

文章编号 1006-8147(2014)03-0177-04

论著

达格列净芳环间亚甲基改造对活性和药代性质的影响

宋金芝^{1,2}, 王玉丽², 徐为人^{1,2}, 赵桂龙², 汤立达²

(1.天津医科大学研究生院, 天津 300070; 2.天津药物研究院, 天津市新药设计与发现重点实验室, 天津 300193)

摘要 目的:考察达格列净芳环间亚甲基的取代对活性和药代性质的影响,为寻找更理想的药物探索改造方向。方法:考察取代衍生物对正常大鼠糖负荷后的尿排糖量、血糖和尿量等指标,正常大鼠体内静脉给药和经口给药后的血药浓度,并计算药代参数。结果:(1)大鼠尿排糖和降血糖实验显示,与模型组相比,一甲基取代产物(TY702-5)和二甲基取代产物(TY702-5D)在0~6 h和6~24 h尿排糖量及0~3 h血糖抑制率呈剂量依赖性增加($P<0.05$);同等剂量下,TY702-5和TY702-5D在0~6 h和6~24 h尿排糖量及0~3 h血糖抑制率明显低于达格列净组($P<0.05$);同等剂量的TY702-5D的血糖抑制效果优于尿排糖效果。(2)体内吸收实验显示,与达格列净相比,TY702-5的吸收速度(T_{max})和程度(C_{max} 和AUC)增加,消除半衰期($T_{1/2}$)基本不变,组织分布和生物利用度下降。TY702-5D的药物吸收速度加快,吸收程度降低,组织分布增加,消除半衰期和生物利用度下降。结论:达格列净芳环间亚甲基改造后,药物的活性降低,且对尿糖和血糖的影响存在差异,对药物的各项药代参数有较大影响,提示利用这个位置结合其他部位进行改造,有可能得到一个更理想药物。

关键词 达格列净;结构改造;甲基取代;活性;药代参数

中图分类号 R9

文献标志码 A

Effect of methylene transformation between aromatic rings in dapagliflozin on pharmacokinetics and its active properties

SONG Jin-zhi^{1,2}, WANG Yu-li², XU Wei-ren^{1,2}, ZHAO Gui-long², TANG Li-da²

(1. Graduate School, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin Key Laboratory of Molecular Design and Drug Discovery, Tianjin 300193, China)

Abstract Objective: To observe the effect on pharmacokinetics and active properties by transforming methylene between aromatic rings in FORXIGA, and search for better drugs to explore the direction of transformation. **Methods:** Substituted derivatives were observed in normal rats about urine glucose excretion test, blood glucose and urine volume and other indicators, as well as the plasma concentration after intravenous administration and oral administration, based on which pharmacokinetic parameters were calculated. **Results:** (1) The urine glucose excretion and blood glucose test in rats displayed that compared with the model group, the urine glucose excretion during 0-6 h and 6-24 h and blood glucose inhibition rates during 0-3 h of one methyl-substituted product (TY702-5) group and dimethyl substituted product (TY702-5D) group were increased at a dose-dependence ($P<0.05$); under the same dosage, the urine glucose excretion during 0-6 h and 6-24 h and blood sugar inhibition rates during 0-3 h of TY702-5 group and TY702-5D group were significantly lower than those of dapagliflozin group ($P<0.05$); under the same dosage, the blood sugar inhibition rates of TY702-5D group was better than the urine glucose excretion. (2) The absorption test in rats displayed that compared with dapagliflozin, the rate of absorption (T_{max}) and extent (C_{max} and AUC) for TY702-5 were increased whereas elimination half-life ($T_{1/2}$) maintained constant and tissue distribution and bioavailability were decreased. Furthermore, the rate of absorption and extent for TY702-5D were decreased and tissue distribution increased while elimination half-life and bioavailability were decreased. **Conclusion:** The methylene transformation between the aromatic ring of dapagliflozin can reduce the activity of the drug, and significant differences are found in its effects on urine glucose and blood glucose. And also has a greater impact on the pharmacokinetic parameters of the drug, indicating that a better drug can be acquired through the combination of this position and other parts of the transformation.

Key words dapagliflozin; structural modification; methyl substituted; activity; pharmacokinetic parameters

根皮昔是第一个被发现的钠-葡萄糖共转运子2 (sodium-glucose cotransporter 2, SGLT2) 抑制剂, 基金项目 国家重大新药创制专项基金资助(2011ZX09401-009); 天津市科技支撑计划重点项目(10ZCKFSH01300) 作者简介 宋金芝(1987-),女,硕士在读,研究方向:降糖类新药药理研究;通信作者:徐为人,E-mail: xuwr@tjpr.com。

SGLT2 抑制剂通过抑制肾小管上皮细胞内的主要血糖转运蛋白 SGLT2 从而降低肾内滤过葡萄糖的重吸收,实现降血糖作用^[1],降糖机制和其他类型降血糖药物不同,因此有很好的联合用药的可行性^[2]。C-芳基葡萄糖苷达格列净(FORXIGA; dapagliflozin)

是第一个上市的 SGLT2 抑制剂类降糖药物,本文通过对达格列净结构两个苯环中间的亚甲基位置的改造及对活性、吸收程度、药代参数影响的研究,为进一步设计新的化合物提供方向。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验药物 TY702-5(批号:20110805,含量 98.5%,天津药物研究院);TY702-5D(批号 20111020,含量 99.2%,天津药物研究院);Dapagliflozin(批号:20110206,含量 99.0%,天津药物研究院)(药物结构见图 1)。实验药物均用 1%羧甲基纤维素钠配制。

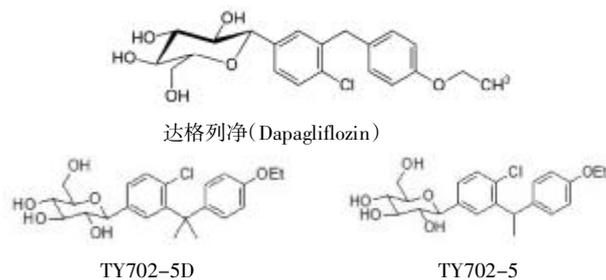


图 1 化合物结构

Fig 1 Structure of tested compounds

1.1.2 实验试剂 葡萄糖($C_6H_{12}O_6$)(批号:100224,天津市化学试剂一厂);葡萄糖试剂盒(NK法)(批号:100215,中生北控生物科技股份有限公司);其他均为国产或进口分析纯。

1.1.3 实验仪器 酶标仪(SoftMax pro 5serial number:SMP500-15418-QWGI);ET-1 型易立测血糖/尿酸双功能测试仪和血糖试纸(聿新生物科技有限公司);液质联用(Finnigan surveyor PDA Plus Detector;Finnigan surveyor Autosampler Plus;Finnigan surveyor LCPump Plus;Finnigan LCQ Advantage Max)(Thermo 公司)。

1.1.4 实验动物 健康雄性 Wistar 大鼠,清洁级,200~220 g,天津市山川红实验动物科技有限公司提供,许可证号:SCXK(津)2011-0001。

1.2 实验方法

1.2.1 正常大鼠尿排糖和降血糖实验 雄性 Wistar 大鼠,体质量 200~220 g,实验前预筛 24 h 尿量无异常的大鼠,禁食 16 h。实验前大鼠称重,测定大鼠给药前血糖,挑选血糖在正常范围内的大鼠进行实验。大鼠按血糖随机分为空白组、模型组(空白给糖组)和给药组(12 组),给药组分为达格列净 4 个剂量组、TY702-5 4 个剂量组和 TY702-5D 4 个剂量组,各给药组剂量分别为 2、6、18、54 $mg \cdot kg^{-1}$,各组均为 6 只大鼠。灌胃给药,模型组给予同体积的溶

剂,空白组不做任何处理,给药体积为 1 mL/100 g。给药 0.5 h 后,灌胃给予 3 $g \cdot kg^{-1}$ 的葡萄糖水溶液,给糖体积为 1 mL/100 g。给糖后 0.5、1、3 h 测定血糖值。收集给药后 0~6 h 和 6~24 h 尿液,记录尿量,用葡萄糖试剂盒(NK 法)测定大鼠各时间段尿中的排糖量。尿排糖量计算方法:尿排糖量=(样品吸光值-空白吸光值)/(标准品吸光值-空白吸光值) \times 稀释倍数 \times 尿量 \times 1 000/大鼠体质量。血糖抑制率(%)=[1-(试验组血糖 AUC-空白组血糖 AUC)/(模型组血糖 AUC-空白组血糖 AUC)] \times 100。血糖 AUC 为血糖-时间曲线下面积。

1.2.2 正常大鼠体内吸收实验 Wistar 大鼠,雄性,质量 200~220 g,实验前大鼠禁食 16 h,按质量随机分为 6 组,每组 3 只。实验组分别为口服给药组(po):达格列净 po 组, TY702-5 po 组, TY702-5D po 组;静脉给药(iv)组:达格列净 iv 组, TY702-5 iv 组, TY702-5D iv 组。大鼠经口灌胃剂量为 90 $mg \cdot kg^{-1}$,静脉给药剂量为 30 $mg \cdot kg^{-1}$,给药体积均为 10 mL $\cdot kg^{-1}$ 。静脉给药大鼠分别于给药前、药后 2、5、20、40 min, 1、2、3、4、6、8、12、24 h 眼静脉取血;经口灌胃给药大鼠于给药前、药后 20、40 min, 1、2、3、4、6、8、12、24 h 眼静脉取血;离心,得到血清样品,用液质联用测定不同时间点血浆中药物浓度,计算各化合物药代参数。

1.3 统计学处理 药代参数由 PKsolver 软件进行数据处理。数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 表示有显著性差异。

2 结果

2.1 正常大鼠尿排糖和降血糖实验结果

2.1.1 正常大鼠尿排糖实验结果 见表 1。尿糖结果显示,正常大鼠尿糖很少,糖负荷后增加排糖,但增加量很少($P \geq 0.05$)。尿量结果显示,糖负荷基本不影响尿量($P \geq 0.05$)。各给药组大鼠 0~6 h 与 6~24 h 尿排糖量和尿量与模型组相比明显增加($P < 0.05$),且与给药剂量正相关。同等剂量下,改造后的化合物与达格列净组相比尿量和尿排糖量明显下降,两种取代产物间尿排糖量和尿量无显著性差异($P \geq 0.05$)。

2.1.2 正常大鼠降血糖实验结果 见表 2。空白组血糖在 3 h 内波动很小,糖负荷后,大鼠血糖 1 h 达到高峰,至 3 h 回落接近给药前水平。0~3 h 的血糖结果显示,3 种化合物均可以剂量依赖性地降低血糖值。同等剂量下,改造后化合物的血糖抑制率下降,二甲基取代产物 TY702-5D 的血糖抑制效果优于一甲基取代产物 TY702-5。

表1 化合物对糖负荷大鼠尿排糖量、尿量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)Tab 1 Effects of compounds on urine glucose excretion and urine volume ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	尿量/(mL·kg ⁻¹ ·h ⁻¹)		尿排糖量/(mg·kg ⁻¹)	
		0~6 h	6~24 h	0~6 h	6~24 h
空白	-	1.9±0.2	0.7±0.1	6.5±0.8	8.3±1.3
模型	-	1.9±0.1	0.7±0.1	10.0±3.3	12.2±6.1
TY702-5	2	2.1±0.2	0.9±0.1*	48.8±5.7**	44.6±8.1*
	6	2.4±0.3*	1.6±0.3**	176.9±26.9**	184.0±20.4**
	18	3.2±0.5**	2.0±0.2**	492.5±34.7**	612.0±40.1**
	54	4.0±0.6**	2.4±0.3**	1075.3±108.2**	1137.7±160.9**
TY702-5D	2	2.0±0.2	0.8±0.1	36.3±5.7**	43.9±5.1**
	6	2.4±0.3*	1.0±0.2*	185.9±17.1**	149.5±17.6**
	18	3.0±0.4**	1.6±0.2**	444.1±36.6**	482.6±55.5**
	54	4.0±0.4**	3.5±0.4**	924.1±81.3**	987.0±77.9**
达格列净	2	3.3±0.2**	1.9±0.3**	1093.7±79.8**	719.8±122.4**
	6	4.1±0.7**	2.2±0.3**	1470.6±169.7**	1411.3±95.4**
	18	6.4±0.7**	3.3±0.4**	1827.7±159.0**	2404.5±189.4**
	54	8.3±0.4**	4.2±0.7**	1962.4±183.0**	2485.2±345.7**

与模型组比较: *P<0.05, **P<0.01

表2 化合物对糖负荷大鼠血糖的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)Tab 2 Effects of compounds on blood glucose ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	血糖值/(mmol·L ⁻¹)				血糖抑制率/%
		给糖前	给糖后 0.5 h	给糖后 1 h	给糖后 3 h	
空白	-	3.6±0.3	3.7±0.2	3.4±0.2	3.0±0.2	-
模型	-	3.6±0.4	6.8±0.5	8.3±0.3	4.2±0.2	-
TY702-5	2	3.5±0.3	6.5±0.5	7.8±0.3*	4.6±0.5	5.0±4.1
	6	3.3±0.6	5.8±0.5*	7.1±0.3**	4.2±0.6	22.9±2.8
	18	3.4±0.5	5.0±0.6**	6.2±0.4**	4.0±0.6	41.4±6.5
	54	3.3±0.6	4.0±0.4**	4.7±0.4**	3.4±0.3**	74.5±6.8
TY702-5D	2	3.4±0.3	6.4±0.4	7.5±0.3**	4.6±0.3	5.8±3.2
	6	3.4±0.3	5.4±0.6**	6.4±0.6**	4.3±0.5	30.8±5.3
	18	3.6±0.6	4.1±0.5**	4.6±0.4**	4.0±0.4	69.4±7.6
	54	3.1±0.4	3.8±0.4**	3.8±0.4**	3.1±0.4**	91.9±8.1
达格列净	2	3.5±0.4	6.5±0.9	6.8±0.4**	3.6±0.5*	30.3±3.8
	6	3.6±0.2	5.1±0.3**	5.8±0.4**	3.7±0.4*	50.8±5.5
	18	3.5±0.2	4.1±0.8**	4.4±0.4**	3.9±0.6	88.9±7.0
	54	3.4±0.3	3.4±0.4**	3.3±0.3**	2.8±0.1**	103.3±6.5

与模型组比较: *P<0.05, **P<0.01

2.2 药物体内吸收实验结果 见表3、4。体内吸收实验显示, 甲基改造后药物吸收的达峰时间 T_{max} 降低, 表明甲基取代后药物的吸收加快; 一甲基取代产物 TY702-5 的消除半衰期 $T_{1/2}$ 基本不变, 二甲基取代产物 TY702-5D 的消除半衰期 $T_{1/2}$ 下降, 表明二甲基取代加速了血浆中的消除速度; 一甲基取代产物 TY702-5 的表观分布容积 V_d 降低而二甲基取代产物 TY702-5D 的表观分布容积 V_d 升高, 表

明甲基取代对药物的组织分布有影响, 二甲基取代增加药物在组织中的分布; 一甲基取代产物 TY702-5 的血药峰浓度 C_{max} 和血浆暴露量 AUC 升高而二甲基取代产物 TY702-5D 的血药峰浓度 C_{max} 和血浆暴露量 AUC 降低, 表明甲基取代对药物在血浆中的暴露量影响大, 单甲基可以增加血中的暴露程度, 双甲基取代降低血中暴露程度; 生物利用度 F 降低, 表明甲基取代后降低药物的生物利用度。

表3 大鼠经口灌胃给药药代参数表($n=3$)Tab 3 Compound in normal rat oral absorption pharmacokinetic parameter table ($n=3$)

药物名称	给药方式	剂量/(mg·kg ⁻¹)	药代参数					
			$T_{1/2}/h$	$C_{max}/(\mu g \cdot mL^{-1})$	T_{max}/h	$AUC/(\mu g \cdot h \cdot mL^{-1})$	F/%	$V_d/(L \cdot kg^{-1})$
达格列净	PO	90	4.7±0.7	57.5±2.1	1.7±0.6	423.5±42.4	80.8	1.4±0.1
TY702-5	PO	90	4.7±0.6	111.7±8.6	0.7±0.0	611.1±8.6	61.4	0.9±0.1
TY702-5D	PO	90	1.9±0.2	18.0±3.5	0.7±0.0	50.1±5.1	39.6	4.2±0.8

表 4 大鼠静脉注射给药药代参数表($n=3$)Tab 4 Compound in normal rat intravenous absorption pharmacokinetic parameter table ($n=3$)

药物名称	给药方式	剂量/ ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	药代参数			
			$T_{1/2}/\text{h}$	$C_{\text{max}}/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	$AUC/(\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1})$	$V_d/(\text{L}\cdot\text{kg}^{-1})$
达格列净	iv	30	5.1 ± 0.2	61.7 ± 7.0	174.6 ± 13.6	1.2 ± 0.1
TY702-5	iv	30	5.2 ± 0.5	129.9 ± 25.9	331.6 ± 23.3	0.7 ± 0.1
TY702-5D	iv	30	2.3 ± 0.4	46.5 ± 5.5	42.2 ± 5.4	2.3 ± 0.8

3 讨论

肾脏对于维持人类血糖稳定起着关键的调节作用,人体血液中 99% 的葡萄糖都经肾小球滤过,只有极少量的葡萄糖出现在尿液中。研究发现肾脏对葡萄糖的重吸收与 SGLT2 密切相关,SGLT2 是一类低亲和力、高容量性的转运体系,特定表达于肾小管 S1 段,是肾钠葡萄糖重吸收中的重要转运体^[3]。SGLT2 抑制剂通过抑制肾小管上皮细胞内的主要血糖转运蛋白 SGLT2 降低肾内滤过葡萄糖的重吸收,导致糖尿,从而降低血清内葡萄糖。达格列净是首个批准上市的 SGLT2 抑制剂类药物,是我们进行药物改造的基础,因此被作为阳性药使用。

本实验考察了糖负荷后血糖变化,给糖 3 h 后血糖基本恢复,由于尿糖有一定的滞后效应,0~6 h 的排糖与糖负荷后的血糖变化的相关性较大,研究结果显示,达格列净与 TY702-5 和 TY702-5D 都剂量依赖性影响 0~6 h 尿中排糖和 0~3 h 血糖,同时 TY702-5D 的血浆暴露量 AUC 较小而降糖作用较强,结合 TY702-5D 的表观分布容积 V_d 数据,可以推测组织中的药物浓度较高可能是其中的原因。

本实验中 6~24 h 的尿排糖作用反应了药物作用的持续性,特别是在糖尿病情况下血糖长时间处于较高水平,持续的尿排糖的结果使糖不断从组织向血中输出,减少组织和血中糖积累,对代谢性疾病的治疗具有重要意义。由于 SGLT2 抑制剂类药物独特的降糖机制,有 2 类不良反应需要重点观察,一个是低血糖反应,另一个是尿路感染的发生情况。从糖负荷 3 h 的结果来看,机体对组织与血糖之间的平衡能力很强,尽管理论上低血糖的风险较小,但是从另一个角度来看过强的排尿糖作用还是可能带来一定的低血糖风险,适当的作用时间和强度的平衡可能使药物发挥更好的作用。有临床试验

结果^[4-5]显示达格列净有低血糖和尿路感染风险,可能与其尿中排糖效果较强有关。与达格列净相比,二甲基取代产物(TY702-5D)的 6~24 h 尿中排糖作用较弱,相对于尿排糖量的降低 0~3 h 的血糖抑制作用较小,是一种更温和、有效的降糖药物,推测低血糖风险更小。

本文综合研究了达格列净两个芳环中亚甲基取代对尿排糖、血糖、吸收、分布等参数的影响。一甲基取代后(TY702-5),0~6 h、6~24 h 的尿中排糖作用以及 0~3 h 降血糖作用剂量依赖性地增加,与达格列净相比,药效降低,血药峰浓度 C_{max} 和血浆暴露量 AUC 增加,吸收程度增加,消除半衰期 $T_{1/2}$ 基本不变,达峰时间 T_{max} 、表观分布容积 V_d 和生物利用度 F 降低;二甲基取代后(TY702-5D),0~6 h、6~24 h 的尿中排糖作用以及 0~3 h 降血糖作用剂量依赖性增加,尿排糖效果与一甲基取代产物无显著性差异($P\geq 0.05$),但降血糖效果优于一甲基取代产物(TY702-5)($P<0.05$),与达格列净相比,药效降低,达峰时间 T_{max} 、消除半衰期 $T_{1/2}$ 、血药峰浓度 C_{max} 、血浆暴露量 AUC 和生物利用度 F 降低,但表观分布容积 V_d 增加,增加了组织分布。药物对尿糖和血糖影响的差异提示,亚甲基的取代还对糖在组织和血中的分布有一定的影响。本文对亚甲基的取代进行了研究,表明这个位置对药物性质的影响极大,如果结合其他部位的改造,有可能得到更理想的药物。

参考文献:

- [1] Panchapakesan U, Pegg K, Gross S, et al. Effects of SGLT2 inhibition in human kidney proximal tubular cells—renoprotection in diabetic nephropathy[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e54442
- [2] Washburn W N, Poucher S M. Differentiating sodium-glucose co-transporter-2 inhibitors in development for the treatment of type 2 diabetes mellitus[J]. Expert Opin Investig Drugs, 2013, 22(4): 463
- [3] Kipnes M. Dapagliflozin: an emerging treatment option in type 2 diabetes[J]. Expert Opin Investig Drugs, 2009, 18(3): 327
- [4] Ferrannini E, Ramos S J, Salsali A, et al. Dapagliflozin monotherapy in type 2 diabetic patients with inadequate glycemic control by diet and exercise: a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial[J]. Diabetes Care, 2010, 33(10): 2217
- [5] Wilding J P, Norwood P, Tjoen C, et al. A study of dapagliflozin in patients with type 2 diabetes receiving high doses of insulin plus insulin sensitizers: applicability of a novel insulin-independent treatment[J]. Diabetes Care, 2009, 32(9): 1656

(2013-08-27 收稿)