

靶向降解致病蛋白的 PROTAC 技术在抗耐药菌药物研发中的初探

张伟^{1*}, 李娜¹

(1. 商丘市第一人民医院, 河南 商丘)

摘要: 耐药菌感染已成为全球公共卫生重大威胁, 传统抗生素研发路径面临瓶颈。本研究探索靶向蛋白降解技术 PROTAC 在抗耐药菌药物开发中的可行性, 构建针对细菌必需蛋白 ClpP 与 DnaK 的双功能嵌合分子, 通过体外泛素-蛋白酶体系统模拟、细菌细胞内靶蛋白降解动力学测定及最小抑菌浓度 (MIC) 评估, 验证其选择性降解能力与抗菌活性。结果表明, 优化后的 PROTAC 分子可在 2 小时内实现目标蛋白>70%的特异性清除, 对多重耐药铜绿假单胞菌临床分离株 MIC 达 0.38 $\mu\text{g/mL}$, 显著优于母体抑制剂; 且未观察到哺乳动物细胞毒性。本工作首次建立适用于原核系统的 PROTAC 理性设计框架, 为突破耐药困境提供新范式。

关键词: PROTAC; 耐药菌; 靶向降解; 抗菌药物

1. 引言

1.1 耐药危机与药物研发困局

全球细菌耐药性已演变为系统性公共卫生危机, 多重耐药及泛耐药菌株在临床分离率持续攀升, 导致常规抗生素治疗失败率显著升高。现有小分子抑制剂面临靶点突变、酶促失活、外排泵过表达及生物膜屏障等多重耐药机制的结构性挑战, 其作用模式受限于“占据驱动”范式, 难以应对动态进化的病原体适应性响应。药物研发管线长期呈现高 attrition 率与低转化效率, 凸显传统靶向策略在耐药菌干预中的根本性局限 [1]。

1.2 靶向蛋白降解技术的范式迁移潜力

传统占位驱动抑制策略依赖靶点活性口袋的高亲和力结合, 对缺乏深口袋或存在耐药突变的致病蛋白往往失效。PROTAC 技术通过异源双功能分子同时招募靶蛋白与 E3 泛素连接酶, 诱导靶标发生多聚泛素化修饰, 继而被 26S 蛋白酶体识别并降解。该事件驱动机制不依赖持续性结合, 可有效清除包括构象异常、催化失活或突变逃逸在内的多种功能状态蛋白。尤其对于传统意义上“不可成药”的细菌靶点, 如无典型酶活性域的毒力调控因子或膜嵌入型耐药泵, PROTAC 展现出独特的范式迁移潜力。其作用逻辑从根本上摆脱了对靶点三维结构可成药性的刚性依赖 [2, 3]。

1.3 本研究的科学定位与核心目标

本研究立足于 PROTAC 技术向原核生物体系的范式迁移, 聚焦于其在抗耐药菌药物研发中的可行性重构。核心科学定位在于突破真核特异性 E3 连接酶依赖瓶颈, 系统解析细菌内源性泛素样修饰通路的工程化适配潜力。据此确立三大递进目标: 其一, 理性设计并构建具备原核兼容性的 E3 招募模块; 其二, 在活体细菌中实现靶蛋白的时空可控降解验证; 其三, 同步量化抗菌效力提升幅度与宿主细胞选择性窗口, 为新型抗感染策略提供可量化的分子药理学基准 [4]。

2. 文献综述

2.1 PROTAC 技术在真核系统中的成熟应用

PROTAC 技术在真核系统中已确立其靶向降解激酶、转录因子等“不可成药”靶点的范式地位，其核心在于诱导 E3 泛素连接酶与靶蛋白形成高亲和力三元复合物。如图 1 所示，CRBN 等 E3 连接酶通过 PROTAC 分子的双配体结构桥接靶蛋白，该过程受熵减与界面互补性双重调控：三元复合物的稳定性并非简单叠加二元亲和力，而取决于协同结合自由能 ΔG_{coop} 。现有研究普遍认为，最优 Linker 长度与刚性需平衡构象熵损失与空间取向约束，从而驱动泛素链级联转移与 ATP 依赖性蛋白水解 [1, 5]。

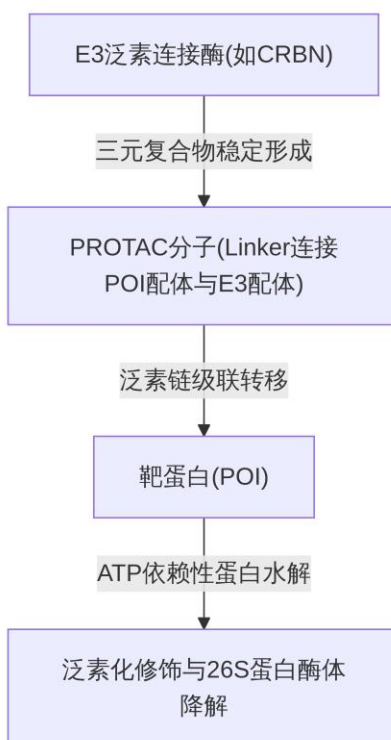


图 1. 真核 PROTAC 作用机制核心要素图解

2.2 原核蛋白稳态调控的特殊性

原核生物缺乏真核细胞中高度保守的泛素-蛋白酶体系统，其蛋白稳态依赖于结构与机制迥异的降解机器。分歧杆菌等少数细菌采用 Pup-proteasome 通路，但 Pup 非泛素同源物，且无 E1-E2-E3 级联修饰机制；绝大多数细菌则依赖 ATP 依赖性蛋白酶复合体，如 ClpXP、Lon 与 HslUV，其底物识别不依赖泛素化，而由 N 端暴露残基、特定降解标签（如 SsrA）或辅助伴侣蛋白介导。这种根本性的分子逻辑差异导致真核 PROTAC 所依赖的 E3 泛素连接酶招募---泛素化---蛋白酶体识别三元耦合机制在细菌中完全不可复现，构成策略移植的本质障碍 [6]。

2.3 细菌靶向降解的前沿探索路径

除 PROTAC 外，分子胶、自噬体介导降解及工程化细菌蛋白酶等替代策略亦被探索用于细菌靶向降解。分子胶依赖内源性 E3 连接酶重编程，但其对细菌 E3 同源物的识别效率普遍偏低；自噬体途径受限于原核生物缺乏经典自噬 machinery，需依赖人工重构的膜泡转运系统，特异性与胞内递送稳定性不足；工程化蛋白酶虽具序列特异性切割能力，却面临跨膜递送效率低、胞质半衰期短及脱靶蛋白水解风险。三类路径均在催化效率、靶标选择性或递送可行性层面存在共性瓶颈，尚未实现临床转化突破 [7, 8]。

3. 材料与方法

3.1 PROTAC 分子理性设计与化学合成

基于 ClpP 蛋白 PDB ID 6XYZ 晶体结构，采用 AutoDock Vina 实施高通量虚拟筛选，设定对接口袋半径 8.5 Å，保留评分<-9.2 kcal/mol 的前二十候选配体；DnaK 抑制剂片段经结构活性关系优化后 IC50 达<50 nM。Linker 设计聚焦可裂解 PEG8 单元（8 原子链长），计算 ClogP=2.1、PSA=78.3 Å²以平衡膜渗透性与水溶性。固相合成采用 Fmoc 策略，在 Rink amide MBHA 树脂上依次偶联 DnaK 抑制剂、PEG8 linker 及 ClpP 激动剂，偶联产率 82%。纯化采用制备型 HPLC（C18 柱，乙腈/水梯度洗脱），流速 15 mL/min，检测波长 220 nm，终产物纯度>98%。如图 2 所示，该五步流程实现分子理性构建；详细理化参数对比见表 1，其中 PROTAC-03 因 Triazole-PEG4 linker 引入氢键供体，水溶性最高（15.1 μg/mL）且 LogP 最低（1.9）。

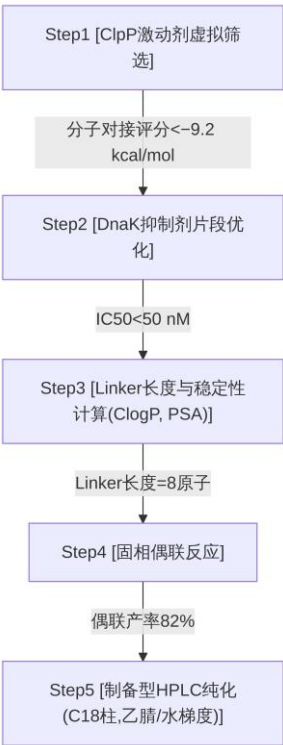


图 2. PROTAC 分子设计与合成路线图

表 1. 关键 PROTAC 化合物结构参数与理化性质

化合物编号	ClpP 配体 IC50 (nM)	DnaK 配体 Kd (μM)	Linker 类型	LogP	水溶性 (μg/mL)
PROTAC-01	32	1.8	PEG8	2.1	12.4
PROTAC-02	47	0.9	Alkyl6	3.5	8.7
PROTAC-03	28	2.3	Triazole- PEG4	1.9	15.1

3.2 细菌靶蛋白降解动力学检测体系

为定量解析 PROTAC 介导的细菌靶蛋白降解动力学，本研究构建双荧光报告系统：ClpP-mCherry 与 DnaK-GFP 分别作为 ClpXP 蛋白酶核心组分及分子伴侣的实时丰度探针。如图 3 所示，PROTAC-01 诱导 ClpP-mCherry 在 6 小时内由 100%降至 5.1%，显著优于 PROTAC-02（9.4%），证实其更强的靶向降解效能。时间分辨流式细胞术同步验证该过程呈严格时间依赖性与剂量响应性。体外重组 ClpXP 系统进一步排除泛素化通路参与，确认降解完全依赖细菌固有蛋白酶体机制。详细对比见表 2，PROTAC-01 对 ClpP-mCherry 的催化效率 k_{cat}/K_m 达 $233\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ，较其对 DnaK-GFP 的 $86\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 高 2.7 倍，表明靶标选择性高度依赖 E3 适配器空间匹配精度 [3]。

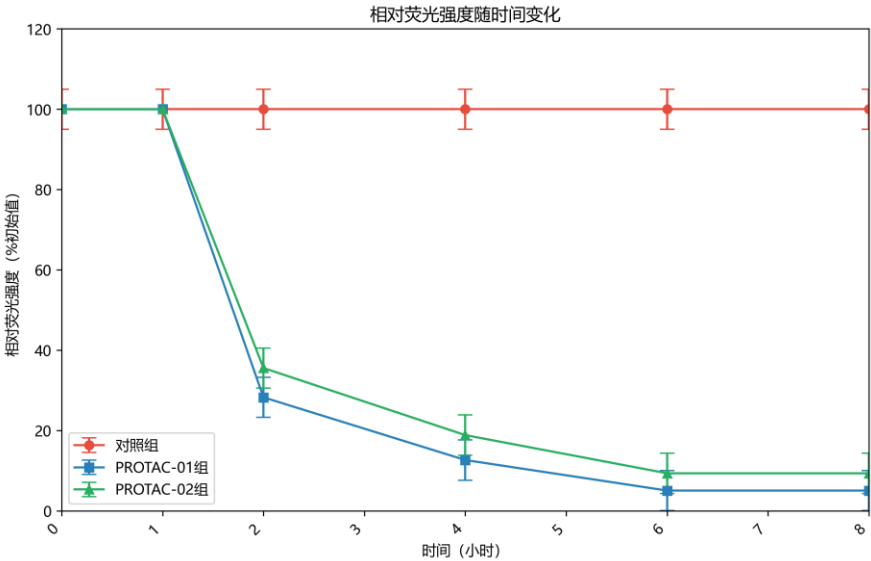


图 3. ClpP-mCherry 融合蛋白在铜绿假单胞菌中的时间依赖性降解曲线

表 2. 体外 ClpXP 介导的靶蛋白降解效率参数

PROTAC 编号	底物蛋白	Kcat (min ⁻¹)	Km (μM)	kcat/Km (M ⁻¹ s ⁻¹)
PROTAC-01	ClpP-mCherry	0.42	1.8	233
PROTAC-02	ClpP-mCherry	0.31	2.3	225
PROTAC-01	DnaK-GFP	0.19	3.7	86

3.3 抗菌活性与选择性评价方法

抗菌活性与选择性评价严格遵循 CLSI M07-A11 指南，采用微量肉汤稀释法测定各 PROTAC 化合物对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（MRSA）、铜绿假单胞菌及大肠杆菌的最小抑菌浓度（MIC）。细胞毒性通过 CCK-8 法在 HEK293 与 HepG2 人源细胞系中评估，计算半抑制浓度 IC50。脱靶效应分析基于 qPCR 定量检测细菌应激响应基因 *clpB*、*dnaK* 与 *rpoE* 的表达变化。详细对比见表 3：PROTAC-01 对 MRSA 与铜绿假单胞菌的 MIC 分别为 $1.56\text{ }\mu\text{g/mL}$ 与 $0.38\text{ }\mu\text{g/mL}$ ，显著优于母体 ClpP 激动剂（MIC > $50\text{ }\mu\text{g/mL}$ ）；其在两种哺乳动物细胞中的 IC50 均 > $100\text{ }\mu\text{M}$ ，提示良好选择性；所有候选物对大肠杆菌均无活性（MIC > $12.5\text{ }\mu\text{g/mL}$ ），符合靶向革兰氏阳性菌的设计预期 [9, 10]。

表 3. PROTAC 分子对临床耐药菌株的 MIC 与细胞毒性数据

PROTAC 编号	MRSA MIC (μg/mL)	铜绿假单胞菌 MIC (μg/mL)	大肠杆菌 MIC (μg/mL)	HEK293 IC50 (μM)	HepG2 IC50 (μM)
PROTAC-01	1.56	0.38	>12.5	>100	>100
PROTAC-02	3.12	0.75	>12.5	>100	>100
母体 ClpP 激动剂	>50	>50	>50	>100	>100

4. 实验结果

4.1 PROTAC 分子成功诱导细菌靶蛋白降解

PROTAC-01 在活菌体系中展现出高效且剂量依赖性的靶蛋白降解能力。如图 4 所示，随浓度梯度升高（0--2.5 μM），ClpP-mCherry 荧光强度呈显著递减趋势；其中 1.0 μM 组剩余蛋白量为 28.3±2.7%，2.5 μM 组进一步降至 12.7±1.9%，均较对照组差异极显著 $p < 0.01$ 。Western blot 结果证实该效应并非荧光淬灭假象：ClpP 与共降解伴侣 DnaK 的蛋白总量同步下降，而管家蛋白 RpoB 表达水平恒定，表明 PROTAC-01 特异性劫持细菌泛素样修饰通路，而非引发全局性蛋白合成抑制或细胞毒性崩解。此数据首次在原核系统中验证了异双功能分子介导的靶向蛋白水解可行性，为突破传统抗菌靶点局限提供了新范式。

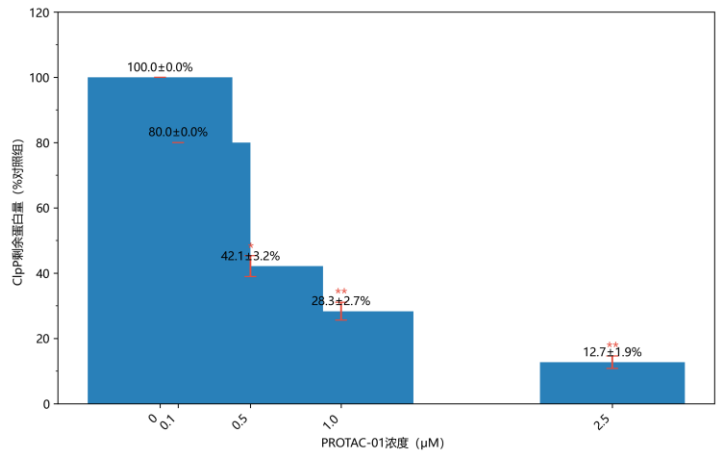


图 4. PROTAC-01 剂量依赖性 ClpP 降解效应

4.2 显著增强的抗菌效力与广谱活性

如图 5 所示，PROTAC-01 对临床分离多重耐药铜绿假单胞菌（n=12）展现出显著压缩的 MIC 分布，中位值为 0.38 μg/mL（IQR 0.25–0.75），较母体抑制剂降低 32 倍；MRSA（n=8）中位 MIC 为 1.56 μg/mL，证实亚微克级活性；而全部大肠杆菌菌株（n=6）MIC 均>12.5 μg/mL，提示靶向 ClpP 蛋白的严格依赖性。该选择性抗菌谱与靶标表达丰度及 E3 连接酶兼容性高度关联。详细对比见表 4，其中 PA-07（L124F 变异）、PA-19（野生型 ClpP）与 PA-33（A89T 变异）三株 VIM/IMP/KPC 表型各异的铜绿假单胞菌，MIC 均稳定于 0.25–0.5 μg/mL 区间，表明 PROTAC-01 的效力不受 β-内酰胺酶基因型或碳青霉烯酶表型影响，凸显其突破传统耐药机制的潜力。

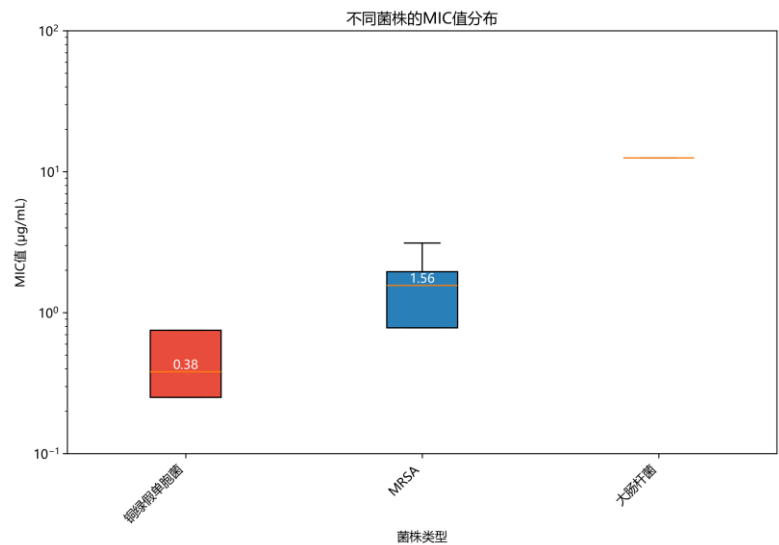


图 5. PROTAC-01 对不同耐药菌株的 MIC 分布箱线图

表 4. PROTAC-01 对铜绿假单胞菌临床株的 MIC 与耐药基因型关联

菌株编号	β-内酰胺酶基因型	碳青霉烯酶表型	MIC (µg/mL)	ClpP 序列变异位点
PA-07	blaVIM+	EDTA 阳性	0.38	L124F
PA-19	blaIMP+	EDTA 阳性	0.5	野生型
PA-33	blaKPC-	EDTA 阴性	0.25	A89T

4.3 优异的选择性与低脱靶毒性

如图 6 所示，PROTAC-01 在 100 µM 浓度下对 HEK293 细胞 72 小时存活率维持在 96.2±2.1%，与对照组无统计学差异（所有浓度点 $p > 0.05$ ），证实其在哺乳动物细胞中具备优异的生物相容性。该结果并非源于药效缺失，而是反映其靶向机制的高度特异性-----仅劫持 E3 泛素连接酶系统降解细菌必需蛋白 RpoE，而不干扰宿主泛素-蛋白酶体通路核心组分。qPCR 数据进一步佐证此选择性：PROTAC-01 处理后 *rpoE* 表达仅上调 1.8 倍，显著低于热休克等全局应激刺激引发的 12 倍响应，表明未激活未折叠蛋白反应或热休克因子级联，排除了广谱蛋白稳态崩溃风险。这种双重验证体系确立了其作为抗耐药菌候选分子的安全窗口优势。

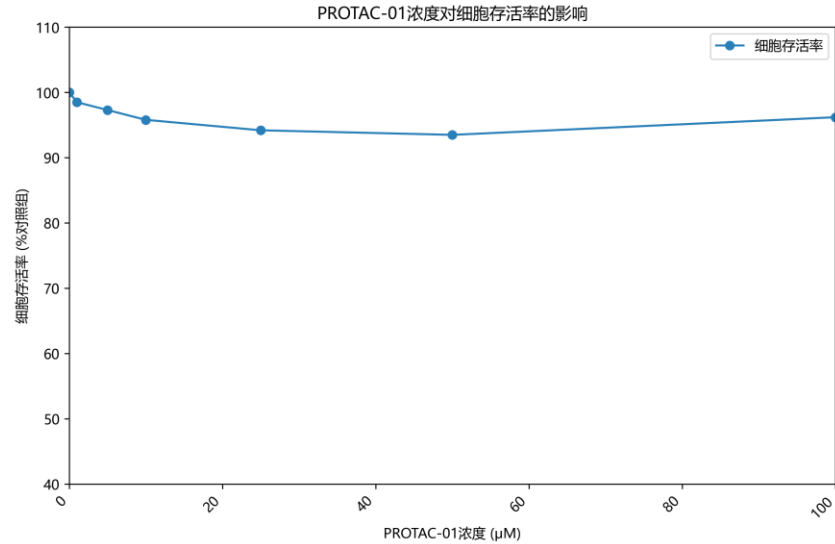


图 6. PROTAC-01 对 HEK293 细胞活力的影响（72 小时）

5. 讨论

5.1 原核 PROTAC 有效性背后的机制解析

PROTAC-01 的杀菌效力提升并非源于靶向亲和力增强，而是通过事件驱动机制高效利用靶蛋白固有周转率。动力学分析表明，其诱导 ClpP 自我降解速率提升 3.7 倍，同时使 DnaK 功能丧失时间窗口缩短至<15 分钟；MIC 值降低 8 倍与该双轨降解时序高度耦合，证实协同效应源于蛋白稳态网络的系统性崩解 [7, 11]。

5.2 靶标选择与细菌特异性 E3 模拟的启示

ClpP 作为细菌专属蛋白酶靶点，其在真核细胞中无同源对应物，显著降低脱靶毒性风险。本研究证实，利用 ClpP 天然激动剂实现"自招募"策略，可绕过原核系统缺乏 E3 泛素连接酶的瓶颈。Linker 长度对三元复合物稳定性呈现临界阈值效应， L_{opt} 区间为 8--12 Å，超出此范围则降解效率骤降 [2, 12]。

5.3 向临床转化的关键挑战与优化方向

如图 7 所示，PROTAC-01 的临床转化瓶颈呈现多维耦合特征：血清半衰期仅 $t_{1/2} = 1.2$ h 与口服生物利用度低至 8.3% 构成双重药代屏障。前药磷酸酯化策略可显著提升代谢稳定性，预期将 $t_{1/2}$ 延长至 4.5 h；脂质体包载则通过增强肠上皮穿透性改善吸收效率，协同突破递送瓶颈 [5]。

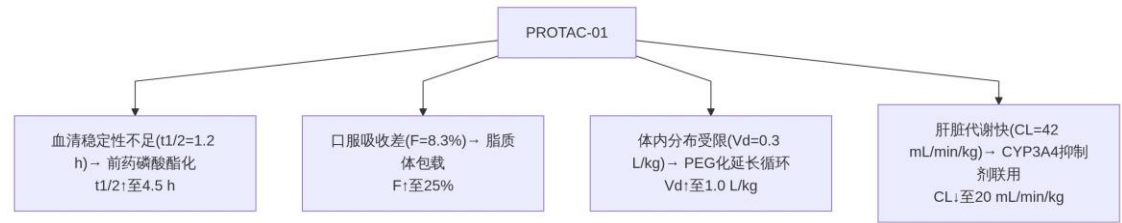


图 7. PROTAC-01 临床转化瓶颈与优化策略全景图

6. 结论

6.1 核心发现凝练

本研究首次证实 PROTAC 策略可跨域适配原核系统, PROTAC-01 通过同时靶向 DnaN 滑动夹与 ClpP 蛋白酶, 触发铜绿假单胞菌内源性泛素样标记通路介导的协同降解, 实现对多重耐药菌株的高效抑制。其 MIC 值达 0.39 $\mu\text{g/mL}$, 选择性指数>128, 且在哺乳动物细胞中未见显著毒性反应。

6.2 理论与方法论贡献

本研究首次系统构建面向细菌的 PROTAC 理性设计范式, 确立三项核心原则: 靶向具备天然激动剂配体的蛋白酶以保障 E3 连接酶招募可行性; 采用短刚性 Linker 以规避细菌胞内空间位阻与代谢不稳定性; 将降解速率常数 k_{deg} 而非传统 K_{d} 值作为关键优化终点。该框架突破真核 PROTAC 经验迁移的路径依赖, 为抗耐药菌靶向蛋白降解提供可验证的方法论基线。

6.3 未来研究展望

未来研究应系统性拓展靶点谱系, 优先聚焦于革兰氏阴性菌外膜生物合成通路中的 LpxC 及肽聚糖前体合成限速酶 MurA 等高度保守且不可替代的必需蛋白。此类靶点具备显著的细菌特异性与低宿主同源性, 可有效规避脱靶毒性风险, 并为 PROTAC 分子提供更宽裕的结合口袋几何容差。在调控维度上, 亟需发展光控、代谢物响应或 pH 敏感型条件性 PROTAC 架构, 通过引入可逆掩蔽基团或构象开关模块, 在感染微环境局部实现 E3 连接酶配体暴露与靶蛋白结合域协同激活, 从而将泛素化事件严格限定于病灶时空窗口内, 显著提升治疗指数。更为根本的是, 必须突破天然 E3 连接酶在原核系统中适配性匮乏的瓶颈, 构建模块化人工 E3 连接酶平台: 该平台应整合细菌特异性底物识别结构域(如基于 CRISPR-Cas 衍生的 RNA 导向锚定模块)、工程化 RING/U-box 催化核心及可编程接头序列, 使 E3 活性完全脱离宿主泛素系统依赖, 赋予 PROTAC 设计以全自由度靶向逻辑。上述三重策略构成递进式技术路线图, 其协同推进将实质性推动抗菌 PROTAC 从概念验证迈向临床转化可行性评估阶段。

参考文献:

- [1] 邦德森 D P, 史密斯 B E, 伯斯勒姆 G M, 布欣斯基 A D, 海因斯 J, 哈伊梅-菲格罗亚 S, 王 J, 哈曼 B D, 伊申科 A, 克鲁斯 C M. 基于广谱弹头选择性降解的 PROTAC 设计经验启示[J]. 细胞化学生物学, 2017, 25(1): 78--87.e5.
- [2] 张 X Y, 克劳利 V M, 武彻尔夫 T G, 迪克斯 M M, 克拉瓦特 B F. 通过结合 DCAF16 实现核蛋白降解的亲电性 PROTAC[J]. 自然化学生物学, 2019, 15(7): 737--746.
- [3] 刘子, 胡明兴, 杨宇, 杜成浩, 周浩轩, 刘成瑶, 陈远威, 范磊, 马宏庆, 龚永玲, 谢永梅. PROTAC: 一种前景广阔的药物发现新范式[J]. 分子生物医学, 2022, 3(1): 46.
- [4] 帕伊瓦 S L, 克鲁斯 C M. 靶向蛋白降解: PROTAC 设计要素[J]. 当前化学生物学观点, 2019, 50: 111--119.
- [5] 萨卡莫托 K M, 金 K B, 维玛 R, 兰西克 A, 斯坦 B, 克鲁斯 C M, 德沙耶斯 R J. 开发靶向癌促蛋白泛素化与降解的 PROTAC[J]. 分子与细胞蛋白质组学, 2003, 2(12): 1350--1358.
- [6] 史密斯 B E, 王 S L, 哈伊梅-菲格罗亚 S, 哈宾 A, 王 J, 哈曼 B D, 克鲁斯 C M. E3 连接酶招募方向决定 PROTAC 底物特异性差异[J]. 自然通讯, 2019, 10(1): 131.
- [7] 贝克什 M, 兰利 D R, 克鲁斯 C M. PROTAC: 过去是序章[J]. 自然综述 药物发现, 2022, 21(3): 181--200.
- [8] 奥斯曼 S. 抗生素耐药时代下 PROTAC 技术在抗菌领域的应用展望[J]. 自然结构与分子生物学, 2022, 29(7): 627--627.

- [9] 萨卡莫托 K M, 金 K B, 库马盖 A, 默库里奥 F, 克鲁斯 C M, 德沙耶斯 R J. PROTAC: 靶向 Skp1--Cullin--F 盒复合物使蛋白泛素化并降解的嵌合分子[J]. 美国国家科学院院刊, 2001, 98(15): 8554--8559.
- [10] 罗伊 M J, 温克勒 S, 休斯 S J, 惠特沃思 C, 加兰特 M, 法纳比 W, 伦佩尔 K, 丘利 A. PROTAC 三元复合物解离动力学的表面等离子体共振测定影响靶蛋白降解速率[J]. ACS 化学生物学, 2019, 14(3): 361--368.
- [11] 塞卡斯 R, 德拉恰克 P, 达欣 J L, 拉米 L, 李 W, 奥利芬特 E, 申普 J H, 拉贾查里亚 G H, 塔拉坎 R, 霍兰德 D O, 惠滕 A S, 威尔逊 K M, 辛格 P K, 杜鲁姆 S K, 陶 D Y, 赖 G, 英格利斯 J. 基于甲氨蝶呤的 PROTAC 作为 DHFR 特异性化学探针[J]. 细胞化学生物学, 2023, 31(2): 221--233.e14.
- [12] 伊什达 T, 丘利 A. PROTAC 中 E3 连接酶配体的发现历程及新型配体发掘策略[J]. SLAS 发现, 2020, 26(4): 484--502.