

可控性蛋白降解靶向嵌合体 (PROTACs) 技术研究进展

牟 伊¹, 文 帅¹, 王 燕¹, 姜正羽^{2*}

(1. 泰州学院医药与化学化工学院, 江苏 泰州 225300; 2. 中国药科大学药学院, 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)

摘要: 蛋白降解靶向嵌合体 (PROTACs) 是一类新型蛋白降解技术, 能同时结合 E3 连接酶与疾病相关蛋白, 利用内源性泛素-蛋白酶体系降解靶蛋白。PROTACs 具有较佳的通用性、较强的蛋白降解活性和较好的目的蛋白选择性, 成为靶向蛋白降解领域的热点技术, 但具有降解不受控的风险。可控 PROTACs 引入了特定的刺激响应触发元件, 在特定的响应条件下可被触发, 产生/终止后续的蛋白质降解效应。本文概述了可控 PROTACs 设计策略, 并按照相应机制不同对代表化合物和研究进展进行了介绍, 从而为可控 PROTACs 的研究提供借鉴和思路。

关键词: 蛋白降解靶向嵌合体; 靶向蛋白降解; 可控性蛋白降解靶向嵌合体

中图分类号: R914 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)08-2193-10

Research progress in controllable proteolysis targeting chimeras

MOU Yi¹, WEN Shuai¹, WANG Yan¹, JIANG Zheng-yu^{2*}

(1. College of Pharmacy and Chemistry & Chemical Engineering, Taizhou University, Taizhou 225300, China;
2. Jiangsu Key Laboratory of Drug Design and Optimization, School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract: Proteolysis targeting chimeras (PROTACs) is an innovative technique in targeted protein degradation. PROTACs is a heterobifunctional molecule which can bind to the E3 ligase and target protein to form a ubiquitination complex, resulting in the ubiquitin-proteasome system dependent degradation of target protein. PROTACs has been regarded as the promising method in drug discovery campaign, for its high commonality, potent degradation activity and unique selectivity profile. However, the catalytic mechanism also induces the uncontrollable protein degradation risk. Controllable PROTACs contain the responsive element in the molecular entity. In certain conditions, the element can be triggered to activate or terminate the degradation event. In this review, we will briefly summarize the strategies in controllable PROTACs and describe the representative examples according to the responsive mechanism. We hope this review could provide some insight into the further development of controllable PROTACs.

Key words: proteolysis targeting chimeras; targeted protein degradation; controllable proteolysis targeting chimeras

蛋白降解靶向嵌合体 (proteolysis targeting chimeras, PROTACs) 是一种能够同时靶向结合 E3 连接酶与疾

病相关蛋白, 利用内源性泛素-蛋白酶体系降解靶蛋白的化学降解蛋白技术^[1,2]。PROTACs 技术的基本思路是设计含有双功能基的化合物分别结合泛素 E3 连接酶和目的蛋白, 形成稳定复合物, 进而通过 E3 连接酶实现对靶标蛋白的泛素化^[3-5], 最终利用泛素-蛋白酶体系降解目标蛋白。PROTACs 可介导泛素 E3 连接酶对特定蛋白质的识别并完成泛素化, 其最大特点是可

收稿日期: 2023-05-01; 修回日期: 2023-07-13.

基金项目: 江苏省高校自然科学基金 (21KJB350008); 泰州市社会发展项目 (TN202135); 江苏省“六大人才高峰”资助 (YY-110).

*通讯作者 Tel: 86-25-83271351, E-mail: jiangzhengyucpu@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0553

有效借助体内泛素-蛋白酶体系统实现对目的蛋白的高效泛素化降解^[6-10]。这一作用机制具备较佳的通用性,较强的蛋白降解活性和较好的目的蛋白选择性,成为诱导蛋白降解领域的前沿和热点技术^[11-15]。

PROTACs技术通过催化循环机制,可不断诱导泛素化循环直至靶标蛋白被彻底降解,且常以非选择性的方式对细胞或者组织发挥降解蛋白质的功能^[16-18],有可能会产生脱靶毒性。为了解决这一问题,研究人员提出可控PROTACs概念:通过不同的响应方式条件性调控PROTACs分子的靶向降解活性,由此提高PROTACs的时空分辨率,改善PROTACs对正常细胞的潜在毒性^[19,20]。本文将总结近期可控性PROTACs的设计思路及其研究进展。

1 PROTACs技术的机制和特点

2001年Crew课题组^[21]首次提出PROTACs概念,借助泛素E3连接酶可特异性介导蛋白泛素化的特点,实现对特定蛋白质的选择性泛素化,最终催化蛋白质降解。PROTACs分子的一端是和目的蛋白结合的小分子配体,负责对目的蛋白的识别;另一端是和E3连接酶结合的小分子配体,负责结合特定的E3连接酶;通过PROTACs分子促进E3连接酶和目的蛋白形成复合物,为泛素转移至目的蛋白建立了合适的空间环境,使目的蛋白和活化的泛素处于接近的合适空间位置,催化了泛素转移反应速率,实现了目的蛋白的泛素化(图1)。

PROTACs技术的作用机制使得其具备较佳的通用性、较强的蛋白降解活性和较好的目的蛋白选择

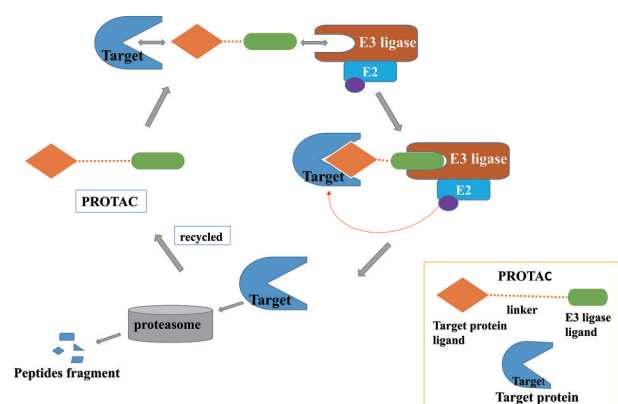


Figure 1 The mechanism of PROTACs. PROTACs consists of three parts: target protein ligand, E3 ligase ligand and "linker" structure that connects the two ligands. PROTACs binds to the target protein and E3 ligase respectively through ligands at both ends to form a stable terpolymer complex, which labels the target protein for ubiquitination, and the ubiquitinated target protein is then recognized and degraded by the proteasome in the cell. PROTACs: Proteolysis targeting chimeras

性^[22,23]。较好的通用性是指该技术能够充分利用体内泛素化系统对各种不同目的蛋白实现泛素化调节。人体内含有的600多种不同的泛素E3连接酶参与催化底物泛素化过程,其为PROTACs分子的设计和发现提供了广阔的空间,能够充分适配不同底物蛋白的需要。已有研究已经证实PROTACs技术能实现对多种不同蛋白的泛素化降解^[24-26]。较强的蛋白降解活性是指PROTACs通过催化作用促进目的蛋白泛素化,少量的PROTACs分子就能够实现对目的蛋白的循环降解,实现对目的蛋白的高效抑制^[27,28]。

较好的目的蛋白选择性是指PROTACs分子能够充分利用泛素化系统实现对目的蛋白的选择性。其选择性机制主要包含以下方面:目的蛋白配体对目的蛋白的选择性,即泛素化的前提是目的蛋白与PROTACs结合;E3连接酶催化作用选择性,即E3连接酶处在合适的催化活性状态;E3连接酶和目的蛋白适配性,即目的蛋白和E3连接酶必须相匹配,能够通过PROTACs分子介导,使目的蛋白的合适赖氨酸残基靠近E3连接酶的催化活性位点。上述的选择性机制保证PROTACs分子对目的蛋白有较好的选择性。现有研究表明,即使非选择性的目的蛋白配体也能通过PROTACs技术提升对诱导蛋白降解的选择性^[29-32]。PROTACs技术的上述特点使得其成为诱导蛋白降解领域最具潜力的新技术^[33]。

2 PROTACs技术现存的主要问题

PROTACs分子克服了传统小分子抑制剂的占据驱动的限制性,能够持续参与降解循环,具备较强的蛋白降解活性,只需催化剂量的PROTACs分子就能够快速且持续的降解靶蛋白^[34,35]。但这种催化降解的特性也是目前限制PROTACs技术发展的关键问题之一,即降解过程的不可调控性。PROTACs分子事件驱动的特点导致降解过程一旦发生就无法停止,并且PROTACs分子可循环参与靶蛋白的泛素化过程,对下游蛋白产生持久的抑制效果,即使是正常细胞或组织内存在少量的PROTACs分子也会产生较强的蛋白降解效应这可能会导致功能性靶蛋白的长时间的过度降解,带来潜在的风险。

因此,如果要避免PROTACs分子的潜在安全风险,其只能运用于某些疾病特异蛋白和正常生理状态下无活性,或者活性影响较小的蛋白质。如已经被广泛研究的肿瘤细胞内的融合蛋白或是突变的蛋白激酶。而众多的非酶蛋白,如转录因子、骨架蛋白等在生理状态下也具有重要的生物学功能。但是现有的PROTACs技术对细胞是缺乏选择性的,即其难以区分生理和病理状态下的目的蛋白,特别是难以实现肿瘤

细胞和正常细胞内的差异化活性。因此,如何提高 PROTACs 分子的组织靶向性,实现功能性靶蛋白的可控降解是 PROTACs 研究中的重要瓶颈问题。

3 可控 PROTACs 药物研究进展

为了实现 PROTACs 诱导的蛋白降解过程的可控,研究人员提出了“可控 PROTACs”的概念,即在 PROTACs 分子中引入特定的刺激响应触发元件^[36,37]。可控蛋白水解靶向嵌合体开发策略主要是采用不同的刺激响应片段 (cage) 封闭 PROTACs 分子中关键性的结合位点,使分子失去降解活性;在特定的响应条件下 PROTACs 被活化,产生后续的蛋白质降解效应 (图 2)。根据刺激的类型不同,将可控 PROTACs 分为光笼保护的 PROTACs、光开关的 PROTACs 分子、终止型 PROTACs、酶催化响应型 PROTACs、GSH 选择性响应 PROTACs、放射线响应的 PROTACs 等。

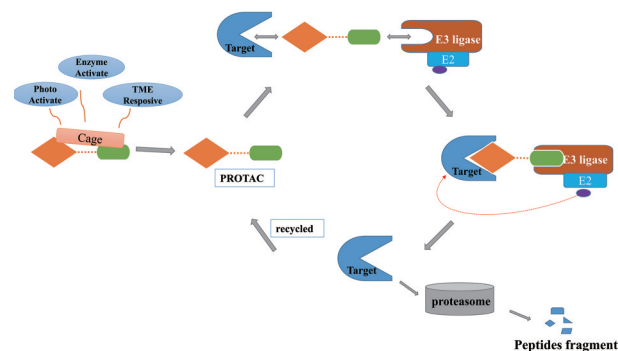


Figure 2 The mechanism of controlled PROTACs. The development strategy of controllable-PROTACs are mainly to block key binding sites in molecules with different stimulus response fragments (cage) to make the molecules lose degradation activity. Controllable-PROTACs are activated under specific response conditions to produce subsequent target protein degradation effects

3.1 光笼型 PROTACs 光可去除保护基团 (photocleavable protecting groups, PPG) 是一类光敏基团,在一定的光照条件下可发生不可逆光裂解反应从分子上脱除^[38]。光笼型蛋白水解靶向嵌合体 (pc-PROTACs, photocaged PROTACs) 是指在活性 PROTACs 分子中的 E3 连接酶配体、靶蛋白配体或连接子三部分中引入光可去除保护基团,光可去除保护基团通过掩盖具有生物活性的药效团,阻碍 PROTACs 分子与靶标的相互作用,阻断 PROTACs 分子的靶向降解作用活性^[39]。pc-PROTACs 光照前为惰性分子,光照后阻断基团从 pc-PROTACs 中去除,可以快速释放有活性的 PROTACs,并使靶蛋白降解,利用光照激活提高了 PROTACs 的时空分辨率。常见的光可去除保护基团有 DMNB₁、DMNB₂、NPOM、DEACM 等,具体结构式如图 3。

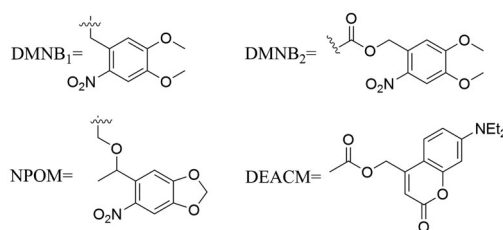


Figure 3 Commonly used photocleavable protecting groups

Xue 等^[40]基于 BRD4 降解剂 dBET1 设计了一系列光笼型 PROTACs (pc-PROTACs),将 4,5-二甲氧基-2-硝基苄基 (DMNB) 分别与 JQ1 (BRD4 配体) 酰胺键上的氮原子以及沙利度胺 (E3 连接酶配体) 上的戊二酰亚胺氮原子连接得到 pc-PROTAC1 和 pc-PROTAC2 (图 4)。其中,pc-PROTAC1 在 365 nm 光线照射下能够脱除 DMNB 释放 dBET1,从而实现对 BRD4 蛋白降解的调控。实验结果显示,pc-PROTAC1 对 BRD4 的亲合力较 dBET1 明显降低 ($IC_{50} = 7.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。该团队还对 pc-PROTAC1 以斑马鱼为模型进行了体内活性评价,365nm 紫外线照射处理 10 min 后的 pc-PROTAC1 组出现了与 dBET1 组类似的蛋黄延伸表型减少的现象,而未照射的 pc-PROTAC1 组出现了与空白对照组类似的结果。

2020 年 Liu 等^[41]基于 dBET1 和 dALK 设计了两类光笼型 PROTACs (opto-PROTACs) (图 5)。这类化合物是通过将 4,5-二甲氧基-2-硝基苄基 (DMNB) 与泊马度胺上的戊二酰亚胺氮原子连接而得。实验结果表明,在 365 nm 光线照射 5~15 min 后,这两类化合物均能够脱除 DMNB 释放 dBET1 和 dALK,从而实现对靶蛋白降解的调控。其中,opto-dBET1 光照激活后呈现剂量依赖性的方式抑制 HEK293FT、C4-2 细胞的增殖;opto-dALK 光照激活后呈现剂量依赖性的方式抑制 SU-DHL-1 细胞的增殖。

Kounde 等^[42]以 BRD4 靶蛋白配体 JQ1 和 VHL E3 连接酶配体为基础,和光去除保护基团 DMNB 合成了一种光笼型 PROTAC (PROTAC3) (图 6)。实验结果表明,在 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 溶液中,365 nm 照射 180 s 后,PROTAC3 可以完全脱除 DMNB,此外,在黑暗条件下,PROTAC3 在溶液中表现出良好的稳定性。BRD4 靶蛋白降解实验表明,365 nm 光线照射 60 s 后,PROTAC3 对 BRD4 蛋白呈现浓度依赖性的降解,避光条件下,PROTAC3 在细胞环境中表现出良好的稳定性。

Naro 等^[43]采用两种光去除保护基团 DEACM 和 NPOM 分别与 VHL、CRBN E3 连接酶配体连接,设计了两类光笼型 PROTACs (DEACM-caged ERRA PROTAC2, NPOM-caged BRD4 PROTAC4) (图 7)。实验结果显示,

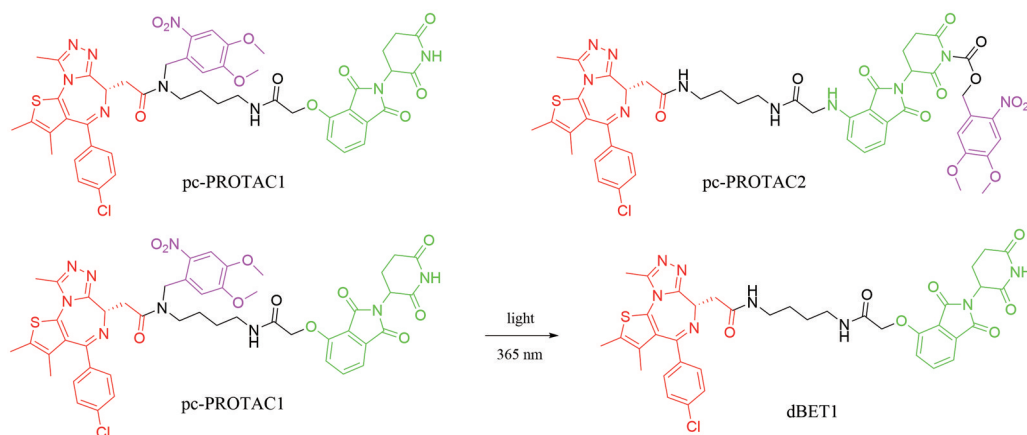


Figure 4 The chemical structures of pc-PROTACs and the release of pc-PROTAC1

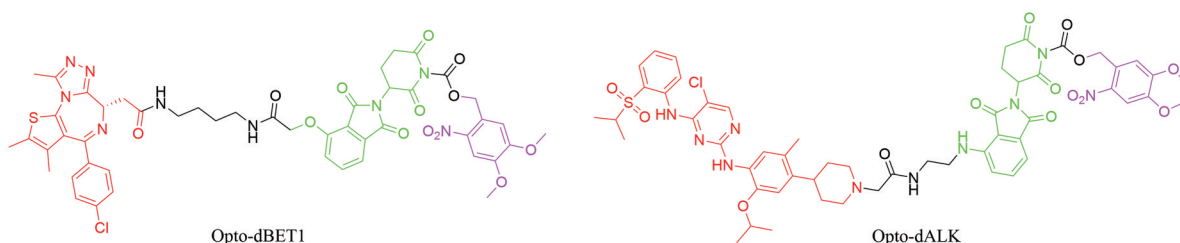


Figure 5 The chemical structures of opto-PROTACs

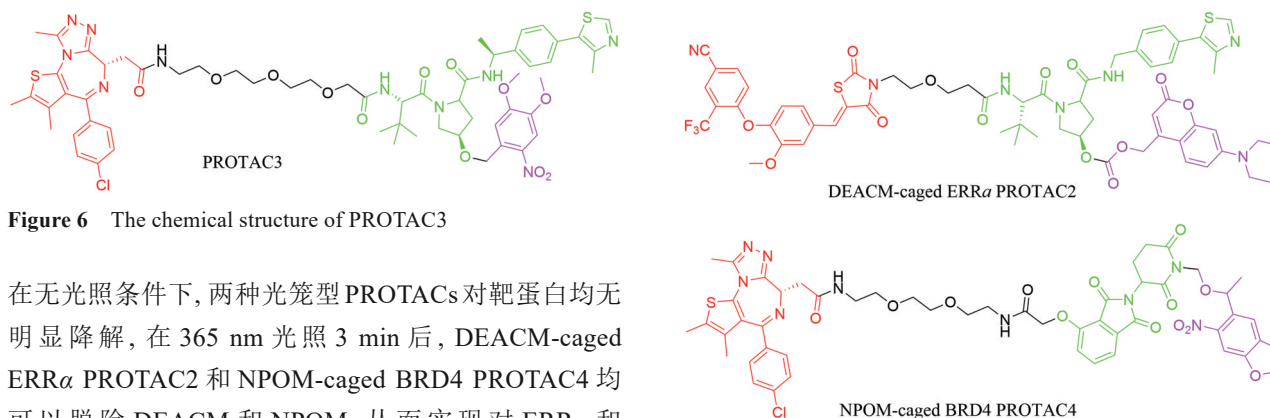


Figure 6 The chemical structure of PROTAC3

在无光照条件下,两种光笼型 PROTACs 对靶蛋白均无明显降解,在 365 nm 光照 3 min 后,DEACM-caged $ERR\alpha$ PROTAC2 和 NPOM-caged BRD4 PROTAC4 均可以脱除 DEACM 和 NPOM,从而实现对 $ERR\alpha$ 和 BRD4 靶蛋白降解的调控。该团队还对两种光笼型 PROTACs 进行了体内活性评价,365 nm 紫外线照射处理后的 DEACM-caged $ERR\alpha$ PROTAC2 和 NPOM-caged BRD4 PROTAC4 组出现了与空白对照组类似的结果。

3.2 光开关的 PROTACs 分子 光开关配体 (photo-switchable PROTACs) 是一类在光照条件下能够可逆改变构象的化学基团^[44]。在 PROTACs 的连接臂部分引入光开关配体,使其可在特定的光照条件下实现构象转换,并且化合物的两种构象能影响蛋白泛素化复合物的形成,以实现蛋白降解的“开”与“关”,该类分子也被称为光开关型 PROTACs。偶氮苯基团是一类双波长调节的可控光开关配体,在不同的波长照射下可

Figure 7 The chemical structures of DEACM-caged $ERR\alpha$ PROTAC2 and NPOM-caged BRD4 PROTAC4

实现顺式和反式构象的转化,具有结构简单、化学稳定性好、可逆性好以及易于制备等优势,因此近年来广泛应用于光可逆型 PROTACs 的开发。在 PROTACs 分子设计中,在连接臂部分引入偶氮苯基团,可实现光切换调节 PROTACs 分子的降解活性以及预测 PROTACs 分子构象变化与降解活性变化的相关性^[45]。

2020 年,Reynders 等^[46]基于 dBET1 设计了靶向 BRD2-4 的一系列 PROTACs。其中 PROTAC-I-3 为性质最优化合物,该化合物在 390 nm 下发生 *trans* 到 *cis* 的异构化,异构化效率大于 90%,并在黑暗中逐渐变回 *trans* 构型,半衰期为 8.8 h。降解活性实验表明,

PROTAC-I-3 在黑暗中未观察到降解活性, 而在 390 nm 照射下观察到依赖浓度的 BET 家族蛋白的降解。此外该团队还设计了靶向 FKBP12 的一系列 PROTACs, 其中 PROTAC-II-5 和 PROTAC-II-6 为性质最优化合物, PROTAC-II-5 脉冲照射后对 FKBP12 的水平有显著影响, PROTAC-II-5 和 PROTAC-II-6 降解 FKBP12 的时间进程展现出了一定的相似性 (图 8)。

Pfaff 等^[47] 基于 BRD 配体和 VHL 配体设计了靶向 BRD4 的一系列 PROTACs (图 9)。其中 photoPROTAC-1 在 415 nm 下发生 *cis* 到 *trans* 的异构化, 异构化效率为 95%, 在 530 nm 下发生 *trans* 到 *cis* 的异构化, 异构化效率为 68%。降解活性实验表明, 在 415 nm 照射下 *trans*-photoPROTAC-1 在低纳摩尔浓度下孵育 6.5 h 显著诱导 BRD2 蛋白的降解, 而 *cis*-photoPROTAC-1 不会引起 BRD2 蛋白的降解。

Jin 等^[48] 利用来那度胺-偶氮-达沙替尼三功能系统, 设计合成了一系列 Azo-PROTACs (图 10)。该团队也验证了这类化合物的反式和顺式异构体在靶蛋白质降解活性上有显著差异, 通过改变这类化合物的构型, 可以选择性地控制 ABL 和 BCR-ABL 蛋白的降解。其中 Azo-PROTAC-4C 为性质最优化合物, 在 361 nm 下光照 1 h 可以实现 *trans* 到 *cis* 的异构化。细胞实验表明, Azo-PROTAC-4C 对 BCR-ABL 介导的 K562 细胞具有较强的抑制作用 ($IC_{50} = 68 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $EC_{50} = 28 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)。此外, Azo-PROTAC-4C 对 BCR-ABL 介导的 K562 细胞具有较强的选择性, 不影响任何非 BCR-ABL 介导的细胞系, 如 A549 肺癌细胞、HCT116 结肠直肠癌细胞和 MCF-7 乳腺癌细胞等。此外, 该团队还验证了 Azo-PROTAC-4C 两种构型 ABL 和 BCR-ABL 蛋白的降解活性, 结果表明 4C-*trans* 在 $25 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下可以观

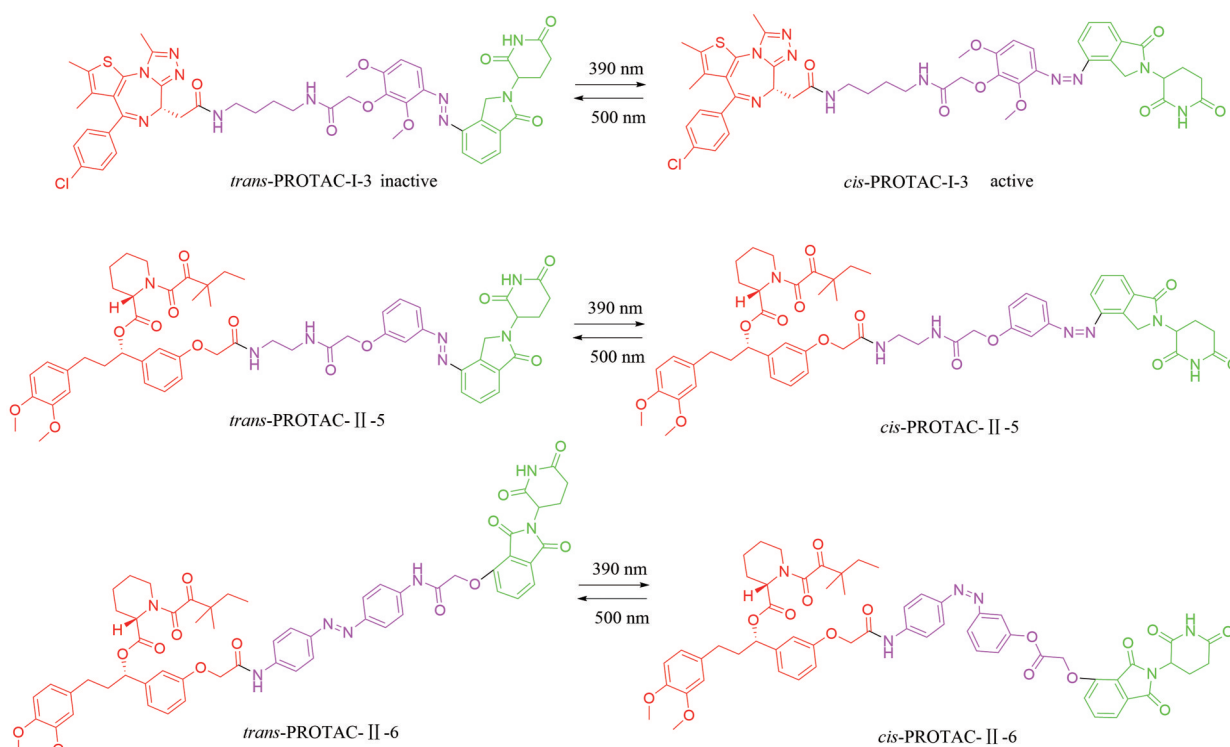


Figure 8 The chemical structures and release mechanism of PROTAC-I-3, PROTAC-II-5 and PROTAC-II-6

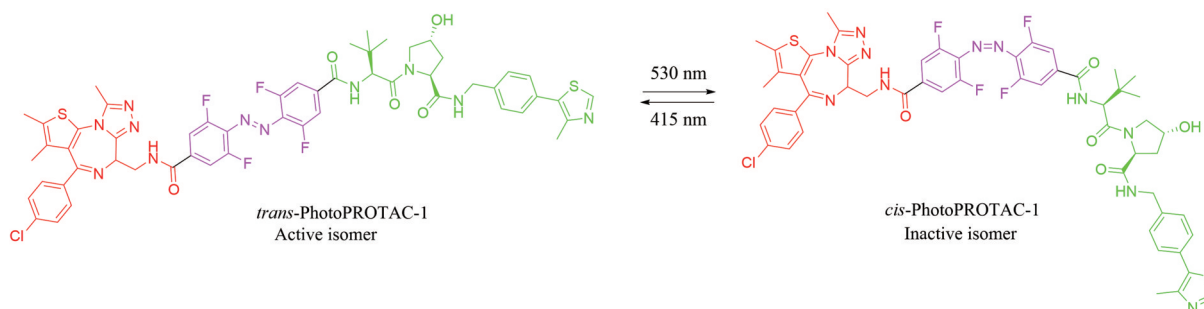


Figure 9 The chemical structure and release mechanism of photoPROTAC-1

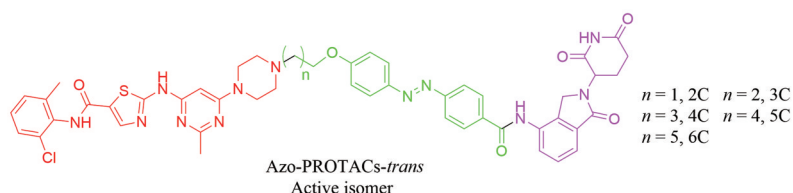


Figure 10 The chemical structures of Azo-PROTACs

观察到BCR-ABL融合蛋白的轻微降解,在 $100 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时观察到ABL和BCR-ABL蛋白的显著降解,而在同等条件下,4C-*cis*对BCR-ABL融合蛋白未发生明显的降解作用。

尽管光响应型Pro-PROTACs分子通过光控条件改善了PROTACs脱靶毒性,但是由于光组织穿透性不佳与潜在光毒性的问题,影响了这类技术的体内应用。如何开发体内适用的光响应型PROTACs仍然具有一定的挑战性。

3.3 终止型 PROTACs 作为事件驱动型分子,PROTACs在该过程中并未被消耗,而是能够催化性地诱导靶蛋白降解。瞄准蛋白降解终止的难点问题,最近研究者提出了连接-终止 (ligation to scavenging) 策略实现对蛋白降解的可靠终止^[49]。该策略由四嗪标记的PROTACs分子(Tz-PROTACs)和PAMAM-G5-TCO组成(图11)。其中,PAMAM-G5-TCO以商品化的树枝状大分子PAMAM作为载体,并用功能性的反式环辛烯(TCO)分子进行修饰。含有四嗪的Tz-PROTACs和含反式环辛烯的PAMAM-G5-TCO可通过生物相容性好、效率高的逆电子需求狄尔斯-阿尔德反应(IEDDA)实现快速的连接,以吸收游离的Tz-PROTACs,从而实现靶向蛋白降解的终止调控。

修饰后的PAMAM-G5-TCO呈球状结构,具有一定的刚性和良好的生物相容性。树枝状分子的巨大表面和IEDDA的高反应性使得修饰后的PAMAM分子能够快速结合并清除四嗪片段标记的PROTACs分子。实验结果显示,在细胞中修饰后的PAMAM分子能够透过细胞膜,快速清除细胞内外游离的PROTACs分子。在PAMAM的作用下,靶蛋白的降解过程被有效终止,已下调的靶蛋白逐步恢复到正常水平。

3.4 酶催化响应型 PROTACs 与正常细胞和组织相

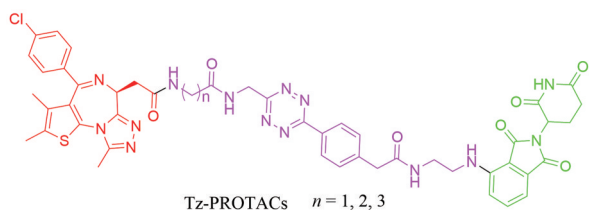


Figure 11 The chemical structures of Tz-PROTACs

比,肿瘤细胞和组织具有快速增殖、代谢、迁移和转移的特点,通常表现出更高的还原水平、更高的缺氧状态^[50,51]和部分功能性酶的过表达^[52,53](如硝基还原酶、水解酶等),基于上述肿瘤微环境的特异性,研究者设计出了一系列刺激响应型PROTACs前药。肿瘤细胞中的部分功能性酶,如脱氢酶、水解酶与组织蛋白酶等,表达量较高,并在癌症发展过程中发挥重要作用^[54,55]。因此酶响应型的PROTACs也被用于提高蛋白降解的组织选择性,有利于实现肿瘤的精准治疗。

在肿瘤组织中过表达硝基还原酶(NTR)的情况下,硝基咪唑作为NTR酶底物能经由酶催化被选择性除去,是大多数前药设计的重要化学基团^[56,57]。2021年,Cheng等^[58]关注肿瘤组织的缺氧环境,在招募靶蛋白的分子配体部分中引入缺氧条件响应分子基序,开发缺氧条件激活的Ha-PROTACs分子(图12),实现惰性PROTACs分子在肿瘤微环境缺氧条件刺激时的功能性激活。

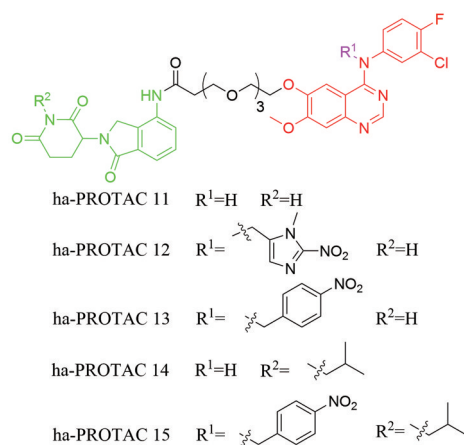


Figure 12 The chemical structures of Ha-PROTACs

醌氧化还原酶(NQO1)的过表达与癌症的发生发展密切相关,该酶在自然生理环境中能够催化醌类物质的双电子还原反应,是哺乳动物的重要解毒途径。Liang等^[59]以癌细胞过表达的NQO1的催化活性设计了两种酶促响应脱笼的Pro-PROTACs分子(NQO1-PROTAC与ROS-PROTAC)(图13),解决PROTACs分子细胞选择性不高的科学问题。作者选择了肿瘤微环境

中的特征酶响应化学条件性激活惰性的 Pro-PROTACs 分子, 利用癌症细胞中过表达的催化型蛋白酶 NQO1 内源性调节 PROTACs 的活性。

3.5 GSH 选择性响应 PROTACs 氧化还原因子如谷胱甘肽 (GSH) 的上调, 肿瘤细胞表现出高还原活性^[60]。肿瘤细胞中的 GSH 浓度约为 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 为正常细胞的两倍^[61]。因此利用二硫键作为 GSH 的底物来构建 GSH 响应型 PROTACs 是一个有前景的策略。基于前期研发的 ALK 蛋白降解剂, Zhang 等^[62]报道了一种 GSH 响应型 PROTACs 分子 FA-S2-POMA, 该分子具有笼化作用和靶向递送 PROTACs 的双重作用 (图 14)。该团队用二硫键将叶酸受体结合配体连接到泊马度胺的戊二酰亚胺的氮原子上, 阻碍了泊马度胺与 CRBN 的相互作用。FA-S2-POMA 能够与癌细胞上高表达的叶酸受体 α (folate receptor α , FOLR1) 特异性结合, 在叶酸引导下进入癌细胞, 通过谷胱甘肽介导的二硫键断裂释放 ALK 蛋白降解剂用于靶蛋白的降解。实验结果显示, 该化合物对 SU-DHL-1 细胞中的 ALK 蛋白表现出浓度和时间依赖性的降解, 在 $3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 2 h 内基本降解完全, 并且通过实验验证该化合物对

ALK 蛋白的降解依赖叶酸受体和过表达的 GSH。

3.6 放射线响应 PROTACs X 射线是重要的癌症放射性治疗策略, 局部的 X 射线治疗可导致 DNA 损伤、细胞凋亡以及肿瘤坏死^[63,64]。除此以外, X 射线也能产生氢自由基、羟基自由基等化学反应产物, 已被用于设计化疗药物的前药激活策略。2022 年, Yang 等^[65]将 X 射线响应的叠氮苯基笼状基团引入 PROTACs 分子的设计中, 首次合成了 X 射线响应的 RT-PROTACs。由于 X 射线的高精度时空分辨率与高组织穿透能力, RT-PROTACs 在 X 射线辐射前保持惰性状态, 经由 X 射线辐射后能够在特定肿瘤组织中被激活, 在体内协同抑制肿瘤生长 (图 15)。

4 可控性 PROTACs 技术的发展展望

光响应型 PROTACs 的设计具有良好的时空分辨率以及高效的释放率, 但受限于光照的组织穿透能力不足与光毒性, 如何实现该技术的体内应用具有较大挑战。终止型 PROTACs 技术为有效停止蛋白降解提供了一种可靠的途径, 如何将终止型 PROTACs 技术整合到蛋白降解药物的开发中需要进一步的研究。

酶催化以及微环境响应型 PROTACs 的设计主要

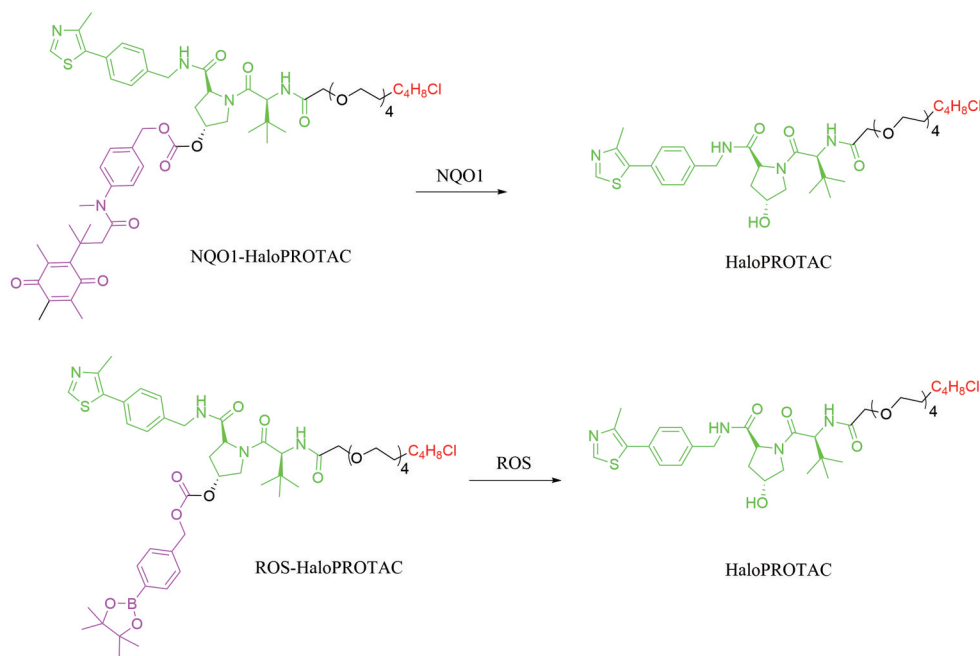


Figure 13 The chemical structures of NQO1-PROTAC and ROS-PROTAC

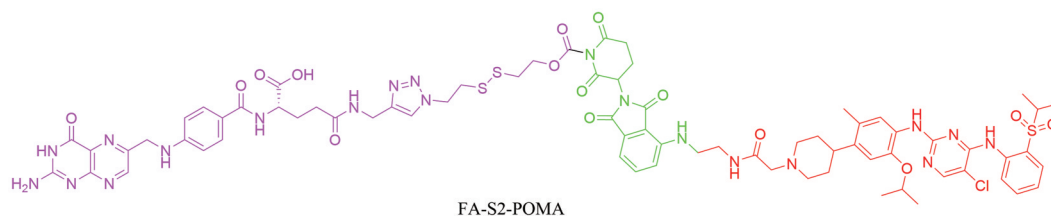


Figure 14 The chemical structure of FA-S2-POMA

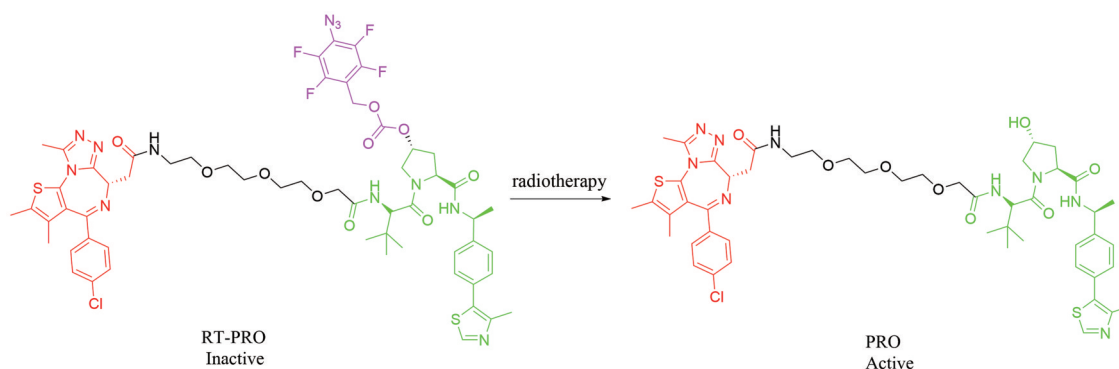


Figure 15 The chemical structures of RT-PROTACs

利用了癌细胞微环境与正常细胞的生理差异,一定程度上实现了肿瘤细胞靶标的蛋白降解;放射线响应型 PROTACs 的设计能够与放射线治疗协同抑制癌细胞的生长,但这些策略改造后的 PROTACs 分子的分子量增加且结构进一步复杂化,通常存在低细胞渗透性和口服生物利用度低的问题,如何进一步优化、保证这类 PROTACs 分子的类药理化性质是该研究方向要解决的主要问题。

可控性 PROTACs 分子虽然在一定程度上增强了组织靶向性,实现功能性靶蛋白的可控降解,但是目前该类分子的研究还主要处于细胞水平,应用于组织机体时的可控性尚需进一步验证。可控性 PROTACs 分子的设计进一步增加了药物分子的质量,是否会进一步影响其吸收分布还需要进一步验证。相信随着该研究领域技术的不断突破,将会有更多的安全有效的 PROTACs 分子被开发设计出来。

作者贡献: 牟伊负责文献的收集整理以及主要内容的撰写;文帅负责文章图片和结构式的绘制和部分案例整理;王燕负责 PROTACs 部分的文献检索和内容修改;姜正羽负责综述选题与框架设计、稿件修改等工作。

利益冲突: 本文的研究内容无任何利益冲突。

References

- [1] Verma R, Mohl D, Deshaies RJ. Harnessing the power of proteolysis for targeted protein inactivation [J]. *Mol Cell*, 2020, 77: 446-460.
- [2] Lai AC, Crews CM. Induced protein degradation: an emerging drug discovery paradigm [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16: 101-114.
- [3] Li R, Liu M, Yang Z, et al. Proteolysis-targeting chimeras (PROTACs) in cancer therapy: present and future [J]. *Molecules*, 2022, 27: 8828.
- [4] Ocana A, Pandiella A. Proteolysis targeting chimeras (PROTACs) in cancer therapy [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39: 189.
- [5] Weng G, Shen C, Cao D, et al. PROTAC-DB: an online database of PROTACs [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49: D1381-D1387.
- [6] Nunes J, Mcgonagle GA, Eden J, et al. Targeting IRAK4 for degradation with PROTACs [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2019, 10: 1081-1085.
- [7] He S, Dong G, Cheng J, et al. Strategies for designing proteolysis targeting chimeras (PROTACs) [J]. *Med Res Rev*, 2022, 42: 1280-1342.
- [8] Pettersson M, Crews CM. Proteolysis targeting chimeras (PROTACs) - past, present and future [J]. *Drug Discov Today Technol*, 2019, 31: 15-27.
- [9] Yao T, Xiao H, Wang H, et al. Recent advances in PROTACs for drug targeted protein research [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23: 10328.
- [10] An S, Fu L. Small-molecule PROTACs: an emerging and promising approach for the development of targeted therapy drugs [J]. *EBioMedicine*, 2018, 36: 553-562.
- [11] Kaur R, Chaudhary G, Kaur A, et al. PROTACs: a hope for breast cancer patients? [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2022, 22: 406-417.
- [12] Wang C, Zhang Y, Yang S, et al. PROTACs for BRDs proteins in cancer therapy: a review [J]. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2022, 37: 1694-1703.
- [13] Giardina SF, Valdambri E, Warren JD, et al. PROTACs: promising approaches for epigenetic strategies to overcome drug resistance [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2021, 21: 306-325.
- [14] Zheng M, Huo J, Gu X, et al. Rational design and synthesis of novel dual PROTACs for simultaneous degradation of EGFR and PARP [J]. *J Med Chem*, 2021, 64: 7839-7852.
- [15] Wang YW, Lan L, Wang M, et al. PROTACs: a technology with a gold rush-like atmosphere [J]. *Eur J Med Chem*, 2023, 247: 115037.
- [16] Yu F, Cai M, Shao L, et al. Targeting protein kinases degradation by PROTACs [J]. *Front Chem*, 2021, 9: 679120.
- [17] Hu Z, Crews CM. Recent developments in PROTAC-mediated protein degradation: from bench to clinic [J]. *ChemBiochem*, 2022, 23: e202100270.
- [18] Liu X, Wang A, Shi Y, et al. PROTACs in epigenetic cancer therapy: current status and future opportunities [J]. *Molecules*,

- 2023, 28: 1217.
- [19] Liu J, Peng Y, Inuzuka H, et al. Targeting micro-environmental pathways by PROTACs as a therapeutic strategy [J]. *Semin Cancer Biol*, 2022, 86: 269-279.
- [20] Li W, Elhassan RM, Hou X, et al. Recent advances in small molecule PROTACs for the treatment of cancer [J]. *Curr Med Chem*, 2021, 28: 4893-4909.
- [21] 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.
- [22] Bartoschik T, Zoephel A, Rumpel K, et al. MST and TRIC technology to reliably study PROTACs binary and ternary binding in drug development [J]. *Methods Mol Biol*, 2021, 23: 115-133.
- [23] Zou Y, Ma D, Wang Y. The PROTAC technology in drug development [J]. *Cell Biochem Funct*, 2019, 37: 21-30.
- [24] Ottis P, Crews CM. Proteolysis-targeting chimeras: induced protein degradation as a therapeutic strategy [J]. *ACS Chem Biol*, 2017, 12: 892-898.
- [25] He M, Cao C, Ni Z, et al. PROTACs: great opportunities for academia and industry (an update from 2020 to 2021) [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7: 181.
- [26] Ma S, Ji J, Tong Y, et al. Non-small molecule PROTACs (NSM-PROTACs): protein degradation kaleidoscope [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2022, 12: 2990-3005.
- [27] Burslem GM, Crews CM. Proteolysis-targeting chimeras as therapeutics and tools for biological discovery [J]. *Cell*, 2020, 181: 102-114.
- [28] Nalawansa DA, Crews CM. PROTACs: an emerging therapeutic modality in precision medicine [J]. *Cell Chem Biol*, 2020, 27: 998-1014.
- [29] Smith BE, Wang SL, Jaime-Figueroa S, et al. Differential PROTAC substrate specificity dictated by orientation of recruited E3 ligase [J]. *Nat Commun*, 2019, 10: 131.
- [30] Bondeson DP, Smith BE, Burslem GM, et al. Lessons in PROTAC design from selective degradation with a promiscuous warhead [J]. *Cell Chem Biol*, 2018, 25: 78-87.
- [31] Olson CM, Jiang B, Erb MA, et al. Pharmacological perturbation of CDK9 using selective CDK9 inhibition or degradation [J]. *Nat Chem Biol*, 2018, 14: 163-170.
- [32] Zorba A, Nguyen C, Xu Y, et al. Delineating the role of cooperativity in the design of potent PROTACs for BTK [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115: E7285-E7292.
- [33] Bekes M, Langley DR, Crews CM. PROTAC targeted protein degraders: the past is prologue [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2022, 21: 181-200.
- [34] Guenette RG, Yang SW, Min J, et al. Target and tissue selectivity of PROTAC degraders [J]. *Chem Soc Rev*, 2022, 51: 5740-5756.
- [35] Graham H. The mechanism of action and clinical value of PROTACs: a graphical review [J]. *Cell Signal*, 2022, 99: 110446.
- [36] Chen L, Wan X, Shan X, et al. Smart PROTACs enable controllable protein degradation for precision cancer therapy [J]. *Mol Diagn Ther*, 2022, 26: 283-291.
- [37] Mou Y, Wen S, Gao X, et al. Proteolysis-targeting chimeras: a kaleidoscope of targeted protein degradation [J]. *Future Med Chem*, 2022, 14: 139-141.
- [38] Liu J, Peng Y, Wei W. Light-controllable PROTACs for temporospatial control of protein degradation [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 678077.
- [39] Klan P, Solomek T, Bochet CG, et al. Photoremovable protecting groups in chemistry and biology: reaction mechanisms and efficacy [J]. *Chem Rev*, 2013, 113: 119-191.
- [40] Xue G, Wang K, Zhou D, et al. Light-induced protein degradation with photocaged PROTACs [J]. *J Am Chem Soc*, 2019, 141: 18370-18374.
- [41] Liu J, Chen H, Ma L, et al. Light-induced control of protein destruction by opto-PROTAC [J]. *Sci Adv*, 2020, 6: eaay5154.
- [42] Kounde CS, Shchepinova MM, Saunders CN, et al. A caged E3 ligase ligand for PROTAC-mediated protein degradation with light [J]. *Chem Commun (Camb)*, 2020, 56: 5532-5535.
- [43] Naro Y, Darrah K, Deiters A. Optical control of small molecule-induced protein degradation [J]. *J Am Chem Soc*, 2020, 142: 2193-2197.
- [44] Weinstain R, Slanina T, Kand D, et al. Visible-to-NIR-light activated release: from small molecules to nanomaterials [J]. *Chem Rev*, 2020, 120: 13135-13272.
- [45] Harris JD, Moran MJ, Aprahamian I. New molecular switch architectures [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115: 9414-9422.
- [46] Reynders M, Matsuura BS, Bérouti M, et al. PROTACs enable optical control of protein degradation [J]. *Sci Adv*, 2020, 6: eaay5064.
- [47] Pfaff P, Samarasinghe TG, Crews CM, et al. Reversible spatio-temporal control of induced protein degradation by bistable photoPROTACs [J]. *ACS Cent Sci*, 2019, 5: 1682-1690.
- [48] Jin YH, Lu MC, Wang Y, et al. Azo-PROTAC: novel light-controlled small-molecule tool for protein knockdown [J]. *J Med Chem*, 2020, 63: 4644-4654.
- [49] Jin Y, Fan J, Wang R, et al. Ligation to scavenging strategy enables on-demand termination of targeted protein degradation [J]. *J Am Chem Soc*, 2023, 145: 7218-7229.
- [50] Bouleetour W, Rowinski E, Louati S, et al. A review of the role of hypoxia in radioresistance in cancer therapy [J]. *Med Sci Monit*, 2021, 27: e934116.
- [51] Jayaprakasn P, Vignali DA, Delgoffe GM, et al. Hypoxia reduction sensitizes refractory cancers to immunotherapy [J]. *Annu Rev Med*, 2022, 73: 251-265.
- [52] Qiao J, Wang M, Cui M, et al. Small-molecule probes for fluorescent detection of cellular hypoxia-related nitroreductase [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2021, 203: 114199.

- [53] Williams EM, Little RF, Mowday AM, et al. Nitroreductase gene-directed enzyme prodrug therapy: insights and advances toward clinical utility [J]. *Biochem J*, 2015, 471: 131-153.
- [54] Zhou Y, Lv H, Li H, et al. Nitroreductase increases menadione-mediated oxidative stress in *aspergillus nidulans* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2021, 87: e0175821.
- [55] Shi S, Du Y, Zou Y, et al. Rational design for nitroreductase (NTR)-responsive proteolysis targeting chimeras (PROTACs) selectively targeting tumor tissues [J]. *J Med Chem*, 2022, 65: 5057-5071.
- [56] Bourque DL, Neumayr A, Libman M, et al. Treatment strategies for nitroimidazole-refractory giardiasis: a systematic review [J]. *J Travel Med*, 2022, 29: taab120.
- [57] Reinhardt T, Lee KM, Niederegger L, et al. Indolin-2-one nitroimidazole antibiotics exhibit an unexpected dual mode of action [J]. *ACS Chem Biol*, 2022, 17: 3077-3085.
- [58] Cheng W, Li S, Wen X, et al. Development of hypoxia-activated PROTAC exerting a more potent effect in tumor hypoxia than in normoxia [J]. *Chem Commun (Camb)*, 2021, 57: 12852-12855.
- [59] Liang C, Zheng Q, Luo T, et al. Enzyme-catalyzed activation of pro-PROTAC for cell-selective protein degradation [J]. *CCS Chemistry*, 2022, 4: 3809-3819.
- [60] Bansal A, Simon MC. Glutathione metabolism in cancer progression and treatment resistance [J]. *J Cell Biol*, 2018, 217: 2291-2298.
- [61] Holmstrom KM, Finkel T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15: 411-421.
- [62] Zhang C, Han XR, Yang X, et al. Proteolysis targeting chimeras (PROTACs) of anaplastic lymphoma kinase (ALK) [J]. *Eur J Med Chem*, 2018, 151: 304-314.
- [63] Zou X, Yao M, Ma L, et al. X-ray-induced nanoparticle-based photodynamic therapy of cancer [J]. *Nanomedicine (Lond)*, 2014, 9: 2339-2351.
- [64] Shamsi M, Islamian JP. Breast cancer: early diagnosis and effective treatment by drug delivery tracing [J]. *Nucl Med Rev Cent East Eur*, 2017, 20: 45-48.
- [65] Yang C, Yang Y, Li Y, et al. Radiotherapy-triggered proteolysis targeting chimera prodrug activation in tumors [J]. *J Am Chem Soc*, 2023, 145: 385-391.