

---

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

# Interacțiuni farmacocinetice ale carvedilolului cu inhibitorii izoenzimei CYP2D6

---

Doctorand **Maria-Bianca Abrudan**

---

Conducător de doctorat **Prof. Dr. Laurian Vlase**

---



**UMF**

UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

## CUPRINS

<b>INTRODUCERE</b>	15
<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b>	
<b>1. Interacțiuni medicamentoase – aspecte generale</b>	19
1.1. Interacțiuni farmaceutice	19
1.2. Interacțiuni farmacocinetice	20
1.2.1. Interacțiuni farmacocinetice la nivelul absorbției	20
1.2.2. Interacțiuni farmacocinetice la nivelul distribuției	20
1.2.3. Interacțiuni farmacocinetice la nivelul metabolismului	21
1.2.4. Interacțiuni farmacocinetice la nivelul eliminării	23
1.3. Interacțiuni farmacodinamice	23
<b>2. Interacțiuni medicamentoase farmacocinetice implicând enzimele citocromului P450</b>	25
2.1. Inhibiție enzimatică mediată de CYP2D6: caracterizare, substrat și inhibitori	26
2.1.1. Bupropiona, inhibitor CYP2D6	28
2.1.2. Sertralina, inhibitor CYP2D6	29
2.1.3. Citalopramul, inhibitor CYP2D6	31
2.1.4. Fluvoxamina, inhibitor CYP2D6	32
2.1.5. Paroxetina, inhibitor CYP2D6	33
<b>3. Carvedilolul, substrat CYP2D6</b>	37
3.1. Profil farmacologic, utilizări terapeutice și reacții adverse	37
3.2. Profil farmacocinetic	39
3.3. Interacțiuni farmacocinetice	40
<b>4. Metodologia de analiză farmacocinetică</b>	41
4.1. Analiză farmacocinetică non-compartimentală	41
4.2. Analiză farmacocinetică compartimentală	43
<b>CONTRIBUȚII PERSONALE</b>	
<b>1. Context/Obiective</b>	47
<b>2. Metodologie generală</b>	49
2.1. Studii de interacțiune medicamentoasă farmacocinetică: descrierea experimentelor <i>in vitro</i>	49
2.2. Studii de interacțiune medicamentoasă farmacocinetică: descrierea studiilor preclinice <i>in vivo</i>	51
2.3. Studii de interacțiune medicamentoasă farmacocinetică: descrierea studiilor clinice	56
<b>3. Studiul 1. Efectul inhibitor enzimatic al bupropionei asupra farmacocineticii carvedilolului <i>in vitro</i> și <i>in vivo</i> (șobolani)</b>	59
3.1. Introducere	59
3.2. Obiective	59
3.3. Materiale și Metode	60
3.3.1. Animale	60
3.3.2. Design-ul studiului	60
3.3.3. Analiză bioanalitică	60

3.3.4. Analiză farmacocinetică	61
3.3.5. Analiză statistică	61
3.4. Rezultate	62
3.4.1. Rezultate bioanalitice	62
3.4.2. Analiză farmacocinetică	65
3.4.3. Analiză statistică	69
3.5. Discuții	70
3.6. Concluzie	71
<b>4. Studiul 2. Efectul inhibitor enzimatic al sertralinei asupra farmacocineticii carvedilolului <i>in vitro</i>, <i>in vivo</i> (șobolani) și la pacienți</b>	73
4.1. Introducere	73
4.2. Obiective	74
4.3. Materiale și Metode	74
4.3.1. Subiecți	74
4.3.2. Design-ul studiului	74
4.3.3. Analiză bioanalitică	75
4.3.4. Analiză farmacocinetică	76
4.3.5. Analiză statistică	76
4.4. Rezultate	77
4.4.1. Rezultate bioanalitice	77
4.4.2. Analiză farmacocinetică	80
4.4.3. Analiză statistică	85
4.5. Discuții	86
4.6. Concluzie	88
<b>5. Studiul 3. Efectul inhibitor enzimatic al citalopramului asupra farmacocineticii carvedilolului <i>in vitro</i> și <i>in vivo</i> (șobolani)</b>	89
5.1. Introducere	89
5.2. Obiective	90
5.3. Materiale și Metode	90
5.3.1. Animale	90
5.3.2. Design-ul studiului	90
5.3.3. Analiză bioanalitică	91
5.3.4. Analiză farmacocinetică	91
5.3.5. Analiză statistică	92
5.4. Rezultate	92
5.4.1. Rezultate bioanalitice	92
5.4.2. Analiză farmacocinetică	96
5.4.3. Analiză statistică	99
5.5. Discuții	99
5.6. Concluzie	101
<b>6. Studiul 4. Efectul inhibitor enzimatic al fluvoxaminei asupra farmacocineticii carvedilolului <i>in vitro</i> și <i>in vivo</i> (șobolani)</b>	103
6.1. Introducere	103
6.2. Obiective	104
6.3. Materiale și Metode	104

6.3.1. Animale	104
6.3.2. Design-ul studiului	104
6.3.3. Analiză bioanalitică	105
6.3.4. Analiză farmacocinetică	105
6.3.5. Analiză statistică	106
6.4. Rezultate	106
6.4.1. Rezultate bioanalitice	106
6.4.2. Analiză farmacocinetică	110
6.4.3. Analiză statistică	113
6.5. Discuții	113
6.6. Concluzie	114
<b>7. Studiul 5. Efectul inhibitor enzimatic al paroxetinei asupra farmacocineticii carvedilolului <i>in vivo</i> (șobolani)</b>	115
7.1. Introducere	115
7.2. Obiective	116
7.3. Materiale și Metode	116
7.3.1. Animale	116
7.3.2. Design-ul studiului	116
7.3.3. Analiză bioanalitică	117
7.3.4. Analiză farmacocinetică	117
7.3.5. Analiză statistică	117
7.4. Rezultate	118
7.4.1. Rezultate bioanalitice	118
7.4.2. Analiză farmacocinetică	118
7.4.3. Analiză statistică	120
7.5. Discuții	120
7.6. Concluzie	121
<b>8. Discuții generale</b>	123
<b>9. Concluzii generale</b>	125
<b>10. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei</b>	127
<b>REFERINȚE</b>	129

## CUVINTE CHEIE

Carvedilol, interacțiuni medicamentoase farmacocinetice, inhibitor enzimatic, izoenzima CYP2D6, bupropionă, sertralină, citalopram, fluvoxamină, paroxetină, studiu *in vitro*, studiu *in vivo*, studio clinic, analiză farmacocinetică non-compartimentală, analiză statistică HPLC, MS, FLD.

## INTRODUCERE

În ultimii ani, bolile cronice tind să aibă o contribuție majoră la mortalitatea globală. Pe primul loc se situează bolile cardiovasculare, decesele fiind atribuite în cea mai mare parte afecțiunilor coronariene și accidentelor vasculare cerebrale. Majoritatea

bolilor cardiovasculare necesită o terapie combinată cu mai mulți agenți farmacologici, în special în situațiile când apar asociate și alte afecțiuni. Ca o consecință a polimedicației, riscul de reacții adverse și de interacțiuni medicamentoase crește.

O comobiditate frecvent întâlnită în cazul pacienților cardiovasculari este depresia, care afectează negativ evoluția bolilor asociate, scăzând calitatea vieții și crescând rata mortalității. Anumiți pacienți pot dezvolta și alte deficiențe funcționale atunci când o tulburare depresivă este asociată.

În contextul epidemiologic actual, relația deja existentă între bolile cardiovasculare și cele depresive, justifică importanța evaluării interacțiunilor medicamentoase studiate în această teză. Obiectivele acestei teze au fost de a investiga interacțiunile farmacocinetice care ar putea apărea între carvedilol și cinci inhibitori ai enzimei sale de metabolizare, CYP2D6, (bupropionă, sertralină, citalopram, fluvoxamină și paroxetină) *in vitro*, *in vivo* și prin studii clinice, de a evalua magnitudinea inhibiției și de a compara potența inhibitorilor studiați.

## STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Prima parte a tezei, intitulată *Stadiul actual al cunoașterii*, sintetizează cele mai recente și mai importante aspecte privind interacțiunile medicamentoase. Începând cu aspectele generale privind interacțiunile medicamentoase, focusul este apoi mutat pe interacțiunile farmacocinetice datorate enzimelor citocromului P450. În continuare, cei cinci inhibitori enzimatici evaluați au fost caracterizați din punct de vedere farmacologic și farmacocinetic. De asemenea, pentru fiecare inhibitor a fost prezentată o sinteză a interacțiunilor medicamentoase studiate și prezentate în literatura de specialitate. Într-o manieră similară, a fost caracterizat și substratul CYP2D6, carvedilol. La sfârșitul capitolului, a fost descrisă metodologia de analiză farmacocinetică.

## CONTRIBUȚII PERSONALE

Cea de-a doua parte a tezei, intitulată *Contribuții personale*, prezintă în detaliu cele cinci studii de interacțiune medicamentoasă farmacocinetică, mediate prin inhibiție enzimatică. Premisele pentru aceste studii de interacțiune sunt oferite de profilul farmacocinetic al medicamentelor alese, precum și de contextul clinic actual. Carvedilolul, un medicament  $\beta$ -blocant folosit pentru tratamentul bolilor cardiovasculare, este metabolizat de enzima CYP2D6. Prin urmare, interacțiunile medicamentoase dintre carvedilol și inhibitorii enzimei CYP2D6 sunt posibile, deoarece aceste substanțe pot fi recomandate împreună în prevenția sau terapia bolilor cardiovasculare asociate cu depresie sau alte tulburări depresive.

## METODOLOGIE GENERALĂ

Metodologia de analiză a fost similară pentru cele cinci studii, fiind descrisă în detaliu în această secțiune. Pentru studiile *in vitro*, au fost folosite două concentrații de

substrat (0,5 și 1  $\mu\text{M}$ ) și patru concentrații de inhibitor (0 , 0,1 , 0,75 și 1.5  $\mu\text{M}$ ) pentru fiecare inhibitor testat. Incubările s-au realizat la 37°C, fiecare eprubetă conținând 0,25 mg proteină microzomială/mL, un inhibitor, sistem regenerativ de NADPH, substrat și tampon Tris (pH 7,4). Incubările s-au terminat prin răcire pe gheață și adăugarea de acetone răcită la mixtura microzomială, la diferite intervale de timp.

Pentru studiile *in vivo*, un număr de 12 șobolani au fost incluși în fiecare studiu. Câte un studiu preclinic deschis, secvențial, conținând două perioade a fost condus pentru fiecare interacțiune medicamentoasă. În timpul perioadei de referință (I), fiecare șobolan a primit o doză orală de 3,57 mg/kg greutate corporală (corp) carvedilol. Pentru următoarele 3-5 zile, șobolanii au primit un tratament inhibitor conținând 21,42 mg/kg corp bupropionă, 7,14 mg/kg corp sertralină, 1,42 mg/kg corp citalopram, 14,28 mg/kg corp fluvoxamină sau 8,60 mg/kg corp paroxetină pe cale orală, de două ori pe zi, pentru a se obține concentrația de stare staționară. În perioada de test (II), 3,57 mg/kg corp carvedilol a fost administrat oral împreună cu unul din inhibitori. Probele de sânge au fost colectate în fiecare din cele două perioade de studiu (Referință și Test) la diferite intervale de timp.

Un studiu clinic deschis, secvențial (studiu pilot), conținând două perioade de studiu, a fost condus pentru interacțiunea dintre carvedilol și sertralină. Șapte pacienți cardiaci și depresivi au fost incluși în studiu. În perioada de referință (I), ziua 1, fiecare pacient a primit o doză orală de 12,5 mg carvedilol. Apoi, timp de șase zile, a primit un tratament inhibitor conținând 50 mg sertralină, oral, pentru a se atinge concentrația de stare staționară. În perioada de test (II), ziua 8, 12,5 mg carvedilol a fost administrat oral împreună cu o doză de sertralină (50 mg). Probe de sânge au fost prelevate la diferite intervale de timp, în fiecare perioadă de studiu.

**Primul studiu** de interacțiune farmacocinetică a evaluat efectul inhibitor enzimatic al bupropionei asupra farmacocineticii carvedilolului *in vitro* și *in vivo* (șobolani). Analiza datelor experimentale a demonstrat că tratamentul cu doze multiple de bupropionă alterează parametrii farmacocinetici ai carvedilolului într-o manieră semnificativă statistic. Spre exemplu, în cazul coadministrării bupropionei, concentrația plasmatică maximă ( $C_{\text{max}}$ ) a carvedilolului a fost de 1,40 ori mai mare, iar aria de sub curbă totală ( $\text{ASC}_{0-\infty}$ ) a fost de 2,80 ori mai mare comparativ cu administrarea carvedilolului singur. Aceste rezultate sugerează existența unei interacțiuni medicamentoase metabolice între cele două medicamente testate.

**Al doilea studiu** de interacțiune a urmărit *in vitro* interacțiunea carvedilolului cu sertralina și *in vivo*, respectiv printr-un studiu clinic pilot, cum modifică dozele multiple de sertralină farmacocinetica unei doze unice de carvedilol la șobolani și respectiv subiecți umani. O interacțiune puternică între cele două substanțe a fost observată în urma analizei datelor experimentale prin analiză farmacocinetică non-compartimentală. În studiul preclinic, toți parametrii evaluați, cu excepția timpului necesar pentru atingerea concentrației plasmatice, au fost modificați semnificativ statistic. Comparativ cu administrarea bupropionei, o interacțiune de magnitudine mai mare a fost obținută

după pretratamentul cu sertralină, când  $C_{max}$  a crescut de 2,50 ori, iar  $ASC_{0-\infty}$  de 7,73 ori. Rezultatele au demonstrat că această asociere a dus la creșterea concentrațiilor plasmatică pentru carvedilol și la scăderea eliminării pentru aceeași substanță. În schimb, rezultatele preliminare ale studiului clinic pilot nu au putut demonstra diferențe semnificative statistic între cele două perioade de studiu, chiar dacă schimbările observate la profilele plasmatică ale carvedilolului după coadministrarea de sertralină au fost conform așteptărilor pentru acest tip de interacțiune. Numărul mic de pacienți incluși în studiul pilot ar putea fi responsabili de lipsa semnificației statistice.

**Al treilea studiu** a evaluat interacțiunea farmacocinetică dintre carvedilol și citalopram *in vitro* și *in vivo* (șobolani). În ambele cazuri, farmacocinetica carvedilolului a fost modificată de pretratamentul cu doze multiple de citalopram. Majoritatea parametrilor farmacocinetici evaluați au fost modificați semnificativ statistic ( $p < 0,05$ ), consecutiv coadministrării de citalopram,  $C_{max}$  a crescut de 2,30 ori, iar  $ASC_{0-\infty}$  de 2,76 ori. Rezultatele experimentale au indicat o expunere mărită la carvedilol și un metabolism presistemic alterat pentru carvedilol, demonstrând existența unei interacțiuni medicamentoase farmacocinetice între carvedilol și citalopram.

**În cel de-al patrulea studiu** al părții experimentale, influența fluvoxaminei asupra farmacocineticii carvedilolului este prezentată *in vitro* și *in vivo* (șobolani). Dozele multiple de fluvoxamină au alterat metabolismul carvedilolului coadministrat, iar în consecință concentrațiile plasmatică de carvedilol au crescut. În plus, tot ca rezultat al acestei interacțiuni, eliminarea carvedilolului a fost întârziată. Parametrii farmacocinetici evaluați au fost modificați semnificativ statistic, spre exemplu  $C_{max}$  a crescut de 1,46 ori, iar  $ASC_{0-\infty}$  a crescut de 2,07 ori, consecutiv coadministrării de fluvoxamină. Aceste rezultate indică clar o interacțiune farmacocinetică la nivel metabolic între carvedilol și fluvoxamină.

**Al cincilea studiu** al acestei teze descrie o altă interacțiune farmacocinetică a carvedilolului, de această dată asocierea cu paroxetina a fost investigată doar *in vivo*, la șobolani. Efectul inhibitor enzimatic al paroxetinei asupra farmacocineticii carvedilolului a fost demonstrat de rezultatele experimentale, paroxetina fiind responsabilă de creșterea expunerii la carvedilol de 4,49 ori ( $ASC_{0-\infty}$ ) și doar de 1,72 ori în termeni de  $C_{max}$ . Analiza statistică a găsit diferențe semnificative statistic pentru cei mai importanți parametri farmacocinetici. O expunere crescută la carvedilol și o eliminare diminuată sugerează existența acestei interacțiuni medicamentoase farmacocinetice.

## DISCUȚII GENERALE

Rezultatele experimentale obținute în cele cinci studii de interacțiuni farmacocinetice ale carvedilolului cu cei cinci inhibitori enzimatici confirmă potența inhibitorilor, descrisă în literatura de specialitate. Fluvoxamina și citalopramul sunt cunoscuți ca fiind inhibitori slabi, aceste două interacțiuni având cea mai mică

magnitudine (pentru fluvoxamină, expunerea totală la carvedilol a crescut de 2,07 ori, în timp ce pentru citalopram creșterea a fost de 2,76 ori). Chiar dacă bupropiona este considerată un inhibitor moderat, experimentele au demonstrat o magnitudine similară cu cea a citalopramului (o expunere totală la carvedilol de 2,80 ori mai mare). În schimb, paroxetina asemenea unui inhibitor puternic, a crescut marcat nivelele de carvedilol de 4,49 ori. Sertralina, pe care literatura o descrie în mod uzual ca un inhibitor moderat, iar la doze crescute ca un inhibitor puternic, a avut cea mai mare potență în studiile preclinice (creșterea nivelelor de carvedilol fiind de 7,73 ori).

## CONCLUZII GENERALE

Toate experimentele *in vitro* au demonstrat alterarea metabolismului carvedilolului când inhibitorul enzimatic a fost coadministrat. În plus, studiile preclinice pe șobolani au demonstrat că pretratamentul cu inhibitor enzimatic a determinat creșterea expunerii la carvedilol în toate situațiile. Toate diferențele observate au fost semnificative statistic și în consecință toate interacțiunile studiate au fost demonstrate *in vitro* și *in vivo*. Obiectivele studiilor au fost îndeplinite cu succes și detaliate în această teză.

Toate cele cinci interacțiuni demonstrate au un mecanism comun: inhibiția enzimatică mediată de citocromul P450 izoenzima CYP2D6. Studiile efectuate sunt originale și au rolul de a completa profilul de siguranță existent atât pentru substrat cât și pentru inhibitorii evaluați în această teză, cu mențiunea că studii clinice suplimentare sunt necesare pentru a clarifica semnificația clinică a acestor interacțiuni medicamentoase farmacocinetice. Rezultatele ar putea aduce beneficii în practica clinică, fiind utile atât pentru pacienții care suferă de afecțiuni cardiovasculare, pentru cei care suferă de tulburări depresive, cât și pentru cei suferinzi de o combinație a celor două comorbidități.

## ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE TEZEI

Interacțiunile medicamentoase evaluate în această teză nu au fost studiate înainte. Primele patru studii sunt complet noi în literatura științifică de specialitate, iar rezultatele lor aduc informații valoroase pentru practica clinică, privind terapia cu aceste medicamente. În plus, studierea acestor interacțiuni aduce contribuții importante la profilele de siguranță, în special pentru carvedilol, dar și pentru inhibitorii enzimatici testați: bupropionă, sertralină, citalopram, fluvoxamină și paroxetină. În ceea ce privește interacțiunea carvedilolului cu paroxetina, un studiu clinic a fost publicat în 2010 de către Stout și colaboratorii, când datele experimentale au fost analizate folosind metodologia noncompartimentală de analiză farmacocinetică. Cu toate acestea, în studiul preclinic cuprins în această teză, un element de noutate a fost analiza compartimentală efectuată, folosind un model monocompartimental.

Studiile *in vitro* folosind microzomi hepatici de șobolan obținuți direct din ficat de șobolan sunt printre primele studii de acest tip efectuate în România, pentru a demonstra o interacțiune farmacocinetică la nivel enzimatic. Un alt aspect inovativ este aparatul de colectare automată a probelor de sânge (BASi Culex ABC® – BASi, Indiana,



USA) folosit în studiile preclinice. Acest echipament a fost folosit pentru prima dată într-un studiu preclinic de interacțiune medicamentoasă farmacocinetică în România. De asemenea, procedura chirurgicală de canulare a venei femurale stângi, efectuată înaintea includerii animalului în studiu este un element de noutate.

---

PhD THESIS SUMMARY

# Pharmacokinetic interactions between carvedilol and CYP2D6 enzyme inhibitors

---

PhD Student **Maria-Bianca Abrudan**

---

PhD Supervisor **Prof. Dr. Laurian Vlase**

---



**UMF**

UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
**IULIU HAȚIEGANU**  
CLUJ-NAPOCA

## TABLE OF CONTENTS

<b>INTRODUCTION</b>	15
<b>ACTUAL STATE OF KNOWLEDGE</b>	
<b>1. Drug-drug interactions – general considerations</b>	19
1.1. Pharmaceutical interactions	19
1.2. Pharmacokinetic interactions	20
1.2.1. Pharmacokinetic interactions at absorption level	20
1.2.2. Pharmacokinetic interactions at distribution level	20
1.2.3. Pharmacokinetic interactions at metabolic level	21
1.2.4. Pharmacokinetic interactions at elimination level	23
1.3. Pharmacodynamic interactions	23
<b>2. Pharmacokinetic drug-drug interactions involving cytochrome P450 enzymes</b>	25
2.1. Enzyme inhibition by CYP2D6: characterisation, substrates and inhibitors	26
2.1.1. Bupropion, a CYP2D6 inhibitor	28
2.1.2. Sertraline, a CYP2D6 inhibitor	29
2.1.3. Citalopram, a CYP2D6 inhibitor	31
2.1.4. Fluvoxamine, a CYP2D6 inhibitor	32
2.1.5. Paroxetine, a CYP2D6 inhibitor	33
<b>3. Carvedilol, a CYP2D6 substrate</b>	37
3.1. Pharmacological profile, therapeutic use and adverse reactions	37
3.2. Pharmacokinetic profile	39
3.3. Pharmacokinetic interactions	40
<b>4. Pharmacokinetic analysis methodology</b>	41
4.1. Pharmacokinetic non-compartmental analysis	41
4.2. Pharmacokinetic compartmental analysis	43
<b>PERSONAL CONTRIBUTION</b>	
<b>1. Background/Objectives</b>	47
<b>2. General methodology</b>	49
2.1. Pharmacokinetic drug-drug interaction studies: <i>in vitro</i> experiments description	49
2.2. Pharmacokinetic drug-drug interaction studies: <i>in vivo</i> preclinical studies description	51
2.3. Pharmacokinetic drug-drug interaction studies: clinical studies description	56
<b>3. Study 1. Inhibitory effect of bupropion on the pharmacokinetics of carvedilol <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> (rats)</b>	59
3.1. Introduction	59
3.2. Objectives	59
3.3. Materials and Methods	60
3.3.1. Animals	60
3.3.2. Study design	60
3.3.3. Bioanalytical analysis	60
3.3.4. Pharmacokinetic analysis	61

3.3.5. Statistical analysis	61
3.4. Results	62
3.4.1. Bioanalytical results	62
3.4.2. Pharmacokinetic analysis	65
3.4.3. Statistical analysis	69
3.5. Discussions	70
3.6. Conclusion	71
<b>4. Study 2. Inhibitory effect of sertraline on the pharmacokinetics of carvedilol <i>in vitro</i>, <i>in vivo</i> (rats) and in patients</b>	<b>73</b>
4.1. Introduction	73
4.2. Objectives	74
4.3. Materials and Methods	74
4.3.1. Subjects	74
4.3.2. Study design	74
4.3.3. Bioanalytical analysis	75
4.3.4. Pharmacokinetic analysis	76
4.3.5. Statistical analysis	76
4.4. Results	77
4.4.1. Bioanalytical results	77
4.4.2. Pharmacokinetic analysis	80
4.4.3. Statistical analysis	85
4.5. Discussions	86
4.6. Conclusion	88
<b>5. Study 3. Inhibitory effect of citalopram on the pharmacokinetics of carvedilol <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> (rats)</b>	<b>89</b>
5.1. Introduction	89
5.2. Objectives	90
5.3. Materials and Methods	90
5.3.1. Animals	90
5.3.2. Study design	90
5.3.3. Bioanalytical analysis	91
5.3.4. Pharmacokinetic analysis	91
5.3.5. Statistical analysis	92
5.4. Results	92
5.4.1. Bioanalytical results	92
5.4.2. Pharmacokinetic analysis	96
5.4.3. Statistical analysis	99
5.5. Discussions	99
5.6. Conclusion	101
<b>6. Study 4. Inhibitory effect of fluvoxamine on the pharmacokinetics of carvedilol <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> (rats)</b>	<b>103</b>
6.1. Introduction	103
6.2. Objectives	104
6.3. Materials and Methods	104
6.3.1. Animals	104
6.3.2. Study design	104
6.3.3. Bioanalytical analysis	105

6.3.4. Pharmacokinetic analysis	105
6.3.5. Statistical analysis	106
6.4. Results	106
6.4.1. Bioanalytical results	106
6.4.2. Pharmacokinetic analysis	110
6.4.3. Statistical analysis	113
6.5. Discussions	113
6.6. Conclusion	114
<b>7. Study 5. Inhibitory effect of paroxetine on the pharmacokinetics of carvedilol <i>in vivo</i> (rats)</b>	115
7.1. Introduction	115
7.2. Objectives	116
7.3. Materials and Methods	116
7.3.1. Animals	116
7.3.2. Study design	116
7.3.3. Bioanalytical analysis	117
7.3.4. Pharmacokinetic analysis	117
7.3.5. Statistical analysis	117
7.4. Results	118
7.4.1. Bioanalytical results	118
7.4.2. Pharmacokinetic analysis	118
7.4.3. Statistical analysis	120
7.5. Discussions	120
7.6. Conclusion	121
<b>8. General discussions</b>	123
<b>9. General conclusions</b>	125
<b>10. Originality and innovative contributions of the thesis</b>	127
<b>REFERENCES</b>	129

## KEYWORDS

Carvedilol, pharmacokinetic drug-drug interactions, enzyme inhibitor, CYP2D6 isoenzyme, bupropion, sertraline, citalopram, fluvoxamine, paroxetine, *in vitro* study, *in vivo* study, clinical study, pharmacokinetic non-compartmental analysis, statistical analysis, HPLC, MS, FLD.

## INTRODUCTION

Recently, the chronic diseases have become the major contributors to total global mortality. The cardiovascular diseases (CVDs) are occupying the first place worldwide, the CVD deaths being attributed mainly to coronary heart disease and stroke. Most of these affections require a combined treatment with more than a single agent, in particular when other conditions are associated. As a consequence of this polydrug use, the risk of adverse reactions and drug interactions increase.

Depression is a prevalent comorbid condition found in cardiovascular patients. It negatively affects the evolution of the CVDs by lowering the quality of life or increasing the mortality rates. Some patients may develop more functional impairments, when a depressive disorder is associated.

In the actual epidemiological context, the proven relation between the cardiovascular and the depressive disorders justifies the importance of studying the drug-drug interactions (DDI) evaluated in this PhD thesis. The objectives of this thesis were to investigate the pharmacokinetic interactions that might occur between carvedilol and five CYP2D6 enzyme inhibitors (bupropion, sertraline, citalopram, fluvoxamine and paroxetine) *in vitro*, *in vivo* and in patients, to assess the inhibition magnitude and to compare the inhibitors potency.

## **ACTUAL STATE OF KNOWLEDGE**

The first part of the PhD thesis, entitled *Actual state of knowledge*, synthetizes the most recent and the most important data regarding drug-drug interactions. Starting with general aspects regarding drug-drug interactions, the focus is then moved on pharmacokinetic interactions which involve cytochrome P450 enzymes. Further, the five enzyme inhibitors evaluated were pharmacological and pharmacokinetic characterized. A literature review of studied drug-drug interactions was presented for each inhibitor. Moreover, carvedilol, a CYP2D6 substrate, was characterized in the same manner previously mention for the inhibitors. At the end of this chapter, the pharmacokinetic analysis methodology is described.

## **PERSONAL CONTRIBUTION**

The second part, named *Personal contribution*, presents in detail the five pharmacokinetic DDI studies, mediated by enzyme inhibition. The premises for these interaction studies were given by the drugs pharmacokinetic profile and by the actual clinical context. Carvedilol, a  $\beta$ -blocking agent, used for the treatment of CVDs is metabolized by CYP2D6 enzyme. Therefore, drug-drug interaction between carvedilol and CYP2D6 enzyme inhibitors can be possible, since they might be recommended together for the prevention or treatment of cardiovascular diseases associated with depression or other depressive disorders.

## **GENERAL METHODOLOGY**

All the studies were performed following a similar methodology, clearly detailed in this section. For the *in vitro* studies, two substrate concentrations (0.5 and 1  $\mu$ M) and four inhibitor concentrations (0, 0.1, 0.75 and 1.5  $\mu$ M) were used for each inhibitor tested. Incubations were performed at 37°C, each tube containing 0.25 mg microsomal protein/mL, one inhibitor, a NADPH regenerating system, substrate and Tris buffer (pH

7.4). Incubations were terminated by cooling on ice and adding cold acetonitrile to microsome mixture, at different time points.

For the *in vivo* studies, a number of 12 rats completed each study. An open-label, sequential preclinical study, consisting in two periods, was conducted for each drug-drug interaction. During the Reference period (I), each rat received an oral dose of 3.57 mg/kg body weight (b.w.) carvedilol. For the following 3-5 days, the rats received an inhibitory treatment consisting of 21.42 mg/kg b.w. bupropion, 7.14 mg/kg b.w. sertraline, 1.42 mg/kg b.w. citalopram, 14.28 mg/kg b.w. fluvoxamine or 8.60 mg/kg b.w. paroxetine, orally, twice a day, in order to reach the steady-state concentration. In the Test period (II), 3.57 mg/kg b.w. carvedilol was orally coadministered with one inhibitor dose. Blood samples were collected during both periods of study (Reference and Test), at different time intervals.

An open-label, sequential clinical study (pilot study), consisting in two periods, was conducted for the drug-drug interaction between carvedilol and sertraline. Seven cardiac and depressive patients were enrolled. In the Reference period (I), day 1, each patient received an oral dose of 12.5 mg carvedilol. For the following 6 days, he received the inhibitory treatment consisting of 50 mg sertraline, orally, in order to reach the steady-state concentration. In the Test period (II), day 8, 12.5 mg carvedilol was orally coadministered with one sertraline dose. Blood samples were taken at different time intervals, in each study period.

**The first study** describes a pharmacokinetic drug-drug interaction evaluating the inhibitory effect of bupropion on the pharmacokinetics of carvedilol *in vitro* models and *in vivo* (in rats). The analysis of experimental data proved that multiple-dose treatment with bupropion altered the pharmacokinetic parameters of carvedilol in a statistical significant manner. For instance, in the case of bupropion coadministration, the mean peak plasma concentration of carvedilol ( $C_{max}$ ) was 1.40-fold higher and the total area under the curve ( $AUC_{0-\infty}$ ) was 2.80-fold higher compared with carvedilol administered alone. These results suggest a metabolic drug-drug interaction between the two tested drugs.

**The second interaction study** investigated *in vitro*, the drug-drug interaction between carvedilol and sertraline and *in vivo*/in a pilot trial, how multiple doses of sertraline changed the pharmacokinetics of a single-dose carvedilol in rats and in human subjects. After evaluating the experimental data through non-compartmental analysis method, a high magnitude interaction was proven between these drugs. In the preclinical trial, all tested pharmacokinetic parameters, except time to reach the maximum concentration, were statistical significant modified. Compared with bupropion co-administration, a bigger magnitude of the interaction was obtained for sertraline pre-treatment, when the increases were 2.50-fold for  $C_{max}$  and 7.73-fold for  $AUC_{0-\infty}$ . The results had shown this association led to higher plasma drug concentrations for carvedilol and also, a decreased elimination for the same substance. The preliminary results from the clinical pilot study were not able to show statistical significant

differences between the two periods of study, even though the changes in the plasma profiles of carvedilol consecutive sertraline administration were as expected for this type of interaction. The small number of patients included in this pilot study might be responsible for the lack of statistical significance.

**The third study** evaluated the pharmacokinetic interaction between carvedilol and citalopram *in vitro* and *in vivo* (in rats). In both cases, the pharmacokinetics of carvedilol was modified by a multiple-dose pre-treatment with citalopram. Most of the evaluated pharmacokinetic parameters were statistically significant ( $p < 0.05$ ) altered, after concomitant intake of citalopram,  $C_{max}$  increased by 2.30-fold, while for  $AUC_{0-\infty}$  the increase was 2.76-fold. The experimental results indicated an increased exposure to carvedilol and a presystemic metabolism of carvedilol affected, demonstrating the existence of a pharmacokinetic drug-drug interaction between carvedilol and citalopram.

**In the fourth study** of the experimental part, the influence of fluvoxamine upon carvedilol pharmacokinetics is presented *in vitro* models and *in vivo* (in rats). Multiple dose-regimen of fluvoxamine altered the metabolism of coadministered carvedilol, leading to increased plasma drug concentrations of carvedilol. Moreover, as a result of this interaction, carvedilol elimination was also decreased. The pharmacokinetic parameters evaluated were statistically significant modified, for instance  $C_{max}$  was greater by 1.46-fold and  $AUC_{0-\infty}$  greater by 2.07-fold, consecutive fluvoxamine co-administration. These results clearly indicate a pharmacokinetic drug-drug interaction at metabolic level between carvedilol and fluvoxamine.

**The fifth study** of this thesis describes another pharmacokinetic drug-drug interaction involving carvedilol, this time the association with paroxetine was investigated only *in vivo*, in rats. The inhibitory effect of paroxetine on the pharmacokinetics of carvedilol was proved by the experimental results; when paroxetine was responsible for a 4.49-fold increased exposure to carvedilol ( $AUC_{0-\infty}$ ), but only 1.72-fold increase in terms of  $C_{max}$ . Further, the analysis found statistically significant differences for the most important pharmacokinetic parameters. A higher exposure to carvedilol and a diminished elimination suggest the existence of this drug-drug interaction.

## GENERAL DISCUSSIONS

The experimental results obtained in the pharmacokinetic drug-drug interactions of carvedilol with five enzyme inhibitors confirm the inhibitors potency, stated in the scientific literature. Fluvoxamine and citalopram were acknowledged to be weak inhibitors, these two PK interactions had the smallest magnitude (for fluvoxamine, the total exposure to carvedilol increased by 2.07-fold, while for citalopram the increase was 2.76-fold). Even if bupropion is considered a moderate inhibitor, the experiments proved a similar magnitude with citalopram (a total exposure to carvedilol increased



by 2.80-fold). On the contrary, paroxetine as a potent inhibitor markedly augmented the levels of carvedilol by 4.49-fold. Sertraline, which the literature describes usually as a moderate, but at higher doses, as a potent inhibitor, had the biggest potency in the preclinical trials (augmentation by 7.73-fold of carvedilol's levels).

### **GENERAL CONCLUSIONS**

All the *in vitro* experiments proved an altered carvedilol metabolism when it was co-administered with enzyme inhibitor. Moreover, the preclinical studies in rats, demonstrated that inhibitor pre-treatment was able to increase the exposure to carvedilol in all of the situations. All the observed differences were statistically significant and in consequence all the studied interactions were demonstrated *in vitro* and *in vivo*. The objectives of the studies were successfully accomplished and detailed in this thesis.

All these five proved interactions have a common mechanism mediated by enzyme inhibition via cytochrome P-450 CYP2D6 enzyme. The investigations are original and have the aim to complement the existing safety profile of both substrate and inhibitors evaluated in this thesis, with the mention that additional clinical studies should be conducted to certify the clinical significance of all these pharmacokinetic drug-drug interactions. The results may have further implications for clinical therapeutics, being useful for the cardiovascular patients and for those who suffer from a depressive disorder, but also for those suffering from both of these two comorbidities.

### **ORIGINALITY AND INNOVATIVE CONTRIBUTIONS OF THE THESIS**

The drug-drug interactions evaluated in this thesis have not been studied before. The first four studies are completely new in the scientific literature and their results offer valuable information for the clinical therapy with these drugs. Moreover, their investigation brings an important contribution to the safety profile especially for carvedilol, but also for each of the evaluated enzyme inhibitors: bupropion, sertraline, citalopram, fluvoxamine and paroxetine. Regarding paroxetine interaction with carvedilol, a clinical study was published before in 2010 by Stout et al., when the data was analysed using non-compartmental methodology. However, in the preclinical study comprised in this thesis, a novelty fact was the compartmental analysis performed, using a mono-compartment model.

The *in vitro* studies using rat hepatic microsome systems obtained directly from rat liver are among the first studies of this type performed in Romania, to prove a pharmacokinetic interaction at the enzymatic level. Another innovative aspect is the automated blood collector (BASi Culex ABC® – BASi, Indiana, USA) used in the preclinical study. This equipment is used for the first time in pharmacokinetic drug-drug interaction studies involving animals in Romania. Also, the surgical procedure of cannulating the left femoral vein, which is performed before the study is a novelty element.