

小分子疏水标签蛋白降解剂的研究进展

霍子瑞, 裴捷雨, 詹芳怡, 谢绍文, 徐进宜, 徐盛涛*

(中国药科大学药物化学系, 南京 211198)

摘要 近年来, 诱导靶标蛋白降解的小分子靶向蛋白降解剂发展迅速, 该类分子由于能够克服传统小分子抑制剂不能应用于难成药靶标、易发耐药等问题而引起了人们极大的兴趣。其中小分子疏水标签蛋白降解剂 (hydrophobic tags, HyTs) 相较于其他靶向蛋白降解分子, 具有更少的氢键供体/受体数量、更小的相对分子质量和较佳的药动学特性, 引起了研究人员的广泛关注。本综述着重介绍了疏水标签蛋白降解剂所涉及的可能作用机制及较为热门的疏水标签类型, 特别针对金刚烷这一典型的疏水标签, 在癌症、神经退行性疾病等领域中的应用进行了详细介绍。但总的来讲, 疏水标签目前还存在类型少、降解机制研究不够深入等问题, 仍需科研人员进一步地探索, 希望本综述能够对此提供有价值的参考信息。

关键词 疏水标签; 靶蛋白降解; 金刚烷; 癌症

中图分类号 R914

文献标志码 A

文章编号 1000-5048(2025)02-0252-12

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.2024031301

引用本文 霍子瑞, 裴捷雨, 詹芳怡, 等. 小分子疏水标签蛋白降解剂的研究进展 [J]. 中国药科大学学报, 2025, 56(2): 252–263.

Cite this article as: HUO Zirui, PEI Jieyu, ZHAN Fangyi, et al. Research advances in small-molecule hydrophobic tagging protein degraders[J]. *J China Pharm Univ*, 2025, 56(2): 252–263.

Research advances in small-molecule hydrophobic tagging protein degraders

HUO Zirui, PEI Jieyu, ZHAN Fangyi, XIE Shaowen, XU Jinyi, XU Shengtao*

Department of Medicinal Chemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

Abstract In recent years, small-molecule targeted protein degraders inducing protein degradation have been developing rapidly. These molecules are attracting substantial interest from researchers since they can overcome such limitations of traditional small-molecule inhibitors as their inapplicability to ‘undruggable’ targets and tendency to induce drug resistance. Compared with other targeted protein degraders, small-molecule hydrophobic tags (HyTs) may have a smaller number of hydrogen bond donors/acceptors, smaller molecular weights, and better pharmacokinetic profiles, thus attracting extensive attention from researchers. This review focuses on the possible mechanisms and popular types of HyTs, with special attention to the potential application value of adamantane, a typical hydrophobic tag, in the fields of cancer and neurodegeneration. In general, there are still some problems like fewer types of hydrophobic tags and insufficient research on degradation mechanisms, which still need to be further explored. This review is expected to provide researchers working in the fields of small-molecule targeted protein degraders with some valuable reference.

Key words hydrophobic tag; targeted protein degradation; adamantane; cancer

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 82173672, No. 82373743); and the National Innovation and Entrepreneurship Training Program for Undergraduate (202410316057Y)

收稿日期 2024-03-13 * 通信作者 Tel: 13601402481 E-mail: cpuxst@cpu.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 82173672, No. 82373743); 2024 年中国药科大学大学生创新创业训练计划项目 (202410316057Y)

传统的小分子靶向抑制剂在诸如癌症等疾病的治疗中发挥了重要的作用,然而,其存在的短板也不容忽视。由于传统的小分子抑制剂依靠占位驱动的药理学原理实现其调控功能,因此只有在较高的血药浓度下才可确保其疗效,这样容易出现脱靶效应,诱发不良反应^[1-2]。此外,“难成药靶标”(如转录因子、骨架蛋白和非酶蛋白等)并不具备传统意义上的生物学功能,无法被小分子抑制剂所靶向^[3]。近年来人们发现,蛋白质的错误折叠、过度表达和聚集与肿瘤、神经退行性疾病等密切相关,开发新型的靶向蛋白降解剂对致病蛋白进行降解可能是一种有前景的策略^[4-5]。目前,已涌现出了一系列基于蛋白降解的药物开发策略,包括蛋白水解靶向嵌合体(poteolysis targeting chimeras, PROTACs)^[6]、分子胶(molecular glue)^[7]、疏水标签(hydrophobic tags, HyTs)^[8]、自噬小体绑定化合物(autophagosome-tethering compound, ATTEC)^[9]、自噬靶向嵌合体(autophagy-targeting chimeras, AUTACs)^[10]、溶酶体靶向嵌合体(lysosome-targeting chimeras, LYTACs)^[11]等,这些靶向蛋白降解(targeted protein degradation, TPD)策略颠覆了传统小分子抑制剂的开发理念,不再以位点占据的模式抑制蛋白质功能,而是能够直接降解靶蛋白,调控靶蛋白的含量,以事件驱动的方式实现疾病的治疗。因此,对于传统意义上的“难成药靶标”及作用靶点出现的耐药性问题,TPD 不失为一种有效的解决方案^[12]。

PROTAC 型蛋白降解剂 ARV-110, ARV-766 等目前已成功进入 II 期临床研究用于治疗去势抵抗性前列腺癌(castration-resistant prostate cancer, CRPC),这表明利用 TPD 技术治疗疾病是有前景的^[13-14]。然而 PROTACs 作为一类主流的蛋白降解技术,其水溶性差、口服生物利用度低等难题尚未解决^[15]。与之较为相似的分子胶虽然成药性问题少,但因难以开展合理药物设计等问题同样面临着瓶颈。HyTs 技术是一类具有前景的 TPD 策略,其不仅弥补了 PROTACs 技术一些难以解决的缺陷,同时在可设计性方面也明显优于分子胶^[16]。比起 PROTACs 与分子胶,HyTs 发展更晚,目前研究还处于起步阶段。到目前为止,有近 10 种疏水标签片段被应用于致病蛋白的降解。这些疏水标签片段包括金刚烷^[8]、叔丁基氨基甲酸酯保护的精氨酸(Boc₃Arg)^[17]、苄^[18]、苈^[19]以及降冰片烯^[20]等。考虑到这些疏水标签片段在新药研发中的潜在应用

价值,本文根据其化学结构对其进行分类,并介绍基于这些疏水标签设计的小分子药物的生物活性和降解机制。将特别对金刚烷这一典型的疏水标签,在癌症、神经退行性疾病等领域表现出的潜在应用价值进行详细探讨。本文旨在通过对 HyTs 技术的全面介绍来帮助人们认识这项新型的蛋白降解策略,以加快蛋白降解药物的开发和应用。

1 PROTACs、分子胶、HyTs 的降解机制

泛素-蛋白酶体系统(ubiquitin-proteasome system, UPS)是天然蛋白质细胞内选择性降解的主要途径,短期存在的、可溶的、未折叠的或错误折叠的蛋白和肽主要依靠 UPS 途径实现降解。而 TPD 策略的主要实现途径与调控 UPS 密切相关,因此深入了解 UPS 途径介导的蛋白降解机制对于合理设计 TPD 具有重要的意义。UPS 途径介导的蛋白质降解过程大致可以分为两个阶段。首先为蛋白质的泛素化,由泛素参与蛋白质的共价修饰,涉及 E1, E2 和 E3 酶的精密调控。其中 E3 连接酶发挥了关键作用,与蛋白泛素化的选择性密切相关。之后泛素化的蛋白质被 26S 蛋白酶体识别,最终实现降解^[21]。

PROTACs 作为主流的 TPD 技术,降解机制已被研究得较为透彻。PROTAC 是一种双功能分子,由靶蛋白配体与 E3 连接酶配体通过合适的连接链组成。它能够同时募集靶蛋白(protein of interest, POI)与 E3 连接酶,使得 POI 与 E3 连接酶在空间上接近,从而诱导 POI 的泛素化,进而通过蛋白酶体识别并降解(图 1-A)。PROTACs 由于机制较为明确,且选择性好、降解效率高、持续时间长,吸引了研究人员较大的兴趣,目前已有多款药物进入临床研究。然而由于其存在相对分子质量大,氢键供体/受体数量多等特性,因此其口服生物利用度与药动学的特性较差。而分子胶的作用机制与之类似,通过诱导泛素连接酶和 POI 之间的直接相互作用,促使 POI 的泛素化并降解(图 1-B)。分子胶不需要 E3 连接酶配体,具有相对分子质量低和选择性强等特征,其在成药性方面相较 PROTACs 更为优异。但是由于分子胶需要同时契合 POI 与 E3 连接酶的结合位点,因此其设计难度大,挑战性强^[6, 22-23]。

HyTs 也是一种双功能分子,由连接链、疏水标签和靶蛋白配体 3 部分构成。目前,根据已发表的 HyTs 介导的降解机制,可将其主要归为以下 3 类:(1)HyT 模拟错误折叠的蛋白质从而降低 POI 的稳定性,使其成为“不稳定蛋白”,之后分子伴侣在“不

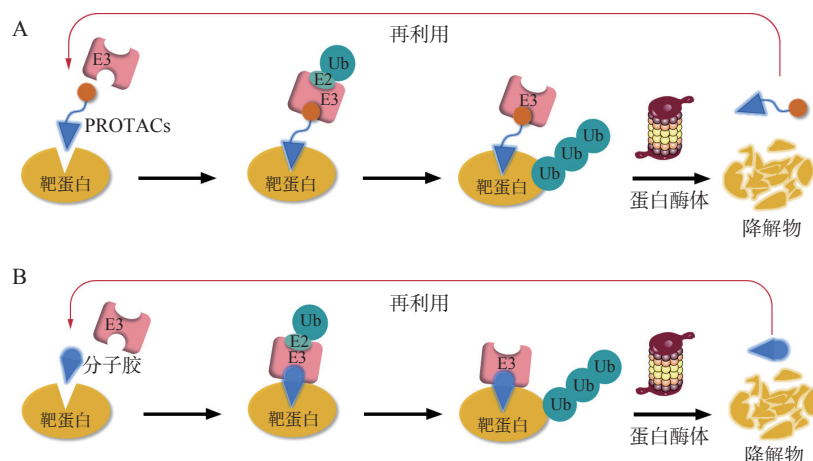


图 1 蛋白水解靶向嵌合体(PROTACs)与分子胶的降解机制

A: PROTACs 的降解机制; B: 分子胶的降解机制

Ub: 泛素; E2: 泛素结合酶; E3: 泛素连接酶

稳定蛋白”上募集并介导蛋白酶体对复合物进行降解(图 2-A); (2)HyT 的疏水标签直接招募分子伴侣, 并介导 POI 泛素化, 通过蛋白酶体降解(图 2-B); (3)HyT 的疏水标签直接招募 20S 蛋白酶体至 POI, 并使之降解(图 2-C)^[16, 24-25]。总的来说, HyTs 相较

于 PROTACs 相对分子质量低, 氢键供体/受体数量更少, 具有更为优异的药动学特性与口服生物利用度。而在空间结构的设计方面, 其构建难度也明显小于分子胶。然而, 目前人们对于 HyTs 降解机制的了解还不够深入, 仍需要科研人员的进一步探索。

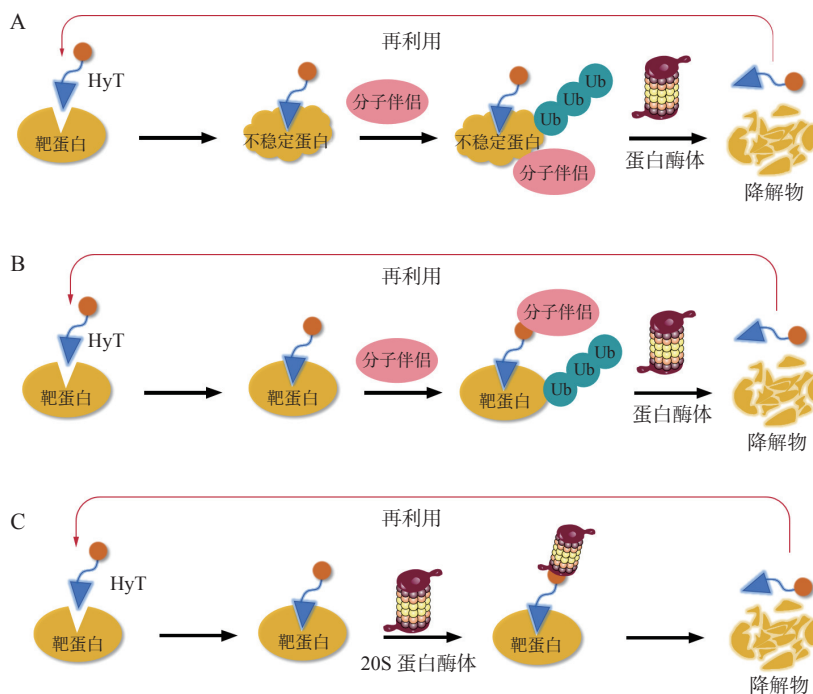


图 2 小分子疏水标签(HyT)的潜在降解机制

A: 模拟靶蛋白错误折叠的降解途径; B: 分子伴侣介导的泛素化降解途径; C: 无泛素化降解途径

2 疏水标签的研究进展

自 2011 年 Neklesa 等^[26]首次提出疏水标签技

术的概念以来, 各种不同类型的疏水标签相继被报道, 考虑到这些疏水标签在新药研发中的潜在应用价值, 本文将根据疏水标签的种类对其进行分类,

介绍其研究进展,旨在促进新型疏水标签的合理开发,增强其临床应用潜力。

2.1 金刚烷

金刚烷是一类典型的基于分子伴侣 Hsp70 和 UPS 途径来发挥降解活性的疏水标签^[16]。金刚烷疏水性良好,结构类似于笼状。其凭借优异的亲脂性、生物相容性、渗透性,在药物化学领域具有巨大的潜力与价值。作为开发最早的疏水标签,目前已被应用于多个靶标蛋白,在癌症、神经退行性疾病等研究领域发挥了巨大的作用。相较于其他类型的疏水标签,其技术更加成熟与完善。

2.1.1 金刚烷在癌症领域的应用 Her3 是一种受体酪氨酸激酶家族蛋白,属于 ErbB/HER 受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinase, RTK)家族。目前,多种癌症都被报道存在 Her3 过表达的情况;同时,Her3 的磷酸化也被报道与 EGFR 抑制剂的耐药密切相关^[27]。虽然 Her3 早在 30 多年前就已被发现,但目前尚未有临床批准的治疗干预手段。Her3 属于假激酶,几乎没有细胞内的酪氨酸激酶活性,小分子抑制剂难以发挥活性^[28-29]。Xie 等^[30-31]报道了第 1 个选择性、不可逆的 Her3 小分子配体(TX1-85-1, 图 3-A),该配体能与 Her3 独有的 Cys721

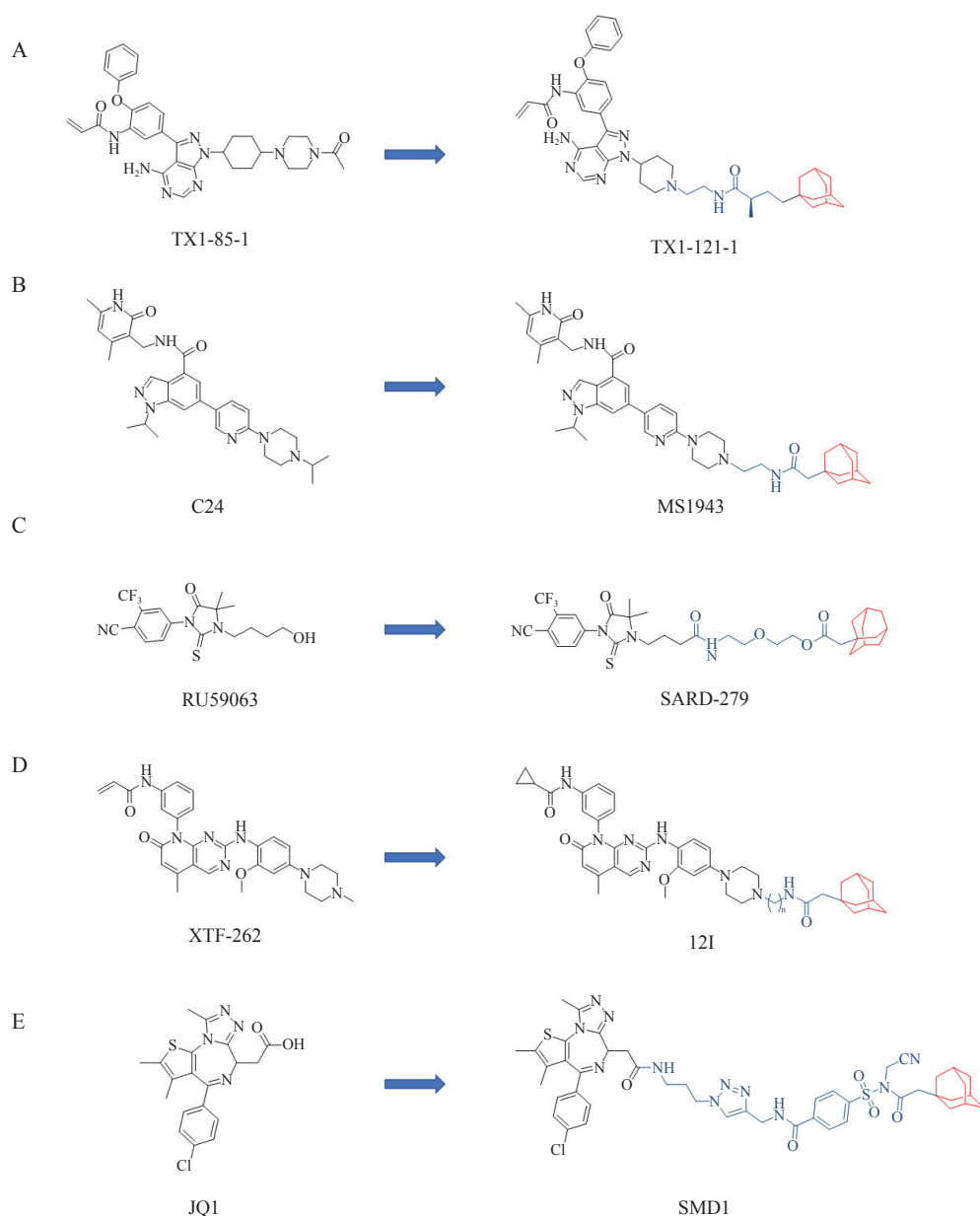


图 3 具有抗肿瘤应用前景的基于金刚烷疏水标签的相关化合物

形成共价键。但研究表明,其除了具有较强的结合力外,对 Her3 的抑制作用并不明显,在 5 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时未能抑制 Her3 重要下游效应物 Akt 的磷酸化。在此之后,他们团队在原有化合物的基础上进行了改进,引入了金刚烷标签,发现改造后的化合物 TX2-121-1 与 Her3 的结合力有显著提高。且在 500 nmol/L 时,与 Her3 共价结合的 HyT 直接招募 Hsp70、Hsp90,并通过 UPS 途径实现 Her3 的降解,表现出较强的降解活性。该团队首次实现了小分子降解剂对 Her3 的靶向降解,由于靶向 Her3 的治疗手段缺失,通过选择性结合并诱导 Her3 降解可能是一种有效的策略, TX2-121-1 展示了对难成药靶标及耐药性问题潜在的应用前景。

EZH2 是负责催化组蛋白 3 的第 27 位赖氨酸(H3K27)进行三甲基化修饰(H3K27me3)的一种组蛋白甲基转移酶,其可通过影响转录过程改变下游靶基因的表达。已有研究表明,多种癌症中出现了 EZH2 的过度表达^[32–33]。虽然三阴性乳腺癌(triple negative breast cancer, TNBC)中 EZH2 也呈现过表达,但是 EZH2 抑制剂却无法抑制 TNBC 细胞的增殖,其主要原因可能是 EZH2 抑制剂只抑制 EZH2 的甲基催化功能,对其介导的转录功能无影响^[34]。为有效抑制 TNBC 细胞的增殖, Ma 等^[35]采用了 HyTs 策略,将非共价的 EZH2 选择性抑制剂 C24 与金刚烷相连接,制备了一种新型的 EZH2 选择性降解剂 MS1943 以促进 EZH2 的降解(图 3-B)。结果显示该分子可有效降解细胞内过度表达的 EZH2,并选择性杀死 EZH2 依赖的 TNBC 细胞。其仅对肿瘤细胞具有较强的毒性,而对正常细胞几乎无影响,有较好的选择性。在小鼠模型中,经口给药与腹腔注射给药均具有良好的生物利用度,小鼠在有效剂量下耐受良好,体内肿瘤得到了有效抑制。机制研究显示, MS1943 与 EZH2 非共价结合后,可能导致大量错误折叠的蛋白质产生,并持续激活未折叠蛋白应答反应途径(unfolded protein response, UPR),从而介导 TNBC 细胞的死亡。

研究表明,前列腺癌中常出现过度表达的雄激素受体(androgen receptor, AR),而传统的抗雄激素治疗手段易出现耐药问题,诱导 AR 降解治疗前列腺癌可能是一种有效的治疗手段^[36–37]。2015 年, Gustafson 等^[8]合成了一系列选择性雄激素受体降解剂(selective androgen receptor degraders, SARDs),

这些降解剂能够与 AR 特异性结合,并且具有较强的亲和力,可明显下调细胞中的 AR 水平。这些降解剂中, SARD279 是通过将金刚烷片段与 AR 激动剂 RU59063 相偶联而构建的(图 3-C)。在人前列腺癌细胞中, 1 $\mu\text{mol/L}$ SARD279 可降解 50% 的 AR,而浓度达到 10 $\mu\text{mol/L}$ 时, AR 的降解率几乎达到 100%,并可有效抑制前列腺癌细胞的增殖。同时,针对恩杂鲁胺 AR^{F876L} 突变所造成的获得性耐药, SARD 可以解决这一难题,因此诱导 AR 降解这一策略可用于去势抵抗性前列腺癌的治疗。

Akt 蛋白也被称为磷酸激酶 B(protein kinase B, PKB),存在 3 种高度同源的亚型(Akt1、Akt2、Akt3),是丝氨酸/苏氨酸特异性激酶家族的受体,参与介导细胞的生长、分裂、凋亡和血管生成等级联信号传导过程。有研究表明,多种肿瘤的发生与 Akt3 信号的上调密切相关^[38–39]。由于 Akt 存在高度同源的亚型,因此针对 Akt 亚型开发选择性降解剂是有挑战的。然而,不同 Akt 亚型中,其结构域的同源性存在一定的差异,这也为选择性降解剂的开发提供了有利条件^[40]。2022 年, Xu 等^[41]为解决 Akt3 过度表达而导致的奥西替尼耐药问题,合成了首例选择性 Akt3 降解剂 12I(图 3-D)。该降解剂是变构 Akt 结合剂 XTF-262 通过连接链与金刚烷相联结而成的,其在体内外均能发挥良好的选择性降解作用,而对另外两种亚型的蛋白几乎无影响。研究表明 Akt3 是 12I 的直接靶点, 12I 通过 UPS 途径实现 Akt3 的降解。在 H1975OR 异种移植瘤裸鼠模型中,腹腔注射 10 或 20 mg/kg 的 12I,肿瘤生长被显著抑制,且无明显毒性。当剂量达到 40 mg/kg 后,几乎完全抑制了肿瘤的生长。Akt3 的选择性 HyT 降解可能成为治疗非小细胞肺癌具有前景的新策略。

DNA/RNA 结合蛋白已被证实与调控基因的表达密切相关,一些癌细胞中会出现过度表达的 DNA/RNA 结合蛋白,因此降解 DNA/RNA 结合蛋白可能是治疗某些癌症的潜在策略^[42–44]。2023 年, Wang 等^[45]报道了一种配体辅助共价疏水标签策略(ligand-assisted covalent hydrophobic tagging, LACHT),他们以一类含溴结构域蛋白 4(BRD4)的 DNA 结合转录因子作为 POI,将非共价靶蛋白配体 JQ1 通过连接链 *N*-酰基-*N*-烷基磺酰胺与金刚烷相连接,设计了 4 类小分子降解剂 SMD1~4,其中 SMD1(图 3-E)在白血病细胞上表现出对靶蛋白的

高效降解。对 LACHT 降解机制的探索表明其作用方式需要 UPS 途径与溶酶体途径的共同参与。

从以上例子中可以看出,基于金刚烷的小分子降解剂在癌症治疗领域展现了广阔的应用前景,上述靶蛋白的选择性降解剂为解决癌症治疗中存在的耐药性和治疗手段缺失等问题提供了新的解决方案。同时,凭借相对分子质量小,氢键供体/受体数量少的优势,此类药物具有更好的成药性。因此,科研人员应深入研究并积极发掘此类降解剂,加速其临床转化,为癌症患者创造福音。

2.1.2 金刚烷在神经退行性疾病中的应用 研究表明,阿尔茨海默病的发生可能与正常 Tau 蛋白功能的丧失及病理性 Tau 的过表达有关,具体的致病机制仍有待考证。但 Tau 的聚集会形成神经元纤维缠结(neurofibrillary tangle, NFT),对神经元可

能有毒性作用,在一定程度上影响记忆力。且有报道称,减少 Tau 的含量可对神经元功能障碍起到一定的改善作用^[46-47]。因此,靶向降解 Tau 蛋白很有可能成为治疗阿尔茨海默病的新策略。2017 年, Gao 等^[48] 合成了基于肽的 Tau 降解剂 HyT-Tau-CPP (图 4-A)。该化合物由疏水标签金刚烷、Tau 识别基序和与阿尔茨海默病相关的细胞穿透肽基序(cell penetrating peptide motif, CPP)组成。该降解剂能够以浓度和时间依赖的方式降解 Tau,此过程主要通过 UPS 途径实现。除此之外,其被证实降低了阿尔茨海默病模型小鼠大脑中 Tau 的水平,这不仅表明了该降解剂的降解效力,同时也说明其具有良好的血脑屏障通透性。虽然该降解剂发挥作用时需要较高的浓度,可能产生一定的毒性,但实验表明其安全性是可以得到保障的。

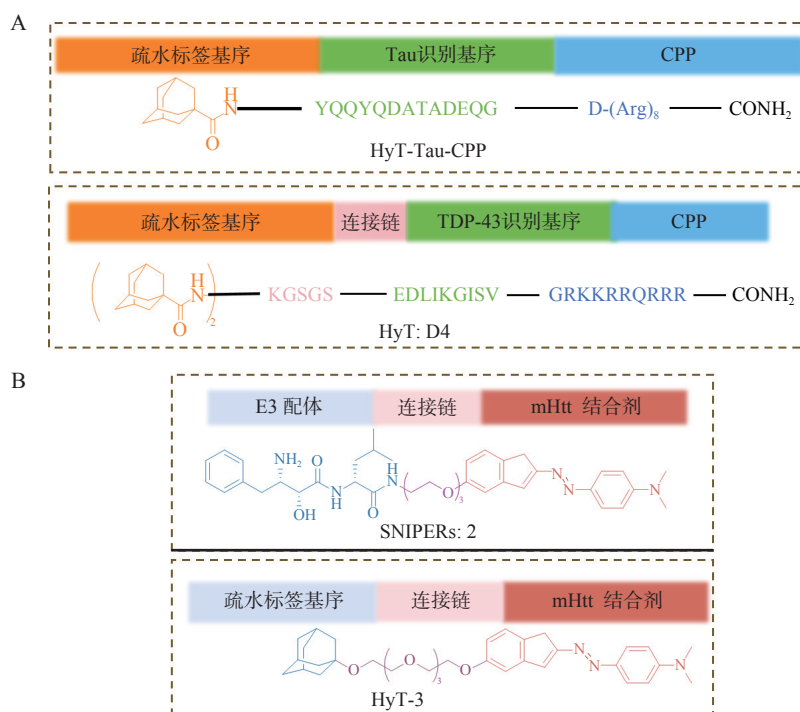


图 4 具有抗神经退行性疾病应用前景的基于金刚烷疏水标签的相关化合物

A: HyT-Tau-CPP 与 HyT-D4 的结构式; B: SNIPERs: 2 与 HyT-3 的结构式

mHtt: 突变的亨廷顿蛋白; CPP: 细胞穿透肽基序

肌萎缩侧索硬化征是一类目前无法完全治愈的神经退行性疾病,当下缺少治疗此类疾病的药物。研究表明,突变的 TDP-43 由于错误的定位,可能产生细胞毒性,造成神经元的损伤^[49-50]。Gao 等^[51] 设计并合成了一系列单或双疏水标记结合肽,尝试对致病蛋白 TDP-43 进行降解,发现 D4(图 4-A)的

诱导降解能力最强,呈现明显的剂量依赖性,且透膜性良好,对细胞的毒性较低。D4 是一类含有二金刚烷标签的功能肽,转基因果蝇模型中,二金刚烷标签相比于单金刚烷标签,在透膜性、降解效率及安全性等方面均有显著的优势。同时,高透膜性利于其透过血脑屏障,在脑部发挥作用。因此,基

于二金刚烷疏水标签治疗肌萎缩侧索硬化症的策略具有良好的前景。

突变的亨廷顿蛋白(mHtt)是由于 4 号染色体上的亨廷顿基因 CAG 三核苷酸出现过度重复所产生的,清除过多表达的亨廷顿突变蛋白被认为是抑制病情发展的有效策略^[52-53]。2022 年, Hirai 等^[54]成功合成了用于靶向降解亨廷顿突变蛋白的降解剂 HyT-3, 该分子是在 PROTAC 降解剂 SNIPERs 的基础上通过修饰转化而来的(图 4-B)。此项工作的核心是将原本 SNIPER 分子 2 中的 E3 配体替换为金刚烷基团,通过替换后得到的 HyT-3 相较于 SNIPERs 其相对分子质量更小,具有较好的透膜性,可透过血脑屏障。其可能的降解机制是:降解剂招募细胞凋亡抑制蛋白 1(cIAP1)至亨廷顿突变蛋白,并通过 UPS 途径诱导其降解。基于 HyT-3 的潜在优势,其具有成为治疗亨廷顿病药物的潜能。

针对神经退行性疾病的疏水标签蛋白降解策略近年来取得较好的进展, Tau 蛋白、TDP-43 及亨廷顿蛋白的小分子降解剂都展现了一定的潜在疗效。此类降解剂往往具有较好的透膜性,能够透过血脑屏障发挥降解作用。然而,这些疗法目前仍处于试验阶段,需要更多的临床研究来验证其安全性和有效性,使之最终成为可靠的治疗方案。

2.1.3 HaloTag 技术在 HyTs 开发中的应用 细菌脱卤素酶(HaloTag)是一类经过修饰的卤代烷脱卤

酶,其可与 HaloTag 配体发生共价结合,具有特异性高、结合迅速、作用不可逆的特点。即使 HaloTag 发生变性,依旧可以产生稳定的结合物。HaloTag 配体是一个氯代烷链通过与特定的功能分子相连接而形成的,如荧光染料、生物素等。HaloTag 为活细胞和体外蛋白质的特异性、快速标记提供了新思路,对细胞内特定的 HaloTag 融合蛋白的成像与定位,以及 HaloTag 融合蛋白相关复合物的分析与分离有着重要的意义^[55-57]。Neklesa 等^[26]在 2011 年首次合成了第 1 例小分子疏水标签降解剂 HyT13,他们以金刚烷作为疏水标签通过连接体与 HaloTag 配体相结合合成了该化合物(图 5)。在斑马鱼胚胎中,该小分子与多种 HaloTag 融合蛋白发生共价结合后,通过蛋白酶体的参与,实现了目的蛋白的强效降解。同时,HyT13 有效抑制了 Hras1^{G12V} 驱动的肿瘤进展,在小鼠体内证实了这一疏水性标记技术的实用性。后来,他们团队在 HyT13 的基础上,适当改进了连接体,合成了另一种降解剂 HyT36。其在 HaloTag7 的降解中表现出更强的降解能力,在 10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下,HyT13 的降解率为 29%,而 HyT36 的降解率达到 65%。研究表明,其降解过程需要分子伴侣 Hsp70 和 UPS 途径的共同参与^[58]。HaloTag 融合蛋白在 HyT 的功能研究、药物开发、降解机制及蛋白相互作用等方面具有重大的意义,是一种深入了解其功能和生物学意义的重要技术。

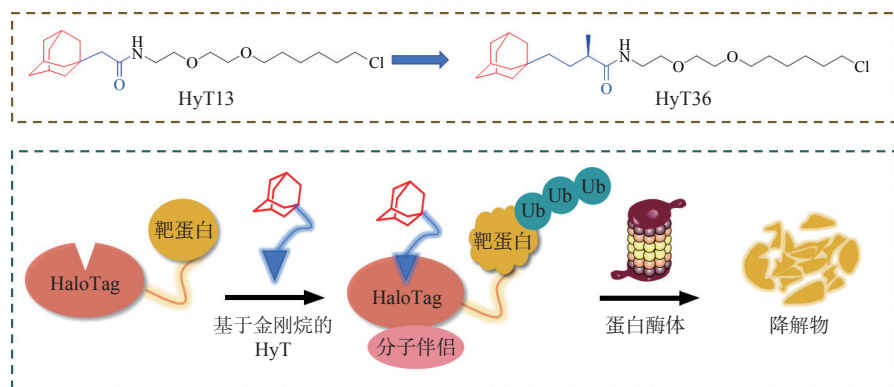


图 5 细菌脱卤素酶(HaloTag)技术在金刚烷疏水标签开发中的应用

2.2 Boc₃Arg

Boc₃Arg 是一种通过 20S 蛋白酶体靶向途径实现目的蛋白降解的代表性疏水标签。Long 等^[59]合成的 EA-Boc₃Arg(图 6),疏水标签部分包含 *N,N,N*-3Boc 保护的精氨酸,其通过 1, 6-二氨基己烷与 EA 相连接。EA-Boc₃Arg 是谷胱甘肽转移酶 (glutathione S-transferase, GST) 的共价

抑制剂, GST 的过度活跃与癌症的发生、发展及化疗耐药等密切相关,因此,此类降解剂可能是治疗癌症的潜在分子^[60]。EA-Boc₃Arg 的化学结构决定其具有良好的疏水性。实验中发现 Boc₃Arg 对特定的蛋白质具有较好的靶向降解作用,在 HeLa 和 NIH3T3 细胞裂解物中, GST- α 1、GST- α 1-egfp 融合蛋白和内源性 GST π 可被 EA-

Boc₃Arg 降解。除 EA-Boc₃Arg 外, 实验中共价抑制剂 Fur-Boc₃Arg 对裂解液中 GST- α 1 的降解与非共价抑制剂 TMP-Boc₃Arg 对裂解液中 eDHFR 的降解同样得到了关注(图 6)。在此过程中, 蛋白酶体 20S 不可或缺, 但是 ATP 并未被消耗, 表明泛素途径并不参与蛋白质降解过程, 在后续的

研究中进一步验证了 Boc₃Arg 是通过将靶蛋白直接定位于蛋白酶体 20S 而实现降解的。在以往的认知中, HyTs 诱导 POI 降解需要分子伴侣及 UPS 途径的参与, 而对 Boc₃Arg 的研究打破了这一观念, 这是首例发现的靶蛋白无泛素化降解途径^[17]。

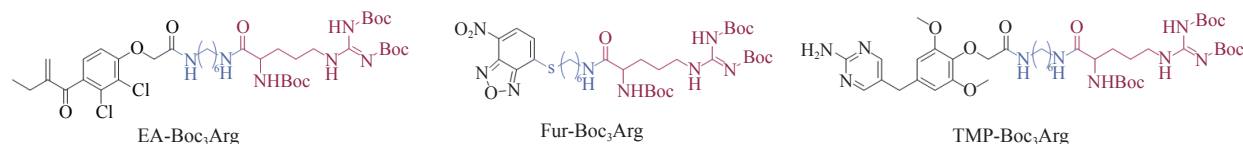


图 6 基于 Boc₃Arg 疏水标签的谷胱甘肽转移酶(GST)降解剂与潜在作用机制
GST π : 谷胱甘肽转移酶 π

2.3 芴

阿斯利康的奥拉帕尼是第 1 个被批准上市的聚 ADP 核糖聚合酶 1(poly-ADP-ribose polymerase1, PARP1)抑制剂, PARP1 是人体内一种重要的酶, 对损伤的单链 DNA 有修复作用。乳腺癌易感基因 1/2(breast cancer susceptibility gene1/2, BRCA1/2)的突变与卵巢癌和乳腺癌的发生密切相关。研究表明, 抑制 PARP1 的表达能促进癌细胞的凋亡, 由于 TNBC 缺乏特异性靶向治疗药物, 且预后差, 因

此 PARP1 抑制剂的应用可能具有较好的前景^[61-63]。2020 年, Go 等^[18]将 HyTs 技术应用于 PARP1 来治疗 TNBC, 他们合成的降解剂 HyT3a 使用奥拉帕尼作为 PARP1 结合剂通过连接链偶联芴基团(图 7), 该化合物能够有效抑制 BRCA1/2 突变的 TNBC 细胞的生长。其作用的主要途径可能是 HyT3a 通过模拟错误折叠的蛋白质, 使 PARP 成为不稳定蛋白, 进而募集分子伴侣并通过 UPS 途径对其进行降解^[64]。

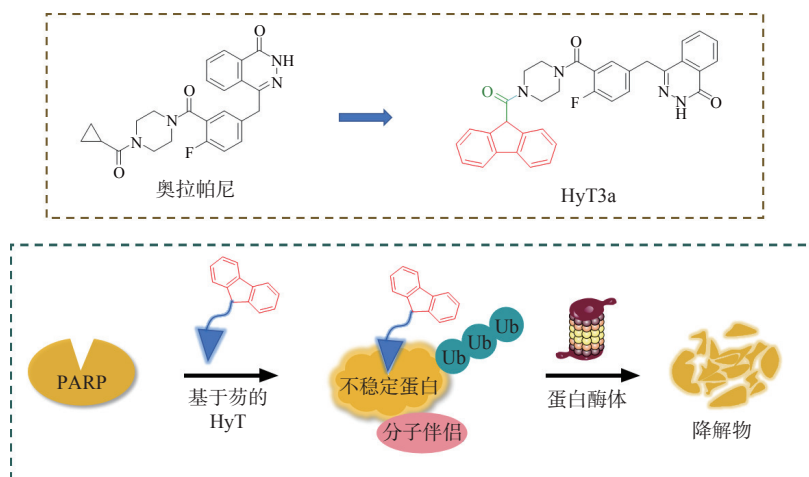


图 7 基于芴疏水标签的 PARP 降解剂与潜在作用机制
PARP: 聚 ADP 核糖聚合酶

2.4 甲氧基乙酰氯

周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent protein kinases, CDKs)通常与细胞周期蛋白(Cyclin)相互作用参与调控细胞周期, 控制细胞的生长与增殖, CDK-Cyclin 的同步降解途径, 对于癌细胞的治疗有重要的意义。CDK9 作为转录调节因子, 与 CyclinT1 相互作用后形成的 CDK9-CyclinT1 复合物调节 RNA

聚合酶 II, 促进复合物的转录^[65-66]。最近, Li 等^[67]通过将 (-)-甲氧基乙酰氯片段连接到 CDK9 抑制剂 SNS032 上, 合成了一种新型的 CDK9-cyclin T1 复合物 HyT 型降解剂 LL-K9-3(图 8), 相比于单体 CDK9 PROTAC 抑制剂 Thal-SNS032, LL-K9-3 可以选择性诱导 CDK9 和 Cyclin T1 的同步降解, 并抑制 AR 和 c-Myc 的转录, 表现出更优异的抗肿瘤

活性。由于基于 PROTACs 及分子胶技术的 TPD 对于蛋白质-蛋白质相互作用及蛋白质复合物降解

的效果不佳,基于甲氧基乙酰氯的 HyTs 技术填补了该领域的空白^[68]。

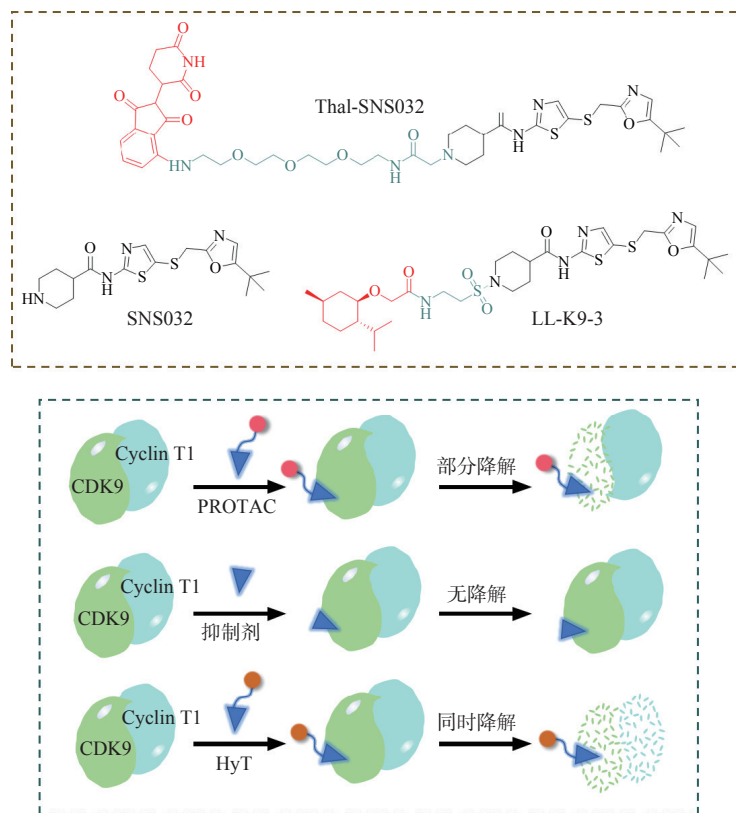


图 8 基于甲氧基乙酰氯的小分子降解剂在 CDK9-CyclinT1 降解中应用与作用机制

CDK9: 周期蛋白依赖性激酶 9; Cyclin11: 细胞周期蛋白 11; PROTAC: 蛋白水解靶向嵌合体

2.5 降冰片烯

最近, Xie 等^[20]报道了一种新型的疏水标签——降冰片烯。间变性淋巴瘤激酶(anaplastic lymphoma kinase, ALK)是治疗多种恶性肿瘤的理想靶点^[69],他们将 ALK 抑制剂艾乐替尼与不同的潜在疏水标签相连接,最终筛选发现连接有降冰片烯疏水片段的 HyT-9 分子具有良好的降解效果(图 9)。降冰片烯疏水标签具有较小的相对分子质量,相较于该课题组前一项研究中的基于艾乐替尼的 PROTAC 分子 Q2^[70],用降冰片烯替换 E3 连接酶配体得到的 HyT-9 透膜性好,口服生物利用度提高,且抑瘤效果更强。将降冰片烯应用于另外两种抑制剂色瑞替尼(HyT-11)和布加替尼(HyT-12),也可靶向降解 ALK 蛋白。此外,基于降冰片烯设计的 EZH2 降解剂 HyT-13(图 9),还可实现 EZH2 蛋白的靶向降解。作用机制研究通过分别添加溶酶体抑制剂与蛋白酶体抑制剂处理细胞,确定其是通过 UPS 途径介导的。之后通过热位移结合分析和

免疫沉淀等实验确定 Hsp70 参与了降解途径。总的来说,基于降冰片烯的 HyTs 可以诱导目的蛋白成为“不稳定蛋白”,从而招募 Hsp70 通过 UPS 途径降解蛋白质。

3 观点与展望

开发新型蛋白降解剂来降解可能与疾病相关的蛋白对于特定疾病的治疗具有重大意义。目前,已经开发了多种 TPD 策略,其中 PROTACs 技术应用最为广泛,且较为成熟,已成功应用于多种蛋白的降解。相较而言,人们对于 HyTs 技术的关注度相对较低,但其在研究过程中表现出的优良前景值得人们关注。同时,其存在的弊端也需研究人员不断地改进。

HyTs 可通过模拟体内未折叠或错误折叠的蛋白质,实现蛋白酶体对 POI 的降解。分子胶和 PROTACs 的降解机制大部分均与 UPS 途径有关,在一定程度上,HyTs 与它们的降解机制存在相似

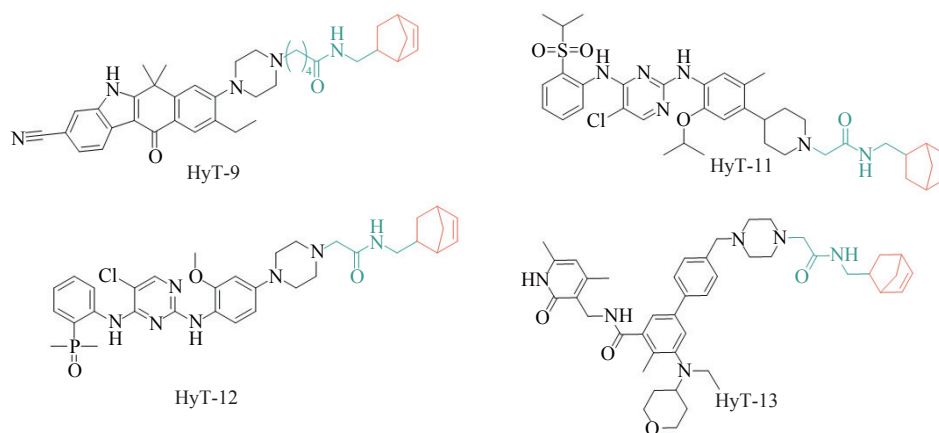


图 9 基于降冰片烯的 ALK、EZH2 小分子降解剂与作用机制

性。同时,它们作为蛋白降解策略都能够有效应对“难成药靶标”与靶标耐药的问题。但不同类型的降解剂有各自的特点。分子胶成药性好,但其开发存在较大的偶然性,合理设计分子胶具有较大的难度。PROTACs 可设计性强,但是由于其存在较多的氢键供体/受体及较大的相对分子质量,因此其成药性相比之下并不占优。HyTs 一定程度上综合了它们的优势,可设计性强,且成药性良好,往往具备较好的透膜性,成为口服药物的可能性高。同时,由于 HyTs 的降解途径不依赖于特定的 E3 连接酶,因此其应用范围可能更广泛。除此之外,相较于 PROTAC 蛋白质降解剂,HyTs 在体内的作用同样具有催化性,且可循环利用,因此其作用持续时间长,降解率高。在蛋白质-蛋白质相互作用或蛋白质复合物的降解方面,HyTs 也弥补了 PROTACs 与分子胶技术留下的空白。

然而,对于 HyTs 的研究还需继续深入,目前仍有部分问题需要科研人员进一步探索与解决。首先,人们对于 HyTs 的降解机制的研究仍停留在较浅的阶段,大多数疏水标签的降解机制并未得到详细的阐述,这在很大程度上限制了 HyTs 的广泛应用。其次,疏水标签的结合性质具有非特异性,这在体内很可能会造成低选择性的问题,诱发不良反应。最后,HyTs 的药效学、药动学及毒理学相关性能有待提高。例如 Boc_3Arg 对多个靶标被证实有效,然而其存在低降解活性、脱靶效应等问题。同时,由于很多 HyTs 的降解机制不明确,HyTs 与蛋白质的结合可能会存在不可控性而影响疗效,甚至引起难以预测的不良反应。因此,利用生物化学技术深入探索 HyTs 的机制是未来一大努力方向。此外,目前疏水标签的类

型还较为有限,也限制了靶标适用的广谱性,开发新型的疏水标签,丰富与拓展疏水标签的类型也是未来需要解决的一大关键问题。

本综述较为全面与系统地对 HyTs 进行了介绍,通过分析并总结部分已成功开发的 HyTs 及相关的应用,客观地评价了 HyTs 的优势与弊端并介绍了其未来可能需要努力的方向。希望通过这篇综述能给有关科研人员带来一些启发,并激励他们能够不断攻克 HyTs 的技术壁垒。相信通过对 HyTs 技术的攻关与完善,这项技术将有望在临床上展现其优异的性能。

References

- [1] Adjei AA. What is the right dose?The elusive optimal biologic dose in phase I clinical trials[J]. *J Clin Oncol*, 2006, **24**(25): 4054-4055.
- [2] Advani RH, Buggy JJ, Sharman JP, *et al*. Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib (PCI-32765) has significant activity in patients with relapsed/refractory B-cell malignancies[J]. *J Clin Oncol*, 2013, **31**(1): 88-94.
- [3] Hopkins AL, Groom CR. The druggable genome[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2002, **1**(9): 727-730.
- [4] Campbell J, Ryan CJ, Brough R, *et al*. Large-scale profiling of kinase dependencies in cancer cell lines[J]. *Cell Rep*, 2016, **14**(10): 2490-2501.
- [5] Vaquer-Alicea J, Diamond MI. Propagation of protein aggregation in neurodegenerative diseases[J]. *Annu Rev Biochem*, 2019, **88**: 785-810.
- [6] Neklesa TK, Winkler JD, Crews CM. Targeted protein degradation by PROTACs[J]. *Pharmacol Ther*, 2017, **174**: 138-144.
- [7] Slabicki M, Kozicka Z, Petzold G, *et al*. The CDK inhibitor CR8 acts as a molecular glue degrader that depletes cyclin K[J].

- Nature*, 2020, **585**(7824): 293-297.
- [8] Gustafson JL, Neklesa TK, Cox CS, *et al.* Small-molecule-mediated degradation of the androgen receptor through hydrophobic tagging[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2015, **54**(33): 9659-9662.
- [9] Li ZY, Zhu CG, Ding Y, *et al.* ATTEC: a potential new approach to target proteinopathies[J]. *Autophagy*, 2020, **16**(1): 185-187.
- [10] Takahashi D, Moriyama J, Nakamura T, *et al.* AUTACs: cargo-specific degraders using selective autophagy[J]. *Mol Cell*, 2019, **76**(5): 797-810. e10.
- [11] Banik SM, Pedram K, Wisnovsky S, *et al.* Lysosome-targeting chimaeras for degradation of extracellular proteins[J]. *Nature*, 2020, **584**(7820): 291-297.
- [12] Kannan MP, Sreeraman S, Somala CS, *et al.* Advancement of targeted protein degradation strategies as therapeutics for undruggable disease targets[J]. *Future Med Chem*, 2023, **15**(10): 867-883.
- [13] Jia XJ, Han X. Targeting androgen receptor degradation with PROTACs from bench to bedside[J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, **158**: 114112.
- [14] Petrylak DP, Stewart TF, Gao X, *et al.* A phase 2 expansion study of ARV-766, a PROTACandrogen receptor (AR) degrader, in metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC)[J]. *J Clin Oncol*, 2023, **41**(6_suppl): TPS290.
- [15] Cantrill C, Chaturvedi P, Rynn C, *et al.* Fundamental aspects of DMPK optimization of targeted protein degraders[J]. *Drug Discov Today*, 2020, **25**(6): 969-982.
- [16] Xie SW, Zhu JJ, Li JD, *et al.* Small-molecule hydrophobic tagging: a promising strategy of druglike technology for targeted protein degradation[J]. *J Med Chem*, 2023, **66**(16): 10917-10933.
- [17] Shi YT, Long MJ, Rosenberg MM, *et al.* Boc₃Arg-linked ligands induce degradation by localizing target proteins to the 20S proteasome[J]. *ACS Chem Biol*, 2016, **11**(12): 3328-3337.
- [18] Go A, Jang JW, Lee W, *et al.* Augmentation of the antitumor effects of PARP inhibitors in triple-negative breast cancer via degradation by hydrophobic tagging modulation[J]. *Eur J Med Chem*, 2020, **204**: 112635.
- [19] Hachisu M, Seko A, Daikoku S, *et al.* Hydrophobic tagged dihydrofolate reductase for creating misfolded glycoprotein mimetics[J]. *ChemBioChem*, 2016, **17**(4): 300-303.
- [20] Xie SW, Zhan FY, Zhu JJ, *et al.* Discovery of norbornene as a novel hydrophobic tag applied in protein degradation[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2023, **62**(13): e202217246.
- [21] Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system[J]. *Annu Rev Biochem*, 1998, **67**: 425-479.
- [22] Dong GQ, Ding Y, He SP, *et al.* Molecular glues for targeted protein degradation: from serendipity to rational discovery[J]. *J Med Chem*, 2021, **64**(15): 10606-10620.
- [23] Luh LM, Scheib U, Juenemann K, *et al.* Prey for the proteasome: targeted protein degradation-a medicinal chemist's perspective[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2020, **59**(36): 15448-15466.
- [24] Ha S, Zhu JC, Xiang H, *et al.* Hydrophobic tag tethering degrader as a promising paradigm of protein degradation: past, present and future perspectives[J]. *Chin Chem Lett*, 2024, **35**(8): 109192.
- [25] Shiber A, Breuer W, Brandeis M, *et al.* Ubiquitin conjugation triggers misfolded protein sequestration into quality control foci when Hsp70 chaperone levels are limiting[J]. *Mol Biol Cell*, 2013, **24**(13): 2076-2087.
- [26] Neklesa TK, Tae HS, Schneekloth AR, *et al.* Small-molecule hydrophobic tagging-induced degradation of HaloTag fusion proteins[J]. *Nat Chem Biol*, 2011, **7**(8): 538-543.
- [27] Gandullo-Sánchez L, Ocaña A, Pandiella A. HER3 in cancer: from the bench to the bedside[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, **41**(1): 310.
- [28] Haikala HM, Jänne PA. Thirty years of HER3: from basic biology to therapeutic interventions[J]. *Clin Cancer Res*, 2021, **27**(13): 3528-3539.
- [29] Uliano J, Corvaja C, Curigliano G, *et al.* Targeting HER3 for cancer treatment: a new horizon for an old target[J]. *ESMO Open*, 2023, **8**(1): 100790.
- [30] Xie T, Lim SM, Westover KD, *et al.* Pharmacological targeting of the pseudokinase Her3[J]. *Nat Chem Biol*, 2014, **10**(12): 1006-1012.
- [31] Lim SM, Xie T, Westover KD, *et al.* Development of small molecules targeting the pseudokinase Her3[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2015, **25**(16): 3382-3389.
- [32] Duan R, Du WF, Guo WJ. EZH2: a novel target for cancer treatment[J]. *J Hematol Oncol*, 2020, **13**(1): 104.
- [33] Liu YK, Yang Q. The roles of EZH2 in cancer and its inhibitors[J]. *Med Oncol*, 2023, **40**(6): 167.
- [34] Wang C, Chen XY, Liu XC, *et al.* Discovery of precision targeting EZH2 degraders for triple-negative breast cancer[J]. *Eur J Med Chem*, 2022, **238**: 114462.
- [35] Ma AQ, Stratikopoulos E, Park KS, *et al.* Discovery of a first-in-class EZH2 selective degrader[J]. *Nat Chem Biol*, 2020, **16**(2): 214-222.
- [36] McKay RR, Kwak L, Crowdis JP, *et al.* Phase II multicenter study of enzalutamide in metastatic castration-resistant prostate cancer to identify mechanisms driving resistance[J]. *Clin Cancer Res*, 2021, **27**(13): 3610-3619.
- [37] Snyder LB, Neklesa TK, Chen X, *et al.* Abstract 43: discovery of ARV-110, a first-in-class androgen receptor degrading PROTAC for the treatment of men with metastatic castration-resistant prostate cancer[J]. *Cancer Res*, 2021, **81**(13_Suppl): 43.
- [38] Shariati M, Meric-Bernstam F. Targeting AKT for cancer therapy[J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2019, **28**(11): 977-988.

- [39] Revathidevi S, Munirajan AK. Akt in cancer: mediator and more[J]. *Semin Cancer Biol*, 2019, **59**: 80-91.
- [40] Gonzalez E, McGraw TE. The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer[J]. *Cell Cycle*, 2009, **8**(16): 2502-2508.
- [41] Xu F, Zhang X, Chen ZP, *et al.* Discovery of isoform-selective Akt3 degraders overcoming osimertinib-induced resistance in non-small cell lung cancer cells[J]. *J Med Chem*, 2022, **65**(20): 14032-14048.
- [42] Shiroma Y, Takahashi RU, Yamamoto Y, *et al.* Targeting DNA binding proteins for cancer therapy[J]. *Cancer Sci*, 2020, **111**(4): 1058-1064.
- [43] Qin H, Ni HW, Liu YC, *et al.* RNA-binding proteins in tumor progression[J]. *J Hematol Oncol*, 2020, **13**(1): 90.
- [44] Bonczek O, Wang LX, Gnanasundram SV, *et al.* DNA and RNA binding proteins: from motifs to roles in cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, **23**(16): 9329.
- [45] Wang Y, Zhang JZ, Deng JF, *et al.* Targeted degradation of DNA/RNA binding proteins via covalent hydrophobic tagging[J]. *CCS Chem*, 2023, **5**(10): 2207-2214.
- [46] Giovannini J, Smeralda W, Jouanne M, *et al.* Tau protein aggregation: key features to improve drug discovery screening[J]. *Drug Discov Today*, 2022, **27**(5): 1284-1297.
- [47] Zhang HQ, Wei W, Zhao M, *et al.* Interaction between $\alpha\beta$ and tau in the pathogenesis of Alzheimer's disease[J]. *Int J Biol Sci*, 2021, **17**(9): 2181-2192.
- [48] Gao N, Chu TT, Li QQ, *et al.* Hydrophobic tagging-mediated degradation of Alzheimer's disease related Tau[J]. *RSC Adv*, 2017, **7**(64): 40362-40366.
- [49] Barmada SJ, Skibinski G, Korb E, *et al.* Cytoplasmic mislocalization of TDP-43 is toxic to neurons and enhanced by a mutation associated with familial amyotrophic lateral sclerosis[J]. *J Neurosci*, 2010, **30**(2): 639-649.
- [50] de Boer EMJ, Orie VK, Williams T, *et al.* TDP-43 proteinopathies: a new wave of neurodegenerative diseases[J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2020, **92**(1): 86-95.
- [51] Gao N, Huang YP, Chu TT, *et al.* TDP-43 specific reduction induced by Di-hydrophobic tags conjugated peptides[J]. *Bioorg Chem*, 2019, **84**: 254-259.
- [52] Boland B, Yu WH, Corti O, *et al.* Promoting the clearance of neurotoxic proteins in neurodegenerative disorders of aging[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2018, **17**(9): 660-688.
- [53] Tabrizi SJ, Flower MD, Ross CA, *et al.* Huntington disease: new insights into molecular pathogenesis and therapeutic opportunities[J]. *Nat Rev Neurol*, 2020, **16**(10): 529-546.
- [54] Hirai K, Yamashita H, Tomoshige S, *et al.* Conversion of a PROTAC mutant huntingtin degrader into small-molecule hydrophobic tags focusing on drug-like properties[J]. *ACS Med Chem Lett*, 2022, **13**(3): 396-402.
- [55] Los GV, Encell LP, McDougall MG, *et al.* HaloTag: a novel protein labeling technology for cell imaging and protein analysis[J]. *ACS Chem Biol*, 2008, **3**(6): 373-382.
- [56] England CG, Luo HM, Cai WB. HaloTag technology: a versatile platform for biomedical applications[J]. *Bioconjug Chem*, 2015, **26**(6): 975-986.
- [57] Chen WY, Younis MH, Zhao ZK, *et al.* Recent biomedical advances enabled by HaloTag technology[J]. *Biocell*, 2022, **46**(8): 1789-1801.
- [58] Tae HS, Sundberg TB, Neklesa TK, *et al.* Identification of hydrophobic tags for the degradation of stabilized proteins[J]. *ChemBioChem*, 2012, **13**(4): 538-541.
- [59] Long MJ, Gollapalli DR, Hedstrom L. Inhibitor mediated protein degradation[J]. *Chem Biol*, 2012, **19**(5): 629-637.
- [60] Singh RR, Reindl KM. Glutathione S-transferases in cancer[J]. *Antioxidants*, 2021, **10**(5): 701.
- [61] Slade D. PARP and PARG inhibitors in cancer treatment[J]. *Genes Dev*, 2020, **34**(5/6): 360-394.
- [62] Rose M, Burgess JT, O'Byrne K, *et al.* PARP inhibitors: clinical relevance, mechanisms of action and tumor resistance[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, **8**: 564601.
- [63] Griguolo G, Dieci MV, Miglietta F, *et al.* Olaparib for advanced breast cancer[J]. *Future Oncol*, 2020, **16**(12): 717-732.
- [64] He QD, Zhao XF, Wu DL, *et al.* Hydrophobic tag-based protein degradation: development, opportunity and challenge[J]. *Eur J Med Chem*, 2023, **260**: 115741.
- [65] Anshabo AT, Milne R, Wang SD, *et al.* CDK9: a comprehensive review of its biology, and its role as a potential target for anti-cancer agents[J]. *Front Oncol*, 2021, **11**: 678559.
- [66] Chen ZS, Yang DH. Protein kinase inhibitors as sensitizing agents for chemotherapy [M]. New York: Academic Press, 2019: 125-149.
- [67] Li JC, Liu T, Song YL, *et al.* Discovery of small-molecule degraders of the CDK9-cyclin T1 complex for targeting transcriptional addiction in prostate cancer[J]. *J Med Chem*, 2022, **65**(16): 11034-11057.
- [68] Wu TZ, Qin Z, Tian YC, *et al.* Recent developments in the biology and medicinal chemistry of CDK9 inhibitors: an update[J]. *J Med Chem*, 2020, **63**(22): 13228-13257.
- [69] Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases[J]. *Cell*, 2010, **141**(7): 1117-1134.
- [70] Xie SW, Sun Y, Liu YL, *et al.* Development of alectinib-based PROTACs as novel potent degraders of anaplastic lymphoma kinase (ALK)[J]. *J Med Chem*, 2021, **64**(13): 9120-9140.