

· 专家论坛 ·

化学诱导临近效应和分子胶药物

郭宗儒*

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 北京 100050)

摘要: 生物界存在的化学诱导临近效应是维持机体和细胞功能的重要方式, 近年来诱导临近在医药领域受到了重视和应用, 分子胶和蛋白靶向降解嵌合体 (PROTAC) 在肿瘤和免疫性疾病的治疗得到广泛的研究。分子胶和 PROTAC 促进两个蛋白相互靠近, 诱导契合发生三元体的互补性结合, 并激发目标蛋白的降解和调节信号转导。分子胶药物作用机制与传统小分子药物不同, 犹如催化剂样作用促进两个蛋白的相互作用使病理性靶标蛋白降解而失活。本文从药物化学视角对处于临床研究的某些分子胶的研制过程、结构特征和作用特点作简要的讨论。

关键词: 诱导临近; 分子胶; 三元复合物; 泛素-蛋白酶体系统

中图分类号: 914 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)04-0789-12

Chemically induced proximity and molecular glue

GUO Zong-ru*

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: The chemically induced proximity (CIP) in biological realm is an important way to maintain the function of organism and cells. In recent years, CIP has been paid attention to and applied in the field of bio-medicines. Molecular glue and PROTAC are widely investigated for the treatment of tumors and immunopathy. Based upon the CIP principle molecular glue and PROTAC promote two proteins to approach each other, induce the complementary binding to triads, and then degrade the target protein or regulate functions. Different from conventional drugs, molecular glue acts as a catalyst, which induces two proteins to approach, bind and ubiquitinate, without taking part in the subsequent degradation process, so it can theoretically function in an infinite cycle. In this article, the development process, structural characteristics and functional characteristics of some molecular glues in clinical trials are briefly discussed from the viewpoint of medicinal chemistry.

Key words: chemically induced proximity; molecular glue; triad complex; ubiquitin-proteasome system

1 引言

传统小分子药物的药理作用是一药对应一靶标, 即使一药多靶 (包括脱靶) 也是 1-1 的分别结合。药物与靶标的结合遵循质量作用定律, 结合的热力学和动力学性质, 决定着抑制(或激活) 靶标功能的强弱和持续时间, 呈现的效应在于药物占据靶标的活性部位, 被称作占据驱动的药理作用 (occupy-driven pharmacology)。

本世纪以来, 出现靶向蛋白质降解 (targeted protein

degradation, TPD) 技术, 集中体现在蛋白降解靶向嵌合体 (proteolysis targeting chimeras, PROTAC), 并由此揭示分子胶药物 (molecular glues, MG), 它们与传统药物的作用机制不同, 作用特征是一药对二 (或多) 靶标, 即药物分子同时或相继结合两个不同的蛋白, 形成三元复合物, 诱导了两个蛋白的互作 (protein-protein interaction, PPI), 其中一个为目标蛋白 (protein of interest, POI), 发生了结构降解和功能丧失。这类蛋白互作所呈现的药效, 系 PROTAC 或 MG 诱导所致, 但它们本身并不参与降解或抑制过程, 扮演的角色是诱导事件的发生, 因而称这类药物是由事件驱动的药理作用

收稿日期: 2024-01-30; 修回日期: 2024-02-21.

*通讯作者 E-mail: zrguo@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0092

(event-driven pharmacology)。TPD 虽然目前尚无批准上市的药物,但处于临床试验的很多。

细斟 PROTAC 和 MG 的作用本质,是分子中不同的结构部分分别与两个蛋白作互补性结合,从而诱导并促进两个蛋白相互临近而引发效应,所以又可视作化学诱导临近效应 (chemically induced proximity, CIP),也可能产生化学诱导二聚化效应 (chemically induced dimerization, CID)。总之, CIP/CID 效应是诱导两个蛋白临近而互动,调控细胞功能,这种效应已被应用于蛋白质降解、细胞信号调控和级联反应、基因的表达和编辑,以及细胞治疗等。通过结合特定的内源性转录因子或表观遗传学调节因子来激活或抑制内源性靶基因,从而激活癌细胞的凋亡,因而在肿瘤的靶向治疗成为新的突破。其实,自然界的许多生物学现象也存在化学诱导临近效应。

2 化学诱导临近效应

两个分子的物理学上靠近是发生相互作用的前提,无论是化学反应,或是蛋白互动而发生的生物学现象,都需要分子相互临近,这是普遍规律。化学反应或生物学现象归根结底是物理的相互临近而发生的,本质是物理学效应的不同表象。

2.1 化学中的化学诱导临近效应

有机化学反应存在有 CIP 效应,熟知的催化氢化反应是金属微粒 (Pd、Pt 等) 将拟还原物分子和 H_2 拉近到微粒表面,降低了活化能促进了氢转移的还原反应。手性催化剂利用特定构型 (构象) 的空间效应,专属性地发生不对称合成反应,例如过渡金属离子 (Ru、Rh、Ir 等) 与手性配体 (多为手性膦、手性胺) 形成的络合物, Ru、Rh 等拉近并诱导了 H_2 与底物的距离发生不对称氢化还原。

2.2 生物界的化学诱导临近效应

人体内许多生理学和生物化学过程是由化学诱导临近效应所驱动,例如酶促反应中二价金属离子 Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 等辅基与底物结合 (配位或螯合),将底物拉近到酶的活性部位发生反应,例如氧化、还原、水解、电子或原子转移或基因变换等,金属离子的主要作用是稳定酶的构象,是拉近酶与底物的媒介或桥梁。例如血管紧张素转化酶抑制剂都含有可与 Zn^{2+} 螯合的亲核基团 (卡托普利的 -SH 和依那普利的 -COOH 等),因为 Zn^{2+} 是拉近血管紧张素转化酶与血管紧张素 1 (十肽) 的金属元素,是诱导发生裂解二肽的必要因素。辅酶与酶临近的弱力结合也是一种特殊的媒介,诱导底物临近于酶,并且发挥酶促反应的运载体作用。例如硫酸胺素、烟酰胺、辅酶 I (NAD)、核黄素、吡哆醛 (醇) 等维生素,辅助参与酶催化的氧化还原、基因转移或异构化

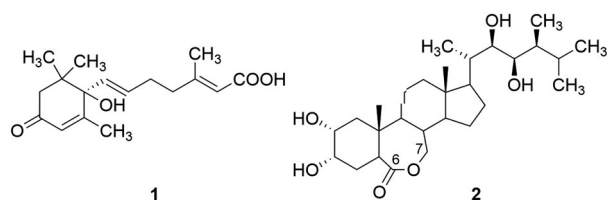
反应等,辅酶首先要拉近酶和底物的空间位置,完成特定的生化反应。

2.3 非降解型天然的分子胶

非降解型分子胶与降解型分子胶的差别在于作用机制不是降解目标蛋白,而是通过结合伴侣蛋白或支架蛋白等与靶标蛋白形成三元复合体,起到抑制效果。降解型分子胶涉及泛素-蛋白酶体系统。

2.3.1 脱落酸和芸苔素内酯 化学诱导临近效应广泛存在于植物界的生物学过程,例如植物中的脱落酸 (1, abscisic acid, ABA) 是倍半萜酸,它的受体 ABAR 属于叶绿体跨膜蛋白, C 端和 N 端处于细胞质内, ABA 与受体结合后,刺激转录因子 AD1A 从核内转至胞质,诱导 ABAR 与 AD1A 两个蛋白临近而发生互动,经一系列信号传递,实现脱落酸的生理效应,例如植物在不同的时期发生叶片脱落、果实成熟和萌芽进入休眠状态等^[1]。

芸苔素内酯 (2, brassinolide, BR) 是 20 世纪 70 年代发现的一种植物生长调节剂,广泛存在于植物界体内,从低等的藻类到被子植物已发现数十种不同结构的芸苔素内酯,说明 BR 的信号途径产生于植物进化的早期,且相对保守。BR 在植物体内主要在生殖器官、未成熟种子及幼嫩组织中,调控生殖发育、种子成熟,促进茎的伸长及根形态建成。



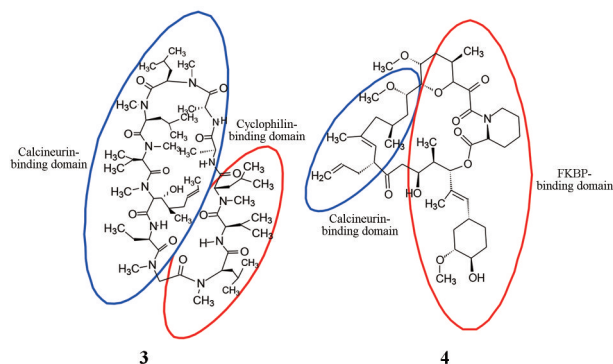
BR 是一类植物甾醇激素,结构特征是 ABCD 四环组成的甾体骨架及 B 环上 C6-C7 间的内酯结构, A 环和 C17 烷基侧链的羟基化水平及空间结构直接影响芸苔素内酯与其受体的结合,从而影响生物活性。

细胞膜上存在 BR 受体蛋白 BRI1, 以及受体蛋白激酶 BAK1。当 BR 不存在时, BRI1 和 BAK1 相安无事,信号通路处于关闭状态。当 BR 存在时与 BRI1 胞外结构结合,并引起细胞内分子结构发生变化,同时招募并拉近细胞膜上的 BAK1 形成 BRI1-BR-BAK1 三元复合物,激活细胞内信号转导途径。活化的 BRI1-BR-BAK1 复合物通过磷酸化作用激活下游蛋白,调控植物的生理功能^[2]。芸苔素内酯作为天然非降解型分子胶被广泛用作绿色环保的植物生长调节剂,但在医药领域目前未见有报道。

2.3.2 微生物次级代谢产物 临床应用的免疫抑制剂

环孢素 A (**3**, cyclosporin A, CsA) 和他克莫司 (**4**, tacrolimus, FK506) 分别是真菌和链霉菌产生的抗生素, 虽然分别属于环肽和大环内酯的不同结构类型, 而且结合的伴侣蛋白也不同, 但靶标蛋白 (POI) 却是相同的, 所以生物效应相同, 诱导临近的 POI 都是钙调磷酸酶 (calcineurin)。钙调磷酸酶是依赖钙/钙调素的磷酸酶催化亚基, 选择性地水解蛋白中丝/苏氨酸上的磷酸基, 参与免疫反应。抑制钙调磷酸酶蛋白, 可阻断多种细胞因子产生, 阻止 T 细胞活化, 因而 **3** 和 **4** 作为免疫抑制剂用于器官移植的排异。

3 首先结合伴侣蛋白亲环素 (cyclophilin), 亲环素是一种 18 kD 小蛋白, 具有催化蛋白质中脯氨酸的顺-反异构转化的酶系。实验证明亲环素与免疫抑制之间没有联系, 而是由于 **3** 拉近了钙调磷酸酶, 介导亲环素与钙调磷酸酶发生结合, 形成的三元复合物促进了 PPI 作用, 抑制了钙调磷酸酶活性, 起到免疫抑制作用。**4** 的受体是 FK 结合蛋白 (FKBP), FK506-FKBP 的形成促进了与钙调磷酸酶形成三元复合物, 发生蛋白互作。所以, **3** 和 **4** 的伴侣蛋白虽然不同, 但诱导、拉近和结合的目标蛋白一样, 从而引发的药理效应是相同的^[3]。**3** 和 **4** 是非降解型分子胶, 它们结构中一部分片段与伴侣蛋白亲环素 (或 FKBP) 结合, 另一部分结合于目标蛋白钙调磷酸酶, 如同结构式中红色和蓝色圈勾勒的结构片段分别是与伴侣蛋白和目标蛋白的结合域。**3** 和 **4** 促进了蛋白临近, 形成三元复合物的构象变化, 促进了两个蛋白的结构互补性适配与结合, 若没有分子胶的“搭桥”, 两个蛋白是互不相识的^[4]。图 1a 和 1b 分别是 **3** 和 **4** 的三元复合物晶体结构的示意图。



另一个具有免疫抑制作用的抗生素雷帕霉素 (**5**, rapamycin, RAPA), 它的伴侣蛋白也是 FK 结合蛋白, 用亲和色谱方法证明 RAPA-FKBP 结合的目标蛋白称作雷帕霉素靶蛋白 (mTOR), 后者是细胞生长和增殖的重要因子, mTOR 的变异与肿瘤密切相关。然而 mTOR 蛋白缺乏结合位点, 一向认为非可药性靶标

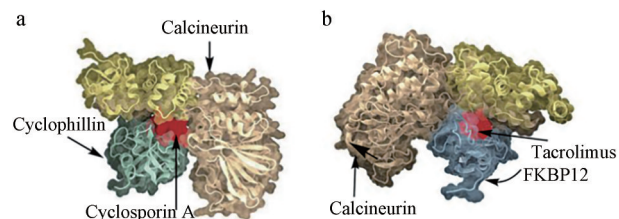


Figure 1 Triad structures of cyclophilin-cyclosporin A-calcineurin (a) and FKBP12-tacrolimus-calcineurin (b)

(undruggability), 由于雷帕霉素拉近并介导两个蛋白生成的 FKBP-RAPA-mTOR 三元复合物, 导致 mTOR 受抑制而失去活性, 这是雷帕霉素扮演了诱导两个蛋白临近而结合所致, 雷帕霉素与 FKBP 结合增加了同 mTOR 的亲合力大约 2 000 倍, 表现出协同结合作用^[5,6]。图 2 是 FKBP-RAPA-mTOR 三元复合物示意图。

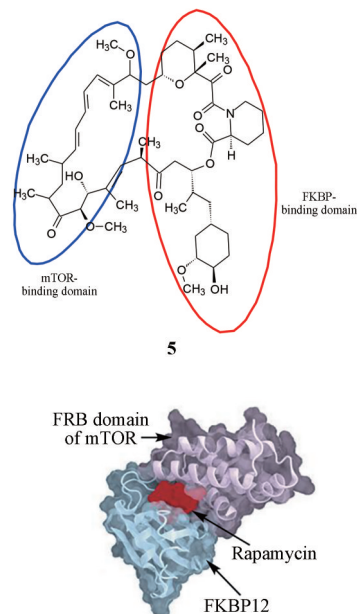
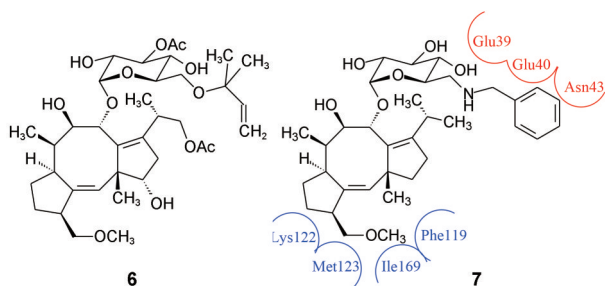


Figure 2 Triad structure of FKBP12-RAPA-TOR

抗生素壳孢素 A (**6**, fusicochin A, FCA) 是真菌 *Fusicoccum amygdali* 的二萜苷类代谢物, 可诱导植物萎蔫病害。在植物细胞中, **6** 促进了浆膜上的 H^+ -ATP 酶 C 端具有与 14-3-3 蛋白发生 PPI 作用, 14-3-3 蛋白因结合而发生构象变化, 激活 H^+ -ATP 酶产生生理效应 (例如叶片的气孔打开)。14-3-3 蛋白家族在真核细胞广泛表达, 研究表明 FCA 选择性杀伤动物和人体癌细胞, 而对正常细胞损伤较小。例如在多种癌细胞系发现 FCA 特异性地与干扰素 α ($IFN\alpha$) 结合, 在 OVCAR-3 细胞中 FCA 拉近 $IFN\alpha$ 并诱导促进与 14-3-3 蛋白 THEMIS2 结合, 因而促进了 14-3-3 蛋白与激酶 2 (RIPK2) 以及 EIF2AK2 的 PPI, 使三元复合物稳定化, 抑制了癌细胞

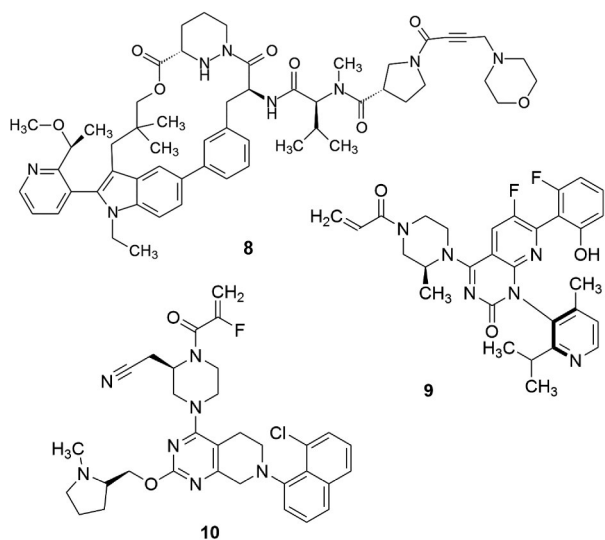
的生长。通过设计合成类似结构的集中库,筛选出具有高活性的化合物^[7]。Ogino等^[8]变换糖苷部分,经SAR优化得到化合物**7**,抗癌细胞分化活性显著强于**6**,并揭示了三元复合物的结合模式,**7**的蓝色残基为结合14-3-3蛋白区域,红色为结合H⁺-ATP酶区域。



2.4 合成的非降解型分子胶

2.4.1 RM018

Revolution Medicines公司研制的RM018(**8**)是合成的环肽化合物,属于非降解型分子胶,**8**拉近的两个蛋白之一是伴侣蛋白亲环素(cyclophilin),与亲环素结合后,结合目标蛋白KRAS^{G12C},KRAS^{G12C}是多种肿瘤相关的突变致癌蛋白。**8**诱导生成了三元复合物cyclophilin-RM018-KRAS^{G12C},KRAS^{G12C}活性受到抑制。

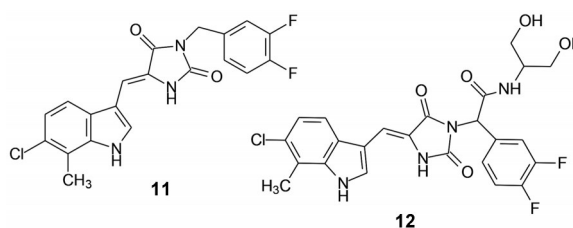


由于RM018含有炔酰氨基片段,是发生迈克尔反应的亲电性结构,与突变的KRAS^{G12C}半胱氨酸巯基形成稳定的共价键,IC₅₀ 1.4~3.5 nmol·L⁻¹。**8**的优点是对于使用过的KRAS^{G12C}抑制剂如索托雷塞(**9**, sotorasib)和阿达雷塞(**10**, adagrasib)发生耐药的双突变靶标KRAS^{G12C/Y96D}有强抑制活性,IC₅₀ 2.8~7.3 nmol·L⁻¹,敏感性极强。双突变KRAS^{G12C/Y96D}由于Y96D残基变异,不与**9**或**10**发生氢键结合。此外,RM018还特异性结

合于KRAS^{G12C}GTP的激活“ON”状态,而**9**或**10**是与KRAS^{G12C}的GDP结合,为非活化的“OFF”状态,作用的开关环节不同^[9]。

2.4.2 双重抑制剂 RO2443

RO2443(**11**)是双靶标抑制剂,而且是通过分子胶作用形成同二聚体和异二聚体,使MDM2和MDM4失活。



Graves等^[10]发现的RO-2443是高活性双重抑制剂,对p53-MDM2复合物抑制活性IC₅₀ 33 nmol·L⁻¹,对p53-MDMX IC₅₀ 41 nmol·L⁻¹。对高表达MDM2/MDMX的癌细胞有强抑制活性。分子中吡啶环与乙内酰脲形成共轭体系而呈共面性与二氟苯sp³杂化碳连接形成分子拐角,两端芳环分别进入Phe19和Trp23的腔穴,这样的结合模式使得RO-2443一旦与一个MDM2(或MDMX)发生结合就会诱导MDM2(或MDMX)发生复合物的二聚化,MDM2与MDMX同时被抑制,抑癌因子p53得以激活。图3是RO-2443与MDMX(a)和MDM2(b)结合的同二聚体的结合图以及二聚体在空间位置的示意图(c)。

进一步优化RO-2443的物理化学性质,在二氟苯基处引入极性基团,优化得到RO-5963(**12**),溶解性显著提高,对p53-MDM2和p53-MDMX复合物的抑制活性IC₅₀分别为17.3和24.7 nmol·L⁻¹。晶体结构显示与RO-2443的结合模式相同,二羟异丙基进入了溶剂相。

3 降解型分子胶

3.1 降解型分子胶特点

当化学诱导剂拉近的两个蛋白中的一个泛素-蛋白酶体系统(UPS)的泛素E3连接酶或E2转合酶,另一个往往成为目标蛋白(POI)被泛素化,POI进入UPS系统,被蛋白酶体视作降解底物而解构,降解成氨基酸或小肽而失去功能。这类降解型诱导剂就是通常简称的分子胶(molecular glue, MG)。

MG的作用机制与熟知的PROTAC没有本质区别,都是结合E3连接酶和目标蛋白,形成E3-MG(PROTAC)-POI三元复合物,导致POI的泛素化和降解失活。二者的区别在于,MG作为“单价”分子本身具备分别与E3和POI发生互补结合的结构域,而且由于MG结合了一个蛋白引起的构象变化促进了与另一蛋

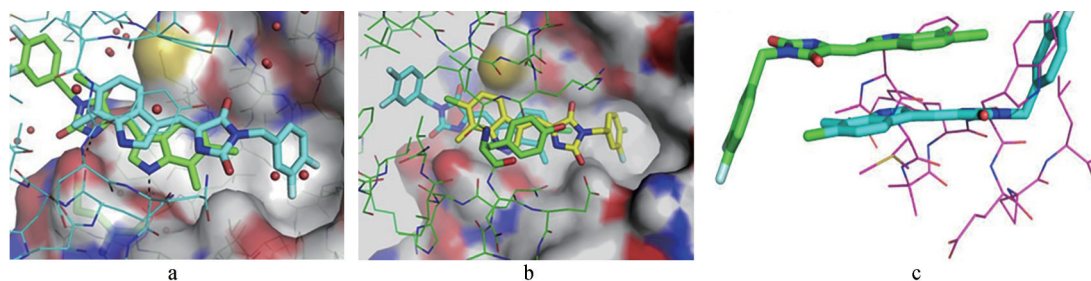


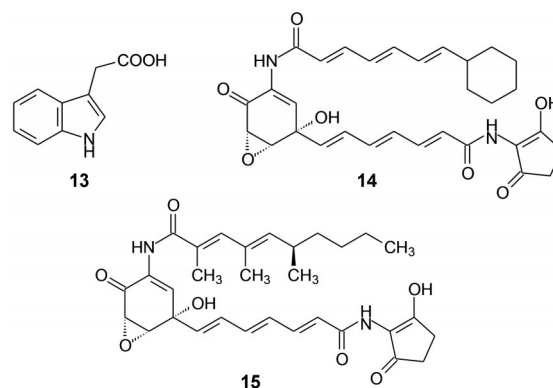
Figure 3 RO-2443 binds to the p53 pocket of MDMX and induces protein dimerization. a: Crystal structure of RO-2443 bound to MDMX. Close-up view of the p53 binding regions of two MDMX molecules forming a dimer. One MDMX molecule is shown as a surface rendition (carbon, white; oxygen, red; nitrogen, blue; and sulfur, yellow). The other MDMX molecule is shown as a stick figure with the same color scheme, but the carbon atoms are colored cyan. The two RO-2443 molecules are shown as stick figures. The molecule with cyan-colored carbon atoms is binding with the indole-hydantoin moiety in the Phe pocket of MDMX, shown as a stick figure and the di-fluoro-phenyl group in the Trp pocket of MDMX shown as a surface. The molecule with green-colored carbon atoms binds in the reverse mode; b: Crystal structure of RO-2443 bound to MDM2. The binding modes of two RO-2443 with yellow- and cyan-colored atoms are also in opposite direction as (a); c: Dimer model for binding of RO-2443 to MDMX

白的适配性结合,两个蛋白可能先天有相互结合的趋势。PROTAC是“双价”分子,E3和POI有“自己的”配体,PROTAC的临近效应借助连接基将两个配体共价连接成一个分子,两个蛋白本来没有关联,硬是PROTAC靠两个配体的结构“强行”两个蛋白靠近而发生互作,使目标蛋白进入UPS的降解系统。与分子胶相比PROTAC分子尺寸较大。由于二者诱导作用的内涵有所区别,PROTAC都是理性设计而得,特别是需要有POI的配体结构,因而降解的往往是可药性的靶标;分子胶目前是靠偶遇或普筛而得,也无需POI的可药性,这对于阻断蛋白-蛋白相互作用的环节,例如降解融合性癌蛋白(fusion oncoprotein)和转录因子等,优于PROTAC^[11,12]。

3.2 天然降解型分子胶

3.2.1 植物生长素3-吲哚乙酸 植物生长素3-吲哚乙酸(**13**, auxin, AU),是促进植物侧根发育生长的重要激素。AU通过介导其受体TIR1/AFB蛋白与生长素应答蛋白AUX/IAA的结合,形成TIR1/AFB-AU-AUX/IAA三元复合物,导致AUX/IAA泛素化而被蛋白酶体降解。在AU的浓度很低的情况下,AUX/IAA与TIR1/ARF形成异源二聚体,阻止TIR1/ARF与下游生长素诱导基因的启动子结合,从而抑制了基因的转录。然而,当植物细胞受到足够浓度的AU刺激时,AU与TIR1/AFB结合并形成TIR1/AFB-AU-AUX/IAA三元体,导致Aux/IAA蛋白泛素化和降解,从而释放了TIR1/AFB蛋白,后者经自身二聚化,促进下游基因的转录,从而呈现了生长素的功能^[13]。

3.2.2 阿苏卡霉素和手霉素 阿苏卡霉素(**14**, asukamycin, ASU)和手霉素(**15**, manumycin A, MANU)是



*Streptomyces nodosus*产生的聚酮类抗生素,起初发现是法呢基转移酶(farnesyltransferase, FTase)竞争性抑制剂,可用作Ras蛋白的非竞争性抑制剂。由于结构中具有多个亲电性位点,与大多数含硒半胱氨酸(Se-Cys)的硫氧还蛋白还原酶(thioredoxinreductase, TrxR)形成共价加合物^[14]。后来发现**14**和**15**也是降解型分子胶。

基于活性蛋白质分析(ABPP)发现,在乳腺癌细胞中UPS系统的E3连接酶UBR7结构中的Cys374是与**14**共价结合的位点,突变或敲除Cys374实验证实**14**靶向结合UBR7是其抗增殖活性的原因;蛋白质组学分析寻找到UBR7-ASU(**14**)的互作,发现拉近了蛋白TP53,形成UBR7-ASU-TP53的三元复合物,导致TP53的泛素化和降解。同样也发现MANU(**15**)能够通过共价连接成UBR7-Cys374,与TP53相互作用发挥抗增殖活性,而且证明**14**和**15**的环氧结构对于结合TP53和功能的发挥是至关重要的^[15]。图4是阿苏卡霉素(或手霉素)作为分子胶与E3连接酶UBR7和目标蛋白TP53三元复合物示意图。

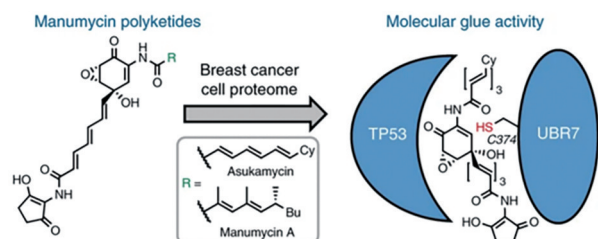
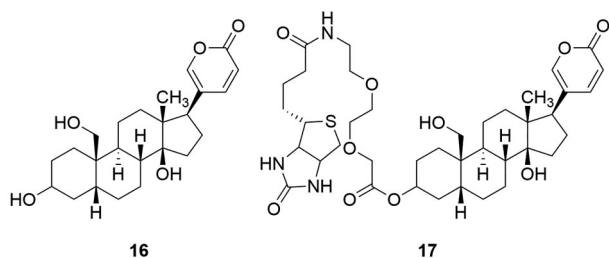


Figure 4 Sketch map of molecular glue **14** (or **15**) binding to UBR7 and TP53 to form triad structure^[14]

3.2.3 蟾酥灵 我国学者屠鹏飞和曾克武等研究蟾酥的主要成分蟾酥灵 (**16**, bufalin) 的抗癌作用机制, 发现 **16** 是分子胶降解剂。研究过程简述如下:

首先设计合成了基于链霉素亲和标记的蟾酥灵-生物素 (**17**) 探针, 以确定蟾酥灵的结合与定位。然后与 20 000 个纯化的重组的人类蛋白质组微阵列作用, 以检测蟾酥灵的结合蛋白。经 LC-MS-MS 发现蟾酥灵的结合蛋白是 E2F2, **16** 与 E2F2 的解离常数 $K_i = 3.15 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。同时, 发现与细胞温孵导致 E2F2 蛋白水平显著降低, 而且也检测到 **16** 能介导 E2F2 蛋白发生泛素化, 表明 **16** 是一种 E2F2 的小分子降解剂。



为了确定 **16** 与 E2F2 的结合位点, 将 E2F2 的分段氨基酸残基 1~130、125~310 和 125~438 的 DNA 质粒分别转染细胞, 与 **16** 温孵后通过蛋白质下拉分析 (pull-down assay) 显示, 与蟾酥灵结合部分是 125~310 片段。

免疫沉淀实验表明 E2F2 与 ZFP91 形成共沉淀, 证明在 **16** 的介导下 ZFP91 是 E2F2 降解的 E3 连接酶。微量热涌动实验 (MST) 表明 **16** 与 ZFP91 复合物的解离常数 (K_d) 为 $462 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。荧光实时动态分析证实 **16** 介导的 E2F2 和 ZFP91 之间发生相互作用以及细胞质中复合物的形成。蟾酥灵与目标蛋白 E2F2 的结合作用远强于同 E3 连接酶 ZFP91 的结合, 但这并不妨碍三元复合物的形成和对目标蛋白的诱导降解, 因为三元体不干预降解, 那是蛋白酶体的任务。图 5 是 E2F2-蟾酥灵-ZFP91 三元体的示意图。

蟾酥灵是含有 α, β 不饱和和内酯的二羟基甾体化合物, 不饱和和内酯作为弱亲电性基团, 可与半胱氨酸的硫

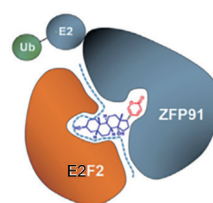
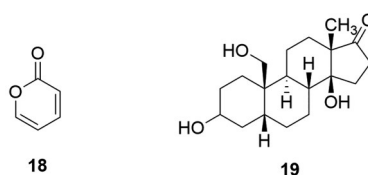


Figure 5 Sketch map of triad M-2 E2F2-bufalin-ZFP91

基发生迈克尔加成反应, 经 LCMS/MS 分析发现 **16** 与 Cys349 结合, 而且当发生 C349A 突变, 由于丙氨酸没有亲核性基团, 从而降低了 ZFP91 与蟾酥灵的结合, 表明 Cys349 是共价键结合位点。

为了解析蟾酥灵作为分子胶与 E2F2 (目标蛋白) 和 ZFP91 (E3 连接酶) 形成三元复合物的细节, 合成了蟾酥灵的片段结构 α -脱氢吡喃酮 (**18**, α -Pyr) 和二羟基雄甾酮 (**19**, DHA), 发现 α -Pyr 直接与 ZFP91 蛋白结合, $K_d = 900 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。DHA 负责与 E2F2 的结合。蟾酥灵似乎可区分呈现“双价”的结构特征, 两个片段只经单键连接, 这表明 PROTAC 与分子胶之间似乎没有质的区别。蟾酥灵无疑为现今较少 E3 连接酶配体增添了新的结构类型^[16]。

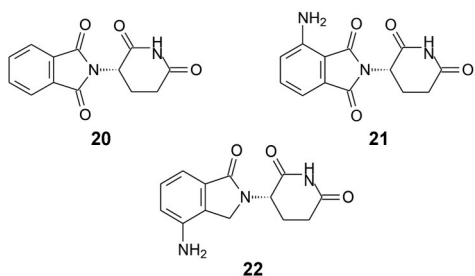


3.3 合成的分子胶—沙利度胺等酰亚胺类药物

20 世纪 50 年代合成的沙利度胺 (**20**, thalidomide) 用于缓解孕妇的早期呕吐, 却导致婴儿畸形的惨剧, 后来证明是 **20** 与 E3 连接酶 cereblon (CRBN) 和维持胚胎干细胞功能的调控蛋白 SALL4 结合成三元复合物, 导致 SALL4 泛素化而被降解, 造成畸形^[17]。后来却又发现沙利度胺有免疫调节作用, 通过招募 E3 连接酶 CRBN 并诱导转录因子 Ikaros 家族锌指蛋白 1 (IKZF1) 和 IKZF3 (又称为 Aiolos) 临近, 三者结合成复合物, 导致转录因子 (目标蛋白) 被 CRBN 泛素化, 遂被蛋白酶体降解。沙利度胺的类似物泊马度胺 (**21**, pomalidomide) 和来那度胺 (**22**, lenalidomide, LENA) 都是 E3 连接酶 CRBN 的招募剂。

20~22 是酰亚胺类 (iMiD) 的免疫调节剂, 但作为分子胶, 结构的微小差异对目标蛋白的结合能力和降解效率有显著差异, 例如泊马度胺和来那度胺都可降解转录因子 IKZF1/3, 而只有来那度胺能够降解另一转录因子 CSNK1A1 (CK1 α), 虽然沙利度胺和泊马度胺诱导也发生一定的 CRBN-iMiD-CK1 α 的三结合, 但

降解活性很弱,提示来那度胺的介导是结构特异性的,从化学结构分析,是因为沙利度胺和泊马度胺苯环上多一个羰基,羰基与CRBN发生碰撞而结合力降低。所以,分子胶结构的微小差异可改变对蛋白降解的特异性^[18]。



CRBN与CK1 α 本是无关的两个蛋白,来那度胺诱导二者临近,结合生成三元复合物导致两个蛋白的互作,在来那度胺饱和浓度下,用时间分辨荧光共振能量转移(TR-FRET)方法测定CRBN与CK1 α 复合物的离解常数 $K_D = 242 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$,表明来那度胺介导了E3连接酶CRBN与靶标蛋白CK1 α 的结合。

研究发现iMiD结合CRBN的位置也是CRBN招募目标蛋白的位置。不同结构的iMiD,与CRBN结合后的构象变化不同,招募的靶标蛋白可能不同,从而导致了不同的靶标蛋白与CRBN产生原本不存在的相互作用。结构生物学研究了CRBN-LENA-CK1 α 三元复合物的晶体结构,表明CRBN成U形构象,CRBN和来那度胺共同位于激酶N叶(N lobe)中的CK1 $\alpha\beta$ -发卡环套提供的结合界面,并证明CK1 α 与CRBN的结合依赖于来那度胺的存在。图6a是CRBN-LENA-CK1 α 复合物的表面图,可以看出来那度胺处于“黏合”了CRBN与CK1 α 三结合状态。图6b、c是来那度胺(橙色)在CRBN(青色)和CK1 α (紫色)的位置。来那度胺的戊二酰亚胺环结合于CRBN的疏水腔内,苯并内

酰胺环暴露于表面,CK1 α 的 β -发卡环套在22的结合腔顶部与CRBN结合,CK1 α 也与22发生范德华作用^[19]。

结构生物学研究表明,iMiD结合E3蛋白CRBN的位置也是CRBN对目标蛋白的招募位点,所以iMiD诱导了这两个蛋白的临近,也由于iMiD与CRBN结合发生构象变化,直接影响了对底物POI的识别与结合,这也就说明不同的iMiD导致CRBN招募不同的POI,这也是本文后面讨论作为“度胺”类似物的分子依据。

iMiD通过CRBN把原本不存在的相互作用另一个蛋白拉到临近,经泛素化被蛋白酶体降解而失活,因而结构简单的iMiD打开了研制新分子胶之路。至于招募怎样的POI,目前尚不能理性预测,所以与常规的药物分子设计不同。常规药物的研制是对确定靶标量体裁衣式的设计模式,是“指哪儿打哪儿”;目前研制分子胶药物是先制备化合物,然后确定被降解的靶标,是“打哪儿指哪儿”。下面以药物化学视角简要讨论某些进入临床研究的iMiD类分子胶化合物。

3.3.1 美兹度胺 美兹度胺是新基公司研制的E3连接酶CRBN调节剂(CELMoD),通过修饰来那度胺结构研制新的分子胶,旨在治疗患者已耐受iMiD药物的多发性骨髓瘤(MM),以对耐药的POI实现最大化地持续性降解。苗头化合物是5-位取代的含脲基侧链的化合物23,23对MM细胞株H929 R10-1(泊马度胺耐药株)呈现活性,降解的蛋白是转录因子Ikaros和Aiolos,但选择性不高,同时也有脱靶作用,对与细胞周期相关的正常蛋白GSPT1有抑制作用。

通过构效关系研究,发现母核4-位连接的侧链提高了选择性,从而对通式24作广泛的SAR研究,评价化合物的活性包括对泊马度胺耐药的H929 R10-1细胞活性(IC₅₀),对转录因子Aiolos蛋白的降解活性(EC₅₀),评价化合物的降解效率是与H929 R10-1细胞温孵4 h后测定并计算残留的Aiolos蛋白的百分含

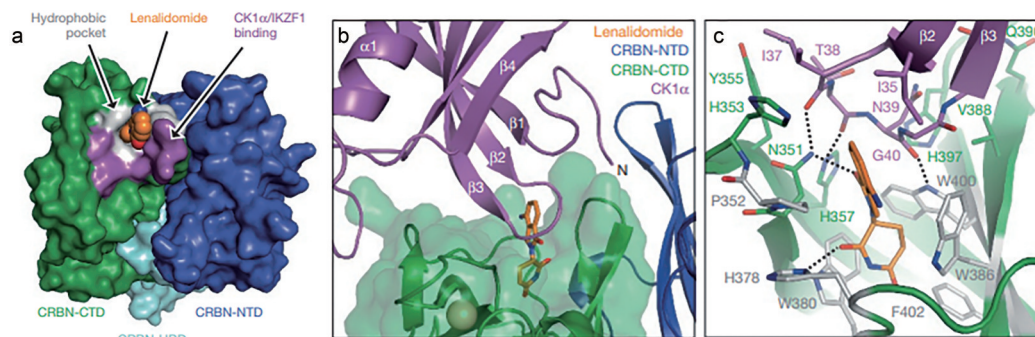
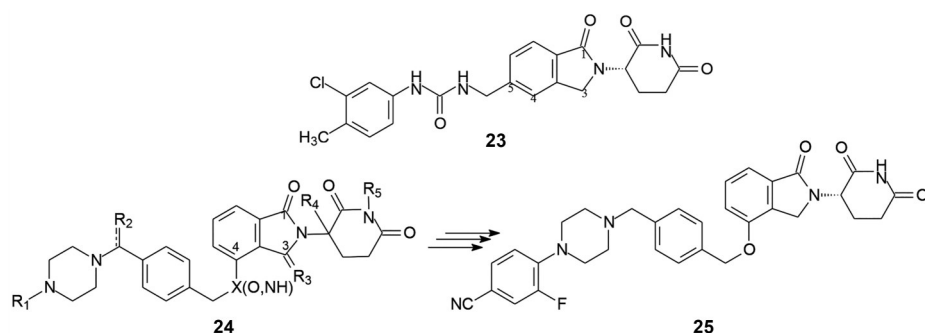


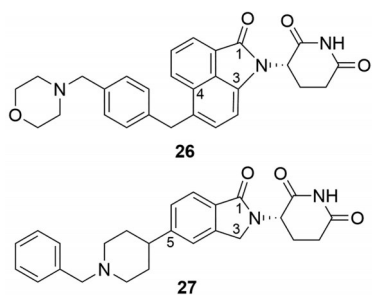
Figure 6 a: The contact surface of CRBN, CK1 α and IKZF1; b: Binding mode of lenalidomide to the hydrophobic pocket of CRBN, phthalimide is solvent-exposed moiety, the β -hairpin loop of CK1 α binds to the top of hydrophobic pocket where lenalidomide located at CRBN; c: The binding mode of lenalidomide with CK1 α and CRBN; hydrophobic and Van der Waals interactions between lenalidomide, CK1 α and CRBN; dotted lines stand for hydrogen bonds



量(越低降解效率越高),以及对GSPT1蛋白的脱靶作用等,最终优化出美兹度胺(**25**, mezigdomide, CC-92480)^[20]。

25是来那度胺4-氨基用氧置换经醚键连接出疏水链,链中的哌嗪环可提高化合物的水溶性。美兹度胺体外抑制H929 R10-1细胞的活性 IC_{50} $1.7 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$,降解Aiolos蛋白的活性 EC_{50} $0.1 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$,4 h后细胞内的降解效率Aiolos蛋白残存量为5%,还消除了原有的脱靶作用,而且有良好的药代动力学性质,现处于临床I/II阶段。

3.3.2 塞司度胺 C4 Therapeutics公司研制的塞司度胺(**26**, cemsidomide, CFT7455)也是锌指转录因子Ikaros和Aiolos口服降解剂。化学结构的母核是4-去氨基来那度胺的3位和4位稠合苯环,在新的稠合苯环上连接疏水性侧链,**26**与E3连接酶CRBN的结合常数 K_d $0.9 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$,在 $0.3 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下1.5 h内促进多发性骨髓瘤细胞中Ikaros蛋白降解率超过75%(稳态),其强亲和力和高降解效率可有效抑制野生型多发性骨髓瘤细胞(IC_{50} 为 $0.071 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$),对泊马度胺耐药的H929细胞 IC_{50} 为 $2.3 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。对移植H929小鼠灌胃剂量 $100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,3/6只小鼠获得完全缓解^[21,22]。良好的I/II临床结果已被FDA授予孤儿药称号。

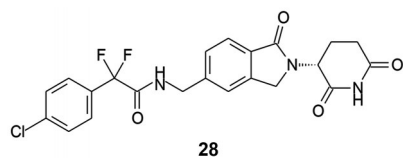


3.3.3 DKY709 诺华研制的DKY709(**27**)是一种IKZF2选择性分子胶降解剂。化学结构是4-去氨基来那度胺的5位连接疏水性片段,疏水链中同样含有碱性氮原子有助于溶解性。侧链连接在5-位的化合物目标

蛋白是IKZF2,而不是IKZF1/3蛋白。**27**与人Jurkat T淋巴细胞温孵16~20 h后,IKZF2受到剂量依赖性地降解(降解效率 $D_{\text{max}} = 69\%$,活性 $DC_{50} = 11 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$),**27**对IKZF1蛋白没有影响。

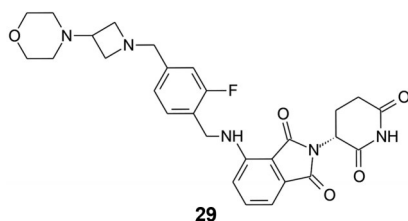
27在小鼠和猴体内有良好的药代动力学性质,有较高的生物利用度。移植MDA-MB-231乳腺癌的小鼠,给药 $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ DKY709,在肿瘤细胞和外周血Treg细胞中的IKZF2都受到显著降解^[23]。目前临床在研的适应症有黑色素瘤、结肠癌和鼻咽癌等。

3.3.4 艾拉度胺 BNS公司研制的艾拉度胺(**28**, eragidomide, CC-90009, ERA)也是去氨基来那度胺的类似物,是以化合物**23**(CC885)为起始物,结构骨架的变换较小,只将远端的NH变换为 CF_2 ,末端苯环经SAR结构优化而得。然而**28**的结构变换虽小,在结合CRBN后招募的蛋白改变成细胞周期G1过渡到S期蛋白1(GSPT1),形成的CRBN-ERA-GSPT1三元复合物,GSPT1被泛素化而降解。**28**对白血病细胞KG-1的活性 IC_{50} 为 $0.097 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,对人正常上皮细胞THLE-2(脱靶)作用很弱, $IC_{50} > 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,选择性很高。对35个急性髓细胞白血病患者样本作异种移植实验表明,艾拉度胺完全降解GSPT1,因而迅速诱导急性髓细胞白血病细胞凋亡^[24]。现处于I/II期临床研究,治疗急性髓细胞白血病。值得指出的是,前述的美兹度胺消除的脱靶蛋白是正常的GSPT1,而艾拉度胺的目标蛋白则是白血病细胞的GSPT1。



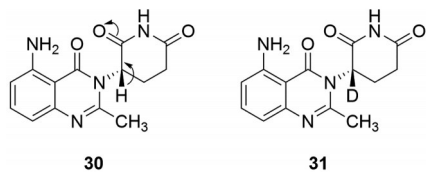
艾拉度胺(**28**)与塞司度胺(**26**)都是4-去氨基来那度胺的5-位连接的疏水链,二者结构相似性较高,但与BRCN结合后招募的目标蛋白不同,因而肿瘤适应症也不同,说明分子胶的结构差异尽管E3连接酶相同,但招募的目标蛋白不同,这在PROTAC是少见的。

3.3.5 果卡度胺 BMS研制的果卡度胺 (**29**, golcado-mide, CC-99282) 是泊马度胺为母核的分子胶, 与BRCN结合后, 募集转录因子 Ikaros/Aiolos, 导致降解, 临床试验用于治疗非霍奇金淋巴瘤 (NHL), 表现出良好的总缓解率 (ORR 42%), 包括B细胞淋巴瘤和滤泡性淋巴瘤。由于严重发热性中性粒细胞减少的发生率较低, 显示有良好的安全性^[25]。



3.3.6 阿伐度胺和SP-3164 阿伐度胺 (**30**, avadomide, CC-122) 是喹唑啉酮-环戊二酰亚胺化合物, 也属于调节BRCN功能的分子胶, 诱导CRBN与Aiolos和Ikaros的临近和结合, 由于降解Aiolos和Ikaros可以模拟干扰素信号, 引发DLBCL的细胞凋亡, 临床试验治疗弥漫大B细胞淋巴瘤 (DLBCL)^[26]。

30的优映体为S构型, 但可经烯醇化发生消旋化而降低活性, Salarius公司研制的氘代分子SP-3164 (**31**), 由于C-D键强于C-H键, 提高了**31**的构型稳定性。



SP-3164对滤泡性淋巴瘤动物模型无论是单独使用或是与上市药物维奈托克 (venetoclax) 或他泽司他 (tazemetostat) 联合使用都有显著疗效^[27]。

以上处于临床试验的“度胺”类似物虽然招募的都是BRCN, 但诱导临近结合的目标蛋白却是不同的, 例如GSPT1与IKZF1、IKZF3或CK1 α 没有明显的同源性, 化学结构的变化选择性地招募了不同靶标。Sievers等^[28]系统筛选了IMiD-CRBN复合物识别的含有Cys2-His2 ZF结构域的转录因子蛋白, 发现新的靶标蛋白被“度胺”类诱导而靶向降解。

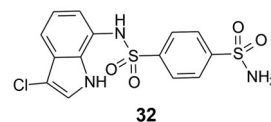
3.4 芳磺酰胺类分子胶

3.4.1 吡地苏兰 吡地苏兰 (**32**, indisulam, E7070, INDI) 是碳酸酐酶抑制剂, 也有抗肿瘤活性, 对移植人肿瘤细胞的小鼠有显著抑制作用, 而且具有安全性。**32**进行临床试验治疗进展期的实体瘤患者, 但因效果

差 (低于10%) 而未能成药。Han等^[29]研究**32**的作用机制以揭示临床治疗效果差的原因, 发现细胞内有一类核蛋白称作RNA结合基源蛋白39 (RBM39), 其功能是参与前体mRNA (pre-mRNA) 的剪切。发现**32**对癌细胞中的野生型RBM39的作用, 是由于与E3泛素连接酶CUL4-DCAF15结合成三元复合物DCAF15-INDI-RBM39, 导致RBM39泛素化而被蛋白酶体降解。然而当RBM39发生数个氨基酸变异, 蛋白构象的改变不能与**32**和CUL4-DCAF15三结合, 因而阻止了泛素化和降解反应, 这是发生耐药的分子基础, 也是临床效果差的原因。

研究发现RBF39和E3连接酶DCAF15两个蛋白与**32**温孵, 只能得到三元复合物DCAF15-INDI-RBM39, 没有生成任何二元复合物, DCAF15与RBM39的相互作用很弱, 不能维持足够的结合力 ($K_i > 50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 所以吡地苏兰的招募、诱导拉近, 与两个蛋白结合后的构象变化, 二者广泛的非极性面, 需要**32**分别结合招募实现三元性结合。说明**32**是“两面胶”型的关键分子, 促进了DCAF15与野生型RBF39的结合, 但变异的RBF39不能被**32**识别与结合, 分子胶失去了“黏合”能力, 因而表现为临床的耐药性。

DCAF15-INDI-RBM39的晶体结构提示, **32**定位于RBM39的中央螺旋和DCAF15的 $\beta 9$ 、 $\beta 16$ 和 $\alpha 6$ 之间; 3-氯代吡啶环结合于由DCAF15的Thr230、Phe235和Val559以及RBM39的Met265和Gly268组成的疏水腔中 (在两个蛋白交织的界面上)。苯磺酰胺定位于DCAF15的Ala234和Thr262以及RBM39的Met265疏水性侧链之中。**32**中间的磺酰胺与DCAF15的Ala234和Phe235主链形成氢键结合, N-H有可离解性, 带负电荷的氮原子与水分子氢键结合, 后者又与RBM39的Thr262和Asp264形成氢键, 增强了结合力。图7是DCAF15-INDI-RBM39晶体结构的部分截图, 绿色为DCAF15结构域, 紫色为RBM39结构域, 橙色结构的**32**跨越在“绿紫”之间。



3.4.2 E7820 日本卫材公司研制的E7820 (**33**) 是芳香磺酰胺衍生物, 最初作为新生血管抑制剂, 抑制内皮细胞整合素 $\alpha 2$ 亚基的表达, 抑制大鼠主动脉血管生成的IC₅₀为0.11 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 调节 α -1、 α -2、 α -3和 α -5整合素mRNA表达, 因而具有抗血管生成和抗肿瘤活性。后来证实E7820是分子胶, 其作用靶标是通过结合泛素E3连

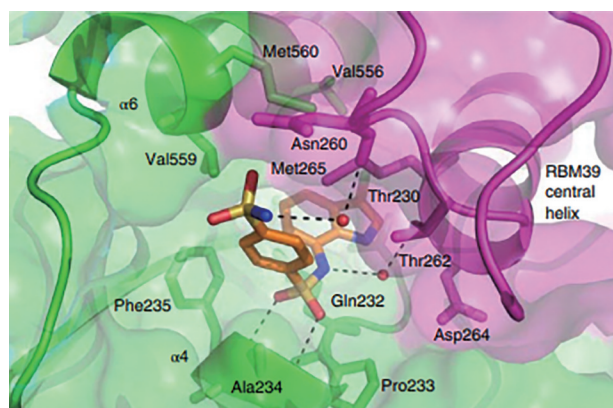
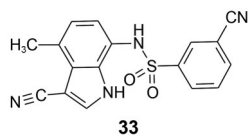


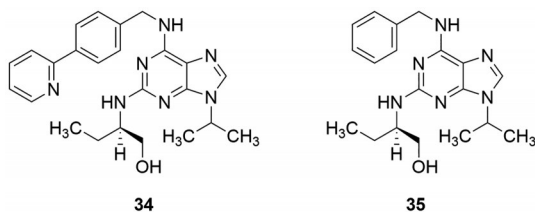
Figure 7 Compound **32**-mediated interactions between DCAF15 and RBM39. **32** (orange) bridges the structure of DCAF15 (green) and RBM39 (magenta) by forming several direct or water-mediated interactions with both DCAF15 and RBM39 and serves to increase the complementarity between the two surfaces

接酶DCAF15招募RBM39,使两个蛋白临近,形成了三元复合物,蛋白-蛋白相互作用导致RBM39泛素化而被降解失活。**33**的结构与吲地苏兰(**32**)有相似性^[30]。



3.5 CR8

为了寻找新的抗癌分子胶药物,美国和瑞士研究所合作筛选了4 518个临床和临床前药物对578株癌细胞的抑制活性强度,以及分析了499个E3连接酶mRNA水平与活性化合物的关联性,从中发现(*R*)-CR8(**34**),是CDK激酶抑制剂,对CDK1/2/5/7/9的作用都很强CDK1/cyclinB ($IC_{50} = 0.09 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), CDK2/cyclinA ($0.072 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), CDK2/cyclinE ($0.041 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), CDK5/p25 ($0.11 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), CDK7/cyclinH ($1.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), CDK9/cyclinT ($0.18 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和CK1 δ/ϵ ($0.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。更为重要的是,**34**是个降解型分子胶,从而进一步解析了CR8分子胶的作用特征。



离体免疫共沉淀实验证明,重组纯化的CDK12的激酶域 [CDK12(713–1052)] 与其伴侣蛋白周期素K

(cyclin K1–267)的复合物在没有CR8时,E3的DDB1没有明显的富集,而加入等摩尔量的CR8,则生成化学计量的DDB1-CR8-CDK12-cyclin K复合物(图8a),提示结合了CDK12-cyclin K,CR8诱导E3酶的临近和富集,促进了DDB1-CR8-CDK12-cyclin K复合物的生成,导致目标蛋白cyclin K的泛素化和降解。

结构生物学显示,CR8与CDK12-cyclin K结合(图8b),端基2-吡啶基发生疏水相互作用,并诱导拉近E3的DDB结构域与CDK12-cyclin K发生互作,面积大约 $2\ 100 \text{ \AA}^2$,CR8的结构对于复合物的疏水-疏水有重要作用。例如将E3参与疏水相互作用的Ile909、Arg928和Arg947变异,降低了结合能力;或去除CR8苯基的 CH_2 或去除吡啶基都削弱降解作用,提示对分子胶的结构变换直接影响降解活性和效率^[31]。

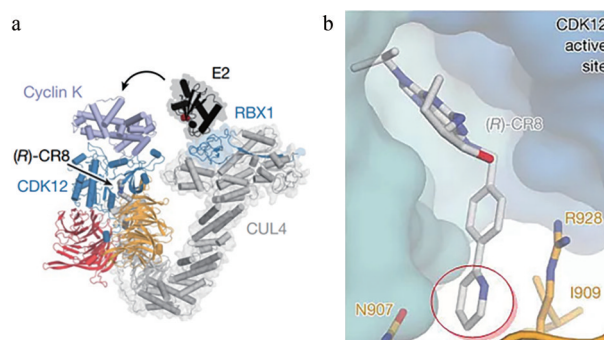


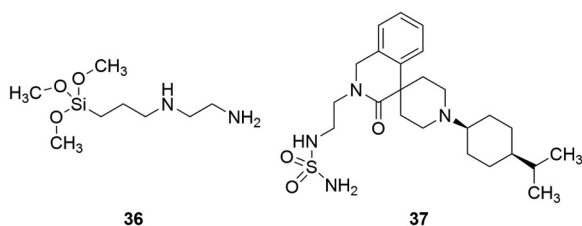
Figure 8 a: Triad complex of CUL4-RBX1-DDB1 (E3) bound to the CR8-CDK12-cyclin K complex; b: The location of CR8 at CDK12-cyclin K

普筛得到的CR8既是多个CDK激酶亚型的强效抑制剂,又是具有降解CDK12的伴侣蛋白cyclin K的分子胶。筛选的化合物库中CR8的原型化合物roscovitine(**35**)虽然是CDK激酶抑制剂^[32],却没有诱导降解作用。**34**比**35**多一个吡啶环,这个并没有与CDK结合的助溶基团却是招募和拉近CDK12-cyclin K的重要药效团,成为降解cyclin K的分子胶,苯基-2-吡啶可能成为招募cyclin蛋白的化学结构,所以,对抑制剂的外向部分作化学修饰,可以变成特定靶标蛋白的分子胶降解剂。

3.6 KPG-818和KPG-121

康朴生物医药研制的降解型分子胶KPG-818(**36**)是含硅醚的二胺化合物,结合于CRBN E3泛素连接酶,拉近目标蛋白锌指转录因子Aiolos和Ikaros,诱导形成三元复合物而泛素化和降解,抑制B淋巴细胞发育和增殖,有效地调节TNF- α 、IL-6、IL-2、IL-10等细胞因子的表达水平。**36**与“度胺”类药物的分子结构迥异,却也结合CRBN E3泛素连接酶,但招募的目标蛋白是不同的。临床前研究显示,KPG-818在多种动

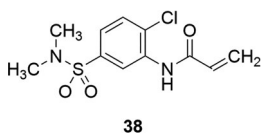
物模型显示抗炎活性和广泛的抗增殖活性。临床试验治疗系统性红斑狼疮 (SLE) 和成人 T 细胞白血病/淋巴瘤、弥漫性大 B 细胞淋巴瘤^[33]。



KPG-121 (**37**) 是康朴生物医药研制的另一个 CRBN E3 泛素连接酶复合物 CRL4-CRBN 调节剂, 属于含有氨基磺酰氨基的四氢异喹啉酮化合物, 具有结合靶向作用酪蛋白激酶 1A1 (CK1 α) 作用和转录因子 Aiolos 及 Ikaros 的泛素化而降解。KPG-121 具有抑制细胞增殖活性和抗血管生成活性, 增强免疫调节功能。KPG-121 与雄激素受体拮抗剂如恩杂鲁胺、醋酸阿比特龙、阿帕鲁胺 (apalutamide) 或达洛鲁胺 (darolutamide) 联用, 能显著提高抗前列腺癌效果^[34]。

3.7 EN450

King 等^[35]为发现新结构类型分子胶, 将表型普筛 (phenotypic screening) 与化学蛋白质组学方法 (chemoproteomic approaches) 相结合, 研究治疗白血病的分子胶药物。筛选了 750 个含有弱亲电基团的化合物库, 以期通过共价键结合发现新型的分子胶。其中 EN450 (**38**) 具有抑制白血病细胞的活性, 而且是通过类泛素化修饰 (neddylation) 后, 目标蛋白被蛋白酶体降解。用基于串联质谱标签 (TMT) 定量蛋白质组学方法揭示出 **38** 结构中丙烯酰氨基作为迈克尔加基团与 E2 铈合酶-转录因子 UBE2D 的 Cys111 巯基发生共价键结合, 是生成三元复合物、对目标蛋白降解的重要环节, **38** 成为作用于 UBE2D 新结构类型的分子胶。



4 结语

小分子化学诱导促进两个蛋白临近 (CIP) 引起的生物学效应, 从相互作用的层面分析, 是化合物与两个蛋白表面的互补性和诱导契合所致, 套用 100 多年前 Fisher 提出的锁-钥学说, 分子胶可视作具有“两面齿”的钥匙, 形成一把钥匙开两把锁的三元复合物。CIP

用于分子胶药物的研究与传统药物的显著不同是无需目标蛋白的活性结合域 (腔穴或裂隙), 打破了非可药性靶标的魔咒, 当然, 两个蛋白原本可能具有互作的倾向, 但毕竟是分子胶促成了事件的发生—目标蛋白被蛋白酶体降解。研制分子胶药物最初是靠偶然的幸运发现, 例如沙利度胺及其类似物。“度胺”类的结构衍生化, 不同的 me-too 分子可改变目标蛋白, 产生不同的适应症。目前虽然难以实现分子胶的理性设计, 但以三结合的方式研制抗肿瘤药的分子胶已形成平台技术, 即筛选结构多样性的小分子库对多种肿瘤细胞库的表型变化—寻找对肿瘤细胞的抑制剂, 基于串联高分辨质谱定量蛋白质组学平台—确定分子胶的结构, 以及高通量 Western blot 筛选平台—分子胶的结构优化, 这是研制分子胶的一个有效途径。人工智能对大数据的信息挖掘也在探索中, 实现分子胶的理性设计仍然面临着挑战^[36]。

作者贡献: 郭宗儒设计、调研并撰写论文。

利益冲突: 无利益冲突。

References

- [1] Melcher K, Xu Y, Ng LM, et al. Identification and mechanism of ABA receptor antagonism [J]. *Nature Struct Mol Biol*, 2010, 17: 1102-1108.
- [2] Nam KH, Li J. BRI1/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling [J]. *Cell*, 2002, 110: 203-212.
- [3] Liu J, Farmer JD, Lane WS, et al. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes [J]. *Cell*, 1991, 66: 807-815.
- [4] Schreiber S. The rise of molecular glue [J]. *Cell*, 2021, 184: 3-8.
- [5] Fretz H, Albers MW, Galat A, et al. Rapamycin and FK506 binding proteins (immunophilins) [J]. *J Am Chem Soc*, 1991, 113: 1409-1411.
- [6] Heitman J, Movva NR, Hall MN. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast [J]. *Science*, 1991, 253: 905-909.
- [7] Andlovic B, Heilmann G, Ninck S, et al. IFN α primes cancer cells for fusicoccin-induced cell death via 14-3-3 PPI stabilization [J]. *Cell Chem Biol*, 2023, 30: 573-590.
- [8] Ogino N, Masuda R, Punzalan LL, et al. Structure-activity-relationship study of semi synthetically modified fusicoccins on their stabilization effect for 14-3-3-phospholigand interactions [J]. *Bioorg Med Chem*, 2022, 73: 117020.
- [9] Tanaka N, Lin JJ, Li C, et al. Clinical acquired resistance to KRASG12C inhibition through a novel KRAS switch-II pocket mutation and polyclonal alterations converging on RAS-MAPK reactivation [J]. *Cancer Discov*, 2021, 11: 1913-1922.
- [10] Graves B, Thompson T, Xia M, et al. Activation of the P53 path-

- way by small-molecule induced MDM2 and MDMX dimerization [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109: 11788-11793.
- [11] Knott MML, Hölting TLB, Ohmura S, et al. Targeting the undruggable: exploiting neomorphic features of fusion oncoproteins in child-hood sarcomas for innovative therapies [J]. Cancer Met Rev, 2019, 38: 625-642.
- [12] Bushweller JH. Targeting transcription factors in cancer – from undruggable to reality [J]. Nat Rev Cancer, 2019, 19: 611-624.
- [13] Worley CK, Zenser N, Ramos J, et al. Degradation of Aux/IAA 2 proteins is essential for normal auxin signaling [J]. Plant J, 2000, 21: 553-562.
- [14] Tuladhar A, Rein KS. Mahymycin A is a potent inhibitor of mammalian thioredoxin reductase-1 [J]. ACS Med Chem Lett, 2018, 9: 318-322.
- [15] Isobe Y, Okumura M, McGregor LM, et al. Manumycin polyketides act as molecular glues between UBR7 and P53 [J]. Nat Chem Biol, 2020, 16: 1189-1198.
- [16] Liu TT, Yang H, Zhuo FF, et al. Atypical E3 ligase ZFP91 promotes small-molecule-induced E2F2 transcription factor degradation for cancer therapy [J]. eBioMedicine, 2022, 86: 104353.
- [17] Sievers QL, Petzold G, Bunker RD, et al. Defining the human C2H2 zinc finger degrome targeted by thalidomide analogs through CRBN [J]. Science, 2018, 362: eaat0572.
- [18] Krönke J, Fink EC, Hollenbach PW, et al. Lenalidomide induces ubiquitination and degradation of CK1 α in Del(5q) MDS [J]. Nature, 2015, 523: 183-188.
- [19] Petzold G, Fischer ES, Thomä NH, et al. Structural basis of lenalidomide-induced CK1 α degradation by the CRL4CRBN ubiquitin ligase [J]. Nature, 2016, 532: 127-130.
- [20] Hansen JD, Correa M, Nagy MA et al. Discovery of CRBN E3 ligase modulator CC-92480 for the treatment of relapsed and refractory multiple myeloma [J]. J Med Chem, 2020, 63: 6648-6676.
- [21] Henderson JA, RJ, Perino S, et al. Abstract LB007: CFT7455: a novel, IKZF1/3 degrader that demonstrates potent tumor regression in IMiD-resistant multiple myeloma (MM) xenograft models [J]. Cancer Res, 2021, 81: LB007.
- [22] Berdeja J, Ailawadhi S, Horwitz SM, et al. A phase 1 study of CFT7455, a novel degrader of IKZF1/3, in multiple myeloma and non-Hodgkin lymphoma [J]. Blood, 2021, 138: 1675.
- [23] Bonazzi S, d'Hennezel E, Beckwith REJ, et al. Discovery and characterization of a selective IKZF2 glue degrader for cancer immunotherapy [J]. Cell Chem Biol, 2023, 30: 235-247.
- [24] Hansen JD, Correa M, Alexander M, et al. CC-90009: a cereblon E3 ligase modulating drug that promotes selective degradation of GSPT1 for the treatment of acute myeloid leukemia [J]. J Med Chem, 2021, 64: 1835-1843.
- [25] Michot JM, Chavez JC, Carpio C, et al. Clinical activity of CC-99282, a novel, oral small molecule cereblon E3 ligase modulator (CELMoD) agent, in patients (pts) with relapsed or refractory non-Hodgkin lymphoma (R/R NHL)-first results from a phase 1, open-label study [J]. Blood, 2021, 138: 3574.
- [26] Rasco DW, Papadopoulos KP, Pourdehnad M, et al. A first-in-human study of novel cereblon modulator avadomide (CC-122) in advanced malignancies [J]. Clin Cancer Res, 2019, 25: 90-98.
- [27] Santiesteban DY, Duncan AD, Mirza NQ, et al. SP-3164, a novel cereblon-binding protein degrader, shows activity in preclinical lymphoma models [J]. Blood, 2022, 140: 8865-8866.
- [28] Sievers QL, Petzold G, Bunker RD, et al. Defining the human C2H2 zinc finger degrome targeted by thalidomide analogs through CRBN [J]. Science, 2018, 362: eaat05.
- [29] Bussiere DE, Xie LL, Srinivas H, et al. Structural basis of indisulam-mediated RBM39 recruitment to DCAF15 E3 ligase complex [J]. Nat Chem Biol, 2020, 16: 15-23.
- [30] Han T, Goralski M, Gaskill N, et al. Anticancer sulfonamides target splicing by inducing RBM39 degradation *via* recruitment to DCAF15 [J]. Science, 2017, 356: eaal3755.
- [31] Miko S, Kozicka Z, Petzold G, et al. The CDK inhibitor CR8 acts as a molecular glue degrader that depletes cyclin K [J]. Nature, 2020, 585: 293-297.
- [32] De Azevedo WF, Leclerc S, Meijer L, et al. Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues: crystal structure of human cdk2 complexed with roscovitine [J]. Eur J Biochem, 1997, 243: 518-526.
- [33] Ge C, Liao B, Zhang L. Abstract 6367: KPG-818, a novel cereblon modulator, inhibits hematological malignancies in preclinical models [J]. Cancer Res, 2020, 80: 6367.
- [34] Ge C, Liao B, Zhang L. Abstract 5327: KPG-121, a novel CRBN modulator, potently inhibits growth of metastatic castration resistant prostate cancer as a single agent or in combination with androgen receptor signaling inhibitors both *in vitro* and *in vivo* [J]. Cancer Res, 2020, 80: 5327.
- [35] King EA, Cho Y, Hsu NS, et al. Chemoproteomics-enabled discovery of a covalent molecular glue degrader targeting NF- κ B [J]. Cell Chem Biol, 2023, 30: 394-402.e9.
- [36] Dong G, Ding Y, He S, et al. Molecular glues for targeted protein degradation: from serendipity to rational discovery [J]. J Med Chem, 2021, 64: 10606-10620.