

· 综 述 ·

作用于 Bcl-2 家族抗凋亡亚族蛋白的小分子抑制剂的研究进展

汤 湧, 张大永, 吴晓明*

(中国药科大学 药学院, 江苏 南京 210009)

摘要: 细胞的凋亡是维持机体平衡的重要因素。细胞凋亡由一系列细胞因子调控。Bcl-2 蛋白家族是细胞凋亡的关键性调节因子。Bcl-2 家族分为抗凋亡和促凋亡两个亚族, 他们的相互作用对细胞凋亡信号传导起调控作用。很多肿瘤细胞高表达 Bcl-2 抗凋亡亚族成员 Bcl-2/Bcl-xL。近年来, 随着 Bcl-2 家族各成员的晶体结构相继阐明, 人们开始寻找作用于 Bcl-2 家族抗凋亡亚族蛋白的小分子抑制剂。本文从药物设计角度对该方面的进展作一综述。

关键词: Bcl-2; 抑制剂; 凋亡; 药物设计

中图分类号: R979.1 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2008)07-0669-09

Progress in small-molecule inhibitors of Bcl-2 family proteins

TANG Yong, ZHANG Da-yong, WU Xiao-ming*

(School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract: Apoptosis is an essential factor in keeping homeostasis of the organism. Apoptosis is regulated by a series of cytokines. Bcl-2 family proteins are key regulators of apoptosis. The Bcl-2 family includes both anti-and pro-apoptotic proteins with opposing biological functions. Their interaction regulates the transmission of the apoptosis signal. High expression of anti-apoptotic members such as Bcl-2 and Bcl-xL are commonly found in human cancers. In recent years, following the disclosing of the crystal structures of Bcl-2 family proteins, researchers have paid attention to the development of the small molecule inhibitors of Bcl-2 family proteins. This article reviews the progress in this field from the view of drug design.

Key words: Bcl-2; inhibitor; apoptosis; drug design

1 细胞凋亡与 Bcl-2 家族

细胞的凋亡是细胞主动的、由基因决定的自动结束生命的过程。对于多细胞生物来说, 细胞凋亡可以清除体内受损、感染或者已经完成特定使命的细胞, 从而有助于机体维持正常的生长发育和内环境的相对稳定。如果正常的细胞凋亡出现障碍, 就会导致包括癌症在内的多种疾病。

细胞凋亡由一系列细胞因子调控, 其调控的分子机制至今尚未完全阐明。但就目前所知, caspase 家族是调节细胞凋亡的关键成员, 它的级联激活引

发细胞发生凋亡特异改变, 并最终崩解。而 Bcl-2 (B-cell lymphocyte/leukemia-2) 蛋白家族是对 caspase 的激活进行调控的一类重要的细胞因子。Bcl-2 家族根据 BH 同源结构域的数量分成 3 类: 第一类是抗凋亡的, 如 Bcl-2、Bcl-xL、Bcl-w、Mcl-1 和 A1, 它们含有 4 个 BH 结构域, 即 BH1、BH2、BH3 和 BH4。第二类是促凋亡的, 如 Bax 和 Bak, 它们含有 3 个 BH 结构域, 即 BH1、BH2 和 BH3。在促凋亡蛋白中, 还有一类特殊的成员, 它们只有一个 BH 结构域(即 BH3), 如 Bid、Bad、Bim、Bik 等。虽然人们把这些成员都归为 Bcl-2 家族, 但各成员在共有的 BH3 结构域的氨基酸序列上并没有太多的相似性, 一级结构存在较大的差异, 但他们的高级结构和功能却基本相仿。

收稿日期: 2007-12-05.

* 通讯作者 Tel: 86-25-83271501, Fax: 86-25-83302827,
E-mail: xmwu@cpu.edu.cn

Bcl-2 家族成员之间能够发生相互作用,形成同或异二聚体,这是 Bcl-2 蛋白家族的一个重要特征,同时也是它们行使凋亡调节功能的重要形式。

Muchmore 等^[1]利用 X 射线晶体衍射和核磁共振相结合的方法,阐明了 Bcl-xL 的结构。Bcl-xL 含有两个主要的核心疏水性 α 螺旋,外围缠绕有数个两亲性 α 螺旋。BH1、BH2 和 BH3 结构域在空间上相互靠近,在 Bcl-xL 的分子表面形成一个疏水的口袋结构。这个疏水口袋类似一个受体,通过它,Bcl-xL 可以与 Bcl-2 家族其他成员相结合。Petros 等^[2]综述了 Bcl-2 家族成员的三维结构,特别是 Bcl-xL、Bcl-2、Bax、Bcl-xL/Bak 复合物的结构。Bcl-2 家族成员结构大都与 Bcl-xL 类似,包含两个主要的核心疏水性 α 螺旋,外围缠绕有数个两亲性 α 螺旋。抗凋亡亚族蛋白的表面形成疏水口袋结构,体外实验中,该疏水口袋可以与促凋亡成员如 Bak 和 Bad 的 BH3 结构域结合。这种结合很大程度上是靠疏水作用实现的。

Bcl-2 家族抗凋亡成员通过与促凋亡成员表面暴露的 BH3 结构域结合,形成异二聚体,实现其抗凋亡功能。当上游出现死亡信号时,Bax, Bak 以及仅含 BH3 结构域的蛋白质发生构象改变,使 BH3 结构域暴露或活化,然后和抗凋亡成员 BH3 疏水结合域(疏水口袋)结合。也就是说,异二聚体是由活化的促凋亡异构体与抗凋亡的 Bcl-2 成员形成。异二聚体的形成抑制了促凋亡成员的活性,从而实现其抗凋亡功能。

在生理状态下, Bcl-2 通常定位于线粒体膜、内质网膜以及外核膜上,而大多数 Bax 蛋白则以单体的形式定位于细胞浆中,少部分定位于内质网等细胞器。正常情况下,线粒体外膜的通透性被抗凋亡蛋白如 Bcl-2、Bcl-xL 所抑制。当凋亡信号传来时,促凋亡蛋白如 Bax、Bak 的构象改变刺激细胞色素 C 的释放,仅含有 BH3 结构域的蛋白质如 Bid、Bim 的裂解则可以直接或间接地(诱导 Bax 或者与 Bak 形成寡聚体)促进细胞的凋亡。一旦细胞色素 C 被释放,即可激活下游的 caspase,从而引起级联反应,导致细胞凋亡^[3]。关于仅含有 BH3 结构域的 Bcl-2 家族成员在这一凋亡过程中的作用,近来研究较多,大部分观点偏向间接活化 Bax 和 Bak 模式^[4]。

癌细胞通过各种手段逃避正常的细胞凋亡。不少癌细胞都高表达 Bcl-2 或 Bcl-xL,这使得人们设法开发 Bcl-2 家族抗凋亡亚族蛋白抑制剂。其思路是

合成 BH3 结构域类似物,使其与 Bcl-2/Bcl-xL 的 BH3 疏水结合域竞争性结合,本文就这类药物的最新进展从药物设计角度作一综述。

2 一些作用于 Bcl-2 家族抗凋亡亚族蛋白的化合物

2.1 BH3I-1 及其类似物

这类化合物最早是由 Degterev 等^[5]通过基于荧光偏振法的高通量筛选法,在剑桥化合物库的 16 320 个化合物中找到的 BH3I-1(1)(图 1)。这也是较早发现的明确作用于 Bcl-2、Bcl-xL 上 BH3 结合位点的小分子化合物,同时发现的还有 BH3I-2(2)(图 1)。他们同样结合于 Bcl-2 及 Bcl-xL 的疏水结合位点。文章特别提到这两个化合物具有较好的选择性,测试其对剪接因子 U2AF35 和 U2AF65 间相互作用的影响,证明其对其他蛋白-蛋白相互作用影响较小。其中 1 与其他抑制剂不同,其作用于疏水区几个不太保守的结合位点。这两个化合物的活性中等。用荧光偏振法测试对 Bcl-xL 的 K_i 值, 1 为 $(2.4 \pm 0.2) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($X = \text{Br}$), 2 为 $(3.3 \pm 0.3) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($Y = \text{Cl}, Z = \text{I}$)。

Xing 等^[6]在此基础上继续研究发现,大部分 Bcl-2 家族蛋白抑制剂对 Bcl-2 家族抗凋亡亚族的主要成员 Bcl-2、Bcl-xL 和 Bcl-w 缺乏选择性。因为 BH3Is 是作用于 Bcl-2 的 BH3 结合位点中的相对不保守区。Xing 等以 1 为基础又设计了一系列化合物 3(图 1)。这些化合物有不同的取代基,因为 Bcl-w 的疏水区体积最大,Bcl-xL 的疏水区最小,而 Bcl-2 的疏水区大小居中,所以通过不同的取代基组合可以实现对 Bcl-2、Bcl-xL 和 Bcl-w 的选择性。其中对 Bcl-2 活性最好的化合物为 $R_1 = (\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2$ 、 $R_2 = \text{Ph}$ 、 $R_3 = \text{Ph}$ 、 $R_4 = \text{OH}$, 其 K_i 值为 $(1.95 \pm 0.13) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 而对 Bcl-xL 活性最好的化合物为 $R_1 = (\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2$ 、 $R_2 = \text{H}$ 、 $R_3 = \text{Br}$ 、 $R_4 = \text{OH}$, 其 K_i 值为 $(2.99 \pm 0.18) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 事实上,其结构与 1 几乎一样。Bcl-2/Bcl-xL 选择性最好的化合物 $R_1 = 3\text{-indolyl-CH}_2$ 、 $R_2 = \text{H}$ 、 $R_3 = \text{Br}$ 、 $R_4 = \text{OH}$, 其对 Bcl-2 的抑制作用是 Bcl-xL 的 11.5 倍。

Wang 等^[7]合成了一系列 1 类似物的二聚体,其中,化合物 3e-D2(4)(图 1)对 Bcl-xL 的 K_i 值为 $0.97 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,对 Bcl-2 的 K_i 值也达 $1.7 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,均明显优于 1,更是其单体的数倍。此外,二聚体较单体体现出了明显的促细胞色素 C 释放作用。

上述研究小组合成了大量 1 的类似物,从中总结出一些构效关系。首先,羧基是重要的活性基团,将其酯化后活性基本消失^[7]。其次,苯基上的取代基对活性有较大影响, R_2 上有取代基的化合物往往

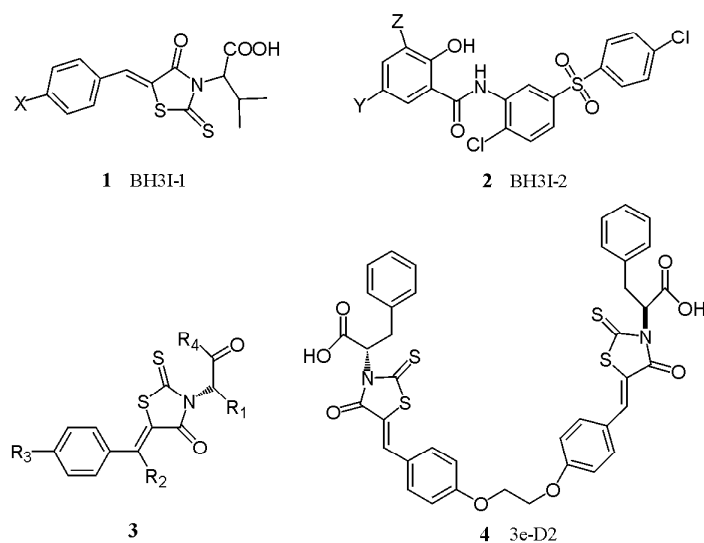


图 1 BH3I-1 及其类似物

对 Bcl-2 有较强的选择性^[6]。

2.2 来源于虚拟筛选与对接的化合物 2000 年, Wang 等^[8]在 Bcl-2 家族抗凋亡亚族作用机制尚不明晰的情况下,用计算机虚拟筛选、荧光偏振法测定化合物 Bcl-2 亲和性及传统的细胞毒测定法筛选出作用于 Bcl-2 的小分子化合物 HA14-1 (**5**) (图 2)。该小组准确地选择了 Bcl-2 上的 BH3 结合位点为虚拟筛选作用靶点,选用含有 193 833 个化合物的 MDL/ACD 3D 结构数据库,筛选程序选用了 Dock 3.5,打分函数是基于被选结构与靶点间的范德华作用力,筛选出 1 000 个候选化合物。在此基础上,经过几何优化和能量优化,挑选出了 53 个具有较低结合能,有利的几何互补性,能够(或)形成氢键的候选化合物。经过类药性评价,选出 28 个化合物进行合成。该小组采用刚性对接程序,计算机优化的优势构象,因而也有可能漏掉了一些在其他构象有较好亲和力的化合物。化合物 **5** 有多个光学异构体,在对接时不同的异构体均分别进行了测试。荧光偏振法测定表明,在 $IC_{50} = 9 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的情况下,**5** 可与 Bax 的 BH3 亚基竞争性结合于 Bcl-2 的 BH3 结合位点。进一步的测试在 HL-60 细胞系上进行,在 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 情况下,**5** 使 90% 的 HL-60 细胞死亡。体外实验表明,**5** 可诱导白血病/淋巴瘤细胞的凋亡,并加强阿糖胞苷的细胞毒作用^[9]。

Doshi 等^[10]对 **5** 的构效关系研究后得出结论,苯环上的溴取代基并不是必需的,可以被氢、烷基、芳香基取代。他们用对叔丁基苯基取代溴所得

衍生物对 Bcl-2 的亲合力比 **5** 大 3 倍,而其对 Jurkat 细胞系的细胞毒性大 13 倍!该小组的研究还表明了 **5** 只存在两个对映异构体(*R,R* 和 *S,S*)。**5** 及其衍生物的细胞毒性与其与 Bcl-2 的亲合性呈正相关。

化合物 **5** 在生理条件下不稳定^[11],在 RPMI 细胞培养基中迅速分解,其分解产物基本没有 Bcl-2 家族抗凋亡蛋白抑制活性。其产生细胞毒活性的原因是产生了氧自由基(ROS)。**5** 的氰基乙酸酯结构有 α 活泼氢、易于反应,估计是其不稳定的原因。

与 Doshi 等同属一个研究小组的 Tian 等^[12]开发了生理条件下 **5** 稳定的类似物 sHA14-1 (**6**) (图 2),**6** 在 RPMI 细胞培养基中 24 h 甚少分解。其和 Bcl-2 家族抗凋亡蛋白结合能力不弱于 **5**,对 Jurkat 细胞系的细胞毒性仅略低于新鲜配制的 **5**。其产生细胞毒作用的机制不是产生自由基,而是抗凋亡蛋白作用。

Enyedy 等^[13]亦使用虚拟筛选的方法找到了化合物 **7** (图 2)。在他们开始工作的时候, Bcl-2 的结构尚未完全阐明,因而他们采用了 Bcl-xL 及其与 Bax 结合体的 3D 结构为基础,选用国家癌症中心的 3D 结构数据库,采用 MODELLE 程序进行同源建模,模拟出了 Bcl-2 的 3D 结构。与 **5** 不同,在使用 DOCK 程序进行对接时,该小组考虑到了分子构象柔性。最终,该小组从 206 876 个化合物中筛选出了 35 个化合物进行 Bcl-2 结合能力测试,并挑选出结合力 IC_{50} 值在 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 以下的化合物 **7**

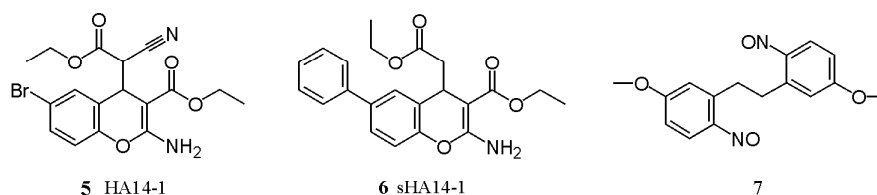


图2 来源于虚拟筛选与对接的化合物

个用 MTT 法测定细胞毒作用。其中活性最好的化合物 IC_{50} 为 $4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。正像通常出现的情况一样,它并不是与 Bcl-2 竞争性结合能力最强的,它对 Bcl-xL 作用同样较强,但对 Bcl-2 低表达的肿瘤细胞系作用不强。值得一提的是,该小组指出了荧光偏振法可能存在误判的情况。该小组采用 NMR (HSQC 谱)法测定 Bcl-2 在结合该化合物后的化学位移值变化,排除了误判的可能。

2.3 以 *N*-苯磺酰基苯甲酰胺为基础的化合物 这类化合物是雅培公司开发的一系列 Bcl-2 家族抑制剂,主要有 ABT-737 (**8**) (图 3)、ABT-262 等。这类化合物的开发是 Bcl-2 家族抑制剂开发史上里程碑的事件。这类化合物的基本结构是取代的 *N*-苯磺酰基苯甲酰胺。开发采用了被称为 SAR by NMR 的先导化合物开发方法。这种方法由 Shuker 等开发,其大致的过程是测定受体蛋白与小分子配体结合后 HSQC 谱中蛋白的 H^1 或 N^{15} 化学位移变化以筛选出可分别与受体两个相近区域结合的两个小分子配体,随后对配体进行优化,最后再寻找合适的连接子将它们连接。其优点是即使两个小分子配体对受体蛋白的亲合性不高,他们用连接子连接后的化合物仍可能有较高亲合性^[14]。

作为基于结构的药物设计基础,雅培公司的研究人员选择了 Bcl-xL 作为受体。他们首先用前述的测定配体-受体结合后受体 HSQC 谱中蛋白的 H^1 或 N^{15} 化学位移变化的方法筛选出了可结合于 Bcl-xL 上 BH3 结合域疏水口袋的基本结构 4'-氟-4-联苯基甲酸结构单元和结合于附近区域的四氢萘酚类似物结构单元。构效关系研究表明,羧基以静电相互作用作用于 Bcl-xL 与 Bak 等促凋亡家族蛋白作用的关键氨基酸残基 Arg139,而氟苯结构插入疏水口袋的核心,但氟原子也可以被氯、萘基等取代。萘酚类似物模拟 Bak 上的 Ile85 残基的疏水结合。连接子选择了 *N*-磺酰基甲酰胺基结构。这一结构是羧基的生物电子等排体,可以直接取代羧基。第二个结构单元通过平行合成法确定,2-氨基硫乙基所联的苯基和硝基苯基呈反-反重叠构象,它们之

间以及分别与 Phe97 和 Tyr194 之间形成了大 π 键,极大地增强了化合物与 Bcl-xL 的作用^[15,16]。

该先导化合物 **9** (图 3) 对 Bcl-xL 的 K_i 值为 $(36 \pm 2) \text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$,其活性仍不强,其中一个重要原因是对 Bcl-2 的作用太弱。此外,该先导化合物与人血清蛋白结合太强,在体内难以发挥作用。研究人员结合先导化合物与血清蛋白位点 III (HSA-III) 的结合构象, Bcl-2 与 Bcl-xL 的结构差别等设计依据,通过增加极性取代基干扰其与 HSA-III 相互作用,设计大体积的疏水取代基增强其与 Bcl-2 的作用等办法,最终设计了 ABT-737 (**8**)^[17,18]。

化合物 **8** 对 Bcl-2 和 Bcl-xL 的 K_i 值均小于(或等于) $1 \text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。在 10% 人血清存在下, **8** 对 Bcl-2 和 Bcl-xL 的 IC_{50} 为 $(103 \pm 2) \text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $(35 \pm 1) \text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。 **8** 有效介导多种 Bcl-2/Bcl-xL 高表达细胞的凋亡,单独使用对 B 细胞淋巴瘤和慢性粒细胞白血病及小细胞肺癌细胞均有较强的细胞毒作用(小细胞肺癌 $EC_{50} < 1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。但 **8** 与 Mcl-1 的亲合力较低^[19],它可通过提高 Bax 水平增加某些肿瘤对药物的敏感性,故可用于联合用药^[20]。

Van Delft 等^[21] 的实验进一步证明: **8** 能有效诱导 Bcl-2 过度表达的细胞凋亡,但如果该细胞过度表达 Mcl-1,则 **8** 的作用被抑制。如果设法抑制肿瘤细胞 Mcl-1 的过度表达,则 **8** 的活性可恢复。

8 不能口服给药。ABT-263 是由雅培公司开发的第二代 Bcl-2 抗凋亡蛋白抑制剂。该药口服有效并且不抑制骨骼生长。目前,雅培公司开始了该药用于淋巴瘤和小细胞肺癌的 I/II 期临床实验^[22],该化合物是目前雅培公司的重点开发对象。Abbott 的专家 Park 在去年 10 月份刚刚召开的美国化学会 2007 西部地区会议上详尽介绍了该药的发现过程^[23]。

2.4 多酚类化合物 该类化合物的特点是拥有一个多羟基酚的母核结构,酚羟基与受体所形成的氢键是重要的结合作用力。

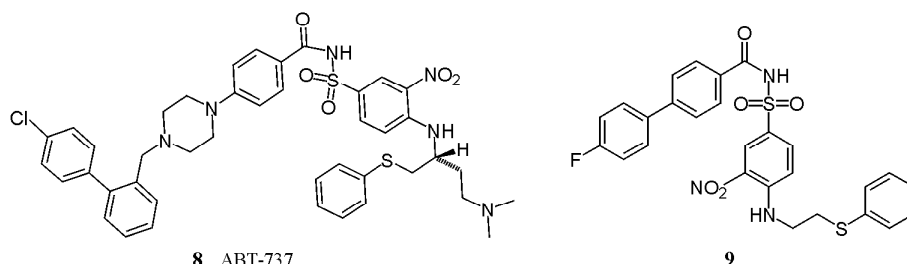


图3 化合物8和9的结构式

密歇根大学的 Wang 等^[24]利用 Dock 程序进行虚拟筛选,从 7 000 个天然化合物中挑选出了 9 个有商品供应的化合物并用荧光偏振法(FP)测定化合物 Bcl-2 亲和性。他们筛选出了棉酚,在几种光学异构体中,(-)-棉酚[(-)-gossypol](10)(图 4)毒性较小而结合力强。随后的测试证实了对包括 HL-60 细胞在内的多种 Bcl-2 高表达细胞系的细胞毒性。他们的结论是:棉酚可以有效诱导 Bcl-xL/Bcl-2 高表达(Bcl-xL 表达更高)的细胞凋亡而不影响正常细胞。在他们申请的专利中,提到了从棉酚出发的多种结构修饰物,如棉酚酮、棉酚乙酸、棉酚西夫碱等。据称这类化合物的临床试验结果良好。

红倍酚(purpurogallin)(11)(图 4)是中等活性的 Bcl-xL 抑制剂,FP 法测定其对 Bcl-xL 的 IC_{50} 值为 $2.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。11 的结构与活性构象均与棉酚的半边结构类似,其对 HeLa 细胞的 IC_{50} 值为 $6.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[25]。

从 2006 年到 2008 年,多个研究小组在(-)-棉酚的基础上进行基于结构的药物设计,设计出了下述一系列 Bcl-2 抑制剂。这类化合物是以 Bim 的 BH3 结构域与 Bcl-2 的结合构象为基础,所以对 Bcl-2 的抑制往往较 Bcl-xL 为强。并且对 Mcl-1 也有较强抑制作用,这与 8 不同。

2006 年,Wang 等使用计算机对接的方法研究了(-)-棉酚与 Bcl-2 的对接模型^[26]。在此基础上,该小组还建立了 Bim 与 Bcl-2 结合的分子对接模型。二者对比,他们发现棉酚通过右侧萘环上的醛基及邻位羟基与 Bcl-2 的 Arg146 和 Asn143 形成氢键,模拟了 Bim 的 Asp99 和 Asn102 残基的作用。异丙基插入 Bcl-2 上的疏水口袋区,部分模拟了 Bim 的 Phe101 残基与 Bcl-2 的疏水结合。(-)-棉酚的另一半结构与 Bcl-2 成疏水结合,模拟了 Bim Ile97 残基的疏水结合。该小组合成了一个(-)-棉酚结

构简化物 12(图 4),多羟基酚保留了棉酚最重要的氢键结合作用,异丙基不变,用一个甲酰胺基连接一个苯基模拟棉酚另一半的疏水作用。这个基本结构成为后来一系列化合物的核心结构——2,3-二羟基苯酚衍生物 12。

Wang 等在前述核心结构的基础上报道了化合物 TW-37(13)(图 4)^[26],相对于原来的结构,13 增加了更多的疏水性基团,特别是 2-叔丁基苯磺基可以模拟 Bim Leu94 残基与 Bcl-2 的疏水结合。该化合物与 Bcl-2 的结合能力比(-)-棉酚强,其 K_i 值为 $290 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。构效关系研究表明,其 3 个羟基的氢键结合十分重要,将其甲醚化则活性下降 100 倍。

同期进行的体外实验还表明,13 有抑制肿瘤血管生成的作用。13 对内皮细胞的 IC_{50} 值为 $1.8 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,在低于细胞毒浓度的条件下($0.05 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 或 $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)可以抑制 VEGF 介导肿瘤血管生长作用。在更低的浓度($0.005 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 或 $0.05 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)下,仍可抑制血管生成化学增活素(angiogenic chemokines) CXCL1 和 CXCL8 表达。合用 13 将有利于增强传统细胞毒药物的作用^[27]。

2007 年,该小组又合成了新的活性更好的化合物 TM1206(14)(图 4)^[28]。他们仍然使用前述 13 使用的先导化合物 12 作为起始物,结构改造的思路依然是增强其疏水性。采用与 8 类似的磺酰胺基作为连接子有利于调节化合物的药动学性质。用 FP 法测定亲和力,化合物 14 对 Bcl-2、Bcl-xL、Mcl-1 的 K_i 值分别为 110、639、150 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。该小组考虑到他们所合成的化合物可能有自发荧光,所以又用酶标记免疫吸附试验法进行了测定,其对于 Bcl-2 的 IC_{50} 值为 $(0.33 \pm 0.05) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,10 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度的化合物可有效促进 MDA-MB-231 细胞系凋亡。

Tang 等^[29]同样以 **12** 为先导化合物,合成了化合物 TM-179(**15**)(图 4),其结构与 **13**、**14** 类似。FP 法测定,该化合物对 Bcl-2 的 IC_{50} 值为 $170 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$,对 Mcl-1 的 K_i 值为 $37 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。显示了对 Mcl-1 较强的抑制作用。

密歇根大学的研究小组进一步对棉酚进行研究。按照 TW-37 的研究成果,以与 **12** 结构类似的棉酚半边结构类似物(2-甲基-5,6,7-三羟基-8-异丁基-色酮)为先导化合物,合成了 BI-33(**16**)(图 4)。在 Bim 的 BH3 结构域 Ile90、Leu94、Ile97 和 Phe101 4 个与 Bcl-2 的 BH3 疏水结合域相结合的氨基酸残基中,先导化合物缺少模拟 Ile90 和 Leu94 两个位置结合能力。但该化合物上的异丁基和甲基却能模拟 Ile90 和 Leu94 两个位置结合。该小组创造性地用苯环将两个前述先导化合物连接起来合成了化合物 **16**,既满足了所有位点结合要求,又以其两个相同结构片断接近 90 度角的垂直构象很好地

模拟了肽类的螺旋状态。FP 亲和力实验证实:对于 Bcl-2,**16** 的 K_i 值为 $17 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$,对于 Bcl-xL 则为 $1.2 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,对于 Mcl-1 为 $18 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。细胞毒实验表明:对于 MAB-MB-231 乳腺癌细胞,其 IC_{50} 为 $110 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。流式细胞仪检测促凋亡试验表明:给予 MAB-MB-231 乳腺癌细胞系 $1 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (3 天),64.4% 细胞死亡^[30]。

2.5 拟肽 Yin^[31]等根据 Bak 的 BH3 结构域 α 螺旋结构合成一系列拟肽。其合成的拟肽骨架为多个萘苯单元构成。**17**(图 5)对 Bcl-xL 的亲和力 K_i 值为 $0.114 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.6 其他化合物 GX15-070MS(obatoclax mesilate, **18**)(图 5)同样作用于 Bcl-2(或 Bcl-xL)的 BH3 疏水结合区, **18** 对 Bcl-2、Bcl-xL、Mcl-1 均有抑制。在 I 期临床试验中,对慢性淋巴白血病、实体瘤、骨髓发育异常综合征、髓细胞恶性肿瘤表现出良好的疗效。目前,该药已进入 II 期临床试验^[32]。

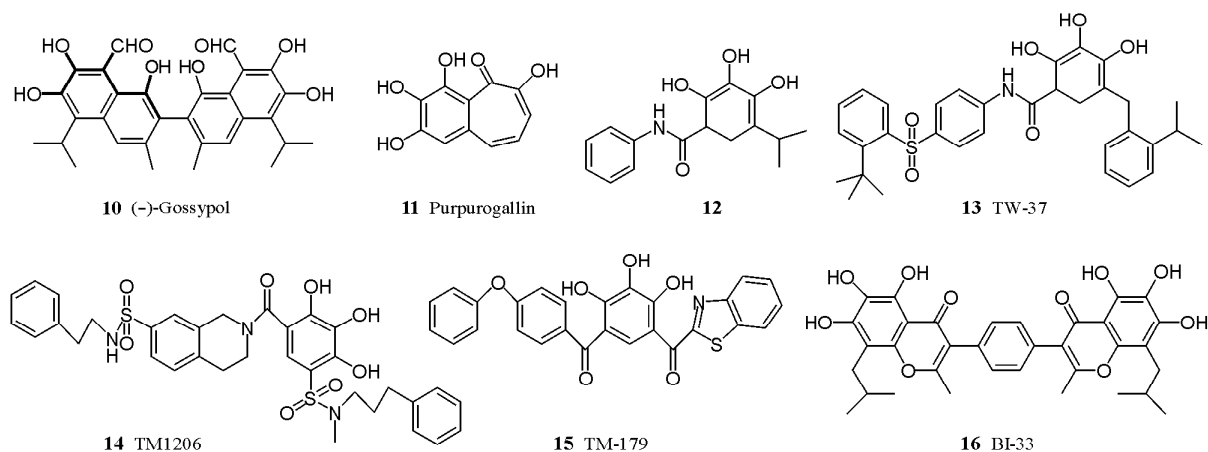


图 4 多酚类化合物

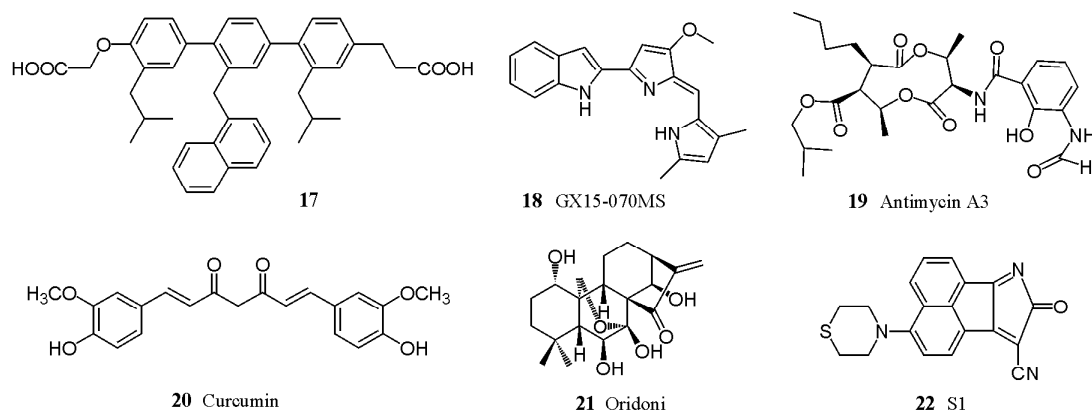


图 5 化合物 17~22 的结构式

2.7 天然产物 天然产物的抗肿瘤作用早已为人所熟知。目前,一些天然产物也被发现是可能的 Bcl-2 家族抗凋亡亚族蛋白的抑制剂。但这些天然产物抑制 Bcl-2 的机制较为复杂,有很多作用于控制 Bcl-2 蛋白合成的上游因素。因此,他们不属于“经典”的 Bcl-2 抗凋亡亚族蛋白抑制剂。但他们作用的最终效应是抑制 Bcl-2,而且有可能成为有前途的先导化合物,所以在这里作简单介绍。

抗霉素 A₃ (antimycin A₃, **19**) (图 5) 是偶然发现的作用于 Bcl-xL 疏水结合区的天然小分子。Tzung 等^[33]认为寻找抑制线粒体呼吸的化合物可以直接诱导细胞凋亡。他们找到了抗霉素 A₃。令人意外的是 Bcl-xL 非但不能对抗它的诱导凋亡作用,反而会促进。进一步的研究表明,抗霉素 A₃ 作用于 Bcl-xL 疏水结合区,抑制了其抗凋亡作用。值得注意的是,抗霉素 A₃ 与经典的 Bcl-2 家族抗凋亡亚族小分子抑制剂有很多不同处,如其与 Bcl-xL 结合并不强但细胞毒作用却较强;其细胞毒作用虽可被 Bcl-xL 的高表达所抑制,但却不成正相关等,提示抗霉素 A₃ 有其他抗肿瘤机制。

姜黄 (curcumin, **20**) (图 5) 的抗癌作用早已为人所熟知, Yu 等^[34]发现,姜黄可以抑制子宫内腺癌 HEC-1-A 细胞的原癌基因 Ets-1 和抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达。他们的实验表明, Ets-1 高表达是 Bcl-2 高表达的上游环节,二者都可被姜黄所抑制。

众多实验证实,冬凌草甲素 (oridonin, **21**) (图 5) 能够通过诱导细胞凋亡发挥其抗肿瘤作用。刘艳秋等^[35]研究了冬凌草甲素诱导人组织淋巴瘤 U937 细胞系凋亡的机制。他们的实验结果表明:冬凌草甲素通过活化 ERK 激酶,升高其下游 Bax/Bcl-xL 的表达比率,从而促进细胞凋亡的发生。

2.8 直接破坏 Bcl-2 蛋白的化合物 金礼吉等^[36]报道了一种具有全新结构的 Bcl-2 蛋白抑制剂 S1 (**22**) (图 5)。采用 Western 印记法检测 Bcl-2 蛋白表达量,结果表明 **22** 可下调 Bcl-2 蛋白表达。圆二色谱检测 **22** 与 Bcl-2 蛋白的结合表明:**22** 破坏了 Bcl-2 蛋白的 α 螺旋结构。结合其他检测方法,该小组得出了 **22** 通过破坏 Bcl-2 蛋白的 α 螺旋结构发挥其抗肿瘤作用的结论,这与一般的 Bcl-2 蛋白抑制剂完全不同。**22** 对 H22、MCF7 细胞和 HL60 细胞的 IC₅₀ 分别达到 0.17、0.09 和 0.22 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

3 总结与展望

目前,作用于 Bcl-2 蛋白家族抗凋亡亚族蛋白的小分子化合物研究还处在刚刚开始阶段。开发的

化合物数量有限,而且在结构上也无共性。很难从中找到相似的结构特征。但他们的作用机制却基本相同,即模拟 BH3 结构域与 Bcl-2/Bcl-xL 的 BH3 疏水结合域相互作用。这不禁让人想起阿片类镇痛药,虽然他们的结构差异较大,但活性构象类似。那 Bcl-2 蛋白家族抗凋亡亚族蛋白的小分子抑制剂是不是也存在这种情况呢?

Zheng 等^[37]研究了这些化合物三维药效团模型。他们首先选用 LUDI 程序,采用以知识为基础的自由能计算打分函数评价了 10 多个化合物的 12 个可能的结合位点。结果显示其中有 5 个位点是关键位点,它们包括 3 个疏水性结合位点 H1、H2 和 H3,氢键相互作用位点 A1 和 C3。该研究小组还研究了 Bak/Bcl-xL、Bad/Bcl-xL、Bim/Bcl-2 几个复合物的结合模型,几个重要结合位点与上述化合物结合位点是相对应的。它们包括:两个接近垂直的疏水结合基团 P1、P2 分别对应 H2、H3,一个疏水性的连接子 L1 对应 H1,侧面两个氢键结合位点则对应 A1 和 C3。事实上,前述的化合物的结合构象与这一模型符合得很好。例如:ABT-737 与 Bcl-xL 的相互作用位点完全包含了上述 5 个关键位点。该小组的构象叠加计算结果也证实了,虽然化学结构差异较大,上述化合物活性构象却大体相同。该小组进一步用 MCSS 算法优化了这一药效团模型。Marta Pinto^[38]等用分子动力学的方法计算 Bak、Bax 等的 BH3 结构域上的各氨基酸残基与 Bcl-2 和 Bcl-xL 上的氨基酸残基相互作用的角度和距离,并评价了疏水相互作用对相互结合能的贡献,得出了与 Zheng 等一致的结论。

Bcl-2 家族抗凋亡亚族蛋白的小分子抑制剂的研究始于上世纪末本世纪初,但其应用前景已经显露:首先, Bcl-2 家族抗凋亡亚族高表达是不少癌细胞对抗抗癌药物的重要方式,因此,这类抑制剂往往可用于联合用药和对付化疗失败病例。其次,这类化合物作用机制是干扰蛋白-蛋白相互作用,但也不同于一般的酶抑制剂,很可能开创癌症化疗药物新的研发领域。

Bcl-2 蛋白家族成员的三维结构相继阐明和计算机辅助药物设计特别是分子对接程序的发展,为这类药的开发提供了极好的条件。化合物筛选方面:采用荧光偏振法或者选用 NMR 化学位移变化法测定化合物对 Bcl-2/Bcl-xL 的亲合性,建立了成熟的筛选模型。一般来说, K_i 值在纳摩尔级的化合

物才有进一步发展的价值。必须指出的是,上述两种方法测出的数据是不能通用的。

作用于 Bcl-2 家族抗凋亡亚族蛋白的小分子抑制剂的研究目前尚存在一些问题:首先,由于合成的化合物数量不多,难以总结出详尽的构效关系,需要有更多的课题组介入研究。第二,增强疏水性的要求与优化药代动力学的要求在一定程度上有矛盾,这需要研发人员合理安排药效基团和药代动力学基团,例如,雅培公司就将 ABT-737 发展成了 ABT-263。第三,进一步增强其细胞毒作用。目前,雅培公司正全力推进 ABT-263 的临床试验,如能最终上市,必能推动这类药物研发高潮的到来。

References

- [1] Muchmore SW, Sattler M, Liang H, et al. X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death [J]. *Nature*, 1996, 381:335-341.
- [2] Petros AM, Olejniczak ET, Fesik SW. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1644:83-94.
- [3] Liu XJ, Zhang LQ, Liu XL, et al. Role for the Bcl-2 family proteins and BH3 domain in apoptosis [J]. *Prog Biochem Biophys* (生物化学与生物物理进展), 2006, 33:221-222.
- [4] Adams JM, Cory S. Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential [J]. *Curr Opin Immunol*, 2007, 19:488-496.
- [5] Degterev A, Lugovskoy A, Cardone M, et al. Identification of small-molecule inhibitors of interaction between the BH3 domain and Bcl-xL [J]. *Nat Cell Biol*, 2001, 3:173-182.
- [6] Xing CG, Wang LY, Tang XH, et al. Development of selective inhibitors for anti-apoptotic Bcl-2 proteins from BHI-1 [J]. *Bioorg Med Chem*, 2007, 15:2167-2176.
- [7] Wang LY, Kong FS, Kokoski CL, et al. Development of dimeric modulators for anti-apoptotic Bcl-2 proteins [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, 18:236-240.
- [8] Wang JL, Liu DX, Zhang ZJ, et al. Structure-based discovery of an organic compound that binds Bcl-2 protein and induces apoptosis of tumor cells [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2000, 97:7124-7129.
- [9] Lickliter JD, Wood NJ, Johnson L, et al. HA14-1 selectively induces apoptosis in Bcl-2-overexpressing leukemia/lymphoma cells, and enhances cytarabine-induced cell death [J]. *Leukemia*, 2003, 17:2074-2080.
- [10] Doshi JM, Tian DF, Xing CG. Structure-activity relationship studies of ethyl 2-amino-6-bromo-4-(1-cyano-2-ethoxy-2-oxoethyl)-4H-chromene-3-carboxylate (HA14-1), an antagonist for antiapoptotic Bcl-2 proteins to overcome drug resistance in cancer [J]. *J Med Chem*, 2006, 49:7731-7739.
- [11] Doshi JM, Tian DF, Xing CG. Ethyl-2-amino-6-bromo-4-(1-cyano-2-ethoxy-2-oxoethyl)-4H-chromene-3-carboxylate (HA14-1), a prototype small-molecule antagonist against antiapoptotic Bcl-2 proteins, decomposes to generate reactive oxygen species that induce apoptosis [J]. *Mol Pharm*, 2007, 4:919-928.
- [12] Tian DF, Das SG, Doshi JM, et al. sHA14-1, a stable and ROS-free antagonist against anti-apoptotic Bcl-2 proteins, bypasses drug resistances and synergizes cancer therapies in human leukemia cell [J]. *Cancer Lett*, 2008, 259:198-208.
- [13] Enyedy IJ, Ling Y, Nacro K, et al. Discovery of small-molecule inhibitors of Bcl-2 through structure-based computer screening [J]. *J Med Chem*, 2001, 44:4313-4324.
- [14] Shuker SB, Hajduk PJ, Meadows RP, et al. Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR [J]. *Science*, 1996, 274:1531-1535.
- [15] Petros AM, Dinges J, Augeri DJ, et al. Discovery of a potent inhibitor of the antiapoptotic protein Bcl-xL from NMR and parallel synthesis [J]. *J Med Chem*, 2006, 49:656-663.
- [16] Park CM, Oie T, Petros AM, et al. Design, synthesis, and computational studies of inhibitors of Bcl-xL [J]. *J Am Chem Soc*, 2006, 128:16206-16212.
- [17] Wendt MD, Shen W, Kunzer A, et al. Discovery and structure-activity relationship of antagonists of B-cell lymphoma 2 family proteins with chemopotential activity *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Med Chem*, 2006, 49:1165-1181.
- [18] Bruncko M, Oost TK, Belli BA, et al. Studies leading to potent, dual inhibitors of Bcl-2 and Bcl-xL [J]. *J Med Chem*, 2007, 50:641-662.
- [19] Oltsersdorf T, Elmore SW, Shoemaker AR, et al. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours [J]. *Nature*, 2005, 435:677-681.
- [20] Gaizo Moore VD, Brown JR, Certo M, et al. Chronic lymphocytic leukemia requires Bcl-2 to sequester prodeath BIM, explaining sensitivity to Bcl-2 antagonist ABT-737 [J]. *J Clin Invest*, 2007, 117:112-121.
- [21] Van Delft M, Wei A, Mason K, et al. The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized [J]. *Cancer Cell*, 2006, 10:389-399.
- [22] Tuma RS. Novel small molecule promotes programmed

- cell death: "new drugs on the horizon" session [AACR annual meeting] [J]. *Oncol Times*, 2007, 29:38 - 40.
- [23] Park CM. Discovery of ABT-263, an orally active small molecule inhibitor of anti-apoptotic Bcl-2 family proteins [C]. American Chemical Society Western Regional Meeting, 2007.
- [24] Wang S, Yang D. Small molecule inhibitor targeted at Bcl-2: CN,1589135A[P], 2005-03-02.
- [25] Kitada S, Leone M, Sareth S, et al. Discovery, characterization, and structure-activity relationships studies of proapoptotic polyphenols targeting B-cell lymphocyte/leukemia-2 proteins [J]. *J Med Chem*, 2006, 46:4259 - 4264.
- [26] Wang GP, Nikolovska-Coleska Z, Yang CY, et al. Structure-based design of potent small-molecule inhibitors of anti-apoptotic Bcl-2 proteins [J]. *J Med Chem*, 2006, 49:6139 - 6142.
- [27] Zeitlin BD, Joo E, Dong ZH, et al. Antiangiogenic effect of TW37, a small-molecule inhibitor of Bcl-2 [J]. *Cancer Res*, 2006, 66:8698 - 8706.
- [28] Tang GZ, Yang CY, Nikolovska-Coleska Z, et al. Pyrogallol-based molecules as potent inhibitors of the antiapoptotic Bcl-2 proteins [J]. *J Med Chem*, 2007, 50:1723 - 1726.
- [29] Tang GZ, Nikolovska-Coleska Z, Qiu S, et al. Acylpyrogallols as inhibitors of antiapoptotic Bcl-2 proteins [J]. *J Med Chem*, 2008, 51:717 - 720.
- [30] Tang GZ, Ding K, Nikolovska-Coleska Z, et al. Structure-based design of flavonoid compounds as a new class of small-molecule inhibitors of the anti-apoptotic Bcl-2 proteins [J]. *J Med Chem*, 2007, 50:3163 - 3166.
- [31] Yin H, Lee GI, Sedey KA, et al. Terphenyl-based Bak BH3 r-helical proteomimetics as low-molecular-weight antagonists of Bcl-xL [J]. *J Am Chem Soc*, 2005, 27:10191 - 10196.
- [32] Wang Y, Serradell N, Bolos J, et al. Obatoclax mesylate [J]. *Drugs Future*, 2007, 32:228 - 233.
- [33] Tzung SP, Kim KM, Basanez G, et al. Antimycin a mimics a cell-death-inducing Bcl-2 homology domain 3 [J]. *Nat Cell Biol*, 2001, 3:183 - 191.
- [34] Yu ZM, Shah DM. Curcumin down-regulates Ets-1 and Bcl-2 expression in human endometrial carcinoma HEC-1-A cells [J]. *Gynecol Oncol*, 2007, 106:541 - 548.
- [35] Liu YQ, You S, Shinichi T, et al. Oridonin induced U937 cell apoptosis through ERK pathway [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2005, 30:1856 - 1859.
- [36] Jin LJ, Zhang ZC, Wang YY, et al. A novel small molecule inhibitor targeted at Bcl-2 [J]. *Sci China Ser C-Life Sci*, 2007, 50:624 - 629.
- [37] Zheng CH, Zhou YJ, Zhu J, et al. Construction of a three-dimensional pharmacophore for Bcl-2 inhibitors by flexible docking and the multiple copy simultaneous search method [J]. *Bioorg Med Chem*, 2007, 15:6407 - 6417.
- [38] Pinto M, Perez JJ, Rubio-Martinez J. Molecular dynamics study of peptide segments of the BH3 domain of the proapoptotic proteins Bak, Bax, Bid and Hrk bound to the Bcl-xL and Bcl-2 proteins [J]. *J Comput Aided Mol Des*, 2004, 18:13 - 22.