

Hovedfagsoppgave for graden cand.pharm.

**Metabolisme av midazolam via  
CYP3A4 og CYP3A5 in vitro**  
**- *Utvikling av LC/MS-metode for analyse av  
hydroksylerte metabolitter***

Lillian Wåge Postvoll



Avdeling for farmasøytisk biovitenskap,  
Farmasøytisk institutt,  
Universitetet i Oslo

Hovedfagsoppgave for graden cand.pharm.

**Metabolisme av midazolam via  
CYP3A4 og CYP3A5 in vitro**  
**- *Utvikling av LC/MS-metode for analyse av  
hydroksylerte metabolitter***

Lillian Wåge Postvoll

Arbeidet ble utført ved Avdeling for farmasøytisk biovitenskap,  
Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo, i tidsrommet november 2005  
til november 2006.

Veiledere:

1. amanuensis Hege Christensen  
Dr.scient. Espen Molden

## FORORD

*Jeg vil rette en spesiell takk til mine veiledere Espen Molden og Hege Christensen. Glødende engasjement og god veiledning har gjort at jeg har hatt et fantastisk hovedfagsår hos dere. Tusen takk Espen for at døra alltid har stått åpen for råd og diskusjoner, spesielt den siste tiden under skrivearbeidet. Jeg er imponert over din arbeidskapasitet ☺ Og Hege; tusen takk for inspirerende veiledning og de mange diskusjonene vi har hatt. Din støtte og ditt gode humør har vært uvurderlig.*

*Takk til Siri Johannesen for hyggelige dager på laben og for et par ekstra hender i hektiske perioder.*

*Jeg vil også takke Bjørn Winther for å ha stilt opp med veiledning og gode råd under utvikling av den analytiske metoden.*

*Til slutt vil jeg gjerne få takke alle ansatte på avd. for farmasøytisk biovitenskap og de andre hovedfagsstudentene for hyggelig samvær og miljø. Familien min og Anneli fortjener også en takk for å ha vært interessert i arbeidet mitt, lyttet og muntret meg opp under hele året.*

*Blindern 23. oktober, 2006*

*Lillian Wåge Postvoll*

**INNHALDSFORTEGNELSE**

<b>FORKORTELSESLISTE.....</b>	<b>6</b>
<b>SAMMENDRAG .....</b>	<b>7</b>
<b>1 INNLEDNING .....</b>	<b>9</b>
1.1 Metabolisme.....	9
1.2 Cytokrom P450 (CYP)-systemet.....	9
1.3 CYP 3A-enzymmer.....	11
1.3.1 CYP3A4 .....	12
1.3.2 CYP3A5 .....	12
1.4 Midazolam som CYP3A-modellsubstrat.....	14
1.5 In vitro-modeller for metabolismestudier.....	15
1.6 Enzymkinetikk .....	17
1.7 Hensikten med oppgaven.....	19
<b>2 MATERIALER OG METODER .....</b>	<b>20</b>
2.1 Materialer .....	20
2.2 Metodeutvikling for kvantifisering av midazolam metabolitter .....	22
2.2.1 LC/MS-apparatur og-betingelser .....	22
2.2.2 Validering av analysen .....	25
2.3 Dyrkning av THLE-celler.....	25
2.3.1 Løsninger .....	25
2.3.2 Prosedyre.....	26
2.4 Preparering og isolering av mikrosomer fra THLE-celler .....	27
2.4.1 Løsninger .....	27
2.4.2 prosedyre .....	27
2.5 Måling av totalprotein ved UV-absorbans .....	27
2.6 Måling av CYP3A4 og CYP3A5 ved elektroforese/Western blott .....	28
2.6.1 Løsninger .....	29
Figur 9: Sammensetning av "sandwich" benyttet under western blotting (pkt.	
2.6.2).....	29
2.6.2 Prosedyre.....	30
2.7 Metabolismestudier med midazolam.....	31
2.7.1 Løsninger og mikrosomer.....	31
2.7.2 Metabolisme av midazolam som funksjon av tid .....	31
2.7.3 Metabolisme av midazolam som funksjon av substratkonsentrasjon ..	32
2.7.4 Hemming av midazolam-metabolisme ved tilsetning av erytromycin ..	32
<b>3 RESULTATER .....</b>	<b>33</b>
3.1 Metodeutvikling .....	33
3.1.1 Validering .....	33
3.2 Immunologisk måling av CYP3A4 og CYP3A5 .....	35
3.3 Metabolismestudier med midazolam.....	37

3.3.1	Metabolisme av midazolam som funksjon av tid .....	37
3.3.2	Metabolisme av midazolam som funksjon av substratkonsentrasjon ..	38
	Hemming av midazolam-metabolisme ved tilsetning av erytromycin.....	41
<b>4</b>	<b><i>DISKUSJON</i></b> .....	<b>42</b>
4.1	Metodologiske betraktninger .....	42
4.1.1	LC/MS-analyse.....	42
4.1.2	Proteinmåling av CYP3A.....	42
4.2	Metabolismestudier.....	44
<b>5</b>	<b><i>OPPSUMMERING OG KONKLUSJON</i></b> .....	<b>46</b>
<b>6</b>	<b><i>REFERANSER</i></b> .....	<b>47</b>

## FORKORTELSER

ACN:	<u>A</u> cetoni <u>t</u> ril
APS:	<u>A</u> mmonium <u>P</u> ersulfat
BSA:	<u>B</u> ovint <u>s</u> erum <u>a</u> lbumin
CYP:	<u>C</u> ytochrom <u>P</u> 450
CYP3A5*1:	Eneste allelet av CYP3A5 som uttrykker et aktivt protein
CYP3A5*3:	Vanligste allel av CYP3A5
Da:	<u>D</u> alton
DIA:	<u>D</u> iazepam
ECL:	Kjemiluminesense ( <u>E</u> nhanced <u>c</u> hemiluminescence)
EDTA:	Etylen diamintetraeddiksyre ( <u>E</u> thylene <u>d</u> iamine <u>t</u> etra <u>a</u> ceticacid)
ER:	<u>E</u> ndoplasmatisk <u>r</u> etikulum
ESI:	<u>E</u> lektrospray ionisator
FCS:	Føkalt kalveserum ( <u>F</u> ocale <u>c</u> alf <u>s</u> erum)
FDA:	<u>F</u> ood and <u>D</u> rug <u>A</u> ministration
GABA:	Gamma aminosmørsyre ( <u>G</u> amma- <u>a</u> minob <u>u</u> tyric <u>a</u> cid)
HBSS:	<u>H</u> anks <u>b</u> alanserte <u>s</u> alt <u>s</u> olution
HEPES:	4-(2- <u>h</u> ydroksyetyl)-1- <u>p</u> iperazineetan- <u>s</u> ulfon-syre
HLM:	<u>H</u> umane <u>l</u> ever <u>m</u> ikrosomer
Insekt-3A4/i3A4:	mikrosomer fra insektceller transfektert med CYP3A4
Insekt-3A5/i3A5:	mikrosomer fra insektceller transfektert med CYP3A5
KCl:	Kaliumklorid ( <u>K</u> alium <u>c</u> hlorid)
K <sub>m</sub> :	Michaelis Menten konstant (beskriver substratets affinitet til enzym)
K <sub>Si</sub> :	Substrat-hemmings-konstant
LC/MS:	Væsekromatografi/massespektrometer ( <u>L</u> iquid chromatography/ <u>m</u> ass spectrometer)
LOD:	Deteksjonsgrense ( <u>L</u> imit of <u>d</u> etection)
LOQ:	Kvantifiseringsgrense ( <u>L</u> imit of <u>q</u> uantification)
NADPH:	<u>N</u> icotinamide <u>a</u> denine <u>d</u> inucleotide <u>p</u> hosphate
PFMR-4:	Pasadena Foundation for Medical Research, medium #4
SDS:	Natrium dodekyl-sufat ( <u>s</u> odium dodecyl <u>s</u> ulfate)
SIM:	<u>S</u> elektiv <u>i</u> onem <u>m</u> onitorering
S <sub>50</sub> :	Tilsvarende K <sub>m</sub>
SV40:	Simian Virus 40 large tumor-antigen
TEMED:	N,N,N,N'- <u>t</u> etra- <u>m</u> etyl-etylend <u>a</u> min
THLE-celler:	<u>T</u> ransfekte <u>h</u> umane <u>l</u> ever <u>e</u> pitel celler
Tris:	<u>T</u> ris (hydroksymetyl)-aminometan
T-TBS:	<u>T</u> ris- <u>t</u> ween <u>b</u> uffret <u>s</u> aline
UV:	<u>U</u> ltraviolett stråling
V <sub>max</sub> :	Maksimal enzymhastighet
V <sub>0</sub> :	Enzymhastighet
1-OH-MDZ:	1-hydroksy-midazolam
4-OH-MDZ:	4-hydroxy-midazolam

## SAMMENDRAG

*Bakgrunn:* CYP3A-enzymene representerer en av de viktigste subfamiliene i metabolisme av legemidler. CYP3A4 er det CYP-enzymet med generelt høyest konsentrasjon i lever, men hos enkeltpersoner som bærer CYP3A5 villtype-allelet kan uttrykket av CYP3A5 være på samme nivå som CYP3A4. Det er stor strukturell likhet mellom CYP3A4 og CYP3A5, og de deler også mange substrater. Overlapping i substratspesifisitet er imidlertid ikke fullstendig og felles substrater vil ofte ha ulik affinitet for CYP3A4 og CYP3A5. Hensikten med denne oppgaven var å utvikle og sammenligne in vitro-modellsystemer for å studere metabolisme og hemming via CYP3A4 og CYP3A5.

*Metoder:* Det ble utviklet en LC/MS-metode for å analysere av hydroksylerte midazolam-metabolitter (1-OH-MDZ og 4-OH-MDZ). LC/MS-metoden ble validert med tanke på linearitet, presisjon og nøyaktighet, og benyttet for kvantifisering av metabolittdannelse i dose-respons-forsøk med midazolam (1-50  $\mu\text{M}$ ) i CYP3A4- og CYP3A5-mikrosomer fra rekombinante insektsceller og humane leverceller (THLE). En metode for å kvantifisere CYP3A4/3A5-enzymet ved elektroforese og Western blott ble også satt opp. Standardkurver av kjente enzymkonsentrasjoner (mikrosomer fra rekombinante insektsceller) ble benyttet for å kvantifisere innholdet i THLE-mikrosomer. På grunn av lavt uttrykk av CYP3A5 i THLE-3A5-mikrosomer ble disse ikke benyttet i metabolismeforsøk med midazolam.

*Resultater:* Valideringen av LC/MS-metoden viste tilfredstillende verdier for både linearitet, presisjon og nøyaktighet. Dose-respons-forsøkene med midazolam som CYP3A4/3A5 modells substans viste fenomenet substrat-hemming for dannelsen av hovedmetabolitten 1-OH-MDZ i insekt-3A4/3A5-mikrosomer, men ikke THLE-3A4-mikrosomer. Midazolam hadde høyere affinitet (lavere  $K_m$ -verdi) til insekt-3A5-mikrosomer enn insekt-3A4-mikrosomer. Samtidig var  $v_{\max}$ -verdien dobbelt så høy via insekt-3A5-mikrosomer sammenlignet med insekt-3A4-mikrosomer (basert på 1-OH-MDZ). Både  $v_{\max}$ - og  $K_m$ -verdi for dannelsen av 1-OH-MDZ via THLE-3A4-mikrosomer var om lag 5 ganger høyere enn via insekt-3A4-mikrosomer.

*Diskusjon og konklusjon:* Det ble utviklet metoder for å studere CYP3A-metabolisme av midazolam in vitro. Disse kan blant annet anvendes for å undersøke i hvilken grad substanser hemmer CYP3A4 sammenlignet med CYP3A5. I tråd med tidligere vitro-studier ble det i forsøk med insektmikrosomer observert en raskere metabolisme av midazolam til 1-OH-MDZ via CYP3A5 enn CYP3A4. Det samme gjaldt fenomenet substrat-hemming, men

dette ble ikke observert for CYP3A4-metabolisme i THLE-mikrosomer.  $v_{\max}$ - og  $K_m$ -verdier for dannelsen av 1-OH-MDZ via CYP3A4 var for øvrig signifikant forskjellige i insekt- og THLE-mikrosomer. Dette kan indikere ulik konformasjon av CYP3A4 i de to ulike mikrosommodellene. I så fall betyr det at metabolittbildningen, og dermed de enzymkinetiske parameterne, vil kunne variere avhengig av hvilken in vitro-modell som benyttes. Siden in vitro-metabolismestudier benyttes til å predikere farmakokinetiske forhold in vivo, bør framtidig forskning også fokusere på valg av in vitro-metabolismemodell.



# 1 INNLEDNING

## 1.1 Metabolisme

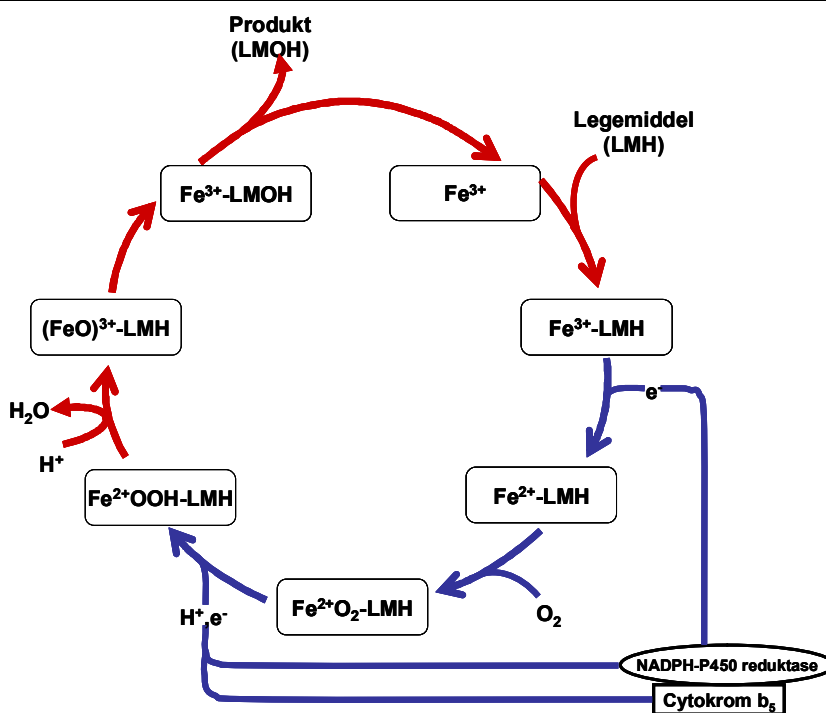
Legemidler og andre xenobiotika omdannes ofte til hydrofile metabolitter før de skilles ut gjennom galle eller i urin. Biotransformasjonsreaksjoner klassifiseres som fase 1 eller fase 2. Fase 1-reaksjoner introduserer en funksjonell gruppe på legemiddelet via blant annet oksidasjonsreaksjoner (hydroksylering eller dealkylering). Denne type reaksjoner fører generelt til tap av farmakologisk aktivitet, men et unntak er demetylering av kodein hvor morfin er aktiv metabolitt [1]. Fase 2-reaksjoner kobler fase 1-metabolitter eller et umetabolisert legemiddel kovalent til et ko-substrat, vanligvis glukuronsyre eller sulfat.

## 1.2 Cytokrom P450 (CYP)-systemet

Det humane cytokrom-systemet består av 57 heme-tiolat enzymer [2], hvor enzymene klassifiseres i undergrupper basert på likhet i aminosyresekvens. Enzymer med mer enn 40 % likhet i sekvens havner i samme familie karakterisert ved et arabisk nummer etter forkortelsen CYP, for eksempel CYP<sub>3</sub>. Ved mer enn 60 % likhet er enzymene i samme subfamilie karakterisert ved en latinsk bokstav, CYP3<sub>A</sub>. Hvert enkelt isoenzym blir deretter karakterisert ved et nytt arabisk nummer CYP3A<sub>4</sub> [3].

CYP-enzymfamiliene 1-3 metaboliserer legemidler og andre eksogene stoffer og inneholder også det største antallet av enzymer [2]. De resterende enzymfamiliene er hovedsaklig involvert i metabolisme av endogene substanser hvor biosyntese av steroidhormoner er den viktigste prosessen, men også fettsyrer og prostaglandiner metaboliseres av disse [2].

Den katalytiske syklusen for CYP-enzymene er beskrevet i figur 1 og krever tilgang til Nikotinamide-adenin-dinukleotide-fosfat (NADPH), molekylært oksygen og NADPH-CYP450-reduktase i tillegg til substrat.



**Figur 1:** Cytokrom P450-enzymers katalytiske syklus. Legemiddelsubstratet, LMH, binder seg til enzymets heme gruppe,  $\text{Fe}^{3+}$ . En konformasjonsendring av cytokrom P450-enzymet katalyserer redoksreaksjonene. Konformasjonsendringen gir en ønsket elektronoverføring fra NADPH via NADPH-P450-reduktase til  $\text{Fe}^{3+}$ -LMH-komplekset og fører til reduksjon av  $\text{Fe}^{3+}$  til  $\text{Fe}^{2+}$ . Molekylært  $\text{O}_2$  binder seg til det reduserte komplekset. Mottak av enda et elektron,  $e^-$ , fra NADPH-P450-reduktase eller alternativt cytokrom  $b_5$  samt to protoner gjør at komplekset dekomponerer til vann og  $(\text{FeO})^{3+}$ -LMH. Hydroksylering av legemiddelet eller en eventuell avspaltet alkylgruppe oppstår og cytokrom P450-enzymet blir regenerert [4, 5].

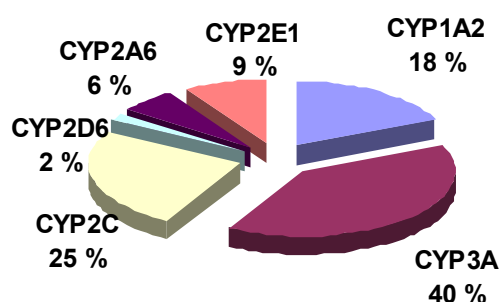
En kombinasjon av genetikk og miljø påvirker metaboliseringsveien via CYP-enzymene. Når det gjelder genetikk, er det for flere enzymer beskrevet genetisk polymorfisme som fører til endret aktivitet. Et eksempel er CYP2D6 der ulike mutasjoner deler befolkningen inn i fire ulike fenotypiske subpopulasjoner; PM (trege omsettere), IM (mellomraske omsettere), EM (raske omsettere) og UM (ultraraske omsettere) [6]. Andelen av de ulike subpopulasjonene varierer med etnisk bakgrunn og høyest andel av trege CYP2D6-omsettere er observert i hvit befolkning (ca 5-10 %).

Nærings-, rus- og legemidler er typiske miljøfaktorer som kan påvirke enzymaktiviteten gjennom hemming og induksjon. Erytromycin (makrolidantibiotikum) og komponenter i grapefruktjuice og granateple er eksempler som hemmer metabolisme via CYP3A4 [7-9]. Karbamazepin (antiepileptikum) og prikkperikum ("Johannesurt") er på sin side indukere av CYP3A4, mens sigaretttrøyk inducerer CYP1A2 [10-12]. I kombinasjon med hemmere eller indukere vil plasmakonsentrasjonen av substrater for de aktuelle enzymene henholdsvis øke eller minske. Dette kan lede til bivirkninger eller terapivikt.

### 1.3 CYP 3A-enzymmer

CYP3A-enzymene representerer en av de viktigste subfamiliene i metabolisme av legemidler. Høyest konsentrasjon av CYP3A finnes i lever, hvor de utgjør hovedbestanddelen av totalt CYP-enzyminnhold (figur 2) [13]. Et stort hydrofobt aktivt sete hos CYP3A fører til at en rekke legemidler med stor variasjon i størrelse og struktur, fra lidokain (molekylvekt 151) til ciklosporin A (molekylvekt 1201), blir metabolisert via disse enzymene [14, 15].

Det humane CYP3A-subfamilien består av isoenzymene CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 og CYP3A43 [2]. CYP3A7 utgjør nær 50 % av totalt CYP-innhold i lever hos nyfødte, men blir kraftig nedregulert kort tid etter fødsel [16, 17]. CYP3A43 er det siste identifiserte medlemmet av CYP3A-familien. De første studiene av denne isoformen viser et meget lavt leveruttrykk og bidraget til den totale CYP3A-metabolisme er trolig neglisjerbar [18]. CYP3A4 er det CYP-enzymet med generelt høyest konsentrasjon i lever, men hos enkeltpersoner kan uttrykket av CYP3A5 være på samme nivå som CYP3A4. Til sammen bidrar disse to enzymene kvantitativt mest til total CYP3A-metabolisme [19].



**Figur 2:** Relativt uttrykk av ulike CYP-enzymmer i 70 % av total CYP-mengde i human lever [20].

### 1.3.1 CYP3A4

CYP3A4-isoenzymet utgjør om lag halvparten av leverens totale innhold av CYP-enzymmer og er derfor det kvantitativt viktigste isoenzymet i CYP3A-subfamilien [21, 22]. Store interindividuelle variasjoner i hepatisk CYP3A4-uttrykk med 37 ganger forskjell i konsentrasjon er rapportert [20, 23]. Denne variasjonen er trolig forårsaket av en kombinasjon av genetikk og miljø [24].

Det er funnet 19 ulike alleler av CYP3A4-genet, men i motsetning til en del andre CYP-enzymmer som for eksempel CYP2D6, er det ikke funnet bevis for et "null-allel" av CYP3A4 [21]. Selv om det ikke er funnet alleler som fører til defekt enzymfunksjon kan de ulike allelene allikevel påvirke uttrykket av CYP3A4 i lever. Mutasjoner kan endre substratets tilgang til aktivt sete, substrataffiniteten eller elektron-overføringen i redoks-reaksjonen ved metabolisme av substrat [21]. Generelt regnes imidlertid miljøfaktorer som viktigere enn genetikk for variasjonene i CYP3A4-fenotype.

Krystallstrukturen av CYP3A4 viser at enzymet inneholder et stort hydrofobt aktivt sete som også sammenfaller med den store variasjonen i molekylstørrelse hos substratene [25, 26]. Et stort bindingssete og lett tilgjengelig heme-del gjør at flere molekyler, identiske eller forskjellige, kan binde seg samtidig til CYP3A4-enzymet [27]. Mye tyder på at det aktive setet inneholder 3 lommer for henholdsvis substrat-, effektor- og hemmingsmolekyl [27]. Multiple kinetisk forskjellige konformasjoner av CYP3A4 kan dermed oppstå som følge av nærvær eller fravær av disse molekylerne og bidra til variasjoner i metabolismen via CYP3A4 [21, 27].

### 1.3.2 CYP3A5

CYP3A5 er polymorft uttrykt i human lever [28]. Ulike alleler av CYP3A5 er beskrevet og CYP3A5\*1 er den eneste varianten som uttrykker et aktivt protein [29]. CYP3A5\*1 betegnes derfor som villtypen. Flere muterte varianter av CYP3A5-genet eksisterer og alle koder for ufullstendig proteintranslasjon, noe som leder til mangel på enzym [29]. CYP3A5\*3 er den vanligste polymorfe formen med mutasjon i intron 3 [28]. Frekvensene av CYP3A5\*1 og CYP3A5\*3 varierer mellom etniske grupper (tabell 1), og villtype-frekvensen varierer fra 10-20 % blant hvite til 80-85 % blant svarte [29]. Betydningen av CYP3A5-genotype på farmakokinetikken av CYP3A-substrater er begrenset studert, men takrolimus er et eksempel der CYP3A5\*1-bærere, sammenlignet med CYP3A5\*3-homozygote, trenger en høyere dose for å oppnå samme serumkonsentrasjon og immunosuppressiv effekt [30].

**Tabell 1:** Gjennomsnittlig relativ fordeling (%) av genotypene CYP3A5\*1/\*1, CYP3A5\*1/\*3 og CYP3A5\*3/\*3 i forskjellige etniske folkegrupper [29].

	Kaukasere	Øst-asiatere	Afro-amerikanere
<b>CYP3A5*1/*1</b>	0,4	7	45
<b>CYP3A5*1/*3</b>	12,6	40	40
<b>CYP3A5*3/*3</b>	87	53	15

Et sentralt spørsmål forskningsmessig har vært i hvilken grad CYP3A5 er uttrykt sammenlignet med CYP3A4 hos bærere av CYP3A5\*1. To studier har undersøkt dette, men det er begrenset samsvar mellom resultatene [31, 32]. Den ene studien konkluderer med at CYP3A5-innholdet av totalt CYP3A i lever er lavt (16 %), mens den andre studien vurderer bidraget som høyt (75 %).

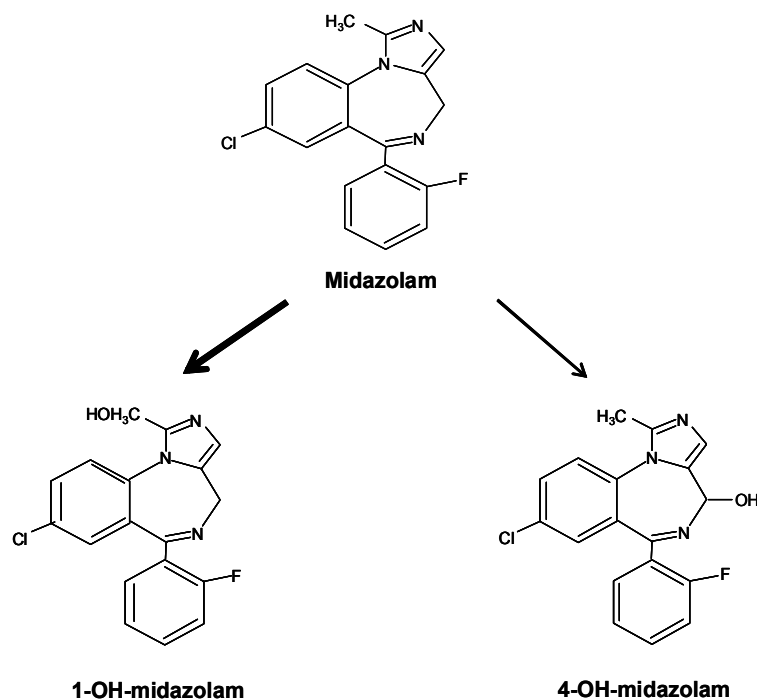
Det er en stor strukturell likhet mellom CYP3A4 og CYP3A5, og de deler også mange substrater. Overlapping i substratspesifisitet er imidlertid ikke fullstendig og felles substrater vil ofte ha ulik affinitet for CYP3A4 og CYP3A5 [33]. Ekins et al. har i sine studier av CYP3A-enzymene sammenlignet hydrofobisiteten og hydrogenbindingsegenskaper hos de aktive setene til CYP3A4 og CYP3A5. Det aktive setet hos begge enzymene er stort, men avstanden fra den mest hydrofobe gruppen i bindingssetet (en aromaring) til en hydrogenbindingsakseptor er lengre hos CYP3A4 enn hos CYP3A5 [33]. Dette kan tyde på at små molekyler kan binde seg i samme konformasjon til begge enzymene, men at det må en konformasjonsendring til for binding av større molekyler til CYP3A5 [33].

De fleste substrater som har blitt studert har vist høyere affinitet til CYP3A4 enn CYP3A5 [19, 31, 34]. Vinkristin (cytostatikum) er imidlertid et eksempel som viser at binding til CYP3A5 kan være mye sterkere enn til CYP3A4 [35]. For vinkristin er også den katalytiske aktiviteten større for CYP3A5 enn for CYP3A4 [35].

### 1.4 Midazolam som CYP3A-modellsubstrat

Midazolam er et raskt innsettende, korttidsvirkende benzodiazepin med anxiolytiske, hypnotiske, krampestillende, skjelettmuskel relakserende og sedative egenskaper [36]. Etter passasje over blod-hjerne-barrieren binder midazolam seg til gamma-aminosmørsyre (GABA)<sub>A</sub>-reseptorer på nerveceller i hjernen. GABA er den viktigste inhibitoriske transmitteren i hjernen. Når benzodiazepiner som midazolam bindes til GABA<sub>A</sub>-reseptorer øker affiniteten for GABA til reseptorene. Binding av GABA til reseptoren fører til innfluks av Cl<sup>-</sup>-ioner, nervecellen blir hyperpolarisert og får redusert eksitasjon [37].

Midazolam er et basisk og lipofilt benzodiazepin med en molekylvekt på 325,8 g/mol [38]. Midazolam metaboliseres hovedsakelig til metabolitten 1-hydroksy-midazolam (1-OH-MDZ), som har lignende farmakologiske egenskaper som midazolam, og en inaktiv sekundær metabolitt 4-hydroksy-midazolam (4-OH-MDZ) (figur 3) [39].

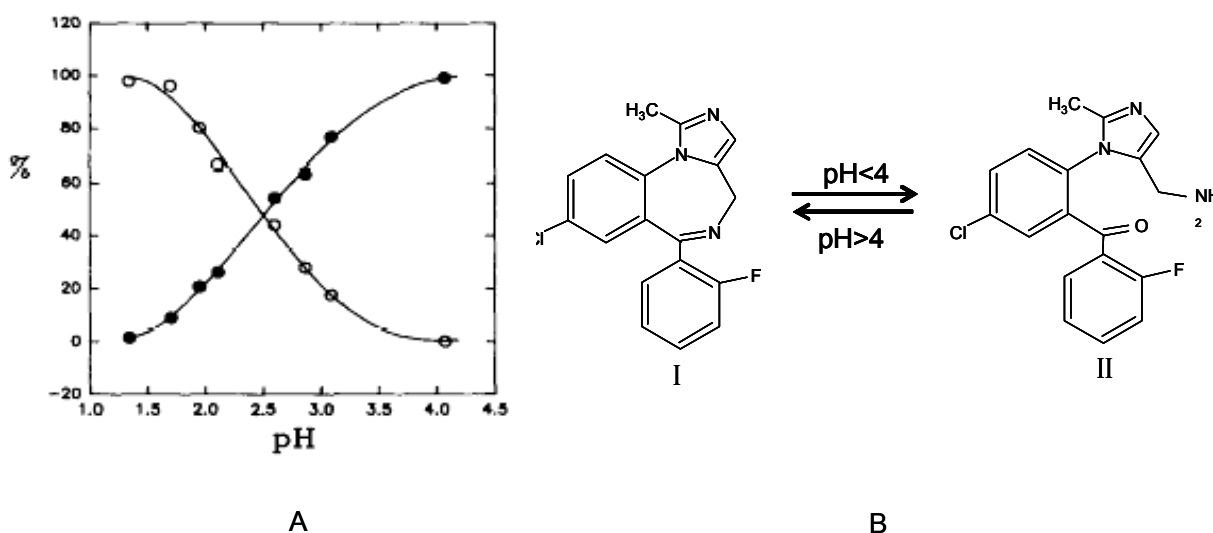


**Figur 3:** Kjemisk struktur og metabolismeveier av midazolam til hovedmetabolitten 1-hydroksy-midazolam (1-OH-MDZ) og en sekundær-metabolitt 4-hydroksy-midazolam (4-OH-MDZ).

Midazolam er mye brukt som CYP3A-modellsubstrat både in vivo og in vitro. Metabolismen av midazolam skjer nesten utelukkende via CYP3A-enzymet og stoffet er foretrukket som modellsubstrat av blant andre amerikanske Food and Drug Administration (FDA) [40]. Halveringstiden er på rundt 2 timer, noe som gjør arbeidet med prøvetaking tidsbegrenset og farmakokinetiske målinger enklere i in vivo-studier. For studier av hepatisk CYP3A-aktivitet

brukes en intravenøs formulering av midazolam, men det finnes også en oral formulering som benyttes ved studier av hepatisk og intestinal CYP3A-metabolisme. Analyse av midazolam og metabolitter gjøres ved væskerkromatografi og ultraviolett (UV) eller massespekrometrisk (MS) deteksjon.

Midazolam, som andre benzodiazepiner, er utsatt for hydrolyse i surt miljø. Sjuringen i benzodiazepinskjelettet (figur 4B) ringåpnes og et benzofenon blir dannet. Ved svakt surt miljø er denne hydrolysen reversibel og benzofenonet reverseres når løsningen blir basisk. Ved sterk sur løsning degraderes benzofenonet til aminobenzofenon. Som vist i figur 4A eksisterer midazolam i en lukket form ved  $\text{pH} > 4$ , mens ved  $\text{pH} 1-4$  foreligger det en likevekt mellom midazolam og benzofenonet [41].



**Figur 4:** (A) Prosentvis endring i andel midazolam (lukkede sirkler) og benzofenonet (åpne sirkler) ved økende pH [41]. (B) Midazolam foreligger som lukket form (I) ved  $\text{pH} > 4$  og som en likevekt mellom lukket form og benzofenonform (II) ved  $\text{pH} < 4$ . Likevekten mellom midazolam og benzofenonet skyves mot venstre jo nærmere pH 4 man kommer.

### 1.5 In vitro-modeller for metabolismestudier

For å kunne forutse potensielle legemiddelinteraksjoner som følge av induksjon og hemming, samt betydning av eventuell genetisk variasjon, er det viktig å karakterisere legemiddelmetabolisme in vitro. Flere ulike modellsystemer har de siste årene blitt benyttet for in vitro-metabolismestudier, blant disse primære cellekulturer, mikrosomer og transfekterte/rekombinante cellelinjer [42].

Primærcellekulturer av hepatocytter krever kontinuerlig tilgang på leverbiopsier og er derfor en lite brukt modell i metabolismestudier (bortsett fra ved induksjonsstudier) [43].

Transfekterte humane lever epitelceller (THLE-celler) er en immortalisert, human levercellelinje, immortalisert ved simian SV40-T antigen transfeksjon som kan dyrkes i kultur i mange passasjer [44]. Dette gjør THLE-cellene mer praktiske for metabolismestudier enn primære hepatocytter. THLE-cellene uttrykker i utgangspunktet lavt/ikke-detekterbar mengde av CYP-enzymmer og kalles da THLE-neo-celler, men subkloner har blitt dannet ved transfeksjon av cDNA som koder for de enkelte CYP-enzymene [44, 45]. Metabolismeforsøk med hele celler utgjør et intakt system hvor de nødvendige faktorene for metabolsk aktivitet og de intracellulære omgivelsene i cellen reguleres av cellen selv. THLE-celler som overuttrykker CYP2D6 og CYP3A4 har blitt benyttet i metabolismeforsøk med diltiazem [46, 47], mens mikrosomfraksjoner av THLE-celler som overuttrykker CYP3A4 har blitt benyttet i metabolismeforsøk med ciklosporin A [48].

Mikrosomer er fraksjoner av endoplasmatisk retikulum (ER) som isoleres ved subcellulær fraksjonering ved differensialsentrifugering etter homogenisering av vev/cellelinjer [49]. Mikrosomer er anvendelige ettersom de kan lagres over lengre tid i nedfrosset tilstand, og i motsetning til hele celler, kan benyttes direkte i en forsøksbuffer ved 37 °C [49]. Den tradisjonelt mest anvendte in vitro-modellen er humane levermikrosomer (HLM), som inneholder en blanding av forskjellige CYP-enzymmer. Studier med HLM vil kunne si noe om den fullstendige in vivo metabolismen til et substrat og ved hjelp av spesifikke hemmere kan ansvarlige enzymer identifiseres [42].

Rekombinante systemer med enzymspesifikt uttrykk i insekt, bakterier eller sopp benyttes stadig oftere i in vitro-metabolismestudier. Her blir cDNA fra humane CYP-enzymmer isolert og rekonstituert, innsatt i en vektor og deretter transfektert inn i det ønskede ekspresjonssystemet [43].

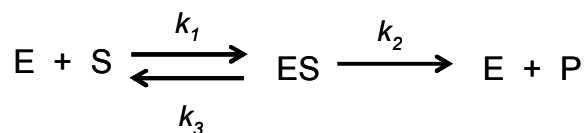
Mikrosomer isolert fra THLE-celler som spesifikt uttrykker ulike CYP-enzymmer (nevnt ovenfor) er et annet rekombinant system til studier av legemiddel-metabolisme [48], og mikrosomene kommer her fra humane celler.

Hensikten med in vitro-metabolismestudier er å predikere farmakokinetiske forhold in vivo. Flere faktorer er viktige for å oppnå vellykkede ekstrapoleringer. Blant annet er in vitro-metabolismedata helt essensielt [48]. Arbeid for å finne optimale inkubasjonsbetingelser og standardiserte retningslinjer i forbindelse med dannelsen av ekspresjonssystemer og den praktiske gjennomføringen av metabolismestudier er nødvendig for å finne modellen som best gjenspeiler in vivo forhold.



## 1.6 Enzymkinetikk

Enzymkinetikk er en kvantitativ beskrivelse av enzymkatalyserte reaksjoner og enzymkinetiske modeller benyttes for å estimere substrat-affinitet og katalytisk evne av reaksjonen. Den enkleste enzymreaksjonen kan beskrives med følgende ligning:

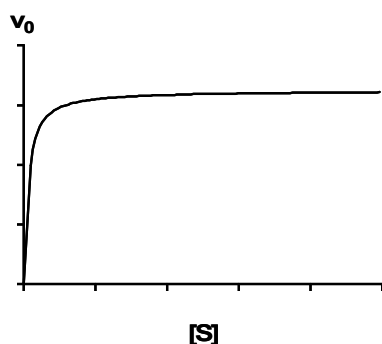


der E er enzym, ES er et substrat-enzym-kompleks og P er den dannede metabolitt. Dannelse av ES =  $\text{E} \times \text{S} \times k_1$  mens tap av ES =  $(\text{ES} \times k_2) + (\text{ES} \times k_3)$ . Når det dannes like mange substrat-enzym-kompleks som det forsvinner substrat-enzym-kompleks, dvs. dannelse ES = tap ES, er situasjonen i likevekt (steady-state).

For denne situasjonen utviklet forskerne Leonor Michaelis og Maud Menten en ligning som viser sammenhengen mellom reaksjonshastigheten ( $v_0$ ) og substratkonsentrasjonen (S):

$$v_0 = \frac{v_{\max} \times [\text{S}]}{K_m + [\text{S}]}$$

Innledningsvis øker hastigheten i enzymreaksjonen hyperbolsk med økende substratkonsentrasjon. Ved substratmetning, det vil si når alle enzymene er bundet til substrat, øker ikke hastigheten mer, kurven flater ut og vi oppnår en maksimal hastighet (figur 5). Denne ligningen ga en mulighet for å estimere enzymkinetiske parametere som beskriver substratets affinitet til enzymet ( $K_m$ ) og effektiviteten av katalysen ( $V_{\max}$ ).  $V_{\max}$  betegner den maksimale reaksjonshastigheten som oppnås for reaksjonen og er et uttrykk for antall enzymer til stede.  $K_m$ -verdien er [S] ved  $\frac{1}{2} V_{\max}$  og vil være konstant uavhengig av antall enzymer [50]. Denne sammenhengen forutsetter substrat-enzym-interaksjoner ved kun et sted per enzym og hvert bindingssete må fungere uavhengig av de andre. CYP3A-enzymet, med sitt store aktive sete, avviker fra denne forutsetningen og mye tyder på at også flere CYP-isoformer er utsatt for samme fenomen [50].



**Figur 5:** Hyperbol kurve hvor metabolismen følger klassisk Michaelis-Menten kinetikk.

Enzymkinetikk som ikke følger Michaelis-Menten ligningen betegnes som atypisk. Årsaker til atypisk enzymkinetikk er blant annet fenomenene substrat-hemming og substrat-aktivering (ko-operativitet) [50]. Substrat-aktivering resulterer i en initiell forsinkelse i dose-respons-kurven og danner en sigmoidal kurve (figur 6A) som beskrives av Hill ligning:

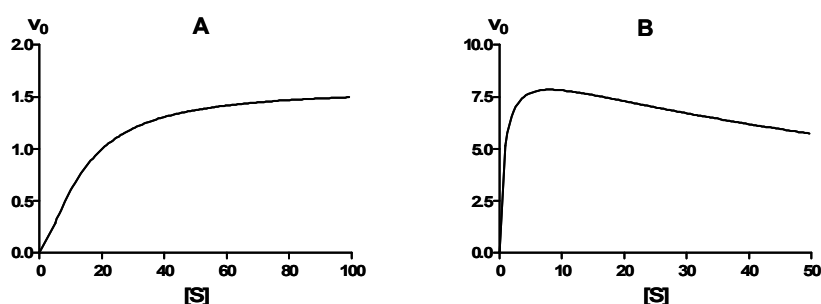
$$v_0 = \frac{v_{max} \times S^n}{S_{50}^n + S^n}$$

hvor  $S_{50}^n$  er analog med  $K_m$  parameteren i Michaelis-Menten og  $n$  er Hills koeffisienten [50].

Substrat-hemming er karakterisert ved en konveks kurve (figur 6B) som skyldes at  $V_{max}$  ikke opprettholdes ved høye substratkonsentrasjoner. Substrathemmingen kan sees på som analog til unkompetitiv hemmingsmekanisme og beskrives ved ligningen:

$$V_0 = \frac{V_{max}}{(1 + (K_m/S) + (S/K_{si}))}$$

hvor  $K_{si}$  er en konstant som beskriver substrathemmingsinteraksjonen [50].



**Figur 6:** Atypisk kinetikk. **(A)** Substrat-aktivering: En initiell forsinkelse gir en sigmoidal kurve. **(B)** Substrat-hemming: Den konvekse kurven karakteriseres av synkende  $V_{max}$  ved økende substratkonsentrasjon.

## 1.7 Hensikten med oppgaven

Metabolisme av legemidler skjer hovedsakelig via cytokrom P450 (CYP)-enzymer hvor CYP3A-subfamilien metaboliserer ca. 50 % av alle legemidler, deriblant flere antiepileptika, benzodiazepiner, antibiotika og  $\text{Ca}^{2+}$ -kanalblokkere. Av de fire humane CYP3A-isoenzymene er CYP3A4 og CYP3A5 kvantitativt viktigst i lever og tynntarm, som er de mest sentrale organene i legemiddelmetabolisme [13].

I motsetning til CYP3A4 er uttrykket av CYP3A5 sterkt betinget av genotype. CYP3A5-genetikken er knyttet til etnisitet og prosentandelen av befolkningen som uttrykker CYP3A5 varierer fra 10-20 % blant kaukasere til over 80 % blant afro-amerikanere [29]. Hos personer som uttrykker CYP3A5 er forholdet CYP3A5/CYP3A4 rapportert å være fra 1/1 til 1/4 [32, 51]. Det betyr at CYP3A5 kan spille en betydelig rolle i den totale CYP3A-metabolismen hos personer som uttrykker CYP3A5. For legemidler som i tilsvarende eller større grad metaboliseres via CYP3A5 sammenlignet med CYP3A4 vil dermed CYP3A5-genotype være bestemmende for farmakokinetiske forskjeller mellom pasienter[35]. Videre vil individuelle forskjeller i interaksjonsgrad mellom CYP3A-substrater og -hemmere være bestemt av CYP3A5-genotype og hemmerens preferanse mot CYP3A5 sammenlignet med CYP3A4.

Metabolisme-studier in vitro er et verktøy for å kartlegge relativ betydning av enkeltzymer og estimere interaksjonsgrad in vivo. Hensikten med denne oppgaven var å utvikle og sammenligne in vitro-modellsystemer for å studere metabolisme og hemming via CYP3A4 og CYP3A5. Midazolam ble benyttet som CYP3A-modellsubstrat og det ble utviklet metoder for;

- 1) kvantifisering av metabolittene 1-OH-MDZ og 4-OH-MDZ ved LC/MS, og
- 2) kvantifisering av CYP3A4 og CYP3A5 ved immunoblotting (Western).

## 2 MATERIALER OG METODER

### 2.1 Materialer

*Fra Sigma-Aldrich, USA:*

HCl 37 %  
Glycerol  
β-Mercaptoetanol  
BSA 96 %  
Human fibronectin  
Tris  
Ponteau S  
HEPES  
EDTA  
NADPH  
1-hydroksy-midazolam  
4-hydroksy-midazolam  
Erytromycin  
Kodak BioMax MS Film  
Kodak LX-24 røntgenfremkaller  
Kodak AL-4 røntgenfiksator

*Fra Biosource International, USA:*

Hydrokortison 10 mM  
Epidermal vekstfaktor 5 µg/ml  
Transferrin 5 mg/ml  
Fosfoetanolamin  
trijodotyronin 1 mM  
Retinsyre 3 mM  
Collagen type 1

*Fra Invitrogen AS, UK:*

PFMR-4  
Gentamycin 200 mM  
Insulin, rekombinant  
BPE  
FCS  
HLM

*Fra Merck, Tyskland:*

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 95-97 %  
MgSO<sub>4</sub>  
Isobutanol  
Etanol  
NaOH  
KCl  
Sukrose  
ACN

*Fra Bio Rad, USA:*

Akrylamid/Bis løsning (37,5:1) 30 %  
SDS  
APS  
TEMED  
SDS-PAGE standard (Low Range)  
Precision Plus protein standard (Dual Colour)  
Bio Rad proteinfarge reagens  
Bromfenolblått  
Geit-anti-kanin IgG-HRP konjugert  
Tween 20

*Fra BDH, VWR International Ltd., UK:*

Glysin

*Fra Amersham Biosciences, UK:*

ECL Western Blotting Detection reagens  
Hybond-ECL nitrocellulosemembran  
Fra PAA Laboratories GmbH, Østerrike:  
L-glutamin 200 mM  
Trypsin-EDTA (1X)  
HBSS

*Normilk AS, Norge:*

Fettfri tørrmelk (gave)

*Fra Nestle, Sveits:*

Humane THLE3A4-celler (gave)  
Humane THLE3A5-celler (gave)  
Humane THLE-Neo-celler (gave)

*Fra Larodan Fine Chemicals AB, Sverige:*

Insekt CYP3A4-xenosomer  
Insekt CYP3A5-xenosomer

*Fra F. Hoffmann-La Roche Ltd., Sveits:*

Midazolam (gave)

*Fra psykofarmakologisk avdeling, diakonhjemmet sykehus, Norge:*

Diazepam (gave)

*Fra Clinical Pharmacology, Imperial College School of Medicine, Hammersmith Hospital,  
U.K:*

Anti-CYP3A4 (gave)  
Anti-CYP3A5 (gave)

## 2.2 Metodeutvikling for kvantifisering av midazolam metabolitter

LC/MS består av et HPLC-system for å separere analytter og et massespektrometer som detektor. HPLC-kolonnen separerer analyttene avhengig av hvor mye de retarderes som følge av interaksjoner med kolonnematerialet. Dersom forskjellen i retensjon er stor nok, vil stoffene separeres og elueres ved ulike tidspunkt. Omvendt-fase-separasjon er det vanligste prinsippet og her er de viktigste retensjonskreftene van der Waals-krefter. De mest lipofile stoffene vil da som regel elueres tregest, men sekundære interaksjoner med restsilanolgrupper kan også noen ganger spille en rolle for elueringsrekkefølgen.

Når massespektrometer brukes som detektor er det viktig at alle komponenter i mobilfase er flyktige. Den vanligste innførings- og ioniseringsenheten for ladede molekyler i MS er elektropray ionisering (ESI). I ioniseringsenheten dannes en aerosol av små dråper med elektrisk ladning ved hjelp av elektrisk felt og forstøvergass, N<sub>2</sub>. Ionefordampning oppstår som følge av en rekke Coulombeksplosjoner hvor frastøtningen mellom ionene i dråpen blir større enn overflatespenningen. Inngangen til kapillæret har alltid motsatt ladning av ionene som skal analyseres slik at ionene akselereres, og her reduseres også trykket fra atmosfærisk trykk til 10<sup>-6</sup>-10<sup>-8</sup> Torr.

Masseanalysatoren kvadrupol består av fire parallelle sylindere som pålegges vekselstrøm. Avhengig av spenningen i kvadrupolfeltet vil ioner med forskjellig masse/ladnings-forhold (m/z) kunne passere kvadrupolen og registreres av detektoren. Dermed kan stoffer med ulik m/z-forhold måles separat til tross for eventuell lik HPLC-retensjon.

### 2.2.1 LC/MS-apparatur og-betingelser

LC/MS-apparatur		Leverandør
Autosampler/injektor	Sil-10AD VP	Shimadzu, Japan
Blandekammer	FCV-10ALVP	Shimadzu, Japan
Degasser	DGU-14A	Shimadzu, Japan
MS-detektor	LC-MS-2010 A	Shimadzu, Japan
Programvare	Class VP Chromatography, Datasystem Version 4.3	Shimadzu, Japan
Pumpe	LC-10AD VP	Shimadzu, Japan
Programvare	Class VP Chromatography, Datasystem version 4.3	Shimadzu, Japan
System controller	SCL-10AVP	Shimadzu, Japan
Kolonne	Inertsil C <sub>8</sub> , 50 * 3mm, 5µM part. str.	Varian, USA

**Mobilfase A:****0,05 M ammoniumformiat-buffer pH 4,4**

NH <sub>3</sub> 25 %	4,036 ml
Kons. HCOOH	2,125 ml
lonebyttet vann	1 l

**Mobilfase B:****Acetonitril 95 %: Metanol 5 %**

ACN	950 ml
MeOH	50 ml

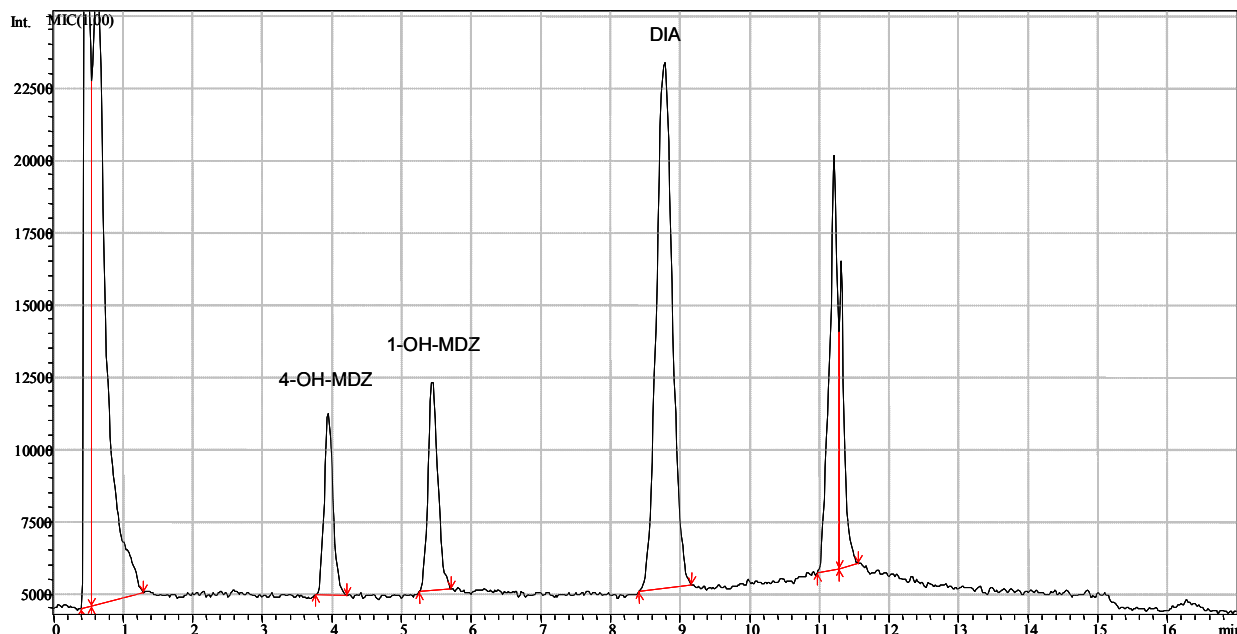
Stamløsninger av 1-OH-MDZ, 4-OH-MDZ og intern standard diazepam (DIA) ble alle laget ved innveiling og oppløsning av tørrstoffene i metanol. Konsentrasjonene var 4 mM for DIA og 1 mg/ml for de to metabolittene. Alle stamløsningene ble oppbevart i dypfryser (-20 °C) og var pakket inn i aluminiumsfolie for å beskyttes mot lys.



**Figur 7:** Relativt innhold (%) av mobilfase B ved ulike tidspunkt (min) etter injeksjon av prøve.

Metabolittene 1-OH-MDZ og 4-OH-MDZ har samme masse/ladningsforhold. Det var derfor nødvendig å separere stoffene kromatografisk og det ble benyttet gradienteluering for å oppnå dette. En blanding av mobilfase A og mobilfase B ble levert til kolonnen som vist i figur 7. Ved starten av separasjonen steg bidraget fra mobilfase B fra 25 % til 37,5 % i løpet av 5 min. Denne sammensetningen ble holdt konstant i 2,5 min, noe som viste seg å være nødvendig for å få de to metabolittene grunnlinjeseparert. Deretter steg bidraget fra mobilfase B til 46,7 % de neste 2,5 min og deretter raskt til 80 % for å få ut eventuelle lipofile forurensninger. Fra 11 til 17 min ble kolonnen reekvilibrert ved reversering av mobilfase B til utgangskonsentrasjonen på 25 %. Hastigheten på mobilfasen var 0,5 ml/min i analysen og 1 ml/min ved reekvilibrering av kolonnen. Total analysetid for hver prøve var 17 min.

Under disse betingelsene ble retensjonstiden for 4-OH-MDZ ca. 3,9 min og for 1-OH-MDZ ca. 5,5 min. Den interne standarden (DIA) ble eluert på ca. 8,9 min (figur 8).



**Figur 8:** Kromatogram av 4-OH-midazolam (4-OH-MDZ 0,075  $\mu$ M), 1-OH-midazolam (1-OH-MDZ 0,075  $\mu$ M) og den interne standarden diazepam (DIA 0,4  $\mu$ M).

Ioniseringen av stoffene ble utført ved hjelp av elektropray (ESI) i positiv mode og for deteksjon ble det benyttet en enkel kvadrupol som masseanalysator. I forsøkene ble et injeksjonsvolum på 20  $\mu$ l benyttet. M/z for metabolittene og intern standard ble funnet ved å analysere prøvene med fullt sveip. Massespektrometeret ble programmert for selektiv måling (SIM) av midazolam-metabolittene og DIA masse-ladningsforhold, og følgende m/z ble detektert: 342,15 (1-OH-MDZ og 4-OH-MDZ) og 285,15 (DIA). Figur 8 viser et typisk kromatogram for midazolam-metabolittene og intern standard fra en standardanalyse.

Kromatogrammene ble registrert og topphøydene og retensjonstidene beregnet ved hjelp av dataprogrammet LCMS-solution.



### 2.2.2 Validering av analysen

En standardkurve for 7 ulike konsentrasjoner 1-OH-MDZ og 4-OH-MDZ ble laget i konsentrasjonsområdet 0,075  $\mu\text{M}$ -1,0  $\mu\text{M}$  og med 2 paralleller på hver konsentrasjon. Prøvene ble deretter fortynnet med 150  $\mu\text{l}$  acetonitril (ACN) tilsatt intern standard og mikset godt før analyse ved LC/MS.

Presisjon og nøyaktighet ble validert i henhold til internasjonale retningslinjer for bioanalyse ved konsentrasjonene 0,075  $\mu\text{M}$ , 0,4  $\mu\text{M}$  og 1,0  $\mu\text{M}$  [52]. Estimering av intradag presisjon ble utført ved analyse av 5 paralleller for hver konsentrasjon på samme dag, og relativt standardavvik (presisjon) beregnet. Interdag presisjon ble bestemt ved de samme konsentrasjonene som for intradag variabilitet. Fem paralleller ble analysert på 5 separate dager. Både intradag og interdag presisjon bør være under 15 % og ikke over 20 % ved kvantifiseringsgrensen (LOQ) [52].

Intradag og interdag nøyaktighet ble bestemt som prosentvis avvik mellom analysesvaret og den teoretiske verdien. Nøyaktigheten ble beregnet på grunnlag av de samme prøvene som intradag og interdag presisjon. Kravene for nøyaktighet er de samme som for presisjon.

## 2.3 Dyrkning av THLE-celler

### 2.3.1 Løsninger

THLE-CELLE DYRKINGSMEDIUM	
PFMR-4 medium	500 ml
L-Glutamin (200 mM)	5 ml
Gentamycin (10 mg/ml)	2,5 ml
Insulin (0,35 mM)	2,5 ml
Hydrokortison (10 mM)	10 $\mu\text{l}$
Epidermal vekstfaktor (5 $\mu\text{g/ml}$ )	500 $\mu\text{l}$
Transferrin (5 mg/ml)	1000 $\mu\text{l}$
Fosfoetanolamin (0,1 mM)	2,5 ml
Trijodotyronin (1 mM)	25 $\mu\text{l}$
Bovint hypofyseekstrakt (6 mg/ml)	1250 $\mu\text{l}$
Retinsyre (3,3 $\mu\text{M}$ )*	50 $\mu\text{l}$
BSA-oppløsning 3 % **	50 ml

\*3 % oppløsning er laget i PMFR-4 medium og deretter steriltfiltrert ved hjelp av sprøyte og filter. Videre er de fordelt i 50 ml rør og frosset.

\*\*Stamløsningen er 3,3 mM og deretter fortynnet til 3,3  $\mu\text{M}$  i 96 % etanol

<b>THLE-CELLE COATINGMEDIUM*</b>	
PFMR-4 medium	100 ml
Human fibronectin	1 mg
Vitrogen 100 (renset bovint kollagen for cellekulturer)	1 ml
BSA-oppløsning 3 %	0,33 ml

\*Sterilfiltreres

Trypsin-EDTA (1X) 0,05 %:	Bruksløsning med trypsin-EDTA fortynnet 1:1 HBSS
HBSS med 2,5 % FCS:	2,5 % FCS i HBSS

### 2.3.2 Prosedyre

Før cellene kunne dyrkes i 75 mm<sup>3</sup> flasker, ble disse tilsatt 3 ml coatingmedium (pkt. 2.3.1). Flaskene ble inkubert i minst 15 min i inkubatorskap ved 37 °C før bruk. Det overflødig coatingmediet ble overført til et nytt rør for gjenbruk og oppbevart i kjøleskap.

Flaskene med THLE celler ble inkubert ved 37 °C i en fuktig atmosfære med 3,5 % CO<sub>2</sub> i luften. Mediet ble skiftet ved å sugge av gammelt medium og tilsette 12 ml nytt medium (pkt. 2.3.1) hver 2.-3. dag, fortrinnsvis mandag, onsdag og fredag inntil flaskene var fulle av celler og ble splittet.

Cellene ble splittet 1 gang pr uke ved ca. 90 % konfluens. Gammelt medium ble sugd av og cellene vasket med 5 ml HBSS. 2 ml bruksferdig trypsin-EDTA ble tilsatt og flasken inkubert ved 37 °C i 5 min. Flasken ble banket i siden slik at cellene løsnet fra overflaten. Trypsin-EDTA med celler ble overført til et sentrifugerør, og flasken ble tilsatt 5 ml HBSS med 2,5 % FCS for å få med siste rest av cellene. Blandingen av Trypsin-EDTA og HBSS med 2,5 % FCS ble sentrifugert ved 200 g i 5 min. Supernatanten ble sugd av og pelletten, inneholdende ca. 9 millioner celler, ble resuspendert i 6 ml dyrkningsmedium (pkt. 2.3.1). 1 ml av celledensjonen ble sådd ut i en coated flaske som ble tilsatt 11 ml rent dyrkningsmedium og inkubert ved 37 °C i en fuktig atmosfære med 3,5 % CO<sub>2</sub> i luften.

Ved mangfoldiggjøring før mikrosomisolering (se pkt 2.4) ble først cellene fra 1 flaske fordelt på 2 flasker etter prosedyren over. Disse ble deretter fordelt på 5 flasker hver slik at det totalt ble 10 flasker, hvor 8 gikk til mikrosomisolering og 2 fortsatte å vokse til ny mangfoldiggjøring.

## 2.4 Preparering og isolering av mikrosomer fra THLE-celler

### 2.4.1 Løsninger

Høstebuffer A:	0,154 M KCl, 50 mM Tris-HCl pH 7,4
Lise Madsen-buffer:	0,25 M sukrose, 10 mM HEPES, 2 mM EDTA
2,5 M sukrose-løsning:	21,3 g sukrose løst i 25 ml dest. vann
0,05 M sukrose-løsning:	1 ml 2,5 M sukrose-løsning fortynnet i 49 ml dest. vann

### 2.4.2 prosedyre

Flaskene med THLE-celler fikk nytt medium dagen før høsting (ved ca. 90 % konfluens). Cellene ble, etter vasking med høstebuffer A (pkt. 2.4.1), skrapet ut av flaskene over i sentrifugerør og sentrifugert ved 710 g i 5 min. Pellettene ble overført til et veid sentrifugerør, sentrifugert en gang til og restpelletten løst i 0,05 M sukrose (pkt. 2.4.1). Cellene ble homogenisert i to omganger. 500 µl av celsuspensjonen ble tilsatt 4,5 ml 0,05 M hypoton sukroseløsning, slik at cellene lettere sprakk, og deretter homogenisert i Dounce homogenisator. I andre runde ble 445 µl hyperten sukroseløsning (2,5 M) tilsatt blandingen slik at løsningen ble isoton og blandingen homogenisert igjen. Uønskede organeller ble deretter fjernet ved differensialsentrifugering. Etter sentrifugering av supernatantene ved 105 000 g i 60 min ved 4 °C ble mikrosomene, som nå befant seg i pelletten, overført til homogenisatoren og løst i Lise Madsen-buffer (pkt. 2.4.1) ved homogenisering. Mikrosomsuspensjonen ble deretter frosset ned ved -70 °C for senere forsøk. (For en mer detaljert beskrivelse se Eili Kases hovedfagsoppgave fra 2002 [49]).

## 2.5 Måling av totalprotein ved UV-absorbans

Totaltprotein i mikrosomprøvene ble målt som beskrevet av Bradford [53], hvor UV-absorbans av fargede forbindelser bundet til proteinene i mikrosomprøven ble detektert ved bølglengde 595 nm. Absorbansverdien ble deretter korrelert til proteinkonsentrasjoner ved hjelp av en standardrekke basert på bovine serum albumin (BSA). BSA ble fortynnet til en standardrekke av 7 kjente konsentrasjoner (10-500 µg/ml). Mikrosomprøvene ble fortynnet med destillert vann slik at estimert konsentrasjon lå innenfor området til standardrekken, henholdsvis 1:500 for HLM og 1:50 for THLE-mikrosomene.

Hver brønn ble tilsatt 10 µl ferdig fortynnet prøve og 200 µl proteinbestemmende farge. Brettet ble stående i 5 min for reaksjon mellom protein og farging før det ble satt inn i Wallac 1420 plateteller fra Perkin Elmer der absorbansen ble målt og verdiene beregnet.

## **2.6 Måling av CYP3A4 og CYP3A5 ved elektroforese/Western blott**

Elektroforese er en teknikk hvor ladede molekyler vandrer, avhengig av masse, i løsning ved å skape et elektrisk felt over løsningen. Natrium-dodekyl-sulfat (SDS) er en detergent som denaturerer proteinene. Dette fører til at separasjonen baserer seg kun på bevegeligheten, som bestemmes av molekylstørrelsen, i gelen. Polyakrylamidgelens funksjon er å størrelsesselektere molekylene, slik at store molekyler retarderes mer enn små molekyler i prøven.

Etter elektroforesen overføres molekylene til en membran ved semi-tørr-blotting og uspesifikk binding blokkeres med blotto. De spesifikke proteinene merkes med primærantistoff fulgt av sekundærantistoff koblet til pepperrot-peroksidase (horseradish peroxidase). Kjemiluminescense er en oksidasjonreaksjon hvor peroksidase sammen med hydrogenperoksid oksiderer luminol i en kort periode. Luminol sender da ut energi i form av lys. Båndene på gelen synliggjøres ved kort eksponering til blåttlys-autoradiografi-film i dette tidsrommet. Denne prosessen kalles Western blott.

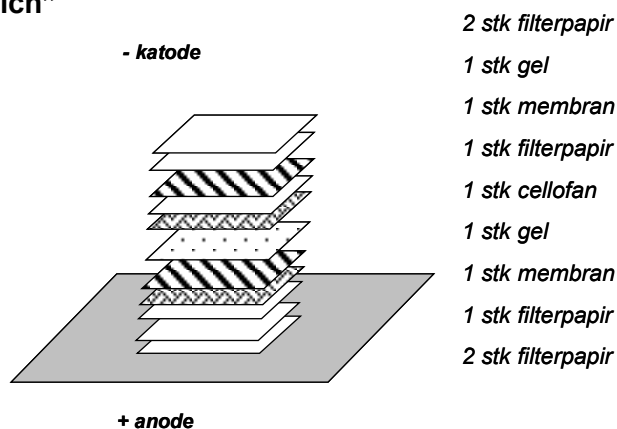
### 2.6.1 Løsninger

12 % Separasjonsgel		4 % Stackinggel
Destillert vann	4,36 ml	6,10 ml
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	3,25 ml	
0,5 M Tris-HCl pH 6,8		2,50 ml
Monomer	5,20 ml	1,3 ml
10 % SDS	130 µl	100 µl
10 % ammoniumpersulfat (APS)	65 µl	50 µl
TEMED	6,5 µl	10 µl

Elektroforesebuffer pH 8,3		Blottingbuffer pH 8,3
0,025 M Tris-HCl	7,5 g	12 g
SDS	2,5 g	
0,02 % SDS		0,8 ml
0,192 M Glysin	35 g	57,6 g
20 % MeOH		800 ml
Destillert vann	2,5 l	2,5 l

2X Laemmlibuffer:	0,0625 M Tris-HCl, 0,1 % SDS, 15 % Glycerol
1X Laemmlibuffer:	50 % 2X laemmlibuffer, 50 % dest. vann
T-TBS:	100 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 0,05 % Tween Oppbevart i kjøleskap
Blotto (125 ml/membran):	25 g fettfri tørrmelk løst i 0,5 l T-TBS. Varmet opp, filtrert gjennom filterpapir og oppbevart i kjøleskap i ca 1 uke.
Fikseringsvæske:	120 ml fiks, 280 ml vann
Fremkallingsvæske:	120 ml fremkaller, 280 ml vann

#### "Sandwich"



**Figur 9:** Sammensetning av "sandwich" benyttet under western blotting (pkt. 2.6.2).

### 2.6.2 Prosedyre

Like mengder mikrosomløsning og 2x Laemmlibuffer (pkt. 2.6.1) ble tilsatt et eppendorfrør. Denne blandingen ble deretter fortynnet videre til passende fortynning i forhold til responsen ved å tilsette 1x Laemmlibuffer (pkt. 2.6.1).  $\beta$ -Merkaptoetanol og bromfenolblått ble tilsatt prøvene til slutt og prøvene ble kokt i 5 min.

#### *Elektroforese*

2 stk 12 % separasjonsgel ble laget (pkt. 2.6.1). APS og TEMED ble tilsatt samtidig og blandingen ble tilført støpingsformen til væskefronten var 1 cm under metallplatekanten. 200  $\mu$ l isobutanol ble pipettert over gelene for å gi en glatt og flat overflate og samtidig forhindre luft i å redusere polymeriseringstiden. Gelene polymeriserte i 45 min før isobutanol ble fjernet og gelene vasket med destillert vann. 4 % stacking gel (pkt. 2.6.1) ble deretter tilsatt støpingsenheten til den var full og brønnkammer ble satt på plass før stacking-gelene polymeriserte i 45 min.

Etter endt polymerisering ble støpingsenheten forsiktig tatt fra hverandre og kassetten bestående av metallplate, spacer og glassplate med polymerisert gel ble overført til elektroforesekaret. Brønnkammene ble fjernet. Elektroforesebuffer (pkt. 2.6.1) ble tilsatt karet og bak kassetten, og brønnene ble skylt for å fjerne upolymerisert akrylamid. 5  $\mu$ l referanseprøve og 15  $\mu$ l mikrosomprøver ble separert ved elektroforese ved 200 V i ca. 1 time.

#### *Western-blott*

Gelene ble tatt ut av kassetten og stackinggelen ble fjernet. Sammen med filterpapir, cellofan og nitrocellulosemembran i samme størrelse, gjennomfuktet av blottingbuffer (pkt. 2.6.1), ble det dannet en "sandwich" (figur 9). Proteinene ble overført fra gel til nitrocellulosemembran ved semitørr-blotting i blottingmaskin ved 100 mA i 45 min. Gel/nitrocellulose-sandwichen ble demontert, og som kontroll på vellykket overføring ble proteinene på membranene farget i 1 min med Ponceau S-løsning og skylt forsiktig i destillert vann.

Membranene ble lagt 10 min i tris-tween-bufret-saline-løsning (T-TBS-løsning) (pkt. 2.6.1). Deretter ble membranene tilsatt 10 ml blotto-løsning (pkt. 2.6.1) per membran i 60 min før primærantistoff i fortynning 1:10000 ble tilsatt membranene og inkubert over natt på kjølerom med vipping. Membranene ble vasket i 3x10 min med blotto ved romtemperatur før peroksidasermerket sekundært antistoff, geit-anti-kanin fortynnet 1:3000 i blotto ble tilsatt og

inkubert 60 min. Membranene ble så vasket i 3x10 min i blotto og 2x10 min med T-TBS. Like mengder Kjemiluminescense (ECL)- reagens ble blandet (6 ml totalt) og tilsatt membranene. Membranene ble deretter pakket inn i plastfolie med proteinsiden ned. Membranene ble overført til en filmkassett og eksponert på film i 40 min. Filmen ble fremkalt og fiksert (pkt. 2.6.1).

For å kunne kvantifisere CYP3A4/3A5-mengder i THLE-mikrosomer ble rekombinante insekt-mikrosomer med deklartert innhold av henholdsvis CYP3A4 (1095,6 pmol 3A4/ml) og CYP3A5 (1041,6 pmol 3A5/ml) benyttet til å lage en standardkurve.

Fortynninger av insekt-mikrosomer i området 1:5000-1:25000 ble tilsatt minimum 3 brønner og de resterende brønnene ble tilsatt prøver med ukjent mengde CYP3A4/3A5 samt negativ kontroll og referansestandard. Ved hjelp av Chemi-Genius<sup>2</sup>-bioimaging-system og dataprogrammet SynGene ble den relative intensiteten av båndene på filmen målt og CYP-mengde i THLE-mikrosomene bestemt fra standardkurven fra insekt-mikrosomene.

## 2.7 Metabolismestudier med midazolam

### 2.7.1 Løsninger og mikrosomer

BUFFERLØSNING TIL MIKROSOMFORSØK	
200 mM Tris-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (pH= 7,4)	130 µl/rør
20 mM MgSO <sub>4</sub>	5,5 µl/rør
10 mM NADPH	35 µl/rør

Alle tørrstoffer var løst i ionebyttet vann og løsningene oppbevart i kjøleskap. NADPH-løsning lages kun med et lite overskudd. Denne er holdbar i fryseren, beskyttet mot lys, til neste dag.

Metabolismestudier med midazolam ble utført i insekt-mikrosomer hvor det humane genet for CYP3A4 eller CYP3A5 er transfektert inn og i mikrosomer isolert fra THLE-celler som spesifikt uttrykker CYP3A4.

### 2.7.2 Metabolisme av midazolam som funksjon av tid

For å sikre likevektsbetingelser (se pkt 1.6) i konsentrasjonsforsøkene (pkt. 2.7.2) ble metabolittproduksjon ved to ulike konsentrasjoner av midazolam (henholdsvis 1 µM og 3 µM) undersøkt som funksjon av tid (0-15 min). Forsøkene ble utført ved inkubering med CYP3A4-insektmikrosomer. Midazolam løst i metanol ble tilsatt et reagensrør og metanolen dampet av under N<sub>2</sub>-gass. Ferdigblandet inkubasjonsbuffer (pkt.2.7.1) ble tilsatt rørene og blandingen fordelt i inkubasjonsrør (170,5 µl/rør). Hvert inkubasjonsrør ble preinkubert 5 min, mens CYP3A4-insektmikrosomer, fortynnet 1:90 i Lise Madsen-buffer, ble preinkubert noen

minutter på vannbad ved 37 °C. Mikrosomene ble tilsatt hvert rør (50 µl/rør) med et halvt minutt forskyvning. Blandingen ble mikset forsiktig og inkubert ved 37 °C på vannbad med risting (trinn 7,5) i henholdsvis 5, 10 og 15 min for begge konsentrasjonene av midazolam. Konsentrasjonen av NADPH og MgSO<sub>4</sub> i metabolismeforsøket var henholdsvis 1,59 mM og 0,5 mM som optimalisert for ciklosporin A metabolisme av Hermann et al.[48]. Proteinfelling ved hjelp av 150 µl iskald ACN, tilsatt intern standard DIA 0,44 µM, stanset metabolismen av midazolam. Etter henstand på is i minimum 30 min ble rørene sentrifugert ved 1600 g, 4 °C, i 5 min og supernatanten avpipettert og analysert ved LC/MS.

### **2.7.3 Metabolisme av midazolam som funksjon av substratkonsentrasjon**

For å kunne estimere enzymkinetiske parametere ble det laget dose-respons-kurver for dannelsen av metabolittene 1-OH-MDZ og 4-OH-MDZ ved ulike konsentrasjoner av midazolam i forsøk med THLE-3A4-mikrosomer, insekt-3A4-mikrosomer og insekt-3A5-mikrosomer. Varierende konsentrasjoner midazolam i området 1-50 µM ble tilsatt reagensrør og det ble benyttet 2 paralleller for hver konsentrasjon. Samme inkubasjonsprosedyre som i pkt. 2.7.2 ble benyttet i dose-respons-eksperimentene. Inkubasjonstiden ved forsøkene var 7,5 min og forsøk med begge insektmikrosomene (CYP3A4 og CYP3A5), fortynnet 1:90 i Lise Madsen-buffer, og ufortynnede THLE-mikrosomer (CYP3A4) ble utført. Metabolismehastigheten ved de ulike substratkonsentrasjonene ble beregnet som mengde metabolitt per mengde CYP3A-protein per minutt. Dataene ble tilpasset ikke-lineært til den best beskrivende av modellene skissert i pkt 1.6 ved programmet Graphpad Prism versjon 4. Enzymkinetiske parametere ble presentert med 95 % konfidensintervall.

### **2.7.4 Hemming av midazolam-metabolisme ved tilsetning av erytromycin**

Innledende forsøk ble gjennomført for å vurdere potensielle forskjeller i hemmingsgraden av erytromycin i forhold til metabolisme i ulike CYP3A-mikrosompreparater. Det ble benyttet samme prosedyre som i pkt. 2.7.2 og 2.7.3, men i disse forsøkene ble varierende konsentrasjon av ren erytromycin (0,1-15 µM), ko-inkubert først med 50 µl mikrosomer i 7,5 min og deretter tilsatt et lite volum (20 µl) midazolam i fast konsentrasjon (15 µM) og inkubert i nye 7,5 min.

Hemmingsgraden ble beskrevet som prosentvis produksjon av hydroksylerte metabolitter i forhold til kontrolleksperimenter uten erytromycin.



### 3 RESULTATER

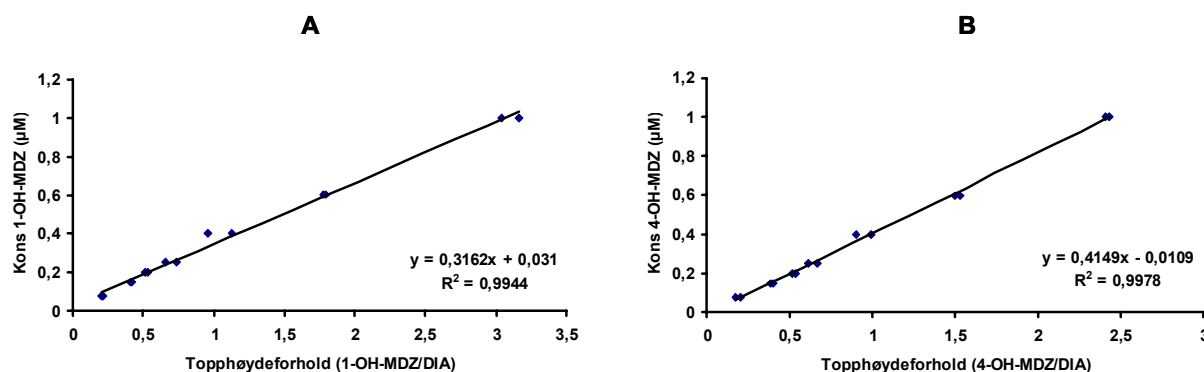
#### 3.1 Metodeutvikling

##### 3.1.1 Validering

Deteksjonsgrensen (LOD) ble estimert til å være 0,045  $\mu\text{M}$  for 1-OH-MDZ og 0,008  $\mu\text{M}$  for 4-OH-MDZ. Den nedre kvantifiseringsgrensen (LOQ) ble estimert til å være 0,078  $\mu\text{M}$  for 1-OH-MDZ og 0,051  $\mu\text{M}$  for 4-OH-MDZ.

For å teste lineariteten av analysemetoden for deteksjon av hydroksylerte metabolitter av midazolam ble det laget standardkurver for 1-OH-MDZ (figur 10A) og 4-OH-MDZ (figur 10B) dannet ved å opparbeide og analysere standardløsninger som beskrevet i pkt 2.2.

7 konsentrasjoner av hver metabolitt i området 0,075-1  $\mu\text{M}$  ble målt hver gang en standardkurve ble satt opp og med 2 paralleller på hver konsentrasjon. En linear korrelasjon mellom konsentrasjon og topphøydeforholdet metabolitt/intern standard ble funnet. Korrelasjonskoeffisienter ( $R^2$ ) lå mellom 0,994-0,997 for 1-OH-MDZ og 0,992-0,998 for 4-OH-MDZ. Standardkurvene ble laget i forbindelse med metabolismeforsøkene (pkt. 2.2.2) og ble benyttet for å beregne dannelse av midazolam-metabolitter.



**Figur 10:** Eksempler på standardkurver for 1-hydroksey-midazolam (1-OH-MDZ) (A) og 4-hydroksey-midazolam (4-OH-MDZ) (B).

Ved presisjonsanalyse ble metodens repeterbarhet (intradag variasjon) og reproduserbarhet (interdag variasjon) validert (tabell 2). Ved intradag valideringen lå alle presisjonsbestemmelsene lavt, både for 1-OH-MDZ og 4-OH-MDZ, med høyeste verdi 7,4 % avvik. For interdag valideringen lå verdiene noe høyere, men alle verdiene var under grenseverdiene fastsatt av guidelines utarbeidet av FDA [1].

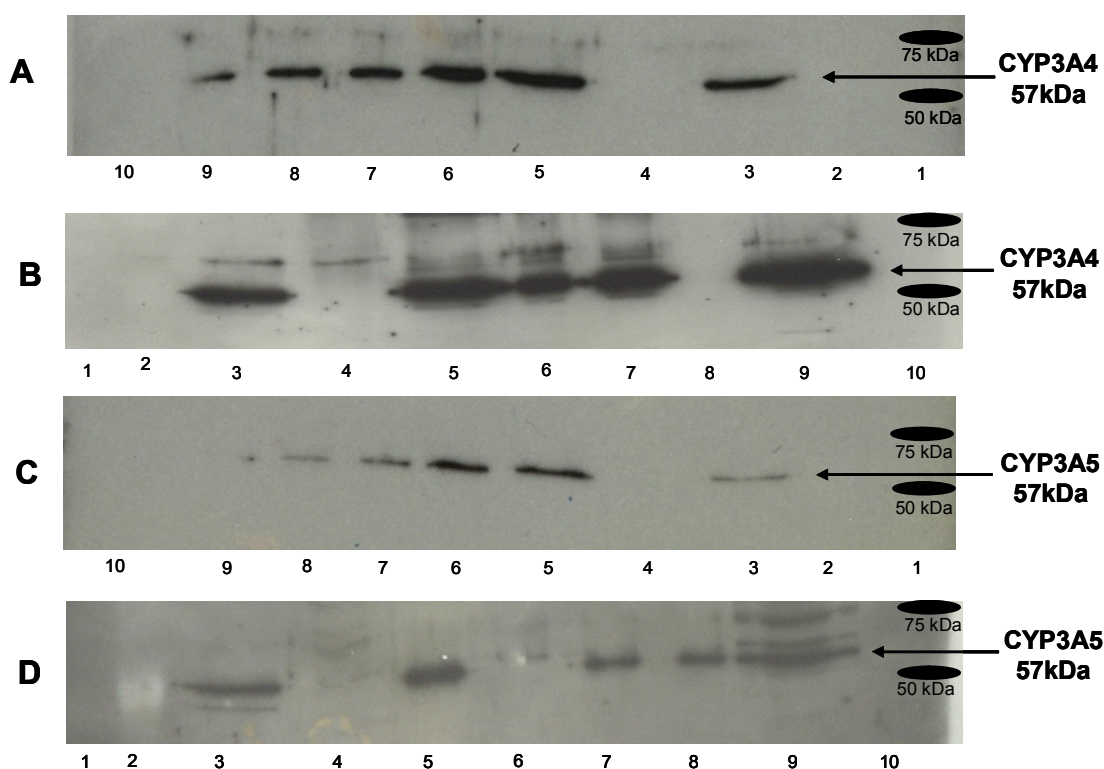
Validering av analysemetodens nøyaktighet var tilfredsstillende for alle analytter i hele konsentrasjonsområdet, med høyeste avvik på 13,7 % ved laveste konsentrasjon av 1-OH-MDZ (tabell 2).

**Tabell 2:** Presisjon og nøyaktighet for bestemmelse av hydroksylerte metabolitter av midazolam (1-OH-MDZ og 4-OH-MDZ)

	<i>Forbindelse</i>	<i>Nominell konsentrasjon (<math>\mu</math>M)</i>	<i>Antall paralleller</i>	<i>Estimert konsentrasjon (<math>\mu</math>M) gj.snitt<math>\pm</math>SD</i>	<i>Presisjon %</i>	<i>Nøyaktighet %</i>
Intradag	1-OH-MDZ	0,075	5	0,065 $\pm$ 0,004	5,8	13,7
		0,4	5	0,414 $\pm$ 0,022	5,3	3,6
		1	5	1,113 $\pm$ 0,016	1,4	11,3
	4-OH-MDZ	0,075	5	0,084 $\pm$ 0,006	6,9	12,1
		0,4	5	0,433 $\pm$ 0,032	7,4	8,3
		1	5	1,100 $\pm$ 0,019	1,7	10
Interdag	1-OH-MDZ	0,075	5	0,073 $\pm$ 0,011	15,1	2,8
		0,4	5	0,409 $\pm$ 0,057	13,9	2,2
		1	5	1,050 $\pm$ 0,118	11,2	5
	4-OH-MDZ	0,075	5	0,076 $\pm$ 0,015	19,6	0,9
		0,4	5	0,385 $\pm$ 0,050	12,9	3,9
		1	5	0,987 $\pm$ 0,098	9,9	1,3

### 3.2 Immunologisk måling av CYP3A4 og CYP3A5

Elektroforese med etterfølgende Western blott ble først benyttet for kvalitativ bestemmelse av CYP3A-enzymet i mikrosomprøver fra THLE-celler. En proteinstandard inneholdende proteiner med ulike, kjente molekyllstørrelser ble tilsatt en brønn i gelen. For å fange opp uspesifikk binding ble en brønn tilsatt THLE-neo-mikrosomer som negativ kontroll. Ved en tilfeldighet ble en insekt-3A4-mikrosomprøve tilsatt en brønn i gelen inkubert med CYP3A5-antistoff. Dette gav oss muligheten til å kontrollere at CYP3A5-antistoffet ikke kryssreagerer med CYP3A4-proteiner. I litteraturen gis CYP3A4 en molekyllvekt lik 57212 Da, mens CYP3A5 har en molekyllvekt lik 57109 Da [34]. Båndene på filmene fremkalt med CYP3A4/3A5-antistoff lå en anelse ovenfor linjen med standardproteinene på størrelse 50 kDa (figur 11A-D). Dermed ble det fastslått at CYP3A4 var til stede i THLE-3A4-mikrosomene, mens CYP3A5 var til stede i THLE-3A5-mikrosomene (figur 11D brønn 9). Likeledes var begge enzymene til stede i båndet fra brønnen med HLM-prøve (figur 11A-D brønn 3).

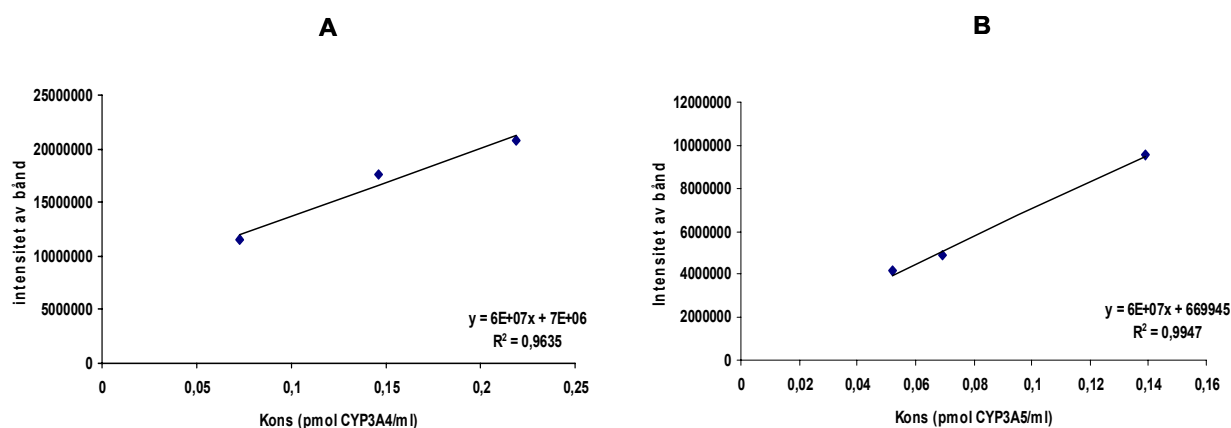


**Figur 11:** Eksempler på immunoblott med CYP3A4-antistoff (A og B) og CYP3A5-antistoff (C og D). Brønnene 1-10 inneholder prøver fra ulike mikrosomer-prepareringer og proteinstandard. Brønn 1: ingen prøve, 2: Proteinstandard, 3: HLM 1:100, 4: THLE-Neo-mikrosomer 1:10, 5: insekt-3A4-mikrosomer(i3A4) 1:5000 (A+B+D) og insekt-3A5-mikrosomer(i3A5) 1:5000 (C), 6: i3A4 1:15000 (A), i3A4 1:7500 (B), i3A5 1:7500 (C+D), 7: i3A4 1:7500 (A), i3A4 1:15000 (B), i3A5 1:15000 (C), i3A5 1:20000 (D), 8: Ingen prøve (A), i3A4 1:20000 (B), i3A5 1:20000 (C+D), 9: THLE-3A4-mikrosomer 1:10 (A), i3A4 1:25000 (B), i3A5 1:25000 (C) og THLE-3A5-mikrosomer 1:1 (D), 10: Ingen prøve.

Samme prinsipp ble videre benyttet til kvantitativ bestemmelse av CYP3A4 og CYP3A5 i THLE-mikrosomer og HLM. Deklarerte rekombinante insektmikrosomer i minimum 3 ulike konsentrasjoner ble benyttet som standard (tabell 3 brønn 5-7 for CYP3A4 og tabell 4 brønn 5-8 for CYP3A5). Etter eksponering og ved bruk av dataprogrammet SynGene, ble intensiteten av hvert bånd på filmen målt.

Standardprøver (i lik fortykning) ga opphav til forskjeller i eksponering fra forsøk til forsøk som vist for CYP3A4 (figur 11A og B). Selv om det så ut som om båndene ble overeksponert i figur 11B viste standardrekkene laget i begge forsøkene en linear sammenheng (figur 12).

Ved hjelp av de lineare sammenhengene (figur 12), ble innholdet av CYP3A4 og CYP3A5 i THLE-3A4/3A5-mikrosomer og HLM bestemt. Innholdet av CYP3A4 var 3,96 pmol 3A4/ml i THLE-3A4-mikrosomer og 14,1 pmol 3A4/ml i HLM (tabell 3). Tilsvarende var innholdet av CYP3A5 0,19 pmol 3A5/ml i THLE-3A5-mikrosomer og 11,2 pmol 3A5/ml i HLM (tabell 4).



**Figur 12:** Eksempler på standardrekker av insekt-CYP3A4-mikrosomer (A) og insekt-CYP3A5-mikrosomer (B).

Måling av totalprotein (pkt. 2.5) gjorde at CYP-innholdet kunne relateres til mengde protein i prøven. Dette gjør at det er enklere å sammenligne innholdet av CYP-enzymet i de ulike mikrosompreparatene (tabell 3 og 4).

**Tabell 3:** Kvantifisering av CYP3A4 ved hjelp av standardkurven (figur 12A).

Brønn	Prøver	Int av bånd i fortynnet prøve	pmol 3A4/ml i ufortynnet prøve	pmol 3A4/mg protein i ufortynnet prøve
1	Ingen prøve	0	0	0
2	Referanseproteinstandard	0	0	0
3	HLM 1:100	15513223	14,1	0,52
4	Negativ kontr. neo 1:10	0	0	0
5	Insektmikrosom CYP3A4 1:5000	20751550	1095,6	83
6	Insektmikrosom CYP3A4 1:15000	11535447	1095,6	83
7	Insektmikrosom CYP3A4 1:7500	17697542	1095,6	83
8	Ingen prøve	0	0	0
9	THLE CYP3A4 1:10	30757504	3,96	1,11
10	Ingen prøve	0	0	0

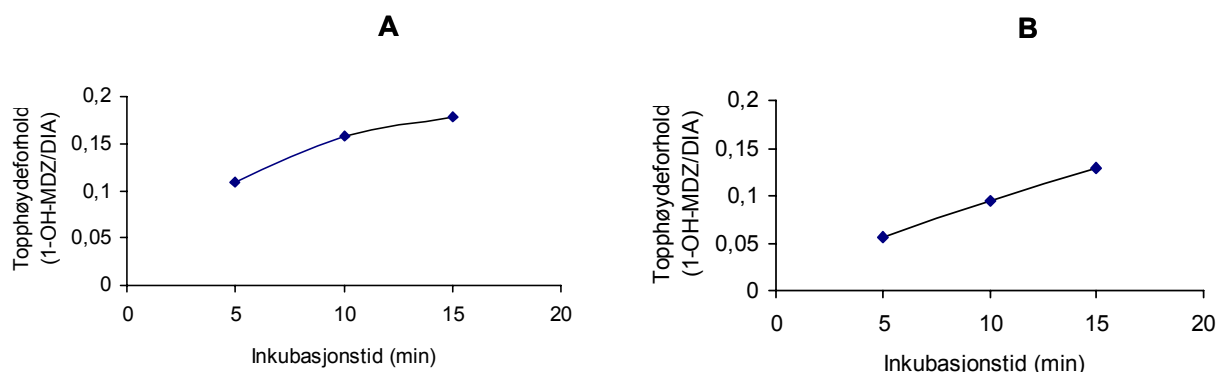
**Tabell 4:** Kvantifisering av CYP3A5 ved hjelp av standardkurven (figur 12B).

Brønn	Prøver	Int av bånd i fortynnet prøve	pmol 3A5/ml i ufortynnet prøve	pmol 3A5/mg protein i ufortynnet prøve
1	Ingen prøve	0	0	0
2	Referanseproteinstandard	0	0	0
3	HLM 1:100	7398270	11,2	0,41
4	Negativ kontr. neo 1:10	0	0	0
5	Insektmikrosom CYP3A5 1:7500	9552761	1041,6	84
6	Insektmikrosom CYP3A4 1:5000	0	0	0
7	Insektmikrosom CYP3A5 1:15000	4854936	1041,6	84
8	Insektmikrosom CYP3A5 1:20000	4170003	1041,6	84
9	THLE CYP3A5 1:1	6470644	0,19	0,041
10	Ingen prøve	0	0	0

### 3.3 Metabolismestudier med midazolam

#### 3.3.1 Metabolisme av midazolam som funksjon av tid

For å sikre likevektsbetingelser i konsentrasjonsforsøkene ble metabolittdannelse fra midazolam i insekt-3A4-mikrosomer undersøkt som funksjon av tid. Ved inkubasjon av 3  $\mu$ M midazolam med insekt-3A4-mikrosomer var det ingen tendens til avbøyning av kurven og en likevektsituasjon i hele tidsområdet (figur 13B). Ved inkubasjon av 1  $\mu$ M midazolam sammen med insekt-3A4-mikrosomer var det en tendens til avbøyning av kurven etter ca. 10 min inkubering (figur 13A). Det ble derfor valgt å benytte 7,5 min inkubering i konsentrasjonsforsøkene.



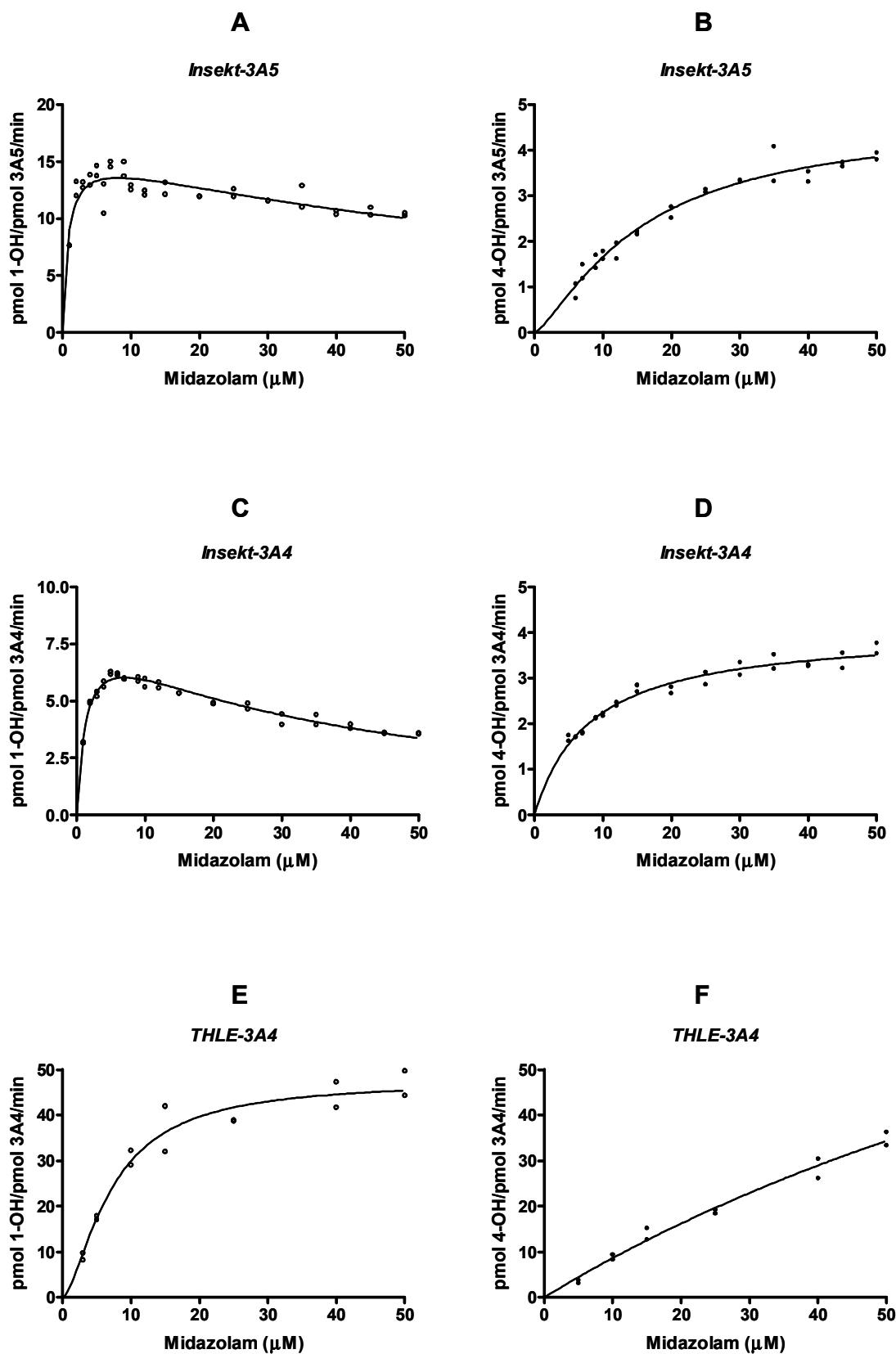
**Figur 13:** Tidskurve for dannelsen av 1-hydroksey-midazolam (1-OH-MDZ) etter inkubasjon med 1  $\mu$ M midazolam (MDZ) (A) og 3  $\mu$ M MDZ (B).

### 3.3.2 Metabolisme av midazolam som funksjon av substratkonsentrasjon

Hensikten med forsøkene var å estimere og sammenligne enzymkinetiske parametre for dannelsen av metabolittene 1-OH-MDZ og 4-OH-MDZ via CYP3A4 og CYP3A5 i ulike mikrosompreparater med midazolam i varierende konsentrasjoner (1-50  $\mu$ M). Ettersom THLE-3A5-mikrosomer inneholdt neglisjerbar mengde CYP3A5, ble det bare gjort forsøk med insekt-3A4- og 3A5-mikrosomer og THLE-3A4-mikrosomer.

Dose-respons-kurvene for de to metabolittene dannet ved inkubering av midazolam med de to ulike insektmikrosomene er vist i figur 14 A-D. Metabolittkurvene ved inkubering med begge insektmikrosom-typene, med unntak av 4-OH-MDZ-dannelse med inkubering med insekt-3A4-mikrosomer kunne ikke beskrives ved hjelp av klassisk Michaelis-Menten kinetikk. Ved dannelsen av hovedmetabolitten 1-OH-MDZ viste kurve A og C i figur 14 substrathemming (negativ ko-operativitet) og kan beskrives av ligningen presentert i pkt. 1.6. Det motsatte er tilfellet med sekundær-metabolitten 4-OH-MDZ. Metabolitt-dannelsen fra insekt-3A5-mikrosomer viste en sigmoidal kurve (figur 14B), som er et tegn på substrat-aktivering (positiv ko-operativitet). Denne beskrives av Hills ligning i pkt. 1.6. Dannelsen av sekundærmetabolitten fra metabolisme via insekt-3A4-mikrosomer følger vanlig klassisk Michaelis-Menten kinetikk (figur 14D).

I dose-respons-forsøk satt opp med THLE-3A4-mikrosomer ble dannelsen av 1-OH-MDZ best beskrevet ved hjelp av en sigmoidal kurve (substrat-aktivering) (figur 14E) og dannelsen av 4-OH-MDZ følger vanlig Michaelis-Menten (figur 14F).



**Figur 14:** Dose-respons-kurver for dannelse av metabolittene 1-hydroksy-midazolam (1-OH-MDZ) og 4-hydroksy-midazolam (4-OH-MDZ) via insekt-3A5-mikrosomer (**A** og **B**), insekt-3A4-mikrosomer (**C** og **D**) og THLE-3A4-mikrosomer (**E** og **F**) som viser enten klassisk Michaelis-Menten (**D** og **F**), sigmoidal (**B** og **E**) eller substrathemmings- (**A** og **C**) kinetikk.

Ved ikke-linear regresjon ble  $K_m$ -verdier og  $v_{max}$ -verdier estimert basert på kurvene i figur 14 og vist i tabell 5. Ettersom  $v_{max}$ -nivået såvidt ble nådd for dannelse av 4-OH-MDZ, ligger det større usikkerhet i estimeringen av enzymatiske parametre fra disse kurvene tilsvarende parametre for dannelsen av 1-OH-MDZ.

Det ble observert lavest  $K_m$ -verdi for dannelse av 1-OH-MDZ ved inkubering av MDZ sammen med insekt-3A5-mikrosomer (0,79  $\mu\text{M}$ ) sammenlignet med insekt-3A4-mikrosomer (1,49  $\mu\text{M}$ ). Samtidig er  $v_{max}$  dobbelt så høy for 1-OH-MDZ-dannelsen via insekt-3A5 enn insekt-3A4, henholdsvis 16,2 pmol/pmol 3A5/min og 8,6 pmol/pmol 3A4/min (tabell 5).

$K_m$ -verdiene for dannelse av 1-OH-MDZ via CYP3A4 ble høyere i mikrosomer fra THLE enn fra insekt, henholdsvis 7,13 og 1,49  $\mu\text{M}$  (tabell 5). Det ble samtidig estimert en høyere  $v_{max}$ -verdi for dannelse av 1-OH-MDZ i THLE i forhold til insekt, og når dette tas med i betraktning vil evnen til å metabolisere midazolam til 1-OH-MDZ i CYP3A4 bli lignende i de 2 ulike mikrosomene.

**Tabell 5:** Enzymkinetiske data ( $K_m$  og  $v_{max}$ ) med 95 % konfidensintervall for de ulike CYP3A-mikrosompreparatene insekt-3A5, insekt-3A4 og THLE-3A4.  $K_{si}$  betegner graden av substrathemming ved dannelse av 1-OH-midazolam (1-OH-MDZ) via insekt-3A5- og insekt-3A4-mikrosomer (se figur 14A og C).

	<i>Insekt-3A5</i>		<i>Insekt-3A4</i>		<i>THLE-3A4</i>	
	1-OH-MDZ	4-OH-MDZ	1-OH-MDZ	4-OH-MDZ	1-OH-MDZ	4-OH-MDZ
$K_m/S_{50}^*$	0,79 (0,43-1,14)	15,73 (9,91-21,56)	1,49 (1,22-1,75)	8,12 (6,97-9,27)	7,134 (5,18-9,08)	147,0 (16,25-277,8)
$v_{max}^{**}$	16,20 (14,69-17,71)	4,68 (3,74-5,63)	8,60 (8,10-9,09)	4,07 (3,90-4,25)	47,53 (41,44-53,62)	135,3 (39,85-230,7)
$K_{si}$	83,63 (51,42-115,8)		32,89 (28,33-37,46)			

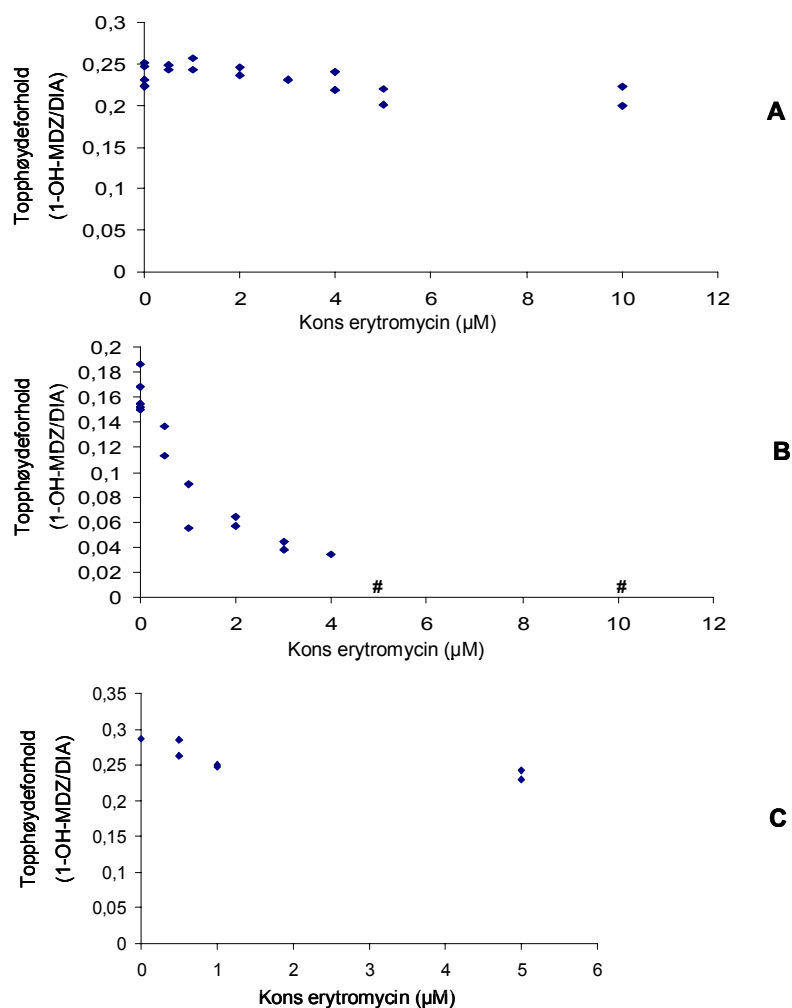
\*  $\mu\text{M}$

\*\* pmol/pmol CYP/min



### ***Hemming av midazolam-metabolisme ved tilsetning av erytromycin***

Pilotforsøkene med hemming av midazolammetabolisme ved tilsetning av varierende konsentrasjon av erytromycin til en fast konsentrasjon av midazolam viser at det er stor forskjell i hemmingsgrad i de ulike CYP3A-mikrosompreparatene (figur 15). Ved tilsetning av erytromycin i konsentrasjonene 0-15  $\mu\text{M}$  for insektmikrosomene og 0-5  $\mu\text{M}$  for THLE-3A4-mikrosomene observeres det kun hemming for inkubasjonen med insekt-CYP3A4-mikrosomer.



**Figur 15:** Hemmingskurver for tilsetning av varierende konsentrasjon erytromycin til 15  $\mu\text{M}$  midazolam i CYP3A5-insektmikrosom (A), CYP3A4-insektmikrosom(# ikke høy nok målt metabolittdannelse) (B) og CYP3A4-THLE-mikrosomer (C).

## 4 DISKUSJON

### 4.1 Metodologiske betraktninger

#### 4.1.1 LC/MS-analyse

Ved metabolisme av midazolam via CYP3A dannes 2 metabolitter med samme masse, henholdsvis 1-OH-MDZ og 4-OH-MDZ (figur 3). For kvantitativ bestemmelse av disse metabolittene ved MS som detektor var det derfor viktig at disse ble separert kromatografisk. Dette ble oppnådd ved hjelp av gradienteluering. Maursyre ble benyttet som bufferkomponent etter innledende forsøk med eddiksyrebuffer. Sistnevnte buffer ga imidlertid opphav til forurensningstopper som følge av reaksjon med plastslangene, et moment det er viktig å være klar over ved utvikling av nye LC/MS- metoder.

Linearitet, presisjon og nøyaktighet er sentrale parametere i validering av en analysemetode. Standardkurvene viste høy grad av linearitet i hele konsentrasjonsområdet (figur 10), og det ble funnet lave og tilfredsstillende verdier både for nøyaktighet og presisjon (tabell 2). Interdag-presisjon lå noe høyere enn intradag-presisjon med verdier henholdsvis mellom 1,4-7,4 % og 9,9-19,6 %. Nøyaktigheten var god med høyeste verdi 13,7 % avvik ved laveste konsentrasjon ved interdag-nøyaktighet.

Et poeng i forhold til valideringen var at mange av metabolittmålingene i metabolismeforsøkene lå under den laveste validerte konsentrasjonen. Ettersom LOQ ligger rundt 0,075 µM for 1-OH-MDZ bør det i det videre arbeidet forsøkes å øke intensiteten til de registrerte toppene ved for eksempel å øke injeksjonsvolumet til 40 µl, slik at LOQ kan bli lavere.

#### 4.1.2 Proteinmåling av CYP3A

Elektroforese med Western blott betegnes generelt som en semi-kvantitativ metode. Ved å benytte denne metoden ble CYP3A4-nivå i THLE-3A4-mikrosomer målt til å være 1,11 pmol CYP3A4/mg protein (tabell 3). For THLE-3A5-mikrosomene var uttrykket av CYP3A5 bare 0,041 pmol CYP3A5/mg protein (tabell 4) og dette lave uttrykket var grunnen til at disse mikrosomene ikke ble benyttet i metabolismeforsøk. Årsaken til den store forskjellen i CYP3A-uttrykk hos de to ulike THLE-cellelinjene (utviklet av Nestle, Sveits) er trolig mislykket transfeksjon av CYP3A5. For å kunne arbeide videre med mikrosomer fra disse cellene bør ny transfeksjon av CYP3A5 gjøres.

To studier har kartlagt CYP3A5-innhold i HLM og dets relative bidrag til totalt hepatisk CYP3A-uttrykk [32, 51]. I den ene studien konkluderer Westlind-Johnsson et al. med at innholdet av CYP3A5 i HLM fra svenske personer er lavt i forhold til CYP3A4, selv hos bærere av CYP3A5\*1 (16 % CYP3A5 av totalt CYP3A; 31,3 pmol 3A5/mg protein og 187,1 pmol 3A/mg protein) [32]. I den andre studien av Lin et al. basert på HLM fra amerikanske borgere, var imidlertid bidraget av CYP3A5 til total CYP3A hos personer med minst en CYP3A5\*1 allel 75 % (180,8 pmol 3A5/mg protein og 238,8 pmol 3A/mg protein) [51]. Årsaken til forskjellene mellom disse studiene er ikke åpenbar, men ulik etnisitet er en mulig forklaring.

Kvantifisering av CYP3A4 og CYP3A5 i denne oppgaven viste lave verdier i HLM sammenlignet med studiene omtalt over. Årsaken til dette er usikker og må utredes. Allikevel, dersom man ser på det relative bidraget fra CYP3A5 til total CYP3A-aktivitet, viser tallene at CYP3A5 bidrar til 44 % av total CYP3A i HLM-prøvene (0,41 pmol 3A5/mg protein og 0,52 pmol 3A4/mg protein), noe som er i tråd med resultatene til Lin et al. [51].

I arbeidet med å finne enzyminnholdet i THLE-3A4- og THLE-3A5-mikrosomer ble flere blott eksponert på film for å bestemme riktig fortynning av standarder. En viktig faktor i denne sammenhengen er eksponeringsstyrken. Ulike blott med samme konsentrasjon av insektmikrosomer ga opphav til forskjellig intensitet etter eksponering (figur 11). Å finne riktig konsentrasjon av standardene var derfor vanskelig, og enkelte av filmene ble overeksponert ved fremkalling (figur 11B). På tross av overeksponering og ulike konsentrasjonsrekker viste samtlige standardkurver dannet fra insekt-mikrosomer god linear sammenheng (figur 12). For å oppnå best mulig resultat bør imidlertid metoden arbeides videre med og optimaliseres med hensyn på eksponeringstid og konsentrasjoner.

## 4.2 Metabolismestudier

Midazolam metaboliseres til 1-OH-MDZ og 4-OH-MDZ via CYP3A-enzymet (pkt. 1.4). I tråd med tidligere in vitro-studier ble det dannet små mengder av 4-OH-MDZ sammenlignet med 1-OH-MDZ i metabolismeforsøkene. På grunn av usikkerhet i de enzymkinetiske estimeringene basert på 4-OH-MDZ vil den videre diskusjonen fokusere på hovedmetabolitten 1-OH-MDZ.

Midazolam er en anerkjent CYP3A-modellsubstans og mange studier har benyttet denne i sine metabolismestudier. Ulikt valg av substrat- og enzymkonsentrasjon, mikrosompreparater, inkuberingstid, inkubasjonsbetingelser (buffer, Mg-konsentrasjon, NADPH-mengde mm.) og modell for estimering av enzymkinetiske parametre gjør det vanskelig å sammenligne resultater fra de forskjellige forsøkene [19, 31, 34, 51, 54-56].

Dannelseshastigheten av metabolitten 1-OH-MDZ som funksjon av substratkonsentrasjon utført i pkt 2.7.3 fulgte åpenbart ikke Michaelis-Menten kinetikk ved inkubasjon sammen med insekt-3A4-mikrosomer og insekt-3A5-mikrosomer (figur 14). I konsentrasjonsområdet 1-50  $\mu\text{M}$  fulgte dannelsen av metabolitten 1-OH-MDZ en konveks kurve som følge av substrathemming og signifikant høyere hemmingsgrad ble estimert ved inkubasjon i insekt-3A4- enn 3A5-mikrosomer (tabell 5). Atypisk kinetikk er beskrevet av bl.a. Galetin et al., hvor dannelsen av 1-OH-MDZ og 4-OH-MDZ i insekt-3A5-mikrosomer er påvirket av substrathemming og følger en konveks kurve [54].

De enzymkinetiske parameterne  $K_m$  og  $v_{max}$  ble estimert fra de dannede kurvene og  $K_m$  var henholdsvis 0,79  $\mu\text{M}$  via insekt-3A5-mikrosomer og 1,49  $\mu\text{M}$  via insekt-3A4-mikrosomer. Disse verdiene viser at midazolam har høyere affinitet til insekt-3A5-mikrosomer i forhold til insekt-3A4-mikrosomer og samsvarer med  $K_m$ -verdiene estimert av Yamaori et al. [56]. De estimerte  $v_{max}$ -verdiene viste, i likhet med de fleste andre studier, signifikant høyere metabolismekapasitet for insekt-3A5-enzym enn insekt-3A4-enzym, henholdsvis 16,2 pmol 1-OH-MDZ/pmol 3A5/min og 8,6 pmol 1-OH-MDZ/pmol 3A4/min [31, 34, 55, 56].

Noe overraskende viste metabolismeforsøkene i pkt. 2.7.3 utført med THLE-3A4-mikrosomer og insekt-3A4-mikrosomer å gi ulikt forløp av metabolittdannelsen. Som tidligere omtalt viste dose-respons kurvene for midazolam i insekt-3A4-mikrosomene fenomenet substrathemming (for 1-OH-MDZ). Dette var imidlertid ikke tilfellet ved inkubering av midazolam sammen med THLE-3A4-mikrosomer. Samtidig ble det observert en betraktelig høyere  $K_m$ -verdi (7,13  $\mu\text{M}$ ) i THLE-mikrosomene i forhold til insekt-mikrosomene (1,49  $\mu\text{M}$ ). Pilotforsøk

med tilsetning av hemmeren erytromycin bekreftet også forskjellen i affinitet hos de to ulike mikrosom-preparatene, hvor gradvis redusert metabolittdannelse ble vist i forsøk med insekt-3A4-mikrosomer, men ikke med THLE-3A4-mikrosomer. Imidlertid var  $v_{\max}$  5 ganger så høy i THLE-3A4 enn i insekt-3A4, henholdsvis 47,53 pmol/pmol 3A4/min og 8,6 pmol/pmol 3A4/min, noe som faktisk innebærer at metabolismekapasiteten overfor midazolam totalt sett var relativt lik i de to 3A4-mikrosompreparatene.

Disse ulike observasjonene av  $K_m$  og  $v_{\max}$  indikerer ulik konformasjon av CYP3A4-enzymet i de to mikrosompreparatene. Dersom dette stemmer, betyr det at de estimerte enzymatiske parametere av samme metabolismereaksjon vil variere som følge av hvilken in vitro-modell som benyttes. Ettersom parametrene  $K_m$  og  $v_{\max}$  benyttes til blant annet estimering av interaksjonsgrad in vivo, er det følgelig grunn til å stille spørsmålstegn ved gyldigheten av de ekstrapoleringer som gjøres basert på in vitro-forsøk. Dette illustrerer at in vitro-in vivo ekstrapoleringer av metabolismedata kan være enda mer komplekst enn det man hittil har trodd.

Flere metabolismestudier må til for å bekrefte funnene i denne oppgaven. Den videre forskningen bør ha hovedfokus på sammenlignbare inkubasjonsbetingelser i de ulike modellene, d.v.s. tilsvarende antall konsentrasjoner av MDZ, enzymmengder og ko-faktorer. For å tilnærme dataene fra in vitro-forsøkene til ulike matematiske modeller, er antall punkter på dose-respons kurven av stor betydning og flere ulike konsentrasjoner enn det som ble benyttet i denne oppgaven er å foretrekke. Samtidig bør også andre CYP3A-substrater testes ut for å se om enzymkinetikken også her er modellavhengig.

## 5 OPPSUMMERING OG KONKLUSJON

En LC/MS-metode for bestemmelse av hydroksylerte midazolam metabolitter ble utviklet. Metoden viste høy grad av linearitet for alle analyttene, og verdiene for nøyaktighet og presisjon var tilfredstillende i hht. gjeldende krav for bioanalyser.

Metoden ble brukt til å sammenligne metabolisme av midazolam in vitro via 3 ulike mikrosompreparater, insekt-3A5, insekt-3A4 og THLE-3A4. Enzymkinetiske parametere ble beregnet for metabolittene 1-OH-MDZ og 4-OH-MDZ, og viste store forskjeller i metabolisme i de ulike modellensystemene. For både insekt-3A4- og insekt-3A5-mikrosomer viste dose-respons forløpet for dannelsen av hovedmetabolitten 1-OH-MDZ fenomenet substrat-hemming i motsetning til THLE-3A4-mikrosomer. Videre ble en signifikant lavere  $K_m$ -verdi for metabolisme via insekt-3A4-mikrosomer estimert sammenlignet med THLE-3A4-mikrosomer, mens forholdet mellom de estimerte  $v_{max}$ -verdiene var motsatt. Dette viser at enzymatiske parametere av samme metabolismereaksjon via CYP3A4 kan variere som følge av hvilken in vitro-modell som benyttes.

## 6 REFERANSER

1. Kirchheiner, J., et al., *Pharmacokinetics of codeine and its metabolite morphine in ultra-rapid metabolizers due to CYP2D6 duplication*. Pharmacogenomics J, 2006.
2. Lewis, D.F.V., *57 varieties: the human cytochromes P450*. Pharmacogenomics, 2004. **5**(3): p. 305-318.
3. Nebert, D.W.A., M. Coon, M.J. Estabrook, R.W. Gonzalez, F.J. Guengerich, F.P., *The CYP450 superfamily: recommended nomenclature*. DNA, 1987(6): p. 1-11.
4. Lin, J.H. and A.Y.H. Lu, *Interindividual variability in inhibition and induction of cytochrome P450 enzymes*. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 2001. **41**(1): p. 535-567.
5. Rang, H.P., et al., *Pharmacology*. 2003.
6. Benet, L.Ø., S. Schwartz, J, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. (9 th edition).
7. Franklin, M., *Cytochrome P450 metabolic intermediate complexes from macrolide antibiotics and related compounds*. Methods in enzymology, 1991. **206**: p. 559-73.
8. Paine, M.F., A.B. Criss, and P.B. Watkins, *Two major grapefruit juice components differ in intestinal CYP3A4 inhibition kinetic and binding properties*. Drug Metab Dispos, 2004. **32**(10): p. 1146-1153.
9. Sorokin, A.V., et al., *Rhabdomyolysis Associated With Pomegranate Juice Consumption*. The American Journal of Cardiology, 2006. **98**(5): p. 705-706.
10. Marcus, M., *Drug Interactions with St John's Wort: Mechanisms and Clinical Implications*. Drug Safety, 2004. **27**(11): p. 773-797.
11. Tanaka, E., *Clinically significant pharmacokinetic drug interactions between antiepileptic drugs*. Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics, 1999. **24**(2): p. 87-92.
12. Toshihiro, K., et al., *Effect of side-stream cigarette smoke on the hepatic cytochrome P450*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 1993. **V25**(2): p. 255-259.
13. Oliver, B. and W. Leszek, *Cytochrome P450 3A and their regulation*. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 2004. **V369**(1): p. 105-124.
14. Guengerich, F.P., *CYTOCHROME P-450 3A4: Regulation and Role in Drug Metabolism*. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 1999. **39**(1): p. 1-17.
15. Zhou, S.S., et al., *Mechanism-based inhibition of cytochrome P450 3A4 by therapeutic drugs*. Clinical pharmacokinetics, 2005. **44**(3): p. 279-304.
16. Lacroix, D., et al., *Expression of CYP3A in the Human Liver; Evidence that the Shift between CYP3A7 and CYP3A4 Occurs Immediately After Birth*. European Journal of Biochemistry, 1997. **247**(2): p. 625-634.
17. Shimada, T., et al., *Characterization of microsomal cytochrome P450 enzymes involved in the oxidation of xenobiotic chemicals in human fetal liver and adult lungs*. Drug Metab Dispos, 1996. **24**(5): p. 515-522.
18. Daly, A.K., *Significance of the minor cytochrome P450 3A isoforms*. Clinical pharmacokinetics, 2006. **45**(1): p. 13-31.
19. Williams, J.A., et al., *Comparative Metabolic Capabilities of CYP3A4, CYP3A5, and CYP3A7*. Drug Metab Dispos, 2002. **30**(8): p. 883-891.

20. 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. 414-423.
21. Jatinder K. Lambaa, Y.S.L., Erin G. Schuetza and Kenneth E. Thummel, *Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism* Advanced drug delivery reviews, 2002. **54**(10): p. 1271.
22. McKinnon, R.A., *Cytochrome P450, multiplicity and function*. Aust J Host Pharm, 2000. **30**: p. 54-56.
23. 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. 557-566.
24. 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. 549-556.
25. Scott, E.E. and J.R. Halpert, *Structures of cytochrome P450 3A4*. Trends in Biochemical Sciences, 2005. **30**(1): p. 5-7.
26. Yano, J.K., et al., *The Structure of Human Microsomal Cytochrome P450 3A4 Determined by X-ray Crystallography to 2.05-A Resolution*. J. Biol. Chem., 2004. **279**(37): p. 38091-38094.
27. Williams, P.A., et al., *Crystal Structures of Human Cytochrome P450 3A4 Bound to Metyrapone and Progesterone*. Science, 2004. **305**(5684): p. 683-686.
28. Wrighton, S.A., et al., *Studies on the expression and metabolic capabilities of human liver cytochrome P450III<sub>A5</sub> (HLp3)*. Mol Pharmacol, 1990. **38**(2): p. 207-213.
29. Xie, H.-G., et al., *Genetic variability in CYP3A5 and its possible consequences*. Pharmacogenomics, 2004. **5**(3): p. 243-272.
30. Zhang, X., et al., *Influence of CYP3A5 and MDR1 polymorphisms on tacrolimus concentration in the early stage after renal transplantation*. Clinical Transplantation, 2005. **19**(5): p. 638-643.
31. Huang, W.W., et al., *Evidence of significant contribution from CYP3A5 to hepatic drug metabolism*. Drug metabolism and disposition, 2004. **32**(12): p. 1434-45.
32. Westlind-Johnsson, A.A., et al., *Comparative analysis of CYP3A expression in human liver suggests only a minor role for CYP3A5 in drug metabolism*. Drug metabolism and disposition, 2003. **31**(6): p. 755-61.
33. Ekins, S., D.M. Stresser, and J. Andrew Williams, *In vitro and pharmacophore insights into CYP3A enzymes*. Trends in Pharmacological Sciences, 2003. **24**(4): p. 161-166.
34. Patki, K.C., L.L. Von Moltke, and D.J.D.J. Greenblatt, *In vitro metabolism of midazolam, triazolam, nifedipine, and testosterone by human liver microsomes and recombinant cytochromes p450: role of cyp3a4 and cyp3a5*. Drug metabolism and disposition, 2003. **31**(7): p. 938-44.
35. Dennison, J.B., et al., *Selective metabolism of vincristine in vitro by CYP3A5*. Drug Metab Dispos, 2006. **34**(8): p. 1317-1327.
36. *Legemiddelhåndboken*. 2006.
37. Brunton L.L., L.J.S., Parker K.L, *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 2006(11 th edition).
38. *European Pharmacopoeia* (5.05): p. 3979-3981.



39. Yuan, R., D.A. Flockhart, and J.D. Balian, *Pharmacokinetic and pharmacodynamic consequences of metabolism-based drug interactions with alprazolam, midazolam, and triazolam*. J Clin Pharmacol, 1999. **39**(11): p. 1109-1125.
40. Chung, E.E., et al., *Comparison of midazolam and simvastatin as cytochrome P450 3A probes*. Clinical pharmacology and therapeutics, 2006. **79**(4): p. 350-61.
41. Andersin, R.R., *Solubility and acid-base behaviour of midazolam in media of different pH, studied by ultraviolet spectrophotometry with multicomponent software*. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 1991. **9**(6): p. 451-5.
42. Donato, M.M.T., *Strategies and Molecular Probes to Investigate the Role of Cytochrome P450 in Drug Metabolism: Focus On <I>In Vitro</I> Studies*. Clinical pharmacokinetics, 2003. **42**(2): p. 153.
43. Ekins, S., et al., *Present and future in vitro approaches for drug metabolism*. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 2000. **44**(1): p. 313-324.
44. Pfeifer, A.M.A., et al., *Simian Virus 40 Large Tumor Antigen-Immortalized Normal Human Liver Epithelial Cells Express Hepatocyte Characteristics and Metabolize Chemical Carcinogens*. PNAS, 1993. **90**(11): p. 5123-5127.
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. 1291-1297.
46. Molden, E., A. Asberg, and H. Christensen, *Desacetyl-Diltiazem Displays Several-fold Higher Affinity to CYP2D6 Compared with CYP3A4*. Drug Metab Dispos, 2002. **30**(1): p. 1-3.
47. Molden, E., A. Åsberg, and H. Christensen, *CYP2D6 is involved in O-demethylation of diltiazem*. European Journal of Clinical Pharmacology, 2000. **V56**(8): p. 575-579.
48. Hermann, M.K., E. Molden, E. Christensen, H., *Evaluation of Microsomal Incubation Conditions on CYP3A4-Mediated Metabolism of Cyclosporine A by a Statistical Experimental Design*. Current Drug Metabolism, 2006. **7**: p. 265-271.
49. Kase, E., *Metodeutvikling for isolering av mikrosomer fra THLE celler. Bestemmelse av enzymkinetiske parametere for dannelsen av cyklosporin A metabolittene AM1 og AM9*. Hovedfagsoppgave, 2002.
50. 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. 246-254.
51. Lin, Y.S., et al., *Co-regulation of CYP3A4 and CYP3A5 and contribution to hepatic and intestinal midazolam metabolism*. Molecular pharmacology, 2002. **62**(1): p. 162-72.
52. U.S. Department of Health and Human Services, F.a.D.A., Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM), *Bioanalytical Method Validation*. 2001.
53. Bradford, M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical biochemistry, 1976. **72**: p. 248-254.
54. Galetin, A.A., et al., *Utility of recombinant enzyme kinetics in prediction of human clearance: impact of variability, CYP3A5, and CYP2C19 on CYP3A4 probe substrates*. Drug metabolism and disposition, 2004. **32**(12): p. 1411-20.

55. M. G. Soars, K.G., R. J. Riley *Comparative analysis of substrate and inhibitor interactions with CYP3A4 and CYP3A5*. Xenobiotica, 2006. **36**(4): p. 287-99.
56. Yamaori, S.S., et al., *Effects of cytochrome b(5) on drug oxidation activities of human cytochrome P450 (CYP) 3As: similarity of CYP3A5 with CYP3A4 but not CYP3A7*. Biochemical pharmacology, 2003. **66**(12): p. 2333-40.