

## 新型抗脑瘤化合物 CAT3 的体外代谢研究

赵晟宇, 王汝冰, 白 洁, 范小庆, 胡民万, 孙燕红, 扈金萍\*, 李 燕

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 天然药物活性物质与功能国家重点实验室,  
创新药物非临床药物代谢及 PK/PD 研究北京市重点实验室, 北京 100050)

**摘要:** CAT3 是一种新型抗脑瘤化合物, 在 Daoy 和 U87MG 裸鼠原位异种移植模型中具有强效抗瘤活性, 但其代谢机制尚不清楚。本研究考察了 CAT3 在小鼠/犬/人全血和肝微粒体、人源化重组酶等温孵体系中的代谢特征, 所有动物福利和动物实验遵循中国医学科学院动物伦理委员会规定。研究结果表明 CAT3 在小鼠/犬/人全血中可水解为活性代谢物 PF403, 丁酰胆碱酯酶、羧酸酯酶和丝氨酸水解酶参与其生成, 代谢速率存在种属差异小鼠>人>犬; 应用 CYPs 同工酶的选择性抑制剂、人源化重组酶研究结果表明, CYP1A2、1A1、2C9 和 3A4 是参与 M1 (氧化脱水), M2 (双氧化脱水), M3 (甲基化氧化脱水), M4 (氧化), M5 (脱甲基) 生成的主要同工酶, CYP2B6、2C8、2C19 和 2D6 等亚型也有少量参与; II 相酶 UGT1A1、1A3、1A9 可催化 PF403 生成葡萄糖醛酸化代谢物 GLU-PF403。以上结果提示, CAT3 代谢是多酶参与的生物转化过程, 代谢酶介导的药物相互作用值得临床关注。

**关键词:** CAT3; 体外代谢; 酯酶; 细胞色素 P450; 葡萄糖醛酸转移酶

中图分类号: R969 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)06-1108-07

## Metabolism of a promising anti-tumor agent CAT3 *in vitro*

ZHAO Sheng-yu, WANG Ru-bing, BAI Jie, FAN Xiao-qing, HU Min-wan,  
SUN Yan-hong, HU Jin-ping\*, LI Yan

(State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, Beijing Key Laboratory of Non-Clinical Drug Metabolism and PK/PD Study, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

**Abstract:** CAT3 is a promising anti-brain tumor agent that has significant anti-tumor activity on Daoy or U87MG orthotopic xenograft in nude mice. This study was carried out to investigate the metabolic profiles of CAT3 in mouse/dog/human blood and microsomes as well as in humanized recombinant enzymes. All animal care and experimental procedures were reviewed and approved by the Animal Ethics Committee of Chinese Academy of Medical Sciences. Our findings showed that CAT3 could be hydrolyzed to active metabolite PF403 by carboxylesterase, butyrylcholinesterase and serine hydrolase in mouse/dog/human blood. PF403 could be further metabolized to M1 oxidative dehydration product, M2 double oxidation dehydration product, M3 methylation oxidative dehydration product, M4 oxidation product and M5 demethylation product, which were mainly catalyzed by CYP1A2, 1A1, 2C9 and 3A4, and slightly by CYP2B6, 2C8, 2C19 and 2D6. Besides oxidative metabolism, PF403 also was transformed into glucuronidation metabolites GLU-PF403 by Phase II enzymes UGT1A1, 1A3 and 1A9. Taken together, the metabolism of CAT3 was a multiple enzyme catalytic reaction. These results could provide valuable information for potential enzyme-mediated DDI in clinic studies.

**Key words:** CAT3; *in vitro* metabolism; esterase; CYPs; UDP-glucuronosyltransferases

收稿日期: 2019-03-27; 修回日期: 2019-04-09.

基金项目: 十三五国家科技重大专项 (2018ZX09711001-002).

\*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-63165185, E-mail: hujp@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0218

CAT3 (图1) 是基于天然产物娃儿藤活性成分CAT的结构进行一系列优化而得到的新型抗脑瘤化合物。药效学研究结果表明CAT3对Daoy和U87MG脑瘤细胞裸鼠原位异种移植模型具有显著的抗肿瘤活性, 其水解产物PF403不但对Daoy、U87MG和U251脑瘤细胞具有明显抑制作用( $IC_{50} < 0.01 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 而且对临床一线抗脑瘤药替莫唑胺耐药的U251细胞也具有明显抑制作用<sup>[1]</sup> (图1)。CAT3作为有望治疗恶性脑瘤的化合物, 其药效学虽已广泛研究, 但其生物转化机制尚不清楚。

药代动力学前期研究结果表明, 小鼠口服CAT3后可在血液、粪便、尿液等生物样本中检测到原形药、活性代谢物PF403、葡萄糖醛酸结合产物GLU-PF403以及氧化脱水M1 ( $m/z$  348), 双氧化脱水M2 ( $m/z$  346), 甲基化氧化脱水M3 ( $m/z$  362), 氧化M4 ( $m/z$  366), 脱甲基M5 ( $m/z$  336)等代谢产物, 但参与其代谢的同工酶类型尚不明确。本研究应用小鼠/犬/人全血、肝微粒体、人源化重组酶等体外温孵体系进行一系列研究, 旨在探究CAT3的生物转化机制, 鉴定参与其转化的代谢酶亚型, 为CAT3临床安全合理用药提供实验依据。

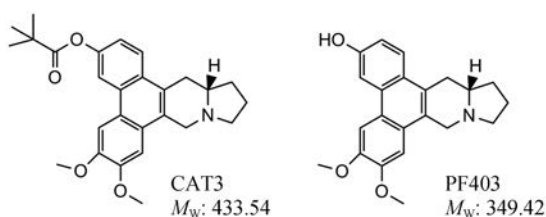


Figure 1 The structures of CAT3 and PF403

## 材料与方法

**仪器** Q Executive 高分辨质谱 (Thermo, 美国), Thermo Fisher Scientific Vanquish binary UPLC (Thermo, 美国) 配有: 二元梯度泵、在线脱气机、自动进样器、柱温箱。数据采集、分析软件 TraceFinder4.1 General Quan。

**药品与试剂** CAT3、PF403、GLU-PF403 标准品由中国医学科学院药物研究所合成室提供, 纯度均大于99%。人全血由北京协和医院惠赠, 小鼠和犬全血由本实验室订购动物采集。小鼠肝微粒体 (mouse liver microsome, MLM) 由本实验室自制。人和犬肝微粒体 (human liver microsome & dog liver microsome, HLM & DLM), 人源化重组葡萄糖醛酸转移酶 (UDP-glucuronosyltransferases, UGTs) 及 CYPs (Cytochrome P450) 酶购自美国 BD 公司。Sodium bis-*p*-nitrophenyl phosphate (BNPP)、BW284c51、5,5'-dithiobis-nitrobenzoic (DTNB)、ethylenedinitrilotetraacetic acid (EDTA)、

Ethyleneglycol-bis(2-aminoethylether) - *N, N, N', N'*-tetraacetic acid (EGTA)、tetra isopropyl pyrophosphoramidate (iso-OMPA)、phenylmethyl-sulfonyl fluoride (PMSF)、4-(2-aminoethyl-)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride (Pefabloc®SC)、氟化钠、三羟甲基氨基甲烷、葡萄糖-6-磷酸、氧化型辅酶 H ( $\beta$ -NADP)、尿苷二磷酸葡萄糖醛酸 (UDP-D-glucuronide trisodium salt, UDPGA)、咪达唑仑、非那西丁、右美沙芬、美芬妥英、氯唑沙宗、双氯芬酸钠、1-羟基-咪达唑仑、4-羟基-美芬妥英、对乙酰氨基酚、右啡烷、4-羟基-双氯芬酸钠和6-羟基-氯唑沙宗、吠拉茶碱、磺胺苯吡唑、噻氯匹定、奎尼丁、二乙基二硫胺甲酸钠 (diethylthiolcarbamate, DETC) 和酮康唑购自 Sigma Aldrich 公司。7-羟基-4-甲基香豆素 (4-methylumbelliferone, 4-MU)、7-羟基-4-甲基香豆素- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷 (4-MUG)、苯海拉明和丙甲菌素购自北京百灵威公司。甲醇、乙腈为色谱纯 (Fisher, 美国), 其他试剂为分析纯。超纯水由 Milli-Q 纯水仪制备 (Millipore, MA, 美国)。

Tris-HCl 缓冲液: 三羟甲基氨基甲烷  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$   $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7.4$ 。

NADPH-GS:  $\beta$ -NADP  $11.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , G-6-P  $110 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , G-6-P-DH  $10 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

**动物** 雄性 ICR 小鼠, SPF 级, 体重  $26 \sim 28 \text{ g}$ , 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 合格证编号: SCXK (京) 2016-0006。雄性 Beagle 犬, SPF 级, 体重  $6 \sim 6.5 \text{ kg}$ , 购自北京玛斯生物技术有限公司, 合格证编号: SCXK (京) 2016-0001。动物福利和动物实验操作遵循中国医学科学院动物伦理委员会规定。

**CAT3在全血中的稳定性** CAT3 (终浓度  $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 与小鼠新鲜全血在  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  水浴温孵 2、5、10、15、30 min 终止反应; 与犬/人新鲜全血在  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  水浴温孵 30、60、90、120、180 min 终止反应。每个种属分别设 0 时对照。反应体系均为  $200 \mu\text{L}$ , 有机溶剂  $< 1\%$ 。

**全血中参与CAT3水解的酯酶鉴定** CAT3 (终浓度  $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 与含不同酯酶抑制剂 (表1)<sup>[2]</sup> 的小鼠/犬/人新鲜全血在  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  温孵, 小鼠全血温孵 10 min 后终止反应, 设置 0、10 min 无抑制剂对照组; 犬和人全血温孵 2 h 后终止反应, 设置 0、2 h 无抑制剂对照组。每组 3 个平行样。抑制率计算公式为: Inhibition ratio (%) =  $(1 - D_{\text{with inhibitor}} / D_{\text{without inhibitor}}) \times 100\%$ 。D: 表示相应的样品中 PF403 生成量。

**CAT3在肝微粒体中的稳定性** 将小鼠、犬或人肝微粒体 (蛋白终浓度  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 与 Tris-HCl 缓冲液、NADPH-GS 溶液混匀, 加入 CAT3 (终浓度  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 启动反应,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  水浴温孵 5、10、20、30、45

**Table 1** Inhibitors and concentrations of esterase enzymes. BNPP: Sodium bis-*p*-nitrophenyl phosphate; DTNB: 5,5'-Dithio-bis-nitrobenzoic; EDTA: Ethylenedinitrotetraacetic acid; EGTA: Ethyleneglycol-bis(2-aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid; iso-OMPA: tetra isopropyl pyrophosphoramidate; Pefabloc®SC: 4-(2-Aminoethyl-)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride; PMSF: Phenylmethyl-sulfonyl fluoride; CE: Carboxyesterase; AChE: Acetylcholinesterase; PON: Aromatic dialkyl phosphatase; BChE: Butyrylcholinesterase

Inhibitor	Isoform	Concentration/mmol·L <sup>-1</sup>
BNPP	CE	0.5
BW284C51	AChE	0.01
DTNB	Arylesterase	10
EDTA	PON	20
EGTA	PON	10
NaF	Total esterase	100
iso-OMPA	BChE	0.2
Pefabloc®SC	Serine hydrolase	1
PMSF	Serine hydrolase	1

和 60 min 后终止反应。反应体系为 200 μL, 有机溶剂含量 < 1%, 每组 3 个平行样。各种属肝微粒体分别设 0 h 对照和咪达唑仑阳性对照。

**参与 CAT3 代谢的 CYPs 酶亚型鉴定** ① 肝微粒体温孵体系: 在人肝微粒体温孵液 (蛋白终浓度 0.5 mg·mL<sup>-1</sup>) 中分别加入 CAT3 (终浓度 5 μmol·L<sup>-1</sup>) 和高、低两个浓度同工酶抑制剂, 加 NADPH-GS 启动反应后, 37 °C 温孵 60 min 终止反应, 测定代谢物生成速率, 设定未加抑制剂和阳性抑制剂对照组。各同工酶阳性抑制剂及探针底物在肝微粒体中的温孵浓度和时间见表 2<sup>[3,4]</sup>。② 人源化重组酶温孵体系: PF403 (终浓度 5 μmol·L<sup>-1</sup>) 分别与 14 个人源化重组酶 CYP1A1、CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1、CYP2J2、CYP3A4、CYP4A11、CYP4F2、CYP4F3、CYP4F12 (终浓度 50 pmol·mL<sup>-1</sup>) 在 37 °C 预温孵 5 min 后, 加入 NADPH-GS 20 μL 启动反应, 温孵 1 h 后终止反应 ( $n = 3$ )。温孵液总体积为 200 μL, 有机溶剂含量 < 1%。每个重组酶体系分别设定阳性底物对照组。

**GLU-PF403 在肝微粒体内的生成速率** 将不同浓

度 PF403 (0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1、2、5、10 μmol·L<sup>-1</sup>) 加入小鼠、犬或人肝微粒体温孵液 (蛋白终浓度 0.5 mg·mL<sup>-1</sup>), 再加入丙甲菌素 [终浓度 50 μg·mg<sup>-1</sup> (pro)] 冰浴穿孔 15 min, 37 °C 预温孵 5 min 后加入 UDPGA (终浓度 3 mmol·L<sup>-1</sup>) 启动反应, 温孵 15 min 后终止反应 ( $n = 3$ )。反应总体积为 200 μL, 有机溶剂含量 < 1%。以 4-MU 作阳性对照验证温孵体系可靠性<sup>[5]</sup>。

**参与 GLU-PF403 生成的人源重组 UGTs 酶鉴定** PF403 (终浓度 1、10 μmol·L<sup>-1</sup>) 分别与 13 种人源重组 UGTs 酶 (终浓度 0.2 mg·mL<sup>-1</sup>) 在 37 °C 预温孵 5 min, 加入 UDPGA (终浓度 5 mmol·L<sup>-1</sup>) 启动反应, 30 min 后终止反应。反应液总体积 200 μL, 有机溶剂 < 1%。实验设定阳性底物对照组<sup>[5-9]</sup>。

**反应液处理及标准曲线配制** 反应结束后加入含内标的 2 倍体积冰乙腈 (IS-1 和 IS-2, 终浓度为 8 ng·mL<sup>-1</sup> 及 2 μg·mL<sup>-1</sup>) 终止反应, 混匀, 高速离心 (14 000 r·min<sup>-1</sup>, 5 min) 两次后, 取上清液 10 μL 进行液质分析, 同时检测原药及代谢物。

准确称取 CAT3、PF403 及 GLU-PF403 标准品, 用 DMSO 溶解为 1 mg·mL<sup>-1</sup> 储备液。储备液用乙腈稀释为一系列浓度工作液用于制备标准曲线。取空白基质 100 μL, 与乙腈 150 μL 混合后加入不同浓度 CAT3、PF403 和 GLU-PF403 标准品各 10 μL 以及内标溶液各 10 μL (IS-1 和 IS-2, 终浓度为 8 ng·mL<sup>-1</sup> 及 2 μg·mL<sup>-1</sup>), 混匀, 高速离心 (14 000 r·min<sup>-1</sup>, 5 min) 两次后, 取上清液 10 μL 进行 LC-MS/MS 分析。M1~M5 无对照品, 以 PF403 相对定量。

**检测条件** 采用 ZORBAX SB-C18 column (2.1 mm×100 mm, 3.5 μm) 色谱柱, 柱温 25 °C; 流动相为 0.1% 甲酸水和 0.1% 甲酸乙腈, 采用梯度洗脱。在平行反应监测 (parallel reaction monitoring, PRM) 模式下采用正离子检测, 定量分析反应离子为: CAT3,  $m/z$  434.23→70.07; PF403,  $m/z$  350.17→70.07; GLU-PF403,  $m/z$  526.21→70.07; IS-1,  $m/z$  364.19→70.07; IS-2,  $m/z$  625.18→317.07; M1,  $m/z$  348.16→348.16; M2,  $m/z$  346.14→346.14; M3,  $m/z$  362.14→362.14; M4,  $m/z$  366.19→70.07; M5,  $m/z$  336.23→70.07。

**Table 2** Substrates, inhibitors, concentrations, analytes and incubation time for the assay of CYPs activity in liver microsome<sup>[3,4]</sup>. DETC: Diethylthiolcarbamate

Inhibitor (Concentration/μmol·L <sup>-1</sup> )	Isoform	Substrates (Concentration/μmol·L <sup>-1</sup> )	Analyte	Incubation time/min
Furafylline (2, 50)	CYP1A2	Phenacetin (50)	Acetaminophen	20
Sulfaphenazole (2, 10)	CYP2C9	Diclofenac (10)	4-Hydroxydiclofenac	10
Ticlopidine (5, 25)	CYP2C19	Mephenytoin (50)	4-Hydroxymephenytoin	20
Quindine (1, 10)	CYP2D6	Dextromethorphan (10)	Dextrophan	10
Ketoconazole (5, 50)	CYP3A4	Midazolam (5)	1-Hydroxymidazolam	10
DETC (1, 10)	CYP2E1	Chlorzoxazone (100)	6-Hydroxychlorzoxazone	10

## 结果

### 1 CAT3在全血中的稳定性

CAT3在小鼠/犬/人全血中稳定性见图2。结果提示, CAT3在小鼠全血中不稳定, 37 °C温孵30 min后98.69%被代谢转化为PF403。在人和犬全血中CAT3代谢较缓慢, 随着时间的延长代谢逐渐增加, 180 min时代谢率分别达到51.28%和36.68%。

### 2 全血中参与CAT3水解的酯酶鉴定

酯酶鉴定结果表明, BNPP和iso-OMPA可显著抑制小鼠全血中CAT3代谢, 抑制率分别为66.57%和63.85%, 表明羧酸酯酶和丁酰胆碱酯酶是催化小鼠全血中CAT3水解为PF403的主要酯酶。iso-OMPA可显著抑制人和犬全血中CAT3代谢, 抑制率分别为39.51%和16.65%, 表明丁酰胆碱酯酶是催化人和犬全血中CAT3水解的主要酯酶。Pefabloc®SC和PMSF对小鼠、犬、人全血CAT3水解的抑制率分别为81.17%和53.40%、46.18%和52.32%、20.59%和20.18%, 表明丝氨酸水解酶参与CAT3水解。此外, 非选择性酯酶抑制剂NaF对小鼠、犬、人全血CAT3水解也有不同程度抑制作用。以上结果提示, 羧酸酯酶、丁酰胆碱酯酶和丝氨酸水解酶是参与CAT3水解的重要酯酶, 结果见表3。

### 3 CAT3在肝微粒体中的稳定性

阳性药咪达唑仑(10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )在3个种属肝微粒体内温孵, 代谢物1-羟基咪达唑仑生成速率为411.50~

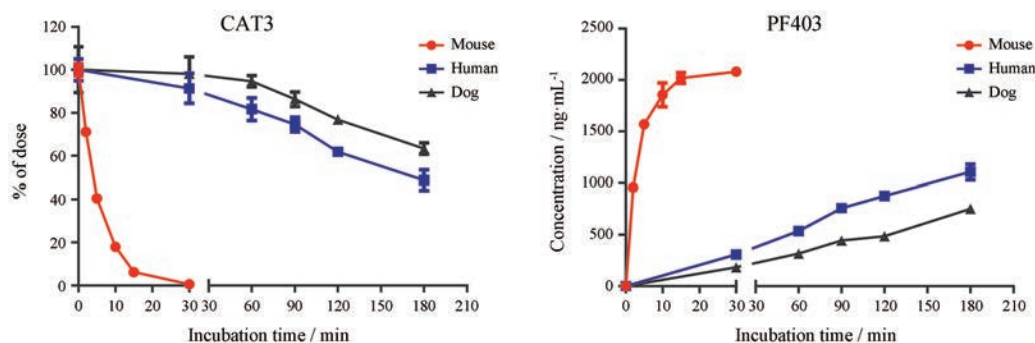
**Table 3** Effects of esterase inhibitors on the hydrolysis of CAT3 in mouse/dog/human blood ( $n = 3$ )

Inhibitor	Isoform	Inhibition/%		
		Mouse	Human	Dog
BNPP	CE	66.57	-22.46	-14.29
BW284C51	AChE	10.51	4.04	-3.68
DTNB	Arylesterase	-5.42	-13.22	-16.98
EDTA	PON	-6.86	6.79	5.74
EGTA	PON	1.92	11.50	-24.38
NaF	Total esterase	63.61	35.11	27.68
iso-OMPA	BChE	63.85	39.51	16.65
Pefabloc®SC	Serine hydrolase	81.17	46.18	20.59
PMSF	Serine hydrolase	53.40	52.32	20.18

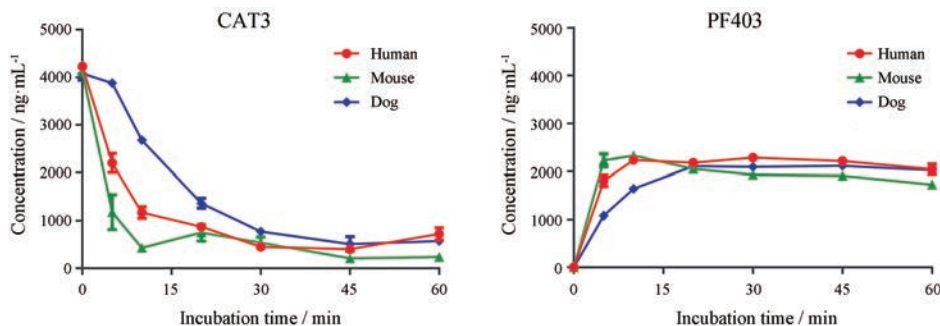
567.37  $\text{pmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}(\text{pro})$ , 证明温孵体系可靠。CAT3(10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )在小鼠、犬及人肝微粒体中温孵10 min后原形药代谢明显, 代谢速率小鼠>人>犬。活性代谢物PF403随温孵时间延长先快速增加后略有降低, 样品进一步鉴定发现有代谢产物M1、M2、M3和M4生成, 结果见图3。

### 4 参与CAT3代谢的CYPs同工酶鉴定

在人肝微粒温孵体系中加入CAT3(5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )后, 抑制剂呋拉茶碱(2和50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )对M1、M3、M4生成的抑制率分别为15.19%和54.81%、24.74%和94.85%、10.00%和94.85%; 磺胺苯吡唑(2和10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )对M2、M3、M4生成的抑制率为15.00%~22.68%; 噻氯匹定(5和25  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )对M4生成的抑制率为17.50%和22.50%; 奎尼丁(1和10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )对M4生成的抑



**Figure 2** Stability of CAT3 in mouse/dog/human blood ( $n = 3$ )



**Figure 3** Time-dependent decreasing of CAT3 and formation of PF403 in mouse, dog and human liver microsome ( $n = 3$ )

制率为 27.50% 和 55.00%。酮康唑 (1 和 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 对 M2、M4 生成的抑制率分别为 21.82% 和 27.44%、35.00% 和 52.50%。二乙基二硫胺甲酸钠 (DETC, 2 和 50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 对 M1、M2、M3、M4 生成的抑制率分别为: 23.15% 和 67.04%、19.01% 和 34.55%、44.33% 和 98.97%、37.50% 和 97.50%。以上结果提示, 人肝微粒体 CYP1A2、2D6 和 2E1 是参与 M1~M4 生成的主要同工酶, 2C19、2C9 和 3A4 等亚型也有少量参与, 结果见图 4。

PF403 浓度为 5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 人源化重组酶 CYP1A1、1A2、2B6、2C8、2C9、2C19、2D6 和 3A4 重组酶体系中可见 M1 的生成, CYP2C9 和 3A4 体系中可见 M2 生成, CYP1A1 和 1A2 体系可见 M3 生成, CYP1A1、

1A2 和 3A4 体系可见 M4 生成, CYP1A2 和 2C9 体系可见 M5 生成。但 CYP2E1、2J2、4A11、4F2、4F3、4F12 重组酶体系中未见 M1~M5 的生成, 上述结果提示 M1~M5 的生成是多酶参与的代谢过程, 结果见图 5。

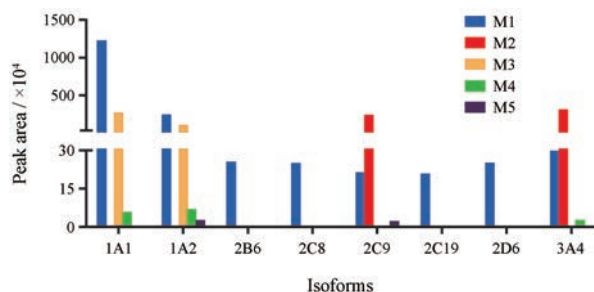


Figure 5 Formation of M1-M5 in recombinant CYPs. *n* = 3

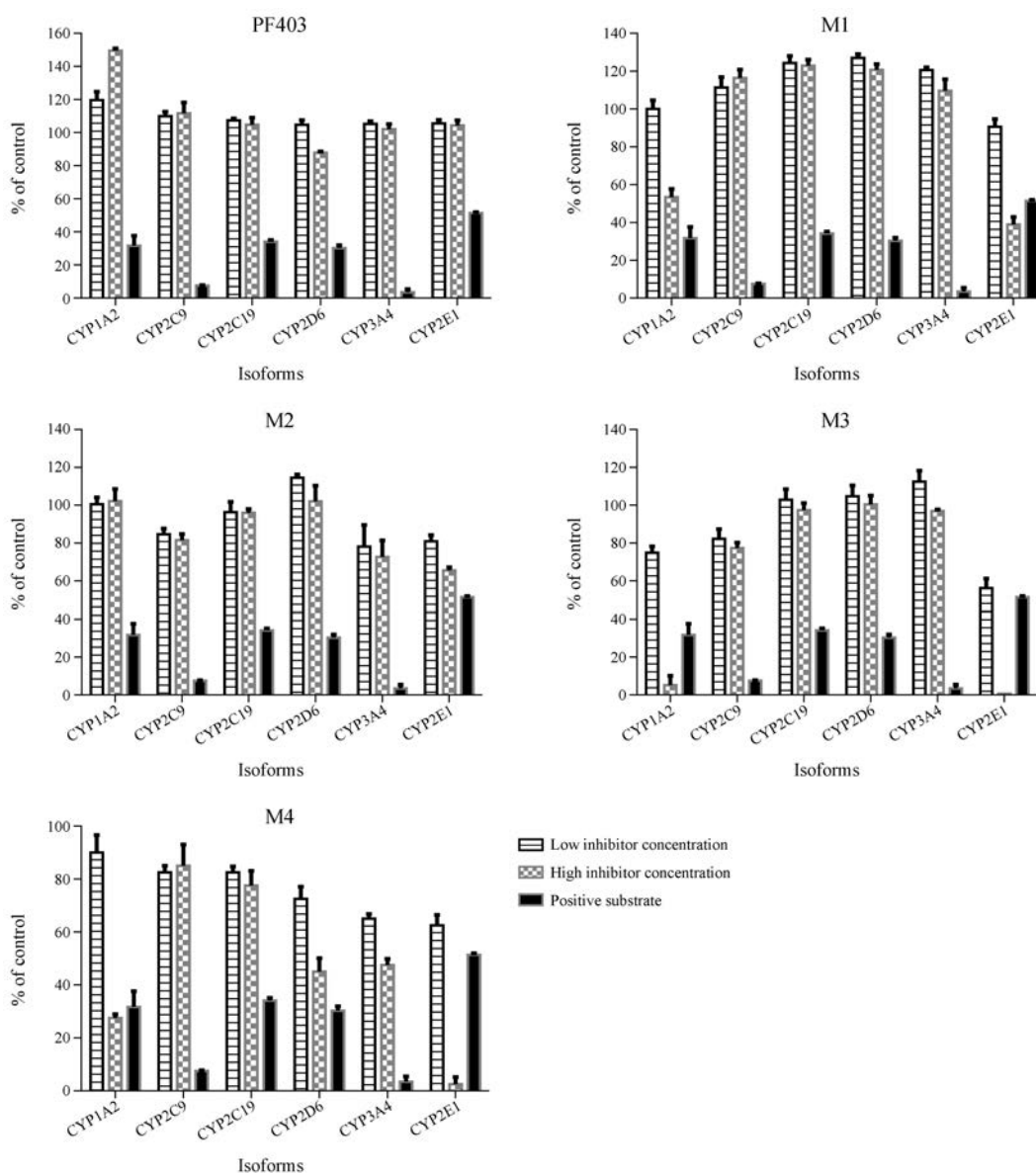


Figure 4 Effects of selective CYPs inhibitors on the formation of CAT3 metabolites (PF403, M1, M2, M3 and M4) in human liver microsome (*n* = 3)

## 5 GLU-PF403在肝微粒体内的生成速率

肝微粒体经丙甲菌素穿孔后,可催化PF403生成GLU-PF403,且GLU-PF403的产生具有UDPGA依赖性,提示GLU-PF403的生成由葡萄糖醛酸转移酶催化。不同浓度PF403与小鼠、犬、人肝微粒体温孵后,GLU-PF403的生成速率随PF403浓度增加而递增,GLU-PF403在人和犬中的生成速率明显大于小鼠。结果见图6。

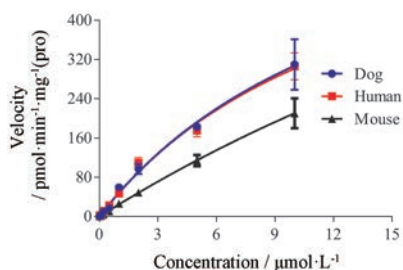


Figure 6 Kinetic plots of GLU-PF403 formation in mouse, dog and human liver microsomes.  $n = 3$

## 6 参与GLU-PF403生成的人源化重组UGTs酶鉴定

人源化重组酶UGT1A1、1A3、1A4、1A6、1A7、1A8、1A9、1A10、2B4、2B7、2B10、2B15、2B17与相应阳性底物温孵后均可见代谢产物显著生成,提示上述重组酶研究体系可靠,可用于药物的体外代谢酶研究。PF403浓度为 $1\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,UGT1A1、1A3、1A9温孵体系中可见GLU-PF403的生成,提示UGT1A1、1A3、1A9是催化GLU-PF403生成的主要同工酶;PF403浓度为 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,除上述亚型外,UGT1A4、1A8、1A10重组酶也少量参与GLU-PF403的生成,但UGT2B家族在PF403高低浓度时均不参与GLU-PF403的生成。以上结果提示GLU-PF403的生成是

UGT1A家族多酶参与的代谢过程,结果见表4。

## 讨论

药物体外生物转化机制研究不仅有助于了解药物发挥药理作用的物质基础,也有助于预测人体内代谢特征。药物的体内生物转化反应主要分为I相反应(氧化、还原和水解反应)和II相反应(结合反应)。在I相反应过程中,化合物在I相酶(酯酶、CYPs等)的作用下生成某些活性基团(-OH、-SH、-COOH、-NH<sub>2</sub>)。在II相反应过程中,化合物及代谢产物在II相酶(葡萄糖醛酸转移酶、磺基转移酶等)作用下与细胞内某些基团如葡萄糖醛酸、硫酸、甲基等结合生成结合产物而排出体外<sup>[10]</sup>。

酯酶作为一类参与药物I相代谢的重要酶系,在肠道、血液及肝脏等广泛分布,参与大约10%治疗药物的代谢,催化化合物发生水解反应,与一些前药活化,药物失活,甚至是药物毒性的发生密切相关<sup>[11]</sup>。PF403是天然产物CAT的活性代谢物,其毒性相对较小,但口服吸收差,经结构改造成为酯类化合物CAT3,使其更易吸收并脑内靶向分布。在小鼠全血中CAT3经羧酸酯酶、丁酰胆碱酯酶及丝氨酸水解酶催化水解,但其水解速率远远大于人和犬全血,这可能与酯酶在组织中的表达、活性以及底物特异性等方面存在的种属差异有关。文献报道大羟基端,小酰基端的化合物,更易被II型羧酸酯酶水解,而犬与小鼠、大鼠、猴和人相比,肠道中几乎不含II型羧酸酯酶<sup>[12]</sup>,这可能是比格犬口服CAT3后生物利用度大于小鼠(约为1.5倍)的主要原因。本研究鉴定了常见酯酶对CAT3水解的催化作用,但是醛脱氢酶、白蛋白等一些酶或蛋白也一定程度参与酯类化合物水解,不排除它们参与CAT3水解的可能。

Table 4 The formation of GLU-PF403 in human recombinant UGTs *in vitro*.  $n = 3$ . a: 4-MU as positive substrate; b: Diphenhydramine as positive substrate. /: Not detected

Isoform	Velocity of GLU-PF403 formation/ $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}(\text{pro})$		Positive control-formation of metabolites (velocity/ $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}(\text{pro})$ or peak area/ $\times 10^6$ )
	$1\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	
1A1	$19.05 \pm 2.01$	$206.9 \pm 19.81$	$197.17 \pm 15.87^a$
1A3	$4.14 \pm 0.55$	$43.96 \pm 7.13$	$170.73 \pm 56.30^a$
1A4	/	$1.06 \pm 0.17$	$27.88 \pm 1.40$ (peak area/ $\times 10^6$ ) <sup>b</sup>
1A6	/	/	$6673.9 \pm 2884.58^a$
1A7	/	/	$2157.51 \pm 254.83^a$
1A8	/	$8.67 \pm 1.92$	$340.46 \pm 53.93^a$
1A9	$2.65 \pm 0.45$	$52.19 \pm 5.37$	$1435.97 \pm 23.19^a$
1A10	/	$3.39 \pm 1.32$	$188.85 \pm 64.4^a$
2B4	/	/	$27.18 \pm 3.00^a$
2B7	/	/	$187.10 \pm 17.68^a$
2B10	/	/	$0.32 \pm 0.05$ (peak area/ $\times 10^6$ ) <sup>b</sup>
2B15	/	/	$283.01 \pm 35.39^a$
2B17	/	/	$14.14 \pm 0.60^a$

肝脏作为主要代谢器官,分布有大量CYPs酶,其中CYP1A2、2C9、2C19、2D6、2E1和3A4是参与药物代谢的主要亚型<sup>[13]</sup>。在人肝脏微粒体温孵体系中采用上述6种主要CYPs同工酶的选择性抑制剂,研究发现M1~M4生成是多酶催化的代谢过程,并且一种CYPs酶亚型可催化M1~M4中的多个产物生成。在14种人源化重组酶中,CYP1A1、1A2、2C9和3A4是催化PF403代谢的主要CYPs同工酶,CYP2B6、2C8、2C19和2D6等亚型也有少量参与。

UGTs存在于肝微粒体中,是一类主要的II相转化酶<sup>[14]</sup>。小鼠/犬/人肝微粒体经丙甲菌素穿孔后可催化PF403生成GLU-PF403,但存在一定种属差异,与小鼠相比,人肝微粒中GLU-PF403的生成与犬更为接近,这可能是由于UGTs表达,活性及底物选择性存在种属差异。在13种人源重组UGTs温孵体系中UGT2B家族不参与GLU-PF403的生成,而UGT1A家族中UGT1A1、1A3、1A9是参与GLU-PF403生成的主要同工酶,UGT1A4、1A8和1A10也有少量参与。

综上所述,CAT3可经酯酶水解为PF403。PF403在多个CYPs同工酶的催化下生成多个氧化代谢产物,与此同时,PF403还可经UGTs同工酶催化生成II相结合产物GLU-PF403,上述结果提示,CAT3的生物转化是一个多酶催化的反应过程,代谢酶介导的药物相互作用值得临床关注。

## References

- [1] Chen J, Lv H, Hu J, et al. CAT3, a novel agent for medulloblastoma and glioblastoma treatment, inhibits tumor growth by disrupting the Hedgehog signaling pathway [J]. *Cancer Lett*, 2016, 381: 391-403.
- [2] Liu YL, He J, Abliz Z, et al. *In vitro* stability and metabolism of O2', O3', O5'-tri-acetyl-N6-(3-hydroxylaniline) adenosine in rat, dog and human plasma: chemical hydrolysis and role of plasma esterases [J]. *Xenobiotica*, 2011, 41: 549-560.
- [3] Bi YF, Liu S, Zhang RX, et al. Metabolites and metabolic pathways of mesaconitine in rat liver microsomal investigated by using UPLC-MS/MS method *in vitro* [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2013, 48: 1823-1828.
- [4] Mi JQ. Establishment of BCRP-MDCK II Cells with High Expression of Human Breast Cancer Resistance Protein & Preclinical Pharmacokinetics of H002 (人源化乳腺癌耐药蛋白高表达BCRP-MDCKII细胞模型的建立H002临床前药代动力学研究) [D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2016.
- [5] Uchaipichat V, Mackenzie PI, Guo XH, et al. Human UDP-glucuronosyltransferases: isoform selectivity and kinetics of 4-methylumbelliferone and 1-naphthol glucuronidation, effects of organic solvents, and inhibition by diclofenac and probenecid [J]. *Drug Metab Dispos*, 2004, 32: 413-423.
- [6] Kerdpin O, Mackenzie PI, Bowalgaha K, et al. Influence of N-terminal domain histidine and proline residues on the substrate selectivities of human UDP-glucuronosyltransferase 1A1, 1A6, 1A9, 2B7, and 2B10 [J]. *Drug Metab Dispos*, 2009, 37: 1948-1955.
- [7] Ismail S, Hanapi NA, Ab Halim MR, et al. Effects of *Andropogon paniculata* and *Orthosiphon stamineus* extracts on the glucuronidation of 4-methylumbelliferone in human UGT isoforms [J]. *Molecules*, 2010, 15: 3578-3592.
- [8] Liu Y, Ramírez J, House L, et al. Comparison of the drug-drug interactions potential of erlotinib and gefitinib *via* inhibition of UDP-glucuronosyltransferases [J]. *Drug Metab Dispos*, 2010, 38: 32-39.
- [9] Shan L, Yang S, Zhang G, et al. Comparison of the inhibitory potential of bavachalcone and corylin against UDP-glucuronosyltransferases [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014, 2014: 1-6.
- [10] Yang R, Ma XH, Guo JH, et al. Characteristics of drug metabolic enzymes [J]. *Chin J New Drugs (中国新药杂志)*, 2016, 25: 751-759.
- [11] Fukami T, Yokoi T. The Emerging Role of human esterases [J]. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2012, 27: 466-477.
- [12] Wang R, Jiang JW, Li Y. Role of carboxylesterase in drug metabolism [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2018, 53: 186-191.
- [13] Mandery K, Bujok K, Schmidt I, et al. Influence of the flavonoids apigenin, kaempferol, and quercetin on the function of organic anion transporting polypeptides 1A2 and 2B1 [J]. *Biochem Pharmacol*, 2010, 80: 1746-1753.
- [14] Li X, Yu YN. Advance in research of drug phase II metabolisms and conjugation enzymes [J]. *Chin J Clin Pharmacol (中国临床药理学杂志)*, 2000, 16: 458-465.