

Anne-Kathrin Matthée
Dr. sc. hum.

Entwicklung von analytisch-chemischen Methoden zur simultanen Quantifizierung von Anti-HIV-Substanzen in biologischen Matrices und Evaluierung der Pharmakokinetik von Efavirenz und dessen Metaboliten

Geboren am 13.10.1978 in Mosbach

(Staats-)Examen der Fachrichtung Pharmazie am 10.12.2003 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin

Doktorvater: Prof. Dr. med. Gerd Mikus

Durch die Kombination der verschiedenen Medikamente in der Anti-HIV-Therapie kann es zwar zu einer Verbesserung der Symptome und zu einer Verringerung der Viruslast kommen, Nachteile einer solchen Kombinationstherapie können aber vermehrte Nebenwirkungen, Interaktionen und non-Compliance sein. Bei subtherapeutischen Konzentrationen treten vermehrt Resistenzentwicklungen auf. Interaktionen zwischen Anti-HIV-Substanzen und auch mit anderen Wirkstoffen sind häufig durch das Cytochrom P450 Enzymsystem des Menschen verursacht. Dabei gewinnt neben CYP3A4 das CYP2B6 Isoenzym ständig an Bedeutung. Es wird diskutiert, ob die Substanz EFV, ein häufig eingesetzter NNRTI, eine Autoinduktion von CYP3A4 und/oder CYP2B6 verursacht.

In der Literatur sind bereits zahlreiche Methoden zur Quantifizierung von Anti-HIV-Substanzen beschrieben, jedoch handelt es sich meist um Assays, die eine Bestimmung von maximal zwei Substanzgruppen erlauben. Im Regelfall werden dabei vergleichsweise teure und aufwändige Aufarbeitungsmethoden wie Flüssig-Flüssig- oder Festphasen-Extraktion gewählt, die nur Substanzen mit ähnlichen chemischen Eigenschaften einschließen können. In der vorliegenden Arbeit wurde eine nach FDA Guidelines validierte LC/MS/MS Methode zur Quantifizierung von 12 verschiedenen Anti-HIV-Substanzen aus drei Substanzgruppen entwickelt, die mit einer einfachen Proteinfällungsmethode die Konzentration dieser Wirkstoffe im Plasma hochsensitiv in 18 min ermöglicht. So können subtherapeutische bzw. zu hohe Plasmakonzentrationen detektiert werden, welche die Ursache für Resistenzen oder auch für Nebenwirkungen sein können. Diese Methode wurde zur Messung von Plasmaproben und einzelner Liquorproben von Patienten eingesetzt.

Im nächsten Schritt der Dissertation wurden die Pharmakokinetik und der Metabolismus von EFV im Menschen untersucht. Dabei wurden Schwerpunkte auf die bereits beschriebene, aber bisher noch nicht bewiesene Autoinduktion von EFV und auf die Konzentration von EFV am Wirkort (intrazellulär) gelegt.

In einer klinischen Studie bekamen die Probanden zunächst EFV als Einmalgabe (Single Dose 400 mg) verabreicht. Nach einer Auswaschphase folgte eine tägliche Einnahme von 400 mg EFV über 14 Tage (Steady-State). Am Tag der Einmalgabe von EFV und im Steady-State am Tag 14 wurde die Pharmakokinetik bestimmt. Zusätzlich wurde Midazolam als Markersubstanz für die CYP3A4 Aktivität verabreicht. Proben zur Konzentrationsbestimmung im Plasma, im Urin, in proteinfreiem Plasma sowie in PBMCs wurden gesammelt. Außerdem wurden Proben zur Bestimmung der PGP Funktion und der Transporterexpression gewonnen. Für die Wirkstoffkonzentration am Ort der Virusvermehrung (PBMCs) spielt neben der Konzentration von EFV in proteinfreiem Plasma der Einfluss von EFV auf zelluläre Transporter eine Rolle. Deshalb wurden deshalb sensitive analytische LC/MS/MS Methoden entwickelt und nach FDA Guidelines validiert, die eine Bestimmung von EFV in proteinfreiem Plasma und intrazellulär ermöglichen. Dabei weist die Aufarbeitung zur Bestimmung der intrazellulären Konzentration einen wesentlichen Vorteil zu bereits publizierten Arbeiten auf, da eine Abtrennung der Thrombozyten optimiert wurde.

In der durchgeführten Studie kam es zwischen den Studientagen weder zu signifikanten Änderungen in der freien Fraktion noch zu Änderungen des Verhältnisses der intrazellulären Konzentration (PBMCs/Thrombozyten) zur totalen Plasmakonzentration.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden außerdem die PGP Funktion in PBMCs sowie die Expression von MDR1, MRP1 und MRP2 nach Einmal- und nach Dauergabe untersucht. Bei keinem dieser Transporter kam es zu einer signifikanten Änderung zwischen den beiden Studientagen. Somit scheint durch EFV keine klinisch relevante Induktion der untersuchten Arzneimitteltransporter hervorgerufen zu werden.

In früheren Veröffentlichungen wurden der Abfall der Konzentration über die Zeit sowie eine Verkürzung der $t_{1/2}$ als Autoinduktion von EFV interpretiert. Zur validen Beurteilung einer Autoinduktion ist es notwendig, außer EFV auch die Metaboliten von EFV im Urin und im Plasma zu quantifizieren. Die Metaboliten wurden zuvor aus dem Urin der Probanden isoliert und aufgereinigt, um als Referenzstandard eingesetzt zu werden. Die Identität der Verbindungen wurde mittels NMR und LC/MS/MS, die Reinheit mittels HPLC/UV bestimmt.

Es konnten auf diese Weise 230 mg 8-OH-EFV (Reinheit: 99%), 45 mg X-EFV (Reinheit: 88%) und 32 mg Di-OH-EFV (Reinheit: 74%) isoliert werden. Die Metaboliten 8-OH-EFV und Di-OH-EFV sind bereits in der Literatur beschrieben, während die Verbindung X-EFV bisher unbekannt war. X-EFV weist im Vergleich zu den anderen Metaboliten, nach NMR und LC/MS/MS Untersuchungen, eine veränderte Struktur auf. Die Substanz wurde in relativ hoher Konzentration im Plasma der Probanden detektiert.

Zur Bestimmung von EFV und der Metaboliten in den Studienproben wurden hochsensitive und nach FDA Guidelines validiert LC/MS/MS Methoden etabliert. Eine signifikante Abnahme der AUC von EFV im Steady-State ($151.5 \text{ h} \cdot \text{nmol/mL}$) im Vergleich zur Single Dose ($309.4 \text{ h} \cdot \text{nmol/mL}$) wurde festgestellt, während die AUC von 8-OH-EFV ($13.8 \text{ h} \cdot \text{nmol/mL}$ auf $20.1 \text{ h} \cdot \text{nmol/mL}$) signifikant zunahm. Neben der Veränderung der AUCs stellt die signifikante Verdopplung der metabolischen Clearance (70.7 mL/min auf 147.5 mL/min) über die 8-Hydroxylierung den wichtigsten Nachweis für eine Autoinduktion dar. Die Ergebnisse der Studie haben somit eindeutig gezeigt, dass es sich um eine Autoinduktion handelt. Für die Anti-HIV-Therapie mit EFV bedeuten diese Ergebnisse, dass bei Dauertherapie EFV aufgrund der Nicht-Linearität der Pharmakokinetik (Autoinduktion) in höherer Dosierung verwendet wird. Für gleichzeitig verabreichte Substanzen, die über das gleiche Enzym-System verstoffwechselt werden, bedeutet dies eine Dosiserhöhung, um subtherapeutische Konzentrationen zu vermeiden.