

基于疏水标签的 Bcl-2/Mcl-1 蛋白泛素化降解剂

王哲明, 黎怡同, 王紫千*, 张志超*

(大连理工大学化学学院, 辽宁 大连 116024)

摘要: Bcl-2 家族中的抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 Mcl-1 是重要的抗肿瘤靶标。本研究以一个非选择性的 Bcl-2 家族蛋白抑制剂为基础, 设计合成了 4 种不同结构的基于疏水标签的 Bcl-2/Mcl-1 蛋白泛素化降解剂 **S1-D1**~**S1-D4**, 在乳腺癌细胞模型 MCF-7 上考察了其诱导 Bcl-2 和 Mcl-1 蛋白泛素化降解和肿瘤细胞凋亡的能力。结果显示, 尽管 **S1-D1**~**S1-D4** 均保持了对 Bcl-2 家族蛋白广谱的亲和力, 但引入不同的连接子导致 **S1-D1**~**S1-D4** 实现了对 Bcl-2 和 Mcl-1 的选择性降解。其中, 具有疏水烷基链的 **S1-D2** 分子对 Bcl-2 的降解能力最强, 加入 $3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时能够降解超 80% 的 Bcl-2 蛋白, 而具有聚乙二醇链连接子的化合物 **S1-D4** 则表现出对 Mcl-1 蛋白的特异性降解, 加入 $3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时降解了约 60% 的 Mcl-1 蛋白。细胞毒性实验证明基于疏水标签的蛋白降解剂能够通过诱导靶蛋白的降解获得更强的肿瘤细胞杀伤活性, 揭示了降解剂相比于抑制剂分子的优势。

关键词: 基于疏水标签的蛋白降解剂; 泛素化降解; Bcl-2 家族蛋白; 抗肿瘤

中图分类号: R914 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)11-2990-07

Development of hydrophobic tag-based protein degraders for Bcl-2/Mcl-1 ubiquitination degradation

WANG Zhe-ming, LI Yi-tong, WANG Zi-qian*, ZHANG Zhi-chao*

(School of Chemistry, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

Abstract: The anti-apoptotic members of Bcl-2 family proteins, Bcl-2 and Mcl-1, are considered therapeutic targets of various cancers. In this article, we developed four hydrophobic tag (HyT)-based protein degraders of Bcl-2/Mcl-1, based on a Bcl-2/Mcl-1 dual inhibitor **S1-6**, and tested their capability in Bcl-2/Mcl-1 degradation and apoptotic induction in MCF-7 cells. Interestingly, different linkers in the HyT degraders led to selective Bcl-2/Mcl-1 degradation, though the degraders **S1-D1**~**S1-D4** maintained the pan-Bcl-2 family binding capacity. Among them, **S1-D2** and **S1-D4**, two compounds bearing a hydrophobic linker or a PEG linker, were observed to potently and selectively induce the ubiquitination and proteasomal degradation of Bcl-2 and Mcl-1 in living cells, with a degradation rate of more than 80% or 60%, respectively. Moreover, the HyT-based degraders showed increased lethality of cancer cells compared to the parent inhibitor **S1-6**, demonstrating that the advantage of degraders to the occupancy-based inhibitors.

Key words: hydrophobic tag-based protein degrader; ubiquitination degradation; Bcl-2 family protein; anti-cancer

细胞凋亡是细胞程序化死亡的主要方式, 作用是

帮助生物体清除衰老或者异常的细胞, 维持体内环境的相对稳定^[1,2]。凋亡异常会导致多种疾病, 包括神经退行性病变、自身免疫疾病和肿瘤等^[1,2]。B 细胞淋巴瘤-2 (Bcl-2) 家族蛋白是内源性细胞凋亡通路的重要调节因子, 成员包括抗凋亡蛋白、促凋亡蛋白和 BH3-only 蛋白, 它们通过彼此之间的蛋白-蛋白相互作用

收稿日期: 2024-07-15; 修回日期: 2024-08-30.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82073703, 82270186, 82273778).

*通讯作者 Tel: 86-411-84784969,

E-mail: wangziqian@dlut.edu.cn; zczhang@dlut.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0659

(protein-protein interaction, PPI) 网络调控细胞的生死^[3-6]。其中, 抗凋亡蛋白Bcl-2、Bcl-xL和Mcl-1的过度表达与肿瘤的发生、发展和化疗耐药密切相关, 是重要的抗肿瘤靶标^[7-9]。近20年来, 靶向Bcl-2家族蛋白的小分子抑制剂一直是药物化学领域的研究热点, 目前已有多个抑制剂分子进入临床研究^[10,11]。其中, Bcl-2抑制剂维奈托克已于2016年被美国食品和药品管理局(FDA)批准上市治疗慢性淋巴白血病^[12], 并于2020年获批用于老年急性髓系白血病的的一线治疗^[13]。

蛋白降解靶向嵌合体技术 (proteolysis targeting chimeras, PROTAC) 是一种在活体内快速、原位降解靶蛋白的方法^[14-17]。PROTAC是一种异双功能分子, 通过化学连接子 (linker) 连接靶蛋白的配体 (蛋白抑制剂) 和E3泛素连接酶的配体, 将E3连接酶招募到靶蛋白附近, 利用泛素-蛋白酶体系统, 实现对目标蛋白的泛素化和降解。相比小分子抑制剂类药物, PROTAC具有明显优势: 利用“事件驱动” (event driven) 而非“占据驱动” (occupation driven) 的作用模式发挥功能, 仅需催化量的药物即可发挥较强疗效, 在靶向“难成药”靶点、提高选择性、克服耐药、降低毒副作用等方面表现出较大的优势^[14-17]。自2019年以来, 已有多种靶向降解的Bcl-2、Bcl-xL和Mcl-1的PROTAC分子被报道, 其中靶向降解Bcl-xL的DT2216, 相比抑制剂显著提高了抗肿瘤活性, 扩大了治疗窗口, 目前已进入I期临床试验^[18-21]。

但是, PROTAC分子也存在分子质量过大 (一般 > 1 000 Da), 疏水性强, 细胞膜通透性小等问题, 因此其成药性尚未得到充分验证。疏水标签技术 (hydrophobic tag, HyT) 是另一种靶向蛋白降解技术, 由PROTAC技术先驱Craig M. Crews于2011年提出。

疏水标签可模拟错误折叠的蛋白质, 从而招募伴侣蛋白或蛋白酶体来降解靶标蛋白。相比PROTAC, HyT具有分子质量更低、成药性更好, 无沙利度胺衍生物的致畸风险等优势, 是一项极具前景的蛋白靶向降解技术^[22,23]。

因此, 本研究拟利用HyT技术, 在本课题组研发的Bcl-2家族蛋白抑制剂S1-6分子^[24]的合适位点引入金刚烷疏水标签, 获得基于疏水标签的Bcl-2/Mcl-1蛋白泛素化降解剂, 并考察Bcl-2/Mcl-1降解剂相比原抑制剂分子对Bcl-2家族蛋白依赖的肿瘤细胞杀伤能力的差异。

结果与讨论

1 化合物的设计与合成

选择本课题组研发的、结合模式明确的Bcl-2/Mcl-1双抑制剂S1-6 (图1) 分子^[24]作为靶蛋白配体, 金刚烷作为疏水基团。分子对接结果显示, S1-6结合在Bcl-2家族蛋白的经典BH3疏水沟槽内部, 其分子结构中3-位的氰基处于疏水沟槽边缘, 提示在此处引入疏水基团可能有利于保持分子与Bcl-2家族蛋白的结合能力。因此, 首先将氰基替换为3-氨基丙酸甲酯基团, 得到中间体1 (图1)。分子对接结果显示, 中间体1保持了S1-6与Bcl-2的BH3沟槽的结合模式, 且甲酯基团朝向溶剂侧, 有利于引入疏水基团 (图2)。

为了讨论连接子 (linker) 的性质对Bcl-2家族蛋白降解效率的影响, 选择了4种不同长度的连接子, 分别连接中间体1和疏水基团金刚烷; 为了平衡蛋白降解分子的亲、疏水性, 这些连接子除长度外也具有不同的亲、疏水性质, 得到4个基于疏水标签的Bcl-2/Mcl-1蛋白泛素化降解剂候选分子S1-D1~S1-D4 (图1)。

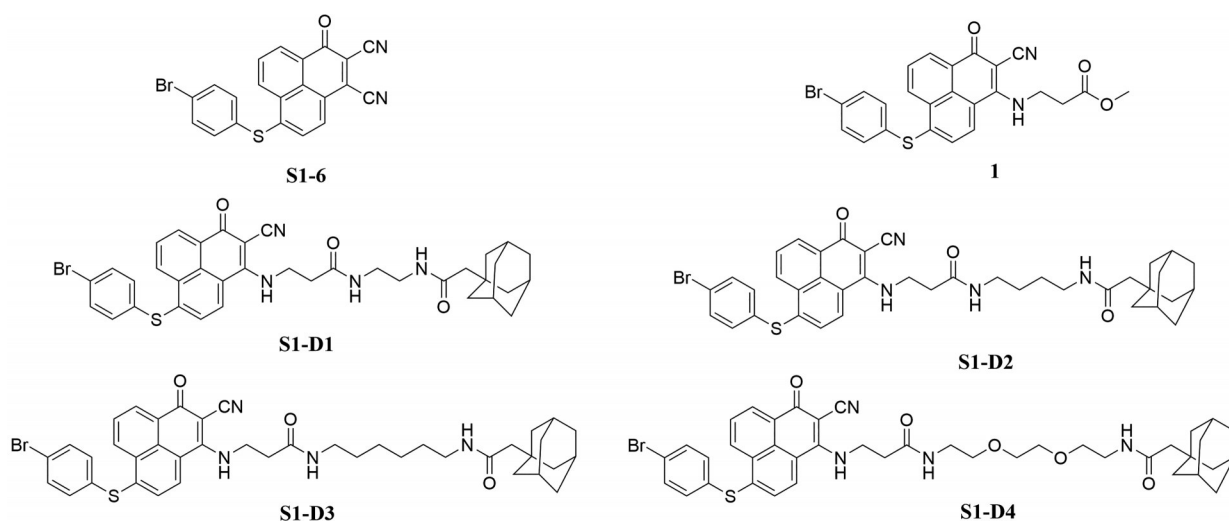


Figure 1 The molecular structures of compounds S1-6, 1, and S1-D1-S1-D4

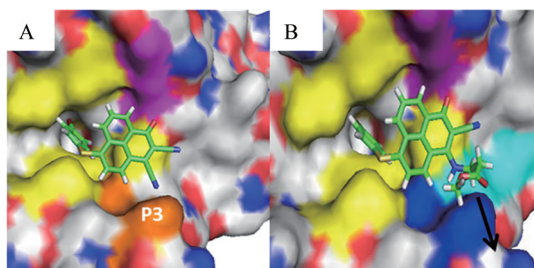


Figure 2 The binding mode of different compound to Bcl-2 family proteins. A: **S1-6**; B: Compound **1**

以 Bcl-2 家族蛋白抑制剂 **S1-6** 和疏水标签金刚烷甲酸为原料, 合成目标化合物的合成路线如合成路线 1 所示。具体步骤为: ① **S1-6** 和氨基丙酸甲酯按投料摩尔比 1:10 在碱性条件下常温发生 S_N1 取代反应合成中间体 **1**, 再通过碱性水解合成中间体 **2**; ② 金刚烷甲酸与单边 Boc 保护的二氨基连接子利用酰胺缩合反应连接, 随后将所得到的产物利用三氟乙酸进行保护基 Boc 的脱除, 获得中间体 **D1~D4**; ③ 最后, 利用酰胺缩合反应连接中间体 **2** 和 **D1~D4**, 合成终产物 **S1-D1~S1-D4**。

2 化合物 **S1-D1~S1-D4** 对 Bcl-2/Mcl-1 蛋白的亲和能力

利用酶联免疫吸附实验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 测定包括 Bcl-2 家族蛋白抑制剂 **S1-6**、中间体 **1** 及 **S1-D1~S1-D4** 化合物对 Bcl-2 家族不同蛋白 (Bcl-2 和 Mcl-1) 的结合能力及结合特异性。ELISA 的实验数据显示, 化合物 **S1-D1~S1-D4** 均保持了与原抑制剂分子 **S1-6** 和中间体 **1** 相近的结合亲和力

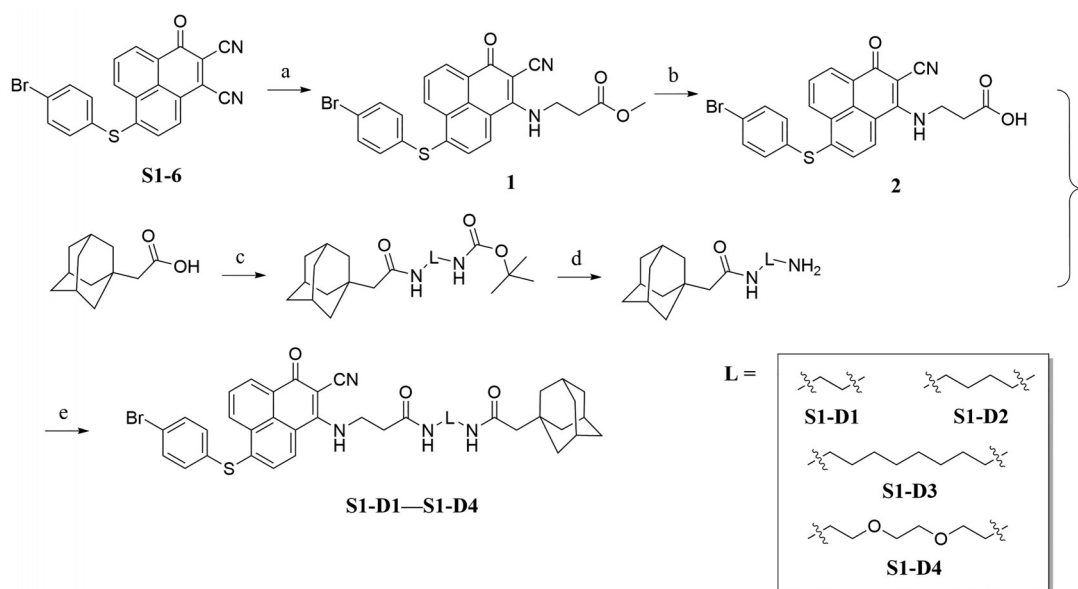
(图 3), 表明连接疏水基团并未显著影响化合物 **S1-D1~S1-D4** 对靶蛋白的亲和能力。

3 化合物 **S1-D1~S1-D4** 对 Bcl-2 和 Mcl-1 蛋白的选择性降解

为了检测化合物 **S1-D1~S1-D4** 在细胞内对不同 Bcl-2 家族蛋白的降解能力和选择性, 利用免疫印迹实验 (Western blot) 分别测定了加入不同浓度化合物 **S1-D1~S1-D4** 后细胞内 Bcl-2 和 Mcl-1 蛋白的水平变化。具体实验方案是以抑制剂 **S1-6** 作为对照组, 分别将化合物 **S1-D1~S1-D4** ($1, 3, 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 与乳腺癌模型 MCF7 细胞孵育 12 h 后, 将细胞裂解并利用免疫印迹实验检测细胞裂解液中 Mcl-1 与 Bcl-2 蛋白的含量变化。

结果显示, 上述连接疏水标签的分子中, 具有疏水烷基链连接子的化合物 **S1-D1~S1-D3** 表现出浓度依赖的、选择性的 Bcl-2 蛋白降解能力 (图 4)。其中, **S1-D2** 分子对 Bcl-2 的降解能力最强, 加入 $3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时能够降解超 80% 的 Bcl-2 蛋白, 加入 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时实现了 95% 以上的 Bcl-2 蛋白降解, 而在此浓度下 Mcl-1 蛋白的水平没有降低。相反, 具有聚乙二醇链连接子的化合物 **S1-D4** 则表现出对 Mcl-1 蛋白的特异性降解, 加入 $3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时降解了约 60% 的 Mcl-1 蛋白, 加入 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时 80% 的 Mcl-1 被降解, 而在这个浓度范围内 Bcl-2 蛋白的含量没有出现降低。对照组的抑制剂 **S1-6** 在加入 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时没有引起任何一个蛋白的降解。

值得注意的是, 化合物 **S1-D1~S1-D3** 表现出浓度



Scheme 1 Synthetic routes of all the target compounds. Reagents and conditions: a: methyl 3-aminopropanoate, CH_3CN , rt, 3 h; b: NaOH, $\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$, rt, 12 h; c: Boc-NH-X-NH₂, HATU, DIPEA, DMF, rt, 12 h; d: TFA, CH_2Cl_2 , rt, 1 h; e: HATU, DIPEA, DMF, rt, 12 h

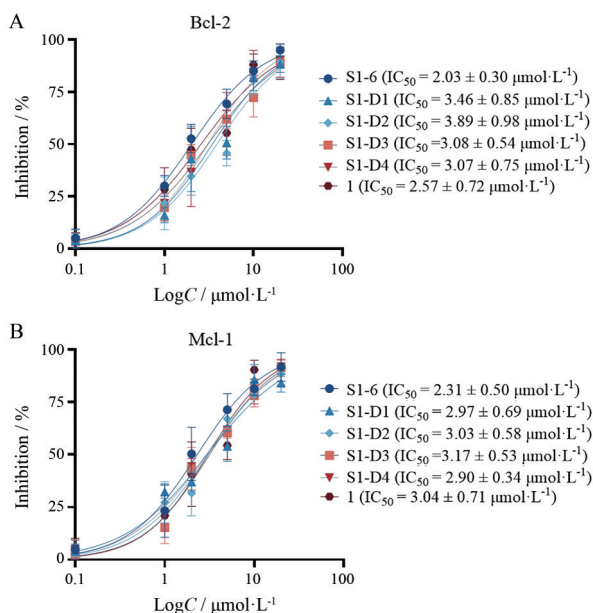


Figure 3 Binding affinities of S1-6, 1, and S1-D1~S1-D4 toward different protein. A: Bcl-2; B: Mcl-1

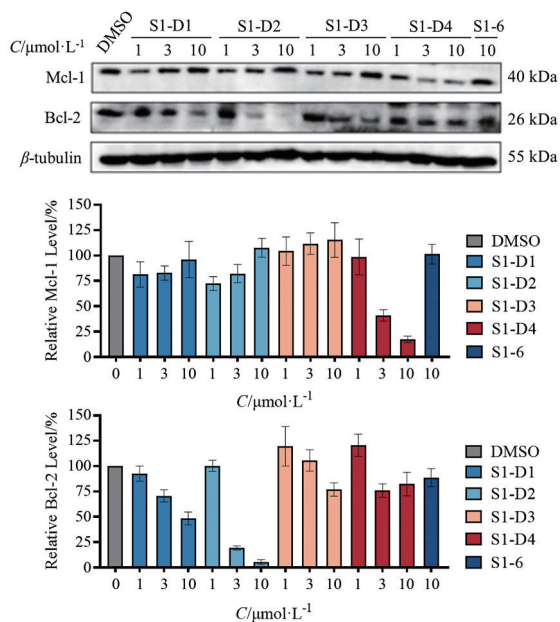


Figure 4 The protein level change of Mcl-1 and Bcl-2 induced by compounds S1-D1~S1-D4

依赖的Mcl-1蛋白水平上调(图4), 该结果与目前多种临床试验阶段的Mcl-1抑制剂(S63845、AZD5991、AMG-176等)会导致Mcl-1水平上调的现象相一致^[25-27]。引起该现象的生物学机制目前尚不清楚, 可能的原因包括通过影响Mcl-1的磷酸化、泛素化、去泛素化等过程调控Mcl-1蛋白的稳定性^[28]。以上结果进一步表明Mcl-1蛋白泛素化降解剂能够有效地解决Mcl-1抑制剂所带来的靶蛋白水平上调的问题, 因此相比于抑制剂可能

具备更显著的优势。

对比S1-D1~S1-D4系列分子对Bcl-2/Mcl-1蛋白的结合亲和力(图3)和它们诱导Bcl-2/Mcl-1蛋白降解的结果(图4), 发现S1-D1~S1-D4分子对靶蛋白的亲和力、降解效率及降解选择性没有相关性。即使是基于同一抑制剂母体设计的系列分子, 它们对Bcl-2家族蛋白的降解能力和选择性也存在较大差异, 可以从广谱性Bcl-2抑制剂出发通过连接子的优化获得Bcl-2/Mcl-1特异性的基于疏水标签的蛋白泛素化降解剂。

目前关于疏水标签诱导靶蛋白降解的机制, 主要存在两种假说: ①疏水标签的功能是模拟部分未折叠的蛋白结构; ②疏水标签与靶蛋白结合, 稳定靶蛋白的错误构象, 被细胞内监控系统误判, 从而招募内源性伴侣蛋白, 促进靶蛋白的蛋白酶体降解^[22,23]。本研究中, 引入不同的连接疏水标签的连接子并未显著影响化合物S1-D1~S1-D4对靶蛋白的亲和能力(图3), 但显著影响化合物对靶蛋白的降解能力(图4), 说明疏水标签很可能并没有与靶蛋白发生直接的相互作用从而改变靶蛋白的构象, 而是模拟部分未折叠的蛋白结构被伴侣蛋白识别并被蛋白酶体降解, 即符合假说①所述的机制。连接子的长度、结构则能够影响靶蛋白-HyT-伴侣蛋白形成复合体中靶蛋白和伴侣蛋白之间的相对位置, 调控的靶蛋白和伴侣蛋白的蛋白-蛋白相互作用, 影响靶蛋白-HyT-伴侣蛋白复合物的稳定性和降解效率。因此, 通过对连接子的优化、适配不同靶蛋白与伴侣蛋白形成蛋白-蛋白相互作用的需要, 有机会实现从广谱性Bcl-2抑制剂出发获得Bcl-2/Mcl-1特异性的基于疏水标签的蛋白泛素化降解剂。

4 化合物S1-D1~S1-D4的抗肿瘤活性

检测降解剂S1-D1~S1-D4与抑制剂分子S1-6在细胞杀伤活性上的差异。将S1-D1~S1-D4和S1-6分别与依赖Bcl-2家族蛋白生存的MCF-7细胞共孵育, 利用CCK8染色测定细胞的生存率。细胞活性实验的结果表明, 基于疏水标签的Bcl-2/Mcl-1蛋白泛素化降解剂S1-D1~S1-D4杀伤细胞的活性均优于抑制剂S1-6, 并且降解剂的细胞杀伤活性与降解剂分子对Bcl-2/Mcl-1降解能力呈正相关(图5)。其中, 对Mcl-1降解能力最强的S1-D2分子具有最高的细胞杀伤活性($IC_{50} = 1.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 相比抑制剂S1-6的细胞杀伤活性($IC_{50} = 9.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)提高5倍以上。

以上结果表明, 基于疏水标签的Bcl-2/Mcl-1蛋白泛素化降解剂通过降低细胞中Bcl-2家族蛋白的含量可以带来更显著的细胞表型变化, 比如癌细胞的细胞生存率显著降低, 显示了蛋白质降解分子相比于抑制剂的优势。

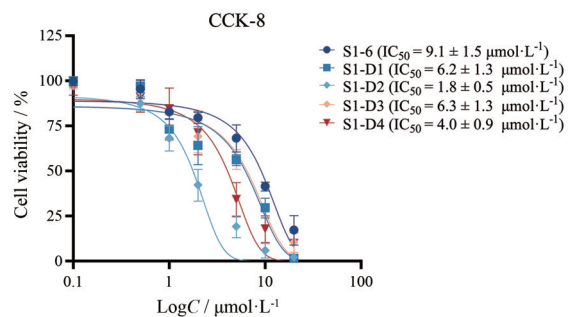


Figure 5 Cell cytotoxicity assays in MCF-7 cells upon addition of S1-D1~S1-D4 and S1-6 for 24 h. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

5 讨论

本研究设计、合成并评价了靶向 Bcl-2 家族蛋白的基于疏水标签的蛋白泛素化降解剂。利用 Bcl-2 家族蛋白广谱性抑制剂 S1-6 作为靶标识别配体, 通过选择不同长度及疏水性的烷基链或者聚乙二醇链连接金刚烷疏水标签, 设计合成了 4 种不同结构的基于疏水标签的 Bcl-2/Mcl-1 蛋白泛素化降解剂 S1-D1~S1-D4, 并在乳腺癌细胞模型 MCF-7 上考察了其诱导 Bcl-2 和 Mcl-1 蛋白泛素化降解和肿瘤细胞凋亡的能力。结果显示, 尽管 S1-D1~S1-D4 均保持了对 Bcl-2 家族蛋白广谱的亲和力, 但引入不同的连接链导致 S1-D1~S1-D4 实现了对 Bcl-2 和 Mcl-1 的选择性降解。其中, 具有疏水烷基链的 S1-D2 分子对 Bcl-2 的降解能力最强, 加入 $3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时能够降解超 80% 的 Bcl-2 蛋白, 而具有聚乙二醇链连接子的化合物 S1-D4 则表现出对 Mcl-1 蛋白的特异性降解, 加入 $3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时降解了约 60% 的 Mcl-1 蛋白。以上结果证明, 基于疏水标签的蛋白泛素化降解剂也可以通过连接子的优化实现对降解效率和选择性的调控, 为后续基于疏水标签的降解剂的设计提供了参考。随后, 细胞毒性实验证明基于疏水标签的蛋白泛素化降解剂能够通过诱导靶蛋白的降解获得更强的肿瘤细胞杀伤活性, 揭示了降解剂相比于抑制剂分子的优势。

实验部分

实验所有试剂和溶剂未经说明的均为分析纯。Bcl-2 和 Mcl-1 抗体购自美国 Santa Cruz 生物公司, RPMI1640 培养液、Tween-20、CCK-8 溶液购自北京索莱宝公司。本实验中所用仪器包括: Varian INOVA 400 MHz 核磁共振波谱仪 (Varian 公司, 美国), HP 1100 LC-MSD 高分辨质谱仪 (HP 公司, 美国), GENios 酶标仪 (TECAN 公司, 瑞士), HH CP-T 恒温 CO_2 细胞培养箱 (益恒实验仪器有限公司, 上海), 水平层流超净台 (益恒实验仪器有限公司, 上海)。

1 化合物 S1-D1~S1-D4 的合成

在 30 mL 乙腈中加入 S1-6 (417 mg, 1 mmol), 氨基丙酸甲酯 (895 mg, 10 mmol), 常温反应 3 h。溶剂蒸干, 粗产品用硅胶柱分离, 流动相为二氯甲烷: 乙酸乙酯 (按体积比 15:1), 得黄色固体化合物 1 48 mg, 产率 10%。

在 10 mL 四氢呋喃中加入 1 (98 mg, 0.20 mmol), 冰水浴搅拌下滴加 5 mL NaOH (80 mg, 2.0 mmol) 水溶液, 常温搅拌 20 h, 倒入 50 mL 水, 用盐酸酸化至 $\text{pH} = 2$, 抽滤, 烘干, 得黄色固体 2 88 mg, 产率 95%。

在 10 mL DMF 中加入 50 mg 金刚烷甲酸, 48 mg *N*-Boc-1, 2- 乙二胺, 冰水浴搅拌下加入 118 mg (0.32 mmol) HATU, 常温搅拌 12 h。将反应液倒入 30 mL 水中并用 30 mL 的乙酸乙酯萃取 3 次。将萃取得到的有机相合并, 用无水硫酸钠干燥后减压蒸馏除去乙酸乙酯, 粗产物用硅胶层析柱分离, 流动相为二氯甲烷: 甲醇 (按体积比 30:1), 得无色油状液体。随后产物溶于 10 mL 二氯甲烷, 然后在冰水浴的条件下向瓶中滴加 3 mL 三氟乙酸, 滴加完成后撤去冰水浴在室温下反应 2 h, 反应结束后减压蒸馏除去二氯甲烷与剩下的三氟乙酸, 得油状液体化合物 D1。产物不进一步提纯, 直接进行下一步反应。

将上一步反应所得化合物 D1 溶于 10 mL DMF, 加入 88 mg 化合物 2, 50 μL DIPEA, 在冰水浴条件下向反应液中加入 84 mg (0.22 mmol) HATU, 常温反应 12 h。将反应液倒入 30 mL 水中并用 30 mL 的乙酸乙酯萃取 3 次。将萃取得到的有机相合并, 用无水硫酸钠干燥后减压蒸馏除去乙酸乙酯, 粗产物用硅胶层析柱分离, 流动相为二氯甲烷: 甲醇 (按体积比 20:1), 得终产物 S1-D1, 黄色固体, 产量 92 mg, 产率 72%。 ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{H} : 8.57 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 8.46 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 8.42 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.90 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.66 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.57 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.41 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 4.13 (m, $J = 6.4$ Hz, 2H), 3.18 (m, 4H), 2.64 (m, $J = 6.4$ Hz, 2H), 1.81 (s, 2H), 1.69–1.63 (m, 3H), 1.61–1.54 (m, 9H), 1.49–1.43 (m, 2H), 1.42–1.36 (m, 3H)。ESI-MS: calcd. For $\text{C}_{36}\text{H}_{36}\text{BrN}_4\text{O}_3\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 683.168 6; found 683.168 1。

S1-D2, 起始原料更换为 *N*-Boc-1, 4-丁二胺 (56 mg, 0.30 mmol), 合成与分离方法同 S1-D1。黄色固体, 终产量 95 mg, 产率 70%。 ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{H} : 8.59 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 8.47 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 8.44 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.91 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.66 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.57 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.41 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 4.14 (m, $J = 6.4$ Hz, 2H), 3.33 (d, $J = 5.3$ Hz,

2H), 3.19 (d, $J = 5.4$ Hz, 2H), 2.66 (m, $J = 6.4$ Hz, 2H), 1.82 (s, 2H), 1.71–1.64 (m, 3H), 1.60–1.55 (m, 9H), 1.51–1.36 (m, 9H)。ESI-MS: calcd. For $C_{38}H_{40}BrN_4O_3S$ $[M+H]^+$, 711.199 9, found 711.199 2。

S1-D3, 起始原料更换为 *N*-Boc-1,6-己二胺 (65 mg, 0.30 mmol), 合成与分离方法同 **S1-D1**。黄色固体, 终产量 84 mg, 产率 57%。 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ_H : 8.56 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 8.45 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 8.42 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.92 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.68 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.54 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.42 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 4.30 (d, $J = 4.6$ Hz, 2H), 3.29 (d, $J = 6.1$ Hz, 2H), 3.21 (dd, $J = 12.3, 6.4$ Hz, 2H), 2.74 (dd, $J = 15.3, 4.2$ Hz, 2H), 1.84 (s, 2H), 1.70–1.66 (m, 3H), 1.62–1.54 (m, 10H), 1.50–1.38 (m, 8H), 1.36–1.29 (m, 4H)。ESI-MS: calcd. For $C_{40}H_{44}BrN_4O_3S$ $[M+H]^+$, 739.231 2, found 739.231 5。

S1-D4, 起始原料更换为 *N*-Boc-2,2-(亚乙二氧基)二乙胺 (74 mg, 0.30 mmol), 合成与分离方法同 **S1-D1**。黄色固体, 终产量 101 mg, 产率 61%。 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ_H : 8.57 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 8.46 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 8.42 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.90 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.66 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.57 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.41 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 4.23 (m, $J = 6.2$ Hz, 2H), 3.69–3.66 (m, 4H), 3.63–3.59 (m, 4H), 3.50–3.44 (m, 4H), 2.68 (m, $J = 6.3$ Hz, 2H), 1.81 (s, 2H), 1.68–1.63 (m, 3H), 1.59–1.52 (m, 8H), 1.50–1.44 (m, 3H), 1.41–1.36 (m, 3H)。ESI-MS: calcd. For $C_{40}H_{44}BrN_4O_5S$ $[M+H]^+$, 771.221 0, found 771.221 5。

2 酶联免疫吸附实验

利用 $0.05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (pH 值为 9.0) 的 Na_2CO_3 缓冲液稀释链霉亲和素储存液至 $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 向 ELISA 专用酶标 96 孔板中的每个测试孔内加入 $100 \mu\text{L}$ 稀释后的链霉亲和素溶液, 4°C 静置孵育 12 h。弃去孔内溶液, 向每个测试孔中加入 $370 \mu\text{L}$ 洗涤液 (洗涤液组成: NaCl $137 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, KCl $2.7 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, Na_2HPO_4 $4.3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, KH_2PO_4 $1.4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 0.05% Tween-20), 静置 3 min。重复润洗 3 次, 然后加入 $100 \mu\text{L}$ 生物素标记的 Bim 肽段, 室温静置 2 h, 弃去溶液, 用洗涤液润洗 3 次。将不同浓度梯度的小分子分别与 $200 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Mcl-1、Bcl-2 蛋白的 PBS 溶液混合, 室温静置孵育 1 h, 随后取 $100 \mu\text{L}$ 蛋白-小分子的混合溶液加入测试孔中, 室温静置孵育 1 h, 随后弃去溶液, 用洗涤液润洗 3 次。然后向每个测试孔中加入 $100 \mu\text{L}$ 的 TMD 显色液, 常温孵育 30 min 后加入 $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的硫酸终止显色反应。最后在酶标仪上测定各孔的吸光值, 记录结果, 用蛋白抑

制率对化合物浓度对数作图, 计算每个小分子对蛋白的半数抑制浓度值 (IC_{50})。

3 免疫印迹实验 (Western blot)

在 6 孔细胞培养板中接种 MCF-7 细胞系 (每孔 2×10^5 个细胞), 用 DMSO 配置不同浓度的待测化合物溶液并加入培养板 (对照组加入相同体积分数的 DMSO), 细胞培育 12 h (室温, 5% CO_2), 弃去培养基, 用 PBS 缓冲液清洗 3 次。收集孔板中的细胞, 加入 $50 \mu\text{L}$ 的 RIPA 细胞裂解液, 低温裂解 30 min, 离心 ($12\ 000 \text{ g}$, 4°C , 15 min), 取上清液。加入 SDS, 进行 12% SDS-PAGE 电泳。随后转至 PVDF 膜, 用含有 5% 脱脂牛奶和 0.1% Tween-20 的 TBS 溶液进行封闭, 最后使用待检测蛋白 (Mcl-1、Bcl-2) 对应的抗体对目的蛋白进行检测。

4 CCK8 细胞增殖毒性检测实验

用 0.25% 的胰蛋白酶处理 MCF-7 细胞系, 再用含有 10% 的胎牛血清的 RPMI1640 培养液配制单细胞悬液。将悬液接种到 96 孔的培养板中 (每孔 $200 \mu\text{L}$, $10^3\sim 10^4$ 个细胞), 37°C 培养 24 h (5% CO_2) 后, 然后向待测孔中加入不同浓度梯度的待测化合物溶液, 对照组则加入相同体积的 DMSO (DMSO 最终含量不超过 0.3%), 继续培养 24 h。向每个测试孔中加入 $10 \mu\text{L}$ 的 CCK-8 溶液, 孵育 3 h。使用酶标仪 (波长 $450 \text{ nm}\cdot\text{L}^{-1}$) 测定各孔中的光吸收值, 记录实验结果。根据公式 (1) 计算细胞存活率, 并利用细胞存活率和小分子浓度的对数值作图, 得到小分子的半数抑制浓度 (IC_{50})。

$$\text{细胞存活率} = \frac{\text{试验组光吸收值}/\text{对照组光吸收值} \times 100\%}{100\%} \quad (1)$$

作者贡献: 王哲明、黎怡同负责实验研究、文章撰写与修改; 张志超负责实验指导与文章修改; 王紫千负责实验方案设计、实验指导、文章撰写、修改与审核。

利益冲突: 本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

References

- [1] Thompson C. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease [J]. Science, 1995, 267: 1456-1462.
- [2] Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death [J]. Nat Med, 2000, 6: 513-519.
- [3] Delbridge ARD, Grabow S, Strasser A, et al. Thirty years of BCL-2: translating cell death discoveries into novel cancer therapies [J]. Nat Rev Cancer, 2016, 16: 99-109.
- [4] Qian SN, Wei Z, Yang WT, et al. The role of BCL-2 family proteins in regulating apoptosis and cancer therapy [J]. Front Oncol, 2022, 12: 985363.
- [5] Adams JM, Cory S. Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential [J]. Curr Opin Immunol, 2007, 19: 488-496.
- [6] Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing

- activities that mediate cell death [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9: 47-59.
- [7] Yap JL, Chen L, Lanning ME, et al. Expanding the cancer arsenal with targeted therapies: disarmament of the antiapoptotic Bcl-2 proteins by small molecules [J]. *J Med Chem*, 2017, 60: 821-838.
- [8] Ashkenazi A, Fairbrother WJ, Souers AJ, et al. From basic apoptosis discoveries to advanced selective BCL-2 family inhibitors [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16: 273-284.
- [9] Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, et al. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15: 49-63.
- [10] Hafezi S, Rahmani M. Targeting BCL-2 in cancer: advances, challenges, and perspectives [J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13: 1292.
- [11] Diepstraten ST, Anderson MA, Czabotar PE, et al. The manipulation of apoptosis for cancer therapy using BH3-mimetic drugs [J]. *Nat Rev Cancer*, 2022, 22: 45-64.
- [12] U. S. Food & Drug Administration. FDA approves venetoclax for CLL or SLL, with or without 17 p deletion, after one prior therapy [EB/OL]. [2018-06-08]. <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-venetoclax-ctl-or-sll-or-without-17-p-deletion-after-one-prior-therapy>.
- [13] U.S. Food & Drug Administration. FDA approves venetoclax in combination for AML in adults [EB/OL]. [2018-12-14]. <https://www.fda.gov/drugs/fda-approves-venetoclax-combination-aml-adults>.
- [14] Chirmomas D, Hornberger KR, Crews CM. Protein degraders enter the clinic- a new approach to cancer therapy [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2023, 20: 265-278.
- [15] Békés M, Langley DR, Crews CM. PROTAC targeted protein degraders: the past is prologue [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2022, 21: 181-200.
- [16] Burslem GM, Crews CM. Proteolysis-targeting chimeras as therapeutics and tools for biological discovery [J]. *Cell*, 2020, 181: 102-114.
- [17] Cao CG, He M, Wang LG, et al. Chemistries of bifunctional PROTAC degraders [J]. *Chem Soc Rev*, 2022, 51: 7066-7114.
- [18] Khan S, Zhang X, Lv DW. A selective BCL-XL PROTAC degrader achieves safe and potent antitumor activity [J]. *Nat Med*, 2019, 25: 1938-1947.
- [19] Wang ZQ, He NZ, Guo ZW, et al. Proteolysis targeting chimeras for the selective degradation of Mcl-1/Bcl-2 derived from nonselective target binding ligands [J]. *J Med Chem*, 2019, 62: 8152-8163.
- [20] Lv DW, Pal P, Liu XG, et al. Development of a BCL-xL and BCL-2 dual degrader with improved anti-leukemic activity [J]. *Nat Commun*, 2021, 12: 6896.
- [21] He YH, Zhang X, Chang JH, et al. Using proteolysis-targeting chimera technology to reduce navitoclax platelet toxicity and improve its senolytic activity [J]. *Nat Commun*, 2020, 11: 1996.
- [22] Xie SW, Zhu JJ, Li JD, et al. Small-molecule hydrophobic tagging: a promising strategy of druglike technology for targeted protein degradation [J]. *J Med Chem*, 2023, 66: 10917-10933.
- [23] Peng XP, Hu ZH, Zeng LM, et al. Overview of epigenetic degraders based on PROTAC, molecular glue, and hydrophobic tagging technologies [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2024, 14: 533-578.
- [24] Song T, Wang ZQ, Ji FL, et al. Deactivation of Mcl-1 by dual-function small-molecule inhibitors targeting the Bcl-2 homology 3 domain and facilitating Mcl-1 ubiquitination [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2016, 55: 14250-14256.
- [25] Kotschy A, Szlavik Z, Murray J, et al. The MCL1 inhibitor S63845 is tolerable and effective in diverse cancer models [J]. *Nature*, 2016, 538: 477-482.
- [26] Tron AE, Belmonte MA, Adam A, et al. Discovery of Mcl-1-specific inhibitor AZD5991 and preclinical activity in multiple myeloma and acute myeloid leukemia [J]. *Nat Commun*, 2018, 9: 5341.
- [27] Koch R, Christie AL, Crombie JL, et al. Biomarker-driven strategy for MCL1 inhibition in T-cell lymphomas [J]. *Blood*, 2019, 133: 566-575.
- [28] Tantawy SI, Sarkar A, Hubner S, et al. Mechanisms of MCL-1 protein stability induced by MCL-1 antagonists in B-Cell malignancies [J]. *Clin Cancer Res*, 2023, 29: 446-457.