



## 靶向SARS-CoV-2主蛋白酶的PROTAC设计、合成与蛋白降解活性研究

魏莱, 董国强, 盛春泉

### Design, synthesis and degradation activity of PROTAC degraders of SARS-CoV-2 main protease

WEI Lai, DONG Guoqiang, SHENG Chunquan

在线阅读 View online: <http://yxsj.smmu.edu.cn/cn/article/doi/10.12206/j.issn.2097-2024.202503063>

### 您可能感兴趣的其他文章

#### Articles you may be interested in

#### 新型Hsp90抑制剂的设计合成及其抗真菌和抗肿瘤活性研究

Design, synthesis and antifungal and antitumor activity research of novel Hsp90 inhibitors

药学实践与服务. 2025, 43(3): 124-135 DOI: [10.12206/j.issn.2097-2024.202501019](https://doi.org/10.12206/j.issn.2097-2024.202501019)

#### ANXA3基因及蛋白的研究进展

Research progress on ANXA3 gene and protein

药学实践与服务. 2025, 43(2): 47-50, 74 DOI: [10.12206/j.issn.2097-2024.202309023](https://doi.org/10.12206/j.issn.2097-2024.202309023)

#### 铁死亡调控蛋白GPX4的小分子抑制剂研究进展

Research progress on small-molecule inhibitors of ferroptosis regulatory protein GPX4

药学实践与服务. 2024, 42(9): 375-378 DOI: [10.12206/j.issn.2097-2024.202312075](https://doi.org/10.12206/j.issn.2097-2024.202312075)

#### 食管癌的靶向治疗与免疫治疗研究进展

Research progress on targeted therapy and immunotherapy for esophageal cancer

药学实践与服务. 2024, 42(6): 231-237 DOI: [10.12206/j.issn.2097-2024.202306008](https://doi.org/10.12206/j.issn.2097-2024.202306008)

#### Keap1-Nrf2通路在炎症疾病中的研究进展

Research progresses on Keap1-Nrf2 pathway in inflammatory diseases

药学实践与服务. 2025, 43(3): 97-108, 116 DOI: [10.12206/j.issn.2097-2024.202405013](https://doi.org/10.12206/j.issn.2097-2024.202405013)



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

· 论著 ·

## 靶向 SARS-CoV-2 主蛋白酶的 PROTAC 设计、合成与蛋白降解活性研究

魏 莱, 董国强, 盛春泉 (海军军医大学药理学系药物化学教研室, 上海 200433)

**[摘要]** 目的 基于蛋白降解靶向嵌合体(PROTAC)技术设计合成靶向 SARS-CoV-2 主蛋白酶(M<sup>pro</sup>)的 PROTAC 降解剂。方法 以化合物 **3w** 为 M<sup>pro</sup> 靶向配体, 选择其溶剂暴露区吡啶 N 原子作为连接位点, 通过不同长度连接子与 CRBN(cereblon)的配体泊马度胺偶联, 设计并合成一系列靶向 M<sup>pro</sup> 的 PROTAC 分子, 采用蛋白印迹(Western Blot)技术评估其在稳定表达 M<sup>pro</sup> 的 HEK-293T 细胞中的降解活性, 并探索其作用机制。结果 成功合成了 4 个新型 M<sup>pro</sup> PROTAC 目标分子(A1 ~ A4), 其结构经<sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR 与 HRMS 确证。其中, 最优化合物 **A4** 对 M<sup>pro</sup> 的降解活性 DC<sub>50</sub> 值达 5.2 μmol/L, 其可同时结合靶蛋白 M<sup>pro</sup> 和 E3 连接酶 CRBN, 触发泛素-蛋白酶体途径, 诱导 M<sup>pro</sup> 蛋白特异性降解。结论 本研究成功设计合成了一类新型 M<sup>pro</sup> PROTAC 降解剂, 验证了其蛋白降解能力, 并阐明了作用机制, 为抗新冠病毒药物研发提供了先导化合物。

**[关键词]** 新型冠状病毒; 主蛋白酶; 靶向蛋白降解嵌合体; 蛋白降解活性; 抗病毒药物

**[文章编号]** 2097-2024(2025)00-0001-08 **[DOI]** 10.12206/j.issn.2097-2024.202503063

## Design, synthesis and degradation activity of PROTAC degraders of SARS-CoV-2 main protease

WEI Lai, DONG Guoqiang, SHENG Chunquan (Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

**[Abstract]** **Objective** To design and synthesize PROTAC degraders targeting the SARS-CoV-2 main protease(M<sup>pro</sup>) based on PROTAC technology. **Methods** Compound **3w** was used as the M<sup>pro</sup> ligand, and the indole N atom in the solvent-exposed region was selected as the linker attachment site. A series of M<sup>pro</sup> PROTACs were designed and synthesized by conjugating compound **3w** with the CRBN ligand pomalidomide through alkane linkers of different lengths. The structures of the target compounds were confirmed by <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, and HRMS. Western Blot analysis was employed to evaluate their degradation activity and explore its mechanism in M<sup>pro</sup>-HEK-293T cells. **Results** Four novel M<sup>pro</sup> PROTACs(A1-A4) were successfully synthesized. The most potent compound **A4** demonstrated M<sup>pro</sup> degradation activity with a DC<sub>50</sub> value of 5.2 μmol/L, and its degradation mechanism was validated. **Conclusion** A novel class of M<sup>pro</sup> PROTAC degraders were successfully designed and synthesized, and their protein degradation capability and mechanism of action were demonstrated. These results provided lead compounds for the research and development of antiviral degraders against SARS-CoV-2.

**[Key words]** SARS-CoV-2; main protease; PROTAC; protein degradation activity; antiviral drug

冠状病毒(coronavirus, CoV)是一类具有单股正链 RNA 基因组的包膜病毒, 基因组长度为 26 ~ 32 kb<sup>[1]</sup>。这类病毒广泛分布于哺乳动物和鸟类中, 能够引起从轻微的呼吸道感染到严重的呼吸道综合征等多种疾病<sup>[2-3]</sup>。2019 年底出现的 SARS-CoV-2, 引发了全球冠状病毒病(COVID-19)大流行, 造成了巨大的公共卫生危机<sup>[4]</sup>。SARS-CoV-

2 是人类发现的第 7 种冠状病毒, 属于包膜内线性单链正向 RNA 病毒, 包含 14 个开放阅读框, 其中, ORF1a 和 ORF1b 编码的多聚蛋白在病毒复制和转录过程中起关键作用<sup>[5-6]</sup>。这些多聚蛋白在主蛋白酶(main protease, M<sup>pro</sup>, 也称为 3C-like protease, 3CL<sup>pro</sup>)和木瓜样蛋白酶(papain-like proteinase protein, PL<sup>pro</sup>)的作用下被切割成多个非结构蛋白, 进一步组装成病毒复制转录复合体, 从而启动病毒 RNA 的复制和转录<sup>[7-9]</sup>。M<sup>pro</sup> 在病毒复制感染中扮演至关重要的角色, 其底物识别位点在所有冠状病毒中高度保守, 且与人类蛋白酶没有显著的同源性, 使其成为极具潜力的抗冠状病毒药物治疗靶点<sup>[10]</sup>。

近年来, 针对 SARS-CoV-2 M<sup>pro</sup> 的抑制剂研究

**[作者简介]** 魏 莱, 硕士研究生, Tel: 18847223856 Email: wyf\_future@163.com

**[通信作者]** 董国强, 博士, 副教授, 博士生导师, 研究方向: 靶向蛋白降解药物研究, Tel: (021)81871242, Email: gdong@smmu.edu.cn; 盛春泉, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 抗真菌和抗肿瘤药物研究, Tel: (021)81871201, Email: shengcq@smmu.edu.cn

取得了显著进展,已有多个药物获得临床批准用于 SARS-CoV-2 病毒感染治疗,如辉瑞公司的奈玛特韦(Nirmatrelvir)、先声药业的先诺欣以及众生睿创的乐睿灵。此外,还有多个 M<sup>pro</sup> 抑制剂处于新药研发阶段。然而,现有抑制剂主要通过 M<sup>pro</sup> 活性位点的可逆或不可逆结合来发挥功能,存在一些局限性<sup>[11-13]</sup>: ①传统抑制剂需要较高浓度才能有效抑制病毒复制,可能增加药物毒性和副作用的风险; ②病毒突变会显著降低药物结合亲和力,导致耐药性,从而降低抑制剂的疗效。例如, SARS-CoV-2 M<sup>pro</sup> 的 E166V 和 E166A 突变已被证实对奈玛特韦表现出显著的耐药性<sup>[14]</sup>。

为了克服这些问题,蛋白降解靶向嵌合体( proteolysis targeting chimera, PROTAC)作为一种新兴的药物研发技术,为抗病毒药物的研发提供了新的思路<sup>[15-17]</sup>。与传统小分子抑制剂依靠占据靶蛋白活性位点来阻断其功能不同,PROTAC 分子一端与靶蛋白结合,另一端结合 E3 泛素连接酶形成靶蛋白-PROTAC-E3 三元复合物,通过招募 E3 连接酶,诱导靶蛋白的泛素化和随后的蛋白酶体降解。这种事件驱动的作用机制不仅提高了药物的

选择性和作用效力,还能有效克服因靶蛋白突变导致的耐药性问题<sup>[18-19]</sup>。在抗病毒药物研究中,PROTAC 技术已应用于多种病毒蛋白的降解,如丙型肝炎病毒 NS3 蛋白和流感病毒血凝素蛋白。针对 SARS-CoV-2 的 M<sup>pro</sup> 蛋白,也有相关研究报道。Alugubelli 等<sup>[20-21]</sup>报道的 M<sup>pro</sup> PROTAC MPD2 在细胞中表现出显著的 M<sup>pro</sup> 蛋白降解活性和抗病毒效果。Sang 等<sup>[22]</sup>也报道了一种基于 CRBN 配体的 PROTAC 分子 HP211206,能够有效降解 SARS-CoV-2 M<sup>pro</sup> 及其耐药突变体。

然而,当前针对 M<sup>pro</sup> 的 PROTAC 降解剂大多基于复杂的拟肽类抑制剂,其合成的难度和成本较高,为后续研发和生产带来一定挑战<sup>[23]</sup>。为了探索更简单、高效的小分子抗新冠病毒 PROTAC 降解剂,我们设计并合成一类基于简单小分子抑制剂 **3w** 的 M<sup>pro</sup> PROTAC 降解剂<sup>[24]</sup>(图 1)。化合物 **3w** 是一种硫酯类小分子 M<sup>pro</sup> 共价抑制剂,与传统 M<sup>pro</sup> 抑制剂相比,具有分子量小、结构简单、易于合成的优点。本研究旨在验证基于简单小分子配体的 PROTAC 策略在抗 SARS-CoV-2 药物研究中的可行性,为未来抗病毒药物的设计提供新的先导化合物。

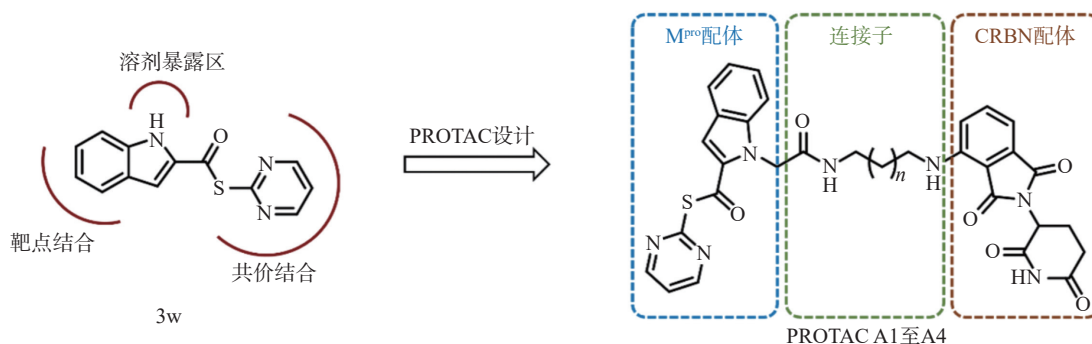


图 1 M<sup>pro</sup> PROTAC 分子设计

## 1 M<sup>pro</sup> PROTAC 分子设计

PROTAC 分子由三部分组成:靶蛋白配体、E3 泛素连接酶配体以及连接两者的连接子<sup>[25-27]</sup>。选择 M<sup>pro</sup> 抑制剂 **3w** 作为靶蛋白配体,依据 **3w** 与靶蛋白 M<sup>pro</sup> 结合模式,吡啶氮指向溶剂暴露区,可以作为 PROTAC 连接子的连接位点;E3 泛素连接酶配体选择分子量小且成药性高的 CRBN 配体泊马度胺<sup>[28]</sup>;最后,采用不同长度的烷烃链将两个配体相连,设计得到目标化合物 **A1 至 A4**(图 1)。

## 2 材料与方法

### 2.1 试剂和仪器

化学原料均为探索平台、毕得等公司购买分

析纯; Rabbit anti-SARS-CoV-2 3CL<sup>pro</sup> antibody (ABclonal, A20831); Rabbit anti-β-Tubulin antibody(ABclonal, A12289); Goat anti-rabbit IgG H&L(Alexa Fluor® 680)(Abcam, ab175773); Bruker AVANCE600(Bruker Company, Germany)核磁共振仪, TMS 作为内标,化学位移与偶合常数分别用 ppm 和 Hz 表示; Agilent 6538 UHD Accurate-Mass Q-TOF LC/MS 高分辨质谱(HRMS)仪; Bioteck Synergy2 多功能酶标仪; Biorad ChemiDoc 成像仪。

### 2.2 目标化合物合成

合成路线见图 2。

试剂和条件: (a)POCl<sub>3</sub>, 吡啶, 噻啶-2-硫醇, DCM, rt, 8 h; (b)丙酮, Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, rt, 6 h; (c)TFA, DCM,

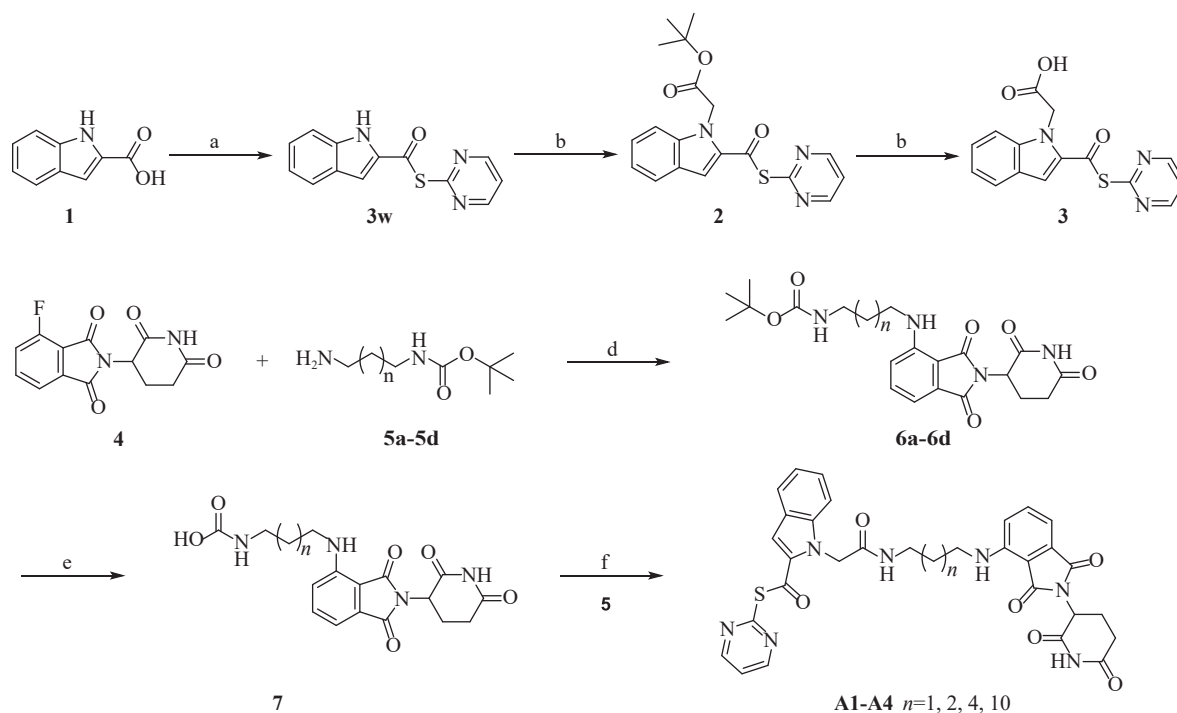


图2 目标化合物合成路线图

试剂和条件: (a)POCl<sub>3</sub>, 吡啶, 噻啉-2-硫醇, DCM, rt, 8 h; (b)丙酮, Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, rt, 6 h; (c)TFA, DCM, rt, 4 h; (d)DIPEA, DMF, 90 °C, rt, 5 h; (e)TFA, DCM, rt, 4 h; 3, EDCl, HOBt, DIPEA, DCM, rt, 10 h.

rt, 4 h; (d)DIPEA, DMF, 90 °C, rt, 5 h; (e)TFA, DCM, rt, 4 h; 3, EDCl, HOBt, DIPEA, DCM, rt, 10 h.  
2.2.1 S-(噻啉-2-基)1H-吲哚-2-硫代甲酸酯(3w)的合成

将1H-吲哚-2-羧酸(3.0 g, 18 mmol)溶于无水二氯甲烷(DCM, 30 ml), 氮气保护下依次加入三氯氧磷(4.3 g, 28 mmol)和吡啶(2.2 g, 28 mmol)。室温搅拌30 min后, 加入噻啉-2-硫醇(0.70 g, 18 mmol)及吡啶(2.4 g, 30 mmol), 室温反应8 h。反应液用饱和柠檬酸钠水溶液(50 ml)淬灭, DCM(20 ml×3)萃取。合并有机相, 饱和氯化钠水溶液洗涤, 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩得粗产物, 经硅胶柱层析纯化(石油醚/乙酸乙酯=60:40)得白色固体(3w)1.86 g, 收率61%。<sup>1</sup>H NMR(600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)δ 12.14(s, 1H), 8.93(d, *J* = 4.9 Hz, 2H), 7.75(d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.59(t, *J* = 4.9 Hz, 1H), 7.51(d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.48(d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.34(t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.14(t, *J* = 7.6 Hz, 1H)。<sup>13</sup>C NMR(151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)δ 178.7, 163.7, 159.1, 138.3, 132.9, 126.6, 126.3, 122.8, 120.9, 120.9, 112.9, 109.6。ESI-HRMS *m/z* Calcd. For C<sub>13</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>OS [M+H]<sup>+</sup> 256.0521, Found 256.0539。

2.2.2 2-(2-((噻啉-2-基硫基)羰基)-1H-吲哚-1-基)乙酸叔丁酯(2)的合成

将化合物3w(0.22 g, 0.85 mmol)与2-溴乙酸

叔丁酯(0.25 g, 1.28 mmol)溶于丙酮(20 ml), 随后加入Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(0.83 g, 2.55 mmol), 室温搅拌6 h。反应液减压抽滤得白色固体, 经硅胶H柱层析纯化(石油醚/乙酸乙酯=65:35), 得淡黄色固体(2)0.18 g, 收率66%。<sup>1</sup>H NMR(600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)δ 8.92(d, *J* = 4.9 Hz, 2H), 7.97(dd, *J* = 8.5, 1.0 Hz, 1H), 7.84(dt, *J* = 8.0, 1.0 Hz, 1H), 7.67(d, *J* = 0.8 Hz, 1H), 7.53(t, *J* = 4.9 Hz, 1H), 7.45(ddd, *J* = 8.4, 7.0, 1.2 Hz, 1H), 7.31(ddd, *J* = 8.0, 7.0, 1.0 Hz, 1H), 3.82(s, 2H), 1.40(s, 9H)。<sup>13</sup>C NMR(101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)δ 184.2, 172.5, 159.5, 156.9, 138.7, 136.4, 132.1, 129.2, 127.4, 123.4, 123.3, 119.7, 113.5, 80.0, 35.2, 27.6。

2.2.3 2-(2-((噻啉-2-基硫基)羰基)-1H-吲哚-1-基)乙酸(3)的合成

将上述化合物2(0.18 g, 0.49 mmol)溶于DCM(20 ml), 加入三氟乙酸(TFA, 4 ml), 室温搅拌6 h, 待反应完全后旋干溶剂和TFA, 得淡黄色固体(3)0.17 g, 收率95%。

2.2.4 4-((3-氨基丙基)氨基)-2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)异吲哚啉-1,3-二酮(6a)的合成

将2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-4-氟异吲哚啉-1,3-二酮(0.27 g, 0.96 mmol)与N-叔丁氧羰基-1,3-丙二胺(0.25 g, 1.43 mmol)溶于N-甲基吡咯烷酮溶液中, 逐滴加入N,N-二异丙基乙胺(DIPEA)(1.2 g,



9.6 mmol)。将反应混合物在 90 °C 下加热搅拌 5 h。待反应结束后,反应液用饱和氯化钠水溶液(20 ml)溶解,然后用乙酸乙酯萃取(10 ml×3),合并有机相,无水硫酸钠干燥,减压浓缩。粗产物经硅胶柱层析纯化(石油醚/乙酸乙酯=55:45),得黄色固体(**6a**)0.26 g,收率 65%。<sup>1</sup>H NMR(600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)δ 11.09(s, 1H), 7.57(t, *J*=7.8 Hz, 1H), 7.08(d, *J*=8.6 Hz, 1H), 7.02(d, *J*=7.0 Hz, 1H), 6.92(s, 1H), 6.66(s, 1H), 5.05(dd, *J*=12.9, 5.4 Hz, 1H), 3.30(d, *J*=5.2 Hz, 2H), 3.03 - 2.98(m, 2H), 2.61 - 2.52(m, 2H), 1.69 - 1.61(m, 2H), 1.38(s, 9H), 1.24(d, *J*=14.4 Hz, 2H)。

#### 2.2.5 4-((4-氨基丁基)氨基)-2-(2,6-二氧化哌啶-3-基)异吡啶-1,3-二酮(**6b**)的合成

中间体 **6b** 的合成步骤参照中间体 **6a**, 得到黄色固体(**6b**)0.19 g, 收率 58%。<sup>1</sup>H NMR(600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)δ 11.09(s, 1H), 7.56(t, *J*=8.2 Hz, 1H), 7.09(d, *J*=9.2 Hz, 1H), 7.01(d, *J*=8.4 Hz, 1H), 6.81(s, 1H), 6.53(s, 1H), 5.03(dq, *J*=10.8, 5.4 Hz, 1H), 3.28(d, *J*=8.8 Hz, 2H), 2.94(d, *J*=12.4 Hz, 2H), 2.68(d, *J*=9.6 Hz, 2H), 1.53(d, *J*=10.2 Hz, 2H), 1.43(s, 2H), 1.35(s, 9H), 1.33 - 1.08(m, 2H)。

#### 2.2.6 4-((8-氨基辛基)氨基)-2-(2,6-二氧化哌啶-3-基)异吡啶-1,3-二酮(**6c**)的合成

中间体 **6c** 的合成步骤参照中间体 **6a**, 得到黄色固体(**6c**)0.22 g, 收率 72%。<sup>1</sup>H NMR(600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)δ 11.09(s, 1H), 7.60 - 7.54(m, 1H), 7.09(d, *J*=8.7 Hz, 1H), 7.02(dd, *J*=7.2, 2.8 Hz, 1H), 6.74(s, 1H), 6.52(s, 1H), 5.05(dd, *J*=7.5, 2.8 Hz, 1H), 3.30(d, *J*=2.8 Hz, 2H), 2.88(d, *J*=6.2 Hz, 2H), 2.61 - 2.51(m, 2H), 1.56(q, *J*=7.5, 7.5, 7.5 Hz, 2H), 1.36(s, 9H), 1.35 - 1.03(m, 12H)。

#### 2.2.7 4-((10-氨基癸基)氨基)-2-(2,6-二氧化哌啶-3-基)异吡啶-1,3-二酮(**6d**)的合成

中间体 **6d** 的合成步骤参照中间体 **6a**, 得到黄色固体(**6d**)0.21 g, 收率 69%。<sup>1</sup>H NMR(600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)δ 11.09(s, 1H), 7.62 - 7.52(m, 1H), 7.08(d, *J*=8.6 Hz, 1H), 7.01(d, *J*=7.0 Hz, 1H), 6.73(s, 1H), 6.52(t, *J*=5.9 Hz, 1H), 5.04(dd, *J*=12.9, 5.4 Hz, 1H), 3.28(q, *J*=6.8, 6.8, 6.8 Hz, 2H), 2.88 - 2.87(m, 2H), 2.61 - 2.51(m, 2H), 1.60 - 1.49(m, 2H), 1.36(s, 9H), 1.30 - 1.21(m, 20H)。

#### 2.2.8 *S*-(嘧啶-2-基)1-(2-((3-((2-(2,6-二氧化哌啶-3-基)-1,3-二氧代异吡啶-4-基)氨基)丙基)氨基)-2-氧代乙基)-1*H*-吡啶-2-硫代甲酸酯(**A1**)的

合成

将 **6a** 溶于 DCM(20 ml), 随后加入 TFA(4 ml), 在室温下搅拌 6 h。旋蒸除去溶剂和 TFA 后, 向残留物中加入化合物 **3**(0.19 g, 0.62 mmol), 并将其溶于 DCM(15 ml)中。在室温下搅拌, 缓慢滴加 DIPEA, 直至不产生白烟。称取 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDCI, 0.13 g, 0.68 mmol), 1-羟基苯并三唑(HOBt, 0.092 g, 0.68 mmol)溶于 DCM 中, 随后将混合液滴加到反应液中, 最后滴加 DIPEA(0.24 g, 1.86 mmol), 继续在室温下搅拌反应 10 h。反应结束后, 反应液用饱和碳酸氢钠溶液(50 ml)淬灭, DCM(20 ml×3)萃取。合并有机相后, 用饱和氯化钠水溶液洗涤, 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩除去溶剂。残余物经硅胶柱层析纯化(二氯甲烷/甲醇=95:5), 得淡黄色固体(**A1**)0.11 g, 收率 33%。<sup>1</sup>H NMR(600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)δ 11.09(s, 1H), 8.91(d, *J*=4.9 Hz, 2H), 8.27(t, *J*=5.7 Hz, 1H), 7.96(d, *J*=8.5 Hz, 1H), 7.83(d, *J*=7.9 Hz, 1H), 7.66(s, 1H), 7.53 - 7.48(m, 2H), 7.44(tt, *J*=7.1, 7.1, 0.9 Hz, 1H), 7.33 - 7.27(m, 1H), 7.06(d, *J*=8.6 Hz, 1H), 6.99(d, *J*=7.0 Hz, 1H), 6.67(t, *J*=6.2 Hz, 1H), 5.04(dd, *J*=12.8, 5.5 Hz, 1H), 3.76(s, 2H), 3.30(dt, *J*=7.0, 3.7 Hz, 2H), 3.16(q, *J*=6.3, 6.3, 6.3 Hz, 2H), 2.87(ddd, *J*=17.0, 13.8, 5.4 Hz, 1H), 2.63 - 2.51(m, 2H), 2.05 - 1.98(m, 1H), 1.68(p, *J*=6.9, 6.9, 6.8, 6.8 Hz, 2H), 1.36 - 1.23(m, 2H)。<sup>13</sup>C NMR(101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)δ 182.8, 172.8, 170.1, 168.8, 167.3, 166.8, 158.9, 156.3, 146.2, 138.4, 136.2, 135.1, 132.2, 127.1, 126.6, 123.0, 119.3, 117.1, 114.2, 112.9, 110.4, 109.2, 48.5, 36.4, 32.8, 30.9, 28.9, 28.6, 22.2。ESI-HRMS *m/z* Calcd. For C<sub>31</sub>H<sub>27</sub>N<sub>7</sub>O<sub>6</sub>S [M+H]<sup>+</sup> 626.6641, Found 626.1816。

#### 2.2.9 *S*-(嘧啶-2-基)1-(2-((4-((2-(2,6-二氧化哌啶-3-基)-1,3-二氧代异吡啶-4-基)氨基)丁基)氨基)-2-氧代乙基)-1*H*-吡啶-2-硫代甲酸酯(**A2**)的合成

目标化合物 **A2** 合成步骤参照化合物 **A1**, 得淡黄色固体(**A2**)0.096 g, 收率 31%。<sup>1</sup>H NMR(600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)δ 11.09(s, 1H), 8.92(d, *J*=4.9 Hz, 2H), 8.19(t, *J*=5.7 Hz, 1H), 7.96(d, *J*=8.5 Hz, 1H), 7.82(d, *J*=8.0 Hz, 1H), 7.64(s, 1H), 7.57 - 7.53(m, 1H), 7.53 - 7.50(m, 1H), 7.44(t, *J*=7.7 Hz, 1H), 7.30(t, *J*=7.5 Hz, 1H), 7.08(d, *J*=8.5 Hz, 1H), 6.99(d, *J*=7.0 Hz, 1H), 6.54(t, *J*=5.8 Hz, 1H), 5.04(dd, *J*=12.5, 5.4 Hz, 1H), 3.74(s, 2H), 3.29(q,

$J = 7.0, 6.8, 6.8$  Hz, 3H), 3.11(q,  $J = 6.5, 6.5, 6.5$  Hz, 2H), 2.88(td,  $J = 13.2, 12.7, 6.8$  Hz, 1H), 2.63 – 2.52(m, 2H), 2.01(d,  $J = 6.7$  Hz, 1H), 1.56(q,  $J = 7.4, 7.4, 7.4$  Hz, 2H), 1.48(t,  $J = 7.5$  Hz, 2H)。 $^{13}\text{C}$  NMR(101 MHz, DMSO- $d_6$ ) $\delta$  182.7, 172.8, 170.1, 168.9, 167.3, 166.5, 158.9, 158.5, 146.4, 138.4, 136.2, 135.1, 132.2, 127.1, 126.6, 122.9, 119.3, 117.2, 114.1, 112.9, 110.4, 109.0, 48.5, 41.5, 38.6, 32.7, 30.9, 26.1, 22.1。ESI-HRMS  $m/z$  Calcd. For  $\text{C}_{32}\text{H}_{29}\text{N}_7\text{O}_6\text{S}$  [M+H] $^+$  640.6954, Found 640.1973。

2.2.10 *S*-(嘧啶-2-基)-1-(2-((12-((2-(2,6-二氧代嘧啶-3-基)-1,3-二氧代异吡啶-4-基)氨基)十二烷基)氨基)-2-氧代乙基)-1*H*-吡啶-2-硫代甲酸酯(A3)的合成

目标化合物 A3 合成步骤参照化合物 A1, 得淡黄色固体(A3)0.12 g, 收率 39%。 $^1\text{H}$  NMR(600 MHz, DMSO- $d_6$ ) $\delta$  11.09(s, 1H), 8.93(d,  $J = 4.9$  Hz, 2H), 8.12(t,  $J = 5.7$  Hz, 1H), 7.96(d,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 7.83(d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 7.65(s, 1H), 7.58 – 7.55(m, 1H), 7.53(td,  $J = 4.9, 4.9, 0.7$  Hz, 1H), 7.46 – 7.42(m, 1H), 7.32 – 7.28(m, 1H), 7.06(d,  $J = 8.6$  Hz, 1H), 7.01(d,  $J = 7.0$  Hz, 1H), 6.50(t,  $J = 6.0$  Hz, 1H), 5.05(dd,  $J = 12.8, 5.5$  Hz, 1H), 3.73(s, 2H), 3.28 – 3.23(m, 2H), 3.05(q,  $J = 6.6, 6.6, 6.6$  Hz, 2H), 2.64 – 2.51(m, 2H), 1.53(p,  $J = 7.2, 7.2, 7.1, 7.1$  Hz, 2H), 1.38(t,  $J = 6.7$  Hz, 2H), 1.33 – 1.23(m, 10H)。 $^{13}\text{C}$  NMR(101 MHz, DMSO- $d_6$ ) $\delta$  182.7, 172.8, 170.1, 168.9, 167.3, 166.3, 158.9, 156.3, 146.4, 138.4, 136.2, 135.1, 132.2, 127.1, 126.6, 122.9, 119.3, 117.1, 114.2, 112.9, 110.3, 108.9, 48.5, 41.8, 32.7, 30.9, 30.1, 28.6, 26.2, 22.1, 17.2。ESI-HRMS  $m/z$  Calcd. For  $\text{C}_{36}\text{H}_{37}\text{N}_7\text{O}_6\text{S}$  [M+H] $^+$  696.8057, Found 696.2599。

2.2.11 *S*-(嘧啶-2-基)-1-(2-((8-((2-(2,6-二氧代嘧啶-3-基)-1,3-二氧代异吡啶-4-基)氨基)辛基)氨基)-2-氧代乙基)-1*H*-吡啶-2-硫代甲酸酯(A4)的合成

目标化合物 A4 合成步骤参照化合物 A1, 得淡黄色固体(A4)0.14 g, 收率 42%。 $^1\text{H}$  NMR(600 MHz, DMSO- $d_6$ ) $\delta$  11.09(s, 1H), 8.92(d,  $J = 4.9$  Hz, 2H), 8.11(t,  $J = 5.6$  Hz, 1H), 7.96(d,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 7.82(d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 7.64(s, 1H), 7.58 – 7.55(m, 1H), 7.52(t,  $J = 4.8$  Hz, 1H), 7.43(t,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 7.30(t,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 7.07(d,  $J = 8.6$  Hz, 1H), 7.01(d,  $J = 7.1$  Hz, 1H), 6.50(t,  $J = 5.8$  Hz,

1H), 5.05(dd,  $J = 12.9, 5.4$  Hz, 1H), 3.73(s, 2H), 3.26(t,  $J = 6.6$  Hz, 2H), 3.04(q,  $J = 6.7, 6.6, 6.6$  Hz, 2H), 2.62 – 2.52(m, 2H), 1.54(t,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 1.37(t,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 1.27(t,  $J = 15.7$  Hz, 18H)。 $^{13}\text{C}$  NMR(101 MHz, DMSO- $d_6$ ) $\delta$  182.7, 172.8, 170.0, 168.9, 167.3, 166.3, 158.9, 158.5, 146.4, 138.4, 136.2, 135.1, 132.2, 127.1, 126.6, 122.9, 119.2, 117.1, 114.1, 112.9, 110.3, 109.0, 64.9, 48.5, 41.8, 32.7, 30.9, 28.9, 26.3, 22.1, 15.1。ESI-HRMS  $m/z$  Calcd. For  $\text{C}_{40}\text{H}_{45}\text{N}_7\text{O}_6\text{S}$  [M+H] $^+$  752.9016, Found 752.3225。

### 2.3 构建稳定表达 M<sup>Pro</sup> 的 HEK-293T 细胞

构建携带 M<sup>Pro</sup> 基因的质粒, 并在其中插入编码荧光蛋白的基因序列, 然后进行质粒抽提以获得高纯度的重组质粒。使用 HG Transgene™ Reagent 转染试剂将构建好的质粒及慢病毒载体共转染进 HEK-293T 细胞。转染 10 ~ 12 h 后加 Enhancing buffer, 8 h 后更换新鲜培养基, 继续培养 48 h, 收集富含慢病毒颗粒的细胞上清液, 对其浓缩后得到高滴度的慢病毒浓缩液。将 HEK-293T 细胞以  $2 \times 10^5$  个细胞/孔密度接种于 12 孔板中, 用 800  $\mu\text{l}$  完全培养基按感染复数(MOI)=10 稀释慢病毒原液, 感染 16 h 后换成完全培养基, 继续培养 72 h, 使细胞充分表达目标蛋白, 最终获得稳定表达 M<sup>Pro</sup> 的 HEK-293T 细胞株(M<sup>Pro</sup>-HEK-293T)。通过蛋白印迹法(Western Blot)检测 M<sup>Pro</sup> 蛋白的表达水平, 验证基因过表达效果。

### 2.4 Western Blot 测试目标化合物对 M<sup>Pro</sup> 的降解活性

将 M<sup>Pro</sup>-HEK-293T 细胞以  $4 \times 10^5$  个/孔的密度接种于 6 孔板中, 置于 37  $^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的培养箱培养 24 h, 使细胞贴壁生长。取对数生长期的 M<sup>Pro</sup>-HEK-293T 细胞接种至 6 孔板。设置含不同药物浓度的完全培养基作为实验组, 加入适量 DMSO 的完全培养基作为阴性对照组, 只有完全培养基的作为空白对照组。各组细胞在相同条件下孵育 24 h 后提取细胞总蛋白。采用 Western Blot 检测细胞中 M<sup>Pro</sup> 的降解情况。首先, 使用以 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白样品。随后, 在恒压 25 mA 条件下转膜 8 min, 将蛋白转移至聚偏二氟乙烯膜(PVDF)膜上。转膜后, 将 PVDF 膜置于快速封闭液中, 室温孵育封闭 30 min。封闭结束后, 用 TBST 缓冲液洗涤膜 3 次, 每次 5 min, 然后与 M<sup>Pro</sup> 兔单克隆抗体(稀释比例 1 : 1 000)在 4  $^\circ\text{C}$  条件下孵育过夜。再次用 TBST 洗涤膜 3 次,

每次 5 min。随后与化学荧光兔二抗在室温下孵育 2 h。最后,将膜置于 BioRad ChemiDoc 成像仪中进行化学发光信号检测并曝光成像。

### 3 实验结果

为了评估目标化合物对 M<sup>pro</sup> 在细胞中的降解活性,我们构建了稳定表达 SARS-CoV-2 M<sup>pro</sup> 的 HEK-293T 细胞。Western Blot 分析显示, M<sup>pro</sup> 特征蛋白条带清晰可见,表明经慢病毒转染后的 HEK-293T 细胞能够持续稳定表达 M<sup>pro</sup> 蛋白(图 3A)。在此基础上,对化合物 A1 至 A4 开展降解活性评价和作用机制研究。Western Blot 实验结果表明,在 10 μmol/L 浓度下,化合物 A4 近乎完全降解 M<sup>pro</sup>(图 3B),表现出显著的降解活性,而化合

物 A1 至 A3 几乎无活性,表明较长的连接子可能有助于提升 M<sup>pro</sup> PROTAC 降解活性。为进一步测定化合物 A4 的降解活性,我们通过浓度梯度实验结合 Image J 软件对蛋白条带灰度值进行定量分析,计算得到化合物 A4 诱导 M<sup>pro</sup> 降解的 DC<sub>50</sub> 值为 5.2 μmol/L(图 3C)。前期在构建质粒时,我们同时插入了编码荧光蛋白(GFP)的基因,以便更直观地观察 M<sup>pro</sup> 的降解情况。用梯度浓度化合物 A4 处理 HEK-293T 细胞,孵育 24 h 后在荧光显微镜下进行观察,结果显示,随着化合物浓度上升,细胞内荧光强度逐渐减弱,表明化合物 A4 浓度依赖性下调 M<sup>pro</sup> 蛋白水平(图 3E),该结果与 Western Blot 分析一致,进一步验证了化合物 A4 的降解效果。

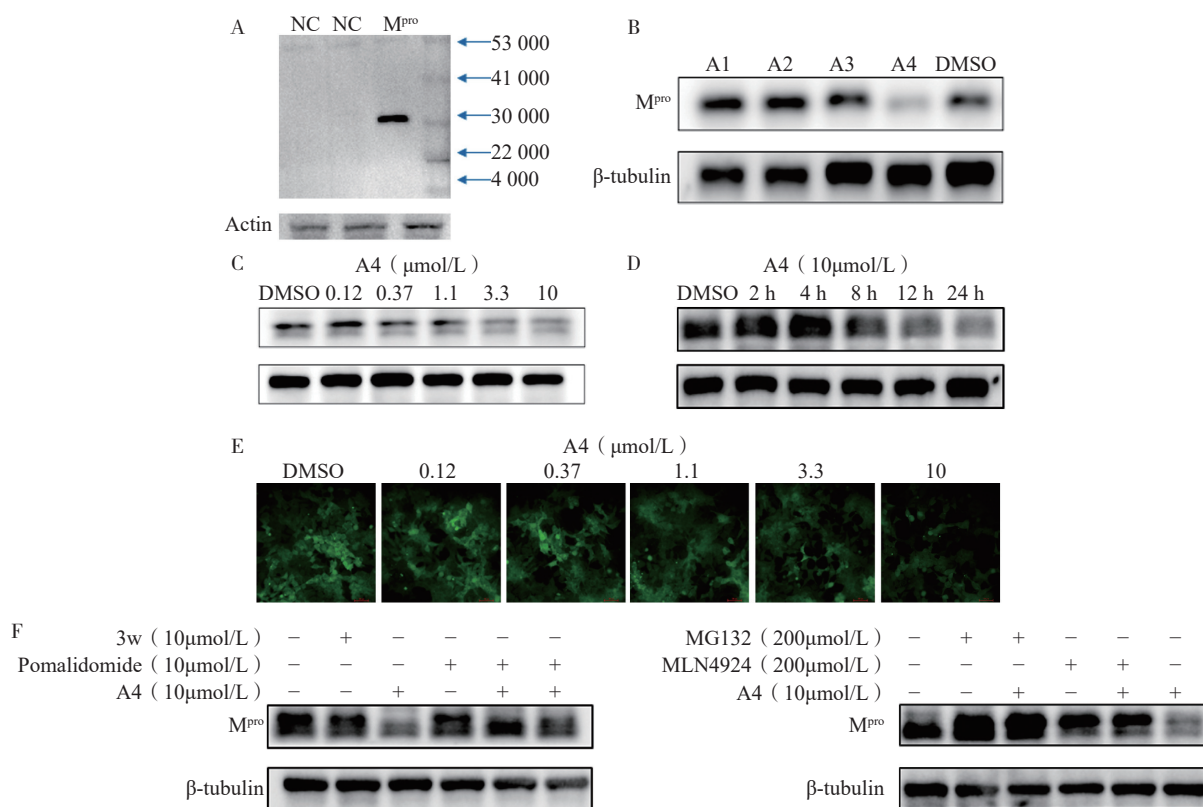


图 3 靶向 M<sup>pro</sup> 的 PROTAC 分子的 Western Blot 实验结果

为进一步探究化合物 A4 的降解动力学特性,我们测定了其在不同孵育时间下导致的 M<sup>pro</sup> 蛋白含量变化(图 3D)。结果显示,给药 8 h 时 M<sup>pro</sup> 开始降解,24 h 达到最大降解效果,表明化合物 A4 能够以时间依赖性方式诱导 M<sup>pro</sup> 蛋白降解。机制研究表明,在 10 μmol/L 浓度下化合物 A4 能够显著下调 M<sup>pro</sup> 蛋白含量。M<sup>pro</sup> 抑制剂 3w 或 CRBN 配体泊马度胺分别与化合物 A4 共孵育时,均能够阻断化合物 A4 对 M<sup>pro</sup> 的降解作用(图 3E),而两

者单独使用时, M<sup>pro</sup> 蛋白含量未发生改变,表明化合物 A4 需要两端结合 M<sup>pro</sup> 和 CRBN 才能发挥相应的降解活性。此外,加入蛋白酶体抑制剂 MG132<sup>[29]</sup> 或类泛素化抑制剂 MLN4924<sup>[30]</sup> 均可逆转化合物 A4 对 M<sup>pro</sup> 的降解作用,而单独使用这些抑制剂时,细胞内 M<sup>pro</sup> 的含量不变(图 3F)。以上实验结果说明,化合物 A4 通过与 M<sup>pro</sup> 蛋白和 CRBN 蛋白的同时结合,诱导 M<sup>pro</sup> 蛋白泛素化修饰并促进其被蛋白酶体降解,从而证明了化合物

**A4**是一种通过泛素-蛋白酶体途径介导 M<sup>pro</sup> 降解的降解剂。

A. M<sup>pro</sup> 在 HEK-293T 细胞中的表达验证; B. 化合物 **A1** 至 **A4**(10 μmol/L) HEK-293T 细胞内的 M<sup>pro</sup> 含量; C. 不同浓度的 **A4** 作用 24 h, HEK-293T 细胞内 M<sup>pro</sup> 含量; D. 化合物 **A4**(10 μmol/L) 与 HEK-293T 细胞株孵育后, 细胞内的 M<sup>pro</sup> 含量随时间的变化; E. 化合物 **A4**(0~10 μmol/L) 与 HEK-293T 细胞株孵育 24 h 后, 荧光显微镜拍摄图片; F. 经 **A4**、**3w** 或 CRBN 配体作用 24 h, HEK-293T 细胞内的 M<sup>pro</sup> 含量以及经 Neddylation 抑制剂或蛋白酶体抑制剂作用 24 h, HEK-293T 细胞内的 M<sup>pro</sup> 含量。

#### 4 讨论

基于 PROTAC 技术, 我们设计并合成得到 4 个靶向 SARS-CoV-2 M<sup>pro</sup> 的 PROTAC 小分子化合物, 所有目标化合物均经过了核磁共振和高分辨质谱确证其化学结构, 并通过高效液相色谱确认纯度均达到 95% 以上。为评估目标化合物对 M<sup>pro</sup> 的降解活性, 构建了稳定表达 SARS-CoV-2 M<sup>pro</sup> 的 HEK-293T 细胞系, 并通过 Western Blot 和荧光显微镜观察验证了 M<sup>pro</sup> 的持续稳定表达。初步筛选结果显示, 连接子长度显著影响 PROTAC 降解效率, 其中, 连接子最长的化合物 **A4** 表现出最优的 M<sup>pro</sup> 降解活性, DC<sub>50</sub> 值为 5.2 μmol/L。机制研究进一步证实, 化合物 **A4** 同时结合靶蛋白 M<sup>pro</sup> 和 E3 连接酶 CRBN, 触发泛素-蛋白酶体途径, 诱导 M<sup>pro</sup> 蛋白特异性降解。

本研究首次探索了以结构简单的抑制剂 **3w** 为 M<sup>pro</sup> 配体的 PROTAC 分子的设计与生物活性, 验证了新型 M<sup>pro</sup> PROTAC **A4** 在细胞内降解 M<sup>pro</sup> 的有效性, 为开发新型抗冠状病毒的 PROTAC 降解剂提供了先导化合物。尽管化合物 **A4** 展现出一定的降解活性, 但其 DC<sub>50</sub> 值仍有进一步优化的空间, 后续的结构优化正在进行中。

#### 【参考文献】

- [1] WALDMAN R H, GANGULY R. Immunity to infections on secretory surfaces[J]. *J Infect Dis*, 1974, 130(4): 419-440.
- [2] FEHR A R, PERLMAN S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis[J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1282: 1-23.
- [3] SHANNON A, SELISKO B, LE N, et al. Favipiravir strikes the SARS-CoV-2 at its Achilles heel, the RNA polymerase[J]. *bioRxiv*, 2020: 2020.05. 15.098731.
- [4] C E. WHO coronavirus disease(COVID-19)[M]. *Weekly Epidemiological Update*, 2021.
- [5] FORNI D, CAGLIANI R, CLERICI M, et al. Molecular evolution of human coronavirus genomes[J]. *Trends Microbiol*, 2017, 25(1): 35-48.
- [6] CUI J, LI F, SHI Z L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2019, 17(3): 181-192.
- [7] GÜNTHER S, REINKE P Y A, FERNÁNDEZ-GARCÍA Y, et al. X-ray screening identifies active site and allosteric inhibitors of SARS-CoV-2 main protease[J]. *Science*, 2021, 372(6542): 642-646.
- [8] GHOSH A K, GONG G L, GRUM-TOKARS V, et al. Design, synthesis and antiviral efficacy of a series of potent chloropyridyl ester-derived SARS-CoV 3CLpro inhibitors[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, 18(20): 5684-5688.
- [9] ZHOU P, YANG X L, WANG X G, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin[J]. *Nature*, 2020, 579(7798): 270-273.
- [10] GORDON D E, JANG G M, BOUHADDOU M, et al. A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing[J]. *Nature*, 2020, 583(7816): 459-468.
- [11] LAN J, GE J W, YU J F, et al. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor[J]. *Nature*, 2020, 581(7807): 215-220.
- [12] XIA S, LIU M Q, WANG C, et al. Inhibition of SARS-CoV-2 (previously 2019-nCoV) infection by a highly potent pan-coronavirus fusion inhibitor targeting its spike protein that harbors a high capacity to mediate membrane fusion[J]. *Cell Res*, 2020, 30(4): 343-355.
- [13] LI G D, HILGENFELD R, WHITLEY R, et al. Therapeutic strategies for COVID-19: progress and lessons learned[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2023, 22(6): 449-475.
- [14] LU Y, MING W, LI CZ, et al. Advances in peptidomimetic inhibitors of corona virus main protease[J]. *Acta Pharm Sin*, 2022(57): 1977-1990.
- [15] PETERSSON M, CREWS C M. PROteolysis TArgeting chimeras (PROTACs): past, present and future[J]. *Drug Discov Today Technol*, 2019, 31: 15-27.
- [16] CROMM P M, CREWS C M. Targeted protein degradation: from chemical biology to drug discovery[J]. *Cell Chem Biol*, 2017, 24(9): 1181-1190.
- [17] ZENG S X, HUANG W H, ZHENG X L, et al. Proteolysis targeting Chimera (PROTAC) in drug discovery paradigm: Recent progress and future challenges[J]. *Eur J Med Chem*, 2021, 210: 112981.
- [18] CHIRNOMAS D, HORNBERGER K R, CREWS C M. Protein degraders enter the clinic: a new approach to cancer therapy[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2023, 20: 265-278.
- [19] YIN L N, HU Q Z. Chimera induced protein degradation: PROTACs and beyond[J]. *Eur J Med Chem*, 2020, 206: 112494.
- [20] ALUGUBELLI Y R, XIAO J, KHATUA K, et al. Discovery of first-in-class PROTAC degraders of SARS-CoV-2 main protease[J]. *J Med Chem*, 2024, 67(8): 6495-6507.



- [21] NALAWANSHA D A, CREWS C M. PROTACs: an emerging therapeutic modality in precision medicine[J]. *Cell Chem Biol*, 2020, 27(8): 998-1014.
- [22] SANG X H, WANG J, ZHOU J, et al. A chemical strategy for the degradation of the main protease of SARS-CoV-2 in cells[J]. *J Am Chem Soc*, 2023, 145(50): 27248-27253.
- [23] GADD M S, TESTA A, LUCAS X, et al. Structural basis of PROTAC cooperative recognition for selective protein degradation[J]. *Nat Chem Biol*, 2017, 13: 514-521.
- [24] PILLAIYAR T, FLURY P, KRÜGER N, et al. Small-molecule thioesters as SARS-CoV-2 main protease inhibitors: enzyme inhibition, structure-activity relationships, antiviral activity, and X-ray structure determination[J]. *J Med Chem*, 2022, 65(13): 9376-9395.
- [25] DE WISPELAERE M, DU G Y, DONOVAN K A, et al. Small molecule degraders of the hepatitis C virus protease reduce susceptibility to resistance mutations[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 3468.
- [26] BOND M J, CREWS C M. Proteolysis targeting chimeras (PROTACs) come of age: entering the third decade of targeted protein degradation[J]. *RSC Chem Biol*, 2021, 2(3): 725-742.
- [27] TOURE M, CREWS C M. Small-molecule PROTACs: new approaches to protein degradation[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2016, 55(6): 1966-1973.
- [28] PETZOLD G, FISCHER E S, THOMÄ N H. Structural basis of lenalidomide-induced CK1 $\alpha$  degradation by the CRL4(CRBN) ubiquitin ligase[J]. *Nature*, 2016, 532(7597): 127-130.
- [29] ZHANG X H, LEE H C, SHIRAZI F, et al. Protein targeting chimeric molecules specific for bromodomain and extra-terminal motif family proteins are active against pre-clinical models of multiple myeloma[J]. *Leukemia*, 2018, 32(10): 2224-2239.
- [30] HAN K K, ZHAO D M, LIU Y Z, et al. The ubiquitin-proteasome system is necessary for the replication of duck Tembusu virus[J]. *Microb Pathog*, 2019, 132: 362-368.
- [收稿日期] 2025-01-01 [修回日期] 2025-04-01  
[本文编辑] 李睿旻