

# Comparative metabolism of warfarin and acenocoumarol: stereoselectivity in oxidative and reductive biotransformation routes

Citation for published version (APA):

Hermans, J. J. R. M. (1993). *Comparative metabolism of warfarin and acenocoumarol: stereoselectivity in oxidative and reductive biotransformation routes*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Rijksuniversiteit Limburg. <https://doi.org/10.26481/dis.19921217jh>

## Document status and date:

Published: 01/01/1993

## DOI:

[10.26481/dis.19921217jh](https://doi.org/10.26481/dis.19921217jh)

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

## CHAPTER 8:

### 8.1 SUMMARY

The fact that stereoisomers exert different effects in biology is well documented and is gaining more and more attention. Warfarin and acenocoumarol (4'-nitrowarfarin) are chiral drugs that are widely used as oral anticoagulants. In the discussion concerning chiral drugs in pharmacology, warfarin is an often cited example because of its well documented stereoselective pharmacokinetics, pharmacodynamics, and drug interactions. In this thesis, the stereochemical course of the pharmacokinetics and *in vitro* metabolism of warfarin has been compared with some of its phenyl ring substituted analogues. Special attention is given to acenocoumarol since it displays quite different pharmacokinetic properties than warfarin.

The pharmacokinetics of various warfarin analogues in rats is described in chapter 2. Phenyl ring substitution appeared to have a great impact on the pharmacokinetics and the stereochemistry thereof. The *S*-enantiomers of warfarin and its 4'- and 3'- substituted analogues were shown to be more tightly bound to plasma proteins than the *R*-enantiomers. The opposite was observed for the 2'-substituted analogues.

Phenyl ring substitution resulted in a higher intrinsic clearance than that of warfarin. Stereoselectivity of the intrinsic clearance was shown to depend on the position of the substituent: the intrinsic clearance of warfarin and its 3'- substituted analogues was higher for the *R*-enantiomers. In contrast, 2'- and 4'- substitution generally reversed this stereoselectivity.

In chapter 3, the rat liver microsomal metabolism of warfarin has been compared with that of acenocoumarol. The overall metabolism of warfarin was found to be stereoselective for the *R*-enantiomer, whereas that of acenocoumarol was shown to be stereoselective for the *S*-enantiomer. In addition, the total metabolic intrinsic clearances of *R*- and *S*-acenocoumarol greatly exceeded those of the enantiomers of warfarin, due to the lower  $K_m$  values of acenocoumarol towards monooxygenases. From experiments with the P450 inducers phenobarbitone and methylcholanthrene and the cytochrome P450 inhibitor cimetidine it appeared that the spectrum of isozymes involved in the metabolism of warfarin is different from that involved in the metabolism of acenocoumarol. Experiments with antibodies raised against P450 isozymes of the 2C and 3A subfamilies showed that these P450s are probably involved in the metabolism of both compounds. However, their stereo- and regioselectivity, differ greatly for warfarin and acenocoumarol.

To investigate whether similar metabolic differences between warfarin and acenocoumarol are also observed in humans, their human liver microsomal metabolism has been compared in chapter 4. The overall metabolism of both compounds was stereoselective for the *S*-enantiomer, but this stereoselectivity was far more pronounced for acenocoumarol. In addition, the total intrinsic clearances of the enantiomers of acenocoumarol greatly exceeded those of *R*- and *S*-warfarin. As in rats, this was mainly due to the lower  $K_m$  values of

acenocoumarol towards the metabolizing enzymes. From experiments with P450 inhibitors, and from the lack of a correlation between the formation rates of warfarin and acenocoumarol metabolites it was concluded that, as in rats, the (stereochemical) differences in the kinetics between warfarin and acenocoumarol are at least in part attributable to the fact that the metabolism of these compounds is carried out by different combinations of P450 isozymes. This suggests that the phenyl ring of warfarin is involved in the interaction with P450 binding sites and that ring substituted warfarin analogues may discriminate for particular P450 isozymes.

Another metabolic route of warfarin analogues, reduction of the acetyl side chain to the diastereomeric alcohols is described in chapters 5 and 6. The ketone reduction of warfarin, and its 4'-nitro, and 4'-chloro analogues was investigated in microsomal and cytosolic fractions of various species (chapter 5). Ketone reduction occurred in both subcellular fractions and was shown to be NADPH dependent. In microsomes, large differences between species, as well as between the warfarin analogues were observed in alcohol formation rates and in substrate- and product stereoselectivity. No general pattern was evident. In cytosolic fractions, a general pattern of substrate- and product stereoselectivity was observed: the R-enantiomers were preferred as a substrate and the alcohols formed were mainly in the S-configuration. Contrary to the microsomal reductase activity, the cytosolic reductase activity in the rat was induced by phenobarbitone and methylcholanthrene. In cytosolic fractions, acenocoumarol was generally a better substrate than 4'-chlorowarfarin which in its turn was a better substrate than warfarin.

In chapter 6, the rabbit liver cytosolic warfarin reductase has been partially purified and characterized. DEAE-Sephacel chromatography revealed that at least two enzymes (fractions A and B) possess warfarin ketone reductase activity. Both enzymes showed similar substrate- (for the R-enantiomers) as well as product stereoselectivity (formation of the S-alcohols) but were differently influenced by 4'-substitution in their kinetics. 4'-Substitution predominantly affected the  $K_m$  values for fraction A, whereas for fraction B  $V_{max}$  values were affected. NADPH was the preferred cofactor, which was absolute for fraction B. Both fractions were able to reduce carbonyl groups from a variety of compounds, including prostaglandin E2 and steroids, but fraction A showed a broader substrate spectrum and was e.g. also able to reduce the quinone menadione. Both fractions were inhibited by the flavonoid quercetin, but not by sodium-barbitone.

Finally, in chapter 7, the results of this thesis, the value of enantiomers in biomedical science, and some considerations concerning the use of enantiomerically pure or racemic drugs will be discussed.

The experiments described in this PhD thesis show that the different effects of enantiomers in biological systems is not only due to the distinct 3-dimensional structure of the enantiomers, but also to the multiplicity of biomolecules with which they can (or cannot) interact.

## 8.2 SAMENVATTING

Het feit dat stereoisomeren verschillende effecten vertonen in biologische systemen kent vele voorbeelden en begint steeds meer aandacht te krijgen. Warfarine en acenocoumarol (4'-nitrowarfarine) zijn chirale verbindingen die algemeen worden toegepast als orale anticoagulantia. Ten aanzien van de rol van chirale verbindingen in de farmacologie wordt warfarine vaak genoemd als voorbeeld omdat hiervan de stereochemische aspecten in de farmacokinetiek, farmacodynamiek, alsook in interacties met andere farmaca uitgebreid zijn beschreven. In dit proefschrift wordt de stereoselectiviteit van de farmacokinetiek en van het in vitro metabolisme van warfarine en enkele phenyl ring gesubstitueerde warfarine analoga met elkaar vergeleken. Hierbij wordt extra aandacht geschonken aan acenocoumarol omdat dit geneesmiddel farmacokinetisch gezien vrij sterk van warfarine verschilt.

De farmacokinetiek van enkele warfarine analoga in de rat wordt beschreven in hoofdstuk 2. Substitutie aan de phenyl ring bleek sterke effecten te hebben op de farmacokinetiek en de stereoselectiviteit hiervan. Zo bleken b.v. de S-enantiomeren van warfarine en diens 3'- en 4'- gesubstitueerde analoga sterker aan plasma eiwitten gebonden te zijn dan de R-enantiomeren. Voor de 2'- gesubstitueerde warfarine analoga bleek echter het omgekeerde het geval te zijn.

Phenyl ring substitutie leidde in alle gevallen tot een verhoging van de intrinsieke klaring. De stereoselectiviteit van de intrinsieke klaring bleek af te hangen van de positie van de substituent. De intrinsieke klaring van warfarine en zijn 3'- gesubstitueerde analoga was hoger voor de R-enantiomeren. Daarentegen bleken 2'- en 4'- substitutie i.h.a. te leiden tot een hogere intrinsieke klaring van de S-enantiomeren.

In hoofdstuk 3 wordt het rattelever microsomaal metabolisme van warfarine vergeleken met dat van acenocoumarol. De totale metabole intrinsieke klaring van warfarine bleek hoger voor de R-enantiomeer te zijn, terwijl in het geval van acenocoumarol juist de S-enantiomeer het snelst gemetaboliseerd werd. Bovendien bleek dat de intrinsieke klaring van R- en S-acenocoumarol veel hoger was dan de intrinsieke klaring van beide warfarine enantiomeren. Dit bleek met name te wijten aan de lagere  $K_m$  waarden die acenocoumarol heeft t.o.v. het monooxygenase systeem. Experimenten met de cytochroom P450 inducers phenobarbital en methylcholanthreen en de P450 inhibitor cimetidine duiden erop dat het spectrum van isoenzymen dat betrokken is bij het metabolisme van acenocoumarol verschilt van dat van warfarine. Uit experimenten met antilichamen, opgewekt tegen P450's van de 3A en 2C subfamilies, bleek dat deze P450's waarschijnlijk betrokken zijn bij het metabolisme van beide stoffen. Echter, hun stereo- en regioselectiviteit en hun relatieve bijdrage aan de totale metabole klaring bleek te verschillen voor warfarine en acenocoumarol.

Om te onderzoeken of dergelijke metabole verschillen tussen warfarine en acenocoumarol ook in de mens waargenomen worden, werd hun metabolisme in humane lever microsomen met elkaar vergeleken. Het totale metabolisme bleek voor beide stoffen stereoselectief te zijn voor de S-enantiomeer, maar deze stereoselectiviteit was veel sterker in het geval van

acenocoumarol. Ook bleek, net als in de rat, de totale intrinsieke klaring van de acenocoumarol enantiomeren veel groter te zijn dan in het geval van R- en S-warfarine. Ook nu weer was dit te wijten aan de lagere  $K_m$  waarden van acenocoumarol t.o.v. de metaboliserende enzymen. Uit experimenten met P450 inhibitoren, en uit het gebrek aan correlatie tussen de vormingssnelheden van de metabolieten van warfarine en acenocoumarol werd geconcludeerd dat de kinetische verschillen tussen de warfarine analoga in ieder geval deels zijn terug te voeren op het feit dat verschillende combinaties van isoenzymen deze stoffen metaboliseren. Hieruit blijkt dat de phenyl ring van warfarine betrokken is bij de interactie met P450 bindingsplaatsen en dat phenyl ring gesubstitueerde warfarine analoga onderscheid kunnen maken tussen bepaalde P450 isoenzymen.

Een andere metabole route van warfarine analoga is de reductie van de acetonyl zijketen waarbij diastereomere alcoholen worden gevormd. De keton reductie van warfarine, en diens 4'-nitro en 4'-chloro analoga door (lever) microsomale en cytosolaire fracties van verschillende species werd bestudeerd in hoofdstuk 5. Deze reactie werd door beide subcellulaire fracties uitgevoerd en bleek NADPH afhankelijk te zijn. In microsomen werden grote verschillen tussen de species en de warfarine analoga waargenomen wat betreft reactie snelheden alsook substraat- en product stereoselectiviteit. Een algemeen patroon werd niet waargenomen. In cytosol fracties werd er echter wel een algemeen patroon van substraat- en product stereoselectiviteit waargenomen: de R-enantiomeren werden geprefereerd als substraat en de gevormde alcoholen bleken vooral in de S-configuratie te zijn. De cytosolaire keton reductase activiteit bleek, in tegenstelling tot de microsomale keton reductase activiteit, in de rat geïnduceerd te worden door phenobarbital en methylcholanthreen. Voorts bleek dat in de cytosolaire fracties acenocoumarol een beter substraat was dan 4'-chlorowarfarine, dat op haar beurt weer een beter substraat was dan warfarine.

In hoofdstuk 6 wordt de partiële zuivering en karakterisering beschreven van lever cytosolaire enzymen uit het konijn die de keton groep van warfarine kunnen reduceren. Uit DEAE Sephacel chromatografie bleek dat deze reactie door minstens twee enzymen wordt gecatalyseerd (fractie A en B). Beide fracties vertoonden een zelfde substraat- (voor de R-enantiomeren) en product (vorming van vooral de S-alcoholen) stereoselectiviteit maar substitutie van de 4'-groep van warfarine had voor beide fracties verschillende effecten op de enzym kinetiek. In het geval van fractie A bleek 4'-substitutie met name effect te hebben op de  $K_m$  van het warfarine analogon, terwijl in het geval van fractie B met name de  $V_{max}$  beïnvloed werd. Beide fracties waren in staat carbonyl groepen van verschillende stoffen (waaronder prostaglandine E2 en steroiden) te reduceren maar de substraat specificiteit bleek het breedst voor fractie A. Deze fractie kon b.v. ook het chinon menadion reduceren. Het flavonoid quercetine was een inhibitor van beide enzym fracties, terwijl natrium barbital geen effect had.

In hoofdstuk 7 tenslotte, worden de resultaten van dit proefschrift, het nut van enantiomeren als gereedschap in de biomedische wetenschappen, en enige overwegingen ten aanzien van het gebruik van racemische of zuiver enantiomere geneesmiddelen bediscussieerd.

De experimenten die in dit proefschrift beschreven worden, laten zien dat de verschillen die waargenomen worden in de biologische effecten van enantiomeren niet alleen terug te voeren zijn op de verschillende 3-dimensionale structuur van de enantiomeren, maar ook op de veelheid van biomoleculen waarmee enantiomeren al dan niet een interactie aangaan.