

抗肿瘤 NEDD8 活化酶抑制剂的研究进展

郭亚辉¹, 陆 鹏², 王玉斌², 张惠斌^{1*}

(¹中国药科大学药物科学研究院,南京 210009; ²南京工业大学药学院,南京 210009)

摘要 NEDD8 活化酶(NAE)是 Neddylation 过程中的限速酶,抑制 NAE 的活性,能够降低泛素-蛋白酶体系统(UPS)通路的活性和相关蛋白的降解,诱导肿瘤细胞凋亡。与蛋白酶体抑制剂相比,NAE 抑制剂对干扰细胞内环境稳态更有特异性。随着对 NAE 研究的不断深入,多种 NAE 抑制剂已被报道。根据这些 NAE 抑制剂的结构特点,可分为 AMP 类似物、双黄酮类脱氧鸭嘴花碱酮衍生物和金属铑络合物类等。本文介绍了类泛素化修饰 Neddylation 过程,其限速酶 NAE 与肿瘤的生理作用,并综述了 NAE 抑制剂的最新研究进展。

关键词 NEDD8 活化酶;抑制剂;抗肿瘤;进展

中图分类号 R914.2 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2017)06-0646-08

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20170603

引用本文 郭亚辉, 陆鹏, 王玉斌, 等. 抗肿瘤 NEDD8 活化酶抑制剂的研究进展[J]. 中国药科大学学报, 2017, 48(6):646–653.
Cite this article as: GUO Yahui, LU Peng, WANG Yubin, et al. Progress in the researches for antitumor NEDD8 activating enzyme inhibitors[J]. J. China Pharm Univ, 2017, 48(6):646–653..

Progress in the researches for antitumor NEDD8 activating enzyme inhibitors

GUO Yahui¹, LU Peng², WANG Yubin², ZHANG Huibin^{1*}

¹Department of Pharmaceutical Science, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009;

²School of Pharmacy, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China

Abstract Inhibition of NEDD8 activating enzyme (NAE), the rate limiting enzyme in Neddylation, can suppress the activity of ubiquitin-proteasome system (UPS) pathway and decrease degradations of related proteins, resulting in cell apoptosis. Compared with the proteasome inhibitors, NAE inhibitors can interfere with cellular homeostasis with more specificity. With the rapid development of the research on NAE, a variety of NAE inhibitors have been reported. According to the structure characteristics, NAE inhibitors can be divided into the AMP analogues, double flavonoids deoxidization duckbill alkali ketone derivatives and metal rhodium complex classes, etc. The process of ubiquitinated modified Neddylation, NAE and physiological role of tumor has been introduced in this paper, and the latest progress of NAE inhibitors also has been summarized.

Key words NEDD8 activating enzyme; inhibitors; antitumor; advances

在真核细胞中,泛素-蛋白酶体系统(UPS)负责蛋白质的降解,并在维持细胞内蛋白质动态平衡中担当重要角色。泛素是由 76 个氨基酸残基组成的多肽,经过泛素激活酶(E1)、泛素结合酶(E2)及泛素连接酶(E3)的级联催化,共价连接到底物蛋白上,最后被 26S 蛋白酶体识别并降解。UPS 的底物蛋白参与诸如细胞周期调节、细胞生长及增殖、信号传导、DNA 修复及细胞凋亡信号传导等过

程。因此,UPS 失调则会导致信号通路的异常激活或抑制,进而可能发展成为肿瘤或其他疾病^[1]。UPS 活性过高与肿瘤的发生发展密切相关,已成为肿瘤研究的热门方向^[2-3]。蛋白酶体抑制剂硼替佐米通过抑制蛋白酶体活性,减少细胞内蛋白降解,导致细胞死亡。其作为治疗多发性骨髓瘤药物上市,进一步证明了通过调节 UPS 治疗肿瘤的可行性。硼替佐米抑制泛素-蛋白酶体通路的 26S 蛋

白酶体,几乎阻断所有经泛素-蛋白酶体途径的蛋白质降解,从而缺乏选择性。因此,硼替佐米在临幊上表现出较严重的不良反应,如骨髓抑制、感染、血小板减少症、溶血性贫血等。泛素化过程的3个酶中,E1催化泛素激活,抑制E1也将阻滞所有经泛素-蛋白酶体途径的蛋白质降解;E2的研究较少;E3种类繁多并具有严格的底物特异性^[4]。抑制UPS中蛋白酶体上游特定的E3活性,能够下调某一个或某一类蛋白的降解。与抑制蛋白酶体相比,抑制特定E3能够特异性阻止该E3底物蛋白的降解,从而降低毒性,增加治疗指数^[5]。泛素-蛋白酶体E3分为3类:HECT结构域的E3连接酶,其直接与泛素形成泛素-E3复合物再将泛素连接至底物上^[6];RING结构域的E3连接酶,该类酶与E2及泛素形成E3-泛素-E2复合物,再将泛素与底物连接;U-box结构域的E3连接酶,它的催化过程与RING finger E3相似,但不需要金属络合^[7]。含有cullin的E3连接酶(cullin-containing RING-finger E3s,CRLs)是RING finger E3的一个亚类。目前已知CRLs是UPS E3中最大的一个蛋白家族,它的底物蛋白大多与肿瘤相关的细胞周期控制、NF-κB信号通路、DNA复制与修复、氧化应激以及缺氧信号有关^[8-9],其对细胞增殖及凋亡起着至关重要的作用。研究表明,Cullin 1 在 40% 的肺癌中存在过表达^[10]。因此,通过调节UPS中CRLs E3的活性来调控UPS达到治疗肿瘤目的更具有选择性和可行性。研究表明,CRLs本身的催化活性较低,当其被类泛

素NEDD8酶(neural precursor cell-expressed developmentally down-regulated 8,NEDD8)蛋白共价修饰后,构象改变,转化为活性形式,提高催化活性^[11-14]。因此,通过抑制CRLs的NEDD8共价修饰过程可以调节UPS中CRLs E3的活性,从而选择性调控UPS达到治疗肿瘤的目的。因此,NEDD8活化酶(NAE)已成为非常重要的抗肿瘤药物靶点。

1 NEDD8与类泛素化修饰 Neddylation

NEDD8是由81个氨基酸组成的蛋白质,与泛素有60%的一致性和80%的同源性^[15-16]。它通过级联酶促反应特异性与底物蛋白结合的过程被称为Neddylation(图1)。Neddylation与泛素化类似:首先,NEDD8前体被人源NEDD8脱乙酰酶1(NEDD8 human deneddylase 1,DEN1)、特异性NEDD8蛋白酶(NEDD8-specific pretease,NEDP1)等酶从C端切除5个氨基酸残基,形成成熟的NEDD8;其次,成熟的NEDD8在NEDD8激活酶(NEDD8 activating enzyme,NAE/E1)催化下,ATP依赖性激活,形成NEDD8-AMP;然后被转移至NEDD8结合酶(E2);最后在NEDD8连接酶(E3)作用下,NEDD8通过硫酯键共价连接于CRLs,形成CRL-NEDD8复合物(CRLs的活性形式)。CRL-NEDD8可通过COP9/CSN的催化解离,释放出游离的CRLs(非活性形式)与NEDD8^[17]。与UPS不同的是,蛋白质泛素化修饰的功能是介导蛋白酶体的识别并被降解,而NEDD8修饰的主要功能为调节底物蛋白活性。

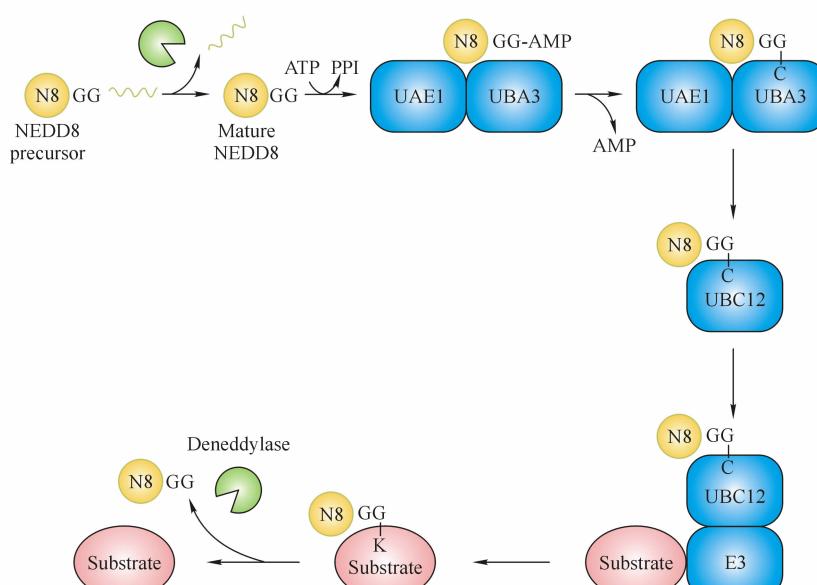


图1 类泛素化修饰 Neddylation 过程底物与其生物效应^[25]

Neddylation 的底物及生物学效应如表 1 所示。Neddylation 在细胞中具有重要功能, Neddylation 异常可引起肿瘤或神经退行性疾病的发生^[18–21], 近期研究亦发现 Neddylation 在肺癌和前列腺癌上调^[22–23]。NAE 为 Neddylation 过程中的限速酶, 通过抑制 NAE 活性, 下调 Neddylation, 降低泛素-蛋白酶体通路活性和相关蛋白降解, 诱导肿瘤细胞凋亡, 从而达到治疗肿瘤的目的。研究显示, 用 shRNA 沉默黑色素瘤细胞中 UBA3 (NAE 的亚基) 基因, 可抑制 Neddylation 活性, 增加细胞内 p53 含量, 抑制细胞增殖, 并能抑制裸鼠体内肿瘤生长^[24]。由于 NEDD8 通路处于泛素-蛋白酶体通路的上游, 所以通过抑制 NAE, 降低 Neddylation 活性, 特异性下调泛素-蛋白酶体通路的 CRLs 活性, 从而选择性减少细胞内与肿瘤相关蛋白的降解。与蛋白酶体抑制剂相比, NAE 抑制剂能更加特异地干扰肿瘤细胞的内环境稳态, 这一点对于临床治疗以及用药安全来说至关重要。因此以 NAE 为靶点, 研究高效低毒抗肿瘤药物具有广阔前景。

2 NAE 抑制剂

2.1 AMP 类似物

2.1.1 MLN4924 AMP 类似物是目前报道数量

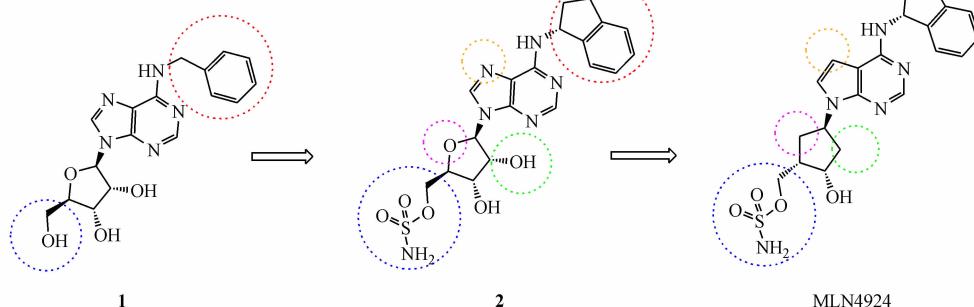


图 2 NAE 抑制剂 MLN4924 的发现

MLN4924 为选择性 NAE 抑制剂, 其对 NAE 的 IC_{50} 为 4 nmol/L, 对其他类泛素激活酶 UAE、SAE、UBA6 和 ATG7 的 IC_{50} 分别为 1.5, 8.2, 1.8 $\mu\text{mol/L}$ 及大于 10 $\mu\text{mol/L}$ 。

MLN4924 能选择性抑制细胞内 NAE 活性, 抑制细胞增殖。体外研究发现, MLN4924 能在低浓度抑制多种肿瘤细胞增殖^[27–29]。MLN4924 能抑制细胞内 CRLs 底物蛋白质(约 9%)的降解, 而蛋白酶体抑制剂(硼替佐米)阻止了细胞内大部分蛋

白质的降解, MLN4924 显示出更好的选择性。体内试验发现 MLN4924 能剂量依赖性抑制荷瘤小鼠肿瘤组织中的 Neddylation, 减少 CRLs 底物降解, 抑制肿瘤生长, 且治疗效果与每天给药总量有关, 而与每天给药次数无关。研究人员用 MLN4924 以 60 和 90 mg/kg 剂量每天两次给药治疗移植人非小细胞肺癌细胞 H522 的小鼠进行治疗, 2 周治疗后, 肿瘤生长得到显著抑制, 且小鼠对 MLN4924 表现出了很好的耐受性。因此, MLN4924 在体内体

表 1 类泛素化修饰 Neddylation 底物与其生物效应^[25]

底物	生物效应
CUL1, 2, 3, 4A, 4B, 5	促进构象改变, 激活 CRLs 活性
p53	抑制 p53 的转录因子活性
p73	抑制 p73 的转录因子活性
Mdm2	增加 mdm2 稳定性, 降低 mdm2 对 p53 的抑制活性
EGFR	增加 EGFR 泛素化并由溶酶体降解
L11 及其他核糖体蛋白	增加蛋白稳定

白质的降解, MLN4924 显示出更好的选择性。体内试验发现 MLN4924 能剂量依赖性抑制荷瘤小鼠肿瘤组织中的 Neddylation, 减少 CRLs 底物降解, 抑制肿瘤生长, 且治疗效果与每天给药总量有关, 而与每天给药次数无关。研究人员用 MLN4924 以 60 和 90 mg/kg 剂量每天两次给药治疗移植人非小细胞肺癌细胞 H522 的小鼠进行治疗, 2 周治疗后, 肿瘤生长得到显著抑制, 且小鼠对 MLN4924 表现出了很好的耐受性。因此, MLN4924 在体内体

外均有良好的抗肿瘤活性及安全性。

Brownell 等^[30]证明,MLN4924 作为前药,本身与 NAE 的结合力较弱,但经 NAE 催化后形成的 NEDD8-MLN4924 缀合物为 NAE 的强效 ATP 竞争性抑制剂。MLN4924 的分子机制如图 3 所示:(1) NEDD8 被 NAE 以 ATP 依赖性催化方式激活,形成 NEDD8-AMP;(2) NAE 酶发生变构,Cys216 的巯基

进攻 NEDD8 的末端羧基,夺取 NEDD8 形成 NEDD8-NAE,释放 AMP 并空出 ATP 结合腔穴;(3) MLN4924 作为 AMP 类似物,结合到 NAE 的 ATP 位点,NAE 酶再次发生变构,MLN4924 的磺酰胺基进攻 NEDD8-NAE 的硫酯键夺回 NEDD8,形成 NEDD8-MLN4924 复合物。

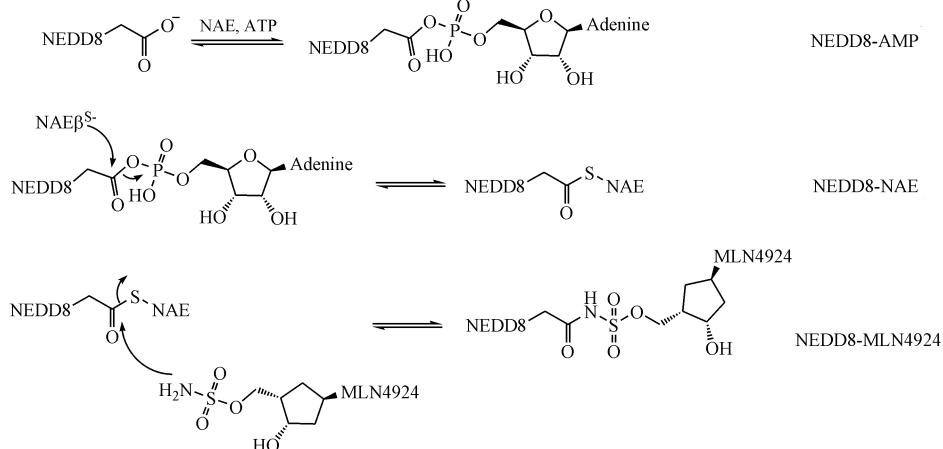


图 3 MLN4924 与 NAE 作用机制

NEDD8-MLN4924 复合物与 NAE 结合,其中 MLN4924 的磺酰基氧作为氢键受体与 Gly79 形成氢键作用,羟基与 Lys124 及 Asp100 形成氢键,嘧啶环 3 位 N 作为氢键受体与 Gln149 形成氢键作用,氨基 N 与 Ile148 形成氢键,茚满基则进入 ATP 口袋后方的疏水区域,产生疏水缔合作用(MLN4924 与 NAE 的共晶结构如图 4)^[30]。

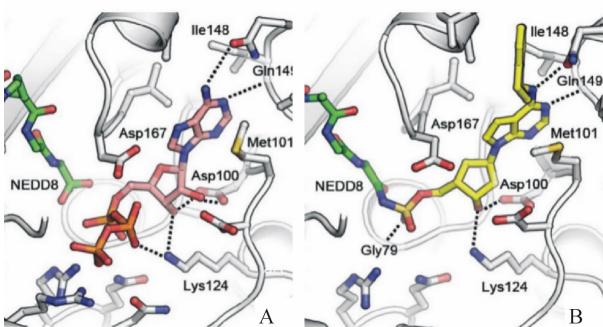


图 4 ATP 与 NAE(A) 及 MLN4924 与 NAE(B) 的共晶结构

2.1.2 4-正己氨基腺苷-5-氨基磺酸酯 Julie 等^[31]报道了 NAE 的强效抑制剂 4-正己氨基腺苷-5-氨基磺酸酯(**3**,结构如图 5)。通过嘌呤 C6 位的迭代的 AMP 类似物,其 N-烷基长链在与 NAE 结合能力上具有关键作用,当烷基链缩短或增长,对

NAE 的抑制活性都有所下降,研究人员认为化合物**3**的烷基链能够完美地占据由 Ile148, Gln149, Ile 170 和 Trp174 组成的疏水口袋。当化合物**3** C6 位为氨基呋喃和氨基噻吩结构时,能够提高化合物的代谢稳定性,但是相比化合物**3**抑制活性有所减弱。化合物**3**对 NAE 的 IC₅₀ 小于 10 nmol/L 并表现出良好的选择性。化合物**3**能够抑制 K562 细胞中 Neddylation,抑制细胞增殖,对 K562 细胞的 IC₅₀ 为 108 nmol/L,活性与 MLN4924 相当。

2.1.3 ABP A3 Heeseon^[32]课题组以 3-乙炔基苯胺取代化合物**3**的茚满基,发现了 NAE 和 UAE 的双重抑制剂 ABP A3(**4**,结构如图 7)。分子实验表明,ABP A3 在 UAE 和催化下形成 Ub-ABP A3 及 NEDD8-ABP A3 复合物,并由 Ub-ABP A3 及 NEDD8-ABP A3 分别抑制 UAE 或 NAE 活性。细胞实验中,ABP A3 能够选择性抑制 Neddylation 及泛素通路活性,抑制肿瘤细胞增殖(对 A549 细胞的 IC₅₀ = 2.5 μmol/L),激活 PARP,引起肿瘤细胞凋亡。ABP A3 还能使细胞内丙种球蛋白结合蛋白(BiP)积累,激活 PERK 及 eIF2α 磷酸化,导致细胞自噬,从多种途径抑制肿瘤细胞生长。同时 ABP A3 抑制 UAE 活性,能有效阻断泛素-蛋白酶

体通路,减少胞内蛋白降解并抑制泛素聚集体的形成,从而抑制肿瘤细胞增殖,引起细胞凋亡。

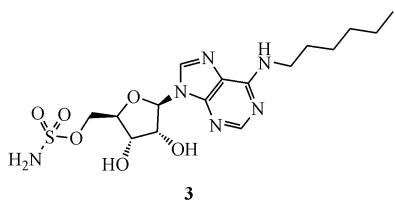


图5 化合物3结构式

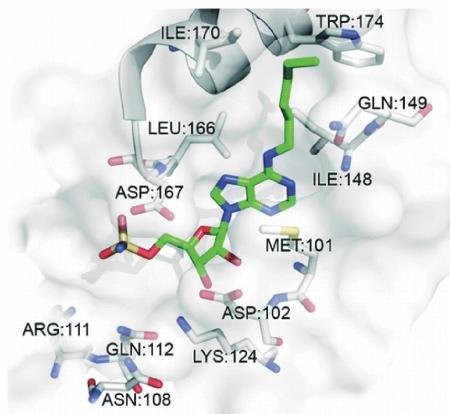


图6 低能量化合物3与NAE的ATP结合口袋对接图

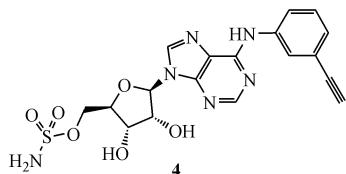


图7 ABP A3(化合物4)的结构式

2.2 6,6'-扁柏双黄酮

6,6'-扁柏双黄酮(**5**)为报道的第2类NAE抑制剂(结构见图8)^[33],其对NAE的 IC_{50} 约为20 $\mu\text{mol}/\text{L}$,并能有效抑制Caco-2细胞内NAE活性。当浓度达到25 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 时,化合物**5**能完全抑制Caco-2细胞内NAE活性。通过分子对接发现,化合物**5**与NAE的结合模式异与MLN4924与NAE的结合模式,被认为是NAE的ATP竞争性抑制剂。

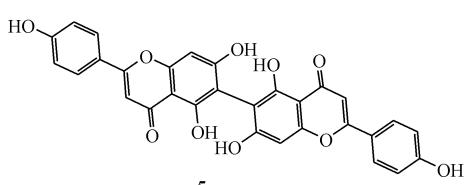


图8 6,6'-扁柏双黄酮(化合物5)的结构式

2.3 脱氧鸭嘴花碱酮类NAE抑制剂

脱氧鸭嘴花碱酮衍生物(**6**,结构见图9)是通过高通量筛选从9万个天然产物中发现的另一类天然产物NAE选择性抑制剂^[34],在胞外酶活性和细胞水平都表现出对NAE的抑制活性。其对NAE的 IC_{50} 约为0.8 $\mu\text{mol}/\text{L}$,而对E1酶类似物UAE、SAE几乎无活性。化合物**6**对Caco-2细胞增殖表现出中等抑制活性, IC_{50} 为10 $\mu\text{mol}/\text{L}$,分子对接模型显示,化合物**6**与NAE的ATP结合口袋结合模式与ATP和MLN4924相似(图10):脱氧鸭嘴花碱酮环占据Ile148和Met101附近的疏水口袋,通过环中的N原子与Gln149形成氢键作用;二肽部分与NAE的亲水区域能够形成多个氢键的相互作用,酰胺羰基O与Lys124的氢键作用,羧基O与Asp167的氢键作用和酰胺H与Asp100的氢键作用。由于与NAE结合模式类似于ATP,化合物**6**被认为是一类非共价竞争NAE抑制剂,同时化合物**6**结构优化空间很大,以期得到活性更好、类药性更高的NAE抑制剂。

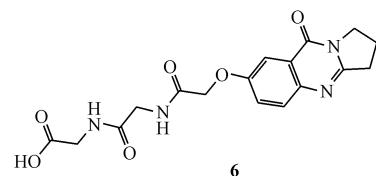


图9 脱氧鸭嘴花碱酮衍生物(化合物6)的结构式

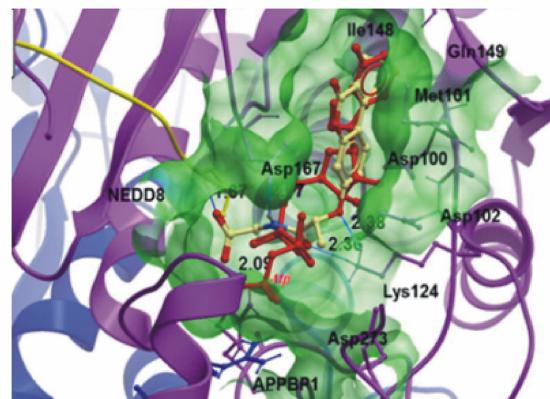


图10 化合物6与NAE的ATP结合口袋结合模式图

2.4 金属络合物类NAE抑制剂

化合物**7**为第1个金属络合物类NAE抑制剂(结构见图11)^[35],其能选择性抑制Caco-2细胞内NAE活性,减少CRLs底物降解,并抑制NF- κ B通路,表现出良好抗增殖活性($IC_{50}=0.3 \mu\text{mol}/\text{L}$)。

分子对接模型显示,化合物 7 与 NAE 的结合模式与 MLN4924 相似,苯基吡啶与 Lys124 和 Asp273 形成氢键作用,同时苯基吡啶位于 NEDD8 附近,这与 MLN4924 的核糖环类似。当化合物 7 经过结构修饰(得到化合物 8,9 和 10),其 NAE 抑制活性都有所减弱。

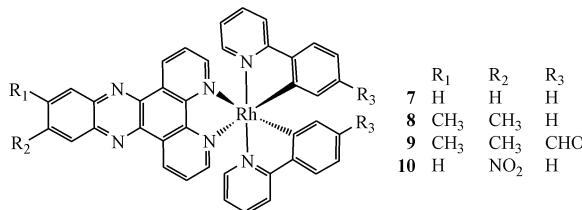


图 11 化合物 7 及其衍生物的结构式

2.5 绕丹宁类 NAE 抑制剂

共价激酶抑制剂的成功鼓舞了研究人员对共价抑制剂的研究热情。其中绕丹宁衍生物 LZ-3 (11) 是通过结合策略的虚拟筛选得到的 NAE 的共价结合抑制剂(结构如图 12),其对 NAE 的 $IC_{50} = 1.06 \mu\text{mol/L}$,并具有一定的选择性^[36]。

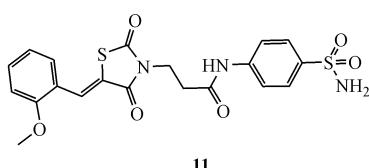


图 12 LZ-3(化合物 11)的结构式

绕丹宁类化合物是活性筛选实验中的检测干扰化合物 (pan-assay interference compounds, PAINS)之一^[37]。在筛选试验中,PAINS 表现出来的“活性”仅仅是一种假阳性结果——它们的“活性”并不是基于化合物分子与蛋白质之间特异性的作用。因此,LZ-3 作为 NAE 抑制剂的结论仍需更多实验证据验证。

2.6 哌拉西林

哌拉西林(piperacillin, 12, 结构如图 13)目前在临幊上用于治疗部分革兰阴性菌的感染,为半合成抗假单胞菌青霉素。Zhong 等^[38]研究发现,哌拉西林为 NAE 的 ATP 竞争性抑制剂 NAE 抑制剂,其对 NAE 的 IC_{50} 为 $1 \mu\text{mol/L}$ 。哌拉西林选择性抑制 Caco-2 细胞内 NAE 活性,并上调细胞内 p27 表达水平。通过分子对接模型可以看出,哌拉西林结

合于 NAE 的 ATP 结合口袋,与 NAE 和 ATP 结合空间重叠性好。其作用方式主要有:①哌拉西林的哌嗪-2,3-二酮部分结合于 NAE 中 Met101 和 Ile148 附近的疏水口袋,此疏水口袋通常与 ATP 腺嘌呤环结合;②哌拉西林的脲氧分子与 Ser147 能够形成氢键作用;③其双环结构能够占据 ATP 中磷酸基团结合位点 APPBP1 亚基,双环中的羰基与 Lys103 形成氢键;④NAE 的 Asp100 与 Asp167 之间的区域被环外的酰胺键占据。因此认为哌拉西林为 NAE 的 ATP 竞争性抑制剂。除此之外,研究人员还通过不同浓度哌拉西林处理 NAE,用 Western blot 检测 ubc12-NEDD8 复合物的含量,进一步验证了哌拉西林为 NAE 的 ATP 竞争性抑制剂。

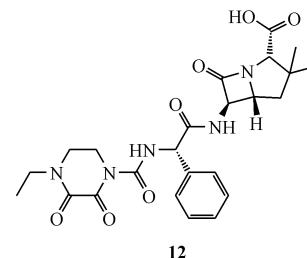


图 13 哌拉西林(化合物 12)的结构式

2.7 M22

M22 为本课题组应用分子对接技术,从 5 万个小分子化合物库基于受体的虚拟筛选发现的具有全新骨架的 NAE 抑制剂^[39]。通过细胞筛选,发现 M22 对 NAE 高表达细胞及 MLN4924 敏感细胞具有良好抑制活性(其对 A549 细胞的 IC_{50} 为 $12.7 \mu\text{mol/L}$)。随后,本课题组通过一系列生物活性测试实验对 M22 的作用靶点进行了验证(图 14)。研究发现,M22 被认为是有效的 ATP 竞争性 NAE 抑制剂。在 cell-free 评价体系中,M22 能有效抑制 NAE 活性,且该抑制效果能被高浓度 ATP 逆转。细胞实验中,M22 能抑制 NAE 高表达的 A549 细胞和 MLN4924 敏感细胞等多种肿瘤细胞增殖,并在微摩尔浓度范围内选择性抑制 NAE 活性,下调 Neddylation,减少 CRLs 被 NEDD8 共价修饰,抑制 CRLs 的激活,减少 CRLs 介导的蛋白底物降解,导致相应蛋白在细胞内积累,引起细胞凋亡。而在体内实验中 M22 能有效抑制肿瘤组织生长,并具有较低的急性毒性特性。又由于 M22 具有相对分子质量低,便于合成和具有多个修饰位点等优点,M22 被认为是理想的先导化合物。

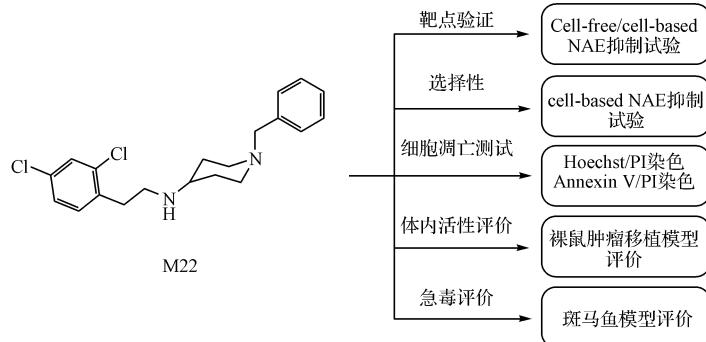


图 14 M22 作用靶点验证技术路线图

3 结语

通过对 UPS 的深入研究,已经明确 Neddylation 在调节众多细胞过程中起到重要作用,并意识到通过调节 Neddylation 来控制 CRLs 活性,从而调节 UPS 活性。CRLs 负责细胞内大量与肿瘤相关蛋白质的降解,因此,NEDD8 通路与肿瘤的发生和生长密切相关。NAE 抑制剂 MLN4924 的发现为以其他 UBL 通路为靶点开发抗肿瘤或其他疾病药物的策略提供重要依据。虽然目前以 NAE 为靶点的抗肿瘤药物只有 MLN4924 正在进行Ⅱ期临床研究,但是随着 NAE 对机体代谢影响机制进一步阐明,以 NAE 为靶点的药物有望为肿瘤患者带来福音。

参考文献

- [1] Hershko A. The ubiquitin system for protein degradation and some of its roles in the control of the cell-division cycle (Nobel Lecture) [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2005, **44**(37): 5932–5943.
- [2] Buckley DL, Crews CM. Small-molecule control of intracellular protein levels through modulation of the ubiquitin proteasome system [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2014, **53**(9): 2312–2330.
- [3] da Silva SR, Paiva SL, Lukkarila JL, et al. Exploring a new frontier in cancer treatment: targeting the ubiquitin and ubiquitin-like activating enzymes [J]. *J Med Chem*, 2013, **56**(6): 2165–2177.
- [4] Bedford L, Lowe J, Dick LR, et al. Ubiquitin-like protein conjugation and the ubiquitin-proteasome system as drug targets [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2011, **10**(1): 29–46.
- [5] Wang SM, Sun W, Zhao YJ, et al. SAR405838: an optimized inhibitor of MDM2-p53 interaction that induces complete and durable tumor regression [J]. *Cancer Res*, 2014, **74**(20): 5855–5865.
- [6] Kee Y, Huibregtse JM. Regulation of catalytic activities of HECT ubiquitin ligases [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, **354**(2): 329–333.
- [7] Hatakeyama S, Nakayama KI. U-box proteins as a new family of ubiquitin ligases [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **302**(4): 635–645.
- [8] Podust VN, Brownell JE, Gladysheva TB, et al. A Nedd8 conjugation pathway is essential for proteolytic targeting of p27kip1 by ubiquitination [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, **97**(9): 4579–4584.
- [9] Read MA, Brownell JE, Gladysheva TB, et al. Nedd8 modification of cul-1 activates SCF(β TrCP)-dependent ubiquitination of IkappaBalpha [J]. *Mol Cell Biol*, 2000, **20**(7): 2326–2333.
- [10] Soucy TA, Dick LR, Smith PG, et al. The Nedd8 conjugation pathway and its relevance in cancer biology and therapy [J]. *Genes Cancer*, 2010, **1**(7): 708–716.
- [11] Pan ZQ, Kentis A, Dias DC, et al. Nedd8 on cullin: building an expressway to protein destruction [J]. *Oncogene*, 2004, **23**(11): 1985–1997.
- [12] Read MA, Brownell JE, Gladysheva TB, et al. Nedd8 modification of Cul-1 activates SCF β TrCP-dependent ubiquitination of IkB α [J]. *Mol Cell Biol*, 2000, **20**(7): 2326–2333.
- [13] Boh BK, Smith PG, Hagen T. Neddylation-induced conformational control regulates cullin RING ligase activity *in vivo* [J]. *J Mol Biol*, 2011, **409**(2): 136–145.
- [14] Xie P, Zhang MH, He SA, et al. The covalent modifier Nedd8 is critical for the activation of Smurfl ubiquitin ligase in tumorigenesis [J]. *Nat Commun*, 2014, **5**(6183): 3733.
- [15] Kumar S, Yoshida Y, Noda M. Cloning of a cDNA which encodes a novel ubiquitin-like protein [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, **195**(1): 393–399.
- [16] Kamitani T, Kito K, Nguyen HP, et al. Characterization of NEDD8, a developmentally down-regulated ubiquitin-like protein [J]. *J Biol Chem*, 1997, **272**(45): 28557–28562.
- [17] Rabut G, Peter M. Function and regulation of protein Neddylation. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series [J]. *EMBO Rep*, 2008, **9**(10): 969–976.
- [18] Salon C, Brambilla E, Brambilla C, et al. Altered pattern of Cul-1

- protein expression and Neddylation in human lung tumours: relationships with CAND1 and cyclin E protein levels [J]. *J Pathol*, 2007, **213**(3):303–310.
- [19] Mori F, Nishie M, Piao YS, et al. Accumulation of NEDD8 in neuronal and glial inclusions of neurodegenerative disorders [J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2005, **31**(1):53–61.
- [20] Chairatvit K, Ngamkitidechakul C. Control of cell proliferation via elevated NEDD8 conjugation in oral squamous cell carcinoma [J]. *Mol Cell Biochem*, 2007, **306**(1):163–169.
- [21] DilKuazi A, Kito K, Abe Y, et al. NEDD8 protein is involved in ubiquitinated inclusion bodies [J]. *J Pathol*, 2003, **199**(2):259–266.
- [22] Li LH, Wang MS, Yu GY, et al. Overactivated Neddylation pathway as a therapeutic target in lung cancer [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2014, **106**(6):dju083.
- [23] Gao Q, Yu GY, Shi JY, et al. Neddylation pathway is up-regulated in human intrahepatic cholangiocarcinoma and serves as a potential therapeutic target [J]. *Oncotarget*, 2014, **5**(17):7820–7832.
- [24] Cheng F, Chen H, Zhang L, et al. Inhibition of the NEDD8 conjugation pathway by shRNA to UBA3, the subunit of the NEDD8-activating enzyme, suppresses the growth of melanoma cells [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, **13**(1):57–62.
- [25] Wang M, Medeiros BC, Erba HP, et al. Targeting protein Neddylation: a novel therapeutic strategy for the treatment of cancer [J]. *Exp Opin Ther Targets*, 2011, **15**(3):253–264.
- [26] Soucy TA, Smith PG, Milhollen MA, et al. An inhibitor of NEDD8-activating enzyme as a new approach to treat cancer [J]. *Nature*, 2009, **458**(7239):732–736.
- [27] Zhao LP, Yue P, Lonial S, et al. The NEDD8-activating enzyme inhibitor, MLN4924, cooperates with TRAIL to augment apoptosis through facilitating c-FLIP degradation in head and neck cancer cells [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2011, **10**(12):2415–2425.
- [28] Swords RT, Kelly KR, Smith PG, et al. Inhibition of NEDD8-activating enzyme: a novel approach for the treatment of acute myeloid leukemia [J]. *Blood*, 2010, **115**(18):3796–3800.
- [29] Wei DP, Li H, Yu J, et al. Radiosensitization of human pancreatic cancer cells by MLN4924, an investigational NEDD8-activating enzyme inhibitor [J]. *Cancer Res*, 2012, **72**(1):282–293.
- [30] Brownell JE, Sintchak MD, Gavin JM, et al. Substrate-assisted inhibition of ubiquitin-like protein-activating enzymes: the NEDD8 E1 inhibitor MLN4924 forms a NEDD8-AMP mimetic *in situ* [J]. *Mol Cell*, 2010, **37**(1):102–111.
- [31] Julie LL, Sara RS, Mohsia A, et al. Identification of NAE inhibitors exhibiting potent activity in leukemia cells: exploring the structural determinants of NAE specificity [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2011, **2**(8):577–582.
- [32] Heeseon A, Alexander VS. An inhibitor of ubiquitin conjugation and aggresome formation [J]. *Chem Sci*, 2015, **6**(9):5235–5245.
- [33] Leung CH, Chan DS, Yang H, et al. A natural product-like inhibitor of NEDD8-activating enzyme [J]. *Chem Commun*, 2011, **47**(9):2511–2513.
- [34] Zhong HJ, Ma VP, Cheng Z, et al. Discovery of a natural product inhibitor targeting protein Neddylation by structure-based virtual screening [J]. *Biochimie*, 2012, **94**(11):2457–2460.
- [35] Zhong HJ, Yang H, Chan DS, et al. A metal-based inhibitor of NEDD8-activating enzyme [J]. *PLoS ONE*, 2012, **7**(11):e49574.
- [36] Zhang SP, Tan JN, Lai ZH, et al. Effective virtual screening strategy toward covalent ligands: identification of novel NEDD8-activating enzyme inhibitors [J]. *J Chem Inf Model*, 2014, **54**(6):1785–1797.
- [37] Baell J, Walters MA. Chemistry: chemical con artists foil drug discovery [J]. *Nature*, 2014, **513**(7519):481–483.
- [38] Zhong HJ, Liu LJ, Chan SH, et al. Structure-based repurposing of FDA-approved drugs as inhibitors of NEDD8-activating enzyme [J]. *Biochimie*, 2014, **102**(1):211–215.
- [39] Lu P, Liu XX, Yuan XR, et al. Discovery of a novel NEDD8 activating enzyme inhibitor with piperidin-4-amine Scaffold by structure-based virtual screening [J]. *ACS Chem Biol*, 2016, **11**(7):1901–1907.