

## • 实验研究 •

## *N*-甲基-*N*-(2-噻吩甲基)-*N'*-(4-甲基-2-噻唑)甘氨酸酰胺的合成、降血糖活性及药动学研究

魏群超<sup>1</sup>, 王玉丽<sup>1</sup>, 徐为人<sup>1</sup>, 汤立达<sup>1</sup>, 赵桂龙<sup>1,2\*</sup>

1. 天津药物研究院 天津市药物设计与发现重点实验室, 天津 300193

2. 山东轻工业学院 化学与制药工程学院, 山东 济南 250353

**摘要:** **目的** 在前期发现的 DPP-IV 抑制剂 *N*-(2-噻吩甲基)-*N'*-(4-甲基-2-噻唑)甘氨酸酰胺 (**1**) 基础上, 设计并合成 *N*-甲基-*N*-(2-噻吩甲基)-*N'*-(4-甲基-2-噻唑)甘氨酸酰胺 (**2**), 以延长半衰期, 并保证其降血糖活性。**方法** 尝试了两种方法合成化合物 **2**, 一是对化合物 **1** 用氨化-还原法甲基化, 二是用 *N*-甲基-2-噻吩甲胺 (**3**) 与 2-氯-*N*-(4-甲基-2-噻唑)乙酰胺 (**4**) 反应制得化合物 **2**。葡萄糖耐量实验降血糖模型研究化合物 **2** 的降血糖活性, 并研究其药动学。**结果** 两种方法合成了化合物 **2**, 其中方法二收率较高。化合物 **2** 的降血糖活性与化合物 **1** 相当, 但是半衰期延长。**结论** 获得了合成化合物 **2** 的较优方法, 保证化合物 **2** 降血糖活性前提下, 延长了半衰期。

**关键词:** *N*-甲基-*N*-(2-噻吩甲基)-*N'*-(4-甲基-2-噻唑)甘氨酸酰胺; DPP-IV 抑制剂; 降血糖活性; 药动学

中图分类号: R914.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2013)01-0007-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2013.01.002

## Synthesis, hypoglycemic activity, and pharmacokinetics of *N*-methyl-*N*-(2-thiophenylmethyl)-*N'*-(4-methyl-2-thiazolyl) glycineamide

WEI Qun-chao<sup>1</sup>, WANG Yu-li<sup>1</sup>, XU Wei-ren<sup>1</sup>, TANG Li-da<sup>1</sup>, ZHAO Gui-long<sup>1,2</sup>

1. Tianjin Key Laboratory of Molecular Design and Drug Discovery, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

2. School of Chemistry and Pharmaceutical Engineering, Shandong Polytechnic University, Jinan 250353, China

**Abstract: Objective** To design and synthesize *N*-methyl-*N*-(2-thiophenylmethyl)-*N'*-(4-methyl-2-thiazolyl) glycineamide (**2**) based on a previous discovered dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitor *N*-(2-thiophenylmethyl)-*N'*-(4-methyl-2-thiazolyl) glycineamide (**1**) in order to prolong its half-life and keep its hypoglycemic activity. **Methods** The synthesis of compound **2** was attempted with two methods: methylation of compound **1** via reductive ammoniation and synthesis by reaction of *N*-methyl-2-thiophenylmethanamine (**3**) and 2-chloro-*N*-(4-methyl-2-thiazolyl) acetamide (**4**). Hypoglycemic activity of compound **2** was investigated by ig administration using glucose tolerance test and its pharmacokinetics was researched. **Results** Compound **2** was synthesized with the above-mentioned two methods, and the second one was better with higher yield. It was tested by ig administration using glucose tolerance test. The hypoglycemic activity of compound **2** was the same as that of compound **1**, while the half-life of compound **2** was prolonged. **Conclusion** The optimal method to synthesize compound **2** is obtained. The half-life of compound **2** is prolonged under the guarantee of hypoglycemic activity of compound **2**.

**Key words:** *N*-methyl-*N*-(2-thiophene-methyl)-*N'*-(4-methyl-2-thiazole) glycineamide; dipeptidyl peptidase IV inhibitor; hypoglycemic activity; pharmacokinetics

目前, 针对 2 型糖尿病靶点的药物研究比较广泛, 其中, 以二肽基肽酶 IV (dipeptidyl peptidase IV, DPP-IV) 为靶点的抑制剂研究最为突出<sup>[1-2]</sup>。已经上市或处于 III 期临床试验的 DPP-IV 抑制剂结构,

收稿日期: 2012-11-06

基金项目: 国家重大新药创制科技重大专项 (2011ZX09401-009); 天津市科技支撑计划重点项目 (10ZCKFSH01300)

作者简介: 魏群超 (1984—), 男, 内蒙古人, 硕士, 助理研究员。E-mail: nauwqunctju@126.com

\*通信作者 赵桂龙 Tel: (022)23006869 E-mail: zhaogl@tjipr.com

以  $\alpha$ -氨基酸系列化合物的研究最为深入<sup>[3]</sup>。部分上市或处于 III 期临床试验的 DPP-IV 抑制剂见图 1。近期, Sakashita 等<sup>[4]</sup>发现, 一类含噻唑烷的化合物具有较好的降血糖活性。本实验室曾设计并合成了一系列酰胺的 *N*-噻唑环的新型 DPP-IV 抑制剂, 甘氨酸的 *N* 上连接不同的五元环, 经过药理测试证实它们中几个化合物具有较好的降血糖活性; 构效关系分析发现含有 4-甲基噻唑的

*N*-(2-噻吩甲基)-*N'*-(4-甲基-2-噻唑)甘氨酸酰胺 (1) 具有优异的降血糖活性, 其降血糖活性超过了格列齐特<sup>[4-6]</sup>。但是, 在对化合物 1 进行药动学研究时发现, 其半衰期较短 ( $t_{1/2}=0.12$  h), 不利于成药。因此, 本研究在其基础上设计并合成了 *N*-甲基-*N*-(2-噻吩甲基)-*N'*-(4-甲基-2-噻唑)甘氨酸酰胺 (2), 以期望其保证化合物 1 的降糖活性的同时, 延长其半衰期。

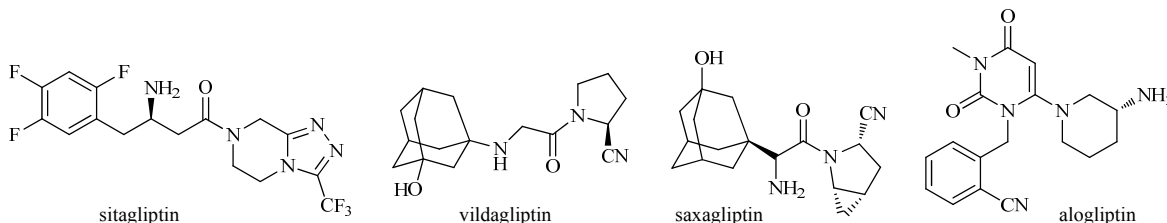


图 1 部分已上市或处于 III 期临床试验 DPP-IV 抑制剂的结构

Fig. 1 Structures of some DPP-IV inhibitors launched or in phase III clinical trial

## 1 仪器和试剂

X-4 型显微熔点仪 (巩义市予华仪器有限公司); Bruker AV400 型核磁共振仪 (DMSO- $d_6$  做溶剂, TMS 内标); FreeStyle 血糖仪 (雅培贸易上海有限公司); Waters 717 高效液相色谱仪。

利舒坦血糖试纸 (雅培贸易上海有限公司); 葡萄糖 (天津化学试剂二厂, 批号 20091121); 甲醇 (天津化学试剂二厂, 批号 20080516); 醋酸 (天津化学试剂二厂, 批号 20081025); 西他列汀 (山东贵铂源药业有限公司, 批号 20091103); 化合物 1 是按文献制备<sup>[4]</sup>, 质量分数 99%; 化合物 3 是按文献制备<sup>[7]</sup>, 质量分数 98%; 化合物 4 是按文献制备<sup>[4]</sup>, 质量分数 99%; 多聚甲醛、三乙胺、 $\text{NaBH}_4$  (天津光复精细化工有限公司, 分析纯);  $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ 、 $\text{NaCNBH}_3$  (阿拉丁化学, 质量分数 95%); 柱色谱所用硅胶 (青岛海洋化工厂, 200~300 目, 精制型); 所有溶剂均经标准方法干燥处理; 其他所用试剂均为市售分析纯。

Wistar 大鼠, 体质量 220~240 g, 天津市山川

红实验动物科技有限公司, 许可证号为 SCXK (津) 2009-0001。

## 2 方法和结果

### 2.1 合成

**2.1.1 化合物 2 的合成路线 (一)** 反应瓶中先后加入 10.00 g (37 mmol) 化合物 1、100 mL 甲醇、1.70 g (63 mmol) 多聚甲醛和 1 mL 醋酸。反应混合物于室温搅拌 1 h, 然后加入 4.62 g (75 mmol)  $\text{NaCNBH}_3$ , 60 °C 搅拌 5 h。TLC 石油醚-醋酸乙酯 (3:1) 展开, 检测大部分化合物 1 消失。旋干反应液, 硅胶柱色谱分离, 石油醚-醋酸乙酯 (3:1) 洗脱, 得到白色粉末状固体 6.21 g, 收率 59%, 质量分数 99%, mp 74~75 °C;  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 11.67 (s, 1H, CO-NH), 7.44 (dd, 1H,  $J=1.2$  Hz, Thiophene-H), 6.98~6.96 (m, 2H, Thiophene-H), 6.75 (s, 1H, Thiazole-H), 3.90 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.36 (s, 2H,  $\text{NHCO-CH}_2$ ), 2.30 (s, 3H,  $\text{N-CH}_3$ ), 2.25 (s, 3H, Thiazole- $\text{CH}_3$ )。见图 2。

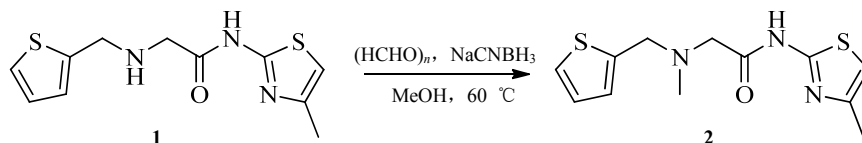


图 2 化合物 2 的合成路线 (一)

Fig. 2 Synthetic route No. 1 of compound 2

本实验尝试了3种氨化-还原的条件,其中,(HCHO)<sub>n</sub>和NaBH<sub>4</sub>条件,TLC监测没有反应;采用(HCHO)<sub>n</sub>和NaBH(OAc)<sub>3</sub>反应能发生,但是TLC显示产物很复杂;采用(HCHO)<sub>n</sub>和NaCNBH<sub>3</sub>最好,反应经TLC检测较纯,分离后产率达到59%。最终找到了化合物1直接转化为化合物2的最佳反应条件,原料、(HCHO)<sub>n</sub>、NaCNBH<sub>3</sub>物质的量比为1:1.7:2。

上述条件得到的产率并不能令人满意,尝试了将*N*-甲基-2-噻吩甲胺(3)与2-氯-*N*-(4-甲基-2-噻唑)

乙酰胺(4)直接进行亲核取代反应,得到目标化合物2。实验证明,此方法可以高产率得到目标产物2。

**2.1.2 化合物2的合成路线(二)** 反应瓶中先后加入1.20 g(6.3 mmol)化合物4、20 mL THF、1.62 g(12.6 mmol)化合物3和1.93 g(18.8 mmol)三乙胺,反应混合物在50 °C下搅拌4 h。TLC石油醚-醋酸乙酯(4:1)展开,显示化合物4消耗完全,旋干反应液,硅胶柱色谱分离,石油醚-醋酸乙酯(3:1)洗脱,得到白色粉末状固体1.63 g,收率91%,质量分数99%。合成路线见图3。

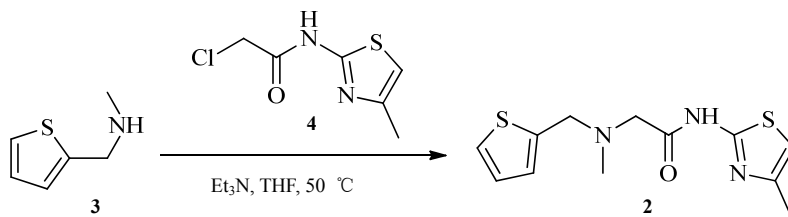


图3 合成化合物2的路线(二)

Fig. 3 Synthetic route No. 2 of compound 2

## 2.2 降血糖实验<sup>[8]</sup>

取大鼠,随机分组,分别为模型组、阳性药西他列汀组(10 mg/kg)、待测化合物组(剂量10 mg/kg),每组6只。ip葡萄糖前0.5 h ig待测化

物。各组大鼠 ip 葡萄糖 3 g/kg (1 mL/100 g)。于给药前及 ip 葡萄糖后 0.5、1、2、4 h 测定大鼠血糖值,计算降糖抑制率,结果见表1。

$$\text{抑制率} = 1 - \text{AUC}(\text{给药组}) / \text{AUC}(\text{模型组})$$

表1 正常大鼠 ig 后各时间点血糖值、AUC 值和降糖抑制率 (n=6)

Table 1 Blood glucose levels at different time points and AUC values in normal rats after ig administration (n=6)

组别	血糖值/(mmol·L <sup>-1</sup> )				AUC	降糖抑制率/%
	0.5 h	1 h	2 h	4 h		
模型	3.9±0.31	10.5±0.79	8.2±0.46	4.9±0.21	19.4	—
西他列汀	4.1±0.38	6.5±0.66**	5.3±0.36*	4.3±0.30	13.2	32
化合物1	3.9±0.41	6.8±0.54**	5.9±0.51*	4.0±0.32	13.8	29
化合物2	4.0±0.45	7.3±0.61**	5.4±0.32*	4.2±0.29	13.6	30

与模型组比较: \*P<0.05 \*\*P<0.01

\*P<0.05 \*\*P<0.01 vs model group

可见 ig 给药,化合物1、2具有明显的降低正常大鼠糖耐量的作用,二者降血糖抑制率与阳性药西他列汀相当,化合物2的降血糖抑制率与化合物1相当。

## 2.3 药动力学实验<sup>[9]</sup>

大鼠按体质量随机分为化合物1、2两组,禁食16 h, ig 给药,剂量均为250 mg/kg,于给药后5、10、15、30 min, 1、2、4、6、8、11、24 h 眼球取

血,离心,取血清,与甲醇按照1:3比例沉淀,沉淀后离心取上清液进样。

色谱条件: C<sub>18</sub> 反向柱(250 mm×4.6 mm, 10 μm); 流动相为甲醇-醋酸缓冲液(80:20); 波长为280 nm; 体积流量为0.7 mL/min; 柱温35 °C; 进样量20 μL。

测定血药浓度,计算药动力学参数。药动力学参数见表2,药物浓度-时间曲线图见图4。

表 2 化合物 1 和 2 给药组正常大鼠 ig 给药后的药动参数表 (n=3)

Table 2 Pharmacokinetic parameters of compounds 1 and 2 in normal rats after ig administration (n=3)

组别	$C_{\max}/(\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1})$	$t_{\max}/\text{h}$	$K_e$	$t_{1/2}/\text{h}$	$\text{AUC}_{0-t}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1})$
化合物 1	56.75	0.083	5.68	0.12	67.9
化合物 2	92.54	0.250	2.39	0.29	204.7

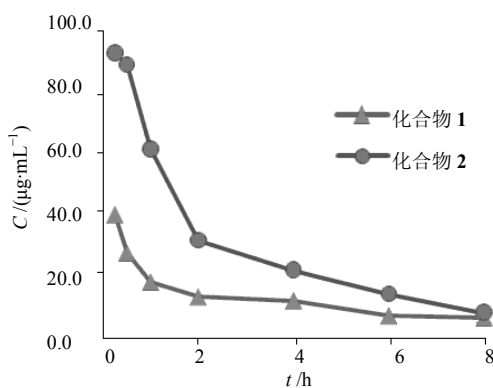


图 4 化合物 1 和 2 正常大鼠 ig 给药后药物浓度-时间曲线图 (n=3)

Fig. 4 Concentration-time curves for compounds 1 and 2 in normal rats after ig administration (n=3)

可以看出, 化合物 2 的半衰期明显比化合物 1 延长, 从而延长了药物在体内的作用时间。

### 3 讨论

为了保证化合物 1 降血糖活性, 延长其药动半衰期, 本文在化合物 1 的基础上, 噻吩-2-甲基位的 N 上甲基化, 设计了一个新的化合物 2。根据化合物 2 的结构特点, 本文设计成功了 2 条合成路线, 均合成了目标化合物 2, 合成的产物经  $^1\text{H-NMR}$  确证了结构。其中, 路线 2 以高产率实现了化合物 2 的合成, 成为化合物 2 合理的合成方法。药效实验和药动实验表明, 化合物 2 的降血糖抑制率与化合物 1 相当, 而化合物 2 的半衰期明显比化合物 1 延长, 有效地增加了药物在体内的作用时间, 提高了化合物的成药可能性。

化合物 1 噻吩-2-甲基位的 N 上甲基化, 不仅保证了降血糖抑制率, 还延长了其半衰期; 研究表明, 化合物 2 在体内可脱甲基, 缓慢转化为化合物 1,

作用于靶点二肽基肽酶 IV, 发挥降血糖作用。

### 参考文献

- [1] 杨英, 陈建华. 胰高血糖素样肽 1 及其类似物的研究进展 [J]. 中国医药生物技术, 2008, 3(2): 140-142.
- [2] 王小彦, 王玉丽, 徐为人. 近几年治疗糖尿病热点靶点的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2012, 35(1): 42-45.
- [3] Deacon C F, Holst J J. Dipeptidyl peptidase IV inhibitors: A promising new therapeutic approach for the management of type 2 diabetes [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2006, 38(5/6): 831-844.
- [4] Sakashita H, Akahoshi F, Kitajima H, et al. [(S)-gamma-(Aryl-amino) prolyl]thiazolidine compounds as a novel series of potent and stable DPP-IV inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem*, 2006, 14(11): 3662-3671.
- [5] 战付旭, 王玉丽, 赵桂龙, 等. 含噻唑环的二肽基肽酶 IV 抑制剂的设计、合成和降血糖活性研究 [J]. 有机化学, 2009, 29(8): 1236-1242.
- [6] 战付旭, 赵桂龙, 王玉丽, 等. 含噻唑环的新型二肽基肽酶 IV 抑制剂的设计合成及其降血糖作用 [J]. 中国药物化学杂志, 2009, 19(5): 334-339.
- [7] 罗杰, 赵桂龙, 王玉丽, 等. 含多氟的 4-甲基噻唑环的新型二肽基肽酶 IV 抑制剂的合成及其降血糖活性 [J]. 合成化学, 2011, 19(1): 41-44.
- [8] Pyun S Y, Lee D C, Seung Y J, et al. Elimination reactions of N-alkyl-N-chlorothenylamines promoted by MeONa-MeOH and Et<sub>2</sub>NH-MeCN. Effect of the β-Aryl group on the imine-forming transition state [J]. *J Org Chem*, 2005, 70(13), 5237-5330.
- [9] 张洁, 韩爱萍, 丁选胜. 淫羊藿总黄酮对四氧嘧啶糖尿病小鼠降糖作用的研究 [J]. 安徽医药, 2011, 15(8): 935-937.
- [10] 汤瑶, 李响, 闻镍, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定大鼠血浆中的磷酸西他列汀 [J]. 色谱, 2011, 29(6): 475-480.