

PPAR γ 非激动配体：基于 PPAR γ 部分激动剂的结构优化

郑 义^{1†}, 环 奕^{2†}, 刘守信¹, 张莉婧², 王 悦², 王 星², 冯志强^{2*}, 申竹芳^{2*}

(1. 河北科技大学, 河北 石家庄 050018; 2. 中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 北京 100050)

摘要: 最近研究表明, TZD 类药物的胰岛素增敏作用是基于其对 Cdk5 介导的 PPAR γ Ser273 的磷酸化的抑制, 起因于其对 PPAR γ 的结合活性; 而 TZD 类药物的不良反应是起因于其对 PPAR γ 的激动活性。本文以 PPAR γ 部分激动剂 INT131 分子结构为模板, 以保持其结合活性、降低或消除其激动活性为目标, 设计合成了 15 个新化合物, 其结构通过 ¹H NMR 和 ESI-MS 确证。初步药理活性筛选显示, 化合物 **15** 的 PPAR γ 结合活性为罗格列酮的 88.47%, 与 INT131 (98.55%) 相近; 而其激动活性仅为罗格列酮的 1.41%, 明显优于 INT131 (15.18%)。

关键词: 胰岛素增敏剂; PPAR γ 非激动配体; PPAR γ 部分激动剂; 2 型糖尿病

中图分类号: R916

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 09-1424-08

PPAR γ non-agonist ligand: the structure optimization based on PPAR γ partial agonist

ZHENG Yi^{1†}, HUAN Yi^{2†}, LIU Shou-xin¹, ZHANG Li-jing², WANG Yue², WANG Xing²,
FENG Zhi-qiang^{2*}, SHEN Zhu-fang^{2*}

(1. Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018, China; 2. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: Recent studies indicate that insulin-sensitizing activity of TZDs occurs through the inhibition of PPAR γ Ser273 phosphorylation mediated by cyclin-dependent kinase 5(Cdk5), which is resulted from the binding activity for PPAR γ . While, the side effects of TZDs may be related to the agonistic potency for PPAR γ . In this article, 15 target compounds were designed and synthesized based on the structure of PPAR γ partial agonist INT131, with the aim of maintaining the insulin-sensitizing activity and reducing the side effects of INT131. The structures of these compounds were confirmed by ¹H NMR and ESI-MS, and their binding activities and agonistic potencies for PPAR γ were measured. The binding activity of compound **15** is 88.47% of rosiglitazone, which is similar to INT131 (98.55%), but the agonistic potency of compound **15** is 1.41% of rosiglitazone, obviously lower than INT131 (15.18%).

Key words: insulin sensitizer; PPAR γ non-agonist ligand; PPAR γ partial agonist; type 2 diabetes

随着社会经济的发展、人们生活水平的提高和生活方式的改变, 糖尿病已经成为 21 世纪人类健康的最大威胁。2015 年, IDF (International Diabetes Federation) 统计数据显示 4.15 亿成年人患有糖尿病,

其中 2 型糖尿病占糖尿病患者 95% 以上, 且 80% 以上的 2 型糖尿病患者均伴有胰岛素抵抗。所以胰岛素增敏剂应该是治疗 2 型糖尿病的理想药物。噻唑烷二酮 (thiazolidinedione, TZD) 类药物是目前上市的唯一高度有效的治疗 2 型糖尿病的胰岛素增敏剂。1999 年, GSK 公司的罗格列酮 (rosiglitazone, 商品名 Avandia)、武田公司的吡格列酮 (pioglitazone, 商品名 Actos) (图 1) 先后经美国食品药品监督管理局

收稿日期: 2017-04-06; 修回日期: 2017-05-25.

[†]为共同第一作者.

*通讯作者 Tel: 86-10-63189351, E-mail: fengzhq@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0318

(US Food and Drug Administration, FDA) 批准上市^[1], 这类药物临床上不但能直击胰岛素抵抗, 而且显著地改善骨骼肌、脂肪组织及肝细胞的胰岛素敏感性、降低空腹高胰岛素及血糖水平, 预测临床应用前景良好^[2-4]。但不幸的是, 相当数量的病人由于服用这类药出现充血性心衰、液体潴留、体重增加和骨质疏松等不良反应, 甚至有报道, 罗格列酮有增加心血管疾病的风险^[5-6]。使这类唯一高度有效的胰岛素增敏剂的临床应用由于安全性问题而受到限制。

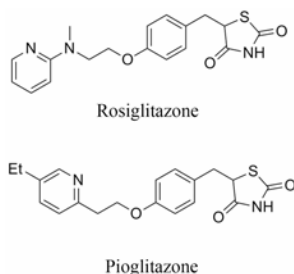


Figure 1 Rosiglitazone and pioglitazone

过氧化酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR γ) 是一种配体激活核转录因子, 在提高葡萄糖的耐受性和和胰岛素敏感性方面起着关键性作用^[7-9], 被认为是 TZDs 药物的分子靶标。TZDs 药物作为 PPAR γ 完全激动剂, 以前的药物设计都是基于化合物对 PPAR γ 的完全激动活性, 认为其激动活性越高, 对胰岛素增敏作用越强。但后来发现的 PPAR γ 部分激动剂, 与 PPAR γ 完全激动剂相比, 虽只部分激活转录基因, 却可以保持良好的降糖活性^[10], 并降低完全激动剂导致的常见不良反应。如 INT131 (图 2), 与完全激动剂罗格列酮相比, 虽然其激动活性较低, 但对胰岛素增敏活性和降糖效果相当, 骨质疏松等不良反应减小^[11, 12]。因此人们对胰岛素增敏与 PPAR γ 完全激动活性的相互关联提出了质疑。

随着对降糖机制的不断探究, 后来的研究已表明, TZD 类药物的胰岛素增敏作用是基于其对 Cdk5 介导的 PPAR γ Ser273 的磷酸化的抑制, 起因于其对 PPAR γ 的结合活性; 而 TZD 类药物的不良反应是起因于其对 PPAR γ 的激动活性^[13]。所以, 以 PPAR γ 为靶标, 设计没有激动活性, 只有结合活性的新型 PPAR γ 非激动配体, 研发只有增敏作用而无 TZD 类药物不良反应的治疗 2 型糖尿病新药成为目前的研究方向。

本文的研究正是基于报道的部分激动剂 INT131

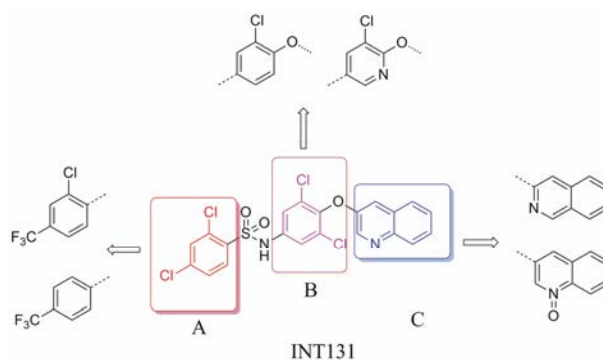


Figure 2 Structure of INT131 and strategy of designing

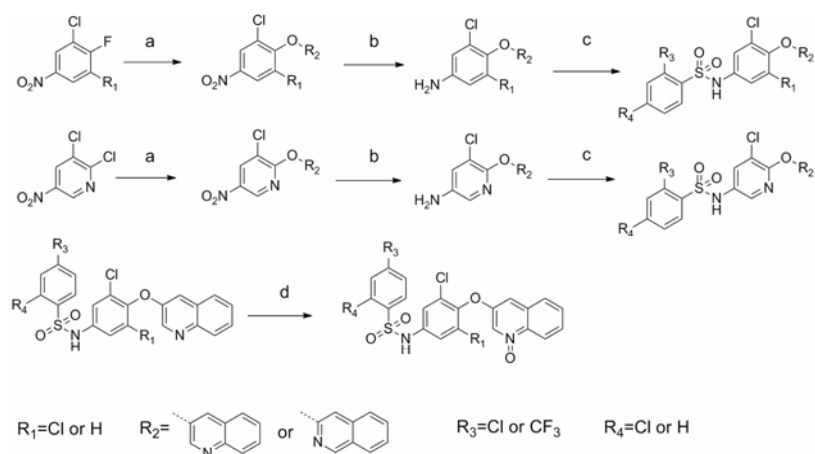
的骨架结构, 以降低或去除其激动活性, 保持或提高其结合活性为目标, 参考 INT131 与 PPAR γ 蛋白的复合物晶体结构信息^[10], 对 INT131 结构的 3 个片段 (A 环、B 环、C 环) 进行微调, 扰动 INT131 分子构象, 优化与 PPAR γ 结合腔的匹配, 提高其结合活性与激动活性比值。

INT131 分子中的 2, 4-二氯苯基, 也是本文设计分子中 R₃ 和 R₄ 所在苯环 (A 环) 位于螺旋 7 和螺旋 3 之间的通道内, 它的空间取向及与 PPAR γ 蛋白的作用强弱对提高其结合活性与激动活性之比值可能有一定影响, 而且通道内 A 环有一定的延伸空间, 选择体积更大的三氟甲基来代替氯原子, 从而考察其对活性的影响。依据 B 片段的结构可分为苯环和吡啶环两个类型, 在 B 片段分别为苯环的单氯取代、双氯取代和吡啶环的单氯取代时, 通过对 A 片段和 C 片段的结构微调, 考察其对结合活性与激动活性之比的影响。C 片段是喹啉环结构, 最简单直接的调节是改为异喹啉和喹啉环中氮的氧化, 考察其对活性的影响。总之, 本文在保持 INT131 整个分子骨架结构不变的同时对 A、B、C 三部分进行结构优化 (图 2), 试图寻找高结合能的 PPAR γ 非激动配体, 为开发新型的治疗 2 型糖尿病的胰岛素增敏剂提供先导物结构。

结果与讨论

1 目标化合物的合成

本文所设计的化合物合成路线也分为两部分, 一部分是以不同取代的硝基苯为原料, 另一部分以不同取代的硝基吡啶为原料经过取代、还原、缩合得到目标化合物 (合成路线 1)。经过实验探索发现: 步骤 a 中, R₂ 为 3-羟基喹啉时采用 THF 为溶剂进行反应, 而 R₂ 为 3-羟基异喹啉时则采用的溶剂是 DMF, 若采用 THF 体系则不反应, 考虑可能是由于 3-羟基



Scheme 1 Synthesis of target compounds. Reagents and conditions: (a) $R_2\text{-OH}$, Cs_2CO_3 , THF or DMF, rt, 3 h; (b) CH_3OH , H_2O , Zn, NH_4Cl , reflux, 30 min; (c) Benzene sulfonyl chloride, pyridine, DMAP, DCM, rt, overnight; (d) 3-Chloroperoxybenzoic acid, chloroform, rt, overnight

异喹啉中氮原子与羟基形成的共轭体系，导致氧的亲核性减弱，只有在极性较大的溶剂体系内反应才可进行；步骤 b 中，硝基的还原需要严格控制反应条件，在实验过程中，尝试过锌粉和醋酸、氢气和钨碳进行还原，但效果并不是太理想，副产物较多。后来发现溶液加热到 $40\text{ }^\circ\text{C}$ 再加入锌粉和氯化铵来还原硝基可以减少副反应的发生，温度低的情况下加入还原剂，硝基不能够一步转化为氨基，可能生成一系列含有不同价态氮的化合物，所以温度的控制是至关重要的；步骤 c 中，苯磺酰氯和胺的投料比控制在 1.2 : 1 以内，否则未反应完的苯磺酰氯在柱色谱分离纯化过程中会影响产品的纯度，进而影响收率，另外锌粉与硝基苯的投料比应 ≥ 10 ，否则反应不完全。化合物理化性质和核磁数据见表 1、2。

2 目标化合物活性评价及初步构效分析

对合成的目标化合物分别进行细胞水平的 $\text{PPAR}\gamma$ 转录激活活性筛选和分子水平的 $\text{PPAR}\gamma$ 结合活性筛选。细胞水平的激活活性表示为：相对于阴性对照的受体激活倍数 (Fold) 和相对于阳性对照的活性百分比 (%)，激活活性越高，不良反应越大；分子水平的结合活性表示：配体结合受体诱导下降的荧光强度，相对于阴性对照的结合活性倍数 (Fold) 以及相对于阳性对照的活性百分比 (%)，结合活性越高，增敏活性越高；从结合活性与激活活性的比值 (A/T) 考虑，比值越高，相对不良反应越低，但要保持一定的结合活性或增敏活性才有意义。

三个结构骨架 (骨架 1、2、3) 及其活性筛选结果见表 3~5。

表 3 结果表明，与 INT131 的结构相比，该部分

化合物结构的 B 环由 INT131 的双氯取代苯环变为单氯取代苯环。 R_2 为异喹啉环时，与 $\text{PPAR}\gamma$ 的结合活性普遍较低，但结合活性与激动活性比值均高于 INT131，其中 $R_3 = \text{CF}_3$ 、 $R_4 = \text{H}$ 时结合活性及与激动活性之比值相对较高。 R_2 为喹啉环时，与 $\text{PPAR}\gamma$ 的结合活性普遍大幅升高，但是结合活性及与激动活性之比值均比 INT131 略高，其中 $R_3 = \text{CF}_3$ 、 $R_4 = \text{Cl}$ 时结合活性及与激动活性之比值相对较高。 R_2 为氮氧化的喹啉环时，结合活性和激动活性均得到了提高，但是激动活性提高的比例要高于结合活性。

表 4 结果表明，此骨架中 B 环结构与 INT131 相同。如果 R_2 为喹啉环保持不变， $R_3 = \text{CF}_3$ 、 $R_4 = \text{H}$ 时，结合活性和激动活性均有所降低，但激动活性降低的比例要高于结合活性，导致结合活性与激动活性比值相比 INT131 有了很大提升，说明 CF_3 更有利于激动活性的降低。 R_2 为异喹啉环时，结合活性和激动活性均大幅降低，其比值也降低； R_2 为氮氧化的喹啉环时，结合活性提高，激动活性降低，结合活性与激动活性比值提升了将近一倍。

表 5 结果表明，与 INT131 的结构相比，该骨架结构的 B 环由 INT131 的双氯取代苯环变为单氯取代吡啶环。同样当 R_2 为异喹啉环， $R_3 = \text{CF}_3$ 、 $R_4 = \text{H}$ 时结合活性和激动活性均大幅降低；但 R_2 为喹啉环时，结合活性均较高，与 INT131 相近；而激动活性却降低很多，尤其是化合物 15，激动活性与 INT131 相比，降低 10 倍多，为罗格列酮的 1.41%，其激动活性接近消失。

3 活性化合物的分子对接

采用 Accelrys 公司 Discovery Studio 2.5.5 软件包中的 Receptor-Ligand interactions 模块下的 Dock

Table 1 Structures and physical property of the target compounds

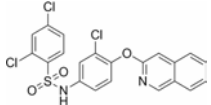
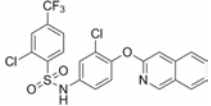
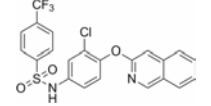
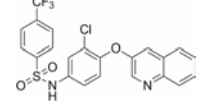
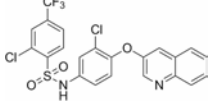
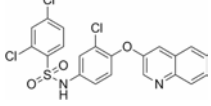
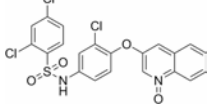
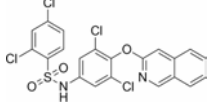
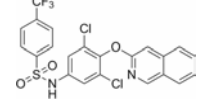
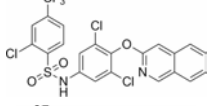
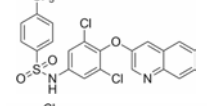
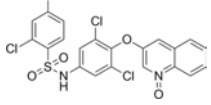
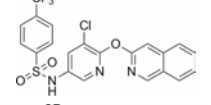
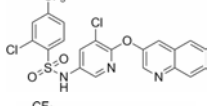
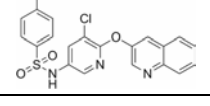
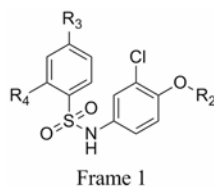
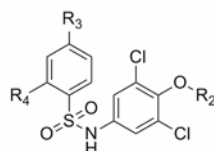
Compd.	Structural formula	Yield/%	mp/ $^{\circ}$ C	HR-ESI-MS (m/z)	
				Calcd.[M+H] ⁺	Found [M+H] ⁺
1		72	145–149	478.978 52	478.979 37
2		42	132–139	513.004 88	513.006 10
3		15	145–160	479.043 85	479.044 56
4		27	178–185	479.043 85	479.044 01
5		47	172–179	513.004 88	513.005 49
6		53	70–93	478.978 52	478.979 74
7		65	215–235	494.972 53	494.973 44
8		21	178–185	512.939 55	512.941 65
9		21	193–201	513.004 88	513.005 62
10		33	150–162	546.965 91	546.957 09
11		34	265–276	513.004 88	513.006 35
12		65	256–275	528.933 96	528.934 46
13		42	162–171	480.039 10	480.030 33
14		13	220–230	514.000 13	513.992 37
15		17	218–232	480.039 10	480.038 27

Table 2 Spectral data of target compounds

Compd.	¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)
1	δ 11.02 (s, 1H, -NH-), 8.42 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 1H, ArH), 8.10 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz, 1H, ArH), 7.95 (d, <i>J</i> = 5.9 Hz, 2H, ArH), 7.72–7.60 (m, 2H, ArH), 7.56–7.44 (m, 2H, ArH), 7.31 (dd, <i>J</i> = 14.3, 9.1 Hz, 3H, ArH), 7.15 (d, <i>J</i> = 8.7 Hz, 1H, ArH).
2	δ 11.19 (s, 1H, -NH-), 8.42 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 1H, ArH), 8.32 (d, <i>J</i> = 8.2 Hz, 1H, ArH), 8.20 (s, 1H, ArH), 7.97 (dd, <i>J</i> = 18.0, 8.0 Hz, 2H, ArH), 7.63 (t, <i>J</i> = 7.6 Hz, 1H, ArH), 7.49 (t, <i>J</i> = 8.9 Hz, 2H, ArH), 7.32 (dd, <i>J</i> = 17.9, 9.0 Hz, 3H, ArH), 7.22–7.14 (m, 1H, ArH).
3	δ 10.82 (s, 1H, -NH-), 8.43 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 1H, ArH), 8.04 (d, <i>J</i> = 2.2 Hz, 4H, ArH), 7.95 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H, ArH), 7.64 (t, <i>J</i> = 7.6 Hz, 1H, ArH), 7.50 (dd, <i>J</i> = 17.5, 8.3 Hz, 2H, ArH), 7.37–7.27 (m, 3H, ArH), 7.16 (dd, <i>J</i> = 8.8, 2.3 Hz, 1H, ArH).
4	δ 10.82 (s, 1H, -NH-), 8.81 (dd, <i>J</i> = 2.8, 1.1 Hz, 1H, ArH), 8.05–8.00 (m, 5H, ArH), 7.88 (d, <i>J</i> = 8.2 Hz, 1H, ArH), 7.68 (dd, <i>J</i> = 8.3, 7.0 Hz, 1H, ArH), 7.61–7.56 (m, 2H, ArH), 7.34 (dd, <i>J</i> = 2.3, 1.1 Hz, 1H, ArH), 7.27 (dd, <i>J</i> = 8.8, 1.1 Hz, 1H, ArH), 7.16–7.11 (m, 1H, ArH).
5	δ 11.22 (s, 1H, -NH-), 8.79 (d, <i>J</i> = 2.9 Hz, 1H, ArH), 8.30 (d, <i>J</i> = 8.2 Hz, 1H, ArH), 8.19 (s, 1H, ArH), 8.00 (dd, <i>J</i> = 15.7, 8.4 Hz, 2H, ArH), 7.87 (d, <i>J</i> = 8.2 Hz, 1H, ArH), 7.67 (t, <i>J</i> = 7.6 Hz, 1H, ArH), 7.58 (q, <i>J</i> = 6.3 Hz, 2H, ArH), 7.36 (d, <i>J</i> = 2.6 Hz, 1H, ArH), 7.26 (d, <i>J</i> = 8.9 Hz, 1H, ArH), 7.16 (dd, <i>J</i> = 8.9, 2.6 Hz, 1H, ArH).
6	δ 11.06 (s, 1H, -NH-), 8.80 (d, <i>J</i> = 2.8 Hz, 1H, ArH), 8.09 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz, 1H, ArH), 8.02 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H, ArH), 7.93 (t, <i>J</i> = 2.2 Hz, 1H, ArH), 7.88 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz, 1H, ArH), 7.71–7.64 (m, 2H, ArH), 7.58 (dd, <i>J</i> = 8.2, 5.4 Hz, 2H, ArH), 7.33 (d, <i>J</i> = 2.5 Hz, 1H, ArH), 7.26 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 1H, ArH), 7.14 (dd, <i>J</i> = 8.9, 2.5 Hz, 1H, ArH).
7	δ 11.12 (d, <i>J</i> = 4.6 Hz, 1H, -NH-), 8.65 (d, <i>J</i> = 2.1 Hz, 1H, ArH), 8.48–8.42 (m, 1H, ArH), 8.09 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 1H, ArH), 7.98–7.91 (m, 2H, ArH), 7.74–7.65 (m, 3H, ArH), 7.35–7.30 (m, 2H, ArH), 7.24 (d, <i>J</i> = 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.16–7.13 (m, 1H, ArH).
8	δ 11.30 (s, 1H, -NH-), 8.47 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 1H, ArH), 8.15 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 1H, ArH), 7.99–7.94 (m, 2H, ArH), 7.72 (dd, <i>J</i> = 8.6, 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.67–7.63 (m, 1H, ArH), 7.54–7.48 (m, 2H, ArH), 7.39 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 1H, ArH), 7.27 (s, 2H, ArH).
9	δ 11.08 (s, 1H, -NH-), 8.47 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 1H, ArH), 8.06 (d, <i>J</i> = 9.4 Hz, 4H, ArH), 7.99–7.95 (m, 1H, ArH), 7.67–7.61 (m, 1H, ArH), 7.54–7.48 (m, 2H, ArH), 7.39 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 1H, ArH), 7.30 (s, 2H, ArH).
10	δ 11.45 (s, 1H, -NH-), 8.46 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 1H, ArH), 8.36 (d, <i>J</i> = 8.2 Hz, 1H, ArH), 8.23 (d, <i>J</i> = 1.3 Hz, 1H, ArH), 8.01 (dd, <i>J</i> = 8.3, 1.3 Hz, 1H, ArH), 7.96 (d, <i>J</i> = 8.2 Hz, 1H, ArH), 7.66–7.61 (m, 1H, ArH), 7.53–7.47 (m, 2H, ArH), 7.39 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 1H, ArH), 7.30 (s, 2H, ArH).
11	δ 11.16 (s, 1H, -NH-), 8.86 (d, <i>J</i> = 3.0 Hz, 1H, ArH), 8.10–8.01 (m, 5H, ArH), 7.87 (dd, <i>J</i> = 8.2, 1.2 Hz, 1H, ArH), 7.67–7.65 (m, 1H, ArH), 7.60–7.56 (m, 1H, ArH), 7.46 (d, <i>J</i> = 2.9 Hz, 1H, ArH), 7.35–7.34 (m, 2H, ArH).
12	δ 11.45 (s, 1H, -NH-), 8.75 (d, <i>J</i> = 2.2 Hz, 1H, ArH), 8.48–8.43 (m, 1H, ArH), 8.19 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 1H, ArH), 7.95 (dd, <i>J</i> = 6.4, 2.3 Hz, 2H, ArH), 7.74–7.65 (m, 3H, ArH), 7.31 (s, 2H, ArH), 7.18 (d, <i>J</i> = 2.1 Hz, 1H, ArH).
13	δ 11.03 (s, 1H, -NH-), 8.48 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 1H, ArH), 8.04 (s, 4H, ArH), 7.99 (dd, <i>J</i> = 7.1, 1.8 Hz, 2H, ArH), 7.84 (d, <i>J</i> = 2.5 Hz, 1H, ArH), 7.70–7.66 (m, 1.5 Hz, 1H, ArH), 7.61–7.52 (m, 2H, ArH), 7.36 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 1H, ArH).
14	δ 11.23 (s, 1H, -NH-), 8.79 (d, <i>J</i> = 2.7 Hz, 1H, ArH), 8.25 (d, <i>J</i> = 8.3 Hz, 1H, ArH), 8.18 (d, <i>J</i> = 3.1 Hz, 2H, ArH), 8.05 (d, <i>J</i> = 8.3 Hz, 1H, ArH), 7.94 (dd, <i>J</i> = 13.8, 5.1 Hz, 2H, ArH), 7.82 (q, <i>J</i> = 2.4 Hz, 2H, ArH), 7.76–7.74 (m, 1H, ArH), 7.67–7.62 (m, 1H, ArH).
15	δ 10.84 (s, 1H, -NH-), 8.81 (d, <i>J</i> = 2.7 Hz, 1H, ArH), 8.19 (d, <i>J</i> = 2.7 Hz, 1H, ArH), 8.06 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H, ArH), 7.99 (s, 4H, ArH), 7.98–7.94 (m, 1H, ArH), 7.81 (d, <i>J</i> = 2.4 Hz, 1H, ArH), 7.78–7.74 (m, 2H, ArH), 7.67–7.63 (m, 1H, ArH).

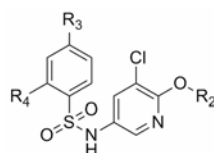
Table 3 Activity of compounds 1–7

Compd.	R ₂	R ₃	R ₄	PPAR γ transactivation		PPAR γ affinity		A/T
				Fold	Percentage/% (rosig.)	Fold	Percentage/% (rosig.)	
1		Cl	Cl	1.30	2.91	1.28	34.37	11.81
2		CF ₃	Cl	1.62	5.93	1.34	39.89	6.73
3		CF ₃	H	1.29	2.84	1.54	54.84	19.31
4		CF ₃	H	2.31	12.62	2.35	89.58	7.10
5		CF ₃	Cl	2.14	10.98	3.35	109.60	9.98
6		Cl	Cl	2.43	13.80	2.50	93.65	6.79
7		Cl	Cl	2.73	16.68	2.99	104.02	6.24
INT131				2.58	15.18	2.71	98.55	6.50
Rosig.				11.39	100	2.78	100.00	
DMSO				1.00	0.00	1.00	0.00	

Table 4 Activity of compounds 8–12

Frame 2

Compd.	R ₂	R ₃	R ₄	PPAR γ transactivation		PPAR γ affinity		A/T
				Fold	Percentage/% (rosig.)	Fold	Percentage/% (rosig.)	
8		Cl	Cl	1.64	6.16	1.25	30.92	5.02
9		CF ₃	H	1.76	7.27	1.19	24.61	3.39
10		CF ₃	Cl	0.98	-0.20	1.19	25.25	0
11		CF ₃	H	1.44	4.26	2.05	80.12	18.81
12		Cl	Cl	1.97	9.37	2.89	102.12	10.90
INT131		Cl	Cl	2.58	15.18	2.71	98.55	6.50
Rosig.				11.39	100	2.78	100.00	
DMSO				1.00	0.00	1.00	0.00	

Table 5 Activity of compounds 13–15

Frame 3

Compd.	R ₂	R ₃	R ₄	PPAR γ transactivation		PPAR γ affinity		A/T
				Fold	Percentage/% (rosig.)	Fold	Percentage/% (rosig.)	
13		CF ₃	H	1.15	1.44	1.40	44.78	31.10
14		CF ₃	Cl	1.92	8.88	2.94	103.03	11.60
15		CF ₃	H	1.15	1.41	2.31	88.47	62.74
INT131				2.58	15.18	2.71	98.55	6.50
Rosig.				11.39	100	2.78	100.00	
DMSO				1.00	0.00	1.00	0.00	

ligands (CDOCKER) 程序进行了分子对接以及图形处理。INT131 和化合物 **15** 分别与 PPAR γ (PDB: 3FUR) 的对接结果见图 3。化合物 **15** 作为配体可以很好地进入 PPAR γ 的结合腔, 形成了一定的氢键网络, 并且和 INT131 的结合模式相似。化合物 **15** 保留了 INT131 的 U 型构象, 但只有磺酰胺键的氮与 Tyr327 残基的氢键作用保留, 磺酰胺键的氧与 Tyr327 残基的氢键作用消失, 导致化合物 **15** 的激动活性大幅降低, 结合活性与激动活性比值提升, 这佐证了参考文献^[10]中报道的 Tyr327 残基与激动活性相关的推测, 这可能与 INT131 分子中 B 片段的改变及 A 片段中一个氯

被三氟甲基取代导致的分子构象的微调有关。

4 小结

本文基于文献报道的 PPAR γ 部分激动剂 INT131 的分子结构, 运用电子等排等方法设计并合成了 3 个骨架结构 15 个目标化合物。通过初步活性筛选, 发现其中化合物 **15** 具有较高的结合活性和很低的激动活性, 可作为 PPAR γ 非激动剂先导物结构进行进一步结构优化, 但是否具有较好的降糖效果和较低的不良反应仍需进一步探究。并通过初步的构效分析, 发现该类化合物中 R₃=CF₃、R₄=H 时其结合活性与激动活性比值较高, 说明 R₃=CF₃ 对于提高结合活性与

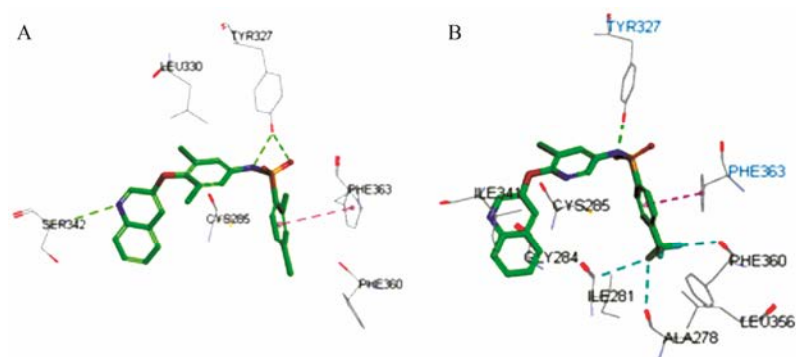


Figure 3 Docking of compound INT131 (A) and **15** (B) with 3FUR

激动活性比值贡献较大; R_2 是喹啉环时结合活性与激动活性都大幅提高; 并且 B 片段是吡啶环时, 结合活性与激动活性比值明显提升。喹啉环上氮原子的氧化导致结合活性与激动活性都稍提高, 但其比值降低。这些结果对于该类化合物的进一步结构优化可提供重要参考。

实验部分

熔点仪为 Yanaco MP-J3 显微熔点仪, 温度未校正。核磁共振仪为 Varian Mercury 400M, 内标为 TMS。质谱仪为 Agilent Technologies LC/MS TOF 或 Thermo Exactive plus-orbitrap。柱色谱分离用粗硅胶 (200~300 目), 薄层色谱用硅胶 GF254 购自青岛海洋化工厂。实验所用试剂均为分析纯, 四氢呋喃 (THF)、*N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF) 和二氯甲烷 (DCM) 均经过无水处理, 其他溶剂未特别指出则未经处理。

1 化学部分

1.1 a 步合成通法 将不同取代的硝基苯 (2 mmol)、3-羟基喹啉或者 3-羟基异喹啉 (2.4 mmol)、 Cs_2CO_3 (2.4 mmol) 加入到 100 mL 单口瓶, 加入 40 mL DMF 或者 THF, 35 °C 下搅拌 5 h, TLC 监测原料完全反应。加适量乙酸乙酯稀释, 水洗 2~3 次, 饱和氯化钠水溶液洗, 无水硫酸钠干燥。过滤, 浓缩, 柱色谱纯化得中间体。

1.2 b 步合成通法 将 a 步产物 (2.4 mmol) 溶于混合溶液 (甲醇-水=20:1), 加热到 45 °C, 搅拌下加入 Zn 粉 (24 mmol)、氯化铵 (24 mmol), 温度升至 70 °C, 反应 30 min, TLC 监测反应完成, 降至室温, 硅藻土过滤, 母液浓缩, 加适量水, 乙酸乙酯萃取两次, 有机相用饱和氯化钠水溶液洗, 然后用无水硫酸钠干燥。过滤, 浓缩所得固体直接用于下一步反应。

1.3 c 步合成通法 将 b 步产物 (1.1 mmol) 溶于无水二氯甲烷, 搅拌下加入吡啶 (1 mL)、催化量的

DMAP 和 2,4-二氯苯磺酰氯 (1.2 mmol), 溶液变为鲜红色, 室温搅拌过夜, 次日 TLC 检测显示反应完成。后处理: 将反应液蒸干, 加 20 mL 乙酸乙酯, 饱和碳酸氢钠溶液洗两次, 水洗, 饱和氯化钠水溶液洗, 无水硫酸钠干燥。过滤, 浓缩, 柱色谱纯化得相应的目标化合物。

1.4 d 步合成通法 将 c 步产物 (1 mmol) 溶于氯仿, 加入 3-氯过氧苯甲酸 (2 mmol), 室温搅拌过夜。TLC 监测反应完成后加氯仿稀释, 用饱和碳酸氢钠水溶液洗, 饱和食盐水洗, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩, 重结晶得氮氧产物。

2 生物活性实验

PPAR γ 配体结合活性: 在微孔板中先后加入受试化合物、Fluoromone 荧光基团以及相应的 PPAR γ 抗体, 充分混匀后, 避光孵育数小时, 检测各孔中荧光强度 (供体荧光 495 nm, 受体荧光 520 nm)。计算 TR-FRET 比值 (520 nm 荧光值/495 nm 荧光值), 对不同浓度下的受试化合物的 TR-FRET 比值作浓度-比值拟合曲线。

按以下公式计算 IC_{50} 及 K_i 值:

$$K_i = \frac{\text{IC}_{50}}{1 + \frac{[\text{tracer}]}{K_D}}$$

其中 [tracer] 为检测反应中最大 TR-FRET 值对应的供体浓度, 本实验中设定为 5 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$; K_D 为供体荧光的结合常数, 本实验的 K_D 值为 $2.8 \pm 0.8 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$; IC_{50} 为达到最大 TR-FRET 值一半时所对应的待测化合物浓度。

PPAR γ 配体激动活性: 将 293E 细胞转染荧光素酶报告基因 (Peak12-6 \times Gal4UAS-luci) 和表达载体 (pcDNA3.1-hPPAR γ LBD-Gal4DB) 共转染, 转染 24 h 后, 分别加入受试化合物和阳性对照化合物, 化合物处理 24 h 后裂解细胞, 加入荧光素酶底物, 用多功能酶标仪检测荧光素酶的活性。计算测试化合物不同

浓度下相比阴性对照的荧光素酶活性倍数 (fold of luciferase activity) = Value_{化合物} / Value_{阴性对照}。以完全激动剂罗格列酮的最大荧光素酶活性值为 100%, 计算受测化合物在不同浓度下的标准化荧光素酶活性百分比 (% normalized luciferase activity)^[12]。

References

- [1] Diamant DM, Heine RJ. Thiazolidinediones in type 2 diabetes mellitus [J]. *Drugs*, 2003, 63: 1373–1405.
- [2] DeFronzo RA, Ferrannini E, Groop L, et al. Type 2 diabetes mellitus [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2015, 1: 1–22.
- [3] Feldman PL, Lambert MH, Henke BR. PPAR modulators and PPAR pan agonists for metabolic diseases: the next generation of drugs targeting peroxisome proliferator-activated receptors? [J]. *Curr Top Med Chem*, 2008, 8: 728–749.
- [4] Rudnicki M, Tripodi GL, Ferrer R, et al. New thiazolidinediones affect endothelial cell activation and angiogenesis [J]. *Eur J Pharmacol*, 2016, 782: 98–106.
- [5] Jones D. Potential remains for PPAR-targeted drugs [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2010, 9: 668–669.
- [6] Cain C, Writer S. PPAR γ : none is more [J]. *Science-Business eXchange*, 2011, 4: 1–2.
- [7] Han E, Jang SY, Kim G, et al. Rosiglitazone use and the risk of bladder cancer in patients with type 2 diabetes [J]. *Medicine*, 2016, 95: e2786.
- [8] Ahmadian M, Suh JM, Hah N, et al. PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future [J]. *Nat Med*, 2013, 19: 557–566.
- [9] Taygerly JP, Megee LR, Rubenstein SM, et al. Discovery of INT131: a selective PPAR γ modulator that enhances insulin sensitivity [J]. *Bioorg Med Chem*, 2013, 21: 979–992.
- [10] Wang MZ, Weiszmann J. INT131: a selective modulator of PPAR γ [J]. *J Mol Biol*, 2009, 386:1 301–1311.
- [11] Lee DH, Huang H, Choi K, et al. Selective PPAR γ modulator INT131 normalizes insulin signaling defects and improves bone mass in diet-induced obese mice [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2012, 302: E552–60.
- [12] Huan Y, Peng J, Wang Y, et al. Establishment and application of screening methods for non-agonist PPAR γ ligand [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2014, 49: 1658–1664.
- [13] Garcia-Vallvé S, Guasch L, Tomas-Hernández S, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) and ligand choreography: newcomers take the stage [J]. *J Med Chem*, 2015, 58: 5381–5394.