

采用重组人源 CYP酶研究艾瑞昔布的体外羟基化代谢

李 强³, 黄海华^{1*}, 董 宇², 钟大放²

(沈阳药科大学 1. 微生物学教研室, 2. 药物代谢与药物动力学实验室, 辽宁 沈阳 110016;
3. 吉林大学 生命科学学院, 吉林 长春 130023)

摘要: 目的 探讨新型抗炎镇痛药艾瑞昔布在人体内的羟基化代谢酶。方法 用体外重组的人源细胞色素 P450(CYP)进行孵育代谢实验,液相色谱-多级质谱法分析代谢产物和残留的母体药物,利用整体归一化法对 4种 CYP酶的代谢作用大小进行评估。结果 艾瑞昔布羟基化代谢可由 CYP2C9, CYP2D6和 CYP3A4催化,其各自作用大小分别为 62.5%, 21.1%和 16.4%。结论 CYP2C9为艾瑞昔布羟基化的主要代谢酶。

关键词: 细胞色素 P450; 羟基化代谢; 艾瑞昔布; 液相色谱-多级质谱法; 整体归一化

中图分类号: R969.1; R969.2; Q559.9; R971.1 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2005)05 - 0410 - 04

Investigation on the hydroxylation metabolism of imrecoxib *in vitro* by using recombinant human CYPs

LI Qiang³, HUANG Hai-hua^{1*}, DONG Yu², ZHONG Da-fang²

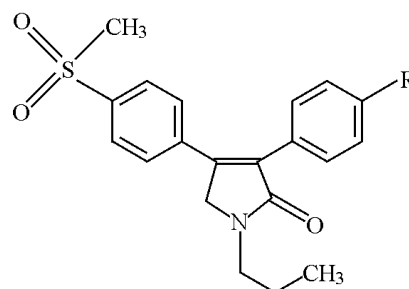
(1. Department of Pharmaceutical Microbiology, 2. Laboratory of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 3. College of Life Science, Jilin University, Changchun 130023, China)

Abstract: **Aim** To identify the drug-metabolizing enzymes involved in the hydroxylation of the new anti-inflammatory and anodyne imrecoxib. **Methods** Imrecoxib was incubated with heterologous expression human cytochrome P450 (rCYPs) *in vitro*, and metabolites and remained parent drug were detected with liquid chromatography-multistage mass spectrometry. The contribution of 4 CYPs in the hydroxylation metabolism of imrecoxib was evaluated by total normalized rate (TNR) method. **Results** Imrecoxib is metabolized by CYP2C9, CYP2D6 and CYP3A4, with the rate of 62.5%, 21.1% and 16.4%, respectively. **Conclusion** CYP2C9 is the major enzyme involved in imrecoxib hydroxylation metabolism.

Key words: cytochrome P450; hydroxylation metabolism; imrecoxib; liquid chromatography-multistage mass spectrometry; total normalized rate

艾瑞昔布(imrecoxib,图1)为我国正在研制开发中的新药,环氧化酶-2(COX-2)特异性抑制剂,对因炎性介质引起的环氧化酶-2的生成有较强抑制作用,进而发挥止痛及抗炎作用^[1]。研究表明,该药在人体内绝大部分以代谢物形式消除,主要代谢途径是经肝脏代谢为 4'α-羟基代谢产物 M1,尿液中

几乎只能检测到进一步氧化的 4'α-羧基代谢产物 M2。



Imrecoxib: R = CH₃; M1: R = CH₂OH; M2: R = COOH
Figure 1 Structures of imrecoxib and its main metabolites (M1 and M2)

收稿日期: 2004-06-18.

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863计划)课题(2003AA2Z347C).

* 通讯作者 Tel: 86 - 24 - 23843711 - 3795, Fax: 86 - 24 - 23902539, E-mail: zhongdf@china.com

目前国外已经上市的同类药物有罗非昔布 (rofecoxib)、伐地昔布 (valdecoxib) 和依他昔布 (etoricoxib) 等,其结构有一定相似性,主要由 CYP2C9 及 CYP3A4 代谢^[2-4]。为探讨艾瑞昔布在人体内的主要代谢酶,本文利用重组人源 CYP 酶对该药进行体外代谢研究,通过液相色谱-多级质谱 (LC-MSⁿ) 方法检测其代谢产物,利用整体归一化 (total normalized rate, TNR) 法对参与代谢 CYP 亚型的作用进行评估,并对其主要代谢酶的动力学性质进行初步探讨。

材料与amp;方法

药物代谢重组酶 人源重组 rCYP2C9, rCYP2C19, rCYP2D6 及 rCYP3A4 购自 CHT 公司 (Salt Lake, 美国), 于 - 86 ℃ 低温冰箱内保存。

药品和试剂 甲苯磺丁脲 (tolbutamide) 原料药,由广州温泉药厂提供;氢溴酸右美沙芬 (dextromethorphan) 原料药和 S 美芬妥英 (S-mephenytoin) 原料药,均由沈阳药科大学药剂教研室提供;盐酸咪达唑仑 (midazolam) 注射剂,罗氏有限公司。艾瑞昔布原料药,纯度为 99.6%;内标物 BAP910 原料药,纯度为 99.5%,均由江苏恒瑞医药股份有限公司提供。其余重组酶孵育体系试剂为市售分析纯,用于 LC-MSⁿ 分析的试剂为色谱纯。

主要仪器设备 美国 Finnigan 公司 LCQ 型液相色谱-质谱联用仪,配有电喷雾离子化源 (ESI) 离子阱质量分析器和日本 Shimadzu LC-10AD 高效液相输液泵及 Xcalibur 1.1 数据处理系统; - 86 ℃ 低温冰箱 (日本三洋)。

重组酶孵育体系 重组酶孵育体系介质为磷酸盐缓冲液,浓度为 100 mmol·L⁻¹, pH 7.4, 含有重组酶 50 nmol·L⁻¹, 因艾瑞昔布不溶于水,孵育时加入甲醇溶液,终浓度为 5 μmol·L⁻¹, 有机相为最终体系的 0.1% (v/v), 以加入 1 mmol·L⁻¹ NADPH 起始反应,最终体积为 200 μL。在 37 ℃ 水浴中孵育,反应至一定时间以等体积的冰冷甲醇终止反应。每次孵育均为双样本。

重组 CYP 酶活力检测

rCYP2C9 酶活力检测 用 CYP2C9 探针药物甲苯磺丁脲为底物,底物浓度为 100 μmol·L⁻¹, 其余条件同重组酶孵育体系, LC-MSⁿ 法以负离子方式检测产物 4'-羟基甲苯磺丁脲生成速率,作为 rCYP2C9 酶活指标。

rCYP2C19 酶活力检测 用 CYP2C19 探针药物

S 美芬妥英为底物,底物浓度为 100 μmol·L⁻¹, LC-MSⁿ 法以正离子方式检测 4'-羟基代谢物生成速率。

rCYP2D6 酶活力检测 用 CYP2D6 探针药物右美沙芬为底物,底物浓度为 5 μmol·L⁻¹, LC-MSⁿ 法以正离子方式检测产物 O-去甲基代谢物生成速率。

rCYP3A4 酶活力检测 用 CYP3A4 探针药物咪达唑仑为底物,底物浓度为 5 μmol·L⁻¹, LC-MSⁿ 法以正离子方式检测产物 1'-羟基咪达唑仑生成速率。

重组酶对艾瑞昔布代谢能力的测定 艾瑞昔布在孵育体系中的终浓度为 5 μmol·L⁻¹, 分别与 rCYP2C9, rCYP2C19, rCYP2D6 和 rCYP3A4 在 37 ℃ 水浴中孵育,各种酶终浓度均为 50 nmol·L⁻¹, 用 LC-MSⁿ 法测定艾瑞昔布 4'-α 羟基代谢产物 M1 生成速率。

LC-MSⁿ 法检测 M1 质谱条件:电喷雾离子化源,正离子方式检测。离子源喷射电压:4.5 kV;毛细管温度:200 ℃;毛细管电压:13 V;鞘气流速:1.05 L·min⁻¹;辅助气流速:0.15 L·min⁻¹;用一级全扫描方式、二级全扫描方式和选择反应监测方式。

色谱条件:色谱柱为 Diamonsil C₁₈ 柱 (200 mm × 4.6 mm ID, 5 μm, 北京迪马公司); 流动相为甲醇-水-甲酸 (75:25:0.1, v/v/v); 柱温:室温;流速:0.5 mL·min⁻¹。

酶动力学参数测定 根据文献^[5]要求,对艾瑞昔布羟化反应的主要代谢酶 (代谢程度超过 20%) rCYP2C9 及 rCYP2D6 进行酶动力学考察,艾瑞昔布在孵育体系中的终浓度范围为 0.1 - 40 μmol·L⁻¹, 测定 M1 的生成速率,计算 K_m, V_{max}。

确证酶浓度与速率成线性 酶浓度范围为 5 - 80 nmol·L⁻¹, 艾瑞昔布浓度为 5 μmol·L⁻¹ 进行体外孵育,验证酶浓度与反应速率是否成线性关系。

结果

1 酶活力检测

对 4 种 rCYP 酶进行的酶活力检测结果证实,研究所用的重组酶均具有较强酶活力 (表 1), 满足本研究的要求。

Table 1 The monitored activities of 4 rCYPs

rCYP	Probe substrate reaction	Activity / pmol product·min ⁻¹ ·(pmol P450) ⁻¹
2C9	Tolbutamide-4'-hydroxylation	3.91
2C19	(S)-Mephenytoin-4'-hydroxylation	6.78
2D6	Dextromethorphan-O-demethylation	0.54
3A4	Midazolam-1'-hydroxylation	0.24

2 主要代谢酶对艾瑞昔布代谢能力的测定

艾瑞昔布代谢后形成羟化产物 M1,检测结果见图 2和图 3。

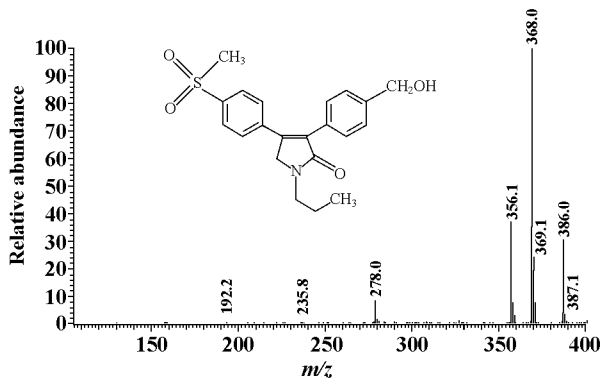


Figure 2 Full scan MS² spectra of *m/z* 386 (M1)

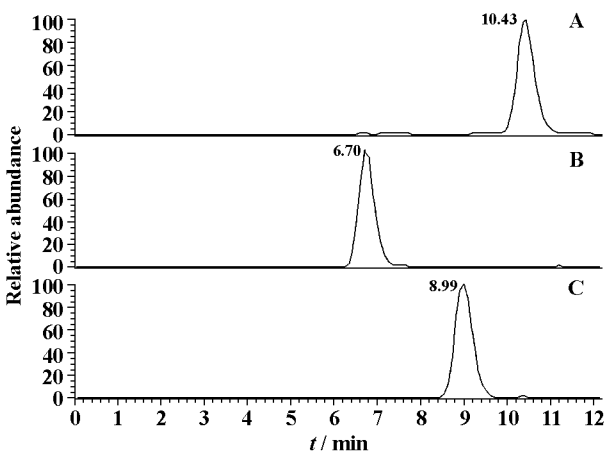
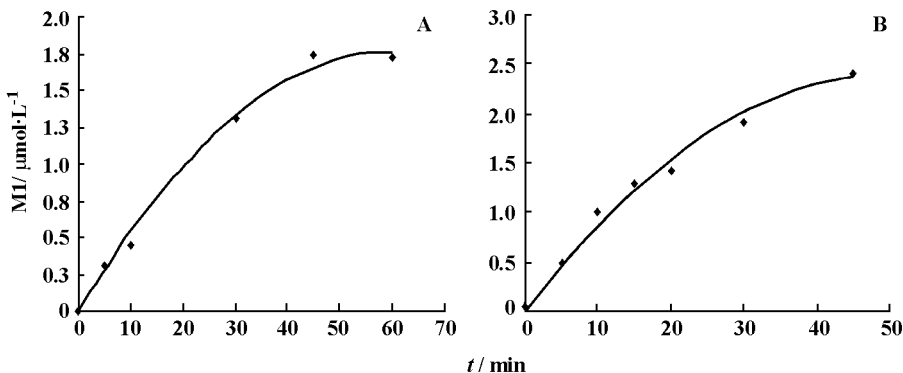


Figure 3 Chromatograms of imrecoxib (A), M1 (B) and BAP910 (C, internal standard, IS) by selected reaction monitoring (SRM) scan mode

rCYP2C9和 rCYP2D6对艾瑞昔布羟化代谢能力的测定见图 4。

艾瑞昔布被 rCYP2C9代谢成羟化产物 M1的速



A: Incubation at 37 °C with 50 nmol·L⁻¹ rCYP2C9 and 5 μmol·L⁻¹ imrecoxib; B: Incubation at 37 °C with 50 nmol·L⁻¹ rCYP2D6 and 5 μmol·L⁻¹ imrecoxib

Figure 4 Time course of M1 production incubated with rCYP2C9 and rCYP2D6, separately

率为 0.585 pmol·min⁻¹·(pmol rCYP)⁻¹,被 rCYP2D6 代谢成 M1 的速率为 1.894 pmol·min⁻¹·(pmol rCYP)⁻¹。艾瑞昔布和 rCYP3A4在相同条件下孵育,检测计算 M1 的形成速率为 0.136 pmol·min⁻¹·(pmol rCYP)⁻¹(图略)。艾瑞昔布和 rCYP2C19在相同条件下孵育 60 min,没有检测到 M1 形成。

3 主要代谢酶动力学参数

由于艾瑞昔布在孵育体系中的溶解上限为 40 μmol·L⁻¹,无法通过继续增大其浓度来获得更多的数据。所测得的数据利用 Eadie-Hofstee plots法进行处理(表 2)。

Table 2 Enzyme kinetics parameters of rCYP2C9 and rCYP2D6

rCYP	<i>K_m</i> /μmol·L ⁻¹	<i>V_{max}</i> /pmol·min ⁻¹ ·(pmol rCYP) ⁻¹
2C9	6.33	4.68
2D6	13.64	10.12

4 验证酶浓度与酶促反应速率成线性

对 rCYP2C9, rCYP2D6和 rCYP3A4进行的酶浓度-反应速率线性考察,表明这 3种酶在 5 - 80 nmol·L⁻¹,酶浓度与反应速率成线性关系, rCYP2C9酶浓度与反应速率见图 5, rCYP2D6和 rCYP3A4数据未列出。

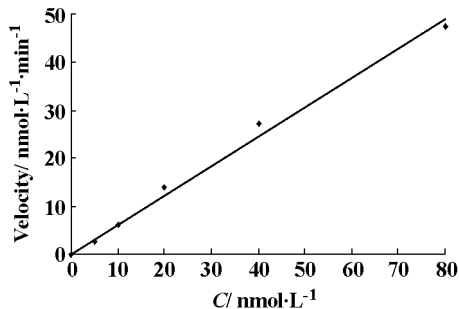


Figure 5 Reaction velocities linear with rCYP2C9 concentration

5 TNR法评估各 rCYP酶作用大小

在本文所采用的重组酶体系中,发现 rCYP2C9, rCYP2D6和 rCYP3A4可代谢艾瑞昔布,利用 TNR法对其各自作用大小进行评估,结果见表 3。

Table 3 Formation of M1 by recombinant CYP proteins

rCYP	M1 formation rate ^a / pmol • min ⁻¹ • (pmol rCYP) ⁻¹	Mean specific CYP content ^b / pmol • (mg protein) ⁻¹	Normalized M1 formation rate / (pmol • min ⁻¹ • (mg protein) ⁻¹)	Percentage of total activity / %
2C9	0.585	96	56.16	62.5
2D6	1.894	10	18.94	21.1
3A4	0.136	108	14.69	16.4

a: Incubation at 37 °C with 50 nmol • L⁻¹ rCYP and 5 μmol • L⁻¹ rofecoxib; b: Mean specific content of CYP in native human liver microsomes^[5]

TNR法为一种利用重组 CYP酶评估各种 CYP亚型对药物代谢程度大小的方法^[5],其公式如下:

% TNR =

$$\frac{\text{pmol/min/pmol rCYPn} \cdot \text{pmol mCYPn/mg}}{\sum (\text{pmol/min/pmol rCYPn} \cdot \text{pmol mCYPn/mg})} \cdot 100$$

讨论

药物消除主要以代谢物或以原形物形式排出体外,若主要以代谢物形式进行,则代谢情况会很大程度上影响药物的使用安全性及药理作用。药物代谢中,肝脏中的 CYP450酶系对药物的氧化代谢占据主要位置。而某些 CYP亚型(如 CYP2D6, CYP2C19)在人群中呈多态分布,有显著的个体及种族差异,用药时应考虑到这些差异。采用个体化用药能更好地发挥药物的作用,减少不良反应。某些 CYP酶(如 CYP2C9)可被相应药物诱导或抑制,不恰当的联合给药将导致药物相互作用,引起药物药理活性和安全性的改变,例如当临床治疗中药物达稳态后联合使用 CYP450诱导剂或抑制剂,则往往需要调整药物的剂量,以求获得最好的临床效果^[6]。因此对药物的 CYP代谢酶的确证对于预测药物之间的相互作用及个体化用药都十分重要。

进行药物代谢体外研究主要包括亚细胞水平和细胞水平,目前以亚细胞水平研究为主,通常利用肝微粒体进行,但人肝微粒体难以获得,且受捐献者生理或病理情况影响。近年来,随着基因工程重组人

源 CYP纯酶的商品化,利用重组 CYP进行体外药物代谢研究已成为药物代谢研究的一个重要方面,并逐渐发展成为一种常规方法。

利用 TNR法评估药物被 CYP各亚型代谢程度,所得结果同抑制实验、相关性实验结果具有较好的一致性。但由于重组酶与真实的 CYP存在一定差别,主要表现在蛋白环境,与 NADPH还原酶的比例不尽相同,其实验结果可能与人体生理真实情况有所差异,但仍不失为一种准确、快速确定药物 CYP代谢亚型的方法^[4,5]。

本文通过体外人源重组 CYP酶法确定了艾瑞昔布羟基化代谢酶为 CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4。在本文实验条件下利用 TNR法对其各自作用大小做出评估,由结果可以看出艾瑞昔布经过多种 CYP亚型代谢,并以 CYP2C9为主。同时使用 CYP2C9底物或可诱导或抑制 CYP2C9的药物(如利福平或磺胺苯吡唑)时可能会对艾瑞昔布药效产生一定影响^[5];艾瑞昔布在人体内代谢迅速,也可能是在肝中被多种 CYP亚型广泛代谢及在肠道中被 CYP3A4代谢所致。

References

- [1] Bai AP, Guo ZR, Hu WH, *et al.* Design, synthesis and *in vitro* evaluation of a new class of novel cyclooxygenase-2 inhibitors: 3, 4-diaryl-3-pyrrolin-2-ones [J]. *Chin Chem Lett*, 2001, **12**(9): 775 - 778.
- [2] Slaughter D, Takenaga N, Lu P, *et al.* Metabolism of rofecoxib *in vitro* using human liver subcellular fractions [J]. *Drug Metab Dispos*, 2003, **31**(11): 1398 - 1408.
- [3] Ibrahim A, Karim A, Feldman J, *et al.* The influence of parecoxib, a parenteral cyclooxygenase-2 specific inhibitor, on the pharmacokinetics and clinical effects of midazolam [J]. *Anesth Analg*, 2002, **95**(3): 667 - 673.
- [4] Kassahun K, McIntosh IS, Shou M, *et al.* Role of human liver cytochrome P450 3A in the metabolism of rofecoxib, a novel cyclooxygenase-2 selective inhibitor [J]. *Drug Metab Dispos*, 2001, **29**(6): 813 - 820.
- [5] Rodrigues AD. Integrated cytochrome P450 reaction phenotyping: attempting to bridge the gap between cDNA-expressed cytochromes P450 and native human liver microsomes [J]. *Biochem Pharmacol*, 1999, **57**(5): 465 - 480.
- [6] The Food and Drug Administration. *Drug metabolism / drug interaction studies in the drug development process: studies in vitro* [S]. 1997.