

Активность препаратов, действующих на GPCR-рецепторы, зависящая от метаболизма кишечной микробиоты человека

Получена: 2 апреля 2024 г.

Принята в печать: 24 февраля 2025 г.

Опубликована онлайн: 3 апреля 2025 г.

Проверка наличия обновлений

Qihao Wu^{1,2,6,7}, Deguang Song^{3,7}, Yanyu Zhao^{1,2}, Andrew A. Verdegaal^{4,5}, Tayah Turocy^{1,2}, Brianna Duncan-Lowey^{1,3}, Andrew L. Goodman^{1,4,5}, Noah W. Palm^{1,3} и Jason M. Crawford^{1,2,4}

Опосредованный микробиотой метаболизм лекарственного препарата может влиять на его фармакологическую эффективность. Авторами проведено системное сравнительное метаболомное исследование способов метаболизма лекарственных препаратов путем оценки влияния комменсальных бактерий кишечника человека на 127 препаратов, действующих на рецепторы, сопряженные с G-белком (GPCR). В данном исследовании изучали как традиционные, так и нетрадиционные способы трансформации наиболее интенсивно метаболизируемых лекарственных препаратов, а также активность соответствующих метаболитов. Сравнение метаболизма лекарственных препаратов, протекающего в присутствии сообщества кишечных микроорганизмов и отдельных их видов, выявило как таксон-специфические, так и общие процессы, которые влияют на активность метаболизируемых препаратов, действующих на GPCR. Также была обнаружена микробная инактивация илоперидона с образованием нестандартных метаболитов. Комменсальные бактерии кишечника человека действовали совместно, встраивая серу в виде тиофенового мотива, тогда как бактерии *Morganella morganii* для включения трициклических систем на основе аминокислот в лекарственные метаболиты использовали каскадную реакцию. Результаты исследования выявили обширное влияние комменсальных бактерий кишечника человека на структуру и активность препаратов-регуляторов GPCR, осуществляемое путем различных опосредованных микробиотой биотрансформаций.

Рецепторы, сопряженные с G-белком (GPCR), представляют собой большую семью рецепторов клеточной поверхности, которые преобразуют внешнюю химическую информацию во внутриклеточные сигнальные процессы и вовлечены в развитие различных заболеваний¹. Их фармакологическая доступность и хорошо изученные сайты связывания делают GPCR самым интенсивно изучаемым классом мишеней лекарственных препаратов². В настоящее время имеется более 400 одобренных FDA лекарственных препаратов, действующих более чем на 100 GPCR рецепторов, при этом еще больше таких препаратов находится в стадии разработки или клинических исследований²⁻⁴. Лекарственные препараты, действующие на GPCR, занимают существенную долю мирового рынка лекарственных средств, с объемом продаж, превышающим 180 миллиардов долларов США в год⁵. Таким образом, понимание внутренних и внешних факторов, влияющих на эффективность препаратов-регуляторов GPCR, а также разработка новых стратегий для ускорения создания перспективных лекарственных средств имеют важное клиническое значение^{6,7}.

Фармакокинетика и фармакодинамика лекарственных препаратов значительно варьируют у разных людей под влиянием таких факторов, как возраст⁸, генетические особенности^{9,10} и рацион питания¹¹. Широко распространенной проблемой с серьезными последствиями для пациентов остается различная реакция на лекарственные препараты, которая может приводить к отсутствию клинического улучшения, опасным нежелательным реакциям и длительному

подбору дозировки методом проб и ошибок¹². Кроме того, более 75 % лекарственных препаратов подвергаются химическим модификациям, превращаясь в метаболиты с различными функциональными профилями^{13,14}, что делает лекарственный метаболизм ключевым фактором, влияющим на результаты лечения^{13,15}. Хотя традиционно печень считалась основным органом для исследований лекарственного метаболизма¹⁶, в последнее время стали признавать важную роль кишечной микробиоты в этом процессе¹⁷⁻²³. Это сложное сообщество, состоящее из триллионов микроорганизмов и вирусных частиц, обладает значительным генетическим разнообразием и способностью продуцировать ферменты²⁴⁻²⁷. Прием человеком лекарственных препаратов изменяет микробную среду, создавая конкурентное давление и влияя на биодоступность и всасывание лекарств^{28,29}. Таким образом, понимание молекулярного вклада кишечной микробиоты в метаболизм лекарственных препаратов является ключевым для улучшения разработки лекарственных препаратов, индивидуального подбора лечения и повышения эффективности терапии в фармацевтической индустрии.

¹Кафедра химии Йельского университета, Нью-Хейвен, Коннектикут, США. ²Институт биомолекулярного проектирования и открытий, Йельский университет, Вест-Хейвен, Коннектикут, США. ³Кафедра иммунобиологии, Школа медицины Йельского университета, Нью-Хейвен, Коннектикут, США.

⁴Кафедра микробиологии и инфекционных заболеваний, Школа медицины Йельского университета, Нью-Хейвен, Коннектикут, США. ⁵Институт микробиологии, Йельский университет, Вест-Хейвен, Коннектикут, США. ⁶Текущий адрес: кафедра фармацевтических наук, Питтсбургский университет, Питтсбург, Пенсильвания, США. ⁷Следующие авторы в равной степени принимали участие в работе: Цихао У, Дэгуан Сун

✉ адрес электронной почты: andrew.goodman@yale.edu; noah.palm@yale.edu; jason.crawford@yale.edu

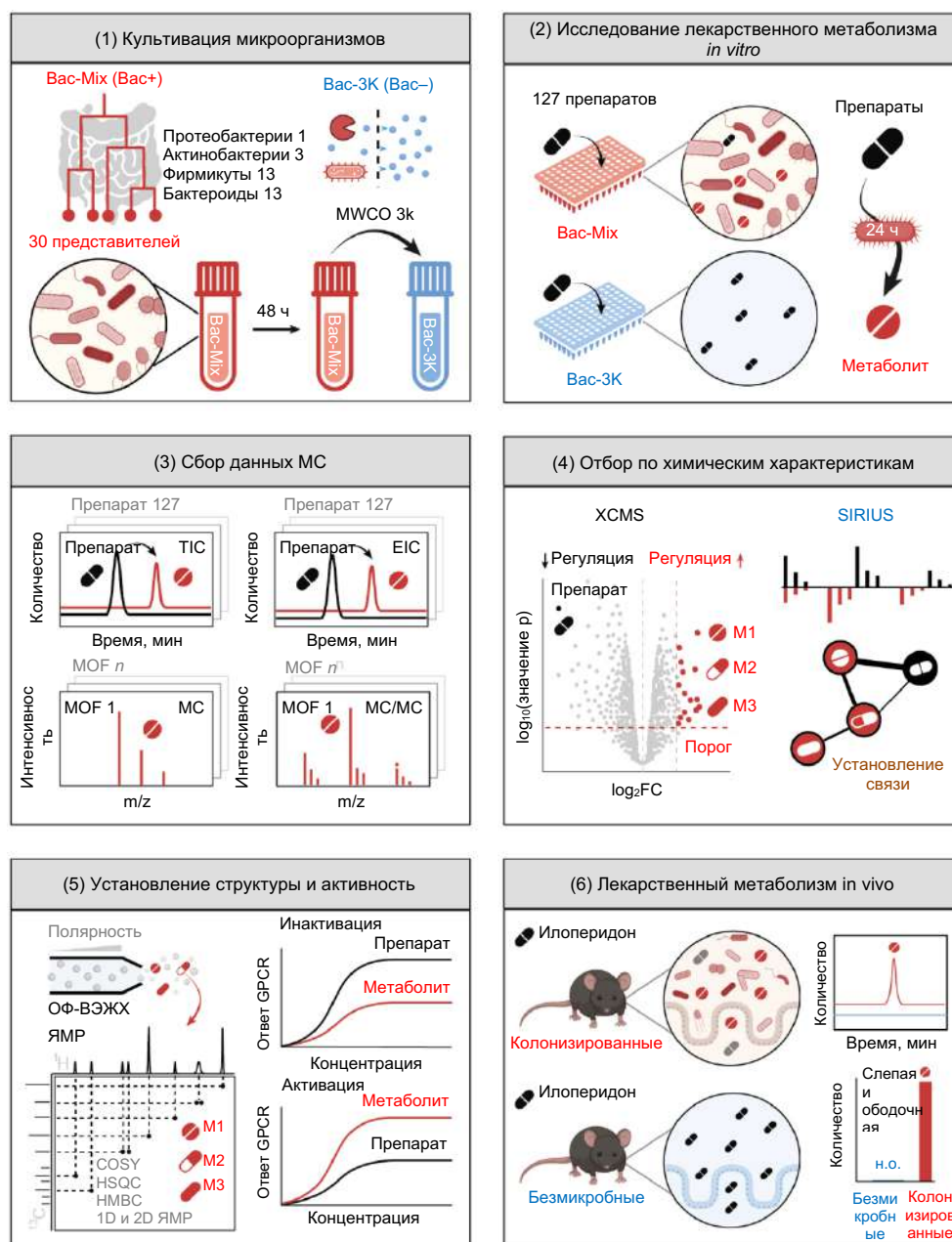


Рис. 1 | Рабочий процесс изучения химических взаимодействий между комменсальной микробиотой кишечника человека и препаратами, действующими на GPCR.

ОФ-ВЭЖХ, обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография; н.о., не обнаружено.

Участие микробиоты кишечника в метаболизме лекарственных препаратов систематически изучали несколько групп исследователей^{17,18,30–32}. Например, Javdan и соавт. и Zimmermann и соавт. проводили метаболические исследования при помощи культур бактерий кишечника человека *ex vivo* и/или монокультур изолятов бактерий кишечника человека для изучения метаболизма 300–500 лекарственных препаратов, одобренных Управлением по пищевым продуктам и лекарственным средствам США^{17,18}. В исследовании Zimmermann и соавт. бактерии кишечника человека, принадлежащие к различным монофилетическим группам, показали способность метаболизировать до двух третей (176 из 271) препаратов¹⁷. Такие исследования демонстрируют значительную способность микробиоты кишечника человека разрушать скелеты целого ряда лекарственных препаратов путем химических реакций. Тем не менее, за исключением нескольких отдельных примеров, остается в значительной степени неизученным более широкое влияние этих микроорганизмов на определенные структуры лекарственных метаболитов и связанные с ними активности.

В исследовании применяли платформу скрининга метаболизма препаратов-регуляторов GPCR, адаптированную с учетом влияния кишечной микробиоты (рис. 1). Скрининг был нацелен на два ключевых аспекта: во-первых, расшифровку специфических трансформаций лекарственных метаболитов, осуществляемых кишечными бактериями; во-вторых, изучение влияния этих структурных трансформаций на активность препаратов в моделях тканевой культуры для изучения активности в отношении GPCR. Изучение воздействия сообщества из 30 штаммов кишечных бактерий на 127 препаратов-регуляторов GPCR помогло охарактеризовать не менее 3 810 возможных отдельных взаимодействий, а также многоступенчатые метаболические пути. Результаты исследования дают представление на молекулярном уровне о сложном взаимодействии между препаратами, действующими на GPCR, микробиотой кишечника человека и обусловленными GPCR сигнальными процессами. Выявленные в данной работе способы метаболизма могут быть полезны в исследовании лекарственных препаратов, вносить вклад в разработку новых лекарств, оптимизацию клинической эффективности и персонализацию медицинских стратегий.

Результаты

Интенсивный метаболизм 12 из 127 препаратов-регуляторов GPCR, осуществляемый комменсальными бактериями кишечника

В исследовании использовали коллекцию разнообразных комменсальных бактерий кишечника человека, которую применяли в исследовании лекарственного метаболизма Zimmermann и соавт.¹⁷, а также несколько дополнительных штаммов для увеличения метаболического и филогенетического разнообразия (выбор штамма и его обоснование описаны в дополнительной информации, раздел 1). Данное синтетическое бактериальное сообщество культивировали в анаэробных условиях при температуре 37 °C в течение 48 ч. Каждый лекарственный препарат (всего 127) в количестве 10 мкМ индивидуально добавляли к культурам и фильтратам, не содержащим клеток/ферментов, в трех повторностях, после чего проводили инкубацию в течение 24 ч (детали эксперимента представлены в разделе «Методы»). Относительные уровни лекарственных препаратов для обоих условий эксперимента определяли с помощью жидкостной хроматографии / масс-спектрометрии (ЖХ/МС). Данные масс-спектрометрии (МС) для каждого анализа лекарственного метаболизма приводили к показателю, обозначенному как «потребление препарата» (см. раздел «Методы»), который количественно определял долю препарата, метаболизированного кишечной микробиотой, по сравнению с контрольным образцом, не содержащим клеток/ферментов. Чтобы исключить простое разложение препарата во время инкубации в сложной истощенной питательной среде, лекарственный препарат считался метаболизируемым, если значение «потребления препарата» выходило за рамки снижения на 20 % по сравнению с контрольным образцом, не содержащим клеток/ферментов. Согласно этим строгим критериям, 30 препаратов (24 %) сочли метаболизируемыми, и только 12 препаратов (9,4 %, 12/127; рис. 2с и расширенные данные рис. 2) показали интенсивный уровень метаболизма («потребление препарата» $\geq 80\%$;

рис. 2с). Из этих 30 метаболизируемых препаратов 10 являлись агонистами (33,3 %), составляя в панели из 127 выбранных препаратов более высокую долю — 20,5 % (26/127).

Влияние опосредованных метаболизмом структурных мотивов на активность в отношении GPCR-рецепторов

Высокие уровни метаболизма ($\geq 80\%$), выявленные у 12 препаратов в этом исследовании, указывали на возможность влияния кишечной микробиоты на активность этих препаратов-регуляторов GPCR. Поэтому авторы стремились изучить специфические механизмы метаболизма лекарств и активность их метаболитов. С образцами истощения препарата ($t = 24$ ч, бактериальная культура и препараты после инкубации в течение 24 ч) и образцами, собранными до начала метаболизма лекарственного препарата ($t = 0$ ч, бактериальная культура и препараты без инкубации), проводили исследования активности в отношении GPCR при помощи метода PRESTO-Tango^{33,34} (расширенные данные, рис. 3). Из 12 исследованных препаратов с высоким уровнем метаболизма 5 (41,7 %; илоперидон, понесимод, озанимод, азилсартан медоксомил и GSK1292263) продемонстрировали функциональную корреляцию между истощением препарата и снижением активности в отношении GPCR (инактивация, $-\log_2$ (кратность изменения (fold change, FC) значений EA_{50} через 24 ч по сравнению со значениями EA_{50} через 0 ч) ≤ -2); 3 из них (25,0 %; селексипаг, триметобензамид и SB756050) показали корреляцию между истощением препарата и увеличением активности в отношении GPCR (активация, $-\log_2$ (FC значений EA_{50} через 24 ч по сравнению со значениями EA_{50} через 0 ч) ≥ 2), при этом 4 препарата (33,3 %; фезотеродин, тримепутин, сарпогрелат и олмесартан медоксомил) не проявили заметных различий активности в этом анализе (рис. 2d). В целом, комменсальные бактерии кишечника влияли на функциональность лекарственных препаратов, что побудило авторов проанализировать химические характеристики 127 препаратов панели для выявления у метаболизированных препаратов устойчивых структурных мотивов.

Рис. 2 | Скрининг микробного метаболизма лекарств позволяет определить устойчивые изменения сродства к рецепторам, связанные с определенными структурными мотивами.

a, Химическое разнообразие 127 проанализированных препаратов, действующих на GPCR (обозначены красными точками), в сравнении с остальными 346 зарегистрированными препаратами, связывающимися с GPCR (синие точки) и 10 799 лекарственными препаратами (серые точки, данные из DrugBank). ОК, основной компонент. **b**, Коллекция бактерий содержит 30 штаммов, включая 1 штамм протеобактерий, 3 – актинобактерий, 13 – фирмикутов и 13 бактериоидов. Количественный анализ состава приведен в Дополнении рис. 1. **c**, Число препаратов, метаболизированных до пяти пороговых значений потребления. Всего 12 препаратов были метаболизированы на уровне выше, чем 80 % (выделены красным). **d**, Оценка влияния микробного метаболизма лекарств на активность в отношении GPCR при помощи анализа необработанных экстрактов метаболитов. Изменения активности оценивали с использованием нормализованного показателя FC значений EA_{50} (определение EA_{50} приведено в разделе «Методы»). Значения FC определяли путем сравнения значения EA_{50} до лекарственного метаболизма ($t = 0$ ч) со значением EA_{50} после лекарственного метаболизма ($t = 24$ ч). Из 12 препаратов, метаболизированных бактериями, красным цветом выделены три, что указывает на активацию со значениями $\log_2 FC \geq 2$.

Пять препаратов, которые были инактивированы, выделенные синим цветом, поскольку их значения $\log_2 FC \leq -2$. **e**, Метаболизм лекарственного препарата и изменения активности устойчиво связаны с определенными структурными мотивами. Иерархический кластерный анализ (HCA) 127 препаратов, действующих на GPCR, основанный на структурном сходстве с использованием химических отпечатков алгоритма Morgan. Внутренний слой (L1) тепловой карты отображает потребление лекарственных препаратов. Исследуемые препараты с общими структурными мотивами идентифицированы и обозначены цветом для наглядности. Внешний слой (L2) отображает определенные структурные мотивы, присущие лекарственным препаратам. Препараты, содержащие сложные эфиры, отмечены оранжевым цветом, амиды — фиолетовым, O-метильные группы ароматических соединений — зеленым, а препараты, содержащие 1,2,4-оксадиазол или изоксазол — синим. Понесимод изображен серым цветом. Хотя деградация ситаксентана в образцах Vas^+ была выше по сравнению с контролем, не содержащим клеток/ферментов, уровни обнаружения исходного препарата (менее 5×10^5) оставались низкими в обоих случаях, что подтверждает преимущественно неферментативный механизм деградации. По этой причине данный препарат не изучали дополнительно. **f**, Химическая структура 12 препаратов, действующих на GPCR, отобранных на основе скрининга.

(≥ 64 -кратное снижение; рис. 2d). Это говорит о том, что сниженная активность обусловлена модификацией их общих гетероциклических мотивов (рис. 2e). Более того, метаболизм азилсартана медоксомила, обладающего двойной функциональностью благодаря медоксомиловому эфиру и 1,2,4-оксадиазолу, аналогичным образом приводил к примерно 70-кратному снижению активности препарата (рис. 2d). Поскольку олмесартана медоксомил, не содержащий оксадиазольную группу, сохраняет после метаболизма заметную активность, снижение активности азилсартана медоксомила вероятно связано с деградацией его 1,2,4-оксадиазольного мотива (рис. 2e). Селексипаг, являющийся пролекарством и не отнесенный ни к одной из групп, продемонстрировал 32-кратную активацию (рис. 2d), что подтверждает его преобразование в активную форму. Наблюдаемое увеличение активности (в 7 раз; рис. 2d) SB756050 и триметобензамида, которые содержат несколько ароматических *O*-метильных групп (рис. 2e), указывает на деметилирование, как возможный механизм повышения активности, учитывая зарегистрированные у микробиоты кишечника человека случаи *O*-деметилирования ароматических соединений^{35–39}.

Кишечные бактерии и человеческий организм имеют общие пути метаболизма лекарственных препаратов

Поскольку у 12 препаратов с интенсивным уровнем метаболизма наблюдалась корреляция между активностью в отношении GPCR, структурой исходного препарата и его истощением (рис. 2f), авторы сосредоточились на идентификации образующихся при этом метаболитов. Для лекарственных препаратов, содержащих сложноеэфирные группы, разложение посредством гидролиза сложных эфиров является одной из наиболее распространенных модификаций⁴⁰. Как и ожидалось, были легко идентифицированы пять метаболитических трансформаций, соответствующих препаратам, содержащим эфирные/амидные функциональные группы. К ним отнесли гидролиз сложного эфира сарпогеллата⁴¹, фезотеродина⁴², олмесартана медоксомила⁴³ и азилсартана медоксомила⁴⁴. Кроме того, наблюдался гидролиз *N*-ацилсульфонамидной группы селексипага, приводящий к образованию зарегистрированного активного метаболита, АСТ-333679 (ссылка 45). Структуры метаболитов подтверждали путем сравнения со стандартами, полученными в результате химических реакций гидролиза исходных препаратов и/или из доступных коммерческих источников (сравнение времени удерживания и результатов тандемной масс-спектрометрии (МС/МС); дополнение, рис. 2). Подобные биотрансформации лекарственных препаратов ранее были описаны в рамках метаболизма хозяина; однако данное исследование подтверждает, что микробиота кишечника осуществляет аналогичные метаболитические преобразования этих пяти препаратов.

Влияние различных путей микробного метаболизма на активность лекарственных препаратов

Далее для выявления ранее не описанных путей лекарственного метаболизма были применены методы сравнительной метаболомики^{46,47} (семь оставшихся препаратов, подвергшихся интенсивному метаболизму; дополнение, таблицы 4–10). При этом сначала идентифицировали присутствие метаболитов, зависящих от лекарств и бактерий, чтобы связать эти продукты с выявленными различиями активности в отношении GPCR. При помощи сравнительной метаболомики анализировали образцы с бактериальными клетками (Vac^+) и контрольные образцы, не содержащие клеток/ферментов (Vac^-), которые по отдельности обрабатывали семью препаратами с интенсивным уровнем метаболизма и отслеживали образование новых продуктов, а также истощение препарата (расширенные данные, рис. 4). Статистически значимые ($-\log_{10}(\text{значение } P) \geq 2$) молекулярные компоненты, имеющие в образцах Vac^+ повышенную активность по сравнению с Vac^- ($\log_2(FC) \geq 4$) были идентифицированы как кандидаты в метаболиты, зависящие от прямых взаимодействий между бактериями и лекарствами (рис. 3a). Сигналы кандидатов проверяли вручную, что позволило выявить уникальные метаболиты с заметной интенсивностью в образцах Vac^+ , при этом в образцах Vac^- наблюдали их следовое количество или полное отсутствие (расширенные данные, рис. 5). Эти наблюдения свидетельствуют о том, что данные метаболиты

являются результатом ферментативных реакций, а не спонтанной деградации в условиях клеточной культуры. В принципе, такой подход может быть использован для выявления индуцированных лекарственным препаратом клеточных метаболитических ответов.

Для определения химической структуры метаболитов изучали разницу масс между каждым специфичным для лекарственного препарата кандидатом в бактериальные метаболиты и самим препаратом. При сравнении этих метаболитов с исходными лекарственными препаратами, выявляли общие различия в массе между исходными препаратами и специфичными для них кандидатами в метаболиты в ходе нескольких лекарственных трансформаций (рис. 3b и дополнение, рис. 3). Далее проводили МС/МС анализ метаболитов и анализировали данные вручную, а также с помощью платформы Спектральной идентификации изучаемых соединений по единой структуре (Spectral Identification of Research Compounds by Unified Structure, SIRIUS)^{48,49}, чтобы облегчить аннотирование МС/МС фрагментных ионов. Предполагаемые химические структуры метаболитов, подтвержденные этим анализом, приведены на рис. 3c. В частности, *O*-деметилирование с различной степенью выраженности наблюдали у всех трех препаратов, содержащих *O*-метильные группы (SB756050, триметобензамид и тримебутин). Чтобы подтвердить эти предположения были выделены три основных метаболита препарата SB756050. Их структура была подтверждена при помощи метода спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) в одномерном (1D) и двумерном (2D) режимах (дополнение, рис. 258–269). Согласно с повышенной по сравнению с исходным препаратом активностью в неочищенном микробном экстракте с добавлением SB756050, при анализе системой PRESTO-Tango эти лекарственные метаболиты показали более выраженную активность, чем SB756050 (дополнение, рис. 276). Были идентифицированы два метаболита понесимода, содержащие восстановленный иминовый мотив, на что указывает наличие двух хроматографических пиков (расширенные данные, рис. 5b) с соотношением 1:1. Это свидетельствует о возможном существовании диастереомеров (расширенные данные, рис. 9). Что касается GSK1292263 и озанимода, восстановление их 1,2,4-оксадиазольных мотивов приводило к образованию соответствующих ациламидных метаболитов (дополнение, рис. 13 и 17). Затем ациламидные продукты подвергались кислотному гидролизу, что приводило к образованию в обоих метаболитах мочевиного мотива (дополнение, рис. 14 и 18). Структуру продукта ациламидного восстановления препарата GSK1292263 верифицировали путем сравнения его времени удерживания и профиля фрагментирования МС² с синтетическим стандартом (расширенные данные, рис. 8a–d). Кроме того, была подтверждена сниженная активность этого метаболита как агониста GPR119 по сравнению с препаратом GSK1292263 (расширенные данные, рис. 8e). Установлено, что восстановление иминовой, изоксазольной и 1,2,4-оксадиазольной функциональных групп препаратов понесимод, илоперидон и озанимод/GSK1292263/азилсартана медоксомила соответственно изменяет их фармакофоры, приводя к снижению активности (рис. 2d). Также отмечено, что по сравнению с препаратами SB756050 и триметобензамид продукты их *O*-деметилирования обладают повышенной активностью (рис. 2d), что указывает на механизм, отличающийся от установленных ранее путей активации пролекарства посредством гидролиза сложного эфира⁴⁰. В связи с выявлением этих модификаций данные скрининга метаболизма первоначальных препаратов были повторно проанализированы на предмет аналогичных биотрансформаций препаратов со схожими функциональными группами. В ходе этого анализа выявили гидролиз сложных эфиров у кандесартана цилексетила⁴⁰ (дополнение, рис. 291), ницерголина⁵⁰ (дополнение, рис. 280), препарата МК-0557 (дополнение, рис. 278) и клопидогрела⁵¹ (дополнение, рис. 282), а также *O*-деметилирование доксазолина⁵² (дополнение, рис. 246–249).

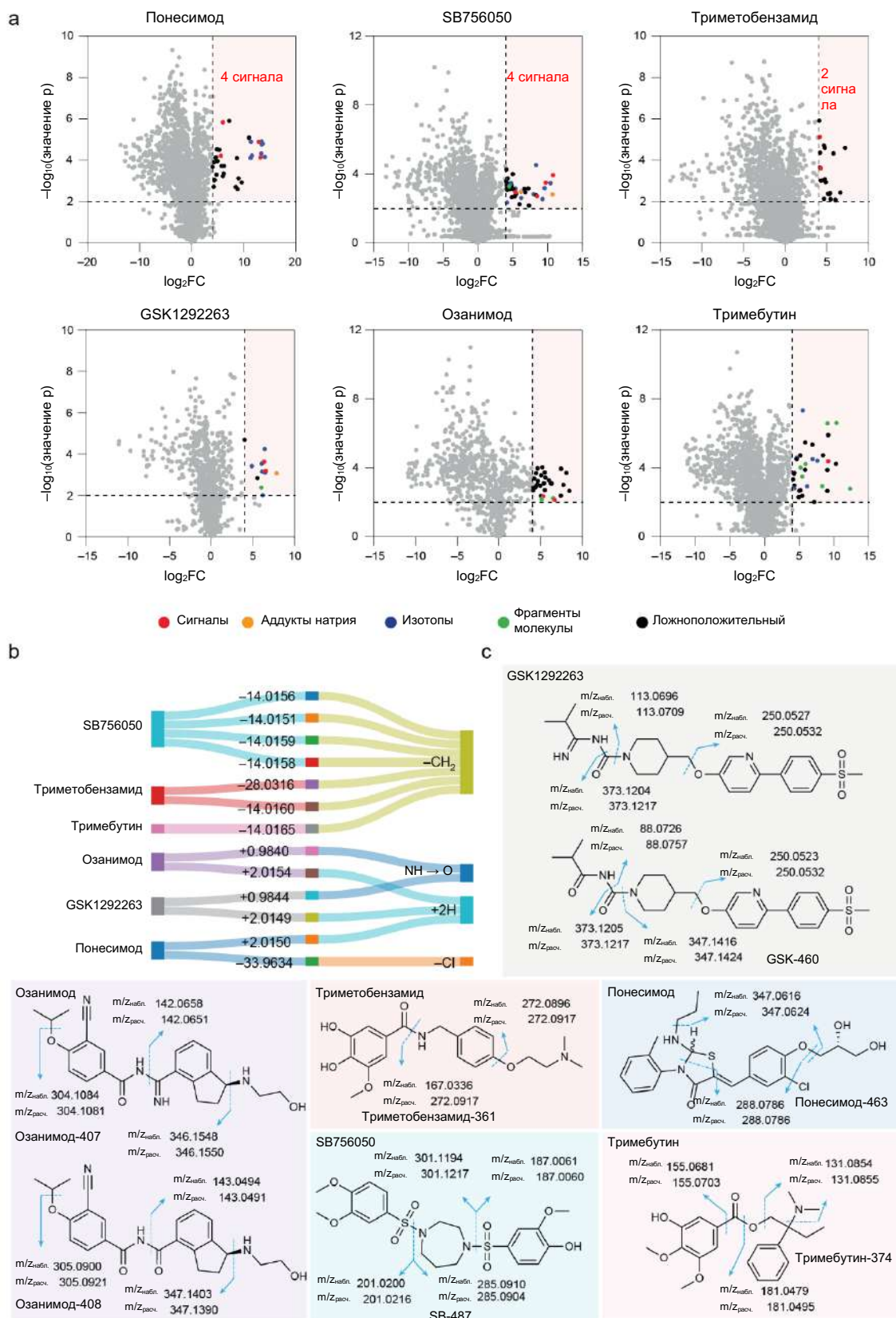


Рис. 3 | Определение структуры метаболитов указывает на изменение активности шести лекарственных препаратов, обусловленное нестандартными путями метаболизма.

a, Отбор метаболитов лекарственных препаратов на основе сравнительной метаболомики с использованием анализа вулканической диаграммы (volcano plot). Область в верхнем правом квадранте, соответствующую пороговым значениям $x \geq 4$ ($FC \geq 16$) и $y \geq 2$ ($P \geq 0,01$), выделяли цветом для отделения потенциальных сигналов молекулярных компонентов. Статистическую значимость определяли при помощи двустороннего t -критерия.

После проверки вручную приоритет получили верифицированные сигналы (обозначены красными точками; расширенные данные, рис. 5а), при этом другие молекулярные компоненты были исключены из дальнейшего анализа. Исключенные молекулярные компоненты включали аддукты натрия (фиолетовые точки), изотопы (синие точки), фрагменты метаболитов (зеленые точки) и ложноположительные молекулярные характеристики (черные точки). **b**, диаграмма Сэнки (Sankey) иллюстрирует соответствующие каждому препарату различия в массе, а также возможные структурные модификации. **c**, Предложенная MS/MS фрагментация для репрезентативных метаболитов шести препаратов на основе MS/MS анализа. *набл.* — наблюдаемое значение; *расч.* — рассчитанное значение.

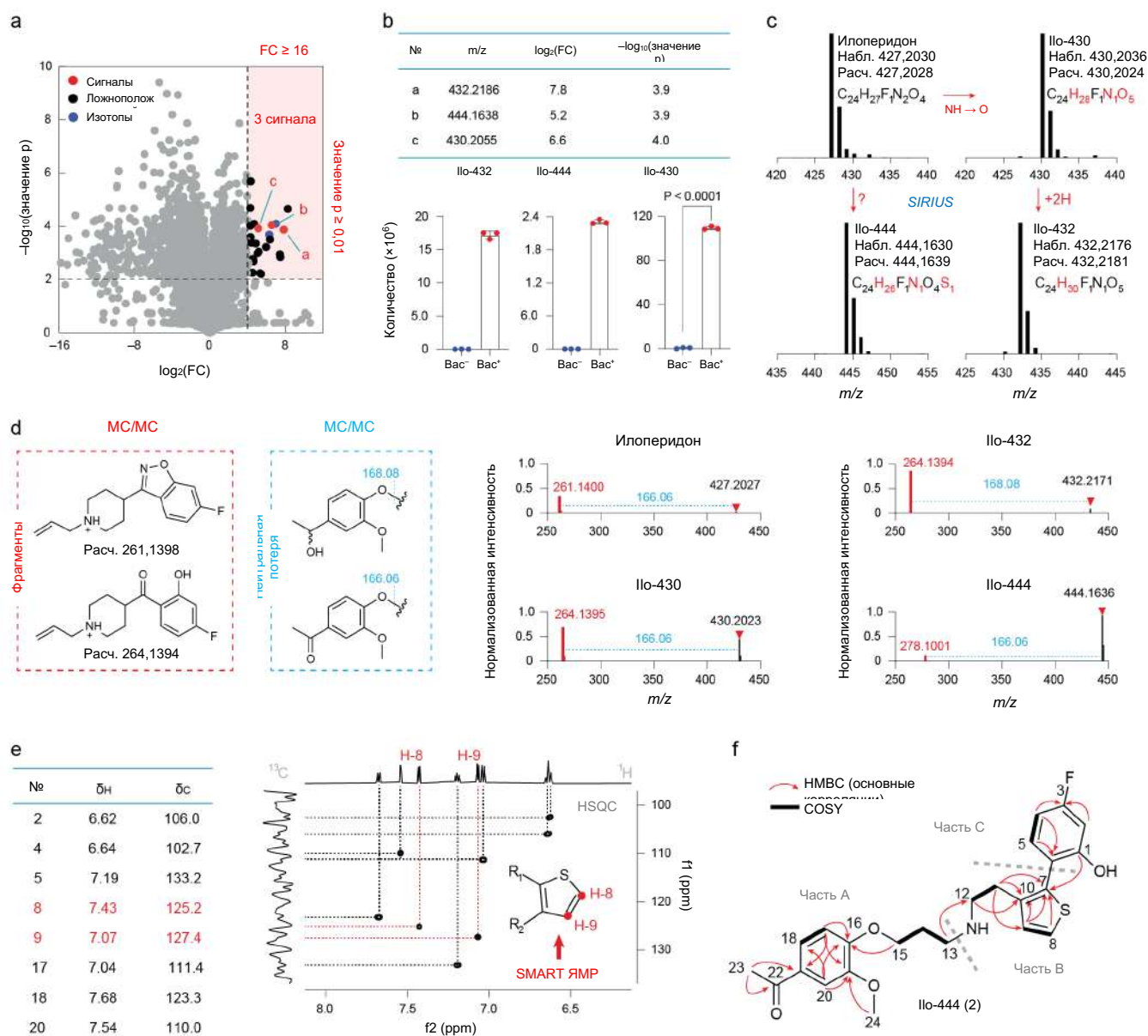


Рис. 4 | Сравнительный метаболомный анализ выявил нетрадиционный путь метаболизма илоперидона.

a, На вулканической диаграмме (volcano plot) показана кратность изменения (FC) (молекулярные компоненты образцов Vac^+ по сравнению с Vac^-) и значения P , полученные методом жидкостной хроматографии и квадрупольно-временноразрешенной масс-спектрометрии (LC-QTOF-MS) в режиме регистрации положительных ионов для илоперидона в диапазоне молекулярных компонентов с пороговыми значениями $x \geq 4$ ($FC \geq 16$) и $y \geq 2$ ($P \geq 0,01$). После ручной проверки и верификации приоритет был отдан трем значимым сигналам (**a**, m/z 432,2186; **b**, m/z 444,1638; **c**, m/z 430,2055). **b**, Хроматограммы экстрагированных ионов (EICs) для трех молекулярных компонентов (слева — m/z 432, в центре — m/z 444, справа — m/z 430) в образцах Vac^+ и Vac^- показали, что эти продукты лекарственного метаболизма выявлялись только в присутствии бактерий. $n = 3$ биологические повторности. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение. Статистическую значимость определяли при помощи двустороннего t -критерия № — номер; н.о. — не обнаружено.

c, Различия в массе между илоперидоном и его предполагаемыми метаболитами. Молекулярные формулы были подтверждены с помощью программного обеспечения SIRIUS. **d**, При помощи анализа MC/MC фрагментов и нейтральных потерь установили структуру двух молекулярных компонентов (ilo-430 и ilo-432). Молекулярный компонент ilo-444 был определен как метаболит, поскольку имел идентичный с илоперидоном профиль нейтральных потерь. **e**, Определение неидентифицированных сигналов фрагмента ilo-444 как тиофенового мотива (часть B). Другие сигналы ароматического кольца были определены как структурные фрагменты (части A и C) ilo-444 путем сравнительного анализа с его модельным соединением ilo-430. **f**, ^{13}C ppm; f_2 , 1H ppm. **f**, Установление структуры ilo-444 на основе анализа данных спектроскопии ЯМР. Основные корреляции, определенные методом HMBC (гетероядерной многосвязной корреляционной спектроскопии), показаны красными стрелками, а корреляции, определенные методом COSY (гомоядерной корреляционной спектроскопии), обозначены жирными черными линиями.

Перестройка тиофенов в результате метаболизма илоперидона и рисперидона.

В ходе анализа путей метаболизма илоперидона методами сравнительной метаболомики выявили три молекулярных компонента (рис. 4a, b). Положительная разница массы в 3,0006 Да у метаболита илоперидона ilo-430 указывает на гидролиз изоксазола (рис. 4c). Этот процесс идентичен гидролизу изоксазола, который был обнаружен у структурного аналога, рисперидона (расширенные данные, рис. 9), и был ранее описан в исследованиях микробного метаболизма^{17,18}. Дальнейшее увеличение массы метаболита илоперидона ilo-432 на 2,014 Да по сравнению с ilo-430 указывает на реакцию гидрирования (+2H; расширенные данные, рис. 9)^{53,54}. Хотя

структуры большинства выявленных во время скрининга метаболитов можно было предварительно определить при помощи MC/MC и подтверждающего анализа, третий метаболит илоперидона, ilo-444 (m/z 444,1639; рис. 4a, b), потребовал значительных усилий для установления его структуры. Любопытно, что в молекулярной формуле ilo-444 неожиданно был обнаружен атом серы (рис. 4c), что было подтверждено изотопным профилем молекулярного иона, который аналогичным образом при анализе фрагмента распознала система SIRIUS. Чтобы установить химическую структуру ilo-444, для очистки продуктов метаболизма илоперидона использовали управляемую масс-спектрометрией (MC) процесс разделения.

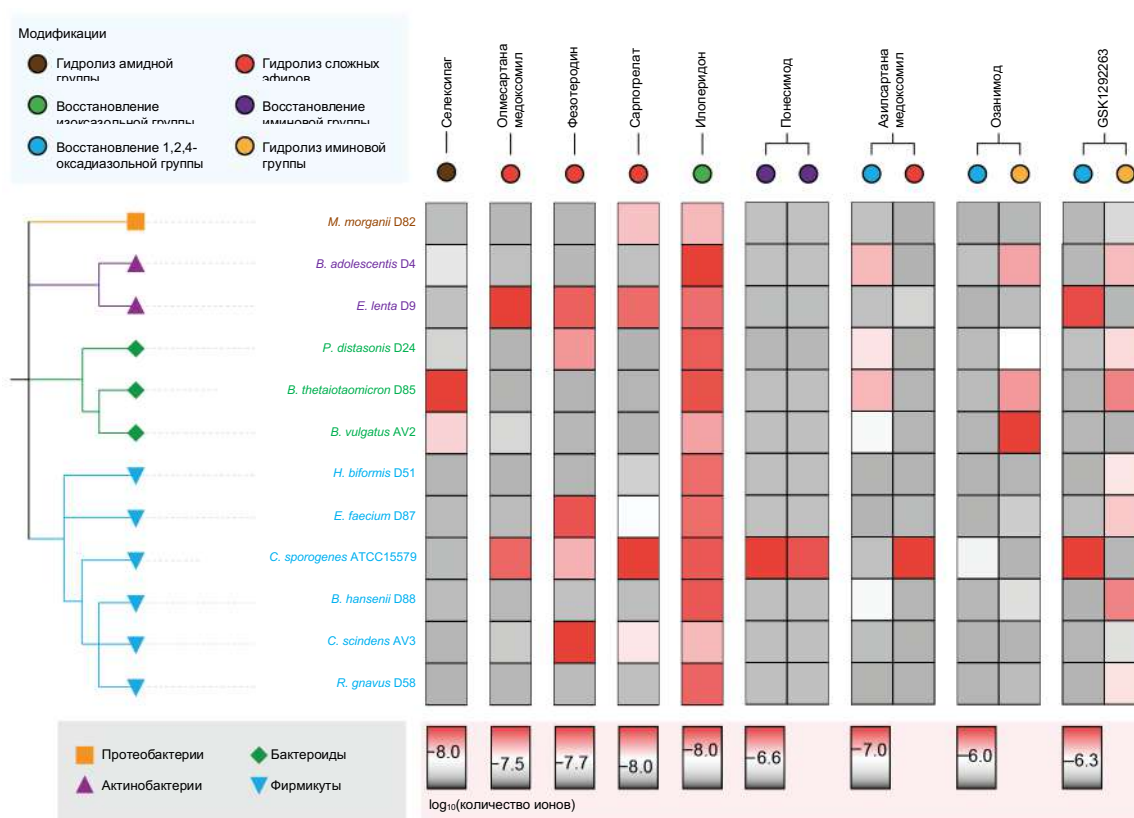


Рис. 5 | Картирование метаболизма лекарственных препаратов, осуществляемого отдельными видами бактерий.

Для изучения метаболизма лекарственных препаратов в монокультурах из коллекции бактерий было отобрано двенадцать изолятов, представляющих соответствующие им клады. Протеобактерии, оранжевый цвет; Актинобактерии, фиолетовый цвет; Бактероиды, зеленый цвет; Фирмикуты, синий цвет.

Различные типы метаболизма обозначали разными цветами. Для сравнения между таксономическими группами на тепловой карте отображено относительное количество ионов метаболитов для каждого препарата, полученного из монобактериальных культур для исследования лекарственного метаболизма.

Поскольку для основного продукта метаболизма илоперидона, iIo-430, данные о спектрах ЯМР отсутствовали, при помощи метода МС/МС (рис. 4d) и анализа спектров ЯМР было проведено de novo определение структуры для обоих метаболитов, iIo-430 и iIo-444 (рис. 4e, f и расширенные данные, рис. 8g; подробности изложены в дополнительной информации). Подобные исходному препарату сигналы подтвердили наличие двух отдельных субструктур (части A и C; рис. 4f). Сравнение спектров ЯМР с использованием технологии точного распознавания малых молекул (Small Molecule Accurate Recognition Technology, SMART)⁵⁵ показало сходство двух новых сигналов ($\delta_n = 7,43$, $\delta_c = 125,2$ и $\delta_n = 7,07$, $\delta_c = 127,4$) с тиофеновым мотивом (часть B; рис. 4f), что соответствует присутствию атома серы (рис. 4e и дополнение, рис. 71). Полностью структуру скелета iIo-444 установили посредством интерпретации перекрестных пиков, полученных при гетероядерной многосвязной корреляционной спектроскопии (НМВС) (рис. 4e, f). Метаболит iIo-444 является продуктом сложного и ранее не описанного механизма метаболизма лекарственных препаратов микробиотой кишечника человека. Предположительно восстановление изоксазольного мотива приводит к раскрытию кольца и образованию iIo-430 как основного продукта. При использовании в качестве субстрата метаболита iIo-430, содержащего реактивный карбонильный фрагмент (RCS), неизвестный источник серы^{56–58} (например, H₂S или другой низкомолекулярный тиоловый донор) может привести к образованию гемитиоацетального мотива путем формирования C–S связи⁵⁸. После дегидратации, образования дополнительной C–S связи и этапов окисления может сформироваться конечный продукт, метаболит iIo-444 (расширенные данные, рис. 7a). Изучение метаболизма комменсальных бактерий кишечника человека на предмет аналогичных илоперидону результатов инкубации смеси препарат/бактерии показало, что респеридон также подвергается метаболизму с образованием соответствующих тиофеновых продуктов (дополнение, рис. 78). Эффективным

использование микробиотой источников серы демонстрирует различные механизмы переработки ксенобиотиков на основе реактивных карбонильных соединений (RCS).

Специфичный для таксономических групп и осуществляемый микробным сообществом метаболизм лекарственных препаратов.

После оценки 12 интенсивно метаболизируемых препаратов, действующих на GPCR, и их активности, выявленной в ходе первичного скрининга на уровне микробного сообщества, был проведен вторичный скрининг, в ходе которого оценивали метаболизирующую способность отдельных бактериальных изолятов из каждой клады в рамках определенного бактериального сообщества. Для анализа были выбраны 12 изолятов, включая 1 штамм протеобактерий, 2 штамма актинобактерий, 6 – фирмикутов и 3 бактериоидов. Эти изоляты представляли соответствующие клады и использовались для изучения метаболизма лекарственных препаратов (рис. 5, расширенные данные, рис. 6a и дополнение, рис. 79). При вторичном скрининге выявляли присущие отдельным видам/изолятам закономерности для большинства обнаруженных модификаций. Модификации лекарственных препаратов были связаны с конкретными бактериальными видами за исключением процессов деметилирования (SB756050, триметобензамид и тримебутин; дополнение, рис. 81) и дехлорирования (понесимод; дополнение, рис. 82). Результаты показали, что за эти модификации может отвечать по меньшей мере один из 18 неотобранных представителей бактериальной коллекции. Большинство штаммов фирмикутов обладали значительной способностью к метаболизму лекарственных препаратов путем гидролиза сложноэфирных связей, при этом наиболее активен был *Clostridium sporogenes* ATCC15579 (рис. 5).

Один из штаммов актинобактерий, *Eggerthella lenta* D9, продемонстрировал активность, сопоставимую с *C. sporogenes*. С другой стороны, штаммы бактериоидов были ответственны за гидролиз селексипага (расширенные данные, рис. 6e).

Несмотря на отсутствие явных закономерностей в метаболизме озанимода и GSK1292263, *C. sporogenes* проявлял наибольшую активность в отношении восстановления 1,2,4-оксадиазольной группы (расширенные данные, рис. 6g, h). Особенно интересное явление, указывавшее на совместное воздействие изолятов, обнаруживали в случае понесимода. В ходе исследования было выявлено интенсивное восстановление иминовой группы понесимода, осуществляемое *C. sporogenes* (расширенные данные, рис. 6i), при этом не наблюдалось дехлорирования (дополнение, рис. 82). Наличие продуктов восстановления и дехлорирования в присутствии бактериального сообщества указывает на то, что *C. sporogenes* мог катализировать процесс восстановления, тогда как один или несколько других штаммов отвечали за дехлорирование.

Анализ взаимосвязи между изменениями активности лекарственных препаратов и бактериальной таксономией, показал, что за активацию селексипага, вероятно, ответственные штаммы бактериоидов. *C. sporogenes* участвовал в восстановлении нескольких фармакофоров, что привело к снижению активности лекарственных препаратов. Инактивация илоперидона происходила главным образом через открытие изоксазольного кольца, поскольку было обнаружено, что все отобранные бактерии метаболизировали илоперидон с образованием ilo-430. Восстановление кетона с образованием ilo-432 (рис. 4d) обнаружили в присутствии трех штаммов фирмикутов, при этом *C. sporogenes* продемонстрировал наиболее выраженную активность⁵⁹ (расширенные данные, рис. 6j). Кроме того, три штамма фирмикутов, вместе со штаммом бактериоидов и *Morganella morganii* проявили способность синтезировать атипичные тифозные продукты, (расширенные данные, рис. 6j), вероятно, через промежуточный метаболит ilo-430 (расширенные данные, рис. 7a).

***M. morganii* инактивирует илоперидон, используя определенные аминокислоты**

Культуры *M. morganii* D82 демонстрировали сравнительно низкий уровень метаболита ilo-430, несмотря на интенсивный метаболизм илоперидона (рис. 6a), что указывает на наличие альтернативных путей биотрансформации. Сравнительный метаболомный анализ (рис. 6b) опосредованного *M. morganii* D82 метаболизма илоперидона, (образцы *MmD82*⁺ по сравнению с *MmD82*⁻), выявил три дополнительных неидентифицированных ранее молекулярных компонента (ilo-491, ilo-477 и ilo-493; рис. 6c). Все три компонента были классифицированы как метаболиты илоперидона благодаря присутствию в их MS²-спектрах идентичной, специфической для илоперидона, нейтральной потери (166,06) (рис. 6c). Кроме того, эти метаболиты с помощью молекулярного сетевого анализа были определены как часть взаимосвязанного молекулярного семейства (рис. 6d), что было подтверждено высокой степенью сходства фрагментов⁶⁰. Дополнительный анализ с помощью программного обеспечения SIRIUS подтвердил, что три метаболита лекарственного препарата имеют схожие молекулярные формулы (дополнение, рис. 68–70) и показал, что метаболизм илоперидона происходит путем конъюгации с неидентифицированными структурными мотивами. Эти неожиданные результаты мотивировали авторов исследования к выделению продуктов (ilo-491 и ilo-493) из образца *M. morganii*, обработанного илоперидоном, и их оценке при помощи методов MS/MS и спектроскопии ЯМР для установления химических структур (рис. 6e и дополнение, рис. 46–53). Каждый из идентифицированных метаболитов илоперидона обладал структурой, не имеющей аналогов в рамках известных путей метаболизма. Соединения ilo-491 и ilo-493 имели конъюгированную трициклическую кольцевую систему 6/5/6 близкую метаболиту ilo-430 (часть В; рис. 6e), а для соединения ilo-477 была характерна трициклическая кольцевая структура 6/5/5 (рис. 6f). Несмотря на то, что метаболомный анализ методом ЖК–МС показал высокое содержание ilo-491 в супернатантах *M. morganii* (дополнение, рис. 80c), выход, полученный после препаративной очистки методом ВЭЖХ, оказался неожиданно низким (1,2 мг из 60 л культуры). Это наблюдение согласуется с предположением о наличии у ilo-491 нестабильной иминовой группы⁶¹ (рис. 6f), что было подтверждено методом двумерной спектроскопии ЯМР.

Присутствие в структурах вновь образованных шестичленного (ilo-491) и пятичленного (ilo-477) циклов указывает на включение в ilo-430 Δ¹-пиперидина и 3,4-дигидро-2H-пиррола, соответственно, что предположительно приводит к образованию трициклических диминиевых катионных промежуточных продуктов и последующему окислению до ilo-491 и ilo-477 (расширенные данные, рис. 7a)^{62,63}. Эти предшественники могли образоваться в результате окисления/трансаминирования полиаминов кадаверина и путресцина^{62,63}, которые, в свою очередь, являются продуктами декарбоксилирования L-лизина и L-орнитина соответственно. Однако для установления последовательности этих процессов требуется дальнейшее исследование (рис. 6f). Биоинформационный анализ подтверждает присутствие в геноме *M. morganii* D82 одной предполагаемой лизиндекарбоксилазы (peg512) и двух орнитиндекарбоксилаз (peg3926 и peg234) (ссылка 64). Для проверки этой гипотезы были проведены исследования с введением предшественников⁶⁵. В культуры *M. morganii* с илоперидоном (10 мкмоль/л) добавляли легкие (5 мг мл⁻¹ L-лизина и L-орнитина) и тяжелые аминокислоты (2 мг мл⁻¹ L-лизина-4,4,5,5-d₄ и L-орнитина-¹³C₅), после чего инкубировали их в течение 24 ч. Введение аминокислотных добавок в целом привело к значимому двукратному увеличению продукции ilo-491, ilo-493 и ilo-477 (рис. 6g). Кроме того, в ilo-491 выявили включение четырех атомов дейтерия из L-лизина-d₄, а в ilo-477 — четырех атомов ¹³C из L-орнитина-¹³C₅ (рис. 6h). Учитывая трудности с выделением этих метаболитов, были собраны MS² данные маркированных соединений ilo-491 и ilo-477 и проанализирован изотопный состав их фрагментных ионов. В ходе исследования были выявлены несколько основных фрагментов ilo-491 и ilo-477 (рис. 6h), среди которых два позволили точно определить локализацию включения изотопа путем сравнения меченых и немеченых фрагментов (рис. 6h). Усиление активности лекарственных препаратов в присутствии аминокислотных добавок и при встраивании тяжелых аминокислот предоставили убедительные доказательства влияния метаболизма аминокислот лизина и орнитина на функциональную активность илоперидона. Эти результаты, полученные в отношении илоперидона, раскрывают нестандартный механизм лекарственного метаболизма, осуществляемый представителем человеческой микробиоты *M. morganii*.

Илоперидон действует как антагонист на несколько рецепторов, включая дофаминовый рецептор D2 (DRD2)⁶⁶. Чтобы выяснить, влияет ли метаболизм илоперидона, опосредованный микробиотой человека, на снижение его эффективности, наблюдаемое в необработанном экстракте (рис. 2d), была изучена способность воздействовать на антагонистическую активность в отношении DRD2 у всех очищенных продуктов (расширенные данные, рис. 8f). По сравнению с илоперидоном (полумаксимальная эффективная концентрация, EC₅₀ 79,0 нмоль/л), все его производные полностью утратили антагонистическую активность (расширенные данные, рис. 8h). Чтобы выяснить молекулярный механизм снижения активности микробных метаболитов илоперидона, использовали метод молекулярного докинга (связывания), моделирующий взаимодействия лиганда с рецептором. В отличие от рисперидона и илоперидона, которые связывались с DRD2 (ссылка 67), ilo-430 демонстрировал нестабильное связывание, включая локализацию полностью вне кармана связывания с лигандом (дополнение, рис. 30g). Моделирующие исследования подтверждают снижение антагонистической активности в отношении DRD2 после гидролиза препарата. Экспериментальные исследования и результаты молекулярного докинга показали, что разрушение 6-фторбензилоксазола во всех проанализированных производных илоперидона привело к значительному снижению активности, что подчеркивает важность этого структурного элемента для связывания с DRD2 у рисперидона и его аналогов.

Микробный метаболизм илоперидона в кишечнике млекопитающих

Сравнительный метаболомный анализ выявил ранее неописанные метаболические трансформации лекарственных препаратов, осуществляемые кишечными бактериями, для 12 интенсивно модифицируемых и 6 частично модифицируемых препаратов, взаимодействующих с GPCR, включая

нестандартный механизм восстановления и конъюгации илоперидона с участием *M. organii*. Таким образом, илоперидон был выбран в качестве представителя для изучения аналогичных процессов лекарственного метаболизма в модели на мышах. В исследовании использовались безмикробные (организмы которых не содержат микроорганизмов) мыши линии C57BL/6, которые были разделены на две группы: одну колонизированную бактериальным сообществом (Vac^+ , $n=4$) и одну без колонизации (Vac^- , $n=4$). Мышам вводили илоперидон в дозе 2 мг кг⁻¹⁶⁸ перорально через зонд, после чего через 4 ч измеряли метаболиты, извлеченные из тонкой, ободочной и слепой кишки. Затем при помощи ЖХ–МС анализа были количественно определены относительные уровни метаболитов (рис. 7a). В образцах, полученных из слепой и ободочной кишки мышей, колонизированных бактериальным сообществом, были четко идентифицированы два метаболита — ilo-430 и ilo-432. В безмикробных условиях они не обнаруживались, что подтверждает участие микробиоты в лекарственном метаболизме (рис. 7b). В тонкой кишке концентрации двух метаболитов не показали значительных различий, что можно объяснить относительно меньшей численностью микробиоты по сравнению с ободочной и слепой кишкой. Метаболизм илоперидона в тонкой кишке мышей может происходить посредством деградации, опосредованной альдегидоксидазой⁶⁹. С другой стороны, илоперидон может подвергаться аналогичному метаболизму в печени и повторно попадать в тонкую кишку при энтерогепатической циркуляции. Метаболизм илоперидона также был изучен в стандартной модели с использованием мышей линии C57BL/6, свободных от специфической патогенной микрофлоры (SPF, $n=5$). В этой модели при аналогичных условиях введения илоперидона в тонкой, ободочной и слепой кишке ilo-430 был идентифицирован как основной метаболит (рис. 7c и дополнение, рис. 237–240). Эти результаты свидетельствуют о том, что основные пути бактериального метаболизма илоперидона, выявленные по данным скрининга, были с успехом подтверждены в исследовании *in vivo*. Предполагаемая причина невозможности определения второстепенных метаболитов (например, ilo-444 и ilo-491) вероятно связана с ограниченным количеством биоматериала мышей и/или пределами обнаружения метаболитов в условиях данного исследования, а также возможным дальнейшим метаболизмом или абсорбцией в организме хозяина. Полученные результаты указывают на то, что присутствие кишечной микробиоты и микробный метаболизм могут существенно влиять на восстановление и функциональную активность илоперидона.

Обсуждение

Появляется все больше данных, подтверждающих решающую роль микробиоты кишечника человека в метаболизме принимаемых перорально лекарственных препаратов. Такое взаимодействие между микробиотой кишечника и лекарствами может влиять на результаты лечения и состояние здоровья организма-хозяина^{29,70–72}. Однако, только недавно стало складываться более глубокое понимание микробного метаболизма лекарственных препаратов. Современные аналитические технологии, в сочетании с высокопроизводительными генетическими анализами, играют ключевую роль в установлении лекарственных метаболитов и генных продуктов микроорганизмов, ответственных за их метаболизм^{17,18,23,73–75}. Несмотря на развитие технологий, лишь в немногих исследованиях предпринимались попытки систематического выявления скрытых механизмов микробной биотрансформации лекарственных препаратов. Кроме того, лишь ограниченное количество исследований посвящено изучению влияния этих метаболических процессов на активность лекарственных препаратов.

Рецепторы, сопряженные с G-белком (GPCRs) играют важную роль в открытии и разработке лекарственных препаратов, главным образом благодаря их участию в различных физиологических процессах и эффективности препаратов, взаимодействующих с GPCR, в лечении широкого спектра заболеваний и расстройств². Поэтому с целью выявления ранее не описанных путей метаболизма препаратов, действующих на GPCR, и влияния метаболизма на их активность была создана платформа, основанная на

сравнительной метаболомике, для систематического изучения опосредованного микробиотой метаболизма данных препаратов. Данное исследование сфокусировано на изучении группы препаратов, действующих на GPCR, однако использованные подходы можно применять и шире, для изучения других классов препаратов.

При скрининге 127 препаратов, репрезентативных для более широкого трехмерного профиля препаратов, действующих на GPCR, было обнаружено, что в присутствии определенного сообщества кишечных микроорганизмов 30 из них подвергались метаболизму (24 %, 30/127), при этом 12 метаболитовались интенсивно (9 %, 12/127). Расщепление лекарственных препаратов, содержащих сложнотерпеновые и амидные функциональные группы, опосредованное кишечными комменсальными бактериями и человеческим организмом происходит по общим метаболическим путям. Другие исследования также выявили общие для бактерий кишечника и человеческого организма пути метаболизма определенных лекарственных препаратов^{30,76}. Результаты настоящего исследования свидетельствуют о распространенности общих для микробиоты и хозяина лекарственных метаболитов. Для 18 метаболизируемых препаратов, охарактеризованных в данном исследовании, 10 идентифицированных трансформаций совпадали с трансформациями, присущими человеческому метаболизму, при этом 8 трансформаций отличались от таковых (расширенные данные, рис. 9 и дополнение, рис. 292–308). Также были идентифицированы различные способы лекарственного метаболизма, которые влияли на активность препаратов в отношении GPCR. При исследовании GPCR клеток человека эти реакции лекарственного метаболизма приводили как к снижению, так и к усилению активности сигнальных цепей GPCR.

Настоящее исследование метаболизма лекарств, осуществляемого как сообществом бактерий, так и отдельными видами, выявило совместные и таксон-специфические процессы, влияющие на трансформацию и активность препаратов, связывающихся с GPCR. Представители фирмикутов, в частности *C. sporogenes*, были вовлечены в разнообразные процессы метаболизма лекарств, в то время как штаммы бактериоидов участвовали в специфических реакциях гидролиза. *M. organii* продемонстрировала нестандартный путь использования аминокислот при инактивации реактивного карбонильного соединения (RCS), образующегося в процессе метаболизма илоперидона. Аналогичные реакции зафиксированы при биосинтезе растительных алкалоидов⁶³. Взаимодействие между RCS мотивом и продуктами аминокислот может иметь более широкие последствия в силу возможного влияния на эффективность аналогично функционализированных препаратов.

Также был охарактеризован изолят-специфический метаболизм двух лекарственных препаратов, содержащих 1,2,4-оксадиазольный фрагмент, озанимода и GSK1292263. Несмотря на то, что расщепление 1,2,4-оксадиазольного кольца и образующиеся в результате этого продукты присутствовали в человеческих образцах^{77,78}, по сведению авторов, конкретных представителей микробиома человека, ответственных за такую биотрансформацию, выявлено не было. В ходе данного исследования было установлено, что виды *E. lenta*, *Bacteroides vulgatus* и *C. sporogenes* способны осуществлять эти преобразования, что приводит к потере активности лекарств. Микробная инактивация препарата GSK1292263 в отношении GPR119, рецептора, преимущественно представленного в желудочно-кишечном тракте человека^{79–82}, может повлиять на регуляцию обмена глюкозы в организме, осуществляемую препаратом GSK1292263. Полученные результаты свидетельствуют о том, что дальнейшее изучение микробных биомаркеров метаболизма лекарственных препаратов в области персонализированной медицины представляет собой ценное направление для будущих исследований.

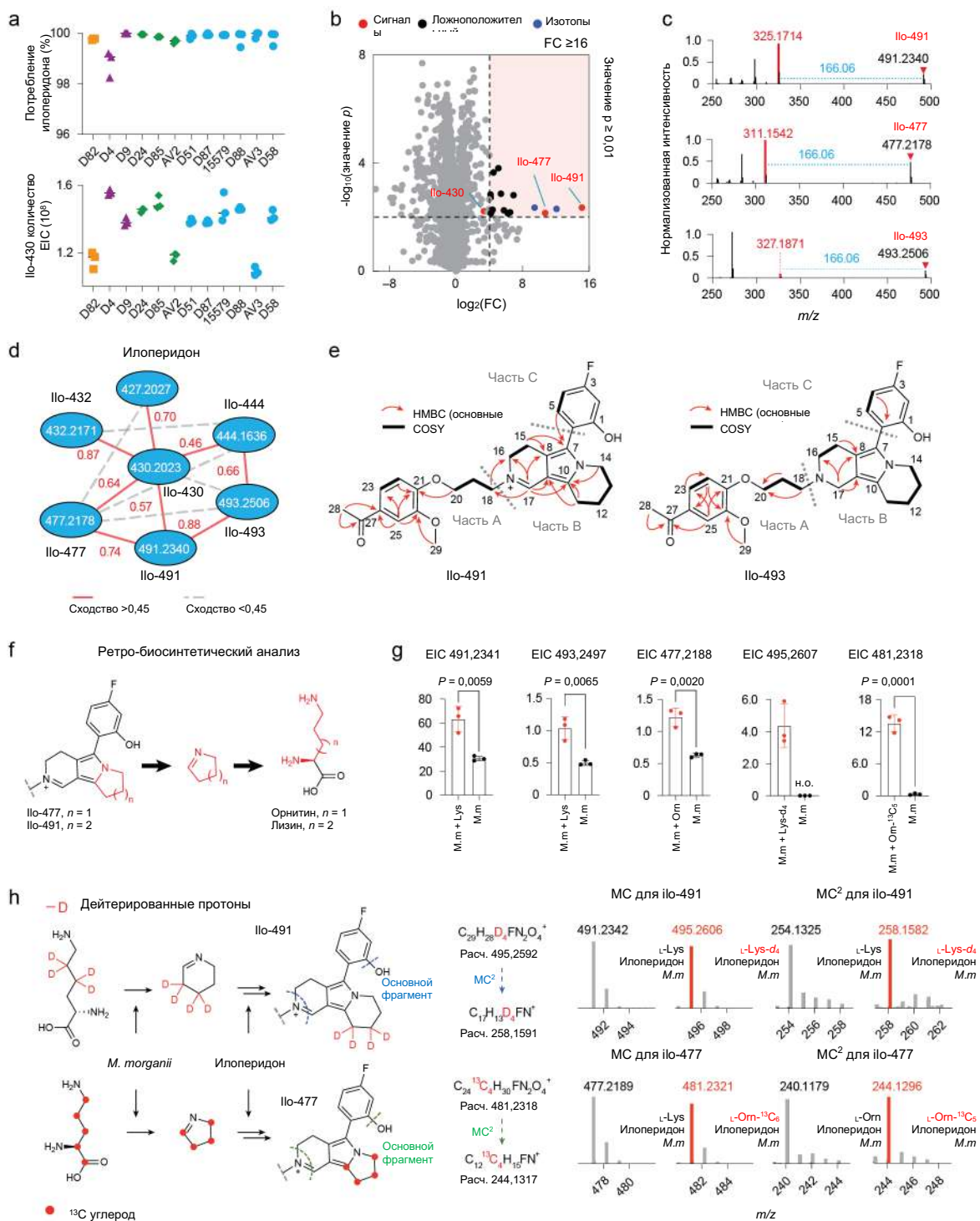


Рис. 6 | *M. morgani* D82 инактивирует илоперидон с использованием аминокислот.
а. Все проанализированные штаммы интенсивно метаболизируют илоперидон. В культурах *M. morgani* D82, *Bacteroides vulgatus* (также называемые *Phocaeicola vulgatus*) и *S. scindens* отмечали сравнительно более низкий уровень ило-430, что указывает на наличие альтернативных путей биотрансформации. Только в культуре *M. morgani* D82 был выявлен особый по сравнению с остальной бактериальной коллекцией метаболит, что потребовало дальнейших химических исследований. Оранжевый квадрат, Протеобактерии; фиолетовый треугольник, Актинобактерии; зеленый ромб, Бактероиды; синий круг, Фирмикуты. $n = 3$ биологические повторности. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение. **б.** Анализ вулканной диаграммы (Volcano plot) иллюстрирует значения FC (молекулярные компоненты образцов Bas_{D82} по сравнению с Bas_{D82}) и FDR (уровень ложноположительных результатов), полученные методом LC-QTOF-MS в режиме регистрации положительных ионов. Для идентификации потенциальных сигналов молекулярных компонентов применяли пороговые значения $x \geq 4$ ($\text{FC} \geq 16$) и $y \geq 2$ ($P \geq 0,01$). Два молекулярных компонента (ило-491, m/z 491,2342, и ило-477, m/z 477,2216), выделенных красным цветом, были выбраны для дальнейшего изучения. $n = 3$ биологических повторностей. **с.** Измеренные методом MS² профили фрагментации для ило-491, ило-477 и ило-493. Все лекарственные метаболиты имели сопоставимый с илоперидоном профиль нейтральных потерь ($\Delta = 166,06$ Да) (рис. 4d). Вверху: ило-491; в середине: ило-477; внизу: ило-493. **д.** Расчёт степени сходства для всех обнаруженных метаболитов при помощи анализа молекулярных сетей (рис. 4d). Вверху: ило-491; в середине: ило-477; внизу: ило-493. **е.** Основные корреляции, выявленные методом двумерной (2D) спектроскопии ЯМР (COSY и HMBC) для определения структуры ило-491 и ило-493. **ф.** Ретро-биосинтетический анализ ило-477 и ило-491.

г. Предполагаемый биосинтез ило-491, ило-493 и ило-477 с использованием аминокислот был подтвержден исследованиями с введением предшественников, в которых использовались немеченые и меченые изотопами предшественники аминокислот. Сравнение количества ионов в EIC (хроматограмме экстрагированных ионов) показало повышенный уровень образования лекарственных метаболитов в присутствии добавки аминокислот. Обнаружение ионов с m/z 495,2607 и 481,2318 подтвердило включение меченых изотопов атомов в ило-491 и ило-477, соответственно. $n = 3$ биологических повторности. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение; н.о. не обнаружено. Статистическую значимость определяли при помощи двустороннего t -критерия. **г.** Предполагаемый метаболизм меченных изотопами аминокислот (L-лизин-4,4,5,5- d_4 и L-орнитин- ^{13}C) и их включение в метаболический путь илоперидона, осуществляемый *M. morgani* D82. Рассчитанные значения m/z для предполагаемых меченных изотопами молекул ило-491 [$\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{D}_4\text{FN}_2\text{O}_4$]⁺ и ило-477 [$\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{D}_4\text{FN}_2\text{O}_4$]⁺ составили 495,2592 и 481,2318, соответственно. Успешное включение изотопов в ило-491 (вверху, $m/z_{\text{эабл.}}$ = 495,2606, 2,8 ppm) и ило-477 (внизу, $m/z_{\text{эабл.}}$ = 481,2321, 0,6 ppm) с использованием двух меченных изотопов предшественников аминокислот. При определении включения изотопов убедительным доказательством являются репрезентативные для соединений ило-491 и ило-477 основные фрагменты, наблюдаемые при масс-спектрометрии. Фрагмент для ило-491: $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{FN}^+$, [M + H]⁺, $m/z_{\text{расч.}}$ 254,1340, $m/z_{\text{эабл.}}$ 254,1325 по сравнению с $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{D}_4\text{FN}^+$, [M + H]⁺, $m/z_{\text{расч.}}$ 258,1591, $m/z_{\text{эабл.}}$ 258,1582; фрагмент для ило-477: $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{FN}^+$, [M + H]⁺, $m/z_{\text{расч.}}$ 240,1183, $m/z_{\text{эабл.}}$ 240,1179 по сравнению с $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{D}_4\text{FN}^+$, [M + H]⁺, $m/z_{\text{расч.}}$ 244,1317, $m/z_{\text{эабл.}}$ 244,1296. $n = 3$ биологических повторности. M.m., *Morganella morgani*.

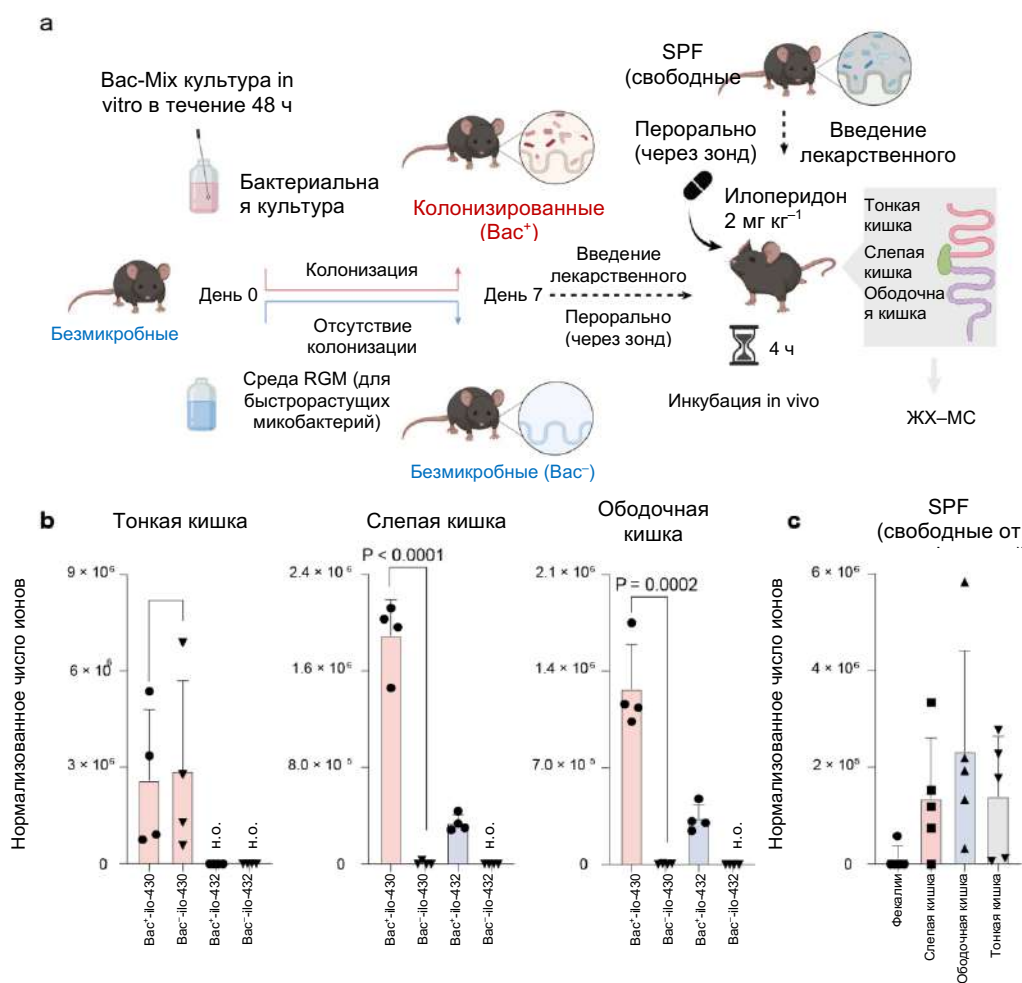


Рис. 7 | Исследование микробного метаболизма илоперидона in vivo. **a**, Дизайн эксперимента по изучению метаболизма илоперидона in vivo на мышах линии C57BL/6. Безмикробных (GF) мышей колонизировали бактериальным сообществом (Vas⁺, $n = 4$) или оставляли неcolonизированными (Vas⁻, $n = 4$). Свободных от специфической патогенной микрофлоры (SPF) мышей ($n = 5$) использовали также для изучения in vivo метаболизма илоперидона, опосредованного кишечной микробиотой мышей.

b, Относительное количество ilo-430 и ilo-432 в образцах от колонизированных мышей Vas⁺ ($n = 4$) по сравнению с образцами от Vas⁻ мышей ($n = 4$). 430, метаболит с m/z 430,2024; 432, метаболит с m/z 432,2181; н.з., не значимо; н.о., не обнаружено. Статистическую значимость определяли при помощи двустороннего t -критерия. Среднее значение и стандартное отклонение (границы ошибок) рассчитаны на основе четырёх биологических повторностей ($n = 4$). **c**, Выявление ilo-430 в образцах SPF-мышей ($n = 5$), включая фекалии, слепую кишку, толстую кишку и тонкую кишку. Среднее значение и стандартное отклонение (границы ошибок) рассчитаны на основе пяти биологических повторностей ($n = 5$).

Исследование показало, что комменсальные бактерии кишечника человека играют ключевую роль, влияя на активность препаратов-регуляторов GPCR посредством разнообразных метаболических путей. Результаты исследования выделяют существенное влияние комменсальных бактерий кишечника на метаболизм лекарств, подчеркивая необходимость учитывать это влияние при разработке лекарственных препаратов и в персонализированной медицине.

Онлайн содержание

Любые методы, дополнительные ссылки, сводные отчёты Nature Portfolio, исходные данные, расширенные данные, дополнительные материалы, благодарности, информация, рецензированная специалистами; сведения о вкладе авторов и конфликте интересов; а также заявления о доступности данных и кода доступны по следующему адресу <https://doi.org/10.1038/s41557-025-01789-w>.