

Aus dem Zentrum Pharmakologie und Toxikologie
der Medizinischen Hochschule Hannover
Institut für Allgemeine Pharmakologie
(Direktor: Prof. Dr. med. K.-Fr. Sewing)

**Pharmaka-Interaktionen der HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren Lovastatin und
Pravastatin - Hemmung des Metabolismus *in vitro* in der Leber und im Dünndarm**

Dem Fachbereich Chemie
der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades Doktor der Naturwissenschaft

- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biol. Wolfgang Jacobsen
geboren am 30.01.1967 in Reinbek

1998

Referent: Priv.-Doz. Dr. W. Müller

Korreferent: Prof. Dr. K.-Fr. Sewing

Tag der Promotion: 15.01.1998

Datum der Veröffentlichung: 03.02.1998

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am **Institut für Allgemeine Pharmakologie** der Medizinischen Hochschule Hannover angefertigt. Meinen Dank möchte ich folgenden Personen aussprechen:

Herrn Prof. Dr. **K.-Fr. Sewing** danke ich für die Überlassung des Themas, seine stete Diskussionsbereitschaft und die großzügige Unterstützung dieser Arbeit.

Bei Herrn PD Dr. **W. Müller** bedanke ich mich für sein starkes Interesse und die Betreuung der Arbeit von Seiten des Fachbereichs Biochemie.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. **U. Christians**. Trotz der Entfernung San Francisco-Hannover waren eine hervorragende Unterstützung und ein guter wissenschaftlicher Austausch gegeben.

Für die Unterstützung in Hannover bedanke ich mich bei Frau Dr. **G. Kirchner**.

Frau **Ina Hackbarth** (mein besonderer Dank für ihre Unterstützung), Frau **Annette Linck**, Frau Dipl. Chem. **Katrin Hallensleben** und Herrn Dipl. Chem. **Christian Vidal** danke ich für die herzliche Arbeitsatmosphäre innerhalb unserer Arbeitsgruppe.

Auch den restlichen Kollegen und Kolleginnen am Institut für Allgemeine Pharmakologie sei an dieser Stelle für die nette Arbeitsatmosphäre gedankt: Frau **R. Scheller**, Frau **A. Stanke**, Frau **P. Kilian**, Frau **S. Netz-Piepenbrink**, Frau **H. Hannemann**, Frau **U. Staar**, Frau **A. Bauer**, Frau **R. Schottmann**, Frau **K. Vasic**, Frau **E. Wegerich**, Frau Dipl. Biol. **B. Obst**, Frau **B. Sebil**, Herrn Dr. **H. K. Heim**, Herrn Prof. Dr. **W. Beil**, Herrn Dr. **A. Bertram-Drogatz** sowie Herrn Dipl. Biol. **H. Esselmann** und Herrn Dipl. Biol. **M. Piller**.

Für die herzliche Unterstützung außerhalb des Labors bedanke ich mich ganz besonders bei meiner Freundin **Karin Gebken**.

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AM1	Hydroxymetabolit von Ciclosporin (Hydroxylierung an Aminosäure 1)
AM9	Hydroxymetabolit von Ciclosporin (Hydroxylierung an Aminosäure 9)
API	atmospheric pressure ionization
AUC	area under the curve
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
CL _{int}	intrinsische Clearance
CYP	Cytochrom P-450
DEAS	Dehydro- <i>Epi</i> -Androsteron
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
EM	electron multiplier
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	electrospray ionization
EST	Estron
g	Gramm
g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
h	Stunde
HED	high energy dynode
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzym A
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HW	Hanes-Woolf
IC ₅₀	Konzentration, bei der die Metabolitenbildung um 50 % gehemmt wird.
K _i	Inhibitionskonstante
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
LB	Lineweaver-Burk
LC-MS	Liquid Chromatography gekoppelt mit MS (≅ HPLC-MS)
m/z	Verhältnis Masse zu Ladung
MAK	monoklonaler Antikörper

mg	Milligramm
min	Minute
MOS	Dimethyloctyl-Silica
MS	Massenspektrometrie
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduziert)
nm	Nanometer
n.n.	nicht nachweisbar
n.b.	nicht bestimmt
ODS	Octadecyl-Silica
PAPS	Adenosin 3'-Phosphat 5'-Phosphosulfat
2-POH	2-Propanol
S	Substrat
SD	Standardabweichung
SIM	selected ion monitoring
SKIM	Skimmer
t	Zeit
T	Temperatur
TAO	Troleandomycin
U	Unit
UV	Ultraviolett
v	Geschwindigkeit
V cap	Kapillaren-Eingangsspannung
V cyl	Zylinder-Elektroden-Spannung
V end	Endplatten-Spannung
v/v	Volumen pro Volumen
V _{max.}	Maximalgeschwindigkeit

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	1
II.	Material und Methoden	8
1.	Chemikalien und Enzyme	9
2.	Herkunft der verwendeten Gewebe	9
3.	Isolierung der Enterozyten	11
4.	Isolierung von Mikrosomen	12
5.	Proteinbestimmung	14
6.	CYP-Bestimmung	14
7.	Mikrosomen-Inkubationsansätze	15
7.1	Metabolisierung von Lovastatin durch Mikrosomen	15
7.2	Metabolisierung von Pravastatin durch Mikrosomen	16
7.3	Metabolisierung von Pravastatin durch rekombinantes CYP 3A4 und CYP 3A5	17
7.4	Ciclosporin-Hydroxylierung	17
7.5	Testosteron-6'β-Hydroxylierung	17
8.	Cytosol-Inkubationsansätze	18
8.1	Metabolisierung von Pravastatin durch Enzyme des Cytosols	18
9.	Aufreinigung / Aufkonzentrierung der Reaktionsansätze	18
9.1	Flüssig-Flüssig-Extraktion (Lovastatin)	18
9.2	Festphasenextraktion (Pravastatin)	20
9.3	Bestimmung der Wiederfindungsraten von Mevastatin sowie Lovastatin und seiner Metabolite bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion	21
9.4	Bestimmung der Wiederfindungsraten von Pravastatin und seiner Metabolite bei der Festphasenextraktion	22
10.	Überprüfung der Stabilität von Lovastatin und Pravastatin sowie deren Metabolite	22
11.	HPLC-Verfahren	23
11.1	HPLC-Analytik von Lovastatin und seiner Metabolite	23
11.2	HPLC-Analytik von Pravastatin	24

11.2.1	HPLC-Analytik von Pravastatin und 3'α, 5'β, 6'β-Trihydroxy-Pravastatin	24
11.2.2	HPLC-Analytik von Pravastatin (Stabilitätsprüfung)	25
11.3	HPLC-Analytik von Ciclosporin und seiner Metabolite	26
11.4	HPLC-Analytik von Testosteron und 6'β-Hydroxy-Testosteron	27
12.	Massenspektrometrie der Statine (LC-MS)	28
12.1	Justierung des Massenspektrometers und des API-Elektrospray- Interfaces	29
12.2	Verbesserung der Pravastatinsignalintensität bei der Massenspektrometrie	31
12.3	LC-MS-Analytik von Lovastatin und seiner Metabolite	31
12.4	LC-MS-Analytik von Pravastatin	32
12.4.1	LC-MS-Analytik von Pravastatin und seines Hauptmetaboliten 3'α, 5'β, 6'β-Trihydroxy-Pravastatin	32
12.4.2	LC-MS-Analytik von Hydroxy-Pravastatin und 3'α, 5'β, 6'β-Trihydroxy-Pravastatin	32
12.4.3	LC-MS-Analytik von Pravastatin und 3'α- <i>Iso</i> -Pravastatin	34
13.	Bestimmung der Interassay-Variabilität	35
14.	Bestimmung der enzymkinetischen Parameter K_m und V_{max}.	35
14.1	Bestimmung der enzymkinetischen Parameter K_m und V_{max} . für die Metabolisierung von Lovastatin	35
14.2	Bestimmung der enzymkinetischen Parameter K_m und V_{max} . für die Metabolisierung von Pravastatin	36
15.	Beinflussung der Metabolisierung von Pravastatin und Lovastatin <i>in vitro</i>	36
15.1	Einfluß von organischen Lösungsmitteln auf die CYP 3A-Aktivität	36
15.2	Hemmung der Lovastatinmetabolisierung durch spezifische CYP 3A-Inhibitoren und -Substrate	37
15.3	Hemmung der Pravastatinmetabolisierung durch spezifische CYP -Inhibitoren und -Substrate	37
15.4	Hemmung des Pravastatin-Phase-II-Metabolismus <i>in vitro</i>	38
15.5	Hemmung der Ciclosporinmetabolisierung durch Lovastatin und Pravastatin	38

16.	Bestimmung der K_i-Werte und der Art der Interaktionen	39
17.	Immunhemmung der Statinmetabolisierung	40
17.1	Hemmung der Metabolisierung von Lovastatin <i>in vitro</i> durch MAK gegen CYP 3A	40
17.2	Hemmung der Metabolisierung von Pravastatin <i>in vitro</i> durch MAK gegen CYP 3A	40
III.	Ergebnisse	41
1.	Verbesserung der CYP 3A-Ausbeute bei der Isolierung von Mikrosomen aus Darm	41
1.1	Untersuchung zur Isolierung von Enterozyten aus Schweinedarm	41
1.2	Verbesserung des Zellaufschlusses mittels Ultraschall	42
1.3	Untersuchung zur Ultrazentrifugation von Darmmikrosomen	43
2.	Stabilität der Lovastatinmetabolite und des internen Standards Mevastatin	44
3.	Metabolisierung von Lovastatin durch Leber- und Dünndarmmikrosomen des Menschen und des Schweins	45
4.	Linearität der Reaktionsgeschwindigkeit bei Inkubationsansätzen mit Lovastatin	50
5.	Wiederfindungsraten von Mevastatin sowie Lovastatin und seiner Metabolite bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion	51
6.	Reproduzierbarkeit der Bestimmung der Metabolitenkonzentrationen in Reaktionsansätzen mit Lovastatin	52
7.	HPLC-Kalibriergerade mit Lovastatin als Standard	52
8.	Bestimmung der apparenten enzymkinetischen Parameter V_{max} und K_m für die Metabolisierung von Lovastatin	53
9.	Beeinflussung der Metabolisierung des CYP 3A-Substrats Lovastatin <i>in vitro</i>	60
9.1	Einfluß von organischen Lösungsmitteln auf die CYP 3A-Aktivität	60
9.2	Hemmung der Lovastatinmetabolisierung durch die CYP 3A- Substrate Ciclosporin und Troleandomycin sowie den CYP 3A-Inhibitor Ketoconazol	61

9.3	Immunitinhibition der Lovastatinmetabolisierung in menschlichen Lebermikrosomen	65
10.	Hemmung der Ciclosporinmetabolisierung durch Lovastatin	65
11.	Bestimmung des Hemmtyps und der K_i-Werte von Pharmaka, die mit der Metabolisierung von Lovastatin <i>in vitro</i> in der menschlichen Leber und im Dünndarm des Schweins interagieren	67
12.	Verbesserung der Pravastatinsignalintensität bei der Massenspektrometrie	77
13.	Stabilität von Pravastatin und seiner Metabolite	81
14.	Metabolisierung von Pravastatin <i>in vitro</i>	82
14.1	Metabolisierung von Pravastatin durch Leber- und Dünndarmmikrosomen des Menschen	82
14.2	Metabolisierung von Pravastatin durch Leber- und Dünndarmcytosol des Menschen	86
15.	Linearität der Reaktionsgeschwindigkeit bei Inkubationsansätzen mit Pravastatin	88
16.	Wiederfindungsraten von Pravastatin und seiner Metabolite bei der Festphasenextraktion	89
17.	Reproduzierbarkeit der Bestimmung der Metabolitenkonzentrationen in Reaktionsansätzen mit Pravastatin	90
18.	LC-MS-Kalibriergeraden mit Pravastatin als Standard	91
19.	Bestimmung der apparenten enzymkinetischen Parameter V_{max} und K_m für die Metabolisierung von Pravastatin	93
20.	Hemmung der Metabolisierung von Pravastatin <i>in vitro</i>	98
20.1	Hemmung der Pravastatinmetabolisierung durch spezifische CYP-Inhibitoren und -Substrate	97
20.2	Immunitinhibition der Pravastatinmetabolisierung in menschlichen Lebermikrosomen	104
20.3	Hemmung des Phase-II-Metabolismus von Pravastatin durch Estron und Dehydro- <i>Epi</i> -Androsteron	103
21.	Hemmung der Ciclosporinmetabolisierung durch Pravastatin	104

22. Metabolisierung von Pravastatin durch menschliches rekombinantes CYP 3A4 und CYP 3A5	105
IV. Diskussion	108
V. Zusammenfassung	121
VI. Literaturverzeichnis	124

Kapitel I - Einleitung

Die koronare Herzkrankheit ist mit einer Mortalität von 107 pro 100000 Einwohner (Deutschland 1995) eine der häufigsten Todesursachen in Deutschland und den anderen westlichen Industrieländern. Neben den Risikofaktoren Nikotinmißbrauch oder Bluthochdruck konnte der Zusammenhang zwischen Hypercholesterolämie als Risikofaktor und der koronaren Herzkrankheit eindeutig bewiesen werden (Castelli *et al.*, 1988; Ludwig, 1993).

Zwei Drittel des gesamten im Organismus vorkommenden Cholesterols stammen aus der endogenen *de novo*-Synthese; wobei der Hauptsyntheseort bei Säugern die Leber ist. Die Hemmung der Cholesterolsynthese stellt damit einen therapeutisch wichtigen Angriffspunkt dar. Die neue Generation der lipidsenkenden Pharmaka hemmt kompetitiv das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Cholesterolsynthese, die HMG-CoA-Reduktase. Eine vereinfachte schematische Darstellung der Cholesterolsynthese sowie die Hemmung der Einstiegsreaktion durch Statine sind in Abbildung 1 dargestellt (Bradford *et al.*, 1991; Henwood und Heel, 1988; Pan *et al.*, 1989; Hummelsiep, 1995; Forth, 1992).

Lovastatin (Mevinacor[®]) und Pravastatin (z. B. Pravasin[®]) gehören zu der Gruppe der HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren. Beide Wirkstoffe sind Weiterentwicklungen von Mevastatin, der ersten HMG-CoA-Reduktase hemmenden Substanz. Die Strukturformeln der drei Statine sind in Abbildung 2 dargestellt.

Eine der wichtigsten Nebenwirkungen unter Statintherapie sind Myopathien (Bradford *et al.*, 1991). Diese konnten nach monatelanger Lovastatingabe in 0,1-0,2 % der Fälle in Rhabdomyolysen (= Auflösung quergestreifter Muskelfasern) übergehen (Tobert *et al.*, 1990; Meier *et al.*, 1995). Die Häufigkeit solcher rhabdomyolytischer Komplikationen nimmt massiv zu, wenn Lovastatin gleichzeitig mit Arzneimitteln wie Ciclosporin, Itraconazol oder Erythromycin verabreicht wird (Alejandro *et al.*, 1994; East *et al.*, 1988; Lees und Lees, 1995; Norman *et al.*, 1988; Spach *et al.*, 1991; Velosa *et al.*, 1992): Bei gleichzeitiger Gabe des Immunsuppressivums Ciclosporin und Lovastatin wurden innerhalb eines Jahres bei 30 % der so behandelten Patienten Rhabdomyolysen diagnostiziert (Tobert, 1988).

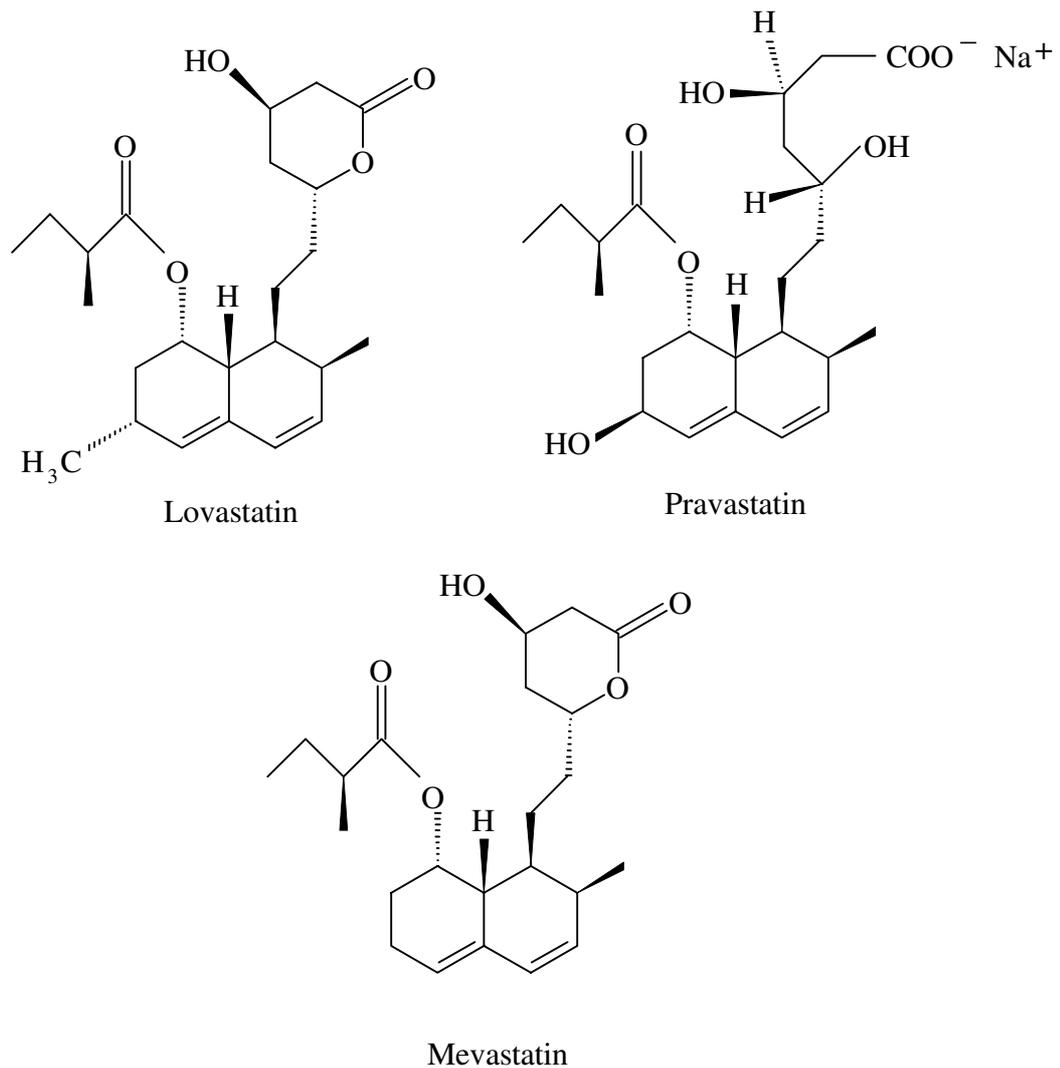


Abb. 2: Strukturformeln der Statine

Neben der enzymatischen Öffnung des Lactonringes zur wirksamen Dihydroxysäure wird **Lovastatin** in der Leber durch CYP-Enzyme der Subfamilie 3A zu drei aktiven Metaboliten oxidiert: 6 β -Hydroxy-Lovastatin (Hauptmetabolit), 6'-Exomethylen-Lovastatin und in geringem Umfang 3''-Hydroxy-Lovastatin (siehe Abbildung 3; Halpin *et al.*, 1993; Vyas *et al.*, 1990 a,b,c; Wang *et al.*, 1991; Greenspan *et al.*, 1988). Die Eliminierung erfolgt zu 70 % über die Galle, wobei nur Metabolite als ringgeöffnete Dihydroxysäure und kein Lovastatin detektiert werden konnten (Hsu *et al.*, 1995; Halpin *et al.*, 1993).

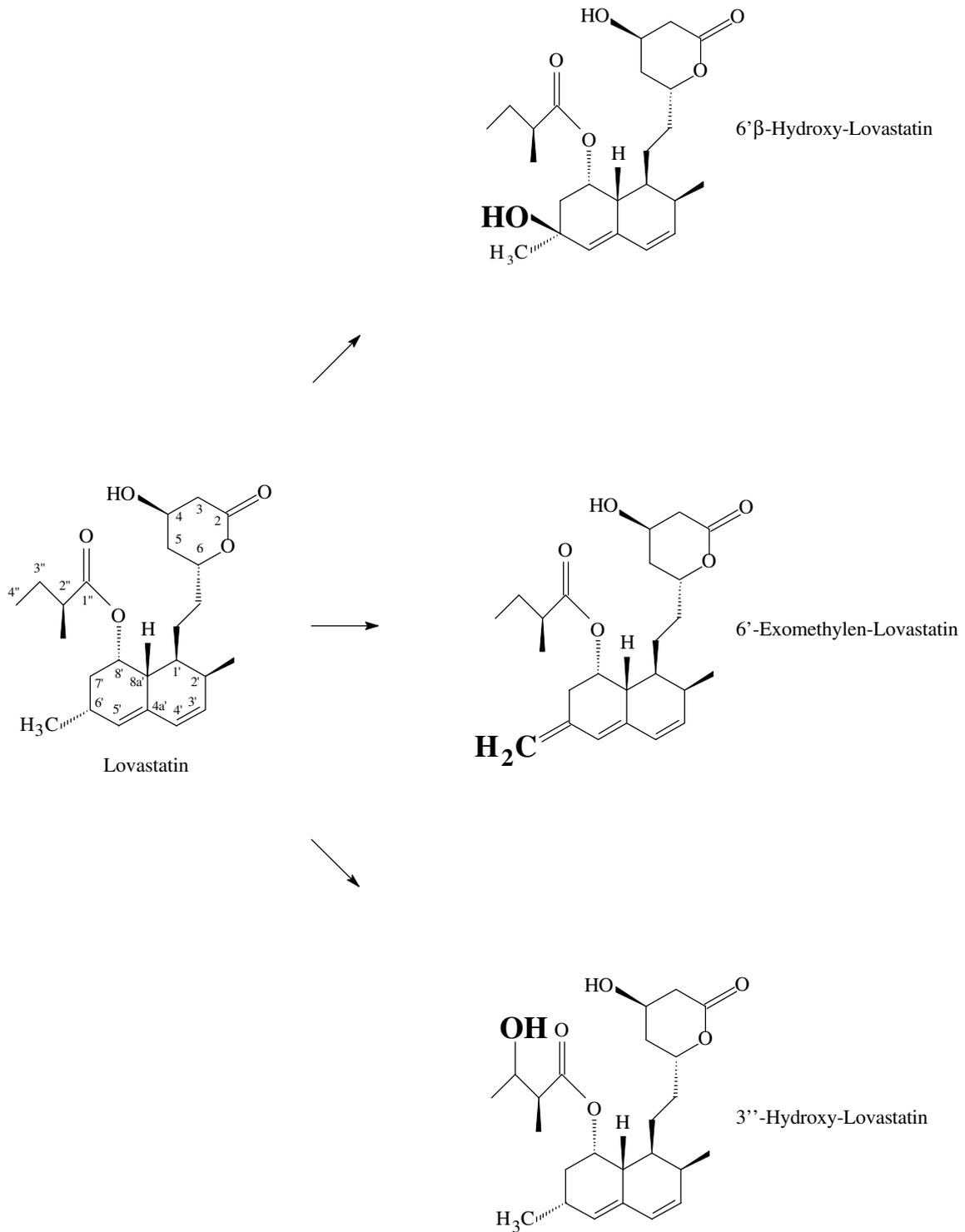


Abb. 3: Biotransformation von Lovastatin durch CYP-Enzyme des Menschen

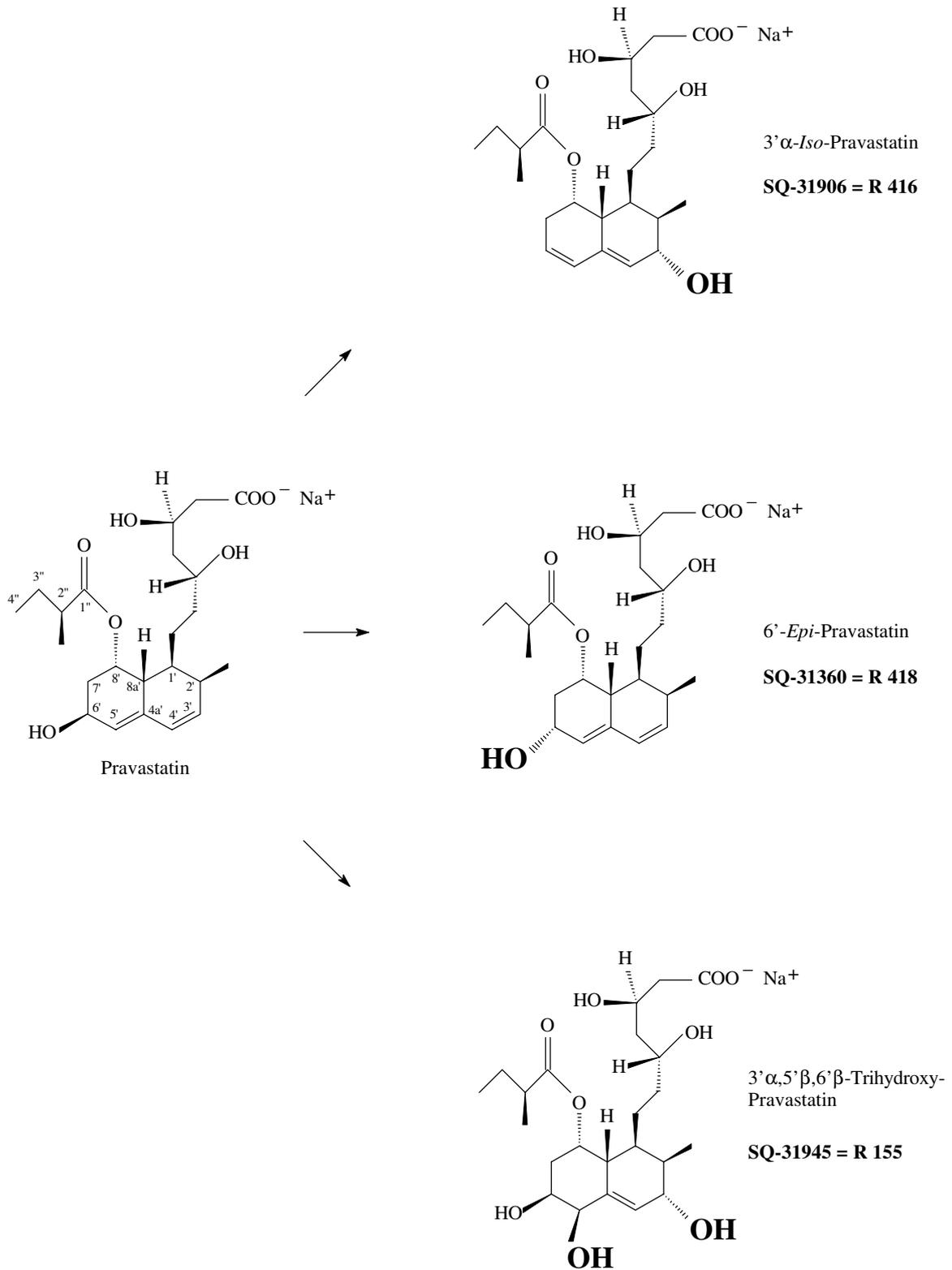


Abb. 4: Hauptmetabolisierungswege des Pravastatins beim Menschen.

Neben dem Metabolismus in der Leber kommt dem Metabolismus von CYP 3A-Substraten in der Mukosa des Darmtraktes eine große Bedeutung zu, da im Dünndarm zu 70 % CYP-Enzyme der Subfamilie 3 A vorkommen (Watkins *et al.*, 1985). Dies konnte durch klinische Pharmaka-Interaktionsstudien belegt werden (Gomez *et al.*, 1995; Gupta *et al.*, 1989). Die Untersuchungen von Wu *et al.* (1995) ergaben, daß die schlechte orale Bioverfügbarkeit von Ciclosporin größtenteils auf den CYP 3A-Metabolismus im Darm zurückzuführen ist: Zwei Drittel des Metabolismus entfallen auf den Darm. Nur ein Drittel trägt die Leber zur Metabolisierung bei.

Zur Zeit liegen keine Untersuchungen vor, ob auch Lovastatin im Dünndarm metabolisiert wird.

Von **Pravastatin**, welches als Dihydroxysäure und damit in aktiver Form verabreicht wird, wurden in menschlichen Urinproben 17 verschiedene Metabolite gefunden. Quion *et al.* (1994) beschreiben beim Patienten zwei relevante Hauptmetabolite: 3' α -*Iso*-Pravastatin (SQ 31906) und 3' α ,5' β ,6' β -Trihydroxy-Pravastatin (SQ-31945). Everett *et al.* (1991) konnten im Urin zusätzlich noch 6'-*Epi*-Pravastatin (SQ-31360) als einen weiteren Hauptmetaboliten identifizieren. Die Strukturen dieser drei Metabolite sind in Abbildung 4 dargestellt.

Neben der Entstehung der Metabolite 3' α -*Iso*-Pravastatin und 6'-*Epi*-Pravastatin durch niedrige pH-Werte im Magen (Kitazawa *et al.*, 1993; Triscari *et al.*, 1995), könnten diese alternativ auch enzymatisch durch eine Sulfotransferase im Rattenlebercytosol in der Anwesenheit des Kofaktors PAPS gebildet werden (Kitazawa *et al.*, 1993).

Bisher ist kein CYP-abhängiger Metabolismus von Pravastatin beschrieben worden, obwohl in einem jüngsten Übersichtsartikel (Lennernäs und Fager, 1997) Pravastatin als CYP 3A-Substrat bezeichnet wurde. Dieser falsche Rückschluß geht auf die *in vitro*-Studie von Transon *et al.* (1996) zurück. In dieser Studie wurde der CYP 2C9-, 2D6- und 3A4-abhängige Substratmetabolismus durch hohe Konzentrationen von Pravastatin gehemmt ($IC_{50} = 100 - 1000 \mu\text{mol/l}$). Jedoch ist ein CYP-Inhibitor nicht automatisch auch ein Substrat desselben CYP-Enzyms. Da nicht bekannt ist, ob Pravastatin ein CYP-Substrat ist, kann zur Zeit nicht beurteilt werden, ob die gleichzeitige Gabe anderer CYP-Substrate oder -Inhibitoren seine Pharmakokinetik wie beim Lovastatin beeinflussen kann.

Folgende Sachverhalte sind noch ungeklärt:

- Es ist nicht bekannt, ob Lovastatin im Darm metabolisiert wird.
- Die Lovastatin-Interaktionen in der Leber und im Darm sind unzureichend untersucht. Bisher liegen nur Fallbeschreibungen vor, aber keine systematischen Studien.

- Es ist nicht bekannt, ob Pravastatin ein CYP-Substrat ist.
- Es erfolgten noch keine Untersuchungen über die Metabolisierung von Pravastatin im Darm.
- Es liegen kaum Daten über Pharmakainteraktionen mit Pravastatin vor.

Da Pharmakainteraktionen mit HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren offensichtlich zu einer deutlich erhöhten Inzidenz von Rhabdomyolysen, einer schweren Nebenwirkung, die durch Nierenversagen sogar den Tod zur Folge haben kann, führen und ihnen damit eine große klinische Bedeutung zukommt, sollen durch die vorliegende Arbeit diese offenen Fragen untersucht werden.

Kapitel II - Material und Methoden

1. Chemikalien und Enzyme

Aceton	Baker, Deventer (NL)
Acetonitril	Baker, Deventer (NL)
Ameisensäure	Merck, Darmstadt
Bicinchoninsäure-Lösung	Sigma, Deisenhofen
Ciclosporin	Sandoz, Nürnberg
CYP 3A4	Gentest, Woburn , MA (U.S.A.)
CYP 3A5	Gentest, Woburn , MA (U.S.A.)
Dehydro- <i>Epi</i> -Androsteron	Sigma, Deisenhofen
1,4-Dithiothreitol	Biomol, Hamburg
EDTA (Dinatriumsalz-Dihydrat) = Titriplex III	Merck, Darmstadt
Ethylacetat	Merck, Darmstadt
Estron	Sigma, Deisenhofen
Glycerol	Sigma, Deisenhofen
6' β -Hydroxy-Testosteron	Sigma, Deisenhofen
D,L-Isocitrat	Sigma, Deisenhofen
Isocitrat-Dehydrogenase	Sigma, Deisenhofen
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Ketoconazol	RBI, Research Biochemicals International, Natick, MA (U.S.A.)
Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat	Merck, Darmstadt
Lovastatin	Merck, Rahway, NJ (U.S.A.)
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Baker, Deventer (NL)
Mevastatin	Sigma, Deisenhofen
NADP	Sigma, Deisenhofen
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Riedel-de Haen, Seelze
<i>tri</i> -Natriumcitrat-Dihydrat	Riedel-de Haen, Seelze

<i>tetra</i> -Natriumdiphosphat	Riedel-de Haen, Seelze
<i>di</i> -Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
PAPS	Sigma, Deisenhofen
Pravastatin und Metabolite	Bristol-Myers-Squibb, Princeton, NJ (U.S.A.)
2-Propanol	Baker, Deventer (NL)
Rinderserumalbumin	Serva, Heidelberg
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure	Merck, Darmstadt
Testosteron	Sigma, Deisenhofen
Tetraethylammonium-Acetat	Sigma, Deisenhofen
Troleandomycin	Sigma, Deisenhofen
Wasser (für HPLC)	Baker, Deventer (NL)
Zinkacetat-Dihydrat	Merck, Darmstadt

Alle weiteren Chemikalien wurden im höchstmöglichen Reinheitsgrad bezogen.

2. Herkunft der verwendeten Gewebe

Die verwendeten Proben (Leber und Darm) wurden von der Abteilung für Abdominal- und Transplantationschirurgie der Medizinischen Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt. Bei Patienten mit Leber- oder Dünndarmkrebs wurde zusätzlich zum kranken Gewebe der Sicherheit wegen auch eine geringe Menge gesundes Gewebe entfernt. Teile dieses gesunden Gewebes wurden wie unter 3. bzw. 4. beschrieben weiterverarbeitet.

Leber und Dünndärme des Schweins erhielten wir vom Schlachthof in Hannover. Die isolierten Dünndarm-Enterozyten (Duodenum) von fünf Individuen wurden jeweils gepoolt aufgearbeitet. Bei den menschlichen Darmproben handelte es sich mit einer Ausnahme (HDMD) um Stücke des Duodenums. Hier wurde ein Stück aus dem proximalen Bereich des Jejunums verarbeitet.

Patienten, die in der Zeit vor der Operation Medikamente bekamen, die bekannte CYP 3A-Induktoren sind, wurden von der Studie ausgeschlossen.

Folgende Mikrosomen-Präparationen wurden in der vorliegenden Arbeit eingesetzt:

Gewebe	Spezies	Geschlecht	Abkürzung
Leber	Mensch	weiblich	HLW01
	Mensch	weiblich	HLW02
	Mensch	männlich	HLM11
	Mensch	männlich	HLM12
Darm	Mensch	weiblich	HDWH
	Mensch	weiblich	HDWJ
	Mensch	männlich	HDMR
	Mensch	männlich	HDMK
	Mensch	männlich	HDMH
	Mensch	männlich	HDMD
	Mensch	männlich	HDMG

Gewebe	Spezies	Geschlecht	Abkürzung
Leber	Schwein	weiblich	SLW101
	Schwein	weiblich	SLW102
	Schwein	männlich	SLM111
	Schwein	männlich	SLM112
Darm	Schwein	jeweils Pool (n = 5)	SD A, SD B, SD D SD X, SD Y, SD Z

HL = menschliche Leber, SL = Schweineleber, D = Darm, M = männlich, W = weiblich

3. Isolierung der Enterozyten

Enterozyten (Dünndarmepithelzellen) wurden nach der Chelations-Elutionsmethode von Weiser (1973) modifiziert nach Porteous *et al.* (1979) und Pinkus (1981) isoliert. Der Dünndarm wurde in 1,32% NaCl-Lösung gewaschen. Eine Seite wurde mit Zwirn zugebunden, das Lumen mit Lösung A (Zusammensetzung siehe unten) prall gefüllt und 20 min bei 4 °C inkubiert. Der Darm wurde entleert und der Inhalt verworfen. Die Mukosazellen wurden durch Füllen mit Lösung B und der anschließenden Inkubation (40 min, bei 4 °C) abgelöst. Die mit Enterozyten angereicherte Lösung B wurde 10 min bei 900 x g zentrifugiert (Omnifuge 2.0 RS der Firma Heraeus Sepatech GmbH, Rotor 2250), das Pellet in Puffer A gewaschen

Lösung A (pH 7,3):	96,0	mmol/l NaCl
	27,0	mmol/l Na ₂ -Citrat
	5,6	mmol/l KH ₂ PO ₄
	1,5	mmol/l KCl
Lösung B (pH 7,4):	137,0	mmol/l NaCl
	8,2	mmol/l Na ₂ HPO ₄
	1,5	mmol/l KH ₂ PO ₄
	3,2	mmol/l KCl
	1,5	mmol/l EDTA
	1,0	mmol/l DTT
	0,1	%; w/v BSA

und nochmals zentrifugiert. Das Volumen des entstandenen Pellets wurde mittels Meßkolben bestimmt und bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert. Bei der Isolierung der menschlichen Darmproben wurde genauso vorgegangen wie bei den Schweinedärmen, jedoch mit dem Unterschied, daß der aufgeschnittene Darm (bedingt durch die Größe) in die entsprechenden Lösungen getaucht wurde.

Bevor Enterozyten in großen Mengen isoliert wurden, wurde überprüft, ob eine Absenkung der Temperatur auf 4 °C während der Inkubation der Därme (am Beispiel von Dünndärmen

des Schweins, jeweils $n = 10$ pro Temperatur) einen Einfluß auf die spezifische Aktivität der gewonnenen Mikrosomen hat. Die Originalmethode (Weiser, 1973; Porteous *et al.*, 1979, Pinkus, 1981) sah nämlich eine Inkubationstemperatur von $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ vor. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte durch die CYP 3A-abhängige Metabolitenbildung 6 β -Hydroxy-, 3''-Hydroxy- und 6'-Exomethylen-Lovastatin ($100\text{ }\mu\text{mol/l}$ Lovastatin, siehe 7.1).

4. Isolierung von Mikrosomen

Die Mikrosomen wurden durch Differentialzentrifugation nach Guengerich (1982) aus frisch zerkleinerten Leberstücken oder aus tiefgefrorenen (-80°C) Enterozyten gewonnen. Alle Arbeitsschritte erfolgten bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die Leberstücke wurden in 0,9% Natriumchlorid-Lösung gewaschen, das Bindegewebe und die Gefäße wurden entfernt.

Nach der Zerkleinerung mit einer Schere in kleine Stücke wurde die Leber in dem vierfachen Volumen Puffer A aufgenommen und mit einem Mixer der Firma Emide, Typ UZ 100 zerkleinert.

Die Enterozytensuspension (Pellet und Puffer A in einem Verhältnis von 1:4) wurde mit einem Glas-Teflon-Homogenisator der Firma B. Braun, Melsungen homogenisiert.

Dieses Homogenisat wurde 4mal für 1 min mit 40 % Ausgangsleistung ($\cong 80\text{ Watt}$) mit dem BRANSON Ultraschall-Desintegrator, Danbury, CT, U.S.A. beschallt und anschließend in einer Sorvall-Zentrifuge (Sorvall-DuPont Superspeed RC2-B) bei $10000\text{ x }g$ für 20 min zentrifugiert. Das Zellbruchstücke, Mitochondrien und Plasmamembranen enthaltende Pellet wurde verworfen. Der Überstand wurde gesammelt und 1 h in einer Ultrazentrifuge (Beckman TL-100, Rotor 50 Ti) bei $100000\text{ x }g$ zentrifugiert. Der Überstand, das Cytosol, wurde bis zum Gebrauch bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Das Pellet der ersten Ultrazentrifugation wurde ohne die Glycogenschicht (betrifft nur Leberpräparationen) in Puffer B aufgenommen und weitere 60 min mit der Beckman-Zentrifuge bei $100000\text{ x }g$ zentrifugiert. Das neue Pellet stellte die Mikrosomenfraktion dar; es wurde in vier Teile Puffer C aufgenommen und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Zur Überprüfung der optimalen Dauer des Zellaufschlusses von Enterozyten mittels Ultraschall wurden jeweils 10 ml eines Zellhomogenisats aus Schweineenterozyten (Pool aus drei Individuen) 1, 2, 3, 4 und 5mal für 1 min bei 40 % Ausgangsleistung beschallt und separat weiterverarbeitet. Das Mikrosomenpellet wurde jeweils in 1,5 ml Puffer C aufgenommen und

die CYP 3A-Aktivität der Darmmikrosomen durch die Metabolisierung von Ciclosporin zum Hydroxy-Metaboliten AM9 bestimmt (siehe 7.4) (n = 3).

Außerdem wurde geprüft, ob das Waschen der Mikrosomen in Puffer B (dient der Entfernung des Hämoglobins bei der Leberpräparation) und die anschließende Zentrifugation die spezifische Aktivität der gewonnenen Mikrosomen signifikant erhöht: Bei einer Mikrosomenisolierung aus Schweinedarm (Pool A, B, C und D) wurde die Hälfte des Pellets nach 60 min Zentrifugation direkt in Puffer C aufgenommen und bei - 80 °C gelagert. Die zweite Hälfte des jeweiligen Pellets nach 1 h Zentrifugation wurde wie üblich in Puffer B aufgenommen, dadurch gewaschen und nochmals zentrifugiert. Dieses Pellet wurde dann in Puffer C aufgenommen. Die Aktivitätsbestimmung dieser unterschiedlich aufgearbeiteten Mikrosomen erfolgte durch die CYP 3A-abhängige Metabolitenbildung 6'β-Hydroxy-, 3''-Hydroxy- und 6'-Exomethylen-Lovastatin (100 µmol/l Lovastatin, siehe 7.1; n = 3 Enterozytenpools).

Puffer A (pH 7,4):	0,1	mmol/l Na ⁺ /K ⁺ -Phosphatpuffer
	0,1	mmol/l KCl
	1,0	mmol/l EDTA
	0,1	mmol/l DTT

Puffer B (pH 7,4):	0,1	mmol/l Na ⁺ /K ⁺ -Phosphatpuffer
	0,1	mmol/l Natriumpyrophosphat
	1,0	mmol/l EDTA
	0,1	mmol/l DTT

Puffer C (pH 7,4):	0,1	mmol/l Na ⁺ /K ⁺ -Phosphatpuffer
	20 %	(w/v) Glycerol
	1,0	mmol/l EDTA

5. Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Proteingehaltes der Mikrosomen wurde photometrisch nach der von Smith *et al.* (1985) beschriebenen Methode durchgeführt. Die Messung beruht auf der Bildung eines Farbkomplexes aus 2 Molekülen Bicinchoninsäure und einem Kupfer(I)-Ion, welches bei Anwesenheit von Protein durch Reduktion von Cu^{2+} im alkalischen Medium entsteht. Das Reagenz wurde frisch aus Kupfer(II)sulfatlösung (4%, w/v) und Bicinchoninsäurelösung durch Mischen in einem Verhältnis von 1:50 (v/v) hergestellt. Die Mikrosomensuspensionen wurden mit Wasser verdünnt (Darmmikrosomen 1:100; Lebermikrosomen 1:200; Lebercytosol 1:100; Darmcytosol 1:10; je $n = 2$), und je 30 μl dieser Verdünnung wurden mit 200 μl der Reagenzlösung in einem Well auf einer Mikrotiterplatte versetzt. Nach einer Inkubation von 45 min bei 60 °C wurde die Extinktion des gebildeten Farbkomplexes bei 550 nm an einem Photometer (Elisa-Reader Mr 5000 der Firma Dynatech) gegen einen entsprechenden Blindwert (Wasser anstelle der Mikrosomenlösung) gemessen. Der Proteingehalt wurde mittels einer erstellten Kalibriergeraden berechnet, für deren Bestimmung Rinderserumalbumin in einem Konzentrationsbereich von 50 - 400 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt wurde.

6. CYP-Bestimmung

Die Bestimmung des CYP-Gehaltes der Mikrosomensuspensionen wurde nach den von Estabrook *et al.* (1978) und Omura *et al.* (1964) beschriebenen Methoden durchgeführt. Die Bestimmung beruht auf der Messung von Differenzspektren des CO-Adduktes an das reduzierte CYP-Protein bei 450 nm. Eine Probe der Mikrosomensuspension wurde dazu mit Phosphatpuffer auf 1 g/l Protein verdünnt und in zwei Küvetten des Spektralphotometers (Uvikon 930, Kontron Instruments-Tegimenta, Rotkreuz/Schweiz) verteilt. Nach der Aufnahme der Basislinie im Meßbereich von 400-500 nm wurde eine Küvette mit Kohlenmonoxid begast. Ein eventuell sichtbares Differenzspektrum mit einem Absorptionsmaximum bei 420 nm zeigte Verunreinigungen der Mikrosomenpräparationen mit Hämoglobin, welches unter diesen Bedingungen zu Carboxyhämoglobin reagiert. Nach der Zugabe von 1 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ zu der Probenküvette wurde ein Spektrum aufgezeichnet, welches der Summe aus reduziertem Cytochrom b_5 und dem CO-Addukt des reduzierten CYP entsprach. Nach der Zugabe der gleichen Menge $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ zu der Referenzküvette wurde das Differenzspektrum aus dem CO-Addukt des reduzierten CYP (Probenküvette) abzüglich dem

spektralen Anteil des reduzierten CYP (Referenzküvette) bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Cytochrom b_5 wurde in beiden Küvetten reduziert und daher im Differenzspektrum eliminiert. Die Berechnung der Konzentration erfolgte mittels des molaren Extinktionskoeffizienten ($\Delta E_{420-490}$) von $91 \cdot 10^3 \text{ mol/l}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ für diese Wellenlänge (Guengerich, 1982).

7. Mikrosomen-Inkubationsansätze

Die Inkubation von Lovastatin, Pravastatin, Ciclosporin oder Testosteron mit Mikrosomen erfolgte zur Untersuchung des Metabolismus und zur Bestimmung von enzymkinetischen Parametern und Enzymaktivitäten.

7.1 Metabolisierung von Lovastatin durch Mikrosomen

Der Reaktionsansatz enthielt folgende Bestandteile:

K ⁺ /Na ⁺ -Phosphatpuffer:	0,1 mol/l; pH 7,4
Mikrosomen:	0,05 - 0,5 mg Protein von menschlicher Leber 0,8 - 1,5 mg Protein von menschlichem Darm 0,5 - 1,5 mg Protein von Schweineleber 0,5 - 1,5 mg Protein von Schweinedarm
Substrat:	5 -300 $\mu\text{mol/l}$ Lovastatin gelöst in Acetonitril / H ₂ O pH-neutral; 2:1 (v/v)
NADPH:	0,84 $\mu\text{mol/l}$ aus NADPH-erzeugendem System (s.u.)

Die Lösung des NADPH-erzeugenden System (pH 7,4) bestand aus: 0,1 mol/l Phosphatpuffer; 18,0 mmol/l Isocitrat; 10,0 mmol/l MgCl₂; 2,0 mmol/l EDTA; 0,84 mmol/l NADP und 0,7 U Isocitrat-Dehydrogenase. Die pH-Korrektur erfolgte mit 1 N HCl.

Die Ansätze (je 1,0 ml-Ansatz) von Darmmikrosomen wurden 60 min bei 37 °C inkubiert. Bei denen von Lebermikrosomen wurde die Dauer auf 5-20 min reduziert.

Die Linearität der Reaktionsgeschwindigkeit wurde vorher durch Messung der entstandenen Metabolite in den Reaktionsansätzen durch HPLC-Analytik überprüft. Als Blindwerte wurden Reaktionsansätze ohne NADPH und mit hitzedenaturierten Mikrosomen (10 min, 95 °C) inkubiert.

Nach erfolgter Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von 500 µl Acetonitril bei Lebermikrosomen oder 500 µl Methanol / ZnSO₄ 0,2 mol/l; 70/30 (v/v) bei Darmmikrosomen abgestoppt.

Nach der Zugabe von 600 ng des internen Standards Mevastatin wurden die denaturierten Proteine bei 4 °C und 3400 x g 10 min abzentrifugiert (Omnifuge 2.0 RS der Firma Heraeus Sepatech GmbH, Rotor 2250). Der klare Überstand fungierte als Ausgangslösung für die Flüssig-Flüssig-Extraktion (siehe 9.1).

7.2 Metabolisierung von Pravastatin durch Mikrosomen

Der Reaktionsansatz enthielt folgende Bestandteile:

Na ⁺ /Na ⁺ -Phosphatpuffer:	0,1 mol/l; pH 7,4
Mikrosomen:	0,5 - 1,5 mg Protein von menschlicher Leber 0,6 - 1,4 mg Protein von menschlichem Darm
Substrat:	250-2000 µmol/l Pravastatin gelöst in H ₂ O, pH-neutral
NADPH:	0,84 µmol/l aus NADPH-erzeugendem System (siehe 7.1)

Die Ansätze (je 0,5 ml-Ansatz) wurden 45-60 min bei 37 °C inkubiert.

Die Linearität der Reaktionsgeschwindigkeit wurde vorher durch Messung der entstandenen Metabolite in den Reaktionsansätzen mittels LC-MS-Analytik überprüft. Als Blindwerte wurden Reaktionsansätze ohne NADPH und mit hitzedenaturierten Mikrosomen (10 min, 95 °C) inkubiert.

Nach erfolgter Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von 200 µl 1 mol/l Zink-Acetat-Lösung abgestoppt. Weitere 500 µl Puffer wurden hinzugefügt.

Die denaturierten Proteine wurden bei 4 °C und 10500 x g für 10 min abzentrifugiert (Tischzentrifuge der Firma Abbott). Der klare Überstand fungierte als Ausgangslösung für die Festphasen-Extraktion (siehe 9.2).

7.3 Metabolisierung von Pravastatin durch rekombinantes CYP 3A4 und CYP 3A5

10-30 pmol rekombinantes menschliches CYP 3A4 und CYP 3A5 der Firma Gentest (Woburn, MA, U.S.A.) wurden mit 1000 µmol/l Pravastatin unter den in 7.2 beschriebenen Bedingungen inkubiert. Als Blindwert fungierten Mikrosomen aus Baculovirus (Wildtyp) infizierten Insektenzellen.

7.4 Ciclosporin-Hydroxylierung

Die Bildung der Ciclosporinmetabolite AM 1 und AM 9 diente zur Aktivitätsbestimmung von CYP 3A4-Aktivität in menschlichen Lebermikrosomen und Schweinedünndarmmikrosomen. Zu 0,6 bis 1,0 mg mikrosomalem Protein und 0,84 µmol/l NADPH aus NADPH-erzeugendem System (siehe 7.1) in K⁺/Na⁺-Phosphatpuffer (0,1 mol/l; pH 7,4) wurde 12,5 µmol/l Ciclosporin (1 mg/ml in Ethanol) gegeben. Nach Inkubation von 90 min und 37 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 500 µl Acetonitril gestoppt.

7.5 Testosteron-6'β-Hydroxylierung

Die Bildung des Testosteronmetaboliten 6'β-Hydroxy-Testosteron diente der Aktivitätsbestimmung des rekombinanten menschlichen CYP 3A4 und CYP 3A5. Zu 20 pmol CYP und 0,84 µmol/l NADPH aus NADPH-erzeugendem System (siehe 7.1) in Na⁺/Na⁺-Phosphatpuffer (0,1 mol/l; pH 7,4) wurde 200 µmol/l Testosteron zugegeben und 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Abstopfung der Reaktion erfolgte mit 250 µl Acetonitril.

8. Cytosol-Inkubationsansatz

8.1 Metabolisierung von Pravastatin durch Enzyme des Cytosols

Zur Überprüfung, ob Pravastatin als Phase-II-Substrat fungiert (Konjugation mit Schwefelsäure), wurde es mit menschlichem Leber- und Dünndarmcytosol und PAPS inkubiert (Kitazawa *et al.*, 1993).

Die Inkubation erfolgte 90 min bei 37 °C. Die Linearität der Reaktionsgeschwindigkeit wurde vorher durch Quantifizierung der entstandenen Metaboliten in den Reaktionsansätzen durch LC-MS-Analytik überprüft. Als Blindwerte wurden Reaktionsansätze ohne PAPS und mit hitzedenaturiertem Cytosol (10 min, 95 °C) inkubiert. Der gesamte Reaktionsansatz enthielt folgende Bestandteile:

Na ⁺ /Na ⁺ -Phosphatpuffer:	0,1 mol/l; pH 7,4
Cytosolische Proteine:	19-26 mg Protein von menschlicher Leber 2-3,2 mg Protein von menschlichem Darm
Substrat:	50 µmol/l Pravastatin, gelöst in H ₂ O, pH-neutral
PAPS:	0,5 mol/l gelöst in H ₂ O, pH-neutral

9. Aufreinigung / Aufkonzentrierung der Reaktionsansätze

9.1 Flüssig-Flüssig-Extraktion (Lovastatin)

Als Ausgangslösung der Flüssig-Flüssig-Extraktion wurde der klare Überstand der deproteinierten Reaktionsansätze eingesetzt (siehe 7.1). Zu 1,5 ml des abgestoppten Reaktionsansatzes wurden 2 ml (bei Lebermikrosomen) oder 3 ml (bei Darmmikrosomen) des organischen Lösungsmittelgemisches (Ethylacetat/Aceton, v/v 2/1) gegeben. Nach 15 s Vortexen (Vortex der Firma Heidolph) und anschließender Zentrifugation von 5 min bei 3400

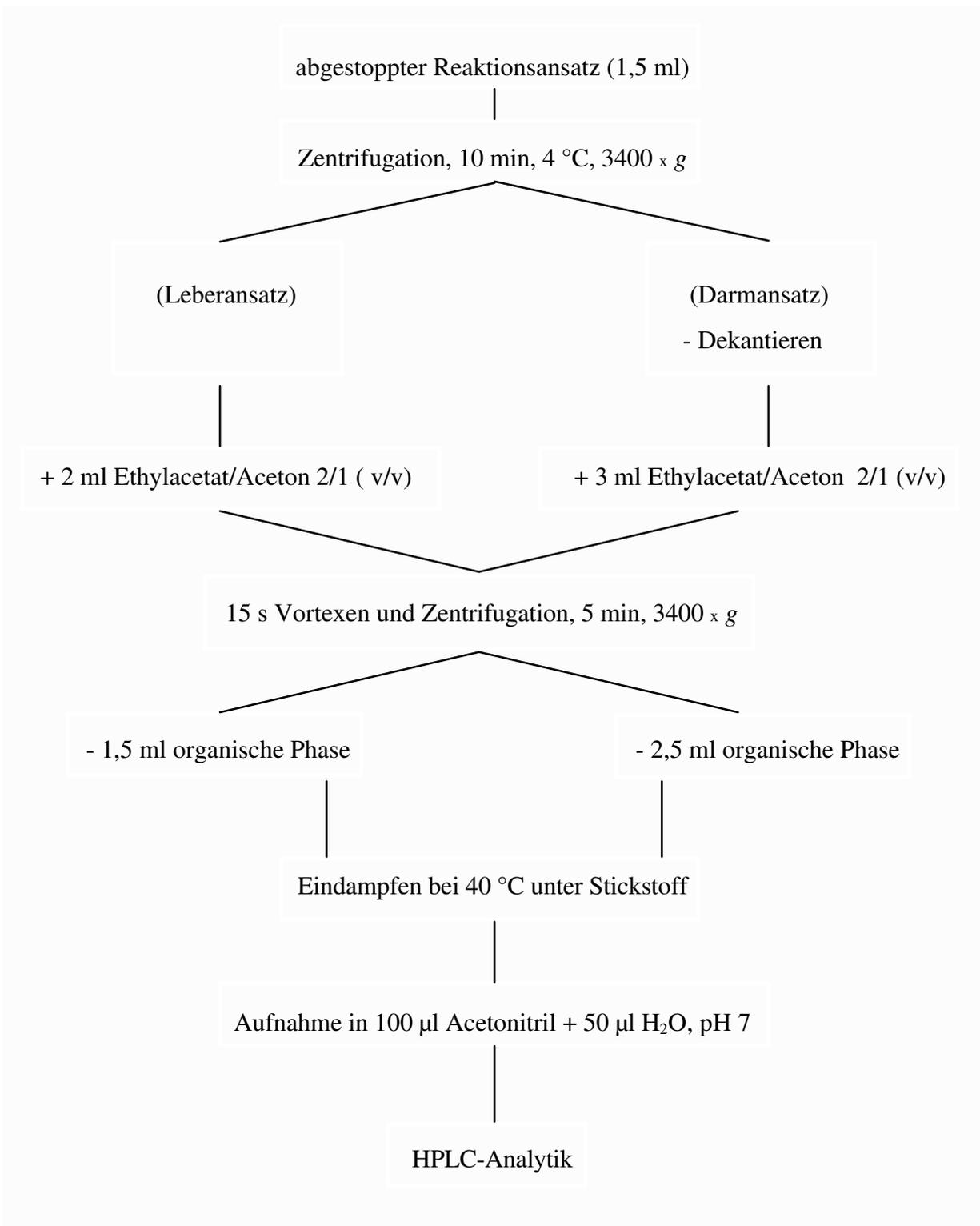


Abb. 5: Flußdiagramm für die Aufarbeitung der Reaktionsansätze mit Lovastatin als Substrat

g und Raumtemperatur (Omnifuge 2.0 RS der Firma Heraeus Sepatech GmbH, Rotor 2250) wurden mit einer Eppendorfpipette (500-2500 µl) 1,5 ml (Leber) oder 2,5 ml (Darm) von der oberen organischen Phase abgenommen und in ein neues Reagenzglas überführt. Unter einem

Stickstoffstrom bei 40°C wurden die organischen Lösungsmittelgemische eingedampft und der Rückstand in 100 µl Acetonitril aufgenommen. 50 µl dest. Wasser wurden hinzugefügt und die Lösung in Probengefäße für die HPLC gefüllt.

9.2 Festphasenextraktion (Pravastatin)

Als Ausgangslösung der Festphasenextraktion wurde der klare Reaktionsüberstand (siehe 8.1/7.2 / 7.3) verwendet.

Nach Konditionierung der Säulen (LiChroprep®, Partikelgrösse 25-40 µm, C₁₈ gefüllte Festphasenkartuschen der Firma Merck/Recipe) mit 2 ml Methanol und 2 ml H₂O (pH-neutral) wurden die Proben (jeweils 900 µl der Reaktionsansätze) auf die einzelnen Säulen gegeben.

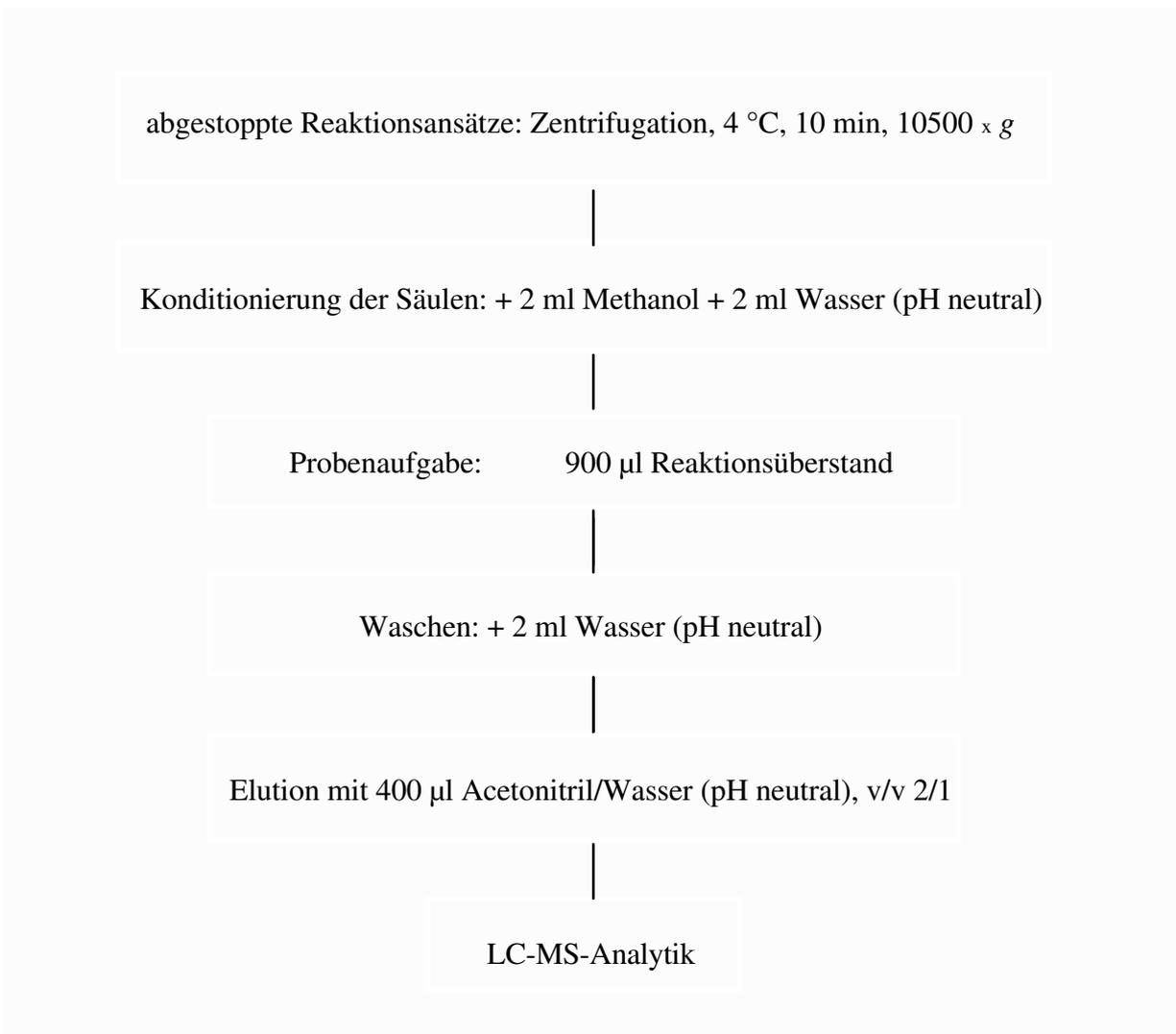


Abb. 6: Flußdiagramm für die Aufarbeitung der Reaktionsansätze mit Pravastatin als Substrat

Ein gleichmäßiger Fluß von ca. 1,5 ml/min wurde durch den Anschluß einer Pumpe (Modell XX 5522050 der Firma Millipore, Eschborn) erreicht, die für den nötigen Unterdruck sorgte. Es war darauf zu achten, daß die Säulen vor dem Aufgeben der Proben nicht trockengesaugt wurden. Nach dem folgenden Waschschrift mit 2 ml H₂O (pH-neutral) wurden Pravastatin und seine Metabolite mit 400 µl Acetonitril / H₂O (pH-neutral), 2/1 (v/v) eluiert. Die Eluate wurden in HPLC-Probengefäße abgefüllt.

9.3 Bestimmung der Wiederfindungsraten von Mevastatin sowie Lovastatin und seiner Metabolite bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion

Lovastatin, der interne Standard Mevastatin und die Lovastatinmetabolite wurden mit einem einzigen Extraktionsschritt aus den Reaktionsansätzen entfernt. Die organische Phase mußte somit groß genug sein, um die Metabolite in einem Extraktionsschritt vollständig zu extrahieren. Zur Überprüfung, ob Mevastatin sowie Lovastatin und seine Metabolite vollständig in die organische Phase übergehen, wurde die Ausbeute in der organischen Phase nach erfolgter Extraktion bestimmt.

Die Wiederfindungsraten der gesamten Flüssig-Flüssig-Extraktion wurden zusätzlich berechnet, indem die Wiederfindungsraten in der gesamten organischen Phase auf den tatsächlich entfernten Anteil des organischen Lösungsmittels bezogen wurde.

Um die Metabolite mit einzubeziehen, wurde von entsprechenden Inkubationsansätzen (Leber 20 µmol/l, Darm 50 µmol/l Lovastatin, je 10 ml) ausgegangen. Von den abgestoppten und deproteinierten Inkubationsüberständen wurden mittels HPLC-Analytik die Konzentrationen von Lovastatin (Carboxy- und Lacton-Form), seiner Metabolite und Mevastatin bestimmt (je n = 4).

Die verdampften organischen Phasen (je n = 9) wurden in 150 µl Acetonitril/Wasser (pH-neutral, 2/1; v/v) aufgenommen und ebenfalls durch HPLC-Analytik die Konzentrationen ermittelt. Durch das Verhältnis der gemessenen Konzentrationen vor und nach der Extraktion ergaben sich die einzelnen Wiederfindungsraten.

Das genaue Volumen der wäßrigen und der organischen Phase eines Reaktionsansatzes nach der Phasentrennung wurde mittels eines Meßzylinders bestimmt, indem 10 abgestoppte Reaktionsansätze (= 15 ml) zu 30 ml (Darm) oder 20 ml (Leber) Ethylacetat/Aceton-Gemisch (2/1; v/v) gegeben wurden. Nach erfolgter Phasentrennung wurden die Volumina abgelesen (n = 3).

9.4 Bestimmung der Wiederfindungsraten von Pravastatin und seiner Metabolite bei der Festphasen-Extraktion

Die Wiederfindungsrate von Pravastatin bei der Festphasen-Extraktion wurde für die Aufarbeitung von Lebermikrosomen-Inkubationsansätzen bestimmt. Von den abgestoppten und deproteinierten Inkubationsüberständen (je 10 Reaktionsansätze mit 200 oder 2000 $\mu\text{mol/l}$ Pravastatin, siehe 7.2 und 9.2) wurden mittels HPLC-Analytik die Konzentrationen von Pravastatin bestimmt (siehe 11.2.2, je $n = 3$). Die Eluate der Extraktion wurden in 1 ml-Meßkolben aufgefangen, mit Acetonitril/Wasser pH-neutral (v/v 2/1) aufgefüllt und der Pravastatingehalt ermittelt (je $n = 10$).

Die Wiederfindungsraten der drei Pravastatinmetabolite 3'-*Iso*-Pravastatin, 3' α ,5' β ,6' β -Trihydroxy-Pravastatin und Hydroxy-Pravastatin für die Festphasenextraktion wurden ausgehend von Reaktionsansätzen nach 60 min Inkubation (1000 $\mu\text{mol/l}$ Pravastatin und menschliche Lebermikrosomen, siehe 7.2) oder 90 min Inkubation (50 $\mu\text{mol/l}$ Pravastatin und menschliches Lebercytosol, siehe 8.1) ermittelt: Die Metabolitenkonzentrationen der deproteinierten Überstände wurden, ohne eine Festphasenextraktion durchzuführen, mittels LC-MS-Analytik bestimmt ($n = 3$, siehe 12.4.2 und 12.4.3). Zehn Aliquote desselben Reaktionsansatzes wurden einer Festphasenextraktion (9.2) unterzogen. Die Elution erfolgte jeweils direkt in 1ml-Meßkolben, die anschließend auf 1 ml aufgefüllt wurden. Diese Eluate wurden auch mittels LC-MS-Analytik quantifiziert.

Durch das Verhältnis der gemessenen Konzentrationen vor und nach der Extraktion ergaben sich die einzelnen Wiederfindungsraten.

10. Überprüfung der Stabilität von Lovastatin und Pravastatin sowie deren Metabolite

Die Stabilität von Lovastatin, Pravastatin und deren Metabolite, sowie des internen Standards Mevastatin in Acetonitril/Wasser pH-neutral (v/v, 2/1) wurde mittels HPLC- oder LC-MS-Analytik für einen Zeitraum von 48 h überprüft, da die gefüllten Probengefäße bis zu 48 h bei Raumtemperatur (aber lichtgeschützt) im Autosampler des HPLC-Gerätes standen.

Bei Pravastatin wurde zusätzlich dessen Stabilität unter LC-MS-Laufmittelbedingungen (2-Propanol/Wasser, pH 4 mit Ameisensäure eingestellt [v/v, 3/7]) überprüft.

11. HPLC-Verfahren

Die Auftrennung und Detektion der Statine erfolgte mittels einer HPLC-Anlage der Firma Hewlett-Packard (Waldbronn): Der 1090 A Serie II Chromatograph mit einem 1040 A Dioden-Array-Detektor wurde durch einen HP 85 B Computer und die entsprechende Software HP-ChemStation Version C.02.02. gesteuert.

11.1 HPLC-Analytik von Lovastatin und seiner Metabolite

Bei der HPLC-Analytik von Lovastatin und seiner Metabolite wurden analytische Säulen der Dimension 4 mm x 250 mm, gepackt mit Hypersil® C₈-Material der Partikelgröße 3 µm verwendet (Firma Shandon, Chadwick, UK). Als Laufmittel wurden Acetonitril und Wasser (pH 3; 0,004% Schwefelsäure) eingesetzt. Der Fluß betrug 0,7 ml/min, und der Säulenofen wurde auf 40 °C beheizt. Da 6'-Exomethylen-Lovastatin ein zum langwelligen Bereich verschobenes Absorptionsmaximum aufweist (Vyas *et al.*, 1990 a), wurde bei den Wellenlängen 239 nm und 273 nm detektiert.

Da keine Lovastatinmetabolite als Standards verfügbar waren, wurden diese über eine externe Lovastatin-Kalibriergerade quantifiziert (gespikete Reaktionsansätze mit 200 - 2000 ng/ml Lovastatin). Die Verluste durch die Aufarbeitung der Reaktionsansätze wurden dabei durch den internen Standard Mevastatin korrigiert. Die unterschiedlichen molaren Extinktionskoeffizienten von Lovastatin ($21500 \text{ mol/l}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), 6'β-Hydroxy-Lovastatin ($21400 \text{ mol/l}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) und 6'-Exomethylen-Lovastatin ($32200 \text{ mol/l}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) wurden bei der Auswertung mitberücksichtigt (Vyas *et al.*, 1990 a).

Da für 3''-Hydroxy-Lovastatin kein Extinktionskoeffizient bekannt ist, wurde der Wert von Lovastatin zugrunde gelegt, um gemessene Aktivitäten in ihrer Größenordnung abschätzen zu können.

Der bei der HPLC-Analytik eingesetzte Laufmittelgradient und die anderen HPLC-Bedingungen sind in Tabelle 1 aufgelistet.

HPLC-Bedingungen: Lovastatin und seine Metabolite

<u>Säulenmaterial:</u>	C ₈ , Hypersil-MOS, 3µm, Länge 250 mm, ID 4 mm		
<u>Laufmittel:</u>	A:	H ₂ O, pH 3 (H ₂ SO ₄) 0,004 %	B: Acetonitril
<u>Flußrate:</u>	0,7 ml / min		
<u>Säulentemperatur:</u>	40 °C		
<u>Wellenlänge:</u>	239 nm, 273 nm		
<u>Programm:</u>			
	0 min	A: 85 %	B: 15 %
	25 min	A: 50 %	B: 50 %
	45 min	A: 50 %	B: 50 %
	46 min	A: 5 %	B: 95 %
	53 min	A: 5%	B: 95 %
	53 min	Stopp	

Tab. 1: HPLC-Bedingungen für die Analytik von Lovastatin und seiner Metabolite**11.2 HPLC-Analytik von Pravastatin****11.2.1 HPLC-Analytik von Pravastatin und seines Metaboliten 3'α,5'β,6'β-Trihydroxy-Pravastatin**

Bei der HPLC-Analytik von Pravastatin und seines Metaboliten wurden analytische Säulen der Dimension 2 mm x 250 mm, gepackt mit Hypersil[®] C₁₈-Material der Partikelgröße 3 µm (Firma Shandon, Chadwick, UK) verwendet. Als Laufmittel wurden Acetonitril und Wasser angesäuert mit Ameisensäure (pH 4) eingesetzt. Der Fluß betrug 0,25 ml/min, und der Säulenofen wurde auf 40 °C beheizt.

HPLC-Bedingungen: Pravastatin und 3'α,5'β,6'β-Trihydroxy-Pravastatin

Säulenmaterial: C₁₈, Hypersil-ODS-2, 3μm, Länge 250 mm, ID 2 mm

Laufmittel: **A:** H₂O, pH 4 (HCOOH) **B:** Acetonitril
0,002 %

Flußrate: 0,25 ml / min

Säulentemperatur: 40 °C

Wellenlänge: 200 nm

Programm:

0 min	A: 0 %	B: 100 %
10 min	A: 10 %	B: 90 %
20 min	A: 25 %	B: 75 %
25 min	A: 25 %	B: 75 %
40 min	A: 70 %	B: 30 %
45 min	A: 5%	B: 95 %
50 min	Stopp	

Tab. 2: HPLC-Bedingungen für die Analytik von Pravastatin und 3'α,5'β,6'β-Trihydroxy-Pravastatin

Ein authentischer Referenz-Standard von 3'α, 5'β, 6'β-Trihydroxy-Pravastatin stand zur Verfügung (Bristol-Myers Squibb, Princeton, NJ). Der bei der HPLC-Analytik eingesetzte Laufmittel-Gradient und die anderen HPLC-Bedingungen sind in Tabelle 2 aufgelistet.

11.2.2 HPLC-Analytik von Pravastatin (Stabilitätsprüfung)

Diese HPLC-Analytik wurde zur Stabilitätsüberprüfung des Pravastatins genutzt. Sie ermöglichte die Trennung des Pravastatins von seinen beiden Isomeren 3'α-*Iso*- und 6'-*Epi*-Pravastatin, welche auch durch Isomerisierung in Lösungsmittel mit einem niedrigen pH-Wert entstehen (Triscari *et al.*, 1995). Diese Metbolite standen als Referenz-Standards zur Verfügung (Bristol-Myers Squibb, Princeton, NJ).

HPLC-Bedingungen: Pravastatin - Stabilität

<u>Säulenmaterial:</u>	C ₈ , Hypersil-MOS 2, 3 µm, Länge 250 mm, ID 4 mm		
<u>Laufmittel:</u>	A:	5 mmol/l Tetraethylammonium-Acetat	
	B:	Acetonitril	
<u>Flußrate:</u>	0,7 ml / min		
<u>Säulentemperatur:</u>	40 °C		
<u>Wellenlänge:</u>	239 nm		
<u>Programm:</u>			
	0 min	A: 82 %	B: 18 %
	25 min	A: 82 %	B: 18 %
	28 min	A: 5 %	B: 95 %
	28 min	Stopp	

Tab. 3: HPLC-Bedingungen für die Analytik von Pravastatin, 3' α -*Iso*-Pravastatin und 6'-*Epi*-Pravastatin

Der bei der HPLC-Analytik eingesetzte Laufmittel-Gradient und die anderen HPLC-Bedingungen sind in Tabelle 3 aufgelistet.

11.3 HPLC-Analytik von Ciclosporin und seiner Metabolite

Zur Analytik von Ciclosporin und seiner Metabolite wurde die HPLC-Methode nach Christians *et al.* (1988) eingesetzt. Sie diente zur Bestimmung der CYP 3 A-Aktivität von menschlichen Lebermikrosomen und Schweinedarmmikrosomen.

Zu den abgestoppten Reaktionsansätzen wurden jeweils 25 µl des internen Standards Ciclosporin D (10 µg/ml) gegeben. Nach der Zentrifugation (5 min, 3400 g, Omnifuge 2.0 RS der Firma Heraeus Sepatech GmbH, Rotor 2250) wurden die klaren Überstände durch Extraktionssäulen der Firma Krannich (Göttingen) mit Hilfe eines Unterdruckes (Pumpe der Firma Millipore, Modell XX 5522050) gesaugt (Extraktionssäulen gefüllt mit C₈-Lichroprep[®], Korngröße 25-40 µm, von der Firma Merck, Darmstadt). Die Aktivierung der Säulen erfolgte zuvor mit je 3 ml Acetonitril und Wasser.

Nachdem die Reaktionsansätze auf die Säulen gegeben wurden, folgte ein Waschgang mit 3 ml Methanol/Wasser (pH 3 mit Schwefelsäure, v/v 1/1) und 1 ml Hexan. Für 5 min wurde Luft zum Trocknen durch die Säulen gesaugt, um dann mit 2 ml Dichlormethan zu eluieren. Die Elution erfolgte durch Zentrifugation mit 100 g .

Die so gewonnene Fraktion wurde bei 65 °C unter Stickstoffstrom eingedampft und der Rückstand mit 500 µl Hexan und 300 µl Acetonitril/Wasser (pH 3, v/v 1/1) aufgenommen. Nach erfolgter Phasentrennung durch Zentrifugation bei 400 g wurden 200 µl der Acetonitrilphase für die HPLC-Analytik verwendet.

Ciclosporin und seine Metabolite wurden auf eine analytischen Säule (C₈-Hypersil-MOS, 3µm, 250 mm x 4 mm) mit einem Fluß von 0,7 ml/min und einem Anteil von 43 % Acetonitril (restlicher Anteil Wasser angesäuert mit Schwefelsäure; 0,004 % \cong pH 3) aufgegeben. Die Elution erfolgte mit folgenden Gradienten: 20 min: 53 % Acetonitril, 35 min: 63 % Acetonitril, 50 min bis 52,5 min 75 % Acetonitril mit einem anschließenden 3,5 min dauernden Waschgang mit 95 % Acetonitril. Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 205 nm, der Säulenofen wurde auf 65 °C geheizt. Die Quantifizierung erfolgte über den zugesetzten internen Standard Ciclosporin D.

11.4 HPLC-Analytik von Testosteron und 6'β-Hydroxy-Testosteron

Die HPLC-Analytik von Testosteron und seines Metaboliten diente zur Aktivitätsbestimmung von rekombinanten menschlichen CYP 3A4 und CYP 3A5-Enzymen der Firma Gentest (Woburn, MA, U.S.A.).

Der Überstand des Reaktionsansatzes nach Zentrifugation (10500 g, 5 min, Tischzentrifuge der Firma Abbott) wurden auf eine analytischen Säule (C₁₈-Hypersil-ODS-2, 5µm, 250 mm x 2 mm) mit einem Fluß von 0,3 ml/min und einem Anteil von 40 % Methanol (restlicher Anteil: pH-neutrales Wasser) aufgegeben. Die Elution erfolgte mit folgenden Gradienten: 0 min: 40 % Methanol, 5 min: 40 % Methanol, 5 min bis 10 min: 50 % Methanol, 10 min bis 15 min: 50 % bis 58 % Methanol und 15 min bis 30 min: 58 % bis 62 % Methanol. Es folgte ein 4 min dauernder Waschgang mit 95 % Methanol. Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 254 nm, der Säulenofen wurde auf 50 °C geheizt. Die Retentionszeit von Testosteron betrug 22.1 min; der Metabolit 6'β-Hydroxy-Testosteron eluierte nach 11.1 min. Die Quantifizierung

erfolgte durch gespikete Reaktionsansätze mit 100 bis 4000 ng/ml 6 β -Hydroxy-Testosteron (nach Informationen der Firma Gentest, Woburn, MA, U.S.A.).

12. Massenspektrometrie der Statine (LC-Elektrospray-MS)

Für die massenspektrometrische Messung von Lovastatin und Pravastatin wurde die Atmospheric-Pressure-Ionization-Elektrospray-Massenspektrometrie (API-Elektrospray-MS bzw. Elektrospray-Ionization-MS oder ESI-MS genannt) angewendet.

Das gesamte System bestand aus einem HP 5989B Massenspektrometer (MS-Engine) und einem HP 59987 A API-Elektrospray LC-MS Interface.

Nach der Auftrennung der zu untersuchenden Reaktionsansätze mittels der 1090 A Serie II HPLC-Anlage wurde das Eluat aus der HPLC-Säule mittels einer Kapillare direkt ins LC-MS-Interface überführt.

Alle Geräte wurden von der Firma Hewlett Packard (Waldbronn) bezogen und durch die HP Chemstation mit HP G1047A LC-MS Software gesteuert.

Das Massenspektrometer mit dem API-Elektrospray-Interface läßt sich in drei Bereiche einteilen: die Ionenquelle, den Massenfilter und den Detektor.

Das API-Elektrospray-Interface beinhaltet die Ionenquelle, welche Ionen von den Substanzen im HPLC-Eluat erzeugt. Diese Ionen werden durch elektronische Linsen und Skimmer fokussiert und in den Massenfilter der MS-Engine transportiert. Der Massenfilter (= Quadrupol) hat die Aufgabe, die Ionen nach dem eingestellten Massen-Ladungs-Verhältnis (m/z) herauszufiltern und leitet diese zum Detektor weiter. Der Elektronen-Multiplier des Detektors gibt ein verstärktes Signal proportional zu der ihn erreichten Ionenmenge weiter an den Integrator, der die Signale schließlich auswertet.

Am API-Elektrospray-Interface und MS-Spektrometer (MS-Engine)* waren folgende Parameter während der gesamten Messungen unverändert eingestellt:

Vernebelungsgas	Stickstoff, 5.0; 80 psi
Trocknungsgas	Stickstoff, 5.0; Fluss: 40 (einheitslos) T: 350 °C
Kapillar-Ausgangsspannung	50-300 V; substanzspezifisch, Statine: 160 V 100 V beim Tunen

Elektrospray-Spannungen	Vcap: - 4000 V
	Vend: - 3500 V
	Vcyl: - 6000 V
Detektor*	Xray (HED): 10000 V

12.1 Justierung des Massenspektrometers und des API-Elektrospray-Interfaces

Bevor Messungen am Massenspektrometer durchgeführt werden können, müssen bestimmte Parameter der MS-Engine und des API-Elektrospray-Interfaces überprüft werden. Dieser Vorgang wird als Tunen bezeichnet und kann in drei Schritte unterteilt werden:

- Kalibrierung der Massenachse des Massenfilters (siehe 2, Seite 30)
- Verbesserung der Signalausbeute, d.h.
 - Justierung der Skimmer- und Linsen-Spannungen des Interfaces (s. 3)
 - Justierung der Vernebelung des HPLC-Eluats (s. 1)

Zum Tunen wurde die Kalibrierlösung der Firma Hewlett Packard für die Messung von positiven Ionen (positiver Modus) eingesetzt: Diese enthält folgende drei Substanzen: Valin (50 ng/μl), Trityrosin (25 ng/μl) und Hexatyrosin (50 ng/μl). Mit einem Fluß von 25 μl/min wurde die Kalibrierlösung mit Hilfe einer Spritzenpumpe Harvard Apparatus 22 (Hewlett Packard, Waldbronn) ins Interface überführt.

1. Die Überführung des HPLC-Laufmittels in die sogenannte Spraykammer des Interfaces erfolgt über eine Nadel, an deren Ende die Lösung austritt und versprüht wird. Diese Nadel wird durch eine Stahlkapillare geführt und kann 0,5 - 3 mm über das Ende der Stahlkapillare hinausragen. Die an der Stahlkapillare angelegte konstante Spannung und ein Stickstoffstrom, der zwischen Nadel und Kapillare austritt, führt zu der Vernebelung des HPLC-Laufmittels. Die Länge des Nadelabschnittes, welcher über die Kapillare herausragt, beeinflusst die Vernebelung des HPLC-Laufmittels und somit auch die Signalausbeute des Massenspektrometers. Sie wurde daher beim Tunen zuerst eingestellt.

2. Der Massenfilter wurde so eingestellt, daß die drei Kalibriersubstanzen mit ihren korrekten Massen (Valin: 118,08 m/z; Trityrosin: 508,20 m/z und Hexatyrosin: 997,39 m/z) mit einer maximalen Abweichung von 0,1 m/z detektiert wurden. Die Peak-Halbwertsbreiten sollten bei $0,7 \pm 0,1$ liegen.
3. Zum Schluß wurden die Skimmer- und Linsen-Spannungen des API-Interfaces eingestellt. In der Reihenfolge Linse 3, Linse 2, Skimmer 2, Linse 1 und Skimmer 1 wurden jeweils die einzelnen Spannungen so verändert, daß die höchstmögliche Intensität aller drei Kalibriersubstanzen erreicht wurde.

Falls beim Tunen nur eine Empfindlichkeit von ≤ 13000 Abundance für eine der drei Massen-Ladungsverhältnisse erreicht wurde, wurde die Multiplier-Spannung (EM Volt) des Elektronen-Multipliers um 50-100 V erhöht. Der Elektronen-Multiplier hat die Aufgabe, die ankommenden Ionen-Signale zu verstärken, und durch die Erhöhung der Spannung wurde der alterungsbedingte Sensitivitätsverlust des Detektors ausgeglichen.

Insgesamt können folgende Spannungen beim Tunen verändert werden (angegeben werden typische Werte):

Linsen- und Skimmer-Spannungen	ESSKIM 1:	28,5 V	Skimmer 1
	ESOFFS:	- 1,0 V	Linse 1
	ESSKIM 2:	9,2 V	Skimmer 2
	ESLENS 2:	3,6 V	Linse 2
	ESLENS 3:	-44 V	Linse 3
Multiplier-Spannung	EM Volts:	1795 V	

Bei den Linsen- und Skimmer-Spannungen handelt es sich um Parameter des Interfaces, die Multiplier-Spannung ist ein Parameter des Detektors der MS-Engine.

Die Messungen wurden im Scan- und im SIM-Modus (selected ion monitoring) durchgeführt. Im Scan-Modus werden alle Massen-Ladungsverhältnisse (m/z) in einem gewünschten Bereich erfaßt, in der SIM-Einstellung nur einzelne ausgewählte Massen-Ladungsverhältnisse.

Die LC-ESI-MS-Technik wurde aus einem unterschiedlichen Grund zur Analyse der beiden Statine gewählt:

Lovastatin: Die ESI-MS-Analytik diente zur Identifizierung der drei Hauptmetabolite über die Molekularmasse.

Pravastatin: Hier diente sie als empfindliche Analytikmethode zur Quantifizierung der Hauptmetabolite.

12.2 Versuche zur Verbesserung der Pravastatinsignalintensität bei der Massenspektrometrie

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit war es nötig, mittels LC-MS-Technik eine empfindliche Analysemethode für Pravastatin und seine Metabolite zu entwickeln. In Vorversuchen wurde deshalb die LC-Bedingungen ermittelt, die eine empfindliche Detektion von Pravastatin ermöglichen. Es wurde überprüft, ob eine Veränderung der Laufmittelzusammensetzung (pH-Wert des Wassers, unterschiedliche organische Lösungsmittel) einen Einfluß auf die Empfindlichkeit des Pravastatinnachweises hatten. Zu diesem Zweck wurden jeweils 10 ng Pravastatin (Standard-Lösung 1 µg/ml Wasser pH-neutral, 10 µl Injektion) injiziert und über die HPLC-Anlage ins Massenspektrometer überführt. Diese Untersuchung wurde ohne chromatographische Auftrennung durchgeführt, d. h. es war keine HPLC-Säule in das System eingebaut (flow-injection).

In den API-Elektrospray-Massenspektren niedermolekularer Verbindungen, gemeint sind hier Moleküle mit einer Molekularmasse von < 1000 Dalton, dominieren im positiven Modus (nur positive Ionen werden detektiert) in der Regel einfach positiv geladene Ionen. Diese entstehen durch Anlagerung eines Protons oder durch Anlagerung von ubiquitär vorhandenen Metallkationen. Aus diesem Grund wurde vorher überprüft, welche Addukte vom Pravastatin im API-Elektrospray-Massenspektrometer nachweisbar waren.

12.3 LC-MS-Analytik von Lovastatin und seiner Metabolite

Die ESI-MS-Analytik wurde genutzt, um die drei Hauptmetabolite des Lovastatins über die Molekularmasse zu identifizieren. Es wurden analytische Säulen der Dimension 2 mm x 250 mm, gepackt mit Hypersil® C₈-Material der Partikelgröße 3 µm verwendet. Als Laufmittel

wurden Acetonitril und Wasser (angesäuert mit 0,01% Ameisensäure \cong pH 3) eingesetzt. Der Fluß betrug 0,25 ml/min, und der Säulenofen wurde auf 40 °C beheizt.

Es wurden alle Massen-Ladungsverhältnisse im Bereich von 350-550 m/z detektiert. Die Retentionszeiten der Metabolite wurden vorher durch ein HPLC-Lauf mit UV-Detektion unter den gleichen Bedingungen bestimmt. Im anschließenden HPLC-MS-Lauf konnten somit die Molekularmassen der Metabolite bestimmt werden.

12.4 LC-MS-Analytik von Pravastatin

12.4.1 LC-MS-Analytik von Pravastatin und seines Hauptmetaboliten 3'α, 5'β, 6'β-Trihydroxy-Pravastatin

Auf der Basis der unter 11.2.1 beschriebenen HPLC-Methode wurde die erste LC-MS-Methode für Pravastatin und seines Hauptmetaboliten 3'α, 5'β, 6'β-Trihydroxy-Pravastatin durchgeführt.

Bei der LC-MS-Analytik von Pravastatin und seiner Metabolite wurden analytische Säulen der Dimension 2 mm x 250 mm, gepackt mit Hypersil® C₁₈-Material der Partikelgröße 3 µm verwendet. Als Laufmittel wurden Acetonitril und Wasser angesäuert mit Ameisensäure (0,002% \cong pH 4) eingesetzt. Der Fluß betrug 0,25 ml/min, und der Säulenofen wurde auf 40 °C beheizt. Zwischen HPLC-Säule und ESI-MS wurde des Eluat durch ein eingebautes T-Stück im Verhältnis 1:1,5 gesplittet, d.h. nur 40 % wurden ins MS überführt, der Rest floß in den Abfall. Durch die Splittung betrug der Fluß ins MS-Interface nur 0,1 ml/min. Dadurch wurde erreicht, daß trotz des hohen Wasseranteils im Laufmittelgemisch, dieses vollständig im Interface verdampft werden konnte.

Diese erste LC-MS-Methode war die Grundlage einer weiteren Verbesserung der LC-Parameter (12.4.2 und 12.4.3).

12.4.2 LC-MS-Analytik von 3'α, 5'β, 6'β-Trihydroxy-Pravastatin und Hydroxy-Pravastatin

Für die LC-MS-Analytik von 3'α, 5'β, 6'β-Trihydroxy-Pravastatin wurden analytische Säulen der Dimension 2 mm x 250 mm, gepackt mit Hypersil® C₁₈-Material der Partikelgröße 5 µm verwendet. Als Laufmittel wurden 2-Propanol und Wasser angesäuert mit Ameisensäure

(0,002% \cong pH 4) eingesetzt. Der Fluß betrug 0,1 ml/min, und der Säulenofen wurde auf 40 °C beheizt. Die Parameter der LC-MS Analytik, die bei den Untersuchungen des Pravastatin-Metabolismus benutzt wurden, sind in der Tabelle 4 zusammengefaßt.

Durch ein zusätzliches Schaltventil (Modell 7010 der Firma Rheodyne) zwischen HPLC-Säule und API-Elektrospray-Interface wurde nur die Metabolitenfraktion, die zwischen 6 min und 15 min des HPLC-Laufs eluierte, ins Interface befördert. Die vollständige Waschphase (beginnend nach 15 min Chromatographie), während der auch das Pravastatin eluierte, wurde in den Abfall gepumpt. Der Chromatographielauf wurde dadurch verkürzt, daß der Fluß während der Wasch- und Equilibrierungsphase auf 0,25 ml/min erhöht wurde. Außerdem wurde das

**LC-Bedingungen: 3'α, 5'β, 6'β-Trihydroxy-Pravastatin und Hydroxy-Pravastatin;
Mikrosomenreaktionsansätze**

Säulenmaterial: C₁₈, Hypersil-ODS-2, 5 µm, Länge 250 mm, ID 2mm

Laufmittel: **A:** Wasser, pH 4, eingestellt mit Ameisensäure; 0,002%
B: 2-Propanol

Flußrate: 0,1 ml / min (Waschphase ab 15 min: 0,25 ml/min)

Säulentemperatur: 40 °C

Detektierte Massen: 463 m/z, 447 m/z, 481 m/z

Programm:

0 min	A: 82 %	B: 18 %
14 min	A: 82 %	B: 18 %
15 min	A: 5 %	B: 95 %
15 min	A: 5 %	B: 95 %

Tab. 4: LC-Bedingungen zur Quantifizierung von 3'α, 5'β, 6'β-Trihydroxy-Pravastatin und Hydroxy-Pravastatin in Mikrosomenreaktionsansätzen

Massenspektrometer nicht durch die hohen Pravastatinkonzentrationen im Reaktionsansatz von 250-2000 $\mu\text{mol/l}$ unnötig belastet. Da 3' α , 5' β , 6' β -Trihydroxy-Pravastatin nur als Referenz-Standard und kein Standard für Hydroxy-Pravastatin zur Verfügung standen, wurde über eine externe Pravastatin-Kalibriergerade quantifiziert (gespikte Reaktionsansätze mit 50 bis 800 ng/ml Pravastatin).

12.4.3 LC-MS-Analytik von Pravastatin und 3' α -Iso-Pravastatin

Für die LC-MS-Analytik von Pravastatin und seinem Metaboliten 3' α -Iso-Pravastatin wurden analytische Säulen der Dimension 2 mm x 250 mm, gepackt mit Hypersil[®] C₁₈-Material der Partikelgröße 5 μm verwendet. Als Laufmittel wurden 2-Propanol und Wasser angesäuert mit

LC-Bedingungen: Pravastatin und 3' α -Iso-Pravastatin; Cytosol-Inkubation

Säulenmaterial: C₁₈, Hypersil-ODS-2, 5 μm , Länge 250 mm, ID 2mm

Laufmittel: **A:** Wasser, pH 4, eingestellt mit Ameisensäure; 0,00 %
B: 2-Propanol

Flußrate: 0,1 ml / min (Waschphase ab 20 min: 0,25 ml/min)

Säulentemperatur: 40 °C

Detektierte Massen: 447 m/z;

<u>Programm:</u>	0 min	A: 70 %	B: 30 %
	20 min	A: 70 %	B: 30 %
	20 min	A: 10 %	B: 90 %
	25 min	A: 10 %	B: 90 %

Tab. 5: LC-Bedingungen zur Quantifizierung von Pravastatin und 3' α -Iso-Pravastatin in Cytosolreaktionsansätzen

Ameisensäure (0,002% \cong pH 4) verwendet. Der Fluß betrug 0,1 ml/min, und der Säulenofen wurde auf 40 °C beheizt. Während der Wasch- und Equilibrierungsphase wurde der Fluß von 0,1 auf 0,25 ml/min erhöht. Innerhalb dieser Zeit wurde das Eluat durch das zusätzliche Schaltventil in den Abfall gepumpt.

Da nur ein Referenz-Standard (3'-*Iso*-Pravastatin) zur Verfügung stand, wurde über eine externe Pravastatin-Kalibriergerade quantifiziert (gespikte Reaktionsansätze mit 20-200 ng/ml Pravastatin).

13. Bestimmung der Interassay-Variabilität

Zur Qualitätsüberprüfung der Bestimmung der Metabolitenkonzentrationen in den Reaktionsansätzen wurde die Interassay-Variabilität überprüft. Beginnend mit dem Pipettieren der Reaktionsansätze, der Flüssig-Flüssig-Extraktion (Lovastatin) oder der Festphasenextraktion (Pravastatin) sowie der anschließenden Analytik (Lovastatin: HPLC, Pravastatin: LC-MS) wurde die Reproduzierbarkeit überprüft (n = 24). In den Reaktionsansätzen mit Lovastatin wurde der Variationskoeffizient anhand des zugesetzten internen Standards Mevastatin bestimmt, beim Pravastatin wurden die Peakflächen der Metabolite 3'- α , 5'- β , 6'- β -Trihydroxy-Pravastatin und Hydroxy-Pravastatin zugrunde gelegt.

14. Bestimmung der enzymkinetischen Parameter K_m und V_{max} .

14.1 Bestimmung der enzymkinetischen Parameter K_m und V_{max} für die Metabolisierung von Lovastatin

Zur Bestimmung der kinetischen Parameter für den Metabolismus *in vitro* wurden jeweils Leber- und Dünndarmmikrosomen von 4 Individuen (siehe 2.) mit folgenden Lovastatinkonzentrationen inkubiert (siehe 7.1):

menschliche Lebermikrosomen	5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 μ mol/l
menschliche Dünndarmmikrosomen	10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 100 μ mol/l
Schweine-Lebermikrosomen	10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 100 μ mol/l
Schweine-Dünndarmmikrosomen (Pool)	10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 100 μ mol/l

Beim Schweinedarm wurden vier Mikrosomenpräparationen (SD A, SD S, SD Y, SD Z) eingesetzt. Jede dieser Mikrosomenlösung wurde aus gepoolten Enterozyten von 5 Individuen isoliert.

Es wurden jeweils Blindwerte mit hitzedenaturierten Mikrosomen im Inkubationsansatz für jede Lovastatinkonzentration ermittelt. Die Bestimmung der kinetischen Parameter erfolgte nach der Linearisierungsmethode nach Hanes-Woolf und Lineweaver-Burk (Bisswanger, 1994; Eisenthal und Danson, 1990) mit Hilfe der Software SigmaPlot für Windows, Version 1.0 (Jandel Scientific).

14.2 Bestimmung der kinetischen Parameter K_m und V_{max} für die Metabolisierung von Pravastatin

Zur Bestimmung der kinetischen Parameter für den Metabolismus *in vitro* wurden jeweils Mikrosomen von 4 Individuen (siehe 2.) mit folgenden Pravastatin-Konzentrationen inkubiert (siehe 7.2) :

menschliche Lebermikrosomen	250, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 2000 $\mu\text{mol/l}$
menschliche Dünndarmmikrosomen	250, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 2000 $\mu\text{mol/l}$

Es wurden jeweils Blindwerte mit hitzedenaturierten Mikrosomen im Inkubationsansatz für jede Pravastatin-Konzentration ermittelt. Die Bestimmung der kinetischen Parameter erfolgte wie bei Lovastatin beschrieben (siehe 14.1).

15. Beeinflussung der Metabolisierung von Pravastatin und Lovastatin *in vitro*

15.1 Einfluß von organischen Lösungsmitteln auf die CYP 3A-Aktivität

Bei der Untersuchung der Hemmung von CYP-Aktivitäten durch bekannte CYP- Substrate und -Inhibitoren mußte der Hemmstoff den jeweiligen Reaktionsansätzen zugefügt werden. Die meisten dieser Substanzen sind sehr schlecht wasserlöslich (Ausnahme: Debrisoquin) und wurden in einem entsprechenden organischen Lösungsmittel zugesetzt. Weil diese Lösungsmittel die im Reaktionsansatz enthaltenden CYP-Enzyme in ihrer Aktivität beeinflussen könnten, wurde deren Einfluß auf die CYP 3A-Aktivität von Lebermikrosomen

durch Bildung der Metabolite 6 β -Hydroxy- und 6 α -Exomethylen-Lovastatin untersucht. Zu Reaktionsansätzen mit 100 $\mu\text{mol/l}$ Lovastatin und menschlichen Lebermikrosomen (siehe 7.1) wurden 5 % (v/v) der organischen Lösungsmittel Ethanol, Methanol, Acetonitril, Dimethylsulfoxid und Aceton zugefügt ($n = 4$). Als Referenz fungierten Reaktionsansätze mit Puffer.

15.2 Hemmung der Lovastatinmetabolisierung *in vitro* durch spezifische CYP 3A-Inhibitoren und -Substrate

Die Hemmung von CYP 3A-Enzymaktivitäten erfolgte durch Troleandomycin, Ketoconazol und Ciclosporin. Alle drei sind selektive Inhibitoren oder Substrate dieser CYP-Subfamilie (Guengerich, 1992; Chang *et al.*, 1994, Pacifici und Fracchia, 1995).

Die in Methanol gelösten Substanzen wurden den einzelnen Reaktionsansätzen in den Konzentrationen 0,1 ; 1; 10; 100 $\mu\text{mol/l}$ zugesetzt (jeweils 10 μl ; bei Troleandomycin zusätzlich 250 $\mu\text{mol/l}$). Die Lovastatinkonzentration in den Reaktionsansätzen betrug 20 $\mu\text{mol/l}$ bei menschlichen Mikrosomen und 40 $\mu\text{mol/l}$ bei Schweinedarmmikrosomen. Zu den ungehemmten Kontrollen wurden 10 μl Methanol zugesetzt.

Bei den Ciclosporin- und den Ketoconazol-Interaktionsstudien wurde nach einer Vorinkubation von 5 min bei 37 °C die Reaktion durch Zugabe des Lovastatins gestartet, bei Troleandomycin wurde insgesamt 20 min vorinkubiert. Diese Untersuchung wurde mit menschlichen Lebermikrosomen von vier Individuen und vier Mikrosomenpräparationen aus Schweinedünndarm-Enterozyten durchgeführt.

15.3 Hemmung der Pravastatinmetabolisierung durch spezifische CYP-Inhibitoren und -Substrate

Neben der Hemmung durch Troleandomycin, Ketoconazol und Ciclosporin wurde überprüft, ob auch Substrate/Inhibitoren anderer CYP-Enzyme die Bildung von Metaboliten im Reaktionsansatz hemmen können, um die Beteiligung der verschiedenen CYP-Subfamilien am Metabolismus von Pravastatin *in vitro* aufzuklären (Guengerich, 1992; Chang *et al.*, 1994; Nelson *et al.*, 1993).

Die in Methanol (Ausnahme: Debrisoquin, Lösungsmittel hier pH neutrales Wasser) gelösten Substanzen wurden (jeweils 10 μl) den einzelnen Reaktionsansätzen mit 1000 $\mu\text{mol/l}$

Pravastatin in den Konzentrationen 1; 10; 100, 500 $\mu\text{mol/l}$ zugeben (bei S-(+)-Mephenytoin 250 $\mu\text{mol/l}$ und bei Ciclosporin 100 $\mu\text{mol/l}$ als höchste Konzentration). Als Referenz fungierten

Phenacetin	CYP 1A1/2
Coumarin	CYP 2A6
Tolbutamid	CYP 2C8/9
S-(+)-Mephenytoin	CYP 2C19
Debrisoquin	CYP 2D6
Chlorzoxazon	CYP 2E1
Ciclosporin	CYP 3A
Ketoconazol	CYP 3A
Troleandomycin	CYP 3A
Nifedipin	CYP 3A

entsprechende Ansätze mit Methanol oder Wasser. In der folgenden Übersicht sind alle eingesetzten Substrate und die entsprechenden CYP-Subfamilien oder Enzyme, die durch sie gehemmt werden, aufgelistet. Bei Ketoconazol handelt es sich im Gegensatz zu den restlichen Substanzen jedoch um einen CYP-Inhibitor.

15.4 Hemmung des Pravastatin-Phase-II-Metabolismus *in vitro*

Zur Bestätigung, ob Pravastatin als Phase-II-Substrat fungiert, wurde untersucht, ob Estron (EST) und Dehydro-*Epi*-Androsteron (DEAS), selbst Substrate einer Sulfatierung, die Bildung des Metaboliten 3' α -*Iso*-Pravastatin hemmen konnten (Kitazawa *et al.*, 1993). Jeweils 0, 50 und 200 $\mu\text{mol/l}$ der beiden in Aceton gelösten Substanzen wurden in einem Volumen von 20 μl zu den Reaktionsansätzen mit Lebercytosol (siehe 8.1; n = 4) gegeben.

15.5 Hemmung der Ciclosporinmetabolisierung *in vitro* durch Lovastatin / Pravastatin

Es wurde überprüft, ob auch Lovastatin und Pravastatin die CYP 3A-abhängige *in vitro*-Bildung der Ciclosporinmetabolite AM1 und AM9 hemmen konnten. Zu Reaktionsansätzen mit

12,5 $\mu\text{mol/l}$ Ciclosporin wurden die Statine (Lovastatin gelöst in Acetonitril/Wasser pH-neutral, v/v 2/1; Pravastatin gelöst in pH-neutralem Wasser) in den Konzentrationen 0 / 1 / 10 / 100 / 1000 mmol/l zugegeben (Pravastatin zusätzlich 5000 $\mu\text{mol/l}$).

16. Bestimmung der K_i -Werte und Art der Interaktionen für die CYP 3A-Substrate Troleandomycin und Ciclosporin sowie den CYP 3A-Inhibitor Ketoconazol für die Lovastatinmetabolisierung *in vitro*

Lovastatin wurde in folgenden Konzentrationen zu den Inkubationsansätzen gegeben: 5, 10, 15, 20, 30, 40 $\mu\text{mol/l}$ bei menschlichen Lebermikrosomen und 30, 40, 50, 60, 80, 100 mmol/l bei Schweinedarmmikrosomem. Die Substrate oder der Inhibitor wurden in 4 verschiedenen Konzentrationen zugegeben:

Inhibitor / Substrat	[$\mu\text{mol/l}$]
Ciclosporin	0 / 2,5 / 5 / 10
Ketoconazol	0 / 0,25 / 0,5 / 1
Troleandomycin (menschliche Leber)	0 / 25 / 50 / 100
(Schweinedünndarm)	0 / 0,25 / 0,5 / 1

Die Bestimmung des Hemmtyps und die Berechnung K_i -Werte erfolgte nach der Linearisierungsmethode nach Lineweaver-Burk und Hanes-Woolf und deren Sekundär-diagrammen (Bisswanger, 1994):

Die Darstellung der Meßergebnisse in der doppelt reziproken Form $1/v$ gegen $1/[S]$ des Lineweaver-Burk-Diagramms führten bei vier Inhibitorkonzentrationen zu vier Geraden.

Beim Lineweaver-Burk-Sekundärdiagramm wurden die Steigungen dieser vier Geraden gegen die vier Inhibitorkonzentrationen aufgetragen. Durch den Schnittpunkt der Gerade des Sekundärdiagramms mit der Abzisse ergab sich der K_i -Wert.

Das Hanes-Woolf-Diagramm $[S]/v$ gegen $[S]$ ergab ebenfalls vier Geraden. Bei dem entsprechenden Sekundärdiagramm wurden die vier y-Achsenabschnitte gegen die jeweiligen

Inhibitorkonzentrationen aufgetragen. Durch den Schnittpunkt der Gerade des Sekundärdiagramms mit der Abzisse erhielt man den entsprechenden K_i -Wert. Die Bestimmung des K_i -Wertes über das Hanes-Woolf-Diagramm gilt nur für den Fall einer kompetitiven Hemmung (Bisswanger, 1994). Die Berechnung der Steigungen, Y-Achsenabschnitte und der K_i -Werte erfolgte mit Hilfe der Software SigmaPlot für Windows, Version 1.0 (Jandel Scientific).

17. Immunhemmung der Statinmetabolisierung

17.1 Hemmung der Lovastatinmetabolisierung *in vitro* durch MAK gegen CYP 3A

Um die Ergebnisse der chemischen Inhibitionsversuche zu bestätigen, wurden MAK gegen menschliches CYP 3 A4/5 zur Immuninhibition des Metabolismus eingesetzt. Dieser MAK inhibiert die Enzyme CYP 3A4 und CYP 3A5, wobei keine Kreuzreaktionen mit Enzymen anderer Subfamilien (CYP 1A1, 1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6 und 2E1) nachgewiesen wurden (Gentest Produktinformation).

100 µg mikrosomales Protein gepoolter menschlicher Leber (n = 4) in einem Volumen von 20 µl wurden mit 0, 2, 4, 6, 8, 10 µl Antikörperlösung der Firma Gentest (Woburn, MA, U.S.A.) versetzt. Nach einer Vorinkubation von 15 min auf Eis wurden die Reaktionsansätze entsprechend 7.1 vervollständigt und 30 min bei 37 °C inkubiert (Lovastatinkonzentration im Reaktionsansatz: 20 µmol/l).

17.2 Hemmung der Pravastatinmetabolisierung *in vitro* durch MAK gegen CYP 3A

Um die Ergebnisse der chemischen Inhibitionsversuche zu bestätigen wurde der unter 17.1 beschriebene Versuch für Pravastatin (siehe auch 7.2; 1000 µmol/l Pravastatin; Inkubationsdauer: 60 min) durchgeführt.

Kapitel III - Ergebnisse

1. Verbesserung der CYP 3A-Ausbeute bei der Isolierung von Mikrosomen aus Darm

Bevor Untersuchungen zum Metabolismus der Statine in Darmmikrosomen durchgeführt wurden, mußte die Ausbeute an CYP-Enzymen bei der Isolierung von Mikrosomen aus Darm verbessert werden. Dieses war notwendig, denn nur hohe Proteinmengen von 2 - 3 mg in den Reaktionsansätzen führten zu einer Metabolitenkonzentration, die in der HPLC nachgewiesen werden konnte. Diese Untersuchungen wurden durch Bestimmung der CYP 3A-Aktivität von Dünndarmmikrosomen des Schweins durchgeführt, welche unter unterschiedlichen Bedingungen isoliert wurden.

1.1 Untersuchung zur Isolierung von Enterozyten aus Schweinedarm

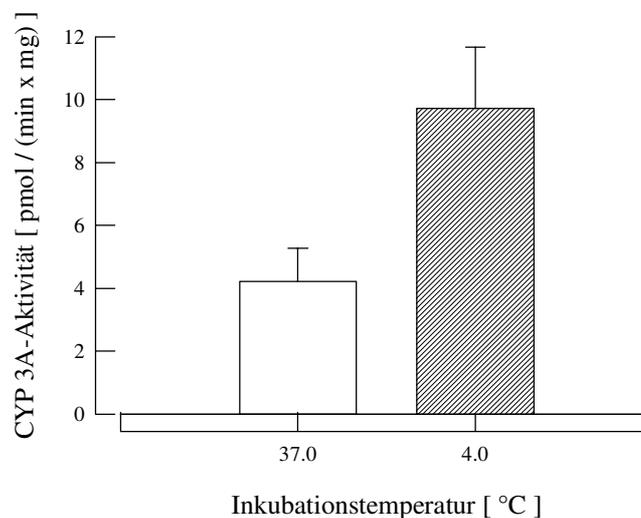


Abb. 7: Einfluß der Inkubationstemperatur während der Enterozyten-Isolierung von Dünndärmen des Schweins auf die spezifische CYP 3A-Aktivität der Mikrosomen.; weißer Balken: 37 °C, gestreifter Balken: 4 °C. Aktivitätsbestimmung durch die Bildung der Metabolite 6' β -Hydroxy-, 3''-Hydroxy- und 6'-Exomethylen-Lovastatin. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen (n = 3 gepoolte Enterozytenansätze).

Durch die Absenkung der Temperatur von 37 °C auf 4 °C bei beiden Inkubationsschritten während der Isolierung von Enterozyten aus Schweinedarm konnte die spezifische Aktivität der daraus isolierten Mikrosomen im Durchschnitt von 4,2 auf 9,7 pmol · min⁻¹ · mg⁻¹ gesteigert werden (n = 3 Enterozytenpools, Abb. 7). Dies entsprach einer Erhöhung um den Faktor 2,3.

1.2 Verbesserung des Zellaufschlusses mittels Ultraschall

Durch Verlängerung der Beschallung der Enterozytensuspension mit Ultraschall von 1 min auf 4 min konnte die Ausbeute an Gesamtprotein um den Faktor 2,2 von 6,2 auf 13,9 mg/ml gesteigert werden. Die Aktivität der Mikrosomensuspension erhöhte sich um den Faktor 1,8 von 15,8 auf 28,1 pmol · min⁻¹ · ml⁻¹ (Abb. 8). Um möglichst hohe Aktivitäten aus Enterozyten

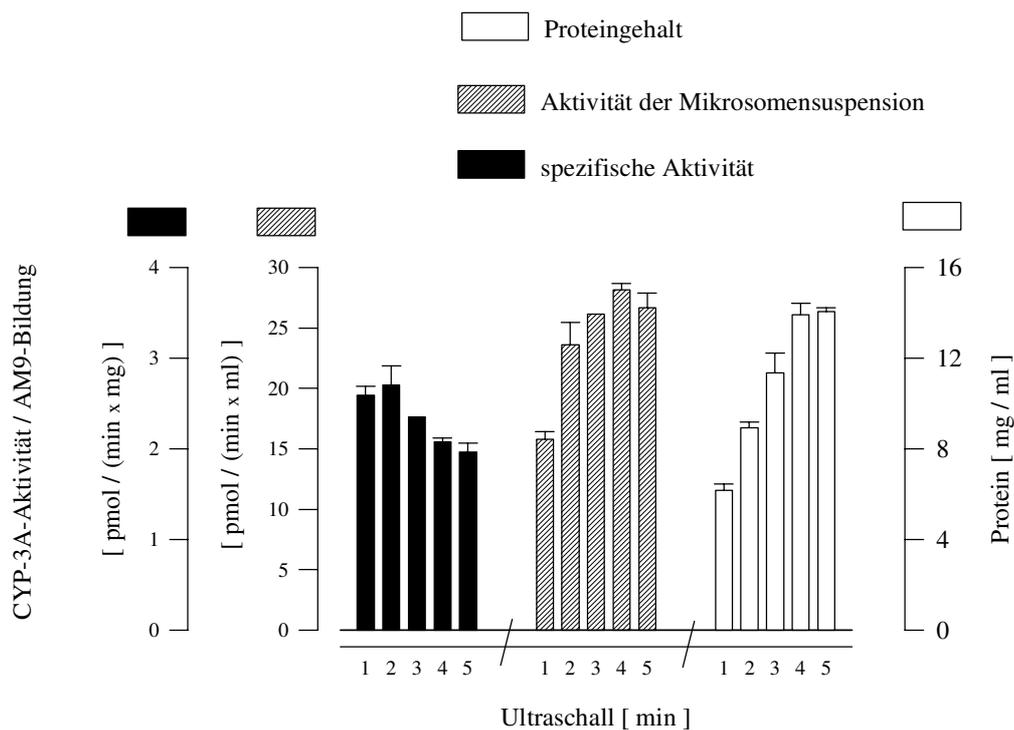


Abb. 8: Kinetik der CYP 3A- und Proteinfreisetzung bei Zellaufschluß von Schweineenterozyten mittels Ultraschall; schwarze Balken: spezifische Aktivität, gestreifte Balken: Aktivität der Mikrosomensuspension, weiße Balken: Proteingehalt der Mikrosomen. Aktivitätsbestimmung durch die Bildung des Ciclosporinmetaboliten AM9. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen (n = 3).

zu gewinnen, wurde der Zellaufschluß mittels Ultraschall 4mal 1 min durchgeführt. Die spezifische Aktivität reduzierte sich dadurch aber von 2,6 auf 2,1 pmol · min⁻¹ · mg⁻¹ (Abb. 8).

1.3 Untersuchung zur Ultrazentrifugation von Darmmikrosomen

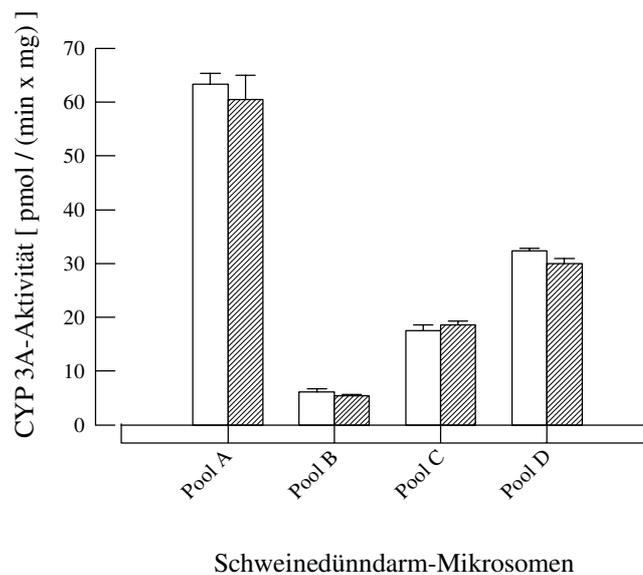


Abb. 9: Einfluß des Waschschruttes mit Puffer B während der Mikrosomen-Isolierung aus Schweinedarm (Pool A, B, C und D) auf die spezifische CYP 3A-Aktivität der Mikrosomen; weiße Balken: ohne Waschen mit Puffer B, gestreifte Balken: mit Waschen mit Puffer B. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte durch die CYP 3A-abhängigen Metabolitenbildung 6'β-Hydroxy-, 3''-Hydroxy- und 6'-Exomethylen-Lovastatin. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen (n = 3 Reaktionsansätze).

Durch den zusätzlichen Waschschrut mit Puffer B und der anschließenden Zentrifugation konnte die spezifische Aktivität der gewonnenen Schweinedünndarmmikrosomen nicht signifikant erhöht werden im Vergleich zu Mikrosomen, die während der Isolierung mit Puffer B gewaschen und anschließend nochmals zentrifugiert wurden:

Die Aktivität der Mikrosomenpools A, B, C und D erhöhte sich insgesamt nur auf 104,5 % ± 7,1 % (n = 4) bezogen auf die Aktivität der Mikrosomen, die ohne Waschgang mit Puffer B gewonnen wurden (Abb. 9). Bei der Isolierung von Enterozyten wurde somit auf das Waschen mit Puffer B verzichtet und die Dauer der Isolierung von Darmmikrosomen um 2 h reduziert.

2. Stabilität der Lovastatinmetabolite und des internen Standards Mevastatin

Die Stabilität der Lovastatinmetabolite und des internen Standards Mevastatin über einen Zeitraum von 48 h bei Raumtemperatur in Acetonitril/Wasser pH-neutral (v/v 2/1) konnte nachgewiesen werden (Abb. 10). Die angesetzte Stammlösung des internen Standards Mevastatin (60 µg/ml in Acetonitril) war bei - 20 °C über einen Zeitraum von 8 Wochen stabil (Abb. 11).

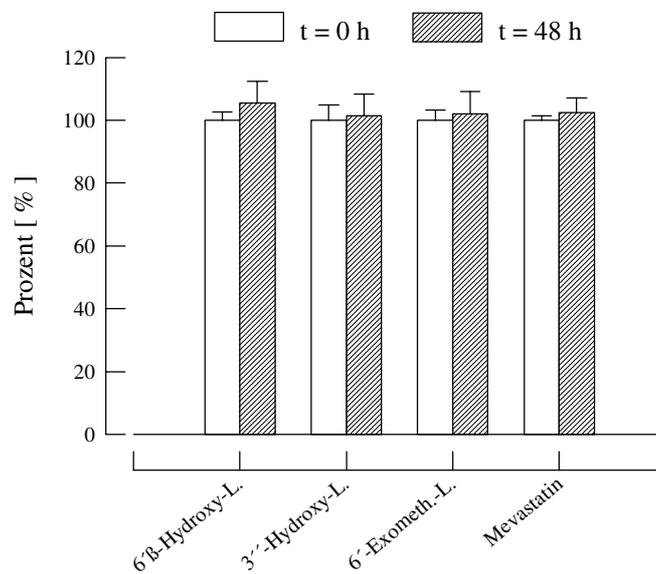


Abb. 10: Stabilitätsüberprüfung der Lovastatin-Metabolite und des internen Standards Mevastatin in der HPLC-Injektionslösung (Acetonitril / pH neutrales Wasser, 2/1, v/v) mittels HPLC-Analytik. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen (n = 3); weiße Balken: Konzentration zum Zeitpunkt t = 0 h; gestreifte Balken: Konzentration nach 48 h Inkubation bei Raumtemperatur und Lichtabschluß.

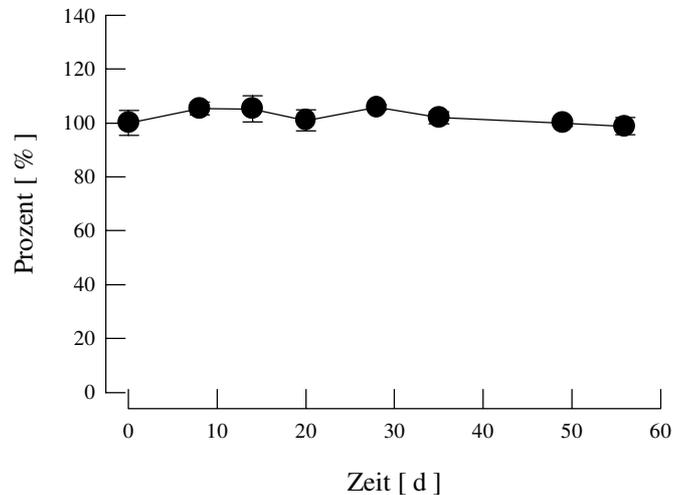
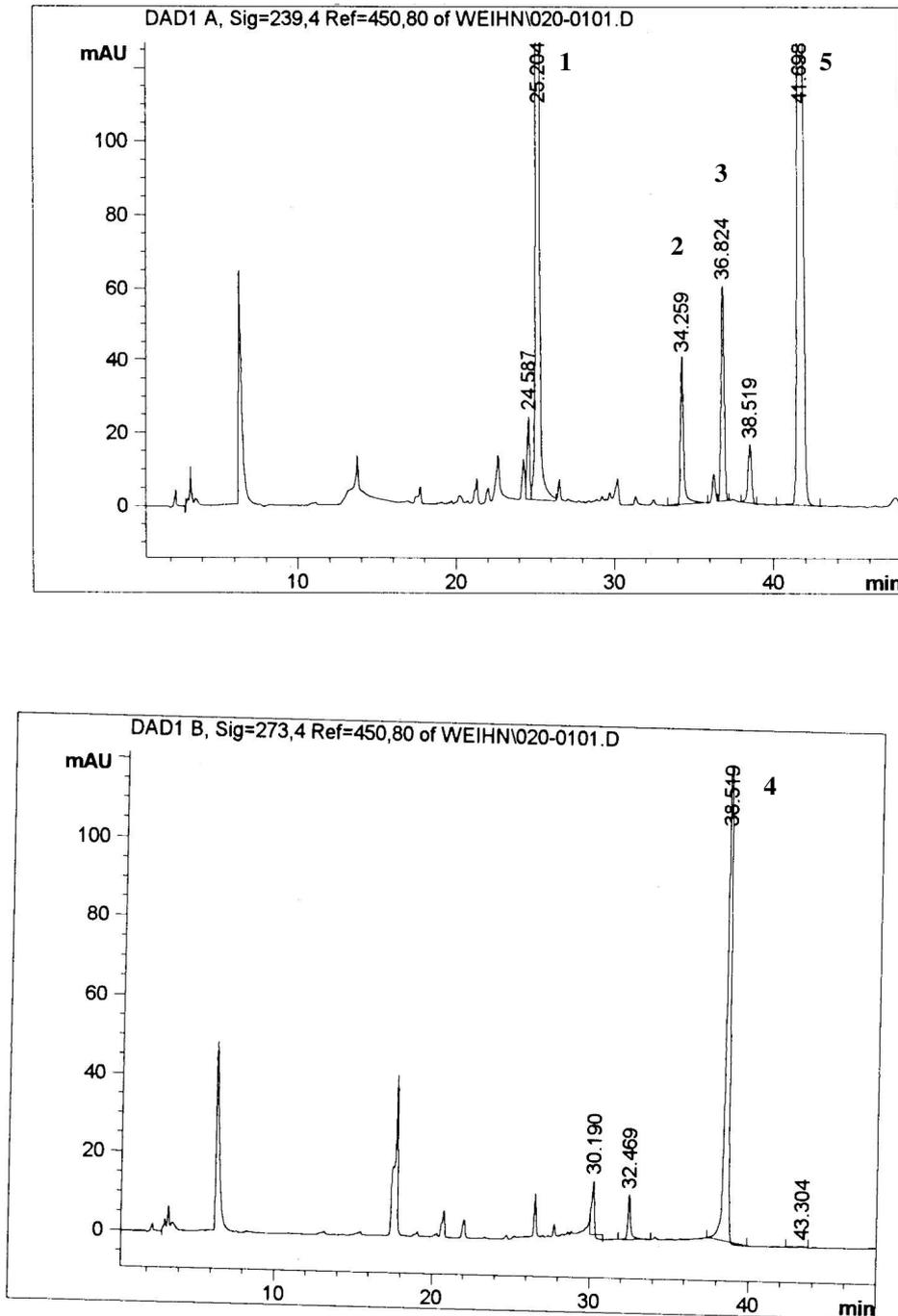


Abb. 11: Stabilitätsüberprüfung der Mevastatin-Stammlösung (60 µg / ml in Acetonitril) bei - 20 °C mittels HPLC-Analytik. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen (n = 5).

3. Metabolisierung von Lovastatin durch Leber- und Dünndarmmikrosomen des Menschen und des Schweins

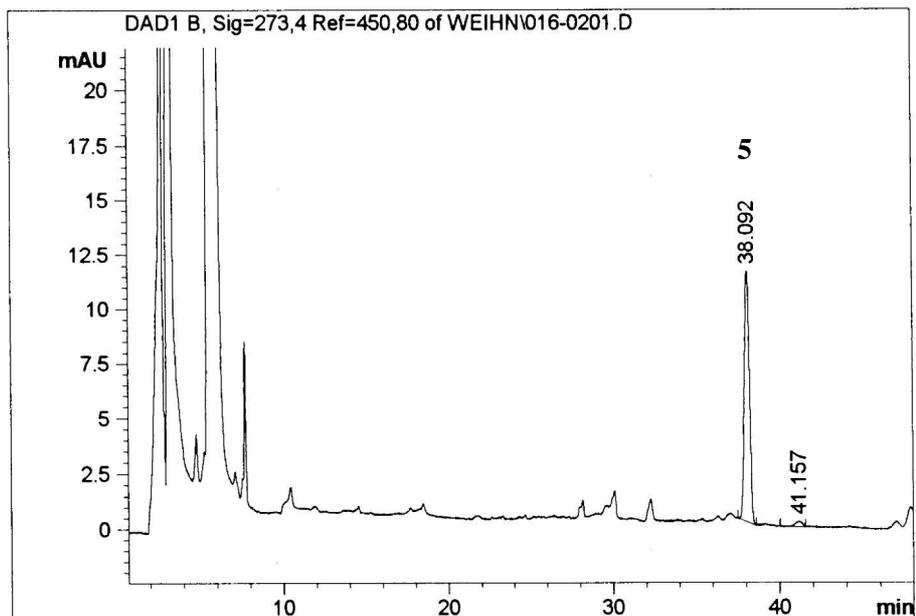
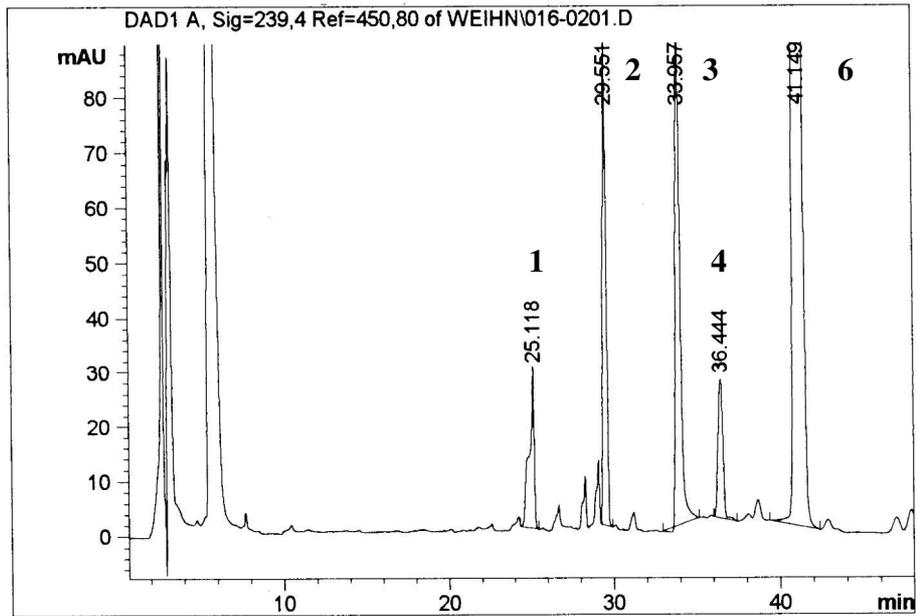
Nach erfolgter Inkubation der Reaktionsansätze mit den Mikrosomen aus Enterozyten und Lebergewebe beider Spezies und anschließender HPLC-Analytik konnten beim Menschen zwei und beim Schwein drei Metabolite detektiert werden. Mittels der UV-Spektren, der Retentionsreihenfolge im Chromatogramm (Vyas *et al.*, 1990 a,b,c) und den Daten aus der Massenspektrometrie konnten die Metabolite als 6'β-Hydroxy-, 3''-Hydroxy- und 6'-Exomethylen-Lovastatin identifiziert werden. Je ein HPLC-UV-Chromatogramm, die UV- und Massenspektren der Metabolite sind in den Abbildungen 12-15 dargestellt.

Für die beiden Metabolite 6'β-Hydroxy- und 3''-Hydroxy-Lovastatin mit der zu erwarteten Molekularmasse von 420 (Vyas *et al.*, 1990 c) wurden Molekülonen mit einem Masse-Ladungs-Verhältnis von 443 m/z nachgewiesen (Abb. 13). Die um 23 erhöhten m/z-Werte werden dadurch erklärt, daß jeweils die Natriumaddukte $[M + Na]^+$ der Metabolite detektiert



Peak	Retentionszeit [min]	Substanz
1	25	6'β-Hydroxy-Lovastatin
2	34	Lovastatin (Carboxy-Form)
3	36	Mevastatin
4	38	6'-Exomethylen-Lovastatin
5	41	Lovastatin (Lacton-Form)

Abb. 12: HPLC-UV-Chromatogramme der Lovastatin-Inkubationsansätze mit menschlichen Dünndarmmikrosomen; oben: 239 nm, unten: 273 nm. Peak 1= 6'β-Hydroxy-Lovastatin, Peak 2 = Lovastatin (Carboxy-Form), Peak 3 = Mevastatin, Peak 4 = 6'-Exomethylen-Lovastatin, Peak 5 = Lovastatin (Lacton-Form)



Peak	Retentionszeit [min]	Substanz
1	25	6'β-Hydroxy-Lovastatin
2	29	3''-Hydroxy-Lovastatin
3	34	Lovastatin (Carboxy-Form)
4	36	Mevastatin
5	38	6'-Exomethylen-Lovastatin
6	41	Lovastatin (Lacton-Form)

Abb. 13: HPLC-UV-Chromatogramme der Lovastatin-Inkubationsansätze mit Dünndarm-mikrosomen des Schweins; oben: 239 nm, unten: 273 nm. Peak 1 = 6'β-Hydroxy-Lovastatin, Peak 2 = 3''-Hydroxy-Lovastatin, Peak 3 = Lovastatin (Carboxy-Form), Peak 4 = Mevastatin, Peak 5 = 6'-Exomethylen-Lovastatin, Peak 6 = Lovastatin (Lacton-Form)

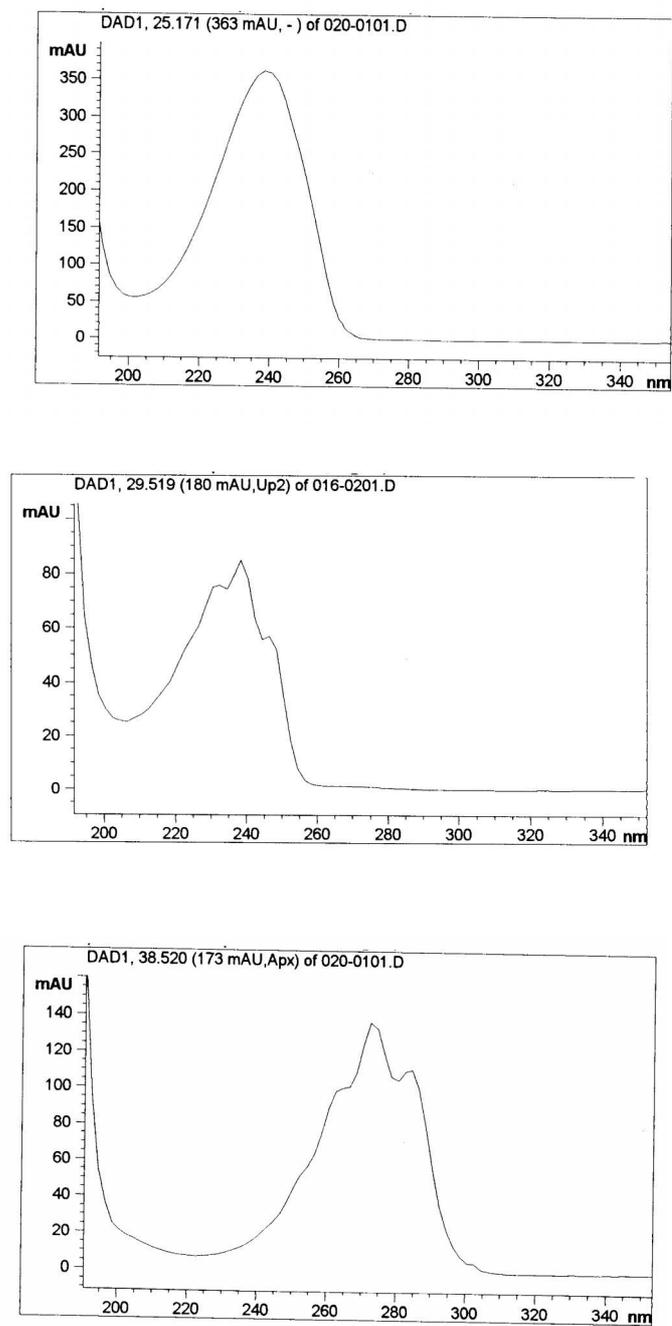


Abb. 14: UV-Spektren der drei Lovastatin-Metabolite: oben: 6' β -Hydroxy-Lovastatin, Mitte: 3''-Hydroxy-Lovastatin, unten: 6'-Exomethylen-Lovastatin

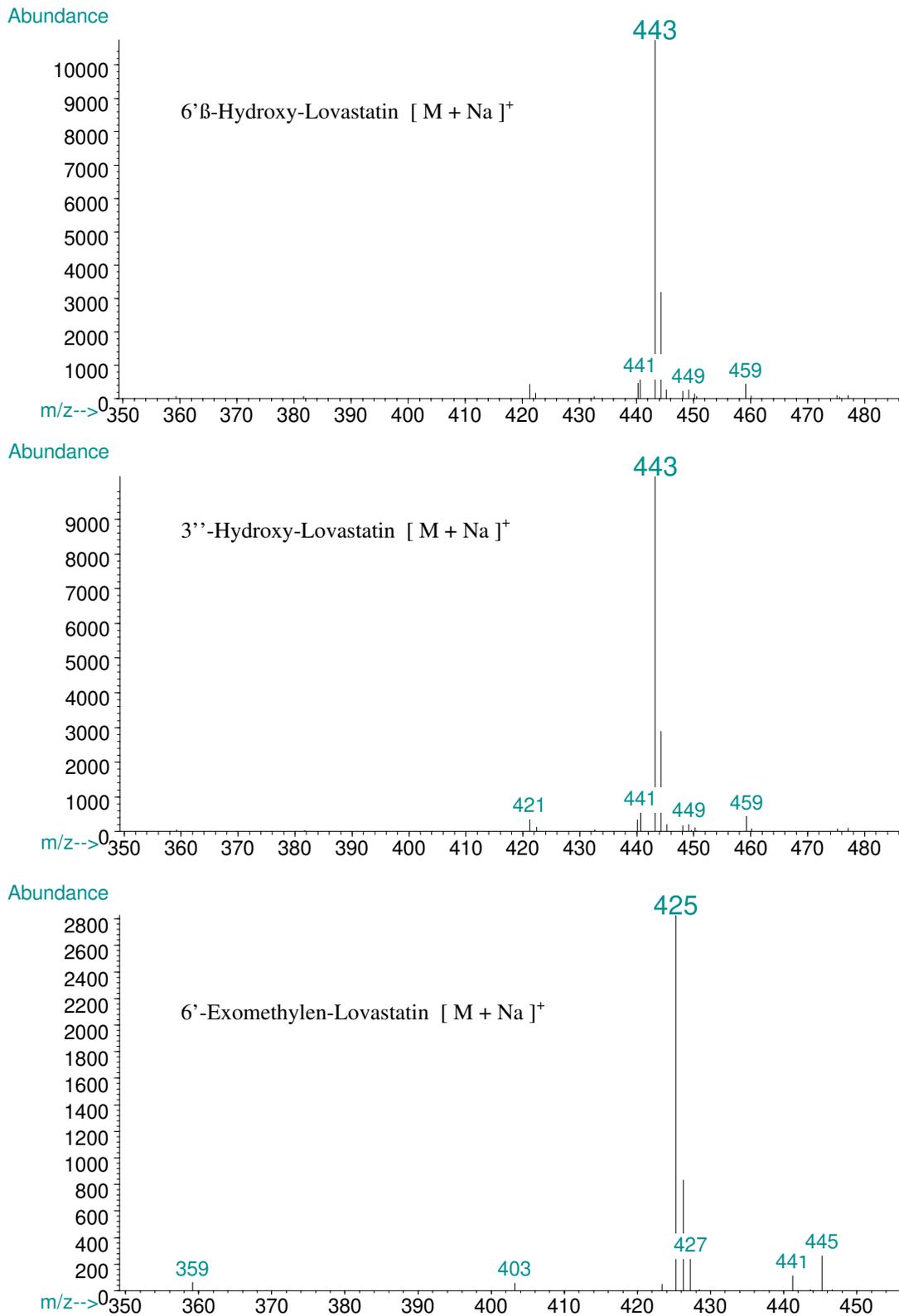


Abb. 15: Positiv-Ionen API-Elektrospray-Massenspektren der Lovastatin-Metabolite als Na-Addukt [M + Na]⁺; oben: 6'β-Hydroxy-Lovastatin, Mitte: 3''-Hydroxy-Lovastatin, unten: 6'-Exomethylen-Lovastatin

wurden. Auch bei 6'-Exomethylen-Lovastatin wurde anstatt der Masse von 402 ein Molekülion von 425 m/z nachgewiesen.

3''-Hydroxy-Lovastatin konnte weder nach der Inkubation mit Dünndarm- noch mit Lebermikrosomen des Menschen detektiert werden. Beim Schwein unterscheiden sich die Metabolitenmuster nach Inkubation mit Mikrosomen aus der Leber und des Dünndarms: Der Metabolit 3''-Hydroxy-Lovastatin konnte nur nach der Inkubation mit Dünndarmmikrosomen nachgewiesen werden.

4. Linearität der Reaktionsgeschwindigkeit bei Inkubationsansätzen mit Lovastatin

Bei diskontinuierlichen Enzymassays muß die Linearität der Reaktionsgeschwindigkeit über die gesamte Inkubationsdauer gewährleistet sein. Dies konnte bei Lebermikrosomenreaktionsansätzen (50 µmol/l Lovastatin) bis zu einer Inkubationsdauer von 20 min gezeigt werden (Abb. 16). Bei Inkubationen mit Mikrosomen des Darms war die Linearität der Metabolitenbildung über die gesamte Dauer von 60 min (Abb. 17; 100 µmol/l Lovastatin, siehe auch Kapitel II, 7.1) gewährleistet.

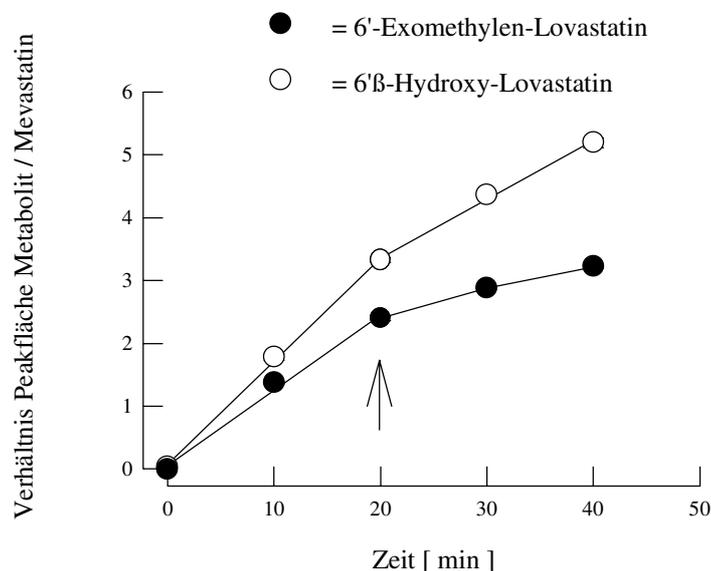


Abb. 16: Linearität der Reaktionsgeschwindigkeit bis zu einer Dauer von 20 min (siehe Pfeil) bei Lebermikrosomenansätzen mit Lovastatin als Substrat (50 µmol/l). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($n = 3$); weiße Kreise: 6'β-Hydroxy-Lovastatin, schwarze Kreise: 6'-Exomethylen-Lovastatin

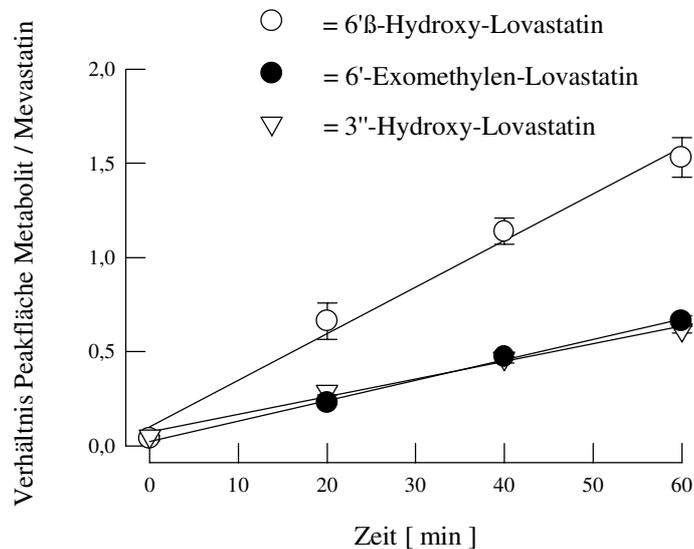


Abb. 17: Linearität der Reaktionsgeschwindigkeit bis zu einer Dauer von 60 min bei Ansätzen mit Schweinedünndarmmikrosomen und Lovastatin als Substrat (100 $\mu\text{mol/l}$). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($n = 3$); weiße Kreise: 6'β-Hydroxy-Lovastatin, schwarze Kreise: 6'-Exomethylen-Lovastatin, weiße Dreiecke: 3''-Hydroxy-Lovastatin.

5. Wiederfindungsraten von Lovastatin und seiner Metabolite bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion

Zuerst wurde das Volumen der wäßrigen und der organischen Phase eines Reaktionsansatzes nach der Phasentrennung mittels eines Meßzylinders bestimmt, indem 10 abgestoppte Reaktionsansätze (= 15 ml) zu 30 ml (Darm) oder 20 ml (Leber) Ethylacetat/Aceton-Gemisch (2/1; v/v) gegeben wurden. Nach erfolgter Phasentrennung wurden die Volumina abgelesen. Bei 10 Leberinkubationsansätzen ergab sich für die organische Phase ein Volumen von 22,0 ml ($n = 3$), bei den Ansätzen mit Dünndarmmikrosomen 30,0 ml ($n = 3$). Weil ein Teil des Acetonitrils (Abstoppreagenz) beim Leberinkubationsansatz in die organische Phase überging, erhöhte sich das Volumen der gesamten organischen Phase von 20 auf 22 ml.

Die Wiederfindungsraten von Lovastatin und seiner Metabolite sowie des internen Standards Mevastatin bezogen auf die gesamte organische Phase lagen beim Leberinkubationsansatz zwischen 87 und 94 %, bei Reaktionsansätzen mit Mikrosomen aus Dünndarm im Bereich zwischen 95 und 100 % ($n = 9$).

Die Qualität der Extraktion stand im Vordergrund, aus diesem Grund wurde nur ein Teil der organischen Phase abgenommen: Leber: 1,5 ml von 2,2 ml und Darm: 2,5 ml von 3 ml. Dadurch reduzierten sich die Wiederfindungsraten von Lovastatin und seiner Metabolite sowie von Mevastatin bezogen auf den gesamten Aufreinigungsschritt auf 59 bis 64 % bei Leberinkubationsansätzen und 79 bis 83 % bei Darminkubationsansätzen. Die Wiederfindungsrate von Carboxy-Lovastatin war bedingt durch den polaren Charakter des offenen Lactonringes erheblich reduziert. Je nach Inkubationsansatz konnten zwischen 50 und 60 % in der organischen Phase wiedergefunden werden.

6. Reproduzierbarkeit der Bestimmung der Metabolitenkonzentrationen in Reaktionsansätzen mit Lovastatin

Für die Bestimmung der Peakfläche des internen Standards Mevastatin in Reaktionsansätzen mit Lovastatin als Substrat wurde ein Variationskoeffizient von 2,7 % (n = 24) für die Lebermikrosomenansätze und von 4,7 % (n = 24) für die Dünndarmmikrosomenansätze berechnet.

7. HPLC-Kalibriergerade mit Lovastatin als Standard

Da keine Lovastatinmetabolite zur Verfügung standen, wurden die Konzentrationen der Metabolite in den Reaktionsansätzen über eine externe Lovastatin-Kalibriergerade ermittelt.

In Abbildung 18 ist eine Kalibriergerade für Lebermikrosomenansätze dargestellt: Die Nachweisgrenze dieser HPLC-Analytik betrug 61 ng/ml, berechnet über die Kalibrierfunktion: $y = 0,002 x + 0,15$. Die Gerade war über den gesamten Arbeitsbereich von 200-2000 ng/ml linear (r = 0,999). Die Berechnung der analytischen Parameter erfolgte nach der DIN 32645 (Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze).

Da während der Chromatographie, verursacht durch den niedrigen pH-Werts des Wassers im HPLC-Laufmittelgemisch, die Lacton-Form des Lovastatins zu 2,6 % \pm 0,1 % (n = 3; 2000 ng/ml) in die Carboxy-Form übergeht, wurden die Peakflächen beider Lovastatin-Formen zur Bestimmung der Kalibriergeraden herangezogen.

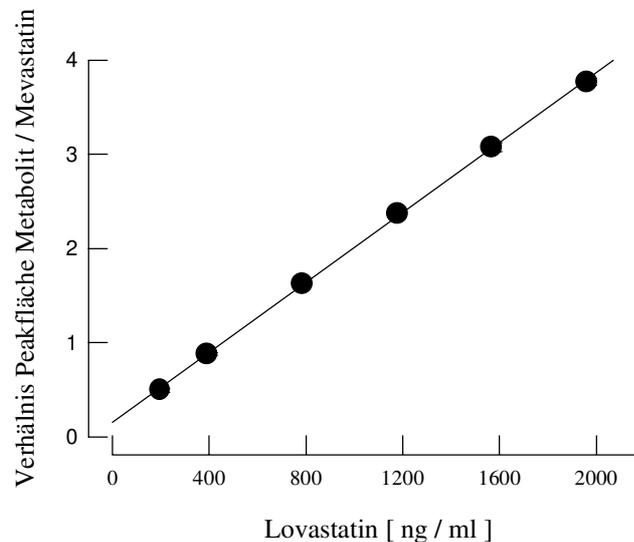


Abb. 18: Kalibriergerade für die Metabolitenbestimmung in Reaktionsansätzen mit Lebermikrosomen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($n = 3$).

8. Bestimmung der apparenten enzymkinetischen Parameter V_{max} und K_m für die Metabolisierung von Lovastatin

Um die Lovastatin metabolisierenden Enzyme zu charakterisieren und richtige Versuchsbedingungen für die Untersuchung zu wählen, wurden Messungen zur Bestimmung der kinetischen Parameter V_{max} und K_m durchgeführt.

Lovastatin wird durch CYP 3A-Enzyme metabolisiert (Wang *et al.*, 1991). Da die Aktivität jedoch keinem einzelnen Enzym dieser Subfamilie zugeordnet werden kann, konnten nur apparente kinetische Werte bestimmt werden.

Hohe Konzentrationen $> 100 \mu\text{mol/l}$ von Lovastatin in den Reaktionsansätzen führten bei Schweine- und menschlichen Lebermikrosomen zur Hemmung der Lovastatinmetabolisierung.

Die kinetischen Parameter der Lovastatinmetabolisierung durch Schweine- und menschliche Mikrosomen der Leber und des Dünndarms sind in den Tabellen 6 bis 9 dargestellt, je ein

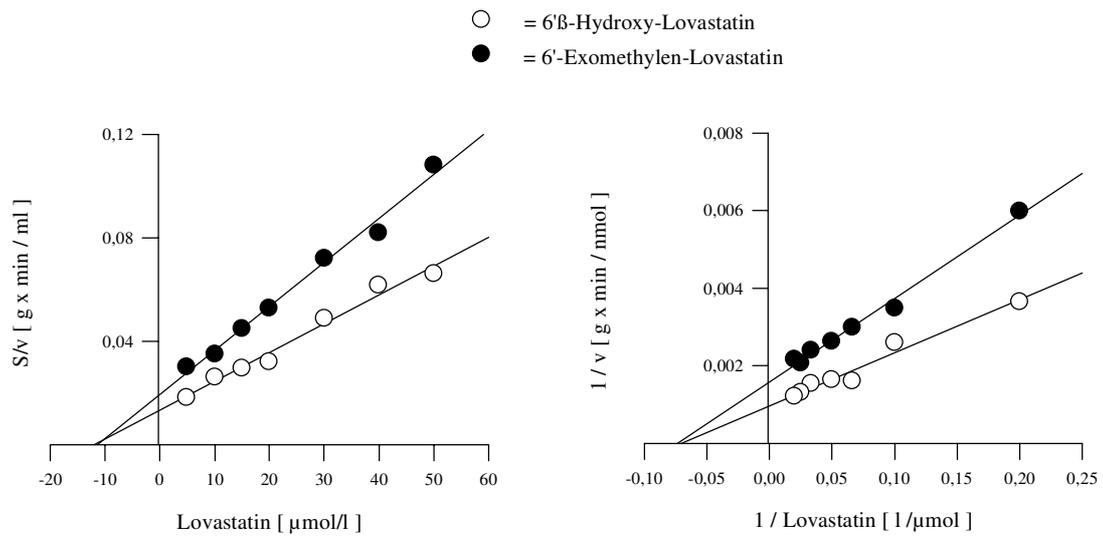


Abb. 19: Hanes-Woolf-Plot (links) und Lineweaver-Burk-Plot (rechts) für den Metabolismus von Lovastatin durch menschliche Lebermikrosomen (exemplarisch dargestellt HL M 12); weiße Kreise: 6'β-Hydroxy-Lovastatin, schwarze Kreise: 6'-Exomethylen-Lovastatin

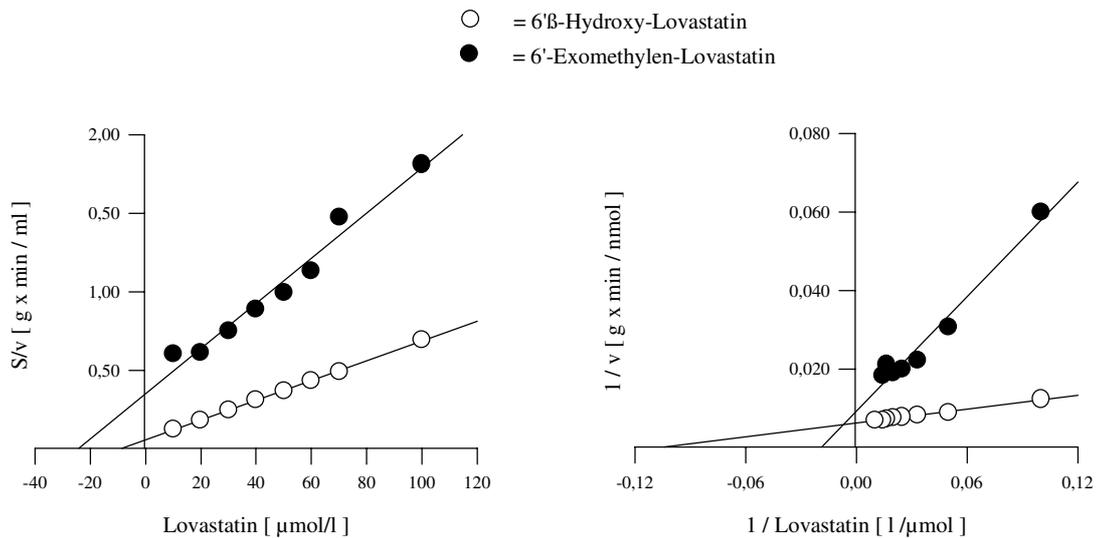


Abb. 20: Hanes-Woolf-Plot (links) und Lineweaver-Burk-Plot (rechts) für den Metabolismus von Lovastatin durch menschliche Dünndarmmikrosomen (exemplarisch dargestellt HD M R); weiße Kreise: 6'β-Hydroxy-Lovastatin, schwarze Kreise: 6'-Exomethylen-Lovastatin

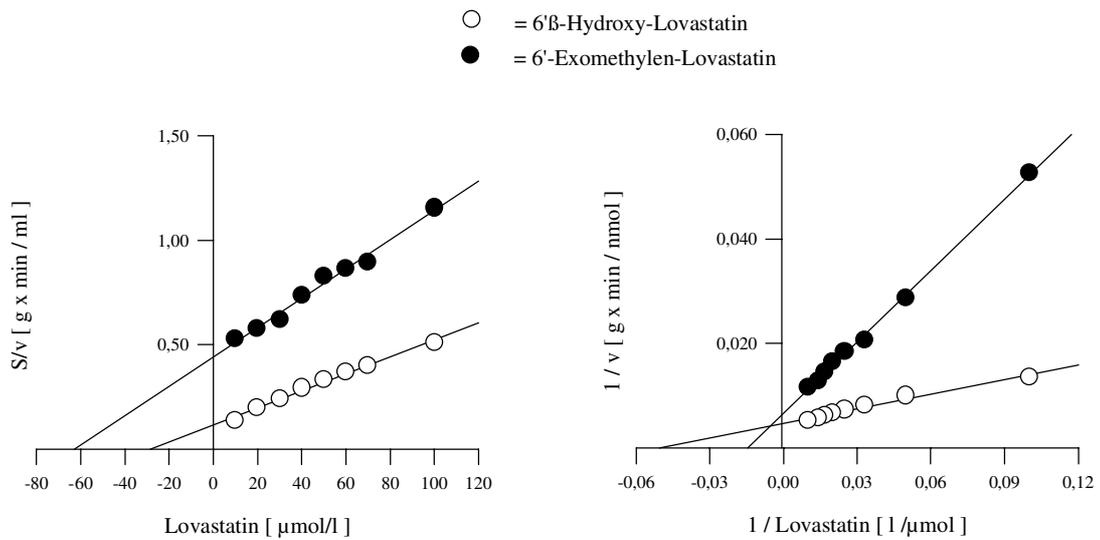


Abb. 21: Hanes-Woolf-Plot (links) und Lineweaver-Burk-Plot (rechts) für den Metabolismus von Lovastatin durch Schweine-Lebermikrosomen (exemplarisch dargestellt SL M 111); weiße Kreise: 6'β-Hydroxy-Lovastatin, schwarze Kreise: 6'-Exomethylen- Lovastatin.

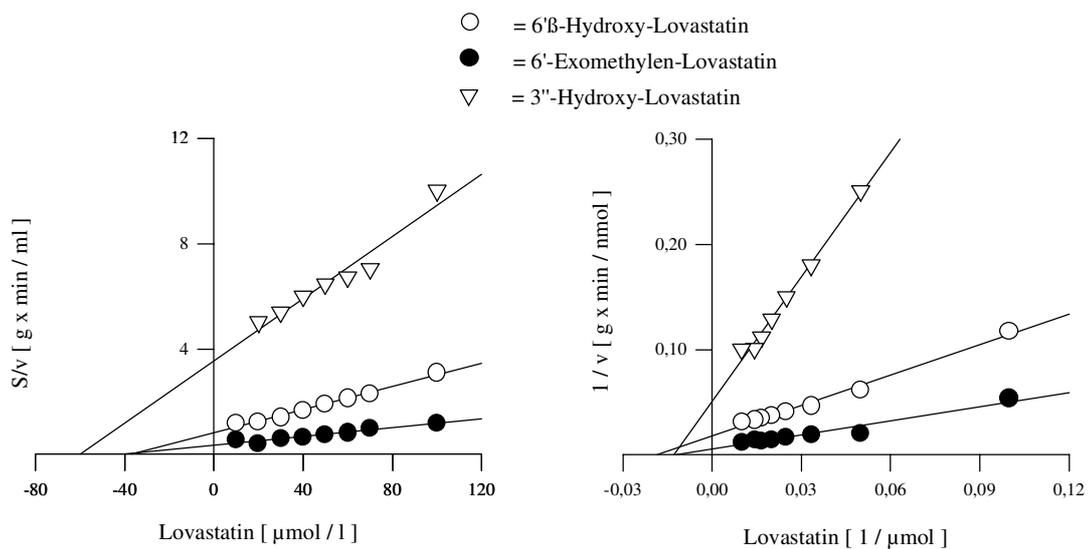


Abb. 22: Hanes-Woolf-Plot (links) und Lineweaver-Burk-Plot (rechts) für den Metabolismus von Lovastatin durch Dünndarmmikrosomen des Schweins (exemplarisch dargestellt SD A); weiße Kreise: 6'β-Hydroxy-Lovastatin, schwarze Kreise: 6'-Exomethylen- Lovastatin, weiße Dreiecke: 3''-Hydroxy-Lovastatin.

Spezies / Organ	K_m [$\mu\text{mol} / \text{l}$]		
	6'β-Hydroxy-Lovastatin	6'-Exomethylen-Lovastatin	3''-Hydroxy-Lovastatin
menschliche Leber			
HL W 01	5,2	4,1	
HL W 02	5,6	6,4	Metabolit nicht
HL M 11	8,8	10,6	nachweisbar
HL M 12	12,0	11,4	
Mittelwert \pm SD	7,9 \pm 3,2	8,1 \pm 3,5	
menschlicher Darm			
HD W H	14,3	33,8	
HD W J	8,2	12,1	Metabolit nicht
HD M R	8,6	24,1	nachweisbar
HD M K	13,8	20,6	
Mittelwert \pm SD	11,2 \pm 3,3	22,7 \pm 9,0	
Schweineleber			
SL W 101	52,4	73,0	
SL W 102	18,6	64,5	Metabolit nicht
SL M 111	28,5	62,9	nachweisbar
SL M 112	27,1	131,0	
Mittelwert \pm SD	31,7 \pm 14,5	82,9 \pm 32,4	
Schweinedünndarm			
SD A	36,7	59,7	40,0
SD X	41,1	78,4	56,3
SD Y	38,9	140,6	81,7
SD Z	19,9	44,1	37,6
Mittelwert \pm SD	34,2 \pm 9,7	80,7 \pm 42,3	53,9 \pm 20,3

Tab. 6: K_m -Werte für die Bildung der Lovastatinmetabolite 6' β -Hydroxy-, 6'-Exomethylen- und 3'' Hydroxy-Lovastatin durch Dünndarm- und Lebermikrosomen des Menschen und des Schweins. Berechnung nach der Linearisierungsmethode nach Hanes-Woolf mit der Software SigmaPlot.

Spezies / Organ	$V_{\max.}$ [pmol · min ⁻¹ · mg ⁻¹]		
	6'β-Hydroxy-Lovastatin	6'-Exomethylen-Lovastatin	3''-Hydroxy-Lovastatin
menschliche Leber			
HL W 01	2688	1859	
HL W 02	1468	1044	Metabolit nicht
HL M 11	1250	1021	nachweisbar
HL M 12	897	587	
Mittelwert ± SD	1575 ± 778	1128 ± 531	
menschlicher Darm			
HD W H	176,9	74,4	
HD W J	114,2	51,6	Metabolit nicht
HD M R	158,3	69,4	nachweisbar
HD M K	172,1	83,6	
Mittelwert ± SD	155,4 ± 28,6	69,8 ± 13,5	
Schweineleber			
SL W 101	90,5	32,9	
SL W 102	142,8	86,5	Metabolit nicht
SL M 111	245,9	142,6	nachweisbar
SL M 112	131,0	77,3	
Mittelwert ± SD	152,6 ± 66,1	84,8 ± 45,0	
Schweinedünndarm			
SD A	45,5	16,9	119,5
SD X	119,8	59,0	42,0
SD Y	56,6	38,4	13,9
SD Z	51,4	22,2	20,8
Mittelwert ± SD	68,3 ± 34,6	34,1 ± 18,9	49,1 ± 48,5

Tab. 7: $V_{\max.}$ -Werte für die Bildung der Lovastatinmetabolite 6'β-Hydroxy-, 6'-Exomethylen- und 3'' Hydroxy-Lovastatin durch Dünndarm- und Lebermikrosomen des Menschen und des Schweins. Berechnung nach der Linearisierungsmethode nach Hanes-Woolf mit der Software SigmaPlot.

Spezies / Organ	K_m [$\mu\text{mol} / \text{l}$]		
	6'β-Hydroxy-Lovastatin	6'-Exomethylen-Lovastatin	3''-Hydroxy-Lovastatin
menschliche Leber			
HL W 01	4,8	7,4	
HL W 02	6,8	9,3	Metabolit nicht
HL M 11	8,3	11,1	nachweisbar
HL M 12	11,3	13,5	
Mittelwert \pm SD	7,8 \pm 2,7	10,3 \pm 2,6	
menschlicher Darm			
HD W H	16,1	27,9	
HD W J	7,7	11,7	Metabolit nicht
HD M R	9,6	21,0	nachweisbar
HD M K	16,8	19,5	
Mittelwert \pm SD	12,6 \pm 4,6	20,0 \pm 6,6	
Schweineleber			
SL W 101	71,1	98,5	
SL W 102	15,7	48,1	Metabolit nicht
SL M 111	19,9	68,9	nachweisbar
SL M 112	20,9	71,3	
Mittelwert \pm SD	31,9 \pm 26,2	71,7 \pm 20,7	
Schweinedünndarm			
SD A	54,4	78,4	84,2
SD X	53,4	68,9	78,4
SD Y	63,7	126,9	183,2
SD Z	23,3	50,8	48,7
Mittelwert \pm SD	48,7 \pm 17,6	81,3 \pm 32,5	98,6 \pm 58,5

Tab. 8: K_m -Werte für die Bildung der Lovastatinmetabolite 6' β -Hydroxy-, 6'-Exomethylen- und 3'' Hydroxy-Lovastatin durch Dünndarm- und Lebermikrosomen des Menschen und des Schweins. Berechnung nach der Linearisierungsmethode nach Lineweaver-Burk mit der Software SigmaPlot.

Spezies / Organ	$V_{\max.}$ [pmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹]		
	6'β-Hydroxy-Lovastatin	6'-Exomethylen-Lovastatin	3''-Hydroxy-Lovastatin
menschliche Leber			
HL W 01	2646	2127	
HL W 02	1542	1164	Metabolit nicht
HL M 11	1238	1042	nachweisbar
HL M 12	877	630	
Mittelwert ± SD	1575 ± 763	1241 ± 633	
menschlicher Darm			
HD W H	183,2	70,7	
HD W J	112,9	51,1	Metabolit nicht
HD M R	161,6	67,7	nachweisbar
HD M K	178,9	92,5	
Mittelwert ± SD	159,2 ± 32,2	70,5 ± 17,0	
Schweineleber			
SL W 101	109,4	40,3	
SL W 102	135,6	73,0	Metabolit nicht
SL M 111	214,1	151,3	nachweisbar
SL M 112	118,6	75,6	
Mittelwert ± SD	144,4 ± 47,7	85,1 ± 47,0	
Schweinedünndarm			
SD A	56,2	19,8	188,1
SD X	138,4	124,4	50,9
SD Y	74,8	35,7	24,8
SD Z	54,3	23,8	23,5
Mittelwert ± SD	80,9 ± 39,4	50,9 ± 49,4	71,8 ± 78,5

Tab. 9: $V_{\max.}$ -Werte für die Bildung der Lovastatinmetabolite 6'β-Hydroxy-, 6'-Exomethylen- und 3'' Hydroxy-Lovastatin durch Dünndarm- und Lebermikrosomen des Menschen und des Schweins. Berechnung nach der Linearisierungsmethode nach Lineweaver-Burk mit der Software SigmaPlot.

Hanes-Woolf- und Lineweaver-Burk-Diagramm jeder Spezies für Darm- und Lebermikrosomen in den Abbildungen 19-22.

Für die Metabolisierung von Lovastatin durch menschliche Lebermikrosomen wurde eine hohe Affinität zwischen CYP-Enzymen und Substrat bestimmt: Für 6'β-Hydroxy-Lovastatin war der K_m -Wert 7,9 μmol/l nach der Hanes-Woolf-Linearisierungsmethode und 7,8 μmol/l nach der Lineweaver-Burk-Linearisierung. Ein ähnlicher K_m -Wert wurde für 6'-Exomethylen-Lovastatin bestimmt: 8,1 μmol/l (Hanes-Woolf) und 10,3 μmol/l (Lineweaver-Burk).

Für menschliche Dünndarmmikrosomen lagen die K_m -Werte geringfügig höher: ein um 50 % höherer K_m -Wert wurde für 6'β-Hydroxy-Lovastatin ermittelt: 11,2 μmol/l (Hanes-Woolf) und 12,6 μmol/l (Lineweaver-Burk) und für 6'-Exomethylen-Lovastatin ein knapp 3fach höherer K_m -Wert: 22,2 μmol/l (Hanes-Woolf) und 20,0 μmol/l (Lineweaver-Burk).

In der Schweineleber war die Affinität zwischen Lovastatin und CYP-Enzymen geringer als bei Mikrosomen aus menschlicher Leber: Für die Bildung von 6'β-Hydroxy-Lovastatin ist der K_m -Wert um den Faktor 4 höher (31,7 μmol/l nach Hanes-Woolf und 31,9 μmol/l nach Lineweaver-Burk). Für 6'-Exomethylen-Lovastatin mit den K_m -Wert 82,9 μmol/l (Hanes-Woolf) und 71,7 μmol/l (Lineweaver-Burk) wurde ein 10fach höherer Wert als für die Metabolisierung in der menschlichen Leber bestimmt. Die K_m -Werte für den Metabolismus im Schweinedünndarm entsprachen ungefähr den Affinitäten aus der Schweineleber. Für die Bildung des Metaboliten 3''-Hydroxy-Lovastatin, der nur durch Mikrosomen des Schweinedünndarms gebildet wurde, lag der K_m -Wert bei 54 μmol/l (Hanes-Woolf) und 98,6 μmol/l (Lineweaver-Burk).

9. Beeinflussung der Metabolisierung des CYP 3A-Substrats Lovastatin *in vitro*

9.1 Einfluß von organischen Lösungsmitteln auf die CYP 3A-Aktivität

Wenn organische Lösungsmittel den Reaktionsansätzen zugesetzt wurden, zeigte Methanol mit 71 % der Referenzaktivität die geringste, Acetonitril mit 23 % die höchste Reduzierung der CYP 3A-Aktivität der Mikrosomen. Die Werte für die Aktivitätsreduzierung lagen beim Ethanol, DMSO und Aceton zwischen 44-48 % im Vergleich zu den Kontrollansätzen mit Puffer (Abb. 23). Bei der vorliegenden *in vitro*-Interaktionsstudie wurden die Inhibitoren oder Substrate nur in Volumina von 10-20 μl/ml Reaktionsansatz zugesetzt. Der Effekt des Lösungsmittels ist somit geringer, trotzdem wurde bevorzugt Methanol als organisches Lösungsmittel eingesetzt.

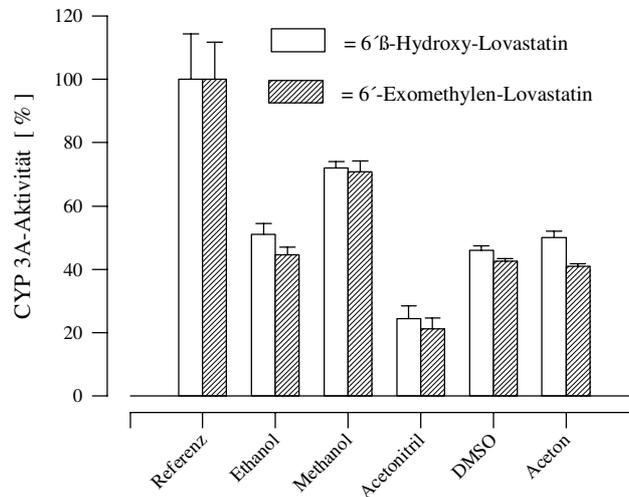


Abb. 23: Einfluß von organischen Lösungsmitteln (5 %, v/v im Reaktionsansatz) auf die CYP 3A-Aktivität von Lebermikrosomen des Menschen. Aktivitätsbestimmung durch die Metabolitenbildung 6'β-Hydroxy- und 6'-Exomethylen-Lovastatin. weißer Balken: 6'β-Hydroxy-Lovastatin; gestreifter Balken: 6'-Exomethylen-Lovastatin. Als Referenz fungierte ein Reaktionsansatz mit Puffer. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen (n = 4).

9.2 Hemmung der Lovastatinmetabolisierung durch die CYP 3A-Substrate Troleandomycin und Ciclosporin sowie den CYP 3A-Inhibitor Ketoconazol

Ciclosporin, Ketoconazol und Troleandomycin hemmten die Bildung von 6'β-Hydroxy- und 6'-Exomethylen-Lovastatin durch menschliche Lebermikrosomen und Schweinedünndarmmikrosomen. Die Bildung von 3''-Hydroxy-Lovastatin durch Dünndarmmikrosomen des Schweins wurde nur durch Ketoconazol gehemmt.

10 µmol/l Ciclosporin im Reaktionsansatz führten bei menschlichen Lebermikrosomen zu einer Inhibition zwischen 55 und 73 % der Ausgangsaktivität, 100 µmol/l reduzierten die Aktivität auf 43 bis 54 %. Bei Schweinedünndarmmikrosomen führten bereits 10 µmol/l Ciclosporin zu einer Hemmung von 49 %; 100 µmol/l erniedrigen die Aktivität auf 25 % der Aktivität von

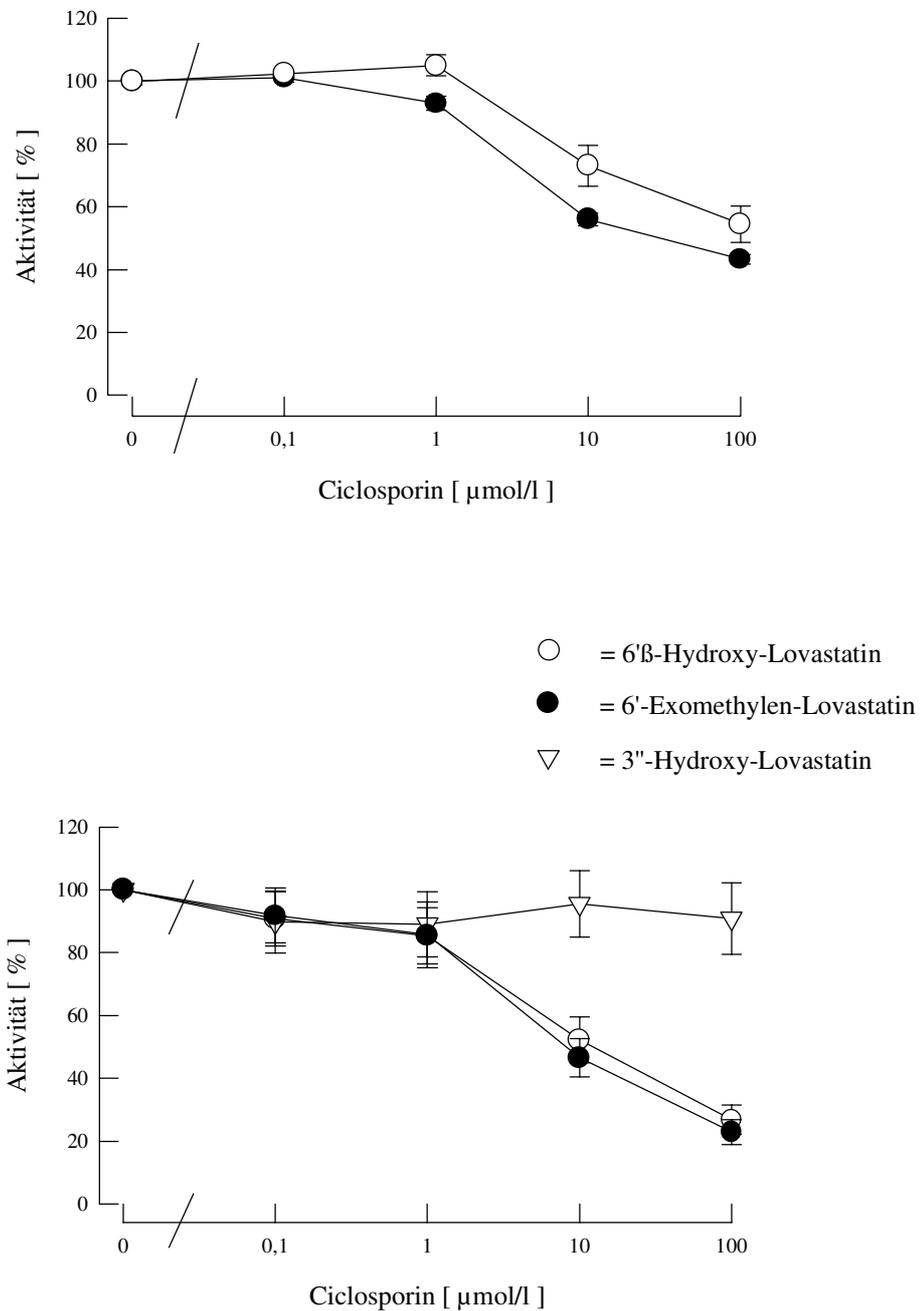


Abb. 24: Konzentrationsabhängige Hemmung des Lovastatinmetabolismus durch Cyclosporin bei Inkubation mit menschlichen Lebermikrosomen (oben) und Schweinedünndarmmikrosomen (unten); weiße Kreise: 6'β-Hydroxy-Lovastatin, schwarze Kreise: 6'-Exomethylen-Lovastatin, weiße Dreiecke: 3''-Hydroxy-Lovastatin. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($n = 4$).

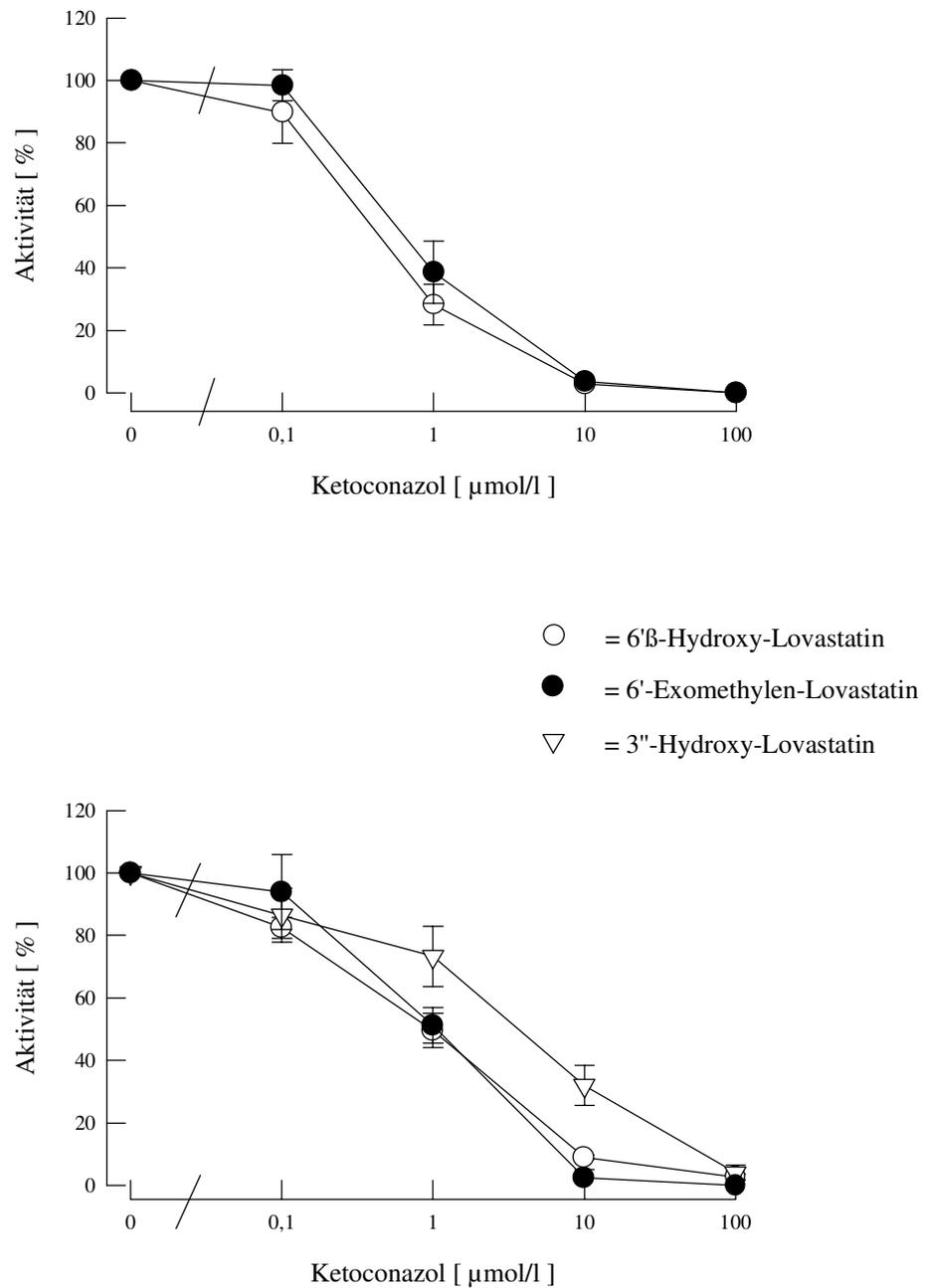


Abb. 25: Konzentrationsabhängige Hemmung des Lovastatinmetabolismus durch Ketoconazol bei Inkubation mit menschlichen Lebermikrosomen (oben) und Schweinedünndarmmikrosomen (unten); weiße Kreise: 6'β-Hydroxy-Lovastatin, schwarze Kreise: 6'-Exomethylen-Lovastatin, weiße Dreiecke: 3''-Hydroxy-Lovastatin. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen (n = 4).

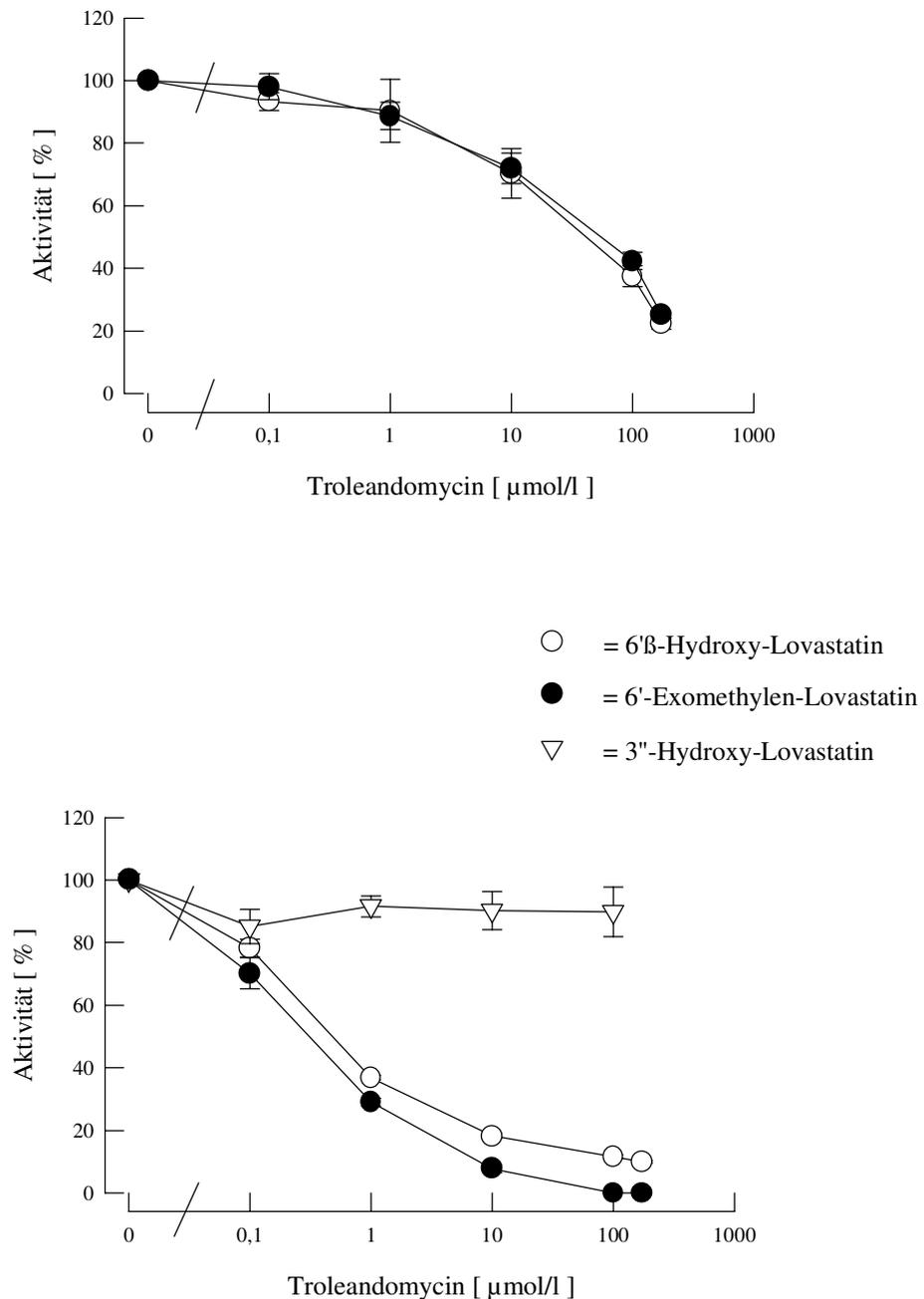


Abb. 26: Konzentrationsabhängige Hemmung des Lovastatinmetabolismus durch Troleandomycin bei Inkubation mit menschlichen Lebermikrosomen (oben) und Schweinedünndarmmikrosomen (unten); weiße Kreise: 6'β-Hydroxy-Lovastatin, schwarze Kreise: 6'-Exomethylen-Lovastatin, weiße Dreiecke: 3''-Hydroxy-Lovastatin. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen (n = 4).

Reaktionsansätzen ohne Ciclosporin (Abb. 24). Bei Konzentrationen von $> 10 \mu\text{mol/l}$ im Reaktionsansatz (Zusatz als Methanollösung, $10 \mu\text{l/ml}$ Reaktionsansatz) löste sich Ciclosporin nicht vollständig, es lag als Kolloid vor. Auch zusätzliche 5 % (v/v) Methanol im Reaktionsansatz führten zu keiner vollständigen Löslichkeit des Ciclosporins. Dies könnte dazu führen, daß bei hohen Ciclosporinkonzentrationen keine der Konzentration entsprechende Hemmung stattfand. Bei Ansätzen mit zusätzlichem Methanol konnte kein stärkerer inhibitorischer Effekt des Ciclosporins nachgewiesen werden: $50 \mu\text{mol/l}$ Ciclosporin hemmen die Bildung von $6'\beta$ -Hydroxy-Lovastatin in menschlichen Lebermikrosomen mit 2 % (v/v) Methanol um 48 %, mit 7 % (v/v) Methanol konnte die Hemmung mit 47 % geringerer Metabolitenbildung nicht verstärkt werden ($n = 4$).

Ketoconazol reduzierte bereits bei $10 \mu\text{mol/l}$ in den Reaktionsansätzen mit menschlichen Lebermikrosomen und Schweinedünndarmmikrosomen die Aktivität auf Werte von $< 10 \%$. Die $3''$ -Hydroxy-Lovastatinbildung wurde bei dieser Konzentration auf 32 % reduziert (Abb. 25). Die Hemmung des Lovastatinmetabolismus durch Troleandomycin unterschied sich bei beiden Spezies: $100 \mu\text{mol/l}$ Troleandomycin hemmten die Bildung der Metabolite $6'\beta$ -Hydroxy- und $6'$ -Exomethylen-Lovastatin in menschlichen Lebermikrosomen um 60 %. Bei Schweinedünndarmmikrosomen konnte bei dieser Konzentration bereits kein $6'$ -Exomethylen-Lovastatin nachgewiesen werden, die Aktivität der $6'\beta$ -Hydroxy-Lovastatin-Bildung wurde auf 12 % reduziert (Abb. 26).

9. 3 Immuninhibition der Lovastatinmetabolisierung in menschlichen Lebermikrosomen

Als Positiv-Kontrolle wurde überprüft, ob die MAK gegen menschliches CYP 3A4/5 den Lovastatinmetabolismus konzentrationsabhängig hemmen konnten.

Bereits $2 \mu\text{l}$ der MAK-Lösung ($\cong 20 \mu\text{g}$ Protein) pro $100 \mu\text{g}$ mikrosomalem Protein menschlicher Leber ($n = 4$) inhibierten die Metabolisierung von Lovastatin um 54 und 61 % (Abb. 27). Die Metabolisierung durch Schweinedünndarmmikrosomen konnte aufgrund der Spezifität der Antikörper gegenüber menschlichem CYP 3A4/5 nicht inhibiert werden.

10. Hemmung der Ciclosporinmetabolisierung durch Lovastatin

$100 \mu\text{mol/l}$ Lovastatin in Reaktionsansätzen mit menschlichen Lebermikrosomen hemmten die CYP 3A-abhängige Bildung der Hydroxymetabolite AM1 und AM9 um 66 und 60 %, eine

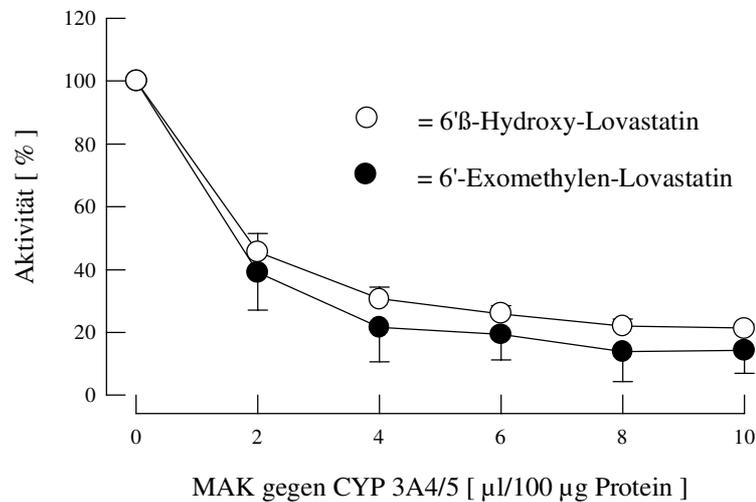


Abb. 27: Konzentrationsabhängigkeit der Immuninhibition des Lovastatinmetabolismus in menschlichen Lebermikrosomen durch MAK gegen menschliches CYP 3A4/5. weiße Kreise: 6'β-Hydroxy-Lovastatin, schwarze Kreise: 6'-Exomethylen-Lovastatin (1 µl MAK \cong 10 µg Protein, Lovastatinkonzentration: 20 µmol/l). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen (n = 4).

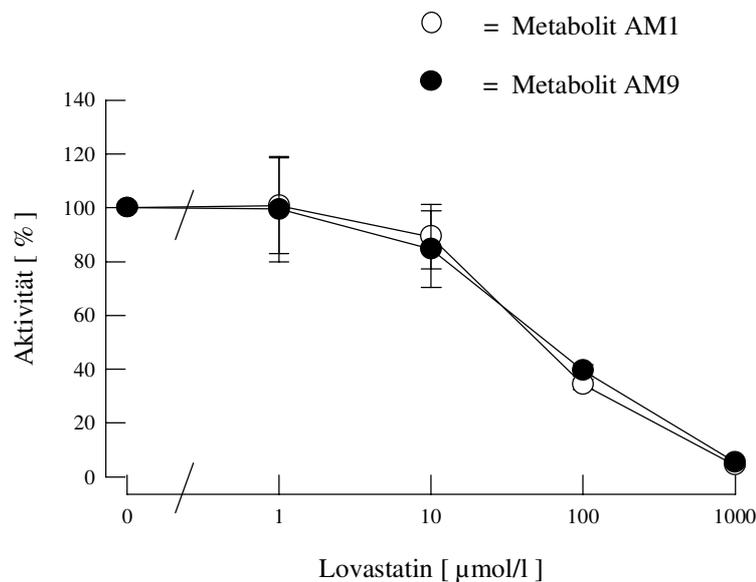


Abb. 28: Konzentrationsabhängige Hemmung der Cyclosporinmetabolisierung durch Lovastatin bei Inkubation mit menschlichen Lebermikrosomen; weiße Kreise: Hydroxy-Cyclosporin AM1, schwarze Kreise: Hydroxy-Cyclosporin AM9. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen (n = 4).

10fach höhere Konzentration von Lovastatin hemmte die Ausgangsaktivität auf 5 und 4 % (Abb. 28).

11. Bestimmung des Hemmtyps und der K_i -Werte von Pharmaka, die mit der Metabolisierung von Lovastatin *in vitro* in der menschlichen Leber und im Dünndarm des Schweins interagieren

Die K_i -Werte wurden für die beiden CYP 3A-Substrate Ciclosporin und Troleandomycin sowie den CYP 3A-Inhibitor Ketoconazol bestimmt.

Je ein Lineweaver-Burk- und ein Hanes-Woolf-Plot für die Inhibition der Bildung des Metaboliten 6 β -Hydroxy-Lovastatin durch Mikrosomen der menschlichen Leber sind in den Abbildungen 29-34 dargestellt, alle K_i -Werten für die Metabolisierung von Lovastatin durch Dünndarmmikrosomen des Schweins und der menschlichen Leber sind in den Tabellen 10-12 aufgelistet.

Ciclosporin hemmte die Bildung der Lovastatinmetabolite durch menschliche Lebermikrosomen je nach Methode und Metaboliten mit K_i -Werten zwischen 7 und 10 $\mu\text{mol/l}$. Für die Metabolisierung durch Schweinedünndarmmikrosomen wurden K_i -Werte zwischen 1,6 und 4,0 $\mu\text{mol/l}$ bestimmt. Bei beiden Spezies erfolgte die Hemmung kompetitiv. Dieser Hemmtyp ist typisch für Substrate, wie Ciclosporin und Lovastatin, die von denselben CYP-Enzymen (hier CYP 3 A) metabolisiert werden.

Der effektivste Inhibitor war Ketoconazol mit K_i -Werten zwischen 0,25 und 0,4 $\mu\text{mol/l}$ für menschliche Lebermikrosomen und Schweinedünndarmmikrosomen. Die Hemmung erfolgte beim Schwein kompetitiv, beim Menschen nicht-kompetitiv. Der K_i -Wert der 3''-Hydroxy-Lovastatinbildung, der Metabolit der nur durch Schweinedünndarmmikrosomen gebildet wurde, lag mit 3,4 $\mu\text{mol/l}$ 10fach höher als der K_i -Wert der anderen beiden Metabolite.

Den geringsten inhibitorischen Effekt bei menschlichen Lebermikrosomen zeigte Troleandomycin mit K_i -Werten zwischen 27 und 31 $\mu\text{mol/l}$ für die Hemmung der 6 β -Hydroxy- und 6'-Exomethylen-Lovastatinbildung. Die Metabolisierung durch Schweinedünndarmmikrosomen wurde mit K_i -Werten von 0,25 bis 0,8 $\mu\text{mol/l}$ wesentlich stärker inhibiert. Troleandomycin war bei menschlichen Lebermikrosomen und Schweinedünndarmmikrosomen ein kompetitiver Inhibitor. Die Entscheidungen hinsichtlich der verschiedenen Hemmtypen konnten nicht mit absoluter Sicherheit getroffen werden, da sich meistens nur drei der vier Geraden in einem Punkt schneideten.

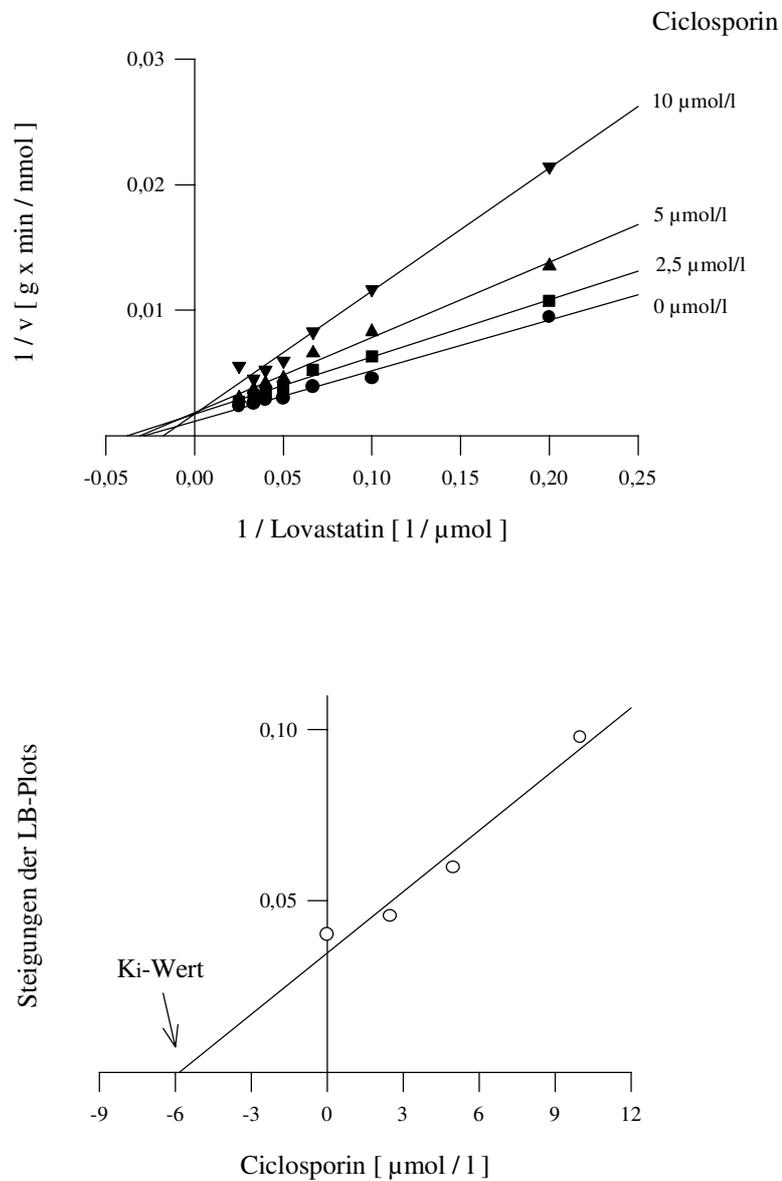


Abb. 29: Kompetitive Hemmung der Bildung von 6'β-Hydroxy-Lovastatin durch Cyclosporin während der Inkubation mit Lebermikrosomen des Menschen (n = 4, exemplarisch dargestellt HL M 11). oben: Lineweaver-Burk-Diagramm; schwarze Kreise: 0 $\mu\text{mol/l}$ Cyclosporin, schwarze Quadrate: 2,5 $\mu\text{mol/l}$ Cyclosporin, schwarze Dreiecke mit der Spitze nach oben: 5 $\mu\text{mol/l}$ Cyclosporin, schwarze Dreiecke mit der Spitze nach unten: 10 $\mu\text{mol/l}$ Cyclosporin. unten: Sekundärdiagramm zur Bestimmung der Hemmkonstanten aus den Steigungen (weiße Kreise) der Geraden des Lineweaver-Burk-Diagramms.

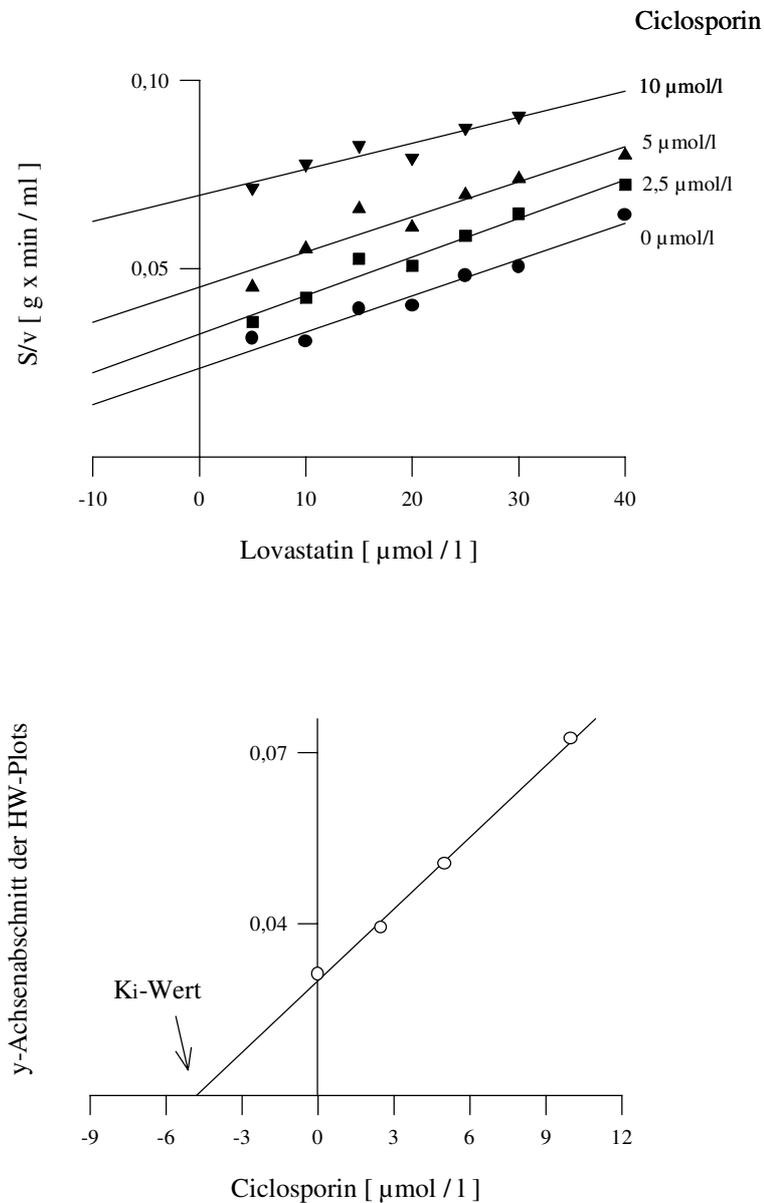


Abb. 30: Kompetitive Hemmung der Bildung von 6' β -Hydroxy-Lovastatin durch Ciclosporin wahrend der Inkubation mit Lebermikrosomen des Menschen ($n = 4$, exemplarisch dargestellt HL M 11). oben: Hanes-Woolf-Diagramm; schwarze Kreise: 0 $\mu\text{mol/l}$ Ciclosporin, schwarze Quadrate: 2,5 $\mu\text{mol/l}$ Ciclosporin, schwarze Dreiecke mit der Spitze nach oben: 5 $\mu\text{mol/l}$ Ciclosporin, schwarze Dreiecke mit der Spitze nach unten: 10 $\mu\text{mol/l}$ Ciclosporin. unten: Sekundardiagramm zur Bestimmung der Hemmkonstanten aus den Ordinatenabschnitten (weiße Kreise) der Geraden des Hanes-Woolf-Diagramms.

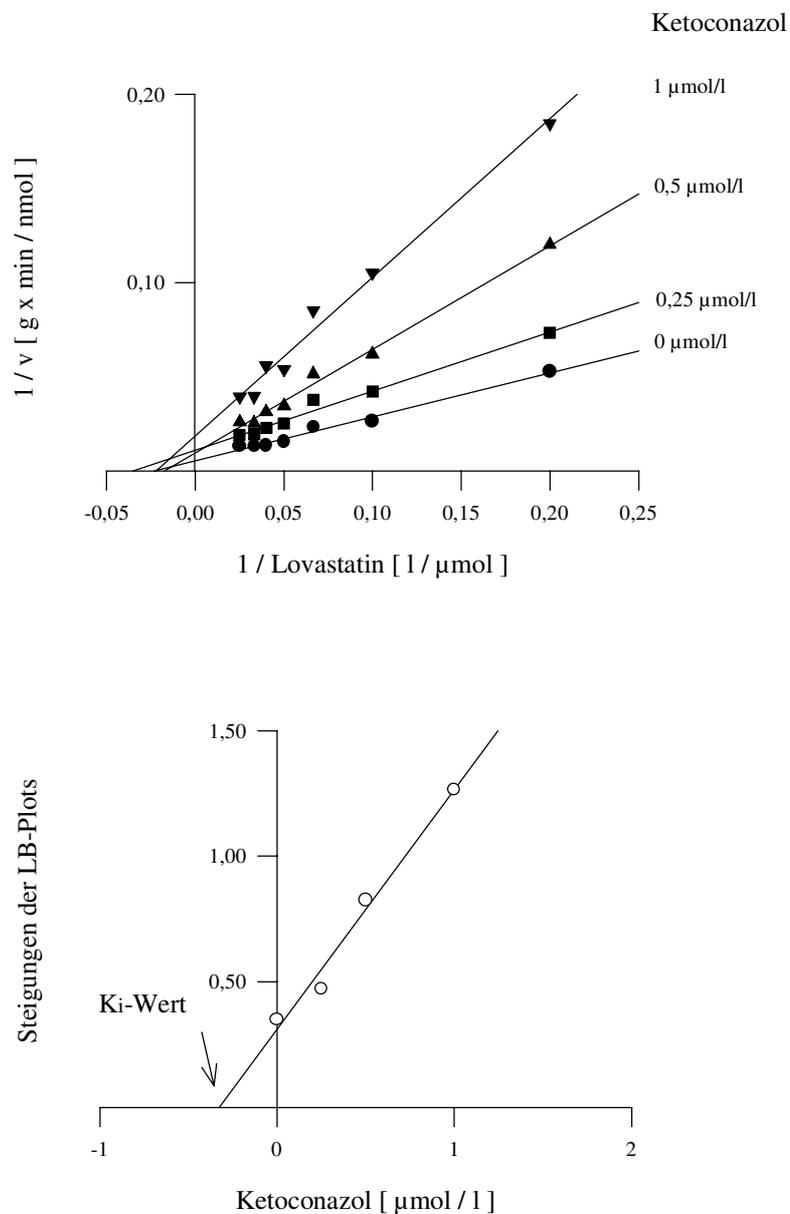


Abb. 31: Nicht-kompetitive Hemmung der Bildung von 6 β -Hydroxy-Lovastatin durch Ketoconazol während der Inkubation mit Lebermikrosomen des Menschen ($n = 4$, exemplarisch dargestellt HL M 11). oben: Lineweaver-Burk-Diagramm; schwarze Kreise: 0 $\mu\text{mol/l}$ Ketoconazol, schwarze Quadrate: 0,25 $\mu\text{mol/l}$ Ketoconazol, schwarze Dreiecke mit der Spitze nach oben: 0,5 $\mu\text{mol/l}$ Ketoconazol, schwarze Dreiecke mit der Spitze nach unten: 1,0 $\mu\text{mol/l}$ Ketoconazol. unten: Sekundärplot zur Bestimmung der Hemmkonstanten aus den Steigungen (weiße Kreise) der Geraden des Lineweaver-Burk-Diagramms.

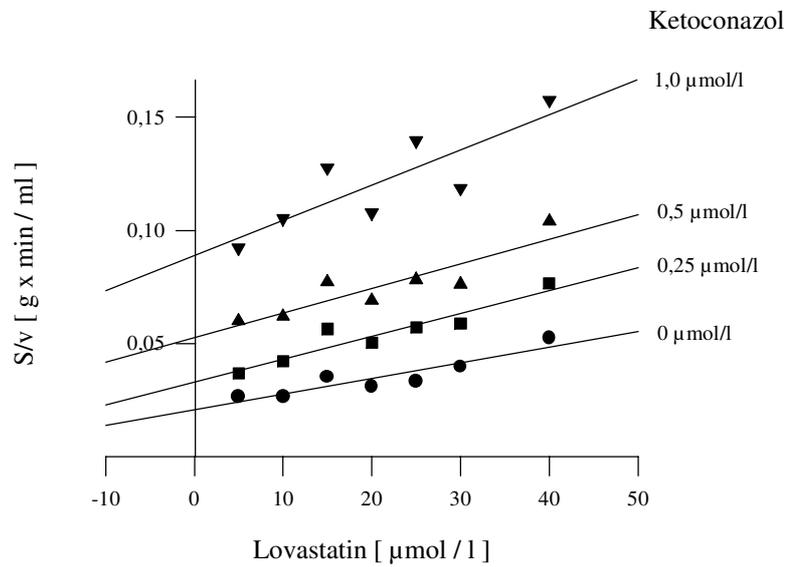


Abb. 32: Nicht-kompetitive Hemmung der Bildung von 6'β-Hydroxy-Lovastatin durch Ketoconazol während der Inkubation mit Lebermikrosomen des Menschen ($n = 4$, exemplarisch dargestellt HL M 11): Hanes-Woolf-Diagramm; schwarze Kreise: 0 μmol/l Ketoconazol, schwarze Quadrate: 0,25 μmol/l Ketoconazol, schwarze Dreiecke mit der Spitze nach oben: 0,5 μmol/l Ketoconazol, schwarze Dreiecke mit der Spitze nach unten: 1,0 μmol/l Ketoconazol.

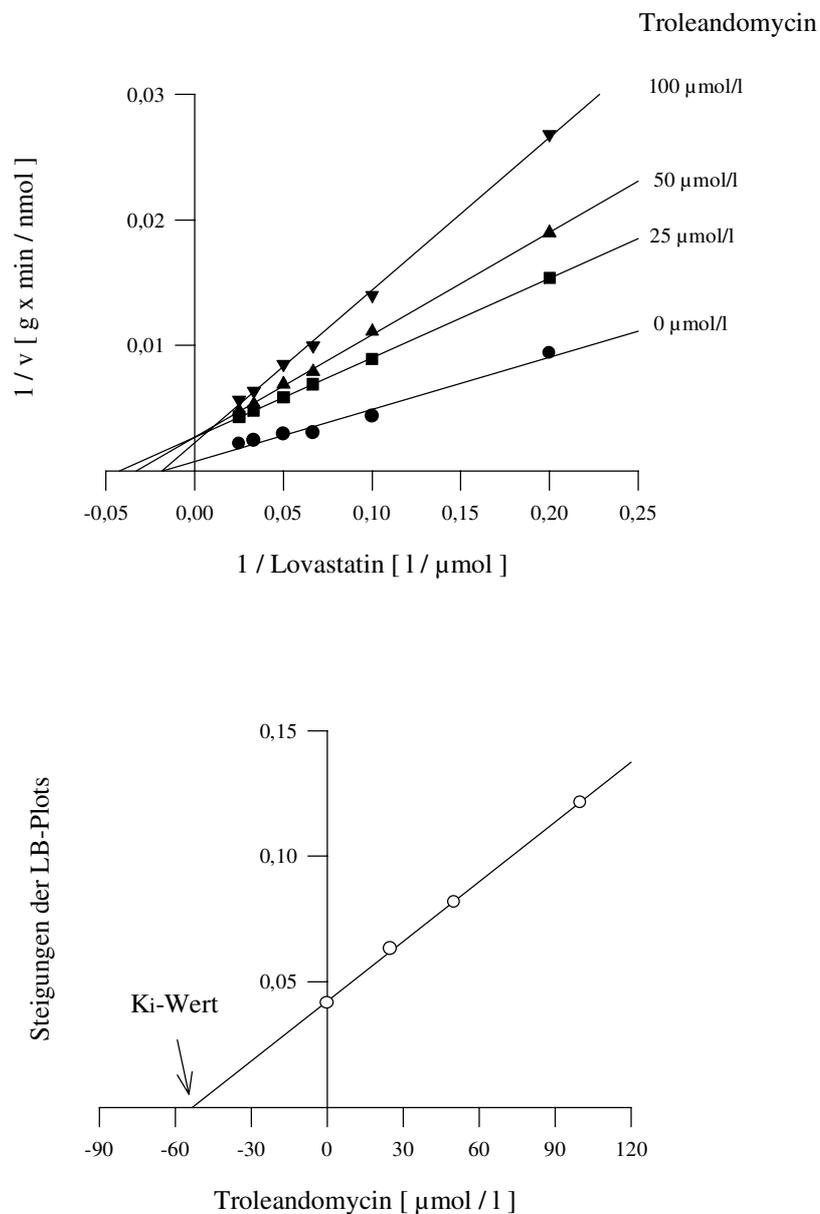


Abb. 33: Kompetitive Hemmung der Bildung von 6 β -Hydroxy-Lovastatin durch Troleandomycin wahrend der Inkubation mit Lebermikrosomen des Menschen ($n = 4$, exemplarisch dargestellt HL M 11). oben: Lineweaver-Burk-Diagramm; schwarze Kreise: 0 $\mu\text{mol/l}$ Troleandomycin, schwarze Quadrate: 25 $\mu\text{mol/l}$ Troleandomycin, schwarze Dreiecke mit der Spitze nach oben: 50 $\mu\text{mol/l}$ Troleandomycin, schwarze Dreiecke mit der Spitze nach unten: 100 $\mu\text{mol/l}$ Troleandomycin. unten: Sekundardiagramm zur Bestimmung der Hemmkonstanten aus den Steigungen (weiße Kreise) der Geraden des Lineweaver-Burk-Diagramms.

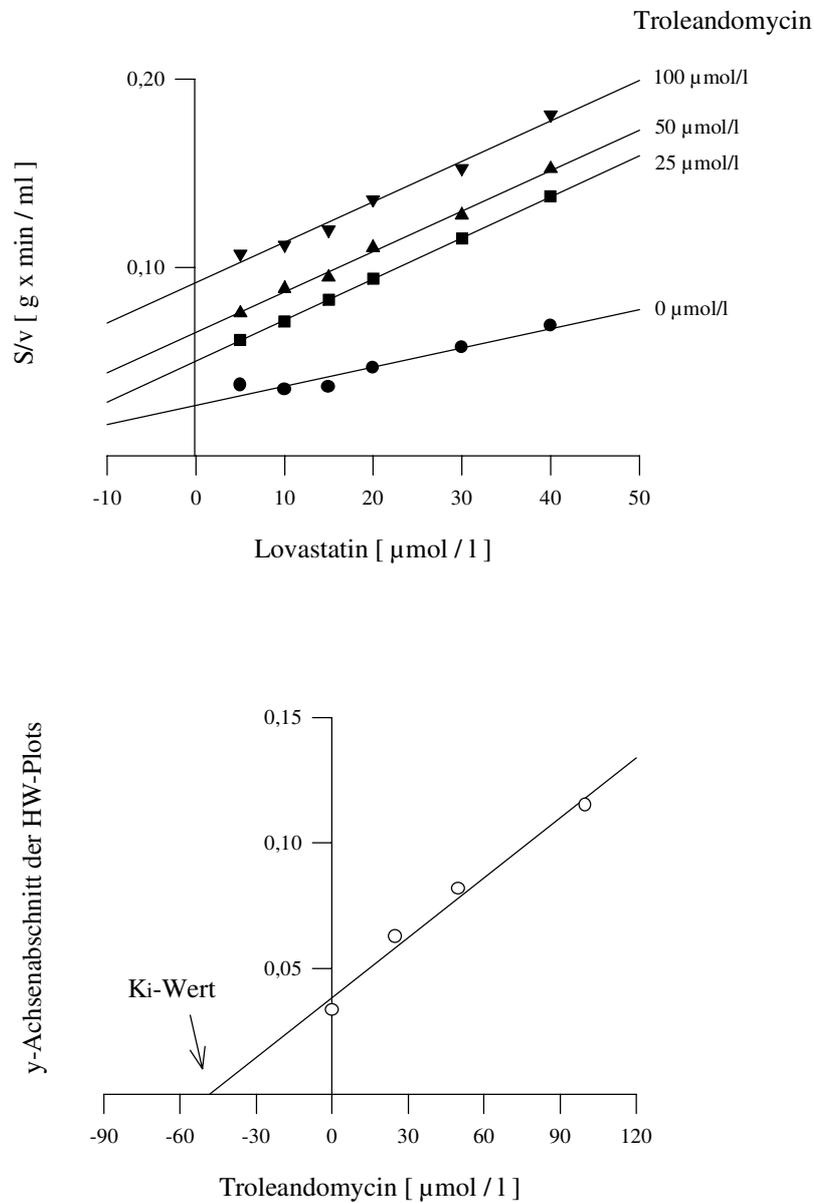


Abb. 34: Kompetitive Hemmung der Bildung von 6 β -Hydroxy-Lovastatin durch Troleandomycin wahrend der Inkubation mit Lebermikrosomen des Menschen ($n = 4$, exemplarisch dargestellt HL M 11). oben: Hanes-Woolf-Diagramm; schwarze Kreise: 0 $\mu\text{mol/l}$ Troleandomycin, schwarze Quadrate: 25 $\mu\text{mol/l}$ Troleandomycin, schwarze Dreiecke mit der Spitze nach oben: 50 $\mu\text{mol/l}$ Troleandomycin, schwarze Dreiecke mit der Spitze nach unten: 100 $\mu\text{mol/l}$ Troleandomycin. unten: Sekundardiagramm zur Bestimmung der Hemmkonstanten aus den Ordinatenabschnitten (weiße Kreise) der Geraden des Hanes-Woolf-Diagramms.

Spezies / Organ	K _i [μmol / l]		
	6'β-Hydroxy-Lovastatin	6'-Exomethylen-Lovastatin	3''-Hydroxy-Lovastatin
menschliche Leber			
HL W 01	5,7 (14,1)	11,8 (8,4)	
HL W 02	10,6 (8,6)	10,9 (13,6)	Metabolit
HL M 11	5,8 (4,8)	8,5 (5,7)	nicht nachweisbar
HL M 12	8,2 (3,5)	10,0 (6,6)	
Mittelwert ± SD	7,6 ± 2,3 (7,8 ± 4,8)	10,3 ± 1,4 (8,6 ± 3,5)	
Schweinedünndarm			
SD A	2,3 (2,0)	0,8 (1,3)	
SD X	4,9 (4,8)	2,7 (4,4)	
SD Y	3,6 (5,4)	2,7 (2,3)	keine Inhibition
SD Z	2,3 (3,8)	0,3 (1,8)	
Mittelwert ± SD	3,3 ± 1,2 (4,0 ± 1,5)	1,6 ± 1,3 (2,5 ± 1,4)	

Tab. 10: Hemmkonstanten für die Inhibition der Lovastatinmetabolisierung durch Ciclosporin bei der Inkubation mit Mikrosomen aus menschlicher Leber und Schweinedünndarm. Die K_i - Werte wurden durch Sekundärdiagramme aus den Steigungen der Geraden des Lineweaver-Burk-Diagramms und aus den Ordinatenschnittpunkten der Geraden des Hanes-Woolf-Diagramms berechnet (Werte in Klammern).

Spezies / Organ	K _i [μmol / l]		
	6'β-Hydroxy-Lovastatin	6'-Exomethylen-Lovastatin	3''-Hydroxy-Lovastatin
menschliche Leber			
HL W 01	0,4	0,9	
HL W 02	0,1	0,2	Metabolit
HL M 11	0,3	0,4	nicht nachweisbar
HL M 12	0,2	0,2	
Mittelwert ± SD	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,3	
Schweinedünndarm			
SD A	0,3 (0,3)	0,5 (0,4)	2,8 (3,7)
SD X	0,4 (0,3)	0,1 (1,2)	6,7 (1,9)
SD Y	0,3 (0,4)	0,4 (0,2)	2,1 (5,3)
SD Z	0,4 (0,3)	0,6 (0,5)	1,9 (1,7)
Mittelwert ± SD	0,4 ± 0,1 (0,3 ± 0,1)	0,4 ± 0,2 (0,6 ± 0,4)	3,4 ± 2,3 (3,2 ± 1,7)

Tab. 11: Hemmkonstanten für die Inhibition der Lovastatinmetabolisierung durch Ketoconazol bei der Inkubation mit Mikrosomen aus menschlicher Leber und Schweinedünndarm. Die K_i - Werte wurden durch Sekundärdiagramme aus den Steigungen der Geraden des Lineweaver-Burk-Diagramms und aus den Ordinatenschnittpunkten der Geraden des Hanes-Woolf-Diagramms berechnet (Werte in Klammern).

Spezies / Organ	K _i [μmol / l]		
	6'β-Hydroxy-Lovastatin	6'-Exomethylen-Lovastatin	3''-Hydroxy-Lovastatin
menschliche Leber			
HL W 01	14,7 (16,6)	26,8 (26,4)	Metabolit nicht nachweisbar
HL W 02	15,7 (26,6)	21,6 (37,8)	
HL M 11	53,2 (48,7)	53,2 (49,8)	
HL M 12	18,6 (41,0)	22,6 (20,1)	
Mittelwert ± SD	26,6 ± 18,5 (33,2 ± 14,4)	31,0 ± 14,9 (33,5 ± 13,1)	
Schweinedünndarm			
SD A	0,3 (0,3)	0,2 (0,3)	keine Inhibition
SD X	0,3 (0,3)	0,5 (0,4)	
SD Y	0,5 (0,2)	0,3 (0,2)	
SD Z	2,2 (0,3)	1,3 (0,1)	
Mittelwert ± SD	0,8 ± 0,9 (0,3 ± 0,1)	0,6 ± 0,5 (0,3 ± 0,1)	

Tab. 12: Hemmkonstanten für die Inhibition der Lovastatinmetabolisierung durch Troleandomycin bei der Inkubation mit Mikrosomen aus menschlicher Leber und Schweinedünndarm. Die K_i-Werte wurden durch Sekundäradiagramme aus den Steigungen der Geraden des Lineweaver-Burk-Diagramms und aus den Ordinatenschnittpunkten der Geraden des Hanes-Woolf-Diagramms berechnet (Werte in Klammern).

12. Verbesserung der Pravastatinsignalintensität bei der Massenspektrometrie

Für die Analytik der Pravastatinmetabolite war es notwendig, eine empfindliche LC-MS-Methode zu entwickeln. Während der Vorversuche, die das Ziel hatten, Pravastatinsignale mit hoher Intensität im Massenspektrometer zu erzielen, wurde das Massenspektrometer auf drei Ionen von Pravastatin fokussiert (SIM-Modus):

Im Positiv-Ionen-API-Elektrospray-Spektrum von Pravastatin von 200-750 m/z konnten die Ionen m/z 447 $[M+ Na]^+$, m/z 463 $[M+ K]^+$ und m/z 469 $[M+ 2Na]^+$ detektiert werden: Ein Massenspektrum des Pravastatins mit seinem dominanten Na^+ -Addukt ist in Abb. 35 dargestellt.

Um MS-Signale von Pravastatin mit hoher Intensität zu erreichen, erwies sich 2-Propanol als geeignetes organisches Lösungsmittel. Mit Methanol im Laufmittelgemisch (organisches Lösungsmittel/pH-neutrales Wasser, v/v, 7/3) konnte nur 52 % der Intensität im Vergleich zu 2-Propanol nachgewiesen werden. Mit Acetonitril reduzierte sich die Empfindlichkeit um 68 % (Abb. 36).

Hohe (pH 8,5 oder pH 9,5) und niedrige pH-Werte (pH 3) des Wassers im Laufmittelgemisch (2-Propanol/Wasser, v/v, 1/1) verschlechterten die Intensität der gemessenen Pravastatin-Signale: Die beste Empfindlichkeit wurde bei pH-Werten im Bereich zwischen 4 und 7 erzielt (Abb. 37).

Hohe Anteile von 2-Propanol im Laufmittel führten nicht automatisch zu intensiven Pravastatin-Signalen: Das Optimum lag bei einem Anteil von 75 % 2-Propanol (Rest: pH-neutrales Wasser) im Vergleich zu 25, 50 und 90 %: Bei 90 % 2-Propanol sank die Empfindlichkeit um 43 %, bei 50 % 2-Propanol um 57 %. Bei einer weiteren Reduzierung des Propanolanteils auf 25 % zugunsten von Wasser reduzierten sich die Pravastatin-Signale im Vergleich zu 75 % Propanol um 72 % (Abb. 38).

Auch der Fluß der LC-Laufmittels beeinflußt die Empfindlichkeit: Eine Erhöhung der Flußrate von 10 auf 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ reduzierte die Intensität des Pravastatin-Signals um 18 %; und bei einer weiteren Verdoppelung des Flusses mußte man insgesamt 41 % der Empfindlichkeit einbüßen (Abb. 39).

Die Ergebnisse der Vorversuche wurden bei der Entwicklung der beiden LC-MS-Methoden für Pravastatin und/oder seiner Metabolite mitberücksichtigt (Kapitel II, 12.4.2 und 12.4.3).

Ionenpaarreagenzien, die bereits erfolgreich zur HPLC-UV-Detektion von Pravastatin und seiner Metabolite eingesetzt wurden, wie Tetraethylammonium-Acetat (Everett *et al.*, 1991)

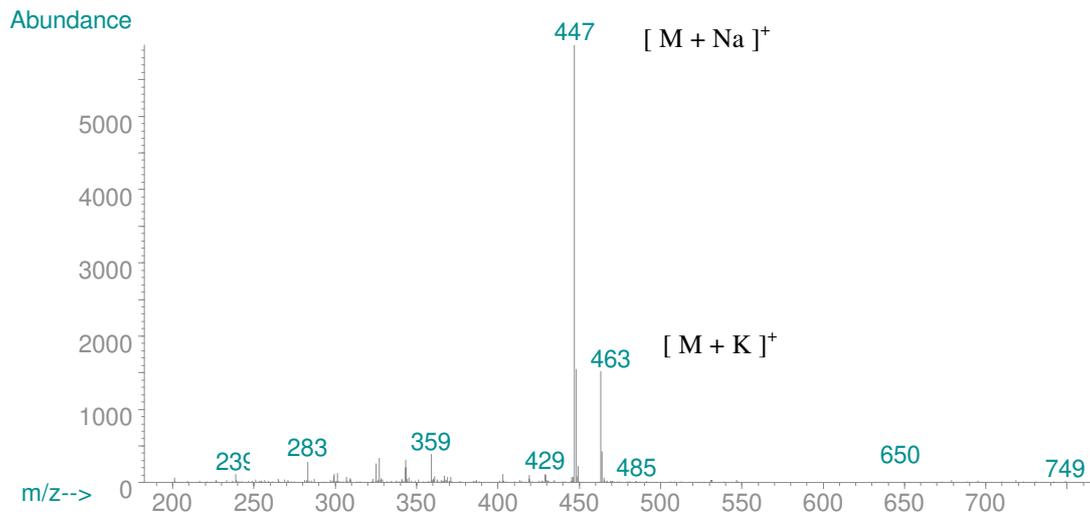


Abb. 35: Positiv-Ionen API-Elektrospray-Spektrum von Pravastatin von 200-750 m/z. Das Spektrum zeigt als Basis-Ion das Natriumaddukt von Pravastatin (m/z 447) und ein kleineres Signal, erzeugt durch Anlagerung von K^+ (m/z 463). Lösungsmittel: Wasser pH-neutral; HPLC-Laufmittelgemisch: 2-Propanol/Wasser pH 4 eingestellt mit Ameisensäure, v/v, 3/7.

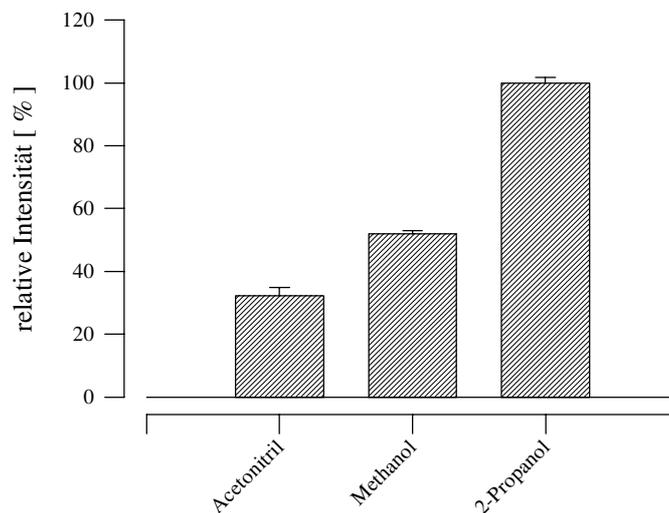


Abb. 36: Abhängigkeit der Intensität des LC-MS-Signals von Pravastatin vom verwendeten organischen Lösungsmittel (70 %; v/v, 30 % H_2O pH-neutral). Mittels flow-injection wurden jeweils 10 ng Pravastatin eingespritzt. Es erfolgte die Detektion der Massen 447, 463 und 469 m/z. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen (n = 10).

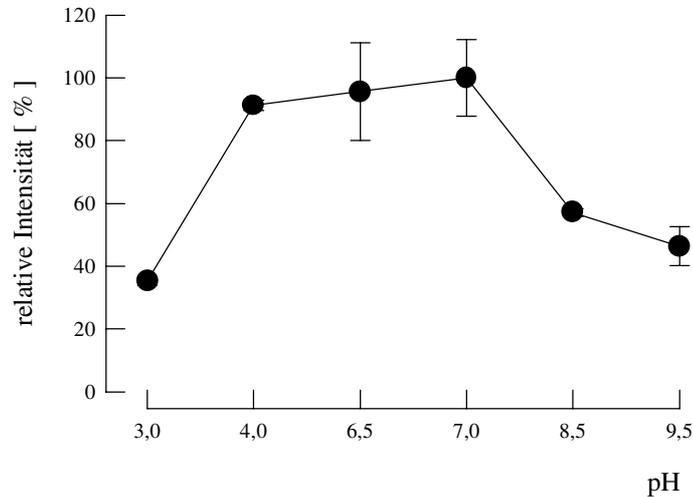


Abb. 37: Abhängigkeit der Intensität des LC-MS-Signals von Pravastatin vom pH-Wert des Wassers im Laufmittelgemisch (2-Propanol/H₂O, 1/1, v/v). Die pH-Einstellung erfolgte mit Ameisensäure oder Ammoniak. Mittels flow-injection wurden jeweils 10 ng Pravastatin eingespritzt. Es erfolgte die Detektion der Massen 447, 463 und 469 m/z. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen (n = 10).

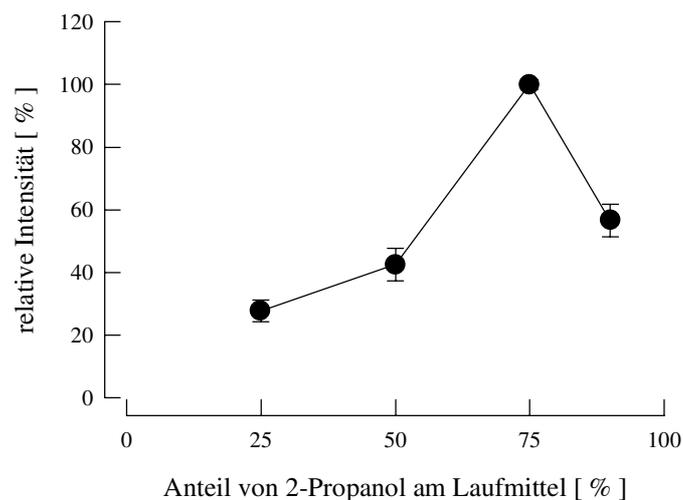


Abb. 38: Abhängigkeit der Intensität des LC-MS-Signals von Pravastatin vom Anteil des 2-Propanols im Laufmittelgemisch (H₂O, pH-neutral, v/v). Mittels flow-injection wurden jeweils 10 ng Pravastatin eingespritzt. Es erfolgte die Detektion der Massen 447, 463 und 469 m/z. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen (n = 10).

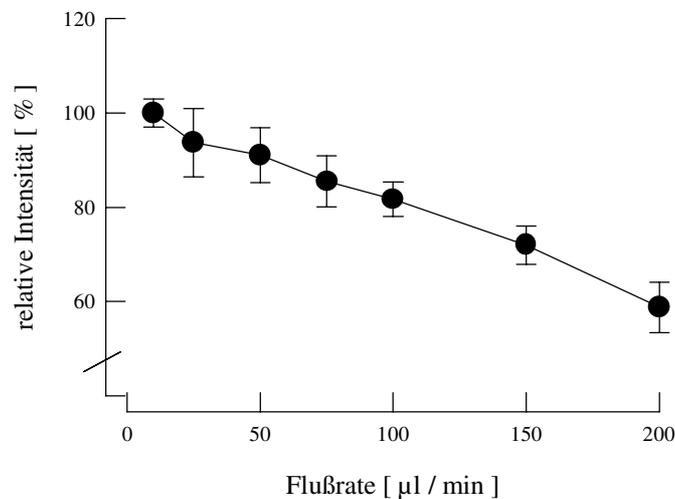


Abb. 39: Einfluß der Flußrate auf die Intensität des LC-MS-Signals von Pravastatin (Laufmittelgemisch: 2-Propanol/H₂O, pH-neutral, 1/1, v/v). Mittels flow-injection wurden jeweils 10 ng Pravastatin eingespritzt. Es erfolgte die Detektion der Massen 447, 463 und 469 m/z. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen (n = 10).

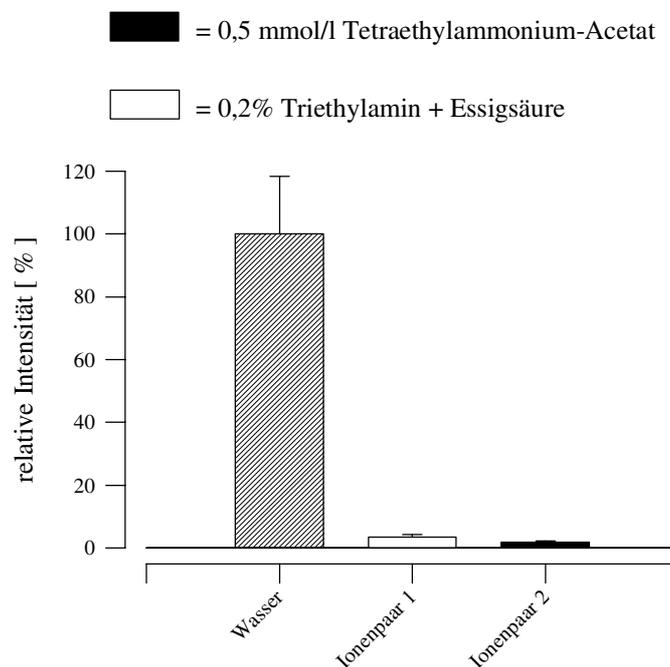


Abb. 40: Einfluß von Ionenpaarreagenzien auf die Intensität des LC-MS-Signals von Pravastatin (Laufmittelgemisch: Methanol/H₂O, mit und ohne Ionenpaarreagenzien, 3/7, v/v: gestreifter Balken: pH-neutrales Wasser, weißer Balken: je 0,2% Triethylamin + Essigsäure, schwarzer Balken: 0,5 mmol/l Tetraethylammonium-Acetat). Mittels flow-injection wurden jeweils 10 ng Pravastatin eingespritzt. Es erfolgte die Detektion der Massen 447, 463 und 469 m/z. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen (n = 10).

und ein Triethylamin/Essigsäure-Gemisch (Kitazawa *et al.*, 1993) verschlechterten die Empfindlichkeit um 98,6 % bzw. 96,5 % derart, daß deren Einsatz nicht in Betracht gezogen wurde (Abb. 40). Durch einen Scan im Massenbereich von 300-1000 m/z wurde vorher überprüft, ob durch die Ionenpaarreagenzien neben den bekannten (m/z 447, m/z 463 und m/z 469) auch neue Pravastatinaddukte entstanden. Dieses war nicht der Fall.

13. Stabilität von Pravastatin und seiner Metabolite

Pravastatin und die Metabolite 3' α -*Iso*-Pravastatin, 3' α ,5' β ,6' β -Trihydroxy- und Hydroxy-Pravastatin waren im Lösungsmittel Acetonitril/Wasser pH-neutral (2/1; v/v) über 48 h bei Raumtemperatur stabil (Hydroxy-Pravastatinstabilität wurde nur für 24 h überprüft). Die Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchungen sind in den Abb. 41 und 41 dargestellt. Als Positivkontrolle fungierte der Ansatz mit pH 2 Wasser (angesäuert mit Ameisensäure), da bekannt ist, daß Pravastatin bei niedrigen pH-Werten instabil ist (Kitazawa *et al.*, 1993).

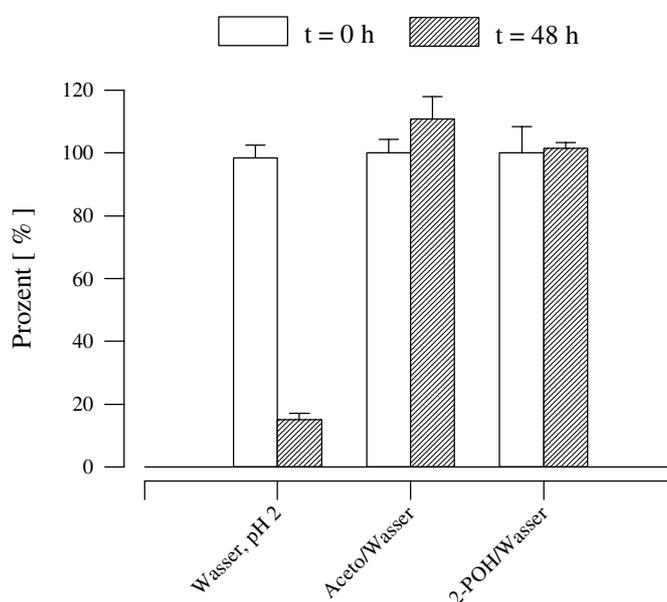


Abb. 41: Stabilität von Pravastatin über 48 h bei Raumtemperatur und Lichtausschluß in drei verschiedenen Lösungsmitteln. links: Wasser, pH 2 mit Ameisensäure angesäuert; Mitte: Acetonitril/Wasser, pH-neutral, v/v 2/1; rechts: 2 Propanol/Wasser, pH 4 angesäuert mit Ameisensäure, v/v 3/7. Überprüfung mittels HPLC-Analytik. weiße Balken: Konzentration zum Zeitpunkt t = 0 h, gestreifte Balken: Konzentration zum Zeitpunkt t = 48 h. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen (n = 3). Aceto = Acetonitril

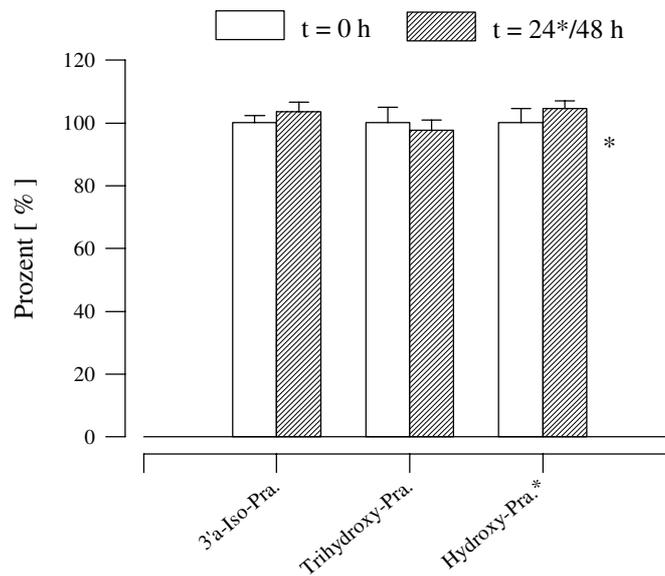


Abb. 42: Stabilität von 3'α-*Iso*-Pravastatin (links), 3'α,5'β,6'β-Trihydroxy-Pravastatin (mittig) und Hydroxy-Pravastatin (rechts) über 48 h (Hydroxy-Pravastatin 24 h) bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluß in Acetonitril/Wasser, pH-neutral, v/v 2/1. Überprüfung mittels HPLC-Analytik oder LC-MS-Analytik (Hydroxy-Pravastatin). weiße Balken: Konzentration zum Zeitpunkt t = 0 h, gestreifte Balken: Konzentration zum Zeitpunkt t = 48 h (24 h bei Hydroxy-Pravastatin). Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen (n = 3).

14. Metabolisierung von Pravastatin *in vitro*

14. 1 Metabolisierung von Pravastatin durch Leber- und Dünndarmmikrosomen des Menschen

Nach Inkubation von Pravastatin mit menschlichen Lebermikrosomen konnte durch anschließende HPLC-Analytik des Reaktionsansatzes ein NADPH-abhängiger Metabolit detektiert werden: Mittels eines Referenz-Standards wurde der Peak bei 23.2 min in Abbildung 43 oben als 3'α,5'β,6'β-Trihydroxy-Pravastatin identifiziert. Um jedoch diese geringe Metabolitenkonzentration nachzuweisen, waren hohe Proteinkonzentrationen von 1,5 mg pro ml Reaktionsansatz, lange Inkubationszeiten von 60 min und hohe Pravastatinkonzentrationen von 1000 μmol/l notwendig. Die HPLC-UV-Analytik war somit ungeeignet, den Metabolismus von Pravastatin *in vitro* zu untersuchen. Wurde das HPLC-Eluat nicht in den HPLC-UV-Detektor

geleitet, sondern in das Interface des Massenspektrometers, führte dieses zu einer Methode, die die Bildung von $3'\alpha,5'\beta,6'\beta$ -Trihydroxy-Pravastatin empfindlicher detektieren konnte (Peak bei 24.03 min, Abb. 44). Die unterschiedliche Empfindlichkeit wird durch den Vergleich der Abb. 43 und 44 deutlich:

Unter den identischen chromatographischen Bedingungen (Kapitel II, 11.2.1 und 12.4.1) wurde derselbe aufgearbeitete Reaktionsansatz sowohl mit UV-Detektion (200 nm, 200 μ l

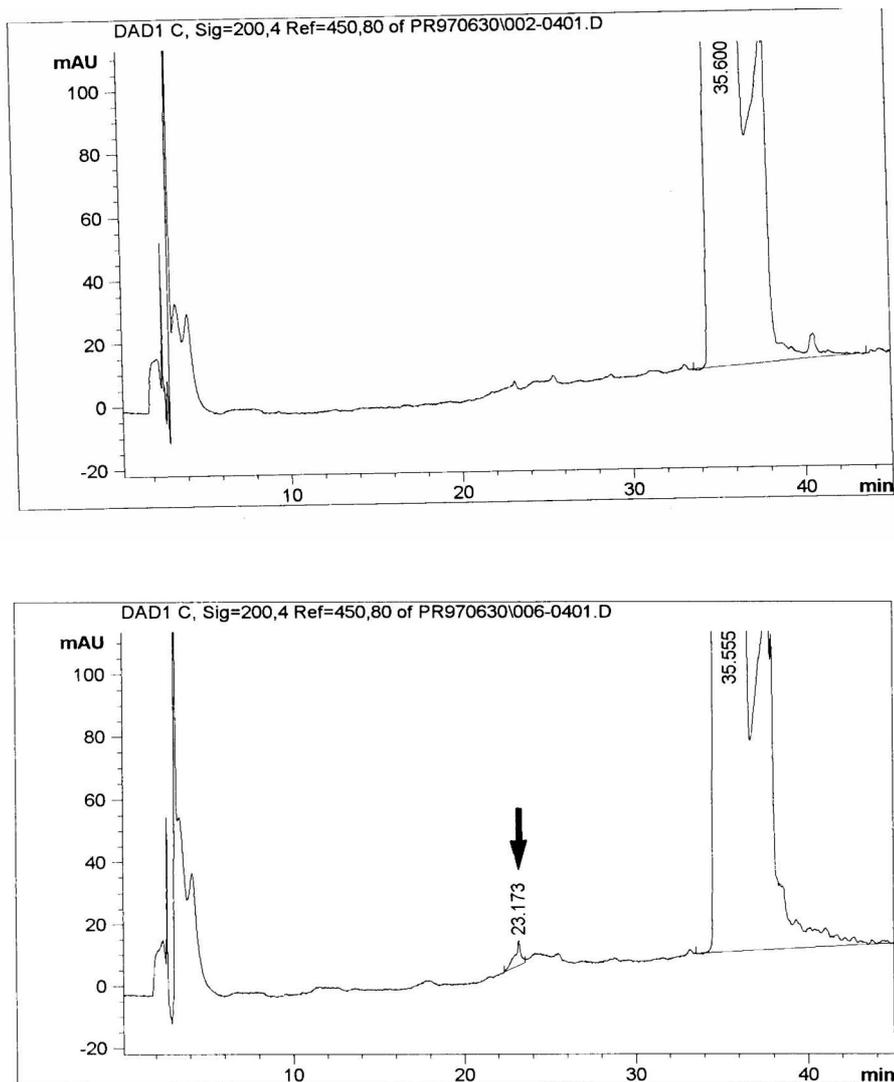


Abb. 43: HPLC-UV-Chromatogramm eines Pravastatin-Reaktionsansatzes (1000 μ mol/l) nach 60 min Inkubation bei 37 °C mit menschlichen Lebermikrosomen (hier HL W 02, 1,5 mg Protein/ml) mit NADPH (oben) und ohne NADPH (unten). Pfeil = $3'\alpha,5'\beta,6'\beta$ -Trihydroxy-Pravastatin.

Injektionsvolumen) als auch mit dem Massenspektrometer als Detektor (2 μ l Injektionsvolumen) analysiert. Trotz eines um den Faktor 100 geringeren Injektionsvolumen konnte der Metabolit 3' α ,5' β ,6' β -Trihydroxy-Pravastatin durch die HPLC-MS-Analytik empfindlicher nachgewiesen werden.

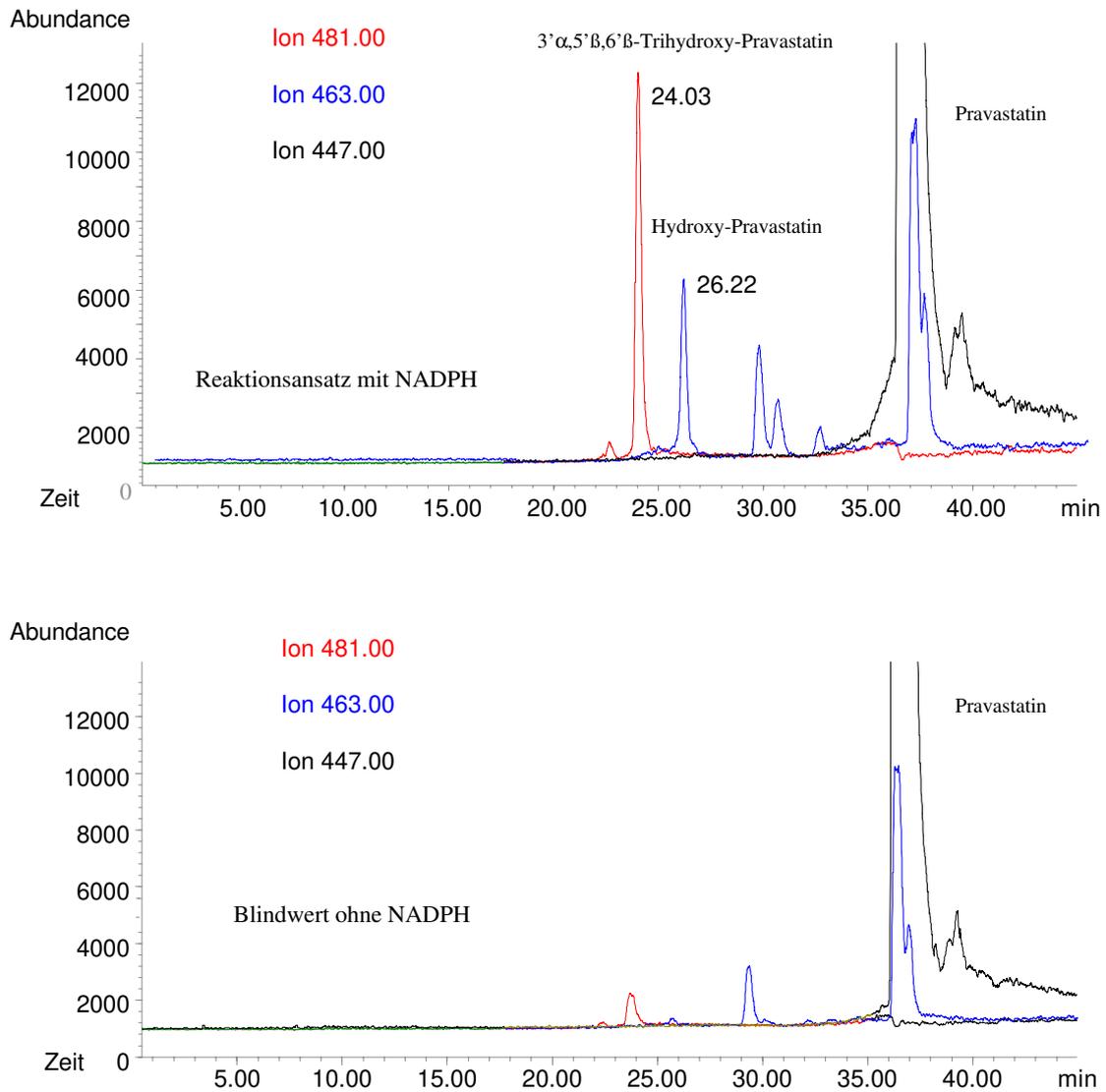


Abb. 44: HPLC-MS-Ionenchromatogramm eines Pravastatinreaktionsansatzes (1000 μ mol/l) nach 60 min Inkubation bei 37 $^{\circ}$ C mit menschlichen Lebermikrosomen (hier HL W 02, 1,5 mg Protein/ml) mit NADPH (oben) und ohne NADPH (unten). rote Spur für m/z 481; blaue Spur für m/z 463; schwarze Spur für 447 m/z. Peak bei 24.03 min \cong 3' α ,5' β ,6' β -Trihydroxy-Pravastatin, Peak bei 26.22 min \cong Hydroxy-Pravastatin, Peak bei 38 min \cong Pravastatin

Seine Identifizierung erfolgte neben dem Retentionszeitenvergleich mit dem Standard zusätzlich durch den Vergleich der Massen. Das detektierte Masse/Ladungs-Verhältnis war jeweils 481 m/z: Die Molekülonen wurden als Natriumaddukt $[M + Na]^+$ nachgewiesen (Everett *et al.*, 1991).

Bei dem zweiten durch HPLC-MS-Kopplung nachgewiesenen Metaboliten-Peak mit der Retentionszeit von 26.22 min (Abb. 44), den man durch die HPLC-Analytik nicht detektieren konnte, handelte es sich um einen Hydroxy-Pravastatinmetaboliten. Er hat die Masse 463 m/z. Die um 16 m/z größere Masse als die Muttersubstanz Pravastatin (m/z = 447) kann durch die Bildung einer Hydroxygruppe erklärt werden. Auch das Kaliumaddukt von Pravastatin $[M + K]^+$ hat ein Masse/Ladungsverhältnis von 463, jedoch eluierte das Kaliumaddukt zeitgleich mit dem Natriumaddukt des Pravastatins bei 38 min (Abb. 44).

Bei dem Hydroxy-Metaboliten könnte es sich um 3''-Hydroxy-Pravastatin handeln. Dieses ist der einzige bekannte Metabolit erster Generation des Pravastatins mit dieser Masse (Everett *et al.*, 1991). In der vorliegenden Arbeit wird dieser Metabolit weiterhin als Hydroxy-Pravastatin bezeichnet, da kein Standard zur genaueren Identifizierung vorlag.

Auch in Reaktionsansätzen mit Dünndarmmikrosomen des Menschen konnte die Bildung der Metabolite 3'α,5'β,6'β-Trihydroxy-Pravastatin und Hydroxy-Pravastatin nachgewiesen werden.

Die Bildung des Metaboliten 3'α-Iso-Pravastatin konnte in Mikrosomenreaktionsansätzen nicht nachgewiesen werden.

Auf der Basis der in Abb. 44 gezeigten HPLC-MS-Methode wurde eine zweite zeitlich verkürzte und empfindlichere Methode entwickelt, die die Detektion der beiden Pravastatin-Metabolite ermöglichte (Kapitel II, 12.4.2): Ausschließlich diese Methode wurde im weiteren Verlauf der Untersuchungen zum CYP-abhängigen Metabolismus des Pravastatins genutzt. Ein charakteristisches Chromatogramm ist in Abb. 45 dargestellt.

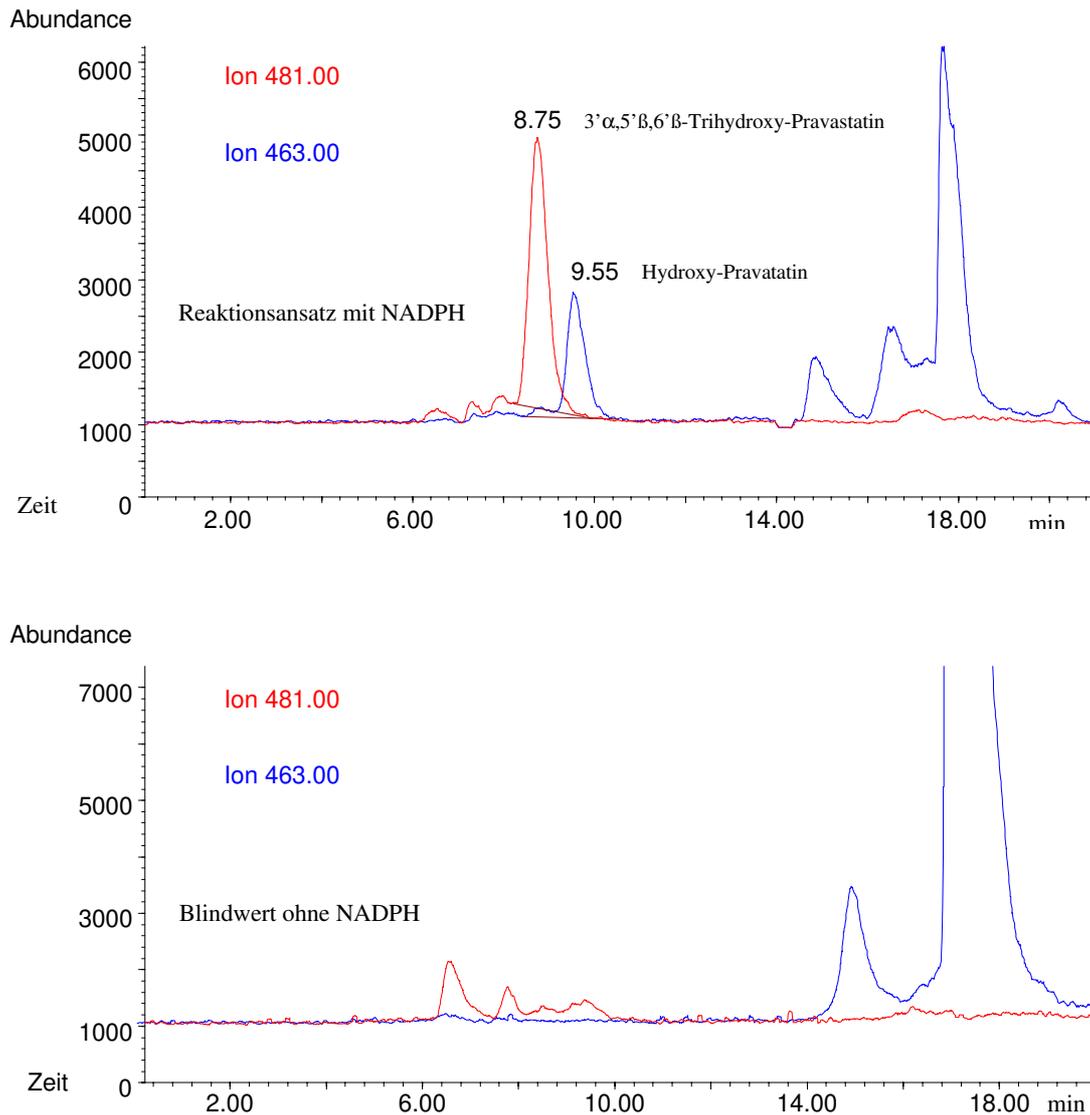


Abb. 45: HPLC-MS-Ionenchromatogramm der CYP-abhängigen Pravastatinmetabolite (1000 $\mu\text{mol/l}$ Pravastatin, 60 min Inkubation bei 37 °C mit menschlichen Lebermikrosomen) Injektion eines Reaktionsansatzes mit NADPH (oben) und ohne NADPH (unten). rote Spur für m/z 481; blaue Spur für m/z 463. Peak bei 8.75 min \cong 3'α,5'β,6'β-Trihydroxy-Pravastatin, Peak bei 9.55 min \cong Hydroxy-Pravastatin, Peak bei 18 min \cong Pravastatin.

14. 2 Metabolisierung von Pravastatin durch Leber- und Dünndarmcytosol des Menschen

Die Bildung des Metaboliten 3'α-*Iso*-Pravastatin konnte nach Inkubation von menschlichem Leber- und Dünndarmcytosol in der Anwesenheit von PAPS nachgewiesen werden. Blindwerte

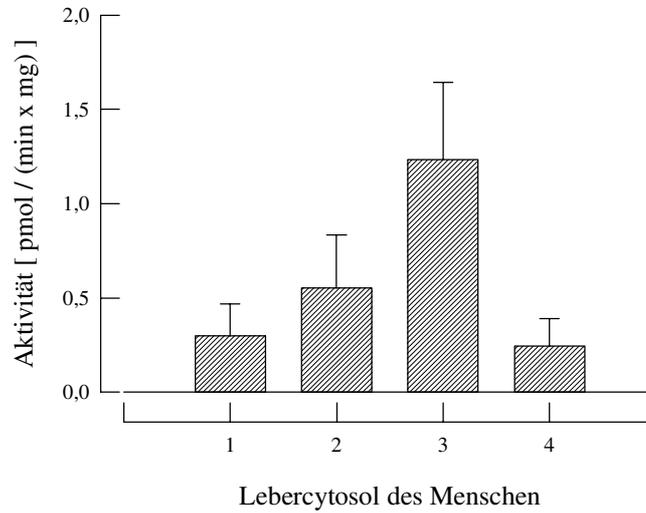


Abb. 46: Bildungsrate von 3'α-*Iso*-Pravastatin nach Inkubation von Pravastatin (50 μmol/l) mit menschlichem Lebercytosol von 4 Individuen. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen (n = 3).

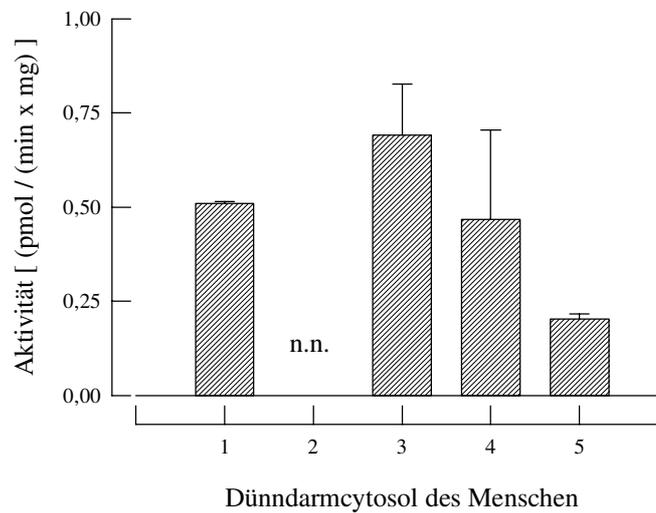


Abb. 47: Bildungsrate von 3'α-*Iso*-Pravastatin nach Inkubation von Pravastatin (50 μmol/l) mit menschlichem Dünndarmcytosol von 5 Individuen. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen (n = 4). n.n. = nicht nachweisbar

ohne PAPS oder mit hitzedenaturiertem Cytosol führten zu keiner 3' α -*Iso*-Pravastatin-Bildung. Dabei zeigte das Cytosol menschlicher Leber spezifische Aktivitäten von 0,3 bis 1,2 pmol \cdot min⁻¹ \cdot mg⁻¹. Im menschlichen Dünndarmcytosol wurde eine spezifische Aktivität von 0,2 bis 0,7 pmol \cdot min⁻¹ \cdot mg⁻¹ nachgewiesen. Bei einem Probanden konnte im Dünndarmcytosol keine Aktivität nachgewiesen werden (Abb. 46 und 47). Ob auch 6'-*Epi*-Pravastatin in den Reaktionsansätzen entstand, kann nicht beurteilt werden. Die LC-MS-Methode ermöglichte keine Trennung von Pravastatin und 6'-*Epi*-Pravastatin.

15. Linearität der Reaktionsgeschwindigkeit bei Inkubationsansätzen mit Pravastatin

Die Linearität der Reaktionsgeschwindigkeit in Reaktionsansätzen mit menschlichen Lebermikrosomen konnte nachgewiesen werden: Über die gesamte Inkubationsdauer von 60 min bei 37 °C war die Linearität der Bildung von 3' α ,5' β ,6' β -Trihydroxy-Pravastatin und Hydroxy-Pravastatin gewährleistet (Abb. 48).

Auch bei Reaktionsansätzen mit menschlichem Lebercytosol war die Geschwindigkeit der enzymatischen Bildung von 3' α -*Iso*-Pravastatin über 90 min konstant (Abb. 49).

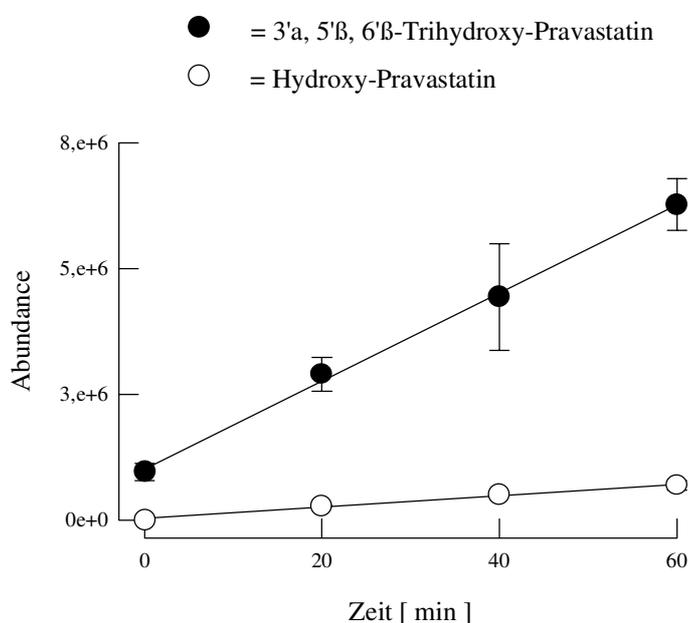


Abb. 48: Linearität der 3' α ,5' β ,6' β -Trihydroxy- und Hydroxy-Pravastatinbildung über 60 min bei 37 °C in Inkubationsansätzen mit menschlichen Lebermikrosomen (1000 μ mol/l Pravastatin). weiße Kreise: Hydroxy-Pravastatin ; schwarze Kreise: 3' α ,5' β ,6' β -Trihydroxy-Pravastatin. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen (n = 3).

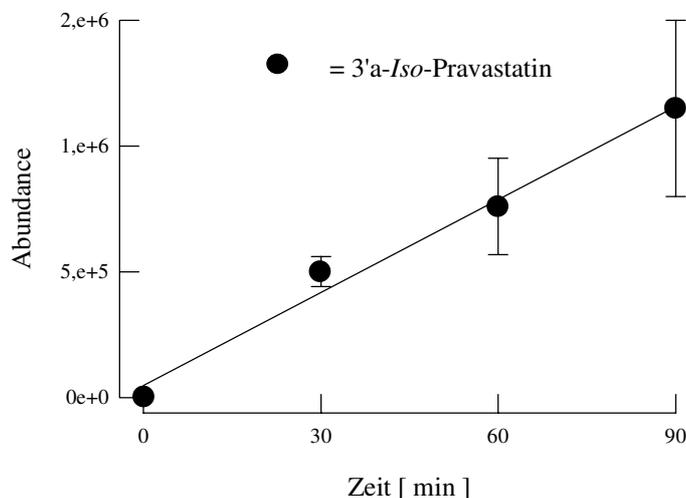


Abb. 49: Linearität der 3'α-Iso-Pravastatinbildung über 90 min bei 37 °C in Inkubationsansätzen mit menschlichem Lebercytosol (50 µmol/l Pravastatin). schwarze Kreise: 3'α-Iso-Pravastatin. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen (n = 3).

16. Wiederfindungsraten von Pravastatin und seiner Metabolite bei der Festphasenextraktion

Die Wiederfindungsrate von Pravastatin für die Festphasenextraktion lag bei 94 % (200 µmol/l) bzw. 98 % (2000 µmol/l) (je n = 10).

Für α,5'β,6'β-Trihydroxy-Pravastatin und Hydroxy-Pravastatin wurden für die Festphasenextraktion Wiederfindungsraten von 96 % und für 3'α-Iso-Pravastatin eine Wiederfindungsrate von 105 % berechnet (je n = 10).

Durch die hohe Konzentrationen von Alkalimetallen in den nicht aufgereinigten Reaktionsansätzen konnten im API-Elektrospray-Massenspektrum zusätzliche Na⁺/K⁺-Addukte der Metabolite nachgewiesen werden: Bei 3'α-Iso-Pravastatin führten Kalium- und Natrium-Ionenkonzentrationen zwischen 0,05 und 1,0 mmol/l in den Reaktionsansätzen neben der Anlagerung von einem Natrium- und Kaliumion (m/z 447 und 463) auch zur Anlagerung von jeweils zwei Kationen pro Molekül Pravastatin: [M + 2Na]⁺ = 469 m/z bzw. [M + 2K]⁺ = 501 m/z. Ein Addukt aus beiden Metallionen [M + K + Na]⁺ = 485 m/z konnte auch nachgewiesen werden.

Wurde der abgestoppte Mikrosomenreaktionsansatz direkt ohne vorhergehende Festphasenextraktion über HPLC ins Massenspektrometer überführt, konnte bei 3' α ,5' β ,6' β -Trihydroxy-Pravastatin zusätzlich das Ion 503 m/z = [M + 2Na]⁺ detektiert werden. Bei Hydroxy-Pravastatin kam das Ion 479 m/z = [M + Na + K]⁺ hinzu.

Bei der Bestimmung der Wiederfindungsraten wurden die LC-MS-Methoden (s. Kapitel II, 12.4.2 und 12.4.3) so verändert, daß das Massenspektrometer auch auf diese zusätzlich vorkommenden Ionen fokussiert war.

17. Reproduzierbarkeit der Bestimmung von Metabolitenkonzentrationen in Reaktionsansätzen mit Pravastatin

Für die Bestimmung der Konzentration von 3' α ,5' β ,6' β -Trihydroxy-Pravastatin und Hydroxy-Pravastatin in 24 Reaktionsansätzen wurden Variationskoeffizienten von 7,4 % und 5,0 % berechnet.

18. LC-MS-Kalibriergeraden mit Pravastatin als Standard

Da keine oder nur unvollständig aufgereinigte Referenz-Standards zur Verfügung standen, wurden die Konzentration der Pravastatinmetabolite 3' α -*Iso*-Pravastatin, 3' α ,5' β ,6' β -Trihydroxy-Pravastatin und Hydroxy-Pravastatin über eine externe Pravastatinkalibriergerade ermittelt. In den Abbildungen 50 und 51 sind Kalibriergeraden für die Metabolitenbestimmung in Mikrosomen- und Cytosolreaktionsansätzen dargestellt.

Die Nachweisgrenze für die Quantifizierung in Mikrosomenansätzen betrug 62,9 ng/ml, berechnet über die Kalibrierfunktion $y = 10014 x - 57247$. Die hohe Nachweisgrenze erklärt sich durch die Tatsache, daß nur 10 μ l des Festphasenextraktes (400 μ l) durch den Autosampler injiziert wurden. Größere Volumina führten zu einer schlechten Peakqualität (Doppelpeaks) im LC-MS-Ionenchromatogramm. Die Kalibriergerade war über den gesamten Arbeitsbereich von 50 bis 800 ng/ml linear ($r = 0,997$). Da die Empfindlichkeit der MS-Analytik vom Anteil des 2-Propanols im LC-Laufmittelgemisch abhing (Abb. 38), erfolgte die Auftrennung der Kalibrierstandards über eine verkürzte Chromatographiesäule der Dimension 10 mm x 2 mm mit einer Retentionszeit für Pravastatin von 5.5 min (Methode s. Kapitel II, 12.4.2). Bei einem Wasseranteil von 82 % im Laufmittelgemisch, welcher für die Auftrennung

der Pravastatinmetabolite notwendig war, wäre Pravastatin bei der Verwendung einer Säule der Dimension 250 mm x 2 mm nicht innerhalb von 30 min eluiert.

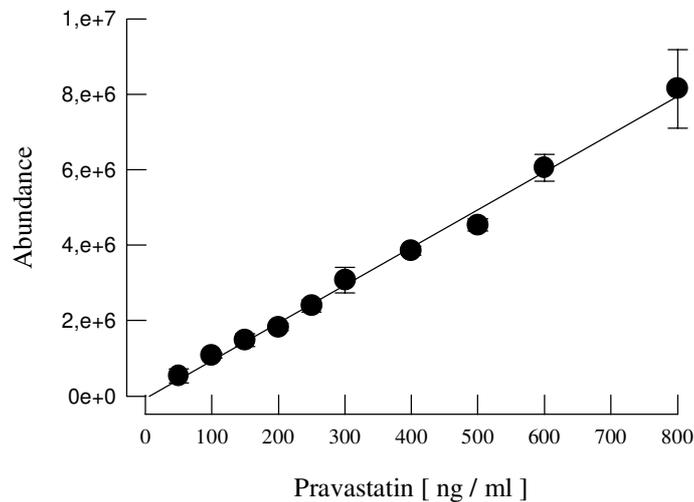


Abb. 50: Kalibriergerade für die Metabolitenbestimmung in Mikrosomenreaktionsansätzen mit Pravastatin als Standard. Ausgewertet wurden die Signale des Na^+ -Addukts von Pravastatin. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($n = 3$).

Die Kalibriergerade (Abb. 50) für die Bestimmung von $3'\alpha$ -*Iso*-Pravastatin in Reaktionsansätzen mit Cytosol war über den Bereich von 20 bis 200 ng/ml linear ($r = 0,997$). Über die Kalibrierfunktion $y = 29605 x - 11564$ wurde die Nachweisgrenze von 16,4 ng/ml ermittelt (Injektionsvolumina von 30 μl). Die Berechnung der Nachweisgrenzen erfolgte nach der DIN 32645 (Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze).

Im API-Elektrospray-Massenspektrum von Pravastatin und seiner Metabolite wurden nur Signale nachgewiesen, die durch Anlagerung von einem Natriumkation, einem Kaliumkation oder von zwei Natriumkationen entstanden. Andere Addukte, wie die Anlagerung von einem Proton, spielten keine Rolle (Abb. 35).

Die Quantifizierung erfolgte bei allen Substanzen über das jeweilige Natriumionenaddukt: $3'\alpha$ -*Iso*-Pravastatin: 447 m/z, $3'\alpha,5'\beta,6'\beta$ -Trihydroxy-Pravastatin: 481 m/z und Hydroxy-Pravastatin: 463 m/z. Dabei muß gewährleistet sein, daß die möglichen Kationaddukte von Pravastatin jeweils im gleichen Verhältnis zueinander entstehen wie bei seinen Metaboliten.

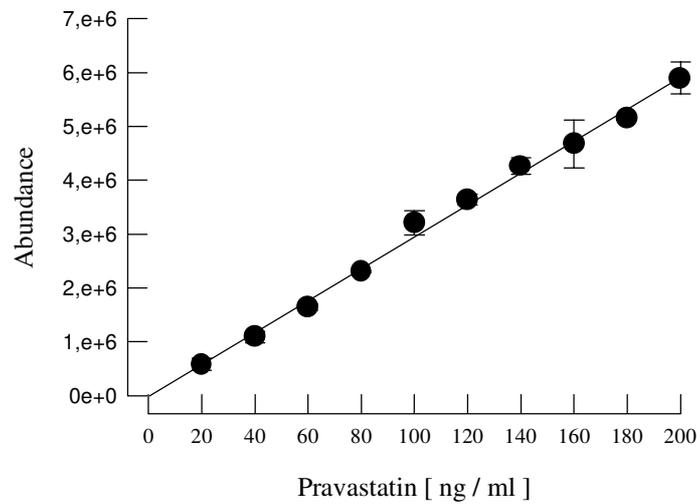


Abb. 51: Kalibriergerade für die Metabolitenbestimmung in Cytosolreaktionsansätzen mit Pravastatin als Standard. Ausgewertet wurden die Signale des Na^+ -Addukts von Pravastatin. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n = 3$).

Kationaddukt	Pravastatin	3' α -Iso-Pravastatin	3' α ,5' β ,6' β -Trihydroxy-Pravastatin	Hydroxy-Pravastatin
[M + Na] ⁺	77,3 \pm 3,0 %	80,9 \pm 2,5 %	79,3 \pm 2,8 %	100 %
[M + K] ⁺	14,9 \pm 2,7 %	6,1 \pm 2,3 %	n.n.	n.n.
[M + 2Na] ⁺	7,8 \pm 0,6 %	11,1 \pm 2,1 %	20,7 \pm 2,8 %	n.n.

Tab. 13: Verhältnis der verschiedenen Pravastatin- und Metabolitenionen, die durch API-Elektrospray-Massenspektrometrie nachweisbar waren. Sie entstanden durch Anlagerung von einem oder zwei Natriumkationen oder einem Kaliumkation. Lösungsmittel: Acetonitril/Wasser pH-neutral, v/v 2/1. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($n = 10$). n.n. = nicht nachweisbar

Diese Übereinstimmung konnte bei 3'- α -*Iso*-Pravastatin, 3'- α ,5'- β ,6'- β -Trihydroxy-Pravastatin und Pravastatin nachgewiesen werden: Jeweils ca. 80 % der gebildeten Ionen im Massenspektrometer entstanden durch Anlagerung von Natriumkationen. Nur bei Hydroxy-Pravastatin wurde zu 100 % das Na⁺-Addukt gebildet, so daß hier die gemessenen Aktivitäten einen systematischen Fehler beinhalten, der jedoch eine Abschätzung der wirklichen Aktivität zuläßt (Tab. 13).

19. Bestimmung der apparenten enzymkinetischen Parameter V_{\max} und K_m für die Metabolisierung von Pravastatin

Um die Pravastatin metabolisierenden Enzyme zu charakterisieren, wurden Messungen zur Bestimmung der kinetischen Parameter V_{\max} und K_m durchgeführt.

Da die Enzymaktivitäten jedoch keinem einzelnen CYP-Enzymen zugeordnet werden können, konnten nur apparente kinetische Werte bestimmt werden.

Die kinetischen Parameter der Pravastatinmetabolisierung durch menschliche Mikrosomen der Leber und des Dünndarms sind in den Tabellen 14 und 15 aufgelistet, je ein Hanes-Woolf- und Lineweaver-Burk-Diagramm für Darm- und Lebermikrosomen in den Abbildungen 52 und 53.

Für die Metabolisierung von Pravastatin durch menschliche Lebermikrosomen wurde eine geringe Affinität von den CYP-Enzymen zum Substrat festgestellt: Für die Bildung von 3'- α ,5'- β ,6'- β -Trihydroxy-Pravastatin betrug der K_m -Wert 3482 $\mu\text{mol/l}$ nach der Hanes-Woolf-Linearisierungsmethode und 4887 $\mu\text{mol/l}$ nach der Lineweaver-Burk-Linearisierung. Vierfach höhere K_m -Werte wurden für Hydroxy-Pravastatin bestimmt: 12891 $\mu\text{mol/l}$ (Hanes-Woolf) und 20987 $\mu\text{mol/l}$ (Lineweaver-Burk).

Für menschliche Dünndarmmikrosomen konnte eine ähnliche geringe Affinität zwischen CYP-Enzymen und Pravastatin nachgewiesen werden: die K_m -Werte für die Bildung von 3'- α ,5'- β ,6'- β -Trihydroxy-Pravastatin lagen mit 4556 $\mu\text{mol/l}$ (Hanes-Woolf) und 2387 $\mu\text{mol/l}$ (Lineweaver-Burk) sowie für Hydroxy-Pravastatin mit 5292 $\mu\text{mol/l}$ (Hanes-Woolf) und 2968 $\mu\text{mol/l}$ (Lineweaver-Burk) jedoch dichter beieinander.

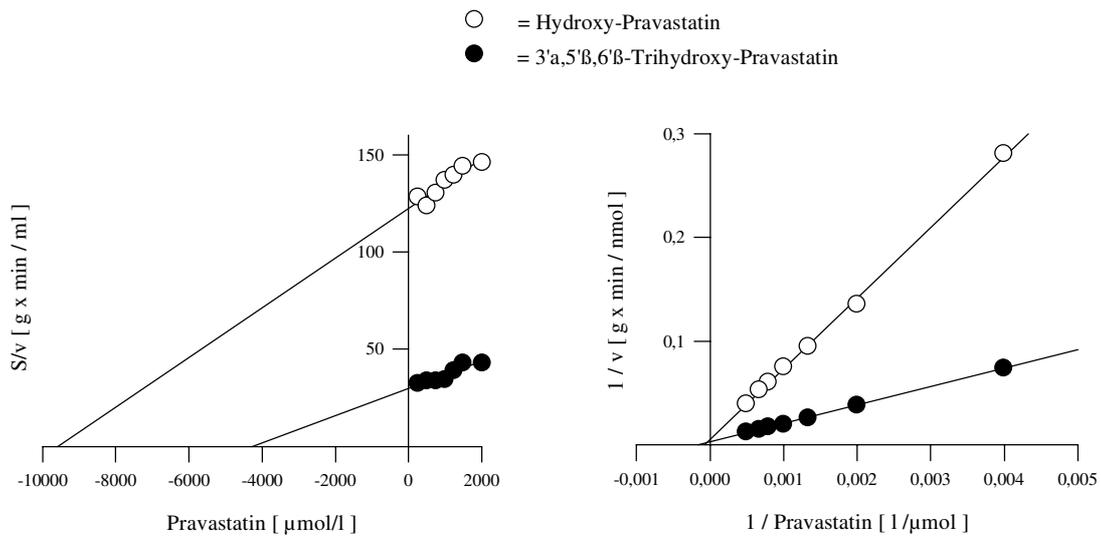


Abb. 52: Hanes-Woolf-Plot (links) und Lineweaver-Burk-Plot (rechts) für den Metabolismus von Pravastatin durch menschliche Lebermikrosomen (exemplarisch dargestellt HL W 01); weiße Kreise: Hydroxy-Pravastatin, schwarze Kreise: 3'α,5'β,6'β-Trihydroxy-Pravastatin

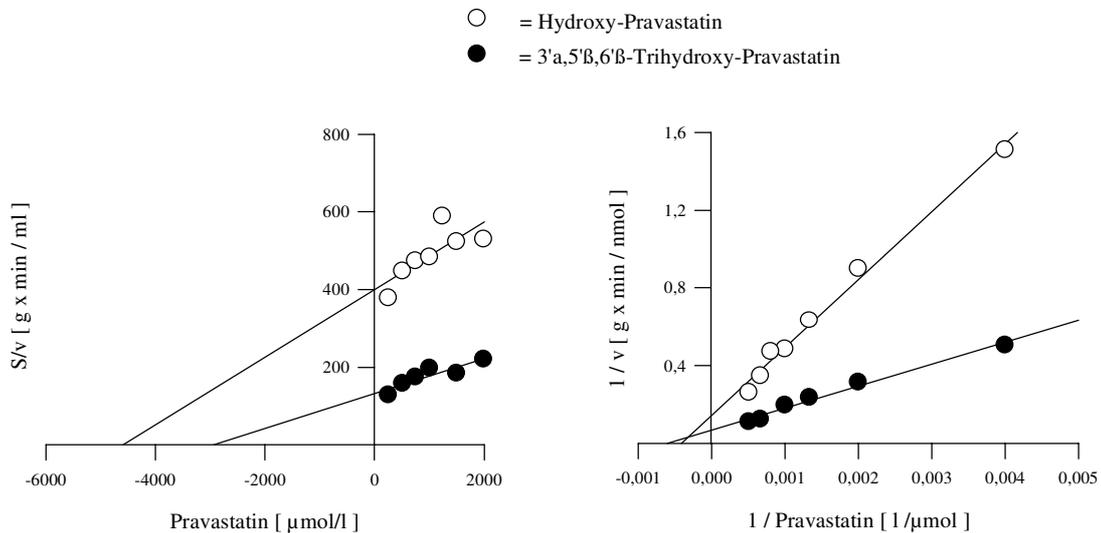


Abb. 53: Hanes-Woolf-Plot (links) und Lineweaver-Burk-Plot (rechts) für den Metabolismus von Pravastatin durch menschliche Dünndarmmikrosomen (exemplarisch dargestellt HD M K); weiße Kreise: Hydroxy-Pravastatin, schwarze Kreise: 3'α,5'β,6'β-Trihydroxy-Pravastatin

Spezies / Organ	K_m [$\mu\text{mol} / \text{l}$]	
	3'α,5'β,6'β-Trihydroxy-Pravastatin	Hydroxy-Pravastatin
menschliche Leber		
HL W 01	4279	9583
HL W 02	3142	4875
HL M 11	4050	17413
HL M 12	2455	19694
Mittelwert \pm SD	3482 \pm 842	12891 \pm 6878
menschlicher Darm		
HD M D	5395	7270
HD M K	2926	4584
HD W H	5347	4021
Mittelwert \pm SD	4556 \pm 1412	5292 \pm 1736

Spezies / Organ	V_{max} [$\text{pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$]	
	3'α,5'β,6'β-Trihydroxy-Pravastatin	Hydroxy-Pravastatin
menschliche Leber		
HL W 01	272,8	148,8
HL W 02	62,0	52,1
HL M 11	35,5	60,0
HL M 12	22,2	57,6
Mittelwert \pm SD	98,1 \pm 117,6	79,6 \pm 46,2
menschlicher Darm		
HD M D	143,8	78,7
HD M K	22,3	11,5
HD W H	25,8	4,8
Mittelwert \pm SD	64,0 \pm 69,2	31,7 \pm 40,9

Tab. 14: K_m -Werte und V_{max} -Werte für die Bildung der Pravastatinmetabolite 3' α ,5' β ,6' β -Trihydroxy-Pravastatin und Hydroxy-Pravastatin durch Dünndarm- und Lebermikrosomen des Menschen. Berechnung nach der Linearisierungsmethode nach Hanes-Woolf mit der Software SigmaPlot.

Spezies / Organ	K_m [$\mu\text{mol} / \text{l}$]	
	3'α,5'β,6'β-Trihydroxy-Pravastatin	Hydroxy-Pravastatin
menschliche Leber		
HL W 01	6186	12810
HL W 02	4191	13715
HL M 11	7032	25151
HL M 12	2140	32273
Mittelwert \pm SD	4887 \pm 2185	20987 \pm 9389
menschlicher Darm		
HD M D	1982	4663
HD M K	1648	2401
HD W H	3530	1841
Mittelwert \pm SD	2387 \pm 1004	2968 \pm 1494
Spezies / Organ	V_{max} [$\text{pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$]	
	3'α,5'β,6'β-Trihydroxy-Pravastatin	Hydroxy-Pravastatin
menschliche Leber		
HL W 01	348,8	188,3
HL W 02	87,7	132,4
HL M 11	57,1	80,2
HL M 12	20,1	58,3
Mittelwert \pm SD	128,4 \pm 149,5	114,8 \pm 58,0
menschlicher Darm		
HD M D	65,3	54,6
HD M K	14,6	6,9
HD W H	18,2	2,6
Mittelwert \pm SD	32,7 \pm 28,3	21,4 \pm 28,9

Tab. 15: K_m -Werte und V_{max} -Werte für die Bildung der Pravastatinmetabolite 3' α ,5' β ,6' β -Trihydroxy-Pravastatin und Hydroxy-Pravastatin durch Dünndarm- und Lebermikrosomen des Menschen. Berechnung nach der Linearisierungsmethode nach Lineweaver-Burk mit der Software SigmaPlot.

20. Hemmung der Metabolisierung von Pravastatin *in vitro*

20.1 Hemmung der Pravastatinmetabolisierung durch spezifische CYP-Inhibitoren und -Substrate

In der folgenden Untersuchung wurde geklärt, ob wie beim Lovastatin CYP-Enzyme der Subfamilie 3A für die Metabolisierung verantwortlich sind oder ob andere CYP-Subfamilien an der Bildung von 3' α ,5' β ,6' β -Trihydroxy-Pravastatin und Hydroxy-Pravastatin beteiligt sind.

Weder Phenacetin, Coumarin, Tolbutamid, S-(+)-Mephenytoin, Debrisoquin und Chlorzoxazon konnten die Bildung von 3' α ,5' β ,6' β -Trihydroxy-Pravastatin und Hydroxy-Pravastatin im Reaktionsansatz hemmen (Abb. 54-59). Dadurch wurde gezeigt, daß folgende CYP-Subfamilien und Enzyme nicht oder nur zu einem geringen Anteil an der Bildung der Pravastatinmetabolite beteiligt sind: CYP 1A1/2, CYP 2A6, CYP 2C8/9, CYP 2C19, CYP 2D6 und CYP 2E1. Nur die spezifischen CYP 3A-Inhibitoren bzw. -Substrate Ciclosporin, Ketoconazol, Troleandomycin und Nifedipin hemmten die Metabolitenbildung (Abb. 60-63).

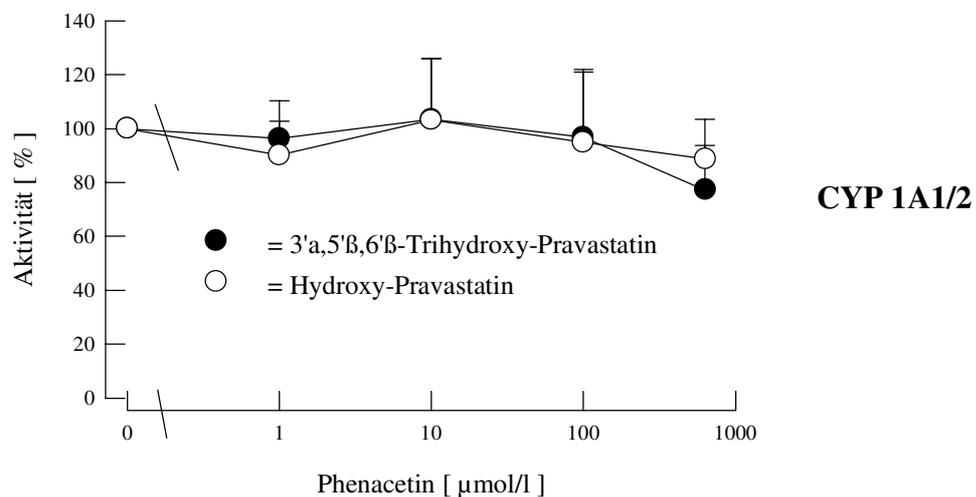


Abb. 54: Konzentrationsabhängige Hemmung der Pravastatinmetabolisierung \pm durch Phenacetin bei Inkubation mit menschlichen Lebermikrosomen. weiße Kreise: Hydroxy-Pravastatin, schwarze Kreise: 3' α ,5' β ,6' β -Trihydroxy-Pravastatin. Mit Phenacetin wurde die Beteiligung von CYP 1A1/2 an der Metabolitenbildung überprüft. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen (n = 4).

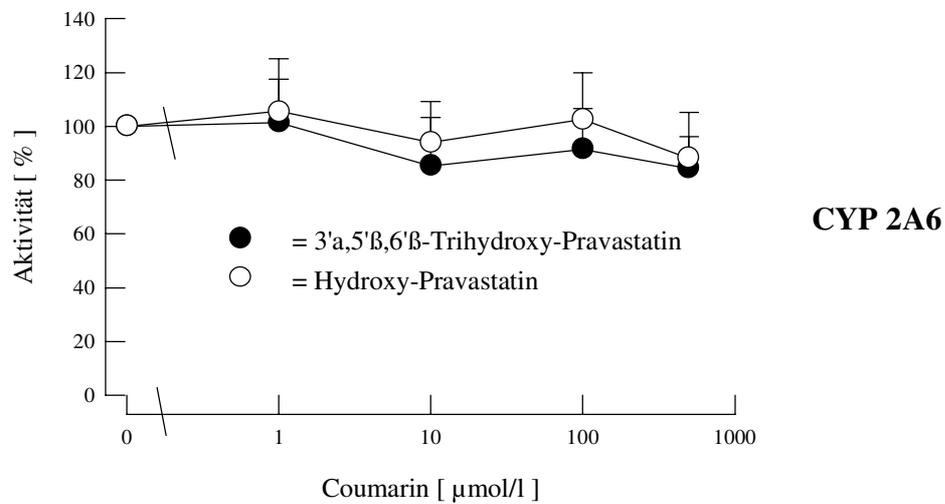


Abb. 55: Konzentrationsabhängige Hemmung der Pravastatinmetabolisierung durch Coumarin bei Inkubation mit menschlichen Lebermikrosomen. weiße Kreise: Hydroxy-Pravastatin, schwarze Kreise: 3'α,5'β,6'β-Trihydroxy-Pravastatin. Mit Coumarin wurde die Beteiligung von CYP 2A6 an der Metabolitenbildung überprüft. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen (n = 4).

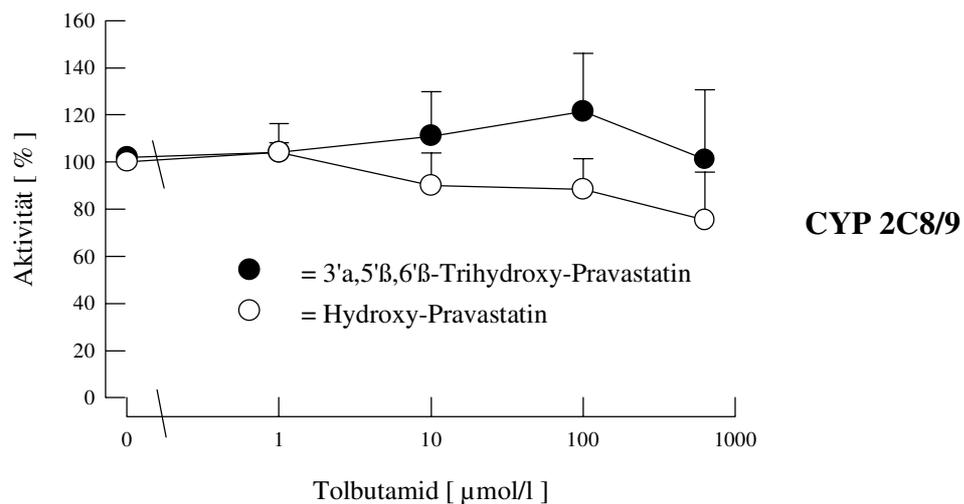


Abb. 56: Konzentrationsabhängige Hemmung der Pravastatinmetabolisierung durch Tolbutamid bei Inkubation mit menschlichen Lebermikrosomen. weiße Kreise: Hydroxy-Pravastatin, schwarze Kreise: 3'α,5'β,6'β-Trihydroxy-Pravastatin. Mit Tolbutamid wurde die Beteiligung von CYP 2C8/9 an der Metabolitenbildung überprüft. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen (n = 4).

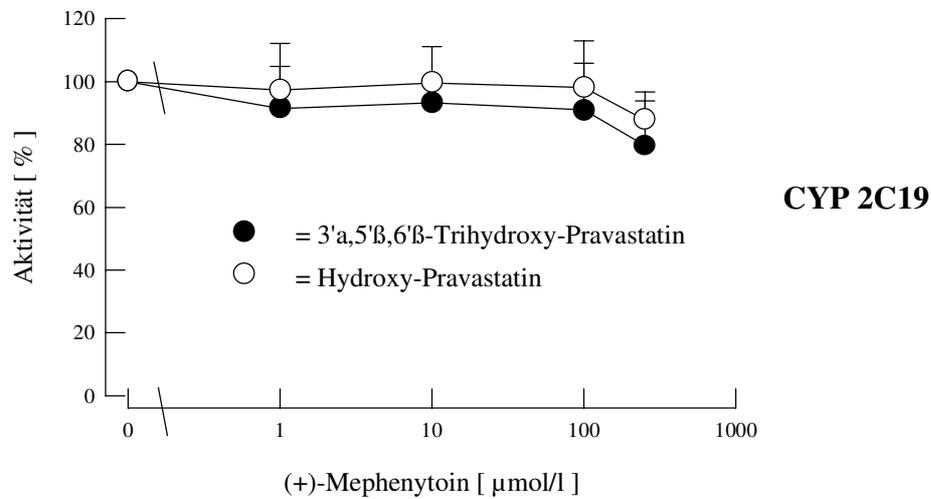


Abb. 57: Konzentrationsabhängige Hemmung der Pravastatinmetabolisierung durch S-(+)-Mephentermine bei Inkubation mit menschlichen Lebermikrosomen. weiße Kreise: Hydroxy-Pravastatin, schwarze Kreise: 3' α ,5' β ,6' β -Trihydroxy-Pravastatin. Mit S-(+)-Mephentermine wurde die Beteiligung von CYP 2C19 an der Metabolitenbildung überprüft. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen (n = 4).

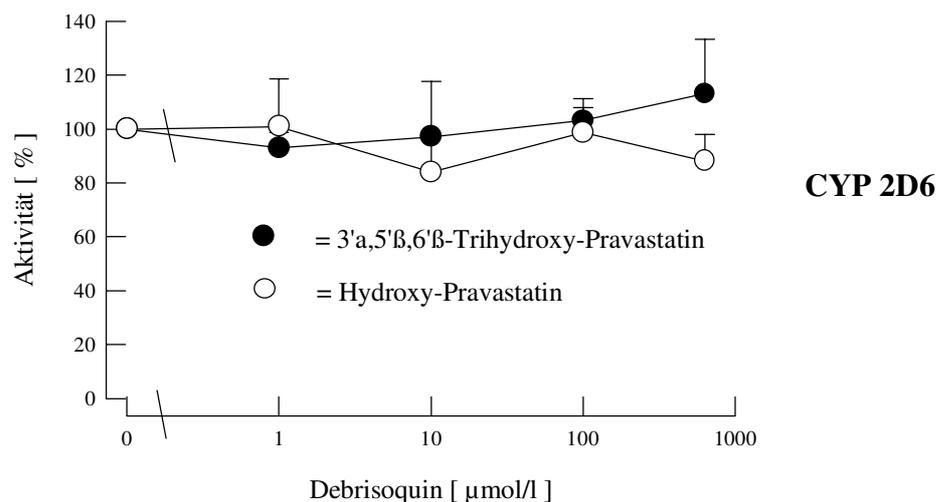


Abb. 58: Konzentrationsabhängige Hemmung der Pravastatinmetabolisierung durch Debrisoquine bei Inkubation mit menschlichen Lebermikrosomen. weiße Kreise: Hydroxy-Pravastatin, schwarze Kreise: 3' α ,5' β ,6' β -Trihydroxy-Pravastatin. Mit Debrisoquine wurde die Beteiligung von CYP 2D6 an der Metabolitenbildung überprüft. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen (n = 4).

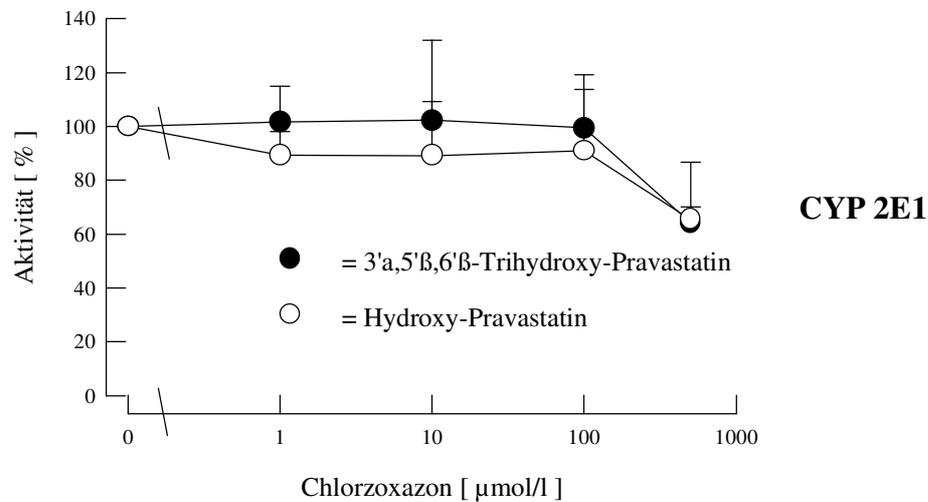


Abb. 59: Konzentrationsabhängige Hemmung der Pravastatinmetabolisierung durch Chlorzoxazon bei Inkubation mit menschlichen Lebermikrosomen. weiße Kreise: Hydroxy-Pravastatin, schwarze Kreise: 3'α,5'β,6'β-Trihydroxy-Pravastatin. Mit Chlorzoxazon wurde die Beteiligung von CYP 2E1 an der Metabolitenbildung überprüft. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen (n = 4).

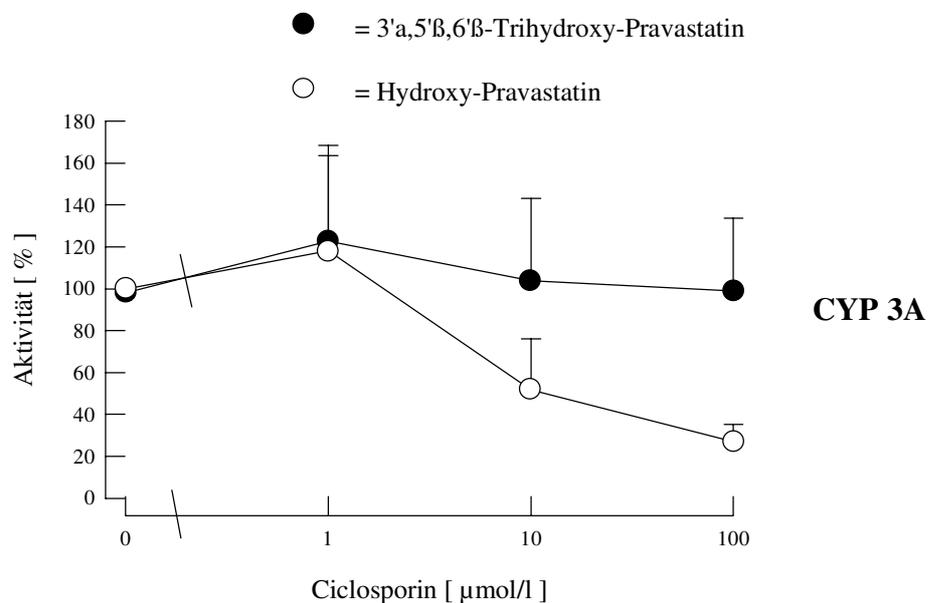


Abb. 60: Konzentrationsabhängige Hemmung der Pravastatinmetabolisierung durch Cyclosporin bei Inkubation mit menschlichen Lebermikrosomen. weiße Kreise: Hydroxy-Pravastatin, schwarze Kreise: 3'α,5'β,6'β-Trihydroxy-Pravastatin. Mit Cyclosporin wurde die Beteiligung von CYP 3A an der Metabolitenbildung überprüft. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen (n = 4).

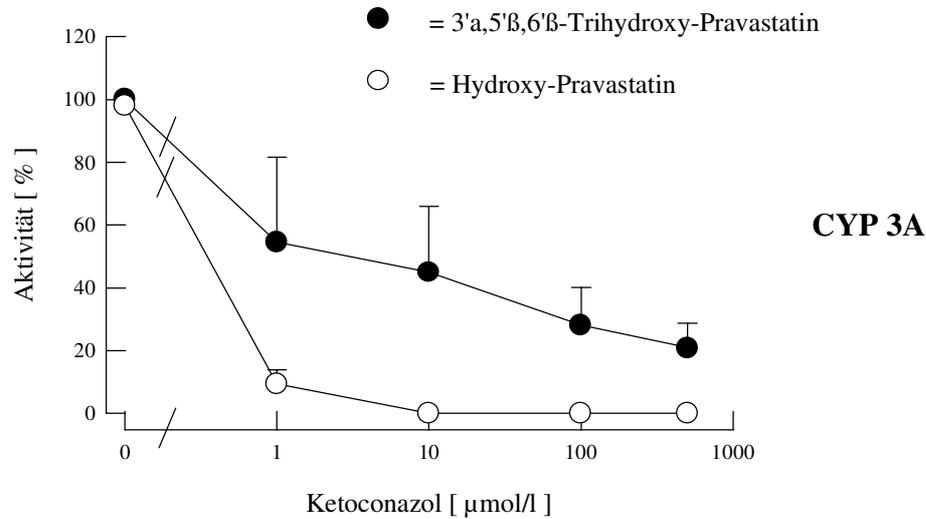


Abb. 61: Konzentrationsabhängige Hemmung der Pravastatinmetabolisierung durch Ketoconazol bei Inkubation mit menschlichen Lebermikrosomen. weiße Kreise: Hydroxy-Pravastatin, schwarze Kreise: 3' α ,5' β ,6' β -Trihydroxy-Pravastatin. Mit Ketoconazol wurde die Beteiligung von CYP 3A4 an der Metabolitenbildung überprüft. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen (n = 4).

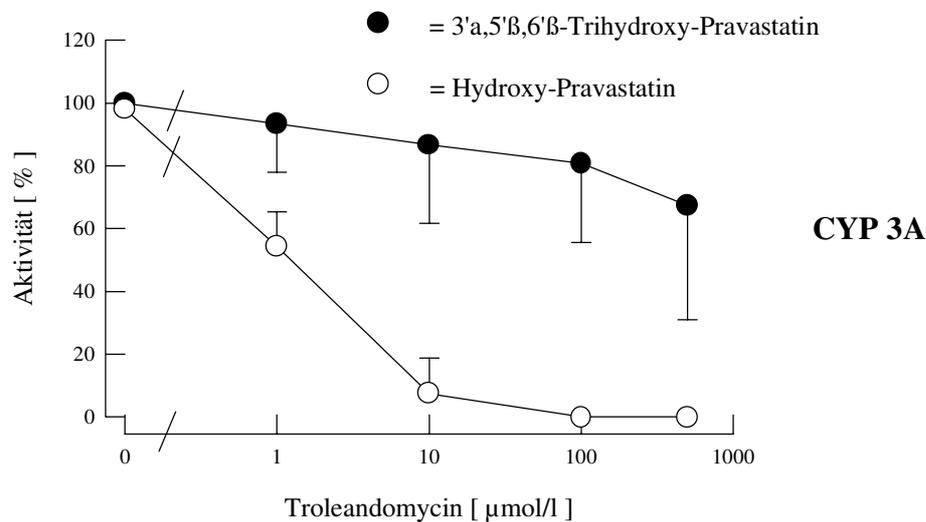


Abb. 62: Konzentrationsabhängige Hemmung der Pravastatinmetabolisierung durch Troleandomycin bei Inkubation mit menschlichen Lebermikrosomen. weiße Kreise: Hydroxy-Pravastatin, schwarze Kreise: 3' α ,5' β ,6' β -Trihydroxy-Pravastatin. Mit Troleandomycin wurde die Beteiligung von CYP 3A an der Metabolitenbildung überprüft. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen (n = 4).

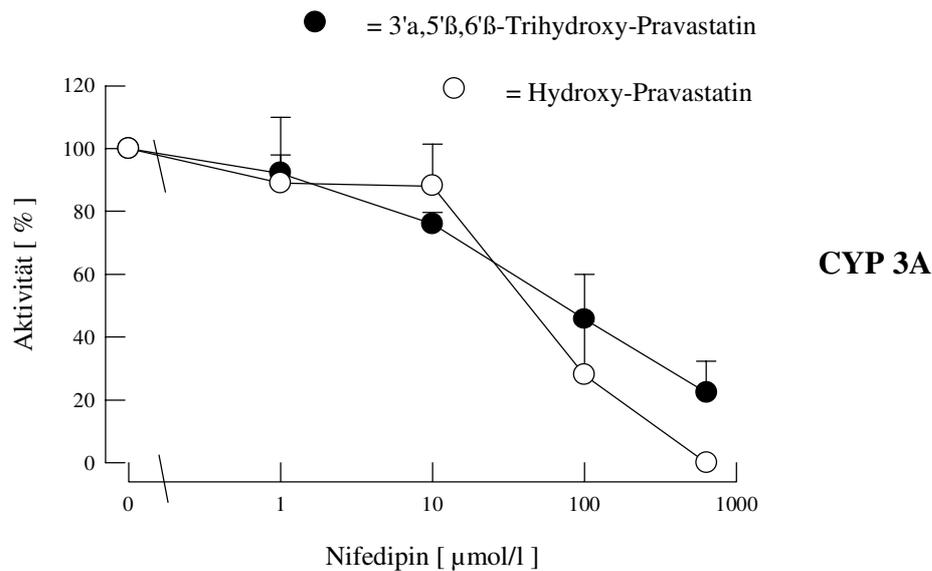


Abb. 63: Konzentrationsabhängige Hemmung der Pravastatinmetabolisierung durch Nifedipin bei Inkubation mit menschlichen Lebermikrosomen. weiße Kreise: Hydroxy-Pravastatin, schwarze Kreise: 3' α ,5' β ,6' β -Trihydroxy-Pravastatin. Mit Nifedipin wurde die Beteiligung von CYP 3A an der Metabolitenbildung überprüft. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen (n = 4).

Die Bildung des Hydroxy-Pravastatinmetaboliten wurden von allen 4 Hemmstoffen inhibiert: Bereits 10 $\mu\text{mol/l}$ Ketoconazol hemmten um 55 %. Bei Nifedipin und Ciclosporin waren Konzentrationen von 100 $\mu\text{mol/l}$ notwendig, um die Ausgangsaktivität um 72 und 73 % zu reduzieren. Der inhibitorische Effekt von Troleandomycin war am größten: 10 $\mu\text{mol/l}$ im Reaktionsansatz hemmten die Bildung des Hydroxy-Pravastatins um 93 % (Abb. 60-63).

Die Bildung von 3' α ,5' β ,6' β -Trihydroxy-Pravastatin durch menschliche Lebermikrosomen wurde nur durch ein CYP 3A-Inhibitor und durch ein anderes CYP 3A-Substrat gehemmt: Es inhibierten nur Ketoconazol und Nifedipin, Ciclosporin und Troleandomycin zeigten keinen hemmenden Effekt: 100 $\mu\text{mol/l}$ Nifedipin reduzierten die Bildung von 3' α ,5' β ,6' β -Trihydroxy-Pravastatin um 54 % im Vergleich zu Reaktionsansätzen ohne Zusatz des Inhibitors. Mit 500 $\mu\text{mol/l}$ Nifedipin konnten nur noch 22 % der Ausgangsaktivität nachgewiesen werden. 10 $\mu\text{mol/l}$ Ketoconazol führten zu einer Hemmung von 55 %, 100 $\mu\text{mol/l}$ reduzierten die 3' α ,5' β ,6' β -Trihydroxy-Pravastatinbildung auf 28 % der Ausgangsaktivität (Abb. 60-63).

20.2 Immuninhibition der Pravastatinmetabolisierung in menschlichen Lebermikrosomen

4 μl der MAK-Lösung ($\cong 20 \mu\text{g}$ Protein) pro 100 μg mikrosomalem Protein aus menschlichen Lebern ($n = 4$) inhibierten die Metabolisierung von Pravastatin um 50 %. Die Inhibition nimmt mit zunehmender MAK-Konzentration zu: 10 μl der MAK-Lösung reduzierten die Hydroxy-Pravastatin-Bildung auf 6 %, bei 3' α ,5' β ,6' β -Trihydroxy-Pravastatin erfolgte eine Reduzierung um 73 % im Vergleich zu den Referenzansätzen (kein MAK im Reaktionsansatz)(Abb. 64).

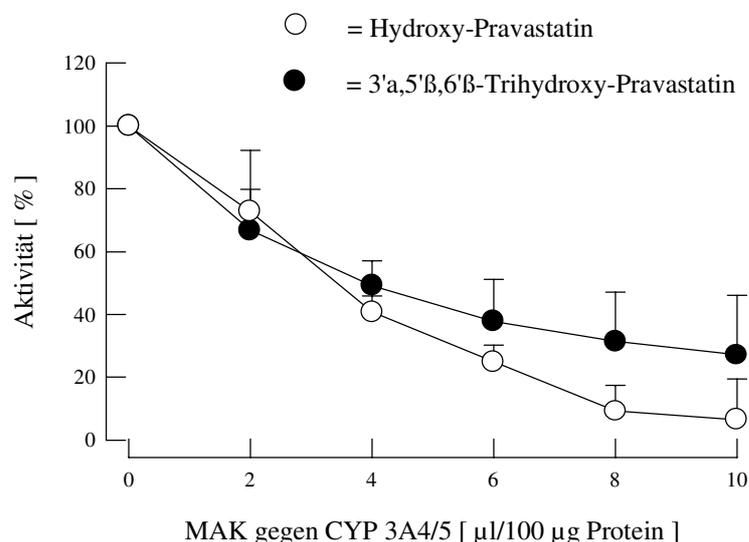


Abb. 64: Konzentrationsabhängigkeit der Immuninhibition der Pravastatinmetabolisierung in menschlichen Lebermikrosomen durch MAK gegen menschliches CYP 3A4/5. weiße Kreise: Hydroxy-Pravastatin, schwarze Kreise: 3' α ,5' β ,6' β -Trihydroxy-Pravastatin (1 μl MAK $\cong 10 \mu\text{g}$ Protein, Pravastatin: 1000 $\mu\text{mol/l}$). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($n = 4$).

20.3 Hemmung des Phase-II-Metabolismus von Pravastatin *in vitro* durch Estron und Dehydro-Epi-Androsteron

Die Phase-II-Substrate Estron und Dehydro-Epi-Androsteron konnten die Bildung von 3' α -Iso-Pravastatin aus Pravastatin in Reaktionsansätzen mit menschlichem Lebercytosol hemmen: 200 $\mu\text{mol/l}$ Estron in den Reaktionsansätzen hemmten die Bildung von 3' α -Iso-Pravastatin auf

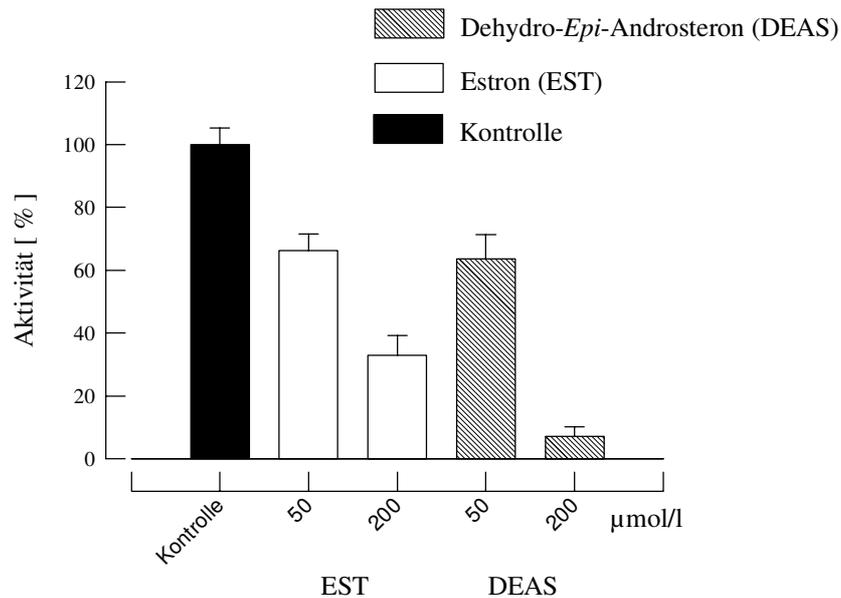


Abb. 65: Konzentrationsabhängige Hemmung des Pravastatin-Phase-II-Metabolismus durch Estron und Dehydro-*Epi*-Androsteron bei Inkubation mit menschlichem Lebercytosol. Aktivitätsbestimmung durch die Bildung von 3' α -*Iso*-Pravastatin. weiße Balken: Estron als Inhibitor, schwarze Balken: Kontrolle ohne Inhibitor, gestreifte Balken: Dehydro-*Epi*-Androsteron als Inhibitor. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($n = 4$).

33 % der Ausgangsaktivität, und 200 $\mu\text{mol/l}$ Dehydro-*Epi*-Androsteron reduzierten die Aktivität um 93 % (Abb. 64).

21. Hemmung der Ciclosporinmetabolisierung durch Pravastatin

Es konnte nachgewiesen werden, daß Pravastatin die Ciclosporinmetabolisierung nicht hemmte (Abb. 66). Selbst 5000 $\mu\text{mol/l}$ Pravastatin in Reaktionsansätzen mit menschlichen Lebermikrosomen konnten die CYP 3A-abhängige Bildung der Hydroxy-metabolite AM1 und AM9 nicht hemmen.

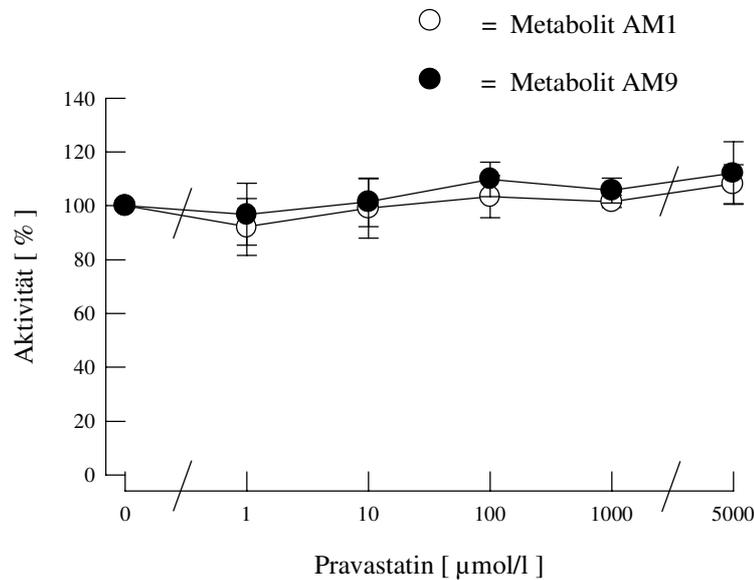


Abb. 66: Konzentrationsabhängige Hemmung der Ciclosporinmetabolisierung durch Pravastatin bei Inkubation mit menschlichen Lebermikrosomen; weiße Kreise: Hydroxy-Ciclosporin AM1, schwarze Kreise: Hydroxy-Ciclosporin AM9. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($n = 4$).

22. Metabolisierung von Pravastatin durch menschliches rekombinantes CYP 3A4 und CYP 3A5

Die Bildung von 3' α ,5' β ,6' β -Trihydroxy-Pravastatin und Hydroxy-Pravastatin in Reaktionsansätzen mit rekombinantem menschlichen CYP 3A4 und CYP 3A5 konnte nachgewiesen werden. Als Positivkontrolle wurde zusätzlich die Testosteron-Hydroxylierungsaktivität der CYP-Enzyme bestimmt: Rekombinantes CYP 3A4 metabolisiert Testosteron mit einer Aktivität von $3,7 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{pmol}^{-1}$ CYP. Für 3' α ,5' β ,6' β -Trihydroxy-Pravastatin konnte eine um den Faktor 21 geringere Aktivität nachgewiesen werden: $0,175 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{pmol}^{-1}$ CYP, für Hydroxy-Pravastatin mit $0,138 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{pmol}^{-1}$ CYP eine um den Faktor 27 geringere Aktivität.

6' β -Hydroxy-Testosteron wurde in Reaktionsansätzen mit CYP 3A5 mit einer Aktivität von $2,7 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{pmol}^{-1}$ CYP gebildet. Die Metabolisierung von Pravastatin zu 3' α ,5' β ,6' β -

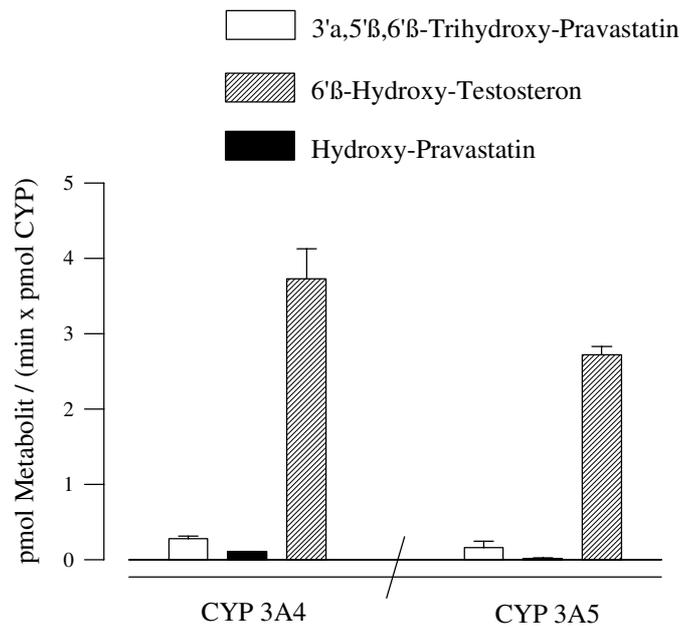


Abb: 67: Vergleich der Bildungsraten von 3'α,5'β,6'β-Trihydroxy-Pravastatin (weiße Balken) und Hydroxy-Pravastatin (schwarze Balken) mit der Bildungsrate von 6'β-Hydroxy-Testosteron (gestreifte Balken) nach der Inkubation von Pravastatin (1000 μmol/l) und Testosteron (200 μmol/l) in Reaktionsansätzen mit rekombinanten menschlichen CYP 3A4 oder CYP 3A5. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen (n = 4).

CYP	Aktivität [pmol Metabolit · min ⁻¹ · pmol ⁻¹ CYP]		
	6'β-Hydroxy-Testosteron	3'α,5'β,6'β-Trihydroxy-Pravastatin	Hydroxy-Pravastatin
CYP 3A4	3,7 ± 0,4	0,175 ± 0,036	0,138 ± 0,005
CYP 3A5	2,7 ± 0,1	0,061 ± 0,008	0,034 ± 0,001

Tab. 16: Vergleich der Bildungsraten von 3'α,5'β,6'β-Trihydroxy-Pravastatin und Hydroxy-Pravastatin mit der Bildungsrate von 6'β-Hydroxy-Testosteron nach der Inkubation von Pravastatin (1000 μmol/l) und Testosteron (200 μmol/l) in Reaktionsansätzen mit rekombinanten menschlichen CYP 3A4 oder CYP 3A5. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen (n = 4).

Trihydroxy-Pravastatin erfolgte mit einer um den Faktor 44 geringeren Aktivität ($0,061 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{pmol}^{-1} \text{ CYP}$). Der Metabolit Hydroxy-Pravastatin wurde mit einer Aktivität von $0,034 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{pmol}^{-1} \text{ CYP}$ gebildet. Dies war eine um den Faktor 79 geringere Aktivität im Vergleich zu $6'\beta$ -Hydroxy-Testosteron. Die Aktivitäten von rekombinanten CYP-Enzymen im Vergleich der Substrate Pravastatin und Testosteron sind in Abb. 67 und Tab. 16 dargestellt. Die Mikrosomen aus Wildtyp-infizierten Insektenzellen (Kontrollen) zeigten keine Aktivität.

Kapitel IV - Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß Lovastatin durch CYP 3A-Enzyme in der Leber und im Darm zu seinen Hauptmetaboliten abgebaut wird. Seine Metabolisierung wird durch andere Pharmaka, die CYP 3A-Substrate oder -Inhibitoren sind, gehemmt. Pravastatin ist ebenfalls ein CYP 3A-Substrat und wird in der Leber und im Darm metabolisiert. Seine Affinität zu CYP 3A-Enzymen ist jedoch um Zehnerpotenzen niedriger als die des Lovastatins. Im Gegensatz zu Lovastatin hemmen einige CYP 3A-Substrate und -Inhibitoren die CYP 3A-abhängige Metabolisierung von Pravastatin nur unvollständig.

Wang *et al.* konnten 1991 nachweisen, daß **Lovastatin** in menschlichen Lebermikrosomen von CYP-Enzymen der Subfamilie 3A metabolisiert wird. Die Bildung von 6' β -Hydroxy-, 6'-Exomethylen- und 3''-Hydroxy-Lovastatin konnten durch Antikörper und das CYP 3A-Substrat Troleandomycin gehemmt werden. Diese Ergebnisse konnten in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden, da sowohl MAK gegen menschliches CYP 3A als auch die CYP 3A-Substrate Ciclosporin und Troleandomycin sowie der CYP 3A-Inhibitor Ketoconazol die Metabolitenbildung in Reaktionsansätzen mit menschlichen Lebermikrosomen hemmten.

Die Bildung von 3''-Hydroxy-Lovastatin nach Inkubation von Lovastatin mit menschlichen Lebermikrosomen konnte in der vorliegenden Arbeit neben der Bildung der Hauptmetabolite 6' β -Hydroxy- und 6'-Exomethylen-Lovastatin jedoch nicht nachgewiesen werden. Dieser Metabolit wurde in weiteren Veröffentlichungen unterschiedlich beurteilt: Die Untersuchungen von Vyas *et al.* (1990 c) erwähnten nur eine unerhebliche Hydroxylierung an der 3''-Position von Lovastatin durch menschliche Lebermikrosomen; Greenspan *et al.* (1988) konnten die 3''-Hydroxy-Lovastatinbildung gar nicht nachweisen.

Dieser 3''-Hydroxy-Lovastatinmetabolit wurde neben der Bildung von 6' β -Hydroxy- und 6'-Exomethylen-Lovastatin nur nach Inkubation von Lovastatin mit Dünndarmmikrosomen des Schweins nachgewiesen, nicht jedoch bei Ansätzen mit Schweinelebermikrosomen. Beim Schwein gibt es somit offensichtlich einen Unterschied bei der Lovastatinmetabolisierung zwischen Dünndarm- und Lebermikrosomen.

Zusätzlich zu bisher publizierten Arbeiten (Wang *et al.*, 1991; Vyas *et al.*, 1990 b,c; Greenspan *et al.*, 1988) wurde in der vorliegenden Arbeit die Affinität zwischen Lovastatin und CYP 3A-Enzymen in isolierten Mikrosomen bestimmt.

Lovastatin wurde auch in menschlichen Dünndarmmikrosomen metabolisiert. Dabei entsprach das Metabolitenmuster dem nach Inkubation mit Lebermikrosomen. Für die Bildung beider Metabolite wurde eine geringfügig höhere Affinität von Lovastatin zu den CYP 3A-Enzymen nachgewiesen. Der K_m -Wert für die Bildung von 6' β -Hydroxy-Lovastatin war 1,4fach höher und für 6'-Exomethylen-Lovastatin 3fach höher als der entsprechende Wert für die Metabolisierung in Lebermikrosomen.

Weil Dünndarmproben des Menschen nur in geringem Umfang zur Verfügung standen, wurden für Hemmstudien der Dünndarmmetabolisierung, die eine große Menge Material erfordern, Mikrosomen aus der Darmmukosa des Schweins verwendet. Daß dieses Modell geeignet war, um den intestinalen Metabolismus von Arzneimitteln zu untersuchen, zeigten bereits die Untersuchungen von Lampen *et al.* (1995). Lampen *et al.* konnten nachweisen, daß die Immunsuppressiva Tacrolimus und Sirolimus sowohl in Reaktionsansätzen mit menschlichen Leber- als auch mit Dünndarmmikrosomen durch CYP 3A-Enzyme metabolisiert werden. Ein übereinstimmendes Metabolitenmuster und ähnliche K_m - und V_{max} -Werte für die Metabolisierung von Tacrolimus in Leber- und Dünndarmmikrosomen des Schweins und des Menschen wurden nachgewiesen. Lampen *et al.* fanden, daß Antikörper gegen menschliches CYP 3A auch mit CYP 3A-Enzymen des Schweins kreuzreagierte, wodurch eine gewisse Strukturhomologie zwischen CYP 3A-Enzymen beider Spezies gezeigt werden konnte.

17 verschiedene Inhibitoren wie Ciclosporin, Ketoconazol und Troleandomycin hemmten die Metabolisierung der Immunsuppressiva dabei sowohl in Reaktionsansätzen mit menschlichen Lebermikrosomen als auch mit Dünndarmmikrosomen des Schweins (Lampen *et al.*, 1996).

Auch in der vorliegenden Arbeit konnte bei Lovastatin als Substrat die Metabolitenbildung in Reaktionsansätzen mit Schweinedünndarmmikrosomen durch Ciclosporin, Ketoconazol und Troleandomycin gehemmt werden. Dadurch wurde gezeigt, daß auch beim Lovastatin CYP-Enzyme der Subfamilie 3A für die Metabolisierung im Darm verantwortlich sind.

Um mehr Mikrosomen mit einer höheren Aktivität aus den im begrenzten Umfang zur Verfügung stehenden Darmmukosaproben zu erhalten, wurden die Methoden von Pinkus (1981), Porteus *et al.* (1979) und Guengerich (1982) systematisch untersucht und verbessert.

Durch die Reduzierung der Inkubationstemperatur bei der Enterozytenisolierung von 37 °C auf 4 °C und die Verlängerung der Ultraschallbehandlung zum Zellaufschluß der Enterozyten von 1 min auf 4 min erhöhte sich die Ausbeute an CYP 3A-Enzymen insgesamt um das Vierfache gegenüber den Originalmethoden (Pinkus, 1981; Porteus *et al.*, 1979; Guengerich, 1982). Durch den Wegfall des zweiten Zentrifugationsschrittes bei der Isolierung von Mikrosomen aus Zellaufschlüssen von Enterozyten wurde im Vergleich zur Originalmethode (Guengerich, 1982) zusätzlich die Dauer der Isolierung um 2 h reduziert.

Durch die Bestimmung der Hemmkonstanten in der vorliegenden Arbeit konnte erstmals nachgewiesen werden, daß Ciclosporin, Ketoconazol und Troleandomycin potente Inhibitoren der Lovastatinmetabolisierung in Lebermikrosomen des Menschen und Schweinedünndarmmikrosomen sind. Die Unterschiede der Hemmkonstanten für Troleandomycin (menschliche Leber: 27 µmol/l und Schweinedünndarm: 0,8 µmol/l) sind dabei eher auf Speziesunterschiede zurückzuführen. Obwohl die Inhibitionskonstanten nicht direkt vom Schwein auf den Menschen übertragen werden können, sind die effektiven Inhibitoren des Lovastatinmetabolismus im Schweinedarm mit hoher Wahrscheinlichkeit ebenso effektive Inhibitoren des intestinalen Metabolismus von Lovastatin im Menschen.

In einer klinischen Studie von Olbricht *et al.* (1997) führte die gleichzeitige Gabe von Lovastatin und Ciclosporin bei Patienten zu einem 20fachen Anstieg der AUC von Lovastatin im Vergleich zu nicht mit Ciclosporin behandelten Patienten. Die AUC von Ciclosporin blieb hingegen unverändert.

Diese Ergebnisse können durch die vorliegende Studie erklärt werden: Da Lovastatin wie auch Ciclosporin (Kronbach *et al.*, 1988; Lampen *et al.*, 1996) von derselben CYP-Subfamilie metabolisiert werden, konkurrieren sie bei gleichzeitiger Gabe um die Substrat-Bindungsstellen dieser Enzyme im Darm und in der Leber. In Tab. 17 sind die K_m -Werte für die Metabolisierung der Statine und von Ciclosporin (aus Lampen *et al.*, 1996) durch menschliche Leber- und Dünndarmmikrosomen zum Vergleich dargestellt. Zur besseren Übersicht ist repräsentativ nur der K_m -Wert für die Bildung des Hauptmetaboliten angegeben, die nach der Linearisierungsmethode nach Lineweaver-Burk berechnet wurden.

Sowohl für Lovastatin mit K_m -Werten um 10 µmol/l und Ciclosporin mit K_m -Werten von 4 µmol/l ist eine relativ hohe Affinität zwischen CYP 3A-Enzymen und den Substraten sowohl im Darm auch in der Leber nachgewiesen worden.

Demnach ist Ciclosporin ein effektiver Hemmstoff der Lovastatinmetabolisierung. Dies konnte mit K_i -Werten zwischen 1,6 und 10,3 $\mu\text{mol/l}$ für die Hemmung der Lovastatinmetabolitenbildung sowohl in Reaktionsansätzen mit Lebermikrosomen des Menschen als auch mit Dünndarmmikrosomen des Schweins nachgewiesen werden. Olbricht *et al.* (1997) konnten am ersten Tag der gemeinsamen Gabe von Ciclosporin und Lovastatin eine 19fach größere AUC für Ciclosporin als für Lovastatin nachweisen. Die dadurch nachgewiesene höhere Konzentration von Ciclosporin *in vivo* erklärt, daß die kombinierte Gabe beider Pharmaka im Vergleich zur Einzelgabe zu einer Erhöhung der AUC von Lovastatin, nicht aber zu einer gleichzeitigen Erhöhung der AUC von Ciclosporin, führt.

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen, daß die Erhöhung der AUC für Lovastatin bei der gleichzeitigen Gabe von Ciclosporin nicht nur durch die Hemmung der Lovastatinmetabolisierung in der Leber erklärt werden kann, sondern wahrscheinlich auch durch die Zunahme der oralen Bioverfügbarkeit, die durch eine Hemmung des CYP 3A-Metabolismus in der Mukosa des Dünndarms verursacht wurde.

Spezies / Organ	K_m [$\mu\text{mol} / \text{l}$]		
	6' β -Hydroxy-Lovastatin	3' α ,5' β ,6' β -Trihydroxy-Pravastatin	Hydroxy-Ciclosporin AM9
menschliche Leber	7,8 \pm 2,7	4887 \pm 2185	4,2 \pm 1,7
menschlicher Darm	12,6 \pm 4,6	2387 \pm 1004	3,9 \pm 1,4

Tab. 17: K_m -Werte für die Bildung der Metabolite 6' β -Hydroxy-Lovastatin, 3' α ,5' β ,6' β -Trihydroxy-Pravastatin und Hydroxy-Ciclosporin (AM9) durch menschliche Leber- und Dünndarmmikrosomen. Berechnung nach der Linearisierungsmethode nach Lineweaver-Burk. Die K_m -Werte für Hydroxy-Ciclosporin wurden der Veröffentlichung von Lampen *et al.* (1996) entnommen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen (n = 4).

Die Bedeutung des intestinalen Metabolismus für die Pharmakokinetik von CYP 3A-Substraten zeigte die Studie von Wu *et al.* (1995): Wu *et al.* konnten nachweisen, daß die schlechte orale Bioverfügbarkeit von Ciclosporin (< 30 %) trotz einer Resorptionsquote von 86 % hauptsächlich auf die CYP 3A-abhängige Metabolisierung im Darm zurückzuführen ist.

Mikrosomen repräsentieren eine isolierte Enzymsuspension und lassen andere Faktoren wie z. B. den Transport durch Membranen, die eine zusätzliche Rolle bei den Pharmaka-Interaktionen von Lovastatin spielen können, außer acht. Wachter *et al.* (1995) zeigten, daß die meisten bekannten CYP 3A-Substrate auch Substrate des p-Glycoproteins sind. P-Glycoprotein kommt u.a. in den Membranen der Mukosazellen des Darms vor und transportiert Pharmaka oder andere Fremdstoffe aus der Zelle zurück ins Darmlumen (Roninson, 1991). Dieser Rücktransport aus der Mukosazelle in das Darmlumen ist neben der Metabolisierung durch CYP-Enzyme für die geringe und variable Bioverfügbarkeit von Pharmaka, die CYP 3A-Substrate sind, mitverantwortlich (Benet *et al.*, 1996).

In der vorliegenden Arbeit konnte mittels isolierter Mikrosomen nachgewiesen werden, daß **Pravastatin** durch CYP-Enzyme der Subfamilie 3A in menschlichen Lebermikrosomen zu den Metaboliten 3'α,5'β,6'β-Trihydroxy-Pravastatin (CYP 3A-Hauptmetabolit) und Hydroxy-Pravastatin metabolisiert wird. Der Nachweis erfolgte durch chemische Inhibition und durch Immuninhibition der Metabolisierung von Pravastatin sowie durch den Nachweis der Metabolitenbildung in Reaktionsansätzen mit rekombinanten menschlichen CYP 3A4 und CYP 3A5.

Kein anderer der getesteten Inhibitoren hemmte die Bildung der Metabolite in den Reaktionsansätzen signifikant. Hiermit konnte gezeigt werden, daß eine Beteiligung der untersuchten CYP-Enzyme (CYP 1A1/2, CYP 2A6, CYP 2C8/9, CYP 2C19, CYP 2D6 und CYP 2E1) nicht nachweisbar war. Muramatsu *et al.* (1992) konnten die Bildung von 3'α,5'β,6'β-Trihydroxy-Pravastatin in Rattenhepatozytenkulturen durch die vorangegangene Gabe von 3-Methylcholanthren (Induktor von CYP 1A1, CYP 1A2, CYP 2A1, CYP 2A2, und CYP 2D1 der Ratte [Soucek *et al.*, 1985]) signifikant erhöhen.

Weiterhin hemmten in der vorliegenden Arbeit die CYP 3A-Substrate Ciclosporin und Troleandomycin die Metabolisierung von Pravastatin zu 3'α,5'β,6'β-Trihydroxy-Pravastatin durch Lebermikrosomen des Menschen nicht (Ciclosporin, 100 µmol/l) oder nur zu einem relativ geringen Umfang (Troleandomycin, 500 µmol/l, - 33 % der Aktivität), während

Ketoconazol (100 $\mu\text{mol/l}$, - 72 % der Aktivität) und Nifedipin (500 $\mu\text{mol/l}$, - 78 % der Aktivität) hemmten. Im Vergleich blockierten alle diese Inhibitoren bei entsprechenden Konzentrationen die Bildung von Lovastatinmetaboliten um mehr als 80 %. Die unvollständige Hemmung durch einige CYP 3A-Substrate und die Induktionsversuche von Muramatsu *et al.* (1992) geben einen Hinweis darauf, daß noch andere CYP-Enzyme, die in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurden, an der Pravastatinmetabolisierung beteiligt sein können.

Auch in Reaktionsansätzen mit menschlichen Dünndarmmikrosomen konnte die Bildung von 3' α ,5' β ,6' β -Trihydroxy-Pravastatin und Hydroxy-Pravastatin nachgewiesen werden. Da Tacrolimus, Sirolimus (Lampen *et al.*, 1995) und Lovastatin sowohl in der Leber als auch im Darm durch die gleiche CYP-Subfamilie, nämlich CYP 3A, metabolisiert werden, sind mit hoher Wahrscheinlichkeit auch CYP 3A-Enzyme für die Metabolisierung von Pravastatin im Darm verantwortlich.

Bei dem nachgewiesenen Hydroxy-Pravastatinmetaboliten könnte es sich um 3''-Hydroxy-Pravastatin handeln, denn es ist der einzige Hydroxy-Metabolit des Pravastatins der ersten Generation, der bekannt ist (Everett *et al.*, 1991).

Muramatsu *et al.* (1992) schlugen für die Bildung von 3' α ,5' β ,6' β -Trihydroxy-Pravastatin folgenden Mechanismus vor: Nach Oxidation von Pravastatin durch CYP-Enzyme zum 4' α ,5' β -Epoxid-Pravastatin erfolgt der nucleophile Angriff eines Hydroxy-Anions am Epoxid. Das Produkt dieser chemischen Umsetzung ist 3' α ,5' β ,6' β -Trihydroxy-Pravastatin, oder das Epoxid wird enzymatisch mit Glutathion konjugiert (Abb. 68). Dieses Epoxid hätte wie der von uns als Hydroxy-Pravastatin bezeichnete zweite CYP 3A-Metabolit die Masse 463 m/z im Massenspektrometer. Daß es sich jedoch wahrscheinlich nicht um das Pravastatin-Epoxid handelte, läßt sich dadurch erklären, daß sich dieser Hydroxy-Pravastatinmetabolit im Gegensatz zu 3' α ,5' β ,6' β -Trihydroxy-Pravastatin durch Ciclosporin und Troleandomycin im Reaktionsansatz inhibieren ließ. Dieses unterschiedliche Inhibitionsverhalten sollte man nicht erwarten, wenn es sich beim zweiten Metaboliten um eine direkte Vorstufe von 3' α ,5' β ,6' β -Trihydroxy-Pravastatin handelte. Das Glutathion-Konjugat von Pravastatin konnte nach Inkubation mit Ratten-Hepatozyten nachgewiesen werden (Muramatsu *et al.*, 1992). Dieser Metabolit wird dagegen nicht als ein möglicher Metabolit erwähnt, der *in vivo* im Menschen entsteht (Everett *et al.*, 1991; Haria und McTavish, 1997).

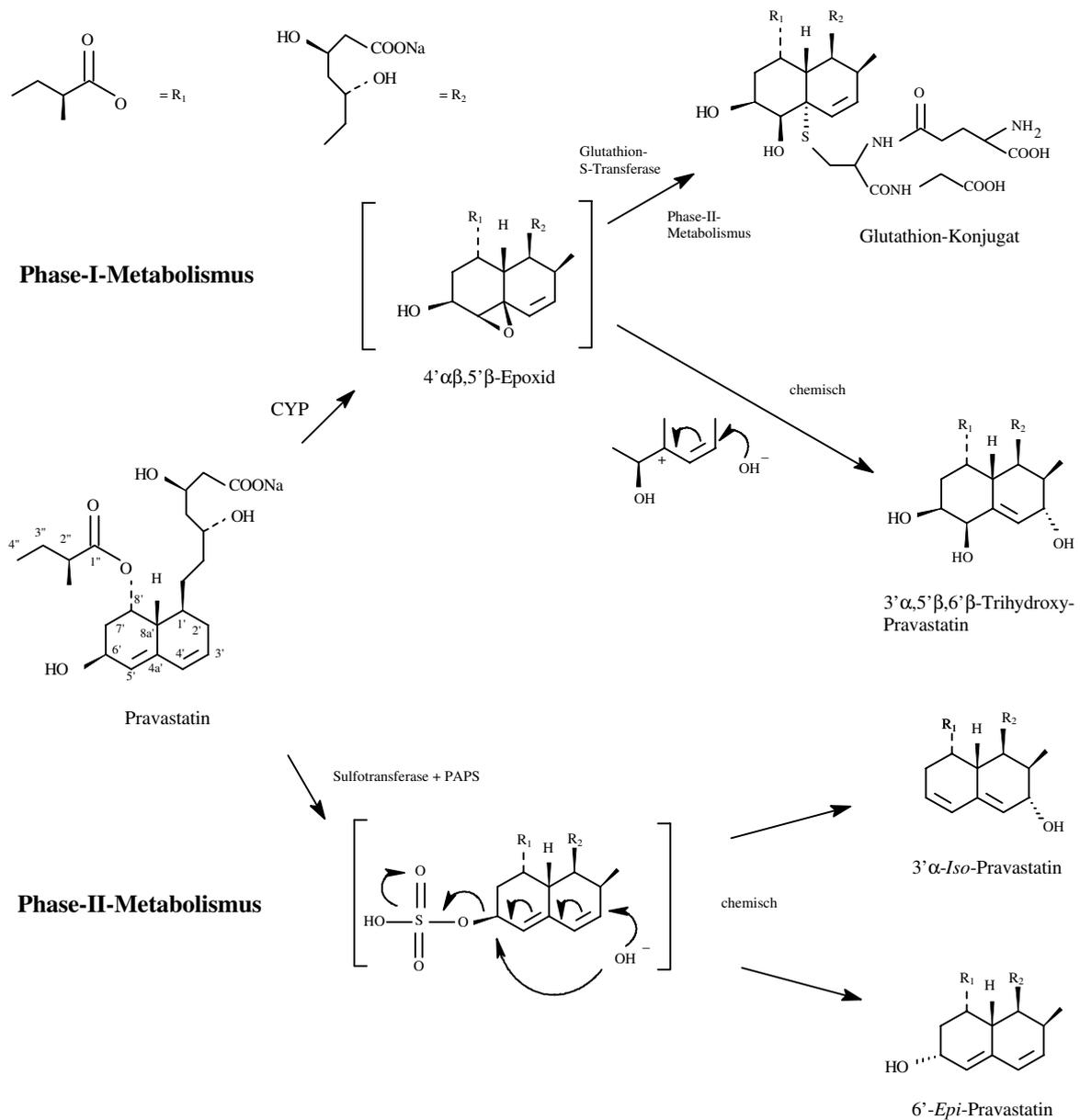


Abb. 68: Mögliche Mechanismen für die Bildung der Pravastatinhauptmetabolite. Nach einer enzymatischen Reaktion durch Phase-I- und Phase-II-Enzyme erfolgt eine chemische Reaktion: oben: Nach Oxidation von Pravastatin durch CYP-Enzyme zum $4'\alpha\beta,5'\beta$ -Epoxid-Pravastatin erfolgt der nucleophile Angriff eines Hydroxy-Anions am Epoxid. Das Produkt dieser chemischen Umsetzung ist $3'\alpha,5'\beta,6'\beta$ -Trihydroxy-Pravastatin. Oder das Epoxid wird enzymatisch mit Glutathion konjugiert (nach Muramatsu *et al.*, 1992). unten: Als zweite Möglichkeit geht Pravastatin direkt in den Phase-II-Metabolismus ein: Nach Konjugation mit Schwefelsäure kommt es durch den nucleophilen Angriff eines Hydroxy-Anions zur Abspaltung der Sulfatgruppe und der Bildung von $3'\alpha$ -Iso-Pravastatin oder $6'$ -Epi-Pravastatin. (nach Kitazawa *et al.*, 1993).

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, daß Pravastatin *in vitro* auch direkt durch Enzyme des Phase-II-Metabolismus umgesetzt wird: Eine Sulfotransferase in menschlichem Leber- und Dünndarmcytosol metabolisierte Pravastatin zu 3' α -*Iso*-Pravastatin: Nur nicht hitzedenaturiertes Cytosol in der Anwesenheit von PAPS im Reaktionsansatz führte zur Bildung von 3' α -*Iso*-Pravastatin. Der Zusatz von Estron und Dehydro-*Epi*-Androsteron, selbst Substrate einer Sulfatierung (Kitazawa *et al.*, 1993), hemmten seine Entstehung. Kitazawa *et al.* (1993) postulierten für die Bildung dieses Metaboliten folgenden Mechanismus: Nach Konjugation mit Schwefelsäure kommt es durch den nucleophilen Angriff eines Hydroxy-Anions an der 3'- oder. 6'-Position des Decalinringes zur Abspaltung der Sulfatgruppe und einer Umlagerung zu 3' α -*Iso*-Pravastatin oder 6'-*Epi*-Pravastatin (Abb. 68, unten). Kitazawa *et al.* konnten die enzymatische Bildung dieser Pravastatin-Isomere im Lebercytosol der Ratte nachweisen, wobei hauptsächlich 3' α -*Iso*-Pravastatin entstand. In der vorliegenden Arbeit konnte zusätzlich zu dem von Kitazawa *et al.* (1993) beschriebenen Phase-II-Metabolismus von Pravastatin in der Leber, der Phase-II-Metabolismus in der Darmschleimhaut nachgewiesen werden. Inwiefern dieser zu der niedrigen und variablen oralen Bioverfügbarkeit von Pravastatin beiträgt und der Angriffspunkt von Pharmakainteraktionen ist, muß noch weiterhin untersucht werden.

Über die Entstehung von 6'-*Epi*-Pravastatin in Reaktionsansätzen mit Leber- oder Darmcytosol des Menschen kann in der vorliegenden Arbeit keine Aussage gemacht werden, weil die genutzte LC-MS-Methode keine Trennung von Pravastatin und 6'-*Epi*-Pravastatin ermöglichte.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Affinität von Pravastatin zu CYP 3A-Enzymen bestimmt, dabei konnte eine geringe Affinität zu den abbauenden Enzymen nachgewiesen werden: In Reaktionsansätzen mit menschlichen Dünndarmmikrosomen konnte für den CYP 3A-Hauptmetaboliten von Pravastatin 3' α ,5' β ,6' β -Trihydroxy-Pravastatin ein K_m -Wert nachgewiesen werden, der mit 2387 $\mu\text{mol/l}$ um den Faktor 200 höher war als der des entsprechenden CYP 3A-Hauptmetabolit von Lovastatin (Tab. 17). In der Leber war der K_m -Wert für 3' α ,5' β ,6' β -Trihydroxy-Pravastatin mit 4887 $\mu\text{mol/l}$ um den Faktor 600 höher als für 6' β -Hydroxy-Lovastatin. Der K_m -Wert für die Bildung von Hydroxy-Pravastatin in menschlichen Dünndarmmikrosomen lag in einem ähnlichen Konzentrationsbereich, nur für die Metabolisierung in menschlichen Lebermikrosomen lag der K_m -Wert um den Faktor drei höher.

Die unterschiedlichen Affinitäten von Pravastatin und Lovastatin zu den CYP 3A-Enzymen können dadurch erklärt werden, daß Pravastatin im Vergleich zu Lovastatin wesentlich hydrophiler ist. Dieser hydrophile Charakter von Pravastatin wird durch den offenen Lactonring und die Hydroxygruppe an der 6'-Position des Decalinringsystems verursacht, welcher durch einen Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten ($P_{o/w}$) von 0,59 deutlich wird. Lovastatin im Vergleich hat einen $P_{o/w}$ von 18700 und Pravastatin-Lacton einen $P_{o/w}$ von 280 (alle Werte für pH 7, aus Serajuddin *et al.*, 1990). Die Untersuchungen von Hummelsiep *et al.* (1995) ergaben, daß der offene Lactonring des Pravastatins für die schlechte Metabolisierung von Pravastatin verantwortlich ist: Nach der 60-minütigen Inkubation von Rattenhepatozyten mit Pravastatin und der anschließenden Detektion mittels eines Radiodünnschichtanalysators konnte keine Metabolitenbildung festgestellt werden. Bei Pravastatin-Lacton hingegen war unter identischen Versuchsbedingungen die Radioaktivität nahezu vollständig an einen Metaboliten gebunden.

Obwohl Pravastatin ein CYP 3A-Substrat ist, scheint der CYP 3A-abhängige Metabolismus, verursacht durch die geringe Affinität zu den CYP 3A-Enzymen, nicht klinisch signifikant zur Pravastatineliminierung beizutragen.

Die aus K_m und V_{max} berechnete intrinsische Clearance von $\leq 0,03 \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ von Pravastatin durch CYP 3A-Enzyme in Reaktionsansätzen mit menschlichen Lebermikrosomen unterstreicht dies (Tab. 18).

	Lovastatin		Pravastatin	
	6'β-Hydroxy-	6'-Exomethylen-	3'α,5'β,6'β-Trihydroxy	Hydroxy-
CL_{int}				
[$\mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$]	199 ± 248	139 ± 152	0,03 ± 0,03	0,01 ± 0,006

Tab. 18: Vergleich der intrinsischen Clearance von Lovastatin und Pravastatin in Reaktionsansätzen mit menschlichen Lebermikrosomen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($n = 4$). $CL_{int} = V_{max} / K_m$

Aus diesem Grund kann erwartet werden, daß die Hemmung der CYP-abhängigen Metabolisierung von Pravastatin durch ein zweites CYP 3A-Substrat keinen signifikanten Einfluß auf die Pharmakokinetik des Statins haben.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit werden durch die folgenden *in vivo*-Studien bestätigt:

Everett *et al.* (1991) konnten nach einer einzelnen oralen Dosis von 19,2 mg [¹⁴C]-Pravastatin im 48 h-Urin 29 % der Gesamt-Urin-Radioaktivität als unverändertes Pravastatin wiederfinden. Nur 6,2 % der Radioaktivität fiel auf 3'α,5'β,6'β-Trihydroxy-Pravastatin, der Metabolit 3''-Hydroxy-Pravastatin war mit einem Anteil von 3,3 % beteiligt. Dabei wurde nur 20 % der Radioaktivität über die Niere ausgeschieden.

71 % der Radioaktivität wurde im Stuhl wiedergefunden, wobei 47,6 % der Radioaktivität aus dem Stuhl auf unverändertes Pravastatin entfielen (Everett *et al.*, 1991). Eine Übersicht über die prozentuale Verteilung der Radioaktivitätsausscheidung nach der Gabe von [¹⁴C]-Pravastatin ist in Tab. 19 zusammengefaßt.

Nach den Untersuchungen von Everett *et al.* (1991) ist 3'α-Iso-Pravastatin der Hauptmetabolit von Pravastatin: 10 % der Radioaktivität im Urin entfielen auf diesen Metaboliten; im Stuhl waren es 13,9 %. Dieser Metabolit wird, wie zuvor beschrieben, nicht durch CYP-Enzyme gebildet.

In vivo wird 3'α-Iso-Pravastatin auch durch eine rein chemische Reaktion im Magen gebildet, die durch den dort vorhandenen niedrigen pH-Wert begünstigt wird (Triscari *et al.*, 1995). Nach der i.v. Gabe von [¹⁴C]-Pravastatin reduzierte sich der Anteil von 3'α-Iso-Pravastatin im 48 h-Urin von 10 % (orale Gabe) auf 2,3 %. Die chemische und enzymatische Umsetzung während der Passage durch den Magen und die anschließende Resorption im Darm haben also einen großen Anteil an der Bildung dieses Metaboliten. Ob dabei mehr die säurekatalysierte Isomerisierung im Magen oder die enzymatische Umsetzung in der Mukosa des Darms die Hauptrolle spielten, läßt sich nicht abschätzen.

Bei einer intrinsischen Clearance von $0,03 \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ für 3'α,5'β,6'β-Trihydroxy-Pravastatin in Reaktionsansätzen mit menschlichen Lebermikrosomen (Tab. 18) läßt sich ein Anteil von 6,2 % von 3'α,5'β,6'β-Trihydroxy-Pravastatin an der im Urin gemessenen Radioaktivität jedoch nicht erklären. Weitere Untersuchungen müssen klären, ob 3'α,5'β,6'β-Trihydroxy-Pravastatin *in vivo* durch einen unbekanntem Degradationsprozeß oder durch Oxidation von 3'α-Iso-Pravastatin entstehen könnte. Insgesamt wurde Pravastatin bei der

Studie von Everett *et al.* (1991) hauptsächlich unverändert ausgeschieden, die durch CYP3A-Enzyme gebildeten Metabolite machten nur einen geringen Anteil aus, was durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erklärt werden kann.

	prozentuale Verteilung der Radioaktivität im	
	Urin (0-48h) \cong 20 %	Stuhl (0-96h) \cong 71 %
Pravastatin	29,0 %	47,6 %
3'α-Iso-Pravastatin	10,0 %	13,9 %
6'-Epi-Pravastatin	2,8 %	0,7 %
3'α,5'β,6'β-Trihydroxy-Pravastatin	6,2 %	n. b.

Tab. 19: Prozentuale Verteilung der Radioaktivitätsausscheidung im Stuhl und im Urin gesunder Probanden (n = 8) nach der einzelnen oralen Gabe von 19,2 mg [¹⁴C]-Pravastatin. Die Wiederfindungsrate im 48 h-Urin betrug 20 %, beim Stuhl (0-96h) 71 %. n.b. = nicht bestimmt; (aus Everett *et al.*, 1991)

Eine ähnliche Studie zeigte, daß Lovastatin im Gegensatz zu Pravastatin im menschlichen Körper gut metabolisiert wird: Lovastatin wird hauptsächlich über die Galle ausgeschieden, da 84 % einer Gabe von Lovastatin als Metabolite im Stuhl wiedergefunden wurden (Desager und Horsmans, 1996). Halpin *et al.* (1993) konnten nach der oralen Gabe von 100 mg [¹⁴C]-Lovastatin in der Galle von drei Probanden kein Lovastatin nachweisen. Hauptbestandteile dieser Galle waren Phase-II-Metabolite (Glucuronsäurekonjugate) des CYP 3A-Hauptmetaboliten 6' β -Hydroxy-Lovastatin. Die *in vivo* hauptsächlich über den CYP 3A-Metabolismus erfolgende Eliminierung von Lovastatin bestätigen die in der vorliegenden Arbeit berechnete intrinsischen Clearance von 140-200 $\mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ für Lovastatin durch die Bildung der beiden CYP 3A-Metabolite in Reaktionsansätzen mit menschlichen Lebermikrosomen (Tab. 18).

Eine von Neuvonen *et al.* (1997) durchgeführte Studie an gesunden Probanden zeigte, daß der CYP 3A- (Olkkola *et al.*, 1994; Gascon *et al.*, 1991) und p-Glycoprotein-Inhibitor (Wacher *et al.*, 1995; Gupta *et al.*, 1991) Itraconazol keinen signifikanten Einfluß auf die

Pharmakokinetik von Pravastatin hatte: Die AUC von Pravastatin bei der gleichzeitigen Gabe von Itraconazol erhöhte sich statistisch nicht signifikant um den Faktor 1,7 im Vergleich zur Gabe von Placebo anstelle von Itraconazol. Im direkten Vergleich wird die unterschiedliche Beeinflussbarkeit der Pharmakokinetik von Lovastatin und Pravastatin deutlich: Neuvonen *et al.* (1996) konnten bei einer Lovastatin-Itraconazol-Interaktionsstudie einen mehr als 20fachen Anstieg der AUC für Lovastatin nachweisen, wenn Lovastatin gleichzeitig mit Itraconazol verabreicht wurde.

Die schon erwähnte Studie von Olbricht *et al.* (1997) zeigte bei der gleichzeitigen Gabe von Ciclosporin eine fünffache Erhöhung der AUC von Pravastatin im Vergleich zu ohne Ciclosporin behandelten Patienten. Da Pravastatin keinen signifikanten CYP-abhängigen Metabolismus unterliegt, kann diese AUC-Erhöhung nicht durch eine Hemmung der Metabolisierung von Pravastatin durch Ciclosporin erklärt werden. Eine mögliche Erklärung, warum Ciclosporin, aber nicht Itraconazol (Neuvonen *et al.*, 1997) mit Pravastatin interagiert, bietet die Untersuchung von Ziegler *et al.* (1993):

Ziegler *et al.* (1993; und Hummelsiep, 1995) konnten für die Aufnahme von Pravastatin in die Leberzelle der Ratte einen hepatoselektiven carrier-vermittelten Transport nachweisen. In Untersuchungen die in Anwesenheit von Ciclosporin durchgeführt wurden, konnte gezeigt werden, daß dieser Transport durch das Immunsuppressivum kompetitiv gehemmt werden konnte.

Die meisten CYP 3A-Substrate sind auch p-Glycoproteinsubstrate (Wacher *et al.*, 1995). Itraconazol, ein p-Glycoprotein-Inhibitor (Wacher *et al.*, 1995; Gupta *et al.*, 1991), erhöhte bei der gleichzeitigen Gabe die AUC nur von Lovastatin signifikant, jedoch nicht von Pravastatin (Neuvonen *et al.*, 1996 und 1997). Diese klinischen Interaktionsstudien könnten einen ersten Hinweis darauf geben, daß Pravastatin, im Gegensatz zu Lovastatin, ebenfalls kein klinisch bedeutendes p-Glycoproteinsubstrat ist. Eine weitere Abklärung des Transportes ist notwendig. Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, sind für Pharmakainteraktionen mit Pravastatin im Gegensatz zu Lovastatin eher Transportprozesse als der CYP-abhängige Metabolismus verantwortlich. Aufgrund der vorliegenden Studie kann abgeleitet werden, daß die Pharmakokinetik von Pravastatin durch Pharmakainteraktionen mit CYP 3A-Substraten und -Inhibitoren, wenn überhaupt, weniger stark beeinflusst wird, als dies bei Lovastatin der Fall ist.

Die Bedeutung dieser Pharmakainteraktion wird deutlich, wenn man bedenkt, daß die Hälfte aller in der Klinik häufig verwendeten Pharmaka CYP 3A-Substrate und damit potentielle kompetitive Inhibitoren des Lovastatinmetabolismus sind (Guengerich, 1995). Demnach kann erwartet werden, daß in der klinischen Praxis Pravastatin gegenüber Lovastatin bei Kombinationstherapie mit anderen Pharmaka, die bekannte CYP 3A-Substrate und/oder -Inhibitoren sind, Vorteile besitzt. Als Hinweis hierauf kann gewertet werden, daß bisher kein Fall von Rhabdomyolysen bei der Kombinationstherapie von Pravastatin mit CYP 3A-Substraten und/oder -Inhibitoren beschrieben wurde (Hsu *et al.*, 1995; Christians *et al.*, 1998).

Kapitel V - Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der CYP 3A-abhängige Metabolismus der HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren Lovastatin und Pravastatin miteinander verglichen.

Lovastatin wurde durch menschliche Leber- und Dünndarmmikrosomen zu 6'-Hydroxy-Lovastatin und 6'-Exomethylen-Lovastatin metabolisiert. Dabei konnte mit K_m -Werten um 10 $\mu\text{mol/l}$ eine hohe Affinität zu den CYP 3A-Enzymen nachgewiesen werden (6'-Hydroxy-Lovastatin: menschliche Leber mit $7,8 \pm 2,7 \mu\text{mol/l}$ und menschlicher Dünndarm mit $12,6 \pm 4,6 \mu\text{mol/l}$; 6'-Exomethylen-Lovastatin: menschliche Leber mit $10,3 \pm 2,6 \mu\text{mol/l}$ und menschlicher Dünndarm mit $20,0 \pm 6,6 \mu\text{mol/l}$).

In Reaktionsansätzen mit menschlichen Lebermikrosomen konnte die Bildung der beiden Metabolite effektiv durch andere CYP 3A-Substrate/-Inhibitoren gehemmt werden. Für die 6'-Hydroxy-Lovastatinbildung wurden folgende K_i -Werte ermittelt: für die Hemmung durch Ciclosporin $7,6 \pm 2,3 \mu\text{mol/l}$, für die Hemmung durch Ketoconazol $0,3 \pm 0,1 \mu\text{mol/l}$ und für die Hemmung durch Troleandomycin $26,6 \pm 18,5 \mu\text{mol/l}$. Die Hemmkonstanten für die Interaktion bei der 6'-Exomethylen-Lovastatinbildung und in Reaktionsansätzen mit Dünndarm-mikrosomen des Schweins waren ähnlich wie bei 6'-Hydroxy-Lovastatin.

Auch Pravastatin wurde durch CYP 3A-Enzyme metabolisiert. Die Bildung der Metabolite 3'- α ,5'- β ,6'-Trihydroxy-Pravastatin und Hydroxy-Pravastatin wurde durch monoklonale Antikörper gegen menschliches CYP 3A4/5 und durch die spezifischen CYP 3A-Substrate oder -Inhibitoren Ketoconazol, Troleandomycin, Ciclosporin und Nifedipin signifikant gehemmt. Jedoch konnten nur Nifedipin und Ketoconazol die Metabolisierung zu 3'- α ,5'- β ,6'-Trihydroxy-Pravastatin hemmen.

Für die Metabolisierung von Pravastatin durch menschliche Mikrosomen konnte eine geringe Affinität zwischen Substrat und CYP 3A-Enzymen nachgewiesen werden: (3'- α ,5'- β ,6'-Trihydroxy-Pravastatin: menschliche Leber mit $4887 \pm 2185 \mu\text{mol/l}$ und menschlicher Dünndarm mit $2387 \pm 1004 \mu\text{mol/l}$; Hydroxy-Pravastatin: menschliche Leber mit $20987 \pm 9389 \mu\text{mol/l}$ und menschlicher Dünndarm mit $2968 \pm 1494 \mu\text{mol/l}$).

Die K_m -Werte für die Bildung des jeweiligen Hauptmetaboliten von Lovastatin und Pravastatin verglichen, ergeben für Pravastatin eine 200-600fach geringere Affinität zum Enzym. Aus diesem Grund scheint die Inhibition des CYP 3A-abhängigen Metabolismus von Pravastatin

keinen Einfluß auf die Pharmakokinetik auszuüben. Weitere Untersuchungen müssen klären, ob die nachgewiesenen Pharmaka-Interaktionen durch die Beeinflussung von Transportprozessen *in vivo* zu erklären sind.

Stichwörter: Lovastatin, Pravastatin, Pharmakainteraktionen, CYP 3A

Summery

In an *in vitro* study, the CYP3A-dependent metabolism and drug interactions of the HMG-CoA reductase inhibitors lovastatin and pravastatin were compared with each other.

Lovastatin was metabolized by human liver and human small intestinal microsomes to two major metabolites: 6'β-hydroxy (K_m liver microsomes: $7.8 \pm 2.7 \mu\text{mol/l}$; K_m small intestinal microsomes: $12.6 \pm 4.6 \mu\text{mol/l}$) and 6'-exomethylene lovastatin (K_m liver microsomes: $10.3 \pm 2.6 \mu\text{mol/l}$; K_m small intestinal microsomes: $20.0 \pm 6.6 \mu\text{mol/l}$). 6'β-hydroxy lovastatin formation in the liver was inhibited by the specific CYP3A inhibitors/substrates cyclosporine (K_i : $7.6 \pm 2.3 \mu\text{mol/l}$), ketoconazole (K_i : $0.3 \pm 0.1 \mu\text{mol/l}$) and troleandomycin (K_i : $26.6 \pm 18.5 \mu\text{mol/l}$). The inhibition constants (K_i) for the interactions with 6'-exomethylene formation by human liver and pig small intestinal microsomes were similar to those for 6'β hydroxy lovastatin.

Incubation of pravastatin with human liver and human small intestinal microsomes resulted in generation of 3'α, 5'β, 6'β-trihydroxy pravastatin (K_m liver microsomes: $4887 \pm 2185 \mu\text{mol/l}$; K_m small intestine microsomes: $2387 \pm 1004 \mu\text{mol/l}$) and hydroxy pravastatin (K_m liver microsomes: $20987 \pm 9389 \mu\text{mol/l}$; K_m small intestine microsomes: $2968 \pm 1494 \mu\text{mol/l}$). The specific CYP3A inhibitors/substrates cyclosporine, ketoconazole, nifedipine and troleandomycin and monoclonal antibodies against human CYP 3A4/5 significantly inhibited hydroxy lovastatin and 3'α, 5'β, 6'β-trihydroxy pravastatin formation by human liver microsomes, but cyclosporine and troleandomycin were not inhibitors of 3'α, 5'β, 6'β-trihydroxy pravastatin.

It was concluded that in addition to the liver, the small intestine is a major site of lovastatin drug metabolism and drug interactions with CYP3A inhibitors. Compared with lovastatin, the Michaelis-Menten constants of pravastatin were 200-600 times higher. In contrast to lovastatin, the results of the present study indicate that pravastatin is a low-affinity CYP substrate, and that CYP3A-dependent metabolism is only a minor pravastatin metabolic

pathway. Therefore, inhibition of the CYP3A-dependent metabolism of pravastatin should not significantly impact its clinical pharmacokinetics.

Keywords: lovastatin, pravastatin, drug interactions, CYP 3A

Kapitel VI - Literaturverzeichnis

Alejandro DS, Petersen J. Myoglobinuric acute renal failure in a cardiac transplant patient taking lovastatin and cyclosporine. *J Am Soc Nephrol* 5: 153-160, 1994.

Baldwin SJ, Bloomer JC, Smith, GJ, Ayrton AD, Clarke SE, Chenery RJ. Ketoconazole and sulphaphenazole as the respective selective inhibitors of P4503A and 2C9. *Xenobiotika* 25:261-270, 1995.

Benet LZ, Wu C-Y, Hebert MF, Wachter VJ. Intestinal drug metabolism and antitransport processes: A potential paradigm shift in oral drug delivery. *J Controlled Release* 39: 139-143, 1996.

Bisswanger H. Enzymkinetik: Theorie und Methoden. Verlag für Chemie, Weinheim, 2. Auflage, 1994.

Bradford RH, Shear CL, Chremos AN. Clinical evaluation of lovastatin (EXCEL) study results. *Arch Intern Med* 151: 43-49, 1991.

Castelli WP, Garrison RJ, Wilson PWF, Abbott RD, Kalousdian S, Kannel WB. Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels: the Framingham Study. *JAMA* 256: 2835-2838, 1986.

Chang T, Gonzalez FJ, Waxman DJ. Evaluation of triacetyloleandomycin, α -naphthoflavone and diethylthiocarbamate as selective chemical probes for inhibition of human cytochrome P450. *Arch Biochem Biophys* 311: 437-442, 1994.

Christians U, Zimmer KO, Wonigeit K, Maurer G, Sewing K-F. Liquid-chromatographic measurement of cyclosporin A and its metabolites in blood, bile and urine. *Clin Chem* 34: 34-39, 1988.

Christians U, Jacobsen W, Floren LC. Metabolism and drug interactions of HMG-CoA reductase inhibitors in transplant patients: Are the statins mechanistically similar? *Pharmac Ther*: in Druck, 1998.

Desager J-P, Horsmans Y. Clinical pharmacokinetics of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase inhibitors. *Clin Pharmacokinet* 31: 348-371, 1996.

East C, Alivizatos PA, Grundy SM, Jones PH, Farmer JA. Rhabdomyolysis in patients receiving lovastatin. *N Engl J Med* 318: 47-48, 1988.

Eisenthal D, Danson W. Enzyme assays. The Practical Approach Series. IRL Press, Oxford, 1990.

Estabrook R.W., Werringloer J: The measurement of difference spectra: Application to the cytochromes of microsomes. *Meth Enzymol* 52: 212-220, 1978.

Everett DW, Chando TJ, Didonato GC, Singhvi SM, Pan HY, Weinstein SH. Biotransformation of pravastatin sodium in humans. *Drug Metab Dispos* 19: 740-748, 1991.

Forth W [Hrsg.]. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. BI Wissenschaftsverlag, Mannheim, 6. Auflage, 1992.

Gascon M-P, Dayer P. In vitro forecasting of drugs which may interfere with the biotransformation of midazolam. *Eur J Clin Pharmacol* 41: 573-578.

Gomez DY, Wacher VJ, Tomlanovich SJ, Herbert MF, Benet LZ. The effect of ketoconazole on the intestinal metabolism and bioavailability of cyclosporine. *Clin Pharmacol Ther* 58: 15-19, 1995.

Greenspan MD, Yudkovitz JB, Alberts AW, Argenbright LS, Arison BH, Smith JL. Metabolism of lovastatin by rat and human liver microsomes in vitro. *Drug Metab Dispos* 16: 768-82, 1988.

Guengerich FP. Microsomal enzymes involved in toxicology- analysis and separation; in Hayes AW (ed): *Principles and Methods of Toxicology*. New York, Raven Press, 609-637, 1982.

Guengerich FP. Characterization of human P-450 enzymes. *FASEB J* 6, 745-748, 1992.

Guengerich FP. Human cytochrome P450 enzymes. In: *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*. Ortiz de Montellano PR (ed.), Plenum Press, New York, 2nd edition, 1995: 473-535.

Gupta SK, Bakran A, Johnson RWG, Rowland M. Cyclosporin-erythromycin interaction in renal transplant patients. *Br J Clin Pharmacol* 27: 475-481, 1989.

Gupta SK, Kim J, Gollapudi S. Reversal of daunorubicin resistance in P388/ADR cells by iraconazole. *J Clin Invest* 87: 1467-1469, 1991.

Halpin RA, Ulm EH, Till AE, Kari PH, Vyas KP, Hunninghake DB, Duggan DE. Biotransformation of lovastatin. V. Species differences in in vivo metabolite profiles of mouse, rat, dog, and human. *Drug Metab Dispos* 21: 1003-1011, 1993.

Haria M, McTavish D. Pravastatin. A reappraisal of its pharmacological properties and clinical effectiveness in the management of coronary heart disease. *Drugs* 53: 299-336, 1997

Henwood JM, Heel RC: Lovastatin. A preliminary review of its pharmacodynamic properties and therapeutic use in hyperlipidaemia. *Drugs* 36: 429-454, 1988

Hsu I, Spinler SA, Johnson NE. Comparative evaluation of the safety and efficacy of HMG-CoA reductase inhibitor monotherapy in the treatment of primary hypercholesterolemia. *Ann Pharmacother* 29: 743-759, 1995.

Hummelsiep S. Hepatozelluläre Aufnahme des HMG-CoA-Reduktase-Inhibitors Pravastatin. Dissertation. Gießen, 1995.

Kitazawa E, Tamura N, Iwabuchi H, Uchiyama M, Muramatsu S, Tkahagi H, Tanaka M. Biotransformation of pravastatin sodium (I). Mechanisms of enzymic transformation of epimerization of an allylic hydroxy group of pravastatin sodium. *Biochem Biophys Res Commun* 192: 597-602, 1993.

Kolars JC, Lown KS, Schmiedlin-Ren P, Ghosh M, Fang C, Wrighton SA, Merion RM, Watkins PB. CYP3A gene expression in the human gut epithelium. *Pharmacogenetics* 4: 247-259, 1994.

Kronbach T, Fischer V, Meyer UA. Cyclosporine metabolism in human liver: identification of a cytochrome P-450III gene family as the major cyclosporine-metabolizing enzyme explains interactions of cyclosporine with other drugs. *Clin Pharmacol Ther* 43: 630-635, 1988.

Lampen A. Das Cytochrom P450-System als Komponente der transepithelialen Barriere des Gasrointestinaltraktes - Sein Einfluß auf die Resorption und Bioverfügbarkeit der Immunsuppressiva Tacrolimus und Rapamycin. Dissertation, Hannover, 1996.

Lampen A, Christians U, Bader A, Hackbarth I, Sewing KF. Drug interactions and interindividual variability of ciclosporin metabolism in the small intestine. *Pharmacology* 52: 159-168, 1996.

Lampen A, Christians U, Guengerich FP, Watkins P, Kolars JC, Bader A, Dralle H, Hackbarth I, Sewing KF. Metabolism of the immunosuppressant tacrolimus in the small intestine: cytochrome P450, drug interactions and interindividual variability. *Drug Metab Dispos* 23: 1315-1324, 1995.

Lees RS, Lees AM. Rhabdomyolysis from the coadministration of lovastatin and the antifungal agent itraconazole. *New Engl J Med* 333: 664-665, 1995.

Lennernäs H, Fager G. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the HMG-CoA reductase inhibitors: similarities and differences. *Clin Pharmacokinet* 32:403-425, 1997.

Ludwig KJG. Lovastatin, Simvastatin und Fenofibrat: Laborchemische Wirkungen und Nebenwirkungen im Langzeitversuch. Dissertation, Bonn, 1993.

Meier C, Stey C, Brack T, Maggiorini M, Risti B, Krähenbühl S. Rhabdomyolyse bei mit Simvastatin und Ciclosporin behandelten Patienten: Rolle der Aktivität des Cytochrom-P450-Enzymsystems der Leber. *Schweiz Med Wochenschr* 125: 1342-1346, 1995.

Muramatsu S, Miyaguchi K, Iwabuchi H, Matsushita Y, Nakamura T, Kinoshita T, Tanaka M, Takahagi H. Metabolism of pravastatin sodium in isolated rat hepatocytes. I. Glutathione conjugate formation reaction. *Xenobiotica* 22: 487-498, 1992.

Nelson DR, Kamataki T, Waxman DJ, Guengerich P, Estabrook RW, Feyereisen R, Gonzales FJ, Coon MJ, Gunsalus IC, Gotoh O, Okuda K, Nebert DW. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA and Cell Biology* 12: 1-51, 1993.

Neuvonen PJ, Jalava MD. Itraconazole drastically increases plasma concentrations of lovastatin and lovastatin acid. *Clin Pharmacol Ther* 60: 54-61, 1996.

Neuvonen PJ, Kantola T, Krivistö KT. Effekt of itraconazole on serum concentrations of simvastatin and pravastatin. XIth International Symposium on Atherosclerosis, Paris, Frankreich, 5.-9.Oktober, 1997.

Norman DJ, Illingworth DR, Muson J, Hosenpud J. Myololysis and acute renal failure in a heart transplant patient receiving lovastatin. *N Engl J Med* 318: 46-47, 1988.

Olbricht C, Wanner C, Eisenhauer T, Kliem V, Doll R, Boddaert M, O'Grady P, Krekler M, Mangold B, Christians U. Accumulation of lovastatin, but not pravastatin, in the blood of cyclosporine-treated kidney graft patients after multiple doses. *Clin Pharmacol Ther* 62: (in Druck), 1997.

Olkola PT, Backman JT, Neuvonen PJ. Midazolam should be avoided in patients receiving systemic antimycotics ketoconazole and itraconazole. *Clin Pharmac Ther* 55: 481-485, 1994.

Omura T, Sato R: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem* 1964: 239; 2370-2378.

Pacifici GM, Fracchia GN. Advances in drug metabolism in man. Office for Official Publications of the European Communities, Brüssel, 1995.

Pan HY, Funke PT, Willard DA, McKinsty DN. Pharmacokinetics, pharmacodynamics and safety of pravastatin sodium, a potent inhibitor of HMG-CoA reductase, in healthy volunteers, in *New Advances in the Control of Lipid Metabolism: Focus on Pravastatin*, edited by LaRosa C, London, Royal Society of Medicine Services Ltd., 9-21, 1989.

Pan HY. HMG-CoA reductase inhibitors: clinical pharmacology. In: *Treatment of severe hypercholesterolemia in prevention of coronary heart disease*. Gotto AM, Mancini M, Richter WO (eds.) Proceedings 2nd International Symposium, June, Munich 1989. Karger, Basle: 66-70, 1989.

Porteous JW, Furneaux HM, Pearson FK, Lake CM, Morison A: Poly adenosine diphosphate ribose synthetase activity in nuclei of dividing but differentiating intestinal epithelial cells. *Biochem J* 180: 455-463, 1979.

Pinkus LM: Separation and use of enterocytes; in Jakoby WB (ed): *Methods in Enzymology*. New York, Academic Press, pp. 154-162, 1981.

Quion JAV, Jones PH. Clinical pharmacokinetics of pravastatin. *Clin Pharmacokinet* 27: 94-103, 1994.

Roninson IB [Hrsg.]. *Molecular and cellular biology of multidrug resistance in tumor cells*. Plenum Press, New York, 1991.

Serajuddin ATM, Ranadive SA, Mahoney EM. Relative lipophilicities, solubilities, and structure-pharmacological considerations of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors pravastatin, lovastatin, mevastatin, and simvastatin. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 80: 830-834, 1991.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC: Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150: 76-85, 1985.

Soucek P, Gut I. Cytochromes P-450 in rats: structures, functions, properties and relevant human forms. *Xenobiotica* 22: 83-103, 1992.

Spach DH, Bauwens JE, Clark CD, Burke WG. Rhabdomyolysis associated with lovastatin and erythromycin use. *West J Med* 154: 213-215, 1991.

Tobert JA. Rhabdomyolysis in patients receiving lovastatin after cardiac transplantation. *N Engl J Med* 318: 48, 1988.

Tobert JA, Shear CL, Chremos AN, Mantell GE. Clinical experience with lovastatin. *Am J Cardiol* 65: 23F-26F, 1990.

Transon C, Leemann T, Dayer P. In vitro comparative inhibition profiles of major human drug metabolising P450 isozymes (CYP2C9, CYP2D6, and CYP3A4) by HMG-CoA reductase inhibitors. *Eur J Clin Pharmacol* 50: 209-215, 1996.

Triscari J, O'Donnell D, Zinny M, Pan HY. Gastrointestinal absorption of pravastatin in healthy subjects. *J Clin Pharmacol* 35: 142-144, 1995.

Velosa JA, LaBelle P, Ronca PD, Stubbs RJ, Carreiro LH. Pharmacokinetics of lovastatin in renal transplant patients on azathioprine or cyclosporine. *Clin Nephrol* 37: 325, 1992.

Vyas KP, Kari PH, Pitzemberger SM, Halpin RA, Ramjit HG, Arison B. Biotransformation of lovastatin. I. Structure elucidation of in vitro and in vivo metabolites in rat and mouse. *Drug Metab Dispos* 18: 203-11, 1990 a.

Vyas KP, Kari PH, Prakash SR, Duggan SR. Biotransformation of lovastatin. II. In vitro metabolism by rat and mouse liver microsomes and involvement of cytochrome P-450 in dehydrogenation. *Drug Metab Dispos* 18: 218-22, 1990 b.

Vyas KP, Kari PH, Wang RW, Lu AYH. Biotransformation of lovastatin- III. Effect of cimetidine and famotidine on in vitro metabolism by rat and human liver microsomes. *Biochem Pharmacol* 39: 67-73, 1990 c.

Wacher VJ, Wu CY, Benet LZ. Overlapping substrate specificities and tissue distribution of cytochrome P450 3A and p-glycoprotein: Implications for drug delivery and activity in cancer chemotherapy. *Mol Carcinogen* 13: 129-134, 1995.

Wang RW, Kari PH, Lu AYH, Thomas PE, Guengerich FP, Vyas KP. Biotransformation of lovastatin. IV. Identification of cytochrome P450 3A proteins as the major enzymes responsible for oxidative metabolism of lovastatin in rat and human liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* 290: 355-361, 1991.

Watkins PB, Wrighton SA, Maurel P, Schuetz EG, Mendez-Picon G, Parker GA, Guzelian PS. Identification of an inducible form of cytochrome P-450 in human liver. *Proc natn Acad Sci USA* 82: 6310-6314, 1985.

Watkins PB, Wrighton PB, Schuetz EG, Molowa DT, Guzelian PS. Identification of glucocorticoid-inducible cytochrome P-450 in the intestinal mucosa of rats and man. *J Clin Invest* 80: 1029-1036, 1987.

Weiser MM. Intestinal epithelial cell surface membrane glycoprotein synthesis. *J Biol Chem* 248: 2536-2541, 1973.

Wu C-Y, Benet LZ, Hebert MF, Gupta SK, Rowland M, Gomez DY, Wacher VJ. Differences of absorption and first-pass gut and hepatic metabolism in humans: Studies with Cyclosporine. *Clin Pharmac Ther* 58: 492-497, 1995.

Ziegler K, Hummelsiep S. Hepatoselective carrier-mediated sodium-independent uptake of pravastatin and pravastatin-lactone. *Biochimica et Biophysica Acta* 1153: 23-33, 1993.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Wolfgang Jacobsen
am 30.01.1967 in Reinbek geboren
ledig

Schulbildung

1973-1983	Grund- und Realschule
1983-1986	Sozialwirtschaftliches Fachgymnasium in Eutin
	Allgemeine Hochschulreife: Juni 1986

Zivildienst

10/1986-4/1988	Altenpflegehelfer in einem Seniorenheim in Timmendorfer Strand
----------------	---

Hochschulausbildung

10/1988-4/1995	Biologiestudium an der TU Braunschweig Studienschwerpunkte: Biochemie (Hauptfach), Ökologische Chemie und Genetik
	Diplomarbeit am Institut für Biochemie und Biotechnologie zum Thema „Untersuchung zum D-Serin- Metabolismus ausgewählter Mikroorganismen“ unter Betreuung von Prof. Dr. F. Wagner

Promotion

9/1995-1/1998	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Allgemeine Pharmakologie der Medizinischen Hochschule Hannover, Direktor: Prof. Dr. med. K.-Fr. Sewing Promotion zum Thema: „ Pharmaka-Interaktionen der HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren Lovastatin und Pravastatin - Hemmung des Metabolismus <i>in vitro</i> in der Leber und im Darm “
---------------	--