Hans Journal of Medicinal Chemistry 药物化学, 2026, 14(1), 53-63
Published Online February 2026 in Hans. https://www.hanspub.org/journal/hjmce
https://doi.org/10.12677/hjmce.2026.141006

Hans汉斯

双靶E3连接酶配体：克服耐药新出路

潘相奕

浙江师范大学化学与材料科学学院，浙江 金华

收稿日期：2025年12月9日；录用日期：2025年12月22日；发布日期：2026年2月12日

摘 要

由与E3泛素连接酶配体连接的蛋白质靶向配体组成的蛋白水解靶向嵌合体(PROTAC)的靶向蛋白质降解已成为一种通过蛋白酶体介导的降解致病蛋白质的强大治疗方式。目前对于PROTAC的研究如火如荼，但在应用方面PROTAC仍具有较大限制，例如肿瘤细胞的耐药性。联合用药是目前最广泛使用的规避耐药性方式，但是联合用药带来了新的问题。相较之下，双靶药物则具有巨大前景。双靶药物通过同时抑制多个靶标蛋白并产生协同抗病毒作用来对抗病毒感染。肿瘤的耐药性突变改变的是E3连接酶，如果能够设计合成双靶E3连接酶配体的PROTAC，哪怕其中一端的E3连接酶失活，另一端对应的E3连接酶仍能发挥作用。

关键词

E3泛素连接酶配体、蛋白靶向嵌合体(PROTAC)、双靶药物

Dual Target E3 Ligase Ligands: A New Way to Overcome Drug Resistance

Xiangyi Pan

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

Received: December 9, 2025; accepted: December 22, 2026; published: February 12, 2026

Abstract

Targeted protein degradation by proteolytic targeting chimera (protac), which consists of protein targeting ligands linked to E3 ubiquitin ligase ligands, has become a powerful therapeutic modality to degrade pathogenic proteins through proteasome-mediated degradation. At present, the research on protac is in full swing, but there are still great limitations in the application of protac, such as the drug resistance of tumor cells. Drug combination is the most widely used way to avoid drug resistance, but

文章引用: 潘相奕. 双靶 E3 连接酶配体: 克服耐药新出路[J]. 药物化学, 2026, 14(1): 53-63.
DOI: 10.12677/hjmce.2026.141006

it has brought new problems. In contrast, dual-target drugs have great prospects. Dual target drugs fight against viral infection by simultaneously inhibiting multiple target proteins and producing synergistic antiviral effects. The drug resistance mutation of tumor is targeted at the E3 ligase. If protacs with dual target E3 ligase ligands can be designed and synthesized, even if the E3 ligase at one end is inactivated, the corresponding E3 ligase at the other end can still play a role.

Keywords

E3 Ubiquitin Ligase Ligand, Proteolysis-Targeting Chimeras (PROTAC), Dual Target Drugs

Copyright © 2026 by author(s) and Hans Publishers Inc.
This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).
http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Open Access

1. E3 泛素连接酶配体

1.1. 泛素化系统

泛素－蛋白酶体系统(UPS)广泛存在于真核细胞中，用于降解蛋白质[1]。由于降解蛋白质必须严格管控，该系统依赖于泛素标记。泛素是一种一种高度进化保守的多肽，蛋白质一旦被泛素标记，便会启动泛素化程序，激活一系列称为 E1、E2、E3 的泛素酶，将该蛋白质泛素化并降解[2]。

1.2. E3 泛素连接酶在细胞中广泛分布

UPS 由蛋白酶体通过酶级联反应[3]。第一步是 E1 酶消耗 ATP 结合并激活泛素，紧接着 E2 酶结合形成 E2 泛素复合物，最后 E3 酶介导泛素通过 E2 酶转移到目标蛋白。关于泛素化程序以及 E1、E2、E3 酶，研究已经进行了几十年[4]，总共发现了超过了 600 种 E3 泛素连接酶，但是只发现 40 种左右 E2 泛素结合酶和 2 种 E1 泛素激活酶[5]。显而易见，E3 酶的数量过于不平衡。E3 泛素连接酶的多样性使得其可选择的范围极大，但是 E3 泛素连接酶的配体开发却有困难，这主要是因为 E3 泛素连接酶基本都不具有常规的小分子结合位点，因此只有极少数的 E3 泛素连接酶配体得到应用，这是研究中亟需克服的难点。

1.3. 常见的 E3 泛素连接酶配体

虽然目前已经发现了超过 600 种 E3 泛素连接酶，但是只有 CRBN (Cereblon)、MDM2 (Mouse Doubleminute 2 homolog)、VHL (Von-Hippel-Lindau)、DCAF (DDB1 and CUL4 Associated Factor)家族、IAP (Inhibitor of Apoptosis Proteins)等得到充分研究[6]。

(1) CRBN 配体

在研究沙利度胺致畸机理的过程中，意外发现沙利度胺作为一种免疫调节酰亚胺药物(IMiD)十分有前途。2011 年，Ito [7]等人的研究才证明了沙利度胺其实是一类 CRBN 的配体，随后 Zhu [8]等人证明了泊马度胺和来那度胺也是靶向 CRBN 的。沙利度胺由邻苯二甲酰亚胺和戊二酰胺两个部分组成，其衍生物也具有类似的结构。

随着结合机理与构效关系认知的不断深入，研究人员不满足于将 CRBN 配体的结构局限于沙利度胺衍生物。正如上文提及的，真正与 CRBN 结合的是沙利度胺衍生物中的戊二酰胺基团，且改变沙利度胺的邻苯二甲酰亚胺部分并不会有明显的不利影响，在此认知基础上，Hwang [9]等人将沙利度胺的邻苯二

甲酰亚胺部分改变为氨基苯并三氮嗪，开发了新型的 CRBN 配体，其对 IKZF1 与 IKZF3 的降解效率比泊马度胺更高。

(2) DCAF 配体

抗菌、抗真菌、抗病毒和抗癌等领域，磺胺类衍生物一直因为其优良的活性受到关注，Nijhawan [10]等人发现 **Indisulam** (一种磺胺衍生物)以及 **E7820** 和 **CQS** 能够作为 DCAF15 配体。同样是 DACF 家族的 DCAF16，Zhang [11]等人在试图开发新的亲电 E3 泛素连接酶配体时，在筛选过程中发现具有氯乙酰胺或丙烯酰胺片段的结构表现出降解效果。经过一系列实验证明这类结构靶向 DCAF16 这种缺乏研究的核定位 E3 泛素连接酶。

值得注意的是，发现的这几种 DCAF16 配体与包括 CRBN 配体在内的其他配体不同，是通过共价作用于靶标结合，而非氢键与分子间作用力。这不仅丰富了 E3 泛素连接酶的多样性，也拓宽了 E3 泛素连接酶配体的开发思路。Cravatt [12]等人采用相同的开发思路，鉴定了一种 DCAF11 的配体。

(3) VHL 配体

VHL 同样是一种被充分研究的 E3 泛素连接酶，有相当多种类的配体。Buckley [13]等人鉴定并先后优化产生了多种 VHL 配体的结构，其中包含多种亲和能力较强的配体。Zoppi [14]等人更是提出了一种指导性的 VHL 配体结构优化方向，他们发现增加 VHL 配体的脂溶性不仅能提高对 VHL 的结合能力，还能提高细胞通透性。在此方向下，他们开发了新的 VHL 配体。

之后，在对 VHL 配体的研究中，Lucas [15]等人针对 VHL 进行了一项基于片段的筛选，发现了三个之前从未发现的有结合潜力的小分子片段，更振奋人心的是，三个片段都靶向之前未知的结合位点。这项研究的成功说明了将包括差示扫描荧光法(DSF)在内的高通量生物物理方法以及包括核磁共振技术(NMR)在内的高灵敏度生物物理方法与 X 射线晶体学相结合是一种发现重要药物靶点的新配体的重要途径。

2. PROTAC (蛋白水解靶向嵌合体)

2.1. PROTAC 的基本原理

PROTAC 即蛋白水解靶向嵌合体，是一种靶向蛋白降解领域中的明星技术。PROTACs 是一类异双功能分子，结构中含有靶标蛋白(POI)配体、连接子(linker)、E3 泛素连接酶配体[16]。PROTACs 可以同时特异性募集靶标蛋白与 E3 泛素连接酶，形成稳定的三元复合物(图 1)，促进靶标蛋白进行泛素化进而降解靶标蛋白[17]。

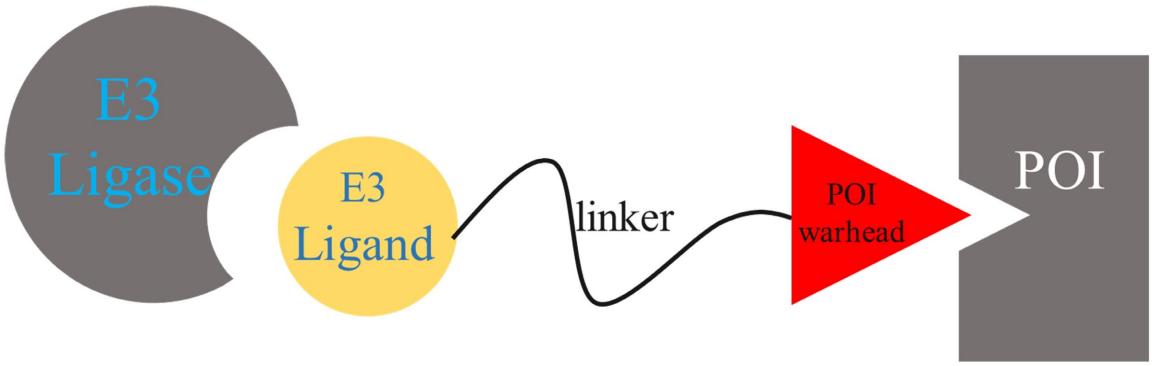

Figure 1. Schematic diagram of ternary composite
图 1. 三元复合物示意图

PROTAC 甚至可以作用于传统概念中“不可成药”的蛋白质。没有结合口袋或口袋太浅的蛋白被视为“不可成药”的，但随着 PROTAC 研究的推进，已经有多种“不可成药”靶标被攻克。同时，大型的多蛋白复合物也被视为“不可成药”，因为仅仅抑制其中一个亚基并不能完全抑制复合物的功能，而同时针对复合物的大多数部分具有较大的实践困难。但这对于 PROTAC 来说完全不是问题——一旦其中一个易配体的亚基被 PROTACs 募集，则多个复合物成员将被泛素化，从而有效降解大型多蛋白复合物[18]。

2.2. PROTAC 的结构特征

前文已提及，PROTAC 分子有三大组成部分：靶标蛋白配体、连接子、E3 泛素连接酶配体，这种模块化的结构为药物设计带来极大的便利。PROTAC 得益于其模块化的设计，开发过程对三个组成部分进行排列组合，这使得 PROTAC 分子设计的灵活性极大提升。通过更换 PROTACs 的某一个“组件”，则有可能达到不同的效果，这里的效果不仅指降解能力，还包括代谢活性、细胞毒性等一系列药物生化性质。针对 PROTAC 的“组件”，PROTAC 的研究则出现两个重点方向，即靶标蛋白配体与 E3 泛素连接酶配体的开发。

2.3. PROTAC 的研究现状

自从 PROTAC 的概念和原理在 2001 问世[19]以来，对 PROTAC 的研究不断深入。从最初的主要针对激素受体的研究[20]，到进入二期临床的 Arvinas Therapeutics 开发的 **NCT04072952** 和 **NCT03888612**。

第一代的 PROTAC 由于缺乏小分子 E3 泛素连接酶配体，大多基于大肽基序[19]，但这也使得这些早期的 PROTACs 具有较差的细胞通透性，这极大地限制了其应用[21]。之后，几种小分子的 E3 连接酶配体的问世改变了这一情况，使用 MDM2 (Mouse Doubleminute 2 homolog)配体 **Nutlin-3** 构建的 PROTACs [22]标志着 PROTAC 进入“小分子”时代。使用 CRBN (Cereblon)配体沙利度胺及其衍生物来那度胺和泊马度胺构建的 PROTACs 凭借更高的活性成为了新一代的风向标，CRBN 一跃成为应用最广的 E3 泛素连接酶。

在 PROTAC 的应用中，最常见的是 CRBN 与 VHL (Von-Hippel-Lindau)两种 E3 泛素连接酶的配体，同时也只有一些基于 CRBN 配体的 PROTACs 和仅一种基于 VHL 配体的 PROTACs 进入临床阶段。主要原因就是这两种 E3 泛素连接酶在人体中广泛分布，应用前景最大。然而，出于多样性的考虑，开发多种 E3 泛素连接酶的配体显然是有必要的。Crews [23]等人在 2015 年基于沙利度胺衍生物开发出了靶向含溴结构域蛋白 4 (BRD4)的 PROTACs (图 2(A))。将靶向 BRD4 的 **JQ1** 与沙利度胺衍生物偶联制备的 dBET1，无论在体内还是体内都对急性髓系白血病(AML)表现出良好的疗效，是第一个进入临床阶段的 PROTACs，也是基于 CRBN 的 PROTAC 的代表，更是目前 PROTAC 研究中最前端。里程碑式的第一个小分子 PROTACs (图 2(B))则是基于 MDM2 [22]，该配体在当时是已知的。而后 Sheng [24]等人基于同样的 MDM2 配体 **Nutlin-3** 构建了其他几种 PROTACs，具有更高的抑制活性。基于 VHL 的 PROTAC 则是除了 CRBN 外唯一进入临床阶段的 PROTAC，针对其的研究同样完善。如 Buckley [13]等人在鉴定的多种 VHL 配体中分别选取先后两次研究中表现最好的配体组装 PROTAC，表达出了良好的降解活性。Wang [25]等人在之后的研究中优化了该课题组之前鉴定的并配体组成了 PROTAC (图 2(C))，合成的 PROTACs 在包括 VCaP、LNCaP、22Rv1 等常见前列腺癌细胞系中产生了十分喜人的药效。Wang [26]等人在进一步的研究中，采用了弱结合的 VHL 配体组装出了与其他强结合的 VHL 配体 PROTACs 相比具有高疗效的 PROTACs (图 2(D))，这项研究证明了一些弱结合的 E3 泛素连接酶配体组装的 PROTACs 也能够诱导靶标蛋白形成三元复合物。

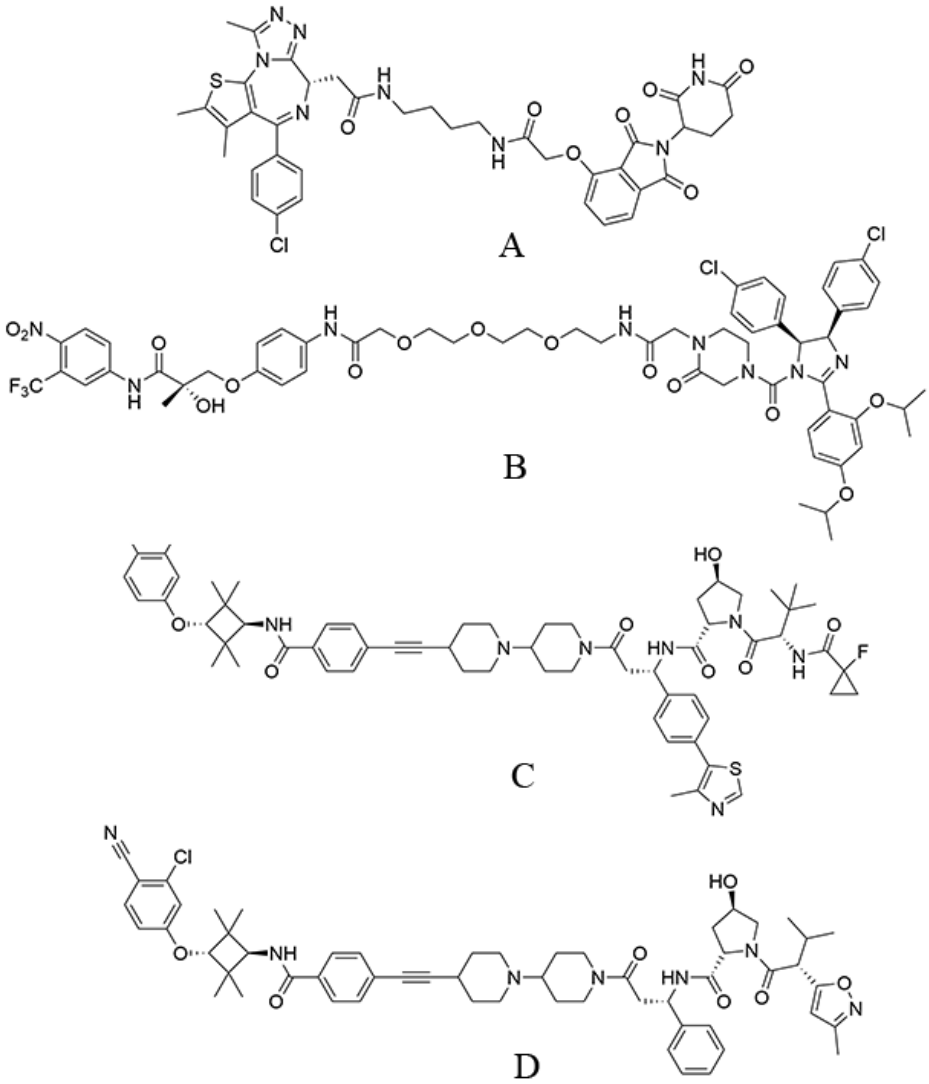

Figure 2. Some representative PROTAC structures
图 2. 一些具有代表性的 PROTAC 结构

3. 肿瘤对 PROTAC 的耐药性

3.1. 肿瘤耐药性对 PROTAC 治疗的影响

众所周知，攻克癌症是人类在医疗领域的至高理想之一。随着人们对肿瘤学的认知不断增加，开发了众多抗肿瘤药物。但是肿瘤耐药性仍然是最大的难题之一[27]。肿瘤细胞会突变获得新的功能以对抗药物的治疗[28]，而这使得原先有效的药物失去作用。在初期的疗程中，耐药性的产生不明显，随着治疗的持续，耐药性带来的不良影响越来越显著，最终严重干扰药物的治疗。

PROTAC 独特的机理使得它在对抗因靶标蛋白过表达、点突变、靶标蛋白支架功能改变而产生的耐药性尤为有效。事实上，也的确有许多证明 PROTAC 可以一定程度上规避肿瘤耐药性的研究。例如 Zhang [29]等人开发的一种基于步加替尼的 PROTAC 可以选择性地灭活非小细胞肺癌(NSCLC)持续治疗过程产生的突变型肿瘤细胞，说明 PROTAC 治疗过程中触发肿瘤耐药性突变的概率要比常规药物小得多。

可惜的是，随着研究的深入，研究人员也发现了 PROTAC 治疗过程中发生耐药性突变的风险，治疗

过程中甚至还可能产生 MDR (Multiple Drug Resistant，多重耐药性)，即包括肿瘤细胞在内的病原体对多种不同类型的药物产生耐药性[30]。例如 Zhang [31]等人在持续暴露在 VHL 的 PROTACs 或 CRBN 的 PROTACs 的人卵巢癌可传代细胞系 OVCAR8 中提取到了耐药克隆。VHL 的 PROTACs 或 CRBN 的 PROTACs 对于这些耐药克隆的 IC_{50} 增加了超过 40 倍。

3.2. PROTAC 治疗肿瘤中耐药性产生的原理

想要规避肿瘤的耐药性，则必须了解 PROTAC 治疗肿瘤中耐药性产生的原理。已有研究证明，产生 PROTAC 耐药性的肿瘤细胞中的靶标蛋白表达水平只有些微降低(研究采用的是靶向 BET 溴结构域的 BET-PROTAC)，这种变化过于微小以至于可以排除其成为产生耐药性原因的可能性[32]。现有的数据表明，有大约三分之一的患者接受泊马度胺治疗后产生了 CRBN 突变[33]-[35]。既然泊马度胺等 iMID 持续治疗会引起 CRBN 突变，那采用 iMID 作为 CRBN 配体的 PROTAC 同样会引起 CRBN 突变进而使得肿瘤细胞产生耐药性。Zhang [31]等人发现，在对 CRBN 配体的 PROTAC 产生耐药性的肿瘤细胞中存在 CRBN 缺失。Zhang 等人在研究中发现敲低 CUL2 或 CRBN 使 LNCaP 细胞产生耐药性，这表明对基于 VHL 或 CRBN 的 PROTAC 的耐药性产生是由于相应 E3 泛素连接酶的基因改变。除此对 PROTAC 产生耐药性的肿瘤细胞内，蛋白酶体与泛素系统仍保持运作[31]。经过 Zhang 等人的研究，已经确定的是基于 CRBN 和 VHL 的 PROTAC 之间的耐药性原理是不同的。对基于 CRBN 的 BET-PROTAC 的耐药性是由基因突变缺失导致 CRBN 基因丢失引起的，这引发了 CRBN 这一 E3 泛素连接酶本身缺失。对基于 VHL 的 BET-PROTAC 的耐药性是由 CUL2 基因组的多个基因组改变导致的 CUL2 丢失引起的，CUL2 是 VHL 的一个重要结合域，VHL 的配体大多在此位点结合。

基于 CRBN 和 VHL 的 PROTAC 之间的耐药性原理不同，这可能是由于肿瘤细胞对不同的 E3 泛素连接酶的依赖性不同。例如 VHL 虽然能够发挥抑癌基因的作用[36]，但是近千种细胞系中都发现其对肿瘤的生长增殖是必需的[37]。而 CRBN 的缺失对肿瘤的生长增殖却无影响，Mayor-Ruiz [38]等人的研究已证实 CRBN 敲除并不会对人慢性粒细胞白血病细胞 KBM-7 产生不利影响。这说明了不同的 E3 泛素连接酶配体需要不同的耐药性突变才能够应对。

3.3. PROTAC 治疗中规避耐药性的方法

在肿瘤的靶向药物治疗中，常规的规避耐药性的方法有很多，若粗略概括则可以分为开发低耐药敏感药物、联合用药、开发多靶点药物等[39]。开发新的低耐药敏感药物如 EGFR 抑制剂从第一代的吉非替尼到第三代的奥希替尼，目前也已经在研究第四代药物。然而尽管开发了新的药物，也可规避旧药物产生的耐药性，但新的药物也可能出现新的耐药机制。还是以 EGFR 抑制剂举例，第一代的吉非替尼因 T790M 耐药突变使其在约 50%的患者中失效[40]，而第三代的奥希替尼虽然几乎完全克服了 T790M 耐药突变，但用药过程中产生了 C797S 耐药突变[41]。新的药物要面对新的挑战，并且开发新药物的过程冗长，不能说这是一种高效的方法。联合用药是目前最广泛使用的规避耐药性方式，已被应用于多种抗癌领域[42]。对于肿瘤单一耐药性多种药物联合治疗被认为是有前景的[43]。例如 MET 和 PD-L1 联合阻断可以提高对胰腺癌的治疗效果[44]但是联合用药也会带来新的问题，如药物相互作用(DDI)、不可预测的药代动力学(PK)、不良脱靶效应和患者依从性差等。难以预测这一点极大地限制了联合用药的效果。多靶点药物也是应用非常广泛的规避耐药性方法[45] [46]。应用双靶或者多靶药物能够提高疗效、规避耐药性、克服复杂致病机制、减少副作用等[47]-[49]。总体来看，多靶点药物的作用更容易预测，且该方案能很好地与 PROTAC 结合[50]-[52]。

双靶 PROTAC 有两种主要类型：二价双 PROTAC 与三价双 PROTAC [53]。前者指 PROTAC 的结构

仍是三个部分，后者指 PROTAC 一端有两个靶标蛋白配体的“Y”型结构。双靶 PROTAC 能够显著扩大 PROTAC 的应用范围，为治疗带来实际的益处[53]。Chen [54]等人开发了一种能够同时降解 CDK2 与 CDK9 的二价双 PROTAC。Xiao [55]等人开发了一种能够同时降解 HDAC3 与 HDAC8 的二价双 PROTAC。Zhou [56]等人开发了一种能够同时降解 BCL-2 与 BCL-xL 的二价双 PROTAC。以上几种研究，以及更多同类型的二价双 PROTAC，是通过优化靶标蛋白配体，使其能靶向结合两种或多种靶标蛋白来实现多靶效果的。三价或更多价的 PROTAC 理论上可以达到更好的降解效果[57] [58]，Zheng [51]等人在 2021 年首次提出此概念，使用 EGFR 抑制剂吉非替尼和 PARP 抑制剂奥拉帕尼合成了一种三价双 PROTAC，采用了“Y”型的连接子。三价双 PROTAC 表现出更好的疗效，为制备新型 PROTAC 注入了新的活力。此外，Chen [59]等人采用铜催化叠氮化物－炔烃环加成(CuAAC)将两种 PROTAC 的连接子固定在一起，突破了“Y”型的结构，合成出了降解效果更强的“X”型四价双 PROTAC，并且由于其采用了点击化学的方法，可以模块化地快速产出更多的双 PROTAC。

3.4. 双靶 E3 连接酶配体的意义

尽管多靶 PROTAC 大多表现出更好的药效和降解活性，在规避肿瘤耐药性这一方面并没有表现出明显的效果。因为如上文所介绍，肿瘤对 PROTAC 的耐药性主要是通过 E3 泛素连接酶结构突变产生的，而目前的多靶 PROTAC 并未优化 E3 泛素连接酶配体这一端，仍对 E3 泛素连接酶的稳定性具有较高依赖。

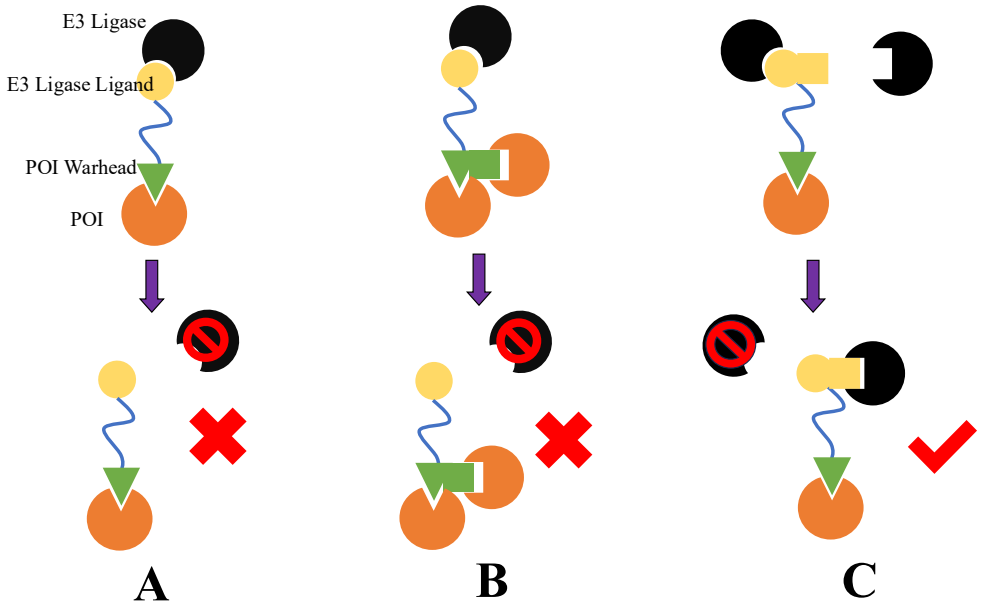

Figure 3. Schematic diagram of the process of tumor drug resistance
图 3. 肿瘤耐药性作用过程示意图

如图 3(A)所示，肿瘤细胞产生耐药性突变后，E3 泛素连接酶无法正常被 PROTAC 分子募集，从而导致 PROTAC 失去作用。而多靶 PROTAC 尽管可能有着常态更高的降解效率，但一旦肿瘤细胞产生耐药性突变，E3 泛素连接酶结构变化，整个 PROTAC 分子依旧无法发挥作用(图 3(B))。这就是目前多靶 PROTAC 将研究重点放在了靶标蛋白配体一端的缺陷。而如果能够设计一种双靶 E3 泛素连接酶配体的 PROTAC，则可以预见能够极大降低对肿瘤耐药突变的敏感性。Zhang [31]等人的研究也表明：对 CRBN

的 PROTACs 产生耐药性的肿瘤细胞对于 VHL 的 PROTACs 仍具备敏感性，反之亦然。这是由于肿瘤的耐药突变对于不同的 E3 泛素连接酶是不同的，哪怕其中一端的 E3 连接酶失活，另一端对应的 E3 连接酶仍能发挥作用(图 3(C))。为了达到理想的结果，我们需要一种能够结合两种 E3 泛素连接酶且不能同时结合两种 E3 泛素连接酶的双靶 E3 泛素连接酶配体。上文提及的二价双 PROTAC 中的靶标蛋白配体是通过广泛的筛选和精细的优化，最后鉴定出能够同时结合两种靶标蛋白的靶标蛋白配体。这样的方案固然有其优点，比如分子量相对小，但是弊端也十分明显——一般情况下只能针对两种结构相近或者结合域相似的靶标蛋白，并且对于大通量筛选的依赖性过强。目前对于这种方案的研究，暂时没有足够简洁的理性设计思路，这使得每一种双靶配体的诞生都难以复制。

相对而言三价双 PROTAC “Y”型结构的设计思路更有操作上的借鉴意义。可惜的是，目前的大部分三价双 PROTAC 正是由于其分子量过大，使得它的细胞透过性与药代动力学性质不尽如人意，这也是目前限制三价双 PROTAC 应用的最大因素[60]。不过我们可以发现，从 Zheng [51]等人设计的第一个“Y”型双 PROTAC，到 Chen [59]等人设计的“X”型双 PROTAC，都是针对连接子来设计的“Y”或“X”，这也直接导致了分子量过大。为了解决这个问题，我们需要采用药效团融合和叠加的方案，将两个配体设计融合成单个分子，或是通过骨架转变的方案直接构建双靶配体[61] [62]。并且幸运的是，随着对 E3 泛素连接酶配体的研究不断推进，目前我们对许多 E3 泛素连接酶配体的结合有效基团有了更多更清晰的认知，也有许多分子量较小的 E3 泛素连接酶配体可供我们选择，这为设计一种结构紧凑、分子量小的双靶 E3 泛素连接酶配体打下了理论基础。

4. 总结与展望

对 PROTAC 的研究不断推进，但对于规避肿瘤细胞的耐药性仍较为空白。目前常用的联合用药策略带来了诸多问题。相较之下，双靶药物则具有巨大前景。但是，目前已有研究的双靶药物并不适用于 PROTAC 的应用，或是减少耐药性的效果不尽如人意。常规 PROTAC 通过与 E3 连接酶形成三元复合物来诱导所选目标蛋白(POI)的泛素化。而肿瘤的耐药性突变针对的正是 E3 连接酶配体这一部分，通过突变失活细胞内的 E3 连接酶，导致 PROTAC 失效，目前的能够降解多个靶标蛋白的双靶 PROTAC 尽管可能具有更好的降解活性，但一旦肿瘤细胞发生耐药性突变，整体的双靶 PROTAC 也会失去作用。因此我们需要设计合成双靶 E3 连接酶配体的 PROTAC。

参考文献

[1] Nandi, D., Tahiliani, P., Kumar, A. and Chandu, D. (2006) The Ubiquitin-Proteasome System. *Journal of Biosciences*, **31**, 137-155. https://doi.org/10.1007/bf02705243

[2] Bond, M.J. and Crews, C.M. (2021) Proteolysis Targeting Chimeras (PROTACs) Come of Age: Entering the Third Decade of Targeted Protein Degradation. *RSC Chemical Biology*, **2**, 725-742. https://doi.org/10.1039/d1cb00011j

[3] Hershko, A., Heller, H., Elias, S. and Ciechanover, A. (1983) Components of Ubiquitin-Protein Ligase System. Resolution, Affinity Purification, and Role in Protein Breakdown. *Journal of Biological Chemistry*, **258**, 8206-8214. https://doi.org/10.1016/s0021-9258(20)82050-x

[4] Wertz, I.E. and Wang, X. (2019) From Discovery to Bedside: Targeting the Ubiquitin System. *Cell Chemical Biology*, **26**, 156-177. https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2018.10.022

[5] Michaelides, I.N. and Collie, G.W. (2023) E3 Ligases Meet Their Match: Fragment-Based Approaches to Discover New E3 Ligands and to Unravel E3 Biology. *Journal of Medicinal Chemistry*, **66**, 3173-3194. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.2c01882

[6] Jiang, H., Xiong, H., Gu, S. and Wang, M. (2023) E3 Ligase Ligand Optimization of Clinical PROTACs. *Frontiers in Chemistry*, **11**, Article ID: 1098331. https://doi.org/10.3389/fchem.2023.1098331

[7] Ito, T., Ando, H., Suzuki, T., Ogura, T., Hotta, K., Imamura, Y., *et al*. (2010) Identification of a Primary Target of Thalidomide Teratogenicity. *Science*, **327**, 1345-1350. https://doi.org/10.1126/science.1177319

[8] Zhu, Y.X., Braggio, E., Shi, C., Bruins, L.A., Schmidt, J.E., Van Wier, S., *et al*. (2011) Cereblon Expression Is Required for the Antimyeloma Activity of Lenalidomide and Pomalidomide. *Blood*, **118**, 4771-4779. https://doi.org/10.1182/blood-2011-05-356063

[9] Takwale, A.D., Jo, S., Jeon, Y.U., Kim, H.S., Shin, C.H., Lee, H.K., *et al*. (2020) Design and Characterization of Cereblon-Mediated Androgen Receptor Proteolysis-Targeting Chimeras. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **208**, Article 112769. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112769

[10] Han, T., Goralski, M., Gaskill, N., Capota, E., Kim, J., Ting, T.C., *et al*. (2017) Anticancer Sulfonamides Target Splicing by Inducing RBM39 Degradation via Recruitment to Dcaf15. *Science*, **356**, eaal3755. https://doi.org/10.1126/science.aal3755

[11] Zhang, X., Crowley, V.M., Wucherpfennig, T.G., Dix, M.M. and Cravatt, B.F. (2019) Electrophilic PROTACs that Degrade Nuclear Proteins by Engaging Dcaf16. *Nature Chemical Biology*, **15**, 737-746. https://doi.org/10.1038/s41589-019-0279-5

[12] Zhang, X., Luukkonen, L.M., Eissler, C.L., Crowley, V.M., Yamashita, Y., Schafroth, M.A., *et al*. (2021) DCAF11 Supports Targeted Protein Degradation by Electrophilic Proteolysis-Targeting Chimeras. *Journal of the American Chemical Society*, **143**, 5141-5149. https://doi.org/10.1021/jacs.1c00990

[13] Buckley, D.L., Gustafson, J.L., Van Molle, I., Roth, A.G., Tae, H.S., Gareiss, P.C., *et al*. (2012) Small-Molecule Inhibitors of the Interaction between the E3 Ligase VHL and HIF1α. *Angewandte Chemie International Edition*, **51**, 11463-11467. https://doi.org/10.1002/anie.201206231

[14] Zoppi, V., Hughes, S.J., Maniaci, C., Testa, A., Gmaschitz, T., Wieshofer, C., *et al*. (2019) Iterative Design and Optimization of Initially Inactive Proteolysis Targeting Chimeras (PROTACs) Identify VZ185 as a Potent, Fast, and Selective Von Hippel-Lindau (VHL) Based Dual Degrader Probe of BRD9 and Brd7. *Journal of Medicinal Chemistry*, **62**, 699-726. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01413

[15] Lucas, X., Van Molle, I. and Ciulli, A. (2018) Surface Probing by Fragment-Based Screening and Computational Methods Identifies Ligandable Pockets on the Von Hippel-Lindau (VHL) E3 Ubiquitin Ligase. *Journal of Medicinal Chemistry*, **61**, 7387-7393. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00842

[16] Burslem, G.M. and Crews, C.M. (2020) Proteolysis-Targeting Chimeras as Therapeutics and Tools for Biological Discovery. *Cell*, **181**, 102-114. https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.11.031

[17] Nowak, R.P., DeAngelo, S.L., Buckley, D., He, Z., Donovan, K.A., An, J., *et al*. (2018) Plasticity in Binding Confers Selectivity in Ligand-Induced Protein Degradation. *Nature Chemical Biology*, **14**, 706-714. https://doi.org/10.1038/s41589-018-0055-y

[18] Bondeson, D.P., Smith, B.E., Burslem, G.M., Buhimschi, A.D., Hines, J., Jaime-Figueroa, S., *et al*. (2018) Lessons in PROTAC Design from Selective Degradation with a Promiscuous Warhead. *Cell Chemical Biology*, **25**, 78-87.e5. https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2017.09.010

[19] Sakamoto, K.M., Kim, K.B., Kumagai, A., Mercurio, F., Crews, C.M. and Deshaies, R.J. (2001) PROTACs: Chimeric Molecules That Target Proteins to the Skp1-Cullin-F Box Complex for Ubiquitination and Degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **98**, 8554-8559. https://doi.org/10.1073/pnas.141230798

[20] Flanagan, J.J. and Neklesa, T.K. (2019) Targeting Nuclear Receptors with PROTAC Degraders. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **493**, Article 110452. https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.110452

[21] Sakamoto, K.M., Kim, K.B., Verma, R., Ransick, A., Stein, B., Crews, C.M., *et al*. (2003) Development of PROTACs to Target Cancer-Promoting Proteins for Ubiquitination and Degradation. *Molecular & Cellular Proteomics*, **2**, 1350-1358. https://doi.org/10.1074/mcp.t300009-mcp200

[22] Vassilev, L.T., Vu, B.T., Graves, B., Carvajal, D., Podlaski, F., Filipovic, Z., *et al*. (2004) *In Vivo* Activation of the P53 Pathway by Small-Molecule Antagonists of Mdm2. *Science*, **303**, 844-848. https://doi.org/10.1126/science.1092472

[23] Lu, J., Qian, Y., Altieri, M., Dong, H., Wang, J., Raina, K., *et al*. (2015) Hijacking the E3 Ubiquitin Ligase Cereblon to Efficiently Target BRD4. *Chemistry & Biology*, **22**, 755-763. https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2015.05.009

[24] He, S., Ma, J., Fang, Y., Liu, Y., Wu, S., Dong, G., *et al*. (2021) Homo-PROTAC Mediated Suicide of MDM2 to Treat Non-Small Cell Lung Cancer. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, **11**, 1617-1628. https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.11.022

[25] Han, X., Wang, C., Qin, C., Xiang, W., Fernandez-Salas, E., Yang, C., *et al*. (2019) Discovery of ARD-69 as a Highly Potent Proteolysis Targeting Chimera (PROTAC) Degrader of Androgen Receptor (AR) for the Treatment of Prostate Cancer. *Journal of Medicinal Chemistry*, **62**, 941-964. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01631

[26] Han, X., Zhao, L., Xiang, W., Qin, C., Miao, B., Xu, T., *et al*. (2019) Discovery of Highly Potent and Efficient PROTAC Degraders of Androgen Receptor (AR) by Employing Weak Binding Affinity VHL E3 Ligase Ligands. *Journal of Medicinal Chemistry*, **62**, 11218-11231. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01393

[27] Burke, M.R., Smith, A.R. and Zheng, G. (2022) Overcoming Cancer Drug Resistance Utilizing PROTAC Technology. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, **10**, Article ID: 872729. https://doi.org/10.3389/fcell.2022.872729

[28] Ward, R.A., Fawell, S., Floc'h, N., Flemington, V., McKerrecher, D. and Smith, P.D. (2021) Challenges and Opportunities in Cancer Drug Resistance. *Chemical Reviews*, **121**, 3297-3351. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00383

[29] Zhang, W., Li, P., Sun, S., Jia, C., Yang, N., Zhuang, X., *et al*. (2022) Discovery of Highly Potent and Selective CRBN-Recruiting EGFRL858R/T790M Degraders *in Vivo*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **238**, Article 114509. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114509

[30] Wolf, G., Craigon, C., Teoh, S.T., Essletzbichler, P., Onstein, S., Cassidy, D., *et al*. (2025) The Efflux Pump ABCC1/MRP1 Constitutively Restricts PROTAC Sensitivity in Cancer Cells. *Cell Chemical Biology*, **32**, 291-306.e6. https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2024.11.009

[31] Zhang, L., Riley-Gillis, B., Vijay, P. and Shen, Y. (2019) Acquired Resistance to Bet-PROTACs (Proteolysis-Targeting Chimeras) Caused by Genomic Alterations in Core Components of E3 Ligase Complexes. *Molecular Cancer Therapeutics*, **18**, 1302-1311. https://doi.org/10.1158/1535-7163.mct-18-1129

[32] Delmore, J.E., Issa, G.C., Lemieux, M.E., Rahl, P.B., Shi, J., Jacobs, H.M., *et al*. (2011) BET Bromodomain Inhibition as a Therapeutic Strategy to Target C-Myc. *Cell*, **146**, 904-917. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.017

[33] Kortüm, K.M., Mai, E.K., Hanafiah, N.H., Shi, C., Zhu, Y., Bruins, L., *et al*. (2016) Targeted Sequencing of Refractory Myeloma Reveals a High Incidence of Mutations in CRBN and Ras Pathway Genes. *Blood*, **128**, 1226-1233. https://doi.org/10.1182/blood-2016-02-698092

[34] Barrio, S., Munawar, U., Zhu, Y.X., Giesen, N., Shi, C., Viá, M.D., *et al*. (2020) IKZF1/3 and CRL4^{crbn} E3 Ubiquitin Ligase Mutations and Resistance to Immunomodulatory Drugs in Multiple Myeloma. *Haematologica*, **105**, e237-e241. https://doi.org/10.3324/haematol.2019.217943

[35] Gooding, S., Ansari-Pour, N., Towfic, F., Ortiz Estévez, M., Chamberlain, P.P., Tsai, K., *et al*. (2021) Multiple Cereblon Genetic Changes Are Associated with Acquired Resistance to Lenalidomide or Pomalidomide in Multiple Myeloma. *Blood*, **137**, 232-237. https://doi.org/10.1182/blood.2020007081

[36] Latif, F., Tory, K., Gnarra, J., Yao, M., Duh, F., Orcutt, M.L., *et al*. (1993) Identification of the Von Hippel-Lindau Disease Tumor Suppressor Gene. *Science*, **260**, 1317-1320. https://doi.org/10.1126/science.8493574

[37] Hanzl, A., Casement, R., Imrichova, H., Hughes, S.J., Barone, E., Testa, A., *et al*. (2023) Functional E3 Ligase Hotspots and Resistance Mechanisms to Small-Molecule Degraders. *Nature Chemical Biology*, **19**, 323-333. https://doi.org/10.1038/s41589-022-01177-2

[38] Mayor-Ruiz, C., Jaeger, M.G., Bauer, S., Brand, M., Sin, C., Hanzl, A., *et al*. (2019) Plasticity of the Cullin-Ring Ligase Repertoire Shapes Sensitivity to Ligand-Induced Protein Degradation. *Molecular Cell*, **75**, 849-858.e8. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.07.013

[39] Aldea, M., Andre, F., Marabelle, A., Dogan, S., Barlesi, F. and Soria, J. (2021) Overcoming Resistance to Tumor-Targeted and Immune-Targeted Therapies. *Cancer Discovery*, **11**, 874-899. https://doi.org/10.1158/2159-8290.cd-20-1638

[40] Kobayashi, S., Boggon, T.J., Dayaram, T., Jänne, P.A., Kocher, O., Meyerson, M., *et al*. (2005) *EGFR* Mutation and Resistance of Non-Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib. *New England Journal of Medicine*, **352**, 786-792. https://doi.org/10.1056/nejmoa044238

[41] Nagpure, N.R. and Patel, H.M. (2025) Overcoming Triple Mutant EGFR-Tyrosine Kinase Barriers in the Therapeutics of Non-Small Cell Lung Cancer: A Patent Review on Fourth-Generation Inhibitors (2017-2024). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, **35**, 963-982. https://doi.org/10.1080/13543776.2025.2536006

[42] Huang, X., Zhang, G., Tang, T., Gao, X. and Liang, T. (2022) One Shoot, Three Birds: Targeting NEK2 Orchestrates Chemoradiotherapy, Targeted Therapy, and Immunotherapy in Cancer Treatment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, **1877**, Article 188696. https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2022.188696

[43] Huang, Q., Li, Y., Huang, Y., Wu, J., Bao, W., Xue, C., *et al*. (2025) Advances in Molecular Pathology and Therapy of Non-Small Cell Lung Cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, **10**, Article No. 186. https://doi.org/10.1038/s41392-025-02243-6

[44] Li, E., Huang, X., Zhang, G. and Liang, T. (2021) Combinational Blockade of MET and PD-L1 Improves Pancreatic Cancer Immunotherapeutic Efficacy. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, **40**, Article No. 279. https://doi.org/10.1186/s13046-021-02055-w

[45] Wang, X., Lu, Y., Chen, S., Zhu, Z., Fu, Y., Zhang, J., *et al*. (2024) Discovery of a Prominent Dual-Target DDR1/EGFR Inhibitor Aimed DDR1/EGFR-Positive NSCLC. *Bioorganic Chemistry*, **149**, Article 107500. https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2024.107500

[46] He, J. and Tam, K.Y. (2024) Dual-Target Inhibitors of Cholinesterase and Gsk-3β to Modulate Alzheimer's Disease. *Drug Discovery Today*, **29**, Article 103914. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2024.103914

[47] Ramsay, R.R., Popovic-Nikolic, M.R., Nikolic, K., Uliassi, E. and Bolognesi, M.L. (2018) A Perspective on Multi-Target Drug Discovery and Design for Complex Diseases. *Clinical and Translational Medicine*, **7**, e3. https://doi.org/10.1186/s40169-017-0181-2

[48] Santos, R., Ursu, O., Gaulton, A., Bento, A.P., Donadi, R.S., Bologa, C.G., *et al*. (2016) A Comprehensive Map of Molecular Drug Targets. *Nature Reviews Drug Discovery*, **16**, 19-34. https://doi.org/10.1038/nrd.2016.230

[49] Zięba, A., Stępnicki, P., Matosiuk, D. and Kaczor, A.A. (2022) What Are the Challenges with Multi-Targeted Drug Design for Complex Diseases? *Expert Opinion on Drug Discovery*, **17**, 673-683. https://doi.org/10.1080/17460441.2022.2072827

[50] Xin, L., Wang, C., Cheng, Y., Wang, H., Guo, X., Deng, X., *et al*. (2024) Discovery of Novel Erα and Aromatase Dual-Targeting PROTAC Degraders to Overcome Endocrine-Resistant Breast Cancer. *Journal of Medicinal Chemistry*, **67**, 8913-8931. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.4c00196

[51] Zheng, M., Huo, J., Gu, X., Wang, Y., Wu, C., Zhang, Q., *et al*. (2021) Rational Design and Synthesis of Novel Dual PROTACs for Simultaneous Degradation of EGFR and PARP. *Journal of Medicinal Chemistry*, **64**, 7839-7852. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c00649

[52] Teng, M., Jiang, J., He, Z., Kwiatkowski, N.P., Donovan, K.A., Mills, C.E., *et al*. (2020) Development of CDK2 and CDK5 Dual Degrader Tmx-2172. *Angewandte Chemie International Edition*, **59**, 13865-13870. https://doi.org/10.1002/anie.202004087

[53] Liu, J., Liu, Y., Tang, J., Gong, Q., Yan, G., Fan, H., *et al*. (2024) Recent Advances in Dual PROTACs Degrader Strategies for Disease Treatment. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **279**, Article 116901. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2024.116901

[54] Zhou, F., Chen, L., Cao, C., Yu, J., Luo, X., Zhou, P., *et al*. (2020) Development of Selective Mono or Dual PROTAC Degrader Probe of CDK Isoforms. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **187**, Article 111952. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111952

[55] Xiao, Y., Hale, S., Awasthee, N., Meng, C., Zhang, X., Liu, Y., *et al*. (2023) HDAC3 and HDAC8 PROTAC Dual Degrader Reveals Roles of Histone Acetylation in Gene Regulation. *Cell Chemical Biology*, **30**, 1421-1435.e12. https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2023.07.010

[56] Lv, D., Pal, P., Liu, X., Jia, Y., Thummuri, D., Zhang, P., *et al*. (2021) Development of a BCL-XL and BCL-2 Dual Degrader with Improved Anti-Leukemic Activity. *Nature Communications*, **12**, Article No. 6896. https://doi.org/10.1038/s41467-021-27210-x

[57] Huang, Y., Yokoe, H., Kaiho-Soma, A., Takahashi, K., Hirasawa, Y., Morita, H., *et al*. (2022) Design, Synthesis, and Evaluation of Trivalent PROTACs Having a Functionalization Site with Controlled Orientation. *Bioconjugate Chemistry*, **33**, 142-151. https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.1c00490

[58] Imaide, S., Riching, K.M., Makukhin, N., Vetma, V., Whitworth, C., Hughes, S.J., *et al*. (2021) Trivalent PROTACs Enhance Protein Degradation via Combined Avidity and Cooperativity. *Nature Chemical Biology*, **17**, 1157-1167. https://doi.org/10.1038/s41589-021-00878-4

[59] Chen, Y., Xia, Z., Suwal, U., Rappu, P., Heino, J., De Wever, O., *et al*. (2024) Dual-Ligand PROTACS Mediate Superior Target Protein Degradation *in Vitro* and Therapeutic Efficacy *in Vivo*. *Chemical Science*, **15**, 17691-17701. https://doi.org/10.1039/d4sc03555k

[60] Li, J., Chen, X., Lu, A. and Liang, C. (2023) Targeted Protein Degradation in Cancers: Orthodox PROTACs and Beyond. *The Innovation*, **4**, Article 100413. https://doi.org/10.1016/j.xinn.2023.100413

[61] Wang, S., Li, Y., Huang, S., Wu, S., Gao, L., Sun, Q., *et al*. (2021) Discovery of Potent and Novel Dual PARP/BRD4 Inhibitors for Efficient Treatment of Pancreatic Cancer. *Journal of Medicinal Chemistry*, **64**, 17413-17435. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c01535

[62] Zhang, J., Yang, C., Tang, P., Chen, J., Zhang, D., Li, Y., *et al*. (2022) Discovery of 4-Hydroxyquinazoline Derivatives as Small Molecular BET/PARP1 Inhibitors That Induce Defective Homologous Recombination and Lead to Synthetic Lethality for Triple-Negative Breast Cancer Therapy. *Journal of Medicinal Chemistry*, **65**, 6803-6825. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.2c00135