



哺乳类药物代谢的微生物模型概念

杨 顺 楷

(中国科学院成都生物研究所, 成都)

合成药物化学中微生物方法学的应用带来了革命性的变化。1952年, Peterson 和 Murray 报道了应用霉菌完成对黄体酮的 11 α -羟基化反应, 从而使抗炎抗风湿皮质激素药物可的松的合成取得了突破性的进展, 导致建立了以化学法和微生物发酵法相结合的甾体医药工业体系。这是合成化学史上的又一个里程碑^[1]。

在甾体化合物微生物转化取得成功的基础上, 目前这一套研究手段及其研究思想方法都已经扩展到研究药理学和毒理学领域内的课题。本文介绍在药物化学中微生物转化作用的新进展及有关哺乳类药物代谢的微生物模型概念。

药物化学发展的新趋向

目前, 药物化学已经从单纯地“药物合成有机化学”发展到应用多种手段达到合理地合成治疗剂的新阶段。这个新阶段的到来, 主要依赖于对药物与有机体生物学系统相互作用关系的逐步了解, 以及对其它研究领域的了解。在合成中结合应用可取的化学和生物学手段可有助于达到合成符合要求的药物的目的。药物构效关系的研究提出了母体药物结构修饰与改变其生物学作用(功效, 毒性)的关系, 药物作用机理的阐明有助于高效低毒新药的设计。在此基础上, 当前在药物化学中具有重要意义的一个领域——药物代谢研究就成了热点。

大多数药物在哺乳类有机体内被转化为称作代谢物的化学物质。这些化学物质主要都是经由肝脏酶系统催化形成的代谢产物。这类酶叫做细胞色素 P-450 单加氧酶系统(原名叫混合功能氧化酶), 它催化各种有机底物的氧化。这类酶是可诱导的。有机体(哺乳类或微生物)

在对外界化学性异物(Xenobiotics)的代谢中, 这类酶起着十分重要的作用, 日益引起人们的关注^[2]。传统的观点认为, 药物在有机体内自动地转化为低活性或较低毒性的代谢物。然而, 现在已经知道某些药物和其它化学药品在机体内可以被生物学活化, 也就是说, 所形成的代谢物对母体药物来说具有更高的活性或更强的毒副作用。这样, 药物分子结构在体内的变化就成为药物化学工作中很有意义的课题。对药物代谢途径了解得愈清楚, 就愈能有效地控制所需要反应位置上的代谢路线。药物代谢研究已成为当今新药研制工作的重要组成部分。事实上, 有些已经发现的新药, 基本上都是从哺乳类代谢物中检测出来的^[3]。哺乳类形成的相对少量的代谢产物, 即使能够通过极端复杂的仪器设备检测出来, 但想要搜集到足够数量的代谢产物用以完成化学分析和生物学评价仍存在着相当大的困难。例如, 评价代谢产物在药物的整体生物学效应中所起的作用, 就需要足够数量的代谢物进行试验。即使制备适当数量的简单代谢物是可行的, 但要制备比较复杂的药物分子代谢物, 就必需涉及大量时间、精力和物质原料的耗费。于是, 寻找一种有效的制备药物代谢物的方法学问题就提出来了^[4]。

哺乳类药物代谢的微生物模型

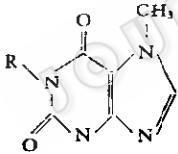
1973年, Smith 和 Rosazza 提出的哺乳类代谢的微生物模型概念, 使得微生物转化手段及其研究的思想方法进入到药理学和毒理学的研究领域, 推动了药物代谢的研究^[5]。本概念可定义为使用微生物模拟在高等动物(包括人)所观察到的代谢途径。与一般使用动物进行代谢研究相比较, 其明显的优点是, 实验过程容易

操作,代谢物的制备规模易于放大,可作为复杂的发散型途径或单一途径模式的可替代模型,还可在代谢研究中减少对实验动物的需求。这种系统在表述哺乳类代谢途径方面是有用的(回顾证实性或预测性)。因而,某些微生物,特别是真核类群的真菌和酵母被用来研究药物在人体内的转化代谢方面,看来是一种可行有效的手段,尤其是在一些难于合成的哺乳类药物代谢物方面,更具有独特的优点。

进行哺乳类代谢的微生物模型研究,包括下列几个主要阶段:定义所要进行的反应类型;选择供筛选研究的微生物菌株;建立药物和所预期的模式代谢物的分析方法;微生物筛选;发酵条件及其参数的最优化;制备规模实验。

现以 Pentoxifylline 黄嘌呤药物的微生物转化为例,说明应用微生物发酵法进行药物代谢的研究原理、制备一定数量的药物代谢物作结构鉴定及生物学评价^[6]。

Pentoxifylline [1-(5'-氧己基)-3,7-二甲基黄嘌呤]是国外用来治疗脑及外周血管疾患的一种血管扩张剂。在哺乳类(包括人体)代谢中,它主要被还原为醇代谢物(I)和氧化为羧酸类似物(IV)和(V)(图1)。按照哺乳类



- P $R=CH_2-(CH_2)_5-CO-CH_3$
 I $R=CH_2-(CH_2)_5-CHOH-CH_3$
 IV $R=CH_2-(CH_2)_5-COOH$
 V $R=CH_2-(CH_2)_5-COOH$

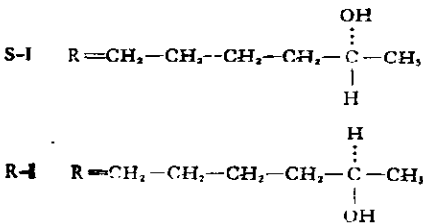


图1 Pentoxifylline (P), 醇代谢物(I), 羧酸代谢物(IV)、(V)及S-和R-Pentoxifylline 醇(S-I, R-I)的结构式

代谢的微生物模型概念,微生物发酵法被用来

研究该药物的代谢,本方法的目的是获得足够数量的药物代谢物,进行生物学评价和结构解析。根据母体药物的化学结构,可以预测出该微生物转化反应类型属于侧链酮基还原,及继续被氧化代谢为羧酸。根据文献,选择了14株对酮型基质具有还原能力的微生物,包括真菌、酵母和细菌作为筛选研究的出发菌株。用薄层层析(TLC)和高效液相色谱(HPLC)法测定在微生物液体培养物中黄嘌呤药物及其三种代谢物(包括一种醇代谢物(I)和二种羧酸代谢物)。测定结果表明,所用的分析方法具有良好的准确度和精密度,这就为微生物筛选、发酵条件及其参数最优化和制备性实验提供了灵敏可靠的检测手段^[7]。

通过微生物筛选研究,发现在选择的14株菌中,有13株能还原该药物为醇代谢物(I),其中两株菌还能继续氧化酮型侧链为羧酸代谢物(IV)和(V)。根据HPLC和TLC的分析结果,选出一株红酵母(*Rhodotorula rubra* ATCC 20129)进行制备性实验,其产物经用柱层析、制备性TLC和半制备性的HPLC分离纯化,所得纯化产物经熔点、质谱和质子磁共振(PMR)谱测定,产物的结构鉴定为醇代谢物(I),产率为40%;其中两株菌还产生低浓度水平的羧酸代谢物(IV)和(V)(2—10%)。通过微生物转化产生的三种主要代谢产物,与哺乳类对该药物代谢形成的主要代谢物(I),(IV)和(V)相同,结果证实了哺乳类代谢的微生物模型概念^[8]。

在制备实验获得近100mg醇代谢物(I)的基础上,又进行了Pentoxifylline微生物代谢中酮型基质还原立体专一性的研究^[9]。内容包括利用旋光色散谱(ORD)和PMR技术,通过对Pentoxifylline醇及其同手性试剂R-(+)- α -甲氧- α -(三氟甲基)苯基乙酸(MTPA)化学衍生形成的酯化物研究,决定了由微生物还原所生成的醇代谢物(I)的绝对构型;还建立了对外消旋Pentoxifylline醇的R-(+)-MTPA酯的反相HPLC拆分非对映体的方法。根据色谱峰流出顺序,还可以测定出13株具有还原

Pentoxifylline 能力的微生物所形成的醇代谢物 (I) 的立体化学纯度, 其分析结果表明, 有 5 株微生物呈现完全的 S-醇立体选择性, 2 株呈现外消旋醇 (RS-醇)。建立起来的这套方法学扩展了微生物模型概念, 并在推动哺乳类立体-分化生物转化中将是有用的研究手段。

前景展望

十多年来, 国外对这个研究领域已经奠定了较坚实的基础。近几年, 通过微生物转化发酵产生难于合成的哺乳类代谢物的例子, 证明了应用本方法学的有效性。不论在工业界或学术界都乐于采用微生物转化手段解决药理和毒理学方面的难题; 生物有机化学工作者对使用这种生物技术催化某些合成反应的兴趣也逐渐浓厚。毫无疑问, 在这些方面还有许多工作要做。例如, 模型研究应该着手进行微生物和哺乳类的 S-和 N-氧化作用、O-葡糖醛酸化作用和酯胺水解之间的平行比较试验。这样就必然导致药物化学中微生物转化的更大规模的应用。可以预料, 作为药物代谢研究的一种模式手段

——微生物学转化作用, 是一种非常有用的研究方法学, 无论从纯学术进取或应用目的方面, 都存在着巨大的潜在力, 其发展前景是无比广阔的^[10]。

参 考 文 献

- [1] Peterson, D. H. and H. C. Murray.: *J. A. C. S.*, 74: 1871, 1952.
- [2] Smith, R. V. and P. J. Davis.: *Adv. Biochem. Eng.*, 14: 61, 1980.
- [3] Davis, P. J.: *Mycology*, P. 215—218, 1983.
- [4] Rosazza, J. P., and R. V. Smith.: *Adv. Appl. Microbiol.*, 25: 169, 1979.
- [5] Smith, R. V., and J. P. Rosazza.: *J. Pharm. Sci.*, 65: 1737, 1975.
- [6] Smith, R. V., and J. P. Rosazza.: edited by J. P. Rosazza, in *Microbial transformations of bioactive Compounds*, Vol. II, P. 1—42, 1982.
- [7] Smith, R. V., S.-K. Yang, P. J. Davis and M. T. Bauza: *J. Chromatogr.* 281: 281, 1983.
- [8] Davis, P. J., S.-K. Yang and R. V. Smith: *Appl. Environ. Microbiol.*, 48: 327, 1984.
- [9] Davis P. J., S.-K. Yang, and R. V. Smith. *Xenobiotica*, 15: 1001, 1985.
- [10] Smith, R. V., and J. P. Rosazza.: *J. Nat. Prod.*, 46: 79, 1983.