

蛋白水解靶向嵌合分子的小分子抗肿瘤药物的研究进展

崔洁¹, 魏会强², 宁洪鑫², 李祎亮^{2*}

1. 天津中医药大学, 天津 300193

2. 中国医学科学院 北京协和医学院 放射医学研究所, 天津 300192

摘要: 近年来蛋白靶向降解 (PROTAC) 技术作为一种新的治疗手段在抗肿瘤药物领域中得到了广泛的研究。PROTAC 是一种双功能的小分子化合物, 可以将靶蛋白与 E3 泛素连接酶连接形成三元复合物, 通过泛素-蛋白酶体系降解靶蛋白。雌激素 (ER)、雄激素 (AR)、间变性淋巴瘤激酶 (ALK)、布鲁顿酪氨酸激酶 (BTK)、溴结构域蛋白 4 (BRD4) 和细胞周期蛋白依赖激酶 8 (CDK8) 等多种蛋白已经被选为靶蛋白进行了研究。对 PROTAC 的小分子抗肿瘤药物的研究进展进行综述。

关键词: PROTAC; 泛素-蛋白酶体系; 蛋白靶向降解

中图分类号: R914 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2019)10-3187-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2019.10.063

Research progress on small-molecule protein proteolysis-targeting chimeras as antitumor agents

CUI Jie¹, WEI Hui-qiang², NING Hong-Xin², LI Yi-liang²

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Tianjin Key Laboratory of Radiation Medicine and Molecular Nuclear Medicine, Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Science & Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China

Abstract: In recent years, proteolysis targeting chimera (PROTAC), as a new therapeutic method, has been widely studied in the field of anti-cancer drugs. PROTAC is a bifunctional small molecule compound, which can connect target protein with E3 ubiquitin ligase to form ternary complex, and degrade target protein through ubiquitin-protease system. Estrogen (ER), androgen (AR), anaplastic lymphoma kinase (ALK), bromine domain protein 4 (BRD4), and cyclin dependent kinase 8 (CDK8) have been selected as target proteins for a large number of studies. Research progress on small molecule anti-cancer drugs of PROTAC is reviewed in this paper.

Key words: PROTAC; ubiquitin- protease system; protein targeted degradation

肿瘤严重威胁着人们的身体健康, 特别是恶性肿瘤。据最新数据显示, 恶性肿瘤死亡占全部死因的 23.91%, 肿瘤发病率和死亡率仍在逐年升高^[1]。面对这种现象, 高效、安全、具选择性的靶向抗肿瘤药物成为了研究热点。2001 年 Crew 和 Deshaies 首次提出了蛋白靶向降解 (PROTAC) 概念^[2]。蛋白水解靶向嵌合分子是一种双功能的小分子化合物, 它能与靶蛋白和 E3 连接酶连接, 形成靶蛋白-PROTAC-E3 连接酶的三元复合物, 使靶蛋白与 E3 连接酶在空间上拉近, 泛素从 E3 连接酶上转移至

靶蛋白, 最后在蛋白酶的作用下彻底降解靶蛋白^[3], 其作用机制见图 1。

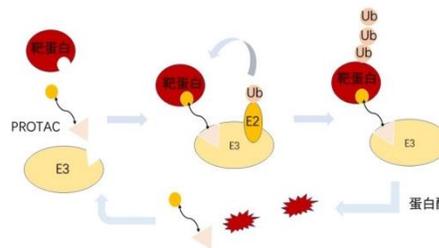


图 1 PROTAC 降解靶蛋白的作用机制

Fig. 1 Mechanism of PROTAC degradation of target protein

收稿日期: 2019-05-27

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目 (3332018117); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(2016-I2M-3-022 和 2017-I2M-3-019)

作者简介: 崔洁, 女, 研究方向为天然药物合成。E-mail: 15222862562@163.com

*通信作者 李祎亮 (1975—), 教授, 博士生导师。E-mail: liyiliang75@163.com

最初由 Crew 等设计的 PROTAC-1 是由 ovalicin 和 E3 泛素连接酶的配体 SCF β TrCP 构成的, 可以成功降解 MetAP-2。接着他们在雌二醇以及二氢睾酮 (DHT) 基础上设计合成了可以降解 ER α 和雄激素受体 (AR) 的 PROTAC-2 与 PROTAC-3^[4]。由于这些 PROTAC 的 E3 连接酶配体均来自肽类, 导致其相对分子质量大、细胞通透性差以及结构不稳定容易被水解^[5]。接着在后续的研究中发现了小分子 E3 连接酶配体如 MDM2、IAP、VHL 和 Cereblon。Schneekloth 等^[6]在 2008 年报道了第 1 个小分子 PROTAC, 将 SARM 与 MDM2 通过 PEG 连接。接着用 10 $\mu\text{mol/L}$ PROTAC 处理 HeLa 细胞 7 h 后, 发现雄激素受体水平明显下降。基于小分子 E3 连接酶配体设计的 PROTAC 克服了相对分子质量大细胞通透性差等缺点。越来越多的靶蛋白被作为研究对象, 本文主要对作用于 AR、间变性淋巴瘤激酶 (ALK)、雌激素受体 (ER)、布鲁顿酪氨酸激酶 (BTK)、溴结构域蛋白 4 (BRD4) 和细胞周期蛋白依赖激酶 8 (CDK8) 等靶蛋白的 PROTAC 的研究进展进行综述。

1 作用于 AR 的 PROTAC

雄激素是一类类固醇激素, 主要通过雄激素受体来调控基因转录, 来影响基因表达水平。雄激素在前列腺的发育中发挥着重要作用, AR 是前列腺癌的主要治疗靶点, 研究表明前列腺癌的发展与 AR 在恶性肿瘤细胞中的高表达有关^[7]。40% 患者会发展为去势耐药前列腺癌, 这是由耐药性引起的, 这也是患有前列腺癌的患者存活率低的主要原因^[8]。Schneekloth 等^[9]利用 DHT 和一种含有精氨酸的 E3 连接酶配体得到了第 1 个可以降解 AR 的化合物 PROTAC-5, 见图 2, 通过对稳定表达 AR 的 HEK293 细胞进行活性实验, 并以荧光信号强弱变化来判断 AR 的降解程度。结果发现 PROTAC-5 在 25 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下, 成功降解了 AR。Han 等^[10]利用 AR 拮抗剂与小分子配体 VHL 合成了 AED-69, 见图 3, 研究发现 ARD-69 能抑制阳性前列腺癌细胞系的细胞生长和 AR 调控的基因表达水平, 并使前列腺癌细胞 Ar 蛋白水平降低 95% 以上。ARD-69 在 LNCaP、VCaP 和 22Rv1 AR+前列腺癌细胞中, 半数清除浓度 (DC_{50}) 分别为 0.86、0.76、10 $\mu\text{mol/L}$ 。单剂量 ARD-69 能有效地降低小鼠异种移植瘤组织中 AR 蛋白的含量。进一步对 ARD-69 进行优化, 可能成为一种新的有效治疗去势耐药前列腺癌的方法。

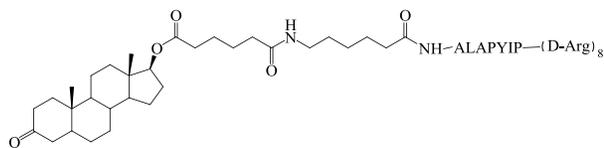


图 2 PROTAC-5 的结构

Fig. 2 Structure of PROTAC-5

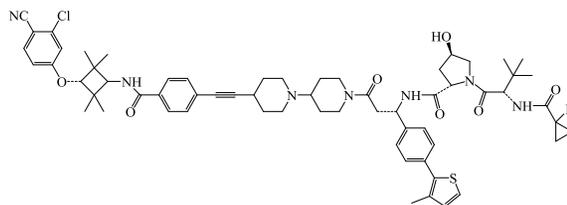


图 3 ARD-69 的结构

Fig. 3 Structure of ARD-69

2 作用于 ALK 的 PROTAC

ALK 是一种受体酪氨酸激酶, 与多种类型肿瘤的发生和发展相关, 如非小细胞肺癌 (NSCLC)、弥漫性大 B 细胞淋巴瘤 (DLBCL) 和间变性大细胞淋巴瘤 (ALCL)、甲状腺癌和乳腺癌等^[11]。有研究表明携带 ALK 融合蛋白的癌细胞与 ALK 的活性有关, 因此抑制 ALK 活性可以抑制癌细胞的增殖^[12]。目前, 市场上有 4 种 ALK 抑制剂已被 FDA 批准用于治疗 ALK 阳性的 NSCLC 患者, 但这些 ALK 抑制剂在使用一段时间后, 癌细胞会产生耐药性。因此, 需要开发新的治疗方法来延缓或克服耐药性。因为传统酶抑制剂只是抑制酶的活性, 而 PROTAC 是通过泛素-蛋白酶体系将酶降解, 既起到同样的治疗, 还不会产生耐药性。Zhang 等^[13]研究的 MS4077 和 MS4078 是将 ALK 抑制剂 ceritinib 和泊马度胺 (pomalidomide) 通过不同的连接基团得到了两种 PROTAC, 见图 4。通过对两种表达不同 ALK 融合蛋白的肿瘤细胞株 SU-DHL-1 和 NCI-H2228 进行活性测定, 发现 MS4077 和 MS4078 能有效地降低 ALK 融合蛋白水平, 并抑制 ALK 和它下游 STAT3 的自我磷酸化。在 SU-DHL-1 肿瘤细胞中被处理 16 h 后, 观察 NPM-ALK 蛋白降解水平, MS4077 的 DC_{50} 值为 $(3 \pm 1) \text{nmol/L}$, MS4078 的 DC_{50} 值为 $(11 \pm 2) \text{nmol/L}$ 。MS4077 和 MS4078 对 ALK 有较高的亲和力, K_d 值分别为 (37 ± 4) 、 $(19 \pm 3) \text{nmol/L}$ 。Kang 等^[14]利用 ALK 抑制剂 ceritinib 和 E3 连接酶配体 VHL 设计合成了 TD-004, 并对其进行了活性评价。体外实验表明 TD-004 不仅能有效地降低细胞内 ALK 融合蛋白水平, 还能选择性地抑制融合 ALK 阳性癌

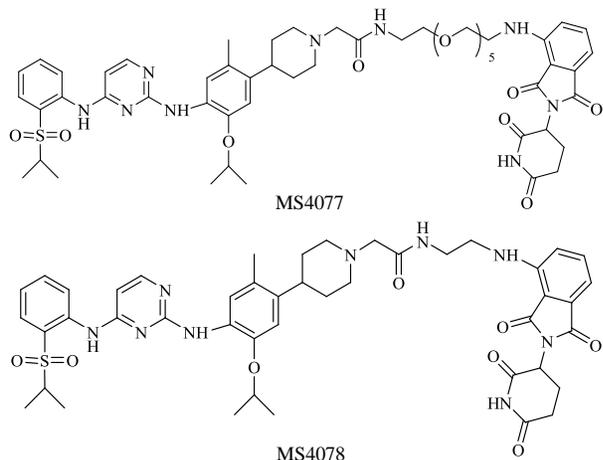


图 4 MS4077 和 MS4078 的结构

Fig. 4 Structure of MS4077 and MS4078

细胞增殖。TD-004 在异种移植小鼠模型中也显示出良好的效果，表明靶向降解 ALK 的 PROTAC 可开发为新的 ALK 治疗方法。

3 作用于 ER 的 PROTAC

ER 是治疗雌激素受体阳性乳腺癌的重要靶点。目前，fulvestrant 是唯一一个已被批准用于治疗雌激素阳性乳腺癌的雌激素受体降解剂。临床实验表明 fulvestrant 是对乳腺癌的治疗是有益的，但是它的溶解性差，不能口服，临床上只能肌肉注射给药。为了解决给药问题，新的雌激素受体降解剂正在不断的研究开发中。Hu 等^[15]将 fulvestrant 和 E3 连接酶配体 VHL 通过多个碳原子连接得到了 ERD-308，见图 5。ERD-308 对 MCF-7 和 T47D 雌激素阳性乳腺癌细胞系的 DC_{50} 分别为 0.17、0.43 $\mu\text{mol/L}$ ，对 ER 的降解率大于 95%。与 fulvestrant 比，ERD-308 对 ER 的降解效果以及抑制 MCF-7 细胞增殖效果更强。进一步优化 ERD-308，可能为治疗雌激素受体阳性乳腺癌提供一种新的治疗方法。

4 作用于 BTK 的 PROTAC

Ibrutinib 是酪氨酸激酶的一种不可逆抑制剂，

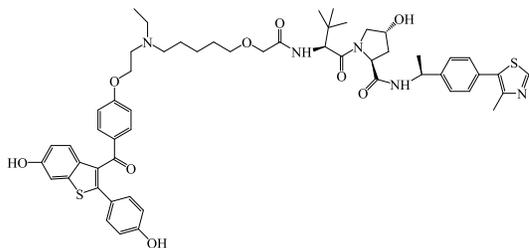


图 5 ERD-308 的结构

Fig. 5 Structure of ERD-308

主要用于治疗慢性淋巴细胞白血病 (CLL) 和其他 B 细胞恶性肿瘤。但是 80% CLL 患者会因 ibrutinib 与酪氨酸共价结合位点的半胱氨酸突变为丝氨酸而出现耐药性^[16]。对于复发的患者，目前尚无治疗方法。因此有课题组研究了 PROTAC 来降解野生型和突变型的 BTK。Buhimschi 等^[17]通过设计合成得到了 MT-802，它由 BTK 抑制剂依鲁替尼和 E3 连接酶配体 CRBN 通过 PEG 连接组成的。初步表征实验中，MT-802 降解 BTK 的 DC_{50} 为 9.1 nmol/L 。Sun 等^[18]研究发现将依鲁替尼与泊马度胺连接得到的 P13I，它对 BTK 的降解能力最佳。P13I 分别用 10、100 nmol/L 的浓度处理 Burkitt's 淋巴瘤，可观察到对 BTK 降解分别达到 73%、89%。

5 作用于 BRD4 的 PROTAC

Bromodomain and extra-terminal (BET) 家族蛋白包括 BRD2、BRD3、BRD4 以及 BRDT，主要参与细胞增殖和细胞周期的基因转录^[19]。研究报道 BRD4 是治疗急性髓系白血病和卵巢癌的重要靶点^[20-21]，说明 BRD4 具有作为靶向治疗靶点的潜力。大量的 BET 靶向降解剂被报道如 dBET1^[22]、ARV-771^[23]、和 ARV-825^[24]，这 3 种靶向降解剂均能很好的降解 BRD4。JQ1 是已报道的 BET 小分子抑制剂，能与 BRD 的 KAC-口袋结合，干扰 BET 与组蛋白的相互作用，影响基因的转录^[25]。Zengerle 等^[26]将小分子抑制剂 JQ1 与 E3 连接酶配体 VHL 通过不同的长度 Linker 连接得到 MZ1 和 MZ2。活性实验结果表明 MZ1 降解 BRD 蛋白效果更佳，且浓度在 1 $\mu\text{mol/L}$ 时候能降解 90% 以上的 BET 蛋白。Zengerle 等^[26]设计将 BET 抑制剂 HJB97 与沙利多胺经 5 个碳原子相连得到了 Compound 23，它能在 0.1~0.3 nmol/L 条件下，诱导 BRD2、BRD3 和 BRD4 的降解。更重要的是 Compound 23 能抑制 RS4; 11 细胞生长，其半数抑制浓度 (IC_{50}) 值可以达到 51 pmol/L 。这有可能作为治疗人类急性白血病和其他癌症的一种新疗法。BET 抑制剂的结构见图 6。

6 作用于 CDK8 的 PROTAC

CDKs 含有 13 种以上的丝氨酸 - 苏氨酸激酶。其中 CDK1-4、CDK6 和 CDK11 主要是调控细胞周期，而 CDK7-9 主要调控基因转录翻译^[27]。CDK 8 在 TGF- β 信号通路、p53 通路等致癌信号通路中起着重要作用^[28-29]。Hatcher 等^[30]在 Cortistatin A 的基础上经过 8 步反应设计合成了抑制 CDK8 效果更好的化合物 JH-VIII-49，见图 7，在 JH-VIII-49 的基础

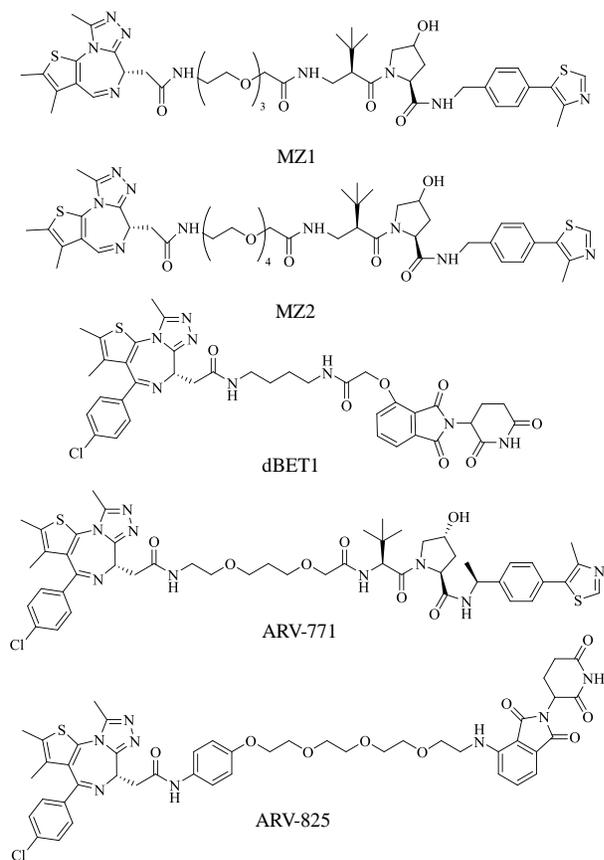


图 6 BET 抑制剂的结构

Fig. 6 Structure of BET inhibitors

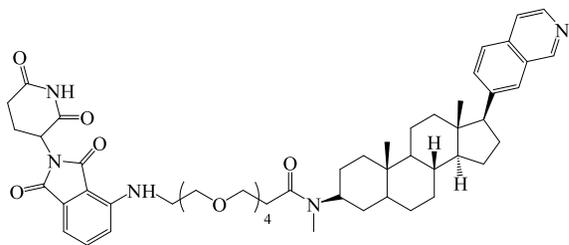


图 7 JH-XI-10-02 的结构

Fig. 7 Structure of JH-XI-10-02

上与 E3 连接酶的配体 CRBN 通过 PEG 相连得到了 JH-XI-10-02。用 1 μmol/L JH-XI-10-02 处理 Jurkat 细胞可以在 24 h 内明显观察到 CDK8 的降解。

7 结语

近年来，靶向药物逐渐成为了抗肿瘤药物的研究热点，因为靶向药物可以特定的作用于病变部位，不仅提高了药效而且减少了对人体正常组织的伤害。PROTAC 是利用泛素 - 蛋白酶体系特异性降解靶蛋白，也成为了一种靶向治疗的方法。PROTAC 理论上只要靶蛋白有特定的配体，就可以与不同的

Linker 以及 E3 连接酶配体形成靶蛋白-PROTAC-E3 泛素连接酶三元复合物，然后通过泛素 - 蛋白酶途径降解靶蛋白，PROTAC 在未来的有可能成为抗肿瘤药物的研究重点。

参考文献

- [1] 郑荣寿, 孙可欣, 张思维, 等. 2015 年中国恶性肿瘤流行情况分析 [J]. 中华肿瘤杂志, 2019, 41(1): 19-28.
- [2] Schneekloth J S, Fonseca F N, Koldobskiy M, et al. Chemical genetic control of protein levels: selective *in vivo* targeted degradation [J]. *J Am Chem Soc*, 2004, 126(12): 3748-3754.
- [3] Myung J, Kim K B, Crews C M. The ubiquitin-proteasome pathway and proteasome inhibitors [J]. *Med Res Rev*, 2001, 21(4): 245-273.
- [4] Sakamoto, K. M. Development of protacs to target cancer-promoting proteins for ubiquitination and degradation [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2003, 2(12): 1350-1358.
- [5] Lai A C, Crews C M. Induced protein degradation: an emerging drug discovery paradigm [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16(2): 101-114.
- [6] Schneekloth A R, Puchault M, Tae H S, et al. Targeted intracellular protein degradation induced by a small molecule: en route to chemical proteomics [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, 18(22): 5904-5908.
- [7] Bhasin S, Cunningham G R, Hayes F J, et al. Testosterone therapy in men with androgen deficiency syndromes: an endocrine society clinical practice guideline [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010, 95(6): 2536-2559.
- [8] Dubrovskaya A, Kim C, Elliott J, et al. A chemically induced vaccine strategy for prostate cancer [J]. *ACS Chem Biol*, 2011, 6(11): 1223-1231.
- [9] Schneekloth J S, Fonseca F N, Koldobskiy M, et al. Chemical genetic control of protein levels: selective *in vivo* targeted degradation [J]. *J Am Chem Soc*, 2004, 126(12): 3748-3754.
- [10] Han X, Wang C, Qin C, et al. Discovery of ARD-69 as a highly potent proteolysis targeting chimera (PROTAC) degrader of androgen receptor (AR) for the treatment of prostate cancer [J]. *J Med Chem*, 2019, 62: 941-964.
- [11] Achary R, Yun J I, Park C M, et al. Discovery of novel tetrahydroisoquinoline-containing pyrimidines as ALK inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2016, 24(2): 207-219.
- [12] Christensen J G, Zou H Y, Arango M E, et al. Cytoreductive antitumor activity of PF-2341066, a novel inhibitor of anaplastic lymphoma kinase and c-Met, in experimental models of anaplastic large-cell lymphoma [J]. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6(12): 3314-3322.

- [13] Zhang C, Han X R, Yang X, *et al.* Proteolysis targeting chimeras (PROTACs) of anaplastic lymphoma kinase (ALK) [J]. *Eur J Med Chem*, 2018, 151: 304-314.
- [14] Kang C H, Lee D H, Lee C O, *et al.* Induced protein degradation of anaplastic lymphoma kinase (ALK) by proteolysis targeting chimera (PROTAC) [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 505(2): 542-547.
- [15] Hu J, Hu B, Wang M, *et al.* Discovery of ERD-308 as a highly potent proteolysis targeting chimera (PROTAC) degrader of estrogen receptor (ER) [J]. *J Med Chem*, 2019, 62(3): 1420-1442.
- [16] John C, Richard R, Steven E, *et al.* Targeting BTK with Ibrutinib in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2013, 369(1): 32-42.
- [17] Buhimschi A D, Armstrong H A, Toure M, *et al.* Targeting the C481S ibrutinib-resistance mutation in Bruton's tyrosine kinase using PROTAC-mediated degradation [J]. *Biochemistry*, 2018, 57(26): 3564-3575.
- [18] Sun Y, Zhao X, Ding N, *et al.* PROTAC-induced BTK degradation as a novel therapy for mutated BTK C481S induced ibrutinib-resistant B-cell malignancies [J]. *Cell Res*, 2018, 28(7): 779-781.
- [19] Gallenkamp D, Gelato K A, Haendler B, *et al.* Bromodomains and their pharmacological inhibitors [J]. *Chem Med Chem*, 2014, 9(3): 438-464.
- [20] Zuber J, Shi J, Wang E, *et al.* RNAi screen identifies Brd4 as a therapeutic target in acute myeloid leukaemia [J]. *Nature*, 2011, 478(7370): 524-528.
- [21] Baratta M G, Schinzel A C, Zwang Y, *et al.* An in-tumor genetic screen reveals that the BET bromodomain protein, BRD4, is a potential therapeutic target in ovarian carcinoma [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(1): 232-237.
- [22] Winter G E, Buckley D L, Paulk J, *et al.* Phthalimide conjugation as a strategy for *in vivo* target protein degradation [J]. *Science*, 2015, 348(6241): 1376-1381.
- [23] Raina K, Lu J, Qian Y, *et al.* PROTAC-induced BET protein degradation as a therapy for castration-resistant prostate cancer [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(26): 7124-7129.
- [24] Lu J, Qian Y, Altieri M, *et al.* Hijacking the E3 ubiquitin ligase cereblon to efficiently target BRD4 [J]. *Chem Biol*, 2015, 22(6): 755-763.
- [25] Boi M, Gaudio E, Bonetti P, *et al.* The BET bromodomain Inhibitor OTX015 affects pathogenetic pathways in preclinical B-cell tumor models and synergizes with targeted drugs [J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(7): 1628-1638.
- [26] Zengerle M, Chan K H, Ciulli A. Selective small molecule induced degradation of the BET bromodomain protein BRD4 [J]. *ACS Chem Biol*, 2015, 10(8): 1770-1777.
- [27] Allen B L, Taatjes D J. The mediator complex: a central integrator of transcription [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2015, 16(3): 155-166.
- [28] Claudio Alarcón, Zaromytidou A I, Xi Q, *et al.* Nuclear CDKs drive Smad transcriptional activation and turnover in BMP and TGF- β pathways [J]. *Cell*, 2009, 139(4): 757-769.
- [29] Donner A J, Szostek S, Hoover J M, *et al.* CDK8 is a stimulus-specific positive coregulator of p53 target genes [J]. *Mol Cell*, 2007, 27(1): 121-133.
- [30] Hatcher J M, Wang E, Johannessen L, *et al.* Development of highly potent and selective steroidal inhibitors and degraders of CDK8. [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2018, 9(6): 540-545.