Marcrolide계 항생제의 Cytochrome P450 3A4에 대한 인체 간 Microsome을 이용한 in Vitro 억제효과

왈레스 기념 침례병원 소아과¹, 가천의과대학교 약리학과²

이동일,¹ 이태호,¹ 김경아,² 변순옥,¹ 박지영²

=Abstract=

Inhibitory Effects of Macrolide Antibiotics on Cytochrome P450 3A4 by Human Liver Microsomes

Dong-il Lee, M.D.¹, Tae-Ho Lee, MD.¹, Kyoung-Ah Kim, Ph.D.², Soon-Ok Byun, M.D.¹,
Ji-Young Park, M.D, Ph.D.²

Department of Pediatrics, Wallace Memorial Baptist Hospital¹, Busan;

Department of Pharmacology, Gachon Medical School², Incheon, Korea

Background & Objectives : Macrolide antibiotics have been reported to cause several drug interactions with co-administered drugs clinically. However, there is no clear demonstration to reveal the relative potential to cause drug interaction. Therefore we investigated and compared the inhibitory effects of macrolide antibiotics on cytochrome P450 3A4 (CYP3A4)-catalyzed reactions using human liver microsomes.

Methods : Macrolide antibiotics including azithromycin, clarithromycin, dirithromycin, erythromycin, and troleandomycin was co-incubated with midazolam or testosterone, probe substrates of CYP3A4, in human liver microsomes, respectively. Metabolic activities of midazolam 1-hydroxylation and testosterone 6 β -hydroxylation were determined using high-performance liquid chromatography and inhibitory effects of macrolide antibiotics were determined by the calculation of IC₅₀ (the concentration of inhibitor representing 50% inhibitory potency) values by nonlinear regression method.

Results : Among macrolide antibiotics tested, troleandomycin inhibited midazolam 1-hydroxylation and testosterone 6 β -hydroxylation potently with IC₅₀ values of 52.3 and 65.9 μ M, respectively. Clarithromycin and erythromycin showed moderate and similar inhibitory potency on both CYP3A4-catalyzed reactions. However, azithromycin and dirithromycin showed little inhibitory effects on CYP3A4-catalyzed midazolam 1-hydroxylation and testosterone 6 β -hydroxylation.

Conclusions : Dirithromycin and azithromycin showed little inhibitory effects on CYP3A4-catalyzed reactions. However, other macrolide antibiotics including troleandomycin, clarithromycin, and erythromycin caused significant inhibitory effects, thereby it should be cautious to co-medicated these drugs with other CYP3A4 substrates that have a narrow therapeutic range or concentration-dependent toxicity.

KeyWords : Macrolide antibiotics · Azithromycin · Clarithromycin · Dirithromycin · Erythromycin · Troleandomycin · Cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) · Drug interactions.

교신저자 : 박 지 영

소 속 : 가천의과대학교 약리학과

주 소 : 인천시 남동구 구월동 1198번지 (우편번호: 405-760)

전화번호 : 032) 460-2151 팩스 : 032) 422-5105 E-mail : jypark@gachon.ac.kr

서 론

Azithromycin, clarithromycin, 및 erythromycin 등과 같은 macrolide계 항생제는 지역사회 감염 질환 (community-acquired infection)의 치료에 널리 사용되어 왔으며 특히 azithromycin의 경우 최근에는 *Mycobacterium avium*의 예방 치료에 단독요법으로 효과가 있는 것으로 알려져 있는 등 지난 수십년간 매우 안전한 항생제중의 하나로 널리 사용되어 왔다¹⁾. 하지만 이러한 광범위한 macrolide계 항생제의 사용 증가와 함께 꾸준히 다른 병용 투여 약물과의 상호작용으로 약물 부작용이 꾸준히 보고 되고 있는 실정이다. 예를 들어 erythromycin의 경우 인체에 terfenadine과 병용 투여시 심각한 심장 부작용 (cardiotoxicity)를 일으키는 것으로 알려져 있다^{2,3)}. Honig 등(1994)에 의하면 terfenadine의 혈중 약물 농도는 단독으로 투여(7일간 하루 2회 60 mg)시 혈중에서 광범위한 대사로 인하여 검출한계에서의 농도측정이 불가능할 정도로 낮으나 erythromycin을 투여할 경우 현저히 증가하는 것으로 알려져 있다⁴⁾. 이러한 결과는 macrolide계 항생제에 의한 terfenadine의 대사가 억제에 의한 것이라고 밝혀졌다⁵⁾. 뿐만 아니라 macrolide 항생제와 고지혈증 치료제인 statin계열 약물과의 상호작용으로 인한 횡문근 용해증(rhabdomyolysis) 등의 심각한 부작용이 보고되고 있다⁶⁻¹⁰⁾.

이러한 약물상호작용은 기질약물에 대해 macrolide 항생제의 cytochrome P450 (CYP) 3A4에 대한 억제작용 기인한 것으로 알려져 있다.¹¹⁻¹³⁾ Cytochrome P450 약물대사효소는 많은 내인성 및 외인성 물질들의 산화 등을 통한 약물대사에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.^{14,15)}

이러한 macrolide계 항생제의 CYP3A4에 대한 억제작용은 잘 알려진 주지의 사실이지만¹⁶⁾ 각각의 macrolide계 항생제들의 CYP3A4에 대한 억제작용의 정도(potency)에 대해서는 잘 알려져 있지 않은

실정이다. 예를 들어 CYP3A4에 의해 대사되어지는 carbamazepine의 경우 erythromycin과 병용투여시 약 20%정도의 경구청소율(oral clearance)이 감소하는 것으로 알려져 있지만 azithromycin과 병용투여시 약동학적 특성에 변화를 주지 않는 것으로 알려져 있어 각각의 macrolide계 항생제들이 CYP3A4에 대한 억제 정도가 다를 수 있다.¹⁷⁾ 많은 임상적 연구 및 증례보고를 통해 macrolide계 항생제의 CYP3A4에 대한 억제가능성에 대한 가능성이 제시되고 있지만 이들 항생제의 CYP3A4 기질약물들에 대한 상대적 억제 정도에 대해서는 잘 알려져 있지 않다^{16,17)}.

본 연구에서는 macrolide계 항생제로 널리 사용되고 있는 azithromycin, clarithromycin, erythromycin, dirithromycin, 및 troleandomycin 등이 in vitro 약물대사 연구에서 CYP3A4 기질약물로 널리 사용되고 있는 midazolam 및 testosterone에 대하여 이들 항생제의 억제 작용 유무 및 억제 정도를 인체 간 microsomes을 사용하여 밝히고자 하였다.

방 법

1. 시약 및 인체 간 microsomes

Azithromycin, clarithromycin, erythromycin, dirithromycin, troleandomycin 등은 Sigma-Aldrich 사(St. Louis, USA)로부터 구입하여 사용하였다. Midazolam, 1-hydroxymidazolam, testosterone, 및 6 β -hydroxytestosterone은 Ultrafine Chemicals 사(Manchester, UK)로부터 구입하였다. 증류수(deionized water), methanol, 및 acetonitrile은 HPLC (High-performance liquid chromatography) grade를 사용하였다. Pooled human liver microsomes는 Gentest 사 (Woburn, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

2. 인체간 microsomes을 이용한 CYP3 동효소 활성도 평가

Azithromycin, clarithromycin, erythromycin, dirithromycin, 및 troleandomycin 등의 macrolide계 약물들의 CYP3A4에 대한 억제 효과를 평가하기 위해 CYP3A4에 대해 지표약물(probe drug)로 사용되고 있는 midazolam 1-hydroxylation 및 testosterone 6 β -hydroxylation의 대사 과정에 대한 억제 유무 및 억제 정도를 평가하였다.¹⁸⁻²⁰⁾ 본 연구에서 억제제로서 사용된 macrolide계 항생제들은 methanol에 녹여 10 mM stock solution 형태로 만들어 -70 °C에 보관하여 사용하였으며 각각 최종 농도가 1-100 μ M이 되도록 반응액(mixture)에 첨가하여 사용하였다. 각 CYP3A4에 대한 활성도는 midazolam 및 testosterone으로부터 각각 생성되는 대사산물인 1-hydroxymidazolam과 6 β -hydroxytestosterone의 생성량을 단위 microsome에 대한 단백질 농도(mg)에서 단위 반응시간(분)당 생성되는 양을 기준으로 나타내었다. 본 연구에서 CYP3A4에 대한 기질약물로 사용된 midazolam과 testosterone의 농도는 억제효과 평가시 사용할 microsome에서의 대사능을 평가하였을 때 얻어진 평균 *K_m* 값을 기준으로 하여 정하였다.

모든 *in vitro* incubation 실험은 triplicate로 시행하였으며 평균값을 사용하였다. 대사반응을 위한 incubation 혼합액(mixture)은 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4), 5 mM MgCl₂, 및 NADPH-regenerating system (0.5 mM NADP, 5 mM glucose-6-phosphate, 및 1 unit/ml glucose-6-phosphate dehydrogenase)와 함께 pooled human liver microsome은 최종 농도가 0.5 mg/ml이 되게 사용하였다. 억제제로 사용된 각각의 macrolide계 항생제와 incubation 혼합액을 첨가하여 5 분간 preincubation시킨 후 각각의 CYP에 대한 기질약물을 첨가함으로써 반응을 시작하였다. Midazolam 1-hydroxylation의 경우 25 μ M의 midazolam을 30분 동안 반응시켰고

Testosterone 6 β -hydroxylation의 50 μ M의 testosterone을 15분간 반응시켰다.

3. HPLC를 이용한 약물 농도 분석

지표약물로 사용한 midazolam과 testosterone의 대사산물은 측정 농도분석은 HPLC (Shiseido사 Nanospace SI-1 model 2001 pump, model 2023 injector, SI-1 model 2002 UV검출기, 및 model 2004 column oven)을 사용하여 측정하였다.

Midazolam을 기질 약물로 사용했을 경우의 대사 물질인 1-hydroxymidazolam의 농도는 Shiseido사 (Tokyo, Japan)의 Capcell Pak C₁₈ column (1.5 $\times$ 250 mm, particle size 5 μ m)을 이용하였다. Flow rate는 150 μ l/min로 하였으며 245 nm 파장의 UV 검출기에서 분석하였다. 이때 ketoconazole을 내부 표준물질로 사용하였으며, 이동상의 조성은 0.4 M acetate buffer (pH 4.0) : methanol : CH₃CN (550 : 48 : 402, vol/vol)이었다. Testosterone을 기질약물로 사용한 경우 대사 물질인 6 β -hydroxytestosterone의 농도는 Shiseido사 (Tokyo, Japan)의 Capcell Pak C₁₈ column (1.5 $\times$ 250 mm, particle size 5 μ m)을 이용하였다. Flow rate는 180 μ l/min로 하였으며 248 nm 파장의 UV 검출기에서 분석하였다. 이때 내부 표준물질로 midazolam을 사용하였으며, 이동상의 조성은 0.4 M acetate buffer (pH 4.0) : methanol : CH₃CN (560 : 50 : 390, vol/vol)이었다.

모든 샘플들은 반응이 끝나고 4 °C에서 15000 g로 10분간 원심 분리하여 얻은 상층액 일부를 취하여 HPLC 시스템에 직접 주입하였다.

4. 효소역학 경수 산출 및 평가

각 CYP 동효소에 대한 macrolide계 항생제의 억제 정도를 나타내는 경수인 IC₅₀ 값은 WinNonlin[®] (Version 2.0, Scientific Consulting, Inc., Apex, NC,

Table 1. Inhibitory potential (IC_{50} , μM) of macrolide antibiotics on CYP3A4-catalyzed midazolam 1-hydroxylation and testosterone 6 β -hydroxylation in human liver microsomes, respectively.

Inhibitor	Midazolam 1-hydroxylation	Testosterone 6 β -hydroxylation
Azithromycin	>1000	> 1000
Clarithromycin	124.5 $\pm$ 42.4	192.5 $\pm$ 45.3
Dirithromycin	>1000	> 1000
Erythromycin	90.8 $\pm$ 10.1	132.3 $\pm$ 48.3
Troleandomycin	52.3 $\pm$ 7.4	65.9 $\pm$ 18.4

Values are derived from nonlinear regression analysis based on the co-incubation of the midazolam and testosterone with various concentrations of macrolide antibiotics including azithromycin, clarithromycin, dirithromycin, erythromycin, and troleandomycin, respectively, (see the materials and methods for details).

Fig. 2. Inhibitory effect of macrolide antibiotics on CYP3A4-catalyzed testosterone 6 β -hydroxylation in pooled human liver microsomes.

Macrolide antibiotics including azithromycin, clarithromycin, dirithromycin, erythromycin, and troleandomycin were incubated using conditions described under materials and methods. Testosterone (50 μ M) was used at concentrations around their corresponding K_m values. Each data point represents an average of triplicates.

USA) 프로그램을 이용하여 비선형 회귀분석법 (nonlinear regression analysis)을 이용하여 산출하였다.

결 과

본 연구에서는 macrolide계 항생제인 azithromycin, clarithromycin, dirithromycin, erythromycin, 및 troleandomycin의 CYP3A4의 대사능에 대한 억제 유무 및 정도를 이에 대한 지표 약물인 midazolam 및 testosterone을 인체 간 microsomes와 함께 반응시킨 *in vitro* 실험을 통해 이들 약물들의 각각의 CYP 동효소에 대한 상대적 억제 정도를 관찰하였다.

본 연구에서 얻어진 각각의 CYP에 대한 지표 약물의 대사물의 생성 속도(mean $\pm$ S.D., n=6)는 midazolam의 경우 69.1 $\pm$ 4.9 pmol/min/mg protein이었으며, testosterone의 경우 11.2 $\pm$ 2.6 pmol/min/mg

protein이었다. Midazolam을 기질약물로 사용한 경우 troleandomycin이 가장 강한 억제작용을보였으며(IC₅₀; 52.3 $\pm$ 7.4 μ M), erythromycin, clarithromycin은 약한 억제작용을 나타내었다(IC₅₀s; 90.8 $\pm$ 10.1 and 124.5 $\pm$ 42.4 μ M, respectively). 그러나 azithromycin과 dirithromycin의 경우 억제작용이 거의 관찰되지 않았다(IC₅₀>1mM; Table 1 및 Fig. 1). Testosterone을 기질로 사용한 경우 midazolam을 기질약물로 사용한 경우와 유사하게 troleandomycin에 의해서 가장 강한 작용이 나타났으며(IC₅₀; 65.9 $\pm$ 18.4 μ M), azithromycin 및 dirithromycin에 의

Fig. 1. Inhibitory effects of macrolide antibiotics on CYP3A4-catalyzed midazolam 1-hydroxylation in pooled human liver microsomes.

Macrolide antibiotics including azithromycin, clarithromycin, dirithromycin, erythromycin, and troleandomycin were incubated using conditions described under materials and methods. Midazolam (25 μ M) was used at concentrations around their corresponding K_m values. Each data point represents an average of triplicates.

해서는 억제작용이 관찰되지 않았다($IC_{50} > 1mM$; Table 1 및 Fig. 2).

고 찰

다양한 종류의 macrolide계 항생제가 임상적으로 사용되고 있으며 이들 macrolide계 항생제들은 약물 대사 효소중의 하나인 CYP3A4 대사효소와 결합하여 cytochrome P450 대사효소의 작용을 억제하는 것으로 알려져 있다. 이들 약물들은 많은 CYP3A4 약물대사효소에 대하여 기질 특이성을 가진 약물들과 상호작용을 일으킴으로써 약물 이상반응을 초래하는 것으로 알려져 있으나 macrolide 계 항생제의 종류에 따라 그 억제 정도가 다르다고 알려져 있다.^{13,16)}

본 연구에서 in vitro 연구에서 midazolam 1-hydroxylation과 testosterone 6 β -hydroxylation 대사 과정에 대해 troleandomycin이 다른 macrolide계 항생제에 비해 강력한 억제작용을 나타내었다. Troleandomycin의 경우 인체 간 microsome을 이용한 in vitro 연구에서 CYP3A4에 대해 강한 선택적 억제작용을 나타내는 것으로 알려져 있으며^{21,22)} 인체에서도 여러 CYP3A4 기질 약물(steroid, carbamazepine, triazolam, cyclosporine 등)과의 상호작용이 보고된 바 있어 CYP3A4기질 약물과 병용 투여시 상호작용의 발생이 가장 빈번할 것으로 사료된다.²³⁻²⁶⁾

임상적으로 CYP3A4 기질 약물인 midazolam의 AUC (area under the time-concentration curve; 농도곡선하 면적)는 erythromycin과 clarithromycin을 병용 투여하는 경우 이들 macrolide계 항생제에 의한 CYP3A4에 대한 강한 억제작용으로 인하여 현저한 증가가 관찰된 바 있지만^{27,28)} azithromycin의 경우 두 약물에 비해 그 정도가 약한 것으로 알려져 있다.²⁹⁾ 인체 간 microsome을 이용한 본 연구에서도 midazolam 1-hydroxylation 대사반응에 대

해 erythromycin과 clarithromycin에 의한 억제작용이 관찰되었으나 aziathromycin에 의해서는 억제작용이 관찰되지 않았다. 또한 testosterone 6 β -hydroxylation에 대해서도 erythromycin과 clarithromycin에 의한 억제작용이 관찰되었으나 azithromycin에 의한 억제작용은 관찰할 수 없었다. 이러한 결과는 고지혈증 치료약물로서 CYP3A4 기질약물인 atorvastatin에 대해 azithromycin과 clarithromycin을 각각 투여하였을 때 clarithromycin의 경우 유의한 약물상호작용이 관찰되었지만 azithromycin의 경우 유의한 차이와 유사한 결과이다. 이러한 결과로부터 유추할 때 임상적으로 clarithromycin이나 erythromycin을 다른 CYP3A4 기질약물과 병용투여 할 경우 이들 macrolide계 항생제에 의한 약물상호작용의 가능성이 있음을 추측해 볼 수 있다. 뿐만 아니라 임상적으로 clarithromycin과 erythromycin의 경우 치료영역이 좁은 약물들인 cyclosporine, tacrolimus, terfenadine, cisapride, triazolam 등의 많은 약물상호작용의 증례가 보고되었다.³⁰⁻³³⁾

기존의 한 연구결과에 의하면 CYP3A4에 대한 억제작용은 erythromycin에 비해 clarithromycin이 강한 억제작용을 나타낸다는 보고가 있으나¹¹⁾ 본 연구결과는 erythromycin이 clarithromycin에 비해 강한 억제작용을 나타내었다. 하지만 임상적으로 치료용량 범위내에서는 두 약물의 억제정도는 유사한 것으로 알려져 있다.¹⁶⁾

본 연구에서 azithromycin의 경우 midazolam 뿐만 아니라 testosterone의 대사과정에 대해 억제작용을 관찰할 수 없었다. 이러한 결과는 azithromycin에 의한 CYP3A4에 대한 억제작용은 미미할 것으로 사료되며 임상적으로도 azithromycin과 CYP3A4 기질약물간의 상호작용에 대해서는 의미 있는 상호작용을 찾을 수 없었다.^{16,29)} 하지만 azithromycin이 phenytoin, warfarin 등과의 상호작용이 보고된 바 있고³⁴⁻³⁶⁾ 이들 두 약물이 CYP2C9 기질약물임을 고려할 때 CYP3A4를 제외한 다른

CYP 대사효소에 대한 억제작용을 고려해 볼 수 있으며 이에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

본 연구결과를 요약하면, 인체 간 microsome을 이용한 CYP3A4 기질약물에 대한 macrolide계 항생제의 억제 정도를 살펴보았을 때 azithromycin과 dirithromycin의 경우 유의한 억제반응이 관찰되지 않았다. 그러나 troleandomycin의 경우 가장 강력한 억제작용이 관찰되었고 clarithromycin과 erythromycin의 경우 CYP3A4 기질약물에 대해 중등도의 유사한 억제반응이 관찰되었다. 이들 약물을 CYP3A4 기질약물로서 치료영역이 좁은 약물이나 농도에 따른 독성이 큰 약물의 경우 이들 약물에 대한 적극적인 감시(monitoring)가 필요할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Tomioka H, Sano C, Sato K, Shimizu T. Antimicrobial activities of clarithromycin, gatifloxacin and sitafloxacin, in combination with various antimycobacterial drugs against extracellular and intramacrophage *Mycobacterium avium* complex. *Int J Antimicrob Agents* 2002;19:139-145
2. Thompson D, Oster G. Use of terfenadine and contraindicated drugs. *JAMA* 1996;275:1339-41
3. Biglin KE, Faraon MS, Constance TD, Lieh-Lai M. Drug-induced torsades de pointes: a possible interaction of terfenadine and erythromycin. *Ann Pharmacother*. 1994;28:282
4. Honig PK, Wortham DC, Zamani K, and Cantilena LR. Comparison of the effect of the macrolide antibiotics erythromycin, clarithromycin and azithromycin on terfenadine steady-state pharmacokinetics and electrocardiographic parameters. *Drug Invest* 1994;7:148-156
5. Jurima-Romet M, Crawford K, Cyr T, and Inaba T. Terfenadine metabolism in human liver. In vitro inhibition by macrolide antibiotics and azole antifungals. *Drug Metab Dispos* 1994;22:849-857
6. Luh JY, Karnath BM. Issues in statin-associated myopathy. *JAMA* 2003;290:888
7. Omar MA, Wilson JP. FDA adverse event reports on statin-associated rhabdomyolysis. *Ann Pharmacother* 2002;36:288-295
8. Omar MA, Wilson JP, Cox TS. Rhabdomyolysis and HMG-CoA reductase inhibitors. *Ann Pharmacother* 2001;35:1096-1107
9. Lee AJ, Maddix DS. Rhabdomyolysis secondary to a drug interaction between simvastatin and clarithromycin. *Ann Pharmacother* 2001;35:26-31
10. Ucar M, Mjorndal T, Dahlqvist R. HMG-CoA reductase inhibitors and myotoxicity. *Drug Safety* 2000;22:441-457
11. Gascon PM & Dayer P. Comparative effects of macrolide antibiotics on liver mono-oxygenases. Abstract. *Clin Pharmacol Ther* 1991;49:158
12. Ohmori S, Ishii I, Kuriya S, Taniguchi T, Rikihisa T, Hirose S, Kanakubo Y, Kitada M. Effects of clarithromycin and its metabolites on the mixed function oxydase system in hepatic microsomes of rats. *Drug Metab Dispos* 1993;21:358-363
13. Periti P, Mazzei T, Mini E, and Novelli A. Pharmacokinetic drug interactions of macrolides. *Clin Pharmacokinet* 1992;23:106-131
14. Watkins PB. Drug metabolism by cytochrome P-450 in the liver and small bowel. *Gastroenterol Clin N Am* 1992;21:511-526
15. Slaughter RL, Edwards DJ. Recent advances: the cytochrome P-450 enzymes. *Ann Pharmacother* 1995;29: 619-624
16. Westphal JF. Macrolide-induced clinically relevant drug interactions with cytochrome P-450A (CYP) 3A4: an update focused on clarithromycin, azithromycin and dirithromycin. *Br J Clin Pharmacol* 2000;50:285-295
17. Amsden GW. Macrolides versus azalides: a drug interaction update. *Ann Pharmacother* 1995;29:906-917
18. Park JY, Kim KA, Kim SL. Chloramphenicol is a potent inhibitor of cytochrome P450 isoforms CYP2C19 and CYP3A4 in human liver microsomes. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;

- 47:3464-3469
19. Kim KA, Park JY. *Inhibitory effect of glyburide on human cytochrome p450 isoforms in human liver microsomes. Drug Metab Dispos* 2003;31:1090-1092
20. Fayer JL, Petullo DM, Ring BJ, Wrighton SA, Ruterbories KJ. *A novel testosterone 6 beta-hydroxylase activity assay for the study of CYP3A-mediated metabolism, inhibition, and induction in vitro. J Pharmacol Toxicol Methods* 2001;46:117-123
21. Marre F, de Sousa G, Orloff AM, Rahmani R. *In vitro interaction between cyclosporin A and macrolide antibiotics. Br J Clin Pharmacol* 1993;35:447-448
22. Jurima-Romet M, Crawford K, Cyr T, Inaba T.

- Terfenadine metabolism in human liver. In vitro inhibition by macrolide antibiotics and azole antifungals. Drug Metab Dispos* 1994; 22:849-857
23. Schellens JHM, van der Wart JHF, Brugman M, Breimer DD. Influence of enzyme induction and inhibition on the oxidation of nifedipine, sparteine, mepherytoin and antipyrine in humans as assessed by a "cocktail" study design. *J Pharmacol Exp Ther* 1989;249:638-45
 24. Li AP, Kaminski DL, Rasmussen A. Substrates of human hepatic cytochrome P450 3A4. *Toxicology* 1995;104:1-8
 25. Szeffler SJ, Rose JQ, Ellis EF, Spector SL, Green AW, Jusko WJ. The effect of troleandomycin on methylprednisolone elimination. *J Allergy Clin Immunol* 1980;66:447-451
 26. Ludden TM. Pharmacokinetic interactions of the macrolide antibiotics. *Clin Pharmacokinet* 1985;10:63-79
 27. Olkkola KT, Aranko K, Luurila H, Hiller A, Saarnivaara L, Himberg JJ, Neuvonen PJ. A potentially hazardous interaction between erythromycin and midazolam. *Clin Pharmacol Ther* 1993;53:298-305
 28. Gorski JC, Jones DR, Haehner-Daniels BD, Hamman MA, O'Mara EM Jr, Hall SD. The contribution of intestinal and hepatic CYP3A to the interaction between midazolam and clarithromycin. *Clin Pharmacol Ther* 1998;64:133-43
 29. Yeates RA, Lauten H, Zimmerman T. Interaction between midazolam and clarithromycin: comparison with azithromycin. *Int J Clin Pharmacol Ther* 1996;34:400-405
 30. Spicer ST, Liddle C, Chapman JR, Barclay P, Nankivell BJ, Thomas P, O'Connell PJ. The mechanism of cyclosporin toxicity induced by clarythromycin. *Br J Clin Pharmacol* 1997;43:194-196
 31. Piquette RK. Torsade de pointes induced by cisapride/clarythromycin interaction. *Ann Pharmacother* 1999;33:22-26
 32. van Haarst AD, van't Klooster GA, van Gerven JM, Schoemaker RC, van Oene JC, Burggraaf J, Coene MC, Cohen AF. The influence of cisapride and clarithromycin on QT intervals in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther* 1998;64:542-546
 33. Greenblatt DJ, von Moltke LL, Harmatz JS, Counihan M, Graf JA, Durol AL, Mertzanis P, Duan SX, Wright CE, Shader RI. Inhibition of triazolam clearance by macrolide antimicrobial agents: in vitro correlates and dynamic consequences. *Clin Pharmacol Ther* 1998;64:278-285
 34. Lane G. Increased hypoprothrombinemic effect of warfarin possibly induced by azithromycin (letter). *Ann Pharmacother* 1996;30:884-885
 35. Woldtvedt BR, Cahoon CL, Bradley LA, Miller SJ. Possible increased anticoagulation effect of warfarin induced by azithromycin (letter). *Ann Pharmacother* 1998;32:269-270
 36. Nahata M. Drug interactions with azithromycin and the macrolides: an overview. *J Antimicrob Chemother* 1996;37 Suppl C:133-142