

蛋白质降解技术

高杰克, 李晨帆, 方成涛, 张敏*

浙江师范大学, 化学与生命科学学院, 浙江 金华

收稿日期: 2021年12月30日; 录用日期: 2022年1月12日; 发布日期: 2022年2月14日

摘要

由于小分子药物通过占据驱动抑制蛋白水平的局限性, 越来越多的蛋白质降解技术得到了发展, 这些降解技术通过降解靶标蛋白的方式调控蛋白质水平, 它们的出现, 为肿瘤等疾病治疗提供了潜在的策略。

关键词

蛋白质降解

Protein Degradation Technology

Jieke Gao, Chenfan Li, Chengtao Fang, Min Zhang*

College of Chemistry and Life Science, Zhejiang Normal University, Jinhua Zhejiang

Received: Dec. 30th, 2021; accepted: Jan. 12th, 2022; published: Feb. 14th, 2022

Abstract

Due to the limitations of small molecule drugs to control protein levels by occupancy drive, an increasing number of protein degradation technologies have been developed that modulate protein levels by degrading target proteins, and their emergence offers potential strategies for the treatment of diseases such as oncology.

Keywords

Protein Degradation

*通讯作者。



1. 简介

虽然随着人类基因测序的完成,人们了解到了许多新蛋白质靶点与疾病的关联性,并且确定了许多高亲和力的小分子药物调控目标蛋白的活性[1]。这是通过占用驱动的方式发生的,抑制剂与其目标结合并占用结合部位,从而抑制目标功能。[2]然而,大多数蛋白质仍然难以解决,由于缺乏可用的结合口袋和合适的化学物质,使得80%~85%的人类蛋白质组无法药物治疗。此外小分子药物通常需要较高的浓度来占据结合位点,而高浓度的药物经常会带来脱靶毒性,因而对小分子抑制剂的设计带来了极大的困难。[3]

然而,近些年靶向蛋白降解(Targeted protein degradation, TPD)技术的出现,为化学生物学和药物发现带来了诸多机遇。靶向蛋白质降解通过劫持内源性蛋白质降解机制诱导疾病蛋白质的消耗或减少,提供了一种新的治疗选择。[4] TPD有可能针对限制当前无法“下药”的靶点进行降解,因为仅需要靶标蛋白配体作为弹头结合靶标蛋白,并通过自身双功能小分子来募集靶蛋白用于降解而不仅仅是高亲和力抑制剂。除了它们的治疗潜力之外,蛋白质降解物是有价值的化学生物学工具,用于验证靶标并更深入地了解蛋白质功能和细胞途径。目前 TDP 领域发展最为成熟的是基于泛素化-蛋白酶体系统降解途径的蛋白水解靶向嵌合体(proteolysis-targeting chimera, PROTAC)技术,并且已经进入了临床实验。但随后的机制研究表明,PROTAC 技术降解局限于胞内靶点。因而针对于此,溶酶体靶向嵌合体(lysosome-targeting chimera, LYTAC)等随着出现。靶向蛋白质降解技术在多种疾病领域如恶性肿瘤、神经退行性疾病等具有广阔的应用前景和发展空间。本文将简述几类蛋白质降解技术的作用机制和特点,介绍其新兴技术的研究现状、优势和存在的问题。

2. 各种降解的技术

蛋白质降解是调控细胞内固有的维持蛋白质稳态的重要机制,其中泛素-蛋白酶体系统和溶酶体途径是细胞内蛋白质降解的两个主要途径。其中进入临床的 PROTAC 技术(基于泛素-蛋白酶体系统)格外引人注目,由于其只能降解胞内的蛋白,LYTAC 技术(基于溶酶体途径)弥补了 PROTAC 降解范围的局限性。[5]此外,还有其他不同的降解技术正不断地涌现例如疏水标签技术(hydrophobic tagging, HyT)、自噬体技术等。

2.1. PROTAC 技术

PROTACs 于 2001 年被首次报道作为人工靶向泛素连接酶复合物 Skp1-Cullin-F box 的嵌合体分子。[6]起初,PROTACs 被认为仅仅是一种学术行为,或者正如 Craig Crews 所说的“cute chemical curiosity”。近二十年后的今天,随着 Crews 课题组针对 AR 的 PROTACs 进入了临床研究,PROTACs 被认为是一种新的药物发现方式。[7] PROTACs 的运行机制主要是通过泛素-蛋白酶体系统(the ubiquitin-proteasome system, UPS),UPS 是真核细胞中细胞内蛋白质降解的主要途径之一。真核细胞中的蛋白质被泛素标记后可以被 26S 蛋白酶体识别并降解。[8]蛋白质的泛素化由 E1、E2 和 E3 泛素化酶级联进行。E1 酶通过 ATP 使泛素 C 端腺苷酸化来激活泛素,一旦形成活化的泛素硫酯泛素就通过硫酯转移与 E2 酶结合,接下来 E2 酶与 E3 连接酶结合。根据 E3 连接酶的种类,泛素接下来直接从 E2 转移到底物表面的赖氨酸上,或者从 E2 转移到 E3 再转移到底物。泛素含有 7 个赖氨酸残基(K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63),从而允

许 E3 连接酶反复进行泛素化以形成多聚泛素链。K48 位点连接的多聚泛素化后的蛋白质能够被 26S 蛋白酶体识别并进一步降解。PROTACs 是一个双功能小分子，其一端是结合目标蛋白的配体，另一端是与泛素化相关的 E3 连接酶配体中间通过 linker 连接形成的三元复合物。[9] PROTACs 结合目标蛋白，通过 E3 连接酶配体拉近与 E3 连接酶距离，从而导致泛素化，随后被 26S 蛋白酶体识别和降解(图 1)。[10]在完成对靶蛋白的泛素化标记后，PROTAC 可脱离靶蛋白和 E3 连接酶，实现在细胞内循环利用。[11]在 PROTAC 诱导靶蛋白降解的过程中，“靶蛋白-PROTAC-E3 泛素连接酶”三元复合物的形成作为一个核心生物学事件，是 PROTAC 对靶蛋白进行多泛素化修饰中必经的步骤。对于 PROTAC 诱导降解效率而言，形成三元复合物的稳定性远比 PROTAC 分子与靶蛋白或是 E3 泛素酶结合的牢固程度重要。实验发现，p38 α -PROTAC-VHL，一种稳定的 PROTAC 分子，可以成功诱导靶蛋白降解；相比之下，而对对照实验中的 PROTAC 分子单独引入具有高结合力的靶蛋白配体，未能诱导三元复合物的形成，没有得到良好的降解效果。[12]此外，在王少萌教授针对 AR 的 PROTAC 降解剂的研究中发现，PROTAC 的连接链长度变化时，会对靶蛋白和 E3 酶间的相互作用产生正面或负面的影响，过短的连接链会限制两者接近的构象，而过长的连接链则可能会导致 PROTAC 分子的自抑制作用。更重要的是，改变 E3 连接酶配体的结构也会影响 PROTAC 的降解能力。[13]由于 PROTACs 可以在细胞内循环利用，因而其可以在亚化学计量水平下诱导靶蛋白泛素和蛋白酶体降解靶蛋白，具体表现为在纳摩尔(nM)浓度下将蛋白质水平降低 90%以上，这对于利用占有驱动力的模型是不可能实现的。此外，在 PROTAC 介导的受体酪氨酸激酶(RTK)降解的最新研究中，进一步证明了降解优于蛋白质抑制，包括即使在清除 PROTAC 之后，也能持续地减少下游信号和保持反应活性时间[14]。与经典的高受体占用依赖性药物相比，PROTACs 的长期生物学效应和不同的下游信号传导具有显著优势。目前报道的 PROTACs 的分子量基本在 800 以上，不太符合小分子细胞通透性的指标。尽管 PROTACs 的分子量相对较大，但只要它能维持足够的细胞内浓度，再与催化机制相结合，就可以成功将蛋白降解。目前对于 PROTACs 透膜进入细胞的机制尚不清楚，但细胞渗透的现象出现，表明这可能是一个被动过程。总的来说，蛋白降解是一个非常令人兴奋的领域，可能会彻底改变药物的发现。[15]并且随着 Crews 课题组针对 AR 的 PROTAC 小分子 ARV-110 进入了临床研究，并表现除了较好的治疗肿瘤疾病的效果，Protac 这一蛋白质降解技术已经展现出了治疗肿瘤等疾病的能力，并成为一种可模块化的技术可以针对其他致病蛋白提供治疗策略。

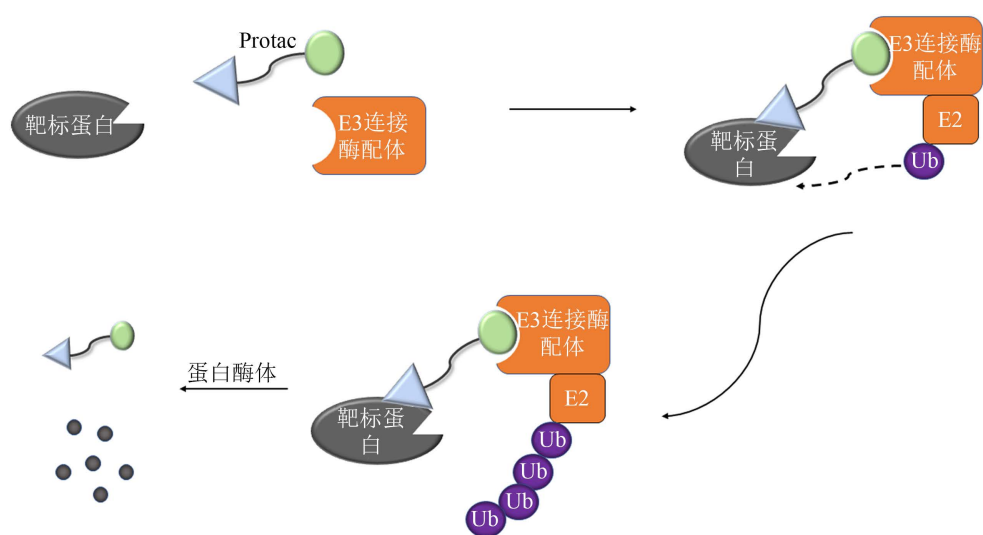


Figure 1. Mechanism of PROTAC degradation of target proteins
图 1. PROTAC 降解靶标蛋白机制图

2.2. LYTAC 技术

PROTACs 已经被广泛证明可靶向降解细胞内蛋白, 而且从 Arvinas 公布的 ARV-110 和 ARV-471 临床数据表明 PROTACs 具备良好的体内安全性。但 PROTACs 却只能降解细胞内的蛋白质, 而细胞外蛋白质和膜相关蛋白占蛋白质编码基因产物的 40%, 为了打开这些限制, 并将蛋白质降解的范围扩大到细胞外靶位, LYTAC 被开发出来。[5] LYTAC 可将质膜相关或分泌的蛋白质结合并导向溶酶体, 通过内吞 - 溶酶体途径, 降解胞外蛋白与跨膜蛋白。

2020 年, Carolyn Bertozzi 课题组在 Nature 上首次提出降解细胞外蛋白的溶酶体靶向嵌合体(LYTAC)概念, 初代的 LYTACs 通过将目标蛋白与低聚甘露糖-6-磷酸短肽连接来靶向细胞外和膜蛋白进行降解, 甘露糖-6-磷酸受体(CI-M6PR)是一种跨膜糖蛋白, 也是溶酶体靶向受体(LTRs)家族中的代表性受体, 90% 在细胞膜和高尔基体之间循环, 10% 处于细胞膜, 可介导蛋白质向溶酶体转运, 当目标蛋白被 6 磷酸甘露糖(M6P)修饰后, 就可能被 CI-M6PR 识别并转运至溶酶体中降解(图 2)。[16]通过初代 LYTAC, 成功实现了载脂蛋白(Apoprotein E4)、表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)、和程序性细胞死亡蛋白-1 (programmed death-1, PD-1)的降解, 证明了 LYTAC 成为模块化降解技术的可能性。第一代 LYTAC 招募的是 CI-M6PR, 第二代在第一代的基础上进一步探索了其他溶酶体靶向受体的可能性, 并采用了肝脏特异性摄取受体, 即抗去唾液酸糖蛋白受体(ASGPR)。通过将 ASGPR 的配体和 EGFR 的抗体 ct_x 偶联, 成功实现了肝细胞特异性的 EGFR 的降解, 且不会造成肝脏细胞毒性。[17]与此同时, Tang 的课题组也报道了相关 GalNAc-LYTAC 的研究, 该课题组通过将 tri-GalNAc 与抗体片段偶联合成 LYTAC 分子, 成功降解肝脏细胞的胞外蛋白鼠抗兔 IgG-647、鼠抗生物素 IgG-647 与膜蛋白 EGFR。[18]此外, 该课题组发现在几种情况下, 较小的络合物表现出较高的摄取效率。[19]因此, 除了连接子的长度、连接子的类型、受体和蛋白靶的结合亲和力等已知因素外, 复合物的尺寸可能是优化 GalNAc 介导的胞外蛋白溶酶体降解的一个额外参数。

LYTAC 技术打破了 PROTAC 等蛋白质降解技术仅降解胞内蛋白的限制, 拓宽了靶向蛋白质降解技术的应用空间, 但是目前 LYTAC 技术仍存在问题和挑战: 理论上 LYTAC 和靶标的结合是由 pH 调控的, 当 pH 降低时, LYTAC 得到释放, 可从新参与多轮靶标的降解, 具备催化性。然而, 目前基于 CI-M6PR 的 LYTAC 技术, 其 CI-M6PR 与抗体的偶联方式是非特异性的, 其次其非特异性糖基修饰的抗体在小鼠体内会很快被清除, LYTAC 与蛋白解离后是否可以再次循环降解蛋白有待进一步研究。[16]此外, 只有当 EGFR 的抗原表位保持完整, 抗体可以结合靶点, LYTAC 才能发挥作用, 但如果突变阻碍了 EGFR 抗原表位, 或许会对 LYTAC 出现抗性。最后, 目前已被报道的 LYTAC 主要是抗体类大分子, 小分子类 LYTAC 仍有待开发。综上 LYTAC 弥补了 PROTACs 降解范围上的局限性, 进一步地将蛋白质降解的概念扩大到了细胞外并取得了较好的降解效果, 相信这些降解蛋白的手段能够为人类的疾病治疗提供潜在的治疗策略。

2.3. 其他蛋白质降解技术

除了上述提到的两种蛋白质降解技术之外, 目前已经有许多的蛋白质降解技术也被开发了出来。例如基于自噬 - 溶酶体途径的蛋白质降解, 类似 PROTACs, 通过将靶标蛋白泛素化从而导致降解的发生, 但不同的是, 它是通过溶酶体的方式而 PROTACs 是通过蛋白酶体的方式实现的降解。[20]此外, 在 2014 年被 Crews 课题组提出的 HyT 技术也实现了靶标蛋白的降解, 其可能的机制是通过表面的疏水标签造成靶标蛋白失稳, 从而错误折叠, 之后被伴侣蛋白识别而被蛋白酶体降解。[21] Gao 等人通过疏水标签技术实现了对 TDP 和 Tau 蛋白的降解[22] [23], 成功地跨越了血脑屏障, 并且对于大脑皮层的靶标蛋白都

产生了不同程度的降解,这可能意味着针对于脑内等蛋白靶点的时候 HyT 技术可能更为合适,因为其具有较少的氢键受体/供体和较低的分子量。[24]

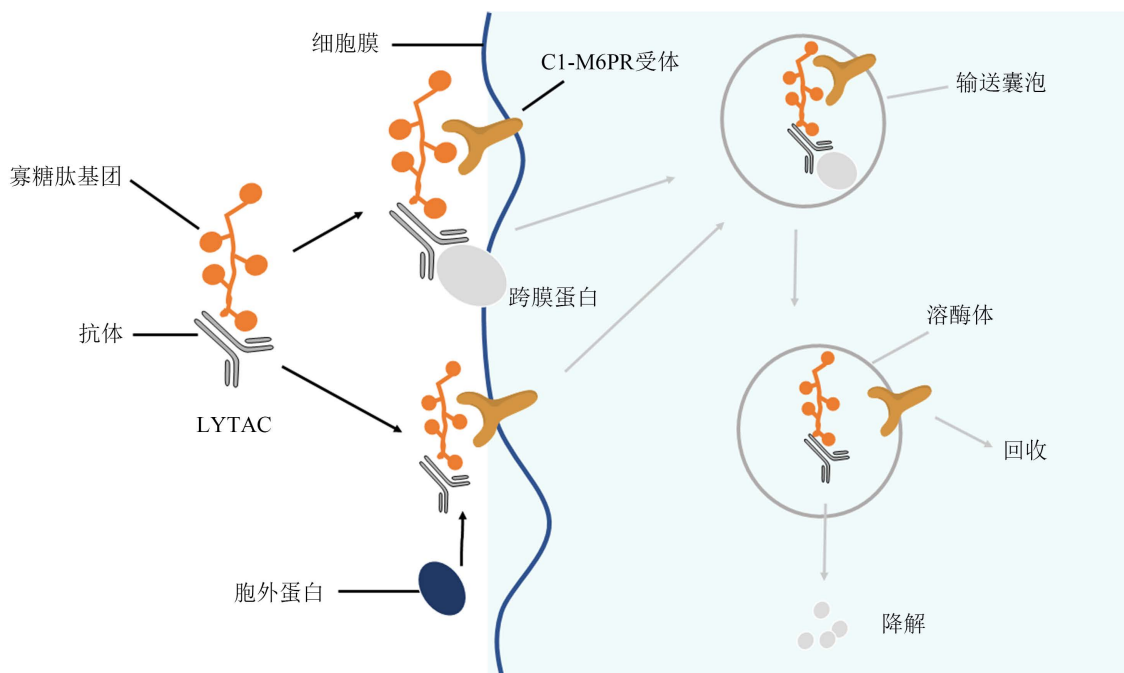


Figure 2. Mechanism of target protein degradation by LYTAC

图 2. LYTAC 降解靶标蛋白机制图

3. 总结

过去, 药物开发依赖于“占用驱动”的模式, 即通过持续占据靶蛋白结合位点产生药理作用, 因此, 在耐受剂量下高亲和力配体对特定生物活性是必要的。以 PROTAC 和 LYTAC 为代表的靶向蛋白降解技术, 以高度选择性和有效的方式控制蛋白质的水平, 并且针对之前一些不可“下药”的靶点实现了降解, 在化学生物学和药物发现领域引起了极大的兴趣。并且 PROTAC 已经进入了临床性的研究。尽管这些蛋白质降解技术都一定的问题, 但随着技术的不断进步, 它们为肿瘤治疗提供潜在的治疗策略。

参考文献

- [1] Lai, A.C. and Crews, C.M. (2017) Induced Protein Degradation: An Emerging Drug Discovery Paradigm. *Nature Reviews Drug Discovery*, **16**, 101-114. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.211>
- [2] Gong, L., Cui, D., Xiong, X. and Zhao, Y. (2020) Targeting Cullin-RING Ubiquitin Ligases and the Applications in PROTACs. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **1217**, 317-347. https://doi.org/10.1007/978-981-15-1025-0_19
- [3] Dang, C.V., Reddy, E.P., Shokat, K.M. and Soucek, L. (2017) Drugging the “Undruggable” Cancer Targets. *Nature Reviews. Cancer*, **17**, 502-508. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.36>
- [4] Cromm, P.M. and Crews, C.M. (2017) Targeted Protein Degradation: from Chemical Biology to Drug Discovery. *Cell Chemical Biology*, **24**, 1181-1190. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2017.05.024>
- [5] Caianiello, D.F., Zhang, M., Ray, J.D., Howell, R.A., Swartzel, J.C., Branham, E.M.J., Chirkin, E., Sabbasani, V.R., Gong, A.Z., McDonald, D.M., Muthusamy, V. and Spiegel, D.A. (2021) Bifunctional Small Molecules That Mediate the Degradation of Extracellular Proteins. *Nature Chemical Biology*, **17**, 947-953. <https://doi.org/10.1038/s41589-021-00851-1>
- [6] Sakamoto, K.M., Kim, K.B., Kumagai, A., Mercurio, F., Crews, C.M. and Deshaies, R.J. (2001) Protacs: Chimeric

- Molecules That Target Proteins to the Skp1-Cullin-F Box Complex for Ubiquitination and Degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**, 8554-8559. <https://doi.org/10.1073/pnas.141230798>
- [7] Scudellari, M. (2019) Protein-Slaying Drugs Could Be the Next Blockbuster Therapies. *Nature*, **567**, 298-300. <https://doi.org/10.1038/d41586-019-00879-3>
- [8] Hershko, A. and Ciechanover, A. (1998) The Ubiquitin System. *Annual Review of Biochemistry*, **67**, 425-479. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.425>
- [9] Maniaci, C. and Ciulli, A. (2019) Bifunctional Chemical Probes Inducing Protein-Protein Interactions. *Current Opinion in Chemical Biology*, **52**, 145-156. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.07.003>
- [10] Bond, M.J. and Crews, C.M. (2021) Proteolysis Targeting Chimeras (PROTACs) Come of Age: Entering the Third Decade of Targeted Protein Degradation. *RSC Chemical Biology*, **2**, 725-742. <https://doi.org/10.1039/D1CB00011J>
- [11] Flanagan, J.J. and Neklesa, T.K. (2019) Targeting Nuclear Receptors with PROTAC Degraders. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **493**, Article ID: 110452. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.110452>
- [12] Chan, K.H., Zengerle, M., Testa, A. and Ciulli, A. (2018) Impact of Target Warhead and Linkage Vector on Inducing Protein Degradation: Comparison of Bromodomain and Extra-Terminal (BET) Degraders Derived from Triazolodiazepine (JQ1) and Tetrahydroquinoline (I-BET726) BET Inhibitor Scaffolds. *Journal of Medicinal Chemistry*, **61**, 504-513. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01912>
- [13] Han, X., Wang, C., Qin, C., Xiang, W., Fernandez-Salas, E., Yang, C.Y., Wang, M., Zhao, L., Xu, T., Chinnaswamy, K., Delproposito, J., Stuckey, J. and Wang, S. (2019) Discovery of ARD-69 as a Highly Potent Proteolysis Targeting Chimera (PROTAC) Degradar of Androgen Receptor (AR) for the Treatment of Prostate Cancer. *Journal of Medicinal Chemistry*, **62**, 941-964. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01631>
- [14] Burslem, G.M., Smith, B.E., Lai, A.C., Jaime-Figueroa, S., McQuaid, D.C., Bondeson, D.P., Toure, M., Dong, H., Qian, Y., Wang, J., Crew, A.P., Hines, J. and Crews, C.M. (2018) The Advantages of Targeted Protein Degradation Over Inhibition: An RTK Case Study. *Cell Chemical Biology*, **25**, 67-77.e3. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2017.09.009>
- [15] Konstantinidou, M., Li, J., Zhang, B., Wang, Z., Shaabani, S., Ter Brake, F., Essa, K. and Domling, A. (2019) PROTACs—A Game-Changing Technology. *Expert Opinion on Drug Discovery*, **14**, 1255-1268. <https://doi.org/10.1080/17460441.2019.1659242>
- [16] Banik, S.M., Pedram, K., Wisnovsky, S., Ahn, G., Riley, N.M. and Bertozzi, C.R. (2020) Lysosome-Targeting Chimaeras for Degradation of Extracellular Proteins. *Nature*, **584**, 291-297. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2545-9>
- [17] Ahn, G., Banik, S.M., Miller, C.L., Riley, N.M., Cochran, J.R. and Bertozzi, C.R. (2021) LYTACs That Engage the Asialoglycoprotein Receptor for Targeted Protein Degradation. *Nature Chemical Biology*, **17**, 937-946. <https://doi.org/10.1038/s41589-021-00770-1>
- [18] Zhou, Y., Teng, P., Montgomery, N.T., Li, X. and Tang, W. (2021) Development of Triantennary N-Acetylgalactosamine Conjugates as Degraders for Extracellular Proteins. *ACS Central Science*, **7**, 499-506. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.1c00146>
- [19] García De La Torre, J., Huertas, M.L. and Carrasco, B. (2000) Calculation of Hydrodynamic Properties of Globular Proteins from Their Atomic-Level Structure. *Biophysical Journal*, **78**, 719-730. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76630-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76630-6)
- [20] Takahashi, D., Moriyama, J., Nakamura, T., Miki, E., Takahashi, E., Sato, A., Akaike, T., Itto-Nakama, K., Arimoto, H. (2019) AUTACs: Cargo-Specific Degraders Using Selective Autophagy. *Molecular Cell*, **76**, 797-810.e10. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.09.009>
- [21] Xie, T., Lim, S.M., Westover, K.D., Dodge, M.E., Ercan, D., Ficarro, S.B., Udayakumar, D., Gurbani, D., Tae, H.S., Riddle, S.M., Sim, T., Marto, J.A., Jänne, P.A., Crews, C.M. and Gray, N.S. (2014) Pharmacological Targeting of the Pseudokinase Her3. *Nature Chemical Biology*, **10**, 1006-1012. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1658>
- [22] Gao, N., Chu, T.-T., Li, Q.-Q., Lim, Y.-J., Qiu, T., Ma, M.-R., Hu, Z.-W., Yang, X.-F., Chen, Y.-X., Zhao, Y.-F. and Li, Y.-M. (2017) Hydrophobic Tagging-Mediated Degradation of Alzheimer's Disease Related Tau. *RSC Advances*, **7**, 40362-40366. <https://doi.org/10.1039/C7RA05347A>
- [23] Gao, N., Huang, Y.-P., Chu, T.-T., Li, Q.-Q., Zhou, B., Chen, Y.-X., Zhao, Y.-F. and Li, Y.-M. (2019) TDP-43 Specific Reduction Induced by Di-Hydrophobic Tags Conjugated Peptides. *Bioorganic Chemistry*, **84**, 254-259. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.11.042>
- [24] Luh, L.M., Scheib, U., Juenemann, K., Wortmann, L., Brands, M. and Cromm, P.M. (2020) Prey for the Proteasome: Targeted Protein Degradation—A Medicinal Chemist's Perspective. *Angewandte Chemie International Edition*, **59**, 15448-15466. <https://doi.org/10.1002/anie.202004310>