

# 异吲哚啉酮类 ERK 抑制剂的设计、合成及初步生物活性研究

张灵芝<sup>1</sup>, 鞠秋荣<sup>2</sup>, 管哲<sup>3</sup>, 朱启华<sup>2</sup>, 张婷婷<sup>1</sup>, 杨诗勤<sup>1</sup>, 徐云根<sup>2</sup>

(1. 苏州健雄职业技术学院生物医药学院, 苏州 215411;

2. 中国药科大学药物化学系, 南京 210009; 3. 信达生物制药(苏州)有限公司, 苏州 215123)

**摘要** 以 ERK 抑制剂 EK-I-22 和 MK-8353 为先导化合物, 利用药效团融合策略, 设计合成了 14 个异吲哚啉酮类目标化合物. 初步的药理活性测试结果显示, 化合物 19a( $IC_{50}=16$  nmol/L), 19b( $IC_{50}=15$  nmol/L), 19e( $IC_{50}=20$  nmol/L), 27a( $IC_{50}=19$  nmol/L) 和 27b( $IC_{50}=56$  nmol/L) 对 ERK2 激酶具有较好的抑制活性, 其中化合物 27b 对 4 种人肿瘤细胞(Colo-205, A375, A2058 和 HT-29)均具有一定的抑制活性.

**关键词** MAPK 信号通路; ERK 抑制剂; 合成; 抗肿瘤活性

中图分类号 O626.4 文献标志码 A doi: 10.7503/cjcu20250123

## Design, Synthesis and Biological Evaluation of ERK Inhibitors with Isoindolin-1-one Structure

ZHANG Lingzhi<sup>1\*</sup>, JU Qiuqiong<sup>2</sup>, GUAN Zhe<sup>3</sup>, ZHU Qihua<sup>2</sup>,  
ZHANG Tingting<sup>1</sup>, YANG Shiqin<sup>1</sup>, XU Yungen<sup>2</sup>

(1. College of Biopharmacy, Suzhou Chien-Shiung Institute of Technology, Suzhou 215411, China;

2. Department of Medical Chemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China;

3. Innovent Biologics(Suzhou) Co. Ltd., Suzhou 215123, China)

**Abstract** Using the ERK inhibitor EK-I-22 and MK-8353 as the lead compounds, 14 compounds were designed and synthesized by pharmacophore fusion strategy. Preliminary pharmacological activity assessments revealed that compounds 19a ( $IC_{50}=16$  nmol/L), 19b ( $IC_{50}=15$  nmol/L), 19e ( $IC_{50}=20$  nmol/L), 27a ( $IC_{50}=19$  nmol/L) and 27b ( $IC_{50}=56$  nmol/L) exhibited significant inhibitory activity against ERK2 kinase. Notably, compound 27b demonstrated moderate inhibitory effects against four human tumor cell lines (Colo-205, A375, A2058 and HT-29).

**Keywords** MAPK pathway; ERK inhibitors; Synthesis; Antitumor activity

丝裂原活化蛋白激酶(Mitogen-activated protein kinases, MAPKs)信号转导通路是将细胞表面信号转导至细胞核的重要信号通路, 该通路通过影响动物细胞内基因的转录和调控, 从而引起细胞增殖、分化、转化及凋亡等生物学反应<sup>[1,2]</sup>. 在已发现的 5 条 MAPKs 信号通路中, RAS-RAF-MEK-ERK 信号转导通路(ERK 通路)是负责放大和调控有丝分裂信号的蛋白激酶级联反应通路, 其可被多种有丝分裂原或其它细胞外来源(如生长因子、胰岛素、渗透压和细胞因子等)激活<sup>[3,4]</sup>. RAS-RAF-MEK-ERK 级联信号转导通路在多种肿瘤细胞中处于激活状态, 已经成为癌症治疗的一大热点<sup>[5-8]</sup>. 但在临床使用中, 上

收稿日期: 2025-04-25. 网络首发日期: 2025-06-25.

联系人简介: 张灵芝, 女, 博士, 讲师, 主要从事新药分子的设计与合成及药物合成新工艺方面的研究. E-mail: zhanglingzhi@cpu.edu.cn

基金项目: 2023 年度省高校基础科学(自然科学)研究项目(批准号: 23KJB350008)和 2024 年度太仓市基础研究计划面上项目(批准号: TC2024JC21)资助.

Supported by the Natural Science Foundation of the Jiangsu Higher Education Institutions of China(No.23KJB350008) and the Taicang Research Foundation for Basic Research Plan General Project, China(No.TC2024JC21).

激酶抑制剂会产生严重的耐药性,从而导致治疗失败<sup>[9-11]</sup>. 靶向下游关键节点细胞外信号调节激酶1/2(ERK)的抑制剂,一方面可以逆转因抑制上游靶点而引起的获得性耐药;另一方面,相较于MAPK通路中其它上游激酶抑制剂,ERK抑制剂不易产生耐药性<sup>[10, 12, 13]</sup>. 因此,设计选择性好、活性高的ERK抑制剂具有更大的临床潜力和前景.

前文<sup>[14]</sup>得到了药理活性好且结构新颖的ERK抑制剂EK-I-22(ERK2: IC<sub>50</sub>=0.7 nmol/L). 本文在此基础上,保留EK-I-22的异吡啶酮母核A结构,利用药效团融合策略,将取代苯环替换为ERK抑制剂MK-8353(ERK2: IC<sub>50</sub>=1.7 nmol/L)的药效团侧链B结构(图1),设计合成了14个未见文献报道的目标化合物,并对其进行了ERK2激酶抑制活性评价,发现了活性良好的化合物19a, 19b, 19e, 27a和27b,并对这5个化合物进行了肿瘤细胞抑制活性测试.

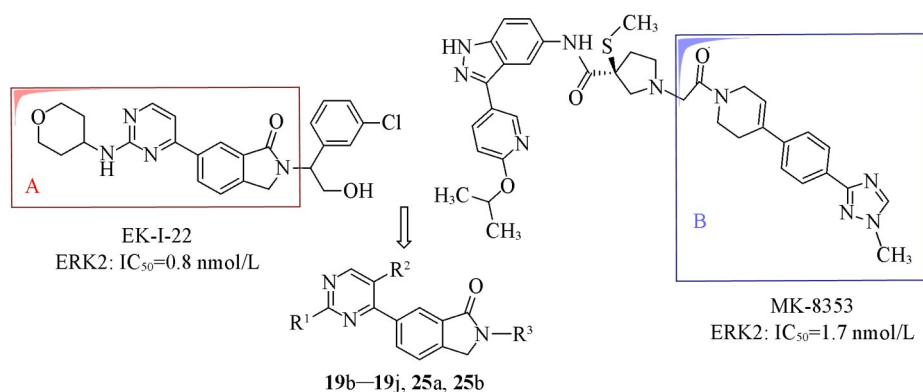


Fig. 1 Design concepts for ERK inhibitors

## 1 实验部分

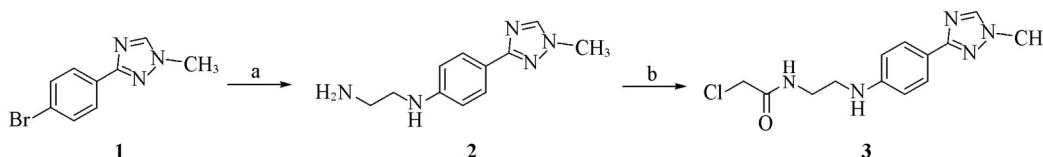
### 1.1 试剂与仪器

自制磷酸二氢钾-磷酸氢二钾缓冲液(0.1 mol/L, pH=7.4, 含3.00 mmol/L氯化镁和1.00 mmol/L EDTA); 溴化噻唑蓝四氮唑(MTT), 纯度98%, 南京生兴生物技术有限公司; 人黑色素瘤细胞A375和A2058, 人结肠癌细胞Colo-205和HT-29, 上海细胞库; 其它常用试剂均为市售分析纯试剂.

TEENSOR27型红外光谱仪, 瑞士Bruker公司; AVANCE 300M型和AVANCE AV 500型核磁共振谱仪(NMR), 瑞士Bruker公司; Waters Micros Q-TOF型高分辨质谱仪, 美国Waters公司; Molecular Devices ID5型多功能酶标仪, 美国Molecular Devices公司; LC20A型高效液相色谱仪, 日本岛津公司; HF safe 1500型连续加样器, 德国Eppendorf公司; Direct-Q with pump型超纯水仪, 美国Millopore公司.

### 1.2 实验过程

关键中间体3的合成通式见Scheme 1.

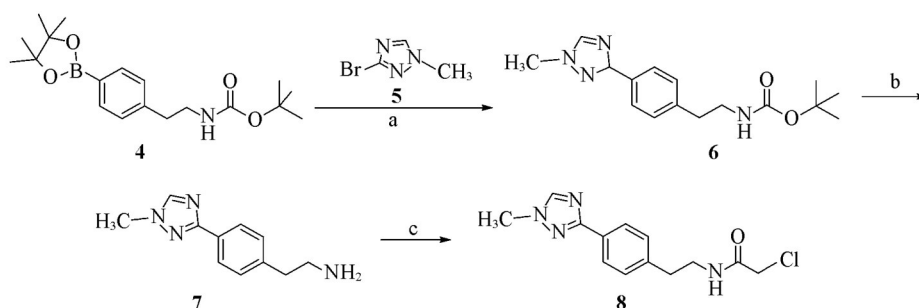


Scheme 1 Synthetic route of compound 3

Reagents and conditions: a. ethylenediamine, CuI, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 125 °C; b. Et<sub>3</sub>N, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C<sup>[15]</sup>.

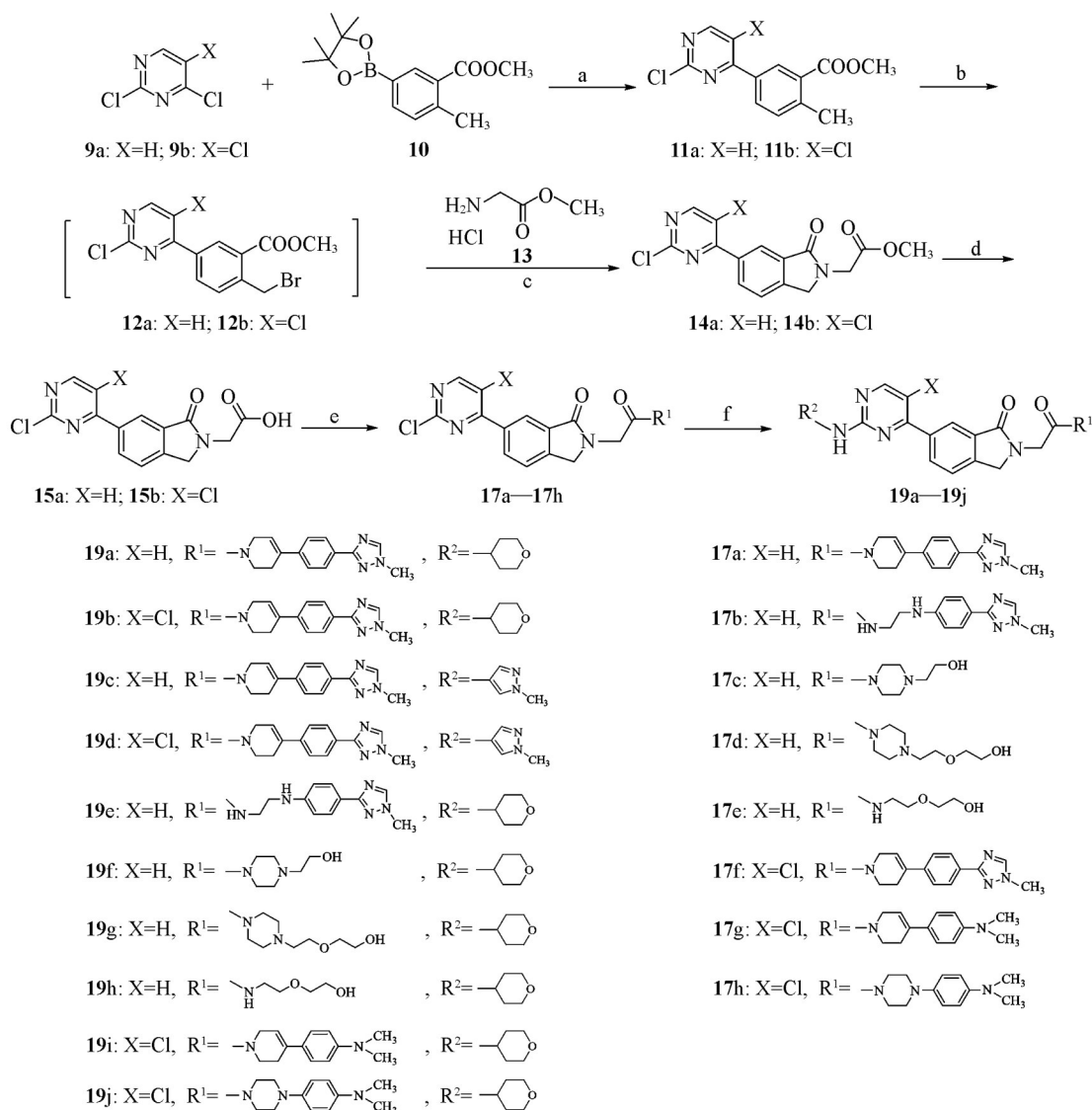
关键中间体8的合成通式见Scheme 2. 目标化合物19a~19j的合成通式见Scheme 3. 目标化合物25a和25b的合成通式见Scheme 4. 目标化合物27a和27b的合成通式见Scheme 5.

1.2.1 关键中间体2的合成 将化合物1(200 mg, 0.84 mmol)、碳酸钾(234 mg, 1.68 mmol)、碘化亚铜(8 mg, 0.042 mmol)和二乙胺(5 mL)加入到封管中, 加热至123 °C反应18 h. 用薄层色谱(TLC, 二氯甲烷/甲醇体积比10:1)监测反应完毕后, 减压蒸除溶剂, 残留物经柱层析(二氯甲烷/甲醇体积比



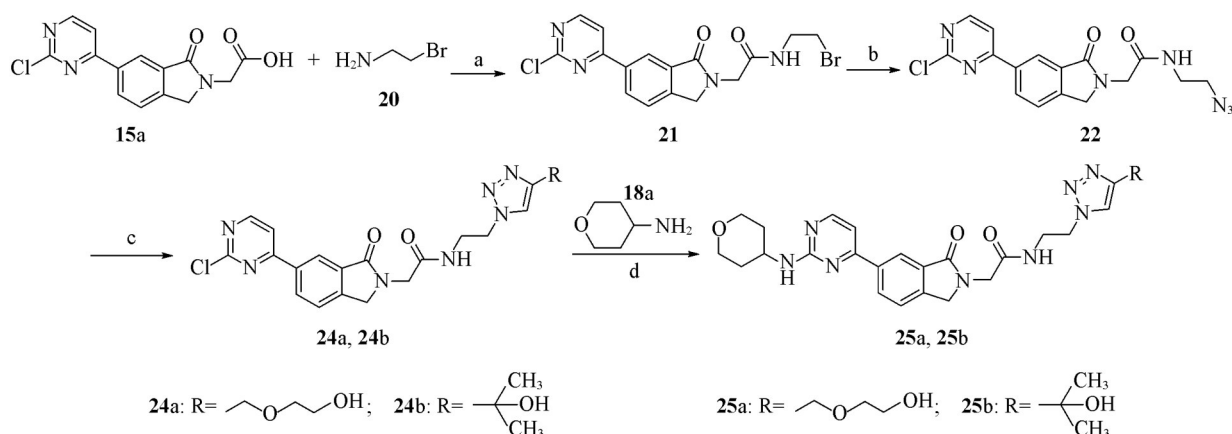
**Scheme 2** Synthetic route of compound **8**

Reagents and conditions: a. Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, dioxane/H<sub>2</sub>O, 120 °C, N<sub>2</sub><sup>[16]</sup>; b. TFA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub><sup>[17]</sup>; c. chloro acetyl chloride, Et<sub>3</sub>N, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C<sup>[15]</sup>.



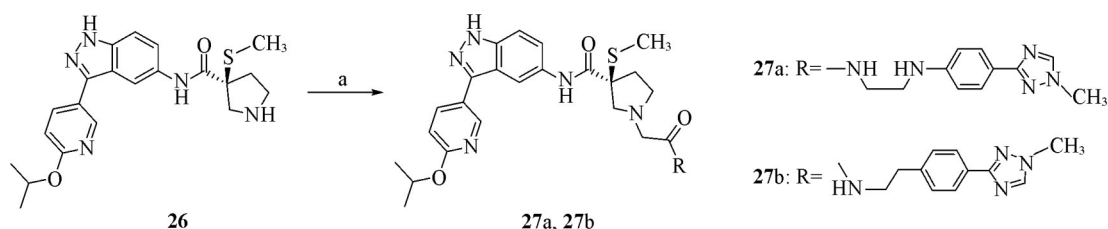
**Scheme 3** Synthetic routes of compounds **19a—19j**

Reagents and conditions: a. Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, dioxane / H<sub>2</sub>O, 90 °C, 10 h<sup>[18]</sup>; b. NBS, AIBN, benzene, 80 °C, 4 h; c. Et<sub>3</sub>N, MeCN, 85 °C, 8 h; d. LiOH·H<sub>2</sub>O, dioxane / H<sub>2</sub>O<sup>[19]</sup>; e. compound 2/2-(piperazin-1-yl)ethan-1-ol(**16a**)/2-(2-(piperazin-1-yl)ethoxy)ethan-1-ol (**16b**)/2-(2-aminoethoxy)ethan-1-ol(**16c**)/4-(4-(1-methyl-1H-1,2,4-triazol-3-yl)phenyl)-1,2,3,6-tetrahydropyridinehydrochloride(**16d**)/benzenamine, *N*-dimethyl-4-(1,2,3,6-tetrahydro-4-pyridinyl)(**16e**)/*N,N*-dimethyl-(4-piperazin-1-yl-phenyl)-amine(**16f**), EDCl, HOBT, DIEA, DCM, r. t.; f. (i) tetrahydro-2H-pyran-4-amine(**18a**), 2-butyl alcohol, 125 °C, 12 h<sup>[20]</sup> or(ii) 1-methyl-1H-pyrazol-4-amine (**18b**), DMSO, DIEA, 140 °C, 12 h.



Scheme 4 Synthetic routes of compounds 25a and 25b

Reagents and conditions: a. EDCI, HOBt, DIEA, DCM, r. t.; b.  $\text{NaN}_3$ , DMF, r. t.<sup>[21]</sup>; c. 2-(prop-2-yn-1-yloxy)ethan-1-ol(23a) or 2-methylbut-3-yn-2-ol(23b), CuI, MeCN /  $\text{H}_2\text{O}$ ; d. tetrahydro-2H-pyran-4-amine(18a), 2-butyl alcohol, 125 °C, 12 h<sup>[20]</sup>.



Scheme 5 Synthetic routes of compounds 27a and 27b

Reagents and conditions: a. compound 3 or compound 8, *i*-Pr<sub>2</sub>EtN, DMF, 50 °C.

200:1~30:1)分离,得70 mg淡黄色固体2,产率38.4%, m. p. 86.8~88.5 °C. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), δ: 8.35(s, 1H), 7.70(d, *J*=8.6 Hz, 2H), 6.61(d, *J*=8.6 Hz, 2H), 5.91(t, 1H, *J*=5.1 Hz, 1H), 3.84(s, 3H), 3.16~3.10(m, 2H), 2.80(t, *J*=6.1 Hz, 2H).

1.2.2 关键中间体 12a 的合成 将化合物 11a(10 g, 38.1 mmol)和 NBS(10.2 g, 57.11 mmol)溶于 150 mL 苯中,加入偶氮二异丁氰(1.3 g, 7.6 mmol),加热至 80 °C 反应 6 h. 用 TLC(石油醚/乙酸乙酯体积比 1:1)监测反应完毕后,冷却至室温,经浓缩得红色油状物,不经处理直接投入下一步反应. 采用相同方法合成化合物 12b.

1.2.3 关键中间体 14a 的合成 将化合物 12a(13.0 g, 38.1 mmol)、甘氨酸甲酯盐酸盐(13, 4.8 g, 38.1 mmol)和三乙胺(11.6 g, 114.21 mmol)溶于 100 mL 乙腈中,加热回流反应 6 h. 用 TLC(二氯甲烷/甲醇体积比 20:1)监测反应完毕后,减压蒸除去溶剂,残留物经柱层析(石油醚/乙酸乙酯体积比 5:1~1:1)分离,得 5.6 g 淡黄色固体 14a,产率 46.3%. 采用相同方法合成化合物 14b. 化合物 14a 和 14b 的理化数据和核磁共振数据分别列于表 1 和表 2.

1.2.4 关键中间体 17a~17h 和 21 的合成 将化合物 15a(200 mg, 0.66 mmol)、化合物 16d(159 mg, 0.66 mmol)、EDCI(154 mg, 0.80 mmol)、HOBt(108 mg, 0.80 mmol)和 DIEA(104 mg, 0.80 mmol)溶于 5 mL 二氯甲烷中,室温下搅拌反应 24 h. 用 TLC(二氯甲烷/甲醇体积比 20:1)监测反应完毕后,补加二氯甲烷(5 mL),用水洗涤(5 mL×3),将有机层干燥、过滤、减压蒸除溶剂,得到 220 mg 白色固体化合物 17a,产率 63.4%. 采用相同方法合成化合物 17b~17h 和 21. 化合物 17b~17h 和 21 的理化数据和核磁共振数据分别列于表 1 和表 2.

1.2.5 关键中间体 24a 和 24b 的合成 将化合物 22(400 mg, 1.08 mmol)和丙炔醇乙氧基化合物(23a, 132 mg, 1.32 mmol)溶于乙腈(6 mL)/水(1 mL)混合溶液中,在冰浴下缓慢分批加入碘化亚铜(48 mg, 0.24 mmol),搅拌 10 min,升温至 40 °C 反应 16 h. 用 TLC(二氯甲烷/甲醇体积比 20:1)监测反应完毕

**Table 1** Appearances and yields of compounds 11a, 11b, 14a, 14b, 15a, 15b, 17a—17h, 21, 24a, 24b

Compd.	Appearance	Yield (%)	m. p./°C	Compd.	Appearance	Yield (%)	m. p./°C
3	Yellow solid	39.4	128—130	17b	White solid	54.3	222—224
6	Yellow solid	86.2	150—152	17c	White solid	80.2	192—194
7*	Yellow solid	—	—	17d	White solid	50.5	181—183
8	White solid	37.4	130—132	17e	White solid	89.2	177—179
11a	White solid	69.4	140—142	17f	White solid	25.5	243—245
11b	White solid	95.6	129—130	17g	Yellow solid	59.3	134—136
14a	Yellow solid	46.3	182—184	17h	Yellow solid	50.8	126—128
14b	Yellow solid	78.0	113—115	21	White solid	64.7	222—224
15a	Yellow solid	81.7	>250	22	White solid	78.7	176—178
15b	White solid	40.5	209—211	24a	Yellow solid	62.8	190—192
17a	White solid	63.4	246—248	24b	Yellow solid	94.2	240—242

\* Compound 7 is directly fed into the next step without any treatment.

**Table 2** <sup>1</sup>H NMR data of compounds 11a, 11b, 14a, 14b, 15a, 15b, 17a—17h, 21, 22, 24a, 24b

Compd.	<sup>1</sup> H NMR
3	(300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ), δ: 8.00(s, 1H), 7.92(d, J=8.8 Hz, 2H), 6.67(d, J=8.7 Hz, 2H), 4.07(s, 2H), 3.93(s, 3H), 3.60(q, J=5.9 Hz, 2H), 3.39(t, J=5.8 Hz, 2H)
6	(300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ), δ: 8.08—7.95(m, 3H), 7.25(d, J=8.0 Hz, 2H), 4.78(s, 1H), 3.92(s, 3H), 3.44—3.35(m, 2H), 2.82(t, J=7.0 Hz, 2H), 1.43(s, 9H)
8	(300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ), δ: 8.10(s, 1H), 8.08(d, J=8.2 Hz, 2H), 7.34—7.31(d, J=2.0 Hz, 2H), 6.68(s, 1H), 4.07(s, 2H), 4.01(s, 3H), 3.64(q, J=6.7 Hz, 2H), 2.93(t, J=7.0 Hz, 2H)
11a	(300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ), δ: 8.65(d, J=5.3 Hz, 1H), 8.61—8.60(m, 1H), 8.16(dd, J=9.8, 1.8 Hz, 1H), 7.68(d, J=5.3 Hz, 1H), 7.41(d, J=8.1 Hz, 1H), 3.95(s, 3H), 2.68(s, 3H)
11b	(400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ), δ: 8.65(s, 1H), 8.61—8.60(d, J=2.0 Hz, 1H), 7.96(dd, J=10.0, 2.0 Hz, 1H), 7.41(d, J=8.0 Hz, 1H), 3.93(s, 3H), 2.69(s, 3H)
14a	(300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ), δ: 8.71(d, J=5.3 Hz, 1H), 8.51—8.50(m, 1H), 8.46(dd, J=9.7, 1.7 Hz, 1H), 7.76(d, J=5.3 Hz, 1H), 7.64(d, J=8.0 Hz, 1H), 4.64(s, 2H), 4.46(s, 2H), 3.80(s, 3H)
14b	(300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ), δ: 8.69(s, 1H), 8.44(s, 1H), 8.11(d, J=8.1 Hz, 1H), 7.63(d, J=8.1 Hz, 1H), 4.63(s, 2H), 4.46(s, 2H), 3.78(s, 3H)
15a	(300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ), δ: 8.84(d, J=5.3 Hz, 1H), 8.48—8.43(m, 2H), 8.30(d, J=5.3 Hz, 1H), 7.82(d, J=8.0 Hz, 1H), 4.62(s, 2H), 4.32(s, 2H)
15b	(300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ), δ: 12.98(s, 1H), 9.03(s, 1H), 8.14(s, 1H), 8.07(d, J=7.6 Hz, 1H), 7.83(d, J=8.3 Hz, 1H), 4.64(s, 2H), 4.33(s, 2H)
17a	(300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ), δ: 8.85(d, J=5.2 Hz, 1H), 8.50—8.44(m, 3H), 8.31(d, J=5.3 Hz, 1H), 7.97(d, J=8.1 Hz, 2H), 7.82(d, J=8.3 Hz, 1H), 7.57—7.53(m, 2H), 6.30—6.28(m, 1H), 4.61—4.54(m, 3H), 4.30—4.15(m, 2H), 3.93—3.91(m, 4H), 3.76—3.70(m, 2H), 2.72—2.65(m, 2H)
17b	(300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ), δ: 8.69(d, J=5.1 Hz, 1H), 8.41—8.38(m, 2H), 7.97(s, 1H), 7.78(d, J=8.5 Hz, 2H), 7.71(d, J=5.4 Hz, 1H), 7.56(d, J=8.2 Hz, 1H), 6.57(d, J=8.9 Hz, 2H), 4.54(s, 2H), 4.27(s, 2H), 3.94(s, 3H), 3.59—3.53(m, 2H), 3.40—3.35(m, 2H)
17c	(300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ), δ: 8.71(d, J=5.3 Hz, 1H), 8.52(s, 1H), 8.46(dd, J=8.0, 1.7 Hz, 1H), 7.76(d, J=5.3 Hz, 1H), 7.65(d, J=8.0 Hz, 1H), 4.70(s, 2H), 4.51(s, 2H), 3.70—3.64(m, 6H), 2.63—2.55(m, 6H)
17d	(300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ), δ: 8.71(d, J=5.3 Hz, 1H), 8.54—8.51(m, 1H), 8.45(dd, J=9.7, 1.7 Hz, 1H), 7.76(d, J=5.3 Hz, 1H), 7.64(d, J=8.4 Hz, 1H), 4.68(s, 2H), 4.50(s, 2H), 3.75—3.63(m, 10H), 2.70—2.58(m, 6H)
17e	(300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ), δ: 8.72(d, J=5.3 Hz, 1H), 8.51—8.47(m, 2H), 7.78(d, J=5.2 Hz, 1H), 7.67(d, J=7.8 Hz, 1H), 4.70(s, 2H), 4.29(s, 2H), 3.77—3.74(m, 2H), 3.59(t, J=4.6 Hz, 4H), 3.52—3.48(m, 2H)
17f	(400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ), δ: 8.70—8.67(m, 1H), 8.45—8.44(m, 1H), 8.08—8.06(m, 4H), 7.63—7.62(m, 1H), 7.46—7.44(m, 2H), 6.18—6.13(m, 1H), 4.70(s, 2H), 4.58—4.53(m, 2H), 4.28(s, 2H), 3.98(s, 3H), 3.86—3.82(m, 2H), 2.68—2.61(m, 2H)
17g	(300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ), δ: 9.05(s, 1H), 8.14(s, 1H), 8.08—8.04(m, 1H), 7.83(d, J=8.0 Hz, 1H), 7.32—7.28(m, 2H), 6.70(d, J=9.6 Hz, 2H), 6.02—6.00(m, 1H), 4.62—4.53(m, 4H), 4.24—4.10(m, 2H), 3.71—3.69(m, 2H), 2.90(s, 6H), 2.60—2.56(m, 2H)
17h	(300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ), δ: 9.05(s, 1H), 8.14(s, 1H), 8.07(dd, J=8.0, 1.6 Hz, 1H), 7.83(d, J=8.4 Hz, 1H), 6.91—6.84(m, 2H), 6.74—6.68(m, 2H), 4.61(s, 2H), 4.55(s, 2H), 3.66—3.49(m, 8H), 2.80(s, 6H)
21	(300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> -D <sub>2</sub> O), δ: 8.86(d, J=5.3 Hz, 1H, ArH), 8.50—8.43(m, 2H, ArH), 8.22(d, J=6.2 Hz, 1H, ArH), 7.87(d, J=7.7 Hz, 1H, ArH), 4.68(s, 2H, CONCH <sub>2</sub> ), 4.51(s, 2H, CONCH <sub>2</sub> ), 4.35—4.32(m, 2H, NHCH <sub>2</sub> ), 3.15(t, J=5.1 Hz, 2H, CH <sub>2</sub> Br)

Continued

Compd.	<sup>1</sup> H NMR
22	(300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ), δ: 8.72(d, <i>J</i> =5.3 Hz, 1H), 8.52(s, 1H), 8.46(dd, <i>J</i> =8.0, 1.6 Hz, 1H), 7.75(d, <i>J</i> =5.2 Hz, 1H), 7.66(d, <i>J</i> =8.2 Hz, 1H), 6.64(s, 1H), 4.68(s, 2H), 4.33(s, 2H), 3.52—3.44(m, 4H).
24a	(300 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ), δ: 8.85(d, <i>J</i> =5.3 Hz, 1H), 8.48(s, 1H), 8.45(dd, <i>J</i> =8.0, 1.6 Hz, 1H), 8.30(d, <i>J</i> =5.3 Hz, 1H), 8.28—8.26(m, 1H), 8.06(s, 1H), 7.80(d, <i>J</i> =8.1 Hz, 1H), 4.55(s, 2H), 4.51(s, 2H), 4.43(t, <i>J</i> =5.8 Hz, 2H), 4.16(s, 2H), 3.53—3.46(m, 6H)
24b	(300 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ), δ: 8.85(d, <i>J</i> =5.7 Hz, 1H), 8.48(s, 1H), 8.45(dd, <i>J</i> =7.9, 1.6 Hz, 1H), 8.30—8.26(m, 2H), 7.84(s, 1H), 7.79(d, <i>J</i> =8.0 Hz, 1H), 5.02(s, 1H), 4.55(s, 2H), 4.39(t, <i>J</i> =6.1 Hz, 2H), 4.17(s, 2H), 3.53—3.46(m, 2H), 1.45(s, 6H)

后, 减压蒸馏除去溶剂, 残留物经柱层析(二氯甲烷/甲醇体积比 100:1~20:1)分离, 得到 320 mg 黄色固体化合物 24a, 产率 62.8%。采用相同方法合成化合物 24b。化合物 24a 和 24b 的理化数据和核磁共振数据分别列于表 1 和表 2。

1.2.6 目标化合物 19a~19j, 25a 和 25b 的合成 参照文献[20]方法, 将化合物 17a (100 mg, 0.19 mmol)、4-氨基四氢吡喃(18a, 39 mg, 0.38 mmol)和 DIEA (50 mg, 0.38 mmol)溶于 3 mL 仲丁醇中, 封管加热至 125 °C 反应 12 h。用 TLC(二氯甲烷/甲醇体积比 30:1)监测反应完毕后, 冷却至室温, 减压蒸干溶剂, 经柱层析(二氯甲烷/甲醇体积比 200:1~40:1)分离, 得到 20 mg 白色固体化合物 19a, 产率 17.8%, *m. p.* >250 °C。采用相同方法合成化合物 19b~19j, 25a 和 25b。化合物 19a~19j, 25a 和 25b 的理化数据和核磁共振数据分别列于表 3 和表 4。

Table 3 Appearances, melting points, yields and HRMS data of compounds 19a—19j, 25a, 25b, 27a and 27b

Compd.	Appearance	<i>m. p.</i> /°C	Yield (%)	HRMS (calcd.), <i>m/z</i> [ <i>M</i> + <i>H</i> ] <sup>+</sup>
19a	White solid	>250	17.8	591.2832(591.2833)
19b	White solid	254—256	58.6	625.2437(625.2431)
19c	Yellow solid	>250	46.7	587.2626(587.2622)
19d	Yellow solid	279—281	68.4	621.2236(621.2247)
19e	White solid	219—221	61.7	568.2784(568.2784)
19f	Yellow solid	170—172	48.6	481.2563(481.2555)
19g	White solid	139—141	44.5	525.2825(525.2828)
19h	White solid	188—190	59.1	456.2247(456.2234)
19i	White solid	215—217	65.3	587.2532(587.2530)
19j	White solid	222—224	77.2	612.2460(612.2441)
25a	Yellow solid	100—102	85.1	537.2574(537.2571)
25b	White solid	118—120	90.2	521.2625(521.2617)
27a	White solid	139—141	52.9	669.3078(669.3085)
27b	White solid	140—142	41.2	654.2969(654.2977)

Table 4 <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR data of compounds 19a—19j, 25a, 25b, 27a and 27b

Compd.	<sup>1</sup> H NMR	<sup>13</sup> C NMR
19a	(300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ), δ: 8.50(s, 1H), 8.38(d, <i>J</i> =5.3 Hz, 1H), 8.30(dd, <i>J</i> =8.1, 1.7 Hz, 1H), 8.11—8.08(m, 3H), 7.59(d, <i>J</i> =8.0 Hz, 1H), 7.49—7.44(m, 2H), 7.08(d, <i>J</i> =5.3 Hz, 1H), 6.20—6.15(m, 1H), 5.26(d, <i>J</i> =8.4 Hz, 1H), 4.69(s, 2H), 4.60(s, 1H), 4.55(s, 1H), 4.31—4.30(m, 2H), 4.23—4.19(m, 1H), 4.07—4.0(m, 5H), 3.90—3.82(m, 2H), 3.66—3.58(m, 2H), 2.69—2.64(m, 2H), 2.15—2.11(m, 2H), 1.63—1.58(m, 2H)	(75 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ), δ: 167.99, 166.75, 166.58, 162.27, 161.27, 159.65, 146.15, 144.91, 140.60, 134.82, 134.38, 133.14, 130.31, 126.21, 125.47, 124.34, 121.72, 121.43, 121.14, 106.14, 72.75, 66.59, 60.72, 51.03, 47.21, 44.05, 36.44, 32.98, 27.33
19b	(300 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ), δ: 8.51(s, 1H), 8.44(s, 1H), 8.04—7.96(m, 4H), 7.75(d, <i>J</i> =8.4 Hz, 1H), 7.57—7.54(m, 2H), 6.29(s, 1H), 4.59—4.54(m, 4H), 4.29—4.15(m, 2H), 3.92—3.85(m, 6H), 3.76—3.73(m, 2H), 3.41—3.37(m, 2H), 2.66—2.54(m, 2H), 1.87—1.83(m, 2H), 1.55—1.51(m, 2H)	(75 MHz, acetic- <i>d</i> <sub>4</sub> ), δ: 169.74, 167.74, 160.38, 145.52, 144.50, 141.34, 135.50, 134.44, 132.86, 131.57, 128.40, 126.53, 125.14, 124.67, 122.99, 120.76, 115.97, 115.73, 104.31, 99.06, 66.06, 51.68, 47.26, 35.99, 31.92, 26.88, 19.64, 19.38, 19.12

Continued

Compd.	<sup>1</sup> H NMR	<sup>13</sup> C NMR
19c	(400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ), δ: 9.56(s, 1H), 8.52—8.40(m, 4H), 8.48(s, 1H), 7.98(d, J=8.3 Hz, 2H), 7.92(s, 1H), 7.79(d, J=8.0 Hz, 1H), 7.57(t, J=7.2 Hz, 3H), 7.42(d, J=5.2 Hz, 1H), 6.30(s, 1H), 4.61—4.55(m, 4H), 4.30(s, 1H), 4.16(s, 1H), 3.92(s, 3H), 3.83(s, 3H), 3.76—3.70(m, 2H), 2.67—2.54(m, 2H)	(75 MHz, acetic-d <sub>4</sub> ), δ: 169.65, 167.47, 160.51, 145.56, 143.16, 141.20, 140.14, 139.16, 136.38, 135.48, 134.41, 132.39, 131.43, 128.45, 126.49, 125.09, 123.97, 123.11, 121.59, 114.73, 107.02, 96.29, 90.58, 51.74, 38.06, 35.93, 35.45, 19.64, 19.38, 19.12
19d	(400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ), δ: 9.83(s, 1H), 8.58(s, 1H), 8.51(s, 1H), 8.11(s, 1H), 8.06(d, J=8.0 Hz, 1H), 7.98(d, J=8.5 Hz, 2H), 7.83—7.79(m, 2H), 7.56(dd, J=8.2, 6.2 Hz, 2H), 7.52(s, 1H), 6.30(s, 1H), 4.61—4.55(m, 4H), 4.30(s, 1H), 4.16(s, 1H), 3.92(s, 3H), 3.79—3.71(m, 5H), 2.66—2.54(m, 2H)	(75 MHz, acetic-d <sub>4</sub> ), δ: 169.76, 167.58, 159.65, 157.54, 149.08, 145.21, 144.61, 141.60, 134.40, 132.93, 131.68, 126.63, 125.18, 124.70, 123.17, 122.56, 120.93, 119.97, 116.95, 101.59, 98.04, 90.16, 86.42, 64.75, 51.73, 37.95, 36.24, 19.65, 19.38, 19.12
19e	(300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ), δ: 8.44(s, 1H), 8.38(d, J=5.3 Hz, 1H), 8.26(dd, J=7.5, 1.7 Hz, 1H), 7.99(s, 1H), 7.86(d, J=8.5 Hz, 2H), 7.52(d, J=8.2 Hz, 1H), 7.04(d, J=5.0 Hz, 1H), 6.62(d, J=8.5 Hz, 2H), 4.48(s, 1H), 4.28(s, 2H), 4.21—4.15(m, 1H), 4.06—4.02(m, 2H), 3.94(s, 3H), 3.65—3.53(m, 4H), 3.36(t, J=6.2 Hz, 2H), 2.15—2.09(m, 2H), 1.66—1.60(m, 2H)	(75 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ), δ: 168.70, 168.35, 163.20, 162.11, 162.04, 149.70, 145.42, 144.93, 137.35, 132.83, 130.49, 127.37, 124.37, 121.45, 118.97, 114.94, 112.21, 106.16, 66.58, 51.22, 47.10, 45.43, 42.29, 36.14, 32.83, 27.27
19f	(300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ), δ: 8.42(s, 1H), 8.33(d, J=5.2 Hz, 1H), 8.24(d, J=9.8 Hz, 1H), 7.53(d, J=8.9 Hz, 1H), 7.01(d, J=5.5 Hz, 1H), 5.15(d, J=6.8 Hz, 1H), 4.60(s, 2H), 4.44(s, 2H), 4.19—4.09(m, 1H), 4.01—3.97(m, 2H), 3.64—3.52(m, 8H), 2.57—2.50(m, 6H), 2.08—2.04(m, 2H), 1.84(brs, 1H), 1.63—1.52(m, 2H)	(75 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ), δ: 167.92, 166.32, 163.17, 162.27, 159.61, 144.87, 137.47, 133.10, 130.30, 124.31, 121.43, 106.14, 66.59, 60.54, 58.96, 53.63, 53.23, 50.99, 47.21, 44.59, 43.87, 41.93, 32.98(Affected by steric hindrance, the four carbon atoms in piperazine show different displacements)
19g	(300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ), δ: 8.48(s, 1H, ArH), 8.39(d, J=5.2 Hz, 1H), 8.30(dd, J=8.0, 1.7 Hz, 1H), 7.58(d, J=8.2 Hz, 1H), 7.07(d, J=6.0 Hz, 1H), 5.18(d, J=7.8 Hz, 1H), 4.65(s, 2H), 4.49(s, 2H), 4.24—4.17(m, 1H), 4.06—4.02(m, 2H), 3.75—3.58(m, 12H), 2.72—2.64(m, 6H), 2.16—2.09(m, 2H), 1.65—1.61(m, 3H)	(75 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ), δ: 167.92, 166.33, 162.27, 159.72, 144.87, 137.48, 133.11, 130.31, 124.33, 121.44, 116.58, 106.15, 72.69, 68.67, 66.59, 60.71, 57.57, 53.59, 53.18, 50.99, 47.21, 44.57, 43.88, 32.98.
19h	(300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ), δ: 8.50(s, 1H), 8.39(d, J=5.5 Hz, 1H), 8.32(dd, J=8.0, 1.7 Hz, 1H), 7.61(d, J=7.7 Hz, 1H), 7.18—7.15(m, 1H), 7.08(d, J=5.3 Hz, 1H), 5.46—5.42(m, 1H), 4.67(s, 2H), 4.29(s, 2H), 4.22—4.18(m, 1H), 4.07—4.03(m, 2H), 3.75(t, J=4.5 Hz, 2H), 3.67—3.58(m, 6H), 3.51—3.48(m, 2H), 2.16—2.10(m, 2H), 1.69—1.63(m, 3H)	(75 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ), δ: 168.34, 167.88, 163.17, 162.27, 159.64, 144.88, 137.44, 133.14, 130.29, 124.28, 121.44, 106.12, 72.58, 69.35, 66.60, 60.65, 51.08, 47.22, 45.25, 36.44, 32.97
19i	(300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ), δ: 8.45(s, 1H), 8.03(s, 1H), 7.99(d, J=6.5 Hz, 1H), 7.76(d, J=9.0 Hz, 1H), 7.63(s, 1H), 7.33—7.28(m, 2H), 6.71(d, J=9.3 Hz, 2H), 6.02—6.00(m, 1H), 4.58—4.45(m, 4H), 4.23—4.10(m, 2H), 3.90—3.85(m, 3H), 3.74—3.67(m, 4H), 2.90(s, 6H), 2.59—2.55(m, 2H), 1.88—1.82(m, 2H), 1.58—1.49(m, 2H)	(75 MHz, acetic-d <sub>4</sub> ), δ: 169.76, 163.66, 157.73, 146.51, 145.71, 144.43, 132.93, 131.53, 126.45, 124.63, 122.99, 120.45, 120.09, 115.69, 110.54, 109.86, 108.66, 98.84, 66.06, 51.64, 47.23, 45.42, 31.94, 25.79, 19.64, 19.38, 19.11
19j	(300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ), δ: 8.45(s, 1H), 8.04(s, 1H), 7.99(d, J=8.4 Hz, 1H), 7.75(d, J=7.9 Hz, 1H), 7.63(s, 1H), 6.90—6.86(m, 2H), 6.73—6.68(s, 2H), 4.56(d, J=11.9 Hz, 4H), 3.95—3.84(m, 3H), 3.63(d, J=15.9 Hz, 4H), 3.41—3.37(m, 2H), 3.05—2.96(m, 4H), 2.78(s, 6H), 1.86—1.81(m, 2H), 1.59—1.46(m, 2H)	(75 MHz, acetic-d <sub>4</sub> ), δ: 169.74, 167.59, 163.30, 144.42, 143.85, 136.64, 135.56, 135.16, 132.94, 131.48, 126.61, 124.62, 123.01, 120.62, 117.38, 110.20, 66.06, 47.24, 45.56, 31.93, 25.89, 19.65, 19.38, 19.12
25a	(300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ), δ: 8.40(s, 1H), 8.37(d, J=5.2 Hz, 1H), 8.34—8.32(m, 2H), 8.07(s, 1H), 7.71(d, J=8.0 Hz, 1H), 7.26—7.22(m, 2H), 4.55—4.51(m, 4H), 4.43(t, J=5.6 Hz, 2H), 4.15(s, 2H), 4.06—3.99(m, 1H), 3.88(d, J=12.1 Hz, 2H), 3.52—3.32(m, 9H), 1.90—1.85(m, 2H), 1.61—1.50(m, 2H)	(75 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ), δ: 168.24, 167.44, 161.73, 159.12, 151.81, 148.31, 144.41, 143.97, 132.59, 129.84, 124.17, 123.78, 120.96, 105.63, 77.24, 71.49, 66.09, 63.51, 60.12, 50.51, 48.54, 46.72, 44.89, 32.47

Continued

Compd.	<sup>1</sup> H NMR	<sup>13</sup> C NMR
25b	(300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ), δ: 8.40—8.24(m, 4H), 7.83(s, 1H), 7.70(d, J=8.1 Hz, 1H), 7.26(s, 1H), 7.26(s, 1H), 7.23(d, J=5.2 Hz, 1H), 5.01(s, 1H), 4.51(s, 2H), 4.39(t, J=5.9 Hz, 2H), 4.15(s, 2H), 4.05—3.98(m, 1H), 3.90—3.87(m, 2H), 3.54—3.37(m, 4H), 1.90—1.85(m, 2H), 1.59—1.51(m, 2H), 1.45(s, 6H)	(75 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ), δ: 167.56, 167.14, 160.75, 158.35, 155.10, 154.71, 143.63, 136.03, 131.47, 129.23, 123.04, 120.10, 104.90, 99.87, 66.26, 65.29, 49.86, 47.58, 45.82, 44.07, 31.52, 29.54, 21.84
27a	(300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ), δ: 9.03(s, 1H), 8.13(t, J=1.3 Hz, 1H), 7.98—7.94(m, 3H), 7.89(dd, J=9.3, 2.5 Hz, 1H), 7.75(d, J=8.7 Hz, 2H), 7.44(d, J=1.3 Hz, 2H), 6.69(d, J=9.3 Hz, 1H), 6.51(d, J=8.7 Hz, 1H), 5.34(hept, J=6.8 Hz, 1H), 4.81(s, 1H), 3.89(s, 3H), 3.74—3.67(m, 2H), 3.49—3.32(m, 4H), 3.13—2.99(m, 2H), 2.843—2.53(m, 3H), 2.06—1.99(m, 4H), 1.42—1.40(m, 6H)	(75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ), δ: 172.20, 170.86, 163.17, 161.73, 149.06, 143.99, 142.20, 139.37, 138.19, 131.61, 127.51, 125.25, 121.85, 120.73, 120.59, 119.75, 113.31, 112.30, 111.49, 110.99, 63.37, 57.65, 56.97, 53.15, 46.86, 43.70, 37.28, 36.16, 22.04, 13.93
27b	(300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ), δ: 9.04(s, 1H), 8.31(s, 1H), 8.06—7.94(m, 6H), 7.55—7.45(m, 3H), 7.34(s, 1H), 6.77(d, J=9.3 Hz, 1H), 5.41(hept, J=7.4 Hz, 1H), 3.97(s, 3H), 3.69—3.62(m, 2H), 3.50—3.47(m, 1H), 3.38—3.32(m, 1H), 2.99—2.71(m, 6H), 2.68—2.64(m, 1H), 2.11(s, 3H), 2.05—2.03(m, 1H), 1.51—1.49(m, 6H)	(75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ), δ: 171.13, 170.33, 162.54, 161.78, 144.33, 141.88, 140.13, 139.21, 138.28, 131.90, 131.49, 129.18, 129.09, 126.46, 121.28, 120.71, 120.46, 113.64, 110.89, 110.81, 63.35, 58.36, 57.68, 53.56, 46.90, 40.02, 36.65, 36.28, 35.33, 22.07, 13.90

1.2.7 目标化合物 **27a** 和 **27b** 的合成 将化合物 **26** (100 mg, 0.24 mmol), 化合物 **3** (72 mg, 0.24 mmol) 和 DIEA (188 mg, 1.46 mmol) 溶于 2 mL DMF 中, 升温至 50 °C 反应 12 h. 用 TLC (二氯甲烷/甲醇体积比 20:1) 监测至反应完全, 冷却至室温, 加 6 mL 水稀释, 用乙酸乙酯萃取 (4 mL×3), 合并有机层, 加入无水硫酸钠干燥, 抽滤, 减压蒸干溶剂, 经柱层析 (二氯甲烷/甲醇体积比 200:1~40:1) 分离, 得到 86 mg 类白色固体化合物 **27a**, 产率 52.9%, m. p. 139.8~140.0 °C. 采用相同方法合成化合物 **27b**. 化合物 **27a** 和 **27b** 的理化数据和核磁共振数据分别列于表 3 和表 4.

1.2.8 ERK2 酶抑制活性实验 将 14 个目标化合物及阳性对照药 MK-8353 用 DMSO 溶解, 配制成浓度为 10 mmol/L 的母液.

激酶反应过程: (1) 配制 1×Kinase buffer. (2) 化合物浓度梯度的配制: 受试化合物测试浓度为 10 μmol/L 起始, 3 倍稀释 10 个浓度, 在 384 孔板中梯度稀释成 100 倍终浓度的 10 个不同浓度的溶液. 然后, 用 Echo550 转移 250 nL 到 384 反应板中备用. 向阴性对照孔和阳性对照孔中分别加入 250 nL 的 100% DMSO. (3) 用 1×Kinase buffer 配制 2.5 倍终浓度的激酶溶液. (4) 在化合物孔和阳性对照孔分别加入 10 μL 2.5 倍终浓度的激酶溶液; 在阴性对照孔中加入 10 μL 1×Kinase buffer. (5) 以 1000 r/min 转速离心 30 s, 振荡混合均匀后于室温孵育 10 min. (6) 用 1×Kinase buffer 配制 25/15 倍终浓度的 ATP 和 Kinase substrate 混合溶液. (7) 加入 15 μL 25/15 倍终浓度的 ATP 与底物的混合溶液, 起始反应. (8) 将 384 孔板以 1000 r/min 转速离心 30 s, 振荡混合均匀后于室温孵育 40 min. (9) 加入 30 μL 终止检测液停止激酶反应, 以 1000 r/min 转速离心 30 s, 振荡混合均匀. (10) 用 Caliper EZ Reader 读取转化率.

抑制率 (Inhibition, %) 计算公式为

$$\text{Inhibition} = \frac{(\text{Conversion}_{\text{max}} - \text{Conversion}_{\text{sample}})}{(\text{Conversion}_{\text{max}} - \text{Conversion}_{\text{min}})} \times 100\% \quad (1)$$

式中:  $\text{Conversion}_{\text{sample}}$  是测试样品的转化率;  $\text{Conversion}_{\text{min}}$  为阴性对照孔均值, 代表没有酶活孔的转化率;  $\text{Conversion}_{\text{max}}$  为阳性对照孔均值, 代表没有化合物抑制孔的转化率.

1.2.9 细胞生长抑制实验 将化合物 **19a**, **19b**, **19e**, **27a**, **27b** 和 MK-8353 分别配成浓度为 0.016, 0.049, 0.148, 0.444, 1.333, 4.00, 12 和 60 μmol/L 的溶液备用.

细胞培养: 将细胞传代培养 10~15 代, 培养条件为含有青霉素 (终浓度为 100 U/mL)、链霉素 (终浓度为 100 μg/mL)、10% FBS 的培养基 (A2058, A375: DMEM, Colo-205: RPMI-1640, HT-29: McCoy's 5A), 当细胞融合至 90% 时, 弃去旧培养基, 用 2 mL PBS 缓冲液洗涤细胞 2 次, 弃去 PBS 缓冲液后加入

2 mL 2.5 g/L Trypsin-0.53 mmol/L EDTA 混合消化液, 置于显微镜下观察约 30 s, 当细胞变圆后迅速加入 2 mL 完全培养基终止消化, 轻轻吹打, 收集细胞. 以 800 r/min 转速于 4 °C 离心 5 min, 弃去上层清液, 用完全培养基重悬细胞, 分瓶培养, 隔天换液.

MTT 实验: 将对数生长期细胞以  $1 \times 10^5$  cells/孔接种于 96 孔板中, 于 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养, 直至细胞 90% 融合后, 用无血清的培养基孵育 2 h 使细胞同步化. 随后, 弃去上层清液, 分别加入含有各种化合物 (0.016, 0.049, 0.148, 0.444, 1.333, 4.00, 12 和 60 μmol/L) 的培养基孵育 96 h; 孵育结束前 4 h, 每孔中加入 20 μL MTT 溶液 (5 mg/mL). 孵育结束后, 弃去各孔中上层清液, 每孔加入 150 μL DMSO, 置于细胞振荡仪上振荡 10 min, 待结晶物充分溶解后用酶标仪测定 OD<sub>570</sub>.

增殖抑制活性百分率 (Proliferation Inhibition, %) 计算公式为:

$$\text{Proliferation Inhibition}(\%) = (\text{OD}_s - \text{OD}_b) / (\text{OD}_c - \text{OD}_b) \times 100\% \quad (2)$$

式中: OD<sub>s</sub> 是测试样品的吸光度读数; OD<sub>b</sub> 为空白组吸光度, 代表没有细胞组的吸光度读数; OD<sub>c</sub> 为对照组吸光度, 代表没有化合物处理的正常细胞组的吸光度读数.

以药物浓度作为横坐标, 各浓度对应的增殖抑制活性百分率为纵坐标, 使用 Graphpad Prism5 做非线性回归, 计算得出化合物 IC<sub>50</sub> 值.

1.2.10 分子对接实验 参考文献 [22] 方法, 利用 Schrodinger Suites 2021 软件包中的 Protein Preparation Wizard 模块对 ERK2 (PDB ID: 6DCG) 原始晶体结构进行预处理, 移除结构中所有水分子及其它溶剂分子. 再采用 LigPrep 模块对小分子配体进行构象优化, 通过能量最小化方法处理其离子化构型及互变异构状态. 然后, 在完成受体网格生成后, 借助 Glide 模块进行分子对接计算. 对接过程中优选能量最低构象, 并最终筛选出具有特征氢键的结合模式.

## 2 结果与讨论

### 2.1 中间体及目标化合物的合成

首先, 以 2,4-二氯嘧啶类化合物和 3-(甲氧基羰基)-4-甲基苯基硼酸频哪醇酯为原料, 经 Suzuki 反应、NBS 溴代, 再与甘氨酸甲酯盐酸盐环合, 得到中间体 14; 中间体 14 经水解后, 分别与关键中间体 2, 16a~16f 缩合, 即得中间体 17a~17h; 中间体 17a~17h 与 4-氨基吗啉或 4-氨基-N-甲基吡啶在高温下发生取代反应, 即得目标化合物 19a~19j (结构见图 2).

其次, 中间体 15a 与 1-溴乙胺经缩合反应、叠氮化钠还原, 得到中间体 22; 再分别与丙炔醇乙氧基化合物 (化合物 23a) 和 3-甲基丁炔醇-3 (化合物 23b) 发生 Click 反应得到关键中间体 24; 中间体 24 与 4-氨基吗啉在高温下发生取代反应, 即得目标化合物 25a 和 25b (结构见图 2).

然后, 化合物 26 与 4-氨基吗啉在高温下发生取代反应, 即得目标化合物 27a 和 27b.

所有化合物的结构经 <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR 和 HRMS 确证.

### 2.2 对 ERK2 激酶抑制活性的筛选

初步的 ERK2 激酶抑制活性测试结果 (表 5) 显示, R<sup>1</sup> 为四氢咪唑氨基取代基的化合物 (化合物 19b) 的活性优于甲基吡啶胺取代基化合物 (化合物 19d). R<sup>2</sup> 为氯原子或氢原子时, 对 ERK2 的抑制活性影响较小. 当 R<sup>3</sup> 为芳香长链取代基时, 活性较好, 尤其末端为三氮唑芳香环时, 活性最佳 (化合物 19b 和 19j 对比); 随着长链取代基芳香性减弱, 活性逐渐降低, 改为脂肪侧链取代基 (化合物 19f 和 19g) 时, 对 ERK2 的抑制活性几乎完全丧失; 当 R<sup>3</sup> 用 N,N-二甲基氨基 (化合物 19i) 替代 1-甲基-1,2,4-三氮唑-3-基时, 或芳香侧链取代基过短时 (化合物 25a 和 25b), 对 ERK2 的抑制活性显著下降. 将阳性药 MK-8353 的左侧母核保留, 引入化合物 19e 的 R<sup>2</sup> 侧链 (化合物 27a, 结构见图 3), 或缩短后的 19e 的 R<sup>2</sup> 侧链 (化合物 27b, 结构见图 3), 产物虽有较好的抑制活性, 但仍弱于阳性药 MK-8353.

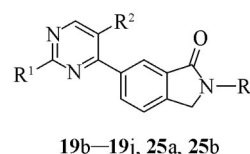


Fig. 2 Structure of compounds 19a—19j, 25a and 25b

Table 5 Inhibitory activities of compounds 19a–19j, 25a and 25b on ERK2

Compd.	R <sup>1a</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3a</sup>	ERK2 IC <sub>50</sub> /(nmol·L <sup>-1</sup> )
19a		H		16
19b		Cl		15
19c		H		97
19d		Cl		121
19e		H		20
19f				9085
19g				>10000
19h				3475
19i		Cl		96
19j				150
25a		H		2152
25b				2254
MK-8353 <sup>b</sup>	—	—	—	1.7

a. The substituents serve as key pharmacophores; b. data presented is used as a positive control.

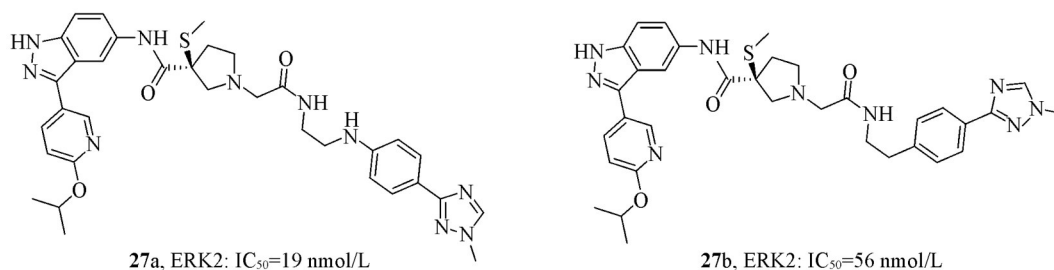


Fig. 3 Structures of compounds 27a and 27b

### 2.3 活性目标化合物的结合模式预测

挑选激酶抑制活性较好的化合物 19a 和 27a, 分别对接入 MK-8353 与 ERK2 蛋白共晶结构中(PDB ID:6DCG), 如图 4 所示, 2 个化合物均可与关键氨基酸残基 MET104, ASP106, LYS112 及 LYS52 形成活性相关氢键, 同时 R<sup>3</sup> 长链取代基, 可以很好地模拟 MK-8353 药效团侧链 B 的走向, 深入到 TYR62 与

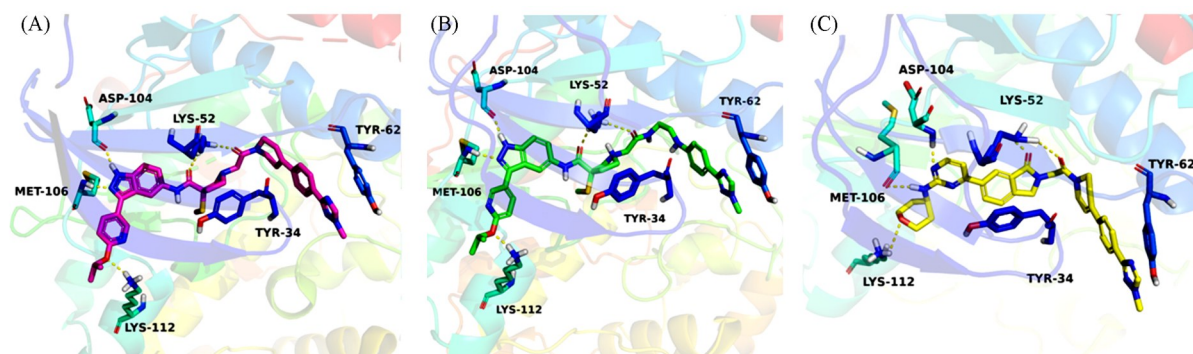


Fig. 4 X-ray crystal structure of MK-8353(A, in red) and proposed binding modes for compounds 27a(B, in green,  $IC_{50}=19$  nmol/L) and 19a(C, in yellow,  $IC_{50}=16$  nmol/L) in the active site of ERK2(PDB: 6DCG)

TYR34形成的第二口袋中,进一步验证了本研究化合物设计思路的可行性.

#### 2.4 部分活性目标化合物抗肿瘤细胞增殖的初步结果

选取对ERK2抑制活性较好的化合物19a, 19b, 19e, 27a和27b,测试了其对含有RAS-RAF-MEK-ERK突变的肿瘤细胞系人结肠癌细胞Colo-205、人黑色素瘤细胞A375、人皮肤癌细胞A2058和人结肠癌细胞HT-29的抗增殖能力.实验结果(表6)表明,化合物19a只对A375细胞的增殖具有一定的抑制活性;化合物19b对A375, A2058和COLO-205均有一定的增殖抑制作用,但对HT-29的活性较弱;化合物19e对A375和COLO-205具有一定的增殖抑制作用,对A2058的抑制作用较弱,但对HT-29的增殖抑制活性基本丧失;化合物27a对4种肿瘤细胞的增殖抑制活性均较差;化合物27b对4种肿瘤细胞均具有一定的抑制活性,其中对细胞COLO-205的增殖抑制活性为1.08  $\mu$ mol/L.

Table 6 Anti-proliferation activities of five selected compounds

Compd.	$IC_{50}^a/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$			
	A375	A2058	COLO-205	HT-29
19a	1.13±0.05	7.82±0.06	9.30±0.09	>50
19b	2.89±0.04	2.69±0.04	2.29±0.05	5.62±0.06
19e	3.29±0.01	7.22±0.03	2.82±0.04	>50
30a	>50	9.72±0.05	21.96±0.03	26.14±0.01
30b	3.04±0.03	1.73±0.04	1.08±0.05	3.16±0.04
MK-8353 <sup>b</sup>	0.04±0.04	0.04±0.03	0.01±0.05	0.57±0.06

a. Data presented are the mean±SD values of three independent determinations; b. used as a positive control.

### 3 结 论

以ERK抑制剂EK-I-22和MK-8353为先导化合物,利用药效团融合策略,设计合成了14个目标化合物.初步的药理活性测试结果表明,化合物19a( $IC_{50}=16$  nmol/L), 19b( $IC_{50}=15$  nmol/L), 19e( $IC_{50}=20$  nmol/L), 27a( $IC_{50}=19$  nmol/L)和27b( $IC_{50}=56$  nmol/L)对ERK2激酶具有较好的抑制活性.肿瘤细胞增殖抑制活性测试结果显示,化合物19b和27b对人肿瘤细胞Colo-205, A375, A2058和HT-29具有一定的增殖抑制活性.

#### 参 考 文 献

- [1] Zhang W., Liu H. T., *Cell Res.*, **2002**, *12*(1), 9—18
- [2] Raman M., Chen W., Cobb M. H., *Oncogene*, **2007**, *26*(22), 3100—3112
- [3] Lavoie H., Gagnon J., Therrien M., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2020**, *21*(10), 607—632
- [4] Guo Y. J., Pan W. W., Liu S. B., Shen Z. F., Xu Y., Hu L. L., *Exp. Ther. Med.*, **2020**, *19*(3), 1997—2007
- [5] Degirmenci U., Wang M., Hu J. C., *Cells*, **2020**, *9*(1), 198
- [6] Maik-Rachline G., Hacohen-Lev-Ran A., Seger R., *Int. J. Mol. Sci.*, **2019**, *20*(5), 1194

- [ 7 ] Liang T. T., Wang W. J., Hao S. Y., He G. C., Xu Y. G., *J. China Pharm. Univ.*, **2020**, *51*(3), 260—269(梁亭亭, 王文杰, 郝思远, 何光超, 徐云根. 中国药科大学学报, **2020**, *51*(3), 260—269)
- [ 8 ] Song Y. L., Bi Z. F., Liu Y., Qin F. R., Wei Y. Q., Wei X. W., *Genes Dis.*, **2023**, *10*(1), 76—88
- [ 9 ] Smorodinsky-Atias K., Soudah N., Engelberg D., *Cells*, **2020**, *9*(1), 129
- [ 10 ] Pan X. L., Pei J. P., Wang A. X., Shuai W., Feng L., Bu F. Q., Zhu Y. M., Zhang L., Wang G., Ouyang L., *Acta Pharm. Sin. B*, **2022**, *12*(5), 2171—2192
- [ 11 ] Timofeev O., Giron P., Lawo S., Pichler M., Noeparast M., *NPJ Precis. Oncol.*, **2024**, *8*(1), 70
- [ 12 ] Xiao H., Wang A. X., Shuai W., Qian Y. P., Wu C. Y., Wang X., Yang P. P., Sun Q., Wang G., Ouyang L., Sun Q., *Signal Transduct. Target. Ther.*, **2025**, *10*(1), 70
- [ 13 ] McCubrey J. A., Steelman L. S., Chappell W. H., Abrams S. L., Franklin R. A., Montalto G., Cervello M., Libra M., Candido S., Malaponte G., Mazzarino M. C., Fagone P., Nicoletti F., Bäsecke J., Mijatovic S., Maksimovic-Ivanic D., Milella M., Tafuri A., Chiarini F., Evangelisti C., Cocco L., Martelli A. M., *Oncotarget*, **2012**, *3*(10), 1068—1111
- [ 14 ] Ji D. Z., Zhang L. Z., Zhu Q. H., Bai Y., Wu Y. Y., Xu Y. G., *Eur. J. Med. Chem.*, **2019**, *164*, 334—341
- [ 15 ] Cevik U. A., Saglik B. N., Osmaniye D., Levent S., Cavusoglu B. K., Karaduman A. B., Atlid O., Eklioglu O. A., Kaplancikli Z. A., *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **2020**, *35*(1), 1657—1673
- [ 16 ] Giampietro N. C., Demeter D. A., Diagne A. B., Esguerra K. V. N., Heemstra R. J., Schuldt R. A., Barton T. J., Horthy L. G., Sparks T. C., Watson G. B., *Molecules Having Certain Pesticidal Utilities, and Intermediates, Compositions, and Processes Related Thereto*, WO 2021011722 A1, 2021-01-21
- [ 17 ] Boyington A. J., Seath C. P., Zearfoss A. M., Xu Z. H., Jui N. T., *J. Am. Chem. Soc.*, **2019**, *141*(9), 4147—4153
- [ 18 ] Jin B., Tao Y., Yang H. L., *Chem. Res. Chinese Universities*, **2018**, *34*(6), 912—917
- [ 19 ] Tan S., Li F., Park S., Kim S., *Org. Chem. Front.*, **2019**, *6*(23), 3854—3858
- [ 20 ] Heightman T. D., Berdini V., Braithwaite H., Buck I. M., Cassidy M., Castro J., Courtin A., Day J. E. H., East C., Fazal L., Graham B., Griffiths-Jones C. M., Lyons J. F., Martins V., Muench S., Munck J. M., Norton D., O'Reilly M., Palmer N., Pathuri P., Reader M., Rees D. C., Rich S. J., Richardson C., Saini H., Thompson N. T., Wallis N. G., Walton H., Wilsher N. E., Woolford A. J. A., Cooke M., Cousin D., Onions S., Shannon J., Watts J., Murray C. W., *J. Med. Chem.*, **2018**, *61*(11), 4978—4992
- [ 21 ] Kampmann S. S., Skelton B. W., Yeoh G. C., Abraham L. J., Lengkeek N. A., Stubbs K. A., Heath C. H., Stewart S. G., *Tetrahedron*, **2015**, *71*(42), 8140—8149
- [ 22 ] Zhang L., Chen Y. Q., Li W. H., *Chem. Res. Chinese Universities*, **2025**, *41*(1), 146—154

(Ed.: L, V, K)