



Doctoral Thesis

Bioanalysis and pharmacokinetics of fumarates in humans

Author(s):

Reddingius, Wiebrandus Gerardus

Publication Date:

1997

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-001828088> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH ex. B

Diss. ETH No. 12199

**BIOANALYSIS AND PHARMACOKINETICS OF
FUMARATES IN HUMANS**

Dissertation

submitted to the
Swiss Federal Institute of Technology Zurich

for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by

Wiebrandus Gerardus Reddingius
drs. farmacie, State University of Groningen
born on March 18, 1963
citizen of The Netherlands

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. H.P. Merkle, examiner
PD Dr. P. Langguth, co-examiner
Dr. R.K. Joshi, co-examiner



CatE

Zurich, 1997

SUMMARY

Bioanalytical as well as pharmacokinetic aspects of the antipsoriatic agents dimethylfumarate and monoethylfumarate, as well as of their metabolites monomethylfumarate and fumaric acid, were studied. A literature review revealed that polycarboxylic acids from the citric acid cycle, like fumaric acid, are mostly analyzed by means of chromatographic methods, particularly HPLC. Pharmacokinetic data of fumarates are scarce, and the pharmacokinetics of monoethylfumarate was not assessed in humans previously.

The first objective was the development of a suitable bioanalysis for fumarates in human serum and plasma, to be used for the routine analysis of samples from pharmacokinetic studies. An ion-pair reversed-phase HPLC method with UV-detection served as a starting point. With this method, especially the determination of monoethylfumarate directly in serum was problematic (overlap by a serum peak). Varying the HPLC conditions, i.e. by changing the percentage of the organic solvent in the eluent and by selecting other ion-pairing reagents with different chain lengths, did not lead to improvements. The method was therefore modified with respect to the procedure for sample preparation. Two-step solvent extraction with diethylether, preceded by protein precipitation with metaphosphoric acid (HPO_3)_n, allowed the determination of the monoesters and fumaric acid in serum and plasma; metahydroxybenzoic acid was a suitable internal standard. For dimethylfumarate very low recoveries were found, which is to be ascribed to its highly volatile properties, leading to a loss during evaporation of the ether phase. The recovery fluctuations of monoethylfumarate and monomethylfumarate could be reduced by using mild evaporation conditions, i.e. low gas flow and room temperature. An obviously temperature dependent ghost peak, interfering with the monoethylfumarate peak, was suppressed by performing the extraction procedure at 15-17°C. Dimethylfumarate could be determined directly in serum and plasma by means of a reversed-phase HPLC method, without using an ion-pairing reagent; diethylmaleate was a suitable internal standard.

In order to prove that the assay methods are reliable and reproducible, they were validated and the stability of the fumarates was determined. The validation comprised the following parameters: selectivity, limits of quantification, linearity, precision (within-batch as well as between-batch), accuracy and recovery after

extraction. Precision, accuracy and recovery were determined at high (5 µg/mL), medium (1 µg/mL) and low (0.1 µg/mL) concentrations. Based on the results, the limits of quantification were at least 5 µg/mL for the higher limit and 0.1 µg/mL for the lower limit.

Stability of the fumarates was determined under various conditions occurring from sample collection until analysis. Data were analyzed by performing linear regression analysis and computing the time points at which the 95% one-sided lower confidence limit for the mean intersects the 5% and 10% degradation limits. A maximum of 10% degradation was considered tolerable. The monoesters and fumaric acid were sufficiently stable in serum at 20°C to allow sample collection as well as sample preparation for HPLC-analysis at room temperature. Storage of serum samples at -30°C is limited to 19 weeks; serum samples should not be frozen and thawed more than once. HPLC samples (prepared from serum) can be kept at ambient temperature no longer than 17 hours. The high degradation rate of dimethylfumarate in serum could be strongly reduced *in vitro* by lowering the temperature and by adding sodium fluoride (NaF) as esterase inhibitor. Dimethylfumarate was sufficiently stable in plasma containing sodium fluoride at 4°C to allow sample collection as well as sample preparation for HPLC-analysis under these conditions (less than 10% degradation in one hour). Storage of plasma samples with dimethylfumarate at -30°C is limited to only four days even when sodium fluoride is added. HPLC samples with dimethylfumarate, prepared from plasma with sodium fluoride, can be kept at ambient temperature only for one hour.

A trial with three healthy, normal, male volunteers was performed in order to assess the *in vivo* pharmacokinetics of dimethylfumarate and monoethylfumarate, as well as of their metabolites monomethylfumarate and fumaric acid, after oral administration of two enteric coated tablets (containing dimethylfumarate and monoethylfumarate-salts), applied as a single dose. It was especially of interest to clarify whether dimethylfumarate appears in the blood stream, in spite of its rapid metabolism in serum at 37°C. The results showed that, although an esterase inhibitor (sodium fluoride) was used, dimethylfumarate could not be detected in quantifiable concentrations in any of the plasma samples from the three subjects. Since optimal conditions were maintained from sample collection until analysis in order to reduce degradation of dimethylfumarate in the collected sample (based on the stability determinations), the bioavailability of dimethylfumarate

may be assumed to be zero or negligible. Instead, its first metabolite, monomethylfumarate, as well as the second constituent, monoethylfumarate, showed a clear concentration peak. The concentration-time profiles of the monoesters were both characterized by a long lag-phase (4 to 5 hours), due to the enteric coating of the dosage form. A considerable inter-subject variability of C_{\max} , λ_z , the AUC, and the apparent total body clearance (Cl_{tot}/F) was found, whereas t_{\max} and t_{lag} showed a more homogeneous behaviour. As expected monoethylfumarate showed smaller values for C_{\max} and AUC than monomethylfumarate, which may be explained by the lower monoethylfumarate dose. Curve-fit data showed that the concentration-time profiles of monoethylfumarate and monomethylfumarate could not be described by a uniform compartment model; the most suitable model rather varied from subject to subject. Both one-compartment and two-compartment disposition kinetics were found, with input being multi-phase in two of three subjects. The fumaric acid concentration did not rise in the plasma in any of the three subjects; a slightly fluctuating level of about 0.1 $\mu\text{g/mL}$ could be ascribed to endogenous fumaric acid. The study showed that the assay methods developed for the fumarates are applicable to an in vivo study.

ZUSAMMENFASSUNG

Gegenstand dieser Arbeit sind die antipsoriatisch wirksamen Substanzen Dimethylfumarat und Monoethylfumarat, sowie deren Metaboliten Monomethylfumarat und Fumarsäure. Es wurden sowohl bioanalytische als auch pharmakokinetische Aspekte dieser Fumarate untersucht. Eine Literaturrecherche zeigte, dass Polycarbonsäuren des Zitronensäurezyklus wie die Fumarsäure meistens mit Hilfe von chromatographischen Methoden, insbesondere HPLC, analysiert werden. Pharmakokinetische Angaben zu Fumaraten sind kaum vorhanden; die Pharmakokinetik von Monoethylfumarat am Menschen ist bislang unbekannt.

Das erste Ziel bestand in der Entwicklung eines geeigneten bioanalytischen Verfahrens für Fumarate in Humanserum und -plasma, welches zur routinemässigen Analyse von Proben aus pharmakokinetischen Studien zur Anwendung kommen sollte. Ausgegangen wurde von einer HPLC-Methode mit UV-Detektion, welche auf dem Prinzip der Ionenpaarchromatographie mit Phasenumkehr (Reversed-phase) basierte. Bei dieser Methode stellte vor allem die direkte Bestimmung von Monoethylfumarat aus Serum ein Problem dar (Überlagerung durch einen Serumpeak). Änderungen in den HPLC-Bedingungen, wie der Prozentsatz des organischen Lösungsmittels im Eluenten und die Kettenlänge des Ionenpaarbildners, führten nicht zu einer Verbesserung. Die Methode wurde daher bezüglich des Probenaufbereitungsverfahrens modifiziert. Ein zweistufiges Extraktionsverfahren, mit Diethylether als Extraktionsmittel und mit vorgängiger Proteinpräzipitierung mit Metaphosphorsäure ($(\text{HPO}_3)_n$), ermöglichte die Bestimmung der Monoester und der Fumarsäure aus Serum und Plasma; Metahydroxybenzoesäure eignete sich als interner Standard. Von Dimethylfumarat wurde nur sehr wenig wiedergefunden, was seinen stark flüchtigen Eigenschaften zugeschrieben werden muss, die zu einem Verlust während des Abdampfens der Etherphase führten. Die Schwankungen in den Wiederfindungsraten von Monoethylfumarat und Monomethylfumarat konnten durch milde Abdampfbedingungen, d.h. niedriger Gasfluss und Raumtemperatur, reduziert werden. Ein temperaturabhängiger Störpeak zur Retentionszeit des Monoethylfumarats konnte durch Änderung des Extraktionsverfahrens bei 15-17°C unterdrückt werden. Dimethylfumarat konnte direkt aus Serum und Plasma mittels einer HPLC-Methode mit Phasenumkehr bestimmt werden, wobei sich ein Ionenpaarbildner erübrigte; Diethylmaleat eignete sich als interner Standard.

Um zu prüfen, ob die bei der Probenanalyse der Pharmakokinetikstudien erhaltenen Ergebnisse genau und reproduzierbar sind, wurden die ausgearbeiteten Analysemethoden validiert und die Stabilität der Fumarate bestimmt. Die Validierung umfasste die nachfolgenden Parameter: Selektivität, Nachweisgrenzen, Linearität, Präzision (innerhalb einer Probenreihe sowie zwischen verschiedenen Probenreihen), Richtigkeit und Wiederfindung nach Extraktion. Präzision, Richtigkeit und Wiederfindung wurden für hohe (5 µg/mL), mittlere (1 µg/mL) und niedrige (0.1 µg/mL) Konzentrationen bestimmt. Aufgrund der Resultate betrug die obere Nachweisgrenze mindestens 5 µg/mL und die untere Nachweisgrenze 0.1 µg/mL.

Die Stabilität der Fumarate wurde unter verschiedenen Bedingungen bestimmt, wie sie zwischen Probenentnahme und Analyse auftreten. Zur Datenauswertung wurde eine lineare Regression durchgeführt und es wurden die Zeitpunkte berechnet, bei denen die einseitige untere 95%-Vertrauensgrenze für den Mittelwert die 5%- bzw. 10%-Abbauschranken schneidet. 10% Abbau wurde als maximal zulässig angesehen. Die Monoester und die Fumarsäure waren bei 20°C im Serum ausreichend stabil, um sowohl die Probenentnahme sowie die Aufbereitung der Proben zur HPLC-Analyse bei Raumtemperatur durchführen zu können. Die Lagerung von Serumproben bei -30°C sollte auf 19 Wochen begrenzt werden; Serumproben sollten nicht mehr als einmal eingefroren und wieder aufgetaut werden. Aus Serum zur HPLC-Analyse aufbereitete Proben können nicht länger als 17 Stunden bei Raumtemperatur aufbewahrt werden. Die hohe Abbaugeschwindigkeit von Dimethylfumarat im Serum konnte durch Temperaturerniedrigung und durch die Zugabe von Natriumfluorid (NaF) als Esterasehemmer *in-vitro* stark reduziert werden. In mit Natriumfluorid versetztem Plasma war Dimethylfumarat bei 4°C ausreichend stabil, um sowohl die Probenentnahme sowie die Aufbereitung der Proben zur HPLC-Analyse unter diesen Bedingungen durchführen zu können (weniger als 10% Abbau in einer Stunde). Die Lagerung von Plasmaproben mit Dimethylfumarat bei -30°C ist auch nach Natriumfluoridzugabe auf nur vier Tage begrenzt. Aus Plasma mit Natriumfluorid zur HPLC aufbereitete Dimethylfumarat-Proben können nur eine Stunde bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

Weiter umfasst diese Arbeit eine Studie mit drei gesunden, normalen, männlichen Freiwilligen mit dem Ziel einer Bestimmung der *in-vivo* Pharmakokinetik von Dimethylfumarat und Monoethylfumarat, sowie von deren Metaboliten

Monomethylfumarat und Fumarsäure, und zwar nach oraler Verabreichung von zwei magensaftresistent überzogenen Tabletten als Einzeldosis (Bestandteile: Dimethylfumarat und Monoethylfumarat-Salze). Es war von besonderem Interesse abzuklären, ob Dimethylfumarat trotz seiner hohen Metabolisierungsgeschwindigkeit in Serum bei 37°C im Blut erscheint. Obwohl ein Esterasehemmer (Natriumfluorid) verwendet wurde, zeigten die Resultate, dass Dimethylfumarat in keiner der Plasmaproben der drei Probanden in messbarer Konzentration nachgewiesen werden konnte. Da von der Probenentnahme bis zur Analyse optimale Bedingungen eingehalten wurden, um den Abbau von Dimethylfumarat in der Probe zu begrenzen (basierend auf den Stabilitätsmessungen), gibt es guten Grund zur Annahme, dass die Bioverfügbarkeit von Dimethylfumarat gleich null oder vernachlässigbar klein ist. Dafür zeigte dessen erster Metabolit, Monomethylfumarat, wie auch der zweite Bestandteil, Monoethylfumarat, einen klaren Konzentrationspeak. Die Plasmaspiegel/Zeit-Kurven der beiden Monoester waren gekennzeichnet durch eine lange lag-Phase (4 bis 5 Stunden), die dem magensaftresistenten Überzug der Darreichungsform zugeschrieben werden muss. Zwischen den Probanden wurde eine beträchtliche Variabilität bezüglich C_{max} , λ_z , AUC, und der scheinbaren totalen Körperclearance (Cl_{tot}/F) gefunden, während die Werte für t_{max} and t_{lag} ein homogeneres Verhalten zeigten. Erwartungsgemäss wies Monoethylfumarat für C_{max} und die AUC kleinere Werte als Monomethylfumarat auf, was auf die geringere Monoethylfumaratdosis zurückgeführt werden dürfte. Die Kurvenanpassung führte zu dem Ergebnis, dass die Plasmaspiegelverläufe von Monoethylfumarat und Monomethylfumarat nicht mit einem einheitlichen Kompartiment-Modell beschrieben werden konnten; von Proband zu Proband bestehen eher unterschiedliche Modelle. Sowohl Ein- als auch Zwei-Kompartiment-Dispositions kinetik wurde festgestellt, wobei der Input in zwei der drei Probanden mehrstufig erschien. Die Fumarsäurekonzentration im Plasma stieg bei keinem der drei Probanden an; es wurden um ca. 0.1 µg/mL leicht schwankende Konzentrationen gemessen, welche der endogenen Fumarsäure zugeschrieben werden können. Die Studie zeigte, dass die für die Fumarate entwickelten Analysenmethoden sich auf die Analyse von in-vivo Versuchen anwenden lassen.