

新型镇静催眠化合物 YZG-331 药代动力学特征的研究

杨雅坤^{1†}, 刘志浩^{2†}, 盛莉^{1*}, 李燕^{1*}

(1. 中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所药物代谢室, 创新药物非临床药代/药效北京市重点实验室, 活性物质发现与适药化研究北京市重点实验室, 北京 100050; 2. 大连医科大学药学院临床药理学室, 辽宁 大连 116000)

摘要: 本文旨在研究小/大鼠口服和静脉注射 YZG-331 后的血浆药代动力学、血浆蛋白结合以及体外代谢特征。通过 LC-MS/MS 方法测定小/大鼠口服和静脉注射 YZG-331 后血浆药物浓度变化及组织分布, 计算药代动力学参数和生物利用度; 应用超滤法测定 YZG-331 与动物和人血浆蛋白的结合率; 比较 YZG-331 在动物和人血浆、肝微粒体、肠菌以及人工胃肠液中的体外稳定性。结果表明, 小/大鼠口服 YZG-331 后均吸收较快, 存在吸收与消除饱和趋势。雄性小鼠的生物利用度 (51.2%) 明显高于雌性 (27.7%), 而雌性大鼠的生物利用度 (78.7%) 明显高于雄鼠 (27.1%)。小鼠口服 YZG-331 后体内分布广泛, 在药效靶组织脑中也有分布, 包括丘脑、海马、皮层、纹状体。YZG-331 与人和动物血浆蛋白高度结合 (93.3%~98.9%), 无明显浓度依赖和种属差异。YZG-331 在人和动物血浆、人工胃肠液以及小鼠、猴、狗和人肝微粒体中稳定, 但可经大鼠肝微粒体和肠道菌群代谢。YZG-331 在小鼠、大鼠体内的血浆药代动力学存在一定性别差异和种属差异; YZG-331 在体内分布广泛, 与血浆蛋白高度结合, 可经大鼠肝脏微粒体和肠道菌群代谢转化。

关键词: *N*⁶-取代-腺苷衍生物; 临床前药代动力学; 代谢稳定性; 种属差异; 性别差异

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 12-1910-08

Pharmacokinetic characteristics of YZG-331, a promising sedative-hypnotic candidate agent

YANG Ya-kun^{1†}, LIU Zhi-hao^{2†}, SHENG Li^{1*}, LI Yan^{1*}

(1. Department of Drug Metabolism, Key Laboratory of Active Substances Discovery and Drug Ability Evaluation, State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China; 2. Department of Clinical Pharmacology, College of Pharmacy, Dalian Medical University, Dalian 116000, China)

Abstract: The purpose of this article was to study the pharmacokinetic characteristics of YZG-331, plasma protein binding and metabolic stability *in vivo* and *in vitro*. Plasma and tissue concentrations of YZG-331 were determined in mice and rats after administration by LC-MS/MS analysis orally or intravenously. The plasma protein binding of YZG-331 with human, dog, monkey, rat and mouse were measured by ultrafiltration method. The stability of YZG-331 in animal and human plasma, liver microsomes, intestinal bacteria and artificial gastrointestinal fluid was also investigated *in vitro*. The results show that YZG-331 was absorbed rapidly in both mice and rats after oral administration, while the absorption and elimination saturation YZG-331 were also observed. The bioavailability of YZG-331 was much higher in male mice (51.2%) than that in female

收稿日期: 2017-05-23; 修回日期: 2017-08-16.

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (81603190); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程经费资助 (2016-I2M-3-011).

†共同第一作者.

*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-63165185, E-mail: shengli@imm.ac.cn;

Tel / Fax: 86-10-63165172, E-mail: yanli@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0513

mice (27.7%), however, the bioavailability in male rats (27.1%) was lower than that in female rats (78.7%). YZG-331 was widely distributed in different tissues of mice, especially in certain regions of brain, including thalamus, hippocampus, cortical and striatal. YZG-331 was found to bind to human, dog, monkey, rat and mouse plasma protein *in vitro* (93.3%–98.9%) without significant concentration dependences and species differences. YZG-331 was stable in animal and human plasma, simulated gastric/intestinal fluid and liver microsomal incubations, except rat liver microsomes and intestinal flora. Therefore, we concluded that: the pharmacokinetics of YZG-331 in mice and rats have gender and species differences; YZG-331 was widely distributed *in vivo* including brain, the targets of the agent; YZG-331 had a high affinity to plasma protein and was metabolized by rat liver microsomes and intestinal flora.

Key words: *N*⁶-substituted adenosine derivatives; preclinical pharmacokinetics; metabolic stability; species difference; gender difference

失眠症是一种常见的睡眠障碍, 即睡眠的质或量不能满足个体生理需要, 从而影响人们日常工作和生活的一种主观体验^[1]。失眠患者多伴有注意力不集中、精神减退和记忆力障碍等症^[2,3]。目前药物仍是治疗失眠的重要手段。以安定和唑吡坦为代表的第二、第三代镇静催眠药物主要针对 γ -氨基丁酸 (GABA) 信号系统发挥睡眠调节作用, 虽然药效肯定, 但在用药过程可能会产生宿醉、肌松、耐受或反跳性失眠等症^[4,5]。因此, 寻找具有作用机制新颖、不良反应更小的新型睡眠调节剂仍是热点。

腺苷是重要的内源性物质, 在睡眠诱导、持续和深度调节中发挥重要作用。腺苷 A₁ 和 A_{2A} 受体与腺苷亲和力高且在脑组织高表达。以往研究表明, 腺苷主要通过激活 A₁ 受体抑制促觉醒神经元, 兴奋 A_{2A} 受体激活睡眠神经元发出抑制信号, 抑制组胺和单胺类觉醒系统而诱导睡眠^[6,7]。因此, 激动腺苷 A₁ 和 A_{2A} 受体的腺苷类似物具有促进睡眠的潜在作用, 可望开发成为新型镇静催眠药物。

天麻是具有“镇静安神”作用的传统中药。从天麻中分离得到的 *N*⁶-对羟苄基-腺苷 (NHBA) 可显著降低小鼠自主活动, 具有明显镇静作用^[8]。YZG-331 是以 NHBA 为先导化合物进行结构改造优选出的 *N*⁶-取代-腺苷衍生物。前期药理研究表明, 小鼠口服 YZG-331 后肌松作用轻、降压作用弱, 连续 4 周给药未发现明显成瘾性, 明显优于安定和唑吡坦, 现已申请国家发明专利和国际 PCT^[9]。

尽管 YZG-331 药理活性研究已见相关报道, 但其药代动力学特征尚不清楚。本研究拟应用 LC-MS/MS 分析方法, 研究不同性别小/大鼠口服和静脉注射不同剂量 YZG-331 后的血浆药代动力学特征及在主要脏器及组织的分布; 考察 YZG-331 与不同种属动物及人的血浆蛋白结合率和体外代谢稳定性, 为

了解 YZG-331 体内动态变化规律、种属/性别差异以及后续临床药代动力学研究提供参考依据。

材料与方法

药品和试剂 YZG-331 及内标 YZG-441 (图 1, 纯度 > 99%) 由中国医学科学院药物研究所植化室提供。比格犬、食蟹猴和人肝微粒体购自 BD 公司, SD 大鼠和 ICR 小鼠肝微粒体由本实验室自制。甲醇和乙腈为色谱纯 (Fisher, 美国), 其他试剂均为分析纯。超纯水经 Milli-Q 纯水仪制备 (Millipore, MA, 美国)。

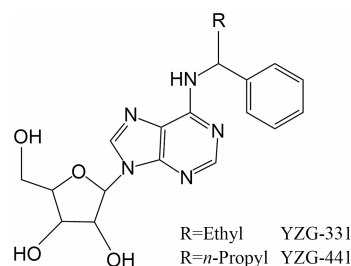


Figure 1 Chemical structures of YZG-331 and YZG-441

实验动物 雌/雄 ICR 小鼠 (30~32 g) 和雌/雄 SD 大鼠 (220~250 g) 购自北京维通利华实验动物技术有限公司 [许可证号: SCXK(京)2013-0001], 动物福利和实验过程遵循中国医学科学院动物伦理委员会的规定。

实验仪器 API 4000 型-液质联用仪 (AB 公司, 美国); Agilent 1260 系统: 四元梯度泵、在线脱气机、自动进样器、柱温箱 (Agilent 公司) 及用于数据采集和分析的软件 Xcalibur 1.4.2。GL-88B 漩涡混合器 (江苏海门麒麟医用仪器厂), Biofuge Primo R 低温离心机 (Thermo, 美国), TGL-16B 型离心机 (上海安亭科学仪器厂)。

色谱条件 色谱柱: Zorbax C18 柱 (2.1 mm × 100 mm, 3.5 μm), 流动相: 甲醇-水 (60 : 40, 0.1% 甲酸), 流速: 0.2 mL·min⁻¹; 柱温: 25 °C; 进样量: 5 μL; 进样池温度: 4 °C。

质谱条件 电喷雾离子源 (ESI), 喷雾电压为 5.5 kV。阳离子方式检测, 扫描方式为选择反应离子监测 (SRM), YZG-331 用于定量分析的选择性反应离子分别为: m/z 386.2→254.2 (CE: 25 eV)。一次进样的分析时间为 7.5 min。

小鼠口服 YZG-331 后的血浆药代动力学 雌雄 ICR 小鼠各 20 只, 分为 4 组, 每组 5 只, 实验前禁食 12 h, 自由饮水。YZG-331 以 0.5% CMC 配制成质量浓度为 1、2、4 和 8 mg·mL⁻¹ 悬液。小鼠分别口服 YZG-331 (10、20、40 和 80 mg·kg⁻¹) 后 2、5、15、30 min、1、2、3、4、6、8、12 和 24 h (40、80 mg·kg⁻¹ 剂量组增加 36、48 和 72 h) 用肝素化的玻璃毛细管于眼眶静脉丛取血 30 μL, 5 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 分离血浆并储存在 -20 °C 备用。

小鼠静脉注射 YZG-331 的血浆药代动力学及生物利用度 雌雄 ICR 小鼠各 5 只, 自由饮水和饮食。YZG-331 用乙醇 100 μL 溶解后用生理盐水配制成 0.1 mg·mL⁻¹ 溶液。小鼠尾静脉注射 YZG-331 (1 mg·kg⁻¹) 后 2、5、10、20、30 min、1、2、3、4、6 和 8 h 用肝素化的玻璃毛细管于眼眶静脉丛取血约 30 μL, 分离血浆储存在 -20 °C 备用。生物利用度计算公式: $F(\%) = D_{\text{静脉}} \times \text{AUC}_{\text{口服}} / D_{\text{口服}} \times \text{AUC}_{\text{静脉}} \times 100\%$ 。

小鼠口服 YZG-331 后在体内主要脏器及脑组织的分布 雌雄 ICR 小鼠各 15 只, 分为 3 组, 每组 5 只, 实验前禁食 12 h, 自由饮水。根据雌雄小鼠口服给药后的血浆药时曲线, 选择 YZG-331 (10 mg·kg⁻¹) 口服后 5 min、30 min、2 h 断头处死动物, 收集血液, 5 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 制备血浆储存在 -20 °C 备用。另收集全部或部分心、肝、脾、肺、肾、肾上腺、脑、睾丸 (卵巢)、附睾 (子宫)、胃、小肠、肌肉、脂肪组织和器官样品, 称重后, 按照 1 : 3 (w/v) 体积加入生理盐水研磨, 制备成组织匀浆并储存在 -20 °C 备用。

雌雄小鼠各 5 只, 实验前禁食 12 h, 自由饮水。口服给予 YZG-331 (10 mg·kg⁻¹) 后 30 min 断头处死动物, 取下丘脑、海马、纹状体、皮层等部位称重后, 按照 1 : 3 (w/v) 体积加入生理盐水制备匀浆, 储存在 -20 °C 备用。

大鼠口服和静脉注射 YZG-331 的体内药代动力学 雌雄 SD 大鼠各 20 只, 分为 4 组, 每组 5 只。实

验前禁食 12 h, 自由饮水。大鼠分别口服 YZG-331 (25、50、100 和 200 mg·kg⁻¹) 后 5、15、30 min、1、2、4、6、8、12 和 24 h (100、200 mg·kg⁻¹ 剂量组增加 36、48 和 72 h) 用肝素化的玻璃毛细管于眼眶静脉丛取血, 分离血浆储存在 -20 °C 备用。

雌雄 SD 大鼠各 5 只, 自由饮水和饮食。大鼠尾静脉注射 YZG-331 (5 mg·kg⁻¹) 后 2、5、10、20、30 min、1、2、3、4、6 和 8 h 于眼眶静脉丛取血肝素抗凝 5 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 分离血浆储存在 -20 °C 备用。

血浆蛋白结合率测定 以改良超滤法测定 YZG-331 (100、1 000 和 5 000 ng·mL⁻¹) 与小鼠、大鼠、猴、犬和人血浆蛋白的结合率。分别配制不同种属含 YZG-331 (100、1 000 和 5 000 ng·mL⁻¹) 的血浆样品, 于室温放置平衡 1 h 后取出部分样品测定药物初始浓度。取血浆样品 140 μL 加到超滤上层管, 另取超滤管, 于上层管中加入空白血浆样品 140 μL 作为平行样。10 000 ×g 离心 15 min 后, 翻转上层管, 加药样品和空白样品互换上层管, 在常温 700 ×g 离心 3 min, 测定 2 个下层管中药物含量分别作为结合药物浓度和游离药物浓度。

YZG-331 在动物及人血浆中的稳定性 将 YZG-331 与大鼠、小鼠、犬、猴和人血浆温孵, 考察 YZG-331 在动物及人血浆的稳定性。将 YZG-331 (终浓度为 1 μmol·L⁻¹) 分别加到 200 μL 小鼠、大鼠、猴、犬、人血浆中, 每组设置 3 个平行样, 37 °C 水浴温孵 0、60 和 120 min。

YZG-331 在人工肠液/胃液中的稳定性 配制人工胃液: 取盐酸 234 mL 加水稀释到 1 L, 配制成稀盐酸。取稀盐酸 16.4 mL 加水 800 mL, 与胃蛋白酶 10 g 混匀后, 用水稀释至 1 L。配制人工肠液: 取磷酸二氢钾 6 g 溶于 500 mL 水, 用 0.4% 氢氧化钠溶液调至 pH 6.8, 另取胰蛋白酶 10 g 用水溶解, 将两液合并, 用水稀释至 1 L。将 YZG-331 (终浓度为 1 μmol·L⁻¹) 分别加到人工肠液/胃液 200 μL 中, 每组设置 3 个平行样, 37 °C 水浴温孵 0、15、30、60 和 120 min。

YZG-331 在动物及人肝微粒体中的稳定性 将 YZG-331 与大鼠、小鼠、犬、猴和人肝微粒体温孵, 考察 YZG-331 在动物及人肝微粒体的稳定性。肝微粒体温孵体系包括: 肝微粒体蛋白 (0.5 mg·mL⁻¹)、NADPH 再生系统、Tris-HCl 缓冲液 (50 mmol·L⁻¹, pH 7.4)、YZG-331 (0.5 μmol·L⁻¹), 反应总体积为 200 μL (有机溶剂含量 < 1%)。每组设置 2 个平行样, 37 °C 温孵 30 min。

在雌鼠体内的消除较雄鼠慢。同时，雌鼠的 AUC_{0-t} 是雄鼠的 1.5 倍，提示其暴露量明显高于雄鼠。根据口服和静脉注射 YZG-331 后的 AUC_{0-t} 计算雄鼠口服 YZG-331 ($10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 后的生物利用度为 51.2%，雌鼠为 27.7%，雄鼠生物利用度是雌鼠的 1.8 倍，存在一定的性别差异。

2 小鼠口服 YZG-331 后在各主要脏器和组织的分布

雌雄小鼠口服 YZG-331 ($10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 后体内分布广泛 (图 4)。雄鼠给药 5 min 后组织和器官中 YZG-331 浓度排序为：小肠>胃>肝>肾>心脏>肾上腺>脾>肺>血浆>附睾>肌肉>脂肪>睾丸>脑，给药后 30 min 和 2 h 的分布趋势与 5 min 相似。雌鼠给药 5 min 后组织和器官中 YZG-331 浓度排序为：小肠>胃>肝>肾>心脏>肾上腺>肺>血浆>脾>卵巢>肌肉>脂肪>子宫>脑，其他时间点的分布趋势与 5 min 相似。小鼠口服 YZG-331 后在胃肠道及血流量丰富组织分布较多，靶器官脑中也有分布，但浓度较低，组织分布未见明显性别差异。

YZG-331 ($10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 口服给药后在脑中多个部位均有分布 (图 5)。雄鼠给药后 30 min，各部位药物浓度排序为：血浆>丘脑>海马>皮层>纹状体，雌鼠给药 30 min 后的药物分布趋势与雄鼠相似。

3 大鼠口服/静脉注射 YZG-331 后的血浆药代动力学特征

参考 YZG-331 大鼠药效学剂量及预实验结果，

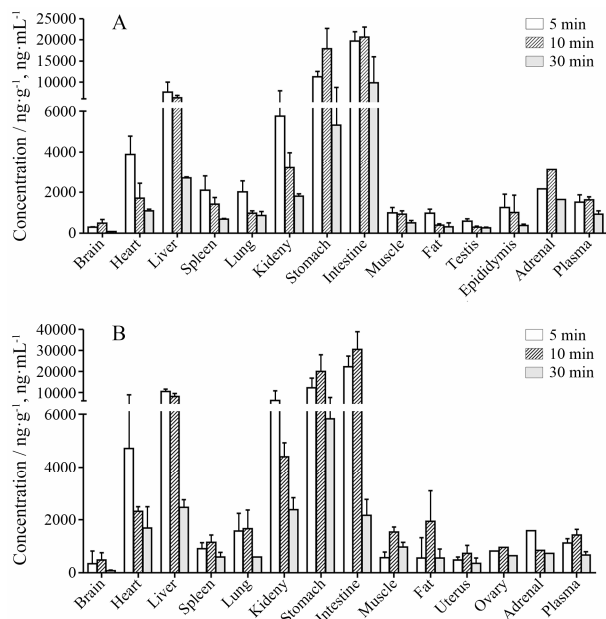


Figure 4 Tissue distribution of YZG-331 in male (A) and female (B) mice after a single oral administration at $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. $n=5$, $\bar{x}\pm s$

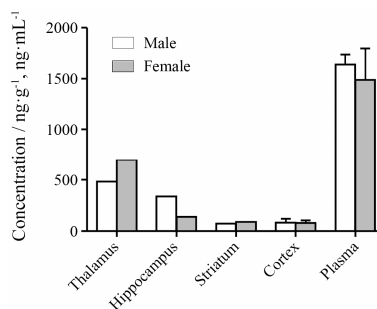


Figure 5 Brain distribution of YZG-331 in male and female mice after a single oral administration at $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. $n=5$, $\bar{x}\pm s$

选择大鼠口服 YZG-331 剂量为 25、50、100 和 $200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ，进行血浆药代动力学研究，血浆药时曲线见图 6，应用 WinNonlin 程序采用非房室模型计算其药代动力学参数见表 2。

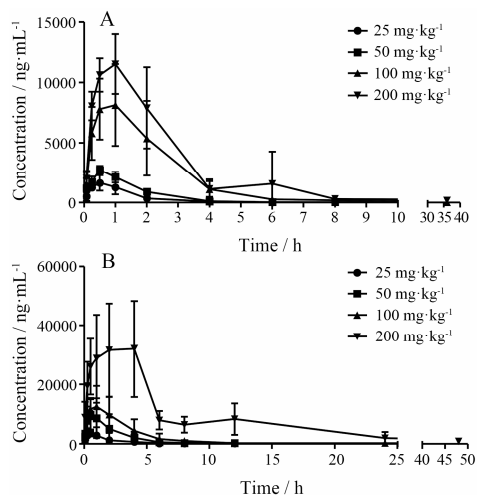


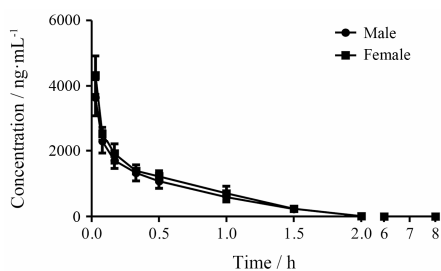
Figure 6 Mean plasma concentration-time profiles of YZG-331 in male (A) and female (B) rats after oral administration at 25, 50, 100 and $200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. $n=5$, $\bar{x}\pm s$

雌雄大鼠单次口服 YZG-331 后吸收较快，各剂量组给药后 5 min 血中即可测到原形药，雄鼠给药后 8~48 h 血药浓度接近检测限，雌鼠给药后 24~72 h 血药浓度接近检测限。雌雄大鼠的 C_{max} 均随剂量增加而递增，但高剂量组出现吸收饱和趋势。给药剂量与 AUC_{0-t} 作拟合曲线显示雌雄大鼠体内 YZG-331 的 AUC_{0-t} 增加与剂量不呈比例 ($R^2=0.94$ 和 0.92)。同时， MRT_{0-t} 随着剂量增加均出现明显延长，提示存在消除饱和。此外，YZG-331 在雌鼠体内 C_{max} 和 AUC_{0-t} 明显高于雄鼠，提示存在一定性别差异。

雌雄大鼠尾静脉注射 YZG-331 ($5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 4 h 后血浆中原形药含量低于检测限 (图 7)，药代动力学参数见表 2。雌雄大鼠静脉注射 YZG-331 后药代参数未见明显性别差异。根据口服和静脉注射 YZG-331

Table 2 Pharmacokinetic parameters of YZG-331 in male and female rat after oral administration at 25, 50, 100, 200 mg·kg⁻¹ and intravenous injection at 5 mg·kg⁻¹. n=5, $\bar{x} \pm s$. *P<0.05, **P<0.01 vs male

Parameter	po								IV	
	25 mg·kg ⁻¹		50 mg·kg ⁻¹		100 mg·kg ⁻¹		200 mg·kg ⁻¹		5 mg·kg ⁻¹	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
<i>t</i> _{1/2z} /h	0.83±0.16	1.53±0.50*	0.73±0.11	1.46±0.51*	1.16±0.36	1.62±0.43	1.02±0.43	4.68±1.37**	0.58±0.10	0.53±0.07
<i>t</i> _{max} /h	0.41±0.18	0.55±0.27	0.41±0.18	0.550±0.274	0.75±0.35	0.65±0.33	1.10±0.54	2.90±1.60*	0.033	0.033
<i>C</i> _{max} /μg·L ⁻¹	1 732±518	3 718±1 094**	2 748±353	10 118±6 123**	8 464±3 054	13 842±5 945	11 986±1 955	34 920±13 235**	-	-
AUC _{0-t} /h·μg·L ⁻¹	2 726±679	8 402±1 967**	5 471±1 042	26 290±20 181**	24 654±10 736	51 773±32 351	36 903±4 449	297 040±118 624**	2 010±341	2 135±443
MRT _{0-t} /h	1.87±0.61	2.38±0.51	2.60±0.61	2.30±0.26	3.78±0.81	4.96±1.73	5.92±2.17	11.40±4.06*	0.82±0.09	0.76±0.12
CLz/L·h·kg ⁻¹	-	-	-	-	-	-	-	-	2.55±0.443	2.43±0.547
<i>V</i> _z /L·kg ⁻¹	-	-	-	-	-	-	-	-	2.19±0.67	1.84±0.23
<i>F</i> /%	27.1	78.7	-	-	-	-	-	-	-	-

**Figure 7** Mean plasma concentration-time profiles of YZG-331 in male and female rats after intravenous injection at 5 mg·kg⁻¹. n=5, $\bar{x} \pm s$

后的 AUC_{0-t} 结果计算雄鼠口服 YZG-331 (25 mg·kg⁻¹) 后的生物利用度为 27.1%, 雌鼠为 78.7%, 存在明显性别差异。

4 YZG-331 与动物和人血浆蛋白的结合

应用超滤法测定 YZG-331 体外与动物及人血浆蛋白的结合, 结果表明 YZG-331 (100、1 000、5 000 ng·mL⁻¹) 体外与小鼠、大鼠、猴、犬、人血浆蛋白高度结合, 结合率为 93.3%~98.9% (表 3), 无明显浓度依赖性和种属差异。

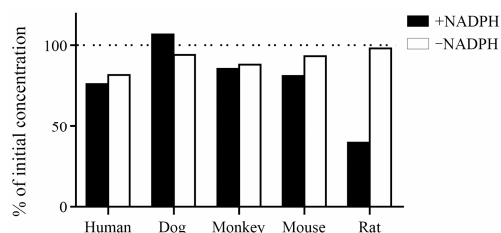
Table 3 Protein binding (%) of YZG-331 with mouse, rat, monkey, dog and human plasma *in vitro*. n=3, $\bar{x} \pm s$

Plasma	Concentration of YZG-331		
	100 ng·mL ⁻¹	1 000 ng·mL ⁻¹	5 000 ng·mL ⁻¹
Human	96.01 ± 0.76	94.60 ± 0.21	95.60 ± 0.14
Dog	96.71 ± 0.21	98.01 ± 0.06	97.01 ± 0.14
Monkey	93.90 ± 0.54	93.51 ± 2.35	93.60 ± 0.07
Rat	93.32 ± 0.27	95.01 ± 0.11	95.21 ± 0.39
Mouse	96.10 ± 0.95	97.81 ± 0.34	96.42 ± 0.04

5 YZG-331 血浆/人工胃液/人工肠液以及肝微粒体中的稳定性

YZG-331 与不同种属和人血浆及人工胃液/肠液温孵 2 h 后原形药含量无明显减少, 提示 YZG-331 在

血浆和人工胃液/肠液中稳定。YZG-331 在不同种属肝微粒体中的代谢稳定性见图 8。结果表明, 在无 NADPH 的条件下, YZG-331 含量均无明显降低。在加入 NADPH 的条件下, 大鼠肝微粒体中的原形药剩余量低于 50%, 而其他种属动物和人肝微粒体的含量均无明显降低 (<25%), 提示 YZG-331 在肝微粒体的代谢具有明显种属差异, 且 YZG-331 在大鼠肝微粒体中的代谢是 NADPH 依赖的酶促反应。

**Figure 8** Stability of YZG-331 in liver microsomes of human, dog, monkey, mouse and rat *in vitro*

6 YZG-331 在大鼠肠菌中的稳定性

YZG-331 与大鼠肠菌温孵结果见图 9。肠菌温孵液中 YZG-331 含量随温孵时间延长逐渐降低, 温孵 6 h 后原形药剩余量为 21%, 并可检测到代谢产物 (*m/z* 254) 生成, 经与对照品比对保留时间、质谱裂解规律, 该代谢产物被鉴定为 YZG-331 的水解代谢产物 M2, 其与原形药减少具有一定消长依赖性。

讨论

药代动力学研究是通过了解药物在体内的吸收、分布、代谢和排泄过程, 阐明药物的体内动态变化规律, 解释药效、毒理作用的体内物质基础, 对于早期成药性评价、优化给药方案及指导临床合理用药均具有重要意义。

YZG-331 的主要药效学研究均选用 ICR 小鼠完

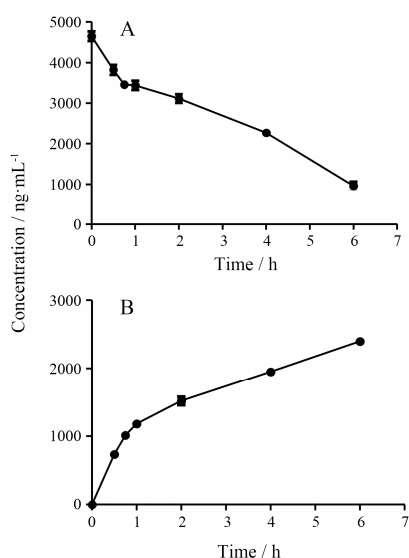


Figure 9 Concentration-time profiles of YZG-331 (A) and M2 (B) in rat intestinal bacteria incubations

成, 本研究发现小鼠口服 YZG-331 ($10\sim 80\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 后 AUC_{0-t} 可随剂量增加而递增, AUC_{0-t} 与剂量相关性较好, 但高剂量组雄鼠出现吸收饱和, 雌鼠存在消除饱和。前期研究证实, YZG-331 是外排转运体 P-gp 的底物, 因此 YZG-331 的吸收与消除饱和是否与 P-gp 或其他转运体相关有待研究^[10]。

雄性小鼠的口服生物利用度是雌鼠的 1.8 倍, 存在一定性别差异。考虑到雄鼠静脉注射 YZG-331 ($1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 后 CL 是雌鼠的 1.5 倍, 但口服给药 $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组雄鼠 C_{max} 均为雌鼠的 1.4 倍, 推测 YZG-331 的吸收过程可能是口服生物利用度的性别差异主要原因之一。YZG-331 在雌鼠体内清除较慢可能与雌性动物体重和脏器重量相对较轻、体脂含量较高、肾小球滤过率较低有关^[11]。另外, 动力学特性的性别差异还可能由 CYP450 和转运体介导的药物代谢/转运过程的差异引起^[12, 13]。

为比较 YZG-331 的体内动力学是否存在种属差异, 为后期预测人体的药效和药代及毒性评价研究寻找合适的临床前实验动物, 本研究还考察了大鼠口服和静脉注射 YZG-331 后的血浆药代动力学特征。由于大鼠口服 YZG-331 最低有效剂量为 $25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 高于小鼠, 因此本研究大鼠所用剂量与小鼠药效保持一致。研究发现 YZG-331 在大鼠体内存在吸收和消除饱和趋势。YZG-331 在雌鼠体内 C_{max} 和 AUC_{0-t} 均明显高于雄鼠, 生物利用度是雄鼠的 2.9 倍, 由于静脉给药后 YZG-331 在雌雄大鼠体内 CL、 $t_{1/2}$ 、 AUC_{0-t} 无明显差别, 提示大鼠生物利用度性别差异可能与药物吸收有关。

前期药效学研究表明, 雄性小鼠口服 YZG-331 ($10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 即可发挥药效, 而雄性大鼠则需要口服 $25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 才能产生药效。本研究可见雄性小鼠口服 YZG-331 ($10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 血药峰浓度 (C_{max}) 及体内暴露量 (AUC) 均明显高于雄性大鼠 $25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组, 提示药代动力学特征可能是导致药效种属差异的原因。另外, 雌性小鼠 YZG-331 的生物利用度低于雄鼠, 而雌性大鼠的生物利用度却高于雄鼠, 提示生物利用度也存在一定种属差异。雄性小鼠的生物利用度明显高于雌鼠, 但是雄性小鼠体内清除率明显快于雌鼠; 雄性大鼠的生物利用度明显低于雌鼠, 而雄性大鼠体内清除率与雌鼠相近, 因此推测吸收因素可能是小鼠和大鼠口服 YZG-331 生物利用度种属差异的主要原因。

同时, 对候选物代谢稳定性的评估是早期药物研发的关键。肝脏是药物代谢转化的主要场所, 人肝微粒体已普遍应用于早期代谢稳定性的高通量筛选。本研究发现, YZG-331 在不同种属动物和人肝微粒体的代谢稳定性存在明显种属差异, 因此不能采用大鼠肝脏清除率预测其在人体的代谢, 小鼠、大鼠的体内血浆药代动力学差异是否与 YZG-331 在肝脏代谢的种属差异相关还需要进一步研究。

肠道是口服药物体内吸收、转运及代谢的重要场所, 近年来随着对肠道菌群认识的增加, 肠菌参与药物代谢的重要性越来越引起重视。YZG-331 与大鼠肠菌温孵 6 h 后原形药剩余含量低于 20%, 推测大鼠肠道是 YZG-331 代谢的主要场所。此外, 具有明显种属及性别差异的 FMOs 参与 YZG-331 代谢^[14], 除在肝脏表达外, FMOs 也在小肠表达, 因此影响 YZG-331 吸收的转运体以及肠道 FMOs 的首过是否是造成 YZG-331 生物利用度性别及种属差异的原因值得进一步研究。

结论

本文研究了小/大鼠口服和静脉注射 YZG-331 后的血浆药代动力学、血浆蛋白结合以及体外代谢特征。结果表明, YZG-331 在小鼠、大鼠体内的血浆药代动力学存在性别差异和种属差异; 药物在体内分布广泛, 在主要药效部位脑中也有分布; YZG-331 与血浆蛋白结合高度结合; 主要经大鼠肝脏微粒体和肠道菌群代谢。YZG-331 的小鼠、大鼠体内血浆药代动力学性别及种属差异是否与其肝脏及肠道代谢的差异相关还需要进一步研究。

References

- [1] Ohayon MM, Partinen M. Insomnia and global sleep dissatisfaction in Finland [J]. *J Sleep Res*, 2002, 11: 339–346.
- [2] Wafford KA, Ebert B. Emerging anti-insomnia drugs: tackling sleeplessness and the quality of wake time [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2008, 7: 530–540.
- [3] Ramar K, Olson EJ. Management of common sleep disorders [J]. *Am Fam Physician*, 2013, 88: 231–238.
- [4] Griffiths AN, Jones DM, Richens A. Zopiclone produces effects on human performance similar to flurazepam, lorazepam and triazolam [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 1986, 21: 647–653.
- [5] Bocca ML, Le Doze F, Etard O, et al. Residual effect of zolpidem 10 mg and zopiclone 7.5 mg versus flunitrazepam 1 mg and placebo on driving performance and ocular saccades [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 1999, 143: 373–379.
- [6] Sheth S, Brito R, Mukherjea D, et al. Adenosine receptors: expression, function and regulation [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15: 2024–2052.
- [7] Scammell TE, Gerashchenko DY, Mochizuki T, et al. An adenosine A2a agonist increases sleep and induces Fos in ventrolateral preoptic neurons [J]. *Neuroscience*, 2001, 107: 653–663.
- [8] Zhang Y, Li M, Kang RX, et al. NHBA isolated from *Gastrodia elata* exerts sedative and hypnotic effects in sodium pentobarbital-treated mice [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2012, 102: 450–457.
- [9] Shi J, Zhang J, Yue Z. *N*⁶-Substituted adenosine derivatives, *N*⁶-substituted adenine derivatives and uses thereof [P]. WO2011069294, 2011-06-26.
- [10] Liu Z, Sheng L, Li Y, et al. Effects of P-glycoprotein on the intestine and blood-brain barrier transport of YZG-331, a promising sedative-hypnotic compound [J]. *Eur J Pharmacol*, 2016, 791: 339–347.
- [11] Obach RS, Baxter JG, Liston TE, et al. The prediction of human pharmacokinetic parameters from preclinical and *in vitro* metabolism data [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1997, 283: 46–58.
- [12] Kim RB, Wandel C, Leake B, et al. Interrelationship between substrates and inhibitors of human CYP3A and P-glycoprotein [J]. *Pharm Res*, 1999, 16: 408–414.
- [13] Wolbold R, Klein K, Burk O, et al. Sex is a major determinant of CYP3A4 expression in human liver [J]. *Hepatology*, 2003, 38: 978–988.
- [14] Liu Z, Yang Y, Sheng L, et al. Interspecies variation of *in vitro* stability and metabolic diversity of YZG-331, a promising sedative-hypnotic compound [J]. *Frontiers Pharmacol*, 2017. DOI: 10.3389/fphar.2017.00527.