

DOI: 10.13376/j.cbls/20230006

文章编号: 1004-0374(2023)06-0816-08

· 技术与应用 ·

# 化学蛋白质组学技术在药物靶标鉴定中的应用

张美婷, 丁 明\*

(中国药科大学生命科学与技术学院, 南京 210009)

**摘要:** 药物开发过程面临多重挑战, 而靶标确证是其中的重要一环。如何运用多种研究方法发现和确认小分子药物的靶标是目前研究人员的主要工作内容之一。化学蛋白质组学整合了细胞生物学、合成化学和生物质谱等多门学科, 为药物的靶标筛选提供了新平台。本文对近年来发展的基于生物质谱的化学蛋白质组学药物靶标鉴定技术进行了总结, 结合具体应用分析其优缺点, 并对该类技术的发展和應用进行总结和展望。

**关键词:** 化学蛋白质组学; 药物靶标鉴定; ABPP; DARTS; SPROX; CETSA

**中图分类号:** Q503 **文献标志码:** A

## Application of chemoproteomics in drug target identification

ZHANG Mei-Ting, DING Ming\*

(School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

**Abstract:** The drug development process faces multiple challenges, and target validation is an important part. How to use a variety of research methods to discover and confirm the targets of small molecule drugs is one of the main tasks of researchers at present. Chemoproteomics is an integration of cell biology, synthetic chemistry and biomass spectroscopy, which provides a new platform for drug target screening. In this paper, we review the development of chemoproteomic drug target identification technology based on biomass spectrum in recent years, analyze its advantages and disadvantages combined with specific applications. We also summarize and prospect the development and application of this technology.

**Key words:** chemoproteomics; drug targets identification; ABPP; DARTS; SPROX; CETSA

人类使用药物来预防和治疗疾病已经有数千年的历史, 药物进入体内后作用于特定分子靶标, 从而调节疾病表型以达到相应治疗效果。目前上市的药物中有 95% 以上的靶分子为蛋白质, 其中以受体蛋白、酶、离子通道蛋白、转运蛋白为主<sup>[1]</sup>。然而, 当药物研发进入临床试验后, 会有 90% 的候选药物面临失败。其中, 靶点验证不足、疗效缺乏以及由于脱靶等问题导致的毒副作用是失败的主要原因<sup>[2]</sup>。因此, 在现代药物研发过程中, 靶标的确证至关重要, 这就需要在整体和动态网络水平上对药物靶点进行更加全面且深入的认知。

传统的仅对单个蛋白质进行研究的模式已无法满足现代药物研究的需求, 因此衍生出了一系列新

的学科和技术。蛋白质组学 (proteomics) 是以生物体内基因组表达的所有蛋白质以及这些蛋白质的存在方式为研究对象的一门科学。随着蛋白质组学技术的出现, 与其相关的各个科学领域 (如疾病诊断、个性化医疗、人工智能等) 近年来都在迅速发展, 组学技术的优势日益明显。化学蛋白质组学 (chemoproteomics) 则是蛋白质组学的一个重要分支, 该学科整合了细胞生物学、合成化学和生物质谱等多门学科, 为药物的靶标鉴定及机制研究提供了良好的平台。

收稿日期: 2023-01-07; 修回日期: 2023-02-08

\*通信作者: E-mail: mingding@cpu.edu.cn

## 1 化学蛋白质组学概念

化学蛋白质组学相较于蛋白质组学而言, 通常在实验中涉及一种药物或潜在药物分子, 这就是“化学蛋白质组学”一词的由来。它是一种以发现为驱动的蛋白质组学技术, 通过表征化合物与蛋白质之间的相互作用来评估靶点结合、作用机制和(或)非特异性脱靶情况。该技术通常适用于各个物种(动物、植物、微生物)的大多数类型的细胞及组织, 甚至能够用于监测动物体内的靶标特异性、药物的转运和激活以及剂量依赖性的靶点结合情况, 从而辅助确定临床有效剂量范围。得益于日益发展的高分辨质谱技术和生物信息学分析, 化学蛋白质组学技术具有系统性、高通量、高精度等特点, 因此被研究人员广泛地应用于药物的靶点识别。此外, 由于许多疾病都与翻译后修饰或蛋白质-蛋白质相互作用的变化有关, 而这两者在一定情况下都会对蛋白质活性或功能产生影响, 化学蛋白质组学也越来越多地被用于评估疾病状态下蛋白质功能的差异, 从而鉴定生物标志物, 甚至是疾病治疗的潜在靶点<sup>[3]</sup>。

## 2 化学蛋白质组学研究方法及应用

### 2.1 基于活性的蛋白质谱分析(activity-based protein profiling, ABPP)

#### 2.1.1 ABPP技术简介

ABPP 是化学蛋白质组学最成功的例子之一, 最早由美国 Scripps 研究所 Cravatt 小组发明<sup>[4-5]</sup>。该技术通过将基于活性的小分子化学探针(activity-based probes, ABP; 通常作用于酶的活性中心)与细胞或组织裂解液进行孵育, 能够同时报告整个蛋白质组范围内结构和(或)功能相关的酶的状态, 结合生物质谱及生物信息技术, 可得到高精度的药

物与细胞靶蛋白结合模型, 是经典蛋白质组学与功能蛋白质组学间的重要过渡桥梁。ABPP 实验流程如图 1 所示。

ABP 主要由两部分组成: 与蛋白质直接结合的反应基团(reactive group)和用于富集/分析的报告基团(reporter group), 两者通常通过聚乙二醇或碳链连接在一起。反应基团一般为亲电基团, 可以与含有高活性亲核基团(丝氨酸、苏氨酸和半胱氨酸残基)的蛋白质形成共价复合物, 从而“抓住”靶点。对于通过以非共价结合方式与靶蛋白进行相互作用的活性小分子, 在设计探针时则需额外引入一个光交联基团(如双吡丙啶、二氮嗪和芳香叠氮化物)将两者间的相互作用转化为共价键。报告基团负责将反应基团“抓住”的靶点从蛋白质组中“钓”出来。报告基团主要有两大类: 一类是荧光基团(荧光素、罗丹明和 Cy3/Cy5 等), 当被探针标记的蛋白质组通过聚丙烯酰胺凝胶分离时, 靶蛋白会发出荧光信号, 便于检测和后续鉴定; 另一类是生物素或炔基基团, 用于特异性富集和分离靶蛋白。随着生物正交反应技术的发展, 炔基基团正在被广泛应用<sup>[6]</sup>。该基团不仅可以极大地减小整个分子探针的空间位阻, 也简化了探针的合成步骤。目前已有的 ABP 主要分为两大类: (1) 靶向特定蛋白质家族, 如蛋白激酶、HDAC 家族、水解酶、P450 酶系、去泛素酶和磷酸酶等; (2) 靶向蛋白质序列中的几种活泼氨基酸残基, 如丝氨酸、赖氨酸、组氨酸、半胱氨酸、天冬氨酸和甲硫氨酸等。ABP 结构示意图如图 2 所示。

ABPP 技术解决了传统靶标发现方法(如亲和色谱纯化)的一些弊端, 过程简单, 无需对目标化合物进行固定化。但此方法需要配体的详细结构活

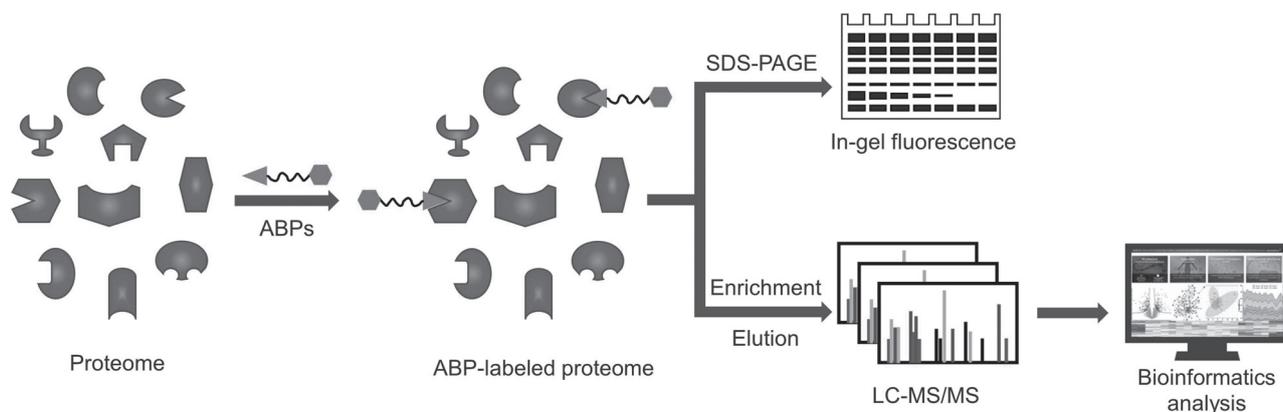


图1 ABPP实验流程示意图

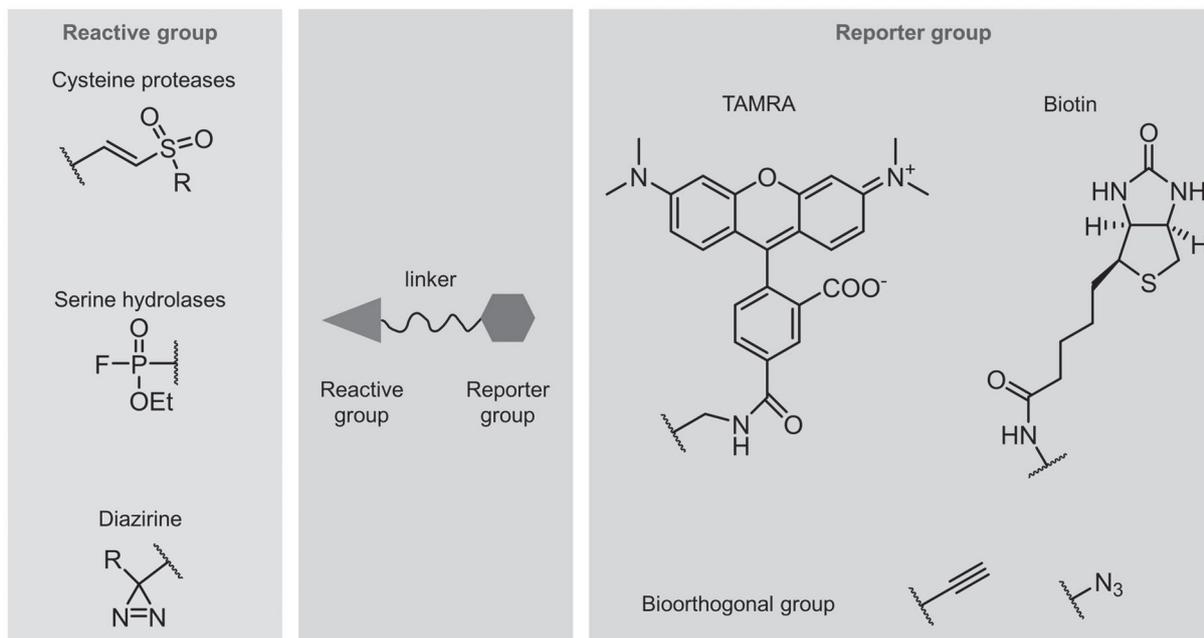


图2 ABP结构示意图及示例

性信息, 针对配体结构逐一设计探针。该过程不仅费力耗时, 并且还可能改变药物本身的性质, 而且有些小分子化合物无法进行化学修饰, 因此该方法存在一定的局限性。

### 2.1.2 ABPP技术在药物靶标鉴定中的应用

随着质谱及定量标记技术不断地发展, 针对多种类型蛋白质家族的 ABP 的设计合成不断成熟, ABPP 已经被广泛应用于生命科学的诸多领域分支, 成为新药研发过程中的重要工具。中医药是中华民族瑰宝, 在人类千百年来的与疾病的斗争中发挥着重要作用。然而, 天然产物一般具有多成分、多靶点和多功能等特点, 通常情况下无法确定其发挥药效的具体靶标蛋白, 限制了进一步的临床应用。苏木酮对小胶质细胞的激活有明显的抑制作用, 然而其具体的药理靶标尚未阐明。Liao 等<sup>[7]</sup>利用 ABPP 技术分别合成报告基团为 Biotin 和 Cy3 的两种探针, 结合稳定同位素标记技术 (stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC), 鉴定出肌苷单磷酸脱氢酶 2 (inosine monophosphate dehydrogenase 2, IMPDH2) 的 Cys-140 为苏木酮的特异性结合靶点。作者通过进一步实验发现, 苏木酮与 IMPDH2 的 Cys-140 位点结合后导致该酶发生变构, 从而封闭 IMPDH2 的催化口袋, 导致其失活, 进而有效抑制神经炎症反应。此外, 许多天然产物中的著名成分如青蒿素<sup>[8]</sup>和黄芩苷<sup>[9]</sup>等也通过此技术鉴定出相应的靶蛋白。

Lanning 等<sup>[10]</sup>通过 ABPP 结合定量质谱策略, 对人类癌细胞中共价激酶抑制剂靶向的蛋白质组进行了全面深入的分析。研究发现, 包括已批准的药物在内的共价激酶抑制剂都有明确但有限的浓度窗口以实现选择性抑制靶蛋白, 一旦超出该范围就会出现脱靶效应以及与靶标激酶无关的细胞毒性。富马酸二甲酯 (dimethyl fumarate, DMF) 是一种治疗多发性硬化症的处方药, 也可用于治疗银屑病。Zaro 等<sup>[11]</sup>利用同位素标记串联正交水解酶 - 活性蛋白表达谱 (isotopic tandem orthogonal proteolysis-ABPP, isoTOP-ABPP) 分析鉴定到白介素 -1 受体相关激酶 4 (interleukin-1 receptor-associated kinase 4, IRAK4) 的 Cys-13 是 DMF 的主要细胞靶点。作者进一步研究发现, DMF 以 Cys-13 依赖的方式阻断 IRAK4-MyD88 之间的相互作用, 从而抑制 IRAK4 介导的细胞因子产生及 IFN- $\alpha$  通路, 最终减缓自身免疫性疾病的发生。该研究成功揭示了 DMF 作为抑制自身免疫性疾病药物的分子机制, 为更好地寻找该类疾病的靶点提供了数据支持。Zhuang 等<sup>[12]</sup>设计合成了多种基于胆汁酸 (bile acid, BA) 结构的光交联探针并将其应用于稳定同位素氨基酸标记培养的活细胞中, 共鉴定到 600 多种高可信度的 BA 相互作用蛋白。该研究数据为理解胆汁酸在人体生理和病理过程中的调节作用提供了宝贵的资源。光反应基团 (photoreactive group) 使化学家们能够利用光笼 (photocage) 激活生物学功能<sup>[13]</sup>, 该类探针在活细胞

超高分辨荧光成像<sup>[14]</sup>以及药物高时空分辨精准递送<sup>[15-16]</sup>中均有广泛应用。

除了蛋白质, 基于探针的化学蛋白质组学方法也可以用于分析各种生物大分子的相互作用, 如脂质、DNA 和 RNA<sup>[17]</sup>。Cravatt 课题组报道了一组基于脂质的化学蛋白质组探针及其在哺乳动物细胞中的相互作用图谱<sup>[18]</sup>。每个探针在常见的脂肪酸基团(花生四烯酸、油酸、棕榈酸和硬脂酸)的基础上都加上了双吡啶光敏基团和炔基基团。该研究数据表明, 脂质探针可富集和鉴定数百种脂质结合蛋白, 通过对蛋白质位点具体分析, 可确定影响脂质的药物靶点或脱靶情况。此外, 该团队具体示例证明脂质探针还可用于高通量筛选脂质结合蛋白的小分子配体。C-糖苷类天然产物 polycarcin V 在 365~450 nm 光照下可与 DNA 中的胸腺嘧啶发生加成反应, 而且该反应不依赖于 DNA 序列。Yue 等<sup>[19]</sup>利用该化合物此特点, 在其原有结构上引入双吡啶和炔基基团, 将其开发成一种光控 DNA-蛋白质双功能化学交联探针。利用该探针, 作者表征了 DNA 损伤状态下与其发生相互作用的蛋白质组, 为发现新的 DNA 损伤应答元件提供线索。在真核细胞中, RNA 可以单独存在, 也可以和蛋白质结合形成复合体, 从而发挥作用。光反应性核糖核苷类似物 4-thiouridine 和 6-thioguanosine 能够掺入到新生成的 RNA 中, 在 365 nm 紫外光照射下, 可与其结合蛋白发生交联反应, 之后在变性条件下通过 oligo(dT) beads 将 RNA-蛋白质复合体沉淀分离。Baltz Alexander 等<sup>[20]</sup>通过这一策略在 HEK293 细胞中鉴定到将近 800 种 RNA 结合蛋白, 近三分之一为首次发现, 为 RNA-蛋白质相互作用提供了全新的视角。

## 2.2 药物亲和响应的靶标稳定性技术(drug affinity responsive target stability, DARTS)

### 2.2.1 DARTS技术简介

2009 年, Lomenick 等<sup>[21]</sup>最早提出 DARTS 这一概念。20 世纪 60 年代, 有研究人员发现蛋白质与小分子配体结合后构象稳定性会增强, 对蛋白酶的抵抗能力也增强<sup>[22]</sup>。DARTS 技术正是利用此现象, 结合质谱及其他技术, 通过确定经小分子化合物孵育和蛋白酶水解后的样品中含量发生变化的蛋白质, 实现在复杂多样的环境中鉴定药物靶点。由于该方法不需要对药物进行修饰并且不依赖于药物活性, 因此可以被广泛地应用于小分子化合物的靶标筛选及验证。与此原理相似, 一种近年发明的有

限蛋白水解质谱技术 (limited proteolysis-coupled mass spectrometry, LIP-MS) 也可以通过蛋白酶解产生的肽段来反映化合物存在时的蛋白质折叠情况<sup>[23]</sup>。

DARTS 技术中常用的蛋白酶主要有三种: 枯草杆菌蛋白酶、嗜热菌蛋白酶和链霉菌蛋白酶<sup>[24]</sup>。枯草杆菌蛋白酶的成分较为复杂, 蛋白水解活性较强, 反应需在碱性条件下进行; 嗜热菌蛋白酶只能切割非折叠状态的蛋白质多肽链, 导致假阳性率提高; 链霉菌蛋白酶则可以对折叠/非折叠状态蛋白质或多肽链中的谷氨酸和天冬氨酸羧基侧链进行特异性切割, 且在中性条件下即有较强的酶活性, 因此通常被广泛应用于 DARTS 实验。

在 DARTS 实验中, 为了在对照组和实验组中观察到明显的结合蛋白质差异, 需要最大程度地降解无关蛋白质, 保留结合蛋白质, 因此其对实验条件的要求较高, 蛋白酶的选择、浓度和酶解时间以及细胞裂解液和缓冲液的选择至关重要。此外, 该技术对较低丰度的蛋白质检测及膜蛋白的研究具有一定的挑战性。

### 2.2.2 DARTS技术在药物靶标鉴定中的应用

在过去的十几年中, DARTS 技术被成功应用于多种类型药物的靶标发现。人参的主要有效成分人参皂甙在中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 中表现出良好的生物活性, 但人参皂甙在脑组织中的靶点尚未明确。Chen 等<sup>[25]</sup>利用基于质谱的 DARTS 技术在大鼠脑组织中筛选可能与人参皂苷发生相互作用的蛋白质, 后续通过生物膜干涉技术、等温滴定量热技术及分子锚定模拟, 最终鉴定并确认腺苷酸激酶 5 (adenylate kinase 5, AK5) 是人参皂苷的靶蛋白, 该研究结果为人参在中枢神经系统中的生物活性分子机制提供了初步的认识。

Hwang 等<sup>[26]</sup>通过 DARTS 技术结合免疫印迹方法揭示, 抗抑郁药物舍曲林 (sertraline) 通过与 VDAC1 蛋白发生相互作用, 调控 AMPK-mTOR 信号通路介导的自噬, 从而发挥相应生物学功能。

Hu 等<sup>[27]</sup>为了在美国食品和药品监督管理局 (FDA) 批准的非抗癌药物中发现新的抗癌功能, 并确定其在结直肠癌中的潜在治疗靶标, 筛选了一个包含 1056 种 FDA 批准的非抗癌上市药物库。DARTS 实验表明, 抗过敏药物氮卓斯汀 (azelastine) 与 ADP-核糖基化因子 1 (ADP-ribosylation factor 1, ARF1) 有直接相互作用, 通过直接靶向 ARF1, 与其 Thr-48 位点结合并抑制其活性, 进而抑制 IQGAP1-ERK-Drp1 信号通路介导的线粒体分裂, 最终抑制结直肠

癌的发生。

### 2.3 基于氧化速率的蛋白质稳定性测定(stability of proteins from rates of oxidation, SPROX)

#### 2.3.1 SPROX技术简介

SPROX 是另一种无需化学修饰的药物靶标鉴定技术。蛋白质与小分子化合物结合后会变得更加稳定,不易被化学变性剂(例如尿素和盐酸胍)诱导而发生变性(去折叠),此时蛋白质上的甲硫氨酸残基不容易被过氧化氢( $H_2O_2$ )氧化。甲硫氨酸在天然蛋白质氨基酸序列中含量较低,约为2%<sup>[28]</sup>,但几乎所有蛋白质序列中至少含有一个甲硫氨酸,甲硫氨酸残基的氧化情况反映了蛋白质的稳定性变化。在小分子配体缺失或存在的情况下,分别对复杂样品中含有氧化态甲硫氨酸和非氧化态甲硫氨酸的肽段进行定量,即可对甲硫氨酸残基的氧化速率进行分析,从而确定药物的靶蛋白或脱靶蛋白。

SPROX 技术的常规流程是:首先,在小分子化合物缺失或存在的条件下,向细胞裂解液中加入不同浓度的变性剂缓冲液,使蛋白质达到展开/再折叠平衡;之后,加入 $H_2O_2$ 氧化甲硫氨酸残基,待反应结束后,用过量的过氧化氢酶或甲硫氨酸对 $H_2O_2$ 进行淬灭;然后,采用不同类型的质谱技术对样品中含有甲硫氨酸的肽段进行定量;最后,经过数据分析,依据化学变性曲线转移中点( $\Delta$ Transition point)的偏移确定潜在靶标。

SPROX 的优点是能够通过转移中点的变化进行定量分析,局限性在于靶蛋白序列中必须含有甲硫氨酸,化合物浓度需求较大,并且需要绘制标准曲线。

#### 2.3.2 SPROX技术在药物靶标鉴定中的应用

2008年,West等<sup>[29]</sup>首次报道在四种模型蛋白质上获得的SPROX结果,包括泛素、核糖核酸酶A(RNaseA)、亲环素A(cyclophilin A, CypA)和牛碳酸酐酶II(bovine carbonic anhydrase II, BCA II),并将该结果所得的 $\Delta G(f)$ 和 $m$ 值与使用当时更成熟的技术(如圆二色谱)所得的结果相比较,发现两种方法所得实验结果具有一致性。此外,该团队还利用SPROX技术确定了这几种模型蛋白质与已知配体的解离常数。

Ogburn等<sup>[30]</sup>通过使用SPROX技术结合两种不同的定量蛋白质组学策略,即SILAC和串联质谱标签(tandem mass tags, TMT)定量标记,在人乳腺癌细胞系MCF-7中发现了他莫昔芬(tamoxifen)的靶蛋白Y-box结合蛋白1(Y-box binding protein

1, YBX1)。此外,作者还发现,几乎所有高可信度靶蛋白与乳腺癌的发生发展相关,近三分之一的高可信度靶蛋白之前已通过实验被证实与雌激素受体有联系,进一步佐证了该技术的准确性和可靠性。

Geer等<sup>[31]</sup>使用SPROX方法在酿酒酵母细胞裂解液中鉴定到28种蛋白质被不可水解的ATP类似物亚胺二磷酸腺苷(adenylyl imidodiphosphate, AMP-PNP)诱导发生热力学稳定性变化,其中14种蛋白质在酿酒酵母基因组数据库(*Saccharomyces* Genome Database, SGD)中被注释为ATP结合蛋白,其余14种未注释蛋白中有9种在之前的SILAC-SPROX实验中表现出对ATP敏感。而后作者对他们的研究结果和早期SILAC-SPROX实验所得ATP结合蛋白进行生物信息学分析发现,先前注释的ATP结合蛋白均为激酶、连接酶和伴侣分子,相比之下,许多新发现的对ATP敏感的蛋白质并不属于这些类别,而是水解酶、氧化还原酶和核酸结合蛋白。该工作为研究ATP相互作用蛋白提供了新见解。

### 2.4 细胞热迁移检测(cellular thermal shift assay, CETSA)

#### 2.4.1 CETSA技术简介

2013年,瑞典Karolinska研究所的Pär Nordlund课题组<sup>[32]</sup>最早开发了这一方法。该方法的基本原理是配体结合可介导靶蛋白热稳定性增加。随着温度的升高,蛋白质逐渐变性,结构展开,暴露疏水核心,进而发生聚集沉淀。但是,与小分子化合物结合而变得更加稳定的靶蛋白对热诱导的沉淀具有更高的抵抗力。经高速离心可将可溶性上清与蛋白质聚集体分离,之后结合质谱及定量标记技术,通过比较药物缺失或存在的样品在高温下的可溶性蛋白质的丰度差异来确定靶蛋白。该课题组验证了一组重要临床靶点(CDK2、CDK6、BRAF和MetAP2)的药物结合情况,并监测了癌细胞系中药物转运和激活代谢的过程,解释了脱靶效应和耐药性的产生。

该技术可以在活细胞或组织水平检测小分子药物与靶蛋白的结合,也可以检测活体给药后的组织样本,有效地减少假阳性结果,为药物的靶标确认提供了客观有效的方法。但此方法不适用于高度不均一的蛋白质或配体结合域的展开不促进聚集的蛋白质,另外对与化合物结合前后热熔曲线无显著变化的靶蛋白也不适用。

#### 2.4.2 CETSA技术在药物靶标鉴定中的应用

疟疾是由热带和亚热带地区疟原虫属原生物

引起的一种流行传播疾病, 然而目前对绝大多数用于临床的抗疟疾药物的作用机制的了解仍处于初级阶段。Dzikan 等<sup>[33]</sup>通过一种广谱半胱氨酸蛋白酶抑制剂 E64d (在恶性疟原虫中有几种已知靶标) 确证 CETSA 方法可直接用于在恶性疟原虫细胞中鉴定抗疟疾化合物的靶标蛋白。之后作者研究了两种重要的抗疟疾药物奎宁和甲氟喹, 结果显示两种药物均与疟原虫细胞中的嘌呤核苷磷酸化酶 (purine nucleoside phosphorylase, PfPNP) 结合并抑制其酶活性, 而且奎宁与 PfPNP 有更高的亲和力, 为其治疗效果明显提供了部分解释, 证明对疟原虫实施 MS-CETSA 是阐明现有和潜在抗疟疾药物作用机制的有力工具。

Perrin 等<sup>[34]</sup>在 CETSA 的基础上进行了组织热蛋白质组分析 (tissue thermal-shift assay, tissue-TTP), 用于检测小分子药物治疗的动物组织样品中蛋白质热稳定性的变化。他们报告了蛋白质组范围内器官特异性的热稳定图谱, 并得出了大鼠肺、肝、脾和肾中非共价组蛋白去乙酰化酶抑制剂 panobinostat 和小鼠睾丸中 B-Raf 抑制剂 vemurafenib 的靶标情况, 有助于进一步阐明药物在体内的作用机制。此外, 该组研究人员还成功将 CETSA 和 TPP 应用于血液样品中, 直接检测全血中 panobinostat 和 BET 家族抑制剂 JQ1 的靶向和脱靶情况。

### 2.5 其他

2020 年, 中国科学院大连化学物理研究所叶明亮课题组<sup>[35]</sup>提出一种新的基于能量的化学蛋白质组学药物靶标发现策略——有机溶剂介导的蛋白质沉淀法 (solvent-induced protein precipitation, SIP)。该团队利用结合了药物的靶蛋白更不易被有机溶剂变性沉淀这一性质, 成功鉴定到三种模型药物甲氨蝶呤 (methotrexate, MTX)、CDK 选择性抑制剂 SNS-032 和星形孢菌素 (staurosporine) 的已知靶点; 此外, 作者还发现 NDUFV1 是 Hsp90 特异性抑制剂 geldan- amycin 的新靶标。该方法与前述靶标发现方法互为补充, 操作简单, 由于实验试剂为丙酮、乙醇和乙酸等常用化学试剂, 因此适用于大多数实验室。

2022 年, Zhang 等<sup>[36]</sup>利用药物结合后的靶蛋白具有更高稳定性, 能够对酸性试剂引起的蛋白质沉淀有更高的耐受性这一原理, 又发展了药物免修饰的药物靶标鉴定方法——pH 依赖的蛋白质沉淀法 (pH-dependent protein precipitation, pHDPP)。实验表明, pHDPP 适用于多种类型的配体, 包括叶酸

衍生物、ATP 类似物、细胞周期蛋白抑制剂和免疫抑制剂, 证明了该方法的稳健可行性。作者还以广谱激酶抑制剂为模型药物, 证明了该方法的灵敏度以及与 CETSA、SIP 方法的互补性; 在该研究中, 作者鉴定到了 45 个双氢青蒿素 (dihydroartemisinin, DHA) 的潜在靶点。

### 3 总结与展望

药物开发面临多重挑战, 基于机制的药物发现的成功取决于药物靶点的确定; 同时, 对分子、细胞和生理过程的深入研究已经确定了大量蛋白质作为潜在的药物靶点。因此, 迫切需要加快药物开发的方法。

20 世纪 90 年代起, 得益于基因组革命的到来, 化学生物学科也在迅速发展, 大大增强了人们对来自同基因家族蛋白质的了解。而后蛋白质组学的出现与发展, 为探索针对蛋白质特定功能而设计的化学探针奠定了基础。随着多种学科和技术的交叉融合, 化学蛋白质组学技术应运而生。Cravatt 团队首先提出 ABPP 概念, 并将其应用于小分子药物靶标的发现。此外, 一些基于蛋白质结构稳定性的无化学修饰靶标鉴定技术 (如 DARTS、SPROX 和 CETSA 等) 作为 ABPP 的补充方法也得到了快速发展, 该类方法可方便快速地确定药物靶标。上述几种方法互为补充, 极大地促进了化合物向临床药物的开发。文中所述方法的优缺点及具体应用总结见表 1。James Black 曾说过: “新药发现的最佳之路起始于老药”, 即 “老药新用”。所以, 化学蛋白质组学技术也可助力药物的再利用。在适当的情况下, 对靶向药物机制作用的深入理解可为药物发现、临床试验和克服耐药性提供信息<sup>[37]</sup>。

尽管本文描述了许多进展和成功案例, 但由于成本和所需的专业知识, 蛋白质组学分析对药物发现的影响仍然受到质谱技术的限制。我们认为, 随着基于质谱的蛋白质组学越来越被认为是阐明疾病发生机制和监测药物作用的强大和通用工具<sup>[38-39]</sup>, 而且目前可用的仪器、软件及工作流程也已经相当成熟, 并且变得更加系统稳健, 上述情况正在发生改变。

由于蛋白质可能会继续占据药物靶标的绝大部分, 这种化学蛋白质组学策略仍将是未来数十年主流药物发现的重要手段。可以期待, 随着未来科学技术的发展以及多学科的进一步交叉融合, 小分子药物靶标的发现将会迈向更高的层次。

表1 几种化学蛋白质组学技术的优缺点及具体应用

名称	优点	缺点	参考文献
ABPP	无需固定化合物, 适用广泛 不局限于寻找化合物相互作用蛋白	需针对化合物逐一设计探针 可能影响药物本身性质 不适用无法进行修饰的化合物	[7-12]
DARTS	不需对化合物进行修饰 原理简单, 操作流程少	不适用低丰度蛋白质、膜蛋白及水解酶抗性蛋白质 需预先测试水解酶的浓度和时间	[21, 25-27]
SPROX	不需对化合物进行化学修饰 药物介导的靶蛋白热力学变化呈剂量依赖性(可进行定量分析)	靶蛋白序列中必须含有甲硫氨酸 需要绘制标准曲线 对化合物浓度需求较高	[29-31]
CETSA	可在细胞、组织水平上进行 Western blot检测方法具有高度特异性	不适用于高度不均一或配体结合域展开不促进聚集的蛋白质 不适用化合物结合前后热焓曲线无显著变化的靶蛋白	[32-34]

## 参 考 文 献

- [1] Santos R, Ursu O, Gaulton A, et al. A comprehensive map of molecular drug targets. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16: 19-34
- [2] Sun D, Gao W, Hu H, et al. Why 90% of clinical drug development fails and how to improve it? *Acta Pharm Sin B*, 2022, 12: 3049-62
- [3] Jones LH, Neubert H. Clinical chemoproteomics--opportunities and obstacles. *Sci Transl Med*, 2017, 9: eaaf7951
- [4] Cravatt BF, Wright AT, Kozarich JW. Activity-based protein profiling: from enzyme chemistry to proteomic chemistry. *Annu Rev Biochem*, 2008, 77: 383-414
- [5] Liu Y, Patricelli MP, Cravatt BF, et al. Activity-based protein profiling: the serine hydrolases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96: 14694-9
- [6] McKay CS, Finn MG. Click chemistry in complex mixtures: bioorthogonal bioconjugation. *Chem Biol*, 2014, 21: 1075-101
- [7] Liao LX, Song XM, Wang LC, et al. Highly selective inhibition of IMPDH2 provides the basis of antineuroinflammation therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114: E5986-94
- [8] Wang J, Zhang CJ, Chia WN, et al. Haem-activated promiscuous targeting of artemisinin in *Plasmodium falciparum*. *Nat Commun*, 2015, 6: 10111
- [9] Dai J, Liang K, Zhao S, et al. Chemoproteomics reveals baicalin activates hepatic CPT1 to ameliorate diet-induced obesity and hepatic steatosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115: E5896-905
- [10] Lanning BR, Whitby LR, Dix MM, et al. A road map to evaluate the proteome-wide selectivity of covalent kinase inhibitors. *Nat Chem Biol*, 2014, 10: 760-7
- [11] Zaro BW, Vinogradova EV, Lazar DC, et al. Dimethyl fumarate disrupts human innate immune signaling by targeting the IRAK4-MyD88 complex. *J Immunol*, 2019, 202: 2737-46
- [12] Zhuang S, Li Q, Cai L, et al. Chemoproteomic profiling of bile acid interacting proteins. *ACS Cent Sci*, 2017, 3: 501-9
- [13] Mangubat-Medina AE, Ball ZT. Triggering biological processes: methods and applications of photocaged peptides and proteins. *Chem Soc Rev*, 2021, 50: 10403-21
- [14] Loredó A, Tang J, Wang L, et al. Tetrazine as a general phototrigger to turn on fluorophores. *Chem Sci*, 2020, 11: 4410-5
- [15] Chen Z, Ke R, Song Z, et al. A novel photocaged B-Raf (V600E) inhibitor toward precise melanoma treatment. *Bioorg Med Chem Lett*, 2022, 64: 128683
- [16] Zhang Y, Yan C, Zheng Q, et al. Harnessing hypoxia-dependent cyanine photocages for *in vivo* precision drug release. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2021, 60: 9553-61
- [17] Castello A, Hentze MW, Preiss T. Metabolic enzymes enjoying new partnerships as RNA-binding proteins. *Trends Endocrinol Metab*, 2015, 26: 746-57
- [18] Niphakis MJ, Lum KM, Cognetta AB, et al. A global map of lipid-binding proteins and their ligandability in cells. *Cell*, 2015, 161: 1668-80
- [19] Yue Z, Wu F, Guo F, et al. Polycarcin V induces DNA-damage response and enables the profiling of DNA-binding proteins. *Natl Sci Rev*, 2022, 9: nwac046
- [20] Baltz Alexander G, Munschauer M, Schwanhäusser B, et al. The mRNA-bound proteome and its global occupancy profile on protein-coding transcripts. *Mol Cell*, 2012, 46: 674-90
- [21] Lomenick B, Hao R, Jonai N, et al. Target identification using drug affinity responsive target stability (DARTS). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 22: 21984-9
- [22] Markus G, McClintock DK, Castellani BA. Ligand-stabilized conformations in serum albumin. *J Biol Chem*, 1967, 242: 4402-8
- [23] Pepelnjak M, de Souza N, Picotti P. Detecting protein-small molecule interactions using limited proteolysis-mass spectrometry (LiP-MS). *Trends Biochem Sci*, 2020, 45: 919-20
- [24] Lomenick B, Jung G, Wohlschlegel JA, et al. Target identification using drug affinity responsive target stability (DARTS). *Curr Protoc Chem Biol*, 2011, 3: 163-80
- [25] Chen F, Li C, Cao H, et al. Identification of adenylylate kinase 5 as a protein target of ginsenosides in brain tissues using mass spectrometry-based drug affinity responsive target stability (DARTS) and cellular thermal shift assay (CETSA) techniques. *J Agric Food Chem*, 2022, 70:

- 2741-51
- [26] Hwang HY, Shim JS, Kim D, et al. Antidepressant drug sertraline modulates AMPK-MTOR signaling-mediated autophagy via targeting mitochondrial VDAC1 protein. *Autophagy*, 2021, 17: 2783-99
- [27] Hu HF, Xu WW, Li YJ, et al. Anti-allergic drug azelastine suppresses colon tumorigenesis by directly targeting ARF1 to inhibit IQGAP1-ERK-Drp1-mediated mitochondrial fission. *Theranostics*, 2021, 11: 1828-44
- [28] Baud F, Karlin S. Measures of residue density in protein structures. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96: 12494-9
- [29] West GM, Tang L, Fitzgerald MC. Thermodynamic analysis of protein stability and ligand binding using a chemical modification- and mass spectrometry-based strategy. *Anal Chem*, 2008, 80: 4175-85
- [30] Ogburn RN, Jin L, Meng H, et al. Discovery of tamoxifen and N-desmethyl tamoxifen protein targets in MCF-7 cells using large-scale protein folding and stability measurements. *J Proteome Res*, 2017, 16: 4073-85
- [31] Geer MA, Fitzgerald MC. Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* ATP-interactome using iTRAQ-SPROX technique. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2016, 27: 233-43
- [32] Martinez Molina D, Jafari R, Ignatushchenko M, et al. Monitoring drug target engagement in cells and tissues using the cellular thermal shift assay. *Science*, 2013, 341: 84-7
- [33] Dziekan JM, Yu H, Chen D, et al. Identifying purine nucleoside phosphorylase as the target of quinine using cellular thermal shift assay. *Sci Transl Med*, 2019, 11: eaau3174
- [34] Perrin J, Werner T, Kurzawa N, et al. Identifying drug targets in tissues and whole blood with thermal-shift profiling. *Nat Biotechnol*, 2020, 38: 303-8
- [35] Zhang X, Wang Q, Li Y, et al. Solvent-induced protein precipitation for drug target discovery on the proteomic scale. *Anal Chem*, 2020, 92: 1363-71
- [36] Zhang X, Wang K, Wu S, et al. Highly effective identification of drug targets at the proteome level by pH-dependent protein precipitation. *Chem Sci*, 2022, 13: 12403-18
- [37] Meissner F, Geddes-McAlister J, Mann M, et al. The emerging role of mass spectrometry-based proteomics in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 2022, 21: 637-54
- [38] Kuzmanov U, Wang EY, Vanderlaan R, et al. Mapping signalling perturbations in myocardial fibrosis via the integrative phosphoproteomic profiling of tissue from diverse sources. *Nat Biomed Eng*, 2020, 4: 889-900
- [39] Krug K, Jaehnig EJ, Satpathy S, et al. Proteogenomic landscape of breast cancer tumorigenesis and targeted therapy. *Cell*, 2020, 183: 1436-56.e31