

1, 2, 4-三氮唑类衍生物的设计、合成及SHP-2活性评价

高立信, 王文龙

江南大学生命科学与健康工程学院, 江苏 无锡

收稿日期: 2024年3月6日; 录用日期: 2024年3月26日; 发布日期: 2024年5月20日

摘要

SHP2作为一种重要的磷酸化酶与多种癌症的发生密切相关, 高活化的SHP2使得包括胃癌, 乳腺癌在内的各种癌症的发生率增大, 因此它成为治疗癌症的重要靶标之一。为了寻找高效的SHP2抑制剂, 本文在具有潜在的抗肿瘤活性的1, 2, 4-三氮唑母核基础上, 通过化学合成, 设计并完成了10个新型1, 2, 4-三氮唑类衍生物, 利用核磁共振氢谱技术对结构进行了表征, 并进行了生物学活性评价, 为后期的基于1, 2, 4-三氮唑母核的SHP2抑制剂发现工作奠定了一定的基础。

关键词

1, 2, 4-三氮唑, SHP2, 抗肿瘤活性

Design and Synthesis of 1, 2, 4-Triazole Derivatives and Evaluation of SHP-2 Activity

Lixin Gao, Wenlong Wang

School of Life Science and Health Engineering, Jiangnan University, Wuxi Jiangsu

Received: Mar. 6th, 2024; accepted: Mar. 26th, 2024; published: May 20th, 2024

Abstract

SHP2 is closely associated with the development of many cancers as a key phosphatase. Highly activated SHP2 is one of the important targets for cancer treatment as it increases the incidence of several cancers, including gastric and breast cancer. In order to find efficient SHP2 inhibitors, in this work, based on the 1, 2, 4-triazole parent nucleus with potential antitumour activity, ten novel 1, 2, 4-triazole derivatives were designed and completed by chemical synthesis. The structures

were characterised by NMR hydrogen spectroscopy and evaluated for biological activity, which laid a certain foundation for the later discovery of SHP2 inhibitors based on the parent nucleus of 1, 2, 4-triazole.

Keywords

1, 2, 4-Triazole, SHP2, Antitumour Activity

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



1. 引言

1.1. SHP2 的功能

非受体型蛋白酪氨酸磷酸酶 No. 11 (简称: SHP2), 由位于人第 12 号染色体上的 PTPN11 基因编码而成[1], SHP2 是一种在动物体内普遍表达的酪氨酸磷酸酶(PTP), 在生命过程中, SHP2 作为酪氨酸磷酸酶的一种, 通过与相应的酪氨酸激酶共同调控蛋白酪氨酸残基的可逆磷酸化来完成相关的信号转导, 如 RAS-MAPK、JAK-STAT、PI3K-AKT、NF- κ B 等诸多关键的信号通路, 从而控制细胞增殖、分化、迁移和死亡等一系列生命过程[2]。其结构上通过特定序列或接头蛋白(如 GAB1-3、FRS-2、IRS1-4 等)与 SHP2 的两个 SH2 结构域上的特定位点相互作用并识别, 使得 SHP2 从低活性自抑制构象转变为高催化活性开放构象, 并进一步识别下游特异性底物进行去磷酸化, 完成整个信号转导过程[3]。

1.2. SHP2 与肿瘤

SHP2 的编码基因在 PTP 家族中率先被认定为原癌基因, SHP2 蛋白也是 PTP 家族中目前唯一被证实的原癌蛋白[4], 是明确的癌症治疗靶标, 在发育障碍努南综合征(50%) [5]和各种癌症类型中, 都发现了 SHP2 的突变导致活性过度激活, 高活化的 SHP2 使得白血病、胃癌和乳腺癌的发生率增大[6] [7] [8] [9], 而且, SHP2 与 PD-L1/PD-1 信号通路相关, 可抑制 T 细胞活化, 这也使它成为肿瘤免疫治疗的潜力靶点(如图 1 所示)。因此, 对于 SHP2 小分子抑制剂的开发, 已成为当下热点。

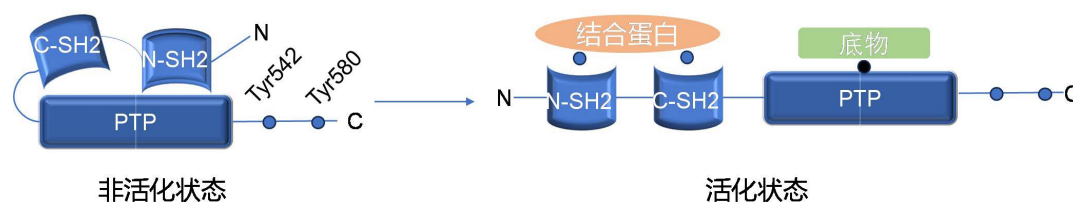


Figure 1. Activation of SHP2 protein

图 1. SHP2 蛋白的激活

1.3. 三氮唑衍生物

三氮唑衍生物属五元杂环化合物, 环上有三个 N 原子, 因此其配位形式多样, 兼备有吡啶和咪唑的特点, 对金属离子的络合及氢键作用力比较强, 是很好的有机配体[10]。近年来, 1, 2, 4-三氮唑衍生物凭借其独特的结构特性, 可以结合生物系统中各种受体, 如磷酸酶, 具有抗肿瘤[11]、抗疟疾[12]、抗病毒[13]

及抗真菌[14]等多种生物活性(如图 2), 已有多个含 1, 2, 4-三氮唑药效团的化合物处于临床前评价或临床试验阶段。因此, 对 1, 2, 4-三氮唑衍生物的合成研究及活性筛选, 具有重要的意义。

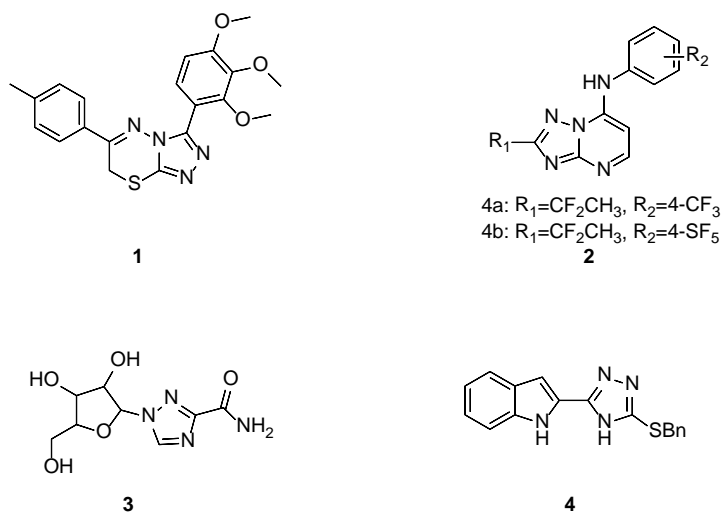


Figure 2. Chemical structure of triazole derivatives
图 2. 三氮唑衍生物的化学结构

2. 实验

2.1. 仪器与试剂

AB54-S 精密电子天平(METTLER TOLEDO); DF-101Z 集热式恒温加热磁力搅拌器(郑州科泰实验仪器设备有限公司); R-1001 旋转蒸发仪(郑州长城科工贸易有限公司); SHK-III 循环水式多用真空泵(郑州科泰实验仪器设备有限公司); ZF-6 三用紫外分析仪(上海嘉鹏科技有限公司); AVENCE III/400 MHZ 核磁共振仪(BRUKER, German); -80℃ 低温冰箱(SANYO); 电动移液器(Thermo Scientific); Envision 多功能微孔板酶标仪(Perkin Elmer); AKTA Avant 蛋白纯化仪器(通用公司)。

苯甲酸(98%, 上海毕得医药科技有限公司); 二氯亚砷(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); N, N-二甲基甲酰胺(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 二氯甲烷(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 石油醚(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 无水乙醇(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 1, 4-二氧六环(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 盐酸(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 乙酸乙酯(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 氢氧化钠(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 氨基胍碳酸盐(98%, 上海毕得医药科技有限公司); 四丁基溴化铵(TBAB) (98%, 上海毕得医药科技有限公司)。Tris Base、NaCl、丙三醇(甘油)、Tween-20、EDTA、乙酸铵、MnCl₂ 等普通化学试剂系国产分析纯试剂(AR 级), 二硫苏糖醇(DTT)购自上海生工生物有限公司; 二甲亚砷 DMSO (分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)。

2.2. 化合物 a-j 的合成通法

将 10 g 化合物苯甲酸 1a (82 mmol) 加入至 100 ml 圆底烧瓶中, 加入 40 mL 二氯甲烷和 8.0 mL 氯化亚砷(100 mmol), 缓慢加入 N, N-二甲基甲酰胺(DMF) 4 滴, 加热回流过夜, 反应完毕后, 反应液减压蒸发后直接投下一步。取圆底烧瓶(250 mL), 加入氨基胍碳酸盐(13.6 g, 100 mmol), 用 1, 4-二氧六环(100 mL) 溶解, 放置在冰水浴中搅拌 5 min, 使反应物充分溶解混匀。再加入 TBAB (1.6 g, 5 mmol) 至烧瓶中, 然后在体系中逐滴加入化合物苯甲酰氯 1b (7.03 g, 50 mmol), 置于室温下搅拌, 保持反应 12 h, 反应完毕

后, 使用旋转蒸发仪除去溶剂。将烧瓶内残余物溶于水(75 mL), 室温下搅拌混匀, 用 NaOH 水溶液调 pH 至 12, 有白色固体析出, 过滤干燥后得到化合物 2-苯甲酰肼-1-甲脒 1c (7.93 g, 89.1%)。取圆底烧瓶(250 mL) 加入 7.93 g 的 1c, 加入 50 mL 水溶解, 放置 100°C 油浴锅加热搅拌过夜。反应完毕后有大量白色固体析出, 抽滤干燥后得到产物 5-苯基-4H-1, 2, 4-三氮唑-3-胺 a (7.05 g, 98.9%)。

化合物 b-j 的合成方法与化合物 a 相同(如图 3)。

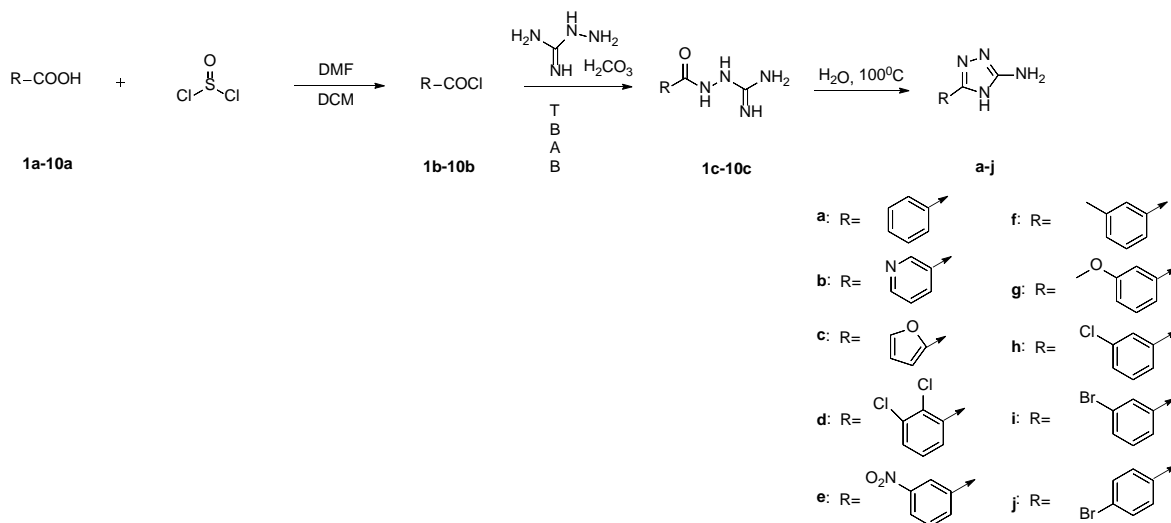


Figure 3. The synthetic route of compound a-j

图 3. 化合物 a-j 的合成路线

2.3. 化合物的结构表征

表征数据

5-苯基-4H-1, 2, 4-三氮唑-3-胺(a): 白色固体, 收率为: 98.9%。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 12.09 (s, 1H), 7.88 (dd, J = 8.4, 1.2 Hz, 2H), 7.40 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 7.33 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 5.94 (s, 2H)。

5-(3-吡啶基)-4H-1, 2, 4-三氮唑-3-胺(b): 白色固体, 收率为: 94.5%。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 12.18 (s, 1H), 9.04 (s, 1H), 8.53 (d, J = 4.4 Hz, 1H), 8.17 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.42 (dd, J = 4.8, 2.8 Hz, 1H), 6.14 (s, 2H)。

5-(2-呋喃基)-4H-1, 2, 4-三氮唑-3-胺(c): 红色固体, 收率为: 95.6%。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 12.05 (s, 1H), 7.67 (s, 1H), 6.67 (d, J = 3.2 Hz, 1H), 6.53 (dd, J = 2.8, 1.6 Hz, 1H), 6.04 (s, 2H)。

5-(2, 3-二氯苯基)-4H-1, 2, 4-三氮唑-3-胺(d): 红色固体, 收率为: 98.1%。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 12.24 (s, 1H), 7.75 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.64 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.39 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 6.11 (s, 2H)。

5-(3-硝基苯基)-4H-1, 2, 4-三氮唑-3-胺(e): 黄色固体, 收率为: 95.3%。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 12.29 (s, 1H), 8.63 (t, J = 2.0 Hz, 1H), 8.28 (m, J = 8.0, 1.2 Hz, 1H), 8.19 (m, J = 8.4, 2.0 Hz, 1H), 7.71 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 6.20 (s, 2H)。

5-(间甲基苯基)-4H-1, 2, 4-三氮唑-3-胺(f): 黄色固体, 收率为: 70.2%。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 11.99 (s, 1H), 7.71 (s, 1H), 7.67 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.26 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 7.13 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 5.99 (s, 2H), 2.33 (s, 3H)。

5-(3-甲氧基苯基)-4H-1, 2, 4-三氮唑-3-胺(g): 红色固体, 收率为: 97.8%。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 12.08 (s, 1H), 7.52-7.43 (m, 1H), 7.42 (m, 1H), 7.30 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 6.90 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 5.93 (s,

2H), 3.78 (t, $J = 1.6$ Hz, 3H)。

5-(3-氯苯基)-4H-1, 2, 4-三氮唑-3-胺(h): 白色固体, 收率为: 97.7%。 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.93~7.73 (m, 2H), 7.40 (m, 2H), 6.06 (s, 2H)。

5-(3-溴苯基)-4H-1, 2, 4-三氮唑-3-胺(i): 红色固体, 收率为: 97.7%。 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.15 (s, 1H), 7.99 (s, 1H), 7.93~7.77 (m, 1H), 7.52 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.36 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.10 (s, 2H)。

5-(4-溴苯基)-4H-1, 2, 4-三氮唑-3-胺(j): 白色固体, 收率为: 95.2%。 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.11 (s, 1H), 7.98~7.71 (m, 2H), 7.58 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 6.07 (s, 2H)。

2.4. 化合物的生物活性评价

应用大肠杆菌系统克隆表达 GST-SHP2 融合蛋白, 经过 GSH-Sepharose 亲和层析分离得到纯化的 GST-SHP2 蛋白。通过实验表明蛋白酪氨酸磷酸酯酶 SHP2 与融合形式的 GST-SHP2 有相似的酶学特性。应用大肠杆菌表达系统表达 GST-SHP2 催化结构域, 以 GST 融合蛋白形式存在于上清, 细胞裂解后经 GSH-亲和柱纯化, 获得融合蛋白进行 GST-SHP2 抑制剂的活性筛选。

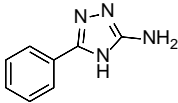
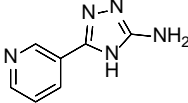
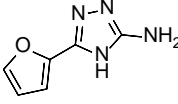
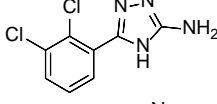
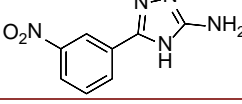
对合成得到的 10 个 1, 2, 4-三氮唑类衍生物进行体外 SHP2 分子活性评价, 应用大肠杆菌系统克隆表达 GST-SHP2 融合蛋白, 荧光底物为 DIFUMP, 在 384 孔黑色微孔板(OptiPlate-384, Perkin Elmer)中检测酶活性, 先加入 SHP2 蛋白(终浓度为 2 nM) 20 μL , 其中 SHP2 蛋白先与 10 μl 检测化合物在 25 $^\circ\text{C}$ 条件下共孵育 15 min, 后加入底物 DiFMUP, 终浓度(10 μM) 20 μL 起始反应, 反应体系终体积为 50 μL , DMSO [1% (v/v)], 使用酶标仪(Envision)检测激发/发射波长 340/450 nm 通道信号值, 通过计算得到反应初速度。加入合成的 1, 2, 4-三氮唑类衍生物, 通过观察荧光强度变化反映酶活性的变化, 进而得到不同化合物对蛋白酶的抑制情况。

3. 结果与讨论

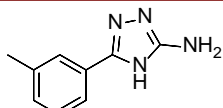
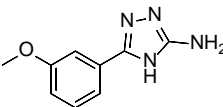
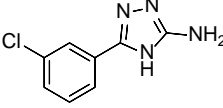
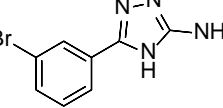
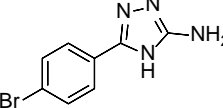
3.1. 化合物生物活性测定结果

Table 1. Compound biological activity results

表 1. 化合物生物活性结果

Compound name	结构	SHP2 ^{PTP} Inhibition Rate% (50 μM)
1a		6.54 \pm 1.58
2b		27.37 \pm 1.07
3c		5.19 \pm 0.94
4d		5.02 \pm 2.69
5e		44.61 \pm 5.43

续表

6f		-1.67 ± 4.57
7g		1.29 ± 1.12
8h		2.85 ± 1.48
9i		4.80 ± 2.14
10g		-1.90 ± 0.49

3.2. 化合物生物活性结果分析

表 1 汇总了评价 1, 2, 4-三氮唑衍生物对 SHP2 的抑制活性数据, 有 8 个化合物是苯环取代的, 在这 8 个化合物中, 我们发现, 引入给电子会使化合物对 SHP2 的抑制活性降低; 而引入吸电子对 SHP-2PTP 的抑制率的情况是复杂的, 如间位引入硝基后, 化合物 5e 对 SHP2 的抑制活性增强; 引入卤素原子后, 化合物 4d, 8h, 9i, 10g 对 SHP2 的抑制活性减弱, 这可能因为硝基电负性卤素原子大, 与 SHP2 活性位点区域更容易结合。而杂环取代的化合物中, 吡啶环取代的化合物 2b 比咪唑环取代的化合物 3c 的抑制活性要强。遗憾的是, 这类化合物的抑制活性较低。

4. 结论

本文为拓展 SHP2 抑制剂结构的多样性, 设计并合成了 10 个 1, 2, 4-三氮唑衍生物, 利用核磁共振氢谱对其进行了表征, 并对其进行生物活性评价, 构效分析表明, 苯环上强吸电子的引入对生物活性有重要的影响, 而杂环的替代对化合物产生一定的影响。这是一类全新骨架的 SHP2 小分子化合物, 该类化合物分子量小, 易于衍生化, 为后续作为活性片段开发更多的 SHP2 抑制剂提供了重要的基础。

参考文献

- [1] Jamieson, C.R., *et al.* (1994) Mapping a Gene for Noonan Syndrome to the Long Arm of Chromosome 12. *Nature Genetics*, **8**, 357-360. <https://doi.org/10.1038/ng1294-357>
- [2] Chan, R.J. and Feng, G.S. (2007) PTPN11 Is the First Identified Proto-Oncogene that Encodes a Tyrosine Phosphatase. *Blood*, **109**, 862-867. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-07-028829>
- [3] Östman, A., Hellberg, C. and Böhmer, F.D. (2006) Protein-Tyrosine Phosphatases and Cancer. *Nature Reviews Cancer*, **6**, 307-320. <https://doi.org/10.1038/nrc1837>
- [4] Grossmann, K.S., Rosário, M., Birchmeier, C., *et al.* (2010) The Tyrosine Phosphatase Shp2 in Development and Cancer. *Advances in Cancer Research*, **106**, 53-89. [https://doi.org/10.1016/S0065-230X\(10\)06002-1](https://doi.org/10.1016/S0065-230X(10)06002-1)
- [5] Tartaglia, M., Mehler, E., Goldberg, R., *et al.* (2001) Mutations in PTPN11, Encoding the Protein Tyrosine Phosphatase SHP-2, Cause Noonan Syndrome. *Nature Genetics*, **29**, 465-468. <https://doi.org/10.1038/ng772>
- [6] Zhang, J., Zhang, F. and Niu, R. (2015) Functions of Shp2 in Cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **19**, 2075-2083. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12618>

- [7] Levy, A.D., Xiao, X., Shaw, J.E., *et al.* (2018) Noonan Syndrome Associated SHP2 Dephosphorylates GluN2B to Regulate NMDA Receptor Function. *Cell Reports*, **24**, 1523-1535. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.07.006>
- [8] Mulero-Navarro, S., Sevilla, A., Roman, A., *et al.* (2015) Myeloid Dysregulation in a Human Induced Pluripotent Stem Cell Model of PTPN11-Associated Juvenile Myelomonocytic Leukemia. *Cell Reports*, **13**, 504-515. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.09.019>
- [9] Bentires-Alj, M., Paez, J.G., David, F.S., *et al.* (2004) Activating Mutations of the Noonan Syndrome-Associated SHP2/PTPN11 Gene in Human Solid Tumors and Adult Acute Myelogenous Leukemia. *Cancer Research*, **64**, 8816-8820. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1923>
- [10] 朱霞. 含唑基多齿柔性配体配位聚合物的合成、结构和性质研究[D]: [博士学位论文]. 苏州: 苏州大学, 2012.
- [11] Li, B.L., Li, B., Zhang, R.L., *et al.* (2016) Synthesis and Antiproliferative Evaluation of Novel 1, 2, 4-Triazole Derivatives Incorporating Benzisoseleazolone Scaffold. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **26**, 1279-1281. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.01.017>
- [12] Marwaha, A., White, J., El Mazouni, F., *et al.* (2012) Bioisosteric Transformations and Permutations in the Triazolopyrimidine Scaffold to Identify the Minimum Pharmacophore Required for Inhibitory Activity against Plasmodium Falciparum Dihydroorotate Dehydrogenase. *Journal of Medicinal Chemistry*, **55**, 7425-7436. <https://doi.org/10.1021/jm300351w>
- [13] Wittine, K., Stipković Babić, M., Makuc, D., *et al.* (2012) Novel 1, 2, 4-Triazole and Imidazole Derivatives of L-Ascorbic and Imino-Ascorbic Acid: Synthesis, Anti-HCV and Antitumor Activity Evaluations. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **20**, 3675-3685. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.01.054>
- [14] Liu, N., Tu, J., Dong, G.Q., *et al.* (2018) Emerging New Targets for the Treatment of Resistant Fungal Infections. *Journal of Medical Chemistry*, **61**, 5484-5511. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01413>