

## • 专题报道 •

## 调控蛋白成熟与翻译后修饰的小分子设计策略

何彦仪<sup>1,2</sup>, 尤启冬<sup>1,2\*</sup>, 王磊<sup>1,2\*</sup>

(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, 江苏 南京 210009)

**摘要:** 蛋白成熟与翻译后修饰是各类蛋白质发挥生物学功能的前提, 在体内由多种复杂的生物系统协同调控, 其中包括分子伴侣系统、泛素化系统、磷酸化系统和乙酰化系统等。合理调控上述系统可以实现对蛋白成熟和翻译后修饰过程的有效干预, 逐渐成为有效的药物设计方向。本文回顾了调控蛋白成熟和翻译后修饰相关的分子设计策略, 重点聚焦于靶向分子伴侣系统的小分子调控剂和异双功能分子策略。一方面基于分子伴侣系统调控蛋白成熟的生物学原理, 总结靶向分子伴侣系统的小分子研发历程; 另一方面围绕异双功能分子的设计原理和特点, 归纳其在调控翻译后修饰中的应用和发展, 为调控蛋白成熟与翻译后修饰过程的小分子设计提供新思路。

**关键词:** 蛋白成熟; 翻译后修饰; 分子伴侣系统; 异双功能分子; 分子药物设计

中图分类号: R914 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)11-2897-15

## Targeting protein folding and post-translational modifications by small molecules: review and prospects

HE Yan-yi<sup>1,2</sup>, YOU Qi-dong<sup>1,2\*</sup>, WANG Lei<sup>1,2\*</sup>

(1. Jiangsu Key Laboratory of Drug Design and Optimization, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009,

China; 2. School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

**Abstract:** Folding and post-translational modification of proteins are vital for their proper functionality, with various functional regulatory systems playing significant roles, including molecular chaperone systems, ubiquitination systems, phosphorylation systems, acetylation systems, etc. Precise regulations of these systems have emerged as an important trend in drug development. This review systematically summarizes the molecular control strategies related to protein folding and post-translational modification, with a specific focus on the molecular chaperone system and the strategy of heterobifunctional molecules. On one hand, based on the similarities and differences in molecular mechanisms and design strategies, we summarize the drug development process targeting the molecular chaperone system. On the other hand, we discuss the design principles and characteristics of dual-functional molecules, and summarize their applications and developments in the precise control of post-translational modifications, aiming to provide new insights for future design.

**Key words:** protein folding; post-translational modification; molecular chaperone system; heterobifunctional molecule; molecule drug design

1970年, Francis Crick提出分子生物学的中心法

收稿日期: 2024-05-27; 修回日期: 2024-07-23.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(82003582); 江苏省自然科学基金-优秀青年基金(BK20230103).

\*通讯作者 Tel: 86-25-83271351,

E-mail: youqd@163.com; leiwang.91@cpu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0503

则 (central dogma), 即 DNA 的复制 (replication)、转录 (transcription) 和翻译 (translation) 这三大过程<sup>[1]</sup>, 阐明了 DNA、RNA 和蛋白质三者之间的联系, 揭示了遗传信息传递的规律。具体而言, DNA 通过转录将遗传信息传递给 RNA, 然后通过翻译将信息表达为氨基酸序列, 最终这个序列经过折叠和翻译后修饰形成具有特

定三维结构的蛋白质分子,以执行特定的生物功能,维持生命的正常活动(图1)。

蛋白质正确折叠对其功能的发挥至关重要。20世纪80年代末,John Ellis首次发现分子伴侣(molecular chaperones)蛋白可以辅助客户蛋白进行特定的折叠和组装<sup>[2]</sup>,推翻了蛋白折叠无需外力的观点<sup>[3]</sup>。20世纪90年代,辅助蛋白折叠的蛋白质被进一步分为两大类——分子伴侣和折叠酶(foldases)<sup>[4]</sup>(图1)。二者的区别在于,折叠酶可以辅助客户蛋白的二硫键断裂和生成、脯氨酸顺反异构等化学键变化,而分子伴侣主要催化客户蛋白发生非共价的折叠或解折叠<sup>[5,6]</sup>。折叠酶主要包括两种异构酶,即蛋白质二硫化物异构酶和肽基脯氨酸顺反异构酶。分子伴侣系统是一个庞大且多样的蛋白质群体,主要包含热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)家族,它们能够协助蛋白质从头折叠或重新折叠,并具有借助泛素蛋白酶体系统(ubiquitin-proteasome system, UPS)和自噬系统及时清除错误蛋白质的能力<sup>[7,8]</sup>。分子伴侣系统和折叠酶在维持蛋白质稳态方面都发挥了重要作用。目前,越来越多的疾病呈现出蛋白质稳态的失衡,主要表现为蛋白质因错误折叠而在细胞内外聚集形成沉积。例如,帕金森病中出现的 $\alpha$ -突触核蛋白及阿尔茨海默病中形成的细胞外 $\beta$ -淀粉样蛋白沉积<sup>[9]</sup>。因此,以蛋白折叠的调控为切入点,设计发现针对性的小分子药物,有望成为维持蛋白稳态的有效策略。

蛋白质在翻译后可以通过特定的氨基酸修饰呈现出多样的表型,此过程通过多种酶的催化修饰而完

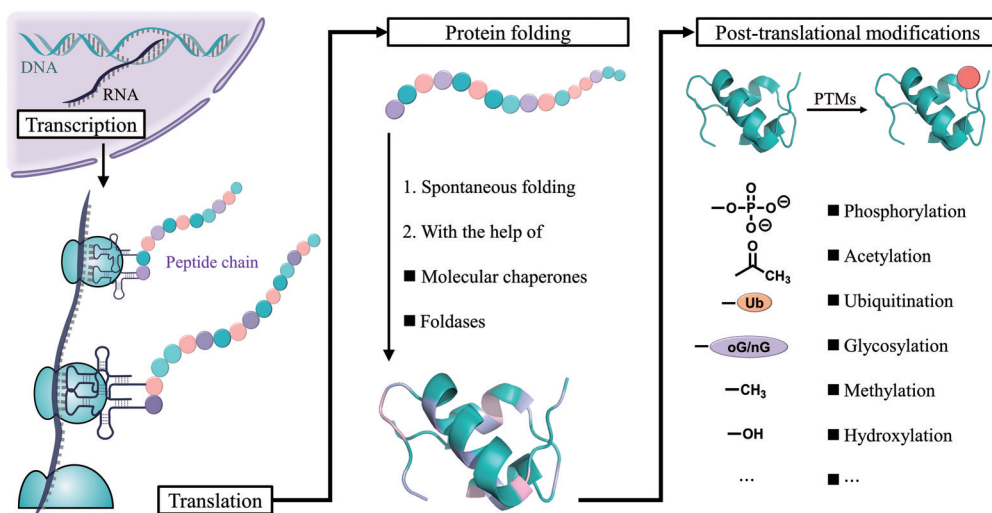
成<sup>[10]</sup>,称为蛋白质的翻译后修饰(post-translational modifications, PTMs)。几乎所有蛋白质都存在翻译后修饰位点<sup>[11]</sup>,并且大多数蛋白会发生多种修饰,表现出蛋白功能的多样性<sup>[12]</sup>。翻译后修饰包括磷酸化、乙酰化、泛素化、糖基化、甲基化、羟基化、酰胺化、硫酸化、脂质化等<sup>[10]</sup>(图1)。这些修饰会显著影响蛋白质活性、定位、折叠和相互作用<sup>[12-14]</sup>,异常的翻译后修饰会导致多种疾病的发生<sup>[15]</sup>。因此,设计调控蛋白质翻译后修饰的小分子被认为是调节蛋白功能、活性和互作的有效方法。

## 1 调控蛋白成熟的小分子设计策略

蛋白成熟与折叠的类型主要分为三类:第一类蛋白不折叠或部分折叠,缺乏特定的二级和三级结构;第二类蛋白可以独立完成折叠;第三类蛋白需要其他蛋白协助折叠。辅助折叠的蛋白主要有两种,分子伴侣和折叠酶。作者将分别探讨这两种蛋白的分子调控策略,并总结已报道的代表性小分子。

### 1.1 靶向分子伴侣系统的小分子调控策略

分子伴侣系统是一种帮助客户蛋白折叠或组装的蛋白群体<sup>[16]</sup>,存在于大多数原核和真核生物中<sup>[17]</sup>。除了协助蛋白质折叠外,分子伴侣系统还参与维持蛋白质稳态,包括协助大分子复合物组装、蛋白质转运和降解,及处理应激状态下的蛋白质的聚集问题等<sup>[18]</sup>。大多数分子伴侣属于热休克蛋白(heat shock protein, HSP),这些蛋白在细胞热应激时被诱导表达,以适应应激状态。除热应激外,其他环境、化学和疾病等因素也会增加热休克蛋白的表达<sup>[19]</sup>。热休克蛋白根据分子



**Figure 1** The process of transmission of genetic information. The process of genetic information transfer involves DNA transcribing its instructions into RNA through transcription. This RNA is then translated into specific sequences of amino acids. These sequences undergo folding and modifications to form proteins with distinct three-dimensional structures, which carry out various biological functions and maintain normal life activities. PTMs: Post-translational modifications

质量可分为不同亚类,如 HSP10、HSP20、HSP40、HSP60、HSP70、HSP90 和 HSP100 等。分子伴侣系统的相关蛋白在细胞内表达量高,约占细胞质量的 10%。其中, HSP90 和 HSP70 是最主要的成员,相关研究备受关注<sup>[20]</sup>。HSP90 和 HSP70 功能的发挥离不开共伴侣蛋白 (cochaperones) 的帮助,共伴侣蛋白能够参与对底物蛋白的识别和递送、稳定分子伴侣构象等过程,是分子伴侣循环正常运作所不可缺少的一部分。

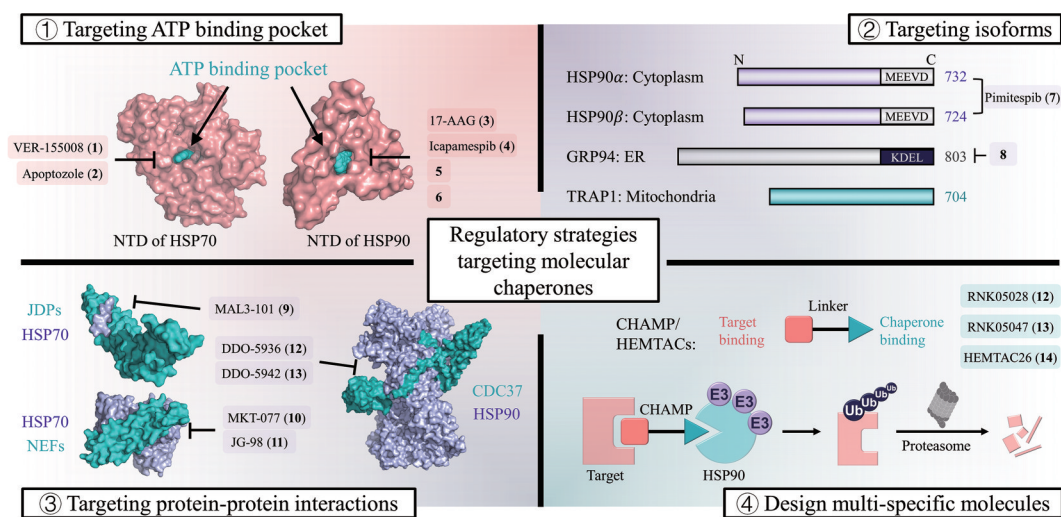
HSP70 是一种普遍存在的伴侣蛋白,通过与共伴侣蛋白结合发挥多种生物学功能,包括蛋白质折叠、转运和分解等<sup>[21]</sup>。人体中的 HSP70 包含 641 个氨基酸残基,分子质量约为 70 kDa。HSP70 是 ATP 依赖型的分子伴侣,由两个主要功能域组成<sup>[21]</sup>,其一是保守的 N 端核苷酸结合域 (nucleotide-binding domain, NBD),能够结合并水解 ATP,因此也称为 ATP 结合域 (ATP-binding domain, ABD);其二是更易发生构象变化的 C 端底物结合域 (substrate-binding domain, SBD),负责结合客户蛋白。HSP70 的活性既取决于这两个功能域之间的动态相互作用,也取决于与共伴侣蛋白之间的相互作用。

HSP90 是一类高度保守的伴侣蛋白,在所有真核细胞中表达<sup>[22]</sup>。它参与了多种重要的生理过程,如细胞凋亡、蛋白质折叠和降解及信号传导等<sup>[23]</sup>。HSP90 也是 ATP 依赖型的分子伴侣,常以二聚体的形式存在。其单体分子质量约为 90 kDa,主要可以分为 3 个较为保守的结构域: N 端结构域 (N-terminal domain, NTD)、中间结构域 (middle domain, MD) 和 C 端结构域 (C-terminal domain, CTD)。N 端结构域能与 ATP 结合,因此也被称为 ATP 结合域。中间结构域主要负责结合客

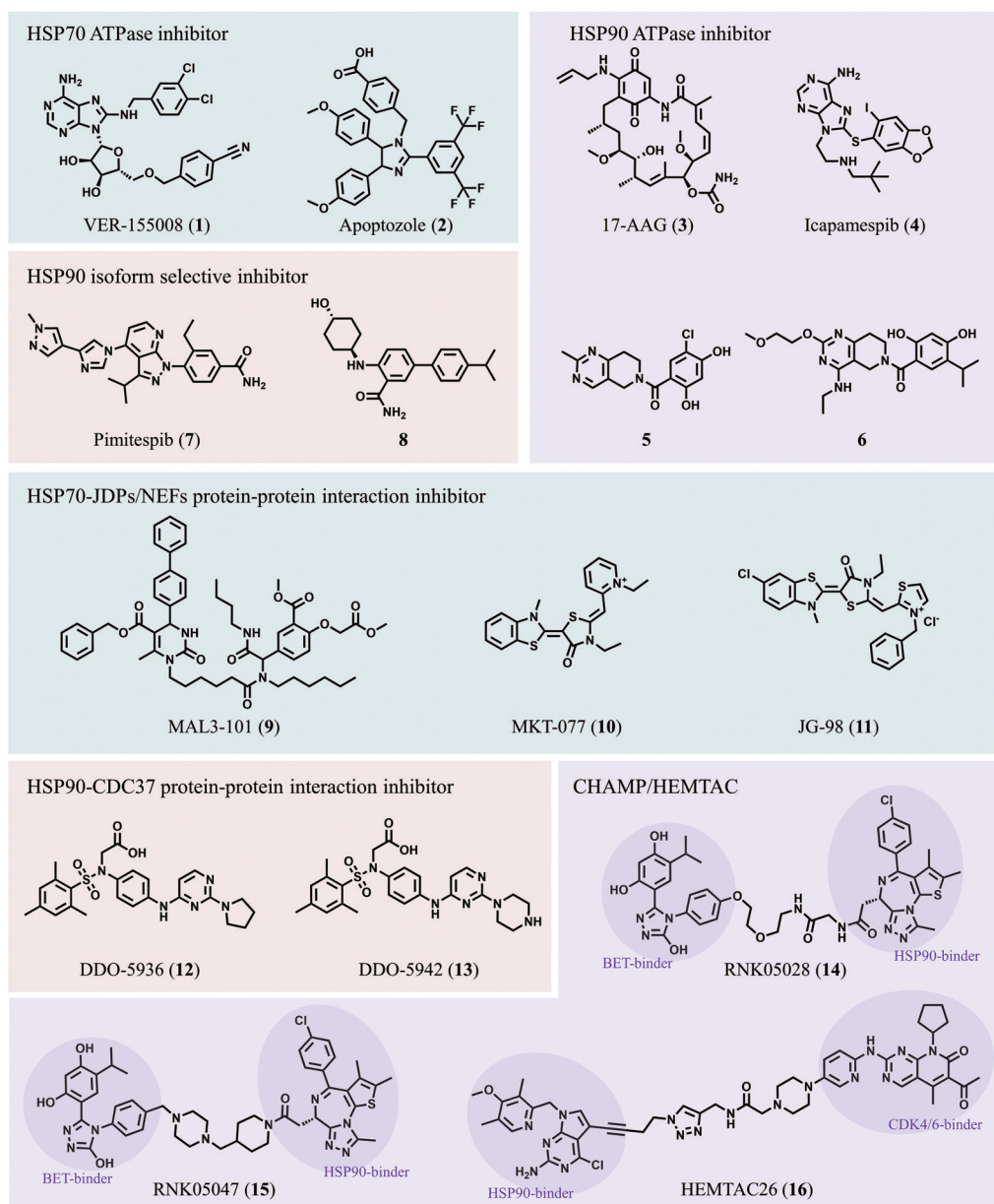
户蛋白。C 端结构域负责 HSP90 的二聚化,包含特殊序列 MEEVD 或 KDEL,特殊序列的种类主要取决于 HSP90 亚型及其所处细胞位置。与 HSP70 类似, HSP90 需要与多种共伴侣蛋白形成蛋白互作网络,以发挥精细化的生物学功能。

HSP70 与 HSP90 的过表达与多种人类癌症相关,如肺癌、乳腺癌、结肠癌、肝癌、前列腺癌、食道癌和宫颈癌等<sup>[24-32]</sup>。因此,设计靶向 HSP70 和 HSP90 的小分子调控剂具有临床前景与应用价值。这部分内容将介绍靶向分子伴侣系统的分子调控手段,聚焦 HSP70 和 HSP90 这两种伴侣蛋白,按照作用位点与调控机制的异同,将分子调控手段分为四大类 (图 2): 一是靶向分子伴侣蛋白的 ATP 口袋,二是选择性靶向分子伴侣蛋白亚型,三是靶向分子伴侣蛋白与共伴侣蛋白间的蛋白相互作用,四是设计多特异性分子,并介绍这四类调控手段的代表性分子 (图 3)。

**1.1.1 靶向热休克蛋白的 ATP 口袋** HSP70 的许多功能都与 NBD 的 ATP 酶活性有关,因此抑制 HSP70 与 ATP 的结合有望阻断 HSP70 的伴侣活性。靶向 HSP70 N 端 ATP 结合口袋的代表性 HSP70 ATPase 抑制剂包括 VER-155008 (1) 和 Apoptozole (2)。2009 年,Williamson 等<sup>[33]</sup>通过荧光偏振实验设计筛选了一系列腺苷衍生物,借助其在结构上与 ATP 的相似性实现了对 HSP70 的竞争性结合。其中, VER-155008 (1) 对 HSP70 的亲合力最强 ( $IC_{50}$  值为  $0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),且在 HCT116 细胞中表现出抗增殖活性 ( $GI_{50}$  值为  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),并降低了对 HSP70 敲除敏感的 HER2 蛋白的水平。另有研究表明,这类化合物在 HCT116 细胞中与 HSP90 抑制剂具有协同作用<sup>[34]</sup>。2008 年,Williams 等<sup>[35]</sup>首次设计了咪唑类



**Figure 2** Regulatory strategies targeting molecular chaperone systems. HSP: Heat shock protein; NTD: N terminal domain; GRP94: Glucose-regulated protein 94; TRAP1: Tumor necrosis factor receptor-associated protein 1; ER: Endoplasmic reticulum; CDC37: Cell division cycle 37 homolog; CHAMP: Chaperone-mediated protein degrader; HEMTACs: Heat shock protein 90-mediated targeting chimeras



**Figure 3** Representative molecules targeting molecular chaperone systems. JDPs: The J-domain containing proteins; NEFs: Nucleotide exchange factors

凋亡诱导分子 Apoptozole (2), 该分子能够以相似的亲和力结合 HSP70 和 HSC70 (heat shock cognate 71 kDa protein) ( $K_d$  值分别是 0.21 和 0.14  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。Apoptozole (2) 通过结合在 HSP70 的 ATP 结合域来抑制 HSP70 活性, 不与其他热休克蛋白如 HSP40、HSP60 和 HSP90 结合<sup>[36]</sup>。细胞实验表明 Apoptozole (2) 阻断 HSP70 与 APAF-1 (apoptotic peptidase activating factor 1) 的结合, 但不影响其与 ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1)、JNK (c-Jun N-terminal kinase)、BAX (Bcl-2 Associated X Protein) 和 AIF (apoptosis-inducing factor) 的结合。动物实验表明 Apoptozole (2) 会显著抑制肿瘤生长并诱导细胞凋亡。联用结果显示, Apoptozole

(2) 可以通过与现有化疗药物联用来减少所需剂量, 减少毒副作用。以上结果证明了 Apoptozole (2) 具有作为抗肿瘤剂的强大潜力。然而与 HSP90 相比, HSP70 对 ATP 具有更强的亲和力 ( $K_d$  值为 100~500  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 这使得 ATPase 类抑制剂的设计具有挑战性<sup>[37]</sup>。

HSP90 的生物学功能依赖于 ATP 的结合<sup>[38]</sup>, 抑制 HSP90 的 ATP 酶活性会破坏底物蛋白的“折叠-循环”过程, 从而导致客户蛋白的不稳定、泛素化和最终降解<sup>[39]</sup>。因此, HSP90 的 ATP 结合位点在开发抑制剂的过程中备受关注。目前, 多种 HSP90 ATPase 抑制剂已进入临床试验阶段, 根据结构类型主要分为 4 类: 格尔德霉素衍生物类、间苯二酚类、嘌呤骨架类和苯甲酰胺

类。首个进入临床试验的HSP90抑制剂为格尔德霉素衍生物17-AAG (3)<sup>[40]</sup>, 尽管17-AAG (3) 在试验中表现出预期的药效活性, 但其水溶性和肝毒性的缺陷严重限制了临床应用<sup>[41]</sup>。另一种嘌呤骨架类抑制剂伊卡司匹 (icapamespib, 又称PU-AD或PU-HZ151) (4) 已进入临床II期, 表现出对病变神经元较好的选择性<sup>[42,43]</sup>。此外, 在单次或多次给药条件下, 伊卡司匹 (4) 均表现出良好的耐受性。

本课题组早期也聚焦于HSP90 ATPase抑制剂的研究, 设计了一系列基于间苯二酚结构的四氢吡啶并[4,3-d]嘧啶核类化合物。在第一阶段研究中, 化合物5<sup>[44]</sup>表现出百纳摩尔级别的结合活性 ( $IC_{50} = 100 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 对HSP90 ATP酶活抑制活性较强 ( $IC_{50} = 420 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。在此基础上, 本课题组设计并合成了化合物6, 其结合活性相较于化合物5提高了约4倍 ( $IC_{50} = 28 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 具有合适的半衰期和良好的肝微粒体代谢稳定性, 且在大鼠模型中未表现出眼毒性, 有望成为靶向HSP90的抗肿瘤候选药物<sup>[45]</sup>。

然而, 各类HSP90 ATPase抑制剂都表现出一定的缺陷, 包括: ① 无选择性降解底物蛋白, 导致潜在药物毒性; ② HSP70的代偿性表达, 引发严重的热休克不良反应。为了克服HSP90 ATPase抑制剂的固有缺陷, 研究人员需要寻找全新的作用靶点和调控策略。

**1.1.2 选择性靶向热休克蛋白亚型** 不同的细胞区域具有不同的分子伴侣网络, 特定的分子伴侣网络仅在指定区域发挥作用<sup>[8,18]</sup>。因此, 探究热休克蛋白位于特定区域的不同亚型有望实现对特定分子伴侣网络的靶向干预, 提高抑制剂对靶点的选择性有利于规避泛抑制导致的潜在毒性。

人类HSP70家族至少包含8个成员, 包括细胞内应激诱导的HSP70 (又称为HSP70-1、HSP72或HSPA1)、构成细胞质的HSC70 (又称为HSP73或HSPA8)、内质网定位的GRP78 (glucose-regulated protein 78, 又称为BiP或HSPA5) 和位于线粒体中的GRP75 (glucose-regulated protein 75, 又称为mtHSP-70、mortalin或HSPA9)。这些成员均包含高度保守的N端ATP结合域和C端底物结合域, 参与了蛋白折叠和蛋白降解等多种生理进程。虽然已报道的HSP70抑制剂尚未在亚型间表现出明显的选择性, 但是随着对HSP70不同结构亚型的深入认知, 未来有望设计差异化的小分子调控剂。

在哺乳动物细胞中, HSP90可以根据结构分为4类: HSP90 $\alpha$ 、HSP90 $\beta$ 、GRP94 (glucose-regulated protein 94) 和TRAP1 (tumor necrosis factor receptor associated protein 1)<sup>[46-48]</sup>。HSP90 $\alpha$ 和HSP90 $\beta$ 主要位于细胞质

中, 少量存在于细胞核中, GRP94存在于内质网中, TRAP1位于线粒体中。这4种亚型均包含NTD、MD和CTD这3个结构域, NTD上含有ATP结合口袋。HSP90 $\alpha$ 和HSP90 $\beta$ 在序列上具有85%的同一性, 在功能上也具有高度的相似性<sup>[49]</sup>。GRP94与HSP90 $\alpha/\beta$ 在序列上具有50%的同源性<sup>[50]</sup>, 其N末端额外包含靶向内质网所需的21个氨基酸序列<sup>[23]</sup>, C末端额外包含55个氨基酸, 且末端序列为KDEL而非MEEVD<sup>[51]</sup>。TRAP1与HSP90 $\alpha/\beta$ 具有60%的相似性<sup>[52]</sup>, 它在序列上缺乏C端MEEVD基序和连接MD和CTD的结构域<sup>[53]</sup>。这些结构上的微小区别使设计选择性靶向HSP90不同亚型的抑制剂成为可能, 随着结构解析技术的发展, 配体诱导的HSP90亚型的特异性结构变化也为设计选择性抑制剂提供了方向。

2012年, Kodama等<sup>[54]</sup>首次报道了HSP90 $\alpha/\beta$ 选择性抑制剂派米司匹 (pimitespib, TAS-116) (7), 这是首个也是唯一一个进入临床的HSP90亚型选择性抑制剂。2022年6月, 派米司匹 (7) 在日本获批上市, 用于治疗化疗后恶化的胃肠道间质瘤。派米司匹 (7) 具有较高的选择性<sup>[55]</sup>, 能有效抑制ATP与HSP90 $\alpha$ 和HSP90 $\beta$ 的结合 ( $K_i$ 值分别为34.7和21.3  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 但不影响其与GRP94和TRAP1的结合 ( $K_i$ 值均大于50 000  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。晶体结构显示派米司匹类似物具有独特的结合模式, 能促使HSP90 $\alpha/\beta$ 形成局部的 $\alpha$ -螺旋<sup>[56]</sup>。这一现象与Ernst等<sup>[57]</sup>在2014年提出的观念相吻合——HSP90 $\alpha/\beta$ 在104~111区域可形成配体依赖性的 $\alpha$ -螺旋, 这一构象是否形成会影响抑制剂的亚型选择性。派米司匹 (7) 凭借其口服有效、安全性高等优点, 目前正在进行治疗去势抵抗性前列腺癌的II期临床试验和治疗晚期实体瘤患者的I期临床试验。

2018年, Que等<sup>[58]</sup>在解析晶体数据时指出, 能否诱导GRP94的Phe199发生移位是产生GRP94选择性的关键。受此启发, 本课题组选择苯甲酰胺结构作为活性片段, 并在间位引入刚性苯环来移动Phe199残基, 成功设计合成了化合物8<sup>[59]</sup>。该化合物的GRP94抑制活性达到2  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 且在100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 条件下也没有表现出明显的HSP90 $\alpha$ 抑制, 展现出较优的选择性。在细胞水平上, 化合物8下调GRP94特异性客户蛋白, 但不干扰HSP70和AKT的表达。在小鼠溃疡性结肠炎模型中, 化合物8表现出显著的抗炎功效。该分子可作为强选择性探针化合物, 辅助探究GRP94的生物学功能。

**1.1.3 靶向伴侣蛋白间的蛋白相互作用** 在生命体中, HSP70和HSP90并不是孤立地发挥作用, 而是与许多共伴侣蛋白交织在一起, 形成伴侣作用网络。

HSP70的共伴侣蛋白包括J结构域蛋白(the J-domain containing proteins, JDPs)和核苷酸交换因子(nucleotide exchange factors, NEFs)。JDPs,也称为HSP40s,能够刺激ATP水解<sup>[60]</sup>。人类基因组中已鉴定出超过40种J蛋白基因<sup>[61]</sup>,每个基因都包含结合和刺激HSP70所需的保守的J结构域<sup>[62]</sup>。JDPs与HSP70之间的相互作用通过J结构域与HSP70 NBD结合来触发HSP70的变构,从而使ATP的周转速度增加约7倍,因此在存在JDPs的情况下,ADP的释放成为限速步骤<sup>[63]</sup>。NEFs是一类能够促进ADP释放的共伴侣蛋白,主要包括GrpE样家族、BAG家族、HSPBP1和非典型HSP70同源物<sup>[64]</sup>。几乎所有NEFs都可以结合HSP70的NBD并促进ADP释放,但每一类都具有不同的结构机制来实现这一效果<sup>[65]</sup>。综上所述,JDPs和NEFs共同调节HSP70的ATP循环,虽然它们不具有酶活性,但作为重要的调节因子,对HSP70实现伴侣功能至关重要。因此,设计抑制HSP70与共伴侣蛋白相互作用的小分子成为调节HSP70伴侣功能的策略之一。

靶向HSP70与共伴侣蛋白相互作用的代表性分子包括MAL3-101 (9)、MKT-077 (10)和JG-98 (11)。2004年,Fewell等<sup>[66]</sup>首次报道了一个作用于HSP70与JDPs结合界面的二氢嘧啶类衍生物MAL3-101 (9)。研究人员发现MAL3-101 (9)能够抑制JDPs诱导的HSP70的ATP酶活,而不影响HSP70本身活性。进一步研究发现MAL3-101 (9)对SKBr3细胞具有抗增殖活性<sup>[67]</sup>,这一结果可能与MAL3-101 (9)阻断了JDPs对Hsp70的作用有关<sup>[68]</sup>。MAL3-101 (9)凭借其独特的作用机制可用于调节HSP70-JDPs依赖性细胞过程,或作为工具分子识别与HSP70-JDPs互作相关的信号通路。有别于JDPs推动ATP周转的方式,NEFs通过加速ADP释放来增加HSP70的ATP周转速度,进而控制客户蛋白从复合体中释放的速度。因此,阻断NEFs与HSP70结合有望使HSP70暂时稳定在ADP结合状态,有利于一些客户蛋白的降解<sup>[69]</sup>。2000年,Wadhwa等<sup>[70]</sup>首次描述了含苯并噻唑结构的分子MKT-077 (10),该分子能结合在HSP70的变构口袋中<sup>[69,71]</sup>,通过构象变化促进HSP70与ADP的结合并破坏HSP70与NEFs的相互作用<sup>[72]</sup>。MKT-077 (10)展现出一定的抗增殖活性<sup>[70]</sup>,已进入II期临床试验。然而,其在MCF7乳腺癌细胞中的效力相对较弱( $EC_{50}$ 约为 $2.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),且在肝微粒体存在的情况下稳定性较差<sup>[72]</sup>。在此基础上,研究人员进行了结构优化,得到了类似物JG-98 (11),其在MCF7模型中表现出更为优越的抗肿瘤活性( $IC_{50}$ 约为 $0.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )<sup>[73-76]</sup>。这些分子展现了特殊的生物学机制和良好的生物学效应,有望成为HSP70-NEFs

生物学研究的重要化学探针。

HSP90的共伴侣蛋白对HSP90功能至关重要,它们能特异性作用于不同的底物蛋白,协助HSP90发挥不同的功能。CDC37 (cell division cycle 37 homolog)主要负责识别和结合HSP90未折叠的激酶客户,形成HSP90-CDC37-激酶复合物,通过ATP驱动辅助激酶折叠<sup>[22]</sup>。HSP90的激酶客户包括受体酪氨酸激酶、非受体酪氨酸激酶、淋巴细胞特异性酪氨酸激酶和丝/苏氨酸激酶等,其客户范围之广反映出癌细胞激酶组对HSP90伴侣网络的依赖性<sup>[76]</sup>。HSP90-CDC37的协同作用加速异常激酶蛋白的折叠,促进肿瘤的发生。因此,设计靶向HSP90-CDC37作用界面的小分子来抑制HSP90-CDC37二者相互作用,同时不影响HSP90的ATP酶活性,成为有别于HSP90 N端抑制剂的分子设计策略。

2019年,本课题组报道了小分子抑制剂DDO-5936 (12)<sup>[77]</sup>,首次实现在细胞水平上破坏HSP90-CDC37相互作用。借助分子动力学模拟和关键残基突变等手段,确定了HSP90与CDC37结合的关键氨基酸位点,构建了一套高通量筛选方法和生物评价体系,将DDO-5936 (12)确证为HSP90-CDC37蛋白互作抑制剂。该抑制剂选择性结合HSP90 NBD,不干扰其ATP酶活性。DDO-5936 (12)能够选择性下调HSP90的激酶客户,而不影响非激酶客户,它对HSP90-CDC37互作的阻断作用能够引起CDK4 (cyclin dependent kinase 4)的显著下调,阻碍了CDC37依赖性细胞周期,从而抑制细胞增殖。在此基础上,作者进一步设计合成了DDO-5942 (13)<sup>[78]</sup>,在理化性质和靶标活性上取得了改善。DDO-5936 (12)及DDO-5942 (13)的成功发现为调节HSP90与CDC37或其他共伴侣蛋白相互作用提供了新模板,也为设计靶向分子伴侣系统的小分子药物提供了新思路。

**1.1.4 设计多特异性分子** HSP90在参与蛋白折叠之外,还可以识别错误折叠的蛋白,并通过泛素蛋白酶体系统加速其降解。HSP90会与人体约30%的E3泛素连接酶结合<sup>[79,80]</sup>,这些连接酶能特异性识别并泛素化标记底物蛋白,帮助蛋白降解,维护细胞的正常功能。基于HSP90与E3泛素连接酶的相互作用,HSP90成为选择性诱导靶蛋白降解的一个突破口。

瑞诺生物医药科技于2021年首次提出CHAMP (chaperone-mediated protein degradation) 分子设计概念。CHAMP分子包括靶蛋白结合物、HSP90结合物和连接链三部分,借助HSP90与E3泛素连接酶的结合,拉近E3与靶蛋白的距离,使靶蛋白被泛素化标记后降解。RNK05028 (14)是首个代表性的CHAMP分

子, 由 BET (bromodomain and extra-terminal domain) 结合物、HSP90 结合物 (HSP90 binder) 和连接链三部分组成。该分子能在 MV-411 细胞中形成 BRD4 (bromodomain-containing protein 4)、CHAMP 分子和 HSP90 三元复合物, 选择性降解具有蛋白酶体依赖性的 BRD4, 抑制细胞增殖。RNK05028 (**14**) 在肿瘤中显示出较长的药物代谢周期和优良的选择性, 进一步证实了 CHAMP 技术的可行性。在此基础上衍生出的 RNK05047 (**15**) 成为了第一个进入临床的 CHAMP 分子, 用于治疗晚期实体瘤或弥漫性大 B 细胞淋巴瘤。2023 年, Li 等<sup>[81]</sup>提出了类似的 HEMTACs (heat shock protein 90-mediated targeting chimeras) 分子设计概念, 同样由靶蛋白配体、HSP90 配体和连接链组成, 利用同样的原理诱导靶蛋白降解。Li 等<sup>[81]</sup>设计合成了 HEMTAC26 (**16**) 分子, 该分子使用柔性连接链分别连接 CDK4/6 与 HSP90 的配体, 实现对 CDK4/6 与 HSP90 的化学诱导拉近, 靶向降解 CDK4/6。

以上 3 个分子 RNK05028 (**14**)、RNK05047 (**15**) 和 HEMTAC26 (**16**) 都是基于分子伴侣系统的基础功能设计多特异性分子的成功运用。通过化学诱导拉近这一手段, 实现了对靶蛋白的选择性降解。基于它们独特的作用机制, 是否可以选择性诱导分子伴侣系统非底物蛋白降解, 以及是否可以拉近 HSP70 等其他热休克蛋白发挥功能, 是现阶段这一分子设计策略研究的重点方向。

## 1.2 靶向折叠酶的分子调控策略

折叠酶是另一种蛋白折叠过程中的辅助因子, 其催化过程中会诱导客户蛋白发生共价变化, 主要包括两个成员: 蛋白质二硫化物异构酶 (protein disulfide isomerase, PDI) 和肽基脯氨酸基顺反异构酶 (peptidyl prolyl cis-trans isomerase, PPIase)。

PDI 通过重排二硫键, 帮助蛋白质快速找到热力学最稳定的配对方式, 形成正确的二硫键。PDI 与许多疾病的发病机制相关, 如癌症<sup>[82]</sup>、血栓<sup>[83-85]</sup>、神经退行性疾病<sup>[86,87]</sup>和心血管疾病<sup>[88]</sup>等。其生物学机制的多样性推动了靶向 PDI 的分子药物设计。目前已相继报道了 juniferdin<sup>[89]</sup>、芦丁<sup>[90]</sup>、丙酸氨甲酰甲酰胺 (PACMAs)<sup>[91,92]</sup>和 origamicin<sup>[92]</sup>等多种具有不同药理特性的 PDI 抑制剂。

PPIase 通过帮助脯氨酸异构化形成正确的顺反结构, 加速蛋白质的折叠。PPIase 在许多客户蛋白的折叠、活化或降解过程中充当重要的调节开关。这些客户蛋白包括在癌症<sup>[93]</sup>、心血管<sup>[94]</sup>和精神疾病<sup>[95]</sup>中起关键作用的蛋白质, 是许多潜在的药物作用靶点。因此, 设计靶向 PPIase 的小分子药物来调控客户蛋白的生理过程是一种可行的药物设计策略。在前期的药物筛选

过程中, 大环天然产物<sup>[96-100]</sup>, 如 FK506、雷帕霉素和环孢菌素等, 均表现出与 PPIase 极强的亲和力。通过整合天然产物的结构特征和 PPIase 的生物学功能, 大环化和脯氨酸模拟等分子设计策略应运而生<sup>[101]</sup>。随着对 PPIase 研究的不断深入, 其作为药物作用靶点展现出越来越强的可塑性。因此, 非传统的药物设计策略, 如共价抑制剂和化学诱导临近等, 可能成为靶向 PPIase 的有效手段。

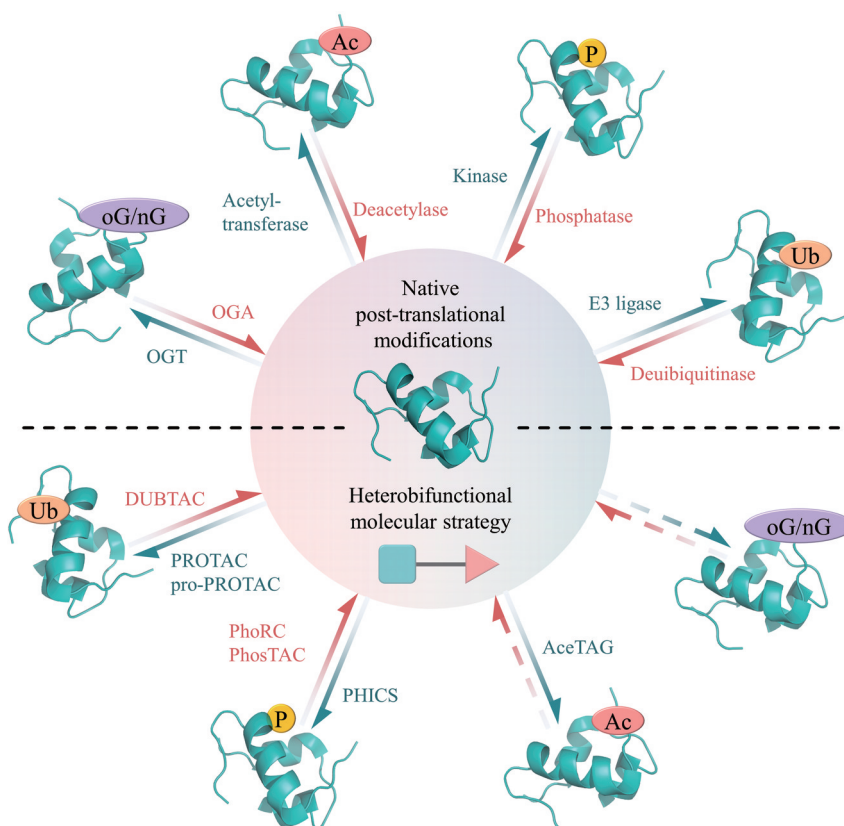
## 2 调控蛋白翻译后修饰的小分子设计策略

PTMs 有利于增加蛋白质的多样性, 为生物体的复杂性提供了物质基础。迄今为止, 已经报道了近 700 种 PTMs<sup>[102,103]</sup>, 常见的包括磷酸化、乙酰化、糖基化和泛素化等。异常的 PTMs 可能导致蛋白质特性和生物功能的改变, 直接影响疾病的发生和恶化。因此, 蛋白质翻译后修饰一直是研究人员关注的热点。

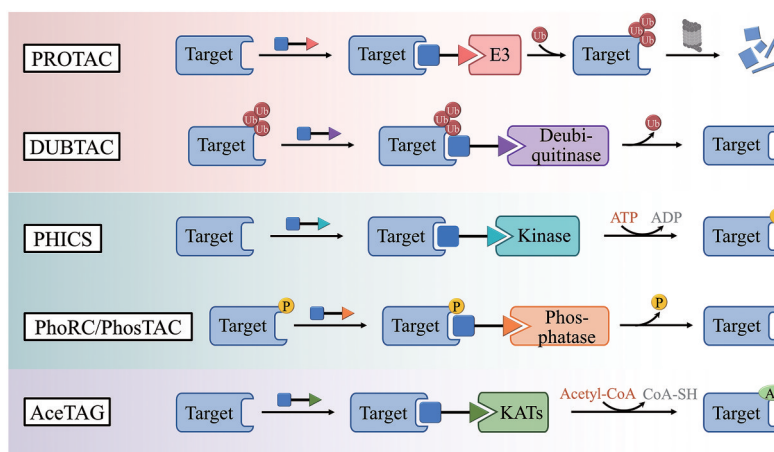
迄今为止, 已有数百种针对 PTMs 调节因子的小分子药物被批准用于癌症治疗, 如激酶抑制剂、脱乙酰酶抑制剂和甲基转移酶抑制剂等。然而, 传统药物设计中的作用靶点通常可调节多种蛋白, 选择性较差, 不可避免地会产生一些不良反应, 限制其临床应用<sup>[104]</sup>。与传统的药物设计不同, 异双功能分子调控策略可以通过结构中包含的两个特异性结合位点, 选择性地拉近功能蛋白和靶蛋白, 能更加精确地调节单个靶蛋白的翻译后修饰, 实现选择性调控 (图 4)。这部分内容将聚焦泛素化、磷酸化和乙酰化这 3 种翻译后修饰, 总结已报道的异双功能分子设计策略和代表性分子 (图 5、6)。

### 2.1 针对泛素化的调控策略

泛素蛋白酶体途径是蛋白降解的主要途径之一, 超过 70% 的蛋白质降解通过该途径进行<sup>[105]</sup>。该途径调节着细胞周期、细胞信号传导、应激反应等多个细胞进程。在该途径中, 泛素激活酶 E1 (ubiquitin-activating enzyme)、泛素结合酶 E2 (ubiquitin-conjugating enzyme) 和泛素连接酶 E3 (ubiquitin ligase) 依次催化目标蛋白, 使其连上泛素化标记, 被蛋白酶体识别和降解。在泛素化标记过程中, E3 连接酶通过识别底物蛋白的末端特征序列, 实现选择性降解。蛋白质去泛素化过程由去泛素化酶 (deubiquitinases, DUBs) 介导, 某些蛋白质的主动泛素化和降解也会导致多种疾病, 如肿瘤抑制因子的降解会诱导癌症的发生。因此, 通过拉近 E3 泛素连接酶或去泛素化酶与靶蛋白的距离, 可以促进或抑制对靶蛋白的选择性降解。基于此, 靶向蛋白降解嵌合体 (proteolysis-targeting chimera, PROTAC) 技术和去泛素化酶靶向嵌合体 (deubiquitinase-targeting chimera, DUBTAC) 技术分别利用 E3 泛素连接酶和去泛素化酶的功能, 实现了对底物蛋白降解过程的选择



**Figure 4** Native PTMs and heterobifunctional molecular strategies targeting PTMs in cells. Various heterobifunctional molecules have been developed to modify the PTMs, including ubiquitination by PROTAC and pro-PROTAC, deubiquitination by DUBTAC, phosphorylation by PHICS, dephosphorylation by PhoRC and PhosTAC, acetylation by AceTAG. OGA: O-GlcNAcase; OGT: O-GlcNAc transferase; PROTAC: Proteolysis-targeting chimera; pro-PROTAC: Prodrug-based PROTAC; DUBTAC: Deubiquitinase-targeting chimera; PHICS: Phosphorylation-inducing chimeric small molecules; PhoRC: Phosphatase recruiting chimeras; PhosTAC: Phosphorylation targeting chimeras; AceTAG: Acetylation tagging system

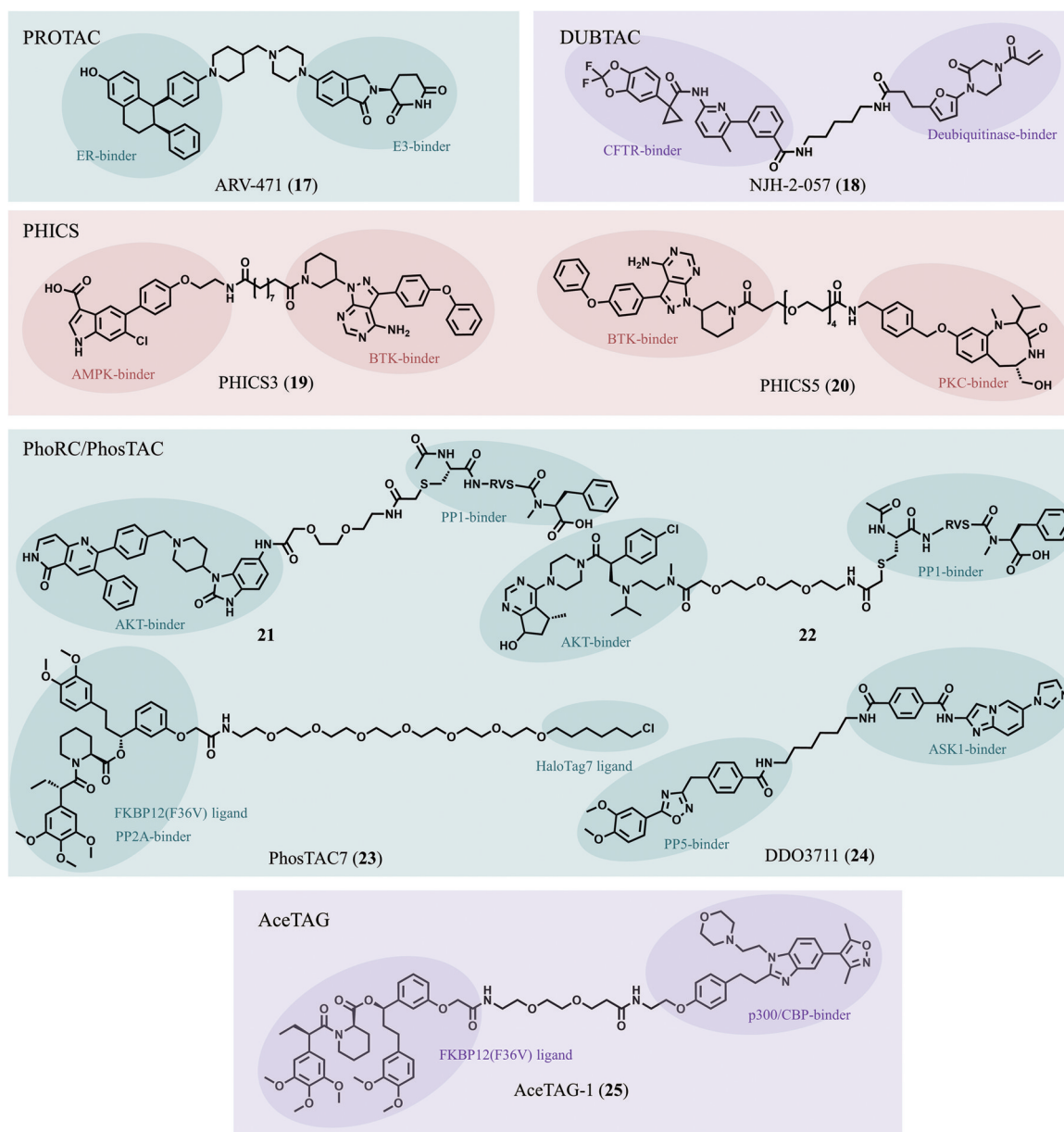


**Figure 5** The mechanism of PROTAC, DUBTAC, PHICS, PhoRC/PhosTAC and AceTAG. E3: Ubiquitin protein ligases; ATP: Adenosine triphosphate; ADP: Adenosine diphosphate; KATs: Lysine acetyltransferases; Acetyl-CoA: Acetyl coenzyme A; CoA-SH: Coenzyme A

性调控。

Crews 和 Deshaies 于 2001 年首次提出了 PROTAC 技术概念<sup>[106]</sup>。PROTAC 分子通过拉近 E3 泛素连接酶与靶蛋白的距离, 依靠泛素蛋白酶系统实现对目标蛋

白的靶向泛素化和降解。PROTAC 分子由目标蛋白配体、连接链和 E3 泛素连接酶配体三部分组成。随着 E3 泛素连接酶配体的不断发现, 该技术迅速发展, 成为了一种极具前景的靶向蛋白质降解 (targeted protein



**Figure 6** Representative heterobifunctional molecules targeting PTMs. ER: Estrogen receptor; CFTR: Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; AMPK: AMP-activated protein kinase; BTK: Bruton's tyrosine kinase; PKC: Protein kinase C; PP2A: Serine/Threonine protein phosphatase 2A; PP5: Protein phosphatase 5; ASK1: Apoptosis signal-regulated kinase 1; CBP: CREB-binding protein

degradation, TPD) 技术<sup>[107]</sup>。目前, 已有多种 PROTAC 化合物进入临床试验阶段。其中, 进展最快的 ARV-471 (17) 已进入 III 期临床, 它由雌激素受体配体、E3 连接酶配体和连接链三部分组成, 能够选择性地降解雌激素受体  $\alpha$ , 有望用于治疗乳腺癌<sup>[108]</sup>。PROTAC 技术在分子设计层面的创新赋予了其降解细胞内多种蛋白的潜力, 且在目标蛋白的配体选择上更为灵活, 不要求配体作用于目标蛋白的活性位点。然而, 如何设计发现目标蛋白的特异性配体仍然是 PROTAC 分子开发面临的主要挑战。PROTAC 分子组成难以符合 Lipinski 五规则, 影响了其在渗透性、溶解性和口服生物利用度

等方面的表现。此外, PROTAC 分子在组织或细胞层面不具有选择性, 可能会导致靶蛋白在正常组织或细胞中的降解, 具有难以避免的脱靶毒性。

除此之外, 更多新颖的 PROTAC 分子设计策略被陆续报道。例如: 融合前药设计理念的 PROTAC 技术 (prodrug-based PROTAC, pro-PROTAC)<sup>[109]</sup>、抗体-PROTAC、叶酸-PROTAC、核酸适配体-PROTAC 等, 还有部分 pro-PROTAC 依赖光、亚硝基还原酶、活性氧等激活。以上策略通过不同的反应模式对 PROTAC 分子的靶向降解活性进行调节, 增强了 PROTAC 分子的选择性。

受到 PROTAC 技术的启发, Henning 等<sup>[10]</sup>在 2022 年提出了去泛素化酶靶向嵌合体 DUBTAC 技术。与 PROTAC 类似, DUBTAC 分子包含目标蛋白配体、去泛素化酶配体和连接链三部分。这类分子通过拉近去泛素化酶与目标蛋白间的距离实现靶向去泛素化, 稳定目标蛋白。NJH-2-057 (**18**) 是首个成功设计的 DUBTAC 分子, 将去泛素化酶配体 EN523 与 CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) 蛋白配体鲁玛卡托 (lumacaftor) 连接, 稳定了 CFTR 蛋白<sup>[10]</sup>。这一分子的成功设计为 DUBTAC 作为蛋白质稳定剂提供了概念证明。目前, 已报道的去泛素化酶配体非常有限, 进一步开发这些配体将推动新一代 DUBTAC 分子的发展, 为治疗蛋白异常降解导致的疾病提供新策略。

## 2.2 针对磷酸化的调控策略

磷酸化和去磷酸化是蛋白质最常见的翻译后修饰, 它们分别由蛋白激酶和蛋白磷酸酶介导, 激酶利用 ATP 催化氨基酸侧链羟基的磷酸化, 而磷酸酶则去除磷酸基。人类基因组中大约有 500 种蛋白激酶, 主要分为丝/苏氨酸激酶和酪氨酸激酶两类<sup>[11]</sup>, 每种激酶都具有独特的底物谱<sup>[12]</sup>。人体内近 200 种磷酸酶可分为磷酸蛋白磷酸酶、酪氨酸磷酸酶和天冬氨酸磷酸酶三大类<sup>[13]</sup>。激酶和磷酸酶通过改变蛋白质的磷酸化修饰影响蛋白折叠、定位、相互作用、稳定性和活性等各个方面, 参与细胞存活、生长、迁移、分化和能量代谢等多种生理过程。蛋白质磷酸化失调通常与多种疾病相关, 使得蛋白激酶和磷酸酶成为潜在的治疗靶点。然而, 由于激酶和磷酸酶底物蛋白的非单一性, 传统的激酶抑制剂和磷酸酶抑制剂往往存在不可避免的毒副作用, 且在临床应用中常引发患者的获得性耐药<sup>[14]</sup>。因此, 研究人员受到 PROTAC 异双功能分子设计策略的启发, 提出了磷酸化诱导嵌合分子 (phosphorylation-inducing chimeric small molecules, PHICS) 和磷酸酶募集嵌合体 (phosphatase recruiting chimeras, PhoRC; phosphorylation targeting chimeras, PhosTAC) 两种分子设计策略, 分别借助激酶和磷酸酶, 利用异双功能分子对靶蛋白和效应器的拉近效应, 实现对目标蛋白的特异性磷酸化调控。

2020 年, Siriwardena 等<sup>[15]</sup>首次提出了 PHICS 分子设计概念, PHICS 分子由激酶配体和蛋白配体连接而成, 是典型的双功能分子。研究人员设计合成了两个代表性分子——PHICS3 (**19**) 和 PHICS5 (**20**)。PHICS3 (**19**) 通过募集 AMPK (AMP-activated protein kinase) 和非底物蛋白 BTK (Bruton's tyrosine kinase) 实现了 BTK Ser180 的磷酸化<sup>[15]</sup>。PHICS5 (**20**) 通过募集 PKC (protein kinase C) 和底物蛋白 BTK 实现了 BTK 新位点

Ser310、Ser378 和 Thr410 的磷酸化<sup>[16]</sup>。PHICS3 (**19**) 成功将 PHICS 设计策略拓展到了非底物层面, 实现了对非底物蛋白旧位点的磷酸化。PHICS5 (**20**) 佐证了利用 PHICS 策略实行底物蛋白新位点磷酸化的可行性。PHICS5 (**20**) 诱导的 BTK 新位点的磷酸化成功抑制了 BTK 蛋白的激活, 这为 BTK-S180A 相关癌症的治疗提供了新思路<sup>[16]</sup>。总之, PHICS 分子设计策略通过招募蛋白激酶实现了对靶蛋白磷酸化状态的有效调控, 保留了双功能分子的高特异性优点。但截至目前, 已完成概念验证的 PHICS 分子仍占少数, 其成药性仍有待确证。

2020 年, Yamazoe 等<sup>[17]</sup>首次设计合成了两个 PHORC/PhosTAC 分子, 化合物 **21** 和 **22**, 它们以 RVSF 四肽序列作为磷酸酶 PP1 (protein-phosphatase 1) 配体, 分别以 AKT (protein kinase B) 的变构抑制剂和 ATP 竞争性抑制剂作为底物蛋白 AKT 配体, 通过募集磷酸酶 PP1 实现对 AKT 的靶向去磷酸化。Chen 等<sup>[14]</sup>在 2021 年设计合成了 PhosTAC7 (**23**), 该分子一端采用了 FKBP12 (F36V) 标签配体, 选择性靶向融合了该标签的磷酸酶 PP2A (serine/threonine protein phosphatase 2A) 的骨架亚基, 将效应磷酸酶成功拓展到 PP2A, 并证明了通过靶向 PP2A 骨架亚基 (PP2A-A) 间接招募 PP2A 催化亚基 (PP2A-C) 的可行性; 另一端通过 Halo-Tag 配体实现了对带 Halo-Tag 标签的 PDCD4 (programmed cell death 4) 和 FOXO3a (Forkhead-box O3a) 蛋白的去磷酸化。

2023 年初, 本课题组将应用于 PHORC/PhosTAC 分子设计的效应磷酸酶种类进一步拓展, 提出了首个招募磷酸酶 PP5 (protein phosphatase 5) 的 PHORC 分子 DDO3711 (**24**)<sup>[18,19]</sup>。该分子通过连接链将 ASK1 (apoptosis signal-regulated kinase 1) 抑制剂与 PP5 激活剂连接, 诱导拉近 PP5 与 ASK1 的距离, 在体内外实现了对 ASK1 Thr838 位点的去磷酸化, 削弱了 ASK1 活性, 有望治疗因 ASK1 过度活化而加速恶化的胃癌。在 MKN45 人胃癌细胞模型上, DDO3711 (**24**) 显示出较好的抗增殖活性 ( $IC_{50} = 0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 且单独或联合使用 ASK1 抑制剂和 PP5 激活剂对 MKN45 细胞均无影响, 进一步佐证了该分子在治疗学上的潜在应用。PHORC/PhosTAC 分子的成功开发表明靶向磷酸酶的异双功能分子是一种可行的磷酸化调控策略, 但仍有诸多问题有待解决, 包括如何实现非底物蛋白的去磷酸化、如何设计磷酸酶非抑制性配体、如何提高成药性等等<sup>[19]</sup>。

## 2.3 针对乙酰化的调控策略

乙酰化是一种常见的蛋白质翻译后修饰, 目前已

知的超过 10 000 个赖氨酸位点, 涉及多种生物学事件<sup>[120]</sup>。这种修饰不仅直接影响蛋白质功能, 还会与其他翻译后修饰如磷酸化、泛素化和甲基化相互作用。乙酰化过程是可逆的, 由赖氨酸乙酰转移酶 (lysine acetyltransferase, KATs) 和赖氨酸脱乙酰酶 (lysine deacetylase, KDACs) 共同维持着动态平衡, KATs 负责将乙酰基从乙酰辅酶 A 转移到赖氨酸, KDACs 催化逆反应去除乙酰赖氨酸的乙酰基。乙酰化修饰失调与多种人类疾病有关, 包括各种癌症<sup>[121,122]</sup>、神经退行性疾病<sup>[123,124]</sup>、自身免疫性疾病<sup>[125,126]</sup>和代谢疾病<sup>[121,127,128]</sup>等。虽然传统的靶向 KDACs 或 KATs 的化学或遗传学策略让人们乙酰化修饰有了更为深入的理解<sup>[129,130]</sup>, 但是缺乏特异性, 难以精准解释单一底物蛋白的生物学效应<sup>[131,132]</sup>。即便是通过对底物蛋白位点加以修饰, 来模拟或阻断乙酰化<sup>[133,134]</sup>, 这种人为的修饰过程也可能对蛋白质结构产生不良影响, 左右体内外生物学探究。为了实现底物蛋白乙酰化的特异性调控, 研究人员提出了一种靶向 KATs 的异双功能分子设计策略——乙酰化标记系统 (acetylation tagging system, AceTAG)。

2021 年, Wang 等<sup>[135]</sup>开发了一种 AceTAG, 用于诱导目标蛋白的乙酰化。基于 p300 及 CBP (CREB-binding protein) 这两个同源 KATs 的结构功能相似性、底物蛋白多样性及重要的生物学效应, 研究人员设计合成了异双功能分子 AceTAG-1 (25)。该分子通过连接 p300/CBP 配体和 FKBP12-F36V 结合配体, 将 p300/CBP 选择性地引向融合了 FKBP12-F36V 标签的蛋白质, 诱导其乙酰化。通过 AceTAG 分子, 该团队成功诱导了多种带标签蛋白的靶向乙酰化, 如组蛋白 H3.3、NF- $\kappa$ B 亚基 p65 和肿瘤抑制因子 p53。实验结果证明, AceTAG 调控策略具有快速、可逆、选择性强和剂量依赖等优点, 进一步证明了 AceTAG 分子用于调节蛋白质乙酰化的可行性。值得注意的是, 临近诱导的乙酰化修饰可以在避免扰乱蛋白结构的同时, 调节其乙酰化状态, 且不会与其他翻译后修饰竞争, 这使得 AceTAG 成为分析蛋白乙酰化如何影响下游信号通路及生理病理过程的有力工具<sup>[119]</sup>。当然, 该技术现在仍处于起步阶段, 需要设计发现更多的特异性配体, 乙酰化位点的选择性和分子成药性也需要更为深入的探究。

### 3 总结与展望

正确的蛋白折叠和翻译后修饰是蛋白功能能够正常发挥的基础, 一些功能性蛋白在其中发挥了举足轻重的作用, 如分子伴侣和折叠酶辅助蛋白正确折叠, E3 连接酶和去泛素化酶、激酶和磷酸酶及赖氨酸乙酰转移酶和赖氨酸脱乙酰酶维持着翻译后修饰的动态平衡。如何利用这些功能性蛋白治疗下游蛋白异常引起

的疾病, 一直是科研工作者试图解决的难题。

针对以 HSP70 和 HSP90 为代表的分子伴侣系统, 研究人员采取了 4 种主要干预手段: 作用于蛋白 ATP 口袋、选择性靶向蛋白亚型、干扰蛋白相互作用和设计多特异性分子。作用模式和作用靶点的异同使这 4 种调控策略具有不同的优势和缺陷, 为临床应用提供了选择的空间。

针对翻译后修饰, 异双功能分子设计策略 (如 PROTAC、DUBTAC、PHICS、PHORC/PhosTAC 和 AceTAG) 在许多方面都展现出了独特优势。传统的抑制剂或激动剂常常通过占据靶蛋白口袋来影响其功能, 且分子本身也会在解离的同时失效, 往往一个分子只能影响一个目标蛋白。而异双功能分子本质上发挥着催化作用, 通过拉近效应器和蛋白间的距离, 来诱导效应器发挥作用, 理论上一个分子能进行多轮诱导催化。独特的设计方法和作用模式赋予了异双功能分子更强的选择性、更长的作用周期和克服耐药性的潜力, 这也揭示了其作为化学生物学工具或临床治疗药物的巨大潜力。

**作者贡献:** 何彦仪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:** 本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

### References

- [1] Crick F. Central dogma of molecular biology [J]. *Nature*, 1970, 227: 561-563.
- [2] Ellis J. Proteins as molecular chaperones [J]. *Nature*, 1987, 328: 378-379.
- [3] Anfinsen CB. Principles that govern the folding of protein chains [J]. *Science*, 1973, 181: 223-230.
- [4] Gething MJ, Sambrook J. Protein folding in the cell [J]. *Nature*, 1992, 355: 33-45.
- [5] Wang CC, Tsou CL. Enzymes as chaperones and chaperones as enzymes [J]. *FEBS Lett*, 1998, 425: 382-384.
- [6] Ellis RJ. The general concept of molecular chaperones [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1993, 339: 257-261.
- [7] Ellis RJ. Molecular chaperones: assisting assembly in addition to folding [J]. *Trends Biochem Sci*, 2006, 31: 395-401.
- [8] Hartl FU, Bracher A, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis [J]. *Nature*, 2011, 475: 324-332.
- [9] Chiti F, Dobson CM. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease [J]. *Annu Rev Biochem*, 2006, 75: 333-366.
- [10] Walsh CT, Garneau-Tsodikova S, Gatto Jr GJ. Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2005, 44: 7342-7372.
- [11] Xin FX, Radivojac P. Post-translational modifications induce significant yet not extreme changes to protein structure [J].

- Bioinformatics, 2012, 28: 2905-2913.
- [12] Kaur S, Baldi B, Vuong J, et al. Visualization and analysis of epiproteome dynamics [J]. *J Mol Biol*, 2019, 431: 1519-1539.
- [13] Nishi H, Hashimoto K, Panchenko AR. Phosphorylation in protein-protein binding: effect on stability and function [J]. *Structure*, 2011, 19: 1807-1815.
- [14] Lothrop AP, Torres MP, Fuchs SM. Deciphering post-translational modification codes [J]. *FEBS Lett*, 2013, 587: 1247-1257.
- [15] Xu HD, Wang YB, Lin SF, et al. PTMD: a database of human disease-associated post-translational modifications [J]. *Genomics Proteomics Bioinf*, 2018, 16: 244-251.
- [16] Hartl FU, Martin J. Molecular chaperones in cellular protein folding [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 1995, 5: 92-102.
- [17] Maaroufi H, Tanguay RM. Analysis and phylogeny of small heat shock proteins from marine viruses and their cyanobacteria host [J]. *PLoS One*, 2013, 8: e81207.
- [18] Kim YE, Hipp MS, Bracher A, et al. Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis [J]. *Annu Rev Biochem*, 2013, 82: 323-355.
- [19] Pirkkala L, Sistonen L. Heat Shock Proteins (HSPs): Structure, Function and Genetics [M]//Wiley. *Encyclopedia of Life Sciences*. Hoboken: Wiley, 2006.
- [20] Shrestha L, Patel HJ, Chiosis G. Chemical tools to investigate mechanisms associated with HSP90 and HSP70 in disease [J]. *Cell Chem Biol*, 2016, 23: 158-172.
- [21] Saibil H. Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, 14: 630-642.
- [22] Verba KA, Wang RY, Arakawa A, et al. Atomic structure of Hsp90-Cdc37-Cdk4 reveals that Hsp90 traps and stabilizes an unfolded kinase [J]. *Science*, 2016, 352: 1542-1547.
- [23] Hoter A, El-Sabban ME, Naim HY. The HSP90 family: structure, regulation, function, and implications in health and disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19: 2560.
- [24] Cioeca DR, Calderwood SK. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2005, 10: 86-103.
- [25] Pfister K, Radons J, Busch R, et al. Patient survival by Hsp70 membrane phenotype: association with different routes of metastasis [J]. *Cancer*, 2007, 110: 926-935.
- [26] Sarto C, Valsecchi C, Magni F, et al. Expression of heat shock protein 27 in human renal cell carcinoma [J]. *Proteomics*, 2004, 4: 2252-2260.
- [27] Seigneuric R, Mjahed H, Gobbo J, et al. Heat shock proteins as danger signals for cancer detection [J]. *Front Oncol*, 2011, 1: 37.
- [28] Sherman MY, Gabai VL. Hsp70 in cancer: back to the future [J]. *Oncogene*, 2015, 34: 4153-4161.
- [29] Vostakolaei MA, Abdolalizadeh J, Hejazi MS, et al. Hsp70 in cancer: partner or traitor to immune system [J]. *Iran J Allergy Asthma Immunol*, 2019, 18: 589-604.
- [30] Geller R, Taguwa S, Frydman J. Broad action of Hsp90 as a host chaperone required for viral replication [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1823: 698-706.
- [31] Luo WJ, Sun WL, Taldone T, et al. Heat shock protein 90 in neurodegenerative diseases [J]. *Mol Neurodegener*, 2010, 5: 24.
- [32] Whitesell L, Lindquist SL. HSP90 and the chaperoning of cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5: 761-772.
- [33] Williamson DS, Borgognoni J, Clay A, et al. Novel adenosine-derived inhibitors of 70 kDa heat shock protein, discovered through structure-based design [J]. *J Med Chem*, 2009, 52: 1510-1513.
- [34] Massey AJ, Williamson DS, Browne H, et al. A novel, small molecule inhibitor of Hsc70/Hsp70 potentiates Hsp90 inhibitor induced apoptosis in HCT116 colon carcinoma cells [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2010, 66: 535-545.
- [35] Williams DR, Ko S, Park S, et al. An apoptosis-inducing small molecule that binds to heat shock protein 70 [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2008, 47: 7466-7469.
- [36] Ko SK, Kim J, Na DC, et al. A small molecule inhibitor of ATPase activity of HSP70 induces apoptosis and has antitumor activities [J]. *Chem Biol*, 2015, 22: 391-403.
- [37] Pettinger J, Le Bihan YV, Widya M, et al. An irreversible inhibitor of HSP72 that unexpectedly targets Lysine-56 [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2017, 56: 3536-3540.
- [38] Neckers L. Development of small molecule Hsp90 inhibitors: utilizing both forward and reverse chemical genomics for drug identification [J]. *Curr Med Chem*, 2003, 10: 733-739.
- [39] Workman P. Combinatorial attack on multistep oncogenesis by inhibiting the Hsp90 molecular chaperone [J]. *Cancer Lett*, 2004, 206: 149-157.
- [40] Jez JM, Chen JC, Rastelli G, et al. Crystal structure and molecular modeling of 17-DMAG in complex with human Hsp90 [J]. *Chem Biol*, 2003, 10: 361-368.
- [41] Talaei S, Mellatyar H, Asadi A, et al. Spotlight on 17-AAG as an Hsp90 inhibitor for molecular targeted cancer treatment [J]. *Chem Biol Drug Des*, 2019, 93: 760-786.
- [42] Silverman MH, Duggan S, Bardelli G, et al. Safety, tolerability and pharmacokinetics of icapamespib, a selective epichaperome inhibitor, in healthy adults [J]. *J Prev Alzheimers Dis*, 2022, 9: 635-645.
- [43] Pillarsetty N, Jhaveri K, Taldone T, et al. Paradigms for precision medicine in epichaperome cancer therapy [J]. *Cancer Cell*, 2019, 36: 559-573.e7.
- [44] Sun HP, Jia JM, 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.
- [45] Jiang F, Wang HJ, Jin YH, 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.
- [46] Maharaj KA, Que NLS, Hong F, et al. Exploring the functional

- complementation between Grp94 and Hsp90 [J]. *PLoS One*, 2016, 11: e0166271.
- [47] Sung N, Lee J, Kim JH, et al. 2.4 Å resolution crystal structure of human TRAP1NM, the Hsp90 paralog in the mitochondrial matrix [J]. *Acta Crystallogr D Struct Biol*, 2016, 72: 904-911.
- [48] Lettini G, Maddalena F, Sisinni L, et al. TRAP1: a viable therapeutic target for future cancer treatments? [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2017, 21: 805-815.
- [49] Johnson JL. Evolution and function of diverse Hsp90 homologs and cochaperone proteins [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1823: 607-613.
- [50] Gupta RS. Phylogenetic analysis of the 90 kD heat shock family of protein sequences and an examination of the relationship among animals, plants, and fungi species [J]. *Mol Biol Evol*, 1995, 12: 1063-1073.
- [51] Jackson SE. Hsp90: Structure and Function [M]//Jackson S. *Molecular Chaperones: Vol. 328*. Berlin: Springer, 2012: 155-240.
- [52] Song HY, Dunbar JD, Zhang YX, et al. Identification of a protein with homology to hsp90 that binds the type 1 tumor necrosis factor receptor [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270: 3574-3581.
- [53] Masgras I, Sanchez-Martin C, Colombo G, et al. The chaperone TRAP1 as a modulator of the mitochondrial adaptations in cancer cells [J]. *Front Oncol*, 2017, 7: 58.
- [54] Kodama Y, Hitotsumachi H, Shibata Y, et al. TAS-116, a novel, orally bioavailable highly potent HSP90 $\alpha/\beta$  selective inhibitor demonstrates favorable tissue distribution properties which lead to minimized ocular toxicity [J]. *Eur J Cancer*, 2012, 48: 89.
- [55] Ohkubo S, Kodama Y, Muraoka H, et al. TAS-116, a highly selective inhibitor of heat shock protein 90 $\alpha$  and  $\beta$ , demonstrates potent antitumor activity and minimal ocular toxicity in preclinical models [J]. *Mol Cancer Ther*, 2015, 14: 14-22.
- [56] 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.
- [57] 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.
- [58] Que NLS, Crowley VM, Duerfeldt AS, et al. Structure based design of a Grp94-Selective inhibitor: exploiting a key residue in Grp94 to optimize paralog-selective binding [J]. *J Med Chem*, 2018, 61: 2793-2805.
- [59] Jiang F, Guo AP, Xu JC, 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.
- [60] Laufen T, Mayer MP, Beisel C, et al. Mechanism of regulation of Hsp70 chaperones by DnaJ cochaperones [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96: 5452-5457.
- [61] Qiu XB, Shao YM, Miao S, et al. The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2006, 63: 2560-2570.
- [62] Wall D, Zylicz M, Georgopoulos C. The NH<sub>2</sub>-terminal 108 amino acids of the *Escherichia coli* DnaJ protein stimulate the ATPase activity of DnaK and are sufficient for lambda replication [J]. *J Biol Chem*, 1994, 269: 5446-5451.
- [63] Pierpaoli EV, Sandmeier E, Baici A, et al. The power stroke of the DnaK/DnaJ/GrpE molecular chaperone system [J]. *J Mol Biol*, 1997, 269: 757-768.
- [64] Evans CG, Chang L, Gestwicki JE. Heat shock protein 70 (Hsp70) as an emerging drug target [J]. *J Med Chem*, 2010, 53: 4585-4602.
- [65] Bukau B, Weissman J, Horwich A. Molecular chaperones and protein quality control [J]. *Cell*, 2006, 125: 443-451.
- [66] Fewell SW, Smith CM, Lyon MA, et al. Small molecule modulators of endogenous and co-chaperone-stimulated Hsp70 ATPase activity [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279: 51131-51140.
- [67] Rodina A, Vilenchik M, Moulick K, et al. Selective compounds define Hsp90 as a major inhibitor of apoptosis in small-cell lung cancer [J]. *Nat Chem Biol*, 2007, 3: 498-507.
- [68] Wright CM, Chovatiya RJ, Jameson NE, et al. Pyrimidinone-peptoid hybrid molecules with distinct effects on molecular chaperone function and cell proliferation [J]. *Bioorg Med Chem*, 2008, 16: 3291-3301.
- [69] Young ZT, Rauch JN, Assimon VA, et al. Stabilizing the Hsp70-Tau complex promotes turnover in models of tauopathy [J]. *Cell Chem Biol*, 2016, 23: 992-1001.
- [70] Wadhwa R, Sugihara T, Yoshida A, et al. Selective toxicity of MKT-077 to cancer cells is mediated by its binding to the hsp70 family protein mot-2 and reactivation of p53 function [J]. *Cancer Res*, 2000, 60: 6818-6821.
- [71] Rousaki A, Miyata Y, Jinwal UK, et al. Allosteric drugs: the interaction of antitumor compound MKT-077 with human Hsp70 chaperones [J]. *J Mol Biol*, 2011, 411: 614-632.
- [72] Shao H, Li XK, Moses MA, et al. Exploration of benzothiazole rhodacyanines as allosteric inhibitors of protein-protein interactions with heat shock protein 70 (Hsp70) [J]. *J Med Chem*, 2018, 61: 6163-6177.
- [73] Gabai VL, Yaglom JA, Wang YM, et al. Anticancer effects of targeting Hsp70 in tumor stromal cells [J]. *Cancer Res*, 2016, 76: 5926-5932.
- [74] Li XK, Colvin T, Rauch JN, et al. Validation of the Hsp70-Bag3 protein-protein interaction as a potential therapeutic target in cancer [J]. *Mol Cancer Ther*, 2015, 14: 642-648.
- [75] Li XK, Srinivasan SR, Connarn J, et al. Analogues of the allosteric heat shock protein 70 (Hsp70) inhibitor, MKT-077, as anti-cancer agents [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2013, 4: 1042-1047.

- [76] Mandal AK, Lee P, Chen JA, et al. Cdc37 has distinct roles in protein kinase quality control that protect nascent chains from degradation and promote posttranslational maturation [J]. *J Cell Biol*, 2007, 176: 319-328.
- [77] Wang L, Zhang LX, Li L, et al. Small-molecule inhibitor targeting the Hsp90-Cdc37 protein-protein interaction in colorectal cancer [J]. *Sci Adv*, 2019, 5: eaax2277.
- [78] Wang L, Jiang JS, Zhang LX, 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.
- [79] 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.
- [80] Schopf FH, Biebl MM, Buchner J. The HSP90 chaperone machinery [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, 18: 345-360.
- [81] Li ZZ, Ma SY, Zhang L, et al. Targeted protein degradation induced by HEMTACs based on HSP90 [J]. *J Med Chem*, 2023, 66: 733-751.
- [82] Lee E, Lee DH. Emerging roles of protein disulfide isomerase in cancer [J]. *BMB Rep*, 2017, 50: 401-410.
- [83] Sharda A, Furie B. Regulatory role of thiol isomerases in thrombus formation [J]. *Expert Rev Hematol*, 2018, 11: 437-448.
- [84] Bekendam RH, Flaumenhaft R. Inhibition of protein disulfide isomerase in thrombosis [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2016, 119: 42-48.
- [85] Cho J, Furie BC, Coughlin SR, et al. A critical role for extracellular protein disulfide isomerase during thrombus formation in mice [J]. *J Clin Invest*, 2008, 118: 1123-1131.
- [86] Unterberger U, Höftberger R, Gelpi E, et al. Endoplasmic reticulum stress features are prominent in alzheimer disease but not in prion diseases *in vivo* [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2006, 65: 348-357.
- [87] Uehara T, Nakamura T, Yao DD, et al. S-nitrosylated protein-disulphide isomerase links protein misfolding to neurodegeneration [J]. *Nature*, 2006, 441: 513-517.
- [88] Xiong B, Jha V, Min JK, et al. Protein disulfide isomerase in cardiovascular disease [J]. *Exp Mol Med*, 2020, 52: 390-399.
- [89] Khan MM, Simizu S, Kawatani M, et al. The potential of protein disulfide isomerase as a therapeutic drug target [J]. *Oncol Res*, 2011, 19: 445-453.
- [90] Jasuja R, Passam FH, Kennedy DR, et al. Protein disulfide isomerase inhibitors constitute a new class of antithrombotic agents [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122: 2104-2113.
- [91] Xu SL, Butkevich AN, Yamada R, et al. Discovery of an orally active small-molecule irreversible inhibitor of protein disulfide isomerase for ovarian cancer treatment [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109: 16348-16353.
- [92] Özcelik D, Pezacki JP. Small molecule inhibition of protein disulfide isomerase in neuroblastoma cells induces an oxidative stress response and apoptosis pathways [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2019, 10: 4068-4075.
- [93] Yu JH, Im CY, Min S. Function of PIN1 in cancer development and its inhibitors as cancer therapeutics [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 120.
- [94] Rath D, von Ungern-Sternberg S, Heinzmann D, et al. Platelet surface expression of cyclophilin A is associated with increased mortality in patients with symptomatic coronary artery disease [J]. *J Thromb Haemost*, 2020, 18: 234-242.
- [95] Wang L, Zhou Y, Chen DM, et al. Peptidyl-prolyl cis/trans isomerase Pin1 and Alzheimer's disease [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 355.
- [96] Rosen MK, Schreiber SL. Natural products as probes of cellular function: studies of immunophilins [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 1992, 31: 384-400.
- [97] Koehn FE. Therapeutic potential of natural product signal transduction agents [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2006, 17: 631-637.
- [98] Heitman J, Movva NR, Hall MN. Proline isomerases at the crossroads of protein folding, signal transduction, and immunosuppression [J]. *New Biol*, 1992, 4: 448-460.
- [99] Carlson EE. Natural products as chemical probes [J]. *ACS Chem Biol*, 2010, 5: 639-653.
- [100] Gaali S, Gopalakrishnan R, Wang Y, et al. The chemical biology of immunophilin ligands [J]. *Curr Med Chem*, 2011, 18: 5355-5379.
- [101] Duniak BM, Gestwicki JE. Peptidyl-proline isomerases (PPIases): targets for natural products and natural product-inspired compounds: miniperspective [J]. *J Med Chem*, 2016, 59: 9622-9644.
- [102] Wang HY, Yang LQ, Liu MH, et al. Protein post-translational modifications in the regulation of cancer hallmarks [J]. *Cancer Gene Ther*, 2023, 30: 529-547.
- [103] Ramazi S, Zehri J. Post-translational modifications in proteins: resources, tools and prediction methods [J]. *Database*, 2021, 2021: baab012.
- [104] Peng YH, Liu J, Inuzuka H, et al. Targeted protein posttranslational modifications by chemically induced proximity for cancer therapy [J]. *J Biol Chem*, 2023, 299: 104572.
- [105] Pohl C, Dikic I. Cellular quality control by the ubiquitin-proteasome system and autophagy [J]. *Science*, 2019, 366: 818-822.
- [106] 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.
- [107] Bond MJ, Crews CM. Proteolysis targeting chimeras (PROTACs) come of age: entering the third decade of targeted protein degradation [J]. *RSC Chem Biol*, 2021, 2: 725-742.
- [108] Lin X, Xiang H, Luo GS. Targeting estrogen receptor  $\alpha$  for degradation with PROTACs: A promising approach to overcome

- endocrine resistance [J]. *Eur J Med Chem*, 2020, 206: 112689.
- [109] Chen CJ, Yang YW, Wang Z, et al. Recent advances in PROTAC development to address on-target off-tumor toxicity [J]. *J Med Chem*, 2023, 66: 8428-8440.
- [110] Henning NJ, Boike L, Spradlin JN, et al. Deubiquitinase-targeting chimeras for targeted protein stabilization [J]. *Nat Chem Biol*, 2022, 18: 412-421.
- [111] Manning G, Whyte DB, Martinez R, et al. The protein kinase complement of the human genome [J]. *Science*, 2002, 298: 1912-1934.
- [112] Johnson JL, Yaron TM, Huntsman EM, et al. An atlas of substrate specificities for the human serine/threonine kinome [J]. *Nature*, 2023, 613: 759-766.
- [113] Chen MJ, Dixon JE, Manning G. Genomics and evolution of protein phosphatases [J]. *Sci Signal*, 2017, 10: eaag1796.
- [114] Chen PH, Hu ZY, An E, et al. Modulation of phosphoprotein activity by phosphorylation targeting chimeras (PhosTACs) [J]. *ACS Chem Biol*, 2021, 16: 2808-2815.
- [115] Siriwardena SU, Godage DNPM, Shoba VM, et al. Phosphorylation-inducing chimeric small molecules [J]. *J Am Chem Soc*, 2020, 142: 14052-14057.
- [116] Shoba VM, Munkanatta Godage DNP, Chaudhary SK, et al. Synthetic reprogramming of kinases expands cellular activities of proteins [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2022, 61: e202202770.
- [117] Yamazoe S, Tom J, Fu Y, et al. Heterobifunctional molecules induce dephosphorylation of kinases—a proof of concept study [J]. *J Med Chem*, 2020, 63: 2807-2813.
- [118] Zhang QY, Wu XX, Zhang HH, et al. Protein phosphatase 5-recruiting chimeras for accelerating apoptosis-signal-regulated kinase 1 dephosphorylation with antiproliferative activity [J]. *J Am Chem Soc*, 2023, 145: 1118-1128.
- [119] Hua LW, Zhang QY, Zhu XY, et al. Beyond proteolysis-targeting chimeric molecules: designing heterobifunctional molecules based on functional effectors [J]. *J Med Chem*, 2022, 65: 8091-8112.
- [120] Narita T, Weinert BT, Choudhary C. Author correction: functions and mechanisms of non-histone protein acetylation [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20: 508.
- [121] Ropero S, Esteller M. The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer [J]. *Mol Oncol*, 2007, 1: 19-25.
- [122] Singh BN, Zhang GH, Hwa YL, et al. Nonhistone protein acetylation as cancer therapy targets [J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2010, 10: 935-954.
- [123] Saha RN, Pahan K. HATs and HDACs in neurodegeneration: a tale of disconcerted acetylation homeostasis [J]. *Cell Death Differ*, 2006, 13: 539-550.
- [124] Morris M, Knudsen GM, Maeda S, et al. Tau post-translational modifications in wild-type and human amyloid precursor protein transgenic mice [J]. *Nat Neurosci*, 2015, 18: 1183-1189.
- [125] Forster N, Gallinat S, Jablonska J, et al. P300 protein acetyltransferase activity suppresses systemic lupus erythematosus-like autoimmune disease in mice [J]. *J Immunol*, 2007, 178: 6941-6948.
- [126] Mazzone R, Zwergel C, Artico M, et al. The emerging role of epigenetics in human autoimmune disorders [J]. *Clin Epigenetics*, 2019, 11: 34.
- [127] Guan KL, Xiong Y. Regulation of intermediary metabolism by protein acetylation [J]. *Trends Biochem Sci*, 2011, 36: 108-116.
- [128] Iyer A, Fairlie DP, Brown L. Lysine acetylation in obesity, diabetes and metabolic disease [J]. *Immunol Cell Biol*, 2012, 90: 39-46.
- [129] Schiedel M, Conway SJ. Small molecules as tools to study the chemical epigenetics of lysine acetylation [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2018, 45: 166-178.
- [130] Ali I, Conrad RJ, Verdin E, et al. Lysine acetylation goes global: from epigenetics to metabolism and therapeutics [J]. *Chem Rev*, 2018, 118: 1216-1252.
- [131] Weinert BT, Narita T, Satpathy S, et al. Time-resolved analysis reveals rapid dynamics and broad scope of the CBP/p300 acetylome [J]. *Cell*, 2018, 174: 231-244.e12.
- [132] Choudhary C, Kumar C, Gnad F, et al. Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions [J]. *Science*, 2009, 325: 834-840.
- [133] Su H, Yang F, Wang QT, et al. VPS34 acetylation controls its lipid kinase activity and the initiation of canonical and non-canonical autophagy [J]. *Mol Cell*, 2017, 67: 907-921.e7.
- [134] Tracy TE, Sohn PD, Minami SS, et al. Acetylated tau obstructs KIBRA-mediated signaling in synaptic plasticity and promotes tauopathy-related memory loss [J]. *Neuron*, 2016, 90: 245-260.
- [135] Wang WW, Chen LY, Wozniak JM, et al. Targeted protein acetylation in cells using heterobifunctional molecules [J]. *J Am Chem Soc*, 2021, 143: 16700-16708.