление о конкурирующих интересах*

Никто.

*Благодарности*

Работа поддержана Национальным агентством науки и технологий.

Крупный проект Китая (2018ZX09711001-002) и CAMS Innovation

Фонд медицинских наук (CIFMS № 2017-I2M-3-011).

## Ссылки:

1. Блейсделл, Дж., Моренвайзер, Х., Джексон, Дж., Фергюсон, С., Коултер, С., Чанас, Б., Си, Т., Ghanayem, В., Goldstein, J.A., 2002. Идентификация и функциональная характеристика новых потенциально дефектных аллелей человеческого CYP2C19. Фармакогенетика 12, 703–711.  
<https://doi.org/10.1097/00008571-200212000-00004>.
2. Бур, Дж., Янг-Шайм, Р., Ли, Ф., Боуман, К. Дж., Янг, Х., Ши, Дж. Г., Недза, Ф. М., Фритце, В., Галя, Л., Комбс, А.П., Елесварам, С., Даймонд, С., 2016. Роли UGT, P450, и кишечная микробиота в метаболизме эпакадостата у людей. Drug Metab. Dispos. 44, 1668–1674.  
<https://doi.org/10.1124/dmd.116.070680>.
3. Колдуэлл, Дж., 2011. Роль метаболизма лекарств в открытии и разработке лекарств. Pharm. Pharmacol. Commun. 2, 117–119. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158> 1996.tb00572.x.
4. Дэй, А.Дж., Бао, Ю., Морган, М.Р., Уильямсон, Г., 2000. Положение конъюгации кверцетина глюкуроноиды и влияние на биологическую активность. Free Radical Biol. Med. 29, 1234–1243.  
[https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(00\)00416-0](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(00)00416-0).
5. Гонг, К.Л., Хеднер, Т., Хеднер, Дж., Бьёркман, Р., Нордберг, Г., 1991. Антиноцицептивное средство и вентиляционные эффекты метаболитов морфина: морфин-6-глюкуроноид и морфин-3-глюкуроноид. Евро. J. Pharmacol. 193, 47–56. <https://doi.org/10.1016/> 0014-2999 (91) 90199-з.
6. Клозе, Т.С., Блейсделл, Дж. А., Гольдштейн, Дж. А., 1999. Генная структура CYP2C8 и внепеченочные распределение CYP2C человека. J. Biochem. Мол. Toxicol. 13, 289–295  
10.1002 / (sici) 1099-0461 (1999) 13: 6 <289 :: aid-jbt1> 3.0.co; 2-n.
7. Leise, M.D., Poterucha, J.J., Talwalkar, J.A, 2014. Поражение печени, вызванное лекарственными средствами. Mayo Clin. Proc. 89, 95–106.  
<https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2013.09.016>.
8. Ли, З., Чжан, Л., Юань, Ю., Ян, З., 2019. Идентификация метаболитов эвобрутиниба в гепатоциты крысы и человека с помощью жидкостной хроматографии сверхвысокого разрешения в сочетании с диодно-матричным детектором и тандемной масс-спектрометрией Q Exactive Orbitrap. Тест на наркотики. Анальный. 11, 129–139. <https://doi.org/10.1002/dta.2477>.
9. Лю, Г.Т., 2009. Бицикллол: новый препарат для лечения хронических вирусных гепатитов В и С. Med. Chem. 5, 29–43.  
<https://doi.org/10.2174/157340609787049316>.
10. Martignoni, M., Groothuis, G.M., de Kanter, R., 2006. Видовые различия между мышами, метаболизм, ингибирование и индукция лекарственного средства, опосредованный цитохромом CYP у крыс, собак, обезьян и человека Мнение эксперта. Drug Metab. Toxicol. 2, 875–894. <https://doi.org/10.1517/17425255.2.6.875>.
11. Ми, Дж., Чжао, М., Ян, С., Цзя, Ю., Ван, Ю., Ван, Б., Цзинь, Дж., Ван, Х., Сяо, К., Ху, Дж., Ли Ю., 2017. Идентификация изоферментов цитохрома P450, участвующих в метаболизме. Syl930, селективного агониста S1PR1, действующего как потенциальный терапевтический агент для аутоиммунных заболеваний. энцефалит. Drug Metab. Фармакокинет. 32, 53–60.  
<https://doi.org/10.1016/j.dmpk.2016.07.002>.
12. Неберт Д.В., Дальтон Т.П., 2006. Роль ферментов цитохрома P450 в эндогенном сигнальные пути и канцерогенез в окружающей среде. Nat. Rev. Cancer 6, 947–960. <https://doi.org/10.1038/nrc2015>.
13. Окура К., Кавагути Ю., Ватанабэ Ю., Масубучи Ю., Шинохара Ю., Хори Х., 2009. Гибкая структура цитохрома P450: беспорядочное связывание лиганда в CYP3A4 гемовый карман. Anticancer Res. 29, 935–942.  
<https://doi.org/10.1001/jama.2009.1212>.
14. Оно, С., Накаджин, С., 2009. Определение экспрессии мРНК UDP-глюкуронозилтрансфераз

человека. и приложение для локализации в различных тканях человека в реальном времени обратная транскриптаза-полимеразная цепная реакция. *Drug Metab. Dispos.* 37, 32–40.

<https://doi.org/10.1124/dmd.108.023598> .

15. Шольц, Х., Шмитц, В., 1984. Положительные инотропные эффекты дигитоксин- и дигоксин-глюкуронидов в препаратах изолированной желудочковой сердечной мышцы человека. *Basic Res. Кардиол.* 79 (Дополнение), 134–139.

[https://doi.org/10.1007/978-3-642-72376-6\\_18](https://doi.org/10.1007/978-3-642-72376-6_18) .

16. Шелби, М.К., Черрингтон, штат Нью-Джерси, Ванселл, Н.Р., Клаассен, К.Д., 2003. Экспрессия мРНК в тканях гена UDP-глюкуронозилтрансферазы крысы. *Drug Metab. Dispos.* 31, 326–333.

<https://doi.org/10.1124/dmd.31.3.326> .

17. Шен, Т., Лю, Ю., Шан, Дж., Се, К., Ли, Дж., Янь, М., Сюй, Дж., Ню, Дж., Лю, Дж., Уоткинс, П. Б., Айтал, Г.П., Андраде, Р.Дж., Доу, Х., Яо, Л., Льв, Ф., Ван, К., Ли, Ю., Чжоу, Х., Чжан, Ю., Цзун, П., Ван, Б., Цзоу, З., Ян, Д., Не, Й., Ли, Д., Ван, Й., Хань, Х., Чжуан, Х., Мао, Ю., Чен, С., 2019. Частота и этиология лекарственного поражения печени на Материковом Китае. *Гастроэнтерология* 156, 2230–2241. <https://doi.org/10.1053/j> .

*gastro.*2019.02.002.

18. Ширатани, Х., Катох, М., Накадзима, М., Йокои, Т., 2008. Видовые различия UDP-глюкуронозилтрансферазы активность у мышей и крыс. *Drug Metab. Dispos.* 36, 1745–1752.

<https://doi.org/10.1124/dmd.108.021469> .

19. Словак, Дж. Э., Мили, К., Суд, М. Х., 2017. Сравнительный метаболизм микофенолов кислоты путем конъюгации глюкуроновой кислоты и глюкозы в микросомах печени человека, собаки и кошки. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 40, 123–129. <https://doi.org/10.1111/jvp.12338> .

20. Тан, В., Чен, Х., Чжао, Дж., Ху, Дж., Ли, Ю., 2008а. Исследование кишечной абсорбции бициклол у крыс: активный отток и метаболизм как причины его плохой биодоступности. *J. Pharm. Фармацевтика. Sci.* 11, 97–105. <https://doi.org/10.18433/j3b88v>.

21. Тан, В., Ван, Б., Чжао, Дж., Шэн, Л., Ху, Дж., Ли, Ю., 2008б. Фармакокинетика бициклола у крыс с острой печеночной недостаточностью. *Xenobiotica* 38, 1399–1409. <https://doi.org/10.1080/00498250802460733>.

22. Тер Хайне, Р., Хиллебранд, М.Дж., Розинг, Х., ван Горп, Э.К., Малдер, Дж. У., Бейнен, Дж. Х., Huitema, A.D., 2009. Идентификация и профилирование циркулирующих метаболитов атазанавира, ингибитор протеазы ВИЧ. *Drug Metab. Dispos.* 37, 1826–1840.

<https://doi.org/10.1124/dmd.109.028258>

23. Tukey, R.H., Strassburg, C.P., 2000. UDP-глюкуронозилтрансферазы человека: метаболизм, выражение и болезнь. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40, 581–616.

<https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.40.1.581>

24. Винборн, Дж., Хейнс, Д., Керриган, С., 2018. Метаболизм дезоморфина in vitro. *Forensic Sci. Int.* 289, 140–149. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2018.05.017> .

25. Вонг, Ю.К., Чжан, Л., Линь, Г., Цзо, З., 2009. Взаимосвязь между структурой и активностью глюкуронозилтрансферазами человека. Мнение эксперта. Препарат, средство, медикамент. *Метаб. Toxicol.* 5, 1399–1419. <https://doi.org/10.1517/17425250903179300>

26. Ву, Х., Чжан, Q., Го, Дж., Цзя, Ю., Чжан, З., Чжао, М., Ян, Ю., Ван, Б., Ху, Дж., Шэн, Л., Ли Ю., 2017. Метаболизм F18, производного каланолида А, в печени человека. микросомы и цитозоль. *Передний. Pharmacol.* 8, 479. <https://doi.org/10.3389/fphar> . 2017.00479.

27. Ян, Н., Сан, Р., Ляо, Х., Аа, Дж., Ван, Г., 2017. УДФ-глюкуронозилтрансферазы (УГТ) и связанные с ними метаболические перекрестные переговоры с внутренним гомеостазом: систематический обзор изоферментов УГТ для точной медицины. *Pharmacol. Res.* 121, 169–183.

<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.05.001> .

28. Зангер, У.М., Шваб, М., 2013. Ферменты цитохрома P450 в метаболизме лекарств: регуляция экспрессии генов, активности ферментов и влияния генетической изменчивости. *Pharmacol. Ther.* 138, 103–141. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.12.007>.

29. Zhang, G., Sun, J., Капо, Y., Yuan, D., 2013. Получен метаболический профиль иризолидона у крыс. методом сверхвысокой производительности жидкостной хроматографии / квадрупольной времяпролетной масс-спектрометрии. *J. Chromatogr. B* 941, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb> . 2013.09.033.

30. Чжан В., Рамамурти Ю., Киликарслан Т., Нолти Х., Тиндейл Р. Ф., Селлерс Е. М., 2002. Ингибирование цитохромов P450 противогрибковыми производными имидазола. *Drug Metab. Dispos.* 30, 314–318. <https://doi.org/10.1124/dmd.30.3.314> .

31. Чжу, Л., Лу, Л., Цзэн, С., Ло, Ф., Дай, П., Ву, П., Ван, Ю., Лю, Л., Ху, М., Лю, З., 2015 г. UDP-глюкуронозилтрансферазы 1A6 и 1A9 являются основными изоферментами, ответственными за 7-О-глюкуронизацию эскулетина и 4-метилэскулетина в микросоме печени человека. *Drug Metab. Dispos.* 43, 977–983. <https://doi.org/10.1124/dmd.115.063552>.