



靶向蛋白质泛素修饰及降解在前列腺癌治疗中的机遇与挑战*

彭韵桦¹⁾ 刘莎^{2,3)} 崔莉¹⁾ 刘健康^{1,4)} 龙建纲^{1)**}

¹⁾ 西安交通大学生命科学与技术学院, 线粒体生物医学研究所, 生物医学信息工程教育部重点实验室, 西安 710049;

²⁾ 陆军军医大学大坪医院, 重庆 400042; ³⁾ 西南医科大学基础医学院, 泸州 646000; ⁴⁾ 康复大学健康与生命科学学院, 青岛 266071)

摘要 前列腺癌是中国发病率增长最快的男性肿瘤, 抗雄激素治疗耐药是导致前列腺癌患者预后差的主要原因。因此, 解决耐药性难题是前列腺癌转化研究的关键问题。哺乳动物细胞利用泛素-蛋白酶体系统实现蛋白质的靶向降解。因此, 前列腺癌中关键的癌基因如雄激素受体 (AR) 的上游泛素化调控因子 (如去泛素化酶) 是潜在的治疗靶点。然而, 这些酶具有较广的底物谱系, 存在脱靶的可能性。近来, 基于泛素-蛋白酶体系统开发的蛋白质降解靶向嵌合体 (proteolysis-targeting chimeras, PROTAC) 技术是最具前景和革命性的新型抗癌药物研发技术, 能够利用特定 E3 泛素连接酶对靶蛋白进行降解而不影响其他底物。与传统小分子抑制剂相比, PROTAC 分子在克服耐药性以及针对不可成药的靶点方面拥有巨大优势。目前, 针对 AR 的 PROTAC 降解剂已在 II 期临床取得了成功, 靶向蛋白质泛素化及降解途径的新技术将有望为前列腺癌的临床治疗带来新的突破。

关键词 前列腺癌, 泛素-蛋白酶体, 去势抵抗, 靶向策略

中图分类号 Q51, R73

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0568

前列腺癌是全球男性发病率排名第二的恶性肿瘤, 是男性癌症死亡的重要原因。据 WHO 最新全球肿瘤流行病学统计数据 (GLOBOCAN) 显示, 2020 年前列腺癌新发病例 141 万^[1]。前列腺癌发病率近年来迅速攀升, 已经成为泌尿系统最常见的恶性肿瘤, 2020 年中国前列腺癌新增病例占男性肿瘤病例 4.7%, 居第 6 位; 死亡病例占男性死亡病例 2.8%, 居第 7 位^[1]。近年来, 前列腺癌已经成为中国发病率增长最快的男性肿瘤^[2], 并且中国前列腺癌患者确诊时多处于发病晚期, 总体预后落后于发达国家^[3]。

前列腺癌病程长、阶段多, 包括可被根治的早期局限性前列腺癌 (localized prostate cancer, LPC) 和更为致命的晚期转移性激素敏感性前列腺癌 (metastatic hormone sensitive prostate cancer, mHSPC)、非转移性去势抵抗性前列腺癌 (non-metastatic castration-resistant prostate cancer, nmCRPC) 及转移性去势抵抗性前列腺癌 (metastatic castration-resistant prostate cancer,

mCRPC) 等。雄激素信号通路在前列腺癌发展过程中起关键作用, Charles Huggins 和 Clarence Hodges 因创立前列腺癌的激素疗法而获得 1966 年诺贝尔生理学或医学奖 (图 1)。自此, 雄激素剥夺治疗 (androgen deprivation therapy, ADT) 成为前列腺癌最基础、最广泛的治疗方式之一, 大多数患者在持续 ADT 后, 肿瘤适应了低雄激素水平, 最终发展为 mCRPC, 而后者对 ADT 不敏感, 常与前列腺特异抗原 (PSA) 水平升高相关^[3]。

前列腺癌重要的促癌蛋白包括雄激素受体 (androgen receptor, AR)、FOXA1 (forkhead box protein A1)、Myc 及表观遗传 PRC2 (polycomb repressive complex 2) 复合物中的 EZH2 (enhancer of zeste homolog 2) 等^[4], 前列腺癌的靶向治疗主

* 国家自然科学基金 (81802787) 和西安市科协青年人才托举计划 (095920221354) 资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 029-82664232, E-mail: jglong@xjtu.edu.cn

收稿日期: 2022-12-17, 接受日期: 2023-03-20

要围绕这些分子开展。其中, AR 在前列腺癌中最受关注, 在大多数情况下, AR 是去势抵抗性前列腺癌 (CRPC) 患者的主要驱动分子。临床上, 针对 mCRPC 的标准治疗仍是第二代 AR 靶向治疗, 如雄激素合成阻断剂阿比特龙 (abiraterone)、AR 拮抗剂恩杂鲁胺 (enzalutamide) 和阿帕鲁胺 (apalutamide) 等 (图 1)。然而, 这些疗法最终都会产生耐药性导致预后很差, 而 AR 基因的过表达、扩增和突变 (点突变或可变剪切变体 AR-V) 是导致耐药的重要机制, 其中 AR-V7 是 CRPC 中最常见的 AR-V 类型。

细胞利用自身的泛素-蛋白酶体系统能够实现蛋白质的靶向降解, 基于此原理开发的蛋白质降解靶向嵌合体 (proteolysis-targeting chimeras, PROTAC) 技术是最具前景和革命性的一项疗法, 在克服耐药性以及针对不可成药的靶点方面有着巨大优势。临床上, PROTAC 技术也是最先被应用于前列腺癌的治疗, 代表性药物 AR 降解剂 ARV-110 在临床试验中表现出能够克服 AR 耐药突变的巨大优势, 为 mCRPC 的治疗带来了突破性进展 (图 1) [5-6]。

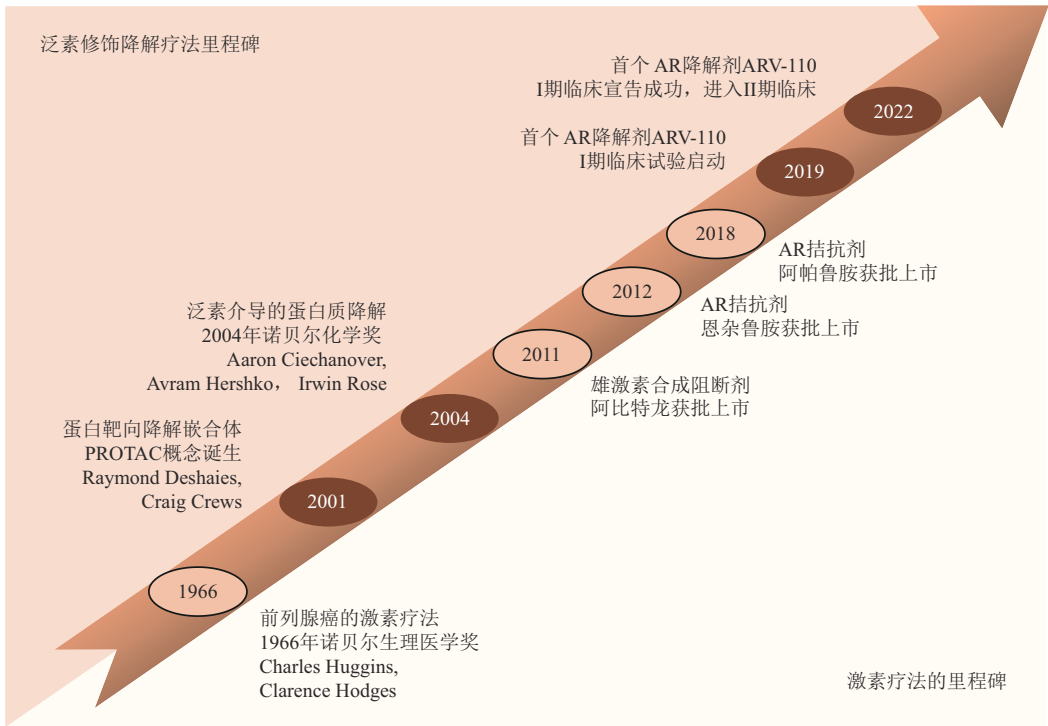


Fig. 1 Milestones in targeted therapy for prostate cancer
图1 前列腺癌靶向治疗的里程碑事件

1 泛素-蛋白酶体系统

泛素是维持真核生物细胞中蛋白质生成与降解平衡的关键分子, 由 76 个氨基酸组成, 1975 年由 Goldstein 首次从牛胸腺中发现, 因为它广泛存在于机体组织中, 因此被命名为泛素 (ubiquitin)。当泛素锚定到靶蛋白之后, 靶蛋白就会被蛋白酶体识别并降解。泛素化过程是一个包括 E1 泛素活化酶、E2 泛素缀合酶、E3 泛素连接酶参与的级联反应 [7]。

Aaron Ciechanover、Avram Herskho 及 Irwin Rose 三位科学家因在泛素介导的蛋白质降解领域的研究获得了 2004 年诺贝尔化学奖 (图 1)。泛素-蛋白酶体系统 (ubiquitin-proteasome system, UPS) 是细胞内蛋白质周转更新的主要途径, 参与了细胞内 80% 以上蛋白质的降解。该过程受到泛素连接酶和去泛素化酶的动态调节 [8] (图 2)。泛素化/去泛素化的稳态失衡与癌症、神经退行性疾病、代谢性疾病等多种人类疾病的发病机制密切相关。

2 蛋白质降解靶向嵌合体 (PROTAC) 技术

2001 年, Raymond J. Deshaies 和 Craig M. Crews 发表了开创性论文, PROTAC 概念从此诞生^[9]。PROTAC 是一种双功能小分子, 由靶蛋白配体、连接链和 E3 泛素连接酶配体三部分构成。

PROTAC 能够特异性地结合靶蛋白 (protein of interest, POI), 并将 E3 泛素连接酶招募到靶蛋白附近, 形成靶蛋白-PROTAC-E3 泛素连接酶三元复合物, 使靶蛋白得到泛素化标记, 进而被蛋白酶体识别和降解^[10] (图2)。PROTAC 技术提供了一种新的方式来诱导靶蛋白的降解或清除, 最终抑制肿瘤细胞的增殖, 达到治疗疾病的目的。

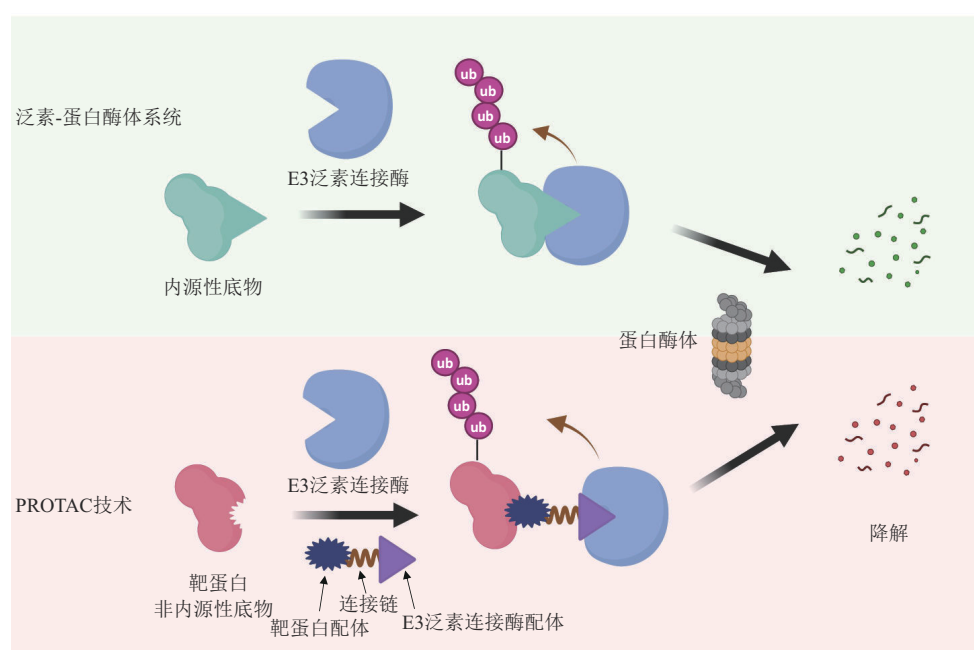


Fig. 2 Diagram of the ubiquitin-proteasome system (UPS) and the proteolysis-targeting chimeras (PROTAC) based on UPS

图2 泛素-蛋白酶体系统图和基于该系统的蛋白质降解靶向嵌合体PROTAC技术

细胞内蛋白质由E3泛素连接酶催化发生泛素化修饰, 进一步被蛋白酶体系统降解。蛋白质降解靶向嵌合体 (PROTAC) 技术借用内源性E3泛素连接酶-蛋白酶体系统, 促进特定靶蛋白 (非内源性底物) 泛素化和降解。

2.1 PROTAC技术的优势

PROTAC 是继蛋白激酶抑制剂和单克隆抗体药之后的又一个明星新技术, 兼具了靶向治疗药物对靶蛋白的特异性作用, 又不像传统小分子抑制剂依赖于靶蛋白活性口袋或变构调节才能发挥抑制作用, 而是直接导致靶蛋白降解清除, 因而具有独特的优势。

2.1.1 能够靶向“不可成药”的靶点

人体内 80% 的蛋白质难以成药, 成药性是药物研发的瓶颈, 靶蛋白难以成药的原因包括: 蛋白质表面平滑、没有小分子结合位点; 蛋白质本身缺少有效的活性位点; 蛋白质结构复杂、活性位点太多、单个小分子难以发挥作用; 分子口袋太浅、小分子结合能力差等。PROTAC 分子不需要直接抑制

靶蛋白的功能活性, 只要能结合靶蛋白就可以诱导降解, 因此可以拓展可成药靶蛋白的范围。很多过去认为“不可成药”的靶点, 如 Myc、RAS、Tau 等蛋白质的 PROTAC 均相继被开发出来。此外, 大部分转录因子都是传统意义的“不可成药”靶点, 而最新开发的 TF-PROTAC^[11] 等实现了对转录因子的降解^[12-13]。

2.1.2 克服耐药性

许多小分子抑制剂或拮抗剂在临床上不可避免地会发生获得性耐药, 其中靶蛋白突变或表达升高是重要的耐药性机制之一。PROTAC 因其独特的技术优势, 可直接将靶蛋白降解清除, 且对突变的靶蛋白仍可发挥作用, 在一定程度上能够避免耐药性^[14]。以 CRPC 为例, 经过 AR 拮抗剂恩杂鲁胺治

疗后患者常出现 AR 基因突变 (H875Y、F877L、T878A/S) 等原因产生耐药性^[15], 而靶向 AR 的 PROTAC 可以有效降解野生型 AR 及其突变体, 包括 H875/T878 点突变^[16] 及 AR-V7 变体^[17-18]。

2.1.3 可重复利用

在靶蛋白泛素化的过程中, PROTAC 扮演类似催化剂的角色, 在靶蛋白-PROTAC-E3 泛素连接酶三元复合物解离后, PROTAC 被重复循环利用。因此, 仅需很低浓度的 PROTAC 即可发挥高效的靶蛋白降解, 例如 1 个 PROTAC 分子可以清除多达 400 个 AR 分子^[5]。

2.1.4 高活性和安全性

由于 PROTAC 可重复利用且不需要占据活性位点的特点, 起效浓度低, 能够低剂量低频次通过静脉注射、透皮给药或口服给药。PROTAC 临床管线已证明其可成药性、人体安全性、靶向性与临床疗效。

迄今为止, 已有包括激酶、核受体、表观遗传相关靶点在内的超过 100 种靶蛋白被成功降解, 超过 20 个 PROTAC 分子进入临床, 探索其在前列腺癌、乳腺癌、淋巴瘤等疾病治疗中的应用价值。PROTAC 作为能够直接清除靶蛋白的新技术成为新型药物开发的热点, 能够用来开发降解易耐药和难成药靶点的药物, 然而这项新兴技术依然存在诸多挑战。

2.2 PROTAC 技术的挑战

PROTAC 技术的机理依赖于在细胞内和靶蛋白及 E3 泛素连接酶结合, 因此这项技术还不能应用于细胞外蛋白及细胞膜蛋白。尽管 PROTAC 技术具有独特的优势, 但是由于其药代动力学性能不理想, 会影响 PROTAC 的成药性。另外, 探索新的细胞/组织靶向方法有望降低 PROTAC 分子全身递送对正常细胞产生的毒性。通过对 E3 连接酶配体、连接链和 E3 泛素连接酶种类进行优化能够进一步提高 PROTAC 的降解效率, 特别是筛选和开发新的靶点配体有望拓宽 PROTAC 的应用范围。最后, 随着临床试验的深入, PROTAC 药物可能会面临临床挑战。

2.2.1 提升药代动力学性能

PROTAC 分子质量超过 700 u, 分子质量较大、细胞膜通透性不佳、药代动力学性能不理想, 减弱了其成药性。因此, 改良 PROTAC 结构、改善其物理化学性质、建立药代-药效关系模型、优化 PROTAC 的设计与合成至关重要^[10, 19]。同样具备

直接诱导靶蛋白与 E3 泛素连接酶相互作用而降解靶蛋白功效的分子胶降解剂, 由于其分子质量更小的特点倍受关注^[20]。然而, 目前大多数分子胶的发现都属于偶然, 数量很少, 通过结构修饰将 PROTAC 转变为分子胶有望改善 PROTAC 的成药性。

2.2.2 特异性靶向细胞/组织, 减小对正常细胞的毒副作用

PROTAC 的高活性也同样伴随着对正常组织/细胞的毒副作用, 因此, 将 PROTAC 分子先“关”起来, 运送到目的地(靶细胞/组织)后再使用特殊方法将它们“放”出来, 就有可能解决对正常组织/细胞毒性问题; 或使用特殊定向递送方法将其导航到靶细胞/组织, 从而解决其细胞/组织靶向性的问题。

通过对 PROTAC 进行优化改造, 第三代光控 PROTAC (如 PHOTACs^[21] 和 opto-PROTAC^[22]) 可以通过光照特定区域活化特定组织(如肿瘤)中的光控 PROTAC 实现对靶蛋白降解的时空控制, 这种方法对于光照可及的肿瘤具有应用潜力。此外, 由于叶酸受体(folate receptor)在多种肿瘤例如卵巢癌、肺癌和乳腺癌等细胞表面上高表达, 而在正常细胞膜上低表达或不表达, 因此可被用于抗肿瘤药物的靶向递送, folate-PROTAC 借助肿瘤细胞表面特异性表达的叶酸受体, 可以实现对这些肿瘤细胞的定向输送, 实现有组织选择性的蛋白质靶向降解, 从而降低潜在毒副作用^[23-24]。除利用叶酸受体这类靶细胞表面特异性表达的蛋白质作为 PROTAC 分子定向递送的锚定蛋白外, 选择靶细胞/组织特异性表达的 E3 泛素连接酶开发针对性的 PROTAC 也是一个重要方向。

2.2.3 新靶点配体的筛选与开发

目前 PROTAC 的开发主要依赖于已有的小分子抑制剂作为靶蛋白配体, 因而大部分不可成药靶点仍然缺乏配体, 所以对于新靶点配体的筛选是 PROTAC 研究的重中之重。常见的方法有 DNA 编码化合物库(DNA-encoded library, DEL)等高通量筛选。迄今为止, 在 600 多种 E3 泛素连接酶中, 仅有少数几个被用于 PROTAC 开发, 如 CRBN (cereblon)、VHL (von Hippel-Lindau)、MDM2 和 IAPs (inhibitor of apoptosis proteins) 等^[25], 开发其他 E3 泛素连接酶的小分子配体则是当前 PROTAC 技术的一大瓶颈。

2.2.4 临床挑战

尽管从PROTAC的作用机制上看,克服耐药性是其重要优势,但是截至目前,临床前及临床试验给出的耐药性结果有限。考虑到PROTAC技术通过UPS系统诱导靶蛋白降解,E3泛素连接酶或E2泛素缀合酶的活性都会影响到PROTAC对靶蛋白的调节,长期服用PROTAC药物是否会引起患者耐药还有待进一步临床监测。

3 癌基因或其泛素调节因子的靶向治疗

PROTAC分子根据其3大组成部分——靶蛋白配体、连接链、E3连接酶配体进行设计。E3连接酶配体目前还仅限于结合CRBN、VHL、IAPs和MDM2的化合物。应用PROTAC技术进行前列腺癌靶向治疗研究主要围绕AR、Myc、EZH2等靶蛋白进行(表1)。

3.1 AR

AR是核受体超家族成员,为前列腺肿瘤生长所必需,是引起mCRPC的关键蛋白。AR是当前治疗前列腺癌的主要靶点,其蛋白质稳定性受到泛素化调节,已经报道的E3泛素连接酶包括SKP2(S-phase kinase-associated protein 2)^[26]、SPOP(speckle-type POZ protein)^[27]、MDM2^[28]、CHIP^[29]、SIAH2和RNF6等。SPOP是前列腺癌中最常见突变的蛋白质之一,抗雄激素疗法能够促进SPOP介导的AR降解^[27]。AR的去泛素化酶则包括USP7^[30]、USP10^[31]及USP26^[32],靶向抑制这些去泛素化酶可以作为前列腺癌的治疗手段,包括各种抑制剂及蛋白质降解剂^[33]。

除了以上间接靶向AR上游调控蛋白外,还可以使用PROTAC药物直接靶向降解AR蛋白,对于针对AR的PROTAC降解剂的设计,AR配体可以是激动剂、拮抗剂或AR变构位点结合剂。E3连接酶配体可以是CRBN配体、VHL配体、IAPs配体和MDM2配体等。

在目前PROTAC技术选用的E3泛素连接酶配体中,AR降解剂的开发通常选择募集VHL或CRBN连接酶,CRBN配体分子质量最小,具有良好的类药性特征,在PROTAC分子设计中广泛使用。利用CRBN配体的AR降解剂包括ARV-110^[34]、ARD-2585^[35]、ARD-2128^[36]、TD-802^[37]、A031^[38]和A16^[39]等。ARV-110是第一个口服AR降解剂,也是PROTAC技术在临床上应用的首例^[34]。ARV-110由AR配体和E3连接酶配体

CRBN通过连接链组成,ARV-110的I期临床试验于2019年启动,主要用于治疗mCRPC^[40],已在II期临床取得了成功^[16]。近期披露的临床数据表明,ARV-110对经历ADT治疗的患者仍然表现出很好的疗效,而对携带AR-T878A/S和H875Y突变的患者效果更好^[16],在46%的携带AR突变的前列腺癌患者中,ARV-110可以使得前列腺特异性抗原(prostate-specific antigen, PSA)水平降低50%。ARV-110和ARD-2585除了能降解野生型AR外,也能降解AR-T878突变体,而后者也是抗雄激素治疗耐药的机制之一^[41]。ARD-2585在前列腺癌细胞中降解AR的效力优于ARV-110,在小鼠中表现了优异的药代动力学性质和安全性,实现了51%的口服生物利用度^[35]。在此基础上优化的ARD-2128口服药代动力学性质更出色,在小鼠中达到67%的口服生物利用度^[36]。A031的毒性比恩杂鲁胺低5倍^[38]。由于泊马度胺(pomalidomide)衍生物的强荧光特性,A16在AR阳性的前列腺癌细胞中能够被可视化监测^[39]。

AR降解剂的开发还会选择募集VHL连接酶,VHL配体类药性较高、细胞通透性较好,这类AR降解剂包括ARCC-4^[42]、ARD-69^[43]、ARD-266^[44]、ARD-61^[45]和MTX-23^[17]等。ARCC-4由恩杂鲁胺和VHL配体通过一条短链连接,能够降解细胞内约95%的AR蛋白,且能有效降解导致临床耐药的AR-V7变体,克服对恩杂鲁胺的耐药性^[46]。ARD-69能将前列腺癌细胞AR水平降低95%以上并降低PSA水平^[43],在此基础上进一步优化结构获得的ARD-266和ARD-61等PROTAC,对前列腺癌的抑制效果均优于恩杂鲁胺^[44-45]。MTX-23也能降解AR-V7变体,有望克服CRPC患者对抗雄激素治疗的耐药性^[17]。

此外,还有募集MDM2或IAPs的PROTAC被用于设计AR降解剂。MDM2配体合成难度大,第一个开发用于AR降解的SARM-nutlin PROTAC由非甾体雄激素受体配体(SARM)和MDM2配体(nutlin)组成,实现了AR的泛素化修饰和降解^[47]。针对AR的DNA结合结构域开发的AR-DBD PROTAC可以同时降解AR及AR-V7变体^[48]。由于IAPs易发生自泛素化降解,因此靶向IAPs的PROTAC分子报道很少,基于IAPs配体的AR降解剂AR-SNIPER 42a对AR显示出有效的蛋白质降解活性,抑制AR介导的基因表达和雄激素依赖性前列腺癌细胞的增殖^[49]。

以上这些基于不同配体设计的AR降解剂充分证明了PROTAC技术的兼容性, 这些备选药物在临床上的效果值得期待。

3.2 Myc

c-Myc是前列腺癌的重要驱动基因^[50], 也是前列腺癌患者生存率低的重要因素^[51], 80%~90%的原发性前列腺癌患者都存在c-Myc mRNA和蛋白质的高表达^[52]。c-Myc的过表达显著减少了前列腺细胞中AR转录程序, 当高Myc转录和低AR转录程序同时存在时, 会加速前列腺癌向转移性去势抵抗发展^[53]。c-Myc的抑制剂在研究中存在很多困难, c-Myc半衰期非常短, 首先Ras促进ERK对c-Myc S62位点的磷酸化, 进而引发GSK3对c-Myc T58位点的磷酸化, 被磷酸化的c-Myc会被E3连接酶Fbw7和Skp2泛素化, 通过泛素-蛋白酶体途径降解^[54]。在前列腺中报道的c-Myc去泛素化酶包括OTUD6A^[55]和USP16^[56]等, 但这些去泛素化酶没有可用的抑制剂, 而去泛素化酶抑制剂的开发存在巨大瓶颈^[57]。

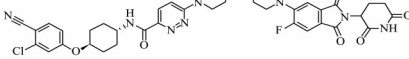
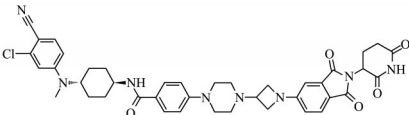
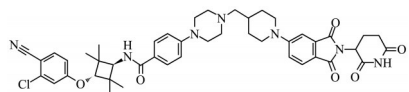
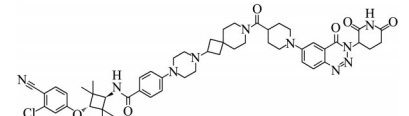
最近, 首个Myc降解剂GT19506被开发出来, 但仅具有较低的降解效率^[58]。不过, 靶向超级增强子(super enhancer)的多个PROTAC药物均能引起Myc蛋白显著降低, 包括ARV-825, 它是由BRD降解剂OTX015和CRBN配体组成的PROTAC药物^[59]; 以及AU-15330, 它是SWI/SNF ATP酶的特异性降解剂^[60]。此外, 鉴于AR靶基因的转录表

达依赖于SWI/SNF复合物的功能, SWI/SNF-ATP酶的降解破坏了连接AR、FOXA1和MYC癌基因自身高表达的超级增强子和启动子环相互作用, SWI/SNF降解剂也能引起前列腺癌细胞中AR和FOXA1靶基因的显著降低^[60]。目前在PROTAC技术基础上新设计合成的DUBTAC技术, 基于去泛素化和稳定化的DUBTAC^[61]和TF-DUBTAC^[62], 能够稳定体内主动降解的靶蛋白, 对于靶向参与前列腺癌发生发展的去泛素化酶调控也有很大的应用潜力。

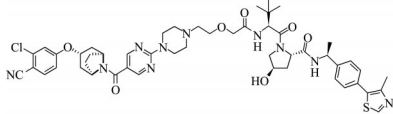
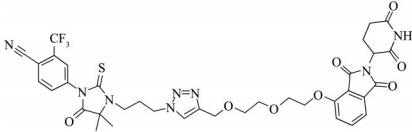
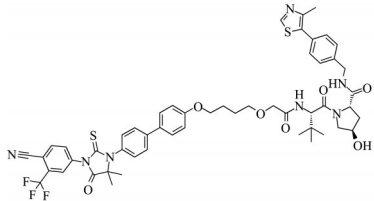
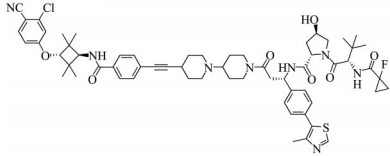
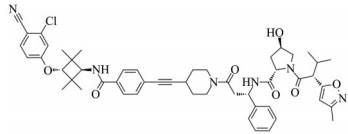
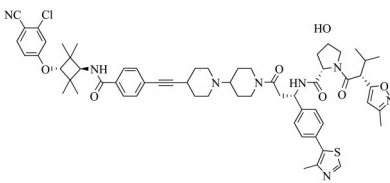
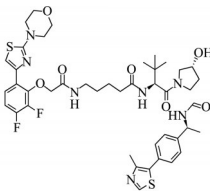
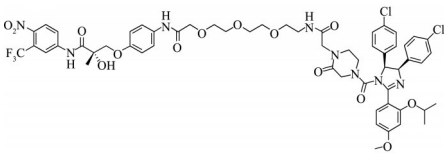
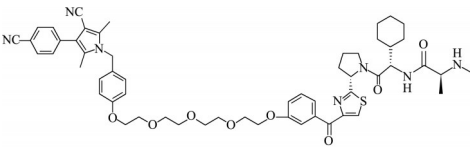
3.3 PRC2复合物

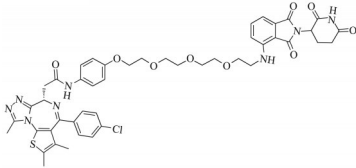
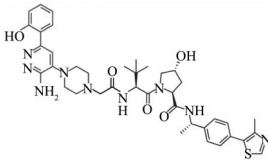
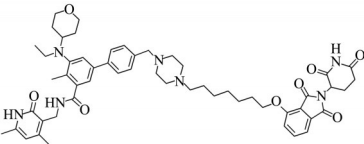
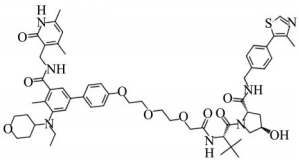
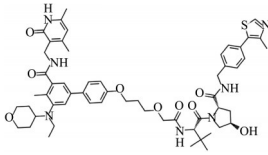
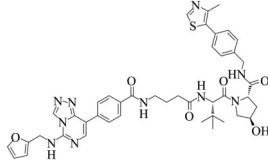
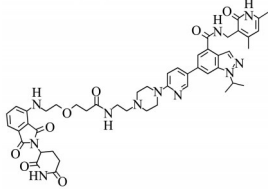
EZH2是PRC2甲基化转移酶复合物中的催化亚基, 与EED和SUZ12形成三聚体, 催化H3K27甲基化修饰。EZH2是驱动前列腺癌进展^[63-64]和去势抵抗^[65]的主要因子, 而大量关于EZH2抑制剂在前列腺癌治疗中的前临床/临床研究仍在进行中, 包括与其他靶向治疗的联合方案, 如PARP抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂、CDK4/6抑制剂等。基于CRBN的EZH2降解剂E7^[66]和VHL的EZH2降解剂YM181和YM281^[67], 以及基于VHL的EED降解剂UNC6852^[68]都能引起PRC2复合物中单个或多个亚基的降解。PROTAC小分子降解剂MS177能够靶向EZH2的催化和非催化功能, 有效降解PRC2复合物的所有3个亚基^[69], 同时, 还能够有效降解c-Myc, 比小分子抑制剂更有效地抑制了肿瘤的生长^[70]。

Table 1 Potential PROTAC for targeted therapy in prostate cancer
表1 前列腺癌靶向治疗的潜在PROTACs分子

名称	结构	分子 质量/u	E3连接酶 配体	靶点	参考文献
ARV-110		812.3	CRBN	AR	[34]
ARD-2585		763.3	CRBN	AR	[35]
ARD-2128		820.4	CRBN	AR	[36]
TD-802		957.6	CRBN	AR	[37]

续表1

名称	结构	分子 质量/u	E3连接酶 配体	靶点	参考文献
A031		981.6	CRBN	AR	[38]
A16		797.3	CRBN	AR	[39]
ARCC-4		1 024.2	VHL	AR	[42]
ARD-69		1 129.8	VHL	AR	[43]
ARD-266		915.5	VHL	AR	[44]
ARD-61		1 095.8	VHL	AR	[45]
MTX-23		882.1	VHL	AR	[17]
SARM-nutlin		1 209.4	MDM2	AR	[47]
AR-DBD	多肽序列: YLCSSNNNRERDKFRR GGSGGTSFEQFWAWLWP	约3 950	MDM2	AR	[48]
AR-SNIPER 42a		984.5	IAPs	AR	[49]
GT19506	未披露	未披露	未披露	Myc	[58]

续表1					
名称	结构	分子 质量/u	E3连接酶 配体	靶点	参考文献
ARV-825		923.4	CRBN	BRD	[59]
AU-15330		755.9	VHL	SWI/SNF	[60]
E7		942.5	CRBN	EZH2	[66]
YM181		1 048.3	VHL	EZH2	[67]
YM281		1 018.3	VHL	EZH2	[67]
UNC6852		833.0	VHL	EED	[68]
MS177		914.4	CRBN	PRC2复合物	[69-70]

4 总结与展望

前列腺癌在中国发病率呈上升趋势，抗雄激素治疗耐药是导致患者治疗失败的主要原因，因此，开发新的耐药性解决方案是前列腺癌转化研究的首要目标。泛素化介导的蛋白质稳定性调节对前列腺癌中关键的癌基因（如AR）的蛋白质水平实现精确调控，参与该调控过程的上游E3泛素连接酶和去泛素化酶都是理想的药物靶点，但对这些靶点的

药物开发难度较大。

以泛素-蛋白酶体系统为基础的PROTAC分子是一种新型抗癌药物，与传统药物相比，PROTAC技术具有能够靶向“不可成药”的靶点、克服耐药性、可重复利用、高活性和安全性等优势，有望解决传统药物不擅长或难以解决的问题，是目前跨越药物研发瓶颈的有效途径。同时，从改善PROTAC的理化性质、提升药代动力学性能和细胞/组织靶向性、减小毒副作用以及筛选新靶点配体等角度开

发新 PROTAC 分子还存在瓶颈与挑战。靶向 AR 的 PROTAC 药物的开发过程贯穿了整个 PROTAC 技术的发展历程, 首个药物在临床试验中表现出显著的前列腺癌治疗效果。目前共有 5 项关于前列腺癌的 PROTAC 临床试验正在开展并显示了积极的结

果 (表 2), 长期使用 PROTAC 是否会引起患者耐药还需等待临床评估。总而言之, 这项新技术将会在实践中不断升级和完善, 使更多前列腺癌患者尽快从这项新技术中获益。

Table 2 Clinical development of drugs for prostate cancer targeting protein ubiquitin modification and degradation
表2 靶向蛋白质泛素修饰及降解的前列腺癌药物临床进展

药物名称	E3连接酶配体	靶点	给药方式	研发机构	临床阶段
ARV-110	CRBN	AR	口服	Arvinas	II期
ARV-766	未披露	AR	口服	Arvinas	I期
AC0176	未披露	AR	口服	Accutar Biotechnology	I期
CC-94676	CRBN	AR	口服	BMS	I期
HP518	未披露	AR	口服	海创药业	I期

参 考 文 献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 2021, **71**(3): 209-249
- [2] 国家癌症中心. 2017 中国肿瘤登记年报. 人民卫生出版社. 2018
National Cancer Center. 2017 China cancer registry annual report. People's Medical Publishing House. 2018
- [3] 中国抗癌协会泌尿男生殖系统肿瘤专业委员会前列腺癌学组. 前列腺癌筛查中国专家共识(2021 年版). *中国癌症杂志*, 2021, **31**(5): 435-440
Prostate Cancer Group, Urogenital Oncology Committee, China Anti-Cancer Association. *China Oncology*, 2021, **31**(5): 435-440
- [4] He Y, Xu W, Xiao Y T, *et al.* Targeting signaling pathways in prostate cancer: mechanisms and clinical trials. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, **7**(1): 198
- [5] Makin S. The destructive power of PROTACs could tackle prostate cancer. *Nature*, 2022, **609**(7927): S41
- [6] Schapira M, Calabrese M F, Bullock A N, *et al.* Targeted protein degradation: expanding the toolbox. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, **18**(12): 949-963
- [7] 郑清芸, 王涛, 潘漫, 等. 泛素链水解酶的选择性和产生机制. *生物化学与生物物理进展*, 2016, **43**(9): 864-879
Zheng Q Y, Wang T, Pan M, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2016, **43**(9): 864-879
- [8] 陈雨晗, 张令强, 贺福初. 去泛素化酶与基因表达调控. *生物化学与生物物理进展*, 2014, **41**(2): 126-138
Chen Y H, Zhang L Q, He F C. *Prog Biochem Biophys*, 2014, **41**(2): 126-138
- [9] 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
- [10] Cao C, He M, Wang L, *et al.* Chemistries of bifunctional PROTAC degraders. *Chem Soc Rev*, 2022, **51**(16): 7066-7114
- [11] Liu J, Chen H, Kaniskan H, *et al.* TF-PROTACs enable targeted degradation of transcription factors. *J Am Chem Soc*, 2021, **143**(23): 8902-8910
- [12] Samarasinghe K T, Jaime-Figueroa S, Burgess M, *et al.* Targeted degradation of transcription factors by TRAFACs: transcription factor targeting chimeras. *Cell Chem Biol*, 2021, **28**(5): 648-661. e645
- [13] Shao J, Yan Y, Ding D, *et al.* Destruction of DNA-binding proteins by programmable oligonucleotide PROTAC (O'PROTAC): effective targeting of IEF1 and ERG. *Adv Sci*, 2021, **8**(20): 2102555
- [14] Liu J, Peng Y, Inuzuka H, *et al.* Targeting micro-environmental pathways by PROTACs as a therapeutic strategy. *Semin Cancer Biol*, 2022, **86**(Pt 2): 269-279
- [15] Claessens F, Helsen C, Prekovic S, *et al.* Emerging mechanisms of enzalutamide resistance in prostate cancer. *Nat Rev Urol*, 2014, **11**(12): 712-716
- [16] Gao X, Burris Iii H A, Vuky J, *et al.* Phase 1/2 study of ARV-110, an androgen receptor (AR) PROTAC degrader, in metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC). *J Clin Oncol*, 2022, **40**(suppl 6): 17
- [17] Lee G T, Nagaya N, Desantis J, *et al.* Effects of MTX-23, a novel PROTAC of androgen receptor splice variant-7 and androgen receptor, on CRPC resistant to second-line antiandrogen therapy. *Mol Cancer Ther*, 2021, **20**(3): 490-499
- [18] 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
- [19] Peng Y, Liu J, Inuzuka H, *et al.* Targeted protein posttranslational modifications by chemically induced proximity for cancer therapy. *J Biol Chem*, 2023, **299**(4): 104572
- [20] Schreiber S L. The rise of molecular glues. *Cell*, 2021, **184**(1): 3-9
- [21] Reynders M, Matsuura B S, Bérouti M, *et al.* PHOTACs enable

- optical control of protein degradation. *Sci Adv*, 2020, **6**(8): eaay5064
- [22] Liu J, Chen H, Ma L, *et al.* Light-induced control of protein destruction by opto-PROTAC. *Sci Adv*, 2020, **6**(8): eaay5154
- [23] Liu J, Chen H, Liu Y, *et al.* Cancer selective target degradation by folate-caged PROTACs. *J Am Chem Soc*, 2021, **143**(19): 7380-7387
- [24] Chen H, Liu J, Kaniskan H U, *et al.* Folate-guided protein degradation by immunomodulatory imide drug-based molecular glues and proteolysis targeting chimeras. *J Med Chem*, 2021, **64**(16): 12273-12285
- [25] 张晓元, 张艳艳, 孙晓康, 等. 靶向蛋白质降解技术研究进展. *生物化学与生物物理进展*, 2022, **49**(1): 171-182
Zhang X Y, Zhang Y Y, Sun X K, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2022, **49**(1): 171-182
- [26] Li B, Lu W, Yang Q, *et al.* Skp2 regulates androgen receptor through ubiquitin-mediated degradation independent of Akt/mTOR pathways in prostate cancer. *Prostate*, 2014, **74**(4): 421-432
- [27] An J, Wang C, Deng Y, *et al.* Destruction of full-length androgen receptor by wild-type SPOP, but not prostate-cancer-associated mutants. *Cell Rep*, 2014, **6**(4): 657-669
- [28] Giridhar P V, Williams K, Vonhandorf A P, *et al.* Constant degradation of the androgen receptor by MDM2 conserves prostate cancer stem cell integrity. *Cancer Res*, 2019, **79**(6): 1124-1137
- [29] Cardozo C P, Michaud C, Ost M C, *et al.* C-terminal Hsp-interacting protein slows androgen receptor synthesis and reduces its rate of degradation. *Arch Biochem Biophys*, 2003, **410**(1): 134-140
- [30] Chen S T, Okada M, Nakato R, *et al.* The deubiquitinating enzyme USP7 regulates androgen receptor activity by modulating its binding to chromatin. *J Biol Chem*, 2015, **290**(35): 21713-21723
- [31] Faus H, Meyer H A, Huber M, *et al.* The ubiquitin-specific protease USP10 modulates androgen receptor function. *Mol Cell Endocrinol*, 2005, **245**(1-2): 138-146
- [32] Dirac A M, Bernards R. The deubiquitinating enzyme USP26 is a regulator of androgen receptor signaling. *Mol Cancer Res*, 2010, **8**(6): 844-854
- [33] Pei Y, Fu J, Shi Y, *et al.* Discovery of a potent and selective degrader for USP7. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2022, **134**(33): e202204395
- [34] Neklesa T, Snyder L B, Willard R R, *et al.* ARV-110: an androgen receptor PROTAC degrader for prostate cancer. *Cancer Res*, 2018, **78**(13_Suppl): 5236-5236
- [35] Xiang W, Zhao L, Han X, *et al.* Discovery of ARD-2585 as an exceptionally potent and orally active PROTAC degrader of androgen receptor for the treatment of advanced prostate cancer. *J Med Chem*, 2021, **64**(18): 13487-13509
- [36] Han X, Zhao L, Xiang W, *et al.* Strategies toward discovery of potent and orally bioavailable proteolysis targeting chimera degraders of androgen receptor for the treatment of prostate cancer. *J Med Chem*, 2021, **64**(17): 12831-12854
- [37] Takwale A D, Jo S H, Jeon Y U, *et al.* Design and characterization of cereblon-mediated androgen receptor proteolysis-targeting chimeras. *Eur J Med Chem*, 2020, **208**: 112769
- [38] Chen L, Han L, Mao S, *et al.* Discovery of A031 as effective proteolysis targeting chimera (PROTAC) androgen receptor (AR) degrader for the treatment of prostate cancer. *Eur J Med Chem*, 2021, **216**: 113307
- [39] Liang J J, Xie H, Yang R H, *et al.* Designed, synthesized and biological evaluation of proteolysis targeting chimeras (PROTACs) as AR degraders for prostate cancer treatment. *Bioorg Med Chem*, 2021, **45**: 116331
- [40] Mullard A. Arvinas's PROTACs pass first safety and PK analysis. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, **18**(12): 895
- [41] Rathkopf D E, Smith M, Ryan C, *et al.* Androgen receptor mutations in patients with castration-resistant prostate cancer treated with apalutamide. *Ann Oncol*, 2017, **28**(9): 2264-2271
- [42] Salami J, Alabi S, Willard R R, *et al.* Androgen receptor degradation by the proteolysis-targeting chimera ARCC-4 outperforms enzalutamide in cellular models of prostate cancer drug resistance. *Commun Biol*, 2018, **1**: 100
- [43] 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 Med Chem*, 2019, **62**(2): 941-964
- [44] Han X, Zhao L, Xiang W, *et al.* Discovery of highly potent and efficient PROTAC degraders of androgen receptor (AR) by employing weak binding affinity VHL E3 ligase ligands. *J Med Chem*, 2019, **62**(24): 11218-11231
- [45] Zhao L, Han X, Lu J, *et al.* A highly potent PROTAC androgen receptor (AR) degrader ARD-61 effectively inhibits AR-positive breast cancer cell growth *in vitro* and tumor growth *in vivo*. *Neoplasia*, 2020, **22**(10): 522-532
- [46] Antonarakis E S, Lu C, Wang H, *et al.* AR-V7 and resistance to enzalutamide and abiraterone in prostate cancer. *N Engl J Med*, 2014, **371**(11): 1028-1038
- [47] Schneckloth A R, Puchault M, Tae H S, *et al.* Targeted intracellular protein degradation induced by a small molecule: En route to chemical proteomics. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, **18**(22): 5904-5908
- [48] Ma B, Fan Y, Zhang D, *et al.* *De novo* design of an androgen receptor DNA binding domain-targeted peptide PROTAC for prostate cancer therapy. *Adv Sci*, 2022, **9**(28): 2201859
- [49] Shibata N, Nagai K, Morita Y, *et al.* Development of protein degradation inducers of androgen receptor by conjugation of androgen receptor ligands and inhibitor of apoptosis protein ligands. *J Med Chem*, 2018, **61**(2): 543-575
- [50] Siegel R L, Miller K D, Fuchs H E, *et al.* Cancer statistics, 2021. *CA Cancer J Clin*, 2021, **71**(1): 7-33
- [51] Ribeiro F R, Jerónimo C, Henrique R, *et al.* 8q gain is an independent predictor of poor survival in diagnostic needle biopsies from prostate cancer suspects. *Clin Cancer Res*, 2006, **12**(13): 3961-3970

- [52] Tomlins S A, Mehra R, Rhodes D R, *et al.* Integrative molecular concept modeling of prostate cancer progression. *Nat Genet*, 2007, **39**(1): 41-51
- [53] Qiu X, Boufaied N, Hallal T, *et al.* MYC drives aggressive prostate cancer by disrupting transcriptional pause release at androgen receptor targets. *Nat Commun*, 2022, **13**(1): 2559
- [54] Jin J, Harper J W. A license to kill: transcriptional activation and enhanced turnover of Myc by the SCF(kp2) ubiquitin ligase. *Cancer Cell*, 2003, **3**(6): 517-518
- [55] Peng Y, Liu J, Wang Z, *et al.* Prostate-specific oncogene OTUD6A promotes prostatic tumorigenesis *via* deubiquitinating and stabilizing c-Myc. *Cell Death Differ*, 2022, **29**(9): 1730-1743
- [56] Ge J, Yu W, Li J, *et al.* USP16 regulates castration-resistant prostate cancer cell proliferation by deubiquitinating and stabilizing c-Myc. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, **40**(1): 59
- [57] Harrigan J A, Jacq X, Martin N M, *et al.* Deubiquitylating enzymes and drug discovery: emerging opportunities. *Nat Rev Drug Discov*, 2018, **17**(1): 57-78
- [58] Ma L, Tong Y, Zhou Q, *et al.* Discovery of GT19077, a c-Myc/Max protein-protein interaction (PPI) small molecule inhibitor, and GT19506 a c-Myc PROTAC molecule, for targeting c-Myc-driven blood cancers and small cell lung cancers. *Cancer Res*, 2021, **81**(13_Supplement): 1265
- [59] Li Z, Lim S L, Tao Y, *et al.* PROTAC bromodomain inhibitor ARV-825 displays anti-tumor activity in neuroblastoma by repressing expression of MYCN or c-Myc. *Front Oncol*, 2020, **10**: 574525
- [60] Xiao L, Parolia A, Qiao Y, *et al.* Targeting SWI/SNF ATPases in enhancer-addicted prostate cancer. *Nature*, 2022, **601**(7893): 434-439
- [61] Henning N J, Boike L, Spradlin J N, *et al.* Deubiquitinase-targeting chimeras for targeted protein stabilization. *Nat Chem Biol*, 2022, **18**(4): 412-421
- [62] Liu J, Yu X, Chen H, *et al.* TF-DUBTACs stabilize tumor suppressor transcription factors. *J Am Chem Soc*, 2022, **144**(28): 12934-12941
- [63] Varambally S, Dhanasekaran S M, Zhou M, *et al.* The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature*, 2002, **419**(6907): 624-629
- [64] Xin L. EZH2 accompanies prostate cancer progression. *Nat Cell Biol*, 2021, **23**(9): 934-936
- [65] Xu K, Wu Z J, Groner A C, *et al.* EZH2 oncogenic activity in castration-resistant prostate cancer cells is Polycomb-independent. *Science*, 2012, **338**(6113): 1465-1469
- [66] Liu Z, Hu X, Wang Q, *et al.* Design and synthesis of EZH2-based PROTACs to degrade the PRC2 complex for targeting the noncatalytic activity of EZH2. *J Med Chem*, 2021, **64**(5): 2829-2848
- [67] Tu Y, Sun Y, Qiao S, *et al.* Design, synthesis, and evaluation of VHL-based EZH2 degraders to enhance therapeutic activity against lymphoma. *J Med Chem*, 2021, **64**(14): 10167-10184
- [68] Potjewyd F, Turner A M W, Beri J, *et al.* Degradation of polycomb repressive complex 2 with an EED-targeted bivalent chemical degrader. *Cell Chem Biol*, 2020, **27**(1): 47-56. e15
- [69] Wang J, Park K S, Yu X, *et al.* A cryptic transactivation domain of EZH2 binds AR and AR's splice variant, promoting oncogene activation and tumorous transformation. *Nucleic Acids Res*, 2022, **50**(19): 10929-10946
- [70] Wang J, Yu X, Gong W, *et al.* EZH2 noncanonically binds cMyc and p300 through a cryptic transactivation domain to mediate gene activation and promote oncogenesis. *Nat Cell Biol*, 2022, **24**(3): 384-399

Opportunities and Challenges in Targeting Ubiquitin Modification and Degradation for Prostate Cancer Therapy*

PENG Yun-Hua¹⁾, LIU Sha^{2,3)}, CUI Li¹⁾, LIU Jian-Kang^{1,4)}, LONG Jian-Gang^{1)**}

⁽¹⁾Center for Mitochondrial Biology and Medicine, The Key Laboratory of Biomedical Information Engineering of Ministry of Education,

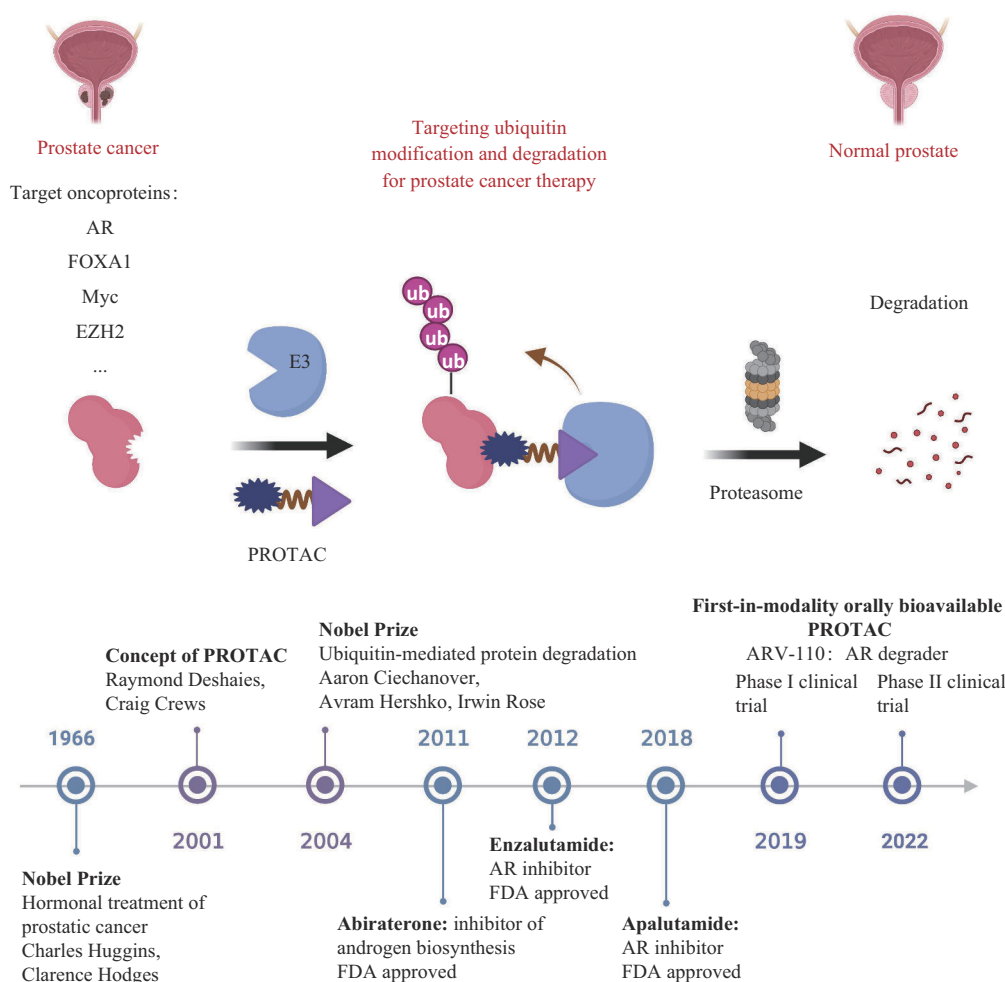
School of Life Science and Technology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China;

²⁾Daping Hospital, Army Medical University, Chongqing 400042, China;

³⁾School of Basic Medical Sciences, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China;

⁴⁾School of Health and Life Sciences, University of Health and Rehabilitation Sciences, Qingdao 266071, China)

Graphical abstract



* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (81802787) and Young Talent Fund of Association for Science and Technology in Xi'an (095920221354).

** Corresponding author.

Tel: 86-29-82664232, E-mail: jglong@xjtu.edu.cn

Received: December 17, 2022 Accepted: March 20, 2023

Abstract Prostate cancer is the fastest growing cancer among Chinese male population. Resistance to antiandrogen therapy is the leading cause of death in patients with prostate cancer. Therefore, solving the drug resistance conundrum is the key issue for translational research in prostate cancer. Mammalian cells utilize the ubiquitin-proteasome system to degrade targeted proteins. Consequently, key oncogenes in prostate cancer, such as upstream ubiquitination regulators (*e.g.*, deubiquitinases) of androgen receptor (AR), are potential therapeutic targets. However, these enzymes have a broad spectrum of substrates and may be off target. Recently, the proteolysis-targeting chimeras (PROTAC) technology developed based on the ubiquitin-proteasome system is the most promising and revolutionary new anti-cancer drug discovery technology, enabling the degradation of target proteins by specific E3 ubiquitin ligases without affecting other substrates. Compared with traditional small molecule inhibitors, PROTAC hold great advantages in overcoming drug resistance as well as targeting undruggable targets. Currently, the PROTAC degraders targeting the AR has achieved success in phase II clinical trials. In the future, the new technology targeting protein ubiquitination and degradation pathway will bring new breakthroughs for the clinical treatment of prostate cancer.

Key words prostate cancer, ubiquitin-proteasome, castration-resistant, targeting strategy

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0568