

Biological Evaluation of Diaryl Ketones against SHP2

Qiuyue Fan, Chuantao Zhang, Wenlong Wang*

School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi Jiangsu
Email: wwenlong2011@163.com

Received: Apr. 14th, 2019; accepted: Apr. 28th, 2019; published: May 6th, 2019

Abstract

SHP2 is of importance for the regulation of essential cellular processes that control growth, differentiation, metabolism, motility and apoptosis and has potential as a drug target. Diaryl ketones are frequently used as core motifs for fragment-based drug discovery (FBDD). A series of diaryl-ketones was evaluated as a new class of inhibitors against Src homology-2 domain containing protein tyrosine phosphatase-2 (SHP2). Among them, (4-methoxyphenyl) (phenyl) methanone (1l), (2-fluorophenyl) (thiophen-2-yl) methanone (1u), (2,4-dimethoxyphenyl) (2-fluorophenyl) methanone (1v) exhibited enzyme inhibitory ratio at the dose of 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ with $53.90\% \pm 8.35\%$, $47.03\% \pm 4.85\%$ and $50.08\% \pm 3.90\%$ respectively and these results would be highly advantageous for fragment-based drug discovery to obtain selective SHP2 inhibitors.

Keywords

Diaryl Ketones, SHP2, Inhibitors, Structure-Activity Relationships (SARs)

二芳基甲酮化合物抑制SHP2生物活性研究

范秋玥, 张传涛, 王文龙*

江南大学药学院, 江苏 无锡
Email: wwenlong2011@163.com

收稿日期: 2019年4月14日; 录用日期: 2019年4月28日; 发布日期: 2019年5月6日

摘要

蛋白酪氨酸磷酸酶SHP2在细胞信号转导过程中起着重要的作用, 参与细胞的生长、分化、代谢、运动和
*通讯作者。

凋亡, 作为潜在的抗肿瘤治疗靶点备受关注。二芳基甲酮化合物在生物活性分子中广泛存在, 是基于片段的药物发现策略(fragment-based drug discovery, FBDD)的理想结构模块。本试验研究了二芳基甲酮化合物在SHP2^{PTP}模型上的构效关系, 结果表明4-甲氧基二苯甲酮(11)、(2-氟苯基)-(2-噻吩基)甲酮(1u)以及(2,4-二甲氧基苯基)-(2-氟苯基)甲酮(1v)在20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度下, 对SHP2^{PTP}分别表现了53.90% \pm 8.35%、47.03% \pm 4.85%和50.08% \pm 3.90%的抑制率, 为后续基于片段的SHP2抑制剂研究工作奠定了一定的基础。

关键词

二芳基甲酮, SHP2^{PTP}, 抑制剂, 构效关系

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

二芳基甲酮结构片段广泛存在于天然产物和生物活性分子中[1] [2] [3], 代表性分子包括非甾体抗炎药(NSAID)酮洛芬[4]、广谱人类驱虫药甲苯咪唑[5]、经典脂质调节剂非诺贝特[6]和促尿酸排泄药苯溴马隆(BBR) [7]等(图 1)。研究表明, 含二芳基甲酮结构片段的化合物对人单核细胞白血病癌细胞系有一定的细胞毒性[8]; 与肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体结合后, 诱导 Jurkat 细胞凋亡[9]; 可以作为血管生成抑制剂起到抑癌作用[10]; 也可以作为转运 P-糖蛋白(P-gp/ABC1)抑制剂克服肿瘤多药耐药性[11]。对于基于片段的药物发现策略而言[12], 二芳基甲酮在片段大小、溶解度以及类药性等方面表现了良好的物理化学性质, 可以为创新药物研究提供良好的分子模块[13]。

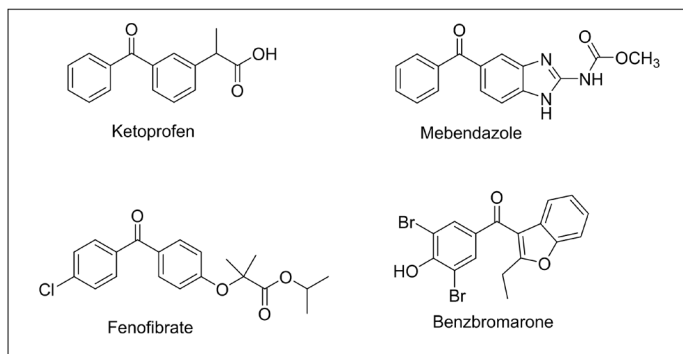


Figure 1. Pharmaceutical with diaryl ketone motif

图 1. 含二芳基甲酮骨架的药物

SHP2是由PTPN11编码的一种在体内广泛表达的蛋白酪氨酸磷酸酶, 调节细胞内的蛋白磷酸化水平, 参与多种细胞生命活动, 包括细胞侵袭, 细胞凋亡, 细胞增殖, 细胞周期等的信号传导[14]。SHP2的过度活化与多种恶性疾病(如 Noonan 综合征、白血病、乳腺癌、肺癌、胃癌等)的发生发展有着密切的联系[15], 已经成为了肿瘤治疗领域的重要靶标[16]。在前期的工作中, 我们基于组合化学的理念, 报道了连续合成二芳基甲酮化合物的方法[17]。本文以 SHP2 催化域蛋白(SHP2^{PTP})作为活性评价模型, 在浓度 20 g/mL 的条件下, 考察二芳基甲酮化合物对 SHP2^{PTP}的抑制效果, 研究构效关系。实验结果表明, 4-甲氧

基二苯甲酮(**II**)、(2-氟苯基)-(2-噻吩基)甲酮(**Iu**)以及(2,4-二甲氧基苯基)-(2-氟苯基)甲酮(**Iv**)对 SHP2^{PTP} 分别表现了 53.90% ± 8.35%、47.03% ± 4.85%和 50.08% ± 3.90%的抑制率,为后续基于片段的 SHP2 抑制剂研究工作奠定了一定的基础。

2. 材料与amp;方法

2.1. 材料

实验材料:二芳基甲酮化合物由江南大学药学院药物化学实验室制备。

实验试剂:

HEPS、Tris-Base、NaCl、KCl、Tween-20、KH₂PO₄、乙二胺四乙酸(EDTA)、二硫苏糖醇(DTT)、Na₂HPO₄、二甲亚砜(DMSO),购自国药集团化学试剂有限公司;

牛白蛋白(BSA)、氨苄青霉素、异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)、琼脂糖、TritonX-100、胰蛋白酶、酵母提取物等分子生物学试剂,购自上海生工生物工程公司;

菌株、质粒及蛋白:大肠杆菌感受态 BL21 及用于蛋白表达的质粒由国家新药筛选中心实验室提供, SHP2 催化域蛋白(SHP2^{PTP}:246-523AA)国家新药筛选中心实验室纯化;

底物:6,8-二氟-4-甲基-7-羟基香豆素磷酸酯(DiFMUP),购自英潍捷基公司。

实验仪器(如表 1):

Table 1. Instruments and equipments

表 1. 实验设备与仪器

仪器名称	公司名称
恒温摇床	上海市智城仪器制造公司
37℃恒温培养箱	上海市福玛实验设备有限公司
Hitachi CRG 冷冻高速离心机	日本日立公司
Envision 多功能微孔板酶标仪	Molecular Devices (U.S.A)

2.2. 实验方法

2.2.1. 蛋白的表达及纯化

将截短的 SHP2^{PTP} 催化域蛋白表达重组质粒通过热激法转化到 BL21 感受态中,将菌液均匀涂布在含有氨苄青霉素的 LB 平板上,37℃恒温培养过夜。次日挑单克隆菌落接种于含有 100 μg/mL 的氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,于 37℃恒温 250 rpm 摇床上培养。监测菌液密度,当 OD₆₀₀ = 0.6~0.8 之间时,可加入 0.5 mM 的 IPTG 进行 16℃低温 180 rpm 低转速诱导 16 小时。将诱导后的菌液离心收集,用平衡液(137 mM NaCl、1.5 mM KH₂PO₄、2.7 mM KCl、8 mM Na₂HPO₄、2 mM EDTA、2 mM DTT、1% TritonX-100)重悬,在冰浴的条件下用 350W 的超声强度超声 2 秒,停顿 6 秒裂解菌液 40min。超声结束后于 4℃离心菌液,收集上清,与 GST-Beeds 于 4℃孵育 2h 或过夜后,用洗脱液(137 mM NaCl、1.5 mM KH₂PO₄、2.7 mM KCl、8 mM Na₂HPO₄、2 mM DTT、2 mM EDTA、10 mM 还原性谷胱甘肽、50 mM Tris-Base pH = 8.0)将目的蛋白洗脱,用考马斯亮蓝 G250 染色,以 100 μg/mL 牛血清白蛋白为标准品检测蛋白浓度。

2.2.2. 二芳基甲酮化合物对 SHP2^{PTP} 活性抑制作用

化合物活性测试体系是国家新药筛选中心的标准化常规筛选体系;活性测试体系总体积为 50 μL: 10 μL 待测化合物(20 μg/mL, 2% DMSO)、20 μL 底物 DiFMUP (25 μM)、20 μL SHP2^{PTP} (2 nM);活性测试反

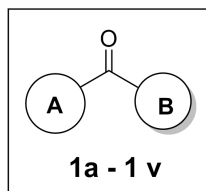
应 Buffer: 60 mM Heps pH = 7.2、75 mM NaCl、75 mM KCl、5 mM DTT、1 mM EDTA 及 0.05% Tween-20。反应在黑底 384 孔板中进行, 用 Buffer 稀释蛋白及底物, 将待测化合物与蛋白孵育 10min 后加入底物, 立即在 Envision 上用动态法监测波长 340 nm/450 nm 处的荧光信号, 通过荧光信号值曲线的斜率来判断去磷酸化反应的速率, 进而测定目的蛋白的活性, 观察化合物对酶活性的影响。

3. 结果与讨论

本研究以 Na_3VO_3 作为阳性对照, 评价二芳基甲酮化合物(1a-1v)对 SHP2^{PTP} 的抑制活性, 结果如表 2 所示。实验结果表明, 当 A 环为苯基(1a-1o), B 环为苯基(1a)、甲基取代苯基(1b-1d)、氟代苯基(1e-1g)、间氯苯基(1h)、三氟甲基取代苯基(1i-1j)、萘基(1n)以及(1-氧乙基)苯基(1o)时, 衍生物未产生抑制活性; 当 B 环为对甲氧基苯基时, 对甲氧基二苯甲酮(1l)对 SHP2^{PTP} 的抑制率达到了 $53.90\% \pm 8.35\%$, 抑制活性是间甲氧基二苯甲酮(1k)的 5 倍, 是对氰基二苯甲酮(1m)的 2 倍。这些结果表明, B 环上取代基的类型、取代基的位置, 对活性产生影响。当 A 环为 2-氟苯基时(1p-1v), B 环为对氯苯基(1p)、甲基取代苯基(1q-1r)以及间氟苯基(1s)时, 没有抑制活性。值得注意的是, 对 2-氟-4'-甲氧基二苯甲酮(1t)的抑制活性明显低于 4-甲氧基二苯甲酮(1l), 这一结果表明, A 环为 2-氟苯基, 不利于抑制活性的提高。有意思的是, B 环为噻吩基(1u)和 2,3-二甲氧基苯环(1v)时, 抑制活性显著提高, 这些结果表明, B 环为富电子芳香环, 对提高抑制活性有力。遗憾的是, 所有二芳基甲酮化合物对 SHP2^{PTP} 的抑制活性明显低于阳性对照 Na_3VO_3 。


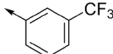



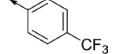



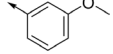

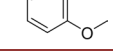
Table 2. Inhibitory ratio of compounds diaryl ketones 1a-1v against SHP2^{PTP}

表 2. 二芳基甲酮化合物 1a-1v 对 SHP2^{PTP} 的抑制活性



Comp	A	B	Inhibitory ratio(%)	Comp	A	B	Inhibitory ratio(%)
1a			1.16 ± 5.94	1m			21.11 ± 2.45
1b			-1.20 ± 3.74	1n			1.57 ± 0.02
1c			-6.47 ± 3.48	1o			-1.52 ± 5.06
1d			-4.16 ± 4.79	1p			-8.38 ± 2.65
1e			-3.86 ± 2.39	1q			-5.17 ± 2.19
1f			-0.63 ± 4.42	1r			-2.72 ± 2.74
1g			-1.06 ± 4.26	1s			-0.14 ± 3.97
1h			1.72 ± 3.17	1t			10.14 ± 4.29

Continued

1i			1.17 ± 4.06	1u			47.03 ± 4.85
1j			-5.45 ± 1.25	1v			50.08 ± 3.90
1k			10.66 ± 1.23	Na ₃ VO ₃	-	-	95.38 ± 4.65
1l			53.90 ± 8.35	-	-	-	-

4. 结论

本文对二芳基甲酮化合物进行了抑制 SHP2^{PTP} 生物活性的构效关系研究,发现 4-甲氧基二苯甲酮(**1l**)、(2-氟苯基)-(2-噻吩基)甲酮(**1u**)以及(2,4-二甲氧基苯基)-(2-氟苯基)甲酮(**1v**)对 SHP2^{PTP} 表现了一定的抑制活性,为基于片段的靶向 SHP2 抑制剂的研究工作提供了一些分子量小、类药性好的片段分子,为后续的研究提供了有利的信息。

基金项目

国家自然科学基金面上项目(21772068)。

参考文献

- [1] Keylor, M.H., Matsuura, B.S. and Stephenson, C.R.J. (2015) Chemistry and Biology of Resveratrol-Derived Natural Products. *Chemical Reviews*, **115**, 8976-9027. <https://doi.org/10.1021/cr500689b>
- [2] Qi, X., Jiang, L.-B., Li, H.-P., et al. (2015) A Convenient Palladium-Catalyzed Carbonylative Suzuki Coupling of Aryl Halides with Formic Acid as the Carbon Monoxide Source. *Chemistry—A European Journal*, **21**, 17650-17656. <https://doi.org/10.1002/chem.201502943>
- [3] Rao, M.L.N. and Ramakrishna, B.S. (2017) Roodium-Catalyzed Directing-Group-Assisted Aldehydic C-H Arylations with Aryl Halides. *European Journal of Organic Chemistry*, No. 34, 5080-5093. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201700881>
- [4] Smith, E.A., Marshall, J.G., Selph, S.S., et al. (2017) Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs for Managing Postoperative Endodontic Pain in Patients Who Present with Preoperative Pain: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Endodontics*, **43**, 7-15. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2016.09.010>
- [5] Zimmermann, S.C., Tichy, T., Vavra, J., et al. (2018) N-Substituted Prodrugs of Mebendazole Provide Improved Aqueous Solubility and Oral Bioavailability in Mice and Dogs. *Journal of Medicinal Chemistry*, **61**, 3918-3929. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01792>
- [6] Agarwal, V., Bajpai, M. and Sharma, A. (2018) Patented and Approval Scenario of Nanopharmaceuticals with Relevancy to Biomedical Application, Manufacturing Procedure and Safety Aspects. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*, **12**, 40-52. <https://doi.org/10.2174/1872211312666180105114644>
- [7] Zheng, J. (2018) Metabolic Activation-Based Design of Uricosuric Benzofuran Derivatives with Low Potential of Hepatotoxicity. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, **33**, S70-S70. <https://doi.org/10.1016/j.dmpk.2017.11.234>
- [8] Cao, S.G., Wu, X.-H., Sim, K.Y., et al. (1998) Minor Coumarins from *Calophyllum teysmannii* var. inophylloide and Synthesis of Cytotoxic Calanone Derivatives. *Helvetica Chimica Acta*, **81**, 1404-1416. <https://doi.org/10.1002/hlca.19980810549>
- [9] Takashima, J., Ikeda, Y., Komiyama, K., et al. (2007) New Constituents from the Leaves of *Morinda citrifolia*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **55**, 343-345. <https://doi.org/10.1248/cpb.55.343>
- [10] Hornick, C.A., Myers, A., Sadowska-Krowicka, H., et al. (2003) Inhibition of Angiogenic Initiation and Disruption of Newly Established Human Vascular Networks by Juice from *Morinda citrifolia* (noni). *Angiogenesis*, **6**, 143-149. <https://doi.org/10.1023/B:AGEN.0000011800.04507.4b>
- [11] Jabeen, I., Pleban, K., Rinner, U., et al. (2012) Structure-Activity Relationships, Ligand Efficiency, and Lipophilic Ef-

iciency Profiles of Benzophenone-Type Inhibitors of the Multidrug Transporter P-Glycoprotein. *Journal of Medicinal Chemistry*, **55**, 3261-3273. <https://doi.org/10.1021/jm201705f>

- [12] 程俊飞, 盛春泉, 董国强. 基于片段的药物发现(FBDD)研究进展[J]. 中国药物化学杂志, 2018, 28(6): 504-510.
- [13] Doweiko, A.M. and Wroblewski, S.T. (2005) Structural Comparison of p38 Inhibitor-Protein Complexes: A Review of Recent p38 Inhibitors Having Unique Binding Interactions. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **5**, 1005-1016. <https://doi.org/10.2174/1568026054985894>
- [14] Zhang, J., Zhang, F. and Niu, R. (2015) Functions of Shp2 in Cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **78**, 2075-2083. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12618>
- [15] Frankson, R., Yu, Z.H., Bai, Y., Li, Q., Zhang, R.Y., et al. (2017) Therapeutic Targeting of Oncogenic Tyrosine Phosphatases. *Cancer Research*, **7**, 5701-5705. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-1510>
- [16] Chen, Y.N., LaMarche, M.J., Chan, H.M., Fekkes, P., Carcia-Fortanet, J., et al. (2016) Allosteric Inhibition of SHP2 Phosphatase Inhibits Cancers Driven by Receptor Tyrosine Kinases. *Nature*, **535**, 148-152.
- [17] Zhang, C.T., Zhu, R., Wang, Z., et al. (2019) Continuous Flow Synthesis of Diaryl Ketones by Coupling of Aryl Grignard Reagents with Acyl Chlorides under Mild Conditions in the Ecofriendly Solvent 2-Methyltetrahydrofuran. *RSC Advances*, **9**, 2199-2204. <https://doi.org/10.1039/C8RA07447J>

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2331-8287, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: hjmce@hanspub.org