

• 研究论文 •

吡咯里嗪类非甾体抗炎药 ML-3000 衍生物对人 P450 同工酶的体外抑制作用

崔涛^{1,2}, 曾勇^{2*}, 梅林雨², 高晶², 伊秀林², 司端运²

1. 天津中医药大学, 天津 300193

2. 天津药物研究院 天津市新药安全评价研究中心, 天津 300193

摘要:目的 研究吡咯里嗪类 ML-3000 及其两种 NO 供体衍生物 ML-4000 和 ML-5000 对人 P450 同工酶 CYP2D6、CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19 和 CYP3A4 的体外抑制作用。方法 采用 Gentest 公司的高通量 P450 酶抑制剂筛选试剂盒(High throughput Inhibitor Screening Kit), 测定 ML-3000、ML-4000 和 ML-5000 对五种 P450 同工酶 CYP2D6、CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19 和 CYP3A4 的体外抑制作用。结果 ML-3000、ML-4000 和 ML-5000 抑制 CYP3A4 的 IC₅₀ 分别为 7.07、0.40、2.82 μmol/L, 对其他 4 个酶(CYP1A2、CYP2D6、CYP2C9 和 CYP2C19)的 IC₅₀ 均大于 10 μmol/L。结论 3 种化合物对 CYP3A4 活力均有抑制作用, 其中 ML-4000 的抑制能力最强。3 种化合物对其他 4 个酶基本没有抑制作用。

关键词: 肝细胞色素 P450; NO 供体化合物; IC₅₀

中图分类号: R969.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2013)04-0249-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2013.04.003

In vitro inhibition of ML-3000 derivatives in non-steroidal anti-inflammatory drugs of pyrrolizine on human cytochrome P450 isozymes

CUI Tao^{1,2}, ZENG Yong², MEI Lin-yu², GAO Jing², YI Xiu-lin², SI Duan-yun²

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Tianjin Centre for Drug Safety Assessment, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To investigate the inhibition of ML-3000 and two NO donor derivatives in pyrrolizine on five human cytochrome P450 isozymes CYP2D6, CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, and CYP3A4. **Methods** Inhibition of ML-3000, ML-4000, and ML-5000 on five human cytochrome P450 isozymes CYP2D6, CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, and CYP3A4 was determined with High Throughput Inhibitor Screening Kit. **Results** IC₅₀ values of ML-3000, ML-4000, and ML-5000 to CYP3A4 were 7.07, 0.40, and 2.82 μmol/L, respectively. IC₅₀ values of ML-3000, ML-4000, and ML-5000 to others were more than 10 μmol/L. **Conclusion** Three compounds have the inhibitory effects on CYP3A4. Among them, ML-4000 has the strongest inhibition. The three compounds show no inhibition on the other four enzymes.

Key words: cytochrome P450; NO donor compound; IC₅₀

ML-3000 是一种吡咯里嗪类的非甾体抗炎药(NSAIDs), 由德国 Merckle 公司开发的环氧化酶(COX)和 5-脂氧合酶(5-LOX)双重抑制剂, 主要是通过抑制 COX 和 5-LOX 的共用底物——花生四烯酸发挥解热、镇痛、抗炎作用, 目前正在进行临床研究阶段。ML-4000 和 ML-5000 是以 ML-3000 为母核, 分别引入侧链硝酸丁酯和硝酸丙酯(化学结构见图 1), 主要目的是希望在体内酯酶的作用下

主要水解成 ML-3000, 同时释放 NO。释放的 NO 在血液中发挥着对心血管和胃肠道的保护作用, 从而减少了 NSAIDs 的副作用, 能够成为新型的非甾体抗炎药。

肝细胞色素 P450 是存在于肝脏微粒体混合功能氧化酶系的主要成分, 是一组由许多同工酶组成的超基因大家族, 对许多内源、外源性化合物在体内的 I 相生物转化有重要作用, 是药物代谢中起着

收稿日期: 2013-04-27

作者简介: 崔涛, 女, 硕士研究生, 研究方向为药代动力学。Tel: 13821697465 E-mail: cuitao2010@yahoo.com.cn

*通信作者 曾勇, 男, 副研究员, 研究方向为药代动力学。Tel: (022)84845243 E-mail: zengy@tjipr.com

最重要作用的代谢酶类。人类与肝脏药物代谢密切相关的同工酶有 CYP2D6、CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19 和 CYP3A4^[1]等, 如果某个药物对 P450s 有抑制作用, 临床应用时就可能对同时服用的其他药物产生相互作用, 目前国内外已经把药物与 CYP450 同工酶相互作用的研究列为新药申报必须进行的一项实验。

本课题组采用 Gentest 公司的高通量 P450 酶抑制剂筛选试剂盒 (High throughput Inhibitor Screening Kit), 测定了 ML-3000 及两种 NO 载体化合物 ML-4000 和 ML-5000 对 5 种 P450 同工酶 CYP2D6、CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19 和 CYP3A4 的体外抑制活性。

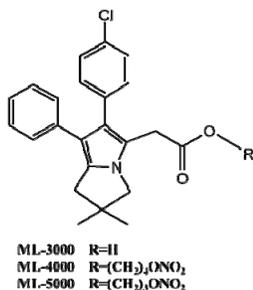


图1 ML-3000, ML-4000 和 ML-5000 的结构式

Fig. 1 Structures of ML-3000, ML-4000 and ML-5000

1 材料

1.1 药物

ML-3000, 质量分数 99.41%, 批号 070604; ML-4000, 质量分数 97.33%, 批号 070604; ML-5000, 质量分数 99.41%, 批号 070611; 3 种药物均由天津药物研究院化学制药部提供。实验使用试剂均为分析纯, 水为双蒸水。

1.2 试剂

分装的高通量 P450 酶抑制剂筛选试剂盒 (每份试剂够一块 96 孔板用量) 均为 Gentest 公司出品。CYP2D6/AMMC 高通量筛选试剂盒 (批号 43742), 阳性对照为 25 $\mu\text{mol/L}$ 的奎尼丁 (quinidine)。CYP1A2/CEC 高通量筛选试剂盒 (批号 48128), 阳性对照为 5 mmol/L 的 furallyline 乙腈溶液。CYP2C9/MFC 高通量筛选试剂盒 (批号 46274), 阳性对照为 500 $\mu\text{mol/L}$ 的磺胺苯吡唑 (sulfaphenazole) 乙腈溶液。CYP2C19/CEC 高通量筛选试剂盒 (批号 43744), 阳性对照为 5 mmol/L 的反苯环丙胺 (tranylcypromine) 乙腈溶液。CYP3A4/BFC 高通量筛选试剂盒 (批号 48126), 阳

性对照为 250 $\mu\text{mol/L}$ 的酮康唑 (ketoconazole) 乙腈溶液, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.3 主要仪器

Zenyth 1100 多功能扫描仪, 奥地利 Anthos 公司出品; 荧光专用 96 孔板 (全黑), Costar 公司出品。

2 方法

2.1 待测药物对 CYP2D6/AMMC 酶抑制实验

2.1.1 溶液配制 (1) 将 25 mL 的去离子水及一管缓冲液在 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中预热。其余试剂融化后放冰浴上备用。(2) 取 Cofactor 1.375 mL 和 G6PDH 1.1 mL, 加入预热的水 8.570 mL, 混匀, 配成辅助因子液 11.045 mL。(3) 取 9.25 mL 的辅助因子液和 385 μL 乙腈, 配成 9.635 mL 的辅助因子/CAN 液。(4) 取 2D6 酶液 0.9 mL 和 AMMC 底物液 0.9 mL 加入到 8.994 mL 缓冲液中, 配成 10.794 mL 的 Enzyme/Substrate。(5) 称取适量待测药物, 以乙腈溶解并稀释至 1 mmol/L。

2.1.2 荧光测定 在 96 孔板中设 A、B 行为阳性对照组, C、D 行为 ML-3000 组, E、F 行为 ML-4000 组, G、H 行为 ML-5000 组, 第 9~12 列为空白组, 每组上下行为复孔。在 96 孔板第 1 列每孔加入 144 μL 的辅助因子。在第 2~12 列每孔加入 100 μL 的辅助因子/CAN。在样品所对应行的第 1 列加入 6 μL 的 1 mmol/L 待测药物乙腈溶液, 用 Pipetter 吸打 3~5 次混匀。在阳性对照 quinidine 所对应行的第 1 列加入 6 μL 的 quinidine 乙腈溶液, 用 Pipetter 吸打 3~5 次混匀。

在样品和 quinidine 所对应行的第 1~8 列逐级进行 3 倍稀释, 即从第 1 列吸 50 μL 加到第 2 列混匀, 再从第 2 列吸 50 μL 加到第 3 列混匀……以此类推, 将第 8 列吸出的 50 μL 丢弃。

盖上 96 孔板, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中预热 10 min。在样品和 quinidine 所对应行的第 1~10 列每孔加入 100 μL 的 Enzyme/Substrate, 加液时液滴成线不成滴并混匀。待测药物终浓度分别为 20 000、6 667、2 222、741、247、82.3、27.4 和 9.14 $\mu\text{mol/L}$ 。

盖上 96 孔板, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中恒温反应 30 min。在样品和 quinidine 所对应行的第 1~12 列每孔加入 75 μL 的终止液并混匀。在样品和 quinidine 所对应行的第 11~12 列每孔加入 100 μL 的 Enzyme/Substrate, 混匀。

在荧光扫描仪上读出 96 孔板的荧光强度值 (激发波长 390 nm, 发射波长 460 nm)。

2.1.3 数据处理 平行样取平均值, 9、10 孔平均值平均, 11、12 孔平均值平均。各孔值减去同行 11、12 孔平均值, 所得值除以同行 9、10 孔平均值减去 11、12 孔平均所得的值。计算所得的值即为样品和 quinidine 各对应浓度的剩余活性(%), 以样品浓度的对数值对剩余活性作图, 找到最接近 50%酶活力的上下值 (high%和 low%) 以及相对应的样品浓度 (high con.和 low con.), 按以下公式计算 IC_{50} 。

$$IC_{50} = \frac{(50\% - low\%) \times (high\ con. - low\ con.)}{(high\% - low\%)} + low\ con.$$

2.2 待测药物对其他酶的抑制实验

采用其他酶的试剂盒, 按上述 2.1 的方法测定待测药物对其他酶的 IC_{50} , 荧光测定的波长分别为: CYP1A2 (激发波长 410 nm, 发射波长 460 nm)、

CYP2C9 (激发波长 410 nm, 发射波长 530 nm)、CYP2C19 (激发波长 410 nm, 发射波长 460 nm)、CYP3A4 (激发波长 410 nm, 发射波长 538 nm)。

3 结果

阳性对照药物和待测药物对 CYPs 的体外抑制实验结果分别见表 1 和表 2。表 1 结果显示在本试验条件下, 5 种已知的专一性抑制剂均对各自对应的酶有显著抑制作用, IC_{50} 分别为 17.8、2 225、327、4 536、61.2 nmol/L。抑制剂浓度越低对酶活性的抑制作用越弱, 酶活性越高, 证明了本实验方法的可靠性。表 2 结果显示 ML-3000、ML-4000 和 ML-5000 均对 CYP3A4 的活力有抑制 (IC_{50} 分别为 7.07、0.40 和 2.82 $\mu\text{mol/L}$), 对 CYP2D6、CYP1A2、CYP2C9 和 CYP2C19 活力基本没有抑制作用, IC_{50} 均 $>10 \mu\text{mol/L}$ 。

表 1 阳性对照药对 CYPs 的抑制实验结果

Table 1 Inhibition of positive control drugs on CYPs

2D6		1A2		2C9		2C19		3A4	
酶活性/%	Qui/(nmol·L ⁻¹)	酶活性/%	Fur/(nmol·L ⁻¹)	酶活性/%	Sul/(nmol·L ⁻¹)	酶活性/%	Tra/(nmol·L ⁻¹)	酶活性/%	Ket/(nmol·L ⁻¹)
—	500	0.6	100 000	—	10 000	7.7	100 000	1.5	5 000
7.0	166.7	4.8	33 333	—	3 333	8.0	33 333	8.2	1 667
21.5	55.6	17.5	11 111	26.6	1 111	19.5	11 111	11.0	555.6
50.3	18.5	33.3	3 704	46.9	370.4	56.9	3 704	32.1	185.2
112	6.17	69.3	1 235	74.0	123.5	115	1 235	49.7	61.7
79.6	2.06	132	411.5	109	41.2	141	411.5	91.6	20.6
88.2	0.69	84.2	137.2	93.3	13.7	149	137.2	141	6.86
117	0.23	165	45.7	77.4	4.57	157	45.7	117	2.29

表 2 ML-3000、ML-4000 和 ML-5000 对 CYPs 的 IC_{50}

Table 2 IC_{50} of ML-3000, ML-4000 and ML-5000 on CYPs

药物	$IC_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$				
	2D6	1A2	2C9	2C19	3A4
ML-3000	>10	>10	>10	>10	7.07
ML-4000	>10	>10	>10	>10	0.40
ML-5000	>10	>10	>10	>10	2.82

4 讨论

传统 NSAIDs 抑制花生四烯酸代谢过程中的关键酶 COX, 使前列腺素合成减少, 从而发挥解热、镇痛和抗炎作用。但其对 COX 的抑制作用无选择性, 同时抑制 COX-1 及 COX-2。抑制 COX-2 发挥解热、镇痛、抗炎作用, 抑制 COX-1 则会出现胃肠道、肾脏毒性等不良反应。抑制 COX 途径, 阻断花生四烯酸生成前列腺素的同时会开通花生四烯酸

经 5-LOX 的代谢途径, 增加了引起血管收缩的急、慢性炎症反应物质——白三烯, 改变血管渗透性, 并且通过损伤微血管、收缩胃血管、破坏黏膜屏障、刺激胃酸分泌的作用, 增加胃黏膜损伤的敏感性, 加重了胃肠道损害^[2]。COX/5-LOX 双重抑制剂具有和 COX 抑制剂等效或增强的抗炎作用, 同时避免其胃肠损伤、肾毒性, 以及心血管副作用。

ML-3000 是 COX/5-LOX 双重抑制剂, 同时阻断 COX 和 5-LOX 发挥抗炎作用, 并可减轻 NSAIDs 相关的胃肠道毒性^[3]。目前, ML-3000 正在进行 III 期临床研究。有文献报道^[4-7], ML-3000 有抗炎、镇痛、解热及抗血小板活性。ML-4000、ML-5000 分别为 ML-3000 的硝酸丁酯及硝酸丙酯, 入血后在代谢酶的作用下, 转化为 ML-3000 发挥解热、镇痛、抗炎作用, 并释放 NO 保护胃黏膜、急性心肌梗死等, 减轻 NSAIDs 引起的不良反应。

ML-3000, ML-4000 和 ML-5000 对 5 种 CYP 酶的体外抑制实验结果表明, 3 种药物对 CYP3A4 活力有抑制作用 (IC_{50} 分别为 7.07、0.40、2.82 $\mu\text{mol/L}$), 尤其是 ML-4000, 对 CYP3A4 活力抑制 $IC_{50} < 1.0 \mu\text{mol/L}$, 应在以后的研究中对其可能的与其他药物的相互作用多予以关注。ML-3000、ML-4000 和 ML-5000 对其他 4 个酶 (CYP1A2、CYP2D6、CYP2C9 和 CYP2C19) 的 IC_{50} 均 $> 10 \mu\text{mol/L}$, 基本没有抑制作用。

参考文献

- [1] Bjornsson T D, Callaghan J T, Einolf H J, *et al.* The conduct of *in vitro* and *in vivo* drug-drug interaction studies: a Pharmaceutical research and manufacturers of America (PhRMA) perspective [J]. *Drug Metab Dispos*, 2003, 31(7): 815-832.
- [2] Funk C D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoids biology [J]. *Science*, 2001, 294(5548): 1871-1875.
- [3] Fiorucci S, Meli R, Bucci M, *et al.* Dual inhibitors of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. A new avenue in anti-inflammatory therapy [J]. *Biochem Pharmacol*, 2001, 62: 1433-1438.
- [4] Laufer S, Tries S, Augustin J, *et al.* Acute and chronic anti-inflammatory properties of [2, 2-dimethyl 1-(4-chlorophenyl)-7-phenyl-2, 3-dihydro-1H-pyrrolizine-5-yl]-acetic acid [J]. *Arzneimittelforschung*, 1995, 45(1): 27-32.
- [5] Abraham W M, Laufer S, Tries S. The effects of ML3000 on antigen-induced responses in sheep [J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 1997, 10 (3): 167-73.
- [6] Rotondo S, Krauze-Brzosko K, Manarini S, *et al.* Licofelone, an inhibitor of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase, specifically inhibits cyclooxygenase-1-dependent platelet activation [J]. *Eur J Pharmacol*, 2004, 488(1-3): 79-83.
- [7] Singh V P, Patil C S, Kulkarni S K. Anti-inflammatory effect of licofelone against various inflammatory challenges [J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2006, 20(1): 65-71.