

MEK 小分子抑制剂的设计、合成与初步活性研究

宋彬彬¹, 张自阔¹, 朱庆枫¹, 何谷², 范举正^{1*}

(四川大学 1. 华西药学院, 2. 华西医院生物治疗国家重点实验室, 四川 成都 610041)

摘要: 基于已报道的 MEK 小分子抑制剂, 运用 Autodock 4.2 研究其与 MEK 蛋白的作用方式, 并以此设计、合成 10 个全新小分子化合物, 其结构经 ¹H NMR 和 ¹³C NMR 确定, 并采用 MTT 法进行了体外抗肿瘤活性研究。结果表明, 所设计的化合物大多对 MCF-7、PANC-1、SY5Y 和 A549 四种肿瘤细胞株有较好的作用。其中, 化合物 4、6、7、8、10 表现了较好的活性。

关键词: MEK; 设计; 合成; 抗肿瘤活性

中图分类号: R916

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 03-0416-09

Design, synthesis and evaluation of a novel MEK protein inhibitors

SONG Bin-bin¹, ZHANG Zi-kuo¹, ZHU Qing-feng¹, HE Gu², FAN Ju-zheng^{1*}

(1. West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China;

2. State Key Laboratory of Biotherapy, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: This study was conducted to design and synthesize highly efficient, specific, non-resistant small MEK inhibitors. Based on active small molecules which have been reported, we studied the action mode with MEK protein using Autodock 4.2, generated innovative and feasible design method, designed novel small MEK protein inhibitors with a reference to molecular modeling and docking. The anti-tumor activities of four kinds of cells including MCF-7, PANC-1, SY5Y, A549 were tested with MTT method *in vitro*. The structure of 10 new small molecules has been determined with ¹H NMR and ¹³C NMR. The compounds 4, 6, 7, 8, 10 had high antitumor activities, the compounds 1, 3, 5 also showed good activity, and the compounds 2, 9 showed cell selectivity in killing tumor.

Key words: MEK; design; synthesize; anti-tumor activity

RAF-MEK-ERK 通路是细胞凋亡通路中重要成员。其中, MEK 是一种可磷酸化靶蛋白上丝氨酸/苏氨酸和酪氨酸残基的双特异性激酶, MEK 作为 MAPK 通路关键激酶, 近年来受到越来越多的关注与研究^[1]。MEK 抑制剂通过下调 MEK 的自身活性, 抑制异常的 RAS 和 RAF 对 MEK 的过度激活, 降低整条 MAPK 通路的活性^[2], 起到抑制肿瘤细胞增长的目的。利用 MEK 抑制剂来干预肿瘤的发生和发展已

经成为现实, 曲美替尼作为第一个上市的 MEK 抑制剂, FDA 于 2013 年 5 月批准其用于治疗伴有 BRAF V600E 或 V600K 突变的不可切除或转移性黑色素瘤^[3]。MEK 抑制剂的研究已经成为肿瘤治疗领域的重要研究内容^[4]。

现有激酶抑制剂大部分属于 ATP 竞争性抑制剂, 而 MEK 蛋白激酶抑制剂由于活性区域的结构特点, 可以考虑设计 ATP 非竞争性抑制剂, 期待能避免由于激酶在 ATP 口袋的高度同源性而引发抑制剂不可预测的多激酶抑制不良反应, 已公布的相关研究结果也证明了这一点: 一些 ATP 非竞争性抑制剂临床前及临床试验均显示较好的肿瘤抑制活性, 并且较少

收稿日期: 2016-09-21; 修回日期: 2016-11-23.

*通讯作者 Tel: 86-28-85503222, E-mail: david-811@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2016-0926

存在多激酶同时抑制的情况^[5], 是 MEK 作为肿瘤治疗药物研发重要靶点的原因之一。

已报道的 MEK 小分子抑制剂从与靶点结合特点的角度考虑可以分为 3 类: 第 1 类是由辉瑞公司开发的 PD 系列 (如 CI1040^[6]、PD0325901 等) 及罗氏公司开发的 G 系类化合物^[7, 8], 这类化合物主要占据 MEK 的 A、C 结合区域, 小分子在 C 结合区域含有胍基、羰基、双羟基。双羟基与 ATP 的 γ -磷酸残基形成氢键来稳定复合物的结合能力。第 2 类化合物是由日本中外制药株式会社研发的 CH 系列^[9], 如 CH4858060、CH4858061、CH4987655、CH5126766, 该类化合物相比第一类化合物增加了 B 结合区域的占据, 在 C 结合区域仍然保留了羰基、胍基、羟基等典型基团, 取得了不错的临床效果。其中化合物 CH5126766 放弃了 C 结合区域, 在 B 结合区域做了更多的尝试, 占据了该区域的更多空间。第三类化合物以葛兰素史克公司研发的系列小分子和拜尔公司研发的系列抑制剂为代表, 这类抑制剂相比于第二类抑制剂简化了 C 结合区域的基团, 只保留较短的基团链。该系列化合物具有很好的抑制活性, 上市的药

物有曲美替尼 (GSK1120212)。部分化合物分子结构见图 1~5。

PD 系列抑制剂是前期开发 MEK 小分子抑制剂的通用结构模型, 它们与蛋白的结合呈“7”型形态, 当研究者发现在 B 结合区域有很大的空间, 它们开始兼顾 A、B、C 结合区域, 设计出与蛋白呈“T”型结合的系列小分子。随着研究的深入, 简化甚至放弃结合区域 C 处的基团, 重点考虑与蛋白 A、B 结合区域的作用, 这一设计思路被提出, 于是与 MEK 蛋白呈“一”型形态结合的小分子开始出现。目前大多数早期上市 MEK 抑制剂在给药一段时间后, 普遍产生强烈的耐药性。但是 CH 系列中的 CH5126766 小分子并没有产生同样的耐药性^[11], 该小分子与 MEK 蛋白的结合呈“一”型形态, 且相比于同系列中小分子, 该小分子强化了与蛋白 B 结合区域的作用。CH5126766 设计的成功, 说明“一”型形态小分子的设计策略是可行的, 蛋白 B 结合区域可能与耐药性有关。

相比与“经典”结合, 与 MEK 蛋白结合位点呈“一”型结合形态的小分子抑制剂很少, 且早期的

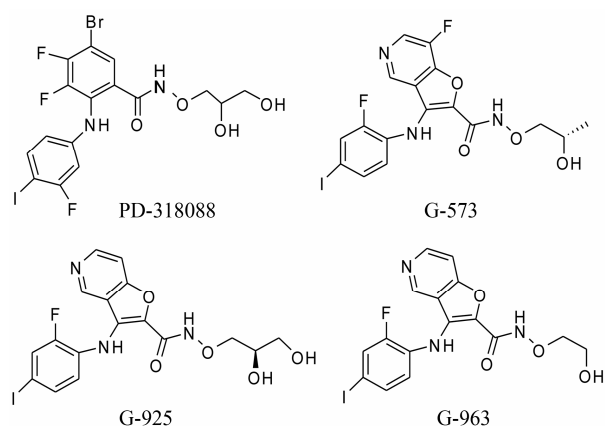


Figure 1 Structures of PD-318088 and G series of compounds

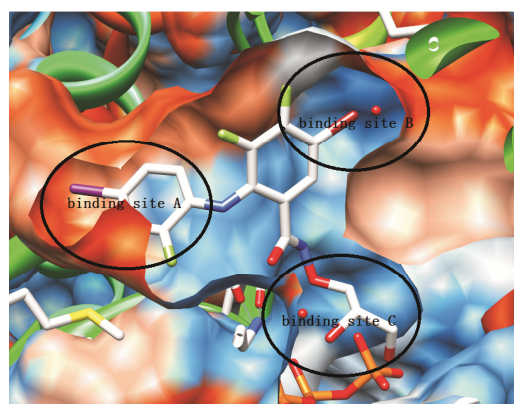


Figure 2 PD318088 and MEK protein complexes (PDBID: 1S9J)^[10]

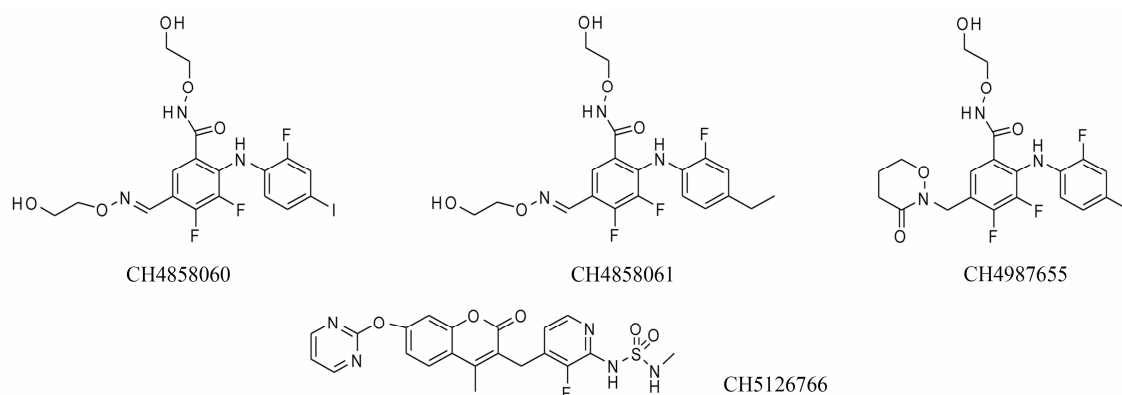


Figure 3 Structures of some CH series compounds

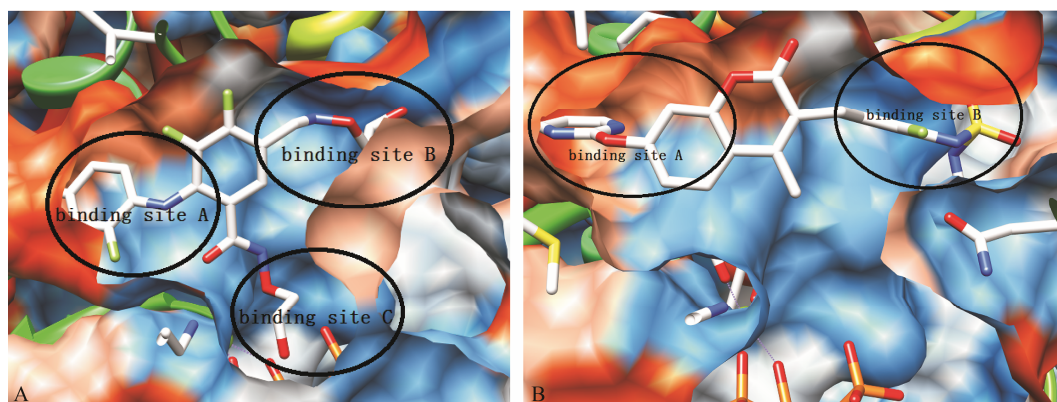


Figure 4 Crystal complex of MEK and CH4858061 (A) and MEK and CH5126766 (B)

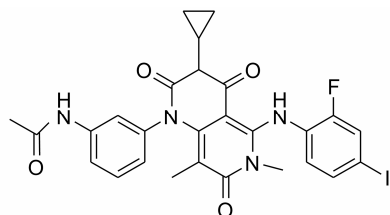


Figure 5 Structure of trametinib (GSK1120212)

小分子抑制剂对B结合区域研究较少,而B结合区域又与耐药性有很大的关系。综上提出如下设计思路:小分子主要占据MEK蛋白的A、B结合区域,放弃或者简化C区域的占据,重点考察小分子在蛋白B结合区域变化对生物活性的影响,希望获得非ATP竞争、低耐药性的高效MEK抑制剂。

通过分子模拟和对接,确定了已报道的活性较好的小分子抑制剂与MEK蛋白A、B、C结合区域的作用特点。结合区域A:放置用小基团(如卤素、甲基等)单取代或二取代的苯环。用碘原子取代的苯环占据结合区域A效果较好,它能与MEK蛋白上的氨基酸残基Val128、Lys98形成卤键作用。结合区域A、B过渡区:采用单或者稠合的芳香杂环占据,着重考虑氨基酸残基Ser213和Val212。结合区域B:引入长的基团链和环状基团。研究发现,MEK蛋白B结合区域的Ser223是RAF激活MEK的重要磷酸化位点,小分子抑制剂与MEK蛋白B区域的Asn222和Ser223形成作用力,可以克服小分子的耐药性,因此氨基酸残基Ser223与Asn222是重点考虑的氨基酸(图6)。

根据上述设计思路,参考已报道小分子与MEK蛋白作用特点,设计了200多个化合物。

分别将这200多个化合物与MEK蛋白进行对接,根据以下挑选原则最终选定了10个化合物进行合成。① Autodock对接结果分析,小分子能够很好地匹

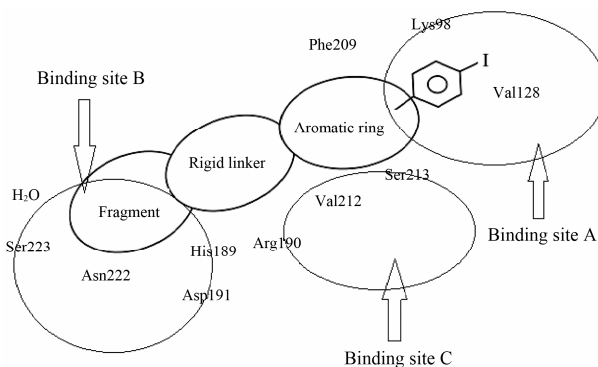


Figure 6 Design strategy of target compounds

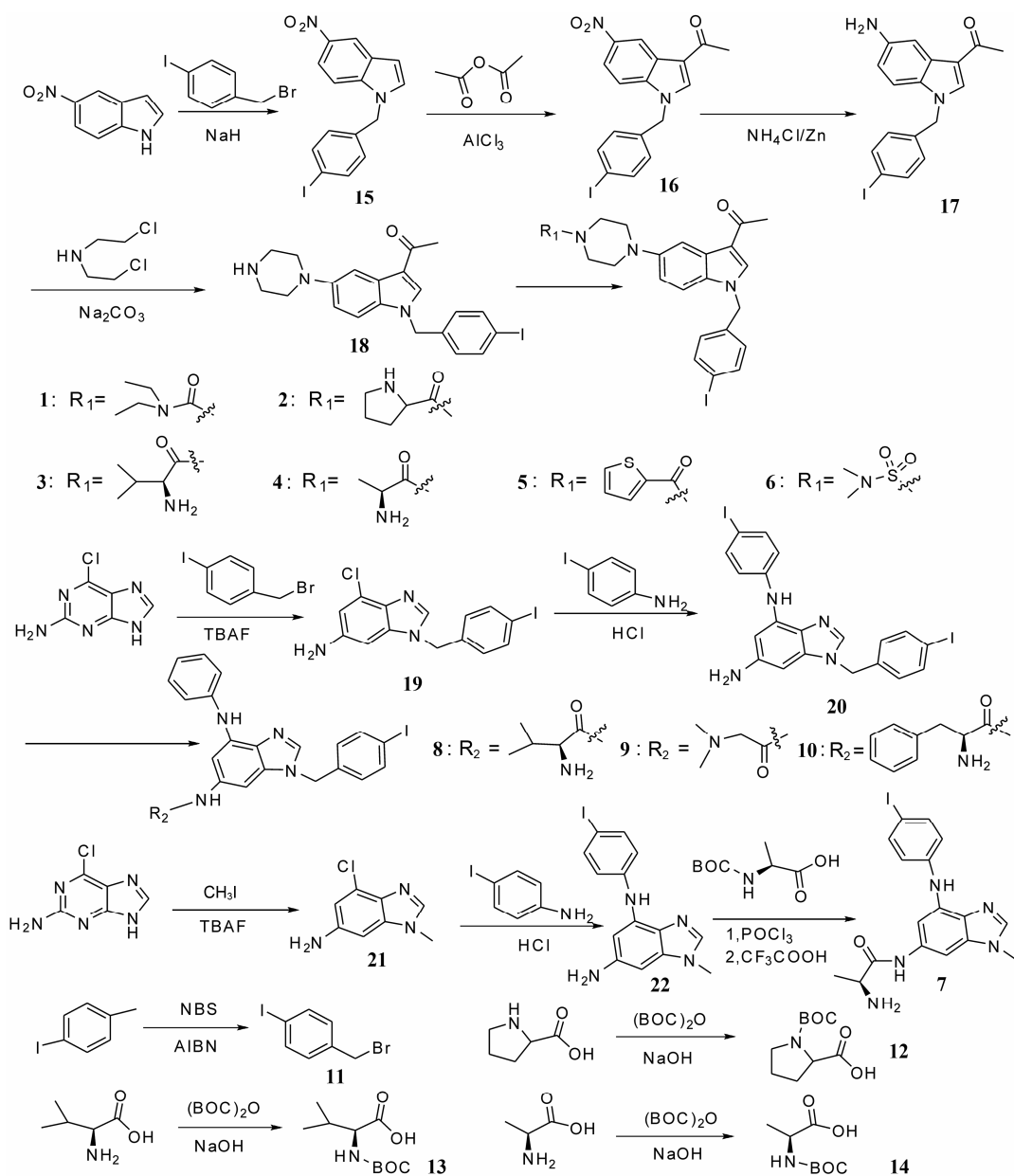
配在P1、P2、P3及P4区域,化合物主要构型簇的平均结合能及预测的 K_i 值要足够低;②对关键位点、关键氨基酸的占据要符合期望;③选取的化合物符合类药性五规则。最终选择合成的这10个化合物为全新化合物,未见文献报道,其中化合物1~6主要与MEK呈“一”型结合形态,占据MEK蛋白的A、B结合区域。嘧啶类即化合物7~10占据MEK蛋白A、B结合区域外,还占据了部分C结合区域。

目标化合物1~10的合成过程见合成路线1。化合物1~6以5-硝基咪唑为起始原料,用对碘苄溴取代咪唑氮上的活泼氢原子得到化合物15,化合物15发生付克酰基化反应得到化合物16,化合物16发生还原反应得到化合物17,化合物17与二氯乙基氨基发生合环反应得到化合物18,化合物18发生缩合反应得到各个目标化合物。化合物7~10以6-氯嘌呤为起始原料,经过取代反应和缩合反应得到各个目标化合物。

结果与讨论

1 化合物的合成

目标化合物的结构经NMR的验证,其理化性质见后文实验部分。



Scheme 1 Synthetic route of target compounds

2 目标化合物的抑制活性

目标化合物 1~10 的抗肿瘤活性见表 1。采用 MTT 法对 10 个化合物进行了初步活性测定, 结果表明化合物对 4 个细胞系均表现出了较高的抑制率, 其中化合物 4、6、7、8、10 的表现尤为突出。有些化合物对细胞株表现出一定的选择性, 化合物 2 对人肺癌细胞株 A549 的抑制率达到了 80%, 但对人胰腺癌细胞 PANC-1 却没有抑制效果。化合物 9 对人神经癌细胞 SY5Y 有较好的抑制效果, 但对其他 3 个细胞株的抑制效果相比对人神经癌细胞的抑制效果要差很多。

3 构效关系分析

所设计的化合物都用碘苯占据 MEK 的 A 结合区

Table 1 *In vitro* inhibition of MCF-7, PANC-1, SY5Y, and A549

| Compound | MCF-7 | PANC-1 | SY5Y | A549 |
|----------|-------|--------|------|------|
| NS | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Taxol | 47% | 32% | 39% | 42% |
| 1 | 51% | 31% | 55% | 43% |
| 2 | 26% | -12% | 69% | 80% |
| 3 | 45% | 36% | 61% | 57% |
| 4 | 73% | 86% | 63% | 77% |
| 5 | 71% | 53% | 76% | 67% |
| 6 | 87% | 82% | 84% | 85% |
| 7 | 87% | 78% | 84% | 65% |
| 8 | 85% | 78% | 82% | 79% |
| 9 | 43% | 41% | 78% | 59% |
| 10 | 83% | 81% | 79% | 79% |

域, 采用芳香环和刚性连接子过渡到 MEK 的 B 结合区域, B 结合区域基团的变化为影响活性数值的主要因素。对活性较好的化合物 4、6、7、8、10 进行对接分析, 发现化合物 4、7、8、10 与 MEK 蛋白 B 结合区域的 Asn222 形成了稳定的氢键作用, 并且与 Ser223 形成了疏水作用, 这可能是它们活性优于其他化合物的主要原因。化合物 6 在 MEK 的 B 结合区域采用磺酰胺基类基团占据, 有文献报道这类化合物对 MEK 有特殊的抑制活性^[12], 通过对接分析, 推测这与 Arg190 形成的稳定氢键有关, 但由于样本太少, 需要进一步研究才能证实。

4 小结

从初步的活性结果可知, 设计与蛋白呈“一”型结合的小分子抑制剂是可行的。MEK 蛋白 B 结合位点上的氨基酸 Asn222、Ser223 对小分子活性及耐药性影响较大, 且围绕 B 位点设计的酰胺类是很好的骨架。放置碘原子取代的苯环占据 A 位点与 Val128 形成卤键是合理的策略。本文设计的咪唑骨架和嘧啶骨架是很好的骨架, 对此骨架进行优化和改造以获得更好活性的小分子抑制剂未来值得研究。

实验部分

¹H NMR 与 ¹³C NMR 采用 Varian Unity NOVA400/54 和 Bruker Ac-E200 核磁共振仪测定; 熔点测定使用 XT-4 双目显微熔点测试仪; 柱色谱所用硅胶 G/H 为青岛海洋化工厂所生产; 薄层色谱板产于青岛海洋化工厂; 所用化学试剂来自成都贝斯特有限公司和天津希恩思生化科技有限公司, 溶剂均为分析纯, 来自成都科龙化工试剂厂。抗肿瘤活性实验所用的人乳腺癌细胞 MCF-7、人胰腺癌细胞 PANC-1、人神经癌细胞株 SY5Y、人肺癌细胞 A549 来自上海细胞库。

1 化学合成

1.1 化合物 11 的合成 取对碘甲苯 436 mg (2.0 mmol)、AIBN (偶氮二异丁腈, 0.1 mmol) 加入到 50 mL 单口圆底反应瓶中, 加入四氯化碳 20 mL, 取 NBS (*N*-溴代丁二酰亚胺) 373 mg (2.1 mmol) 加入到反应瓶中, 80 °C 回流反应, 过夜 (12 h 以上)。反应结束后, 室温冷却, 减压蒸馏除去溶剂, 加入乙酸乙酯 (EA) 溶解, 旋干, 柱色谱纯化得粉红色固体化合物 582 mg, 收率 98%^[13]。

1.2 化合物 12~14 的合成 取脯氨酸 230 mg (2.0 mmol) 于 25 mL 单口圆底反应瓶中, 加入 5 mL 水,

搅拌; 称量 (Boc)₂O 650 mg (3.0 mmol), 溶解于 5 mL 四氢呋喃中, 加入反应瓶; 称取氢氧化钠 176 mg (4.4 mmol) 加到反应瓶中; 室温搅拌 13 h 后减压旋蒸除去溶剂, 加 5 mL 水, 用 1 mol·L⁻¹ 的盐酸溶液调节 pH=1~2, EA 萃取 3 次, 合并有机相, 旋干的粗品 422 mg, 得白色粉末 12, 收率 98%。Boc-缬氨酸 (13)、Boc-丙氨酸 (14) 的制备方法同 Boc-脯氨酸的制备, 产物均为白色粉末, 收率分别为 97%、98%。

1.3 化合物 15 的合成 取 5-硝基咪唑 324 mg (2.0 mmol) 放入 25 mL 单口圆底反应瓶中, 加入无水四氢呋喃 5 mL, 冰浴下搅拌 10 min, 称取氯化钠 (60%) 96 mg (2.4 mmol) 缓慢加入到反应瓶中, 冰浴下搅拌 5 min, 室温下搅拌 30 min。取对碘苄溴 730 mg (2.4 mmol) 溶于 5 mL 无水四氢呋喃中, 冰浴条件下缓慢滴加到反应瓶中, 大约 30 min, 滴加完撤去冰浴, 室温下反应 16 h 后, 减压旋蒸除去溶剂, 加入 EA 溶解, 倒入冰水中, EA 层用饱和氯化钠溶液洗涤两次, 合并所有水层并用 EA 萃取两到三次, 合并所用 EA 层, 旋干, 柱色谱纯化, 得到黄色固体 718 mg, 收率 95%^[14]。

1.4 化合物 16 的合成 取无水二氯甲烷 15 mL 加入到 100 mL 磨口圆底烧瓶中, 取无水氯化铝 2.825 g (18 mmol), 快速加入到反应瓶中, 冰浴条件下搅拌 5 min; 取醋酸酐 1.081 g (9 mmol) 冰浴条件下滴加到反应瓶中, 约 40 min 滴加结束, 在冰浴条件下搅拌 30 min; 取化合物 15 1.081 g (3 mmol) 滴加到反应瓶中, 约 30 min 滴加完毕, 室温下反应 2 h。TLC (PE : EA=3 : 1) 监测反应进程。反应结束后加入二氯甲烷 30 mL 稀释反应液, 冰饱和食盐水洗涤两次, 收集所有水层, EA 萃取两次, 收集所有有机层, 柱色谱纯化, 得深黄色固体 1.071 g, 收率 85%^[15]。¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 9.28 (s, 1H, Ar-H), 8.13 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.85 (s, 1H, Ar-H), 7.69 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, Ar-H), 7.30 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, Ar-H), 6.89 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, Ar-H), 5.36 (s, 2H, Bn-H), 2.06 (s, 3H, COCH₃)。

1.5 化合物 17 的合成 分别取化合物 16、氯化铵、锌粉: 1.840 g (4.3 mmol)、2.385 g (43.0 mmol)、2.925 g (43.0 mmol), 加入到 100 mL 单口圆底烧瓶中; 取 50 mL 甲醇、5 mL 水混合后倒入反应瓶中; 搅拌回流反应 16 h。TLC (PE : EA=1 : 2) 监测反应进程, 反应结束后, 自然冷却至室温, 减压旋蒸除去溶剂, 加入乙酸乙酯溶解固体, 加入饱和碳酸氢钠溶液, 充分搅拌 30 min; 减压过滤, 用乙酸乙酯充分洗涤固体残

渣, 至滴下的 EA 无色为止; 收集有机相, 饱和食盐水洗涤两次; 收集水层, EA 萃取两次; 合并有机层, 旋干, 柱色谱纯化, 得 887 mg 深红色固体, 收率 53.1%^[16]。

1.6 化合物 18 的合成 分别取化合物 17、双(2-氯乙基)氨基: 780 mg (2.0 mmol)、390 mg (2.2 mmol), 加入到 50 mL 单口圆底烧瓶中, 加入正丁醇, 称取碳酸钠 42 mg 加入到反应瓶中, 120 °C 搅拌回流反应; 反应 24 h 后加入碳酸钠粉末 42 mg; 反应 48 h 后再次加入碳酸钠粉末 42 mg; 反应 72 h 后 TLC 检测反应进度, 反应进行 4~6 天。反应完全后, 自然冷却到室温, 减压旋蒸除去溶剂, 加入二氯甲烷 20 mL 溶解; 用 pH=1 的盐酸溶液洗涤 4 次, 合并水层; 搅拌下向水层中缓慢加入氢氧化钠, 调节 pH 至 13 左右, 用二氯甲烷萃取 5 次; 合并有机层旋干, 柱色谱纯化, 得棕色固体 413 mg, 即化合物 18, 收率 53%^[17]。

1.7 目标化合物 1、5 的合成 分别称取化合物 18、研磨后的碳酸钾粉末: 121 mg (0.3 mmol)、24 mg (0.2 mmol) 加入到 25 mL 单口圆底烧瓶中; 加入适量无水二氯甲烷, 室温搅拌 10 min; 取二乙胺基甲酰氯 40 mg (0.3 mmol) 滴加到反应瓶中, 室温搅拌 3 h。反应完全后减压旋干反应液, EA 溶解, 饱和食盐水洗涤 2~3 次, 萃取水层 2 次, 合并有机层, 旋干后柱色谱纯化, 制得暗红色固体 123 mg, 即化合物 1, 收率 85%, 熔点 92~93 °C。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.96 (s, 1H, Ar-H), 7.69 (s, 1H, Ar-H), 7.32 (m, 2H, Ar-H), 7.19 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H, Ar-H), 7.14 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H, Ar-H), 7.01 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, Ar-H), 5.03 (s, 1H, Bn-H), 3.38 (m, 4H, piperazine-H), 3.25 (m, 4H, -CH₂-), 2.20 (m, 4H, piperazine-H), 2.48 (s, 3H, COCH₃), 1.15 (t, $J = 8.0$ Hz, 6H, -CH₃); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 193.00 (C=O), 164.43 (C=O), 138.00 (Ar-C), 135.77 (Ar-C), 135.15 (Ar-C), 132.31 (Ar-C), 128.93 (Ar-C), 128.09 (Ar-C), 127.171 (Ar-C), 126.84 (Ar-C), 116.93 (Ar-C), 116.33 (Ar-C), 110.33 (Ar-C), 109.21 (Ar-C), 50.96 (-CH₂-), 50.74 (2C, piperazine-C), 47.19 (2C, piperazine-C), 41.71 (-CH₂-), 21.41 (-CH₂-), 13.16 (-CH₃)。

目标化合物 5 的制备同上, 暗红色固体, 收率 83%, 熔点 142~143 °C。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.00 (s, 1H, Ar-H), 7.71 (s, 1H, Ar-H), 7.47 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H, Ar-H), 7.33 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, Ar-H), 7.29 (s, 1H, Ar-H), 7.21 (d, $J = 12$ Hz, 1H, Ar-H), 7.15 (d, $J = 8$ Hz, 2H, Ar-H), 7.07 (t, $J = 4.0$ Hz, 1H, Ar-H), 7.03 (s, 1H, Ar-H), 5.32 (s, 1H, Bn-H), 3.94 (s, 4H, piperazine-

H), 3.26 (s, 4H, piperazine-H), 2.49 (s, 3H, COCH₃); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 193.07 (C=O), 163.65 (C=O), 147.73 (Ar-C), 135.78 (Ar-C), 135.33 (Ar-C), 132.66 (Ar-C), 129.04 (Ar-C), 129.94 (Ar-C), 128.681 (Ar-C), 128.21 (Ar-C), 127.28 (Ar-C), 126.92 (Ar-C), 126.72 (Ar-C), 117.05 (Ar-C), 116.420 (Ar-C), 110.80 (Ar-C), 109.92 (Ar-C), 51.49 (2C, piperazine-C), 50.85 (2C, piperazine-C), 29.68 (-CH₂-), 27.07 (-CH₃)。

1.8 目标化合物 2~4 的合成 分别称取化合物 12、EDCI (1-乙基-(3-二甲氨基丙基) 碳酰二亚胺盐酸盐)、HOBT (1-羟基苯并三唑): 215 mg (1 mmol)、230 mg (1.2 mmol)、162 mg (1.2 mmol), 将三者加入到单口圆底反应瓶中, 加入无水二氯甲烷, 室温搅拌 1 h; 称取 200 mg (0.4 mmol) 化合物 18, 加入到反应瓶中, 室温搅拌 12 h。反应完全后加入少量二氯甲烷稀释, 饱和氯化钠溶液洗涤 3 次, 水层用 EA 萃取 2 次, 合并有机相, 减压旋干, 柱色谱纯化, 制得 145 mg 灰白色固体 Boc-2, 收率为 62%。将 Boc-2 加入到 10 mL 单口圆底反应瓶, 量取 2 mL 无水二氯甲烷加入到反应瓶中, 冰浴下搅拌, 量取三氟乙酸 2 mL 加入到反应瓶中, 冰浴搅拌 30 min, 室温搅拌 7 h。反应完全后减压蒸馏除去溶剂, 加入二氯甲烷溶解, 饱和碳酸氢钠洗涤 3 次, 水层用二氯甲烷萃取两次, 合并有机相, 柱色谱制得 113 mg 的浅黄色固体, 即化合物 2, 收率 85%, 熔点 117~118 °C。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.94 (s, 1H, Ar-H), 7.69 (s, 1H, Ar-H), 7.30 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, Ar-H), 7.17 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, Ar-H), 7.11 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H, Ar-H), 6.95 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, Ar-H), 5.28 (s, 1H, Bn-H), 3.99 (m, 1H, CO-H), 3.76 (m, 2H, NHC-H), 3.64~3.01 (m, 8H, piperazine-H), 2.45 (s, 3H, COCH₃), 2.17~1.65 (m, 4H, -CH₂-); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 192.97 (C=O), 170.21 (C=O), 138.00 (Ar-C), 147.53 (Ar-C), 135.69 (Ar-C), 135.60 (Ar-C), 128.94 (Ar-C), 128.12 (Ar-C), 127.16 (Ar-C), 126.83 (Ar-C), 116.92 (Ar-C), 116.39 (Ar-C), 110.76 (Ar-C), 109.89 (Ar-C), 57.99 (-CH₂-), 51.24 (piperazine-C), 51.06 (piperazine-C), 50.76 (piperazine-C), 47.14 (piperazine-C), 45.21 (-CH₂-), 42.54 (-CH₂-), 30.52 (-CH₃), 27.388 (-CH₂-), 25.72 (-CH₂-)。

目标化合物 3 的制备同上, 浅黄色固体, 收率 81%, 熔点 100~101 °C。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.97 (s, 1H, Ar-H), 7.71 (s, 1H, Ar-H), 7.29~7.36 (m, 2H, Ar-H), 7.19 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, Ar-H), 7.14 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H, Ar-H), 6.97~7.00 (m, 1H, Ar-H), 5.30 (s, 1H, Bn-H), 3.89 (m, 1H, CO-H-NH₂), 3.78~3.63 (m,

4H, piperazine-H), 3.23~3.08 (m, 4H, piperazine-H), 2.49 (s, 3H, COCH₃), 1.91 (m, 1H, -CH-), 1.03~0.92 (m, 6H, -CH₃); ¹³CNMR (100 MHz, CDCl₃) δ 192.98 (C=O), 173.11 (C=O), 147.73 (Ar-C), 135.72 (Ar-C), 135.25 (Ar-C), 132.54 (Ar-C), 128.96 (Ar-C), 128.17 (Ar-C), 127.23 (Ar-C), 126.85 (Ar-C), 116.97 (Ar-C), 116.39 (Ar-C), 110.74 (Ar-C), 109.70 (Ar-C), 55.94 (-CH₂-), 51.60 (piperazine-C), 51.14 (piperazine-C), 50.79 (piperazine-C), 45.53 (piperazine-C), 42.19 (-CH₂-), 31.89 (-CH₂-), 27.39 (-CH₃), 20.05 (-CH₃), 16.52 (-CH₃)。

目标化合物 **4** 的制备同上, 浅黄色固体, 收率 82%, 熔点 130~131 °C。 ¹HNMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.95 (s, 1H, Ar-H), 7.70 (s, 1H, Ar-H), 7.32 (d, *J* = 4.0 Hz, 2H, Ar-H), 7.19 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, Ar-H), 7.14 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, Ar-H), 6.97 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, Ar-H), 5.30 (s, 1H, Bn-H), 3.95 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, CO-H-NH₂), 3.79 (s, 2H, piperazine-H), 3.64 (s, 2H, piperazine-H), 3.18 (m, 4H, piperazine-H), 2.68 (s, 3H, COCH₃), 1.33 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H, -CH₃); ¹³CNMR (100 MHz, CDCl₃) δ 193.02 (C=O), 173.85 (C=O), 147.72 (Ar-C), 135.71 (Ar-C), 135.29 (Ar-C), 132.58 (Ar-C), 128.98 (Ar-C), 128.16 (Ar-C), 127.21 (Ar-C), 126.87 (Ar-C), 116.98 (Ar-C), 116.40 (Ar-C), 110.75 (Ar-C), 109.81 (Ar-C), 51.41 (-CH₂-), 51.15 (piperazine-C), 50.80 (piperazine-C), 46.82 (piperazine-C), 45.20 (piperazine-C), 42.26 (-CH₂-), 27.40 (-CH₂-), 20.99 (-CH₃)。

1.9 目标化合物 6 的合成 取化合物 **18** 95 mg (0.2 mmol) 的化合物 **18**, 溶于无水二氯甲烷的单口圆底反应瓶中, 置于冰浴下, 二甲胺基磺酰氯 43 mg (0.3 mmol) 滴加到反应瓶中, 约 20 min 滴加完毕, 冰浴下搅拌 30 min。反应完全后用二氯甲烷稀释, 饱和食盐水洗涤 2 次, 二氯甲烷萃取水层 3 次, 收集有机相, 旋干, 柱色谱纯化制得酒红色固体化合物 **6**, 重 100 mg, 收率 88%, 熔点 96~97 °C。 ¹HNMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.98 (s, 1H, Ar-H), 7.71 (s, 1H, Ar-H), 7.33 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, Ar-H), 7.19 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, Ar-H), 7.14 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H, Ar-H), 6.98 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, Ar-H), 5.31 (s, 1H, Bn-H), 3.42 (t, *J* = 4.0 Hz, 4H, piperazine-H), 3.23 (t, *J* = 4.0 Hz, 4H, piperazine-H), 2.87 (s, 6H, -CH₃), 2.48 (s, 3H, COCH₃); ¹³CNMR (100 MHz, CDCl₃) δ 193.00 (C=O), 147.68 (Ar-C), 135.75 (Ar-C), 135.27 (Ar-C), 132.64 (Ar-C), 129.00 (Ar-C), 128.17 (Ar-C), 127.22 (Ar-C), 126.88 (Ar-C), 117.01 (Ar-C), 116.53 (Ar-C), 110.75 (Ar-C), 109.94 (Ar-C), 51.06 (-CH₂-), 50.82 (piperazine-C), 46.43 (piperazine-C), 38.24 (-CH₂-), 29.64 (-CH₂-), 27.42

(-CH₃)。

1.10 化合物 19、21 的合成 分别取 6-氯嘌呤、对碘苄溴: 200 mg (1.29 mmol)、540 mg (1.81 mmol) 加入到反应瓶, 乙腈作溶剂, 常温下搅拌 15 min; 将溶于乙腈的四丁基氟化铵 570 mg (TBAF, 2.20 mmol) 滴入反应液中, 反应 48 h。后处理: 将反应液旋干, 溶于 EA, 用饱和 NaCl 水溶液洗 3 次, 取有机层, 旋干后柱色谱分离, 得化合物 **19**, 重 290 mg, 黄色固体, 收率为 63.4%。

化合物 **21** 的反应步骤同上, 收率 52.3%。

1.11 化合物 20、22 的合成 分别取化合物 **19**、对碘苯胺: 410 mg (1.01 mmol)、270 mg (1.21 mmol) 于反应瓶中, 加入 THF 12 mL 做溶剂, 搅拌溶解, 滴入两滴浓盐酸, 68 °C 下回流 5 h 后反应完全。后处理: 将反应液旋干, 用 EA 溶解, 加入 1 mol·L⁻¹ K₂CO₃ 水溶液搅拌 30 min, 置于分液漏斗, 取有机层并用饱和 NaCl 水溶液洗 3 遍, 旋干, 柱色谱分离得化合物 **20**, 淡红色固体 510 mg, 收率为 85.1%。

化合物 **22** 的反应步骤同上。

1.12 目标化合物 7、8、10 的合成 分别取化合物 **20**、Boc-缬氨酸: 120 mg (0.21 mmol)、40 mg (0.25 mmol) 溶于吡啶, 置于-15 °C 的冰盐浴中 20 min, 滴加 POCl₃ 60 mg (0.39 mmol), 冰盐浴中反应 30 min。后处理: 将反应液倒入冰水中, 搅拌。静置至室温, 加入 EA, 用饱和 NaCl 洗, 取有机层旋干。后加入无水二氯甲烷 3 mL, 置于冰浴, 滴入三氟乙酸 3 mL。反应约 3 h。将反应液旋干, 用 10 mL EA 溶解, 饱和 NaHCO₃ 水溶液洗 3 遍, 饱和 NaCl 水溶液洗 3 遍, 取有机层, 旋干, 柱色谱分离。得化合物 **8**, 淡黄色粉末 90 mg, mp 116~117 °C, 收率为 62.3%。 ¹HNMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.07 (s, 1H, NH), 8.30 (s, 1H, N=C-H), 8.15 (d, *J* = 8.4 Hz, Hz, 2H, Ar-H), 7.71 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, Ar-H), 7.58 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, Ar-H), 7.12 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, Ar-H), 5.34 (s, 1H, -CH₂), 2.05 (t, 1H, -CH), 0.95 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, -CH₃), 0.85 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, -CH₃); ¹³CNMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 173.39 (C=O), 152.05 (Purine-C), 151.65 (Purine-C), 150.77 (Purine-C), 141.29 (Purine-C), 140.02 (Purine-C), 137.72 (Ar-C), 137.63 (Ar-C), 137.11 (Ar-C), 137.02 (Ar-C), 136.92 (Ar-C), 129.93 (Ar-C), 122.91 (Ar-C), 122.7 (Ar-C), 116.92 (Ar-C), 94.14 (Ar-C), 85.73 (Ar-C), 60.47 (-CH), 45.81 (-CH₂), 31.44 (-CH), 19.90 (-CH₃), 16.96 (-CH₃)。

化合物 **10** 的制备方法同上, 淡黄色粉末, 收率为 51.7%, mp 113~114 °C。 ¹HNMR (400 MHz, DMSO-

d_6) δ 10.94 (s, 1H, NH), 8.30 (s, 1H, N=C-H), 8.16 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, Ar-H), 7.71 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, Ar-H), 7.60 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, Ar-H), 7.27 (m, 4H, Ar-H), 7.19 (m, 1H, Ar-H), 7.12 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, Ar-H), 5.33 (s, 1H, -CH₂), 3.72 (s, 1H, -CH), 3.09 (m, 1H, -CH₂), 2.68 (m, 1H, -CH₂); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 172.96 (C=O), 152.04 (Purine-C), 151.66 (Purine-C), 150.73 (Purine-C), 141.34 (Purine-C), 139.98 (Purine-C), 138.91 (Ar-C), 137.66 (Ar-C), 137.10 (Ar-C), 136.89 (Ar-C), 129.91 (Ar-C), 129.60 (Ar-C), 128.29 (Ar-C), 126.30 (Ar-C), 122.89 (Ar-C), 116.95 (Ar-C), 94.10 (Ar-C), 85.75 (Ar-C), 56.92 (-CH), 45.83 (-CH₂), 40.62 (-CH₂).

化合物 **7** 的制备以化合物 **22** 为原料, 方法同上, 收率为 57.4%, mp 218~220 °C。¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.00 (s, 1H, NH), 8.20 (s, 1H, N=C-H), 8.16 (d, $J = 10$ Hz, 2H, Ar-H), 7.59 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, Ar-H), 3.54 (m, 1H, -CH), 1.24 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H, -CH₃); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 174.12 (C=O), 151.88 (Purine-C), 151.52 (Purine-C), 151.16 (Purine-C), 142.13 (Purine-C), 140.10 (Purine-C), 137.03 (Ar-C), 122.77 (Ar-C), 116.86 (Ar-C), 85.59 (Ar-C), 51.21 (-CH), 29.70 (-CH₃), 21.37 (-CH₃).

1.13 目标化合物 9 的合成 化合物 **9** 的制备方法同化合物 **7**, 吡啶中-15 °C 冰盐浴条件下反应 30 min, 将反应液倒入冰水中, 搅拌。静置至室温, 加入 EA, 用饱和 NaCl 洗, 取有机层旋干, 柱色谱分离得淡黄色粉末, 收率 58.1%, mp 119~120 °C。¹H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 10.09 (s, 1H, NH), 9.82 (s, 1H, NH), 8.29 (s, 1H, N=C-H), 8.12 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H, Ar-H), 7.71 (d, $J = 5.2$ Hz, 2H, Ar-H), 7.59 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H, Ar-H), 7.13 (d, $J = 5.2$ Hz, 2H, Ar-H), 5.34 (s, 1H, -CH₂), 3.17 (s, 2H, -CH₂), 2.30 (s, 6H, -(CH₃)₂N); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 168.20 (C=O), 151.87 (Purine-C), 151.66 (Purine-C), 150.69 (Purine-C), 141.37 (Purine-C), 139.90 (Purine-C), 137.66 (Ar-C), 137.08 (Ar-C), 136.87 (Ar-C), 129.94 (Ar-C), 122.94 (Ar-C), 116.95 (Ar-C), 94.09 (Ar-C), 85.82 (Ar-C), 63.38 (-CH₂), 45.83 (-CH₂), 45.52 (-CH₃)₂N)。

2 抗肿瘤活性实验

初步活性实验采用 MTT 法对人乳腺癌细胞 MCF-7、人胰腺癌细胞 PANC-1、人神经瘤细胞株 SY5Y、人肺癌细胞 A549 进行体外抗肿瘤活性测试, 以紫杉醇作为阳性对照品。

实验前的无菌处理: 无菌室及无菌操作台用紫外灯照射 0.5~1 h 进行灭菌, 无菌操作台面用 70% 的乙醇溶液擦拭, 无菌操作的风扇运转 15 min, 保证良

好的消毒效果后再进行实验操作。

细胞接种: 收集对数生长期细胞, 调整细胞悬液浓度, 以每孔 1000~10 000 个细胞接种到 96 孔板, 每孔体积 200 μ L。

加药处理: 5% CO₂、37 °C 孵育 24 h 后, 加入 200 μ L 含 40 μ mol·L⁻¹ 化合物的完全培养基, 加入等体积的对照组培养基, 每个药物设置 3 个复孔。

加 MTT 溶液: 药物处理后在 5% CO₂、37 °C 孵育 24 h 后, 至细胞单层铺满孔底 (96 孔平底板), 每孔加入含 20 μ L MTT 溶液 (0.5% MTT) 的培养液 200 μ L, 继续培养 3 h。

终止培养: 小心吸去孔内液体, 每孔加二甲基亚砜 150 μ L, 置于摇床上振荡 15 min, 充分溶解结晶物后停止。

OD 值检测: 使用酶标仪在 570 nm 波长下检测每孔 OD 值。药物对细胞的抑制效果用相对抑制率来衡量: 抑制率 (%) = (对照组平均 OD 值 - 给药组平均 OD 值) / 对照组平均 OD 值 \times 100%。

References

- [1] Neuzillet C, Tijeras-Raballand A, de Mestier L, et al. MEK in cancer and cancer therapy [J]. *Pharmacol Ther*, 2014, 141: 160-171.
- [2] Libero S, Lippman SM, El-Naggar AK. Targeting the MAPK-RAS-RAF signaling pathway in cancer therapy [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2012, 16: 103-119.
- [3] Zhao YJ, Adjei AA. The clinical development of MEK inhibitors [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2014, 11: 385-400.
- [4] Hao PQ, An S, Yang Y, et al. The progress on MEK kinases and their inhibitors [J]. *Chin J Cell Biol (中国细胞生物学报)*, 2015, 37: 1425-1431.
- [5] Spicer JA. New small-molecule inhibitors of mitogen-activated protein kinase [J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2008, 3: 801-817.
- [6] Barrett SD, Bridges AJ, Dudley DT, et al. The discovery of the benzhydroxamate MEK inhibitors CI-1040 and PD 0325901 [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, 18: 6501-6504.
- [7] Robarge KD, Lee W, Eigenbrot C, et al. Structure based design of novel 6,5 heterobicyclic mitogen-activated protein kinase (MEK) inhibitors leading to the discovery of imidazo [1,5-a] pyrazine G-479 [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2014, 24: 4714-4723.
- [8] Heald RA, Jackson P, Savy P, et al. Discovery of novel allosteric mitogen-activated protein kinase (MEK)1,2 inhibitors

- possessing bidentate Ser212 interactions [J]. *J Med Chem*, 2012, 55: 4594–4604.
- [9] Nobuya I, Naoki H, Joseph EW, et al. Enhanced inhibition of ERK signaling by a novel allosteric MEK inhibitor, CH5126766, that suppresses feedback reactivation of RAF activity [J]. *Cancer Res*, 2013, 73: 4050–4060.
- [10] Ohren JF, Chen H, Pavlovsky A, et al. Structures of human MAP kinase1 (MEK1) and MEK2 describe novel noncompetitive kinase inhibition [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2004, 11: 1192–1197.
- [11] Lito P, Saborowski A, Yue J, et al. Disruption of CRAF-mediated MEK activation is required for effective MEK inhibition in KRAS mutant tumors [J]. *Cancer Cell*, 2014, 25: 697–710.
- [12] Aoki T, Hyohdoh I, Furuichi N, et al. The sulfamide moiety affords higher inhibitory activity and oral bioavailability to a series of coumarin dual selective RAF/MEK inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2013, 23: 6223–6227.
- [13] Flynn BL, Hamel E, Jung MK. One-pot synthesis of benzo [b] furan and indole inhibitors of tubulin polymerization [J]. *J Med Chem*, 2002, 45: 2670–2673.
- [14] Suzuki N, Somei M, Seki A, et al. Novel bromomelatonin derivatives as potentially effective drugs to treat bone diseases [J]. *J Pineal Res*, 2008, 45: 229–234.
- [15] Ran JQ, Huang N, Xu H, et al. Anti HIV-1 agents 5: synthesis and anti-HIV-1 activity of some *N*-arylsulfonyl-3-acetylindoles *in vitro* [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2010, 20: 3534–3536.
- [16] Wang C, Sperry J. Total synthesis of the photoprotecting dipyrrolobenzoquinone (+)-terreusinone [J]. *Org Lett*, 2011, 13: 6444–6447.
- [17] Liu KG, Robichaud AJ. A general and convenient synthesis of *N*-aryl piperazines [J]. *Circ Res*, 2005, 46: 7921–7922.