

基于分子原型和分子探针的药用活性分子蛋白作用靶标研究

杨婉琪, 张崇敬*

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 天然产物活性物质与功能国家重点实验室, 北京 100050)

摘要: 药用活性分子是药物活性的载体和实施者。研究它们的蛋白作用靶标不但能够阐明其作用机制而且能够加深研究人员对生物体系的理解。本文综述了一些在临床使用的药物分子和在研活性分子的蛋白作用靶标, 它们具有抗炎、抗疟、抗肿瘤等生物活性。研究方法侧重于两种化学蛋白质组学方法: 基于活性的蛋白质组学分析和细胞热迁移分析。基于活性的蛋白质组学分析利用修饰活性分子后得到的分子探针来了解化合物与靶标之间的相互作用机制, 可用于识别小分子的蛋白质靶标。细胞热迁移分析, 不必对活性分子进行任何化学修饰, 而是利用活性分子与靶标蛋白结合后提高了蛋白的热稳定性, 结合定量蛋白质组学方法实现靶标蛋白的发现。这两种方法互为补充, 能够有效阐明药用分子的蛋白作用靶标, 发现其药效作用机制、揭示其毒性作用机制、发现新型的药用靶标, 最终推动药物研发的进程。

关键词: 化学蛋白质组学; 活性分子探针; 细胞热迁移分析; 靶点探索; 药物开发

中图分类号: R916 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)07-1439-14

Protein targets of medicinally active molecules based on their original structures and molecular probes

YANG Wan-qi, ZHANG Chong-jing*

(State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: Medicinally active molecules are those that have pharmacological effects. Research on protein targets of these molecules not only clarifies their mechanism of action, but also deepens our understanding of biological systems. Here we review recent advances in protein targets of drugs used in clinical practice or in preclinical research. They have various functions including anti-inflammatory, anti-malarial, anti-tumor and other biological activities. Activity-based protein profiling (ABPP) and cellular thermal shift assay (CETSA) are two useful methods to identify the protein targets of small molecules. ABPP depends on a derivative active molecule probe to pull down the protein targets to reveal the interaction mechanisms between the active molecules and targets. Drug target engagement also can be assessed by means of CETSA based on ligand-induced changes in protein thermal stability. In the CETSA approach, the active molecules do not need to be chemically modified. Combining the CETSA method with quantitative mass spectrometry is an effective approach to study the effect of compounds on the thermal profile of a cellular proteome and identify the protein targets. ABPP and CETSA can be complementary and effectively clarify the protein targets. The study of protein targets will help reveal the mechanism of action of medicinal molecules, reveal toxic mechanisms and aid in the discovery of new medicinal targets to promote the process of drug development.

Key words: chemical proteomics; activity-based protein profiling; cellular thermal shift assay; target identification; drug development

收稿日期: 2019-12-20; 修回日期: 2020-02-20.

基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程 (2017-12M-4-005).

*通讯作者 Tel: 86-10-63165311, E-mail: zhangchongjing@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-1039

活性分子的发现是药物研发的初始阶段,也是药物研发的最关键环节。活性分子的发现通常包括两种筛选方式,一是基于已知靶标进行的筛选和发现^[1],根据靶标的空间结构,采用计算机模拟设计、化学合成等方法得到活性化合物,这些化合物虽然作用于已知的靶标,但在体内仍存在其他未知的蛋白靶标,这些未知的靶标可能会引起致命的毒副作用,例如葡萄牙制药公司研发的脂肪酸酰胺水解酶抑制剂 BIA 10-2474 由于脱靶效应导致了 5 名临床 I 期试验受试者神经系统损伤,其中一名在服用该抑制剂后第 9 天死亡^[2]。另外一种是基于细胞或动物的表型筛选方法得到的活性分子^[3],虽有较好的活性,但它们确切的作用机制和靶标未知,这限制了活性分子的进一步结构优化。因此,这两种筛选方式得到的活性分子都需要进行蛋白靶标的研究。

靶标发现和功能确证是功能基因组学和创新药物研发的重要任务,然而靶标的确证工作非常困难。传统的靶标发现和确证技术多依赖生命组学技术,周期长,风险高。20 世纪 90 年代中期,人们提出了“化学生物学”的新概念^[4]。化学生物学家通过发展新的化学反应、标记监测方法和新的活性小分子探针,系统地探索和阐明一个信号通路到信号网络并最终涉及整个生命体系的分子过程,对于发现新的靶蛋白有着重要的意义。小分子探针在信号传导网络中也发挥重要作用,药物化学家可以利用其找到药物靶标,效率高、周期短、花费少,可提高小分子化合物的成药性^[4,5]。目前对药用活性分子的蛋白靶标研究主要有两种方法:基于活性的蛋白质组学分析 (activity-based protein profiling, ABPP) 和细胞热迁移分析 (cellular thermal shift assay, CETSA)。

1 ABPP

ABPP 是一项基于活性分子探针的化学蛋白质组学技术,是化学生物学的一个重要部分,它可以在复杂的蛋白质组体系中直接获取某类蛋白的活性功能信息^[6]。

ABPP 是于 1999 年开启的一个研究领域, Cravatt 和 Bogoy 是这个领域的先驱。ABPP 运用基于活性的探针 (activity-based probe, ABP) 在复杂的蛋白质组中特异性地标记处于功能状态下的蛋白质,反映了蛋白质在生命体系中的功能。基于活性的蛋白质组学分析最初被应用于阐明蛋白的活性,随着研究的深入,该技术具有广泛的应用。在药物化学领域,ABPP 主要用来阐明活性药物分子的作用靶标和小分子抑制剂的筛选^[7]。

用于药物分子靶标研究的 ABP 通常包括 3 部分:药物分子、连接基团和报告基团 (图 1a)。连接基团一般是碳链或者聚乙二醇链,将药物分子和报告基团连

接在一起。根据活性小分子与靶蛋白作用方式的不同,分子探针的设计主要包括两大类:一是能够与靶蛋白发生共价结合的药物分子,能够与靶蛋白发生共价结合的结构片段包括如含 Michael 受体、 β -内酯、 β -内酰胺、氮丙啶、环氧化物、卤代羰基化合物、异硫氰酸酯等结构 (图 1c),这类探针的设计需要在不影响活性的区域通过连接基团引入报告基团,从而得到活性保持的分子探针,这些探针能够选择性地与蛋白质组中某一类蛋白的活性中心结合,并与其执行重要催化功能的亲核性氨基酸发生共价性结合,从而将探针分子共价性地标记在靶蛋白上。二是对于以非共价键形式与靶标结合的药物分子,在设计探针时,除了引入连接基团和报告基团外,还要引入在紫外线照射下与靶蛋白形成共价键的光反应基团。常用的光交联基团包括双吡丙啶、二苯甲酮和芳基叠氮化物^[8],与靶蛋白结合的方式如图 1d 所示。报告基团通常是荧光染料和生物素 (biotin),分别用于蛋白标记情况的分析与靶蛋白的分离、富集和鉴定,如图 1b。随着生物正交反应的发展,报告基团逐渐发展为惰性体积较小的正交反应基团,如炔基或叠氮基,在探针标记完成后,再利用 Click 反应,即铜催化的环加成反应,在探针上连接荧光素或生物素。这样可以减少活性分子探针的空间位阻,有利于探针保持原有的生物活性,简化探针的合成步骤^[7,9,10],增加探针的标记效率^[11]。相对于叠氮基,炔基更常用于可点击化探针的设计,因为它的对应探针具有较低的背景信号干扰^[12]。

ABPP 用于药物活性分子的靶标研究是一个经典的化学生物学研究。它涉及到化学合成、生物学实验和蛋白质组学等。在具体研究过程中,首先利用化学合成方法得到活性保持的分子探针,然后将分子探针与被研究细胞或者组织孵育并实现探针分子与靶蛋白的共价结合。蛋白被修饰的情况可通过 SDS-PAGE 进行凝胶成像分析,在该方法中,只有那些被探针标记的蛋白才发出荧光^[13-15]。基于质谱的检测方法通常与生物素化的 ABP 一起使用,可以使用链霉抗生物素蛋白树脂将生物素标记的蛋白质与细胞中的其他蛋白质分离,然后通过基于质谱的多肽测序确定这些标记蛋白的属性^[16]。在进行靶标分离富集的过程中,会产生蛋白的非特异性吸附,为去除这些背景蛋白的干扰,人们发展了定量蛋白质组学。常用的定量蛋白质组学方法包括:利用稳定同位素标记的氨基酸来标记蛋白的 SILAC 方法^[17];利用等量异位标记多肽片段的 TMT^[18]、iTRAQ^[19]方法;以及非标定量蛋白质组学方法 (label free)^[20]。这些定量蛋白质组学方法的发展提高了靶蛋白鉴定的准确性。

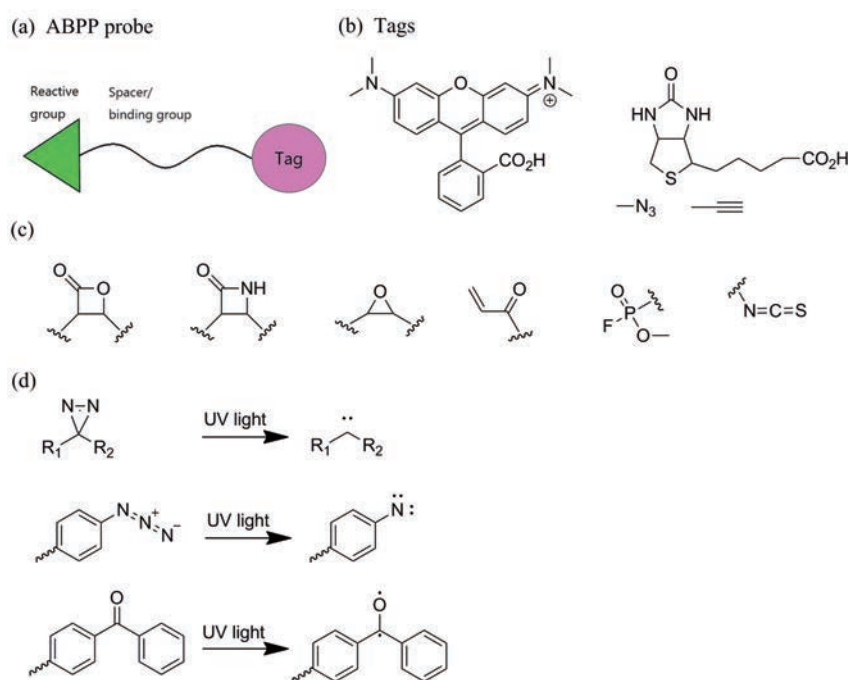


Figure 1 (a) Representative structure of an activity-based protein profiling (ABPP) probe, which contains a reactive group (green), a spacer or binding group (black), and a reporter tag (purple); (b) Visualization and enrichment of enzymes can be achieved by a variety of reporter tags including fluorophores (e.g., rhodamine) and biotin. Clickable handles including azide and alkyne can also serve as a reporter tag; (c) Common electrophilic traps that react with nucleophilic residues in proteins; (d) Commonly used photoreactive groups and their reaction under UV light

在药物研发中, ABPP 的另外一个重要应用是通过竞争性的 ABPP 实验筛选和优化改变蛋白质活性的小分子化合物, 特别是对那些结构新颖但尚未有筛选方法的蛋白质^[21,22]。在这个应用中, 待筛选的候选小分子化合物首先加入到细胞裂解液中 (或活细胞里), 再加入活性分子探针对靶蛋白进行标记。如果小分子化合物可以通过攻击靶蛋白的酶活中心而抑制它的生

物活性, 那么它就可以竞争性地阻断活性分子探针对靶蛋白的标记, 导致荧光偏振信号降低。与加入溶剂的空白对照组相比, 探针荧光偏振信号的减弱程度间接反映了该小分子对靶标蛋白的抑制效力 (图2)。

2 CETSA

CETSA 的原理是药物分子与蛋白的结合使蛋白热稳定性提高, 即结合药物的蛋白将显示出热稳定性

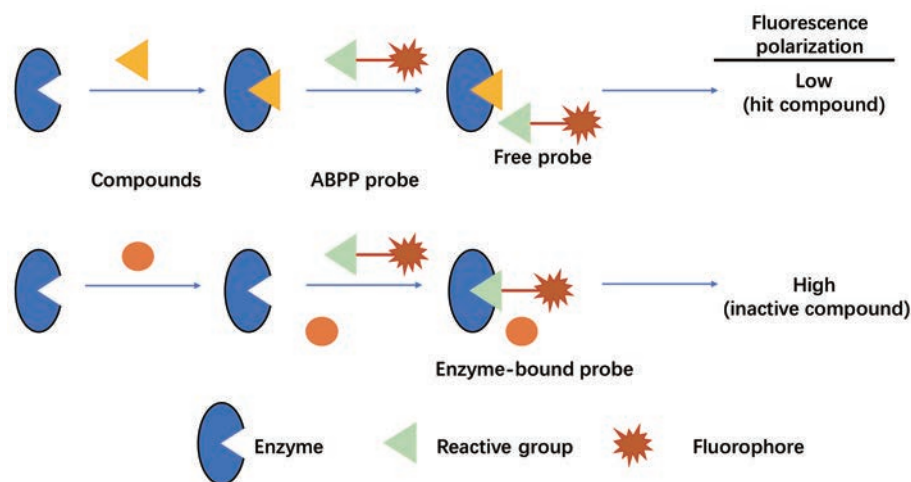


Figure 2 Inhibitor discovery by competitive ABPP. The selectivity and potency of enzyme inhibitors can be determined by preincubation of a proteome with inhibitors followed by probe treatment. Inhibitor-bound enzymes are detected by a reduction in labeling intensity of ABPP probe

增加,可溶性蛋白会在更高的温度下变性析出^[23]。该方法可以在细胞裂解液、活细胞或组织内检测蛋白质与药物的结合,与定量质谱结合可评估整个蛋白质组中蛋白质热稳定性的变化^[24,25]。蛋白随温度变化产生的热稳定性变化即该蛋白的热图谱,目前已经确定了多达7 000种蛋白质的细胞内热图谱。通过分析细胞中给药前后各种蛋白热稳定性的变化,可以在活细胞中鉴定活性分子的潜在靶标。通过CETSA方法确定药物分子的潜在靶标蛋白质后,可通过等温剂量反应(isothermal dose-response, ITDR)实验确定化合物的效力,在生理环境中评估药物-蛋白质相互作用的能力,这是药物研发中的重要步骤。将CETSA和ITDR与高分辨质谱检测相结合,引入热蛋白质组分析的方法(thermal proteome profiling, TPP)。

TPP的研究过程通常包括两个实验:一种是固定药物分子的浓度,改变孵育的温度(TPP-temperature range, TPP-TR);另外一种则是固定孵育的温度,改变药物分子的浓度(TPP-compound concentration range, TPP-CCR)。在TPP-TR实验中,先用固定的化合物浓度在37~67 °C的温度范围内对样品进行处理,结合TMT定量蛋白质组学分析,可以在蛋白质组范围内对药物靶向的蛋白质进行鉴定。蛋白靶标鉴定之后,可在固定温度下,用不同浓度化合物处理样品得到浓度依赖的蛋白稳定性变化。

TPP-TR实验流程:培养细胞,然后将细胞或细胞裂解液与对照溶剂或活性分子孵育,将处理过的细胞或细胞裂解液分为10等份,每份试样在如图3a所示温度下加热。随后通过反复冻融法裂解细胞,提取完整细胞的蛋白样品,每个样品都用胰蛋白酶消化,并用TMT10同位素标签分别标记,将10个温度处理的样品混合并通过LC-MS/MS分析。使用Mascot和isobar-Quant软件包进行蛋白质鉴定和定量,拟合溶解曲线,计算对照溶剂组和化合物组的蛋白熔点 T_m ,最后使用TPP R语言包确定因活性分子处理而导致 T_m 明显改变的蛋白质^[26]。

TPP-CCR实验流程:如图3b所示,提取细胞,将细胞或细胞裂解液与溶剂或9种浓度药物孵育,所有10个样品都在相同温度下加热,提取蛋白样品后用TMT10同位素标签标记。将10个标记的样品混合,并通过LC-MS/MS进行分析。使用Mascot和isobar-Quant软件包进行蛋白质鉴定和定量,使用TPP R软件包的CCR工作流程拟合剂量-反应曲线,计算热稳定性受药物影响的蛋白质的 pEC_{50} 数值^[26]。

TPP方法中使用等量异位同位素标签TMT标记多肽,在一级质谱中这些标签具有相同的分子量,但在

二级质谱中,报告离子以不同的分子量出现。这样做可以减少质谱实验的次数,减少样品处理和仪器条件等带来的误差。对于确定每种肽段或蛋白质的浓度随温度和药物处理的相对变化的函数,是通过用R语言编写的TPP软件包来完成的,蛋白的含量就可以通过这种多重质谱的方式确认。在该方法中,不同温度处理得到的多肽最终混合在一起进行定量分析,因此该方法的特征是能够平行分析数千种蛋白质的含量来评估目标活性分子的蛋白靶标结合情况。它可用于鉴定活性分子在细胞提取物、活细胞以及组织中的蛋白靶标。由于活性分子作用可能引起下游蛋白的翻译后修饰水平的改变,从而引起蛋白热稳定性的变化,因此TPP方法还可以鉴定到这些药物作用的间接蛋白靶标。

3 药用活性分子蛋白作用靶标研究实例

3.1 上市药物药用活性分子的蛋白作用靶标研究

3.1.1 阿司匹林 阿司匹林(aspirin)是著名的解热镇痛抗炎药,从19世纪后期开始商业化生产,直到1971年,瓦内(Vane)发现环氧酶的抑制作用以及随后阿司匹林阻碍前列腺素合成的作用,才知道其主要作用方式,但还有很多未知的阿司匹林靶向的活性位点。Lin和他的同事^[27]对阿司匹林进行ABPP研究,采用一种基于酸切的定量蛋白质组分析(quantitative acid-cleavable activity-based protein profiling, QA-ABPP),可以实现靶标蛋白的属性和具体结合位点的确认。该方法共鉴定出了523种蛋白质作为阿司匹林的高置信度靶标,使用酸切的连接基团便于鉴定出乙酰化的位点。研究发现,除了已知的氨基酸靶标赖氨酸、丝氨酸和半胱氨酸之外,精氨酸、组氨酸、苏氨酸、酪氨酸和色氨酸也是阿司匹林的乙酰化位点。在Pratt及其同事^[28]的较早研究中,使用炔基修饰的阿司匹林分子Aspirin-yne(图4),共鉴定出120种靶向蛋白。其中一些靶标蛋白是组蛋白,表明阿司匹林可能是潜在的转录调节剂。

3.1.2 穿心莲内酯 穿心莲内酯(andrographolide)是药用植物穿心莲中的主要活性化合物,穿心莲内酯广泛用于治疗小儿肺炎和呼吸道感染,具有抗炎和抗癌作用,其结构如图5所示。Lin和他的同事^[29]通过将炔基连接到分子内酯部分的游离羟基上来合成穿心莲内酯探针(andrographolide-yne),通过ABPP技术鉴定出75种蛋白质作为穿心莲内酯的特异性靶标。这项研究特别关注该药物的抗癌特性,已确定的30多种蛋白质靶标与癌细胞死亡途径有关,另外15种蛋白质参与细胞迁移和转移。姚及其同事^[30]发表了另一项关于穿心莲内酯的ABPP研究,所合成的穿心莲内酯探针中引入了荧光基团,当目标蛋白亲核地攻击探针分子的

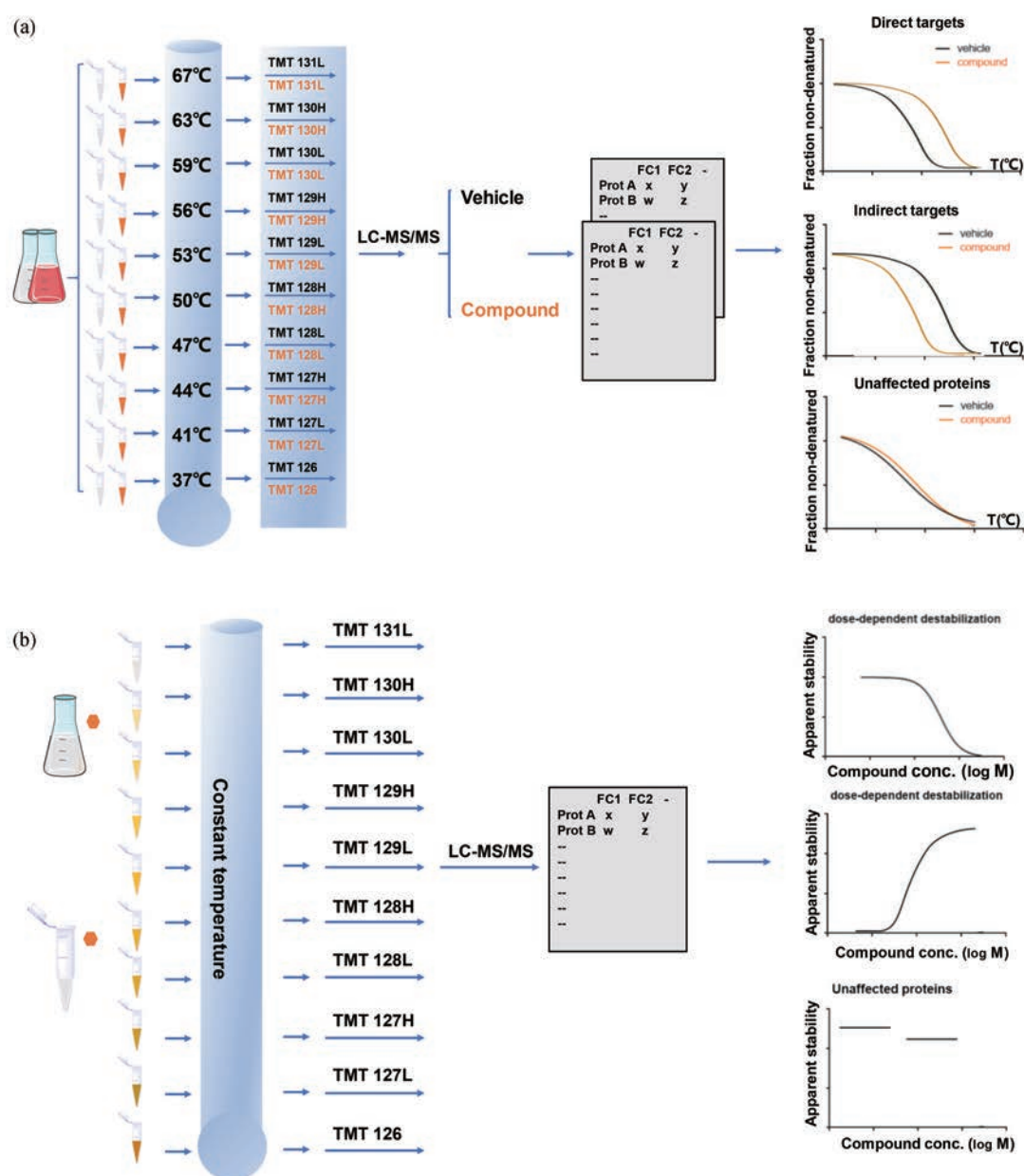


Figure 3 (a) TPP-TR experiment: cells are treated with vehicle or a compound in a range of temperatures; (b) TPP-CCR experiment: cells are treated with vehicle or a compound over a range of nine concentrations

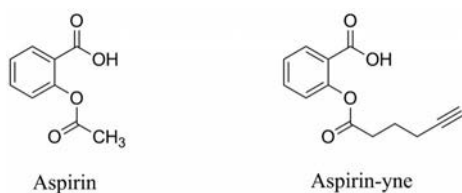


Figure 4 Structure of aspirin and its activity-based probe

α,β -不饱和酯基团时, 荧光团将被消除, 并可通过显微镜观察到。探针与 HepG2 和 A549 癌细胞一起孵育, 能够视觉检测存在高浓度靶蛋白的区域, 在进一步的实验中通过 LC-MS 鉴定了靶蛋白, 鉴定出 6 个独特的

蛋白质: NAMPT、ALDH1B1、GSR、ENDOD1、ADCK4 和 CYP4F11。

3.1.3 依罗替尼 2013 年批准的药物依罗替尼 (ibrutinib) 用于治疗 B 细胞恶性肿瘤。Buggy 等^[31]于 2010 年通过 ABPP 实验鉴定了该化合物的作用靶标, 他们将 BODIPY 荧光染料与母体分子连接得到探针 ibrutinib-based probe-1 (图 6a), 然后通过使用 B 细胞淋巴瘤细胞系 DOHH2 评估该分子的蛋白质结合能力。通过使用免疫沉淀, 探针分子在细胞中仅标记了一种蛋白质, 布鲁顿酪氨酸激酶 (bruton tyrosine kinase, BTK)。Cravatt 团队^[32]发表了另一项关于依罗替尼的研究, 主

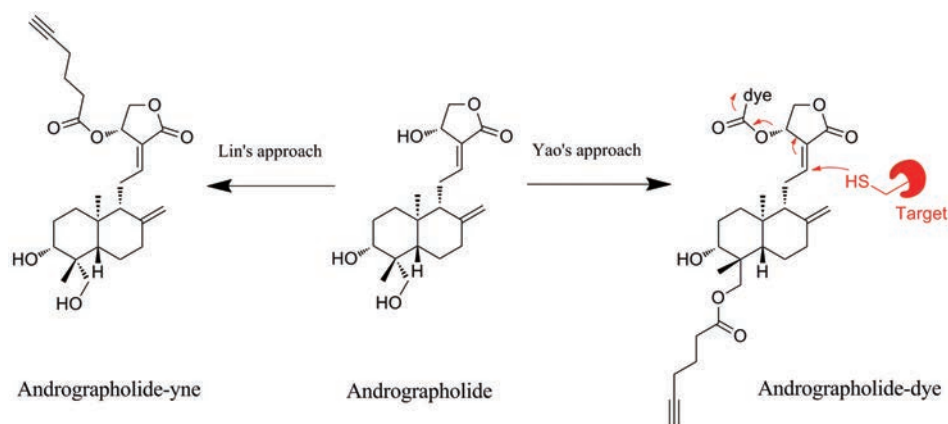


Figure 5 Structure of andrographolide and its activity-based probes

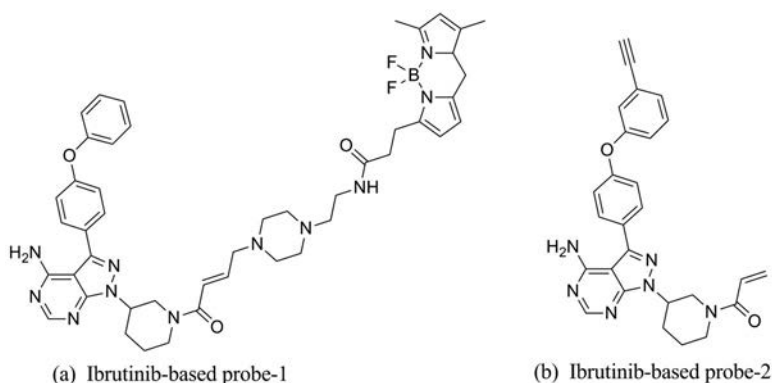


Figure 6 Ibrutinib-based ABPP probes developed by Buggy's group (a) and Cravatt's group (b)

要研究了它的靶标选择性, 探针 ibrutinib-based probe-2 的设计如图 6b 所示, 在依罗替尼末端的苯环上引入炔基得到活性保持的小分子探针, 通过 SILAC 定量蛋白质组学方法, 确定了它的蛋白质靶标, 除 BTK 和 EGFR 外, 还发现了其他激酶, 例如 BLK、MAP2K7、TEC 和 MLTK, 也确定了非激酶靶标 PTGES2 和 ALDH1A, 以及受体 AHR, 还鉴定到未表征蛋白质 FAM213A。

3.1.4 β -内酰胺类抗生素 β -内酰胺是一类大规模应用的抗生素, 早在 1990 年, 礼来公司就使用了放射性标记的青霉素衍生物对它们的确切作用方式进行了研究, 该类抗生素能结合青霉素结合蛋白 (penicillin binding proteins, PBPs)^[33]。针对广泛使用的抗生素, 例如氨苄青霉素 (ampicillin) 和头孢菌素 (cephalosporin),

Sieber 课题组^[34]合成了他们对应的炔基修饰的类似物 ampicillin-based probe 和 cephalosporin-based probe (图 7), 并在细菌裂解液和活细菌中对其进行了测试, 在荧光标记和 LC-MS/MS 分析之后没有检测到其他酶, 可以证明这些化合物对青霉素结合蛋白 (penicillin binding proteins, PBP) 酶类具有高亲和力。

3.1.5 福美司坦 福美司坦具有类固醇的结构, 用于绝经后妇女雌激素受体阳性乳腺癌的治疗, 通过抑制酶 P450 19A1 起作用。该酶属于细胞色素 P450 酶的超家族, P450 酶在异生物素和药物的代谢中起重要作用。Cravatt 组^[35]选择了竞争性 ABPP 方法来研究这种酶。首先设计了不同的探针分子 (CYP-450-targeting probes 1~5, 图 8), 通过其不同的结构来靶向各种 P450 酶。

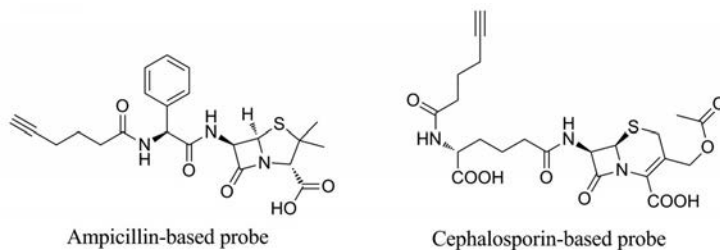


Figure 7 β -Lactam ABPP probes including ampicillin-based and cephalosporin-based probes

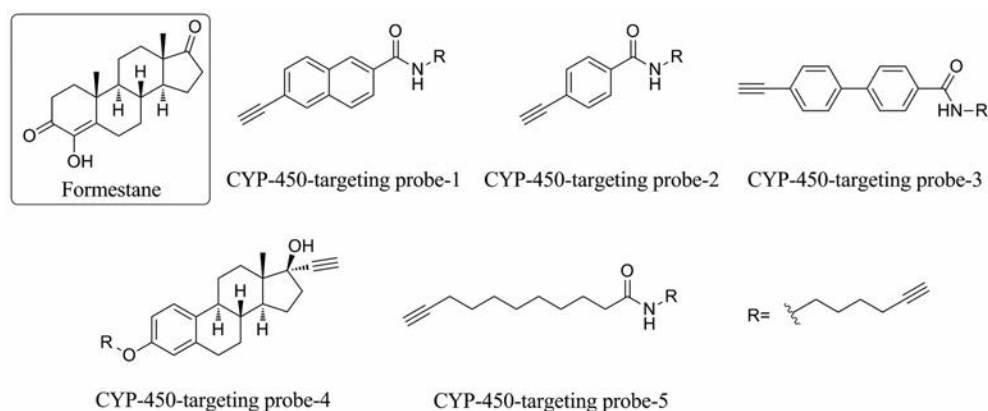


Figure 8 Chemical structure of formestane and probes used to profile the targets of formestane

这种竞争性 ABPP 方法证实了福美司坦优先抑制 P450 19A 酶。此外, 将该药物与人肝微粒体共同孵育并结合 ABPP 实验可以鉴定出该药物的两个脱靶蛋白, 即酶 P450 2C19 和 P450 3A4。

3.1.6 硼替佐米和卡非佐米 两种市售药物硼替佐米 (bortezomib) 和卡非佐米 (carfilzomib), 它们都用于治疗多发性骨髓瘤。Kirk 等^[36]使用 ABPP 方法分析了 bortezomib 和 carfilzomib 的靶标特异性差异。早期研究报道, 硼替佐米可抑制几种丝氨酸蛋白酶^[37], 如胰凝乳蛋白酶、CatG 和糜酶, 因此该实验应用竞争性 ABPP 方法, 选用可以靶向多种丝氨酸蛋白酶的工具探针 FP-biotin (图 9)。先用药物分子处理了裂解物再加入探针, 则药物靶向的条带在 SDS-PAGE 分析中消失, 再通过 MS 分析鉴定出药物靶向的酶。与卡非佐米相比, 硼替佐米抑制了某些细胞系中的特定蛋白酶, 如 HepG2 细胞中的 CatA 和 THP-1 细胞中的 CatG。硼替佐米含有一个硼酸部分, 负责与酶活性位点结合, 而卡非佐米具有环氧酮作为活性药效基团。因此, 可以假定硼替佐米的硼酸是其脱靶反应性的原因。为了证明这一假设, 合成了具有卡非佐米肽主链但含有硼酸的化合物, 并进行了 ABPP 实验。这些实验表明, 新合成的化合物还能够抑制几种丝氨酸蛋白酶, 这进一步表

明硼酸基团是硼替佐米脱靶活性的主要原因。

3.1.7 青蒿素 青蒿素 (artemisinin, ART) 是从一年生植物黄花蒿中分离出的含有过氧桥键的倍半萜内酯。目前在临床应用的是青蒿素的衍生物: 双氢青蒿素、蒿甲醚和青蒿琥酯, 它们能有效杀死疟原虫, 挽救了数百万人的生命, 是目前治疗疟疾的一线用药。Wang 等^[38]合成了基于活性的青蒿素探针 AP1 (图 10a), 利用 AP1 鉴定到了其在疟原虫中的 120 多种蛋白质, 这些蛋白涉及到多个生理过程。这些蛋白被青蒿素共价修饰后, 生物活性受到很大影响。例如, PyrK 和 LDH 被修饰后, 活性显著降低。进一步研究表明, 青蒿素对蛋白的烷基化修饰是依赖于 heme 而不是二价铁离子。所以, 这项研究的结果表明, 青蒿素是通过 heme 活化之后混杂靶向多种疟原虫蛋白而产生了抗疟作用。来自利物浦大学的 Paul 团队^[39]合成了新的青蒿素探针 P1、CP1、P2、CP2 (图 10b), 其中 P1 含有炔基, P2 含有叠氮, CP1 和 CP2 是它们的对照探针, 没有过氧桥键。与 Wang 等使用的探针相比, P1 和 P2 具有缩短的连接基团。分别使用铜依赖的和无需铜催化的点击化学反应, P1 和 P2 共同鉴定到的蛋白为 42 种。

最近的研究表明, ART 还具有抗癌特性。Xiao 团队^[40]合成了探针 ART-yne (图 10c), 它能在 HeLa 细胞中

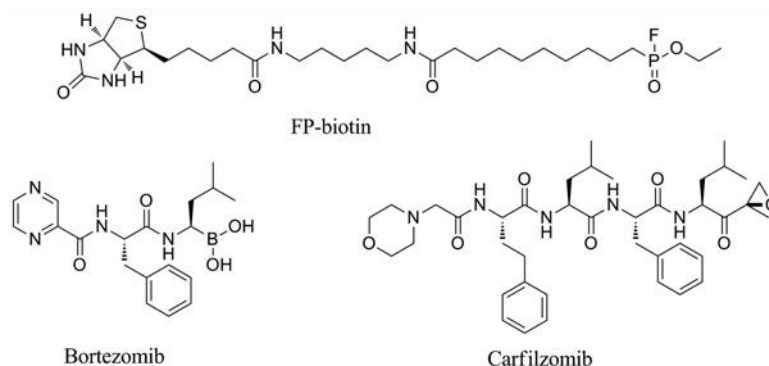


Figure 9 Structures of FP-biotin, bortezomib and carfilzomib

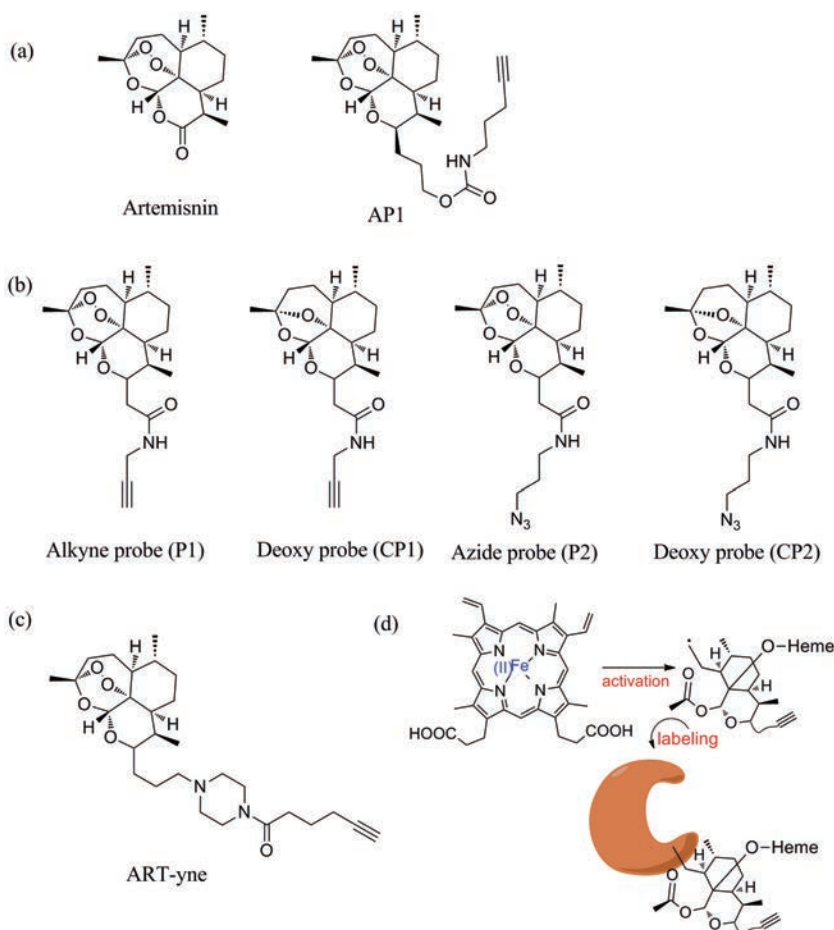


Figure 10 (a) Structures of artemisinin, AP1; (b) Structures of P1, CP1, P2 and CP2; (c) Structure of ART-yne; (d) Binding mode of heme-activated-artemisinin with proteins

靶向修饰4个人类谷胱甘肽-S-转移酶 (glutathione S-transferases, GST) 成员 GSTP1、GSTK1、GSTO1 和 MGST3。青蒿素可以抑制 GSTP1 和 GSTK1 的酶活性,抑制均在微摩尔范围内,青蒿素可能与这两个 GST 的催化结构域相互作用,如图 10d 所示,若相互作用是非特异性的表面附着则不会影响酶活性。

3.1.8 奎宁 奎宁 (quinine) 于 1820 年首次从金鸡纳树皮中分离出来,它是治疗严重疟疾的重要药物,是孕早期且未出现并发症的孕妇的首选治疗药物^[41]。绝大多数临床使用的抗疟疾药物是根据其在表型筛选中的有效抗疟疾特性进行鉴定的,这些药物的具体作用机制并不十分清楚。来自南洋理工大学的科学家们^[42]选择 CETSA 方法鉴定了恶性疟原虫蛋白质组中奎宁的直接蛋白靶标。由于红细胞质中血红蛋白和碳酸酐酶-1 的丰度高,可能干扰 MS 分析,因此他们使用体外红内期恶性疟原虫裂解物来研究药物与靶标之间的直接相互作用,也使用了完整的恶性疟原虫感染的红细胞来研究药物-靶标的结合。作者采用了两种现有的 CETSA 数据收集策略,首先在单一浓度下确定蛋白质组范围

内蛋白质在 37~73 °C 温度范围内的热稳定性,对于随后的 TPP-CCR 分析,选择对应于恶性疟原虫蛋白质组 TPP-TR 实验中 51 °C 和 57 °C,进一步在奎宁浓度 0~10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 内监测蛋白质稳定化。结果表明恶性疟原虫嘌呤核苷磷酸化酶 (*P. falciparum* purine nucleoside phosphorylase, PfPNP) 表现出剂量依赖性的蛋白稳定性变化,推测该蛋白为奎宁在疟原虫红细胞内发展周期的中间阶段最重要的靶标。

3.1.9 帕比司他 组蛋白脱乙酰化酶 (histone deacetylase, HDAC) 抑制剂帕比司他 (panobinostat) 已获得美国食品和药品管理局的批准,可用于治疗多发性骨髓瘤,目前正在进行针对其他恶性疾病的临床试验。在临床试验中发现了一些其他 HDAC 抑制剂没有的不良反应,如甲状旁腺功能减退、癫痫发作和震颤等,提示帕比司他具有不明确的脱靶效应^[43]。Savitski 课题组^[44]设计了一种二维策略 (2D-TPP) 全面检测该小分子抑制剂对靶标的浓度依赖性作用。肿瘤细胞或其裂解液分别用 5 种不同化合物浓度的小分子处理,每个浓度化合物处理的样品分成 12 份,分别用 42~63.9 °C 共 12

个不同的温度处理,进行细胞裂解和蛋白酶切,相邻两个浓度的10个样品进行一组TMT10标记,合并后做一次LC-MS/MS检测。因为是12个不同的温度,所以共进行6次LC-MS/MS检测。在两个连续温度下表现出化合物浓度依赖的蛋白稳定性变化的蛋白为高置信度靶标。在HepG2细胞中,有23种蛋白质显示出浓度依赖性的热稳定性变化,在细胞裂解液中有5种蛋白质显示出这种变化。在活细胞和裂解液中都鉴定到蛋白为4个,表明这4个是化合物的直接作用靶标,其中,已知靶标HDAC1浓度依赖性热稳定变化图谱如图11所示。除了HDAC外,另有两种蛋白质在低浓度化合物刺激下稳定性提高,分别为四肽重复结构域38(tetratricopeptide repeat domain 38, TTC38)和苯丙氨酸羟化酶(phenylalanine hydroxylase, PAH)。基于亲和力富集的化学蛋白质组学方法无法鉴定到这两种蛋白。经过系统的生物学验证,抑制PAH可为甲状腺功能减退、甲状腺激素水平降低提供理论依据。

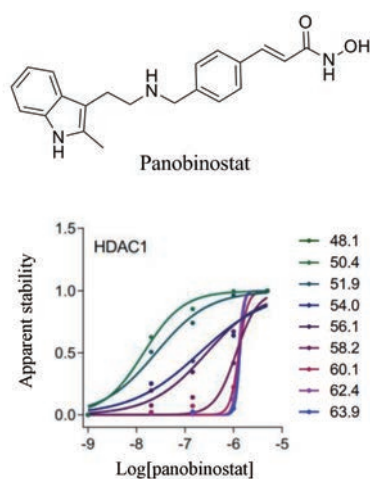


Figure 11 Structure of panobinostat and the apparent stability of HDAC1 in presence different concentration of panobinostat

3.2 在研药用活性分子蛋白作用靶标研究

数十年前,天然产物阿西维林(acivicin, ACV)的临床抗癌作用就得到了研究,但由于其毒性较大而无法成药。拜尔公司联合Sieber课题组利用ABPP方法进一步阐明了该化合物的药效和毒性作用的蛋白靶标,他们合成了几种含阿西维林的炔基衍生物:ACV1、ACV2和ACV3(图12)。鉴定到该化合物易与醛脱氢酶结合,ALDH4A1为未知的ACV靶标,参与谷氨酸的合成,ACV可能是使该酶失活的底物类似物,通过结合至催化位点抑制ALDH4A1活性。siRNA对ALDH4A1的下调导致细胞生长的严重抑制,因此可能为阿西维奇的细胞毒性作用提供了解释^[45]。

抑制 β -分泌酶BACE1被认为是治疗阿尔茨海默

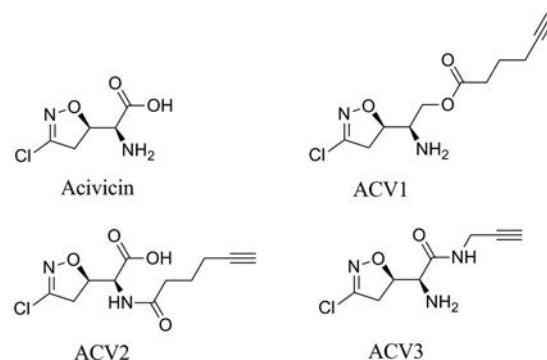


Figure 12 Structures of acivicin and its activity-based probes

病最有前途的方法之一。由于在动物模型中诱发眼毒性后,几种不同结构的BACE1抑制剂已终止继续研发,如礼来公司第一代临床候选药物LY2811376和安进临床前候选药物AMG-8718,但尚未确定此类化合物介导这种毒性的靶标。辉瑞公司利用ABPP方法对分子PF-9283进行了毒理研究,在化合物的母核上引入二苯甲酮和末端炔基,得到探针化合物PF-7802(图13)。结果表明组织蛋白酶D(cathepsin D, CatD)是人视网膜上皮细胞ARPE-19细胞中BACE1抑制剂PF-9283的主要脱靶分子。通过整体动物实验,对视网膜进行组织化学染色等方法,确立脱靶抑制CatD是BACE1抑制剂产生眼睛毒性的主要原因^[46]。这项研究表明,ABPP不但可以阐明药物的药效作用机制还可以阐明其毒理作用机制。

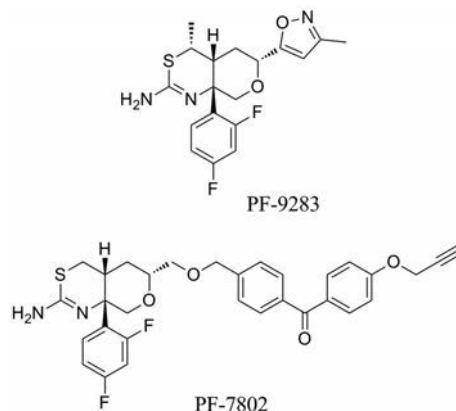


Figure 13 Structure of BACE1 inhibitor PF-9283 and its clickable photoprobe analog PF-7802

内源性大麻素是内源性信号传导脂质,在人类健康和疾病中发挥着重要作用。花生四烯酸乙醇胺(anandamide, AEA)和2-花生四烯酰甘油(2-arachidonoylglycerol, 2-AG)是内源性大麻素系统的内源性激动剂(图14a)。这两种化合物是首先鉴定出来研究最多的内源性大麻素,它们都是花生四烯酸的衍生物。脂

肪酸酰胺水解酶 (fatty acid amide hydrolase, FAAH) 降解 AEA 为游离花生四烯酸和乙醇胺。辉瑞公司报道了一类苯并噻吩哌啶/哌嗪尿素化合物, 可以高度特异性地抑制 FAAH, 产生高效的抗炎和镇痛作用。通过基于竞争活性的蛋白质谱分析可以全面了解酶抑制剂在蛋白质组范围内的选择性^[47]。该公司还利用 ABPP 方法研究了 FAAH 抑制剂 PF-3845 (图 14b) 的详细机制。合成了该抑制剂的炔烃类似物 PF3845yne 作为分子探针, PF3845yne 在脑和肝组织中高选择性标记 FAAH, 在体内不与其他丝氨酸水解酶反应, 在长达 24 h 的时间内提高了内源性大麻素 AEA 的大脑水平, 具有显著抗痛觉过敏作用^[48]。另外, 脂肪酸酰胺水解酶 (fatty acid amide hydrolase, FAAH) 抑制剂 BIA 10-2474 (图 14c) 的临床研究导致了严重的不良神经事件。Scripps 研究所与辉瑞公司共同对该化合物的蛋白结合靶点进行了研究, 基于活性的蛋白质谱分析研究表明, BIA 10-2474 及其主要代谢产物之一可抑制 FAAH 所属的丝氨酸水解酶的多个其他成员。BIA 10-2474 的去甲基化代谢物共价修饰了醛脱氢酶 (aldehyde dehydrogenase, ALDH) 中的半胱氨酸, ALDH2 在保护大脑免受过量活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的毒性作用起重要作用, 被修饰后无法发挥神经保护作用^[49]。

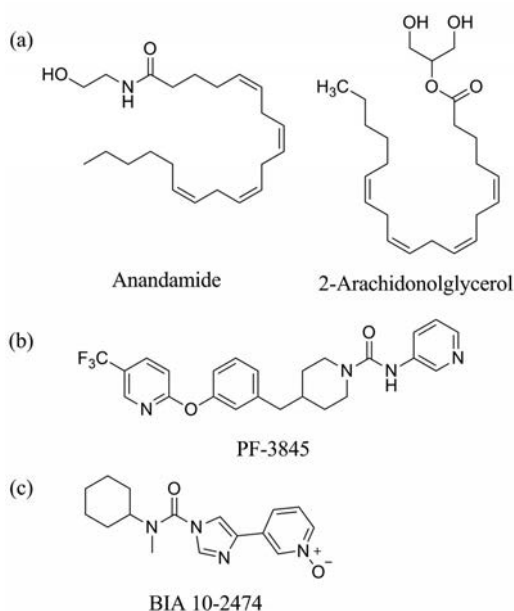


Figure 14 (a) Structures of anandamide and 2-arachidonolglycerol; (b) The structure of PF-3845; (c) The structure of BIA 10-2474

雅培公司通过高通量筛选发现苯并噻唑类似物 **3** (图 15a) 为有效的 FAAH 抑制剂。在大鼠的皮层组织, 皮层匀浆分离粗制的 FAAH 酶中进行竞争性 ABPP 实验, 通过研究化合物 **3** 对探针 FP-biotin 和 FP-TAMRA

(图 15c) 标记丝氨酸水解酶的竞争作用得到靶标蛋白, 与其他丝氨酸水解酶抑制剂相比, 它具有出色的选择性且没有脱靶活性^[50]。该公司采用 ABPP 方法研究了已经报道的 FAAH 抑制剂在大鼠和人类蛋白质组中数百种丝氨酸水解酶之间的选择性^[51], 发现抑制剂 SA-47 和 SA-72 对 FAAH 具有出色的选择性 (图 15b)。研究还发现 AM404 是相对较弱 FAAH 抑制剂, 但它也具有很高的选择性。另外, 在 ABPP 研究中, 抑制剂 α -KH7 表现出选择性, 但它可能靶向未鉴定的羧酸酯酶。抑制剂 URB597、BMS-1、OL-135 和 LY2077855 在多个大鼠和人类组织中具有脱靶蛋白, 它们的相对特异性为 OL-135 > URB597 > BMS-1 > LY2077855 (图 15b)。

Nimbolide 是一种来自印度楝的具有抗癌活性的天然产物, 结构如图 16, 目前对其发挥作用的靶标和机制尚未深入了解。诺华公司使用基于活性的蛋白质谱分析的化学蛋白组学平台, 发现 nimbolide 与 E3 泛素连接酶 RNF114 中与底物识别至关重要的新型功能性半胱氨酸反应。Nimbolide 通过靶向 RNF114 中 C8 处的底物识别域来抑制肿瘤抑制因子 p21 泛素化和降解, 使其稳定, 从而发挥抗乳腺癌作用^[52]。

诺华公司还利用基于活性的蛋白质谱的共价配体筛选方法来鉴定与 E3 泛素连接酶 RNF4 的半胱氨酸反应的小分子, 并为基于 RNF4 的降解物的设计提供配体。将这种潜在的 RNF4 募集者 CCW-16 与 JQ1 (溴结构域蛋白的 BET 家族的抑制剂) 相连 (图 17), 所得化合物 CCW 28-3 能够以蛋白酶体和 RNF4 依赖性方式降解 BRD4。靶向蛋白质降解已成为一种强大的药物发现策略, 但该策略的局限性是可供使用的 E3 泛素连接酶的配体太少。ABPP 可以用来发现新的 E3 泛素连接酶的配体, 对药物研发具有重大意义^[53]。

另外, 含溴结构域蛋白是表观遗传调节剂, 广泛参与细胞活动, 对癌症发展起重要调节作用。诺华公司还设计合成了针对含溴结构域蛋白的共价探针 bromotriazine (BTZ), 通过二氯三嗪部位 (图 18) 对纯化的溴结构域的非催化和高度保守的赖氨酸进行了前所未有的选择性标记^[54]。

自噬是一种溶酶体降解途径, 它消除了聚集的蛋白质和受损的细胞器, 以维持细胞稳态。激活自噬的主要途径涉及抑制 mTORC1 激酶, 但是目前靶向 mTORC1 的化合物无法完全和选择性地阻断 mTORC1。诺华公司的研究团队将共价配体文库筛选与基于活性的蛋白质谱分析相结合, 用稳定表达 GFP-LC3-RFP-LC3ΔG 的 MEF 细胞筛选了 217 个化合物, 激活自噬的化合物可以使细胞内绿色荧光减弱。筛选得到了小分子 EN6 (图 19), 再用 ABPP 的方法鉴定了

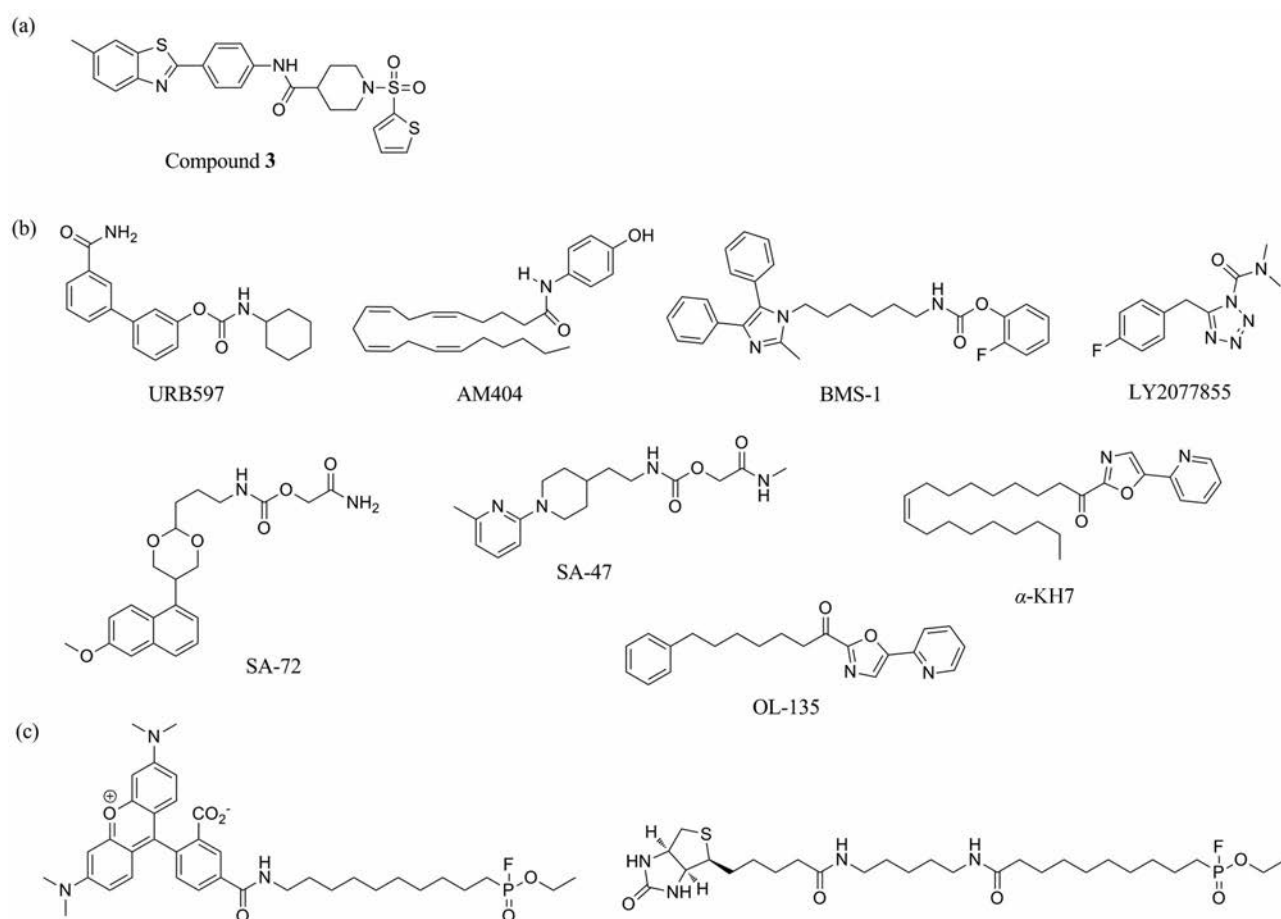


Figure 15 (a) The chemical structure of compound 3; (b) Structures of URB597, BMS-1, SA-47, SA-72, α -KH7, OL-135, AM404 and LY2077855; (c) Structures of FP-TAMRA and FP-biotin

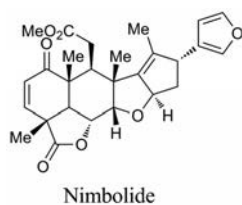


Figure 16 Structure of nimbolide

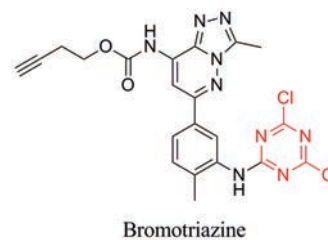


Figure 18 Structure of probe bromotriazine (BTZ)

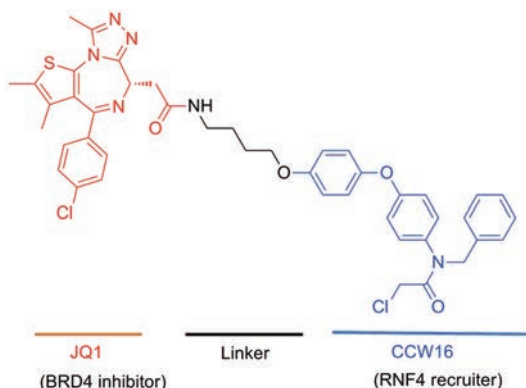


Figure 17 Structure of CCW 28-3, an RNF-4-recruiter-based degrader linked to BRD4 inhibitor JQ1

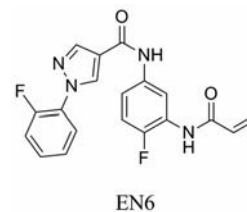


Figure 19 Structure of EN6

它的靶标蛋白。它是一种自噬的小分子体内活化剂, 其共价靶向溶酶体 v-ATPase ATP6V1A 亚基中的半胱氨酸 277, EN6 介导的 ATP6V1A 修饰使 v-ATPase 与鸟苷三磷酸酶 Rags 解偶联, 从而导致 mTORC1 信号抑

制, 溶酶体酸化增加和自噬激活^[55]。

天然产物 vioprolide A (VioA) 结构如图 20 所示, 具有良好的抗血癌活性, 为研究其作用的分子机制, 德国科学家 Sieber 实验室^[56]首先对该小分子进行了修饰, 但没有鉴定到明确的靶标, 因此又选用了 TPP 方法对 VioA 的靶标进行鉴定。将 Jurkat 细胞与 VioA ($1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 或 DMSO 进行孵育, 在一定温度范围 ($37\sim 67^\circ\text{C}$) 内分别处理。裂解细胞, 并通过超速离心分离可溶性蛋白, 经胰蛋白酶消化, 并用 TMT 标签进行标记。合并标记的样品, 通过 LC-MS/MS 分析。从两次 VioA 与 DMSO 处理的重复计算熔点偏移, 筛选所得数据得到了 6 个潜在的靶标蛋白, 经过生物学验证可得 VioA 通过作用在核蛋白 NOP14 影响其与 EMG1 蛋白的相互作用发挥抗血癌活性。

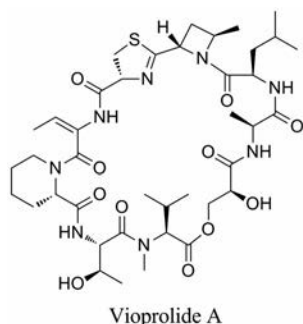


Figure 20 Structure of vioprolide A

4 总结与展望

本综述总结了多个生物活性分子蛋白靶标解析的实例, 这些分子已上市, 或处于各大医药公司的研究阶段, 科学家们需要对蛋白质组中确切的靶标进行了详细的研究, 以深入了解作用方式并揭示药物的不良反应。这些靶标解析主要利用了 ABPP 和 CETSA, 并结合了各种定量蛋白质组学方法。ABPP 首先需要对活性分子进行化学修饰, 基于活性探针实现靶标的分离富集和鉴定, 可以在氨基酸水平鉴定到小分子与蛋白的结合位点; CETSA 不需要对活性分子进行任何化学修饰, 利用小分子结合蛋白后引起蛋白稳定性的增加以及不同浓度化合物对蛋白稳定性的影响, 在蛋白组水平实现靶标蛋白的鉴定, 但该方法成本较高, 样品前处理复杂, 数据处理繁琐。ABPP 和 CETSA 互为补充, 为结构多样的活性分子提供了靶标发现的手段。活性分子靶标的研究不但阐明了活性分子本身的作用对象, 还能发现新的潜在成药性蛋白靶标。新药靶的发现可以从源头上推动创新药物的研发。因此, 随着活性分子蛋白靶标发现技术的进一步推广和使用, 它必定能为我国的原创药物研究注入强大的发展动力。

作者贡献: 杨婉琪是本文的第一作者, 负责选题和文章撰写; 张崇敬为本文的通讯作者, 负责选题和文章修改。

利益冲突: 本文的研究内容无任何利益冲突。

References

- [1] Zhou ZX, Sun L, Kang DW, et al. Progress on HIV-1 RT inhibitors with novel mechanism of action [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2018, 53: 691-700.
- [2] Van Esbroeck ACM, Janssen APA, Cognetta AB, et al. Activity-based protein profiling reveals off-target proteins of the FAAH inhibitor BIA 10-2474 [J]. Science, 2017, 356: 1084-1087.
- [3] Zheng YM, Zhang JP, Tang S, et al. Establish and use of an epilepsy model in larval zebrafish [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2016, 51: 580-587.
- [4] Wu H. Chemical biology: a rapidly rising frontier [J]. Prog Chem (化学进展), 2000, 12: 423.
- [5] Zhang LH. Drug discovery based on chemical biology [J]. Prog Pharm Sci (药学进展), 2017, 41: 1-3.
- [6] Wang C, Chen N. Activity-based protein profiling [J]. Acta Chim Sin (化学学报), 2015, 73: 657-668.
- [7] Zhou YQ, Xiao YL. Target identification of bioactive natural products [J]. Acta Chim Sin (化学学报), 2018, 76: 177-189.
- [8] Kleiner P, Heydenreuter W, Stahl M, et al. A whole proteome inventory of background photocrosslinker binding [J]. Angew Chem Int Ed, 2017, 56: 1396-1401.
- [9] Cravatt BF, Wright AT, Kozarich JW. Activity-based protein profiling: from enzyme chemistry to proteomic chemistry [J]. Annu Rev Biochem, 2008, 77: 383-414.
- [10] Simon GM, Cravatt BF. Activity-based proteomics of enzyme superfamilies: serine hydrolases as a case study [J]. J Biol Chem, 2010, 285: 11051-11055.
- [11] Prescher JA, Bertozzi CR. Chemistry in living systems [J]. Nat Chem Biol, 2005, 1: 13-21.
- [12] Hein JE, Fokin VV. Copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) and beyond: new reactivity of copper (I) acetylides [J]. Chem Soc Rev, 2010, 39: 1302-1315.
- [13] Wahler D, Badalassi F, Crotti P, et al. Enzyme fingerprints by fluorogenic and chromogenic substrate arrays [J]. Angew Chem Int Ed, 2001, 40: 4457-4460.
- [14] Patricelli MP, Giang DK, Stamp LM, et al. Direct visualization of serine hydrolase activities in complex proteomes using fluorescent active site-directed probes [J]. Proteomics, 2001, 1: 1067-1071.
- [15] Greenbaum D, Baruch A, Hayrapetian L, et al. Chemical approaches for functionally probing the proteome [J]. Mol Cell Proteomics, 2002, 1: 60-68.
- [16] Jessani N, Niessen S, Wei BQ, et al. A streamlined platform for high-content functional proteomics of primary human specimens [J]. Nat Methods, 2005, 2: 691-697.

- [17] Mann M. Functional and quantitative proteomics using SILAC [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7: 952-958.
- [18] Ting L, Rad R, Gygi SP, et al. MS3 eliminates ratio distortion in isobaric multiplexed quantitative proteomics [J]. *Nat Methods*, 2011, 8: 937.
- [19] Aggarwal K, Choe LH, Lee KH. Shotgun proteomics using the iTRAQ isobaric tags [J]. *Brief Funct Genomic Proteomic*, 2006, 5: 112-120.
- [20] Zhu W, Smith JW, Huang CM. Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics [J]. *J Biomed Biotechnol*, 2010, 2010: 840518.
- [21] Kidd D, Liu Y, Cravatt BF. Profiling serine hydrolase activities in complex proteomes [J]. *Biochemistry*, 2001, 40: 4005-4015.
- [22] Greenbaum DC, Arnold WD, Lu F, et al. Small molecule affinity fingerprinting: a tool for enzyme family subclassification, target identification, and inhibitor design [J]. *Chem Biol*, 2002, 9: 1085-1094.
- [23] Schellman JA, Schellman CG. Kaj Ulrik Linderstrøm-Lang (1896-1959) [J]. *Protein Sci*, 1997, 6: 1092-1100.
- [24] Molina DM, Jafari R, Ignatushchenko M, et al. Monitoring drug target engagement in cells and tissues using the cellular thermal shift assay [J]. *Science*, 2013, 341: 84-87.
- [25] Savitski MM, Reinhard FBM, Franken H, et al. Tracking cancer drugs in living cells by thermal profiling of the proteome [J]. *Science*, 2014, 346: 1255784.
- [26] Franken H, Mathieson T, Childs D, et al. Thermal proteome profiling for unbiased identification of direct and indirect drug targets using multiplexed quantitative mass spectrometry [J]. *Nat Protoc*, 2015, 10: 1567.
- [27] Wang J, Zhang CJ, Zhang J, et al. Mapping sites of aspirin-induced acetylations in live cells by quantitative acid-cleavable activity-based protein profiling (QA-ABPP) [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 1-12.
- [28] Bateman LA, Zaro BW, Miller SM, et al. An alkyne-aspirin chemical reporter for the detection of aspirin-dependent protein modification in living cells [J]. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 14568-14573.
- [29] Wang J, Tan XF, Yang P, et al. A quantitative chemical proteomics approach to profile the specific cellular targets of andrographolide, a promising anticancer agent that suppresses tumor metastasis [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2014, 13: 876-886.
- [30] Li L, Wijaya H, Samanta S, et al. *In situ* imaging and proteome profiling indicate andrographolide is a highly promiscuous compound [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 11522.
- [31] Honigberg LA, Smith AM, Sirisawad M, et al. The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 blocks B-cell activation and is efficacious in models of autoimmune disease and B-cell malignancy [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107: 13075-13080.
- [32] Lanning BR, Whitby LR, Dix MM, et al. A road map to evaluate the proteome-wide selectivity of covalent kinase inhibitors [J]. *Nat Chem Biol*, 2014, 10: 760.
- [33] Preston DA, Wu CY, Blaszczyk LC, et al. Biological characterization of a new radioactive labeling reagent for bacterial penicillin-binding proteins [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1990, 34: 718-721.
- [34] Staub I, Sieber SA. β -Lactams as selective chemical probes for the *in vivo* labeling of bacterial enzymes involved in cell wall biosynthesis, antibiotic resistance, and virulence [J]. *J Am Chem Soc*, 2008, 130: 13400-13409.
- [35] Wright AT, Song JD, Cravatt BF. A suite of activity-based probes for human cytochrome P450 enzymes [J]. *J Am Chem Soc*, 2009, 131: 10692-10700.
- [36] Arastu-Kapur S, Anderl JL, Kraus M, et al. Nonproteasomal targets of the proteasome inhibitors bortezomib and carfilzomib: a link to clinical adverse events [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17: 2734-2743.
- [37] Adams J, Behnke M, Chen S, et al. Potent and selective inhibitors of the proteasome: dipeptidyl boronic acids [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 1998, 8: 333-338.
- [38] Wang J, Zhang CJ, Chia WN, et al. Haem-activated promiscuous targeting of artemisinin in *Plasmodium falciparum* [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 1-11.
- [39] Ismail HM, Barton V, Phanchana M, et al. Artemisinin activity-based probes identify multiple molecular targets within the asexual stage of the malaria parasites *Plasmodium falciparum* 3D7 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113: 2080-2085.
- [40] Zhou Y, Li W, Xiao Y. Profiling of multiple targets of artemisinin activated by hemin in cancer cell proteome [J]. *ACS Chem Biol*, 2016, 11: 882-888.
- [41] Foley M, Tilley L. Quinoline antimalarials: mechanisms of action and resistance and prospects for new agents [J]. *Pharmacol Ther*, 1998, 79: 55-87.
- [42] Dziekan JM, Yu H, Chen D, et al. Identifying purine nucleoside phosphorylase as the target of quinine using cellular thermal shift assay [J]. *Sci Transl Med*, 2019, 11: eaau3174.
- [43] Younes A, Sureda A, Ben-Yehuda D, et al. Panobinostat in patients with relapsed/refractory Hodgkin's lymphoma after autologous stem-cell transplantation: results of a phase II study [J]. *J Clin Oncol*, 2012, 30: 2197-2203.
- [44] Becher I, Werner T, Doce C, et al. Thermal profiling reveals phenylalanine hydroxylase as an off-target of panobinostat [J]. *Nat Chem Biol*, 2016, 12: 908-910.
- [45] Kreuzer J, Bach NC, Forler D, et al. Target discovery of acivicin in cancer cells elucidates its mechanism of growth inhibition [J]. *Chem Sci*, 2015, 6: 237-245.
- [46] Zuhl AM, Nolan CE, Brodney MA, et al. Chemoproteomic profiling reveals that cathepsin D off-target activity drives ocular toxicity of β -secretase inhibitors [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 1-14.
- [47] Johnson DS, Ahn K, Kesten S, et al. Benzothioephene piperazine

- and piperidine urea inhibitors of fatty acid amide hydrolase (FAAH) [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, 19: 2865-2869.
- [48] Ahn K, Johnson DS, Mileni M, et al. Discovery and characterization of a highly selective FAAH inhibitor that reduces inflammatory pain [J]. *Chem Biol*, 2009, 16: 411-420.
- [49] Huang Z, Ogasawara D, Seneviratne UI, et al. Global portrait of protein targets of metabolites of the neurotoxic compound BIA 10-2474 [J]. *ACS Chem Biol*, 2019, 14: 192-197.
- [50] Wang X, Sarris K, Kage K, et al. Synthesis and evaluation of benzothiazole-based analogues as novel, potent, and selective fatty acid amide hydrolase inhibitors [J]. *J Med Chem*, 2008, 52: 170-180.
- [51] Zhang D, Saraf A, Kolasa T, et al. Fatty acid amide hydrolase inhibitors display broad selectivity and inhibit multiple carboxylesterases as off-targets [J]. *Neuropharmacology*, 2007, 52: 1095-1105.
- [52] Spradlin JN, Hu X, Ward CC, et al. Harnessing the anti-cancer natural product nimbolide for targeted protein degradation [J]. *Nat Chem Biol*, 2019, 15: 747-755.
- [53] Ward CC, Kleinman JI, Brittain SM, et al. Covalent ligand screening uncovers a RNF4 E3 ligase recruiter for targeted protein degradation applications [J]. *ACS Chem Biol*, 2019, 14: 2430-2440.
- [54] D'Ascenzio M, Pugh KM, Konietzny R, et al. An activity-based probe targeting non-catalytic, highly conserved amino acid residues within bromodomains [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2019, 58: 1007-1012.
- [55] Chung CYS, Shin HR, Berdan CA, et al. Covalent targeting of the vacuolar H⁺-ATPase activates autophagy *via* mTORC1 inhibition [J]. *Nat Chem Biol*, 2019, 15: 776-785.
- [56] Kirsch VC, Orgler C, Braig S, et al. The cytotoxic natural product vioprolide targets nucleolar protein 14, which is essential for ribosome biogenesis [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2020, 59: 1595-1600.