

生化与药用试剂

疏水标签靶向蛋白降解剂的应用进展

余思琦¹, 王京², 王琴², 张磊^{*1,2}

(1. 遵义医科大学 药学院, 贵州 遵义 563006;

2. 凯里学院 大健康学院 黔东南苗侗药现代化研究重点实验室, 贵州 凯里 556011)

摘要:近年来,靶向蛋白降解技术蓬勃发展,其能够选择性且有效地触发目标蛋白质的降解,有望克服传统药物研发技术的瓶颈问题,挑战“难成药”靶点,为靶向药物领域提供新的治疗策略。这种新颖的方法相比常规小分子抑制剂具有多种优势,如低剂量、高选择性、克服耐药性等优点。靶向蛋白质降解策略包括分子胶、蛋白水解靶向嵌合体和基于疏水标签的降解剂等。与其他的靶向蛋白降解剂相比,疏水标签蛋白降解剂是通过模拟蛋白错误折叠而被蛋白酶体识别并降解,但是具体的降解机制还有待进一步研究。目前不同结构的疏水标签被报道,例如金刚烷、Boc₃Arg、降冰片烯、苝、茱、碳硼烷等,而且疏水标签降解剂优异的成药性与可设计性,已广泛应用于多个研究领域。但现有的疏水标签在诸多方面存在的问题,仍存在理化性质差、易被消除、生物利用度较低、降解效率不高等缺点,对疏水标签降解剂的发展形成了一定阻碍。因此主要介绍了近年来疏水标签降解剂在药物研发领域中的应用进展,希望为未来靶向蛋白降解剂的研发提供有价值的参考。

关键词:疏水标签;靶向蛋白降解;靶向药物;药物研发;蛋白酶

中图分类号: O66 **文献标识码:** A **文章编号:** 0258-3283(2025)04-0033-10

DOI: 10.13822/j.cnki.hxsj.2024.0490

Advances in the Application of Hydrophobic Label-targeted Protein Degradation Agents YU Si-qi¹, WANG Jing², WANG Qin², ZHANG Lei^{*1,2} (1. School of Pharmacy, Zunyi Medical University, Zunyi 563006, China; 2. Key Laboratory for Modernization of Qiandongnan Miao & Dong Medicine, School of Life and Health Science, Kaili University, Kaili 556011, China)

Abstract: In recent years, targeted protein degradation technology has developed vigorously, which can selectively and effectively trigger the degradation of target proteins. It is expected to overcome the bottleneck of traditional drug development technology, challenge “undruggable” targets, and provide new therapeutic strategies for the field of targeted drugs. This novel approach has several advantages over conventional small molecule inhibitors, such as low dose, high selectivity, and overcoming drug resistance. Targeted protein degradation strategies include molecular glues, proteolytic targeting chimeras, and hydrophobic tag degraders. Compared with other targeted protein degraders, hydrophobic tag protein degraders are recognized and degraded by the proteasome by mimicking protein misfolding, but the specific degradation mechanism needs to be further studied. At present, hydrophobic tags with different structures have been reported, such as adamantane, Boc₃Arg, norbornene, pyrene, fluorene, carborane, etc. Among them, hydrophobic tag has various applications due to its druggability and designability compared with other targeted protein degradation molecules. However, the existing hydrophobic labels still have the shortcomings of poor physical and chemical properties, easy elimination, low bioavailability, and low degradation efficiency, which hinder the development of hydrophobic label degraders. The recent applications of hydrophobic tag degraders in drug development were highlighted, which might provide valuable information for the future research and development of targeted protein degraders.

Key words: hydrophobic tag; targeted protein degradation; targeted drug; drug discovery; proteasome

靶向蛋白降解技术 (Targeted protein degradation, TPD) 是针对难以成药靶点的一种药物开发策略。相较于传统的抑制剂,它在剂量、副作用和靶向“不可成药”蛋白等方面,具备潜在优势^[1]。这种技术能够特异性识别目标蛋白,并利用细胞内固有的蛋白降解途径直接降解致病靶蛋白,从

收稿日期: 2024-12-18; 修回日期: 2025-02-05

基金项目: 黔科合基础项目 (ZK (2023) 499)。

作者简介: 余思琦 (2000-), 女, 四川广元人, 硕士生, 主要研究方向为药物化学。

通讯作者: 张磊, E-mail: lei_chang@yeah.net。

而用于克服小分子药物的耐药性和副作用等缺点。TPD 的降解系统可分为两种:泛素-蛋白酶体系统 (Ubiquitin-proteasome system, UPS) 与自噬-溶酶体系统 (Autophagy-lysosome system, ALS), 这是细胞内两大关键的蛋白质降解途径。目前, 基于 UPS 系统的降解剂已成功应用于“难以成药”靶蛋白^[2]。泛素-蛋白酶体系统作为细胞内重要的蛋白质降解机制, 负责维持蛋白质的稳态, 清除不再需要或已受损的蛋白质。而自噬-溶酶体系统通过自噬作用将细胞内的废弃物、受损的细胞器及不再需要的蛋白质包裹在自噬小体中, 将其送入溶酶体内进行降解, 但其背后复杂的分子机制仍有待进一步探索。

目前, 基于蛋白降解的药物开发策略主要包括: 蛋白水解靶向嵌合体 (Proteolysis targeting chimeras, PROTAC)、分子胶 (Molecular glue)、疏水标签 (Hydrophobic tag, HyT)、自噬靶向嵌合体 (Autophagy-targeting chimeras, AUTACs)、溶酶体靶向嵌合体 (Lysosome-targeting chimeras, LYTACs)、自噬小体绑定化合物 (Autophagosome tethering compound, ATTEC) 等^[3]。其中, 疏水标签蛋白降解剂因其优异的成药性与可设计性, 已广泛应用于多个靶标蛋白降解。本文着重阐述近年来疏水标签降解剂于药物研发领域的应用进展情况。

1 疏水标签降解剂的设计及优势

2011 年, Neklesa 等^[4]首次提出疏水标签技术的概念, 成功设计合成了结合 HaloTag 蛋白的双功能化合物 1, 它由一个金刚烷基团、一个聚乙二醇连接子和一个氯烷烃连接体组成 (图 1), 可以特异性和不可逆地结合 HaloTag 蛋白, 成功抑制了小鼠肿瘤的增殖。自此, 基于疏水标签的靶向蛋白质降解技术备受关注。诸多报道显示, 疏水标签降解剂在蛋白质高效降解及药代动力学特性方面表现卓越, 有力推动了人们对此技术的探索兴趣。

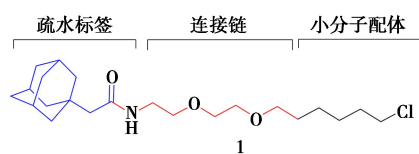


图 1 化合物 1 的结构

Fig.1 Structure of compound 1

疏水标签降解剂是双功能靶向蛋白降解分子, 由疏水标签和靶蛋白的小分子配体通过 linker

连接组成^[5]。疏水标签降解剂只需将简单的疏水标签连接到靶蛋白的配体结构上, 无需考虑疏水标签与其他蛋白质的结合情况, 连接子长度与刚性对活性影响小, 这大大降低了设计的难度, 而不同疏水标签对降解活性影响显著。目前存在多种疏水基团, 常用的包括金刚烷和精氨酸衍生物, 其他化合物降冰片烯、芴和茈也能促进目标蛋白降解, 如图 2 所示^[6]。疏水标签技术虽长期遭忽视, 却不失为一种有前途的设计策略。其在解决耐药性及降低副作用方面优势显著, 为突破传统药物局限提供良策。靶向蛋白降解的主流技术里, PROTAC 与分子胶均存在一定局限。相较 PROTAC, 疏水标签降解剂往往分子量更低, 在成药方面更具优势。同时, PROTAC 中沙利度胺基团可能具有致畸风险, 而疏水标签降解剂的毒性风险较低。对比分子胶, 疏水标签设计原则更加简单明确^[6]。

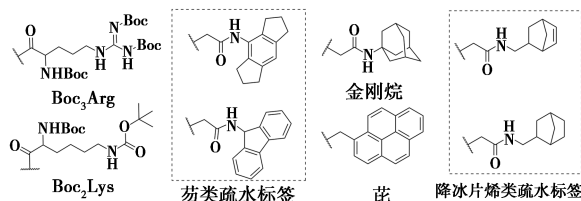


图 2 常用疏水基团的结构^[6]

Fig.2 Structures of common hydrophobic tags^[6]

2 疏水标签降解剂的降解机制

疏水标签可以破坏目标蛋白的稳定性或模拟部分未展开蛋白状态, 从而通过直接募集内源性伴侣蛋白或蛋白酶体介导降解^[7]。HyT 的降解机制尚未完全阐明, 但目前 HyT 促进蛋白质降解有两种假说模式^[8,9]。模式一认为, 疏水基团破坏靶蛋白的稳定性, 导致热休克蛋白 (如 Hsp70 等) 结合靶蛋白并诱导 UPS 介导的降解; 模式二认为, 伴侣分子直接识别疏水标签并触发 UPS 介导的降解。

3 疏水标签降解剂的应用实例

目前, 多种基于不同类型疏水标签的降解剂已被报道。本文将系统介绍使用不同疏水标签的 HyT 分子在癌症、自身免疫性疾病等疾病中的发展历程和特点, 简要阐述其疏水标签的选择方法及具体的设计理念。

3.1 基于金刚烷疏水标签的降解剂

金刚烷是一种具有良好疏水性的笼状化合

物,在许多疏水标签降解剂中被广泛用作疏水标签,是设计药物分子的重要组成部分。金刚烷基团在药物化学领域中极具价值,其高亲脂性能够有效提升渗透性、亲和力以及生物相容性^[7]。

3.1.1 GPX4 降解剂

谷胱甘肽过氧化物酶 4 (Glutathione peroxidase 4, GPX4) 在维持细胞氧化还原平衡和保护细胞免于铁死亡中起重要作用^[10]。因此,抑制 GPX4 被视为诱导铁死亡、治疗耐药性癌症的潜在靶点。已报道的 GPX4 抑制剂包括化合物 2 (ML210) 和化合物 3 (RSL3) (图 3) 等^[11]。

Li 等^[12]报道了基于化合物 2 的疏水标签降解剂。通过蛋白晶体结构分析,化合物 2 的氯苯基部分暴露于溶剂,可连接疏水标签。以 PEG 链为连接子,连接金刚烷基团得到了降解剂化合物 4 (图 3)。在人纤维肉瘤 HT1080 细胞中,化合物 4 能够抑制其生长,IC₅₀ 值为 0.13 $\mu\text{mol/L}$,并能通过 UPS 及 ALS 途径降解 GPX4 蛋白,DC₅₀ 值为 0.058 $\mu\text{mol/L}$ 。Ning 等^[13]报道了基于化合物 3 的疏水标签降解剂的设计合成与鉴定。通过 GPX4 复合物中的结合模型分析,化合物 3 的苯甲酸甲酯部分引入疏水标签金刚烷,烷烃链为连接臂得到疏水标签降解剂化合物 5 (图 3)。结果表明,降解剂化合物 5 通过 UPS 途径诱导 GPX4 降解,在人纤维肉瘤 HT1080 细胞,0.05 和 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下,降解率分别达到 47% 和 78%,DC₅₀ 值为 0.019 $\mu\text{mol/L}$ 。研究表明,降解剂化合物 4 是一类有效的、有前途的 GPX4 降解物,具有通过诱导铁死亡治疗耐药肿瘤的巨大潜力。

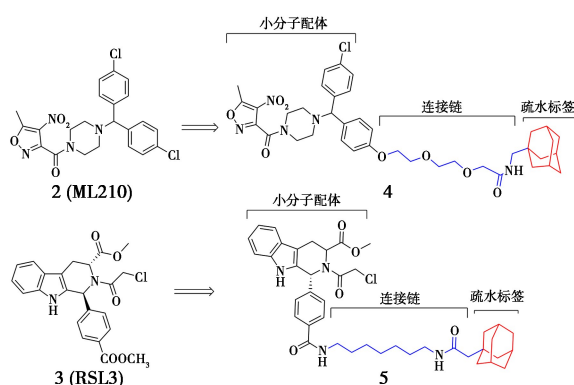


图 3 化合物 2~5 的结构

Fig.3 Structures of compounds 2~5

3.1.2 Gli1 降解剂

Hedgehog 信号通路在调控胚胎发育、组织稳态、组织再生和干细胞维持中发挥重要作用^[14]。

神经胶质瘤相关癌基因锌指蛋白 (Glioma-associated oncogene 1, Gli1) 是 Hedgehog 通路的下游转录因子, Gli1 的异常激活与多种肿瘤的耐药性、侵袭性和转移性密切相关^[15]。因此,抑制 Gli1 是一种有效的抗肿瘤途径。目前,直接靶向 Gli1 的小分子抑制剂有化合物 6 (GANT61) 等 (图 4)^[16]。

Li 等^[17]报道了基于 Gli1 抑制剂化合物 6 的结构,对其进行优化,并引入不同疏水标签和连接子,通过降解活性筛选得到降解剂化合物 7 (图 4),其能够有效抑制 Gli1 过表达的 HT29 结直肠癌细胞的增殖,并诱导 Gli1 蛋白降解,DC₅₀ 值为 5.4 $\mu\text{mol/L}$ 。在 Hedgehog 信号通路激活的 MEFPTCH1^{-/-} 和 MEFSUFU^{-/-} 中,降解剂化合物 7 在 7.5 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下,可降解 70% 的 Gli1 蛋白。研究表明,降解物化合物 7 依赖 UPS 途径诱导 Gli1 蛋白降解,可以有效地干扰 (经典和非经典) Hh 信号传导,并克服当前 Smoothened (SMO) 拮抗剂的耐药性,这可能为开发针对 Hh/Gli1 信号传导途径的治疗方式提供新方法。

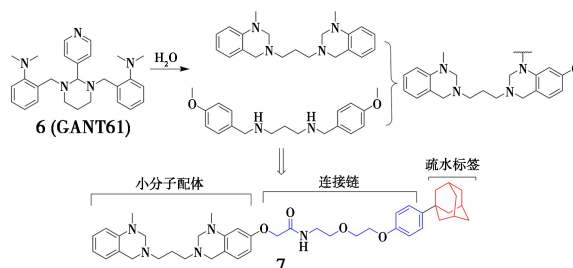


图 4 化合物 6 和 7 的结构

Fig.4 Structures of compounds 6 and 7

3.1.3 NAMPT 降解剂

烟酰胺磷酸核糖基转移酶 (Nicotinamide phosphoribosyltransferase, NAMPT) 在肿瘤代谢中发挥重要作用,被认为是一个有前景的肿瘤治疗靶点^[18]。目前,已有部分 NAMPT 抑制剂步入临床试验阶段,但临床试验效果不佳,这可能与细胞内 NAMPT 酶活性的抑制不足有关^[19,20]。

Xu 等^[21]通过高通量筛选发现了 NAMPT 抑制剂化合物 8 (MS7, 图 5)。Guo 等^[22]基于抑制剂化合物 8 的结构,苯基哌嗪结构暴露于溶剂中,将苯基部分替换为连接臂和疏水标签,筛选得到降解剂化合物 9 (图 5)。降解剂化合物 9 能够通过 UPS 降解不同肿瘤细胞中的 NAMPT,其 DC₅₀ 值分别为 3.18 $\mu\text{mol/L}$ (人慢性髓系白血病细胞 K562) 和 6.05 $\mu\text{mol/L}$ (人原髓细胞白血病细胞 HL60),而且降解剂化合物 9 能诱导细胞凋亡,且

对正常细胞具有低毒性作用,这是一种有前景的抗白血病先导化合物。

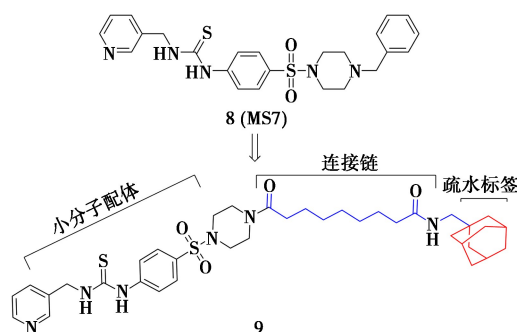


图 5 化合物 8 和 9 的结构

Fig.5 Structures of compounds 8 and 9

3.1.4 KRAS-PDE δ 降解剂

Kirsten 大鼠肉瘤病毒癌基因同源物 (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog, KRAS) 在癌细胞中的构象会发生改变, KRAS 的突变体能与 GTP 蛋白持续结合, 进而产生异常增殖信号, 导致肿瘤细胞增殖^[23,24]。KRAS-PDE δ 蛋白-蛋白相互作用在 KRAS 的功能调控中起重要作用^[25], 抑制 PDE δ 可导致 KRAS 的转运和分布异常, 从而干扰 KRAS 信号转导通路, 抑制肿瘤细胞增殖^[26]。

Guo 等^[27]以 KRAS-PDE δ 抑制剂化合物 10 (Deltazinone) 为先导物, 设计了首个基于疏水标签的 KRAS-PDE δ 降解剂化合物 11 (图 6)。在抑制剂化合物 10 暴露于蛋白质表面的末端苯胺位点连接金刚烷基团和烷烃链得到降解剂化合物 11, 其在 SW480 结肠癌细胞中能以浓度依赖性的方式诱导 PDE δ 降解, DC_{50} 值为 11.4 $\mu\text{mol/L}$ 。降解剂化合物 11 是一种很有前景的工具分子或先导化合物, 可用于进一步结构优化和生物学研究。

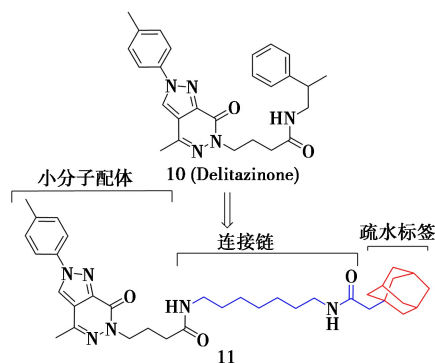


图 6 化合物 10 和 11 的结构

Fig.6 Structures of compounds 10 and 11

3.1.5 Tau 降解剂

微管相关蛋白 Tau 在阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 中起着至关重要的作用^[28]。

由 Tau 聚集体形成的神经丛状缠结是阿尔茨海默病发病机制的主要标志之一, Tau 功能障碍可引起微管功能缺损甚至神经元丢失^[29]。因此, 降低 Tau 蛋白水平可能是治疗 AD 的有效策略。

Gao 等^[30]研究出一个三功能分子化合物 12 (图 7), 其由疏水标签金刚烷、Tau 识别基序和细胞穿透肽 (Cell penetrating peptide motif, CPP) 组成。首先, 他们基于小鼠脑神经瘤细胞 N2a 细胞建立了一个 Tau-egfp 过表达细胞系, 并证明化合物 12 可降低 Tau-egfp 细胞中的 Tau 水平, 此过程主要通过泛素-蛋白酶体途径实现, 最大降解率为 80%。激光扫描共聚焦实验进一步证实, 降解剂化合物 12 能够以剂量和时间依赖性地降解 Tau 蛋白。降解剂化合物 12 不仅具有良好的降解效力, 还具有良好的血脑屏障通透性。然而, 降解剂化合物 12 作用于野生型小鼠脑神经瘤细胞 N2a 细胞, 在 200 mmol/L 浓度以下, 能观察到相对较小的细胞毒性; 而浓度较高时, 会产生轻微的细胞毒性。综上所述, 降解剂化合物 12 有望成为 AD 的一种潜在治疗药物。

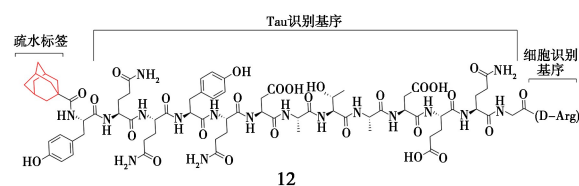


图 7 化合物 12 的结构

Fig.7 Structure of compound 12

3.1.6 SRC-1 降解剂

类固醇受体共激活因子-1 (Steroid receptor coactivator-1, SRC-1) 是一种转录共激活因子, 通过与相关转录因子和核受体相互作用, 能够介导多种信号通路发挥关键作用^[31]。SRC-1 活性异常升高与癌症和增殖和转移有关, 因此抑制 SRC-1 正成为一种有前景的癌症治疗策略^[32]。

Choi 等^[33]开发了一种新的 SRC-1 降解剂化合物 13 (图 8), 由 YL_2 、疏水性基团金刚烷和 PEG 组成。 YL_2 是一种具有细胞渗透性的肽, 可选择性地与 SRC-1 结合, K_i 值为 140 nmol/L。降解剂化合物 13 表面的疏水片段可以模拟蛋白质部分变性的疏水区域, 因此 SRC-1 可以被识别为未折叠的蛋白质, 并通过泛素-蛋白酶体系统途径诱导降解 SRC-1。在三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞中, 其 DC_{50} 值为 5 $\mu\text{mol/L}$ 。这些结果表明, 利用

疏水标签技术化学敲低细胞内 SRC-1 将是针对癌症转移的一种潜在治疗策略,而且能为新型抗肿瘤药物的研发提供新思路与候选化合物。

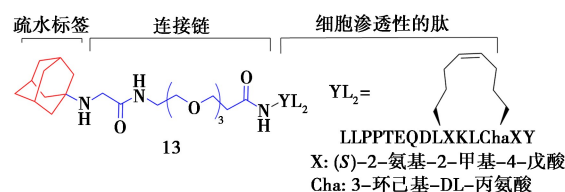


图 8 化合物 13 的结构

Fig.8 Structure of compound 13

3.1.7 AR 降解剂

雄激素受体 (Androgen receptor, AR) 作为一种重要的致癌驱动因子,其异常激活依赖于雄激素受体信号,且与前列腺癌的发生密切相关^[34,35]。

Crews 等^[36]报道了基于雄激素受体拮抗剂 14 (RU59063) 的疏水标签降解剂化合物 15 和 16 (图 9)。降解剂化合物 15 和 16 是由 Hsp70/CHIP 复合物介导,并通过 UPS 途径实现的 AR 降解。并且在抑制 Hsp90 的情况下,Hsp70 水平升高是降解活性增加的基础。在人前列腺肿瘤 LNCaP 细胞中,降解剂化合物 15 和 16 的 DC₅₀ 值分别为 1 和 2 μmol/L。随后,Xie 等^[37]基于拮抗剂化合物 14,得到了经过 UPS 途径降解 AR 的降解剂化合物 17 (图 9)。在人前列腺肿瘤 LNCaP 细胞中,降解剂化合物 17 呈剂量依赖性地降解 AR。在 10 μmol/L 浓度下,AR 几乎被完全降解。目前,已有的临床 AR 的抑制剂,尚无法有效规避因雄激素受体异常而引发的耐药问题;而靶向

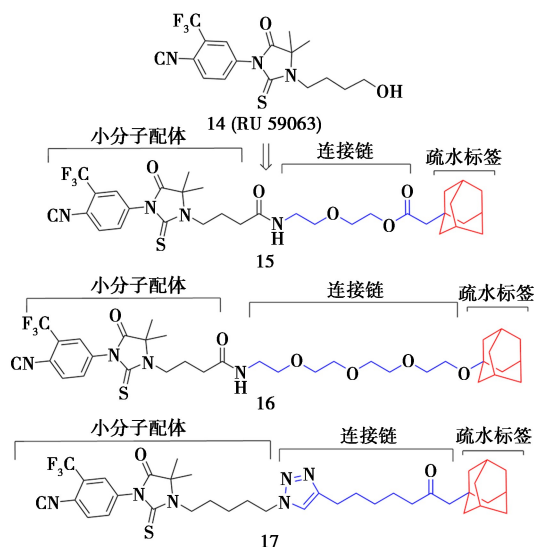


图 9 化合物 14~17 的结构

Fig.9 Structures of compounds 14~17

AR 降解的候选药物已经在临床前和临床研究中获得了不错的成果。多种小分子 AR 降解剂有望在未来成为治疗去势抵抗性前列腺癌的关键药物。

3.1.8 CDK9-Cyclin T1 降解剂

细胞周期蛋白与相应的细胞周期蛋白依赖性激酶 (Cyclin-dependent kinase, CDKs) 结合形成活性复合物,作为细胞周期或转录调节因子,其与肿瘤发生、进展和耐药相关^[38]。目前,CDKs cyclin 复合物的双降解剂很少被报道,值得进一步开发^[39]。

Lin 等^[40]基于化合物 18 (SNS032) 合成了一种新型降解剂。在化合物 18 的哌啶片段引入疏水标签金刚烷和烷烃链,设计并合成了能够降解 CDK9-cyclin T1 复合物的疏水标签降解剂化合物 19 (图 10)。在人前列腺癌 22RV1 细胞中,降解剂化合物 19 通过泛素-蛋白酶体系统途径诱导 CDK9-cyclin T1 的蛋白降解,且呈剂量依赖性地降解 CDK9 和 cyclin T1,DC₅₀ 值分别为 0.362 和 0.683 μmol/L,并且有助于进一步研究 CDK9-cyclin T1 的功能。

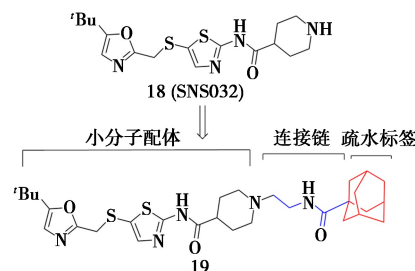


图 10 化合物 18 和 19 的结构

Fig.10 Structures of compounds 18 and 19

3.1.9 Plk1 降解剂

丝氨酸/苏氨酸激酶 (Serine/threonine kinase proteins polo-like kinase 1, Plk1) 在许多人类肿瘤中过表达,已被证明是肿瘤治疗的靶标之一。抑制 Plk1 能够诱导肿瘤细胞发生有丝分裂阻滞和凋亡,因此,针对调节 Plk1 活性已成为药物研发的重点^[41,42]。

Rubner 等^[43]将疏水标签金刚烷片段连接到 Plk1 抑制剂化合物 20 (Poloxin-2) 的末端苯环处,得到了降解剂化合物 21 (图 11),可诱导人宫颈癌 HeLa 细胞中 Plk1 的降解。对降解剂化合物 21 进一步优化得到了降解剂化合物 22 (图 11),其能够诱导 HeLa 细胞中抗肿瘤靶点 Plk1 的降解,对 Plk2 和 Plk3 的降解具有选择性。在 HeLa 细胞中,其 IC₅₀ 值为 9.2 μmol/L,在 50 μmol/L

下,Plk1 的降解率达到 85%。他们首次将疏水标签技术应用于现有的蛋白-蛋白相互作用抑制剂,并验证了疏水标记选择性蛋白-蛋白相互作用是一种靶向和破坏疾病相关蛋白的新策略。

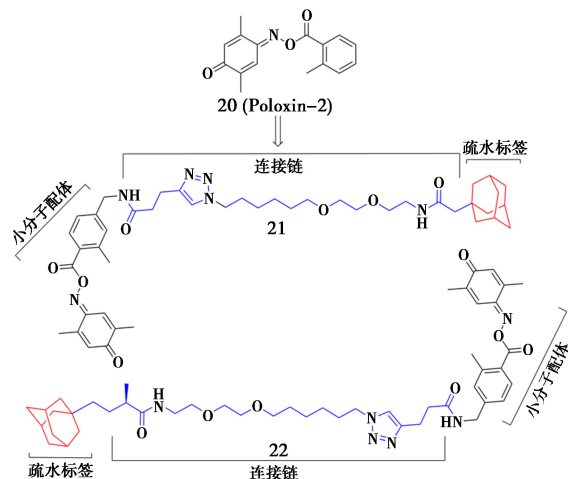


图 11 化合物 20~22 的结构

Fig.11 Structures of compounds 20~22

3.2 基于精氨酸衍生物疏水标签的降解剂

氨基甲酸叔丁酯保护精氨酸 (Boc_3Arg) 相连的降解剂可诱导目标蛋白质降解。 Boc_3Arg 诱导的降解似乎不涉及目标蛋白质的泛素化, Boc_3Arg 标签似乎也不会扰乱目标蛋白质的结构^[44]。

3.2.1 GSTP 降解剂

谷胱甘肽 S-转移酶 (GSTs) 是一类酶,肿瘤细胞中高水平的 GSTs 可能会导致药物高速代谢而限制抗肿瘤效果,其中, GST- π (Glutathione S-transferase π) 是一种肿瘤发生的标志性蛋白,抑制 GSTP1 是一种有前景的癌症治疗策略^[45]。

Long 等^[46]将谷胱甘肽-s 转移酶的抑制剂化合物 23 (EA, 图 12) 与疏水标签 Boc_3Arg 连接得到了降解剂化合物 24 (图 12), 其在人宫颈癌 Hela 细胞中呈剂量依赖性降解 GST- $\alpha 1$ 蛋白, 在 10 mmol/L 化合物 24 作用 1.2 h 后, 50% 的 GST- $\alpha 1$ 蛋白被降解。在 80 mmol/L 下作用 2 h 后, GST- $\alpha 1$ 蛋白几乎被完全降解。Sun 等^[47]基于先前发现的降解剂化合物 24, 利用精氨酸和赖氨酸相似的理化性质, 将原有的疏水标签 Boc_3Arg , 替换成 Boc_2Lys , 保持 linker 的长度不变, 得到了新的降解剂化合物 25 (图 12)。降解剂化合物 25 既通过 ALS 途径介导, 也通过 UPS 途径诱导 GSTP 蛋白降解。在人宫颈癌 HeLa 细胞中, 化合物 25 可诱导 GSTP 蛋白降解, DC_{50} 值为 48 $\mu\text{mol/L}$ 。他们研究也证明了疏水标签具有 3 个 Boc 组并不一

定是诱导降解的必要条件。

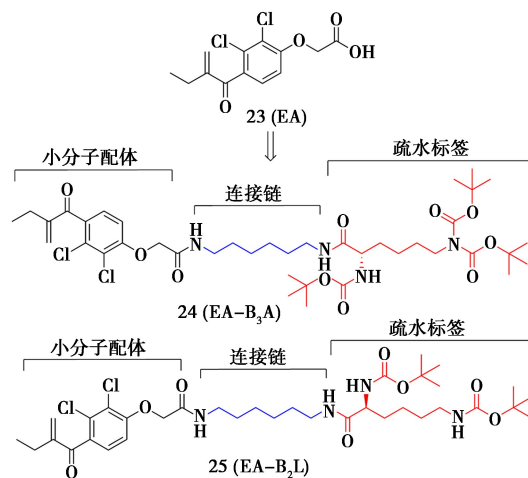


图 12 化合物 23~25 的结构

Fig.12 Structures of compounds 23~25

3.2.2 PA 降解剂

异源三聚体 RNA 依赖性 RNA 组成聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRps) 能催化 RNA 模板合成 RNA, 在大多数 RNA 病毒的基因组复制和转录中是必不可少的。异源三聚体包括两个碱性蛋白, 聚合酶碱性蛋白 1 (PB1) 和聚合酶碱性蛋白 2 (PB2), 以及一个聚合酶酸性蛋白 (PA)^[48]。

Ma 等^[49]选择了合适的化合物 26 作为靶蛋白配体, 其对甲型流感病毒 H1N1 ($\text{EC}_{50} = 0.024 (\pm 0.005 \mu\text{mol/L})$) 具有抗病毒活性。他们将疏水标签引入到病毒蛋白降解剂的设计中, 合成得到基于酰基硫脲骨架的新型流感病毒 RdRp 酸性蛋白 (PA) 降解剂化合物 27 (图 13)。降解剂化合物 27 通过 UPS 途径和 ALS 途径双重途径诱导 PA 蛋白降解, 且能以时间、剂量依赖方式选择性地降解靶蛋白聚合酶酸性蛋白 PA ($\text{DC}_{50} = 0.06 \mu\text{mol/L}$), 对 RdRp 的另外两个亚基 PB1 和 PB2 没有影响。在犬肾 MDCK 细胞中对 H1N1 病毒表

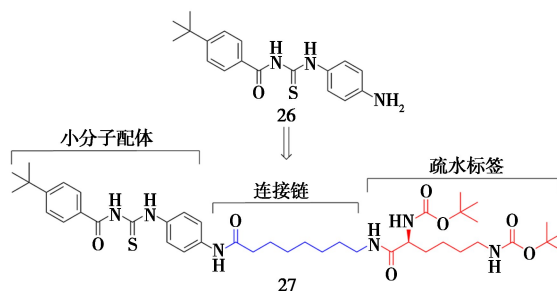


图 13 化合物 26 和 27 的结构

Fig.13 Structures of compounds 26 and 27

现出强效的抑制活性 ($EC_{50} = 0.015 \mu\text{mol/L}$)。MST 实验也进一步验证了 PA 为降解剂化合物 27 的靶点, 并且 $\text{Boc}_2\text{-(L)-赖氨酸}$ 增强了化合物 27 对 PA 的结合作用。他们开创性地把疏水标签技术运用到靶向降解病毒蛋白这一策略之中, 为新型抗流感药物的研发开辟了新思路, 同时也提供了候选化合物。

3.3 基于降冰片烯疏水标签的降解剂

降冰片烯是一种由环己烯环和亚甲基桥组成的环烯, 具有显著的环张力和高疏水性, 有助于优异的膜通透性, 并使其成为药物靶向递送系统中常用结构^[50]。研究结果表明, 与金刚烷、 Boc_3Arg 等其他 HyT 相比, 降冰片烯具有更好的靶蛋白 (Protein of interest, POI) 降解能力、选择性和药代动力学特性^[50]。

间变性淋巴瘤激酶 (Anaplastic lymphoma kinase, ALK) 是癌症治疗的理想靶点, 与多种恶性肿瘤有重要关系^[50]。

Xie 等^[7]报道了从未被发现的疏水标签降冰片烯, 并且基于降冰片烯片段合成得到了降解剂。将 ALK 抑制剂化合物 28 (Alectinib, 图 14) 与金刚烷、 Boc_3Arg 等不同的疏水标签和不同的连接臂连接, 筛选得到连接有降冰片烯基团的降解剂化合物 29 (图 14)。降解剂化合物 29 在人非小细胞肺癌细胞 H3122 中表现出较强的抗增殖活性和降解能力。在 H3122 异种移植小鼠模型中的抗肿瘤动物实验中, 小鼠的肿瘤生长抑制率约为 50.7%~65.9%, 且均未出现明显的体重减轻或其他毒性情况。机制研究表明, 降解剂化合物 29 可以通过募集 Hsp70 介导 POI 泛素化, 从而在蛋白水平上介导 EML4-ALK 的下调, 依赖 UPS 途径进行降解。降解剂化合物 29 能够实现口服给药, 且展现出了可被接受的生物利用度。同时, 疏水标

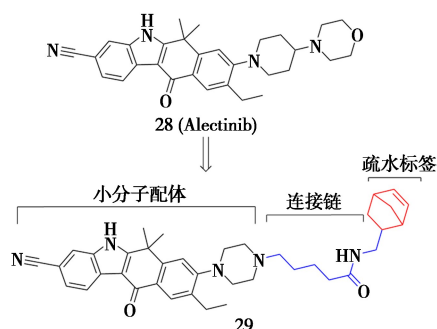


图 14 化合物 28 和 29 的结构

Fig.14 Structures of compounds 28 and 29

签降冰片烯具有降解其他靶点的潜力, 今后值得进一步的研究和探索。

3.4 基于其他疏水标签的降解剂

3.4.1 PD-L1 降解剂

程序化死亡配体 1 (Programmed cell death ligand-1, PD-L1) 与程序性细胞死亡蛋白 1 (Programmed death-1, PD-1) 相互作用传递抑制性信号, 能抑制淋巴结中抗原特异性 T 细胞的增殖^[41]。因此, 通过阻断 PD-1 与 PD-L1 的相互作用, 能够消除 T 细胞活化的抑制信号, 从而使肿瘤特异性 T 细胞得以发挥其抗肿瘤作用^[51,52]。

Gao 等^[53]以 PD-L1 结合剂化合物 30 (BMS-220) 为母核, 连接氟代二苯基甲基和 PEG 链得到了降解剂化合物 31 (图 15)。在人大细胞肺癌 NCI-H460 细胞中, 降解剂 31 ($10 \mu\text{mol/L}$) 以蛋白酶体依赖的方式下调 PD-L1 水平, 但随着时间降解活性逐渐减弱, 72 h 后几乎丧失降解活性, 且具有低细胞毒性。他们还发现了一种新的 HyT 片段, 即氟代二苯基甲基, 有望应用于其他靶点降解剂开发。

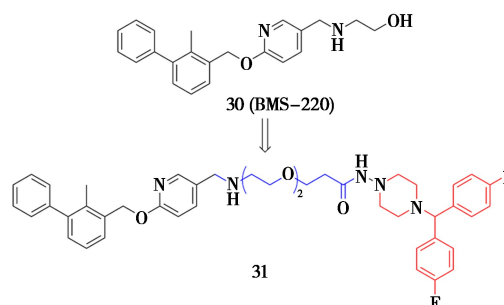


图 15 化合物 30 和 31 的结构

Fig.15 Structures of compounds 30 and 31

3.4.2 HaloTag 蛋白降解剂

HaloTag 标签蛋白是一种脱卤素酶的遗传修饰衍生物, 可与多种合成的 HaloTag 配基有效地共价结合^[54]。

Asawa 等^[55]在金刚烷基础上进一步研究得到一种新的疏水标签碳硼烷, 设计了一种与酰胺官能团共轭的间碳硼烷和一种亚甲基与酰胺官能团共轭的邻碳硼烷。他们基于 Crews 的 HaloTag 降解剂, 将这两种碳硼烷跟 HaloTag 连接得到降解剂, 并构建了能够稳定表达血凝素 (HA)-Halo-Tag2-绿色荧光蛋白 (EGFP) 的 Flp-In 293 细胞, 发现两种降解剂均能降解 HA-HaloTag2-EGFP 蛋白水平, 其中间碳硼烷降解剂化合物 32 (图 16) 降解活性最好, 机制表明碳硼烷偶联的蛋白质可

以通过 E3 连接酶和 UPS 途径被降解。

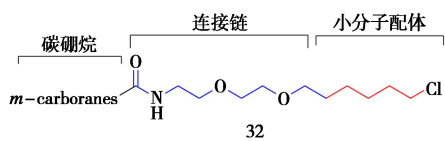


图 16 化合物 32 的结构

Fig.16 Structure of compound 32

3.4.3 ER α 降解剂

雌激素 (Estrogen) 是类固醇激素。雌激素受体 (Estrogen receptor, ER) 分为两种类型的经典雌激素受体 ER α 和 ER β ^[56]。

Qing 等^[57]发现了一种新型疏水标签 D 环缩环青蒿素。基于此疏水标签,他们设计并合成了一系列 ER α 蛋白降解剂。采取不同长度的烷烃链作为连接子,将 D 环缩环青蒿素与雷洛昔芬化合物 33(图 17)连接。其中,降解剂化合物 34(图 17)的活性最强,在 MCF-7 人乳腺癌细胞中呈剂量依赖性降解 ER α 蛋白,在 10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下降解效率达 83.1%。机制研究证明,UPS 系统在介导降解剂化合物 34 诱导的 ER α 蛋白降解中起关键作用。此外,他们还研究了此疏水标签对细胞周期蛋白依赖性激酶 6 (Cyclin-dependent kinases 6, CDK6) 与组蛋白去乙酰化酶 (Histone deacetylase, HDAC) 的降解,发现化合物 34 均能降解这两种蛋白。

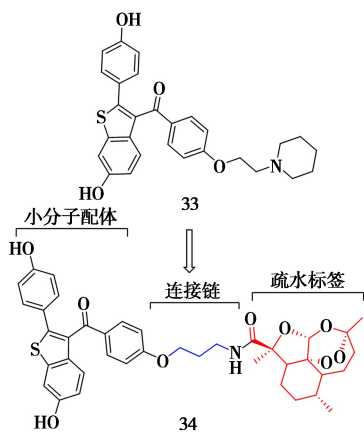


图 17 化合物 33 和 34 的结构

Fig.17 Structures of compounds 33 and 34

3.5 疏水标签总结

综上所述,金刚烷具有高度对称的笼状刚性结构,能在各种化学和生物环境中保持稳定^[7],且具有很强的疏水性,能够增强生物分子的疏水性,在蛋白质折叠、膜蛋白定位等过程中发挥重要作用,是最常用的疏水标签之一。Boc₃Arg 具有

一定的疏水性,可通过将蛋白质直接定位到 20S 蛋白酶体来诱导降解^[44]。与蛋白质结合后,不会对其产生影响,有利于蛋白质保持正常的生物活性^[44]。在 Boc₃Arg 基础上的改造 Boc₂Lys 也是一种疏水标签,与 Boc₃Arg 具有相似的性质,同理, Boc₃Gly、Boc₃Orn 同样可作为疏水标签进行降解,这类疏水标签打破了必须具有 3 个 Boc 基团的观念,为靶向蛋白降解提供了一种新的策略和研究方向^[47]。降冰片烯^[50]是一种新型疏水标签,降冰片烯相比于金刚烷、Boc₃Arg 等其他 HyT,具有更好的 POI 降解能力、选择性和药代动力学特性,其发展前景十分广阔。茈由共轭芳香体系使其具有很强的疏水性,它不仅能提供疏水性,还能利用其荧光性质进行荧光标记和检测。茈由两个苯环通过一个五元环耦合而成,具有刚性的平面结构和较大的共轭体系。同茈一样,具有良好的疏水性,也具有荧光性质,利于生物检测。碳硼烷^[54]是一种基于金刚烷结构的一种新型疏水标签,由硼原子和碳原子组成的多面体笼状结构,具有高度对称和稳定的骨架,呈现出高度的疏水性。D 环缩环青蒿素^[57]是新发现的一种疏水标签,具有广泛适用性,但目前研究内容较少,值得进一步探索。总而言之,目前疏水标签还有优化的空间,改善其理化性质,提高生物利用度,有助于疏水标签降解剂的研究与发展。

4 总结与展望

开发疏水标签靶向降解蛋白质是一种有前景的治疗策略。相较于传统小分子药物,疏水标签降解剂具有很多优势:能够特异性地诱导目标蛋白的降解,通过促进蛋白质降解,延长药效持续时间,降低给药频率,有效降低耐药性。疏水标签降解技术虽前景广阔,但要真正将其大规模应用到临床治疗中,仍面临一些挑战。首先,疏水标签的降解机制尚未被完全揭示,若能透彻了解化合物疏水标签如何招募蛋白质以促使降解,将有助于开发更加精确的检测手段,并可能为连接子与疏水标签的优化提供重要指导。其次,如何更好地设计和合成具有高度选择性的降解剂,以确保它们只针对目标蛋白质而不引发其他副作用,仍然是一个有待解决的问题。此外,疏水标签片段的可用性有限,将它们掺入药物分子受到严格限制。其高疏水性原则上不可避免地导致其低口服生物利用度,如何提高降解剂的稳定性和生物利用度,

如何改进疏水性基团的生物相容性和代谢稳定性,为优化其降解活性及物理化学性质提供了潜在的改进空间。因此,在疏水标签降解剂的开发过程中,对其药物动力学特性加以考量依旧至关重要。与此同时,必须对高疏水性所带来的难以预见的副作用保持警惕,毕竟高疏水性会增大药物性肝损伤的可能性,而这正是临床试验中研究药物失败以及已批准药物退出市场的主要原因。总体而言,深入探究疏水标签的不良效应,平衡疏水性、代谢稳定性与生物利用度,将会成为疏水标签降解剂后续研究的核心要点。

参考文献:

- [1] Fang Y, Wang S, Han S, Zhao Y, Yu C, Liu H, Li N. *Trends Pharmacol.Sci.*, 2023, **44**(5):303-317.
- [2] Song J, Hu M, Zhou J, Xie S, Li T, Li Y. *Eur. J. Med. Chem.*, 2023, **261**:115-839.
- [3] Dai X J, Ji S K, Fu M J, Liu G Z, Liu H M, Wang S P, Shen L, Wang N, Herdewijn P, Zheng Y C, Wang S Q, Chen X B. *Theranostics*, 2024, **14**(4):1-464.
- [4] Neklesa T K, Tae H S, Schneekloth A R, Stulberg M J, Corson T W, Sundberg T B, Raina K, Holley S A, Crews C M. *Nat. Chem. Biol.*, 2011, **7**(8):538-543.
- [5] Xie S, Zhu J, Li J, Zhan F, Yao H, Xu J, Xu S. *J. Med. Chem.*, 2023, **66**(16):10 917-10 933.
- [6] Peng X, Hu Z, Zeng L, Zhang M, Xu C, Lu B, Tao C, Chen W, Hou W, Cheng K, Bi H, Pan W, Chen J. *Acta Pharm.Sin.B*, 2024, **14**(2):533-578.
- [7] Xie S, Zhan F, Zhu J, Sun Y, Zhu H, Liu J, Chen J, Zhu Z, Yang D H, Chen Z S, Yao H, Xu J, Xu S. *Angew. Chem. Int.Ed.*, 2023, **62**(13):e202 217 246.
- [8] Gao J, Zhang J, Han X, Zhou J. *Curr. Med. Chem.*, 2023, **30**(27):3 137-3 155.
- [9] Ha S, Zhu J, Xiang H, Luo G. *Chin. Chem. Lett.*, 2024, **35**(8):109 192.
- [10] Eaton J K, Furst L, Cai L L, Viswanathan V S, Schreiber S L. *Bioorg.Med.Chem.Lett.*, 2020, **30**(23):127 538.
- [11] Moosmayer D, Hilpmann A, Hoffmann J, Schnirch L, Zimmermann K, Badock V, Furst L, Eaton J K, Viswanathan V S, Schreiber S L, Gradl S, Hillig R C. *Acta Crystallogr.D*, 2021, **77**(2):237-248.
- [12] Li X, Hu M, Zhang Y, Hua H, Sun Y, Xiang Q, Zhu D. *Bioorg.Chem.*, 2024, **144**:107 115.
- [13] Ning Y, Zhu Z, Wang Y, Fan X, Wang J, Qian H, Qiu X, Wang Y. *Eur.J.Med.Chem.*, 2024, **277**:116 719.
- [14] Rubin L L, Sauvage F J. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2006, **5**(12):1 026-1 033.
- [15] Xin M, Ji X, Cruz L K, Thareja S, Wang B. *Med. Res. Rev.*, 2018, **38**(3):870-913.
- [16] Lauth M, Bergström A, Shimokawa T, Toftgard R. *Proc. Natl.Acad.Sci.*, 2007, **104**(20):8 455-8 460.
- [17] Li X, Sun R, Wu H, Zheng C, Long Y Q. *Bioorg. Chem.*, 2023, **138**:106 649.
- [18] Galli U, Travelli C, Massarotti A, Fakhfour G, Rahimian R, Tron G C, Genazzani A A. *J. Med. Chem.*, 2013, **56**(16):6 279-6 296.
- [19] Wei Y, Xiang H, Zhang W. *Front. Pharmacol.*, 2022, **13**:970 553.
- [20] Grolla A A, Travelli C, Genazzani A A, Sethi J K. *Brit. J. Pharmacol.*, 2016, **173**(14):2 182-2 194.
- [21] Xu T Y, Zhang S L, Dong G Q, Liu X Z, Wang X, Lv X Q, Qian Q J, Zhang R Y, Sheng C Q, Miao C Y. *Sci. Rep.*, 2015, **5**(1):10 043.
- [22] Guo M, Song Y Q, Cheng J, Dong G, Sun X, Sheng C. *Chin. Chem. Lett.*, 2024, **35**(9):109 392.
- [23] Malumbres M, Barbacid M. *Nat. Rev. Cancer*, 2003, **3**(6):459-465.
- [24] Pylyayeva-gupta Y, Grabocka E, Bar-sagi D. *Nat. Rev. Cancer*, 2011, **11**(11):761-774.
- [25] Spiegel J, Cromm P M, Zimmermann G, Grossmann T N, Waldmann H. *Nat. Chem. Biol.*, 2014, **10**(8):613-622.
- [26] Chen F, Alphonse M P, Liu Y, Liu Q. *Curr. Top. Med. Chem.*, 2019, **19**(23):2 098-2 113.
- [27] Guo M, He S, Cheng J, Li Y, Dong G, Sheng C. *ACS Med.Chem.Lett.*, 2022, **13**(2):298-303.
- [28] Ballatore C, Lee V M, Trojanowski J Q. *Nat. Neurosci.*, 2007, **8**(9):663-672.
- [29] Di J, Cohen L S, Corbo C P, Phillips G R, Idrissi A, Alonso A D. *Sci.Rep.*, 2016, **6**:20 833.
- [30] 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, Li Y M. *RSC Adv.*, 2017, **7**(64):40 362-40 366.
- [31] Onate S A, Tsai S Y, Tsai M J, O'malley B W. *Science*, 1995, **270**(5 240):1 354-1 357.
- [32] Xu J, Wu R C, O'malley B W. *Nat. Rev. Cancer*, 2009, **9**(9):615-630.
- [33] Choi S R, Wang H M, Shin M H, Lim H S. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, **22**(12):6 407.
- [34] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. *CA-Cancer J. Clin.*, 2021,

- 71(3):209-249.
- [35] Ha S, Luo G, Xiang H. *J. Med. Chem.*, 2022, **65**(24): 16 128-16 154.
- [36] Gustafson J L, Neklesa T K, Cox C S, Roth A G, Buckley D L, Tae H S, Sundberg T B, Stagg D B, Hines J, McDonnell D P, Norris J D, Crews C M. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2015, **54**(33): 9 659-9 662.
- [37] Xie H, Liang J J, Wang Y L, Hu T X, Wang J Y, Yang R H, Yan J K, Zhang Q R, Xu X, Liu H M, Ke Y. *Eur. J. Med. Chem.*, 2020, **204**: 112 512.
- [38] Asghar U, Witkiewicz A K, Turner N C, Knudsen E S. *Nat. Rev. Drug. Discov.*, 2015, **14**(2): 130-146.
- [39] Wang Y, Jiang X, Feng F, Liu W, Sun H. *Acta Pharm. Sin. B*, 2020, **10**(2): 207-238.
- [40] Lin R, Yang J, Liu T, Wang M, Ke C, Luo C, Lin J, Li J, Lin H. *Chem. Biodivers.*, 2023, **20**(8): e202 300 769.
- [41] Sharma P, Goswami S, Raychaudhuri D, Siddiqui B A, Singh P, Nagarajan A, Liu J, Subudhi S K, Poon C, Gant K L, Herbrich S M, Anandhan S, Islam S, Amit M, Anandappa G, Allison J P. *Cell*, 2023, **186**(8): 1 652-1 669.
- [42] Lee K S, Burke T R, Park J E, Bang J K, Lee E. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2015, **36**(12): 858-877.
- [43] Rubner S, Schubert S, Berg T. *Org. Biomol. Chem.*, 2019, **17**(12): 3 113-3 117.
- [44] He Q, Zhao X, Wu D, Jia S, Liu C, Cheng Z, Huang F, Chen Y, Lu T, Lu S. *Eur. J. Med. Chem.*, 2023, **260**: 115 741.
- [45] McIlwain C C, Townsend D M, Tew K D. *Oncogene*, 2006, **25**(11): 1 639-1 648.
- [46] Long M J, Gollapalli D R, Hedstrom L. *Chem. Biol.*, 2012, **19**(5): 629-637.
- [47] Sun H, Wang C, Li X, Lv Z, Li K, Hu H, Xu P, Xiao Y, Niu Y. *ACS Med. Chem. Lett.*, 2024, **15**(11): 1 852-1 859.
- [48] Stevaert A, Naesens L. *Med. Res. Rev.*, 2016, **36**(6): 1 127-1 173.
- [49] Ma X, Wang X, Chen F, Zou W, Ren J, Xin L, He P, Liang J, Xu Z, Dong C, Lan K, Wu S, Zhou H B. *J. Med. Chem.*, 2024, **67**(11): 8 791-8 816.
- [50] Kong X, Pan P, Sun H, Xia H, Wang X, Li Y, Hou T. *J. Med. Chem.*, 2019, **62**(24): 10 927-10 954.
- [51] Sun C, Mezzadra R, Schumacher T N. *Immunity*, 2018, **48**(3): 434-452.
- [52] Dermani F K, Samadi P, Rahmani G, Kohlan A K, Najafi R. *J. Cell. Physiol.*, 2019, **234**(2): 1 313-1 325.
- [53] Gao J, Xie Y, Zhang J, Chen H, Zou Y, Gen S, Zhou J. *RSC Med. Chem.*, 2024, **15**(9): 3 038-3 047.
- [54] Buckley D L, Raina K, Darricarrere N, Hines J, Gustafson J L, Smith I E, Miah A H, Harling J D, Crews C M. *ACS Chem. Biol.*, 2015, **10**(8): 1 831-1 837.
- [55] Asawa Y, Nishida K, Kawai K, Domae K, Ban H S, Kitazaki A, Asami H, Kohno J Y, Okada S, Tokuma H, Sakano D, Kume S, Tanaka M, Nakamura H. *Bioconjugate Chem.*, 2021, **32**(11): 2 377-2 385.
- [56] Hsu L H, Chu N M, Kao S H. *Int. J. Mol. Sci.*, 2017, **18**(8): 1 713.
- [57] Qing L, Yu Q, Wang C, Lu X, Yang Y, Chen X, Li X, Min J, Pan W, He H, Zhong H, Zhang S. *J. Med. Chem.*, 2025, **68**(2): 1 619-1 631.