

嘌呤衍生物的设计、合成及其降糖活性研究

石素梅, 李惠兰, 刘文琴, 叶喜德, 张少坤, 李家辉, 房元英*, 杨尊华*

(江西中医药大学药学院, 江西 南昌 330004)

摘要: 基于前期工作基础, 本研究采用药效团拼合原理, 尝试将 GPR119 激动剂和 DPP-4 抑制剂的药效片段拼接到嘌呤环的 6 位和 9 位, 设计合成了 12 个嘌呤类衍生物作为 GPR119 与 DPP-4 双调节剂。体外降血糖活性结果显示, 化合物 **11** 含有 2-氟-4-甲磺基苯胺片段和氰基吡咯烷片段, 表现出最强的 GPR119 激动活性 ($EC_{50} = 0.33 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $IA = 71.1\%$) 与 DPP-4 抑制活性 (58.4% 抑制浓度为 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 21.2% 抑制浓度为 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。对化合物进行构效关系讨论与分子对接研究, 为下一步化合物的设计提供指导。

关键词: GPR119; DPP-4; 设计; 合成; 降血糖活性

中图分类号: R914 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)05-1275-08

Design, synthesis and antidiabetic activity studies of purine derivatives

SHI Su-mei, LI Hui-lan, LIU Wen-qin, YE Xi-de, ZHANG Shao-kun, LI Jia-hui,
FANG Yuan-ying*, YANG Zun-hua*

(College of Pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

Abstract: Based our previous work, twelve purine derivatives were designed and synthesized as dual modulators of GPR119 and DPP-4 by conjugating the GPR119 activating and DPP-4 inhibiting fragments with the position 6 and 9 of purine core via an approach of merged pharmacophores. Compound **11**, bearing 2-fluoro-4-methylsulphonyl anilide and cyanopyrrolidine moieties, exhibited the most potent GPR119 agonistic activities ($EC_{50} = 0.33 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $IA = 71.1\%$) and DPP-4 inhibitory (58.4% inhibition at $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 21.2% inhibition at $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) activities in the *in vitro* antidiabetic study. Subsequently, we performed studies on structure activity relationships and molecular docking to guide the further drug design.

Key words: GPR119; DPP-4; design; synthesis; antidiabetic activity

2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 是一种以胰岛素抵抗和胰岛素的代偿性分泌不足为特征的慢性代谢疾病, 如果不进行有效的预防和治疗, 可能会导致严重的并发症^[1-4]。由于 T2DM 的病因和发病机

制十分复杂, 治疗药物往往在初期有效, 到后期却无法控制血糖。为满足糖尿病患者长期用药的需求, 采用“多靶点配体”策略进行药物的设计有可能成为开发出强效且安全的抗 2 型糖尿病药物的有用策略。多靶点药物在降低毒性、避免联合用药时可能出现的相互作用等方面显示出其特有的优势^[5,6]。

G 蛋白偶联受体 119 (G protein-coupled receptor 119, GPR119) 和二肽基肽酶-4 (dipeptidyl peptidase-4, DPP-4) 都是与 2 型糖尿病相关的靶点, 相应的激动剂或抑制剂均能通过调节血浆中胰高糖素样肽-1 (glucagon-like peptide 1, GLP-1) 和葡萄糖依赖性促胰岛素多肽

收稿日期: 2022-11-07; 修回日期: 2022-12-06.

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82160663); 江西省自然科学基金项目 (20212BAB206015, 20212BAB206016); 江西省教育厅科学技术研究项目 (GJJ201211); 江西省卫计委科技项目 (2019A108); 江西中医药大学中药炮制创新团队 (CXTD22003).

*通讯作者 Tel: 86-791-87118908,

E-mail: joshiyy@126.com; fangyuanying@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-1187

(glucose-dependent insulintropic polypeptide, GIP) 的浓度水平来发挥降糖作用^[7-10]。本课题组前期致力于设计合成高选择性的强效GPR119激动剂,考虑到GPR119激动剂与DPP-4抑制剂两者在血糖调节上的协同作用,设想若能设计出可以同时激动GPR119和抑制DPP-4两个靶点的调节剂,可能会产生更强的血糖浓度依赖性的胰岛素释放作用,更好地保持胰岛 β 细胞活力,维持2型糖尿病患者的葡萄糖平衡。于是,基于片段的药物设计(fragment-based drug design, FBDD)原理,通过保留GPR119激动剂的尾部取代芳胺和中间母核药效团片段,并将从DPP-4抑制剂中提取的共同特征片段药效团与之拼合,设计了GPR119与DPP-4双重调节剂^[11]。在设计合成的一系列四氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶衍生物

中,衍生物**1**(图1)显示出强效的GPR119激动活性($EC_{50} = 8.7 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)和中等的DPP-4抑制活性(74.5%抑制浓度为 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),促使继续寻找具有GPR119激动与DPP-4抑制双重活性的新型小分子化合物。

本研究在四氢吡啶并[4,3-*d*]嘧啶类GPR119/DPP-4双重调节剂的基础上,采用骨架跃迁策略对母核结构进行修饰,设计合成了一系列6,9-二取代嘌呤衍生物,并测试其体外降血糖活性与探讨其构效关系(图2)。

结果与讨论

1 化合物的合成

中间体**2**由L-脯氨酸酰胺化后脱水得到,中间体**3~5**由环胺化合物与氯乙酰氯反应得到(合成路线1)。

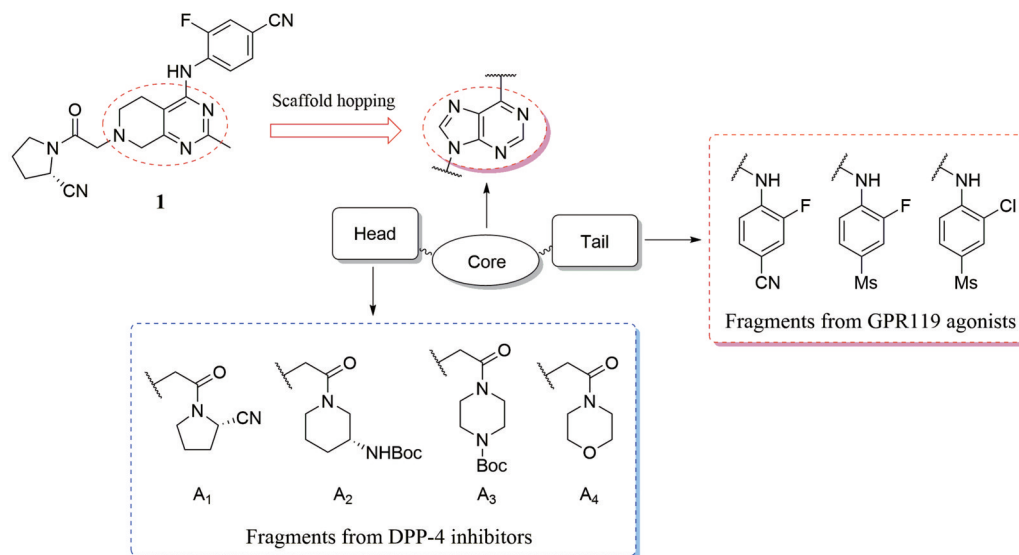


Figure 1 Design strategy of dual GPR119 and DPP-4 modulators

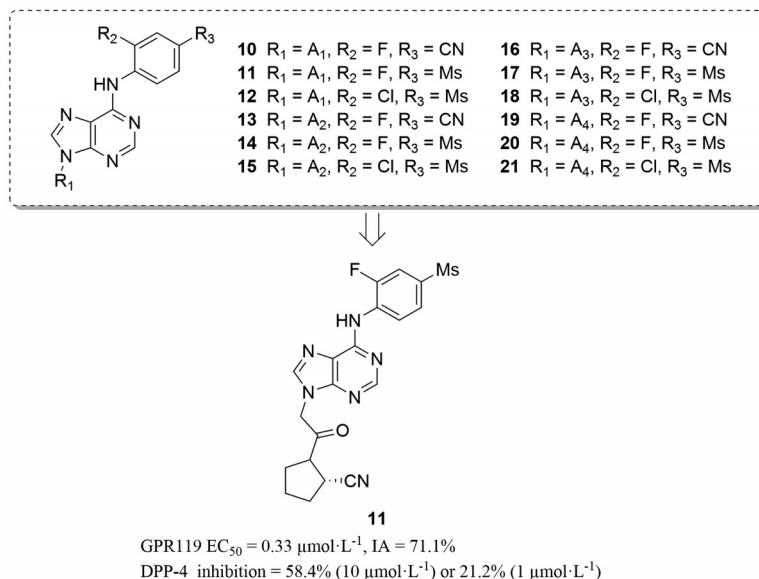
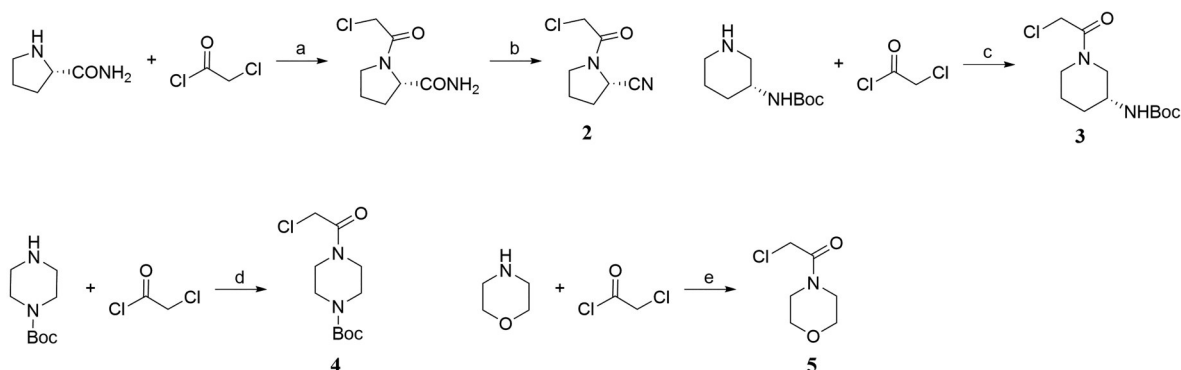
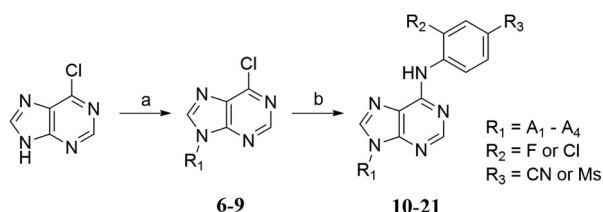


Figure 2 Structures of target compounds and the most potent compound **11**



Scheme 1 Synthetic route of intermediates 2-5. Reagents and conditions: (a) K_2CO_3 , DCM, room temperature, 1 h; (b) TFAA, pyridine, DCM, room temperature, 4 h, 73%; (c) TEA, DCM, room temperature, 1 h, 98%; (d) TEA, DCM, room temperature, 1 h, 73%; (e) TEA, DCM, room temperature, 1 h, 97%

在碱性条件下, 6-氯嘌呤分别与氯乙酰胺中间体 2~5 反应得到中间体 6~9。随后, 中间体 6~9 分别与不同取代芳胺发生 Buchwald-Hartwig 芳胺化反应, 得到相应的目标产物 10~21 (合成路线 2)。



Scheme 2 Synthetic route of compounds 10-21. Reagents and conditions: (a) 2 or 3 or 4 or 5, K_2CO_3 , DMF, 70 °C, 12 h; (b) Ar-NH₂, BINAP, Pd₂(dba)₃, Cs₂CO₃, 1,4-dioxane, 110 °C, 24 h

2 活性评价

本部分实验分别选择 GPR119 激动剂 GSK-1292263 和 DPP-4 抑制剂西格列汀作为阳性对照, 测试目标化合物 10~21 (图 2) 对 GPR119 受体激动作用和对 DPP-4 酶抑制作用, 结果见表 1。体外活性结果表明, 大部分化合物能够显示出中等的 GPR119 激动活性 ($EC_{50} < 10.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 甚至可以达到亚微摩尔级别, 而 DPP-4

抑制活性则为中等偏弱。发现从 DPP-4 抑制剂中提取的药效团片段, 即 R₁ 取代基的结构对化合物 DPP-4 抑制活性的影响最为显著, 当 R₁ 为 A₁ 片段取代时 DPP-4 抑制活性最强, 由此推测对该部分结构进行合理改造是提高双调节剂 DPP-4 抑制作用的重要手段。苯环 C2 位上为氟取代时或其 C4 位为氰基 (CN) 取代时 GPR119 激动活性通常都高于相应的氯取代物或甲磺基 (Ms) 取代物, 前二者对提高 GPR119 激动活性更有利。其中, 化合物 11 的 GPR119 激动活性与内在活性最佳 ($EC_{50} = 0.33 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, IA = 71.1%), 并显示出一定的 DPP-4 抑制作用 (58.4% 抑制浓度为 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 21.2% 抑制浓度为 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。

3 分子对接结果分析

为进一步分析化合物与 DPP-4 靶点的结合模式, 利用 hDPP-4 与西格列汀的 X 射线晶体结构与体外降糖活性最强的化合物 11 进行分子模拟对接研究 (图 3)。结果显示, 该化合物与西格列汀具有相似的活性结合位点^[12-14]。化合物 11 的 2-氰基吡咯烷基团完全嵌入到 DPP-4 酶的疏水口袋中, 与 Glu205、Glu206 和 Arg125 产生氢键相互作用, 这是保持 DPP-4 抑制活性的关键。嘌呤环与结合位点入口处的 Phe357 侧链形

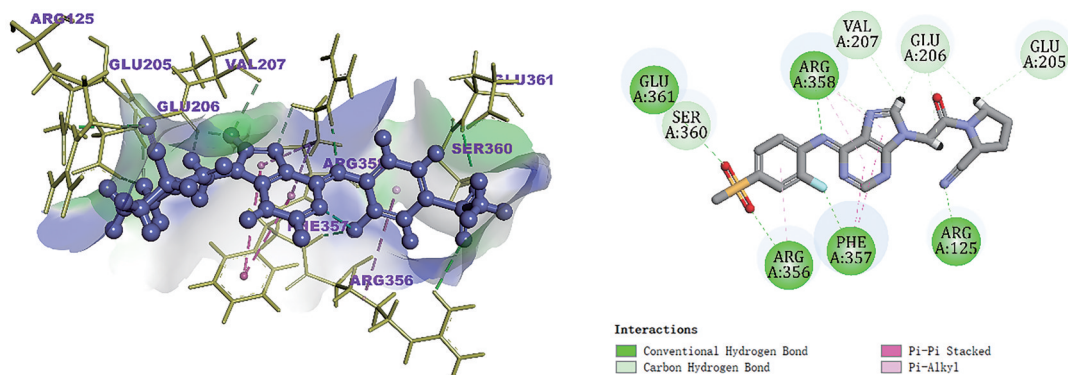
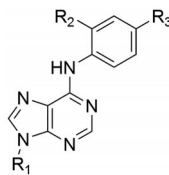


Figure 3 Docking results of compound 11 (purple stick) with DPP-4 (PDB ID: 1x70)

Table 1 GPR119 agonistic and DPP-4 inhibitory activities of 6,9-disubstituted purine compounds. ^aIntrinsic activity (%max): cAMP stimulation % compared to maximal effect of GSK1292263

Compd.	R ₁	R ₂	R ₃	GPR119		DPP-4	
				EC ₅₀ /μmol·L ⁻¹	IA/% ^a	Inhibition (10 μmol·L ⁻¹)/%	Inhibition (1 μmol·L ⁻¹)/%
10	A ₁	F	CN	1.4	62.5	49.3	7.8
11	A ₁	F	Ms	0.33	71.1	58.4	21.2
12	A ₁	Cl	Ms	0.87	58.2	37.5	5.6
13	A ₂	F	CN	3.7	45.9	17.5	4.4
14	A ₂	F	Ms	8.5	47	34	9.6
15	A ₂	Cl	Ms	>10	29.3	48.3	8.9
16	A ₃	F	CN	>10	23.3	22.7	3.2
17	A ₃	F	Ms	7.7	36.3	15.2	3.3
18	A ₃	Cl	Ms	3.6	63.5	10.2	2.4
19	A ₄	F	CN	8.6	29.4	4.1	2.6
20	A ₄	F	Ms	6.3	47.9	0.6	2.2
21	A ₄	Cl	Ms	>10	29.7	7.3	3.9
GSK1292263				0.010 35	100	–	–
Sitagliptin				–	–	99.9	99.5

成了较强的 π - π 堆积作用, 该作用同样存在于西格列汀 1,2,4-三唑环与 Phe357 残基之间。在 S2 延伸区域, 化合物与 Val207 和 Arg358 之间的相互作用增强了其与口袋的结合能力。

小结

本研究以融合型双靶点化合物 **1** 为先导化合物, 采用骨架跃迁策略设计合成了 12 个新型嘌呤类衍生物作为 GPR119/DPP-4 双调节剂, 并通过体外生物活性研究评估目标化合物的双靶点活性。合成的化合物与前期设计合成的双调节剂相比并没有得到预期的提高, 但是发现中间母核对两个靶点的活性影响都比较大, 寻找合适的母核结构可能是开发出对两个靶点都具有强活性的双调节剂的关键。此外, 头部药效团片段是保证 DPP-4 抑制活性的关键, 寻找合适的片段或进行合理结构修饰是一个难点。在体外活性结果基础上, 对于双重活性最佳的化合物 **11** 进行了分子对接研究, 为进一步结构修饰提供信息。

实验部分

本文化合物的 ¹H NMR 及 ¹³C NMR 使用 Bruker AVANCE III HD 600MHz 型核磁共振波谱仪测定; HR-ESI-MS 使用超高分辨 LTQOrbitrapMS (Thermo) 质谱仪测定; 熔点使用 WRS-2 型微机熔点仪测定; 柱色谱均使用青岛海洋化工有限公司精细型 200~300 目柱色

谱硅胶; 薄层色谱 (TLC) 使用上海盛亚化工有限公司生产的 GF254 型铝箔色谱硅胶板, 用 WFH-204B 型手提紫外分析仪 254 显色。所有试剂均为市售分析纯或化学纯, 除特别说明外, 一般不经纯化直接使用。

1 化学合成

1.1 (S)-1-(2-氯乙酰基)吡咯烷-2-甲腈 (**2**)

将 L-脯氨酸 (3.00 g, 26.28 mmol) 溶于二氯甲烷 (30 mL) 中, 加入 K₂CO₃ (7.26 g, 52.56 mmol), 0 °C 下慢慢滴加氯乙酰氯 (4.18 mL, 52.56 mmol), 升温至室温后继续反应 1 h, TLC 监测。反应完成后加入二氯甲烷稀释, 饱和 NaCl 溶液洗两次, 无水硫酸镁干燥, 过滤, 减压浓缩得到黄色中间体, 无需纯化直接用于下一步反应。将上述中间体溶于二氯甲烷 (50 mL) 中, 加入吡啶 (6.00 mL, 74.38 mmol), 在氩气保护且 0 °C 下加入三氟乙酸酐 (5.19 mL, 36.79 mmol), 随后升温至室温, 室温条件下搅拌反应 4 h。反应完成后加入冰水 (20 mL) 淬灭, 有机层用 10% 盐酸溶液 (30 mL) 洗 1 次, 无水硫酸镁干燥, 过滤, 减压浓缩滤液, 硅胶柱色谱 ($V_{\text{石油醚}}: V_{\text{乙酸乙酯}} = 2:1$) 分离得到黄色油状产物 3.31 g, 两步产率为 73.0%。¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 4.78 (dd, $J = 8.0, 2.6$ Hz, 1H), 4.08 (d, $J = 3.7$ Hz, 2H), 3.79~3.71 (m, 2H), 3.69~3.59 (m, 2H), 2.40~2.29 (m, 2H), 2.26~2.20 (m, 2H)。

1.2 (R)-(1-(2-氯乙酰基)哌啶-3-基)氨基甲酸叔丁酯 (**3**)

将 R-3-(Boc-氨基)哌啶 (2.00 g, 9.99 mmol) 溶于

二氯甲烷 (20 mL) 中, 搅拌下加入三乙胺 (2.08 mL, 14.98 mmol), 0 °C 下慢慢滴加氯乙酰氯 (0.95 mL, 11.98 mmol), 升温至室温后继续反应 1 h, TLC 监测。反应完成后加入二氯甲烷稀释, 有机层用 10% 盐酸溶液 (30 mL) 洗 1 次, 饱和 NaCl 溶液洗两次, 无水硫酸镁干燥, 过滤, 减压浓缩得到黄棕色粗品。硅胶柱色谱 ($V_{\text{石油醚}}:V_{\text{乙酸乙酯}} = 3:1$) 分离得到白色固体产物 (2.71 g, 98.1%)。 $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 4.63 (s, 1H), 4.10 (s, 1H), 4.08 (s, 2H), 3.68~3.62 (m, 2H), 3.49~3.43 (m, 2H), 3.35~3.29 (m, 2H), 1.94~1.90 (m, 1H), 1.73~1.65 (m, 1H), 1.44 (s, 9H)。

1.3 4-(2-氯乙酰基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯 (4)

采用与 3 类似合成方法, 由 1-Boc-哌嗪 (3.00 g, 16.11 mmol) 得到淡黄色油状液体产物 4 (3.11 g, 73.5%)。 $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 4.10 (s, 2H), 3.62 (s, 2H), 3.53 (s, 4H), 3.47 (s, 2H), 1.50 (s, 9H)。

1.4 2-氯-1-吗啉乙-1-酮 (5)

采用与 3 类似合成方法, 由吗啉 (1.00 mL, 11.48 mmol) 得到淡黄色油状液体产物 5 (1.83 g, 97.4%)。 $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 4.06 (s, 2H), 3.72 (t, $J = 4.8$ Hz, 2H), 3.69 (t, $J = 4.9$ Hz, 2H), 3.62 (t, $J = 4.9$ Hz, 2H), 3.52 (t, $J = 4.9$ Hz, 2H)。

1.5 中间体 6~9 合成通法

将 6-氯嘌呤 (500 mg, 3.24 mmol) 和氯化物 2~5 (4.21 mmol) 溶于 *N,N*-二甲基甲酰胺 (10 mL) 中, 加入碳酸钾 (671 mg, 4.85 mmol), 70 °C 反应过夜, TLC 监测反应。反应完成后用乙酸乙酯和水萃取 3 次, 饱和 NaCl 溶液洗两次, 无水硫酸镁干燥, 过滤, 乙酸乙酯层减压浓缩后使用硅胶柱色谱进行分离。

1.5.1 (S)-1-(2-(6-氯-9H-嘌呤-9-基)乙酰基)吡咯烷-2-甲腈 (6) 黄色油状物, 产率 68.0%。 $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 8.73 (s, 1H), 8.35 (s, 1H), 5.16 (d, $J = 16.9$ Hz, 1H), 5.07 (d, $J = 16.9$ Hz, 1H), 4.78 (dd, $J = 8.0, 2.3$ Hz, 1H), 3.84 (ddd, $J = 9.0, 7.8, 3.3$ Hz, 1H), 3.70 (ddd, $J = 9.3, 8.2, 6.6$ Hz, 1H), 2.41~2.32 (m, 2H), 2.32~2.23 (m, 2H)。

1.5.2 叔丁基(S)-1-(2-(6-氯-9H-嘌呤-9-基)乙酰基)哌啶-3-基)氨基甲酸酯 (7) 无色油状物, 产率 74.0%。 $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 8.73 (s, 1H), 8.17 (s, 1H), 5.20~5.10 (m, 2H), 4.77 (s, 1H), 3.86 (dd, $J = 13.5, 3.3$ Hz, 1H), 3.75 (s, 1H), 3.68 (s, 1H), 3.41~3.35 (m, 2H), 2.01~1.96 (m, 1H), 1.77~1.72 (m, 1H), 1.63~1.56 (m, 2H), 1.46 (s, 9H)。

1.5.3 叔丁基 4-(2-(6-氯-9H-嘌呤-9-基)乙酰基)哌嗪-1-羧酸酯 (8) 浅黄色油状物, 产率 70.0%。 $^1\text{H NMR}$

(600 MHz, CDCl_3) δ 8.73 (s, 1H), 8.25 (s, 1H), 5.14 (s, 2H), 3.63 (t, $J = 5.5$ Hz, 2H), 3.62~3.56 (m, 4H), 3.47 (t, $J = 5.3$ Hz, 2H), 1.49 (s, 9H)。

1.5.4 2-(6-氯-9H-嘌呤-9-基)-1-吗啉代乙烷-1-酮 (9) 浅黄色油状物, 产率 81.0%。 $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 8.73 (s, 1H), 8.25 (s, 1H), 5.13 (s, 2H), 3.80 (t, $J = 4.8$ Hz, 2H), 3.73 (t, $J = 4.9$ Hz, 2H), 3.67~3.62 (m, 4H)。

1.6 目标化合物 10~12 合成通法

将中间体 6 (200 mg, 0.69 mmol) 和芳胺 (0.76 mmol) 溶于 1,4-二氧六环 (4 mL) 中, 加入三(二亚苄基丙酮) 二钯 (0.14 mmol)、1,1'-联萘-2,2'-双二苯膦 (0.14 mmol) 和碳酸铯 (1.72 mmol), 在氩气保护下升温至 110 °C, 回流搅拌反应 24 h。反应完成后, 冷却至室温, 加入适量水, 用乙酸乙酯萃取 3 次, 饱和 NaCl 溶液洗两次, 无水硫酸镁干燥, 过滤, 减压浓缩, 得到的粗品使用硅胶柱色谱进行分离纯化。

1.6.1 (S)-1-(2-(6-((4-氟基-2-氟苯基)氨基)-9H-嘌呤-9-基)乙酰基)吡咯烷-2-甲腈 (10) 浅黄色固体, 产率 35.0%。熔点 175.2~176.5 °C; $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 9.85 (s, 1H), 8.40 (s, 1H), 8.29 (s, 1H), 8.07 (t, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.93 (dd, $J = 10.6, 1.9$ Hz, 1H), 7.72 (dd, $J = 8.4, 1.9$ Hz, 1H), 5.29 (d, $J = 17.3$ Hz, 1H), 5.21 (d, $J = 17.3$ Hz, 1H), 4.81 (dd, $J = 7.6, 3.5$ Hz, 1H), 3.85~3.80 (m, 1H), 3.67~3.61 (m, 1H), 2.25~2.18 (m, 2H), 2.16~2.06 (m, 2H); $^{13}\text{C NMR}$ (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 165.46, 154.38 (d, $J = 249.0$ Hz), 151.79, 151.31, 150.83, 143.66, 132.24 (d, $J = 11.1$ Hz), 129.07 (d, $J = 3.3$ Hz), 125.91, 119.71, 119.67 (d, $J = 23.7$ Hz), 119.07, 118.07, 106.61 (d, $J = 9.3$ Hz), 46.48, 45.59, 44.78, 29.53, 24.88; HR-MS-ESI (m/z) $\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{FN}_8\text{O}$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 计算值 391.143 1, 测量值 391.148 9。

1.6.2 (S)-1-(2-(6-((2-氟-4-(甲磺酰)苯基)氨基)-9H-嘌呤-9-基)乙酰基)吡咯烷-2-甲腈 (11) 浅黄色固体, 产率 28.6%。熔点 192.4~193.4 °C; $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, $\text{Acetone}-d_6$) δ 8.95 (t, $J = 8.1$ Hz, 1H), 8.52 (s, 1H), 8.23 (s, 1H), 7.83 (dd, $J = 7.7, 2.1$ Hz, 1H), 7.79 (dd, $J = 10.5, 2.1$ Hz, 1H), 5.34 (d, $J = 17.2$ Hz, 1H), 5.28 (d, $J = 17.2$ Hz, 1H), 4.81 (dd, $J = 8.0, 2.5$ Hz, 1H), 4.03~3.96 (m, 1H), 3.87~3.81 (m, 1H), 3.19 (s, 3H), 2.40~2.21 (m, 4H); $^{13}\text{C NMR}$ (150 MHz, $\text{acetone}-d_6$) δ 166.12, 153.35 (d, $J = 248.4$ Hz), 152.79, 152.04, 151.90, 144.72, 136.29 (d, $J = 6.2$ Hz), 133.53 (d, $J = 10.0$ Hz), 124.93 (d, $J = 3.4$ Hz), 123.17, 121.23, 119.39, 115.30, 115.15, 47.64, 46.63, 45.60, 44.46, 25.96; HR-MS-ESI (m/z) $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{FN}_7\text{O}_3\text{S}$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 计算值 444.125 4, 测量值 444.129 8。

1.6.3 (S)-1-(2-(6-((2-氯-4-(甲磺酰)苯基)氨基)-9H-嘌呤-9-基)乙酰基)吡咯烷-2-甲腈 (12) 浅黄色固体, 产率 17.3%。¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 9.18 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 8.60 (s, 1H), 8.42 (s, 1H), 8.11 (s, 1H), 8.00 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.87 (dd, *J* = 8.8, 2.2 Hz, 1H), 5.16~4.97 (m, 2H), 4.79 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 3.90~3.82 (m, 1H), 3.77~3.67 (m, 1H), 3.08 (s, 3H), 2.40~2.33 (m, 2H), 2.33~2.21 (m, 2H)。

1.7 目标化合物 13~15 合成通法

采用化合物 10~12 类似合成步骤, 由中间体 7 (200 mg, 0.51 mmol)、芳胺 (0.56 mmol)、三(二亚苄基丙酮)二钨 (0.10 mmol)、1,1'-联萘-2,2'-双二苯膦 (0.10 mmol) 和碳酸铯 (1.28 mmol) 反应得到化合物 13~15。

1.7.1 叔丁基(S)-(1-(2-(6-((4-氟基-2-氟苯基)氨基)-9H-嘌呤-9-基)乙酰基)哌啶-3-基)氨基甲酸酯 (13) 浅黄色固体, 产率 14.4%。¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.41 (s, 1H), 8.43 (s, 1H), 8.39 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 8.31 (s, 1H), 8.08 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.93 (dd, *J* = 8.5, 2.2 Hz, 1H), 5.31 (d, *J* = 17.3 Hz, 1H), 5.22 (d, *J* = 17.2 Hz, 1H), 4.85~4.79 (m, 1H), 3.86~3.81 (m, 1H), 3.68~3.61 (m, 2H), 2.24~2.18 (m, 2H), 2.18~2.12 (m, 2H), 2.11~2.04 (m, 2H), 1.48 (s, 9H)。

1.7.2 叔丁基(S)-(1-(2-(6-((2-氟-4-(甲磺酰)苯基)氨基)-9H-嘌呤-9-基)乙酰基)哌啶-3-基)氨基甲酸酯 (14) 浅黄色固体, 产率 11.6%。¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 9.13 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.62 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 8.02 (d, *J* = 40.8 Hz, 1H), 7.79 (dd, *J* = 8.7, 1.6 Hz, 1H), 7.73 (dd, *J* = 10.1, 2.1 Hz, 1H), 5.21~5.03 (m, 2H), 4.91~4.63 (m, 1H), 3.87 (d, *J* = 13.5 Hz, 1H), 3.82~3.58 (m, 2H), 3.46~3.25 (m, 2H), 3.07 (s, 3H), 2.02~1.95 (m, 1H), 1.80~1.71 (m, 1H), 1.64~1.55 (m, 2H), 1.47 (s, 9H)。

1.7.3 叔丁基(S)-(1-(2-(6-((2-氯-4-(甲磺酰)苯基)氨基)-9H-嘌呤-9-基)乙酰基)哌啶-3-基)氨基甲酸酯 (15) 浅黄色固体, 产率 22.4%。熔点 207.3~209.1 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 9.19 (dd, *J* = 8.8, 4.1 Hz, 1H), 8.62 (s, 1H), 8.42 (s, 1H), 8.08~7.97 (m, 2H), 7.88 (dd, *J* = 8.8, 2.2 Hz, 1H), 5.20~5.04 (m, 2H), 4.84 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H), 3.87 (d, *J* = 10.2 Hz, 1H), 3.83~3.59 (m, 2H), 3.46~3.24 (m, 2H), 3.08 (s, 3H), 2.12~1.78 (m, 2H), 1.66~1.55 (m, 2H), 1.47 (s, 9H); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 164.39, 155.50, 152.45, 151.01, 150.85, 143.31, 140.52, 134.02, 128.61, 127.27, 122.96, 121.03, 120.62, 80.36, 49.91, 47.39, 44.97, 44.40, 43.05, 29.97, 28.53, 22.58; HR-MS-ESI (*m/z*) C₂₄H₃₀ClN₇O₅S

[M+H]⁺ 计算值 564.179 6, 测量值 564.185 5。

1.8 目标化合物 16~18 合成通法

采用化合物 10~12 类似合成步骤, 由中间体 8 (200 mg, 0.52 mmol)、芳胺 (0.57 mmol)、三(二亚苄基丙酮)二钨 (0.10 mmol)、1,1'-联萘-2,2'-双二苯膦 (0.10 mmol) 和碳酸铯 (1.30 mmol) 得到化合物 16~18。

1.8.1 叔丁基 4-(2-(6-((4-氟基-2-氟苯基)氨基)-9H-嘌呤-9-基)乙酰基)哌啶-1-羧酸酯 (16) 浅黄色固体, 产率 12.4%。¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 9.05 (t, *J* = 8.3 Hz, 1H), 8.59 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 8.04 (s, 1H), 7.50 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 7.42 (d, *J* = 10.6 Hz, 1H), 5.11 (s, 2H), 3.65~3.58 (m, 4H), 3.59~3.54 (m, 2H), 3.46 (t, *J* = 5.3 Hz, 2H), 1.48 (s, 9H); HR-MS-ESI (*m/z*) C₂₃H₂₅FN₈O₃ [M+H]⁺ 计算值 481.211 2, 测量值 481.205 1。

1.8.2 叔丁基 4-(2-(6-((2-氟-4-(甲磺酰)苯基)氨基)-9H-嘌呤-9-基)乙酰基)哌啶-1-羧酸酯 (17) 浅黄色固体, 产率 18.1%。熔点 213.6~215.7 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 9.10 (t, *J* = 8.6 Hz, 1H), 8.60 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 8.04 (s, 1H), 7.77 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.71 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 5.11 (s, 2H), 3.65~3.59 (m, 4H), 3.58~3.53 (m, 2H), 3.47 (t, *J* = 5.3 Hz, 2H), 3.07 (s, 3H), 1.48 (s, 9H); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 164.31, 154.52, 152.45, 151.07, 150.86, 150.57, 143.04, 133.73 (d, *J* = 5.8 Hz), 132.85 (d, *J* = 9.4 Hz), 124.40 (d, *J* = 3.5 Hz), 121.36, 120.49, 114.39 (d, *J* = 22.4 Hz), 80.82, 45.11, 44.87, 44.26, 42.34, 32.03, 28.47(x3), 22.80; HR-MS-ESI (*m/z*) C₂₃H₂₈FN₇O₅S [M+H]⁺ 计算值 534.192 9, 测量值 534.186 6。

1.8.3 叔丁基 4-(2-(6-((2-氯-4-(甲磺酰)苯基)氨基)-9H-嘌呤-9-基)乙酰基)哌啶-1-羧酸酯 (18) 浅黄色固体, 产率 15.1%。¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 9.19 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 8.62 (s, 1H), 8.43 (s, 1H), 8.06 (s, 1H), 8.02 (s, 1H), 7.89 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 5.12 (s, 2H), 3.65~3.60 (m, 4H), 3.59~3.55 (m, 2H), 3.47 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H), 3.08 (s, 3H), 1.48 (s, 9H); HR-MS-ESI (*m/z*) C₂₃H₂₈ClN₇O₅S [M+H]⁺ 计算值 550.163 4, 测量值 550.156 9。

1.9 目标化合物 19~21 合成通法

采用化合物 10~12 类似合成步骤, 由中间体 9 (200 mg, 0.71 mmol)、芳胺 (0.78 mmol)、三(二亚苄基丙酮)二钨 (0.14 mmol)、1,1'-联萘-2,2'-双二苯膦 (0.14 mmol) 和碳酸铯 (1.78 mmol) 得到化合物 19~21。

1.9.1 3-氟-4-((9-(2-吗啉-2-羰基乙基)-9H-嘌呤-6-基)氨基)苯甲腈 (19) 浅黄色固体, 产率 14.4%。熔点 231.4~232.7 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 9.07 (t,

$J = 8.3$ Hz, 1H), 8.61 (s, 1H), 8.16 (s, 1H), 8.05 (s, 1H), 7.52 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.44 (d, $J = 10.6$ Hz, 1H), 5.10 (s, 2H), 3.78 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H), 3.73 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H), 3.68~3.63 (m, 4H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 163.22, 151.46, 150.55 (d, $J = 247.0$ Hz), 150.11, 149.62, 141.99, 131.41 (d, $J = 9.4$ Hz), 128.45 (d, $J = 3.8$ Hz), 120.44, 119.64, 117.48 (d, $J = 22.6$ Hz), 117.27 (d, $J = 2.5$ Hz), 104.24 (d, $J = 9.0$ Hz), 65.74, 65.42, 44.64, 43.00, 41.74; HR-MS-ESI (m/z) $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{FN}_7\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 计算值 382.142 2, 测量值 382.137 4。

1.9.2 2-(6-((2-氟-4-(甲磺酰)苯基)氨基)-9H-嘌呤-9-基)-1-吗啉乙烷-1-酮 (20) 浅黄色固体, 产率 6.8%。 ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 9.13 (s, 1H), 8.62 (s, 1H), 8.17 (s, 1H), 8.05 (s, 1H), 7.78 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.73 (d, $J = 10.1$ Hz, 1H), 5.10 (s, 4H), 3.82~3.77 (m, 2H), 3.75~3.71 (m, 2H), 3.68~3.63 (m, 4H), 3.07 (s, 3H); HR-MS-ESI (m/z) $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{FN}_6\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 计算值 435.124 5, 测量值 435.119 2。

1.9.3 2-(6-((2-氯-4-(甲磺酰)苯基)氨基)-9H-嘌呤-9-基)-1-吗啉乙烷-1-酮 (21) 浅黄色固体, 产率 10.6%。熔点 278.3~279.8 $^\circ\text{C}$; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 9.17 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 8.61 (s, 1H), 8.40 (s, 1H), 8.05 (s, 1H), 7.99 (s, 1H), 7.85 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 5.10 (s, 2H), 3.79 (t, $J = 4.8$ Hz, 2H), 3.73 (t, $J = 4.8$ Hz, 2H), 3.67~3.62 (m, 4H), 3.07 (s, 3H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 164.26, 152.43, 151.00, 150.62, 143.23, 140.40, 134.01, 128.55, 127.20, 122.92, 120.89, 120.55, 66.77, 66.46, 45.64, 44.96, 44.10, 42.75; HR-MS-ESI (m/z) $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{ClN}_6\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 计算值 451.095 0, 测量值 451.089 4。

2 初步体外降糖活性测试

2.1 GPR119 激动活性

以 GPR119 激动剂 GSK1292263 作为阳性对照药, 参照本课题组前期 GPR119 激动活性测试方法^[11,15,16], 使用 LANCE[®] Ultra cAMP 检测试剂盒考察目标化合物对 GPR119 的激动作用。根据 GPR119 激动剂刺激下细胞产生 cAMP 浓度变化来获得化合物的 EC_{50} 值, 并用于评价化合物对受体的亲和力强弱, 计算化合物刺激 cAMP 作用与 GSK1292263 产生最大作用的比值 (%max), 用于比较化合物对受体的内在活性 (IA)。

2.2 DPP-4 抑制活性

以西格列汀为阳性对照药, 采用以 Gly-Pro-PNA 为底物的发色底物法测定化合物对 DPP-4 的抑制活性^[11]。通过检测 PNA 的吸光度, 计算 DPP-4 抑制百分比, 用于评价化合物对酶的抑制活性。

3 分子对接实验

在 Protein Data Bank (PDB) 库中下载 DPP-4 的晶体结构, 利用软件 Discovery Studio 4.5 对蛋白结构 (PDB ID: 1X70) 进行加氢、删除未结合水分子和能量优化等预处理。将小分子进行结构优化、能量最小化等操作后, 与上述准备好的蛋白质在 Dock Ligands 模块进行分子对接。

作者贡献: 石素梅负责化合物的合成、计算机辅助药物设计及稿件的撰写与修改; 李惠兰、刘文琴负责活性研究; 叶喜德指导分子对接工作; 张少坤、李家辉参与化合物的合成; 房元英、杨尊华负责化合物的设计, 并指导整个研究、稿件修改等工作。

利益冲突: 所有作者均无相关利益冲突。

References

- [1] Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haefen TW. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy [J]. *Lancet*, 2005, 365: 1333-1346.
- [2] Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes [J]. *Nature*, 2006, 444: 840-846.
- [3] Skyler JS. Diabetes mellitus: pathogenesis and treatment strategies [J]. *J Med Chem*, 2004, 47: 4113-4117.
- [4] Demir S, Nawroth PP, Herzig S, et al. Emerging targets in type 2 diabetes and diabetic complications [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2021, 8: e2100275.
- [5] Morphy R, Kay C, Rankovic Z. From magic bullets to designed multiple ligands [J]. *Drug Discov Today*, 2004, 9: 641-651.
- [6] Zhou JT, Jiang XY, Feng F, et al. Multi-target drug design strategy and its research progress [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2018, 53: 2012-2025.
- [7] Ansarullah, Lu Y, Holstein M, et al. Stimulating beta-cell regeneration by combining a GPR119 agonist with a DPP-IV inhibitor [J]. *PLoS One*, 2013, 8: e53345.
- [8] Li G, Huan Y, Yuan B, et al. Discovery of novel xanthine compounds targeting DPP-IV and GPR119 as anti-diabetic agents [J]. *Eur J Med Chem*, 2016, 124: 103-116.
- [9] Shi S, Fang Y, Liu R, et al. Recent advances in G protein coupled receptor 119 agonists [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 2834-2842.
- [10] Li G, Meng B, Yuan B, et al. The optimization of xanthine derivatives leading to HBK001 hydrochloride as a potent dual ligand targeting DPP-IV and GPR119 [J]. *Eur J Med Chem*, 2020, 188: 112017.
- [11] Fang Y, Zhang S, Wu W, et al. Design and synthesis of tetrahydropyridopyrimidine derivatives as dual GPR119 and DPP-4 modulators [J]. *Bioorg Chem*, 2020, 94: 103390.
- [12] Li S, Qin C, Cui S, et al. Discovery of a natural-product-derived

- preclinical candidate for once-weekly treatment of type 2 diabetes [J]. *J Med Chem*, 2019, 62: 2348-2361.
- [13] Fuh MT, Tseng CC, Li SM, et al. Design, synthesis and biological evaluation of glycolamide, glycinamide, and β -amino carbonyl 1,2,4-triazole derivatives as DPP-4 inhibitors [J]. *Bioorg Chem*, 2021, 114: 105049.
- [14] Vo DV, Hong KH, Lee J, et al. Synthesis, *in vitro* evaluation, and computational simulations studies of 1,2,3-triazole analogues as DPP-4 inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem*, 2021, 29: 115861.
- [15] Fang Y, Xu J, Li Z, et al. Design and synthesis of novel pyrimido [5,4-d]pyrimidine derivatives as GPR119 agonist for treatment of type 2 diabetes [J]. *Bioorg Med Chem*, 2018, 26: 4080-4087.
- [16] Fang Y, Zhang S, Li M, et al. Optimisation of novel 4, 8-disubstituted dihydropyrimido[5,4-b][1,4]oxazine derivatives as potent GPR 119 agonists [J]. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2020, 35: 50-58.