

# Effekt av IL-6 på CYP3A4-mediert metabolisme av midazolam i THLE- celler

Philip Fleischer



Masteroppgave i farmasi

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap

Farmasøytisk Institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2012

# Effekt av IL-6 på CYP3A4-mediert metabolisme av midazolam i THLE- celler

Masteroppgave i farmakologi for graden *Master i farmasi*

Oppgaven ble utført ved avdeling for farmasøytisk biovitenskap,

Farmasøytisk Institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet,

Universitetet i Oslo



Veiledere:

Hege Christensen

Anders Åsberg

Espen Molden

Philip Fleischer

Mai 2012

## **Forord**

Først og fremst vil jeg rette en stor takk til hovedveilederne mine, professor Hege Christensen og professor Anders Åsberg for eksepsjonelt god veiledning i forbindelse med min hovedfagsoppgave. Deres engasjement og evne til å diskutere både teoretiske og praktiske problemstillinger har vært uvurderlig. I tillegg vil jeg takke professor Espen Molden for å ha bidratt med nyttige innspill underveis. Dere har gjort dette til et svært lærerikt år!

Tusen takk til overingeniørene Siri Johannesen og Beata Mohebi for deres gode humør, samt veiledning og hjelp til det praktiske arbeidet i hektiske perioder.

Jeg vil også benytte anledningen til å takke medstudent Tor Arne Hotvedt for hans bidrag til å arbeide for farmasiens fremme.

Til slutt vil jeg takke alle i 4.etasje for å ha gjort dette til et veldig hyggelig år!

Blindern, mai 2012

Philip Fleischer

---

# Innholdsfortegnelse

<b>FORORD</b> .....	<b>3</b>
<b>FORKORTELSER</b> .....	<b>6</b>
<b>SAMMENDRAG</b> .....	<b>9</b>
<b>1 INNLEDNING</b> .....	<b>11</b>
1.1 LEGEMIDDELMETABOLISME .....	11
1.1.1 Cytokrom P450 enzymene .....	12
1.1.2 CYP3A-subfamilien .....	13
1.1.3 CYP3A4 .....	14
1.2 CYTOKINERS EFFEKT PÅ CYP-ENZYMER.....	14
1.2.1 IL-6 mediert endring i uttrykket av CYP3A4.....	16
1.2.2 Mekanismer for IL-6 mediert endring i uttrykket av CYP3A4 .....	17
1.2.3 Effekter av biologiske legemidler på CYP-mediert legemiddelmetabolisme .....	19
1.3 ENZYMKINETIKK .....	20
1.4 MIDAZOLAM SOM CYP3A4-PROBE .....	22
1.5 <i>IN VITRO</i> MODELLER FOR METABOLISMESTUDIER .....	24
1.6 HENSIKTEN MED OPPGAVEN .....	25
<b>2. MATERIALER OG METODER</b> .....	<b>26</b>
2.1 DYRKNING AV THLE-CELLER SOM UTTRYKKER CYP3A4 .....	26
2.2 HØSTING AV CELLER .....	26
2.3 STANDARDKURVER .....	27
2.4 LC-MS-ANALYSE .....	27
2.5 BEARBEIDING AV DATA .....	28
2.6 INNLEDENDE METABOLISMEFORSØK I THLE-CELLER .....	28
2.7 BASALAKTIVITET .....	29

2.8	METABOLISMESTUDIER MED IL-6 .....	29
2.9	MIKROSOMFORSØK MED IL-6 .....	30
<b>3.</b>	<b>RESULTATER .....</b>	<b>31</b>
3.1	STANDARDKURVER .....	31
3.2	METNINGSKURVER FOR 1'-OH MDZ OG 4-OH MDZ.....	31
3.3	BASALAKTIVITET .....	32
3.4	EFFEKT AV IL-6 PÅ CYP3A4-MEDIERT METABOLISME I THLE-CELLER .....	33
3.5	EFFEKT AV IL-6 PÅ CYP3A4-MEDIERT METABOLISME I INSEKTSMIKROSOMER .....	35
<b>4.</b>	<b>DISKUSJON .....</b>	<b>36</b>
4.1	METODER OG MATERIALER .....	36
	<i>4.1.1 CYP3A4-aktivitet estimert ved dannelse av 4-OH MDZ.....</i>	36
4.2	METABOLISME I THLE-CELLER .....	37
	<i>4.2.1 Metabolismestudier med IL-6 .....</i>	37
4.3	VALG AV <i>IN VITRO</i> CELLEMODELL .....	38
4.4	MIDAZOLAM SOM PROBE.....	39
<b>5.</b>	<b>KONKLUSJON .....</b>	<b>40</b>
<b>6.</b>	<b>REFERANSER .....</b>	<b>41</b>
<b>7.</b>	<b>APPENDIKS .....</b>	<b>46</b>
	UTSTYR.....	46
	KJEMIKALIER .....	47
	LØSNINGER FOR THLE-CELLER.....	49
	LØSNINGER FOR LC-MS .....	49

---

## Forkortelser

1'-OH-MDZ	1'-hydroksymidazolam
4-OH-MDZ	4-hydroksymidazolam
gp130	130 kDa signal transduser
ABCB1	P-Glykoprotein
ACN	Acetonitril
APR	Akutt-fase respons
CAR	Konstitutiv androstan reseptor
CRP	C-reaktivt protein
C/EPB- $\alpha$	CCAAT/enhancer bindende protein- $\alpha$
C/EPB- $\beta$	CCAAT/enhancer bindende protein- $\beta$
CsA	Ciklosporin
CYP-enzymmer	Cytokrom P450 enzymer
DIA	Diazepam
EC <sub>50</sub>	Konsentrasjon ved halv maksimal effekt
EDTA	Etylen diamintetraeddiksyre
E <sub>min</sub>	Minimal respons
ER	Endoplasmatisk retikulum
E	Enzym
ES	Enzym-substrat-kompleks
FCS	Føtalt kalveserum
FDA	Food and Drug Administration
GABA	Gamma-aminosmørsyre
g	Sentrifugeringseffekt (RCF)
IL-6R	IL-6 reseptor
IL	Interleukin
INF	Interferon

---

INF- $\alpha$	Interferon- $\alpha$
INF- $\beta$	Interferon- $\beta$
INF- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL-1B	Interleukin-1B
IL-6	Interleukin-6
IS	Intern standard
JAK	Janus tyrosin kinase
KCl	Kaliumklorid
LC-MS	Væskekromatografi med massespektrometrisk deteksjon
LAP	Lever aktiverende protein
LIP	Lever inhiberende protein
LPS	Lipopolysakkarid
MeOH	Metanol
K <sub>m</sub>	Michaelis-konstanten
MDZ	Midazolam
Min	Minutter
ml	Milliliter
mAb	Monoklonalt antistoff
ng	Nanogram
NO	Nitrogenoksid
NOS	Nitrogenoksyd-syntetase
NF- $\kappa$ B	Nukleær faktor kappa-B
p38 MAPK	p38 mitogen-aktivert protein kinase
P	Produkt
pg	Pikogram
RA	Revmatoid artritt
PXR	Pregnan X reseptor

---

RXR- $\alpha$	Retinoid X reseptor- $\alpha$
Rpm	Omdreiningstall
SEM	Standard feil til gjennomsnitt
SAA	Serum amyloid A
SV40 T antigen	Simian virus 40 T antigen
STAT	Signal transducer og aktivator av transkripsjon
S	Substrat
[S]	Konsentrasjon av substrat
THLE-celler	Transfektete humane leverepitel-celler
TNF- $\alpha$	Tumor nekrose faktor- $\alpha$
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ M	Mikromolar
V	Reaksjonshastighet
V <sub>max</sub>	Maksimal reaksjonshastighet



---

## Sammendrag

### Bakgrunn:

Flere kliniske studier indikerer at inflammatoriske tilstander hos pasienter kan endre farmakokinetikken til mange ulike legemidler. Det er vist nedsatt clearance og økt systemisk eksponering av legemidler i forbindelse med infeksjoner, vevsskade, operasjoner, kreft og autoimmune sykdommer. Interferoner, interleukin-1 og -6, samt TNF- $\alpha$  ser ut til å være sentrale mediatorer i denne sammenheng. Immunologisk respons antas derfor å være en av årsakene til individuell variasjon i evnen til å metabolisere legemidler. Biologiske legemidler (BL) er i kraftig vekst innen farmasøytisk industri, og mange av disse kan potensielt endre cytokinkonsentrasjoner *in vivo*. Det er fortsatt mye ukjent vedrørende effekten av spesifikke cytokiners effekt på de enkelte CYP-enzymene. Hensikten med denne studien var å etablere en metode for å studere CYP3A4-mediert metabolisme i THLE-celler. Cellemodellen skulle deretter brukes til å studere effekten av IL-6 på metabolisme via CYP3A4.

### Metode:

Transfekterte humane leverepitel (THLE)-celler som spesifikt uttrykker CYP3A4 ble sådd ut i 6-brønners Corning<sup>®</sup> CellBIND<sup>®</sup> brett; 3 paralleller med prøve og kontroll. Ulike inkubasjonstider og konsentrasjoner av midazolam (MDZ) ble utprøvd i innledende forsøk, og 15 minutter viste seg å være optimal inkubasjonstid. Basert på metningskurver for dannelse av 4-hydroksymidazolam (4-OH MDZ) ble femti  $\mu$ M MDZ benyttet i endelig metode. THLE-cellene ble preinkubert med IL-6 i 12-96 timer før forsøksdagen. Femti  $\mu$ M MDZ ble tilsatt brønnene og inkubert ved 37 °C i 15 minutter. THLE-cellene ble høstet og fryst ned ved -20 °C for senere analyser. Det ble benyttet en tidligere validert LC-MS-metode for analyse av 1'-hydroksymidazolam (1'-OH MDZ) og 4-OH MDZ som mål på CYP3A4-aktivitet. CYP3A4-aktivitet er presentert som gjennomsnittlig prosent av kontroll  $\pm$  SEM.

### Resultat:

Det ble utviklet en metode for å studere CYP3A4-mediert metabolisme av MDZ i THLE-celler. Dannelse av 1'-OH MDZ og 4-OH MDZ viste en Michaelis-Menten lignende kinetikk. En svak økning i CYP3A4-aktivitet ble vist etter 12 timer inkubering med både 2000 og 10000 pg/ml IL-6. Ingen betydelig effekt på CYP3A4-aktivitet ble derimot påvist i

tidsrommet 24-96 timer inkubering med IL-6. Det var stor inter- og intravariasjon i CYP3A4-aktivitet etter inkubasjon med IL-6.

**Konklusjon:**

Det ble i denne oppgaven utviklet en metode for å studere CYP3A4-mediert metabolisme av MDZ i THLE-celler. Det ble ikke vist nedregulering av CYP3A4-aktivitet i THLE-celler med IL-6. Det er mulig at THLE-celler ikke er en egnet modell for å studere cytokinindusert nedregulering av CYP3A4-aktivitet.

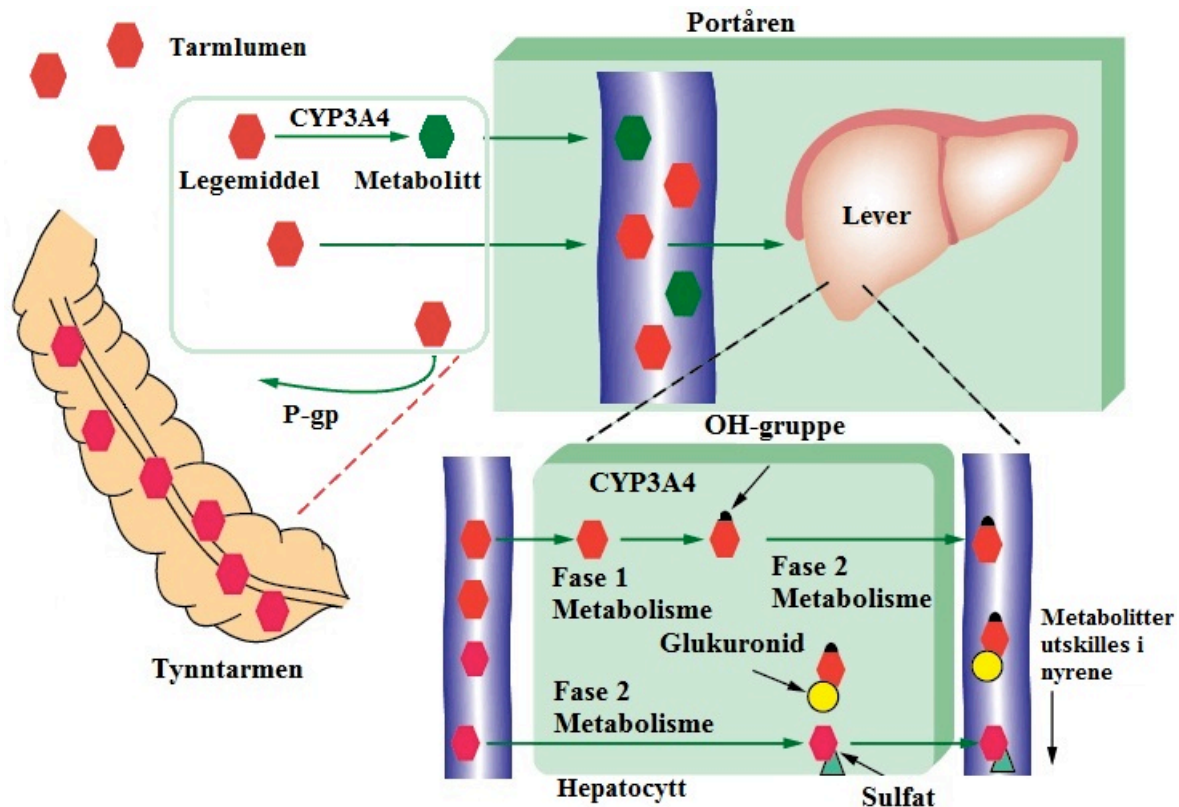
# 1 Innledning

## 1.1 Legemiddelmetabolisme

Mennesker kommer i kontakt med xenobiotika (substanser som er fremmed for kroppen) hver dag, f. eks fra prosessert mat, tilsetningsstoffer, miljøforurensinger eller legemidler. Mange ulike substanser kroppen eksponeres for elimineres vha. metabolisme, for deretter å bli utskilt via urin eller galle. I prinsippet vil hydrofile legemidler utskilles uforandret i urinen, mens de hydrofobe vil ha behov for å bli metabolisert til mer hydrofile stoffer. Fordi legemidler generelt må ha fysiske egenskaper som gjør dem egnet til å passere gjennom hydrofobe vev er metabolismen i leveren essensiell for å hindre akkumulering og toksisitet i kroppen.

Metabolismen av xenobiotika deles inn i fase 1 og fase 2 metabolisme. For fase 1 metabolisme er cytokrom P450 enzymene (CYP-enzymene) viktigst. Disse kobler på, eller eksponerer funksjonelle grupper ved oksidasjon, reduksjon eller hydrolyse av molekylet. Det vanligste er at legemidlet demetyleres eller hydroksyleres for å øke vannløseligheten. Ofte vil fase 1 metabolisme føre til inaktivering av legemidler, men kan også føre til dannelse av aktive metabolitter, som f.eks hydroksylering av MDZ til 1'-OH MDZ. CYP-enzymene kan også aktivere legemidler som inntas i inaktiv form, såkalte prodrugs. I fase 2 metabolisme dannes det konjugater av substansene. Disse substansene er ofte produkter av fase 1 metabolisme, men det finnes unntak [1]. Resultatet er betydelig økt vannløselighet og høyere molekylvekt, noe som fremmer eliminasjonen av substansen.

Metabolismen av legemidler foregår hovedsakelig i leveren, men også i tarmvegg og andre vev. Tynntarmen kan betraktes som den initielle førstepassasjemetabolismen, fordi det er her legemidlet først eksponeres for ulike enzymer og transportører (Figur 1.1). En del av det aktive legemidlet vil komme seg forbi førstepassasjemetabolismen, men leveren vil til slutt eliminere det ved gjentatt eksponering [2].



**Figur 1.1:** Legemidler absorberes fra tynntarmen, gjennom portåresystemet, til leveren. I enterocytene i tarmen blir legemidler eksponert for transportører som P-gp og CYP-enzymet som CYP3A4. Fase 2 metabolisme fremmer eliminasjonen av legemidler ved blant annet sulfatering og glukuronidering. Vannløselige metabolitter skilles deretter ut med urin i nyrene. Modifisert fra [3].

### 1.1.1 Cytokrom P450 enzymene

CYP-enzym-familien er en stor og mangfoldig gruppe med enzymer som hovedsakelig befinner seg i leveren, men også i tarm, hjerte, hjerne og andre vev. Enzymene er lokalisert i endoplasmatisk retikulum (ER) i cellen. Alle CYP-enzymene er hemoproteiner, det vil si at de inneholder et heme-molekyl som er non-kovalent bundet til en polypeptidkjede. Heme-delen er avgjørende for bindingen til oksygen og katalyseringen av den oksidative metabolismen. Den vanligste reaksjonen katalysert av CYP-enzymene er en monooksygenase reaksjon, som kan beskrives med denne likningen:



Her blir ett oksygenatom satt inn i substratet (S), mens det andre oksygenatomet blir redusert til vann [4]. Navnet cytokrom P450 stammer fra observasjonen om at når en substans er

bundet til det reduserte hem-enzymet ( $\text{Fe}^{2+}$ ), kan karbonmonoksid bindes til komplekset og få et absorpsjonsmaksimum på 450 nm [5].

Nomenklaturen til CYP-enzymene baseres på homologi i aminosyresekvensen, og de deles inn i familier og subfamilier. Ved mer enn 40% homologi i aminosyresekvensen plasseres enzymene i samme familie som indikeres med et arabisk nummer. Ved minimum 55% homologi i aminosyresekvensen plasseres enzymene i samme subfamilie ved hjelp av en bokstav. Det siste tallet i nomenklaturen gis for de respektive enzymene innenfor hver subfamilie. For hvert enzym blir det vanligste allelet eller villtypen betegnet med \*1, deretter blir de nummerert ettersom de blir oppdaget. I dag er det identifisert over 57 aktive humane P450 gener og 58 pseudogener [5].

Noen enzymer har spesifikke og viktige fysiologiske roller, mens andre har et bredere spekter og omdanner/uskadeliggjør fremmede stoffer. CYP-enzymene har en enorm kapasitet til å metabolisere strukturelt forskjellige forbindelser og mer enn 80% av all fase 1-avhengig metabolisme av legemidler i klinisk bruk utføres av disse enzymene. Hovedsakelig er det ca. 10 CYP-enzymene som står for metabolismen av de fleste farmakologiske substanser i mennesker [5].

### **1.1.2 CYP3A-subfamilien**

CYP3A-subfamilien består av isoenzymene CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 og i mindre grad CYP3A43. Disse enzymene kan metabolisere en mengde strukturelt forskjellige substrater. Denne subfamilien er av stor betydning, da det er CYP3A-enzymene som er høyest uttrykt i lever og tarmepitel. Det er sannsynlig at CYP3A-enzymene står for metabolismen av over 50% av legemidler som brukes nå til dags [6].

### 1.1.3 CYP3A4

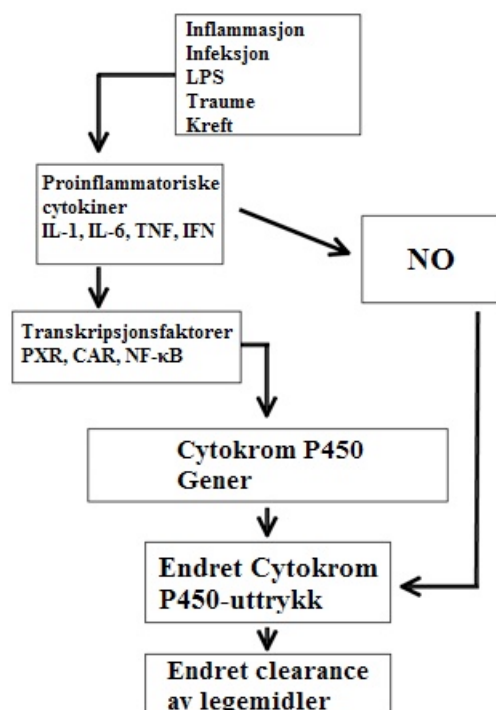
CYP3A4 er betraktet som det kvantitativt viktigste CYP-enzymet med tanke på legemiddelmetabolisme. Det er det dominerende CYP-enzymet i voksne mennesker, men det er store interindividuelle forskjeller i uttrykk og aktivitet av enzymet. En metaanalyse publisert av Ozdemir et al. antyder at 66-98% av interindividuell variabilitet i CYP3A4 ekspresjon og aktivitet skyldes genetiske faktorer [7]. Hittil er det funnet 42 ulike CYP3A4 alleler. Av disse er det bare 2 alleler som er vist å føre til nedsatt katalytisk aktivitet *in vivo* [8]. De avgjørende genetiske faktorene er fortsatt ikke avklart [9]. Selv om genetisk variasjon i dette systemet er viktig med tanke på interindividuelle forskjeller, vil også andre faktorer kunne endre det fenotypiske uttrykket og dermed aktiviteten til CYP3A4. Disse faktorene er legemidler, næringsmidler, sykdomstilstand og generell helse. Det er fortsatt diskusjon angående det genetiske bidraget kontra miljøets påvirkning på CYP3A4-aktivitet. Metaanalysen utført av Ozdemir. et al. er hovedsakelig basert på studier med friske frivillige, det kan derfor tenkes at miljøets påvirkning på CYP3A4-aktivitet er større i pasientpopulasjoner [7]. På grunn av enzymets brede spesifisitet vil det være spesielt utsatt for interaksjoner [2]. Induksjonen av CYP3A4 blir hovedsakelig regulert av kjernereseptoren PXR (Pregnan X reseptor), men også av CAR (Konstitutiv androstan reseptor). Mange legemidler og andre xenobiotika interagerer med disse kjernereseptorene, og gir på denne måten opphav til legemiddelinteraksjoner [10].

## 1.2 Cytokiners effekt på CYP-enzymmer

Cytokiner er en mangfoldig superfamilie med regulatoriske proteiner som utviser et komplekst, interagerende og overlappende spektrum av biologiske effekter. Cytokiner kontrollerer overlevelse, vekst, differensiering og effektorfunksjoner i celler [11]. Disse molekylene utskilles fra monocytter, makrofager, T-celler, mastceller og nonhematopoietiske celler som adipocytter, fibroblaster, hepatocytter, epitelceller og kondrocytter [12]. Alle cytokiner utviser pleiotropi (flere biologiske effekter) og redundans (delte biologiske effekter) i større eller mindre grad [13].

Cytokinekspresjon er primært et resultat av traume eller inflammasjon, og produseres vanligvis ikke konstitutivt [12]. Ved en primær infeksjon eller vevsskade vil immunforsvaret initiere en akutt-fase respons (APR) for å motarbeide kilden til forstyrrelsen. Immuncellene

setter i gang en signalkaskade som fører til økt ekspresjon og utskillelse av proinflammatoriske cytokiner som interleukin-6 (IL-6) og tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), histamin, bradykinin, prostaglandiner, kjemoattraktanter, komplementærproteiner, NO og proteolytiske faktorer [14, 15]. Ved økende alvorlighetsgrad av infeksjon eller vevsskade vil større mengder inflammatoriske mediatorer utskilles i sirkulasjonen [14]. Dette fører til aktivering av deres respektive reseptorer i ulike målorganer som skaper fysiologiske forandringer typisk for en inflammasjon, f. eks produksjon av hepatiske akutt-fase proteiner [16, 17].



**Figur 1.2:** Innvirkning av cytokiner på ekspresjonen av CYP-enzymet.

Det er blitt utført studier som viser endret farmakokinetikk av legemidler som respons på ulike humane tilstander hvor nivået av cytokiner er forhøyet [18, 19] (Figur 1.2). Disse inkluderer virale og bakterielle infeksjoner, vevsskader, operasjoner, cancer og ulike autoimmune sykdommer [20, 21]. De proinflammatoriske cytokinene interferon- $\alpha$  (INF- $\alpha$ ), interferon- $\beta$  (INF- $\beta$ ), interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), interleukin-1B (IL-1B), IL-6 og TNF- $\alpha$  ser ut til å være sentrale mediatorer [12]. Disse cytokinene har blitt tilskrevet deres evne til å redusere uttrykket av CYP-enzymet ved å binde seg til overflatereseptorer på celler og aktivere intracellulære signalkaskader som endrer uttrykket av transkripsjonsfaktorer som regulerer CYP-transkripsjon, ekspresjon og aktivitet [21-23]. En annen foreslått mekanisme

omhandler NOS (nitrogenoksyd-syntetase) mediert produksjon av NO (nitrogenoksid) med påfølgende endring av CYP-aktivitet [24].

Det er i dag tydelig at cytokin-legemiddel interaksjoner er bredere enn tidligere antatt, data indikerer at transportører som ABCB1 (P-glykoprotein) også blir regulert av cytokiner [25]. ABCB1 transporterer legemidler ut av celler og beskytter på denne måten kroppen mot fremmedstoffer. ABCB1 og CYP3A4 utviser stor grad av substratoverlapping, og en kombinert effekt av cytokiner på disse proteinene er forventet [26]. Cytokin-legemiddel interaksjoner defineres derfor som en hvilken som helst interaksjon mellom et cytokin og et legemiddelmetaboliserende enzym, legemiddeltransportør eller reseptor som fører til endret fordeling eller respons av et legemiddel [12].

Konsekvenser av cytokin-legemiddel interaksjoner er endret absorpsjon, eliminasjon og vevsdistribusjon av legemidler. Utfallet av en cytokin-legemiddel interaksjon avhenger av alvorligheten og varigheten av det primære stimuli, samt hvilket CYP-enzym og transportør som er involvert. Cytokiners effekter er ikke leverspesifikke og involverer derfor legemiddelmetaboliserende enzymer og transportører i hjernen, tarmen, nyrene, placenta, immun- og cancer-celler. I tillegg ser reguleringen av CYP-enzym og transportører ut til å være cytokin og organspesifikke, noe som ytterligere kompliserer vurderingen av utfallet [26].

Vanligvis vil cytokin-legemiddelinteraksjoner føre til økt toksisitet og forekomst av bivirkninger, samt mangel på effekt ved inntak av prodrugs [12]. Legemidler med smalt terapeutisk vindu er en utsatt gruppe da små forandringer i plasmakonsentrasjon kan føre til terapivikt eller økt toksisitet. Chang et al. viste allerede i 1978 at clearance av teofyllin ble signifikant redusert ved øvre luftveisinfeksjoner forårsaket av influensa eller adenovirus hos astmatiske barn [27].

### **1.2.1 IL-6 mediert endring i uttrykket av CYP3A4**

IL-6 er et pleiotropisk, proinflammatorisk cytokin som påvirker den antigen spesifikke immunresponsen og immunreaksjoner *in vivo* [28]. IL-6 produseres hovedsakelig i stimulerede monocytter, fibroblaster og endotelceller. En av de primære rollene IL-6 har *in vivo* er å initiere den hepatiske APR [29].



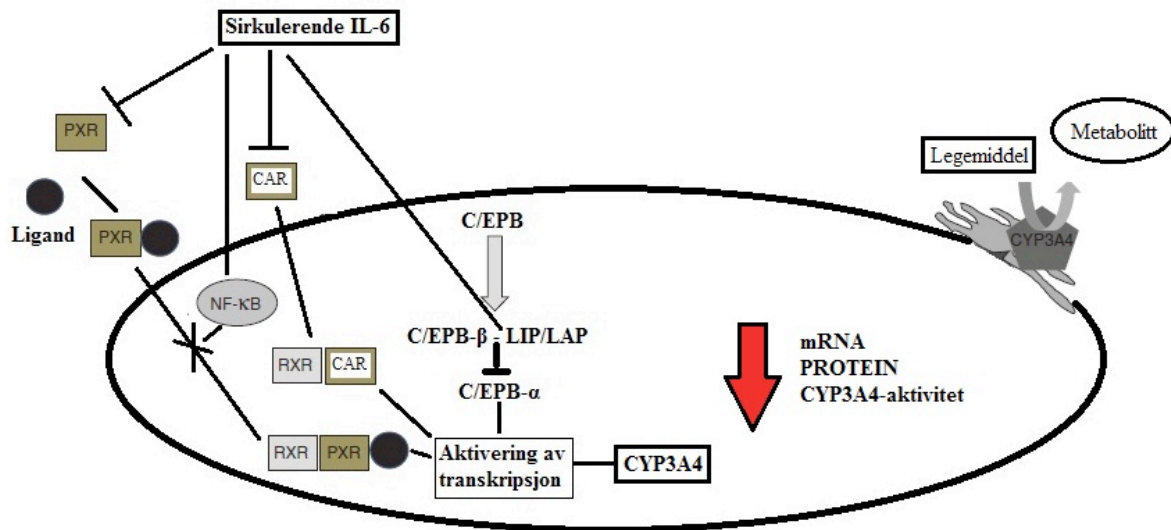
Det er utført flere studier på pasienter med revmatoid artritt (RA), en tilstand hvor nivået av IL-6 er forhøyet. I en studie utført av Mayo et al. forårsaker RA en betydelig økning i AUC for både S- og R-Verapamil, henholdsvis med 4 og 3 ganger økning i forhold til kontrollgruppen [19]. Tilsvarende viser en studie utført av Zhang et al. en 4 ganger økning i AUC for simvastin i RA pasienter [30]. Endring i farmakokinetikken for CYP3A4 substratet ciklosporin (CsA) i forbindelse benmargstransplantasjon har blitt observert. I denne studien ble det funnet en positiv korrelasjon mellom nivået av IL-6 og plasmakonsentrasjonen av CsA [31]. Det er vist en nedregulering av CYP3A4 mRNA og proteinuttrykk etter tilsetning av IL-6 i flere studier med humane hepatocytter [32-34]. Disse studiene indikerer en nedregulering i ekspresjonen av CYP3A4 ved endogent IL-6.

### 1.2.2 Mekanismer for IL-6 mediert endring i uttrykket av CYP3A4

IL-6 reseptoren består av to polypeptidkjeder: en 80 kDa IL-6 reseptor (IL-6R) og en 130 kDa signal transduser (gp130). Reseptoren finnes i både membranbundet og løselig form i sirkulasjonen. Binding av IL-6 til den transmembrane reseptoren stimulerer assosiasjon til to monomerer av gp130 for å aktivere videre signaltransduksjon [28, 35].

Aktivering av gp130 etter reseptorbinding ser ut til å initiere nedreguleringen i uttrykket av CYP3A4, da blokkering av IL-6R med et monoklonalt antistoff (mAb) forhindrer IL-6 mediert suppresjon av CYP3A4 [18]. Det finnes flere foreslåtte mekanismer for hvordan cytokiner fører til nedregulering av CYP-enzymaktivitet. Den raske nedreguleringen av CYP-enzymenes mRNA har rettet fokuset mot transkripsjonen som den primære mekanismen for nedregulering [34].

Figur 1.3 viser en potensiell mekanisme som kan bidra til nedregulering av CYP3A4 gjennom en forstyrrelse av balansen mellom to isoformer av CCAAT/enhancer bindende protein- $\beta$  (C/EPB- $\beta$ ), henholdsvis lever inhiberende protein (LIP) og lever aktiverende protein (LAP). Dette medieres gjennom induksjon i transkripsjon av LIP, som mangler det transaktiverende domenet for aktivering av C/EPB- $\alpha$ . C/EPB- $\alpha$  er nødvendig for basalekspresjon av CYP3A4 i humane hepatocytter [36, 37]. Kjerne reseptorer har blitt vist å være relevante for reguleringen av CYP-enzym. Nedsatt ekspresjon av PXR og CAR ble observert i humane hepatocytter etter inkubering med IL-6 [38]. Disse kjernereseptorene er involvert i transkripsjon og induksjon av CYP3A4, og aktiveres av en rekke substanser [10, 39, 40].



**Figur 1.3:** Innvirkning av sirkulerende IL-6 på CYP3A4-ekspressjon gjennom ulike mekanismer. IL-6 kan påvirke reseptor-mediert regulering av CYP3A4 gjennom direkte nedregulering av kjernereseptorene CAR og PXR. En annen mekanisme er at IL-6 øker ekspressjonen av NF- $\kappa$ B, som kan påvirke assosiasjonen mellom PXR og RXR- $\alpha$ . Alternativt kan IL-6 forstyrre balansen mellom LIP og LAP og på denne måten interferere med aktivering av CYP3A4-transkripsjon mediert av C/EPB- $\alpha$ . Modifisert fra [21, 41]

Mekanismer som involverer suppresjon av PXR er nå blitt mer vektlagt. En studie utført av Gu et al. viser at cytokiner induserer produksjonen av transkripsjonsfaktoren nukleær faktor kappa-B (NF- $\kappa$ B), med påfølgende suppresjon av CYP3A4 ekspressjon. NF- $\kappa$ B forstyrrer assosiasjonen mellom PXR og heterodimeriseringspartneren retinoid X reseptor- $\alpha$  (RXR- $\alpha$ ), og hindrer dermed komplekset i å aktivere transkripsjon av CYP3A4 [42]. En nyere studie viser at PXR er nødvendig for IL-6 mediert undertrykkelse av CYP3A4 ekspressjon i humane hepatocytter. Nedregulering av CYP3A4 mediert av IL-6 oppstod etter nedgangen i uttrykket av PXR [33].

### 1.2.3 Effekter av biologiske legemidler på CYP-medierte legemiddelmetabolisme

BL er en gruppe protein-legemidler som blir mye brukt innenfor behandling av ulike autoimmune sykdommer, cancer og HIV. I denne gruppen finnes blant annet monoklonale antistoffer (mAb), cytokiner og vekstfaktorer. Disse proteinene er makromolekyler og mekanismene for eliminering skiller seg betraktelig fra små-molekylære substanser. Elimineringen av BL medieres hovedsakelig gjennom reseptor-medierte internalisering, proteolyse og renal filtrering [26]. Dette har ført til den generelle misoppfatningen om at BL ikke fører til CYP-interaksjoner. I senere tid har økt kunnskap om cytokin-medierte CYP-interaksjoner ført til at denne oppfatningen er blitt endret. BL kan påvirke farmakokinetikken til små-molekylære substanser gjennom en endring i cytokinkonsentrasjoner *in vivo*. Monoklonale antistoffer kan både øke og nedregulere CYP-ekspressjonen, avhengig av virkningsmekanismen. I en studie utført av Strehlau et al. førte behandling med basiliximab (mAb mot interleukin-2 reseptor (IL-2R)) av nyretransplanterte pasienter til en økning i plasmakonsentrasjonen av CsA [43]. Denne effekten kan forklares med at blokkering av IL-2R fører til økt sirkulasjon av IL-2 i blodet, med påfølgende nedregulering av CYP3A4-ekspressjonen.

Det er nylig rapportert om gjenoppretting av cytokin-medierte suppresjon av CYP3A4 etter behandling med tocilizumab i pasienter med RA. Tocilizumab bindes spesifikt til løselige og membranbundne IL-6R (sIL-6R og mIL-6R), og hindrer dermed signaloverføring via disse reseptorene [44]. I en studie utført av Zhang et al. ble AUC for simvastatin i pasienter med RA redusert med ca. 60%, en uke etter administrasjon av en enkel dose tocilizumab [30]. Senere har Schmitt et al. bekreftet disse resultatene med en lignende studie i RA pasienter. I denne studien var det ca. 40% og 60% reduksjon i AUC for simvastatin, henholdsvis en og fem uker etter behandling med tocilizumab [18]. C-reaktivt protein (CRP) ble målt i studien, og viste en normalisering en uke etter at behandling med tocilizumab ble initiert. Nedgangen i plasmakonsentrasjonen av CRP var parallell med endring i metabolismen av simvastatin [18].

Studiene ovenfor indikerer at BL kan føre til både økt og nedsatt metabolisme av legemidler. Per i dag finnes det lite informasjon om BL-legemiddelinteraksjoner, til tross for at dette er en legemiddelgruppe i kraftig vekst innen farmasøytisk industri. For å oppnå trygg og

effektiv bruk av småmolekylære substanser i kombinasjon med BL, er det essensielt med flere *in vivo* studier for BL-legemiddelinteraksjoner [45].

### 1.3 Enzymkinetikk

Enzymkinetikk er studiet av de forhold som bestemmer hastigheten for enzymkatalyserte reaksjoner. Det benyttes ulike enzymkinetiske modeller for dette, men Michaelis-Menten modellen er en av de mest kjente. I 1913 satte Leonor Michaelis og Maud Menten opp en modell basert på studier av enzymet invertase [46]. Modellen gikk ut på at et enzym (E) bindes til et substrat (S) og danner et enzym-substrat-kompleks (ES), som igjen spaltes til enzym og produkt (P). Denne enzymreaksjonen kan beskrives med følgende likning:

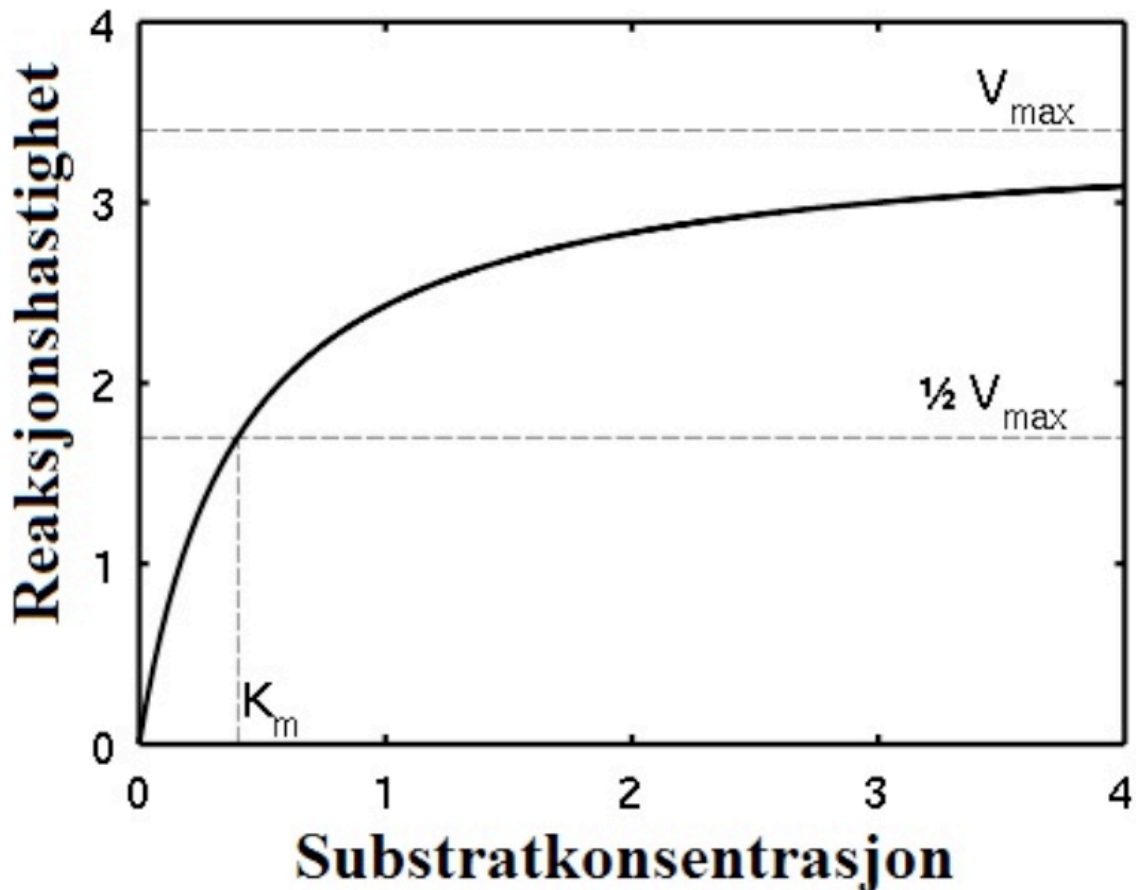


I likning 2 er  $k_1$ ,  $k'_1$  og  $k_2$  hastighetskonstanter for dannelse (ES x  $k_1$ ) og nedbrytning (ES x  $k'_1$ ) + (ES x  $k_2$ ) av enzymsubstratkomplekset [47]. Michaelis-Menten likningen (Likning 3) beskriver enzymenes reaksjonshastighet ved å relatere reaksjonshastigheten (V) til konsentrasjonen av substrat [S].

$$v = \frac{V_{max} \times [S]}{K_m + [S]} \quad (\text{Likning 3})$$

$V_{max}$  beskriver maksimal reaksjonshastighet, og  $K_m$  er Michaelis-konstanten (Figur 1.4). Michaelis-konstanten tilsvarer [S] ved halvparten av maksimal reaksjonshastighet,  $\frac{1}{2} V_{max}$ .  $K_m$  gir ett uttrykk for substratets affinitet til enzymet. En lav  $K_m$  verdi indikerer en høy affinitet, og et S med en lavere  $K_m$  verdi vil nå  $V_{max}$  raskere. Ved lav [S] vil mesteparten av enzymet være ubundet, da øker V hyperbolsk ved økende [S]. Etterhvert som [S] øker vil

kurven flate ut, fordi enzymet når metning. Ytterligere økning av [S] vil ikke føre til vesentlig økning i  $V$ .

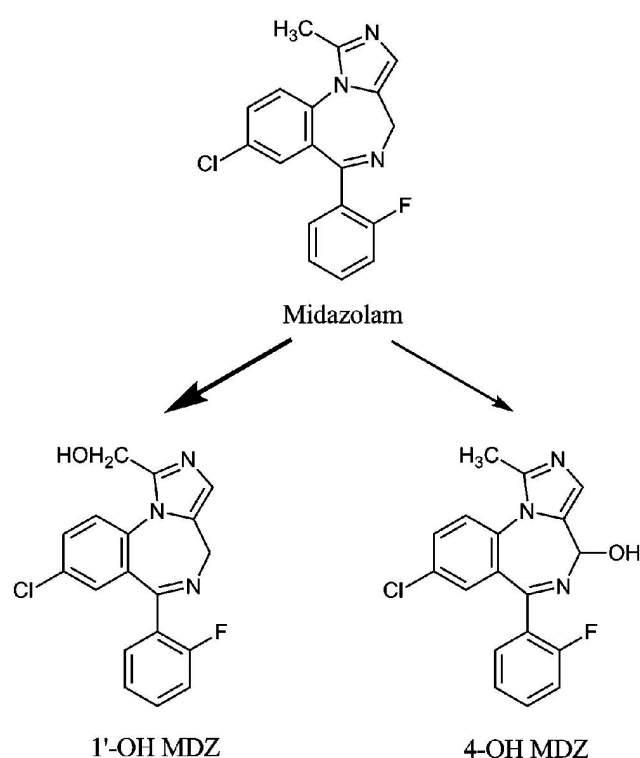


**Figur 1.4:** Michaelis-Menten kurveforløp som viser reaksjonshastighet ( $V$ ) som funksjon av substratkonsentrasjon  $[S]$ . Reaksjonshastigheten øker ved økende konsentrasjon av substrat. Ettersom substratkonsentrasjonen stiger vil enzymene til slutt bli mettet med substrat, og reaksjonshastigheten når  $V_{max}$ .  $K_m$  tilsvarer substratkonsentrasjonen ved halvparten av  $V_{max}$ .

$V_{max}$  og  $K_m$  kan estimeres ved å plote  $V_0$  mot  $[S]$ , og deretter tilpasse kurven med non-lineær regresjon. Disse dataene skaper et bilde av hvordan den enkelte substans metaboliseres *in vivo*. Med denne informasjonen kan det utføres sammenligninger mellom ulike enzymer for å finne ut i hvilken grad ett enkelt enzym bidrar til den overordnede metabolismen av substansen [48]. Clearance *in vivo* kan predikeres ved å bruke *in vitro* dataene [49].

## 1.4 Midazolam som CYP3A4-probe

MDZ er et basisk, lipofilt derivat av imidazobenzodiazepingruppen med en molekylvekt på 325,8 g/mol. MDZ utviser uttalt sedativ og hypnotisk effekt, i tillegg til å virke anxiolytisk, antikonvulsivt og muskelrelakserende. MDZ bindes selektivt til ionotrope GABA<sub>A</sub> reseptorer i CNS, og øker på denne måten affiniteten for binding av gamma-aminosmørsyre (GABA). Binding av GABA til reseptoren fører til en økt influks av Cl<sup>-</sup> ioner og en hyperpolarisering av cellemembranen [50].

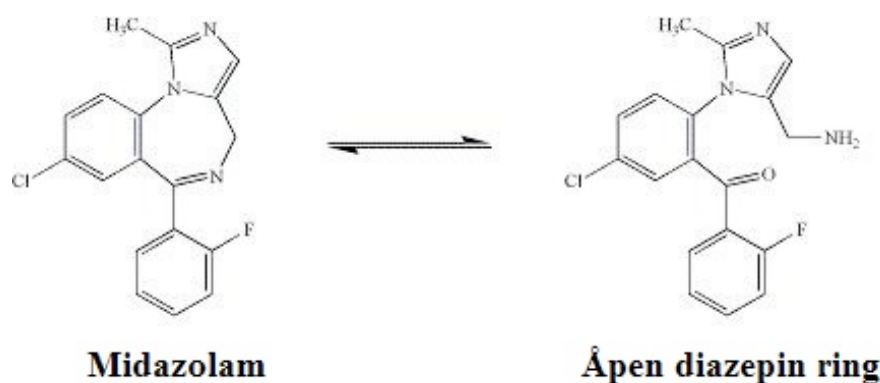


**Figur 1.5:** Kjemisk struktur og metabolismeveier av midazolam til hovedmetabolitten 1'-OH MDZ og sekundærmolekylmetabolitten 4-OH MDZ mediert av CYP3A.

MDZ blir metabolisert til hovedmetabolitten 1'-OH-MDZ og i mindre grad sekundærmolekylmetabolitten 4-OH-MDZ. Begge disse metabolismeveiene medieres selektivt av CYP3A (Figur 1.5). MDZ har blitt undersøkt som *in vivo* og *in vitro* probe for CYP3A-aktivitet og tilfredstiller de fleste kriteriene for dette [6]. Det er flere grunner til at MDZ er foretrukket modellsubstrat for CYP3A4. MDZ kan trygt gis både oralt og intravenøst. Dette gjør det mulig å få et mål på CYP3A-aktivitet relatert til førstepassasjemetabolismen ved

oralt inntak. Intravenøs administrasjon av MDZ gir et isolert mål på den hepatisk medierte metabolismen [6]. Den korte halveringstiden på kun 1,7-3,5 timer gjør det praktisk med tanke på blodprøvetaking fra pasienter, i tillegg til kortvarig farmakologisk virkning. Det finnes i dag god dokumentasjon på at clearance av MDZ gir et klart bilde av CYP3A-aktivitet [51].

MDZ er utsatt for hydrolyse av diazepinringen ved  $\text{pH} < 4$ , noe som utnyttes kommersielt i injeksjonspreparatet Dormicum®. MDZ er i utgangspunktet et molekyl med lav vannløselighet. Ved å justere pH i løsningen til 3, sikrer man god vannløselighet. Når MDZ senere injiseres i pasienter, øker  $\text{pH} > 4$ , diazepin-ringene lukkes og lipidløseligheten øker igjen [50] (Figur 1.6).



**Figur 1.6:** Åpen og lukket diazepin-ring avhengig av pH for midazolam.

I mange år ble det antatt at alle enzymene som er involvert i human metabolisme fulgte Michaelis-Menten kinetikk. I de senere år har det blitt oppdaget at flere enzymer avviker fra den klassiske Michaelis-Menten likningen, denne typen kinetikk betegnes som atypisk [48]. Det er trolig at det store aktive setet på CYP3A4 gjør det mulig for flere substratmolekyler å binde seg samtidig. Dette kan føre til endring av bindingsaffinitet eller hastighet for dannelse av produktet. Binding av mer enn ett av det samme molekylet til et enzym kalles homotrop kooperativitet, mens binding av to eller flere ulike substrater kalles heterotrop kooperativitet. Ved positiv kooperativitet er det en initiell forsinkelse i reaksjonshastighet-substratkonsentrasjons-profilen, det dannes da en sigmoidal kurve. Negativ kooperativitet karakteriseres ved en konveks kurve, fordi  $V_{\text{max}}$  ikke opprettholdes ved høye  $[S]$  [52]. Den regioselektive dannelsen av 1'-OH MDZ og 4-OH MDZ *in vitro* avhenger av enzym isoform, MDZ konsentrasjon, og tilstedeværelse av andre allosteriske molekyler [53].

## 1.5 *In vitro* modeller for metabolismestudier

Modeller for å studere mekanismer *in vitro* er svært nyttig under utviklingen av nye legemidler. De kan gi verdifull informasjon allerede tidlig i utviklingsprosessen uten å utgjøre en risiko for mennesker eller dyr. *In vitro* modeller er relativt enkle å bruke, i tillegg til at de er kostnadsbesparende. Imidlertid er alle *in vitro* modeller for å studere metabolisme en forenkling av det komplekse systemet *in vivo*. Dette gjør at tolkningen av resultater fra *in vitro* studier kan være vanskelige å overføre direkte til mennesker [54]. Ideelt sett bør *in vitro* modeller for metabolismestudier mest mulig etterligne metabolismen *in vivo*.

Intakte cellemodeller, f. eks biter av lever eller hepatocytter i kultur har flere fordeler. Bruken av disse cellemodellene sikrer at hele spekteret av legemiddelmetaboliserende enzymer er tilstede, og tilsetning av kofaktorer er ikke nødvendig. Subcellulære fraksjoner har derimot den fordelen at cellulært opptak av legemidlet ikke er en faktor. I mikrosomer eksponeres legemidler maksimalt for enzymene, og hastighet for nedbryting av substansen som undersøkes er bare avhengig av metabolismen. Ved bruk av cellemodeller som stammer fra humant vev er det også viktig å huske på at det fenotypiske uttrykket av CYP-enzym utviser stor inter-individuell variasjon [55]. Humant levervev og hepatocytter i kultur har begrenset levetid *in vitro*, gradvis tap av funksjoner over tid, i tillegg til at tilgjengeligheten ofte er begrenset [56]. Mikrosomer fra humane hepatocytter er den mest brukte modellen, grunnet stor tilgjengelighet og enkelhet i bruk.

THLE-celler er en hepatisk cellelinje som skiller seg fra de andre modellene. I denne modellen utnyttes det at levetiden til humane leverepitelceller i kultur kan økes betraktelig etter transfeksjon med simian virus 40 T antigen (SV40 T antigen). I tillegg til den økte levetiden er ekspresjonen av fase-1-enzym redusert, noe som gjør disse cellene egnet for transfeksjon med gener som koder for spesifikke CYP-enzym.

Dette muliggjør selektive studier på legemiddelmetabolisme via kun et CYP-enzym [56].



## 1.6 Hensikten med oppgaven

Hensikten med denne oppgaven var å etablere en metode for å studere CYP3A4-mediert metabolisme av MDZ i THLE-celler. Cellemodellen skulle deretter brukes til å studere effekten av IL-6 på metabolisme via CYP3A4.

## 2. Materialer og metoder

### 2.1 Dyrkning av THLE-celler som uttrykker CYP3A4

THLE-cellene T5-3A4 (passasje 22) ble tatt opp fra nitrogentank (-196 °C), og tinet raskt i vannbad ved 37 °C. Innholdet i ampullen ble resuspendert i 1 ml celledyrkningsmedium (Løsning 1), og deretter overført til Corning® CellBIND® 75 cm<sup>2</sup> flaske med 11 ml celledyrkningsmedium. Cellene ble dyrket i en inkubator ved 37 °C i fuktig atmosfære med 5 % CO<sub>2</sub> i luft.

Celledyrkningsmediet ble skiftet ved å suge av gammelt medium og tilsette 12 ml nytt medium, på mandager, onsdager og fredager. Cellene ble splittet 1 gang i uken ved ca. 90 % konfluens. Gammelt medium ble sugd av og deretter vasket med 5 ml HBSS to ganger. Videre ble det tilsatt 2 ml Trypsin-EDTA 0,25 % (Løsning 2) til flasken og inkubert i 5 minutter ved 37 °C. Flasken ble etter endt inkubering dunket kraftig mot hånden og det ble studert i mikroskop at cellene hadde løsnet fra overflaten før tilsetning av 5 ml dyrkningsmedium. Dette ble så overført til et sentrifugerør og sentrifugert i 5 minutter ved 1300 rpm. Supernatanten ble sugd av, og pelleten inneholdende ca. 9 millioner celler ble reløst i 7 ml dyrkningsmedium. Det ble tatt ut 1 ml av celledyrkningsmedium som ble sådd ut i en Corning® CellBIND® 75 cm<sup>2</sup> flaske og tilsatt 11 ml dyrkningsmedium. Flasken ble deretter inkubert ved 37 °C i fuktig atmosfære med 5 % CO<sub>2</sub> i luft.

### 2.2 Høsting av celler

Etter inkubering ble cellene høstet for måling av proteinverdier. Cellelaget ble vasket med 1 ml høstebuffer (Løsning 3) for å fjerne rester av medium. Deretter ble det tilsatt ytterligere 1 ml høstebuffer og en gummiskrape ble benyttet for å løsne cellene. Celledyrkningsmedium ble så overført til et plastrør, og brønnene ble vasket med ytterligere 1 ml høstebuffer og overført til samme plastrør. Plastrøret ble deretter sentrifugert i 5 minutter ved 2000 g og 4 °C.

Supernatanten ble sugd av og cellepelletten ble resuspendert i 200 µL høstebuffer og frosset ned ved -20 °C.

## 2.3 Standardkurver

Det ble laget en standardkurve bestående av 8 ulike konsentrasjoner 1'-OH-MDZ og 4-OH-MDZ i området 0,0143-0,236  $\mu\text{M}$ , med to paralleller av hver konsentrasjon. Det ble benyttet stamløsninger av de to metabolittene for å pipettere ut volumer som tilsvarte de ulike konsentrasjonene. Alle løsningene ble tilsatt samme mengde av etylacetat med intern standard (0,0073  $\mu\text{M}$  diazepam) som i prøvene, for deretter å dampes inn med nitrogengass. Standardprøvene ble deretter reløst i 123  $\mu\text{L}$  reløsningsbuffer (MS-vann/Acetonitril (ACN) i forholdet 220/150).

## 2.4 LC-MS-analyse

Det ble brukt væskerkromatografi med massespektrometrisk deteksjon (LC-MS) for å analysere prøvene. Dette var en tidligere validert metode utviklet for å detektere 1-OH MDZ, 4-OH MDZ og diazepam (DIA) [57]. Analyttene ble separert på omvendt-fase C8 kolonne (3 x 50 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), med forkolonne (omvendt-fase C8, 3 x 10 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), ved hjelp av gradienteluering med to mobilfaser; mobilfase A (0,05 M ammoniumformiatbuffer, pH 4,4) og mobilfase B (ACN og Metanol (MeOH); 95:5 v/v). Under analysen ble et injeksjonsvolum på 10  $\mu\text{L}$  benyttet. I løpet av de første 5 minuttene etter injeksjon av prøve steg det prosentvise bidraget av mobilfase B fra 25 % til 37,5 %. Sammensetningen av mobilfase A (62,5%) og mobilfase B (37,5 %) forholdt seg konstant i 2,5 minutter. De neste 2,5 minuttene steg mengde mobilfase B til 46,7 %, for deretter å øke raskt til 80 %, etter 10 minutter. Reekvilibrering av kolonnen startet 11 minutter etter injeksjon av prøve, og foregikk i 6 minutter. I denne perioden ble mengde mobilfase B redusert til 25 % og holdt konstant frem til analysens avslutning, 17 minutter etter injeksjon av prøve. Gjennom analyseforløpet holdt mobilfasen en hastighet på 0,5 ml/min, for så å øke til 1 ml/min under reekvilibreringen av kolonnen. Nevnte betingelser ga omtrentlige retensjonstider på 4,7 og 6 minutter for henholdsvis 4-OH MDZ og 1'-OH MDZ. DIA ble benyttet som internstandard og hadde retensjonstid på ca. 9,8 minutter.

## 2.5 Bearbeiding av data

Topphøydene og retensjonstidene i kromatogrammene ble bearbeidet og bestemt ved hjelp av dataprogrammet LC-MS-solution. Etter rensing av kromatogrammene, ble topphøydene og retensjonstidene for henholdsvis 1'-OH MDZ, 4-OH MDZ og DIA lagt inn i Microsoft Office Excel 2011. Forholdet mellom topphøyden til metabolittene og internstandard; 4-OH MDZ/DIA og 1'-OH MDZ/DIA ble beregnet. Det ble tatt gjennomsnitt av de 3 parallellene i hvert forsøk, og kontrollprøvene ble satt til 100% CYP3A4-aktivitet. Ratioen mellom prøver med tilsatt IL-6 og kontroller ble regnet om til prosent  $\pm$  SEM (standard feil til gjennomsnitt). Resultatene er presentert i form av prosentvis CYP3A4-aktivitet som en funksjon av tid. GraphPad Prism 5 ble benyttet til databearbeidelse og kurvetilpasning.

## 2.6 Innledende metabolismeforsøk i THLE-celler

I de innledende forsøkene ble det utprøvd ulike inkubasjonstider og konsentrasjoner av MDZ. Inkubasjonstidene 15 min, 30 min, 1 time, 2 timer og 4 timer ble undersøkt. Det innledende forsøket med IL-6 ble utført med 70  $\mu$ M MDZ og 30 min inkubasjonstid. I den endelige metoden ble 15 min inkubasjonstid benyttet, da denne viste seg å være optimal. Det ble laget metningskurver mellom 2-50  $\mu$ M og 10-200  $\mu$ M MDZ. Basert på disse ble konsentrasjonen 50  $\mu$ M MDZ benyttet i videre forsøk, da denne lå i det lineære området for dannelse av 4-OH MDZ.

Cellene ble sådd ut i 6-brønners Corning<sup>®</sup> CellBIND<sup>®</sup> brett, hvor det var 3 paralleller av både prøve og kontroll med ca. 200 000 celler i hver brønn. Det ble deretter tilsatt 2 ml medium (Løsning 1) i hver brønn, med bytte av medium annenhver dag og dagen før forsøket. Cellene fikk stå i minst 4 dager etter utsåing før forsøk ble gjennomført. MDZ ble løst i medium til ønskede konsentrasjoner. På forsøksdagen ble gammelt medium sugd av og 1 ml 50  $\mu$ M MDZ i medium ble tilsatt brønnene og inkubert ved 37 °C i 15 min. Etter inkubering ble brønnene satt direkte på is for å stoppe metabolismen. Medium ble sugd av og pipettert over i ferdig merkede glassrør. For å ekstrahere metabolitter ut av mediet ble 300  $\mu$ l etylacetat med intern standard (IS) tilsatt. Etter tilsetning av IS ble glassrøret forsiktig vendt for å blande mediet med den organiske fasen. Organisk fase ble sugd over i ferdig merkede eppendorfrør. En ny ekstraksjon med 300  $\mu$ l ren etylacetat ble utført for å få med rester av metabolitter fra mediet i glassrørene. Organisk fase ble sugd opp og tilsatt samme

eppendorfrør som i første ekstraksjon. Etter dette ble etylacetat dampet av med nitrogen-gass. Innholdet i eppendorfrørene ble deretter reløst i 123  $\mu$ l reløsningsbuffer.

Eppendorfrørene ble ristet på whirlmikser (2000 rpm, 5 sek) og løsningen ble så overført til merkede HPLC-rør. Prøvene ble tatt med til analyse i LC-MS eller fryst ned ved  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  for senere analyse.

## 2.7 Basalaktivitet

For å undersøke om THLE-cellene utviste lik aktivitet uavhengig av hvor mange dager det hadde gått etter utsåing ble det utført basalaktivitetsforsøk ( $n=2$ ) av Hotvedt [58]. Det ble utført metabolismeforsøk med  $50\text{ }\mu\text{M}$  MDZ, 3 paralleller, fra og med dag 4 etter utsåing til og med dag 8. Det ble utført daglig skifte av medium (Løsning 1).

## 2.8 Metabolismestudier med IL-6

En  $10\text{ }\mu\text{g}$  ampulle med IL-6 tørrstoff ble løst i MS-vann til  $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ . Løsningen ble overført til et eppendorfrør og deretter fryst ned ved  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Dette eppendorfrøret ble brukt som stamløsning i videre forsøk, og fortynt i medium (Løsning 1) til ønskede konsentrasjoner.

På bakgrunn av tidligere studier utført av Dickmann et al. [32] ble det valgt å tilsette  $500\text{ pg/ml}$  og  $2000\text{ pg/ml}$  IL-6 til THLE-cellene henholdsvis 48, 72 og 96 timer før forsøksdagen. Dette forsøket ble utført på et tidlig stadium, med henholdsvis  $70\text{ }\mu\text{M}$  MDZ og 30 min inkubering. I alle videre forsøk med IL-6 ble det benyttet  $50\text{ }\mu\text{M}$  MDZ og 15 min inkubering. Det ble utført forsøk med tilsetning av  $2000\text{ pg/ml}$  IL-6 til cellene henholdsvis 48 ( $n=6$ ), 72 ( $n=3$ ) og 96 ( $n=3$ ) timer før forsøksdagen. Senere ble  $2000\text{ pg/ml}$  og  $10000\text{ pg/ml}$  IL-6 tilsatt cellene henholdsvis 12 ( $n=3$ ), 24 ( $n=3$ ) og 48 ( $n=3$ ) timer før forsøksdagen.

Samme forsøksdesign ble benyttet som i de innledende metabolismeforsøkene, med unntak av daglig mediumbytte etter utsåing av celler. Dette ble gjort for å sikre at konsentrasjonen av IL-6 ble opprettholdt frem til forsøksdagen. Alle forsøkene ble gjort med 3 paralleller av både prøver og kontroller.

## 2.9 Mikrosomforsøk med IL-6

Det ble utført et forsøk med rekombinante CYP3A4 insektmikrosomer for å undersøke om IL-6 kunne ha en direkte effekt på CYP3A4-mediert metabolisme av MDZ. Det ble benyttet en konsentrasjon på 2  $\mu\text{M}$  av MDZ, da dette har vist seg å være nær  $K_m$ -verdien [59].

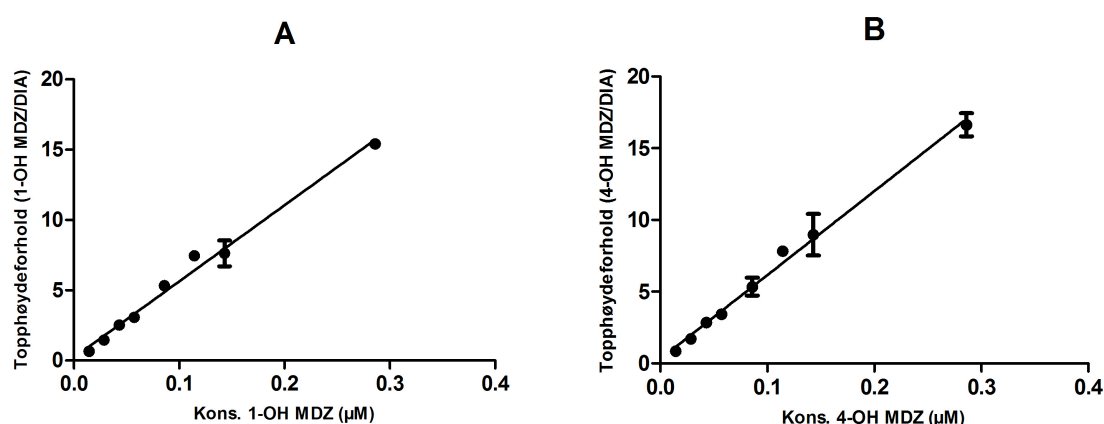
Forsøket ble utført med 2 paralleller på hver konsentrasjon av IL-6 som ble studert, og to paralleller med kontrollprøve. IL-6 ble testet ut i 3 ulike konsentrasjoner; 500 pg/ml, 2000 pg/ml og 10000 pg/ml. Det ble laget ulike stamløsninger av IL-6 løst i MS-vann, slik at samme volum IL-6-løsning ble brukt i alle prøvene uavhengig av konsentrasjon. MDZ ble laget fra en stamløsning i MeOH på 100 mM. Riktig mengde MDZ i MeOH ble pipettert ut i et plastrør, dampet av med nitrogen-gass og deretter reløst i Tris- $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

IL-6 ble pipettert ut i merkede glassrør, og senere tilsatt Tris- $\text{H}_2\text{SO}_4$  (118 mM),  $\text{MgSO}_4$  (0,5 mM) og NADPH (1,6 mM) til et sluttvolum på 220,5  $\mu\text{l}$ . Det ble tilsatt 50  $\mu\text{l}$  mikrosomløsning til alle rørene, som deretter ble satt på is midlertidig. Alle rørene ble deretter preinkubert i vannbad med risting i 15 min ved 37 °C. Etter preinkubering ble rørene fortløpende tilsatt 22  $\mu\text{l}$  MDZ-løsning hvert 30. sekund, og satt tilbake i vannbad ved 37 °C med risting (trinn 7,5) i 7,5 min. Det første røret som ble tilsatt MDZ ble tatt ut etter nøyaktig 7,5 min og tilsatt 150  $\mu\text{l}$  iskald ACN med 0,044  $\mu\text{M}$  DIA. De andre rørene ble tatt ut fortløpende hvert 30. sekund og behandlet på samme måte. Etter tilsetning av ACN og DIA ble rørene ristet på whirlmikser og satt på is i 30 min. Rørene ble deretter sentrifugert i 5 min, ved 1600 g og 4 °C. Supernatanten (300  $\mu\text{l}$ ) ble til slutt pipettert over i ferdig merkede rør til analyse i LC-MS.

### 3. Resultater

#### 3.1 Standardkurver

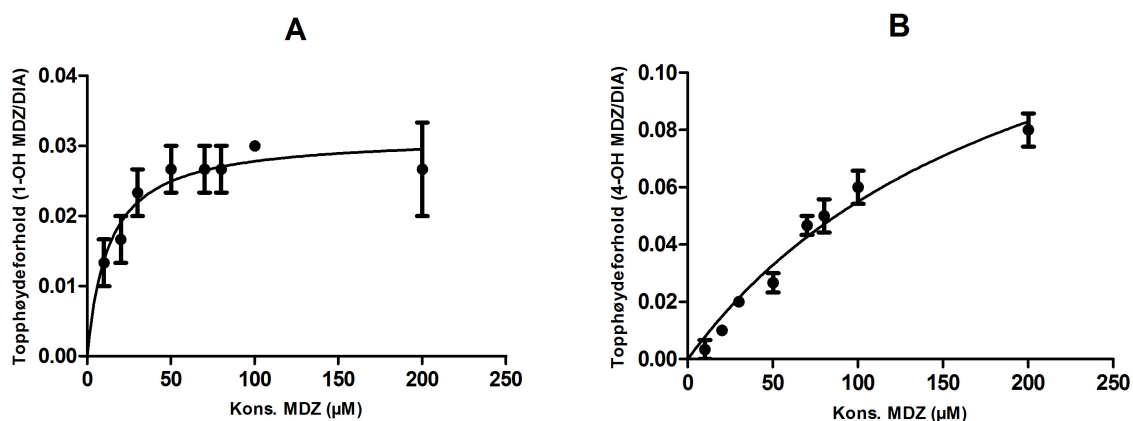
LC-MS metoden for bestemmelse av MDZ-metabolittene viste en høy grad av korrelasjon mellom konsentrasjon av de to metabolittene 1'-OH MDZ og 4-OH MDZ, og detektert topphøydeforhold mellom metabolittene og IS (Figur 3.1). Korrelasjonskoeffisienten ( $r^2$ ) var 0,982 for 1'-OH MDZ og 0,977 for 4-OH MDZ.



**Figur 3.1:** Standardkurver for 1'-OH MDZ ( $r^2 = 0,982$ ) (A) og 4-OH MDZ ( $r^2 = 0,977$ ) (B)

#### 3.2 Metningskurver for 1'-OH MDZ og 4-OH MDZ

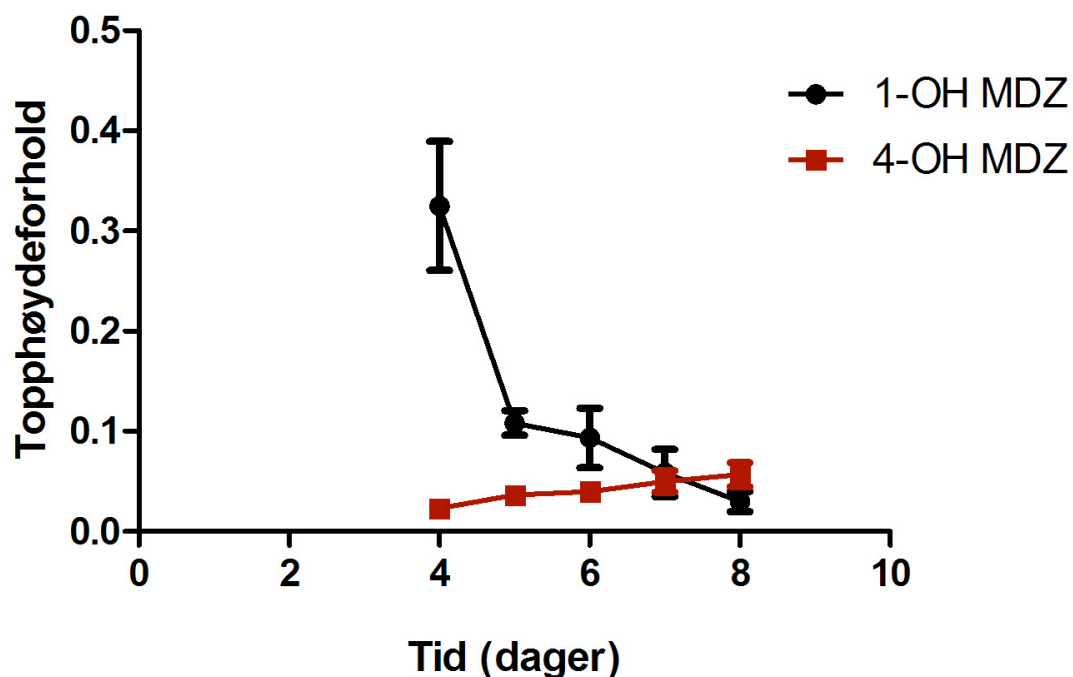
Dannelse av 1'-OH MDZ og 4-OH MDZ etter 15 min inkubering med MDZ i THLE-celler viste en Michaelis-Menten lignende kinetikk (Figur 3.2). Dannelse av 1'-OH MDZ økte hyperbolsk med økende konsentrasjon av MDZ, med utflating av kurven ved enzyymetning innenfor konsentrasjonsområdet som ble undersøkt (10-200  $\mu\text{M}$ ). Dannelse av 4-OH MDZ viste også en Michaelis-Menten lignende kinetikk, men nådde ikke  $V_{\text{max}}$  i undersøkt konsentrasjonsområde. For dannelse av 1'-OH MDZ var  $K_m$ -verdien 13  $\mu\text{M}$  MDZ, mens dannelse av 4-OH MDZ hadde en  $K_m$ -verdi på 207  $\mu\text{M}$  MDZ.



**Figur 3.2:** Dannelse av 1'-OH MDZ ( $r^2 = 0,458$ ) (A) og 4-OH MDZ ( $r^2 = 0,921$ ) (B) som funksjon av MDZ-konsentrasjon (10-200  $\mu\text{M}$ ), etter 15 min inkubering. Dataene er kurvetilpasset til Michaelis-Menten kinetikk.

### 3.3 Basalaktivitet

Basalaktivitetsforsøkene ( $n=2$ ) utført av Hotvedt [58] viste stor dag til dag-variasjon i dannelse av hovedmetabolitten 1'-OH MDZ, med høy dannelse på dag 4 for deretter å synke fra og med dag 5 (Figur 3.3). Dannelse av 4-OH MDZ var uavhengig av hvor mange dager det hadde gått etter utsåing av THLE-cellene.

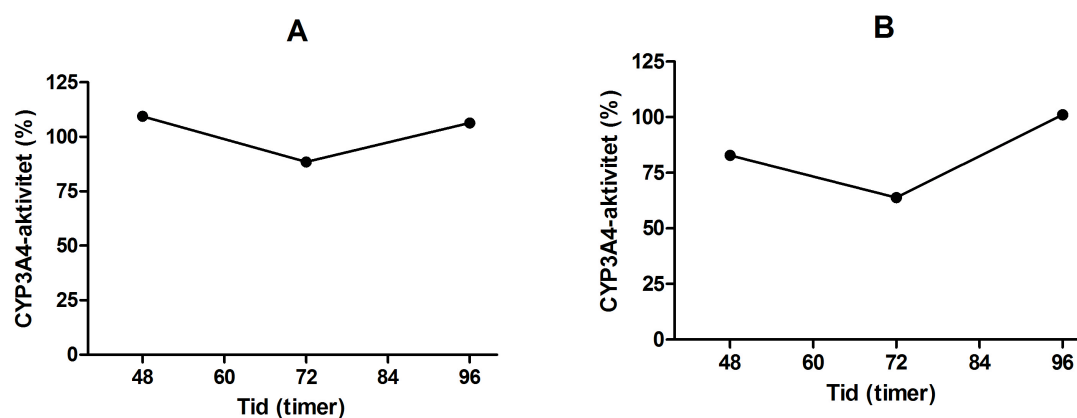




**Figur 3.3:** Dannelse av 1'-OH MDZ (sirkel) og 4-OH MDZ (firkant) som funksjon av antall dager etter utsåing av THLE-celler ( $n=2$ ). Det ble benyttet 50  $\mu\text{M}$  MDZ og 15 min inkubasjonstid.

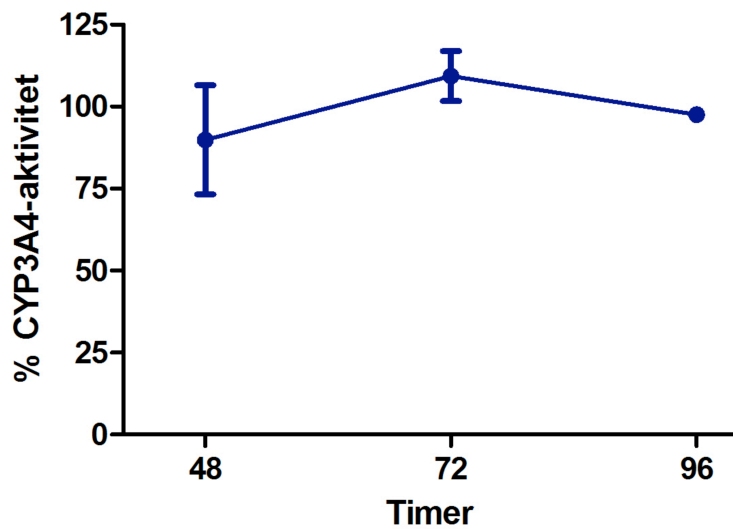
### 3.4 Effekt av IL-6 på CYP3A4-mediert metabolisme i THLE-celler

Det innledende forsøket, hvor det ble benyttet 70  $\mu\text{M}$  MDZ og 30 min inkubasjonstid, viste ingen betydelig endring i CYP3A4-aktivitet etter preinkubering med 500 pg/ml (A) og 2000 pg/ml IL-6 (B) i tidsrommet 48-96 timer. Det var stor variasjon mellom parallellene i forsøket (Figur 3.4).



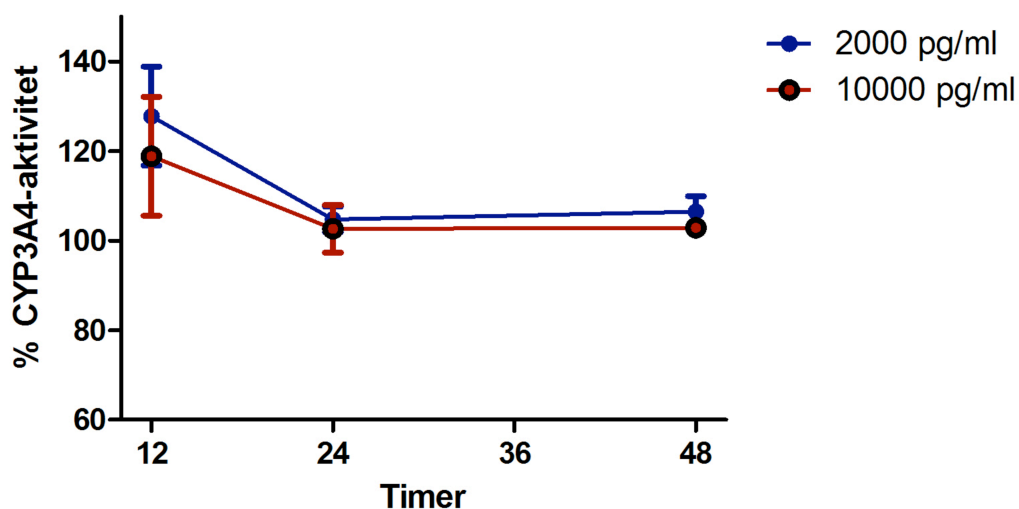
**Figur 3.4:** CYP3A4-aktivitet, bestemt ved dannelse av 4-OH MDZ, som funksjon av inkubasjonstid med 500 pg/ml (A) og 2000 pg/ml IL-6 (B). Forsøket ble utført med 70  $\mu\text{M}$  MDZ, 30 min inkubasjon og 3 paralleller.

I videre forsøk med IL-6 (2000 pg/ml) hvor det ble benyttet 50  $\mu\text{M}$  MDZ og 15 min inkubasjonstid ble det ikke vist endring i CYP3A4-aktivitet i tidsrommet 48-96 timer ( $n=3$ ) (Figur 3.5).



**Figur 3.5:** CYP3A4-aktivitet, bestemt ved dannelse av 4-OH MDZ, som funksjon av inkubasjonstid med 2000 pg/ml IL-6. Forsøket ble utført med 50  $\mu$ M MDZ, 15 min inkubasjon og 3 paralleller med prøve og kontroll ( $n=3$ ).

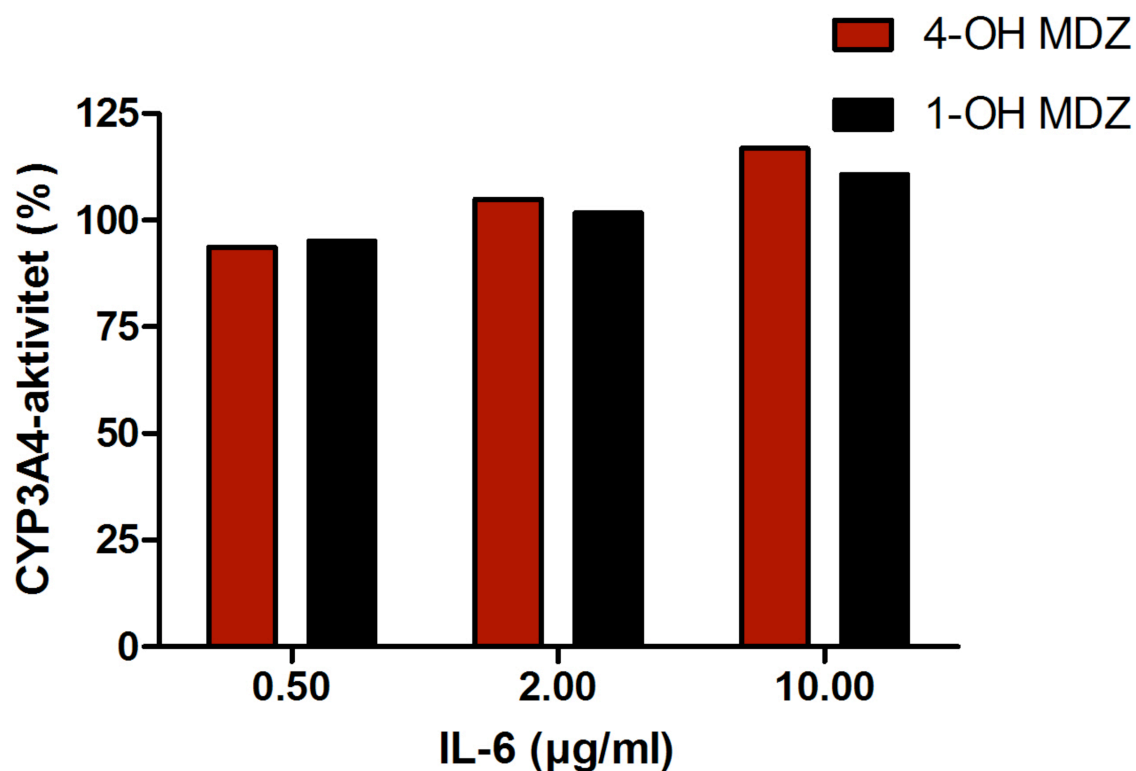
Videre forsøk i tidsrommet 12-48 timer viste ingen endring i CYP3A4-aktivitet etter inkubering med 2000 pg/ml og 10000 pg/ml IL-6, etter 24 og 48 timer (Figur 3.6). Etter 12 timer inkubering med 2000 pg/ml IL-6 ble det vist ca. 30% økning i CYP3A4-aktivitet. Tilsvarende viste 12 timer inkubering med 10000 pg/ml IL-6 ca. 20% økning i CYP3A4-aktivitet.



**Figur 3.6:** CYP3A4-aktivitet, bestemt ved dannelse av 4-OH MDZ, som funksjon av inkubasjonstid med 2000 og 10000 pg/ml IL-6. Forsøket ble utført med 50  $\mu$ M MDZ, 15 min inkubasjon og 3 paralleller med prøve og kontroll ( $n=3$ ).

### 3.5 Effekt av IL-6 på CYP3A4-mediert metabolisme i insektmikrosomer

CYP3A4-insektmikrosomer ble preinkubert med 0,5  $\mu$ g, 2  $\mu$ g og 10  $\mu$ g IL-6. Resultatene viste ingen effekt på CYP3A4-mediert dannelse av 1'-OH MDZ og 4-OH MDZ ved økende konsentrasjon av IL-6 (Figur 3.7).



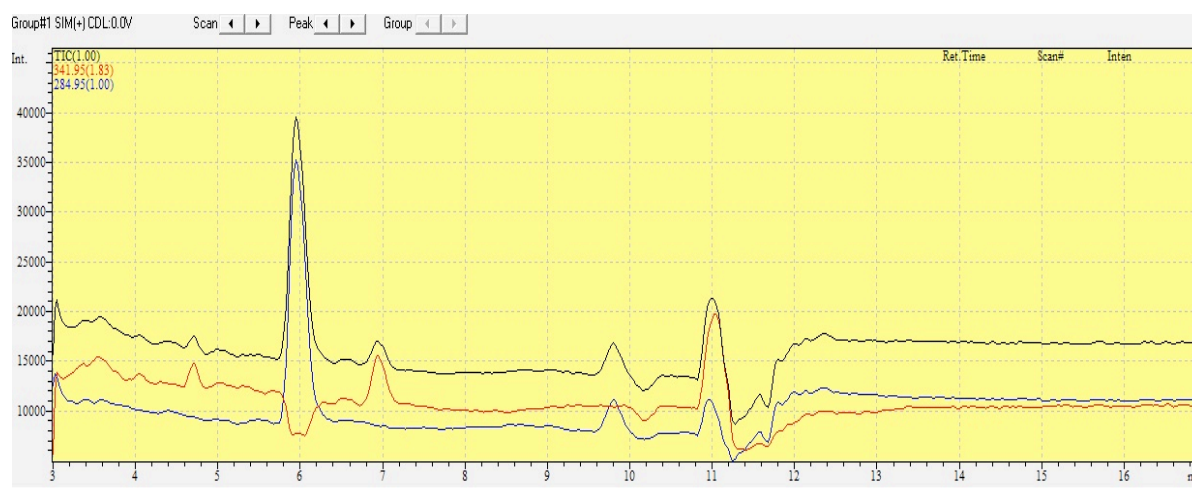
**Figur 3.7:** CYP3A4-aktivitet, bestemt ved dannelse av 1'-OH MDZ og 4-OH MDZ, som funksjon av IL-6 konsentrasjon. Forsøket ble utført med 2  $\mu$ M MDZ og prøver ble relatert til kontroll uten IL-6.

## 4. Diskusjon

### 4.1 Metoder og materialer

#### 4.1.1 CYP3A4-aktivitet estimert ved dannelse av 4-OH MDZ

Det ble brukt en tidligere validert metode for å detektere 1'-OH MDZ og 4-OH MDZ, med DIA som IS. Retensjonstider til 1'-OH MDZ og 4-OH MDZ var henholdsvis 6,0 og 4,7 minutter [60]. I de innledende forsøkene ble det observert at intensiteten på 1'-OH MDZ toppen var lav i forhold til hva som kunne forventes. Samtidig ble det observert en forurensning ved samme retensjonstid som 1'-OH MDZ i kromatogrammene. Det ble antatt at denne forurensningen førte til en undertrykkelse i MS-signalet til 1'-OH MDZ. Det ble foretatt rensing og utskifting av kolonne, uten at dette førte til bedre deteksjon av 1'-OH MDZ. Videre ble det utført forsøk for å finne ut hvor forurensningen stammet fra. Prøver med økende konsentrasjon av MDZ (2,5, 5,0 og 7,5  $\mu\text{m}$ ) ble analysert i LC-MS både uten og etter eksponering for THLE-celler. Konsentrasjonen av forurensning økte ved økende konsentrasjon av MDZ i begge tilfeller. Det ble derfor konkludert med at forurensningen førte til en undertrykkelse i MS-signalet til 1'-OH MDZ, og at denne stammet fra MDZ-stamløsningen (Figur 4.1).



**Figur 4.1:** Forurensning vises som blå topp og 1'-OH MDZ vises som rød topp, begge med retensjonstid på 6 minutter. Forurensning hadde samme masse/ladningsforhold ( $m/z$ ) som DIA (284,95).

Basalaktivitetsforsøkene viste at metabolismen av MDZ til 4-OH MDZ var uavhengig av hvor mange dager det hadde gått etter utsåing av THLE-cellene. 1-'OH MDZ kunne i basalaktivitetsforsøkene detekteres, selv om forurensningen fortsatt var til stede ved samme retensjonstid. Det ble valgt å utføre forsøk på dag 4 etter utsåing av THLE-celler, på grunn av den høye dannelsen av 1-'OH MDZ på denne dagen. Dette var ikke reproduserbart i fremtidige forsøk med like betingelser. En ny MDZ-batch fra et annet firma (Sigma-Aldrich) ble testet, men også denne inneholdt forurensningen. Det ble besluttet å estimere CYP3A4-aktivitet ved dannelse av sekundærmetylitten, 4-OH MDZ, som ga reproduserbare data i forsøkene og forsøksdag 4 dager etter utsåing ble beholdt.

## 4.2 Metabolisme i THLE-celler

Det ble utviklet en metode for å studere CYP3A4-mediert metabolisme i THLE-celler. Dannelse av 1-'OH MDZ og 4-OH MDZ viste en Michaelis-Menten lignende kinetikk i metningsforsøk (10-200  $\mu\text{M}$ ). Samtidig ble det vist at ratioen mellom  $K_m$ -verdiene for dannelse av 1-'OH MDZ og 4-OH MDZ var tilnærmet lik i THLE-mikrosomer (0,057) og THLE-celler (0,062) [61]. Dette styrker validiteten til metoden utviklet for å studere CYP3A4-mediert metabolisme i THLE-celler. Det var relativt liten variasjon i forsøkene utført i fravær av cytokin.

### 4.2.1 Metabolismestudier med IL-6

Effekt av IL-6 på CYP3A4-mediert metabolisme av MDZ i THLE-celler ble undersøkt ved inkubering i tidsrommet 12-96 timer. En svak økning i CYP3A4 aktivitet ble vist etter 12 timer inkubering med både 2000 og 10000 pg/ml IL-6 (Figur 3.7). Ingen betydelig effekt ble vist i tidsrommet 24-96 timer inkubering med IL-6. Den store variasjonen mellom forsøkene gjør det vanskelig å trekke sikre konklusjoner der antydning til endring i CYP3A4-aktivitet ble vist. At det ikke var noen tegn til forandring i CYP3A4-aktivitet etter 96 timer inkubering med IL-6 tyder på at den eventuelle effekten i beste fall er svak og overgående.

Våre data er ikke i samsvar med tidligere publiserte data. Nedregulering av CYP3A4-aktivitet etter tilsetning av IL-6 er vist i flere studier med humane hepatocytter [32, 34]. I studien utført av Dickmann et al. ble humane hepatocytter tilsatt IL-6 henholdsvis 48, 72 og 96 timer før forsøksdagen. CYP3A4-aktivitet ble målt med testosteron som probe, og 15 min

inkubering med substrat ble benyttet. Ved alle tidspunkter var det en klar nedgang i CYP3A4-aktivitet med økende konsentrasjon av IL-6. Maksimal suppresjon av CYP3A4-aktivitet ble rapportert etter 96 timer, med  $E_{\min}$  på 21.5% av kontroll og  $EC_{50}$  verdi på 17,1 pg/ml.  $EC_{50}$  for suppresjon av CYP3A4-aktivitet etter 48 og 72 timer var henholdsvis 56,3 pg/ml og 20,6 pg/ml. Måling av CYP3A4 mRNA-ekspressjon etter 72 timer med IL-6 eksponering viste en nedregulering til under 5% av kontroll og en  $EC_{50}$  verdi på 3,2 pg/ml IL-6. Det ble målt IL-6-mediert nedregulering av mRNA også i andre CYP-enzymmer, men CYP3A4 var mest sensitiv [32]. I denne studien ble det benyttet IL-6 konsentrasjoner i samme spekter som målt i plasma hos mennesker med sykdommer forbundet med inflammasjon (2,6 pg/ml – 123 pg/ml), dvs. mye lavere enn i våre studier.  $EC_{50}$ -verdiene for suppresjon av CYP3A4-aktivitet lå innenfor dette spekteret ved både 48, 72 og 96 timer inkubering med IL-6.

Et interessant funn var økningen i CYP3A4 aktivitet som ble vist etter 12 timer inkubering med IL-6 i vår studie. Økningen i CYP3A4-aktivitet var henholdsvis ca. 30% for 2000 pg/ml IL-6 og ca. 20% for 10000 pg/ml (Figur 3.7). Det ble utført mikrosomforsøk for å undersøke om IL-6 kunne ha en direkte effekt på CYP3A4, men ingen effekt ble vist. Det kan tenkes at den marginale effekten i THLE-celler i denne studien skyldes at IL-6 har virket stabiliserende på CYP3A4 gjennom en allosterisk modellering. Det er imidlertid uklart hvorfor denne effekten ikke opprettholdes etter 24-96 timer.

### 4.3 Valg av *in vitro* cellemodell

Det er en forutsetning at cellemodellen som brukes er egnet for å studere IL-6 signaloverføring. IL-6 induserer transkripsjonen av CRP og serum amyloid A (SAA) under APR. Transkripsjonen av akutt-fase proteinene er avhengig av signalering gjennom Janus tyrosin kinase (JAK) og Signal Transduser og Aktivator av Transkripsjon 3 (STAT3) signalveien, i tillegg til at subenheter av NF- $\kappa$ B er involvert [62, 63]. Det er blitt observert en dose-avhengig transkripsjon av CRP og SAA i humane hepatocytter, mediert av IL-6 [32]. Humane hepatocytter har også blitt brukt til å studere signaloverføring i celler mediert av blant annet NF- $\kappa$ B, C/EPB og p38 MAPK (p38 mitogen-aktivert protein kinase) [64]. Det er ikke funnet lignende studier utført på THLE-celler, og det er derfor vanskelig å vite om THLE-celler er en egnet modell for å studere IL-6-signaloverføring.

Gu et al. viste at IL-6 induserer produksjonen av NF- $\kappa$ B i humane hepatocytter, etterfulgt av suppresjon av CYP3A4-ekspressjon [42]. NF- $\kappa$ B binder seg til RXR- $\alpha$  og hindrer på denne måten dannelsen av PXR-RXR- $\alpha$  komplekset, som aktiverer transkripsjon av CYP3A4. Transkripsjonen av CYP3A4 blir indusert av både PXR og CAR, og disse kjernereseptorene aktiveres av en rekke xenobiotika [2]. Rifampicin er et legemiddel som er kjent for å indusere en rekke CYP-enzymmer, hvorav CYP3A4 er en av de som blir mest effektivt indusert [65]. CYP3A4 mRNA økte 14 ganger i humane hepatocytter etter eksponering for 20  $\mu$ M rifampicin [66]. Den induserende effekten medieres gjennom binding av rifampicin til PXR [67]. Det er usikkert om alle faktorer i signalveiene for regulering av CYP3A4 er tilstede eller aktive nok i THLE-celler i forhold til i humane hepatocytter. Det er ingen studier som dokumenterer at transkripsjon av NF- $\kappa$ B induseres av IL-6 i THLE-celler. Det kan derfor være ulike grunner til den manglende effekten av IL-6 på nedregulering av CYP3A4-aktivitet i THLE-celler. Videre studier i THLE-celler bør fokusere på å kartlegge faktorer i signalveiene, og om disse fungerer optimalt.

#### 4.4 Midazolam som probe

I en studie utført med RAW264,7 makrofag-celler ble det funnet at MDZ inhiberer transkripsjonen av proinflammatoriske mediatorer gjennom blokkering av p38 MAPK og/eller NF- $\kappa$ B [68]. Cellene ble tilsatt lipopolysakkarid (LPS), som er vist å initiere intracellulære signalveier som fører til aktivering av NF- $\kappa$ B og p38 MAPK [69].

I studien ble det funnet at preinkubering med MDZ førte til blokkering av LPS-indusert degradering av I $\kappa$ B- $\alpha$ . I $\kappa$ B- $\alpha$  er et protein som danner et kompleks med NF- $\kappa$ B i cytoplasma, og inhiberer på denne måten aktivering av NF- $\kappa$ B. Et annet funn var at LPS induserte translokasjonen av NF- $\kappa$ B inn i cellekjernen, mens MDZ blokkerte denne translokasjonen [68].

En av de primære mekanismene for nedregulering av CYP3A4-aktivitet baserer seg på at NF- $\kappa$ B forstyrrer assosiasjonen mellom PXR-RXR- $\alpha$  komplekset, med påfølgende suppresjon av CYP3A4-ekspressjon [33]. Ut i fra resultatene fra studien ovenfor er det mulig at effekten av IL-6 på THLE-celler er substratavhengig. Det kan tenkes at MDZ hemmer aktivering av NF- $\kappa$ B i THLE-celler og at den derfor ikke er en egnet probe.

## 5. Konklusjon

Det ble i denne oppgaven utviklet en metode for å studere CYP3A4-mediert metabolisme av MDZ i THLE-celler. Det ble ikke vist nedregulering av CYP3A4-aktivitet i THLE-celler med IL-6. Det er mulig at THLE-celler ikke er en egnet modell for å studere nedregulering av CYP3A4. En substratavhengig effekt kan heller ikke utelukkes, da en studie viser at MDZ kan hemme aktivering av NF- $\kappa$ B, den antatte sentrale mediatoren for IL-6-mediert nedregulering av CYP3A4-aktivitet. En alternativ probe bør derfor undersøkes for å se på effekten av IL-6 på CYP3A4-aktivitet. Resultatene fra vår studie indikerer at andre cellemodeller bør benyttes for å undersøke effekt av IL-6 på CYP3A4-mediert metabolisme.



## 6. Referanser

1. Zhao, L. and G. Pickering, *Paracetamol metabolism and related genetic differences*. Drug metabolism reviews, 2011. **43**(1): p. 41-52.
2. Gonzalez, F.J. and R.H. Tukey, *Drug Metabolism*. Goodman and Gillmans Pharmacological basis of therapeutics. 2006. 71-91.
3. Page, R.L., 2nd, P.M. Klem, and C. Rogers, *Potential elevation of tacrolimus trough concentrations with concomitant metronidazole therapy*. The Annals of pharmacotherapy, 2005. **39**(6): p. 1109-13.
4. Meunier, B., S.P. de Visser, and S. Shaik, *Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome p450 enzymes*. Chemical reviews, 2004. **104**(9): p. 3947-80.
5. Omari, A.A. and D.J. Murry, *Pharmacogenetics of the Cytochrome P450 Enzyme System: Review of Current Knowledge and Clinical Significance*. Journal of Pharmacy Practice, 2007. **20**(3): p. 206-218.
6. Thummel, K.E. and G.R. Wilkinson, *In vitro and in vivo drug interactions involving human CYP3A*. Annual review of pharmacology and toxicology, 1998. **38**: p. 389-430.
7. Ozdemir, V., et al., *Evaluation of the genetic component of variability in CYP3A4 activity: a repeated drug administration method*. Pharmacogenetics, 2000. **10**(5): p. 373-88.
8. Sim, S., *Home Page of the Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee*. 2008.
9. Westlind-Johnsson, A., et al., *Comparative analysis of CYP3A expression in human liver suggests only a minor role for CYP3A5 in drug metabolism*. Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals, 2003. **31**(6): p. 755-61.
10. Chang, T.K. and D.J. Waxman, *Synthetic drugs and natural products as modulators of constitutive androstane receptor (CAR) and pregnane X receptor (PXR)*. Drug metabolism reviews, 2006. **38**(1-2): p. 51-73.
11. Steinke, J.W. and L. Borish, *3. Cytokines and chemokines*. The Journal of allergy and clinical immunology, 2006. **117**(2 Suppl Mini-Primer): p. S441-5.
12. Stephen C Piscitelli, K.A.R., Manjunath P. Pai, *Drug Interactions in Infectious Disease*. Springer 2011: p. 167-190.
13. Nicola, N.A., *Cytokine pleiotropy and redundancy: a view from the receptor*. Stem cells, 1994. **12 Suppl 1**: p. 3-12; discussion 12-4.
14. Medzhitov, R., *Inflammation 2010: new adventures of an old flame*. Cell, 2010. **140**(6): p. 771-6.
15. Medzhitov, R., *Origin and physiological roles of inflammation*. Nature, 2008. **454**(7203): p. 428-35.
16. Ramadori, G. and B. Christ, *Cytokines and the hepatic acute-phase response*. Seminars in liver disease, 1999. **19**(2): p. 141-55.
17. Moshage, H., *Cytokines and the hepatic acute phase response*. The Journal of pathology, 1997. **181**(3): p. 257-66.

18. Schmitt, C., et al., *Disease-drug-drug interaction involving tocilizumab and simvastatin in patients with rheumatoid arthritis*. Clinical pharmacology and therapeutics, 2011. **89**(5): p. 735-40.
19. Mayo, P.R., et al., *Decreased dromotropic response to verapamil despite pronounced increased drug concentration in rheumatoid arthritis*. British journal of clinical pharmacology, 2000. **50**(6): p. 605-13.
20. Morgan, E.T., *Impact of infectious and inflammatory disease on cytochrome P450-mediated drug metabolism and pharmacokinetics*. Clinical pharmacology and therapeutics, 2009. **85**(4): p. 434-8.
21. Morgan, E.T., et al., *Regulation of drug-metabolizing enzymes and transporters in infection, inflammation, and cancer*. Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals, 2008. **36**(2): p. 205-16.
22. Aitken, A.E., T.A. Richardson, and E.T. Morgan, *Regulation of drug-metabolizing enzymes and transporters in inflammation*. Annual review of pharmacology and toxicology, 2006. **46**: p. 123-49.
23. Miller, D.S., *Regulation of P-glycoprotein and other ABC drug transporters at the blood-brain barrier*. Trends in pharmacological sciences, 2010. **31**(6): p. 246-54.
24. Donato, M.T., et al., *Nitric oxide-mediated inhibition of cytochrome P450 by interferon-gamma in human hepatocytes*. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 1997. **281**(1): p. 484-90.
25. Petrovic, V., S. Teng, and M. Piquette-Miller, *Regulation of drug transporters during infection and inflammation*. Molecular interventions, 2007. **7**(2): p. 99-111.
26. Christensen, H. and M. Hermann, *Immunological response as a source to variability in drug metabolism and transport*. Frontiers in pharmacology, 2012. **3**: p. 8.
27. Chang, K.C., et al., *Altered theophylline pharmacokinetics during acute respiratory viral illness*. Lancet, 1978. **1**(8074): p. 1132-3.
28. Kishimoto, T., *Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine*. Arthritis research & therapy, 2006. **8 Suppl 2**: p. S2.
29. Anthony R. Mire-Sluis, R.T., *Cytokines*. 1998: p. 94.
30. Zhang X., S.C., Grange S., Terao K., Miya K., Kivitz A., Marino M., *Disease-drug interaction studies of tocilizumab with cytochrome P450 substrates in vitro and in vivo*. Clin. Pharmacol. , 2009.
31. Chen, Y.L., et al., *Acute-phase response, interleukin-6, and alteration of cyclosporine pharmacokinetics*. Clinical pharmacology and therapeutics, 1994. **55**(6): p. 649-60.
32. Dickmann, L.J., et al., *Effects of Interleukin-6 (IL-6) and an Anti-IL-6 Monoclonal Antibody on Drug-Metabolizing Enzymes in Human Hepatocyte Culture*. Drug Metab Dispos, 2011. **39**(8): p. 1415-22.
33. Yang, J., et al., *Pregnane X receptor is required for interleukin-6-mediated down-regulation of cytochrome P450 3A4 in human hepatocytes*. Toxicology letters, 2010. **197**(3): p. 219-26.

34. Aitken, A.E. and E.T. Morgan, *Gene-specific effects of inflammatory cytokines on cytochrome P450 2C, 2B6 and 3A4 mRNA levels in human hepatocytes*. Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals, 2007. **35**(9): p. 1687-93.
35. Rose-John, S., et al., *The IL-6/sIL-6R complex as a novel target for therapeutic approaches*. Expert opinion on therapeutic targets, 2007. **11**(5): p. 613-24.
36. Jover, R., et al., *Down-regulation of human CYP3A4 by the inflammatory signal interleukin-6: molecular mechanism and transcription factors involved*. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 2002. **16**(13): p. 1799-801.
37. Rodriguez-Antona, C., et al., *Transcriptional regulation of human CYP3A4 basal expression by CCAAT enhancer-binding protein alpha and hepatocyte nuclear factor-3 gamma*. Molecular pharmacology, 2003. **63**(5): p. 1180-9.
38. Pascussi, J.M., et al., *Interleukin-6 negatively regulates the expression of pregnane X receptor and constitutively activated receptor in primary human hepatocytes*. Biochemical and biophysical research communications, 2000. **274**(3): p. 707-13.
39. Bombail, V., et al., *Role of Sp1, C/EBP alpha, HNF3, and PXR in the basal- and xenobiotic-mediated regulation of the CYP3A4 gene*. Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals, 2004. **32**(5): p. 525-35.
40. Tirona, R.G. and R.B. Kim, *Nuclear receptors and drug disposition gene regulation*. Journal of pharmaceutical sciences, 2005. **94**(6): p. 1169-86.
41. Liptrott, N.J. and A. Owen, *The role of cytokines in the regulation of drug disposition: extended functional pleiotropism?* Expert opinion on drug metabolism & toxicology, 2011. **7**(3): p. 341-52.
42. Gu, X., et al., *Role of NF-kappaB in regulation of PXR-mediated gene expression: a mechanism for the suppression of cytochrome P-450 3A4 by proinflammatory agents*. The Journal of biological chemistry, 2006. **281**(26): p. 17882-9.
43. Strehlau, J., et al., *Interleukin-2 receptor antibody-induced alterations of ciclosporin dose requirements in paediatric transplant recipients*. Lancet, 2000. **356**(9238): p. 1327-8.
44. SPC, *SPC for tocilizumab*.
45. Lee, J.I., et al., *CYP-mediated therapeutic protein-drug interactions: clinical findings, proposed mechanisms and regulatory implications*. Clinical pharmacokinetics, 2010. **49**(5): p. 295-310.
46. Michaelis, L., et al., *The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis-Menten paper*. Biochemistry, 2011. **50**(39): p. 8264-9.
47. Chen, W.W., M. Niepel, and P.K. Sorger, *Classic and contemporary approaches to modeling biochemical reactions*. Genes & development, 2010. **24**(17): p. 1861-75.
48. Tracy, T.S. and M.A. Hummel, *Modeling kinetic data from in vitro drug metabolism enzyme experiments*. Drug metabolism reviews, 2004. **36**(2): p. 231-42.

49. Chiba, M., Y. Ishii, and Y. Sugiyama, *Prediction of hepatic clearance in human from in vitro data for successful drug development*. The AAPS journal, 2009. **11**(2): p. 262-76.
50. SPC. *Midazolam* 2012; Available from: <http://www.legemiddelverket.no/custom/Preparatsok/Omtale.aspx?docID=e953357b-969f-4a6d-af19-44c386f868a0>.
51. Thummel, K.E., et al., *Use of midazolam as a human cytochrome P450 3A probe: I. In vitro-in vivo correlations in liver transplant patients*. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 1994. **271**(1): p. 549-56.
52. Houston, J.B. and A. Galetin, *Modelling atypical CYP3A4 kinetics: principles and pragmatism*. Archives of biochemistry and biophysics, 2005. **433**(2): p. 351-60.
53. Yang, J., et al., *Evidence of CYP3A allosterism in vivo: analysis of interaction between fluconazole and midazolam*. Clinical pharmacology and therapeutics, 2012. **91**(3): p. 442-9.
54. Jose V Castell, M.J.G.-L., *In Vitro Methods in Pharmaceutical Research*. Academic Press, 1997.
55. Rodrigues, A.D., *Use of in vitro human metabolism studies in drug development. An industrial perspective*. Biochemical pharmacology, 1994. **48**(12): p. 2147-56.
56. Pfeifer, A.M., et al., *Simian virus 40 large tumor antigen-immortalized normal human liver epithelial cells express hepatocyte characteristics and metabolize chemical carcinogens*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1993. **90**(11): p. 5123-7.
57. Postvoll, L.W., *Metabolisme av midazolam via CYP3A4 og CYP3A5 in vitro: utvikling av LC/MS-metode for analyse av hydroksylerte metabolitter*. 2006.
58. Hotvedt, T.A., *Effekt av IL-6 og IFN- $\alpha$ 2b på CYP3A4-mediert metabolisme av midazolam i THLE-celler*. 2012.
59. Christensen, H., et al., *Different enzyme kinetics of midazolam in recombinant CYP3A4 microsomes from human and insect sources*. Drug Metab Pharmacokinet, 2009. **24**(3): p. 261-8.
60. Postvoll, L.W., *Metabolisme av midazolam via CYP3A4 og CYP3A5 in vitro. - Utvikling av LC/MS-metode for analyse av hydroksylerte metabolitter*. 2006.
61. Christensen, H., et al., *Different enzyme kinetics of midazolam in recombinant CYP3A4 microsomes from human and insect sources*. Drug metabolism and pharmacokinetics, 2009. **24**(3): p. 261-8.
62. Zhang, D., et al., *STAT3 participates in transcriptional activation of the C-reactive protein gene by interleukin-6*. The Journal of biological chemistry, 1996. **271**(16): p. 9503-9.
63. Jensen, L.E. and A.S. Whitehead, *Regulation of serum amyloid A protein expression during the acute-phase response*. The Biochemical journal, 1998. **334 ( Pt 3)**: p. 489-503.
64. Henklova, P., et al., *SB203580, a pharmacological inhibitor of p38 MAP kinase transduction pathway activates ERK and JNK MAP kinases in primary*

- 
- cultures of human hepatocytes*. European journal of pharmacology, 2008. **593**(1-3): p. 16-23.
65. Waxman, D.J. and L. Azaroff, *Phenobarbital induction of cytochrome P-450 gene expression*. The Biochemical journal, 1992. **281 ( Pt 3)**: p. 577-92.
66. Hesse, L.M., et al., *Effect of bupropion on CYP2B6 and CYP3A4 catalytic activity, immunoreactive protein and mRNA levels in primary human hepatocytes: comparison with rifampicin*. The Journal of pharmacy and pharmacology, 2003. **55**(9): p. 1229-39.
67. Chen, J. and K. Raymond, *Roles of rifampicin in drug-drug interactions: underlying molecular mechanisms involving the nuclear pregnane X receptor*. Annals of clinical microbiology and antimicrobials, 2006. **5**: p. 3.
68. Kim, S.N., et al., *Midazolam inhibits proinflammatory mediators in the lipopolysaccharide-activated macrophage*. Anesthesiology, 2006. **105**(1): p. 105-10.
69. Sanghera, J.S., et al., *Activation of multiple proline-directed kinases by bacterial lipopolysaccharide in murine macrophages*. Journal of immunology, 1996. **156**(11): p. 4457-65.

## 7. Appendiks

### Utstyr

<b>Utstyr</b>	<b>Produsent</b>
Autoinjektor SIL-10AD VP	<b>Shimadzu, Kyoto, Japan</b>
Degasser DGU-14A	<b>Shimadzu, Kyoto, Japan</b>
Detektor massespektrometer LCMS-2010A	<b>Shimadzu, Kyoto, Japan</b>
Forkolonne Inertsil C8-3, 5µm, 3,0 x 10mm	<b>GL Sciences Inc, Tokyo, Japan</b>
Graphpad Prism 5	<b>Graphpad Software Inc, La Joll, CA, USA</b>
Ionebyttet vann	<b>Easypure UV, Barnstead, USA</b>
Kolonne Inertsil C8-3, 5µm, 3,0 x 50mm	<b>GL Sciences Inc, Tokyo, Japan</b>
LCMSsolution programvare 2.04	<b>Shimadzu, Kyoto, Japan</b>
Microsoft Office Excel 2011	<b>Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA</b>
pH-meter Beckman 50 pH meter	<b>Beckman Instruments Inc, Fullerton, CA, USA</b>
Pumper LC-10AP VP	<b>Shimadzu, Kyoto, Japan</b>
Sentrifuge universal 32 R	<b>Hettich zentrifugen, Tyskland</b>
Switch FCV-12AH	<b>Shimadzu, Kyoto, Japan</b>
Systemkontroller SCL-10A VP	<b>Shimadzu, Kyoto, Japan</b>

Vannbad	<b>Gallenkamp, England</b>
Vekt	<b>Ohaus, PRECISION, Standard, N.J, USA</b>
Vekt	<b>Mettler Toledo, Sveits</b>
Whirlmixer	<b>Fisons Scientific Apparatus, England</b>
Whirlmikser MS 3 basic	<b>IKA Works Inc, Wilmington NC, USA</b>

## Kjemikalier

Acetonitril (ACN)	<b>Merck, Darmstadt, Tyskland</b>
Diazepam	<b>Diakonhjemmet sykehus, Oslo, Norge</b>
Insektsmikrosomer med CYP3A4+450 reduktase+cytokrom b5 supersomer	<b>Supersomes, BD Gentest, Woburn, MA, USA</b>
Kaliumklorid (KCl)	<b>Merck, Darmstadt, Tyskland</b>
Maurusyre (CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	<b>Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Tyskland</b>
Metanol (MeOH)	<b>Merck, Darmstadt, Tyskland</b>
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	<b>Merck, Darmstadt, Tyskland</b>
Midazolam	<b>F. Hoffmann-La Roche AB, Sveits</b>
N <sub>2</sub> -gass	<b>AGA AS, Oslo, Norge</b>
NADPH	<b>Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA</b>
Ny midazolam	<b>Sigma-Aldrich, St. Louis, USA</b>

---

THLE T5-3A4-celler	<b>Nestle © Research Center, Sveits</b>
Tris-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	<b>Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA</b>
Tris HCL	<b>Sigma-Aldrich, St. Louis, USA</b>



## Løsninger for THLE-celler

### **Sammensetning av dyrkningsmediet benyttet for THLE-celler (Løsning 1)**

Løsning		Mengde
Dulbeccos Modified Eagles's medium (DMEM) m/GLUTAMAX	Gibco, no.21885-108	500 ml
FCS (Føtalt kalveserum)	Gibco, no.10108-165	50 ml
Penicillin/Streptomycin 10 000 IU/ml	Gibco, no.15290-026	2,5 ml
Fungizone (250 µg/ml Amfotericin)	Gibco, no.15140-114	2,5 ml

### **Trypsinløsning 0,25% - THLE-celler (Løsning 2)**

Løsning		Mengde
Trypsin-EDTA 0,5 %	PAA, no.L00410-0749	1 ml
HBSS	Gibco, no.20115-155	1 ml

### **Høstebuffer pH 7,4 (Løsning 3)**

Stoff		Mengde
0,154 M KCL (isoton)	Merck, no. 6328879	11,5 g
50 mM Tris HCL	Sigma-Aldrich, Lot 115H5730	6,05 g
Destillert vann	Aquatron A4S	ad 1000 ml

## Løsninger for LC-MS

### **Mobilfase A:**

#### **0,05 M ammoniumformiat-buffer pH 4,4**

Løsning	Mengde
Ammoniakk (NH <sub>3</sub> ) 25%	4,036 ml
Kons. maursyre (CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	2,2125 ml
Ionebyttet vann	ad 1000 ml

### **Mobilfase B:**

#### **Acetonitril 95 %: Metanol 5 %**

Løsning	Mengde
Acetonitril (ACN)	950 ml
Metanol (MeOH)	50 ml