

新型抗肿瘤微管抑制剂 IG-105 的体外代谢及药物相互作用的研究

庞晶¹, 胡辛欣¹, 王跃明¹, 李聪然¹, 杨信怡¹, 刘宗英¹, 胡来兴¹,
宋丹青¹, 李卓荣¹, 游雪甫^{1*}, 蒋建东^{2*}

(中国医学科学院、北京协和医学院 1. 医药生物技术研究所, 抗感染药物研究
北京市重点实验室, 2. 药物研究所, 北京 100050)

摘要: *N*-(2,6-二甲氧吡啶-3-取代)-9-甲基咪唑-3-磺酰胺 (IG-105) 是全新结构的小分子微管解聚剂, 在体外和动物实验中显示出较好的抗肿瘤活性。为了解 IG-105 的代谢性质并评价代谢性药物相互作用可能性, 使用混合人肝微粒体 (HLMs) 和重组 CYP450 同工酶 (rP450s) 研究参与 IG-105 生物转化的药物代谢酶, 利用液相色谱-静电场轨道阱质谱 (HPLC-Orbitrap-MS) 鉴定可能的代谢产物, 并评估 IG-105 对 5 种主要 CYP450 酶的抑制作用。结果显示, IG-105 可以被包括 CYP1A2、CYP2B6、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP3A4 和 CYP3A5 在内的多种 P450 酶代谢, 其中 IG-105 的代谢最有可能是由 CYP1A2、CYP2B6、CYP2C19 和 CYP3A 介导的; 脱甲基化是 IG-105 最主要的 I 相代谢反应, 鉴定出 3 种代谢产物 (M1~M3); 同时 IG-105 对 CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 和 CYP3A 具有一定的抑制作用, IC₅₀ 值分别为 6.4、23.64、0.39、1.4 和 3.14 μmol·L⁻¹。结果表明, IG-105 的生物转化涉及多个酶途径, 当与其他药物合用时, 由于其他药物抑制某种 P450 酶的活性而使 IG-105 代谢受阻而引起毒副作用的风险较低; 同时, IG-105 对 CYP1A2、CYP2D6 和 CYP3A 具有中度抑制作用, 对 CYP2C19 具有较强的抑制作用, 因此与主要被这些酶代谢的药物合用时应格外注意药物相互作用, 避免毒副作用。

关键词: IG-105; 抗肿瘤; 体外代谢; 药物相互作用

中图分类号: R945

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 06-0921-07

In vitro metabolism and drug-drug interaction potential of IG-105, a novel antimicrotubule agent

PANG Jing¹, HU Xin-xin¹, WANG Yue-ming¹, LI Cong-ran¹, YANG Xin-yi¹, LIU Zong-ying¹,
HU Lai-xing¹, SONG Dan-qing¹, LI Zhuo-rong¹, YOU Xue-fu^{1*}, JIANG Jian-dong^{2*}

(1. Beijing Key Laboratory of Antimicrobial Agents and Department of Pharmacology, Institute of Medicinal Biotechnology,
2. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: IG-105, *N*-(2,6-dimethoxypyridine-3-yl)-9-methylcarbazole-3-sulfonamide, a novel antimicrotubule agent, showed potent anticancer activity in a variety of human tumor cells *in vitro* and *in vivo*. In order to characterize the metabolism and the possible drug-drug interaction of IG-105, we carried out a series of experiments. Drug metabolizing enzymes involved in IG-105 metabolism were investigated by using pooled human liver microsomes (HLMs) and recombinant cytochrome P450 isoforms (rP450s) respectively. The possible metabolites were analyzed by liquid chromatography-orbitrap-mass spectrometry (LC-Orbitrap-MS).

收稿日期: 2017-05-10; 修回日期: 2017-05-18.

基金项目: 国家自然科学基金委创新群体 (81621064); 北京市科技专项 (Z141102004414065, Z151100000315029).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-67061033, E-mail: xuefuyou@hotmail.com; jiang.jdong@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0467

The inhibitory effect of IG-105 on main P450 enzymes was also evaluated. The results showed that IG-105 can be metabolized by a series of rP450s, including CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4 and CYP3A5, with the major contribution enzymes being CYP1A2, CYP2B6, CYP2C19, and CYP3A. Three metabolites (M1–M3) were identified and demethylation was the major phase I metabolic reaction for IG-105. IG-105 moderately inhibited CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, and CYP3A enzyme activities with IC_{50} values of 6.42, 23.64, 0.39, 1.4, and 3.14 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. Since the biotransformation of IG-105 involves multiple enzymatic pathways, the compound is less likely to be a victim of a concomitantly used medicine which inhibits activity of one of the CYPs. However, as IG-105 showed medium to strong inhibition on CYP1A2, CYP2D6, CYP3A, and CYP2C19, caution is particularly needed when IG-105 is co-administrated with other anticancer drugs which are mainly metabolized by the above enzymes.

Key words: IG-105; anticancer; *in vitro* metabolism; drug-drug interaction

IG-105, *N*-(2,6-二甲氧基吡啶-3-取代)-9-甲基咪唑-3-磺酰胺, 是一种具有全新结构母核的咪唑磺酰胺类药物, 通过与秋水仙碱口袋结合而抑制微管装配^[1], 在体外和动物实验中均显示出较好的抗肿瘤活性, 由于不是 P-糖蛋白底物, 对耐药肿瘤也表现出相当的活性^[2]。

微管是构成细胞骨架的主要成分, 由 α 和 β 微管蛋白异二聚体 (α,β -tubulin) 装配成长管状纤维结构。微管具有重要的生物学功能, 在维持细胞形态、细胞运动和细胞分裂中发挥重要作用^[3]。抑制微管活性将阻止有丝分裂并导致细胞凋亡^[4]。微管的动力学行为对细胞命运至关重要, 因此, 抑制微管功能已成为一种发现抗肿瘤药物的重要策略^[5]。

靶向微管的化合物用于化疗药物已获得巨大成功。抗微管蛋白药物有两类代表, 分别是抑制微管组装的长春花碱生物碱类 (如长春新碱) 和破坏微管解聚的紫杉醇类 (如紫杉醇)^[6,7]。但现有抗微管药物的临床应用出现了一系列问题: ① 微管蛋白本身发生突变或药物外排泵作用导致耐药性产生^[8]; ② 现有药物虽对卵巢癌、肺癌、乳腺癌和血液肿瘤有效, 但对许多实体瘤无效; ③ 周围神经炎作为现有药物最普遍的不良反应, 限制了临床应用剂量和时间^[9]; ④ 现有抗微管药物均为天然产物, 结构复杂, 全合成困难。

美国 FDA 建议对所有新化学实体进行临床试验前, 先进行代谢特性研究, 包括探明参与代谢的药物代谢酶、鉴定代谢物结构、评价潜在的药物-药物相互作用风险等^[10]。细胞色素 P450 酶系是由超家族基因编码形成的一组血红素蛋白, 负责大多数药物的代谢, 对于全新结构的候选物, 评价其与 P450 酶的相互作用极其重要^[11,12]。在肿瘤的治疗中, 常采用多种抗肿瘤药物联合化疗, 但药物联用往往由于药物

相互作用而引发不良反应, 其中以代谢性药物相互作用最为常见。因此, 明确抗肿瘤药物的生物转化和药物相互作用, 对其临床应用有重要指导意义。

本研究的目的是研究参与 IG-105 代谢的主要 CYP 同功酶, 鉴定主要的代谢物, 并评估其对 CYP 酶的抑制作用, 预测代谢性药物相互作用。

材料与方法

仪器 美国 Thermo Scientific™液相色谱串联质谱仪 (配有 Surveyor® MS 四元梯度质谱泵、Surveyor® 温控生物自动进样器、电喷雾离子化源、TSQ Quantum™三重四级杆质量分析器); 美国 Thermo Scientific™超高压液相色谱-静电场轨道阱质谱 (配有 Vanquish™超高效液相色谱仪、电喷雾离子化源、Orbitrap XL 静电场轨道阱质量分析器); 3-18K 型低温高速离心机 (德国 Sigma 公司); XS-105DU 型分析天平 (梅特勒-托利多仪器有限公司); Milli-Q Integral 10 超纯水系统 (美国 Millipore 公司)。

试剂 IG-105 (>99%) 由中国医学科学院医药生物技术研究所药物化学室合成提供; 内标 (IS) 3-氨基-9-乙基-咪唑 (3-amino-9-ethyl-carbazole, AEC) 购自德国 Sigma-Aldrich 公司; 色谱纯甲醇和乙腈购自美国 Fisher Scientific 公司; 醋酸铵购自德国 Sigma-Aldrich 公司; 冰醋酸购自北京化工厂; 水为 Milliporell-Q 超纯水。混合人肝微粒体 (HLMs)、重组 P450 酶、NADPH 再生系统、磷酸钾缓冲液购自美国 Corning 公司; 非那西丁、对乙酰氨基酚、甲苯磺丁脲、4-羟基甲苯磺丁脲、美芬妥因、4-羟基美芬妥因、1'-羟基丁呋洛尔、噻氯匹定、酮康唑、磺胺苯吡唑和特非那定均购自美国 Sigma 公司; 睾酮、 α -萘黄酮、奎尼丁购自美国 Fisher Scientific 公司; 6 β -羟基睾酮、苄基尼凡诺、羟基特非那定、丁呋洛尔购自加

拿大 Toronto Research Chemicals 公司。

IG-105 与肝微粒体共孵育 将 IG-105 与肝微粒体 (0.01、0.02、0.05、0.1、0.2 和 0.5 mg·mL⁻¹) 一起孵育 0、0.5、1、5、10 或 15 min 以确定线性动力学孵育条件。温孵体系包含 0.1 mg·mL⁻¹ 混合肝微粒体、100 mmol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲溶液 (PBS, pH 7.4)、NADPH 再生系统 (终浓度含 3.3 mmol·L⁻¹ 葡萄糖-6-磷酸、1.3 mmol·L⁻¹ NADP⁺、0.4 U·mL⁻¹ 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶以及 3.3 mmol·L⁻¹ MgCl₂)、以及不同浓度 IG-105 (溶于 DMSO, DMSO 终体积小于 0.1%), 终体积为 200 μL。除肝微粒体外的其他组分 37 °C 温孵 5 min 后, 加入肝微粒体启动反应。所有孵育均为三样本。对照组以 PBS 替代 NADPH 再生系统。孵育 15 min 后, 加入 200 μL 含有内标 AEC (0.1 μmol·L⁻¹) 的冰乙腈终止反应。混合振荡 1 min 后, 于 4 °C 下以 15000×g 离心 15 min, 收集上清, LC-MS/MS 系统进样分析。

将肝微粒体、IG-105 与 CYP1A2、CYP2B6、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 和 CYP3A 六种同工酶的特异性抑制剂分别共同孵育, 通过测定原药的消耗, 进一步明确人肝微粒体中主要负责 IG-105 代谢的 CYP 同工酶。以不加入抑制剂为对照, 考察何种同工酶被抑制后, IG-105 的代谢显著减少, 即证明该 P450 酶对 IG-105 的代谢起主要作用。各酶特异性化学抑制剂的终浓度如下: CYP1A2 抑制剂 α-萘黄酮 1 μmol·L⁻¹, CYP2B6 抑制剂噻氯匹定 10 μmol·L⁻¹, CYP2C9 抑制剂磺胺苯吡啉 10 μmol·L⁻¹, CYP2C19 抑制剂苄基尼凡诺 5 μmol·L⁻¹, CYP2D6 抑制剂奎尼丁 1 μmol·L⁻¹, 以及 CYP3A 抑制剂酮康唑 10 μmol·L⁻¹。在以上浓度下, 特异性抑制剂对目标 P450 酶的抑制率大于 90%^[13-17]。抑制剂与肝微粒体 37 °C 预孵育 5 min, 加入 NADPH 溶液启动反应。所有孵育均为三样本。无抑制剂的对照组以 DMSO 代替化学抑制剂。

IG-105 与重组 CYP450 同工酶共孵育 使用 CYP1A2、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1、CYP3A4 和 CYP3A5 等 10 种重组人源 P450 酶, 通过测定 IG-105 原药消耗研究参与 IG-105 代谢的酶。温孵体系包括终浓度为 20 pmol·L⁻¹ 的各种 CYP 同工酶、100 mmol·L⁻¹ PBS (pH 7.4) 或 100 mmol·L⁻¹ Tris 缓冲液 (pH 7.5, CYP2C9 和 CYP2A6 的反应体系中使用 Tris 缓冲液, 其他酶使用 PBS)、NADPH 再生系统、以及 1 μmol·L⁻¹ IG-105, 最终体积为 200 μL。除 P450 酶外其他组分

37 °C 温孵 5 min 后, 加不同的 CYP450 同工酶启动反应, 不表达任何 P450 酶的空白昆虫微粒体作为阴性对照。所有孵育均为三样本。孵育完成后, 样品处理方法同前所述, LC-MS/MS 系统进样分析。

HPLC-MS/MS 定量分析 使用 Thermo Fisher TSQ 液质联用仪对处理后的肝微粒体或重组 P450 酶反应体系中的 IG-105 进行定量分析。液相条件: 色谱柱为 Waters XTerra[®] MS C18 柱 (50 mm×2.1 mm, 3.5 μm); 柱温为 30 °C; 流动相 A 为 0.2% 醋酸水溶液 (v/v), 流动相 B 为含 0.2% 醋酸的乙腈, 洗脱梯度为 0~0.5 min, A 相 90%, 0.5~4.5 min, A 相从 90% 降至 30%, 4.5~5.5 min, A 相维持 30%, 5.5~5.7 min, A 相从 30% 升至 90%, 5.7~10 min, A 相维持 90%; 流速为 0.2 mL·min⁻¹; 自动进样器托盘温度为 4 °C; 进样量为 5 μL。质谱条件: 喷雾电压为 3.8 kV; 鞘气 (N₂) 压力为 30 arbitrary units (Arb); 辅气 (N₂) 压力为 10 Arb; 毛细管温度为 350 °C; 扫描模式为选择性反应监测 (SRM), IG-105 的扫描通道为 398→154 (轰击能量 21 eV), AEC 的扫描通道为 211→182 (轰击能量 28 eV)。依据《FDA 生物样品分析方法验证的指导原则》, 对于定量方法开展了包括特异性、线性、准确度、精密度、回收率、稳定性在内方法学验证。

HPLC-Orbitrap-MS 定性分析 使用 Thermo Scientific[™]液相色谱-静电场轨道阱高分辨质谱寻找 IG-105 的代谢产物, 并测定所有检测到的代谢产物的精确分子量。液相条件: 色谱柱为 Waters XTerra[®] MS C18 柱 (50 mm×2.1 mm, 3.5 μm); 柱温为 30 °C; 流动相 A 为 0.2% 醋酸水溶液 (v/v), 流动相 B 为含 0.2% 醋酸的乙腈, 洗脱梯度为 0~5 min, A 相 90%, 5~20 min, A 相从 90% 降至 30%, 20~22 min, A 相维持 30%, 22~23 min, A 相从 30% 升至 90%, 23~30 min, A 相维持 90%; 流速为 0.2 mL·min⁻¹; 自动进样器托盘温度为 4 °C; 进样量为 5 μL。质谱条件: 喷雾电压为 4.5 kV; 鞘气压力为 50 Arb; 辅气压力为 30 Arb; 毛细管温度为 375 °C; 扫描模式为全扫描 (扫描范围为 50~800) 和数据依赖性扫描, 对数据依赖性扫描获得的目标分子离子进行诱导碰撞解离, 获得其二级和三级质谱数据。

IG-105 对主要 P450 酶的抑制作用 根据《FDA 关于药物相互作用研究指南 (草稿)》2006 版的建议, 选择与药物代谢最为相关的 5 种 P450 重组酶 CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP3A, 开展了 IG-105 对这 5 种酶的抑制作用研究。以 P450 酶

将特异性探针底物转化为产物的能力作为评价 P450 酶活性的指标。不同浓度的 IG-105 与各种 P450 酶及其相应的探针底物共同孵育, 考察 IG-105 对不同 P450 酶的竞争性抑制作用。各探针底物的浓度选取文献报道的 K_m 值, 反应体系中包括不同浓度的 IG-105 (0.046、0.137、0.412、1.235、3.704、11.111、33.333、100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS (pH 7.4)、不同底物 (非那西丁、甲苯磺丁脲、美芬妥因、丁洛洛尔、睾酮)、各种 P450 同工酶 (20 $\text{pmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 NADPH 再生系统。阳性对照组中, 以各 P450 酶已知的特异性抑制剂 (α -萘黄酮、磺胺苯吡啶、苄基尼凡诺、奎尼丁、酮康唑) 替代 IG-105, 监测研究体系的可靠性^[16]。表 1 中列出了其他非共性孵育条件。反应终止方法、样品前处理方法同前所述。使用 LC-MS/MS 方法, 对上清液中探针底物相应的代谢产物进行定量测定, 检测条件如表 2 所示。

数据分析 使用 SPSS 13.0 软件计算 IC_{50} 值。

Table 2 SRM transitions and fragmentation parameters for the analytes

P450 enzyme	Analyte	SRM	Collision energy/eV
CYP1A2	Acetaminophen	152→110	16
CYP2C9	4-Hydroxytolbutamide	287→89	33
CYP2C19	4-Hydroxymephenytoin	235→150	25
CYP2D6	Hydroxybufuralol	278→186	18
CYP3A	6 β -Hydroxytestosterone	305→269	16

Table 1 Isoforms tested, marker substrates, and incubation conditions for enzyme inhibition study

Isoform monitored	Marker substrate	Substrate concentration / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Incubation time /min	Metabolite formed	Specific inhibitor
CYP1A2	Phenacetin	50	30	Acetaminophen	α -Naphthoflavone
CYP2C9	Tolbutamide	140	20	4-Hydroxytolbutamide	Sulfaphenazole
CYP2C19	Mephenytoin	50	30	4-hydroxymephenytoin	Benzylrinvanol
CYP2D6	Bufuralol	5	5	Hydroxybufuralol	Quinidine
CYP3A	Testosterone	50	10	6 β -Hydroxytestosterone	Ketoconazole

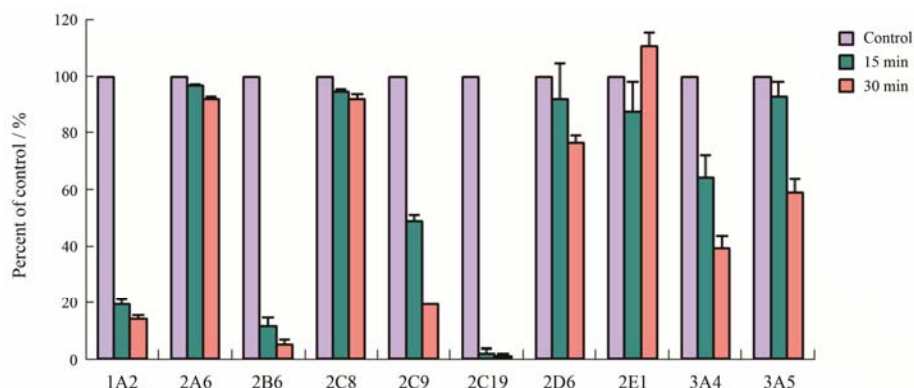


Figure 1 Metabolism of IG-105 in each CYP enzyme. IG-105: *N*-(2,6-Dimethoxyppyridine-3-yl)-9-methylcarbazole-3-sulfonamide

结果与讨论

1 IG-105 在肝微粒体中的代谢

首先, 对于 HPLC-MS/MS 定量方法的方法学验证结果表明, 人肝微粒体孵育体系中的 IG-105 的定量方法满足分析需求, 包括特异性、线性、准确度、精密度、回收率、稳定性在内的各项指标符合指导原则的规定。

IG-105 在 NADPH 再生系统作为辅酶的条件下可被 HLMs 代谢。IG-105 的底物消耗在反应时间为 0~15 min 内、以及肝微粒体蛋白质量浓度为 0.01~0.2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内, 呈线性动力学。因此选择微粒体浓度为 0.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 以及孵育时间 15 min 作为孵育条件。

2 参与 IG-105 I 相代谢的 CYP450 同工酶

10 种重组人 P450 酶 (CYP1A2、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1、CYP3A4 和 CYP3A5) 与 IG-105 共同孵育 15 或 30 min 后, 如图 1 所示, CYP1A2、CYP2B6、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP3A4 以及 CYP3A5 可不同程度的代谢 IG-105, 其中 CYP1A2、CYP2B6、CYP2C9 和 CYP2C19 对 IG-105 的代谢速度较快, 15 min 内 50% 以上的原形药物消失。

如图 2 所示, 以不加入抑制剂时 IG-105 的代谢百分率设为 100%, 加入 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ α -萘黄酮 (CYP1A2 的选择性抑制剂) 后, IG-105 的代谢百分率降至对照的 34%, 表明抑制 CYP1A2 严重影响了 IG-105 的代

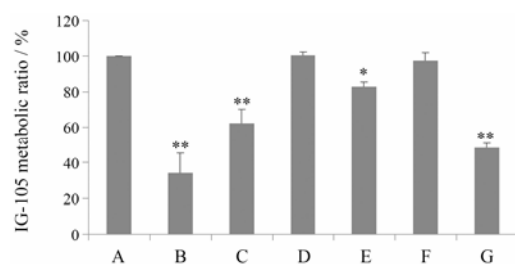


Figure 2 Effects of the CYP-selective inhibitors on the metabolism of IG-105 in human liver microsomes compared with control group. A: No inhibitor; B: α -Naphthoflavone; C: Ticlopidine; D: Sulfaphenazole; E: Benzylrnirvanol; F: Quinidine; G: Ketoconazole. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs No inhibitor

谢; 加入 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 噻氯匹定 (CYP2B6 的选择性抑制剂)、 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 苯基尼凡诺 (CYP2C19 的选择性抑制剂)、 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 酮康唑 (CYP3A 的选择性抑制剂) 也显著地将 IG-105 的代谢百分率降低至对照的 62%、82% 和 48%。CYP2C9 和 CYP2D6 的抑制剂的添加对 IG-105 代谢没有显著影响。对于 CYP2C9, 虽然重组 P450 酶实验结果显示其可以快速代谢 IG-105, 但抑制剂结果显示, 抑制 CYP2C9 的活性并不会显著减少 IG-105 的代谢, 说明 CYP2C9 并不是主要负责 IG-105 代谢的 P450 酶。因此推测, IG-105 的代谢最有可能是由 CYP1A2、CYP2B6、CYP2C19 和 CYP3A 介导的。

3 IG-105 的体外代谢产物鉴定

IG-105 与肝微粒体孵育后的样品经 HPLC 分离后, 与空白肝微粒体的色谱图相比, 可以看到在 IG-105 的保留时间之前的 3 个主要的代谢产物 (图 3)。

仔细挖掘从 Orbitrap 系统收集的高分辨质谱多级碎片信息, 初步推测了代谢产物的结构, 比对 IG-105 原药, 发现去甲基化 (相对分子质量与原药相比 -14, -28) 是 IG-105 在肝微粒体中最主要的 I 相代谢反应 (表 3)。其中 M1 和 M2 是 IG-105 的单脱甲基代谢物, 去甲基化分别发生在咪唑环和吡啶环相应的活性位点上。M3 是 IG-105 在吡啶环和咪唑环上都发生了去甲基化的双脱甲基代谢物。但对于 M1 和 M3 脱甲基的位点, 以目前的信息仍无法准确判断, 因此对于代谢产物结构的确定还需核磁共振等光谱

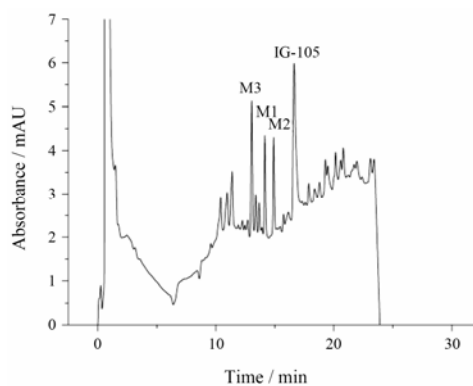


Figure 3 Typical chromatogram of IG-105 and its metabolites after incubation in human liver microsomes. M1, M2, and M3 are the identified metabolites of IG-105 after incubation in human liver microsomes

数据的进一步佐证。此外, 色谱图上仍有一些暂未归属的小峰有待进一步解析和确定。

将 IG-105 与各 P450 酶共孵育, 依据表 3 中的一级和二级质谱信息, 使用 LC-MS/MS 对所得样本进行代谢产物的分析, 分析不同的 P450 酶对应的代谢产物。结果如图 4, M1 可由 CYP1A2、CYP2B6、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP3A4 和 CYP3A5 代谢生成, M2 可由 CYP1A2、CYP2B6、CYP3A4、CYP3A5 代谢生成, M3 可由 CYP2B6 和 CYP3A4 代谢生成, 其中 CYP1A2、CYP2B6、CYP3A4 和 CYP3A5 体系中的代谢产物种类最为丰富, 这与上一部分抑制剂研究获得的代谢贡献结果基本吻合。

4 IG-105 对主要 P450 酶的竞争性抑制作用

IG-105 对主要 P450 酶的竞争性抑制作用结果如表 4 所示。作为阳性对照, 各 P450 酶特异性抑制剂的 IC_{50} 值与文献报道值基本一致, 证明了本研究的可靠性。酶抑制研究结果表明, IG-105 对所测试的 P450 酶都具有一定的抑制作用, 其中对 CYP2C9 ($\text{IC}_{50} = 23.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 抑制作用较弱, 对 CYP1A2 ($\text{IC}_{50} =$

Table 4 Half maximal inhibitory concentrations (IC_{50} , $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) of IG-105 and positive controls on main P450 enzymes

Compound	CYP1A2	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6	CYP3A
IG-105	6.4	23.6	0.4	1.4	3.1
Positive control	0.17	2.19	3.71	2.02	1.62

Table 3 Formula, mass of MS and MS^n data for the metabolites of IG-105 as detected by UHPLC-Orbitrap

Metabolites	Formula (M)	$\text{MS}^1[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z	Error (ppm)	Major fragment ions in positive mode	
				MS^2 m/z	MS^3 m/z
M1	$\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$	384.100 8	-2.6	140.016 8	125.028 0
M2	$\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$	384.100 5	-3.4	154.084 3	139.157 0, 125.150 6
M3	$\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$	370.085 1	-3.0	140.033 7	125.010 2

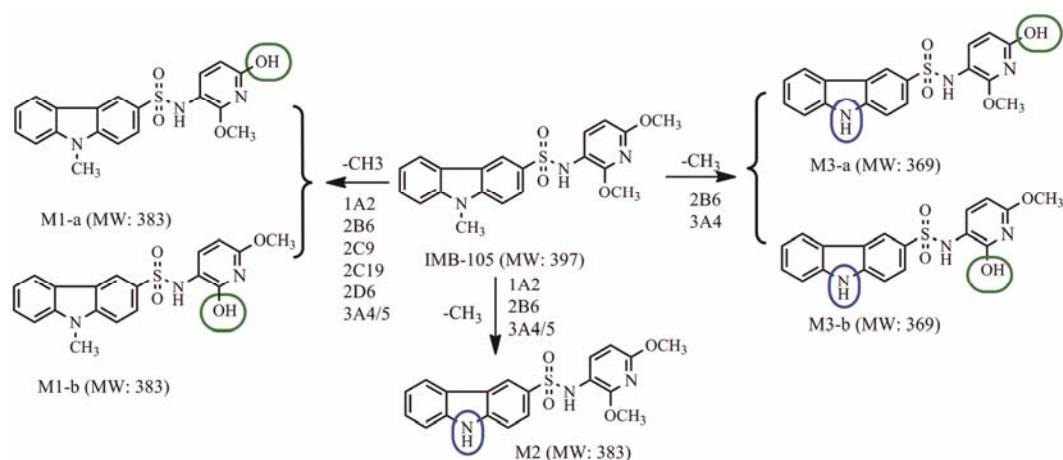


Figure 4 The proposed *in vitro* metabolic pathways of IG-105 in human liver microsomes

6.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、CYP2D6 ($\text{IC}_{50}=1.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 CYP3A ($\text{IC}_{50}=3.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 具有中度的抑制作用, 对 CYP2C19 具有较强的抑制作用 (IC_{50} 为 $0.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。因此本研究结果提示, 那些主要被 CYP1A2、CYP2C19、CYP2D6、CYP3A 代谢解毒的药物与 IG-105 合用时应格外注意药物相互作用。

小结

在代谢性药物相互作用中, 药物扮演两类角色, 既是药物代谢酶的底物, 又可能是药物代谢酶的抑制剂。联合用药时, 若一种药物被单一 P450 酶代谢, 而另一种药物强烈抑制这种 P450 酶的活性, 则第一种药物因代谢通路受阻, 血药浓度升高, 一旦血药浓度超过治疗窗, 毒性随即发生。因此, 研究药物的代谢性相互作用对于指导安全用药具有重要的意义。本研究重点采用体外代谢研究对 IG-105 代谢性药物相互作用的潜在可能进行了预测。

首先, 在体外代谢方面, P450 酶在 IG-105 的生物转化中起关键作用, 无论是从底物的消耗, 还是从产物的生成方面, 结果均显示 IG-105 可以被 CPY1A2、CYP2B6、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP3A4 和 CYP3A5 所代谢, 其中以 CYP1A2、CYP2B6、CYP2C19 和 CYP3A 为主要贡献, 代谢通路广泛, 当某种 P450 酶的催化活性受到抑制时, IG-105 的代谢受到显著影响的风险较低。研究发现了 3 个脱甲基代谢产物 M1~M3, 但对于代谢产物结构的鉴定尚需更多研究, 相关结果包括: ① M1 和 M3 均存在两个同分异构体, 代谢产物是哪一种同分异构体还需进一步确认; ② 对于已经寻找到的代谢产物仍需进一步借助其他光谱手段进行确证; ③ 目前的代谢产物谱可能不够完整, 仍需进一步扩充与完善。其次, 考察

了 IG-105 对主要 P450 酶的抑制作用, 结果显示 IG-105 对所测试的 P450 酶都具有一定的抑制作用, 其中对 CYP1A2、CYP2D6、CYP3A 具有中度抑制作用, 对 CYP2C19 具有较强的抑制作用, 因此与主要被这些 P450 酶代谢解毒的药物合用时应格外注意药物相互作用, 避免不良反应。

References

- [1] Hu L, Li ZR, Wang YM, et al. Novel pyridinyl and pyrimidinylcarbazole sulfonamides as antiproliferative agents [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2007, 17: 1193–1196.
- [2] Wang YM, Hu LX, Liu ZM, et al. *N*-(2,6-Dimethoxy-pyridine-3-yl)-9-methylcarbazole-3-sulfonamide as a novel tubulin ligand against human cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14: 6218–6227.
- [3] Jordan MA, Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs [J]. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4: 253–265.
- [4] Jordan MA. Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin [J]. *Curr Med Chem Anticancer Agents*, 2002, 2: 1–17.
- [5] Shang H, Pan L, Yang S, et al. Progress in the study of tubulin inhibitors [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2015, 50: 1309–1317.
- [6] Bhalla KN. Microtubule-targeted anticancer agents and apoptosis [J]. *Oncogene*, 2003, 22: 9075–9086.
- [7] Mollinedo F, Gajate C. Microtubules, microtubule-interfering agents and apoptosis [J]. *Apoptosis*, 2003, 8: 413–450.
- [8] Dumontet C, Sikic BI. Mechanisms of action of and resistance to antitubulin agents: microtubule dynamics, drug transport, and cell death [J]. *J Clin Oncol*, 1999, 17: 1061–1070.
- [9] Lee JJ, Low JA, Croarkin E, et al. Changes in neurologic

- function tests may predict neurotoxicity caused by ixabepilone [J]. *J Clin Oncol*, 2006, 24: 2084–2091.
- [10] FDA. Drug Interaction Studies-Study Design, Data Analysis, and Implications for Dosing and Labeling [EB/OL]. 2014-05-02 [2017-05-10]. <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm292362.pdf>.
- [11] Hedrich WD, Hassan HE, Wang H. Insights into CYP2B6-mediated drug-drug interactions [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2016, 6: 413–425.
- [12] Liu Q, Liu K. Advances in the study of enzymes and transporters-mediated pharmacokinetic mechanism for herb-drug interaction [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2015, 50: 406–412.
- [13] Funck-Brentano C, Becquemont L, Leneveu A, et al. Inhibition by omeprazole of proguanil metabolism: mechanism of the interaction *in vitro* and prediction of *in vivo* results from the *in vitro* experiments [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1997, 280: 730–738.
- [14] Walsky RL, Obach RS, Gaman EA, et al. Selective inhibition of human cytochrome P4502C8 by montelukast [J]. *Drug Metab Dispos*, 2005, 33: 413–418.
- [15] Hickman D, Wang JP, Wang Y, et al. Evaluation of the selectivity of *in vitro* probes and suitability of organic solvents for the measurement of human cytochrome P450 monooxygenase activities [J]. *Drug Metab Dispos*, 1998, 26: 207–215.
- [16] Wandel C, Kim RB, Guengerich FP, et al. Mibefradil is a P-glycoprotein substrate and a potent inhibitor of both P-glycoprotein and CYP3A *in vitro* [J]. *Drug Metab Dispos*, 2000, 28: 895–898.
- [17] Rae JM, Soukhova NV, Flockhart DA, et al. Triethylene-thiophosphoramidate is a specific inhibitor of cytochrome P450 2B6: implications for cyclophosphamide metabolism [J]. *Drug Metab Dispos*, 2002, 30: 525–530.