新型细胞外信号相关激酶(ERK)小分子抑制剂的设计、合成与
抗肿瘤活性研究朱仲珍 乔 雨 张子豪 顾明震 王 晋
高志宇 郭文昊 刘明明 李 荣*

(安徽医科大学药学院 合肥 230032)

摘要 细胞外信号相关激酶(ERK)是恶性肿瘤发生发展中的关键激酶,为了寻找新型结构的 ERK 抑制剂,采用拼合原理设计合成了两类共 12 个含有吗啉环的脲类化合物,其结构经 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 和 HRMS 确证. ERK 激酶活力和细胞增殖测试结果表明,大部分目标化合物对人结肠癌细胞 SW480 和 HCT-116 具有中等强度的抑制作用,尤其是 1-(4-氟苄基)-3-(5-(4-吗啉代苯基)吡啶-2-基)脲(**18f**)的 IC_{50} 分别达到 0.36 和 0.55 $\mu\text{mol/L}$,对正常细胞 L02 毒性较低($>10 \mu\text{mol/L}$). 同时, **18f** 能抑制 ERK 的激酶活力($\text{IC}_{50}=0.051 \mu\text{mol/L}$)和磷酸化水平,但不影响总 ERK 表达和上游丝裂原活化的细胞外信号调节激酶(MEK)的激活. 上述结果为新型苄基吡啶基脲类 ERK 抑制剂的深入研究提供了重要参考信息.

关键词 丝裂原活化蛋白激酶(MAPKs); 细胞外信号相关激酶(ERK); 二芳基脲; 合成; 抗肿瘤活性

Design, Synthesis and Antitumor Evaluation of Novel Small Molecule
Extracellular Regulated Protein Kinase (ERK) InhibitorsZhu, Zhongzhen Qiao, Yu Zhang, Zihao Gu, Mingzhen Wang, Jin
Gao, Zhiyu Guo, Wenhao Liu, Mingming Li, Rong*
(School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Extracellular regulated protein kinase (ERK) is a key kinase in the development of cancer. 12 urea compounds containing morpholin rings were designed and synthesized in search of novel ERK inhibitors by using merging strategy. The structures of all compounds were confirmed by ^1H NMR, ^{13}C NMR and HRMS. ERK kinase activity and cell proliferation test results indicate that most of the target compounds have moderately inhibitory effects on human colorectal cancer cells SW480 and HCT-116, especially the IC_{50} of 1-(4-fluorobenzyl)-3-(5-(4-morpholinophenyl)pyridin-2-yl)urea (**18f**) reaches 0.36 and 0.55 $\mu\text{mol/L}$, respectively, and has low toxicity to normal cells L02 ($>10 \mu\text{mol/L}$). At the same time, **18f** can inhibit ERK kinase activity ($\text{IC}_{50}=0.051 \mu\text{mol/L}$) and phosphorylation level, but does not affect total ERK expression and upstream activation of mitogen-activated extracellular signal-regulated kinase (MEK) activation. These research provides important reference for the further study of novel benzylpyridylurea ERK inhibitors.

Keywords mitogen-activated protein kinases (MAPKs); extracellular regulated protein kinase (ERK); diarylurea; synthesis; antitumor activity

细胞外信号相关激酶(extracellular signal-related kinases, ERK)属于丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)家族,是真核生物中广泛存在的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶. ERK 是 RAS(鸟苷酸结合调节蛋白)-RAF(丝氨酸/苏氨酸激酶)-MEK(丝裂原活化的细胞外信号调节激酶)-ERK 信号传导途径的关键信

号分子,通过级联反应,将细胞外生长因子、丝裂原和环境刺激等信号传导至细胞核,参与调控细胞增殖、分化、迁移及粘附等一系列细胞生理学过程^[1]. 近年来的研究发现,由于 RAS 和 BRAF 的突变, RAS-RAF-MEK-ERK 信号通路在黑色素瘤、肺癌、胰腺癌和结肠直肠癌等多种肿瘤中过度激活,是促进肿瘤发生发展的主要原因

* Corresponding author. E-mail: aydlirong@163.com

Received December 23, 2019; revised April 26, 2020; published online April 30, 2020.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81972040).

国家自然科学基金(No. 81972040)资助项目.

之一。因此, 针对 RAS-RAF-MEK-ERK 信号通路研究开发的小分子抑制剂, 可能成为新型靶向抗肿瘤药物^[2,3]。虽然, 针对 BRAF、MEK 开发了多种小分子抑制剂, 但固有耐药和突变耐药的产生, 导致下游 ERK 继续激活, 限制了 BRAF、MEK 抑制剂的临床效果。由于 ERK 是该通路的下游信号分子, 针对 ERK 研究开发的小分子抑制剂, 作为单独或联合用药, 被认为可以解决耐药性问题, 已经受到各大制药公司的关注^[4-8]。已经有多种结构类型的 ERK 抑制剂被报道(图 1), 如默克公司开发的 SCH772984 (1)^[4]、基因泰克公司开发的 Ravoxertinib (GDC-0994, 2)^[5] 和礼来公司开发的 LY3214996 (3)^[6] 等已经进入临床研究阶段。此外, 针对化合物 1 分子量较大, 不符合成药性“5 规则”的缺点, 默克公司的 Lim 等^[7] 对其结构进行了简化, 开发了一类具有脲结构的 ERK 抑制剂 4, 其在体内外表现出较好的抗肿瘤活性。化合物 5 是 Heightman 等^[8] 采用基于片段

的药物设计开发的一类新型 ERK 抑制剂, 其特点是能同时抑制 ERK 的激酶活力、磷酸化水平和核转位, 被认为可以更有效地抑制 ERK 的功能, 发挥抗肿瘤作用。虽然部分 ERK 抑制剂进入临床试验, 但目前尚没有 ERK 抑制剂被批准上市。因此, 针对 ERK 研究开发结构新颖、具有抗肿瘤作用的小分子抑制剂仍然是药物化学研究领域的热点。

为了寻找新型结构的 ERK 抑制剂, 我们分别对化合物 4、5 与 ERK 激酶的结合模式进行了分析(晶体复合物 PDB 号: 5EK0 和 6G9I), 化合物 4 脲结构中的 O 原子、N 原子分别与 Lys52 和 Gln103 形成氢键; 甲基吡啶 N 原子与 Lys112 形成氢键; 化合物 5 的酰胺 O 原子与 Lys52 形成氢键, 四氢吡喃的 O 原子分别与 Lys112 和 Thr108 形成氢键。基于化合物与 ERK 的结合模式, 将化合物 4 与 3、5 的结构进行拼合(图 2), 保留化合物 4 脲的结构, 希望与 Lys52 和 Gln103 形成氢键, 同时在化

图 1 ERK 小分子抑制剂的化学结构

Figure 1 Chemical structures of small molecular ERK inhibitors

图 2 目标化合物的设计思路

Figure 2 Design of targeted compounds

合物 **4** 中引入吗啉环, 希望吗啉环的 O 原子与 Lys112 和 Thr108 形成氢键, 设计并合成了两类含有吗啉环的吡啶基苯基脲类化合物 **17a~17f** 和 **18a~18f**. 从激酶水平和细胞水平检测了目标化合物的对 ERK 激酶活力, MEK、ERK 磷酸化水平, 总 MEK、ERK 表达水平以及细胞增殖的抑制作用.

1 结果与讨论

1.1 目标化合物的合成

如 Scheme 1 所示, 4-(2-氯乙基)吗啉盐酸盐(**6**)与对溴苯酚(**7**)反应得到中间体 *N*-2-(4-溴苯氧基)乙基吗啡啉(**8**)^[9], 中间体 **8** 与联硼酸频哪醇酯在钯催化下发生 Suzuki 偶联反应, 生成 *N*-2-(4-硼酸频哪醇酯基苯氧基)乙基吗啡啉(**9**)^[10]. 不同取代的苄胺 **10** 与三光气反应生成相应的异氰酸酯类化合物 **11**, 再与正丁基锂去质子化的 5-溴-2-氨基吡啶反应生成不同取代的吡啶基苯基脲 **12a~12f**^[11], 中间体 **9** 和中间体 **12a~12f** 在无氧环境中通过钯催化的 Suzuki 偶联反应生成目标化合物 **17a~17f**. 吗啡啉(**13**)与 1,4-二溴苯(**14**)反应生成 *N*-4-溴苯基吗啡啉(**15**)^[12], 中间体 **15** 与联硼酸频哪醇酯在钯催化下发生 Suzuki 偶联反应, 生成 *N*-4-硼酸频哪醇酯基苯氧基吗啡啉(**16**)^[13]. 中间体 **16** 与中间体 **12a~12f** 经 Suzuki 偶联反应生成目标化合物 **18a~18f**^[14]. 目标化合

物的结构均经过 ¹H NMR、¹³C NMR 和 HRMS 鉴定, 结构正确.

1.2 抗细胞增殖实验

在获得目标化合物之后, 首先测试了目标化合物对人结直肠癌细胞 SW480 和 HCT-116 增殖的抑制作用, 并选择人正常肝细胞 L02 作为对照, 测试了目标化合物对正常细胞的毒性(表 1). 如表 1 所示, 大部分目标化合物对两种肿瘤细胞系具有中等强度的抑制作用, 对正常细胞 L02 的毒性较低. 当苄基苯环上有取代基时, 化合物 **18b~18f** 活性优于 **17b~17f**, 表明吗啡啉直接与吡啶基苯环相连有利于这类化合物的抗肿瘤活性. 当苄基苯环上为甲氧基(**17b** 和 **18b**)或甲基(**17c** 和 **18c**)取代时活性较差, 说明苄基苯环上有给电子基团或位阻增加可能对活性不利. 苄基苯环上有卤素取代, 特别是氟原子取代时活性较好, 4-位取代优于 3-位. 目标化合物中, 吗啡啉直接与吡啶基苯环相连的 4-位氟原子取代化合物 **18f** 活性最佳, 对 SW480 和 HCT-116 细胞的抑制作用 IC₅₀ 分别达到 0.36 和 0.55 μmol/L, 对正常细胞 L02 毒性较低(>10 μmol/L).

1.3 ERK 激酶活力抑制作用

选择对肿瘤细胞增殖具有较好抑制作用的 4 个化合物(**17a**、**17f**、**18d** 和 **18f**), 检测了化合物对 ERK 激酶活力的影响. ERK 有 ERK1 和 ERK2 两种亚型, 其同源性

Reagents and conditions: (i) K₂CO₃, DMF, 60 °C, 15 h; (ii) bis(pinacolato)diboron, PdCl₂(dppf), KOAc, DMF, 80 °C, 18 h; (iii) triphosgene, sat. NaHCO₃, DCM, 0 °C, 2.5 h; (iv) 5-bromopyridin-2-amine, *n*-BuLi, THF, r.t., 12 h; (v) Pd(AmPhos)₂Cl₂, Na₂CO₃, EtOH, H₂O, Ar, 60 °C, 3 h; (vi) potassium *tert*-butoxide, Pd₂(dba)₃, BINAP, toluene, 125 °C, 8 h

图式 1 目标化合物 **17a~17f** 和 **18a~18f** 的合成路线
Scheme 1 Synthetic route of targeted compounds **17a~17f** and **18a~18f**

表 1 目标化合物对细胞增殖和 ERK2 激酶活性的抑制作用

Table 1 Inhibitory effects of targeted compounds on cell proliferation and ERK2 kinase activities

17a ~ 17f

18a ~ 18f

Compound	R	IC ₅₀ /(μmol•L ⁻¹)			
		SW480	HCT-116	L02	ERK2
17a	H	0.42	0.81	7.24	0.092
17b	3-MeO	5.48	7.36	>10	N.D. ^a
17c	4-Me	>10	>10	>10	N.D. ^a
17d	4-Cl	6.59	8.57	9.64	N.D. ^a
17e	3-F	1.29	2.34	>10	N.D. ^a
17f	4-F	1.02	0.84	6.24	0.147
18a	H	1.37	1.28	>10	N.D. ^a
18b	3-MeO	2.38	4.69	>10	N.D. ^a
18c	4-Me	3.99	7.25	>10	N.D. ^a
18d	4-Cl	1.70	0.85	8.14	0.189
18e	3-F	1.20	1.49	>10	N.D. ^a
18f	4-F	0.36	0.55	>10	0.051
1 (SCH772984)		0.21	0.11	>10	0.008

N.D. represents not determined.

为 88%, 在激酶活性位点的氨基酸序列是保守的, 因此, 我们根据文献[7]的方法对磷酸化 ERK2(活性形式)的激酶活力进行检测。结果如表 1 所示, 四个化合物对磷酸化 ERK2 激酶活力均有不同程度的抑制作用, 与抑制细胞增殖作用一致。其中活性最好的是 **18f**, 其 IC₅₀ 达到 0.051 μmol·L⁻¹, 表明 **18f** 对 ERK2 的激酶活力具有较好的抑制作用。

1.4 化合物 18f 对 MEK、ERK 磷酸化和总 MEK、ERK 表达的影响

为了研究 **18f** 对 ERK 磷酸化水平和上游信号通路的影响, 我们用蛋白免疫印迹(western blot)检测了 MEK、ERK 的磷酸化和总 MEK、ERK 表达水平。如图 3 所示, 与阴性对照二甲基亚砜(DMSO)相比, **18f** 浓度依赖地降低了 ERK 磷酸化(*p*-ERK)水平, 抑制作用与阳性对照 **1** 作用相当, 但对 MEK 磷酸化(*p*-MEK)以及总 MEK (*t*-MEK)、ERK (*t*-ERK)表达没有影响。上述表明, 与化合物 **1** 类似, **18f** 可以同时抑制 ERK 的激酶活力和磷酸化激活, 但对上游 MEK 信号没有影响。

2 结论

针对恶性肿瘤发生发展中的关键激酶 ERK, 通过拼合原理, 设计合成了 12 个吗啡啉乙基苯取代和吗啡啉苯基取代的吡啶基苯基胍类化合物, 并进行了抑制细胞增殖和抑制 ERK 激酶活力、磷酸化的药理活性测试,

图 3 **18f** 对 MEK、ERK 磷酸化和总 MEK、ERK 表达的影响
Figure 3 Effects of **18f** on phosphorylation and total expression of ERK and MEK

初步确定了这类化合物的构效关系。其中化合物 **18f** 对肿瘤细胞增殖和 ERK 激酶活力、磷酸化作用均具有较好的抑制作用。上述研究结果为研发新型吡啶基苯基胍类 ERK 抑制剂提供了新的先导化合物, 具有重要理论研究和潜在临床应用价值。

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

柱色谱采用 combiflash 色谱系统(TELEDYNE ISCO)

Rf200)在硅胶(300~400 目)上进行色谱. 质谱采用安捷伦科技公司的 LC-TOF 型质谱仪(ESIMS)测定; 核磁共振波谱使用 Bruker 400 MHz 核磁共振仪测定, 内标四甲基硅烷(TMS), 溶剂 CDCl_3 , 所有的试剂均为市售分析纯, 使用时未进一步纯化.

3.2 化学合成

3.2.1 4-(2-(4-溴苯氧基)乙基)吗啉(8)的合成

在 250 mL 茄型瓶中加入 4-溴苯酚 **7** (30 mmol), 4-(2-氯乙基)吗啉盐酸盐 **6** (30 mmol), 碳酸钾(60 mmol) 以及 *N,N*-二甲基甲酰胺(100 mL), 60 °C 下搅拌 15 h, 冷却至室温后过滤旋干, 粗产物溶于 200 mL 乙酸乙酯中, 2 mol/L 氢氧化钠洗 2 次, 饱和氯化钠洗 2 次, 无水硫酸钠干燥, 经柱分离 [$V(\text{石油醚}) : V(\text{乙酸乙酯}) = 4 : 1$] 后得到无色油状液体 **8**^[9], 收率 86.1%. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 7.72 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 6.87 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 3.84 (t, $J=4.8$ Hz, 4H), 3.21 (t, $J=4.8$ Hz, 4H), 1.32 (s, 12H); HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{25}\text{BrNO}_3$ ($\text{M}+\text{H}$)⁺ 289.1958, found 289.1958.

3.2.2 4-(2-(4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼烷-2-基)苯氧基)乙基)吗啉(9)的合成

在封管中加入化合物 **8** (10 mmol), 醋酸钾(48 mmol), 联硼酸频哪醇酯(15 mmol)以及 *N,N*-二甲基甲酰胺(50 mL), 通入氮气后加入[双(二苯基膦基)二茂铁]二氯化钯(0.1 mmol), 80 °C 下反应 18 h. 冷却后将混合物用乙酸乙酯稀释, 再依次用水和饱和氯化钠洗涤, 无水硫酸钠干燥, 经柱分离 [$V(\text{石油醚}) : V(\text{乙酸乙酯}) = 1 : 1$] 后得到褐色油状液体 **9**, 收率 81.2%, ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 6.133 (s, 12H), 2.56~2.59 (t, $J=4.6$, 4H), 2.8~2.9 (m, 2H), 3.71~3.74 (t, $J=4.7$, 4H), 4.13~4.14 (m, 2H), 6.88~6.90 (d, $J=8.5$, 2H), 7.72~7.75 (d, $J=8.5$, 2H); HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{29}\text{BNO}_4$ ($\text{M}+\text{H}$)⁺ 333.2220, found 333.2222.

3.2.3 脲的衍生物 12a~12f 的合成

在 0 °C 下, 将取代苄胺 **10** (1 mmol) 加入到饱和碳酸氢钠溶液(5 mL)和二氯甲烷(5 mL)的混合物中, 然后缓慢加入三光气(0.35 mmol), 0 °C 下反应 2.5 h 后, 二氯甲烷萃取(10 mL $\times$ 2), 合并有机层, 用饱和氯化铵和饱和氯化钠洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤浓缩得到中间体 **11**. 将 5-溴吡啶-2-胺(1 mmol)加入到 1.5 mL 四氢呋喃溶液中, 向其缓慢滴入正丁基锂(1 mmol), 加毕后再将溶于四氢呋喃(1.5 mL)的化合物 **11** 缓慢加入, 室温下搅拌过夜. 反应结束后将反应液加入剧烈搅拌的水中, 分别得到脲类中间体 **12a~12f**, 滤出固体, 未进行纯化直接用于下一步.

3.2.4 4-(4-溴苯基)吗啉(15)的合成

在封管中加入二溴苯 **14** (10 mmol), 吗啡啉 **13** (10 mmol), 叔丁醇钾(12 mmol), ($\pm$)-2,2'-双-(二苯膦基)-1,1'-联萘(0.5 mmol)以及甲苯(50 mL), 通入氮气后加入三(二亚苄-BASE 丙酮)二钯(0)(0.25 mmol), 125 °C 下反应 8 h. 室温冷却后过滤旋干得到褐色的固体, 经柱分离 [$V(\text{石油醚}) : V(\text{乙酸乙酯}) = 4 : 1$] 后得到白色固体 **15**, 收率 75.6%. m.p. 112.1~113.7 °C (m.p.^[12] 114.5~115.5 °C); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.35 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 6.77 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 3.84 (t, $J=4.8$ Hz, 4H), 3.11 (t, $J=4.8$ Hz, 4H); HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{BrNO}$ ($\text{M}+\text{H}$)⁺ 242.0175, found 242.0177.

3.2.5 4-(4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼烷-2-基)苯基)吗啉(16)的合成

在封管中加入化合物 **15** (10 mmol), 醋酸钾(20 mmol), 联硼酸频哪醇酯(20 mmol)以及 *N,N*-二甲基甲酰胺(50 mL), 通入氮气后加入[双(二苯基膦基)二茂铁]二氯化钯(0.5 mmol), 125 °C 下反应 8~10 h. 冷却后将混合物用乙酸乙酯稀释, 再依次用水和饱和氯化钠洗涤, 无水硫酸钠干燥, 经柱分离后得到白色固体 **16**. 收率 72.2%. m.p. 98.3~99.6 °C (m.p.^[13] 98.6~99.0 °C); ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 7.52 (d, $J=8.79$ Hz, 2H), 6.82~6.98 (m, 2H), 3.66~3.79 (m, 4H), 3.08~3.23 (m, 4H), 1.26 (s, 12H); HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{BrNO}_2$ ($\text{M}+\text{H}$)⁺ 286.0437, found 286.0438.

3.2.6 目标化合物 17a~17f 和 18a~18f 的合成

在封管中加入 **9** 或 **16** (1 mmol), 1-(5-溴吡啶-2-基)-3-(取代苄基)脲 **12a~12f** (1.1 mmol), 碳酸钠(3 mmol)以及乙醇(5 mL)和水(1 mL), 通入氮气后加入二氯双[二叔丁基-(4-二甲基氨基苯基)膦]钯(II)(0.01 mmol), 60 °C 下回流 3 h. 冷却至室温后过滤旋干, 通过柱分离 [$V(\text{石油醚}) : V(\text{乙酸乙酯}) : V(\text{甲醇}) = 15 : 15 : 1$] 得到目标化合物 **17a~17f** 和 **18a~18f**.

1-苄基-3-(5-(4-(2-吗啉代乙氧基)苯基)吡啶-2-基)脲 (**17a**): 白色固体, 收率 40.3%. m.p. 129.9~131.2 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 9.86 (s, 1H), 9.21 (s, 1H), 8.31 (d, $J=2.0$ Hz, 1H), 7.73 (dd, $J=8.6$, 2.3 Hz, 1H), 7.45~7.39 (m, 4H), 7.37~7.32 (m, 2H), 7.29~7.27 (m, 1H), 7.00~6.96 (m, 2H), 6.93~6.89 (m, 1H), 4.66 (d, $J=5.7$ Hz, 2H), 4.16 (t, $J=5.6$ Hz, 2H), 3.78~3.73 (m, 4H), 2.84 (t, $J=5.6$ Hz, 2H), 2.65~2.57 (m, 4H); ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ : 158.4, 156.7, 152.3, 143.7, 139.4, 136.5, 130.2, 129.6, 128.5, 127.6, 127.3, 127.0, 115.2, 112.1, 66.9, 65.9, 57.6, 54.1, 43.7; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{N}_4\text{O}_3$ ($\text{M}+\text{H}$)⁺ 433.2234, found 433.2238.

1-(3-甲氧基苄基)-3-(5-(4-(2-吗啉代乙氧基)苄基)吡啶-2-基)脲(**17b**): 白色固体, 收率 36.7%. m.p. 146.5~147.8 °C; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 9.81 (s, 1H), 8.32 (d, $J=2.0$ Hz, 1H), 8.10 (s, 1H), 7.75 (dd, $J=8.5, 2.4$ Hz, 1H), 7.44~7.41 (m, 2H), 7.28~7.24 (m, 1H), 7.00~6.97 (m, 3H), 6.95~6.94 (m, 1H), 6.82~6.79 (m, 2H), 4.62 (d, $J=5.8$ Hz, 2H), 4.15 (t, $J=5.7$ Hz, 2H), 3.80 (s, 3H), 3.76~3.73 (m, 4H), 2.83 (t, $J=5.7$ Hz, 2H), 2.61~2.58 (m, 4H); ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ : 159.9, 158.5, 156.4, 152.1, 143.7, 141.0, 136.5, 130.2, 129.7, 129.5, 127.6, 119.6, 115.2, 113.0, 112.5, 112.0, 66.9, 66.0, 57.6, 55.2, 54.1, 43.7; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{N}_4\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 463.2340, found 463.2342.

1-(4-甲基苄基)-3-(5-(4-(2-吗啉代乙氧基)苄基)吡啶-2-基)脲(**17c**): 白色固体, 收率 43.6%. m.p. 179.4~180.7 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 9.82~9.74 (m, 1H), 9.37 (s, 1H), 8.30 (d, $J=2.3$ Hz, 1H), 7.72 (dd, $J=8.6, 2.4$ Hz, 1H), 7.45~7.40 (m, 2H), 7.31~7.28 (m, 2H), 7.17~7.13 (m, 2H), 7.00~6.96 (m, 2H), 6.96~6.92 (m, 1H), 4.61 (d, $J=5.7$ Hz, 2H), 4.15 (t, $J=5.7$ Hz, 2H), 3.77~3.73 (m, 4H), 2.83 (t, $J=5.7$ Hz, 2H), 2.62~2.58 (m, 4H), 2.33 (s, 3H); ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ : 158.4, 156.4, 152.2, 143.8, 136.6, 136.5, 136.3, 130.3, 129.6, 129.2, 127.6, 127.3, 115.2, 111.9, 66.9, 66.0, 57.6, 54.1, 43.5, 21.1; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{N}_4\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 447.2391, found 447.2395.

1-(4-氯苄基)-3-(5-(4-(2-吗啉代乙氧基)苄基)吡啶-2-基)脲(**17d**): 白色固体, 收率 39.5%. m.p. 154.6~155.9 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 9.94 (s, 1H), 8.99~8.98 (m, 1H), 8.33 (d, $J=2.2$ Hz, 1H), 7.75 (dd, $J=8.6, 2.4$ Hz, 1H), 7.44~7.42 (m, 2H), 7.33~7.27 (m, 1H), 7.18~7.16 (m, 1H), 7.13~7.10 (m, 1H), 7.00~6.97 (m, 2H), 6.95~6.92 (m, 1H), 6.89~6.87 (m, 1H), 4.64 (d, $J=5.9$ Hz, 2H), 4.15 (t, $J=5.7$ Hz, 2H), 3.77~3.72 (m, 4H), 2.83 (t, $J=5.7$ Hz, 2H), 2.63~2.57 (m, 4H); ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ : 158.5, 156.8, 152.2, 143.6, 138.0, 136.5, 132.7, 130.2, 129.7, 128.7, 128.6, 127.6, 115.2, 112.1, 66.9, 66.0, 57.6, 54.1, 43.1; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{ClN}_4\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 467.1844, found 467.1845.

1-(3-氟苄基)-3-(5-(4-(2-吗啉代乙氧基)苄基)吡啶-2-基)脲(**17e**): 白色固体, 收率 41.8%. m.p. 132.3~134.0 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 9.94 (s, 1H), 9.50~9.42 (m, 1H), 8.32 (d, $J=2.2$ Hz, 1H), 7.74 (dd, $J=8.6, 2.4$ Hz, 1H), 7.47~7.40 (m, 2H), 7.33~7.26 (m, 1H), 7.18~7.16 (m, 1H), 7.14~7.11 (m, 1H), 7.01~6.96 (m,

2H), 6.95~6.92 (m, 2H), 4.64 (d, $J=5.9$ Hz, 2H), 4.15 (t, $J=5.7$ Hz, 2H), 3.79~3.72 (m, 4H), 2.83 (t, $J=5.7$ Hz, 2H), 2.65~2.54 (m, 4H); ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ : 163.9, 162.2, 158.5, 156.5, 152.0, 143.7, 142.1, 136.6, 130.1, 129.9, 127.6, 122.8, 115.2, 114.2, 113.9, 112.0, 66.9, 66.0, 57.6, 54.1, 43.2; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{FN}_4\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 451.2140, found 451.2141.

1-(4-氟苄基)-3-(5-(4-(2-吗啉代乙氧基)苄基)吡啶-2-基)脲(**17f**): 白色固体, 收率 40.1%. m.p. 141.0~142.3 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 9.87 (s, 1H), 9.54 (s, 1H), 8.31 (d, $J=2.2$ Hz, 1H), 7.73 (dd, $J=8.6, 2.3$ Hz, 1H), 7.45~7.41 (m, 2H), 7.39~7.34 (m, 2H), 7.04~6.96 (m, 4H), 6.95~6.90 (m, 1H), 4.60 (d, $J=5.8$ Hz, 2H), 4.15 (t, $J=5.7$ Hz, 2H), 3.77~3.72 (m, 4H), 2.83 (t, $J=5.7$ Hz, 2H), 2.63~2.57 (m, 4H); ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ : 162.0, 158.5, 156.5, 152.1, 143.7, 136.6, 135.2, 130.2, 129.8, 128.9, 127.6, 115.3, 115.2, 112.0, 66.9, 66.0, 57.6, 54.1, 43.1; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{FN}_4\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 451.2140, found 451.2141.

1-苄基-3-(5-(4-吗啉代苄基)吡啶-2-基)脲(**18a**): 白色固体, 收率 43.2%. m.p. 203.2~204.5 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 9.85 (s, 1H), 8.76 (s, 1H), 8.32 (d, $J=2.3$ Hz, 1H), 7.75 (dd, $J=8.6, 2.4$ Hz, 1H), 7.46~7.42 (m, 2H), 7.42~7.38 (m, 2H), 7.37~7.32 (m, 2H), 7.29~7.26 (m, 1H), 7.00~6.96 (m, 2H), 6.89~6.85 (m, 1H), 4.65 (d, $J=5.8$ Hz, 2H), 3.91~3.86 (m, 4H), 3.23~3.19 (m, 4H); ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ : 156.4, 151.9, 150.7, 143.5, 139.6, 136.4, 129.8, 128.8, 128.5, 127.3, 127.2, 127.0, 115.9, 111.9, 66.8, 49.0, 43.7; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{N}_4\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 389.1972, found 389.1972.

1-(3-甲氧基苄基)-3-(5-(4-吗啉代苄基)吡啶-2-基)脲(**18b**): 白色固体, 收率 40.8%. m.p. 201.8~203.1 °C; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 9.82 (s, 1H), 8.33 (d, $J=2.1$ Hz, 1H), 8.09 (s, 1H), 7.76 (dd, $J=8.5, 2.3$ Hz, 1H), 7.44 (d, $J=8.7$ Hz, 2H), 7.28~7.25 (m, 1H), 6.98 (d, $J=8.7$ Hz, 3H), 6.95~6.94 (m, 1H), 6.82~6.79 (m, 2H), 4.62 (d, $J=5.8$ Hz, 2H), 3.90~3.87 (m, 4H), 3.80 (s, 3H), 3.22~3.19 (m, 4H); ^{13}C NMR (151 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 159.8, 158.5, 155.3, 152.3, 150.9, 143.0, 136.0, 129.9, 129.7, 127.1, 119.6, 115.8, 113.2, 113.0, 112.4, 112.1, 66.5, 55.4, 48.7, 43.4; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 419.2078, found 419.2080.

1-(4-甲基苄基)-3-(5-(4-吗啉代苄基)吡啶-2-基)脲(**18c**): 白色固体, 收率 42.5%. m.p. 197.1~198.2 °C; ^1H

NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 9.85~9.75 (m, 1H), 9.27 (s, 1H), 8.32 (d, $J=2.2$ Hz, 1H), 7.74 (dd, $J=8.6$, 2.4 Hz, 1H), 7.46~7.41 (m, 2H), 7.32~7.27 (m, 2H), 7.17~7.13 (m, 2H), 7.00~6.96 (m, 2H), 6.95~6.91 (m, 1H), 4.61 (d, $J=5.7$ Hz, 2H), 3.91~3.86 (m, 4H), 3.23~3.17 (m, 4H), 2.34 (s, 3H); ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ : 156.2, 151.9, 150.7, 143.6, 136.6, 136.3, 136.3, 129.8, 129.2, 128.8, 127.3, 127.2, 115.9, 111.8, 66.8, 49.0, 43.5, 21.1; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 403.2129, found 402.2132.

1-(4-氯苄基)-3-(5-(4-吗啉代苄基)吡啶-2-基)脲(**18d**): 白色固体, 收率 37.8%. m.p. 180.2~181.8 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 9.91 (s, 1H), 9.30 (s, 1H), 8.33 (d, $J=2.1$ Hz, 1H), 7.75 (dd, $J=8.6$, 2.3 Hz, 1H), 7.46~7.42 (m, 2H), 7.35~7.28 (m, 4H), 7.00~6.96 (m, 2H), 6.89~6.85 (m, 1H), 4.60 (d, $J=5.8$ Hz, 2H), 3.91~3.85 (m, 4H), 3.23~3.18 (m, 4H); ^{13}C NMR (151 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 151.6, 147.0, 146.0, 138.8, 133.3, 131.6, 128.0, 125.2, 124.1, 123.9, 123.9, 122.5, 111.1, 107.1, 62.0, 44.3, 38.4; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{ClN}_4\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 423.1582, found 423.1587.

1-(3-氟苄基)-3-(5-(4-吗啉代苄基)吡啶-2-基)脲(**18e**): 白色固体, 收率 45.2%. m.p. 212.3~213.4 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 9.92 (s, 1H), 8.91 (s, 1H), 8.34 (d, $J=2.2$ Hz, 1H), 7.76 (dd, $J=8.6$, 2.3 Hz, 1H), 7.44 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 7.33~7.26 (m, 1H), 7.16 (d, $J=7.7$ Hz, 1H), 7.11 (d, $J=9.9$ Hz, 1H), 6.98 (d, $J=8.9$ Hz, 2H), 6.94 (dd, $J=8.3$, 2.2 Hz, 1H), 6.88 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 4.63 (d, $J=5.9$ Hz, 2H), 3.91~3.86 (m, 4H), 3.23~3.18 (m, 4H); ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ : 167.5, 160.1, 157.0, 155.6, 149.0, 148.4, 140.8, 135.5, 134.1, 132.6, 131.8, 128.2, 120.6, 118.9, 118.7, 116.8, 71.2, 53.4, 47.4; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{FN}_4\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 407.1878, found 407.1879.

1-(4-氟苄基)-3-(5-(4-吗啉代苄基)吡啶-2-基)脲(**18f**): 白色固体, 收率 43.9%. m.p. 186.5~187.9 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 9.84 (s, 1H), 8.62 (s, 1H), 8.33 (d, $J=2.2$ Hz, 1H), 7.76 (dd, $J=8.6$, 2.4 Hz, 1H), 7.46~7.42 (m, 2H), 7.39~7.33 (m, 2H), 7.05~7.00 (m, 2H), 7.00~6.95 (m, 2H), 6.84 (d, $J=8.5$ Hz, 1H), 4.59 (d, $J=5.8$ Hz, 2H), 3.91~3.85 (m, 4H), 3.24~3.17 (m, 4H); ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ : 162.0, 156.2, 151.7, 150.8, 143.5, 136.5, 135.1, 130.0, 128.9, 128.6, 127.2, 115.9, 115.3, 111.8, 66.8, 49.0, 43.1; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{FN}_4\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 407.1878, found 407.1882.

3.3 化合物抑制细胞增殖活性测试

将 HCT-116 细胞按 5×10^3 个/孔接种于 96 孔板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数为 5% 的 CO_2 条件下培养 24 h, 待细胞贴壁后, 加入不同浓度的受试化合物, 继续培养 48 h, 弃去培养基, 加入 200 μL 含 0.5 mg/mL 噻唑蓝(MTT) 的培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 4 h. 弃去培养基, 每孔加入 150 μL DMSO, 低速震荡 10 min. 酶标仪(PE VICTOR Nivo) 上测定 570 nm 处的吸光度. 每个受试化合物, 设置 6 个浓度梯度, 并设阴性对照组(加入空白溶剂), 计算抑制率. 根据不同浓度的抑制率, 使用 Graph Pad Prism 软件计算半数抑制浓度(IC_{50}).

3.4 化合物抑制 ERK2 激酶活性测试

采用 Z'-LYTE® 激酶检测试剂盒(ThermoFisher), 应用荧光能量共振转移(FRET)的方法检测磷酸化 ERK2 的激酶活性. 根据说明书, 在 384 孔板(Corning Cat. #3676)中, 加入 5 μL 磷酸化的 ERK2 激酶和底物混合物(Ser/Thr 03), 2.5 μL 受试化合物, 2.5 μL 腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)溶液, 震荡 30 s, 室温孵育 1 h 后, 加入 5 μL Development Reagent 溶液, 震荡 30 s, 室温孵育 1 h. 用酶标仪检测荧光强度(PE VICTOR Nivo, 激发光波长为 400 nm, 发射光波长为 445 nm、520 nm). 设置 100% 磷酸化组(加入磷酸化肽段)和 0% 磷酸化组(不加 ATP 溶液)分别作为阴性和阳性对照, 根据 100% 磷酸化组和 0% 磷酸化组的荧光强度, 计算受试化合物的抑制率, 并计算 IC_{50} 值.

3.5 化合物诱导细胞凋亡测试

取对数生长期的 HCT-116 细胞, 加入不同浓度的化合物 **18f** 或 DMSO(阴性对照), 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h, 胰蛋白酶消化细胞, 磷酸缓冲液(PBS)洗涤, 加入 100 μL $1 \times$ binding buffer 吹打混匀, 加入 5 μL Annexin-V FITC 和 5 μL PI 染液, 轻微震荡后室温下避光孵育 15 min, 用流式细胞仪(Beckman CytoFLEX S)分析细胞凋亡.

3.6 蛋白免疫印迹

取对数生长期的 HCT-116 细胞, 加入不同浓度的化合物 **18f** 或 DMSO 处理 24 h. 加入裂解液裂解细胞, 蛋白定量试剂盒(BCA)试剂盒测定总蛋白浓度, 加入上样缓冲液, 沸水浴 5~10 min. 蛋白样品经 SDS-PAGE 电泳后、转膜、室温封闭 1 h, 加入一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育, 二抗孵育后, 滴加化学发光反应液, 置于数字成像仪(Bio-Rad ChemiDoc XRS⁺)中显影, 观察结果.

辅助材料(Supporting Information) 所有目标化合物的 ^1H NMR 及 ^{13}C NMR 谱图. 这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载.

References

- [1] Roskoski, R. Jr. *Pharmacol. Res.* **2012**, *66*, 105.
- [2] Roberts, P. J.; Der, C. J. *Oncogene* **2007**, *26*, 3291.
- [3] Uehling, D. E.; Harris, P. A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 4047.
- [4] Morris, E. J.; Jha, S.; Restaino, C. R.; Dayananth, P.; Zhu, H.; Cooper, A.; Carr, D.; Deng, Y.; Jin, W.; Black, S.; Long, B.; Liu, J.; Dinunzio, E.; Windsor, W.; Zhang, R.; Zhao, S.; Angagaw, M. H.; Pinheiro, E. M.; Desai, J.; Xiao, L.; Shipps, G.; Hruza, A.; Wang, J.; Kelly, J.; Paliwal, S.; Gao, X.; Babu, B. S.; Zhu, L.; Daublain, P.; Zhang, L.; Lutterbach, B. A.; Pelletier, M. R.; Philippar, U.; Siliphaivanh, P.; Witter, D.; Kirschmeier, P.; Bishop, W. R.; Hicklin, D.; Gilliland, D. G.; Jayaraman, L.; Zewel, L.; Fawell, S.; Samatar, A. A. *Cancer Discovery* **2013**, *3*, 742.
- [5] Blake, J. F.; Burkard, M.; Chan, J.; Chen, H.; Chou, K. J.; Diaz, D.; Dudley, D. A.; Gaudino, J. J.; Gould, S. E.; Grina, J.; Hunsaker, T.; Liu, L.; Martinson, M.; Moreno, D.; Mueller, L.; Orr, C.; Pacheco, P.; Qin, A.; Rasor, K.; Ren, L.; Robarge, K.; Shahidi-Latham, S.; Stults, J.; Sullivan, F.; Wang, W.; Yin, J.; Zhou, A.; Belvin, M.; Merchant, M.; Moffat, J.; Schwarz, J. B. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 5650.
- [6] Bhagwat, S. V.; McMillen, W. T.; Cai, S.; Zhao, B.; Whitesell, M.; Shen, W.; Kindler, L.; Flack, R. S.; Wu, W.; Anderson, B.; Zhai, Y.; Yuan, X. J.; Pogue, M.; Van Horn, R. D.; Rao, X.; McCann, D.; Dropsey, A. J.; Manro, J.; Walgren, J.; Yuen, E.; Rodriguez, M. J.; Plowman, G. D.; Tiu, R. V.; Joseph, S.; Peng, S. B. *Mol. Cancer Ther.* **2020**, *19*, 325.
- [7] Lim, J.; Kelley, E. H.; Methot, J. L.; Zhou, H.; Petrocchi, A.; Chen, H.; Hill, S. E.; Hinton, M. C.; Hruza, A.; Jung, J. O.; Maclean, J. K.; Mansueto, M.; Naumov, G. N.; Philippar, U.; Raut, S.; Spacapioli, P.; Sun, D.; Siliphaivanh, P. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 6501.
- [8] 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.; Cooke, M.; Cousin, D.; Onions, S.; Shannon, J.; Watts, J.; Murray, C. W. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 4978.
- [9] Yamamoto, T.; Morita, T.; Takagi, J.; Yamakawa, T. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 5766.
- [10] Sun, C. L.; Liang, C. X.; Huang, P.; Harris, G. D.; Guan, H. P. *US 20040220189*, **2004**.
- [11] Monte, F. L.; Kramer, T.; Bolander, A.; Plotkin, B.; Eldar-Finkelman, H.; Fuertes, A.; Dominguez, J.; Schmidt, B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 5610.
- [12] Song, S.; Sun, X.; Li, X.; Yuan, Y.; Jiao, N. *Org. Lett.* **2015**, *17*, 2886.
- [13] Patel, G.; Karver, C. E.; Behera, R.; Guyett, P. J.; Sullenberger, C.; Edwards, P.; Roncal, N. E.; Mensa-Wilmot, K.; Pollastri, M. P. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 3820.
- [14] Dow, R. L.; Ammirati, M.; Bagley, S. W.; Bhattacharya, S. K.; Buckbinder, L.; Cortes, C.; El-Kattan, A. F.; Ford, K.; Freeman, G. B.; Guimaraes, C. R. W.; Liu, S.; Niosi, M.; Skoura, A.; Tess, D. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 3114.

(Cheng, F.)