



蛋白质的拟素化通路在肺癌中的激活和化学靶向干预

秦向硕^{1,2†}, 俞卿^{3†}, 李旭凡^{2,4†}, 熊秀芳^{1,2}, 刘鹏渊^{2,4}, 韩欣^{1,2}, 孙毅^{1,2*}

1. 浙江大学医学院附属第二医院肿瘤研究所, 杭州 310009

2. 浙江大学医学院转化医学研究院, 杭州 310029

3. 浙江省肿瘤医院甲状腺外科, 浙江省头颈肿瘤转化医学研究重点实验室, 杭州 310022

4. 浙江大学医学院附属邵逸夫医院呼吸科, 杭州 310018

†同等贡献

*通讯作者, E-mail: yisun@zju.edu.cn

收稿日期: 2025-01-25; 接受日期: 2025-03-11; 网络版发表日期: 2025-03-21

国家重点基础研究发展规划(编号: 2009CB724100)和国家自然科学基金(编号: 11221062, 11452002)资助项目

摘要 蛋白质拟素化(neddylation)是一种重要的翻译后修饰, 通过将NEDD8拟素蛋白共价结合到底物的赖氨酸残基上, 从而调节底物的生化活性. 此过程是由拟素化激酶(E1)、拟素化耦联酶(E2)和拟素化连接酶(E3)催化的. Cullin家族蛋白是Cullin-RING E3泛素连接酶(CRLs)的核心组分, 是拟素化修饰最重要的生理性底物. Cullin被拟素化修饰后, 激活CRLs, 促进各种关键信号蛋白的泛素化修饰和蛋白酶体降解, 从而调节许多关键的生物学功能. 近年来的研究表明, 拟素化通路在肺癌中高度活化, 促进癌细胞的增殖、生存和肺癌的发生发展, 并与患者的不良预后呈正相关. 因此, 靶向拟素化通路已成为开发新型抗肺癌药物研发有前景的策略. 本综述首先介绍蛋白质拟素化修饰的生化特性, 作为肺癌促进因子的生物信息学分析和细胞学功能验证, 然后系统总结了研发拟素化通路小分子抑制剂的方法, 至今报道的三大类靶向拟素化通路的小分子抑制剂, 以及今后的研究方向. 对该研究领域进行了最新的、全面的介绍, 以吸引更多的科研工作者投入抗肺癌拟素化小分子抑制剂的研发.

关键词 拟素化修饰, CRL E3连接酶, 肺癌, 免疫微环境, 靶向治疗, 小分子抑制剂

1 引言

蛋白拟素化(neddylation)修饰^[1]是将NEDD8 (neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 8, 即拟素)共价结合到底物蛋白上的一类蛋白翻译后修饰^[2]. NEDD8属于泛素(ubiquitylation-like, UBL)蛋白家族, 它与泛素的序列一致性达60%, 最初

是以含有81个氨基酸的前体形式合成^[3], 再经UCHL3^[4]、SENP8 (也叫DENP1/DEN1)^[5]等蛋白酶的水解作用, 被切割加工成成熟蛋白, 使其C末端Gly 76被暴露出来^[3]. 随后, NEDD8在拟素激活酶E1 (NEDD8-activating enzyme E1, NAE)的催化作用下, 以ATP依赖的方式活化, 形成NEDD8-NAE复合物. 拟素耦联酶E2 (NEDD8-conjugating enzyme E2)再与

引用格式: Qin X, Yu Q, Li X, Xiong X, Liu P, Han X, Sun Y. Highly activated neddylation pathway in lung cancer and chemical targeted intervention. *Sci Sin Chim*, 2025, 55: 914–936, doi: 10.1360/SSC-2025-0015

NEDD8-NAE复合物结合, 催化转硫酯反应, 将NEDD8分子转移到E2上. 最终, 拟素连接酶E3催化NEDD8分子的Gly76与靶蛋白的赖氨酸残基形成异肽键, 完成NEDD8分子与底物的共价连接^[6,7] (图1). 因此, 蛋白拟素化修饰与泛素化修饰类似, 也是由E1、E2和E3三类关键酶催化的三步级联反应, 且拟素化修饰也具有可逆性, 底物上的NEDD8分子可被CSN (COP9 signalosome complex)^[8]、SENp8^[9,10]等去拟素化酶(denedylase)催化去除. 尽管NEDD8与泛素相似、同源性高, 拟素化E3大多数兼有泛素化E3的特征, 但是催化拟素化修饰的E1、E2与泛素化均不同, 去拟素化酶也与去泛素化酶(deubiquitinase, DUB)不同, 这些差异性确保了拟素化修饰的精准性. 此外, 与泛素化修饰多形成泛素长链促进底物蛋白降解不同, 拟素化修饰表现出自身的独特性. 尽管有研究表明, NEDD8可在其自身的K6、K11、K22、K27、K33、K48、K54、K60等位点上形成多聚拟素化链^[11-13], 但拟素化修饰通常以单拟素化为主, 即仅将一个NEDD8分子共价结合到底物上, 以此调控蛋白的活性、功能, 亚细胞定位及稳定性等, 而不直接导致底物蛋白的降解^[14].

在哺乳动物细胞中, 催化拟素化反应的关键酶包括一个E1 (NAE)、两个E2 (UBE2M和UBE2F)和二十余个E3. 其中, NAE是一个由调节亚基NAE1 (也叫APPBP1)和催化亚基UBA3 (也叫NAE β)组成的异源二聚体^[15,16]. 与泛素化通路拥有大量的E3不同, 拟素连接酶E3的数目相对有限, 包括RBX1 (也叫ROC1)、RBX2 (也叫ROC2、SAG或RNF7)、DCN1-5、

MDM2、c-CBL、RNF111、SMURF1、TRIM40、IAPs等^[2]. 这些E3均为兼具拟素化与泛素化修饰的双功能, 可将NEDD8或泛素从E2转移至底物蛋白上. 根据E3与NEDD8或泛素是否形成硫酯键(thioester)中间体, 可以将拟素或泛素连接酶E3分为两类: 形成硫酯键中间体的E3连接酶和不形成硫酯键中间体的E3连接酶. 形成硫酯键中间体的E3连接酶主要包括HECT家族, 它们通过其C末端的HECT (homologous to E6-AP C-terminus)结构域与泛素或NEDD8形成硫酯键中间体, 随后将NEDD8或泛素分子转移到底物蛋白上, 如Smurf1^[17]等. 不形成硫酯键中间体的E3连接酶主要包括RING (really interesting new gene)或U-box家族, 它们通过RING或U-box结构域与E2结合, 直接将E2上的NEDD8或泛素分子转移到底物蛋白上, 而不形成硫酯键中间体, 如RBX1^[18,19]、RBX2^[20]、DCN1^[21,22]、XIAP^[23]、MDM2^[24]等, 其中研究得最清楚的是RBX家族蛋白(包括RBX1和RBX2/SAG). 作为双功能E3酶, RBX家族是CRL (Cullin RING ligase)泛素连接酶(最大的E3泛素连接酶家族)中负责催化活性的RING蛋白, 而RBX家族的拟素化底物正是CRL泛素连接酶复合物中的骨架蛋白Cullin家族^[25].

Cullin家族共有8位成员, 分别是cullin-1、2、3、4A、4B、5、7、9, 它们分别组装了CRL1、CRL2、CRL3、CRL4A、CRL4B、CRL5、CRL7和CRL9泛素连接酶复合物. Cullin家族蛋白的拟素化修饰主要受到两条拟素化通路的调控, 其中RBX1与E2耦联酶UBE2M (也叫UBC12)共同催化cullins 1-4的拟素化修

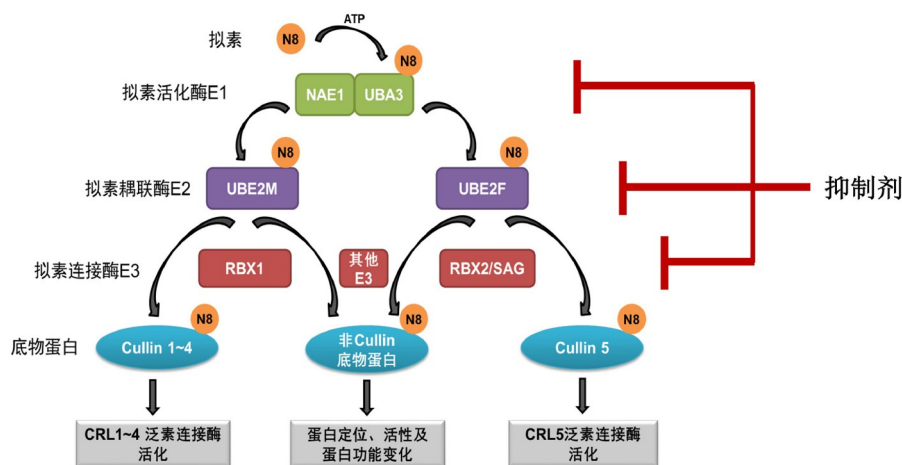


图1 (网络版彩图)蛋白拟素化修饰过程概况

Figure 1 (Color online) The process of protein neddylation modification.

饰; 而RBX2/SAG则是与E2耦联酶UBE2F共同作用, 实现cullin-5的拟素化^[20] (图1)。Cullin蛋白发生拟素化修饰后会导致构象改变, 进而解除CAND1 (Cullin-associated and neddylation-dissociated 1)的抑制性结合, 激活CRLs^[26,27], 从而调控下游约20%的细胞蛋白发生多聚泛素化和蛋白酶体降解, 实现对多种细胞过程的调节和细胞稳态的维持^[28]。越来越多非cullin蛋白也被报道能发生拟素化修饰^[2,29], 如p53^[24]、EGFR^[30]、cGAS^[31]、PTEN^[23]、PDK1^[32]、RHEB^[33]、SHP2^[34]、组蛋白H4^[35]、H2A^[35]、核糖体蛋白RPL11^[36]、RPS27/S27L^[37]等, 进而影响这些底物蛋白参与调控的生物学过程。负责非cullin底物的拟素连接酶与拟素耦联酶的相互作用机制还不明确, 且由于鉴定新拟素化底物时, 常因发生拟素化修饰的蛋白含量低而需使用过表达系统, 拟素化反应本身又比较复杂、存在瞬时性等问题, 使得一些非cullin底物是否为生理底物仍存在争议。本文将用生物信息方法解析拟素化通路在肺癌组织中的变化, 综述它在肺癌细胞生长和肺癌发生发展过程中的促进作用, 探讨研发靶向拟素化/CRL小分子抑制剂的筛选方法, 并进一步分类介绍靶向拟素化通路的抗肿瘤小分子抑制剂的研究进展, 为肺癌的新型靶向药物研发和个体化精准治疗提供参考。

2 拟素化修饰通路在肺癌中的高度活化, 改变免疫微环境, 促进肺癌的发生发展

肺癌是全球范围内导致癌症死亡的第一大杀手^[38]。根据国家癌症中心的统计分析, 我国肺癌的发生率和死亡率居所有癌症类型之首^[39]。肺癌最常见的类型是非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC), 占肺癌病例的近80%, 包括肺腺癌、肺鳞癌等。尽管近年来肺癌治疗手段有了很大的改善, 但NSCLC的总体五年生存率仍仅有26.5%^[40]。前期的多项研究表明, 拟素化通路的异常活化在肺癌发生、发展、转移和耐药过程中都发挥重要的促进作用^[41], 拟素化通路的关键组分NEDD8、NAE1、UBA3^[42]、UBE2M^[42,43]、UBE2F^[44]、RBX2/SAG^[45]、RBX1^[46]等在肺癌组织中高表达, 其中NEDD8、NAE1、UBE2M、UBE2F和RBX2/SAG的高表达与肺癌患者的不良预后呈显著正相关。我们近期有篇综述对此有详细的描述^[47]。因此, 靶向拟素化通路, 特别是靶向在

肺癌中发挥促癌作用的关键酶已成为有前景的靶向抗肿瘤药物研发的新策略^[48]。

然而, 这些前期的研究主要集中在拟素化通路中若干关键酶在肺癌中的表达, 而缺乏对整个cullin拟素化和去拟素化通路活性进行的全面评估。基于TCGA肺腺癌样本的RNA-seq数据^[49], 我们分析了cullin拟素化通路中12个拟素化修饰关键基因、10个去拟素化关键基因以及8个底物cullin。结果显示, 肺肿瘤组织中的cullin拟素化和去拟素化通路整体呈现激活状态(图2a)。这体现在cullin拟素化和去拟素化修饰基因表达一致性升高, 并且cullin本身的基因表达水平也同步上调(图2b)。

2.1 生物信息学分析显示cullin拟素化和去拟素化通路在肺癌中动态激活

进一步利用基因集变异分析(gene set variation analysis, GSVA)方法^[50], 对每个样本中的cullin拟素化和去拟素化通路活性进行评分, 发现拟素化和去拟素化通路活性呈显著正相关(图2c), 这表明去拟素化相关基因的高表达并不代表拟素化通路活性被抑制, 而是表明cullin拟素化修饰在肺癌中更加动态化, 在拟素化活性增高的情况下, 去拟素化活性也相应地增高。这一结果进一步强调了cullin拟素化修饰的动态平衡在肺癌发生发展中的重要性。

此外, 无论是拟素化基因还是去拟素化基因, 其高表达大多与肺癌患者的不良预后显著正相(图2d)。从肺癌cullin拟素化通路总体活性的趋势分析也表明, 总体活性越高, 患者的肿瘤分期越晚(图3a), 且生存期越短(图3b), 该结果进一步支持了拟素化修饰的动态调控在肺癌进展中的重要作用。因此, 除了聚集于某一特定酶或蛋白以外, 靶向cullin拟素化修饰的动态调控机制可能为肺癌个性化治疗提供新的策略, 有望显著改善肺癌患者的预后。

2.2 拟素化修饰驱动肺癌的细胞周期调控与代谢重塑

肿瘤细胞具有无限增殖和快速生长的特征, 而这主要源于其持续的增殖信号传导及加速的细胞周期进程。多项研究表明, 拟素化通路参与调节细胞周期进程、细胞存活和细胞代谢等生理活动^[29,51]。在肺癌细胞系中, 沉默NEDD8或UBE2M, 可阻断cullin-RING泛

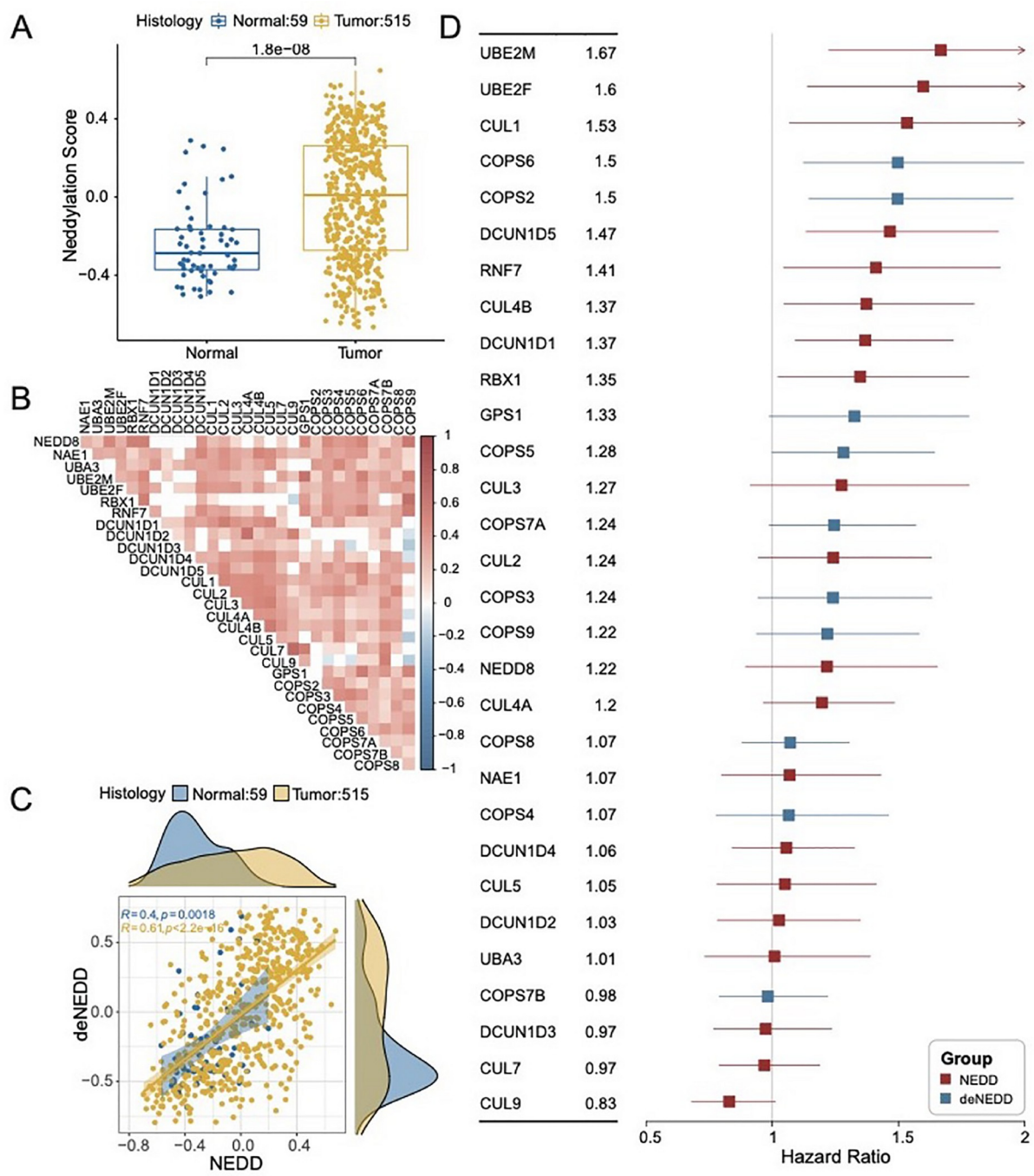


图 2 (网络版彩图) 肺腺癌中拟素化通路异常激活. (A) 肺腺癌组织中的拟素化水平明显高于癌旁组织. (B) 肺腺癌组织中拟素化基因间的表达相关热图, 促拟素化基因、去拟素化基因和cullin底物基因间表达模式高度一致, 基本上呈现正相关. (C) 肺腺癌组织中促拟素化活性与去拟素化活性呈现正相关. (D) 促拟素化和去拟素化相关基因与肺腺癌患者临床预后的关系, 大多数基因高表达患者预后较差

Figure 2 (Color online) Abnormal activation of neddylation pathway in lung adenocarcinoma. (A) The level of neddylation is significantly higher in lung adenocarcinoma tissues compared to adjacent normal tissues. (B) Heatmap of expression correlations among neddylation-related genes in lung adenocarcinoma, showing a highly consistent expression pattern among neddylation genes, deneddylation genes, and cullin substrate genes, with a predominantly positive correlation. (C) A positive correlation is observed between neddylation and deneddylation activities in lung adenocarcinoma tissues. (D) Relationship between the expression of neddylation-related genes and clinical prognosis in lung adenocarcinoma patients. Higher expression of most genes is associated with poorer patient outcomes.

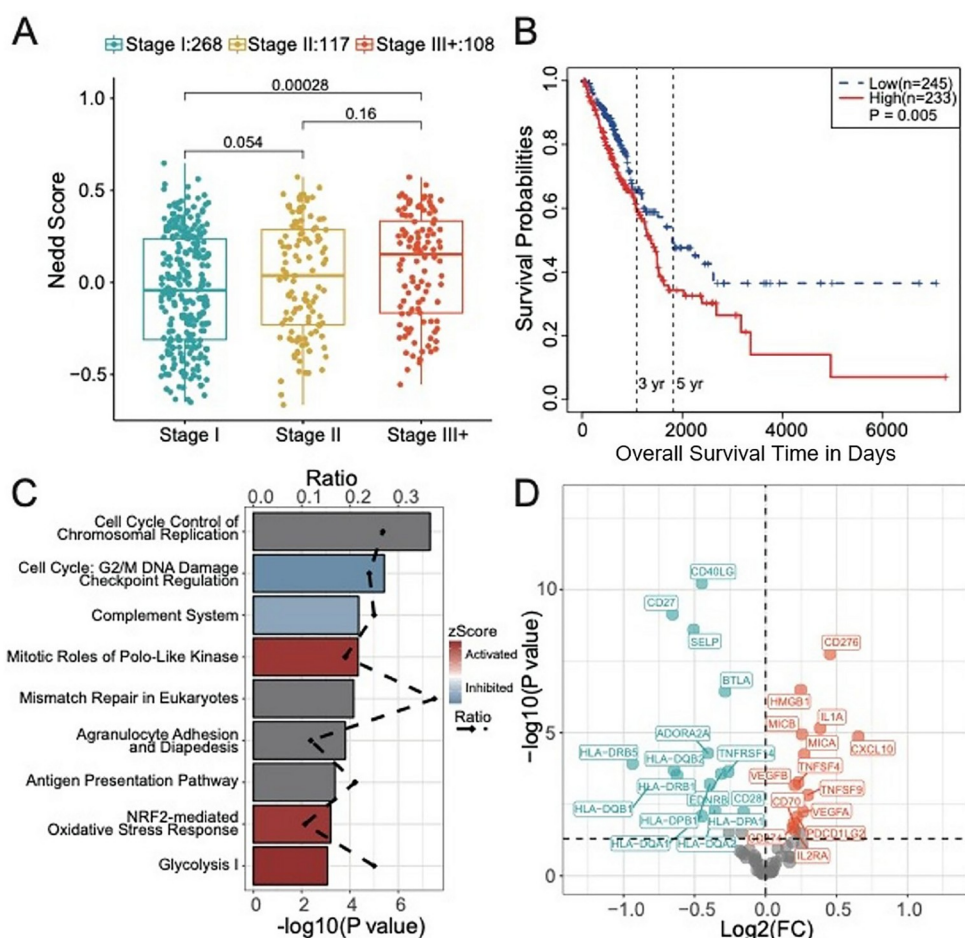


图 3 (网络版彩图) TCGA资料分析揭示肺癌进展与拟素化活性相关. (A) 不同肺腺癌分期的拟素化总体活性存在显著差异, 分期越晚, 拟素化通路活性越高. (B) 拟素化总体活性与患者预后的关系, 按拟素化活性中位数对样本进行分组, 高拟素化水平患者预后较差. (C) 不同拟素化水平样本间差异表达基因的通路富集, 柱状图的长度表示该通路富集的显著性(即 p 值), 柱状图的颜色表示该通路在高拟素化水平样本中的活化情况, 红色表示通路激活, 蓝色表示通路被抑制, 折线图表示该通路中差异表达基因的占比. (D) 免疫相关基因在不同拟素化水平样本间的表达差异火山图, 高拟素化活性的样本中的炎症相关基因倾向于被抑制

Figure 3 (Color online) TCGA data analysis reveals the association of lung cancer progression and neddylation activation. (A) Neddylation pathway activity significantly differs across lung adenocarcinoma stages, with higher activity observed in later stages. (B) Relationship between overall neddylation activity and patient prognosis. Samples were stratified based on the median neddylation activity, showing that patients with higher neddylation activity have poorer prognosis. (C) Pathway enrichment analysis of differentially expressed genes (DEGs) between samples with high and low neddylation activity. Bar length represents the significance of pathway enrichment (p -value), while bar color indicates pathway activation status in high-neddylation samples (red: activated, blue: suppressed). The line chart represents the proportion of DEGs within each pathway. (D) Volcano plot illustrating the differential expression of immune-related genes between high- and low-neddylation samples. Inflammation-related genes tend to be suppressed in samples with high neddylation activity.

素连接酶对周期抑制蛋白(p21/p27/Wee1)的降解, 诱导细胞周期阻滞, 显著抑制肿瘤进展^[43,52]. 在细胞水平基于siRNA的基因敲降实验表明, 敲降UBE2F, 可抑制cullin-5的拟素化, 灭活CRL5, 导致NOXA累积, 诱导肺癌细胞凋亡^[44]. 同样地, 在肺癌细胞中敲降SAG或RBX1, 明显地抑制癌细胞的增殖和存活^[45,53], 说明拟素化通路的E2和E3都是肺癌细胞生长所必须. 在

KrasG12D诱导的小鼠肺癌模型中, 敲除SAG或RBX1, 可以通过积累多种肿瘤抑制因子进而阻断KrasG12D下游致癌通路, 明显抑制肺癌的发生发展, 延长小鼠的寿命^[45,46].

通过对肺肿瘤组织样本拟素化通路活性系统评分后, 我们对不同拟素化活性组别样本的差异表达分析(图3c), 发现差异表达基因主要富集于细胞周期调

控、DNA错配修复、NRF2介导的氧化应激反应和糖酵解等关键通路. 其中细胞周期调控最为显著, 这与文献中细胞水平结果一致, 表明拟素化通过调控细胞周期, 促进肺癌的发生发展. 其次, 细胞周期中的G₂/M DNA损伤检查点调控通路也显示出较高水平的显著性, 提示肺癌细胞可能通过增强DNA损伤修复以适应肿瘤微环境中的遗传不稳定. 同时, NRF2介导的氧化应激反应通路也显示较高的激活水平, NRF2作为氧化应激反应的关键转录因子, 在肿瘤细胞的耐药性和生存中扮演重要角色, 提示肺癌细胞可通过增强氧化应激反应, 抵御抗癌治疗带来的压力, 从而提升其生存能力和耐药性.

另外, 糖酵解通路的富集进一步表明拟素化修饰可能参与肺癌细胞的代谢重塑, 促进能量供给以支持快速增殖的需求. 这些结果共同表明拟素化修饰在肺癌的发生和进展中扮演着重要角色, 不仅影响细胞周期调控和DNA修复, 还可能通过代谢调节和耐药机制影响肺癌细胞的适应性和恶性进展.

2.3 拟素化通路重塑肺癌的免疫微环境

肿瘤微环境由肿瘤细胞、免疫细胞、癌症相关成纤维细胞(CAFs)和内皮细胞等多种细胞组成. 免疫细胞作为微环境中的重要组成部分, 对肿瘤的进展起着多方面的作用. 多项研究表明, 拟素化通路在调控肿瘤微环境中也发挥了重要作用. 比如, 肺癌中激活的拟素化通路可通过NF- κ B-CCL2轴, 促进肿瘤相关巨噬细胞的浸润, 影响肿瘤微环境的形成^[54]. 我们前期通过使用LysM-Cre/Sagfl/fl小鼠, 特异性删除了巨噬细胞和中性粒细胞中的Sag基因, 发现Sag缺失在巨噬细胞中抑制了LPS诱导的I κ B α 降解, 进而抑制了NF- κ B的激活, 并减少了促炎细胞因子IL-6和TNF- α 的水平. 然而在中性粒细胞中, Sag缺失增加了LPS诱导的促炎细胞因子的释放增强, 增加小鼠死亡率, 说明SAG差异性调节免疫细胞的功能^[55]. 除巨噬细胞外, Mathewson等^[56]还发现, 在树突状细胞中敲低SAG抑制了促炎细胞因子TNF- α 的释放, 而在T细胞中敲除Sag显著减少了T细胞在刺激下的激活和增殖. 机制研究表明, SAG基因的敲除通过抑制NF- κ B的入核, 抑制了树突状细胞和巨噬细胞的功能^[57], 而在T细胞中, Sag基因的敲除则通过抑制细胞因子信号的释放, 抑制了T细胞的功能^[58]. 最近, 我们的一项研究发现, 在调节性T细胞

(Treg)中, 分别敲除两个拟素化E2酶(Ube2M和Ube2F)和两个E3连接酶(Rbx1和Sag)基因时, Ube2f或Sag基因的敲除对Treg细胞的功能没有显著影响, 而敲除Rbx1或Ube2m则破坏了Treg的稳态和功能, 导致炎症性自身免疫性疾病和早期致死. Rbx1的底物Bim(一个促凋亡蛋白)在Rbx1缺失的Treg细胞中积累, 同时敲除Bim可以部分缓解Rbx1敲除所引发的炎症表型^[59].

在药理学方法方面, MLN4924作为一种拟素化E1的特异性抑制剂^[60], 显著改变肺癌细胞中的免疫/炎症相关信号通路. MLN4924通过抑制CRL1活性, 导致I κ B α 的积累, 进一步抑制NF- κ B的转录活性, 抑制CCL2的转录激活, 减少了MDSC和TAM在肺肿瘤部位的浸润, 从而抑制了肿瘤转移^[54,61]. MLN4924也抑制LPS诱导的IL-6和TNF- α 的上调, 减少促炎细胞因子的释放. 这些作用表明, 靶向拟素化通路在肺癌的免疫治疗上有潜在应用价值^[55,57,62].

为了进一步探讨拟素化通路与肿瘤免疫微环境的关联, 我们分析了TCGA数据集中肺腺癌样本的总体拟素化水平与炎症的关系, 结果显示免疫相关通路出现了显著富集, 如补体系统和抗原呈递系统等(图3c). 补体系统是免疫反应的重要组成部分, 负责清除受损或感染的细胞. 其抑制可能有助于肿瘤逃逸宿主免疫监视, 成为肿瘤免疫逃逸机制的一部分^[63]. 而抗原呈递是肿瘤免疫监视的核心环节, 癌细胞通过这一通路呈递抗原, 激活宿主的免疫系统. 然而, 肺癌细胞通过这一机制常常调节免疫逃逸, 抑制T细胞的活化, 从而减弱免疫反应^[64,65]. 另外, 在高拟素化表达的肺癌组织中, 大多数免疫调节基因的表达下调, 如HLA家族的抗原呈递相关基因; 而高表达的基因通常与炎症反应相关, 如CD276、HMGB1和IL1A等(图3d). 这些研究清楚地表明, 拟素化通路不仅调节免疫细胞的功能, 还通过调控肿瘤微环境中的免疫细胞, 如MDSC (髓源抑制性细胞)和TAM (肿瘤相关巨噬细胞), 在肺癌的进展及免疫逃逸过程中发挥重要作用.

3 靶向拟素化/CRL的药物筛选和研发技术

2009年, *Nature*报道了第一个靶向拟素化修饰通路的抗肿瘤小分子化合物MLN4924 (商品名Pevonedistat)^[60]. MLN4924可与NEDD8共价形成稳定的加合物, 并特异性结合到NAE的酶活中心, 有效阻断细胞中

Cullin家族蛋白的拟素化修饰, 诱导多种底物累积, 并在多种肿瘤细胞系中表现出明显的抑制增殖作用^[66]. 截至2025年1月23日, MLN4924在美国ClinicalTrials.gov网站上注册的临床I~III期试验已达41项(检索词“MLN4924”). 2020年, MLN4924 (Pevonedistat)通过美国食品药品监督管理局(FDA)突破性疗法认证, 加速推进其治疗高风险多发性骨髓瘤(HR-MDS)方面的临床研究^[67]. MLN4924的出现, 证实了靶向拟素化修饰是可行且有效的抗肿瘤策略. 随后, 世界各地的研究者们开始用不同的方法寻找更多更好的靶向拟素化修饰的小分子化合物^[2]. 以下基于目前已发表的文献和本团队前期在靶向拟素化药物筛选方面的探索经验, 阐述适用于早期发现靶向拟素化/CRL小分子化合物的方法(图4).

3.1 高通量筛选

在小分子化合物的研发领域和工业制药领域, 高通量筛选(high throughput screening, HTS)仍然是被广为采用的主要的早期药物筛选方法^[68]. 曾有学者统计, 可能有超过50%的上市药物的苗头化合物都是通过高通量筛选得到的^[69]. 传统的高通量筛选需要在微孔板

中建立可适配高通量的筛选模型, 包括基于分子-蛋白互作实验、生物化学反应或基于活细胞表型的筛选模型. 常见的分子-蛋白互作实验包括等温滴定量热法(isothermal titration calorimetry, ITC)^[70]、核磁共振波谱法(nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR)^[71]、表面等离子体共振(surface plasmon resonance, SPR)^[72]、差示扫描荧光法(differential scanning fluorimetry, DSF)^[73,74]、微量热泳动(microscale thermophoresis, MST)^[75]、细胞热转移实验(cellular thermal shift assay, CETSA)^[76,77]等. 常见的基于生物化学反应的筛选技术包括荧光偏振(fluorescence polarization, FP)^[78]、荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)和时间分辨的荧光共振能量转移(time-resolved fluorescence energy transfer, TR-FRET)^[79]和AlphaScreen (amplified luminescent proximity homogeneous assay)^[80,81]等. 常见的细胞表型筛选方法包括细胞活力检测、报告基因检测、第二信使检测和高通量显微实验(高内涵检测)等^[68].

理论上说, 上述常见且成熟的实验技术都可以用于筛选靶向拟素化过程中任意关键酶的小分子化合物. 但事实上, 基于结构生物学的研究提示拟素化修饰

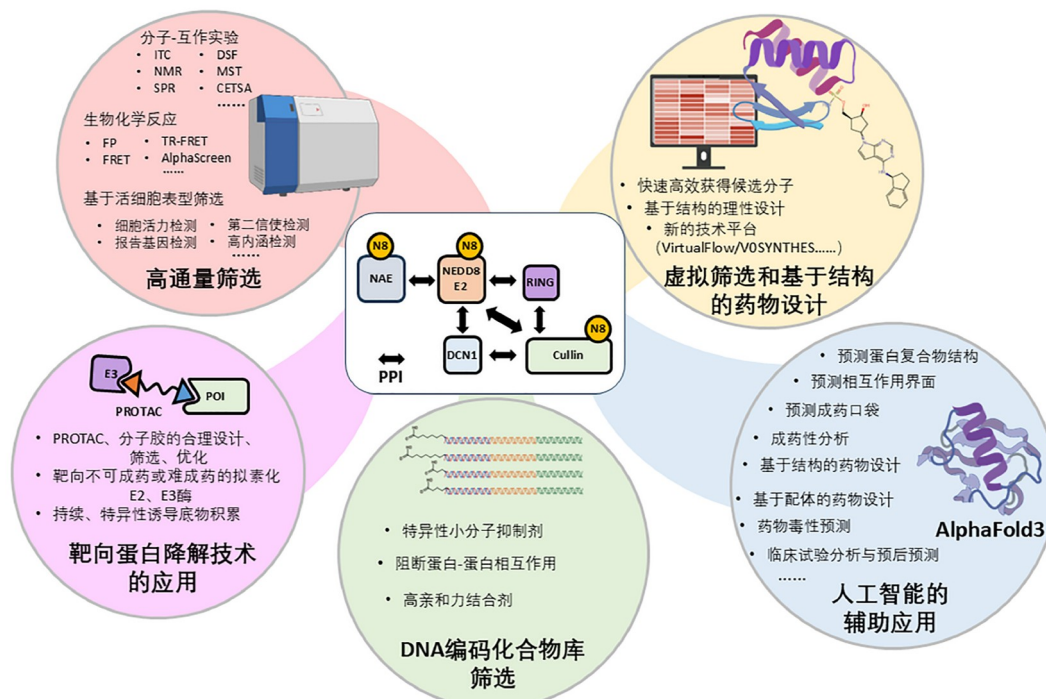


图4 (网络版彩图)靶向拟素化修饰的药物筛选方法

Figure 4 (Color online) Screening methods for the discovery of neddylation inhibitors.

过程中存在大量蛋白-蛋白相互作用和瞬时的构象变化^[2,82], 且拟素化酶不像酪氨酸激酶那样存在经典的成药口袋^[83], 因此针对某一酶建立单一的蛋白-小分子互作模型, 往往很难筛选到高效阻断拟素化修饰的特异性小分子化合物. 幸运的是, 人们可以通过利用重组蛋白在体外建立由E1、E2、E3酶序贯催化的级联催化反应, 从而建立基于动态生化反应的高通量筛选模型.

以MLN4924的发现为例, 从已发表的实验方法来看, 该团队通过原核表达NAE、GST-Ubc12和Flag-NEDD8, 建立体外NAE的拟素化修饰反应, 再通过TR-FRET技术, 建立基于上述反应的高通量筛选模型, 实现可在384孔板中完成反应并获得足够稳定的信号窗口^[60,66]. 来自西奈山医学院的Pan团队^[84,85]通过构建突变并结合荧光分子的泛素蛋白, 使得改造后的泛素分子在E1、E2和CRL1 E3参与的体外生化反应中只能形成二聚体(Di-Ub)而非多聚泛素长链, 再结合FRET技术, 建立了基于体外泛素化反应的动态高通量筛选模型, 用于筛选靶向泛素化的小分子抑制剂, 并找到了一系列靶向CRL4的小分子抑制剂. 本课题组通过建立体外CUL5拟素化反应, 并利用AlphaScreen技术, 建立了体外CUL5~NEDD8的报告系统, 并通过进一步优化, 使其适配高通量筛选的要求, Z' 值可达0.87, CV小于5%, 窗口可达70倍. 基于这个平台, 本课题组^[86,87]先后实施了超过200000个化合物规模的高通量筛选, 获得了一系列E2、E3的小分子抑制剂. 相关研发还在推进当中.

但是, 传统高通量筛选也存在一些缺点和局限性. 首先, 高通量筛选模型的建立具有较高的技术门槛. 不仅需要获得高纯度、良好酶学活性的重组蛋白, 更需要大量的前期实验, 来获得稳定、易操作、可重复、可适配高通量的酶学反应, 并获得较高的信号窗口和 Z' 值. 其次, 如上述的案例中所示的体外反应, 往往存在多个蛋白、多个环节, 因此所得到的阳性化合物可能针对不同的靶蛋白、蛋白与蛋白相互作用、中间产物或者其他环节. 因此, 需要设计严谨、缜密的分类和验证实验, 才能高效地排除假阳性化合物、并获得相应靶点的阳性化合物, 否则, 将浪费大量时间、人力和物力. 最后, 高通量筛选的费用往往较高, 不仅需要购买足够多的化合物库、孔板, 重复实验、分类和验证实验也将大大增加成本(图4a).

3.2 计算机辅助的虚拟筛选

近年来结构生物学技术的飞速发展, 包括冷冻电镜的应用, 极大地推进了蛋白质结构解析工作的进展. 目前, 已经有大量拟素化修饰相关蛋白的高分辨率结构被解析出来^[2]. 通过对成药口袋的预测, 结合虚拟筛选技术, 可以高效地筛选潜在的小分子抑制剂.

本课题组^[86,88]与合作团队基于UBA3和UBE2F的复合物结构(PDB ID:3FN1), 预测了3个潜在的成药口袋, 并基于上述口袋设计了虚拟筛选, 并找到了2种不同的可以阻断UBA3-UBE2F相互作用的小分子抑制剂. HA-1141可结合并抑制拟素化E1催化亚基UBA3^[88]. 而HA-9104则通过结合UBE2F, 特异性阻断CUL5的拟素化修饰, 从而诱导底物NOXA的积累^[86]. 2019年, Ohkubo团队^[89]通过NAE的结构预测的成药口袋进行虚拟筛选, 获得了高效已知NAE的化合物TAS4464, 其 IC_{50} 可低至0.96 nM. 随着虚拟筛选的应用不断普及, 相关技术也在快速发展. 例如, 最近发表的V-SYNTHES是一种新的虚拟筛选策略, 可用于超大型虚拟化合物库筛选, 高效发现新型配体, 为药物研发提供有力工具^[90]. VirtualFlow是另一种新的开源药物发现平台, 可进行超大规模虚拟筛选. Arthanari团队^[91]通过该平台筛选约13亿个化合物, 找到了一系列能阻断KEAP1与NRF2相互作用的化合物, 并通过分子-蛋白互作实验完成了初步验证. 此外, Forli等^[92]详细总结了经典的对接软件AutoDock套件在蛋白质-配体对接和虚拟药物筛选中的应用, 为相关研究提供了全面指导. 相信借助这些新的工具和平台, 虚拟筛选将会进一步推进拟素化药物的研发进程(图4b).

3.3 基于结构的药物设计

由于拟素化修饰过程中存在大量蛋白-蛋白相互作用, 基于已知的复合物晶体结构, 在蛋白-蛋白相互作用界面中寻找潜在的成药口袋, 并合理设计小分子化合物, 可能得到非常特异性阻断蛋白-蛋白相互作用的小分子抑制剂. 2017年, Schulman和Guy团队^[93]发表了靶向DCN1和UBE2M相互作用界面的小分子抑制剂. 他们首先通过对DCN1和UBE2M复合物的结构进行分析, 发现UBE2M的乙酰化N端与DCN1之间的一个相互作用区域, 并通过TR-FRET高通量筛选, 获得了约300个可不同程度阻断DCN1-UBE2M相互作用的

化合物, 并找到了DCN1上的5个不同的结合口袋. 随后通过基于结构的进一步分析及构效关系研究, 最终找到了可高度选择性结合DCN1、阻断DCN1-UBE2M相互作用的候选化合物NACM-HIT及NACM-OPT^[94]. 上述发现很好地展现了基于结构的药物设计(structure-based drug design, SBDD)在靶向蛋白-蛋白相互作用(PPI)的药物研发方面的强大作用. 同样在2017年, Wang团队^[95]也发现了一类不同结构的靶向DCN1-UBE2M的小分子抑制剂, 并且是完全通过基于结构开展的药物设计. 该团队基于UBE2M的N端序列, 从一个12个氨基酸残基组成的肽段开始, 经过逐步设计和优化, 最终获得一个小分子化合物DI-591, 可以精确地结合到DCN1的一个亚口袋中, 高效阻断UBE2M与DCN1的结合, 其 K_i 可达12.4 nmol/L. 上述研究成为了SBDD助力拟素化药物研发的典型案例(图4b).

3.4 靶向蛋白降解技术的应用

近年来, 靶向蛋白降解技术日益兴起, 在许多“不可成药”靶点的药物研发中展现出独特优势. 目前主流的靶向蛋白降解技术包括蛋白水解靶向嵌合体(proteolysis-targeting chimera, PROTAC)和分子胶(molecular glue), 二者均通过劫持细胞内源性的泛素-蛋白酶体系统, 诱导特定靶蛋白的泛素化修饰和降解, 从而实现疾病相关通路的精准调控^[96]. 在拟素化调控领域, 由于拟素化E3连接酶具有底物特异性和功能多样性, 利用PROTAC技术开发其特异性降解剂成为突破传统酶活性抑制策略的重要方向.

以SMURF1 (Smad ubiquitination regulatory factor 1)为例, 该蛋白作为HECT型E3连接酶, 不仅具有泛素化功能, 还被发现可通过拟素化修饰调控PDK1-AKT信号通路, 在KRAS突变型结直肠癌中发挥关键作用^[97]. 研究表明, SMURF1在结直肠癌组织中显著高表达, 且与患者不良预后呈正相关, 其通过催化PDK1的K163位点多拟素化修饰, 促进SETDB1的招募及AKT的膜定位与活化, 从而驱动肿瘤发生^[32]. 由于SMURF1的催化口袋较浅且缺乏高亲和力配体, 传统小分子抑制剂开发面临挑战. Zhang团队^[32]通过PROTAC技术成功开发了SMURF1降解剂SMART1 (SMURF1-antagonizing repressor of tumor 1), 其设计策略包含三个关键要素: (1) 选用可结合SMURF1 HECT结构域的Smurf1-L作为靶向配体; (2) 通过柔性连接子

偶联CRBN配体泊马度胺; (3) 利用HiBiT高通量筛选平台优化分子构效关系. 表面等离子体共振(SPR)实验显示, SMART1对SMURF1 HECT结构域的亲和力($K_D=500$ nM)显著高于同源蛋白SMURF2, 表现出良好的选择性^[32]. 在体外实验中, SMART1在KRAS突变型结直肠癌细胞系中展现出优异的降解效率($DC_{50}=5.14$ nM, $D_{max}=83.17\%$), 且对SMURF1家族其他成员无显著影响^[32]. 通过抑制SMURF1介导的PDK1拟素化, SMART1可有效阻断AKT T308位点的磷酸化($IC_{50}=28.04$ nM), 并显著降低肿瘤细胞的葡萄糖摄取和乳酸生成等代谢活性, 并可在动物模型中有效抑制结肠癌异种移植瘤生长, 且未观察到明显毒性^[32].

上述SMURF1 PROTAC的成功研发展现了PROTAC在药物合理设计和成药性方面的优势, 且PROTAC的“可逆敲除”特性, 可避免传统抑制剂面临的耐药性问题. 而SMART1作为首个拟素化E3连接酶降解剂, 也验证了靶向蛋白降解技术在拟素化调控领域的可行性. 随着相关技术的进一步发展, 包括可用于PROTAC的E3配体库的快速扩展、口服利用度的提高及分子胶类药物的进一步发展, 有望在靶向拟素化药物研发方面发挥巨大作用(图4c).

3.5 其他(DEL筛选和人工智能的潜在应用)

DNA编码化合物库(DNA-encoded library, DEL)筛选是一种强大的小分子发现方法, 在药物研发领域具有重要意义. DEL技术最早于20世纪90年代被提出^[98], 通过在文库合成、选择方法、数据处理和配体发现等方面的进步而逐渐成熟. 其基本原理是将每个文库成员共价连接一个可识别的DNA条形码, 从而能够将整个文库混合在一起, 通过与目标蛋白结合, 利用DNA条形码的扩增和测序来鉴定与目标蛋白结合的配体^[98]. 这种基于DNA编码的方式使得DEL筛选相较于传统的高通量筛选具有显著优势, 如筛选效率高、可同时针对多个目标和文库进行筛选、所需资源少以及文库规模大等^[98,99].

尽管目前未见有关DEL筛选在拟素化/CRL小分子抑制剂的实例, 但DEL筛选在寻找抑制其他靶蛋白或蛋白-蛋白相互作用的小分子化合物方面已表现出强大的能力. 以凝血酶抑制剂为例, 利用基于精氨酸的蛋白酶聚焦DEL, 通过与固定化、生物素化的凝血酶进行筛选, 成功发现了强效的凝血酶蛋白酶活性抑制

剂^[100]。在细胞因子相关研究中, 针对IL-2结合剂的筛选, 构建了特定的DEL并与固定化的L19-IL-2融合蛋白进行选择, 最终获得了对IL-2具有强结合能力且对非靶血浆伴侣蛋白结合较弱的抑制剂, 为开发更有效的IL-2调节剂提供了有潜力的起点^[101]。对于耐药酶靶点, 如 β -内酰胺酶OXA-48, 通过大规模的DEL筛选, 成功鉴定出非机制性的抑制剂, 且该抑制剂对其他相关酶也表现出一定的抑制活性, 为抗生素的研发提供了新的思路^[102]。在蛋白-蛋白相互作用(PPI)靶点方面, DEL有大量成功应用的案例。如对于cyclophilin D (CypD)这一关键的线粒体通透性转换孔调节剂, 利用DEL筛选出了新型的活性位点抑制剂, 并通过结构优化获得了具有亚型选择性的抑制剂, 为深入研究CypD的功能和相关疾病的治疗提供了工具^[103]。针对TEAD4-YAP这一PPI靶点, 通过合成聚焦的DEL并进行筛选, 发现了能够抑制该相互作用并降低下游基因转录的抑制剂, 为相关疾病的治疗提供了潜在的药物靶点^[104]。

除了寻找小分子抑制剂, DEL筛选还有其他潜在应用。在多功能分子的开发方面, 由于DEL成员本身的双功能结构特点, 可用于发现具有新型降解活性的双功能分子, 如在靶向蛋白降解领域, 可用于寻找能够招募效应蛋白的配体, 为PROTAC系统的发展提供支持^[98]。在分子胶的发现中, DEL技术可利用其大规模文库和灵活的筛选条件, 发现能够促进两个目标蛋白相互作用并产生独特下游表型的分子胶, 为药物研发提供新的作用机制^[98,105] (图4d)。

人工智能在药物发现领域近年来取得了显著进展, 合理应用人工智能也可能在拟素化/CRL抑制剂的研发方面提供帮助^[106,107]。2024年5月, DeepMind公司和Isomorphic Labs研究团队发布了蛋白质结构预测工具AlphaFold的最新一代AlphaFold3^[108]。作为一款应用了人工智能技术的工具, AlphaFold在2018年推出时, 就在蛋白质预测竞赛(CASP)中排名第一, 并成功预测了当时被评为最难目标的蛋白质结构, 被认为是蛋白质结构预测领域的里程碑式突破, 而最新的AlphaFold3更是在预测范围和精度等方面有了全面的提升和拓展^[108]。以AlphaFold为代表的蛋白质结构预测工具可以帮助快速筛选潜在药物靶点, 揭示靶点蛋白的活性位点和结合口袋, 加速药物设计, 提高识别命中先导化合物的概率, 加快药物靶点验证速度, 优化药

物结构设计^[109]。2024年诺贝尔化学奖授予了美国生物化学家David Baker和DeepMind的Demis Hassabis与John M. Jumper, 以表彰他们在构建全新蛋白质结构和开发预测蛋白质结构的人工智能模型AlphaFold方面的贡献^[110]。除了辅助预测目标蛋白的3D结构, 许多人工智能工具还可以在预测蛋白质-蛋白质相互作用、药物活性及进行从头药物设计方面提供帮助^[111,112], 或通过深度学习神经网络(如人工神经网络、卷积神经网络、循环神经网络等), 利用大量数据和复杂算法对药物分子的各种性质进行分析和预测^[113]。此外, 人工智能还有助于在基于配体的药物设计(ligand-based drug design, LBDD)中, 利用定量结构-活性关系(QSAR)和药效团模型等算法处理大量配体数据, 建立结构与活性之间的数学模型, 筛选出具有相似活性的化合物^[107]。在药物研发的其他环节, 人工智能也有诸多应用。在药物再利用方面, 机器学习算法可学习现有药物相关生物数据中的模式, 并将其与特定疾病相关联, 从而发现现有药物的新用途。例如, 通过分析药物表达谱和使用机器学习方法, 挖掘可用于治疗其他疾病的药物^[114]。在药物毒性预测方面, 深度学习算法可预测化学物质的毒性, 帮助筛选低毒性的药物候选物, 减少药物研发后期因毒性问题导致的失败风险^[115,116]。在临床试验阶段, 人工智能在提高数据的分析效率、提高预后的预测能力等方面也展现了应用前景^[117,118]。2024年, 人工智能技术驱动的生物医药公司英矽智能(Insilico)发表了第一个由人工智能方法研发并进入临床I期试验的小分子抑制剂INS018_055^[79]。英矽智能通过组织纤维化相关的组学和临床数据集, 训练其靶点发现平台PandaOmics, 获得潜在靶点列表, 再通过自然语言处理模型确定TNIK为抗纤维化的潜在靶点, 并通过生成化学引擎Chemistry42, 结合基于结构的药物设计方法, 逐步得到了候选分子INS018_055, 并进一步推进到临床试验阶段。有理由相信, 随着人工智能技术的快速发展, 很快也会在拟素化/CRL小分子药物的研发领域看到人工智能的应用成果(图4e)。

4 蛋白质拟素化通路抑制剂的研究进展

4.1 拟素化抑制剂的分类

多年的研究表明, 拟素化通路催化酶的小分子抑

制或基因敲除能有效抑制癌细胞的生长和存活, 并提高癌细胞对放化疗的敏感性. 因此, 拟素化通路被认为是抗癌药物研发的新靶点; 拟素化通路抑制剂在过去10年中迅速发展. 在此, 我们总结了目前报道的所有拟素化通路抑制剂, 并将其分为以下3类: E1 (NAE) 抑制剂, 包括共价和非共价抑制剂^[15]; E2抑制剂, 包括UBE2M-DCN1和UBE2F抑制剂; 以及E3抑制剂, 包括RBX1/RBX2/SAG抑制剂和Smurf1降解剂(图5). 表1罗列了各种抑制剂的分子结构.

4.2 E1-NAE抑制剂

NAE (NEDD8活化酶)是由APPBP1 (淀粉样β前体蛋白结合蛋白1)和UBA3 (泛素活化酶3)组成的异二聚体^[15]. 在拟素化通路激活过程中, NEDD8-MgATP首先连接到UBA3的腺苷酰化位点, 消耗一分子ATP的能量并转化为AMP, 随后NEDD8的碳终端连接到APPBP1的催化半胱氨酸位点上, 形成NAE-NEDD8复合物, 并释放AMP^[119]. 接下来, 另一个NEDD8分子连接到UBA3的腺苷酰化位点上, 形成由两个NEDD8和一个NAE组成的三级复合物^[120]. NEDD8-NAE复合物的形成需要三个关键位点: 连接NEDD8-MgATP的UBA3活性腺苷酰化位点^[121]、催化转硫酯反应的APPBP1的半胱氨酸位点^[122], 以及连接E2的UBA3上的C端泛素结构域(UFD)位点^[123]. NAE催化过程中蛋白质之间的多重相互作用为小分子抑制剂的开发提供了多种策略: 首先, 可以使用ATP竞争性抑制剂来干扰ATP与UBA3的结合^[124]; 其次, 可以利用AMP类似物形成NEDD8-类似物复合体, 模仿NEDD8-AMP复合物, 以阻止酶内部反应^[66]; 再者, 靶向APPBP1上的催化半胱氨酸位点

可以阻断硫酯键的形成^[125]; 最后, 可以通过抑制E1与E2之间的作用来阻碍NEDD8向E2的转移^[126]. 目前, 大多数NAE抑制剂采用的是第一种策略.

4.2.1 氨基磺酸腺苷类似物

2009年, 通过高通量筛选(HTS)和系统构效关系(SAR)研究, Soucy课题组^[60]报道了一种新型强效的NAE抑制剂, 命名为MLN4924 (也称为Pevonidistat, 表1, 1). 作为首个特异性NAE抑制剂, MLN4924在NAE催化下与NEDD8形成共价的NEDD8-MLN4924加合物, 类似于NEDD8-AMP, 但不能进一步参与后续的酶内反应, 从而以4 nmol/L的半数抑制浓度(IC₅₀)有效阻断E2与NEDD8的结合. MLN4924能够完全抑制拟素化通路, 导致多种肿瘤细胞系中抑癌蛋白的积累^[127], 进而引起肿瘤细胞的生长停滞、凋亡、衰老和自噬^[128]. 此外, MLN4924在体外细胞实验和体内异种移植肿瘤模型中均能提高肿瘤细胞对放化疗的敏感性, 并且抑制了血管生成和炎症的发生^[129]. 目前, MLN4924正处于单独或与化疗联合使用的临床试验中, 应用于黑色素瘤、淋巴瘤、急性髓性白血病(AML)、骨髓增生异常(MDS)及多发性实体瘤的治疗^[130]. 此外, MLN4924还会在患者的外周血和皮肤组织中触发CRL蛋白的积聚. 儿科临床前测试计划(PPTP)也评估了MLN4924在体外和体内肿瘤模型(如胶质母细胞瘤、横纹肌肉瘤和神经母细胞瘤等)中的作用, 结果表明该药物可显著提高生存率且无复发趋势^[131]. 这些研究揭示了MLN4924在儿童癌症治疗中的可行性, 为其在该领域的应用奠定了基础.

尽管MLN4924在临床前实验中展现了良好的抗

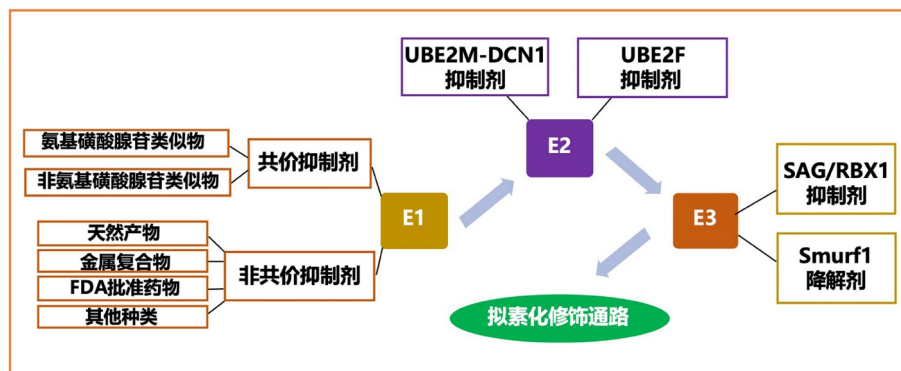
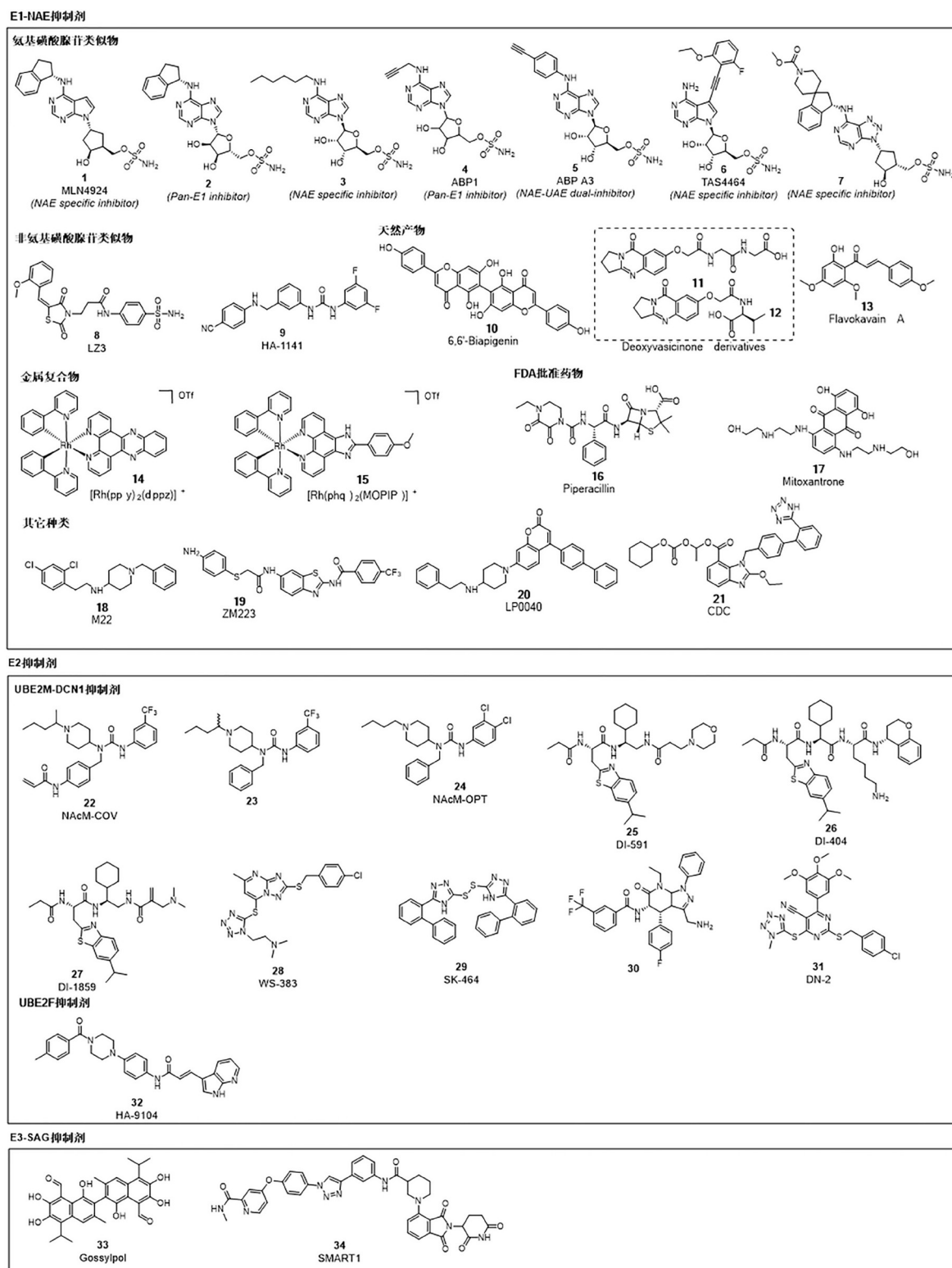


图5 (网络版彩图)拟素化抑制剂的分类

Figure 5 (Color online) Classification of neddylation inhibitors.

表 1 现有拟素化抑制剂的化学结构

Table 1 Structure of neddylation inhibitors



癌活性, 但靶向NAE的抑制剂仍存在不少问题。首先, 靶向E1可能导致整个拟素化通路受到抑制, 进而引起不可避免的细胞毒性。其次, NAE抑制剂对所有Cullin家族成员的非选择性抑制可能导致抑癌底物与致癌底物的同时积累, 从而降低其抗癌活性。再者, 最近发现MLN4924存在一些脱靶效应^[132]。瑕不掩瑜, MLN4924对NAE的高效抑制激发了针对NAE的小分子抑制剂的探索。后续大多数新化合物都是基于MLN4924的结构进行改造而得, 或是根据NAE-NEDD8-MLN4924的晶体结构进行虚拟筛选得到。化合物2和3是MLN4924的第一系列类似物(表1, 2和3), 由Dick研究组^[133]于2011年报道。作为MLN4924的类似物, 化合物2阻断了UBA3依赖的ATP-PPi交换活性, 导致UAE硫酸酯无法形成, 并抑制了E1-E2的转硫酸酯反应。化合物2是一个泛E1抑制剂, 并不具备特异性。MTT实验表明, 化合物2具有中等细胞毒性, IC_{50} 为10 mmol/L。

ABP1 (表1, 4)是另一个MLN4924的类似物, 由Statsyuk研究组^[134]于2013年报道。ABP1通过与UBL形成共价结合来发挥抑制作用, 细胞实验表明, ABP1能够减少蛋白质的拟素化、SUMO和泛素化修饰。该化合物可以通过点击化学法与荧光素或生物素标记, 因此可以作为活性探针用于检测NAE的活性, 以及进行体外拟素化测定。两年后, 该团队^[135]针对ABP1的结构进行了化学优化, 成功获得了Ub E1和NEDD8 E1的双重抑制剂ABP A3 (表1, 5)。ABP A3可以阻断泛素化修饰与拟素化修饰, 但在A549细胞中对SUMO 1-3、Ufm1、ISG15或LC3修饰没有影响。

2019年, Ohkubo团队^[89]通过高通量筛选和结构虚拟筛选(SBVS)获得了化合物TAS4464 (表1, 6)。体外平行UBE2M-NEDD8转硫酸酯实验结果显示, TAS4464对拟素化展现出良好的抑制作用, IC_{50} 为0.995 nmol/L, 效力是MLN4924的10倍。进一步实验验证, TAS4464在有效浓度下能够阻断拟素化修饰, 导致底物的积累。作为高效的NAE抑制剂, TAS4464在多种异种移植小鼠模型中展现出强大的抗肿瘤活性和多种治疗窗口^[89]。然而, 由于肝毒性, TAS4464在实体瘤(如多发性骨髓瘤或淋巴瘤)的I期临床试验中被迫终止^[136]。

2021年, Zhang团队^[137]对MLN4924的中心去氮嘌呤骨架进行了改造, 并优化了其溶剂作用区域, 最终得到了化合物7 (表1)。引入嘧啶三唑结构后, 化合物7在

生化和细胞测定中显示出强烈的抑制活性, 其 IC_{50} 值分别为0.55和36.2 nmol/L。相比MLN4924, 化合物7在血浆中的浓度更高, 具有更好的药物代谢动力学特性。在异种移植模型中, 化合物7也展现出较好的体内抗肿瘤疗效和安全性。

在目前公开的NAE抑制剂中, MLN4924依然最为出色且处于领先地位。这与其以氨基磺酸腺苷的作用机制密切相关: MLN4924与AMP结构相似, 能够与NEDD8形成稳定的复合物, 作用于NAE的活性位点上, 进而抑制NEDD8向E2的转移, 阻断拟素化进程。2011年披露的NAE-NEDD8-MLN4924复合物的晶体结构表明, MLN4924与NEDD8的结合并不会影响催化半胱氨酸结构域或UFD结构域的取向, 说明MLN4924更像是一种ATP竞争抑制剂^[138]。不同分子的抑制活性及化合物UBL复合物的比较表明, 复合物的形成率及其与E1的结合亲和力是影响其效力的两个关键因素^[133]。另一项研究发现, 嘌呤的C6位置可能是决定选择性的关键区域^[138], 这为进一步设计NAE抑制剂提供了新的策略。

4.2.2 非氨基磺酸腺苷类似物

2014年, Zhang课题组^[139]将共价对接与虚拟筛选相结合, 报道了一种具有NAE靶向活性的共价抑制化合物LZ3 (表1, 8)。在LZ3中, 磺酰氨基结构得到保留, 并与NEDD8的Gly76相连。细胞分析表明, LZ3具有与MLN4924相似的活性模式。SAR研究证实, 苯胺基团是影响Asp100腺苷酸化位点结合亲和力的关键因素。MTT法检测发现, LZ3对癌细胞生长具有抑制作用, 其 IC_{50} 值在12~29 μ mol/L之间。MCF7细胞洗脱实验表明, 化合物LZ3是NAE的共价抑制剂。

2021年, 通过计算机辅助虚拟筛选和结构优化, 本课题组^[88]报道了一种新的NAE抑制剂, 命名为HA-1141 (表1, 9)。HA-1141能够选择性结合NAE并抑制Cullin蛋白的拟素化。此外, HA-1141还可诱发内质网(ER)应激和PKR介导的末端整合应激反应(ISR), 早期激活ATF4, 而在后期抑制蛋白质合成及mTORC1活性, 最终诱导自噬。HA-1141对癌细胞以及裸鼠异种移植肺癌模型的生长和存活表现出强有效的抑制活性。作为一类同时具有拟素化通路抑制和ER应激诱导双重活性的分子, HA-1141为开发具有独特机制的抗癌药物开辟了新的途径。

4.2.3 天然产物

2011年, Ma课题组^[140]报道了首个靶向NAE的天然产物——6,6'-biapigenin (表1, 10). 在微摩尔浓度下, 化合物6,6'-biapigenin在蛋白和细胞水平的测试中均显示出一定的NAE抑制活性. 与MLN4924的共价结合不同, 化合物6,6'-biapigenin通过与APPBP1和NEDD8形成氢键来抑制拟素化进程. 通过结构虚拟筛选, 2012年, Leung研究组^[141]开发了一系列全新结构的NAE抑制剂, 具体如化合物11和12^[142]所示(表1). 2015年, Zi课题组^[143]发现卡瓦胡椒(Kava)与癌症发病率的降低之间存在关联, 后续研究发现Kava提取物Flavokawain A (FKA, 表1, 13)能够诱导膀胱癌和前列腺癌细胞的凋亡. 机制研究表明, FKA占据了NAE中的ATP结合口袋, 阻断了NEDD8与UBE2M和CUL-1的结合, 从而引发SKP2的泛素化和降解, 最终导致抑癌蛋白p27的积累, 触发癌细胞的凋亡.

4.2.4 金属复合物

通过基于结构的药物设计, Ma和Liang团队分别在2012年和2017年鉴定出两种铑(III)配合物: $[\text{Rh}(\text{ppy})_2(\text{dppz})]^+$ (表1, 14)^[144]和 $[\text{Rh}(\text{phq})_2(\text{MOPIP})]^+$ (表1, 15)^[145]. 其中 $[\text{Rh}(\text{ppy})_2(\text{dppz})]^+$ 对UBE2M-NEDD8的抑制作用呈现出剂量依赖性, 并诱导Caco-2细胞中p27的积累, 而 $[\text{Rh}(\text{phq})_2(\text{MOPIP})]^+$ 在体内显示出一些抗炎活性.

4.2.5 FDA认证的药物

2014年, Leung研究组^[146]通过综合虚拟筛选发现, 半合成 β -内酰胺类抗生素Piperacilin (表1, 16)可作为ATP竞争性抑制剂调节p27的降解. 通过对FDA认证的药物数据库进行虚拟筛选, 发现另一种药物Mitoxantrone^[147]是一种ATP竞争性NAE抑制剂(表1, 17), 可诱导p53的积累, 从而触发结直肠癌细胞的凋亡.

4.2.6 其他种类抑制剂

2016年, Ouyang研究组^[148]通过结构高通量虚拟筛选和计算对接发现了一种可逆的NAE抑制剂——M22 (表1, 18). M22能够诱导A549细胞凋亡, 并在斑马鱼模型的AGS胃癌异种移植瘤中展现了对肿瘤生长的抑制作用, 同时表现出较低的急性毒性. 通过靶点虚拟

筛选和随后的结构优化, 2017年, 基于新型骨架苯并噻唑的ZM223被确认为NAE抑制剂(表1, 19), 其 EC_{50} 值范围为0.1~1.22 $\mu\text{mol/L}$, 进一步扩展了NAE抑制剂的结构多样性.

以M22为基础, 并通过合理的药物化学设计, 一种双重抑制剂LP0040于2018年被报道(表1, 20)^[149]. LP0040既能抑制泛素化又能抑制拟素化, 在与蛋白酶体抑制剂硼替佐米联合使用的情况下, 化合物LP0040对AGS胃癌细胞的生长显示出协同抑制作用. 通过对“旧药库”的筛选, Li课题组^[150]在2020年发表了化合物CDC (表1, 21). 作为ATP竞争性抑制剂, CDC能够抑制UBE2M-NEDD8的形成. 化合物CDC对肿瘤细胞生长和存活的抑制活性在微摩尔范围内, 优于M22和米托蒽醌, 但不如MLN4924.

4.3 E2抑制剂

4.3.1 UBE2M-DCN1抑制剂

在哺乳动物细胞中, 有两个E2拟素化耦联酶: UBE2M (也叫UBC12)^[151]和UBE2F^[20]. 它们通过催化转硫酯反应将NEDD8从NAE转移至自身的半胱氨酸活性位点上. DCN1 (在酿酒酵母中称为defective cullin neddylation-1)则可以与CRLs和UBE2M的氮端结合, 充当支架, 诱导NEDD8转移到Cullin蛋白的赖氨酸上, 从而促进拟素化过程^[152]. DCN家族的5个成员(DCNL1–5)特异性介导不同Cullin蛋白的拟素化. 研究表明, DCNL1在多种癌症中过表达, 包括肺癌、前列腺癌、头颈癌及宫颈癌等, 这使其成为一个潜在的抗癌靶点^[22]. 在DCNL蛋白家族中, 碳端的类泛素化片段PONY用于连接Cullin蛋白, 而DCNL1–5的氮端结构则相对特殊, 先前的研究表明, DCNL1是一种支架型拟素化E3连接酶配体, 后续的晶体结构解析发现, 氮端的肽与E2上的乙酰化蛋氨酸残基一起, 完全插入DCNL1或DCNL3的疏水腔中. 此时设计合成的E2氮端短肽可以作为E2的竞争性抑制剂, 阻断E2与DCNL2/3之间的相互作用, 从而导致Cullin1和Cullin3的拟素化修饰水平降低^[153]. 该研究为DCNL1依赖的拟素化抑制剂的开发提供了新的策略.

2017年, 经过高通量筛选和结构优化, Guy课题组^[93]报道了首个UBE2M-DCN1抑制剂, 并命名为NAcM-COV (表1, 22). DCN1连接口袋上的半胱氨酸需要与UBE2M氮端酰化的甲硫氨酸结合才能发挥作

用, 这对于两者之间的相互作用至关重要. NAcM-COV会以共价方式占据半胱氨酸-丙烯酰胺基团, 从而抑制拟素化进程. NAcM-COV是一个不可逆的DCN1抑制剂, 其 IC_{50} 值为28 nmol/L. 在NAcM-COV的结构优化过程中, 一些化合物也显示出良好的拟素化通路抑制效果, 但NAcM-COV是首个被报道的. 2018年, Guy课题组^[154]揭示了完整的药物优化过程, 高通量筛选出的首个化合物为NAcM-HIT, 可以插入氮端的乙酰蛋氨酸口袋中, 以干扰DCN1依赖的拟素化进程, 其 IC_{50} 值为4~7 mmol/L. 在此基础上, 后续的化学结构优化逐渐展开, 最终的化合物在生化活性上提升了100倍, 并在溶解性和通透性方面也有所改善. 优化后的结构为化合物**23** (表1), 其 IC_{50} 值为60 nmol/L, 但生物利用度不尽如人意, 且在小鼠肝微粒体中的代谢时间过短.

随后, 该团队对化合物**23**进行了进一步优化, 得到了化合物NAcM-OPT (表1, **24**)^[94]. NAcM-OPT选择性靶向DCN1-UBE2M, 并特异性针对DCN1和DCN2, 展现了良好的抑癌效果. 在鳞状细胞癌HCC95细胞系中, NAcM-OPT特异性抑制了Cullin1和Cullin3的拟素化修饰, 导致部分p27和NRF2的累积, 而对其他Cullin蛋白及其底物未造成影响. NAcM-OPT保留了化合物**23**的生化活性及细胞活性, 且在原有基础上增强了体内外稳定性, 提高了口服生物利用度.

2017年, Wang课题组^[95]通过结构设计及改造得到了一种不同于嘧啶胺类的化合物DI-591 (表1, **25**). DI-591作用于DCN1的子口袋(K_i 值为12.4 nmol/L), 展现出高效特异的拟素化通路抑制作用, 且具有良好的细胞穿透性和水溶性(在pH 2.0及7.4下均大于20 mmol/L). 随后, 该课题组^[155]针对DI-591进行了后续结构修饰, 于2018年发表了化合物DI-404 (表1, **26**). DI-404展现了良好的DCN1亲和性(K_d 值为6.7 nmol/L). 细胞热转换实验表明, DI-591和DI-404特异性靶向DCN1, 共免疫沉淀实验显示, DI-591和DI-404阻碍了DCN1与UBE2M之间的相互作用. 二者均选择性抑制Cullin3的拟素化修饰, 导致NRF2蛋白水平的累积.

2021年, 同一课题组^[156]对DI-591的丙烯酰胺基团进行了修饰, 得到了化合物DI-1859 (表1, **27**). DI-1859对Cullin3的拟素化修饰展现出高效的抑制能力, 活性相比于改造前提高了2~3个数量级. 体内实验表明, DI-1859能够引起小鼠肝脏内NRF2蛋白的累积, 从而保护肝脏免受对乙酰氨基酚的损伤. 这项研究表明,

拟素化抑制剂具有待发掘潜在应用价值, 如减缓ROS引起的细胞毒性等.

2019年, Liu课题组^[157]经过高通量筛选和结构优化, 获得了一种三唑啉嘧啶类DCN1抑制剂, 并命名为WS-383 (表1, **28**). WS-383特异性靶向DCN1, 其体外 IC_{50} 值为11 nmol/L. 在胃癌细胞系MGC-803中, WS-383有效抑制了Cullin1和Cullin3的拟素化修饰, 导致NRF2、p21和p27蛋白的累积. 然而, WS-383的药效动力学结果较差, 在人、大鼠和狗的肝微粒体中代谢速率过快. WS-383的芳杂环配体结构意味着该化合物可能具有激酶抑制活性, 但实验表明WS-383对多种激酶(如BTK、CDKs和EGFR)的抑制活性较弱.

2021年, Zhao课题组^[158]通过高通量筛选、结构优化以及SAR研究, 报道了一种全新结构的DCN1-UBE2M抑制剂: SK-464 (表1, **29**), 该化合物在体内和体外均能有效抑制Cullin3的拟素化修饰. 分子对接结果显示, SK-464对DCN1展现出强亲和力, 并能特异性靶向DCN1和DCN2. 研究发现, SK-464能够抑制胃癌细胞KYSE70和H2170的转移与侵袭, 但静脉注射给药时该药物的半衰期较短, 需要进一步优化以提升其性能.

2021年, 基于吡唑并吡唑酮的骨架Guy课题组^[159]发展了一种新的DCN1-UBE2M抑制剂, 结构示于化合物**30** (表1). 该化合物通过阻断DCN1与UBE2M的相互作用, 从而抑制拟素化进程, 可延缓DCN1过表达的非锚定依赖性鳞状细胞癌细胞的生长. 药物代谢动力学测试表明, 当该化合物在50 mg/kg剂量条件下单次口服给药时, 表现出较好的口服生物利用度, 使小鼠血浆中暴露在生化 IC_{90} 以上达24 h. 2021年, Liu团队^[160]公开了一项专利, 发布了一系列2-巯基-5-氰基嘧啶衍生物(表1, **31**), 其抑制UBE2M-DCN2相互作用的 IC_{50} 为 9.55 ± 0.98 nmol/L.

4.3.2 UBE2F抑制剂

在哺乳动物细胞内, 有两个拟素化耦联酶: UBE2M与RBX1共同催化Cullin1-4的拟素化修饰^[20], 而UBE2F与RBX2/SAG则共同催化Cullin5的拟素化修饰^[44]. 研究已证实, 这两种E2耦联酶在一系列癌症中均存在过表达, 且与癌症的发生发展密切相关, 因此都是癌症治疗的潜在靶点. 我们近期的研究表明, 敲除UBE2F会使CRL5失活, 从而导致下游促凋亡蛋白

NOXA的累积, 诱导肺癌细胞凋亡^[44], 此外还有研究表明, 敲除UBE2F可提高肺癌细胞对其他抗癌药物的敏感性, 如MCL1抑制剂^[161]、顺铂^[162]. 因此, 靶向UBE2F可以作为一种有效的放化疗辅助抗肺癌策略. 我们最新的研究表明, 在KrasG12D-诱导的胰腺癌模型中, 敲除Ube2F明显抑制了胰腺癌的发生发展^[163], 进一步说明Ube2F是一个有希望的抗肿瘤靶点.

2022年, 本课题组^[86]通过虚拟筛选和化学结构优化, 发现了一种特异性UBE2F抑制剂, 命名为HA-9104 (表1, 32). HA-9104能够有效抑制Cullin5的拟素化修饰, 导致NOXA的累积, 从而引起肺癌细胞的凋亡. 在不同细胞系中的IC₅₀值范围为1~5 $\mu\text{mol/L}$. 此外, 我们发现HA-9104可诱导DNA复制应激, 增加肺癌细胞对放疗的敏感性. 然而, 由于HA-9104的溶解性较差且半衰期较短, 其体内抗癌活性表现并不理想. 我们目前正在对其结构进行化学优化, 以改善其溶解度, 延长半衰期, 并力求消除其复制应激诱导活性, 以期发现高效特异性的UBE2F抑制剂.

4.4 E3-SAG抑制剂

在拟素化的最后阶段, E3连接酶负责将NEDD8从E2转移到底物蛋白上, 从而完成拟素化修饰.

4.4.1 SAG抑制剂

大多数E3连接酶含有RING片段^[164], 其中RBX1/ROC1和RBX2/ROC2/SAG被认为是重要的催化剂, 推动拟素化过程的进行^[126]. 除了催化拟素化通路外, RBX1和SAG也是Cullin-RING连接酶(CRLs)中的RING组成部分^[165], CRLs是泛素E3连接酶家族中最大的成员, 负责约20%的胞内蛋白降解^[60].

1999年, 本团队^[166,167]克隆了SAG蛋白, 并发现SAG是SCF E3泛素连接酶RING组分的第二个成员, 在一系列生理和病理过程中发挥着重要作用. 在KrasG12D诱导的肺癌小鼠模型中, 敲除Sag能明显抑制肿瘤的发生发展, 延长了小鼠的生存期^[45]. 因此SAG被认为是一个潜在的抗癌靶点. 通过高通量药物筛选, 本课题组^[87]于2020年发现了一种从棉籽中提取的天然产物: Gossypol (表1, 33). 该化合物可以直接作用于SAG-CUL5或RBX1-CUL1复合物, 抑制Cullin1和Cullin5的拟素化修饰. 相关生物实验表明, Gossypol能够显著抑制多种肿瘤细胞系中cullin蛋白的拟素化

修饰, 并选择性诱导Cullin1和Cullin5的底物MCL1和NOXA的累积. Gossypol与MCL1抑制剂联用可以抑制癌细胞的生长^[87]. 这项研究不仅揭示了Gossypol的新用途, 拓宽了已知药物的应用范围, 并且为E3连接酶抑制剂的后续开发奠定了基础.

4.4.2 Smurf1降解剂

SMAD泛素化调节因子1 (Smurf1)是一种HECT型E3泛素连接酶, 通过靶向泛素化和蛋白酶体降解的各种关键信号和调节蛋白, 在许多生物过程中起着关键的调节作用, 包括凋亡、衰老、细胞周期进展、转移和基因组稳定性等. 研究表明, Smurf1是一种同时作为泛素化和拟素化的双E3连接酶, 它通过增加泛素E2的募集来促进Smurf1自身拟素化水平, 从而增强其泛素连接酶活性^[168].

2024年, Zhang课题组^[32]通过蛋白水解靶向嵌合体(PROTAC)技术, 构建了基于CRBN的小分子Smurf1降解剂, 命名为SMART1 (表1, 34), SMART1能有效且选择性地降解Smurf1蛋白, 但不能降解其他家族成员, 包括具有高度同源性的Smurf2. 此外, Zhang团队发现PDK1是Smurf1的一种新拟素化底物, 通过降解Smurf1, SMART1显著抑制了胰岛素介导的PDK1的拟素化. 此外SMART1可有效抑制KRAS突变的结直肠癌和胰腺导管癌细胞的生长, IC₅₀值为10~50 nmol/L, 且在50 mg/kg的给药剂量下可显著抑制携带RAS突变体的HCT116细胞的异种移植瘤的体内生长, 是第一个报道的有效抗肿瘤活性和低细胞毒性的Smurf1降解剂.

5 总结与展望

自2009年首个NAE抑制剂MLN4924报道以来, 仅有2个拟素化E1抑制剂进入了临床试验, 一个是2009年报道的MLN4924 (Pevoedistat)^[60], 成为靶向拟素化通路抗肿瘤药物研发的里程碑. 另一个是TAS4464^[89]. 由于MLN4924和TAS4464都为NAE E1激酶抑制剂, 抑制整条拟素化通路, 缺乏底物选择性, 所以, 不可避免地会产生较强的毒副作用. 因此, 研发靶向在肺癌中发挥促进作用的拟素化通路下游的E2和E3会提高对肿瘤细胞的选择性并降低对正常细胞的毒副作用, 具有重要的基础研究意义和临床应用前景.

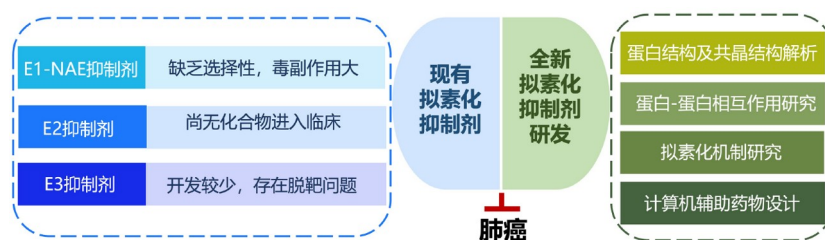


图6 (网络版彩图)靶向拟素化修饰治疗肺癌的总结和未来展望

Figure 6 (Color online) Summary and future perspectives for neddylation-targeted therapy of lung cancer.

自2017年以来,有数类DCN1-UBE2M抑制剂的报道,但缺乏有效的抗肿瘤活性,目前仍处于临床前研究阶段。靶向UBE2F和E3的小分子抑制剂研究较少,目前仅有HA-9104和Gossypol分别靶向UBE2F和SAG,这些化合物在选择性和脱靶效应方面仍存在问题,这限制了它们在癌症治疗中的应用。

总的来说,研发特异性拟素化通路抑制剂仍是该研究领域面临的重要挑战。在结构生物学研究方面,解析E2、E3的晶体结构和共晶结构,以及E1-E2、E2-E3

和E3-底物之间蛋白相互作用界面研究的突破,将有助于开发高选择性、低毒性的靶向NAE下游E2、E3新型拟素化抑制剂。在细胞生物学层面,必须从机制上阐明拟素化通路是如何在肺癌肿瘤微环境中精准调控不同类型的免疫细胞以及它对免疫细胞功能的调节是如何影响肿瘤的发生发展和免疫应答。随着对拟素化生物机制的深入了解,以及计算机辅助药物设计技术的发展(图6),我们相信拟素化通路抑制剂的开发将迅速迈入一个新阶段。

参考文献

- Wang C, Xie S, Xu P, Rao F, Li W, Zhang H, Zhou J, Miao S, Zhang L, Wang H, Liu X, Zhang H, Xie Z, Xu ZH, Cao C, Wei W, Chen C, Wang Z, Chen Q, Jin J, Gao D, Feng R, Yang C, Wang P, Liu C, Ying M, Ma L, Jiang TX, Sun Y, Wang L, Yang B, Song Z, Qiu XB, Li HH, Shang Y, Zhao Y, Zhu J, Wan Y, Chang Z, Wu M, Hu R, Wu Q, Cheng J, Jia L, Xie Q. *Chin Sci Bull*, 2018, 63: 2564–2569
- Zhang S, Yu Q, Li Z, Zhao Y, Sun Y. *Sig Transduct Target Ther*, 2024, 9: 85
- Kamitani T, Kito K, Nguyen HP, Yeh ETH. *J Biol Chem*, 1997, 272: 28557–28562
- Frickel EM, Quesada V, Muething L, Gubbels MJ, Spooner E, Ploegh H, Artavanis-Tsakonas K. *Cell Microbiol*, 2007, 9: 1601–1610
- Wu K, Yamoah K, Dolios G, Gan-Erdene T, Tan P, Chen A, Lee C, Wei N, Wilkinson KD, Wang R, Pan ZQ. *J Biol Chem*, 2003, 278: 28882–28891
- Zhao Y, Morgan MA, Sun Y. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 21: 2383–2400
- Zhou L, Zhang W, Sun Y, Jia L. *Cell Signal*, 2018, 44: 92–102
- Schulze-Niemand E, Naumann M. *Trends Biochem Sci*, 2023, 48: 82–95
- Gan-Erdene T, Nagamalleswari K, Yin L, Wu K, Pan ZQ, Wilkinson KD. *J Biol Chem*, 2003, 278: 28892–28900
- Mendoza HM, Shen L, Botting C, Lewis A, Chen J, Ink B, Hay RT. *J Biol Chem*, 2003, 278: 25637–25643
- Jeram SM, Srikumar T, Zhang XD, Anne Eisenhauer H, Rogers R, Pedrioli PGA, Matunis M, Raught B. *Proteomics*, 2010, 10: 254–265
- Jones J, Wu K, Yang Y, Guerrero C, Nillegoda N, Pan ZQ, Huang L. *J Proteome Res*, 2008, 7: 1274–1287
- Vogl AM, Phu L, Becerra R, Giusti SA, Verschueren E, Hinkle TB, Bordenave MD, Adrian M, Heidersbach A, Yankilevich P, Stefani FD, Wurst W, Hoogenraad CC, Kirkpatrick DS, Refojo D, Sheng M. *Nat Struct Mol Biol*, 2020, 27: 210–220
- Cappadocia L, Lima CD. *Chem Rev*, 2018, 118: 889–918
- Gong L, Yeh ETH. *J Biol Chem*, 1999, 274: 12036–12042
- Walden H, Podgorski MS, Huang DT, Miller DW, Howard RJ, Minor Jr. DL, Holton JM, Schulman BA. *Mol Cell*, 2003, 12: 1427–1437
- Xie P, Zhang M, He S, Lu K, Chen Y, Xing G, Lu Y, Liu P, Li Y, Wang S, Chai N, Wu J, Deng H, Wang HR, Cao Y, Zhao F, Cui Y, Wang J, He

- F, Zhang L. *Nat Commun*, 2014, 5: 3733
- 18 Kamura T, Conrad MN, Yan Q, Conaway RC, Conaway JW. *Genes Dev*, 1999, 13: 2928–2933
 - 19 Morimoto M, Nishida T, Nagayama Y, Yasuda H. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 301: 392–398
 - 20 Huang DT, Ayrault O, Hunt HW, Taherbhoy AM, Duda DM, Scott DC, Borg LA, Neale G, Murray PJ, Roussel MF, Schulman BA. *Mol Cell*, 2009, 33: 483–495
 - 21 Kurz T, Özlü N, Rudolf F, O'Rourke SM, Luke B, Hofmann K, Hyman AA, Bowerman B, Peter M. *Nature*, 2005, 435: 1257–1261
 - 22 Kurz T, Chou YC, Willems AR, Meyer-Schaller N, Hecht ML, Tyers M, Peter M, Sicheri F. *Mol Cell*, 2008, 29: 23–35
 - 23 Xie P, Peng Z, Chen Y, Li H, Du M, Tan Y, Zhang X, Lu Z, Cui CP, Liu CH, He F, Zhang L. *Cell Res*, 2021, 31: 291–311
 - 24 Xirodimas DP, Saville MK, Bourdon JC, Hay RT, Lane DP. *Cell*, 2004, 118: 83–97
 - 25 Zhao Y, Sun Y. *Curr Pharm Des*, 2013, 19: 3215–3225
 - 26 Duda DM, Borg LA, Scott DC, Hunt HW, Hammel M, Schulman BA. *Cell*, 2008, 134: 995–1006
 - 27 Goldenberg SJ, Cascio TC, Shumway SD, Garbutt KC, Liu J, Xiong Y, Zheng N. *Cell*, 2004, 119: 517–528
 - 28 Sun Y. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1217: 1–8
 - 29 Enchev RI, Schulman BA, Peter M. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2015, 16: 30–44
 - 30 Najor NA, Fitz GN, Koetsier JL, Godsel LM, Albrecht LV, Harmon R, Green KJ. *eLife*, 2017, 6: e22599
 - 31 Li C, Zhang L, Qian D, Cheng M, Hu H, Hong Z, Cui Y, Yu H, Wang Q, Zhu J, Meng W, Xu J, Sun Y, Zhang P, Wang C, Yount JS. *PLoS Pathog*, 2021, 17: e1009401
 - 32 Peng Z, Fang W, Wu B, He M, Li S, Wei J, Hao Y, Jin L, Liu M, Zhang X, Wei Y, Ge Y, Wei Y, Qian H, Zhang Y, Jiang J, Chang Z, Rao Y, Zhang X, Cui CP, Zhang L. *Nat Chem Biol*, 2025, 21: 59–70
 - 33 Zhang F, Xiong X, Li Z, Wang H, Wang W, Zhao Y, Sun Y. *EMBO J*, 2025, 44: 1185–1219
 - 34 Li Y, Zhou H, Liu P, Lv D, Shi Y, Tang B, Xu J, Zhong T, Xu W, Zhang J, Zhou J, Ying K, Zhao Y, Sun Y, Jiang Z, Cheng H, Zhang X, Ke Y. *J Clin Invest*, 2023, 133: e162870
 - 35 Ma T, Chen Y, Zhang F, Yang CY, Wang S, Yu X. *Mol Cell*, 2013, 49: 897–907
 - 36 Sundqvist A, Liu G, Mirsalis A, Xirodimas DP. *EMBO Rep*, 2009, 10: 1132–1139
 - 37 Xiong X, Cui D, Bi Y, Sun Y, Zhao Y. *FASEB J*, 2020, 34: 13419–13429
 - 38 Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, Jemal A. *CA Cancer J Clin*, 2024, 74: 229–263
 - 39 Han B, Zheng R, Zeng H, Wang S, Sun K, Chen R, Li L, Wei W, He J. *J Natl Cancer Center*, 2024, 4: 47–53
 - 40 Ettinger DS, Wood DE, Aisner DL, Akerley W, Bauman JR, Bharat A, Bruno DS, Chang JY, Chirieac LR, D'Amico TA, DeCamp M, Dilling TJ, Dowell J, Gettinger S, Grotz TE, Gubens MA, Hegde A, Lackner RP, Lanuti M, Lin J, Loo BW, Lovly CM, Maldonado F, Massarelli E, Morgensztern D, Ng T, Otterson GA, Pacheco JM, Patel SP, Riely GJ, Riess J, Schild SE, Shapiro TA, Singh AP, Stevenson J, Tam A, Tanvetanont T, Yanagawa J, Yang SC, Yau E, Gregory K, Hughes M. *J Natl Compr Cancer Netw*, 2022, 20: 497–530
 - 41 Zheng Y, Inuzuka H, Wei W, Sun Y. *Fundamental Res*, 2023, doi: 10.1016/j.fmre.2023.10.005
 - 42 Li L, Wang M, Yu G, Chen P, Li H, Wei D, Zhu J, Xie L, Jia H, Shi J, Li C, Yao W, Wang Y, Gao Q, Jeong LS, Lee HW, Yu J, Hu F, Mei J, Wang P, Chu Y, Qi H, Yang M, Dong Z, Sun Y, Hoffman RM, Jia L. *JNCI-J Natl Cancer Instit*, 2014, 106
 - 43 Li L, Kang J, Zhang W, Cai L, Wang S, Liang Y, Jiang Y, Liu X, Zhang Y, Ruan H, Chen G, Wang M, Jia L. *EBioMedicine*, 2019, 45: 81–91
 - 44 Zhou W, Xu J, Li H, Xu M, Chen ZJ, Wei W, Pan Z, Sun Y. *Clin Cancer Res*, 2017, 23: 1104–1116
 - 45 Li H, Tan M, Jia L, Wei D, Zhao Y, Chen G, Xu J, Zhao L, Thomas D, Beer DG, Sun Y. *J Clin Invest*, 2014, 124: 835–846
 - 46 Li Y, Wu D, Li H, Sun Y. *MedComm*, 2023, 4: e332
 - 47 Zheng Y, Xiong X, Sun Y. *Prog Biochem Biophys*, 2023, 50: 808–823 (in Chinese) [郑雅文, 熊秀芳, 孙毅. 生物化学与生物物理进展, 2023, 50: 808–823]
 - 48 Yu Q, Jiang Y, Sun Y. *Acta Pharm Sin B*, 2020, 10: 746–765
 - 49 Collisson EA, Campbell JD, Brooks AN, Berger AH, Lee W, Chmielecki J, Beer DG, Cope L, Creighton CJ, Danilova L, Ding L, Getz G, Hammerman PS, Neil Hayes D, Hernandez B, Herman JG, Heymach JV, Jurisica I, Kucherlapati R, Kwiatkowski D, Ladanyi M, Robertson G, Schultz N, Shen R, Sinha R, Sougnez C, Tsao MS, Travis WD, Weinstein JN, Wigle DA, Wilkerson MD, Chu A, Cherniack AD, Hadjipanayis A, Rosenberg M, Weisenberger DJ, Laird PW, Radenbaugh A, Ma S, Stuart JM, Averett Byers L, Baylin SB, Govindan R, Rosenberg M, Gabriel SB, Cibulskis K, Sougnez C, Kim J, Stewart C, Lichtenstein L, Lander ES, Lawrence MS, Kandoth C, Fulton R, Fulton LL, McLellan

- MD, Wilson RK, Ye K, Fronick CC, Maher CA, Miller CA, Wendl MC, Cabanski C, Ding L, Mardis E, Creighton CJ, Balasundaram M, Butterfield YSN, Carlsen R, Chu A, Chuah E, Dhalla N, Guin R, Hirst C, Lee D, Li HI, Mayo M, Moore RA, Mungall AJ, Schein JE, Sipahimalani P, Tam A, Varhol R, Gordon Robertson A, Wye N, Thiessen N, Holt RA, Jones SJM, Campbell JD, Brooks AN, Chmielecki J, Imielinski M, Onofrio RC, Hodis E, Zack T, Sougnez C, Helman E, Sekhar Pedamallu C, Mesirov J, Cherniack AD, Saksena G, Schumacher SE, Carter SL, Hernandez B, Garraway L, Beroukhi R, Gabriel SB, Getz G, Hadjipanayis A, Lee S, Mahadeshwar HS, Pantazi A, Protopopov A, Ren X, Seth S, Song X, Tang J, Yang L, Zhang J, Chen PC, Parfenov M, Wei Xu A, Santoso N, Chin L, Park PJ, Hoadley KA, Todd Auman J, Meng S, Shi Y, Buda E, Waring S, Veluvolu U, Tan D, Mieczkowski PA, Jones CD, Simons JV, Soloway MG, Bodenheimer T, Jefferys SR, Roach J, Hoyle AP, Wu J, Balu S, Singh D, Prins JF, Marron JS, Parker JS, Neil Hayes D, Cope L, Danilova L, Weisenberger DJ, Maglinte DT, Lai PH, Bootwalla MS, van den Berg DJ, Triche Jr. T, Baylin SB, Rosenberg M, Chin L, Zhang J, Cho J, Dicara D, Heiman D, Lin P, Mallard W, Voet D, Zhang H, Zou L, Noble MS, Lawrence MS, Saksena G, Gehlenborg N, Thorvaldsdottir H, Mesirov J, Nazaire MD, Robinson J, Lee W, Arman Aksoy B, Ciriello G, Taylor BS, Dresdner G, Gao J, Gross B, Seshan VE, Ladanyi M, Reva B, Sinha R, Onur Sumer S, Weinhold N, Schultz N, Shen R, Ng S, Ma S, Zhu J, Radenbaugh A, Stuart JM, Benz CC, Yau C, Wilkerson MD. *Nature*, 2014, 511: 543–550
- 50 Hänzelmann S, Castelo R, Guinney J. *BMC BioInf*, 2013, 14: 7
- 51 Zhou Q, Zheng Y, Sun Y. *Cell Biosci*, 2021, 11: 55
- 52 Jiang Y, Cheng W, Li L, Zhou L, Liang Y, Zhang W, Chen W, Wang S, Zhao H, Chen G, Zhou W, Ji G, Zhang Y, Hoffman RM, Wang M, Jia L. *Cell Biol Toxicol*, 2020, 36: 349–364
- 53 Jia L, Soengas MS, Sun Y. *Cancer Res*, 2009, 69: 4974–4982
- 54 Zhou L, Jiang Y, Liu X, Li L, Yang X, Dong C, Liu X, Lin Y, Li Y, Yu J, He R, Huang S, Liu G, Zhang Y, Jeong LS, Hoffman RM, Jia L. *Oncogene*, 2019, 38: 5792–5804
- 55 Xiong X, Mathewson ND, Li H, Tan M, Fujiwara H, Li H, Reddy P, Sun Y. *Front Immunol*, 2018, 9: 2882
- 56 Mathewson N, Toubai T, Kapeles S, Sun Y, Oravec-Wilson K, Tamaki H, Wang Y, Hou G, Sun Y, Reddy P. *Blood*, 2013, 122: 2062–2073
- 57 Chang FM, Reyna SM, Granados JC, Wei SJ, Innis-Whitehouse W, Maffi SK, Rodriguez E, Slaga TJ, Short JD. *J Biol Chem*, 2012, 287: 35756–35767
- 58 Mathewson ND, Fujiwara H, Wu SR, Toubai T, Oravec-Wilson K, Sun Y, Rossi C, Zajac C, Sun Y, Reddy P. *Am J Pathol*, 2016, 186: 2679–2691
- 59 Wu D, Li H, Liu M, Qin J, Sun Y. *Nat Commun*, 2022, 13: 3021
- 60 Soucy TA, Smith PG, Milhollen MA, Berger AJ, Gavin JM, Adhikari S, Brownell JE, Burke KE, Cardin DP, Critchley S, Cullis CA, Doucette A, Garnsey JJ, Gaulin JL, Gershman RE, Lublinsky AR, McDonald A, Mizutani H, Narayanan U, Olhava EJ, Peluso S, Rezaei M, Sintchak MD, Talreja T, Thomas MP, Traore T, Vyskocil S, Weatherhead GS, Yu J, Zhang J, Dick LR, Claiborne CF, Rolfe M, Bolen JB, Langston SP. *Nature*, 2009, 458: 732–736
- 61 Taniguchi K, Karin M. *Nat Rev Immunol*, 2018, 18: 309–324
- 62 Li L, Liu B, Dong T, Lee HW, Yu J, Zheng Y, Gao H, Zhang Y, Chu Y, Liu G, Niu W, Zheng S, Jeong LS, Jia L. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 432: 494–498
- 63 Kwak JW, Laskowski J, Li HY, McSharry MV, Sippel TR, Bullock BL, Johnson AM, Pocobutt JM, Neuwelt AJ, Malkoski SP, Weiser-Evans MC, Lambris JD, Clambey ET, Thurman JM, Nemenoff RA. *Cancer Res*, 2018, 78: 143–156
- 64 Waldman AD, Fritz JM, Lenardo MJ. *Nat Rev Immunol*, 2020, 20: 651–668
- 65 Joyce JA, Fearon DT. *Science*, 2015, 348: 74–80
- 66 Brownell JE, Sintchak MD, Gavin JM, Liao H, Bruzzese FJ, Bump NJ, Soucy TA, Milhollen MA, Yang X, Burkhardt AL, Ma J, Loke HK, Lingaraj T, Wu D, Hamman KB, Spelman JJ, Cullis CA, Langston SP, Vyskocil S, Sells TB, Mallender WD, Visiers I, Li P, Claiborne CF, Rolfe M, Bolen JB, Dick LR. *Mol Cell*, 2010, 37: 102–111
- 67 Takeda announces US FDA breakthrough therapy designation granted for pevonedistat for the treatment of patients with higher-risk myelodysplastic syndromes (HR-MDS). *Takeda Pharmaceutical Company Limited News Release*, <https://bit.ly/3hPZuRp>
- 68 Blay V, Tolani B, Ho SP, Arkin MR. *Drug Discov Today*, 2020, 25: 1807–1821
- 69 Ankur, G., Swatantra, K., Vimal, K. M., Bipin, P. & Shailendra, K. S. in *High-Throughput Screening for Drug Discovery* (ed K. Saxena Shailendra) Ch. 2 (IntechOpen, 2022)
- 70 Lima Cavalcanti ID, Xavier Junior FH, Santos Magalhães NS, Lira Nogueira MCB. *Int J Pharm*, 2023, 641: 123063

- 71 Caceres-Cortes J, Falk B, Mueller L, Dhar TGM. *J Med Chem*, 2024, 67: 1701–1733
- 72 Olaru A, Bala C, Jaffrezic-Renault N, Aboul-Enein HY. *Crit Rev Anal Chem*, 2015, 45: 97–105
- 73 Wu T, Yu JC, Suresh A, Gale-Day ZJ, Alteen MG, Woo AS, Millbern Z, Johnson OT, Carroll EC, Partch CL, Fourches D, Vinueza NR, Vocadlo DJ, Gestwicki JE. *Nat Biotechnol*, 2025, 43: 106–113
- 74 Niesen FH, Berglund H, Vedadi M. *Nat Protoc*, 2007, 2: 2212–2221
- 75 Magnez R, Bailly C, Thuru X. *Int J Mol Sci*, 2022, 23: 7672
- 76 Molina DM, Jafari R, Ignatushchenko M, Seki T, Larsson EA, Dan C, Sreekumar L, Cao Y, Nordlund P. *Science*, 2013, 341: 84–87
- 77 Jafari R, Almqvist H, Axelsson H, Ignatushchenko M, Lundbäck T, Nordlund P, Molina DM. *Nat Protoc*, 2014, 9: 2100–2122
- 78 Hendrickson OD, Taranova NA, Zherdev AV, Dzantiev BB, Eremin SA. *Sensors*, 2020, 20: 7132
- 79 Ren F, Aliper A, Chen J, Zhao H, Rao S, Kuppe C, Ozerov IV, Zhang M, Witte K, Kruse C, Aladinskiy V, Ivanenkov Y, Polykovskiy D, Fu Y, Babin E, Qiao J, Liang X, Mou Z, Wang H, Pun FW, Torres-Ayuso P, Veviorskiy A, Song D, Liu S, Zhang B, Naumov V, Ding X, Kukharensko A, Izumchenko E, Zhavoronkov A. *Nat Biotechnol*, 2025, 43: 63–75
- 80 Walport LJ, Low JKK, Matthews JM, Mackay JP. *Chem Soc Rev*, 2021, 50: 12292–12307
- 81 Zhao H, Zhao J, Hou J, Wang S, Ding Y, Lu B, Wang J. *Protein Cell*, 2017, 8: 696–700
- 82 Kostrhon S, Prabu JR, Baek K, Horn-Ghetko D, von Gronau S, Klügel M, Basquin J, Alpi AF, Schulman BA. *Nat Chem Biol*, 2021, 17: 1075–1083
- 83 Huang X, Dixit VM. *Cell Res*, 2016, 26: 484–498
- 84 Wu K, Chong RA, Yu Q, Bai J, Spratt DE, Ching K, Lee C, Miao H, Tappin I, Hurwitz J, Zheng N, Shaw GS, Sun Y, Felsenfeld DP, Sanchez R, Zheng J, Pan ZQ. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: E2011–E2018
- 85 Wu K, Ching K, Chong RA, Pan ZQ. *J Biol Chem*, 2021, 296: 100230
- 86 Xu T, Ma Q, Li Y, Yu Q, Pan P, Zheng Y, Li Z, Xiong X, Hou T, Yu B, Liu H, Sun Y. *Sig Transduct Target Ther*, 2022, 7: 354
- 87 Yu Q, Hu Z, Shen Y, Jiang Y, Pan P, Hou T, Pan ZQ, Huang J, Sun Y. *Neoplasia*, 2020, 22: 179–191
- 88 Li Y, Wang C, Xu T, Pan P, Yu Q, Xu L, Xiong X, Hou T, Cui S, Sun Y. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11: 3567–3584
- 89 Yoshimura C, Muraoka H, Ochiwa H, Tsuji S, Hashimoto A, Kazuno H, Nakagawa F, Komiya Y, Suzuki S, Takenaka T, Kumazaki M, Fujita N, Mizutani T, Ohkubo S. *Mol Cancer Ther*, 2019, 18: 1205–1216
- 90 Sadybekov AA, Sadybekov AV, Liu Y, Iliopoulos-Tsoutsouvas C, Huang XP, Pickett J, Houser B, Patel N, Tran NK, Tong F, Zvonok N, Jain MK, Savych O, Radchenko DS, Nikas SP, Petasis NA, Moroz YS, Roth BL, Makriyannis A, Katritch V. *Nature*, 2022, 601: 452–459
- 91 Gorgulla C, Boeszoermenyi A, Wang ZF, Fischer PD, Coote PW, Padmanabha Das KM, Malets YS, Radchenko DS, Moroz YS, Scott DA, Fackeldey K, Hoffmann M, Iavniuk I, Wagner G, Arthanari H. *Nature*, 2020, 580: 663–668
- 92 Forli S, Huey R, Pique ME, Sanner MF, Goodsell DS, Olson AJ. *Nat Protoc*, 2016, 11: 905–919
- 93 Scott DC, Hammill JT, Min J, Rhee DY, Connelly M, Sviderskiy VO, Bhasin D, Chen Y, Ong SS, Chai SC, Goktug AN, Huang G, Monda JK, Low J, Kim HS, Paulo JA, Cannon JR, Shelat AA, Chen T, Kelsall IR, Alpi AF, Pagala V, Wang X, Peng J, Singh B, Harper JW, Schulman BA, Guy RK. *Nat Chem Biol*, 2017, 13: 850–857
- 94 Hammill JT, Bhasin D, Scott DC, Min J, Chen Y, Lu Y, Yang L, Kim HS, Connelly MC, Hammill C, Holbrook G, Jeffries C, Singh B, Schulman BA, Guy RK. *J Med Chem*, 2018, 61: 2694–2706
- 95 Zhou H, Lu J, Liu L, Bernard D, Yang CY, Fernandez-Salas E, Chinnaswamy K, Layton S, Stuckey J, Yu Q, Zhou W, Pan Z, Sun Y, Wang S. *Nat Commun*, 2017, 8: 1150
- 96 Békés M, Langley DR, Crews CM. *Nat Rev Drug Discov*, 2022, 21: 181–200
- 97 Xiong X, Zhao Y, Sun Y. *Protein Cell*, 2025, 16: 157–160
- 98 Peterson AA, Liu DR. *Nat Rev Drug Discov*, 2023, 22: 699–722
- 99 Huang Y, Li Y, Li X. *Nat Chem*, 2022, 14: 129–140
- 100 Dawadi S, Simmons N, Miklossy G, Bohren KM, Faver JC, Ucisik MN, Nyshadham P, Yu Z, Matzuk MM. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117: 16782–16789
- 101 Gironda-Martínez A, Gorre ÉMD, Prati L, Gosalbes JF, Dakhel S, Cazzamalli S, Samain F, Donckele EJ, Neri D. *J Med Chem*, 2021, 64: 17496–17510
- 102 Taylor DM, Anglin J, Park S, Ucisik MN, Faver JC, Simmons N, Jin Z, Palaniappan M, Nyshadham P, Li F, Campbell J, Hu L, Sankaran B,

- Prasad BVV, Huang H, Matzuk MM, Palzkill T. *ACS Infect Dis*, 2020, 6: 1214–1227
- 103 Usanov DL, Chan AI, Maianti JP, Liu DR. *Nat Chem*, 2018, 10: 704–714
- 104 Kunig VBK, Potowski M, Akbarzadeh M, Klika Škopić M, dos Santos Smith D, Arendt L, Dormuth I, Adihou H, Andlovic B, Karatas H, Shaabani S, Zarganes-Tzitzikas T, Neochoritis CG, Zhang R, Groves M, Guéret SM, Ottmann C, Rahnenführer J, Fried R, Dömling A, Brunschweiler A. *Angew Chem Int Ed*, 2020, 59: 20338–20342
- 105 Chen Q, Liu C, Wang W, Meng X, Cheng X, Li X, Cai L, Luo L, He X, Qu H, Luo J, Wei H, Gao S, Liu G, Wan J, Israel DI, Li J, Dou D. *ACS Chem Biol*, 2023, 18: 25–33
- 106 Perez-Lopez R, Ghaffari Laleh N, Mahmood F, Kather JN. *Nat Rev Cancer*, 2024, 24: 427–441
- 107 Vemula D, Jayasurya P, Sushmitha V, Kumar YN, Bhandari V. *Eur J Pharm Sci*, 2023, 181: 106324
- 108 Abramson J, Adler J, Dunger J, Evans R, Green T, Pritzel A, Ronneberger O, Willmore L, Ballard AJ, Bambrick J, Bodenstein SW, Evans DA, Hung CC, O'Neill M, Reiman D, Tunyasuvunakool K, Wu Z, Žemgulytė A, Arvaniti E, Beattie C, Bertolli O, Bridgland A, Cherepanov A, Congreve M, Cowen-Rivers AI, Cowie A, Figurnov M, Fuchs FB, Gladman H, Jain R, Khan YA, Low CMR, Perlin K, Potapenko A, Savy P, Singh S, Stecula A, Thillaisundaram A, Tong C, Yakneen S, Zhong ED, Zielinski M, Židek A, Bapst V, Kohli P, Jaderberg M, Hassabis D, Jumper JM. *Nature*, 2024, 630: 493–500
- 109 Guo SB, Meng Y, Lin L, Zhou ZZ, Li HL, Tian XP, Huang WJ. *Mol Cancer*, 2024, 23: 223
- 110 Callaway E. *Nature*, 2024, 634: 525–526
- 111 Paul D, Sanap G, Shenoy S, Kalyane D, Kalia K, Tekade RK. *Drug Discov Today*, 2021, 26: 80–93
- 112 Mak KK, Pichika MR. *Drug Discov Today*, 2019, 24: 773–780
- 113 Schmidhuber J. *Neural Netw*, 2015, 61: 85–117
- 114 Vamathevan J, Clark D, Czodrowski P, Dunham I, Ferran E, Lee G, Li B, Madabhushi A, Shah P, Spitzer M, Zhao S. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, 18: 463–477
- 115 Klambauer G, Wischenbart M, Mahr M, Unterthiner T, Mayr A, Hochreiter S. *Bioinformatics*, 2015, 31: 3392–3394
- 116 Janizek JD, Dincer AB, Celik S, Chen H, Chen W, Naxerova K, Lee SI. *Nat Biomed Eng*, 2023, 7: 811–829
- 117 Yuan C, Ryan PB, Ta C, Guo Y, Li Z, Hardin J, Makadia R, Jin P, Shang N, Kang T, Weng C. *J Am Med Inf Assoc*, 2019, 26: 294–305
- 118 Lu L, Dercle L, Zhao B, Schwartz LH. *Nat Commun*, 2021, 12: 6654
- 119 Whitby FG, Xia G, Pickart CM, Hill CP. *J Biol Chem*, 1998, 273: 34983–34991
- 120 Huang DT, Hunt HW, Zhuang M, Ohi MD, Holton JM, Schulman BA. *Nature*, 2007, 445: 394–398
- 121 Olsen SK, Lima CD. *Mol Cell*, 2013, 49: 884–896
- 122 Tokgöz Z, Siepmann TJ, Streich Jr. F, Kumar B, Klein JM, Haas AL. *J Biol Chem*, 2012, 287: 311–321
- 123 Huang DT, Paydar A, Zhuang M, Waddell MB, Holton JM, Schulman BA. *Mol Cell*, 2005, 17: 341–350
- 124 Wu P, Nielsen TE, Clausen MH. *Trends Pharmacol Sci*, 2015, 36: 422–439
- 125 Lux MC, Standke LC, Tan DS. *J Antibiot*, 2019, 72: 325–349
- 126 Yang Y, Kitagaki J, Dai RM, Tsai YC, Lorick KL, Ludwig RL, Pierre SA, Jensen JP, Davydov IV, Oberoi P, Li CCH, Kenten JH, Beutler JA, Vousden KH, Weissman AM. *Cancer Res*, 2007, 67: 9472–9481
- 127 Wang J, Wang S, Zhang W, Wang X, Liu X, Liu L, Li L, Liang Y, Yu J, Jeong LS, Jia L, Zhao H, Zhang Y. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 490: 1183–1188
- 128 Zhou L, Chen W, Lin D, Hu W, Tang Z. *Exp Eye Res*, 2019, 180: 77–85
- 129 Xie L, Ji X, Tu Y, Wang K, Zhu L, Zeng X, Wang X, Zhang J, Zhu M. *Biomed Pharmacother*, 2020, 130: 110654
- 130 Faessel HM, Mould DR, Zhou X, Faller DV, Sedarati F, Venkatakrishnan K. *Brit J Clin Pharma*, 2019, 85: 2568–2579
- 131 Calandrini C, van Hooff SR, Paassen I, Ayyildiz D, Derakhshan S, Dolman MEM, Langenberg KPS, van de Ven M, de Heus C, Liv N, Kool M, de Krijger RR, Tytgat GAM, van den Heuvel-Eibrink MM, Molenaar JJ, Drost J. *Cell Rep*, 2021, 36: 109568
- 132 Flores-Martínez YA, Le-Trilling VTK, Trilling M. *Viruses*, 2021, 13: 1610
- 133 Chen JJ, Tsu CA, Gavin JM, Milhollen MA, Bruzzese FJ, Mallender WD, Sintchak MD, Bump NJ, Yang X, Ma J, Loke HK, Xu Q, Li P, Bence NF, Brownell JE, Dick LR. *J Biol Chem*, 2011, 286: 40867–40877
- 134 Bareiss PM, Paczulla A, Wang H, Schairer R, Wiehr S, Kohlhofer U, Rothfuss OC, Fischer A, Perner S, Staebler A, Wallwiener D, Fend F, Fehm T, Pichler B, Kanz L, Quintanilla-Martinez L, Schulze-Osthoff K, Essmann F, Lengerke C. *Cancer Res*, 2013, 73: 5544–5555

- 135 An H, Statsyuk AV. *Chem Sci*, 2015, 6: 5235–5245
- 136 Yamamoto N, Shimizu T, Yonemori K, Kitano S, Kondo S, Iwasa S, Koyama T, Sudo K, Sato J, Tamura K, Tomomatsu J, Ono M, Fukuda N, Takahashi S. *Invest New Drugs*, 2021, 39: 1036–1046
- 137 Xiong C, Zhou L, Tan J, Song S, Bao X, Zhang N, Ding H, Zhao J, He J, Miao ZH, Zhang A. *J Med Chem*, 2021, 64: 6161–6178
- 138 Lukkariila JL, da Silva SR, Ali M, Shahani VM, Xu GW, Berman J, Roughton A, Dhe-Paganon S, Schimmer AD, Gunning PT. *ACS Med Chem Lett*, 2011, 2: 577–582
- 139 Zhang S, Tan J, Lai Z, Li Y, Pang J, Xiao J, Huang Z, Zhang Y, Ji H, Lai Y. *J Chem Inf Model*, 2014, 54: 1785–1797
- 140 Leung CH, Chan DSH, Yang H, Abagyan R, Lee SMY, Zhu GY, Fong WF, Ma DL. *Chem Commun*, 2011, 47: 2511
- 141 Zhong HJ, Pui-Yan Ma V, Cheng Z, Shiu-Hin Chan D, He HZ, Leung KH, Ma DL, Leung CH. *Biochimie*, 2012, 94: 2457–2460
- 142 Zhong HJ, Leung KH, Lin S, Chan DSH, Han QB, Chan SLF, Ma DL, Leung CH. *Methods*, 2015, 71: 71–76
- 143 Li X, Yokoyama NN, Zhang S, Ding L, Liu H, Lilly MB, Mercola D, Zi X. *Oncotarget*, 2015, 6: 41809–41824
- 144 Zhong HJ, Yang H, Chan DSH, Leung CH, Wang HM, Ma DL, Seifert R. *PLoS ONE*, 2012, 7: e49574
- 145 Zhong HJ, Wang W, Kang TS, Yan H, Yang Y, Xu L, Wang Y, Ma DL, Leung CH. *J Med Chem*, 2017, 60: 497–503
- 146 Zhong HJ, Liu LJ, Chan DSH, Wang HM, Chan PWH, Ma DL, Leung CH. *Biochimie*, 2014, 102: 211–215
- 147 Wu KJ, Zhong HJ, Li G, Liu C, Wang HMD, Ma DL, Leung CH. *Eur J Med Chem*, 2018, 143: 1021–1027
- 148 Lu P, Liu X, Yuan X, He M, Wang Y, Zhang Q, Ouyang P. *ACS Chem Biol*, 2016, 11: 1901–1907
- 149 Lu P, Guo Y, Zhu L, Xia Y, Zhong Y, Wang Y. *Eur J Med Chem*, 2018, 154: 294–304
- 150 Ni S, Chen X, Yu Q, Xu Y, Hu Z, Zhang J, Zhang W, Li B, Yang X, Mao F, Huang J, Sun Y, Li J, Jia L. *Eur J Med Chem*, 2020, 185: 111848
- 151 Liakopoulos D. *EMBO J*, 1998, 17: 2208–2214
- 152 Lin L, Chen L, Tran PT. *Biol Open*, 2017, 6: bio.021238
- 153 Meyer-Schaller N, Chou YC, Sumara I, Martin DDO, Kurz T, Katheder N, Hofmann K, Berthiaume LG, Sicheri F, Peter M. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 12365–12370
- 154 Hammill JT, Scott DC, Min J, Connelly MC, Holbrook G, Zhu F, Matheny A, Yang L, Singh B, Schulman BA, Guy RK. *J Med Chem*, 2018, 61: 2680–2693
- 155 Zhou H, Zhou W, Zhou B, Liu L, Chern TR, Chinnaswamy K, Lu J, Bernard D, Yang CY, Li S, Wang M, Stuckey J, Sun Y, Wang S. *J Med Chem*, 2018, 61: 1934–1950
- 156 Zhou H, Lu J, Chinnaswamy K, Stuckey JA, Liu L, McEachern D, Yang CY, Bernard D, Shen H, Rui L, Sun Y, Wang S. *Nat Commun*, 2021, 12: 2621
- 157 Wang S, Zhao L, Shi XJ, Ding L, Yang L, Wang ZZ, Shen D, Tang K, Li XJ, Mamun M, Li H, Yu B, Zheng YC, Wang S, Liu HM. *J Med Chem*, 2019, 62: 2772–2797
- 158 Zhou W, Xu C, Dong G, Qiao H, Yang J, Liu H, Ding L, Sun K, Zhao W. *Eur J Med Chem*, 2021, 217: 113326
- 159 Kim HS, Hammill JT, Scott DC, Chen Y, Rice AL, Pistel W, Singh B, Schulman BA, Guy RK. *J Med Chem*, 2021, 64: 5850–5862
- 160 He ZX, An Q, Wei B, Zhou WJ, Wei BF, Gong YP, Zhang X, Gao G, Dong GJ, Huo JL, Zhang XH, Yang FF, Liu HM, Ma LY, Zhao W. *J Med Chem*, 2022, 65: 163–190
- 161 Kabir S, Cidado J, Andersen C, Dick C, Lin PC, Mitros T, Ma H, Baik SH, Belmonte MA, Drew L, Corn JE. *eLife*, 2019, 8: e44288
- 162 Zhou L, Zhu J, Chen W, Jiang Y, Hu T, Wang Y, Ye X, Zhan M, Ji C, Xu Z, Wang X, Gu Y, Jia L. *Cell Death Dis*, 2020, 11: 975
- 163 Chang Y, Chen Q, Li H, Xu J, Tan M, Xiong X, Sun Y. *Dev Cell*, 2024, 59: 1317–1332.e5
- 164 Satijn DPE, Gunster MJ, van der Vlag J, Hamer KM, Schul W, Alkema MJ, Saurin AJ, Freemont PS, van Driel R, Otte AP. *Mol Cell Biol*, 1997, 17: 4105–4113
- 165 Rankin CA, Galeva NA, Bae KM, Ahmad MN, Witte TM, Richter ML. *Biochemistry*, 2014, 53: 225–234
- 166 Duan H, Wang Y, Aviram M, Swaroop M, Loo JA, Bian J, Tian Y, Mueller T, Bisgaier CL, Sun Y. *Mol Cell Biol*, 1999, 19: 3145–3155
- 167 Sun Y, Li H. *Protein Cell*, 2013, 4: 103–116
- 168 Fu L, Cui CP, Zhang X, Zhang L. *Semin Cancer Biol*, 2020, 67: 102–116

Highly activated neddylation pathway in lung cancer and chemical targeted intervention

Xiangshuo Qin^{1,2†}, Qing Yu^{3†}, Xufan Li^{2,4†}, Xiufang Xiong^{1,2}, Pengyuan Liu^{2,4}, Xin Han^{1,2}, Yi Sun^{1,2*}

¹ Cancer Institute of the Second Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310009, China

² Institute of Translational Medicine, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310029, China

³ Thyroid Surgery of Zhejiang Cancer Hospital, Key Laboratory of Zhejiang Translational Medicine for Head and Neck Tumors, Hangzhou 310022, China

⁴ Respiratory Department of Run Run Shaw Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310018, China

†Equally contributed to this work.

*Corresponding author (email: yisun@zju.edu.cn)

Abstract: Protein neddylation is one type of post-translational modifications in which NEDD8 is attached covalently to a lysine residue of a substrate. Neddylation is catalyzed by E1 activation enzyme (NAE), E2 conjugating enzymes, and E3 ligases. Cullin family members are the physiological substrates of neddylation, and cullin neddylation activates cullin-RING ligases (CRLs), which then promote ubiquitylation and proteasome degradation of many key signal proteins, thus regulating many important biological process. Accumulated data showed that neddylation pathway is highly activated in human lung cancer with positive correlation to poor survival of lung cancer patients. Activated neddylation pathway promotes the proliferation and survival of lung cancer cells, and accelerates lung tumorigenesis. Thus, targeting neddylation has become an attractive approach for the discovery and development of anti-lung cancer therapy. In this review, we first introduce neddylation process, its biochemical properties, and its alterations via bioinformatics analysis, and its known tumor promoting functions in lung cancer. We then list few advanced methodologies/techniques for the discovery of small molecule inhibitors of neddylation enzymes, followed by a comprehensive summary of all known inhibitors of neddylation enzymes. We end the review with brief summary and proposed future perspectives. The goal is to provide a most updated and comprehensive information to the readers of interest, and to draw more scientists to join the effort in the discovery of neddylation inhibitors for anti-cancer therapy.

Keywords: neddylation, CRL E3 ligase, lung cancer, immune microenvironment, targeted therapy, inhibitors

doi: [10.1360/SSC-2025-0015](https://doi.org/10.1360/SSC-2025-0015)