

抗艾滋病候选化合物 3-氰甲基-4-甲基-DCK 在人小肠微粒体的代谢

庄笑梅, 温媛媛, 李桦*, 邓婧婷, 孔维莉, 田兴涛, 崔淑莉, 谢蓝

(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

摘要: 在人肠微粒体孵育体系中研究抗艾滋病候选药 3-氰甲基-4-甲基-DCK (CMDCK) 的肠道代谢转化、CYP 同工酶表型、酶动力学特点以及 CYP 抑制剂对其代谢的影响。将 CMDCK ($4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 与一组重组人源 CYP 同工酶 (CYP1A2、2C9、2C19、2D6 和 3A4) 孵育并在人肠微粒体中与 CYP 同工酶特异性化学抑制剂共孵育后, 应用 LC-MS 法测定孵育液中原形化合物的剩余量, 确定 CYP3A4 是主导 CMDCK 肠代谢的同工酶, 并观察到其主要代谢途径是氧化反应, 应用 LC-MS 筛查到多个单氧化产物。CMDCK 在体外肠微粒体中的代谢消除半衰期 ($T_{1/2}$) 为 25.7 min, 酶动力学参数 K_m 和 V_{max} 分别为 $45.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $0.33 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ 。应用 Well Stirred 模型对肠微粒体的动力学参数进行外推, 预测得到其体内肠道清除率为 $3.3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$, 接近于人肠道的平均血流量 ($4.6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$)。由此推测, CMDCK 的肠道代谢可能对其口服首过效应有显著影响。应用 CYP450 酶特异性化学抑制剂及底物与 CMDCK 共同孵育均能对 CMDCK 的肠微粒体代谢产生抑制作用。HIV 蛋白酶抑制剂利托那韦能有效抑制 CMDCK 的肠道代谢, 提高其代谢稳定性; 同时发现利托那韦对 CMDCK 的抑制作用与是否预孵育无关, 将 CMDCK 与利托那韦合用可降低其肠道首过代谢。

关键词: CMDCK; 抗艾滋病候选药; 肠道代谢; 微粒体; 重组 CYP 酶

中图分类号: R968

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2010) 09-1116-07

Metabolism of 3-cyanomethyl-4-methyl-DCK, a new anti-HIV candidate, in human intestinal microsomes

ZHUANG Xiao-mei, WEN Yuan-yuan, LI Hua*, DENG Jing-ting, KONG Wei-li,
TIAN Xing-tao, CUI Shu-li, XIE Lan

(Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract: The biotransformation, CYP reaction phenotyping, the impact of CYP inhibitors and enzyme kinetics of 3-cyanomethyl-4-methyl-DCK (CMDCK), a new anti-HIV preclinical candidate belonging to DCK analogs, were investigated in human intestinal microsomes and recombinant cytochrome P450 (CYP) enzymes. CMDCK ($4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) was incubated with a panel of rCYP enzymes (CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6 and 3A4) *in vitro*. The remaining parent drug in incubates was quantitatively analyzed by a LC-MS method. CYP3A4 was identified as the principal CYP isoenzyme responsible for its metabolism in intestinal microsomes. The major metabolic pathway of CMDCK was oxidation and a number of oxidative metabolites were screened with LC-MS. The K_m , V_{max} , CL_{int} and $T_{1/2}$ of CMDCK obtained from human intestinal microsome were $45.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $0.33 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, $12.1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ and 25.7 min, respectively. Intestinal clearance of CMDCK was estimated from *in vitro* data to be $3.3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$, and was almost equal to the intestinal blood flow rate (4.6

收稿日期: 2010-03-25.

基金项目: 国家科技重大新药研制专项资助项目 (2009ZX09102-008); 北京市科技计划项目 (D0206001040191).

*通讯作者 Tel: 86-10-66930664, Fax: 86-10-88270688, E-mail: amms_hli@126.com

$\text{mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$). The selective CYP3A4 inhibitors, ketoconazole, troleandomycin and ritonavir demonstrated significant inhibitory effects on CMDCK intestinal metabolism, which suggested that co-administration of CMDCK with potent CYP3A inhibitors, such as ritonavir, might decrease its intestinal metabolic clearance and subsequently improve its bioavailability in body.

Key words: CMDCK; anti-HIV candidate; intestinal metabolism; microsome; recombinant CYP enzyme

肠道和肝脏是口服药物进入体循环的必经器官。但近年来研究发现, 肠道上皮细胞中除了分布有与吸收相关的转运体 (如 P-gp、MRP 和 BCRP) 外, 还存在着与肝脏相同的 I 相和 II 相代谢酶, 如细胞色素 P450 酶 (CYP450s)、尿苷-5'-二磷酸葡萄糖醛酸基转移酶 (UGTs) 和硫酸转移酶 (SULTs) 等, 其中以 CYP3A 和 UGT 的含量为最高^[1]。再者, 由于小肠在解剖结构上位于肝脏之前, 小肠对口服药物的首过代谢在很大程度上是非常重要的, 但目前国内对肠道的代谢作用研究报道不多^[2]。

对具有抗 HIV 活性的天然产物 suksdorfin 的结构修饰, 使作者发现了一类高效低毒抗 HIV 的三环香豆素类手性化合物 [(3'R, 4'R)-3', 4'-di-O-(S)-camphanoyl-(+)-cis-khellactone derivatives, DCKs], 简称为 DCK 类似物^[3, 4]。作用机制研究^[5]表明, DCK 类似物是一类能抑制 HIV-1 病毒 DNA-DNA 双链形成的新型非核苷类 HIV-1 逆转录酶抑制剂。对系列 DCK 类活性化合物的早期快速评价发现, 3-氰甲基-4-甲基-DCK (CMDCK, 图 1) 不仅对野生型、多变异耐药性和多种临床分离病毒株均有很强抑制作用, 而且还显示出低毒和较好的药性性质, 是具有开发前景的临床前候选化合物^[6]。

在对 CMDCK 的早期代谢评价中, 作者注意到它与目前已上市的抗艾滋病药物相似, 在肝脏中能被快速并广泛地代谢, 结合体内评价数据推测 CMDCK 在大鼠体内生物利用度较低 (~15%) 的主要原因可能是其高脂溶性导致的吸收不完全以及首过代谢所致。作者还发现, 肠道对该化合物也有一定的代谢作用。为深入了解 CMDCK 在肠道的代谢特点, 本文在应用一组重组 CYP 同工酶确定 CMDCK 代谢表型的基础上, 在体外人小肠微粒体孵育体系中对 CMDCK 的肠道代谢转化反应、酶动力学特点以及 CYP 酶特异性抑制剂对其肠道代谢的影响进行了研究, 以期深入认识 CMDCK 的肠道首过代谢性质、对其安全有效用药寻找可能的干预措施提供科学依据。

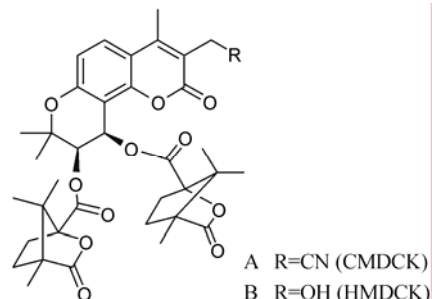


Figure 1 Chemical structures of CMDCK (A) and IS (B)

材料与方法

药品和试剂 CMDCK 及其类似物 HMDCK (内标, IS, 图 1) 自行合成, 纯度 > 98.5%。CYP 同工酶特异性抑制剂萘酚黄酮 (naphthoflavone, CYP1A2)、磺胺苯吡唑 (sulfaphenazole, CYP2C9)、反苯环丙铵 (tranylcypromine, CYP2C19)、奎尼丁 (quinidine, CYP2D6)、酮康唑 (ketoconazole, KET, CYP3A4)、利托那韦 (ritonavir, RIT, CYP3A4)、醋竹桃霉素 (troleandomycin, TAO, CYP3A4)、CYP3A4 底物咪达唑仑 (midazolam, MDZ)、环孢素 (cyclosporin A, CsA) 和 NADPH 均购自 Sigma-Aldrich 公司 (St. Louis, MO)。人肠微粒体 (human intestinal microsomes, HIM, 蛋白含量 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 货号 452210) 和人重组 CYP P450 同工酶 (CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 和 CYP3A4) 购自 BD Gentest 公司 (Woburn, MA)。乙腈 (色谱纯) 购自 Sigma-Aldrich 公司 (St. Louis, USA)。实验用纯净水由 Millipore Milli-Q A10 (美国 Millipore 公司) 水纯化系统制备。其他试剂均为分析纯。

仪器 Agilent LC/MSD VL 液质联用仪配有 HPLC (Agilent 1100), 单四级杆 MS 和数据处理工作站 (ChemStation, Version A. 09)。

肠微粒体孵育 孵育液总体积为 $200 \mu\text{L}$, 以 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ K}_2\text{HPO}_4$ 缓冲液 (pH 7.4) 为基质配制, 其中含有终质量浓度为 $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (蛋白含量) 的人肠微粒体及 $4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CMDCK。在 37°C 水浴中预孵育 5 min 后加入同样经预孵育 5 min 的 NADPH 溶液 (终浓度为 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 启动反应, 在反应终点加入含有

200 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 内标的乙腈溶液 200 μL 混合以终止反应。将终止后的孵育样品震荡 2 min, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、14 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, LC-MS 法定量检测 CMDCK 的剩余量。校正组为不加 NADPH 的微粒体反应组。

重组酶孵育 孵育液总体积为 200 μL , 以 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ K_2HPO_4 缓冲液 (pH 7.4) 为基质配制, 其中含有 25 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的各重组酶 (CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 和 CYP3A4) 和终浓度为 4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 CMDCK; 孵育实验设酶反应组、零时组和校正组。酶反应组将 CMDCK 与重组酶溶液混匀后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 预孵育 5 min, 加入 NADPH 溶液 (终浓度为 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 启动反应, 继续孵育 60 min 后按“肠微粒体孵育”方法终止反应, 并按“肠微粒体孵育”方法处理样品并检测。校正组为不加 NADPH 的重组酶反应组。

化学抑制剂实验 在 CMDCK 人肠微粒体孵育体系中分别加入选择性 CYP450 酶的抑制剂与其共孵育 60 min, 按“肠微粒体孵育”方法孵育、处理样品并检测, 比较加入抑制剂后孵育体系中 CMDCK 的剩余量。选用的抑制剂分别为萘酚黄酮 (CYP1A2, 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、磺胺苯吡唑 (CYP2C9, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、反苯环丙胺 (CYP2C19, 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、奎尼丁 (CYP2D6, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、酮康唑 (CYP3A4, 1.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和利托那韦 (CYP3A4, 1.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。基于机制的 CYP3A4 抑制剂醋竹桃霉素 (100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、CYP3A4 和 P-gp 共同抑制剂环孢素 (50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、以及 CYP3A4 底物咪达唑仑 (50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。上述化合物均用 DMSO 溶解, 并控制孵育体系中 DMSO 的浓度不超过 0.1%。在孵育时先将醋竹桃霉素在肠微粒体孵育体系中与 NADPH 共同预孵育 15 min 后, 再加入 CMDCK 启动反应。对照组孵育体系中不含抑制剂。

酶动力学研究 肠微粒体孵育方法同“肠微粒体孵育”, 代谢动力学实验中分别于 0、5、15、30 和 60 min 取出样品, 终止反应并按“肠微粒体孵育”方法处理样品并检测。

CMDCK 与肠微粒体酶的 K_m 及 $V_{\max}$ 测定: 将系列浓度 (0.5~50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的 CMDCK 分别在肠微粒体中孵育, 方法同“肠微粒体孵育”, 并于 0 和 10 min 取出, 按“肠微粒体孵育”方法处理样品并检测。

利托那韦对 CMDCK 代谢的抑制作用

利托那韦对 CMDCK 代谢稳定性的影响: 在肠微粒体孵育体系中加入利托那韦 (1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 与

CMDCK (4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 共同孵育, 方法同“肠微粒体孵育”, 分别于 0、5、15、30 和 60 min 取出样品, 终止反应并按“肠微粒体孵育”方法处理样品并检测。

利托那韦对 CMDCK 的代谢抑制作用机制的考察: 试验设两个孵育组, 预孵育组将利托那韦 (1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 在肠微粒体孵育体系中与 NADPH 共同预孵育 15 min 后, 再加入 CMDCK 启动反应; 对照孵育组同时加入利托那韦 (1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 CMDCK, 共同预孵育 5 min 后再加入 NADPH 启动反应。两组在启动反应后孵育 60 min 终止反应, 按“肠微粒体孵育”方法处理样品并检测, 比较 CMDCK 的剩余量。

CMDCK 及其代谢产物的 LC-MS 测定 色谱条件: BetaBasic- C_{18} 色谱柱 (100 mm $\times$ 2.1 mm ID, 5 μm , Finnigan, USA), 流动相为含有 0.1% 甲酸水溶液-含有 0.1% 甲酸乙腈溶液 (55:45, v/v), 流速为 0.2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 进样量为 20 μL , 样品分析时间为 17 min。

质谱条件: 毛细管温度 300 $^{\circ}\text{C}$, 毛细管电压 +4 000 V; 以 ESI 正离子方式检测, CMDCK m/z 698 ($\text{M}+\text{Na}^+$)、单氧化产物 m/z 714 ($\text{M}+16+\text{Na}^+$)、IS m/z 689 ($\text{M}+\text{Na}^+$) 碰撞能量均为 150 V。

数据处理与分析 以 0 时的 CMDCK 浓度作为 100%, 其他时间点的浓度与 0 时的浓度相比得到其剩余百分比。将各时间点剩余百分比的自然对数与相应的孵育时间作图, 经直线回归求得斜率 ($-k$), 由公式 (1) 得到原药微粒体代谢的 $T_{1/2}$ (min), 应用 Well Stirred 模型对微粒体的数据进行外推 [公式 (2)、(3)] 可以得到 CMDCK 在人小肠中的固有清除率 CL_{int} ($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$) 和肠道清除率 $\text{CL}_{\text{in vivo}}$ ($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$)^[7], 其中 Q 为人肠道血流量, 取经验值 4.6 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

$$T_{1/2} = -0.693/k \quad (1)$$

$$\text{CL}_{\text{int}} = \frac{0.693}{\text{in vitro } T_{1/2}} \times \frac{\text{mL} \cdot \text{incubation}}{\text{mg} \cdot \text{microsomes}} \times \frac{\text{mg} \cdot \text{microsomes}}{\text{g} \cdot \text{organ}} \times \frac{\text{g} \cdot \text{organ}}{\text{kg} \cdot \text{B.W.}} \quad (2)$$

$$\text{CL}_{\text{in vivo}} = \frac{Q \times \text{CL}_{\text{int}}}{Q + \text{CL}_{\text{int}}} \quad (3)$$

按 Line weaver-Burk 法计算 CMDCK 在人肠微粒体中的米氏常数 (K_m) 和最大反应速度 ($V_{\max}$)。

应用 Windows Excel (微软公司) 进行数据分析和制图。选择性化学抑制剂对 CMDCK 在人肠微粒体中代谢的抑制作用的数据比较, 以及利托那韦对 CMDCK 人肠微粒体代谢的抑制作用, 均采用成组 t 检验。

结果

1 CMDCK 的 LC-MS 定量检测方法的验证

在本文所用的检测条件下, 孵育液中的杂质不干扰 CMDCK 以及内标物的测定。CMDCK 在 $0.25 \sim 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度范围内呈良好的线性关系, 相关系数大于 0.99, 检测下限为 $0.25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。CMDCK 在 3 个浓度水平 (0.5 、 5 和 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的回收率大于 93%, 日内和日间精密度均小于 10%。方法学验证结果表明, 该 LC-MSD 法的特异性、灵敏度和精密度均能满足本研究的要求。

2 CMDCK 的代谢酶表型确定

将一组 5 个主要参与药物代谢的重组人源 CYP 同工酶 (CYP1A2、2C9、2C19、2D6 和 3A4) 分别与特异性探针底物温孵 60 min 后, 测得的底物代谢转化率结果表明, 商品化重组酶的活性正常, 符合供货商提供的质量标准, 同一温孵体系可以用于 CMDCK 代谢酶表型试验。

将 5 个重组 CYP 同工酶分别与 CMDCK 孵育 60 min, 检测孵育体系中原形化合物的剩余浓度。与酶反应组平行孵育的各对应校正组的结果显示, CMDCK 在无 NADPH 的孵育体系中不发生代谢转化。在所试验的 5 个同工酶中, 共孵的 CMDCK 仅在 CYP3A4 的孵育液中浓度明显下降, 孵育终点原形化合物的剩余百分率为 $(11.7 \pm 2.0)\%$ (图 2)。结果表明, CMDCK 的代谢主要是由 CYP3A4 介导的。

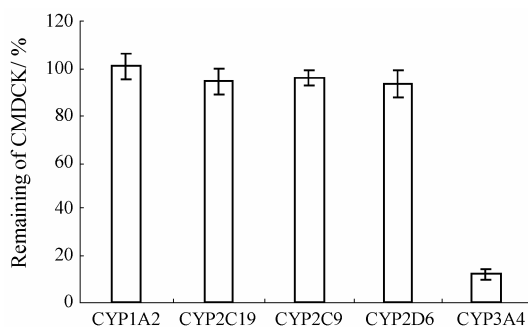


Figure 2 CMDCK metabolism by expressed human P450 isoforms. Incubations were performed with the CMDCK initial concentration of $4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $25 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ P450 microsomal protein, and $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NADPH for 60 min at 37°C . Each bar represents the mean of duplicate determinations

3 CMDCK 在 CYP3A4 孵育液及人肠微粒体中的氧化产物筛查

根据文献^[8]报道以及药物代谢的相关知识, 在 LC-MS 上分别对 0 和 60 min 的 CYP3A4 孵育液和肠微粒体孵育样品进行选择离子扫描, 设定的选择离

子包括原药准分子离子 m/z 698 ($\text{M}+\text{Na}$)⁺ 及单氧化产物 m/z 714 ($\text{M}+16+\text{Na}$)⁺。结果可见, 与 0 min 的样品比较, 在 60 min 的 CYP3A4 孵育液中出现多个新色谱峰, 其中 3 个主要的色谱峰的保留时间分别为 4.06、5.21 和 5.78 min, 推测是 CMDCK 的单氧化产物。这 3 个主要的产物峰与 CMDCK 在肠微粒体孵育液选择离子色谱上的新增产物峰一致 (图 3)。而其他 4 个同工酶的孵育液中原形的含量没有发生明显变化 (图 2), 也没有检测到相应的氧化产物。

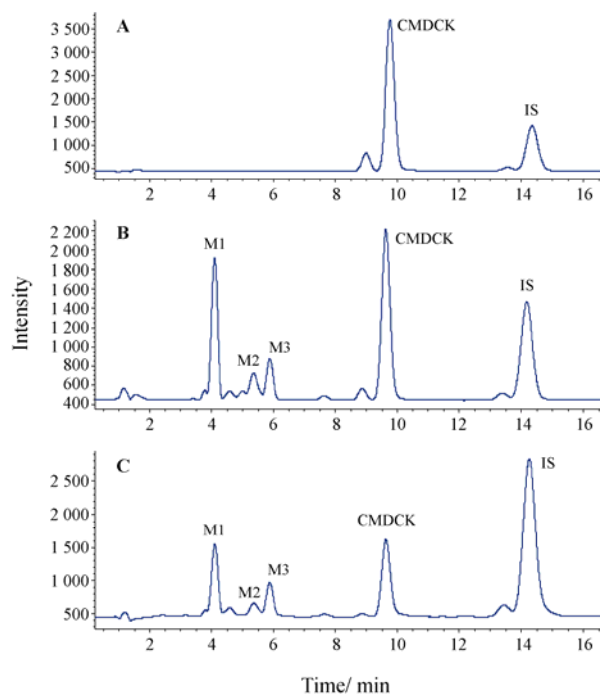


Figure 3 LC-MS extracted chromatograms of CMDCK incubates with human intestinal microsomes and recombinant CYP3A4. A: The 60 min incubate of CMDCK with human intestinal microsomes ($0.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ microsomal protein) without NADPH; B: The 60 min incubate of CMDCK with human intestinal microsomes ($0.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ microsomal protein); C: The 60 min incubate of CMDCK with recombinant CYP3A4 ($25 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ of CYP) at 37°C with NADPH in a final volume of 0.2 mL. The selected ions were m/z 698 ($\text{M}+\text{Na}$)⁺ and m/z 714 ($\text{M}+16+\text{Na}$)⁺. M1–M3 were the possible metabolites observed when compared to the 0 min incubate

4 CMDCK 的肠微粒体代谢动力学

CMDCK 与人肠微粒体 (蛋白浓度为 $0.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) 温孵不同时间, 原形化合物在 0~60 min 的时间段内呈线性消除; 将不同浓度的 CMDCK 分别与肠微粒体孵育, 观察到当 CMDCK 浓度超过 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 消除呈饱和特性。因此, 在进行代谢动力学实验时, 选择 $4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CMDCK 与蛋白浓度为 $0.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的肠微粒体共孵育 60 min, 不同时间点取样, 测定其 $T_{1/2}$

并推算 CL_{int} 。在测定 CMDCK 与人肠微粒体反应的酶动力学参数 K_m 和 V_{max} 时, 在 $0.25 \sim 50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 内选择 CMDCK 的系列浓度与 $0.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的微粒体蛋白共孵育 10 min。结果表明, $t_{1/2}$ 、 CL_{int} 、 CL_h 、 K_m 及 V_{max} 分别为 25.7 min 、 $12.1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $3.3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $45.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $0.33 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ 。CMDCK ($4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 在肠微粒体中的代谢消除半衰期小于 26 min, 其外推得到的肠清除率为 $3.3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$, 接近肠道的血流量 ($4.6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$), 提示肠道 CYP 酶对 CMDCK 有较强的代谢效率, 经口服进入体内的药物有可能经历显著的肠道首过代谢。

5 化学抑制剂对 CMDCK 肠微粒体代谢的影响

选择性化学抑制剂对 CMDCK 在人肠微粒体中代谢的抑制作用见图 4。CYP3A4 强抑制剂酮康唑和利托那韦均能极显著地抑制 CMDCK 的肠微粒体代谢; CYP3A4 及 P-gp 的共同抑制剂环孢素也能明显抑制 CMDCK 的代谢; CYP3A4 底物咪达唑仑能通过竞争机制显示出对 CMDCK 代谢的抑制; CYP3A4 中等强度抑制剂醋竹桃霉素也在一定程度上抑制 CMDCK 的代谢。而其他 4 个主要同工酶的特异性抑制剂都不能明显抑制 CMDCK 的肠微粒体代谢。这一结果进一步证明, CYP3A4 是主导 CMDCK 肠微粒体代谢的同工酶。

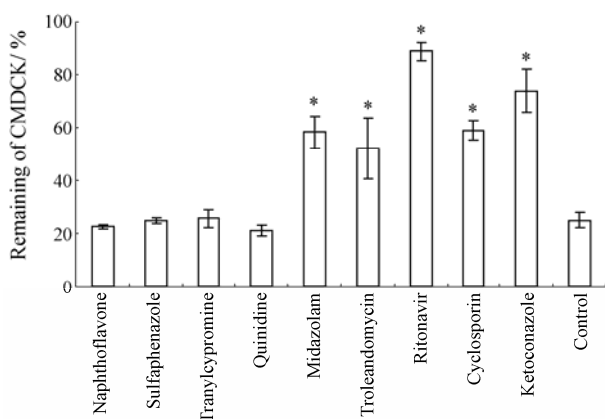


Figure 4 Effects of various chemical inhibitors of CYP enzymes on the CMDCK metabolism in human intestinal microsomes. CYP isoform-selective inhibitors at their optimal concentrations (naphthoflavone $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, sulfaphenazole $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, translcyproline $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, quinidine $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, ketoconazole $1.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, troleandomycin $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, midazolam $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, ritonavir $1.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, cyclosporin A $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) were co-incubated individually with CMDCK ($4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) in the human intestinal microsomal incubations at 37°C in the presence of NADPH ($1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 60 min. * $P < 0.05$ vs control group

6 利托那韦对 CMDCK 人肠微粒体代谢的抑制作用及可能机制

将利托那韦 ($1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 与 CMDCK ($4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 在人肠微粒体中共同孵育的前 30 min 中, 后者在肠微粒体中的代谢几乎被完全抑制, 30 min 后的代谢降解速度也显著低于对照组 (图 5), 在实验终点利托那韦共孵育组的孵育液中仍保留有 92.2% 的 CMDCK, 而对照组仅有 21.8% 的原形化合物残留。由此表明, 利托那韦能有效地抑制 CMDCK 的肠道代谢, CMDCK 与利托那韦同服有可能降低前者的首过代谢, 提高生物利用度。

将利托那韦与肠微粒体预孵育后, 其对 CMDCK 代谢的抑制水平与未预孵育组相比没有明显改变, 两组孵育液中 CMDCK 的剩余百分率没有统计学差异 (图 6)。说明利托那韦对 CMDCK 的抑制作用与其是否预孵育和时间无关。

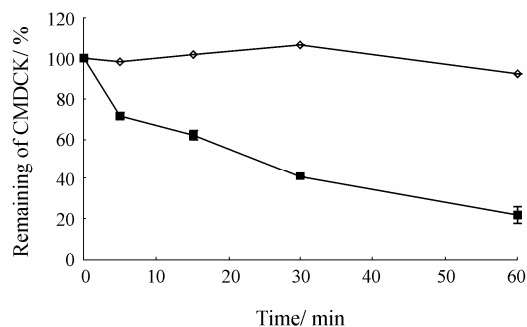


Figure 5 Inhibitory effect of ritonavir on the intestinal metabolic stability of CMDCK in human intestinal microsomes. CMDCK ($4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) was incubated with human intestinal microsomes ($0.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) alone (■-■) and together with ritonavir ($1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) (◇-◇) for up to 60 min at 37°C in the presence of NADPH ($1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$). The samples were analyzed by an Agilent LC-MS. Each data point is the mean of two determinations

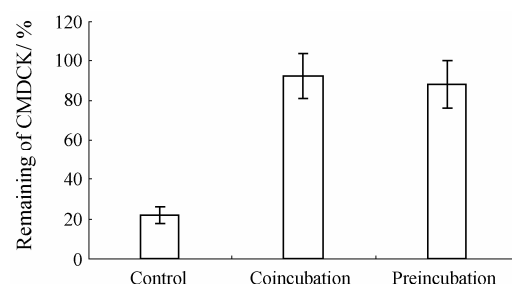


Figure 6 CMDCK metabolism in human intestinal microsomes co-incubated with ritonavir. CMDCK ($4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) was co-incubated with ritonavir ($1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) in human intestinal microsomes ($0.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) incubation, or it was co-incubated after ritonavir was preincubated with human intestinal microsomes at 37°C in the presence of NADPH ($1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 15 min. The co-incubations were carried out at 37°C for 60 min

讨论

本文报道的候选药 CMDCK 是一个新化合物,它在体外肝微粒体中的代谢稳定性与文献已报道的 DCK 类化合物类似^[8],其代谢途径也主要是氧化反应,产生多个氧化产物(结果另文发表)。CMDCK 在肠微粒体中的代谢稳定性也较差,能很快代谢生成多个氧化产物,消除半衰期小于 26 min; CYP3A4 是主导 CMDCK 肠道代谢的同工酶,这与文献报道的人肠道中 I 相代谢酶主要为 CYP3A4 相吻合。表明肠道是代谢 CMDCK 的一个重要的肝外器官。

虽然肠道中代谢酶的种类及含量均低于肝脏,但目前发现肠道对口服药物或食物的代谢作用在它们体内处置中占有重要地位,对某些药物来说,其作用甚至可能超过肝脏的代谢^[9]。本研究应用体外肠微粒体孵育体系研究了 CMDCK 的代谢动力学,并应用 Well Stirred 模型^[10]对体外肠微粒体孵育数据进行外推,预测得到 CMDCK 的体内肠道代谢清除率为 $3.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$,非常接近人肠道的平均血流量($4.6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$);同时考虑到 CMDCK 在肠道吸收较为缓慢的特性,可以推测,肠道对口服 CMDCK 的系统前首过效应具有不可忽视的影响。由于肠微粒体与体内小肠体系在酶浓度及酶所处环境上存在差异,对体内肠道代谢消除 CMDCK 的能力以及肠道在首过代谢中贡献的全面认识,还要通过体外器官水平以及体内试验来获得。

CMDCK 在肠道经 CYP3A4 介导发生代谢转化,由此提示其口服后在肠道经过时有可能发生药物-药物相互作用^[11]。本研究结果表明, CYP3A4 的抑制剂(酮康唑、利托那韦和醋竹桃霉素)或底物(咪达唑仑)都能明显减慢 CMDCK 的肠道代谢。同是 P-gp 的底物和 CYP3A4 抑制剂的环孢素与 CMDCK 共孵育,前者也能抑制后者的代谢。虽然药物-药物相互作用对药物的临床应用是个不利因素,但是对因首过效应强、生物利用度较低而影响临床有效性的药物来说,加入适宜的抑制剂可通过降低首过效应而达到提高生物利用度的目的。目前已有利用利托那韦对 CYP3A4 的抑制作用将其作为增效剂与叠氮胸苷、茚地那韦和沙奎那韦等抗 HIV 病毒药物合用的成功先例^[12];与利托那韦合用的药物-药物相互作用评价也成为抗 HIV 新药开发研究中的重要内容之一^[13]。本研究室曾系统考察了利托那韦在人肝微粒体中对 CMDCK 的抑制作用,与同时孵育组相比,将利托那

韦与肝微粒体预孵育后再加入 CMDCK 未发现 IC_{50} 值的漂移,表明利托那韦对 CMDCK 代谢的作用可能不是基于机制的抑制^[14]。本文研究了利托那韦与肠微粒体预孵育对 CMDCK 代谢的影响,发现其抑制作用也与是否预孵育无关。将 CMDCK 与利托那韦合用有可能提高其生物利用度、继而提高药效,本研究为两药的临床合用提供了科学基础和实验依据。

References

- [1] van Herwaarden AE, van Waterschoot RA, Schinkel AH. How important is intestinal cytochrome P450 3A metabolism? [J]. Trends Pharmacol Sci, 2009, 30: 223–227.
- [2] Liu Z, Ma YM, Wang TM, et al. *In vitro* metabolic interconversion between baicalin and baicale in the liver, kidney, intestine and bladder of rat [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2008, 43: 664–668.
- [3] Xie L, Yu D, Wild C, et al. Anti-AIDS agents 52. Synthesis and anti-HIV activity of hydroxymethyl (3'R, 4'R)-3', 4'-di-O-(S)-camphanoyl-(+)-cis-khellactone (DCK) derivatives [J]. J Med Chem, 2004, 47: 756–760.
- [4] Xie LC, Zhao H, Zhuo T, et al. Molecular modeling, design, synthesis, and biological evaluation of novel 3', 4'-di-O-(S)-camphanoyl-(+)-cis-khellactone (DCK) analogues as potent anti-HIV agents [J]. Bioorg Med Chem, 2005, 13: 6435–6449.
- [5] Huang L, Yuan X, Yu DL, et al. Mechanism of action and resistant profile of anti-HIV coumarin derivatives [J]. Virology, 2005, 332: 623–628.
- [6] Xie L, Guo HF, Lu H, et al. Development and preclinical studies of broad-spectrum anti-HIV agent (3'R, 4'R)-3-cyanomethyl-4-methyl-3', 4'-di-O-(S)-camphanoyl-(+)-cis-khellactone (3-cyanomethyl-4-methyl-DCK) [J]. J Med Chem, 2008, 51: 7689–7696.
- [7] Motohiro KATO. Intestinal first-pass metabolism of CYP3A4 substrates [J]. Drug Metab Pharmacokinet, 2008, 23: 87–94.
- [8] Suzuki M, Li Y, Smith PC, et al. Anti-AIDS agents 65: investigation of the *in vitro* oxidative metabolism of 3', 4'-di-O-(+)-camphanoyl-(+)-cis-khellactone derivatives as potent anti-AIDS agents [J]. Drug Metab Dispos, 2005, 33: 1588–1592.
- [9] Zhang QY, Kaminsky LS, Dunbar D, et al. Role of small intestinal cytochromes P450 in the bioavailability of oral nifedipine [J]. Drug Metab Dispos, 2007, 35: 1617–1623.

- [10] Galetin A, Gertz M, Houston JB. Potential role of intestinal first-pass metabolism in the prediction of drug-drug interactions [J]. *Exp Opin Drug Metab Toxicol*, 2008, 4: 909-921.
- [11] Hisaka A, Ohno Y, Yamamoto T, et al. Prediction of pharmacokinetic drug-drug interaction caused by changes in cytochrome P450 activity using *in vivo* information [J]. *Pharmacol Ther*, 2010, 125: 230-248.
- [12] Eagling VA, Back DJ, Barry MG, et al. Differential inhibition of cytochrome P450 isoforms by the protease inhibitors: ritonavir, saquinavir and indinavir [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 1997, 44: 190-194.
- [13] Ripamonti D, Maggiolo F. Rilpivirine, a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor for the treatment of HIV infection [J]. *Curr Opin Invest Drugs*, 2008, 9: 899-912.
- [14] Grime KH, Bird J, Ferguson D, et al. Mechanism-based inhibition of cytochrome P450 enzymes: an evaluation of early decision making *in vitro* approaches and drug-drug interaction prediction methods [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2009, 36: 175-191.

**关于举办 2010 年中国药学会
暨第十届中国药师周的通知 (第一轮)**

由中国药学会、天津市人民政府共同主办,天津市食品药品监督管理局、天津药学会承办,天津天士力集团有限公司、浙江海正药业股份有限公司、浙江医药股份有限公司协办的 2010 年中国药学会暨第十届中国药师周定于 2010 年 11 月 6 日至 7 日在天津市 (具体地点详见下轮通知) 举行。请登陆中国药学会网站 (<http://www.cpa.org.cn>) 或会议网站 (<http://www.cpameeting.org.cn>) 查询大会情况。

征文范围和要求 详情请登录会议网站,征文截止日期: 2010 年 9 月 20 日。

论文邮寄 因大会征集论文较多,为便于专家评审,请作者务必按时限要求将论文用 A4 纸打印后,寄至北京市朝阳区建外大街四号建外 SOHO 九号楼 18 层 1802 室,中国药学会学术部孙文虹收,邮政编码: 100022。同时论文电子稿必须以 Word 格式通过 E-mail 传至: sunwenhong2002@163.com,请注明稿件所属专业,以便于制作论文集光盘。我们收到每篇稿件后,将及时给与作者邮件回复,请注意查收。

论文评奖 五个专业分会场分别评出一等奖 1 名 (奖金 3000 元),二等奖 2 名 (奖金 2000 元),三等奖 3 名 (奖金 1000 元),并颁发获奖证书。获奖论文优先推荐在《中国药学杂志》等中国药学会主办期刊发表。

会议学分 授予参会代表中国药学会继续药学教育 I 类学分。

收费及注意事项 详情请登录会议网站。

报名截止时间 2010 年 9 月 20 日。

联系方式

中国药学会,地址:北京市朝阳区建外大街四号建外 SOHO 九号楼 18 层 1802 室;邮编: 100022;
传真: 010-58694812。

中国药学会联系人: 孙文虹 (010-58699280-819; sunwenhong2002@163.com);

范政杉 (010-58699280-820; yxfms@163.com)

中国药师周联系人: 高三章 (010-58696206-188; gaosanzhang@cmei.org.cn);

邢莉 (010-58696206-118; xingli@cmei.org.cn)

财务联系人: 郑巍、乔中兴 (010-58694879)