

# 基于液相色谱-串联质谱技术鉴定药物靶标的研究进展

金金, 梁旭俊, 毕武, 张鹏飞\*

(中南大学 湘雅医院 肿瘤科 国家卫健委肿瘤蛋白质组学重点实验室, 中国湖南 长沙 410008)

**摘要:** 药物靶标是指细胞、组织或器官的特殊结构, 它能与药物相互作用, 促使药物发挥疗效。全面识别药物靶标对了解药物的作用机制及其潜在的副作用至关重要。目前, 应用广泛的药物靶标识别和鉴定技术, 如基于活性的蛋白质分析(activity-based protein profiling, ABPP)、以化合物为中心的化学蛋白质组学(compound-centric chemical proteomics, CCCP), 需要对化合物小分子进行修饰, 这可能会降低甚至改变药物分子的活性。因此, 无需对药物分子进行化学修饰的技术, 如药物亲和反应的靶标稳定(drug affinity responsive target stability, DARTS)、细胞热位移分析(cellular thermal shift assay, CETSA)和热蛋白质组分析(thermal proteome profiling, TPP), 逐渐成为药物靶标研究的重要手段。液相色谱-串联质谱技术是鉴定药物靶标蛋白的重要工具。本文综述了基于液相色谱-串联质谱技术的药物靶标研究方法的应用, 并对药物靶标鉴定技术的未来发展进行了展望。  
**关键词:** 液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS); 靶标; 基于活性的蛋白质分析(ABPP); 以化合物为中心的化学蛋白质组学(CCCP); 药物亲和反应的靶标稳定(DARTS); 细胞热位移分析(CETSA); 热蛋白质组分析(TPP)

中图分类号: O657.63, Q81, R96

文献标志码: A

文章编号: 1007-7847(2023)03-0275-08

## Advances in the Identification of Drug Targets Based on Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

JIN Jin, LIANG Xujun, BI Wu, ZHANG Pengfei\*

(National Health Commission Key Laboratory of Cancer Proteomics, Department of Oncology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan, China)

**Abstract:** A drug target is a specific structure in a cell, tissue or organ that interacts with a drug to make it work. Comprehensive identification of drug targets is essential to understanding the mechanism of action of drugs and their potential side effects. Currently, widely used drug target identification and validation techniques, such as activity-based protein profiling (ABPP), compound-centric chemical proteomics (CCCP), require the modification of small-molecule compounds, which may reduce or alter the activity of drug molecules. Therefore, advanced techniques that do not require chemical modification of drug molecules, such as drug affinity responsive target stability (DARTS), cellular thermal shift assay (CETSA), and thermal proteome profiling (TPP), are becoming important tools for drug target research. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) is a powerful tool for identification of drug target proteins. This paper reviewed drug target research techniques based on LC-MS/MS and future development of drug target identification.

**Key words:** liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS); target; activity-based protein profiling (ABPP); compound-centric chemical proteomics (CCCP); drug affinity responsive target stability (DARTS); cellular thermal shift assay (CETSA); thermal proteome profiling (TPP)

(Life Science Research, 2023, 27(3): 275-282)

收稿日期: 2022-08-06; 修回日期: 2022-10-25; 网络首发日期: 2022-12-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(82073008); 湖南省重点研发计划项目(2020SK2071); 湖南省自然科学基金项目(2020JJ4924); 中南大学大型仪器设备共享基金项目(CSUZC202247)

作者简介: 金金(1996-), 女, 河南驻马店人, 硕士研究生, 主要从事抗肿瘤药物研究; \*通信作者: 张鹏飞(1969-), 男, 湖南娄底人, 博士, 中南大学教授, 主要从事新型抗癌药物研发和靶标鉴定, Tel: 0731-84327239, E-mail: zhangpf690421@csu.edu.cn.

蛋白质是生命活动的主要承担者。药物靶标大部分是蛋白质, 药物分子与其结合, 通过促进或抑制某种代谢通路来治愈或缓解疾病, 从而减轻人类痛苦, 促进社会健康发展。识别并鉴定药物靶标能够清楚了解药物作用机制, 从而优化药物结构, 减少药物副作用, 促进新药研发工作的开展<sup>[1-3]</sup>。

随着基因组学、转录组学和蛋白质组学的蓬勃发展, 药物靶标发现技术不断更新。液相色谱(liquid chromatography, LC)和质谱(mass spectrometry, MS)联用技术具有高通量、高选择和高灵敏度的优势, 在药物发现和研发中发挥重要作用<sup>[4]</sup>。基于液相色谱-串联质谱(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)的药物靶标识别与鉴定技术能够对细胞和组织中的蛋白质进行全面、灵敏及定量的分析, 从而发现蛋白质丰度、周转和翻译后修饰在干扰或疾病情况下的变化<sup>[5]</sup>。典型的基于 LC-MS/MS 的药物靶标识别与鉴定技术的主要实验流程为: 样品制备、LC-MS/MS 检测、数据分析等。目前, 识别与鉴定化合物分子的靶标技术不断涌现, 各具优势, 在生物医学领域发挥重要作用<sup>[6]</sup>。本文将研究药物靶标识别和鉴定的技术主要分为两种, 即需要对化合物分子进行修饰的标记法和无需对化合物进行修饰的非标记法, 前者主要有基于活性的蛋白质分析(activity-based protein profiling, ABPP)和以化合物为中心的化学蛋白质组学(compound-centric chemical proteomics, CCCP), 后者包括药物亲和反应的靶标稳定(drug affinity responsive target stability, DARTS)、细胞热位移分析(cellular thermal shift assay, CETSA)和热蛋白质组分析(thermal proteome profiling, TPP)。本文将介绍这些技术的原理、优势和各自的局限性, 以及它们与 LC-MS/MS 技术联用在药物靶标鉴定中的应用。

## 1 标记法

### 1.1 CCCP

#### 1.1.1 CCCP 的原理和优缺点

CCCP 专注于药物与靶标蛋白的亲合力结合, 其中化合物和蛋白质之间的共价连接不是必不可少的。其操作步骤如下: 首先, 将具有生物活性的化合物修饰在用于固定化的基质(比如琼脂糖凝胶、树脂)上, 这一步骤的关键是在不影响药物生物活性的情况下合成必要的药物-基质连接物; 其次, 将亲和基质与蛋白质裂解物或组织提取物共孵育, 以拉下发生特异性结合的蛋白质; 再次, 对靶标蛋白进行洗脱、纯化、富集并通过染色显示; 最后, 采用 LC-MS/MS 技术进行鉴定(图 1)<sup>[7]</sup>。

CCCP 可以快速富集大量靶标蛋白, 但是由于固定化化合物的基质材料寻找困难、大多数被修饰的药物分子的生物活性受到影响, 以及靶标蛋白在细胞提取物中的溶解性不确定, 目前很少使用。

#### 1.1.2 CCCP 的应用

为研究姜黄素的潜在细胞内靶标, 评估这种天然化合物的生物学作用和副作用, Firouzi 等<sup>[8]</sup>将姜黄素固定于环氧活化-琼脂糖凝胶 6-B 上, 以 1 mol/L 乙醇胺(pH 11)与环氧活化-琼脂糖凝胶 6-B 孵育, 制备对照组, 利用 MS/MS, 在小鼠脑组织中首次鉴定出数十种姜黄素的潜在靶标蛋白, 发现姜黄素可以同参与抗氧化、糖酵解和代谢活性的蛋白质进行物理相互作用, 发挥其抗癌的药理作用。同时, 该项研究表明姜黄素可以作为脑癌化学预防和治疗适应症的潜在候选者, 因为它可以通过血脑屏障。

### 1.2 ABPP

#### 1.2.1 ABPP 的原理和优缺点

ABPP 是一种基于反应性化学探针的化学蛋白质组学方法, 可以发现小分子配体靶向的蛋白

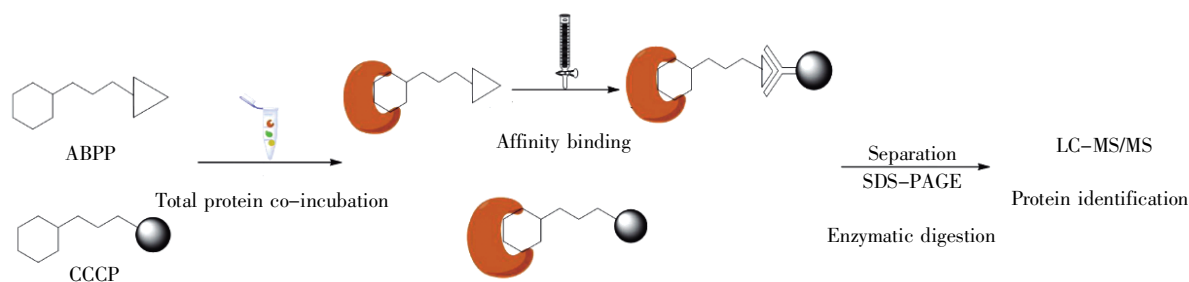


图 1 CCCP 和 ABPP 应用于蛋白质鉴定的实验流程<sup>[7]</sup>  
Fig.1 CCCP and ABPP for protein identification<sup>[7]</sup>

质或蛋白质组范围内的位点。ABPP 最初由 Cravatt 和 Bogoy 开创, 起源于活性位点定向化学探针, 可用于各种酶类, 包括水解酶、蛋白激酶等<sup>[9-12]</sup>。ABPP 探针包含 3 种分子元素: 1) 活性基团; 2) 报告基团(标签); 3) 结合基团。活性基团用于结合或共价修饰一个或多个酶类中许多成员的活性位点。报告基团用于快速检测和分离可能标记的酶, 如生物素和/或荧光团。结合基团用于将活性基团引导到蛋白质组中的不同酶活性位点<sup>[13]</sup>。

根据活性小分子与靶标蛋白作用方式的不同, ABPP 可分为基于活性的分析与基于亲和性的分析。基于活性的探针(activity-based probe, ABP)是能够直接标记其靶标蛋白的亲核氨基酸位点(如半胱氨酸、赖氨酸、丝氨酸、酪氨酸)的共价抑制剂, 这些位点通常富集在催化位点、翻译后修饰位点、蛋白质-蛋白质相互作用位点、金属结合位点、变构结合口袋或其他结合模式中<sup>[14-20]</sup>。基于亲和性的探针是非共价抑制剂, 因此需要额外的光反应基团在紫外光照射时形成共价键。光反应基团能够响应紫外光照射并产生高反应性中间体, 这使得非共价相互作用能够原位转化为稳定的共价配合物<sup>[21]</sup>。稳定的探针-蛋白质共价复合物产生后, 可以利用报告基团对其进行检测或富集和洗脱, 从而实现探针标记的蛋白质组学分析<sup>[22]</sup>。

ABPP 是目前使用非常广泛并发展快速的一种用于研究化合物靶标蛋白的方法。但是, 设计不影响化合物活性和进入细胞不受阻的 ABP 需

要专业的化学知识; 而且, ABP 与非特异性杂蛋白的结合严重影响实验结果, 通常蛋白质丰度较低或者 ABP 结合力较弱的靶标蛋白难以被检测到。

### 1.2.2 ABPP 的应用

ABPP 可用于识别和鉴定现有药物的未知靶点。达沙替尼是一种多靶点激酶抑制剂, 其靶点包括 BCR-ABL、SRC 家族激酶和各种癌症激酶。为阐明达沙替尼在胃癌治疗中的作用机制, Choi 等<sup>[23]</sup>利用不同的胃癌细胞系, 使用去硫代生物素-ATP 探针, 通过 LC-MS/MS 进行了靶标蛋白分析(图 2), 在达沙替尼敏感细胞系(SNU-216 和 MKN-1)和耐药细胞系(SNU-484 和 SNU-601)中分别鉴定出 29 个和 18 个可作为潜在靶点的激酶。

ABPP 也可以用来研究与细菌相关的靶标蛋白, 是抗菌药物研发的重要工具。一线抗生素通过抑制细菌菌膜的生物合成导致细胞快速死亡。 $\beta$ -内酯可阻断菌膜生物合成所必需的丝氨酸水解酶。EZ120 是一种具有强效抗分枝杆菌和杀菌活性的 $\beta$ -内酯药物。研究人员利用 ABPP 方法合成了 EZ120 探针, LC-MS/MS 实验结果显示 Pks13 和 Ag85 丝氨酸水解酶是 EZ120 的主要靶标。而且, EZ120 具有较低的最小抑制浓度和最低杀菌浓度, 对人体细胞毒性低, 具有良好的菌膜穿透性<sup>[24-26]</sup>。

此外, ABPP 在研究与病毒相关的靶标蛋白、揭示病毒作用机制以促进抗病毒药物研发方面也发挥重要作用。新型冠状病毒感染(corona virus

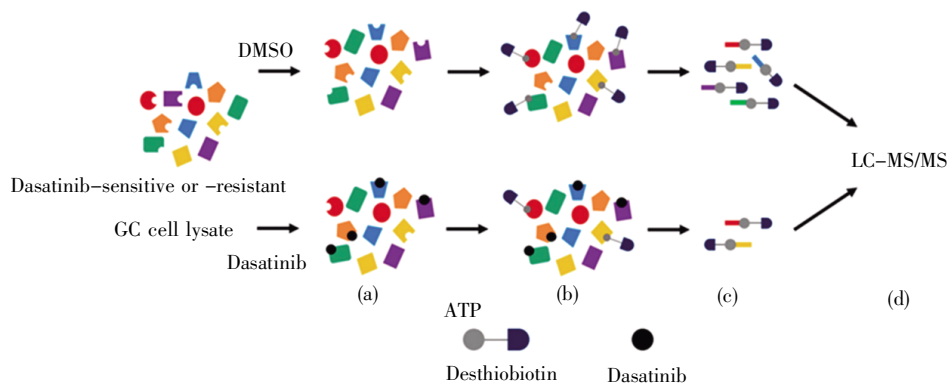


图 2 通过基于 ATP 探针的 ABPP 在胃癌细胞中进行达沙替尼靶标分析的工作流程

将来自达沙替尼敏感(MKN-1 和 SNU-216)和耐药性(SNU-484 和 SNU-601)胃癌细胞系的细胞裂解物用载体对照二甲亚砜(DMSO)或 10  $\mu\text{mol/L}$  达沙替尼预孵育(a), 然后与去硫代生物素-ATP 探针反应(b)。随后, 胰蛋白酶消化细胞裂解物, 并通过链霉亲和素琼脂糖珠纯化标记的肽(c)。最后, 采用 LC-MS/MS 分析探针标记的肽(d)<sup>[23]</sup>。

### Fig.2 Workflow for dasatinib target profiling via ATP probe-based ABPP in gastric cancer cells

Cell lysates from dasatinib-sensitive (MKN-1 and SNU-216) and -resistant (SNU-484 and SNU-601) gastric cancer (GC) cell lines were preincubated with vehicle control dimethyl sulfoxide (DMSO) or 10  $\mu\text{mol/L}$  dasatinib (a), then reacted with desthiobiotin-ATP probe (b). Subsequently, cell lysates were digested with trypsin and labeled peptides were purified by streptavidin agarose beads (c). Finally, probe-labeled peptides were analyzed by LC-MS/MS (d)<sup>[23]</sup>.

disease 2019, COVID-19)是全球性的流行病, 严重威胁人类健康和寿命, 影响世界经济和社会发展。抗病毒药物替诺福韦和索非布韦被建议用于治疗 COVID-19<sup>[27-29]</sup>。然而, 这两种前药在肺部激活的潜在机制仍然没有定论。Li 等<sup>[30]</sup>使用 ABPP 和 LC-MS/MS 分析方法, 利用人肺和人肝的 S9 组分与纯化的酶对替诺福韦和索非布韦的水解作用进行了评估。结果表明, 替诺福韦在人肺 S9 中的水解率是索非布韦的近 4 倍; 在人肺和原代人气道上皮细胞中, 组织蛋白酶 A 对羧酸酯酶 1 的相对蛋白质丰度明显高于其在人肝和原代人肝细胞中的相对蛋白质丰度, 提示替诺福韦对组织蛋白酶 A 介导的水解高度敏感, 从而导致替诺福韦在人肺内高效水解, 后期在设计治疗呼吸道病毒感染的抗病毒酯类前体药物时, 组织蛋白酶 A 可以用作靶标激活酶。

传统的蛋白质标记探针, 如生物素、荧光基团等, 普遍存在降低蛋白质活性、对极性变化不够敏感等缺点<sup>[31-32]</sup>, 会影响药物靶标的识别和鉴定。因此, 无需对化合物进行修饰的非标记法显得至关重要。目前已经有很多研究应用了无需对化合物进行修饰的药物靶标识别和鉴定技术。

## 2 非标记法

### 2.1 DARTS

#### 2.1.1 DARTS 的原理和优缺点

鉴定小分子药物分子靶标(有益或副作用)是一项重要的挑战。基于以下几个熟悉的概念: 与转录因子结合的 DNA 位点具有 DNA 酶抗性; 与

天然配体(如 DNA 和碳水化合物)相互作用的蛋白质免受蛋白酶消化等<sup>[33-35]</sup>, 2009 年, Lomenick 等<sup>[36]</sup>开发了一种 DARTS 技术, 该技术利用了药物结合时靶标蛋白的蛋白酶敏感性降低的原理, 可以用来进行药物研发和药物靶标鉴定。DARTS 技术的一般操作流程(图 3)如下: 1) 收集细胞并裂解; 2) 获得蛋白质混合物; 3) 药物与蛋白质共孵育; 4) 蛋白质水解; 5) 凝胶电泳; 6) 收集目标蛋白质凝胶条带; 7) 利用 LC-MS/MS 技术进行蛋白质鉴定; 8) 验证靶标蛋白<sup>[37]</sup>。

DARTS 的普适性强, 因为它不需要对药物进行化学修饰, 且独立于药物作用的机制。同时, DARTS 操作简单, 效率高, 可以快速直接鉴定任何小分子的直接结合靶标。此外, 该技术无需纯化大量蛋白质, 甚至可以使用细胞裂解液。但是, 体内蛋白质的稳定性复杂, 在很大程度上是不可预测的; 而且, 药物结合既可增加又可降低有些靶标蛋白的蛋白质水解敏感性, 同时药物结合还可能会改变非靶向蛋白的蛋白酶敏感性等<sup>[38-41]</sup>。

#### 2.1.2 DARTS 的应用

无标记的 DARTS 技术与高分辨率的质谱联用, 既可以鉴定和验证化合物的靶标, 又能简化药物发现的一般流程。Kim 等<sup>[42]</sup>首先通过姜黄素和其已知靶标氨肽酶 N 验证了无标记的 DARTS 和 MS 联用策略的可行性, 然后使用该策略研究了抗血管生成小分子伏康京碱的作用模式, 在血管内皮细胞中鉴定出伏康京碱具有抗血管生成特性的靶标蛋白血管内皮生长因子受体 2。Tian 等<sup>[43]</sup>通过将 DARTS 与 LC-MS/MS 技术相结合, 使用

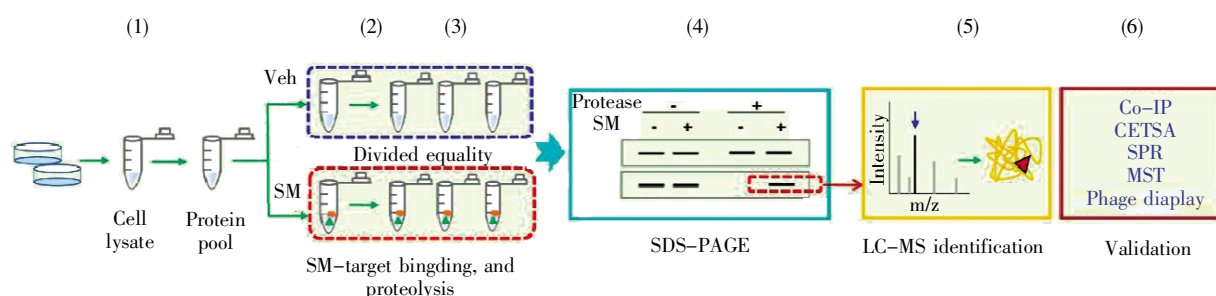


图 3 DARTS 的一般流程

(1) 收集细胞裂解物以制备蛋白质库; (2) 孵育含和不含小分子的蛋白质; (3) 用不同剂量的蛋白酶进行蛋白质水解; (4) 用 SDS-PAGE 分离消化后的片段; (5) 收集靶标蛋白的凝胶条带, 用于 LC-MS 分析; (6) 鉴定和进一步验证靶标蛋白<sup>[37]</sup>。Veh: 载体对照; SM: 小分子物质。

Fig.3 General protocol of DARTS

(1) Cell lysate collection for preparing the protein pool; (2) Incubation of proteins with and without SM; (3) Proteolysis with various amounts of protease; (4) Separation of digested fragments with SDS-PAGE; (5) Collection of target protein bands for LC-MS analysis; (6) Identification and further validation of target proteins<sup>[37]</sup>. Veh: Vehicle; SM: Small molecule.

四面体 DNA 纳米结构(tetrahedral DNA nanostructure, TDN)与细胞裂解物的混合物鉴定了 TDN 内吞作用的候选靶标蛋白,发现 TDN 与 10 种内吞途径相关蛋白质密切相关。该方法为应用和分析 DNA 纳米结构的细胞内化过程提供了通用策略。

## 2.2 CETSA 和 TPP

### 2.2.1 CETSA 和 TPP 的原理与优缺点

药物治疗的有效性取决于药物与其靶标的结合,而药物副作用是指药物与靶标的过度结合,或者与非靶标的结合,即脱靶。由于无法监测细胞内药物与靶标的结合,所以优化药物分子结构以促进药物研发非常具有挑战性。2013 年, Molina 等<sup>[44]</sup>开发了一种评估药物与细胞或组织样品中的靶标蛋白结合的方法,即 CETSA。CETSA 是基于配体诱导的靶标蛋白热稳定的生物物理原理,即当靶标蛋白与药物分子结合时,靶标蛋白的熔化温度升高(热稳定),这样靶标蛋白仍可在溶液部分被检测到。为研究药物浓度效应, Molina 等<sup>[44]</sup>还设计了一个等温剂量-反应指纹(isothermal dose-response fingerprint, ITDRF<sub>CETSA</sub>)程序:在温度和加热时间保持恒定的情况下,将裂解液等分暴露于不同浓度的药物。ITDRF<sub>CETSA</sub> 可用来估计达到相似的靶标作用程度所需的药物浓度的相对差异。

CETSA 技术灵敏度不高,检测通量不足。为解决新药研发中的两个关键问题:靶标和脱靶识别,以及发现验证药物疗效的分子生物标志物,2014 年, Savitski 等<sup>[45]</sup>通过将 CETSA 方法与多重定量质谱结合开发了 TPP 技术,也叫 MS-CETSA,建立了完整细胞中蛋白质组范围内蛋白质热稳定性的测定方法。TPP 可以直接监测细胞或组织中蛋白质与配体的相互作用,因为理论上,蛋白质的任何修饰都会影响其热稳定性<sup>[46]</sup>。CETSA 和 MS-CETSA 主要包括以下步骤(图 4): 1) 样品制备; 2) 药物处理; 3) 加热反应; 4) 蛋白质提取; 5) 蛋白质鉴定; 6) 数据处理<sup>[47]</sup>。

CETSA 或 MS-CETSA 是一种无标记的方法,即不需要化学修饰,减少了合成特殊药物探针所需的时间和成本,可监测完整细胞或裂解物中化合物处理时蛋白质热稳定性的变化。改变蛋白质熔点的化合物可被认为是正在研究的蛋白质的结合剂。虽然 CETSA 能够验证已知靶标,但它缺乏检测意外靶标的潜力。TPP 能够以公正的方式识别活细胞中药物的直接和间接靶标,而且灵敏度和检测通量高。但是,蛋白质的(去)稳定性可能不

是由化合物直接结合引起的,而是通过化合物间接发生。并且,某些靶标不会因与配体相互作用而稳定,或者在较高温度下相互作用丢失,这样会掩盖结合事件,导致假阴性。此外,化合物与纯化蛋白质的结合并不能视为该化合物作为靶标的可靠预测指标,在这一过程中,化合物的细胞通透性以及许多其他因素,如靶标与其他蛋白质和辅因子的相互作用,都起着重要的作用。

### 2.2.2 CETSA 和 TPP 的应用

自 2013 年 Molina 等发明 CETSA 技术以来,研究者陆续将 CETSA 应用到药物的研发工作中。Ceder 等<sup>[48]</sup>使用突变 p53 再激活化合物 APR-246 (Eprentapopt/PRIMA-1Met)的活性产物亚甲基奎宁环酮(methylene quinuclidinone, MQ)处理细胞,然后利用 CETSA 和 LC-MS/MS 技术进行实验,结果显示天冬酰胺合成酶(asparagine synthetase, ASNS)是 MQ 处理后热稳定的五大蛋白质之一,表明 MQ 与 ASNS 直接互相作用或间接影响。此外,天冬酰胺酶和 APR-246 联合处理可协同抑制急性淋巴细胞白血病细胞系的生长。该研究结果为急性淋巴细胞白血病提供了一种潜在的新治疗策略。Dziekan 等<sup>[49]</sup>采用 CETSA 和 LC-MS/MS 技术对人类疟疾的主要病原体恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)进行了药物靶点鉴定,发现恶性疟原虫嘌呤核苷磷酸化酶是奎宁和甲氟喹的共同结合靶点。针对药物的疗效和不良反应, Sun 等<sup>[50]</sup>在蛋白质组水平上直接监测了蛋白质结构的活性氧和氧化还原调节,证明 CETSA 可以应用于蛋白质氧化还原调节的细胞研究,同时也可用于发现基于 CETSA 的生物标志物,以及报告药物的治疗效果和副作用。

TPP 能够快速灵敏地识别已知的药物靶标,鉴定未知的药物靶标,并能识别和鉴定作为膜结合受体的药物靶标。Zinn 等<sup>[51]</sup>利用 TPP 和 LC-MS/MS 技术,使用 16-plex 标签,记录了溶剂对照组和实验组化合物星形孢菌素处理样品的完整热变性图谱,展示了 HepG2 细胞提取物中星形孢菌素靶标的灵敏和省时鉴定。Corpas-Lopez 等<sup>[52]</sup>采用 TPP 和 LC-MS/MS 技术,证实化合物 DDD100097 在利什曼原虫(*Leishmania*)寄生虫内作用于靶点 *N*-肉豆蔻酰基转移酶。离子型嘌呤能受体 P2X4 是嘌呤能受体家族的三聚体 ATP 门控阳离子通道,对 Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>和 Ca<sup>2+</sup>具有渗透性, Carnero Corrales 等<sup>[53]</sup>首先利用人乳腺癌细胞系 MCF7 确定吡啶咪

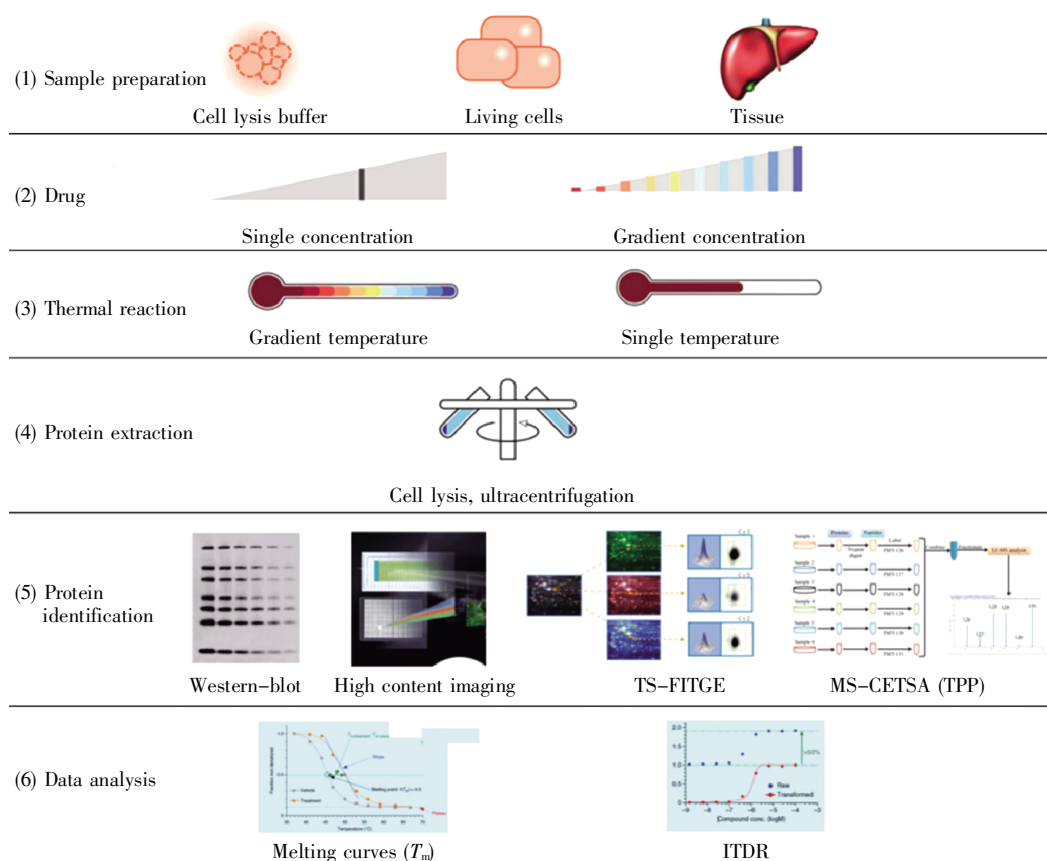


图4 CETSA的操作流程图<sup>[47]</sup>

TS-FITGE: 基于二维荧光凝胶差异的热稳定性分析技术; ITDR: 等温剂量反应。

Fig.4 Operation flowchart of CETSA<sup>[47]</sup>

TS-FITGE: Thermal stability shift-based fluorescence difference in two-dimensional gel electrophoresis; ITDR: Isothermal dose-response.

衍生物 indophagolin 是自噬抑制剂, 然后联合应用 TPP 和 LC-MS/MS 技术识别并鉴定出嘌呤能受体 P2X4 是 indophagolin 的作用靶标, 最后采用 CETSA、ITDRF 和钙流入测定进一步证实 P2X4 为 indophagolin 的靶标。

### 3 小结与展望

药物靶标的发现在整个新药研发过程中起着至关重要的作用。本文介绍了 5 种识别与鉴定药物靶标的研究技术, 以及相应的进展和应用。由于成本、时间等因素, 它们各有优缺点, 这限制了新药研发的进展。

如何从上万种蛋白质中准确快速地找到真正发挥药物疗效的靶标, 以阐明药物作用机制, 减少药物副作用, 依然需要我们不断研发新技术。一种较好的靶标蛋白识别与鉴定技术, 应当具有以下优势: 1) 不仅能灵敏地识别含量丰富的蛋白质, 而且适用于低丰度蛋白质; 2) 能应用于不同

生物体的细胞、组织; 3) 药物分子的结构和活性不会改变或降低; 4) 可极大降低实验所需成本、时间等。

随着基因组学、蛋白质组学、生物信息学和质谱技术的飞速发展, 能够整合各种技术先进性和创新性的准确、高通量的靶标识别新技术, 将减少研发新药所需成本和时间, 更加清楚地阐明药物的作用机制, 以优化药物结构、改善药物性能、增强药物疗效、减少药物不良反应, 推动医药事业蓬勃发展。

### 参考文献(References):

- [1] 杨建雄, 刘志辉. 药物靶标在新药研发中的作用[J]. 时珍国医国药(YANG Jianxiong, LIU Zhihui. Effects of drug targets in developing novel drug[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research), 2009, 20(3): 750-751.
- [2] MADHUKAR N S, KHADE P K, HUANG L D, *et al.* A Bayesian machine learning approach for drug target identification using diverse data types[J]. Nature Communications, 2019, 10: 5221.

- [3] GUREVICH V V. Protein multi-functionality: introduction[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2019, 76(22): 4405-4406.
- [4] ERMER J, VOGEL M. Applications of hyphenated LC-MS techniques in pharmaceutical analysis[J]. Biomedical Chromatography, 2000, 14(6): 373-383.
- [5] GREGORICH Z R, GE Y. Top-down proteomics in health and disease: challenges and opportunities[J]. Proteomics, 2014, 14(10): 1195-1210.
- [6] LIU P F, KIHARA D, PARK C. Energetics-based discovery of protein-ligand interactions on a proteomic scale[J]. Journal of Molecular Biology, 2011, 408(1): 147-162.
- [7] MIAO Q, ZHANG C C, KAST J. Chemical proteomics and its impact on the drug discovery process[J]. Expert Review of Proteomics, 2012, 9(3): 281-291.
- [8] FIROUZI Z, LARI P, RASHEDINIA M, et al. Proteomics screening of molecular targets of curcumin in mouse brain[J]. Life Sciences, 2014, 98(1): 12-17.
- [9] EVANS M J, CRAVATT B F. Mechanism-based profiling of enzyme families[J]. Chemical Reviews, 2006, 106(8): 3279-3301.
- [10] NOMURA D K, DIX M M, CRAVATT B F. Activity-based protein profiling for biochemical pathway discovery in cancer[J]. Nature Reviews Cancer, 2010, 10(9): 630-638.
- [11] EDGINGTON L E, VERDOES M, BOGYO M. Functional imaging of proteases: recent advances in the design and application of substrate-based and activity-based probes[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2011, 15(6): 798-805.
- [12] SANMAN L E, BOGYO M. Activity-based profiling of proteases[J]. Annual Review of Biochemistry, 2014, 83: 249-273.
- [13] SPEERS A E, CRAVATT B F. Chemical strategies for activity-based proteomics[J]. ChemBioChem, 2004, 5(1): 41-47.
- [14] MOELLERING R E, CRAVATT B F. How chemoproteomics can enable drug discovery and development[J]. Chemistry & Biology, 2012, 19(1): 11-22.
- [15] WEERAPANA E, WANG C, SIMON G M, et al. Quantitative reactivity profiling predicts functional cysteines in proteomes[J]. Nature, 2010, 468(7325): 790-795.
- [16] KULJANIN M, MITCHELL D C, SCHWEPPE D K, et al. Reimagining high-throughput profiling of reactive cysteines for cell-based screening of large electrophile libraries[J]. Nature Biotechnology, 2021, 39(5): 630-641.
- [17] ROBERTS A M, WARD C C, NOMURA D K. Activity-based protein profiling for mapping and pharmacologically interrogating proteome-wide ligandable hotspots[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2017, 43: 25-33.
- [18] ADIBEKIAN A, MARTIN B R, WANG C, et al. Click-generated triazole ureas as ultrapotent *in vivo*-active serine hydrolase inhibitors[J]. Nature Chemical Biology, 2011, 7(7): 469-478.
- [19] YANG J, TALLMAN K A, PORTER N A, et al. Quantitative chemoproteomics for site-specific analysis of protein alkylation by 4-hydroxy-2-nonenal in cells[J]. Analytical Chemistry, 2015, 87(5): 2535-2541.
- [20] QIAN Y, MARTELL J, PACE N J, et al. An isotopically tagged azobenzene-based cleavable linker for quantitative proteomics[J]. ChemBioChem, 2013, 14(12): 1410-1414.
- [21] JOHNSON D S, WEERAPANA E, CRAVATT B F. Strategies for discovering and derisking covalent, irreversible enzyme inhibitors[J]. Future Medicinal Chemistry, 2010, 2(6): 949-964.
- [22] MURALE D P, HONG S C, HAQUE M M, et al. Photo-affinity labeling (PAL) in chemical proteomics: a handy tool to investigate protein-protein interactions (PPIs)[J]. Proteome Science, 2016, 15: 14.
- [23] CHOI K M, CHO E, BANG G, et al. Activity-based protein profiling reveals potential dasatinib targets in gastric cancer[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(23): 9276.
- [24] LEHMANN J, CHENG T Y, AGGARWAL A, et al. An antibacterial beta-lactone kills *Mycobacterium tuberculosis* by disrupting mycolic acid biosynthesis[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2018, 57(1): 348-353.
- [25] DANHEISER R L, NOWICK J S. A practical and efficient method for the synthesis of  $\beta$ -lactones[J]. The Journal of Organic Chemistry, 1991, 56(3): 1176-1185.
- [26] ZEILER E, KOROTKOV V S, LORENZ-BAATH K, et al. Development and characterization of improved  $\beta$ -lactone-based anti-virulence drugs targeting ClpP[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2012, 20(2): 583-591.
- [27] SERPI M, PERTUSATI F. An overview of ProTide technology and its implications to drug discovery[J]. Expert Opinion on Drug Discovery, 2021, 16(10): 1149-1161.
- [28] LI R D, LICLICAN A, XU Y L, et al. Key metabolic enzymes involved in remdesivir activation in human lung cells[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2021, 65(9): e0060221.
- [29] BIRKUS G, BAM R A, WILLKOM M, et al. Intracellular activation of tenofovir alafenamide and the effect of viral and host protease inhibitors[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2016, 60(1): 316-322.
- [30] LI J P, LIU S H, SHI J, et al. Activation of tenofovir alafenamide and sofosbuvir in the human lung and its implications in the development of nucleoside/nucleotide prodrugs for treating SARS-CoV-2 pulmonary infection[J]. Pharmaceutics, 2021, 13(10): 1656.
- [31] SHAO S Y, CHEN B, CHENG J, et al. A fluorogenic probe for imaging protein S-nitrosylation in live cells[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2017, 94: 162-168.
- [32] TSE J, WANG Y Y, ZENGEYA T, et al. Peptide nucleic acid probe for protein affinity purification based on biotin-streptavidin interaction and peptide nucleic acid strand hybridization[J]. Analytical Biochemistry, 2015, 470: 34-40.
- [33] MANIATIS T, PTASHNE M. Multiple repressor binding at the operators in bacteriophage lambda[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, 1973, 70(5): 1531-1535.
- [34] PARK C, MARQUESE S. Pulse proteolysis: a simple method for quantitative determination of protein stability and ligand binding[J]. Nature Methods, 2005, 2(3): 207-212.
- [35] HUANG J, WEINTRAUB H, KEDES L. Intramolecular regulation of MyoD activation domain conformation and function[J]. Molecular and Cellular Biology, 1998, 18(9): 5478-5484.
- [36] LOMENICK B, HAO R, JONAI N, et al. Target identification using drug affinity responsive target stability (DARTS)[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, 2009, 106(51): 21984-21989.
- [37] REN Y S, LI H L, PIAO X H, et al. Drug affinity responsive target stability (DARTS) accelerated small molecules target discovery: principles and application[J]. Biochemical Pharmacology, 2021, 194: 114798.
- [38] STANKUNAS K, BAYLE J H, GESTWICKI J E, et al. Conditional protein alleles using knockin mice and a chemical inducer of dimerization[J]. Molecular Cell, 2003, 12(6): 1615-1624.
- [39] COHEN A A, GEVA-ZATORSKY N, EDEN E, et al. Dynamic proteomics of individual cancer cells in response to a drug[J]. Science, 2008, 322(5907): 1511-1516.
- [40] BANASZYNSKI L A, CHEN L C, MAYNARD-SMITH L A, et al. A rapid, reversible, and tunable method to regulate protein function in living cells using synthetic small molecules[J]. Cell, 2006, 126(5): 995-1004.

- [41] NISHIYA Y, SHIBATA K, SAITO S, *et al.* Drug–target identification from total cellular lysate by drug–induced conformational changes[J]. *Analytical Biochemistry*, 2009, 385(2): 314–320.
- [42] KIM Y, SUGIHARA Y, KIM T Y, *et al.* Identification and validation of VEGFR2 kinase as a target of voacangine by a systematic combination of DARTS and MSI[J]. *Biomolecules*, 2020, 10(4): 508.
- [43] TIAN T, ZHANG C Q, LI J, *et al.* Proteomic exploration of endocytosis of framework nucleic acids[J]. *Small*, 2021, 17(23): e2100837.
- [44] MOLINA D M, JAFARI R, IGNATUSHCHENKO M, *et al.* Monitoring drug target engagement in cells and tissues using the cellular thermal shift assay[J]. *Science*, 2013, 341(6141): 84–87.
- [45] SAVITSKI M M, REINHARD F B M, FRANKEN H, *et al.* Tracking cancer drugs in living cells by thermal profiling of the proteome[J]. *Science*, 2014, 346(6205): 1255784.
- [46] FRASER J A, MADHUMALAR A, BLACKBURN E, *et al.* A novel p53 phosphorylation site within the MDM2 ubiquitination signal: II. A model in which phosphorylation at SER269 induces a mutant conformation to p53[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(48): 37773–37786.
- [47] 徐雨昕, 季静静, 张巧艳, 等. 细胞热迁移分析技术及其在靶标发现中的应用进展[J]. *药学服务与研究*(XU Yuxin, JI Jingjing, ZHANG Qiaoyan, *et al.* Cellular thermal shift assay technology and research progress in the application of target discovery[J]. *Pharmaceutical Care and Research*), 2021, 21(2): 122–127.
- [48] CEDER S, ERIKSSON S E, LIANG Y Y, *et al.* Mutant p53–reactivating compound APR–246 synergizes with asparaginase in inducing growth suppression in acute lymphoblastic leukemia cells[J]. *Cell Death & Disease*, 2021, 12(7): 709.
- [49] DZIEKAN J M, YU H, CHEN D, *et al.* Identifying purine nucleoside phosphorylase as the target of quinine using cellular thermal shift assay[J]. *Science Translational Medicine*, 2019, 11(473): eaau3174.
- [50] SUN W D, DAI L Y, YU H, *et al.* Monitoring structural modulation of redox–sensitive proteins in cells with MS–CETSA[J]. *Redox Biology*, 2019, 24: 101168.
- [51] ZINN N, WERNER T, DOCE C, *et al.* Improved proteomics–based drug mechanism–of–action studies using 16–plex isobaric mass tags[J]. *Journal of Proteome Research*, 2021, 20(3): 1792–1801.
- [52] CORPAS–LOPEZ V, MONIZ S, THOMAS M, *et al.* Pharmacological validation of *N*–myristoyltransferase as a drug target in *Leishmania donovani*[J]. *ACS Infectious Diseases*, 2019, 5(1): 111–122.
- [53] CARNERO CORRALES M A, ZINKEN S, KONSTANTINIDIS G, *et al.* Thermal proteome profiling identifies the membrane–bound purinergic receptor P2X4 as a target of the autophagy inhibitor indophagolin[J]. *Cell Chemical Biology*, 2021, 28(12): 1750–1757.e5.

---

(上接第 274 页)

- [14] MOON S H, HUANG C H, HOULIHAN S L, *et al.* p53 represses the mevalonate pathway to mediate tumor suppression[J]. *Cell*, 2019, 176(3): 564–580.e19.
- [15] BEMLIH S, POIRIER M D, EL ANDALOUSSI A. Acyl–coenzyme A: cholesterol acyltransferase inhibitor avasimibe affect survival and proliferation of glioma tumor cell lines[J]. *Cancer Biology & Therapy*, 2010, 9(12): 1025–1032.
- [16] ANTALIS C J, ARNOLD T, RASOOL T, *et al.* High ACAT1 expression in estrogen receptor negative basal–like breast cancer cells is associated with LDL–induced proliferation[J]. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2010, 122(3): 661–670.
- [17] CHEN L, PENG T C, LUO Y W, *et al.* ACAT1 and metabolism–related pathways are essential for the progression of clear cell renal cell carcinoma (ccRCC), as determined by co–expression network analysis[J]. *Frontiers in Oncology*, 2019, 9: 957.
- [18] LACOMBE A M F, SOARES I C, MARIANI B M D P, *et al.* Sterol *O*–acyl transferase 1 as a prognostic marker of adrenocortical carcinoma[J]. *Cancers*, 2020, 12(1): 247.
- [19] REN M L, XU H J, XIA H W, *et al.* Simultaneously targeting SOAT1 and CPT1A ameliorates hepatocellular carcinoma by disrupting lipid homeostasis[J]. *Cell Death Discovery*, 2021, 7(1): 125.
- [20] CHEN Y L, YANG X J, CHEN Y, *et al.* Impacts of the SOAT1 genetic variants and protein expression on HBV–related hepatocellular carcinoma[J]. *BioMed Central Cancer*, 2021, 21: 615.
- [21] WALLS D, LOUGHRAN S T. Tagging recombinant proteins to enhance solubility and aid purification[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2011, 681: 151–175.