

## 小分子 ERK 抑制剂的研究进展

梁婷婷<sup>1,2</sup>, 王文杰<sup>1</sup>, 郝思远<sup>1</sup>, 何光超<sup>1,2</sup>, 徐云根<sup>1,2\*</sup>( <sup>1</sup>中国药科大学药物化学系, 南京 211198; <sup>2</sup>江苏省药物分子设计与成药性优化重点实验室, 南京 211198)

**摘要** 细胞外信号调节激酶(ERK)是一种丝/苏氨酸蛋白激酶。作为 RAS-RAF-MEK-ERK 信号通路中关键的下游蛋白, 其异常活化在肿瘤的发生发展中起着重要作用。选择性 ERK1/2 抑制剂能够阻断 ERK 信号通路, 同时克服上游靶点突变而导致的耐药性。本文概述了 MAPK 信号通路的组成、ERK 的结构与功能以及 ERK 信号通路在肿瘤发生发展中的作用, 并重点介绍一些具有代表性的处于临床和临床前研究阶段的 ERK 抑制剂。

**关键词** 细胞外信号调节激酶; 细胞外信号调节激酶抑制剂; 抗肿瘤; 耐药性; 进展

中图分类号 R914.5 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2020)03-0260-10

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.20200302

引用本文 梁婷婷, 王文杰, 郝思远, 等. 小分子 ERK 抑制剂的研究进展[J]. 中国药科大学学报, 2020, 51(3): 260–269.

Cite this article as: LIANG Tingting, WANG Wenjie, HAO Siyuan, et al. Research progress of ERK small molecule inhibitors[J]. J China Pharm Univ, 2020, 51(3): 260–269.

## Research progress of ERK small molecule inhibitors

LIANG Tingting<sup>1,2</sup>, WANG Wenjie<sup>1</sup>, HAO Siyuan<sup>1</sup>, HE Guangchao<sup>1,2</sup>, XU Yungen<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup>Department of Medicinal Chemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198;<sup>2</sup>Jiangsu Key Laboratory of Drug Molecular Design and Optimization, Nanjing 211198, China

**Abstract** Extracellular signal-regulated kinase (ERK) is a kind of serine/threonine protein kinase. As a key downstream protein in RAS-RAF-MEK-ERK signaling pathway, its abnormal activation plays an important role in the development of tumors. Selective ERK1/2 inhibitors can block ERK signaling pathway while overcoming drug resistance caused by upstream target mutation. In this paper, the components of MAPK signaling pathway, the structure and functions of ERK and the role of ERK signaling pathway in tumor development are summarized, and some representative ERK inhibitors in clinical or preclinical studies are emphasized.

**Key words** extracellular signal-regulated kinase (ERK); ERK inhibitors; antitumor; drug resistance; progress

This study was supported by the Undergraduate Innovation and Entrepreneurship Training Program of China Pharmaceutical University (No. 201910316099)

RAS-RAF-MEK-ERK 信号通路是一条广泛存在于哺乳动物细胞中的信号级联通路, 在细胞的分化、存活、衰老和凋亡等细胞活动中发挥着极其重要的作用<sup>[1-2]</sup>。大量研究表明, 在肿瘤的发展进程中, 该信号通路处于持续异常激活状态。因此, 以 RAS-RAF-MEK-ERK 信号通路各成员蛋白为靶点的抗肿瘤药物的研发受到了人们的广泛重视<sup>[3]</sup>。目前, 虽然尚无 ERK 抑制剂成功上市, 但是随着人

们对 ERK 结构与功能的深入研究, ERK 逐渐成为抗肿瘤药物研究的十分重要的靶点<sup>[4]</sup>。

## 1 MAPK 信号通路

丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)信号通路可以将细胞外信号转导至细胞内, 从而调节各种生物学功能<sup>[5]</sup>。在生长因子、氧化应激、炎症因子等细胞外信号的刺激

收稿日期 2019-11-12 \* 通信作者 Tel: 13505155520 E-mail: xyg64@126.com

基金项目 中国药科大学大学生创新创业训练计划资助项目(No. 201910316099)

下,该信号通路被激活,通过三级激酶级联的形式(MAPKKK→MAPKK→MAPK)传导细胞信号,调节哺乳动物细胞内相关基因的转录和表达,从而调控细胞的增殖、分化、凋亡、炎症反应<sup>[6]</sup>以及血管发育<sup>[7]</sup>等生物学功能。目前,在哺乳动物中,已经发现了5种不同的MAPKs,分别为细胞外信号调

节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)、C-Jun N末端激酶(C-Jun N-terminal kinase, JNK)、p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase, p38MAPK)、ERK3/4和ERK5<sup>[8]</sup>(图1)。

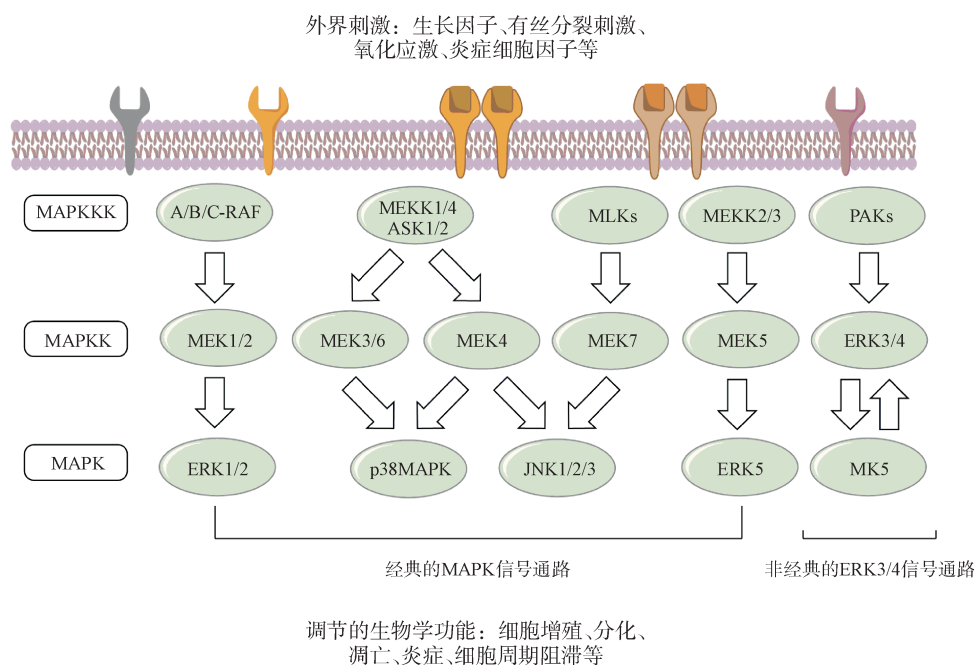


图1 哺乳动物体内的MAPKs信号传导通路

ASK: 凋亡信号调节激酶(apoptosis signal-regulation kinase); MAPKKK: 丝裂原活化蛋白激酶激酶激酶(mitogen-activated protein kinase kinase kinase); MAPKK: 丝裂原活化蛋白激酶激酶(mitogen-activated protein kinase kinase); MAPK: 丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase); MLKs: 混合谱系激酶(mixed lineage kinases); MK: 丝裂原活化蛋白激酶激活蛋白激酶(MAPK-activated protein kinase); PAKs: p21活化的激酶(p21-activated kinases)

RAS-RAF-MEK-ERK信号通路具有高度的保守性<sup>[9]</sup>,其激活过程如下:首先,具有GTPase活性的RAS蛋白被上游的受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinase, RTK)、细胞因子受体(cytokine receptor, CKR)和G蛋白偶联受体(G protein coupled receptor, GPCR)等细胞表面受体激活<sup>[10]</sup>,通过鸟苷酸交换因子(guanine nucleotide exchange factors, GEFs)使RAS发生构象变化<sup>[11]</sup>,从GDP结合的非活化状态变为GTP结合的活化状态<sup>[12]</sup>。然后,活化的RAS通过与RAF的N端结构域结合,将RAF从细胞质招募到细胞膜上使其二聚化并激活<sup>[13]</sup>。RAF是一个丝/苏氨酸蛋白激酶<sup>[14]</sup>,活化的RAF能够进一步与下游的MEK蛋白结合,使其丝/苏氨酸残基磷酸化而导致MEK的激活<sup>[10]</sup>。MEK1/2是丝/

苏氨酸和酪氨酸的双重特异性蛋白激酶,它能够磷酸化其下游的唯一底物 $erk1/2$ 的苏氨酸和酪氨酸残基使其活化。活化的ERK进入细胞核,对其他激酶和转录因子等多种底物如RSK、CREB、Elk-1、NF- $\kappa$ B等进行磷酸化修饰<sup>[15]</sup>,改变相关基因的表达,最终引起细胞周期进展以及细胞增殖、分化、代谢、凋亡等细胞行为的变化<sup>[16]</sup>(图2)。

## 2 细胞外信号调节激酶(ERK)

### 2.1 ERK的结构与功能

与其他蛋白激酶类似,ERK蛋白也具有由N端和C端卷曲形成的双叶结构。其N端由5股反向平行的 $\beta$ 片层结构( $\beta 1 \sim \beta 5$ )、1个 $\alpha$ C螺旋结构和一个甘氨酸富集环结构组成,C端则由6个保守

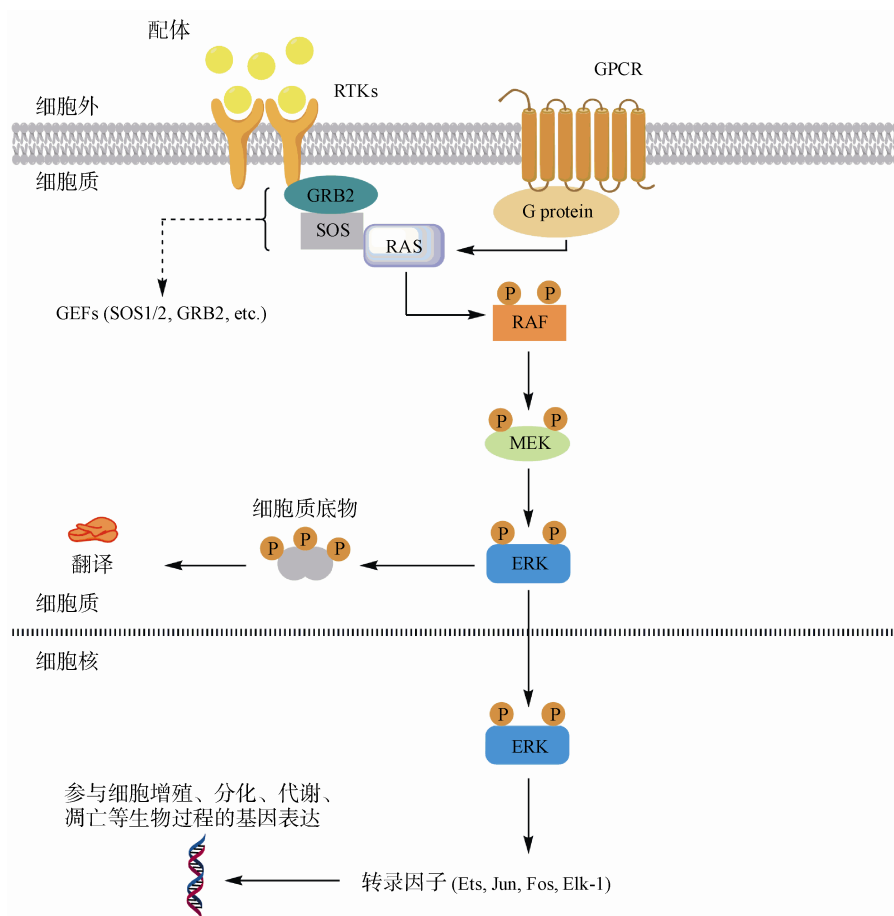


图2 RAS-RAF-MEK-ERK信号通路

GEFs: 鸟苷酸交换因子(guanine nucleotide exchange factors); GPCR: G蛋白偶联受体(G protein coupled receptor); GRB2: 生长因子受体结合蛋白2 (growth factor receptor bound protein 2); RTK: 受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinase); SOS: son of sevenless homolog

的 $\alpha$ 螺旋结构和4股较短的 $\beta$ 片层结构( $\beta 6 \sim \beta 9$ )组成<sup>[17]</sup>(图3)。

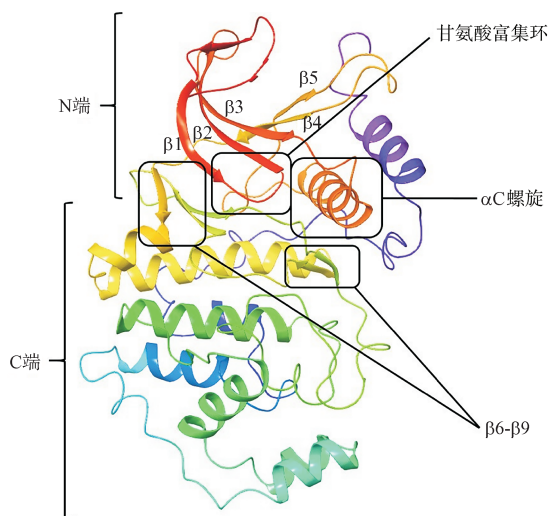


图3 ERK2的二级结构(PDB:2OJJ)

几乎所有的哺乳动物体内都有ERK蛋白的表达。到目前为止,ERK蛋白被鉴定出有两个亚型:ERK1和ERK2<sup>[18]</sup>,二者在氨基酸序列上同源性高达84%<sup>[19]</sup>。以人源ERK为例,ERK1由379个氨基酸残基组成,而ERK2则由360个氨基酸残基组成<sup>[20]</sup>。对于ERK1和ERK2的功能差异,目前主流的观点是ERK1和ERK2的生物学功能类似,只是两个亚型在整个ERK蛋白活性中的贡献度不同<sup>[21]</sup>。但是Buscà等<sup>[18]</sup>发现,在ERK1/2基因破坏的小鼠中,ERK1/2表现出显著的表型差异:*erk1*<sup>-/-</sup>小鼠能够存活和正常繁殖,而ERK2被破坏则导致早期胚胎死亡。在对ERK1和ERK2之间的功能差异作进一步研究时,仅有少数实验揭示了ERK1和ERK2在功能上的微小差异,其具体的生物学机制仍有待探究。

目前,已知的ERK底物数量多达上百种,主要

分布在细胞膜、细胞质以及细胞核。ERK1/2 在细胞质底物包括 RSK 家族蛋白激酶、磷蛋白磷酸酶、cAMP 磷酸二酯酶、胞浆磷脂酶 A<sub>2</sub>、细胞骨架蛋白等<sup>[22-25]</sup>,而 ERK1/2 在细胞核内的底物大多是转录因子,主要是转录因子 TCF 家族<sup>[26]</sup>。ERK 通过对不同底物的调节,从而发挥不同的生物学作用。

## 2.2 ERK 信号通路在肿瘤发生发展中的作用

在约 30% 的肿瘤中,RAS-RAF-MEK-ERK 信号通路均处于异常激活状态。该信号通路中各成员蛋白的突变和异常表达在多种恶性肿瘤的发生发展过程中都发挥了重要作用。例如:在约 1/3 的肿瘤中存在 RAS 的突变激活,其中 KRAS 的突变比率最高,占人类肿瘤总数的 20% 以上,在前列腺癌中的突变比率更是高达 90%<sup>[27]</sup>;在 7% 的肿瘤中含有 BRAF 突变<sup>[28]</sup>,其中最常见的突变为 BRAF-V600E 突变,在黑色素瘤中的突变比率高达 63%,在甲状腺乳头状癌中突变比率也有 50% 以上<sup>[29]</sup>;在胃癌<sup>[30]</sup>、黑色素瘤<sup>[31]</sup>、结直肠癌<sup>[32]</sup>和肺癌<sup>[33]</sup>中均表现出 MEK 突变。

因此,针对 RAS-RAF-MEK-ERK 信号通路研发的小分子靶向药物无疑在抗肿瘤药物研究领域占有突出地位<sup>[34]</sup>。

## 2.3 ERK 抑制剂的优势

目前,已有多个 BRAF 抑制剂和 MEK 抑制剂被美国 FDA 批准上市,用于治疗各种实体瘤,在临床治疗中取得了良好的效果。如:BRAF 抑制剂索拉非尼(sorafenib)、维罗非尼(vemurafenib)和达拉非尼(dabrafenib);MEK 抑制剂曲美替尼(trametinib)、司美替尼(selumetinib)和考比替尼(cobimetinib)。虽然在患者接受治疗的初期,肿瘤的发展进程得到了有效控制,但是在长时间服用该类靶向药物后,肿瘤细胞不可避免的产生了获得性耐药。与 RAS、BRAF 等在肿瘤细胞中的高突变率不同,到目前为止,ERK1/2 的获得性突变在肿瘤细胞中几乎没有出现<sup>[35]</sup>。其原因可能是细胞中 ERK1/2 能够调控激酶与转录因子等多种底物,一旦 ERK1/2 发生耐药性突变,将会失去对这些底物的有效调控,影响正常细胞活动,无法保证细胞的存活。而且,越来越多的临床前研究结果显示,ERK 抑制剂比 RAF 和 MEK 抑制剂具有更好的效果。Qin 等<sup>[36]</sup>发现,选择性敲除 ERK1/2 能够有效杀死 A375 黑色素瘤细胞,同时增强 A375 细胞对

BRAF 抑制剂维罗替尼的敏感性;Hatzivassiliou 等<sup>[37]</sup>发现,MEK 抑制剂耐药的细胞持续保持对 MAPK 信号通路的依赖,其对选择性 ERK1/2 抑制剂敏感,应用 ERK 抑制剂能够有效阻断细胞增殖。

因此,与抑制 MAPK 信号通路中的上游靶点相比,抑制下游的 ERK 同样能够起到阻断细胞信号转导的作用。更为重要的是,ERK 抑制剂能够克服肿瘤细胞对 RAF 抑制剂和 MEK 抑制剂的耐药性,在临床上具有更广泛的应用前景。

## 3 小分子ERK抑制剂的研究进展

鉴于在肿瘤的发生发展过程中,MAPK 信号通路发挥了重要作用,而 ERK 激酶又是 MAPK 信号通路中十分关键的下游靶点。因此,选择性抑制 ERK 能够阻断 MAPK 信号通路,同时逆转上游靶点突变产生的耐药性。虽然目前尚无 ERK1/2 抑制剂被正式批准上市,但是已经有一些小分子 ERK 抑制剂处于临床或临床前研究阶段,下面将重点介绍小分子 ERK 抑制剂的研究进展。

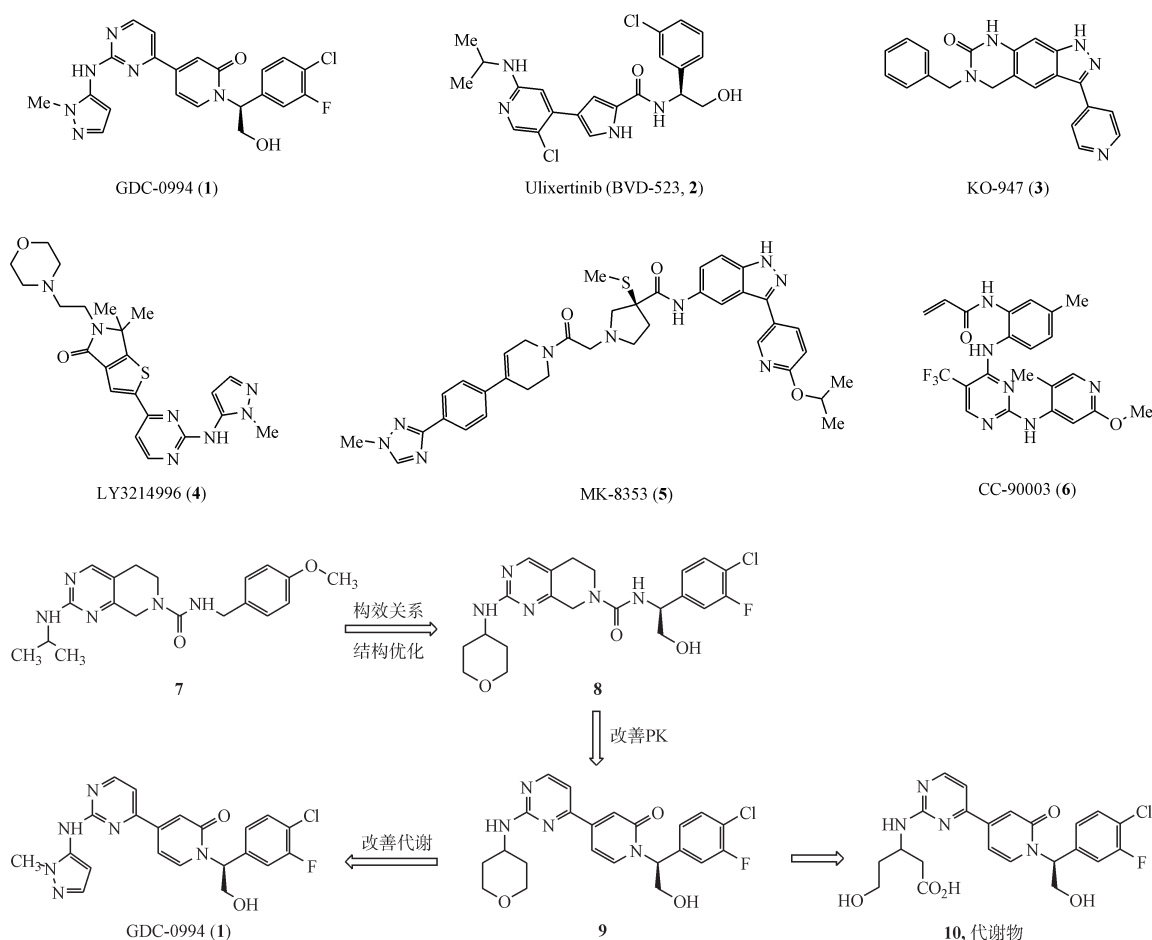
### 3.1 处于临床研究阶段的 ERK 抑制剂

近年来,已有多个 ERK 抑制剂进入临床研究,包括 GDC-0994(1)、Ulixertinib(BVD-523)(2)、KO-947(3)、LY3214996(4)、MK-8353(5)、CC-90003(6)、LTT462 等。

3.1.1 GDC-0994 GDC-0994(1)是由 Genentech 公司研发的口服的选择性 ERK1/2 抑制剂,其对 ERK1 和 ERK2 的 IC<sub>50</sub> 分别为 6.1 和 3.1 nmol/L。

2014 年,Genentech 公司通过高通量筛选得到四氢吡啶并嘧啶类化合物 7,其对 ERK2 的 IC<sub>50</sub> 为 106 nmol/L。以化合物 7 为先导化合物,经过结构优化得到化合物 8,其对 ERK2 的 IC<sub>50</sub> 提高到 2 nmol/L,并且在人 HCT116 结直肠癌的裸鼠移植模型中表现出较好的抗肿瘤效果<sup>[38]</sup>。但是,化合物 8 的药代动力学性质不佳,在动物体内清除率较高,口服生物利用度较低。为了改善化合物 8 的药代动力学性质,对其结构进行进一步优化,得到了化合物 9<sup>[39]</sup>。但是,由于化合物 9 中的四氢吡喃环在体内可以被代谢为羧基酸产物 10,使得化合物 9 的预测给药量过大(>1 g/d)。为了进一步提高化合物 9 的活性和代谢稳定性,将结构优化集中在四氢吡喃环的改造上,最终得到化合物 GDC-0994<sup>[40]</sup>。





分析GDC-0994与ERK2的共晶复合物(图4), 可以发现2-氨基嘧啶结构能够与铰链区的Met108、Leu107形成氢键作用, 吡啶酮羰基能够通过水分子与门控残基Gln105和催化残基Lys54形成相互作用, 羟甲基部分可以同时与Asp167和Asn154形成氢键作用, 氟氯取代的苯基能够结合到甘氨酸富集环结构下方的疏水口袋。此外, 5-氨基吡唑结构也能够与Lys114形成氢键相互作用。

动物实验结果表明, 在HCT116小鼠移植瘤模型中, GDC-0994能够显著降低p90RSK的磷酸化水平, 抑制肿瘤组织的生长。在临床前的安全性评价试验中, 与其他MEK和ERK抑制剂类似, GDC-0994也表现出一些不良反应, 包括大鼠体内由磷失调引发的软组织矿化、白蛋白水平下调和皮肤毒性、以及犬的胃肠道毒性等<sup>[40]</sup>。

目前, GDC-0994用于治疗局部晚期或转移性实体瘤的I期临床试验已经结束, 进一步的临床研究暂无报道。

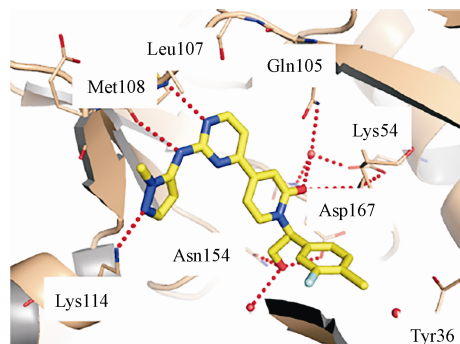


图4 化合物GDC-0994与ERK2的共晶复合物<sup>[40]</sup> (PDB:5K4I)

3.1.2 Ulixertinib Ulixertinib (BVD-523, VRT752271, 2)是由BioMed Valley Discoveries公司研发的可逆型ATP竞争性ERK1/2抑制剂, 其对ERK1的 $K_i < 0.3 \text{ nmol/L}$ , 对ERK2的 $K_i = 0.04 \text{ nmol/L}$ 。无论是对活化的ERK2(pERK2)还是非活化的ERK2, Ulixertinib均表现出强亲和力, 但是对pERK2的亲和力要强于非活化的ERK2。

体外细胞实验结果显示, 在BRAF<sup>V600E</sup>突变的UACC-62黑色素瘤细胞中, Ulixertinib浓度依赖性

地抑制 ERK1/2 的活性,使细胞周期被阻滞在 G<sub>1</sub> 期,从而发挥其抗增殖作用。此外,Ulixertinib 还能诱导 caspase-3/7 依赖性细胞凋亡通路的激活,促进肿瘤细胞的凋亡。动物实验结果表明,Ulixertinib 可以剂量依赖性抑制肿瘤的生长,同时对裸鼠体重基本没有影响<sup>[41]</sup>。更重要的是,在其他 MAPK 信号通路抑制剂耐药的模型中,Ulixertinib 仍然表现出抗增殖活性<sup>[42]</sup>。

目前,Ulixertinib 单独用药治疗晚期恶性肿瘤正处于 II 期临床研究阶段(NCT01781429),用于治疗急性骨髓性白血病和骨髓增生异常综合征正处于 I / II 期临床研究阶段(NCT02296242)。在药物联用方面,Ulixertinib 与白蛋白结合型紫杉醇(nab-paclitaxel)和吉西他滨(gemcitabine)联合应用治疗转移性胰腺癌正处于 I 期临床研究阶段(NCT02608229),与 CDK4/6 抑制剂哌柏西利(palbociclib)联合应用治疗晚期胰腺癌和其他实体瘤正处于 I 期临床研究阶段(NCT03454035)。

**3.1.3 LY3214996** LY3214996 (**4**) 是由礼来公司研发的口服的 ERK1/2 抑制剂(IC<sub>50</sub> = 5 nmol/L),在 BRAF 和 RAS 突变的肿瘤细胞中可以抑制 RSK1 的磷酸化水平。2016 年作为治疗晚期实体瘤的药物进入 I 期临床研究。其除了可以单独用药外,还可以与其他抗肿瘤药物联合使用,比如与 CDK4/6 抑制剂、PI3K/mTOR 抑制剂联用治疗 RAS 突变的非小细胞型肺癌<sup>[43]</sup>。

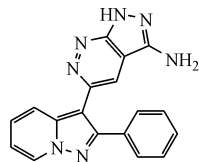
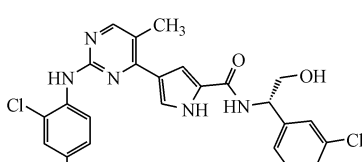
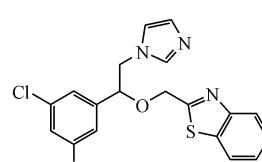
**3.1.4 MK-8353** MK-8353 (**5**) 是通过改善 SCH772984 的 PK 而优化得到的(ERK1:IC<sub>50</sub> = 20 nmol/L; ERK2:IC<sub>50</sub> = 7 nmol/L)。SCH772984 是由 Merck 公司通过基于亲和力的质谱高通量平台筛

选、鉴定并通过结构优化得到的 ATP 竞争性的 ERK1/2 抑制剂。分析共晶结构,发现吡啶环与铰链区的 Asp104 与 Met106 形成至关重要的氢键作用,吡咯烷与 Lys52 形成另一个关键的氢键,同时 P-loop 结构中的 Tyr34 残基翻转到 ATP 位点并堆叠到吡咯烷环的上方,导致 P-loop 结构发生扭曲,P-loop 结合口袋被打开产生一个可以被甲基取代的三唑环占据的空腔。这些结论也表明,MK-8353 对 ERK 的高选择性主要是通过变构抑制的方式实现的<sup>[44]</sup>。因此,MK-8353 不仅能够 ATP 竞争性地抑制 ERK1/2 的催化活性,还能够诱导或稳定 ERK 的构象,阻止其被 MEK 激活<sup>[45]</sup>。到目前为止 MK-8353 与帕姆单抗联用治疗晚期实体瘤已经进入 I 期临床研究阶段<sup>[46]</sup>。2018 年,MK-8353 与司美替尼联用治疗晚期或转移性实体瘤也进入 I 期临床研究<sup>[47]</sup>。

**3.1.5 CC-90003** CC-90003 (**6**) 是不可逆的共价结合的选择性 ERK1/2 抑制剂,主要用于治疗 KRAS 突变的肿瘤,2015 年进入 I 期临床研究。但是由于在 I 期临床试验中,其最大耐受剂量(MTD)结果不令人满意,目前已经暂停了其临床试验<sup>[48]</sup>。经过分析共晶复合物,发现 2-氨基嘧啶与铰链区形成至关重要的氢键作用,而丙烯酰胺基团则与 Cys(ERK1: Cys183; ERK2: Cys164) 形成不可逆的共价结合作用<sup>[49]</sup>。

### 3.2 尚处于临床前研究阶段的 ERK 抑制剂

除了上述介绍的已经进入临床的化合物,目前还有很多的 ERK 抑制剂处于临床前阶段或生物活性评价阶段。这些化合物主要包括 FR180204 (**11**)、VTX-11e (**12**)、BL-EI-001 (**13**)。

FR180204 (**11**)VTX-11e (**12**)BL-EI-001 (**13**)

**3.2.1 FR180204** Ohori 等<sup>[50]</sup>通过高通量筛选得到了 ATP 竞争性的 ERK1/2 抑制剂 FR180204 (**11**),对 ERK1 和 ERK2 的 IC<sub>50</sub> 分别为 0.51 μmol/L 和 0.33 μmol/L。

通过分析 FR180204 与 ERK2 的共晶复合物(图 5),发现 FR180204 占据了 ERK2 的 ATP 结合

口袋。FR180204 结构中的吡啶并吡嗪环 2' 位的氮原子与 Met108 形成氢键相互作用,3' 位的氨基与 Gln105 和 Asp106 形成氢键作用,吡啶并吡嗪环 3 位的氮原子与 Lys54 形成氢键作用。同时,FR180204 结构中吡啶并吡嗪环与 Leu156 存在 CH-π 型相互作用,吡啶并吡嗪环与 Cys166 存在 SH-π

型相互作用。此外,在共晶复合物中还观察到,甘氨酸富集环采取了一种有利于与FR180204结合的优势构象。这些独特的相互作用模式增强了FR180204对ERK2的选择性抑制,使其对p38 $\alpha$ 的选择性高达30倍,对MEK1、MKK4、IKK $\alpha$ 等其他激酶的选择性高100倍以上。

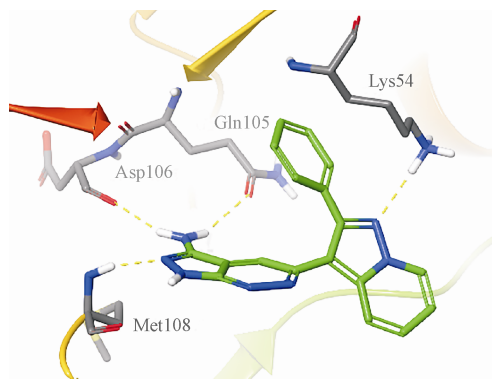


图5 FR180204与ERK2的共晶复合物(PDB:1TV0)

在Mv1Lu貂肺上皮细胞中,FR180204能够剂量依赖性地抑制TGF $\beta$ 诱导的AP-1的激活,其IC<sub>50</sub>为3.1  $\mu$ mol/L。动物实验结果表明,在CIA小鼠模型中,FR180204能够明显改善关节炎症状并恢复体重损失<sup>[51]</sup>。在登革病毒(DENV)感染的小鼠模型中,FR180204通过抑制ERK1/2的磷酸化,抑制肝细胞凋亡,减轻登革病毒诱导的肝损伤<sup>[52]</sup>。

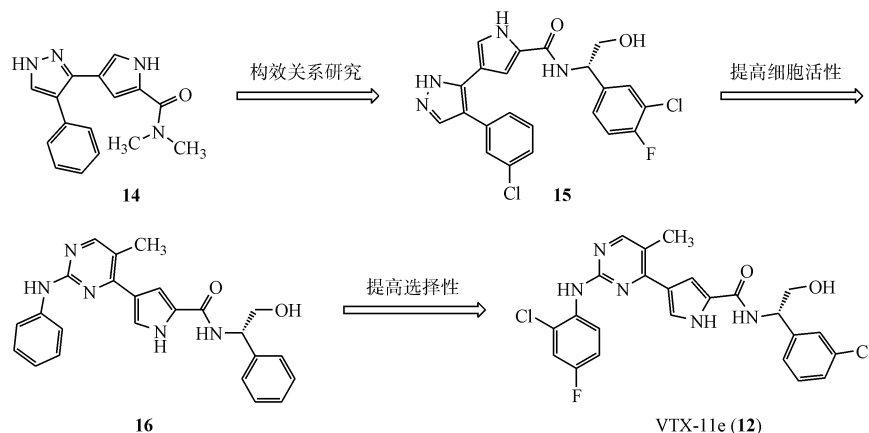
目前,FR180204仍处于临床前的研究阶段,未见相关的临床试验报道。

**3.2.2 VTX-11e** Vertex制药公司<sup>[53]</sup>通过高通量筛选得到具有吡唑并吡咯结构的化合物**14**,其对ERK的K<sub>i</sub>为2.3  $\mu$ mol/L。通过对化合物**14**与ERK共晶结构的分析(图6-A),发现化合物**14**结构中的吡唑环能够与ERK铰链区的Met106、Asp104形成

至关重要的氢键作用。同时,酰胺键上的羰基能够与Lys52形成氢键作用,吡咯环上的NH能够与门控残基Gln103形成氢键作用,苯基能够与甘氨酸富集环结构中的Val37形成疏水作用。根据以上晶体结构信息,研究人员对化合物进行结构优化,发现具有(S)-苯基甘氨酸结构的化合物**15**不仅增加了与Lys52的疏水相互作用,羟甲基的引入还能与Asn152、Asp165形成氢键作用,从而有利于化合物与ERK结合构象的稳定。此外,(S)-苯基甘氨酸结构上的卤素取代能够填充疏水空腔并与glycine-rich loop结构形成相互作用(图6-B)。这些结合上的优势,使得化合物**15**表现出较好的ERK抑制活性(K<sub>i</sub>=0.002  $\mu$ mol/L)和选择性。但是,化合物**15**的细胞活性不够理想,在Colo205人结肠癌细胞增殖测试中,其IC<sub>50</sub>仅为0.54  $\mu$ mol/L。

为了提高化合物的细胞活性,将化合物**15**结构中铰链区有相互作用的吡唑环替换为氨基嘧啶环,增强了化合物与铰链区的氢键作用,得到了先导化合物**16**。但是通过分析共晶结构(图6-C),发现与化合物**15**相比,化合物**16**吡咯环翻转了将近180°,导致了化合物对激酶的选择性大大降低。与化合物**15**相比,先导化合物**16**对GSK3、AuroraA和CDK2的抑制活性提高了250倍以上<sup>[54]</sup>。

为了提高先导化合物**16**对ERK的选择性,研究人员对苯胺部分和苯基甘氨酸部分进行结构优化,最终得到化合物VTX-11e(**12**)。VTX-11e是有效的高选择性ERK2抑制剂,其对ERK2的K<sub>i</sub>小于2.0 nmol/L,对GSK3、AuroraA和CDK2有200倍以上的选择性,对受测的其他激酶的选择性更是大于500倍<sup>[54]</sup>。



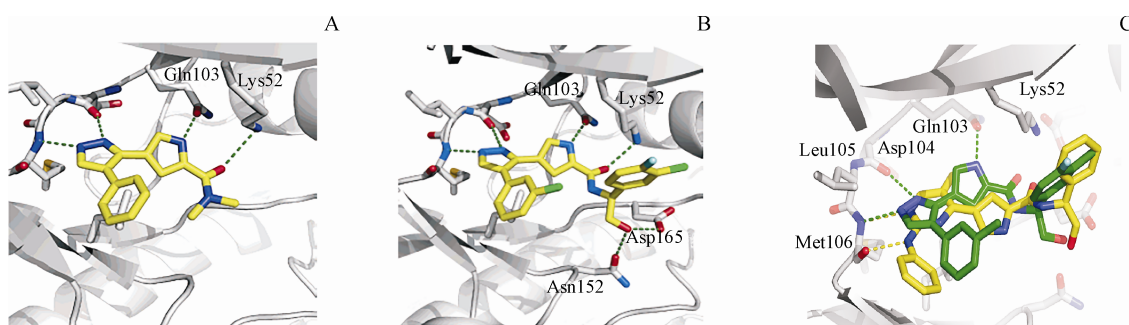


图6 化合物与ERK2的共晶复合物和叠合图

A: 化合物 14 与 ERK2 的共晶复合物<sup>[53]</sup> (PDB:20JG); B: 化合物 15 与 ERK2 的共晶复合物<sup>[53]</sup> (PDB:20JJ); C: 化合物 15 (绿色)和 16 (黄色)空间取向的比较<sup>[54]</sup> (PDB:315Z)

体外细胞研究结果显示,在 HT29 人结肠癌细胞增殖测试中,VX-11e 的  $IC_{50}$  为 48 nmol/L。体内研究结果显示,在大鼠和小鼠中,VX-11e 表现出较好的口服生物利用度。在对 BRAF/MEK 抑制剂联合治疗和 PI3K 抑制剂单独治疗均有耐药性的人黑色素瘤移植的 NSG 小鼠模型中,单独使用 VX-11e 能够抑制肿瘤组织生长;当与 PI3K 抑制剂 BKM120 联用时,能够明显抑制肿瘤生长<sup>[55]</sup>。

目前,VX-11e 仍处于临床前的生物活性测试阶段。

**3.2.3 BL-EI-001** BL-EI-001 (**13**)是由清华大学、四川大学、沈阳药科大学联合开发的 ERK 抑制剂,其设计策略是基于结构的药物设计,通过分子对接筛选 DrugBank 和 ZINC 得到了打分最高的 11 个化合物,然后通过生物活性测试确定先导化合物后再进行结构优化从而发现了 BL-EI-001。通过对接发现疏水基团苯环与氨基酸残基 Ile48、Val56、Ala69 和 Met125 形成疏水作用,同时 BL-EI-001 可以与 Lys71 形成两个氢键作用,与 Tyr53 形成两个  $\pi$ - $\pi$  作用。然而 BL-EI-001 对肿瘤的抑制作用不是通过 Ras/Raf/MEK1/2 通路,而是通过线粒体通路来发挥抗肿瘤作用<sup>[56]</sup>。

#### 4 总结与展望

到目前为止,已有多个 RAF 抑制剂和 MEK 抑制剂应用于临床并取得了较好的肿瘤治疗效果。但是,在长期服用该类药物治疗肿瘤的过程中,不可避免的产生了耐药性问题。在对肿瘤耐药机制的研究中发现,原本被抑制的 RAS-RAF-MEK-ERK 信号通路被重新激活,其主要原因是 RAF 和 MEK

的突变导致其对现有药物治疗的不敏感,从而引起患者肿瘤复发,治疗失败。本课题组通过骨架跃迁的药物设计策略,发现了一类异吲哚-1-酮类化合物对 ERK 具有较好的抑制作用,在 KRAS 和 BRAF 突变的肿瘤中体现出良好的抗增殖活性<sup>[57]</sup>。因此,通过靶向抑制 RAS-RAF-MEK-ERK 信号通路中关键的下游蛋白 ERK,能够再次抑制重新活化的该信号通路,达到治疗耐药性肿瘤的目的。

虽然与 RAF 和 MEK 抑制剂深入的研究进展相比,ERK 抑制剂的研发较为滞后,但是以 ERK 为靶点来特异性阻断 RAS-RAF-MEK-ERK 信号通路的药物研发策略正越来越受到人们的重视。目前,已有多个 ERK 抑制剂处于临床或临床前研究阶段。

随着 ERK 抑制剂的不断研发以及临床研究的逐步深入,ERK 抑制剂有望成为继 RAF 抑制剂和 MEK 抑制剂之后的新一代 MAPK 信号通路相关药物,克服 RAF 抑制剂和 MEK 抑制剂的耐药性问题,并在肿瘤的临床治疗方面产生积极而深远的影响。

#### 参考文献

- [1] Liu QH, Shi ML, Sun C, *et al.* Role of the ERK1/2 pathway in tumor chemoresistance and tumor therapy [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2015, **25**(2): 192–197.
- [2] Wang X, Zhang PH. Advances in research on the modulation of autophagy by Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2017, **48**(1): 110–116.
- [3] Samatar AA, Poulikakos PI. Targeting RAS-ERK signalling in cancer: promises and challenges [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2014, **13**(12): 928–942.



- [4] Yu ZT, Ye SQ, Hu GY, *et al.* The RAF-MEK-ERK pathway: targeting ERK to overcome obstacles to effective cancer therapy [J]. *Future Med Chem*, 2015, **7**(3): 269–289.
- [5] Uehling DE, Harris PA. Recent progress on MAP kinase pathway inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2015, **25**(19): 4047–4056.
- [6] Menon MB, Gaestel M. TPL2 meets p38MAPK: emergence of a novel positive feedback loop in inflammation [J]. *Biochem J*, 2016, **473**(19): 2995–2999.
- [7] Lei ZY, van Mil A, Brandt MM, *et al.* MicroRNA-132/212 family enhances arteriogenesis after hindlimb ischaemia through modulation of the Ras-MAPK pathway [J]. *J Cell Mol Med*, 2015, **19**(8): 1994–2005.
- [8] Kim EK, Choi EJ. Compromised MAPK signaling in human diseases: an update [J]. *Arch Toxicol*, 2015, **89**(6): 867–882.
- [9] Asati V, Mahapatra DK, Bharti SK. PI3K/Akt/mTOR and Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathways inhibitors as anticancer agents: Structural and pharmacological perspectives [J]. *Eur J Med Chem*, 2016, **109**: 314–341.
- [10] Caunt CJ, Sale MJ, Smith PD, *et al.* MEK1 and MEK2 inhibitors and cancer therapy: the long and winding road [J]. *Nat Rev Cancer*, 2015, **15**(10): 577–592.
- [11] Simanshu DK, Nissley DV, McCormick F. RAS proteins and their regulators in human disease [J]. *Cell*, 2017, **170**(1): 17–33.
- [12] Roskoski R Jr. A historical overview of protein kinases and their targeted small molecule inhibitors [J]. *Pharmacol Res*, 2015, **100**: 1–23.
- [13] Lavoie H, Therrien M. Regulation of RAF protein kinases in ERK signalling [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2015, **16**(5): 281–298.
- [14] An S, Yang Y, Ward R, *et al.* Raf-interactome in tuning the complexity and diversity of Raf function [J]. *FEBS J*, 2015, **282**(1): 32–53.
- [15] Cseh B, Doma E, Baccarini M. “RAF” neighborhood: protein-protein interaction in the Raf/Mek/Erk pathway [J]. *FEBS Lett*, 2014, **588**(15): 2398–2406.
- [16] Okumura S, Jänne PA. Molecular pathways: the basis for rational combination using MEK inhibitors in KRAS-mutant cancers [J]. *Clin Cancer Res*, 2014, **20**(16): 4193–4199.
- [17] Taylor SS, Kornev AP. Protein kinases: evolution of dynamic regulatory proteins [J]. *Trends Biochem Sci*, 2011, **36**(2): 65–77.
- [18] Buscà R, Christen R, Lovern M, *et al.* ERK1 and ERK2 present functional redundancy in tetrapods despite higher evolution rate of ERK1 [J]. *BMC Evol Biol*, 2015, **15**: 179.
- [19] Kidger AM, Siphthorp J, Cook SJ. ERK1/2 inhibitors: New weapons to inhibit the RAS-regulated RAF-MEK1/2-ERK1/2 pathway [J]. *Pharmacol Ther*, 2018, **187**: 45–60.
- [20] Roskoski R Jr. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation [J]. *Pharmacol Res*, 2012, **66**(2): 105–143.
- [21] Buscà R, Pouyssegur J, Lenormand P. ERK<sub>1</sub> and ERK<sub>2</sub> map kinases: specific roles or functional redundancy [J]? *Front Cell Dev Biol*, 2016, **4**: 53.
- [22] Yoon S, Seger R. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions [J]. *Growth Factors*, 2006, **24**(1): 21–44.
- [23] Houles T, Roux PP. Defining the role of the RSK isoforms in cancer [J]. *Semin Cancer Biol*, 2018, **48**: 53–61.
- [24] Casali KA, Matheson CJ, Backos DS, *et al.* Selective targeting of RSK isoforms in cancer [J]. *Trends Cancer*, 2017, **3**(4): 302–312.
- [25] Asano E, Maeda M, Hasegawa H, *et al.* Role of palladin phosphorylation by extracellular signal-regulated kinase in cell migration [J]. *PLoS One*, 2011, **6**(12): e29338.
- [26] Plotnikov A, Zehorai E, Procaccia S, *et al.* The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, **1813**(9): 1619–1633.
- [27] Hobbs GA, der CJ, Rossman KL. RAS isoforms and mutations in cancer at a glance [J]. *J Cell Sci*, 2016, **129**(7): 1287–1292.
- [28] Holderfield M, Deuker MM, McCormick F, *et al.* Targeting RAF kinases for cancer therapy: BRAF-mutated melanoma and beyond [J]. *Nat Rev Cancer*, 2014, **14**(7): 455–467.
- [29] Jetschke K, Viehweger H, Freesmeyer M, *et al.* Primary pineal malignant melanoma with B-Raf V600E mutation: a case report and brief review of the literature [J]. *Acta Neurochir (Wien)*, 2015, **157**(7): 1267–1270.
- [30] Sogabe S, Togashi Y, Kato H, *et al.* MEK inhibitor for gastric cancer with MEK1 gene mutations [J]. *Mol Cancer Ther*, 2014, **13**(12): 3098–3106.
- [31] Nikolaev SI, Rimoldi D, Iseli C, *et al.* Exome sequencing identifies recurrent somatic MAP2K1 and MAP2K2 mutations in melanoma [J]. *Nat Genet*, 2011, **44**(2): 133–139.
- [32] Murugan AK, Dong JL, Xie JW, *et al.* MEK1 mutations, but not ERK2 mutations, occur in melanomas and colon carcinomas, but none in thyroid carcinomas [J]. *Cell Cycle*, 2009, **8**(13): 2122–2124.
- [33] Arcila ME, Drilon A, Sylvester BE, *et al.* MAP2K1 (MEK1) mutations define a distinct subset of lung adenocarcinoma associated with smoking [J]. *Clin Cancer Res*, 2015, **21**(8): 1935–1943.
- [34] Roskoski R Jr. Targeting ERK1/2 protein-serine/threonine kinases in human cancers [J]. *Pharmacol Res*, 2019, **142**: 151–168.
- [35] Jaiswal BS, Durinck S, Stawiski EW, *et al.* ERK mutations and amplification confer resistance to ERK-inhibitor therapy [J]. *Clin Cancer Res*, 2018, **24**(16): 4044–4055.
- [36] Qin JZ, Xin H, Nickoloff BJ. Specifically targeting ERK1 or

- ERK2 kills melanoma cells[J]. *J Transl Med*, 2012, **10**: 15.
- [37] Hatzivassiliou G, Liu B, O'Brien C, *et al.* ERK inhibition overcomes acquired resistance to MEK inhibitors[J]. *Mol Cancer Ther*, 2012, **11**(5): 1143–1154.
- [38] Blake JF, Gaudino JJ, De Meese J, *et al.* Discovery of 5, 6, 7, 8-tetrahydropyrido [3, 4-d] pyrimidine inhibitors of Erk2[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2014, **24**(12): 2635–2639.
- [39] Ren L, Grina J, Moreno D, *et al.* Discovery of highly potent, selective, and efficacious small molecule inhibitors of ERK1/2[J]. *J Med Chem*, 2015, **58**(4): 1976–1991.
- [40] Blake JF, Burkard M, Chan J, *et al.* Discovery of (S)-1-(1-(4-Chloro-3-fluorophenyl)-2-hydroxyethyl)-4-(2-((1-methyl-1H-pyrazol-5-yl)amino)pyrimidin-4-yl)pyridin-2(1H)-one (GDC-0994), an extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) inhibitor in early clinical development[J]. *J Med Chem*, 2016, **59**(12): 5650–5660.
- [41] Germann UA, Furey BF, Markland W, *et al.* Targeting the MAPK signaling pathway in cancer: promising preclinical activity with the novel selective ERK1/2 inhibitor BVD-523 (ulixertinib) [J]. *Mol Cancer Ther*, 2017, **16**(11): 2351–2363.
- [42] Germann U, Furey B, Roix J, *et al.* The selective ERK inhibitor BVD-523 is active in models of MAPK pathway-dependent cancers, including those with intrinsic and acquired drug resistance[J]. *Cancer Res*, 2015, **75**: 4693.
- [43] U.S. National Library of Medicine. A study of LYA3214996 administered alone or in combination with other agents in participants with advanced/metastatic cancer[EB/OL]. (2019-09-17) [2019-03-14]. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02857270>.
- [44] Chaikuad A, Tacconi EM, Zimmer J, *et al.* A unique inhibitor binding site in ERK1/2 is associated with slow binding kinetics[J]. *Nat Chem Biol*, 2014, **10**(10): 853–860.
- [45] Boga SB, Deng YQ, Zhu L, *et al.* MK-8353: discovery of an orally bioavailable dual mechanism ERK inhibitor for oncology[J]. *ACS Med Chem Lett*, 2018, **9**(7): 761–767.
- [46] U.S. National Library of Medicine. Study of MK-8353 in combination with pembrolizumab (MK-3475) in participants with advanced malignancies (MK-8353-013) [EB/OL]. (2019-07-23) [2019-03-14]. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02972034>.
- [47] U.S. National Library of Medicine. Study of MK-8353 + Selumetinib in Advanced/Metastatic Solid Tumors (MK-8353-014) [EB/OL]. (2019-07-22) [2019-03-14]. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03745989>.
- [48] U.S. National Library of Medicine. Safety and PK Study of CC-90003 in Relapsed/Refractory Solid Tumors [EB/OL]. (2016-08-22) [2019-03-14]. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02313012>.
- [49] Aronchik I, Dai YM, Labenski M, *et al.* Efficacy of a covalent ERK1/2 inhibitor, CC-90003, in KRAS-mutant cancer models reveals novel mechanisms of response and resistance[J]. *Mol Cancer Res*, 2019, **17**(2): 642–654.
- [50] Ohori M, Kinoshita T, Okubo M, *et al.* Identification of a selective ERK inhibitor and structural determination of the inhibitor-ERK2 complex[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, **336**(1): 357–363.
- [51] Ohori M, Takeuchi M, Maruki R, *et al.* FR180204, a novel and selective inhibitor of extracellular signal-regulated kinase, ameliorates collagen-induced arthritis in mice [J]. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 2007, **374**(4): 311–316.
- [52] Sreekanth GP, Chuncharunee A, Sirimontaporn A, *et al.* Role of ERK1/2 signaling in dengue virus-induced liver injury[J]. *Virus Res*, 2014, **188**: 15–26.
- [53] Aronov AM, Baker C, Bemis GW, *et al.* Flipped out: structure-guided design of selective pyrazolopyrrole ERK inhibitors[J]. *J Med Chem*, 2007, **50**(6): 1280–1287.
- [54] Aronov AM, Tang Q, Martinez-Botella G, *et al.* Structure-guided design of potent and selective pyrimidylpyrrole inhibitors of extracellular signal-regulated kinase (ERK) using conformational control[J]. *J Med Chem*, 2009, **52**(20): 6362–6368.
- [55] Krepler C, Xiao M, Sproesser K, *et al.* Personalized preclinical trials in BRAF inhibitor-resistant patient-derived xenograft models identify second-line combination therapies [J]. *Clin Cancer Res*, 2016, **22**(7): 1592–1602.
- [56] Liu B, Fu LL, Zhang C, *et al.* Computational design, chemical synthesis, and biological evaluation of a novel ERK inhibitor (BL-EI001) with apoptosis-inducing mechanisms in breast cancer[J]. *Oncotarget*, 2015, **6**(9): 6762–6775.
- [57] Ji DZ, Zhang LZ, Zhu QH, *et al.* Discovery of potent, orally bioavailable ERK1/2 inhibitors with isoindolin-1-one structure by structure-based drug design[J]. *Eur J Med Chem*, 2019, **164**: 334–341.