· 药咖论坛 ·

新技术/策略在难成药靶点药物发现中的作用

茹慷洁[1,2]，黄蕙[2,3]，孟乾[2]，周虎[1,2,3*]

（1. 南京中医药大学新中药学院，江苏 南京 210023；2. 中国科学院上海药物研究所，上海 200120；3. 国科大杭州高等研究院，浙江 杭州 310024）

[摘要] 药物靶标发现是现代医药研发的基石，对实现药物高选择性和有效治疗至关重要。作为一项新兴技术，化学蛋白质组学结合化学生物学与蛋白质组学，推动了药物靶标发现的进展。概述针对难成药靶点的突破性技术/策略，包括蛋白降解剂、共价抑制剂等，探讨基于化学蛋白质组学的靶标发现技术在难成药靶点药物发现中的作用，为攻克难成药靶点提供了新的思路和方向。

[关键词] 难成药靶点；靶标发现；化学蛋白质组学

[中图分类号] R914.2；R915 [文献标志码] A [文章编号] 1001-5094（2025）08-0589-09

DOI: 10.20053/j.issn1001-5094.20250064

The Role of New Technologies and Strategies in Drug Discovery for Undruggable Targets

RU Sujie[1,2], HUANG Hui[2,3], MENG Qian[2], ZHOU Hu[1,2,3]

(1. School of Chinese Materia Medica, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 2. Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200120, China; 3. Hangzhou Institute for Advanced Study, University of Chinese Academy of Sciences, Hangzhou 310024, China)

[Abstract] Drug target discovery, a critical part of modern drug development, is essential for achieving high selectivity and therapeutic efficacy. As an emerging technology that combines proteomics with chemical biology, chemical proteomics has advanced target discovery. This review presents breakthrough technologies and strategies for targeting traditionally undruggable proteins, including protein degraders and covalent inhibitors, and explores the role of chemical proteomics-based target identification technologies in the discovery of therapeutics for these undruggable targets, aiming to provide new insights and directions for overcoming the limitations of undruggable targets.

[Key words] undruggable target; target discovery; chemical proteomics

药物发现是现代生物医学研究中最具挑战性和关键性的领域之一。随着疾病机制研究的不断深入及技术手段的发展，药物靶点的识别与验证已成为新药研发过程中的核心环节。药物靶点通常指在体内与药物产生特异性结合并介导生物学效应的分子，主要包括蛋白质、核酸及其他大分子。通过调控这些靶点的功能，药物能够干预相关信号通路，从而达到治疗目的[1-2]。当前药物研发主要依赖2种策略，分别是基于表型的药物发现（phenotypic-based drug discovery，PDD）和基于靶点的药物发现（target-based drug discovery，TDD）。PDD通过观察细胞、组织或整个有机体的表型变化来筛选和识别药物，依赖于对生物体整体的反应来评估药效，适用于机制复杂或多基因相关的疾病研究；TDD则针对特定生物分子靶点设计化合物，针对性强，可直接作用于靶点分子进行特异性调控。然而，PDD的局限性在于难以解析分子机制和确认核心靶点，导致后续优化困难；TDD面临的关键挑战则是传统可成药靶点的数量有限，且对靶点结构特征有较高要求[1-2]。

目前，传统药物靶点大多是具有明确结构特征、能够稳定结合小分子的蛋白质。然而，越来越多研究发现，许多在生理和病理过程中发挥关键作用的蛋白质并不具备典型的小分子结合口袋，这类难成药靶点通常具有结构无序、高度动态或依赖蛋白-蛋白相互作用（protein-protein interaction，PPI）维持功能等特征，使其难以通过常规药物设计策略进行有效干预，严重阻碍新药开发。随着基础研究和新技术/策略（如蛋白降解剂、共价抑制剂等）的不断发展，诸如Kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因同源物（Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog，*KRAS*）编码蛋白等难成药靶点已不再是难以逾越的障碍。其中，化学蛋白质组学靶标发现技术的发展为PDD和TDD策略的互补融合提供了可能，能够高效地将药物、靶点和疾病联系起来，极大地促进了难成药靶点的药物发现。其将定量蛋白质组学技术与化学生物学方法或生物物理学原理相结合，从而实现小分子在细胞或组织体系中的全局靶点筛选，

接受日期：2025-03-28

基金项目：上海东方英才计划领军人才项目（No. LJ2023123）

* 通信作者：周虎，研究员

研究方向：基于质谱的药物蛋白质组学

E-mail：zhouhu@simm.ac.cn

为药物靶标发现技术带来了重大突破[3]。

1 难成药靶点蛋白的类型与靶向策略研究

在药物研发过程中，TDD 策略面临的挑战之一是针对已知靶标蛋白如何设计有效结合的小分子化合物。在药物发现与研究中有效的药物靶点至关重要，其不仅具备与药物特异性结合的能力，还需要在体内发挥明确的治疗效果[4]。理想的可成药靶点通常具有清晰的结构和功能特征，能与配体形成高亲和力的结合，并通过传统药物设计策略进行有效干预。然而随着越来越多靶标蛋白被发现，难成药靶点蛋白逐渐受到关注。这类蛋白通常具有复杂的结构和多样的功能，因其表面平坦且缺乏可靶向的结合口袋而难以作为药物的靶点，为药物设计带来了重大挑战[5-6]。

1.1 难成药靶点蛋白的分类

难成药靶点蛋白通常分为以下几类：1）小 GTP 酶类（small GTPases）。如大鼠肉瘤病毒癌基因同源物（rat sarcoma viral oncogene homolog，*RAS*）编码的 RAS 家族蛋白 [包括 KRAS 蛋白、Harvey 大鼠肉瘤病毒癌基因同源物（Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog，*HRAS*）编码的 HRAS 蛋白、神经母细胞瘤大鼠肉瘤病毒癌基因同源物（neuroblastoma rat sarcoma viral oncogene homolog，*NRAS*）编码的 NRAS 蛋白]，因表面缺乏可靶向口袋而被认为是难成药蛋白[6-7]。2）磷酸酶类。与激酶的作用相反，磷酸酶是一种催化蛋白质 [包括丝氨酸（serine，Ser）、苏氨酸和酪氨酸残基] 去磷酸化的酶。根据结构特征，磷酸酶被分为碱性磷酸酶和酸性磷酸酶。由于磷酸酶的结构存在很多相似性，具有选择性低和副作用大等问题，因此被认为是难成药靶点蛋白[8]。3）转录因子类。转录因子在基因表达调控中发挥核心作用，其功能失调与多种疾病密切相关，如肿瘤相关转录因子 [p53 和髓细胞瘤病毒癌基因同源物（myelocytomatosis virus oncogene homolog，*Myc*）编码的 Myc 蛋白等] 在癌症发生发展中起重要作用。然而，转录因子通常缺乏典型的小分子结合口袋，由于其结构异质性和缺乏结合位点，无法被小分子药物靶向[6,9]。4）表观遗传类靶点。该类靶点在基因表达调节中起关键作用，主要通过 DNA 甲基化、组蛋白修饰等过程改变基因表达模式，进而影响细胞分化、肿瘤发生及多种疾病的进程，例如组蛋白甲基转移酶 zeste 增强子同源物 2 在多种癌症中呈高表达，可抑制抑癌基因的表达。然而由于表观遗传修饰具有可逆性和复杂性，调控范围广泛且特异性差，易产生脱靶效应和毒性，因此其靶向干预面临较大挑战[10]。5）PPI 及其网络。PPI 在生物过程和细胞周期调节中至关重要。而大多数 PPI 表面相对平坦，使得传统药物难以有效结合。例如，B 细胞淋巴瘤/白血病-2 家族的抗凋亡蛋白和本质无序蛋白，由于其高度动态的结构和缺乏稳定的结合位点而难以靶向。近年来蛋白降解靶向嵌合体（proteolysis-targeting chimera，PROTAC）等新型技术的出现，为 PPI 靶点的成药性提供了新方案[11-12]。

1.2 靶向难成药蛋白的药物设计策略与前沿技术

随着机制研究和多种新技术的快速发展，难成药靶点药物的研发已不再是难以攻克的难题。目前，一些新技术和药物设计策略被应用于靶向难成药蛋白，其中常用的技术/策略包括蛋白降解剂、共价抑制剂、变构调节剂、化学诱导邻近技术（chemically induced proximity，CIP）、基因治疗和人工智能（artificial intelligence，AI）制药等[13]。

1.2.1 蛋白降解剂 蛋白降解剂是目前针对难成药靶点的重要研发策略之一，可通过细胞内蛋白降解途径靶向目标蛋白降解。蛋白降解剂包括多种类型，如 PROTAC、分子胶降解剂（molecular glue degrader，MGD）、溶酶体靶向嵌合体（lysosome-targeting chimera，LYTAC）、自噬体偶联化合物（autophagosome-tethering compound，ATTEC）等，其中，PROTAC 和分子胶是研究最为广泛的 2 种类型[8,14]。

真核细胞中负责蛋白质降解的两大系统分别是泛素-蛋白酶体系统和自噬 - 溶酶体系统。PROTAC 是通过泛素-蛋白酶体系统靶向蛋白降解的一种技术[15]。PROTAC 分子通常由 E3 泛素连接酶配体、靶蛋白配体，以及连接这两者的连接子（linker）组成。其中，E3 泛素连接酶配体负责特异性招募 E3 泛素连接酶，靶蛋白配体则识别并结合目标蛋白[16]。PROTAC 分子可将 E3 泛素连接酶募集到靶蛋白附近，为其贴上泛素标签，并最终被蛋白酶体降解。PROTAC 技术最早由 Crews 等人于 2001 年提出，其原理是利用机体内固有的蛋白降解系统降低靶标蛋白水平，从而实现治疗疾病的目的[5,17]。与传统小分子抑制剂或抗体药物相比，PROTAC 的优势在于其对靶标蛋白的抑制作用不依赖于药物直接结合，而是通过降解目标蛋白发挥作用。这一特性使其尤其适用于传统难以靶向的蛋白质，如无活性位点或无序结构蛋白等。目前，PROTAC 技术已成为难成药靶点研发领域的重要工具之一。

MGD 是一种能够诱导泛素 E3 连接酶复合体与靶标蛋白发生相互作用，从而促进蛋白降解的靶向

降解策略。MGD 通过拉近目标蛋白与 E3 连接酶的空间距离，增强、稳定或诱导两者形成新的蛋白间相互作用，改变靶蛋白或 E3 连接酶的构象，从而促进目标蛋白的泛素化降解。与 PROTAC 相比，MGD 通常由单一小分子组成，不需要额外的靶蛋白配体和连接子，具有较高的通透性和更佳的药代动力学特性。临床上免疫调节剂沙利度胺、来那度胺、泊马度胺等就是典型的分子胶药物，它们通过介导淋巴细胞增殖关键转录因子（IKAROS 家族锌指蛋白 1/3）降解来发挥抗肿瘤作用 [18-19]。

此外，基于自噬-溶酶体系统的新型蛋白降解策略也逐渐受到关注，包括 LYTAC 和 ATTEC 等方法。通过溶酶体途径可降解难以通过泛素-蛋白酶体系统处理的靶标蛋白，有望与现有蛋白降解剂互补，拓展可降解靶标蛋白的范围 [20]。

1.2.2 共价抑制剂 共价抑制剂一般通过温和的反应性官能团与靶标蛋白的氨基酸残基结合形成共价键，在药物结合引起的非共价相互作用之外提供额外的亲和力。针对缺乏表面“口袋”的难成药蛋白质，共价抑制剂在药物研发中展现出极大潜力，为治疗复杂疾病提供了新的可能性。

针对 KRAS 的共价抑制剂是当前难成药靶点研究的热点之一。KRAS 是一种小 GTP 酶，在细胞生长调控信号通路中起着至关重要的作用 [21-22]。然而，KRAS 蛋白结构近球形，缺乏明确的小分子结合位点，长期以来被认为是难成药靶点。这一难题在 2021 年取得突破：美国食品药品监督管理局（Food and Drug Administration，FDA）批准了首个靶向 *KRAS*^{G12C} 突变的创新药 sotorasib，标志着“不可成药”靶点药物研发进入新阶段。Sotorasib 是通过共价结合突变位点 Cys12，将 KRAS 锁定在非活性的鸟苷二磷酸结合状态，从而阻断其信号传导功能，实现对肿瘤的特异性抑制。目前 sotorasib 可用于治疗携带 *KRAS*^{G12C} 突变的腺癌、转移性结直肠癌和非小细胞肺癌等多种疾病，为相关肿瘤患者带来治疗希望 [23-24]。

表皮生长因子受体（epidermal growth factor receptor，EGFR）共价抑制剂通过特异性与酪氨酸激酶活性位点结合，抑制 EGFR 激酶活性，从而抑制肿瘤细胞增殖 [25-26]。例如，第 3 代 EGFR 抑制剂奥希替尼和阿美替尼已被广泛应用于治疗 *EGFR* 突变引起的非小细胞肺癌 [27]。此外，p53 作为调控细胞周期和凋亡的关键肿瘤抑制蛋白，其功能往往受突变或失活影响，导致细胞增殖异常，因此通过共价抑制剂恢复 p53 功能成为癌症治疗的全新思路和重要策略之一 [28-29]。

1.2.3 变构调节剂 传统药物设计通常聚焦于靶标蛋白的正构位点，即直接作用于活性位点来调节蛋白质的功能。然而对于难成药靶点蛋白，变构调节剂作为一种创新的药物设计策略，引起越来越多的关注。与直接作用于活性位点的传统药物不同，变构调节剂通过结合靶标蛋白的变构位点，改变蛋白质的构象状态，从而影响其与底物的亲和力及结合能力 [30]。变构调节剂可分为 2 类：变构激活剂（allosteric activator），通过结合变构位点使受体构象发生变化，从而改变活性位点构象，促进底物和受体的结合；变构抑制剂（allosteric inhibitor），结合于变构位点，从而阻止底物与活性位点的结合 [31-32]。近年来，基于共价抑制与变构调节的联合策略，为难成药靶点蛋白的干预提供了新的解决方案。例如，上述提到的 sotorasib，作为首个获得 FDA 批准的 KRAS 共价抑制剂，同时也具备变构抑制剂的特性。Sotorasib 通过与变构位点残基共价结合，使 KRAS^{G12C} 突变体稳定在失活状态，从而发挥抑制作用 [21-22]。

1.2.4 CIP CIP 是一种利用双功能小分子诱导，使难成药靶点蛋白与效应分子相互靠近而发生蛋白质相互作用，从而实现特定生物学效应的技术。该技术分为 2 个独立的结构域：靶蛋白结合域和效应蛋白募集域。研究表明，CIP 技术可促进伴侣蛋白和 KRAS 接近，形成“伴侣蛋白-药物分子-KRAS^{G12C}”三元复合物，从而抑制 KRAS 活性，抑制癌细胞生长增殖，对非小细胞肺癌和结直肠癌有显著的治疗效果，为难成药靶点的药物研发提供了新思路 [33]。

1.2.5 基因治疗 沿中心法则上游出发，针对传统小分子难以靶向的难成药蛋白，可通过基因层面干预，实现对这些靶点的功能调控，从而拓展难成药靶点蛋白的药物发现策略。基因治疗通过靶向 DNA 或 RNA 来调节基因表达，常见的策略包括运输正常基因以替代突变基因、导入新基因、激活或敲除突变基因等。例如正在开发的靶向 *c-Myc* mRNA 小分子，通过抑制 c-Myc 蛋白的表达来阻断其功能 [32]。此外，成簇的规律间隔短回文重复序列（clustered regularly interspaced short palindromic repeats，CRISPR）/CRISPR 相关蛋白 9（CRISPR-associated protein 9，Cas9）技术能够直接靶向 DNA 进行基因敲除，相较于传统依赖转录后调控的方法，更具精确性和持久性，有望在难成药靶点药物研究中发挥优势 [34]。

1.2.6 AI 制药 近年来，随着 AI 和深度学习等技术不断发展，AI 制药作为一项新兴工具在难成药靶点药物开发中逐渐取得优势 [35]。近期，新一代 AI 生物分子结构预测模型 AlphaFold 3 发布，实现了对蛋白质、核酸分子、配体小分子及离子等结构的预

测。AI 制药可通过数据分析和 AI 算法实现难成药蛋白的结构预测以及药物设计，拓展初始蛋白结构库，推动难成药靶点的发现以及成药机制的深入探究 [36]。目前，全球已有多个针对难成药靶点在研的 AI 制药药物处于研发阶段，如 Relay Therapeutics 开发的含 Src 同源 2 结构域蛋白酪氨酸磷酸酶 2（Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 2，SHP2）抑制剂 GDC-1971（RLY-1971），结合并稳定 SHP2 的非活性构象 [35]。此外，AI 技术还可以应用于 RNA 研究，通过 AI 模型训练生成并分析大量 RNA 的结构和功能方面的数据，为难成药靶点药物的研发提供了新的可能性 [37]。

2 基于化学蛋白质组学的靶标发现技术

随着难成药靶点研究的不断深入，依赖于已知靶点的药物发现方法日益显现出局限性，难以有效覆盖结构不规则、功能尚不明确或缺乏典型配体结合口袋的难成药靶点。而基于化学蛋白质组学的药物靶标发现技术能够在无需先验靶点信息的条件下，系统解析小分子与蛋白质的相互作用，还能够高通量地识别难成药靶点的小分子配体，为靶标发现和机制解析提供了强有力的支持。该技术通过高分辨率质谱结合生物信息学分析，可系统筛选与小分子结合的蛋白质，进而识别潜在靶标。基于化学蛋白质组学的靶标发现技术主要分为基于化学探针的靶标发现方法和非标记的靶标发现方法（见表 1）。其中，基于化学探针的靶标发现方法依赖于特定化学探针捕获靶标蛋白，是化学蛋白质组学中的经典策略；相比之下，非标记的靶标发现方法主要是通过检测蛋白质稳定性或构象变化来识别靶标，随着高分辨率质谱和定量蛋白质组学的发展，近年来受到越来越多的关注。

表 1 基于化学蛋白质组学的靶标发现技术

Table 1 Chemical proteomics-based target identification techniques

技术类别	方法	是否需标记	是否适用于活细胞	优势	局限性
基于化学探针的靶标发现方法	CCCP	是	否	探针合成相对简单，可直接从复杂生物体系中富集靶标蛋白	可能因空间位阻掩盖结合位点，膜蛋白鉴定效率低
	ABPP	是	是	灵敏度高，富集效率高，应用广泛	生物素标签可能干扰化合物活性，易出现假阳性结果
非标记的靶标发现方法	CETSA（TPP）	否	是	无需标记，可实现全蛋白质组筛选	高温可能破坏蛋白复合物或导致非特异性聚集
	DARTS（LiP-MS，PELSA）	否	否	无需标记，适用于蛋白酶敏感的靶标蛋白	低丰度蛋白难以检测，蛋白酶选择影响实验结果
	SPROX	否	否	无需纯化蛋白，通过标记蛋白质氨基来确定肽的相对含量	仅限含甲硫氨酸蛋白，需较强氧化条件
	CPP	否	否	材料简单，操作便捷	仅适用于体外裂解体系

CCCP：compound-centric chemical proteomics（以化合物为中心的化学蛋白质组学）；ABPP：affinity-based protein profiling（基于活性的蛋白质分析）；CETSA：cellular thermal shift assay（细胞热转移分析）；TPP：thermal proteome profiling（热蛋白质组分析）；DARTS：drug affinity responsive target stability（药物亲和反应靶点稳定性方法）；LiP-MS：limited proteolysis-mass spectrometry（限制性蛋白水解-质谱分析）；PELSA：peptide-centric local stability assay（以肽段为中心的蛋白质局部稳定性探测方法）；SPROX：stability of proteins from rates of oxidation（基于氧化速率的蛋白稳定性方法）；CPP：chemical denaturation and protein precipitation（基于化学变性的蛋白沉淀法）

2.1 基于化学探针的靶标发现方法

基于化学探针的靶标发现方法主要利用含特定报告基团或亲和基团的化学探针，在细胞裂解液或组织匀浆中孵育，识别和富集与探针结合的蛋白质，并借助定量蛋白质组学技术对潜在靶标蛋白进行分析和鉴定。这一过程通常被称为基于探针的化学蛋白质组学（probe-based chemical proteomics）[37-38]。这种方法的核心优势在于可直接捕获靶标蛋白，极大提高了靶点鉴定的特异性和准确性。根据工作流程不同，基于化学探针的靶标发现方法通常分为以化合物为中心的化学蛋白质组学（compound-centric chemical proteomics，CCCP）和基于活性的蛋白质分析（affinity-based protein profiling，ABPP）[39]。

2.1.1 CCCP CCCP 方法是基于小分子与靶标蛋白之间的强亲和力相互作用，进行靶标蛋白捕获和鉴定的一种方法。该方法将亲和纯化色谱与质谱技术相结合，在小分子化合物或特定药物上引入可衍生化的官能团，使其固定于固相基质（如琼脂糖珠或磁性颗粒）上。随后将修饰后的固相基质与细胞裂解物共孵育，使靶标蛋白与小分子结合，最终通过定量蛋白质组学技术对富集的靶标蛋白进行分析和鉴定 [40]。

CCCP 方法是化合物靶标发现中较为经典的方法，不仅可以精确捕获靶标蛋白，还能揭示小分子与蛋白质相互作用的竞争性结合信息 [41]。例如，Wang 等 [42] 利用 CCCP 技术发现膜联蛋白 A2（annexin A2，ANXA2）是抗肿瘤药物博来霉素的直接结合靶标蛋白。博来霉素与 ANXA2 的结合可阻碍转录因子 EB 诱导的自噬通量，从而导致肺纤

维化的发生。这项研究不仅揭示了博来霉素致纤维化的分子机制，也突出了 CCCP 方法在靶标发现及作用机制解析中的价值。随着技术发展，CCCP 技术有望在难成药靶点发现中发挥作用，为药物安全性改进和机制导向的药物设计提供有力支持。

2.1.2 ABPP ABPP 最早由美国 Cravatt 团队提出，在 CCCP 技术的基础上发展而来，是一种更为方便、适用范围更广的方法 [43]。ABPP 的核心原理是利用基于活性位点导向的化学探针，通过共价或非共价方式特异性结合蛋白质的活性位点，从而实现功能状态酶和药物靶标等蛋白质的识别 [44]。相较于 CCCP，ABPP 可检测识别蛋白质的活化状态，在机制研究及先导化合物筛选中显示出极大的优势。其中，ABPP 的关键步骤在于活性化学探针的设计与合成。探针通常由反应基团和化学标签 2 个主要部分组成，反应基团负责与蛋白质活性位点结合或共价修饰，化学标签（如生物素、荧光素等标记分子）负责富集靶标蛋白。近年来研究表明，ABPP 技术能够利用特异性化学探针靶向蛋白质中具有高反应活性的氨基酸 [如半胱氨酸（cysteine，Cys）、赖氨酸（lysine，Lys）和 Ser 等] 残基，在活细胞体系中直接监测小分子与蛋白质的相互作用，从而拓展了可靶向蛋白的范围，为共价抑制剂的新靶标发现提供了重要线索。以北京大学王初教授团队开发的基于数据非依赖采集（data-independent acquisition，DIA）的 ABPP 方法为例，该方法面向含有共价弹头（warhead，如丙烯酰胺或氯乙酰胺）的小分子片段库，通过竞争性结合实验，在活细胞中识别小分子与靶蛋白中 Cys 残基的共价相互作用。这种方法在一次筛选中可覆盖 20 000 余个 Cys 位点，既保留了先导化合物在活细胞内的真实结合特性，又突破了难成药靶点的技术瓶颈，为那些缺乏传统结合口袋的蛋白质提供了潜在的共价靶点 [45]。

2.2 非标记的药物靶标发现方法

目前，基于化学探针的靶标发现方法已得到广泛应用，但仍存在一定的局限性，例如化学探针可能会导致非特异性结合影响靶标的准确性，化学修饰过程费时费力，可能改变靶蛋白的构象或活性从而使其失去生物功能。为克服这些局限性，近年来非标记的药物靶标发现方法得到广泛的研究与快速发展。其中主要的非标记靶标发现方法包括细胞热转移分析（cellular thermal shift assay，CETSA）、热蛋白质组分析（thermal proteome profiling，TPP）、药物亲和反应靶点稳定性方法（drug affinity responsive target stability，DARTS）、限制性蛋白水解-质谱分析（limited proteolysis-mass spectrometry，LiP-MS）、以肽段为中心的蛋白质局部稳定性探测方法（peptide-centric local stability assay，PELSA）、基于氧化速率的蛋白稳定性方法（stability of proteins from rates of oxidation，SPROX）以及基于化学变性的蛋白沉淀法（chemical denaturation and protein precipitation，CPP）等。这些方法的核心原理相似：当蛋白质与配体药物结合后，其稳定性通常会增加，进而增强对热变性、蛋白酶水解和氧化变性等外界因素的抵抗力。相比于基于化学探针的靶标发现方法，非标记靶标发现方法能够减少因化学修饰带来的干扰，提高靶标鉴定的可靠性，因此在药物发现及难成药靶点研究中具有广阔的应用前景。

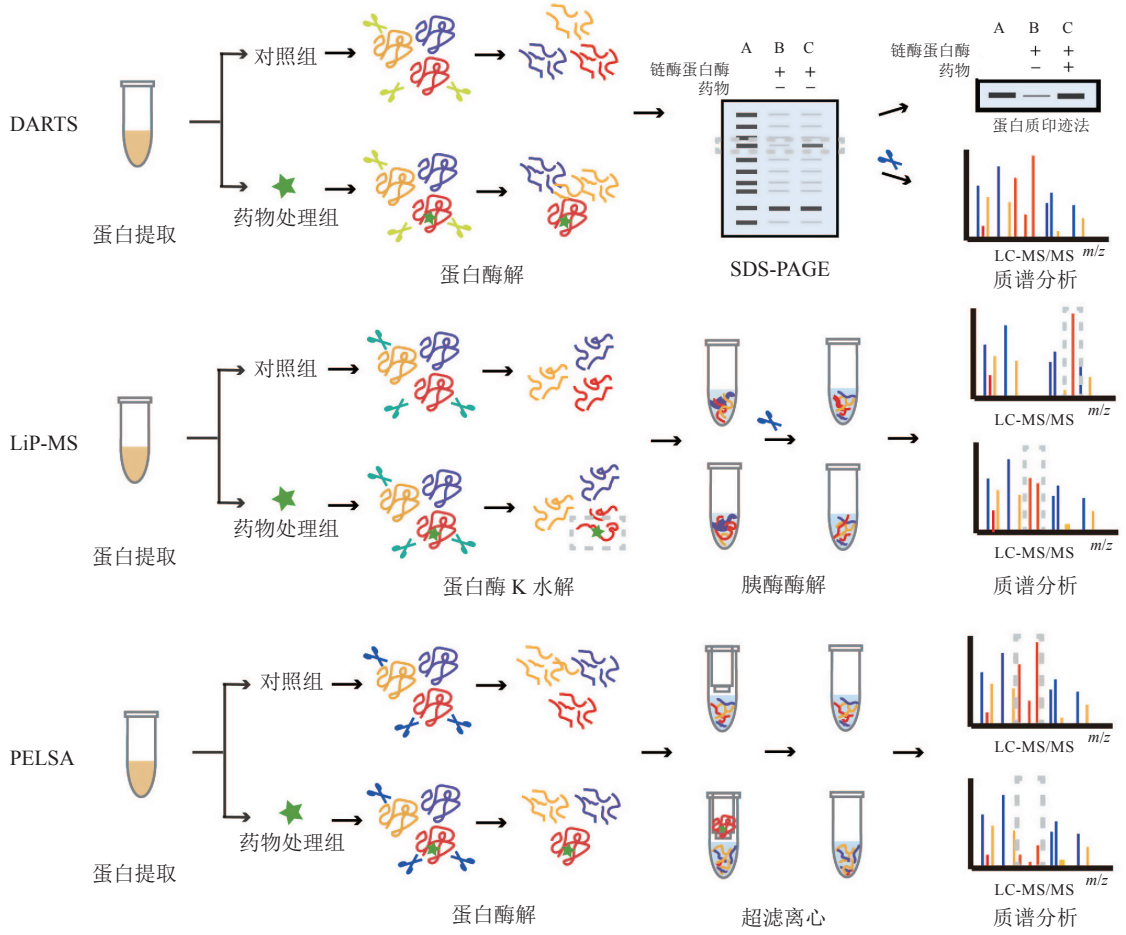
2.2.1 CETSA CETSA 最早由瑞典 Karolinska 研究所于 2013 年开发，其原理是通过温度变化观察蛋白质在药物存在下的稳定性变化。当蛋白质与药物结合时，其热稳定性通常会变化，导致蛋白质的热熔曲线改变，从而检测潜在的靶点 [46]。

CETSA 可适用于细胞裂解液、完整细胞或组织样本，然而该方法的局限性在于短时间内只能检测少量蛋白质。近年来，研究者开发了一种新技术——TPP，恰好弥补了这一缺点 [47]。TPP 技术将 CETSA 与定量蛋白质组学技术结合，通过质谱对不同温度下未变性的可溶性蛋白质进行定量分析，系统性识别潜在的靶标蛋白。目前广泛应用于抗肿瘤药物靶标发现及蛋白质相互作用研究，为非标记靶标发现提供了更高效、全面的解决方案 [46]。例如，Walters 等 [48] 利用 TPP 技术发现小分子 Ro-08-2750 可显著改变 RNA 结合蛋白（RNA-binding proteins，RBPs）的热稳定性，特别是含 RNA 识别基序（RNA recognition motif，RRM）结构域的 RBPs。其中，RBPs 因表面缺乏明显的小分子结合口袋，且功能高度依赖 RNA 介导的复合物结构，被视为难成药靶点。这一发现提示 Ro-08-2750 可广谱干扰多个 RBP-RNA 复合物，而非单一靶点抑制，为 RNA 结合蛋白等难成药靶点的药物发现提供了新的思路。

2.2.2 DARTS DARTS 是经典的非标记靶标发现方法之一。该技术由 Lomenick 等 [49] 于 2009 年开发，其核心原理是基于药物与靶标蛋白结合后可增强靶标蛋白结构稳定性，从而抗蛋白酶水解。如图 1 所示，在生理条件下，蛋白质构象处于动态变化状态，能够被各种蛋白酶降解，而当药物结合时，靶标蛋白的构象更加稳定，对蛋白酶水解的抵抗能力显著增强。目前 DARTS 方法广泛应用于小分子靶标的初步筛选和验证，在老药新用研究中也发挥重要作用，有研究通过 DARTS 方法发现传统抗过敏药物地氯雷他定可直接靶向 *N*-肉豆蔻酰转移酶 1，抑制其介

导的蛋白质肉豆蔻酰化从而发挥抗肝癌作用[50]。

然而，DARTS 技术存在一定的局限性，其不适用于药物与靶标蛋白结合亲和力较弱的情况，同时受限于不同蛋白质对蛋白酶降解的固有差异，从而导致靶标检测的灵敏度不足。近年来，在 DARTS 的基础上发展了一种新技术——LiP-MS[51]。其原理是当药物与小分子结合后，蛋白构象发生变化，遮盖了原有的广谱性蛋白酶酶切位点，从而产生不同的酶切片段。LiP-MS 通常采用蛋白酶 K 进行有限水解，切割蛋白质暴露在外的未折叠部分。随后将蛋白变性后用胰酶进行二次酶切，仅酶切 Lys 或精氨酸位点的肽段，而其他氨基酸位点肽段由蛋白酶 K 酶切产生，最终通过液相色谱-串联质谱分析比较药物处理组和对照组的肽段分布及蛋白丰度差异，从而实现靶标筛选（见图 1）[52]。这一方法在高通量筛选与高灵敏度检测方面表现出色，广泛应用于小分子药物靶标鉴定，有研究表明利用 LiP-MS 技术鉴定到蛋白磷酸酶 2A 作为抗癌药物洛米替定的直接靶点，为难成药靶点药物研究和作用机制解析提供了有力工具[53]。



DARTS：drug affinity responsive target stability（药物亲和反应靶点稳定性方法）；SDS-PAGE：sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis（十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳）；LC-MS/MS：liquid chromatography-tandem mass spectrometry（液相色谱-串联质谱）；LiP-MS：limited proteolysis-mass spectrometry（限制性蛋白水解-质谱分析）；PELSA：peptide-centric local stability assay（以肽段为中心的蛋白质局部稳定性探测方法）

图 1 非标记的药物靶标发现方法——DARTS，LiP-MS 和 PELSA 技术路线

Figure 1 Label-free target identification methods: technical routes of DARTS, LiP-MS and PELSA

2.2.3 PELSA PELSA 是最新发展的一种基于肽段水平检测蛋白质局部稳定性的技术，应用于药物靶标筛选和蛋白质相互作用研究[54]。其原理是根据药物与靶标蛋白结合后会改变蛋白质结合区域的稳定性，从而影响蛋白的酶切效率。在实验过程中，利用大量胰蛋白酶（酶与底物质量比为 1/2），将蛋白质酶切成小肽段，并与未被酶切的蛋白大片段分离开来，最终利用定量蛋白质组学技术检测肽段丰度发生变化的蛋白质，从而有效筛选并鉴定潜在的靶标蛋白和结合区域（见图 1）。相较于 LiP-MS，PELSA 大大降低了样品的复杂度，具有更高的靶标蛋白鉴定灵敏度，能够在蛋白质组水平精准识别多种配体的靶标蛋白及其结合区域，在检测蛋白质翻译后修饰、抗体表位以及弱蛋白-配体相互作用等方面发挥

重要作用[54]。因此，PELSA 技术在药物靶标筛选、药物辅助设计及蛋白功能状态研究等方面具有广泛的应用前景，未来有望助力解析复杂蛋白功能，推动难成药靶点药物的开发与应用。

2.2.4 SPROX 通常情况下，与药物结合的蛋白质相对不容易被化学变性剂诱导发生变性，靶标蛋白的抗氧化能力增强。SPROX 就是根据这一原理，通过检测靶标蛋白中甲硫氨酸（methionine，Met）的氧化水平，从而测定并识别靶标蛋白。目前 SPROX 技术成功应用于酵母系统中，并鉴定出白藜芦醇的多个靶点，包括与胞质醛脱氢酶和翻译相关的蛋白质，进一步揭示了白藜芦醇的作用机制[55]。然而，SPROX 技术的局限性在于其对 Met 残基的依赖性，而蛋白质中 Met 含量较低，限制了可检测的蛋白质范围。此外，SPROX 仅适用于细胞裂解液的分析，因此在一定程度上限制了该技术的进一步应用。

2.2.5 CPP CPP 是一种新型的非修饰目标分子靶标发现策略，用于大规模检测靶标蛋白和定量蛋白质 - 药物相互作用。该方法结合 SPROX 技术与 TPP 技术原理，利用化学变性剂诱导蛋白质沉淀，比较给药组和对照组样品中的蛋白质沉淀情况从而筛选靶标蛋白并量化蛋白质-药物结合亲和力。CPP 方法操作简单，适用于高通量筛选，能减少背景噪音，有效提高蛋白质组学覆盖率。然而对化学变性剂的选择需谨慎，以免影响靶标蛋白的稳定性和活性[56]。

3 结语与展望

药物发现是现代生物医学研究中至关重要的领域，随着科学技术的不断进步，难成药靶点蛋白的研究逐渐成为药物发现领域的热点和挑战。难成药靶点蛋白因其结构复杂、缺乏传统结合口袋等特性，难以通过常规药物设计策略进行有效干预。靶向这类蛋白虽具挑战性，但也为疾病治疗提供了新机遇。目前针对难成药靶点蛋白，已经开发了多种直接或间接靶向的技术 / 策略，包括蛋白降解剂、共价抑制剂、变构调节剂和基因治疗等，在靶向设计和技术开发等方面取得了显著进展。然而这些技术 / 策略也面临着分子复杂性、成药性瓶颈以及潜在脱靶风险等多重挑战，有待进一步通过多维度技术整合，实现对难成药靶标蛋白更精准的识别与表征。

近年来，基于化学蛋白质组学的靶标发现技术取得了重要突破，为难成药靶点药物发现与先导化合物筛选提供了有力工具，加速了其向成药靶点的转化进程[57]。基于化学蛋白质组学的靶标发现技术与其他技术相比有着显著优势。目前，BridGene Biosciences 公司开发创建的化学蛋白质组学平台 IMTAC™（Isobaric Mass Tagged Affinity Characterization）可在活细胞中对全蛋白质组，特别是难以成药且与疾病密切相关的靶点，筛选小分子药物，为难成药靶点的药物开发带来了前所未有的机遇[58]。此外，AI 和机器学习技术的快速发展也为药物发现不断注入新活力。整合计算模拟和大数据分析，不仅能够加速药物分子结构的优化，还能精准预测靶标蛋白的动态变化与配体结合模式。这些技术的发展将进一步提高药物的靶向性与亲和力，为难治疾病的临床治疗开辟新的方向，为药物研发带来革命性突破。

[参考文献]

[1] Ha J, Park H, Park J, *et al*. Recent advances in identifying protein targets in drug discovery[J]. *Cell Chem Biol*, 2021, 28(3): 394–423.

[2] Jensen A J, Martinez Molina D, Lundbäck T. CETSA: a target engagement assay with potential to transform drug discovery[J]. *Future Med Chem*, 2015, 7(8): 975–978.

[3] Schenone M, Dančík V, Wagner B K, *et al*. Target identification and mechanism of action in chemical biology and drug discovery[J]. *Nat Chem Biol*, 2013, 9(4): 232–240.

[4] Qin R, You F M, Zhao Q, *et al*. Naturally derived indole alkaloids targeting regulated cell death (RCD) for cancer therapy: from molecular mechanisms to potential therapeutic targets[J]. *J Hematol Oncol*, 2022, 15(1): 133.

[5] Zhang G, Zhang J, Gao Y, *et al*. Strategies for targeting undruggable targets[J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2022, 17(1): 55–69.

[6] Dang C V, Reddy E P, Shokat K M, *et al*. Drugging the 'undruggable' cancer targets[J]. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17(8): 502–508.

[7] Kim D, Xue J Y, Lito P. Targeting KRAS($G^{12}C$): from inhibitory mechanism to modulation of antitumor effects in patients[J]. *Cell*, 2020, 183(4): 850–859.

[8] Zhang C, Liu Y, Li G, *et al*. Targeting the undruggables: the power of protein degraders[J]. *Sci Bull*, 2024, 69(11): 1776–1797.

[9] Lu Y, Yang Y, Zhu G, *et al*. Emerging pharmacotherapeutic strategies to overcome undruggable proteins in cancer[J]. *Int J Biol Sci*, 2023, 19(11): 3360–3382.

[10] Ye F, Huang J, Wang H, *et al*. Targeting epigenetic machinery: emerging novel allosteric inhibitors[J]. *Pharmacol Ther*, 2019, 204: 107406.

[11] Lu H, Zhou Q, He J, *et al*. Recent advances in the development of protein-protein interactions modulators: mechanisms and clinical trials[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1): 213.

[12] Qiu Y, Li X, He X, *et al*. Computational methods-guided design of modulators targeting protein-protein interactions (PPIs)[J]. *Eur J Med*

Chem, 2020, 207: 112764.

[13] Xie X, Yu T, Li X, *et al*. Recent advances in targeting the "undruggable" proteins: from drug discovery to clinical trials[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 335.

[14] Venkatesan J, Murugan D, Lakshminarayanan K, *et al*. Powering up targeted protein degradation through active and passive tumour-targeting strategies: current and future scopes[J]. *Pharmacol Ther*, 2024, 263: 108725.

[15] Yao T, Xiao H, Wang H, *et al*. Recent advances in PROTACs for drug targeted protein research[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(18): 10328.

[16] Zhao H Y, Yang X Y, Lei H, *et al*. Discovery of potent small molecule PROTACs targeting mutant EGFR[J]. *Eur J Med Chem*, 2020, 208: 112781.

[17] Sakamoto K M, Kim K B, Kumagai A, *et al*. Protacs: chimeric molecules that target proteins to the Skp1-Cullin-F box complex for ubiquitination and degradation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(15): 8554–8559.

[18] Li P, Hu X, Fan Z, *et al*. Novel potent molecular glue degraders against broad range of hematological cancer cell lines *via* multiple neosubstrates degradation[J]. *J Hematol Oncol*, 2024, 17(1): 77.

[19] Ito T, Ando H, Suzuki T, *et al*. Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity[J]. *Science*, 2010, 327(5971): 1345–1350.

[20] Banik S M, Pedram K, Wisnovsky S, *et al*. Lysosome-targeting chimaeras for degradation of extracellular proteins[J]. *Nature*, 2020, 584(7820): 291–297.

[21] Moore A R, Rosenberg S C, McCormick F, *et al*. RAS-targeted therapies: is the undruggable drugged?[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2020, 19(8): 533–552.

[22] Huang L, Guo Z, Wang F, *et al*. KRAS mutation: from undruggable to druggable in cancer[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 386.

[23] Chen Y, Yin Z, Westover K D, *et al*. Advances and challenges in RAS signaling targeted therapy in leukemia[J]. *Mol Cancer Ther*, 2025, 24(1): 33–46.

[24] Miyazaki S, Kitazawa M, Nakamura S, *et al*. Targeting *KRAS*-mutant pancreatic cancer through simultaneous inhibition of KRAS, MEK, and JAK2[J]. *Mol Oncol*, 2025, 19(2): 377–390.

[25] Boilève A, Smolenschi C, Lambert A, *et al*. KRAS, a new target for precision medicine in colorectal cancer?[J]. *Cancers (Basel)*, 2024, 16(20): 3455.

[26] Ostrem J M L, Shokat K M. Direct small-molecule inhibitors of KRAS: from structural insights to mechanism-based design[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2016, 15(11): 771–785.

[27] Robinson N D, Canavan M E, Zhan P L, *et al*. Treatment patterns and clinical outcomes in patients with *EGFR*-mutated non-small-cell lung cancer after progression on osimertinib[J]. *Clin Lung Cancer*, 2025, 26(1): 9–17.e3.

[28] Bista M, Smithson D, Pecak A, *et al*. On the mechanism of action of SJ-172550 in inhibiting the interaction of MDM4 and p53[J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e37518.

[29] Vazquez A, Bond E E, Levine A J, *et al*. The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2008, 7(12): 979–987.

[30] Tsai C J, Nussinov R. A unified view of "how allostery works"[J]. *PLoS Comput Biol*, 2014, 10(2): e1003394.

[31] Engers D W, Lindsley C W. Allosteric modulation of class C GPCRs: a novel approach for the treatment of CNS disorders[J]. *Drug Discov Today Technol*, 2013, 10(2): e269–e276.

[32] Wootten D, Christopoulos A, Sexton P M. Emerging paradigms in GPCR allostery: implications for drug discovery[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2013, 12(8): 630–644.

[33] Schulze C J, Seamon K J, Zhao Y, *et al*. Chemical remodeling of a cellular chaperone to target the active state of mutant KRAS[J]. *Science*, 2023, 381(6659): 794–799.

[34] Sekhon H S, London C A, Sekhon M, *et al*. C-MYC antisense phosphosphorodiamidate morpholino oligomer inhibits lung metastasis in a murine tumor model[J]. *Lung Cancer*, 2008, 60(3): 347–354.

[35] McAndrews K M, Xiao F, Chronopoulos A, *et al*. Exosome-mediated delivery of CRISPR/Cas9 for targeting of oncogenic $Kras^{G12D}$ in pancreatic cancer[J]. *Life Sci Alliance*, 2021, 4(9): e202000875.

[36] Chen H, Lu D, Xiao Z, *et al*. Comprehensive applications of the artificial intelligence technology in new drug research and development[J]. *Health Inf Sci Syst*, 2024, 12(1): 41.

[37] Taylor A M, Williams B R, Giordanetto F, *et al*. Identification of GDC-1971 (RLY-1971), a SHP2 inhibitor designed for the treatment of solid tumors[J]. *J Med Chem*, 2023, 66(19): 13384–13399.

[38] Oda Y, Owa T, Sato T, *et al*. Quantitative chemical proteomics for identifying candidate drug targets[J]. *Anal Chem*, 2003, 75(9): 2159–2165.

[39] Meissner F, Geddes-McAlister J, Mann M, *et al*. The emerging role of mass spectrometry-based proteomics in drug discovery[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2022, 21(9): 637–654.

[40] Miao Q, Zhang C C, Kast J. Chemical proteomics and its impact on the drug discovery process[J]. *Expert Rev Proteomics*, 2012, 9(3): 281–291.

[41] Wright M H, Sieber S A. Chemical proteomics approaches for identifying the cellular targets of natural products[J]. *Nat Prod Rep*, 2016, 33(5): 681–708.

[42] Wang K, Zhang T, Lei Y, *et al*. Identification of ANXA2 (annexin A2) as a specific bleomycin target to induce pulmonary fibrosis by impeding TFEB-mediated autophagic flux[J]. *Autophagy*, 2018, 14(2): 269–282.

[43] Zhang X, Wang Q, Li Y, *et al*. Solvent-induced protein precipitation for drug target discovery on the proteomic scale[J]. *Anal Chem*, 2020, 92(1): 1363–1371.

[44] Rix U, Superti-Furga G. Target profiling of small molecules by chemical proteomics[J]. *Nat Chem Biol*, 2009, 5(9): 616–624.

[45] Yang F, Jia G, Guo J, *et al*. Quantitative chemoproteomic profiling

with data-independent acquisition-based mass spectrometry[J]. *J Am Chem Soc*, 2022, 144(2): 901−911.

[46] 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.

[47] Perrin J, Werner T, Kurzawa N, *et al*. Identifying drug targets in tissues and whole blood with thermal-shift profiling[J]. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(3): 303−308.

[48] Walters K, Sajek M P, Murphy E, *et al*. Small-molecule Ro-08-2750 interacts with many RNA-binding proteins and elicits MUSASHI2-independent phenotypes[J]. *RNA*, 2023, 29(10): 1458−1470.

[49] 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): 21984−21989.

[50] Tan X P, He Y, Yang J, *et al*. Blockade of NMT1 enzymatic activity inhibits N-myristoylation of VILIP3 protein and suppresses liver cancer progression[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 14.

[51] Malinovska L, Cappelletti V, Kohler D, *et al*. Proteome-wide structural changes measured with limited proteolysis-mass spectrometry: an advanced protocol for high-throughput applications[J]. *Nat Protoc*, 2023, 18(3): 659−682.

[52] Lu H, Zhu Z, Fields L, *et al*. Mass spectrometry structural proteomics enabled by limited proteolysis and cross-linking[J]. *Mass Spectrom Rev*, 2024.

[53] Zuo Q, Liao L, Yao Z T, *et al*. Targeting PP2A with lomitapide suppresses colorectal tumorigenesis through the activation of AMPK/Beclin1-mediated autophagy[J]. *Cancer Lett*, 2021, 521: 281−293.

[54] Li K, Chen S, Wang K, *et al*. A peptide-centric local stability assay enables proteome-scale identification of the protein targets and binding regions of diverse ligands[J]. *Nat Methods*, 2025, 22(2): 278−282.

[55] 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): 4948−4958.

[56] Meng H, Ma R, Fitzgerald M C. Chemical denaturation and protein precipitation approach for discovery and quantitation of protein-drug interactions[J]. *Anal Chem*, 2018, 90(15): 9249−9255.

[57] Morishita EC, Nakamura S. Recent applications of artificial intelligence in RNA-targeted small molecule drug discovery[J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2024, 19(4): 415−431.

[58] BridGene Biosciences. BridGene Biosciences' IMTAC™ Small Molecule Discovery Platform Featured in Multiple Presentations at 2021 AACR-NCI-EORTC Virtual International Conference on Molecular Targets and Cancer Therapeutics[EB/OL].(2021-10-07)[2025-03-28]. https://www.prnewswire.com/news-releases/bridgene-biosciences-imtac--small-molecule-discovery-platform-featured-in-multiple-presentations-at-2021-aacr-nci-eortc-virtual-international-conference-on-molecular-targets-and-cancer-therapeutics-301395183.html.



[专家介绍] **周虎**：博士，中国科学院上海药物研究所质谱中心负责人/研究员/博士生导师/课题组长，国家自然科学基金青年科学基金项目（A类）获得者，中国生物化学与分子生物学会蛋白质组学专委会委员，中国生物化学与分子生物学会分子系统生物学专委会委员。2001年于南开大学获生物学学士学位，2007年于中科院上海生物化学与细胞生物学研究所获生物化学与分子生物学博士学位。2008—2012年在渥太华大学系统生物学研究所进行博士后研究，其间担任质谱实验室主管，2012年3月担任中国科学院上海药物研究所研究员和课题组长。研究方向为基于质谱的药物蛋白质组学研究：1）有机小分子和生物大分子相互作用的质谱方法学研究；2）转化蛋白质组学研究；3）药物蛋白质组学研究，以寻找药物小分子的作用靶点及其作用机制。已在 *Cell*, *Cancer Cell* 等 SCI 期刊上发表论文 100 余篇。