

CYP3A4-mediert metabolisme av cyklosporin A i ulike mikrosommodeller

- *Utvikling av analysemetode for bestemmelse av
metabolittene AM1 og AM9 ved UPLC-MS*

Ågot Karoline Jensstuen



Masteroppgave i farmasi

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2011

CYP3A4-mediert metabolisme av cyklosporin A i ulike mikrosommodeller

- *Utvikling av analysemetode for bestemmelse av
metabolittene AM1 og AM9 ved UPLC-MS*

Ågot Karoline Jensstuen



Masteroppgave i farmasi

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2011

Veileder:

Professor Hege Christensen

Forord

Denne oppgaven er utført ved avdeling for farmasøytisk biovitenskap under veiledning av professor Hege Christensen. Arbeidet ble påbegynt i august 2010 og avsluttet mai 2011.

Først av alt vil jeg få takke professor Hege Christensen for utmerket veiledning. Ditt smittende humør og engasjement, og dine konstruktive tilbakemeldinger underveis i arbeidet dette året, har vært gull verdt. Jeg vil også få takke stipendiat Ida Robertsen for hyggelig samarbeid på lab og de mange faglige og ikke fullt så faglige diskusjonene. Ikke minst takk for at du tok deg tid til å se på oppgaven når det nærmet seg slutten. Takk også til professor Espen Molden for nyttige råd underveis i arbeidet. En takk rettes til overingeniør Siri Johannesen for god opplæring og hjelp med det praktiske arbeidet. Jeg vil også takke andre som har kommet med gode tips og råd underveis. Takk også til resten av kinetikkgruppa, hele 4. etasje og ikke minst mine medstudenter for at dere har gjort dette året uforglemmelig.

En stor takk rettes også til Psykofarmakologisk avdeling ved Diakonhjemmet sykehus for at dere var villige til å stille en av deres LC-MS maskiner til disposisjon når ionefellen på FI sa takk for seg. Overingeniør Niclas Lunder, takk for uvurderlig hjelp under utviklingen av analysemetoden, og takk for at du alltid like blid, troppet opp med gode svar og løsninger når det oppstod et problem. Takk også til resten av avdelingen for å ha vært så imøtekommende.

Til slutt vil jeg få takke venner og familie for støtte og oppmuntring underveis, og ikke minst for tålmodig ha lyttet til mine frustrasjoner og gleder rundt lab-arbeidet.

Oslo, mai 2011

Ågot Karoline Jensstuen

Innholdsfortegnelse

Forkortelser	6
Sammendrag	9
1 Innledning.....	10
1.1 Farmakokinetikk	10
1.2 Legemiddelmetabolisme.....	10
1.3 Cytokrom P450 enzymsystemet	11
1.4 CYP3A subfamilien.....	13
1.4.1 CYP3A4	14
1.5 Enzymkinetikk.....	14
1.6 Cyklosporin A.....	18
1.7 <i>In vitro</i> modeller for metabolismestudier	19
1.8 LC-MS / LC-MS/MS	20
1.8.1 Væskekromatografi	21
1.8.2 Massespektrometri	21
1.9 Hensikt med oppgaven	23
2 Materialer og metoder	24
2.1 Kjemikalier og mikrosomer.....	24
2.2 Utstyr	26
2.3 Løsninger	27
2.3.1 Stammløsninger.....	27
2.3.2 Hjelpeløsninger	27
2.3.3 Intern standard.....	27
2.3.4 Bufferløsninger.....	27
2.3.5 Mobilfaseløsninger.....	28
2.4 Opprinnelig analysemetode	28
2.5 Metabolismestudier med cyklosporin A – innledende forsøk.....	30
2.5.1 Standardkurver	30
2.5.2 Generell inkubasjonsprosedyre	30
2.5.3 Metabolittdannelse som funksjon av tid.....	31
2.5.4 Metabolittdannelse som funksjon av konsentrasjon organisk modifikator	31
2.5.5 Metabolittdannelse som funksjon av substrat- og metanolkonsentrasjon	32

2.6	Utvikling av ny analysemetode for AM1 og AM9.....	32
2.6.1	Prøveopparbeidelse	34
2.6.2	Validering.....	35
2.7	Metabolismestudier med cyklosporin A i ulike mikrosommodeller	35
2.8	Databearbeidelse.....	36
3	Resultater.....	37
3.1	Metabolismestudier med cyklosporin A – innledende forsøk.....	37
3.1.1	Metabolittdannelse som funksjon av tid.....	37
3.1.2	Metabolittdannelse som funksjon av konsentrasjon organisk modifikator.....	38
3.1.3	Metabolittdannelse som funksjon av substrat- og metanolkonsentrasjon.....	38
3.2	Utvikling av ny analysemetode for AM1 og AM9.....	39
3.2.1	Prøveopparbeidelse	40
3.2.2	Validering av ny analysemetode	41
3.3	Metabolismestudier med cyklosporin A i ulike mikrosommodeller	42
3.3.1	Insektmikrosomer med CYP3A4, cytokrom P450 reduktase og cytokrom b ₅ ...	42
3.3.2	Insektmikrosomer med CYP3A4, cytokrom P450 reduktase uten cytokrom b ₅	46
3.3.3	THLE-mikrosomer med CYP3A4	48
3.3.4	Sammenlikning mellom de ulike mikrosommodellene.....	51
4	Diskusjon.....	54
4.1	Metodologiske betraktninger	54
4.2	Metabolismestudier	55
5	Oppsummering og konklusjon	59
	Litteraturliste	60

Forkortelser

ADME	Absorpsjon, distribusjon, metabolisme og eliminasjon
AM1, AM9, AM4N, AM1c, AM19, AM1c9	Metabolitter av cyclosporin A
APCI	Atmosfæretrykk kjemisk ionisasjon
ATP	Adenosintrifosfat
cDNA	Komplimentær DNA
C8, 18	Octyl, octadecyl stasjonærfase
CI	Kjemisk ionisasjon
CL _{int, H, tot}	Intrinsic, hepatisk og total clearance
CsA	Cyclosporin A (INN: ciklosporin A)
CsC	Cyclosporin C (INN: ciklosporin C)
CYP	Cytokrom P450
EDTA	Etylendiamintetraeddiksyre
EI	Elektronionisasjon
ER	Endoplasmatisk retikulum
ESI	Elektrosprayionisasjon
FDA	U. S. Food and Drug Administration
H ₂ SO ₄	Svovelsyre
Hepes	4-(2-hydroksyetyl)-1-piperazinetansulfonsyre
HLM	Humane levermikrosomer
HPLC	High performance liquid chromatography
ICH	The International Conference of Harmonisation
k _{1,2,3}	Hastighetskonstanter

K_m	Michaelis-Menten konstant
K_{si}	Hemmingskonstant
$MgSO_4$	Magnesiumsulfat
MS	Massespektrometri
m/z	Masse/ladning
MRM	Multiple reaction monitoring
n	Mål på antall bindingssteder på et enzym
NADPH	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NaOH	Natriumhydroksid
P-gp	P-glykoprotein
r^2	Korrelasjonskoeffisient
RSD	Relativt standardavvik
S	Substratkonsentrasjon
S_{50}	Substratkonsentrasjon ved halve V_{max}
S/N	Signal/støy
SD	Standardavvik
SIR	Single ion recording
SRM	Single reaction monitoring
T5-3A4	THLE-celler med CYP3A4
THLE-celler	Transfektete humane leverepitelceller
Tris	Tris(hydroksymetyl)aminometan
UGT	UDP-glukuronosyltransferase
UPLC	Ultra performance liquid chromatography
v	Reaksjonshastighet for et enzym

% (v/v)

Volumprosent

Vmax

Maksimal reaksjonshastighet for et enzym

Sammendrag

Introduksjon: Det immunosuppressive legemidlet cyklosporin A (CsA) gjennomgår utstrakt metabolisme til mer enn 30 metabolitter. De primære metabolittene er AM1, AM9 og AM4N, og disse er vist å bli dannet via cytokrom P450 3A4 (CYP3A4). Metabolismen av CsA til AM1 og AM9 har tidligere blitt beskrevet å utvise atypisk enzymkinetikk, såkalt substrathemming, *in vitro*. For midazolam er det vist at ulike mikrosommodeller kan gi ulik enzymkinetikk. Hensikten med dette arbeidet var derfor å studere metabolismen av CsA i insektmikrosomer og humane mikrosomer som spesifikt uttrykker CYP3A4, i tillegg til å overføre analysemetoden for metabolittene AM1 og AM9 fra HPLC koblet til ionefelle MS/MS til UPLC koblet til trippelkvadrupol MS.

Metode: En analysemetode for bestemmelse av CsA-metabolittene AM1 og AM9 ble overført til UPLC-MS og validert for linearitet, nøyaktighet og presisjon. Metabolismestudier med CsA i konsentrasjonsområdet 0-100 μM , ble utført med insektmikrosomer med CYP3A4, cytokrom P450 reduktase, med ($n = 3$) og uten ($n = 1$) cytokrom b_5 , og i humane CYP3A4-mikrosomer ($n = 3$).

Resultater: Valideringen av den nye analysemetoden viste linearitet med korrelasjonskoeffisient (r^2) bedre enn 0,9966 for metabolittene AM1 og AM9. Alle verdiene for intra- og interdag nøyaktighet og presisjon lå under 5 % avvik fra sann verdi og 9 % variasjon. Dannelsen av CsA-metabolittene AM1 og AM9 viste Michaelis-Menten liknende enzymkinetikk i alle de tre mikrosomsystemene. Det ble funnet signifikant forskjell mellom estimerte CL_{int} -verdier for metabolitt AM1 i insektmikrosomene med cytokrom b_5 og de humane CYP3A4-mikrosomene ($P = 0,021$). Forholdet mellom AM1 og AM9 for V_{max} og CL_{int} ble henholdsvis 2,9 og 4,2 i de humane CYP3A4-mikrosomene, mot 0,9 og 1,3 i insektmikrosomene med cytokrom b_5 .

Konklusjon: Forskjeller i enzymkinetiske parametre og metabolittmønster for metabolismen av CsA i humane CYP3A4-mikrosomer og insektmikrosomer med CYP3A4, som er funnet i denne oppgaven, kan være av betydning for *in vitro-in vivo* ekstrapolering av legemiddelmetabolisme, og bør derfor studeres videre.

1 Innledning

1.1 Farmakokinetikk

Farmakokinetikk er læren om hva som skjer med legemidlene i kroppen. ADME, som står for absorpsjon, distribusjon, metabolisme og eliminasjon, er et sentralt begrep. Når et legemiddel inntas oralt, starter veien gjennom kroppen med absorpsjon fra tarm. Hvor mye som absorberes varierer i stor grad fra legemiddel til legemiddel og mellom individer. En andel av legemiddelet undergår first-pass metabolisme, det vil si at det metaboliseres i tarmveggen og leveren eller pumpes ut av membrantransportører, for eksempel P-glykoprotein (P-gp) [1]. Resten distribueres ut i kroppen via blodet og lymfesystemet. Noen legemidler elimineres uforandret, mens andre er avhengig av å bli metabolisert til mer hydrofile metabolitter. Eliminasjonen skjer primært via nyrene og gallen, mens andre organer, som lungene, også kan bidra [2].

1.2 Legemiddelmetabolisme

Metabolisme er kroppens måte å gjøre upolare, hydrofobe stoffer bedre egnet til å skilles ut av kroppen. De omdannes til mer hydrofile derivater slik at de kan skilles ut via nyrene, for å unngå akkumulering og mulig toksisitet [3]. Metaboliserende reaksjoner med tilhørende enzymer deles ofte inn i to grupper. Den ene er fase 1 reaksjoner og består av katabolske reaksjoner der enzymer oksiderer, reduserer eller hydrolyserer substratene. Oksideringene utføres av blant andre cytokrom P450 enzymer (CYP-enzymmer). Disse reaksjonene resulterer i en modifisering av substratet, det påføres funksjonelle grupper. Slike reaksjoner fører ofte til en inaktivering av legemiddelet, men kan også føre til bioaktivering av legemidler som inntas i inaktiv form (prodrug). I fase 2 reaksjoner dannes konjugater av substansene, som gjerne er produkter fra fase 1 reaksjoner. Dette fører til økt vannløselighet og større molekylvekt, og fremmer dermed utskillelse av stoffene. Disse reaksjonene utføres av flere ulike superfamilier av konjugerende enzymer, blant andre UDP-glukuronosyltransferase (UGT) som adderer en glukuronsyre til en funksjonell gruppe på substratet og danner dermed et glukuronid [3, 4]. Metaboliserende enzymer er i størst grad lokalisert i lever og tarm, men de finnes også i de fleste andre vev i kroppen. Inne i cellene er de lokalisert i intracellulære membraner og i cytosol [4].

Ved utvikling av nye legemidler er det nødvendig å vite hvordan og av hvilke enzymer substansene metaboliseres, for å kunne si noe om effektiviteten og sikkerheten til de nye legemidlene. Dette undersøkes med blant annet *in vitro* metabolismestudier [4].

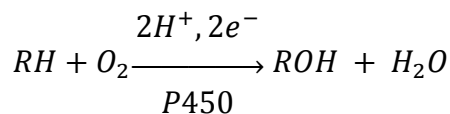
1.3 Cytokrom P450 enzymesystemet

Cytokrom P450 enzymesystemet (CYP) er en superfamilie av hemoproteiner [5]. Det er funnet 57 aktive gener for CYP-enzymet i det humane genomet [6, 7]. De varierer i mengde og lokalisering. Ulike CYP-enzymet metaboliserer ulike substrater. Noen er spesifikke og metaboliserer kun enkelte forbindelser, mens andre metaboliserer en rekke strukturelt forskjellige substrater [5]. Basert på likheter i aminosyresekvensene er de delt inn i familier som betegnes med tall, underfamilier som angis med bokstaver før et nummer angir det enkelte isoenzymet [8].

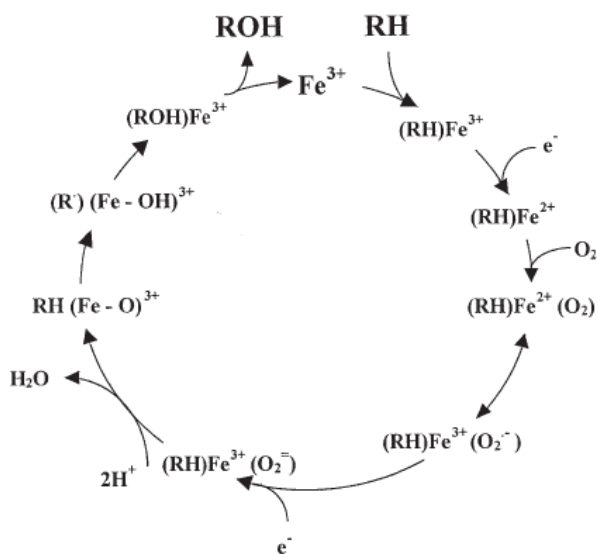
CYP-enzymene er involvert i metabolismen av kroppsfremmede stoffer, som legemidler, nedbrytningen av næringsstoffer, samt i syntesen av endogene forbindelser, som for eksempel steroider og gallesyrer. CYP-enzymene utfører blant annet N-dealkylering, O-dealkylering, aromatisk hydroksylering, N-oksidasjon, S-oksidasjon, deaminering og dehalogenering [4, 8]. Det er primært CYP-enzymene i familiene 1-3 som metaboliserer kroppsfremmede stoffer. De CYP-enzymene som er mest aktive i legemiddelmetabolisme er de som tilhører underfamiliene CYP2C, CYP2D og CYP3A [9]. Disse CYP-enzymene er i størst grad lokalisert i leveren, som dermed sørger for en effektiv first-pass metabolisme av legemidler som inntas oralt. CYP-enzymene finnes også gjennom hele gastrointestinal traktus, og i mindre mengder i lunger, nyre og sentralnervesystemet [3]. Inne i cellene sitter CYP-enzymene i endoplasmatisk retikulum (ER) [4, 5].

Uttrykket av CYP-enzymene varierer i stor grad, både fra dag til dag innen ett individ og mellom individer. Variasjonen skyldes både inntak og påvirkning av indukere og hemmere i omgivelsene, alder, helsetilstand og nedarvet genetisk polymorfisme [9]. De viktigste humane CYP-enzymene som utøver genetisk polymorfisme er CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 og CYP3A5 [4, 10]. Det er flere måter et substrat kan påvirke metabolismen av andre substrater. Noen substrater virker som indukere, det vil si at de øker uttrykket av aktuelle CYP-enzymet, og dermed øker metabolismen. Andre substanser hemmer enzymene, slik at metabolismen nedsettes [4].

Når et substrat bindes til et CYP-enzym begynner enzymets katalytiske syklus. Den overordnede reaksjonen kan beskrives:



der RH representerer legemiddelet som substrat og ROH er ferdig oksidert produkt [11]. Enzymene har tilkoblet et heme molekyl som via et jernatom binder molekylært oksygen i det aktive setet. Ved binding av substrat konverteres Fe^{3+} til et høyere energinivå slik at det lettere lar seg redusere. Fe^{3+} reduseres til Fe^{2+} av et elektron som kommer fra redusert nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH), som fungerer som elektrondonor via flavoproteinet NADPH-cytokrom P450 reduktase. Et molekylært oksygen bindes så til Fe^{2+} -substratkomplekset og danner et $Fe^{2+}O_2$ -substratkompleks. Dette komplekset mottar deretter nok et elektron fra NADPH-cytokrom P450 reduktase, eventuelt fra cytokrom b_5 , i tillegg til et proton. Da dannes peroksidkomplekset $Fe^{2+}OOH$ -substrat, som videre kløyves til vann og $(FeO)^{3+}$ -substratkompleks etter tilførsel av nok et proton. $(FeO)^{3+}$ tilføres så et hydrogenatom fra substratet slik at det dannes to frie radikaler, substratradikal og $Fe^{2+}OH$ -radikal. Substratradikalet går så sammen med OH -radikalet og danner et hydroksylert produkt, som deretter frigjøres fra komplekset med påfølgende regenerering av enzymet til den opprinnelige formen (Figur 1-1) [4, 11, 12].



Figur 1-1 Katalytisk syklus. Modifisert fra Anzenbacher et al. [9].

Cytokrom b_5 er et lite membranbundet hemoprotein lokalisert i ER. Funksjonen er ikke fullstendig klarlagt, men den fungerer som elektrondonor. Cytokrom b_5 kan overføre elektroner fra NADPH-cytokrom P450 reduktase til elektronakseptorer som for eksempel CYP-enzymene [13]. Det er også vist for flere enzym-substrat par at tilgang til cytokrom b_5 har effektivisert metabolismen *in vitro* [13-17].

1.4 CYP3A subfamilien

CYP3A subfamilien består av flere isoenzymer og er uttrykt i størst grad i lever og tynntarm. Disse enzymene utgjør ca. 30 % av alle CYP-enzymene i leveren og om lag 80 % av CYP-enzymene i tarmen [18, 19]. CYP3A står for metabolismen av en rekke terapeutisk viktige legemidler, men er også involvert i reguleringen av endogene og eksogene steroider. De er dermed i stand til å metabolisere en rekke ulike kjemiske strukturer. Siden disse enzymene er uttrykt i så stor grad i lever og tynntarm vil de for legemidler og andre substrater, som inntas oralt, sørge for en effektiv first-pass effekt [20].

CYP3A-enzymene som er beskrevet i mennesket er CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7, og CYP3A43 [8, 21]. CYP3A4 er uttrykt i stor grad i lever og tynntarm [20]. Det er det mest uttrykte av CYP-enzymene og er involvert i metabolismen av om lag 50 % av alle klinisk brukte legemidler [9]. CYP3A5 er det enzymet i CYP3A subfamilien som er uttrykt i størst grad utenfor lever og tarm, det vil si i for eksempel nyrer og lunger. Det er involvert i metabolisme av legemidler og andre kroppsfremmede substrater, men er også med å regulere mengde endogene faktorer, som steroider, i kroppen [22]. CYP3A7 er funnet i lever hos fostre [23]. Det er også funnet CYP3A7 mRNA i ER hos om lag 50 % av den voksne befolkningen, men da i mengder tilsvarende ca. 10 % av den funnet i fostre. Det er fortsatt usikkert om, eller i hvilken grad dette uttrykket av mRNA i voksne har betydning [23]. CYP3A43 er tilstede i kroppen i små mengder i lever, nyrer, pancreas og prostata. Enzymet har foreløpig vist å ha en lav metabolsk aktivitet tilsvarende de lave nivåene *in vivo* [21].

CYP3A5 viser genetisk polymorfisme og det er dermed stor individuell variasjon i uttrykk av enzymet. Enzymet er funnet å være tilstede i leveren til ca. 20-25 % av den kaukasiske befolkningen, men det er stor variasjon mellom verdensdelene [22, 23]. Det er funnet 3 alleler av genet, CYP3A5*1, CYP3A5*3 og CYP3A5*6, der det er nødvendig å være homozygot eller heterozygot CYP3A5*1 for å uttrykke CYP3A5. Det er vist at også ved CYP3A5*3

genotype kan det dannes små mengder funksjonelt enzym. For de med genotype CYP3A5*1 kan uttrykket CYP3A5 stå for så mye som 50 % av det totale CYP3A uttrykket [22].

1.4.1 CYP3A4

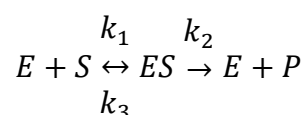
CYP3A4 metaboliserer en rekke strukturelt forskjellige legemidler og andre substrater. Enzymet er derfor utsatt for å skape interaksjoner når flere slike legemidler inntas samtidig. Disse interaksjonene kan være et resultat av hemming av enzymet og dermed resultere i nedsatt metabolisme og mulig toksisk konsentrasjon av legemiddelet. På den andre side kan induksjon av enzymet føre til økt metabolisme og mindre aktivt legemiddel tilstede i kroppen [9].

Uttrykket av CYP3A4 utviser stor interindividuell variasjon [24]. Det er funnet flere ulike allelvarianter av CYP3A4, men allelfrekvensen er lav og de er ikke funnet å gi store variasjoner i katalytisk aktivitet [25]. Det er derimot funnet at polymorfisme i transkripsjonsfaktorene PXR, FoxA2, FoxA3 og HNF4α sammen med kjønn kan forklare inntil 24,6 % av variasjonen i hepatisk CYP3A4 mRNA uttrykk [26]. Hovedårsaken til variasjonen synes derfor å være faktorer som hemmer eller induserer enzymaktiviteten, som miljø, diett, alder og helsestatus [9].

CYP3A4 utøver atypisk kinetikk for flere substrater. Det er foreslått at enzymet har mulighet til å binde flere substanser samtidig, som dermed kan påvirke metabolismen av hverandre og gi atypisk kinetikk. Videre er det vist at CYP3A4 har et stort katalytisk sete der det kan være rom for binding av flere substrater samtidig [27, 28].

1.5 Enzymkinetikk

En enzymatisk reaksjon kan beskrives som følger:



der E er enzym, S er substrat, P er metabolisert substrat, k_1 er hastighetskonstanten for dannelsen av enzym-substrat kompleks, k_2 er hastighetskonstanten for dannelsen av produkt og frigjøring fra enzymet og k_3 er hastighetskonstanten for oppløsning av enzym-substrat

komplekset. Ut fra dette defineres Michaelis-Menten konstanten, K_m (Likning 1). K_m kan også leses direkte av på Michaelis-Menten kurver, som substratkonsentrasjonen der metabolismehastigheten er halvparten av V_{max} [2].

$$K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \quad (1)$$

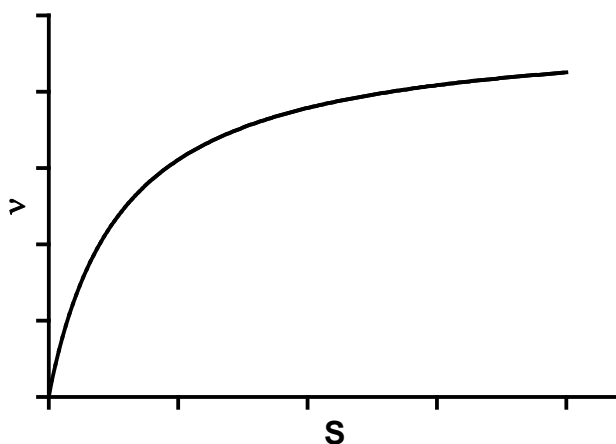
De fleste CYP-enzymene viser hyperbol metningskinetikk, metabolismen kan altså beskrives av Michaelis-Menten modellen [29, 30]. Dette gjør det mulig å bruke *in vitro* metabolismestudier til å si noe om hvordan metabolismen kan foreligge *in vivo*. Michaelis-Menten kinetikk beskrives av likning 2, der v er hastigheten til dannelsen av metabolitter, S er substratkonsentrasjonen, V_{max} er den maksimale hastigheten og K_m er Michaelis-Menten konstanten. Figur 1-2 viser en typisk Michaelis-Menten kurve.

$$v = \frac{V_{max} \times S}{K_m + S} \quad (2)$$

V_{max} er direkte proporsjonal med den totale konsentrasjonen av enzymer tilstede, og kan dermed sees som et mål på enzymkonsentrasjonen i løsningen. K_m er et mål på affiniteten mellom enzymet og substratet. Intrinsic metabolsk clearance (CL_{int}) er definert som forholdet mellom metabolismehastigheten og substratkonsentrasjonen (Likning 3) og forteller om metabolismekapasiteten til enzymet [2, 31]. Når substratkonsentrasjonen er mye mindre enn K_m kan likning 3 forenkles til likning 4 [2, 29]. CL_{int} , beregnet *in vitro*, kan så brukes til å anslå CL_{int} *in vivo*. CL_{int} er direkte proporsjonal med hepatisk clearance (CL_H), som igjen er en del av legemidlets totale clearance (CL_{tot}) [2].

$$CL_{int} = \frac{V_{max}}{K_m + S} \quad (3)$$

$$CL_{int} = \frac{V_{max}}{K_m} \quad (4)$$

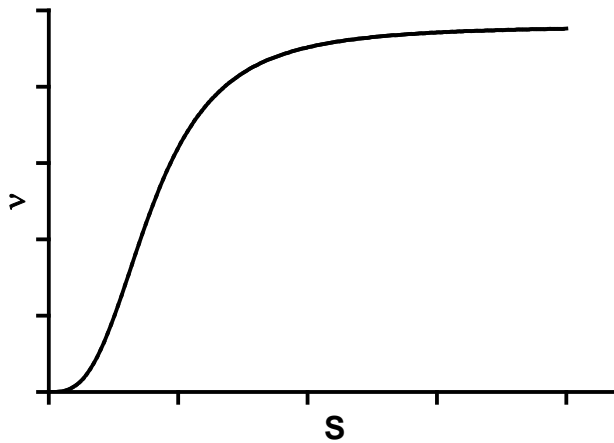


Figur 1-2 Michaelis-Menten hastighetskurve.

Michaelis-Menten modellen setter som forutsetning at enzymet kun har ett bindingssted for substratene. Det er for flere substrater vist resultater som ikke kan forklares med denne klassiske kinetikkmodellen [29].

CYP3A-enzymenes kinetikk avviker ofte fra den klassiske Michaelis-Menten modellen de fleste andre CYP-enzymene karakteriseres av. Når flere substrater kan bindes samtidig til enzymet, kan enten binding av et substrat påvirke affiniteten til neste substrat til bindingsstedet, eller binding av neste substrat kan skje uavhengig [27]. Den atypiske kinetikken deles ofte inn i fire typer, aktivering, autoaktivering, delvis inhibering og substrathemming. Ved aktivering fører binding av et annet substrat til en økt metabolismehastighet. Når substratet selv virker som aktivator kalles det autoaktivering. Det viser seg ofte i en sigmoidal hastighetskurve (Figur 1-3). Det vil si at det ved lave konsentrasjoner metaboliseres mindre per tidsenhet enn det ville gjort ved en typisk Michaelis-Menten reaksjon [27, 32]. Slike sigmoidale hastighetskurver beskrives ofte av Hill-likningen (Likning 5) der S_{50}^n er substratkonsentrasjonen ved 50 % av V_{max} (tilsvarer K_m når n er 1), og n sier noe om graden av sigmoidalitet. I ligandbindingsstudier kan n brukes som et mål på antall bindingssteder på enzymet [27, 32].

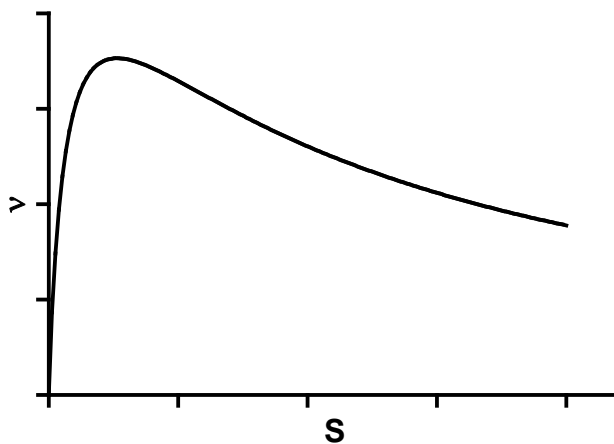
$$v = \frac{V_{max} \times S^n}{S_{50}^n + S^n} \quad (5)$$



Figur 1-3 Sigmoidal hastighetskurve.

Delvis inhibering oppstår når metningskonsentrasjonen av hemmeren ikke fullstendig hemmer metabolismen av substratet. Ved substrathemming fører en økning i konsentrasjon av hemmer over et visst nivå, til en nedgang i metabolismehastighet (Figur 1-4) [30, 32]. Likning 6 er en forenklet likning som beskriver substrathemmingskurven der K_{si} er dissosiasjonskonstanten for binding av substrat til hemmingssetet.

$$v = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_m}{S} + \frac{S}{K_{si}}} \quad (6)$$

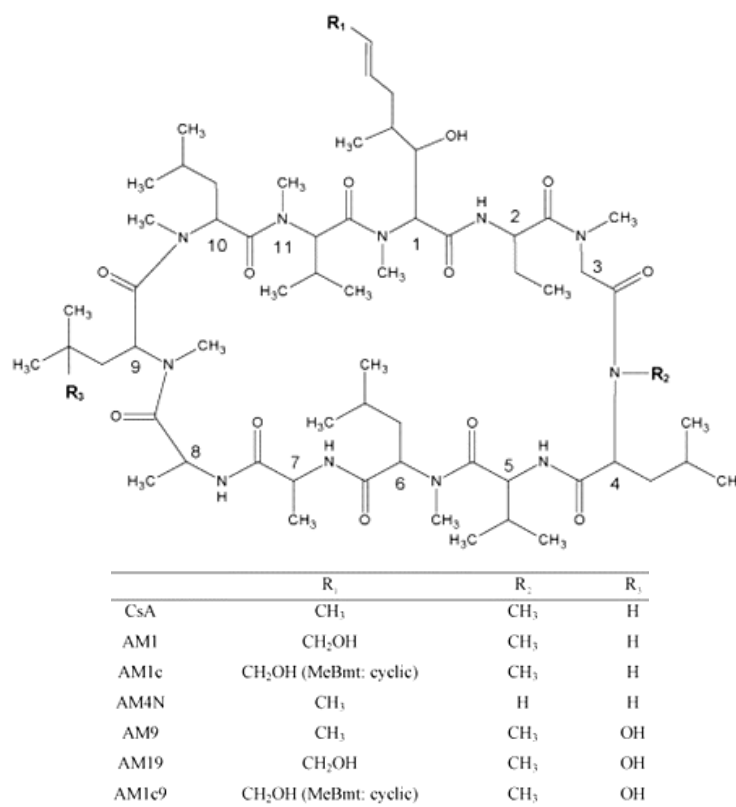


Figur 1-4 Substrathemmingskurve.

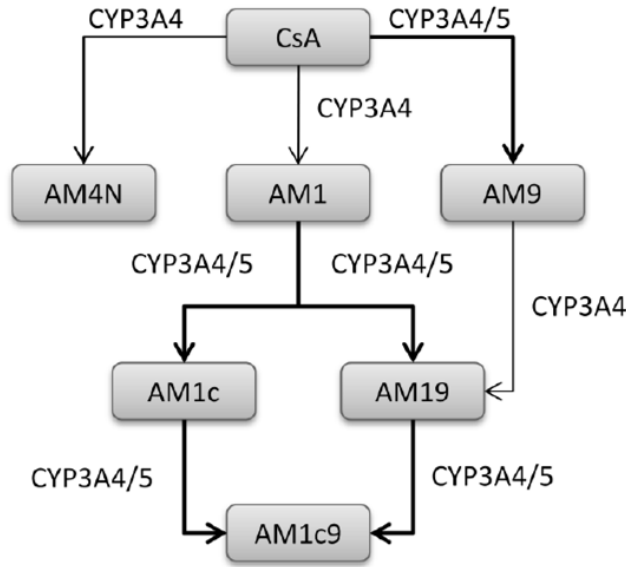
1.6 Cyklosporin A

Cyklosporin A (CsA) er et syklisk peptid som består av 11 aminosyrer som produseres i soppen *Tolypocladium inflatum*. CsA er en kalsineurinhemmer, immunsuppressivum, og er mye brukt av organtransplanterte [33].

Det er funnet mer enn 30 metabolitter av CsA i ulike arter. Strukturformel til CsA og noen av metabolittene er vist i figur 1-5. Blant produktene fra fase 1 reaksjonene oksidering og demetylering, dannes tre primære metabolitter med kun en modifikasjon av modersubstansen, AM1, AM9 og AM4N. Disse kan så metaboliseres videre til AM19, AM1c, AM1c9 og flere andre metabolitter (Figur 1-6) [34]. Når det gjelder fase 2 reaksjoner er det funnet et sulfatkonjugat og et glukuronid. Disse konjugatene kan dannes både direkte fra CsA og fra dets metabolitter [34].



Figur 1-5 Strukturformel for CsA og de viktigste metabolittene [35].



Figur 1-6 Skjematisk oversikt over metabolismemønsteret til CsA via CYP3A4 og CYP3A5 [36].

Det er kun 4-6 % av CsA som er funnet å skilles ut uforandret via urinen, men metabolittene skilles ut i stor grad. Dette forteller at CsA metaboliseres nærmest fullstendig [34]. Det er vist at CYP3A4 står for om lag 80 % av den hepatiske metaboliseringen av CsA [37]. Sammen med 30 % av alle klinisk brukte legemidler er CsA substrat for P-glykoprotein (P-gp). Det ser ut til at det er overlapp mellom substratspesifisiteten til CYP3A4 og P-gp [38]. P-gp er en membranbundet, ATP-drevet effluxpumpe som blant annet regulerer opptak i tarmen og renal sekresjon av legemidler og metabolitter [39, 40]. På lik linje med CYP-enzymene er også P-gp utsatt for polymorfisme resulterende i interindividuell variasjon i uttrykk og effekt, men det er ikke sett noen sammenheng mellom polymorfisme og den store variasjonen i biotilgjengeligheten av CsA [34, 40].

1.7 *In vitro* modeller for metabolismestudier

In vitro modeller brukes i industrien for å bestemme metabolismeprofilen til nye legemiddelsubstanser på et tidlig stadium i utviklingsprosessen. Videre kan *in vitro-in vivo* ekstrapolering gi indikasjoner på farmakokinetiske parametre *in vivo*. En kan også studere legemidlers mulighet til å skape eller påvirkes av interaksjoner med andre legemidler [41].

Det finnes flere ulike *in vitro* modeller for studier av legemiddelmetabolisme, der noen bygger på celler mens andre benytter kun enkelte cellekomponenter. Disse modellene har hver sine fordeler og ulemper, og dermed ulike anvendelsesområder. En modell der hele celler

benyttes består av primære hepatocytter. Denne modellen inneholder fase 1 og 2 metabolske enzymer i tillegg til nødvendige kofaktorer [41]. Dette er en av de viktigste modellene når det gjelder studier av induksjon av enzymer. De største ulempene ved denne modellen er tilgjengeligheten av cellene og at det kan være lite metaboliserende enzymer tilstede eller mengdene synker hurtig [41-43].

Ved homogenisering av vev, for eksempel levervev, etterfulgt av differensialsentrifugering kan man isolere subcellulære fraksjoner av endoplasmatisk retikulum (ER), som kalles mikrosomer [2, 43]. Som tidligere nevnt sitter CYP-enzymene plassert i ER, de vil derfor være tilstede i mikrosomene. Disse mikrosomene er avhengig av å tilføres NADPH eller et NADPH regenererende system, som energitilførsel til CYP-enzymene [43]. Humane levermikrosomer (HLM) er isolert fra human lever og inneholder dermed den enkelte donors utvalg av CYP-enzymmer. For å få en mest mulig representativ modell blir derfor levermikrosomer fra flere donorer samlet. Denne modellen kan brukes til å studere blant annet generell metabolisme, grad av interindividuell variasjon i legemiddelmetabolisme og variasjon mellom kjønnene. Den er mye brukt til å predikere clearance *in vivo* [41, 43]. I en annen mikrosommodell, stammer mikrosomene fra baculovirusinfiserte insektceller som er transfektert med cDNA-uttrykk for individuelle humane CYP-enzymmer samt NADPH-cytokrom P450 reduktase, og med mulighet for cytokrom b₅. Med disse insektmikrosomene kan en studere hvordan ett enkelt enzym bidrar til metabolismen av substratene og en kan se på interaksjoner mellom substrater (hemming av enzymet) [41, 43]. En tredje modell benytter mikrosomer isolert fra transfekterte humane leverepitelceller (THLE-celler), en kontinuerlig human levercellelinje med lite eller ingen CYP-aktivitet, som er transfektert med enkelte CYP-enzymmer blant andre CYP3A4 (T5-3A4) [44, 45]. Disse cellene inneholder etter transfeksjonen et stabilt uttrykk av enzymer [45]. På samme måte som med insektmikrosomene kan man med disse THLE-mikrosomene, også omtalt som humane CYP3A4-mikrosomer, studere effekten av ett enkelt enzym på metabolismen av substratene [44].

1.8 LC-MS / LC-MS/MS

Væskekromatografi (LC) koblet til enkelt eller tandem massespektrometer (MS, MS/MS) er mye brukt i legemiddelanalyse siden det er et sensitivt og selektivt analysesystem. Systemet fungerer ved at analyttene separeres ved hjelp av væskekromatografi og deretter detekteres

med et massespektrometer. Ved tandem massespektroskopi legges det til et fragmenteringstrinn som muliggjør ytterligere forbedring av sensitiviteten og selektiviteten [46].

1.8.1 Væskekromatografi

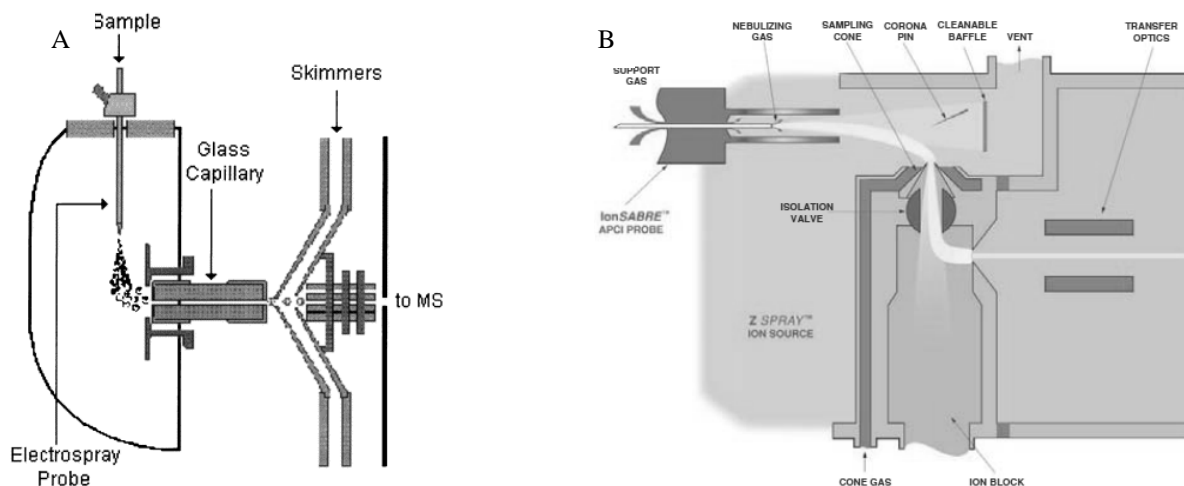
Omvendt fase kromatografi er det viktigste separasjonsprinsippet innen væskekromatografi. Dette prinsippet baserer seg på fordelingen av analyttene mellom en hydrofob stasjonærfase og en vandig mobilfase. Analyttene retarderes på kolonnen med hydrofob stasjonærfase og separeres avhengig av hydrofobe egenskaper [46]. Mobilfasen består av en blanding med vandig bufferløsning og organisk modifikator til rett løsemiddelstyrke. Når det er stor variasjon i retensjon mellom analyttene er det nødvendig å bruke gradienteluering. Da endres sammensetningen av mobilfase, økning i løsemiddelstyrke, underveis slik at retensjonen av hver analytt blir tilfredsstillende.

1.8.2 Massespektrometri

Et massespektrometer separerer analyttene etter forholdet mellom massen (m) og ladningen (z), m/z , ved hjelp av et magnetisk eller elektrostatisk felt, før aktuelle m/z -forhold blir detektert. Fra kolonnen fører mobilfasen de separerte analyttene inn i ionekilden, der analyttene ioniseres før de videre separeres etter m/z -verdi i masseanalysatoren og detekteres.

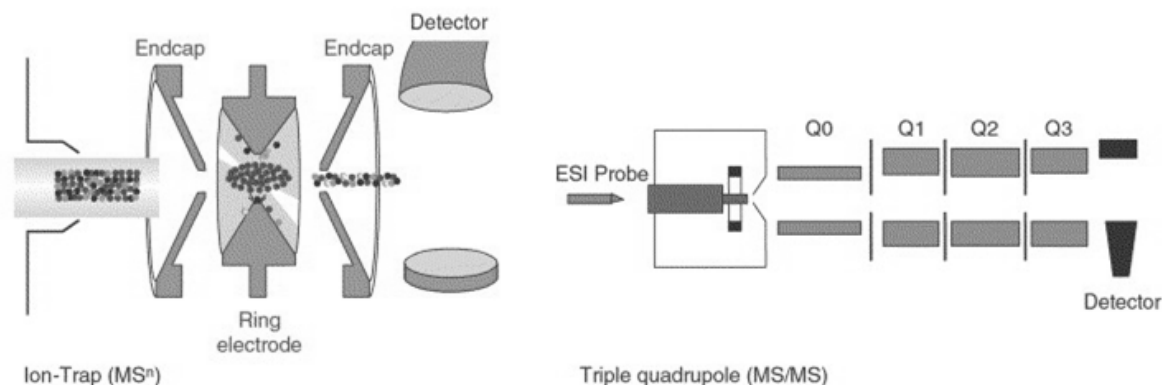
Ioniseringen kan enten skje i vakuum (elektronionisasjon, EI, og kjemisk ionisasjon, CI), eller under atmosfærisk trykk (elektrosprayionisasjon, ESI, og atmosfæretrykk kjemisk ionisasjon, APCI), og operere i positiv eller negativ modus [46]. Her nevnes kun ESI og APCI. Ved ESI føres væskestrømmen med protonerte eller deprotonerte analytter fra LC-kolonnen inn i ionekilden via et kapillærrør. Over kapillæret er det påført høyspenning som fører til at det dannes en spray av ioniserte dråper. I tillegg er det ofte også en nebulisatorgass, nitrogen, tilstede for å bistå i prosessen. Nitrogen brukes også som fordampningsgass for å dampe inn mobilfasen før ionene sendes inn i masseanalysatoren (Figur 1-7 A). ESI er en såkalt myk ioniseringskilde. Det vil si at det hovedsakelig dannes molekylioner, som ikke fragmenterer videre inne i ionekilden [46, 47]. APCI fungerer ved at væskestrømmen fra LC-kolonnen ledes gjennom et oppvarmet kapillærrør og fordamper i utkanten ved hjelp av en fordampningsgass. Nitrogen og vann ioniseres av en nål pålagt et høyt elektrisk potensial på utsiden av kapillæret. Radikalene som dannes reagerer videre med analyttene og danner

protonerte eller deprotonerte molekyler som videre innføres i masseanalysatoren (Figur 1-7 B). Som ESI er også APCI en forholdsvis myk ioniseringsteknikk [46, 47].



Figur 1-7 Skjematisk fremstilling av ESI ioniseringskilde (A) [48] og APCI ionisasjonskilde (B) [49].

Det finnes flere typer massespektrometre. I denne oppgaven ble ionefelle og trippelkvadrupol MS brukt, derfor nevnes kun disse. Ionefellen samler ionene i fellen ved hjelp av spenning over ringelektrodene og heliumgass (Figur 1-8). Ved å endre spenningen og tilhørende frekvens vil ioner med den karakteristiske frekvens passere ut av ionefellen og detekteres. Endring av spenningen kan også, via kollisjon mellom ionene og heliumgass, føre til fragmentering og videre utvelgelse av fragmenter. Dette utnyttes ved tandem MS [50]. En trippelkvadrupol består av tre kvadrupoler koblet i serie (Figur 1-8). En kvadrupol består av fire parallelle stenger hvor to og to motstående stenger har samme elektriske ladning, slik at det dannes et elektrisk felt [46, 50]. Ioner med m/z -forhold som korresponderer med valgt spenning vil vandre gjennom kvadrupolen til neste kvadrupol eller til detektoren. Et trippelkvadrupol massespektrometer kan innstilles til å fungere som både enkel og tandem MS. Ved enkel MS fungerer kun den første kvadrupolen som m/z -utvelger, mens de to andre kun leder ionene, som slipper gjennom den første kvadrupolen, til detektoren. Ved tandem MS fragmenteres ionene, som er valgt ut i den første kvadrupolen, ved at de kolliderer med en inert gass i kvadrupol nummer to. Denne kvadrupolen kalles derfor kollisjonscelle. Den tredje kvadrupolen fungerer deretter på samme måte som den første, velger ut fragmentationene med valgt m/z -forhold eller sveiper over masser i et gitt område [50].



Figur 1-8 Skjematisk fremstilling av ionefelle og trippelkvadrupol MS. Modifisert fra Korfmacher et al [51].

Det er flere ulike prinsipper for massedeteksjon, her omtales kun single ion recording (SIR) for enkel MS og multiple og single reaction monitoring (MRM/SRM) for tandem MS. Ved enkel MS kan man velge å sveipe over et spekter m/z -forhold, eller en kan velge å søke på kun en eller noen få utvalgte m/z -forhold (SIR). Tandem MS gir en mulighet til å i første kvadrupol velge ut en enkel eller flere m/z -forhold for så å fragmentere disse ionene i kollisjonscellen før den tredje kvadrupolen sveiper over m/z -verdiene eller analyserer kun ett eller noen få m/z -forhold (SRM/MRM) [50].

1.9 Hensikt med oppgaven

Det er tidligere vist at metabolismen av benzodiazepinet midazolam, som er et mye brukt modellsubstrat for CYP3A4 [52], utøver ulik enzymkinetikk i insektmikrosomer med CYP3A4 og humane CYP3A4-mikrosomer. I insektmikrosomer, både med og uten cytokrom b_5 , ble det vist at metabolismen følger atypisk enzymkinetikk for dannelsen av metabolitten 1-hydroksymidazolam. Derimot viste de humane CYP3A4-mikrosomene klassisk Michaelis-Menten kinetikk for dannelsen av denne metabolitten [53]. Ulik kinetikk som dette kan ha betydning for overføringen av resultater fra *in vitro*-studier til *in vivo*. Det er derfor viktig å undersøke om det er et utstrakt fenomen, eller om det kun gjelder for midazolam [53].

Hensikten med denne oppgaven var derfor å undersøke om dette også gjelder for andre legemidler som er substrater for CYP3A4. Metabolismen av legemiddelet CsA skulle derfor studeres i insekt- og THLE-mikrosomer med CYP3A4. Grunnet uforutsette problemer med analyseinstrumentet (HPLC med ionefelle MS) ble det nødvendig å utvikle og validere en metode for analyse av metabolittene AM1 og AM9 på UPLC koblet til trippelkvadrupol MS.

2 Materialer og metoder

2.1 Kjemikalier og mikrosomer

Kjemikalier	Leverandør
Acetonitril (ACN)	Merck, Darmstadt, Tyskland
AM1, AM9 og AM1c	Novartis, Basel, Sveits
Ammoniakk (NH ₃)	Merck, Darmstadt, Tyskland
Cyklosporin A	Novartis, Basel, Sveits
Cyklosporin C	Novartis, Basel, Sveits
EDTA	Merck, Darmstadt, Tyskland
Etylacetat (EtAc)	VWR international, Leuven, Belgia
Hepes	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Insektmikrosomer med CYP3A4, cytokrom P450 reduktase og cytokrom b ₅ (Supersomes™)	BD Gentest, Woburn, MA, USA
Insektmikrosomer med CYP3A4, cytokrom P450 reduktase uten cytokrom b ₅ (Supersomes™)	BD Gentest, Woburn, MA, USA
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck, Darmstadt, Tyskland
Maurisyre (HCOOH)	Merck, Darmstadt, Tyskland
Metanol (MeOH)	Merck, Darmstadt, Tyskland
NADPH	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Nitrogengass (N ₂)	AGA Progas A/S, Oslo, Norge
Tris	VWR international, Leuven, Belgia

Tabell 2-1 Deklarert innhold i insektmikrosompreparatene.

	Proteinkonsentrasjon⁽¹⁾	Cytokrom P450 konsentrasjon⁽²⁾	Cytokrom P450 reduktase aktivitet⁽³⁾	Cytokrom b₅ innhold⁽⁴⁾
CYP3A4 med cytokrom b₅	6,40 / 8,00	1,00	2,70 / 4,30	0,703 / 1,10
CYP3A4 uten cytokrom b₅	2,90	2,00	0,640	

⁽¹⁾ mg/ml⁽²⁾ nmol/ml⁽³⁾ $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg protein})$ ⁽⁴⁾ nmol/mg protein

2.2 Utstyr

Utstyr	Produsent
Acquity Ultra Performance liquid chromatography™	Waters Corporation, Milford, MA, USA
Acquity UPLC BEH Shield C18 (100 x 2,1 mm, 1,7 µm)	Waters Corporation, Milford, MA, USA
BD Vacutainer® Z Blood Collection Tubes	BD, Plymouth, UK
Finnigan LOQ ^{DUO} ionefelle	Thermo Finnigan, Austin, Texas, USA
Drop-In Guard Cartridge C8 forkolonne (10 x 2 mm, 5 µm)	Thermo Electron Corporation, CT, USA
BetaBasic C8 kolonne (30 x 2,1 mm, 3 µm)	Thermo Electron Corporation, CT, USA
Micromass Quattro <i>micro</i> ™	Waters Corporation, Milford, MA, USA
Milli-Q Reference system	Millipore Corporation, Billerica, MA, USA
pH-meter	Beckman, Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA
Prominence kolonneovn, CTO-20AC	Shimadzu, Kyoto, Japan
Speedvac®	Thermo Electron Corporation, Milford, MA, Canada
Ultimate 3000 autosampler og pumpe	Thermo Finnigan, Austin, Texas, USA
Universal 32R kjølesentrifuge	Hettich zentrifugen, Tuttlingen, Tyskland
Vannbad med rister	Citenco Ltd., Herts, England
Vekt, AB54	Mettler Toledo, Sveits
Vekt, B410	Sartorius, Göttingen, Tyskland
VenoJect 7 ml 13 x 100 mm silikonerte glassrør	Terumo, Leuven, Belgia
Wirlmikser	IKA Works, Inc., Wilmington, NC, USA

2.3 Løsninger

2.3.1 Stamløsninger

En stamløsning av CsA i metanol, med konsentrasjon 5 mg/ml ble fortynnet videre i metanol. Ved tillaging av sterkere konsentrasjoner ble løsningsmiddelet dampet av under nitrogengass før stoffet ble reløst i metanol. Disse løsningene ble oppbevart i fryser ved -18 °C.

2.3.2 Hjelpeløsninger

Hjelpeløsningene til forsøkene med 1 % metanol ble laget ved å fortynne stamløsningene med bufferløsning (Tabell 2-2) til 10 ganger sterkere konsentrasjon enn i inkubasjonsrørene. Til forsøkene med 5 % metanol ble stamløsningene fortynnet slik at de inneholdt 50 % metanol og 50 % (v/v) Tris-H₂SO₄-buffer. Hjelpeløsningene ble oppbevart i fryser ved -18 °C.

2.3.3 Intern standard

Ved tillaging av intern standard (cyklosporin C (CsC)) ble 100 µl CsC med konsentrasjon 1 mg/ml i metanol fortynnet til 100 µg/ml og 10 µg/ml i metanol. Denne ble oppbevart i fryser ved -18 °C. Til forsøkene ble disse løsningene fortynnet videre i acetonitril til konsentrasjonene 0,2 og 0,4 µM CsC, og i etylacetat til konsentrasjonen 0,2 µM CsC.

2.3.4 Bufferløsninger

Inkubasjonsbuffer til metabolismeforsøkene bestod av 200 mM Tris-H₂SO₄ med pH 7,4, 20 mM MgSO₄ og 10 mM NADPH (Tabell 2-2). Trismabase ble løst i vann og titrert til pH 7,4 med H₂SO₄. MgSO₄ og NADPH ble også løst i vann til riktig konsentrasjon. Tris-H₂SO₄ (200 mM) og MgSO₄ (20 mM) ble oppbevart i kjøleskap, mens NADPH (10 mM) ble tillaget til hvert enkelt forsøk og oppbevart på is, lysbeskyttet med aluminiumsfolie.

Tabell 2-2 Inkubasjonsbuffer.

Bufferløsning	Mengde per rør (µl)
Tris-H ₂ SO ₄ (200 mM), pH 7,4	130
MgSO ₄ (20 mM)	5,5
NADPH (10 mM)	35
Totalt	170,5

Bufferløsningen som ble brukt til fortynning av mikrosomene var Lise Madsen-buffer (Tabell 2-3). Sukrose, hepes og EDTA ble innveid og løst i vann. pH ble deretter justert til 7,4 med 4 M NaOH. Lise Madsen-bufferen ble oppbevart i kjøleskap.

Tabell 2-3 Bufferløsning til mikrosomene,

Lise Madsen-buffer, pH 7,4	Konsentrasjon
Sukrose	0,25 M
Hepes	10 mM
EDTA	2,0 mM

2.3.5 Mobilfaseløsninger

Mobilfaseløsningene som ble brukt under analysen bestod av mobilfase A med sammensetningen 20 % (v/v) acetonitril og 80 % (v/v) 20 mM ammoniumformiat buffer, pH 3,6, og mobilfase B med sammensetningen 80 % (v/v) acetonitril og 20 % (v/v) 20 mM ammoniumformiat buffer, pH 3,6. Ammoniumformiat bufferen ble laget ved å fortynne 1,5 ml 25 % ammoniakk (NH₃) i 1 liter vann slik at konsentrasjonen ble 20 mM. Deretter ble maursyre tilsatt dråpevis til pH 3,6 ble oppnådd. Acetonitril og ammoniumformiat bufferen ble til slutt blandet til riktig forhold i de to mobilfasesammensetningene (Tabell 2-4).

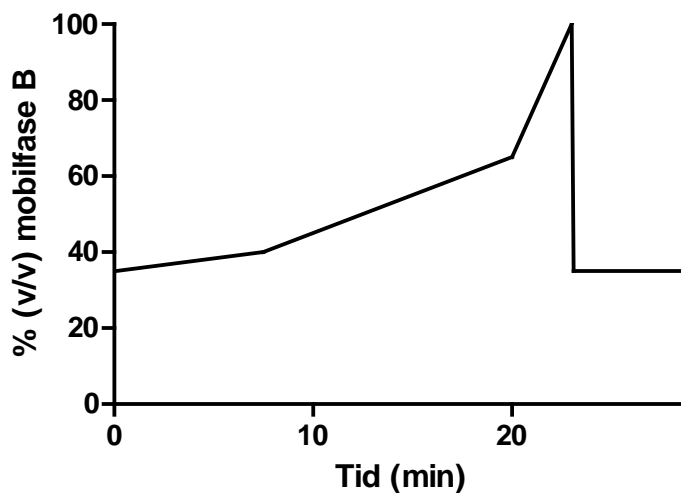
Tabell 2-4 Mobilfasesammensetning.

	Mobilfase A (ml)	Mobilfase B (ml)
Acetonitril	200	800
Ammoniumformiat buffer (20 mM), pH 3,6	800	200
Totalt	1000	1000

2.4 Opprinnelig analysemetode

Prøvene ble analysert på high performance liquid chromatography (HPLC) (Ultimate 3000 autosampler og pumpe) med Finnigan LOQ^{DUO} ionefelle tandem massespektroskopi (MS/MS) APCI i positiv modus, som detektor (levert av Thermo Finnigan, USA). Denne metoden var utviklet og validert av Falck et al. [35]. Prøvene ble injisert i et volum på 100 µl på omvendt fase C8 kolonne (BetaBasic C8 kolonne (30 x 2,1 mm, 3 µm)) med forkolonne (Drop-In Guard Cartridge C8 forkolonne (10 x 2 mm, 5 µm)), begge levert av Thermo

Electron Corporation, USA. Kolonnen var forvarmet til 70 °C i kolonneovn (Prominence Column Oven, CTO-20AC) levert av Shimadzu, Japan. Analyttene ble eluert med en gradient med en mobilfasehastighet på 0,2 ml/min. Gradientprogrammet startet med 65 % (v/v) mobilfase A og 35 % (v/v) mobilfase B. Andel mobilfase B ble gradvis økt til 40 % (v/v) etter 7,5 minutter, med videre økning til 65 % (v/v) etter 20 minutter. Gradienten avsluttet med en rask økning til 100 % (v/v) mobilfase B før ca. seks minutters reekvilibrering til utgangsbetingelsene (Figur 2-1). Metabolittene AM1 og AM9 hadde retensjonstider på henholdsvis ca. 13,2 og 13,8 minutter, mens intern standard (CsC) og CsA ble eluert etter henholdsvis ca. 19,1 og 21,2 minutter. Den totale analysetiden var på 30 minutter. De første 4 minuttene og de siste 30 sekundene gikk utenfor MS-detektoren. MS-detektoren var innstilt på MRM slik at selekterte forløperion ble fragmentert og fragmenter med spesifikke m/z-forhold ble detektert (Tabell 2-5).



Figur 2-1 Gradientprogrammet. Relativt innhold mobilfase B mot tid etter injeksjon.

Tabell 2-5 Fragmentoverganger for CsA, metabolittene AM1 og AM9 og intern standard CsC.

	m/z-verdi	m/z-verdi til fragmentene
AM1	1219,7	1074,2-1077,2 1115,2-1118,2 1200,2-1203,2
AM9	1219,7	1074,2-1077,2 1115,2-1118,2 1200,2-1203,2
CsA	1203,7	1069,5-1072,5 1183,2-1186,2
CsC	1219,7	1087,2-1090,2 1200,2-1203,2

2.5 Metabolismestudier med cyklosporin A – innledende forsøk

2.5.1 Standardkurver

Standardkurver bestående av 8 konsentrasjoner fra 2 til 400 ng/ml (2, 4, 8, 20, 40, 80, 200 og 400 ng/ml) ble laget ved å pipettere ut volumer som tilsvarte konsentrasjonen til den aktuelle standarden fra løsninger med metabolittene AM1 og AM9 og CsA med konsentrasjonene 10, 100 og 1000 ng/ml. Standardene ble også tilsatt samme mengde intern standard (CsC) som i prøvene, fra en løsning med konsentrasjon 0,5 µg/ml. Disse løsningene ble så dampet inn under nitrogengass, før standardene ble reløst i 250 µl av en blanding av mobilfasene som bestod av 65 % (v/v) mobilfase A og 35 % (v/v) mobilfase B (Tabell 2-4).

2.5.2 Generell inkubasjonsprosedyre

Inkubasjonsbetingelsene ble hentet fra Hermann et al. [44], hvor ulike inkubasjonsbetingelser ble utprøvd for å finne de mest optimale betingelsene for metabolittdannelse fra CsA. Det ble funnet at sluttkonsentrasjoner på 118 mM Tris-H₂SO₄, 0,5 mM MgSO₄ og 1,6 mM NADPH etter tilsetning av mikrosomer ga best dannelse av metabolittene AM1 og AM9 [44].

I hvert rør ble 22 µl hjelpeløsning med den aktuelle konsentrasjonen av CsA tilsatt og blandet med 148 µl bufferløsning (Tabell 2-2), slik at volumet ble 170 µl i det enkelte rør før tilsetning

av 50 µl mikrosomløsning. Det ble brukt silikonerte glassrør siden CsA bindes til plast [54]. Mikrosomløsningen bestod til disse innledende forsøkene av mikrosomer fortynnet 64 ganger i Lise Madsen-buffer (Tabell 2-3). Det ble brukt insektmikrosomer med CYP3A4, cytokrom P450 reduktase og cytokrom b₅, deklart innhold er gjengitt i tabell 2-1. Sluttkonsentrasjon CYP3A4 i inkubasjonsløsningen var på 3,54 nM og 5,00 µg totalt proteininnhold. Før mikrosomene ble tilsatt, ble rørene preinkubert i ca. 5 minutter på vannbad med 37 °C og risting på trinn 7,5. Inkubasjonen ble stoppet med tilsetning av 150 µl iskald acetonitril med intern standard, 0,4 µM CsC i forsøket med 1 % metanol og 0,2 µM CsC i tidsforsøkene og i forsøket med 5 % metanol. Etter at rørene hadde stått på is i minimum 30 minutter ble de sentrifugert ved 1600 g og 4 °C i 5 minutter, før 250 µl av supernatanten ble pipettert over i autosamplerrør. De ble deretter lagt direkte i fryseren eller dampet inn til tørrhet med Speedvac®. Før innjisering på kolonnen ble prøvene reløst i 250 µl av en blanding av mobilfasene som bestod av 65 % (v/v) mobilfase A og 35 % (v/v) mobilfase B (Tabell 2-4).

2.5.3 Metabolittdannelse som funksjon av tid

For å finne inkubasjonstiden, ble det gjort forsøk der det ble sett på dannelsen av metabolittene over tid. Konsentrasjonen av CsA som ble brukt var 2 µM, som var nær den konsentrasjonen flere har funnet å være K_m-verdien [44, 55]. Prøvene ble inkubert i 7 tider (2,5, 5, 10, 15, 20, 30 og 60 minutter) med 2 paralleller på hvert tidspunkt. Alle prøvene hadde 1 % (v/v) metanol. Inkubasjonstiden ble valgt i området der dannelsen av metabolittene var tidslinær.

2.5.4 Metabolittdannelse som funksjon av konsentrasjon organisk modifikator

For å se på effekten av metanol i inkubasjonene, ble det gjort et forsøk med ulike konsentrasjoner metanol, men med samme konsentrasjon av CsA. Konsentrasjonen 2 µM ble valgt siden det er en lav konsentrasjon som ville kunne være løst uten tilsetning av organisk modifikator. Metanolvolumene som ble tilsatt, ble trukket fra volumet av Tris-H₂SO₄-bufferen. Serien bestod av 6 ulike metanolkonsentrasjoner, hver med to paralleller (0, 1, 2, 4, 5, 6 % (v/v)). Inkubasjonstiden var 10 minutter som bestemt i kap. 2.5.3. I stedet for å bli direkte reløst i mobilfaseblandingen med 65 % (v/v) mobilfase A og 35 % (v/v) mobilfase B (Tabell 2-4), ble prøvene reløst i 220 µl vann. Deretter ble de ekstrahert to ganger med 220 µl

romtemperert etylacetat. Den samlede organiske fasen (den øverste) ble så dampet inn under nitrogengass og reløst i 55 µl av mobilfaseblandingen. Prøvene ble så analysert med den nye metoden på UPLC koblet til trippelkvadrupol MS (Kap. 2.6).

2.5.5 Metabolittdannelse som funksjon av substrat- og metanolkonsentrasjon

Det ble sett på hastigheten for dannelsen av metabolitter fra ulike konsentrasjoner CsA med 1 og 5 % (v/v) metanol tilsatt i inkubasjonene. Metanol ble tilsatt på grunn av den dårlige løseligheten til CsA i vandig miljø [34], Det ble tilsatt lik mengde metanol i alle konsentrasjoner i samme serie. Det er ønskelig med så lav konsentrasjon av organisk løsningsmiddel som mulig, siden det hemmer aktiviteten til mikrosomene [56]. Alle konsentrasjonene ble inkubert i 10 minutter. Forsøket med 1 % (v/v) metanol hadde 8 ulike konsentrasjoner CsA (0,25, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20 og 40 µM), mens forsøket med 5 % (v/v) metanol hadde 10 konsentrasjoner CsA (0,25, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, 40, 60 og 100 µM). I tillegg ble det inkubert en kontroll der CsA i metanol var erstattet med ren metanol. Alle konsentrasjoner og kontroller ble inkubert i to paralleller. I forsøkene med 5 % (v/v) metanol ble volumet metanol trukket fra volumet av Tris-H₂SO₄-bufferen.

2.6 Utvikling av ny analysemetode for AM1 og AM9

På grunn av at MS/MS ionefellen som ble brukt innledningsvis måtte byttes ut, ble det utviklet en ny analysemetode ved Aquity Ultra Performance liquid chromatographyTM (UPLC) koblet til trippelkvadrupol massespekteret Micromass Quattro *micro*TM, begge levert av Waters Corporation, USA.

For å finne m/z-forholdet til metabolittene, CsA og CsC ble det kjørt fullt scan under kontinuerlig infusjon av standardløsning inn i massespektrometeret. Både APCI og ESI i positiv modus ble testet. Videre ble innstillinger som cone-spenning, kapillærspenning, cone-temperatur, kapillærtemperatur, hastighet på nebulisatorgass og tørkegass og scanintervall optimalisert. Det ble utprøvd både enkel, SIR, og tandem, SRM, MS, for å se hva som ga best intensitet på signalene og dermed lavest deteksjonsgrense. Sentrale innstillinger på massespektrometeret er oppsummert i tabell 2-6.

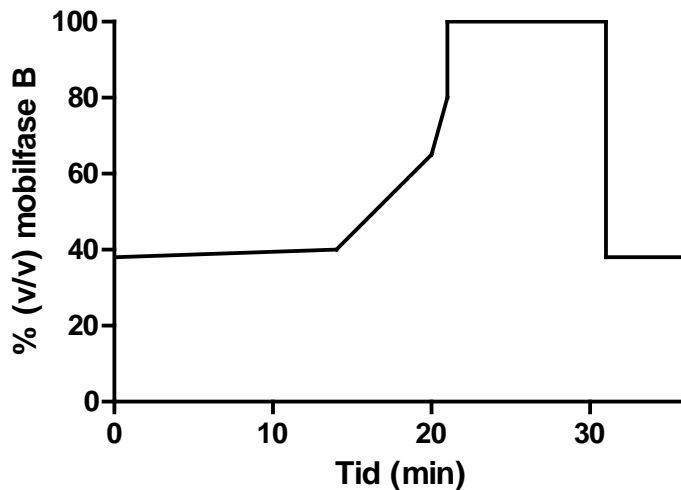
Den kromatografiske separasjonen ble også optimalisert. Det ble forsøkt to ulike kolonner. Den opprinnelige omvendtfase HPLC C8-kolonnen (30 x 2,1 mm, 3 µm) med forkolonne (10 x 2 mm, 5 µm). Den andre kolonnen var en omvendtfase UPLC C18-kolonne (100 x 2,1 mm, 1,7 µm), (Acquity UPLC BEH Shield C18) levert av Waters, USA. God kromatografisk separasjon av metabolittene AM1 og AM9 var nødvendig siden de hadde likt m/z-forhold. Injiseringvolumet var på 20 µl. Gradienten ble med utgangspunkt i gradienten fra Falck et al. [35], tilpasset det nye systemet og optimalisert. Mobilfasegradienten er vist i tabell 2-7 og figur 2-2.

Tabell 2-6 Sentrale MS-innstillinger.

MS-innstillinger	
Ionisering	ESI +
Nebulisorgass	Nitrogen
Hastighet på nebulisatorgass (l/t)	90
Fordampningsgass	Nitrogen
Hastighet på fordampningsgass (l/t)	500
Cone temperatur (°C)	110
Kapillærtemperatur (°C)	450
Cone spenning (V)	60
Kapillærspenning (kV)	3,0
Scanintervall (sek)	1,0

Tabell 2-7 Mobilfasegradient.

Tid (min)	Hastighet (ml/min)	Mobilfase A (% (v/v))	Mobilfase B (% (v/v))
0,00	0,600	62,0	38,0
14,0	0,600	60,0	40,0
20,0	0,600	35,0	65,0
21,0	0,600	20,0	80,0
21,2	0,600	0,00	100
31,0	0,600	0,00	100
31,2	0,600	62,0	38,0
36,0	0,600	62,0	38,0



Figur 2-2 Gradientprogrammet. Relativt innhold mobilfase B mot tid etter injeksjon.

2.6.1 Prøveopparbeidelse

Den nye analysemetoden gjorde det nødvendig med en prøveopparbeidelse som kunne gi renere prøver, for å minske bakgrunnsstøyen i kromatogrammene og/eller oppkonsentrering. Det ble først testet å oppkonsentrere prøvene med den opprinnelige prøveopparbeidelsen, proteinfelling med acetonitril. Det ble tatt ut 300 μl av supernatanten etter sentrifugering, denne ble dampet inn, for deretter å bli reløst i 50 μl av mobilfaseblandingen med 65 % (v/v) mobilfase A og 35 % (v/v) mobilfase B (Tabell 2-4).

Med utgangspunkt i en tidligere masteroppgave [57] og Dai et al. [55] ble det forsøkt væske-væske-ekstraksjon med etylacetat på ulike måter. Det ble forsøkt å ekstrahere med etylacetat (fem ganger volum av prøvevolumet) etter vanlig proteinfelling med iskald acetonitril etterfulgt av sentrifugering. Proteinfellingen med acetonitril ble også forsøkt byttet ut med proteinfelling og ekstraksjon i ett, med 2 ekstraksjoner med 220 μl iskald etylacetat, der første ekstraksjon var tilsatt 0,2 μM intern standard. Det ble også gjort forsøk med romtemperert etylacetat. Denne metoden ble også forsøkt med 4 ganger oppkonsentrering, ved at prøvene etter inndampning av samlet organisk fase ble reløst i 55 μl mobilfaseblanding i stedet for 220 μl . I tillegg ble det analysert prøver der volumet med Lise Madsen-buffer var byttet ut med Tris- H_2SO_4 -buffer, for å se om denne Lise Madsen-buffere suppresserte signalene under analysen.

2.6.2 Validering

Metoden ble validert med utgangspunkt i retningslinjer utgitt av FDA og ICH [58, 59]. Det ble validert for linearitet, nøyaktighet og presisjon. I tillegg ble ren matriks (bufferløsninger og mikrosomer, uten analytter) analysert for å se om matriksen alene ga signaler ved samme retensjonstid som noen av analyttene.

Valideringsprøvene og standardene til standardkurvene ble laget på samme måte, mest mulig likt prøvene. Volumer som tilsvarte konsentrasjonen til den aktuelle standarden ble pipettert ut fra løsninger med AM1, AM9 og CsA med konsentrasjonene 1, 10, 100 og 1000 ng/ml. Løsningene ble så dampet inn under nitrogengass, før de ble reløst i og tilsatt 119 µl tris-H₂SO₄ buffer, 5,5 µl MgSO₄, 35 µl vann (med 10 mM NADPH i matriksprøvene), 11 µl metanol og 50 µl Lise Madsen-buffer (med 64 ganger fortykning av insektmikrosomer med cytokrom b₅ i matriksprøvene). Deretter ble de ekstrahert to ganger med 220 µl romtemperert etylacetat, hvorav etylacetat i den første ekstraksjonen var tilsatt 0,2 µM intern standard (CsC). Den samlede organiske fasen (øverste fase) ble dampet inn til tørrhet under nitrogengass, før standardene ble reløst i 55 µl av mobilfaseblandingen med 65 % (v/v) mobilfase A og 35 % (v/v) mobilfase B (Tabell 2-4).

Lineariteten ble undersøkt ved å analysere en standardrekke med seks konsentrasjoner mellom 0,4 og 20 ng/ml (0,4, 0,8, 2, 4, 8 og 20 ng/ml). Tre standardrekker ble analysert på hver sin dag (n = 3). Det ble også analysert en standardrekke med 10 konsentrasjoner fra 0,4 til 400 ng/ml (0,4, 0,8, 2, 4, 8, 20, 40, 80, 200 og 400 ng/ml) for å se på lineariteten ved høyere konsentrasjoner. Kravet for kvantifiseringsgrensen ble satt til S/N-ratio lik 5. Nøyaktigheten og presisjonen til metoden ble testet ved å analysere tre konsentrasjoner (0,4, 4 og 20 ng/ml) med tre paralleller samme dag (intradag) og 1 parallell på tre ulike dager (interdag).

2.7 Metabolismestudier med cyklosporin A i ulike mikrosommodeller

Prosedyren var lik som for de innledende forsøkene inntil avslutning av inkubasjonen. Her ble metabolismen stanset etter 10 minutters inkubasjon ved å tilsette 220 µl romtemperert etylacetat med 0,2 µM CsC som intern standard, for så å virvle prøvene godt før henstand i ca. 30 minutter i romtemperatur. Den organiske fasen ble pipettert ut, mens vannfasen ble

ekstrahert en gang til med 220 μl romtemperert etylacetat, denne gang uten intern standard. Den samlede organiske fasen ble dampet inn til tørrhet under nitrogengass, før prøvene ble reløst i 55 μl av mobilfaseblandingen med 65 % (v/v) mobilfase A og 35 % (v/v) mobilfase B (Tabell 2-4).

I alle tre mikrosommodellene (insektmikrosomer med CYP3A4, cytokrom P450 reduktase, med og uten cytokrom b_5 og THLE-mikrosomer med CYP3A4) ble det utført serier med 10 konsentrasjoner fra 0,25 til 100 μM CsA (0,25, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, 40, 60 og 100 μM), alle med 5 % (v/v) metanol tilsatt. I tillegg ble det inkubert en kontroll der CsA i metanol var erstattet med ren metanol. Alle konsentrasjoner og kontroller ble inkubert i to paralleller. Med insektmikrosomer med cytokrom b_5 og THLE-mikrosomer ble det inkubert tre serier ($n = 3$), mens det med insektmikrosomer uten cytokrom ble inkubert kun en serie ($n = 1$).

Til insektmikrosommodellene bestod mikrosomløsningen av insektmikrosomer med CYP3A4, cytokrom P450 reduktase med/uten cytokrom b_5 , fortynnet 64 ganger i Lise Madsen-buffer. Deklarert innhold i mikrosompreparatene er gjengitt i tabell 2-1. Sluttkonsentrasjonen av CYP3A4 ble 3,54 og 7,09 nM i insektmikrosomene for henholdsvis med og uten cytokrom b_5 . Totalproteininnholdet var 5,00 μg i de to første forsøkene og 6,25 μg i det siste i insektmikrosomene med cytokrom b_5 , og 2,27 μg i insektmikrosomene uten cytokrom b_5 . THLE-mikrosomene ble ikke fortynnet, men tilsatt 50 μl direkte ved start av inkubasjonen. Sluttkonsentrasjonen av CYP3A4 var i denne modellen 6,22 nM, (bestemt med western immunoblottingmetode som beskrevet i Christensen et al. [53]) og totalt proteininnhold var 5,84 μg .

2.8 Databearbeidelse

Kromatogrammene ble integrert ved hjelp av programvaren MassLynx versjon 4.1, som fulgte analysesystemet. Topphøydene ble derfra overført til Microsoft Office Excel 2007, hvor topphøydeforholdet analytt/intern standard ble regnet ut. Excel ble også brukt til å beregne valideringsresultatene. Kinetiske tilpasninger ble utført i GraphPad Prism versjon 5. Beste tilpasning til Michaelis-Menten kinetikk og de atypiske kinetikkmodellene substrathemming og autoaktivering ble undersøkt. Minitab versjon 15 ble brukt til de statistiske analysene av de kinetiske parametrene.

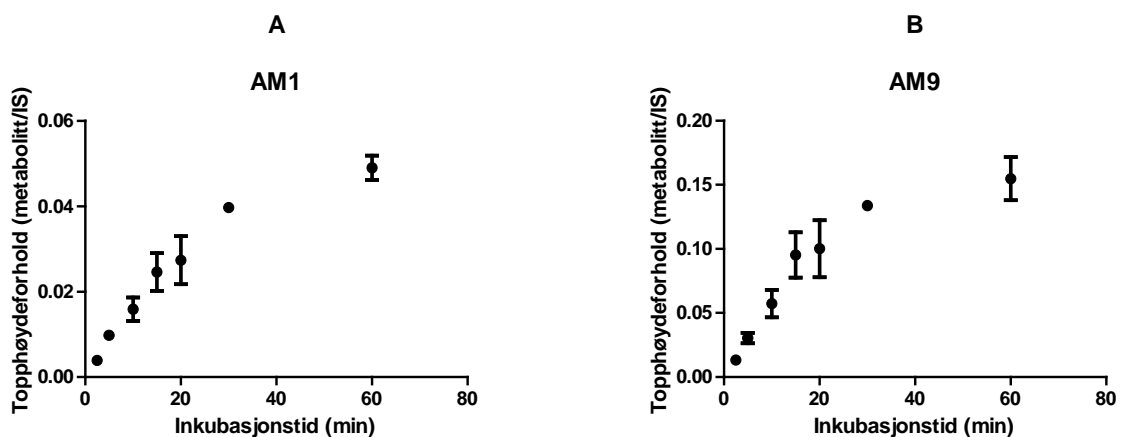
3 Resultater

3.1 Metabolismestudier med cyclosporin A – innledende forsøk

Standardkurver for metabolittene AM1 og AM9 ved metoden benyttet i de innledende forsøkene hadde en lineær sammenheng mellom konsentrasjonen av standardene og topphøydeforholdet mellom metabolitt og intern standard. Korrelasjonskoeffisienten (r^2) lå mellom 0,983 og 0,994 for AM1 og mellom 0,977 og 0,997 for AM9.

3.1.1 Metabolittdannelse som funksjon av tid

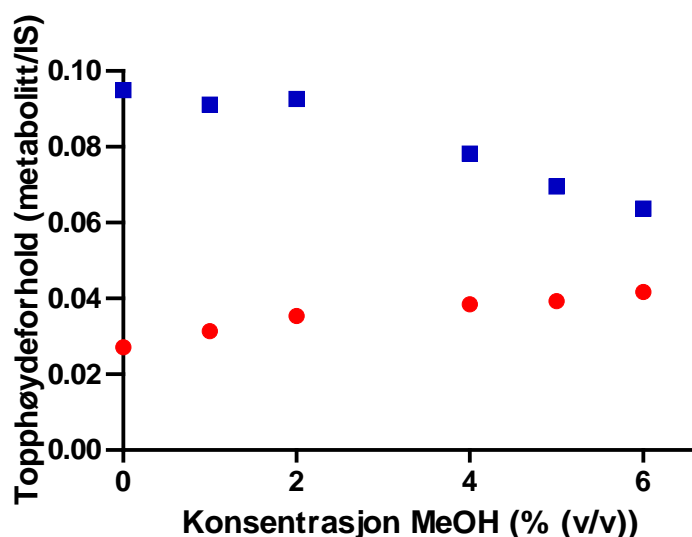
Dannelsen av metabolittene AM1 og AM9 er i figur 3-1 plottet mot inkubasjonstiden. Disse tidskurvene var tilnærmet lineære frem til 15 minutter for begge metabolittene etter inkubering av 2 μ M CsA med insektmikrosomer med CYP3A4, cytokrom P450 reduktase og cytokrom b₅. Etter 15 minutter var det en tendens, som økte med tiden, til at kurven flatet ut og systemet nådde metning.



Figur 3-1 Dannelse av metabolittene AM1 (A) og AM9 (B) etter inkubasjon av 2 μ M CsA med insektmikrosomer med CYP3A4, cytokrom P450 reduktase og cytokrom b₅, som funksjon av tid.

3.1.2 Metabolittdannelse som funksjon av konsentrasjon organisk modifikator

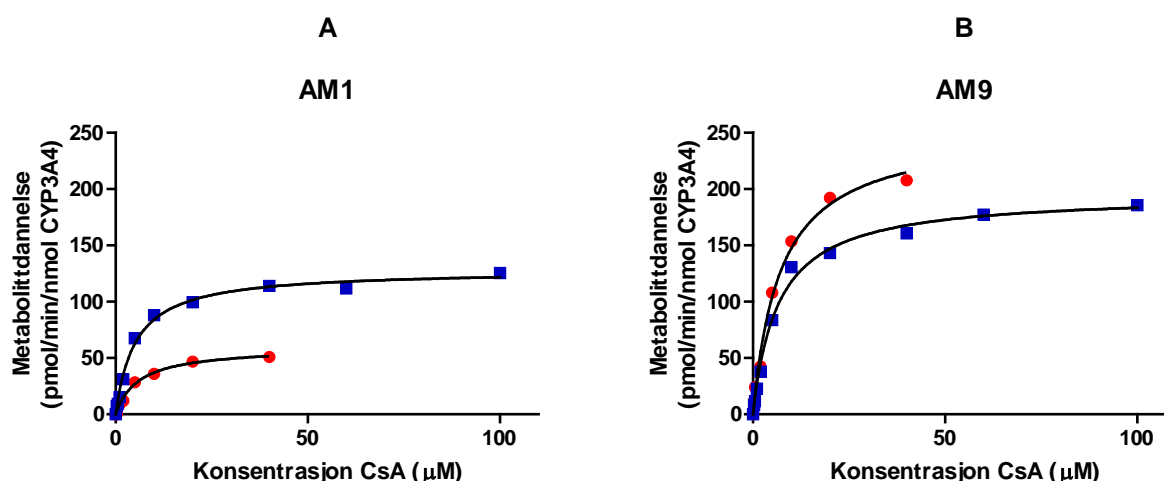
Metabolitten AM1 viste etter inkubasjon med 2 μM CsA og insektmikrosomer med CYP3A4, cytokrom P450 reduktase og cytokrom b_5 , svak økning i dannelse med økende volumkonsentrasjon metanol (Figur 3-2). Fra prøven uten tilsatt metanol eller annen organisk modifikator, til prøven med 1 % (v/v) metanol økte dannelsen av metabolitten med om lag 15 %. Til prøven med 5 % (v/v) metanol økte metabolittdannelsen med om lag 31 % fra prøven uten tilsatt metanol. Metabolitten AM9 viste derimot en synkende metabolittdannelse med økende konsentrasjon metanol (Figur 3-2). Her sank metabolittdannelsen med om lag 4 og 36 % fra prøven uten metanol til prøven med henholdsvis 1 og 5 % (v/v) metanol.



Figur 3-2 Dannelse av metabolittene AM1 (●) og AM9 (■) etter inkubasjon av 2 μM CsA sammen med insektmikrosomer med CYP3A4, cytokrom P450 reduktase og cytokrom b_5 som funksjon av metanolkonsentrasjon.

3.1.3 Metabolittdannelse som funksjon av substrat- og metanolkonsentrasjon

Tilsetning av 1 % (v/v) metanol til inkubasjonsløsningen gjorde det mulig å løse inntil 40 μM CsA. Med 5 % (v/v) metanol kunne konsentrasjoner opp til 100 μM inkluderes i inkubasjonene. Dannelsen av begge metabolittene så ut til å følge klassisk Michaelis-Menten kinetikk, både ved 1 og 5 % (v/v) metanol tilsatt (Figur 3-3). Det er noe usikkert ved 1 % (v/v) metanol siden kurven ikke har nådd metningspunktet.

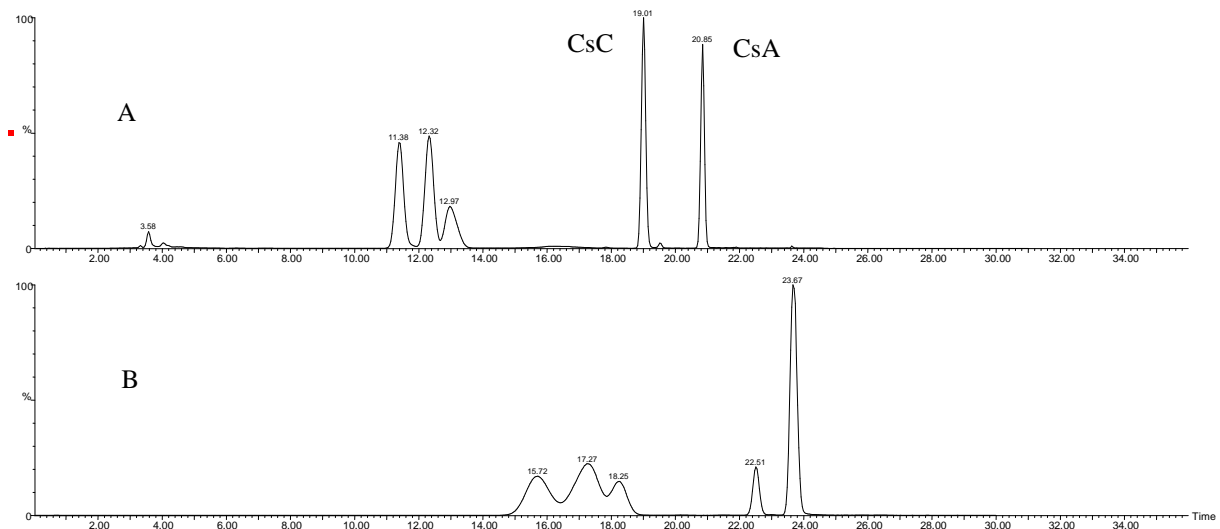


Figur 3-3 Dannelse av metabolittene AM1 (A) og AM9 (B) med 1 % (v/v) metanol (●), og med 5 % (v/v) metanol (■), som funksjon av konsentrasjon CsA. Beste kurvetilpasning til Michaelis-Menten modellen er vist.

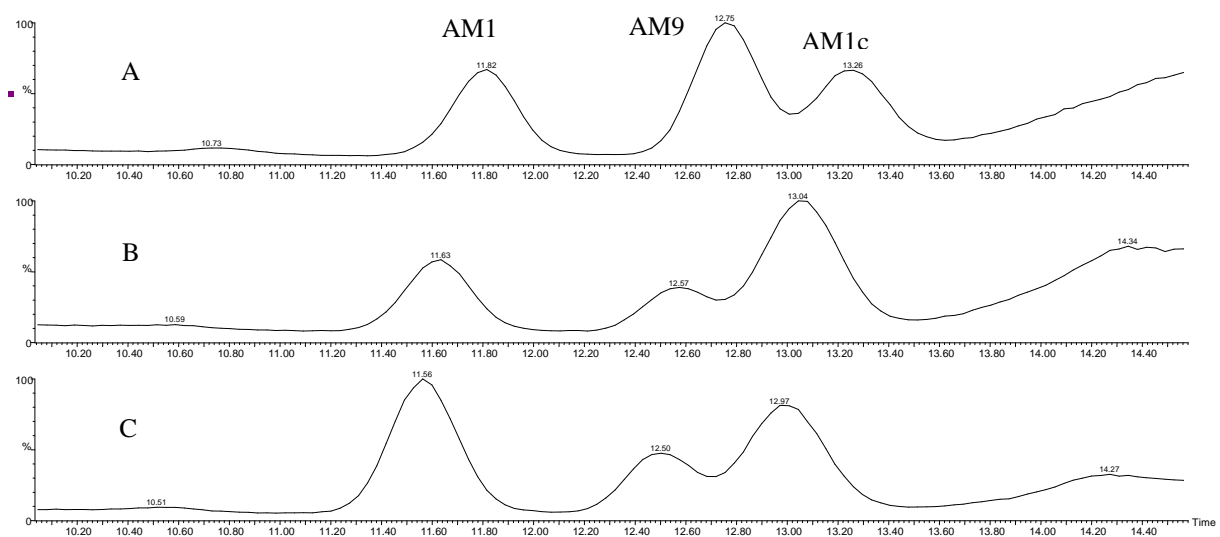
3.2 Utvikling av ny analysemetode for AM1 og AM9

Masse over ladning (m/z) forholdet ble funnet til å være 1202,8 for CsA og 1218,8 for metabolittene AM1 og AM9 og intern standard CsC. Retensjonstidene til CsA, AM1, AM9 og CsC var henholdsvis ca. 20,8, 11,6, 12,5 og 19,1 minutter. Ved test av ioniseringskilde ble det funnet at ESI ga bedre signaler enn APCI. Generelt vil bruk av tandem massespektrometer gi bedre selektivitet og S/N-ratio. Her ble ikke dette tilfellet siden det var nødvendig med så høy energi for å oppnå nok fragmentering til å gi god intensitet på signalene, at mye av fragmentene ble fragmentert videre umiddelbart. Ved enkel MS ble intensiteten på signalene bedre (opptil 10 ganger bedre) og det var mulig å oppnå tilfredsstillende S/N-ratio.

Forsøk med ulike omvendt fase kolonner, UPLC C18-kolonne og den opprinnelige HPLC C8-kolonnen med og uten forkolonne, viste at UPLC-kolonnen ga bedre separasjon samt spissere og høyere topper og dermed lavere deteksjonsgrense enn HPLC-kolonnen. Eksempel på kromatogram av standard med UPLC-kolonnen og HPLC-kolonnen er vist i figur 3-4. Figur 3-5 viser representative kromatogram innzoomet på metabolittene i de tre mikrosommodellene. Endelige kromatografiske og MS parametre er oppsummert i tabell 2-6 og 2-7 i materialer og metode (Kap. 2.6).



Figur 3-4 Eksempel på kromatogram fra henholdsvis UPLC-kolonnen (A) og HPLC-kolonnen (B).



Figur 3-5 Eksempel på kromatogram zoomet inn på metabolittene AM1, AM9 og AM1c (ikke med i oppgaven), fra insektmikrosomer med CYP3A4, cytokrom P450 reduktase og cytokrom b₅ (A), insektmikrosomer med CYP3A4, cytokrom P450 reduktase uten cytokrom b₅ (B) og THLE-mikrosomer med CYP3A4 (C).

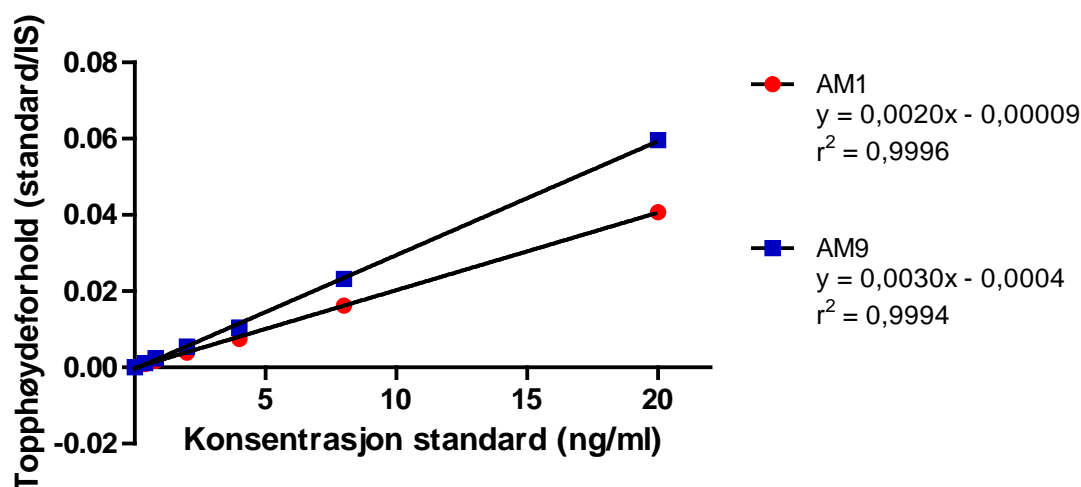
3.2.1 Prøveoppbeidelse

Påfølgende S/N-ratio er basert på 4 ng/ml standarden for metabolitten AM1, som blant analyttene hadde lavest signal. Den opprinnelige prøveoppbeidelsen med proteinfelling med acetonitril etterfulgt av sentrifugering ga S/N-ratio på 33. En seks ganger oppkonsentrering

med samme prøveopparbeidelse ga S/N-ratio på 71. Samtidig proteinfelling og væske-væske-ekstraksjon med 2 ganger 220 μ l etylacetat ga S/N-ratio på 56. Ved å oppkonsentrere 4 ganger etter proteinfelling og ekstraksjon med etylacetat ble en S/N-ratio på 115 oppnådd. Det gjør at deteksjonsgrensen, med krav om S/N-ratio på minst 5, teoretisk kommer ned i 0,17 ng/ml for metabolitten AM1. Tilsvarende teoretisk deteksjonsgrense for metabolitten AM9 ble beregnet til 0,11 ng/ml. Forsøk der Lise Madsen-bufferen var byttet ut med Tris-H₂SO₄-buffer ga dårligere signaler enn der begge bufferne var tilstede. Forsøk viste at kald etylacetat, etter inndamping felte ut ved reløsning i mobilfaseblandingen. Det så ut til at det skyldes kombinasjonen etylacetat og acetonitril. Ved bruk av etylacetat som hadde stått i romtemperatur hele tiden var det ikke tegn til utfelling, så dette ble gjort i det videre arbeidet.

3.2.2 Validering av ny analysemetode

Valideringen bestod av test for linearitet, nøyaktighet og presisjon. Standardkurvene viste linearitet fra 0 til 20 ng/ml (Figur 3-6). Korrelasjonskoeffisienten (r^2) varierte fra 0,9976 til 0,9999 for AM1 og mellom 0,9966 og 0,9998 for AM9 under valideringsforsøkene.



Figur 3-6 Eksempel på standardkurve for AM1 og AM9 med tilhørende likning og korrelasjonskoeffisient.

Intradag variasjon for AM1 og AM9 varierte mellom 0,49 og 3,38 % relativt standardavvik (RSD) og nøyaktigheten varierte fra -1,62 til 4,01 % avvik (Tabell 3-1). Variasjonen var noe større for interdag variasjon, der den varierte fra 3,34 til 8,56 % RSD. Nøyaktigheten derimot, så ut til å være mindre variabel interdag, med variasjon mellom -0,825 og 2,41 % avvik fra sann verdi (Tabell 3-1). Alle verdiene lå under 5 % avvik fra sann verdi og 9 % variasjon.

Matriksprøver uten analyttene viste også at matriksen ikke ga opphav til topper på samme sted som analyttene i kromatogrammet.

Tabell 3-1 Presisjon og nøyaktighet for bestemmelse av metabolittene AM1 og AM9.

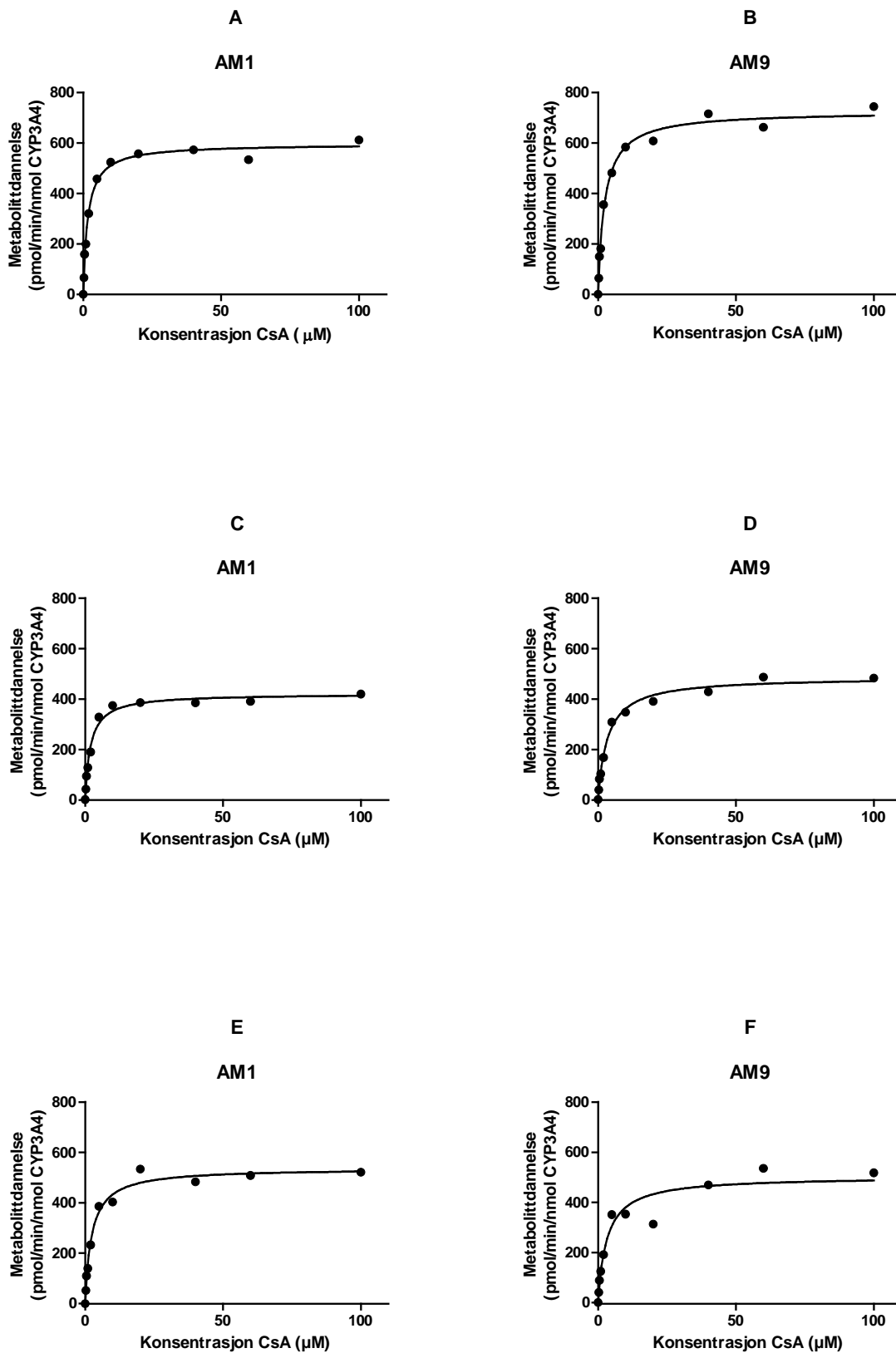
	Analytt	Nominell konsentrasjon (ng/ml)	Estimert konsentrasjon (ng/ml) (gjennomsnitt ± SD)	Presisjon (% RSD)	Nøyaktighet (% avvik)
Intradag variasjon	AM1	0,4	0,404 ± 0,0126	3,12	1,10
		4	3,99 ± 0,0502	1,26	-0,207
		20	20,7 ± 0,699	3,38	3,32
	AM9	0,4	0,416 ± 0,0138	3,32	4,01
		4	3,94 ± 0,0191	0,49	-1,62
		20	20,4 ± 0,645	3,16	2,05
Interdag variasjon	AM1	0,4	0,401 ± 0,0222	5,53	0,374
		4	4,02 ± 0,164	4,08	0,543
		20	20,3 ± 1,74	8,56	1,67
	AM9	0,4	0,410 ± 0,0232	5,66	2,41
		4	3,97 ± 0,133	3,34	-0,825
		20	20,2 ± 1,63	8,09	0,781

3.3 Metabolismestudier med cyklosporin A i ulike mikrosommodeller

3.3.1 Insektmikrosomer med CYP3A4, cytokrom P450 reduktase og cytokrom b₅

Hastighetskurvene for dannelsen av metabolittene AM1 og AM9 i tre separate forsøk er vist i figur 3-7. Dannelsen av begge metabolittene så ut til å følge Michaelis-Menten liknende kinetikk. Tilpasning til substrathemmingsmodellen er presentert for den aktuelle metabolitten i de aktuelle forsøkene i tabell 3-3. Det var bare metabolitten AM1 som i forsøk 2 og 3 ga entydig tilpasning til substrathemmingskinetikk. Sett i forhold til tilpasningen til Michaelis-Menten modellen (Tabell 3-2), ga substrathemmingsmodellen noe bedre korrelasjonskoeffisient, men også bredere 95 % konfidensintervall for både K_m og V_{max} som inneholdt 0,0. Tilpasning til Hill-likningen og autoaktivering ga også god

korrelasjonskoeffisient (Tabell 3-4), men 95 % konfidensintervall for n inneholdt verdien 1 og n var derfor ikke signifikant forskjellig fra 1. Det vistes også i at K_m fra Michaelis-Menten tilpasningen sammenfalt med S_{50}^n . Når det gjelder Michaelis-Menten modellen var det innad i hvert forsøk en tendens til at AM1 generelt ga en noe lavere K_m enn AM9, mens for V_{max} var det mer variabelt. Dette førte til at CL_{int} lå noe høyere for metabolitten AM1 enn for AM9. Metabolitten AM1 har K_m -verdier som varierte mellom 1,7 og 2,4 μM , mens AM9 varierte mellom 2,4 og 3,5 μM . V_{max} -verdiene for metabolittene var mer liknende og varierte for AM1 fra 422 til 596 pmol/min/nmol CYP3A4 og for AM9 mellom 488 og 726 pmol/min/nmol CYP3A4.



Figur 3-7 Dannelse av metabolittene AM1 og AM9 i insektmikrosomer med CYP3A4, cytokrom P450 reduktase og cytokrom b_5 som funksjon av konsentrasjon CsA. Figuren viser dannelsen av de to metabolittene i tre separate forsøk (A og B, C og D, E og F). Beste kurvetilpasning til Michaelis-Menten modellen er vist.

Tabell 3-2 Enzymkinetiske data basert på beste tilpasning til Michaelis-Menten kinetikk med 95 % konfidensintervall i parentes, for metabolittene AM1 og AM9 i insektmikrosomer med CYP3A4, cytokrom P450 reduktase og cytokrom b₅, i de enkelte forsøkene.

Forsøk	Metabolitt	$K_m^{(1)}$	$V_{max}^{(2)}$	$CL_{int}^{(3)}$	r^2
1	AM1	1,7 (1,3-2,1)	596 (570-623)	351	0,9914
	AM9	2,4 (1,8-3,0)	726 (688-764)	303	0,9900
2	AM1	2,0 (1,5-2,4)	422 (401-443)	211	0,9899
	AM9	3,5 (2,6-4,4)	488 (461-515)	139	0,9907
3	AM1	2,4 (1,7-3,1)	537 (503-571)	224	0,9859
	AM9	3,3 (1,2-5,4)	503 (432-574)	152	0,9410

⁽¹⁾ μM

⁽²⁾ pmol/min/nmol CYP3A4

⁽³⁾ $\mu\text{l}/\text{min}/\text{nmol}$ CYP3A4

Tabell 3-3 Enzymkinetiske data basert på beste tilpasning til substrathemmingskinetikk med 95 % konfidensintervall i parentes, for metabolitten AM1 i insektmikrosomer med CYP3A4, cytokrom P450 reduktase og cytokrom b₅, i de enkelte forsøkene. Forsøk 1 og dannelsen av metabolitten AM9 kunne ikke tilpasses denne kinetikkmodellen.

Forsøk	Metabolitt	$K_m^{(1)}$	$V_{max}^{(2)}$	K_{si}	$CL_{int}^{(3)}$	r^2
2	AM1	2,1 (1,4-2,8)	433 (387-480)	2062 (0,0-9402)	206	0,9904
		2,6 (1,5-3,7)	555 (476-633)	1789 (0,0-8853)	213	0,9866

⁽¹⁾ μM

⁽²⁾ pmol/min/nmol CYP3A4

⁽³⁾ $\mu\text{l}/\text{min}/\text{nmol}$ CYP3A4

Tabell 3-4 Enzymkinetiske data basert på beste tilpasning til sigmoidal kinetikk med 95 % konfidensintervall i parentes, for metabolittene AM1 og AM9 i insektmikrosomer med CYP3A4, cytokrom P450 reduktase og cytokrom b₅, i de enkelte forsøkene.

Forsøk	Metabolitt	S ₅₀ ⁽¹⁾	V _{max} ⁽²⁾	n	CL _{int} ⁽³⁾	r ²
1	AM1	1,7 (1,3-2,1)	591 (554-628)	1,1 (0,8-1,3)	348	0,9916
	AM9	2,4 (1,8-3,0)	739 (673-805)	0,9 (0,6-1,2)	308	0,9904
2	AM1	2,0 (1,5-2,5)	412 (387-438)	1,1 (0,9-1,5)	206	0,9916
	AM9	3,3 (2,5-4,1)	511 (458-563)	0,9 (0,7-1,1)	155	0,9924
3	AM1	2,5 (1,6-3,3)	532 (482-581)	1,0 (0,7-1,4)	213	0,9861
	AM9	3,4 (1,2-5,6)	606 (340-872)	0,7 (0,2-1,1)	178	0,9531

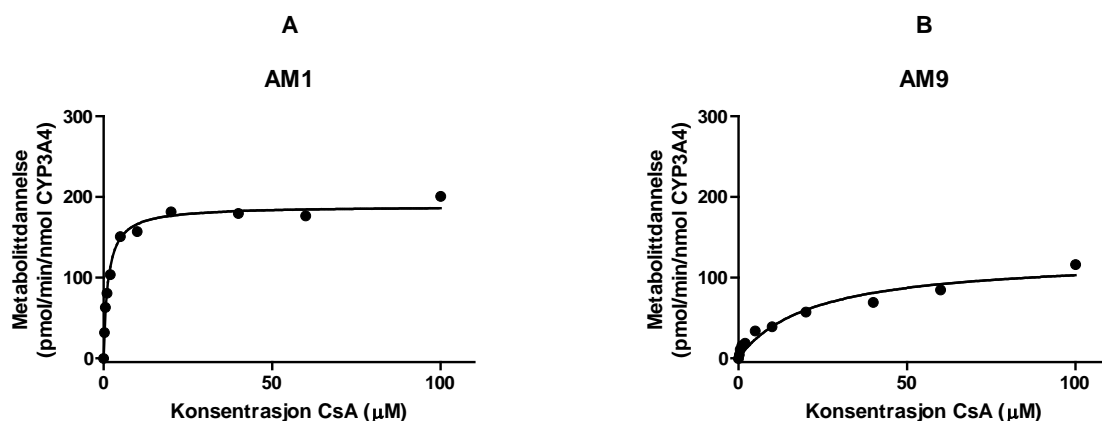
⁽¹⁾ μM

⁽²⁾ pmol/min/nmol CYP3A4

⁽³⁾ μl/min/nmol CYP3A4

3.3.2 Insektmikrosomer med CYP3A4, cytokrom P450 reduktase uten cytokrom b₅

Dannelsen av metabolittene så i denne modellen også ut til å følge Michaelis-Menten kinetikk (Figur 3-8). I dette systemet ga ikke kurvetilpasningen til substrathemmingsmodellen noe entydig svar for noen av metabolittene. AM1 ga derimot god tilpasning til sigmoidal kinetikkmodell (Tabell 3-6), men som i insektmikrosomene med cytokrom b₅ var ikke n signifikant forskjellig fra 1. Metabolitten AM9 kunne ikke tilpasses sigmoidal kinetikk. AM9 nådde ikke metning i dette konsentrasjonsområdet (Figur 3-8 B), de kinetiske dataene (Tabell 3-5) er derfor noe usikre. K_m for AM1 ble 1,3 μM, mens den for AM9 ble anslått til 22 μM med et bredt 95 % konfidensintervall. AM1 fikk V_{max} på 189 pmol/min/nmol CYP3A4. Tilsvarende for AM9 var 126 pmol/min/nmol CYP3A4. Dette ga CL_{int}-verdier på 145 μl/min/nmol CYP3A4 for AM1 og 5,7 μl/min/nmol CYP3A4 for AM9.



Figur 3-8 Dannelse av metabolittene AM1 og AM9 i insektmikrosomer med CYP3A4, cytokrom P450 reduktase uten cytokrom b_5 som funksjon av konsentrasjon CsA. Beste kurvetilpasning til Michaelis-Menten modellen er vist.

Tabell 3-5 Enzymkinetiske data basert på beste tilpasning til Michaelis-Menten kinetikk med 95 % konfidensintervall, for, for metabolittene AM1 og AM9 i insektmikrosomer med CYP3A4, cytokrom P450 reduktase uten cytokrom b_5 .

Forsøk	Metabolitt	$K_m^{(1)}$	$V_{max}^{(2)}$	$CL_{int}^{(3)}$	r^2
1	AM1	1,3 (1,0-1,7)	189 (179-198)	145	0,9864
	AM9	22 (6,1-38)	126 (93-158)	5,7	0,9477

⁽¹⁾ μM

⁽²⁾ pmol/min/nmol CYP3A4

⁽³⁾ $\mu\text{l}/\text{min}/\text{nmol}$ CYP3A4

Tabell 3-6 Enzymkinetiske data basert på beste tilpasning til sigmiodal kinetikk med 95 % konfidensintervall i parentes, for metabolitten AM1 i insektmikrosomer med CYP3A4, cytokrom P450 reduktase uten cytokrom b_5 . Metabolitten AM9 kunne ikke tilpasses denne modellen.

Forsøk	Metabolitt	$S_{50}^{(1)}$	$V_{max}^{(2)}$	n	$CL_{int}^{(3)}$	r^2
1	AM1	1,4 (1,1-1,8)	196 (180-213)	0,8 (0,6-1,1)	140	0,9899

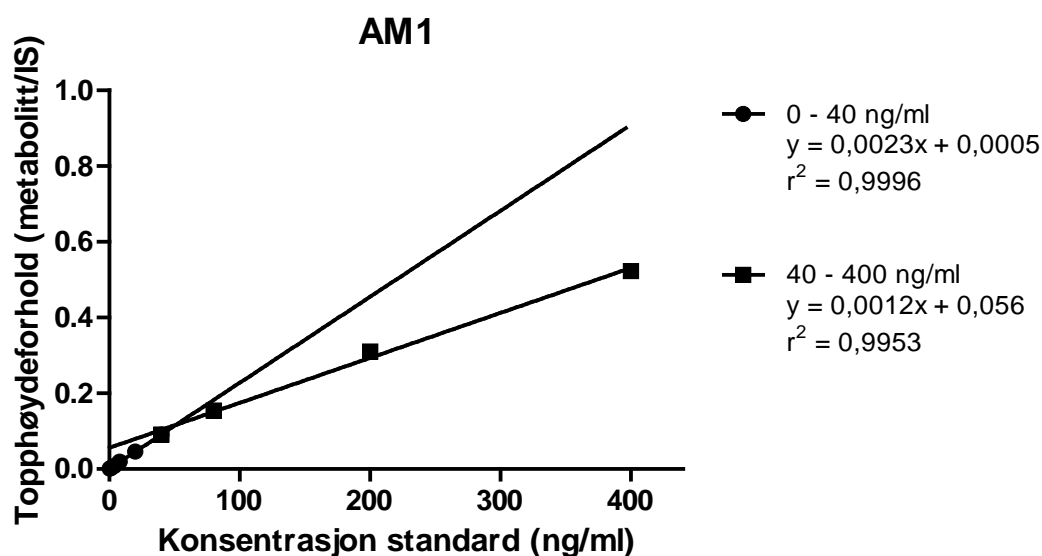
⁽¹⁾ μM

⁽²⁾ pmol/min/nmol CYP3A4

⁽³⁾ $\mu\text{l}/\text{min}/\text{nmol}$ CYP3A4

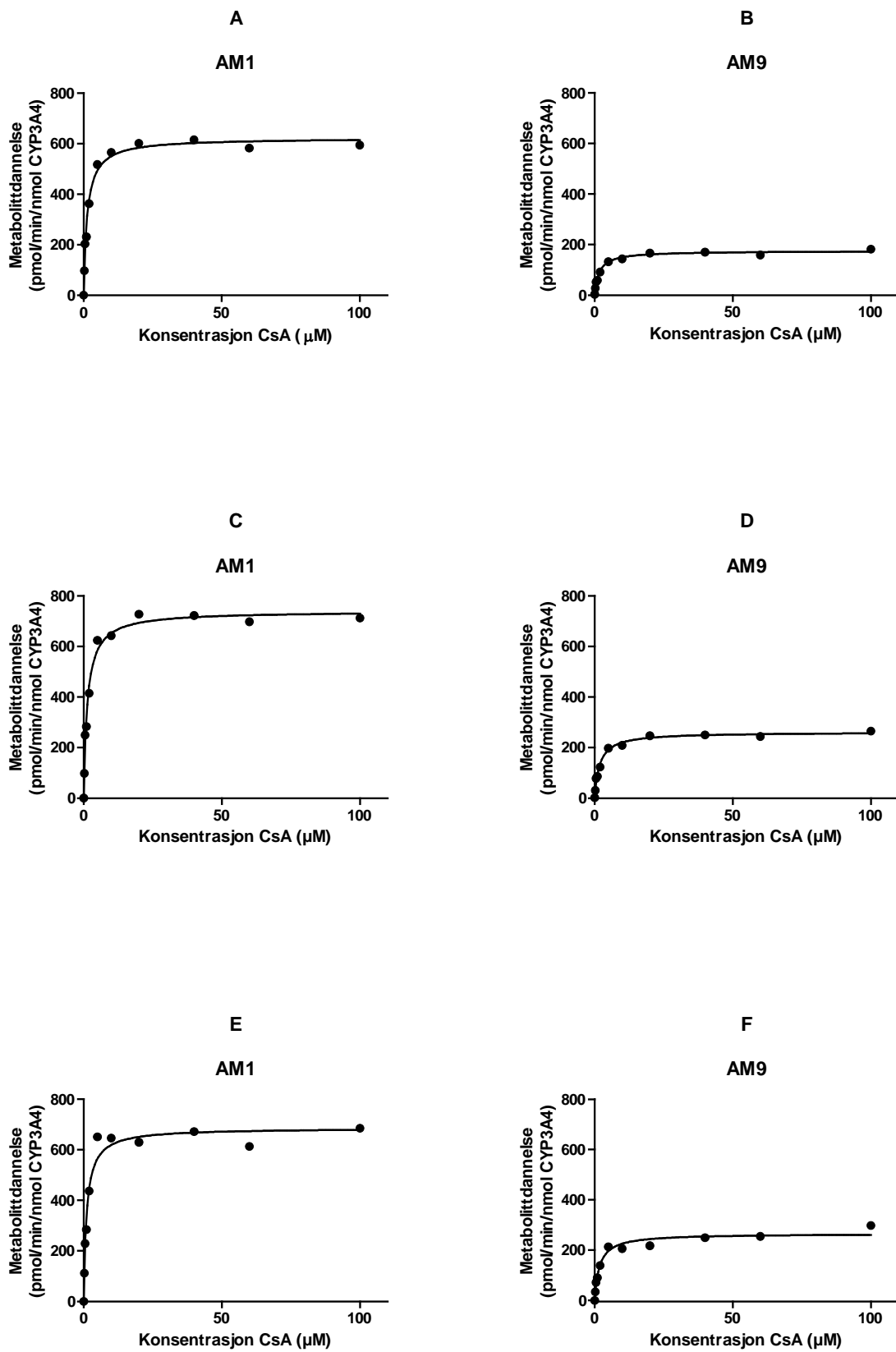
3.3.3 THLE-mikrosomer med CYP3A4

De høyeste konsentrasjonene til metabolitten AM1 i denne mikrosommodellen, falt utenfor standardkurven. Et forsøk med lengre standardkurve (0,4 – 400 ng/ml) viste at standardkurven var lineær til og med 40 ng/ml, og fra 40 til 400 ng/ml (Figur 3-9). De høyeste konsentrasjonene på hastighetskurvene til AM1 lå mellom 40 og 80 ng/ml. Forsøk med denne standardkurven viste at forskjellen i konsentrasjon som ble kalibrert ut fra standardkurven 0,4 – 20 ng/ml, mot standardkurve med brudd, var minimal.



Figur 3-9 Standardkurve 0,4 – 400 ng/ml med brudd.

Hastighetskurver fra metabolittdannelse i THLE-mikrosomer med CYP3A4 så ut til å følge Michaelis-Menten kinetikk (Figur 3-10). Som det også fremgår av figur 3-10 har metabolitten AM1 høyere V_{\max} enn AM9, 622-686 mot 175-265 pmol/min/nmol CYP3A4. K_m var mer liknende og varierte mellom 1,1 og 1,3 μM for AM1 og fra 1,7 til 1,9 μM for AM9. Det gjør at metabolitten AM1 fikk høyere CL_{int} enn AM9, 478-624 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{nmol}$ CYP3A4 mot 103-147 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{nmol}$ CYP3A4 (Tabell 3-7). Som det fremgår av tabell 3-8, ga substrathemmingsmodellen en noe bedre tilpasning enn Michaelis-Menten modellen, men 95 % konfidensintervallene for K_m og V_{\max} ble bredere og inneholdt 0,0. Metabolitten AM9 kunne heller ikke i denne mikrosommodellen tilpasses substrathemmingskinetikk. Tilpasning til sigmoidal kinetikkmodell ga også gode korrelasjonskoeffisienter for begge metabolittene (Tabell 3-9), men som med de andre mikrosommodellene ble ikke n signifikant forskjellig fra 1.



Figur 3-10 Dannelse av metabolittene AM1 og AM9 i THLE-mikrosomer som funksjon av konsentrasjon CsA. Figuren viser dannelsen av de to metabolittene i tre separate forsøk (A og B, C og D, E og F). Beste kurvetilpasning til Michaelis-Menten modellen er vist.

Tabell 3-7 Enzymkinetiske data basert på beste tilpasning til Michaelis-Menten kinetikk med 95 % konfidensintervall i parentes, for metabolittene AM1 og AM9 i THLE-mikrosomer, i de enkelte forsøkene.

Forsøk	Metabolitt	$K_m^{(1)}$	$V_{max}^{(2)}$	$CL_{int}^{(3)}$	r^2
1	AM1	1,3 (1,0-1,6)	622 (595-650)	478	0,9904
	AM9	1,7 (1,2-2,1)	175 (166-185)	103	0,9869
2	AM1	1,3 (1,0-1,7)	740 (704-776)	569	0,9885
	AM9	1,9 (1,4-2,3)	261 (248-275)	137	0,9882
3	AM1	1,1 (0,7-1,5)	686 (640-732)	624	0,9763
	AM9	1,8 (1,0-2-5)	265 (243-288)	147	0,9700

⁽¹⁾ μM

⁽²⁾ $\text{pmol}/\text{min}/\text{nmol CYP3A4}$

⁽³⁾ $\mu\text{l}/\text{min}/\text{nmol CYP3A4}$

Tabell 3-8 Enzymkinetiske data basert på beste tilpasning til substrathemmingskinetikk med 95 % konfidensintervall i parentes, for metabolittene AM1 i THLE-mikrosomer, i de enkelte forsøkene. Metabolittene AM9 kunne ikke tilpasses denne modellen.

Forsøk	Metabolitt	$K_m^{(1)}$	$V_{max}^{(2)}$	K_{si}	$CL_{int}^{(3)}$	r^2
1	AM1	1,5 (1,1-1,9)	657 (607-707)	934 (0,0-2131)	438	0,9934
		1,5 (1,0-1,9)	772 (700-843)	1206 (0,0-3557)	515	0,9904
3	AM1	1,2 (0,7-1,7)	718 (627-810)	1028 (0,0-3493)	598	0,9789

⁽¹⁾ μM

⁽²⁾ $\text{pmol}/\text{min}/\text{nmol CYP3A4}$

⁽³⁾ $\mu\text{l}/\text{min}/\text{nmol CYP3A4}$

Tabell 3-9 Enzymkinetiske data basert på beste tilpasning til sigmoidal kinetikk med 95 % konfidensintervall i parentes, for metabolittene AM1 og AM9 i THLE-mikrosomer, i de enkelte forsøkene.

Forsøk	Metabolitt	$S_{50}^{(1)}$	$V_{max}^{(2)}$	N	$CL_{int}^{(3)}$	r^2
1	AM1	1,3 (1,0-1,6)	617 (580-655)	1,1 (0,8-1,3)	475	0,9907
	AM9	1,7 (1,3-2,1)	181 (165-197)	0,9 (0,6-1,1)	106	0,9890
2	AM1	1,3 (1,0-1,7)	735 (685-786)	1,0 (0,7-1,3)	565	0,9887
	AM9	1,9 (1,4-2,3)	269 (245-292)	0,9 (0,6-1,1)	142	0,9897
3	AM1	1,0 (0,7-1,4)	669 (620-719)	1,2 (0,8-1,7)	669	0,9808
	AM9	1,9 (1,1-2,7)	284 (236-333)	0,8 (0,4-1,1)	149	0,9744

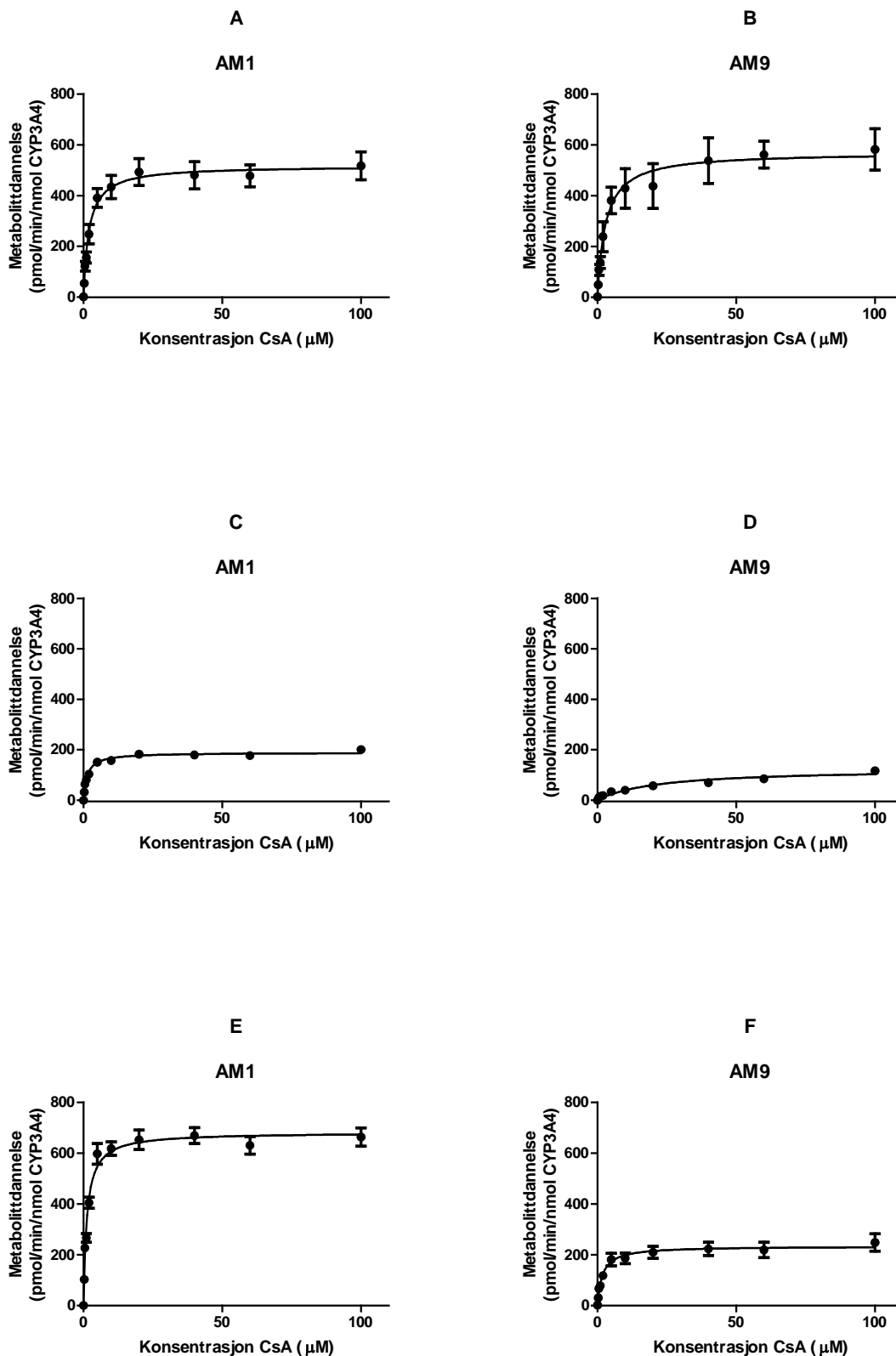
⁽¹⁾ μM

⁽²⁾ $\text{pmol}/\text{min}/\text{nmol CYP3A4}$

⁽³⁾ $\mu\text{l}/\text{min}/\text{nmol CYP3A4}$

3.3.4 Sammenlikning mellom de ulike mikrosommodellene

De tre mikrosommodellene ga liknende hastighetskurver som så ut til å følge Michaelis-Menten liknende forløp for metabolittene AM1 og AM9 (Figur 3-11). Kurvene fra insektmikrosomene uten cytokrom b_5 skilte seg ut fra de andre modellene med lavere V_{max} for begge metabolittene (Figur 3-11). Med tilpasning til Michaelis-Menten modellen så det ut til at AM1 i THLE-mikrosomene hadde en tendens til noe høyere V_{max} og noe lavere K_m enn i insektmikrosomene med cytokrom b_5 . Dette resulterte i en signifikant høyere CL_{int} i THLE-mikrosomene ($P = 0,021$), $554 \mu\text{l}/\text{min}/\text{nmol CYP3A4}$ i THLE-mikrosomene mot $264 \mu\text{l}/\text{min}/\text{nmol CYP3A4}$ i insektmikrosomene (Tabell 3-10). For AM9 derimot ble det ikke funnet noen signifikante forskjeller mellom de to mikrosomsystemene, men det var en tendens til at THLE-mikrosomene ga lavere K_m og V_{max} enn insektmikrosomene med cytokrom b_5 (Tabell 3-11). Som det også kommer frem av kromatogrammene i figur 3-5, var forholdet mellom dannelseshastigheten for AM1 mot AM9 mindre i insektmikrosomer med cytokrom b_5 enn det var i THLE-mikrosomene (Figur 3-12). I insektmikrosomene så det ut til at det ble dannet ca. like mye av de to metabolittene, muligens litt mer AM9. For THLE-mikrosomene derimot så det ut til at det ble dannet om lag tre ganger så mye AM1 som AM9 ved alle konsentrasjonene av CSA.



Figur 3-11 Dannelse av metabolittene AM1 og AM9 i insektmikrosomer med CYP3A4, cytokrom P450 reduktase og cytokrom b₅ (n = 3) (A og B), insektmikrosomer med CYP3A4, cytokrom P450 reduktase uten cytokrom b₅ (n = 1) (C og D) og THLE-mikrosomer (n = 3) (E og F), som funksjon av konsentrasjon CsA. Figuren viser gjennomsnitt med standardavvik for dannelsen av de to metabolittene. Beste kurvetilpasning til Michaelis-Menten modellen er vist.

Tabell 3-10 Gjennomsnitt \pm standardavvik av de enzymkinetiske parametrene ved tilpasning til Michaelis-Menten kinetikk for metabolitten AM1 i insektmikrosomer med CYP3A4, cytokrom P450 reduktase og cytokrom b_5 (n = 3) og THLE-mikrosomer (n = 3).

	Insektmikrosomer	THLE-mikrosomer	P-verdi ⁽⁴⁾
	med cytokrom b_5		
K_m ⁽¹⁾	2,0 \pm 0,4	1,2 \pm 0,1	0,078
V_{max} ⁽²⁾	518 \pm 89	683 \pm 59	0,075
CL_{int} ⁽³⁾	264 \pm 79	554 \pm 80	0,021

(1) μ M

(2) pmol/min/nmol CYP3A4

(3) μ l/min/nmol CYP3A4

(4) Tosidig uparet t-test

Tabell 3-11 Gjennomsnitt \pm standardavvik av de enzymkinetiske parametrene ved tilpasning til Michaelis-Menten kinetikk for metabolitten AM9 i insektmikrosomer med CYP3A4, cytokrom P450 reduktase og cytokrom b_5 (n = 3) og THLE-mikrosomer (n = 3).

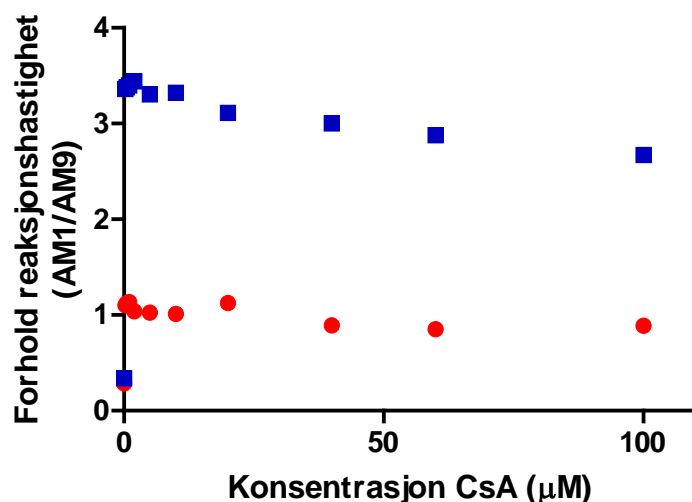
	Insektmikrosomer	THLE-mikrosomer	P-verdi ⁽⁴⁾
	med cytokrom b_5		
K_m ⁽¹⁾	3,1 \pm 0,6	1,8 \pm 0,09	0,059
V_{max} ⁽²⁾	572 \pm 133	234 \pm 51	0,054
CL_{int} ⁽³⁾	198 \pm 88	131 \pm 24	0,331

(1) μ M

(2) pmol/min/nmol CYP3A4

(3) μ l/min/nmol CYP3A4

(4) Tosidig uparet t-test



Figur 3-12 Forholdet mellom reaksjonshastigheten av AM1 og AM9 i insektmikrosomer med CYP3A4, cytokrom P450 reduktase og cytokrom b_5 (●) og THLE-mikrosomer (■), mot konsentrasjon CsA.

4 Diskusjon

4.1 Metodologiske betraktninger

For analyse av CsA og metabolittene AM1 og AM9 ble det med UPLC og trippelkvadrupol MS funnet best signaler med enkel MS og med ESI som ioniseringskilde. Dette i motsetning til Falck et al., som analyserte CsA og metabolitter med HPLC og ionefelle MS med tandem MS og APCI som ioniseringskilde [35]. CsC, som ble brukt som intern standard, og metabolittene AM1 og AM9 har samme masse. Kvantifiseringen av disse var derfor avhengig av god kromatografisk separasjon. CsC ble eluert med god avstand fra metabolittene. Den eneste forskjellen på metabolittene AM1 og AM9 er plasseringen av hydroksylgruppen som påføres under metabolismen av CsA. Dette gjør at de eluerer nokså samtidig. Ved å optimalisere mobilfasegradienten ble akseptabel separasjon oppnådd (Figur 3-5). Separasjonen av AM9 og en tredje metabolitt, AM1c, som også har samme masse, lot seg derimot ikke separere like godt (Figur 3-5). På grunn av dette ble det valgt å bruke topphøyden som mål på mengde analytt tilstede. Topphøyden ble på lik måte som i Falck et al. [35] målt for alle analyttene. Bruk av topphøyden forutsetter at mobilfasegradienten holder seg konstant gjennom analysen av alle prøvene i serien og tilhørende standardkurve.

Som det fremgår av valideringen, ga den nye analysemetoden resultater med god nøyaktighet og presisjon. Variasjonen i nøyaktighet lå under 5 % og presisjonen varierte med mindre enn 9 %. Kravet for nøyaktighet og presisjon er at prøven ved kvantifiseringsgrensen (laveste konsentrasjon) ikke skal avvike mer enn 20 % fra sann verdi for nøyaktighet eller ha større relativt standardavvik (% RSD) enn 20 %, og tilsvarende grenser på 15 % for de øvrige prøvene [58, 59]. Disse kravene ble følgelig nådd med god margin.

Prøveopparbeidelsen som ble brukt initialt var ikke god nok til å kunne kvantifisere de laveste konsentrasjonene i prøvene. Dette skyldes antakeligvis at de ble analysert ved enkel MS og dermed mistet den ekstra opprensningen tandem MS har kapasitet til. En væske-væske-ekstraksjon i tillegg til fire ganger oppkonsentrering av prøvene gjorde det mulig å komme ned i noe lavere konsentrasjoner enn det metoden til Falck et al. [35] var utviklet og validert for, slik at selv de laveste konsentrasjonene i substratkonsentrasjonsseriene kunne kvantifiseres med akseptabel S/N-ratio.

Siden CsA er dårlig vannløselig var det nødvendig å tilsette metanol til inkubasjonen. Det ble valgt å bruke 5 % metanol i inkubasjonsløsningene til alle konsentrasjoner i alle paralleller, serier og mikrosommodeller. Dette på grunn av at med 1 % metanol var 40 μM den høyeste konsentrasjonen CsA som kunne løses, mens med 5 % metanol kunne også 100 μM CsA inkluderes i inkubasjonen. Som det kommer frem av figur 3-3 er det ikke sikkert at kurvene med 1 % metanol har kommet opp i metningsområdet, noe kurvene med 5 % metanol ser ut til. Imidlertid har tilstedeværelse av organisk løsningsmiddel tidligere blitt vist å hemme blant annet CYP3A4-metabolisme av testosteron og dermed gi mindre dannelse av metabolittene [56]. I denne oppgaven ble dannelsen av metabolitten AM9 hemmet i noen grad med økende metanolkonsentrasjon, mens dannelsen av AM1 ikke viste hemming. En mulig årsak til ulik hemming av AM1 og AM9 med metanol kan være hemming av metabolismen av AM1 videre til AM1c. Siden alle inkubasjonene inneholder samme mengde metanol, vil en mulig hemmende effekt på CYP3A4 være tilsvarende i de ulike mikrosommodellene, noe som likevel muliggjør sammenlikning mellom modellene.

For å kunne sammenlikne de ulike mikrosommodellene ble metabolittdannelsen korrigeret for mengde enzymer tilstede i inkubasjonsløsningen, men det ble ikke tatt høyde for forholdet mellom aktivt og inaktivt enzym (med og uten heme tilkoblet) tilstede i mikrosompreparatene. Under kvantifiseringen av innhold CYP3A4 i THLE-mikrosomene ble det tatt som forutsetning at forholdet mellom aktivt og inaktivt enzym var likt som i standarden, som var insektmikrosomer med CYP3A4, men dette er ikke nødvendigvis tilfellet [60]. Dette kan bidra til noe usikkerhet i V_{max} -estimatene i THLE-mikrosomene.

4.2 Metabolismestudier

Metabolismen av CsA er i denne oppgaven vist å følge Michaelis-Menten kinetikk i alle de tre mikrosomsystemene. Dette vises ved hastighetskurvene i figur 3-11, der beste tilpasning til Michaelis-Menten metningskinetikk er vist. Tilpasning til substrathemming og sigmoidal hastighetsforløp ga også god korrelasjon. Alle forsøkene for begge metabolittene ga ved tilpasning til sigmoidal hastighetskurve og Hill-likningen en verdi for n som ikke var signifikant forskjellig fra 1, når $n = 1$ blir Hill-likningen lik Michaelis-Menten-likningen. Tilpasningene til substrathemmingskinetikk ga brede 95 % konfidensintervaller for hemmingskonstanten K_{si} , som strakk seg fra 0,0 for alle de enkelte forsøkene. Dette vil si at tilpasningene til de atypiske kinetikkmodellene ikke var statistisk signifikante. Tidligere er det

for metabolismen av midazolam, ved samme laboratorium, vist at atypisk kinetikk ga best tilpasning ved inkubering med insektmikrosomer med CYP3A4, cytokrom P450, både med og uten cytokrom b_5 [53]. Derimot ble det vist at i THLE-mikrosomer var tilpasningen til Michaelis-Menten kinetikk best [53]. THLE-mikrosomer, hvor humant CYP3A4 er transfektert inn i en human levercellelinje har altså vist klassisk Michaelis-Menten kinetikk for metabolisme av CsA og midazolam.

Det var et interessant funn at også insektmikrosomer, hvor humant CYP3A4 er transfektert inn i insektcelle, i dette arbeidet viste Michaelis-Menten kinetikk for CsA og ikke substrathemmingskinetikk som tidligere vist i et liknende system av Dai et al. [55]. Årsaker til forskjellig enzymkinetikk i denne oppgaven og hos Dai et al. kan være ulike inkubasjonsbetingelser, ulikt innhold av metanol, samt ulikt uttrykk av elektrononorene cytokrom P450 reduktase og cytokrom b_5 .

Ved sammenlikning av enzymkinetiske parametre ble CL_{int} for metabolitten AM1 funnet å være signifikant 2,1 ganger høyere i THLE-mikrosomene enn i insektmikrosomene med cytokrom b_5 ($P = 0,021$ (Tabell 3-10)). Denne forskjellen skyldes en tendens til lavere K_m og høyere V_{max} i THLE-mikrosomene. For metabolitten AM9 ble det imidlertid ikke funnet signifikant forskjell i noen av de tre parametrene, men her var det en tendens til at THLE-mikrosomene ga lavere både K_m og V_{max} . Til sammenlikning ble det for midazolam funnet signifikant høyere K_m og dermed signifikant lavere CL_{int} for dannelsen av 1-hydroksymidazolam i THLE-mikrosomene enn i insektmikrosomene, med anvendelse av samme inkubasjonsbetingelser som i denne oppgaven [53]. For dannelsen av CsA-metabolitten AM1, ga altså de humane CYP3A4-mikrosomene økt metabolisme og signifikant høyere CL_{int} -verdi enn i insektmikrosomene med CYP3A4.

Humane CYP3A4-mikrosomer ga en reaksjonshastighet som var 2,9 ganger høyere for AM1 enn for AM9 og forholdet mellom CL_{int} for de to metabolittene var 4,2. Dette er et interessant funn siden det i *in vivo* farmakokinetikkstudier er vist at det dannes mer AM1 enn AM9 [61-63]. I insektmikrosomene ble det dannet om lag like mye av de to metabolittene, med forhold på 0,9 og 1,3 for henholdsvis V_{max} og CL_{int} . I tilsvarende system har Dai et al. derimot funnet forhold mellom metabolittene AM1 og AM9 for V_{max} og CL_{int} i insektmikrosomer med cytokrom b_5 på henholdsvis 0,40 og 0,35. De har imidlertid også funnet lave forhold i reaksjonshastighet i HLM uten CYP3A5 (0,25 og 0,32 for henholdsvis lav (2 μ M) og høy (20 μ M) konsentrasjon CsA) [55]. Forholdet mellom AM1 og AM9 ble ca. tre ganger så høyt i

THLE-mikrosomene som i insektmikrosomene i denne oppgaven, mens det hos Dai et al. altså ble relativt likt metabolittforhold i insektmikrosomene med cytokrom b_5 og i HLM. Det er også tidligere vist forskjeller i hvilken metabolitt som dannes i størst grad. I *in vitro*-studier er det vist at det i leverceller fra rotte dannes mest AM9, mens det i humane leverceller dannes mest AM1 [64-67]. Årsaker til ulikt forhold mellom metabolittene i denne oppgaven og hos Dai et al. kan være ulike inkubasjonsbetingelser i metabolismestudiene, som for eksempel ulik konsentrasjon NADPH. Det er vist at dannelsen av metabolitten AM1 påvirkes av mengde NADPH tilstede, en økning i NADPH-innhold fra 0,25 til 1,75 mM ga en dobling i dannelsen av AM1, mens dannelsen av metabolitten AM9 ikke ble påvirket [44]. I Dai et al. består inkubasjonsløsningen av en sluttkonsentrasjon NADPH på 1 mM [55], mens det i denne oppgaven er benyttet 1,6 mM NADPH. En annen årsak til ulik dannelse av de to metabolittene kan være ulik metanolkonsentrasjon i inkubasjonsløsningen, 5 % (v/v) mot under 4 % hos Dai et al [55]. Siden inkubasjonsbetingelsene er like i begge mikrosommodellene i denne oppgaven, ligger antakelig årsaken til ulikt metabolittforhold mellom mikrosommodellene, i mikrosompreparatene. Dette kan for eksempel være ulikt uttrykk av elektrondonorene cytokrom P450 reduktase og cytokrom b_5 eller ulik lipidsammensetning av mikrosommembranen.

THLE-mikrosomene og insektmikrosomene med cytokrom b_5 hadde liknende totalproteininnhold i inkubasjonsløsningene, mens insektmikrosomene uten cytokrom b_5 hadde om lag halvparten. Det kan føre til mindre uspesifikk binding og dermed potensielt kunne gi økt metabolisme som følge av mer substrat tilgjengelig for enzymene. Insektmikrosomene uten cytokrom b_5 ga imidlertid lavere V_{\max} og CL_{int} for begge metabolittene sammenliknet med de andre mikrosomsystemene. Også i Dai et al. ble det funnet lavere V_{\max} og CL_{int} for AM1 og AM9 i insektmikrosomene som ikke var transfektert med cytokrom b_5 , selv om de var tilsatt eksogent cytokrom b_5 , enn i de mikrosomene der cytokrom b_5 var transfektert inn i cellen [55]. Det kan altså se ut til at fravær av cytokrom b_5 gir et noe mindre aktivt system, noe som også er antydnet i tidligere studier [13-15].

Forskjellene som i denne oppgaven er funnet i farmakokinetiske parametre mellom metabolismen av CsA til AM1 og AM9 i insektmikrosomene og THLE-mikrosomene vil kunne ha betydning for *in vitro-in vivo* korrelering av legemiddelmetabolisme. Parameteren CL_{int} funnet *in vitro* brukes ved *in vitro-in vivo* korrelering til å beregne CL_H *in vivo*, som igjen er en del av CL_{tot} . En 2,1 ganger større CL_{int} i mikrosomer med humant opphav enn i

insektmikrosomer, vil dermed kunne gi en halvering av den estimerte CL_H *in vivo*, som er direkte proporsjonal med CL_{int} , ved bruk av insektmikrosomer i *in vitro*-studier, dersom man forutsetter at THLE-mikrosomene er mer lik de humane forholdene. Dette bør studeres videre med flere CYP3A4-substrater, og det kan være av interesse og også sammenlikne med metabolismestudier i humane levermikrosomer, som er enda nærmere en *in vivo*-situasjon.

5 Oppsummering og konklusjon

En analysemetode for CsA-metabolittene AM1 og AM9 er i denne oppgaven overført fra HPLC koblet til ionefelle MS/MS med APCI i positiv modus som ionisasjonskilde, til UPLC koblet til trippelkvadrupol MS med ESI i positiv modus. Valideringen av den nye analysemetoden viste god nøyaktighet og presisjon.

Metabolismestudier med CsA i insektmikrosomer med CYP3A4, cytokrom P450 reduktase, både med og uten cytokrom b₅ og THLE-mikrosomer med CYP3A4 viste hastighetskurver for dannelsen av metabolittene AM1 og AM9 som fulgte Michaelis-Menten liknende enzymkinetikk i alle tre modellene. Det ble funnet signifikant forskjell i CL_{int}-verdiene for metabolitt AM1 mellom de humane CYP3A4-mikrosomene og insektmikrosomene med cytokrom b₅. Forholdet mellom dannelsen av metabolittene AM1 og AM9 ble høyere i THLE-mikrosomene enn i insektmikrosomene med cytokrom b₅.

Disse resultatene indikerer at type mikrosommodell brukt i *in vitro*-studier av legemiddelmetabolisme kan ha betydning for resultatene, og konklusjonene som trekkes på bakgrunn av disse. Spesielt er det viktig å ta hensyn til dette ved *in vitro-in vivo* ekstrapolering av metabolismedata.

Litteraturliste

1. Giacomini, K.M., Sugiyama, Y., *Membrane transporters and drug response*, in *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*, L.S. Goodman, et al., Editors. 2006, McGraw-Hill: New York. p. 41-70.
2. Rowland, M. and T.N. Tozer, *Clinical pharmacokinetics : concepts and applications*. 3rd ed. 1995, Baltimore: Williams & Wilkins. xiv, 601 p.
3. Venkatakrishnan, K., L.L. Von Moltke, and D.J. Greenblatt, *Human drug metabolism and the cytochromes P450: application and relevance of in vitro models*. *J Clin Pharmacol*, 2001. **41**(11): p. 1149-79.
4. Gonzalez, F.J., Tukey, R. H., *Drug metabolism*, in *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*, L.S. Goodman, et al., Editors. 2006, McGraw-Hill: New York. p. 71-91.
5. Omura, T., *Forty years of cytochrome P450*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999. **266**(3): p. 690-8.
6. Wilkinson, G.R., *Drug metabolism and variability among patients in drug response*. *N Engl J Med*, 2005. **352**(21): p. 2211-21.
7. Ingelman-Sundberg, M. and S.C. Sim, *Pharmacogenetic biomarkers as tools for improved drug therapy; emphasis on the cytochrome P450 system*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010. **396**(1): p. 90-4.
8. Nelson, D.R., et al., *P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature*. *Pharmacogenetics*, 1996. **6**(1): p. 1-42.
9. Anzenbacher, P. and E. Anzenbacherova, *Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics*. *Cell Mol Life Sci*, 2001. **58**(5-6): p. 737-47.
10. Ingelman-Sundberg, M., et al., *Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoepigenetic and clinical aspects*. *Pharmacol Ther*, 2007. **116**(3): p. 496-526.
11. Lewis, D.F. and J.M. Pratt, *The P450 catalytic cycle and oxygenation mechanism*. *Drug Metab Rev*, 1998. **30**(4): p. 739-86.
12. Lewis, D.F., *P450 structures and oxidative metabolism of xenobiotics*. *Pharmacogenomics*, 2003. **4**(4): p. 387-95.
13. Schenkman, J.B. and I. Jansson, *The many roles of cytochrome b5*. *Pharmacol Ther*, 2003. **97**(2): p. 139-52.
14. Morgan, E.T. and M.J. Coon, *Effects of cytochrome b5 on cytochrome P-450-catalyzed reactions. Studies with manganese-substituted cytochrome b5*. *Drug Metab Dispos*, 1984. **12**(3): p. 358-64.
15. Loughran, P.A., et al., *The kinetic and spectral characterization of the E. coli-expressed mammalian CYP4A7: cytochrome b5 effects vary with substrate*. *Arch Biochem Biophys*, 2001. **385**(2): p. 311-21.
16. Hayashi, K., et al., *Coexpression of genetically engineered fused enzyme between yeast NADPH-P450 reductase and human cytochrome P450 3A4 and human cytochrome b5 in yeast*. *Arch Biochem Biophys*, 2000. **381**(1): p. 164-70.
17. Hlavica, P. and D.F. Lewis, *Allosteric phenomena in cytochrome P450-catalyzed monooxygenations*. *Eur J Biochem*, 2001. **268**(18): p. 4817-32.
18. Shimada, T., et al., *Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1994. **270**(1): p. 414-23.

19. Paine, M.F., et al., *The human intestinal cytochrome P450 "pie"*. Drug Metab Dispos, 2006. **34**(5): p. 880-6.
20. Wilkinson, G.R., *Cytochrome P4503A (CYP3A) metabolism: prediction of in vivo activity in humans*. J Pharmacokinet Biopharm, 1996. **24**(5): p. 475-90.
21. Domanski, T.L., et al., *cDNA cloning and initial characterization of CYP3A43, a novel human cytochrome P450*. Mol Pharmacol, 2001. **59**(2): p. 386-92.
22. Kuehl, P., et al., *Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression*. Nat Genet, 2001. **27**(4): p. 383-91.
23. Schuetz, J.D., D.L. Beach, and P.S. Guzelian, *Selective expression of cytochrome P450 CYP3A mRNAs in embryonic and adult human liver*. Pharmacogenetics, 1994. **4**(1): p. 11-20.
24. Thummel, K.E., et al., *Use of midazolam as a human cytochrome P450 3A probe: II. Characterization of inter- and intraindividual hepatic CYP3A variability after liver transplantation*. J Pharmacol Exp Ther, 1994. **271**(1): p. 557-66.
25. Lamba, J.K., et al., *Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism*. Adv Drug Deliv Rev, 2002. **54**(10): p. 1271-94.
26. Lamba, V., et al., *Genetic predictors of interindividual variability in hepatic CYP3A4 expression*. J Pharmacol Exp Ther, 2010. **332**(3): p. 1088-99.
27. Shou, M., et al., *Sigmoidal kinetic model for two co-operative substrate-binding sites in a cytochrome P450 3A4 active site: an example of the metabolism of diazepam and its derivatives*. Biochem J, 1999. **340** (Pt 3): p. 845-53.
28. Williams, P.A., et al., *Crystal structures of human cytochrome P450 3A4 bound to metyrapone and progesterone*. Science, 2004. **305**(5684): p. 683-6.
29. Houston, J.B. and K.E. Kenworthy, *In vitro-in vivo scaling of CYP kinetic data not consistent with the classical Michaelis-Menten model*. Drug Metab Dispos, 2000. **28**(3): p. 246-54.
30. Korzekwa, K.R., et al., *Evaluation of atypical cytochrome P450 kinetics with two-substrate models: evidence that multiple substrates can simultaneously bind to cytochrome P450 active sites*. Biochemistry, 1998. **37**(12): p. 4137-47.
31. Shen, D.D., K.L. Kunze, and K.E. Thummel, *Enzyme-catalyzed processes of first-pass hepatic and intestinal drug extraction*. Adv Drug Deliv Rev, 1997. **27**(2-3): p. 99-127.
32. Tracy, T.S. and M.A. Hummel, *Modeling kinetic data from in vitro drug metabolism enzyme experiments*. Drug Metab Rev, 2004. **36**(2): p. 231-42.
33. Fabre, G., et al., *Metabolism of cyclosporin A. I. Study in freshly isolated rabbit hepatocytes*. Drug Metab Dispos, 1987. **15**(3): p. 384-90.
34. Christians, U. and K.F. Sewing, *Cyclosporin metabolism in transplant patients*. Pharmacol Ther, 1993. **57**(2-3): p. 291-345.
35. Falck, P., et al., *Determination of ciclosporin A and its six main metabolites in isolated T-lymphocytes and whole blood using liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2007. **852**(1-2): p. 345-52.
36. Falck, P., *Whole blood and intracellular pharmacokinetics of cyclosporine A in renal transplant recipients*. 2008, Oslo: Universitetet i Oslo.
37. Combalbert, J., et al., *Metabolism of cyclosporin A. IV. Purification and identification of the rifampicin-inducible human liver cytochrome P-450 (cyclosporin A oxidase) as a product of P450III A gene subfamily*. Drug Metab Dispos, 1989. **17**(2): p. 197-207.
38. Zhang, Y., et al., *Overlapping substrate specificities of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein for a novel cysteine protease inhibitor*. Drug Metab Dispos, 1998. **26**(4): p. 360-6.

39. Edwards, D.J., et al., *6',7'-Dihydroxybergamottin in grapefruit juice and Seville orange juice: effects on cyclosporine disposition, enterocyte CYP3A4, and P-glycoprotein*. Clin Pharmacol Ther, 1999. **65**(3): p. 237-44.
40. Szekeres, T. and A. Haushofer, *Clinical pharmacogenetics of immunosuppressive drugs in organ transplantation*. Pharmacogenomics, 2005. **6**(2): p. 163-8.
41. Baranczewski, P., et al., *Introduction to in vitro estimation of metabolic stability and drug interactions of new chemical entities in drug discovery and development*. Pharmacol Rep, 2006. **58**(4): p. 453-72.
42. McMillan, J.M., et al., *Differential stability of drug-metabolizing enzyme activities in primary rat hepatocytes, cultured in the absence or presence of dexamethasone*. Mutat Res, 1991. **249**(1): p. 81-92.
43. Brandon, E.F., et al., *An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons*. Toxicol Appl Pharmacol, 2003. **189**(3): p. 233-46.
44. Hermann, M., et al., *Evaluation of microsomal incubation conditions on CYP3A4-mediated metabolism of cyclosporine A by a statistical experimental design*. Curr Drug Metab, 2006. **7**(3): p. 265-71.
45. Mace, K., et al., *Aflatoxin B1-induced DNA adduct formation and p53 mutations in CYP450-expressing human liver cell lines*. Carcinogenesis, 1997. **18**(7): p. 1291-7.
46. Pedersen-Bjergaard, S., Rasmussen, K., *Legemiddelanalyse*. 2004, Bergen: Fagbokforlaget.
47. Lim, C.K. and G. Lord, *Current developments in LC-MS for pharmaceutical analysis*. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2002. **25**(5): p. 547-557.
48. Niessen, W.M.A., *State-of-the-art in liquid chromatography-mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 1999. **856**(1-2): p. 179-197.
49. Waters, *Micromass Quattro microTM API Tandem Quadropole System*. Waters Corporation, 2002.
50. Lemière, F., *Mass Analysers for LC-MS*. LC-GC Eur Guide to LC-MS, 2001: p. 2-8.
51. Korfmacher, W., *Principles and applications of LC-MS in new drug discovery*. Drug Discovery Today, 2005. **10**(20): p. 1357-67.
52. Thummel, K.E., et al., *Use of midazolam as a human cytochrome P450 3A probe: I. In vitro-in vivo correlations in liver transplant patients*. J Pharmacol Exp Ther, 1994. **271**(1): p. 549-56.
53. Christensen, H., et al., *Different enzyme kinetics of midazolam in recombinant CYP3A4 microsomes from human and insect sources*. Drug Metab Pharmacokinet, 2009. **24**(3): p. 261-8.
54. Blifeld, C. and R.B. Ettenger, *Measurement of cyclosporine levels in samples obtained from peripheral sites and indwelling lines*. N Engl J Med, 1987. **317**(8): p. 509.
55. Dai, Y., et al., *In vitro metabolism of cyclosporine A by human kidney CYP3A5*. Biochem Pharmacol, 2004. **68**(9): p. 1889-902.
56. Chauret, N., A. Gauthier, and D.A. Nicoll-Griffith, *Effect of common organic solvents on in vitro cytochrome P450-mediated metabolic activities in human liver microsomes*. Drug Metab Dispos, 1998. **26**(1): p. 1-4.
57. Nguyen, M., *Hemming av CYP3A4-metabolisme av ulike bærekstrakter*. 2010, Oslo: Universitetet i Oslo.
58. U.S. Department of Health & Human Services, F.a.D.A., Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM), *Bioanalytical Method Validation*. 2001.
59. International Conference of Harmonisation (ICH), E.W.G., *ICH Harmonised Tripartite Guideline, Validation of Analytical Procedures*. 2005.

60. Perrett, H.F., et al., *Disparity in holoprotein/apoprotein ratios of different standards used for immunoquantification of hepatic cytochrome P450 enzymes*. *Drug Metab Dispos*, 2007. **35**(10): p. 1733-6.
61. Lehle, K., et al., *A prospective cross-over study comparing the pharmacokinetics of cyclosporine A and its metabolites after oral versus short-time intravenous cyclosporine A administration in pre-heart transplant patients*. *Transplant Proc*, 2007. **39**(10): p. 3323-8.
62. Koseki, N., et al., *Simultaneous quantitative determination of cyclosporine A and its three main metabolites (AM1, AM4N and AM9) in human blood by liquid chromatography/mass spectrometry using a rapid sample processing method*. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2006. **20**(5): p. 733-40.
63. Karamperis, N., et al., *Correlations between calcineurin phosphatase inhibition and cyclosporine metabolites concentrations in kidney transplant recipients: implications for immunoassays*. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2006. **98**(6): p. 569-74.
64. Wagner, O., et al., *Tissue distribution, disposition, and metabolism of cyclosporine in rats*. *Drug Metab Dispos*, 1987. **15**(3): p. 377-83.
65. Lensmeyer, G.L., D.A. Wiebe, and I.H. Carlson, *Identification and analysis of nine metabolites of cyclosporine in whole blood by liquid chromatography. 2: Comparison of patients' results*. *Clin Chem*, 1987. **33**(10): p. 1851-5.
66. Schmelzer, E., et al., *Biotransformation of cyclosporin in primary rat, porcine and human liver cell co-cultures*. *Xenobiotica*, 2006. **36**(8): p. 693-708.
67. Vickers, A.E., et al., *Cyclosporin A metabolism in human liver, kidney, and intestine slices. Comparison to rat and dog slices and human cell lines*. *Drug Metab Dispos*, 1992. **20**(6): p. 802-9.