

靶向分子伴侣系统的小分子设计策略: 回顾与展望

舒黄亮^{1,2}, 尤启冬^{1,2*}, 王磊^{1,2*}

(1. 中国药科大学, 江苏省药物分子设计与成药性优化重点实验室, 江苏 南京 210009; 2. 中国药科大学药学院药物化学系, 江苏 南京 210009)

摘要: 分子伴侣系统 (molecular chaperone system) 对维持生命体蛋白稳态十分重要, 它主要由热休克蛋白 (heat shock proteins, HSPs) 家族及其共伴侣蛋白 (cochaperones) 构成。分子伴侣主要参与蛋白的折叠、成熟和经泛素-蛋白酶体系统 (ubiquitin-proteasome system, UPS) 介导的蛋白降解, 最终调控细胞增殖和凋亡。分子伴侣系统功能的紊乱与癌症、自身免疫疾病、炎症、感染性疾病和神经退行性疾病等疾病的发生发展高度相关, 成为药物研发的潜在靶标群。本文系统性回顾靶向分子伴侣系统的小分子设计策略及其发展历程, 分析各阶段代表性分子的特点, 为未来靶向分子伴侣系统的小分子药物设计提供更多思路。

关键词: 分子伴侣系统; 小分子药物; 药物设计

中图分类号: R914 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)08-2035-12

Design of small molecules targeting molecular chaperone system: review and perspective

SHU Huang-liang^{1,2}, YOU Qi-dong^{1,2*}, WANG Lei^{1,2*}

(1. Jiangsu Key Laboratory of Drug Design and Optimization, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China; 2. Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract: Molecular chaperone system, which mainly consist of heat shock proteins family and their cochaperones, is crucial for maintaining proteostasis in life. It assists in folding, maturation and ubiquitin-proteasome-mediated degradation of proteins, thus to play a key role in cell proliferation and apoptosis. Functional disorder of molecular chaperone system is highly relevant to occurrence and development of multiple diseases including cancers, autoimmune disease/inflammatory, infective diseases, neurodegenerative disease, etc. Therefore, molecular chaperone system has long been regarded as potential drug targets. In this review, we outline the progress in the design of small molecules targeting molecular chaperone system and analyze the features of small molecules with different mechanisms. Finally, we put forward expects about potential development directions for future drug design in this field.

Key words: molecular chaperone system; small molecule; drug design

1 前言

蛋白发挥生物学功能需要稳定的三维结构, 但在

病理情况下存在折叠效率低、易发生错误折叠等问题, 进而影响蛋白质稳态^[1]。在生命体中, 分子伴侣系统负责调控此过程, 包括帮助新生多肽准确折叠、修复重要细胞蛋白 (如蛋白激酶、类固醇激素受体、转录因子等)、抑制蛋白聚集、协助蛋白酶体降解等, 在细胞生长、分化和生存中发挥关键作用^[2,3]。分子伴侣系统主要由热休克蛋白 (heat shock proteins, HSPs) HSP60、

收稿日期: 2023-04-02; 修回日期: 2023-04-21.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82173741, 82003582, 81930100).

*通讯作者 Tel: 15261483858, E-mail: leiwang.91@cpu.edu.cn;

Tel: 86-25-83271351, E-mail: youqd@cpu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0395

HSP70、HSP90和HSP100及共伴侣蛋白 (cochaperones) 构成。其中, HSP60作用于蛋白质折叠早期, 为蛋白折叠提供了封闭的场所; HSP70指导蛋白的展开、分解、再折叠或降解; HSP90作用于折叠后期, 识别已部分折叠的蛋白并协助其成熟或通过蛋白酶体降解; HSP100主要负责展开蛋白、协助蛋白降解和避免蛋白聚集^[4]。

HSP90是一种腺嘌呤核苷三磷酸 (adenosine triphosphate, ATP) 依赖的分子伴侣蛋白, 其已知的客户蛋白已超过500余个, 处于细胞内多种信号通路调节的中心位置^[5]。HSP90及其共伴侣蛋白构成的分子伴侣循环是蛋白质折叠、成熟的重要途径 (图1A), 主要包括以下阶段: ① HSP70/HSP40复合物, 承载新生多肽或错误折叠蛋白, 通过同源域特有蛋白 (homeodomain only protein, HOP) 与HSP90链接发生相互作用; ② 细胞分裂周期37 (cell division cycle 37, CDC37)、结合素 (immunophilin) 等共伴侣蛋白与HSP90结合形成多元复合物, 将客户蛋白装载于HSP90并伴随HSP70/HSP40复合物离去; ③ ATP结合于HSP90 N端, HSP90构象逐渐由开放钳形转变为闭合二聚体; ④ 包括热休克蛋白90 ATP酶激活因子1 (HSP90 ATPase homologue 1, AHA1) 在内的其他共伴侣蛋白结合于HSP90, AHA1能提高HSP90 ATPase的活性, 加速HSP90构象二聚化, 促进底物蛋白成熟; ⑤ ATP水解, HSP90 N端闭合构象打开, 释放出成熟的客户蛋白, HSP90复位准备进入下一次循环^[6] (图1A)。

基于分子伴侣系统的重要生物学功能, 已在包括癌症、炎症、感染性疾病和神经退行性疾病等病理过程中发现其功能异常或紊乱。因此, 靶向分子伴侣系统的关键节点开展小分子药物设计极具前景。1997年, 天然产物格尔德霉素 (geldanamycin, GDA) 被确证为首个HSP90 ATPase抑制剂 (图1B)^[7], 掀起了靶向HSP90 ATP结合位点小分子药物设计的浪潮, 本课题组也在2014~2016年设计并优化了一系列基于该位点的小分子抑制剂^[8,9]。截至目前, 先后已有超过30种HSP90 ATPase抑制剂进入临床, 但发现此类抑制剂会造成HSP90所有客户蛋白的无选择性降解, 并发生不可逆的热休克反应, 难以找到有效的药用安全窗口使得临床研究严重受阻^[10,11]。从2010年开始, 为解决ATPase抑制剂的泛抑制问题, 药物化学家们陆续开发出针对HSP90单一亚型的选择性抑制剂 (图1B)^[12-14]。在哺乳动物细胞中, HSP90有4种亚型: HSP90 α/β 、葡萄糖调节蛋白94 (94-kDa glucose-regulated protein, GRP94) 和肿瘤坏死因子受体相关蛋白1 (tumor necrosis factor receptor-associated protein 1, TRAP1), 针对以上各类亚型目前均有高选择性、高活性的抑制剂报道。本课题

组也在2018年得到了一类具有抗炎活性的GRP94抑制剂 (GRP94 inhibitor 1, 图4)^[15]。亚型选择性抑制剂为研究HSP90亚型间的结构和功能差异提供了工具, 但是单一亚型抑制的作用效果不佳, 且各亚型的生物学功能研究尚不深入, 与之相匹配的临床适应症不明确, 限制了此类抑制剂的进一步开发。随着对分子伴侣系统生物学研究的深入, 药物化学家们注意到分子伴侣系统间的蛋白-蛋白相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 是其功能精细化调控的基础, 因此设计小分子有目的地干预伴侣蛋白间的相互作用过程成为重要的研究策略。从2008年开始, 靶向HSP90-cochaperone PPI的小分子药物设计在CDC37、HOP、AHA1和p23等共伴侣蛋白上取得突破, 本课题组在CDC37研究领域处于领先地位, 在2019年报道了首个HSP90-CDC37 PPI小分子抑制剂 (DDO-5936, 图1B)^[16]。PPI抑制剂的设计绕开了N端ATP口袋, 避免了热休克反应, 同时还基于共伴侣蛋白的底物特异性识别实现了蛋白的差异化降解, 颇具潜力, 相关研究仍处于起步阶段^[16-18]。2021年, 利用HSP90底物选择和肿瘤组织高表达的特性, 珞诺生物科技提出了分子伴侣介导的蛋白降解技术 (chaperone-mediated protein degrader, CHAMP, 图1B), 该技术利用化学嵌合体 (chimeras) 拉近靶蛋白和HSP90的距离, 以HSP90为生物效应器泛素化靶蛋白后经蛋白酶体降解, 是一种新型的靶向蛋白降解 (target protein degradation, TPD) 技术, 在效力和安全性方面具有显著优势。2022年, 基于HSP90共伴侣蛋白丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶5 (Ser/Thr protein phosphatase 5, PP5), 本课题组设计首个募集PP5的磷酸酶募集嵌合体 (phosphatase recruiting chimeras, PHORCs), 实现了对过度磷酸化底物蛋白的选择性去磷酸化调控 (DDO-3711, 图1B)^[19]。基于分子伴侣系统的异双功能分子代表了全新的药物设计策略, 拓展了伴侣蛋白的功能与分子设计思路^[19,20]。本篇综述以靶向分子伴侣系统小分子设计策略的发展历程为主线, 提出各阶段代表性的抑制剂, 总结其各自特点, 并展望该领域未来的发展方向。

2 HSP90 ATPase抑制剂的发展

1997年, 天然产物格尔丹霉素被确证为首个HSP90抑制剂, 拉开了HSP90 ATPase抑制剂研究的序幕。药物化学家们采用经典的基于配体的药物设计策略, 先后设计了多种不同化学骨架的小分子药物, 他们的共有机制是模仿ATP竞争性结合于HSP90 N端结构域ATP结合口袋, 阻断HSP90 ATP依赖性的构象转变, 继而干扰分子伴侣循环的正常运转, 最后使过表达的未成熟致癌蛋白因无法正确折叠而被泛素-蛋白酶体系

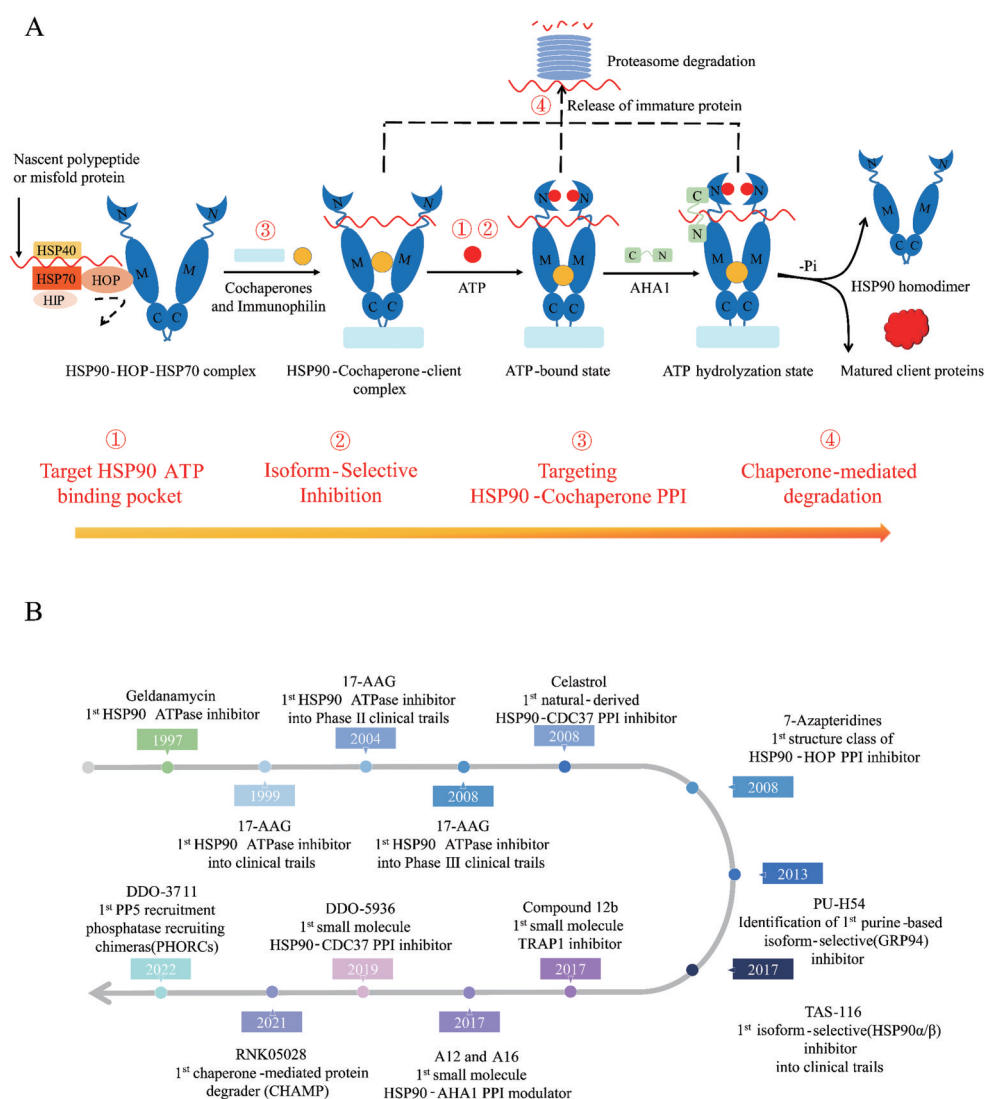


Figure 1 The mechanism of the molecular chaperone cycle and strategies for inhibiting the molecular chaperone machinery (A). HSP: Heat shock protein. HOP: Homeodomain only protein; HIP: HSP70 interacting protein; AHA1: HSP90 ATPase homologue 1; PPI: Protein-protein interaction; ATP: Adenosine triphosphate. Timeline for the development of small molecules targeting molecular chaperone (B). CDC37: Cell division cycle 37; GRP94: 94-kDa glucose-regulated protein; TRAP1: Tumor necrosis factor receptor-associated protein 1; CHAMP: Chaperone-mediated protein degrader; PHORCs: Phosphatase recruiting chimeras

统 (ubiquitin-proteasome system, UPS) 识别并降解^[10]。

按照小分子结构类型, ATPase 抑制剂可分为以下 4 类: 格尔丹霉素衍生物类、间苯二酚类、嘌呤骨架类和苯甲酰胺类 (图 2)。由于格尔丹霉素在治疗剂量下展现出显著肝脏毒性、低溶解度和稳定性欠佳等问题^[7], 研究者们通过对格尔丹霉素结构进行优化, 试图改善其理化特性, 陆续获得了 17-AAG、17-DAMG、IP-504 和 IP-493 等格尔丹霉素衍生物, 共同构成了第一代 HSP90 ATPase 抑制剂。其中, 衍生物 17-AAG ($IC_{50} = 0.031 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 因肝毒性缓解而成为第一个进入临床试验的 HSP90 抑制剂 (NCT00003969), 用于成人实体瘤的治疗^[21]。此外, 后续的诸多实验表明, 17-AAG 在

多发性骨髓瘤 (multiple myeloma, MM) 的治疗领域也有着重要作用^[22]。17-AAG 单药使用的情况下, 能在体内和体外对 MM 细胞产生多效作用, 包括降低蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB 或 AKT) 和抗凋亡蛋白 caspase-8/caspase-9 的活性, 使骨髓基质细胞对癌症细胞的保护作用失效等, 表现出抗增殖作用 (图 2)^[22]。然而, 17-AAG 单药使用疗效不佳, 药物化学家们转而筛选联合用药策略。临床试验结果表明, 17-AAG 和蛋白酶体抑制剂硼替佐米 (bortezomib) 的联用可提升耐药 MM 细胞对硼替佐米的敏感性, 并具有良好的耐受性 (NCT00514371)^[22,23]。但是, 格尔丹霉素衍生物类药性、治疗剂量下的低效性和代谢物肝毒性问题始

终难以解决,随着 17-AAG 临床 III 期试验终止,第一代 ATPase 抑制剂研究宣告失败。

第二类 ATPase 抑制剂的间苯二酚母核来源于天然产物根赤壳菌素 (radicol)。1953 年,根赤壳菌素最早从真菌中提取得到,后来这种抗生素被发现也能和格尔德霉素一样作用于 HSP90 N 端 ATP 口袋 ($IC_{50} = 30 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)。尽管由于其结构环氧部分的不稳定性^[7],体内活性不佳,但其结构中的间苯二酚母核在 X-衍射共晶研究中发现同 HSP90 N 端 ATP 口袋 Asp93 和 Thr184 形成氢键作用,是高靶标亲和力的关键。故而间苯二酚部分被保留用以指导一系列衍生物的合成。加特司匹 (ganetespi) 是通过基于药物片段的设计策略获得的三唑类间苯二酚抑制剂,亲和力和安全性均得到改善 (图 2)^[24]。目前,已有累计 37 项 (其中 24 项完成,9 项终止) 针对加特司匹的临床研究,适应症涉及多发性骨髓瘤、黑色素瘤、乳腺癌、非小细胞肺癌 (non small cell lung cancer, NSCLC)、直肠癌等,研究阶段最高 (III 期) 的是治疗 NSCLC。在体外 NSCLC 细胞系中,加特司匹能引起受体酪氨酸激酶的耗竭,抑制下游通路和细胞增殖,诱导细胞凋亡, IC_{50} 值为 $2\sim 300 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$,远低于 17-AAG 的 $0.02\sim 3.50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[25]。体内研究表明加特司匹 ($125 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, iv) 能在整个肿瘤组织中有效分布,表现出比 17-AAG 更强效力,且无明显心脏或肝脏毒性^[24],然而,加特司匹联合多西他赛 (docetaxel) 对 NSCLC 患者的治疗 III 期临床试验却在

2015 年因总生存风险比不理想而终止^[5]。其他进入临床研究阶段的间苯二酚小分子包括: KW-2478、芦米司匹 (luminespib) 和奥那司匹 (onalespib),最高临床阶段皆为 II 期。相较于 GDA 系列化合物,间苯二酚骨架的小分子呈现出更少的毒副作用和更好的耐受性,但是治疗效果不理想。

第三类 ATPase 抑制剂嘌呤骨架类的研究始于 2001 年,基于对 ADP/ATP 以及格尔德霉素和根赤壳菌素等抑制剂与 HSP90 共晶结构的研究,Chiosis 等^[26]发表了首个嘌呤骨架的 HSP90 抑制剂 PU-3,虽然 PU-3 本身活性不佳,但提供了一种新的 HSP90 ATPase 抑制剂结构母核。代表性分子 CUDC-305 ($IC_{50} = 100 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 是一种可口服的嘌呤骨架 HSP90 抑制剂 (图 2),通过抑制 P13K/AKT 和 RAF/MEK/ERK 等多种信号通路诱导细胞凋亡,且具有独特的药理性: CUDC-305 具有很高的口服生物利用度 (96.0%) 和肿瘤组织选择性保留 ($t_{1/2} = 20.4 \text{ h}$),还能透过血脑屏障在脑组织中达到有效浓度。CUDC-305 在 40 种癌细胞系中 (34 种实体瘤和 6 种血液瘤) 展示出抗增殖活性,平均 IC_{50} 值为 $200 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[27]。此外, CUDC-305 在 2018 年被用于银屑病治疗的临床试验中 (NCT03675542)。除 CUDC-305 外,此类分子还包括 BIIB021、PU-H71 和 MPC-3100 等,他们在溶解度方面有所改善,但临床疗效不佳,止步于 I / II 期研究。

第四类 ATPase 抑制剂为苯甲酰胺类,主要由 SNX-

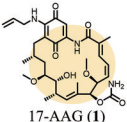

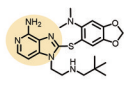
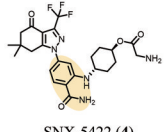
Scaffold	Representative Molecule	Biological evaluation and clinical state	Limitations
GDA derivatives	 17-AAG (1)	<ul style="list-style-type: none"> $IC_{50} = 0.031 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (FP) In vivo and in vitro activity (MM cells) Highest clinical phase: III (Multiple Myeloma) 	<ul style="list-style-type: none"> Poor efficacy × Limited solubility and bioavailability ×
Resorcinol derivatives	 Ganetespi (2)	<ul style="list-style-type: none"> $IC_{50} = 2\text{-}300 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (NSCLC cell lines) Highest clinical phase: III (Non-small Cell Lung Cancer) 	<ul style="list-style-type: none"> Poor efficacy in clinical trials ×
Purine analogs	 CUDC-305 (3)	<ul style="list-style-type: none"> $IC_{50} = 100 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (FP) IC_{50} mean value = $200 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (multiple cancer cell lines) Highest clinical phase: I (Solid Tumors/Lymphoma) 	<ul style="list-style-type: none"> Poor efficacy in clinical trials ×
Benzamide analogs	 SNX-5422 (4)	<ul style="list-style-type: none"> $IC_{50} = 32 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (FP) $IC_{50} = 0.9\text{-}114.0 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (multiple cancer cell lines) Highest clinical phase: II (HER2 Positive Cancers) 	<ul style="list-style-type: none"> Ocular toxicity × Irreversible retinal damage ×

Figure 2 Chemical scaffolds of HSP90 ATPase inhibitors and biological/clinical data. GDA: Geldanamycin; FP: Fluorescence polarization; MM: Multiple myeloma; NSCLC: Non-small cell lung cancer; HER2: Human epidermal growth factor receptor 2

2112、SNX-5422、XL-888 和 TAS-116 等构成。其中, SNX-5422 ($IC_{50} = 32 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 采用前药设计改善了 SNX-2112 的溶解度和生物利用度, 并于 2008 年成为首个进入临床的苯甲酰胺类小分子, 用于实体瘤和淋巴瘤治疗^[28]。SNX-5422 在 20 余种实体瘤和血液瘤中表现出抗增殖活性 ($IC_{50} = 0.9\sim 114.0 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 诱导降解人表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2)、蛋白激酶 R (PKR) 样内质网激酶 (PKR-like endoplasmic reticulum kinase, pERK)、p56 和 HSP70 (EC_{50} 分别为 3、5、14 和 $7 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)。在 MM 异种移植的小鼠模型中, SNX-5422 能促进 MM 细胞凋亡和降低微血管密度, 抑制肿瘤生长 (图 2)^[11]。但是, 关于 SNX-5422 的 II 期临床试验由于眼毒性和潜在的不可逆视网膜损伤而受阻。

本课题组在研究早期也致力于开发 HSP90 ATPase 抑制剂。2014 年, 通过基于配体和化合物库的虚拟筛选技术 ROCS (rapid overlay of chemical structures), 以奥那司匹为参照化合物, 筛选出基于间苯二酚结构的 5,6,7,8-四氢吡啶 [4,3-d] 嘧啶核苗头化合物 ($IC_{50} = 45.39 \pm 2.82 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)^[8]。而后, 在分子对接模拟对配体-蛋白相互作用的研究和构效关系、构性关系分析的辅助下进行两轮优化, 所得优化产物不仅靶标亲和力提升 ($IC_{50} = 0.028 \pm 0.002 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 且体内肝微粒体代谢稳定性良好, 无眼毒性, 展示出优良的安全特性, 成为颇具潜力的小分子候选物^[9]。

如今, HSP90 ATPase 抑制剂的研发已走过 20 余载, 但仍未能有一个安全性和疗效俱佳的小分子药物经美国食品药品监督管理局批准上市。虽然药物化学家通过骨架更新和结构优化对 ATPase 抑制剂的类药性和物化性质进行了优化, 但是其核心抑制策略始终无法绕开 N 端 ATP 结合口袋。N 端 ATP 抑制造成 HSP90 底物蛋白无选择性地降解, 还会代偿性引起 HSP70 表达, 造成热休克反应, 降低药效, 以上是靶向 ATPase 的小分子药物始终难以解决的问题。因此, 纵然仍有诸多 ATPase 抑制剂处于临床研究当中, 药物化学家们需深入对分子伴侣系统的生物学研究, 寻求新的作用位点, 探索基于全新机制的靶向策略。

3 HSP90 亚型选择性抑制剂的发展

ATPase 抑制剂对 HSP90 各个亚型的抑制活性相当, 从而造成泛抑制和毒副作用。为解决这一问题, 药物化学家们致力于开发亚型选择性抑制剂实现对肿瘤细胞精准杀伤。在哺乳动物细胞中, HSP90 有 4 种亚型: HSP90 α/β 、GRP94 和 TRAP1。HSP90 α/β 分布于细胞质, 二者调控的信号通路和客户蛋白 (HSP90 α : 原癌基因丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (RAF-1)、细胞外信号调

控的蛋白激酶 5 (ERK-5) 和凋亡抑制基因 Survivin 等, HSP90 β : 周期蛋白依赖性激酶 4/6 (CDK4/6)、AKT 和趋化因子受体 CXCR4 等) 与癌症高度关联^[6]; GRP94 分布于内质网, 其客户蛋白 (Toll 样受体、胰岛素样生长因子、结合素和免疫球蛋白等) 与细胞迁移和黏附相关, 在肿瘤转移和免疫逃避过程中有关键作用^[29]; TRAP1 位于线粒体, 具有抗凋亡和抗氧化特性, 可以调节活性氧介导的致死应激和伴侣蛋白变性, 保护线粒体完整性^[30]。HSP90s 的氨基酸序列高度同源, 任意两者间相似的可达 50%~60%^[29]。这一保守性进一步体现在结构上, 他们均是由 3 个结构域构成的同源二聚体, 包括: 含 ATP 结合位点的 N 端结构域 (N terminal domain, NTD)、用于结合客户蛋白的中部结构域 (middle domain, MD) 和二聚化的 C 端结构域 (C terminal domain, CTD)。HSP90s 的保守性限制了基于结合口袋氨基酸差异的分子设计, 但随着小分子-蛋白晶体结构研究的深入, 配体诱导的特异性构象变化为亚型选择性抑制剂的设计提供了方向。

2014 年, Ernst 等^[31]通过比对小分子配体-HSP90s 的晶体结构, 发现 HSP90 α/β NTD ATP 口袋 104~111 氨基酸序列存在特异性构象变化: apo 状态下, 该序列为一段不规则的铰链, 在结合配体后则形成了 α -螺旋 (图 3A)。这一发现为 HSP90 α/β 选择性抑制剂的开发提供了生物学基础。目前, TAS-116 是首个也是唯一一个进入临床的 HSP90 α/β 选择性抑制剂 (HSP90 α , $K_i = 34.7 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$; HSP90 β , $K_i = 21.3 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$; GRP94 和 TRAP1, $K_i > 50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。TAS-116 甲酰胺基团同 Asp93 和 Thr184 形成水分子介导的氢键网络; 吡唑并 [3,4-b] 吡啶结构占据由 Leu107、Trp162 和 Phe138 构成的疏水区域; C-3 取代的异丙基则是占据 Ala111、Tyr139 和 Val136 形成的疏水口袋; 同样地, TAS-116 诱导了 Ile110-Gly114 的构象变化, 形成了新的 α -螺旋, 是其具备 HSP90 α/β 选择性的关键 (图 3B)^[31,32]。但是, TAS-116 并不具有 HSP90 α 和 HSP90 β 之间选择性, 这可能是由于二者高度的同源性 (95%) 而致使 TAS-116 无法在结合位点引起差异化的构象转变。在高表达 HER2 的 NCI-N87 人胃癌细胞异种移植的小鼠模型中, TAS-116 ($14 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 下调 HER2、HER3 和 AKT 蛋白水平, 抑制 P13K/AKT 和 MAPK/ERK 信号通路, 展示强大的抗肿瘤活性。同时, TAS-116 在动物模型实验中更多地在肿瘤组织富集, 有着良好的分布, 这也可能是其不引起眼毒性的原因之一^[13]。综合而言, TAS-116 是一个可口服的、安全性改善的 HSP90 α/β ATPase 抑制剂 (图 3)。2022 年 8 月, TAS-116 作为四线用药在日本获批上市, 用于癌症化疗后胃肠道间质瘤恶化^[33]。

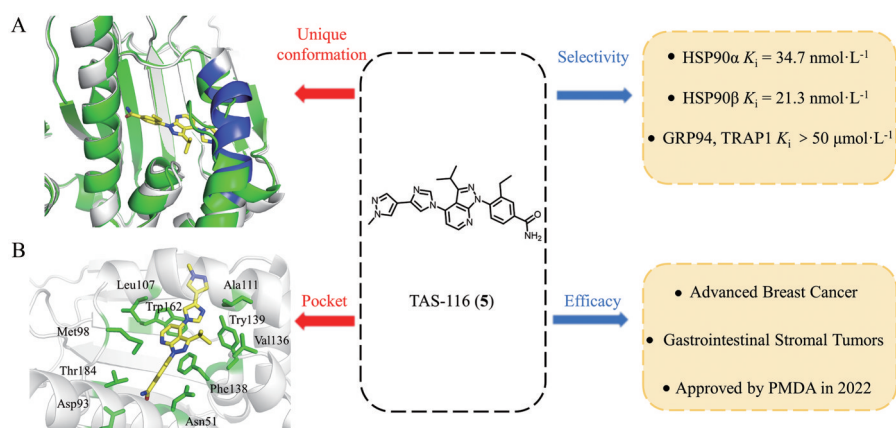


Figure 3 Superimposition of the crystal structure of apo-N-terminal Hsp90 α (PDB: 1YER, green) and the predicted binding mode of HSP90N-TAS-116 (white) (A). TAS-116 is indicated in yellow sticks. The ligand-induced conformation of residues 104–111 is indicated in blue cartoon. Key binding residues are highlighted in green. HSP90 α/β selective inhibitor TAS-116 and its biological testing (B). PMDA: Pharmaceuticals and medical devices agency

与 HSP90 α/β 选择性抑制剂相似, GRP94 抑制剂的研究也是基于特定的构象变化。2013 年, Patel 等^[12]发现在 PU-H54 和 GRP94 的共晶结构中有一个配体诱导的特异性疏水位点 site 2 (图 4), 利用疏水取代基团占据该位点成为 GRP94 抑制剂开发的关键。2018 年, 本课题组针对 site 2 开展了深入研究, 以求获取活性更佳的 GRP94 抑制剂。通过比对 PU-H54 和 HSP90 α 、GRP94 的共晶结构发现, 在 HSP90 α 结合袋中, Phe138 平行排列; 而在 GRP94 中, PU-H54 的 8 位芳基基团插入 GRP94 的 site 2, 并且造成残基 Phe199 倾斜 (图 4)。GRP94 构象中的“Phe199 移位”仅发生在配体存在的情况下, 因此, 假设用具有刚性基团的化合物来诱导这种构象变化能实现更好的 GRP94 选择性。根据以上假设, 本课题组将芳基与苯甲酰胺支架结合, 形成了一系列新的 GRP94 选择性抑制剂^[15]。最终, 获得的 GRP94 inhibitor 1 (图 4), 相较于 HSP90 α , 有着 1 000 倍的 GRP94 活性选择性 (HSP90 α : IC₅₀ > 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; GRP94: IC₅₀ = 2 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)。在 Panc-1 细胞系中, GRP94 inhibitor 1 能在不干扰 AKT 和 HSP70 的表达的情况下, 选择性下调 GRP94 的客户蛋白 (整合素 $\alpha 2$ 和整合素 αL 等)。在溃疡性结肠炎小鼠模型中, GRP94 inhibitor 1 展示出强效的

抗炎作用^[15]。总的来说, 本课题组的研究证明 Phe199 的移位与实现 GRP94 选择性有关, 为后续的开发提供了指导。

2017 年, Park 等^[14]通过对 HSP90、TRAP1 和 PU-H71 的共晶研究, 发现了二者之间存在的细微结构差异: TRAP1 结合位点中的 172~201 氨基酸序列相较于在 HSP90 中是无序的, 且两个保守的氨基酸 Asn171 和 Gly202 在 HSP90 和 TRAP1 中有着不同的布局 (图 5A)。基于以上结果, 他们对 PU-H71 的咪唑环进行改造得到了 7 (TRAP1, IC₅₀ = 79 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$; HSP90, IC₅₀ = 698 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 图 5), 与 PU-H71 不同, 7 的吡唑并嘧啶环和保守氨基酸 Gly202 旁的 Phe201 形成 $\pi-\pi$ 堆积作用; 此外, 吡唑环 N-2 和 Asn171 形成水分子介导的氢键网络, 以上相互作用是 7 具备 TRAP1 选择性的关键 (图 5B)^[14]。在 HeLa 细胞中, 7 导致线粒体膜电位下降和活性氧的过量生成。且在 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下抑制客户蛋白的表达而不上调 HSP70^[14]。

HSP90 亚型选择性抑制是减少 HSP90 泛抑制剂不良反应的替代策略。对 HSP90 各亚型及其抑制剂的共晶结构研究为基于结构的药物设计提供了有力的指导^[13-15]。同时, 选择性抑制剂的发现又有助于研究各

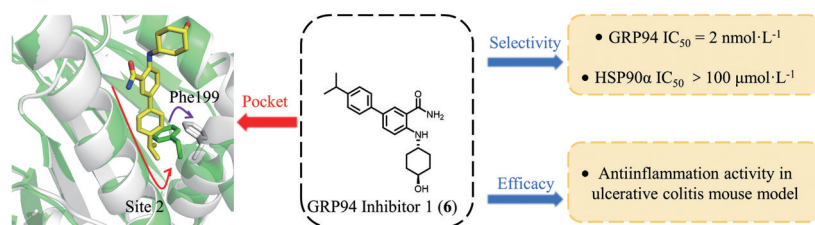


Figure 4 Superimposition of the co-crystal structure of apo-GRP94 (PDB: 3O2F, green) and the predicted binding mode of GRP94-6 (White). 6 is indicated in yellow sticks. The unique site 2 is indicated by the red curve. The "Phe199 shift" effect is indicated by a small magenta arrow. GRP94 selective inhibitor 6 and its biological testing

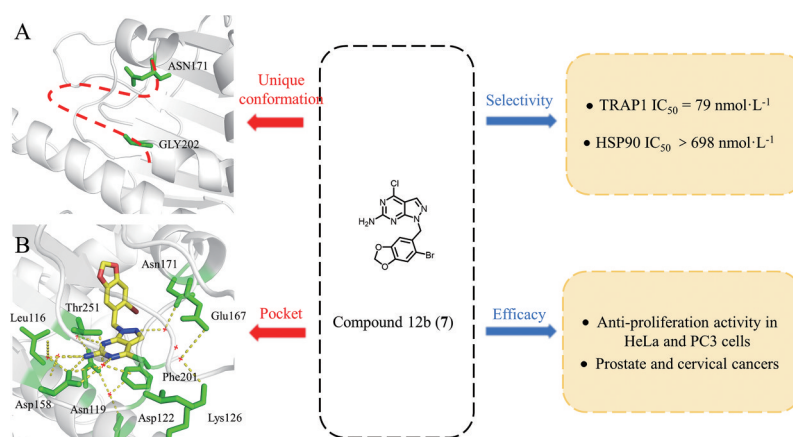


Figure 5 The co-crystal structure of TRAP1-PU-H71 (PDB: 4Z1F, white). The disordered sequence 171–202 in the binding site is indicated *via* red dash (A). The co-crystal structure of TRAP1-7 (PDB: 3Y2N, white) (B). **7** is indicated in yellow sticks. The key binding residues are highlighted in green. Dotted yellow lines and red wires indicate intermolecular hydrogen bonds and water molecules, respectively. TRAP1 selective inhibitor **7** and its biological testing

亚型的功能, 形成一个互促的良性循环。但是单一亚型的抑制作用效果不能满足临床需求, 并且当下对于亚型生物学功能探索不足以支撑成药性研究, 提出明确的临床适应症。因此, 基于现有的研究进展, 靶向亚型设计小分子的策略暂无法对泛抑制剂形成有效替代。

4 HSP90-cochaperone PPI 抑制剂的发展

共伴侣蛋白是分子伴侣循环的重要组成部分, 其功能包括不同底物的识别与递呈, 构象稳定和酶功能催化等。近年来, 随着对诸多共伴侣蛋白与 HSP90 之间的相互作用机制和结合位点研究的深入, 靶向共伴侣蛋白与 HSP90 的蛋白-蛋白相互作用、干扰共伴侣蛋白对分子伴侣循环的调控成为新的药物设计策略。这种基于不同作用机制的策略绕开了经典 ATP 结合口袋, 能够避免对 HSP90 泛抑制; 同时, 得益于各共伴侣蛋白对不同底物蛋白的特异性识别, 有望借此实现针对不同疾病中特征高表达的蛋白的靶向降解。下文将围绕 CDC37、AHA1 和 HOP 三种共伴侣蛋白的 PPI 抑制剂展开。

CDC37 是一种激酶特异性的共伴侣蛋白, 其能识别多种未折叠的激酶客户蛋白 (受体酪氨酸激酶、非受体酪氨酸激酶、淋巴细胞特异性酪氨酸激酶、丝氨酸/苏氨酸激酶等) 并将它们募集至 HSP90 完成折叠和成熟^[34]。CDC37 已被证实包括前列腺癌、肝癌和多发性骨髓瘤等多种癌症细胞中过表达, 且癌症相关激酶 (AKT、CDK4、ERK 和 B-RAF 等) 的成熟高度依赖 CDC37 与 HSP90 间的相互作用^[35]。因此, 靶向 HSP90-CDC37 PPI 被视为一种潜在的分子设计策略。2008 年, 研究发现天然产物雷公藤红素 (celastrol) 能够下调 HSP90 激酶客户蛋白的表达而不引起热休克反应。

2009 年, Sreeramulu 等^[36]的后续研究通过异核单量子相干谱 (heteronuclear singular quantum correlation, HSQC) 和免疫共沉淀 (co-immunoprecipitation, Co-IP) 确证了雷公藤红素的抗增殖活性源自结合 CDC37 NTD 而干扰了 HSP90 和 CDC37 的 PPI。虽然雷公藤红素的靶标众多、无特异性、成药性欠佳, 但也为靶向 HSP90-CDC37 PPI 提供了部分前期思路。2019 年, 本课题组通过分子动力学模拟和点突变分析, 发现 Glu47/Gln133 (HSP90) 和 Arg167 (CDC37) 是二者相互作用的关键氨基酸, 突变上述任一氨基酸都将导致 HSP90-CDC37 复合物解离 (图 6B)^[16]。设定该区域为结合热区, 通过对化合物库的高通量筛选和生物学评价获得苗头化合物, 结构优化后得到了首个 HSP90-CDC37 PPI 小分子抑制剂 DDO-5936 [生物层干涉测量法 (bio-layer interferometry, BLI): $K_D = 7.41 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 等温滴定量热法 (isothermal titration calorimetry, ITC): $K_D = 5.68 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 图 6]。HSQC 发现 DDO-5936 结合于一个包括 Glu47 在内的 HSP90 N 端口袋, 该口袋位于 HSP90-CDC37 相互作用区域, 且临近 HSP90 ATP 结合位点, 但 DDO-5936 并未对 ATPase 产生抑制 ($\text{IC}_{50} > 50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 图 6A)。DDO-5936 展示出良好的体内体外活性: 在 HCT116 细胞中 ($\text{IC}_{50} = 10.24 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), DDO-5936 选择性下调 CDC37 依赖的激酶蛋白 (CDK4/6 和 p-AKT 等) 而不影响其他 HSP90 客户蛋白, 进而阻断细胞周期; 在多种 HCT116 异种移植的器官中, DDO-5936 的疗效和安全性俱佳^[16]。本课题组后续对 DDO-5936 的进一步结构修饰获得了亲和力、理化性质和体内活性改善的 DDO-5942^[37]。DDO-5936 揭示了一个全新的 HSP90-CDC37 PPI 抑制位点, 但囿于缺乏作用于该位点的小分子-蛋

白的共晶,进一步的药物设计和成药性优化难以开展^[5]。目前,针对HSP90-CDC37 PPI抑制剂的研发仍处于起步阶段。

AHA1是作用于分子伴侣循环后期(ATP水解,图1A)的另一共伴侣蛋白,能提升HSP90 ATPase的活性,加速HSP90 N端闭合构象的形成^[38]。AHA1具有两个结构域,AHA1 NTD与HSP90 MD结合形成半闭合构象,AHA1 CTD的空间位阻致使HSP90 NTD游离MD,这样更有利于ATP进入^[39]。此外,AHA1还可能与客户蛋白的选择性相关:在酵母菌中,AHA1的敲除影响了糖皮质激素受体和SRC激酶的成熟^[40]。靶向HSP90-AHA1 PPI成为一种新的HSP90抑制策略。2020年,Singh等^[18]通过喹哪啶红ATPase活性测定证明SEW84能抑制AHA1提升的HSP90 ATPase活性($IC_{50} = 0.30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),进一步的HSQC试验表明SEW84结合于AHA1 CTD ($K_D = 1.74 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)进而阻断AHA1和HSP90的PPI,但由于缺乏复合物共晶,具体作用位点和相互作用模式还有待阐明(图7)。在HEK293细胞中,SEW84能抑制雄激素受体和特异性清除磷酸化的Tau蛋白,提示其适应症可能与前列腺癌和神经退行性疾病相关。SEW84的构效关系研究表明,结构中的三氟甲基和肼基部分为活性相关基团,苯环上的间位或对

位取代基起活性调节作用^[18]。SEW84提供了一种新型的HSP90-AHA1 PPI抑制剂的结构母核。除SEW84外,靶向HSP90-AHA1 PPI的小分子还包括A12、A16和TL-2-8等,相关研究处于生物测试阶段^[39]。

回到HOP作用的分子伴侣循环起始阶段(图1A),HOP负责连接HSP70和HSP90并将处于HSP70复合物中的新生多肽装配至HSP90。HSP90通过CTD的五肽重复序列MEEVD和HOP的TPR2A结构域发生相互作用($K_D = 11 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,图8)^[41]。这种相互作用对HSP90分子伴侣循环的启动十分重要,设计小分子阻断HSP90-HOP PPI成为干扰分子伴侣循环的有效策略。2008年,Yi等^[17]通过AlphaScreen高通量筛选,得到7-氮杂蝶啶类化合物,其中**10**活性最好, K_D 值为 $202 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (图8)。ITC证明**10**同TPR2A存在1:1结合,但具体的作用位点和结合模式尚未阐明。在BT474和SKBR3细胞中,这些化合物降低HSP90客户蛋白HER2的表达水平,诱导细胞凋亡,但并不引起HSP70的上调。**10**证实了靶向HSP90-HOP PPI的可行性并展示了较好的安全性,为后续研究提供了结构母核^[17]。

分子伴侣循环的正常运行不仅需要ATP来推动构象的转变,同时也要借助在不同阶段和各共伴侣蛋白的相互作用。鉴于作用于HSP90 NTD ATP结合口袋所

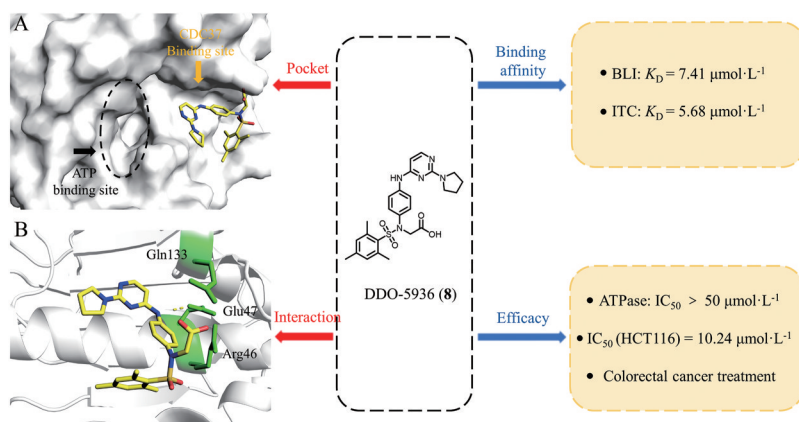


Figure 6 Overall structure with the surface of HSP90 colored white (A). Detailed binding region of DDO-5936. HSP90 is represented as a white cartoon, and DDO-5936 is shown as yellow sticks (B). The residues Arg46, Glu47 and Gln133 are highlighted within the green stick model. Hydrogen bonds are displayed as yellow dotted lines. Structure and biological testing of DDO-5936. BLI: Bio-layer interferometry; ITC: Isothermal titration calorimetry

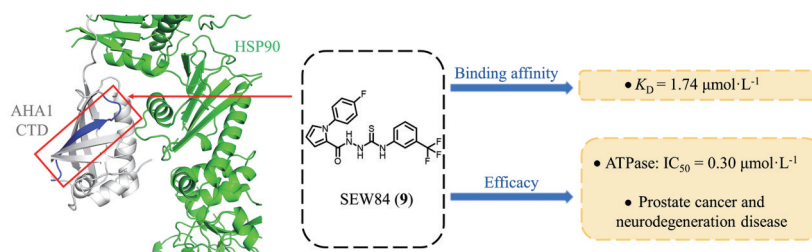


Figure 7 Co-crystal structure of AHA1-CTD (white) and HSP90 (PDB: 6XLG, green). Predicted binding site is indicated in blue. Structure and biological testing of SEW84. CTD: C terminal domain

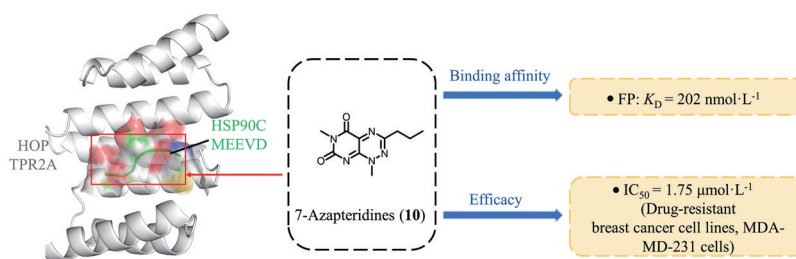


Figure 8 Co-crystal structure of HOP-TPR2A (white) and HSP90C MEEVD sequences (show in surface and cartoon, PDB: 1ELR, green). Predicted binding site is indicated in red rectangle. Structure and biological testing of 7-azapteridines. TPR: Tetratricopeptide repeat; MEEVD: Met-Glu-Glu-Val-Asp motif

造成的泛抑制和诸多不良反应, 药物化学家们试图通过靶向 HSP90-cochaperone PPI 来实现对分子伴侣循环的针对性调控。这一药物分子设计策略已在 CDC37、AHA1 和 HOP 等共伴侣蛋白上取得可观的进展。基于共伴侣蛋白的客户蛋白选择性, 经典热休克反应的有效避免都证实了该策略颇具潜力。当然, 该领域的研究仍有低亲和力, 具体作用机制不明确, 缺乏复合物共晶指导进一步药物优化等问题尚待解决。

5 基于分子伴侣系统的异双功能分子

基于异双功能分子 (heterobifunctional small molecule) 的靶向蛋白降解技术在近年来成为热门的药物设计策略。其中, 基于 E3 泛素连接酶和泛素-蛋白酶体系统的靶向蛋白水解嵌合体 (proteolysis targeting chimeras, PROTACs) 技术进展迅速, ARV-110 和 ARV-471 两个分子已进入临床 II 期^[42]。然而, 由于 E3 泛素连接酶分布的广泛性, PROTACs 造成的正常组织损伤和诱导机体耐药机制是其主要面临的问题^[43]。利用分子伴侣系统介导 TPD 或能解决上述问题。分子伴侣系统除了帮助客户蛋白折叠、成熟外, 还可以识别错误折叠的蛋白以加速其经 UPS 的降解^[38]。分子伴侣系统中的 HSP90 能与多种 E3 泛素连接酶 (泛素样含 PHD 和环指域 1、热休克蛋白 70 羧基端作用蛋白、清选蛋白 5 和小鼠双微体 2 蛋白等^[44-46]) 产生相互作用, E3 泛素连接酶继而把小泛素蛋白附着于底物蛋白上, 将其标记为缺陷或受损蛋白, 加速蛋白酶体对其的识别和降解。此外, HSP90 在癌症细胞中过表达, 诸多癌症相关蛋白依赖 HSP90 成熟。综合 HSP90 的以上特征, 基于分子伴侣系统设计新的 TPD 平台颇具潜力。

2021 年, 珞诺生物医药科技首创性地提出了 CHAMP 技术。CHAMP 是一种基于分子伴侣系统的异双功能分子, 通过 linker 链接靶蛋白配体和分子伴侣配体, 能化学诱导性地拉近靶蛋白和分子伴侣复合物, 形成三元复合物, 将靶蛋白泛素化后降解, 代表了全新的小分子设计策略。RNK05028 是首个报道的 CHAMP 分子, 它由溴结构域和超末端结构域 (bromo-

domain and extra-terminal domain, BET) 蛋白抑制剂 (+)-JQ1^[47], 含三唑酮的间苯二酚系列 HSP90 抑制剂^[24] 以及链接二者的 linker 构成, 实现了对癌症相关溴域蛋白 -4 (bromodomain-containing protein 4, BRD4) 的靶向降解 (图 9A)。在 MV-4-11 细胞中, 经免疫共沉淀测定, RNK05028、BRD4 和 HSP90 形成了三元复合物。对比 BET 抑制剂 MK-8628、RNK05028 对 BRD4 具有更强的降解作用。该 CHAMP 分子还具有优良的选择性: 与 BET-PROTAC 对 BRD2、BRD3 和 BRD4 同等效力的降解不同^[48], 蛋白质印迹法 (Western blot) 结果显示 RNK05028 仅降解 BRD4 ($\text{IC}_{50} = \sim 50 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 同时, RNK05028 对除 BRD4 外的其他 HSP90 客户蛋白无降解效果。RNK05028 展示出良好的药代动力学特性, 在 MV-4-11 细胞异种移植的小鼠模型中, 选择性浓集于癌细胞中且单剂给药后在 72 h 内持续保有降解活性。其后续优化产品 RNK05047 已于 2022 年 8 月在美国 I / II 临床完成首例患者给药, 用于评估在晚期实体肿瘤以及淋巴瘤受试者中的安全性和耐受性。2023 年 2 月, 珞诺生物向药品审评中心提交 RNK05047 的临床试验申请, 并已被受理。除珞诺的 BRD4-CHAMP 系列分子外, 2023 年, Li 等^[20]发表了基于 HSP90 配体 BIIB021 和 CDK4/6 配体哌柏西利 (palbociclib) 的小分子 HEMTAC (heat shock protein 90-mediated targeting chimeras), 实现了对 CDK4/6 的靶向降解, 是基于分子伴侣系统的 TPD 设计策略的又一成功应用。综合而言, 以分子伴侣系统为生物效应器, 利用其特异性底物识别和肿瘤细胞高表达的特性, 设计靶向蛋白降解的异双功能分子技术, 与现有 TPD 手段相比, 因选择性提升而降低了脱靶风险, 具备更好的效力和安全性。

靶向分子伴侣系统的异双功能分子不仅在靶向蛋白降解领域有所建树, 还在靶向去磷酸化调节领域取得突破。蛋白磷酸化水平异常与多种疾病的发生发展相关, 包括炎症、肝脏疾病、心肺功能疾病以及癌症等^[49]。PP5 是 HSP90 的共伴侣蛋白, PP5 结合于 HSP90 解除自抑制状态进而去磷酸化 HSP90-CDC37-Client 复合物,

促进HSP90构象转变,释放成熟客户蛋白^[38]。2022年,本课题组基于此前对HSP90-CDC37-PP5-Client分子伴侣系统特点的研究,报道了首个募集PP5的PHORC分子DDO-3711(图9B)。DDO-3711由凋亡信号调节激酶1(apoptosis signal-regulated kinase 1, ASK1)的抑制剂TCASK10($IC_{50} = 37.2 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$),PP5激动剂P5SA-2(PP5 activation: 222%)以及linker三部分组成。一方面,DDO-3711作用于PP5激活其磷酸酶功能(PP5 activation: 424%);另一方面,结合ASK1($IC_{50} = 164.1 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)拉近与PP5距离,最终实现PP5对ASK1的自磷酸化位点Thr848的靶向去磷酸化调节,进而抑制ASK1下游信号通路c-Jun氨基末端激酶、p-38的激活以及细胞周期相关蛋白CDK4/6、G1/S-特异性周期蛋白-D1的表达,表现出抗增殖活性。在MKN-45胃癌细胞和异种移植的小鼠模型中,较之于TCASK10和P5SA-2各自单用或联用,DDO-3711具备更优的活性($IC_{50} = 0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),提示DDO-3711或为有效的胃癌治疗手段^[19]。与PROTACs相比,PHORCs在不影响蛋白表达水平的情况下,实现了对底物蛋白磷酸化水平的精准调控,为小分子调控蛋白的翻译后修饰过程提供了重要研究思路与范例,同时也是靶向分子伴侣系统的异双功能分子药物设计

策略的有效实践。

6 总结与展望

一直以来,分子伴侣系统因其在蛋白稳态和细胞周期中的重要调控作用而被视作治疗多种相关疾病的理想靶标。1997年GDA确证为HSP90抑制剂并发现ATP结合口袋,此后近20年的时间是ATPase抑制剂研发的黄金年代,前后有30余种药物进入临床。但随着临床数据的累积,ATPase抑制剂三大缺陷也逐渐浮现:①眼毒性和肝毒性等不良反应;②有限的治疗效果;③热休克反应和机体耐药机制,成为制约HSP90抑制剂上市的主要因素。单药使用不理想,ATPase抑制剂或转向联合用药领域发挥余热^[50-52]。就靶向分子伴侣系统本身而言,亟需新的药物设计策略。2013年,首个GRP94抑制剂发现,开发HSP90亚型抑制剂的设计策略进入药物化学家们的视野^[12]。选择性抑制单一亚型HSP90可减轻泛抑制作用引起多种不良反应,但伴随着疗效的减弱。并且,HSP90四个亚型间高度同源,针对各亚型的结构和功能研究不足以支撑成药性研究。生物学研究进展或许能为作用于亚型选择性抑制剂注入活力。随着对分子伴侣系统作用机制研究的深入,共伴侣蛋白的调控作用被强调,通过干扰

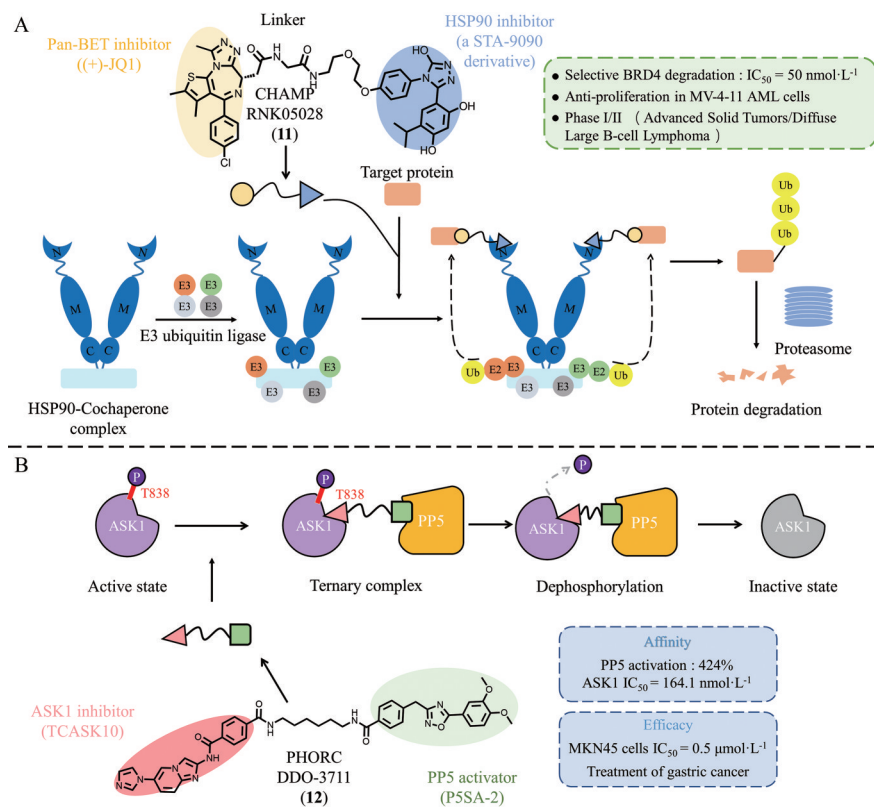


Figure 9 The structure, biological testing and mechanism of action for CHAMP (A). BET: Bromodomain and extra-terminal domain; BRD4: Bromodomain-containing protein 4; AML: Acute myelocytic leukemia. The structure, biological testing and mechanism of action for PHORC (B). ASK1: Apoptosis signal-regulated kinase 1; PP5: Ser/Thr protein phosphatase 5

HSP90-cochaperone PPI 实现对分子伴侣循环的精准调控代表了全新的药物设计理念。2008 年至今, 已涌现出多种共伴侣蛋白的 PPI 抑制剂, 他们基于全新的结合口袋, 有效避免了热休克反应, 并且基于共伴侣蛋白对底物的特异性识别实现了靶蛋白降解。但是, 由于 PPI 的动态性和复杂性, 这些分子的具体作用机制研究还不够深入; 同时, 相互作用蛋白间本身的低亲和力结合致使现有 PPI 抑制剂的结合活性不佳; 具体分子机制的阐明和更多小分子-蛋白共晶复合物的获得是 PPI 抑制剂进一步优化的关键。自 PROTACs 问世以来, 异双功能分子研究的热度日趋增加。结合分子伴侣系统强大的生物效应器特性, 选择性和安全性更佳的靶向降解技术 CHAMP 和靶向去磷酸化调节分子 PHORC 将靶向分子伴侣系统的药物设计推向一个新的高度, 提供了更多的可能性。由于分子伴侣底物蛋白/非底物蛋白本身界限的模糊性^[53], 众多以往“不可靶”或“可靶性差”的靶点, 有望借助分子伴侣系统的降解和调控作用成为有效的作用位点。基于非底物蛋白的靶向降解或许代表了下一代靶向分子伴侣系统的小分子设计策略。

作者贡献: 舒黄亮负责文章资料收集与撰写; 尤启冬、王磊负责文章的选题与修改, 为该文章的主要负责人。

利益冲突: 本文无利益冲突。

References

- [1] Ellis RJ, Minton AP. Protein aggregation in crowded environments [J]. *Biol Chem*, 2006, 387: 485-497.
- [2] Hartl FU, Bracher A, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis [J]. *Nature*, 2011, 475: 324-332.
- [3] Kim YE, Hipp MS, Bracher A, et al. Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis [J]. *Annu Rev Biochem*, 2013, 82: 323-355.
- [4] Saibil H. Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, 14: 630-642.
- [5] Wang L, Zhang Q, You Q. Targeting the HSP90-CDC37-kinase chaperone cycle: a promising therapeutic strategy for cancer [J]. *Med Res Rev*, 2022, 42: 156-182.
- [6] Li L, Wang L, You Q, et al. Heat shock protein 90 inhibitors: an update on achievements, challenges, and future directions [J]. *J Med Chem*, 2020, 63: 1798-1822.
- [7] Jhaveri K, Taldone T, Modi S, et al. Advances in the clinical development of heat shock protein 90 (HSP90) inhibitors in cancers [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1823: 742-755.
- [8] Sun H, Jia J, Jiang F, et al. Identification and optimization of novel HSP90 inhibitors with tetrahydropyrido[4,3-d]pyrimidines core through shape-based screening [J]. *Eur J Med Chem*, 2014, 79: 399-412.
- [9] Jiang F, Wang H, Jin Y, et al. Novel tetrahydropyrido[4,3-d]pyrimidines as potent inhibitors of chaperone heat shock protein 90 [J]. *J Med Chem*, 2016, 59: 10498-10519.
- [10] Garcia-Carbonero R, Camero A, Paz-Ares L. Inhibition of HSP90 molecular chaperones: moving into the clinic [J]. *Lancet Oncol*, 2013, 14: e358-369.
- [11] Li Z, Luo Y. HSP90 inhibitors and cancer: prospects for use in targeted therapies (review) [J]. *Oncol Rep*, 2022, 49: 6.
- [12] Patel PD, Yan P, Seidler PM, et al. Paralog-selective HSP90 inhibitors define tumor-specific regulation of HER2 [J]. *Nat Chem Biol*, 2013, 9: 677-684.
- [13] Ohkubo S, Kodama Y, Muraoka H, et al. TAS-116, a highly selective inhibitor of heat shock protein 90alpha and beta, demonstrates potent antitumor activity and minimal ocular toxicity in preclinical models [J]. *Mol Cancer Ther*, 2015, 14: 14-22.
- [14] Park HK, Jeong H, Ko E, et al. Paralog specificity determines subcellular distribution, action mechanism, and anticancer activity of TRAP1 inhibitors [J]. *J Med Chem*, 2017, 60: 7569-7578.
- [15] Jiang F, Guo A, Xu J, et al. Discovery of a potent GRP94 selective inhibitor with anti-inflammatory efficacy in a mouse model of ulcerative colitis [J]. *J Med Chem*, 2018, 61: 9513-9533.
- [16] Wang L, Zhang L, Li L, et al. Small-molecule inhibitor targeting the HSP90-CDC37 protein-protein interaction in colorectal cancer [J]. *Sci Adv*, 2019, 5: eaax2277.
- [17] Yi F, Regan L. A novel class of small molecule inhibitors of HSP90 [J]. *ACS Chem Biol*, 2008, 3: 645-654.
- [18] Singh JK, Hutt DM, Tait B, et al. Management of HSP90-dependent protein folding by small molecules targeting the AHA1 co-chaperone [J]. *Cell Chem Biol*, 2020, 27: 292-305.
- [19] Zhang Q, Wu X, Zhang H, et al. Protein phosphatase 5-recruiting chimeras for accelerating apoptosis-signal-regulated kinase 1 dephosphorylation with antiproliferative activity [J]. *J Am Chem Soc*, 2022, 145: 1118-1128.
- [20] Li Z, Ma S, Zhang L, et al. Targeted protein degradation induced by HEMTACs based on HSP90 [J]. *J Med Chem*, 2023, 66: 733-751.
- [21] Jez JM, Chen JCH, Rastelli G, et al. Crystal structure and molecular modeling of 17-DMAG in complex with human HSP90 [J]. *Chem Biol*, 2003, 10: 361-368.
- [22] Mitsiades CS, Mitsiades NS, McMullan CJ, et al. Antimyeloma activity of heat shock protein-90 inhibition [J]. *Blood*, 2006, 107: 1092-1100.
- [23] Richardson PG, Chanan-Khan AA, Lonial S, et al. Tanespimycin and bortezomib combination treatment in patients with relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma: results of a phase 1/2 study [J]. *Br J Haematol*, 2011, 153: 729-740.
- [24] Ying W, Du Z, Sun L, et al. Ganetespib, a unique triazolone-containing HSP90 inhibitor, exhibits potent antitumor activity and a superior safety profile for cancer therapy [J]. *Mol Cancer*

- Ther, 2012, 11: 475-484.
- [25] Shimamura T, Perera SA, Foley KP, et al. Ganetespib (STA-9090), a nongeldanamycin HSP90 inhibitor, has potent antitumor activity in *in vitro* and *in vivo* models of non-small cell lung cancer [J]. Clin Cancer Res, 2012, 18: 4973-4985.
- [26] Chiosis G, Timaul MN, Lucas B, et al. A small molecule designed to bind to the adenine nucleotide pocket of HSP90 causes HER2 degradation and the growth arrest and differentiation of breast cancer cells [J]. Chem Biol, 2001, 8: 289-299.
- [27] Bao R, Lai CJ, Qu H, et al. CUDC-305, a novel synthetic HSP90 inhibitor with unique pharmacologic properties for cancer therapy [J]. Clin Cancer Res, 2009, 15: 4046-4057.
- [28] Taldone T, Gozman A, Maharaj R, et al. Targeting HSP90: small-molecule inhibitors and their clinical development [J]. Curr Opin Pharmacol, 2008, 8: 370-374.
- [29] Gewirth DT. Paralog specific HSP90 inhibitors - a brief history and a bright future [J]. Curr Top Med Chem, 2016, 16: 2779-2791.
- [30] Altieri DC, Stein GS, Lian JB, et al. TRAP-1, the mitochondrial HSP90 [J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2012, 1823: 767-773.
- [31] Ernst JT, Liu M, Zuccola H, et al. Correlation between chemotype-dependent binding conformations of HSP90 alpha/beta and isoform selectivity-Implications for the structure-based design of HSP90 alpha/beta selective inhibitors for treating neurodegenerative diseases [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2014, 24: 204-208.
- [32] Uno T, Kawai Y, Yamashita S, et al. Discovery of 3-ethyl-4-(3-isopropyl-4-(4-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)-1H-imidazol-1-yl)-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridin-1-yl)benzamide (TAS-116) as a potent, selective, and orally available HSP90 inhibitor [J]. J Med Chem, 2019, 62: 531-551.
- [33] Hoy SM. Pimipitespib: first approval [J]. Drugs, 2022, 82: 1413-1418.
- [34] Taipale M, Krykbaeva I, Koeva M, et al. Quantitative analysis of HSP90-client interactions reveals principles of substrate recognition [J]. Cell, 2012, 150: 987-1001.
- [35] Gray PJ, Prince T, Cheng J, et al. Targeting the oncogene and kinome chaperone CDC37 [J]. Nat Rev Cancer, 2008, 8: 491-495.
- [36] Sreeramulu S, Gande SL, Göbel M, et al. Molecular mechanism of inhibition of the human protein complex HSP90-CDC37, a kinome chaperone-cochaperone, by triterpene celastrol [J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2009, 48: 5853-5855.
- [37] Wang L, Jiang J, Zhang L, et al. Discovery and optimization of small molecules targeting the protein-protein interaction of heat shock protein 90 (HSP90) and cell division cycle 37 as orally active inhibitors for the treatment of colorectal cancer [J]. J Med Chem, 2020, 63: 1281-1297.
- [38] Schopf FH, Biebl MM, Buchner J. The HSP90 chaperone machinery [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2017, 18: 345-360.
- [39] Serwetnyk MA, Blagg BSJ. The disruption of protein-protein interactions with co-chaperones and client substrates as a strategy towards HSP90 inhibition [J]. Acta Pharm Sin B, 2021, 11: 1446-1468.
- [40] Harst A, Lin H, Obermann WM. Aha1 competes with HOP, p50 and p23 for binding to the molecular chaperone HSP90 and contributes to kinase and hormone receptor activation [J]. Biochem J, 2005, 387: 789-796.
- [41] Adão R, Zanphorlin LM, Lima TB, et al. Revealing the interaction mode of the highly flexible *Sorghum bicolor* HSP70/HSP90 organizing protein (HOP): a conserved carboxylate clamp confers high affinity binding to HSP90 [J]. J Proteomics, 2019, 191: 191-201.
- [42] Poh A. Proof-of-concept with PROTACs in prostate cancer [J]. Cancer Discov, 2020, 10: 1084.
- [43] Hua L, Zhang Q, Zhu X, et al. Beyond proteolysis-targeting chimeric molecules: designing heterobifunctional molecules based on functional effectors [J]. J Med Chem, 2022, 65: 8091-8112.
- [44] Ding G, Chen P, Zhang H, et al. Regulation of ubiquitin-like with plant homeodomain and RING Finger Domain 1 (UHRF1) protein stability by heat shock protein 90 chaperone machinery [J]. J Biol Chem, 2016, 291: 20125-20135.
- [45] Connell P, Ballinger CA, Jiang J, et al. The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins [J]. Nat Cell Biol, 2001, 3: 93-96.
- [46] Ehrlich ES, Wang T, Luo K, et al. Regulation of HSP90 client proteins by a Cullin5-RING E3 ubiquitin ligase [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106: 20330-20335.
- [47] Filippakopoulos P, Qi J, Picaud S, et al. Selective inhibition of BET bromodomains [J]. Nature, 2010, 468: 1067-1073.
- [48] Winter GE, Buckley DL, Paulk J, et al. Drug development. Phthalimide conjugation as a strategy for *in vivo* target protein degradation [J]. Science, 2015, 348: 1376-1381.
- [49] Ardito F, Giuliani M, Perrone D, et al. The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy [J]. Int J Mol Med, 2017, 40: 271-280.
- [50] Ojha R, Huang H, Huangfu W, et al. 1-Aroylindoline-hydroxamic acids as anticancer agents, inhibitors of HSP90 and HDAC [J]. Eur J Med Chem, 2018, 150: 667-677.
- [51] Wang M, Shen A, Zhang C, et al. Development of heat shock protein (HSP90) inhibitors to combat resistance to tyrosine kinase inhibitors through HSP90-kinase interactions [J]. J Med Chem, 2016, 59: 5563-5586.
- [52] Gao L, Sun Y, He C, et al. *In vitro* interactions between 17-AAG and azoles against *Exophiala dermatitidis* [J]. Mycoses, 2018, 61: 853-856.
- [53] Taipale M, Jarosz DF, Lindquist S. HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010, 11: 515-528.