

第二线粒体源性胱氨酸酶激活因子及其类似物 与肿瘤的相关性研究进展

魏娟,张全安

(东南大学附属第二医院肿瘤科,江苏 南京 210003)

摘要:第二线粒体源性胱氨酸酶激活因子(Smac)是一种存在线粒体中并具有促凋亡作用的蛋白,Smac 主要通过参与细胞凋亡的线粒体途径和死亡受体途径的下游反应,特异性地与凋亡抑制因子(IAPs)结合,解除 IAPs 对 Caspase 的抑制效应从而促进细胞凋亡。在肿瘤细胞中,Smac 的过表达可以抑制或延缓肿瘤的发生发展过程,提高细胞浆 Smac 含量可增强细胞对放化疗的敏感性。人工合成的 Smac 类似物可通过级联放大效应提高肿瘤细胞对放化疗的敏感性,具有高效、低毒、高通透性等优点,为肿瘤的治疗提供了新的方法和思路,具有重要的临床意义。该研究就 Smac、Smac 类似物与肿瘤的相关性研究进展做一综述。

关键词:Smac;Smac 类似物;细胞凋亡;肿瘤

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2016.10.003

Advances in the research of the relationship between Smac, Smac mimetic and tumor

WEI Juan,ZHANG Quanan

(Department of Oncology, The Second Affiliated Hospital, Southeast University, Nanjing, Jiangsu 210003, China)

Abstract: Smac is a newly found protein promoting apoptosis of mitochondria, which can promote cell apoptosis and was initially discovered independently by two groups in 2000. Smac has a pro-apoptotic effect that is mediated by its interaction with IAPs and the release of caspases from them. Overexpression of Smac in cancer cells can promote its cells apoptosis and postpone its development. Improving content of Smac in the cytoplasm can sensitize these cells to chemotherapy and radiotherapy. Smac mimetics is a potent enhancer of chemotherapy and radiotherapy, which can overcome the resistance of several cancers to anti-cancer therapies and have the advantages of high efficiency, low toxicity and high permeability. It is clear that Smas has great therapeutic potential for the treatment of cancer and has important clinical significance. In this article, we reviewed the recent advances in the study of the correlation among Smac, Smac mimetic and cancer.

Key words: Smac; Smac mimetics; Cell apoptosis; Cancer

人类第二线粒体源性胱氨酸酶激活因子(Smac),也称为低等电点(PI)的凋亡蛋白抑制剂(IAP)家族直接结合蛋白(DIABLO),是2000年Du^[1]和Verhagen^[2]同时发现的来源于线粒体的促凋亡蛋白,主要通过抑制IAPs的活性而发挥促凋亡作用。本研究就Smac的结构、促凋亡的机制及其与Smac类似物在肿瘤发生发展、治疗、预后过程中的影响作一综述。

1 Smac 的结构

Smac 主要通过参与细胞凋亡的线粒体途径和死亡受体途径的下游反应,特异性地与IAPs结合,解除IAPs对半胱氨酸蛋白酶(caspase)的抑制效应从而促进细胞的凋亡。Smac由7个外显子组成,位于12号染色体长臂。全长为1.5 kb的Smac cDNA

编码分子量约为27 kDa的239个氨基酸的前体蛋白。其末端的55个氨基酸残基构成了线粒体靶序列(MTS)。Smac进入线粒体后剪切脱离线粒体靶序列,成为成熟的Smac。成熟的Smac才具有促凋亡活性。Smac蛋白在空间上有二聚体和单体两种形态。二聚体Smac蛋白位于线粒体膜间隙内,当释放入胞质时发挥促凋亡的活性^[3],单体形态的Smac则无促凋亡功能。Smac蛋白的高表达可促进细胞对凋亡的敏感性及对化疗药诱导凋亡的敏感性,而低表达则提高细胞凋亡的阈值^[4]。

2 Smac 的促凋亡机制

2.1 线粒体途径 线粒体途径也称为内源性途径,当受到如抗癌药物、缺氧、DNA破坏、射线照射以及化学信号等的外界因素作用时,激活线粒体外膜渗透效应使Smac从线粒体释放到细胞质。Smac一方面可以直接与细胞色素C(cytochrome-C)、半

胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-9 前体 (procaspase-9)、三磷酸脱氧腺苷 (dATP)、凋亡蛋白酶活化因子-1 (Apaf-1) 作用, 形成凋亡体激活 caspase-9, 进而激活效应因子 caspase-3, caspase-6, caspase-7。另一方面通过与 IAPs 作用, 拮抗 IAPs 对 caspases 活性的抑制作用, 诱导细胞凋亡。Smac 发挥功能的分子基础是其 N 端的一段保守序列 Ala-Val-Pro-Ile (AVPI), 通过这 4 个疏水氨基酸残基同 IAPs 的 BIR2, BIR3 结构域结合, 发挥抑制 IAPs 的功能^[6-7]。

2.2 死亡受体途径 死亡受体途径也称为外源性途径, 死亡受体主要包括凋亡相关蛋白 FAS、肿瘤坏死因子受体 (TNFR)、肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体受体 (TRAILR) 等。肿瘤坏死因子 (TNF) 与相应 TNFR 特异性结合发生寡聚化, 促进 TNFR 胞浆部分与接头蛋白 Fas 相关死亡结构域 (FADD) 和 procaspase-8 结合, 形成 DISC, 激活 procaspase-8 自身切割后形成有活性的 caspase-8, 再通过 TRAIL 启动 caspase-8-tBid-bax 的级联反应, 促进成熟的 Smac 蛋白迅速释放到细胞质中, 与 IAPs 特异性结合并解除对 caspase-3 的抑制作用, 并使得 caspase-8 激活 caspase-3, 启动 caspase 级联激活反应从而导致靶细胞凋亡^[8-9]。

2.3 Smac 调控因素 Smac 受调控的因素很多且过程复杂, Bcl-2 家族 (tBid、Bax、Bim)、Puma、JNK、caspases、cytochrome-C 激发 Smac 从线粒体释放到细胞质中, 而 Bcl-2、Bcl-xL、Survivin、XIAP、Apollon、Erk1/2 和 c-Myc 阻止其释放过程。XIAP、c-IAP1、IAP2 和 Livin 促进 Smac 在细胞质中的降解和泛素化, 而 Survivin 和 NADE 阻止 Smac 降解过程^[10-12]。

3 Smac 在肿瘤中的表达

Smac 在肿瘤中广泛表达, 在不同肿瘤组织中的表达情况有差异, Yoo 等^[13] 用免疫组织化学方法分析结果表明在胃癌、结肠癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌等中 Smac 表达率为 62%, 在恶性神经鞘瘤、横纹肌肉瘤、恶性皮肤纤维瘤、平滑肌肉瘤、尤文肉瘤等中 Smac 表达率为 22%, 而血管肉瘤和脂肪肉瘤中无表达。随后, 相关研究结果证实^[14-16], Smac 在直肠癌、肝癌、睾丸癌等肿瘤中较正常组织呈低表达或缺失状态, 并且 Smac 低表达可能有抑制细胞凋亡效应。而在宫颈癌和胃癌中恰恰相反, Smac 呈高表达状态, Shibata 等^[17] 认为造成表达差异的原因是由于 XAF1 表达量减少; XAF1 是 xIAP 的直接抑制因子, 它的降低可能增加了肿瘤细胞的凋亡阈值, 从而促进 Smac 的合成与释放。而对于 Smac 在肺癌中的表达程度存有争议。Sekimura 等^[18] 发现

肺癌组织中 Smac mRNA 的表达明显低于正常肺组织; Hofmann 等^[19] 证明在非小细胞肺癌 (NSCLC) 中 Smac 的低表达提高了细胞凋亡的阈值。而 Zhao 等^[20] 证明 Smac mRNA 在肺癌组织中的表达阳性率高于相应的正常肺组织。Evzen 等^[21] 亦得出 Smac mRNA 在 NSCLC 中的表达高于正常肺组织的结论, Evzen 认为其研究结果相反原因在于选择的内参不同。Yang 等^[22] 发现 Smac 蛋白在 NSCLC 中的表达明显高于正常组织, 作者认为该结果与 Smac 蛋白的促凋亡效应并不矛盾; 因为 Smac 在 NSCLC 中高表达可增强促凋亡效应, 而肿瘤细胞增殖速度加快, 细胞凋亡率并不减少。但导致同一肿瘤中表达差异的具体机制究竟是怎样的, 有何意义? 现尚未明确, 还有待进一步深入探讨。

4 Smac 与肿瘤的发生发展及预后

IAPs 通过抗凋亡作用参与肿瘤的发生发展过程, Smac 作为 IAPs 的抑制剂可促进细胞凋亡, 它的高表达可以延缓或抑制肿瘤的发生发展, 低表达可能预示着肿瘤侵袭力更强和预后更差。Yan 等^[23] 认为 xIAP 和 Smac 之间的平衡状态在肿瘤发生发展过程中发挥着重要作用。在肝癌中^[15], Smac mRNA 和蛋白水平较正常肝组织低, IAPs、survivin 表达量的增高与肝癌进展呈正比, 说明 Smac 与肝癌的发生发展相关。Jia 等^[24] 发现将 Smac 转染至白血病细胞株中, Smac 可有效地将肿瘤细胞阻滞于细胞周期的 G0/G1 期, 说明 Smac 可能通过抑制细胞增殖从而延缓白血病的发生发展过程。而 Espinosa 等^[25] 发现宫颈癌组织有 Smac mRNA 的表达, 正常组织中无 Smac mRNA 的表达, 且 Smac mRNA 的表达与 TNM 分期、组织类型及病程无关。肾癌中近期两项研究表明 Smac mRNA 和蛋白水平与肾癌的分期、分级无相关性^[23-26]。但 Mizutani 等^[27] 用 Western blot 方法检测肾癌组织的 Smac 蛋白表达, 发现 82% 的肾细胞癌组织 Smac 表达量低于正常肾组织, 且与肾癌的临床分期及预后具有显著的相关性。Sekimura 等^[18] 发现与正常肺组织相比, 肺癌组织中 Smac mRNA 的表达量明显降低, T2 ~ T4 期肺癌组织的 Smac mRNA 表达量明显较 T1 期低, Smac mRNA 表达量越低的病人预后越差。Chen 等^[28] 研究证明 Smac 高表达预示患者无病生存期和总生存期相对延长。Zhao 等^[20] 则证明 Smac mRNA 在肺癌组织中的阳性率高于相应的正常肺组织, Smac 蛋白在 II 期 NSCLC 患者组织中的表达明显高于 I 期患者。且他们认为 Smac 蛋白表达与 I ~ II 期 NSCLC 患者性别、年龄、血型、病理类型及生存无相

关性,而与淋巴结有无转移有关,在无淋巴结转移者组织中明显低于有淋巴结转移者。

5 Smac/Smac 类似物与肿瘤的治疗关系

目前,肿瘤的治疗强调的是以手术、放化疗、生物治疗及分子靶向治疗等多种方法相结合的综合治疗。Smac 作为 IAPs 的拮抗剂,发挥促细胞凋亡的这一活性,为 Smac 可以应用于肿瘤治疗提供了可靠的理论依据。提高胞浆 Smac 含量不仅可增强细胞对化疗药的敏感性,并且增强机体免疫系统对肿瘤细胞的杀伤和清除作用^[29]。提高 Smac 含量的方法包括:一是将编码 Smac 的表达载体转染肿瘤细胞中,转染 Smac 的肿瘤细胞在受到化疗药或放疗作用时,促凋亡效应较未转染的细胞显著增强。二是将由 Smac 蛋白衍生的含 AVPI 的小分子多肽与载体蛋白结合,转染细胞,增加化疗药对肿瘤细胞的促凋亡作用。但人工切割的小分子多肽存在生物利用度差、细胞膜通透性差、生物体内代谢稳定性差等缺点。目前通过应用荧光标记已开发出一种高通量的药物筛选方法,已经成功合成比自然存在的 Smac 多肽促凋亡功能强 20 倍的 Smac 肽类的模拟物,优点是高效、低毒、细胞膜通透性好等。但因需要高浓度及直接注射到肿瘤部位等缺点,暂无法应用于临床。进而,研究人员合成了非肽类 Smac 类似物,通过模拟靶向蛋白-蛋白相互作用,激活肿瘤细胞的凋亡途径,目的在于增强结合能力、细胞膜通透性、体内稳定性和生物利用度。Smac 类似物可以二价结合 IAP 的 BIR2 和 BIR3 域,通过 TNF- α 环路发挥促凋亡活性。在 TNF- α 环路中,Smac 类似物激活 E3 泛素酶活性,导致 cIAPs 的自身泛素化及蛋白酶体降解,从而导致 NIK (NF- κ B-inducing kinase) 激活,最终导致 NF- κ B 向细胞核内转位指导目的基因的表达,包括作用于 TNFR1 的 TNFA,促使了 RIP1 从 TNFR1 释放,去泛素化 RIP1 与 TNFR1、caspase-8、衔接蛋白 TRADD、FADD 形成复合体 II,从而促进细胞凋亡。Smac 类似物在肿瘤中被单独应用或者与化、放疗联合应用探索抗肿瘤效应^[30-31]。相关文献报告中,Huerta 等^[32] 体内外实验证明小分子 Smac 类似物 (Smac-JP1201) 可增加直肠癌细胞对放疗的敏感性,并验证其是通过降低 xIAP 水平及破坏 DNA 修复机制诱导凋亡的;最近相关研究也表明 Smac 类似物 (Smac-BV6) 可通过抑制 DNA 修复作用而提高结直肠癌的放疗敏感性^[33];Yang 等^[34] 应用小分子 Smac 类似物 (SM-164) 作用于头颈部肿瘤,结果表明 SM-164 是通过诱导 cIAP1 降解,激活 NF- κ B 同时促进 TNF- α 产生,下

传凋亡信号,激活 caspase 导致细胞凋亡并增加细胞对放疗的敏感性,随后 Yang 等^[35] 研究人员又将 SM-164 作用于乳腺癌,结果提示 SM-164 可通过同样机制提高乳腺癌细胞对放疗的敏感性;Greer 等^[36] 报告 Smac 类似物 JP1201 能使非小细胞肺癌细胞对多种化疗药物诱导的凋亡敏感性增高。最新研究表明 Smac 类似物可提高儿童急性淋巴细胞白血病的化疗敏感性^[37]。近期一项药物实验^[38] 将纳米颗粒与 Smac 多肽结合,借助纳米颗粒体积小表面积大的特点,在耦合 Smac 多肽后可以与形成多个结合面与 IAPs 家族结合,从而发挥更大的抗肿瘤活性。肿瘤细胞对放化疗抵抗是肿瘤治疗过程中的主要难题,逆转放化疗抵抗、增加放化疗敏感性的靶向治疗一直是肿瘤学界的研究热点,Smac/Smac 类似物既可促进肿瘤细胞凋亡,同时也能发挥放化疗增敏作用,由此可见,Smac 及 Smac 类似物作为新型的靶向药物应用于肿瘤治疗指日可待。

6 展望

近年来,Smac 的促凋亡功能已得到广泛而深入的研究和阐明,IAPs 在肿瘤中的广泛表达也为 Smac 提供了作用靶点。通过调节细胞浆 Smac 的含量可以有效地提高肿瘤细胞对放化疗敏感性,而且通过 Smac 功能与结构的研究发现 AVPI 功能序列也为开发以肽类和非肽类的 Smac 类似物奠定了基础,将为肿瘤治疗方面提供新的思路和好的应用前景。但是应用于临床目前仍存在一系列问题尚待解决:如同一类肿瘤中 Smac 表达情况尚不统一,Smac 的过表达对正常细胞是否有不好的影响,Smac/Smac 类似物最佳治疗浓度的选择,敏感、有效的肿瘤细胞类型和化疗药物如何筛选,Smac 在不同肿瘤中发挥生物学作用的具体机制,Smac 类似物在人体中的毒副反应及疗效尚不明确。因此,Smac 及 Smac 类似物在临床的真正广泛应用,还需要更深入的研究,这也将为肿瘤的诊断、个体化治疗开辟新的方向和途径。

参考文献

- [1] Du CY, Fang M, Li YC, et al. Smac, a mitochondrial protein that pro-motes cytochrome C-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition[J]. Cell, 2000, 102(1): 33-42.
- [2] Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch DL, et al. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins[J]. Cell, 2000, 102(1): 43-55.
- [3] Munoz-Pinedo C, Guio-Carrion A, Goldstein JC, et al. Different mitochondrial inter membrane space proteins are released during apoptosis in a manner that is coordinately initiated but can vary in duration[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103: 11573-11578.

- [4] Peng C, Hao Y, Zhao Y, et al. Effect of Smac and Taxol on non-small-cell lung cancer [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2014, 46 (5):387-393.
- [5] Oberoi-Khanuja TK, Murali A, Rajalingam K. IAPs on the move: role of inhibitors of apoptosis proteins in cell migration [J]. *Cell Death Dis*, 2013, 4: e784.
- [6] Creagh EM, Murphy BM. Smac/Diablo antagonizes ubiquitin ligase activity of inhibitor of apoptosis proteins [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279 (26):26906-26914.
- [7] Varfolomeev E, Vucic D. Inhibitor of apoptosis protein: fascinating biology leads to attractive tumor therapeutic targets [J]. *Future Oncology*, 2011, 7 (5):633-648.
- [8] Deng YB, Lin YH. TRAIL induced apoptosis requires bax-dependent mitochondrial release of Smac/DIABLO [J]. *Genes Dev*, 2002, 16:33-45.
- [9] Wu MS, Wang GF, Zhao ZQ, et al. Smac mimetics in combination with TRAIL selectively target cancer stem cells in nasopharyngeal carcinoma [J]. *Mol Cancer Ther*, 2013, 12 (9):1728-1737.
- [10] Qin S, Yang C, Li S, et al. Smac: Its role in apoptosis induction and use in lung cancer diagnosis and treatment [J]. *Cancer Lett*, 2012, 318 (1):9-13.
- [11] Akl H, Vervloessem T, Kiviluoto S, et al. A dual role for the anti-apoptotic Bcl-2 protein in cancer: mitochondria versus endoplasmic reticulum [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1843 (10):2240-2252.
- [12] Quast SA, Berger A, Buttstadt N, et al. General sensitization of melanoma cells for TRAIL-induced apoptosis by the potassium channel inhibitor TRAM-34 depends on release of SMAC [J]. *PLoS One*, 2012, 7 (6): e39290.
- [13] Yoo NJ, Kim HS, Kim SY, et al. Immunohistochemical analysis of Smac/DIABLO expression in human carcinomas and sarcomas [J]. *APMIS*, 2003, 111 (3):382-388.
- [14] Endo K, Kohnoe S, Watanabe A, et al. Clinical significance of Smac/DIABLO expression in colorectal cancer [J]. *Once Rep*, 2009, 21 (2):351-355.
- [15] Bao ST, Gui SQ, Lin MS. Relationship between expression of Smac and Survivin and apoptosis of primary hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2006, 5 (4):580-583.
- [16] Kempkensteffen C, Jager T, Bub J, et al. The equilibrium of XIAP and Smac/DIABLO expression is gradually deranged during the development and progression of testicular germ cell tumours [J]. *Int J Androl*, 2007, 30 (5):476-483.
- [17] Shibata T, Mahotka C, Wethkamp N, et al. Disturbed expression of the apoptosis regulators XIAP, XAF1, and Smac/DIABLO in gastric adenocarcinomas [J]. *Diagn Mol Pathol*, 2007, 16 (1):1-8.
- [18] Sekimura A, Konishi A, Mizuno K, et al. Expression of Smac/DIABLO is a novel prognostic marker in lung cancer [J]. *Oncol Rep*, 2004, 11 (4):797-802.
- [19] Hofmann HS, Simm A, Hammer A, et al. Expression of inhibitors of apoptosis (IAP) proteins in non-small cell human lung cancer [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2002, 128 (10):554-560.
- [20] Zhao JM, Zhu ZH, Su XD, et al. Clinical significance of Smac expression on non-small cell lung cancers [J]. *Chinese-German Journal of Clinical Oncology*, 2011, 10 (5):249-251.
- [21] Evzen K, Jan P. Expression of apoptosome pathway-related transcripts in non-small cell lung cancer [J]. *Cancer Res Clin Oncol*, 2006, 132:57-68.
- [22] Yang CL, Chen X. Expressions of Livin and Smac proteins in non-small cell lung cancer [J]. *Chin J Cancer Res*, 2008, 20 (2):144-149.
- [23] Yan Y, Mahotka C, Heikau S, et al. Disturbed balance of expression between XIAP and Smac/DIABLO during tumor progression in renal cell carcinomas [J]. *Br J Cancer*, 2004, 91 (7):1349-1357.
- [24] Jia L, Patwari Y, Kelsey SM, et al. Role of Smac in human leukemic cell apoptosis and proliferation [J]. *Oncogene*, 2003, 22 (11):1589-1599.
- [25] Espinosa M, Cantu D, Lopez CM, et al. SMAC is expressed de novo in a subset of cervical cancer tumors [J]. *BMC Cancer*, 2004, 4:84.
- [26] Kempkensteffen C, Hinz S, Christoph F. Expression levels of the mitochondrial IAP antagonists Smac/DIABLO and Omi/HtrA2 in clear-cell renal cell carcinomas and their prognostic value [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2008, 134 (5):543-550.
- [27] Mizutani Y, Nakanishi H, Yamamoto K. Downregulation of Smac/DIABLO expression in renal cell carcinoma and its prognostic significance [J]. *J Clin Oncol*, 2005, 23 (3):448-454.
- [28] Chen P, Li J, Ge LP, et al. Prognostic value of survivin, X-linked inhibitor of apoptosis protein and second mitochondria-derived activator of caspases expression in advanced non-small-cell lung cancer patients [J]. *Respirology*, 2010, 15 (3):501-509.
- [29] Qin S, Yang C, Li S, et al. Smac: Its role in apoptosis induction and use in lung cancer diagnosis and treatment [J]. *Cancer Lett*, 2012, 318 (1):9-13.
- [30] Li ZL, Liang S, Wang ZC, et al. Expression of Smac induced by the Egr1 promoter enhances the radiosensitivity of breast cancer cells [J]. *Cancer Gene Ther*, 2014, 21 (4):142-149.
- [31] Lu J, Qin Q, Zhan LL, et al. AT-406, an IAP inhibitor, activates apoptosis and induces radiosensitization of normoxic and hypoxic cervical cancer cells [J]. *J Pharmacol Sci*, 2014, 126 (1):56-65.
- [32] Huerta S, Gao XH, Livingston EH, et al. In vitro and in vivo radiosensitization of colorectal cancer HT-29 cells by the smac mimetic JP-1201 [J]. *Surgery*, 2010, 148 (2):346-353.
- [33] Hehlhans S, Oppermann J, Reichert S, et al. The SMAC mimetic BV6 sensitizes colorectal cancer cells to ionizing radiation by interfering with DNA repair processes and enhancing apoptosis [J]. *Radiat Oncol*, 2015, 10:198.
- [34] Yang J, McEachern D, Li W, et al. Radiosensitization of head and neck squamous cell carcinoma by a SMAC-mimetic compound, SM-164, requires activation of caspases [J]. *Mol Cancer Ther*, 2011, 10 (4):658-669.
- [35] Yang D, Zhao Y, Li AY, et al. Smac-mimetic compound SM-164 induces radiosensitization in breast cancer cells through activation of caspases and induction of apoptosis [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2012, 133 (1):189-199.
- [36] Greer RM, Peyton M, Larsen JE, et al. Smac Mimetic (JP1201) sensitizes non-small cell lung cancers to multiple chemotherapy agents in an IAP-dependent but TNF- α independent manner [J]. *Cancer Res*, 2011, 71 (24):7640-7648.
- [37] Schirmer M, Trentin L, Queudeville M, et al. Intrinsic and chemosensitizing activity of SMAC-mimetics on high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia [J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7: e2052.
- [38] Seneci P, Rizzi M, Ballabio L, et al. SPION-Smac mimetic nanoconjugates: Putative pro-apoptotic agents in oncology [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2014, 24 (10):2374-2378.