

苯氧乙酸类PTP1B抑制剂的设计、合成及活性研究

田金英, 刘军政, 张书恩, 张晓琳, 叶 菲, 肖志艳*

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 活性物质发现与适药化研究北京市重点实验室, 新药作用机制研究与药效评价北京市重点实验室, 中国医学科学院糖尿病研究中心, 北京 100050)

摘要: 蛋白酪氨酸磷酸酶 (protein tyrosine phosphatase, PTP) 1B 是治疗 2 型糖尿病的潜在靶点。已知的 PTP1B 抑制剂多数为磷酸酪氨酸 (pTyr) 模拟物。本文以苯氧乙酸片段模拟 pTyr, 设计合成了苯氧乙酸类化合物 **2a**~**2g** 和 **3a**~**3c**。其中, 化合物 **2a**~**2g** 对 PTP1B 具有显著的抑制活性, 化合物 **2g** 对 PTP1B 的 IC_{50} 值达到 $0.42 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。化合物 **2f** 可提高胰岛素抵抗 (IR) 小鼠的胰岛素敏感性, 并降低其血总胆固醇水平, 与胰岛素增敏剂罗格列酮的作用类似。上述研究结果提示 PTP1B 抑制剂可能对 2 型糖尿病及其并发症具有综合治疗作用。

关键词: PTP1B 抑制剂; 磷酸酪氨酸模拟物; 苯氧乙酸类; 胰岛素增敏剂

中图分类号: R914 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)12-3684-07

Design, synthesis and evaluation of phenoxyacetic acid-based PTP1B inhibitors

TIAN Jin-ying, LIU Jun-zheng, ZHANG Shu-en, ZHANG Xiao-lin, YE Fei, XIAO Zhi-yan*

(Beijing Key Laboratory of Active Substance Discovery and Druggability Evaluation, Beijing Key Laboratory of New Drug Mechanisms and Pharmacological Evaluation Study, Diabetes Research Center of Chinese Academy of Medical Sciences, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: Protein tyrosine phosphatase (PTP) 1B is a potential therapeutic target for type 2 diabetes. Phosphotyrosine (pTyr) mimetics still dominate the currently available PTP1B inhibitors. The phenoxyacetic acid moiety was taken as a pTyr mimetic herein and phenoxyacetic acid-based compounds **2a**–**2g** and **3a**–**3c** were designed. Among them, compounds **2a**–**2g** exhibited potent inhibition against PTP1B, and compound **2g** showed an IC_{50} of $0.42 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ against PTP1B. Compound **2f** exhibited pharmacological profiles similar to that of rosiglitazone, and could improve the insulin sensitivity and the serum total cholesterol level. The results suggest that PTP1B inhibitors might be effective in treating type 2 diabetes as well as associated metabolic syndromes.

Key words: PTP1B inhibitor; pTyr mimetic; phenoxyacetic acid; insulin sensitizer

蛋白酪氨酸磷酸酶 1B (protein tyrosine phosphatase 1B, PTP1B) 是胰岛素和瘦素信号转导中重要的负调控因子, 因此, PTP1B 被认为是治疗 2 型糖尿病 (T2DM) 的潜在靶点^[1]。此外, 近年研究也表明, PTP1B 在肿瘤^[2]

及神经系统疾病的发生发展中也起着重要作用^[3]。

由于 PTP1B 作为多种疾病治疗靶点的潜在可能性, 近 20 年, 发现活性显著、类药性良好的小分子 PTP1B 抑制剂成为药物化学研究工作中备受关注的领域。虽然已有不同结构类型的高活性 PTP1B 抑制剂见于文献^[4]报道, 但迄今为止, 仅有 3 个小分子 PTP1B 抑制剂, 即 ertiprotafib^[5]、trodusquemine^[6]和 JTT-551^[7]曾进入临床研究阶段 (图 1), 目前尚无小分子 PTP1B 抑制剂应

收稿日期: 2023-10-23; 修回日期: 2023-10-31。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82000820); 北京新药机制与药理评价研究重点实验室 (BZ0150)。

*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-63189228, E-mail: xiaoz@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-1195

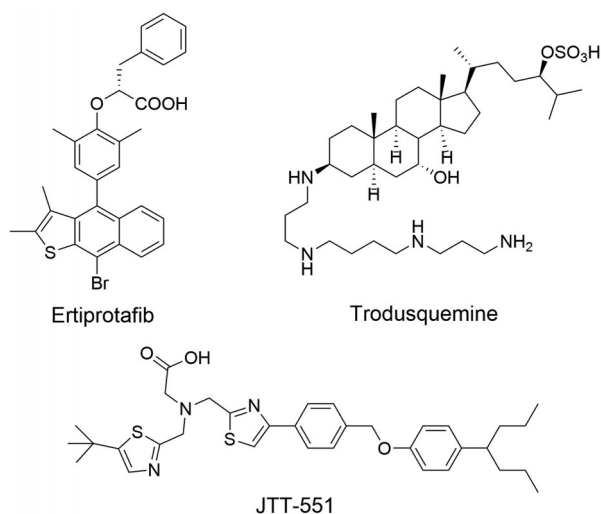


Figure 1 Small-molecule PTP1B inhibitors investigated in clinical trials

用于临床。

磷酸酪氨酸 (pTyr) 是 PTP1B 去磷酸化作用的底物。已知的 PTP1B 抑制剂多数为针对 PTP1B 催化活性区设计的 pTyr 模拟物。由多肽-PTP1B 复合物的晶体结构 (PDB ID: 1PTV)^[8]可知: pTyr 与 PTP1B 的催化活性区 (Cys215-Arg221) 结合, 其磷酸根不仅与 Arg221 形成静电相互作用, 还与 Cys215、Ser216、Ala217、Gly220、Arg221 等催化活性区的残基形成多重氢键相互作用。

目前, pTyr 模拟物类小分子抑制剂仍是新型 PTP1B 抑制剂研究的主流。前期研究中^[9], 采用基于药效团的骨架跃迁策略, 结合 ertiprotafib 与 PTP1B 的作用模式, 发现了多个结构类型的 PTP1B 抑制剂。其中, 化合物 **1a** 和 **1b** (图 2) 采用苯氧乙酸作为 pTyr 的模拟片段, 二者对 PTP1B 具有一定的抑制作用, 其 IC_{50} 值分别为 40.3 和 10.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。本文基于化合物 **1a** 和 **1b**, 分别设计合成了化合物 **2a~2g** 和 **3a~3c**, 初步研

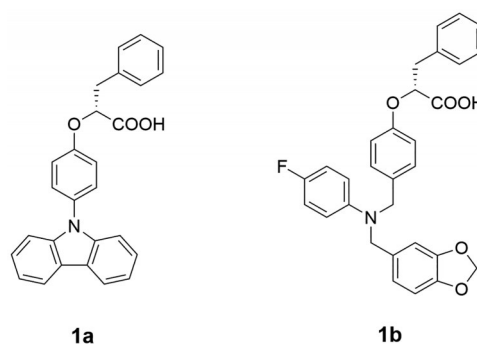


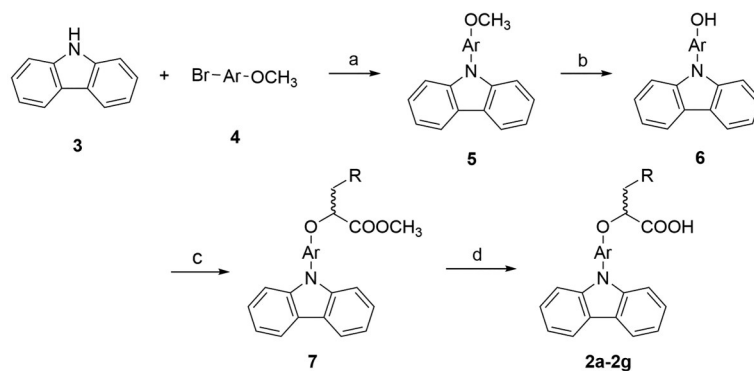
Figure 2 Phenoxyacetic acid-based PTP1B inhibitors identified previously^[9]

究了该类化合物对 PTP1B 抑制作用的构效关系。

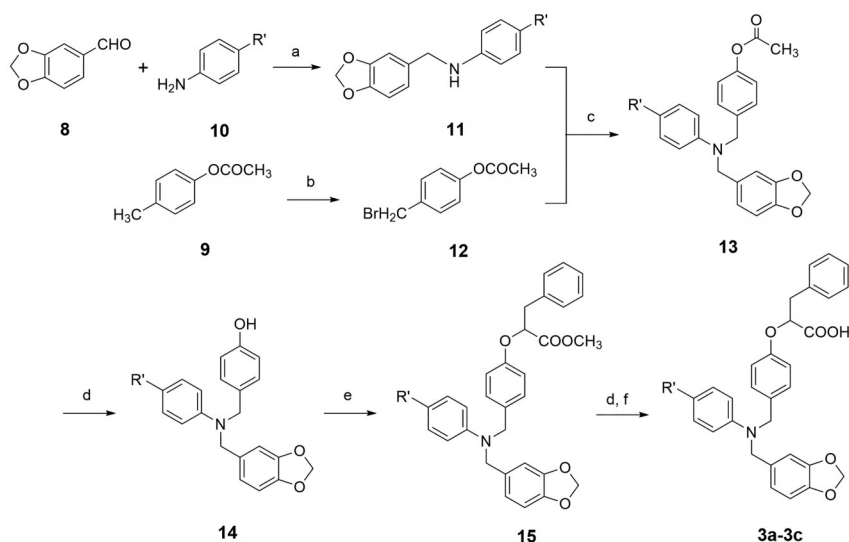
如合成路线 1 所示, 化合物 **2a~2g** 以 9H-吡唑 (**3**) 为起始原料, 与芳基溴化物 **4** 经 Ullmann 反应得到芳甲醚 **5**。化合物 **5** 脱除甲基得到酚类化合物 **6**。进一步的 Mitsunobu 反应得到化合物 **7**, 再经水解反应得到化合物 **2a~2g**。

化合物 **3a~3c** 以胡椒醛 (**8**) 和 4-甲基乙酰苯酚 (**9**) 为原料合成得到 (合成路线 2)。胡椒醛 (**8**) 与芳胺 (**10**) 经还原胺化得到化合物 **11**。4-甲基乙酰苯酚 (**9**) 在 *N*-溴代琥珀酰亚胺 (*N*-bromosuccinimide, NBS) 作用下生成化合物 **12**。化合物 **11** 和 **12** 在碱性条件下反应生成化合物 **13**, 后者水解得到化合物 **14**。**14** 经 Mitsunobu 反应得到化合物 **15**, 再经水解反应得到化合物 **3a~3c**。

文献^[10]中对苯氧乙酸类 PTP1B 抑制剂的药效和代谢性质研究表明, 苯氧乙酸结构中手性中心的构型可能对该类抑制剂的体外 PTP1B 抑酶活性及代谢稳定性影响不明显。因此, 在化合物 **2a~2g** 的合成中, R 为苯基或萘基时, 均既有与化合物 **1a** 维持相同构型的光活体, 也有外消旋体; 而化合物 **3a~3c** 则均为外消旋体。



Scheme 1 Synthesis of compounds **2a-2g**. Reagents and conditions: a. Cu, K₂CO₃, PhNO₂, N₂, reflux or CuI, K₂CO₃, DMSO, *L*-proline, N₂, 90 °C; b. BBr₃, CH₂Cl₂, -15 °C or NaI, (CH₃)₃SiCl, CH₃CN, N₂; c. Methyl 2-hydroxy-3-substituted propanoate, Ph₃P, diethyl azodicarboxylate (DEAD), benzene; d. i) KOH, C₂H₅OH, H₂O, acetone; ii) 5% aqueous HCl



Scheme 2 Synthesis of compounds **3a–3c**. Reagents and conditions: a. i) EtOH, reflux; ii) NaBH₄, r.t.; b. NBS, CCl₄, *hν*, reflux; c. K₂CO₃, DMF, r.t.; d. NaOH, H₂O, r.t.; e. Methyl 2-hydroxy-3-phenyl propanoate, Ph₃P, diethyl azodicarboxylate, benzene; f. 5% aqueous HCl

结果与讨论

1 PTP1B 抑酶活性评价

采用人基因重组 PTP1B 酶测定了化合物 **2a~2g** 和 **3a~3c** 的抑酶活性。如表 1 所示, 化合物 **2a~2g** 均显示出较 **1a** 更强的 PTP1B 抑制作用。当 Ar 为取代苯基或联苯基时, PTP1B 抑制活性显著增加 (**2a, 2b & 2f** vs **1a**); R 为萘基较为苯基时, PTP1B 抑制活性明显增强 (**2c** vs **1a**; **2d** vs **2a**; **2e** vs **2b**; **2g** vs **2f**)。当化合物 **1b** 中氟取代变换为 H、CH₃ 或 OCH₃ 时, 在 10⁻⁴ mol·L⁻¹ 浓度下, 抑制率均低于 60% (表 2)。

化合物 **2d** 与化合物 **1a** 相对构型一致, 对二者进行了分子对接。如图 3 所示, 化合物 **1a** 和 **2d** 作用模式相似, 均作用于 PTP1B 的催化活性区, 二者结构中的羧基均与 Arg221 形成静电及氢键相互作用, 咪唑部分也均与 Lys120 形成了阳离子- π 相互作用。**1a** 中的苯

环和 **2d** 中的萘环均伸入由 Trp179、Asp181、Phe182、Gly220、Ala262 及 Thr263 组成的疏水结合腔中。化合物 **2d** 抑酶活性的提高可能归因于萘环能更好地占据疏水腔, 具有更高的结合能。此外, 萘环提高了分子整体的疏水性和脂溶性, 有助于平衡分子的整体极性, 改善膜通透性。

2 化合物 2f 的体内药效学评价

在 PTP1B 抑制活性最好的 3 个化合物 (**2d, 2f** 和 **2g**) 中, **2f** 的 R 为苯基, 而 **2d** 和 **2g** 的 R 均为萘基。芳环在 CYP 酶作用下, 可经由环氧化物的机制发生羟化反应。而 π 电子更丰富的萘环形成的环氧化物更容易与大分子发生亲核反应, 从而产生毒性^[11]。因此, 本研究选择化合物 **2f** 进行体内药效学评价。

PTP1B 通过去磷酸化胰岛素受体或其底物上的酪氨酸残基负调控胰岛素信号转导, 进而引起胰岛素耐受。

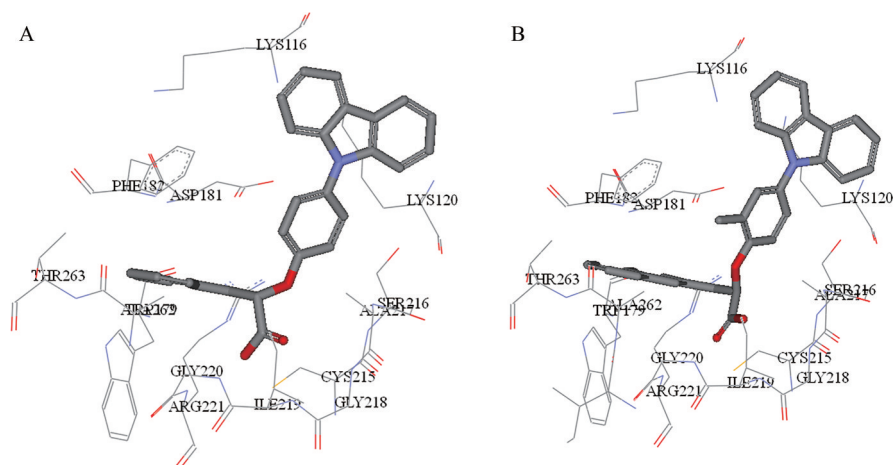
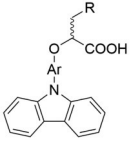
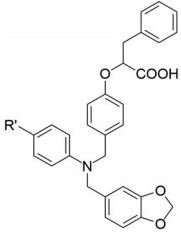


Figure 3 Interaction modes of compounds **1a** and **2d** revealed by molecular docking (PDB code: 1NNY). Docking with (A) compound **1a** and (B) compound **2d**

Table 1 Inhibitory activity of compounds **2a–2g** against PTP1B.*Inhibition was measured at 10^{-4} mol·L⁻¹


No.	Ar	R	Inhibition (10^{-5} mol·L ⁻¹)/%	IC ₅₀ (10^{-6} mol·L ⁻¹)
1a			98.4*	40.3
2a			99.9*	13.0
2b			50.4	5.88
2c			88.8	9.55
2d			81.8	1.28
2e			88.4	2.65
2f			100.7	1.17
2g			97.7	0.42

Table 2 Inhibitory activity of compounds **3a–3c** against PTP1B


No.	R'	Inhibition (10^{-4} mol·L ⁻¹)/%	No.	R'	Inhibition (10^{-4} mol·L ⁻¹)/%
1b	F	111.8	3b	CH ₃	58.7
3a	H	26.0	3c	OCH ₃	24.4

因此, PTP1B 抑制剂是潜在的胰岛素增敏剂。由于目前尚无靶向 PTP1B 的药物上市, 本研究采用胰岛素增敏剂罗格列酮作为体内药效学评价的阳性对照药。

采用高脂高糖饲料喂养的 C57BL/6j 小鼠形成胰岛素抵抗 (IR) 的动物模型。动物连续给药 2 周, 以罗格列酮为阳性对照药物, 评价化合物 **2f** 对 IR 小鼠的胰岛素反应性、血糖和血脂的影响 (图 4)。除 IR 组和药物组外, 同时设采用正常饲料喂养的同批正常动物作为正常对照组 (Con)。

正糖钳实验中稳态时葡萄糖的输注速率 (GIR) 是

公认的评价胰岛素抵抗的金指标^[12]。在该实验中, 与 IR 组比较, 罗格列酮 (Rosi) 组和化合物 **2f** 组的 GIR 水平分别提高了 277.9% 和 106.9% (图 4A), 说明二者均具有明显增加 IR 小鼠胰岛素敏感性的作用。

在口服葡萄糖耐量 (OGTT) 实验中, 与 IR 组比较, 化合物 **2f** 和罗格列酮均明显抑制动物葡萄糖负荷后的血糖峰值 (图 4B), 并显著降低血糖-时间曲线下面积 (AUC) (图 4C), 提示化合物 **2f** 与对饮食诱导的 IR 小鼠具有改善葡萄糖耐量的作用。该化合物可能与罗格列酮有类似作用, 对 IR 小鼠具有增加胰岛素敏感性的作用。

由于胰岛素抵抗常常合并血脂代谢紊乱, 进一步评价了化合物 **2f** 和罗格列酮对血总胆固醇 (TC) 的影响。如图 4D 所示, 与 Con 组比较, IR 组小鼠血总胆固醇明显升高; 而与 IR 组小鼠比较, **2f** 和 Rosi 组的血总胆固醇明显降低, 提示二者在提高胰岛素敏感性的同时, 可改善血脂紊乱, 可能对 2 型糖尿病及其并发症具有综合治疗作用。

3 小结

pTyr 模拟物类小分子抑制剂仍是目前 PTP1B 抑制剂研究的主流。前期研究中, 采用苯氧乙酸作为 pTyr 的模拟片段, 发现了对 PTP1B 具有一定抑制作用的新化合物 **1a** 和 **1b**。本文对化合物 **1a** 和 **1b** 进行了初步的构效关系研究, 设计合成了化合物 **2a–2g** 和 **3a–3c**。其中, 化合物 **2a–2g** 对 PTP1B 具有显著的抑制活性, 化合物 **2g** 抑制 PTP1B 的 IC₅₀ 值达到 0.42 μmol·L⁻¹。分子对接研究表明, 化合物 **2d** 与 **1a** 均作用于 PTP1B 的催化活性区, 二者的作用模式相似, 化合物 **2d** 能更好地占据 Trp179、Asp181、Phe182、Gly220、Ala262 及 Thr263 组成的疏水腔。此外, 化合物 **2f** 与胰岛素增敏剂罗格列酮类似, 可提高胰岛素敏感性, 并降低血总胆固醇水平, 提示 PTP1B 抑制剂可能对 2 型糖尿病及其并发症具有综合治疗作用。

实验部分

熔点用 Fisher Scientific 显微熔点仪测定, 温度未校正。核磁共振仪为 Varian Mercury 300 型, 内标为 TMS。质谱仪为 LC/MDC-MS 串联质谱仪 (Agilent, USA)。柱色谱分离用硅胶 H 或粗硅胶 (200~300 目)、薄层色谱用硅胶 GF254 均购自青岛海洋化工厂。实验所用试剂均为化学纯或分析纯。

1 化学实验

1.1 2-[4-(9H-9-咪唑基)-2-甲基苯氧基]-3-苯基丙酸 (**2a**)

1.1.1 4-(9H-9-咪唑基)-2-甲基苯甲醚 9H-咪唑 (2.51 g, 15 mmol) 和 4-溴-1-甲氧基-2-甲基苯 (18 mmol) 溶于 20 mL 硝基苯, 加入 Cu 粉 (230 mg, 3.6 mmol) 和

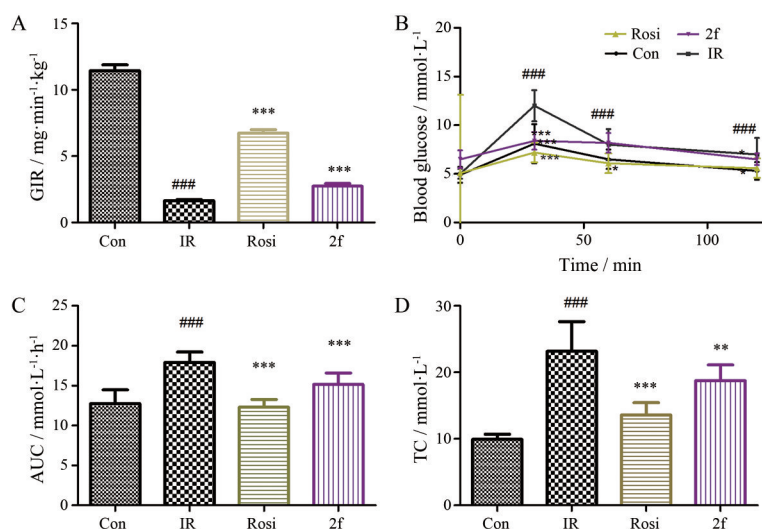


Figure 4 Effects of compound **2f** in insulin-resistant (IR) obese mice. A: Glucose infusion rates (GIR) in hyperinsulinemic–euglycemic clamp test; B: Changes of blood glucose in OGTT; C: AUC values in OGTT; D: Serum total cholesterol (TC) levels. Rosi: Rosiglitazone. ($n = 8$. #### $P < 0.001$ vs Con; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs IR)

无水 K_2CO_3 (2.76 g, 20 mmol), 搅拌下加热回流 24 h, 过滤, 减压蒸馏, 除去绝大部分硝基苯, 乙醇重结晶, 得褐色固体, 收率 79.3%。

1.1.2 4-(9H-9-咪唑基)-2-甲基苯酚 将 4-(9H-9-咪唑基)-2-甲基苯甲醚 (5 mmol) 溶于 10 mL 乙腈中, 加入 NaI (750 mg, 5 mmol) 和 $(CH_3)_3SiCl$, 氮气流保护下加热回流 24 h, 加入 10 mL 水, 以乙醚 (10 mL×3) 萃取, 合并有机相, 以饱和 $Na_2S_2O_3$ (6 mL) 萃取, 有机相采用无水 Na_2SO_4 干燥, 蒸干后柱色谱分离, 得蜡状固体, 收率 16.9%。

1.1.3 2-[4-(9H-9-咪唑基)-2-甲基苯氧基]-3-苯基丙酸甲酯 将 4-(9H-9-咪唑基)-2-甲基苯酚 (1 mmol) 和 2-羟基-3-苯丙酸酯 (180 mg, 1 mmol) 溶解在 5 mL THF 中, 顺次加入 Ph_3P (1 mmol) 和 DEAD (1 mmol), 搅拌下加热回流 14 h, 反应液蒸干后柱色谱分离, 得无色粘稠状物, 收率 48.9%。

1.1.4 2-[4-(9H-9-咪唑基)-2-甲基苯氧基]-3-苯基丙酸 将 2-[4-(9H-9-咪唑基)-2-甲基苯氧基]-3-苯基丙酸甲酯 (0.5 mmol) 溶解在 10 mL 乙醇中, 加入 1 mL 水和 NaOH (40 mg, 1 mmol), 室温搅拌 6 h。旋蒸除去乙醇, 加入 8 mL 水使之溶解, 用 5% 的稀盐酸调节 pH 至 3~4, 过滤, 干燥, 柱色谱分离, 得白色粉末, 收率 85.6%。

1H NMR (300 Hz, CD_3COCD_3) δ 8.18 (m, 2H), 7.47~7.03 (m, 14H), 5.11 (dd, 1H, $J = 5.1, 8.1$ Hz), 3.46~3.40 (dd, 1H, $J = 5.1, 13.8$ Hz), 3.37~3.30 (dd, 1H, $J = 8.1, 13.8$ Hz), 2.31 (s, 3H)。ESI-HR-MS m/z : calcd. for $C_{28}H_{24}NO_3$ $[M+H]^+$ 422.175 1, found 422.173 4。

采用类似方法合成了化合物 **2b**~**2g**。不同之处

在于: ① 化合物 **2b**~**2e** 及 **2g** 合成路线中的步骤 a 参照文献^[13]方法, 采用 NaI (0.1 equiv.), 无水 K_2CO_3 (2.5 equiv.) 及 *L*-脯氨酸 (0.2 equiv.), 在 DMSO 中, 氮气保护, 90 °C 下搅拌 36 h; ② 化合物 **2b**~**2g** 合成路线中的步骤 b 采用冰盐浴下滴加 BBr_3 的二氯甲烷溶液, 室温搅拌过夜; ③ 步骤 c 中, 化合物 **2b**~**2e** 及 **2g** 采用室温搅拌 30 min, 化合物 **2f** 采用超声反应 3 h。

1.2 (R)-2-[4-(9H-9-咪唑基)-2,6-二甲基苯氧基]-3-苯基丙酸 (2b)

白色粉末, 收率: 98%。mp: 85~87 °C。 $[\alpha]_D^{20} +20.8$ (c 0.5, $CHCl_3$)。 1H NMR (300 MHz, acetone- d_6): δ 8.18 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 7.42~7.20 (m, 13H), 4.90 (t, $J = 6.6$ Hz, 1H), 3.37 (d, $J = 6.6$ Hz, 2H), 2.36 (s, 6H)。ESI-HR-MS m/z : calcd. for $C_{29}H_{26}NO_3$ $[M+H]^+$ 436.190 72, found 436.189 5。

1.3 (R)-2-[4-(9H-9-咪唑基)-苯氧基]-3-(2-萘基)-丙酸 (2c)

白色粉末, 收率: 70%。mp: 124~127 °C。 $[\alpha]_D^{20} -27.8$ (c 0.5, $CHCl_3$)。 1H NMR (300 MHz, acetone- d_6): δ 8.12 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 7.93 (s, 1H), 7.85~7.78 (m, 3H), 7.65 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H), 7.44~7.13 (m, 12H), 5.07 (dd, $J = 4.8, 9.3$ Hz, 1H), 3.59 (dd, $J = 4.8, 14.1$ Hz, 1H), 3.39 (dd, $J = 9.3, 14.1$ Hz, 1H)。ESI-HR-MS m/z : calcd. for $C_{31}H_{24}NO_3$ $[M+H]^+$ 458.175 07, found 458.173 6。

1.4 (R)-2-[4-(9H-9-咪唑基)-2-甲基苯氧基]-3-(2-萘基)-丙酸 (2d)

白色粉末, 收率: 32%。mp: 95~98 °C。 $[\alpha]_D^{20} -30.2$ (c 0.5, $CHCl_3$)。 1H NMR (300 MHz, acetone- d_6): δ 8.16

(d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 7.96 (s, 1H), 7.91~7.88 (m, 3H), 7.65 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 8.52~7.44 (m, 2H), 7.39~7.20 (m, 8H), 7.07 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 5.23 (dd, $J = 4.2, 8.1$ Hz, 1H), 3.62 (dd, $J = 4.2, 14.1$ Hz, 1H), 3.52 (dd, $J = 8.1, 14.1$ Hz, 1H), 2.32 (s, 3H)。ESI-HR-MS m/z : calcd. for $C_{32}H_{26}NO_3$ $[M+H]^+$ 472.190 72, found 472.189 1。

1.5 (R)-2-[4-(9H-9-咪唑基)-2,6-二甲苯氧基]-3-(2-萘基)-丙酸 (2e)

白色粉末, 收率: 35%。mp: 93~95 °C。 $[\alpha]_D^{20} + 8.4$ (c 0.5, $CHCl_3$)。 1H NMR (300 MHz, acetone- d_6): δ 8.17 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 7.91~7.86 (m, 4H), 7.58 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.49~7.20 (m, 10H), 5.04 (t, $J = 6.9$ Hz, 1H), 3.56 (d, $J = 6.9$ Hz, 2H), 2.39 (s, 6H)。ESI-HR-MS m/z : calcd. for $C_{33}H_{28}NO_3$ $[M+H]^+$ 486.206 37, found 486.205 1。

1.6 2-[4'-(9H-9-咪唑基)-(1,1'-联苯基)-4-氧]-3-苯基-丙酸 (2f)

白色粉末, 收率: 65.3%。 1H NMR (300 Hz, CD_3COCD_3) δ 8.22~7.02 (m, 21H), 5.50 (dd, $J = 5.1, 8.1$ Hz, 1H), 3.39~3.33 (dd, $J = 5.1, 14.1$ Hz, 1H), 3.31~3.24 (dd, $J = 8.1, 14.1$ Hz, 1H)。ESI-HR-MS m/z : calcd. for $C_{33}H_{25}NO_3$ $[M+Na]^+$ 506.172 3, found 506.171 0。

1.7 2-[4'-(9H-9-咪唑基)-(1,1'-联苯基)-4-氧]-3-(2-萘基)-丙酸 (2g)

黄色粉末, 收率: 21%。mp: 185~187 °C。 1H NMR (300 MHz, acetone- d_6): δ 8.21 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 7.91~7.85 (m, 6H), 7.69~7.60 (m, 5H), 7.48~7.39 (m, 6H), 7.28 (m, 2H), 7.06 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 5.18 (m, 1H), 3.50 (m, 2H)。ESI-HR-MS m/z : calcd. for $C_{37}H_{26}NO_3$ $[M-H]^-$ 532.191 26, found 532.191 3。

1.8 2-[4-[(苯并[d][1,3]二氧代-5-基)甲基](苯基)氨基甲基]苯氧]-3-苯基丙酸 (3a)

1.8.1 对乙酰氧基苄溴 将对乙酰氧基甲苯 (1.05 g, 7 mmol) 溶于 20 mL 四氯化碳中, 加入 NBS (1.37 g, 7.7 mmol), 光照下加热回流 4 h, 过滤, 蒸除四氯化碳, 继续下一步反应。

1.8.2 *N*-[(苯并[d][1,3]二氧代-5-基)甲基]苯胺 将胡椒醛 (1.50 g, 10 mmol) 和苯胺 (930 mg, 10 mmol) 溶解在 25 mL 乙醇中, 加热回流 5 h, 冷却至室温, 加入 $NaBH_4$ (370 mg, 10 mmol), 继续搅拌 4 h。旋干乙醇, 加入 20 mL 水, 用乙醚 (20 mL \times 3) 萃取, 合并有机相, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 旋干乙醚, 95% 乙醇重结晶。收率 79%。

1.8.3 [4-[(苯并[d][1,3]二氧代-5-基)甲基](苯基)氨基甲基]乙酸苯酯 将 *N*-[(苯并[d][1,3]二氧代-5-基)甲基]苯胺 (1.36 g, 6 mmol) 和 1.8.1 得到的对乙酰氧基苄溴

混合在一起, 加入 K_2CO_3 (993 mg, 7.2 mmol) 和 20 mL DMF, 室温搅拌 15 h, 加入 20 mL 水, 用乙醚 (20 mL \times 3) 萃取合并有机相, 无水硫酸钠干燥, 柱色谱分离, 得淡黄色粘稠状物, 收率 71%。

1.8.4 4-[(苯并[d][1,3]二氧代-5-基)甲基](苯基)氨基甲基]苯酚 将 [4-[(苯并[d][1,3]二氧代-5-基)甲基](苯基)氨基甲基]乙酸苯酯 (1.50 g, 4 mmol) 和 NaOH (160 mg, 4 mmol) 溶于 20 mL 水中, 室温搅拌 5 h, 用稀盐酸调节 pH 值至 3~4, 加入 5 mL 饱和 $NaHCO_3$ 溶液, 乙醚 (20 mL \times 3) 萃取, 合并有机相, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 旋干溶剂, 得白色固体, 收率 91%。

1.8.5 2-[4-[(苯并[d][1,3]二氧代-5-基)甲基](苯基)氨基甲基]苯氧]-3-苯基丙酸甲酯 将 4-[(苯并[d][1,3]二氧代-5-基)甲基](苯基)氨基甲基]苯酚 (666 mg, 2 mmol), 加入 2-羟基-3-苯丙酸甲酯 (360 mg, 2 mmol) 和三苯基膦 (384 mg, 2 mmol), 滴入 0.2 mL THF, 超声使之混匀, 滴加 DEAD (524 mg, 2 mmol), 继续超声 1 h。反应液经柱色谱分离, 得无色粘稠状物, 收率 43%。

1.8.6 2-[4-[(苯并[d][1,3]二氧代-5-基)甲基](苯基)氨基甲基]苯氧]-3-苯基丙酸 上述产物加入 NaOH (40 mg, 1 mmol), 溶解在 15 mL 水中, 室温搅拌 5 h。5% 稀盐酸调节 pH 至 3~4, 乙醚 (10 mL \times 3) 萃取, 合并有机相, 无水硫酸钠干燥, 旋干溶剂, 得粗产品, 采用 PE:EA = 4:1 重结晶得白色晶体, 收率 77.1%。 1H NMR (300 Hz, CD_3COCD_3) δ 11.35 (br., 1H), 7.38~6.56 (m, 17H), 5.94 (s, 2H), 4.91 (dd, $J = 4.8, 8.1$ Hz, 1H), 4.57 (s, 2H), 4.55 (s, 2H), 3.31~3.25 (dd, $J = 4.8, 14.1$ Hz, 1H), 3.24~3.17 (dd, $J = 8.4, 14.1$ Hz, 1H)。ESI-HR-MS m/z : calcd. for $C_{30}H_{28}NO_5$ $[M+H]^+$ 482.196 2, found 482.195 1。

采用类似方法合成了化合物 3b、3c。

1.9 2-[4-[(苯并[d][1,3]二氧代-5-基)甲基](4-甲基苯基)氨基甲基]苯氧]-3-苯基丙酸 (3b)

白色晶体, 收率: 67%。 1H NMR (300 Hz, CD_3COCD_3) δ 11.40 (br., 1H), 7.35~6.62 (m, 16H), 5.93 (s, 2H), 4.90 (m, 1H), 4.52 (s, 2H), 4.49 (s, 2H), 3.31~3.16 (m, 2H), 2.31 (s, 3H)。ESI-HR-MS m/z : calcd. for $C_{31}H_{30}NO_5$ $[M+H]^+$ 496.211 8, found 496.209 9。

1.10 2-[4-[(苯并[d][1,3]二氧代-5-基)甲基](4-甲氧基苯基)氨基甲基]苯氧]-3-苯基丙酸 (3c)

白色晶体, 收率: 58.2%。 1H NMR (300 Hz, CD_3COCD_3) δ 7.38~6.71 (m, 16H), 5.92 (s, 2H), 4.90 (dd, $J = 4.2, 7.8$ Hz, 1H), 4.43 (s, 2H), 4.41 (s, 2H), 3.64 (s, 3H), 3.31~3.25 (dd, $J = 4.2, 14.4$ Hz, 1H), 3.24~3.16 (dd, $J = 8.1, 14.4$ Hz, 1H)。ESI-HR-MS m/z : calcd.

for $C_{31}H_{30}NO_6 [M+H]^+$ 512.206 8, found 512.206 8.

2 分子模拟实验

采用 Accelrys 公司的 Discovery Studio 2.1 软件包完成分子模拟工作。由 Diverse Conformation Generation 模块产生分子构象, Conformation Method 设置为“BEST”, 其他参数采用缺省值; 采用 Dock ligands (LibDock) 程序进行分子对接, Input Receptor: 1NNY; Conformation Method 设置为“NONE”; 其他参数采用缺省值。

3 药理活性试验

3.1 PTP1B 的体外抑酶活性实验

采用对硝基苯酚磷酸酯 (*p*NPP) 作为人基因重组 PTP1B 的底物。PTP1B 催化的 *p*NPP 水解反应通过 96 孔板在 pH 值为 7.0 的 100 μ L 反应体系下测定。化合物与酶在室温下预孵 5 min, 加入含有 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HEPES、5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTT、150 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl、2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA 以及 2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ *p*NPP 的反应液。在 30 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 10 min, 加入 50 μ L 3 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的氢氧化钠溶液终止酶反应。在 405 nm 处测出吸收 OD 值, 以未加酶的体系作为空白对照, 即可计算出测试样品对酶促水解的抑制作用的 IC_{50} 值。

3.2 体内药效学实验

采用高脂高糖饲料喂养 C57BL/6j 小鼠, 形成胰岛素抵抗 (IR) 小鼠模型。同时, 采用同批 C57BL/6j 小鼠以普通饲料喂养作为正常对照组 (Con)。将模型动物随机分成 3 组, 分别为模型动物对照组 (IR)、罗格列酮组和化合物组, 分别口服水、阳性对照药罗格列酮 (15 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 和化合物 **2f** (25 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)。

3.2.1 口服葡萄糖耐量实验 (OGTT) 连续给药 7 天后, 给动物口服葡萄糖 2 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 观察动物葡萄糖负荷后 0、30、60、120 min 时血糖的变化, 并计算血糖-时间曲线下面积 (AUC)。

3.2.2 正常葡萄糖水平的胰岛素钳夹 (正糖钳) 实验 连续给药 21~24 天后, 进行正糖钳实验。动物禁食 4 h, 称重, 腹腔注射戊巴比妥钠麻醉, 固定于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温板, 手术分离颈静脉, 插管, 输入 1 000 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 肝素抗凝后, 连接微量注射器 (COLE PARMER, 789100C, 美国) 以恒速输注胰岛素 60 $\text{pmol}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, 连接微量蠕动泵 (ISMATEC, 78001-00, 美国) 以可变速率输注 10% 葡萄糖溶液。手术分离颈动脉, 以备取血测定血糖水平。每隔 10 min 取血, 用血糖仪 (BIOSEN 5030, 德国) 监测血糖水平。根据血糖水平调节葡萄糖输注速率, 使血糖稳定在 $95 \pm 5 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$ 范围内, 在血糖至少稳定 30 min 后, 连续测定 3 次葡萄糖输注速率, 取平均值作为动物的正糖钳实验中稳态时葡萄糖输注速率 (GIR)。

3.2.3 血胆固醇水平的测定 连续给药 16 天后, 取血测定血胆固醇水平。

作者贡献: 田金英、张晓琳完成体外抑酶和体内药效评价以及数据分析; 刘军政、张书恩完成化合物合成、表征以及分子对接; 叶菲提供学术指导并审核论文; 肖志艳设计实验并撰写、审核论文。

利益冲突: 无利益冲突。

References

- [1] Behl T, Gupta A, Sehgal A, et al. Exploring protein tyrosine phosphatases (PTP) and PTP-1B inhibitors in management of diabetes mellitus [J]. Biomed Pharmacother, 2022, 153: 113405.
- [2] Chen PJ, Zhang YT. Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B): insights into its new implications in tumorigenesis [J]. Curr Cancer Drug Targets, 2022, 22: 181-194.
- [3] Olloquequi J, Cano A, Sanchez-López E, et al. Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) as a potential therapeutic target for neurological disorders [J]. Biomed Pharmacother, 2022, 155: 113709.
- [4] Singh S, Grewal AS, Grover R, et al. Recent updates on development of protein-tyrosine phosphatase 1B inhibitors for treatment of diabetes, obesity and related disorders [J]. Bioorg Chem, 2022, 121: 105626.
- [5] Liu G. Protein tyrosine phosphatase 1B inhibition: opportunities and challenges [J]. Curr Med Chem, 2003, 10: 1407-1421.
- [6] Lantz KA, Hart SG, Planey SL, et al. Inhibition of PTP1B by trodusquemine (MSI-1436) causes fat-specific weight loss in diet-induced obese mice [J]. Obesity, 2010, 18: 1516-1523.
- [7] Fukuda S, Ohta T, Sakata S, et al. Pharmacological profiles of a novel protein tyrosine phosphatase 1B inhibitor, JTT-551 [J]. Diabetes Obes Metab, 2010, 12: 299-306.
- [8] Jia ZC, Barford D, Flint AJ, et al. Structural basis for phosphotyrosine peptide recognition by protein tyrosine phosphatase 1B [J]. Science, 1995, 268: 1754-1758.
- [9] Liu JZ, Zhang SE, Nie F, et al. Discovery of novel PTP1B inhibitors via pharmacophore-oriented scaffold hopping from eriprotafib [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2013, 23: 6217-6222.
- [10] Malamas MS, Sredy J, Moxham C, et al. Novel benzofuran and benzothiophene biphenyls as inhibitors of protein tyrosine phosphatase 1B with antihyperglycemic properties [J]. J Med Chem, 2000, 43: 1293-1310.
- [11] Guo ZR. General Medicinal Chemistry (4th Ed.) (药物化学总论) [M]. Beijing: Science Press, 2019: 46-48.
- [12] Ye F, Tao R, Cong W, et al. Utilization of fluorescence tracer in hyperinsulinemic-euglycemic clamp test in mice [J]. J Biochem Biophys Methods, 2008, 70: 978-984.
- [13] Ma D, Cai Q, Zhang H. Mild method for Ullmann coupling reaction of amines and aryl halides [J]. Org Lett, 2003, 5: 2453-2455.