

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200610024410.5

[51] Int. Cl.

C07D 209/20 (2006.01)

A61K 31/405 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008 年 1 月 16 日

[11] 授权公告号 CN 100361973C

[22] 申请日 2006.3.6

[21] 申请号 200610024410.5

[73] 专利权人 复旦大学

地址 200433 上海市邯郸路 220 号

[72] 发明人 闻 韧 董肖椿 郑剑斌 沈 旭
沈建华 蒋华良

[56] 参考文献

CN1505613A 2004.6.16

WO03000253A1 2003.1.3

US20030149029A1 2003.8.7

WO2004052856A1 2004.6.24

CN1569834A 2005.1.26

审查员 石继仙

[74] 专利代理机构 上海正旦专利代理有限公司
代理人 包兆宜

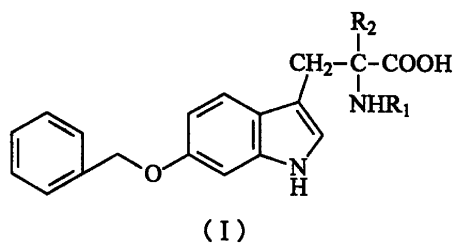
权利要求书 2 页 说明书 17 页

[54] 发明名称

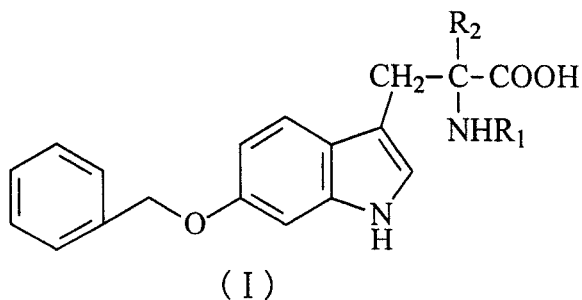
苄氧基取代色氨酸衍生物、制备方法及应用

[57] 摘要

本发明属药物合成领域，涉及通式 (I) 结构的苄氧基取代的色氨酸衍生物及其类似物，制备方法和与 PPAR γ 蛋白结合活性的应用。本发明色氨酸衍生物经药效学 PPAR γ 蛋白结合模型实验，结果显示本发明化合物具有良好的结合活性，可研制为新型 PPAR γ 激动剂，用作 II 型糖尿病治疗药物等。其中，Ar = 苯基；R¹ = 苯甲酰基或氯取代苯甲酰基或苯乙酰基或丙酰基；R² = 氢或羧基。



1、苄氧基取代的色氨酸衍生物，其特征是具有通式 (I) 的结构，

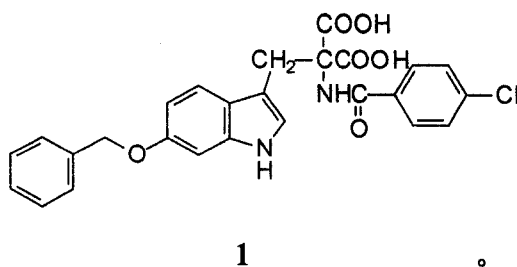


其中

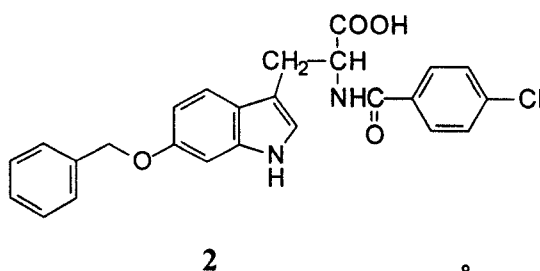
R^1 = 苯甲酰基 或 氯取代苯甲酰基 或 苯乙酰基 或 丙酰基；

R^2 = 氢 或 羧基。

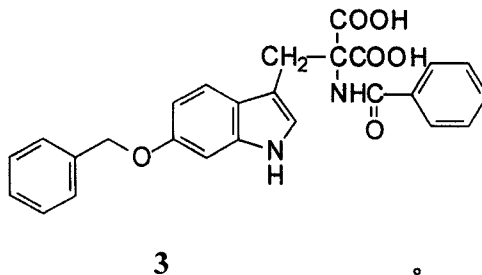
2、根据权利要求 1 所述的苄氧基取代的色氨酸衍生物，其特征是具有下述结构的化合物 1，



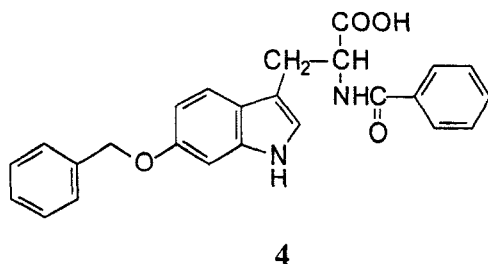
3、根据权利要求 1 所述的苄氧基取代的色氨酸衍生物，其特征是具有下述结构的化合物 2，



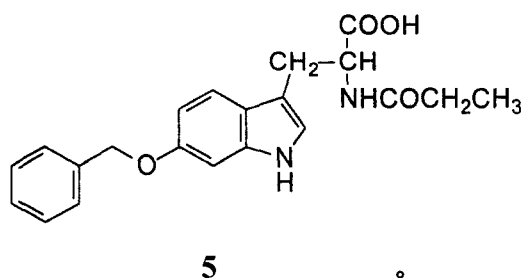
4、根据权利要求 1 所述的苄氧基取代的色氨酸衍生物，其特征是具有下述结构的化合物 3，



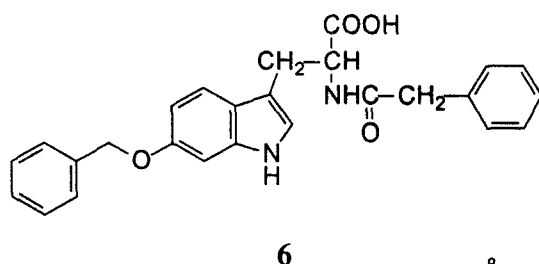
- 5、根据权利要求1所述的苄氧基取代的色氨酸衍生物，其特征是具有下述结构的化合物4，



- 6、根据权利要求1所述的苄氧基取代的色氨酸衍生物，其特征是具有下述结构的化合物5，



- 7、根据权利要求1所述的苄氧基取代的色氨酸衍生物，其特征是具有下述结构的化合物6，



- 8、据权利要求1所述的苄氧基取代的色氨酸衍生物的制备方法，其特征是采用苄氧基苯甲醛和 α -叠氮基乙酸乙酯通过缩合、环合、水解、脱羧得到 6-苄氧基吲哚，以醋酸和四氢呋喃为溶剂，与甲醛水溶液和二甲胺水溶液反应引入二甲胺基甲基；然后在氢氧化钠、甲苯中与不同的酰氨基取代丙二酸二乙酯缩合、碱性条件下水解、加热脱羧得到目标化合物。

- 9、权利要求1的苄氧基取代的色氨酸衍生物在制备过氧化物酶体增殖激活受体 γ 激动剂中的用途。

- 10、权利要求1的苄氧基取代的色氨酸衍生物在制备抗2型糖尿病药物中的用途。

苄氧基取代色氨酸衍生物、制备方法及应用

技术领域

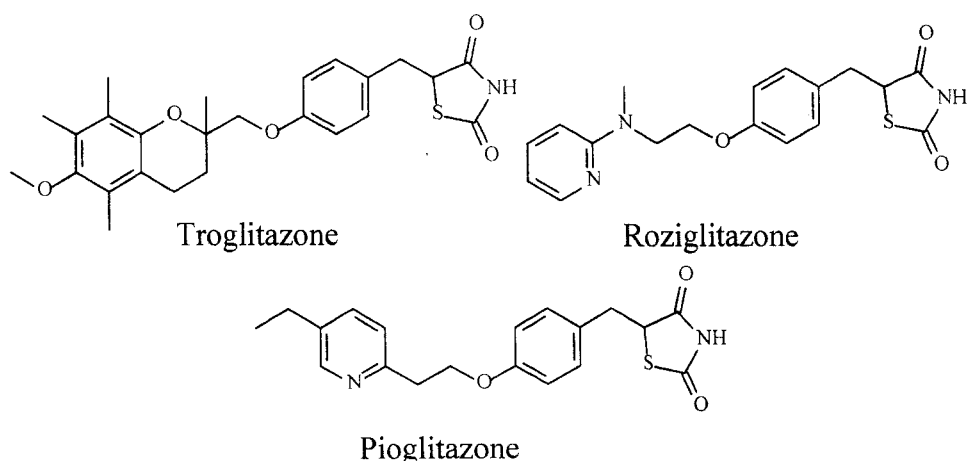
本发明属药物合成领域,具体涉及一种6位有苄氧基取代的色氨酸衍生物及其类似物,制备方法和在药学上的应用。

背景技术

随着人民生活水平提高、生活模式现代化及人口老龄化,糖尿病已成为人类健康的主要杀手。糖尿病的发病率在逐年增加,1995年全球已确诊糖尿病患者约1.35亿,2000年大约1.51亿成年人患糖尿病(占全球成年人的5%),预测2010年世界患糖尿病约2.39亿,到2025年糖尿病患者将达到3亿。我国糖尿病患病率增长很快,估计目前糖尿病患者总数超过3000万人,名列世界第二,而且以每年千分之一的速度递增,到2010年中国糖尿病患者将达到目前的4倍。而这其中95%以上为非胰岛素依赖型糖尿病,即II型糖尿病。威胁II型糖尿病患者生命和影响其生存质量的因素已由它的急性并发症转为慢性并发症,在微血管及大血管病变基础上产生的多种糖尿病血管并发症成为糖尿病患者致死致残的主要原因,其死亡率已上升至继肿瘤、心血管疾病之后的第三位。因此,防治糖尿病尤其是II型糖尿病已是一个迫在眉睫的紧急任务。

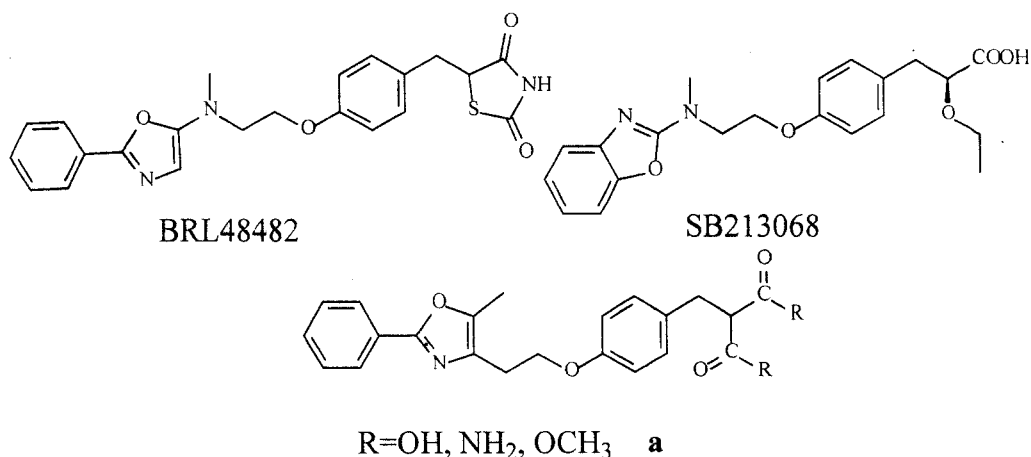
目前临床上对II型糖尿病的治疗主要是采用药物疗法。主要药物分为五大类,即磺酰脲类、非磺酰脲类、双胍类、 α -葡萄糖苷酶抑制剂和噻唑烷二酮类。磺酰脲类药物如甲苯磺丁脲、格列本脲等一直被广泛使用,但仅有60%~70%的患者血糖能得到较好的控制,而持续高血糖水平和严重胰岛患者不能达到预期效果。非磺酰脲类药物如瑞格列奈、纳格列奈等主要在肝脏内代谢,经胆汁排泄,因此对肝脏和胆囊的副作用较大。双胍类药物如二甲双胍可提高胰岛素敏感性和减低高胰岛素血症,因而对于肥胖的糖尿病患者宜作为一线抗糖尿病药物。由于二甲双胍以原型从尿中排出,所以会造成肾功能损害,另外肝功能不全者禁用。 α -葡萄糖苷酶抑制剂能延迟和减少碳水化合物的消耗和葡萄糖的吸收,从而达到控制血糖的目的,代表药物有阿卡波糖、伏格列波糖等,此类药物大多有胃肠道不适的不良反应。

噻唑烷二酮类药物(thiazolidinediones, TZDs)是近年来新研制开发得很有前途的胰岛素增敏剂,据报道,其可增强组织对胰岛素的敏感性,提高细胞对葡萄糖的利用;改善胰岛素抵抗状态,纠正糖及脂肪代谢异常;对糖化血红蛋白水平也有降低作用。代表药物有下述结构的曲格列酮(troglitazone)、罗格列酮(rosiglitazone)和吡格列酮(pioglitazone)。

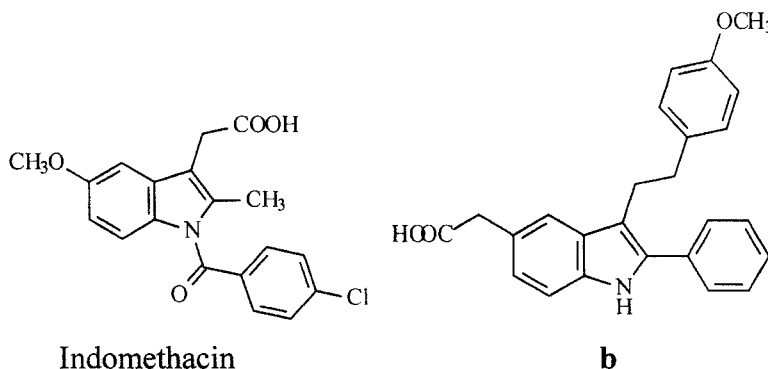


随着对过氧化物酶体增殖激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR γ)研究的深入,直到上世纪 90 年代中期,才发现已上市的用于治疗 2 型糖尿病的噻唑烷二酮类药物曲格列酮、罗格列酮和吡格列酮是 PPAR γ 的激动剂。过氧化物酶体增殖激活受体 γ (PPAR γ)是一类由配体激活的核转录因子,是过氧化物酶体增殖激活受体 PPAR 的一种亚型。当被特定的小分子激活以后,通过对基因表达的调控可以对脂肪的储存、转运和分解代谢起到很好的调控作用。深一步的研究发现,被激活的 PPAR γ 还可以增加外周组织的胰岛素敏感性,从而改善胰岛素抵抗,降低血糖浓度。

目前已知的合成 PPAR γ 激动剂在结构上可分为三个部分:平面芳环、极性头部和疏水尾部。目前已研究开发了多种不同类型的 PPAR γ 激动剂,如 α -取代苯丙酸类、L-酪氨酸类和 1,3-二羧酸类化合物。代表性化合物如下 BRL48482、SB213068、化合物 **a** 等。



葛兰素公司于 1996 年研究发现, 非甾体抗炎药吲哚美辛可以和 PPAR γ 结合并产生激动活性, 在 10^{-4} mol/L 浓度下, 可诱导 PPAR γ 产生 40 倍的活性; 在 10^{-5} 浓度下, 其激动活性的 EC₅₀ 值大约达到 4×10^{-5} mol/L, 与已经上市的 PPAR γ 激动剂罗格列酮相近; 另外吲哚美辛和罗格列酮在 PPAR γ 蛋白受体竞争抑制实验中, IC₅₀ 值达到 1×10^{-4} mol/L。实验数据说明, 以吲哚为母环的吲哚美辛是个很有效的 PPAR γ 激动剂。



1999 年, Henke 等学者在吲哚美辛的基础上又发现了一个化合物(**b**), 对 PPAR γ 也有很好的激动活性。在与 PPAR γ 受体蛋白结合实验中, 其 pK_i 值为 7.32 ± 0.07 , 而阳性对照罗格列酮为 7.33 ± 0.02 ; 其 pEC₅₀ 值为 7.36 ± 0.21 , 罗格列酮为 7.05 ± 0.07 。这些数据说明, 同样以吲哚为中间母环的化合物也是一个活性很强的 PPAR γ 激动剂。另外, 该化合物的一些衍生物也显示了较好的 PPAR γ 活性激动活性。

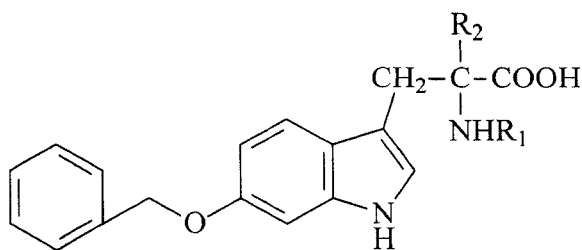
发明内容:

本发明的目的是提供具有良好的 PPAR γ 结合活性的苄氧基取代色氨酸衍生物及其类似物, 具体涉及一种 6 位有苄氧基取代的色氨酸衍生物及其类似物。

本发明的另一目的是提供上述有苄氧基取代的色氨酸衍生物及其类似物的

制备方法。

本发明化合物色氨酸衍生物具有下述通式 (I) 的结构：



其中

(I)

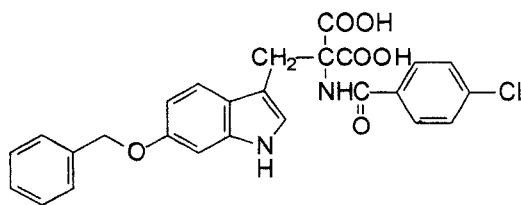
Ar= 苯基；

R¹= 苯甲酰基 或 氯取代苯甲酰基 或 苯乙酰基 或 丙酰基；

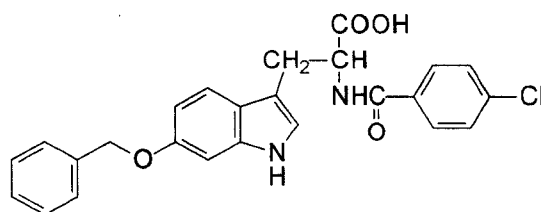
R²= 氢 或 羧基；

本发明新型化合物初步药效学研究，通过与 PPAR γ 蛋白结合实验，显示了良好的活性，可研制开发为具有 PPAR γ 激动活性的新型抗 II 型糖尿病药物。

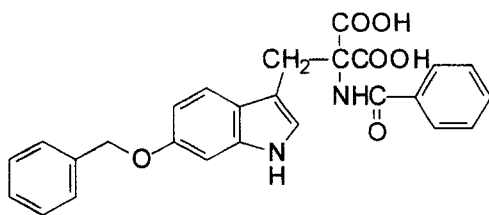
本发明的优选化合物具有下述化合物 1、2、3、4、5 或 6 的结构：



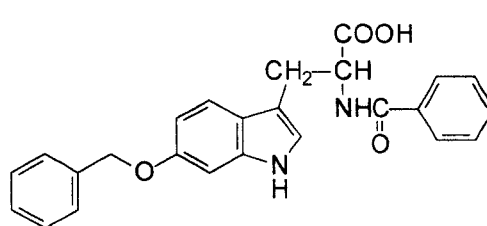
1



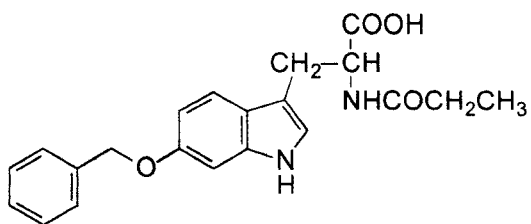
2



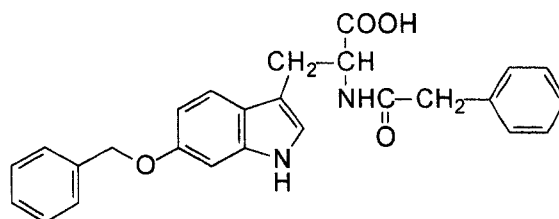
3



4

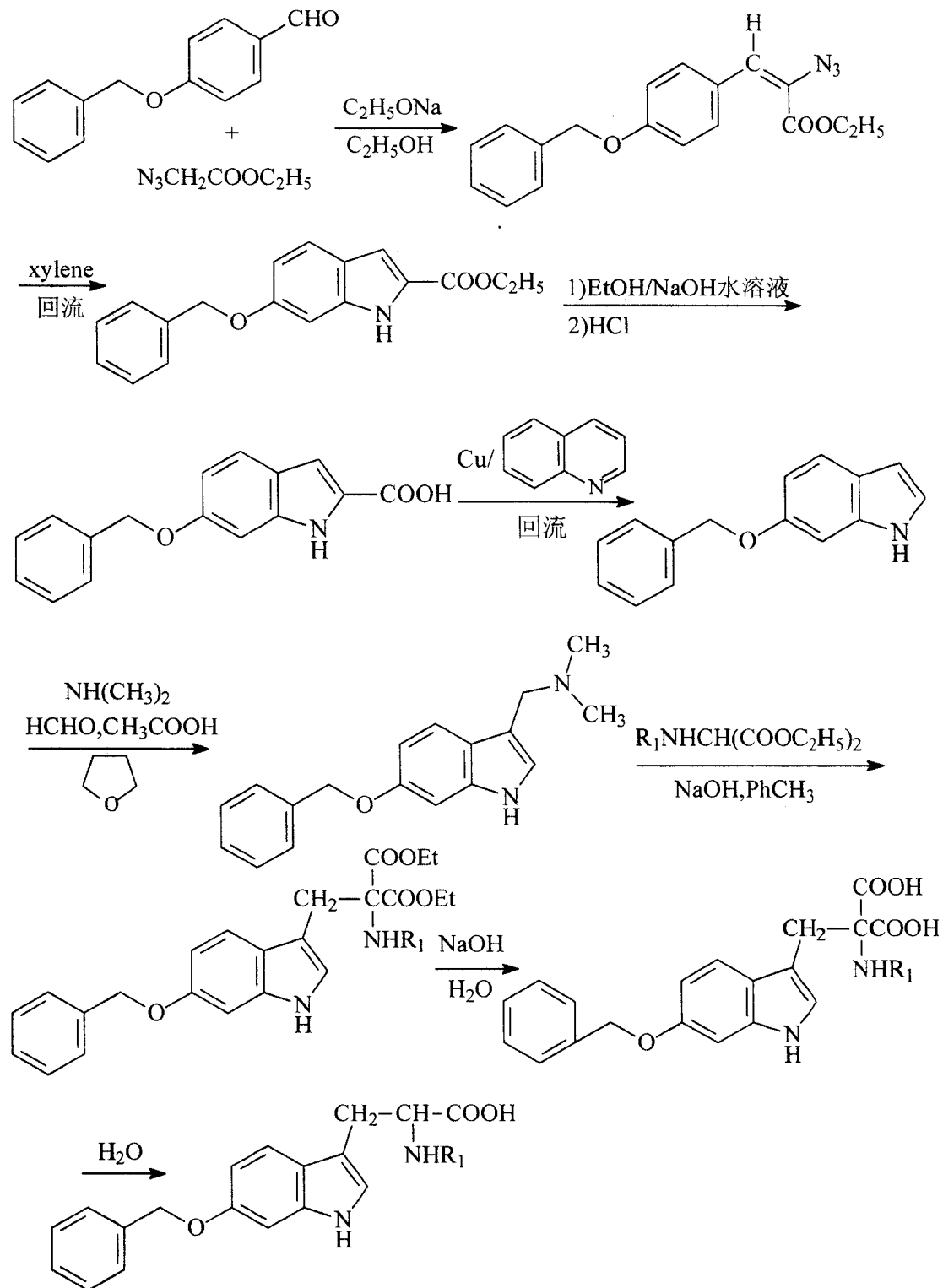


5



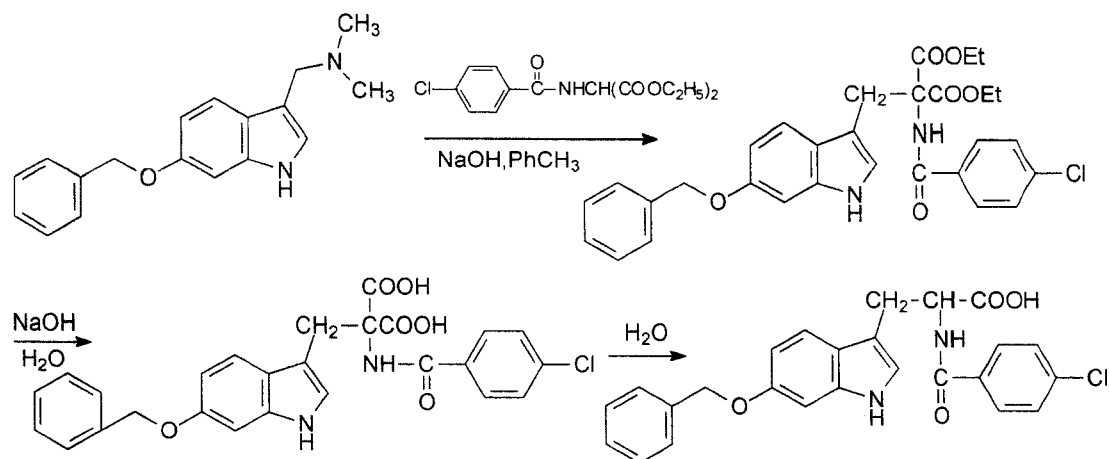
6

本发明所述的苄氧基取代的色氨酸衍生物采用苄氧基苯甲醛和 α -叠氮基乙酸乙酯经过缩合、环合、水解、脱羧得到 6-苄氧基吲哚，再经氨甲基化后与酰基取代丙二酸二乙酯缩合、水解、脱羧得到。反应式为：



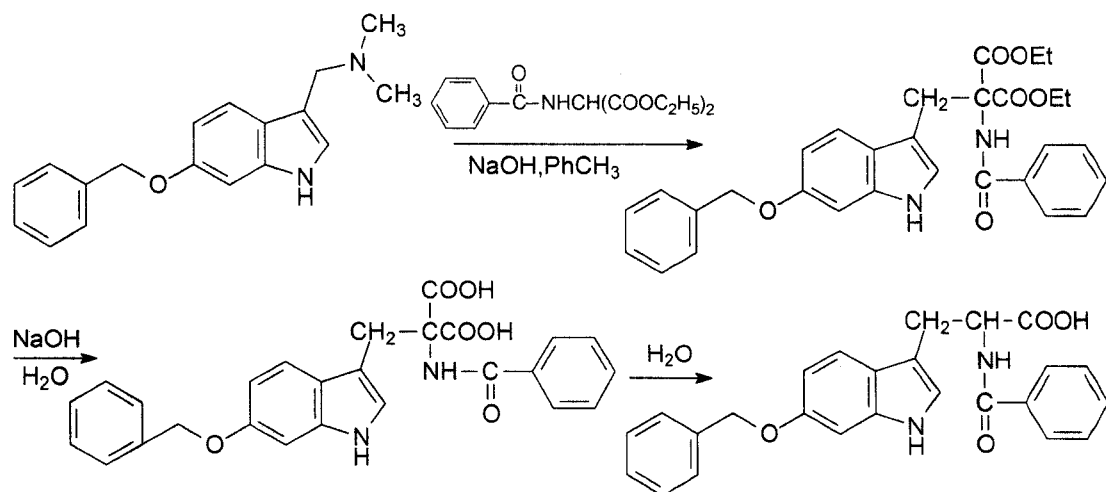
R^1 定义如前。

本发明化合物 1 或 2 的制备过程如下：



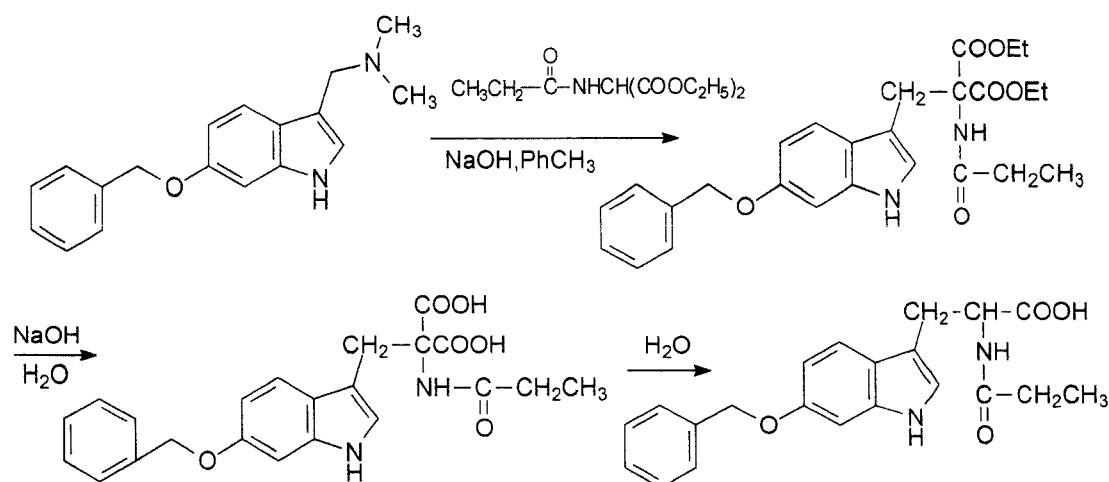
化合物 1 或 2 的制备工艺包括：6-苄氧基吲哚与甲醛、二甲胺经氨甲基化反应后与对氯苯甲酰氨基丙二酸二乙酯缩合、氢氧化钠水解得到化合物 1，最后加热脱羧得到化合物 2。

本发明化合物 3 或 4 的制备过程如下：



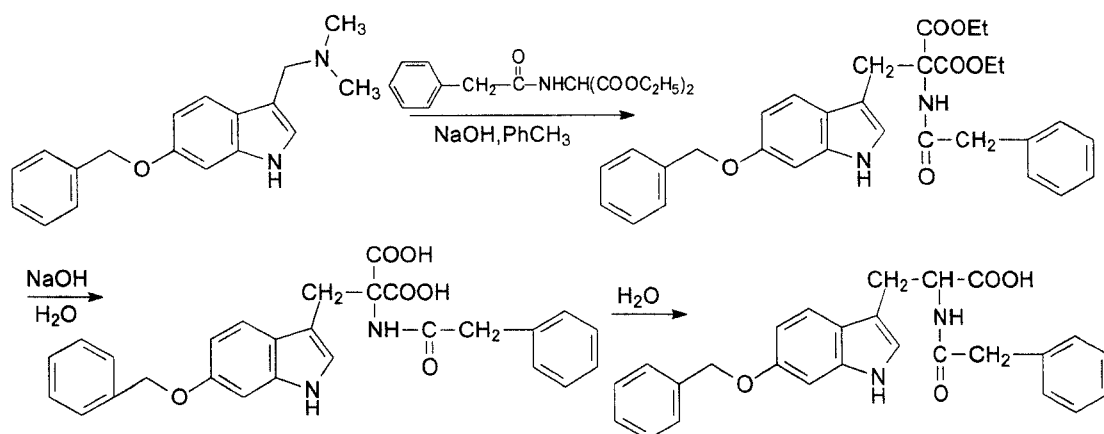
化合物 3 或 4 制备工艺包括：6-苄氧基吲哚与甲醛、二甲胺经氨甲基化反应后与苯甲酰氨基丙二酸二乙酯缩合、氢氧化钠水解得到化合物 3，最后加热脱羧得到化合物 4。

本发明化合物 5 的制备过程如下：



化合物 5 制备工艺包括：6-苄氧基吲哚与甲醛、二甲胺经氨甲基化反应后与丙酰氨基丙二酸二乙酯缩合、氢氧化钠水解、加热脱羧得到化合物 5。

本发明化合物 6 的制备过程如下：



化合物 6 制备工艺包括：6-苄氧基吲哚与甲醛、二甲胺经氨甲基化反应后与苯乙酰氨基丙二酸二乙酯缩合、氢氧化钠水解、加热脱羧得到化合物 6。

本发明化合物色氨酸衍生物可以激活 PPAR γ ，进而产生药理作用，如增加外周组织的胰岛素敏感性；改善胰岛素抵抗；降低血糖浓度；改善减少炎症反应；防止动脉粥样硬化等。

本发明化合物色氨酸衍生物通过初步药效学研究(PPAR γ 蛋白结合实验)，结果显示这类化合物有一定的 PPAR γ 蛋白结合活性。其中化合物 1 的结合 Kd 值为 8.69×10^{-6} mol/L；化合物 2 的结合 Kd 值为 6.86×10^{-6} ；阳性对照物罗格列酮结合 Kd 值为 4.98×10^{-6} mol/L。实验结果说明所设计化合物可以进一步研制开发新型抗 II 型糖尿病药物。

具体实施方式:

实施例 1: 合成化合物 1, 2-对氯苯甲酰氨基-2-[(6-苄氧基吲哚-3)-甲基]-丙二酸

1) 合成 2-叠氮基-3-(4-苄氧基苯基)丙烯酸乙酯

2000ml 圆底三颈烧瓶接冷凝管、干燥管, 加入无水乙醇 400ml, 称取金属钠 15.6g, 做成乙醇钠, 冷却至 -8 °C 以下。将 4-苄氧基苯甲醛 48.2g (0.227mol) 和 α -叠氮基乙酸乙酯 88.0g (0.682mol) 溶解于 350ml 乙醇中。在氮气保护下缓慢滴加入烧瓶, 温度始终控制在 -5 °C 以下。滴加完毕, 继续在氮气保护下 -5 °C 反应 1h。后 TLC 检验(展开剂: 氯仿: 甲醇=10:1), 显示反应结束。后将反应液倾入大量冰水中, 搅拌均匀, 有大量淡黄色固体析出, 抽滤, 用冰水洗涤固体至中性。后真空闭光干燥, 得产物淡黄色固体 66.1g (85.0%) m.p.96-98 °C。¹H-NMR(CDCl₃) δ : 1.39(t, 3H, -CH₂-CH₃, J=7.15), 4.35(q, 2H, -CH₂-CH₃, J=7.15), 5.10(s, 2H, Ar-CH₂-O-), 6.88(s, 1H), 6.96~7.00(m, 2H, phenyl-H), 7.32~7.45(m, 5H, phenyl-H), 7.78~7.82 (m, 2H, phenyl-H)。

2) 合成 2-乙氧羰基-6-苄氧基吲哚

在 1000ml 圆底三颈烧瓶中, 加入二甲苯 300ml, 加热至回流。将 2-叠氮基-3-(4-苄氧基苯基)丙烯酸乙酯 30.2g (0.099mol) 溶解于 300ml 二甲苯中, 在氮气保护回流的状态下, 逐滴缓慢加入到烧瓶中。滴加完毕后继续在氮气保护下回流 1.5h, 后 TLC 检验(展开剂: 氯仿), 显示反应结束。自然冷却至室温放置过夜。有大量晶体析出, 抽滤。滤液水泵减压浓缩至小体积, 冷却至室温后有晶体析出, 抽滤, 用少量二甲苯洗涤。后两次晶体合并, 真空干燥, 得产物白色晶体 23.4g (80.1%) m.p.132-134 °C(文献 m.p.135 °C)。¹H-NMR(CDCl₃) δ : 1.40(t, 3H, -CH₂-CH₃, J=7.24), 4.38(q, 2H, -CH₂-CH₃, J=7.24), 5.11(s, 2H, Ar-CH₂-O-), 6.89~6.92(m, 2H, indole-3,7-H), 7.16(dd, 1H, J=0.58, 1.95, indole-5-H), 7.32~7.48(m, 5H, phenyl-H), 7.56(dd, 1H, J=0.58, 9.98, indole-4-H), 8.76(s, 1H, indole-NH)。

MS m/e: 295(M⁺) 91(100%) 91, 204, 295, 158, 130, 176, 65, 102。

3) 合成 6-苄氧基吲哚-2-甲酸

在 500ml 圆底烧瓶中加入 2-乙氧羰基-6-苄氧基吲哚 3.9g (0.0132mol)、2mol/L 氢氧化钠溶液 200ml、无水乙醇 150ml, 加热回流 1h, TLC 检验(展开剂: 氯仿:

甲醇:甲酸=10:1:0.1), 显示反应结束。后减压蒸馏掉乙醇, 冷却至室温, 有晶体析出。抽滤, 晶体用适量氯仿洗涤后抽干, 转移至 250ml 烧杯中。加入蒸馏水和乙酸乙酯各 80ml, 搅拌均匀后缓慢滴加 10%盐酸, 调节 pH 至酸性 2-3, 静置后分液。分离乙酸乙酯层和水层, 水层用适量新的乙酸乙酯萃取三次。后合并乙酸乙酯层, 用饱和食盐水洗涤至中性, 无水硫酸镁干燥过夜。折滤掉硫酸镁, 乙酸乙酯减压蒸干, 后用乙酸乙酯重结晶得产物白色固体 3.2g (90.8%) m.p.199-201 °C (文献 m.p.203-205 °C)。¹H-NMR(DMSO-d₆) δ: 5.10(s, 2H, Ar-CH₂-O-), 6.78(dd, 1H, J=2.55, 8.74, indole-5-H), 6.93(d, 1H, J=1.82, indole-3-H), 6.99(d, 1H, J=1.46, indole-7-H), 7.29~7.46(m, 5H, phenyl-H), 7.50(d, 1H, J=8.74, indole-4-H), 11.55(s, 1H, -COOH), 12.69(s, 1H, indole-NH)。

MS m/e: 267(M⁺) 91(100%) 91, 267, 65, 158, 92, 130, 176, 102。

4) 合成 6-苄氧基吲哚

在 500ml 圆底烧瓶中加入 6-苄氧基吲哚-2-甲酸 17.8g (0.066mol)、铜粉 5.0g、喹啉 200ml, 在氮气保护下加热回流 1.5h。TLC 检验(展开剂: 氯仿), 显示反应结束。冷却至室温后减压蒸馏掉喹啉, 冷却后加入 200ml 乙酸乙酯, 搅拌溶解后过滤掉不溶铜粉。后用适量 10%盐酸洗涤, 再用饱和食盐水洗至中性, 然后用适量饱和碳酸氢钠溶液洗涤, 再用饱和食盐水洗至中性, 用适量无水硫酸镁干燥过夜。折滤掉硫酸镁, 减压蒸干, 得棕色固体。后用硅胶柱层析(洗脱剂: 氯仿)纯化得产物白色固体 12.1g (82.2%) m.p.112-114 °C (文献 m.p.111-112 °C)。

¹H-NMR(CDCl₃) δ: 5.12(s, 2H, Ar-CH₂-O-), 6.49(brs, 1H, indole-2-H), 6.89(dd, 1H, J=2.20, 8.52, indole-5-H), 6.95(d, 1H, J=1.92, indole-7-H), 7.10(t, 1H, J=3.30, 2.47, indole-3-H), 7.31~7.34(m, 1H, phenyl-4-H), 7.37~7.41(m, 2H, phenyl-2,6-H), 7.46~7.48(m, 2H, phenyl-3,5-H), 7.52(d, 1H, J=8.52, indole-4-H), 8.02(s, 1H, indole-NH)。

5) 合成 3-二甲氨基甲基-6-苄氧基吲哚

在 500ml 圆底烧瓶中加入 33%二甲胺水溶液 6.5ml, 后冷却至 5 °C 以下, 缓慢加入冰醋酸 20ml, 后加入甲醛水溶液 3.4ml, 然后再加入四氢呋喃 120ml, 搅拌均匀。后将 6-苄氧基吲哚 9.1g (0.0408mol)溶解于 100ml 四氢呋喃中, 在冰浴条件下缓慢滴加入烧瓶。后在氮气保护下, 室温反应 2h 后 TLC 检验(展开剂:

氯仿), 显示反应基本结束。后加入 5%硫酸水溶液 200ml, 搅拌均匀后过滤, 收集滤液。然后滤液用 2N 的氢氧化钠水溶液缓慢调节 pH 至 12 以上, 有大量白色絮状固体析出。后抽滤, 固体用大量蒸馏水洗涤后减压干燥, 得产物白色固体 10.8g (91.0%) m.p.177~178 °C。¹H-NMR(DMSO-d₆) δ: 2.12(s, 6H, -N(CH₃)₂), 3.47(s, 2H, -CH₂-N-), 5.10(s, 2H, Ar-CH₂-O-), 6.71(dd, 1H, indole-5-H, J=1.92, 8.52), 6.91(d, 1H, indole-7-H, J=1.92), 7.05(s, 1H, indole-2-H), 7.30~7.33(m, 1H, phenyl-4-H), 7.37~7.41(m, 2H, phenyl-2, 6-H), 7.45~7.47(m, 3H, phenyl-3,5-H, indole-4-H), 10.69(s, 1H, indole-NH)。

6) 合成 2-对氯苯甲酰氨基-2-[(6-苄氧基吲哚-3)-甲基]-丙二酸二乙酯

100mL 烧瓶中加入 3-二甲氨基甲基-6-苄氧基吲哚 1.77 克 (6.32mmol)、对氯苯甲酰氨基丙二酸二乙酯 2.18 克 (6.95mmol)、氢氧化钠 0.38 克 (9.48mmol)、甲苯 25mL, 加热回流 8 小时, TLC 检验不再变化后趁热抽滤, 固体用 10mL 热甲苯洗涤, 合并甲苯相, 0 °C 冷却后析出白色固体, 抽滤后将滤液蒸干得粗品 2.2 克, 硅胶柱层析(洗脱剂: 乙酸乙酯/石油醚=1/3)纯化得产物白色固体 1 克 (30.4%)。 ¹H-NMR(CDCl₃) δ: 1.26~1.32(t, 6H, -CH₂-CH₃), 3.91(s, 2H, indole-CH₂-), 4.18~4.32(m, 4H, -CH₂-CH₃), 5.04(s, 2H, phenyl-CH₂-O), 6.69~6.72(dd, 1H, indole-5-H), 6.77(s, 1H, -NH-CO-), 6.87(d, 1H, indole-7-H), 7.27~7.44(m, 9H, Ar-H), 7.63~7.67(d, 2H, Ar-H), 7.98(s, 1H, indole-NH)。 MS-ESI (-): 549.6(M+1), 571.6(M+Na, 100)。

7) 合成 2-对氯苯甲酰氨基-2-[(6-苄氧基吲哚-3)-甲基]-丙二酸

100mL 烧瓶中加入 2-对氯苯甲酰氨基-2-[(6-苄氧基吲哚-3)-甲基]-丙二酸二乙酯 0.48 克(0.875mmol), 10%氢氧化钠水溶液 3mL, 氮气保护下加热 60-70 °C 3 小时, TLC 显示反应结束。加入少量活性碳脱色后趁热抽滤, 补加少量水后冰浴下用 10% 盐酸调节 PH 至 2, 析出大量白色固体, 0 °C 冷却后抽滤, 固体用少量冰水洗涤, 真空干燥后得米白色固体化合物 **1** 0.36 克 (83.5%)。 ¹H-NMR(DMSO-d₆) δ: 3.62(s, 2H, indole-CH₂-), 5.05(s, 2H, phenyl-CH₂-O), 6.54~6.58(dd, 1H, indole-5-H), 6.78(d, 1H, indole-7-H), 6.84(d, 1H, indole-4-H), 7.20 (d, 1H, indole-2-H), 7.27~7.32(t, 1H, phenyl-H), 7.34~7.38(t, 2H, phenyl-H), 7.40~7.44(d, 2H, phenyl-H), 7.49~7.55(d, 2H, phenyl-H), 7.69~7.74(d, 3H, phenyl-H, -NH-CO-), 10.66(s, 1H, indole-NH), 13.68(brs, 2H, COOH)。

实施例 2: 合成化合物 2 N-(4-氯苯甲酰基)-6-苄氧基色氨酸

50mL 烧瓶中加入 2-对氯苯甲酰氨基-2-[(6-苄氧基吲哚-3)-甲基]-丙二酸 0.2 克 (0.406mmol), 水 3mL, 加热回流 2.5 小时后 TLC 显示反应结束。加入少量 10 % 氢氧化钠溶液使固体全溶, 加入少量活性碳脱色后趁热抽滤, 滤液冰浴下用 10 % 盐酸调节 PH 至 4-5, 析出大量白色固体, 0 °C 冷却后抽滤, 固体用少量冰水洗涤, 真空干燥后的米白色固体化合物 **2** 0.13 克 (71.5%)。

¹H-NMR(DMSO-d₆) δ: 3.08~3.16(dd, 1H, indole-CH₂-), 3.20~3.28(dd, 1H, indole-CH₂-), 4.60(m, 1H, -CH₂-CH-), 5.07(s, 2H, phenyl-CH₂-O), 6.70~6.73(dd, 1H, indole-5-H), 6.88(d, 1H, indole-7-H), 7.03(d, 1H, indole-2-H), 7.28~7.32 (m, 1H, phenyl-H), 7.34~7.39(m, 2H, phenyl-H), 7.42~7.46(m, 3H, Ar-H), 7.50~7.54(d, 2H, phenyl-H), 7.80~7.84(d, 2H, phenyl-H), 8.75(d, 1H, -NH-CO-), 10.60(s, 1H, indole-NH), 12.75(bris, 1H, COOH)。 MS-ESI (-): 448.4(M), 447.4(M-1, 100)。

实施例 3 合成化合物 3 2-苯甲酰氨基-2-[(6-苄氧基吲哚-3)-甲基]-丙二酸**1) 合成 2-苯甲酰氨基-2-[(6-苄氧基吲哚-3)-甲基]-丙二酸二乙酯**

250mL 烧瓶中加入 3-二甲氨基甲基-6-苄氧基吲哚 3 克 (0.0107mol)、苯甲酰氨基丙二酸二乙酯 3.3 克 (0.0118mol)、氢氧化钠 0.66 克 (0.0165mol)、甲苯 45mL, 加热回流 8 小时, TLC 检验不再变化后趁热抽滤, 固体用 15mL 热甲苯洗涤, 合并甲苯相, 0 °C 冷却后析出白色固体, 抽滤后将滤液蒸干得粗品 2.8 克, 硅胶柱层析(洗脱剂: 乙酸乙酯/石油醚 = 1/3)纯化得产物白色固体 1.5 克 (28%)。

¹H-NMR(CDCl₃) δ: 1.26~1.30(t, 6H, -CH₂-CH₃), 3.93(s, 2H, indole-CH₂-), 4.16~4.33(m, 4H, -CH₂-CH₃), 5.05(s, 2H, phenyl-CH₂-O), 6.70~6.74(dd, 1H, indole-5-H), 6.78(d, 1H, indole-7-H), 6.86(d, 1H, indole-4-H), 7.30~7.44(m, 8H, Ar-H), 7.48~7.52(t, 1H, Ar-H), 7.72~7.76(d, 2H, Ar-H), 7.90(bris, 1H, indole-NH)。

2) 合成 2-苯甲酰氨基-2-[(6-苄氧基吲哚-3)-甲基]-丙二酸

100mL 烧瓶中加入 2-苯甲酰氨基-2-[(6-苄氧基吲哚-3)-甲基]-丙二酸二乙酯 0.48 克 (0.934mmol), 10% 氢氧化钠水溶液 3mL, 氮气保护下加热 60-70 °C 1 小时, TLC 显示反应结束。加入少量活性碳脱色后趁热抽滤, 补加少量水后冰浴下用 10 % 盐酸调节 PH 至 2, 析出大量白色固体, 0 °C 冷却后抽滤, 固体用少量冰水洗涤, 真空干燥后得米白色固体化合物 **3** 0.31 克 (72.5%)。 ¹H-NMR(DMSO-d₆) δ: 3.66(s,

2H, indole-CH₂-), 5.05(s, 2H, phenyl-CH₂-O), 6.52~6.56(dd, 1H, indole-5-H), 6.78(d, 1H, indole-7-H), 6.85(d, 1H, indole-4-H), 7.20 (d, 1H, indole-2-H), 7.27~7.32(m, 1H, phenyl-H), 7.34~7.39(m, 2H, phenyl-H), 7.40~7.47(m, 4H, phenyl-H), 7.52~7.57(m, 2H, phenyl-H, -NH-CO-), 7.66~7.70(d, 2H, phenyl-H), 10.70(s, 1H, indole-NH), 13.70(brs, 2H, COOH)。

实施例 4: 合成化合物 4 N-苯甲酰基-6-苄氧基色氨酸

50mL 烧瓶中加入 2-苯甲酰氨基-2-[(6-苄氧基吲哚-3)-甲基]-丙二酸 0.2 克 (0.437mmol), 水 3mL, 加热回流 1.5 小时后 TLC 显示反应结束。加入少量 10% 氢氧化钠溶液使固体全溶, 加入少量活性碳脱色后趁热抽滤, 滤液冰浴下用 10% 盐酸调节 PH 至 4-5, 析出大量白色固体, 0℃ 冷却后抽滤, 固体用少量冰水洗涤, 真空干燥后得米白色固体化合物 4 0.14 克(77.5%)。

¹H-NMR(DMSO-d₆) δ: 3.10~3.20(dd, 1H, indole-CH₂-), 3.22~3.32(dd, 1H, indole-CH₂-), 4.60(m, 1H, -CH₂-CH-), 5.08(s, 2H, phenyl-CH₂-O), 6.70~6.74(dd, 1H, indole-5-H), 6.88(d, 1H, indole-7-H), 7.05(d, 1H, indole-2-H), 7.30 (m, 1H, phenyl-H), 7.34~7.39(m, 2H, phenyl-H), 7.41~7.53(m, 6H, phenyl-H), 7.80(d, 2H, Ar-H), 8.56~8.59(d, 1H, -NH-CO-), 10.60(s, 1H, indole-NH), 12.70(brs, 1H, COOH)。 MS-ESI (-): 414.2(M), 413.2(M-1, 100)。

实施例 5: 合成化合物 5 N-丙酰基-6-苄氧基色氨酸

1) 合成 2-丙酰氨基-2-[(6-苄氧基吲哚-3)-甲基]-丙二酸二乙酯

100mL 烧瓶中加入 3-二甲氨基甲基-6-苄氧基吲哚 1.5 克 (5.36mmol)、丙酰氨基丙二酸二乙酯 1.36 克 (5.89mmol)、氢氧化钠 0.33 克 (8.03mmol)、甲苯 17mL, 加热回流 8 小时, TLC 检验不再变化后趁热抽滤, 固体用 10mL 热甲苯洗涤, 合并甲苯相, 0℃ 冷却后析出白色固体, 抽滤后将滤液蒸干得粗品 1.8 克, 硅胶柱层析(洗脱剂: 乙酸乙酯/石油醚=1/3)纯化得产物白色固体 0.91 克 (36.5%)。

¹H-NMR(CDCl₃) δ: 1.13(t, 3H, COCH₂CH₃), 1.28(t, 6H, COO-CH₂-CH₃), 2.20(m, 2H, COCH₂CH₃), 3.80(s, 2H, indole-CH₂-), 4.16~4.30(m, 4H, COO-CH₂-CH₃), 5.08(s, 2H, phenyl-CH₂-O), 6.61(s, 1H, -NH-CO-), 6.76(d, 1H, indole-7-H), 6.83(dd, 1H, indole-5-H), 6.88(d, 1H, indole-4-H), 7.30~7.40(m, 4H, phenyl-H), 7.43~7.46(d, 2H, Ar-H), 7.97(s, 1H, indole-NH)。

2) 合成 2-丙酰氨基-2-[(6-苄氧基吲哚-3)-甲基]-丙二酸

100mL 烧瓶中加入 2-丙酰氨基-2-[(6-苄氧基吲哚-3)-甲基]-丙二酸二乙酯 0.48 克(1.03mmol),10%氢氧化钠水溶液 3mL, 氮气保护下加热 60-70℃ 1 小时, TLC 显示反应结束。加入少量活性碳脱色后趁热抽滤, 补加少量水后冰浴下用 10 % 盐酸调节 PH 至 2, 析出大量白色固体, 0℃冷却后抽滤, 固体用少量冰水洗涤, 真空干燥后得米白色固体产物 0.32 克(75.8%)。¹H-NMR(DMSO-d₆) δ: 0.95(t, 3H, COCH₂CH₃), 2.12(m, 2H, COCH₂CH₃), 3.42(s, 2H, indole-CH₂-), 5.08(s, 2H, phenyl-CH₂-O), 6.64~6.68(dd, 1H, indole-5-H), 6.80(d, 1H, indole-7-H), 6.85(d, 1H, indole-4-H), 7.22(d, 1H, indole-2-H), 7.30(t, 1H, phenyl-H), 7.35~7.40(t, 2H, phenyl-H), 7.42~7.46(d, 2H, phenyl-H), 7.56(s, 1H, -NH-CO-), 10.65(s, 1H, indole-NH), 13.14(brs, 2H, COOH)。

3) 合成 N-丙酰基- 6-苄氧基色氨酸

50mL 烧瓶中加入 2-丙酰氨基-2-[(6-苄氧基吲哚-3)-甲基]-丙二酸 0.18 克 (0.439mmol), 水 3mL, 加热回流 2 小时后 TLC 显示反应结束。加入少量 10% 氢氧化钠溶液使固体全溶, 加入少量活性碳脱色后趁热抽滤, 滤液冰浴下用 10 % 盐酸调节 PH 至 4-5, 析出大量白色固体, 0℃冷却后抽滤, 固体用少量冰水洗涤, 真空干燥后得米白色固体化合物 **5** 0.12 克(74.7%)。

¹H-NMR(DMSO-d₆) δ: 0.92(t, 3H, COCH₂CH₃), 2.06(m, 2H, COCH₂CH₃), 2.93(dd, 1H, indole-CH₂-), 3.10(dd, 1H, indole-CH₂-), 4.40(m, 1H, -CH₂-CH-), 5.09(s, 2H, phenyl-CH₂-O), 6.70~6.73(dd, 1H, indole-5-H), 6.88(d, 1H, indole-7-H), 6.97(d, 1H, indole-2-H), 7.28~7.33(m, 1H, phenyl-H), 7.35~7.40(m, 3H, Ar-H), 7.43~7.47(d, 2H, Ar-H), 8.01(d, 1H, -NH-CO-), 10.60(s, 1H, indole-NH), 12.58(brs, 2H, COOH)。

MS-ESI (-): 366.4(M), 365.4(M-1, 100)。

实施例 6: 合成化合物 **6** N-苯乙酰基- 6-苄氧基色氨酸

1) 合成 2-苯乙酰氨基-2-[(6-苄氧基吲哚-3)-甲基]-丙二酸二乙酯

100mL 烧瓶中加入 3-二甲氨基甲基-6-苄氧基吲哚 1.5 克 (5.36mmol)、苯乙酰氨基丙二酸二乙酯 1.73 克 (5.89mmol)、氢氧化钠 0.33 克 (8.03mmol)、甲苯 18mL, 加热回流 8 小时, TLC 检验不再变化后趁热抽滤, 固体用 10mL 热甲苯洗涤, 合并甲苯相, 0℃冷却后析出白色固体, 抽滤后将滤液蒸干得粗品 1.5 克, 硅胶柱层析(洗脱剂: 乙酸乙酯/石油醚=1/3)纯化得产物白色固体 0.87 克 (31%)。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ : 1.23(t, 6H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 3.52(s, 2H, phenyl- CH_2-CO), 3.79(s, 2H, indole- CH_2-), 4.11~4.24(m, 4H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 5.10(s, 2H, phenyl- CH_2-O), 6.48(s, 1H, $-\text{NH}-\text{CO}-$), 6.65(d, 1H, indole-7-H), 6.83(dd, 1H, indole-5-H), 6.87(d, 1H, indole-4-H), 7.12(d, 2H, Ar-H), 7.24~7.27(m, 3H, Ar-H), 7.31~7.40(m, 4H, Ar-H), 7.44~7.48(d, 2H, Ar-H), 7.95(brs, 1H, indole-NH)。

2) 合成 2-苯乙酰氨基-2-[(6-苄氧基吲哚-3)-甲基]-丙二酸

50mL 烧瓶中加入 2-苯乙酰氨基-2-[(6-苄氧基吲哚-3)-甲基]-丙二酸二乙酯 0.48 克(0.909mmol), 10%氢氧化钠水溶液 3mL, 氮气保护下加热 60-70℃ 1.5 小时, TLC 显示反应结束。加入少量活性碳脱色后趁热抽滤, 补加少量水后冰浴下用 10% 盐酸调节 pH 至 2, 析出大量白色固体, 0℃ 冷却后抽滤, 固体用少量冰水洗涤, 真空干燥后得米白色固体产物 0.35 克(81.6%)。 $^1\text{H-NMR}(\text{DMSO}-d_6)$ δ : 3.48(s, 2H, phenyl- CH_2-CO), 3.78(s, 2H, indole- CH_2-), 5.08(s, 2H, phenyl- CH_2-O), 6.64~6.68(m, 2H, indole-5-H、indole-7-H), 6.86(dd, 1H, indole-4-H), 7.18~7.33(m, 7H, Ar-H), 7.35~7.40(m, 2H, Ar-H), 7.43~7.65(m, 2H, Ar-H), 7.80(s, 1H, $-\text{NH}-\text{CO}-$), 10.65(s, 1H, indole-NH), 13.25(brs, 2H, COOH)。

3) 合成 N-苯乙酰基-6-苄氧基色氨酸

50mL 烧瓶中加入 2-苯乙酰氨基-2-[(6-苄氧基吲哚-3)-甲基]-丙二酸 0.2 克 (0.423mmol), 水 3mL, 加热回流 3 小时后 TLC 显示反应结束。加入少量 10% 氢氧化钠溶液使固体全溶, 加入少量活性碳脱色后趁热抽滤, 滤液冰浴下用 10% 盐酸调节 pH 至 4-5, 析出大量白色固体, 0℃ 冷却后抽滤, 固体用少量冰水洗涤, 真空干燥后得米白色固体化合物 6 0.15 克(82.9%)。

$^1\text{H-NMR}(\text{DMSO}-d_6)$ δ : 2.86~3.00(dd, 1H, indole- CH_2-), 3.08~3.14(dd, 1H, indole- CH_2-), 3.41(s, 2H, phenyl- CH_2-CO), 4.40~4.47(m, 1H, $-\text{CH}_2-\text{CH}-$), 5.08(s, 2H, phenyl- CH_2-O), 6.70 (dd, 1H, indole-5-H), 6.89(d, 1H, indole-7-H), 6.94(d, 1H, indole-2-H), 7.10~7.24(m, 5H, Ar-H), 7.28~7.33(m, 1H, Ar-H), 7.35~7.40(m, 3H, Ar-H), 7.43~7.47(d, 2H, Ar-H), 8.31(d, 1H, $-\text{NH}-\text{CO}-$), 10.63(s, 1H, indole-NH), 12.63(brs, 2H, COOH)。 MS-ESI (-): 428.3(M), 427.3(M-1, 100)。

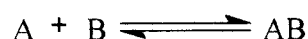
实施例 7. PPAR γ 蛋白结合实验

实验原理:

用 BL21(DE3)细胞和 pET15b-hPPAR γ -LBD 质粒经过培养可得到转录表达的

PPAR γ -LBD (PPAR γ ligand binding domain)。该蛋白经纯化后溶解稀释到醋酸钠缓冲溶液中。使该缓冲溶液在 25℃，流速为 20 μ L/min 情况下进入表面等离子共振生物传感器。该传感器的生物芯片上联有亲水性羧甲基取代的右旋糖苷。当 PPAR γ -LBD 蛋白流经芯片时，蛋白就能够通过氨基偶联反应与右旋糖苷以共价键形式偶联，从而使 PPAR γ -LBD 蛋白固定到该生物芯片上。当 PPAR γ 配基在缓冲溶液中与固定在芯片上的 PPAR γ -LBD 蛋白结合时，传感器可以感受芯片上的信号变化，得到结合响应值 RU (response unit)，进一步还可得到评价蛋白-配基结合反应的平衡常数 KD(即该结合反应速率达到最高速率一半时的样品浓度，该数值越小，说明蛋白与配基的结合能力越强)。

(A: PPAR γ -LBD, B: ligand, AB: complex)



实验仪器及试剂：

表面等离子共振生物传感器(Biacore3000 型，购于 Biacore 公司)；

pET15b-hPPAR γ -LBD质粒(购于Department of Structural Chemistry, Pharmacia and Upjohn, Stockholm, Sweden)；

LB 培养基、BL21(DE3)细胞、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)；镍-氨三乙酸分离柱；

DMSO、Hepes(N-(2-羟乙基)-哌嗪-N'-2-乙烷磺酸钠)、醋酸钠、咪唑、NaCl、EDTA、表面活化剂 P20(均为国产分析纯)；

阳性对照罗格列酮(购于CAYMAN Chem. Co. USA)。

实验步骤：

1. 在含有 50 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基中加入 BL21(DE3)细胞和 pET15b-hPPAR γ -LBD 质粒，在 37℃下进行培养。再加入 0.2mM 异丙基 B-D-硫代半乳糖苷(IPTG)，20℃培养 5 小时，使 PPAR γ -LBD 得到转录表达。然后加入 NaCl/Pi 缓冲溶液通过超声波降解阻断转录。离心后分离上清液，然后将上清液通过一个镍-氨三乙酸分离柱进行柱层析，洗脱剂先后分别用缓冲溶液 A(NaCl/Pi，含有 10mM 咪唑，pH8.8)和 B(NaCl/Pi，含有 25mM 咪唑，pH8.8)。最后再用缓冲溶液 C(NaCl/Pi，含有 500mM 咪唑，pH8.8)洗脱，对得到的缓冲溶液 C 进行分离浓缩即可得到 PPAR γ -LBD 蛋白和咪唑的复合物。最后用 HBS-EP 缓冲溶液

(10mM Hepes、150mM NaCl、3.4mM EDTA、0.005%表面活性剂 P20, pH7.4)对该复合物进行透析, 可得到经纯化的 PPAR γ -LBD 蛋白。

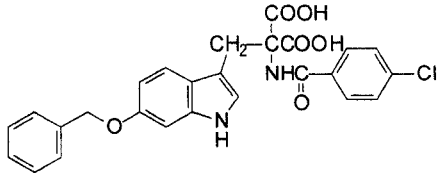
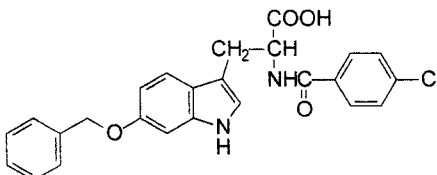
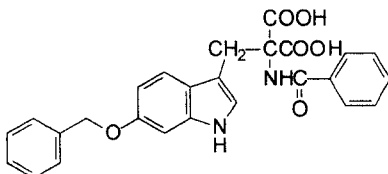
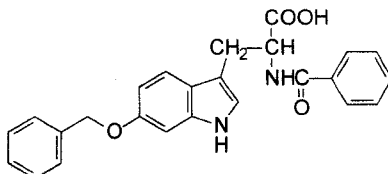
2. 配制 pH4.3 的 10nM 的醋酸钠缓冲溶液, 加入表达纯化的 PPAR γ -LBD, 混合均匀。后使该缓冲溶液进入表面等离子共振生物传感器, 25℃, 流速为 20 μ L/min 情况下流经芯片探头, 直至 PPAR γ -LBD 蛋白固定到该生物芯片上, 使基线达到稳定。

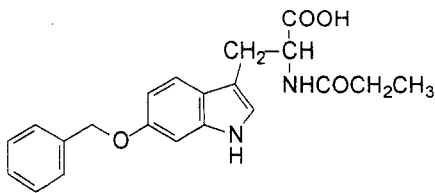
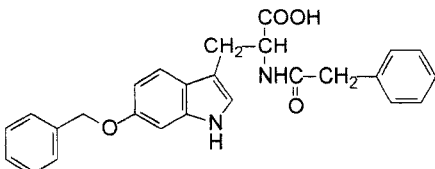
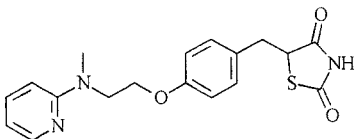
3. 待测样品及阳性对照物分别溶解于 DMSO 中, 配制成 10⁻²mol/L 溶液。后用 HBS-EP 溶液分别稀释至 10⁻⁵mol/L, 10⁻⁶mol/L 浓度。

4. 将待测样品进样至生物传感器中, 25℃, 流速为 20 μ L/min 情况下流经固定在芯片探头上 PPAR γ -LBD 蛋白, 通过检测传感器接收信号的变化, 得到结合响应值 RU, 进一步还可得到评价蛋白-配基结合反应的平衡常数 KD。

表 1 是化合物 1、2、3、4、5、6 的 PPAR γ 蛋白结合实验结果。

表 1

编号	化合物结构	蛋白结合试验	
		结合响应值 RU (10 ⁻⁵ mol/L 浓度)	反应平衡常数 KD(mol/L)
1		35.29	8.69 × 10 ⁻⁶
2		73.42	6.86 × 10 ⁻⁶
3		21.55	-
4		27.08	-

5		16.69	-
6		30.25	-
罗格列酮		-	4.98×10^{-6}

结果表明, 本发明化合物 10^{-5} mol/L 浓度下与 PPAR γ 蛋白均有结合。其中, 化合物 1 和化合物 2 结合能力突出, 进一步测定其蛋白-配基结合反应的平衡常数 KD 值, 分别为 8.69×10^{-6} 和 6.86×10^{-6} , 与阳性对照罗格列酮(4.98×10^{-6} mol/L)的结合活性相似。