

## 果糖-1, 6-二磷酸酶 AMP 变构抑制剂的研究进展

李占梅<sup>1,2</sup>, 别建波<sup>1</sup>, 宋宏锐<sup>2</sup>, 徐柏玲<sup>1\*</sup>

(1. 中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 北京 100050; 2. 沈阳药科大学制药工程学院, 辽宁 沈阳 110016)

**摘要:** 果糖-1, 6-二磷酸酶 (fructose-1, 6-bisphosphatase, FBPase) 是肝葡萄糖异生路径中的一个限速酶, 催化果糖-1, 6-二磷酸水解为果糖-6-磷酸。抑制 FBPase 的活性, 可减少内源性葡萄糖的生成, 降低血糖水平, FBPase 抑制剂是潜在的新型治疗 II 型糖尿病的药物。本文综述了近年来 FBPase 一磷酸腺苷 (adenosine monophosphate, AMP) 变构抑制剂研究的最新进展。

**关键词:** 果糖-1, 6-二磷酸酶; FBPase 抑制剂; 糖尿病

中图分类号: R916

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 11-1291-10

## Recent advance in the discovery of allosteric inhibitors binding to the AMP site of fructose-1, 6-bisphosphatase

LI Zhan-mei<sup>1,2</sup>, BIE Jian-bo<sup>1</sup>, SONG Hong-rui<sup>2</sup>, XU Bai-ling<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China;

2. School of Pharmaceutical Engineering, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

**Abstract:** Fructose-1, 6-bisphosphatase (FBPase), a rate-limiting enzyme involved in the pathway of gluconeogenesis, can catalyze the hydrolysis of fructose-1, 6-bisphosphate to fructose-6-phosphate. Upon inhibiting the activity of FBPase, the production of endogenous glucose can be decreased and the level of blood glucose lowered. Therefore, inhibitors of FBPase are expected to be novel potential therapeutics for the treatment of type II diabetes. Recent research efforts were reviewed in the field of developing allosteric inhibitors interacting with the AMP binding site of FBPase.

**Key words:** fructose 1, 6-bisphosphatase; FBPase inhibitor; diabetes

糖尿病是一种多基因调控的慢性代谢性疾病, 主要表现为持续的高血糖及糖尿。持续的高血糖会导致许多并发症的产生, 如视网膜、肾脏、神经系统病变及血管并发症等。我国糖尿病发病率迅速增长, 据预测我国糖尿病患者已超过 9 200 万, 约有 1.48 亿人是糖尿病高风险人群<sup>[1]</sup>。

糖尿病分为两种类型, 胰岛素依赖型 (I 型) 和非胰岛素依赖型 (II 型), 其中 II 型糖尿病患者占糖尿病患者总数的 90%~95%。生物研究表明, 导致糖尿病的主要病理基础是胰岛素分泌不足、胰岛素抵

抗和肝葡萄糖生成增加。目前临床上应用的药物主要有两类: 一是针对胰岛素分泌不足, 如: 磺脲类和格列奈类促胰岛素分泌剂; 二是改善胰岛素抵抗, 如: 噻唑烷二酮类胰岛素增敏剂。到目前为止, 还没有降低内源性葡萄糖生成的抗糖尿病药物应用于临床。二甲双胍可减少肝葡萄糖的输出, 但作用的分子靶标还不清楚。

已有研究表明, 内源性葡萄糖生成增加是造成糖尿病患者空腹血糖升高的主要原因。内源性葡萄糖主要来源于肝脏。肝脏产生葡萄糖有两种途径, 一种是内源性合成葡萄糖, 即糖异生作用 (gluconeogenesis); 另一种是肝糖原分解 (glycogenolysis)。因此, 通过调控糖异生途径, 减少内源性葡萄糖的生成, 成为开发

收稿日期: 2011-07-13.

\*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-63166764, E-mail: xubl@imm.ac.cn

新作用机制抗糖尿病药物的新策略。

糖异生作用 (图 1) 是将乳酸、甘氨酸和丙三醇等三碳前体, 在多种酶的催化作用下转化为葡萄糖的过程。在糖异生过程中, 果糖 1, 6-二磷酸酶 (FBPase) 催化果糖-1, 6-二磷酸盐转化为果糖-6-磷酸盐, 并释放出一分子磷酸。该催化反应是内源性葡萄糖生成的控速步骤之一, 抑制果糖-1, 6-二磷酸酶的活性, 可减少内源性葡萄糖的生成, 降低血糖水平。因此, 果糖-1, 6-二磷酸酶抑制剂有可能成为新作用机制的抗糖尿病药物。

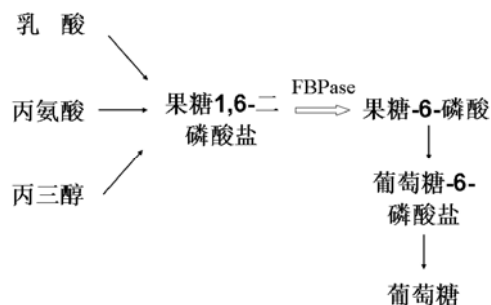


图 1 果糖-1, 6-二磷酸酶的生理功能示意图

## 1 FBPase AMP 变构抑制剂的研究进展

如图 2 所示, FBPase 是一个同源四聚体, 由 4 个结构相同的单体组成。在每一个单体结构中含有两个结合位点: 底物 (果糖 1, 6-二磷酸盐) 结合位点和 AMP 变构位点。AMP 结合于距底物结合腔 28 Å (1 Å = 0.1 nm) 的变构位点, 诱导 FBPase 产生非活性构象, 影响 FBPase 与催化活性密切相关的金属离子  $Mg^{2+}$  的结合, 从而抑制 FBPase 的催化活性, 因此 AMP 是 FBPase 的内源性变构抑制剂<sup>[2]</sup>。此外, 在 FBPase 四聚体亚单位界面之间还存在一个变构位点。与底物结合位点的竞争性抑制剂<sup>[3, 4]</sup>和结合在亚单位界面之间变构抑制剂<sup>[5-7]</sup>的研究相比, AMP 变构位点抑制剂的研究得到了广泛关注。本文将按照抑制剂的结构类

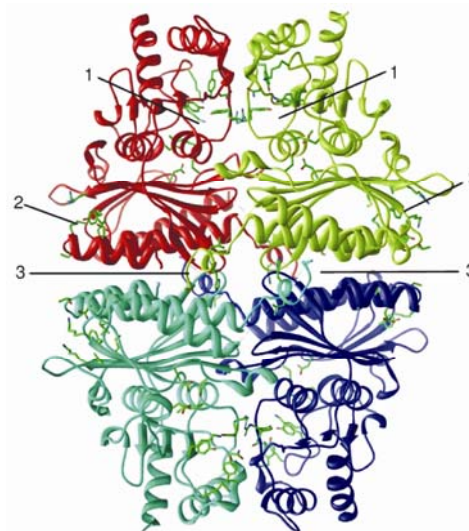


图 2 FBPase 同源四聚体。1: 底物结合位点; 2: AMP 变构位点; 3: 亚单位界面间结合位点 (pdb: 1FTA)

型对 AMP 变构抑制剂进行综述。

### 1.1 AMP 与 FBPase 复合物的晶体结构分析

AMP 变构位点抑制剂通过结合在 FBPase 的 AMP 变构位点而抑制 FBPase 的活性。AMP 与 FBPase 的结合方式是设计和优化新结构 FBPase 抑制剂的重要依据。如图 3 所示, AMP 的嘌呤环处于一个由 Val17、Leu30 和 Leu34 形成的疏水区内, 6-NH<sub>2</sub> 与 Thr31 形成氢键, 磷酸基与 Thr27、Lys112、Tyr113 形成氢键, 核糖基的氧与 Arg140 和 Tyr113 形成氢键<sup>[8]</sup>。由 AMP 与 FBPase 的结合方式可以看出, AMP 变构位点抑制剂的药效团特征主要是模拟磷酸基的氢键接受体和嘌呤环的疏水性基团在空间上的适当配置。此外, 核糖基的下方有一个由 Met177 和 Val160 组成的疏水性区域, 引入疏水性基团结合于此区域, 将有利于提高化合物与 FBPase 的结合, 也有可能改善化合物的物理化学性质, 进而改善化合物的药代特征。

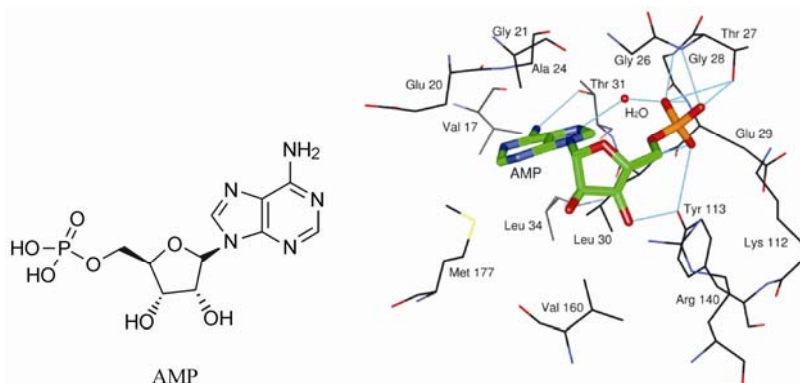
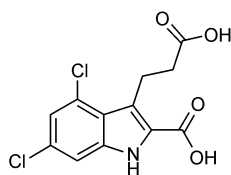


图 3 AMP-FBPase 复合物晶体结构图 (pdb: 1FTA)<sup>[8]</sup>

## 1.2 AMP 变构抑制剂

**1.2.1 吡啶类** 2003 年, Wright 等<sup>[9]</sup>通过高通量筛选, 发现吡啶羧酸类化合物 **1** ( $IC_{50} = 2.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 对 FBPase 具有抑制活性。构效关系研究表明: 吡啶环 2-位羧基对抑制活性非常关键, 将其替换为  $\text{CONH}_2$ 、 $\text{COOEt}$ 、 $\text{CH}_2\text{OH}$  等基团, 化合物的抑制活性消失; 将 3-位羧基进行衍生, 生成酯或酰胺, 对 FBPase 的抑制活性与化合物 **1** 相当; 将吡啶环 N 原子进行烷基化, 完全丧失了对 FBPase 的抑制活性; 吡啶环 3-位烷基链的长度对酶抑制活性也有影响, 一个亚甲基连接的化合物没有活性, 2~3 个亚甲基连接的化合物活性相当。



**1**  $IC_{50} = 2.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

化合物 **1** 与 FBPase 复合物的晶体结构 (pdb: 1LEV) (图 4) 揭示了该类化合物产生抑制作用的结构基础。吡啶羧酸类抑制剂结合于 FBPase 的 AMP 变构位点, 是 AMP 的竞争抑制剂。化合物 **1** 中吡啶环和 AMP 的嘌呤环占据同一个疏水口袋, 吡啶的 N1 与 Thr31 形成氢键作用。吡啶环 2-位羧基除与 Gly28 的酰胺氮形成氢键外, 还通过一分子结构水的介导, 与 Tyr113 的侧链形成氢键作用。虽然 2-位羧基指向 AMP 中磷酸基的结合腔, 但并没有占据该结合位点。3-位羧基伸向溶剂化的腔穴中, 与 Tyr113 的侧链羟基形成氢键, 由此也证明了极性基团引入 3-位, 对活性没有显著影响。

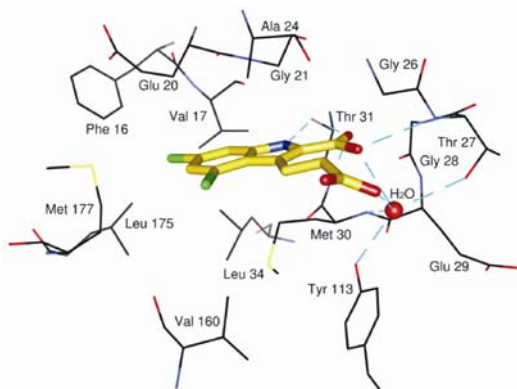
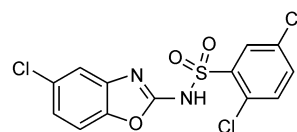


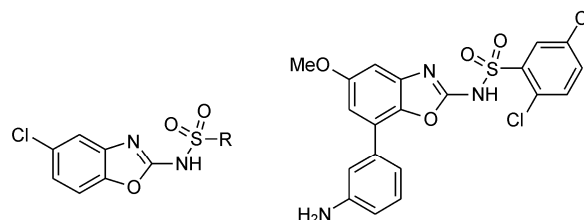
图 4 吡啶类化合物与 FBPase 复合物的晶体结构 (pdb: 1LEV)<sup>[9]</sup>

**1.2.2 苯并噁唑-2-苯磺酰胺类** 2006 年, von Geldern 等<sup>[10]</sup>报道了苯并噁唑-2-苯磺酰胺类 FBPase 抑制剂, 代表性化合物 **2** ( $IC_{50} = 3.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 与 FBPase 复合物的晶体结构 (pdb: 2FHY) 显示, 该类抑制剂具有独特的结合方式。苯磺酰胺中的芳环占据了 AMP 变构位点的一个疏水区域, 该疏水区由 Val17、Leu30、Leu34、Met177、Ala24、Gly26 和 Glu20 的侧链形成, 并且位于由一组极性氨基酸侧链组成的磷酸基结合位点之上, 虽然芳环并未占据该磷酸基结合位点, 但它阻碍了其他基团与磷酸基结合位点的结合; 苯并噁唑环则伸向 FBPase 的亚单元结构之间的界面。



**2**  $IC_{50} = 3.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

苯并噁唑-2-苯磺酰胺类化合物的构效关系研究显示: 芳磺酰基有利于化合物与 FBPase 的结合, 采用烷基 (**3b**) 取代芳香性基团 (**3a**), 活性大大降低; 单取代的芳磺酰基产生的抑制作用与化合物 **2** 相当, 但 2, 6-二取代芳磺酰基则显著降低了抑制活性; 苯并噁唑环的 4-位引入取代基对活性不利, 7-位则允许较大的结构修饰, 亲水性基团有利于提高活性, 代表性化合物 **4** ( $IC_{50} = 0.57 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 对 FBPase 的抑制活性达到亚微摩尔水平<sup>[10]</sup>。



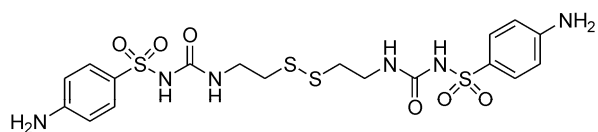
**3a**  $R = \text{naphthyl}$   $IC_{50} = 2.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

**4**  $IC_{50} = 0.57 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

**3b**  $R = n\text{-Bu}$   $IC_{50} > 50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

**1.2.3 双磺酰脲类** Roche 制药公司<sup>[11]</sup>通过高通量筛选得到了一种双位点结合的 FBPase 抑制剂—双磺酰脲类化合物 **5**。化合物 **5** 与 FBPase 复合物晶体结构 (pdb: 2VT5) 研究表明: 一分子的双磺酰脲类化合物同时结合于两个相邻的 AMP 变构位点, 其中氨基苯环位于 AMP 嘌呤环占据的疏水口袋; 磺酰脲基与 Thr31 和 Gly26 形成氢键作用; 二硫键连接基团通过一个狭窄的通道指向两个亚结构单元界面, 与另一分子的磺酰脲基连接。化合物 **5** 并未占据 AMP 的

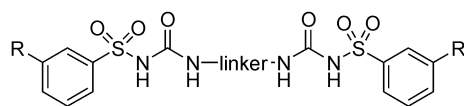
磷酸基结合位点, 但其中的  $-\text{SO}_2-$  通过一分子水的介导, 与 Leu30、Lys112 和 Tyr113 形成氢键网络, 该类化合物的这种独特的结合方式, 避免了离子性酸性基团的引入, 为提高化合物的类药性奠定了基础。



5  $\text{IC}_{50} = 1.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

以两个芳磺酰脲片断作为基本结构, 用共价键相连, 从而构建与两个相邻的 AMP 变构位点结合的双位点抑制剂, 是寻找高活性、类药性 FBPase 抑制剂的一种新策略。

基于化合物 5 与 FBPase 的结合方式, Hebeisen 小组设计合成了 3-氯苯磺酰脲和 3-甲基苯磺酰脲取代的双位点 FBPase 抑制剂 6a 和 6b, 并考察了连接链的长度、刚性和极性对活性的影响。对于化合物 6a 和 6b, 连接基团对活性的影响趋势是一致的。当烷基链的长度由  $\text{C}_2$  变化至  $\text{C}_8$  时, 化合物的抑制活性呈 U 型变化, 以  $\text{C}_7$  长度最佳, 所得化合物抑制活性  $\text{IC}_{50}$  值分别为  $0.009 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $0.012 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。采用极性杂原子替换连接链中的亚甲基, 或在连接链中引入双键、三键和苯环等刚性结构片断, 将导致化合物的抑制活性下降或消失<sup>[11]</sup>。



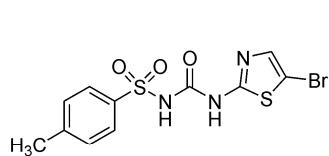
6a  $\text{R} = \text{Cl}$     6b  $\text{R} = \text{CH}_3$

**1.2.4 N-噻唑磺酰脲类** 2010 年, Roche 制药公司报道了另一类通过高通量筛选发现的噻唑取代的磺酰

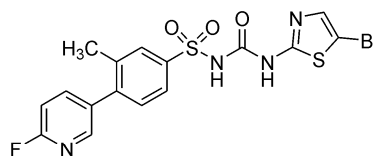
脲类 FBPase 抑制剂<sup>[12]</sup>。化合物 7 与 FBPase 复合物的晶体结构 (pdb: 2WBD) 显示, 该类化合物的结合方式与文献报道的磺酰胺<sup>[10]</sup>和双磺酰脲类<sup>[11]</sup>类化合物相似。对甲基占据了 AMP 的嘌呤环疏水腔; 磺酰脲基作为连接基团, 将噻唑环导向两个亚单元结构的界面, 该噻唑环与结合于相邻 AMP 位点的配体分子中的噻唑环形成  $\pi-\pi$  相互作用。

Roche 对磺酰脲类抑制剂进行了构效关系研究。磺酰基苯环的间位引入较小体积的基团, 如:  $\text{CH}_3$ 、 $\text{Cl}$  和  $\text{C}_2\text{H}_5$  对活性有利, 对位则允许较大体积的基团, 如化合物 8 对 FBPase 的抑制活性提高了近 9 倍。适宜取代的噻吩环替换取代的芳环, 可显著提高化合物的抑制活性, 如化合物 9 抑制 FBPase 活性的  $\text{IC}_{50}$  值为  $0.04 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 比化合物 7 的活性提高了 23 倍。在噻唑环的 4-位和 5-位引入较小体积的基团, 所得化合物的抑制活性与化合物 8 相当; 采用磺酰基的电子等排体, 如: 酰基脲和酰基磺酰胺进行结构变换, 导致化合物活性完全丧失。

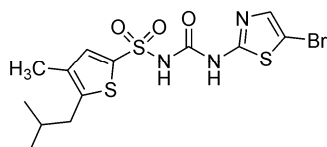
**1.2.5 二芳基胺类** 2009 年, Heng 等<sup>[13]</sup>报道了含有噻唑环的二芳基胺类 FBPase 抑制剂。采用基于结构的虚拟筛选策略, 发现了苗头化合物 10a ( $\text{IC}_{50} = 32 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 并对该类化合物的两个苯环进行结构修饰。当与噻唑环连接的苯环上的羟基被氢原子取代时, 化合物 10b ( $\text{IC}_{50} = 145 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 的抑制活性降低了近 5 倍; 当羟基被硝基取代时, 则抑制活性完全丧失, 由此可见羟基对于化合物与 FBPase 的结合非常关键。对氢磺酰基取代的苯环进行修饰, 当羟基引入间位时 (11a) 抑制活性最强, 氢磺酰基 (11b) 或羧基 (11c) 间位取代, 活性分别下降了 3 倍和 16 倍, 硝基取代间位时, 则没有检测到抑制活性。当两个苯环均为羟基取代时, 所得化合物 (12) 抑制活性的  $\text{IC}_{50}$  值达到  $6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 比苗头化合物 10a 活性提高了 5 倍, 进一步证明多羟基取代化合物有利于提高抑制活性,



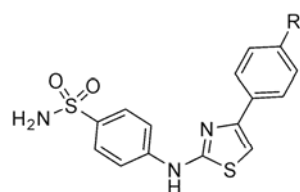
7  $\text{IC}_{50} = 0.92 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$



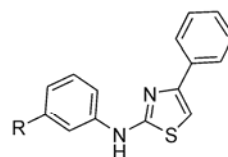
8  $\text{IC}_{50} = 0.13 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$



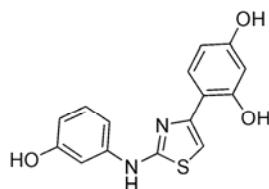
9  $\text{IC}_{50} = 0.04 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$



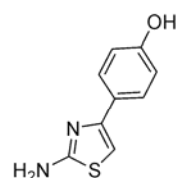
**10a** R=OH  $IC_{50} = 32 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   
**10b** R=H  $IC_{50} = 145 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$



**11a** R=OH  $IC_{50} = 35 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   
**11b** R=SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>  $IC_{50} = 104 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   
**11c** R=COOH  $IC_{50} = 571 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$



**12**  $IC_{50} = 6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$



**13**  $IC_{50} = 1.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

这与 AMP 结合位点的强亲水性相关。

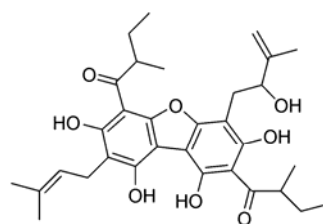
值得一提的是, 作者在进一步的研究工作中, 发现二芳基噻唑结构片断 **13** 对 FBPase 具有更强的结合力, 抑制活性的  $IC_{50}$  值达到了  $1.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。该高亲和力结构片断的发现, 为基于结构的片断衍生法设计合成 FBPase 抑制剂提供了基础。

**1.2.6 二苯并呋喃类** 在发现二芳基胺类 FBPase 抑制剂工作的基础上, Heng 等<sup>[14]</sup>选取文献<sup>[15]</sup>报道的具有抗糖尿病活性的 128 个天然产物进行虚拟筛选, 对接结果显示二苯并呋喃类化合物 **14** (achyrofuran) 与 FBPase 的结合力最强。

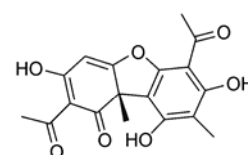
为了验证二苯并呋喃类化合物对 FBPase 的抑制活性, 该研究小组购买了地衣酸 (**15**), 并合成了二苯并呋喃的衍生物 **16** 和 **17**。活性评价结果显示这 3 个化合物均具有抑制活性, 其中地衣酸的抑制活性较弱, 化合物 **16** 和 **17** 的抑制活性相当, 对 FBPase 抑制活性的  $IC_{50}$  值分别为  $8.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $6.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 证明二苯并呋喃类化合物是一种新结构类型的 FBPase 抑制剂。

**1.2.7 吡唑、吡啶和吡咯类** Rudnitskaya 等<sup>[16]</sup>通过虚拟筛选 ZINC 数据库, 发现了新结构类型的 FBPase 抑制剂, 包括吡唑类化合物 **18** ( $IC_{50} = 6.04 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、吡咯类化合物 **19** ( $IC_{50} = 4.81 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 和吡啶类化合物 **20** ( $IC_{50} = 3.09 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。值得注意的是, 该小组发现的 FBPase 抑制剂均含有氟原子, 提示引入氟原子有助于化合物与 FBPase 的结合。

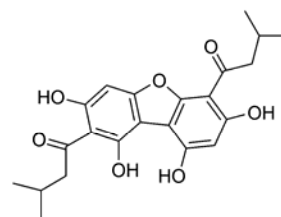
该研究小组在发现上述先导结构的基础上, 依据先导化合物与 FBPase 的结合方式, 对每一种结构类型进行系列衍生, 生成了一个含有吡唑、吡啶和吡咯骨架结构的虚拟化合物库, 含有 207 个化合物, 并



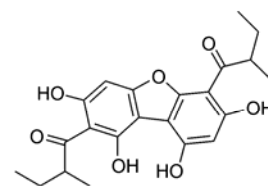
**14**



**15**  $IC_{50} = 32 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$



**16**  $IC_{50} = 8.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$



**17**  $IC_{50} = 6.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

对该化合物库进行了基于结构的虚拟筛选, 预测有 13 个化合物的结合力应强于 AMP。该小组合成了 5 个化合物, 抑制活性均强于 AMP, 由化合物 **21~23** 的分子结构可以看出, 在适当的位置引入小体积的极性基团 COOH、CO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> 和 COOCH<sub>3</sub> 对活性有利。化合物 **23** 对 FBPase 的抑制活性的  $IC_{50}$  值达到了  $32 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

**1.2.8 嘌呤类、苯并咪唑类和噻唑类** 基于结构的药物分子设计策略是理性药物分子设计的重要方法之一, 在药物先导物的发现和优化过程中, 发挥着重要作用。在 FBPase AMP 变构位点抑制剂的发现和发展过程中, Metabasis 制药公司采用基于结构的药物分子设计策略, 综合利用晶体衍射、分子模拟、自由能干扰算法和酶动力学, 设计合成了嘌呤类、苯并咪唑类和噻唑类 FBPase 抑制剂, 发现了新结构的噻唑类 AMP 变构位点抑制剂 MB05032, 该化合物的前药

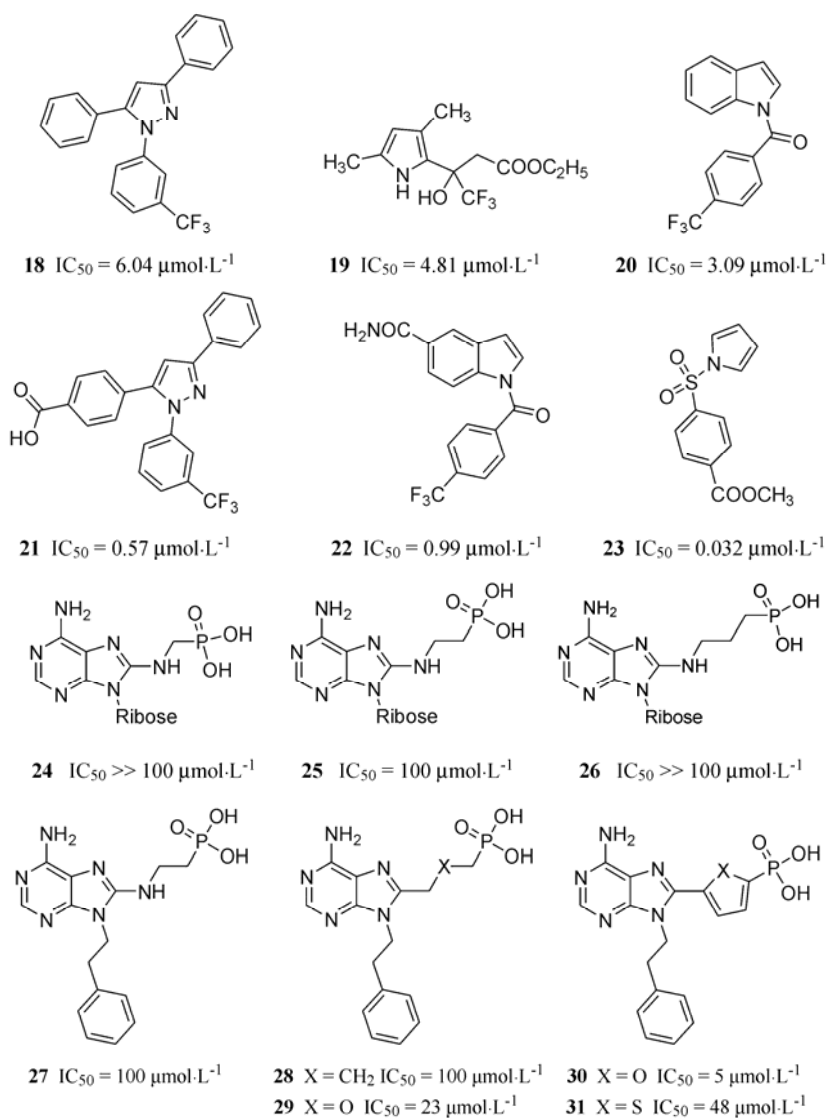
CS-917 已进入临床研究。MB05032 的发现, 是基于结构的药物分子设计策略成功应用的又一范例。下面主要讨论这类化合物的发现和发展过程<sup>[17-24]</sup>。

研究 AMP 与 FBPase 复合物的晶体结构<sup>[19, 20]</sup> (图 3), 发现 AMP 中嘌呤环 C-8 位氢原子直接指向磷酸基, 该研究小组考虑采用适当的连接基团, 将磷酸基直接与 C-8 位连接, 维持磷酸基和嘌呤碱基与 FBPase 的相互作用, 核糖既可以保留在 N-9 位上, 也可以采用其他基团替换。

该研究小组的计算结果表明: 采用 3 个原子的连接链作为连接基团, 将有助于维持化合物与 FBPase 的结合。事实上, 生物活性评价结果证实了他们的预测。当连接基团为 2 个 (**24**  $IC_{50} \gg 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 或 4 个原子 (**26**  $IC_{50} \gg 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 时, 化合物对 FBPase 没有抑制活性; 当连接基团为 3 个原子 (**25**) 时, 对 FBPase 抑制活性  $IC_{50}$  值为  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ <sup>[19]</sup>。

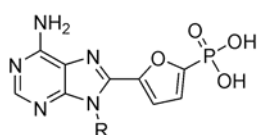
将磷酸基直接与 C-8 位连接, 核糖失去了引入磷酸基的功能, 并且计算结果预测核糖中 O5' 和 O3' 形成的氢键作用对整体结合能的贡献较小; 此外, 晶体复合物的三维结构显示: 在 N9 和 N3 边缘存在一个疏水区, 由 Met177、Leu30 和 Val160 的侧链组成。基于上述分析, 该研究小组采用疏水性取代基替换核糖, 如苯乙基, 所得化合物 (**27**  $IC_{50} = 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 的抑制活性与核糖取代化合物相当, 证明核糖部分对化合物与 FBPase 的结合贡献较小<sup>[20]</sup>。

在此基础上, 进一步考察连接基团对活性的影响。采用 3 个碳原子作为连接基团, 所得化合物 (**28**  $IC_{50} = 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 抑制活性与化合物 **27** 相当; 采用醚链作为连接基团, 化合物 **29** ( $IC_{50} = 23 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 的抑制活性提高了近 5 倍。依据锁定构象的策略, 采用呋喃环替换醚链, 显著提高了化合物 **30** 的抑制活性, 对 FBPase 抑制活性的  $IC_{50}$  值达到了  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。



采用噻吩环作为连接基团, 抑制活性 (**31**  $IC_{50} = 48 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 弱于呋喃环, 提示呋喃环中的氧原子可能参与了氢键作用。采用羧酸基和磺酸基替换化合物 **30** 中磷酸基, 所得化合物没有抑制活性或抑制活性较弱。

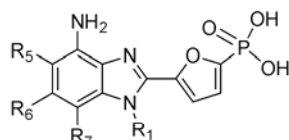
以化合物 **30** 为先导物, 对嘌呤环的 C-2 位、C-6 位和 N-9 位进行更广泛的构效关系研究。研究结果表明: C-2 位取代基对活性有一定的影响, 相对于无取代化合物, 引入  $\text{SCH}_3$  活性变化不显著, 引入  $\text{SO}_2\text{CH}_3$  活性降低; C-6 位氨基对活性有利, N-烷基化导致活性丧失; 较小体积的烷基 (**32**  $IC_{50} = 1.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; **33**  $IC_{50} = 0.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 和环烷基 (**34**  $IC_{50} = 1.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 取代 N-9 位, 有利于提高化合物的抑制活性。采用禁食 SD 大鼠评价化合物 **33** 的体内降血糖活性, 腹腔注射给药  $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 在 1 h 内可降低血糖 65%, 这是首次验证了抑制 FBPase 活性, 可以降低血糖水平, 是潜在的治疗 II 型糖尿病的新策略<sup>[20]</sup>。



**32** R = isobutyl  $IC_{50} = 1.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   
**33** R = neopentyl  $IC_{50} = 0.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   
**34** R = cyclopropyl  $IC_{50} = 1.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

AMP 和 FBPase 复合物的晶体结构研究还显示: 嘌呤环的 N1 和 N3 原子并没有参与氢键的形成, 并且自由能干扰 (FEP) 计算结果显示它们具有显著的去溶剂化能。如果采用 CH 替换 N1 和 N3, 可以避免去溶剂化能对结合产生的不利影响。因此, Metabasis 对嘌呤类 FBPase 抑制剂继续结构修饰, 设计合成了苯并咪唑类 FBPase 抑制剂, 并进行了构效关系研究<sup>[19, 21]</sup>。

采用 CH 替换化合物 **32** 中的 N1 和 N3, 所得化合物 **35** ( $IC_{50} = 1.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 的抑制活性与化合物 **32** 相同, 证明了 N1 和 N3 对结合力没有贡献。N1-



**35**  $R_1 = i\text{Bu}$   $IC_{50} = 1.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

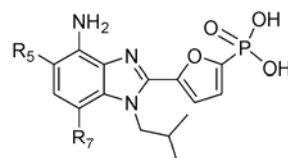
位取代基的构效关系研究表明: 中等大小的烷基基团对活性有利, 小体积 (如甲基) 或大体积 (如苄基) 的疏水性基团对活性不利。苯并咪唑骨架结构中苯环上的取代基构效分析显示: C-5 位引入 OH、 $\text{CH}_3$ 、F、Cl 和 Br, 抑制活性提高, 以 F 原子取代活性最高 (**36**,  $IC_{50} = 0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ); C-7 位引入小体积的疏水性基团, 如乙基或环丙基 (化合物 **37** 和 **38**), 对活性有利<sup>[21]</sup>。

将化合物 **38** 静脉注射给药禁食后 ZDF 大鼠, 在  $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  的剂量下, 血糖水平显著降低, 进一步为 FBPase 抑制剂有可能成为新型抗糖尿病药物提供实验基础。但由于强负电荷的磷酸基的存在, 口服生物利用度只有 1%, 导致该化合物口服无效。采用前药策略, 试图提高化合物 **38** 的口服生物利用度, 未能得到预期结果<sup>[21]</sup>。

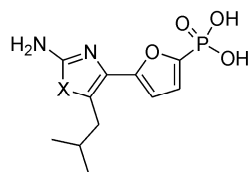
采用前药策略提高嘌呤类和苯并咪唑类 FBPase 抑制剂的口服生物利用度没有获得理想结果, 可能是由于这两类化合物自身骨架结构较大, 导致所得前药分子量更大、溶解度下降、代谢不稳定等, 口服生物利用度难以改善。为此, Metabasis 制药公司依据化合物 **38** 与 FBPase 复合物的晶体结构, 对化合物 **38** 进行结构修饰, 目的在于维持或提高化合物活性的基础上, 进一步优化化合物的物理化学性质, 从而提高化合物的口服生物利用度。

化合物 **38** 与 FBPase 的结合方式研究提示: 苯并咪唑中的苯环对结合力的贡献不显著, 并且增加了化合物的分子量, 降低了化合物的溶解度, 因此, 采用五元杂环替换苯并咪唑环, 维持氨基和磷酸基之间的空间位置和距离, 从而保证化合物与 FBPase 的结合。由于吡咯环和咪唑环的代谢稳定性低于噻唑环, 因此选择了噻唑类结构骨架进行更深入的构效关系研究<sup>[22, 23]</sup>。

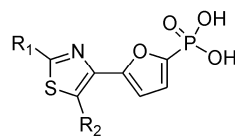
以咪唑环替换苯并咪唑环, 所得化合物 (**39**  $IC_{50} = 5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 对 FBPase 具有一定的抑制活性, 提示该类化合物仍然保留了与 FBPase 的关键结合作用。以噻唑或噻唑环替换咪唑环, 抑制活性显著提



**36**  $R_5 = \text{F}$   $R_7 = \text{H}$   $IC_{50} = 0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   
**37**  $R_5 = \text{F}$   $R_7 = \text{cPr}$   $IC_{50} = 0.06 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   
**38**  $R_5 = \text{F}$   $R_7 = \text{Et}$   $IC_{50} = 0.055 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$



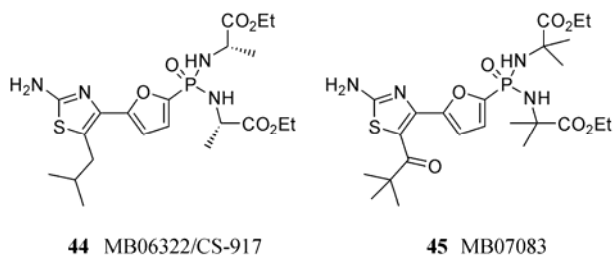
- 39 X = N  $IC_{50} = 5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   
 40 X = O  $IC_{50} = 0.12 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   
 41 X = S  $IC_{50} = 0.016 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$



- 42  $R_1 = \text{H}, R_2 = i\text{Bu}$   $IC_{50} = 0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   
 43  $R_1 = \text{NH}_2, R_2 = \text{H}$   $IC_{50} = 0.45 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

高, 其中噻唑类化合物 **41** (MB05032) 抑制作用的  $IC_{50}$  值达到了  $16 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。除去化合物 **41** 噻唑环上的 2-NH<sub>2</sub> (**42**  $IC_{50} = 0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 或 5-*i*Bu (**43**  $IC_{50} = 0.45 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 活性大大降低, 可见这些基团对小分子与 FBPase 的结合非常关键, 参与了氢键和疏水作用的形成<sup>[22]</sup>。噻唑环 2-位构效关系分析显示: 引入氢键供体有利于提高化合物与 FBPase 的结合, 其中氨基取代结合力最强; 保留 2-位氨基, 对噻唑环 5-位取代基进行构效关系研究, 证明 5-位取代基允许较大的结构变化, 如引入烷基、酯基和芳香性取代基均可产生较好的抑制活性 ( $IC_{50} = 10 \sim 25 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )<sup>[23]</sup>。

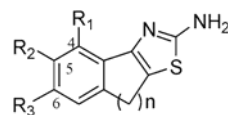
药代动力学研究表明: 化合物 **41** 的药代动力学性质与化合物 **38** 相似, 口服生物利用度只有 4%。对化合物 **41** 进行前药优化, 发现该化合物的磷酸二酰胺前药口服生物利用度可达 22%~47%, 其中化合物 **44** (MB06322 或 CS-917) 的生物利用度为 22%, 在给药剂量为  $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  时, 禁食的正常大鼠血糖可降低 59%。在多种 II 型糖尿病裸鼠模型实验中, 口服化合物 **44**, 均可显著降低血糖水平<sup>[23]</sup>。该化合物是第一个进入 II 期临床研究的 FBPase 抑制剂, 但由于 Metabasis 及其合作伙伴日本三共公司相继出现两例乳糖酸中毒事件, 于 2008 年中止临床研究。目前, Metabasis 制药公司的另一个 FBPase 抑制剂 **45** (MB07083) 正在进行 II 期临床研究<sup>[24]</sup>。



**1.2.9 三环类** 日本 Daiichi Sankyo 制药公司<sup>[25, 26]</sup> 依据 MB05032 骨架结构, 采用骨架迁移药物分子设计策略, 设计合成了刚性的三环类化合物, 期望将化合物 MB05032 中关键药效团氨基和磷酸基放置在

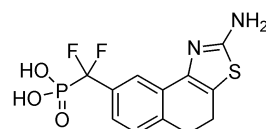
合适的位置, 构建与 AMP 结合腔形状匹配的刚性分子, 减少结合过程中构象熵的损失, 提高化合物与 FBPase 的结合力。

该研究小组固定氨基的位置, 探索了磷酸基在苯环不同取代位置和稠环体系大小对抑制活性的影响。当稠环为五元环时, 磷酸基在 4-位时的活性 (**46**  $IC_{50} = 0.07 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 强于 5-位 ( $IC_{50} = 307 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 和 6-位 ( $IC_{50} = 146 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ); 当稠环为六元环时, 磷酸基在 5-位时的活性 (**47**  $IC_{50} = 0.013 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 强于 4-位 ( $IC_{50} = 335 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 和 6-位 ( $IC_{50} = 112 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ); 当稠环为七元环时, 磷酸基在 5-位时的抑制活性 (**48**  $IC_{50} = 0.022 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 与化合物 **46** 和 **47** 相当。延长磷酸基与苯环之间的连接链, 将导致活性降低, 与化合物 **46** 相比, 化合物 **49** ( $IC_{50} = 0.124 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 的抑制活性降低了近 2 倍。



- 46  $n = 1, R_1 = \text{H}_2\text{PO}_4, R_2 = R_3 = \text{H}$   $IC_{50} = 0.07 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   
 47  $n = 2, R_2 = \text{H}_2\text{PO}_4, R_1 = R_3 = \text{H}$   $IC_{50} = 0.013 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   
 48  $n = 3, R_2 = \text{H}_2\text{PO}_4, R_1 = R_3 = \text{H}$   $IC_{50} = 0.022 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   
 49  $n = 1, R_1 = \text{OCH}_2\text{H}_2\text{PO}_3, R_2 = R_3 = \text{H}$   $IC_{50} = 0.124 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

尽管化合物 **47** 表现出较高的酶抑制活性, 但磷酸基易于水解, 导致代谢不稳定。采用 CF<sub>2</sub> 基团替换氧原子, 所得化合物 **50** ( $IC_{50} = 0.047 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 的抑制活性与化合物 **47** 相当, 并且提高了代谢稳定性<sup>[25]</sup>。



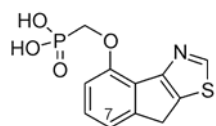
- 50  $IC_{50} = 0.047 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

在细胞水平的降血糖实验中, 化合物 **47** 和 **50** 及其前药并没有产生预期的减少葡萄糖生成的作用,

推测可能是由于分子结构中的氨基易于被 N-乙酰基转移酶代谢造成的。为了提高化合物的代谢稳定性, 增强酶抑制活性, 该研究组采用了基于结构的药物分子设计策略, 对三环类骨架结构中的氨基进行修饰。

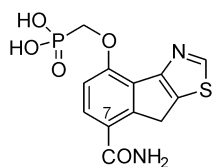
为了避免化合物 **47** 中磷酸基的代谢不稳定性, 该研究组选取不易水解的化合物 **49** 作为先导结构, 对分子中  $\text{NH}_2$  进行结构修饰。采用甲基、卤素替换氨基, 显著降低了化合物的 FBPase 抑制活性。出乎意料的是, 去除氨基后, 所得化合物 **51** ( $\text{IC}_{50} = 12 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 对 FBPase 的抑制活性提高了 10 倍, 与化合物 MB05032 相当。比较化合物 **49** 和 **51** 与 FBPase 的结合方式可以看出, 二者占据了结合腔相同的区域, 以相似的方式与 FBPase 的主链酰胺 N 原子和侧链相互作用。但是, 化合物 **51** 的骨架结构向由疏水性残基 Val17、Leu34 和 Met177 形成的疏水腔内稍微移动了一些, 同时这些氨基酸残基的侧链也发生了轻微的移动, 使得化合物 **51** 与结合腔形状达到更好的空间互补, 从而增强了疏水作用。

化合物 **51** 与 FBPase 复合物的晶体结构 (pdb: 3KC0) 显示, 化合物 **51** 的 7-位有一个空腔, 并且结合腔内有水分子, 提示在 7-位引入侧链与水分子相互作用, 可以增强亲和力。



**51**  $\text{IC}_{50} = 12 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$

在化合物 **51** 的 7-位引入  $\text{CH}_3$ 、 $\text{C}_2\text{H}_5$ 、F、Cl 时, 所得化合物的抑制活性与化合物 **51** 相当,  $\text{IC}_{50}$  值分别为 8、11、15 和  $8 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。引入苯基、2-吡啶基, 导致活性下降; 引入 3-吡啶基和 4-吡啶基, 对活性没有显著影响; 引入 3, 5-嘧啶基, 活性增强,  $\text{IC}_{50}$  值为  $3 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。引入氨酰基, 所得化合物 **52** 的抑制活性  $\text{IC}_{50}$  值达到  $1 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 相对于先导化合物 **49**, 活性提高了 124 倍。



**52**  $\text{IC}_{50} = 1 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$

化合物 **52** 与 FBPase 复合物的晶体结构 (pdb: 3KC1) 证实了预期的结合模式, 化合物 **52** 的酰胺侧链参与形成了包括 Val160、Asp178、Cys179、Glu20 和两分子水在内的氢键网络, 该氢键网络增强了化合物 **52** 与 FBPase 的亲和力和对 FBPase 的抑制活性。目前该类化合物的前药研究和体内活性评价正在进行中<sup>[26]</sup>。

## 2 小结

FBPase 是调控内源性葡萄糖生成的关键酶之一, 抑制 FBPase 活性是潜在的治疗 II 型糖尿病的新策略。基于结构的药物分子设计策略和高通量筛选方法相辅相成, 发现了结构多样的 FBPase 抑制剂, 为 FBPase 抑制剂的研究奠定了基础。已有研究工作表明, 发现药代性质合理的高效 FBPase 抑制剂仍是一个巨大的挑战。本课题组开展了 FBPase 抑制剂的研究, 发现了对 FBPase 具有一定抑制活性的吡啶类化合物, 进一步的结构优化正在进行中。

## References

- [1] Yang WY, Lu JM, Weng JP, et al. Prevalence of diabetes among men and women in China [J]. *New Engl J Med*, 2010, 362: 1090-1101.
- [2] Ke HM, Liang JY, Zhang YP, et al. Conformational transition of fructose-1, 6-bisphosphatase: structure comparison between the AMP complex (T form) and the fructose 6-phosphate complex (R form) [J]. *Biochemistry*, 1991, 30: 4412-4420.
- [3] Bruce EM, Allen BR, Gene FT, et al. Stereoselective synthesis and biological activity of beta- and alpha-D-arabinose 1, 5-diphosphate: analogs of a potent metabolic regulator [J]. *J Am Chem Soc*, 1984, 106: 7851-7853.
- [4] Pilkis SJ, McGrane MM, Kountz PD, et al. The effect of arabinose 1, 5-bisphosphate on rat hepatic 6-phosphofructo-1-kinase and fructose-1, 6-bisphosphatase [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1986, 138: 159-166.
- [5] Wright SW, Hageman DL, McClure LD, et al. Allosteric inhibition of fructose-1, 6-bisphosphatase by anilinoquinazolines [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2001, 11: 17-21.
- [6] Wright SW, Hageman DL, McClure LD, et al. Anilinoquinazoline inhibitors of fructose 1, 6-bisphosphatase bind at a novel allosteric site: synthesis, *in vitro* characterization, and X-ray crystallography [J]. *J Med Chem*, 2002, 45: 3865-3877.
- [7] Rosini M, Mancini F, Tarozzi A, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of substituted 2, 3-dihydro-1H-cyclopenta[b]quinolin-9-ylamine related compounds as fructose-1, 6-bisphosphatase inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem*, 2006, 14:

- 7846–7853.
- [8] Gidh-Jain M, Zhang YP, van Poelje PD, et al. The allosteric site of human liver fructose-1, 6-bisphosphatase. Analysis of six AMP site mutants based on the crystal structure [J]. *J Biol Chem*, 1994, 269: 27732–27738.
- [9] Wright SW, Carlo AA, Danley DE, et al. 3-(2-Carboxy-ethyl)-4, 6-dichloro-1*H*-indole-2-carboxylic acid: an allosteric inhibitor of fructose-1, 6-bisphosphatase at the AMP site [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2003, 13: 2055–2058.
- [10] von Geldern TW, Lai CQ, Gum RJ, et al. Benzoxazole benzenesulfonamides are novel allosteric inhibitors of fructose-1, 6-bisphosphatase with a distinct binding mode [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2006, 16: 1811–1815.
- [11] Hebeisen P, Kuhn B, Kohler P, et al. Allosteric FBPase inhibitors gain 105 times in potency when simultaneously binding two neighboring AMP sites [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, 18: 4708–4712.
- [12] Kitas E, Mohr P, Kuhn B, et al. Sulfonylureido thiazoles as fructose-1, 6-bisphosphatase inhibitors for the treatment of type-2 diabetes [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2010, 20: 594–599.
- [13] Heng S, Gryncel KR, Kantrowitz ER, et al. A library of novel allosteric inhibitors against fructose 1, 6-bisphosphatase [J]. *Bioorg Med Chem*, 2009, 17: 3916–3922.
- [14] Heng S, Harris KM, Kantrowitz ER. Designing inhibitors against fructose 1, 6-bisphosphatase: exploring natural products novel inhibitor scaffolds [J]. *Eur J Med Chem*, 2010, 45: 1478–1484.
- [15] Zareba G, Serradell N, Castaner R, et al. Phytotherapies for diabetes [J]. *Drugs Fut*, 2005, 30: 1253–1282.
- [16] Rudnitskaya R, Borkin DA, Huynh K, et al. Rational design, synthesis, and potency of N-substituted indoles, pyrroles, and triarylpyrazoles as potential fructose 1, 6-bisphosphatase inhibitors [J]. *ChemMedChem*, 2010, 5: 384–389.
- [17] Dang Q, Kasibhatla SR, Jiang T, et al. Discovery of phosphonic diamide prodrugs and their use for the oral delivery of a series of fructose 1, 6-bisphosphatase inhibitors [J]. *J Med Chem*, 2008, 51: 4331–4339.
- [18] van Poelje PD, Dang Q, Erion MD. Discovery of fructose-1, 6-bisphosphatase inhibitors for the treatment of type 2 diabetes [J]. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 2007, 10: 430–437.
- [19] Erion MD, Dang Q, Reddy MR, et al. Structure-guided design of AMP mimics that inhibit fructose-1, 6-bisphosphatase with high affinity and specificity [J]. *J Am Chem Soc*, 2007, 129: 15480–15490.
- [20] Dang Q, Brown BS, Liu Y, et al. Fructose-1, 6-bisphosphatase inhibitors. 1. Purine phosphonic acids as novel AMP mimics [J]. *J Med Chem*, 2009, 52: 2880–2898.
- [21] Dang Q, Kasibhatla SR, Xiao W, et al. Fructose-1, 6-bisphosphatase inhibitors. 2. Design, synthesis, and structure-activity relationship of a series of phosphonic acid containing benzimidazoles that function as 5'-adenosinemonophosphate (AMP) mimics [J]. *J Med Chem*, 2010, 53: 441–451.
- [22] Dang Q, Kasibhatla SR, Reddy KR, et al. Discovery of potent and specific fructose-1, 6-bisphosphatase inhibitors and a series of orally-bioavailable phosphoramidase-sensitive prodrugs for the treatment of type 2 diabetes [J]. *J Am Chem Soc*, 2007, 129: 15491–15502.
- [23] Dang Q, Liu Y, Cashion DK, et al. Discovery of a series of phosphonic acid-containing thiazoles and orally bioavailable diamide prodrugs that lower glucose in diabetic animals through inhibition of fructose-1, 6-bisphosphatase [J]. *J Med Chem*, 2011, 54: 153–165.
- [24] Dang Q, Kopcho JJ, Hecker SJ, et al. Novel thiazole inhibitors of fructose 1, 6-bisphosphatase: US, 225259 A1 [P]. 2007-09-27.
- [25] Tsukada T, Takahashi M, Takemoto T, et al. Synthesis, SAR, and X-ray structure of tricyclic compounds as potent FBPase inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, 19: 5909–5912.
- [26] Tsukada T, Takahashi M, Takemoto T, et al. Structure-based drug design of tricyclic 8*H*-indeno [1, 2-*d*] [1, 3] thiazoles as potent FBPase inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2010, 20: 1004–1007.