

靶向SUMOylation通路的抗肿瘤小分子抑制剂研究进展

熊朝栋, 刁嘉铭, 张 翱*

(上海交通大学药学院, 药学交叉中心, 上海 200240)

摘要: SUMOylation是一种重要的蛋白质翻译后修饰。与ubiquitylation类似, SUMOylation是指将小类泛素化修饰物(SUMO)蛋白特异性地共价连接到底物蛋白中的赖氨酸残基上的过程。SUMOylation通过调节底物蛋白的生物活性来调节细胞的生理功能及病理过程, 在多种肿瘤的发生和发展中异常活化。因此, 靶向SUMOylation已成为抗肿瘤药物研发的重要策略。本文总结了近年来靶向SUMOylation通路的小分子抑制剂研究的最新进展及其独特的抗肿瘤机制, 其中包括SUMO活化酶E1(SAE)抑制剂、SUMO结合酶E2(UBC12)抑制剂及SUMO1降解剂。

关键词: SUMOylation; 活化酶; 翻译后修饰; 抗肿瘤; 抑制剂

中图分类号: R914 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)09-2720-11

Research progress on targeted SUMOylation inhibitors and their antitumor activity

XIONG Chao-dong, DIAO Jia-ming, ZHANG Ao*

(School of Pharmacy, Pharm-X Center, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: SUMOylation is an important post-translational modification of proteins. Similar to ubiquitylation, SUMOylation is the process that the small ubiquitin-like modifier (SUMO) proteins are specifically and covalently binding to lysine residues of substrate proteins. Through SUMOylation, the physiological functions and pathological processes of cells are well controlled and balanced, and its abnormal activation has been reported in various tumors. Therefore, SUMOylation has been a potential target for anti-tumor drug development. In this review, we summarize recent advances on development of inhibitors targeting SUMOylation pathway and their antitumor properties.

Key words: SUMOylation; activation enzyme; post-translational modification; antitumor; inhibitor

1 SUMO蛋白和SUMOylation

小类泛素化修饰物 (small ubiquitin-like modifier, SUMO) 是一类高度保守的由97个氨基酸残基组成的多肽, 也是发现最早、已知底物最多、功能范围最广的泛素相关的蛋白 (ubiquitin-like proteins, UBLs), 参与蛋白质翻译后修饰。虽然SUMO蛋白的C末端的类泛素 (UBL) 结构域的折叠结构与泛素蛋白 (Ub) 的相

应结构域几乎完全重叠, 但SUMO与Ub仅具有18%的序列同一性, 主要区别在于SUMO具有较长的N端延伸结构^[1] (图1a)。

人类SUMO蛋白家族包括4种异构体, 即SUMO1~4。其中SUMO1与SUMO2有48%的相似性, SUMO2和SUMO3仅在N-末端的几个氨基酸残基上存在差异(95%相同), 且这些氨基酸残基在功能上没有区别, 但SUMO4的研究较为稀少^[2] (图1b)。

将SUMO特异性地共价连接到底物蛋白的赖氨酸残基上的过程称为SUMOylation (图2)。作为一种重要的蛋白翻译后修饰, SUMOylation参与调节细胞分化、细胞周期、核转录、蛋白间的相互作用、DNA修

收稿日期: 2022-04-23; 修回日期: 2022-05-09.

基金项目: 科技创新2030重大项目(2021ZD0204004); 上海张江国家自主创新示范区专项发展资金重大项目(ZJ2021-ZD-007).

*通讯作者 Tel: 86-21-34204020, E-mail: ao6919zhang@sjtu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-0483

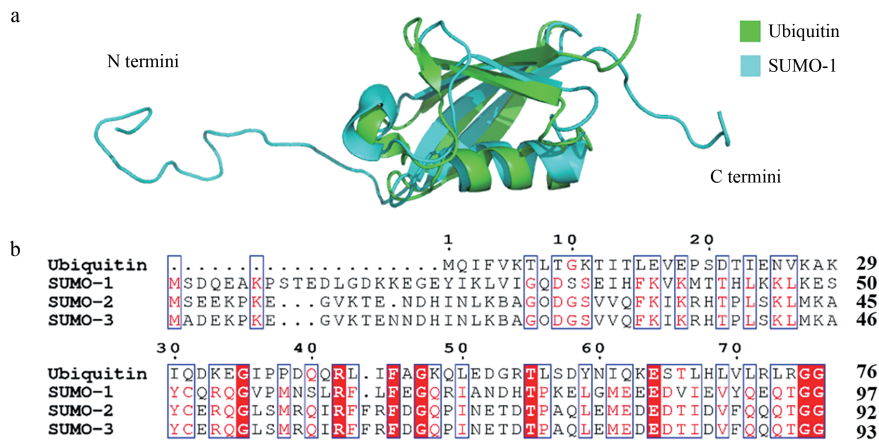


Figure 1 Comparison of small ubiquitin-like modifier (SUMO) and ubiquitin. a: Structural alignment of the backbones of SUMO-1 (cyan, PDB: 1a5r) and ubiquitin (green, PDB: 1ubq); b: Sequence alignment of H. sapiens Ub, SUMO-1, SUMO-2, and SUMO-3 was made using ESPript 3.0. Positions that are completely consistent in all sequences are shaded dark red. Positions that are three identical in all sequences are framed in blue

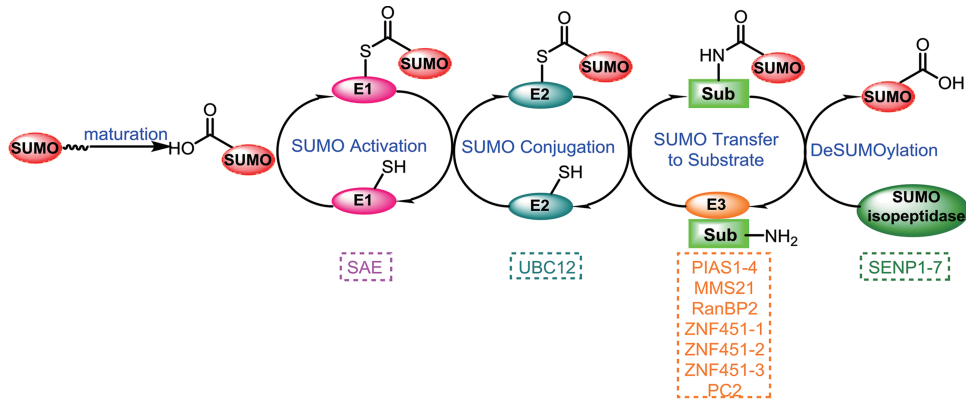


Figure 2 The mechanism of protein SUMOylation and de-SUMOylation. SUMOylation is a process that conjugates matured SUMO to targeted protein substrates *via* enzymatic cascades involving SUMO-activating enzyme E1, SUMO-conjugating enzyme E2 and SUMO ligases E3. Shown are reported SUMOylation E1, E2 and E3. De-SUMOylation is the inverse process of SUMOylation

复等多种病理生理过程。与泛素化不同的是, SUMO 需要经历一个成熟的过程才能进行 SUMOylation, 即 SUMO 前体被 C 端水解酶 (sentrin specific peptidases, SENPs) 水解游离出 Gly97^[3]。与泛素化机制相似, SUMOylation 也是由 SUMO 活化酶 E1 (SUMO activation enzyme, SAE)、SUMO 结合酶 E2、SUMO 连接酶 E3 介导的一系列酶促反应。即成熟的 SUMO 首先以 ATP 依赖的形式与 E1 形成 E1-SUMO 复合物; 随后 E2 被招募, 将活化好的 SUMO 通过转硫醇的过程转移到 E2 酶的半胱氨酸残基上形成 E2-SUMO 复合物; 最后在 E3 酶的作用下将 SUMO 以异肽键的形式共价结合到底物蛋白的赖氨酸残基上 (图 2)。与泛素化不同的是 SUMOylation 只调节底物蛋白的功能活性, 而不影响底物蛋白的降解。

SUMOylation 的底物蛋白众多, 到目前为止, 通

过多肽富集方法和质谱技术, 已经鉴定出 6 000 多个 SUMOylation 的底物蛋白和 40 000 个 SUMO 化的作用位点^[4]。因此 SUMOylation 通路几乎可以调节细胞所有的生理功能及病理过程, 如调控基因表达与转录、细胞核质转运、染色质重塑、生物信号传导、细胞分裂、细胞周期、细胞增殖, 以及亚细胞定位等过程^[1,5,6]。

2 SUMOylation 信号通路失调与肿瘤发生发展

在多种肿瘤的发生和发展中, SUMOylation 通路发现被异常活化^[7], 主要表现为 SUMOs 蛋白水平和 SUMOylation 相关酶的表达上调 (表 1)。

2.1 SUMOylation 通路介导的抗肿瘤机制

由于蛋白通过 SUMOylation 调控其生理平衡, 因此, 阻断肿瘤相关的底物蛋白的 SUMOylation, 即可抑制底物蛋白的功能, 达到抑制肿瘤细胞增殖的目的。在 SUMOylation 介导的众多抗肿瘤机制中, 其与

Table 1 Correlations of SUMOylation dysregulation with cancer

Component of SUMOylation	Upregulated protein	Cancer type
SUMOs	SUMO1-4	Breast, colorectal, glioma, hepatocellular, AML, NSCLS, oral scc, pancreatic
E1	SAE1/2	Breast, cervical, colorectal, gastric, glioblastoma, head and neck, hepatocellular, lung, pancreatic, renal, uterine corpus endometrial
E2	UBC9	Bladder, breast, cervical, cholangio, colorectal, esophageal, gastric, glioblastoma, head and neck, hepatocellular, lung, lymphoma, melanoma, multiple myeloma, ovarian, pancreatic, prostate, renal, testicular germ cell, thymoma, thyroid, uterine
E3	PIAS1	Breast, glioblastoma, multiple myeloma, prostate
	PIAS3	Breast, colorectal, esophageal, gastric, renal Glioblastoma, hepatocellular, lung, prostate
	PIAS4	Glioblastoma, hepatocellular
	RanBP2	Prostate
	RSUME	Renal
	PC2 (CBX4)	Bladder, breast, cholangio, colorectal, esophageal, gastric, liver, lung, melanoma, thyroid, osteosarcoma, pancreatic, prostate, sarcoma, thymoma

Myc 基因的合成致死 (synthetic lethality), 以及激活机体 I 型 IFN 介导的抗肿瘤免疫反应尤为重要。

70% 的癌症患者存在致癌基因 Myc 蛋白的失调, 包括 Myc 基因扩增或过表达^[8]。在多种移植瘤模型中, 沉默 Myc 基因可以显著抑制肿瘤的生长。因此, Myc 很早就被认为是抗肿瘤药物研究的热点靶标^[9], 但由于 Myc 蛋白中缺乏明确的药物分子结合“口袋”, 致使直接靶向肿瘤细胞 Myc 蛋白的小分子抑制剂研究较为困难。近年来, 合成致死在多个靶向药物研究中的成功, 为靶向 Myc 的药物研究带来希望。合成致死是指通过两个非致死基因同时失活导致细胞死亡的现象。这一策略为许多不可成药或难成药的靶标的药物研究提供了新的思路。

2012 年, Kessler 等^[10]通过 RNA 干扰技术筛选出 SAE2 是 Myc 基因的合成致死搭档。进一步机制研究表明, Myc 蛋白的 SUMOylation 修饰是 Myc 依赖的肿瘤细胞生长所必需的, 沉默 SAE2 将抑制 Myc 基因介导的转录程序, 引起 Myc 高表达的细胞有丝分裂过程受阻, 进而导致细胞死亡。随后在多种 Myc 高表达的移植瘤模型中, 沉默 SAE2 显著抑制肿瘤的生长^[10,11]。2017 年, He 等^[12]报道了首个高选择性的 SAE 小分子抑制剂 ML-792, 对 Myc 扩增的肿瘤细胞具有合成致死的作用, 因而具有更强的抗肿瘤作用。

2020 年, Biederstädt 等^[13]发现在 Myc 过表达的胰腺导管癌 PDAC 细胞中, SUMOylation 通路高度活化, SUMOylation 通路相关基因的表达水平提高。在 Myc 过表达的 PDAC 移植瘤模型中, 高选择性的 SAE 小分子抑制剂 ML-93 显著抑制蛋白 SUMOylation 修饰, 并抑制肿瘤的生长。近期, Rohrberg 等^[14]报道 BIRC5、EG5 和 TPX2 也是 Myc 基因的合成致死搭档。重要的

是, 这 3 个蛋白的功能发挥均需要进行 SUMOylation 修饰^[15]。

因此, 对于 Myc 高表达的肿瘤细胞, SUMOylation 抑制剂通过合成致死可以达到协同抗肿瘤作用。

2.2 SUMOylation 抑制机体的先天性免疫应答

研究发现, 类泛素修饰的 E3 连接酶 PIAS 蛋白可以介导多种与免疫调节相关的底物蛋白的 SUMOylation, 进而调控机体的先天性免疫应答。因此, SUMOylation 修饰是机体先天性免疫应答的一个重要过程^[16]。2016 年, Hannoun 等^[17]详细研究了 SUMOylation 的底物蛋白与机体免疫应答之间的关系, 证明 SUMO 蛋白在先天性免疫中应答的作用。

2016 年, Decque 等^[18]发现, 敲除免疫细胞中的 SUMO 修饰的 E2 结合酶 UBC9, 可以阻断 SUMOylation 通路, 进而促进 NF- κ B 依赖的炎症细胞因子和 I 型 IFN 的表达。同时在体内模型中, 敲除 UBC9 可以增加体内炎症细胞因子的水平, 进而增加机体对 LPS 诱导的内毒素休克的敏感性和抗病毒感染的能力。

2018 年, Crowl 等^[19]报道 SUMO2/3 能特异性地阻止自发性的 IFN 应答。在 THP-1 细胞中, UBC9 缺失导致 SUMOylation 被抑制, 进而驱动 IFN 应答, 但机制与目前所有已知的典型的 IFN 应答机制完全不同。

2021 年, Lightcap 等^[20]报道, 临床在研的高选择性的 SAE 抑制剂 TAK-981 可以显著上调免疫细胞中 I 型 IFN 的表达以及激活 I 型 IFN 依赖的先天性免疫细胞, 包括巨噬细胞、NK 细胞、树突细胞及 T 细胞等。在 A20 淋巴瘤细胞小鼠模型中, TAK-981 能够诱导机体产生稳定的抗肿瘤免疫反应。每周给药二次且每次给药 7.5 mg·kg⁻¹ TAK-981 12 天, 1/4 小鼠的肿瘤完全消退, 小鼠的最大耐受剂量可达到 40 mg·kg⁻¹。同时

TAK-981与PD1抗体或抗CTLA4抗体联用可以显著延长CT26和MC38移植瘤小鼠的生存期。

综上所述, SUMOylation通路抑制剂可以通过双重作用模式抑制肿瘤生长, 即阻断SUMOylation抑制肿瘤细胞增殖及刺激I型IFN信号转导增加机体的抗肿瘤免疫反应。

3 靶向SUMOylation通路的小分子抑制剂研究进展

3.1 靶向SUMO活化酶E1 (SAE) 的小分子抑制剂研究进展

SUMO活化酶(SAE)是由SAE1和SAE2/UBA2组成的异源二聚体。其中, SAE负责SUMOylation多级酶联过程的第一步, 也是最关键的决速酶。同时在多种肿瘤细胞中SAE的表达上调, 导致SUMOylation过度活化(表1)。因此, 通过抑制SAE的活性, 可以完全抑制SUMOylation通路的活化, 进而抑制SUMOylation通路过度活化依赖的肿瘤细胞的生长。

目前已报道的SAE抑制剂主要分为天然产物类、半合成的小分子、虚拟筛选的小分子及AMP类似物(表2, 图3~6)。

3.1.1 天然产物类 2009年, Fukuda等^[21]通过筛选500种植物提取物对SUMOylation通路的抑制活性, 发现银杏叶中的提取物主要成分ginkgolic acid (**1**, 图3)和anacardic acid (**2**, 图3)可以有效抑制蛋白的SUMOylation。随后体外SUMOylation通路的测试中, 两者均可有效抑制RanGAP1-C2的SUMOylation, IC_{50} 值分别为3.0和2.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在293T细胞中, 化合物**1**和**2**均能有效且特异性地降低高分子量SUMO偶联物的数量, 进而抑制底物蛋白p53的SUMOylation, 而对高分子量Ub偶联物的数量无影响, 从而显示较好的选择性。进一步机制研究表明, 两者均直接作用于SUMOylation的E1酶, 阻止SUMO1-E1加合物的形成。其中化合物**1**可以抑制多种肿瘤细胞的生长和转移^[22-25]。2019年, Liu等^[26]首次验证了化合物**1**的体内抗肿瘤疗效。在口腔鳞状癌Tca8113细胞的移植瘤小鼠模型中, 通过口服给药的方式, 每天给药一次且每次给药50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 21天后, 化合物**1**显著抑制肿瘤的生长(TGI = 68.5%), 且小鼠体重无变化。机制研究表明, 化合物**1**通过降低底物蛋白SMAD4的SUMOylation抑制细胞的生长和转移。

2009年, Fukuda等^[27]从放线菌培养基中获得一类SAE抑制剂kerriamycin B (**3**, 图3)。化合物**3**同样直接作用于SAE, 特异性地阻止SUMO1-E1加合物的形成, 进而抑制RanGAP1-C2的SUMOylation, 但活性较弱, IC_{50} 值为11.7 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2014年, Takemoto等^[28]再次通过筛选750种植物

和水果提取物, 发现另一天然产物davidiin (**4**, 图3)对SUMOylation通路具有明显抑制。机制研究表明, 化合物**4**同样直接作用于SAE, 特异性地阻止SUMO1-E1加合物的形成, 进而抑制RanGAP1-C2的SUMOylation, IC_{50} 值为0.15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。同时, davidiin可以有效抑制多种肿瘤细胞的增殖, GI_{50} 值为8.3~16.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2015年, Suzawa等^[29]通过基因表达筛选得到了安全性较好的SUMOylation抑制剂tannic acid (**5**, 图3)。化合物**5**同样也是直接作用于SAE, 特异性地阻止SUMO1-E1加合物的形成。在体内外实验中, 化合物**5**明显抑制人肝受体类似物1(LRH1)的SUMOylation, IC_{50} 值为12.8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。但遗憾的是, 化合物**5**对多种肿瘤细胞的增殖无明显抑制作用。

3.1.2 半合成的小分子 2010年, Lu等^[30]基于SUMOylation过程中形成的SUMO-AMP复合物, 设计并合成该复合物的类似物SUMO-AMSN (**6**, 图4)和SUMO-AVSN (**7**, 图4), 两者均高效且特异性地抑制SAE的活性, 阻止SUMO信号传递, 而不影响其他同源的E1s酶。

2014年, Zhao等^[31]利用噬菌体展示技术, 基于SUMO C末端序列研究设计出SUMO蛋白模拟物pS50 (**8**, 图4)。其中化合物**8**与SAE的结合能力比SUMO强, 因此在对底物蛋白进行SUMOylation修饰的过程中, 化合物**8**竞争性地替代SUMO与SAE结合, 并依次转移到UBC9和底物蛋白上, 但并不影响底物蛋白的功能。

3.1.3 虚拟筛选的小分子 2013年, 基于SUMO-E1复合物的晶体结构, Kumar等^[32]对77 931个小分子化合物库进行虚拟筛选, 获得脲类结构的化合物**9**(图5), 为ATP竞争性的SAE抑制剂。化合物**9**可以剂量依赖地抑制RanGAP1-C2的SUMOylation, IC_{50} 值为14.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。但是化合物**9**结构上的对称性使其溶解度较差, 随后进一步的结构优化获得溶解度改善的化合物**10**^[33]和**11**^[34](图5), 两者均能剂量依赖地抑制RanGAP1-C2的SUMOylation, IC_{50} 值分别为13.4和13.8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2019年, Li等^[35]对290 921个小分子化合物库进行高通量筛选, 获得首个SAE的变构抑制剂COH000 (**12**, 图5)。细胞内外实验中, COH000剂量依赖地特异性抑制底物的SUMOylation修饰, IC_{50} 值为0.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 而对同源的ubiquitylation或NEDDylation修饰无明显抑制作用。在Raji和HCT-116细胞中, COH000可以诱导miR-34b的表达, 降低c-Myc mRNA和蛋白的水平。通过皮下注射的给药方式, 每天给药一次且每次给药10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 14天后, COH000显著抑制HCT-116移

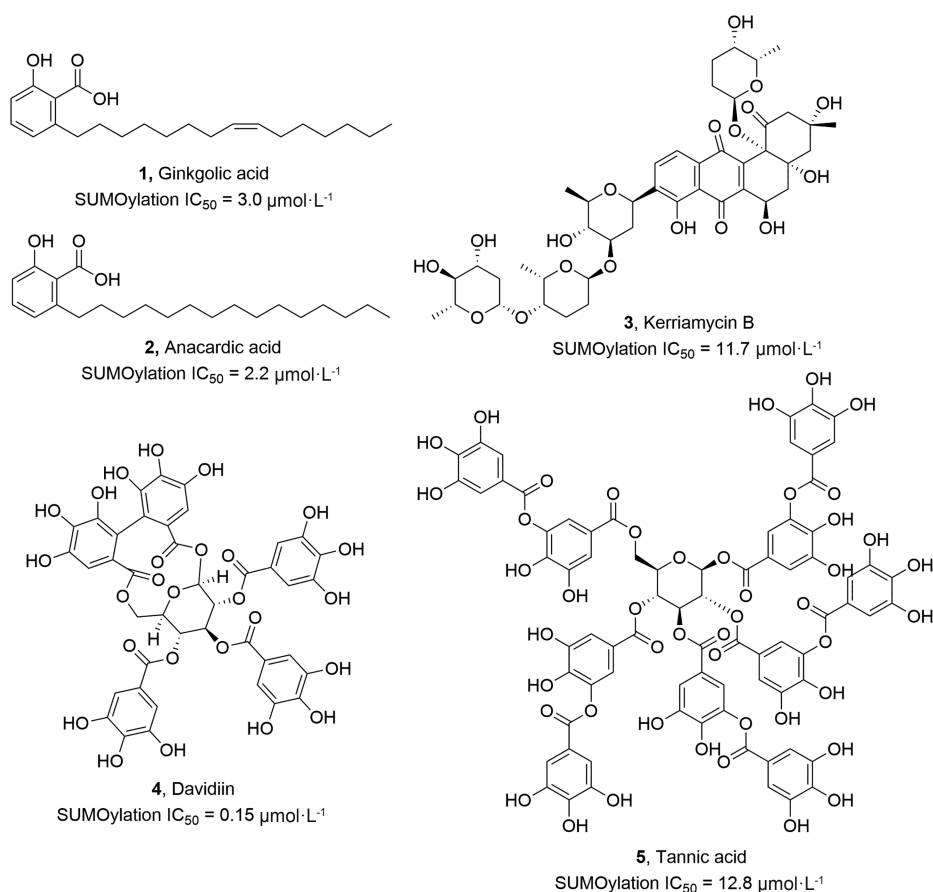


Figure 3 Natural product-based SAE inhibitors

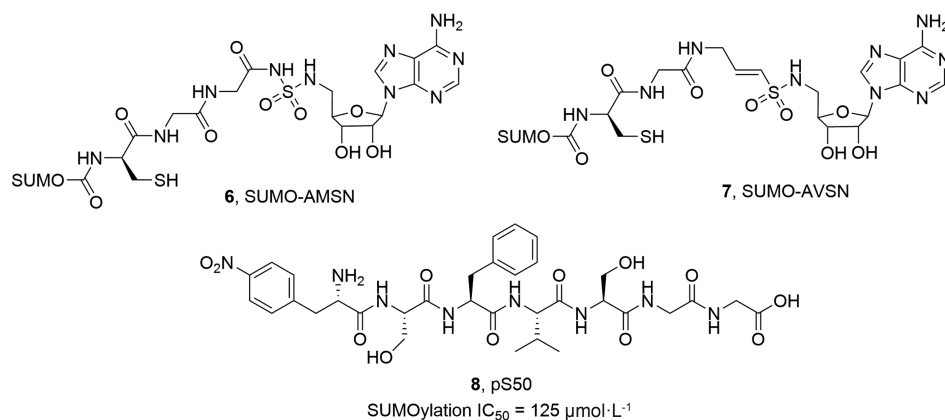


Figure 4 Semi-synthetic SAE inhibitors

植瘤小鼠模型的肿瘤生长,且小鼠体重无变化。进一步机制研究表明,COH000特异性与Cys30共价结合,而对SAE其他Cys残基无相互作用,诱导细胞凋亡和降低c-Myc表达。有意思的是,COH000在抑制SAE酶活性的同时,能促进SAE2的泛素化降解,进而降低SAE2的水平。因此,COH000能通过双重机制抑制SUMOylation通路活性。

3.1.4 AMP类似物 Millenium公司通过高通量筛选

得到*N*-苄基腺苷活性化合物,对其进行结构修饰得到了高活性的Pan-E1酶抑制剂化合物**13**^[36](图6),对E1酶的 IC_{50} 值均小于 $10 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。研究人员首先采取骨架跃迁的策略将化合物**13**的嘧啶并咪唑母核中的咪唑环开环,同时使用五元碳糖环替代呋喃糖环后进一步结构优化得到含嘧啶类母核的SAE/NAE双靶化合物**14**(图6),对SAE及其同源E1酶NAE的 IC_{50} 值分别为 $1 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $29 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$,而对SAE同源的E1酶UAE

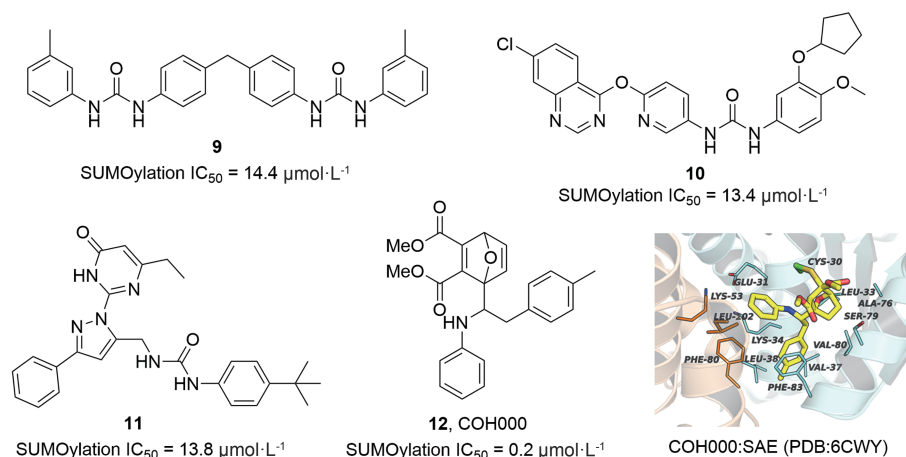


Figure 5 Virtually screened small molecule SAE inhibitors

几乎无明显抑制作用, IC_{50} 值 $> 1\ 000\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。接着移除五元碳糖环 2' 位的羟基后得到对 NAE 选择性提高的化合物 **15** (图 6), IC_{50} 值分别为 $2\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $190\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。最后对 3-吡唑取代基 N1 位的取代基进行优化得到选择性 SAE 抑制剂 ML-792^[12,37] (**16**, 图 6), IC_{50} 值为 $0.4\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 对 SAE 同源的 E1 酶 NAE 和 UAE 的 IC_{50} 值分别为 $228\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $> 1\ 000\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在 HCT-116 细胞中, ML-792 对 SUMOylation 通路抑制的 IC_{50} 值为 $10\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 对其他多种肿瘤细胞也具有强效的抗增殖作用, IC_{50} 值为 $0.06\sim 0.45\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在 HCT-116 细胞的移植瘤小鼠模型中, 通过皮下注射的给药方式, 每天给药一次且每次给药 $150\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 24 天后, ML-792 显著抑制肿瘤的生长, 且小鼠体重无变化^[37]。

研究人员使用不同杂环替代 ML-792 中的 3-吡唑环后, 进一步的成药性优化得到更高选择性的 SAE 抑制剂 ML-93 (**17**, 图 6) 和 TAK981^[37] (**18**, 图 6), IC_{50} 值分别为 $0.4\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $1\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 对 NAE 的 IC_{50} 值分别为 386 和 $960\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 而对 UAE 均无明显抑制作用。

在 HCT-116 细胞中, 两者对 SUMOylation 通路抑制的 IC_{50} 值分别为 $3\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $15\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 抗增殖活性的 IC_{50} 值为 $63\sim 110\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在大鼠体内, 相比于 ML-792, ML-93 和 TAK-981 的 PK 性质略微改善, 但总体仍不理想。在多种移植瘤小鼠模型中, 更低剂量的 ML-93 和 TAK-981 即可达到与 ML-792 相当的抗肿瘤效应, 如在 HCT-116 细胞的移植瘤小鼠模型 21 天的治疗过程中, 每天给药两次且每次给药 $150\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ML-792 与每天给药一次且每次给药 $50\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ML-93 或每周给药三次且每次给药 $50\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ TAK-981 的抗肿瘤效应相当; 在 OCI-Ly10 细胞的移植瘤小鼠模型 21 天的治疗过程中, 每天给药两次且每次给药 $150\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ML-792 与每周给药两次且每次给药 $75\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ML-93 或每周给药三次且每次给药 $25\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ TAK-981 的抗肿瘤效应相当^[37]。基于 TAK-981 优异的临床前抗肿瘤疗效及可接受的安全性, 该化合物已进入临床研究, 目前处于临床 I 期, 用于治疗成人实体瘤和淋巴瘤 (NCT03648372、NCT04074330 和 NCT04381650)。

Table 2 SAE inhibitors and their pharmacologic properties

Class	Inhibitor	IC_{50}	Reference
Natural products	Ginkgolic acid (1)	SUMOylation $IC_{50} = 3.0\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	[21]
	Anacardic acid (2)	SUMOylation $IC_{50} = 2.2\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	[21]
	Kerriamycin B (3)	SUMOylation $IC_{50} = 11.7\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	[27]
	Davidiin (4)	SUMOylation $IC_{50} = 0.15\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	[28]
	Tannic acid (5)	SUMOylation $IC_{50} = 12.8\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	[29]
Semi-synthetic	SUMO-AMSN (6)	-	[30]
	SUMO-AVSN (7)	-	[30]
	pS50 (8)	SUMOylation $IC_{50} = 125\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	[31]
Virtual screening	9	SUMOylation $IC_{50} = 14.4\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	[32]
	10	SUMOylation $IC_{50} = 13.4\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	[33]
	11	SUMOylation $IC_{50} = 13.8\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	[34]
	COH000 (12)	SUMOylation $IC_{50} = 0.2\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	[35]
AMP analogues	13	SAE: $IC_{50} < 10\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	[36]
	ML-792 (16)	SAE: $IC_{50} = 0.4\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	[12]
	ML-93 (17)	SAE: $IC_{50} = 0.4\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	[37]
	TAK981 (18)	SAE: $IC_{50} = 1\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	[37]

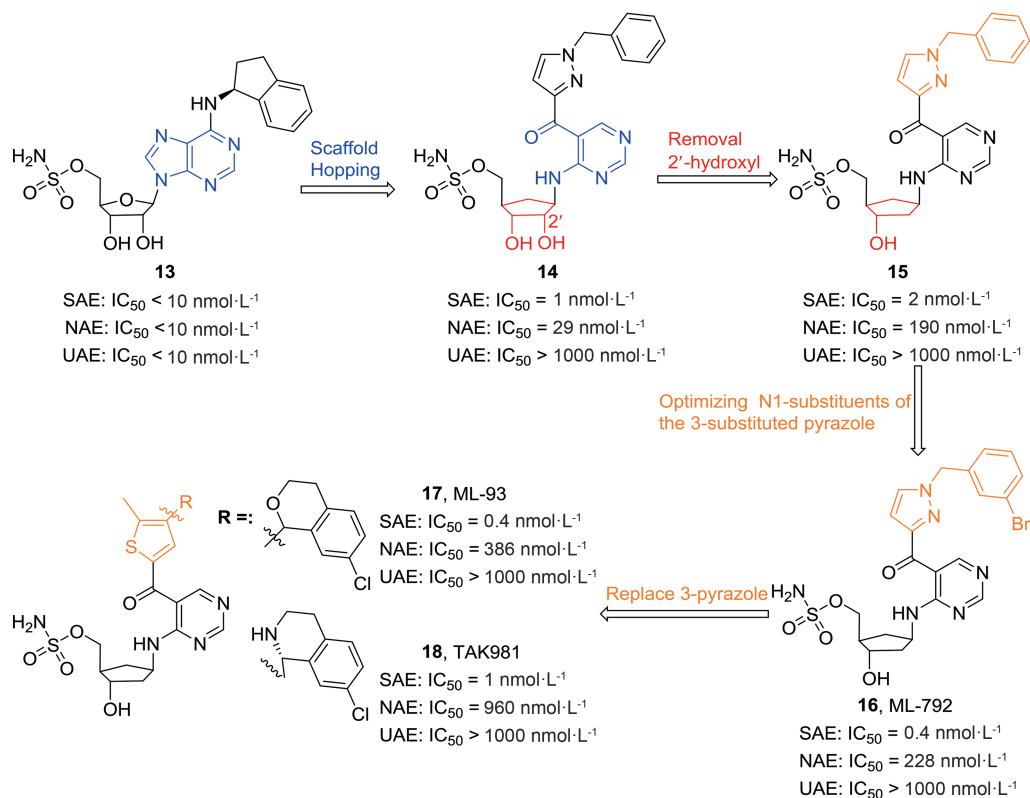


Figure 6 SAE inhibitors of AMP analogues

3.2 靶向SUMO结合酶E2 (UBC9)的小分子抑制剂研究进展

SUMO结合酶(UBC9)是SUMOylation信号通路中的唯一E2结合酶,同时在多种肿瘤细胞中UBC9的表达上调,导致SUMOylation过度活化(表1)。因此,通过抑制UBC9的活性,可以完全抑制SUMOylation信号通路活性,进而抑制SUMOylation通路过度活化导致的肿瘤细胞的生长。目前已报道的UBC9抑制剂主要分为天然产物类和合成小分子类(表3,图7、8)。

3.2.1 天然产物类 Fukuda课题组^[38]长期致力于寻找SUMOylation通路的小分子抑制剂,并且已经发现多个天然产物类的SAE抑制剂。2013年,该课题组报道第一个选择性的UBC9抑制剂spectomycin B1(**19**,图7), K_D 值为 $4.3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。化合物**19**直接与SUMO E2结合,特异性地阻断E2-SUMO中间体的形成,而不与SUMO E1结合。在体外的SUMOylation实验中,化合物**19**有效抑制RanGAP1-C2的SUMOylation, IC_{50} 值为 $4.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。重要的是,化合物**19**可以降低ER依赖基因的表达和抑制MCF7细胞的增殖,证明其具有抗乳腺癌潜力。同时,结构类似物chaetochromin A(**20**,图7)和viomellein(**21**,图7)也表现出与化合物**19**相似的SUMOylation抑制活性^[38]。

3.2.2 合成小分子类 2013年, Kim等^[39]使用电泳迁

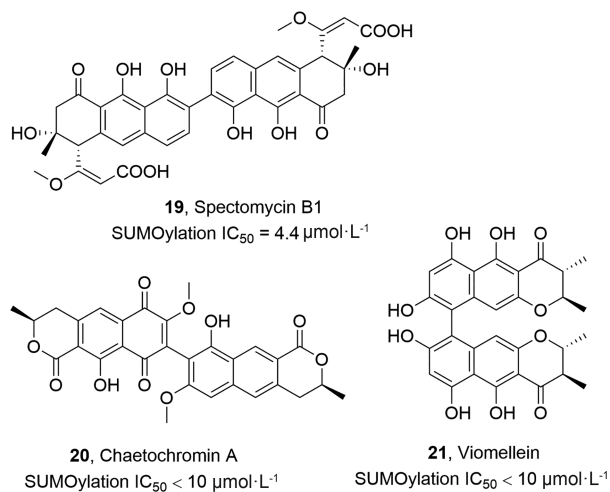


Figure 7 Natural product-based UBC9 inhibitors

移率实验(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)实时监测细胞内的SUMOylation的状态,发现黄酮类衍生物2-D08(**22**,图8)具有UBC9抑制活性, IC_{50} 值为 $6.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。2-D08特异性地阻止SUMO从UBC9转移到底物上,而对同源的ubiquitylation通路无明显抑制作用。在乳腺癌细胞中,2-D08可以有效抑制topo-I的SUMOylation。近期, Zhou等^[40]报道2-D08通过抑制NOX2的SUMOylation,导致ROS蓄积,进而介导AML细胞的凋亡。

2013年, GSK公司开发了一种用于高通量筛选的荧光偏振(FP)检测方法, 发现二氨基嘧啶类UBC9抑制剂GSK145A^[41] (**23**, 图8), IC₅₀值为12.5 μmol·L⁻¹。机制研究表明, GSK145A可能作用于UBC9的底物结合位点, 与底物竞争性地结合UBC9, 进而抑制底物蛋白的SUMOylation。

2014年, Kumar等^[42]利用分子建模方法预测UBC9潜在的成药性口袋, 并对ZINC数据库进行虚拟筛选, 获得UBC9抑制剂化合物**24**(图8), 但活性较弱, IC₅₀值为46.3 μmol·L⁻¹。

2016年, Hewitt等^[43]基于UBC9的晶体结构进行基于片段的药物筛选, 获得UBC9的变构抑制剂化合物**25**和**26**(图8), 但两者仅具有微弱的SUMOylation抑制活性, IC₅₀值分别为3.0和5.8 mmol·L⁻¹, 进一步基于片段的结构优化有望获得活性提高的抑制剂。

2017年, Zlotkowski等^[44]构建了小分子芯片的新型高通量药物筛选平台, 筛选得到UBC9抑制剂三环化合物**27**(图8), IC₅₀值为74 μmol·L⁻¹。在微摩尔浓度下, 化合物**27**可以有效抑制RanGAP1的SUMOylation。

3.3 SUMO1蛋白降解剂的研究进展

SUMOylation在胚胎发育过程中具有重要的调控作用^[45], 其中UBC9和SUMO2对胚胎的存活是必不可少的, 敲除UBC9或者SUMO2的胚胎在早期发育过程中死亡, 而SUMO1缺失的小鼠可以正常存活^[46-50]。因此, 选择性抑制SUMO1介导的SUMOylation具有较好的安全性。同时, SUMO1在多种肿瘤细胞中被发现高表达, 敲除后会抑制肿瘤细胞的增殖并延缓移植瘤模型中肿瘤的生长^[51-54]。因此, 靶向SUMO1介导的SUMOylation的抑制剂具有较好的抗肿瘤药物研发的前景。遗憾的是, 目前尚无特异性抑制SUMO1介导的SUMOylation抑制剂报道。

靶向蛋白降解(targeted protein degradation, TPD)技术凭借其在不可成药靶点和药物耐药性方面的优势, 成为近年来药物研究的热潮^[55]。目前已有多个PROTACs和分子胶形式的降解剂成功进入临床试验^[56]。2021年, Bellail等^[57]从美国国立卫生研究所

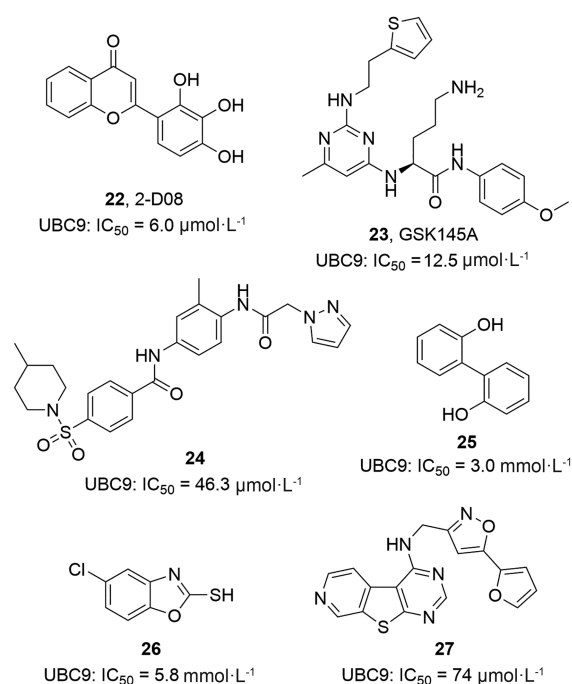


Figure 8 Synthetic small-molecule inhibitors of UBC9

(NCI)的类药性化合物库中, 筛选得到可以特异性靶向降解SUMO1的苗头化合物CPD1 (**28**, 图9)。CPD1特异性地降低SUMO1蛋白水平, 而不影响SUMO1 mRNA水平。进一步的成药性优化获得首个高选择性高效的SUMO1降解剂HB007 (**29**, 图9)。HB007通过选择性降解SUMO1抑制多种肿瘤细胞的增殖, IC₅₀值为0.3~1.5 μmol·L⁻¹, 相对于对正常细胞的增殖抑制作用强10倍。在多种患者来源的移植瘤(PDX)小鼠模型中, HB007均能显著降解SUMO1蛋白水平和肿瘤的生长, 并且延长小鼠的生存期。

4 总结与展望

蛋白质的翻译后修饰是蛋白质稳定和功能发挥的重要调控手段。除了常见的无机和有机小分子修饰(甲基化、乙酰化、磷酸化、糖基化、棕榈酰化等)外, 还有一类用小肽进行的蛋白质翻译后修饰, 包括泛素化(ubiquitination)、类泛素化(SUMOylation)、NEDD8化(neddylaton)等。与其他两类小肽类修饰一样,

Table 3 UBC9 inhibitors and their pharmacologic properties

Class	Inhibitor	IC ₅₀	Reference
Natural products	Spectomycin B1 (19)	SUMOylation IC ₅₀ = 4.4 μmol·L ⁻¹	[38]
	Chaetochromin A (20)	SUMOylation IC ₅₀ < 10 μmol·L ⁻¹	[38]
	Viomellein (21)	SUMOylation IC ₅₀ < 10 μmol·L ⁻¹	[38]
Synthetic	2-D08 (22)	UBC9: IC ₅₀ = 6.0 μmol·L ⁻¹	[39]
	GSK145A (23)	UBC9: IC ₅₀ = 12.5 μmol·L ⁻¹	[41]
	24	UBC9: IC ₅₀ = 46.3 μmol·L ⁻¹	[42]
	25	UBC9: IC ₅₀ = 3.0 mmol·L ⁻¹	[43]
	26	UBC9: IC ₅₀ = 5.8 mmol·L ⁻¹	[43]
	27	UBC9: IC ₅₀ = 74 μmol·L ⁻¹	[44]

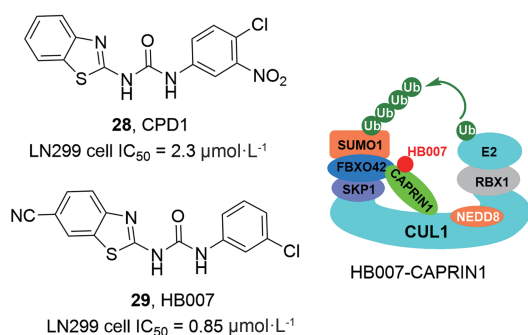


Figure 9 Specific SUMO1 degraders

SUMOylation 也是一种重要的蛋白质翻译后修饰, 参与调节细胞分化、细胞周期、核转录、蛋白间的相互作用、DNA 修复等多种病理生理过程。在多种肿瘤细胞中 SUMOylation 通路异常活化, 敲除 SUMOylation 通路中关键酶具有显著的抗肿瘤效应。因此, 靶向 SUMOylation 通路关键的调控蛋白已成为抗肿瘤药物研发的重要领域。得益于机制研究的不断深入, 近年来涌现出了结构类型多样的 SUMOylation 通路抑制剂, 主要集中在 SAE 抑制剂和 UBC9 抑制剂。其中, 高选择性高效的 SAE 抑制剂 TAK-981 凭借其优异的临床前抗肿瘤疗效及可接受的安全性已成功进入临床研究, 目前处于临床 I 期, 用于治疗成人实体瘤和淋巴瘤。令人欣慰的是, TAK-981 可以显著上调免疫细胞中 I 型 IFN 的表达及激活 I 型 IFN 依赖的先天性免疫应答, 在体内移植瘤模型中, TAK-981 能够诱导机体产生稳定的抗肿瘤免疫反应进而显著抑制肿瘤生长, 同时 TAK-981 与免疫检查点抑制剂联用能显著延长移植瘤小鼠的生存期。因此, SAE 抑制剂研究具有较好的应用前景, 但最终患者临床是否受益, 安全性是否可控, 还需等待大量患者的临床试验结果。

SUMOylation 在胚胎发育过程中起到重要的作用, 尤其是 UBC9 和 SUMO2 对胚胎的存活必不可少, 因此 SUMOylation 通路抑制剂的安全性一直是科研人员最担心的因素。与 UBC9 和 SUMO2 不同, SUMO1 缺失的小鼠可以正常存活。因此, 选择性抑制 SUMO1 介导的 SUMOylation 的药物将具有更高的安全性。近期, Bellail 等^[57]报道了首个高选择性 SUMO1 降解剂 HB007, 体内外实验也证实能显著且特异性降解 SUMO1 的蛋白水平, 进而抑制移植瘤模型中肿瘤的生长, 值得进一步研究。

综上所述, SUMOylation 通路抑制剂通过双重作用模式抑制肿瘤生长, 既通过阻断 SUMOylation 通路抑制肿瘤细胞增殖, 同时通过刺激 I 型 IFN 信号转导增加机体的抗肿瘤免疫反应。因此, 靶向 SUMOylation

通路的抑制剂具有较好的研发潜力。虽然目前报道的 SUMOylation 通路抑制剂大多数只停留在细胞活性水平, 类药性也存在明显缺陷, 但这些抑制剂具有丰富的结构类型, 以及目前众多前沿结构优化技术, 将为后续 SUMOylation 通路抑制剂的研发提供了坚实的基础, 相信将有更多药效好、安全性和选择性高的 SUMOylation 抑制剂进入临床研究和验证, 最终惠及肿瘤病患。

作者贡献: 熊朝栋负责文献检索、文章撰写和绘制插图; 刁嘉铭协助文献检索; 张翱指导和文章修改。

利益冲突: 本论文所有作者均声明无利益冲突。

References

- [1] Johnson ES. Protein modification by SUMO [J]. *Annu Rev Biochem*, 2004, 73: 355-382.
- [2] Wilkinson KA, Henley JM. Mechanisms, regulation and consequences of protein SUMOylation [J]. *Biochem J*, 2010, 428: 133-145.
- [3] Nayak A, Müller S. SUMO-specific proteases/isopeptidases: SENPs and beyond [J]. *Genome Biol*, 2014, 15: 422.
- [4] Cappadocia L, Lima CD. Ubiquitin-like protein conjugation: structures, chemistry, and mechanism [J]. *Chem Rev*, 2018, 118: 889-918.
- [5] Han ZJ, Feng YH, Gu BH, et al. The post-translational modification, SUMOylation, and cancer (Review) [J]. *Int J Oncol*, 2018, 52: 1081-1094.
- [6] Sahin U, De Thé H, Lallemand-Breitenbach V. Sumoylation in physiology, pathology and therapy [J]. *Cells (Basel)*, 2022, 11: 814.
- [7] Kukkula A, Ojala VK, Mendez LM, et al. Therapeutic potential of targeting the SUMO pathway in cancer [J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13: 4402.
- [8] Dang C. Myc on the path to cancer [J]. *Cell*, 2012, 149: 22-35.
- [9] Stine ZE, Walton ZE, Altman BJ, et al. Myc, metabolism, and cancer [J]. *Cancer Discov*, 2015, 5: 1024-1039.
- [10] Kessler JD, Kahle KT, Sun T, et al. A SUMOylation-dependent transcriptional subprogram is required for Myc-driven tumorigenesis [J]. *Science*, 2012, 335: 348-353.
- [11] Liu X, Xu Y, Pang Z, et al. Knockdown of SUMO-activating enzyme subunit 2 (SAE2) suppresses cancer malignancy and enhances chemotherapy sensitivity in small cell lung cancer [J]. *J Hematol Oncol*, 2015, 8: 67.
- [12] He X, Riceberg J, Soucy T, et al. Probing the roles of SUMOylation in cancer cell biology by using a selective SAE inhibitor [J]. *Nat Chem Biol*, 2017, 13: 1164-1171.
- [13] Biederstädt A, Hassan Z, Schneeweis C, et al. SUMO pathway inhibition targets an aggressive pancreatic cancer subtype [J]. *Gut*, 2020, 69: 1472-1482.

- [14] Rohrberg J, Mark D, Rugo HS, et al. Myc dysregulates mitosis, revealing cancer vulnerabilities [J]. *Cell Rep*, 2020, 30: 3368-3382.e7.
- [15] Abrieu A, Liakopoulos D. How does SUMO participate in spindle organization? [J]. *Cells (Basel)*, 2019, 8: 801.
- [16] Shuai K, Liu B. Regulation of gene-activation pathways by PIAS proteins in the immune system [J]. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5: 593-605.
- [17] Hannoun Z, Maarifi G, Chelbi-Alix MK. The implication of SUMO in intrinsic and innate immunity [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2016, 29: 3-16.
- [18] Decque A, Joffre O, Magalhaes JG, et al. Sumoylation coordinates the repression of inflammatory and anti-viral gene-expression programs during innate sensing [J]. *Nat Immunol*, 2016, 17: 140-149.
- [19] Crowl JT, Stetson DB. SUMO2 and SUMO3 redundantly prevent a noncanonical type I interferon response [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115: 6798-6803.
- [20] Lightcap ES, Yu P, Grossman S, et al. A small-molecule SUMOylation inhibitor activates antitumor immune responses and potentiates immune therapies in preclinical models [J]. *Sci Transl Med*, 2021, 13: eaba7791.
- [21] Fukuda I, Ito A, Hirai G, et al. Ginkgolic acid inhibits protein SUMOylation by blocking formation of the E1-SUMO intermediate [J]. *Chem Biol*, 2009, 16: 133-140.
- [22] Baek SH, Ko JH, Lee JH, et al. Ginkgolic acid inhibits invasion and migration and TGF- β -induced EMT of lung cancer cells through PI3K/Akt/mTOR inactivation [J]. *J Cell Physiol*, 2017, 232: 346-354.
- [23] Hamdoun S, Efferth T. Ginkgolic acids inhibit migration in breast cancer cells by inhibition of NEMO sumoylation and NF- κ B activity [J]. *Oncotarget*, 2017, 8: 35103-35115.
- [24] Ma J, Duan W, Han S, et al. Ginkgolic acid suppresses the development of pancreatic cancer by inhibiting pathways driving lipogenesis [J]. *Oncotarget*, 2015, 6: 20993-21003.
- [25] Zhou C, Li X, Du W, et al. Antitumor effects of ginkgolic acid in human cancer cell occur *via* cell cycle arrest and decrease the Bcl-2/Bax ratio to induce apoptosis [J]. *Chemotherapy*, 2010, 56: 393-402.
- [26] Liu K, Wang X, Li D, et al. Ginkgolic acid, a SUMO-1 inhibitor, inhibits the progression of oral squamous cell carcinoma by alleviating SUMOylation of SMAD4 [J]. *Mol Ther Oncol*, 2020, 16: 86-99.
- [27] Fukuda I, Ito A, Uramoto M, et al. Kerriamycin B inhibits protein SUMOylation [J]. *J Antibiot (Tokyo)*, 2009, 62: 221-224.
- [28] Takemoto M, Kawamura Y, Hirohama M, et al. Inhibition of protein SUMOylation by davidiin, an ellagitannin from *Davidia involucrata* [J]. *J Antibiot (Tokyo)*, 2014, 67: 335-338.
- [29] Suzawa M, Miranda DA, Ramos KA, et al. A gene-expression screen identifies a non-toxic sumoylation inhibitor that mimics SUMO-less human LRH-1 in liver [J]. *Elife*, 2015, 4: e09003.
- [30] Lu X, Olsen SK, Capili AD, et al. Designed semisynthetic protein inhibitors of Ub/Ubl E1 activating enzymes [J]. *J Am Chem Soc*, 2010, 132: 1748-1749.
- [31] Zhao B, Villhauer EB, Bhuripanyo K, et al. SUMO-mimicking peptides inhibiting protein SUMOylation [J]. *Chembiochem*, 2014, 15: 2662-2666.
- [32] Kumar A, Ito A, Hirohama M, et al. Identification of sumoylation activating enzyme 1 inhibitors by structure-based virtual screening [J]. *J Chem Inf Model*, 2013, 53: 809-820.
- [33] Kumar A, Ito A, Hirohama M, et al. Identification of quinazolinyl-oxo biaryl urea as a new class of SUMO activating enzyme 1 inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2013, 23: 5145-5149.
- [34] Kumar A, Ito A, Hirohama M, et al. Identification of new SUMO activating enzyme 1 inhibitors using virtual screening and scaffold hopping [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2016, 26: 1218-1223.
- [35] Li YJ, Du L, Wang J, et al. Allosteric inhibition of ubiquitin-like modifications by a class of inhibitor of SUMO-activating enzyme [J]. *Cell Chem Biol*, 2019, 26: 278-288.e6.
- [36] Brownell JE, Sintchak MD, Gavin JM, et al. Substrate-assisted inhibition of ubiquitin-like protein-activating enzymes: the NEDD8 E1 inhibitor MLN4924 forms a NEDD8-AMP mimetic *in situ* [J]. *Mol Cell*, 2010, 37: 102-111.
- [37] Langston SP, Grossman S, England D, et al. Discovery of TAK-981, a first-in-class inhibitor of SUMO-activating enzyme for the treatment of cancer [J]. *J Med Chem*, 2021, 64: 2501-2520.
- [38] Hirohama M, Kumar A, Fukuda I, et al. Spectomycin B1 as a novel SUMOylation inhibitor that directly binds to SUMO E2 [J]. *ACS Chem Biol*, 2013, 8: 2635-2642.
- [39] Kim Y, Nagy K, Keyser S, et al. An electrophoretic mobility shift assay identifies a mechanistically unique inhibitor of protein sumoylation [J]. *Chem Biol*, 2013, 20: 604-613.
- [40] Zhou P, Chen X, Li M, et al. 2-D08 as a SUMOylation inhibitor induced ROS accumulation mediates apoptosis of acute myeloid leukemia cells possibly through the deSUMOylation of NOX2 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 513: 1063-1069.
- [41] Brandt M, Szewczuk LM, Zhang H, et al. Development of a high-throughput screen to detect inhibitors of TRPS1 SUMOylation [J]. *Assay Drug Dev Technol*, 2013, 11: 308-325.
- [42] Kumar A, Ito A, Hirohama M, et al. Identification of SUMOylation inhibitors targeting a predicted pocket in Ubc9 [J]. *J Chem Inf Model*, 2014, 54: 2784-2793.
- [43] Hewitt WM, Lountos GT, Zlotkowski K, et al. Insights into the allosteric inhibition of the SUMO E2 enzyme Ubc9 [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2016, 55: 5703-5707.
- [44] Zlotkowski K, Hewitt WM, Sinniah RS, et al. A small-molecule microarray approach for the identification of E2 enzyme inhibitors in ubiquitin-like conjugation pathways [J]. *SLAS Discov*,

- 2017, 22: 760-766.
- [45] Lomelí H, Vázquez M. Emerging roles of the SUMO pathway in development [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2011, 68: 4045-4064.
- [46] Nacerddine K, Lehembre F, Bhaumik M, et al. The SUMO pathway is essential for nuclear integrity and chromosome segregation in mice [J]. *Dev Cell*, 2005, 9: 769-779.
- [47] Yuan H, Zhou J, Deng M, et al. Small ubiquitin-related modifier paralogs are indispensable but functionally redundant during early development of zebrafish [J]. *Cell Res*, 2010, 20: 185-196.
- [48] Evdokimov E, Sharma P, Lockett SJ, et al. Loss of SUMO1 in mice affects RanGAP1 localization and formation of PML nuclear bodies, but is not lethal as it can be compensated by SUMO2 or SUMO3 [J]. *J Cell Sci*, 2008, 121: 4106-4113.
- [49] Zhang FP, Mikkonen L, Toppari J, et al. Sumo-1 function is dispensable in normal mouse development [J]. *Mol Cell Biol*, 2008, 28: 5381-5390.
- [50] Wang L, Wansleben C, Zhao S, et al. SUMO2 is essential while SUMO3 is dispensable for mouse embryonic development [J]. *EMBO Rep*, 2014, 15: 878-885.
- [51] Guo WH, Yuan LH, Xiao ZH, et al. Overexpression of SUMO-1 in hepatocellular carcinoma: a latent target for diagnosis and therapy of hepatoma [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2011, 137: 533-541.
- [52] Zhang H, Kuai X, Ji Z, et al. Over-expression of small ubiquitin-related modifier-1 and sumoylated p53 in colon cancer [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2013, 67: 1081-1087.
- [53] Alves M, Delgado A, Balducci I, et al. Study of MDM2 and SUMO-1 expression in actinic cheilitis and lip cancer [J]. *Arch Dermatol Res*, 2014, 306: 837-841.
- [54] Bellail AC, Olson JJ, Hao C. SUMO1 modification stabilizes CDK6 protein and drives the cell cycle and glioblastoma progression [J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 4234.
- [55] Wang Y, Long J, Chang Q, et al. The application of small molecule PROTAC in researches of different targets [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 446-452.
- [56] Békés M, Langley DR, Crews CM. PROTAC targeted protein degraders: the past is prologue [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2022, 21: 181-200.
- [57] Bellail AC, Jin HR, Lo HY, et al. Ubiquitination and degradation of SUMO1 by small-molecule degraders extends survival of mice with patient-derived tumors [J]. *Sci Transl Med*, 2021, 13: eabh1486.