

基于 PROTACs 策略的抗肿瘤药物研究进展

段迎超*, 翟晓雨, 秦文平, 关圆圆

(新乡医学院药学院, 河南 新乡 453003)

摘要: 蛋白水解靶向嵌合分子 (protein proteolysis-targeting chimeras, PROTACs) 是一种杂合双功能小分子化合物, 通过将目标靶蛋白和细胞内的 E3 泛素连接酶拉近, 利用泛素-蛋白酶体途径特异性的降解靶蛋白。近年来, CRL4^{CRBN}、CRL2^{VHL}、cIAP 等 E3 泛素连接酶特异性小分子配体的发现, 使 PROTACs 技术取得了巨大的突破, 利用 PROTACs 实现了对溴结构域蛋白 4 (bromodomain-containing protein 4, BRD4)、雌激素受体 (estrogen receptor, ER) 和雄激素受体 (androgen receptor, AR) 等多种癌症相关蛋白的降解, 展现出了小分子抑制剂类抗肿瘤药物不具备的独特优势, 是抗肿瘤药物研发的新策略, 有望在靶向抗肿瘤药物研究方面实现新的突破。本文详细总结了 PROTACs 技术在抗肿瘤药物研发中的研究进展, 并总结了其所面临的问题与挑战。

关键词: 蛋白水解靶向嵌合分子; 抗肿瘤; 降解剂

中图分类号: R916

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 12-1801-10

Advances in the treatment of cancer by PROTACs

DUAN Ying-chao*, ZHAI Xiao-yu, QIN Wen-ping, GUAN Yuan-yuan

(School of Pharmacy, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China)

Abstract: Proteolysis-targeting chimeras (PROTACs) are small-molecule protein degraders based on the ubiquitin-proteasome system. Recently, the development of specific small-molecule ligands for several E3 ligases (CRL4^{CRBN}, CRL2^{VHL} and cIAP) have significantly advanced the PROTACs technology. Several PROTACs against various oncogenic proteins including bromodomain-containing protein 4 (BRD4), estrogen receptor (ER) and androgen receptor (AR) have been developed and considered a novel approach for therapy of cancers. There are advantages of the new technology over the traditional small-molecule strategies. This review article provides a summary on the recent progress in the small-molecule-based PROTACs as antitumor drugs, and the challenges of this technology.

Key words: protein proteolysis-targeting chimeras; antitumor; degrader

肿瘤作为全球范围内发病率和死亡率都很高的一种疾病, 严重威胁着人类健康, 成为世界各国面临的重要社会问题之一。大量的研究发现肿瘤的发生、发展与一些致癌蛋白的过度表达密切相关, 针对这些致癌蛋白的小分子抑制剂的研发, 让肿瘤的靶向治疗取得了很大的进步。然而, 小分子抑制剂类抗肿瘤

药物的研发也面临着诸多问题: 靶蛋白容易发生结构突变或者激活其他致癌蛋白, 产生耐药性^[1, 2]; 部分蛋白抑制其活性后会反馈性上调蛋白表达, 限制其抗肿瘤活性^[3, 4]; 多数蛋白没有足够大的结合口袋, 如转录因子等非酶蛋白, 开发小分子抑制剂难度较大^[5]; 可逆性小分子抑制剂往往需要较大剂量, 以保证足够的结合率维持疗效, 易出现脱靶效应, 产生不良反应^[6]。

与小分子抑制剂通过结合致癌蛋白活性位点抑制其活性不同, 调控这些致癌蛋白的降解是抗肿瘤

收稿日期: 2017-04-26; 修回日期: 2017-06-21.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81402793).

*通讯作者 Tel: 86-373-3831879, E-mail: duanyingchao1986@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0406

药物研发的另一策略。RNA 干扰^[7]、CRISPR/Cas9^[8]等技术是近年来发展起来的基因敲除技术，因其能够特异而有效地阻断靶基因的表达，已被广泛用于基因功能和疾病治疗研究。但是由于核苷类物质的体内不稳定性、易产生机体免疫应答、体内脱靶效应等问题，限制了其临床应用^[9, 10]。研发可特异性降解致癌蛋白的小分子化合物，成为目前抗肿瘤研究的热点领域之一。

1 PROTACs 降解蛋白机制

泛素介导的蛋白质降解是细胞内蛋白质最主要的负向调节方式。泛素化降解途径可以降解细胞内 80%~90% 泛素化的蛋白质，参与调节细胞周期、增殖、凋亡、转移、基因表达、信号传递等几乎一切生命活动。该过程是在泛素激活酶 E1、泛素结合酶 E2 和泛素连接酶 E3 的协同作用下进行，底物蛋白被泛素化后，在蛋白酶体中被降解，依靠泛素连接酶 E3 对底物蛋白特异的识别能力，决定了泛素介导的蛋白降解具有特异性。

2001 年, Deshaies 课题组^[11]首次报道了一种利用泛素-蛋白酶体降解蛋白质的方法: 蛋白水解靶向嵌合分子 (protein proteolysis-targeting chimeras, PROTACs)。PROTACs 本质上是一种杂合双功能小分子化合物, 其结构中含有两种不同配体: 一个是泛素连接酶 E3 配体, 另一个是与细胞中目标靶蛋白结合配体, 两个配体之间通过连接基相连。PROTACs 通过将目标靶蛋白和细胞内的 E3 拉近, 形成靶蛋白-PROTACs-E3 三元聚合物, 通过 E3 泛素连接酶给目标靶蛋白加上泛素化蛋白标签, 启动细胞内强大的泛素化水解过程, 利用泛素-蛋白酶体途径特异性地降解靶蛋白 (图 1)。

Ciulli 研究小组^[12]利用靶蛋白-PROTACs-E3 三元聚合体的共晶结构和等温滴定量热法实验, 证实 PROTAC 可以通过自身折叠将靶蛋白与 E3 拉近, 三者之间通过相互协同作用埋藏在蛋白质表面, 形成特异性的蛋白-蛋白相互作用, 让靶蛋白-PROTACs-E3 三元聚合物比靶蛋白-PROTACs 和 PROTACs-E3 二元复合物具有更好的稳定性。

2 多肽类 PROTACs 的研究进展

2.1 基于 SCF ^{β -TRCP} E3 的多肽类 PROTACs

2001 年, Deshaies 课题组^[11]报道了第一个 PROTAC 分子 PROTAC-1 (图 2), 首次清晰地展示了 PROTAC 的概念。PROTAC-1 通过连接基将血管生成抑制剂卵假散囊菌素 (ovalicin, OVA) 与核因子 κ B 抑制蛋白 α (NF- κ B inhibitor α , I κ B α) 结构中的由 10 个氨基酸残基构成的磷酸肽相连。OVA 可以与蛋氨酸氨肽酶 2 (amino peptidase-2, MetAP-2) 活性位点中第 231 位组氨酸共价结合并抑制其活性, I κ B α 可以与 SCF ^{β -TRCP} E3 泛素连接酶蛋白复合物中的 β -TRCP 结合。PROTAC-1 通过将 MetAP-2 与 SCF ^{β -TRCP} 拉近, 利用泛素-蛋白酶体系统泛素化降解 MetAP-2。

Deshaies 课题组^[13]随后又利用该策略设计合成了降解雄激素受体 (androgen receptor, AR) 的 PROTAC-2 与降解雌激素受体 α (estrogen receptor α , ER α) 的 PROTAC-3。AR 与 ER α 均属于核受体超家族成员, 参与机体多种生理病理过程的调控, 与肿瘤的发生、发展密切相关。PROTAC-2 通过连接基将 AR 小分子配体二氢睾酮与 I κ B α 磷酸肽相连, PROTAC-3 则由 ER α 小分子配体雌二醇、连接基和 I κ B α 磷酸肽组成。

实验结果证明 PROTAC1-3 确实可以泛素-蛋白

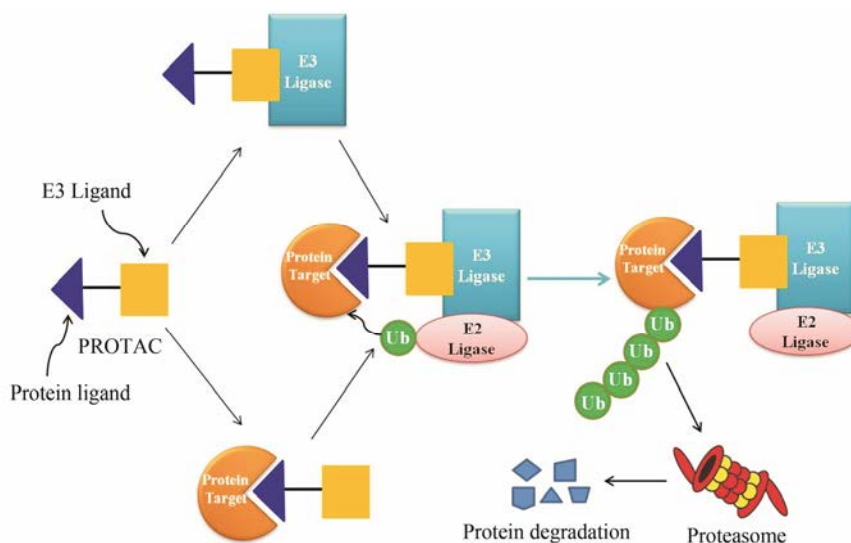


Figure 1 Proposed model of PROTACs-induced protein degradation

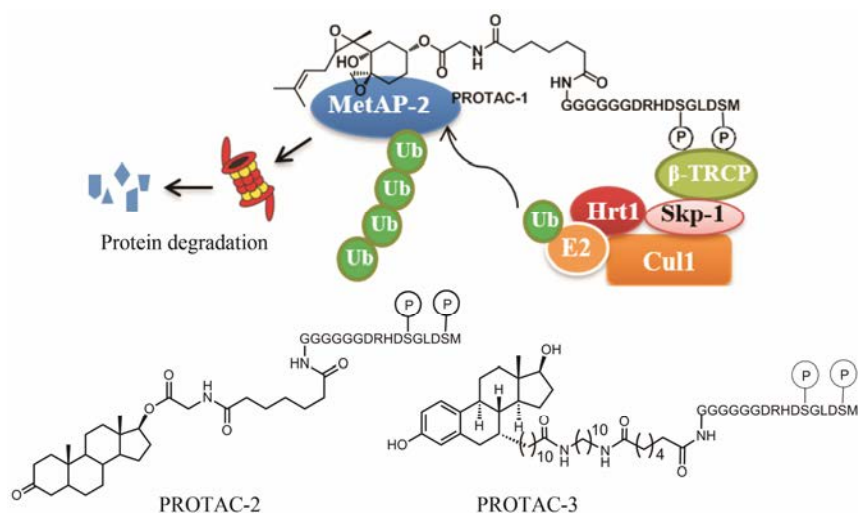


Figure 2 Reported peptidic PROTACs that recruit the SCF^{β-TRCP} E3 ligase

酶体依赖性地降解目标靶蛋白,但是由于结构中不存在磷酸肽结构,PROTAC1-3的细胞通透性较差,且易于被磷酸酶水解,导致降解细胞内目标靶蛋白的能力很弱。

2.2 基于 CRL2^{VHL}E3 的多肽类 PROTACs 希佩尔-林道蛋白 (von Hippel-Lindau protein, pVHL) 是 CRL2^{VHL} E3 泛素连接酶的底物受体。在细胞处于正常氧分压条件下时,缺氧诱导因子 1 α (hypoxia-inducible factor 1 α , HIF-1 α) 的 Pro402 和 Pro564 残基被脯氨酰羟化酶羟基化后与 VHL 蛋白结合,进而被 CRL2^{VHL} E3 泛素化降解。

Sakamoto 等^[14]利用 HIF-1 α 蛋白中可以与 CRL2^{VHL} E3 结合的羟基化五肽结构,设计合成了 PROTAC-4 和 PROTAC-5 (图 3)。PROTAC-4 由 AR 小分子配体二氢睾酮、连接基和 HIF-1 α 羟基化五肽组成。用 12.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PROTAC-4 处理 LNCaP 前列腺癌细胞 72 h 后可以降低细胞内 AR 表达水平,使细胞周期阻滞在 G1 期,抑制细胞的增殖 (72 h IC₅₀ = 12.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 144 h IC₅₀ = 1.52 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 而对不表

达 AR 的 PC-3 和 DU-145 前列腺癌细胞, PROTAC-4 则不能抑制细胞的增殖,显示出对 AR 的靶向降解。PROTAC-5 由 ER α 小分子配体雌二醇、连接基和 HIF-1 α 羟基化五肽组成。50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PROTAC-5 可以明显降低雌激素依赖的 MCF-7 和 T47D 乳腺癌细胞内 ER α 表达水平,下调 Cyclin D1, 阻滞细胞周期,抑制细胞增殖。对雌激素非依赖的 SKBr3 细胞株, PROTAC-5 不具有抗增殖活性。

Crews 等^[15]设计了一个活性受磷酸化调节的 PROTAC 分子 ^{ErbB2}PP_{PI3K}。^{ErbB2}PP_{PI3K} 由一段源自受体酪氨酸激酶 ErbB2 的氨基酸序列、VHL 结合氨基酸序列与连接基组成。在神经生长素的作用下, ^{ErbB2}PP_{PI3K} 结构中的 ErbB2 氨基酸序列发生磷酸化,与 ErbB2 底物蛋白 PI3K 结合,进而招募 CRL2^{VHL} E3 泛素化降解 PI3K, 抑制激酶信号通路。在 OVCAR8 卵巢癌细胞裸鼠移植瘤模型中,腹腔注射 10 mg·kg⁻¹ ^{ErbB2}PP_{PI3K} 47 天可以有效抑制肿瘤的生长,抑瘤率达到 40%。

3 小分子 PROTACs 的研究进展

在过去的十几年中,由于缺乏高亲和性、特异

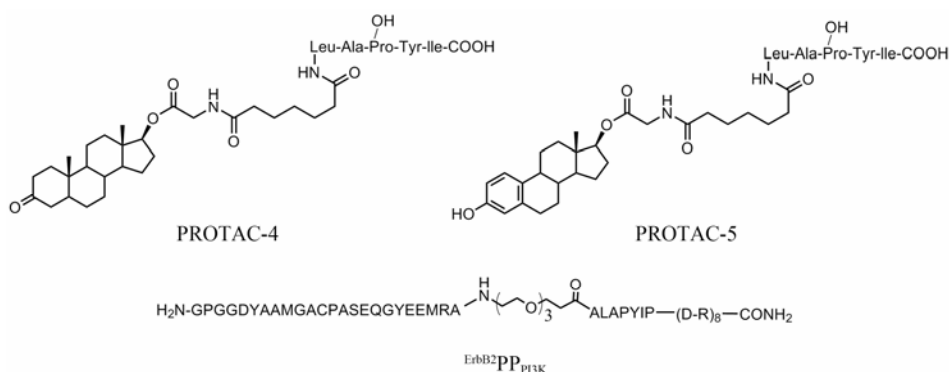


Figure 3 Reported peptidic PROTACs that recruit the CRL2^{VHL} E3 ligase

性的 E3 小分子配体, 设计合成的 PROTACs 分子都是多肽类化合物, 很难穿透细胞膜, 降解靶蛋白的效果不佳, 限制了 PROTACs 技术的应用。近几年, CRL4^{CRBN} [16, 17]、CRL2^{VHL} [18]、cIAP^[19]等 E3 泛素连接酶特异性小分子配体的发现, 让 PROTACs 技术取得了巨大的突破。多个研究小组利用 PROTACs 实现了对溴结构域蛋白 4 (BRD4)、BCR-ABL、ER α 、雌激素相关受体 α (ERR α)、丝氨酸苏氨酸激酶 2 (RIPK2) 和转录相关酸性卷曲蛋白 3 (TACC3) 等多种癌症相关蛋白的降解, 成为抗肿瘤药物研发领域的热点之一, 有望在肿瘤靶向药物研究方面实现新的突破^[20–26]。

3.1 基于 MDM2 E3 的小分子 PROTACs 2008 年, Crews 课题组^[27]报道了第一个小分子 PROTAC: PROTAC_AR (图 4)。PROTAC_AR 通过聚乙二醇连接基将 MDM2 E3 泛素连接酶小分子抑制剂 nutlin 与非甾体雄激素受体小分子配体相连。用 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PROTAC_AR 处理人宫颈癌 HeLa 细胞 7 h, 可以降低细胞内 AR 水平。而如果用蛋白酶体抑制剂环氧霉素预处理 HeLa 细胞, 则 PROTAC_AR 不能够降解 HeLa 细胞内 AR, 说明 PROTAC_AR 是通过蛋白酶体泛素化降解 AR。虽然 PROTAC_AR 降解 AR 的效率很低, 但是 PROTAC_AR 的报道为小分子 PROTAC 化合物的研究提供了思路。

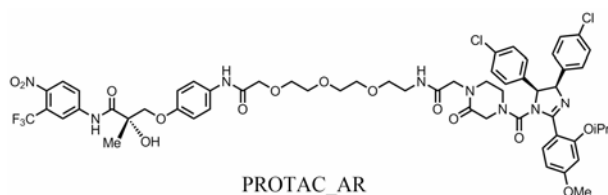


Figure 4 Reported small-molecule PROTAC that recruits the MDM2 E3 ligase

3.2 基于 cIAP1 E3 的小分子 PROTACs 细胞凋亡抑制蛋白 1 (cellular inhibitor of apoptosis protein 1, cIAP1) 是高度保守的内源性抗细胞凋亡因子, 主要包含 BIR、CARD 和 RING 3 个结构域, 其中位于碳端的 RING 结构域具有 E3 泛素连接酶活性。乌苯美司 (bestatin) 是一个氨肽酶抑制剂, 研究发现其甲酯化合物 (MeBS) 可以通过乌苯美司结构端与 cIAP1 的 BIR3 结构域结合, 激活 cIAP1 的 E3 泛素连接酶活性, 诱导 cIAP1 发生自泛素化, 然后被蛋白酶体降解^[19, 28]。利用这一特点, 多个研究小组在乌苯美司甲酯化合物的甲酯端通过连接基连接不同的靶蛋白小分子抑制剂, 得到了多个基于 cIAP1 E3 的 PROTACs (图 5)。

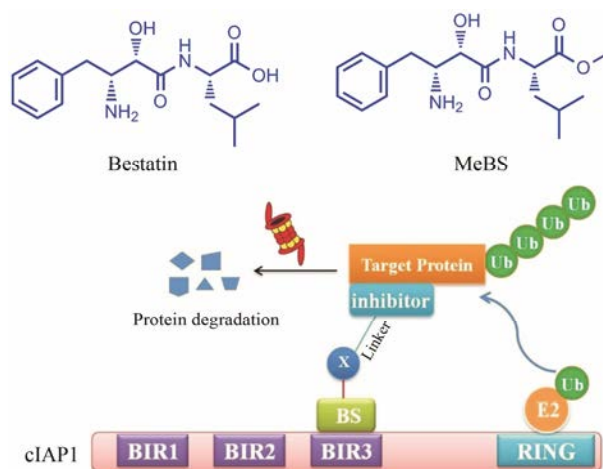


Figure 5 PROTAC mechanism of action utilizing the E3 ubiquitin ligase cIAP1

细胞视黄酸结合蛋白 II (cellular retinoic acid-binding protein II, CRABP-II) 是细胞内视黄酸的结合蛋白, 将视黄酸转运至细胞核, 使其与受体作用调节下游基因表达。CRABP-II 的异常表达与成神经细胞瘤、肾母细胞瘤、头颈鳞状细胞癌的发生发展密切相关。2010 年, Hashimoto 研究组^[29]报道了第一个基于 cIAP1 E3 降解 CRABP-II 的 PROTAC 分子 SNIPER-(2) (图 6)。SNIPER-(2) 通过连接基将全反式视黄酸与乌苯美司甲酯相连。由于乌苯美司甲酯可以诱导 cIAP1 自身发生泛素化降解, 因此 SNIPER-(2) 在泛素化降解 CRABP-II 的同时会泛素化降解 cIAP1, 在很大程度上限制了其降解 CRABP-II 的效率。通过对乌苯美司进一步的结构改造发现, 乌苯美司的酰胺衍生物保留了与 cIAP1 的结合活性, 并且不会引起 cIAP1 的自身泛素化降解。2011 年, Mikihiro 等^[30]在此基础上设计合成了 SNIPER-(4)。10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SNIPER-(4) 可以明显降低人神经母细胞瘤 IMR-32 细胞内 CRABP-II 蛋白, 而对 cIAP1 的蛋白水平没有影响。SNIPER-(4) 通过降解 CRABP-II 下调 MycN 蛋白水平, 激活 caspase-3/7, 抑制细胞的增殖。对不表达 MycN 蛋白的人成纤维肉瘤 HT1080 细胞和人乳腺癌 MCF-7 细胞, SNIPER-(4) 虽然可以降低细胞内 CRABP-II 蛋白水平, 但是对细胞的增殖几乎没有抑制作用。2013 年, Mikihiro 研究小组^[31]将 ER α 调节剂 4-羟基他莫昔芬通过连接基与乌苯美司酰胺衍生物相连, 合成得到了 SNIPER (ER α)。10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SNIPER (ER α) 可以显著降低人乳腺癌 MCF-7 细胞内 ER α 表达量, 抑制雌激素依赖的 pS2 基因的表达。用 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SNIPER (ER α) 处理 MCF-7 细胞 6 h 后, 细胞内 ROS 水平显著升高, 细胞发生明显坏死。

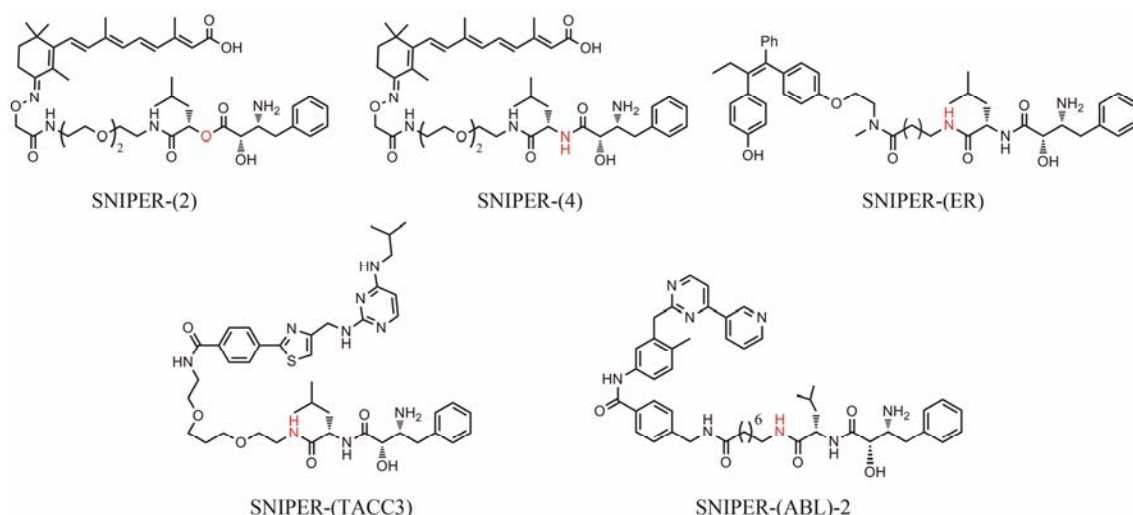


Figure 6 Reported small-molecule PROTACs that recruit the cIAP1 E3 ligase

TACC3 是细胞有丝分裂过程中重要的纺锤体形成调控蛋白。TACC3 在宫颈癌、乳腺癌、肺癌、淋巴瘤、胶质母细胞瘤等癌症中高表达, 与肿瘤的发生密切相关。抑制 TACC3 的活性或者降低其表达量可以抑制细胞分裂、诱导细胞凋亡, 是目前抗肿瘤药物研发的一个重要靶点。30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SNIPER (TACC3) 6 h 内可以明显降低人纤维肉瘤 HT1080 细胞、人乳腺癌 MCF-7 细胞和人骨肉瘤 U2OS 细胞内的 TACC3 表达水平。用 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SNIPER (TACC3) 处理 HT1080 或者 MCF-7 细胞 48 h, 可以裂解 PARP, 引起 caspase-3 活化, 诱导细胞凋亡, 抑制细胞的增殖。SNIPER (TACC3) 对高表达 TACC3 蛋白的肿瘤细胞具较好抑制活性, 而对人正常纤维原细胞抑制活性较差, 显示出较好的选择性^[32]。

SNIPER (ABL)-2 由 BCR-ABL 抑制剂伊马替尼、连接基和乌苯美司酰胺衍生物组成。30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SNIPER (ABL)-2 处理人髓性白血病 K562 细胞 8 h, 可以明显降低细胞内 BCR-ABL 蛋白水平, 下调 BCR-ABL 下游的 STAT5 和 CrkL 蛋白水平, 抑制 K562 细胞的增殖^[33]。

3.3 基于 CRL2^{VHL} E3 的小分子 PROTACs HIF-1 α 的 Pro402 和 Pro564 残基被脯氨酰羟化酶羟基化后可以与 VHL 蛋白结合, 其中羟基化的 Pro564 残基在 HIF-1 α 与 VHL 的结合中起着关键的作用, Ciulli 等^[18, 34]在 4-羟基脯氨酸的基础上经过结构改造, 得到了能与 VHL 特异性结合的小分子配体 (图 7)。

化合物 VH032 与 VHL 蛋白的共晶结构显示, VH032 末端乙酰基的甲基处于溶剂暴露区, 是 PROTACs 连接基的合适连接位置。2015 年, Ciulli 研究小组^[35]采用聚乙二醇连接基将 JQ1 的羧基与 VH032 末端乙酰

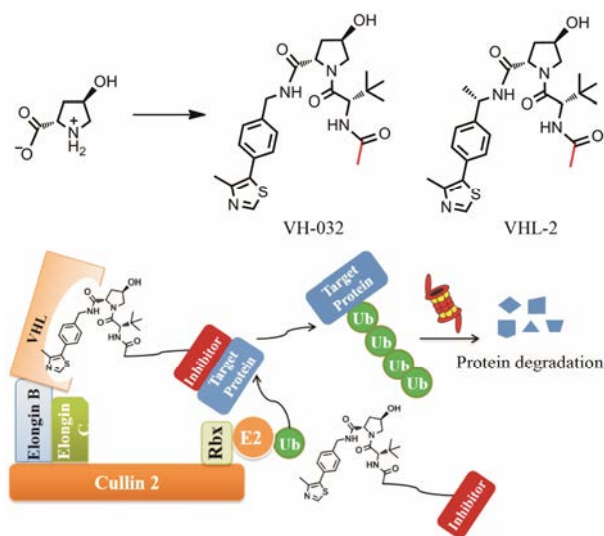


Figure 7 PROTAC mechanism of action utilizing the E3 ubiquitin ligase CRL2^{VHL}

基的甲基相连, 得到了通过招募 CRL2^{VHL} E3 降解 BRD4 的 PROTACs: MZ1 和 MZ2 (图 8)。MZ1 显示了比 MZ2 更加高效的 BRD4 降解活性, 说明连接基的长短对 PROTACs 的活性有着重要影响。100 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MZ1 可以显著降解人宫颈癌 HeLa 细胞与人骨肉瘤 U2OS 细胞内的 BRD4, 下调 *c-Myc* 的表达。虽然 JQ1 为 BET 非选择性抑制剂, MZ1 却在较低浓度时对 BRD2、BRD3 显示出较好的选择性。

2016 年, Coleman 等^[36]利用 JQ1 与 VHL 小分子配体 VHL-2 设计合成了 PROTAC 分子 ARV-771。ARV-771 可以快速降解去势抵抗性前列腺癌 22Rv1、LnCaP95 和 VCaP 细胞中 BRD4 蛋白 ($\text{DC}_{50} < 5 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 抑制 *c-Myc* 的表达 ($\text{IC}_{50} < 1 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)。虽然 ARV-771、JQ1 与 BRD4 的 K_d 值相近, 但是

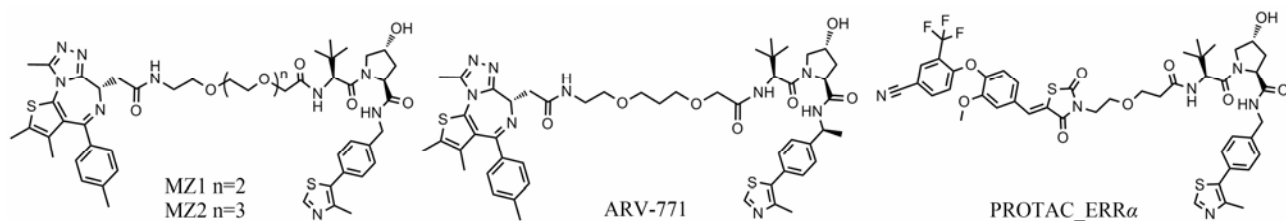


Figure 8 Reported small-molecule PROTACs that recruit the CRL2^{VHL} E3 ligase

ARV-771 下调 *c-Myc* 表达水平的活性是 JQ1 的 10 余倍, 显示出了催化降解蛋白的能力。300 nmol·L⁻¹ ARV-771 可以显著诱导 22Rv1 细胞内 PARP 蛋白裂解, 激活 *capase-3/7*, 诱导细胞凋亡, 其抗细胞增殖活性是 JQ1 的 10 余倍。在人前列腺癌 AR-V7 阳性 22Rv1 细胞 Nu/Nu 裸鼠皮下移植瘤模型中, ARV-771 可以下调 BRD4 和 AR-V7 蛋白水平, 相比 OTX015 80% 的抑瘤率, ARV-771 可以使肿瘤消退, 部分小鼠的肿瘤完全消失。

ERRα 在雌激素依赖性肿瘤如乳腺癌及非雌激素依赖性肿瘤如结直肠癌中均高表达, ERRα 是乳腺癌预后较差的一个分子标记物。PROTAC_ERRα 通过连接基将 ERRα 噻唑烷二酮类小分子配体与 CRL2^{VHL} E3 小分子配体相连。PROTAC_ERRα 可以显著降低人乳腺癌 MCF-7 细胞内 ERRα 蛋白水平, DC₅₀ 为 100 nmol·L⁻¹。在人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞裸鼠移植瘤模型中, PROTAC_ERRα 可以降低肿瘤组织中 50% 的 ERRα 表达^[37]。

3.4 基于 CRL4^{CRBN} E3 的小分子 PROTACs 沙利度胺及其类似物泊马度胺、来那度胺是目前常用的免疫调节药物, 并且对多发性骨髓瘤具有较好疗效 (图 9)。研究发现, 沙利度胺类药物可以通过其戊二酰亚胺结构与 CUL4-RBX1-DDB1-Cereblon (CRL4^{CRBN}) E3 泛素连接酶复合物的底物受体 Cereblon 蛋白结合, 促进转录因子 IKZF1/3 与 Cereblon 的结合, 诱导 IKZF1/3 发生泛素化降解^[38-40]。近几年, 利用沙利度胺及其类似物可以与 CRL4^{CRBN} E3 特异性结合的特点, 将不同的靶蛋白小分子抑制剂通过连接基与沙利度胺或其类似物连接, 设计合成了多个基于 CRL4^{CRBN} E3 的 PROTACs。

BRD4 是含溴结构域和超末端结构 (bromodomain and extraterminal domain, BET) 蛋白家族成员。BRD4 通过溴结构域结合组蛋白乙酰化赖氨酸残基, 在调节细胞基因转录、细胞周期等生物过程中发挥重要作用。BRD4 的过度表达与急性髓性白血病、乳腺癌和黑色素瘤等多种恶性肿瘤的发生发展密切相关, 是目前抗肿瘤药物研发的热点靶标之一, 目前已经有

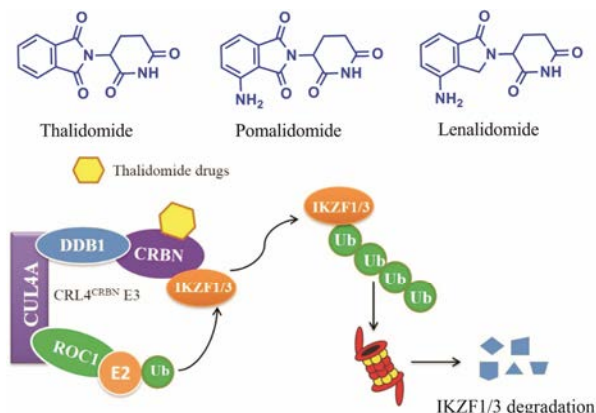


Figure 9 Reported CRL4^{CRBN} E3 small-molecule ligands

多个小分子抑制剂进入临床试验 (图 10)。BRD4 小分子抑制剂通过和 BRD4 溴结构域结合, 阻断其与组蛋白乙酰化赖氨酸残基的相互作用, 调节下游基因表达。但是用小分子抑制剂抑制 BRD4 活性后会反馈性上调 BRD4 基因的表达, 造成对下游信号通路抑制不够充分, 限制了其疗效。构效关系研究发现 BRD4 小分子抑制剂的羧基结构^[41]和沙利度胺的苯环结构为可修饰结构^[39]。多个研究小组利用不同的连接基将 BRD4 小分子抑制剂羧基端与沙利度胺的苯环端相连, 得到了多个靶向降解 BRD4 的 PROTACs。

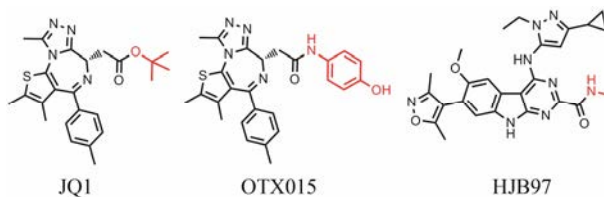


Figure 10 Reported BRD4 small-molecule inhibitors

2015 年, Bradner 等^[42]报道了靶向降解 BRD4 的 PROTAC 小分子 dBET1 (图 11)。dBET1 通过连接基将 BRD4 抑制剂 JQ1 与 CRL4^{CRBN} E3 小分子配体沙利度胺相连。与 JQ1 抑制 BRD4 活性后反馈性引起细胞内 BRD4 表达上调不同, 100 nmol·L⁻¹ dBET1 在 2 h 内可以完全降解急性髓性白血病 MV4:11 细胞中的 BRD4, 显示出比 JQ1 更加显著持久的下调 *c-Myc* 基因、诱导细胞凋亡和抑制细胞增殖能力。在

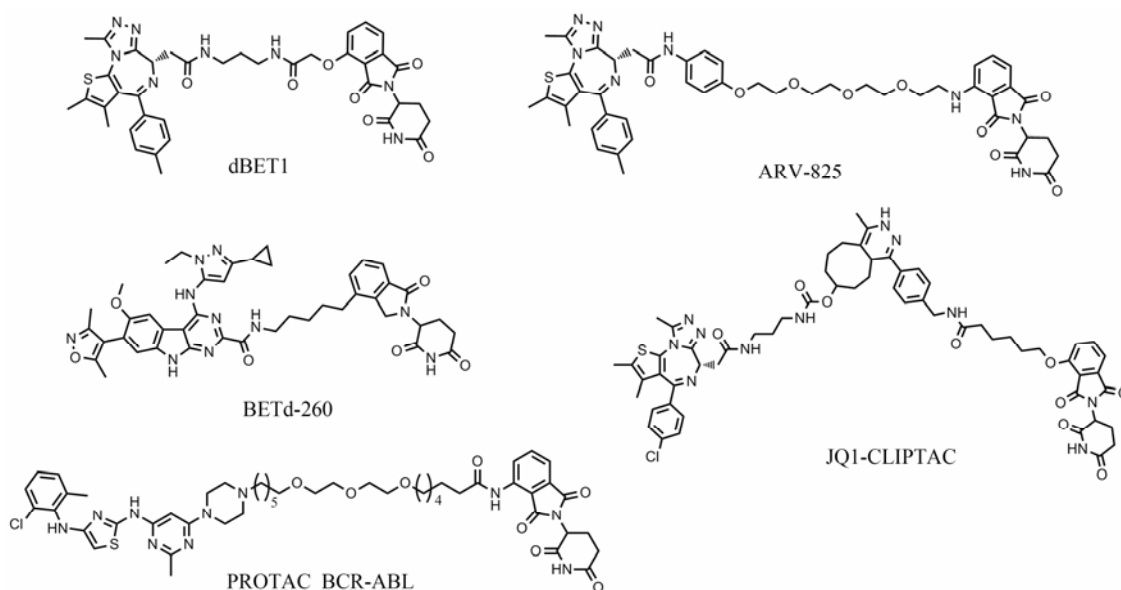


Figure 11 Reported small-molecule PROTACs that recruit the CRL4^{CRBN} E3 ligase

小鼠 MV4:11 白血病后肢移植瘤模型中, 与 JQ1 相比, dBET1 可以更加有效地抑制肿瘤生长。单独用 JQ1、沙利度胺或者二者同时处理 MV4:11 细胞不能下调 BRD4 蛋白水平; 用蛋白酶体抑制剂处理 MV4:11 细胞可以抑制 dBET1 下调 BRD4 蛋白水平的活性; 在 Cereblon 蛋白缺失的多发性骨髓瘤 MM1.S-CRBN^{-/-} 细胞中, dBET1 不能降低 BRD4 蛋白水平, 说明 dBET1 是通过招募 CRL4^{CRBN} E3 泛素化降解 BRD4 蛋白。

Crews 等^[43]利用同一策略设计合成了 ARV-825, ARV-825 与 dBET1 的区别仅仅在于连接基的不同。虽然 ARV-825 与 BRD4、CRL4^{CRBN} 的 K_d 值分别是 $29 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 与 $3 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 但是其降解 BRD4 的 DC_{50} 却小于 $1 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 显示出亚化学计量的降解能力。 $10 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ARV-825 于 6 h 内几乎可以完全降解 Burkitt 淋巴瘤细胞中的 BRD4 蛋白, 抗肿瘤活性明显强于同等浓度的 BRD4 小分子抑制剂 JQ1 和 OTX015。 ARV-825 还可以有效降解患者源性急性髓系白血病细胞中的 BRD4, 下调 *c-Myc*、*CDK4/6* 和 *JAK2* 等致癌基因, 诱导细胞凋亡的能力明显强于 OTX015, 且对卢佐替尼耐药的 UKE1 细胞保持较强抑制活性^[44]。

2017 年, 王少萌课题组^[45]设计合成了由 BRD4 抑制剂 HJB97 与 CRL4^{CRBN} E3 小分子配体泊马度胺组成的 PROTAC 分子 BETd-260。 BETd-260 在低至 $30 \text{ pmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度, 3 h 内可以有效降解 RS4;11 人急性淋巴白血病细胞内的 BRD4 蛋白。 $0.1 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ BETd-260 就可以显著下调 RS4;11 细胞内 *c-Myc* 基因表达, 是 BRD4 抑制剂 HJB97 的 1 000 多倍。 BETd-

260 在纳摩尔浓度可以诱导 RS4;11 和 MOLM-13 白血病细胞发生凋亡, 抑制细胞的增殖, IC_{50} 分别是 $51 \text{ pmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $2.3 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在 RS4;11 白血病细胞裸鼠移植瘤模型中, $5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ BETd-260 可以有效降解肿瘤组织内 BRD4, 大于 90% 的小鼠体内的肿瘤发生消退。在三阴性人乳腺癌细胞裸鼠移植瘤模型中, BETd-260 也可以显著地降解 BRD4, 抑制肿瘤生长。

Heightman 课题组^[46]利用四嗪标记的沙利度胺与反式环辛烯标记 JQ1 之间的生物正交反应, 在细胞内原位生成 PROTAC 分子 JQ1-CLIPTAC。 $3.0 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ JQ1-CLIPTAC 在 18 h 内可以完全降解人宫颈癌 HeLa 细胞内的 BRD4 蛋白。

BCR-ABL 是 *Bcr* 基因与 *Abl* 基因融合后产生的致癌酪氨酸激酶, 是导致慢性髓细胞白血病的主要原因。尽管目前已经有伯舒替尼、达沙替尼等多个小分子抑制剂上市, 但是部分患者会逐渐产生耐药性。2016 年, Crews 小组^[47]报道了首个靶向酪氨酸激酶 BCR-ABL 的 PROTAC 分子 PROTAC_BCR-ABL。 $1 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PROTAC_BCR-ABL 可以降解 90% 的 *c-ABL* 和 BCR-ABL, 对 BCR-ABL 驱动的人髓性白血病 K562 细胞 EC_{50} 达到 $4.4 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 而对非 BCR-ABL 驱动的人乳腺癌 HEK293T 细胞和 SK-BR-3 细胞活性较差, 具有很好的选择性。

4 影响 PROTAC 降解活性的因素

虽然 PROTAC 技术得到了越来越多药物化学家的关注, 但是目前报道的 PROTACs 分子大都是随机合成, 没有进行系统的构效关系研究。如何合理设计, 筛选得到降解活性最优的 PROTAC 分子将是本领域

的一个研究重点。

PROTAC 分子由 E3 配体、靶蛋白抑制剂和连接基三部分构成,不同的 E3 配体、靶蛋白抑制剂和连接基的组合,对 PROTAC 的降解活性有着十分关键的作用。Crews 研究小组^[47]将 BCR-ABL 抑制剂伊马替尼、伯舒替尼、达沙替尼与 VHLE3 配体、CRBN E3 配体两两组合,设计合成了 6 个类型的 PROTACs,活性评价结果显示,不同组合产生的 PROTAC 分子之间,降解活性有着很大的差别。PROTAC_{伯舒替尼-VHL}对 c-ABL 和 BCR-ABL 没有降解活性,而 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PROTAC_{达沙替尼-VHL} 在 24 h 内可以降解 65% 的 c-ABL,但是对 BCR-ABL 蛋白没有影响, $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PROTAC_{达沙替尼-CRBN} 24 h 内则可以同时降解细胞内 85% 的 c-ABL 和 60% 的 BCR-ABL。

连接基的结构类型、长度以及连接基与连接分子之间的结合位点对 PROTAC 分子的活性也有着重要影响,合适的连接基及结合位点使其两端连接的 E3 与靶蛋白之间的相互作用更加有效。Kim 研究小组^[48]设计合成了连接基长度分别为 9、12、16、19 和 21 个碳原子的 PROTACs,降解活性评价结果显示,当连接基长度为 16 个碳原子时,PROTAC 降解 AR 的活性最高。ARV-825 与 dBET1 的区别仅仅在于连接基的结构不同,但是 ARV-825 降解 BRD4 的活性是 dBET1 的 10 多倍^[43]。Kim 等^[49]设计合成了连接基分别与雌二醇的 17 位 O 原子、16 位 C 原子及 7 α 位 C 原子结合的 PROTACs,活性评价结果显示,当连接基结合位点在 7 α 位 C 原子时,PROTAC 的蛋白降解活性最好。

5 结论与展望

PROTACs 利用泛素-蛋白酶体系统对靶蛋白进行翻译后降解,与小分子抑制剂类抗肿瘤药物相比,PROTACs 展现出了独特的优势:PROTACs 不需要与目标靶蛋白长时间和高强度的结合,可以降解转录因子等“不可药靶蛋白”发挥抗肿瘤作用;致癌蛋白被降解后需要重新合成才能恢复功能,因此降解致癌蛋白比抑制其活性显示出更加高效、持久的抗肿瘤作用;PROTACs 降解靶蛋白过程类似于催化反应,可循环结合、降解靶蛋白,不需要等摩尔量的药物,实现亚化学计量用药。

虽然 PROTACs 技术取得了巨大的进步,但是仍面临着诸多的问题:PROTACs 往往具有较大的分子质量,导致部分 PROTACs 药代动力学性质不佳,口服生物利用度较差;可利用的 E3 泛素连接酶及其小分子配体种类有限;E3 小分子配体的体内稳定性不

够,导致 PROTACs 分子半衰期较短,限制了其亚化学计量用药特性;目前报道的 PROTACs 大都没有进行系统的构效关系研究,如连接基的长短、不同的 E3 泛素连接酶等对 PROTACs 活性的影响。

PROTACs 技术已经吸引了药物化学家和国际医药公司的广泛关注,随着越来越多的 E3 特异性小分子配体的发现和对 PROTACs 系统的构效关系研究,PROTACs 目前面临的问题将会逐渐被解决,成为小分子抑制剂、单克隆抗体之后另一重要的肿瘤治疗手段。

References

- [1] Ma CX, Reinert T, Chmielewska I, et al. Mechanisms of aromatase inhibitor resistance [J]. *Nat Rev Cancer*, 2015, 15: 261–275.
- [2] He QY. Tumor heterogeneity and drug resistance of targeted antitumor agents [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 197–201.
- [3] Hatzivassiliou G, Song K, Yen I, et al. RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth [J]. *Nature*, 2010, 464: 431–435.
- [4] Shimamura T, Chen Z, Soucheray M, et al. Efficacy of BET bromodomain inhibition in Kras-mutant non-small cell lung cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19: 6183–6192.
- [5] Russ AP, Lampel S. The druggable genome: an update [J]. *Drug Discov Today*, 2005, 10: 1607–1610.
- [6] Adjei AA. What is the right dose? The elusive optimal biologic dose in phase I clinical trials [J]. *J Clin Oncol*, 2006, 24: 4054–4055.
- [7] Matzke M, Matzke AJ, Kooter JM. RNA: guiding gene silencing [J]. *Science*, 2001, 293: 1080–1083.
- [8] Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas 9 [J]. *Science*, 2014, 346: 1258096.
- [9] Burnett JC, Rossi JJ. RNA-based therapeutics: current progress and future prospects [J]. *Chem Biol*, 2012, 19: 60–71.
- [10] Bruce A, Sullenger SN. From the RNA world to the clinic [J]. *Science*, 2016, 352: 1417–1420.
- [11] Sakamoto KM, Kim KB, Kumagai A, et al. Protacs: chimeric molecules that target proteins to the Skp1-Cullin-F box complex for ubiquitination and degradation [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98: 8554–8559.
- [12] Gadd MS, Testa A, Lucas X, et al. Structural basis of PROTAC cooperative recognition for selective protein degradation [J]. *Nat Chem Biol*, 2017, 13: 514–521.
- [13] Sakamoto KM, Kim KB, Verma R, et al. Development of

- PROTACs to target cancer-promoting proteins for ubiquitination and degradation [J]. *Mol Cell Proteom*, 2003, 2: 1350–1358.
- [14] Rodriguez-Gonzalez A, Cyrus K, Salcius M, et al. Targeting steroid hormone receptors for ubiquitination and degradation in breast and prostate cancer [J]. *Oncogene*, 2008, 27: 7201–7211.
- [15] Hines J, Gough JD, Corson TW, et al. Posttranslational protein knockdown coupled to receptor tyrosine kinase activation with phosphoPROTACs [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110: 8942–8947.
- [16] Matyskiela ME, Lu G, Ito T, et al. A novel cereblon modulator recruits GSPT1 to the CRL4 (CRBN) ubiquitin ligase [J]. *Nature*, 2016, 535: 252–257.
- [17] Kronke J, Fink EC, Hollenbach PW, et al. Lenalidomide induces ubiquitination and degradation of CK1alpha in del(5q) MDS [J]. *Nature*, 2015, 523: 183–188.
- [18] Buckley DL, Van Molle I, Gareiss PC, et al. Targeting the von Hippel-Lindau E3 ubiquitin ligase using small molecules to disrupt the VHL/HIF-1alpha interaction [J]. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 4465–4468.
- [19] Sekine K, Takubo K, Kikuchi R, et al. Small molecules destabilize cIAP1 by activating auto-ubiquitylation [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283: 8961–8968.
- [20] Crews CM, Georg G, Wang S. Inducing protein degradation as a therapeutic strategy [J]. *J Med Chem*, 2016, 59: 5129–5130.
- [21] Crunkhorn S. Anticancer drugs: selectively targeting proteins for degradation [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2015, 14: 459.
- [22] Deshaies RJ. Protein degradation: prime time for PROTACs [J]. *Nat Chem Biol*, 2015, 11: 634–635.
- [23] Ohoka N, Shibata N, Hattori T, et al. Protein knockdown technology: application of ubiquitin ligase to cancer therapy [J]. *Current Cancer Drug Targets*, 2016, 16: 136–146.
- [24] Runcie AC, Chan KH, Zengerle M, et al. Chemical genetics approaches for selective intervention in epigenetics [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2016, 33: 186–194.
- [25] Chi KR. Drug developers delve into the cell's trash-disposal machinery [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2016, 15: 295–297.
- [26] Ottis P, Crews CM. Proteolysis-targeting chimeras: induced protein degradation as a therapeutic strategy [J]. *ACS Chem Biol*, 2017, 12: 892–898.
- [27] Schneekloth AR, Pucheault M, Tae HS, et al. Targeted intracellular protein degradation induced by a small molecule: En route to chemical proteomics [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, 18: 5904–5908.
- [28] Sato S, Aoyama H, Miyachi H, et al. Demonstration of direct binding of cIAP1 degradation-promoting bestatin analogs to BIR3 domain: synthesis and application of fluorescent bestatin ester analogs [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, 18: 3354–3358.
- [29] Itoh Y, Ishikawa M, Naito M, et al. Protein knockdown using methyl bestatin-ligand hybrid molecules: design and synthesis of inducers of ubiquitination-mediated degradation of cellular retinoic acid-binding proteins [J]. *J Am Chem Soc*, 2010, 132: 5820–5826.
- [30] Okuhira K, Ohoka N, Sai K, et al. Specific degradation of CRABP-II *via* cIAP1-mediated ubiquitylation induced by hybrid molecules that crosslink cIAP1 and the target protein [J]. *FEBS Lett*, 2011, 585: 1147–1152.
- [31] Okuhira K, Demizu Y, Hattori T, et al. Development of hybrid small molecules that induce degradation of estrogen receptor-alpha and necrotic cell death in breast cancer cells [J]. *Cancer Sci*, 2013, 104: 1492–1498.
- [32] Ohoka N, Nagai K, Hattori T, et al. Cancer cell death induced by novel small molecules degrading the TACC3 protein *via* the ubiquitin-proteasome pathway [J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5: 5e1513.
- [33] Demizu Y, Shibata N, Hattori T, et al. Development of BCR-ABL degradation inducers *via* the conjugation of an imatinib derivative and a cIAP1 ligand [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2016, 26: 4865–4869.
- [34] Galdeano C, Gadd MS, Soares P, et al. Structure-guided design and optimization of small molecules targeting the protein-protein interaction between the von Hippel-Lindau (VHL) E3 ubiquitin ligase and the hypoxia inducible factor (HIF) alpha subunit with *in vitro* nanomolar affinities [J]. *J Med Chem*, 2014, 57: 8657–8663.
- [35] Zengerle M, Chan KH, Ciulli A. Selective small molecule induced degradation of the bet bromodomain protein BRD4 [J]. *ACS Chem Biol*, 2015, 10: 1770–1777.
- [36] Raina K, Lu J, Qian YM, et al. PROTAC-induced BET protein degradation as a therapy for castration-resistant prostate cancer [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113: 7124–7129.
- [37] Bondeson DP, Mares A, Smith IE, et al. Catalytic *in vivo* protein knockdown by small-molecule PROTACs [J]. *Nat Chem Biol*, 2015, 11: 611–617.
- [38] Chamberlain PP, Lopez-Girona A, Miller K, et al. Structure of the human Cereblon-DDB1-lenalidomide complex reveals basis for responsiveness to thalidomide analogs [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2014, 21: 803–809.
- [39] Fischer ES, Bohm K, Lydeard JR, et al. Structure of the DDB1-CRBN E3 ubiquitin ligase in complex with thalidomide [J]. *Nature*, 2014, 512: 49–53.
- [40] Martiniani R, Di Loreto V, Di Sano C, et al. Biological

- activity of lenalidomide and its underlying therapeutic effects in multiple myeloma [J]. *Adv Hematol*, 2012, 2012: 842945
- [41] Anders L, Guenther MG, Qi J, et al. Genome-wide localization of small molecules [J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32: 92–96.
- [42] Winter GE, Buckley DL, Paul J, et al. Drug Development. Phthalimide conjugation as a strategy for *in vivo* target protein degradation [J]. *Science*, 2015, 348: 1376–1381.
- [43] Lu J, Qian Y, Altieri M, et al. Hijacking the E3 ubiquitin ligase cereblon to efficiently target BRD4 [J]. *Chem Biol*, 2015, 22: 755–763.
- [44] Saenz DT, Fiskus W, Qian Y, et al. Novel BET protein proteolysis-targeting chimera exerts superior lethal activity than bromodomain inhibitor (BETi) against post-myeloproliferative neoplasm secondary (s) AML cells [J]. *Leukemia*, 2017, 31: 1951–1961.
- [45] Zhou B, Hu JT, Xu FM, et al. Discovery of a small-molecule degrader of bromodomain and extra-terminal (BET) proteins with picomolar cellular potencies and capable of achieving tumor regression [J]. *J Med Chem*, 2017. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.6b01816.
- [46] Lebraud H, Wright DJ, Johnson CN, et al. Protein degradation by in-cell self-assembly of proteolysis targeting chimeras [J]. *ACS Cent Sci*, 2016, 2: 927–934.
- [47] Lai AC, Toure M, Hellerschmied D, et al. Modular PROTAC design for the degradation of oncogenic BCR-ABL [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2016, 55: 807–810.
- [48] Cyrus K, Wehenkel M, Choi EY, et al. Impact of linker length on the activity of PROTACs [J]. *Mol Biosyst*, 2011, 7: 359–364.
- [49] Cyrus K, Wehenkel M, Choi EY, et al. Jostling for position: optimizing linker location in the design of estrogen receptor-targeting PROTACs [J]. *ChemMedChem*, 2010, 5: 979–985.