

**Der *in vitro* Metabolismus von Immunsuppressiva, insbesondere
Rapamycin – Charakterisierung und Identifizierung der Metabolite**

Von dem Fachbereich Chemie der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von
Dipl.-Chem. Katrin Hallensleben
geboren am 23.12.1969 in Sangerhausen

1999

Referent: Prof. Dr. G. G. Habermehl

Korreferent: Prof. Dr. H. C. Krebs

Tag der Promotion: 22. Juli 1999

Abstract

Rapamycin sowie SDZ RAD gehören zu einer vielversprechenden Gruppe der Makrolid-Immunsuppressiva. Der Metabolismus und damit die Strukturen der gebildeten Metabolite sind noch nicht vollständig aufgeklärt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Isolierung, Charakterisierung und Identifizierung neuer Metabolite dieser zwei Immunsuppressiva. Um die Metabolite zu generieren wurde Rapamycin und SDZ RAD mit humanen Lebermikrosomen inkubiert. Die erhaltenen Metabolite wurden mittels HPLC getrennt und isoliert. Die Identifizierung wurde mittels Nano-Tandem-ESI-Massenspektrometrie sowie zwei-dimensionaler NMR-Spektroskopie durchgeführt.

Drei der Rapamycin-Metabolite konnten identifiziert und für einen weiteren Metaboliten die Position der Biotransformation eingegrenzt werden. Für SDZ RAD wurden die Strukturen von zwei Metaboliten zugeordnet.

Schlagworte

Rapamycin, SDZ RAD, Elektrospray Massenspektrometrie, Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Abstract

Rapamycin as well as SDZ RAD belong to a group of promising macrolide immunosuppressiva. The metabolism and the structure of the metabolites are not yet completely determined.

Aim of the presented work was the isolation, characterisation and identification of new metabolites of these immunosuppressiva. For generating metabolites rapamycin and SDZ RAD were incubated with human liver microsomes. The obtained metabolites were separated and isolated using HPLC. Identification was carried out using nano tandem ESI mass spectrometry as well as two-dimensional NMR spectroscopy.

Three of the rapamycin metabolites could be identified and a further metabolite could be characterized regarding the position of the biotransformation. For SDZ RAD the structures of two metabolites could be assigned.

Keywords

Rapamycin, SDZ RAD, electrospray mass spectrometry, nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR)

Für Michael und Charlyn

Die wichtigste Motivation der Menschen,
die in die Wissenschaft gehen, war
ursprünglich und ist wohl auch heute,
die Suche nach der Wahrheit.

Carl Friedrich von Weizsäcker, Einheit

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des Graduiertenkollegs „Chemische und technische Naturstofftransformation“ unter Beteiligung der Medizinischen Hochschule Hannover, dem Niedersächsischen Institut für Peptidforschung, der Universität Hannover und der Tierärztlichen Hochschule Hannover angefertigt.

Für die Überlassung des Themas möchte ich Herrn Prof. Dr. Sewing und Herrn Dr. habil. U. Christians aus dem Institut für Allgemeine Pharmakologie der Medizinischen Hochschule Hannover danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. G. Habermehl für die Betreuung der Arbeit sowie für die Unterstützung bei der Durchführung des Forschungsaufenthaltes in Japan.

Herrn Prof. Dr. H. Krebs möchte ich für die interessanten Gespräche und Durchsicht dieser Arbeit danken.

Herrn Dr. Manfred Raida danke ich für die Unterstützung bei den massenspektrometrischen Untersuchungen im Niedersächsischen Institut für Peptidforschung.

Für die gute Zusammenarbeit und das freundliche Arbeitsklima möchte ich mich bei Herrn Dr. Wolfgang Jacobsen bedanken. Weiterhin möchte ich Herrn Dr. Jacobsen für die zur Verfügung gestellten Mikrosomen danken.

Meinem Mann und meiner Tochter möchte ich ganz herzlich für ihre Geduld und ihr liebevolle Unterstützung danken.

Der DAAD unterstützte diese Arbeit durch ein zweimonatiges Forschungsstipendium, welches mir NMR-Experimente an der Tohoku Universität Sendai / Japan ermöglichte.

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	1
II.	Zielsetzung	8
III.	Material und Methoden	9
1.	Lösungsmittel und Reagenzien	9
2.	Isolierung von Lebermikrosomen	10
2.1.	Proteinbestimmung der Mikrosomen	11
3.	Mikrosomen-Inkubation der Makrolid-Immunsuppressiva	12
3.1.	Metabolisierung von Rapamycin	12
3.2.	Metabolisierung von SDZ RAD	13
3.3.	Präparative Inkubation von Rapamycin	14
4.	Isomerisierung von Rapamycin	14
5.	Biotransformation des Rapamycin-Isomers	15
5.1.	Metabolisierung des Rapamycin-Isomers	15
5.2.	Inkubation des Rapamycin-Isomers mit Lebercytosol	15
6.	Extraktion	16
6.1.	Flüssig-Flüssig-Extraktion von Inkubationsansätzen	16
6.2.	Flüssig-Flüssig-Extraktion von Human Blut	17
6.3.	Automatisierte Fest-Phasen-Extraktion (online SPE)	17
7.	HPLC-Analytik der Makrolid-Immunsuppressiva	19
7.1.	HPLC-Methode zur Untersuchung der Stabilität von Rapamycin in Lösungsmitteln	19
7.2.	HPLC-Methode von Rapamycin und seinen Metaboliten	20
7.3.	HPLC-Methode von SDZ RAD und seinen Metaboliten	22
8.	Massenspektrometrie der Makrolid-Immunsuppressiva	23
8.1.	LC-ESI-MS-Analytik der Makrolid-Immunsuppressiva	23
8.1.1.	Stabilitätsuntersuchungen an Rapamycin	24
8.1.2.	LC-MS-Analytik von Rapamycin und seinen Metaboliten	25
8.1.3.	LC-MS-Analytik von SDZ RAD und seinen Metaboliten	26

8.1.4. LC-MS-Analytik von Rapamycin und seinen Metaboliten in Blutproben	27
8.2. Elektrospray-Tandem-Massenspektrometrie der Makrolid-Immunsuppressiva	27
8.2.1. ESI-MS/MS Experimente zur Strukturaufklärung von Rapamycin Metaboliten	29
8.2.2. ESI-MS/MS Experimente zur Strukturaufklärung von SDZ RAD Metaboliten	30
9. NMR-Experimente von Rapamycin und seinen Metaboliten	30
IV. Ergebnisse	32
1. Metabolisierungsuntersuchungen	32
1.1. Metabolisierung von Rapamycin	32
1.1.1 Metabolisierung von Rapamycin mit gepoolten menschlichen Lebermikrosomen	32
1.1.2. Metabolisierung von Rapamycin mit Leber- und Dünndarmmikrosomen des Menschen und des Schweins	34
1.2. Metabolisierung von SDZ RAD	36
1.3. Präparative Inkubation von Rapamycin mit humanen Lebermikrosomen	36
1.4. Isomerisierung von Rapamycin	37
1.5. Metabolisierung des Rapamycin-Isomeren	37
2. Extraktionen der Immunsuppressiva aus Inkubationsansätzen und Blutproben	40
2.1. Flüssig-Flüssig-Extraktion	40
2.2. Automatisierte Fest-Phasen-Extraktion (on-line SPE)	41
3. HPLC-Analytik der Makrolid-Immunsuppressiva	41
3.1. Stabilitätsuntersuchungen an Rapamycin	42
3.2. HPLC-Analytik von Rapamycin	44
3.3. HPLC-Analytik zur Isolierung von Rapamycin-Metaboliten	49
3.4. HPLC-Analytik von SDZ RAD	51
4. Massenspektrometrische Analytik der Makrolid-Immunsuppressiva	52
4.1. LC-ESI-MS-Analytik	52
4.1.1. Stabilitätsuntersuchungen an Rapamycin in Blut	52
4.1.2. LC-ESI-MS-Analytik von Rapamycin und seinen Metaboliten	53

4.1.3.LC-ESI-MS-Analytik von Rapamycin und seinen Metaboliten in Blutproben	55
4.1.4.LC-ESI-MS-Analytik von SDZ RAD seinen Metaboliten	56
4.2. ESI-MS-MS-Analytik	59
4.2.1.ESI-MS-MS-Analytik von Rapamycin und seinen Metaboliten	60
4.2.1.1. Strukturaufklärung des Rapamycin-Metaboliten RM	60
4.2.1.2. Strukturaufklärung des Demethyl-Rapamycin- Metaboliten	64
4.2.1.3. Strukturaufklärung der Monohydroxy-Rapamycin- Metabolite	65
4.2.2.ESI-MS-MS-Analytik von SDZ RAD und seinen Metaboliten	70
5. Kernresonanzspektrometrie (NMR-Spektroskopie)	74
5.1. NMR-Experimente von Rapamycin	74
5.2. NMR-Experimente des Rapamycin-Isomeren	78
5.3. NMR-Experimente des Rapamycin-Metaboliten RM	82
5.4. NMR-Experimente des 39-O-Demethyl-Rapamycin	86
V. Diskussion	88
1. Metabolisierungsuntersuchungen	88
2. Extraktion der Immunsuppressiva aus Inkubationsansätzen und Blutproben	92
3. HPLC-Analytik der Makrolid-Immunsuppressiva	93
4. Massenspektrometrische Analytik der Makrolid-Immunsuppressiva	95
5. NMR-Spektroskopie	102
VI. Zusammenfassung	104
VII. Literaturverzeichnis	106

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
API	atmospheric pressure ionization
BSA	Rinderserumalbumin
t-BME	tertiär Butyl-Methyl-Ether
°C	Grad Celsius
CID	collision induced dissociation
COSY	correlation spectroscopy
CYP	Cytochrom P-450
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
EM	electron multiplier
ESI	electrospray ionization
g	Gramm
$x g$	Vielfaches der Erdbeschleunigung
h	Stunde
HED	high energy dynode
HMBC	heteronuclear multiple bond connectivity
HSQC	heteronuclear single quantum coherence
HPLC	high performance liquid chromatography
KCl	Kaliumchlorid
LC-MS	liquid chromatography –mass spectrometry
LLE	liquid liquid extraction
m/z	Masse/Ladung-Verhältnis
$[M+Na^+]^+$	Natrium-Addukt des Moleküls
$[M_f+Na^+]^+$	Natrium-Addukt des Fragmentions
mg	Milligramm
μ l	Mikroliter
min	Minuten
MS	Massenspektrometrie
MS-MS	Tandem-Massenspektrometrie

NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
nm	Nanometer
NMR	nuclear magnetic resonance
NOESY	Nuclear Overhauser and Exchange Spectroscopy
ppm	part per million
RM	Rapamycin Metabolit
Rp.	Rapamycin
SD	Standardabweichung
SIM	selected ion monitoring
SKIM	Skimmer
SM	SDZ RAD Metabolit
SPE	solid phase extraction
t	Zeit
t _R	Retentionszeit
T	Temperatur
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
UV	Ultraviolett
V _{cap}	Kapillaren-Eingangsspannung
V _{cyl}	Zylinder-Elektroden-Spannung
V _{end}	Endplatten-Spannung
v:v	Volumen pro Volumen

Kapitel I – Einleitung

Die Transplantation solider Organe stellt einen wesentlichen Bestandteil der modernen Medizin dar. Der Transplantationserfolg hängt dabei insbesondere von der Allotransplant-Reaktion ab (Calne *et al.* 1989, Morris *et al.* 1991). Zur Beherrschung dieser physiologischen Abwehrreaktion des Organismus werden immunsuppressive Substanzen verwendet. Der Einsatz bekannter Immunsuppressiva ist jedoch mit erheblichen Nebenwirkungen verbunden, die ihrerseits nicht selten für den Mißerfolg der Transplantation verantwortlich sind. Diese Nebenwirkungen können u.a. auf das Immunsuppressivum selbst als auch auf seine Metabolite zurückzuführen sein.

Der Metabolismus von Arzneistoffen findet grundsätzlich in zwei Schritten statt. In der ersten Phase werden die Moleküle oxidativ, reduktiv oder hydrolytisch verändert. Man spricht dann von der Bildung von Phase I Metaboliten, welche in der Regel hydrophiler als die Ausgangsverbindung sind. In der zweiten Phase können diese Metabolite mit körpereigenen Stoffen wie Essigsäure, Glukuronsäure etc. verknüpft werden. Die so entstandenen Phase II Metabolite (Ester, Glykoside) können nun ausgeschieden werden (Koch 1985).

Die gebildeten Metabolite können jedoch immunsuppressiv sowie toxisch wirksam sein und somit das Wirkspektrum des Arzneimittels beträchtlich beeinflussen. Eine genaue Kenntnis der Metabolite, ihrer Struktur sowie ihrer Eigenschaften sind deshalb von klinischer Relevanz.

Auf der Suche nach neuen immunsuppressiven Substanzen fand man eine dem Tacrolimus (FK 506) strukturverwandte Substanz, welche antifungizide, antibiotische und immunsuppressive Eigenschaften aufweist. Diese als Rapamycin (Sirolimus) bekannte Substanz wurde 1980 aus dem Pilz *Streptomyces hygroscopicus* isoliert (Findlay and Radics 1980). Die Analyse des neu entdeckten Rapamycins mittels NMR-Spektroskopie resultierte in der Annahme, daß es sich um ein Makrolid-Lacton mit der Summenformel $C_{56}H_{89}NO_{14}$ handelt (Sehgal *et al.* 1975). Erst nach einer Röntgenkristallstrukturanalyse von Rapamycin durch Swindells and Withe (1978) konnte die Struktur bestimmt werden. Diese Analyse zeigte, daß das 31-gliedrige Makrolid eine Summenformel $C_{51}H_{79}NO_{13}$ aufweist. Charakteristisch für diese Verbindung ist eine Triensystem sowie eine Amidbindung. Die Rotation um die N-CO-Bindung ist gehindert, was zur Bildung von zwei Konformationsisomeren (*cis-/trans*-Rapamycin) führt.

Ein ebenfalls neues Immunsuppressivum ist das Derivat des Rapamycins, SDZ RAD, (40-O-(2-hydroxyethyl) rapamycin) (Schuler *et al.* 1997, Schuurman *et al.* 1997). Hierbei handelt es sich um ein in der Bindungsdomäne verethertes Derivat von Rapamycin. Diese Modifizierung des SDZ RAD am C₄₀-Atom läßt ganz spezifische Unterschiede in der Region des Cyclohexan-Ringes erwarten. Andererseits läßt die weitgehende Analogie in den Strukturen von Rapamycin und SDZ RAD auf ähnliche physiko-chemische Eigenschaften schließen. In Abbildung I-1 sind die Strukturen der Makrolid-Immunsuppressiva dargestellt.

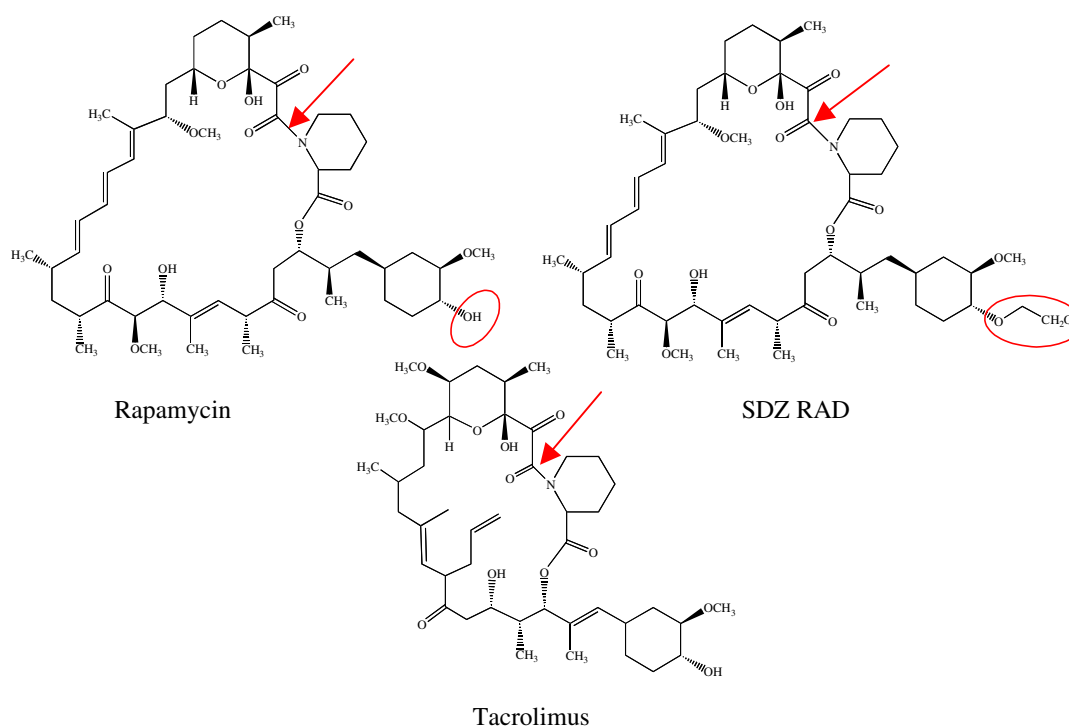


Abb. I-1 Strukturformeln der Immunsuppressiva Rapamycin, SDZ RAD und Tacrolimus. Die roten Pfeile markieren die Amidbindung, welche die Bildung der *cis*- und *trans*-Isomere bedingt.

Bei der Metabolisierung von Fremdstoffen kommt der Leber die entscheidende Bedeutung zu. In diesem Organ sind die für viele Biotransformationen wichtigen Cytochrom P450-Monooxygenasen lokalisiert. Aus diesem Grund werden für die Untersuchung des Fremdstoff-Metabolismus vorrangig Lebermikrosomen als *in vitro* Systeme eingesetzt.

In *in vitro* Versuchen konnte gezeigt werden, daß Rapamycin durch Enzyme der Cytochromsubfamilie P450 3A4 metabolisiert wird (Sattler *et al.* 1992, Christians *et al.* 1992). Die dabei nach der Biotransformation hauptsächlich auftretenden Metabolite sind demethyliert und / oder hydroxyliert (Streit *et al.* 1996). Da diese Transformationen an

verschiedenen Positionen des Moleküls stattfinden, kommt es zur Bildung von Konstitutionsisomeren. Diese weisen ähnliche chemische und physikalische Eigenschaften auf, was eine analytische Trennung der gebildeten Metabolite, z.B. mittels Chromatographie, erschwert.

Durch Kopplung der Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (LC, HPLC) mit der Massenspektrometrie (LC-MS) (Lehmann 1991) ist eine Möglichkeit geschaffen, um Informationen von chromatographisch nicht getrennten Substanzen zu erhalten. Ein inzwischen verbreitetes Analysenverfahren ist die Electrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS), die ebenfalls die Möglichkeit der Kopplung mit einer HPLC bietet. Dabei werden die zum Teil hochpolaren und hochmolekularen Verbindungen bei Atmosphärendruck aus der flüssigen Phase in gasförmige Ionen überführt. Die Anwendung dieser „weichen“ Ionisation erlaubt es, Molekülonen zu detektieren, welche ohne vorherige Fragmentierung aus den Analyten entstehen [Carr *et al.* 1991, Siuzdak 1994, Gelpi 1995]. Damit ist ein Zugang geschaffen, um auch thermolabile Biomoleküle untersuchen zu können. Ein LC-ESI-MS-Chromatogramm liefert somit nicht nur die Retentionszeit und Fläche der Peaks, sondern für jeden Peak zusätzlich ein Massenspektrum. Diese Aussagen lassen Rückschlüsse auf die Polarität, die Quantität und das Molekulargewicht der einzelnen Analyte zu.

Wang *et al.* (1995) isolierte mittels HPLC Rapamycin-Metabolite, welche aus Galle und Blutplasma von mit Rapamycin behandelten Ratten erhalten wurden (Wang *et al.* 1997). Die anschließenden massenspektrometrischen Untersuchungen zeigten monohydroxylierte und / oder demethylierte sowie dihydroxylierte Metabolite. Die Metabolisierungspositionen konnten jedoch nicht zugeordnet werden. Degradationsprodukte von Rapamycin, welche nach Inkubation mit Rattengalle bzw. Ammoniumacetat (pH 8) generiert wurden, konnten ebenfalls mit HPLC-MS identifiziert werden. Es handelt sich dabei um das Hydrat der Muttersubstanz, welches nach Esterhydrolyse entsteht, sowie das daraus entstehende ringgeöffnete Isomer (Wang *et al.* 1994).

Bei der Biotransformation von Rapamycin mit humanen Lebermikrosomen wurde ein Gemisch von sechs hydroxylierten und / oder demethylierten Metaboliten detektiert (Christians *et al.* 1992). Nach Trennung des Metabolitengemisches mittels HPLC gelang es dieser Arbeitsgruppe eine Fraktion ohne Kontamination durch andere Metabolite zu isolieren. Alle weiteren Fraktionen beinhalteten mindestens zwei, chromatographisch nicht zu trennende, Metabolite. Die Anwendung von ESI-MS/MS ermöglichte dennoch folgende Transformationsprodukte des Rapamycins bezüglich ihrer Struktur zu identifizieren: 39-O-

Demethyl-, 16-O-Demethyl- und 12-Hydroxyrapamycin sowie 34-Hydroxyrapamycin (Streit *et al.* 1996). In Abbildung I-2 sind die beschriebenen Biotransformationsprodukte von Rapamycin dargestellt. Das 34-Hydroxyrapamycin entspricht dabei dem von Wang *et al.* (1994) beschriebenen Hydrat der Ausgangssubstanz. Durch das Auffinden von weiteren, zu Metaboliten gehörenden Molekülmassen im ESI-MS-Spektrum wurde auf das Vorhandensein von mehrfach hydroxylierten Rapamycin-Metaboliten geschlossen. Angaben zu den einzelnen Metabolisierungspositionen sind jedoch nicht beschrieben worden.

Bei der Untersuchung der Struktur organischer Moleküle stellt die Tandem Massenspektrometrie eine gut geeignete Analysenmethode dar. Durch Aufnahme von Spektren nach Kollisions-induzierten Dissoziationen (collisional-induced dissociation, CID-Spektren) können die Beziehungen zwischen Vorläuferion (precursor ion) und Produktion untersucht werden. Durch Variation der für die Dissoziation notwendigen Stoßenergie können Spektren mit unterschiedlichen Fragmenten aufgenommen werden. Die einzelnen Fragmente lassen dann Rückschlüsse über die Bindungsstabilität als auch über die Bildungswahrscheinlichkeit zu. Aus den nach kontrollierter Fragmentierung erhaltenen Bruchstücke des Analyten können Aussagen über Metabolisierungsart und -positionen gemacht werden. Für diese zur Strukturaufklärung unerläßlichen Experimente werden Tandem-Massenspektrometer eingesetzt, welche aus vier Quadrupolen besteht (Kuksis and Myher 1995, Schupke *et al.* 1996). Durch Anwendung dieser Methode konnten die bereits erwähnten Rapamycin-Metabolite hinsichtlich ihrer Molekularmasse (ESI-MS) sowie ihrer Struktur (ESI-MS/MS) untersucht und identifiziert werden (Streit *et al.* 1996). Für weitere Metabolite konnten Vorschläge für die Metabolisierungsart gemacht werden. Bei den beschriebenen Metaboliten handelt es sich um monohydroxy-demethylierte-, mehrfach hydroxylierte- und demethylierte-Verbindungen (Wang *et al.* 1997, Streit *et al.* 1996). Diese Metabolite liegen ebenfalls als Konstitutionsisomere vor, was die bereits beschriebenen Probleme bei der Isolierung und Identifizierung erklärt. Die Aufklärung der Struktur und damit die Zuordnung der Metabolisierungspositionen dieser Verbindungen sind bisher nicht beschrieben.

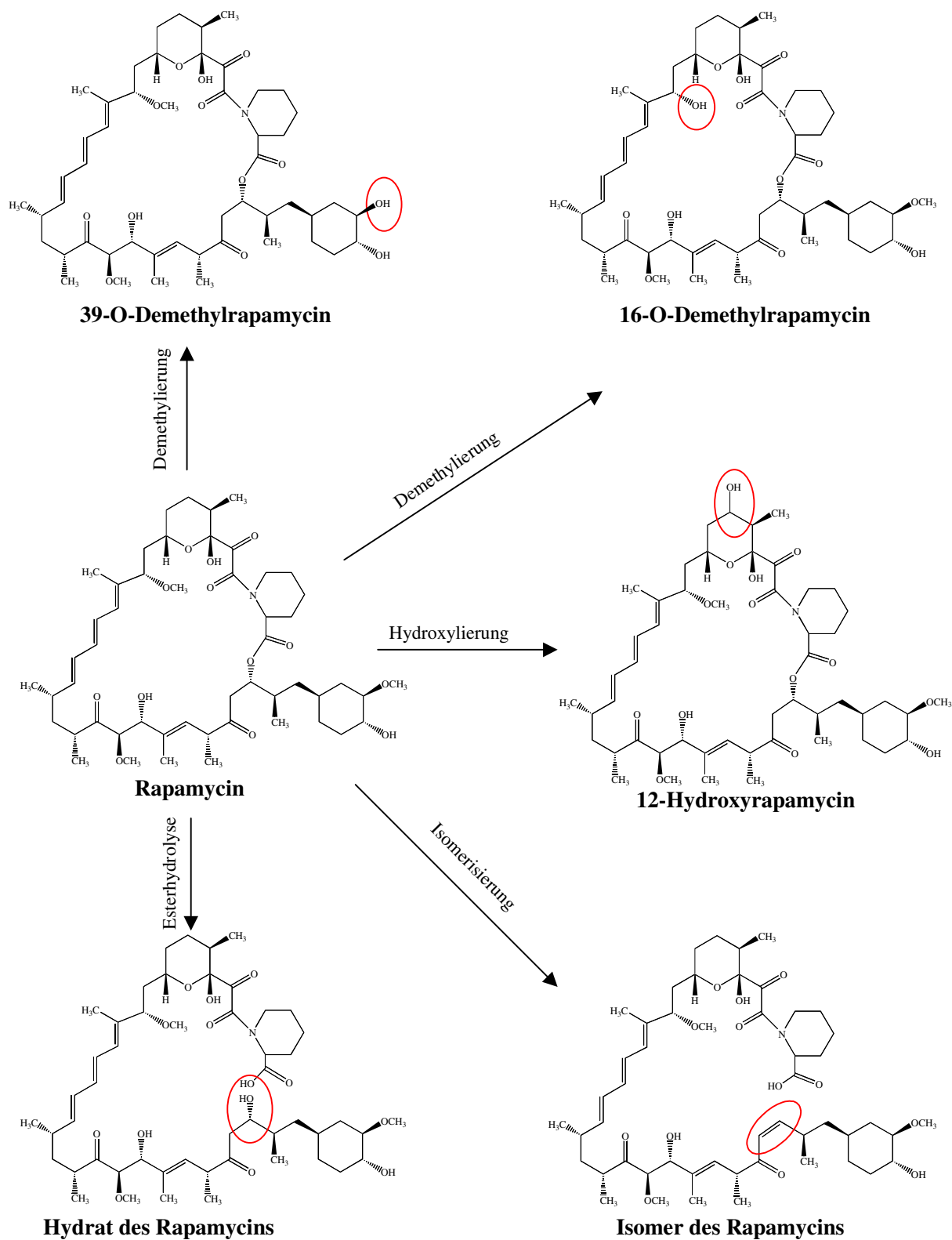


Abb. I-2 Biotransformationsprodukte des Rapamycins. Dargestellt sind die von Streit *et al.* (1996) und Wang *et al.* (1995) beschriebenen Metabolite und Degradationsprodukte von Rapamycin. Im folgenden Text wird mit Isomer immer die ringeöffnete Verbindung bezeichnet. Die beiden Rapamycin Rotamere, *cis* und *trans*, werden immer als *cis*- und *trans*-Rapamycin bezeichnet.

Um die Struktur von Konstitutionsisomeren eindeutig zuordnen zu können, stellt neben der Massenspektrometrie noch die NMR-Spektroskopie (nuclear magnetic resonance spectroscopy) eine geeignete Methode dar. Jedes Proton in der ^1H -NMR-Spektroskopie und jedes Kohlenstoffatom in der ^{13}C -NMR-Spektroskopie stellen kleine Sonden für das gesamte Molekül dar. Somit ist es nicht nur möglich Aussagen zur Konstitution, sondern auch zur Konformation von Molekülen zu machen. Nachteil dieser Methode ist die benötigte, im mg-Bereich liegende, Substanzmenge, die aus der geringen natürlichen Häufigkeit (1,1%) der magnetischen ^{13}C -Kerne resultiert. Erste NMR-spektrometrische Untersuchungen von Rapamycin wurden von Kessler *et al.* (1993) durchgeführt. In diesen Untersuchungen wurde gezeigt, daß Rapamycin in Chloroform als ein Gemisch von 80% trans- und 20% cis-Rapamycin vorliegt. Die Struktur des *trans*-Rotamers wurde dabei vollständig aufgeklärt. Das *trans*-Konformer entspricht der im Kristall vorliegenden Konformation (Swindells and Withe 1978).

Die Durchführung von NMR-Experimenten mit Rapamycin-Metaboliten wurde aufgrund ihrer Instabilität in der Literatur als nicht möglich beschrieben (Christians *et al.* 1992). Wang *et al.* (1994) gelang es jedoch mittels ^1H -NMR-Spektroskopie das Esterhydrolyseprodukt (34-Hydroxy-Rapamycin) und das daraus entstehende ring-geöffnete Isomer zu untersuchen. Die NMR-Daten dieser Experimente wurden nicht publiziert. Für die bereits erwähnten Rapamycin-Metabolite liegen Strukturvorschläge, die auf MS-MS-Experimenten beruhen, vor. Überprüfungen dieser Strukturen mittels NMR-Spektroskopie sind noch nicht beschrieben.

Die Nebenwirkungen des Rapamycins sowie dessen geringe Bioverfügbarkeit stellen in der klinischen Anwendung erhebliche Probleme dar (Pomer 1994). Aus diesem Grund werden beträchtliche Anstrengungen unternommen, um effizientere und nebenwirkungsarme Arzneimittel zu finden. Eine solche Verbesserung verspricht man sich von dem eingangs erwähnten Derivat des Rapamycins, dem SDZ RAD. Der Metabolismus dieser chemisch modifizierten Substanz ist noch kaum untersucht (Sedrani *et al.* 1998, Crowe *et al.* 1999).

Erste *in vitro* Inkubationen von SDZ RAD mit humanen Lebermikrosomen sind von Dannecker *et al.* (1998) beschrieben worden. Das erhaltene Metabolitengemisch wurde einer chromatographischen Trennung unterzogen, bei der Interferenzen der einzelnen Metabolite nicht umgangen werden konnten. Dieses auch beim Rapamycin auftretende Problem wurde durch Kopplung einer HPLC mit einem ESI-Massenspektrometer kompensiert. Durch

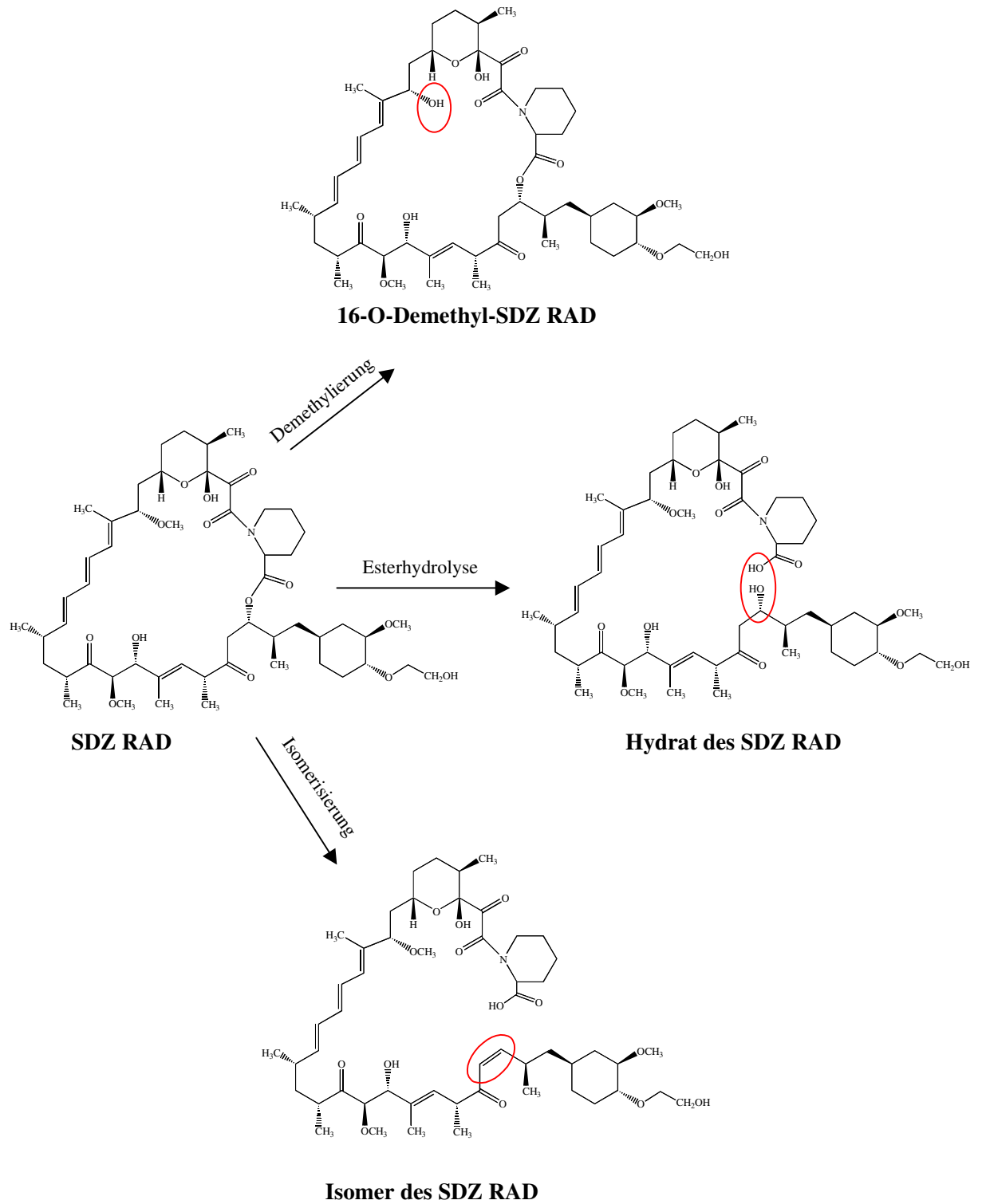


Abb. I-3 Biotransformationsprodukte des SDZ RAD. Dargestellt sind die von Vidal *et al.* (1998) beschriebenen Metabolite von SDZ RAD. Im folgenden Text wird mit Isomer immer die ringgeöffnete Verbindung bezeichnet. Die beiden SDZ RAD Rotamere, *cis* und *trans*, werden immer als *cis*- und *trans*- SDZ RAD bezeichnet.

Aufnahme von CID-Spektren konnten die Strukturen des 16-O-Demethyl-SDZ RAD, des Esterhydrolyseprodukt der Muttersubstanz und des ring-geöffneten Isomeren aufgeklärt werden (Vidal *et al.* 1998). Weitere Metabolite wurden aufgrund ihrer Molekularmasse als dihydroxyliert und hydroxyliert-demethyliert identifiziert. Diese Metabolite entsprechen in der Metabolisierungsart und –position denen des Rapamycins wie die Abbildung **I-3** verdeutlicht.

Kapitel II – Zielsetzung

Bei der Untersuchung des Metabolismus von Arzneistoffen sind die gebildeten Biotransformationsprodukte von besonderem Interesse. Die gebildeten Metabolite können sowohl pharmakologische als auch toxikologische Eigenschaften aufweisen. Dies wird sowohl bei Hauptmetaboliten als auch bei Metaboliten, welche in sehr geringem Maße generiert werden, beobachtet (Radeke *et al.* 1992). Die Untersuchung aller Metabolite ist deshalb von entscheidender Bedeutung, woraus sich die Ziele der vorliegenden Arbeit ergeben.

- Entwicklung einer Extraktionsmethode zur Isolierung von Rapamycin- und SDZ RAD-Metaboliten
- Entwicklung einer HPLC-Methode zur Trennung von Rapamycin- sowie SDZ RAD-Metaboliten
- Charakterisierung der Rapamycin- und SDZ RAD-Metabolite mit ESI-MS sowie anschließender Identifizierung der Metabolite mittels Tandem-Massenspektrometrie
- Durchführung von ein- bzw. zweidimensionalen NMR-Experimenten mit unbekanntem Transformationsprodukten von Rapamycin

Kapitel III - Material und Methoden

1. Lösungsmittel und Reagenzien

Acetonitril	Merck, Darmstadt
Acetonitril (D ₃)	Aldrich, Deisenhofen
Ameisensäure	Merck, Darmstadt
Bicinchoninsäure (BCA)	Sigma, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (D ₆)	Aldrich, Deisenhofen
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Biomol, Hamburg
EDTA (Ethylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz-Dihydrat)	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Riedel-de Haen, Seelze
Glycerol	Sigma, Deisenhofen
D,L-Isocitrat	Sigma, Deisenhofen
Isocitrat-Dehydrogenase	Sigma, Deisenhofen
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Baker, Deventer (NL)
Methanol	Baker, Deventer
NADP	Sigma, Deisenhofen
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Riedel-de Haen, Seelze
2-Propanol	Baker, Deventer (NL)
Rapamycin	Wyeth Ayerst Research, Princeton, NJ
Rinderserumalbumin	Serva, Heidelberg
Schwefelsäure	Merck, Darmstadt
SDZ RAD	Novartis, Basel
t-Butylmethylether	Aldrich, Deisenhofen
Wasser (HPLC-grade)	Baker, Deventer (NL)

Alle zusätzlich verwendeten Chemikalien wurden im höchstmöglichen Reinheitsgrad bezogen.

2. Isolierung von Lebermikrosomen

Die verwendeten Proben von humaner Leber wurden von der Abteilung für Abdominal- und Transplantationschirurgie der Medizinischen Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt.

Bei Lebertransplantationen an Patienten mit Leberkarzinom werden zusätzlich zum pathologischen Gewebe auch geringe Teile gesunden Gewebes entfernt. Diese Gewebeprobe wurden zur Isolierung von Mikrosomen genutzt.

Die Mikrosomen wurden durch Differentialzentrifugation nach Guengerich (1982) aus frisch zerkleinerten Leberstücken gewonnen, wobei alle Arbeitsschritte bei 4°C durchgeführt wurden. Die Leberstücke wurden in 0,7% Natriumchlorid-Lösung gewaschen, das Bindegewebe und die Gefäße wurden entfernt.

Die Leberstücke wurden mit einer Schere zerkleinert und anschließend in dem vierfachen Volumen Puffer A aufgenommen und mit einem Mixer der Firma Emide, Typ ZU 100, weiter zerkleinert. Das Homogenisat wurde 4 mal eine Minute mit 40% der Ausgangsleistung ($\cong 80$ Watt) mit dem BRANSON Ultraschall-Desintegrator, (BRANSON, Danbury, CT, USA) beschallt. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei $104 \times g$ für 20 Minuten in einer SORVALL-Zentrifuge (Sorvall-DuPont Superspeed RC2-B). Das Pellet mit den darin enthaltenen Zellbruchstücken, Mitochondrien und Plasmamembranen wurde verworfen. Der Überstand wurde gesammelt und eine Stunde in einer Ultrazentrifuge (Beckman TL-100, Rotor 50 Ti) bei $10^5 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand, das Zytosol, wurde ohne die Glycogensicht in Puffer B aufgenommen und weitere 60 Minuten mit der Beckman-Zentrifuge bei $10^5 \times g$ zentrifugiert. Das dabei entstandene Pellet entspricht der Mikrosomenfraktion. Dieses Pellet wurde in vier Teile Puffer C aufgenommen und bei -80°C gelagert.

Die Mikrosomenfraktionen verschiedener Individuen wurden gepoolt und der Proteingehalt der vereinigten Fraktionen wurde bestimmt (siehe 3.2.1.).

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
1,0 mmol/l	EDTA
20% (w:v)	Glycerol

2.1. Proteinbestimmung der Mikrosomen

Die photometrische Bestimmung des Proteingehaltes der Mikrosomen erfolgte nach einer durch Smith *et al.*(1985) beschriebenen Methode. Diese Methode beruht auf der Bildung eines Farbkomplexes aus zwei Molekülen Bicinchoninsäure und einem Kupfer (I)-Ion, welches bei Anwesenheit von Protein durch Reduktion von Cu^{2+} im alkalischen Medium entsteht. Die Reagenzlösung wurde frisch aus einer 4%-igen Kupfer(II)-sulfatlösung (w:v) und einer 1:50 verdünnten (v:v) Bicinchoninsäurelösung (BCA-Lösung, Sigma, Deisenhofen) hergestellt. Die Mikrosomensuspension wurde mit 1:100 mit Wasser (n=2) verdünnt und 30 μl dieser Verdünnung wurden jeweils mit 200 μl der Reagenzlösung in einem Well auf einer Mikrotiterplatte versetzt. Nach Inkubation von 45 Minuten bei 60°C wurde die Extinktion des gebildeten Farbkomplexes bei 550 nm an einem Photometer (Elisa-Reader Mr 5000 Fa. Dynatech) gegen einen Blindwert (Wasser statt Mikrosomenlösung) gemessen. Der Proteingehalt wurde mittels einer Kalibriergeraden berechnet, für deren Bestimmung Rinderserumalbumin in einem Konzentrationsbereich von 50-400 $\mu\text{g/ml}$ verwendet wurden. Der Proteingehalt der gepoolten Mikrosomenfraktionen betrug 38 mg/ml.

3. Mikrosomen-Inkubation der Makrolid-Immunsuppressiva

Als Modell für die *in vivo* Metabolisierung des Makrolidimmunsuppressivums Rapamycin wurde dieses in *in vitro*-Versuchen mittels humaner Lebermikrosomen umgesetzt. Die auf diese Weise gewonnenen Metabolite dienen der Aufklärung des Metabolisierungsmusters und strukturanalytischen Untersuchungen.

3.1. Metabolisierung von Rapamycin

Der Reaktionsansatz zur Gewinnung analytischer Mengen von Rapamycin-Metaboliten enthält folgende Komponenten:

1,0ml	0,1M Phosphat-Puffer pH=7,4
500µl	NADPH-regenerierendes System
40µl	Mikrosomen aus: menschlicher Leber menschlichem Darm Schweineleber Schweinedarm
15µl	Rapamycin gelöst in Ethanol (1,0 mM)
Inkubationszeit: 45 min	
Inkubationstemperatur:	37°C
Abstopreagenzien:	300 µl Acetonitril

Die Lösung zur Regenerierung von NADPH besteht aus: 0,1 mol/l Phosphatpuffer (pH=7,4), 18,0 mmol/l Isocitrat, 10,0 mmol/l MgCl₂, 2,0 mmol/l NADP und 0,7 U Isocitrat-Dehydrogenase. Der pH-Wert wurde mit 1N HCl eingestellt.

Um eine optimale Metabolitenausbeute zu erhalten, wurden die Metabolisierungsparameter wie Reaktionszeit, Ansatzgröße und Substrat-Enzym-Verhältnis variiert und optimiert. Als Blindwerte wurden Reaktionsansätze ohne NADPH und mit hitze-denaturierten Mikrosomen (10 min, 95°C) hergestellt und inkubiert.

Die, durch die Zugabe von Acetonitril, denaturierten Proteine in den Inkubationsansätzen wurden in 10 Minuten bei 4°C und 3900 x g (Omnifuge 2.0 RS Fa. Heraeus Sepatech GmbH, Rotor 2250) abzentrifugiert. Der klare Überstand dient als Ausgangslösung für die Flüssig-Flüssig-Extraktion bzw. zur Aufreinigung mittels online Fest-Phasen-Extraktion (online SPE).

3.2. Metabolisierung von SDZ RAD

Der Reaktionsansatz zur Gewinnung analytischer Mengen von SDZ RAD Metaboliten enthält folgende Komponenten:

1,0ml	0,1M Phosphat-Puffer pH=7,4
0,5ml	NADPH-regenerierendes System
40µl	Humane Lebermikrosomen (Pool)
15µl	SDZ RAD gelöst in Ethanol (1,0 mM)
Inkubationszeit: 45 min	
Inkubationstemperatur:	37°C
Abstopreagenzien:	500µl Acetonitril

Die Lösung zur Regenerierung von NADPH besteht aus den unter 3.4.1. beschriebenen Komponenten.

Um eine optimale Metabolitenausbeute zu erhalten, wurden die Metabolisierungsparameter, wie Reaktionszeit, Ansatzgröße und Substrat-Enzym-Verhältnis variiert und optimiert. Als Blindwerte wurden Reaktionsansätze einmal mit NADPH und hitze-denaturierten Mikrosomen sowie ohne NADPH und mit Mikrosomen hergestellt und inkubiert.

Die, durch die Zugabe von Acetonitril, denaturierten Proteine in den Inkubationsansätzen wurden in 10 Minuten bei 4°C und 3900 x g (Omnifuge 2.0 RS Fa. Heraeus Sepatech GmbH, Rotor 2250) abzentrifugiert. Der klare Überstand diente als Ausgangslösung für die Flüssig-Flüssig-Extraktion bzw. zur Aufreinigung mittels online Fest-Phasen-Extraktion (online SPE).

3.3. Präparative Inkubation von Rapamycin

Der Reaktionsansatz zur Gewinnung analytischer Mengen von Rapamycin-Metaboliten enthält folgende Komponenten:

1600ml	0,1M Phosphat-Puffer pH=7,4
800ml	NADPH-regenerierendes System
100ml	Humane Lebermikrosomen (Pool)
28ml	Rapamycin gelöst in Ethanol (2,2 mM)
Inkubationszeit: 45 min	
Inkubationstemperatur:	37°C
Abstopreagenzien:	1250ml Acetonitril

Die Lösung zur Regenerierung von NADPH besteht aus den unter 3.4.1. beschriebenen Komponenten.

Die, durch die Zugabe von Acetonitril, denaturierten Proteine in den Inkubationsansätzen wurden in 45 Minuten bei 4°C und 3900 x g (Omnifuge 2.0 RS Fa. Heraeus Sepatech GmbH, Rotor 2250) abzentrifugiert. Der klare gelbliche Überstand diente als Ausgangslösung für die Flüssig-Flüssig-Extraktion.

4. Isomerisierung von Rapamycin

Die Isomerisierung von Rapamycin erfolgte, um Untersuchungen zu weiterführenden Metabolisierungen anzustellen. Der Reaktionsansatz enthielt dazu folgende Komponenten:

110ml	0,1M Phosphat-Puffer pH=7,4
110ml	hitze-denaturierte Humane Lebermikrosomen (Pool)
20mg	Rapamycin gelöst in Ethanol (2,2 mM)
Inkubationszeit: 26 h	
Inkubationstemperatur:	37°C
Abstopreagenzien:	60 ml Acetonitril

Die Proteinfällung erfolgte durch Zugabe von Acetonitril. Durch anschließende Zentrifugation wurde die Reaktionslösung deproteiniert. Die Zentrifugationsdauer bei 4°C und 3900 x g betrug 45 Minuten. Der klare Überstand diente als Ausgangslösung für die Flüssig-Flüssig-Extraktion (s. 3.5.1).

5. Biotransformation des Rapamycin-Isomers

5.1. Metabolisierung des Rapamycin-Isomers

Zur Gewinnung semipräparativer Mengen des Rapamycin-Metaboliten RM wurde das Isomer der Ausgangssubstanz mit humanen Lebermikrosomen inkubiert. Der Reaktionsansatz enthielt folgende Komponenten:

500ml	0,1M Phosphat-Puffer pH=7,4
300ml	NADPH-regenerierendes System
80ml	Humane Lebermikrosomen (Pool)
200ml	Rapamycin – Isomer – Lösung
Inkubationszeit: 60 min	
Inkubationstemperatur:	37°C
Abstopreagenzien:	550 ml Acetonitril

Die Denaturierung der Proteine sowie die Deproteinierung erfolgte mit entsprechend der Reaktionsgröße veränderten Parametern (wie unter 3.1. beschrieben) durch Zugabe von Acetonitril und anschließender Zentrifugation. Die Zentrifugationsdauer bei 4°C und 3900 x g betrug 30 Minuten. Der klare Überstand diente als Ausgangslösung für die Flüssig-Flüssig-Extraktion.

5.2. Inkubation des Rapamycin-Isomers mit Leberzytosol

Zur Überprüfung des Metabolitenmusters bei Inkubation mit Enzymen aus Leberzytosol wurde das generierte Rapamycin-Isomer für 2,5 Stunden inkubiert. Der Reaktionsansatz enthält folgende Komponenten:

112ml	0,1M Phosphat-Puffer pH=7,4
300ml	NADPH-regenerierendes System
112ml	Humanes Leberzytosol
70ml	Rapamycin – Isomer – Lösung
Inkubationszeit: 2,5 h	
Inkubationstemperatur: 37°C	
Abstopreagenzien:	260 ml Acetonitril

Die weitere Bearbeitung des Reaktionsansatzes erfolgte wie in diesem Kapitel unter 4. beschrieben.

6. Extraktion

Die Extraktion diente der Aufreinigung und Aufkonzentrierung der Rapamycin- und SDZ RAD-Metabolite. Die so gewonnenen Metabolitengemische standen als Ausgangsmaterial für chromatographische und analytische Verfahren zur Verfügung.

6.1. Flüssig-Flüssig-Extraktion von Inkubationsansätzen

Als Ausgangslösung für die Flüssig-Flüssig-Extraktion diente der klare Überstand der deproteinierten und zentrifugierten Inkubationsansätze (siehe 3.1. und 3.2.). Zu den 1,3 ml (Rapamycin-Inkubationsansatz) und 1,9 ml (SDZ RAD-Inkubationsansatz) des Überstandes wurden 2,0 ml t-Butylmethylether (t-BME) gegeben und 10 s gevortext (Vortex Fa. Heidolph). Anschließend wurde das Gemisch 2 Minuten bei 4°C und 1500 x g zentrifugiert (Omnifuge 2.0 RS Fa. Heraeus Sepatech GmbH, Rotor 2250). 1,5 ml der ätherischen Phase wurden mit dem Transferpettor abpipettiert. Die verbleibende Lösung wurde nochmals mit 1,0 ml t-BME extrahiert und wie oben beschrieben zentrifugiert. Die 1,0 ml der ätherischen Phase wurden abgenommen (s.o.) und mit der ersten ätherischen Phase vereinigt. Diese Lösung wurde bei Raumtemperatur unter einem Stickstoffstrom bis zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in 200 µl eines Gemisches aus Acetonitril / Wasser (75:25, v:v) aufgenommen und in HPLC-Vials überführt.

Bei den in Abschnitt 3.1 und 3.3. beschriebenen Transformationen von Rapamycin wurde die Deproteinierung in entsprechend größerem Maßstab durchgeführt als bei der Inkubation von Rapamycin im analytischen Bereich (siehe 3.1.). Die nach Zentrifugation erhaltenen klaren Überstände wurden im 11 - bzw. 31 – Scheidetrichter mit dem gleichen Volumen an t-Butylmethylether (t-BME) überschichtet. Nach der Extraktion sind die Phasen getrennt worden. Die wäßrige Phase wurde zwei noch zweimal mit der Hälfte des Volumens der wäßrigen Phase extrahiert. Die etherischen Phasen wurden vereinigt und am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Die Extrakte wurden bis zur Aufreinigung mittels HPLC bei -20°C gelagert. Gelöst wurden die Extrakte durch Zugabe von einem der jeweiligen HPLC-Trennung entsprechenden Eluentengemisch.

6.2. Flüssig-Flüssig-Extraktion von Human-Blut

Das von Patienten erhaltene, rapamycinhaltige Blut wurde bis zur Extraktion bei -20° gelagert. Durch Zugabe von 250 ml einer Deproteinierungs-Lösung (70% Acetonitril, 30% 0,2 M Zinksulfat-Lösung) wurden die Proteine gefällt. Die ausgefallenen Proteine wurden bei 4°C und $3900 \times g$ dreißig Minuten lang zentrifugiert. Das Proteinpellet wurde abgetrennt und der Überstand mit t-Butylmethyl-Ether (t-BME) extrahiert.

Der Überstand wurde in einem 11 Scheidetrichter mit ca. dem gleichen Volumen an t-BME überschichtet. Nach Extraktion wurden durch Zugabe von kristallinem Kochsalz die Phasen getrennt. Die wäßrige Phase wurde noch zwei weitere Male extrahiert. Nach Vereinigung der ätherischen Phasen wurde am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in 1,5 ml eines Acetonitril-Wasser-Gemisches (2:1, v:v) aufgenommen.

6.3. Automatisierte Fest-Phasen-Extraktion (on-line SPE)

Der nach der Deproteinierung der Inkubationslösungen erhaltene Überstand wurde mit Hilfe einer Säulenschaltung (column-switching procedure) extrahiert. Die HPLC bestand aus einem Merck Autosampler L-7200 (Merck Hitachi, Darmstadt), einem Säulenofen, einem Merck Pumpensystem L-6200 / L-6000 und einem Merck 655A UV-Detektor mit variablen Wellenlängen. Zusätzlich wurde für die on-line SPE ein externes Sechs-Wege-Hochdruck-Schaltventil, eine Knauer Micro Pumpe (WellChrom Micro-Star K-100, Knauer GmbH, Berlin) und eine Vorsäulenkartusche (Schambeck GmbH, Bad Honnef) installiert. Die Ansteuerung des externen Ventils wurde durch einen Analog-Digital-Wandler und die

Software des SRI Peak Simple Chromatographie Daten Systems (Schambeck GmbH, Bad Honnef) realisiert.

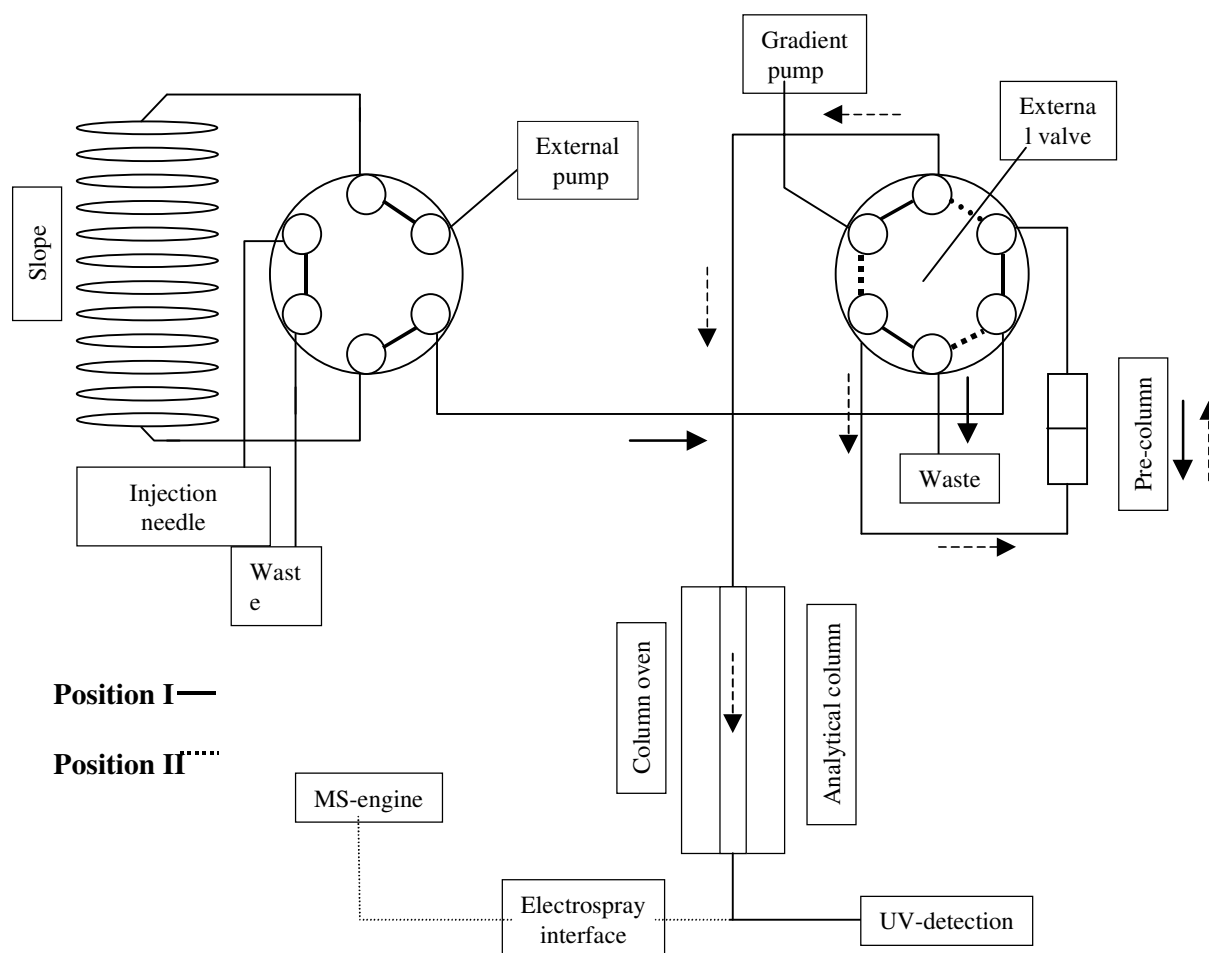


Abb. III-1: Schaltbild der automatisierten Fest-Phasen-Extraktion (on-line SPE)

Die Flußraten beider Pumpen wurden auf 0,7 ml/min eingestellt. Die ganze Prozedur der Aufkonzentrierung bzw. Reinigung der Proben sowie deren Elution wurde durch die Position des externen Ventils bestimmt (Abb. III-1). Die Proben wurden durch die externe Pumpe auf die Vorsäulenkartusche transportiert und dort mit Wasser gewaschen.

Zu Beginn einer Extraktion ist das externe Ventil in Position I, d.h. die Probe wird in die Probenschleife injiziert. Die Mikropumpe spült mit einem Fluß von 0,7 ml / min Wasser durch die Probenschleife, so daß die Probe auf die Vorsäule der Dimension 2 x 10 mm, gefüllt mit C₁₈ Hypersil[®]- Material der Partikelgröße 10 µm (Schambeck GmbH, Bad Honnef), aufgetragen wird.

Es wurde noch 3 Minuten mit Wasser gespült, um hydrophile Komponenten zu entfernen während das Rapamycin und die Metabolite auf der Vorsäule adsorbiert wurden. Nach drei Minuten schaltet das externe Ventil in Position **II**. Das Lösungsmittelgemisch des Gradientenpumpen-Systems fließt im Rückfluß-Modus durch die Vorsäule auf die analytische Säule, wo die chromatographische Trennung beginnt.

7. HPLC-Analytik der Makrolid-Immunsuppressiva

Für die analytische Trennung des Metabolitengemisches wurde eine Merck-HPLC-Anlage bestehend aus einem Autosampler 7200, einem Säulenofen, einem Pumpensystem L-6200 und L-6000 sowie einem 655A Variable Wavelength UV-Monitor (Merck/Hitachi, Darmstadt) verwendet. Die Datenaufnahme und -auswertung wurde mit Hilfe eines SRI PeakSimple Chromatographie Daten Systems durchgeführt.

Um eine automatische Fest-Phasen-Extraktion (on-line SPE) durchführen zu können, wurde die Anlage mit einem zusätzlichen Sechs-Wege-Hochdruck-Schaltventil, einer Knauer Mikropumpe (WellChrom Micro-Star K-100, Knauer GmbH, Berlin) und einem Vorsäulenkartuschenhalter mit Vorsäule (Schambeck GmbH, Bad Honnef) ausgerüstet. Die für die on-line SPE zusätzlich installierten Komponenten wurden je nach Analysenmethode hinzu- oder weggeschaltet.

7.1. HPLC-Methode zur Untersuchung der Stabilität von Rapamycin in Lösungsmitteln

Für die Untersuchungen von Rapamycin in verschiedenen organischen Lösungsmitteln und Puffern verschiedener pH-Werte wurden jeweils 0,07 mg Rapamycin in einem Milliliter Lösungsmittel gelöst. Sofort nach dem Lösen der Probe wurde diese vermessen und der Startwert ($t=0$) gemessen. Die Analytik erfolgte an einem ohne on-line SPE - Modul ausgestatteten Flüssigkeitschromatographen.

Es wurde eine analytische Säule der Dimension 4 x 250 mm gepackt mit RP18 Nucleosil®-Material der Partikelgröße 3 μm und einer Porengröße von 100 Å verwendet (Schambeck GmbH, Bad Honnef). Als Elutionsmittel wurden Acetonitril und Wasser pH=3 (mit HCOOH eingestellt) verwendet. Der Fluß betrug 0,7 ml/min. Es wurde die Probe direkt auf die analytische Säule gegeben. Der Säulenofen wurde auf eine Temperatur von 40°C geheizt. Am UV-Detektor (Merck / Hitachi, Darmstadt) wurde eine Wellenlänge von 276 nm eingestellt.

Für die Stabilitätsuntersuchungen von Rapamycin wurden folgende HPLC-Parameter verwendet:

Säule:	RP18 Nucleosil [®] 100A, 3µm, 4 x 250mm (Schambeck GmbH, Bad Honnef)	
Eluentensystem:	Eluent A: H ₂ O pH=3 (HCOOH) Eluent B: CH ₃ CN	
Gradientenprofil:	0 min	80% B
	10 min	90% B
	15 min	95% B
Flußrate:	0,7 ml / min	
Elutionstemperatur:	40°C	
Detektiionswellenlänge:	276 nm	range: 0,005

Um eine Zuordnung der entstandenen Degradationsprodukte treffen zu können, wurden die Proben massenspektrometrisch mittels dem HP 5989 B MS-Engine Massenspektrometer, ausgestattet mit einem API-Electrospray cabinet HP 59987 A (Hewlett-Packard, Waldbronn), untersucht (siehe 8.1.1.).

7.2. HPLC-Analytik von Rapamycin und seinen Metaboliten

Der Überstand der deproteinierten Probe wurde in HPLC-Vials gefüllt und wie oben beschrieben mit on-line SPE extrahiert (siehe 6.3.). Die Vorsäule der Dimension 2 x 10 mm war mit C₁₈ Hypersil[®]-Material gepackt (Schambeck GmbH, Bad Honnef). Die Partikelgröße betrug 10 µm. Über das zusätzliche Rheodyne Ventil wurde die Probe aufgereinigt und im Rückfluß-Modus auf die analytische Säule eluiert.

Es wurden eine analytische Säule der Dimension 4 x 250 mm gepackt mit RP18 Nucleosil[®]-Material der Partikelgröße 3µm und einer Porengröße von 100A verwendet (Schambeck GmbH, Bad Honnef). Als Elutionsmittel wurden Acetonitril und Wasser pH=3 (mit HCOOH eingestellt) verwendet. Der Fluß betrug 0,7 ml / min. Der Säulenofen wurde auf eine

Temperatur von 40°C geheizt. Am 655A Variable Wavelength UV-Monitor (Merck/Hitachi, Darmstadt) wurde eine Wellenlänge von 276 nm eingestellt.

Für die Trennung der Rapamycin-Metabolite wurden folgende Parameter verwendet:

Säule: RP18 Nucleosil[®] 100A, 3µm, 4 x 250mm
(Schambeck GmbH, Bad Honnef)

Eluentensystem: Eluent A: H₂O pH=3 (HCOOH)
Eluent B: CH₃CN
Laufmittel C: H₂O

Gradientenprofil: Position des Rheodyne Ventil: **I**

0 min	100% C
3 min	100% C

Position des Rheodyne Ventil: **II**

3 min	58% B
25 min	65% B
30 min	80% B
40 min	90% B
43 min	95% B

Flußrate: 0,7ml / min

Elutionstemperatur: 40°C

Detektionswellenlänge: 276 nm range: 0,005

7.3. HPLC-Analytik von SDZ RAD und seinen Metaboliten

Der Überstand der deproteinierten Probe wurde in HPLC-Vials gefüllt und wie oben beschrieben mit on-line SPE extrahiert (siehe 6.3.). Die Vorsäule der Dimension 2 x 10 mm war mit C₁₈ Nucleosil[®]-Material gepackt (Schambeck GmbH, Bad Honnef). Die Partikelgröße

betrug 10 μm . Über das zusätzliche Rheodyne Ventil wurde die Probe aufgereinigt und im Rückfluß-Modus auf die analytische Säule eluiert.

Es wurde eine analytische Säule der Dimension 4 x 250 mm gepackt mit RP18 Nucleosil[®]-Material der Partikelgröße 3 μm und einer Porengröße von 100A verwendet (Schambeck GmbH, Bad Honnef). Als Elutionsmittel diente eine Gemisch aus Acetonitril und Wasser (57:43, v:v) pH=3 (mit HCOOH eingestellt). Der Fluß betrug 0,7 ml / min. Der Säulenofen wurde auf eine Temperatur von 40°C geheizt. Am 655A Variable Wavelength UV-Monitor (Merck/Hitachi, Darmstadt) wurde eine Wellenlänge von 276 nm eingestellt.

Folgende Parameter wurden für die HPLC-Analytik verwendet:

Säule:	RP18 Nucleosil [®] 100A, 3 μm , 4 x 250mm (Schambeck GmbH, Bad Honnef)
Eluentensystem:	Eluent A: H ₂ O pH=3 (HCOOH) Eluent B: CH ₃ CN Laufmittel C: H ₂ O
Gradientenprofil:	Position des Rheodyne Ventil: I
	0 min 100% C
	3 min 100% C
	Position des Rheodyne Ventil: II
	3 min 55% B
	25 min 65% B
	30 min 80% B
	40 min 90% B
	43 min 95% B
Flußrate:	0,7 ml / min
Elutionstemperatur:	40°C
Detektionswellenlänge:	276 nm range: 0,005

8. Massenspektrometrie der Makrolid-Immunsuppressiva

Die massenspektrometrischen Untersuchungen wurden mittels Electrospray-Massenspektrometrie (ESI-MS) durchgeführt. Zur Bestimmung von Molekularmassen wurden die Proben der isolierten Metabolite durch „flow injection“ mittels einer Spritzenpumpe direkt in das Interface des Massenspektrometers überführt. Eine weitere Anwendung der Electrospray-Massenspektrometrie wurde durch die Kopplung mit einer HPLC realisiert (LC-ESI-MS). Dabei konnte von jeder, von der analytischen Säule eluierten, Verbindung das Massenspektrum aufgenommen oder nach konkreten Molekülonen selektiert werden. In Abbildung III-2 ist der schematische Aufbau einer ESI-Quelle mit Interface zu einem Quadrupol-Massenspektrometer dargestellt.

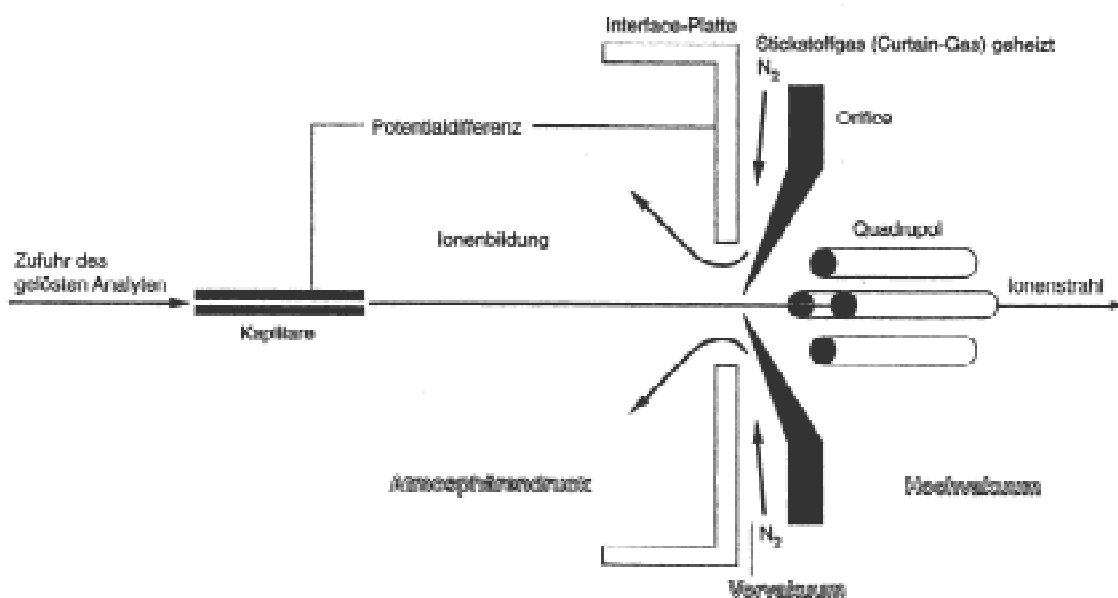


Abb. III-2 Aufbau einer ESI-Quelle mit Interface zu einem Quadrupol-Massenspektrometer (Lottspeich und Zorbas 1998).

Um strukturelle Informationen über die Makrolid-Immunsuppressiva und ihre Metabolite zu erhalten, wurde die Nanospray-Tandem-Massenspektrometrie angewandt. Dabei handelt es sich ebenfalls um eine Form der Electrospray-Massenspektrometrie.

8.1. LC-ESI-MS-Analytik der Makrolid-Immunsuppressiva

Das massenspektrometrische System bestand aus einem HP 5989B Massenspektrometer (MS-Engine) und einem HP 59987A API-Elektrospray LC-MS-Interface. Das Massenspektrometer konnte zusätzlich mit einem Chromatographen 1090 A Serie II der Firma HP ausgerüstet

werden. Das Eluat aus der HPLC wurde durch eine Peak-Kapillare direkt in das Interface überführt. Alle Geräte wurden von der Firma Hewlett Packard (Waldbronn) bezogen und durch die HP Chemstation mit HP G 1047A LC-MS Software gesteuert.

Folgende Parameter waren während der LC-MS-Messungen festgesetzt:

Verneblungsgas	Stickstoff, 5.0; 80 psi
Trocknungsgas	Stickstoff,5.0; Fluß:10 l/min; T:350°C
Kapillar-Ausgangsspannung	300V (Rapamycin und Metabolite) 280V (SDZ RAD und Metabolite)
Elektrospray-Spannung	Vcap: -4000V Vend: -3500V Vcyl: -6000V

8.1.1 Stabilitätsuntersuchungen an Rapamycin

Um die Stabilität von Rapamycin in Blut, in organischen Lösungsmitteln und wäßrigen Lösungen zu überprüfen, wurden Lösungen mit 500 ng/ml Rapamycin hergestellt. Die Deproteinierung der Proben erfolgte durch Fällung mit gleichem Volumen einer Lösung Methanol / 0,4mol/l Zinksulfat-Lösung (80 / 20, v/v), anschließend wurde 10 Minuten bei 4°C und 3900 x g zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde in HPLC-Vials gefüllt und mittels on-line SPE extrahiert. Die chromatographische Trennung erfolgte nach der unter 8.1.4. beschriebenen Methode. Als Detektor diente das HP 5989 B MS-Engine Massenspektrometer, ausgestattet mit einem API-Elektrospray cabinet HP 59987 A Interface. Die massenspektrometrischen Parameter wurden wie unter 8.1. beschrieben eingestellt. Zur Bestimmung der Rapamycin-Konzentrationen wurde im SIM-Modus die Masse des Natrium-Addukts von Rapamycin $[M+Na^+]^+$ m/z 936.5 detektiert. Es wurden je drei Proben zum Zeitpunkt t=0, t=3h, t=6h und t=24h einmal bei Raumtemperatur und einmal bei 37°C untersucht.

8.1.2. LC/MS-Analytik von Rapamycin und seinen Metaboliten

Um eine qualitative Zuordnung der Rapamycin-Metabolite treffen zu können, wurde eine LC-ESI-MS-Methode angewandt.

Die nach Flüssig-Flüssig-Extraktion erhaltenen Proben wurden mit Hilfe des integrierten Autosamplers auf die 250 µl Probenschleife gegeben und anschließend mit einer Flußrate von 0,2 ml/min auf die analytische Säule aufgetragen.

Die HPLC-Parameter sind im folgenden zusammengestellt:

Säule:	RP18 Nucleosil [®] 100A, 3µm, 2 x 250 mm (Fa. Dr. A. Maisch, Ammerbuch)
Eluentensystem:	Eluent A: H ₂ O pH=3 (HCOOH) Eluent B: CH ₃ CN
Gradientenprofil:	0 min 58% B 25 min 65% B 30 min 80% B 40 min 90% B 43 min 95% B
Flußrate:	0,2 ml/min
Elutionstemperatur:	35°C

Als Detektor diente das HP 5989 B MS-Engine Massenspektrometer, ausgestattet mit einem API-Electrospray cabinet HP 59987 A Interface (Hewlett-Packard, Waldbronn). Die massenspektrometrischen Parameter sind unter 8.1. zusammengefaßt.

Das HPLC-Eluat mit den getrennten Metaboliten wurde in das Interface des Elektrospray-Massenspektrometers überführt. Es wurden Scans im Massenbereich von m/z 300 –1200 aufgenommen. Um die Empfindlichkeit der Methode zu erhöhen, wurde anschließend im selected ion mode (SIM) detektiert. Dabei wurden die Massen der Natrium-Addukte [M+Na]⁺ von Rapamycin (m/z 936,5), Demethylrapamycin (m/z 922,5), Hydroxyrapamycin (m/z 952,5) und Dihydroxyrapamycin (m/z 968,5) mit einer dwell time von 0,5 s für jede Masse

eingestellt. Um eine maximale Empfindlichkeit zu erreichen, wurde die Kapillarausgangsspannung auf 300 V eingestellt. Der Multiplier wurde auf 1890 V eingestellt.

8.1.3. LC/MS-Analytik von SDZ RAD und seinen Metaboliten

Um eine qualitative Zuordnung der SDZ RAD-Metabolite treffen zu können, wurde die LC-ESI-MS-Analytik gekoppelt mit der on-line SPE (siehe 6.3.) angewandt.

Die durch on-line SPE extrahierten Proben wurden wie oben beschrieben mit einer Flußrate von 0,7 ml/min auf die analytische Säule aufgetragen

Die HPLC-Parameter sind im folgenden zusammengestellt:

Säule:	RP18 Nucleosil [®] 100A, 3µm, 4 x 250 mm (Fa. Dr. A. Maisch, Ammerbuch)	
Eluentensystem:	Eluent A: H ₂ O pH=3 (HCOOH) Eluent B: CH ₃ CN	
Gradientenprofil:	0 min	58% B
	25 min	65% B
	30 min	80% B
	40 min	90% B
	43 min	95% B
Flußrate:	0,7 ml/min (gesplittet 1:3)	
Elutionstemperatur:	35°C	

Als Detektor diente das HP 5989 B MS-Engine Massenspektrometer ausgestattet mit einem API-Electrospray cabinet HP 59987 A Interface (Hewlett-Packard, Waldbronn). Die massenspektrometrischen Parameter sind unter 3.6. zusammengefaßt.

Das HPLC-Eluat mit den getrennten Metaboliten wurde in das Interface des Elektrospray-Massenspektrometers überführt. Die Metabolite wurden im selected ion mode (SIM) detektiert. Es wurden die Massen der Natrium-Addukte [M+Na]⁺ von SDZ RAD (m/z 980,5), Demethyl-SDZ RAD (m/z 966,5), Hydroxy-SDZ RAD (m/z 996,5) und Dihydroxyrapamycin (m/z 1012,5) mit einer dwell time von 0,5 s für jede Masse eingestellt. Die Kapillar-

Ausgangsspannung betrug 280 V, um eine maximale Empfindlichkeit zu erreichen. Der Multiplier wurde auf 1890 V eingestellt.

8.1.4. LC-MS-Analytik von Rapamycin und seinen Metaboliten in Blutproben

Das nach Extraktion aus Blutproben von einem Patienten gewonnene Metabolitengemisch wurde in dem Elutionsgemisch gelöst und mit der unter 8.1.2. beschriebenen LC-ESI-MS-Methode untersucht. Der Gradient sowie das Injektionsvolumen wurden jedoch modifiziert, so daß das maximal mögliche Injektionsvolumen von 5 ml eingespritzt werden konnte. Der Gradient wurde steiler angelegt, um eine Peakverbreiterung zu verhindern.

Die HPLC-Parameter sind im folgenden zusammengestellt:

Säule:	RP18 Nucleosil [®] 100A, 3µm, 2 x 250 mm (Fa. Dr. A. Maisch, Ammerbuch)
Eluentensystem:	Eluent A: H ₂ O pH=3 (HCOOH) Eluent B: CH ₃ CN
Gradientenprofil:	0-2,0 min 57% B 24,0 min 65% B 24,1 min 95% B 29,0 min 95% B
Flußrate:	0,2 ml/min
Elutionstemperatur:	35°C

8.2. Elektrospray-Tandem-Massenspektrometrie der Makrolid-Immunsuppressiva

Um die isolierten und mit LC-ESI-MS charakterisierten Metabolite bezüglich ihrer Struktur untersuchen zu können, waren Tandem massenspektrometrische Experimente notwendig. Bei diesen Experimenten wurde die Molekularmasse des Natrium-Addukts eines Metaboliten im Quadrupol Q1 definiert. Durch anschließende Fragmentierung in der Kollisionszelle wurden strukturabhängige Fragmente erzeugt, welche im Quadrupol Q3 im Scan-Modus detektiert

wurden. In Abbildung III-3 ist der schematische Aufbau eines Tandem-Massenspektrometers, wie es für diese Untersuchungen verwendet wurde, dargestellt.

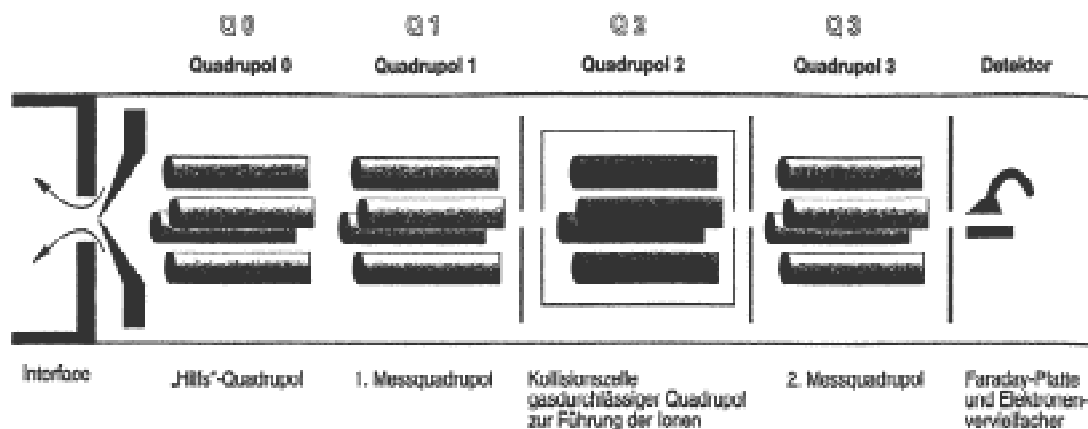


Abb. III-3 Schematischer Aufbau eines Triple-Quadrupol-Massenspektrometers (Lottspeich und Zorbas 1998).

Bei der Ionisation mit herkömmlichen Elektrospray-Quellen, welche mit einer Flußrate von bis zu einem Milliliter / Minute arbeiten, geht der größte Teil der Analytlösung im

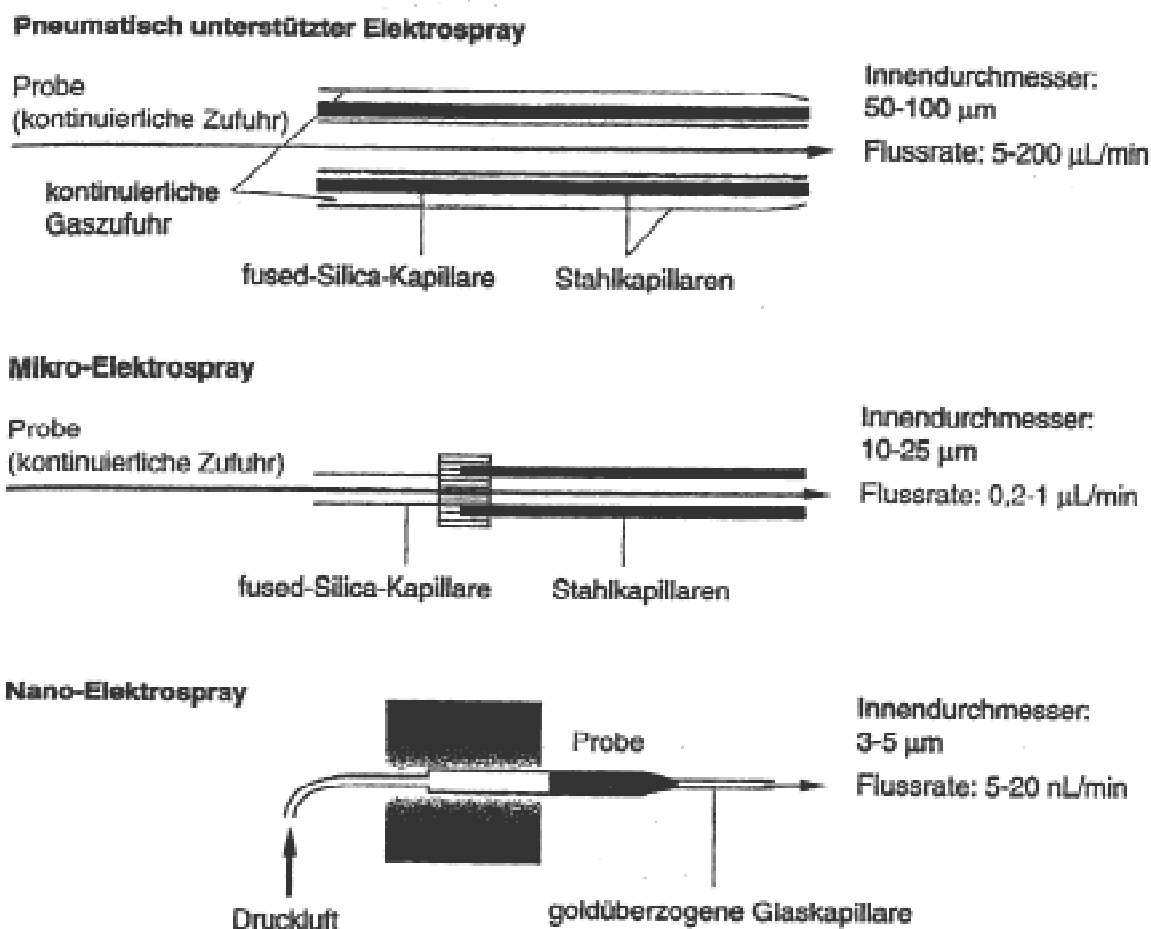


Abb. III-4 Schematischer Aufbau und Varianten von Elektrospray –Quellen (Lottspeich und Zorbas 1998).

Ionisierungsraum und an der Interfaceplatte verloren. Deshalb wurden neue Verfahren entwickelt, welche durch Reduzierung der Flußrate eine Empfindlichkeitssteigerung erreichen. Die dafür geeigneten Methoden sind die Mikro-Elektrospray- bzw. Nano-Elektrospray-Technik. In Abbildung III-4 sind die zur Zeit gebräuchlichen Varianten von Elektrospray-Quellen dargestellt.

Für die Untersuchungen zur Strukturaufklärung der Makrolid-Immunsuppressiva-Metabolite wurde ausschließlich Nano-Elektrospray-Tandem-Massenspektrometrie (Nano-ESI-MS-MS) eingesetzt.

8.2.1. ESI-MS/MS-Experimente zur Strukturaufklärung von Rapamycin Metaboliten

Die Tandem Massenspektrometrischen Untersuchungen wurden an einem API III+ Triple Quadrupol Massenspektrometer (PE-SCIEX, Langen, Deutschland) durchgeführt. Die Datenerfassung erfolgte durch die gerätespezifische MacTune- und die Auswertung mit der MacSpec-Software. Als Ionisations-Quelle wurde eine „in-house“ hergestellte Nano-Elektrospray-Quelle bzw. eine Standard-ESI-Quelle verwendet. Für die Standard-Electrospray Ionisation wurde eine Spritzenpumpe (Harvard Apparatures, Saint-Laurent, Quebec, Canada), welche einem Fluß von 5 µl / min realisiert, und eine 192 µm OD, 50µm ID Silica Kapillare (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ), welche die Spritze (Hamilton, Bonaduz, Switzerland) mit der Electrospray-Quelle verbindet, ausgerüstet. Bei der Nanospray-Variante wurden goldbeschichtete Nadeln (Protana, Odense, Denmark) mit einer Öffnung von 3-10µm mit 5-10 µl einer Metabolite-Lösung gefüllt. Das Metabolitengemisch wurde zuvor in einer Lösung aus 50% Acetonitril, 50% einer 1%igen Ameisensäure (v:v), gelöst und mit einer Flußrate von 20-50 nl/min. in das Interface überführt. Die Nadeln wurden unter Beobachtung mit einem Mikroskop durch vorsichtiges Tippen auf ein Blatt Papier geöffnet. Die Spitze der Nadel wurde vor der orifice-Platte mit einem Abstand von ca. 5 mm justiert. Diese Justierung wurde solange vorgenommen bis ein Maximum des beobachteten Signals für die Metaboliten erhalten wurde. Die Parameter für die Fragmentierungen sind im folgenden dargestellt:

Ionisationsspannung	+700 - +900 V
Orifice-Spannung	45 – 50 eV
Interfaceplatte	+100 V
Argon-Gas:	350-380 (relative Ablesung am Gerät)
Stoßenergie	40 eV - 80 eV
Q1	eingestellt auf das Natrium-Addukt des untersuchten Metaboliten $[M+Na^+]^+$
Q3	Scan von 100amu – 1000 amu step 0,5 amu

Die Stoßenergie wurde je nach Metabolit variiert, um eine maximale Fragment-Ausbeute zu erhalten. Um ein optimales Signal-Rausch-Verhältnis zu erhalten wurden, bis zu 200 Einzelspektren akkumuliert.

8.2.2. ESI-MS/MS-Experimente zur Strukturaufklärung von SDZ RAD Metaboliten

Die Nano-ESI-MS-MS-Technik wurde hier mit den gleichen unter 8.2.1. beschriebenen Parametern angewandt. Die Einstellungen der Massen am Quadrupol Q1 waren entsprechend der veränderten Masse von SDZ RAD und seinen Metaboliten nicht identisch. Zur Auswertung der nach MS-MS-Experimenten erhaltenen Fragmente wurde im Quadrupol über einen Bereich von 100 amu – 1200 amu gescannt.

9. NMR-Experimente mit Rapamycin und seinen Metaboliten

Um die nach ESI-MS-MS-Experimenten vermuteten Strukturen von Metaboliten auf atomarer Ebene aufklären bzw. bestätigen zu können, wurde die Kernmagnetische Resonanz Spektroskopie (NMR) verwendet. Die Interpretation von eindimensionalen NMR-Spektren komplexer Moleküle ist aufgrund von Überlagerung der Signale gänzlich unmöglich. Nimmt man diese Spektren jedoch zweidimensional auf, so ist die Zuordnung der Molekülstruktur möglich. Für die zweidimensionale NMR-Spektroskopie (2D-NMR) haben sich im wesentlichen drei 2D-Experimente herauskristallisiert: COSY, TOCSY und NOESY.

COSY	<i>Correlation Spektroskopie</i>
TOCSY	<i>Total Correlation Spektroskopie</i>
NOESY	<i>Nuclear Overhauser and Exchange Spektroskopie</i>

Bei diesen Spektren handelt es sich um homonucleare Spektren, bei denen in beiden Dimensionen die Signale einer Kernsorte dargestellt sind. Diese Experimente wurden herangezogen um Kopplungen von Protonen über 2-3 Bindungen (COSY), alle Bindungen (TOCSY) und Wechselwirkungen die durch den räumlichen Abstand bedingt sind (NOESY) zu untersuchen. Bei der Komplexität des Rapamycin- bzw. des SDZ RAD Moleküls kommt es trotz der zwei Dimensionen zu Überlagerungen von Signalen.

Alternativ dazu werden heteronucleare 2D-Experimente zur Strukturaufklärung unbekannter Substanzen eingesetzt.

HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Connectivity</i>
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Correlation Transfer</i>

Alle Messungen wurden an einem Bruker AM-600 Spektrometer durchgeführt. Als Lösungsmittel wurden jeweils 0,5 ml Dimethylsulfoxid (d₆) und Acetonitril (d₃) (100 Atom % D) (Aldrich,) verwendet.

Kapitel IV – Ergebnisse

1. Metabolisierungsuntersuchungen

Die Generierung von Metaboliten der Makrolid-Immunsuppressiva, Rapamycin und SDZ RAD, wird im *in vitro* – Versuch durch die Inkubation mit Mikrosomen bei 37°C durchgeführt. Dabei können je nach Aufgabenstellung Mikrosomen von verschiedenen Spezies sowie verschiedener Organe eingesetzt werden. Durch derartige Versuche sind Abschätzungen möglich, inwieweit ein übereinstimmendes Metabolisierungsverhalten der verschiedenen Spezies und Organe vorliegt. Weiterhin können Aussagen darüber getroffen werden, welches System sich zur Gewinnung relevanter Metabolite am besten eignet.

1.1. Metabolisierung von Rapamycin

1.1.1. Metabolisierung von Rapamycin mit gepoolten menschliche Lebermikrosomen

Eine optimale Rapamycin-Metabolitenausbeute nach der Inkubation von Rapamycin mit gepoolten menschlichen Lebermikrosomen (38 mg Protein / ml) stellt eine Inkubation für 60 min bei 37°C dar (vgl. Kap. 4.1.). Innerhalb fünfminütiger Inkubation wird das Isomer sowie

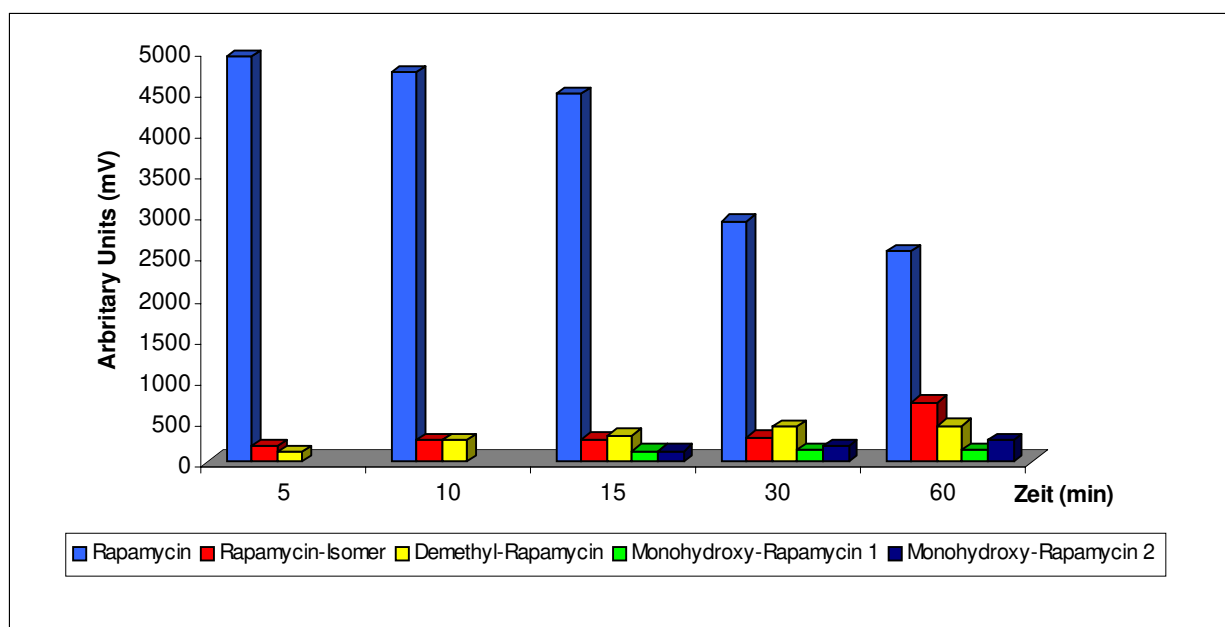


Abb. IV-1 Kinetik zur Bildung der Hauptmetabolite der ersten Generation von Rapamycin nach Inkubation mit humanen Lebermikrosomen bei 37°C für 60 min.

der Demethylmetabolit von Rapamycin gebildet. Die Bildung der einfach hydroxylierten Metabolite findet nach ca. 15 Minuten statt (Abbildung IV-1). Die Bildung der

Hauptmetabolite der ersten Generation (z.B. einfach hydroxylierte – oder einfach demethylierte Metabolite) durchläuft bei 60 min ein Maximum. Bei längeren Inkubationszeiten beginnt die Bildung von Metaboliten der zweiten Generation (z.B. mehrfach hydroxylierte Metabolite).

Um Metabolite der zweiten Generation (Dihydroxylierte Metabolite u.a.) zu generieren, wurde die Inkubationszeit um 30 min erhöht. Hierbei wurden als Hauptmetabolite ebenfalls das Rapamycin-Isomer und das Demethyl-Rapamycin identifiziert. Eine deutliche Zunahme der Konzentration an einem unbekanntem Rapamycin-Metaboliten RM konnte ebenfalls beobachtet werden. Im HPLC-Chromatogramm lag der Peak des Metaboliten RM bei Inkubationszeiten < 60 min unterhalb der Integrationsgrenze. Nach einer um 30 Minuten

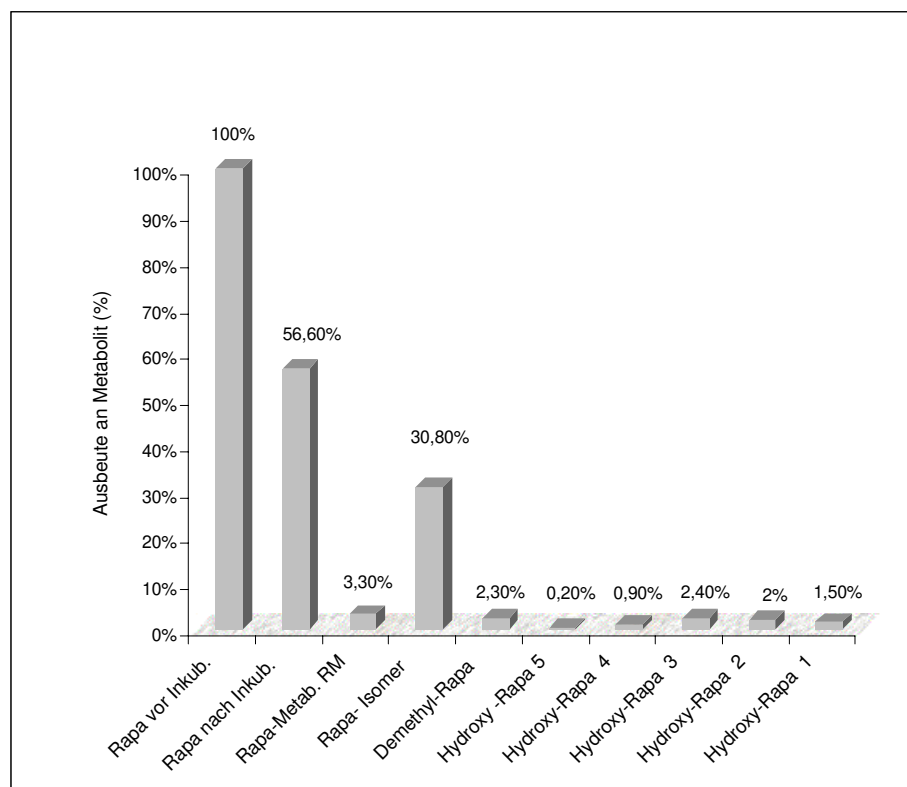


Abb. IV-2 Prozentualer Anteil der Rapamycin-Metaboliten nach Inkubation mit humanen Lebermikrosomen bei 37°C für 90 min., verglichen mit der Einsatzmenge an Rapamycin.

verlängerten Inkubationszeit war dieser Peak deutlich nachweisbar (Abbildung IV-2). Auffällig ist zudem die Polarität des Metaboliten RM, die man aus der Retentionszeit dieser Verbindung im HPLC-Chromatogramm abschätzen kann. Der Metabolit RM mit einer Retentionszeit $t_R=25,15\text{min.}$ ist im HPLC-Chromatogramm zwischen der Ausgangssubstanz

Rapamycin ($t_R=27,15\text{min.}$) und dem Rapamycin-Isomer ($t_R=22,55\text{min.}$) zu finden, was auf eine ähnliche Polarität zu diesen Substanzen hinweist.

1.1.2. Metabolisierung von Rapamycin mit Leber- und Dünndarmmikrosomen des Menschen und des Schweins

Ein Vergleich der Rapamycin-Metabolitenmuster nach Inkubation mit humanen Leber- und Darmmikrosomen und Inkubation mit Schweineleber- und Schweinedarmmikrosomen zeigt eine weitgehende Übereinstimmung der vier Metabolitenmuster. Es konnten in allen Inkubationsansätzen anhand von HPLC-MS-Chromatogrammen folgende Metabolite identifiziert werden: Monohydroxy-Rapamycin, Demethyl-Rapamycin, das Rapamycin-Isomer sowie ein unbekannter Rapamycin-Metabolit RM (Abbildung IV-4). Die erhaltenen Metabolitenkonzentrationen differierten jedoch erheblich voneinander. Auffällig ist, daß der Rapamycin-Metabolit RM durch Mikrosomen des Schweinedarms im Vergleich zu den anderen Inkubationen um den Faktor 10 verstärkt gebildet wird (Abbildung IV-3). Bei der Inkubation mit menschlichen Darmmikrosomen wurde dieser Metabolit in so geringem Maß gebildet, daß er unter die Integrationsgrenze fiel.

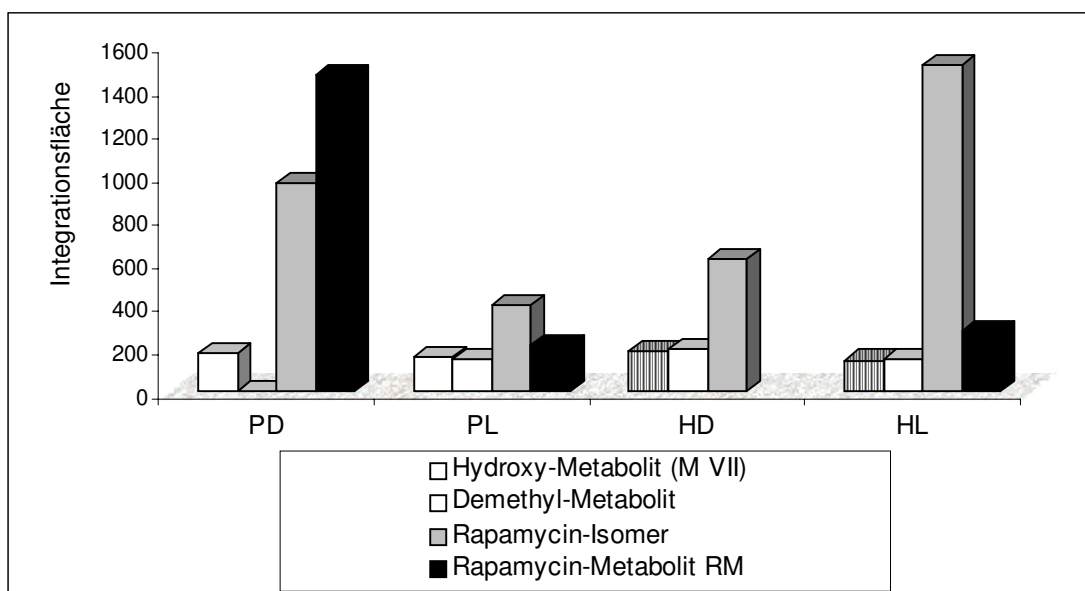


Abb. IV-3 Vergleich der Bildung der Hauptmetabolite von Rapamycin in Inkubationsansätzen mit Mikrosomen verschiedener Herkunft: PD-Schweinedarm, PL-Schweineleber, HD-Menschlicher Darm, HL Menschliche Leber

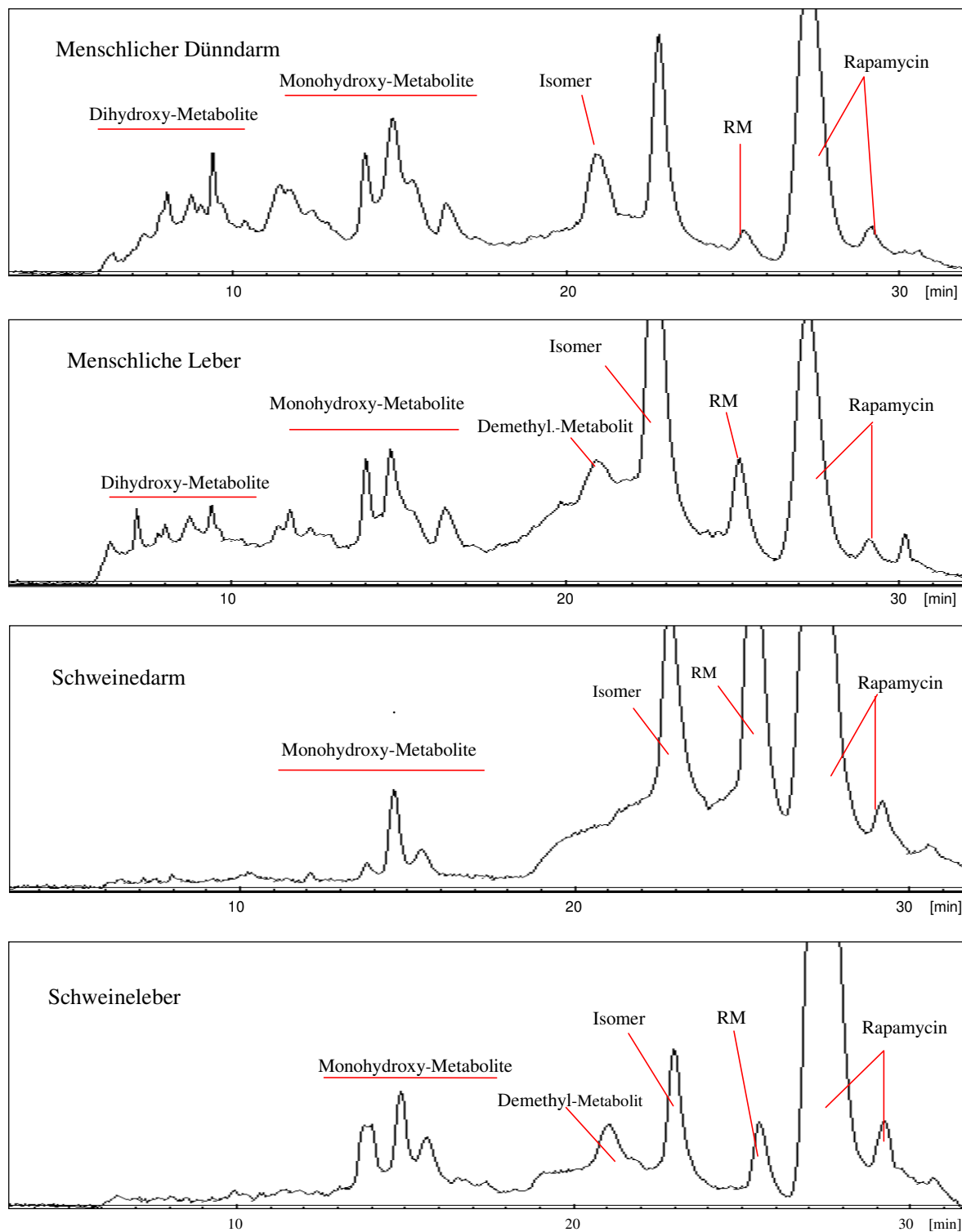


Abb. IV-4 HPLC-UV-Chromatogramme der Rapamycin-Inkubationsansätze mit Mikrosomen aus menschlicher Leber, menschlichem Darm, Schweineleber und Schweinedarm. Bei dem Isomer handelt es sich um das ringgeöffnete Isomer. Die mit „Rapamycin“ gekennzeichneten Peaks stellen jeweils das *trans*- bzw. *cis*-Isomer dar. Die Aufnahme der Chromatogramme erfolgte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 276$ nm.

Als Inkubationskontrollen wurden Versuche mit hitzedenaturierten Mikrosomen und ohne NADPH-generierendes System durchgeführt. Die entsprechenden HPLC-Chromatogramme zeigen jeweils ein intensives Signal für das Rapamycin-Isomer sowie der Ausgangssubstanz Rapamycin. Das Isomer wird demnach ohne NADPH-regenerierendes System gebildet.

1.2. Metabolisierung von SDZ RAD

Die Inkubation von SDZ RAD wurde mit gepoolten menschlichen Lebermikrosomen bei 37°C für 60 min durchgeführt. Als Hauptmetabolite konnten hier, ähnlich dem Rapamycin, hydroxylierte Metabolite sowie das SDZ RAD-Isomer detektiert werden. Der Peak des 39-O-Demethyl-SDZ RAD war im HPLC-Chromatogramm nicht ersichtlich. Der, dem Rapamycin-Metaboliten RM, entsprechende SDZ RAD-Metabolit SM konnte bei gleicher Retentionszeit ($t_R = 26,4$ min) und mit vergleichbarer Konzentration detektiert werden (s. S. 51., Abbildung **IV-20**)

Die Ausgangssubstanz des SDZ RAD bildet, ähnlich dem Rapamycin, zwei isomere Formen. Die Peaks des *trans*- und des *cis*- SDZ RAD – Isomers konnten vollständig getrennt werden und liegen im gleichen Verhältnis wie die Peaks des *trans*- und des *cis*- Rapamycin-Isomeren vor.

1.3. Präparative Inkubation von Rapamycin mit humanen Lebermikrosomen

Da die Rapamycin-Metabolite für weitere analytische Methoden (z.B. NMR-Spektroskopie) in einer Ausbeute von mindestens einigen Milligramm Substanz benötigt wurden, mußte ein *up scaling* der Rapamycin-Inkubationsansätze in den mg-Bereich durchgeführt werden. Dabei blieb das Metabolitenmuster, sowie die Bildungsgeschwindigkeiten der Metabolite relativ zu einander unverändert. Es konnten folgende Metabolite im mg-Maßstab generiert und isoliert werden: Rapamycin-Isomer (1,3 mg) sowie der Rapamycin-Metabolit RM (0,8 mg). Die übrigen, ebenfalls gebildeten Metabolite wurden aufgrund ihrer geringen Bildungsrate nur im Bereich von ca. 90 µg (Demethyl-Rapamycin) bzw. ca. 10 µg (Monohydroxy-Rapamycin) mittels einer präparativen HPLC-Methode isoliert.

1.4. Isomerisierung von Rapamycin

Um die Frage zu klären, ob Metabolite der zweiten Generation aus dem Isomer gebildet werden, mußte das Isomer für Inkubationsversuche generiert werden. Bei der beschriebenen Inkubation (Kapitel III, 4.) von Rapamycin mit hitzedenaturierten menschlichen Lebermikrosomen für 24 Stunden konnte das Rapamycin fast quantitativ (>80%) in sein Isomer überführt (Abbildung IV-5) werden. Versuche die Isomerisierung durch Änderung des pH-Wertes zu induzieren, ergaben nur geringe Ausbeuten an Rapamycin-Isomer.

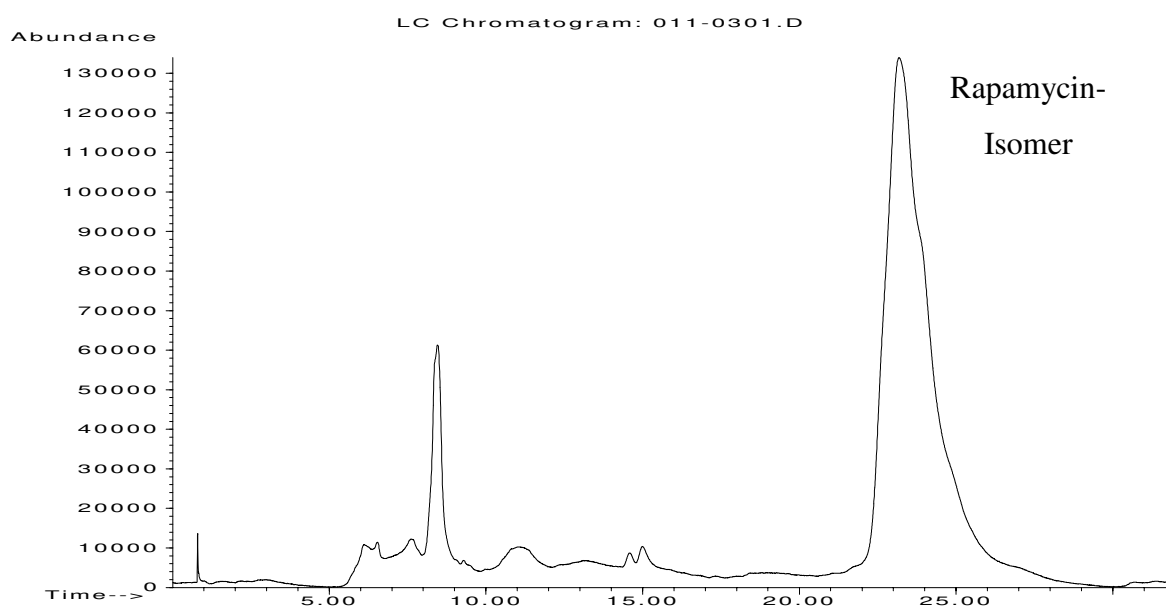


Abb. IV-5 HPLC-Chromatogramm einer analytischen Inkubation von Rapamycin (10 μM) mit hitzedenaturierten menschlichen Lebermikrosomen (15 min., 95°C) für 17 Stunden bei 37°C. Die Retentionszeit ist um 2 min. verschoben, da mit einer automatisierten Fest-Phasen-Extraktion für 5 min statt 3 min gearbeitet wurde.

1.5. Metabolisierung des Rapamycin-Isomeren

Das isolierte Rapamycin-Isomer (10 μM) wurde mit gepoolten menschlichen Lebermikrosomen inkubiert. Dabei zeigte sich, daß der Rapamycin-Metabolit RM aus dem Rapamycin-Isomer gebildet wird. Er stellt somit einen Metabolit der zweiten Generation dar. Daß es sich bei der Bildung dieses Metaboliten um einen NADPH-abhängigen Prozeß handelt zeigt das HPLC-Chromatogramm in Abbildung IV-6. In diesem Chromatogramm ist das Ergebnis einer Inkubation des Rapamycin-Isomers mit Mikrosomen aber ohne NADPH-

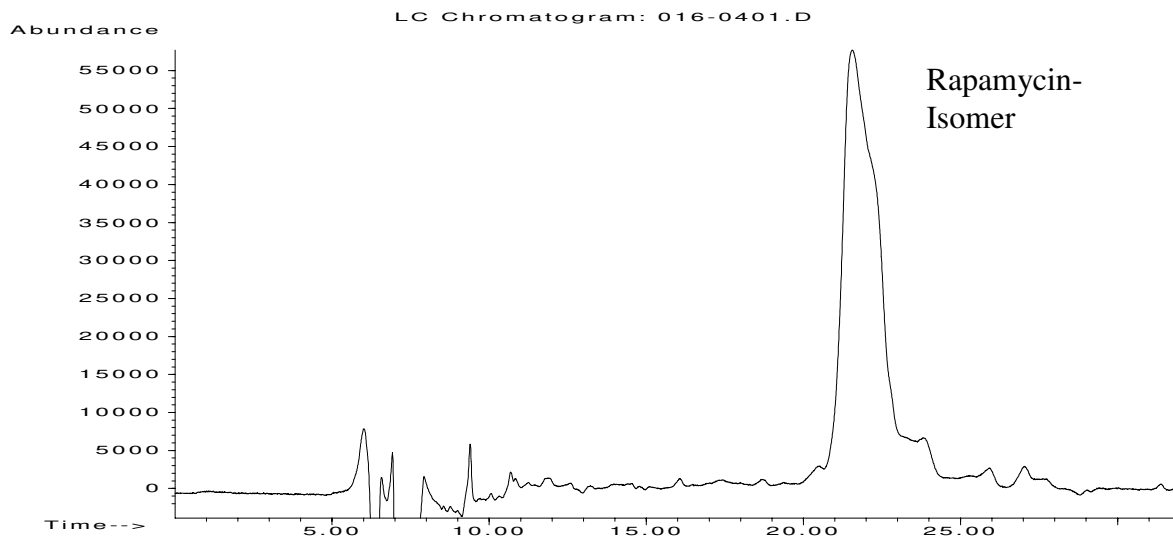


Abb. IV-6 HPLC-Chromatogramm nach einer Inkubation des Rapamycin-Isomers mit Lebermikrosomen ohne NADPH-regenerierendes System.

regenerierendes System dargestellt. Hierbei wird das Rapamycin-Isomer nicht metabolisiert und liegt unverändert vor.

Bei einer Inkubation des Isomers mit Lebermikrosomen in einem Reaktionsansatz mit NADPH-regenerierendem System findet man nach einer Stunde 48% des Metaboliten RM (Abbildung IV-7).

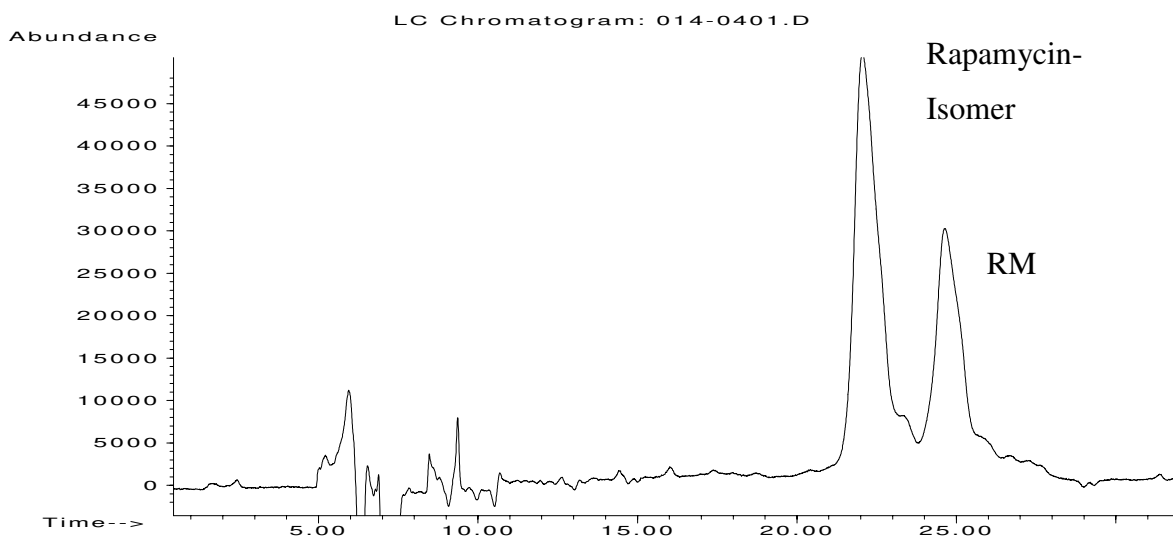


Abb. IV-7 HPLC-Chromatogramm einer Inkubation des Rapamycin-Isomers mit gepoolten menschlichen Lebermikrosomen für 1 Stunde bei 37°C.

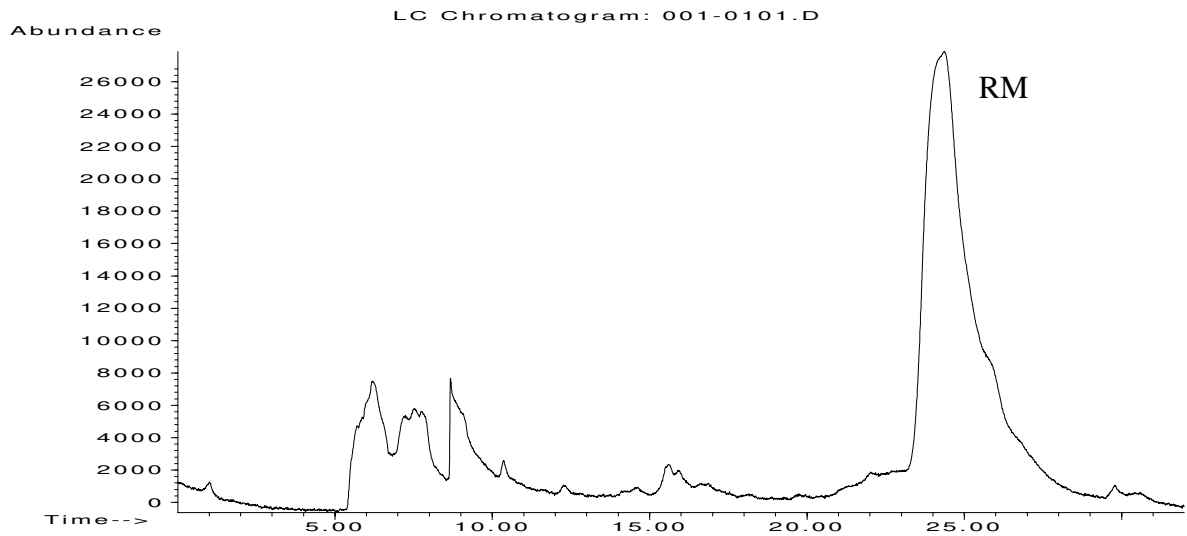


Abb. IV-8 HPLC-Chromatogramm einer Inkubation des Rapamycin-Isomers mit gepoolten menschlichen Lebermikrosomen für 17 Stunden bei 37°C.

Nach einer Inkubationszeit von 17 Stunden unter gleichen Reaktionsbedingungen ist das Rapamycin-Isomer vollständig umgesetzt (Abbildung IV-8).

Nach einer Inkubationszeit von 17 Stunden beginnt die Bildung weiterer, nicht identifizierter Metabolite.

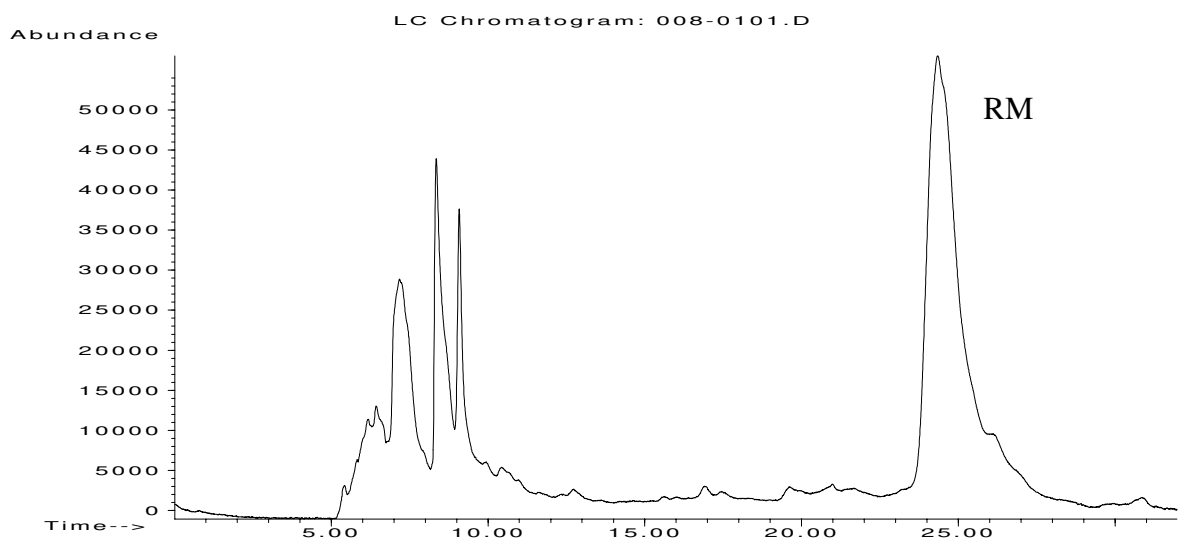


Abb. IV-9 HPLC-Chromatogramm einer Inkubation des Rapamycin-Isomers mit Lebercytosol für 1 Stunde bei 37°C.

Alternativ zu menschlichen Lebermikrosomen ist eine Inkubation des Rapamycin-Isomers mit Lebercytosol möglich. Dies hat den Vorteil, daß bereits nach einer Inkubationszeit von einer Stunde das Isomer nahezu quantitativ zum Rapamycin-Metaboliten RM umgesetzt wurde.

Da die verfügbare Menge an menschlichen Lebermikrosomen begrenzt war, stellte diese Inkubation eine neue Möglichkeit zur Generierung des Metaboliten RM dar. Abbildung IV-9 zeigt das HPLC-Chromatogramm des Rapamycin-Isomers nach Inkubation mit Lebercytosol.

2. Extraktion von Immunsuppressiva aus Inkubationsansätzen und Blutproben

2.1. Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE)

Die Flüssig-Flüssig-Extraktion wurde zur Aufreinigung präparativer Mengen an Rapamycin-Metaboliten aus Inkubationsansätzen sowie aus Blut angewandt. Die Wiederfindungsraten nach Extraktion eines deproteinisierten Inkubationsansatzes (100 ml) sowie von 100 ml deproteinisiertem Blut sind in Abbildung IV-10 dargestellt.

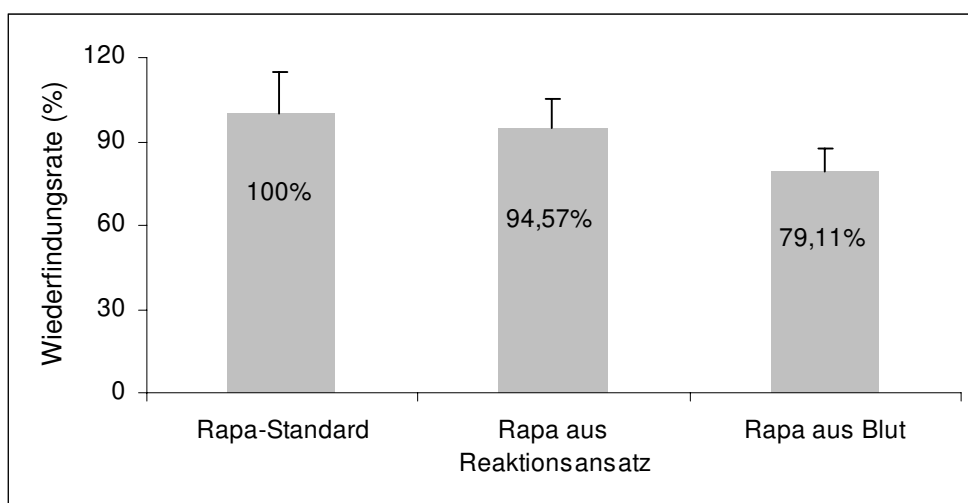


Abb. IV-10 Wiederfindungsrate (% \pm S.D.): von Rapamycin aus Reaktionsansätzen und aus Blut nach Flüssig-Flüssig-Extraktion mit t-Butyl-Methyl-Ether (n=2).

Zur Bestimmung der Wiederfindungsraten wurde der Inkubationsansatz ohne Mikrosomen inkubiert, da in Gegenwart von Proteinen das Rapamycin-Isomer gebildet wird. Dies würde zu einer Verfälschung des Rapamycingehaltes führen. Bei der Extraktion aus Blut liegt die Wiederfindungsrate bei 79,1%, was auf eine mögliche Proteinbindung des Rapamycins hinweist. Da keine Quantifizierung der Metabolite beabsichtigt wurde, ist dieses Phänomen nicht weiter untersucht worden.

2.2. Automatisierte Fest-Phasen-Extraktion (on-line SPE)

Um die deproteinierten analytischen Inkubationsansätze für die HPLC-Analytik zugänglich zu machen, wurde eine automatisierte Fest-Phasen-Extraktion (on-line SPE) entwickelt. Dieses System beinhaltet eine Säulenschaltung, so daß die durch den Autosampler der HPLC-Anlage injizierten Proben in einem Schritt gereinigt, aufkonzentriert und chromatographisch getrennt werden können. Als Injektionsvolumina kamen 10-400 µl eines deproteinierten Inkubationsansatzes zum Einsatz. Dabei wurden über den gesamten Bereich eine optimale Extraktion erhalten und keine Kontaminationen (z.B. endogene Verbindungen) gefunden. Die Wiederfindungsraten für die Hauptmetabolite liegen für die Inkubationsansätze von 100 mmol/l bei >91% und sind in Abbildung IV-11 dargestellt.

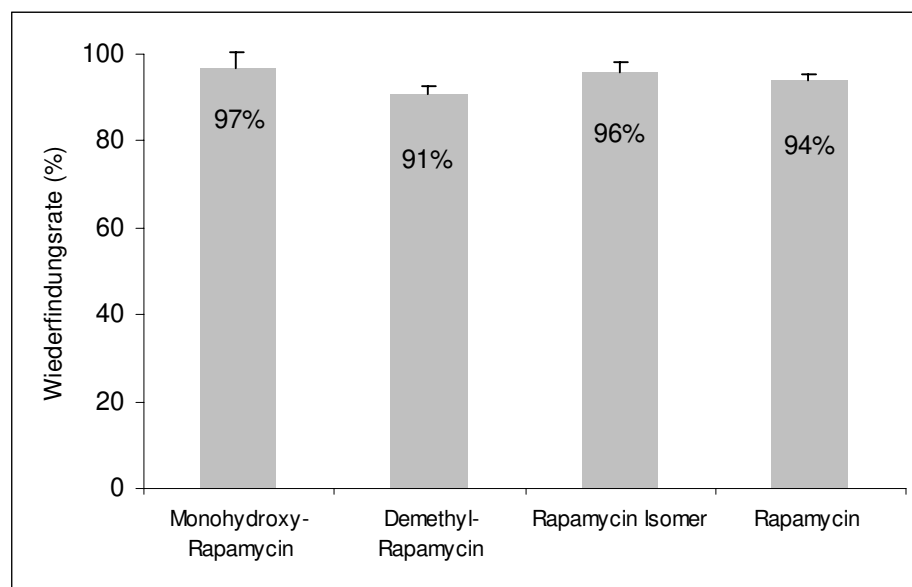


Abb. IV-11 Wiederfindungsrate (%±S.D.) der Rapamycin-Hauptmetabolite aus Inkubationsansätzen nach on-line SPE-HPLC (n=5).

Als Säulenmaterial für die Extraktionskartusche konnte, mit gleichbleibenden Extraktions- und chromatographischen Trennergebnissen, Hypersil®-Material anstelle des kostenintensiveren Nucleosil®-Materials verwendet werden.

3. HPLC-Analytik der Makrolid-Immunsuppressiva

Die Methode der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) ist vom submikroanalytischen bis in den präparativen Bereich anwendbar, so daß sie ein breites Anwendungsgebiet findet. Je nach verwendetem Detektor ist es weiterhin möglich, außer der

Retentionszeit und der Peakfläche, auch noch ein UV-Spektrum der getrennten Komponenten zu erhalten. Dies ist bei Verwendung eines Diodenarray-Detektors möglich. Für qualitative Analysen von Komponenten eines Gemisches, welche wie die untersuchten Makrolid-Immunsuppressiva, ein Absorptionsmaximum im UV-Bereich haben, ist die Verwendung eines einfachen UV-Detektors ausreichend.

3.1. Stabilitätsuntersuchungen an Rapamycin

Für die Entwicklung einer HPLC-Methode zur Trennung und Isolierung von Rapamycin-Metaboliten, mußte die Frage der Stabilität von Rapamycin in verschiedenen Solventien geklärt werden. Es wurden Rapamycin-Proben ($70\ \mu\text{M}$) in verschiedenen Solventien (organische Lösungsmittel und Pufferlösungen mit unterschiedlichen pH-Wert) hergestellt und der Rapamycin-Gehalt, ausgedrückt in Absorptionen *versus* Zeit, mittels HPLC bestimmt.

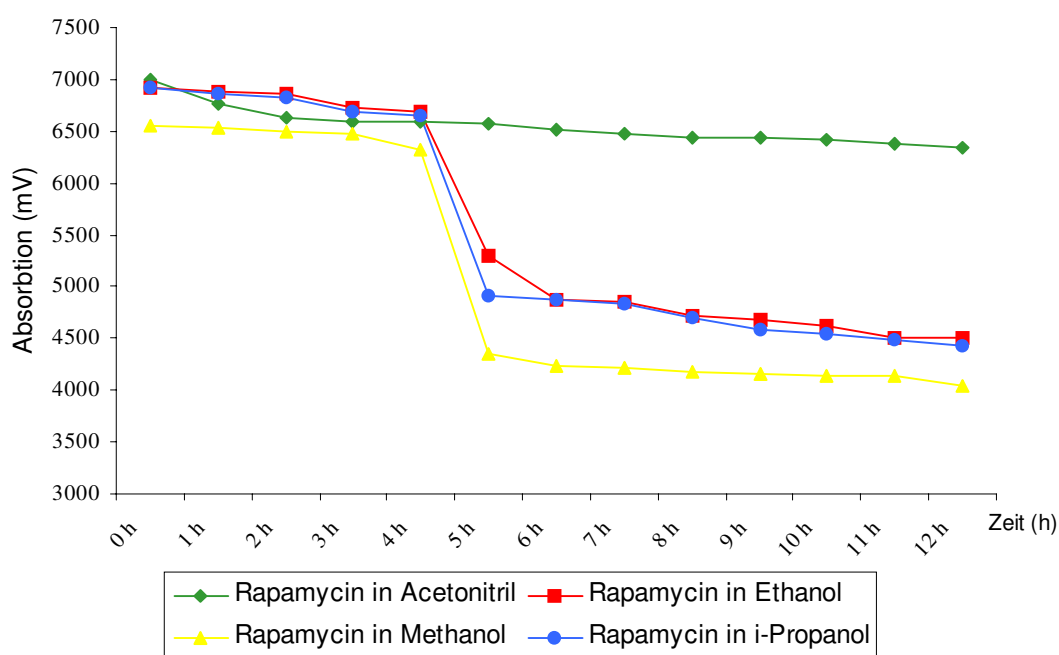


Abb. IV-12 Stabilität von Rapamycin ($70\ \mu\text{M}$) in organischen Lösungsmitteln: Acetonitril, Ethanol, Methanol und iso-Propanol.

In den Abbildungen **IV-(12-14)** sind die Stabilitäten von Rapamycin in organischen Lösungsmitteln und in Pufferlösungen mit verschiedenen pH-Werten dargestellt.

Als organische Komponente im Elutionsgemisch bietet sich Acetonitril an, da Rapamycin über 8 Stunden in diesem Solvent unverändert vorliegt. Im Gegensatz dazu findet man bei

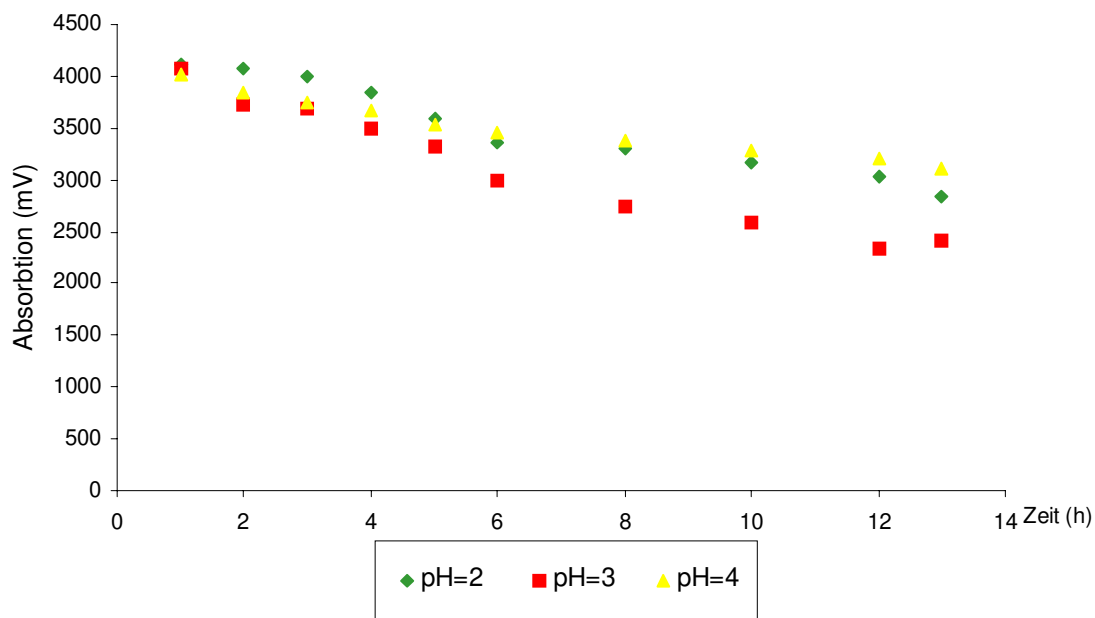


Abb. IV-13 Stabilität von Rapamycin (70 µM) in aciden Pufferlösungen: pH=2 – pH=4 eingestellt mit HCOOH.

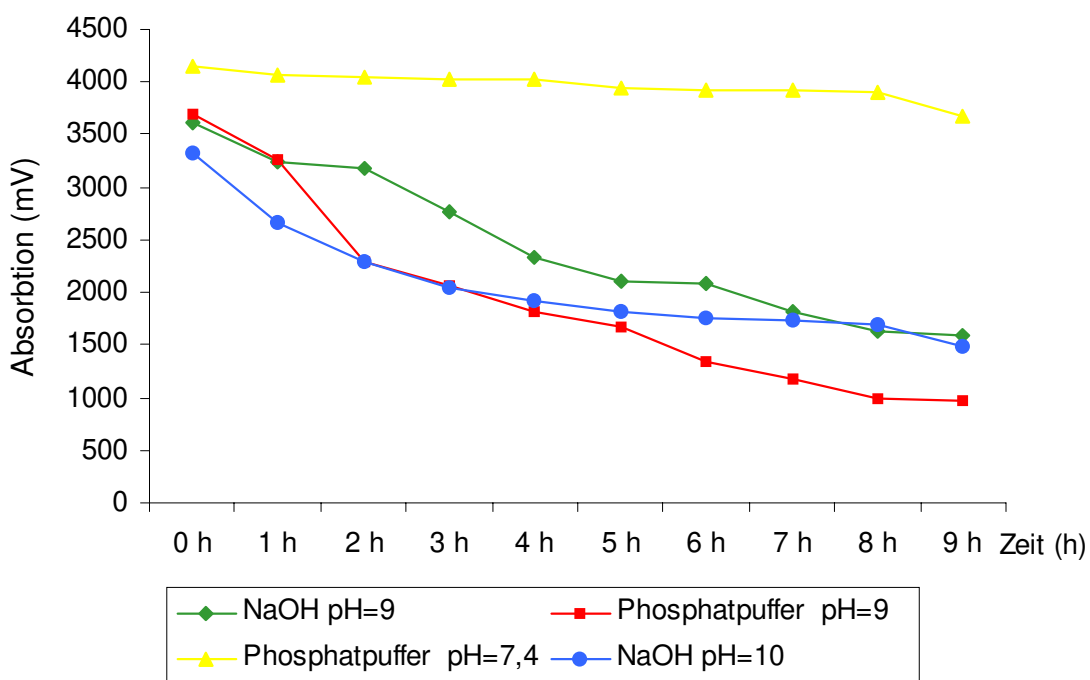


Abb. IV-14 Stabilität von Rapamycin (70 µM) in alkalischen Pufferlösungen, eingestellt mit Natronlauge und Phosphatpuffer.

Methanol schon innerhalb einer Stunde ein Nebenprodukt. Dieses Nebenprodukt wurde massenspektrometrisch untersucht und weist auf einen Methylester des ring-geöffneten Rapamycin-Isomers hin. In Ethanol und iso-Propanol konnte eine Veresterung nicht nachgewiesen werden, auch wenn hier ebenfalls eine Abnahme der Rapamycin-Konzentration vorlag.

Rapamycin ist wie in der Literatur (Findlay et al. 1980, Morris 1992) beschrieben in aciden und basischen Puffern instabil. Ausnahme bildet der physiologische Phosphatpuffer pH=7,4, in welchen Rapamycin über einen Zeitraum von 8 Stunden stabil ist.

3.2. HPLC-Analytik von Rapamycin

Nachdem Rapamycin-Metabolite durch *in vitro* Inkubationen mit gepoolten menschlichen Lebermikrosomen generiert und durch Extraktion aufgereinigt sowie -konzentriert worden sind, wurde eine analytische HPLC-Methode entwickelt. Dazu wurden verschiedene chromatographische Parameter, wie Eluenten-Zusammensetzung, Gradientenprofil, Flußrate und Säulenparameter, getestet.

Da die Trennsäule das Kernstück jeder chromatographischen Trennung darstellt, wurde eine Vielzahl von verschiedenen Trägermaterialien auf ihre Eignung untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle IV-1 aufgelistet. Für eine optimale Trennung kam nur eine RP-

Säulename	Säulenmaterial	Trennergebnis
Hypersil [®]	C ₁₈ -modifiziertes Kieselgel ODS, 5 µm, 120 Å	mittel
Inertsil [®] ODS-3	C ₁₈ -modifiziertes Kieselgel ODS, 5 µm, 100 Å	schlecht
Supersphere [®] 100RP1 8	C ₁₈ -modifiziertes Kieselgel PR 18, 4 µm, 100 Å	schlecht
Nucleosil [®] 100	C ₁₈ -modifiziertes Kieselgel C 18, 5 µm, 100 Å	mittel
Nucleosil [®] 100	C ₁₈ -modifiziertes Kieselgel C 18, 3 µm, 100 Å	sehr gut

Tab. IV-1 Vergleich der verschiedenen Säulenmaterialien in Bezug auf die chromatographische Trennung von Inkubationsproben nach automatisierter Fest-Phasen-Extraktion

C18-Säule gefüllt mit 3 μm Nucleosil-Material und einem Porendurchmesser von 100 \AA in Frage.

Die Verwendung von größeren Teilchen an Säulenmaterial erweist sich für den Druck innerhalb der HPLC als günstiger, die Trennleistung wird jedoch schlechter. Da die Trennung von Konstitutionsisomeren mit einer nahezu gleichen Polarität als Aufgabe stand, wurden für weitere Untersuchungen Nucleosil[®]-Säulen mit einem Füllmaterial von 3 μm und einer Dimension von 250 x 4 mm I.D. eingesetzt. Alle Säulen gehörten zur Gruppe der *reversed phase* Säulen und waren mit einem modifizierten Kieselgel gefüllt.

Für eine optimale Trennung ist außerdem das Eluentensystem von entscheidender Bedeutung. Deshalb wurden folgende Systeme an einer Nucleosil[®]-Säule RP18, 3 μm , 100 \AA getestet: Acetonitril / Wasser pH=7, Acetonitril / Wasser pH=3, Methanol / Wasser pH=7, Acetonitril / iso-Propanol / Wasser pH=7. Ein Eluentensystem aus Acetonitril / Wasser pH=3 führte hierbei zu einem optimalen Trennergebniss. Durch den Einsatz eines aciden Eluenten pH=3 konnte die übliche Peakverbreiterung bei längeren Retentionszeiten gemindert werden. Das im Gegensatz zu Acetonitril ungiftigere Methanol eignete sich nicht als Elutionsmittel, da die Retentionszeiten unökonomisch lang und die Peakformen sehr breit wurden. Darüber hinaus macht die beschriebene Instabilität von Rapamycin in Methanol dieses Lösungsmittel als Eluent ungeeignet (vgl. 3.1).

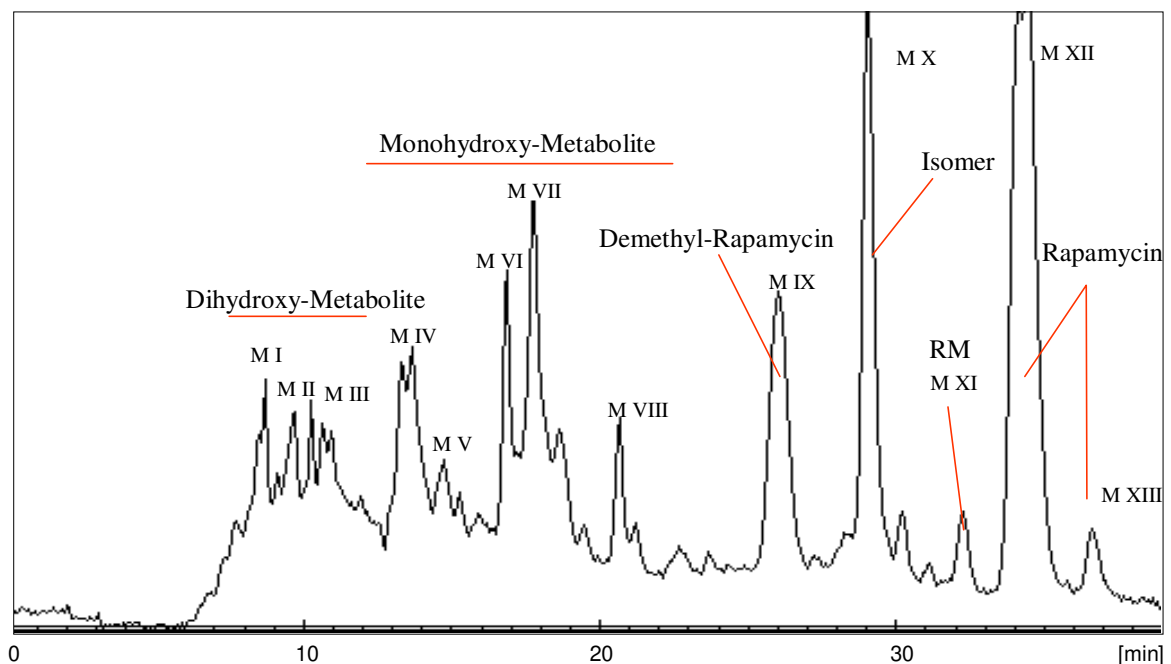


Abb. IV-15 HPLC-Chromatogramm einer Rapamycin Inkubation mit menschlichen Lebermikrosomen nach on-line SPE (5 min.). Das Chromatogramm wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda = 276 \text{ nm}$ mit range 0,005 aufgenommen.

Es wurde folgender Elutionsgradient entwickelt: 0-3 min. 58% Acetonitril, 25 min. 65% Acetonitril, 30 min. 80% Acetonitril und 40 min. 90% Acetonitril. Anschließend wurde die Säule, vor der Rekonditionierung, noch 5 min. bei 95% Acetonitril gespült. In Abbildung **IV-15** ist ein HPLC-Chromatogramm nach on-line SPE für einen Inkubationsansatz von Rapamycin mit menschlichen Lebermikrosomen dargestellt. Eine vollständige Trennung wurde bei folgenden Metaboliten erreicht: Monohydroxy-Metabolit (V), beim Demethyl-Rapamycin (IX), dem Rapamycin-Isomer (X), bei RM (XI) und Rapamycin (XII und XIII). Die Dihydroxy – sowie weitere Monohydroxy-Metabolite konnten getrennt werden. Die Zuordnung der Metabolite erfolgte über die Retentionszeiten sowie Daten aus der Massenspektrometrie (vgl. 4.1.2.). Eine Isolierung der 13 Komponenten einer Rapamycin-Inkubation ist mit dieser HPLC-Methode nun möglich.

Um die Trennung der hydroxylierten Metabolite zu verbessern, wurde eine Änderung der Säulentemperatur (Raumtemperatur bis 70°C) in Betracht gezogen. Diesbezügliche Versuche zeigten jedoch keine spezifischen Trenneffekte. Für reproduzierbare Chromatogramme sollte die Säule immer gleichmäßig beheizt sein, da sonst starke Schwankungen bei den Retentionszeiten auftreten. Als optimal erwies sich die in der Literatur vorgeschlagene Temperatur von 40°C (Aced and Möckel 1991).

Die Retentionszeiten sind sehr gut reproduzierbar und weisen eine Abweichung von maximal $t_R = 0,11$ min. für Rapamycin auf. In Tabelle **IV-2** sind die durchschnittlichen Retentionszeiten und die Standardabweichung der Hauptmetabolite dargestellt.

Komponente	Retentionszeit [min] ± S.D.
Monohydroxy-Metabolit M IV	14,7 ± 0,34
Demethyl-Metabolit M IX	20,8 ± 0,06
Rapamycin-Isomer M X	22,6 ± 0,09
Rapamycin-Metabolite RM M XI	25,1 ± 0,09
Rapamycin M XII	27,1 ± 0,11

Tab. IV-2 Retentionszeiten der Hauptmetabolite nach Inkubation von Rapamycin mit menschlichen Lebermikrosomen und anschließender on-line SPE (3 min.) (n=5).

Als Detektor wurde bei der entwickelten HPLC-Methode ein UV-Detektor mit einer Deuterium-Lampe als Lichtquelle eingesetzt. Um die UV-Spektren der einzelnen Metabolite aufnehmen zu können, wurde diese Methode auf eine HPLC-Anlage mit einem Diodenarray-

Detektor übertragen. Die UV-Spektren von Rapamycin-Metaboliten zeigen alle die charakteristische dreizackige Form mit einem Absorptionsmaximum bei 276 nm. Dies weist bei allen Metaboliten darauf hin, daß auch nach der Biotransformation das Triensystem zwischen C-17 bis C-22 noch intakt ist. In Abbildung **IV-16** sind exemplarisch die UV-Spektren von Rapamycin, dem Rapamycin-Isomer sowie dem Rapamycin-Metabolit RM zusehen.

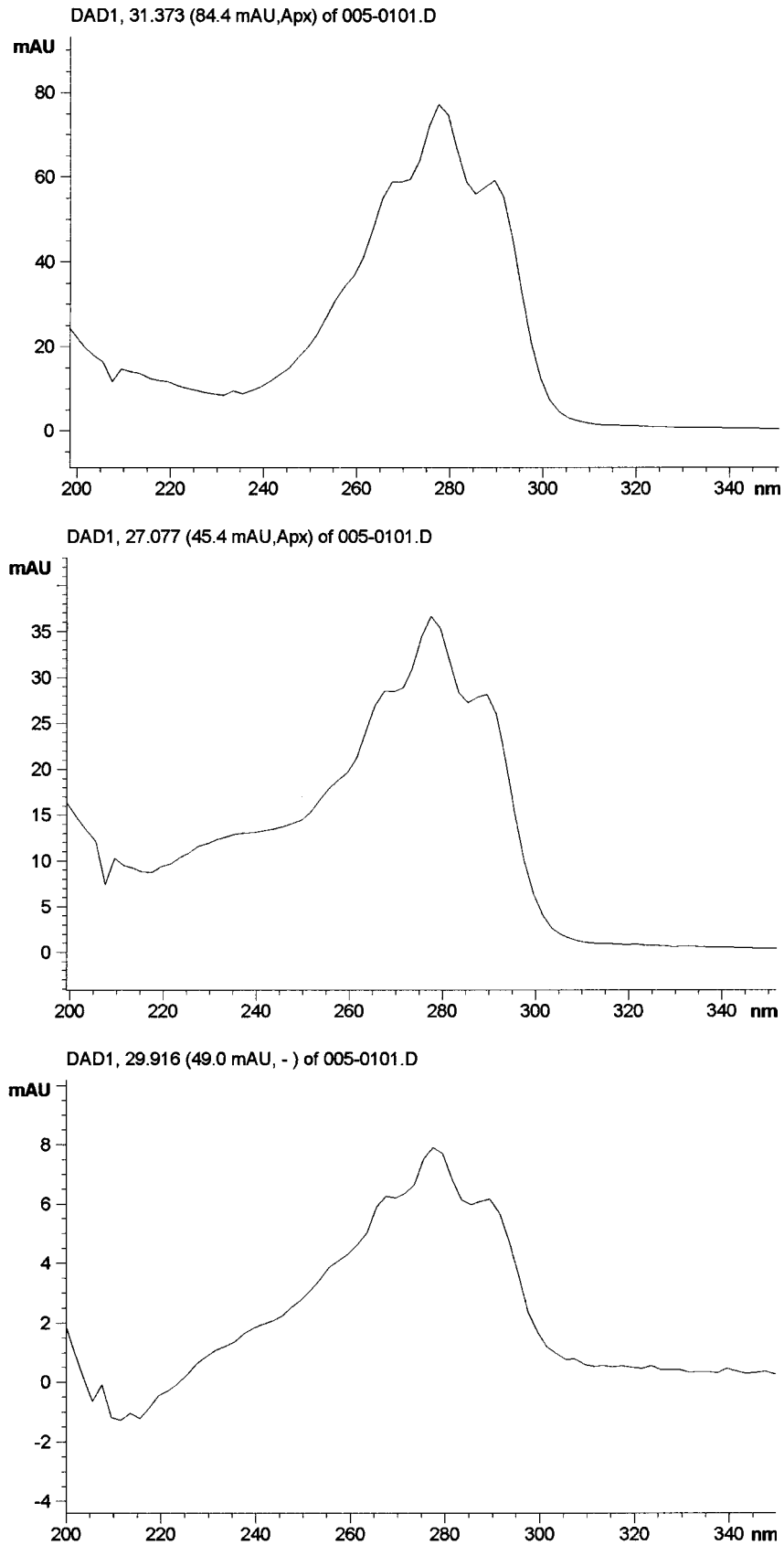


Abb. IV-16 UV-Spektren von Rapamycin (oben), Rapamycin-Isomer (mitte) und von Rapamycin Metabolit RM (unten).

3.3. HPLC-Analytik zur Isolierung von Rapamycin-Metaboliten

Wie zuvor schon erwähnt, ist die Gewinnung von Rapamycin-Metaboliten im semi-präparativen Maßstab für weiterführende analytische Untersuchungen, wie z.B.: NMR-Spektroskopie, unerlässlich. Zur Trennung von größeren Substanzmengen gibt es prinzipiell zwei Möglichkeiten: 1. eine Maßstabsvergrößerung der analytischen Apparatur und 2. die Überladung der analytischen Trennsäule. Im Falle der Maßstabsvergrößerung wird bei gleicher Säulenlänge der Säulenquerschnitt proportional zur aufgegebenen Probenmenge vergrößert. Entsprechend wird der Fluß und das Dosiervolumen angepaßt. Wird mit einer stationären Phase der gleichen Korngröße wie bei der analytischen Säule gearbeitet, bleibt die Trennleistung gleich. Die Überladung der analytischen Säule wurde nicht praktiziert, da eine Trennung der Konstitutionsisomeren in diesem Fall nicht mehr möglich wäre.

Es wurde eine Säule mit einer Dimension von 250 x 20 mm I.D., gefüllt mit dem gleichen Säulenmaterial (Nucleosil[®] RP18, 3µm, 100 Å, ebenfalls gleiche Charge) wie bei der analytischen Trennung, verwendet. Bei einer solchen Erhöhung des Säulenquerschnitts (Faktor 25) besteht die Möglichkeit, das gleiche Trennergebnis für die 25-fache Menge Analyt zu erhalten. Da die apparativen Parameter der HPLC-Anlage eine solche direkte Maßstabsvergrößerung nicht zuließen, mußten Kompromisse eingegangen werden.

So konnten die Pumpen nur einen Fluß von 5,0 ml/min realisieren, da sonst der Rückdruck über dem für das Gerät maximal möglichen Wert lag. Auch die Probenaufgabe war durch den Einsatz des automatischen Probengebers begrenzt, dadurch konnte nur ein Volumen von 5 ml injiziert werden.

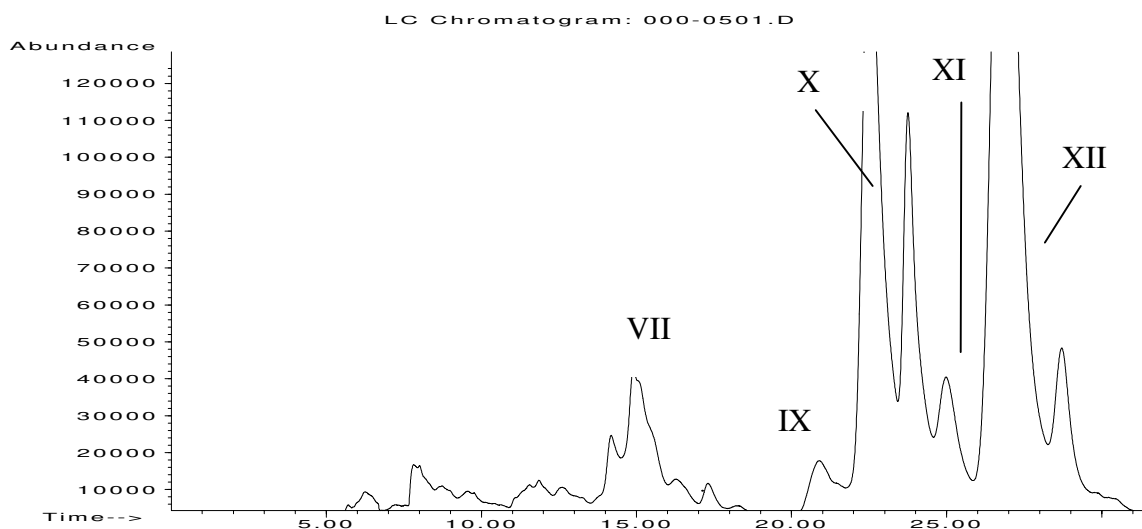


Abb. IV-17 HPLC-Chromatogramm einer präparativen Inkubation von Rapamycin mit menschlichen Lebermikrosomen nach Flüssig-Flüssig-Extraktion mit t-BME. Säule: Nucleosil[®] 3 µm, 100 Å, 250 x 20 I.D.

Als Elutionsprofil wurde folgender Gradient verwendet: 0 min. 60% Acetonitril, 50 min. 72% Acetonitril, 60 min. 72% Acetonitril, 61 min. 95% Acetonitril. Anschließend wurde die Säule für 4 min. bei 95% Acetonitril gespült.

In Abbildung IV-17 ist das HPLC-Chromatogramm eines präparativen Inkubationsansatzes von Rapamycin mit menschlichen Lebermikrosomen dargestellt.

Für die Gewinnung von präparativen Mengen des Rapamycin-Isomeren sowie des Rapamycin-Metaboliten RM wurde eine modifizierte präparative HPLC-Methode angewendet. Die chromatographischen Parameter blieben konstant, lediglich der Elutionsgradient wurde so verändert, daß die Retentionszeit der zu isolierenden Substanzen zwischen 20 min und 30 min lag.

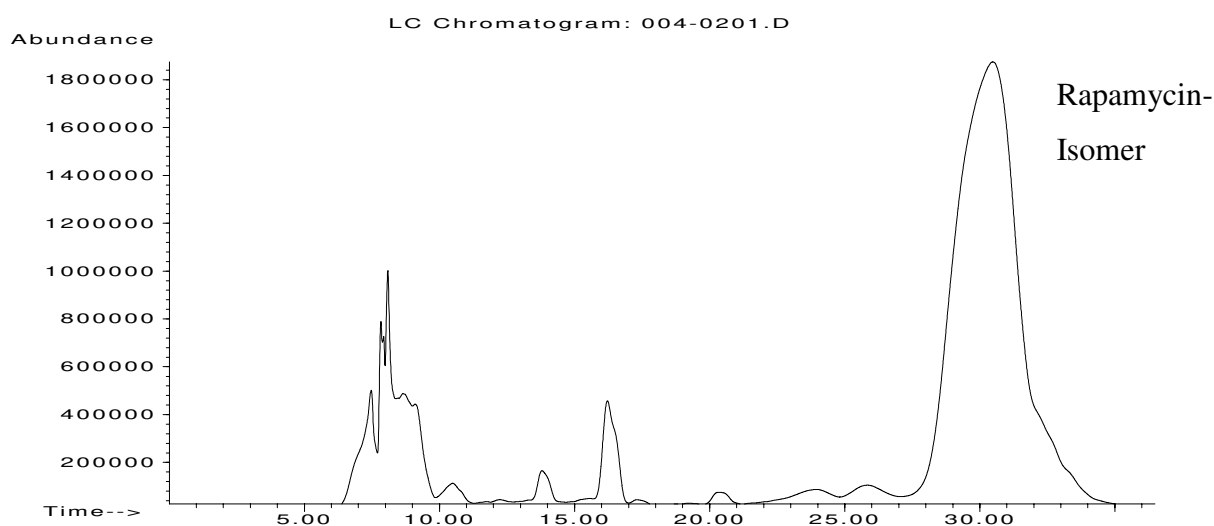


Abb. IV-18 Chromatogramm einer präparativen HPLC-Analytik zur Isolierung des Rapamycin-Isomers nach Inkubation von 20 mg Rapamycin mit 110 ml hitzedenaturierten Lebermikrosomen für 26 Stunden bei 37°C. Säule: Nucleosil® 3 µm, 100 Å, 250 x 20 I.D. Gradient: 0 min. 63% Acetonitril, 10 min. 70% Acetonitril, 45 min. 95% Acetonitril.

Es konnten 2,5 mg des Rapamycin-Isomers sowie 2,3 mg des Rapamycin-Metaboliten RM isoliert werden. In Abbildung IV-18 und IV-19 sind die entsprechenden Chromatogramme dargestellt. Die Reinheit der isolierten Komponenten wurde mittels Massenspektrometrie überprüft.

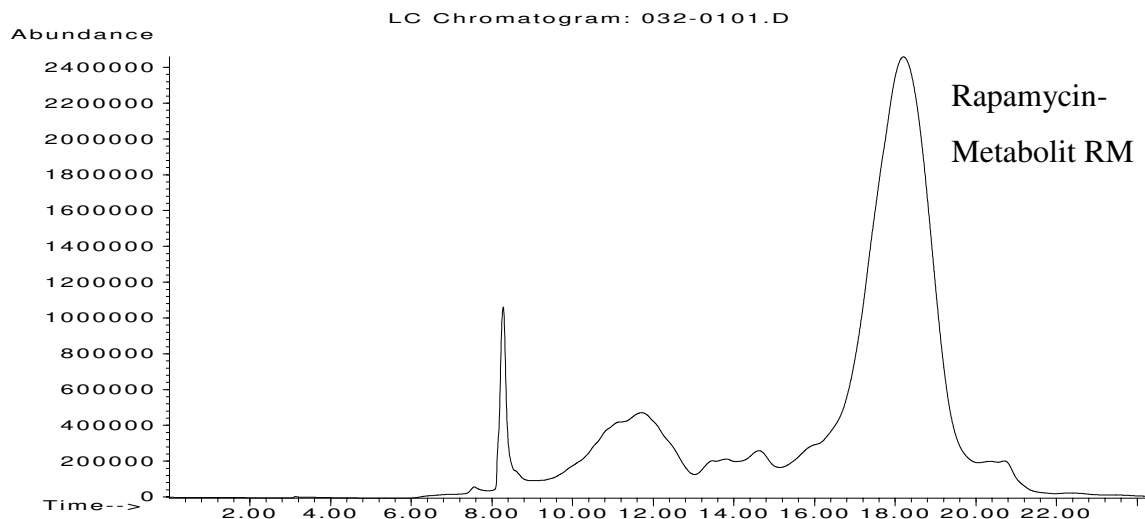


Abb. IV-19 Chromatogramm einer präparativen HPLC-Analytik zur Isolierung des Rapamycin-Metaboliten nach Inkubation des Rapamycin-Isomers mit Lebermikrosomen für 2,5 Stunden bei 37°C. Säule: Nucleosil® 3 µm, 100 Å, 250 x 20 I.D. Gradient: 0 min. 70% Acetonitril, 10 min. 80% Acetonitril, 25 min. 95% Acetonitril.

3.4. HPLC-Analytik von SDZ RAD

Nach Inkubation des SDZ RAD mit menschlichen Lebermikrosomen und anschließender on-line-SPE wurde das Metabolitengemisch der chromatographischen Trennung zugeführt. Die

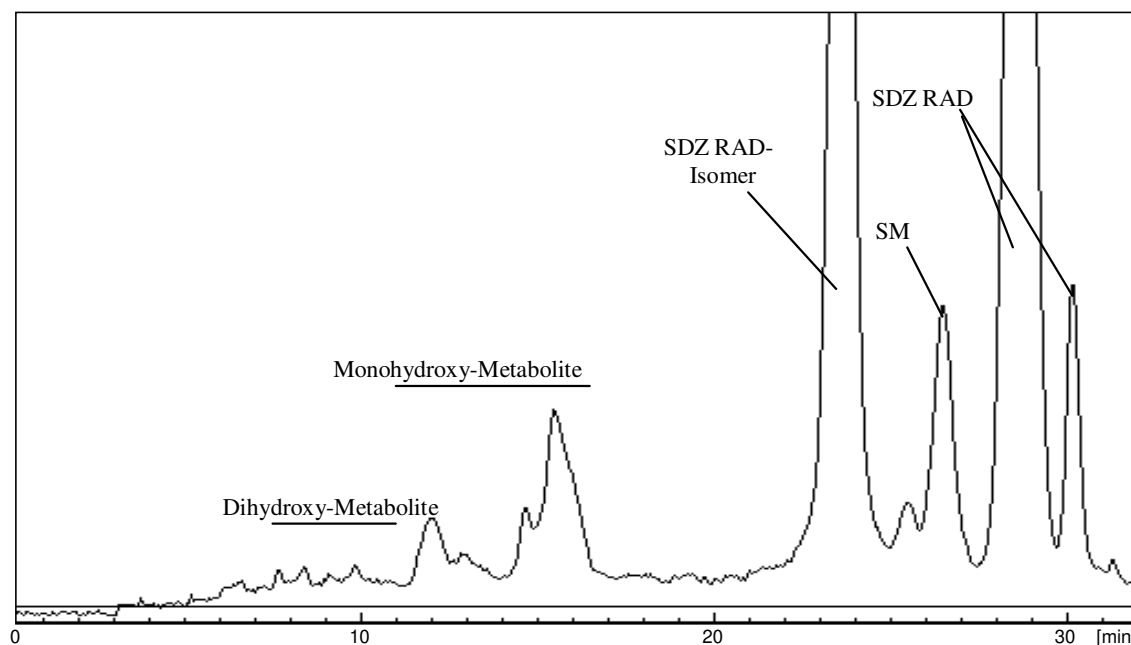


Abb. IV-20 HPLC-Chromatogramm einer SDZ RAD Inkubation mit menschlichen Lebermikrosomen nach on-line SPE (3 min.). Der Metabolite SM entspricht dem Rapamycin-Metaboliten RM. Das Chromatogramm wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda = 276$ nm mit range 0,005 aufgenommen.

apparativen Parameter, wie Fluß, Wellenlänge etc., sowie die Säulenparameter konnten von der analytischen HPLC-Methode für Rapamycin übernommen werden. In Abbildung **IV-20** ist ein Chromatogramm zur Trennung von SDZ RAD – Metaboliten dargestellt.

Es konnten die dihydroxylierten und monohydroxylierten Metabolite getrennt werden. Die Dihydroxy-Metabolite liegen jedoch unterhalb der Integrationsgrenze. Eine qualitative Zuordnung ist dennoch möglich. Für das SDZ RAD-Isomer, der Metabolit SM sowie das *trans* und *cis* SDZ RAD gelang eine Basislinientrennung. Damit ist das Elutionsverhalten, wie zu erwarten, dem des Rapamycin vergleichbar.

Die Zuordnung der Peaks erfolgte über die Retentionszeit sowie über massenspektrometrisch gewonnene Daten.

4. Massenspektrometrische Analytik der Makrolid-Immunsuppressiva

4.1. LC-ESI-MS-Analytik

Die Zuordnung der in HPLC-Chromatogramme gefundenen Peaks bezüglich ihrer Molekularmasse erfolgte über eine Kopplung der HPLC mit einem Electrospray-Interface-Massenspektrometer. Es konnten keine protonierten Molekülonen detektiert werden. Statt dessen bildete Rapamycin wie auch dessen Metabolite hauptsächlich Natrium-Addukte $[M+Na]^+$ und in geringerem Maße Kalium-Addukte $[M+K]^+$. Für SDZ RAD war eine ähnliche Bildung der Addukte zu beobachten.

4.1.1. Stabilitätsuntersuchungen von Rapamycin in Blut

Um die Stabilität von Rapamycin in Blut zu überprüfen wurden 1,0 ml-Proben mit 500 ng/ml Rapamycin hergestellt. 500 µl der deproteinierten Proben wurden über die HPLC in das Interface des Massenspektrometers überführt und der Rapamycin-Gehalt bestimmt.

Zur Empfindlichkeitssteigerung des Massenspektrometers wurden die Messungen im SIM-Modus (m/z 936.5) durchgeführt. Die Konzentration des Rapamycins wurde anhand der Peakfläche des Natrium-Addukts von Rapamycin $[M+Na]^+$ bestimmt. In Abbildung **IV-21** sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen dargestellt.

Der Rapamycin-Gehalt wird schon innerhalb von drei Stunden auf ca. 50% reduziert. Es sind dabei keine Unterschiede bezüglich der Proben temperatur festzustellen.

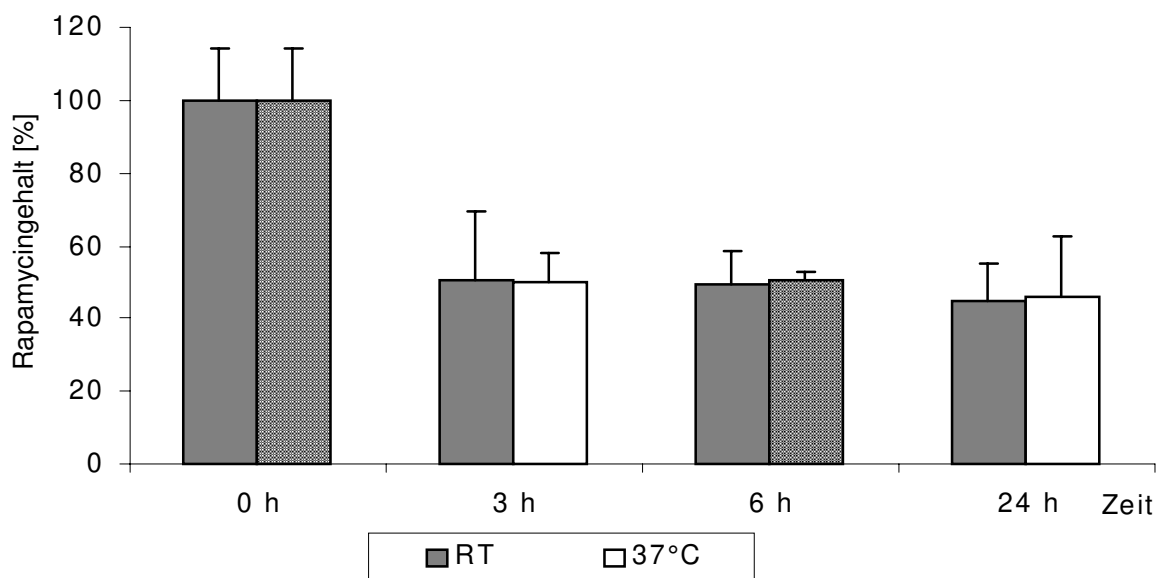


Abb. IV-21 Stabilitätsuntersuchung von Rapamycin (500 ng/ml) in Blut bei Raumtemperatur (RT) und bei 37°C durchgeführt mittels HPLC-ESI-MS-Analytik. Dargestellt sind die Mittelwerte in % \pm Standardabweichung in % (n=3)

4.1.2. LC-ESI-MS-Analytik von Rapamycin und seinen Metaboliten

Durch die Kopplung der HPLC mit einem Electrospray-Interface-Massenspektrometer (ESI-MS) konnten alle im HPLC Chromatogramm detektierten Peaks bezüglich ihrer Molekularmasse zugeordnet werden. Um die Empfindlichkeit zu steigern wurde das MS-Spektrum im SIM-Modus aufgenommen. Dabei wurden folgende Ionen fokussiert: m/z 968.5 (Dihydroxy-Rapamycin), m/z 952.5 (Monohydroxy-Rapamycin), m/z 938.5 (Rapamycin-Metabolite RM), m/z 936.5 (Rapamycin und Rapamycin-Isomer) und m/z 922.5 (Demethyl-Rapamycin). Um andere Transformationsprodukte auszuschließen, wurden diese Spektren im Scan-Modus überprüft. In Abbildung IV-22 ist das LC-ESI-MS-Chromatogramm von Rapamycin nach Inkubation mit menschlichen Lebermikrosomen dargestellt. In den

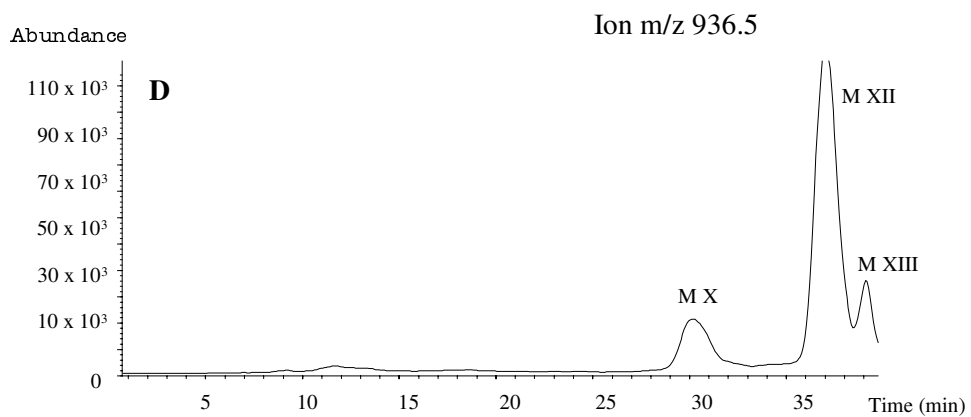
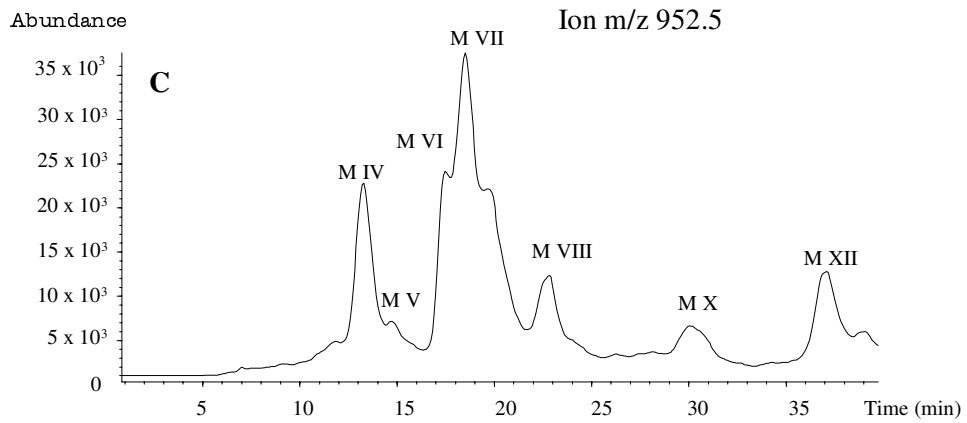
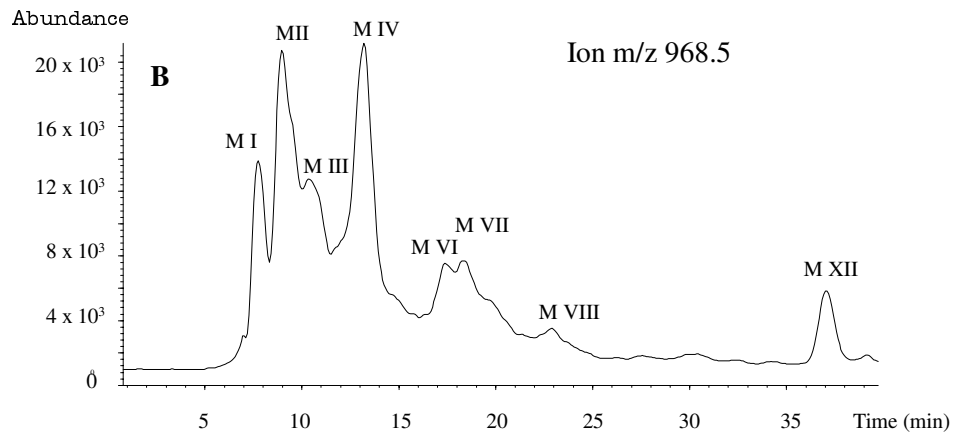
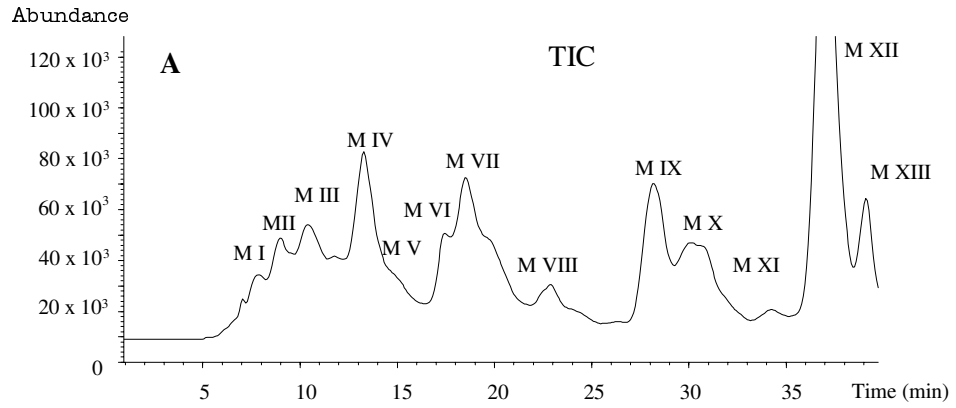


Abb. IV-22 LC-ESI-MS-Chromatogramm von Rapamycin nach Inkubation mit menschlichen Lebermikrosomen, aufgenommen im SIM-Modus: A Totalionenstrom (TIC), B Ionenspur m/z 952.5, C Ionenspur m/z 968.5, D Ionenspur m/z 936.5,

extrahierten Ionenspuren sind Natrium-Addukte $[M+Na]^+$ wie auch Kalium-Addukte $[M+K]^+$ abgebildet, da die Massenzahlen der Kalium-Addukte $[M+K]^+$ denen der Natrium-Addukte $[M+Na]^+$ hydroxylierter Metabolite entsprechen. So sind in der Ionenspur m/z 952.5 die Peaks M IV – M VIII die Natrium-Addukte der monohydroxylierten Metabolite, während M X und M XII die Kalium-Addukte des Rapamycin-Isomers bzw. Rapamycin sind. Der Rapamycin-Metabolite RM (M XI) weist eine Molekularmasse $[M+Na]^+$ m/z 938.5 und damit eine Massendifferenz zur Ausgangsverbindung von 2 amu auf.

4.1.3. LC-ESI-MS-Analytik von Rapamycin und seinen Metaboliten in Blutproben

Blutproben, die nach Extraktion ebenfalls mit LC-ESI-MS untersucht worden sind, zeigen ein ähnliches Metabolitenmuster wie das aus *in vitro* Inkubationen erhaltene Muster. Es konnte das Rapamycin-Isomer (M X), das Demethyl-Rapamycin (M IX) und ein Monohydroxy-Rapamycin (M VI) nachgewiesen werden. Das LC-ESI-MS-Chromatogramm ist in Abbildung IV-23 A dargestellt. Die Abbildungen IV-23 B und C zeigen die extrahierten Ionenspuren des Monohydroxy-Rapamycins $[M+Na]^+$ m/z 952.5 sowie des Rapamycins und Rapamycin-Isomeren $[M+Na]^+$ m/z 936.5.

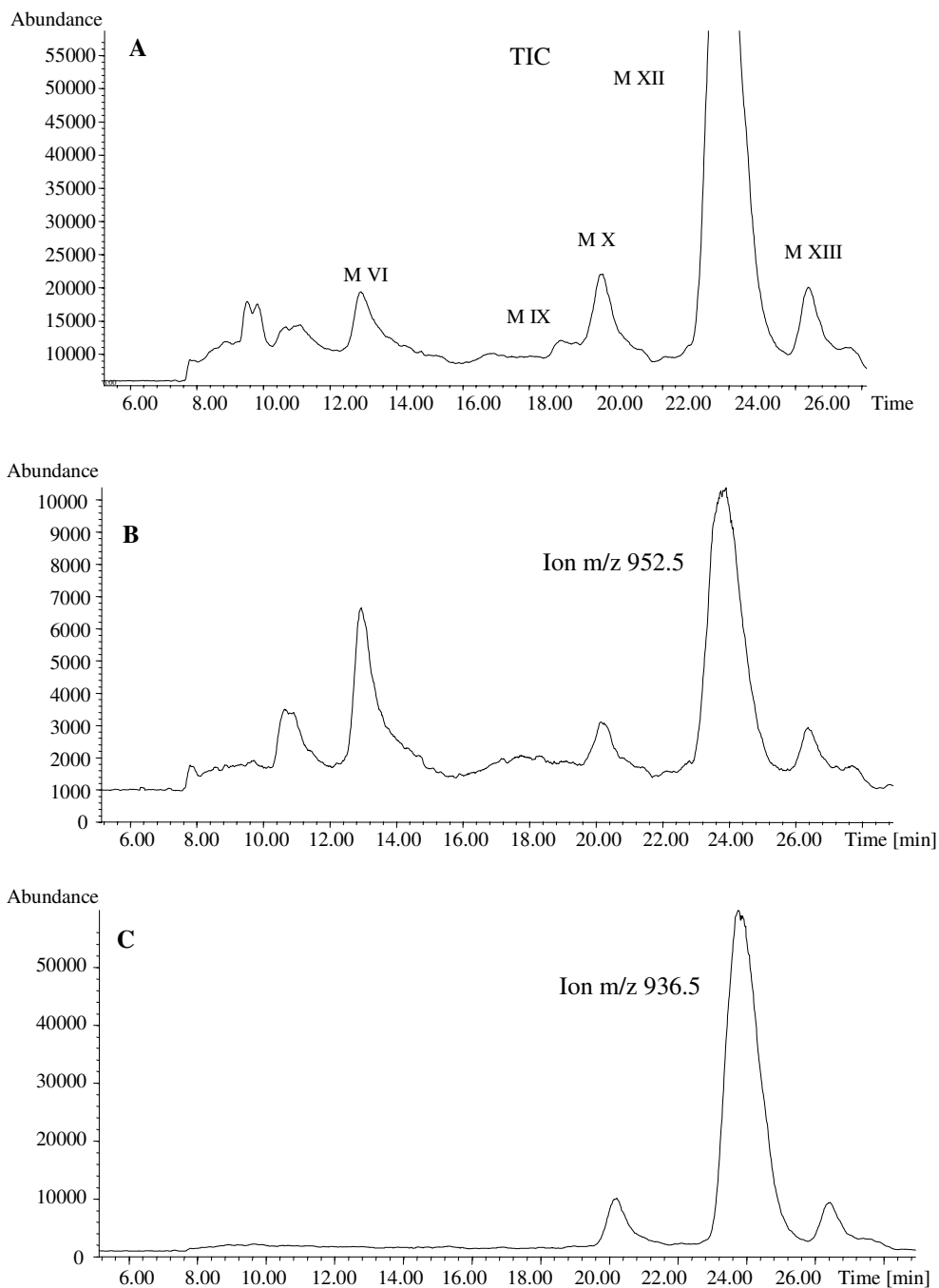


Abb. IV-23 LC-ESI-MS-Chromatogramm mit extrahierten Ionenspuren von Rapamycin und seinen Metaboliten aus 100 ml Blut, aufgenommen im SIM-Modus: A Totalionenstrom (TIC), B Ionenspur m/z 952.5, C Ionenspur m/z 936.5

4.1.4. LC-ESI-MS-Analytik von SDZ RAD und seinen Metaboliten

Zur Charakterisierung der SDZ RAD-Metabolite wurden ebenfalls LC-ESI-MS-Chromatogramme aufgenommen. Hierfür mußte die LC-ESI-MS-Methode von Rapamycin modifiziert werden. Aufgrund der, im Vergleich zu Rapamycin, unterschiedlichen

Ionenausbeute des SDZ RAD und seiner Metabolite, wurde durch Variation der Kapillarausgangsspannung die Empfindlichkeit erhöht.

Die Messungen wurden im SIM-Modus mit folgenden Ionen durchgeführt: m/z 966.5, m/z 980.5, m/z 982.5, m/z 996.5 und m/z 1012.5. In Abbildung **IV-24 A** ist der Totalionenstrom eines LC-ESI-MS-Chromatogramms von SDZ RAD und SDZ RAD-Metaboliten dargestellt. Die Ionenspuren m/z 1012.5 (Dihydroxy-SDZ RAD), m/z 996.5 (Monohydroxy-SDZ RAD) und m/z 980.5 (SDZ RAD-Isomer und SDZ RAD) sind in den Abbildungen **IV-24 B, C** und **D** zusehen.

Auch hier wurden vorrangig Natrium-Addukte $[M+Na]^+$ der Molekülionen, aber auch Kalium-Addukte $[M+K]^+$ detektiert. Protonierte Molekülionen $[M+H]^+$ wurden weder für SDZ RAD noch für die Metabolite beobachtet.

Das Muster der dihydroxylierten sowie der monohydroxylierten Metabolite entspricht dem des Rapamycins. Eine Ausnahme bildet jedoch der Monohydroxy-Metabolit (M IX), welcher eine dem 39-O-Demethyl-Rapamycin vergleichbare Retentionszeit aufweist. Dieser Metabolit wird nur bei Inkubationen des SDZ RAD beobachtet. Im Gegensatz zu Rapamycin findet man bei SDZ RAD keinen Peak für das 39-O-Demethyl-SDZ RAD. Die zwei Monohydroxy-Peaks zwischen M VIII und M IX (Abbildung **IV-24**, mit Pfeilen markiert) sind auch bei Rapamycin zu finden. Bei letzterem sind die Konzentrationen dieser Metabolite sehr gering und fallen unter die Intergrationsgrenze.

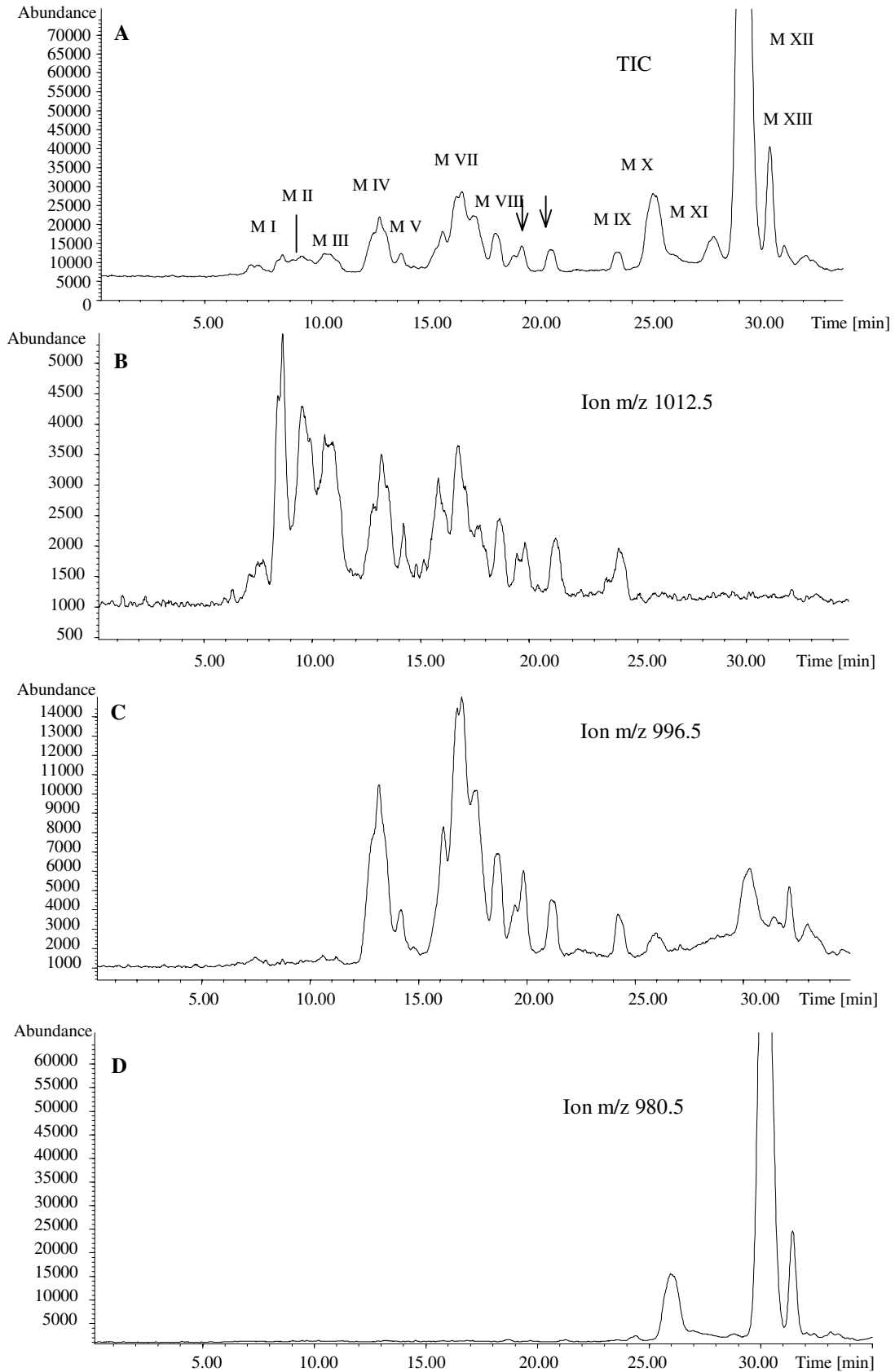


Abb. IV-24 LC-ESI-MS-Chromatogramm mit extrahierten Ionenspuren von SDZ RAD nach Inkubation mit menschlichen Lebermikrosomen, aufgenommen im SIM-Modus: A Totalionenstrom (TIC), B Dihydroxy-SDZ RAD, C Monohydroxy- SDZ RAD, D SDZ RAD und SDZ RAD-Isomer.

In der Ionenspur m/z 996.5 sind ebenfalls neben den Natrium-Addukten auch Kalium-Addukte zu sehen. Der SDZ RAD-Metabolite SM wurde bei einer Molekularmasse $[M+Na]^+$ 982.5 detektiert. Damit liegt auch hier eine Massendifferenz von 2 amu zur Ausgangsverbindung vor. Dies weist auf die gleiche Biotransformationserscheinung wie bei Rapamycin hin.

4.2. ESI-MS-MS-Analytik

Die Aufklärung der Strukturen der Metabolite wurde mit einer modifizierten ESI-MS-Technik durchgeführt. Diese als Nanospray-Tandem-Massenspektrometrie bekannte Methode ist für Proben geeignet, welche im Bereich von nur einigen Mikrogramm bzw. Nanogramm vorliegen. Als Referenzsubstanz für die Metabolite wurden jeweils die Ausgangssubstanzen, Rapamycin und SDZ RAD, mittels Nanospray-Tandem-Massenspektrometrie untersucht.

In Abbildung IV-25 ist die Struktur von Rapamycin ($R=H$) und SDZ RAD ($R=C_2H_4OH$) dargestellt.

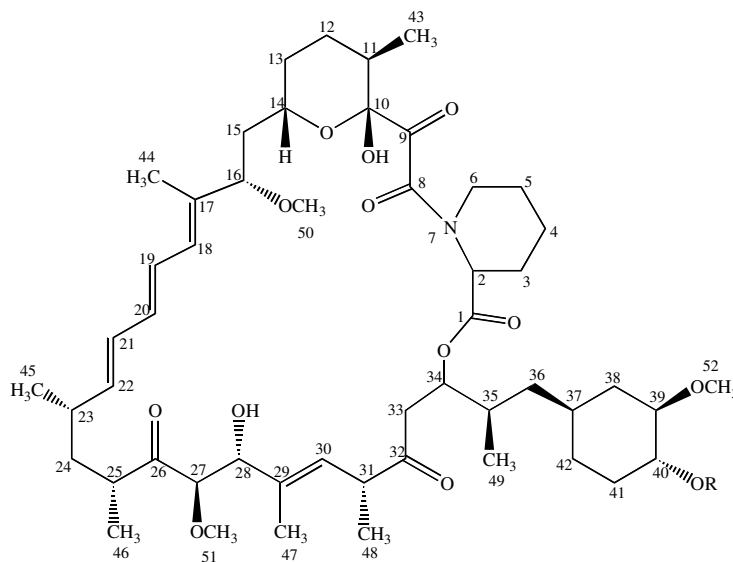


Abb. IV-25 Struktur von Rapamycin ($R=H$) und SDZ RAD ($R=C_2H_4OH$). Die Numerierung des Makrolid-Rings erfolgte nach den Richtlinien der *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC).

4.2.1. ESI-MS-MS-Analytik von Rapamycin und seinen Metaboliten

Die Strukturen von folgenden Metaboliten wurden untersucht: Rapamycin-Metabolit RM, und die verschiedenen Monohydroxy-Rapamycin-Metabolite. Die Spektren der Dihydroxy-Rapamycin-Metabolite konnten aufgrund des schlechten Signal-Rausch-Verhältnisses nicht vollständig ausgewertet werden. Eine Eingrenzung der möglichen Metabolisierungsposition war jedoch möglich.

Um ein optimales Signal-Rausch-Verhältnis zu erzielen, wurden für die einzelnen Metabolite bis zu 200 Spektren akkumuliert. Als Molekül-Eltern-Ion wurde jeweils das Natrium-Addukt des Metaboliten verwendet. Versuche das ebenfalls vorhandene, leichter zu fragmentierende Ammonium-Addukt $[M+NH_4^+]^+$ für die MS-MS-Untersuchungen zu verwenden, ergaben nicht reproduzierbare Spektren. Die CID Spektren der stabileren Natrium-Addukte $[M+Na^+]^+$ waren dagegen sehr gut reproduzierbar. Es wurden Versuche durchgeführt, durch die Variation der Kollisionsenergie verstärkt Ionen zu erhalten, welche durch den Verlust kleiner Neutralteilchen entstehen. Solche größeren, primären Ionen besitzen eine hohe Aussagekraft über die Molekülstruktur, da sie mit der geringsten Wahrscheinlichkeit von Zufallsumlagerungen gebildet werden. Um die Natrium-Addukte der Metabolite zu fragmentieren war jedoch eine Kollisionsenergie von mindestens 40 eV notwendig. Dies führte zu einer verstärkten Bildung von Fragmenten im Bereich von 300 amu bis 500 amu.

4.2.1.1. Strukturaufklärung des Rapamycin-Metaboliten RM

Im LC-ESI-MS-Chromatogramm wurde ein Rapamycin-Metabolit mit einer Molekularmasse m/z 938.5 und einer Retentionszeit von $t_R=25,15$ min. detektiert. Es konnte gezeigt werden, daß dieser Metabolit aus dem Rapamycin-Isomer entsteht (vgl. 1.5.) und somit eine ringgeöffnete Struktur aufweisen muß. Dieser Metabolit wurde isoliert und anschließend mittels Nanospray-Tandem-Massenspektrometrie untersucht. Die Probe wurde dazu in einer Lösung aus 50% Acetonitril und 0,5% Ameisensäure in Wasser (v:v:v) gelöst.

In Abbildung IV-26 sind die Spektren der kollisionsinduzierten Dissoziation des Rapamycin-Metaboliten RM im Vergleich zum Rapamycin dargestellt. Als zu untersuchendes Ion wurde im Q1-Quadrupol die Masse des einfach geladenen Ions $[M+Na^+]^+$ m/z 939 eingestellt. Die charakteristischen Peaks weisen eine Massendifferenz von 2 amu auf und sind mit einem Pfeil markiert. Da die erhaltenen Massenzahlen gerundet wurden, sind Differenzen von ± 1 amu möglich.

Als häufigste Fragmentierungsreaktion kommt die α -Spaltung in Nachbarschaft zu einem Heteroatom als auch die Abspaltung von Neutralteilchen vor. So wird die Methoxy-Gruppe am C-16 Atom sehr leicht unter Bildung von Methanol abgespalten. Dabei wird aus dem Triensystem ein sehr stabiles Tetraensystem gebildet, das zu dem Fragment **A** $[M+Na^+-CH_3OH]^+$ m/z 907 führt. Aus diesem Fragment wird durch anschließende Dehydratisierung ein Fragment **B** $[M+Na^+-CH_3OH-H_2O]^+$ m/z 889 gebildet. Beide Fragmente weisen die Region C-33 bis C-34 auf. Die Spaltung der Bindung zwischen C-8 bis C-9 führt zur Bildung des Fragments **I** ($[M_f + Na]^+$ m/z 766) als auch zu Fragment **II** ($[M_f + Na]^+$ m/z 734). In Fragment **II** ist jedoch die Methoxy-Gruppe am C-16 wie auch ein weiteres Wasser-Molekül abgespalten worden. Die korrespondierenden Fragmente von Rapamycin (**I** - **IX**) sind in Abbildung **IV-27** dargestellt. Durch Abspaltung von Kohlenmonoxid entsteht aus dem Fragment **II** das Fragment **III** ($[M_f + Na]^+$ m/z 706). Ein weiteres Fragment, welches ebenfalls das Tetraensystem enthält, ist das durch Spaltung der C-14 bis C-15 Bindung entstehende Fragment **V**. Ein charakteristisches Fragment, welches auf eine Hydrierung an C-33 bis C-34 hinweist, ist das stabile Fragment **IX** ($[M_f + Na]^+$ m/z 347).

Die Fragmente **IV**, **VI**, **VII** und **VIII** ($[M_f + Na]^+$ m/z 614, 582, 441 und 409) des CID-Spektrums von Rapamycin-Metabolit RM entsprechen denen des Rapamycins ohne eine Massendifferenz von 2 amu. Bei dem Rapamycin-Metaboliten RM handelt es sich somit um ein Hydrierungsprodukt des Rapamycin-Isomers, wobei die Hydrierung an der C-33 bis C-34 Bindung erfolgte.

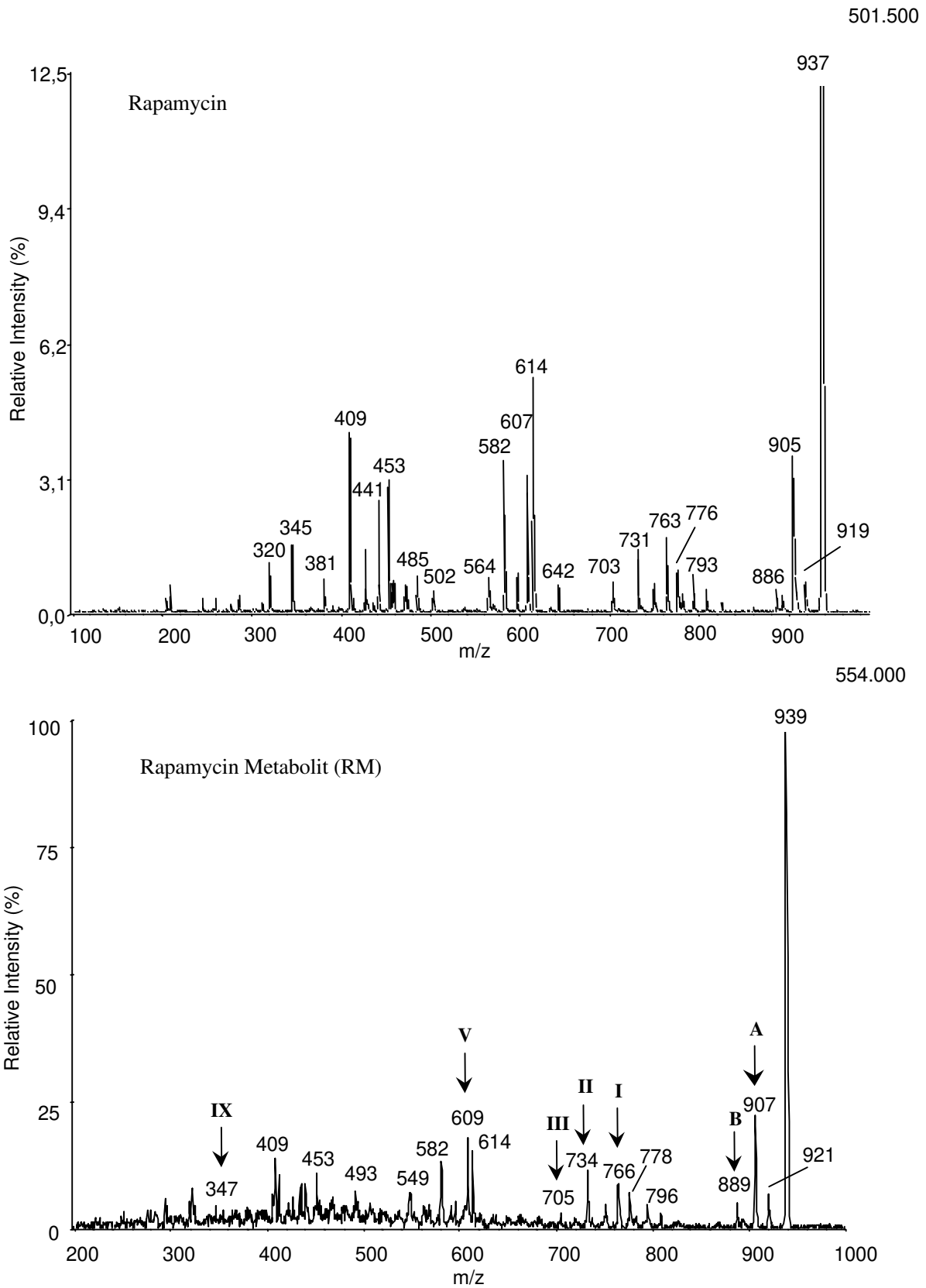


Abb. IV-26 CID-Spektrum von Rapamycin und dem Rapamycin-Metabolit RM. Aufnahmezeit 4min 35s, 126 Akkumulationen, Q1 937 amu (oben), Q1 939 amu (unten), Q3 Massenbereich 10 amu bis 1000 amu. Die charakteristischen Signale sind mit einem Pfeil dargestellt.

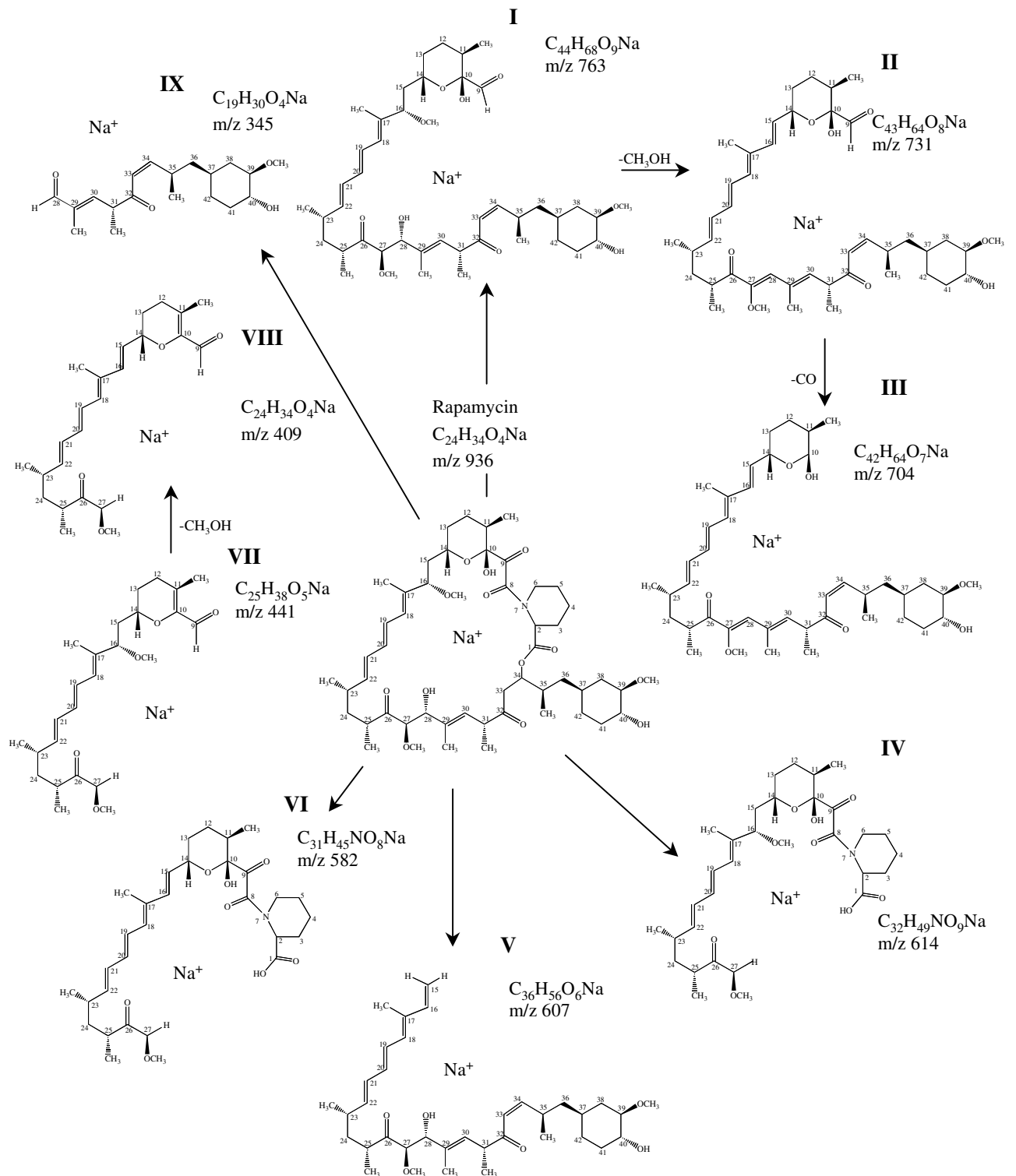


Abb. IV-27 Strukturvorschläge für die nach kollisionsinduzierter Dissoziation erhaltenen Fragmente von Rapamycin, abgeleitet aus dem in Abbildung 26 (oben) dargestellten ESI-CID-Spektrum.

4.2.1.2. Strukturaufklärung des Demethyl-Rapamycin-Metaboliten

In Abbildung IV-28 ist das CID-Spektrum des 39-O-Demethyl-Rapamycin abgebildet. Dieser Metabolit weist eine Molekularmasse von $[M+Na]^+$ m/z 922.5 auf. Für die Strukturuntersuchungen wurde die Masse des Natrium-Addukts $[M+Na^+]^+$ m/z 922.7 am Quadrupol Q1 eingestellt. Der gescannte Bereich in Quadrupol Q3 lag zwischen 100 amu und 1000 amu. Die Signale weisen auf die in Abbildung IV-27 dargestellten Fragmente hin, wobei in den Fragmenten I – III, V und IX eine Massendifferenz von -14 amu vorliegt. Damit konnten die

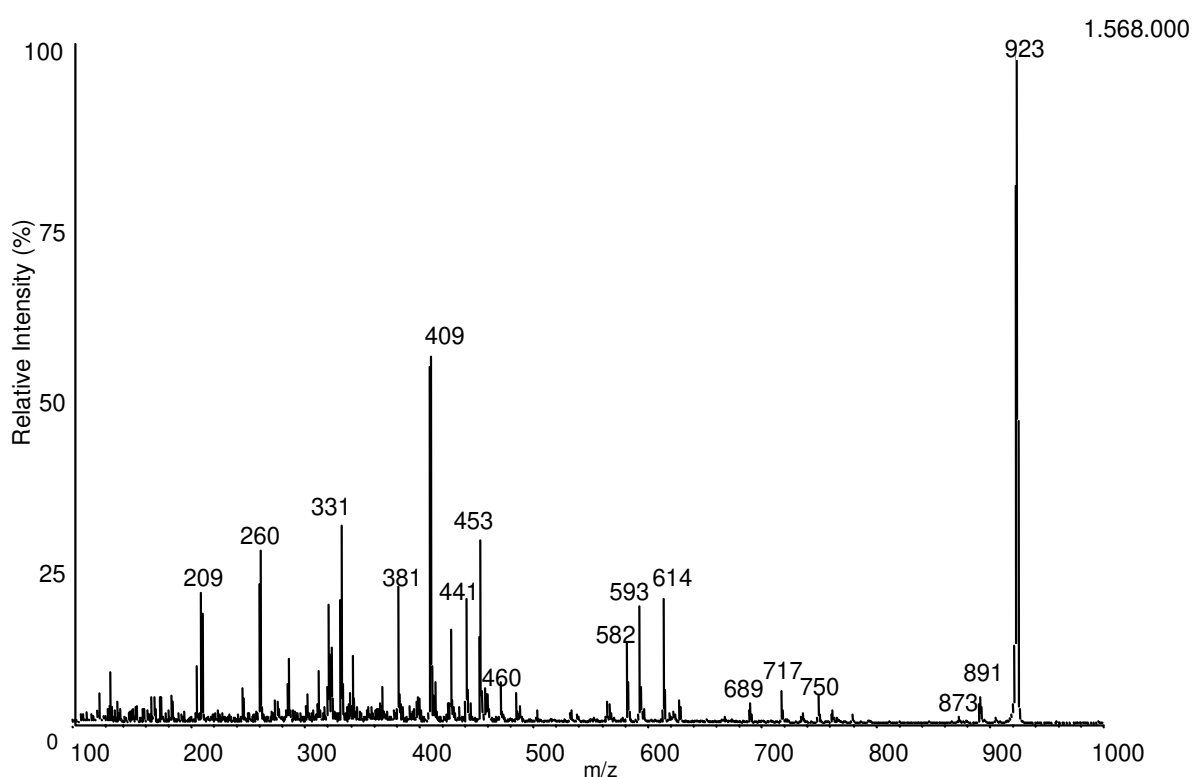
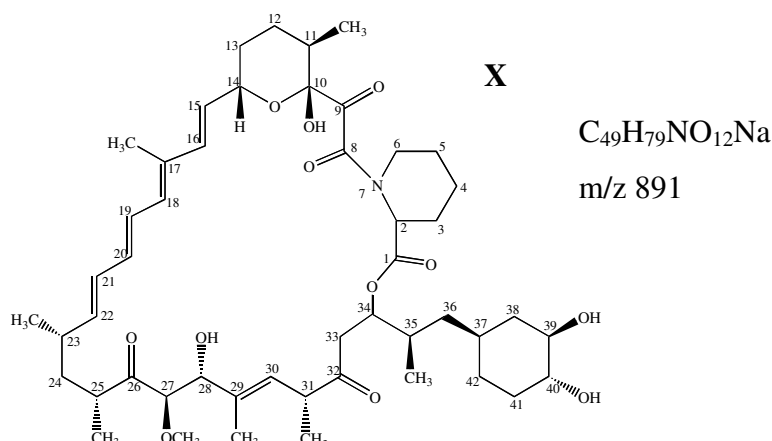


Abb. IV-28 CID-Spektrum von 39-O-Demethyl-Rapamycin. Aufnahmezeit 428s, 86 Akkumulationen, Q1 923 amu, Q3 Massenbereich 100 amu bis 1000 amu.

in der Literatur (Streit et al. 1996) beschriebenen Ergebnisse über die Metabolisierungsposition dieser Substanz bestätigt werden. Ein ebenfalls beschriebener Metabolit, das 16-O-Demethyl-Rapamycin, wurde nicht gefunden. Ein Fragment, welches darauf hinweist, daß es sich bei dem untersuchten Metaboliten nicht um das 16-O-Demethyl-Rapamycin handelt, ist Fragment X.



Da hier die häufig zu beobachtende Abspaltung von Methanol erfolgt, aber trotzdem noch eine Massendifferenz zum Rapamycin-Fragment von -14 amu auftritt, liegt unter Beachtung der anderen Fragmente der Schluß nahe, daß es sich um den 39-O-Demethyl-Rapamycin-Metaboliten handelt.

4.2.1.3 Strukturaufklärung der Monohydroxy-Rapamycin-Metabolite

Da bei der Inkubation des Rapamycin-Isomers keinerlei hydroxylierte Metabolite generiert wurden, ist davon auszugehen, daß die Monohydroxy-Metabolite direkt aus Rapamycin gebildet werden. Dies läßt die Schlußfolgerung zu, daß der Makrolid-Ring der Monohydroxy-Metabolite geschlossen und die Esterbindung intakt ist. Nach McLafferty ist es jedoch möglich, über einen konzertierten Übergangszustand, die Esterbindung zu spalten. Der Mechanismus dieser Spaltung ist in Abbildung IV-29 dargestellt.

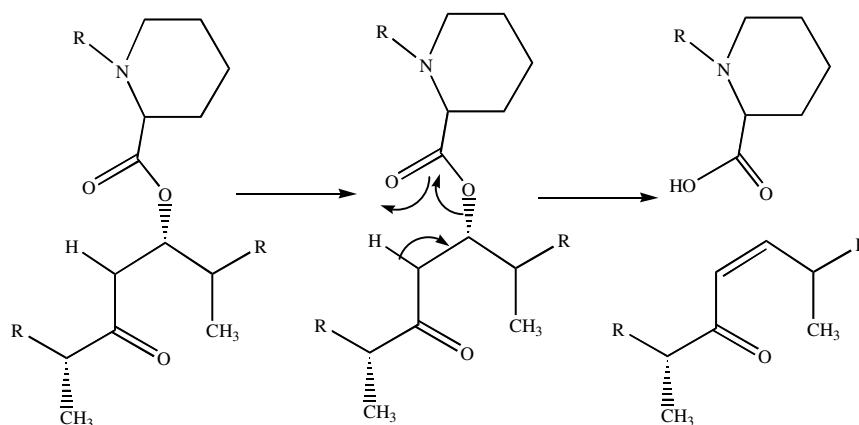


Abb. IV-29 Mechanismus zur Esterspaltung über einen konzertierten Übergangszustand (McLafferty and Turecek 1995).

42-Hydroxy-Rapamycin

In Abbildung **IV-30** ist das CID-Spektrum eines Monohydroxy-Rapamycin-Metaboliten dargestellt. Dieser Metabolit (M VIII) wurde nach HPLC-Trennung isoliert und weist im ESI-MS-Spektrum eine Molekularmasse $[M+Na^+]^+$ m/z 953 auf.

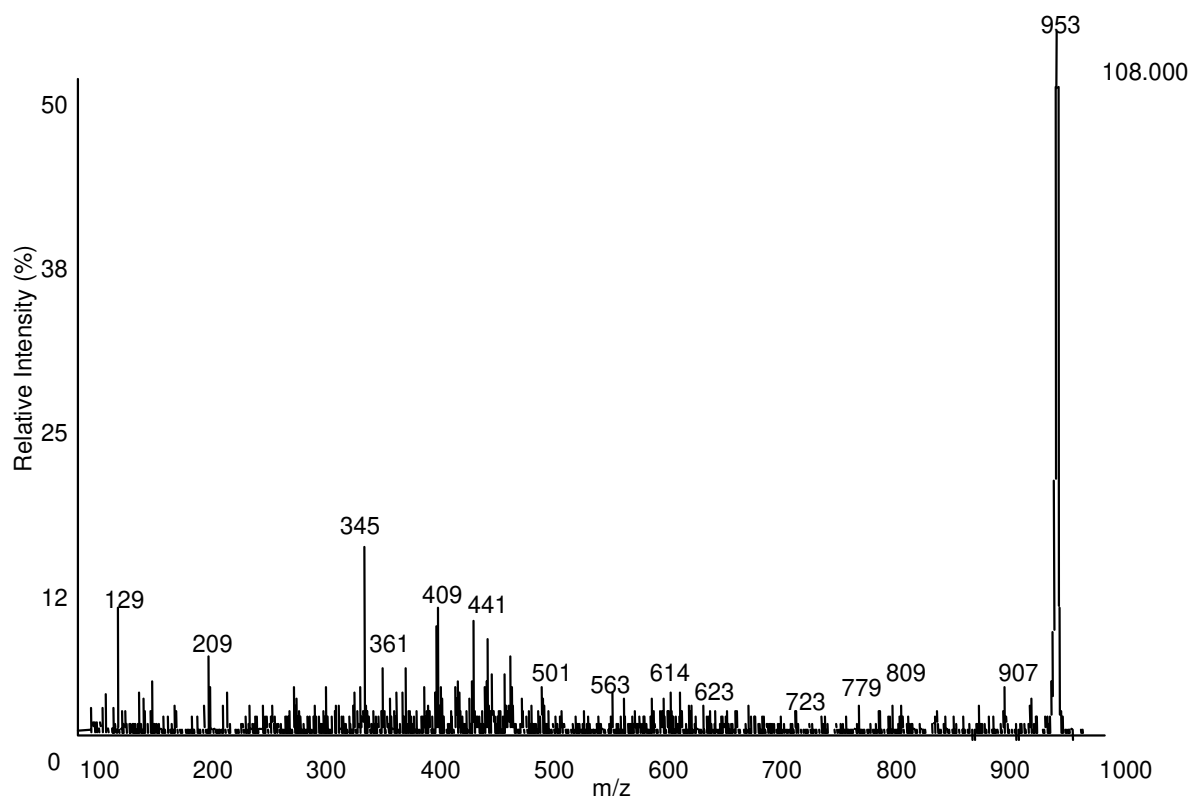


Abb. IV-30 CID-Spektrum des 42-Hydroxy-Rapamycin. Aufnahmezeit 776s, 162 Akkumulationen, Q1 953 amu, Q3 Massenbereich 100 amu bis 1000 amu.

Das Fragment m/z 907 ist durch Dehydratisierung und Abspaltung von Kohlenmonoxid aus dem Ion $[M+Na^+]^+$ m/z 953 entstanden. Das Signal m/z 779 entspricht dem in Abbildung **IV-27** dargestellten Rapamycin-Fragment **I**. Das Fragment $[M_f+Na^+]^+$ m/z 623 gibt einen Hinweis auf eine Metabolisierung am Cyclohexyl-Ring, da dieses Fragment mit einer Massendifferenz von 16 amu dem Fragment **V** (Abbildung **IV-27**) entspricht. Möglich wäre aber auch eine Hydroxylierung am C-24 Atom. Die Fragmentationen $[M_f+Na^+]^+$ m/z 409, 441 und 614 entsprechen den bei Rapamycin gefundenen Fragmentationen **VIII**, **VII** und **IV**. Da keinerlei Massendifferenz auftritt, zeigt dies, daß die Metabolisierungsposition in dem Bereich von C-1 bis C-27 nicht vorliegt. Das ausschlaggebende Fragment stellt das Fragment $[M_f+Na^+]^+$ m/z 361 dar. Dieses Fragment entspricht dem in Abbildung **IV-27 IX** dargestellten mit einer zusätzlichen Hydroxy-Gruppe, die nur noch am Cyclohexyl-Ring lokalisiert sein kann. Die vorgeschlagene Struktur dieses Metaboliten ist in Abbildung **IV-34**

dargestellt. Aufgrund einer sterischen Hinderung durch die Hydroxy-Gruppe am C-40 Atom, wird vermutet, daß die Metabolisierungsposition am C-42 lokalisiert ist.

24-Hydroxy-Rapamycin

In Abbildung IV-31 ist das CID-Spektrum eines monohydroxylierten Metaboliten dargestellt. Dieser Metabolit (M VII) wurde nach HPLC-Trennung isoliert und weist eine Molekularmasse $[M+Na]^+$ m/z 953 auf.

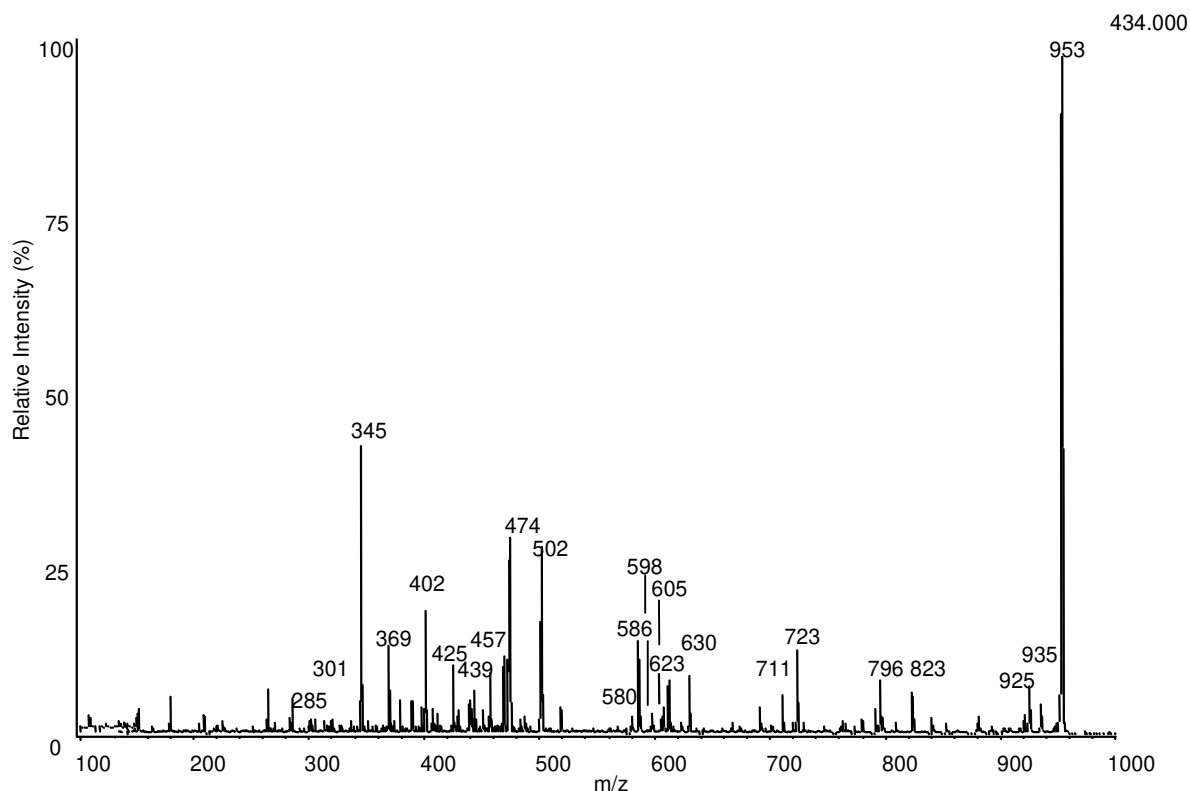


Abb. IV-31 CID-Spektrum des 24-Hydroxy-Rapamycin. Aufnahmezeit 265s, 55 Akkumulationen, Q1 953 amu, Q3 Massenbereich 100 amu bis 1000 amu.

Das Signal bei m/z 921 entsteht durch die Abspaltung der Methoxy-Gruppe am C₁₆ aus dem Ausgangsmolekül $[M+Na]^+$ m/z 953. Bei dem Signal m/z 779 handelt es sich um das dem Rapamycin entsprechenden Fragment I (Abbildung IV-27) mit einer Massendifferenz von 16 amu. Die Hydroxy-Gruppe könnte hier zwischen C-9 bis C-42 lokalisiert sein. Das Fragment IV bei m/z 630 weist darauf hin, daß die Hydroxylierung nur zwischen C-9 bis C-27 statt gefunden haben kann. Die Fragmente $[M_f+Na]^+$ m/z 623, 598, 457 und 425 entsprechen den in Abbildung IV-27 dargestellten Rapamycin-Fragmenten V – VIII mit einer Massendifferenz von 16 amu.

Charakteristisch für die Hydroxylierung am C₂₄ sind jedoch die Fragmente **XI**, **XII**, **XIII** und **XIV** bei m/z 605, 580, 439 und 301, welche in Abbildung IV-32 dargestellt sind.

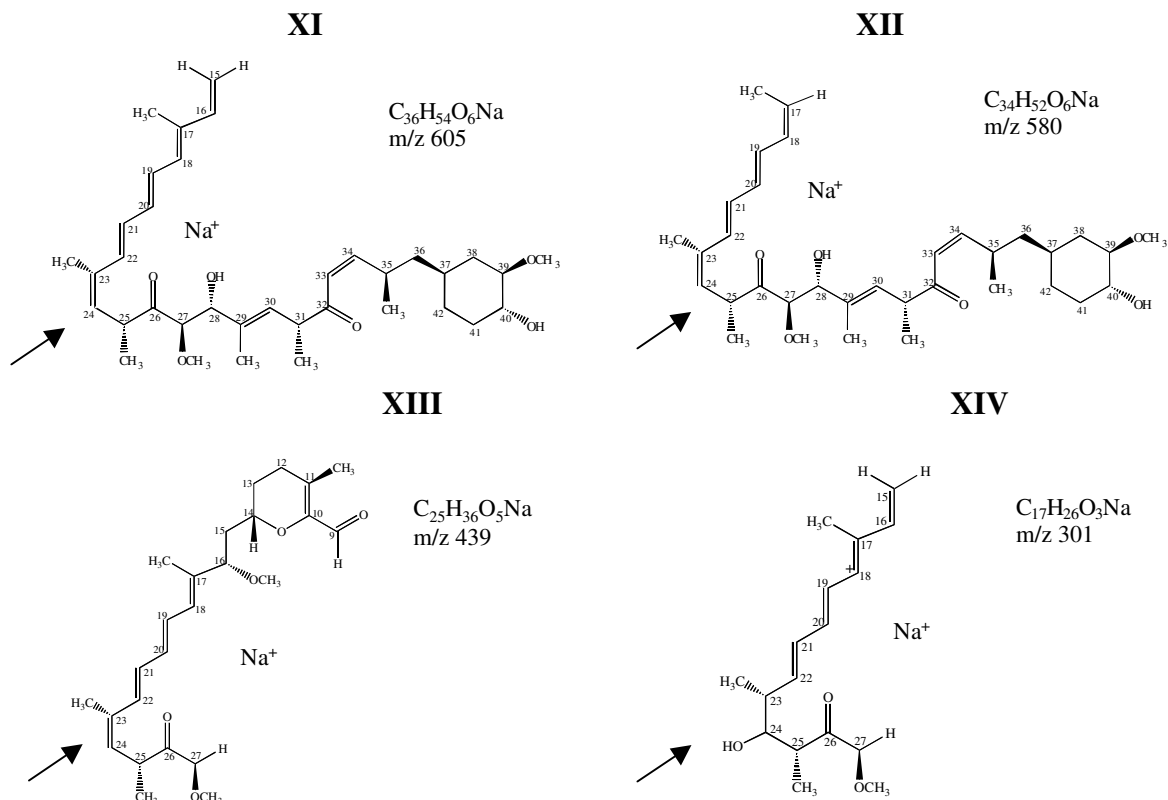


Abb. IV-32 Strukturvorschläge für die Fragmente XI - XIV des 24-Hydroxy-Rapamycin

Dihydroxy-Rapamycin

Nach Trennung der Metabolite mittels HPLC wurde eine Fraktion isoliert, welche einen Metabolit mit einer Molekularmasse $[M+Na^+]^+$ m/z 968 aufweist. In Abbildung IV-33 ist ein CID-Spektrum eines Dihydroxy-Metaboliten dargestellt. Aufgrund der geringen isolierbaren Menge an dihydroxylierten Metaboliten konnten jedoch nur Spektren erhalten werden, welche ein schlechtes Signal-Rausch-Verhältnis aufwiesen. Durch Akkumulation einzelner Spektren wurde nur eine geringfügige Verbesserung dieses Verhältnisses erreicht.

Das Signal $[M_f+Na^+]^+$ m/z 646, welches dem Fragment **IV** des Rapamycins entspricht, weist darauf hin, daß die Hydroxylierungspositionen zwischen C-1 bis C-27 lokalisiert sein müssen. Diese Annahme wird bestätigt durch das Vorhandensein des Fragments **IX** $[M_f+Na^+]^+$ m/z 345. Eine genaue Lokalisierung der Hydroxylierungspositionen ist dennoch nicht möglich.

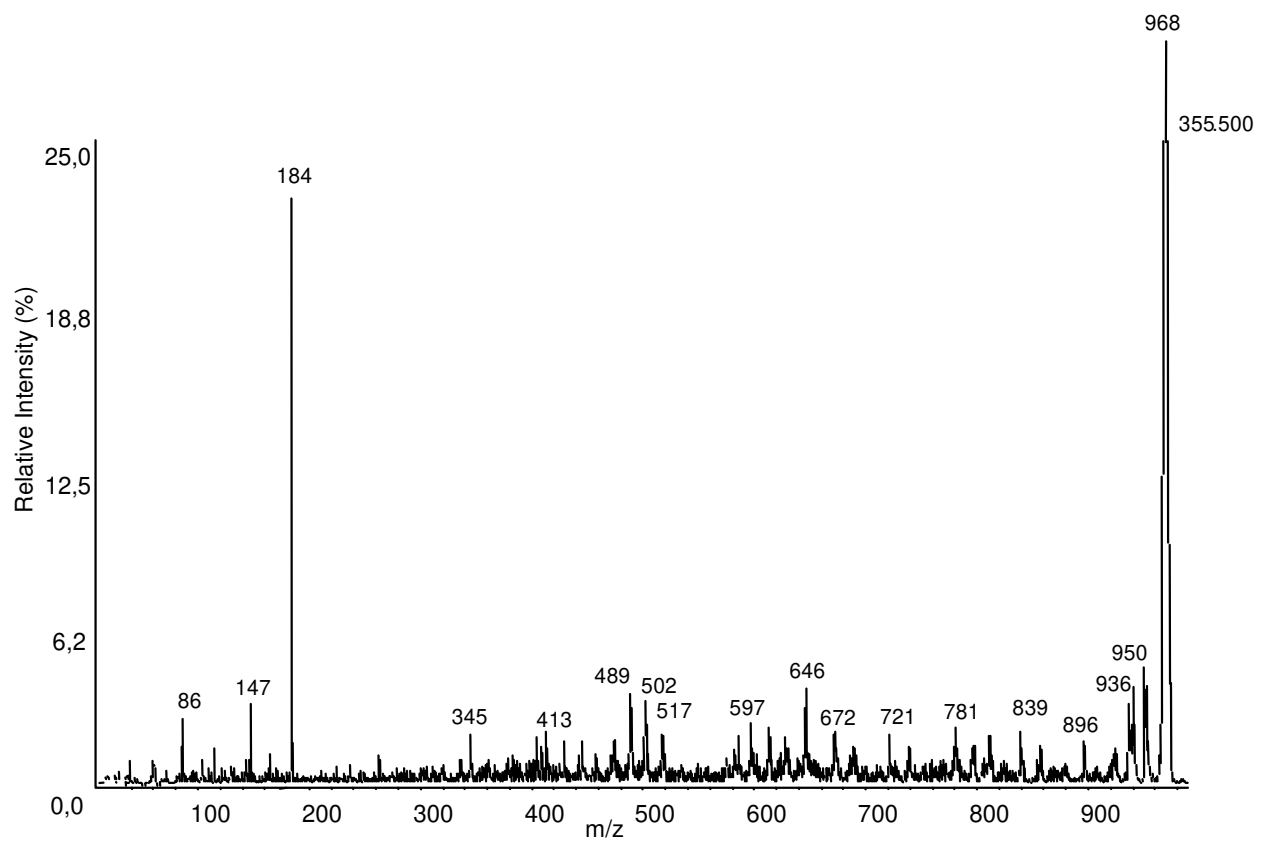


Abb. IV-33 CID-Spektrum eines Dihydroxy-Rapamycin-Metaboliten. Aufnahmezeit 767s, 161 Akkumulationen, Q1 968 amu, Q3 Massenbereich 100 amu bis 1000 amu.

In Abbildung IV-34 sind die Strukturen aller Metabolite von Rapamycin, für welche die Metabolisierungsposition bestimmt werden konnte, abgebildet.

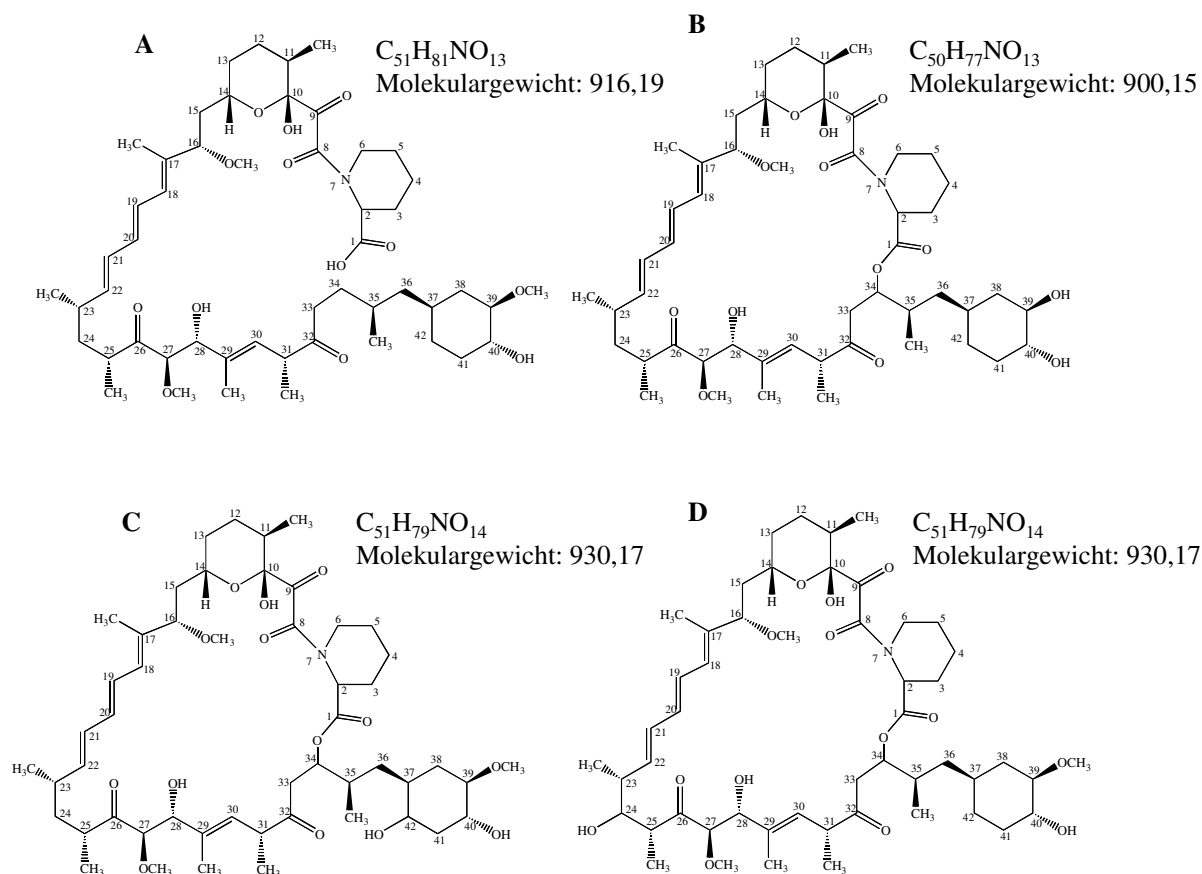


Abb. IV-34 Strukturvorschläge für die mit HPLC isolierten und mit ESI-MS-MS identifizierte Metabolite von Rapamycin. Dargestellt sind : A Rapamycin-Metabolit RM, B 39-O-Demethyl-Rapamycin, C 42-Hydroxy-Rapamycin und D 24-Hydroxy-Rapamycin

4.2.2. ESI-MS-MS-Analytik von SDZ RAD und seinen Metaboliten

Der SDZ RAD-Metabolit SM (Abb. IV-35) wurde ebenfalls mittels HPLC isoliert und mit ESI-MS-MS untersucht. Ähnlich dem Rapamycin ist von den gleichen Annahmen, daß es sich um einen Metabolit des Isomers und damit um eine ringgeöffnete Struktur handeln muß, ausgegangen worden.

Diese Annahmen ließen sich auch bestätigen. In Abbildung IV-36 sind die CID-Spektren von SDZ RAD und dem SDZ RAD-Metaboliten SM abgebildet. Die charakteristischen Signale wurden mit einem Pfeil markiert. Vergleicht man diese Spektren mit den Spektren des

Rapamycins und Rapamycin-Metaboliten RM, so ist bei den markierten Signalen eine Massendifferenz von 44 amu zu beobachten. Diese Massendifferenz ergibt sich durch die Modifizierung des SDZ RAD am C-40 Atom. Die Fragmente dieses Metaboliten wurden entsprechend dem in Abbildung IV-27 vorgeschlagenen Fragmentationsschema zugeordnet.

Bei dem SDZ RAD-Metaboliten SM handelt es sich somit um ein Hydrierungsprodukt des SDZ RAD-Isomers, wobei die Hydrierung an der C-33 bis C-34 Bindung erfolgte. In Abbildung IV-35 ist die Struktur des SDZ RAD-Metaboliten SM dargestellt.

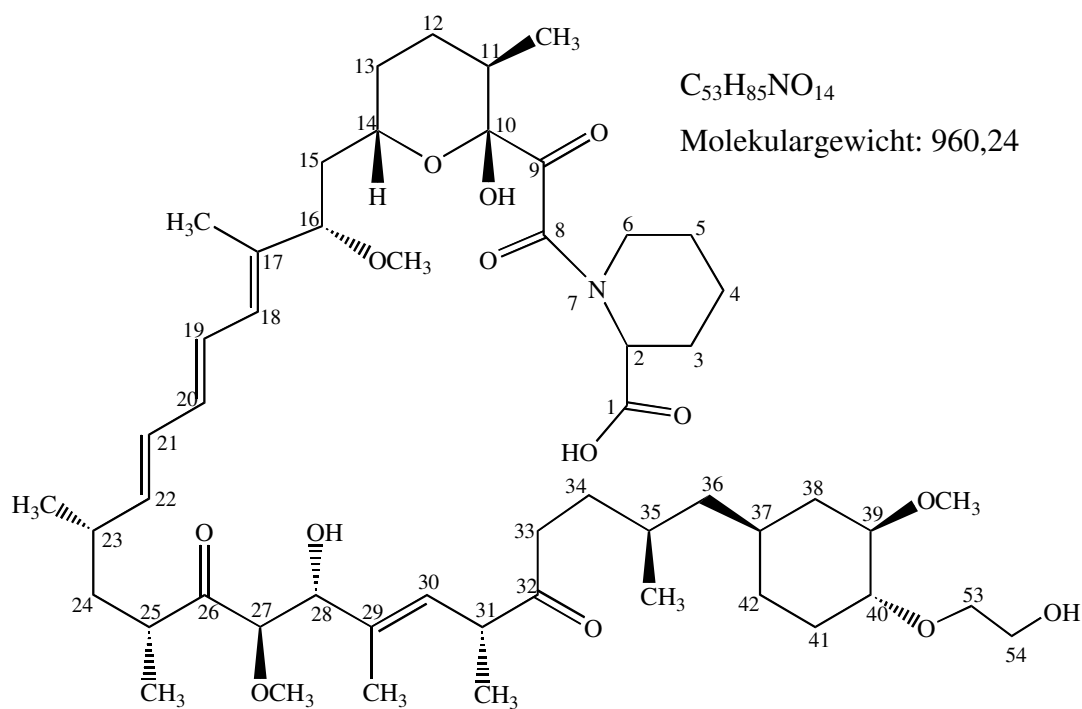


Abb. IV-35 Strukturvorschlag des SDZ RAD-Metaboliten SM

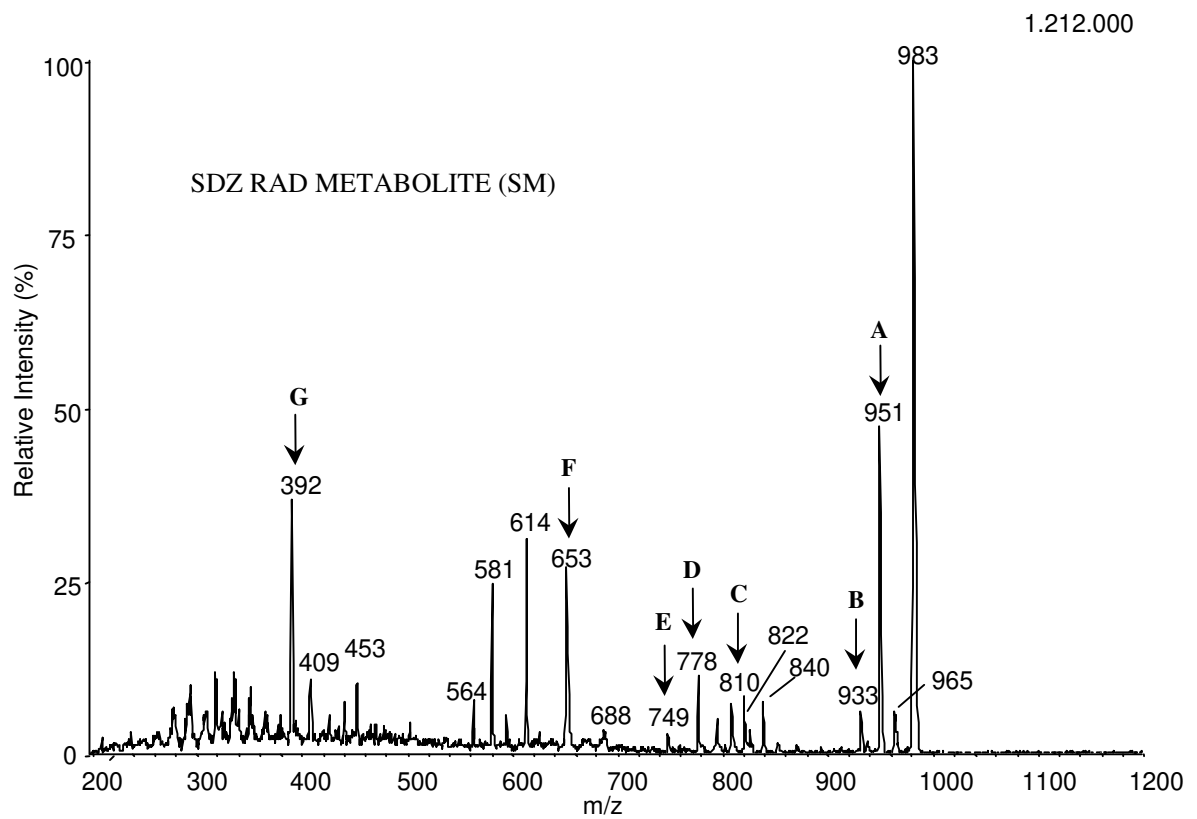
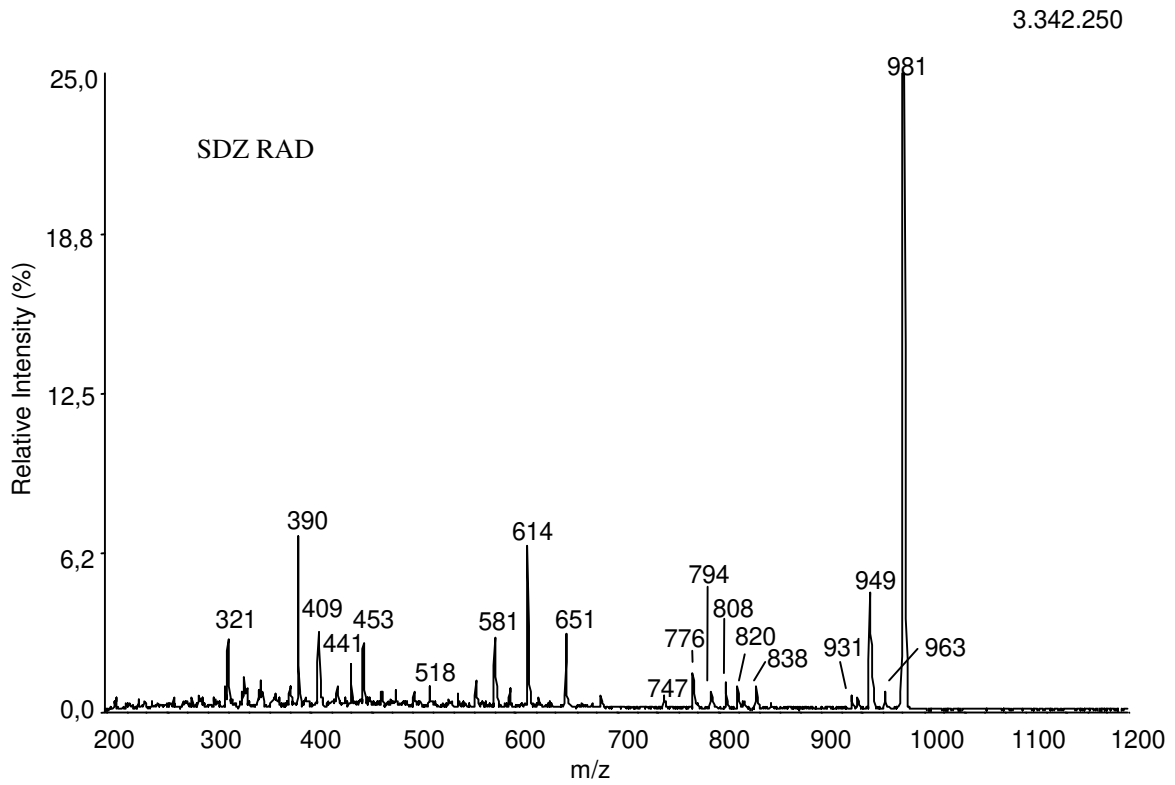


Abb. IV-36 CID-Spektrum von SDZ RAD und dem SDZ RAD-Metabolit SM. Aufnahmezeit 4min 35s, 126 Akkumulationen, Q1 981 amu (oben), Q1 983 amu (unten), Q3 Massenbereich 10 amu bis 1000 amu. Die charakteristischen Signale sind mit einem Pfeil dargestellt.

Von den monohydroxylierten Metaboliten von SDZ RAD konnte die Struktur des 24-Hydroxy-SDZ RAD zugeordnet werden. Der isolierte Metabolit weist im ESI-MS-Spektrum eine Masse von $[M+Na^+]^+$ m/z 997 auf. Das CID-Spektrum dieses Metaboliten ist in Abbildung IV-37 dargestellt.

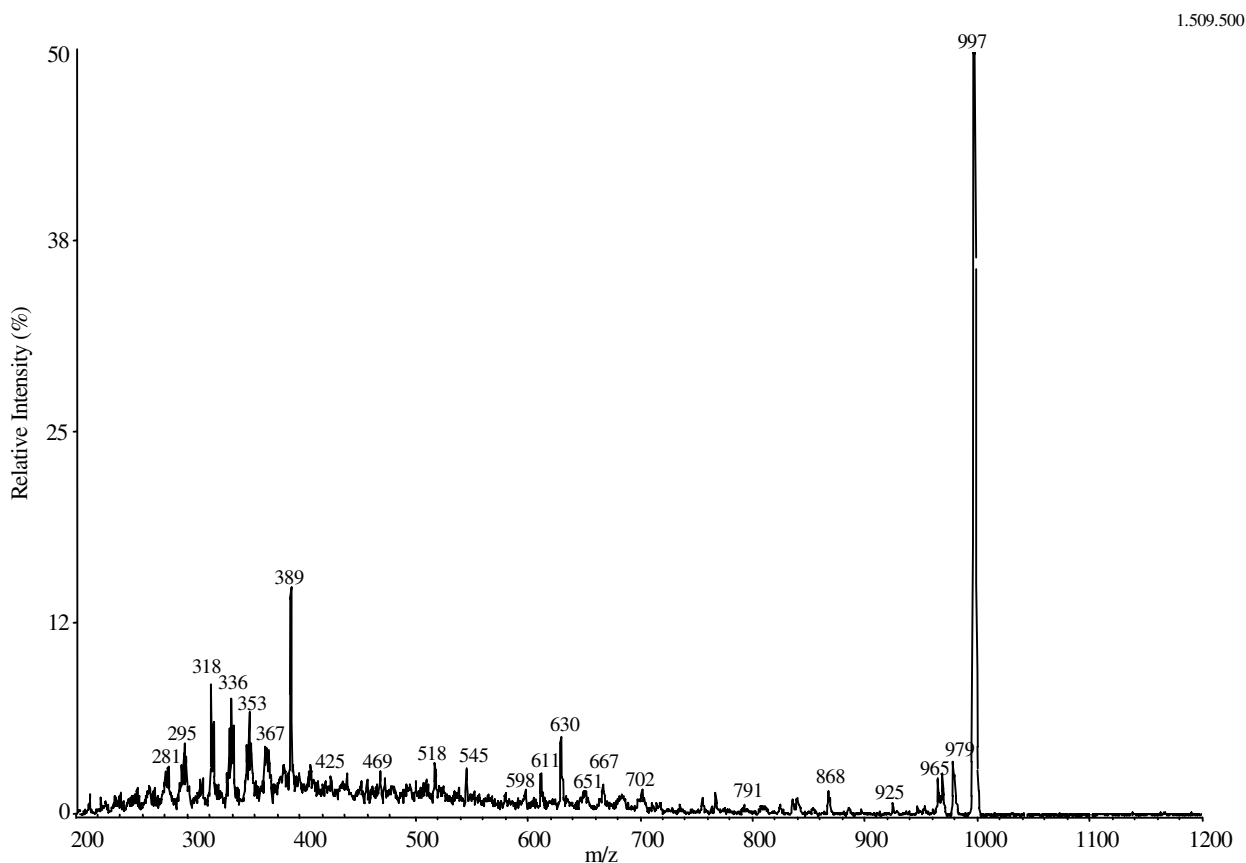


Abb. IV-37 CID-Spektrum des 24-Hydroxy-SDZ RAD-Metaboliten. Aufnahmezeit 767s, 161 Akkumulationen, Q1 997 amu, Q3 Massenbereich 100 amu bis 1200 amu.

Aus dem Ausgangsion $[M+Na^+]^+$ m/z 997 wird unter Abspaltung von Methanol ein Fragment $[M_f+Na^+]^+$ m/z 965 gebildet. Das Fragment $[M_f+Na^+]^+$ m/z 791 entspricht dem Fragment **II** von Rapamycin, jedoch mit einer Massendifferenz von +16 (Hydroxylierung) und +44 (Derivatisierung an C-40). Die Fragmente $[M_f+Na^+]^+$ m/z 667 und m/z 630 entsprechen denen des 24-Hydroxy-Rapamycins (**V** und **IV**). Durch diese zwei Fragmente ist die Metabolisierungsposition eindeutig zuordenbar. Bei den Signalen m/z 598, 425 und 389 handelt es sich um die korrespondierenden Rapamycin-Fragmente **VII**, **VIII** und **IX**.

Ein hydroxylierter Metabolit, bei welchem die Metabolisierungsposition am C-42 Atom lokalisiert ist, wurde nicht detektiert.

5. Kernresonanzspektroskopie

Nach Untersuchungen der Metabolite der Immunsuppressiva Rapamycin und SDZ RAD mit Nano-ESI-MS-MS konnten für 5 Verbindungen Strukturvorschläge gemacht werden. Um diese jedoch zu manifestieren, wurden NMR-Untersuchungen mit Rapamycin-Metaboliten durchgeführt. NMR-Untersuchungen mit SDZ RAD und seinen Metaboliten wurden nicht durchgeführt. Die zur Verfügung stehende Substanzmenge war dafür nicht ausreichend. Es kann jedoch davon ausgegangen werden, daß die mit Rapamycin-Metaboliten erzielten Ergebnisse unter Berücksichtigung der massenspektrometrischen Daten auf SDZ RAD angewandt werden können.

Folgende Metabolite konnten mittels NMR untersucht werden: Rapamycin-Isomer, Rapamycin Metabolit RM und 39-O-Demethyl-Rapamycin. Als Referenzsubstanz wurden jeweils entsprechende Spektren von Rapamycin aufgenommen. In der Literatur sind NMR-Experimente bisher nur von Rapamycin beschrieben (Kessler *et al.* 1993). Von Biotransformationsprodukten sind aufgrund der Instabilität und der schlechten Isolierungsmöglichkeiten der Metabolite keine NMR-Experimente beschrieben worden.

5.1. NMR-Experimente von Rapamycin

Ein Milligramm Rapamycin wurde in 0,5 ml DMSO (d_6) gelöst. Die Zuordnung der ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Signale erfolgte durch Auswertung der 2D-Spektren: COSY, TOCSY, NOESY, HMQC und HMBC. Die chemischen Verschiebungen sind in Tabelle IV-2 dargestellt.

Atome	Rapamycin		Rapamycin (Kessler et al. 1993)	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
C (1)		167,02		166,97
CH (2)	4,92	50,81	4,92	50,74
CH ₂ (3)	1,56 // 2,08	26,47	1,56 // 2,08	26,41
CH ₂ (4)	1,39 // 1,65	20,42	1,38 // 1,65	20,35

CH ₂ (5)	1,27 // 1,56	24,51	1,26 // 1,55	24,45
CH ₂ (6)	3,15 // 3,42	43,56	3,15 // 3,41	43,48
OH (6)			6,43	
C (8)		169,25		169,18
C (9)		198,94		198,87
C (10)		99,06		98,99
OH (10)			5,23	
CH (11)	2,01	34,83	2,01	34,78
CH ₂ (12)	0,84 // 1,52	31,11	0,83 // 1,51	31,09
CH ₂ (13)	1,17 // 1,80	29,66	1,16 // 1,80	29,61
CH (14)	3,99	66,22	3,99	66,19
CH ₂ (15)	1,23 // 1,84	39,08	1,24 // 1,83	40,13
CH (16)	3,62	82,25	3,61	82,24
C (17)		137,91		137,84
CH (18)	6,11	127,11	6,11	126,97
CH (19)	3,39	127,11	6,39	127,02
CH (20)	6,22	132,35	6,21	132,31
CH (21)	6,12	130,45	6,12	130,41
CH (22)	5,45	139,32	5,45	139,28
CH (23)	2,21	35,25	2, 21	35,18
CH ₂ (24)	1,02 // 1,39	39,51	1,02 // 1,39	39,62
CH (25)	2,38	39,78	2,39	39,57
C (26)		210,51		210,49
CH (27)	3,96	85,47	3,92	85,52
CH (28)	4,01	85,47	3,99	75,72
C (29)		137,18		137,12
CH (30)	5,07	124,85	5,08	124,93
CH (31)	3,26	45,26	3,27	45,19
C (32)		207,62		207,52
CH ₂ (33)	2,38 // 2,72	39,78	2,72 // 2,37	39,94
CH (34)	4,97	73,58	4,97	73,56
CH (35)	1,66	33,39	1,66	33,35
CH ₂ (36)	0,96 // 1,03	38,43	0,94 // 1,03	38,39
CH (37)	1,24	32,51	1,23	32,51

CH ₂ (38)	0,58 // 1,88	35,47	0,58 // 1,88	35,43
CH (39)	2,82	83,76	2,81	83,73
CH (40)	3,16	73,25	3,16	73,21
CH ₂ (41)	1,16 // 1,52	32,92	1,15 // 1,73	32,88
CH ₂ (42)	1,52 // 1,52	26,25	1,52 // 1,52	26,22
CH ₃ (43)	0,72	15,56	0,72	15,52
CH ₃ (44)	1,61	10,51	1,62	10,45
CH ₃ (45)	0,97	21,69	0,97	21,63
CH ₃ (46)	0,81	13,34	0,82	13,39
CH ₃ (47)	1,74	13,54	1,73	13,39
CH ₃ (48)	0,86	15,65	0,86	15,56
CH ₃ (49)	0,76	14,74	0,77	14,71
CH ₃ (50)	3,04	55,52	3,04	55,44
CH ₃ (51)	3,14	56,94	3,15	56,92
CH ₃ (52)	3,31	56,81	3,31	56,73

Tab. IV-2 Dargestellt sind die chemischen Verschiebungen der ¹H-Kerne und der ¹³C-Kerne von Rapamycin in DMSO (d₆) im Vergleich zu den aus der Literatur beschriebenen Daten (Kessler et al. 1993).

Die aus der Literatur (Kessler *et al.* 1993) bekannten chemischen Verschiebungen der ¹H- und ¹³C-Signale von Rapamycin wurden bestätigt. Die Kopplungskonstanten wurden nicht bestimmt, da keine Konformationsanalyse angestrebt wurde. Die chemischen Verschiebungen zeigen, daß als Hauptkomponente die Amid-Bindung *trans*-konfiguriert ist (vgl. Kessler et al. 1993).

In Abbildung **IV-38** ist der Ausschnitt aus dem HSQC-Spektrum von Rapamycin dargestellt, welcher die für die Identifizierung des Isomers und RM charakteristischen Signale zeigt.

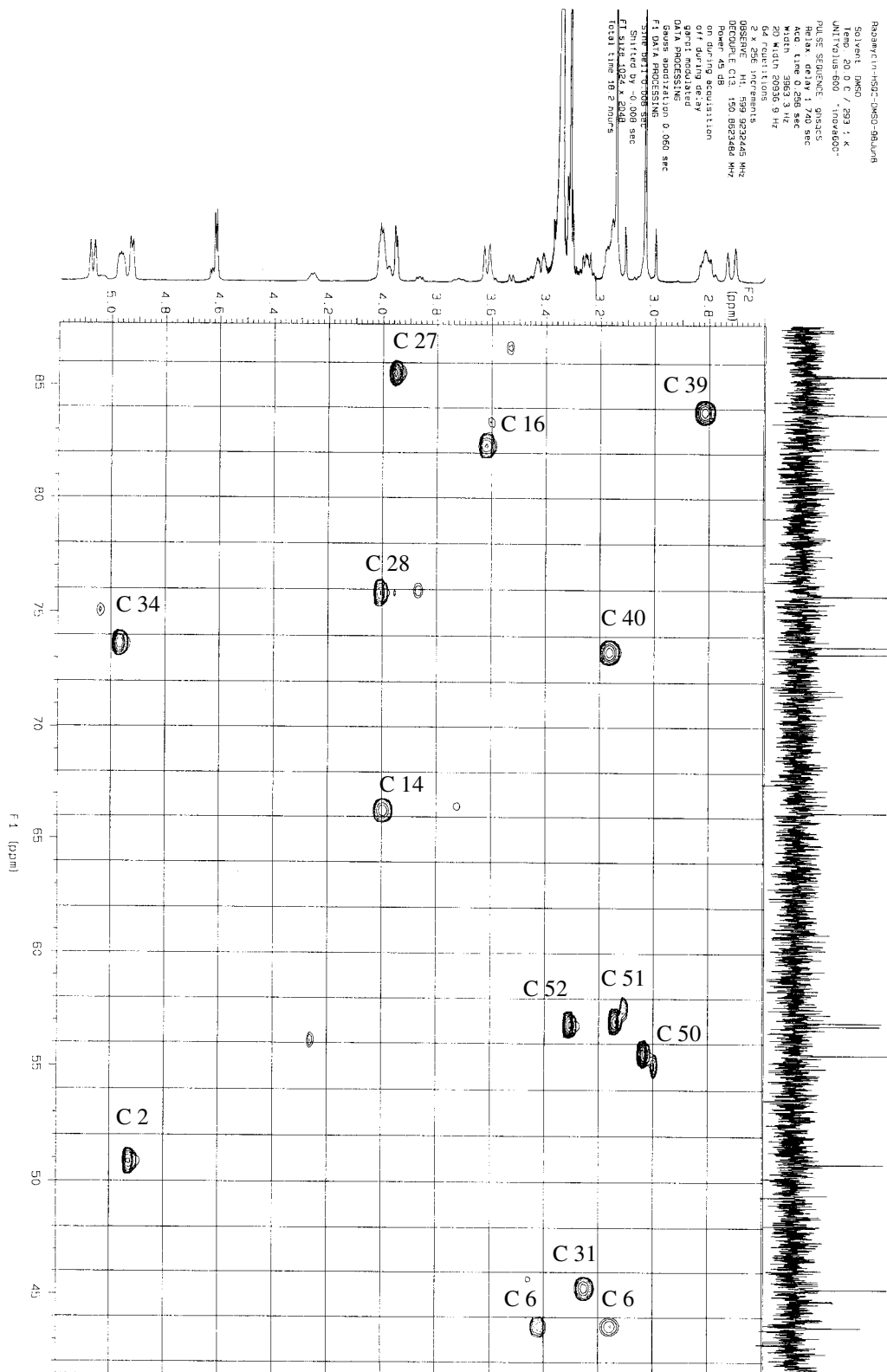


Abb. IV-38 HSQC-Spektrum des Rapamycin in DMSO (d_6). Ausschnitt F1-Achse (^{13}C) 42-87 ppm und F2-Achse (^1H) 2,7-5,2 ppm

5.2. NMR-Experimente des Rapamycin-Isomeren

Für die Analyse des Rapamycin-Isomers wurden ca. 2,5 mg dieser Verbindung in 0,5 ml DMSO (d_6) gelöst. Die Zuordnung der Signale erfolgte nach der unter 5.1. beschriebenen Vorgehensweise. In Tabelle IV-3 sind die chemischen Verschiebungen der ^1H - und ^{13}C -Kerne des Rapamycin-Isomers dargestellt.

Rapamycin-Isomer					
Atome	^1H	^{13}C	Atome	^1H	^{13}C
C (1)		166,73	CH (27)	3,76	85,89
CH (2)	3,81	58,72	CH (28)	3,93	76,49
CH ₂ (3)	1,23 // 2,12	26,97	C (29)		137,44
CH ₂ (4)	1,53 // 1,64	21,26	CH (30)	5,19	126,44
CH ₂ (5)	1,24 // 1,44	24,62	CH (31)	3,61	43,34
CH₂ (6)	2,48 // 4,12	38,21	C (32)		206,12
OH (6)			CH (33)	7,21	126,44
C (8)		170,62	CH (34)	6,65	151,96
C (9)		199,89	CH (35)	2,37	33,49
C (10)		99,07	CH ₂ (36)	1,17 // 1,24	42,53
OH (10)	5,31		CH (37)	1,24	33,15
CH (11)	1,74	35,14	CH ₂ (38)	0,67 // 1,94	36,12
CH ₂ (12)	0,8 // 1,58	30,16	CH (39)	2,79	83,86
CH ₂ (13)	1,22 // 1,43	31,17	CH (40)	3,15	73,09
CH (14)	3,58	65,84	CH ₂ (41)	1,12 // 1,74	32,93
CH ₂ (15)	6,46	39,17	CH ₂ (42)	1,43 // 1,43	26,97
CH (16)	3,51	82,48	CH ₃ (43)	0,73	16,12
C (17)		135,97	CH ₃ (44)	1,54	10,59
CH (18)	6,45	128,88	CH ₃ (45)	0,93	19,74
CH (19)	6,35	127,46	CH ₃ (46)	0,89	14,54

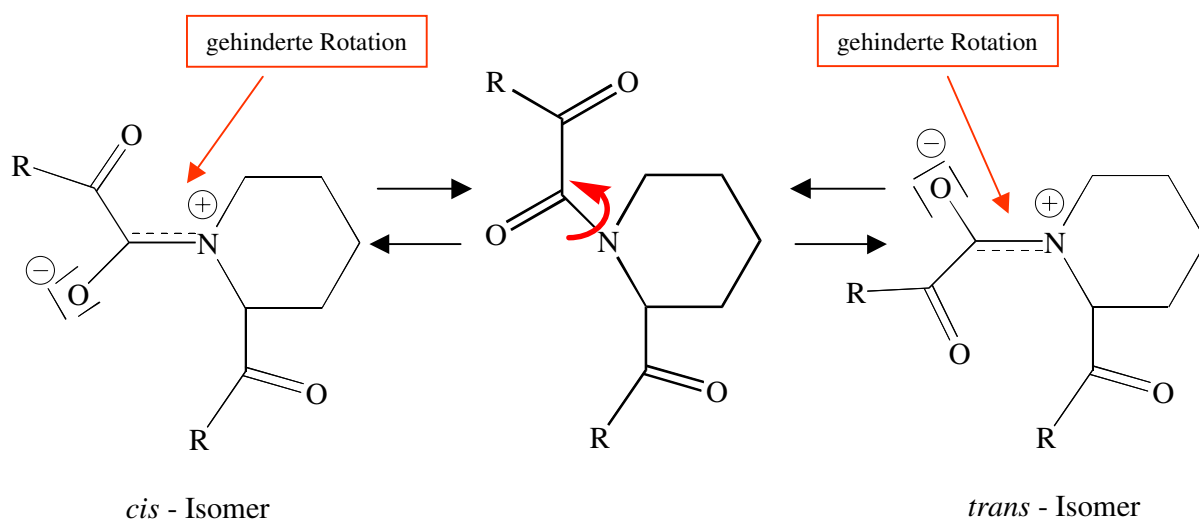
CH (20)	6,35	132,83	CH ₃ (47)	1,69	12,21
CH (21)	6,14	130,16	CH ₃ (48)	1,01	16,49
CH (22)	5,53	138,71	CH ₃ (49)	0,93	21,72
CH (23)	2,25	34,23	CH ₃ (50)	2,96	55,03
CH ₂ (24)	1,08 // 1,53	38,72	CH ₃ (51)	3,14	57,56
CH (25)	2,74	40,55	CH ₃ (52)	3,28	56,61
C (26)		213,15			

Tab. IV-3 Dargestellt sind die chemischen Verschiebungen der ¹H-Kerne und der ¹³C-Kerne des Rapamycin-Isomer in DMSO (d₆). Markiert sind die Werte, die im Vergleich zu Rapamycin auf die veränderte Struktur hinweisen.

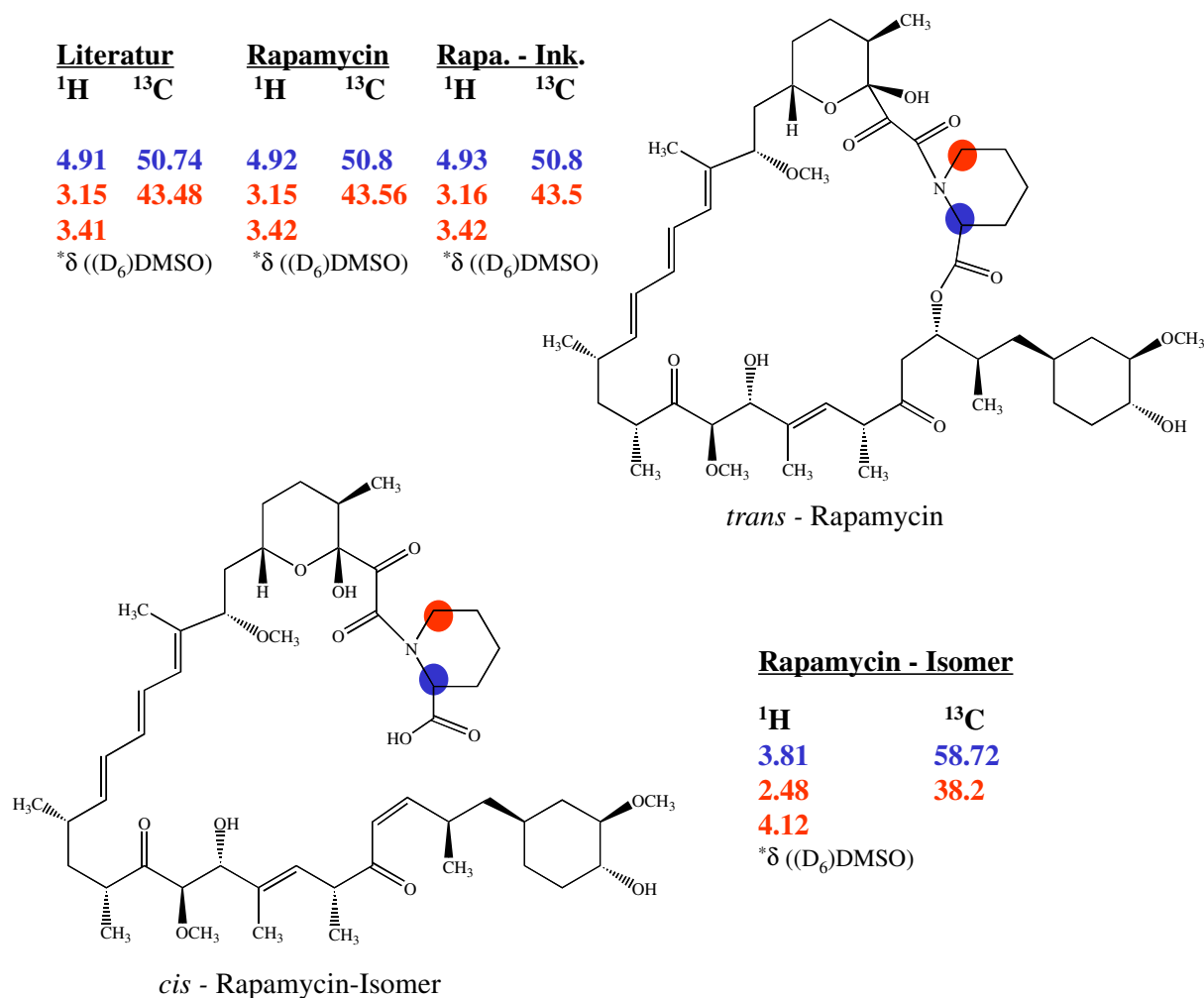
In Abbildung IV-39 ist ein Ausschnitt des HSQC-Spektrums des Isomers dargestellt. Deutlich zu sehen ist die Tieffeld-Verschiebung des Signals für das C-33 Atoms, die typisch für α , β -ungesättigte Ketone ist. Charakteristisch sind auch die ¹³C-Signale des C-34 Atoms für eine Doppelbindung in Nachbarschaft zum Keton sowie des C-1 Atoms für eine freie Carboxyl-Gruppe.

Bei der sonst guten Übereinstimmung der chemischen Verschiebungen des Rapamycins und des Rapamycin-Isomers fällt auf, daß die Amid-Bindung nicht mehr *trans* sondern *cis*-konfiguriert ist. Dies wird deutlich, wenn man die chemischen Verschiebungen (¹H, ¹³C) der CH-Gruppe am C-2 Atom und der CH₂-Gruppe des C-6 Atoms betrachtet.

Der partielle Doppelbindungscharakter der Amid-Bindung ist im Folgenden dargestellt:



Bei der ringgeöffneten Struktur des Rapamycin-Isomers sind, im Vergleich zum Rapamycin, folgende chemische Verschiebungen, welche auf *cis* bzw. *trans* hinweisen zu beobachten:



Für Rapamycin sind zum Vergleich zu den in dieser Arbeit beschriebenen Daten die von Kessler et al. (1993) beschriebenen chemischen Verschiebungen (Literatur) dargestellt. Desweiteren wurde nach Inkubation nicht-modifiziertes Rapamycin isoliert und ebenfalls untersucht (Rapa.-Ink. = Rapamycin-Inkubation).

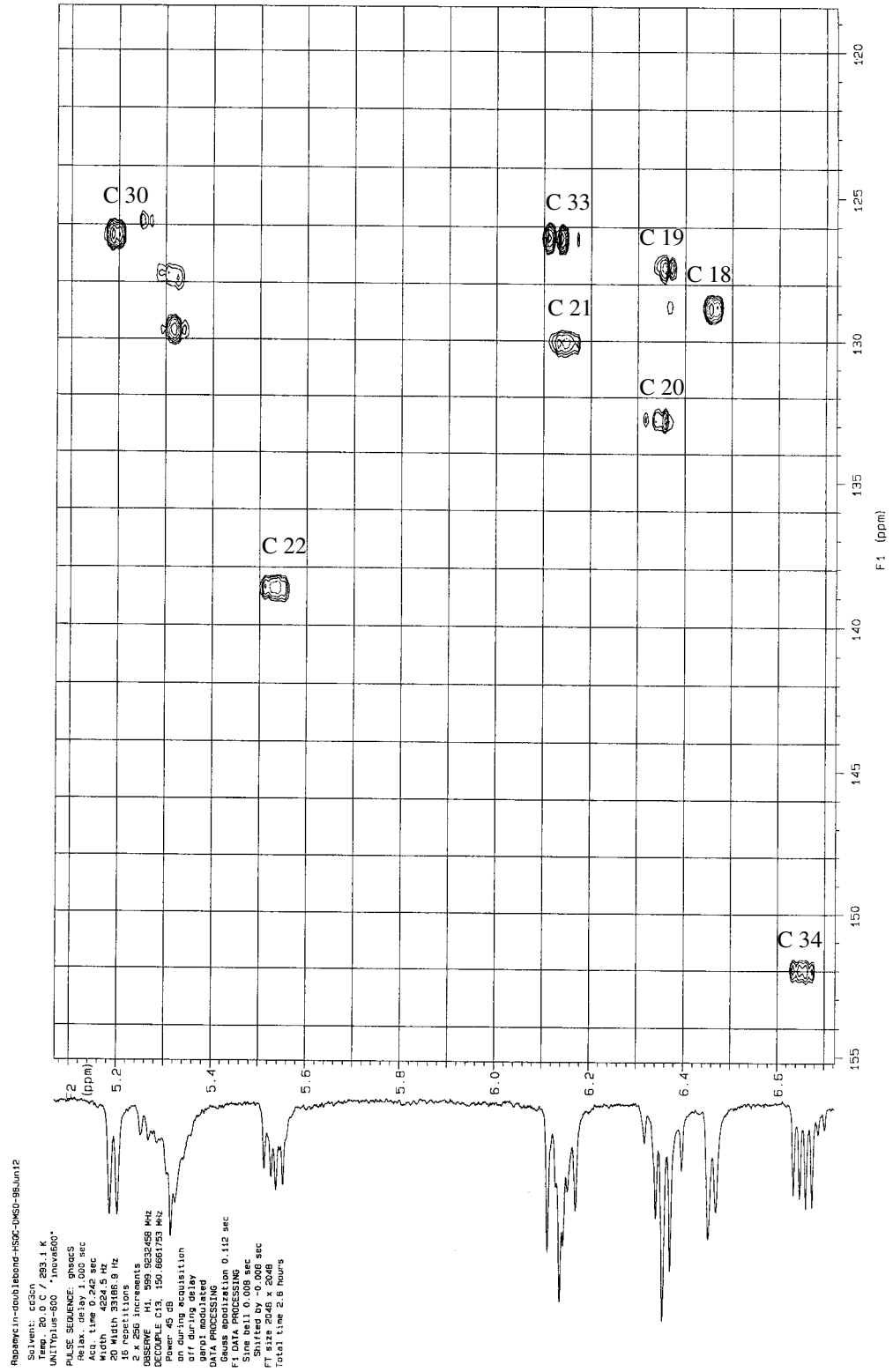
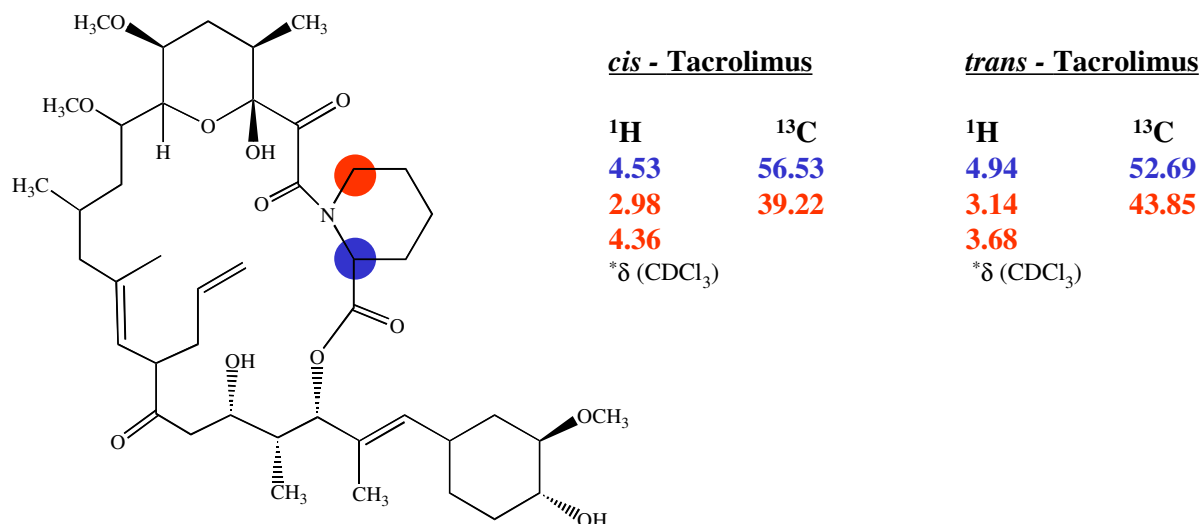


Abb. IV-39 HSQC-Spektrum des Rapamycin-Isomers in DMSO (d_6). Ausschnitt F1-Achse (^{13}C) 119-155 ppm und F2-Achse (^1H) 5,1-6,7 ppm

Für das dem Rapamycin strukturverwandte Tacrolimus sind die chemischen Verschiebungen beider Konformere, *cis* – und *trans*-Tacrolimus, beschrieben (Mierke et al. 1991).

Durch Vergleich der charakteristischen Signale [C (2), H (2), C (6), H_{eq} (6) und H_{ax} (6)] mit den korrespondierenden Werten von Tacrolimus (FK 506), konnte dem Rapamycin-Isomer eine *cis*-Konfiguration zugeordnet werden. Die entsprechenden Werte sind im Folgenden dargestellt:



Um zu überprüfen, ob die Konfigurationsänderung durch Einwirkung der Enzyme bei den *in vitro* Inkubationen entstehen, wurde unumgesetztes Rapamycin nach einer Inkubation isoliert. Alle chemischen Verschiebungen sind mit dem des Rapamycins, welches keiner Inkubation ausgesetzt war, identisch. Die charakteristischen chemischen Verschiebungen C (2), H (2), C (6), H_{eq} (6) und H_{ax} (6) sind oben mit den Rapamycin-Daten (Rapa.-Ink.) dargestellt (s. S. 80).

5.3. NMR-Experimente des Rapamycin-Metaboliten RM

Um die NMR-Experimente zur Strukturaufklärung des Rapamycin-Metabolit RM durchführen zu können, wurden ca. 2,3 mg dieser Substanz in 0,5 ml DMSO (d₆) gelöst.

In Abbildung IV-40 ist eine TOCSY-Spektrum des Rapamycin-Metaboliten RM gezeigt. Die auftretenden Kreuzpeaks weisen auf eine Struktur hin, die mit der durch MS-MS-Untersuchungen vorgeschlagenen Struktur übereinstimmen. Ein Ausschnitt des HSQC-Spektrums des Metaboliten RM ist ein Abbildung IV-41 dargestellt.

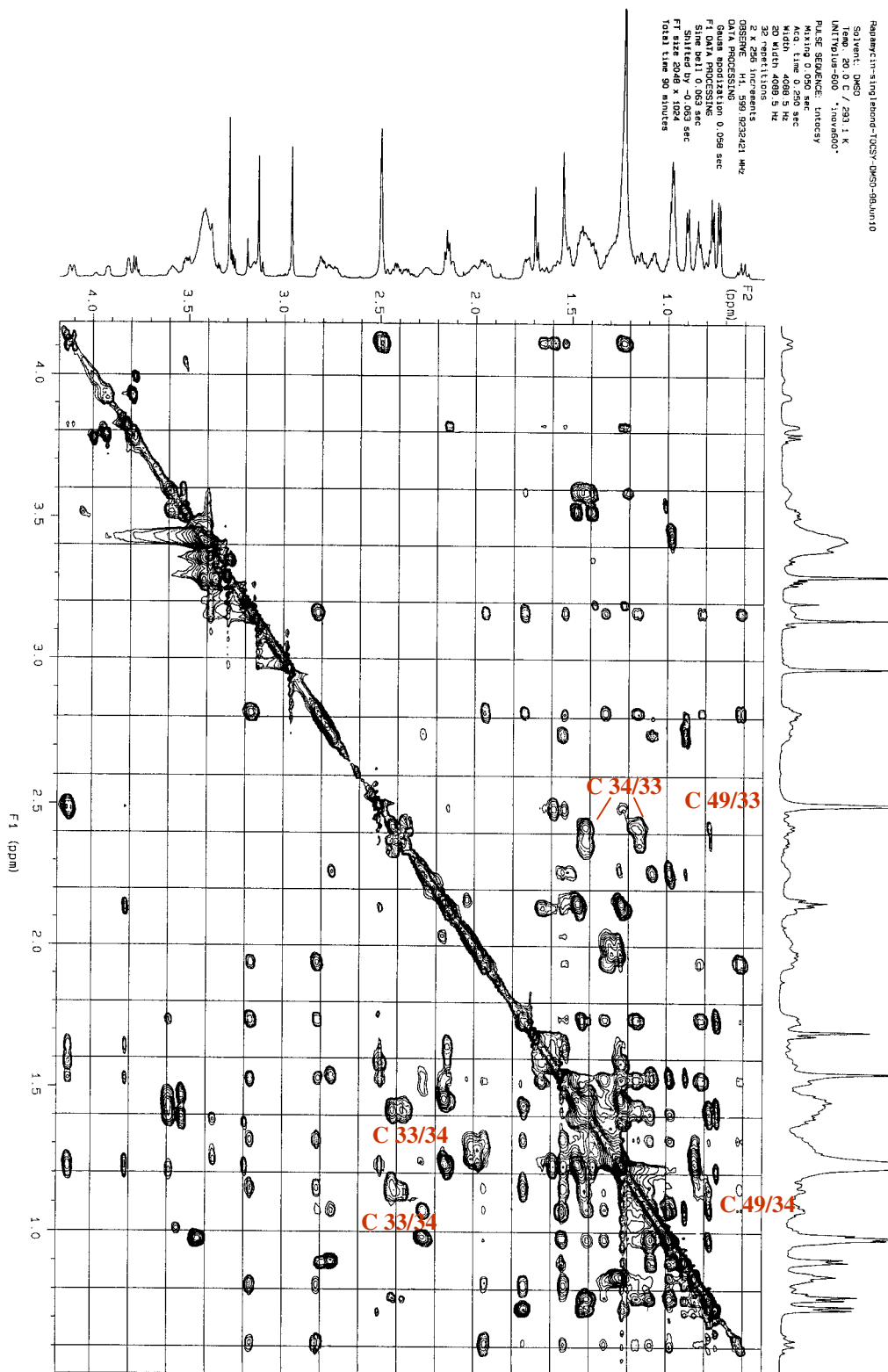


Abb. IV-40 TOCSY-Spektrum des Rapamycin-Metaboliten RM in DMSO (d₆). Ausschnitt: F1- und F2-Achse (¹H) 0,6-4,1 ppm.

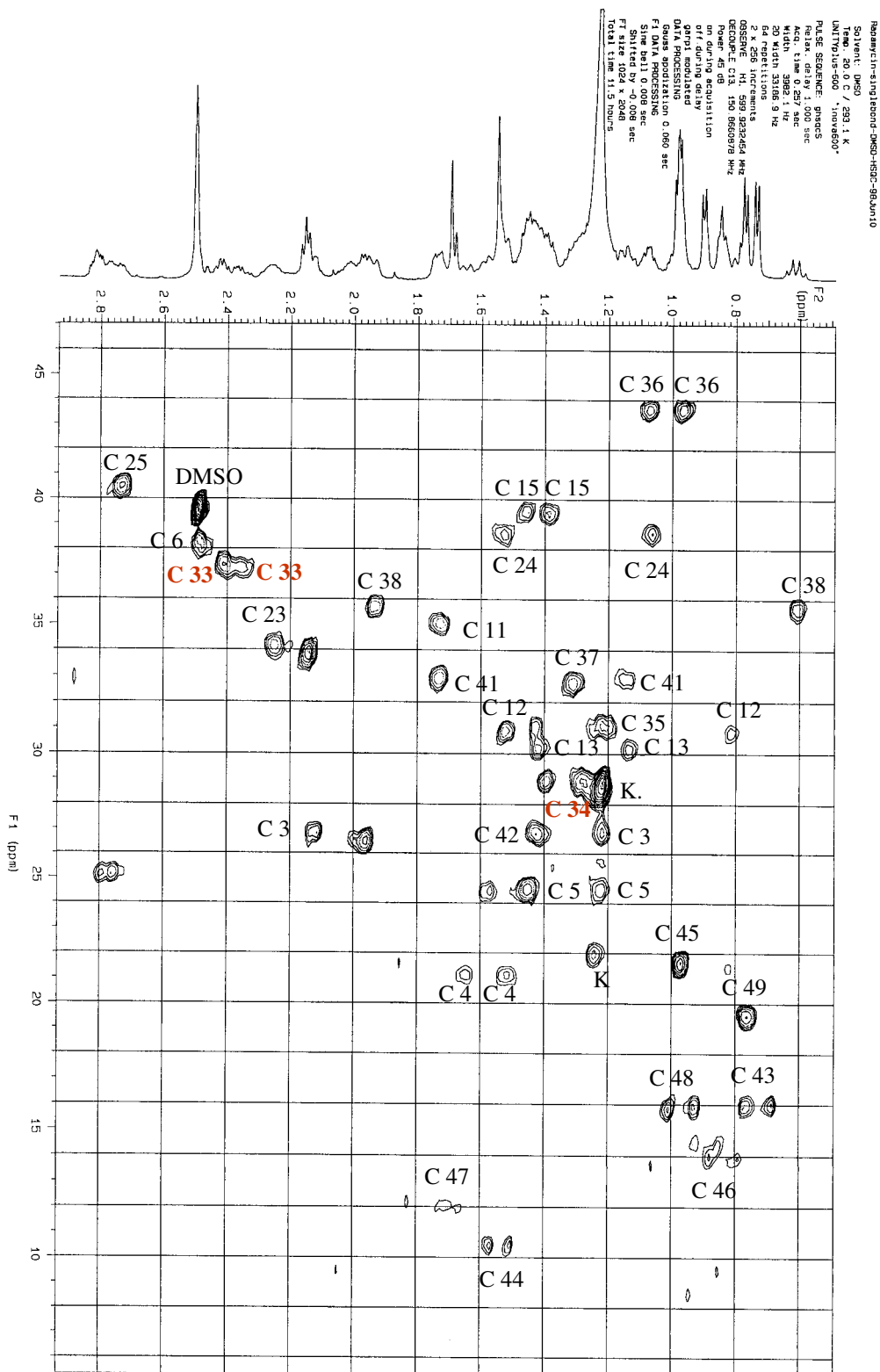


Abb. IV-41 HSQC-Spektrum des Rapamycin-Metaboliten RM in DMSO (d₆). Ausschnitt F1-Achse (¹³C) 5-46 ppm und F2-Achse (¹H) 0,7-2,9 ppm. (K=Kontamination)

Die Auswertung aller aufgenommenen Spektren ergaben die in Tabelle IV-4 dargestellten chemische Verschiebungen:

Rapamycin Metabolit RM					
Atome	¹H	¹³C	Atome	¹H	¹³C
C (1)		166,74	CH (27)	3,76	85,71
CH (2)	3,79	58,72	CH (28)	3,91	76,57
CH ₂ (3)	1,22 // 2,12	26,97	C (29)		137,59
CH ₂ (4)	1,51 // 1,64	21,27	CH (30)	5,11	126,89
CH ₂ (5)	1,23 // 1,45	24,64	CH (31)	3,42	45,16
CH₂ (6)	2,48 // 4,09	38,22	C (32)		211,13
OH (6)			CH₂ (33)	2,35 // 2,41	37,39
C (8)		170,69	CH₂ (34)	1,27 // 1,39	29,04
C (9)		206,08	CH (35)	1,22	31,35
C (10)		99,08	CH ₂ (36)	0,96 // 1,07	43,72
OH (10)	5,32		CH (37)	1,31	32,85
CH (11)	1,72	35,14	CH ₂ (38)	0,68 // 1,94	35,81
CH ₂ (12)	0,82 // 1,52	31,02	CH (39)	2,81	84,03
CH ₂ (13)	1,14 // 1,42	30,33	CH (40)	3,15	73,21
CH (14)	3,56	65,87	CH ₂ (41)	1,14 // 1,73	33,06
CH ₂ (15)	1,38 // 1,46	39,17	CH ₂ (42)	1,42 // 1,42	26,97
CH (16)	3,49	82,05	CH ₃ (43)	0,71	16,11
C (17)		136,04	CH ₃ (44)	1,52	10,61
CH (18)	6,43	128,85	CH ₃ (45)	0,96	21,76
CH (19)	6,33	127,48	CH ₃ (46)	0,88	14,03
CH (20)	6,33	132,82	CH ₃ (47)	1,67	12,09
CH (21)	6,13	130,22	CH ₃ (48)	0,96	16,05
CH (22)	5,52	138,71	CH ₃ (49)	0,75	19,65
CH (23)	2,26	34,32	CH ₃ (50)	2,94	55,05

CH ₂ (24)	1,06 // 1,53	38,77	CH ₃ (51)	3,11	57,48
CH (25)	2,74	40,63	CH ₃ (52)	3,27	56,62
C (26)		213,26			

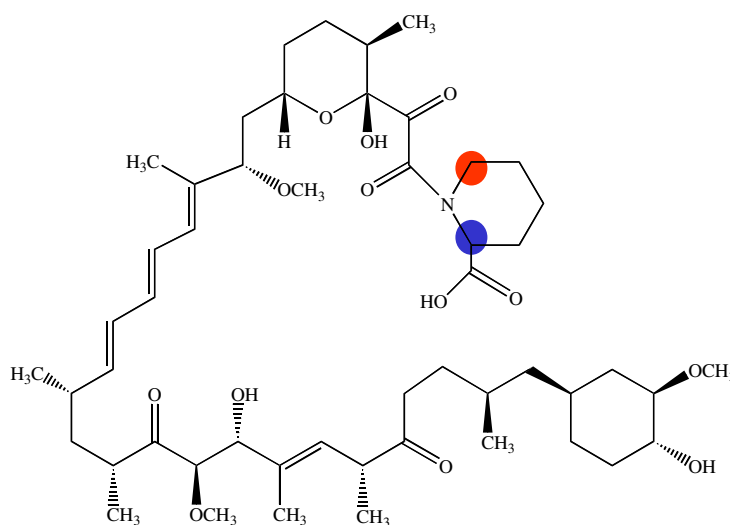
Tab. IV-4 Dargestellt sind die chemischen Verschiebungen der ¹H-Kerne und der ¹³C-Kerne des Rapamycin-Metaboliten RM in DMSO (d₆). Markiert sind die Werte, die im Vergleich zu Rapamycin auf die veränderte Struktur hinweisen.

Es konnte damit eindeutig gezeigt werden, daß die Hydrierung der Doppelbindung zwischen dem C-33 Atom und dem C-34 Atom stattgefunden hat und die Doppelbindung zwischen C-29 bis C-30 noch intakt ist.

Ebenso wie das ringgeöffnete Rapamycin-Isomer weist dieser Metabolit eine *cis*-Konfiguration auf. Die charakteristischen Verschiebungen sowie die Struktur sind im Folgenden dargestellt:

Rapamycin-Metabolite RM

¹ H	¹³ C
3.79	58.72
2.48	38.22
4.09	
*δ ((D ₆)DMSO)	



cis - Rapamycin-Metabolite RM

5.4. NMR-Experimente des 39-O-Demethyl-Rapamycin

Da die Isolierung des Demethyl-Rapamycin-Metaboliten nur eine Ausbeute von ca. 100 µg betrug, war das Signal-Rausch-Verhältnis bei diesen NMR-Experimenten ungünstig. Um die Vermutung zu bestätigen, daß es sich um 39-O-Demethyl-Rapamycin handelt, war die Zuordnung der Signale für die drei Methoxy-Gruppen nötig. Da diese aufgrund der Methyl-Gruppen je ein scharfes Singulett ergaben, war eine Zuordnung möglich. In Abbildung IV-42 sind die Spektren des 39-O-Demethyl-Rapamycin und des Rapamycins gezeigt.

Der Wasserpeak des DMSO (d_6) liegt im Bereich der Signale für die Methoxy-Gruppe, dadurch tritt eine teilweise Überlagerung der Signale auf. Um jedoch eine Zuordnung treffen zu können, wurde der Metabolit in Acetonitril (d_3) gelöst. Zum Vergleich der chemischen Verschiebungen in diesem Lösungsmittel, wurde Rapamycin ebenfalls in Acetonitril (d_3) gelöst und vermessen. In Abbildung IV-42 ist ein ^1H -Spektrum des 39-O-Demethyl-Rapamycin dem des Rapamycins gegenübergestellt. Es ist deutlich zu sehen, daß das Signal der Methoxy-Gruppe OCH_3 (52) nicht mehr vorhanden ist.

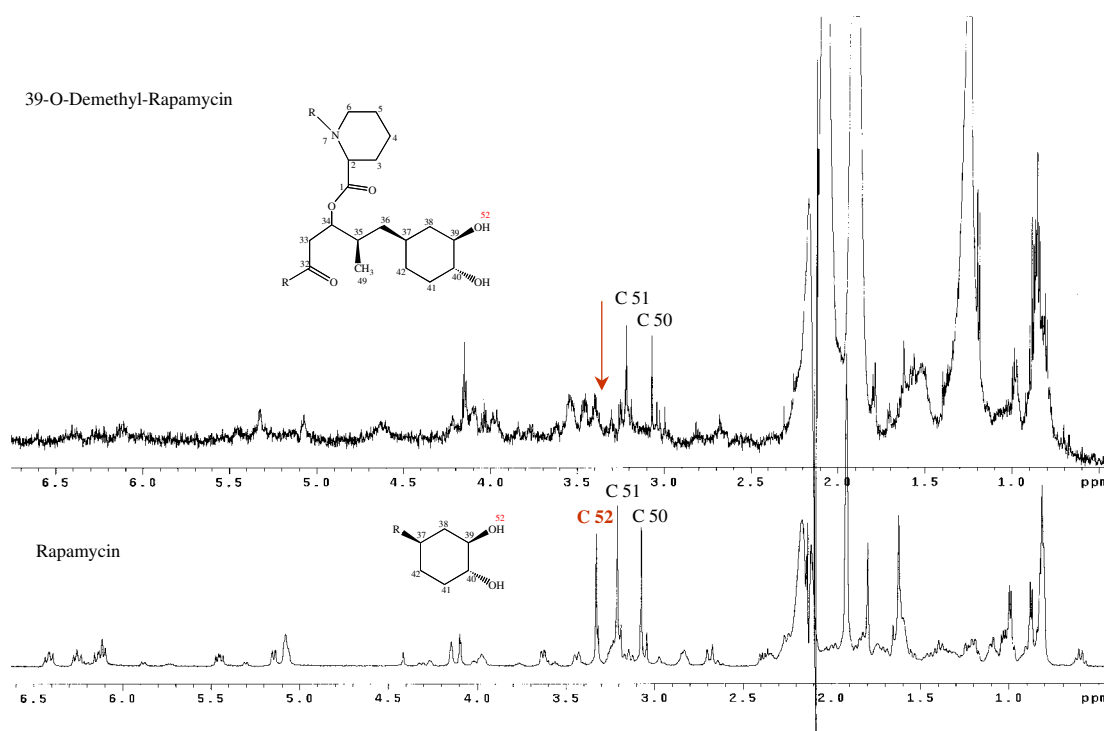


Abb. IV-42 Dargestellt sind die ^1H -Spektren des 39-O-Demethyl-Rapamycin und des Rapamycin in CD_3CN . Die charakteristischen Signale für die drei Methoxy-Gruppen wurden markiert.

Kapitel V – Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Aufklärung des *in vitro* Metabolismus von Rapamycin. Dieses potente Immunsuppressivum bildet eine Reihe von hydroxylierten und demethylierten Metaboliten. Für drei Metabolite und zwei Degradationsprodukte sind die Strukturen und damit die Metabolisierungsposition zugeordnet worden (Christians *et al.* 1992). In Metabolisierungsuntersuchungen von Tacrolimus (FK 506), eine dem Rapamycin strukturverwandte Verbindung, wurde gezeigt, daß Biotransformationsprodukte zur pharmakologischen Wirkung sowie zur Toxizität der Ausgangsverbindung beitragen (Radeke *et al.* 1992, Chan *et al.* 1993). Es ist deshalb von entscheidender Bedeutung, alle Metabolite zu charakterisieren bzw. zu identifizieren.

1. Metabolisierungsuntersuchungen

Zur Untersuchung des Metabolismus eines Arzneistoffes spielen *in vitro* Experimente eine bedeutende Rolle. Als ein solches *in vitro* System eignet sich, je nach Zielstellung, die Mikrosomenfraktion der Leber verschiedener Spezies. Diese Mikrosomen umfassen als Äquivalent des endoplasmatischen Retikulums, einen Teil der arzneistoffmetabolisierenden Enzyme. Vor allem den Cytochrom-P450-abhängigen Monooxygenasen, welche zur Bildung von Phase I – Metaboliten führen, kommt eine besondere Bedeutung zu (Licollari 1996).

Wendet man ein *in vitro* System bestehend aus Lebermikrosomen und NADPH auf Rapamycin an, werden hauptsächlich Phase-I-Metabolite gebildet (Trepanier *et al.* 1998). Bei diesen Metaboliten handelt es sich um 6 hydroxylierte- und / oder demethylierte Metabolite (Christians *et al.* 1992). Wang *et al.* (1995, 1997) beschreibt drei Rapamycin-Metabolite, welche im Blutplasma bzw. in der Gallenflüssigkeit von mit Rapamycin behandelten Ratten gefunden wurden. Dabei handelt es sich um das Rapamycin-Isomer, einen Monohydroxy- und einen Demethyl-Metaboliten.

Als Hauptkomponenten einer *in vitro* Inkubation wurden in der vorliegenden Arbeit nicht-modifiziertes Rapamycin (56,6%) und das Rapamycin-Isomer (30,8%) detektiert. Somit ist die Summe an hydroxylierten, demethylierten und anderen Metaboliten nur 12,6%, bezogen auf die eingesetzte Menge an Rapamycin. Dieses Metaboliten-Verhältnis konnte auch durch Variation der Inkubationsparameter nicht verbessert werden. So wurde nach einer

Inkubationszeit von 60 min eine Maximalkonzentration an Metaboliten erreicht. Längere Inkubationszeiten erwiesen sich nicht als vorteilhaft, da die Metabolite weiter transformiert wurden. Eine Detektion war damit nicht mehr möglich.

Um zu klären, ob die Bildung der Metabolite NADPH-abhängig ist, sind Kontroll-Inkubationen durchgeführt worden. Vergleicht man die als Kontrollen verwendeten Inkubationen ohne NADPH bzw. mit hitzedenaturierten Mikrosomen, so fällt auf, daß das ringgeöffnete Rapamycin-Isomer in beiden Fällen gebildet wird. Andere Produkte, wie hydroxylierte oder demethylierte Metabolite, wurden in diesen Inkubationsansätzen nicht detektiert. Bei Inkubationen, die nur NADPH-regenerierendes System und keine hitzedenaturierten Mikrosomen enthalten, wird das Isomer deutlich geringer gebildet als bei Inkubationen ohne NADPH und mit hitzedenaturierten Mikrosomen. Demnach ist die Gegenwart von Proteinen, auch wenn diese denaturiert sind, für die Isomerisierung mit verantwortlich. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, daß auch NADPH-abhängige Enzyme in geringem Maße das Isomer bilden und somit einen Beitrag zur Isomerisierung leisten. Dies ist wahrscheinlich, da das Rapamycin-Isomer ebenfalls als ein, *in vivo* gebildeter, Metabolit beschrieben wird (Chan *et al.* 1993, Wang *et al.* 1997).

Inwieweit bei der Isomerisierung der Immunsuppressiva Enzyme eine Rolle spielen, läßt sich nicht abschätzen. Dies liegt u.a. daran, daß das Isomer in Gegenwart von NADPH und Mikrosomen durch Biotransformationen abgebaut bzw. in Metabolite der zweiten Generation umgewandelt wird. Somit ist eine Quantifizierung der Isomerbildung nach Inkubation mit intakten Enzymen im Vergleich zu den Kontrollproben nicht möglich.

Da die Rapamycin-Metabolite in den Kontrollproben nicht gefunden wurden, handelt es sich bei ihrer Bildung um einen NADPH-abhängigen Prozeß. Sattler *et al.* (1992) konnte zeigen, daß Rapamycin in Leber- und Darmmikrosomen durch Cytochrom P-450 3A Enzyme metabolisiert wird.

Vergleicht man nun das Metabolisierungsverhalten von Rapamycin in Schweine- bzw. menschlichen Mikrosomen aus Leber und Darm, kommt man zu qualitativ gleichen Ergebnissen. Diese Ergebnisse bestätigen die mit Tacrolimus und Rapamycin erhaltenen Daten (Lampen 1995). Auch hier wurde nach Inkubation der beiden Immunsuppressiva mit Mikrosomen verschiedener Herkunft ein weitgehend übereinstimmendes Metabolisierungsmuster erhalten.

Die Metabolisierung des Rapamycins findet demnach sowohl in der Leber als auch im Darm über den gleichen Metabolisierungsweg statt. Dabei ist die Quantität der gebildeten Metabolite abhängig von der Herkunft der Mikrosomen. Signifikante Unterschiede der

Spezies, Mensch und Schwein, wurden nicht beobachtet. Speziesunterschiede können beim Phase-I-Metabolismus auf den verschiedenen hohen Gehalt an Cytochrom P450, wie auch auf unterschiedliche Struktur und Stabilität der Isoenzyme sowie auf unterschiedliche Aktivität derselben zurückzuführen sein (Koch 1985).

In vivo Untersuchungen zum Metabolismus von Rapamycin und SDZ RAD liegen derzeit noch nicht vor. Dies ist begründet durch die geringen Metaboliten-Konzentrationen an Immunsuppressiva im Blut, was eine Folge der hohen immunsuppressiven Aktivität und der daraus resultierenden geringen therapeutischen Dosis von Rapamycin und SDZ RAD ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Blutprobe eines mit Rapamycin behandelten Patienten untersucht. Hierbei wurden ebenfalls ein Demethyl-Rapamycin-Metabolit sowie Hydroxy-Rapamycin-Metabolite nachgewiesen. Die durch *in vitro* Inkubationen erhaltenen Ergebnisse lassen sich somit gut auf das *in vivo* System anwenden. Von Vorteil wäre eine Studie, bei der eine repräsentative Anzahl von verschiedenen Blutproben untersucht wird. Erst dann wird man einschätzen können, ob alle *in vitro* generierten Metabolite auch *in vivo* zu erwarten sind.

Um Metabolite mit analytischen Methoden, wie z.B. der NMR-Spektroskopie untersuchen zu können, muß mindestens ein Milligramm des Analyten vorliegen. Die Isolierung einer entsprechenden Menge an Metaboliten setzt eine präparative Inkubation voraus. In einem *up scaling* Verfahren gelang es, die Inkubation von 62 mg Rapamycin durchzuführen.

Im Vergleich zur analytischen Inkubation wurde beim *upscaling* das gleiche Metabolitenmuster sowie entsprechende Metabolitenkonzentrationen erhalten. Somit steht nun ein Zugang zur Isolierung präparativer Mengen an Rapamycin-Metaboliten zur Verfügung. Um jedoch eine Sättigung der Enzyme zu verhindern, ist eine direkte Maßstabsvergrößerung unerlässlich, was Inkubationsvolumina von einigen Litern bedingt. Aus diesem Grund haben wir nach Wegen zur Bildung der einzelnen Metabolite, die dann für weitere Untersuchungen zur Verfügung stehen, gesucht, die dieses Problem kompensieren.

Wie bereits diskutiert, ist die Bildung des Rapamycin-Isomers in Gegenwart von Proteinen sehr leicht möglich. Da bei dieser Inkubation keine Nebenprodukte gebildet werden, scheint dies eine Alternative zur Inkubation mit intakten Lebermikrosomen, bei welcher das gesamte Metabolitenmuster gebildet wird, zu sein. Um eine einfache und nahezu quantitative Umsetzung des Rapamycins zum Isomer zu erreichen, wurde mit hitzedenaturierten Lebermikrosomen inkubiert. Da kaum andere Transformationsprodukte abgetrennt werden müssen, besteht der Vorteil dieser Methode in der einfachen und kontaminationsfreien

Isolierung des Isomers. Das so gebildeten Isomer stand nun in ausreichender Menge (einige mg) für Inkubationsversuche zur Bildung von Sekundär-Metaboliten als auch für analytische Untersuchungsmethoden zur Verfügung.

Inkubiert man nun das Rapamycin-Isomer mit menschlichen Lebermikrosomen in Gegenwart von NADPH, so ist interessanterweise die Bildung des Rapamycin-Metaboliten RM zu beobachten. Damit muß dieser Metabolit ein Metabolit zweiter Generation sein. Daß es sich bei der Bildung von RM um einen NADPH-abhängigen Prozeß handelt, zeigen die Kontrollinkubationen ohne NADPH. In letzteren Fall liegt das Isomer unverändert vor und es werden keine Abbau- oder Biotransformationsprodukte gebildet. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß sich der Metabolit RM aus dem Isomer auch durch Inkubation mit Lebercytosol bildet. Die Generierung von RM kann somit sowohl durch mikrosomale als auch cytosolische Enzyme induziert werden. Als Vorteil bei der Transformation des Isomeren mit Cytosol stellt sich die Bildungsgeschwindigkeit von RM dar. So ist die Bildung von RM schon innerhalb von 60 min vollständig abgeschlossen. Es bilden sich in geringem Maße auch polarere Substanzen, welche nicht weiter identifiziert werden konnten. Möglich wäre eine Bildung von Phase II Metaboliten wie Jacobsen sie für Pravastatin, einem HMG-CoA-Reduktase Inhibitor mit Makrolid-Struktur, beschreibt (Jacobsen 1998).

Um die orale Bioverfügbarkeit des Rapamycins zu verbessern, werden immer neue Wege beschritten (Pomer 1994). Die Derivatisierung des Rapamycins am C-40 Atom führt zum 40-O-(2-Hydroxyethyl)-Rapamycin (SDZ RAD). Von dieser abgewandelten Struktur erhofft man sich einige Vorteile, wie z.B. eine bessere orale Bioverfügbarkeit (Schuler *et al.* 1997, Bohler *et al.* 1998). Da sich dieses Immunsuppressivum ebenfalls in der klinischen Prüfung befindet, lagen dem Rapamycin vergleichbare Untersuchungen nahe.

Dannecker *et al.* (1998) beschreibt die *in vitro* Inkubation des SDZ RAD mit Lebermikrosomen. Die dabei gebildeten Metaboliten wurden als demethylierte und einfach hydroxylierte Verbindungen charakterisiert. Das SDZ RAD-Isomer wurde ebenfalls in den Kontrollproben ohne NADPH detektiert. Für beide Immunsuppressiva, Rapamycin und SDZ RAD, wird ein ähnliches Metabolisierungsmuster vermutet (Vidal *et al.* 1998).

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte *in vitro* Metabolisierung des SDZ RAD führte zur Bildung des ringgeöffneten Isomers sowie einer Reihe von hydroxylierten Metaboliten. Im Gegensatz zu den in der Literatur (Dannecker *et al.* 1998; Vidal *et al.* 1998) beschriebenen Metaboliten konnten keine demethylierten Produkte charakterisiert werden. Die Bildung der zwei Rotamere *trans*- und *cis*- SDZ RAD wird, ähnlich dem Rapamycin,

beobachtet. Da die für diese beiden Konfigurationen verantwortliche Region (C-8 - N) in der Molekülstruktur bei beiden Immunsuppressiva gleich ist, wurde dieser Effekt erwartet.

2. Extraktion der Immunsuppressiva aus Inkubationsansätzen und Blutproben

Bei den in der Literatur beschriebenen Methoden zur Probenvorbereitung werden die Analyte häufig durch aufwendige mehrstufige Extraktions-Verfahren aus der jeweiligen Matrix isoliert (Christians und Sewing 1988, Yatscoff *et al.* 1992, Tuttle *et al.* 1997). Dies ist zum einen sehr zeitaufwendig und andererseits beinhalten diese Verfahren zufällige Fehler. Aus diesem Grund geht der Trend immer weiter zu schnelleren und effektiveren Extraktionsverfahren (Müller *et al.* 1982, Schmeer *et al.* 1997). Del Cont Bernard *et al.* (1992) beschreibt die Anwendung einer automatisierten HPLC-Methode zur Bestimmung eines Analyten in deproteiniertem Blutplasma.

Für die nach Inkubation von Rapamycin mit menschlichen Lebermikrosomen generierten Metabolite haben wir ein ähnliches Extraktionsverfahren entwickelt, was sehr gut reproduzierbar und zeitsparend ist sowie gute Wiederfindungsraten (>91%) aufweist. Die automatisierte Fest-Phasen-Extraktion (on-line SPE) in Verbindung mit der HPLC-Analytik eignet sich sowohl für Proben deren Matrix ein Inkubationsansatz ist als auch für die Extraktion von deproteinierten Blutproben. Den limitierenden Faktor dieser Extraktion stellt das begrenzte Injektionsvolumen (einige 100 µl) dar, da die Extraktionskartusche durch den Autosampler der HPLC beladen wird. Damit liegt eine apparative Begrenzung der zu extrahierenden Probenvolumina vor.

Die Konzentrationen der Metabolite in Blutproben liegen unterhalb der für die HPLC mit UV-Detektion möglichen Nachweisgrenze, was eine hohe Aufkonzentrierung der Analyten notwendig macht. Dies betrifft ebenfalls die durch eine *upscaling* Inkubation erhaltene Metaboliten-Menge. Hierbei müssen größere Volumina (ml-L) extrahiert werden, was eine Flüssig-Flüssig-Extraktion nötig macht. Das Lösungsmittel muß anschließend wieder gut abtrennbar sein, um eine thermische Belastung der Analyte so gering wie möglich zu halten. Als ein geeignetes Extraktionsmittel erwies sich t-Butyl-Methyl-Ether (t-BME). Napoli *et al.* beschreibt eine vierstufige Flüssig-Flüssig-Extraktion des Rapamycins aus Blut mit t-BME und anschließend mit Ethanol (Napoli und Kahan 1994). Dabei wurden Wiederfindungsraten von 96% erreicht. Diese Methode wurde modifiziert und ergab ähnlich gute Wiederfindungsraten (94,6% bei Inkubationsansätze und 79,1% bei Blutproben). Es konnten

jedoch im Gegensatz dazu die Extraktionsschritte verkürzt und störende Komponenten optimal abgetrennt werden. Dies hatte den Vorteil, daß im Gegensatz zu der in der Literatur beschriebenen Methode, die Anwendung von zwei hintereinander geschalteten HPLC-Säulen nicht notwendig ist. Auch die Blutproben konnten nun ohne eine Tandem-Schaltung der HPLC-Säulen chromatographiert werden.

3. HPLC-Analytik der Makrolid-Immunsuppressiva

Ein Großteil der in der Literatur beschriebenen HPLC-Methoden für Rapamycin schließen keine Trennung und Detektion der Metabolite ein (Wang *et al.* 1995, Napoli und Kahan 1996, Svenson *et al.* 1997). Lediglich für die Isolierung von *in vivo* Rapamycin-Metaboliten aus Gallenflüssigkeit und aus Blutplasma steht eine HPLC-Methode zur Verfügung (Wang *et al.* 1997). Diese Methode benötigt jedoch zur Isolierung der Metabolite einen aufwendigen Re-Chromatographie-Schritt. Darüber hinaus gelang Christians *et al.* (1992) die Isolierung des 39-O-Demethyl-Rapamycins als reine Fraktion. Weitere Metabolite konnten nicht getrennt werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine HPLC-Methode entwickelt um das, nach Extraktion erhaltene, Metabolitengemisch von Rapamycin und SDZ RAD mittels HPLC chromatographisch zu trennen. Ziel dieser Arbeit war insbesondere die Trennung von Konstitutionsisomeren, z.B. der mono- und dihydroxylierten Metabolite. Es gelang die Trennung von 13 Komponenten eines nach Inkubation erhaltenen Metabolitengemisches. Die so getrennten Metabolite können isoliert und identifiziert werden.

Interessant war die Anwesenheit der Metabolite RM (Rapamycin-Inkubation) und SM (SDZ RAD-Inkubation) im HPLC-Chromatogramm. Diese Metabolite weisen ähnliche chromatographische Eigenschaften wie das jeweilige Isomer und die jeweilige Ausgangssubstanz auf. Dies läßt auf eine andere Art der Metabolisierung als Hydroxylierung und Demethylierung schließen. Die Biotransformation von Arzneistoffen durch Demethylierung wie auch durch Hydroxylierung (Trepanier *et al.* 1998) führt zu polaren Metaboliten, welche im HPLC-Chromatogramm bei kürzeren Retentionszeiten zu finden sein müßten. Eine mögliche Epoxidierung (Koch 1985) des Triensystems zwischen C-17 bis C-22 war ebenfalls nicht erfolgt, was die UV-Spektren dieser Metabolite beweisen. Sie zeigen in guter Übereinstimmung mit den Ausgangsverbindungen und den Isomeren die charakteristische dreizackige Form mit einem Absorptionsmaximum bei $\lambda=276$ nm.

Strukturvorschläge für diese Metaboliten (RM, SM) konnte mittels HPLC-Analytik nicht gemacht werden.

Um diese Metabolite mit anderen analytischen Methoden (Massenspektrometrie, NMR-Spektroskopie) untersuchen zu können, war die Isolierung der Metabolite nötig. Zu diesem Zweck wurde eine präparative HPLC-Methode für Rapamycin-Metabolite entwickelt. In einem *upscaling* Verfahren wurden die Parameter der analytischen Trennung für eine präparative Methode modifiziert. Somit war es möglich den Rapamycin-Metaboliten RM (2,3 mg), das Rapamycin-Isomer (2,5mg), 39-O-Demethyl-Rapamycin (100µg) und drei monohydroxylierte Metabolite ($\leq 80\mu\text{g}$) zu isolieren.

Für SDZ RAD gibt es in der Literatur keine Beispiele, die eine Isolierung von Metaboliten beschreiben. Lediglich eine HPLC-MS-Methode wurde veröffentlicht, mit welcher SDZ RAD in Blutproben von transplantierten Patienten bestimmt werden konnte. Metabolite wurden mit dieser Methode nicht erfaßt (Segarra *et al.* 1998). Vidal *et al.* beschreibt die Identifizierung von SDZ RAD Metaboliten mit LC-MS. Hierbei wurden die Metabolite nur teilweise chromatographisch getrennt und durch MS-Analytik identifiziert (Vidal *et al.* 1998). Da keine vollständige Trennung der Metabolite erfolgte, können Interferenzen der einzelnen Metabolite nicht unterdrückt werden. Eine adäquate chromatographische Trennung der Metabolite ist jedoch für weiterführende massenspektrometrische Untersuchungen unerlässlich (Lehmann 1996, Voyksner und Pack 1991).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Metabolite des SDZ RAD mittels HPLC getrennt werden können, wobei die Modifizierung am C-40 keine Verschiebung der Retentionszeiten, im Vergleich zu Rapamycin, bedingte. Das Elutionsmuster der Metabolite entsprach dabei dem des Rapamycins, so daß durch Vergleich der HPLC-Chromatogramme beider Immunsuppressiva Rückschlüsse auf die Transformationsprodukte des SDZ RAD gezogen werden konnten.

Auffällig war, daß kein Peak für einen 39-O-Demethyl-SDZ RAD-Metaboliten detektiert wurde. Dies läßt sich darauf zurückführen, daß die $\text{C}_2\text{H}_4\text{OH}$ -Gruppe (im Gegensatz zu der OH-Gruppe am C-40 bei Rapamycin) zu einer sterische Hinderung am C-39 Atom führt. Der Angriff durch Enzyme wird dadurch am C-39 Atom erschwert und eine Demethylierung ist nicht mehr möglich. Dies wird in Abbildung V-1 verdeutlicht. Freie Drehbarkeit der $\text{C}_2\text{H}_4\text{OH}$ -Gruppe ist mit einem Pfeil markiert und man sieht die starke Abschirmung der am C-39 befindlichen Methoxy-Gruppe.

Das Metabolitenmuster der hydroxylierten Metabolite des SDZ RAD im HPLC-Chromatogramm glich weitestgehend dem des Rapamycin. Dies war auch zu erwarten, da die beschriebenen Hydroxylierungspositionen des Rapamycins am C₁₂ und am C₃₄ lokalisiert waren (Steit *et al.* 1996). Diese Positionen unterliegen nicht dem Einfluß der C₂H₄OH-Gruppe.

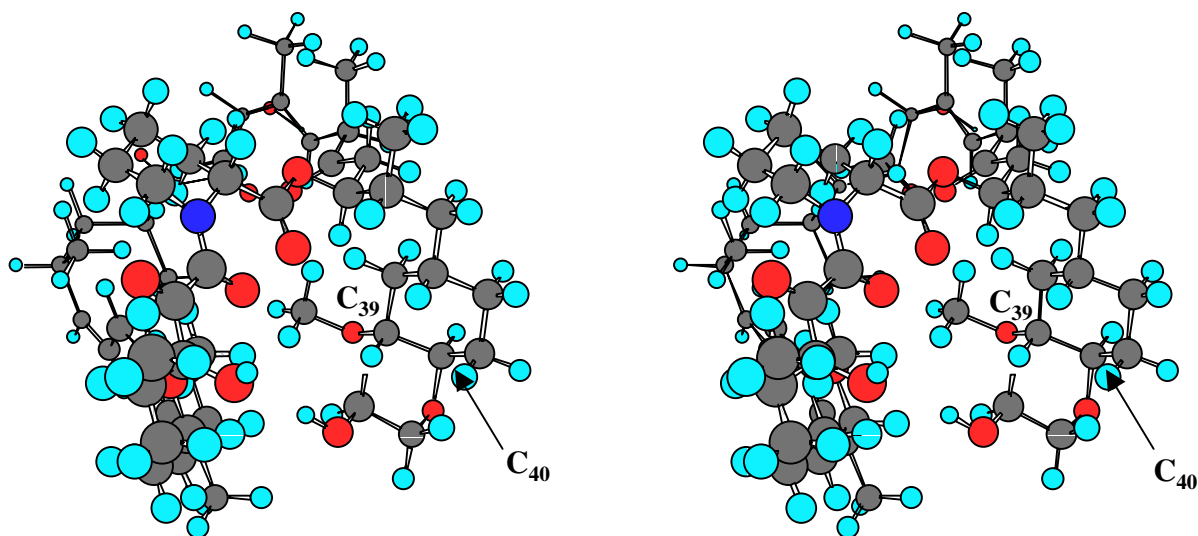


Abb. V-1 Molekülstruktur von SDZ RAD (Blau: N-Atom, Rot: O-Atome, Grau: C-Atome, Türkis: H-Atome)

Im Gegensatz dazu wird jedoch ein Teil des Cyclohexan-Rings abgeschirmt. Dies macht im Bereich C-39 bis C-42 des Cyclohexan-Ring eine Biotransformation durch Enzyme unwahrscheinlich.

Für SDZ RAD wurden die Metabolite nach einer analytischen HPLC-Trennung isoliert, da die Ausgangsmenge (1,0 mg) an SDZ RAD begrenzt war. Diese Metabolite wurden ebenfalls mit Massenspektrometrie untersucht.

4. Massenspektrometrische Analytik der Makrolid-Immunsuppressiva

Die mit HPLC getrennten Metabolite konnten anhand ihrer Retentionszeit charakterisiert werden. Eine genaue Bestimmung der Metabolisierungsart und -position war jedoch nicht möglich. Die Identifizierung der Metabolite bezüglich ihrer Molekularmasse wurde durch die Kopplung einer HPLC mit einem Quadrupol-Massenspektrometer mit ESI-Interface realisiert. Strukturuntersuchungen der Metabolite wurden mit Nano-ESI-Tandem-Massenspektrometrie durchgeführt. In beiden Fällen wurden die Moleküle durch Elektrospray-Ionisation in die

Gasphase überführt. Diese weiche Ionisierungsmöglichkeit hat den Vorteil, daß auch instabile, hochpolare Analyt-Moleküle ohne vorheriges Fragmentieren in das Massenspektrometer überführt werden können (Lehmann 1991, Kuksis und Myher 1995). Die ebenfalls gebräuchliche Elektronenstoß-Ionisation (*electron impact, EI*) läßt dies nicht zu, so daß es zu einer Vielzahl von Fragmenten kommt und keine Molekülionen detektiert werden können (Streit 1998). Ein weiterer Vorteil der ESI-Ionisation ist die hohe Ionisierungsausbeute, was einen beträchtlichen Empfindlichkeitsgewinn und damit einen Zugang zu kleineren Analytmengen darstellt (Smith *et al.* 1990).

Die Extrakte einer Inkubation von Rapamycin bzw. SDZ RAD mit menschlichen Lebermikrosomen wurden in ein LC-ESI-MS-System überführt. Damit war es möglich, alle im chromatographischen Bereich auftretenden Peaks nun hinsichtlich ihres Masse-Ladungsverhältnisses (m/z) zu charakterisieren. Die Aufnahme von Spektren im Scan-Modus erlaubte eine Überprüfung der Reinheit der HPLC-Peaks. Nachteil dieser Methode ist jedoch der Empfindlichkeitsverlust. Nach einer ersten Zuordnung der Peaks wurden die MS-Spektren im SIM-Modus aufgenommen. Dies machte die Methode deutlich empfindlicher, da sich die tatsächliche Meßzeit und damit die Zahl der registrierten Ionen erheblich erhöht (Lehmann 1996).

Es wurden jeweils die Natrium-Addukte des Molekülionen $[M+Na^+]^+$ und nicht die in geringerem Maße ebenfalls vorhandenen Kalium-Addukte $[M+K^+]^+$ detektiert. Es kam jedoch zu Überschneidungen, da die Kalium-Addukte der Ausgangsverbindungen denen der Natrium-Addukte der monohydroxylierten Metaboliten entsprachen ($[M_{\text{Rapamycin}}+K^+]^+ = [M_{\text{Monohydroxy}}+Na^+]^+$). Durch die Retentionszeiten war eine Unterscheidung jedoch leicht möglich. Somit konnten alle 13 Peaks des HPLC-Chromatogramms von Rapamycin (Abb. IV-22) zugeordnet werden.

Detektiert wurden drei Dihydroxy-, fünf Monohydroxy-, ein Demethyl- und ein Metabolite RM. Außerdem lagen als Hauptkomponenten das Rapamycin-Isomer, *trans* Rapamycin und *cis* Rapamycin vor.

Auffällig war die Anwesenheit von nur einem Demethyl-Rapamycin-Metaboliten, welcher nach weiterführenden Untersuchungen als das 39-O-Demethyl-Rapamycin identifiziert werden konnte. Der in der Literatur (Streit *et al.* 1996) beschriebene 16-O-Demethyl-Metabolit wurde nicht nachgewiesen. Die Frage nach der Existenz dieses Metaboliten ist nicht einfach zu beantworten, da bei Fragmentierungsuntersuchungen der Metabolite die Bildung eines Tetraensystems beobachtet wird. Dies entsteht durch die Abspaltung der Methoxy-Gruppe bzw. des Wassers (bei Annahme es handelt sich um 16-O-Demethyl-Rapamycin). Bei

den in der Literatur beschriebenen Experimenten war keine Isolierung des 16-O-Demethyl Metaboliten möglich. Die aufgenommenen Spektren setzten sich dann aus den Fragmenten, von allen nicht getrennten Metaboliten mit gleichem Masse-Ladungs-Verhältnis, zusammen. Damit sind auch Tandem-MS-Experimente nicht aussagekräftig, da die Isomere im Quadrupol Q1 keiner zusätzlichen Auftrennung unterliegen.

Für den Rapamycin-Metaboliten RM (M XI) wurde eine Molekularmasse $[M+Na^+]^+$ m/z 938.5 bestimmt. Da die Polarität und die damit verbundene Retentionszeit dieses Metaboliten RM dem des Isomer bzw. des Rapamycin ähnelt, kann es sich nicht um den in der Literatur (Streit *et al.* 1996) als demethyliert- und hydroxyliert beschriebenen Metaboliten handeln. Die Polarität eines solchen Metaboliten würde eine Retentionszeit im Bereich der dihydroxylierten Metabolite bedingen. Dies ist jedoch nicht der Fall. Wie durch Metabolisierungsuntersuchungen weiterhin gezeigt werden konnte, entsteht RM aus dem ringgeöffneten Rapamycin-Isomer, was ebenfalls auf eine andere Art der Metabolisierung hinweist. Durch Untersuchungen mittels MS wurde gezeigt, daß dieser Metabolit eine Massendifferenz zu Rapamycin, bzw. dem Isomer von 2 amu aufweist. Diese Differenz deutet auf eine Hydrierung hin. Eine solche Reaktion ist an verschiedenen Doppelbindungen im Molekül möglich. Das UV-Spektrum dieses Metaboliten zeigt die charakteristische dreizackige Form, was auf ein intaktes Triensystem zwischen C-17 bis C-22 hinweist. Die Doppelbindung zwischen C-29 bis C-30 trägt als chromophore Gruppe (Hesse *et al.* 1991) ebenfalls zu diesem UV-Spektrum bei, so daß auch hier eine Hydrierung unwahrscheinlich scheint. Damit liegt nahe, daß die Hydrierung des Isomers an C-33 bis C-34 stattfindet, da dies die einzige modifizierte Stelle im Gegensatz zu Rapamycin darstellt. In Abbildung V-2 ist ein möglicher Metabolisierungsweg des Metaboliten RM dargestellt.

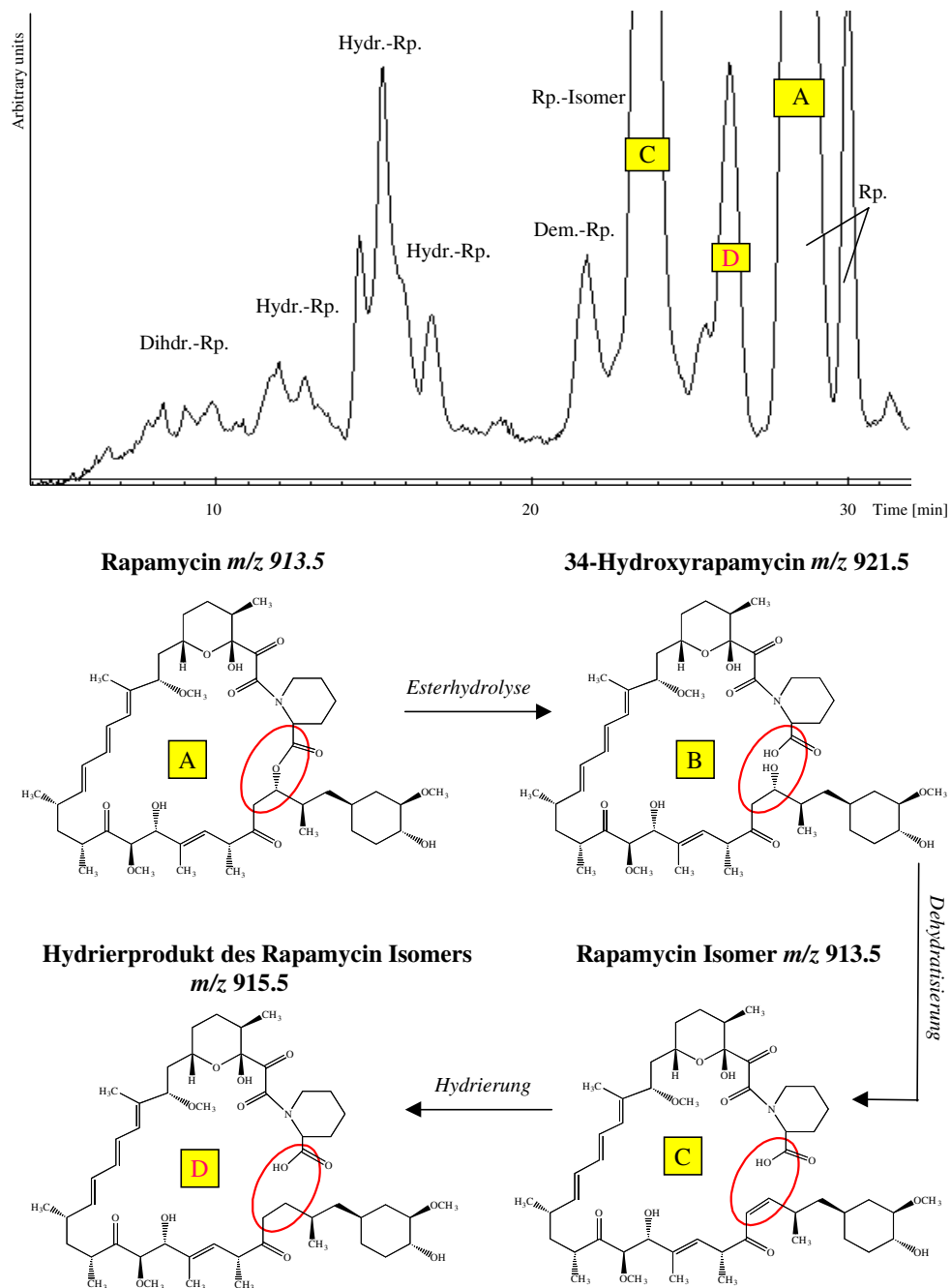


Abb. V-2 Vorgeschlagener Metabolisierungsweg für den Rapamycin-Metaboliten RM, welcher durch Inkubation des Rapamycin mit menschlichen Lebermikrosomen entsteht.

Hydrierungen von Doppelbindungen wurden schon für Terpene, Steroide u.a. beschrieben. Auch substituierte Zimtsäuren wie Ferulasäure oder Isoferulasäure werden durch Rattenleberschnitte zu den Dihydroverbindungen reduziert (Koch 1985). Für Makrolid-Immunsuppressiva, wie Tacrolimus und Rapamycin, ist diese Art von Biotransformation jedoch noch nicht beschrieben. Unter Einwirkung von menschlichen Lebermikrosomen bei 37°C wurden ausschließlich Hydroxylierungen und / oder Demethylierungen, wie auch

Hydratisierungen beschrieben (Streit *et al.* 1996, Nickmilder *et al.* 1998). Die Struktur dieses Metaboliten (RM) wurde mit Nano-ESI-Tandem-MS und NMR aufgeklärt.

Die Zuordnung der Molekülmassen zu den entsprechenden Peaks im HPLC-Chromatogramm von SDZ RAD-Metaboliten gelang ebenfalls mit Hilfe der LC-ESI-MS-Technik. Um eine maximale Empfindlichkeit zu erreichen, wurden die Messungen im SIM-Modus durchgeführt. Die dabei definierten Massen bezogen sich auf die Natrium-Addukte der Molekülonen $[M+Na^+]^+$. Durch Zuordnung der Peaks wurde gezeigt, daß SDZ RAD ein dem Rapamycin sehr ähnliches Verhalten aufweist. Es wurden, wie bei Rapamycin, drei dihydroxylierte Verbindungen, das SDZ RAD-Isomer und das *trans*- und *cis* SDZ RAD detektiert. Abweichungen gab es bei den Monohydroxy-Metaboliten. Fünf dem Rapamycin vergleichbare Metabolite sowie drei weitere wurden nachgewiesen. Diese drei Metabolite sind auch in einer Rapamycin-Inkubation zu finden, jedoch in so geringen Mengen, daß sie nahe der Nachweisgrenze lagen und für die Untersuchung der Metabolite nicht in Betracht gezogen wurden. Die zusätzlichen Metabolite sind unpolarer als die anderen monohydroxylierten Verbindungen und liegen damit bei längeren Retentionszeiten. Aufgrund der ebenfalls geringen Bildung dieser SDZ RAD-Metabolite, konnte nicht genügend Material für weitere analytische Untersuchungen isoliert werden.

Dannecker *et al.* beschreiben die Identifizierung des 39-O-Demethyl-SDZ RAD (Dannecker *et al.* 1998). Dieser SDZ RAD-Metabolite konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Dies ist mit der schon oben beschriebenen sterischen Hinderung am C-40 zu erklären. Statt dessen wurde bei einer dem Demethyl-SDZ RAD entsprechenden Retentionszeit ein Monohydroxy-Metabolit detektiert.

Da dieser Metabolit bei Rapamycin-Inkubationen nicht entsteht, liegt der Schluß nahe, daß es sich um einen an der Seitenkette des C-40 Atom hydroxylierten Metaboliten handelt. Dies würde auch die Retentionszeit im LC-MS-Chromatogramm erklären, die u.a. davon abhängig zu sein scheint, ob die Transformation in der Bindungs- oder Effektor-domäne stattgefunden hat. Diese These konnte, aufgrund der sehr geringen Menge dieses Metaboliten, nicht weiter untersucht werden. Ein von Vidal *et al.* beschriebener 16-O-Demethyl-SDZ RAD Metabolit wurde nicht nachgewiesen (Vidal *et al.* 1998). Die Demethylierung der am C-16 lokalisierten Methoxy-Gruppe wurde bei Rapamycin diskutiert. Die gleichen Annahmen sollten auch für die SDZ RAD Metabolite gelten, da die Strukturen beider Substanzen in der C-16 Region übereinstimmen.

Der dem Rapamycin-Metabolit RM entsprechende Metabolit SM wurde ebenfalls gefunden und mit Nano-ESI-Tandem-MS untersucht.

Mit der Einführung sogenannter Triple-Quadrupol-Instrumente (ebenfalls als Tandem-Massenspektrometer bezeichnet) ist es möglich geworden, über die Massenanalyse der ESI-Ionen hinaus auch gezielt Strukturinformationen über einzelne Ionen zu erhalten. In Kapitel III, Abbildung **III-3** ist die Anordnung eines solchen Instruments, bestehend aus vier Quadrupolen Q0 bis Q3 dargestellt (Lottspeich und Zorbas 1998). Bei den angewendeten Experimenten zur Strukturaufklärung wurde das Quadrupolfeld Q1 so eingestellt, daß nur Ionen einer bestimmten Masse transferiert wurden. Diese Vorläufer-Ionen werden in Q2 fragmentiert und die Tochter-Ionen anschließend in Q3 analysiert. Die Fragmentierung in Q2 durch niedrigerenergetische Stöße wird in der Literatur als *CID* (*collisionally induced dissoziation*) und die Spektren dementsprechend als CID-Spektren bezeichnet (Lottspeich und Zorbas 1998). Den Quadrupol Q3 kann man ebenfalls auf die Massen bestimmter Ionen einstellen, oder aber den gesamten Massenbereich analysieren (*scannen*). Um alle Informationen der Fragmentbildung zu erhalten wurde bei diesen Experimenten über einen Bereich von 200 amu - 1000 amu (Rapamycin) und 200 amu – 1200 amu (SDZ RAD) gescannt.

Mit Hilfe der Nano-ESI-Tandem-Massenspektrometrie konnten Strukturvorschläge für den Rapamycin-Metabolit RM sowie den korrespondierende SDZ RAD-Metabolit gemacht werden. Die CID-Spektren dieser Metabolite beider Immunsuppressiva stimmen weitgehend überein, wenn man die Massenverschiebung von 44 amu berücksichtigt, die durch die Derivatisierung des Rapamycins zum SDZ RAD hervorgerufen wird. Es konnte gezeigt werden, daß diese Metabolite durch die Hydrierung einer Doppelbindung des ringgeöffneten Isomers entstehen. Als mögliche Metabolisierungsposition wurde C-33 bis C-34 vorgeschlagen. Möglich wäre aber auch eine Hydrierung an C-29 bis C-30.

Die in der Literatur (Streit *et al.* 1996) beschriebene Vermutung, daß es sich bei diesem Metaboliten mit m/z 938.5 um eine Demethyl-Hydroxy-Metaboliten handelt, wurde damit widerlegt. Der Strukturvorschlag für RM wurde durch zweidimensionale NMR-Experimente manifestiert.

Für Rapamycin und SDZ RAD konnte die Hydroxylierungsposition eines Monohydroxy-Metaboliten identifiziert werden. Nach Auswertung der aufgenommenen CID-Spektren wurde als Position für die Biotransformation das C-24 Atom zugeordnet. Diese in der Effektor-domäne (C-13 bis C-30) befindliche Modifizierung führt zu einem sehr polaren Hydroxy-Metabolit. Dies steht im Einklang zu den in der Bindungsdomäne modifizierten Transformationsprodukte, wie das Isomer, RM bzw. SM, der 39-O-Demethyl-Rapamycin, welche alle längere Retentionszeiten aufweisen. In Abbildung **V-3** ist exemplarisch die

Struktur des SDZ RAD gezeigt. Eine sterische Hinderung durch die Methyl-Gruppen am C-23 und C-25 liegt nicht vor und ein enzymatischer Angriff an der C-24 Position ist möglich.

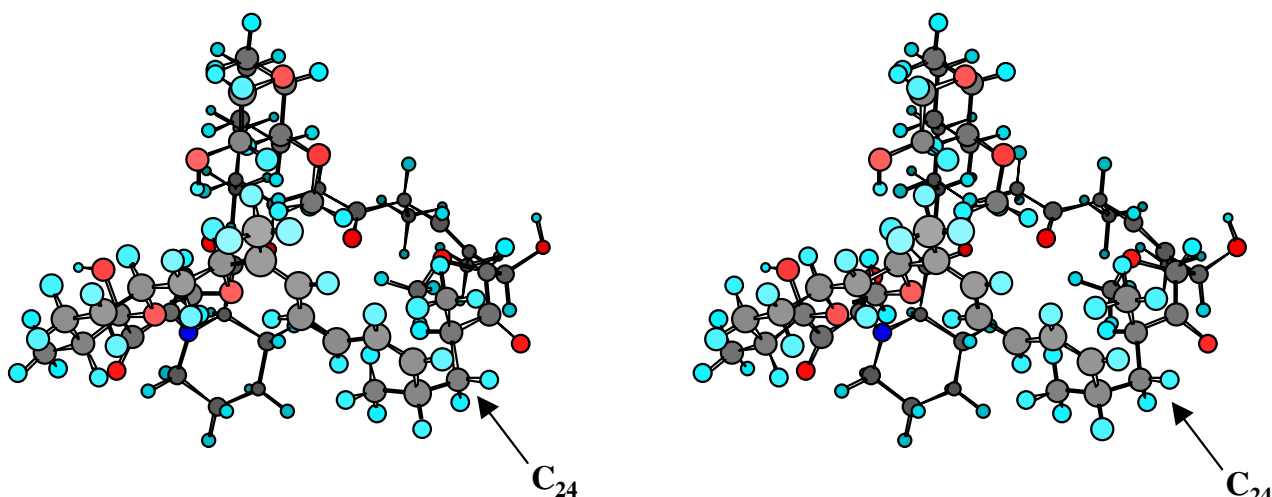


Abb. V-3 Molekülstruktur von SDZ RAD (Blau: N-Atom, Rot: O-Atome, Grau: C-Atome, Türkis: H-Atome)

Die Struktur eines weiteren Monohydroxy-Metaboliten konnte für Rapamycin identifiziert werden. Bei diesem Metabolit handelt es sich um einen am Cyclohexan-Ring hydroxylierten Rapamycin-Metaboliten. Die Metabolisierungsposition ist entweder am C-41 oder am C-42. Die wahrscheinlichste Position scheint die am C-42 zu sein, da an dieser Stelle die sterische Hinderung durch die Hydroxy-Gruppe am C-40 am geringsten ist. Dieser Metabolit wurde nicht für SDZ RAD gefunden. Vermutlich wird auch hier, wie bei dem 39-O-Demethyl-Metaboliten die sterische Hinderung durch die C₂H₄OH-Gruppe am C-40 die Ursache sein. Der 42-Hydroxy-Metabolit ist aus der Gruppe der Monohydroxy-Metabolite der unpolarste, was sich aus der Lage im HPLC-Chromatogramm ableiten läßt. Diese Tatsache bestätigt die Vermutung, daß die Polarität der Metabolite abhängig davon ist, ob die Metabolisierung in der Bindungs- (zwischen C-1 bis C-12 und C-31 bis C-42) oder der Effektdomäne (C-13 bis C-30) auftritt. Metabolite die zwischen C-1 bis C-12 und C-31 bis C-42 modifiziert wurden, sind unpolarer als solche mit einer Transformation zwischen C-13 bis C-30.

Für die Dihydroxy-Metabolite von Rapamycin und SDZ RAD konnten die Metabolisierungspositionen nicht bestimmt werden. Dies lag an der geringen isolierbaren Menge und dem daraus folgenden schlechten Signal-Rausch-Verhältnisses der Spektren. Es war jedoch möglich einen Bereich, in welchem die Hydroxylierungen bei Rapamycin stattgefunden haben, zu bestimmen. Die Metabolisierungspositionen des Rapamycin

Metaboliten (M III) sind zwischen C-1 bis C-27 lokalisiert. Eine weitere Eingrenzung ist nicht möglich.

5. NMR-Spektroskopie

Die Strukturen der isolierten und mit Nano-ESI-Tandem-MS untersuchten Rapamycin-Metabolite sollten mittels NMR-Spektroskopie manifestiert werden. Aufgrund der Instabilität (Lichtempfindlichkeit, etc.) der Ausgangssubstanzen, Rapamycin und SDZ RAD, sind NMR-Untersuchungen an Metaboliten noch nicht durchgeführt worden (Morris 1992). Zur Identifizierung der Degradationsprodukte von Rapamycin wurde die ^1H -NMR-Spektroskopie herangezogen. Die entsprechenden NMR-Daten sind jedoch nicht publiziert (Wang *et al.* 1994).

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methoden waren ausschließlich zweidimensionale NMR-Experimente wie z.B. TOCSY, NOESY, HSQC und HMBC. Für folgende Metabolite gelang es, alle ^1H - bzw. ^{13}C -NMR Signale zuzuordnen: Rapamycin-Isomer, Rapamycin-Metabolit RM. Für das 39-O-Demethyl-Rapamycin konnte trotz der geringen Menge (100 μg), eine Zuordnung der für die Metabolisierung charakteristischen Signale getroffen werden.

Da für die Metabolite in der Literatur keinerlei NMR-Daten beschrieben sind, wurde Rapamycin als Referenzsubstanz untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse bestätigten, die von Kessler *et al.* (1993) gefundenen chemischen Verschiebungen der ^1H - und ^{13}C -Kerne für das *trans*-Rapamycin. Im Gegensatz dazu wurde in der vorliegenden Arbeit keine Konformationsanalyse durchgeführt. Die Auswertung der sehr komplexen Spektren ließ eine genaue Zuordnung der Kopplungskonstanten kaum zu. Für die Bestimmung der Metabolisierungspositionen ist dies jedoch auch nicht von Bedeutung.

Für RM wurde mit Tandem-MS eine Struktur vorgeschlagen, die ähnlich dem Isomer eine geöffnete Makrolidstruktur aufweist. Die Struktur von RM sollte sich durch die Einfachbindung zwischen C-33 bis C-34 von dem des Rapamycin-Isomer unterscheiden. Ein Vergleich der Spektren des Isomers mit den von RM führt deshalb zu einer eindeutigen Zuordnung der Signale. So weisen die Spektren der beiden Verbindungen fast übereinstimmende Daten auf. Die Tieffeldverschiebung der C-33 bis C-34 beim Isomeren entspricht der einer α - β -ungesättigten Carbonylverbindung. Die Werte für C-33 bis C-34 beim Rapamycin bezogen auf RM sind ebenfalls Tieffeld-verschoben, was durch die

Estergruppierung erklärt wird. Somit ist eine eindeutige Zuordnung der Metabolisierungsposition möglich. Der Metabolite RM, welcher aus dem ringgeöffneten Rapamycin-Isomer gebildet wird, weist eine hydrierte Doppelbindung zwischen C-33 bis C-34 auf.

Im Vergleich der Spektren des Rapamycins mit denen der ringgeöffneten Verbindungen, Isomer und RM, tritt noch einen Unterschied auf. Betrachtet man die NMR-Daten, am C-2 bzw. C-6, so fällt auf, daß nach der Ringöffnung nicht mehr die *trans* Konfiguration vorliegt sondern das *cis* Rotamer gebildet wird. Die Werte, für die *cis*- bzw. *trans* Konfiguration wurden für das dem Rapamycin strukturverwandte Tacrolimus (FK506) bestimmt (Mierke *et al.* 1991). Bezugnehmend auf diese Daten wurden die Konfigurationen des Rapamycins zugeordnet. Für das *cis*-konfigurierte Rapamycin konnten noch keine NMR-Daten bestimmt werden. Es stellte sich nun die Frage, ob die Konfigurationsänderung durch die Ringöffnung oder enzymatisch bedingt ist. Deshalb wurde unmodifiziertes Rapamycin nach einer Inkubation isoliert und die chemischen Verschiebungen bestimmt. Diese Werte sind jedoch identisch mit dem des Rapamycin ohne Enzymkontakt. Somit scheint nach der Ringöffnung das *cis* Rotamer energetisch günstiger zu sein.

Die Bestimmung der Demethylierungsposition des Demethyl-Metaboliten gestaltete sich sehr schwierig, da das Wasser Signal im DMSO (d_6) dicht bei den Signalen der Methoxy-Gruppen lag. Dabei trat eine teilweise Interferenz der Signale auf. Abhilfe schaffte die Verwendung eines anderen Lösungsmittels, anstatt DMSO (d_6) wurde CD_3CN verwendet. Um Referenzsignale zu erhalten, wurde Rapamycin ebenfalls in CD_3CN gelöst und entsprechende Spektren aufgenommen. Dadurch war es möglich, die Signale für die drei Methoxy-Gruppen ohne störendes Lösungsmittelsignal darzustellen. Es konnte somit eindeutig gezeigt werden, daß die Demethylierung an der, am C-39 befindlichen, Methoxy-Gruppe stattgefunden hat. Die Signale für die Methoxy-Gruppe am C-16 bzw. am C-27 waren gut zu unterscheiden und konnten somit eindeutig zugeordnet werden.

Kapitel VI – Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des *in vitro* Metabolismus von Rapamycin und SDZ RAD. Dabei stand die Aufklärung der Struktur der Metabolite im Vordergrund. Bisher wurden für fünf Metabolite des Rapamycins und für drei SDZ RAD-Metabolite Strukturvorschläge beschrieben. Für weitere Metabolite liegen Vorschläge zur Art der Biotransformation vor; eine eindeutige Identifizierung der Struktur gelang jedoch nicht.

Durch Inkubationen mit menschlichen Lebermikrosomen wurden Metabolite beider Immunsuppressiva generiert. Dabei konnte gezeigt werden, daß die Unterschiede beider Arzneimittel auf die sterische Hinderung der C₂H₄OH-Gruppe am C-40 des SDZ RAD zurückzuführen sind.

Zur Aufreinigung der generierten Metabolite wurden zwei Extraktionsverfahren entwickelt, welche sowohl für analytische als auch präparative Inkubationsansätze angewendet werden können. Diese Verfahren eigneten sich ebenfalls zur Extraktion der Immunsuppressiva aus Blutproben. Die Wiederfindungsraten lagen dabei oberhalb 90%.

Das aufkonzentrierte und extrahierte Metabolitengemisch wurde mittels HPLC getrennt. Durch Entwicklung einer spezifischen HPLC-Methode ist es nun möglich 13 Komponenten eines Inkubationsansatzes zu trennen. Dadurch wurde ein Zugang geschaffen, um Metabolite von Rapamycin bzw. SDZ RAD als kontaminationsfreie Fraktionen zu isolieren. Um die für NMR-Spektroskopie erforderlichen Mengen zu isolieren, wurde ein *upscaling* in den präparativen Bereich durchgeführt. Dies ließ eine Isolierung einzelner Rapamycin-Metabolite im mg-Maßstab zu.

Die gewonnenen Metabolite wurden mit Nano-ESI-Tandem-Massenspektrometrie untersucht. Dabei konnten Strukturvorschläge für drei Rapamycin-Metabolite sowie zwei SDZ RAD Metabolite gemacht werden. Es handelt sich hier um den Rapamycin-Metabolit RM, 42-Hydroxy-Rapamycin und 24-Hydroxy-Rapamycin. Für SDZ RAD wurde der Metabolit SM und 24-Hydroxy-SDZ RAD identifiziert.

Der Metabolit RM, und damit auch SM, ist ein Metabolit der zweiten Generation, da er durch Hydrierung einer Doppelbindung aus dem ringgeöffneten Isomer des jeweiligen Immunsuppressivums entsteht. Dies konnte durch Inkubationsversuche mit dem Isomer sowie durch Bewertung gewonnener analytischer Daten gezeigt werden. Da diese Art der

Metabolisierung für Makrolid-Immunsuppressiva noch nicht beschrieben ist, wurden diese Ergebnisse mit anderen analytischen Methoden, wie NMR, überprüft.

Mit Hilfe von zweidimensionaler NMR gelang, es die Molekülstruktur von Rapamycin, seinem ring-geöffneten Isomer und RM vollständig zu untersuchen. Es zeigte sich, daß die auf Tandem-MS-Untersuchungen basierenden Strukturvorschläge bestätigt werden konnten. Die Metabolisierungsposition des 39-O-Demethyl-Rapamycin konnte ebenfalls bestätigt werden. Damit ist gezeigt worden, daß die NMR-Spektroskopie zur Untersuchungen von Rapamycin-Metaboliten eingesetzt werden kann und die Instabilität dieser Substanzen bei dieser Methode unerheblich ist.

Die Strukturen eines großes Teils an Rapamycin- und SDZ RAD-Metaboliten sind nun bekannt. Inwieweit diese Metabolite pharmakologisch aktiv sind, muß in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden. Erst dann sind Aussagen über die Struktur-Wirk-Beziehung der Metabolite möglich. Für Steroidhormone der Nebennierenrinde, z.B. Cortison, ist bekannt, daß diese Verbindungen durch Biotransformation zu hochaktiven Hydroverbindungen reduziert werden. Da es sich bei den Metaboliten RM und SM ebenfalls um eine Hydroverbindung handelt, wäre eine ähnlich hohe pharmakologische Aktivität denkbar. Läßt sich ein Zusammenhang zwischen Metabolisierungsposition und –art zur Toxizität bzw. pharmakologischen Aktivität der Metabolite herstellen, wäre eine gezielte Veränderung der Struktur zur Verringerung der Toxizität möglich.

Kapitel VII - Literaturverzeichnis

Aced, G.; Möckel, J.J. Liquidchromatography. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim 1991

Bohler, T.; Waiser, J.; Budde, K.; Lichter, S.; Jauho, A.; Fritsche, L.; Korn, A.; Neumayer, H.H. The in vivo effect of rapamycin derivative SDZ RAD on lymphocyte proliferation. *Transplant Proc* 30: 2195-2197, 1998

Calne, R.; Collier, D.S.; Lim, S.; Pollars S.G.; Samaan, A.; White, D.J.; Thiru, S. Rapamycin for immunosuppression in organ allografting. *Lancet* 2: 227, 1989

Carr, S.; Hemling, M.; Bean, M.; Roberts, G. Integration of mass spectrometry in analytical biotechnology. *Anal.Chem* 63: 2802-2824, 1991

Chan, K.; Wang, P.; Sakuma, T.; Scatina, J.; Cochran, D.; Humber, L.; Sisenwine, S. Characterization of Biliary Rapamycin Metabolites by Ionenspray Liquid Chromatography / Mass Spectrometry. *Proceedings of the 41th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, San Francisco, 545a-545b, 1993

Christians, U.; Sattler, M.; Schiebel, H.M.; Kruse, C.; Radeke, H.H.; Linck, A.; Sewing, K.-F. Isolation of two immunosuppressive metabolites after in vitro metabolism of rapamycin. *Drug Metab Dispos* 20: 186-191, 1992

Christians, U.; Sewing, K.-F. Whole blood sample clean up for chromatographic analysis. *Transpl Proc* 20: 609-613, 1988

Crowe, A.; Bruelisauer, A.; Duerr, L.; Guntz, P.; Lemaire, M. Absorption and Intestinal Metabolism of SDZ RAD and Rapamycin in Rats. *Drug Metab Dispos* 27: 627-632, 1999

Dannecker, R.; Vickers, A.E.; Ubeaud, G.; Hauck, C. In vitro biotransformation of SDZ RAD: a new immunosuppressive macrolide in human liver microsomal preparations. *Transplant Proc* 30: 2206, 1998

Del Cont Bernard, A.; Morrot, M.J.; Zihri, A.; Rambourg, M.; Royer, R.J. Automated determination of disopyramide and N-monodealkyldisopyramide in plasma by reversed-phase liquid chromatography with a column switching system. *J Chromatogr B* 574: 365-368, 1992

Findlay, J.A.; Radics, L. On the chemistry and high field nuclear magnetic resonance spectroscopy of rapamycin. *Can J Chem* 58: 579-590, 1980

Fribolin, H. Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie. 2.Auflage, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Basel, Cambridge, New York, 1992

Gelpi, E. Isolation, identification, and biological activities of oxidative metabolites of FK506, a potent immunosuppressive macrolide lactone. *J Chromatogr* 703: 59-80, 1995

Goodyear, N.; Napoli, K.L.; Murthy, J.N.; Kahan, B.D.; Soldin, S.J. Radioreceptor assay for sirolimus. *Clin Biochem* 29: 457-460, 1996

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

Hesse, M. Meier, H. Zeeh, B. Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie. 4. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1991

Iwasaki, K.; Shiraga, T.; Nagase, K.; Tozuka, Z.; Noda, K.; Sakuma, S.; Fujitsu, T.; Shimatani; T.; Sato, A.; Fujioka, M. Isolation, identification and biological activities of oxidative metabolites of FK 506, a potent immunosuppressive macrolide lactone. *Drug Metab Dispos* 21: 971-977, 1993

Jacobsen, W. Pharmaka-Interaktionen der HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren Lovastatin und Pravastatin-Hemmung des Metabolismus in vitro in der Leber und im Dünndarm, Dissertation, Hannover, 1998

Kessler, H.; Haessner, R.; Schüler, W. Structure of Rapamycin: An NMR and Molecular-Dynamics Investigation. *Helv Chim Acta* 76: 117-130, 1993

Koch, H.P. Pharmaka-Biotransformation. in: Kuemmerle, HP.; Hitzenberger, G. und Spitzky, K.H. (Hrsg.), Klinische Pharmakologie-Grundlagen Methoden Pharmakotherapie, II, 4. Auflage, Ecomed Verlagsgesellschaft, München, 1985

Kuksis, A.; Myher, J. Application of tandem mass spectrometry for the analysis of long-chain carboxylic acids. *J Chromatogr B* 671: 35-70, 1995

Lampen, A. Das Cytochrom P-450-System als Komponente der transepithelialen Barriere des Gastrointestinaltraktes-Sein Einfluß auf die Resorbtion und Bioverfügbarkeit der Immunsupprssiva Tacrolimus und Rapmycin. Dissertation, Hannover, 1995

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

Lehmann, W.-D. Physikalische Methoden inder Chemie: Massenspektrometrie I. *Chemie in unserer Zeit* 4: 183-194, 1991

Lehmann, W.-D. Physikalische Methoden inder Chemie: Massenspektrometrie II. *Chemie in unserer Zeit* 6: 308-316, 1991

Lehmann, W.-D. Massenspektrometrie in der Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, 1996

Licollari, A. Untersuchungen zur Eignung von Mikrosomen der Hundeleber zur Vorhersage Cytochrom-P450-abhängiger Biotransformationsprozesse in vivo am Beispiel des Erythromycins und Cabergolin. Dissertation, Leipzig, 1996

Lottspeich, F.; Zorbas, H. Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 1998

McLafferty, F.W.; Turecek, F. Interpretation von Massenspektren. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin, Oxford 1995

Mierke, D.F.; Schmieder, P.; Karuso, P.; Kessler, H. Conformational Analysis of the cis-Isomer and trans-Isomer of FK506 by NMR and Molecular Dynamics. *Helv. Chim. Acta* 74: 1027-1047, 1991

Morris, R.E. Rapamycin: antifungal, antitumor, antiproliferative, and immunosuppressive macrolides. *Transplant Rev* 6: 39-87, 1992

Morris, R.E.; Meiser, B.M.; Wu, J.; Shorthouse, R.; Wang, J. Use of rapamycin for the suppression of alloimmune reactions in vivo: schedule dependence, tolerance induction, synergy with cyclosporine and FK 506, and effect on host-versus-graft and graft-versus-host reactions. *Transplant Proc* 23: 521-524, 1991

Müller, H.; Zullinger, H.W.; Dörig, B.A.; Egli, R.A. Quantitative determination of suprofen in human plasma and urine by fully automated high-performance liquid chromatography. *Arzneim-Forsch / Drug Res* 257-260: 32, 1982

Napoli, K.L.; Kahan, B.D. High-performance liquid chromatography of rapamycin. *Clin Chem* 37: 294-295, 1991

Napoli, K.L.; Kahan, B.D. Sample clean-up and high-performance liquid chromatographic techniques for measurement of whole blood rapamycin concentrations. *J Chromatogr B* 654: 111-120, 1994

Napoli, K.L.; Kahan, B.D. Routine clinical monitoring of sirolimus (rapamycin) whole-blood concentrations by HPLC with ultraviolet detection. *Clin Chem* 42: 1943-1948, 1996

Nickmilder, M.J.; Latinne, D.; De Houx, J.P.; Verbeeck, R.K.; Lhoest, G.J. Isolation and Identification of a C₃₉ demethylated metabolite of rapamycin from pig liver microsomes and evaluation of its immunosuppressive activity. *Clin Chem* 44: 532-538, 1998

Pomer, S. Neue immunsuppressive Therapien bei Nierentransplantation. *Urologe [A]* 33: 370-376, 1994

Radeke, H.H.; Christians, U.; von der Ohe, J.; Sewing, K.-Fr., Resch, K. The influence of ciclosporin on the synergistic immunosuppressive potential of ciclosporin metabolite combinations. *Int J Immunopharmacol* 14: 595-604, 1992

Sattler, M.; Guengerich, P.; Yun, C.-H.; Christians, U.; Sewing, K.-Fr. Cytochrome P-450 3A enzymes are responsible for biotransformation of FK 506 and Rapamycin in man and rat. *Drug Metab Dispos.* 20: 753-761, 1992

Schmeer, K.; Sauter, T.; Schmid, J. Rapid pharmacokinetic screening of salbutamol in plasma samples by column-switching high-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J Chromatogr A* 777: 67-72, 1997

Schuler, W.; Sedrani, R.; Cottens, S.; Haberlin, B.; Schulz, M.; Schuurmann H.J.; Zenke, G.; Zerwes, H.G.; Schreier, M.H. SDZ RAD, a new rapamycin derivative: pharmacological properties in vitro and in vivo. *Transplantation* 64: 36-42, 1997

Schupke, H.; Hempel, R.; Eckardt, R.; Krombach, T. Identification of Talinolol Metabolites in Urine of Man, Dog, Rat and Mouse after oral Administration by High-Performance Liquid Chromatography-Thermospray Tandem Mass Spectrometry. *J Mass Spectrom* 31: 1371-1381, 1996

Schuurmann, H.J.; Cottens, S.; Fuchs, S.; Joergensen, J.; Meerloo, T.; Sedrani, R.; Tanner, M.; Zenke, G.; Schuler, W. SDZ RAD, a new rapamycin derivative: synergism with cyclosporine. *Transplantation* 64: 32-352, 1997

Sedrani, R.; Cottens, S.; Kallen, J.; Schuler, W. Chemical modification of rapamycin: the discovery of SDZ RAD *Transplant Proc* 30: 2192-2194, 1998

Segarra, I.; Brazelton, T.R.; Guterman, N.; Hausen, B.; Jacobsen, W.; Morris, R.E.; Benet, L.Z.; Christians, U. Development of a high-performance liquid chromatographic-electrospray

mass spectrometric assay for the novel immunosuppressive macrolide 40-O-(2-hydroxyethyl)rapamycin. *J Chromatogr B* 720: 179-187, 1998

Sehgal, S.N.; Baker, H.; Vezina, C. Rapamycin (AY-22,989) a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, Isolation and Characterization. *J Antibiotics* 28: 727-732, 1975

Siuzdak, G. The emergence of mass spectrometry in biochemical research. *Proc. Natl. Acad. Sci* 91: 11290-11297, 1994

Smith, P.K.; Krohn, R.I.; Hermanson, G.T.; Mallia, A.K.; Gartner, F.H. Provenzano, M.D.; Fujimoto, E.K.; Goeke, N.M.; Olson, B.J.; Klenk, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150: 76-85, 1985

Smith, R.; Loo, J.; Edmonds, C.; Barinaga, C.; Udseth, H. New Developments in Biochemical Mass Spectrometry: Electrospray Ionization. *Anal Chem* 62: 882-899, 1990

Stepkowski, S.M.; Chen, H., Daloz P. and Kahan, B.D. Rapamycin, a potent immunosuppressive drug for vascularized heart, kidney, and small bowel transplantation in the rat. *Transplant.* 51 (1991) 22

Streit, F. Strukturaufklärung und Quantifizierung des Makrolidimmunsuppressivums Sirolimus und seiner Metabolite mit Elektrospray-Massenspektrometrie. Dissertation, Braunschweig, 1998

Streit, F.; Christians, U.; Schiebel, H.M.; Meyer, A., Sewing, K.-F. Structural Identification of Three Metabolites and a Degradation Product of the Macrolide Immunosuppressant Sirolimus (Rapamycin) by Electrospray-MS/MS after Incubation with Human Liver Micosomes. *Drug Metab Dispos* 24: 1272-1278, 1996

Streit, F.; Christians, U.; Schiebel, H.M.; Napoli, K.L.; Ernst, L.; Linck, A.; Kahan, B.D.; Sewing, K.-Fr. Sensitive and specific quantification of sirolimus (rapamycin) and its metabolites in blood of kidney graft recipients by HPLC/electrospray - mass spectrometry. *Clin Chem* 42: 1417-1425, 1996

Svensson, J.O.; Brattström, C.; Säwe, J. Determination of Rapamycin in Whole Blood by HPLC. *Ther Drug Monit* 19: 112-116, 1997

Swindells, N.D.; Withe, P.S. The x-ray crystal structure of rapamycin, C₅₁H₇₉NO₁₃. *Can J Chem* 56: 56, 1978

Taylor, P.J.; Johnson, A.G. Quantitative analysis of sirolimus (Rapamycin) in blood by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 718: 251-257, 1998

Trepanier, D.J.; Gallant, H.; Legatt, D.F.; Yatscoff, R.W. Rapamycin: distribution, pharmacokinetics and therapeutic range investigations: an update. *Clin Biochem* 31: 345-351, 1998

Tuttle, R.H.; Hall, J.E.; Tidwell, R.R. High-performance liquid chromatographic assay detects pentamidine metabolism by Fisher rat liver microsomes. *J Chromatogr B* 688: 319-324, 1997

Vidal, C.; Kircher, G.I.; Sewing, K.F. Structural elucidation by electrospray mass spectrometry: an approach to the in vitro metabolism of the macrolid immunosuppressant SDZ RAD. *J Am Soc Mass Spectrom* 9: 1267-1274, 1998

Voyksner, R.D.; Pack, T. Investigation of collisional-activation decomposition process and spectra in the transport region of an electrospray single-quadrupole mass spectrometer. *Rapid Commun Mass Spectrom* 5: 263-268, 1991

Wang, C.P.; Chan, K.W.; Schiksnis, R.A.; Scatina J.; Sisenwine, S.F. High performance liquid chromatographic isolation, spectroscopic characterization, and immunosuppressive activities of two rapamycin degradation products. *J Liq Chrom* 17: 3383-3392, 1994

Wang, C.P.; Lim, H.K.; Chan, K.W.; Scatina, J.; Sisenwine, S.F. High performance liquid chromatographic isolation, spectroscopic characterization of three major metabolites from the plasma of rats receiving rapamycin (sirolimus) orally. *J Liq Chrom* 18: 2559-2568, 1995

Wang, C.P.; Lim, H.K.; Chan, K.W.; Scatina, J.; Sisenwine, S.F. High performance liquid chromatographic isolation, spectroscopic characterization of metabolites from the bile of rats receiving rapamycin (sirolimus) intravenously. *J Liq Chromatogr Relat Technol* 20: 1689-1701, 1997

Wang, C.P.; Scatina, J.; Sisenwine, S.F. A High Performance liquid chromatographic method for the Determination of Rapamycin (Sirolimus) in Rat Serum, Plasma, and Blood and in Monkey Serum. *J Liq Chrom* 18: 1801-1808, 1995

Yatscoff, R.W.; Faraci, C.; Bolingbroke, P. Measurement of rapamycin in whole blood using reverse-phase-high-performance liquid chromatography. *Ther Drug Monit* 14: 138-141, 1992

Lebenslauf

Persönliche Daten

Katrin Hallensleben, Diplom- Chemikerin
am 23.12.1969 in Sangerhausen, Sachsen-Anhalt geboren
verheiratet, eine Tochter

Schulbildung

09.1976-07.1986 Polytechnische Oberschule Erfurt
09.1986-07.1988 Spezialschule der mathematisch-naturwiss. technischen Richtung Erfurt
Abschluß : Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung

09.1988-08.1989 Praktisches Jahr an der Universität Leipzig, Technikum Analytikum
09.1989 Immatrikulation an der Universität Leipzig
Hauptfach : Chemie
07.1993 Diplom-Prüfung
11.1993-06.1994 Diplomarbeit im Institut für Organische Chemie der Fakultät für Chemie
und Mineralogie
Thema: Reaktionen von β -Campholenverbindungen
06.1994 Abschluß : Diplom-Chemikerin

07.1994-12.1996 Erziehungsurlaub

Promotion

01.1997-07.1999 Dissertation im Rahmen des Graduiertenkollegs „Chemische und technische Grundlagen der Naturstofftransformation“, Universität Hannover
Thema: Der *in vitro* Metabolismus von Immunsuppressiva, insbesondere Rapamycin - Charakterisierung und Identifizierung der Metabolite