

Hovedfagsoppgave i farmakologi for graden *candidata pharmaciae*

**Metabolisme av quetiapin via  
CYP3A4 og CYP3A5 *in vitro***



Gry Vibeke Bakken

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap  
Farmasøytisk institutt  
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet  
Universitetet i Oslo

November 2007

Hovedfagsoppgave i farmakologi for graden *candidata pharmaciae*

# **Metabolisme av quetiapin via CYP3A4 og CYP3A5 *in vitro***



Gry Vibeke Bakken

Arbeidet ble utført ved avdeling for farmasøytisk biovitenskap,  
Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo og ved  
Psykofarmakologisk avdeling, Diakonhjemmet Sykehus  
i perioden fra november 2006 til november 2007

Veiledere

Professor Hege Christensen

Dr.scient. Monica Hermann

Dr.scient. Espen Molden

Stipendiat Ida Rudberg

## **FORORD**

Først og fremst vil jeg takke mine veiledere Hege Christensen, Monica Hermann, Espen Molden og Ida Rudberg for meget god veiledning under hele denne perioden. Dere har bidratt til et utrolig spennende og lærerikt hovedfagsår. En spesiell takk til Ida for all hjelp i forbindelse med labforsøk og under skriveprosessen.

Jeg vil også takke alle ved avdeling for farmasøytisk biovitenskap og psykofarmakologisk avdeling som har bidratt ved gjennomføringen av dette prosjektet.

Takk til Niclas Lunder ved psykofarmakologisk avdeling for hjelp med analyseinstrumentet.

Til slutt vil jeg takke Geir og Ragnhild for korrekturlesing av oppgaven.

Blindern, november 2007

Gry Vibeke Bakken

**INNHOLDSFORTEGNELSE**

<b>FORORD .....</b>	<b>3</b>
<b>FORKORTELSER .....</b>	<b>6</b>
<b>SAMMENDRAG.....</b>	<b>7</b>
<b>1 INNLEDNING.....</b>	<b>9</b>
1.1 LEGEMIDDELMETABOLISME OG INTERINDIVIDUELL VARIASJON I LEGEMIDDELRESPONS ..9	
1.2 CYTOKROM P450 (CYP) SYSTEMET .....	9
1.3 CYP3A .....	11
1.3.1 CYP3A4.....	12
1.3.2 CYP3A5.....	13
1.4 QUETIAPIN .....	13
1.5 ENZYMKINETIKK .....	15
1.6 <i>IN VITRO</i> STUDIER AV LEGEMIDDELMETABOLISME.....	18
1.7 HENSIKT .....	20
<b>2 MATERIALER OG METODER .....</b>	<b>21</b>
2.1 ANALYTTER, KJEMIKALIER, MIKROSOMER OG UTSTYR .....	21
2.2 LØSNINGER .....	23
2.3 GENERELL INKUBASJONSPROSEDYRE FOR MIKROSOMFORSØK.....	24
2.4 METABOLITTDANNELSE .....	25
2.4.1 Metabolisme av quetiapin som funksjon av tid .....	25
2.4.2 Metabolisme av quetiapin som funksjon av enzymkonsentrasjon.....	25
2.4.3 Metabolisme av quetiapin som funksjon av substratkonsentrasjon .....	26
2.5 LØSELIGHET AV QUETIAPIN.....	26
2.6 SUBSTRATTAP.....	27
2.7 ANALYSE AV QUETIAPIN OG METABOLITTER .....	28
2.7.1 Analysemetode .....	28
2.7.2 Validering .....	29
<b>3 RESULTATER .....</b>	<b>31</b>
3.1 METABOLITTDANNELSE .....	31
3.1.1 Metabolisme av quetiapin som funksjon av tid .....	31
3.1.2 Metabolisme av quetiapin som funksjon av enzymkonsentrasjon.....	33
3.1.3 Metabolisme av quetiapin som funksjon av substratkonsentrasjon .....	34
3.2 LØSELIGHET AV QUETIAPIN.....	37

3.2.1 Praktiske faktorer.....	37
3.2.2 Inkubasjonsfaktorer .....	38
3.2.3 Effekt av organisk løsemiddel på metabolisme av quetiapin.....	39
3.2.4 Oppsummering løselighetsproblem .....	41
3.3 SUBSTRATTAP.....	41
3.3.1 Betydning av CYP3A5 for <i>in vitro</i> metabolisme av quetiapin .....	43
3.3.2 Betydning av cytokrom b <sub>5</sub> for <i>in vitro</i> metabolisme av quetiapin .....	45
3.4 VALIDERING .....	46
<b>4 DISKUSJON.....</b>	<b>48</b>
<b>5 KONKLUSJON.....</b>	<b>55</b>
<b>REFERANSER .....</b>	<b>56</b>

**FORKORTELSER**

AUC	Areal under plasmakonsentrasjonskurven
b <sub>5</sub>	Cytokrom b <sub>5</sub>
CL <sub>int</sub>	Intrinsic clearance
CYP	Cytokrom P450
DMSO	Dimetylsulfoksid
EDTA	Etylendiamintetraeddiksyre
FDA	Food and Drug Administration
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Svovelsyre
Hepes	4-(2-hydroksyetyl)-1-piperazinetsulfonsyre
HLM	Humane levermikrosomer
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenfosfat
K <sub>m</sub>	Michaelis-Menten konstanten, substratkonsentrasjon som gir halvparten av V <sub>max</sub>
LC-MS/MS	Væskekromatografi-massespektrometri/massespektrometri
LOQ	Kvantifiseringsgrense
MeOH	Metanol
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
NADPH	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (reduert form)
QC-prøver	Kvalitetskontrollprøver
RSD	Relativt standardavvik
S <sub>50</sub>	Substratkonsentrasjon som gir halvparten av V <sub>max</sub>
SD	Standardavvik
Tris	Tris(hydroksymetyl)aminometan
V <sub>d</sub>	Distribusjonsvolum
V <sub>max</sub>	Maksimal reaksjonshastighet for et enzym

## SAMMENDRAG

Quetiapin er et atypisk antipsykotikum som har vist betydelig interindividuell variasjon i serumkonsentrasjon etter inntak av samme dose legemiddel. Quetiapin metaboliseres hovedsakelig via CYP3A4, men i hvilken grad det polymorfe enzymet CYP3A5 bidrar til metabolisme av quetiapin er lite studert. Hensikten med oppgaven var å sammenlikne metabolisme av quetiapin via CYP3A4 og CYP3A5 *in vitro*. Tilstedeværelse av cytokrom b<sub>5</sub> i *in vitro* modellsystemer har vist å påvirke metabolisme av en rekke ulike substrater og betydningen av cytokrom b<sub>5</sub> for metabolisme av quetiapin ble derfor også studert.

Metabolisme av quetiapin ble undersøkt med CYP3A4- og CYP3A5-insektmikrosomer med og uten transfektert cytokrom b<sub>5</sub>. Dannelse av metabolittene quetiapinsulfoksid, N-dealkylquetiapin, O-dealkylquetiapin og 7-OH-quetiapin via CYP3A4 og CYP3A5 ble studert ved ulike quetiapinkonsentrasjoner ved metabolittdannelsesmetoden. Ved substrattapmetoden ble forbruk av quetiapin via CYP3A4 og CYP3A5 med og uten cytokrom b<sub>5</sub> studert i tidsintervallet fra 0-60 minutter. I tillegg ble metabolittmønsteret via CYP3A4 og CYP3A5 med og uten cytokrom b<sub>5</sub> undersøkt etter 60 minutters inkubasjon.

Forsøk med substrattapmetoden viste at  $CL_{int}$  for CYP3A5 var minst 30 % sammenliknet med  $CL_{int}$  for CYP3A4. Tilstedeværelse av cytokrom b<sub>5</sub> i modellsystemet ga liten forskjell i  $CL_{int}$  for CYP3A4, mens for CYP3A5 var  $CL_{int}$  høyere i modellsystemet med cytokrom b<sub>5</sub>. Det ble observert ulikt metabolittmønster via CYP3A4 og CYP3A5, og tilstedeværelse av cytokrom b<sub>5</sub> i modellsystemene påvirket dette. Forsøkene med metabolittdannelsesmetoden ga estimerte  $K_m/S_{50}$ -verdier for quetiapinsulfoksid som var betydelig høyere via CYP3A5 i forhold til via CYP3A4. For O-dealkylquetiapin var  $K_m/S_{50}$  vesentlig lavere via CYP3A5 sammenliknet med CYP3A4. Studier med substrattap viste at det ble dannet mer N-dealkylquetiapin og quetiapinsulfoksid via CYP3A4 i forhold til via CYP3A5. Det motsatte var tilfelle for O-dealkylquetiapin, hvor det ble dannet betydelig mer via CYP3A5 sammenliknet med CYP3A4.

Studien tyder på at CYP3A5 er av betydning for metabolisme av quetiapin *in vitro*. CYP3A5-polymorfisme kan derfor en faktor som bidrar til de store interindividuelle variasjonene i serumkonsentrasjon av quetiapin som er observert. Forsøkene gir indikasjon på at metabolittmønsteret for quetiapin er forskjellig ved metabolisme via CYP3A4 sammenliknet med CYP3A5. Dette kan medføre forskjeller i effekt og/eller bivirkninger av legemidlet avhengig av om pasientene uttrykker CYP3A5 eller ikke. Tilstedeværelse av cytokrom b<sub>5</sub> i modellsystemet påvirket metabolisme av quetiapin, og kan derfor være av betydning ved *in vitro* metabolismestudier av quetiapin. Kliniske studier er nødvendig for å fastslå og kvantifisere bidraget fra CYP3A5 til metabolisme av quetiapin *in vivo*.



## **1 INNLEDNING**

### **1.1 Legemiddelmetabolisme og interindividuell variasjon i legemiddelrespons**

Mange legemidler og andre xenobiotika er fettløselige, og via metabolisme dannes mer vannløselige metabolitter som lettere elimineres fra kroppen. De fleste legemidler skilles ut gjennom nyrene, enten uforandret eller som metabolitter. For noen legemidler er galle og lunger også involvert i eliminasjonen. Metabolisme medfører vanligvis at biologisk og farmakologisk aktivitet opphører. I noen tilfeller kan det imidlertid dannes metabolitter med potent biologisk aktivitet eller toksiske egenskaper [1]. To hovedtyper biokjemiske reaksjoner er involvert i legemiddelmetabolisme. Fase I reaksjoner introduserer et reaktivt senter i molekylet ved oksidasjon, reduksjon eller hydrolyse. Dette senteret kan konjugeres videre med endogene forbindelser som glukuronsyre, sulfat eller glutation i fase II reaksjoner.

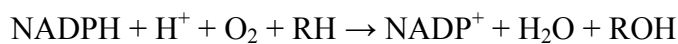
Stor variasjon i legemiddelrespons mellom ulike individer ved inntak av samme dose legemiddel er et velkjent klinisk problem. Dette innebærer store forskjeller i effekt og bivirkninger ved standarddosering av legemidler. Variasjonen kan både skyldes forskjell i farmakokinetikk (absorpsjon, distribusjon, metabolisme og eliminasjon) og farmakodynamikk (reseptorinteraksjon og reseptorrespons) [2]. Både genetikk, miljø og fysiologi bidrar til dette. Forskjeller i legemiddelmetabolisme er ofte årsak til variasjon i terapeutisk respons på legemidler [3].

### **1.2 Cytokrom P450 (CYP) systemet**

Cytokrom P450 (CYP) systemet er et sentralt enzymesystem involvert i fase I metabolisme av legemidler og andre xenobiotika. Enzymsystemet er også viktig for metabolisme av mange endogene forbindelser, blant annet steroider, fettsyrer, prostaglandiner, gallesyrer og retinoider [4]. Navnet refererer til enzymenes karakteristiske absorpsjonsmaksimum på 450 nm når de er redusert og bundet til karbonmonoksid [5]. CYP-enzymene er lokalisert i membraner i glatt endoplasmatiske retikulum. Enzymene finnes hovedsakelig i leveren, men også i magetarmsystemet, samt i lavere mengder i lungene, nyrene og hjernen [6].

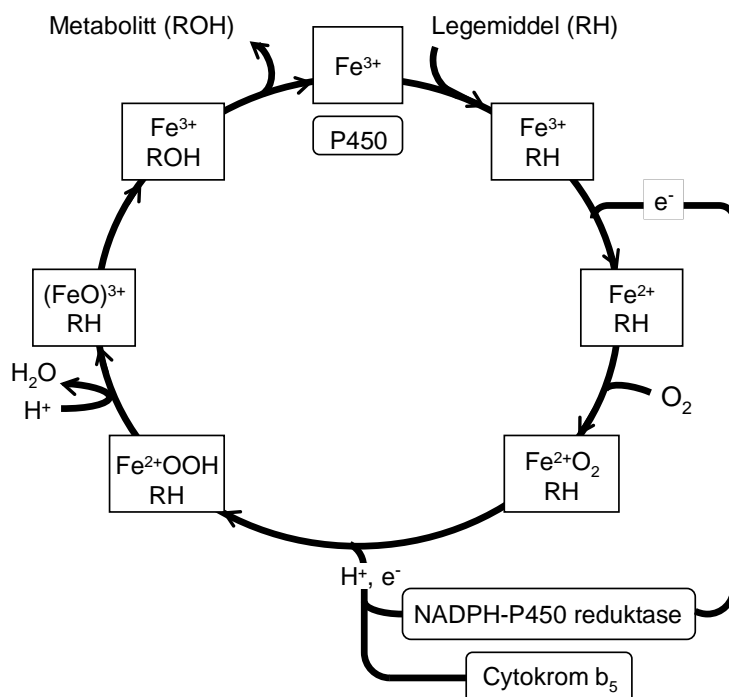
Det er i dag beskrevet 57 antatt funksjonelle *CYP*-gener hos mennesker som hver koder for et enzym [7]. Enzymene klassifiseres i familier og subfamilier etter en systematisk nomenklatur basert på likheter i aminosyresekvens. Enzymer med mer enn 40 % likhet blir plassert i samme familie og angis med et arabisk tall. Videre inndeling i subfamilier skjer ved mer enn 55 % likhet i aminosyresekvens og dette angis med en stor bokstav. Et arabisk tall etter subfamilien angir tilslutt det enkelte isoenzymet. Det assosierte genet betegnes i kursiv [8]. Et eksempel er *CYP3A4* hvor tallet 3 viser til *CYP3*-familien, mens bokstaven A angir at enzymet tilhører subfamilien *CYP3A*. Tallet 4 angir det spesifikke isoenzymet innen denne subfamilien, mens genet som koder for enzymet oppgis som *CYP3A4*. *CYP*-enzymene som hovedsakelig er involvert i legemiddelmetabolisme hos mennesker tilhører familiene 1, 2 og 3, hvor isoenzymene *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6* og *CYP3A4* er blant de viktigste [9].

Legemiddelmetabolisme via cytokrom P450 systemet krever molekylært oksygen, redusert nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) og et flavoprotein (NADPH-P450 reduktase) [1]. Reaksjonsmekanismen involverer en kompleks syklus (figur 1). Forenklet kan oksidasjon av et legemiddel (RH) til en hydrokso-metabolitt (ROH) beskrives med følgende likning [10]:



Det har lenge vært kjent at cytokrom  $b_5$  øker metabolismen av mange substrater, men dette avhenger både av substrat og *CYP*-isoenzym. Cytokrom  $b_5$  øker hastigheten av cytokrom P450 reaksjoner ved ulike mekanismer involvert i elektronoverføring. På hvilken måte dette skjer er imidlertid omstridt [11,12].

Ulik aktivitet av *CYP*-enzymer er ofte en betydelig årsak til variasjon i farmakokinetikk og dermed variasjon i legemiddelrespons mellom ulike individer [13]. Enzymaktiviteten påvirkes både av genetikk og miljøfaktorer. For flere av *CYP*-enzymene er det vist genetisk polymorfisme. Genetisk polymorfisme defineres som nærvær av et variantgen med en hyppighet på over 1 % i den normale befolkningen [13]. *CYP2D6* er det best karakteriserte polymorfe isoenzymet innenfor cytokrom P450 systemet [3].



**Figur 1: Generell katalytisk syklus for cytokrom P450 reaksjoner.** Cytokrom P450 enzymet (P450) inneholder en hemgruppe ( $Fe^{3+}$ ) som binder et legemiddel (RH). Dette medfører en konformasjonsendring i enzymet som gjør jernet lettere å redusere. Reduksjon av jern til  $Fe^{2+}$  skjer ved overføring av et elektron fra NADPH via NADPH-P450 reduktase. Dannelse av et  $Fe^{2+} OOH$ -legemiddel kompleks skjer ved binding av molekylært oksygen, etterfulgt av overførsel av et proton og et nytt elektron. Overføring av dette elektronet skjer ofte også via NADPH-P450 reduktase, men kan enkelte ganger overføres fra cytokrom  $b_5$ . De neste trinnene involverer komplekse reaksjonsmekanismer, og resulterer i frigjøring av en oksidert metabolitt (ROH) og regenerering av cytokrom P450 enzymet [1].

### 1.3 CYP3A

CYP3A-subfamilien utgjør den største andelen av CYP-enzymet i lever (ca. 30 %) og tynntarm, og bidrar til metabolisme av 45 - 60 % av alle legemidler i klinisk bruk [14]. Dette gjør muligens CYP3A til den viktigste subfamilien involvert i legemiddelmetabolisme hos mennesker. I tillegg til legemidler metaboliserer CYP3A-isoenzymene en rekke andre forbindelser som for eksempel steroider, toksiner og karsinogener [14]. Hos mennesker består CYP3A-subfamilien av fire isoenzymer: CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 og CYP3A43 [15]. Både CYP3A7 og CYP3A43 er uttrykt i lever hos foster og voksne, men det antas at disse isoenzymene i liten grad er involvert i metabolisme av legemidler [16]. Innenfor CYP3A-subfamilien er trolig CYP3A4 og CYP3A5 derfor av størst betydning for legemiddelmetabolisme hos voksne.

CYP3A4 har særdeles vid substratspesifisitet, der kjente substrater varierer i størrelse fra veldig små molekyler, som for eksempel benzimidazoler, til ciklosporin A med molekylvekt over 1200 [9,17]. Enzymet katalyserer metabolismen av en rekke strukturelt forskjellige og klinisk viktige legemidler som for eksempel ulike antiarytmika, antimykotika, cytostatika, HIV-proteasehemmere, hormoner, immunosuppressiva, kalsiumantagonister, psykofarmaka og statiner [18]. CYP3A4 og CYP3A5 har delvis overlappende substratspesifisitet [15], og CYP3A5 kan derfor være involvert i metabolisme av mange av de samme legemidlene som metaboliseres via CYP3A4. Siden det kan være forskjell i substratspesifisiteten, er det forventet at bidrag av CYP3A5 til eliminasjon av CYP3A-substrater varierer avhengig av legemidlet [15]. Vanligvis har CYP3A5 lavere katalytisk aktivitet enn CYP3A4 [9], men *in vitro* studier har vist at enkelte substrater metaboliseres i størst grad via CYP3A5 [19]. I tillegg kan metabolittmønsteret være forskjellig for de to isoenzymene. Dette innebærer at det kan dannes ulike metabolitter og ulike relative mengder av metabolittene via de to isoenzymene [20]. Det er vist stor interindividuell variasjon i aktivitet og uttrykk av CYP3A4 og CYP3A5 [21], noe som kan føre til klinisk viktige forskjeller i legemiddeltoksisitet og effekt.

### 1.3.1 CYP3A4

Hos de fleste individer utgjør CYP3A4 hovedandelen av CYP3A-enzymet i lever og tynntarm [15]. Uttrykk av CYP3A4-protein i lever er vist å variere opptil 90 ganger mellom ulike individer [22]. Det hepatiske uttrykket av CYP3A4 er unimodalt fordelt, noe som tyder på en sterk innvirkning av miljøfaktorer eller bidrag av mangfoldige genetiske faktorer [23].

Til nå er det beskrevet 40 ulike *CYP3A4* alleler [24]. De fleste av disse variantene medfører begrensede endringer i enzymuttrykk eller katalytisk funksjon, og allelfrekvensen er lav [15]. Dette antyder at genetisk variasjon ikke er hovedårsaken til de store interindividuelle variasjonene i eliminasjon via CYP3A4. Variasjonen kan derfor skyldes andre forhold, for eksempel bruk av legemidler som hemmer eller induserer enzymet, eller andre faktorer som hormoner, ernæring og helsetilstand [15].

### 1.3.2 CYP3A5

I motsetning til CYP3A4 er CYP3A5 polymorft uttrykt [25]. Større mengder aktivt CYP3A5-enzym er bare uttrykt hos mennesker som har minst et villtype *CYP3A5\*1* allel. Det er beskrevet mange ulike *CYP3A5* alleler som medfører fravær av aktivt CYP3A5-enzym. Av disse er *CYP3A5\*3* det vanligste, og skyldes en enkel-nukleotid polymorfisme som forårsaker alternativ spleising og forkortning av CYP3A5-proteinet [20]. Uttrykk av CYP3A5 er vist å variere mellom ulike etniske grupper. Nyere studier har anslått at hepatisk CYP3A5 er tilstede hos 10 - 25 % av kaukasiere, 33 % av japanere og hos ca. 55 % av afroamerikanere [14].

Relativt bidrag av CYP3A5 til total CYP3A-innhold i lever varierer vesentlig i ulike studier. Det har blitt estimert at CYP3A5 kan representere minst 50 % av total hepatisk CYP3A hos individer som er bærere av villtypeallelet [20]. Andre studier antyder derimot at CYP3A5 utgjør en betydelig mindre andel [26]. De fleste studier indikerer imidlertid at CYP3A5 bidrar med minst 10 - 20 % av total CYP3A-innhold i lever som uttrykker dette isoenzymet. Et bidrag i denne størrelsesordenen forventes å kunne påvirke eliminasjonen av en rekke CYP3A-substrater [16]. CYP3A5-polymorfisme kan derfor være en viktig årsak til interindividuell variasjon av CYP3A aktivitet. Individer som uttrykker villtypeallelet kan ha høyere clearance og lavere biotilgjengelighet av CYP3A-substrater [20]. Dette medfører at pasienter med minst et *CYP3A5\*1* allel kan trenge høyere doser av legemidlet for å oppnå tilstrekkelig terapeutisk respons. Tacrolimus (immunosuppressivum) er et legemiddel der CYP3A5-genotype er vist å ha stor betydning for metabolismen. Flere studier har angitt at individer som uttrykker villtypeallelet trenger høyere doser av legemidlet for å oppnå terapeutisk serumkonsentrasjon [27-30]. Tilsvarende er også nylig vist for simvastatin, hvor pasienter med *CYP3A5\*1*-allelet hadde lavere areal under plasmakonsentrasjonskurven (AUC) og redusert lipidsenkende effekt [31,32].

### 1.4 Quetiapin

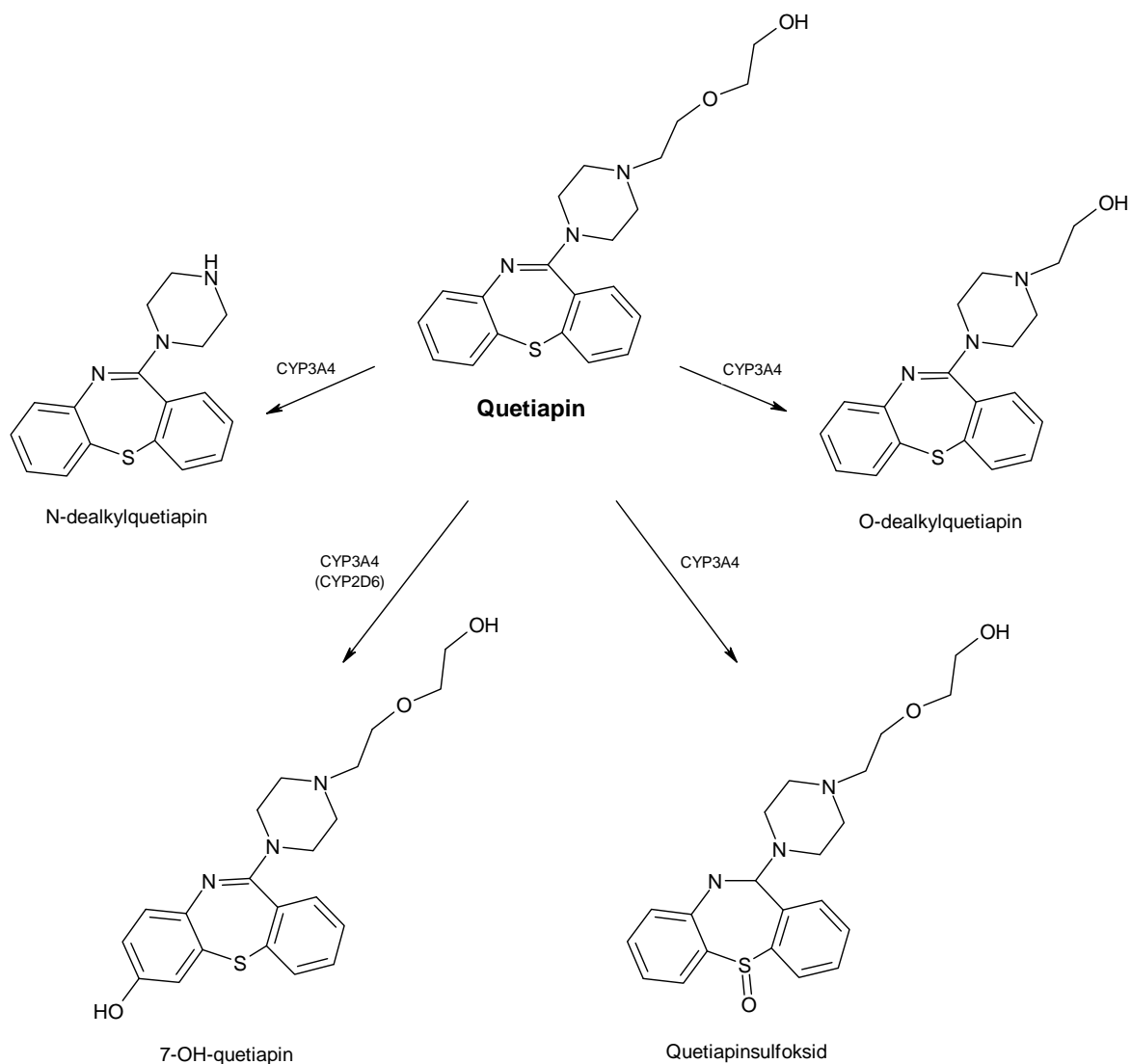
Quetiapin (Seroquel<sup>®</sup>), et dibenzothiazepinderivat, er et atypisk antipsykotikum som i Norge er godkjent til behandling av schizofreni og moderate til alvorlige maniske episoder. I USA har nylig U.S. Food and Drug Administration (FDA) også godkjent quetiapin for behandling av pasienter med depressive episoder assosiert med bipolar

lidelse. Legemidlet interagerer med et vidt spektrum av neurotransmittersystemer: dopamin D<sub>1</sub> og D<sub>2</sub>, serotonin 5-HT<sub>1A</sub> og 5-HT<sub>2</sub>, samt histaminerge, og  $\alpha_1$ - og  $\alpha_2$ -adrenerge reseptorer [33]. Legemidlet induserer ikke ekstrapyramidale bivirkninger og har lavt potensial for tardive dyskinesier. Det gir dessuten ingen vedvarende forhøyning av prolaktinnivå [34]. I tillegg viser quetiapin minimale kortidseffekter på kroppsvekt og har også en gunstig effekt på kroppsvekt på lengre sikt, noe som skiller quetiapin fra flere andre atypiske antipsykotika [35].

Quetiapin blir i stor grad metabolisert i leveren av cytokrom P450 enzymer. *In vitro* studier har vist at quetiapin hovedsakelig metaboliseres via CYP3A4. Dette er vist både ved hjelp av spesifikke hemmere i humane levermikrosomer (HLM) og individuelle rekombinante CYP-enzymmer [36,37]. Dette er også vist *in vivo* i interaksjonsstudier med ketokonazol (CYP3A4-hemmer) og karbamazepin (CYP3A4-induser). Administrasjon av ketokonazol medførte 6 ganger økning i AUC av quetiapin, mens samtidig administrasjon av karbamazepin ga en reduksjon i AUC av quetiapin på 87 % [37].

Quetiapin blir i vesentlig grad metabolisert ved sulfoksidering, og i mindre grad ved N- og O-dealkylering, samt 7-hydroksylering [38]. Figur 2 viser de viktigste metabolittene dannet *in vitro*. Til nå har det blitt identifisert 11 metabolitter *in vivo* [39]. Av disse metabolittene dannes det kvantitativt mest quetiapinsulfoksid, som imidlertid ikke har vist antipsykotisk aktivitet verken *in vitro* eller *in vivo* [33]. N-dealkylquetiapin er den viktigste aktive metabolitten. Det er nylig vist at både quetiapin og N-dealkylquetiapin også har antidepressiv effekt [40]. Studier indikerer at N-dealkylquetiapin har høy affinitet og er en potent hemmer av noradrenalin transportøren, og har partiell agonist aktivitet til serotonin 5-HT<sub>1A</sub> reseptoren [40,41]. Dette kan være med på å forklare den antidepressive effekten.

I tillegg til CYP3A4, er CYP2D6 involvert i 7-hydroksyleringen av quetiapin [42]. Siden 7-OH-quetiapin bare utgjør en liten andel av metabolitter i plasma, er det antatt at den velkjente genetiske polymorfismen av CYP2D6 har liten betydning for metabolisme av quetiapin [33]. I hvilken grad CYP3A5 bidrar til metabolisme av quetiapin er lite kjent. Legemidlet har vist meget store forskjeller i serumkonsentrasjon etter inntak av samme legemiddeldose hos ulike pasienter (upubliserte data,



**Figur 2: Metabolisme av quetiapin in vitro.** De viktigste metabolitter dannet ved metabolisme av quetiapin in vitro.

Psykofarmakologisk avdeling, Diakonhjemmet Sykehus), og CYP3A5-polymorfisme kan være en faktor som bidrar til dette.

## 1.5 Enzymkinetikk

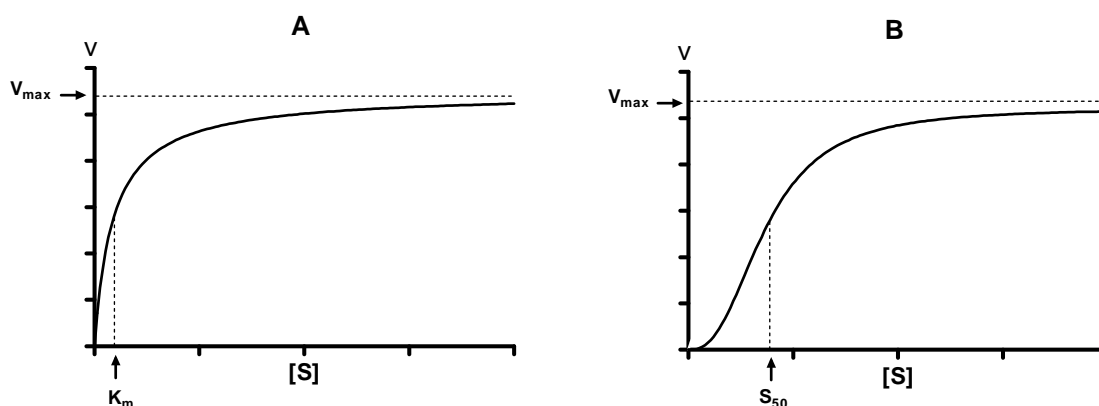
Enzymkinetikk er en kvantitativ hastighetsbeskrivelse av enzymkatalyserte reaksjoner. Ulike enzymkinetiske modeller benyttes for å estimere enzymkinetiske parametere som beskriver enzymaffinitet og katalytisk kapasitet. Metabolismen av mange legemidler følger en enkel enzymkinetisk modell som illustrert ved følgende formel:



I følge denne modellen bindes et substrat (S) reversibelt til et enzym (E) og danner et enzym-substrat-kompleks (ES). ES brytes ned til et produkt (P) og E regenereres. Michaelis-Menten likningen (likning 1) beskriver hastigheten ( $v$ ) av en enzymatisk reaksjon og karakteriseres av en hyperbol kurve for hastighet som funksjon av substratkonsentrasjon  $[S]$  (figur 3 A).

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

Ved lave substratkonsentrasjoner øker hastigheten av produktdannelsen raskt. Ved høyere substratkonsentrasjoner blir enzymene etter hvert mettet og reaksjonen når en maksimal hastighet,  $V_{\max}$ , som er et uttrykk for antall enzymer tilstede.  $K_m$  (Michaelis-Menten konstanten) er substratkonsentrasjonen som gir halvparten av den maksimale reaksjonshastigheten.  $K_m$ -verdien beskriver enzymets affinitet for et substrat.



**Figur 3: Enzymkinetiske modeller.** Klassisk Michaelis-Menten kinetikk (A) og atypisk sigmoidal kinetikk (B).  $V_{\max}$  er den maksimale reaksjonshastigheten for enzymet,  $K_m$  og  $S_{50}$  er substratkonsentrasjonen  $[S]$  som gir halvparten av den maksimale reaksjonshastigheten.

Bruk av Michaelis-Menten modellen forutsetter at interaksjoner mellom substrat og enzym bare forekommer i et aktivt sete per enzym, samt at disse setene virker uavhengig av hverandre [43]. For CYP3A er det vist at dette ikke alltid er tilfelle. Det store aktive setet til CYP3A muliggjør binding av minst to substratmolekyler samtidig. Dette kan resultere i atypiske kinetiske profiler, som sigmoidal kinetikk (autoaktivering), bifasisk kinetikk og substrathemming [44]. Sigmoidal kinetikk oppstår



når et substrat aktiverer sin egen metabolisme ved endring i bindingsaffinitet til enzymet eller hastighet av produktdannelse [45,46]. Dette medfører en initiell forsinkelse i reaksjonshastigheten og karakteriseres av en sigmoidal kurve (figur 3 B). Sigmoidal kinetikk beskrives ofte av Hill likningen (likning 2):

$$v = \frac{V_{\max} [S]^n}{S_{50}^n + [S]^n} \quad (2)$$

hvor  $S_{50}$  er substratkonsentrasjonen som gir halvparten av  $V_{\max}$  og tilsvarer  $K_m$  (likning 1). Hill koeffisienten,  $n$ , beskriver grad av sigmoiditet [44].

For å estimere et legemiddels clearance *in vivo* benyttes ofte Michaelis-Menten modellen til å beskrive *in vitro* enzymkinetiske data og ut fra disse beregne intrinsic clearance,  $CL_{\text{int}}$ .  $CL_{\text{int}}$  reflekterer den maksimale metaboliserende kapasiteten til det eliminerende organet og kan under første ordens kinetikk beskrives med likning 3 [47]:

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

Metabolittdannelsesmetoden har tradisjonelt blitt benyttet i metabolismestudier *in vitro* for å estimere  $CL_{\text{int}}$ . Denne metoden utføres ved å måle produksjon av metabolitt(er) ved ulike substratkonsentrasjoner. I slike studier bør den laveste konsentrasjonen være 1/10 av  $K_m$  for å dekke området med rask økning i hastighet for metabolittdannelse. Den høyeste konsentrasjonen bør være 10 ganger  $K_m$ -verdien for å sikre at metabolismen når  $V_{\max}$  [48]. Generelt benyttes korte inkubasjonstider og lave konsentrasjoner av protein siden Michaelis-Menten likningen forutsetter mindre enn 10 % forbruk av substratet [49].

Substrattap er en alternativ metode hvor tap av substrat blir målt som funksjon av tid. En forutsetning for denne metoden er lave substratkonsentrasjoner (under  $K_m$ ), som sikrer lineær dannelselse av metabolitter. Ofte velges en substratkonsentrasjon på 1  $\mu\text{M}$  eller lavere når  $K_m$ -verdier for metabolitter ikke er kjent [50]. Generelt må minst 20 % av substratet metaboliseres i løpet av inkubasjonstiden for å kunne detektere en nedgang [49]. Ofte må det derfor benyttes høyere proteinkonsentrasjoner og lengre inkubasjonstider i forhold til den tradisjonelle metabolittdannelsesmetoden. Dette kan medføre økt sannsynlighet for uspesifikk binding til proteiner og redusert stabilitet av enzympreparatet [49,50]. I tillegg innebærer disse inkubasjonsforholdene økt risiko for

at metabolitter kan hemme videre metabolisme av substratet pga fravær av fase II enzymer og nødvendige kofaktorer [51]. Det anbefales derfor å benytte lavest mulig proteinkonsentrasjon og kortest mulig inkubasjonstid i studier med denne metoden. Substrattap blir vanligvis tilpasset en monofasisk nedbrytningsmodell angitt ved følgende likning (likning 4):

$$C_t = C_0 * e^{-k*t} \quad (4)$$

$C_0$  angir substratkonsentrasjonen ved tiden (t) 0 minutter, og k er hastighetskonstanten for substrattapet.  $CL_{int}$  beregnes som gitt i likning 5, der  $V_d$  angir distribusjonsvolumet.

$$CL_{int} = k * V_d \quad (5)$$

## 1.6 *In vitro* studier av legemiddelmetabolisme

*In vitro* studier av legemiddelmetabolisme er blant annet viktig i de tidlige fasene ved utvikling av nye legemidler for å kunne forutsi i hvilken grad metabolisme bidrar til eliminasjonen av et potensielt nytt legemiddel. Slike studier kan gi en indikasjon på metabolsk clearance *in vivo*, potensielle legemiddelinteraksjoner som følge av enzymhemming eller -induksjon, samt betydningen av eventuell genetisk variasjon. Flere ulike modellsystemer for *in vitro* metabolismestudier har blitt benyttet, blant annet hepatocytter, rekombinante systemer og mikrosomer [48].

Hepatocytter inneholder mange fase I og II metabolske enzymer. I tillegg inneholder disse, i motsetning til mikrosomer og rekombinante systemer, nødvendige kofaktorer. Dette gjør hepatocytter godt egnet til estimering av clearance og potensielle legemiddelinteraksjoner, men er i mindre bruk pga begrenset tilgang på leverdonorer [48,50].

Rekombinante systemer består av et enkelt humant enzym uttrykt i eukaryote vertsceller, hovedsakelig i sopp, lymfoblast fra mennesker eller baculovirus infektete insektceller [50]. Slike systemer gir mulighet for å studere aktiviteten til spesifikke isoenzymer involvert i metabolismen av et legemiddel, og kan i tillegg gi informasjon om risiko for legemiddelinteraksjoner [52].

Mikrosomer er subcellulære fraksjoner av endoplasmatisk retikulum som fremstilles ved homogenisering av vev etterfulgt av differensialsentrifugering [52,53]. Fordeler ved

å benytte mikrosomer er blant annet at de er enkle i bruk og kan lagres nedfrosset i lang tid med minimalt tap av enzymatisk aktivitet [53]. HLM er den mest anvendte *in vitro* modellen, og kan gi en indikasjon på den metabolske profilen til et legemiddel *in vivo*. I tillegg kan ulike isoenzymers bidrag til metabolisme studeres i nærvær av spesifikke hemmere. Interindividuell variasjon kan også studeres ved bruk av HLM [52]. En annen *in vitro* modell som benyttes i stor grad er mikrosomer tillaget av rekombinante systemer som kun uttrykker ett enkelt enzym.

Formålet med *in vitro* studier er å kunne beskrive metabolismen av et legemiddel *in vivo*. Ekstrapolering av metabolsk clearance *in vivo* fra *in vitro* data er imidlertid problematisk. Mange faktorer kan bidra til misforhold mellom *in vitro* og *in vivo* data. Eksperimentelle betingelser som mikrosomale inkubasjonsforhold har stor betydning for metabolisme. Studier har for eksempel vist at cytokrom b<sub>5</sub> øker den katalytiske aktiviteten til CYP3A4 og CYP3A5. Denne effekten er kjent å være substratavhengig, og er bare sett med ca. 1/3 av substrater [54]. I tillegg er det av betydning om cytokrom b<sub>5</sub> er kotransfektet i modellsystemet eller tilsettes eksogent [55]. Andre inkubasjonsforhold som pH, buffer og eventuell bruk av organiske løsemidler har også stor innvirkning [56]. I tillegg til eksperimentelle betingelser kan interindividuell variasjon, ekstrahepatisk metabolisme, aktiv transport i leveren og ikke-lineær kinetikk medvirke til forskjeller mellom *in vivo* og *in vitro* data [53].

## 1.7 Hensikt

Quetiapin viser betydelig variasjon i serumkonsentrasjon mellom ulike individer etter inntak av samme dose legemiddel. Det er vist at quetiapin hovedsakelig metaboliseres via CYP3A4 [36], men betydningen av det polymorfe enzymet CYP3A5 for metabolisme av quetiapin er derimot lite studert. Hensikten med denne oppgaven var derfor å sammenlikne metabolisme av quetiapin via CYP3A4 og CYP3A5 *in vitro* for å kunne vurdere om polymorft uttrykk av CYP3A5 kan være en faktor som bidrar til interindividuell variasjon i serumkonsentrasjon av quetiapin *in vivo*.

Bruk av ulike *in vitro* modellsystemer i metabolismestudier har vist å kunne gi forskjellige resultater. Tilstedeværelse av cytokrom b<sub>5</sub> i modellsystemet er vist å være av stor betydning for metabolisme av en rekke ulike substrater. Hensikten med oppgaven var derfor også å studere betydningen av cytokrom b<sub>5</sub> for metabolisme av quetiapin *in vitro*.

## 2 MATERIALER OG METODER

### 2.1 Analytter, kjemikalier, mikrosomer og utstyr

#### *Oversikt over analytter*

<b>Analytter (renhetsgrad)</b>	<b>Leverandør</b>
N-dealkylquetiapin (98 %)	Toronto Research Chemicals Inc., North York, ON, Canada
Promazin (>99 %)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Quetiapin (>98 %)	AstraZeneca, London, England/ Toronto Research Chemicals Inc., North York, ON, Canada
Quetiapinsulfoksid (>95%)	Synthetica AS, Oslo, Norge

#### *Oversikt over kjemikalier*

<b>Kjemikalier</b>	<b>Leverandør</b>
Acetonitril	Rathburn Chemicals Ltd., Walkerburn, Skottland
Ammoniumacetat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
DMSO	Fluka, Buchs, Sveits/ Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
EDTA	Ferak Berlin GmbH, Berlin, Tyskland
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt, Tyskland
Hepes	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt, Tyskland
Maursyre	Riedel-de Haën, Seelze, Tyskland
Metanol	Merck, Darmstadt, Tyskland/ Rathburn Chemicals Ltd., Walkerburn, Skottland
MgSO <sub>4</sub> (* 7 H <sub>2</sub> O)	Merck, Darmstadt, Tyskland
NADPH	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumhydroksid	Merck, Darmstadt, Tyskland
Nitrogengass	AGA AS, Oslo, Norge
Sukrose	Merck, Darmstadt, Tyskland
Tris	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

***Oversikt over insektmikrosomer***

<b>Mikrosompreparat</b>	<b>Leverandør</b>
CYP3A4 + cytokrom b <sub>5</sub> supersomer	BD Gentest, Woburn, MA, USA
CYP3A5 + cytokrom b <sub>5</sub> supersomer	BD Gentest, Woburn, MA, USA
CYP3A4 xenosomer	Larodan Fine Chemicals AB, Malmö, Sverige
CYP3A5 xenosomer	Larodan Fine Chemicals AB, Malmö, Sverige

***Oversikt over utstyr***

<b>Utstyr</b>	<b>Modell</b>	<b>Produsent</b>
Automatpipetter	Eppendorf research	Eppendorf AG, Hamburg, Tyskland
	Finnpipette	Termo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA
Kjølesentrifuge	Universal 32R	Hettich zentrifugen, Tuttlingen, Tyskland
pH-meter	pHI 50	Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA
Pipettespisser	epTIPS standard	Eppendorf AG, Hamburg, Tyskland
	Biohit <sup>®</sup> Tip	Biohit Oyj, Helsinki, Finland
Reagensglass	13x100 mm	Instrument Teknikk AS, Østerås, Norge
Ultralydbad	Transsonic T460	Elma, Singen, Tyskland
	Bransonic 220	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Vannbad med rister		Gallenkamp, England
	KQ606	Citenco Ltd., Herts, England
Vannrensesystem	Milli-Q Synthesis A10	Millipore, St. Quentin en Yvelines, Frankrike
	EASYpure UV	Barnstead, Dubuque, IA, USA
Vekt	AT201	Mettler-Toledo AG, Greifensee, Sveits
	AB54	Mettler-Toledo AG, Greifensee, Sveits
Vialer	12x32 mm	Waters Corporation, Milford, MA, USA
Wirlmikser	L46	Labinco, Breda, Nederland
	MS2 Minishaker	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Tyskland

## 2.2 Løsninger

### Stockløsninger

Tørrstoff ble innveid med analysevekt og løst i metanol (MeOH) ved hjelp av ultralydbad. Løsningene ble oppbevart i fryser ved  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### Standardløsninger

Standardløsninger ble tillaget ved fortykning av stockløsninger i metanol. Løsningene ble oppbevart ved  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### Intern standard (promazin $10\ \mu\text{M}$ i acetonitril)

250  $\mu\text{l}$  promazin (1 mM) i metanol ble fortyknet med acetonitril i målekolbe til et totalt volum på 25 ml. Løsningen ble oppbevart i kjøleskap.

### Løsninger til validering og kvalitetskontroll

Bufferløsning i tabell 2-3 ble spiket med standardløsning i forholdet 10:1. Disse løsningene ble oppbevart i fryser ved  $-20^{\circ}\text{C}$ . Før hver kjøring ble 220  $\mu\text{l}$  av løsningene tilsatt 150  $\mu\text{l}$  acetonitril med intern standard. Konsentrasjonen av intern standard i hver prøve var  $4\ \mu\text{M}$ .

### Bufferløsninger

*Tabell 2-1: Bufferløsning til reløsing av legemiddel*

<b>Bufferløsning</b>	
Tris- $\text{H}_2\text{SO}_4$ (200 mM), pH 7,5	130 $\mu\text{l}$ /rør
$\text{MgSO}_4$ (20 mM)	5,5 $\mu\text{l}$ /rør
NADPH (10 mM)	35 $\mu\text{l}$ /rør

Alle tørrstoffene (tabell 2-1) ble løst i ionebyttet vann og løsningene oppbevart i kjøleskap. Løsningene ble byttet ut etter omtrent 4 uker. NADPH ble tillaget umiddelbart før hvert forsøk og beskyttet mot lys med aluminiumsfolie.

*Tabell 2-2: Bufferløsning til mikrosomer*

<b>Lise Madsen buffer, pH 7,4</b>	
Sukrose	0,25 M
Hepes	10 mM
EDTA	2 mM

Ved tillaging av Lise Madsen buffer (tabell 2-2) ble tørrstoffene løst i ionebyttet vann og pH-verdien justert til 7,4 med natriumhydroksid (4 M). Løsningen ble oppbevart i kjøleskap og byttet ut etter ca. 2 uker.

*Tabell 2-3: Bufferløsning til standard-, QC- og valideringsprøver*

<b>Bufferløsning</b>	
Tris-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (200 mM)	130 µl/rør
MgSO <sub>4</sub> (20 mM)	5,5 µl/rør
Ionebyttet vann	35 µl/rør
Lise Madsen buffer	50 µl/rør

*Tabell 2-4: Legemiddel/bufferløsning*

<b>Legemiddel/bufferløsning</b>	
Quetiapin i vann	50 µl/rør
MgSO <sub>4</sub> (20 mM)	5,5 µl/rør
NADPH (10 mM)	35 µl/rør
Tris-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (325 mM)	80 µl/rør

### 2.3 Generell inkubasjonsprosedyre for mikrosomforsøk

Stockløsning av quetiapin i metanol ble pipettert i et reagensglass og dampet av under nitrogengass. Legemidlet ble deretter reløst ved tilsetting av bufferløsning (tabell 2-1) til reagensglasset. I hvert inkubasjonsrør ble det fordelt 170,5 µl av legemiddel/bufferløsningen, og rørene ble preinkubert i 5 minutter på vannbad ved 37°C. Mikrosomer ble fortynt i Lise Madsen buffer (tabell 2-2) og preinkubert i et par minutter på vannbad ved 37°C. Forsøket ble initiert ved tilsetting av 50 µl



mikrosomløsning til hvert inkubasjonsrør. Rørene ble mikset forsiktig på wirlmikser og inkubert på vannbad (37°C) ved risting på trinn 7,5. Konsentrasjonen av de ulike komponentene i bufferløsningen (tabell 2-1) ved inkubasjon var 118 mM, 0,5 mM og 1,6 mM for henholdsvis Tris-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub> og NADPH. Disse inkubasjonsbetingelsene er de samme som optimalisert for ciklosporin A av Hermann *et al.* [57]. Reaksjonene ble avsluttet ved tilsetning av 150 µl kald acetonitril tilsatt intern standard. Dette ga en konsentrasjon av intern standard på 4 µM i hver prøve. Prøvene ble avkjølt på is i minimum 30 minutter før sentrifugering ved 1600 g i 5 minutter (4°C). Supernatanten ble deretter avpipettert i vialer og prøvene analysert på LC-MS/MS. I mikrosomforsøkene ble det inkludert to kontroller, en legemiddelfri og en mikrosomfri prøve. Disse ble opparbeidet på samme måte som de andre prøvene, men legemiddelløsning og mikrosomløsning ble erstattet med henholdsvis bufferløsning uten legemiddel (tabell 2-1) og Lise Madsen buffer (tabell 2-2).

## 2.4 Metabolittdannelse

### 2.4.1 Metabolisme av quetiapin som funksjon av tid

For å bestemme inkubasjonstid i konsentrasjonsforsøkene (punkt 2.4.3) ble dannelsen av metabolitter målt som funksjon av tid (0-20 min) ved to ulike konsentrasjoner av quetiapin (1 og 500 µM). Inkubasjonstid i senere forsøk ble fastsatt på bakgrunn av lineær metabolittdannelse i valgt tidsintervall. Det ble benyttet CYP3A4-insektmikrosomer (xenosomer) som ble fortyntet 1:90 i Lise Madsen buffer. Dette tilsvarer en enzymkonsentrasjon på 2,8 pmol/ml ved inkubasjon (deklarerert fra produsent). Prøvene ble inkubert i henholdsvis 5, 10, 15 og 20 minutter. Det ble utført 2 paralleller ved hvert tidspunkt. Inkubasjonsprosedyren for øvrig var som beskrevet i punkt 2.3, med unntak av mikrosomfri prøve, hvor mikrosomløsningen ble erstattet av Tris-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

### 2.4.2 Metabolisme av quetiapin som funksjon av enzymkonsentrasjon

Det var ønskelig å øke konsentrasjonen av CYP3A-enzym i metabolismeforsøkene tilsvarende konsentrasjonen i HLM estimert ved Western blott (3,9 pmol/ml, upubliserte data, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo). For å sikre lineær metabolittdannelse ved høyere enzymkonsentrasjoner ble derfor produksjon av metabolitt bestemt som funksjon av enzymkonsentrasjon i området fra

2,8 - 8,3 pmol/ml (fortynning 1:90 - 1:30). Forsøket ble utført ved bruk av CYP3A4-insektmikrosomer. Mikrosomløsning med konsentrasjon av CYP3A4 på 8,3 pmol/ml ved inkubasjon ble tillaget og fortynnet videre til følgende konsentrasjoner: 5,5; 4,2; 3,3; og 2,8 pmol/ml. Det ble benyttet samme inkubasjonsprosedyre som beskrevet i punkt 2.3. Konsentrasjonen av quetiapin var 50  $\mu\text{M}$  i alle prøvene. Det ble utført 2 paralleller for hver enzymkonsentrasjon og prøvene ble inkubert i 7,5 minutter.

#### **2.4.3 Metabolisme av quetiapin som funksjon av substratkonsentrasjon**

For å estimere enzymkinetiske parametere for metabolisme av et legemiddel benyttes tradisjonelt metabolittdannelsesmetoden. Ulike konsentrasjoner av quetiapin i området fra 5-500  $\mu\text{M}$  og 5-1000  $\mu\text{M}$  ble inkubert med henholdsvis CYP3A4- og CYP3A5-insektmikrosomer og produksjon av metabolitter ble målt. Forsøket ble utført som beskrevet i punkt 2.3. Prøvene ble inkubert i 10 minutter, og det ble utført 2 paralleller for hver substratkonsentrasjon. Mikrosomløsningen ble fortynnet i forholdet 1:64 (tilsvarende 3,9 pmol/ml CYP3A4 og 3,7 pmol/ml CYP3A5). Kurvetilpasning og estimering av enzymkinetiske parametere ( $V_{\max}$  og  $K_m/S_{50}$ ) ble utført ved ikke-lineær regresjon ved hjelp av GraphPad Prism programvare versjon 4.03 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

#### **2.5 Løselighet av quetiapin**

Under forsøket i punkt 2.4.3 ble det oppdaget et mulig løselighetsproblem. Etter inndamping av legemiddelløsningen under nitrogengass og tilsetting av bufferløsning, ble det observert partikler på reagensglasset under reløsningsprosessen. Konsentrasjonen i legemiddel/bufferløsningen ble målt, og resultatet viste at konsentrasjonen av quetiapin var ca. 30 % av den nominelle konsentrasjonen. Løseligheten av quetiapin ble derfor undersøkt nærmere. Effekt av ulike praktiske faktorer (glasstype, ultralydbad) og inkubasjonsfaktorer ( $\text{MgSO}_4$ , NADPH, buffer, pH og organisk løsemiddel) på løselighet ble vurdert ved sammenlikning av målt quetiapinkonsentrasjon og nominell konsentrasjon. Forsøkene viste at det ikke var mulig å endre noen av disse faktorene for å øke løseligheten av quetiapin, uten å samtidig påvirke metabolittdannelse. En forutsetning for å kunne estimere korrekte enzymkinetiske parametere er en nøyaktig og reproducerbar substratkonsentrasjon. Det ble derfor valgt å benytte en alternativ metode (substrattap) for å studere metabolisme

av quetiapin. Denne metoden forutsetter bruk av lave substratkonsentrasjoner, hvor quetiapin viste tilstrekkelig løselighet.

## 2.6 Substrattap

For å estimere enzymkinetiske data for metabolisme av quetiapin, ble forbruk av quetiapin målt i tidsområdet fra 0-60 minutter. Det ble benyttet fire ulike *in vitro* modellsystemer:

1. Insektmikrosomer transfektert med det humane genet for CYP3A4 (xenosomer)
2. Insektmikrosomer transfektert med både det humane genet for CYP3A4 og cytokrom b<sub>5</sub> (supersomer)
3. Insektmikrosomer transfektert med det humane genet for CYP3A5 (xenosomer)
4. Insektmikrosomer transfektert med både det humane genet for CYP3A5 og cytokrom b<sub>5</sub> (supersomer)

Legemiddel/bufferløsning ble tillaget som angitt i tabell 2-4. Forsøket ble utført som beskrevet i punkt 2.3. Det ble benyttet en enzymkonsentrasjon på 3,9 pmol/ml ved inkubasjon for alle mikrosompreparatene. Prøvene ble inkubert i 0, 0,5, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 og 60 minutter, og 2 paralleller ble benyttet for hvert tidspunkt. Forsøkene ble utført ved 1 og 5 µM quetiapin for CYP3A4 og CYP3A4 med cytokrom b<sub>5</sub>, og ved 5 og 15 µM for CYP3A5 og CYP3A5 med cytokrom b<sub>5</sub>. Dataene ble tilpasset en monofasisk nedbrytningsmodell (likning 4, punkt 1.5) ved hjelp av GraphPad Prism versjon 4.03.  $CL_{int}$  ble deretter beregnet som gitt i likning 5 (punkt 1.5), der  $V_d$  tilsvarer inkubasjonsvolumet (220,5 µl) i disse forsøkene.

I tillegg til forbruk av quetiapin ble det også kvantifisert metabolitter. I forsøkene med 5 µM quetiapin ble det beregnet relativ dannelse av hver metabolitt etter 60 minutters inkubasjon for de fire modellsystemene. For quetiapinsulfoksid og N-dealkylquetiapin ble det beregnet hvor mye metabolitt som var dannet i forhold til tapt mengde quetiapin. For å oppnå et uttrykk for relativ mengde O-dealkylquetiapin og 7-OH-quetiapin dannet, ble topparealforholdet metabolitt/intern standard beregnet i forhold til tapt mengde quetiapin.

## 2.7 Analyse av quetiapin og metabolitter

### 2.7.1 Analysemetode

Quetiapin og metabolitter ble analysert ved hjelp av LC-MS/MS. Analysen ble utført med en 2795 liquid chromatograph koblet til et Micromass Quattro Micro tandem massespektrometer (begge levert av Waters Corporation, Milford, MA, USA). Mikrosomforsøkene ble avsluttet ved proteinfelling med 150  $\mu$ l acetonitril tilsatt intern standard (punkt 2.3), og 5  $\mu$ l av prøven ble injisert i HPLC-systemet. Analyttene ble separert på en ACE 3AQ C<sub>18</sub> analysekolonne (Advanced Chromatography Technologies, Aberdeen, Skottland) beskyttet av en Atlantis dC<sub>18</sub> forkolonne (Waters Corporation, Milford, MA, USA) ved gradient eluering med ammoniumacetat buffer (10 mM, pH 4,5) og acetonitril. Mobilfasegradienten er angitt i tabell 2-5. Hastigheten på mobilfasen var 0,25 ml/min. Disse betingelsene ga retensjonstider på ca. 2,8 min for 7-OH-quetiapin, 3,1 min for quetiapinsulfoksid, 5,6 min for N-dealkylquetiapin, 5,7 min for O-dealkylquetiapin, 6,0 min for quetiapin og 6,9 min for promazin (intern standard). Positiv elektropray ionisering ble benyttet som ioniseringsteknikk, og deteksjon ble utført med MRM (multiple reaction monitoring) ved overgangene 400  $\rightarrow$  269 for 7-OH-quetiapin, 400  $\rightarrow$  221 for quetiapinsulfoksid, 296  $\rightarrow$  210 for N-dealkylquetiapin, 340  $\rightarrow$  253 for O-dealkylquetiapin, 384  $\rightarrow$  253 for quetiapin og 285  $\rightarrow$  212 for promazin. Total analysetid per prøve var 15 minutter. Prosessering ble utført ved hjelp av QuanLynx programvare versjon 4.0. Quetiapin, quetiapinsulfoksid og N-dealkylquetiapin ble kvantifisert ut fra standardkurver kjørt ved hvert forsøk. For O-dealkylquetiapin og 7-OH-quetiapin var tørrstoff ikke tilgjengelig og analyttkonsentrasjon ble derfor uttrykt som forholdet mellom toppareal av analytt og intern standard. Bruk av topparealforhold vil ikke kunne registrere eventuelle avvik fra linearitet i respons i MS-detektoren. Forsøksdata basert på topparealforhold innebærer derfor større usikkerhet enn forsøksdata basert på kvantifisering med standardkurver.

**Tabell 2-5: Mobilfasegradient**

Tid (minutter)	Løsning A <sup>1</sup>	Løsning B <sup>2</sup>
0	75 %	25 %
1,5	65 %	35 %
4	65 %	35 %
6,5	20 %	80 %
9,5	20 %	80 %
10	75 %	25 %
13,5	75 %	25 %

<sup>1</sup>Løsning A: 10 mM ammoniumacetat buffer, pH 4,5 (900 ml ionebyttet vann, 100 ml 0,1 M ammoniumacetat, 1 ml 25 % maursyre)

<sup>2</sup>Løsning B: 100 % acetonitril

### 2.7.2 Validering

Analysemetoden ble validert for ulike parametere i henhold til internasjonale retningslinjer for bioanalyse utgitt av FDA [58]. Valideringen ble utført for quetiapin og de to metabolittene quetiapinsulfoksid og N-dealkylquetiapin.

Det ble tillaget en standardkurve med 6 ulike konsentrasjoner av quetiapin i området fra 0,1-5  $\mu\text{M}$ . På grunn av stort konsentrasjonsområde ble standardrekken for quetiapinsulfoksid og N-dealkylquetiapin delt opp i to standardkurver, hver med 5 ulike konsentrasjoner i området fra 0,01-0,4  $\mu\text{M}$  og 0,4-8  $\mu\text{M}$ . Før hver kjøring ble standardprøver opparbeidet på følgende måte: 200  $\mu\text{l}$  bufferløsning (tabell 2-3) ble spiket med 20  $\mu\text{l}$  standardløsning, og tilsatt 150  $\mu\text{l}$  acetonitril med intern standard. Regresjonskoeffisienten ( $r^2$ ) ble beregnet for hver kjøring.

Kvantifiseringsgrensen (LOQ) var laveste validerte konsentrasjon i standardkurvene, dvs. 0,1  $\mu\text{M}$  for quetiapin og 0,01  $\mu\text{M}$  for quetiapinsulfoksid og N-dealkylquetiapin. I de tilfeller det ble målt verdier under LOQ er dette angitt spesielt.

Nøyaktighet beskriver avvik fra teoretisk verdi, mens presisjon angir spredning i analysedataene. Nøyaktighet og presisjon ble validert ved konsentrasjonene 0,1, 1,5 og 5  $\mu\text{M}$  for quetiapin, og ved 0,01, 0,4 og 8  $\mu\text{M}$  for quetiapinsulfoksid og N-dealkylquetiapin. Intradag nøyaktighet og presisjon ble undersøkt ved analyse av 5

paralleller for hver konsentrasjon på samme dag, mens interdag nøyaktighet og presisjon ble estimert ved de samme konsentrasjonene med 5 paralleller analysert på 5 separate dager. Nøyaktigheten ble beregnet som prosentvis avvik mellom testresultatet og teoretisk verdi, mens presisjon ble beregnet som prosent relativt standardavvik (RSD).

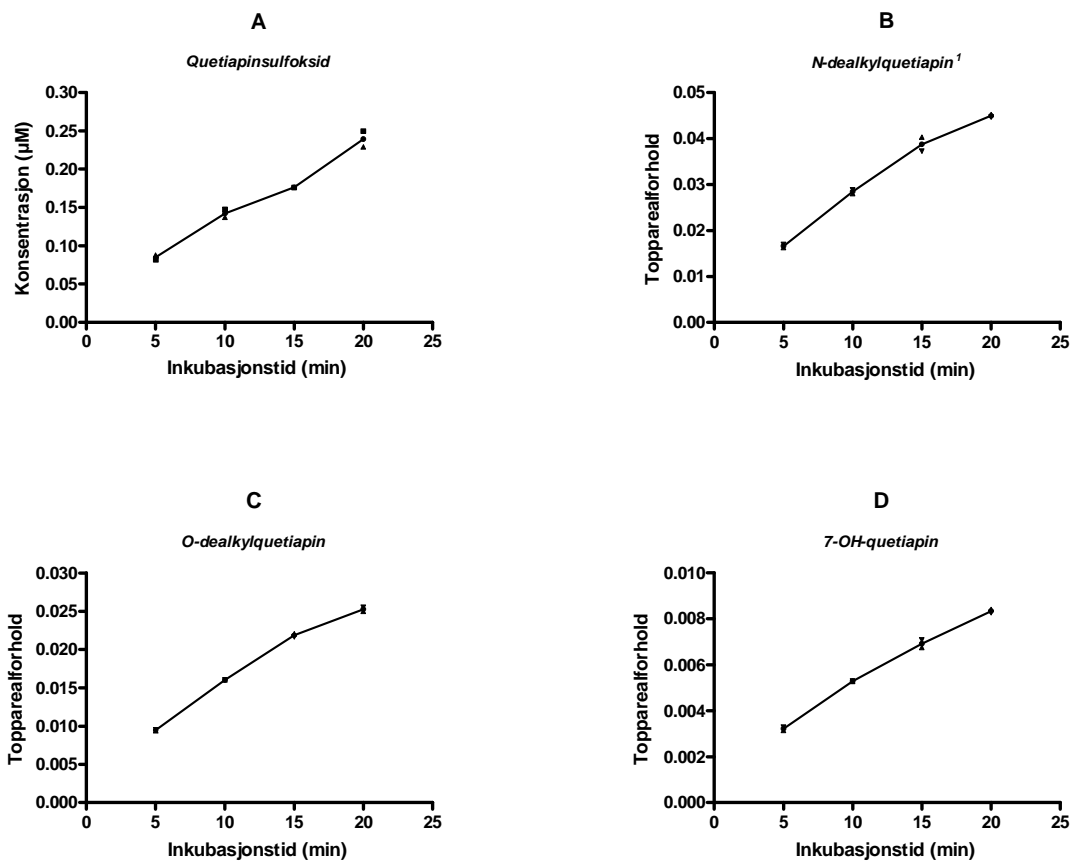
Kvalitetskontrollprøver (QC-prøver) ble inkludert i hver kjøring for å sikre at analysemetoden var stabil. Disse ble tillaget ved konsentrasjonene 0,2, 2 og 4,5  $\mu\text{M}$  for quetiapin. For quetiapinsulfoksid og N-dealkylquetiapin ble det laget QC-prøver ved 0,1, 1 og 4  $\mu\text{M}$ . De valgte konsentrasjonene for metabolittene avviker fra retningslinjene anbefalt av FDA [58], men reflekterer de forventede konsentrasjonene i metabolismeforsøkene. For hver analyse ble det inkludert et antall QC-prøver avhengig av det totale antallet prøver i kjøringen. For godkjenning av en kjøring, måtte minst 2/3 av QC-prøvene ligge innenfor 15 % avvik fra nominell verdi [58].

## 3 RESULTATER

### 3.1 Metabolittdannelse

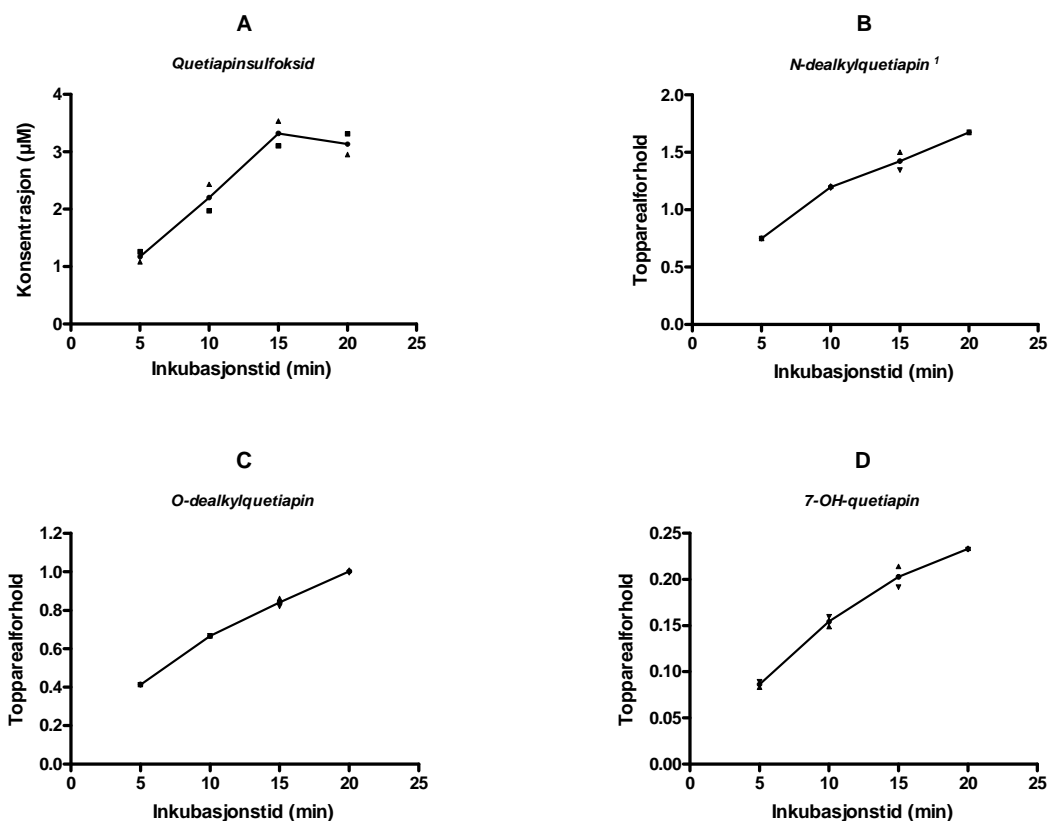
#### 3.1.1 Metabolisme av quetiapin som funksjon av tid

Metabolittdannelse som funksjon av tid ble undersøkt for å velge en inkubasjonstid i konsentrasjonsforsøkene (punkt 2.4.3) som sikrer lineær produksjon av metabolitt. Tidskurve for dannelse av de ulike metabolittene etter inkubasjon med 1 og 500  $\mu\text{M}$  er vist i henholdsvis figur 4 og 5. Kurvene er lineære frem til 15 minutter for alle metabolittene etter inkubasjon med 1  $\mu\text{M}$  quetiapin, samt for quetiapinsulfoksid ved 500  $\mu\text{M}$  quetiapin. Kurvene for N-dealkylquetiapin, O-dealkylquetiapin og 7-OH-quetiapin ved 500  $\mu\text{M}$  quetiapin viser derimot tegn til avvik fra linearitet etter 10 minutter. Dette kan skyldes avvik fra tidslinearitet i metabolittdannelse, men for disse metabolittene hvor metabolittdannelse ble beregnet ved topparealforhold, kan avbøyning i kurven også være forårsaket av ikke-lineær respons i MS-detektoren. Inkubasjon i 10 minutter ga metabolittkonsentrasjoner over LOQ, og for å sikre linearitet i metabolittdannelse ble det derfor valgt å benytte en inkubasjonstid på 10 minutter i videre forsøk med metabolittdannelsesmetoden.



**Figur 4: Metabolisme av 1  $\mu\text{M}$  quetiapin som funksjon av tid.** Tidskurve for dannelse av quetiapinsulfoksid (A), N-dealkylquetiapin (B), O-dealkylquetiapin (C) og 7-OH-quetiapin (D) etter inkubasjon med 1  $\mu\text{M}$  quetiapin. Linjen viser gjennomsnittet av 2 paralleller.  
<sup>1</sup>Dannelse av N-dealkylquetiapin ble beregnet som topparealforhold pga at tørrstoff ikke var tilgjengelig på det tidspunkt forsøket ble gjennomført.



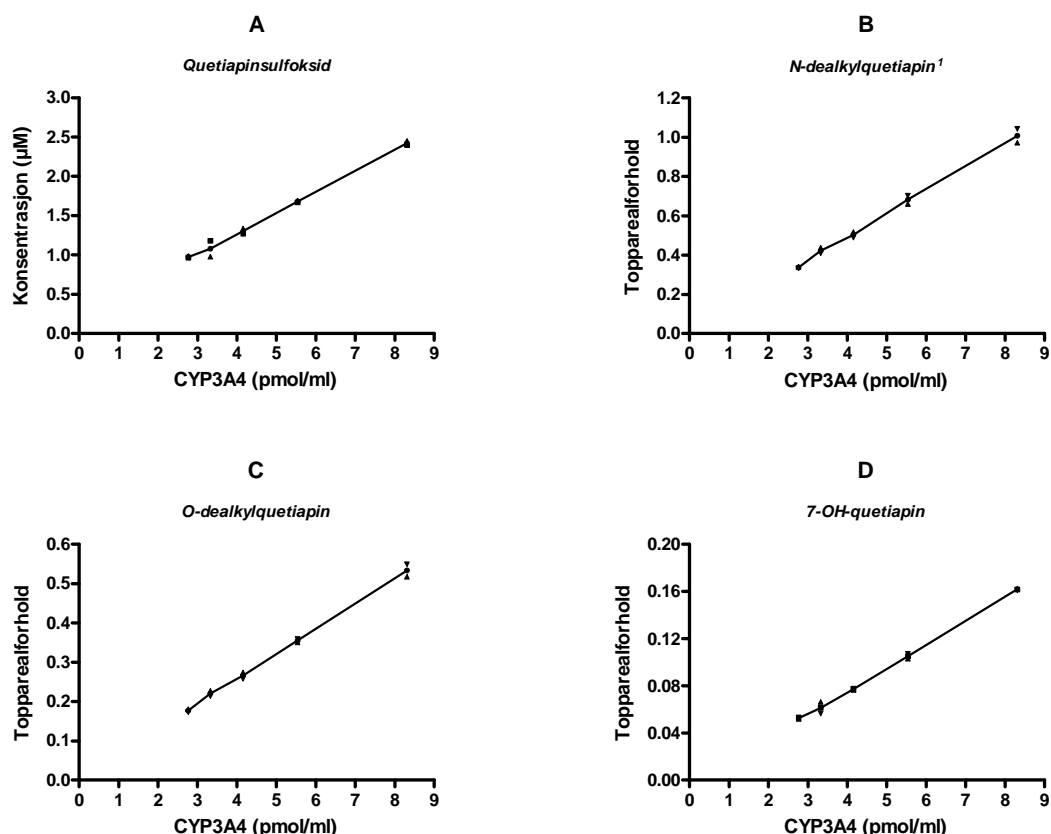


**Figur 5: Metabolisme av 500 µM quetiapin som funksjon av tid.** Tidskurve for dannelse av quetiapinsulfoksid (A), N-dealkylquetiapin (B), O-dealkylquetiapin (C) og 7-OH-quetiapin (D) etter inkubasjon med 500 µM quetiapin. Linjen viser gjennomsnittet av 2 paralleller.

<sup>1</sup>Dannelse av N-dealkylquetiapin ble beregnet som topparealforhold pga at tørrstoff ikke var tilgjengelig på det tidspunkt forsøket ble gjennomført.

### 3.1.2 Metabolisme av quetiapin som funksjon av enzymkonsentrasjon

For å sikre linearitet med hensyn på konsentrasjonen av CYP3A-enzym ble metabolittdannelse undersøkt som funksjon av CYP3A4-konsentrasjon ved 50 µM quetiapin. Dannelse av alle metabolittene var lineær i hele konsentrasjonsområdet fra 2,8 til 8,3 pmol/ml CYP (figur 6). Det ble valgt å benytte en konsentrasjon av CYP-enzym på 3,9 pmol/ml i de videre mikrosomforsøkene. Dette tilsvarer enzymkonsentrasjonen i HLM estimert ved Western blott (upubliserte data, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo).



**Figur 6: Metabolisme av quetiapin som funksjon av enzymkonsentrasjon.** Dannelse av quetiapinsulfoksid (A), N-dealkylquetiapin (B), O-dealkylquetiapin (C) og 7-OH-quetiapin (D) som funksjon av konsentrasjon av CYP3A4-enzym. Linjen viser gjennomsnittet av 2 paralleller.

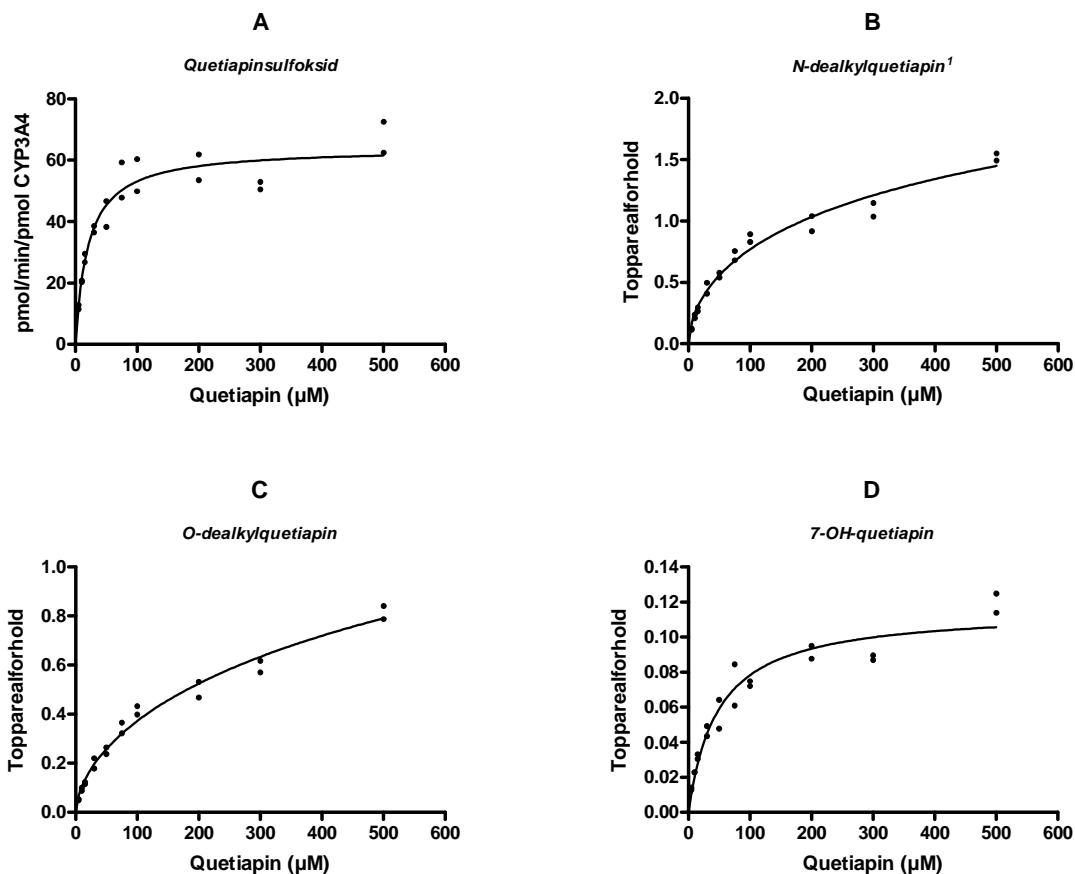
Konsentrasjonen av quetiapin var 50 µM.

<sup>1</sup>Dannelse av N-dealkylquetiapin ble beregnet som topparealforhold pga at tørrstoff ikke var tilgjengelig på det tidspunkt forsøket ble gjennomført.

### 3.1.3 Metabolisme av quetiapin som funksjon av substratkonsentrasjon

Metabolisme som funksjon av substratkonsentrasjon ble studert ved inkubasjon av ulike konsentrasjoner av quetiapin med CYP3A4- og CYP3A5-insektmikrosomer. Metabolittdannelse ble undersøkt i konsentrasjonsområdet fra 5-500 µM quetiapin (figur 7) for CYP3A4 og 5-1000 µM for CYP3A5 (figur 8).

Den enzymkinetiske modellen (Michaelis-Menten, Hill eller bifasisk) som best beskrev forsøksdataene på grunnlag av  $r^2$ -verdi ble benyttet.  $r^2$  var  $\geq 0,9$  for alle metabolitter, både via CYP3A4 og CYP3A5. For CYP3A4 ble dannelsen av quetiapinsulfoksid og 7-OH-quetiapin (figur 7 A, D) best beskrevet av den klassiske Michaelis-Menten likningen (likning 1, punkt 1.5), mens dannelsen av N-dealkylquetiapin og



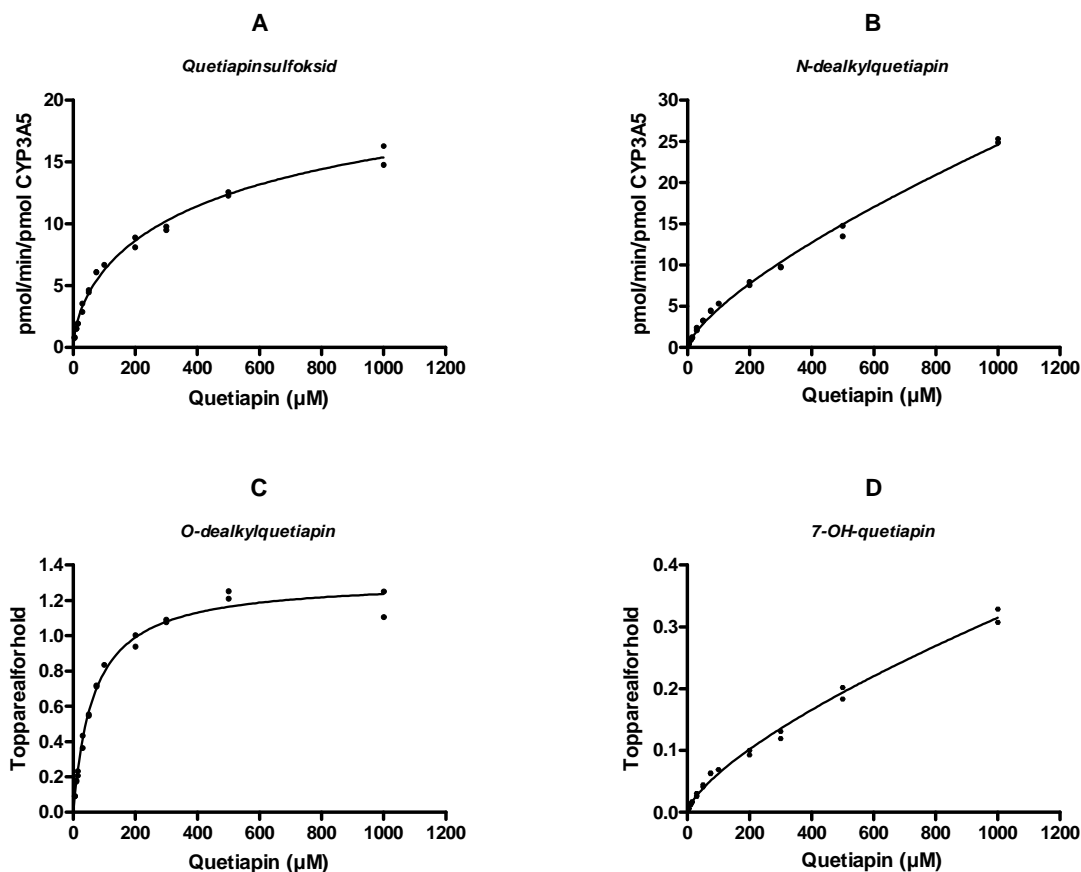
**Figur 7: Metabolisme av quetiapin via CYP3A4 som funksjon av substratkonsentrasjon.**

Hastighetskurver for dannelse av metabolittene quetiapinsulfoksid (A), N-dealkylquetiapin (B), O-dealkylquetiapin (C) og 7-OH-quetiapin (D) via CYP3A4. Linjene representerer beste kurvetilpassning til Michaelis-Menten modellen (A, D) eller Hill-modellen (B, C). ( $n=1$ )

<sup>1</sup>Dannelse av N-dealkylquetiapin ble beregnet som topparealforhold pga at tørrstoff ikke var tilgjengelig på det tidspunkt forsøket ble gjennomført.

O-dealkylquetiapin (figur 7 B, C) ble best beskrevet av Hill likningen (likning 2, punkt 1.5). For det tilsvarende forsøket med CYP3A5 viste kun O-dealkylquetiapin (figur 8 C) klassisk Michaelis-Menten kinetikk, mens dannelsen av de tre resterende metabolittene ble best beskrevet av Hill-modellen (figur 8 A, B, D).

Estimerte enzymkinetiske parametere er angitt i tabell 3-1.  $K_m$ -verdier for quetiapinsulfoksid og 7-OH-quetiapin via CYP3A4 ble bestemt til henholdsvis 21 µM og 98 µM. Verken dannelse av N-dealkylquetiapin eller O-dealkylquetiapin viste tegn til metning ved høyeste quetiapinkonsentrasjon (500 µM), og  $S_{50}$ -verdien ble estimert til



**Figur 8: Metabolisme av quetiapin via CYP3A5 som funksjon av substratkonsentrasjon.** Hastighetskurver for dannelse av metabolittene quetiapinsulfoksid (A), N-dealkylquetiapin (B), O-dealkylquetiapin (C) og 7-OH-quetiapin (D) via CYP3A5. Linjene representerer beste kurvetilpassning med Michaelis-Menten modellen (C) eller Hill-modellen (A, B, D). (n=1)

>500 µM. Forsøket med CYP3A5 ga  $K_m/S_{50}$ -verdier for quetiapinsulfoksid og O-dealkylquetiapin på 650 µM og 66 µM respektivt.  $S_{50}$ -verdien for både N-dealkylquetiapin og 7-OH-quetiapin ble estimert til >1000 µM, siden ingen av disse metabolittene viste tegn til metning ved høyeste quetiapinkonsentrasjon (1000 µM).  $V_{max}$  er bare oppgitt for metabolitter der det forelå tørrstoff slik at metabolittene kunne kvantifiseres, og hvor kurven flatet ut i det benyttede konsentrasjonsområdet. For quetiapinsulfoksid ble  $V_{max}$  estimert til 64 pmol/min/pmol CYP via CYP3A4, mens en lavere verdi for  $V_{max}$  ble estimert via CYP3A5 (27 pmol/min/pmol CYP).  $CL_{int}$ -verdier for quetiapinsulfoksid ble beregnet til 3,0 og 0,042 µl/min/pmol CYP henholdsvis via CYP3A4 og CYP3A5 (likning 3, punkt 1.5).

**Tabell 3-1:** Enzymkinetiske parametere for metabolisme av quetiapin via CYP3A4 og CYP3A5  
 $K_m/S_{50}$  ( $\mu M$ ),  $V_{max}$  (pmol/min/pmol CYP) og  $CL_{int}$  ( $\mu l/min/pmol$  CYP)

	CYP3A4			CYP3A5		
	$K_m/S_{50}$	$V_{max}$	$CL_{int}$	$K_m/S_{50}$	$V_{max}$	$CL_{int}$
Quetiapinsulfoksid	21	64	3,0	650	27	0,042
N-dealkylquetiapin	>500	-		>1000	-	
O-dealkylquetiapin	>500	-		66	-	
7-OH-quetiapin	98	-		>1000	-	

## 3.2 Løselighet av quetiapin

### 3.2.1 Praktiske faktorer

Det er kjent at forbindelser kan adheres til ulike typer glassmateriale. Det ble derfor undersøkt om den lave konsentrasjonen av quetiapin som ble målt kunne skyldes adhesjon av quetiapin til de benyttede engangs reagensglassene. Konsentrasjonen av legemiddelet ble sammenliknet i engangs reagensglass og flergangs glassrør benyttet i tidligere inkubasjonsforsøk ved avdelingen. Det ble ikke funnet vesentlige forskjeller i målt quetiapinkonsentrasjon i de ulike glasstypene (ca. 35 % av nominell konsentrasjon ble målt i begge glasstyper, n=2). Dette tydet på at glasstype ikke bidro til de lave konsentrasjonene av quetiapin.

Ultralydbad er kjent å øke hastigheten av løselighetsprosesser. Det ble derfor forsøkt å reløse quetiapin ved hjelp av ultralydbad, men dette ga ingen vesentlig økning i quetiapinkonsentrasjonen. Omtrent 55 % av nominell konsentrasjon ble målt i prøver behandlet på ultralydbad, mens tilsvarende konsentrasjon i prøver uten ultralydbad ble målt til ca. 60 % (n=2).

Undersøkelse av praktiske faktorer (glasstype og ultralydbad) ga stor variasjon i målt konsentrasjon av quetiapin og lå under 60 % av nominell konsentrasjon i alle forsøkene. Dette tydet på et løselighetsproblem forårsaket av en eller flere komponenter i inkubasjonsløsningen.

### 3.2.2 Inkubasjonsfaktorer

For å undersøke om den lave quetiapinkonsentrasjonen kunne skyldes utfelling av et tungtløselig sulfatsalt av quetiapin, ble det utført et forsøk hvor  $MgSO_4$  i bufferløsningen (tabell 2-1) ble erstattet av vann. Konsentrasjon av quetiapin i bufferløsningen uten  $MgSO_4$  ble målt til omtrent 50 % av nominell verdi ( $n=3$ ). Dette antydte at  $MgSO_4$  ikke påvirket løseligheten av quetiapin. Tilsvarende forsøk ble også gjort med NADPH for å utelukke innvirkning av denne faktoren på løseligheten av quetiapin. Forsøket viste ingen forskjell i konsentrasjon av quetiapin i løsningen med og uten NADPH ( $n=2$ ).

Betydning av trisbuffer ( $Tris-H_2SO_4$ ) på løselighet av quetiapin ble undersøkt ved å erstatte bufferløsningen i tabell 2-1 med vann. Dette ga vesentlige forskjeller i quetiapinkonsentrasjon. Ca. 50 % av nominell konsentrasjon ble målt i bufferløsningen med trisbuffer, mens ca. 100 % av nominell konsentrasjon ble målt i vannløsningen ( $n=2$ ). Dette tydet på at trisbufferen bidro til å redusere løseligheten av legemidlet. Muligheten for å erstatte trisbufferen med fosfatbuffer ( $KH_2PO_4$ , pH 7,4, 100 mM ved inkubasjon) ble undersøkt. Fosfatbufferen ga imidlertid lavere konsentrasjon av quetiapin enn trisbufferen (ca. 25 % lavere konsentrasjon,  $n=2$ ), og ble derfor ikke benyttet i videre forsøk.

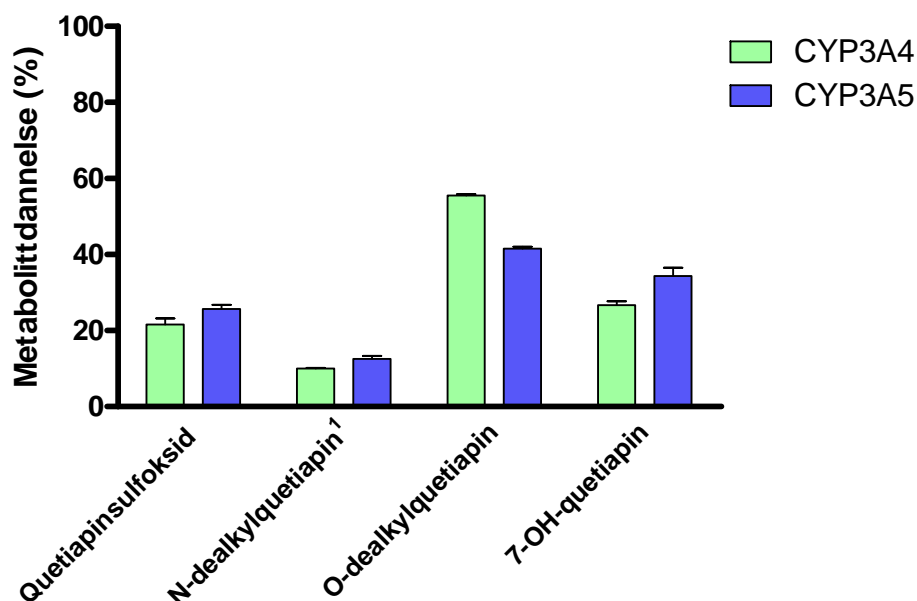
Quetiapin benyttet i forsøkene foreligger som quetiapinfumarat og er en svak syre ( $pK_a$  3,3, 6,8) hvor løseligheten dermed er pH-avhengig [59]. Innvirkning av pH på løseligheten ble undersøkt ved å sammenlikne konsentrasjonen av quetiapin i bufferløsning ved pH 7,5 (som benyttet i metabolismeforsøkene) og pH 4. Forsøket ga betydelige forskjeller i quetiapinkonsentrasjon. Omtrent 50 % av nominell konsentrasjon ble målt ved pH 7,5, mens ved pH 4 ble det målt ca. 100 % av nominell konsentrasjon ( $n=2$ ). Dette indikerer at for høy pH-verdi i bufferløsningen i forhold til  $pK_a$ -verdien (6,8) bidrar til lavere løselighet av quetiapin. For å oppnå tilstrekkelig løselighet måtte trolig pH reduseres til under  $pK_a$  (6,8). En pH-verdi på rundt 7,4 er imidlertid nødvendig i metabolismestudier for å sikre fysiologiske betingelser [57], og det var derfor ikke mulig å anvende en bufferløsning med lavere pH.

Det ble forsøkt å øke løseligheten av quetiapin ved å tilsette organisk løsemiddel. Nye stockløsninger bestående av vann og ulike konsentrasjoner av metanol og dimetylsulfoksid (DMSO) ble tillaget. Disse ble oppbevart i fryser ved  $-20^{\circ}\text{C}$ . Inkubasjonsløsning ble tillaget som vist i tabell 2-4. Følgende konsentrasjoner av organisk løsemiddel ble testet: 1, 2, 5, 7,5 og 10 %. Forsøkene viste at det var nødvendig med 10 % organisk løsemiddel ved inkubasjon for tilstrekkelig løselighet av quetiapin ved de høyeste konsentrasjonene i metabolittdannelsesforsøkene (1000  $\mu\text{M}$ ). MeOH ga bedre løselighet enn DMSO (henholdsvis ca. 100 % og 80 % av nominell quetiapinkonsentrasjon,  $n=2$ ).

### 3.2.3 Effekt av organisk løsemiddel på metabolisme av quetiapin

Bruk av organiske løsemidler er kjent å hemme aktiviteten av CYP-enzymene og er substratavhengig [60]. For å anslå i hvilken grad 10 % organisk løsemiddel påvirker metabolismen av quetiapin, ble dette undersøkt for både CYP3A4 og CYP3A5. Siden MeOH ga best løselighet av quetiapin og flere studier har vist at MeOH hemmer CYP3A4 aktivitet i mindre grad enn DMSO [61,62], ble bare effekten av MeOH evaluert.

I forsøket ble det benyttet en konsentrasjon av quetiapin på 5  $\mu\text{M}$  ved inkubasjon, og det ble kontrollert at denne lå innenfor en akseptabel nominell konsentrasjon på 90-110 % i en vannløsning uten organisk løsemiddel. Metabolittdannelse i inkubasjonsløsning med 10 % MeOH ble sammenliknet med metabolittdannelse i kontrolløsning uten MeOH. Det ble utført 4 paralleller for hvert mikrosompreparat og inkubasjonstiden var 10 minutter. Mikrosomene ble fortynnet til en konsentrasjon på 3,9 pmol/ml ved inkubasjon for begge mikrosompreparatene. Inkubasjonsbetingelsene for øvrig var de samme som beskrevet i punkt 2.3. Forsøket viste at metabolittdannelse ble hemmet betraktelig i inkubasjonsløsninger med MeOH i forhold til kontrolløsninger uten MeOH. Dannelsen av alle metabolitter ble redusert med over 44 % og 55 % via henholdsvis CYP3A4 og CYP3A5 (figur 9). Størst hemming ble funnet for dannelsen av N-dealkylquetiapin, med ca. 90 % reduksjon i dannelsen både via CYP3A4 og CYP3A5. Siden forsøket viste betydelig hemming av metabolittdannelse både via CYP3A4 og CYP3A5, var det derfor ikke mulig å benytte 10 % MeOH i metabolismestudiene.

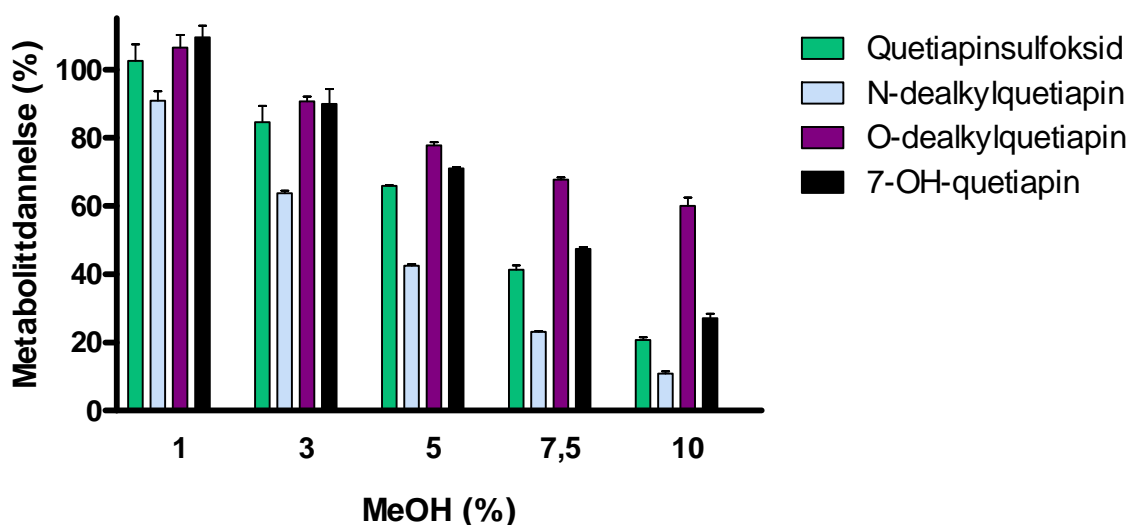


**Figur 9: Prosentvis metabolittdannelse via CYP3A4 og CYP3A5 i nærvær av 10 % MeOH.** Figuren viser gjennomsnittet av 4 paralleller med standardavvik. Data er beregnet i forhold til gjennomsnittlig metabolittdannelse i kontrolløsninger uten MeOH (n=4).

<sup>1</sup>Data for N-dealkylquetiapin via CYP3A5 er under LOQ.

Ved å benytte en lavere maksimalkonsentrasjon av quetiapin enn 1000  $\mu\text{M}$  i metabolittdannelsesforsøkene, kunne mengden av organisk løsemiddel reduseres. Muligheten for dette ble derfor undersøkt ved å måle metabolittdannelse i nærvær av 1, 3, 5, 7,5 og 10 % MeOH. Det ble benyttet samme prosedyre som beskrevet ovenfor, men bare effekt på CYP3A4 ble testet. Forsøket viste at dannelsen av de forskjellige metabolittene ble hemmet i ulik grad av MeOH sammenliknet med kontrolløsninger uten MeOH (figur 10). Størst hemming ble vist for N-dealkylquetiapin ved alle de undersøkte MeOH-konsentrasjonene. Det var bare den laveste konsentrasjonen av MeOH (1 %) som ga akseptabel metabolittdannelse ( $\geq 90$  %) for alle metabolittene. Tilstedeværelse av 1 % metanol ved inkubasjon ville tillate en konsentrasjon av quetiapin på maksimalt 100  $\mu\text{M}$  i metabolittdannelsesforsøkene, noe som vil være for lavt for å kunne estimere pålitelige enzymkinetiske parametere for alle metabolittene.





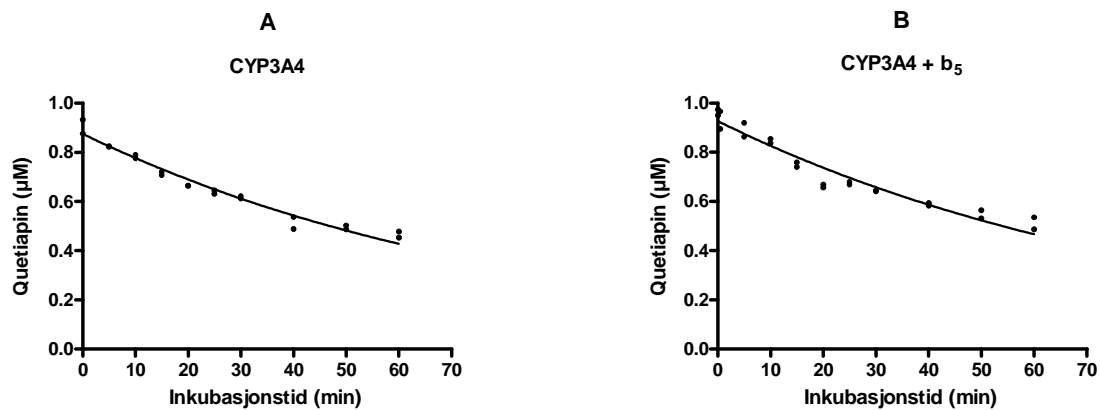
**Figur 10: Prosentvis metabolittdannelse via CYP3A4 i nærvær av 1-10 % MeOH.** Figuren viser gjennomsnittet av 3 paralleller med standardavvik. Data er beregnet i forhold til gjennomsnittlig metabolittdannelse i kontrolløsninger uten MeOH (n=3).

### 3.2.4 Oppsummering løselighetsproblem

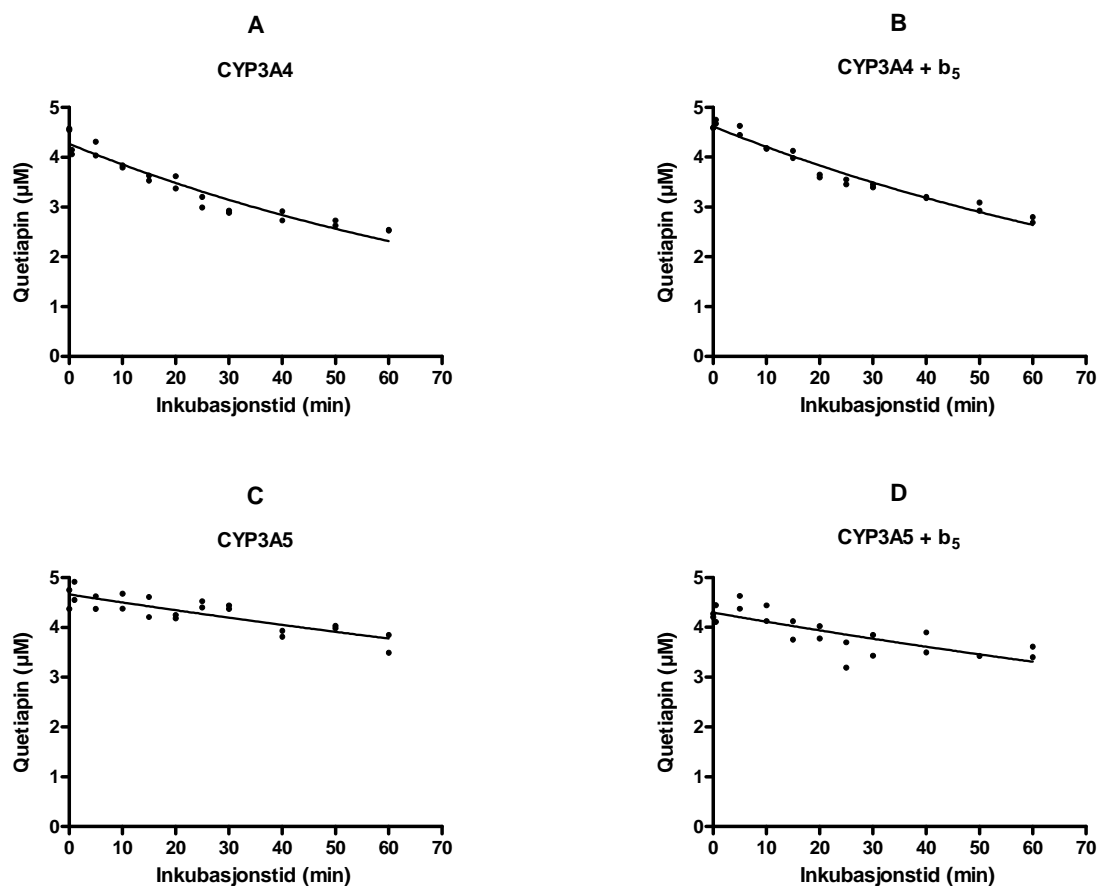
Forsøkene viste at det ikke var mulig å endre praktiske faktorer eller inkubasjonsfaktorer for å øke løseligheten av quetiapin uten samtidig å påvirke metabolittdannelse. Substrattap er en alternativ metode i metabolismestudier. Denne metoden forutsetter bruk av lave substratkonsentrasjoner. Konsentrasjonen av quetiapin i en stockløsning i vann (88,2  $\mu\text{M}$ ) til anvendelse i slike studier ble kontrollert og viste omtrent 90 % av nominell verdi (n=4). Dette ble ansett som akseptabelt, og det ble derfor besluttet å anvende substrattapmetoden for å studere metabolisme av quetiapin.

## 3.3 Substrattap

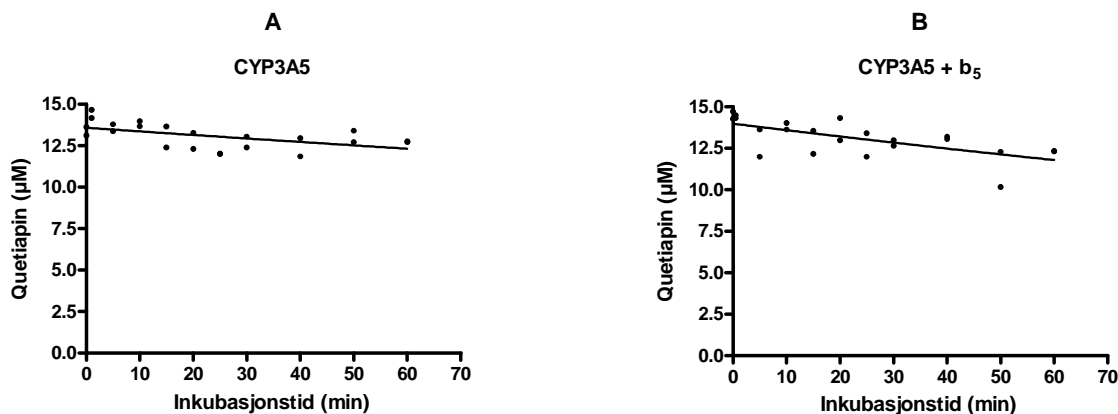
Forbruk av quetiapin ble undersøkt som funksjon av tid (0-60 minutter) i ulike modellsystemer (CYP3A4- og CYP3A5-insektmikrosomer, både med og uten transfektert cytokrom b<sub>5</sub>). Substrattap via CYP3A4 og CYP3A4 med cytokrom b<sub>5</sub> ble målt ved 1 og 5  $\mu\text{M}$  quetiapin (figur 11 A, B og 12 A, B), mens substrattap via CYP3A5 og CYP3A5 med cytokrom b<sub>5</sub> ble målt ved 5 og 15  $\mu\text{M}$  quetiapin (figur 12 C, D og 13 A, B).



**Figur 11: Substrattapkurver ved 1 µM quetiapin.** Substrattap ved inkubasjon av 1 µM quetiapin med CYP3A4 (A) og CYP3A4 + b<sub>5</sub> insektmikrosomer (B). (n=1)



**Figur 12: Substrattapkurver ved 5 µM quetiapin.** Substrattap ved inkubasjon av 5 µM quetiapin med CYP3A4 (A), CYP3A4 + b<sub>5</sub> (B), CYP3A5 (C) og CYP3A5 + b<sub>5</sub> insektmikrosomer (D). (n=1)



**Figur 13:** Substrattapkurver ved 15 µM quetiapin. Substrattap ved inkubasjon av 15 µM quetiapin med CYP3A5 (A) og CYP3A5 + b<sub>5</sub> insektmikrosomer (B). (n=1)

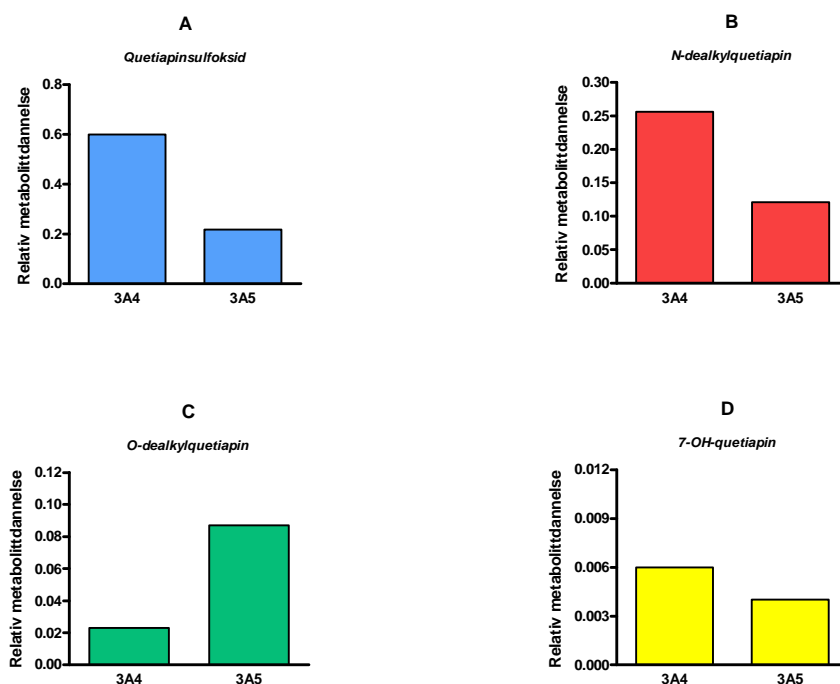
**Tabell 3-2:** Intrinsic clearance,  $CL_{int}$  (µl/min/pmol CYP), for substrattap av quetiapin (1, 5 og 15 µM) via CYP3A4 og CYP3A5 med og uten cytokrom b<sub>5</sub>.

	1 µM	5 µM	15 µM
CYP3A4	3,1	2,6	-
CYP3A4 + b <sub>5</sub>	2,9	2,4	-
CYP3A5	-	0,89	0,41
CYP3A5 + b <sub>5</sub>	-	1,1	0,73

### 3.3.1 Betydning av CYP3A5 for *in vitro* metabolisme av quetiapin

De laveste konsentrasjonene av quetiapin ga de høyeste verdiene for  $CL_{int}$  via de ulike modellsystemene (tabell 3-2). Det ble valgt å benytte de høyeste  $CL_{int}$ -verdiene for sammenlikning av CYP3A4 og CYP3A5. Forsøk med CYP3A5 ved 1 µM quetiapin ble ikke utført pga for lite substrattap ved denne substratkonsentrasjonen til å kunne måle en reell nedgang i quetiapinkonsentrasjon.  $CL_{int}$  for CYP3A4 ble bestemt til 3,1 µl/min/pmol CYP, mens  $CL_{int}$  for CYP3A5 ble bestemt til 0,89 µl/min/pmol CYP.  $CL_{int}$  for CYP3A5 var dermed omtrent 30 % sammenliknet med  $CL_{int}$  for CYP3A4. CYP3A4 med cytokrom b<sub>5</sub> ga  $CL_{int}$  på 2,9 µl/min/pmol CYP, mens  $CL_{int}$  for CYP3A5 med cytokrom b<sub>5</sub> var 1,1 µl/min/pmol CYP. Dette innebærer at  $CL_{int}$  for CYP3A5 med cytokrom b<sub>5</sub> var ca. 40 % i forhold til CYP3A4 med cytokrom b<sub>5</sub>.

Relativ metabolittdannelse i forhold til forbrukt mengde quetiapin via CYP3A4 og CYP3A5 ble undersøkt etter 60 minutters inkubasjon av 5  $\mu$ M quetiapin (figur 14). Forsøket indikerte ulikt metabolittmønster via CYP3A4 og CYP3A5. Dannelsen av quetiapinsulfoksid, N-dealkylquetiapin og 7-OH-quetiapin var relativt sett lavere via CYP3A5 i forhold til via CYP3A4. For N-dealkylquetiapin og quetiapinsulfoksid ble det dannet henholdsvis omtrent 2 og 3 ganger mer metabolitt via CYP3A4 i forhold til via CYP3A5, mens det ble dannet ca. 1,5 ganger mer 7-OH-quetiapin via CYP3A4 i forhold til via CYP3A5. Det motsatte ble vist for O-dealkylquetiapin, hvor det ble dannet ca. 4 ganger mer av denne metabolitten via CYP3A5 i forhold til via CYP3A4. Quetiapinsulfoksid og N-dealkylquetiapin utgjorde største andelen av forbrukt mengde quetiapin via CYP3A4 (86 %), mens de samme metabolittene utgjorde en betydelig mindre andel i forsøkene med CYP3A5 (34 %).

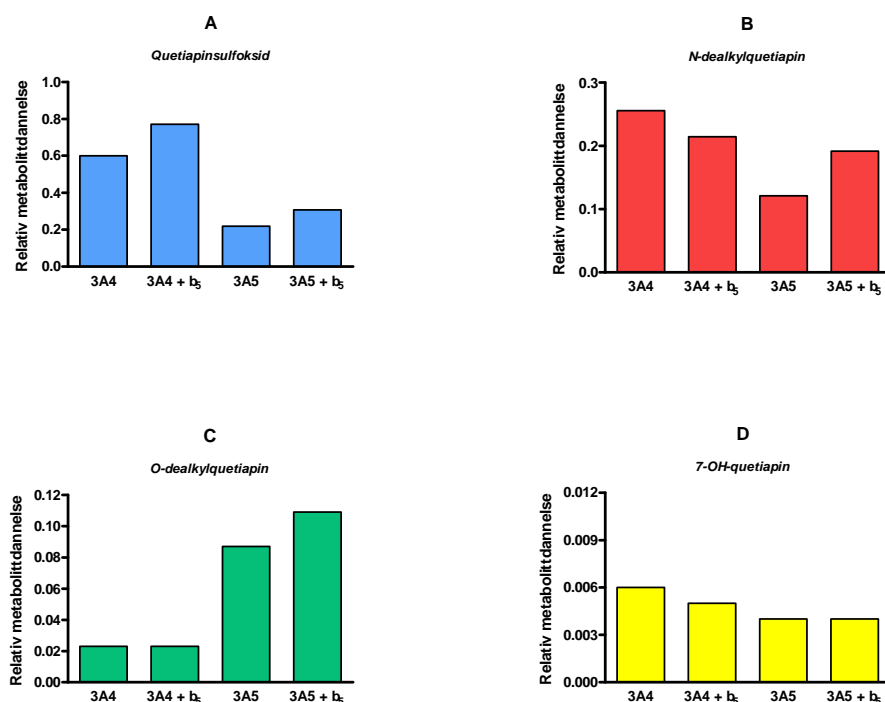


**Figur 14: Relativ metabolittdannelse via CYP3A4 og CYP3A5.** Dannelse av quetiapinsulfoksid (A), N-dealkylquetiapin (B), O-dealkylquetiapin (C) og 7-OH-quetiapin (D) etter inkubasjon av 5  $\mu$ M quetiapin med CYP3A4- og CYP3A5-insektmikrosomer i 60 minutter. For quetiapinsulfoksid og N-dealkylquetiapin viser figurene gjennomsnittlig metabolittdannelse i forhold til gjennomsnittlig mengde quetiapin forbrukt. Figurene for O-dealkylquetiapin og 7-OH-quetiapin er beregnet som gjennomsnittlig topparealforhold i forhold til gjennomsnittlig forbrukt mengde quetiapin. Gjennomsnittet er beregnet ut fra 2 paralleller.

### 3.3.2 Betydning av cytokrom b<sub>5</sub> for *in vitro* metabolisme av quetiapin

For CYP3A4 og CYP3A5 med cytokrom b<sub>5</sub> ble CL<sub>int</sub>-verdier bestemt til henholdsvis 3,1 og 2,9 µl/min/pmol CYP ved 1 µM quetiapin, mens forsøk med 5 µM quetiapin ga CL<sub>int</sub> på henholdsvis 2,6 og 2,4 µl/min/pmol CYP (tabell 3-2). Dette innebærer <10 % forskjell i CL<sub>int</sub> mellom mikrosompreparat med og uten cytokrom b<sub>5</sub> for CYP3A4 ved begge substratkonsentrasjonene. Ved 5 µM quetiapin ble CL<sub>int</sub> beregnet til 0,89 µl/min/pmol CYP for CYP3A5, mens for CYP3A5 med cytokrom b<sub>5</sub> ble CL<sub>int</sub> beregnet til 1,1 µl/min/pmol CYP. Dette betyr at CL<sub>int</sub> for CYP3A5 med cytokrom b<sub>5</sub> var ca. 25 % høyere enn CYP3A5 uten cytokrom b<sub>5</sub>. Tilsvarende verdier for CYP3A5 og CYP3A5 med cytokrom b<sub>5</sub> ved 15 µM quetiapin ble anslått til henholdsvis 0,41 og 0,73 µl/min/pmol CYP. Forsøkene viste dermed ca. 80 % høyere verdi for CL<sub>int</sub> i modellsystemet med cytokrom b<sub>5</sub> i forhold til uten cytokrom b<sub>5</sub> ved denne substratkonsentrasjonen.

Metabolittmønsteret for mikrosompreparatene med og uten cytokrom b<sub>5</sub> ble sammenliknet. Tilstedeværelse av cytokrom b<sub>5</sub> ga høyere dannelse av quetiapinsulfoksid, både via CYP3A4 og CYP3A5 sammenliknet med preparater uten cytokrom b<sub>5</sub> (figur 15). For N-dealkylquetiapin ble det dannet mindre via CYP3A4 med cytokrom b<sub>5</sub> i forhold til CYP3A4, mens CYP3A5 med cytokrom b<sub>5</sub> ga høyere dannelse av denne metabolitten sammenliknet med CYP3A5. CYP3A5 med cytokrom b<sub>5</sub> ga også høyere dannelse av O-dealkylquetiapin i forhold til CYP3A5, mens det ikke var noen effekt av cytokrom b<sub>5</sub> via CYP3A4. For 7-OH-quetiapin viste forsøket noe lavere metabolittdannelse via CYP3A4 i mikrosompreparatet med cytokrom b<sub>5</sub>, mens for CYP3A5 var det ingen effekt av cytokrom b<sub>5</sub>.



**Figur 15: Relativ metabolittdannelse via CYP3A4 og CYP3A5 med og uten cytokrom b<sub>5</sub>.** Dannelse av quetiapinsulfoksid (A), N-dealkylquetiapin (B), O-dealkylquetiapin (C) og 7-OH-quetiapin (D) etter inkubasjon av 5 µM quetiapin med CYP3A4, CYP3A4 + b<sub>5</sub>, CYP3A5 og CYP3A5 + b<sub>5</sub> insektmikrosomer i 60 minutter. For quetiapinsulfoksid og N-dealkylquetiapin viser figurene gjennomsnittlig metabolittdannelse i forhold til gjennomsnittlig mengde quetiapin forbrukt. Figurene for O-dealkylquetiapin og 7-OH-quetiapin er beregnet som gjennomsnittlig topparealforhold i forhold til gjennomsnittlig forbrukt mengde quetiapin. Gjennomsnittet er beregnet ut fra 2 paralleller.

### 3.4 Validering

Linearitet av analysemetoden ble testet ved tillaging av en standardkurve i området fra 0,1-5 µM for quetiapin, og fra 0,01-0,4 µM og 0,4-8 µM for quetiapinsulfoksid og N-dealkylquetiapin. Alle standardkurvene ble imidlertid best beskrevet ved kvadratisk regresjon med vektning 1/y, og toppareal ble brukt som mål på respons. Alle standardkurver ga regresjonskoeffisienter ( $r^2$ ) >0,99 (0,993-0,999, n=5).

Analysemetodens intradag nøyaktighet viste under 9 % avvik fra nominell konsentrasjon for alle analyttene, unntatt for quetiapinsulfoksid ved LOQ (0,01 µM) der avviket var på 16,2 % (tabell 3-3). Presisjonen lå under 10 % avvik for alle analyttene. Både intradag nøyaktighet og presisjon lå dermed godt innenfor kravet om maksimalt 15 % avvik (20 % ved LOQ) fastsatt av FDA [58]. Metodens nøyaktighet og presisjon på forskjellige dager (interdag) var også tilfredsstillende, hvor bestemmelse av

nøyaktighet og presisjon henholdsvis lå under 10 % og 12 % avvik for alle analytter (tabell 3-4).

**Tabell 3-3: Intradag nøyaktighet og presisjon (n=5)**

Analytt	Nominell konsentrasjon (µM)	Målt konsentrasjon (µM) (gjennomsnitt ± SD)	Nøyaktighet (% avvik)	Presisjon (% RSD)
Quetiapinsulfoksid	0,01	0,0084 ± 0,0008	16,2	9,1
	0,4	0,36 ± 0,01	8,9	4,0
	8	7,4 ± 0,3	7,8	4,3
N-dealkylquetiapin	0,01	0,0103 ± 0,0005	2,8	4,9
	0,4	0,40 ± 0,01	0,8	3,3
	8	7,4 ± 0,4	7,7	5,3
Quetiapin	0,1	0,109 ± 0,003	8,9	2,7
	1,5	1,51 ± 0,03	1,0	1,8
	5	4,8 ± 0,2	4,6	3,3

**Tabell 3-4: Interdag nøyaktighet og presisjon (n=5)**

Analytt	Nominell konsentrasjon (µM)	Målt konsentrasjon (µM) (gjennomsnitt ± SD)	Nøyaktighet (% avvik)	Presisjon (% RSD)
Quetiapinsulfoksid	0,01	0,010 ± 0,001	0,2	11,5
	0,4	0,38 ± 0,03	4,3	6,6
	8	7,6 ± 0,5	4,5	6,0
N-dealkylquetiapin	0,01	0,0108 ± 0,0009	7,8	8,4
	0,4	0,41 ± 0,01	3,5	2,4
	8	7,6 ± 0,3	5,4	3,7
Quetiapin	0,1	0,109 ± 0,001	9,2	0,9
	1,5	1,45 ± 0,03	3,0	2,3
	5	4,7 ± 0,1	6,0	3,1

## 4 DISKUSJON

### Metabolisme av quetiapin via CYP3A4 og CYP3A5 *in vitro*

Det er vist betydelig interindividuell variasjon i serumkonsentrasjon av quetiapin etter inntak av samme dose av legemidlet. Quetiapin metaboliseres via CYP3A4, men betydningen av CYP3A5 for metabolisme av quetiapin er lite studert. Forsøk med substrattap i denne studien viste at  $CL_{int}$  for CYP3A5 var minst 30 % sammenliknet med  $CL_{int}$  for CYP3A4. Dette tyder derfor på at CYP3A5 er av betydning for metabolisme av quetiapin. Lin *et al.* [63] rapporterte at metabolisme av quetiapin via CYP3A5 var omtrent 10 % i forhold til via CYP3A4. Lin *et al.* benyttet også substrattapmetoden, men sammenlikning med denne studien er problematisk, blant annet fordi det ikke fremkommer i artikkelen hvordan metabolismeaktiviteten er beregnet. Det ble også benyttet et annet inkubasjonssystem med forskjellig buffer, magnesiumsalt og NADPH-kilde. I forsøkene til Lin *et al.* ble i tillegg CYP3A4-insektmikrosomer transfektert med cytokrom  $b_5$  sammenliknet med CYP3A5-insektmikrosomer uten cytokrom  $b_5$ . Begge studiene indikerer imidlertid at CYP3A5 er av betydning for metabolisme av quetiapin, men i mindre grad enn CYP3A4.

Metabolittmønsteret for quetiapin var ulikt ved metabolisme via CYP3A4 og CYP3A5. I forsøkene med substrattap var den relative dannelsen av quetiapinsulfoksid og N-dealkylquetiapin vesentlig lavere via CYP3A5 sammenliknet med CYP3A4. Det motsatte ble vist for O-dealkylquetiapin, hvor det ble dannet betydelig mer av metabolitten via CYP3A5 i forhold til via CYP3A4. Forbrukt mengde quetiapin i forhold til mengde quetiapinsulfoksid og N-dealkylquetiapin dannet ble beregnet. Via CYP3A4 utgjorde disse metabolittene størstedelen av quetiapinforbruket (86 %), mens via CYP3A5 var denne andelen betydelig lavere (34 %). Forsøkene antyder at økt dannelse av O-dealkylquetiapin via CYP3A5 helt eller delvis kan forklare dette.

Ved metabolittdannelsesmetoden ble det estimert  $K_m/S_{50}$ -verdier som beskriver enzymaffinitet, samt preferanse for å danne ulike metabolitter. Lave  $K_m/S_{50}$ -verdier antyder større preferanse for å danne en metabolitt. For quetiapinsulfoksid ble  $K_m/S_{50}$ -verdier estimert til 21  $\mu\text{M}$  via CYP3A4, mens tilsvarende verdi for CYP3A5 var 650  $\mu\text{M}$ . For O-dealkylquetiapin ble  $K_m/S_{50}$  anslått til  $>500$   $\mu\text{M}$  via CYP3A4, mens en betydelig lavere verdi (66  $\mu\text{M}$ ) ble estimert via CYP3A5. Dette indikerer at det relativt



sett blir dannet mer O-dealkylquetiapin og mindre quetiapinsulfoksid via CYP3A5 sammenliknet med via CYP3A4, noe som også ble observert ved substrattapmetoden. Forsøkene med både substrattap- og metabolittdannelsesmetoden viser at det er holdepunkt for ulikt metabolittmønster via CYP3A4 og CYP3A5 for quetiapin. For andre substrater er det i flere studier vist tilsvarende forskjeller i metabolittmønster via de to CYP-enzymene. Blant annet har Huang *et al.* undersøkt metabolisme av midazolam via CYP3A4 og CYP3A5 [64]. Disse forsøkene viste at forholdet mellom dannelse av hovedmetabolitt (1-hydroksymidazolam) og sekundærm metabolitt (4-hydroksymidazolam) var betydelig høyere via CYP3A5 enn via CYP3A4. Tilsvarende forskjeller i metabolittdannelse via CYP3A4 og CYP3A5 er også vist for metabolisme av 17 $\beta$ - $\alpha$ -estradiol og  $\alpha$ -estrone [65,66].

Det er kjent at tilstedeværelsen av cytokrom b<sub>5</sub> i mikrosompreparatet påvirker aktiviteten av CYP3A-enzymet, og dette er vist å være substratavhengig [54]. Metabolisme av quetiapin via CYP3A4 viste tilnærmet lik verdi for CL<sub>int</sub> i mikrosompreparatet med og uten cytokrom b<sub>5</sub> (<10 % forskjell). For metabolisme via CYP3A5 var det imidlertid tendens til økt metabolisme i mikrosompreparatet med cytokrom b<sub>5</sub> i forhold til uten cytokrom b<sub>5</sub>. CL<sub>int</sub>-verdiene var omtrent 25 % og 80 % høyere for CYP3A5 med cytokrom b<sub>5</sub> i forhold til uten cytokrom b<sub>5</sub> etter inkubasjon med henholdsvis 5  $\mu$ M og 15  $\mu$ M quetiapin. Dette antyder at cytokrom b<sub>5</sub> kan ha betydning for *in vitro* metabolisme av quetiapin via CYP3A5, mens for metabolisme via CYP3A4 ser det ut til at cytokrom b<sub>5</sub> har liten betydning. Flere studier har vist en betydelig økning i metabolisme i modellsystemer som inneholder cytokrom b<sub>5</sub>. Klees *et al.* viste en 5-7 ganger økning i CL<sub>int</sub> for metabolisme av alfentanil via CYP3A4 med transfektert cytokrom b<sub>5</sub> [55]. Forskjellen var imidlertid mindre når cytokrom b<sub>5</sub> ble tilsatt inkubasjonssystemet. I en studie av Dennison *et al.* ble det målt 2 og 3 ganger høyere CL<sub>int</sub>-verdier for dannelse av hovedmetabolitten til vinkristin via henholdsvis CYP3A5 og CYP3A4 i modellsystemer med transfektert cytokrom b<sub>5</sub> [19]. Dette poengterer viktigheten av å velge like inkubasjonssystem for å studere forskjell i metabolisme via CYP3A4 og CYP3A5. Det vil spesielt være av betydning om cytokrom b<sub>5</sub> er tilsatt inkubasjonssystemet, eller transfektert i mikrosompreparatet.

Økt aktivitet av CYP3A-enzymet pga tilstedeværelse av cytokrom b<sub>5</sub> kan også gi opphav til ulikt metabolittmønster i inkubasjonssystem med og uten cytokrom b<sub>5</sub>. Etter

inkubasjon av 5  $\mu\text{M}$  quetiapin i 60 minutter ble det observert ulikt metabolittmønster i mikrosompreparater som var transfektert med cytokrom  $b_5$  i forhold til preparater uten cytokrom  $b_5$ . Via CYP3A4 med cytokrom  $b_5$  ble det målt en høyere dannelse av quetiapinsulfoksid i forhold til CYP3A4 uten cytokrom  $b_5$ , mens det motsatte ble vist for N-dealkylquetiapin og 7-OH-quetiapin. Forsøket indikerte også høyere dannelse av quetiapinsulfoksid, N-dealkylquetiapin og O-dealkylquetiapin via CYP3A5 med cytokrom  $b_5$ . Siden disse resultatene er basert på kun et forsøk, må betydningen av cytokrom  $b_5$  for dannelsen av de ulike metabolittene studeres videre.

$K_m/S_{50}$ -verdiene som ble funnet med metabolittdannelsesmetoden indikerer at quetiapinsulfoksid er hovedmetabolitt dannet via CYP3A4 *in vitro*. En  $K_m$ -verdi på 21  $\mu\text{M}$  ble estimert for dannelsen av quetiapinsulfoksid. Dette samsvarer med en studie av Hasselstrøm *et al.*, hvor  $K_m$  for quetiapinsulfoksid var 8,5  $\mu\text{M}$  [67]. For N-dealkylquetiapin og O-dealkylquetiapin rapporterte Hasselstrøm *et al.*  $K_m$ -verdier på henholdsvis 62 og 96  $\mu\text{M}$  [67]. Dette er betydelig lavere enn beregnet i denne studien, hvor tilsvarende verdier ble estimert til  $>500$   $\mu\text{M}$  for begge metabolitter. En mulig forklaring på denne forskjellen kan være at verken dannelsen av N-dealkylquetiapin eller O-dealkylquetiapin viste metning ved høyeste quetiapinkonsentrasjon i dette prosjektet, noe som innebærer stor usikkerhet i de estimerte verdiene for enzymkinetiske parametere. En annen grunn kan være bruk av forskjellige enzymkinetiske modeller i studiene. Dannelsen av N-dealkylquetiapin og O-dealkylquetiapin ble best beskrevet ved Hill-modellen i denne studien, mens Hasselstrøm *et al.* benyttet Michaelis-Menten modellen. En faktor som også kan medvirke til denne forskjellen i resultater, kan være den lave løseligheten av quetiapin som ble oppdaget i dette prosjektet. På hvilken måte dette påvirket estimering av verdier for enzymkinetiske parametere er imidlertid usikkert.

### **Metodologiske problemstillinger**

Substrattapmetoden er mye benyttet i metabolismestudier, men har noen ulemper i forhold til den tradisjonelle metabolittdannelsesmetoden. Ofte må det benyttes høyere konsentrasjoner av protein og lengre inkubasjonstider for tilstrekkelig metabolisme av substratet. Minst 20 % av substratet bør forbrukes i løpet av inkubasjonsperioden for å kunne skille en reell nedgang i substratkonsentrasjon pga metabolisme fra annen variabilitet [49]. I dette prosjektet var forbruket av quetiapin etter 60 minutters

inkubasjon med CYP3A5 i underkant av 20 %. I videre forsøk kan det derfor være gunstig å forhøye proteinkonsentrasjonen noe for å oppnå økt metabolisme. Høye proteinkonsentrasjoner vil imidlertid kunne medføre større risiko for uspesifikk binding til proteiner. Det er generelt anbefalt å benytte en proteinkonsentrasjon lavere enn 0,5 mg/ml for mikrosompreparater [49]. I denne studien var proteinkonsentrasjonen i alle mikrosompreparatene under 0,05 mg/ml ved inkubasjon, noe som antyder liten risiko for uspesifikk proteinbinding. Det er derfor mulig å øke proteinkonsentrasjonen noe i fremtidige forsøk uten vesentlig større risiko for uspesifikk binding til proteiner.

Ved substrattapmetoden benyttes ofte lengre inkubasjonstider i forhold til metabolittdannelsesmetoden. Dette vil kunne medføre degradering og inaktivering av enzympreparatet, blant annet på grunn av dannelse av reaktive oksygen forbindelser som hydrogenperoksid [50]. Det er derfor generelt anbefalt en inkubasjonstid på maksimum 30 minutter [49]. I denne studien ble det imidlertid benyttet en inkubasjonstid på 60 minutter. Det ble av den grunn undersøkt hvor godt den monofasiske nedbrytningsmodellen for substrattap (likning 4, punkt 1.5) beskrev nedgangen i quetiapinkonsentrasjon. Dette ble utført ved å kontrollere at log-transformering av substrattapkurvene ga lineære kurver. For alle mikrosompreparatene viste de log-transformerte kurvene lite tegn til avvik fra linearitet i hele tidsintervallet (data ikke vist). Dette tydet på at enzymaktiviteten var stabil opptil 60 minutter i det benyttede inkubasjonssystemet. I en studie av Jones *et al.* ble det vist redusert enzymaktivitet i mikrosomer innenfor 60 minutters inkubasjonstid, men dette var i stor grad avhengig av proteinkonsentrasjon. Den lave proteinkonsentrasjonen som ble benyttet i dette prosjektet kan derfor ha bidratt til tilsynelatende god stabilitet av enzympreparatet under hele inkubasjonsperioden på 60 minutter.

Ved metabolismestudier vil dannede metabolitter hope seg opp i inkubasjonsløsningen pga mangel på fase II enzymer og nødvendige kofaktorer [51]. Ved substrattapmetoden benyttes lave substratkonsentrasjoner, samtidig som at det skjer en relativt omfattende metabolisme i løpet av inkubasjonstiden. Disse forholdene medfører at konsentrasjonen av metabolitter i forhold til substrat er høyere ved substrattapmetoden enn ved metabolittdannelsesmetoden. Det er derfor større risiko for at metabolitter kan påvirke videre metabolisme av substratet ved substrattapmetoden enn ved metabolittdannelsesmetoden. Det er for eksempel mulig at dannede metabolitter kan

hemme videre metabolisme av substratet. En slik effekt ville trolig medført avvik fra linearitet i de log-transformerte substrattapkurvene. Siden disse kurvene var lineære, tyder dette på at opphopning av metabolitter ikke ga signifikant påvirkning av metabolisme av quetiapin i disse forsøkene.

En viktig forutsetning ved substrattapmetoden er anvendelse av lave substratkonsentrasjoner. For å sikre lineær metabolittdannelse må konsentrasjonen være godt under  $K_m$  for alle metabolittene. I forsøkene var beregnede verdier for  $CL_{int}$  høyest for de laveste inkubasjonskonsentrasjonene av quetiapin (1  $\mu\text{M}$  for CYP3A4 og 5  $\mu\text{M}$  for CYP3A5). Dette kan tyde på ikke-lineær metabolittdannelse ved de høyere substratkonsentrasjonene, og antyder at konsentrasjonen var nær  $K_m$ -verdien til enkelte av metabolittene. De laveste substratkonsentrasjonene var  $<10\%$  av  $K_m$ -verdiene for alle metabolittene estimert ved metabolittdannelsesmetoden. Siden disse konsentrasjonene var betraktelig lavere enn  $K_m$ , er det grunn til å anta lineær metabolittdannelse ved de laveste quetiapinkonsentrasjonene som ble benyttet i forsøkene med substrattapmetoden.

*In vitro* metabolismestudier benyttes for å kunne estimere metabolisme av et substrat *in vivo*. *In vitro-in vivo* ekstrapolering er imidlertid problematisk, og en rekke faktorer bidrar til dette. Inkubasjonsforhold som blant annet buffer, salter, temperatur og pH har vist å ha stor betydning for metabolisme [57,68]. I tillegg indikerer denne studien og flere andre studier at tilstedeværelsen av cytokrom  $b_5$  kan være av betydning, både for estimerte verdier av  $CL_{int}$  og for metabolittmønsteret. Ulikheter mellom modellsystemer vil kunne medføre forskjellige konklusjoner om metabolisme *in vivo*. Det er derfor viktig å studere betydningen av faktorer som inkubasjonsforhold og tilstedeværelse av cytokrom  $b_5$  for å avgjøre hvilket modellsystem som gir best ekstrapolering til *in vivo* forhold.

Tilstrekkelig løselighet av et substrat i inkubasjonssystemet som anvendes i metabolismestudier er av betydning for estimering av reproduerbare og korrekte verdier for enzymkinetiske parametere *in vitro*. Dette er også viktig ved ekstrapolering til *in vivo* forhold. Under forsøket med metabolittdannelsesmetoden ble det avdekket et problem med utilstrekkelig løselighet av quetiapin. Dette var lett synlig ved den høye substratkonsentrasjonen som ble benyttet, og hadde vært vanskeligere å oppdage ved

lavere konsentrasjoner av substratet. Siden redusert løselighet vil kunne medføre estimering av feilaktige enzymkinetiske parametere, bør kontroll av løselighet inngå i alle metabolismestudier. Ofte benyttes det organisk løsemiddel for å oppnå tilstrekkelig løselighet av et substrat i inkubasjonsløsningen. I denne studien ble det vist betydelig reduksjon i metabolittdannelse ved konsentrasjoner av metanol på  $\geq 3$  %. I tillegg ble dannelsen av de forskjellige metabolittene i ulik grad påvirket av metanol. Effekt av organiske løsemidler kan også variere avhengig av substratet [60]. Ved bruk av organisk løsemiddel bør det derfor undersøkes for hvert enkelt substrat i hvilken grad løsemiddelet påvirker metabolismen. I tillegg er det av betydning at dannelsen av ulike metabolitter kontrolleres.

### **Klinisk betydning**

Denne studien indikerer at CYP3A5 bidrar til metabolisme av quetiapin *in vitro*, og uttrykk av CYP3A5 kan derfor være av betydning for *in vivo* metabolisme av quetiapin. CYP3A5-polymorfisme kan muligens bidra til de store interindividuelle forskjellene i serumkonsentrasjon av legemidlet som er observert etter inntak av samme legemiddeldose. Pasienter som er homozygote eller heterozygote for villtypeallelet *CYP3A5\*1* og dermed uttrykker større mengder aktivt CYP3A5-enzym, kan ha økt clearance av quetiapin. Denne pasientgruppen vil i så fall trenge høyere doser av quetiapin for å oppnå tilstrekkelig serumkonsentrasjon sammenliknet med pasienter som ikke uttrykker CYP3A5.

Ulike metabolitter dannet av det samme legemidlet kan ha forskjellig effekt- og bivirkningsprofil. Det er derfor mulig at ulikt metabolittmønster via CYP3A4 og CYP3A5 kan gi forskjeller i effekt og/eller bivirkninger av legemidler avhengig av om pasientene uttrykker CYP3A5 eller ikke. Spesielt kan dette være av betydning for legemidler som omdannes til aktive metabolitter, og hvor serumkonsentrasjonen av disse metabolittene er betydelig. N-dealkylquetiapin er den viktigste aktive metabolitten av quetiapin, og det er nylig vist at denne metabolitten har antidepressiv effekt [40]. Serumkonsentrasjonen av N-dealkylquetiapin varierer betydelig mellom ulike individer, og median serumkonsentrasjon er vist å være 1,5 ganger høyere for N-dealkylquetiapin enn for quetiapin (upubliserte data, Psykofarmakologisk avdeling, Diakonhjemmet Sykehus). I denne studien ble det dannet dobbelt så mye N-dealkylquetiapin via CYP3A4 i forhold til via CYP3A5. Det kan derfor spekuleres i om pasienter som

uttrykker CYP3A5 har lavere serumkonsentrasjon av denne aktive metabolitten enn pasienter som ikke uttrykker CYP3A5. Dette vil i så fall kunne medføre redusert antidepressiv effekt hos denne pasientgruppen. Sammenlikning av dannelse av N-dealkylquetiapin via CYP3A4 og CYP3A5 hvor begge mikrosompreparatene var transfektert med cytokrom b<sub>5</sub> viste imidlertid vesentlig mindre forskjell. Hvorvidt det er noen reelle forskjeller i dannelse av N-dealkylquetiapin via CYP3A4 og CYP3A5 er dermed uvisst, og må studeres videre.

Den tydeligste forskjellen i metabolittmønster for CYP3A4 og CYP3A5 i denne studien var for dannelsen av O-dealkylquetiapin. Det ble vist betydelig høyere dannelse av denne metabolitten via CYP3A5 i forhold til via CYP3A4, både i modellsystemer med og uten cytokrom b<sub>5</sub>. Lite er imidlertid kjent om hvilke effekter og/eller bivirkninger denne metabolitten kan gi. I tillegg er serumkonsentrasjon av O-dealkylquetiapin uvisst. Hypotetisk sett kan serumkonsentrasjon av metabolitten være høyere hos pasienter som uttrykker CYP3A5.

### **Videre studier**

For å bekrefte betydningen av CYP3A5 for metabolisme av quetiapin *in vitro*, bør forsøkene repeteres. Denne *in vitro* studien gir en indikasjon på betydningen av CYP3A5 for metabolisme av quetiapin, men kliniske studier er nødvendig for å slå fast og kvantifisere bidraget fra CYP3A5 til metabolisme av quetiapin *in vivo*. Betydningen av CYP3A5 for metabolisme av quetiapin kan undersøkes ved å måle serumkonsentrasjon av quetiapin og metabolitter hos pasienter som genotypes for CYP3A5. Dette vil kunne gi svar på om genetisk variasjon i CYP3A5 er av betydning for serumkonsentrasjon av både quetiapin og metabolitter.

## 5 KONKLUSJON

Studien indikerer at CYP3A5 er av betydning for metabolisme av quetiapin *in vitro*. CYP3A5-polymorfisme kan derfor være en faktor som bidrar til de store interindividuelle forskjellene i serumkonsentrasjon av quetiapin etter administrasjon av samme dose legemiddel som er observert. I tillegg antyder studien at metabolittmønsteret for quetiapin er forskjellig ved metabolisme via CYP3A4 og CYP3A5. Dette kan medføre forskjeller i effekt og/eller bivirkninger av legemidlet avhengig av om pasientene uttrykker CYP3A5 eller ikke.

Studien indikerte også at tilstedeværelse av cytokrom b<sub>5</sub> i de benyttede modellsystemene ga høyere CL<sub>int</sub>-verdier for CYP3A5, men ikke for CYP3A4. Cytokrom b<sub>5</sub> påvirket i tillegg metabolittmønsteret for quetiapin. Nærvær av cytokrom b<sub>5</sub> i modellsystem kan derfor være av betydning ved *in vitro* metabolismestudier av quetiapin, og dette bør vurderes ved ekstrapolering til *in vivo* forhold.

**REFERANSER**

1. Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M. and Moore, P.K. (2003) *Pharmacology*. Churchill Livingstone, Edinburgh.
2. Meisel, C., Gerloff, T., Kirchheiner, J., Mrozikiewicz, P.M., Niewinski, P., Brockmoller, J., *et al.* (2003) Implications of pharmacogenetics for individualizing drug treatment and for study design. *Journal of Molecular Medicine-Jmm*, 81, 154-167.
3. Poolsup, N., Po, A.L.W. and Knight, T.L. (2000) Pharmacogenetics and psychopharmacotherapy. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 25, 197-220.
4. Chang, G.W.M. and Kam, P.C.A. (1999) The physiological and pharmacological roles of cytochrome P450 isoenzymes. *Anaesthesia*, 54, 42-50.
5. Nebert, D.W. and Russell, D.W. (2002) Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet*, 360, 1155-1162.
6. Gonzalez, F.J. and Tukey, R.H. (2006) Drug metabolism. In Goodman, L.S., Gilman, A., Brunton, L.L., Lazo, J.S. and Parker, K.L. (eds.), *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. McGraw-Hill, New York, pp. 71-91.
7. Lewis, D.F.V. (2004) 57 varieties: the human cytochromes P450. *Pharmacogenomics*, 5, 305-318.
8. Nelson, D.R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J.J., Feyereisen, R., Waxman, D.J., *et al.* (1996) P450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*, 6, 1-42.
9. Ingelman-Sundberg, M. (2004) Human drug metabolising cytochrome P450 enzymes: properties and polymorphisms. *Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology*, 369, 89-104.
10. Danielson, P.B. (2002) The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. *Current Drug Metabolism*, 3, 561-597.
11. Porter, T.D. (2002) The roles of cytochrome b(5) in cytochrome P450 reactions. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 16, 311-316.
12. Schenkman, J.B. and Jansson, I. (2003) The many roles of cytochrome b5. *Pharmacology & Therapeutics*, 97, 139-152.
13. Ma, J.D., Nafziger, A.N. and Bertino, J.S. (2004) Genetic polymorphisms of cytochrome P450 enzymes and the effect on interindividual, pharmacokinetic variability in extensive metabolizers. *Journal of Clinical Pharmacology*, 44, 447-456.
14. Burk, O. and Wojnowski, L. (2004) Cytochrome P450 3A and their regulation. *Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology*, 369, 105-124.
15. Lamba, J.K., Lin, Y.S., Schuetz, E.G. and Thummel, K.E. (2002) Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 1271-1294.
16. Daly, A.K. (2006) Significance of the minor cytochrome P450 3A isoforms. *Clinical Pharmacokinetics*, 45, 13-31.
17. Guengerich, F.P. (1999) Cytochrome P-450 3A4: regulation and role in drug metabolism. *Annual Review of Pharmacology & Toxicology*, 39, 1-17.
18. Zhang, Y.C. and Benet, L.Z. (2001) The gut as a barrier to drug absorption - Combined role of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein. *Clinical Pharmacokinetics*, 40, 159-168.



19. Dennison, J.B., Kulanthaivel, P., Barbuch, R.J., Renbarger, J.L., Ehlhardt, W.J. and Hall, S.D. (2006) Selective metabolism of vincristine in vitro by CYP3A5. *Drug Metabolism & Disposition*, 34, 1317-1327.
20. Kuehl, P., Zhang, J., Lin, Y., Lamba, J., Assem, M., Schuetz, J., *et al.* (2001) Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nature Genetics*, 27, 383-391.
21. Lin, J.H. and Lu, A.Y. (2001) Interindividual variability in inhibition and induction of cytochrome P450 enzymes. *Annual Review of Pharmacology & Toxicology*, 41, 535-567.
22. Hustert, E., Haberl, M., Burk, O., Wolbold, R., He, Y.Q., Klein, K., *et al.* (2001) The genetic determinants of the CYP3A5 polymorphism. *Pharmacogenetics*, 11, 773-779.
23. Wojnowski, L. and Kamdem, L.K. (2006) Clinical implications of CYP3A polymorphisms. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 2, 171-182.
24. Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee. *CYP3A4* allele nomenclature. <http://www.cypalleles.ki.se/cyp3a4.htm> (Siter 11.10.2007).
25. Xie, H.G., Wood, A.J.J., Kim, R.B., Stein, C.M. and Wilkinson, G.R. (2004) Genetic variability in CYP3A5 and its possible consequences. *Pharmacogenomics*, 5, 243-272.
26. Westlind-Johnsson, A., Malmebo, S., Johansson, A., Otter, C., Andersson, T.B., Johansson, I., *et al.* (2003) Comparative analysis of CYP3A expression in human liver suggests only a minor role for CYP3A5 in drug metabolism. *Drug Metabolism & Disposition*, 31, 755-761.
27. Goto, M., Masuda, S., Kiuchi, T., Ogura, Y., Oike, F., Okuda, M., *et al.* (2004) CYP3A5\*1-carrying graft liver reduces the concentration/oral dose ratio of tacrolimus in recipients of living-donor liver transplantation. *Pharmacogenetics*, 14, 471-478.
28. Ferrareso, M., Tirelli, A., Ghio, L., Grillo, P., Martina, V., Torresani, E., *et al.* (2007) Influence of the Cyp3a5 genotype on tacrolimus pharmacokinetics and pharmacodynamics in young kidney transplant recipients. *Pediatric Transplantation*, 11, 296-300.
29. Hesselink, D.A., van Schaik, R.H.N., van der Heiden, I.P., van der Werf, M., Gregoor, P., Lindemans, J., *et al.* (2003) Genetic polymorphisms of the CYP3A4, CYP3A5, and MDR-1 genes and pharmacokinetics of the calcineurin inhibitors cyclosporine and tacrolimus. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 74, 245-254.
30. Zheng, H.X., Webber, S., Zeevi, A., Schuetz, E., Zhang, J., Bowman, P., *et al.* (2003) Tacrolimus dosing in pediatric heart transplant patients is related to CYP3A5 and MDR1 gene polymorphisms. *American Journal of Transplantation*, 3, 477-483.
31. Kim, K.A., Park, P.W., Lee, O.J., Kang, D.K. and Park, J.Y. (2007) Effect of polymorphic CYP3A5 genotype on the single-dose simvastatin pharmacokinetics in healthy subjects. *Journal of Clinical Pharmacology*, 47, 87-93.
32. Kivisto, K.T., Niemi, M., Schaeffeler, E., Pitkala, K., Tilvis, R.T., Fromm, M.F., *et al.* (2004) Lipid-lowering response to statins is affected by CYP3A5 polymorphism. *Pharmacogenetics*, 14, 523-525.
33. DeVane, C.L. and Nemeroff, C.B. (2001) Clinical pharmacokinetics of quetiapine: an atypical antipsychotic. *Clinical Pharmacokinetics*, 40, 509-522.
34. Felleskatalogen (2007).

35. Cheer, S.M. and Wagstaff, A.J. (2004) Quetiapine - A review of its use in the management of schizophrenia. *Cns Drugs*, 18, 173-199.
36. Grimm, S.W., Stams, K.R. and Bui, K. (1997) In vitro prediction of potential metabolic drug interactions for Seroquel. *Schizophrenia Research*, 24, 198-198.
37. Grimm, S.W., Richtand, N.M., Winter, H.R., Stams, K.R. and Reece, S.B. (2006) Effects of cytochrome P450 3A modulators ketoconazole and carbamazepine on quetiapine pharmacokinetics. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 61, 58-69.
38. Spina, E. and de Leon, J. (2007) Metabolic drug interactions with newer antipsychotics: A comparative review. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 100, 4-22.
39. Nemeroff, C.B., Kinkead, B. and Goldstein, J. (2002) Quetiapine: preclinical studies, pharmacokinetics, drug interactions, and dosing. *Journal of Clinical Psychiatry*, 63 Suppl 13, 5-11.
40. Goldstein, J.M., Christoph, G., Grimm, S., Liu, J.W., Widzowski, D. and M., B. (2007) Unique mechanism of action for the antidepressant properties of the atypical antipsychotic quetiapine. *The Society of Biological Psychiatry's 62nd Annual Convention & Scientific Program*, San Diego, CA, USA.
41. McIntyre, R.S., Soczynska, J.K., Woldeyohannes, H.O., Alsuwaidan, M. and Konarski, J.Z. (2007) A preclinical and clinical rationale for quetiapine in mood syndromes. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 8, 1211-1219.
42. Mauri, M.C., Volonteri, L.S., Colasanti, A., Fiorentini, A., De Gaspari, I.F. and Bareggi, S.R. (2007) Clinical pharmacokinetics of atypical antipsychotics - A critical review of the relationship between plasma concentrations and clinical response. *Clinical Pharmacokinetics*, 46, 359-388.
43. Houston, J.B. and Kenworthy, K.E. (2000) In vitro-in vivo scaling of CYP kinetic data not consistent with the classical Michaelis-Menten model. *Drug Metabolism and Disposition*, 28, 246-254.
44. Tracy, T.S. and Hummel, M.A. (2004) Modeling kinetic data from in vitro drug metabolism enzyme experiments. *Drug Metabolism Reviews*, 36, 231-242.
45. Houston, J.B. and Galetin, A. (2005) Modelling atypical CYP3A4 kinetics: principles and pragmatism. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 433, 351-360.
46. Hutzler, J.M. and Tracy, T.S. (2002) Atypical kinetic profiles in drug metabolism reactions. *Drug Metabolism and Disposition*, 30, 355-362.
47. Buxton, I.L.O. (2006) Pharmacokinetics and pharmacodynamics (the dynamics of drug absorption, distribution, action and elimination). In Goodman, L.S., Gilman, A., Brunton, L.L., Lazo, J.S. and Parker, K.L. (eds.), *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. McGraw-Hill, New York, pp. 12-22.
48. Baranczewski, P., Stanczak, A., Sundberg, K., Svensson, R., Wallin, A., Jansson, J., *et al.* (2006) Introduction to in vitro estimation of metabolic stability and drug interactions of new chemical entities in drug discovery and development. *Pharmacological Reports*, 58, 453-472.
49. Jones, H.M. and Houston, J.B. (2004) Substrate depletion approach for determining in vitro metabolic clearance: Time dependencies in hepatocyte and microsomal incubations. *Drug Metabolism and Disposition*, 32, 973-982.
50. Tingle, M.D. and Helsby, N.A. (2006) Can in vitro drug metabolism studies with human tissue replace in vivo animal studies? *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 21, 184-190.

51. Jones, H.M., Nicholls, G. and Houston, J.B. (2005) Impact of end-product inhibition on the determination of in vitro metabolic clearance. *Xenobiotica*, 35, 439-454.
52. Brandon, E.F.A., Raap, C.D., Meijerman, I., Beijnen, J.H. and Schellens, J.H.M. (2003) An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 189, 233-246.
53. Donato, M.T. and Castell, J.V. (2003) Strategies and molecular probes to investigate the role of cytochrome P450 in drug metabolism: focus on in vitro studies. *Clinical Pharmacokinetics*, 42, 153-178.
54. Yamaori, S., Yamazaki, H., Suzuki, A., Yamada, A., Tani, H., Kamidate, T., *et al.* (2003) 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*, 66, 2333-2340.
55. Klees, T.M., Sheffels, P., Dale, O. and Kharasch, E.D. (2005) Metabolism of alfentanil by cytochrome p4503a (cyp3a) enzymes. *Drug Metabolism & Disposition*, 33, 303-311.
56. Venkatakrisnan, K., von Moltke, L.L. and Greenblatt, D.J. (2001) Human drug metabolism and the cytochromes P450: Application and relevance of in vitro models. *Journal of Clinical Pharmacology*, 41, 1149-1179.
57. Hermann, M., Kase, E.T., Molden, E. and Christensen, H. (2006) Evaluation of microsomal incubation conditions on CYP3A4-mediated metabolism of cyclosporine A by a statistical experimental design. *Current Drug Metabolism*, 7, 265-271.
58. U.S. Department of Health and Human Services, F.D.A., Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM) (2001) Bioanalytical Method Validation.
59. Australian Government, Department of Health and Ageing. Seroquel Product Information. <http://www.pbs.gov.au/pi/appseroq10807.pdf> (Siter 26.11.2007).
60. Iwase, M., Kurata, N., Ehana, R., Nishimura, Y., Masamoto, T. and Yasuhara, H. (2006) Evaluation of the effects of hydrophilic organic solvents on CYP3A-mediated drug-drug interaction in vitro. *Human & Experimental Toxicology*, 25, 715-721.
61. Busby, W.F., Ackermann, J.M. and Crespi, C.L. (1999) Effect of methanol, ethanol, dimethyl sulfoxide, and acetonitrile on in vitro activities of cDNA-expressed human cytochromes P-450. *Drug Metabolism and Disposition*, 27, 246-249.
62. Chauret, N., Gauthier, A. and Nicoll-Griffith, D.A. (1998) Effect of common organic solvents on in vitro cytochrome P450-mediated metabolic activities in human liver microsomes. *Drug Metabolism and Disposition*, 26, 1-4.
63. Lin, S.-N., Chang, Y., Moody, D.E. and Foltz, R.L. (2004) A liquid chromatographic-electrospray-tandem mass spectrometric method for quantitation of quetiapine in human plasma and liver microsomes: application to study in vitro metabolism. *Journal of Analytical Toxicology*, 28, 443-448.
64. Huang, W., Lin, Y.S., McConn, D.J., 2nd, Calamia, J.C., Totah, R.A., Isoherranen, N., *et al.* (2004) Evidence of significant contribution from CYP3A5 to hepatic drug metabolism. *Drug Metabolism & Disposition*, 32, 1434-1445.
65. Lee, A.J., Kosh, J.W., Conney, A.H. and Zhu, B.T. (2001) Characterization of the NADPH-dependent metabolism of 17 beta-estradiol to multiple metabolites

- by human liver microsomes and selectively expressed human cytochrome p450 3A4 and 3A5. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 298, 420-432.
66. Lee, A.J., Mills, L.H., Kosh, J.W., Conney, A.H. and Zhu, B.T. (2002) NADPH-dependent metabolism of estrone by human liver microsomes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 300, 838-849.
67. Hasselstrøm, J. and Linnet, K. (2006) In vitro studies on quetiapine metabolism using the substrate depletion approach with focus on drug-drug interactions. *Drug Metabolism & Drug Interactions*, 21, 187-211.
68. Bournique, B., Petry, M. and Gonsset, G. (1999) Usefulness of statistic experimental designs in enzymology: Example with recombinant hCYP3A4 and 1A2. *Analytical Biochemistry*, 276, 18-26.