

学校编码: 10384
学号: 32320141153413

分类号__密级__
UDC__

廈門大學

碩 士 学 位 论 文

**Drugbank 老药库中核受体 RXR α 配体的发现及双吲
哚甲烷类化合物合成方法学研究**

**Discovery of RXR α modulators from Drugbank database
and synthetic methodology development of
Bisindolylmethanes**

徐丹

指导教师姓名: 曾志平 助理教授

张晓坤 教授

专 业 名 称: 药物化学

论文提交日期: 2017 年 5 月

论文答辩时间: 2017 年 5 月 11 日

学位授予日期:

答辩委员会主席: _____

评阅人: _____

2017 年 5 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目录

缩略词.....	I
摘要.....	II
Abstract.....	III
第一章 绪论	1
1.1 核受体	1
1.1.1 核受体概述.....	1
1.1.2 核受体分类.....	2
1.1.3 核受体结构与功能.....	2
1.2 类视黄醇 X 受体 (RXRs)	3
1.2.1 核受体 RXRs 概述.....	3
1.2.2 核受体 RXR α 的结构.....	4
1.2.3 核受体 RXR α 的功能.....	5
1.3 核受体 RXR 配体研究进展.....	6
1.3.1 核受体 RXR 天然配体	6
1.3.2 核受体 RXR 合成配体	7
1.4 基于分子对接的虚拟筛选	8
1.4.1 分子对接简介.....	8
1.4.2 Drugbank 数据库简介.....	9
1.5 本文研究目的与意义	10
第二章 虚拟筛选方法与结果分析	12
2.1 研究方案	12
2.2 分子对接方法	13
2.2.1 配体准备.....	13
2.2.2 受体文件准备.....	13
2.2.3 对接参数设置.....	13
2.2.4 分子对接.....	14

2.3 结果分析	14
2.4 本章小结	17
第三章 虚拟筛选所得化合物生物活性评估及分子动力学模拟.....	19
3.1 实验仪器及试剂	19
3.1.1 主要实验仪器.....	19
3.1.2 主要实验试剂.....	20
3.1.3 主要实验溶液.....	20
3.2 选择化合物对 RXR α 的转录活性研究	20
3.2.1 报告基因系统.....	20
3.2.2 核受体 RXR α 选择性激动剂和拮抗剂的筛选	21
3.2.3 化合物浓度依赖性测试.....	22
3.2.4 化合物特异性测试.....	23
3.3 表面等离子共振 SPR 结合实验.....	24
3.4 分子动力学模拟	25
3.4.1 分子对接模拟.....	25
3.4.2 分子动力学模拟.....	27
3.5 本章小结	28
第四章 匹伐他汀钙衍生物合成及生物学活性评估.....	30
4.1 匹伐他汀钙衍生物合成	30
4.1.1 衍生物的合成方法.....	30
4.1.2 衍生物的图谱表征.....	31
4.2 衍生物生物活性研究	32
4.2.1 衍生物对 RXR α 的转录活性研究	32
4.2.2 衍生物与 RXR α 的结合研究	33
4.3 结果与讨论	34
第五章 双吡啶化合物合成方法学研究.....	35
5.1 课题背景	35
5.1.1 吡啶类化合物.....	35

5.1.2 碳正离子化合物.....	36
5.2 双吡啶成盐方法学研究设计	37
5.3 双吡啶成盐方法探索	38
5.3.1 主要实验仪器及试剂.....	38
5.3.2 双吡啶化合物成盐条件探索.....	40
5.3.3 双吡啶化合物成盐后处理方法.....	45
5.3.4 合成双吡啶甲烷成盐化合物图谱表征.....	47
5.4 本章小结	52
第六章 总结与展望	54
6.1 基于核受体 RXR α 老药库的虚拟筛选课题	54
6.2 双吡啶甲烷类化合物成盐方法学研究课题	55
【参考文献】	57
附录一 匹伐他汀钙衍生物 $^1\text{H-NMR}$ $^{13}\text{C-NMR}$ HRMS 图谱.....	63
附录二 双吡啶衍生物 $^1\text{H-NMR}$ $^{13}\text{C-NMR}$ HPLC 图谱.....	68
硕士期间发表论文	77
致谢.....	78

Contens

List of Abbreviations.....	I
Abstract (Chinese)	II
Abstract (English)	III
Chapter I Introduction	1
1.1 Nuclear Receptor	1
1.1.1 Overview of Nuclear Receptor	1
1.1.2 Classification of Nuclear Receptor	2
1.1.3 Structure and Functtion of Nuclear Receptor	2
1.2 Retinoid X Receptors (RXRs)	3
1.2.1 Overview of RXRs.....	3
1.2.2 Structure of RXR α	4
1.2.3 Function of RXR α	5
1.3 Research progress of RXRs modulators	6
1.3.1 Natural Ligands of RXRs.....	6
1.3.2 Synthetic Ligands of RXRs	7
1.4 Virtual Screening based on Molecular Docking.....	8
1.4.1 Brief Introduction of Molecular Docking	8
1.4.2 Brief Introduction of Drugbank Library	9
1.5 Aim and Significance	10
Chapter II Method and Result analysis of Virtual Screening	12
2.1 Research Programme	12
2.2 Method of Molecular Docking	13
2.2.1 Ligand Preperation.....	13
2.2.2 Protein Preperation.....	13
2.2.3 Docking parameter Setting	13
2.2.4 Ligand Docking	14

2.3 Result Analysis	14
2.4 Conclusion	17
Chapter III Biological activity evaluation and molecular dynamics simulation of selected compounds	19
3.1 Experimental Instruments and Reagents	19
3.1.1 Experimental Instruments	19
3.1.2 Experimental Reagents	20
3.1.3 Experimental Solution	20
3.2 Transcriptional activity of RXR α for selected compounds	20
3.2.1 Reporter gene system	20
3.2.2 Screening of selective agonists and antagonists of RXR α	21
3.2.3 Concentration dependent test of selected compounds	22
3.2.4 Specificity test of selected compounds	23
3.3 The Surface Plasma Resonance experiment.....	24
3.4 Molecular dynamics simulation	25
3.4.1 Molecular docking simulation	25
3.4.2 Molecular dynamics simulation	27
3.5 Conclusion	28
Chapter IV Synthesis and biological activity evaluation of Pitavastatin calcium derivatives	30
4.1 Synthesis of Pitavastatin derivatives	30
4.1.1 Sythetic route of Pitavastatin derivatives.....	30
4.1.2 Characterization of Pitavastatin derivatives.....	31
4.2 Biological activity research of Pitavastatin derivatives	32
4.2.1 The transcriptional activity of RXR α for Pitavastatin derivatives.....	32
4.2.2 Binding studies between RXR α and Pitavastatin derivatives.....	33
4.3 Result and Discussion	34
Chapter V Methodology research of Bisindolylmethanes.....	35

5.1 Background	35
5.1.1 Indole compounds	35
5.1.2 Carbocationic compounds.....	36
5.2 Design of research method	37
5.3 Bisindolymethanes salt-forming synthesis exploration	38
5.3.1 Experimental Instruments and reagents	38
5.3.2 Reaction conditions exploration	40
5.3.3 Purification methods of Bisindolymethanes salt-forming	45
5.3.4 Characterization of Bisindolymethanes salt-forming	47
5.4 Conclusion	52
Chapter VI Summary and Prospect.....	54
6.1 The project of Virtual Screening	54
6.2 The project of Bisindolymethanes salt-forming synthesis.....	55
Reference.....	57
Appendix I ¹H-NMR ¹³C-NMR HRMS spectra of Pitavastatin calcium derivatives	63
Appendix II ¹H-NMR ¹³C-NMR HPLC spectra of Bisindoles	68
Published papers	77
Acknowledgement.....	78

缩略词

英文缩写	英文全名	中文名称
NR	Nuclear Receptor	核受体
RXR	Retinoid X Receptor	类视黄醇 X 受体
9- <i>cis</i> -RA	9- <i>cis</i> retinoic acid	9-顺视黄酸
DBD	DNA binding domain	DNA 结合域
GR	Glucocorticoid Receptor	糖皮质激素受体
MR	Mineralocorticoid Receptor	盐皮质激素受体
LBD	Ligand binding domain	配体结合域
AR	Androgen Receptor	雄激素受体
ER	Estrogen Receptor	雌激素受体
PR	Progesterone Receptor	孕激素受体
TR	Thyroid-hormone Receptor	甲状腺激素受体
RAR	Retinoic Acid Receptor	视黄酸受体
PPAR	Peroxisome proliferators-activated Receptor	过氧化物酶体增殖物激活受体
VDR	Vitamin D Receptor	维生素 D 受体
NMR	Nuclear magnetic resonance	核磁共振
DHA	Docosahexaenoic acid	二十二碳六烯酸
HRMS	High-resolution mass spectrometer	高分辨质谱
VS	Virtual Screening	虚拟筛选
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	高效液相
HTS	High throughput screening	高通量筛选
TLC	Thin layer chromatography	薄层色谱
Hex	Hexane	正己烷
EA	Ethyl acetate	乙酸乙酯

摘要

核受体 RXR α 作为配体依赖性转录调节因子, 参与调控细胞生长、分化等重要生理过程, 目前, 寻找核受体 RXR α 的新型配体已成为靶点药物开发的一个重要研究方向。

计算机虚拟筛选方法, 可以缩短药物研发的周期, 提高先导化合物的发现效率, 现已成为药物研发的重要手段。本课题对 Drugbank (2.0) 老药库进行虚拟筛选, 一方面是因为已有舒林酸这个老药新用的成功先例, 另一方面是因为老药有着开发周期短、安全性高、成本低等优点。

本课题以核受体 RXR α 为靶点蛋白, 首先, 通过计算机虚拟筛选的方法从 Drugbank (2.0) 老药库中得到了排名靠前的 24 个化合物, 并且购买了其中 15 个老药并对其进行生物活性评价, 通过报告基因实验筛选出了核受体 RXR α 的 2 个拮抗剂, 分别为匹伐他汀钙 (1), 氟伐他汀钠 (4) 和 2 个激动剂, 分别为多潘立酮 (12), 马来酸罗格列酮 (13)。其次, 对上述四个化合物与 RXR α -LBD 的结合方式作了进一步的研究, BIAcore 实验结果表明这四个化合物均能够与 RXR α -LBD 结合, 其中匹伐他汀钙 $K_D = 13.30 \mu\text{M}$, 氟伐他汀钠 $K_D = 11.04 \mu\text{M}$, 多潘立酮 $K_D = 8.80 \mu\text{M}$, 马来酸罗格列酮 $K_D = 15.01 \mu\text{M}$ 。最后, 我们以匹伐他汀钙为先导化合物对其进行了结构改造获得 3 个衍生物 (化合物 25, 26, 27), 而且对衍生物的生物活性通过报告基因和 BIAcore 实验作了进一步的评估, 结果表明匹伐他汀钙上的羧基是其与核受体 RXR α -LBD 结合而发挥转录抑制作用的必须基团, 而侧链羟基则影响不大。

对于双吡啶甲烷类成盐化合物, 目前尚未有合成研究报道, 首先我们利用 HPLC 对反应产率进行定量, 确立了一个最佳的反应条件, 即: 原料与 PDC 当量比为 1:1.4, 原料与甲基磺酸当量比为 1:5, 溶剂为甲醇, 反应时间为 24 h, 该条件下原料 (XS-0150) 几乎反应完全, 成盐产物 (XS-0170) 产率达到 87.66%; 其次我们采用阳离子交换树脂的方法分离纯化成盐后化合物, 使分离产率达到 76.03%, 也拓展了阳离子交换树脂的新用途; 最后运用上述方法合成了十个衍生物, 证明此方法的适用性。

关键词: RXR α ; 虚拟筛选; 双吡啶甲烷

Abstract

The Retinoid X receptor alpha(RXR α), as a ligand-dependent transcriptional, plays a very important role in many physiological processes, such as regulation of cell growth and differentiation.

Virtual screening can improve the efficiency of lead compound discovery and has become one of useful means for drug development. This project use Drugbank(2.0) because of old drugs' Low cost and Proven safety.

In this project, 24 compounds were obtained from the DrugBank library through virtual screening, and 15 old drugs were purchased for testing their bioactivities. According to the reporter assay, we got two RXR α agonists: Domperidone(12), Rosiglitazone maleate(13), and two RXR α antagonists: Pitavastatin(1), Fluvastatin(4). The surface plasma resonance experiment was conducted, each compound can bind with RXR α -LBD well. The K_D for these compounds binding to RXR α -LBD as follow: Pitavastatin(1) $K_D = 13.30 \mu\text{M}$, Fluvastatin(4) $K_D = 11.04 \mu\text{M}$, Domperidone(12) $K_D = 8.80 \mu\text{M}$, Rosiglitazone maleate(13) $K_D = 15.01 \mu\text{M}$. Finally, 3 derivatives (compounds 25, 26, 27) of Pitavastatin(1) were obtained. The biological activity of derivatives was evaluated by reporter assay and BIAcore. The results showed that the carboxyl group on Pitavastatin was the necessary group to play its transcriptional repression activity, while the hydroxyl groups exhibit little effect.

For the bisindolylmethanes project, Firstly, we established the HPLC quantitative method to optimize the reaction conditions. While the equivalent ratio of reactant(XS-0150) and PDC is 1: 1.4, the equivalent ratio of reactant(XS-0150) and methanesulfonic acid is 1:5, methanol as solvent, the reaction time is 24 h, we obtained the highest yield of 87.66% (XS-0170). Then, we use the cation exchange resin to purify the product and made the separation yield reached 76.03%. Finally, using this new method, 10 salt form of bisindolylmethane derivatives were synthesized, which indicated that this new method can be applied in this kind of reaction widely.

Key words: RXR α ; Virtual Screening; Bisindolylmethane

第一章 绪论

1.1 核受体

1.1.1 核受体概述

核受体 (Nuclear Receptor) 作为一类作为配体依赖的转录调节因子, 广泛分布于生物体胞浆及细胞核内。核受体的发现在内分泌学以及脂溶性激素作用机制上有其历史根源, 最初的生物学实验表明细胞内受体的存在, 而类固醇、甲状腺激素以及维生素 A 和 D 等脂溶性激素在穿透细胞膜而进入到细胞内后会导致特定组织靶基因的激活。直到 1985 年, 第一个类固醇受体 cDNAs (互补 DNA) 即糖皮质激素受体才被分离出来 (图 1) [1-3], 这在核受体发展史上有着里程碑式的意义, 在此之后, 人们对核受体的研究也才更加深入, 为后续核受体爆炸式的发展奠定了基础。核受体能够直接与 DNA 结合并调节相邻靶基因的表达[4,5], 并且这种调控通常仅在配体存在的条件下发生, 具体来说也就是配体与核受体结合导致构象发生改变, 进而激活核受体, 导致基因表达的上调或下调, 正是由于核受体的这种基因调控作用使得其在胚胎发育、细胞分化以及等方面发挥着重要作用, 这使得部分核受体成为治疗许多疾病药物开发的重要靶点[6]。

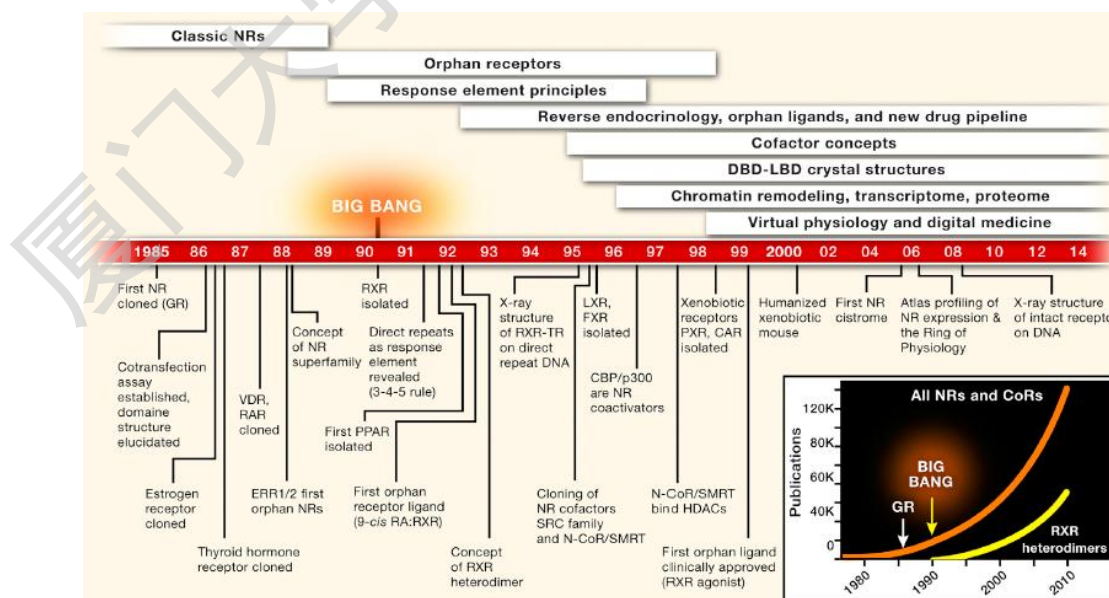


图 1 核受体发展时间表^[3]

1.1.2 核受体分类

目前, 已被发现的人类核受体有 48 种^[7], 根据其配体可分为三大类, 第一类是类固醇激素受体, 包括糖皮质激素受体 (Glucocorticoid Receptor, GR)、盐皮质激素 (Mineralocorticoid Receptor, MR) 受体以及雄激素受体 (Androgen Receptor, AR)、雌激素受体 (Estrogen Receptor, ER)、孕激素受体 (Progesterone Receptor, PR) 等性激素受体, 此类核受体主要通过形成同源二聚体而发挥作用; 第二类是非类固醇激素受体, 主要包括甲状腺激素受体 (Thyroid-hormone Receptor, TR)、视黄酸受体 (Retinoic Acid Receptor, RAR)、类视黄醇 X 受体 (Retinoid X Receptor, RXR)、过氧化物酶体增殖物激活受体 (Peroxisome proliferators-activated Receptors, PPARs) 以及维生素 D 受体 (Vitamin D Receptor, VDR) 等, 该类核受体通常与类视黄醇 X 受体 (RXRs) 形成异源二聚体后发挥转录调节活性; 第三类即为至今尚未发现其内源性配体的一类核受体, 被称为孤儿核受体, 如 Nur77 (TR3), NOR1 等。

1.1.3 核受体结构与功能

随着对核受体研究的不断深入, 许多核受体的结构逐步被解析出来, 除一些特殊的核受体外, 大多数核受体的分子量在 50000 到 100000 Da 之间, 并且包含以下五个结构功能区^[8]: A/B、C、D、E 和 F (图 2)。其中 A/B 功能区为 N-末端调节结构域, 在不同的核受体中 A/B 功能区序列存在高度的可变性。此外, 该结构域还包含一个功能独立于配体的转录激活域 (AF-1)^[9], AF-1 的转录激活作用通常非常弱, 但它与存在于 E 结构域中的 AF-2 协同作用时可以稳健地上调基因表达; A/B 结构域后的 C 功能区是一个高度保守的 DNA 结合区域 (DNA binding domain, DBD), 包含两个锌指结构, 主要负责与 DNA 上的响应元件结合; D 结构域为连接 DBD 和 LBD 的柔性铰链区, 包含核定位的信息; E 区为配体结合区 (Ligand binding domain, LBD), 该结构域相对较为保守, 由一系列的 α -螺旋和 β -折叠组成类似于三明治的结构^[10], 包含一个配体依赖的转录激活域 (AF-2), 其主要功能是识别核受体特异性配体并与之结合, 进而发生构象改变, 形成同源或异源二聚体发挥转录调控作用, 最终导致机体发生一系列生理功能的改变; 此外, 部分核受体 E 功能区后还存在一个 F 区, 为 C-末端调节结构域, 不同的核受体该区域序列存在高度可变性。

Structural Organization of Nuclear Receptors

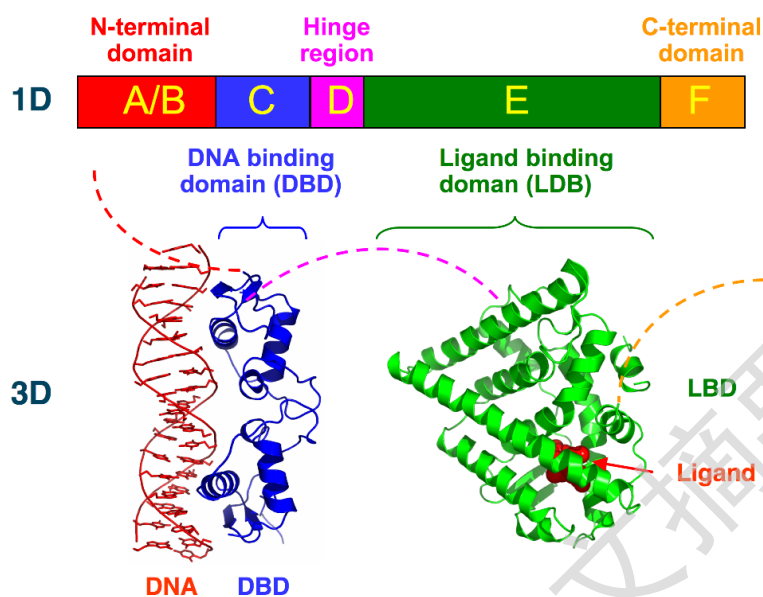


图 2 核受体结构示意图^[11]

1.2 类视黄醇 X 受体(RXR_s)

1.2.1 核受体 RXR_s 概述

类视黄醇 X 受体 (Retinoid X Receptors, RXR_s, NR2B1-3) 作为配体依赖性的转录因子, 在核受体超家族中占据这中心位置^[3]。目前发现, 它有三个亚型: RXR α , RXR β , RXR γ ^[12], 且它们的分布具有组织的特异性, 如 RXR α 在皮肤组织中具有广泛的分布, 同时也在肝, 肺, 肌肉, 肾脏, 上皮组织以及肠等中高度表达。在生理和病理条件下, 核受体 RXR_s 有着多效性功能, 一方面体现为核受体 RXR_s 参与调控很多的生理过程, 如生长发育, 细胞分化, 体内物质平衡与代谢以及细胞存活与凋亡等^[13]。另一方面, 核受体 RXR_s 一旦出现表达异常或者发生功能障碍, 就会导致诸如血脂异常 (dyslipidemia), 2 型糖尿病 (type 2 diabetes), 癌症 (cancer), 自身免疫性疾病 (autoimmune), 过敏症 (allergy) 以及阿尔兹海默症 (Alzheimer's disease) 等众多严重疾病的产生^[14-19]。因此, 寻找核受体 RXR_s 的新型配体也成为当今靶点药物开发的一个重要研究方向。

1.2.2 核受体 RXR α 的结构

核受体 RXR α , 也称为 NR2B1, 全长 462 个氨基酸, 总分子量为 50811 Da。作为核受体超家族的一员, 与其他核受体一样拥有模块化的结构特征, 主要由以下几部分组成: N-端氨基酸编码为 1-134 的 A/B 结构域, 包含一个转录激活域 AF-1^[20]; C 区氨基酸编码为 135-200 的 DNA 结合区域 (DBD), 它包含两个锌指结构 (135-155, 171-195), 主要负责跟 DNA 上的响应元件 (response element) 结合^[21]; D 区是氨基酸编码为 201-224 的绞链区域, 主要负责连接 DBD 及 LBD 结构域; E 区则为 C-端氨基酸编码为 225-462 的配体结合区域^[22], 包含一个配体依赖的转录激活区 AF-2, 区别与其他核受体, RXR α 没有 F 区。目前, 全长的 RXR α 的晶体结构尚处于未知状态, 但 LBD 以及 DBD 结构域的三维结构已经解析出来, 其中, 以配体结合区域的结构解析最为清楚。当核受体 RXR α 分别与激动剂或拮抗剂以离子键、氢键、范德华力、静电力及疏水作用力等结合时, 其 LBD 区相应地产生两种不同的构象 (图 3)。在核受体 RXR α 的 LBD 结构域中, α -螺旋 H3, H5, H7, H11 以及一个 β -折叠共同形成了其配体结合口袋 (Ligand binding pocket, LBP)^[23], 当环境中有激动剂存在时, H12 回摆导致 LBP 构象改变并形成一个辅激活因子 (co-activator, CoA) 结合区域, 进而启动基因的转录激活功能^[24]。而当 LBP 与拮抗剂结合时, 拮抗剂会与 H12 上的氨基酸残基相互排斥, 进而导致 H12 向外部伸展, 形成核受体 RXR α -LBD 的拮抗构象^[25]。

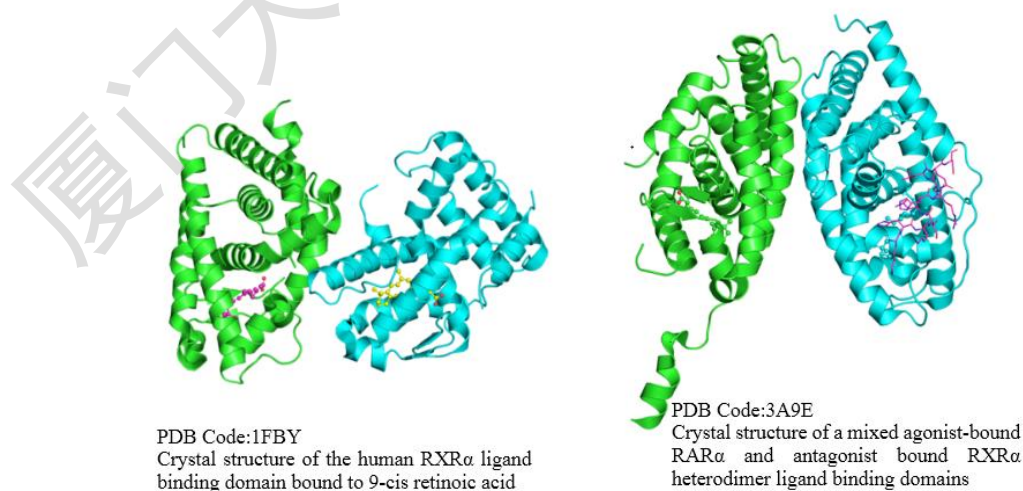


图 3 核受体 RXR α 激动构象(左)和拮抗构象(右) (引自 Protein Data Bank)

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库