

# 膜蛋白靶向降解技术研究进展

赵俗<sup>①</sup>, 张衡<sup>②</sup>, 李焱<sup>①</sup>, 王贞超<sup>①③†</sup>

①贵州大学 药学院, 贵阳 550025; ②深圳湾实验室, 广东 深圳 518000; ③贵州大学 绿色农药与农业生物工程国家重点实验室培育基地, 贵阳 550025

**摘要** 膜蛋白是细胞间相互作用的主要参与者, 在信号传导、分化增殖、应激响应等生命过程中均扮演着重要的角色。传统小分子抑制剂与抗体分别通过抑制和阻断膜蛋白与其配体之间的相互作用来发挥作用, 但往往存在抑制不彻底或诱发耐药性的问题。新兴的蛋白质靶向降解技术为药物发现提供了全新思路, 通过在溶酶体或蛋白酶体中特异性降解目的蛋白, 使其彻底丧失蛋白质功能, 极大地拓展了成药范围。文章简要讨论了近年来膜蛋白靶向降解技术的研究进展, 并展望这些技术在临床治疗中的广阔应用前景。

**关键词** 膜蛋白; 靶向降解; 蛋白质功能

蛋白质是由氨基酸经过复杂的折叠和翻译后修饰形成的具有特定三维空间结构的长链多聚物。它们除了作为组成人体细胞和组织的主要成分, 还参与到包括催化代谢反应、DNA复制、响应刺激、提供支撑骨架在内的多种类型细胞活动中, 因此其结构、功能和数量的异常成为很多疾病产生的直接或重要原因。按照位置不同蛋白质分为胞内蛋白、膜蛋白和胞外蛋白, 其中膜蛋白占全部编码基因的30%左右, 在细胞生命活动中发挥着关键作用<sup>[1]</sup>。膜蛋白功能的异常与多种疾病直接相关, 例如受体酪氨酸激酶EGFR (epithelial growth factor receptor) 和HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) 在正常细胞表面高表达会造成细胞增殖和分化异常, 进而导致癌症的发生<sup>[2]</sup>。近年来受到广泛关注的免疫检查点PD-L1/PD-1 (programmed cell death-ligand 1/programmed cell death protein 1) 分别在肿瘤细胞和T细胞表面高表达, 二者的结合及相互作用抑

制了T细胞的响应和激活, 从而造成肿瘤的免疫逃逸<sup>[3]</sup>。而钠离子通道蛋白Na<sub>v</sub>1.7的三个氨基酸突变则造成慢性疼痛, 因此, 开发阻断其功能的药物成为众多制药公司的目标<sup>[4]</sup>。

目前靶向膜蛋白的药物主要通过两种途径发挥作用: 第一, 作为竞争性抑制分子结合目的蛋白后阻断其与天然底物的结合, 如激酶抑制剂结合在目的蛋白的活性口袋或大分子抗体结合在胞外区占据其活性结合位点<sup>[5-6]</sup>; 第二, 作为别构调节剂结合目的蛋白后改变蛋白质的构象, 如ABL001 (Asciminib) 竞争结合酪氨酸激酶 (tyrosine kinase) ABL的肉豆蔻酰口袋 (Myristoyl pocket), 能够有效克服ATP竞争性抑制剂产生的激酶活性区域的各种突变<sup>[7]</sup>。生物学的发展为合理药物设计提供了坚实的基础, 由此开发的药物也极大地改善了临床治疗效果。然而, 靶向膜蛋白的小分子抑制剂普遍存在特异性差、脱靶严重、易产生耐药性等问题, 大分子抗体则由于只

\* 国家自然科学基金青年基金(22007022)、贵州省科技拔尖人才项目(黔教技[2022]075)、贵州省教育厅重点项目(QjhKYzi[2021]041)

† 通信作者, 研究方向: 药学、农药学。E-mail: zcwang@gzu.edu.cn

能结合在特定胞外区，无法彻底抑制膜蛋白的功能，往往难以发挥效应<sup>[8]</sup>。

近年来新兴的PROTAC (proteolysis targeting chimeras) 技术，通过“靶蛋白/蛋白酶体-双亲和”的小分子，实现蛋白质在蛋白酶体中的降解<sup>[9]</sup>。PROTAC分子无需通过结合在蛋白的特定活性位点来阻断其功能，而是直接消除蛋白质主体，使蛋白质彻底丧失原有的功能。这种降解策略开辟了小分子药物研发的全新途径，几乎所有的重要蛋白都可以成为药物靶点，而且传统意义上无法成药的靶点也有望产生新的治疗药物分子。美国Arvinas公司是PROTAC药物研发的先驱，早期开发的靶向雄激素受体 (androgen receptor, AR) 的ARV-110和靶向雌激素受体 (estrogen receptor, ER) 的ARV-471已进入临床试验<sup>[10]</sup>。现有PROTAC技术开发的药物分子主要靶向胞内蛋白的降解，对于膜蛋白这类重要的药物靶点只能通过靶向其胞内结构域来完成，而对于缺乏胞内结构域的膜蛋白的降解则面临着巨大的困难。

2020年以来陆续报道了LYTAC (lysosome-targeting chimaeras)<sup>[11]</sup>、AbTAC (antibody-based PROTACs)<sup>[12]</sup>、GlueTAC (covalent nanobody-based PROTAC)<sup>[13]</sup>和KineTAC (cytokine receptor-targeting chimeras)<sup>[14]</sup>等蛋白质靶向降解技术，它们可以通过特异性结合受体蛋白胞外区或自身内化至细胞内实现膜蛋白的降解。内化途径包括溶酶体转运蛋白介导的主动运输、受体介导的内吞和穿膜肽介导的内吞等，复合物最终大多在溶酶体中降解。相对于PROTAC技术，上述技术均采用抗体可变区作为靶向结构域，而单克隆抗体技术的发展为其提供了丰富的选择，大大拓展了蛋白质靶向降解技术的应用范围。本文将集中介绍这些代表性的蛋白质靶向降解技术在膜蛋白降解中的机制与应用。

## 1 PROTAC技术

自2001年Crews教授及其合作者首次提出蛋白质靶向降解的概念并报道第一个具有蛋白质靶向降解功能的PROTAC分子以来，PROTAC作为蛋白质降解领域的代表已经对药物研发领域产

生了重大影响<sup>[15]</sup>。PROTAC通常是利用可募集胞内E3连接酶的配体引起胞内蛋白质的泛素化降解，如图1所示。但其在膜蛋白降解方面的研究较少，技术上尚未取得重大突破，其中最大的阻碍之一在于E3连接酶。人基因组编码了超过600种E3连接酶，但不同的E3连接酶在人体不同组织中的表达水平有所差异。为了降低PROTAC的脱靶效应，只有在肿瘤细胞中高表达且在正常组织中低表达的E3连接酶才能用于抗肿瘤PROTAC的设计，而目前所发现的符合条件的E3连接酶却少之又少<sup>[15]</sup>。

PROTAC最常用的两种胞质E3泛素连接酶是CRBN (Cereblon) 与VHL (Von Hippel-Lindau)。2018年，金坚团队利用泊马度胺 (Pomalidomide) 为靶向CRBN的配体，并以色瑞替尼 (Ceritinib) 作为靶向间变性淋巴瘤激酶 (anaplastic lymphoma kinase, ALK) 的配体，两个配体用不同长度的连接子 (linker) 连接，成功构建了一种靶向降解ALK的PROTAC分子——MS4077和MS4078。细胞层面的降解实验表明，MS4077和MS4078均能显著降解细胞中的ALK融合蛋白，从而抑制肿瘤细胞的增殖，并呈现出浓度和时间依赖的特点。它们在小鼠体内表现出相似的活性与优异的药代动力学性质<sup>[16]</sup>。招募跨膜E3泛素连接酶的MS4077和MS4078两个分子的构建，无疑为PROTAC技术在膜蛋白降解中的应用带来了新的希望。2020年，姜标团队同样以泊马度胺作为靶向CRBN的配体，以卡奈替尼 (Canertinib) 作为靶向EGFR的配体，开发了能够靶向降解吉非替尼耐药的突变型EGFR<sup>L858R/T790M</sup>的两种PROTAC分子。研究表明在EGFR-TKI (epithelial growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor) 耐药肺癌细胞系中，二者均能选择性地降解非小细胞肺癌 (H1975) 细胞突变型EGFR<sup>L858R+T790M</sup>和人肺癌细胞 (PC9) 中的外显子19缺失型EGFR<sup>Ex19del</sup>，表现出强效抗肿瘤活性<sup>[17]</sup>。除了基于CRBN的PROTAC之外，基于VHL的PROTAC也取得了一定的进展。2021年，Crews团队以维莫非尼 (Vemurafenib) 为靶向丝氨酸/苏氨酸激酶BRAF蛋白的配体设

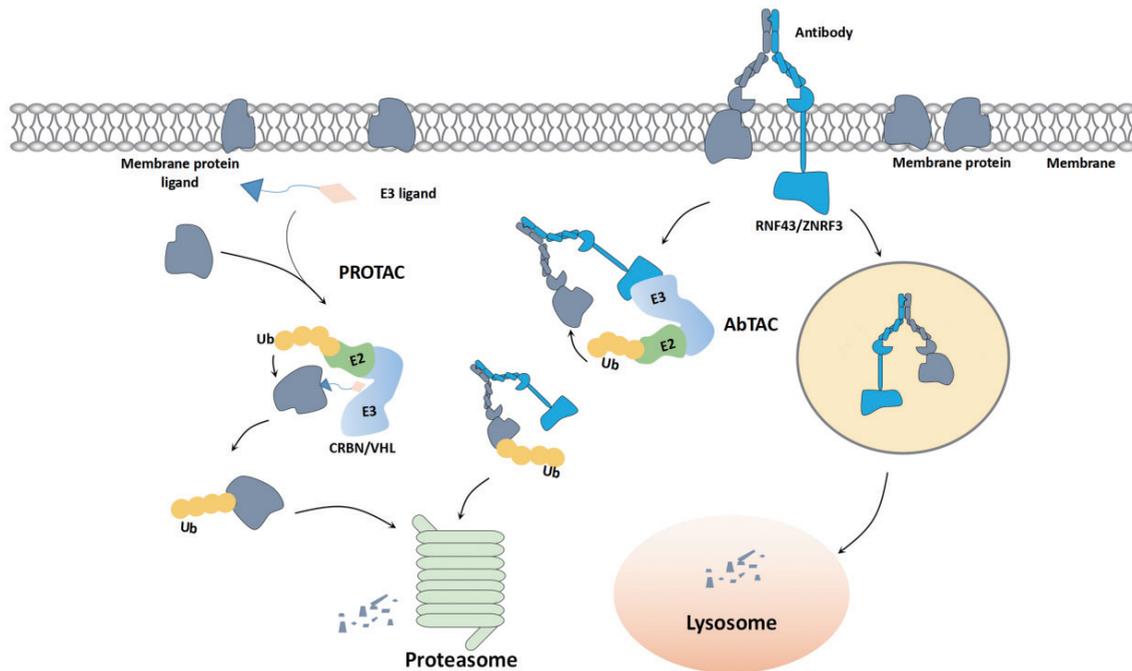


图1 基于E3连接酶的膜蛋白降解技术的作用机制：PROTAC利用双功能小分子同时结合膜蛋白与胞内E3连接酶(CRBN或VHL)形成多元复合物，拉近二者之间的距离，对膜蛋白进行泛素化标记，将其运送至蛋白酶体中降解；AbTAC利用双特异性抗体同时结合膜蛋白与跨膜E3连接酶(RNF43或ZNRF3)形成多元复合物，内化至溶酶体中降解，或对膜蛋白进行泛素化标记后运送至蛋白酶体中降解

计了基于VHL的PROTAC分子，在多种细胞系中均能有效地诱导BRAF-V600E及其他多种突变体的降解，而不会诱导野生型的BRAF蛋白降解，但目前还未能解释为什么该降解子既能选择性降解BRAF-V600E，也能够降解BRAF蛋白的其他突变型<sup>[18]</sup>。

目前PROTAC在靶向膜蛋白降解方面的研究依然是围绕CRBN与VHL两个重要的E3连接酶，二者在理化性质上(如亲脂性)的差异将决定其不同的应用范围。尽管目前处于临床试验中的基于CRBN的PROTAC降解剂数量明显多于基于VHL，但有越来越多的研究数据表明基于VHL的PROTAC的未来是光明的，并将会有更多的临床研究数据来证明这一点<sup>[19]</sup>。

## 2 LYTAC技术

2020年，Bertozzi团队首次报道了溶酶体靶向嵌合体LYTAC技术用于降解膜蛋白和胞外蛋白，该技术通过阳离子非依赖性甘露糖-6-磷

酸受体(cation-independent mannose-6-phosphate receptor, CI-M6PR) 将靶蛋白运送到溶酶体中降解<sup>[11]</sup>。CI-M6PR在体内的主要功能是将特定糖基化的蛋白质装入内体，并传递至溶酶体中降解。糖蛋白通过表面的糖与CI-M6PR结合，进而内化进入细胞中。在晚期内体中，较低的pH值使得糖蛋白与受体解离进入溶酶体，而受体则被循环回细胞膜或高尔基体<sup>[20]</sup>。

研究者巧妙地利用了CI-M6PR的这一特点，将合成的不可水解的6-磷酸甘露糖(M6Pn)糖肽通过点击(Click)反应修饰到靶向抗体上，使得抗体结合抗原后形成的复合物可以结合CI-M6PR并进入溶酶体中降解，如图2所示。实验结果表明，LYTAC能够在CI-M6PR高表达的细胞中高效地降解加速神经退行性病变的靶点载脂蛋白E (Apolipoprotein E, ApoE)、免疫检查点(PD-L1)和表皮生长因子受体(EGFR)<sup>[11]</sup>。遗憾的是，CI-M6PR组织分布较为广泛，导致LYTAC在机体内容易被非靶细胞摄取，生物利用度较低。为了

解决这一问题，研究者进一步选择了只在肝细胞中表达的唾液酸糖蛋白受体(asialoglycoprotein receptor, ASGPR)作为运输蛋白。基于ASGPR的配体N-乙酰半乳糖胺制备得到的GalNAc-LYTAC，同样能够高效地内化至肝癌细胞HepG2中，并降解其表面的抗原蛋白EGFR<sup>[21]</sup>。尽管上述两种LYTAC技术仅在体外细胞水平上获得了验证，但其重要意义在于开辟了胞外及膜蛋白靶向降解的新途径。在此研究基础之上，Spiegel团队<sup>[22]</sup>进一步开发了双功能小分子MoDE-As (molecular degraders of extracellular proteins through the asialoglycoprotein receptor) 来介导胞外靶蛋白与ASGPR的三元复合物的形成，MoDE-As由ASGPR结合序列、PEG (polyethylene glycol)间隔片段、靶蛋白结合序列组成。研究人员利用二硝基苯基团构建靶向a-DNP抗体的小分子D-MoDE-A，该分子通过内吞作用进入胞内后被迅速转运至溶酶体，并被其中的蛋白酶降解。更重要的是，在向含有

a-DNP抗体的小鼠体内每日注射D-MoDE-A后，在21天范围内血浆a-DNP的水平显著下降，同时小鼠的正常生理状态并未受到显著影响，证明了D-MoDE-A在小鼠体内通过ASGPR介导的溶酶体途径靶向降解胞外蛋白的能力。这一研究成果首次验证了LYTAC技术在体内进行蛋白质靶向降解的可行性<sup>[22]</sup>，使得LYTAC技术向真正的药物开发迈出了关键的一步。

LYTAC技术的成功开发不仅让蛋白质靶向降解技术不再局限于胞内蛋白，而且降解子的形式也不再局限于类似PROTAC的小分子，极大地拓展了蛋白质降解技术的应用范畴。然而，LYTAC技术依然有不足之处：其一，M6PR在正常组织细胞中也有表达，降解子的生物利用度会因“on-target, off-tumor”效应而降低；其二，制备LYTAC分子需要十几步以上的化学反应来合成结构复杂的糖肽或多糖分子，放大生产存在困难。如何将其高效地连接到抗体上以得到组分均一的LYTAC分子，同样是亟须解决的问题。

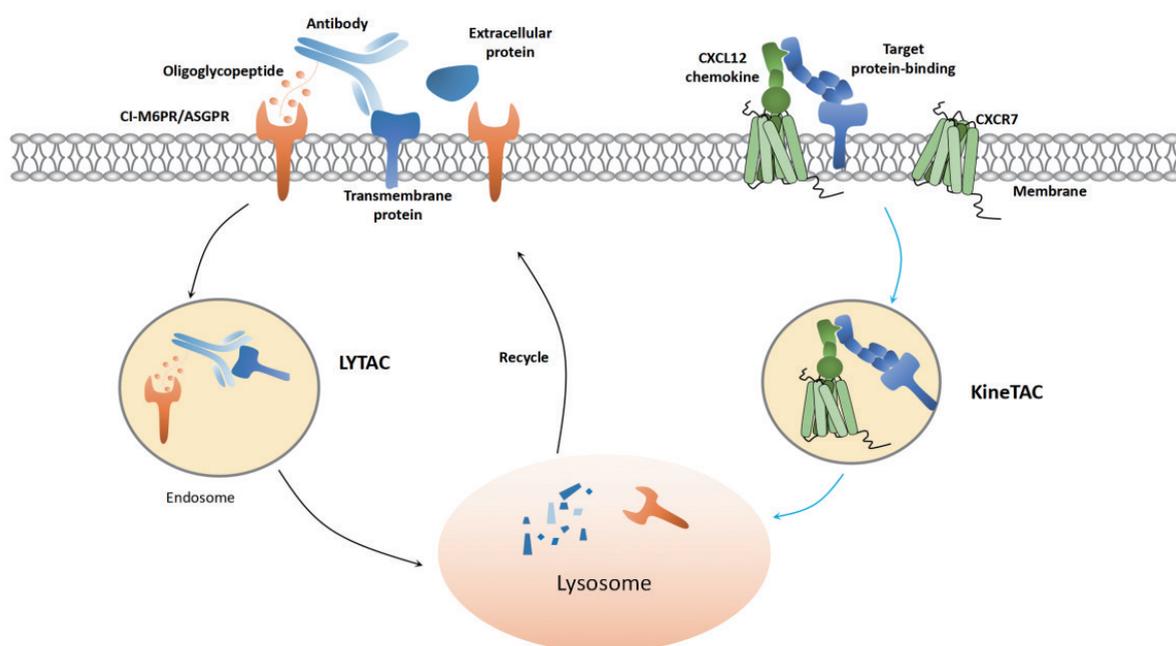


图2 基于细胞膜表面溶酶体结合受体的膜蛋白降解技术的作用机制：LYTAC利用糖基化修饰后的抗体结合膜蛋白后被M6PR(或ASGPR)识别，形成三元复合物内化至细胞中，在溶酶体中降解膜蛋白；KineTAC利用细胞趋化因子CXCL12的N端结合区域与靶向膜蛋白的抗体结合构成的双特异性抗体结合膜蛋白后，被CXCR7识别内化至细胞中，在溶酶体中降解膜蛋白

### 3 AbTAC技术

基于双特异性抗体的蛋白质靶向降解技术AbTAC代表了另一个重要的研究方向。PROTAC分子通过将细胞内的E3连接酶募集到目的蛋白附近促进其在蛋白酶体中的降解,其靶向基团多为小分子或多肽。AbTAC则是通过“knobs in hole”抗体恒定区构建而成的异源双特异性抗体,其一端的可变区结合跨膜E3连接酶(RNF43/ZNRF3)的胞外区,另一端结合膜蛋白的胞外区<sup>[23]</sup>。降解子在细胞外同二者形成三元复合物,并进一步内化进入细胞中通过蛋白酶体或溶酶体降解,如图1所示。利用噬菌体展示和筛选技术,研究人员成功得到了靶向PD-L1和RNF43的AbTAC分子,其在较低浓度时就可以降低多种细胞表面的PD-L1含量。进一步的研究表明,AbTAC分子降解靶蛋白的效率受到抗体亲和力、结合表位和E3连接酶表达水平等在内的多种因素影响。但是,AbTAC诱导靶蛋白降解的作用机理尚未得到完全解析。细胞层面的实验表明,加入溶酶体抑制剂巴佛洛霉素(Bafilomycin)可显著降低AbTAC的降解活性,而加入蛋白酶体抑制剂MG132则对其降解活性无明显作用,表明AbTAC引起的蛋白质降解主要在溶酶体而不是在蛋白酶体中发生<sup>[12]</sup>。但作为E3连接酶的RNF43是否在复合物内化前通过增加靶蛋白的泛素化水平来促进其降解,还是仅仅通过类似于CI-M6PR的穿梭行为来内化和降解蛋白质仍未阐明,目前认为二者均可能作为AbTAC的降解途径。此外,细胞内源的CI-M6PR和ASGPR在溶酶体和细胞膜上都有分布,CI-M6PR在将靶蛋白运输到溶酶体中后,理论上其自身可以回到细胞表面,循环参与降解过程,而作为E3连接酶的RNF43和ZNRF3是否可以在靶蛋白被降解后得到循环利用尚不清楚。

相对于最早的LYTAC技术,AbTAC分子采用抗体靶向跨膜E3连接酶,促进膜蛋白的内化和降解,为蛋白质降解子的开发提供了新的思路。一方面,内化受体蛋白的选择并不局限于特定的糖受体,包括E3连接酶在内的其他具有内化活性

的受体蛋白也可以作为候选;另一方面,靶向结构域不局限于受体蛋白天然的配体或衍生物,人工筛选出的抗体分子或类似物只要具备合适的结合表位,也可以很好地促进膜蛋白内化和降解。AbTAC分子可以通过更换靶向抗体适用于不同的靶点,实现模块化,其在大规模生产上也更为容易,有望在肿瘤免疫治疗中得到进一步应用。

### 4 KineTAC技术

上述蛋白质降解技术均为膜蛋白及胞外蛋白的降解提供了新的思路与方案,但这些技术仍然缺乏模块化及开发简易性。研究发现,内源性细胞趋化因子CXCL12能与趋化因子循环受体CXCR7结合,后者被G蛋白或 $\beta$ 抑制蛋白招募后持续内化<sup>[24]</sup>。2022年,James A. Wells团队首次借助内源性细胞因子CXCL12开发了基于细胞因子受体靶向嵌合体(KineTAC)的新型靶向降解平台<sup>[14]</sup>,如图2所示。KineTAC结合了AbTAC与LYTAC的优势,以CXCR7作为靶向溶酶体的细胞表面受体,将细胞趋化因子CXCL12的N端结合区域与靶向膜蛋白的抗体结合构成能够完全基因编码的双特异性抗体,不需要复杂的化学合成或生物偶联来生产,具有模块化的优势。细胞实验结果显示KineTAC具有高选择性,很大程度上降低了脱靶效应,并以浓度与时间依赖的方式由CXCR7介导膜蛋白至溶酶体中降解。研究人员将CXCL12的N端结合区域分别与靶向结合8种疾病治疗相关膜蛋白(包括HER2、EGFR和PD-L1等)及胞外可溶性蛋白(包括血管内皮生长因子VEGF和肿瘤坏死因子TNF- $\alpha$ )的抗体结合起来,所构建的对应的双特异性抗体均表现出了对目的蛋白的有效降解,且对目的蛋白之外的其他相关蛋白质数量并未产生影响,为KineTAC的安全性提供了有力的数据支撑。

此外,科研人员深入研究后发现,抗体结合亲和力、结合表位等因素会不同程度地影响KineTAC的降解效率,这为基于抗体的蛋白质靶向降解技术未来的设计、优化提供了可行的方向<sup>[14]</sup>。除CXCL12的N端结合结构域之外,用趋化因子CXCL11、白细胞介素IL2构建的双特异

性抗体也发挥了类似的降解作用，进一步突出了靶向降解膜蛋白的KineTAC平台的模块化优势。

## 5 GlueTAC技术

相对于前文中介绍的依赖细胞膜表面特定受体的膜蛋白降解技术，GlueTAC创造性地采用化学合成的“穿膜肽”促进复合物内化，在各种细胞中都可以发挥作用，尤其是对异质性强的肿瘤组织有更好的适用性。如图3所示，GlueTAC包含：①具有共价结合抗原能力的共价纳米抗体(GlueBody)；②带有正电的穿膜肽和溶酶体分选肽(CPP+LSS)，二者通过转肽酶(Sortase A)偶联在一起<sup>[25]</sup>。GlueTAC分子中用纳米抗体替换了传统IgG抗体，显著增加了降解子的组织渗透。首先，分子量小的降解子和抗原复合物也更容易在穿膜肽的促进下内化进入细胞；其次，通过向纳米抗体中定点引入具有邻近反应活性的非天然氨基酸，赋予纳米抗体共价结合抗原的能力，最大程度地降低了降解过程中的脱靶效应；最后，利用转肽酶将穿膜肽和溶酶体分选序列(CPP+LSS)与纳米抗体偶联在一起，实现降解子在结合抗原

后的主动快速内吞和降解。研究人员通过开发靶向免疫检查点PD-L1的GlueTAC分子验证了该技术的有效性。体外实验表明，共价形式的降解子能够快速降低三阴乳腺癌(MDA-MB-231)和非小细胞肺癌(H460)等细胞表面的PD-L1蛋白含量，并展现出比单一的阻断性抗体更强的激活T细胞的活性。同时，研究者在活体动物层面上证明，与FDA批准的靶向PD-L1的阿特珠单抗相比，GlueTAC也更为有效地抑制了免疫重建小鼠上的肿瘤生长。

值得注意的是，虽然在纳米抗体结合抗原诱发的邻近效应存在下，GlueTAC内化进入表达目的蛋白的细胞速率要远大于不表达目的蛋白的细胞，但强正电性的穿膜肽使其在浓度较高时同样能够非特异地进入非靶细胞中。这使得在全身性给药时，降解子的生物利用率因正常组织细胞的摄取而降低，部分限制了其应用范围。但重要的是，GlueTAC通过邻近效应诱发下的交联反应特异性地共价结合抗原，在肿瘤组织中会有更长时间的停留和作用，是一种非常值得关注的药物形式<sup>[13]</sup>。

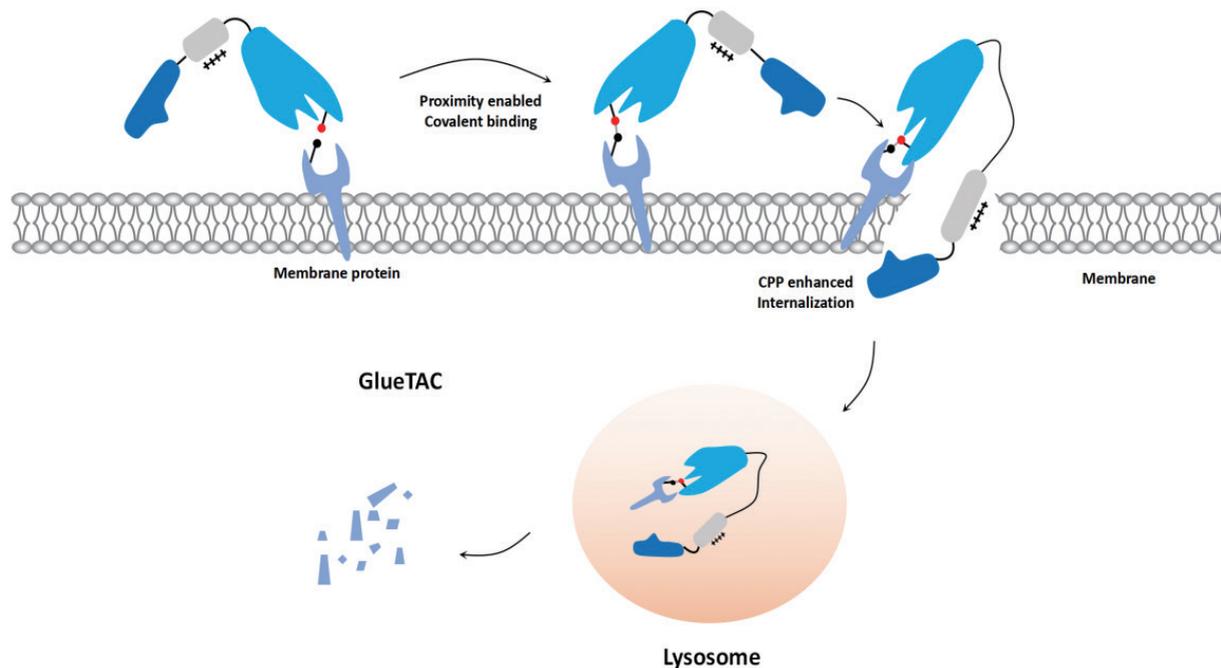


图3 GlueTAC降解膜蛋白的作用机制：非天然氨基酸修饰的纳米抗体偶联带正电的穿膜肽与溶酶体分选肽后形成的复合物与膜蛋白共价结合后内化至细胞内，在溶酶体中降解膜蛋白

## 6 总结与展望

随着对膜蛋白的发生、折叠以及生物功能的深入理解,可以发现,膜蛋白与其他可溶性蛋白一样具有复杂的空间结构,在许多细胞的基本生理过程中起着至关重要的作用,其中大多数与肿瘤的发生、发展密切相关。膜蛋白约占全部基因组编码基因的30%,但迄今为止已知其空间结构的膜蛋白相对较少<sup>[26]</sup>。因此,能够靶向结合其特定活性位点的小分子抑制剂的设计面临重重阻碍,导致这些关键的膜蛋白成为主要的“不可成药”靶点。

近年来,PROTAC技术的开发应用为靶向这类膜蛋白带来了新思路。PROTAC技术首先设计具有双靶向功能的小分子,通过靶向跨膜E3连接酶间接靶向结合膜蛋白,充分利用自身泛素-蛋白酶体系统达到结合并降解膜蛋白的目的,打破了传统小分子抑制剂无法靶向结合并抑制其生物学功能的困局。但PROTAC技术受限于跨膜E3连接酶的种类和数量,目前仅发现ZNF3与RNF43两种合适的跨膜E3连接酶,均具有极高的开发价值<sup>[23]</sup>。因此,发现更多可用的跨膜E3连接酶将为未来PROTAC技术在膜蛋白降解中的广泛应用开辟出新的道路。为了克服对跨膜E3连接酶的依赖,LYTAC技术应运而生。该技术绕开了最具吸引力的泛素-蛋白酶体途径,转而利用少有研究的溶酶体途径。通过模拟细胞表面溶酶体结合受体CI-M6PR的天然识别模式,对靶向结合膜蛋白的单克隆抗体进行糖基化修饰,使修饰后的抗体在结合膜蛋白的同时被CI-M6PR识别,并随着CI-M6PR内化、运送至溶酶体中,实现膜蛋白的降解。但LYTAC需要对抗体进行糖基化修饰,导致降解子合成路线冗长复杂,非常耗时,这一不足大大阻碍了该技术的广泛应用<sup>[21]</sup>。而AbTAC同时具备了LYTAC与PROTAC的优势,以可完全基因编码的双特异性抗体连接跨膜E3连接酶RNF43与膜蛋白,巧妙地解决了糖基化修饰的抗体合成困难的问题。KineTAC则在AbTAC的基础上扩展了膜蛋白降解的范围,利用细胞趋化因子CXCL12能够

与细胞表面溶酶体受体CXCL7特异性识别,将CXCL12的N端识别序列与膜蛋白的抗体识别序列组合成能够完全基因编码的双特异性抗体,使降解子的模块化成为可能<sup>[14]</sup>。相较于上述膜蛋白降解技术,GlueTAC最大的优势在于非天然氨基酸的引入使降解子与膜蛋白共价结合,大大降低了脱靶效应,同时提高了降解子的降解效率和安全性,而穿膜肽的引入则赋予降解子无须依赖任何E3连接酶或细胞膜表面受体即可进入细胞膜的能力,是一种独树一帜的降解方式。几种不同的膜蛋白降解技术汇总如表1所示。

综上所述,通过利用不同的跨膜E3连接酶、细胞膜表面受体等将蛋白质靶向降解技术成功应用于膜蛋白的降解,不仅解决了传统小分子抑制剂与抗体抑制不彻底或产生耐药的问题,且克服了早期PROTAC仅能靶向胞内蛋白或渗透性强的蛋白的局限性。但上述膜蛋白靶向降解技术的降解作用受到多种因素的调节,包括不同的降解技术所依赖的细胞膜表面受体或E3连接酶的表达量、配体的结合亲和力、结合表位、降解子及形成的三元复合物的稳定性等,因此仍需要进一步对降解子的各组分针对性地优化和改造。一方面,对于依赖泛素蛋白酶体降解途径的PROTAC与AbTAC,迫切需要发现除CRBN、VHL、RNF43等之外的其他不同类型的E3连接酶,为二者提供更多的选择去开发更具靶向性的降解子,降低脱靶效应;另一方面,对于依赖溶酶体降解途径的GlueTAC、KineTAC、LYTAC等,除了发现其他具有特异性的能够靶向溶酶体的细胞膜表面受体之外,对降解子本身包括抗体结合亲和力、结合表位、连接子长度及柔性等性质仍有待系统地优化,以适应不同类型的膜蛋白降解。除此之外,在验证降解子的降解功能的同时,应进行全面的蛋白质组学研究,评估降解子对其他相关蛋白数量与功能的影响,尤其是降解子是否在体内积累产生副作用等问题<sup>[27]</sup>。与抑制的治疗策略相比,降解膜蛋白使其彻底丧失生物学功能的策略更具有吸引力,而技术上所面临的机遇与挑战也是并存的。在未来长期的研究与探索下,这些膜蛋白靶向降解技术将会被开发成

表1 膜蛋白靶向降解技术汇总

名称	降解途径	化学本质	优势	不足
PROTAC	泛素蛋白酶体途径	小分子	可循环利用; 可合理设计	难于降解膜蛋白与胞外蛋白
LYTAC	溶酶体途径	寡糖+抗体偶联物	可降解膜蛋白与胞外蛋白; 细胞表面溶酶体结合受体可循环利用	合成复杂耗时; 难以模块化
AbTAC	泛素蛋白酶体途径 溶酶体途径	抗体	可完全基因编码, 易于生产	受限于跨膜E3连接酶的种类
KineTAC	溶酶体途径	抗体	可完全基因编码, 易于生产和模块化	依赖内源性细胞因子, 其受体是否可循环利用有待验证
GlucTAC	溶酶体途径	抗体+多肽偶联物	不依赖任何细胞受体穿膜, 穿膜效率高; 与膜蛋白共价结合, 不易脱靶	体内半衰期较短, 生物利用率低

一种新的临床治疗手段, 为相关疾病的治疗带来福音。

(2022年12月30日收稿) ■



### 参考文献

- [1] UHLÉN M, FAGERBERG L, HALLSTRÖM B M, et al. Tissue-based map of the human proteome [J]. *Science*, 2015, 347(6220): 1260419.
- [2] YANG X, ZHANG X, FU M L, et al. Targeting the tumor microenvironment with interferon- $\beta$  bridges innate and adaptive immune responses [J]. *Cancer Cell*, 2014, 25(1): 37-48.
- [3] DONG H, STROME S E, SALOMAO D R, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion [J]. *Nat Med*, 2002, 8(8): 793-800.
- [4] MCDERMOTT L A, WEIR G A, THEMISTOCLEOUS A C, et al. Defining the functional role of Na $\nu$ 1.7 in human nociception [J]. *Neuron*, 2019, 101(5): 905-919.
- [5] WEN T, WANG J, SHI Y, et al. Inhibitors targeting Bruton's tyrosine kinase in cancers: drug development advances [J]. *Leukemia*, 2021, 35(2): 312-332.
- [6] WEINER G J. Building better monoclonal antibody-based therapeutics [J]. *Nat Rev Cancer*, 2015, 15(6): 361-370.
- [7] YANG X, XIE S, YANG X, et al. Opportunities and challenges for antibodies against intracellular antigens [J]. *Theranostics*, 2019, 9(25): 7792-7806.
- [8] CAO C, HE M, WANG L, et al. Chemistries of bifunctional PROTAC degraders [J]. *Chem Soc Rev*, 2022, 51(16): 7066-7114.
- [9] BONDESON D P, MARES A, SMITH I E, et al. Catalytic in vivo protein knockdown by small-molecule PROTACs [J]. *Nat Chem Biol*, 2015, 11(8): 611-617.
- [10] MULLARD A. Targeted protein degraders crowd into the clinic [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 20(4): 247-250.
- [11] BANIK S M, PEDRAM K, WISNOVSKY S, et al. Lysosome-targeting chimaeras for degradation of extracellular proteins [J]. *Nature*, 2020, 584(7820): 291-297.
- [12] COTTON A D, NGUYEN D P, GRAMESPACHER J A, et al. Development of antibody-based PROTACs for the degradation of the cell-surface immune checkpoint protein PD-L1 [J]. *J Am Chem Soc*, 2021, 143(2): 593-598.
- [13] ZHANG H, HAN Y, YANG Y, et al. Covalently engineered nanobody chimeras for targeted membrane protein degradation [J]. *J Am Chem Soc*, 2021, 143(40): 16377-16382.
- [14] PANCE K, GRAMESPACHER J A, BYRNES J R, et al. Modular cytokine receptor-targeting chimeras for targeted degradation of cell surface and extracellular proteins [J]. *Nat Biotechnol*, 2023, 41(2): 273-281.
- [15] 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 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(15): 8554-8559.
- [16] ZHANG C, HAN X R, YANG X, et al. Proteolysis targeting chimeras (PROTACs) of anaplastic lymphoma kinase (ALK) [J]. *Eur J Med Chem*, 2018, 151: 304-314.
- [17] QU X, LIU H, SONG X, et al. Effective degradation of EGFR<sup>L858R+T790M</sup> mutant proteins by CRBN-based PROTACs through both proteasome and autophagy/lysosome degradation system [J]. *Eur J Med Chem*, 2021, 218: 113328.
- [18] ALABI S, JAIME F S, YAO Z, et al. Mutant-selective degradation by BRAF-targeting PROTACs [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 920.
- [19] DIEHL C J, CIULLI A. Discovery of small molecule ligands for the

- von Hippel-Lindau (VHL) E3 ligase and their use as inhibitors and PROTAC degraders [J]. *Chem Soc Rev*, 2022, 51(19): 8216-8257.
- [20] COUTINHO M F, PRATA M J, ALVES S. A shortcut to the lysosome: the mannose-6-phosphate-independent pathway [J]. *Mol Genet Metab*, 2012, 107(3): 257-266.
- [21] AHN G, BANIK S M, MILLER C L, et al. LYTACs that engage the asialoglycoprotein receptor for targeted protein degradation [J]. *Nat Chem Biol*, 2021, 17(9): 937-946.
- [22] CAIANIELLO D F, ZHANG M, RAY J D, et al. Bifunctional small molecules that mediate the degradation of extracellular proteins [J]. *Nat Chem Biol*, 2021, 17(9): 947-953.
- [23] MAREI H, TSAI W T K, KEE Y S, et al. Antibody targeting of E3 ubiquitin ligases for receptor degradation [J]. *Nature*, 2022, 610(7930): 182-189.
- [24] JANSSENS R, STRUYF S, PROOST P. The unique structural and functional features of CXCL12 [J]. *Cell Mol Immunol*, 2018, 15(4): 299-311.
- [25] CHIN J W. Expanding and reprogramming the genetic code [J]. *Nature*, 2017, 550(7674): 53-60.
- [26] UHLÉN M, FAGERBERG L, HALLSTRÖM B M, et al. Tissue-based map of the human proteome [J]. *Science*, 2015, 347(6220): 1260419.
- [27] CHAMBERLAIN P P, HAMANN L G. Development of targeted protein degradation therapeutics [J]. *Nat Chem Biol*, 2019, 15(10): 937-944.

## Research progress in targeted degradation of membrane proteins

ZHAO Su<sup>①</sup>, ZHANG Heng<sup>②</sup>, LI Yan<sup>①</sup>, WANG Zhenchao<sup>①③</sup>

① School of pharmaceutical sciences, Guizhou University, Guiyang 550025, China; ② Shenzhen Bay Laboratory, Shenzhen 518000, Guangdong Province, China; ③ State Key Laboratory Breeding Base of Green Pesticide and Agricultural Bioengineering, Guizhou University, Guiyang 550025, China

**Abstract** Membrane proteins are the major participants in cell-cell interactions, and play important roles in many essential cellular processes, such as signal transduction, differentiation, proliferation, and stress response. Traditional small molecule inhibitors and antibodies can play a role by inhibiting and blocking the interactions between membrane proteins and their ligands, but there are often problems of incomplete inhibition or induction of drug resistance. The emerging protein targeted degradation technologies provide a new area for drug discovery. The function of protein is completely lost by specifically degrading in lysosome or proteasome, which expands significantly the drugable scope. This review briefly discusses research progress about targeted membrane protein degradation technologies and presents the promising application of these technologies in clinic.

**Key words** membrane protein, targeted degradation, protein function

(编辑: 沈美芳)

### 征订启事

《自然杂志》以邮发方式向全国各地征订、发行, 代号4-226。请各地读者至当地邮局订阅。如错过邮局订阅时间, 可直接与上海大学期刊社发行室联系订阅。

定价: 30.00 元 (全年180元)

通信 (汇款) 地址: 上海市宝山区上大路99号上海大学121信箱 (200444)

电话: 021-66135218; 传真: 021-66132736