

综述与专论

基于天然产物的 PROTAC 及其在靶标验证中的应用进展

徐琳¹, 王京², 张磊^{*1,2}

(1.遵义医科大学 药学院, 贵州 遵义 563000; 2.凯里学院 大健康学院, 贵州 凯里 556011)

摘要:天然产物是创新药物先导化合物的重要来源,具有结构多样性以及功能独特性。目前,天然产物在癌症、心脑血管疾病、神经系统疾病、自身免疫性疾病等的治疗中发挥重要作用。同时,蛋白质靶向嵌合体(PROTAC)技术的兴起为临床分子靶向药物耐药提供了新的解决方案,天然产物及其衍生物作为 PROTAC 的重要组成部分,在靶向蛋白降解药物的开发中发挥着重要作用。综述了基于天然产物的 PROTAC 以及 PROTAC 技术在天然产物靶标鉴定中的应用进展。

关键词:PROTAC;靶点鉴定;靶向药物;天然产物;研究进展

中图分类号:R284 **文献标识码:**A **文章编号:**0258-3283(2024)06-0001-08

DOI:10.13822/j.cnki.hxsj.2024.0005

PROTAC Based on Natural Products and Its Application in Target Validation XU Lin¹, WANG Jing², ZHANG Lei^{*1,2}

(1.School of Pharmacy, Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China; 2.School of Life and Health Sciences, Kaili University, Kaili 556011, China)

Abstract: Natural products are the important sources of lead compounds for innovative drugs, exhibiting structural diversity and functional specificity. At present, natural products play an important role in the targeted therapy of cancer, cardiovascular and cerebrovascular diseases, nervous system diseases, and autoimmune diseases. The development of protein degradation targeted chimeras(PROTAC) provides a new strategy for clinical molecular targeted drug resistance. Natural products and their derivatives, as important parts of PROTAC, play an important role in the development of protein targeted drugs. This article reviewed the progress in the application of natural product-based PROTAC, as well as PROTAC technology for the identification of natural products targets.

Key words: PROTAC; target identification; targeted drug; natural product; research progress

天然产物是指动物、植物和微生物体内的化学成分或其代谢产物,具有结构新颖多样、生物活性独特等特点,是当今药物发现的重要来源。天然产物及其衍生物已应用于多种疾病的治疗中,包括心脑血管疾病、恶性肿瘤和传染病等^[1]。活性天然产物的靶点鉴定是深入了解其作用机制,指导其结构优化的关键。目前天然产物靶点鉴定主要包括基于亲和力的靶点鉴定、基于活性的蛋白质分析(ABPP)和无标签的靶点鉴定 3 种方法。传统基于亲和力的靶点鉴定方法取决于小分子化合物和靶点蛋白质的瞬时结合,这种结合需要足够强,以便从整个蛋白质组中分离目标蛋白质。ABPP 专门用于识别功能活性蛋白质,如酶。无标签靶点识别方法如 DARTS 或 CETSA 联合质谱法等也受到靶标与小分子亲和力和靶标蛋白对蛋白水解或热变性的限制^[2]。由于天然产物结构复杂且可能存在多成分、多靶点的作用模式,以及与靶点蛋白瞬时、弱亲和力的相互作用为天然

产物精确靶点的鉴定带来了很大困难。蛋白质靶向嵌合体(PROTAC)利用蛋白酶体具有特异性降解蛋白底物的功能,采用化学合成方法将靶蛋白结合配体与泛素化 E3 连接酶配体通过 Linker 连接,形成可以自发介导靶蛋白降解的双功能分子化合物,具有广阔的研究与应用价值。本文总结了天然产物及其衍生物的 PROTAC 以及将 PROTAC 与蛋白质组学等方法结合用于天然产物的潜在靶标鉴定的新策略及其应用。

收稿日期:2024-01-03;网络首发日期:2024-03-22

基金项目:黔科合基础项目(ZK[2023]499)。

作者简介:徐琳(1998-),女,贵州遵义人,硕士生,主要研究方向为药物化学。

通讯作者:张磊, E-mail: lei_chang@yeah.net。

引用本文:徐琳,王京,张磊.基于天然产物的 PROTAC 及其在靶标验证中的应用进展[J].化学试剂,2024,46(6):1-8。

1 天然产物靶标验证方法

天然产物靶点研究可以揭示天然产物的作用机制,并为新药开发提供理论基础。目前天然产物靶标鉴定主要包括标记法和非标记法。标记法是指小分子与亲和探针偶联,涉及色谱法、凝胶电泳法及质谱法^[3]。标记法需要对天然产物进行结构修饰,可能影响天然产物的特异性和亲和力,同时一些天然产物没有合适的化学修饰位点等限制了标记法的应用。因此,无标记天然产物靶标鉴定的直接方法,如药物亲和力响应靶向稳定性(DARTS)、蛋白质氧化速率稳定性(SPROX)、细胞热位移分析(CETSA)、热蛋白质组分析(TPP)以及间接的方法如蛋白质降解技术、基因组学方法和 CAMP 等基于生物信息学分析方法应运而生。DARTS 技术由 Lomenick 等^[4]于 2009 年首次提出,推测药物与靶蛋白结合后使蛋白结构更加稳定,从而具有抗蛋白酶水解的特性。Wang 等^[5]首先利用 DARTS 技术发现 ACTN4 是鞣花酸在乳腺癌干细胞中的直接结合靶点。Kim 等^[6]采用 DARTS 技术与 MSI 结合验证了姜黄素与 APN 相互作用。Huang 等^[7]采用 DARTS 技术与等温滴定量热法等技术结合发现蝙蝠葛苏林碱可直接作用于热休克蛋白 90(HSP90),破坏 β -catenin 的稳定性,从而抑制肺癌的肿瘤发生。Liu 等^[8]利用 DARTS 技术发现木香烃内酯可通过直接靶向 CDK2,抑制小胶质细胞介导的神经炎症。Sun 等^[9]利用 DARTS 技术鉴定发现 ABL1 是补骨脂素肝毒性的直接靶标。DARTS 具有操作简单、耗时短等优势,不需要对化合物进行结构修饰,以原有的结构分析与蛋白的相互作用,可以用于寻找化合物的新靶点也可以从成分复杂的天然药物和复方药物中发现新的靶点,但 DARTS 技术需要蛋白丰度高,以及实验中蛋白酶和细胞裂解液的选择会影响天然产物靶点识别,干扰 DARTS 技术的准确性,同时由于药物结合位点与蛋白酶识别位点的不同或蛋白本身对蛋白酶具有抗性而出现假阴性或假阳性结果。与 DARTS 类似,SPROX 是另一种基于配体诱导的靶点稳定性的检测方法,利用分子与靶点结合后增加靶蛋白抗氧化能力的原理,检测靶蛋白甲硫氨酸的氧化水平。Dearmond 等^[10]应用 SPROX 技术寻找中药活性成分白藜芦醇的靶点,发现除了之前已经确定的胞质脱氢酶,还存在 6 个潜在的靶点蛋白。SPROX 优点在于不需要纯化蛋白,可以与串联质

谱标签 TMT、SILAC 相结合,通过标记蛋白质氨基酸来确定肽的相对含量。SPROX 需要对甲硫氨酸残基氧化来测量热力学变化,不同的甲硫氨酸残基可能表现出相同的氧化速率,不足以为天然产物配体与靶点蛋白相互作用的确证提供充分的信息^[11]。CETSA 技术由 Martinez 等^[12]于 2013 年首次提出,主要基于天然产物与靶蛋白结合后热力学稳定性发生变化的原理。Wang 等^[13]利用 CETSA 技术,结合分子对接和质谱等证明莪术醇能与鼻咽癌细胞中的 NCL 蛋白结合,并使之降解,从而发挥抗癌作用。CETSA 常用于靶点的确定,但存在所需药物浓度高、通量不足等缺点^[14]。为了增加其在靶点和脱靶识别以及生物标志物识别上的应用,Savitski 等^[15]于 2014 年在 CETSA 的基础上开发了热蛋白质组分析(TPP)技术。Kak-egwa 等^[16]采用 TPP 技术鉴定出 Conophylline 可与 GPX4 结合,通过靶向 GPX4 诱导脂质活性氧积累和自噬。Chen 等^[17]建立一种基于 XGBoost 的简化热蛋白质组学分析方法,发现雷公藤甲素可通过与 HnRNP A2/B1 的潜在相互作用,调节肿瘤细胞活性。TPP 技术具有稳定性好、鉴定蛋白数量多的优点,而且不需要用抗体进行孵育检测,是一种广谱的蛋白鉴定技术。但存在耗时长、花费高、对膜蛋白的检测有限等问题。

目前,天然产物靶标识别的方法各有优缺点,多种方法结合更有利于天然产物靶点的识别。近年来,用于间接识别和确证非标记天然产物与靶点结合的方法也逐渐发展起来,例如蛋白降解 PROTAC 技术等^[18]。

2 PROTAC 技术

2.1 PROTAC 的设计及优势

2001 年, Sakamoto 等^[19]首次提出 PROTAC 概念,他们将甲硫氨酰氨肽酶-2(MetAP-2)的共价抑制剂 Ovalicin 和能识别 Skp1-Cullin-F-box(SCF)泛素连接酶的磷酸肽偶联,合成了第一个靶向蛋白降解的嵌合分子 PROTAC1,该分子可将 MetAP-2 招募至 SCF,诱导其泛素化和降解。2008 年, Schneekloth 等^[20]设计合成了第一个小分子 PROTAC,由靶向 MDM2 E3 泛素连接酶的小分子抑制剂 Nutlin 和 AR 小分子配体以及中间的 PEG Linker 构成;2019 年第一个 PROTAC 药物 ARV-110 进入临床试验用于治疗前列腺癌^[21]。至此,PROTAC 研究开启新的阶段,多个用于降解

致病蛋白质的 PROTAC 分子逐渐进入临床。目前已报道的基于 PROTAC 降解的蛋白包括:蛋白激酶^[22] (RIPK2、BTK、BCR-ABL、CDK2/4/6/9、PI3K、BTK、Fak、ERK1/2、HER2、c-Met、TBK1 等)、核受体^[23] (AR、ER)、表观遗传蛋白^[24] (PCAF/GCN5)、神经退行性疾病相关蛋白^[25] (Tau 蛋白)、抗凋亡蛋白、转录因子、支架蛋白、细胞因子、病毒相关蛋白等。

在传统小分子抑制剂的开发过程中,由于构象等原因许多关键疾病蛋白被认为是“不可成药”,而 PROTAC 技术是一种简单而有效的解决方案。PROTAC^[26]是由一个 E3 泛素连接酶配体和一个靶蛋白配体,通过特殊设计的“Linker”结构连接最终形成三联体“PROTAC”活性形式。该三联体是一种具有双重功能的小分子,能够同时靶向特定蛋白,并招募 E3 泛素连接酶。在细胞内,PROTAC 的靶蛋白配体和靶蛋白结合,E3 连接酶配体和 E3 泛素连接酶的底物结合区结合,从而通过 Linker 把靶蛋白“拉近”到 E3 泛素连接酶旁边,随后通过泛素-蛋白酶体系统将靶蛋白降解。与传统的小分子抑制剂相比,PROTAC 策略具有一系列优势^[27]:首先,PROTAC 只需要结合在靶标蛋白的任意位点,不需要占据或阻断其活性位点。一些没有传统药物或抑制剂结合位点的蛋白可被泛素化途径降解,且 PROTAC 对靶标蛋白的降解效率与其和靶标蛋白的亲和力之间没有直接关系。其次,在靶标蛋白被泛素化后,PROTAC 分子将被释放并重新结合到新的靶蛋白上,导致其泛素化。因此,PROTAC 的泛素化依赖性降解,有望解决传统药物使用浓度较高的问题;第三,PROTAC 策略可以应对传统药物毒副作用大的问题。大多数蛋白家族包含多种结构高度相似的亚型,但不同亚型在不同疾病中的功能和表达水平各不相同。如果随机使用非特异性抑制剂,可能导致严重的毒性,以能够与特定构型的靶标蛋白结合的小分子构建 PROTAC,可实现对靶标蛋白的选择性降解。

因此,作为一种新的治疗策略,PROTAC 扩大了可成药靶点的范围,以及其具有催化作用,可提高选择性、活性和安全性,可有效降解多种突变体靶蛋白,克服耐药性并具备潜在广谱性等优势得到了广泛应用。

2.2 PROTAC 技术存在的问题

虽然 PROTAC 具有很好的靶向降解活性,但

PROTAC 的相对分子量通常超过 1 000 Da,导致其药代动力学性质较差,给药后难以被吸收。更为重要的是,PROTAC 存在一定的脱靶效应。此外,一些蛋白在一定水平上的表达有助于维持机体基本的生理功能,靶标蛋白的过度降解,可能会影响机体的正常生理活动。因此,在设计 PROTAC 分子时,应综合考虑其体内药代动力学特征、靶点特异性,以及在实际使用时的适当给药浓度等,以最大限度地提高利用效率、降低潜在的毒性效应^[28]。

3 基于天然产物的 PROTAC 及其分子靶点

3.1 基于天然产物及其衍生物的 PROTAC

天然产物通常通过多个靶标相互作用而产生活性,但其与靶标的亲和力较弱。PROTAC 可以有效、特异性地降解靶蛋白,并且可以在较低剂量下与靶蛋白结合,这可能是一种有效的策略以鉴定天然产物不可检测的靶点。因此,基于天然产物设计的 PROTAC 具有较强的蛋白质降解潜力,这些天然产物包括激素、黄酮、生物碱、萜类和微生物代谢产物等。

3.1.1 基于激素类天然产物的 PROTAC

雄激素受体 (Androgen receptor, AR) 属于核受体超家族中的类固醇受体,近年来研究发现,AR 是前列腺癌发生和发展的关键驱动因子,尤其是转移性去势抵抗性前列腺癌 (Metastatic castration-resistant prostate cancer, mCRPC)。迄今为止,全球共有多个 AR PROTAC 降解剂进入临床试验,进展最快的是 Arvinas 公司开发的 ARV-110,目前处于临床 II 期。此外,Arvinas 公司开发的 ARV-766、Bristol Myers Squibb 公司开发的 CC-94676、海创药业公司开发的 HP518、开拓药业公司开发的 GT20029 以及 Accutar 公司开发的 AC-0176,目前均处于 I 期临床试验中^[29]。

雌激素受体 α (ER α) 是类固醇激素核受体,拮抗雌激素与 ER α 的相互作用是治疗乳腺癌的重要方法^[30]。由于传统药物的耐药性,利用选择性雌激素受体降解剂靶向 ER α 的降解也是乳腺癌治疗发展的重要方向^[31]。雌二醇 (1,图 1) 是具有生物活性的天然雌激素。Cyrus 等^[32]设计了基于雌二醇的靶向内质网降解剂,一端连接雌二醇,另一端由缺氧诱导因子 1 α 衍生的合成五肽组成。结果表明,雌二醇 C7 位连接得到的 PROTAC (2,图 1) 具有最强的蛋白降解活性和对雌激素受

体最高的亲和力,该降解剂有望克服乳腺肿瘤对他莫昔芬和氟维司汀等传统药物的耐药性,成为潜在的治疗及克服耐药手段。ARV-471 是由 Arvinas 公司开发的一款靶向 ER 的口服 PROTAC,用于治疗雌激素受体阳性/人表皮生长因子受体 2 阴性($ER^+/HER2^-$)的局部晚期或转移性乳腺癌患者。AC682 是冰洲石生物公司基于 AI 药物发现平台开发的一款 $ER\alpha$ 降解剂,是一种口服生物可利用的嵌合降解分子,也是国内首款获批临床试验的 ER-PROTAC^[29]。

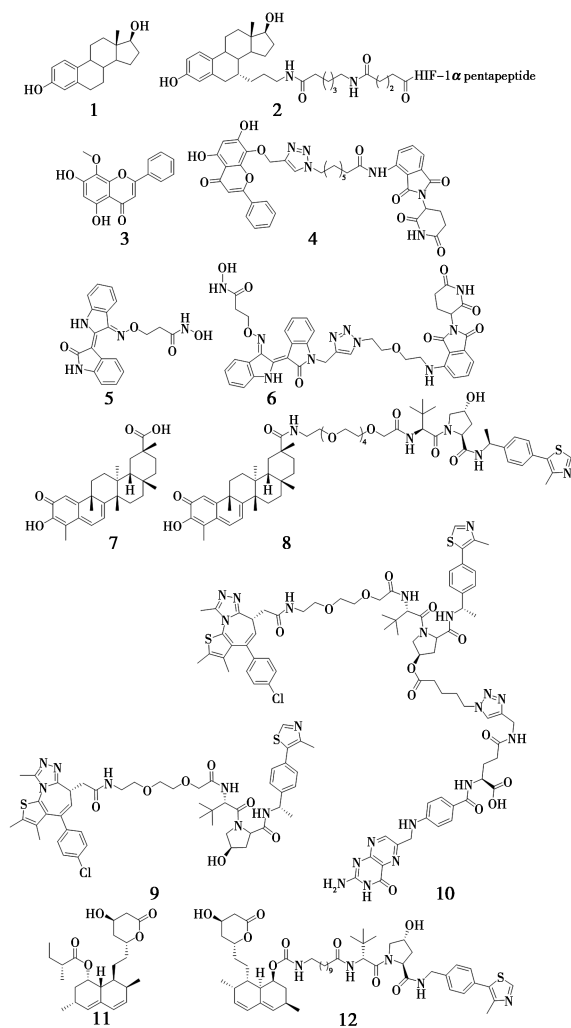


图 1 天然产物及其 PROTAC 结构

Fig.1 Structures of natural products and their corresponding PROTAC

3.1.2 基于黄酮、生物碱、萜类天然产物的 PROTAC

黄芩素(3,图 1)是一种天然黄酮类物质,能够抑制 CDK8/CDK9 等^[33],具有抗炎、抗肿瘤^[34]等功效。Bian 等^[35]利用该骨架,通过 E3 连接酶 CRBN 配体,设计合成了一系列靶向 CDK9 的

PROTAC(4,图 1)。化合物 4 以蛋白酶体和 CRBN 依赖性的降解 CDK9,并选择性地抑制 CDK9 过表达癌细胞的增殖。该研究证明基于黄芩素设计的 PROTAC 是一种有效的 CDK9 降解剂。

靛玉红是来源于中药青黛中的生物碱,具有双吲哚骨架,可用于治疗慢性粒细胞白血病^[36]。Cao 等^[37]将源自靛玉红的选择性 HDAC6 抑制剂(5,图 1)与 E3 连接酶 CRBN 配体泊马度胺连接得到了具有低细胞毒性的 HDAC6 降解剂(6,图 1),可减弱脂多糖诱导小鼠体内 NLRP3 炎症小体的激活,首次证明 HDAC6-PROTAC 可能是治疗 NLRP3 炎症小体相关疾病的新策略。

雷公藤红素(7,图 1)是一种天然的五环三萜,具有抗肿瘤^[38,39]、抗炎^[40]、抗血栓活性^[41,42]等多种生物活性,但存在严重的毒副作用,同时抗肿瘤分子靶标未明确。Wang 等^[43]将雷公藤红素与 E3 连接酶 VHL 配体连接得到化合物 8(图 1),可显著降低 NR4A1 蛋白水平,进一步实验结果显示化合物 8 可靶向 T 细胞、B 细胞、MDSCs 等多种细胞类型,具有较强的抗肿瘤作用。

3.1.3 基于维生素来源的天然产物 PROTAC

研究表明,叶酸受体 FOLR1 在多种肿瘤细胞中高表达^[44]。Liu 等^[45]利用叶酸和肿瘤中叶酸受体的高亲和作用,在传统蛋白水解靶向嵌合体化合物 9(图 1)侧链修饰叶酸基团,得到化合物 10(图 1)。基于叶酸和叶酸受体的高亲和力,使该 PROTAC 可以精准靶向肿瘤细胞,在进入细胞后释放叶酸部分,实现对肿瘤细胞中特定蛋白的选择性降解。该策略有望解决传统 PROTAC 分子对非肿瘤细胞毒副作用的难题。

3.1.4 基于微生物代谢产物的 PROTAC

APL-16-5 是从药用植物内生真菌 *Aspergillus* sp.CPCC 40073512 中分离得到的一种天然化合物。2022 年,Zhao 等^[46]发现 APL-16-5 同时结合 E3 泛素连接酶 TRIM25 和流感病毒 PA 亚基,基于 PROTAC 机制诱导 TRIM25 依赖的 PA 泛素化及其降解,阻断病毒 RNA 复制,具有良好的体内抗甲型流感病毒活性。该研究发现了第一个来源于微生物天然产物的 PROTAC 分子,表明微生物代谢产物可成为天然 PROTAC 分子的重要来源。

洛伐他汀(11,图 1)是由土曲霉发酵产生的天然产物,通过竞争性抑制胆固醇合成途径中羟

甲基戊二酸辅酶 A (HMG-CoA) 还原酶, 治疗原发性高胆固醇血症等^[47]。他汀类药物治疗后, HMG-CoA 还原酶蛋白通常上调, 引发与不良反应相关的更高剂量药物的需求。Luo 等^[48] 采用 PROTAC 技术开发了基于 E3 连接酶 VHL 配体的 HMGR-PROTAC。化合物 12 (图 1) 具有良好的安全性和口服生物利用度, 能够在体内促进 HMG-CoA 还原酶降解和降低胆固醇, 可单独或与他汀类药物协同治疗高血脂症。

3.2 PROTAC 技术用于天然产物靶标鉴定

Wu 等^[49] 将 PROTAC 技术与定量蛋白组学、微量热泳动分子互作检测技术相结合, 从被降解的差异蛋白中找到中药靶点, 并通过下游的一系列分子、生物化学和动物实验进行功能验证, 为中药成分的靶点鉴定提供新的策略。团队前期从中药千金子中获得了一系列千金烷二萜类化合物, 其中化合物 13 (图 2) 具有最强的抗炎活性, 且毒性较低。将化合物 13 的核心骨架化合物 14 (图 2) 与 E3 连接酶 CRBN 配体沙利度胺通过 PEG Linker 相连, 得到 PROTAC 分子化合物 15 (图 2)。将 PROTAC 与细胞共孵育后用定量蛋白组学分析发现, MAFF 蛋白在化合物 15 处理后发生显著的降解。上述研究结果表明, MAFF 蛋白可能是千金烷二萜类化合物 13 的作用靶点之一。

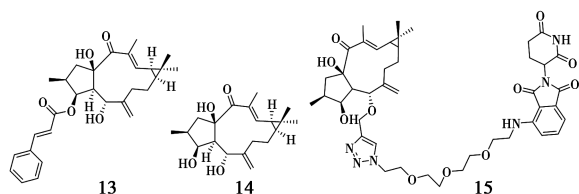


图 2 二萜类结构及其 PROTAC

Fig.2 Structures of diterpenes and its PROTAC

Li 等^[50] 将青蒿素二聚体 16 (图 3) 作为 PROTAC 分子的靶头, 利用 E3 连接酶配体沙利度胺以不同长度的 Linker 合成了一系列 PROTAC。研究发现, 降解活性最好的化合物 17 (图 3) 对肿瘤细胞 RS4; 11、RPMI-8226、U266 的

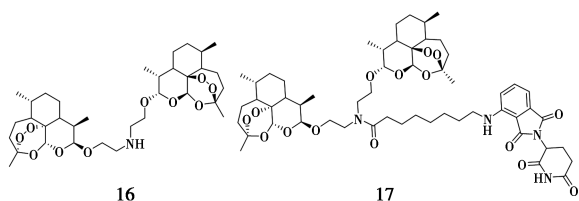


图 3 青蒿素二聚体结构及其 PROTAC

Fig.3 Structures of artemisinin dimer and its PROTAC

IC₅₀ 值分别为 (50.6 ± 6.3)、(235.3 ± 26.0) 和 (342.8 ± 11.6) nmol/L。标记定量蛋白组学分析结果显示, PCLAF 等 8 个蛋白显著下调, 经 Western Blot 验证后发现, PCLAF 能够被化合物 17 显著降解, 并且该降解能够被蛋白酶体抑制剂 MG132 所抑制, 表明 PCLAF 可能是青蒿素的潜在靶标。

植物来源的 2-乙酰基呋喃萘醌 (18, 图 4) 具有显著的抗癌活性。Hanafi 等^[51] 为了探究化合物 18 的作用机制, 设计了多个系列的 PROTAC 分子, 发现化合物 19 (图 4) 强效诱导 ZFP91 降解, 且此过程不能被化合物 18 竞争, 因此化合物 19 的抗肿瘤活性部分依赖于 ZFP91 蛋白的降解。

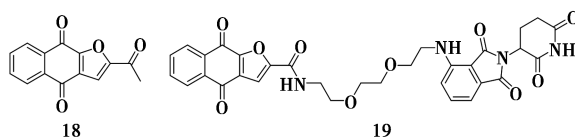


图 4 化合物 18 结构及其 PROTAC

Fig.4 Structures of compound 18 and its PROTAC

吴茱萸碱 (20, 图 5) 是一种从茱萸中提取的生物碱, 具有抗肿瘤等活性。Chen 等^[52] 基于吴茱萸碱已报道的衍生物 21 (图 5), 以 10 位羟基作为连接位点, 通过不同长度的烷基连接 E3 连接酶配体来那度胺, 成功设计了一系列 PROTAC 分子。在 HCT116 细胞的体外抗增殖实验中, 化合物 22、23 (图 5) 的 IC₅₀ 值分别为 0.019 和 0.021 μmol/L。标记定量蛋白组学分析结果显示, 化合物 22 可以剂量依赖的方式降解 REXO4 而发挥抗肿瘤作用。

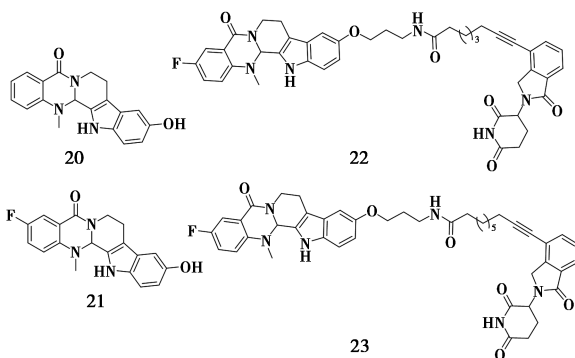


图 5 吴茱萸碱结构及其 PROTAC

Fig.5 Structures of evodiamines and their PROTAC

此外, 刘接卿等^[53] 通过 PROTAC 方法证实, 淫羊藿素的抗肿瘤靶标为 GRIA3 蛋白。Qi 等^[54] 设计合成 UA-PROTA 揭示了 MDM2 是熊果酸的

靶向结合蛋白。

4 总结与展望

天然产物是自然界的生物体在进化过程中为了适应环境、竞争拮抗、沟通交流等而产生的功能性代谢产物,与合成化合物相比,天然产物具有更加多样性的骨架类型,更丰富的官能团和更复杂的立体构型,独特的结构赋予了天然产物独特的生物学性质。因而,天然产物一直是生命科学领域重要的研究对象和新药发现的重要源泉。但由于天然产物的靶点研究尚不明确,严重阻碍了天然产物的发展。阐明天然产物与靶点的相互作用对于揭示天然产物在生物体内的作用模式以及确定天然产物作用靶点,对于化合物结构优化与药物开发至关重要。相较于标记法鉴定天然产物靶标的方法,非标记鉴定天然产物靶标可以最大程度的保留天然产物的结构和活性,以及适用于一些无化学修饰位点的天然产物靶标鉴定,但同样存在靶点特异性低,结合亲和力需求高等不足。PROTAC 技术的出现,为解决这一问题提供了一个新的解决办法。2001 年 PROTAC 概念提出至今,已有许多 PROTAC 药物进入临床,其中包含许多天然产物,本文综述了 PROTAC 技术在天然产物靶标鉴定中的应用,这些天然产物包括来源于激素、黄酮、生物碱、萜类、维生素以及微生物代谢产物的天然产物,进一步说明将天然产物设计成 PROTAC 用于改善天然产物选择性,降低毒副作用以及提高成药性的可能性。以及将天然产物设计成 PROTAC,形成可自发降解的双功能分子,基于 PROTAC 依赖泛素化蛋白酶体降解系统的特性,以天然产物衍生的 PROTAC 分子为探针,将其原型与 PROTAC 分子分别处理后的细胞裂解液进行差异蛋白质组学的测定和分析,结合 KEGG 通路分析等生物信息学方法,从被降解的差异化蛋白质中挑出候选靶蛋白,再通过体外靶点验证方法如 MST、CETSA、DARTS、RNAi 技术、体内靶点相关通路验证等实验进一步确证该天然产物的作用靶点。基于 PROTAC 技术的靶点鉴定与基于亲和力的靶点鉴定不同,基于 PROTAC 技术的靶点鉴定依赖于靶点-PROTAC-E3 连接酶三元复合物的形成,而不需要靶点蛋白与化合物之间的强结合,甚至可以通过稳定微弱的配体-靶蛋白相互作用,诱导靶蛋白的有效降解,并提高配体的选择性,在某种程度上是一个放大的信号,消

除由于实验设计和操作导致的误差,以及基于亲和力的靶点鉴定方法得到的假阳性或假阴性结果。因此,基于 PROTAC 的方法将是目前天然产物靶标鉴定方法的一个重要补充,可以为天然产物的靶点鉴定提供新方法,并可用于发现已知药物作用的新作用靶点。

参考文献:

- [1] ATANASOV A G, ZOTCHEV S B, DIRSCH V M, et al. Natural products and drug discovery [J]. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2021, **20**(3): 200-216.
- [2] PARK H, HA J, PARK B S. Label-free target identification in drug discovery via phenotypic screening [J]. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2019, **50**: 66-72.
- [3] YUE R, SHAN L, YANG X, et al. Approaches to target profiling of natural products [J]. *Curr. Med. Chem.*, 2012, **19**(22): 3 841-3 855.
- [4] LOMENICK B, HAO R, JONAI N, et al. Target identification using drug affinity responsive target stability (DARTS) [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009, **106**(51): 21 984-21 989.
- [5] WANG N, WANG Q, TANG H, et al. Direct inhibition of ACTN4 by ellagic acid limits breast cancer metastasis via regulation of β -catenin stabilization in cancer stem cells [J]. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 2017, **36**(1): 172.
- [6] 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.
- [7] HUANG X, YAN X, ZHANG Q H, et al. Direct targeting of HSP90 with daurisorline destabilizes β -catenin to suppress lung cancer tumorigenesis [J]. *Cancer Lett.*, 2020, **489**: 66-78.
- [8] LIU Y C, FENG N, LI W W, et al. Costunolide plays an anti-neuroinflammation role in lipopolysaccharide-induced BV2 microglial activation by targeting cyclin dependent kinase 2 [J]. *Molecules*, 2020, **25**(12): 2 840.
- [9] SUN S, WANG M, YUAN Y, et al. A new strategy for the rapid identification and validation of direct toxicity targets of psoralen-induced hepatotoxicity [J]. *Toxicol. Lett.*, 2022, **363**: 11-26.
- [10] DEARMOND P D, XU Y, STRICKLAND E C, et al. Thermodynamic analysis of protein-ligand interactions in complex biological mixtures using a shotgun proteomics approach [J]. *J. Proteome Res.*, 2011, **10**(11): 4 948-4 958.
- [11] LOMENICK B, OLSEN R W, HUANG J. Identification of

- direct protein targets of small molecules[J]. *ACS Chem. Biol.*, 2011, **6**(1): 34-46.
- [12] MARTINEZ M D, JAFARI R, IGNATUSCHCHENKO M, et al. Monitoring drug target engagement in cells and tissues using the cellular thermal shift assay [J]. *Science*, 2013, **341**(6 141): 84-87.
- [13] WANG J, WU J, LI X, et al. Identification and validation nucleolin as a target of curcumin in nasopharyngeal carcinoma cells [J]. *J. Proteomics*, 2018, **182**: 1-11.
- [14] DRAKE W R, HOU C W, ZACHARA N E, et al. New use for CETSA: Monitoring innate immune receptor stability via post-translational modification by OGT [J]. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 2018, **50**(3): 231-240.
- [15] SAVITSKI M M, REINHARD F B, FRANKEN H, et al. Tracking cancer drugs in living cells by thermal profiling of the proteome [J]. *Science*, 2014, **346**(6 205): 1 255 784.
- [16] KAKEGWA J, OHTSUKA S, YOKOYAMA M, et al. Thermal proteome profiling reveals glutathione peroxidase 4 as the target of the autophagy inducer conophylline [J]. *Mol. Pharmacol.*, 2021, **100**(3): 181-192.
- [17] CHEN P, ZHAO P, HU M, et al. HnRNP A2/B1 as a potential anti-tumor target for triptolide based on a simplified thermal proteome profiling method using XGBoost [J]. *Phytomedicine*, 2023, **117**: 154 929.
- [18] 李玉斌, 吕超, 张卫东. 非标记的天然产物靶点识别和确证方法及应用 [J]. *药学报*, 2019, **54**(1): 82-88.
- [19] SAKAMOTO K M, KIM K B, KUMAGAI A. Protacs: Chimeric molecules that target proteins to the Skp1-Cul1-F box complex for ubiquitination and degradation [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, **98**(15): 8 554-8 559.
- [20] SCHNEEKLOTH A R, PUCHEAULT M, TAE H S, et al. Targeted intracellular protein degradation induced by a small molecule: En route to chemical proteomics [J]. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2008, **18**(22): 5 904-5 908.
- [21] NEKLESA T, SNYDER L B, WILLARD R R, et al. ARV-110: An oral androgen receptor PROTAC degrader for prostate cancer [J]. *J. Clin. Oncol.*, 2019, **37**(7): 259.
- [22] YU F, CAI M, SHAO L, et al. Targeting protein kinases degradation by PROTACs [J]. *Front. Chem.*, 2021, **9**: 679.
- [23] FLANAGAN J J, NEKLESA T K. Targeting nuclear receptors with PROTAC degraders [J]. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2019, **493**: 110 452.
- [24] JANGAMPALLI A P, REDDY P H. Phosphorylated tau targeted small-molecule PROTACs for the treatment of alzheimer's disease and tauopathies [J]. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.*, 2021, **1 867**(8): 166 162.
- [25] VOGELMANN A, ROBAA D, SIPPL W, et al. Proteolysis targeting chimeras (PROTACs) for epigenetics research [J]. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2020, **57**: 8-16.
- [26] LI X, PU W, ZHENG Q, et al. Proteolysis-targeting chimeras (PROTACs) in cancer therapy [J]. *Mol. Cancer*, 2022, **21**(1): 99.
- [27] LI K, CREWS C M. PROTACs: Past, present and future [J]. *Chem. Soc. Rev.*, 2022, **51**(12): 5 214-5 236.
- [28] CHOUDHARY D, KAUR A, SINGH P, et al. Target protein degradation by protacs: A budding cancer treatment strategy [J]. *Pharmacol. Ther.*, 2023, **250**: 108 525.
- [29] 李炳坤, 杨宁, 李鹏运, 等. 基于蛋白降解靶向嵌合体 (PROTAC) 的药物研发新模式 [J]. *军事医学*, 2023, **47**(1): 1-12.
- [30] BOYAPATI S M, SHU X O, RUAN Z X, et al. Polymorphisms in ER- α gene interact with estrogen receptor status in breast cancer survival [J]. *Clin. Cancer Res.*, 2005, **11**(3): 1 093-1 098.
- [31] PATEL H K, BIHANI T. Selective estrogen receptor modulators (SERMs) and selective estrogen receptor degraders (SERDs) in cancer treatment [J]. *Pharmacol. Ther.*, 2018, **186**: 1-24.
- [32] CYRUS K, WEHENKEL M, CHOI E Y, et al. Jostling for position: Optimizing linker location in the design of estrogen receptor-targeting PROTACs [J]. *ChemMedChem*, 2010, **5**(7): 979-985.
- [33] POLIER G, GIAISI M, KOHLER R, et al. Targeting CDK9 by wogonin and related natural flavones potentiates the anti-cancer efficacy of the Bcl-2 family inhibitor ABT-263 [J]. *Int. J. Cancer*, 2015, **136**(3): 688-698.
- [34] HE L, LU N, DAI Q, et al. Wogonin induced G1 cell cycle arrest by regulating wnt/ β -catenin signaling pathway and inactivating CDK8 in human colorectal cancer carcinoma cells [J]. *Toxicology*, 2013, **312**: 36-47.
- [35] BIAN J, REN J, LI Y, et al. Discovery of wogonin-based PROTACs against CDK9 and capable of achieving anti-tumor activity [J]. *Bioorg. Chem.*, 2018, **81**: 373-381.
- [36] YANG L, LI X, HUANG W, et al. Pharmacological properties of indirubin and its derivatives [J]. *Biomed. Pharmacother.*, 2022, **151**: 113 112.
- [37] CAO Z, GU Z, LIN S, et al. Attenuation of NLRP3 inflammasome activation by indirubin-derived PROTAC targeting HDAC6 [J]. *ACS Chem. Biol.*, 2021, **16**(12): 2 746-2 751.
- [38] XU H, ZHAO H, DING C, et al. Celastrol suppresses

- colorectal cancer via covalent targeting peroxiredoxin 1 [J]. *Signal Transduct. Target Ther.*, 2023, **8**(1): 51.
- [39] 陈倩虹, 周婷, 李媚, 等. 雷公藤红素的结构修饰及抗肿瘤活性研究进展 [J]. *化学试剂*, 2024, **46**(1): 17-25.
- [40] ALLEN S D, LIU Y G, KIM T, et al. Celastrol-loaded PEG-b-PPS nanocarriers as an anti-inflammatory treatment for atherosclerosis [J]. *Biomater. Sci.*, 2019, **7**(2): 657-668.
- [41] JOSHI V, VENKATESHA S H, RAMAKRISHNAN C, et al. Celastrol modulates inflammation through inhibition of the catalytic activity of mediators of arachidonic acid pathway: Secretory phospholipase A 2 group II A, 5-lipoxygenase and cyclooxygenase-2 [J]. *Pharmacol. Res.*, 2016, **113**: 265-275.
- [42] OUYANG M, QIN T, LIU H, et al. Enhanced inflammatory reaction and thrombosis in high-fat diet-fed ApoE^{-/-} mice are attenuated by celastrol [J]. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*, 2021, **129**(5): 339-348.
- [43] WANG L, XIAO Y, LUO Y, et al. Unleashing the power of NR4A1 degradation as a novel strategy for cancer immunotherapy [J]. *bioRxiv*, 2023, doi: 10.1101/2023.08.09.552650.
- [44] VARAGANTI P, BUDDOLLA V, LAKSHMI B A, et al. Recent advances in using folate receptor 1 (FOLR1) for cancer diagnosis and treatment, with an emphasis on cancers that affect women [J]. *Life Sci.*, 2023, **326**: 121 802.
- [45] LIU J, CHEN H, LIU Y, et al. Cancer Selective target degradation by folate-caged PROTACs [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2021, **143**(19): 7 380-7 387.
- [46] ZHAO J, WANG J, PANG X, et al. An anti-influenza a virus microbial metabolite acts by degrading viral endonuclease PA [J]. *Nat. Commun.*, 2022, **13**(1): 2 079.
- [47] TOBERT J A. Lovastatin and beyond: The history of the HMG-CoA reductase inhibitors [J]. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2003, **2**(7): 517-526.
- [48] LUO G, LI Z, LIN X, et al. Discovery of an orally active VHL-recruiting PROTAC that achieves robust HMGCR degradation and potent hypolipidemic activity in vivo [J]. *Acta Pharm. Sin. B*, 2020, **11**(5): 1 300-1 314.
- [49] WU Y, YANG Y, WANG W, et al. PROTAC technology as a novel tool to identify the target of lathyrane diterpenoids [J]. *Acta Pharm. Sin. B*, 2022, **12**(11): 4 262-4 265.
- [50] LI Y, ZENG Z W, CHEN D, et al. Facilitated drug repurposing with artemisinin-derived PROTACs: Unveiling PCLAF as a therapeutic target [J]. *J. Med. Chem.*, 2023, **66**(16): 11 335-11 350.
- [51] HANAFI M, CHEN X, NEAMATI N. Discovery of a napabucasin PROTAC as an effective degrader of the E3 Ligase ZFP91 [J]. *J. Med. Chem.*, 2021, **64**(3): 1 626-1 648.
- [52] CHEN S, BI K, LIANG H, et al. PROTAC derivatization of natural products for target identification and drug discovery: Design of evodiamine-based PROTACs as novel REXO4 degraders [J]. *J. Adv. Res.*, 2023, doi: 10.1016/j.jare.2023.10.014.
- [53] 刘接卿, 李婕, 张佩玺, 等. 淫羊藿素 PROTACs 及其制备方法和应用; CN 114 890 995 [P]. 2023-06-20.
- [54] QI Z, YANG G, DENG T, et al. Design and linkage optimization of ursane-thalidomide-based PROTACs and identification of their targeted-degradation properties to MDM2 protein [J]. *Bioorg. Chem.*, 2021, **111**: 104 901.