

# Slutrapport till Stiftelsen svensk hästforskning (SSH)

## Projekt:

## Studier av ett mikrobiellt *in vitro*-system för produktion av läkemedelsmetaboliter till dopningskontrollen

SSHs projektnummer: H0547146

SVAs diarienummer: 2005/651

## 1. Bakgrund

Dopningskontrollen inom hästsporten utförs idag främst genom analys av urinprover. Förutom för ett mindre antal endogena och foderrelaterade substanser, så är analysen kvalitativ till sin natur, d.v.s. det är tillfyllest att påvisa förekomst av en otillåten substans oavsett koncentration, för att regelbrott ska föreligga. Många läkemedel metaboliseras dock i hög grad i hästen och i vissa fall utsöndras en mycket liten fraktion som oförändrad moderssubstans i urinen. Enligt regelverket är det därför juridiskt sett likvärdigt att påvisa förekomsten av en metabolit till en läkemedelssubstans i ett urinprov som att påvisa själva moderssubstansen. Dessutom är det ur ett rättssäkerhetsperspektiv av fördel om minst en metabolit kan påvisas i ett positivt dopningsprov. Detta utesluter nämligen att det rör sig om ett sabotage genom spetsning av urinprovet, eftersom förekomsten av metaboliter bevisar att den otillåtna substansen i fråga har transporterats genom hästens kropp och där omvandlats före utsöndring.

För att på ett juridiskt hållbart sätt kunna påvisa förekomsten av en viss substans i ett prov, så krävs enligt internationellt överenskomna riktlinjer, att kromatogram och masspektrum från det misstänkta provet kan jämföras med motsvarande från en karakteriserad referenssubstans. Läkemedelssubstanser är i allmänhet kommersiellt tillgängliga och alla dopningskontroll-laboratorier bygger upp stora förråd av referensmaterial av sådana. När det gäller läkemedelsmetaboliter, så är situationen betydligt annorlunda, eftersom endast ett fåtal finns att köpa på marknaden. Detta innebär ett stort problem när det gäller att upprätthålla en effektiv kontrollverksamhet genom att det ofta omöjliggör en juridiskt hållbar identifiering av metaboliter. Det finns några tänkbara sätt att producera metaboliter. Kemisk syntes är mycket kostsam och tidsödande. Administration av aktuellt läkemedel till hästar, uppsamling av urin och renframställning av bildade metaboliter är ineffektivt, dyrt och innebär oönskade djurförsök. *In vitro*-system, såsom levermikrosomer kräver också de tillgång på djurmaterial och är ofta långsamma och ger dåligt utbyte i de metabola reaktionerna.

Syftet med föreliggande projekt har därför varit att utvärdera den kommersiellt tillgängliga filamentösa svampen *Cunninghamella elegans* förmåga att producera läkemedelsmetaboliter av relevans för dopningskontrollen. *C. elegans* har i tidigare studier visat sig kunna producera stora mängder metaboliter på kort tid och metabolismmönstren har visat sig likna dem hos däggdjur. I allmänhet bildas många fler olika typer av metaboliter av *C. elegans* än vid experiment med mer specifika enzymssystem. Dessutom är svampen relativt billig och systemet kräver inga djurförsök.

## 2. Material och metoder

### 2.1 Kunskapsinhämtning

Annica Tevell Åberg, en av de medsökande i detta projekt, företog före projektstarten ett veckolångt besök vid Horseracing Forensic Laboratory, Ltd. (HFL) i Newmarket, England. Där lärde hon sig det praktiska handhavandet kring *C. elegans*.

### 2.2 *C. elegans*

I början av år 2006 inköptes en kultur av *C. elegans* (ATCC9245). Denna ursprungskultur har räckt under hela projektets gång.

Kortfattat skedde odlingen enligt följande. Några droppar av ursprungskulturen droppades på en Saboraud dextros-agarplatta. Plattan inkuberades vid 25-27 °C i 5 dygn. Sporer och mycel suspenderades sedan i 150 mL steril koksaltlösning. Fem milliliter av denna suspension fördes sedan över till en E-kolv innehållande Saboraud dextros-buljong. Kolven inkuberades vid 25-27 °C i ytterligare 48 timmar. Därefter tillsattes den läkemedelssubstans som skulle studeras i en mängd som gav en slutkoncentration på 250-750 µM. Inkubation skedde sedan vid 25-27 °C i 24-96 timmar.

För kvalitativ analys av de bildade metaboliterna, så skedde antingen upprening/uppkoncentrering av de bildade metaboliterna med hjälp av vätskevätskeextraktion eller fastfasextraktion. Även direktinjektion av odlingsmediet har testats.

### 2.3 Testsubstanser

De läkemedelssubstanser som testats i detta projekt är klemastin, meloxicam, bupivakain, flutamid, morfin, verapamil, tramadol, propranolol och bufexamak. Strukturerna för de substanser för vilka resultat presenteras i denna rapport visas i figur 1.

### 2.4 Vätskekromatografi-tandemmasspektrometri (LC-MS/MS)

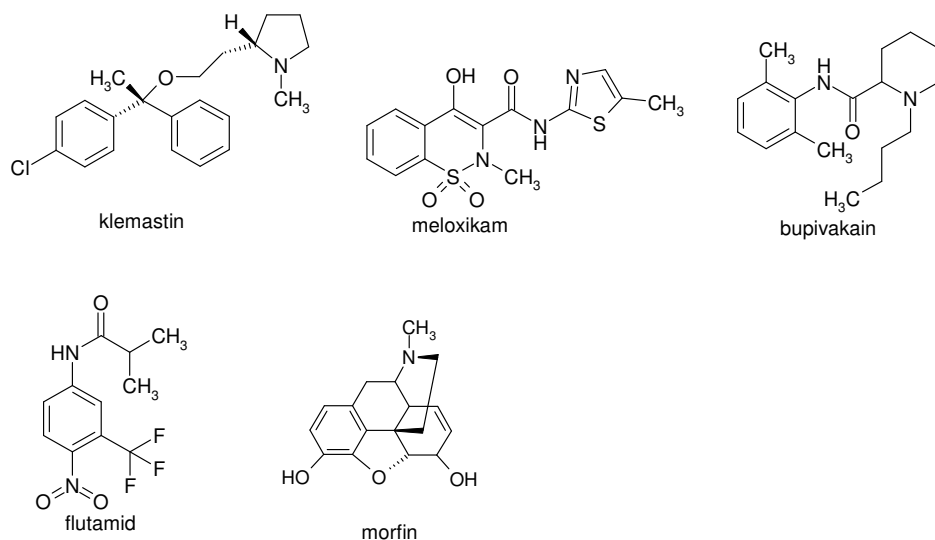
De kvalitativa analyserna har skett med LC-MS/MS med elektroprayjonisering med positiv eller negativ potential. De masspektrometrar som använts har varit av tandemkvadrupoltyp (Quattro LC, Waters, Manchester, UK och TSQ Quantum, ThermoFinnigan, San José, CA, USA) och jonfälletyp (LCQ, ThermoFinnigan, San José, CA, USA).

### 2.5 Preparativ kromatografi

Renframställning av metaboliter av klemastin och meloxicam har skett med hjälp av en HP1050 (Agilent Technologies, Waldbrunn, Tyskland) och en Waters Fraction Collector III.

### 2.6 NMR

Pågående NMR-analyser sker på Läkemedelsverket i Uppsala.

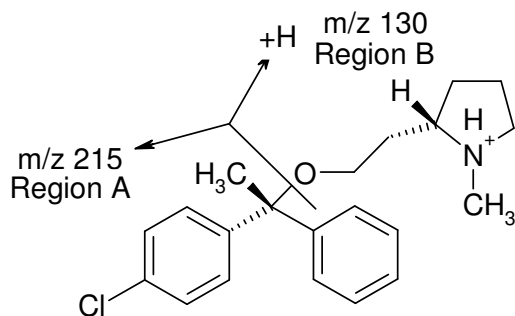


**Figur 1.** Strukturer för de använda testsubstanserna.

### 3. Resultat och diskussion

#### 3.1 Klemastin

Antihistaminen klemastin, som ingår i den humanmedicinska specialiteten Tavegyl<sup>®</sup>, valdes som modellsubstans dels på grund av att den frekvent ordinerar till häst (Törneke *et al.* 2002, Törneke *et al.* 2003) och dels för att den metaboliseras i hög grad i detta djurslag (Tevell *et al.* 2004). Substansen har inkuberats med *C. elegans* vid SVA och de bildade metaboliterna har sedan karakteriserats med LC-MS/MS. Genom kromatografiska resultat i kombination med masspektrometriska slutsatser av de olika bildade protonerade molekylerna ( $[M+H]^+$ ), så kunde konklusionen dras att ett antal isomerer av oxiderade metaboliter bildats, samt en demetylerad form av klemastin. Den enda realistiska positionen för en demetyleringsreaktion rör metylgruppen som sitter bunden till kvävet, vilket ger norklemastin som produkt. För att vidare studera positionerna för de olika oxidationerna, så utfördes kollisionerinducerad fragmentering (MS/MS) enligt samma princip som beskrivs i Tevell *et al.* 2004. De erhållna fragmentmönstren kunde ge grova besked om i vilken region som de metabola reaktionerna skett. Brottet av eterbindningen gav för klemastin de två huvudfragmenten  $m/z$  130, respektive  $m/z$  215 (Figur 2). För de oxiderade metaboliterna, så ökade fragment A eller B med 16 Th beroende på i vilken region som reaktionen skett. Resultatet var att fem isomerer som var monooxiderade i region A kunde identifieras, samt sex isomerer där reaktionen skett i region B. Dessutom återfanns tre isomera former av klemastin som var dioxiderade i region A.



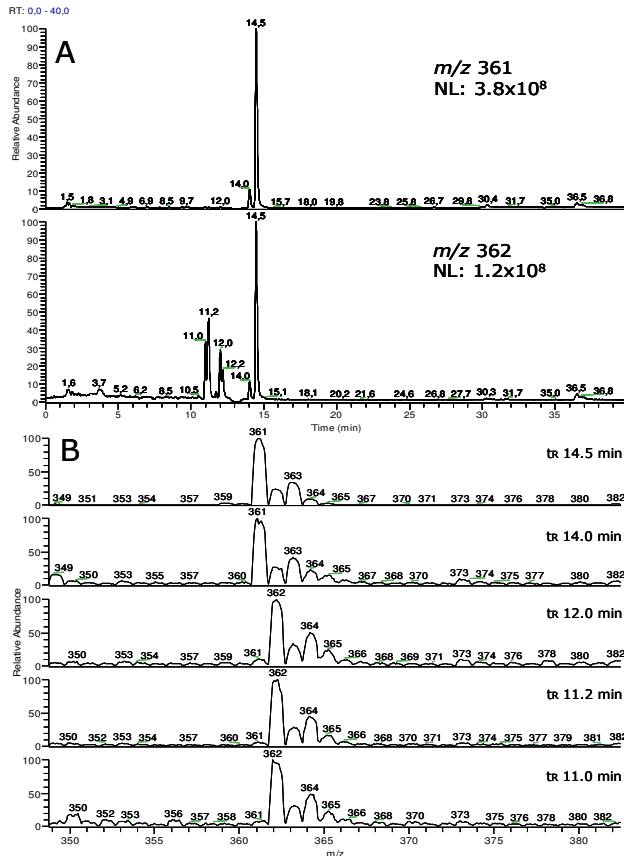
**Figur 2.** LC-MS/MS-klyvning av klemastin och definition av regionerna A och B.

Det troligaste var att de oxidationer som skett på kolatomer resulterat i hydroxylerade former. Dock fanns det en möjlighet att de metaboliter som givit upphov till fragmentet  $m/z$  146 ( $m/z$  130 + 16), d.v.s. de som oxiderats i region B, var modifierade på kvävet. För att skilja ut eventuella N-oxiderade former från de C-oxiderade, så gjordes försök med tillsats av tungt vatten (deuteriumoxid) till den mobila fasen. Varje utbytbar väte i molekylerna byts i dessa experiment ut mot deuterium, vilket ger ett  $m/z$ -skift på +1 Th jämfört med vad som observeras i vanligt vatten. Laddningsprotonen ger också ett tillskott på +1 Th. En oxidation som gav ett nettotillskott på en syreatom gav då en  $[M+H]^+$  på  $m/z$  360 i vanligt vatten och följaktligen  $m/z$  362 i tungt vatten vid en hydroxylering på en kolatom. Två utav metaboliterna som bildats av *C. elegans* gav intressant nog endast ett massskift på +1 Th ( $m/z$  361 vid  $t_R$  14,0 resp. 14,5 min. i figur 3), vilket indikerade på att inga utbytbara väten fanns förutom laddningsprotonen. Slutsatsen av detta var att oxidationen i dessa fall skett på kvävet, vilket kan resultera i hydroxylaminer eller N-oxider.

För att inhämta mer detaljerad information om positionerna för oxidationerna, så utfördes även  $MS^3$  med hjälp av en jonfällmasspektrometer (ion-trap MS). De isomerer som endast givit ett  $m/z$ -skift på 1 Th i experimenten med tungt vatten, gav  $MS^3$ -spektrum ( $m/z$  360  $\rightarrow$  146  $\rightarrow$  scan) som skilde sig från de övriga, genom att de gav den mindre vanliga förlusten på 17 Da, vilket troligen motsvarar en OH-radikal. Detta är ett ytterligare tecken på att de är oxiderade på kvävet.

NMR kan ge en mer exakt bild av en substans struktur jämfört med MS. Dock är den förstnämnda tekniken inte lika känslig som den sistnämnda, vilket ställer krav på rena och högkoncentrerade prover. De bildade klemastinmetaboliterna renframställdes därför med hjälp av preparativ LC. Varje fraktion frystorkades i syfte att möjliggöra byte av lösningsmedel vid kommande NMR-analyser. Preparationerna fick utföras i flera steg, eftersom några av de oxiderade omvandlingsprodukterna var svåra att separera kromatografiskt och en stor mängd oförändrad klemastin fanns kvar efter inkubationen med *C. elegans*. NMR-experimenten som utfördes vid Läkemedelsverket, kunde dessvärre inte ge svar på de exakta positionerna för N-oxidationerna, på grund av för liten mängd renframställt material.

Som slutsats vad gäller användandet av *C. elegans* som modell för metabolismen av klemastin i häst kan sägas att de bildade typerna av metaboliter är lika mellan de två species. Dock sker metabolismen till mycket högre kvantitativ omfattning i häst. Möjligheten att preparera fram välkarakteriserat referensmaterial av klemastinmetaboliter bildade av *C. elegans*, kräver att utbytet i den metabola reaktionen kan ökas. Ytterligare studier krävs för att detta mål ska uppnås.



**Figur 3. A.** LC-MS-analys av extrakt från *C. elegans*-inkubation av klemastin med deuteriumoxid i mobila fasen. Extraherade jonkromatogram för m/z 361 och 362. **B.** Masspektrum från olika tidpunkter i kromatogrammet. Gradient med 0,1% CH<sub>3</sub>COOD i D<sub>2</sub>O/acetonitril. Kolonn: C18 50 x 2,0 mm (längd x innerdiameter). Jonisering: positiv ESI, MS: TSQ Quantum.

### 3.2 Meloxicam

Den antiinflammatoriska och smärtstillande substansen meloxicam har också studerats ingående inom detta projekt. Den förekommer bl.a. i den farmaceutiska specialiteten Metacam<sup>®</sup>, vilken är registrerad för djurslaget häst och är därmed av stort intresse i dopningskontrollsammanhang. Substansen genomgår en omfattande metabolism i häst, vilket bl.a. visats inom samma forskningsprojekt. Detta gör att tillgång på referensmaterial av metaboliterna är mycket viktig. Till skillnad från klemastin, så visade sig meloxicam metaboliseras i mycket hög grad även av *C. elegans*. Huvudmetaboliterna från svampen visade sig också överensstämma väl med dem som hästen utsöndrar, d.v.s. 5'-hydroximeloxicam och karboxymeloxicam (Figur 4).

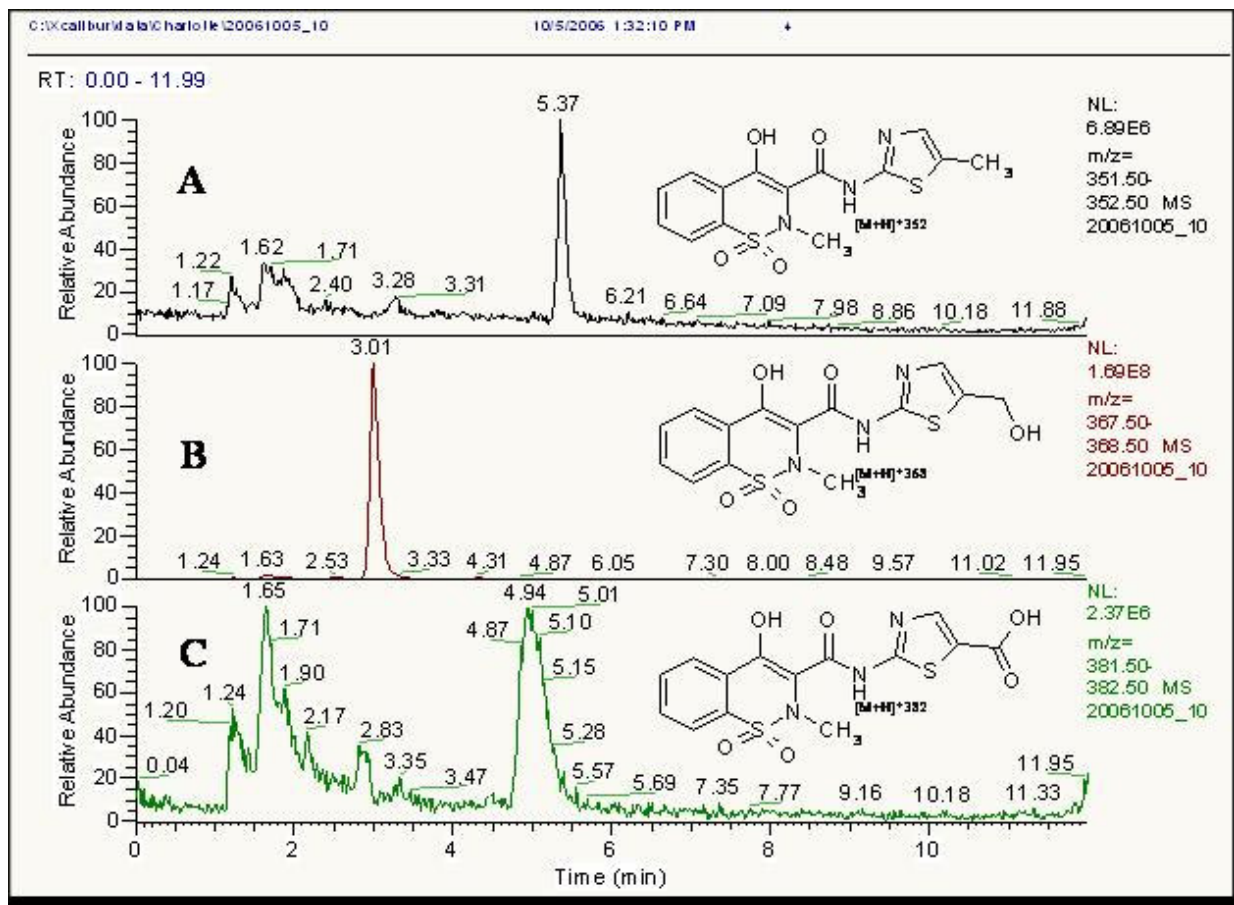
Förutom dessa omvandlingsprodukter, så kunde intressant nog, även mindre mängder av ytterligare en isomer av hydroximeloxicam, samt dihydroximeloxicam identifieras. Dessa metaboliter finns inte tidigare beskrivna i litteraturen.

För att öka möjligheten att hitta nya metaboliter i svampmediet, så har även tillsatser gjorts av 50:50-blandningar av meloxicam och trideutererad meloxicam (meloxicam-D<sub>3</sub>). Detta förfarande ger möjligheten att i masspektrum söka efter dubbeltoppar som skiljer sig med 3 Th från varandra. Förekomsten av dessa blir då en stark indikation på att det är en

omvandlingsprodukt till meloxicam man funnit och fortsatt strukturutredning med MS/MS kan ske på sedvanligt sätt.

Den stora mängden bildade metaboliter i kombination med det faktum att metabolismmönstret kvalitativt sett överensstämmer med det i häst, gör det lovande att kunna använda *C. elegans* som en producent av referensmaterial i detta fall. De två huvudmetaboliterna har renframställts med preparativ LC och NMR-analyser i avsikt att erhålla kompletterande strukturell information, är pågående.

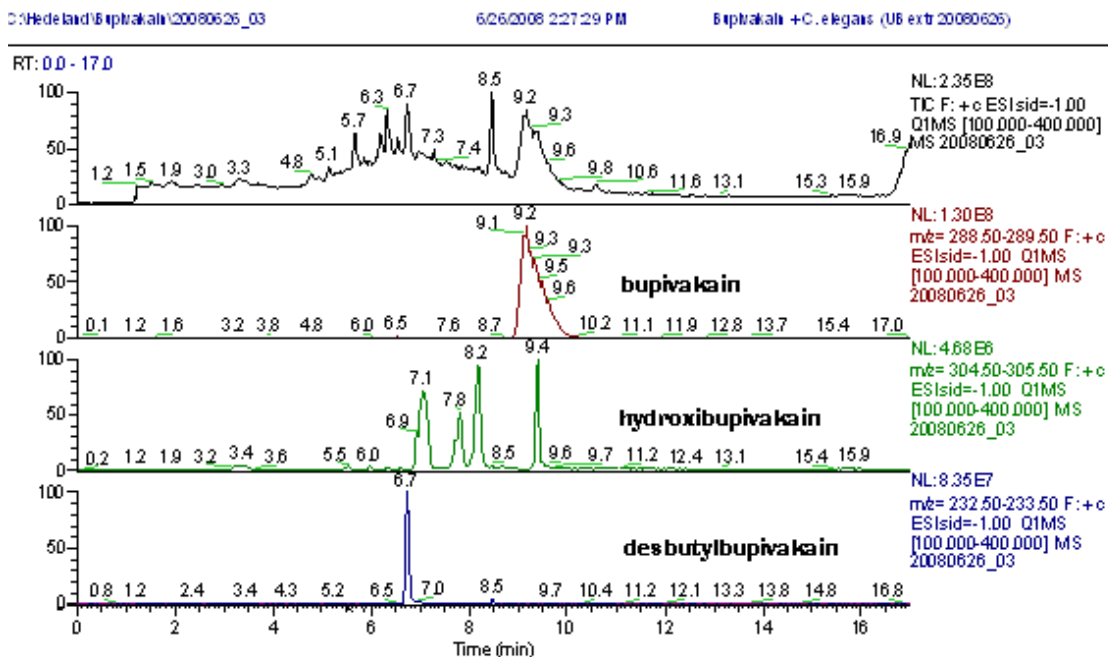
Sammanfattningsvis kan sägas att *C. elegans* visat sig vara en mycket användbar modell för metabolismen av meloxicam i häst. Den höga graden av omvandling till produkter som är identiska med dem som bildas i häst möjliggör att *C. elegans* kan användas som en producent av referensmaterial till t.ex. dopningskontrollen och därmed underlätta beivrandet av otillåtna behandlingar.



Figur 4. LC-MS-analys av extrakt från inkubation av meloxicam med *C. elegans*. Extraherade jonkromatogram motsvarande A) återstående meloxicam B) 5'-hydroxymeloxicam C) karboxymeloxicam. Gradient bestående av komponenterna acetonitril och 0,2% myrsyra i vatten. Kolonn: C18 50 x 2,0 mm (längd x innerdiameter). Jonisering: positiv ESI, MS: TSQ Quantum.

### 3.3 Bupivakain

Det lokalanestetiska medlet bupivakain har också utvärderats inom föreliggande studie. Detta ämne genomgår även det en omfattande metabolism i häst. Det bästa sättet att påvisa bruk av medlet i ett urinprov är således att detektera någon av metaboliterna. Efter inkubation med *C. elegans* påvisades en hög grad av omsättning av modersubstansen. Minst fyra olika isomerer av hydroxibupivakain ( $[M+H]^+$  m/z 305), samt desbutylbupivakain ( $[M+H]^+$  m/z 233) kunde enkelt identifieras (Figur 5). Vidare analyser med MS/MS visade på att det bland de hydroxylerade metaboliterna fanns såväl alifatiskt som aromatiskt oxiderade former. För desbutylbupivakain konfirmerades strukturen genom att bupivakains huvudfragment innehållande aminfunktionen var 56 Th lägre för metaboliten jämfört med modersubstansen, motsvarande förlust av buten.



**Figur 5.** LC-MS-analys av extrakt från inkubation av bupivakain med *C. elegans*. Extraherade jonkromatogram motsvarande m/z-värden för återstående bupivakain, samt metaboliterna hydroxibupivakain och desbutylbupivakain. Gradient bestående av komponenterna 0,2 % myrsyra i vatten och acetonitril. Kolonn: C18 50 x 2,0 mm (längd x innerdiameter). Jonisering: positiv ESI, MS: TSQ Quantum.

Sammanfattningsvis för bupivakain, så är de erhållna resultaten mycket användbara för det planerade syftet. *C. elegans* omsätter bupivakain till hög grad och de bildade metaboliterna tycks vara relevanta ur ett biologiskt perspektiv.

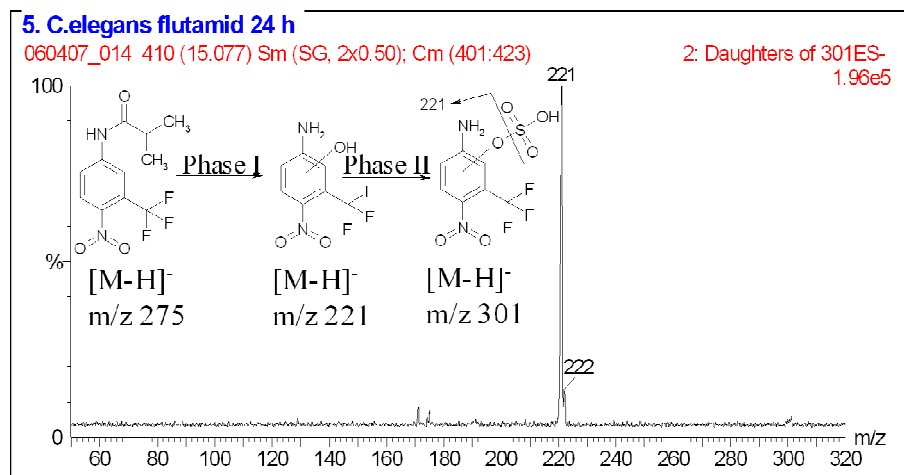
### 3.4 Fas-II-metabolism

Förmågan hos *C. elegans* att utföra fas-II-metabolism har studerats för antiandrogenen flutamid och för opiaten morfin.

Fas-I- och fas-II-metabolism för flutamid har tidigare utretts hos människa (Tevell *et al.* 2006). För flutamid kunde ett sulfokonjugat av en fas-I-metabolit detekteras efter inkubation

med *C. elegans* (Figur 6). Detta fynd betraktades som mycket intressant och visar på att denna svamp i alla fall har viss konjugativ förmåga.

I samband med studien av morfin, där fokus var på bildandet av glukuronider, så tillsattes till svampens medium aktiverad glukuronsyra (uridin 5'-difosfoglukuronsyra). Resultat från dessa försök är under utvärdering. Det finns gott hopp om att finns rätta betingelser för att få *C. elegans* att producera olika typer av konjugat. Tillgång på denna typ av referensmaterial skulle vara mycket värdefullt för olika typer av metabola studier.



**Figur 6.** Fas-II-metabolism av flutamid. Full scan av produktjoner av prekursor m/z 301. Jonisering: negativ ESI, MS: Quattro LC.

#### 4. Publikationer

- Delresultat inom detta projekt har presenterats av Annica Tevell som en poster (#2934) vid 54th Conference of the American Society for Mass Spectrometry (ASMS) i Seattle, WA, USA, maj 2006. Titel: "The use of liquid chromatography tandem mass spectrometry to identify drug metabolites produced by *Cunninghamella elegans*"
- Delresultat har presenteras av Mikael Hedeland som en poster (Abstract #75) vid 16th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians (ICRAV) i Tokyo, Japan i oktober 2006. Titel: "Identification of drug metabolites produced by the fungus *Cunninghamella elegans*".
- En peer-review-granskad artikel har publicerats i Proceedings from the 16<sup>th</sup>, ICRAV, Tokyo, Japan 2006, p. 512-517: "Identification of drug metabolites produced by the fungus *Cunninghamella elegans* using liquid chromatography – tandem mass spectrometry" av A. Tevell, C. Olsson, U. Bondesson and M. Hedeland
- Studier av meloxicams metabolism i häst och *Cunninghamella elegans*, har presenterats som ett 20 p examensarbete på D-nivå i januari 2007 inom civilingenjörsprogrammet kemiteknik med läkemedelsinriktning med titeln "Identification of meloxicam metabolites in horse urine and in *Cunninghamella elegans* by HPLC MS/MS" (tekn. stud. Charlotte Olsson).



- Delresultat inom detta projekt har presenterats av Annica Tevell Åberg som en poster (#360) vid 56th Conference of the American Society for Mass Spectrometry (ASMS) i Denver, CO, USA, juni 2008. Titel: "Characterization of C- and N-oxidized clemastine metabolites using LC-MS<sup>n</sup>"
- Studier av bupivakains metabolism i *C. elegans* håller förnärvarande på att sammanfattas av tekn. stud. Aiman Abtah i ett 10 p examensarbete inom kemiinjengörsprogrammet och planeras presenteras under december 2008.
- Ytterligare utredning av strukturen för de N-oxiderade metaboliterna av klemastin bildade av *C. elegans* håller för närvarande på att sammanfattas av fil. stud. Helena Löfgren i ett 20 p examensarbete inom magisterprogrammet i kemi och planeras presenteras under december 2008.
- Två stycken manuskript är under utarbetande som ska publiceras i peer-review-granskade vetenskapliga artiklar. Preliminära titlar för dessa arbeten är "A study on meloxicam metabolism in horses and *Cunninghamella elegans* and the relevance of this microbial system as a model of drug metabolism in horses" och "Structure elucidation of N-oxidized clemastine metabolites by LC-MS/MS and the use of *Cunninghamella elegans* to facilitate drug metabolite identification".
- De två ovan nämnda manuskripten kommer att ingå som delarbeten i apotekare Annica Tevell Åbergs doktorsavhandling, som enligt plan ska läggas fram vid Farmaceutiska fakulteten, Uppsala universitet i april 2009 (handledare professor Ulf Bondesson och docent Mikael Hedeland).

## 5. Övrig resultatförmedling till näringen

Föredrag av Mikael Hedeland vid Hippocampusdagarna i Uppsala 2006. Föredrag av Annica Tevell Åberg vid Läkemedelskongressen i Stockholm 2006 och 2007.

## 6. Referenser

K. Törneke, C. Ingvast Larsson, K. Pettersson, K. Bergvall, M. Hedeland, U. Bondesson, H. Broström, "Klemastin (Tavegyl<sup>®</sup>) till häst – farmakokinetiska komplikationer", Svensk veterinärtidning, vol. 54, nr 7 (2002) 349-353

K. Törneke, C. Ingvast-Larsson, K. Pettersson, K. Bergvall, M. Hedeland, U. Bondesson and H. Broström, "Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Clemastine in Healthy Horses", Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 26 (2003) 151-157

A. Tevell, U. Bondesson, K. Törneke, M. Hedeland, "Identification of some new clemastine metabolites in dog, horse and human urine with liquid chromatography tandem mass spectrometry", Rapid Communications in Mass Spectrometry, 18 (2004) 2267-2272

A. Tevell, M. Jönsson, H. Lennernäs, B. Lennernäs, U. Bondesson, M. Hedeland, "Flutamide metabolism in four different species in vitro, and identification of flutamide metabolites in

human patient urine, by high performance liquid chromatography / tandem mass spectrometry”, Drug Metabolism and Disposition, 34 (2006) 984-992