一种磷酸酪氨酸拟似物类蛋白酪氨酸磷酸酶 1B 抑制剂的合成及体外活性评价

周晓伟^a 唐延婷^b 桑 锋^c 张秀丽^a
李立新^b 周红刚^c 刘 伟^{*,d} 戴玉洁^a

(^a 天津科技大学生物工程学院 天津 300457)

(^b 天津国际生物医药联合研究院高通量药物筛选中心 天津 300457)

(^c 南开大学药学院 天津 300071)

(^d 天津科技大学理学院 天津 300457)

摘要 蛋白酪氨酸磷酸酶 1B (PTP1B) 是治疗 2 型糖尿病和肥胖症的新靶点。根据已报道的磷酸酪氨酸拟似物类 PTP1B 抑制剂 **A**, 通过计算机药物辅助设计, 经 Negishi 偶联、亚磺酰亚胺烯醇式不对称加成及 Dess-Martin 氧化等 11 步反应成功合成了一个结构新颖的 PTP1B 抑制剂 **1**, 其对体外人重组 PTP1B 的半抑制浓度为 $54.17 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

关键词 蛋白酪氨酸磷酸酶 1B; 酪氨酸拟似物; 抑制剂

Synthesis and Biological Evaluation of Phosphotyrosyl Mimetic as a Novel Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibitor

Zhou, Xiaowei^a Tang, Yanting^b Sang, Feng^c Zhang, Xiuli^a
Li, Lixin^b Zhou, Honggang^c Liu, Wei^{*,d} Dai, Yujie^a

(^a College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457)

(^b High Throughput Molecular Drug Discovery Center, Tianjin International Joint Academy of Biotechnology and Medicine, TEDA, Tianjin 300457)

(^c College of Pharmacy, Nankai University, Tianjin 300071)

(^d College of Sciences, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457)

Abstract Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) has been known to be a promising target for the treatment of type 2 diabetes and obesity. According to the reported phosphotyrosyl mimetics **A**, a new PTP1B inhibitor **1** was designed via computer-assisted drug design. The target compound **1** was achieved through eleven steps with Negishi cross-coupling reaction, diastereoselective sulfinylimine enolate addition reaction and the Dess-Martin oxidation as key steps. The compound **1** inhibited PTP1B competitively with an IC_{50} value of $54.17 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ *in vitro*.

Keywords protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B); phosphotyrosyl mimetics; inhibitors

蛋白质磷酸化水平在人体信号通路调控中具有重要意义^[1]。蛋白酪氨酸磷酸酶(Protein tyrosine phosphatase, PTP)是人体内调节蛋白酪氨酸残基磷酸化水平的酶家族。它与蛋白酪氨酸激酶(protein tyrosine kinases, PTK)通过调控细胞内蛋白酪氨酸残基的去磷酸化和磷酸化, 调节人体内细胞增殖、生长、分化, 参与细胞迁

移、细胞循环、离子通道活性和免疫应答等生物过程^[2,3]。PTP1B是PTP家族中的成员之一, 它是第一个被分离和纯化出来的蛋白酪氨酸磷酸酶。研究发现, PTP1B在人体胰岛素和瘦素的信号转导过程中起负调节作用, 它的过度表达会导致胰岛素受体的过度去磷酸化, 使胰岛素受体与胰岛素的结合受阻, 引起生物体内的胰岛素抵

* E-mail: liuwei2006@tust.edu.cn

Received December 16, 2014; revised January 26, 2015; published online February 5, 2015.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 81102374, 21272171, 21302139).

国家自然科学基金(Nos. 81102374, 21272171, 21302139)资助项目。

抗^[4], 这是 2 型糖尿病和肥胖症发病的重要原因之一。因此, 以 PTP1B 作为一个治疗 2 型糖尿病和肥胖症的新靶点, 具有广阔的发展前景。Zhang 等^[5]研究发现 PTP1B 的生物结构中包含一个具有高度保守性的催化活性位点和一个相邻的非催化活性位点 2, 而后者具有一定的特异性^[6]。因此, PTP1B 抑制剂要成为治疗糖尿病和肥胖症的药物不仅需要有良好的抑制活性, 还需具有一定的选择性以克服对同源蛋白的抑制干扰。现已报道的 PTP1B 小分子抑制剂有羧酸类、磷酸类、磺酸类及杂环类衍生物等结构^[7]。截至目前, 只有两个小分子抑制剂进入临床试验阶段^[8]。较差的生物利用度和选择性仍是开发 PTP1B 抑制剂所需解决的两大问题。

2003 年, Liu 等^[9]经高通量筛选得到一个具有 PTP1B 抑制活性的小分子, 经过一系列结构修饰, 合成出一个磷酸酪氨酸拟似物 **A** ($K_i=17.3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) (图 1)。通过 X 单晶衍射发现, **A** 同时连接到了 PTP1B 的催化活性位点和非催化活性位点 2。A 结构中 N 原子上连有一个苯甲酸基团和一个草氨酸基团, 它们共同进入了 PTP1B 的催化活性口袋, 而下面的戊胺基则增加了 A 的疏水性, 脂肪链插入了位点 2^[10]。研究发现, A 分子结构中至少含有一个羧酸基团时, 才会与 PTP1B 催化活性部位形成静电作用。鉴于此, 在 A 的基础上, 我们利用计算机药物辅助技术, 设计出一个新的酪氨酸拟似物 **1** (图 1)。在拟似物 **1** 中, C 原子取代 A 中的 N 原子, 苯乙酰胺基团取代了苯甲酸基团, 同时引入两个手性中心以提高与蛋白的结合效率。本工作中, 我们经 11 步不对称合成出拟似物 **1**, 并评估了其对人基因重组 PTP1B 酶的体外抑制活性。

1 结果与讨论

1.1 目标化合物 1 的合成

以对溴苯甲醛为原料, 采用 Scheme 1 所示的合成路线, 经 11 步得到目标产物 **1**。首先, 碘代物 **14** 的有机锌

试剂与对溴苯甲醛 **2** 进行 Negishi 偶联反应得到手性化合物 **3**^[11], 收率为 42%。随后, 产物 **3** 在碱性下酯水解, 脱甲基得到羧酸 **4**。采用 TBTU 缩合剂, **4** 与戊胺进行酸胺缩合, 得到酰胺 **5**。为了引入另一个手性中心, 我们利用 (*S*)-叔丁基亚磺酰胺作为手性辅助试剂与 **5** 进行缩合, 得到手性亚胺 **6**。此反应中, 加入过量的 (*S*)-叔丁基亚磺酰胺, 并延长反应时间, 化合物 **5** 总是不能完全被消耗, 最终亚胺 **6** 的收率为 71.3%。接下来, 在 $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下, 向 6 equiv. 的 LiHMDS 中加入 5 equiv. 的化合物 **13**, 形成锂盐后, 加入 1 equiv. 的亚胺 **6**, 得到加成产物亚磺酰胺 **7**^[12], 至此形成了目标化合物 **1** 的骨架。随后化合物 **7** 利用盐酸选择性脱保护, 脱去叔丁基亚磺酰基, 生成胺 **8**。胺 **8** 与苯乙酰胺缩合生成中间产物 **9**。通过对 **9** 进行全部脱 Boc 保护, 得到醇 **11**。此后, 再经 Dess-Martin 氧化, 生成邻二羰基化合物 **12**。最后, 在 $0.25 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaOH 溶液中, 对 **12** 进行酯水解, 得到了目标产物 **1**。

在最初设计的合成路线中, 我们尝试由化合物 **19** 和 **21** 通过 Negishi 偶联反应来制备 **12** (Scheme 2)。其中, 化合物 **21** 可通过 Scheme 1 中所述步骤 d~h 及 Dess-Martin 氧化来合成。化合物 **19** 是以 *L*-丝氨酸 **15** 为初始原料, 通过 Boc 保护、成酰胺、磺酰化及碘代等四步得到。但 **19** 与化合物 **21** 的 Negishi 偶联反应并不成功。虽然, 尝试各种催化剂 [$\text{Pd}(\text{OAc})_2$, $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$, $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ 和 $\text{Pd}(\text{PPh}_3)\text{Cl}_2$], 改变反应温度及延长反应时间, 但都没有得到化合物 **12**。这可能是由于化合物 **21** 中的两个羰基在该反应条件下不稳定导致的。之后, 我们还尝试利用化合物 **20** 与上述 **19** 的有机锌试剂进行偶联, 但两者根本不反应。

1.2 生物活性检测

PTP1B 抑制剂的体外生物活性测定通常是以磷酸对硝基苯酯 (pNPP) 为底物, pNPP 在 PTP1B 的作用下会水解生成黄色的对硝基苯酚 pNP, pNP 产生的荧光在

图 1 基于 PTP1B 抑制剂 A 设计目标产物 1

Figure 1 Design of target compound **1** based on the previously reported PTP1B inhibitor **A**

Reagents and conditions: (a) *N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-L-iodoalanine methyl ester (**14**), I_2 , Zn, $P(o\text{-Tol})_3$, $Pd(OAc)_2$, DMF, 50 °C, 42%; (b) $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH, H_2O /dioxane/MeOH, 98%; (c) amylamine, TBTU, DIPEA, CH_2Cl_2 , r.t., 80.3%; (d) (*S*)-*tert*-butanesulfinamide, titanium tetraisopropionate, THF, r.t., 71.3%; (e) *tert*-butoxycarbonyloxycetic acid methyl ester (**13**), LiHMDS, N_2 , THF, -78 °C, 81.8%; (f) $4\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl, MeOH, dioxane, H_2O , r.t., 62%; (g) phenylacetyl chloride, DIEA, THF, r.t., 71%; (h) $6\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl, MeOH, r.t.; (i) Boc_2O , Et_3N , CH_2Cl_2 , r.t., 82.5%; (j) Dess-Martin periodinane, CH_2Cl_2 , r.t., 56%; (k) $0.25\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH, MeOH, r.t., 35.3%.

图式 1 目标化合物 **1** 的合成路线
Scheme 1 Synthetic pathway of target compound **1**

Reagents and conditions: (a) Boc_2O , NaOH, dioxane/ H_2O , r.t.; (b) amylamine, EDCI, HOBT, NMM, DMF, r.t.; (c) TsCl, NMI, Et_3N , toluene, r.t.; (d) NaI, acetone, reflux; (e) (i) (*S*)-*tert*-butanesulfinamide, titanium tetraisopropionate, THF, r.t.; (ii) *tert*-butoxycarbonyloxycetic acid methyl ester (**13**), LiHMDS, N_2 , THF, -78 °C; (iii) $6\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl, MeOH, dioxane, H_2O , r.t.; (iv) phenylacetyl chloride, DIEA, THF, r.t.; (f) Dess-Martin periodinane, CH_2Cl_2 , r.t.

图式 2 其他尝试过的失败合成路线
Scheme 2 Other unsuccessful pathways attempted to synthesize target compound **1**

405 nm 处有较强吸收峰, 因此我们可测定 pNP 的生成量来反应化合物 PTP1B 对酶活性的抑制水平. 沿用本课题组已报道的该筛选方法^[14], 本工作对目标化合物 **1** 进行了 PTP1B 的体外活性检测. 阳性对照为硫酸钠, 其 IC_{50} 为 $16.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. 化合物 **1** 的 IC_{50} 值达到了 $54.17 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (图 2), 比我们预期的生物活性稍差.

图 2 化合物 **1** 的量效曲线图

Figure 2 The drug effect graph of **1** against PTP1B

2 结论

综上所述, 以对溴苯甲醛为初始原料, 通过尝试不同的路线, 最终经 11 步成功地合成了一个结构新颖的磷酸蛋白酪氨酸拟似物 **1**, 并利用核磁氢谱和高分辨质谱对各步产物进行了结构表征. 采用人基因重组 PTP1B 酶活体系, 体外测定了目标产物 **1** 的抑制活性. 测活结果表明, 化合物 **1** 的 IC_{50} 值为 $54.17 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 比原型抑制剂 **A** 的生物活性稍差, 后期我们将对其进行进一步的结构优化.

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

上海精密科学仪器有限公司 SGW-X4B 型数字显微熔点仪, 温度未校正; 德国 Bruker 400 MHz Avance DPX 型核磁共振仪 (以 TMS 为内标, CDCl_3 或 $\text{DMSO}-d_6$ 为溶剂); 美国 Waters Synapt G1 UPLC-Q-TOF 高分辨质谱仪; 柱层析硅胶为 200~300 目 (青岛海洋化工有限公司). 所用溶剂和试剂均为分析纯, 必要时需经过干燥或蒸馏. 美国 Thermo Varioskan Flash 酶标仪用于酶活测定.

3.2 实验方法

3.2.1 2S-[(叔丁氧羰基)氨基]-3-(对甲酰苯基)丙酸甲酯(**3**)的合成

室温下, 在手套箱中, 将 100 mg 碘单质加入到含

锌粉 (5.93 g, 91.2 mmol) 的 50 mL 单口瓶中, 快速搅拌, 加入 15 mL 干燥的 DMF, 然后再加入 *N*-Boc-3-碘丙氨酸甲酯 (5 g, 15.2 mmol), 有轻微的放热发生, 继续搅拌 5 min, 待温度恢复到室温时停止搅拌. 用注射器取其反应上清液, 加入到装有对溴苯甲醛 (19.7 mmol), $\text{P}(o\text{-Tol})_3$ (462.6 mg, 1.52 mmol, 10 mol%) 和 $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (170.6 mg, 0.76 mmol, 5 mol%) 的封管中. 在 50 °C 条件下, 快速搅拌 2 h. 反应后的粗产物直接经柱层析 (10% 乙酸乙酯-石油醚) 纯化得 1.96 g 黄褐色固体 **3**^[11], 产率 42%. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 10.0 (s, 1H), 7.82 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.32 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 5.02 (d, $J=7.2$ Hz, 1H), 4.67~4.60 (m, 1H), 3.73 (s, 3H), 3.26~3.08 (m, 2H), 1.42 (s, 9H).

3.2.2 3-对甲酰苯基-2S-[(叔丁氧羰基)氨基]丙酸(**4**)的合成

在 100 mL 的反应瓶中, 加入 26 mL 混合溶剂 [$V(1,4\text{-二氧六环}) : V(\text{水}) : V(\text{甲醇}) = 1 : 1 : 1$], 将化合物 **3** (1.5 g, 4.88 mmol) 溶于该溶液中, 再加入 $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaOH (9.8 mL), 室温下搅拌 50 min. 反应结束后加入 HCl ($1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 调节 $\text{pH} < 3$, 再用乙酸乙酯和水稀释, 分液. 水相用乙酸乙酯萃取三次, 合并有机相, 再经无水硫酸钠干燥, 过滤, 除去溶剂, 得到粗产物 **4**, 直接用于下一步反应.

3.2.3 *N*-正戊基-3-对甲酰苯基-2S-[(叔丁氧羰基)氨基]丙酰胺(**5**)的合成

将化合物 **4** (1.47 g, 5.0 mmol) 溶于 5 mL 干燥的二氯甲烷中, 加入 *O*-苯并三唑-*N,N,N',N'*-四甲基脲四氟硼酸 (1.66 g, 5.2 mmol) 和 *N,N*-二异丙基乙胺 (1.56 g, 12.1 mmol), 随后加入戊胺 (0.44 g, 5.0 mmol). 室温下搅拌 1.5 h. 反应结束后加入二氯甲烷和 1% HCl 进行稀释, 分液, 有机相用二氯甲烷萃取, 合并有机相, 再经无水硫酸钠干燥, 过滤, 除去溶剂. 粗产品经柱层析 (30% 乙酸乙酯-石油醚) 纯化得 1.46 g 白色固体 **5**, 产率 80.3%. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 9.97 (s, 1H), 7.81 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.38 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 5.88 (s, 1H), 5.10 (s, 1H), 4.34~4.29 (m, 1H), 3.19~3.04 (m, 4H), 1.39 (s, 9H), 1.39~1.35 (m, 1H), 1.28~1.14 (m, 5H), 0.85 (t, $J=7.2$ Hz, 3H).

3.2.4 *N*-正戊基-3-{4'-[*Z*-(*S*-叔丁亚磺酰基)亚胺]苯基}-2S-[(叔丁氧羰基)氨基]丙酰胺(**6**)的合成

将化合物 **5** (483 mg, 1.33 mmol) 溶于 9 mL 干燥的四氢呋喃中, 随后加入钛酸异丙酯 (758 mg, 2.7 mmol), 室温下搅拌 5 min, 然后加入 (*S*)-叔丁基亚磺酰胺 (245.3 mg, 1.6 mmol), 室温搅拌过夜. 反应结束后加入饱和的氯化铵溶液进行淬灭, 用硅藻土过滤, 滤饼用二氯甲烷

洗涤. 然后用二氯甲烷萃取滤液三次, 合并有机相, 再经无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩, 得粗产品. 粗产品再经柱层析(25%乙酸乙酯-石油醚)得 442 mg 无色油状 **6**, 产率 71.3%. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.54 (s, 1H), 7.77 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.32 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 5.87 (s, 1H), 5.10 (s, 1H), 4.32~4.30 (m, 1H), 3.18~3.05 (m, 4H), 1.39 (s, 9H), 1.26 (s, 9H), 1.29~1.16 (m, 6H), 0.84 (t, $J=7.2$ Hz, 3H); HRMS-ESI calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ [$\text{M}+\text{H}^+$] 466.2740, found 466.2746.

3.2.5 3-{4'-[[(2*S*-叔丁氧羰基氨基)-*N*-戊基丙酰胺]-3-基]苯基}-3*S*-(*S*_s-叔丁亚磺酰氨基)-2-(*O*-叔丁氧羰基)丙酸甲酯(**7**)的合成

氮气保护-78 °C 下, 将 Boc-羧乙酸甲酯 **13** (6.3 g, 33.14 mmol) 溶于 55 mL 干燥的四氢呋喃中, 将其逐滴加入到二(三甲基硅基)氨基锂(39.8 mL, 1 mol·L⁻¹)中, 搅拌 1 h. 再将化合物 **6** (3.1 g, 6.63 mmol) 溶于 80 mL 干燥的四氢呋喃中, 逐滴加入到上述反应液中, 继续搅拌至化合物 **6** 消失(TLC 检测), 停止反应. 反应液用饱和的碳酸氢钠溶液淬灭, 恢复到室温, 再用碳酸氢钠溶液和乙酸乙酯稀释, 分液, 用乙酸乙酯萃取水相, 合并有机相, 再经无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩. 粗产品经柱层析(40%乙酸乙酯-石油醚)纯化得 3.55 g 白色固体 **7**, 产率 81.8%. m.p. 77~79 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.34 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.20 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 5.76 (t, $J=5.2$ Hz, 1H), 5.20 (d, $J=2.8$ Hz, 1H), 5.06 (s, 1H), 4.93 (dd, $J=10, 2.4$ Hz, 1H), 4.22 (d, $J=6.4$ Hz, 1H), 4.09 (d, $J=10$ Hz, 1H), 3.76 (s, 3H), 3.16~2.96 (m, 2H), 3.10~2.95 (m, 2H), 1.42 (s, 9H), 1.41 (s, 9H), 1.33~1.20 (m, 6H), 1.17 (s, 9H), 0.87 (t, $J=7.2$ Hz, 3H); HRMS-ESI calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{54}\text{N}_3\text{O}_9\text{S}$ [$\text{M}+\text{H}^+$] 656.3581, found 656.3567.

3.2.6 3-{4'-[[(2*S*-叔丁氧羰基氨基)-*N*-戊基丙酰胺]-3-基]苯基}-3*S*-氨基-2-(*O*-叔丁氧羰基)丙酸甲酯(**8**)的合成

将化合物 **7** (250 mg, 0.38 mmol) 溶于 3 mL 的甲醇中, 然后加入 4 mol·L⁻¹ 盐酸[0.57 mL, $V(1,4\text{-二氧六环}):V(\text{水})=1:1$], 在室温条件下搅拌, TLC 检测, 原料点消失后停止反应. 反应液先用饱和碳酸氢钠溶液淬灭, 再用二氯甲烷萃取, 有机相经无水硫酸钠干燥, 过滤, 除去溶剂, 得粗产品, 再经柱层析(55%乙酸乙酯-石油醚)分离纯化得 130 mg 黄色油状 **8**, 产率 62%. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.28 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.18 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 5.77 (s, 1H), 5.05 (d, $J=5.2$ Hz, 1H), 4.95 (d, $J=4.8$ Hz, 1H), 4.38 (d, $J=4.8$ Hz, 1H), 4.27~4.18 (m, 1H), 3.67 (s, 3H), 3.17~3.12 (m, 2H), 3.06~

3.00 (m, 2H), 1.81 (s, 2H), 1.43 (s, 9H), 1.40 (s, 9H), 1.30~1.18 (m, 6H), 0.86 (t, $J=7.2$ Hz, 3H); HRMS-ESI calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{45}\text{N}_3\text{NaO}_8$ [$\text{M}+\text{Na}^+$] 574.3104, found 574.3091.

3.2.7 3-{4'-[[(2*S*-叔丁氧羰基氨基)-*N*-戊基丙酰胺]-3-基]苯基}-3*S*-苯乙酰氨基-2-(*O*-叔丁氧羰基)丙酸甲酯(**9**)的合成

将产物 **8** (130 mg, 0.24 mmol) 溶于 3 mL 干燥的四氢呋喃中, 随后加入 *N,N*-二异丙基乙胺(76.1 mg, 0.6 mmol), 向混合溶液中逐滴加入苯乙酰氯(40 mg, 0.26 mmol), 室温搅拌 2 h, TLC 检测. 反应停止后, 除去溶剂, 加入乙酸乙酯稀释, 分别用饱和碳酸氢钠溶液、饱和柠檬酸溶液和食盐水洗涤, 然后有机相用无水硫酸钠进行干燥, 过滤, 除去溶剂得粗品, 粗品再经柱层析(33%乙酸乙酯-石油醚)分离纯化得 196 mg 白色固体 **9**, 产率 71%. m.p. 58~60 °C. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.38~7.27 (m, 5H), 7.12 (dd, $J=15.6, 8.4$ Hz, 4H), 6.35 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 5.78 (s, 1H), 5.62 (dd, $J=9.2, 1.6$ Hz, 1H), 5.12 (d, $J=2.0$ Hz, 1H), 5.00 (s, 1H), 4.25~4.20 (m, 1H), 3.67 (s, 3H), 3.59 (s, 2H), 3.19~3.11 (m, 2H), 3.06~2.96 (m, 2H), 1.42 (s, 9H), 1.41 (s, 9H), 1.32~1.20 (m, 6H), 0.87 (t, $J=7.2$ Hz, 3H); HRMS-ESI calcd for $\text{C}_{36}\text{H}_{51}\text{N}_3\text{NaO}_9$ [$\text{M}+\text{Na}^+$] 692.3523, found 692.3536.

3.2.8 3-{4'-[[(2*S*-氨基)-*N*-戊基丙酰胺]-3-基]苯基}-3*S*-苯乙酰氨基-2-羟基丙酸甲酯(**10**)的合成

将化合物 **9** (196 mg, 0.29 mmol) 溶于 1.4 mL 甲醇中, 在 0 °C 下, 将 6 mol·L⁻¹ 盐酸(2.9 mL)逐滴加入到混合溶液中, 恢复到室温, 搅拌 3 h. 反应结束后, 用饱和碳酸氢钠溶液淬灭, 二氯甲烷萃取, 有机相经无水硫酸钠干燥, 过滤, 除去溶剂得粗品, 粗品再经柱层析(4%甲醇-二氯甲烷)分离纯化得 78 mg 白色固体 **10**, 产率 56.7%. m.p. 186~188 °C. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.38~7.25 (m, 5H), 7.15 (s, 4H), 6.46 (s, 1H), 5.48 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 4.43 (s, 1H), 3.72 (s, 3H), 3.59 (s, 3H), 3.30~3.17 (m, 3H), 2.67~2.61 (m, 1H), 2.31 (s, br, 1H), 1.53~1.46 (m, 2H), 1.34~1.25 (m, 4H), 1.25 (s, 2H), 0.89 (t, $J=6.8$ Hz, 3H); HRMS-ESI calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{N}_3\text{O}_5$ [$\text{M}+\text{H}^+$] 470.2655, found 470.2647.

3.2.9 3-{4'-[[(2*S*-叔丁氧羰基氨基)-*N*-戊基丙酰胺]-3-基]苯基}-3*S*-苯乙酰氨基-2-羟基丙酸甲酯(**11**)的合成

将化合物 **10** (78 mg, 0.17 mmol) 溶于 1 mL 干燥的二氯甲烷中, 加入三乙胺(33.6 mg, 0.34 mmol), 将 0.5 mL 溶有 BOC 酸酐的二氯甲烷, 逐滴加入到上述溶液中, 室温搅拌过夜. 反应结束后, 用饱和食盐水稀释,

用二氯甲烷和甲醇($V:V=10:1$)萃取, 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 除去溶剂得粗品, 粗品再经柱层析(1%甲醇-二氯甲烷)分离纯化得 78 mg 白色固体 **11**, 产率 82.5%. m.p. 217~219 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.39~7.25 (m, 5H), 7.13 (s, 4H), 6.34 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 5.91 (s, 1H), 5.48 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 5.05 (s, 1H), 4.41 (d, $J=1.2$ Hz, 1H), 4.25 (d, $J=6.8$ Hz, 1H), 3.73 (s, 3H), 3.58 (d, $J=1.6$ Hz, 2H), 3.20~3.10 (m, 2H), 3.06~2.95 (m, 2H), 2.69 (br s, 1H), 1.41 (s, 9H), 1.34~1.20 (m, 6H), 0.87 (t, $J=6.8$ Hz, 3H); HRMS-ESI calcd for $\text{C}_{31}\text{H}_{43}\text{N}_3\text{NaO}_7$ [$\text{M}+\text{Na}^+$] 592.2999, found 592.3009.

3.2.10 3-{4'-[[(2*S*-叔丁氧羰基氨基)-*N*-戊基丙酰胺]-3-基]苯基}-3*S*-苯乙酰氨基-2-羧基丙酸甲酯(**12**)的合成

将化合物 **11** (330 mg, 0.58 mmol)溶于 7 mL 干燥的二氯甲烷中, 随后加入 Dess-Martin 氧化剂(368 mg, 0.87 mmol), 室温搅拌 2 h, 反应结束后加入饱和硫代硫酸钠溶液淬灭, 再加入饱和碳酸钠溶液中和, 用二氯甲烷萃取, 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 除去溶剂得粗品, 粗品再经柱层析(60%乙酸乙酯-石油醚)分离纯化得 230 mg 白色固体 **12**, 产率 69.9%. m.p. 223~225 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.36 (t, $J=7.2$ Hz, 2H), 7.31 (d, $J=7.2$ Hz, 1H), 7.26 (d, $J=6.0$ Hz, 2H), 7.18 (s, 4H), 6.44 (s, 1H), 6.21 (d, $J=6.4$ Hz, 1H), 5.90 (s, 1H), 5.02 (s, 1H), 4.25 (d, $J=6.8$ Hz, 1H), 3.76 (s, 3H), 3.60 (s, 2H), 3.16 (d, $J=6.0$ Hz, 2H), 3.08~2.94 (m, 2H), 1.39 (s, 9H), 1.32~1.19 (m, 6H), 0.87 (t, $J=6.8$ Hz, 3H).

3.2.11 3-{4'-[[(2*S*-叔丁氧羰基氨基)-*N*-戊基丙酰胺]-3-基]苯基}-3*S*-苯乙酰氨基-2-羧基丙酸(**1**)的合成

将化合物 **12** (43.6 mg, 0.08 mmol)溶于 0.6 mL 甲醇中, 逐滴加入 $0.25\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH (0.67 mL). 室温搅拌, 通过 TLC 检测, 原料点消失后停止反应. 反应停止后用 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl 中和反应液, 用二氯甲烷萃取, 有机相经无水硫酸钠干燥, 过滤, 除去溶剂得粗品, 粗品再经柱层析(10%甲醇-二氯甲烷)分离纯化得 15 mg 淡黄色固体 **1**, 产率 35.3%. m.p. 228~230 °C; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 8.66 (dd, $J=8.0, 4.8$ Hz, 1H), 7.84 (d, $J=4.8$ Hz, 1H), 7.28~7.16 (m, 9H), 6.85 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 6.15 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 4.09~4.03 (m, 1H), 3.54 (s, 2H), 3.04 (d, $J=6.0$ Hz, 2H), 2.89~2.84 (m, 1H), 2.74~2.68 (m, 1H), 1.39~1.24 (m, 6H), 1.31 (s, 9H), 0.85 (t, $J=6.8$ Hz, 3H); HRMS-ESI calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{NaO}_7$ [$\text{M}+\text{Na}^+$] 576.2686, found 576.2695.

3.2.12 *O*-叔丁氧羰基乙酸甲酯(**13**)的合成

将乙醇酸甲酯(18.0 g, 200 mmol)溶于 100 mL 二氯

甲烷中, 0 °C 下, 加入 4-二甲氨基吡啶(2.44 g, 20.0 mmol)和 BOC 酸酐(43.0 g, 197 mmol), 搅拌 3 h, 恢复到室温后继续搅拌 1 h. 反应停止后, 用无水硫酸钠干燥, 过滤, 除去溶剂得粗品, 粗品再经柱层析(5%乙酸乙酯-石油醚)分离纯化得 31.4 g 无色油状^[15] **13**, 产率 83%. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 4.56 (s, 2H), 3.77 (s, 3H), 1.49 (s, 9H).

3.2.13 化合物 **1** 的 IC_{50} 值测定

利用比色法测定化合物对 PTP1B 的抑制活性, PTP1B 有去磷酸化作用, 底物对硝基苯磷酸盐(pNPP)在 PTP1B 的作用下生成产物对硝基苯酚(pNP), 在碱性条件下对硝基苯酚去质子化, 生成黄色水溶性产物, 在 405 nm 下有强的吸收峰^[16]. 如化合物对 PTP1B 有抑制作用, 则反应体系中产物生成量减少, 405 nm 处吸光值减弱, 酶反应速率下降.

反应体系的缓冲液为 $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-Cl, pH 为 7.2, $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, 10% glycerol, 0.1% BSA, 在 96 孔板中总反应体系为 100 μL , 实验组每孔依次加入 48 μL $100\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PTP1B, 2 μL $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 化合物, 震荡 30 s 混匀, 30 °C 孵育 10 min, 然后加入 50 μL $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pNPP, 震荡 30 s 混匀, 每 3 s 测定 1 次, 测定 300 次, 同时设定加入磷酸酶抑制剂 Na_3VO_4 的孔为阳性对照组, 不含化合物的孔为阴性对照组, 整个反应在 30 °C 下进行, 平行测定 3 次. 阴性对照组酶反应初速率为 v_0 , 实验组酶反应初速率为 v_i , v_i/v_0 表示加入化合物后酶的剩余活性, 因此化合物对 PTP1B 的抑制活性/抑制率为 $1-v_i/v_0$. 将化合物进行梯度稀释, 测定各个浓度时对 PTP1B 的抑制率, 用 GraphPad Prism 5 进行分析得出化合物的 IC_{50} 值.

辅助材料(Supporting Information) 所有新化合物的 ^1H NMR 和 HRMS 谱图. 这些材料可以免费从本刊网站 (<http://sioc-journal.cn/>) 上下载.

References

- [1] Graves, J. D.; Krebs, E. G. *Pharmacol. Ther.* **1999**, 82, 111.
- [2] Lahiry, P.; Torkamani, A.; Schork, N. J. *Nat. Rev. Genet.* **2010**, 11, 60.
- [3] Tonks, N. K. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**, 7, 833.
- [4] Combs, A. P. *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 2333.
- [5] Puius, Y. A.; Zhao, Y.; Sullivan, M.; Lawrence, D. S.; Almo, S. C.; Zhang, Z.-Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, 94, 13420.
- [6] Ibarra-Sanchez, M. D.; Wagner, J.; Ong, M. T.; Lampron, C.; Tremblay, M. L. *Oncogene* **2001**, 20, 4728.
- [7] (a) Oleksandr, L. K.; Viacheslav, V. T.; Vsevolod, Y. T.; Alexander, V. Z.; Pavel, A. T.; Andriy, I. V. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, 24, 3175.
(b) Pan, Y.-M.; Ji, M.-J.; Ye, X.-Q.; Kuang, P.-X. *Chin. J. Org. Chem.* **2003**, 23, 167 (in Chinese).

- (潘咏梅, 计明娟, 叶学其, 邝平先, 有机化学, **2003**, 23, 167.)
(c) Sun, L.-P.; Jiang, Z.; Gao, L.-X.; Liu, X.-F.; Quan, Y.-C.; Zheng, G.-H.; Li, J.; Piao, H.-R. *Chin. J. Org. Chem.* **2013**, 33, 1496 (in Chinese).
(孙良鹏, 姜哲, 高立信, 刘晓芳, 全迎春, 郑光浩, 李佳, 朴虎日, 有机化学, **2013**, 33, 1496.)
- [8] Zhi, Y.; Gao, L.-X.; Jin, Y.; Tang, C.-L.; Li, J.-Y.; Li, J.; Long, Y.-Q. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, 22, 3670.
- [9] Liu, G.; Szczepankiewicz, B. G.; Pei, Z.-H.; Janowick, D. A.; Xin, Z.-L.; Hajduk, P. J.; Abad-Zapatero, C.; Liang, H.; Hutchins, C. W.; Fesik, S. W.; Ballaron, S. J.; Stashko, M. A.; Lubeen, T.; Mika, A. K.; Zinker, B. A.; Trevillyan, J. M.; Jirousek, M. R. *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 2093.
- [10] Xin, Z.-L.; Liu, G.; Abad-Zapatero, C.; Pei, Z.-H.; Szczepankiewicz, B. G.; Li, X.-F.; Zhang, T.-Y.; Hutchins, C. W.; Hajduk, P. J.; Ballaron, S. J.; Stashko, M. A.; Lubben, T. H.; Trevillyan, J. M.; Jirousek, M. R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, 13, 3947.
- [11] Oswald, C. L.; Carrillo-Márquez, T.; Caggiano, L.; Jackson, R. F. W. *Tetrahedron* **2008**, 64, 681.
- [12] Wang, Y.; He, Q.-F.; Wang, H.-W.; Zhou, X.; Huang, Z.-Y.; Qin, Y. *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 1588.
- [13] Nakatsuji, H.; Ueno, K.; Misaki, T.; Tanabe, Y. *Org. Lett.* **2008**, 10, 2131.
- [14] Sun, C.; Peng, C.-E.; Wang, J.; Wang, Q.; Liu, W.; Zhou, H.-G.; Yang, C. *Heterocycles* **2013**, 87, 1711.
- [15] Hjelmgard, T.; Faure, S.; Lemoine, P.; Viossat, B.; Aitken, D. J. *Org. Lett.* **2008**, 10, 841.
- [16] Scott, L. M.; Lawrence, H. R.; Sebt, S. M.; Lawrence, N. J.; Wu, J. *Curr. Pharm. Des.* **2010**, 16, 1843.

(Zhao, C.)