



核酸驱动蛋白质降解：溶酶体靶向降解技术前沿*

殷涵 李钰 樊渝川 郭帅 黄渊余 李永** 翁郁华**

(北京理工大学生命学院, 医学技术学院, 前沿交叉科学研究院, 分子医学与生物诊疗重点实验室, 北京 100081)

摘要 靶向蛋白质降解技术不同于小分子抑制剂的互补抑制作用机制, 利用细胞内源性蛋白质降解途径完成许多“不可成药”靶蛋白的降解, 为疾病的治疗提供了新路径, 其主要包括蛋白质水解靶向嵌合体、溶酶体靶向嵌合体等。与蛋白质水解靶向嵌合体依赖于泛素-蛋白酶体系统主要降解胞内蛋白质的机制不同, 溶酶体靶向嵌合体利用细胞溶酶体途径实现胞外及膜蛋白的降解。核酸驱动的溶酶体靶向嵌合体作为新兴的生物医学技术, 以核酸分子作为嵌合体的特定组分, 在疾病治疗和药物研发等方面展现出广泛的应用前景和潜在的临床价值。本综述主要介绍核酸驱动的溶酶体靶向嵌合体技术, 包括其组成、优势, 并重点介绍其主要应用。此外, 本综述简要回顾了溶酶体靶向嵌合体的发展历程, 使该技术的发展可以呈现出一个明确的时间线, 同时指出当前溶酶体靶向嵌合体发展中的不足和挑战, 为后续深度研发指明方向。最后, 针对当前溶酶体靶向嵌合体技术的开发进展及发展方向, 对该技术目前面临的挑战进行探讨、对其未来可能的发展方向进行展望。综合而言, 核酸驱动的溶酶体靶向嵌合体技术为生物医学研究、药物开发以及临床治疗提供了新思路和新方法, 可以通过进一步研究和优化实现更广泛的应用。

关键词 靶向蛋白质降解, 溶酶体靶向嵌合体, 核酸驱动

中图分类号 R945, Q819

DOI: 10.16476/j.pibb.2024.0179

CSTR: 32369.14.pibb.20240179

作为目前主流的疾病尤其癌症治疗药物, 抗体以及小分子抑制剂通过与靶蛋白 (protein of interest, POI) 的“口袋”进行特异性互补结合、改变蛋白质构象, 从而达到抑制蛋白质功能以治疗相应疾病的目的^[1-2]。相较于目前仅开发出较少靶点的由美国食品药品监督管理局 (U.S. Food and Drug Administration, FDA) 批准的重组抗体药物, 具有更小分子尺寸的小分子抑制剂可以结合更广泛的胞内外 POI^[3-5]。然而, 尽管具有用药方便、中枢神经系统透过性等优势, 小分子抑制剂潜在的毒副作用及其难以靶向“不可成药”蛋白质的弊端已越来越明显地限制其发展^[6]。针对当前“不可成药”蛋白质难以靶向的关键问题, 靶向蛋白质降解 (targeted protein degradation, TPD) 技术被开发出来, 并凭借其拥有蛋白质靶向降解能力的独特优势迅速得到广泛关注。TPD 技术通过直接诱导 POI 的降解而非通过与其三维结构空间互补抑制 POI 功能的机制达到清除致病蛋白的治疗效果, 从而在药物

研发、癌症治疗等方面展现出重要的临床研究价值^[7-9]。

截至目前, 多种 TPD 技术已被报道, 包括蛋白水解靶向嵌合体 (proteolysis-targeting chimeras, PROTAC)、溶酶体靶向嵌合体 (lysosome-targeting chimeras, LYTAC)、分子胶、自噬靶向嵌合体 (autophagy-targeting chimeras, AUTAC)、基于抗体的 PROTAC (antibody-based PROTAC, AbTAC)、自噬体拴系化合物 (autophagosome-tethering compound, ATTEC)、降解抗体偶联药物 (degrader-antibody conjugate, DAC) 等^[10]。其中, PROTAC 作为第一类 TPD 分子于 2001 年被首次报道^[11]。历经 20 余年的发展, 其已成为继小分子抑

* 国家重点研发计划 (2021YFA1201000) 资助项目。

** 通讯联系人。

李永 Tel: 010-68913324, E-mail: liyong2021@bit.edu.cn

翁郁华 Tel: 010-68913324, E-mail: yhweng@bit.edu.cn

收稿日期: 2024-04-30, 接受日期: 2024-08-25

制剂和单克隆抗体药物之后的热门制药技术之一。PROTAC是一种异双功能分子,利用细胞内天然的蛋白质降解系统——泛素-蛋白酶体系统(ubiquitin-proteasome system, UPS)实现POI的靶向降解^[12-13]。PROTAC同时又是一个三元复合体,其中间部分是一段具有灵活性的化学连接链,两端分别包含两种不同的靶向配体,其中一端配体与POI特异性结合,另一端配体负责招募E3泛素连接酶,PROTAC同时结合POI和E3泛素连接酶后所形成的复合体介导了POI的多泛素化以及随后的依赖于UPS的靶向降解^[14]。截至目前,已有多种PROTAC分子进入临床试验^[7]。然而,PROTAC技术也有自身的局限性,由于其通过配体与E3泛素连接酶结合以及利用细胞内UPS作为POI降解平台,因此PROTAC主要靶向降解胞内蛋白质,其在膜蛋白尤其是胞外蛋白质降解领域的应用实例很少且应用范围十分受限。近年来报道的基于膜表面E3连接酶例如ZNR3、RNF43等的PROTAC开发为其靶向降解膜蛋白创造了可能^[15-16]。值得注意的是,膜表面E3连接酶的募集介导了POI的内化,而POI降解最终是在溶酶体内完成的。许多疾病的治疗靶点是胞外和膜蛋白,约占人类蛋白质组的40%左右,且生长因子、细胞因子等胞外蛋白质可以通过与细胞表面受体结合引发异常的信号转导最终导致疾病发生^[17-18]。因此亟需开发新的TPD技术主要用于胞外及膜蛋白的靶向降解。

溶酶体作为一种细胞器,其主要功能为分解、消化和清除细胞中的外源性蛋白质、核酸、糖类等大分子以及一些“垃圾”,同时也具有合成和分泌酶、蛋白质的功能,在细胞正常代谢、代谢废物清除和免疫防御方面发挥着重要作用^[19]。真核细胞内通常存在两种物质降解系统,一种是上文已经提及的UPS,另一种则为细胞溶酶体途径,两种途径在调节细胞内外蛋白质稳态方面均发挥着重要作用^[20]。溶酶体途径通常又包括内体-溶酶体途径(endosome-lysosome pathway, ELP)、吞噬-溶酶体和自噬-溶酶体途径(autophagy-lysosomal pathway, ALP) 3种降解POI的途径^[19, 21-22]。2020年, Bertozzi等^[23]受PROTAC的启发开发了通过细胞溶酶体途径降解胞外及膜蛋白的LYTAC技术。与PROTAC分子的基本结构相似,LYTAC分子同样为由分子两端的配体以及中间的连接链构成的三元复合体,不同的是,PROTAC分子的其中一个配体结合E3泛素连接酶介导POI的多泛素化,而

LYTAC的相应配体则结合溶酶体靶向受体(lysosome-targeting receptor, LTR)以介导LYTAC分子的细胞内化以及随后的POI靶向溶酶体降解^[24]。LYTAC技术的发展是基于对溶酶体生物学的深入理解以及对蛋白质降解机制的广泛研究,这一技术的突破使得许多“不可成药”蛋白质,尤其是运用PROTAC技术无法靶向降解的一些胞外和膜蛋白等也能通过溶酶体途径被有效降解,为药物研发和疾病治疗提供了新的思路和手段。

本综述将着力对核酸驱动的LYTAC进行系统梳理。首先介绍LYTAC的发展历程,重点阐述第一代LYTAC和第二代LYTAC分子的基本结构、分子机制及其应用等,并对二者的不同做比较,以及简要分析当前LYTAC技术的不足与挑战。其次从不同LTR的角度重点介绍核酸驱动LYTAC分子的结构及应用。其中以阳离子非依赖型甘露糖6磷酸受体(cation-independent mannose-6-phosphonate receptor, CI-M6PR)为LTR的核酸驱动LYTAC分子研究最多,基于逻辑识别系统的LYTAC、基因工程化LYTAC以及核酸骨架LYTAC联用小干扰核糖核酸(small interfering ribonucleic acid, siRNA)的LYTAC Plus平台等较为新型的核酸驱动LYTAC分子均是以CI-M6PR为LTR介导POI靶向溶酶体降解。ASGPR介导的核酸驱动LYTAC的开发也有报道。一种由新型LTR介导的树突状脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)嵌合体作为核酸驱动LYTAC分子同样被提及。最后讨论核酸驱动的LYTAC技术目前存在的挑战以及展望其未来的发展方向和应用前景,以期为蛋白质靶向降解药物的深入研发提供新的思路和启示。

1 LYTAC的发展历程

2020年, Bertozzi团队^[23]基于TPD的概念,在PROTAC的基础上开发了一种新型靶向蛋白质降解技术,并将其命名为LYTAC。由此,第一代LYTAC诞生。LYTAC利用细胞内源性溶酶体途径进行胞外以及膜蛋白的特异性降解。由Bertozzi团队开发的第一代LYTAC选择CI-M6PR作为其溶酶体靶向受体。CI-M6PR是一种在细胞膜和溶酶体膜都广泛表达的受体,能够将含有甘露糖6磷酸(mannose-6-phosphonate, M6Pn)支链修饰的糖蛋白转运到溶酶体进行降解^[23, 25]。第一代LYTAC三元复合体的其中一端为特异性结合CI-M6PR的M6Pn修饰的糖肽配体,由其构成的M6Pn-LYTAC

可以实现由 CI-M6PR 介导的特异性 POI 溶酶体降解。另一端则为特异性结合 POI 的抗体配体, M6Pn-LYTAC 通过其 POI 配体挟持胞外和膜表面 POI。成功锚定 POI 的 M6Pn-LYTAC 利用其 M6Pn 修饰的糖肽配体与细胞膜上的 CI-M6PR 特异性结合, 随后通过内化进入细胞并定位于溶酶体, 溶酶体内的低 pH 值条件引起 CI-M6PR 与 M6Pn-LYTAC 解离, 与配体结合的 POI 底物被溶酶体内的各种水解酶降解, 而 CI-M6PR 本身则通过高尔基体转运至细胞膜以便循环利用 (图 1a)^[23]。Bertozzi 等利用 M6Pn-LYTAC 分子成功实现了其对外源性红色荧光蛋白 mCherry 的溶酶体摄取 (图 1b) 和膜蛋白 CD71 的溶酶体降解 (图 1c)。此外, 他们还验证了 M6Pn-LYTAC 对 NA-647、表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 等分子的溶酶体降解能力。该研究证明了 LYTAC 作为继 PROTAC 之后的新型 TPD 技术的可行性及其可降解胞外和膜蛋白的独特优势。然而, 由于 CI-M6PR 是一种广谱受体, 其在大多数细胞中广泛表达, 因此第一代 M6Pn-LYTAC 缺乏组织和细胞特异性^[18]。

基于第一代 M6Pn-LYTAC 较差的组织和细胞特异性, Bertozzi 团队又开发出第二代 LYTAC (GalNAc-LYTAC)^[26]。与第一代 LYTAC 不同的是, GalNAc-LYTAC 所识别并结合的溶酶体靶向受体不是非细胞特异性受体 CI-M6PR, 而是肝细胞特异性表达的去唾液酸糖蛋白受体 (asialoglycoprotein receptor, ASGPR) (图 1d)^[27]。ASGPR 识别含有 N-乙酰氨基半乳糖 (N-acetylgalactosamine, GalNAc) 或半乳糖 (galactose, Gal) 的糖蛋白, 随后允许 ASGPR 通过网格蛋白介导的内吞作用实现糖蛋白的细胞内化至内体, 经过内体最终酸化为溶酶体的过程后, ASGPR 释放其结合物质并再循环至细胞膜, 而携带待降解 POI 的 GalNAc-LYTAC 则在溶酶体中被降解^[28-30]。GalNAc-LYTAC 利用三叉型 GalNAc (triantennary N-acetylgalactosamine, tri-GalNAc) 作为 ASGPR 的结合配体, 在肝细胞性肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 细胞中展现了与 CI-M6PR 依赖型 LYTAC 相当的 EGFR 靶向降解能力 (图 1e)。同时, GalNAc-LYTAC 的肝细胞特异性也通过实验得到证实 (图 1f)。此外, GalNAc-LYTAC 还成功降解了 HCC 细胞系中的另一种膜蛋白——人表皮生长因子受体 2 (human epidermal

growth factor receptor-2, HER2)。研究人员还发现, tri-GalNAc 与 POI 配体的不同偶联位点对 GalNAc-LYTAC 的蛋白质降解能力有不同影响。该工作证实了开发组织和细胞特异性的 LYTAC 策略是可行的, 且在癌症治疗方面具有潜在的应用价值。同一时间, 唐维平等^[31]出于发现更多 LTR 的目的也开发出了基于 ASGPR 的细胞特异性 LYTAC, 并利用其成功降解内源性和外源性蛋白, 以及证明了其作为反义寡核苷酸递送载体的可行性。

随着 LYTAC 技术的不断发展, 越来越多基于 LYTAC 原理的创新性研究被报道。想要从根源上开发出更加多样化的 LYTAC 分子, 介导 LYTAC 内化和 POI 溶酶体降解的新型 LTR 的发现与应用是至关重要的, 而目前可作为 LTR 的膜蛋白十分有限, 还达不到开发更广泛 LYTAC 分子的要求。基于 LTR 受限的问题, 葛璟燕等^[32]报道了一种 GLP-1-LYTAC, 其利用胰高血糖素样肽 1 (glucagon-like peptide-1, GLP-1) 作为一种新发现的 LTR, 胰高血糖素样肽 1 受体 (glucagon-like peptide-1 receptor, GLP-1R), 的配体, 通过 GLP-1 与 GLP-1R 的特异性识别与结合成功介导了包括绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 和中性抗生物素蛋白在内的胞外蛋白以及包括 EGFR 和细胞程序性死亡配体 1 (programmed death ligand 1, PD-L1) 在内的膜蛋白的靶向溶酶体降解。此外, 利用转铁蛋白受体 (transferrin receptor, TfR) 作为 LTR 构成的 TfR-LYTAC 分子也已被报道^[33]。以上研究证实了发现更多新型 LTR 以拓宽 LYTAC 应用的可行性, 也从新型 LTR 开发的角度为更多功能化 LYTAC 的研发提供了新思路。然而, 不论是以 CI-M6PR 还是 ASGPR 作为 LTR 的 LYTAC 分子, 其 LTR 配体主要是基于糖基化修饰的糖肽, 开发及合成过程十分复杂且困难, 这在一定程度上提高了 LYTAC 分子的合成难度及成本。CI-M6PR 又被称为胰岛素样生长因子 2 受体 (insulin-like growth factor 2 receptor, IGF2R), 其可以结合非糖基化胰岛素样生长因子 2 (insulin-like growth factor 2, IGF2) 已被证实^[34]。因此, 基于糖基化配体开发合成复杂化问题, 葛璟燕团队联合新加坡国立大学和大连理工大学又开发出 iLYTACs, 其利用非糖基化 IGF2 作为 CI-M6PR 的配体实现了 POI 的溶酶体降解^[35]。另外, 通过自组装技术形成的纳米球型 LYTAC 也已有研究^[36-37]。

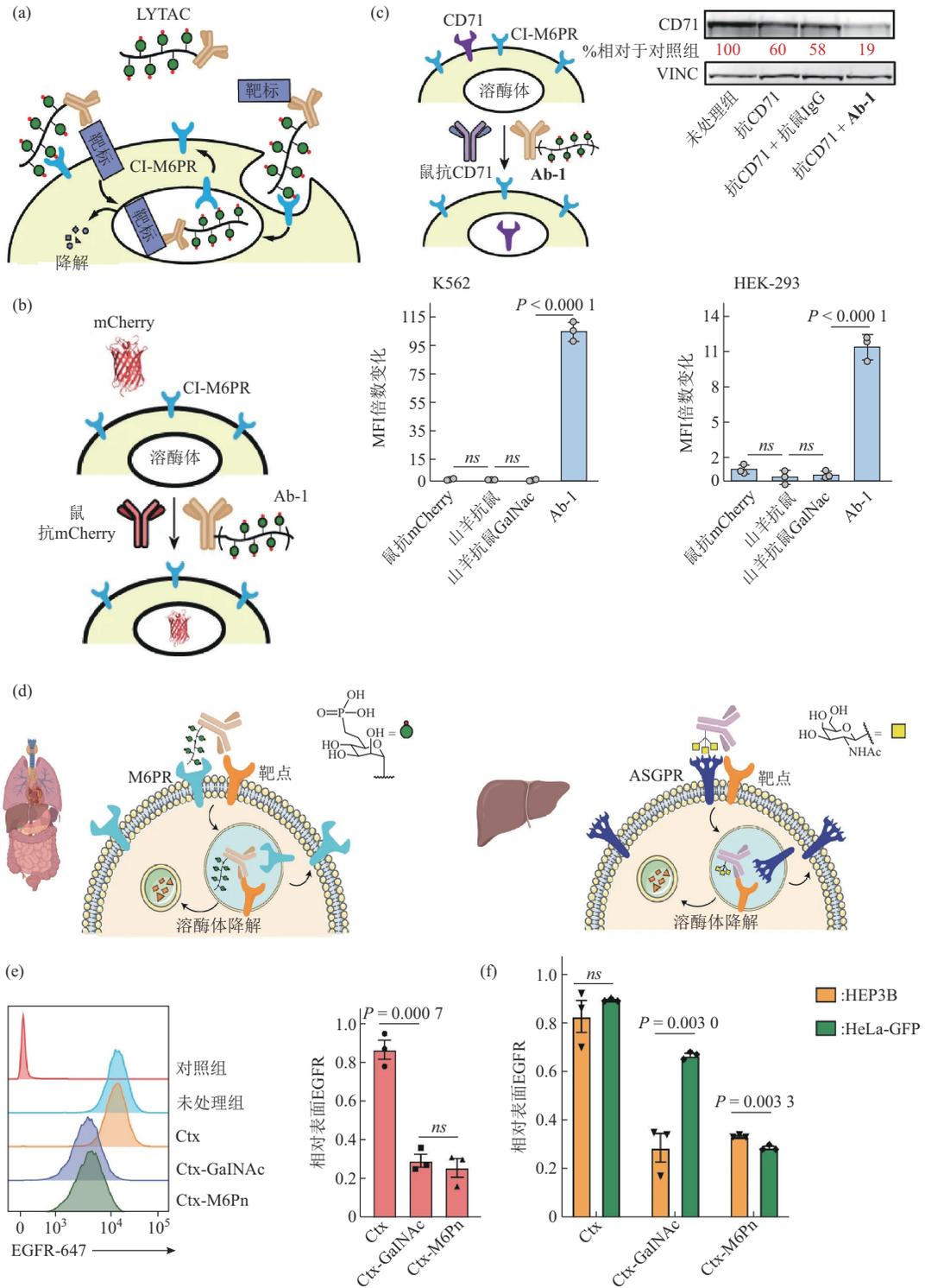


Fig. 1 M6Pn-LYTAC and GalNAc-LYTAC [23, 26]

图1 M6Pn-LYTAC和GalNAc-LYTAC [23, 26]

(a) M6Pn-LYTAC的结构和内化机制。(b) M6Pn-LYTAC介导膜蛋白CD71的靶向降解。(c) M6Pn-LYTAC介导胞外蛋白mCherry的细胞内化。(d) GalNAc-LYTAC与第一代LYTAC的比较。(e) GalNAc-LYTAC在肝细胞的EGFR靶向降解能力与M6Pn-LYTAC相当。(f) GalNAc-LYTAC的细胞特异性。

尽管LYTAC技术以其靶向降解胞外蛋白的优势得到广泛关注和快速发展，其同样存在一些不足

并面临一些困难与挑战。LYTAC分子可以很好地解决PROTAC分子目前无法靶向降解胞外蛋白的

弊端, 但却无法像 PROTAC 分子一样靶向降解胞内蛋白质, 这是由其本身的特性决定的。另外, LYTAC 降解胞外蛋白质的属性与中和抗体略有相似, 而后者是已被证实的临床应用模块, 因此 LYTAC 技术需要找到契合自身特性的独特应用^[38]。LYTAC 分子需要借助 LTR 实现其 POI 溶酶体靶向降解功能, 而目前主流的 LTR 仅有 CI-M6PR 和 ASGPR 两种, 因此开发更多以及可以介导更有效的 LYTAC 内化的新型 LTR 是拓展 LYTAC 分子应用范围的一大关键。与此同时, 基于 LYTAC 分子中糖基化修饰糖肽配体的开发合成难度问题, 亟需开发化学合成更简单的糖肽分子或发现更多可与 LTR 结合的非糖基化蛋白分子, 在保证高效细胞内化能力的基础上降低开发成本以及 LYTAC 合成风险。值得注意的是, 由于 LYTAC 分子中糖肽配体与 POI 结合抗体的偶联是非特异性的, 因此糖结构与 POI 配体的最佳化学计量比以及它们之间的最佳连接位点仍是一个待解决的重要挑战^[39]。

2 核酸驱动的 LYTAC 技术

LYTAC 分子作为由 LTR 配体、POI 配体以及联系二者的连接链 3 部分构成的异双功能靶向性分子, 最初被开发时其 POI 配体主要为与 POI 空间特异性互补结合的抗体, 而其 LTR 配体则主要为能与 CI-M6PR 和 ASGPR 结合介导 LYTAC 分子细胞内化的糖肽分子^[23, 26, 31]。抗体的免疫原性是其不能忽视的体内安全问题之一; 重组抗体的合成难度决定了其相对较昂贵的合成价格, 进而导致 LYTAC 分子合成成本的提升; 作为蛋白质的一种, 抗体自身具有相对不稳定、易变性和易降解的特性等。上述局限在一定程度上阻碍了抗体作为 LYTAC 分子中“一环”的进一步发展^[40-41]。糖肽分子在化学合成上的复杂性也是 LYTAC 技术亟待解决的问题。

核酸适配体属于核酸分子的一种, 是通过指数富集的配体进化技术 (systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX) 得到的具有独特三维结构的单链 DNA 或 RNA 寡核苷酸^[40]。其常见三维结构有茎、环、发夹和 G4 四链体等, 这些三维结构使得核酸适配体能够与目标分子如 DNA、RNA 或蛋白质等特异性结合从而达到特定生物学目的^[42]。相较于抗体以及糖肽分子,

通过 SELEX 技术筛选得到的核酸适配体比较容易合成, 其 POI 亲和力和特异性较高以及序列修饰和设计灵活性较强^[40-41, 43-44]。同时, 经过化学修饰的核酸适配体其体内免疫原性降低以及核酸稳定性提高也已有报道^[45]。这些优势突出了核酸适配体作为 LYTAC 分子的配体部分的巨大潜力, 更强调了核酸驱动的 LYTAC 技术在药物研发、疾病诊断和治疗方面所拥有的重要临床意义^[46-47]。

接下来本综述将从 LTR 受体类型的角度对目前主要的有关核酸驱动 LYTAC 技术做出归纳总结。首先介绍以 ASGPR 为 LTR 的核酸驱动 LYTAC 分子的应用; 然后介绍目前研究最多的 CI-M6PR 介导的核酸驱动 LYTAC 分子用于靶向降解 POI, 同时还依据配体不同进行了进一步归类; 最后描述了一种以清道夫受体作为新型 LTR 的核酸驱动 LYTAC 分子及其在肺癌模型的成功应用。通过对这些核酸驱动 LYTAC 的梳理总结, 以期新型核酸驱动 LYTAC 的开发提供新思路与新方向。

2.1 ASGPR 介导的核酸驱动 LYTAC 用于靶向降解胞外及膜蛋白

2023 年, 朱志等^[46]开发了一种核酸驱动的 LYTAC 分子并命名为 Apt-LYTAC。Apt-LYTAC 利用细胞特异性受体 ASGPR 作为其 LTR, 将基于 POI 设计的核酸适配体与 ASGPR 的配体 tri-GalNAc 相偶联, 通过 ASGPR 介导的途径将 POI 转运到溶酶体随后被蛋白酶降解。

该研究发现, Apt-LYTAC 可以介导人肝癌细胞系 HepG2 中膜蛋白酪氨酸蛋白激酶 7 (protein tyrosine kinase-7, PTK-7) 的高效降解而对人结肠腺癌细胞系 SW480 中的 PTK-7 没有明显降解效果。这也说明了 ASGPR 的细胞特异性以及 Apt-LYTAC 的细胞靶向性。此外, 研究还成功验证了在 HepG2 细胞系中 Apt-LYTAC 有效介导了胞外蛋白血小板源性生长因子 (platelet-derived growth factor, PDGF) 的高效细胞内化。值得注意的是, 研究还发现过量的 Apt-LYTAC 会在一定程度上抑制 POI 的内化, 提示了适量给药的重要性。

该研究首次证明了基于特异性核酸适配体的 LYTAC 能够实现胞外及膜蛋白的细胞特异性溶酶体降解。且由于核酸适配体可以简单地进行序列合理性改变以靶向不同 POI, 因此 Apt-LYTAC 相较于传统的以抗体为 POI 配体的 LYTAC 具有更广泛的适用性。

2.2 以CI-M6PR为LTR的核酸驱动LYTAC分子靶向降解POI

不同于ASGPR的细胞特异性，CI-M6PR广泛表达于许多细胞表面。因此相较于应用于肝细胞特异性POI降解的以ASGPR为LTR的核酸驱动LYTAC分子而言，CI-M6PR介导的核酸驱动LYTAC在一定程度上可以实现更多样化的POI靶向溶酶体降解。正因如此，目前的研究主要集中在以CI-M6PR为LTR的核酸驱动LYTAC分子的开发。接下来本文将依据核酸驱动LYTAC中配体部分的不同对基于单和双特异性核酸适配体的LYTAC、基于DNA双链的LYTAC和基于遗传编码的LYTAC分别综述。

2.2.1 基于单核酸适配体和双核酸适配体的LYTAC

韩达等^[48]开发了一种基于单核酸适配体的LYTAC，并将其命名为ITACs。不同于朱志课题组开发的以ASGPR作为LTR的Apt-LYTAC，ITACs利用IGF2作为CI-M6PR的配体，通过点击化学反应使IGF2与POI亲和的核酸适配体相结合，以此构建了靶向不同POI的ITACs并在多个细胞系中实现了膜表面POI的溶酶体转运和降解。同样地，谭蔚泓和吴琴等^[49]开发出一种基于多价核酸适配体的LYTAC，利用CI-M6PR成功介导了膜蛋白PTK-7和肝细胞生长因子受体（hepatocyte growth factor receptor, Met）的单独降解，以及两种POI的共同降解。该研究首次将LYTAC成功应用于协同降解两种POI，开拓了LYTAC作为多价降解递送系统的应用前景。

朱志等^[46]开发的Apt-LYTAC以及韩达等^[48]开发的ITACs证明了单核酸适配体作为LYTAC分子的POI配体的可行性。同基于单核酸适配体的LYTAC技术一样，双核酸适配体同时作为LYTAC三元复合体中的LTR配体和POI配体部分同样可行且高效。2021年，韩达团队^[50]率先报道了第一种基于双特异性核酸适配体的LYTAC分子。其基本结构为核酸适配体-连接链-核酸适配体，同样利用CI-M6PR作为LTR，通过核酸适配体与POI特异性结合介导膜蛋白靶向溶酶体降解（图2a）。首先，他们通过改变LYTAC分子内连接链的结构及长度设计了3种由不同DNA连接链组成的LYTAC分子D1、D2和D3，通过实验观察到由较长双链DNA作为连接链的D3相较于D1和D2展现了更强的Met溶酶体降解能力且具有剂量和时间依赖性（图

2b）。然而D3对于PTK-7的降解效率却不尽如人意，基于此，该团队又设计了D4并证实了其较强的PTK-7靶向溶酶体降解能力（图2c）。该研究充分验证了基于双特异性核酸适配体的LYTAC分子靶向降解膜蛋白的可行性，进一步拓展了核酸驱动的LYTAC技术的应用空间。随后，韩达团队又联合刘庄团队^[51]开发了一种同样依赖于CI-M6PR的共价LYTAC技术用于免疫检查点降解（immune checkpoint degradation, ICD）疗法。共价LYTAC同以往开发的LYTAC的不同之处在于，其POI特异性核酸适配体选择性结合肿瘤细胞表面高表达的PD-L1且带有二苯并环辛炔（dibenzocyclooctyne, DBCO）修饰。DBCO修饰的核酸适配体可以与叠氮（azide, N₃）标记的POI通过相互作用时的点击化学反应实现特异性共价偶联。因此，基于先前他人的研究，该研究选择四乙酰化N-叠氮基乙酰基-D-甘露糖胺（tetraacetylated N-azidoacetyl-D-mannosamine, Ac4ManNAz）作为前体将非天然N₃结合到活细胞表面，实现了共价LYTAC与PD-L1的共价结合并介导其靶向溶酶体降解，彻底阻断PD-1/PD-L1信号通路，恢复T细胞对肿瘤细胞的杀伤能力。该研究基于对PD-L1降解提出的ICD疗法，相较于目前已取得大量临床成功的免疫检查点阻断（immune checkpoint blockade, ICB）疗法，表现出更显著的抑瘤效果和更低的免疫相关副作用。同年，Keisuke Hamada团队^[52]开发了靶向HER2的基于双特异性DNA适配体的LYTAC，命名为HER2-LYTAC。HER2-LYTAC通过IGF2R介导的胞吞-溶酶体途径实现了高表达于乳腺癌细胞的膜蛋白HER2的降解，抑制其下游信号通路以及癌细胞增殖，具有成为HER2阳性癌症治疗药物的潜力。

金纳米颗粒（gold nanoparticles, AuNPs）表面可以构建核酸适配体并通过多价结合及细胞内化方式提高蛋白靶向降解效率^[53-54]。基于此，刘震等^[40]设计了高价双特异性金纳米颗粒锚定的LYTAC（AuNP-APTACs）。AuNP-APTACs通过连接在AuNPs表面的核酸适配体同时靶向IGF2R和ATP结合盒亚家族G成员2（ATP-binding cassette, subfamily G, isoform 2 protein, ABCG2）介导ABCG2蛋白的靶向降解且具有时间和浓度依赖效应（图2d, e）。研究表明，作为癌细胞表面标志物以及蛋白靶点之一的ABCG2通过外排药物的功能实现癌症治疗中的多药耐药逆转

(reverse multidrug resistance, MDR) 发生^[55-56]。因此刘震等的研究拓宽了MDR策略, 丰富了LYTAC在癌症治疗中的应用。值得注意的是, 核酸适配体对周围化学环境敏感、易被核酸酶降解导致不稳定以及作为单链核酸具有构象灵活性, 而在低浓度时以上缺点尤为明显, 且用于提高其稳定性的化学修饰策略如PS、2'-MeO、2'-F、UNA等又

具有成本高、合成难度大等问题, 因此严重阻碍了核酸适配体作为分子工具在科学研究以及临床实践中的进一步应用^[44, 57]。基于此, 王雪强团队^[58]报告了一种基于“点击化学”的、零下温度的分子叠加策略的高效核酸适配体胶 (aptamer glue, AptG) 定制方法, 并证明了AptG在癌细胞识别和膜蛋白靶向降解方面的能力显著增强。

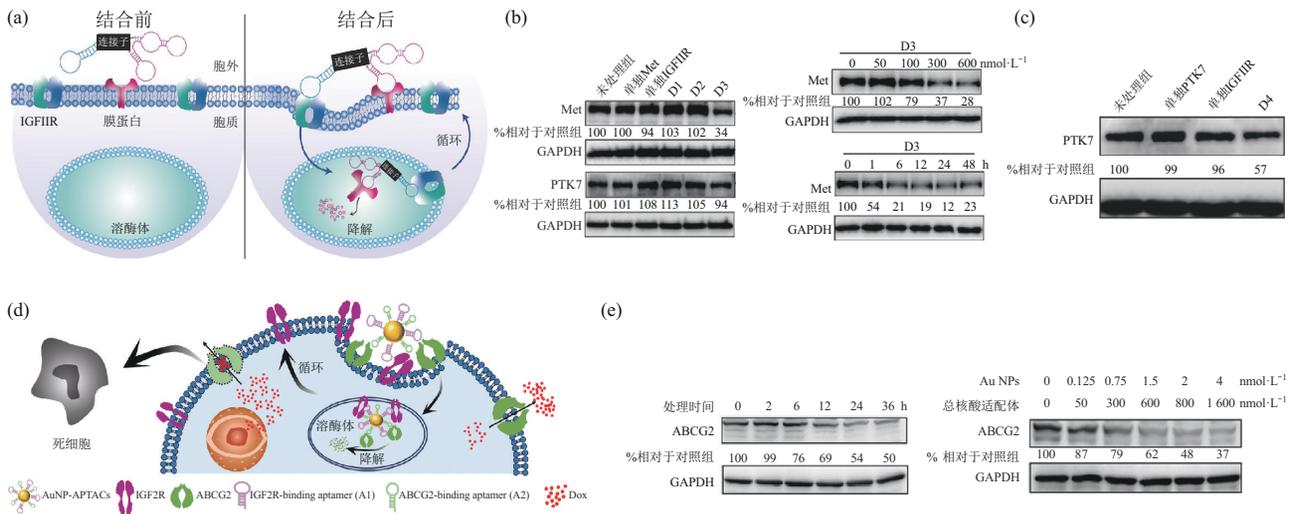


Fig. 2 Bispecific aptamers-based LYTAC^[40, 50]

图2 基于双特异性核酸适配体的LYTAC^[40, 50]

(a) 首个基于双特异性核酸适配体的LYTAC的结构和内化原理。(b) LYTAC分子D1、D2、D3的Met降解能力的比较以及D3对Met靶向降解的剂量和时间依赖效应。(c) LYTAC分子D4对PTK7的靶向降解效率。(d) AuNP-APTACs的结构和入胞机制。(e) AuNP-APTAC对ABCG2靶向降解的时间和浓度依赖效应。

2.2.2 基于双链DNA的LYTAC

生物体内许多膜蛋白在一系列疾病尤其癌症中充当致病蛋白的角色, 对疾病发展起着关键性作用^[59]。然而, 除了癌细胞外, 正常细胞也在一定程度上表达导致癌细胞发生的关键致病蛋白, 因此对于癌症治疗来说, 系统性给予LYTAC会导致全身毒性^[60]。另外, 对LYTAC分子结合POI和LTR的先后顺序不加以控制还会导致脱靶效应的发生。基于癌细胞选择性以及脱靶效应等问题, 刘颖等^[61]开发了一种基于逻辑识别系统的LYTAC (Logic-LYTAC)。Logic-LYTAC是一段双链DNA, 其选择降解的POI为黏蛋白1 (mucin 1, MUC1), 所结合的LTR为IGF2R。为了实现癌细胞选择性, 在到达靶标癌细胞之前, Logic-LYTAC的POI和LTR配体部分由各自的互补DNA链封闭着, 以免引起正常细胞毒性。Logic-LYTAC特异性识别癌细胞是基于在癌细胞MCF-7表面高表达且在正常细

胞MCF-10A表面几乎不表达的上皮细胞黏附分子 (epithelial cell adhesion molecule, EpCAM)^[62]。首先执行第一步DNA逻辑门, EpCAM与Logic-LYTAC相互作用以暴露其POI配体基序。随后执行第二步逻辑门, Logic-LYTAC与MUC1结合随后暴露其IGF2R结合配体。最后输出逻辑门, 结合POI的Logic-LYTAC再与IGF2R结合, 经过内化到达溶酶体并最终实现MUC1靶向溶酶体降解 (图3a)。这种“顺序识别和重新配置 (sequential recognition and reconfiguration, SECORE)”策略使得只有首先结合了POI的Logic-LYTAC才能进一步结合LTR以实现POI的靶向溶酶体降解, 避免了LYTAC的过度消耗导致的药物浪费。利用Logic-LYTAC技术既保证了LYTAC的癌细胞选择性又降低了不必要的脱靶效应, 减弱了由于系统治疗带来的全身毒副作用, 且由于其本质上属于双链DNA结构, 因此又具有序列设计精确、制备简便、低成

本等优势。未来可以致力于发现更多的癌细胞标志蛋白以及LTR以扩大SECORE策略的应用范围,以更好地推进其临床进程。

越来越多证据表明许多疾病的发生是多因子共同作用的结果,因此协同治疗已逐渐成为最常用的治疗手段,且基于两种不同治疗相协同的临床研究已达数百种^[63-65]。2024年,洪佳旭和张川团队^[66]基于协同治疗策略开发了一种以核酸骨架组成的LYTAC Plus水凝胶,实现了靶向降解膜蛋白血管内皮生长因子受体2 (vascular endothelial growth factor receptor-2, VEGFR-2) 和敲低血管生成素2 (angiopoietin-2, ANG-2) 的信使RNA (messenger RNA, mRNA) 的协同。自组装核酸水凝胶由于其可编程化的自组装能力、易合成以及优异的生物相容性等特征已然发展成为一种新型治疗性递送载体^[67]。随着核酸修饰技术的逐渐成熟,现在LTR以及POI结合基序可以很容易地与核酸水凝胶相结合^[66]。该团队基于此设计了下一代LYTAC材料,称之为LYTAC Plus。首先,选择M6PR作为LTR,设计了M6P修饰的DNA单链,使其可以通过退火过程自组装形成Y型DNA基序。其次,选择膜蛋白VEGFR-2作为POI,合成针对VEGFR-2的配体肽并将该配体肽与DNA单链偶联以形成肽修饰的DNA连接链1,随后通过与DNA连接链2互补配对进一步形成POI配体肽修饰的DNA连接链。进一步地,通过M6P修饰的DNA基序、ANG-2的siRNA以及POI配体肽修饰的DNA连接链的自组装最终组成LYTAC Plus水凝胶(图3b)。LYTAC Plus水凝胶通过其LYTAC模块即M6P结合M6PR介导POI配体肽结合的VEGFR-2的细胞内化实现了多种细胞表面VEGFR-2的靶向溶酶体降解(图3c),同时,其siRNA功能模块可以通过RNA诱导沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC)的形成作用于ANG-2 mRNA并介导其降解(图3d),以此完成了POI和目标mRNA降解的协同。在模型治疗验证方面,LYTAC Plus水凝胶被设计用于治疗新生血管性年龄相关黄斑变性(neovascular age-related macular degeneration, n-AMD)。n-AMD是一种可以造成不可逆视力丧失的眼部疾病,该疾病的主要驱动因素包括VEGF/VEGFR以及ANG-2分子通路的过度激活^[68-69]。该研究将LYTAC Plus水凝胶通过玻璃体腔注射至激光诱导的n-AMD模型小鼠的眼球内,LYTAC Plus水凝胶被体液环境中的DNA酶I降解成微粒,随后

分别释放出靶向VEGFR-2的LYTAC模块和靶向ANG-2的siRNA模块。通过对模型小鼠视网膜的免疫荧光染色发现LYTAC Plus水凝胶同时降低了视网膜中VEGFR2和ANG-2的蛋白质表达水平(图3e),表现出了优异的抗血管生成能力和治疗效果。作为一种通用的LYTAC平台,LYTAC Plus水凝胶赋予了核酸驱动的LYTAC新的功能,并拓宽了其在生物医学领域的应用范围。

2.2.3 基于遗传编码的LYTAC

不论是最初的由抗体和糖肽组成的LYTAC还是新兴的核酸驱动LYTAC,其LYTAC分子本身是经过化学合成的。值得注意的是,最近Ting等^[70]报道了一种遗传编码的LYTAC分子。不同于以往通过化学合成得到的LYTAC分子,该遗传编码LYTAC (GELYTACs) 的所有组成部分,包括POI配体、LTR配体和连接器部分,均由转基因编码,可以将其直接引入治疗相关细胞以表达构建的LYTAC分子(图4a)。GELYTAC利用IGF2作为LTR配体,选择性靶向降解mCherry、转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF β) 等蛋白质。同时,基于DNA序列的易编辑特征,该研究通过定向进化对GELYTAC中编码IGF2的序列部分进行突变,使其获得更强的IGF2R结合能力进而介导更高效的mCherry内化效率(图4b)。嵌合抗原受体T细胞(chimeric antigen receptor-T cell, CAR-T) 疗法可以用来靶向肿瘤、在肿瘤内增殖并有效递送治疗性蛋白至肿瘤细胞^[71-72]。因此该研究借鉴CAR-T技术,通过工程化改造原代T细胞使其分泌GELYTAC并有效递送至肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)(图4c)。该研究从基因层面合理开发出基于全遗传编码的LYTAC技术,相较于化学合成层面的LYTAC开发具有更广阔的应用空间,如mRNA以及病毒基因治疗载体等基因药物研发。

2.3 核酸驱动LYTAC利用清道夫受体介导POI的靶向溶酶体降解

同传统LYTAC相似,介导核酸驱动LYTAC分子细胞内化的LTR同样以CI-M6PR和ASGPR为主,其中又以CI-M6PR占绝大多数。受限于LTR种类问题,开发出更多样化的介导核酸驱动LYTAC内化和POI溶酶体降解的新型LTR无疑是进一步发展核酸驱动LYTAC分子的巨大推动力。

李金波和张艳团队^[73]于2023年首次报道了清道夫受体(scavenger receptor, SR)介导的树突状

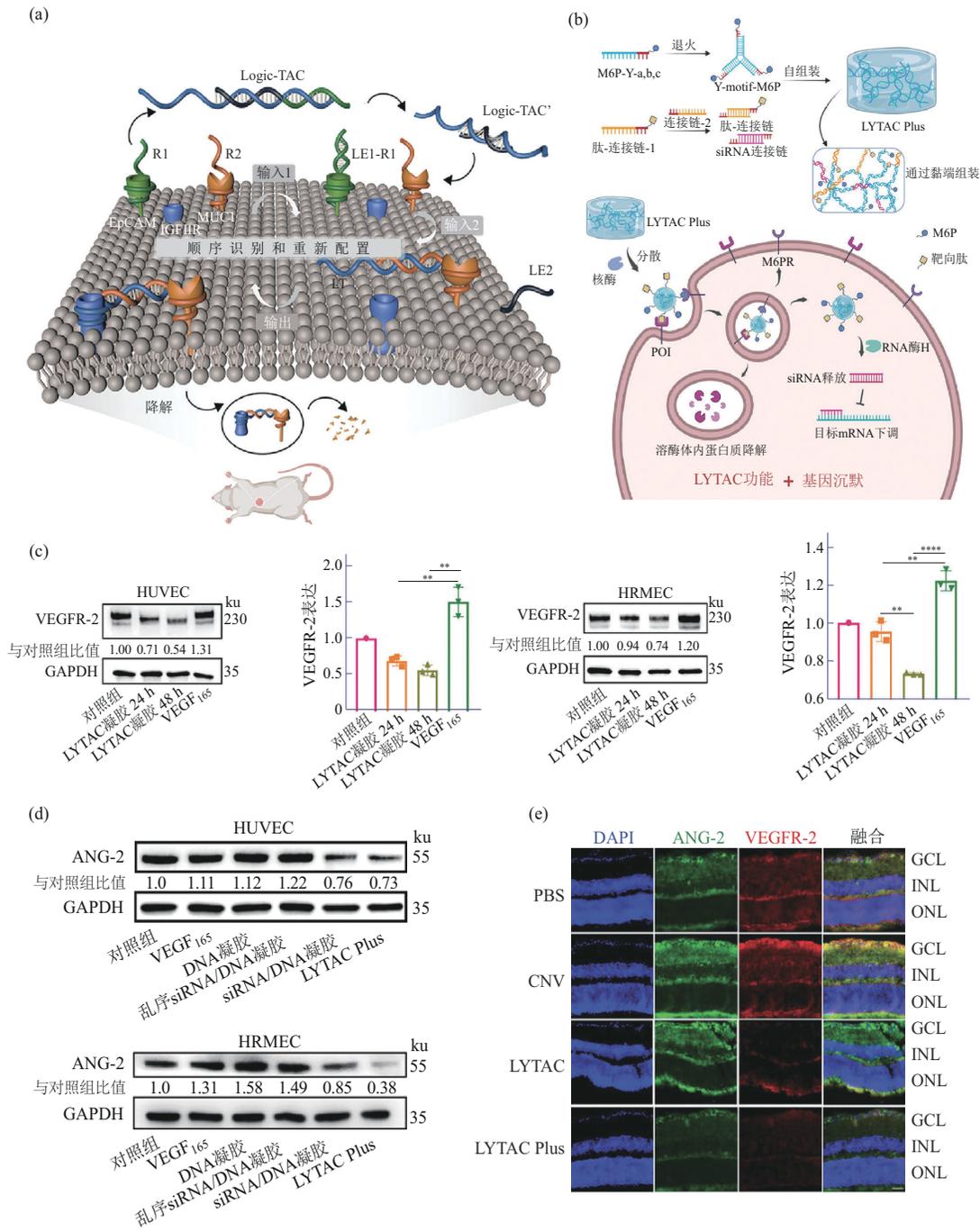


Fig. 3 Logic-LYTAC and nucleic acid-consisting LYTAC Plus hydrogel [61, 66]

图3 基于逻辑识别系统的LYTAC和以核酸骨架组成的LYTAC Plus水凝胶 [61, 66]

(a) Logic-LYTAC的结构构建及SCORE策略的分子机制。(b) LYTAC Plus水凝胶的设计与分子机制。(c) LYTAC Plus水凝胶的LYTAC模块介导VEGFR-2的溶酶体靶向降解。 $**P<0.01$, $****P<0.0001$ 。(d) LYTAC Plus水凝胶的siRNA模块介导ANG-2蛋白表达下调。(e) LYTAC Plus水凝胶介导n-AMD小鼠视网膜内VEGFR-2和ANG-2蛋白降解。

DNA嵌合体 (DENTAC) 用于膜蛋白靶向溶酶体降解。SR是一种阴离子配体结合受体, 多见于巨噬细胞表面, 以化学修饰的蛋白质、核酸、多糖和

磷脂等为配体并可促进其细胞内化, 起着清除外来有毒物质以及促进细胞衰老、凋亡或坏死的作用, 通过小窝蛋白介导的内吞作用使外来物质进入溶酶

体降解^[74]。SR在肿瘤细胞表面高表达,因此具有作为LTR的开发潜力。DENTAC的LTR配体为共价支链DNA分子,其整体带负电荷,是细胞表面SR的通用配体^[75]。基于对SR作为LTR介导膜蛋白降解功能的验证,该研究利用三倍频磷酸胺结合固相寡核苷酸合成技术合成了一个具有三个聚胸腺嘧啶分支和一个聚胸腺嘧啶茎的聚胸腺嘧啶DNA树突状分子PTDD,其中茎端采用DBCO修饰,因此PTDD可以通过点击化学反应与N3修饰的POI配体偶联从而得到完整的DENTAC(图4d)。利用DENTAC,外源性免疫球蛋白G(immunoglobulin G, IgG)的靶向溶酶体降解被证明是可行的。进一步地,作者以膜蛋白核仁素(nucleolin, NCL)作为POI。NCL被报道于癌细胞膜表面过表达以展

现其致癌作用,且抑制膜NCL的表达是一种强大的抑瘤手段^[76-77]。DENTAC通过将PTDD与对膜NCL具有很高亲和力的核酸适配体AS1411进行偶联得到SR介导的膜NCL靶向溶酶体降解的N-DENTAC,并展示了其细胞水平膜NCL靶向降解的高效性和稳定性(图4e),同时在小鼠皮下肺癌肿瘤模型上验证了N-DENTAC的抗癌活性(图4f)^[73]。该研究首次证明了SR作为LTR可以介导膜蛋白的靶向溶酶体降解。次年,该团队又将DENTAC成功应用于胞外蛋白质的靶向溶酶体降解,阐释了SR介导溶酶体降解胞外蛋白的潜力,证明了SR可以作为胞外蛋白质靶向溶酶体降解的LTR^[78]。

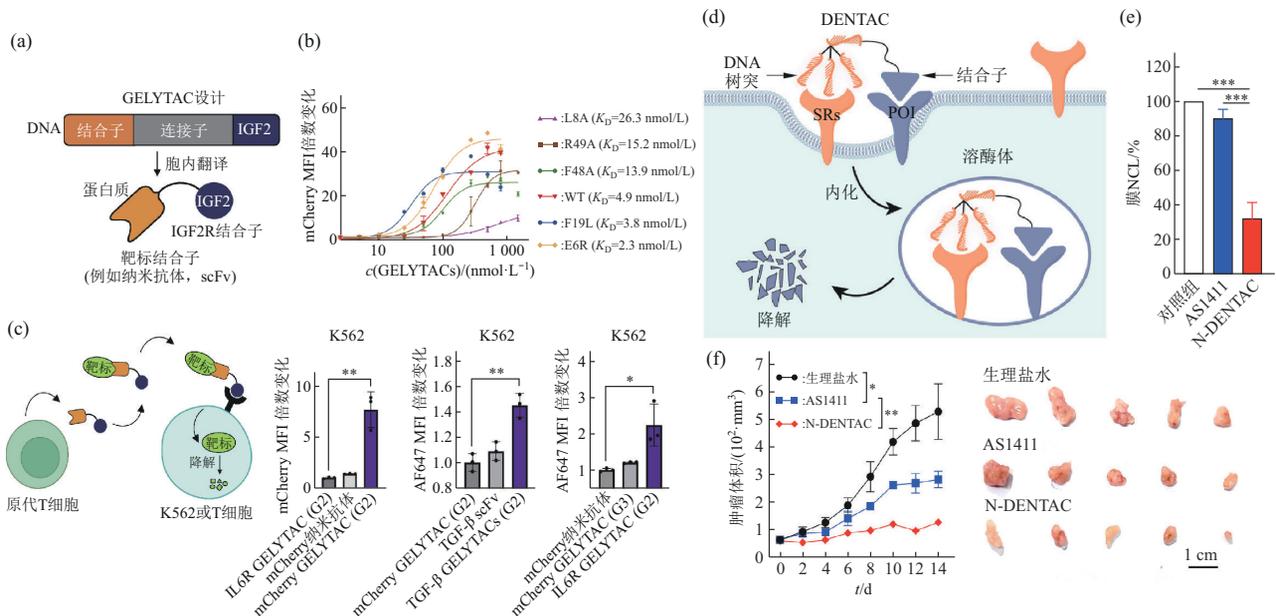


Fig. 4 Genetically encoded LYTAC and SR-mediated nucleic acid-driven LYTAC^[70, 73]

图4 基于遗传编码的LYTAC和清道夫受体介导的核酸驱动LYTAC^[70, 73]

(a) GELYTAC的设计。(b) IGF2R配体序列突变对mCherry细胞内化效率的影响。(c) 工程化原代T细胞分泌GELYTAC提高肿瘤细胞的POI内化能力。(d) DENTAC的设计。(e) N-DENTAC对膜NCL的靶向溶酶体降解能力。(f) N-DENTAC对皮下肺癌肿瘤小鼠模型的抗癌效果验证。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

3 核酸驱动的LYTAC技术的挑战与未来

虽然核酸驱动的LYTAC技术因其独特的基于溶酶体途径的TPD能力展示出广泛的应用前景和潜在的临床价值,但在实际应用中仍面临着一些挑战。例如,从利用CI-M6PR作为LTR的第一代LYTAC分子被开发以来,研究发现利用CI-M6PR介导LYTAC分子的各种POI靶向溶酶体降解效率

无法超过70%~80%,这暗示了LYTAC分子依赖CI-M6PR的溶酶体运输过程存在某些未知的关键影响因素限制了其针对POI的高效降解。幸运的是,开发出第一代LYTAC分子的Bertozzi团队^[79]于2023年揭开了影响CI-M6PR介导POI高效降解的关键分子机制。该研究利用全基因组CRISPR敲除技术发现,逆转录复合体核心成分如VPS35、VPS26A、SNX3等对POI依赖于CI-M6PR的溶酶

体降解效率有着显著影响, 其中在 VPS26A 缺失的细胞中通过给予 M6Pn-LYTAC 观察到高于 90% 的膜蛋白 EGFR 降解, 证明干扰逆转录基因可改善依赖于 CI-M6PR 的 POI 溶酶体降解。同时, 该研究发现, 细胞中更高的拟素化 cullin 3 (CUL3) 水平意味着 LYTAC 分子更高的基于 CI-M6PR 的 POI 靶向溶酶体降解能力, 提示了拟素化 CUL3 促进 LYTAC 复合体的溶酶体成熟, 是 LYTAC 介导的 POI 降解的预测标志物。此外, 研究还发现大多数细胞表面 CI-M6PR 被内源性 M6P 修饰的糖蛋白尤其是溶酶体水解酶所占据, 而抑制 M6P 的生物合成增加了细胞表面 CI-M6PR 的可及性、促进了 LYTAC-POI 的细胞内化能力以及介导了更强的 POI 靶向溶酶体降解。该机制的揭示对于依赖 CI-M6PR 的 LYTAC 技术的优化以及进一步的药物研发提供了宝贵的参考价值。然而, 该研究仅揭示 CI-M6PR 作为 LTR 的机制阐述, 还有更多作为 LYTAC 行使 TPD 功能的关键 LTR 的详细分子机制有待报道, 以广泛性提高 LYTAC 分子的靶向溶酶体降解效率, 更好地适应临床发展。

作为新兴的 LYTAC 技术, 核酸驱动 LYTAC 分子因其利用核酸分子作为 LYTAC 中的关键组分而得名。而核酸的稳定性一直以来都是其作为不论是分子药物还是递送体系的关键挑战之一^[80-81]。天然的未加修饰的核酸分子在体内易受到循环系统中的核酸酶的降解和清除, 这在很大程度上限制了其体内稳定性和持续作用能力^[82]。值得关注的是, 基于核酸序列的许多化学修饰策略已被报道并成功应用于 FDA 批准的核酸药物, 修饰后的核酸分子也展现出了更强的体内稳定性及生物相容性^[45, 83]。但现有的核酸修饰方式并不能满足基于核酸分子的所有科学研究及新型药物研发状况, 因此更多更广泛以及更普适的核酸体内安全及稳定性修饰策略的开发依然拥有极其广阔的应用前景和临床价值。其次, LYTAC 嵌合体的构建需要考虑核酸和溶酶体结构域之间的相互作用和配位^[84], 因此核酸驱动 LYTAC 的设计也是影响其 POI 降解效率的主要挑战之一。而针对嵌合体构建优化问题, 目前的研究相对较少, 更多的关注点则是集中在 POI 配体的设计与选择、基于新概念的 LYTAC 分子的开发等方面, 因此未来相关研究可以着重于考虑核酸分子与溶酶体的作用关系等一系列复杂的机制问题。

基于核酸驱动的 LYTAC 技术因其相对于传统 LYTAC 具有免疫原性及毒副作用低、POI 配体设

计简单、合成方便、可塑性强等优势正在得到越来越广泛的关注。更多 LTR 的发现对于开拓 LYTAC 在不同领域的生物学应用范围同样至关重要, 设计出具有更高 POI 亲和力的核酸配体则是核酸驱动 LYTAC 分子功能有效性的关键之一。未来的研究中, 可以突出关注新型 LTR 发现、核酸配体整体优化、多样化核酸驱动 LYTAC 分子开发以及 LTR 基于溶酶体途径的 POI 靶向降解的分子机制等重要问题, 探索新的技术策略和方法, 进一步优化核酸驱动 LYTAC 技术, 为其在生物学研究、药物研发及临床应用等领域中的广泛应用提供更多的可能性。

参 考 文 献

- [1] Xu J, Kong Y, Zhu P, *et al.* Progress in small-molecule inhibitors targeting PD-L1. *RSC Med Chem*, 2024, **15**(4): 1161-1175
- [2] Berger M F, Mardis E R. The emerging clinical relevance of genomics in cancer medicine. *Nat Rev Clin Oncol*, 2018, **15**(6): 353-365
- [3] Liu G H, Chen T, Zhang X, *et al.* Small molecule inhibitors targeting the cancers. *MedComm*, 2022, **3**(4): e181
- [4] Carter P J, Lazar G A. Next generation antibody drugs: pursuit of the 'high-hanging fruit'. *Nat Rev Drug Discov*, 2018, **17**(3): 197-223
- [5] Li G, Song Z, Ru Y, *et al.* Small-molecule nanoprodru with high drug loading and EGFR, PI3K/AKT dual-inhibiting properties for bladder cancer treatment. *Exploration*, 2023, **3**(5): 20220141
- [6] Song J, Hu M, Zhou J, *et al.* Targeted protein degradation in drug development: recent advances and future challenges. *Eur J Med Chem*, 2023, **261**: 115839
- [7] Li X, Pu W, Zheng Q, *et al.* Proteolysis-targeting chimeras (PROTACs) in cancer therapy. *Mol Cancer*, 2022, **21**(1): 99
- [8] Zhong Y, Chi F, Wu H, *et al.* Emerging targeted protein degradation tools for innovative drug discovery: from classical PROTACs to the novel and beyond. *Eur J Med Chem*, 2022, **231**: 114142
- [9] Lee J, Lee Y, Jung Y M, *et al.* Discovery of E3 ligase ligands for target protein degradation. *Molecules*, 2022, **27**(19): 6515
- [10] Zhang C, Liu Y, Li G, *et al.* Targeting the undruggables-the power of protein degraders. *Sci Bull*, 2024, **69**(11): 1776-1797
- [11] Sakamoto K M, Kim K B, Kumagai A, *et al.* Protacs: chimeric molecules that target proteins to the Skp1-Cullin-F box complex for ubiquitination and degradation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**(15): 8554-8559
- [12] Békés M, Langley D R, Crews C M. PROTAC targeted protein degraders: the past is prologue. *Nat Rev Drug Discov*, 2022, **21**(3): 181-200
- [13] Gao J, Hou B, Zhu Q, *et al.* Engineered bioorthogonal POLY-PROTAC nanoparticles for tumour-specific protein degradation and precise cancer therapy. *Nat Commun*, 2022, **13**(1): 4318

- [14] Wang C, Zheng C, Wang H, *et al.* The state of the art of PROTAC technologies for drug discovery. *Eur J Med Chem*, 2022, **235**: 114290
- [15] Cotton A D, Nguyen D P, Gramspacher J A, *et al.* Development of antibody-based PROTACs for the degradation of the cell-surface immune checkpoint protein PD-L1. *J Am Chem Soc*, 2021, **143**(2): 593-598
- [16] Marei H, Tsai W T K, Kee Y S, *et al.* Antibody targeting of E3 ubiquitin ligases for receptor degradation. *Nature*, 2022, **610**(7930): 182-189
- [17] Uhlén M, Fagerberg L, Hallström B M, *et al.* Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science*, 2015, **347**(6220): 1260419
- [18] Chen X, Zhou Y, Zhao Y, *et al.* Targeted degradation of extracellular secreted and membrane proteins. *Trends Pharmacol Sci*, 2023, **44**(11): 762-775
- [19] Saftig P, Klumperman J. Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, **10**(9): 623-635
- [20] Dikic I. Proteasomal and autophagic degradation systems. *Annu Rev Biochem*, 2017, **86**: 193-224
- [21] Yang C, Wang X. Lysosome biogenesis: regulation and functions. *J Cell Biol*, 2021, **220**(6): e202102001
- [22] Eldeeb M A, Zorca C E, Goiran T. Extracellular protein degradation *via* the lysosome. *Commun Chem*, 2020, **3**(1): 149
- [23] Banik S M, Pedram K, Wisnovsky S, *et al.* Lysosome-targeting chimaeras for degradation of extracellular proteins. *Nature*, 2020, **584**(7820): 291-297
- [24] Fang Y, Wang J, Zhao M, *et al.* Progress and challenges in targeted protein degradation for neurodegenerative disease therapy. *J Med Chem*, 2022, **65**(17): 11454-11477
- [25] Calcagni' A, Staiano L, Zampelli N, *et al.* Loss of the batten disease protein CLN3 leads to mis-trafficking of M6PR and defective autophagic-lysosomal reformation. *Nat Commun*, 2023, **14**(1): 3911
- [26] Ahn G, Banik S M, Miller C L, *et al.* LYTACs that engage the asialoglycoprotein receptor for targeted protein degradation. *Nat Chem Biol*, 2021, **17**(9): 937-946
- [27] Zimmermann T S, Karsten V, Chan A, *et al.* Clinical proof of concept for a novel hepatocyte-targeting GalNAc-siRNA conjugate. *Mol Ther*, 2017, **25**(1): 71-78
- [28] Spiess M. The asialoglycoprotein receptor: a model for endocytic transport receptors. *Biochemistry*, 1990, **29**(43): 10009-10018
- [29] Park E I, Mi Y, Unverzagt C, *et al.* The asialoglycoprotein receptor clears glycoconjugates terminating with sialic acid alpha 2, 6GalNAc. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**(47): 17125-17129
- [30] Stockert R J. The asialoglycoprotein receptor: relationships between structure, function, and expression. *Physiol Rev*, 1995, **75**(3): 591-609
- [31] Zhou Y, Teng P, Montgomery N T, *et al.* Development of triantennary N-acetylgalactosamine conjugates as degraders for extracellular proteins. *ACS Cent Sci*, 2021, **7**(3): 499-506
- [32] Zhu L, Zhou Y, Zhang B, *et al.* Conjugation with glucagon like peptide-1 enables targeted protein degradation. *Bioorg Chem*, 2023, **141**: 106908
- [33] Su L Y, Tian Y, Zheng Q, *et al.* Anti-tumor immunotherapy using engineered bacterial outer membrane vesicles fused to lysosome-targeting chimeras mediated by transferrin receptor. *Cell Chem Biol*, 2024, **31**(6): 1219-1230.e5
- [34] Bochel A J, Williams C, McCoy A J, *et al.* Structure of the human cation-independent mannose 6-phosphate/IGF2 receptor domains 7-11 uncovers the mannose 6-phosphate binding site of domain 9. *Structure*, 2020, **28**(12): 1300-1312.e5
- [35] Zhang B, Brahma R K, Zhu L, *et al.* Insulin-like growth factor 2 (IGF2) -fused lysosomal targeting chimeras for degradation of extracellular and membrane proteins. *J Am Chem Soc*, 2023, **145**(44): 24272-24283
- [36] Wang J, Wang Y, Yang F, *et al.* A novel lysosome targeting chimera for targeted protein degradation *via* split-and-mix strategy. *ACS Chem Biol*, 2024, **19**(5): 1161-1168
- [37] Wang K, Yu A, Liu K, *et al.* Nano-LYTACs for degradation of membrane proteins and inhibition of CD24/siglec-10 signaling pathway. *Adv Sci*, 2023, **10**(13): e2300288
- [38] Paudel R R, Lu D, Roy Chowdhury S, *et al.* Targeted protein degradation *via* lysosomes. *Biochemistry*, 2023, **62**(3): 564-579
- [39] Zheng H, Li G, Min J, *et al.* Lysosome and related protein degradation technologies. *Drug Discov Today*, 2023, **28**(11): 103767
- [40] Lu W, Chen J, Guo Z, *et al.* Targeted degradation of ABCG2 for reversing multidrug resistance by hypervalent bispecific gold nanoparticle-anchored aptamer chimeras. *Chem Commun*, 2023, **59**(21): 3118-3121
- [41] Zhou Y, Zhuo Y, Peng R, *et al.* Functional nucleic acid-based cell imaging and manipulation. *Sci China Chem*, 2021, **64**(11): 1817-1825
- [42] Chen S, Zhang L, Yuan Q, *et al.* Current advances in aptamer-based biomolecular recognition and biological process regulation. *Chem Res Chin Univ*, 2022, **38**(4): 847-855
- [43] Tan W, Donovan M J, Jiang J. Aptamers from cell-based selection for bioanalytical applications. *Chem Rev*, 2013, **113**(4): 2842-2862
- [44] Zhou J, Rossi J. Aptamers as targeted therapeutics: current potential and challenges. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, **16**(6): 440
- [45] Zhang M, Huang Y. siRNA modification and delivery for drug development. *Trends Mol Med*, 2022, **28**(10): 892-893
- [46] Wu Y, Lin B, Lu Y, *et al.* Aptamer-LYTACs for targeted degradation of extracellular and membrane proteins. *Angew Chem Int Ed*, 2023, **62**(15): e202218106
- [47] Nair J K, Willoughby J L S, Chan A, *et al.* Multivalent N-acetylgalactosamine-conjugated siRNA localizes in hepatocytes and elicits robust RNAi-mediated gene silencing. *J Am Chem Soc*, 2014, **136**(49): 16958-16961
- [48] Tian Y, Miao Y, Guo P, *et al.* Insulin-like growth factor 2-tagged aptamer chimeras (ITACs) modular assembly for targeted and efficient degradation of two membrane proteins. *Angew Chem Int Ed*, 2024, **63**(5): e202316089
- [49] Duan Q, Jia H R, Chen W, *et al.* Multivalent aptamer-based

- lysosome-targeting chimeras (LYTACs) platform for mono- or dual-targeted proteins degradation on cell surface. *Adv Sci*, 2024, **11**(17): e2308924
- [50] Miao Y, Gao Q, Mao M, *et al.* Bispecific aptamer chimeras enable targeted protein degradation on cell membranes. *Angew Chem Int Ed*, 2021, **60**(20): 11267-11271
- [51] Li Y, Liu X, Yu L, *et al.* Covalent LYTAC enabled by DNA aptamers for immune checkpoint degradation therapy. *J Am Chem Soc*, 2023, **145**(45): 24506-24521
- [52] Hamada K, Hashimoto T, Iwashita R, *et al.* Development of a bispecific DNA-aptamer-based lysosome-targeting chimera for HER2 protein degradation. *Cell Rep Phys Sci*, 2023, **4**(3): 101296
- [53] Song Y, Shi Y, Huang M, *et al.* Bioinspired engineering of a multivalent aptamer-functionalized nanointerface to enhance the capture and release of circulating tumor cells. *Angew Chem Int Ed*, 2019, **58**(8): 2236-2240
- [54] Lei H, Pei Z, Jiang C, *et al.* Recent progress of metal-based nanomaterials with anti-tumor biological effects for enhanced cancer therapy. *Exploration*, 2023, **3**(5): 20220001
- [55] Gottesman MM, Fojo T, Bates S E. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer*, 2002, **2**(1): 48-58
- [56] Medema J P. Cancer stem cells: the challenges ahead. *Nat Cell Biol*, 2013, **15**(4): 338-344
- [57] Qi S, Duan N, Khan I M, *et al.* Strategies to manipulate the performance of aptamers in SELEX, post-SELEX and microenvironment. *Biotechnol Adv*, 2022, **55**: 107902
- [58] Zhang GR, Tan W, Wang X Q. Chemical tailoring of aptamer glues with significantly enhanced recognition ability for targeted membrane protein degradation. *ACS Nano*, 2023, **17**(15): 15146-15154
- [59] Levental I, Lyman E. Regulation of membrane protein structure and function by their lipid nano-environment. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2023, **24**(2): 107-122
- [60] Moreau K, Coen M, Zhang A X, *et al.* Proteolysis-targeting chimeras in drug development: a safety perspective. *Br J Pharmacol*, 2020, **177**(8): 1709-1718
- [61] Fang Y, Zhang Y, Bi S, *et al.* Securing LYTAC with logic-identification system for cancer cell-selective membrane protein degradation. *Small*, 2024, **20**(30): e2310039
- [62] Gao T, Wang B, Shi L, *et al.* Ultrasensitive quantitation of plasma membrane proteins *via* isRTA. *Anal Chem*, 2017, **89**(20): 10776-10782
- [63] He C, Tang Z, Tian H, *et al.* Co-delivery of chemotherapeutics and proteins for synergistic therapy. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, **98**: 64-76
- [64] Melero I, Berman D M, Aznar M A, *et al.* Evolving synergistic combinations of targeted immunotherapies to combat cancer. *Nat Rev Cancer*, 2015, **15**(8): 457-472
- [65] Guo Y, Zhang Q, Zhu Q, *et al.* Copackaging photosensitizer and PD-L1 siRNA in a nucleic acid nanogel for synergistic cancer photoimmunotherapy. *Sci Adv*, 2022, **8**(16): eabn2941
- [66] Huang Y, Zhou X, Zhang Y, *et al.* A nucleic acid-based LYTAC plus platform to simultaneously mediate disease-driven protein downregulation. *Adv Sci*, 2024, **11**(13): e2306248
- [67] Li F, Lyu D, Liu S, *et al.* DNA hydrogels and microgels for biosensing and biomedical applications. *Adv Mater*, 2020, **32**(3): e1806538
- [68] Papadopoulos Z. Recent developments in the treatment of wet age-related macular degeneration. *Curr Med Sci*, 2020, **40**(5): 851-857
- [69] Fleckenstein M, Schmitz-Valckenberg S, Chakravarthy U. Age-related macular degeneration: a review. *JAMA*, 2024, **331**(2): 147-157
- [70] Yang J L, Yamada-Hunter S A, Labanieh L, *et al.* Directed evolution of genetically encoded LYTACs for cell-mediated delivery. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2024, **121**(13): e2320053121
- [71] Choi B D, Yu X, Castano A P, *et al.* CAR-T cells secreting BiTEs circumvent antigen escape without detectable toxicity. *Nat Biotechnol*, 2019, **37**(9): 1049-1058
- [72] Du S, Yan J, Xue Y, *et al.* Adoptive cell therapy for cancer treatment. *Exploration*, 2023, **3**(4): 20210058
- [73] Zhu C, Wang W, Wang Y, *et al.* Dendronized DNA chimeras harness scavenger receptors to degrade cell membrane proteins. *Angew Chem Int Ed*, 2023, **62**(13): e202300694
- [74] Mineo C. Lipoprotein receptor signalling in atherosclerosis. *Cardiovasc Res*, 2020, **116**(7): 1254-1274
- [75] Distler M E, Teplensky M H, Bujold K E, *et al.* DNA dendrons as agents for intracellular delivery. *J Am Chem Soc*, 2021, **143**(34): 13513-13518
- [76] Romano S, Fonseca N, Simões S, *et al.* Nucleolin-based targeting strategies for cancer therapy: from targeted drug delivery to cytotoxic ligands. *Drug Discov Today*, 2019, **24**(10): 1985-2001
- [77] Koutsoumpa M, Papadimitriou E. Cell surface nucleolin as a target for anti-cancer therapies. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, 2014, **9**(2): 137-152
- [78] Zhu C, Wang W, Wang Y, *et al.* Targeted extracellular protein degradation by dendronized DNA chimeras. *ACS Chem Biol*, 2024, **19**(3): 654-659
- [79] Ahn G, Riley N M, Kamber R A, *et al.* Elucidating the cellular determinants of targeted membrane protein degradation by lysosome-targeting chimeras. *Science*, 2023, **382**(6668): eadf6249
- [80] Kong L Z, Kim S M, Wang C, *et al.* Understanding nucleic acid sensing and its therapeutic applications. *Exp Mol Med*, 2023, **55**(11): 2320-2331
- [81] Zhang Z, Sen P, Adhikari B R, *et al.* Development of nucleic-acid-based electrochemical biosensors for clinical applications. *Angew Chem Int Ed*, 2022, **61**(50): e202212496
- [82] Krishnan Y, Seeman N C. Introduction: nucleic acid nanotechnology. *Chem Rev*, 2019, **119**(10): 6271-6272
- [83] Adams D, Gonzalez-Duarte A, O'Riordan W D, *et al.* Patisiran, an RNAi therapeutic, for hereditary transthyretin amyloidosis. *N Engl J Med*, 2018, **379**(1): 11-21
- [84] Wang W, He S, Dong G, *et al.* Nucleic-acid-based targeted degradation in drug discovery. *J Med Chem*, 2022, **65**(15): 10217-10232

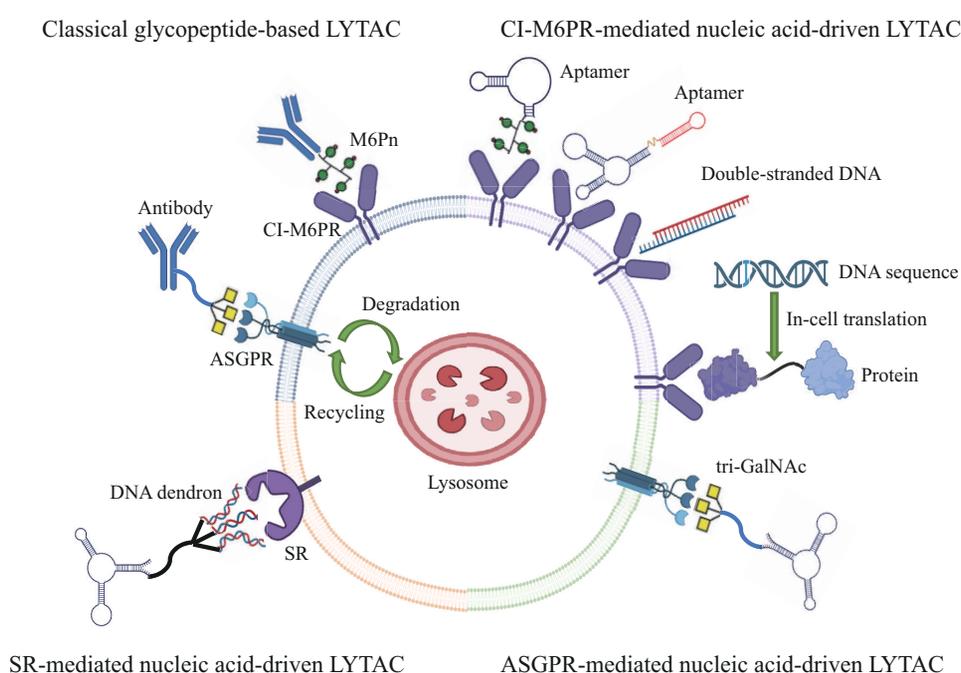
Nucleic Acid-driven Protein Degradation: Frontiers of Lysosomal Targeted Degradation Technology*

YIN Han, LI Yu, FAN Yu-Chuan, GUO Shuai, HUANG Yuan-Yu, LI Yong**, WENG Yu-Hua**

(School of Life Science, School of Medical Technology, Advanced Research Institute of Multidisciplinary Science,

Key Laboratory of Molecular Medicine and Biotherapy, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China)

Graphical abstract



Abstract Distinct from the complementary inhibition mechanism through binding to the target with three-dimensional conformation of small molecule inhibitors, targeted protein degradation technology takes tremendous advantage of endogenous protein degradation pathway inside cells to degrade plenty of “undruggable” target proteins, which provides a novel route for the treatment of many serious diseases, mainly including proteolysis-targeting chimeras, lysosome-targeting chimeras, autophagy-targeting chimeras, antibody-based proteolysis-targeting chimeras, *etc.* Unlike proteolysis-targeting chimeras first found in 2001, which rely on ubiquitin-proteasome system to mainly degrade intracellular proteins of interest, lysosome-targeting chimeras identified in 2020, which was act as the fastly developing technology, utilize cellular lysosomal pathway through endocytosis mediated by lysosome-targeting receptor to degrade both extracellular and membrane proteins. As an emerging

* This work was supported by a grant from National Key Research and Development Program of China (2021YFA1201000).

** Corresponding author.

LI Yong. Tel: 86-10-68913324, E-mail: liyong2021@bit.edu.cn

WENG Yu-Hua. Tel: 86-10-68913324, E-mail: yhweng@bit.edu.cn

Received: April 30, 2024 Accepted: August 25, 2024

biomedical technology, nucleic acid-driven lysosome-targeting chimeras utilize nucleic acids as certain components of chimera molecule to replace with ligand to lysosome-targeting receptor or protein of interest, exhibiting broad application prospects and potential clinical value in disease treatment and drug development. This review mainly introduced present progress of nucleic acid-driven lysosome-targeting chimeras technology, including its basic composition, its advantages compared with antibody or glycopeptide-based lysosome-targeting chimeras, and focused on its chief application, in terms of the type of lysosome-targeting receptors. Most research about the development of nucleic acid-driven lysosome-targeting chimeras focused on those which utilized cation-independent mannose-6-phosphonate receptor as the lysosome-targeting receptor. Both mannose-6-phosphonate-modified glycopeptide and nucleic aptamer targeting cation-independent mannose-6-phosphonate receptor, even double-stranded DNA molecule moiety can be taken advantage as the ligand to lysosome-targeting receptor. The same as classical lysosome-targeting chimeras, asialoglycoprotein receptor can also be used for advance of nucleic acid-driven lysosome-targeting chimeras. Another new-found lysosome-targeting receptor, scavenger receptor, can bind dendritic DNA molecules to mediate cellular internalization of complex and lysosomal degradation of target protein, suggesting the successful application of scavenger receptor-mediated nucleic acid-driven lysosome-targeting chimeras. In addition, this review briefly overviewed the history of lysosome-targeting chimeras, including first-generation and second-generation lysosome-targeting chimeras through cation-independent mannose-6-phosphonate receptor-mediated and asialoglycoprotein receptor-mediated endocytosis respectively, so that a clear timeline can be presented for the advance of chimera technique. Meantime, current deficiency and challenge of lysosome-targeting chimeras was also mentioned to give some direction for deep progress of lysosome-targeting chimeras. Finally, according to faulty lysosomal degradation efficiency, more cellular mechanism where lysosome-targeting chimeras perform degradation of protein of interest need to be deeply explored. In view of current progress and direction of nucleic acid-driven lysosome-targeting chimeras, we discussed its current challenges and development direction in the future. Stability of natural nucleic acid molecule and optimized chimera construction have a great influence on the biological function of lysosome-targeting chimeras. Discovery of novel lysosome-targeting receptors and nucleic aptamer with higher affinity to the target will greatly facilitate profound advance of chimera technique. In summary, nucleic acid-driven lysosome-targeting chimeras have many superiorities, such as lower immunogenicity, expedient synthesis of chimera molecules and so on, in contrast to classical lysosome-targeting chimeras, making it more valuable. Also, the chimera technology provides new ideas and methods for biomedical research, drug development and clinical treatment, and can be used more widely through further research and optimization.

Key words targeted protein degradation, lysosome-targeting chimeras, nucleic acid-driven

DOI: DOI: 10.16476/j.pibb.2024.0179

CSTR: 32369.14.pibb.20240179