综述

蛋白质组学技术在靶向蛋白质降解研究中的应用进展

严婧文[1,2]，张盼盼[1,2]，陈宇婷[3]，张 炜[1,2*]，孔德志[1,2*]

（1. 河北医科大学中西医结合研究所，河北石家庄 050017；2. 河北省中医药管理局安神定志中药重点实验室，河北石家庄 050017；3. 河北医科大学药学院，河北石家庄 050017）

摘要：蛋白质组学技术旨在全面分析蛋白质的表达水平、结构、功能、修饰状态以及蛋白质之间的相互作用，是目前常用的高通量蛋白分析手段。蛋白降解靶向嵌合体（PROTACs）技术是利用生物体内天然存在的泛素 - 蛋白酶体系统降低靶标蛋白表达水平的新型成药模式。文章总结了蛋白质组学技术在靶向蛋白质降解研究中 PROTACs 靶标蛋白的确认，分子配体的设计、筛选和优化，靶标结合情况的鉴定，靶标敲除后的效率评价，以及通路验证的应用进展。

关键词：靶向蛋白质降解；蛋白降解靶向嵌合体（PROTACs）；蛋白质组学；蛋白靶标；蛋白调控策略；成药性；研究进展

中图分类号：R914；R979.1^{+}9　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255（2025）06-0705-10

引用：严婧文 , 张盼盼 , 陈宇婷 , 等．蛋白质组学技术在靶向蛋白质降解研究中的应用进展［J］．中国医药工业杂志 , 2025, 56（6）: 705-714．DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2025.06.001

Advances in the Application of Proteomics Technology in Targeted Protein Degradation Research

YAN Jingwen[1,2], ZHANG Panpan[1,2], CHEN Yuting[3], ZHANG Wei[1,2*], KONG Dezhi[1,2*]

(*1. Institute of Integrative Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017; 2. Key Lab. of Tranquilizing TCM, Hebei Provincial Administration of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050017; 3. School of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017*)

ABSTRACT: Proteomics technology, a widely utilized high-throughput method for protein analysis, aims to comprehensively analyze protein expression levels, structures, functions, modification states, and interactions. Proteolysis targeting chimeras（PROTACs）, a novel drug development strategy, harnesses the natural ubiquitin-proteasome system to reduce target protein levels. This paper summarizes the advancements in proteomics technology applied to targeted protein degradation research, encompassing the identification of target proteins for PROTACs, design, screening and optimization of ligands, identification of target binding, efficiency assessment of post knockdown, and validation of pathways.

Key Words: targeted protein degradation; proteolysis targeting chimeras（PROTACs）; proteomics; protein target; protein regulation strategy; druggability; research progress

功能异常的蛋白质与许多疾病的发生、发展密切相关，是药物开发的重要靶点。传统的以蛋白质为靶点的小分子药物多为蛋白质激动药或抑制剂。此类药物针对的靶蛋白仅占所有蛋白质种类的15%，约 85%的蛋白质被认为是“不可成药”的靶点[1]，难以通过传统的小分子药物进行有效调控。

蛋白降解靶向嵌合体（proteolysis targeting

收稿日期：2024-11-08

作者简介：严婧文（2000—），女，硕士研究生，专业方向：蛋白质组学技术的方法开发。

通信作者：孔德志（1985—），男，教授，博士生导师，从事蛋白质组学技术的相关研究。

E-mail：kongdezhi@hebmu.edu.cn

张 炜（1974—），男，教授，博士生导师，从事中药神经药理的相关研究。

E-mail：weizhang@hebmu.edu.cn

chimeras，PROTACs）技术通过设计特定的分子来诱导蛋白质降解，提出了一种全新的蛋白调控策略[2]。这种技术可有效针对传统药物难以成药的靶点，为疾病治疗提供新的可能性。PROTACs 通常由 3 个部分组成：靶蛋白结合模块［目标蛋白（protein of interest，POI）配体］、连接子（linker）以及 E3 泛素连接酶（E3 ligase）配体[3]。在已报道的 PROTACs 中，POI 配体的种类繁多，常见的有雄激素受体（androgen receptor，AR）、雌激素受体（estrogen receptor，ER）、含溴结构域的蛋白（bromodomain-containing protein，BRD）、布鲁顿酪氨酸激酶（Bruton's tyrosine kinase，BTK）等。连接子位于 POI 配体和 E3 连接酶配体之间，其长度和化学性质对于整个 PROTACs 分子至关重要。理想的连接子长度既要保证 POI 和 E3 连接酶之间有一定的空间间隔，又不影响整体的亲和力或稳定性。连接子一般是烷基链[4]，为了增加溶解度，也常使用聚乙二醇链[5]。E3 连接酶配体负责与细胞内的 E3 泛素连接酶进行结合，参与泛素 - 蛋白酶体系统，将泛素分子连接到 POI 上以达到降解目的。这 3 个部分协同作用（图 1），可选择性地降解靶蛋白，调控细胞生物学过程，发挥疗效。

蛋白质组学技术具有独特的高通量、高分辨特性，在 PROTACs 开发过程中应用广泛。例如，串联质量标签（tandem mass tags，TMT）法[6—7]、荧光标记法[8]等技术常被用于筛选靶蛋白；数据非依赖性采集（data-independent acquisition，DIA）法、细胞培养条件下稳定同位素标记（stable isotope labeling with amino acids in cell culture，SILAC）技术[9]、细胞热位移检测（cell thermal shift assay，CETSA）[10—11]等方法被用于设计、筛选 POI 配体；而基于活性的蛋白质谱（activity-based protein profiling，ABPP）[12]、非标记定量（label-free quantification，LFQ）[13]等方法可用于优化 PROTACs。此外，蛋白质组学技术还可应用于 PROTACs 靶标敲除后的效率评价以及通路验证[14]。本文综述了蛋白质组学技术在 PROTACs 开发、设计及后续评价中的应用。

1　利用蛋白质组学技术筛选 PROTACs 的靶蛋白

蛋白质组学技术能系统分析细胞内蛋白质的表达、修饰和相互作用，为筛选靶蛋白提供更全面的信息。NI 等[15]利用 TMT 技术，用建立的基于雷公藤红素（celastrol）的 PROTAC 库对人 T 淋巴细胞白血病细胞（Jurkat 细胞）进行 8 h 短时处理，识别被下调的蛋白并将其作为雷公藤红素的潜在靶点，为构建 PROTACs 提供合适的 POI。CHEN 等[7]运用 TMT 技术，通过磷酸化蛋白质组学分析，比较了

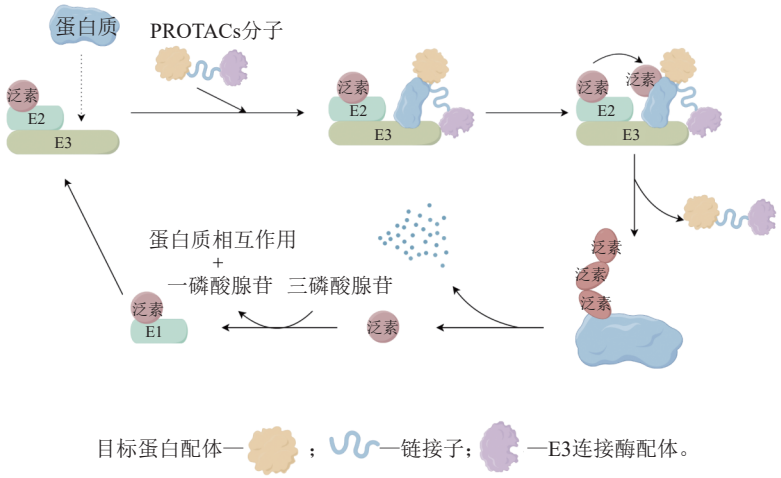


图 1　PROTACs 降解靶蛋白的示意图

Fig.1　Schematic Diagram of Target Protein Degradation by PROTACs

敲除或表达周期蛋白依赖性激酶（cyclin-dependent kinase，CDK）8 和 CDK19 的人胚肾细胞（HEK293 细胞）中基因表达情况的差异，在蛋白水平和磷酸化水平上揭示了 CDK8 和 CDK19 对基因表达的调控作用。利用定量蛋白质组学方法，能在短时间内分析大量的蛋白质样本，从而快速筛选出潜在的靶点。这种方法不仅提高了筛选靶点的效率，还大幅提高了灵敏度，使原本难以检测的低丰度蛋白质也能被准确地定量分析。

2 利用蛋白质组学技术设计、筛选 PROTACs 靶标配体

PROTACs 靶标配体设计应从以下几方面进行考虑：靶亲和力、细胞渗透性、化合物稳定性[16]和连接子设计等[17]。

2.1 蛋白质组学技术协助评估靶亲和力

通常以 PROTACs 与 POI 的结合选择性、结合效率作为评价 PROTACs 靶亲和力的指标；靶标配体亲和力越高，构成的 PROTACs 降解蛋白的能力越强。蛋白质组学技术可通过高通量过滤系统展现蛋白质降解结果，作为评估靶标配体亲和力的依据，从而反映 PROTACs 的降解能力。然而，由于“挂钩效应”（即 PROTACs 浓度过高时会导致 POI-POI 配体或 E3-E3 配体结合后产生的二元络合物占主导，抑制 PROTACs 与 POI 的结合并降低其对 POI 降解活性的现象）[18]，评估 PROTACs 与 POI 的亲和力时也需考虑 E3 连接酶的靶亲和力。YANG 等[19]开发了一种基于细胞的靶标结合测定方法，用于评估 cereblon（CRBN）E3 连接酶配体的结合亲和力，并用以筛选针对组蛋白脱乙酰酶（histone deacetylase，HDAC）6 的 PROTACs。研究者采用 SILAC 等方法监测 POI，验证了 PROTACs 具备诱导 HDAC 6 降解的功能。同时，该研究表明免疫调节药物（immunomodulatory drugs，IMiDs）及其衍生物能竞争性抑制 PROTACs 介导的蛋白质降解，确认了 POI 和 E3 连接酶在降解中的作用，以及高亲和力配体在 PROTACs 开发中的重要性。

此外，值得注意的是，一些具有低亲和力 POI 配体的 PROTACs 降解蛋白的能力并不亚于具有高亲和力配体的 PROTACs，甚至降解效率更高。例如，BONDESON 等[20]采用蛋白质组学技术对基于 VHL（Von Hippel-Lindau）和 CRBN 受体的 PROTACs 进行分析，并将获得的降解谱图与激酶亲和谱图比对。结果显示，对于 Ste20 样激酶（Ste20-like kinase，SLK）、受体酪氨酸激酶 AXL，即使是具备高亲和力 POI 配体的 PROTACs，也不能发挥降解靶蛋白的作用。这表明 PROTACs 的降解作用并不一定取决于 POI 配体和 POI 之间的亲和力。推测原因是 POI 的蛋白构象变化导致泛素化位点被隐藏，因而 E3 连接酶的泛素转移结构域无法靠近 POI 表面，最终阻止了 POI 的降解。

DIA 技术能采集所有母离子的全部子离子信息，获取完整的肽段信息，从而提升分析精度和效率；再通过深入研究蛋白质状态及其相互作用，可为筛选 PROTACs 提供直接依据。CHEN 等[9]运用 SILAC 技术测定了不同浓度 PROTACs 作用不同时间时对靶蛋白的降解能力，并通过 DIA 技术分析谱图、比对数据以筛选最合适的蛋白质 - 蛋白质相互作用（protein-protein interaction，PPI）关系，最终成功构建了以 RNA 外切酶 4（REXO 4）为 POI 的高活性吴茱萸碱类 PROTACs，其在低浓度（0.01 ～ 0.80 μmol/L）下就可实现 REXO 4 的降解，发挥抗肿瘤作用。

2.2 蛋白质组学技术辅助评价细胞渗透性与药代动力学（pharmacokinetics，PK）

细胞渗透性关系到 PROTACs 能否到达靶点并降解 POI。但由于相对分子质量较大，PROTACs 倾向于聚集或沉淀，继而影响溶解性和渗透性。为提高 PROTACs 的药效，在分子设计过程中需重点考虑溶解度，同时需平衡亲脂性和亲水性，以达到最佳溶解度分布[21]。

蛋白质组学技术能准确评估 PROTACs 的细胞渗透性和 PK 参数，同时揭示其与 POI 在生理状态下的结合情况[22]。CETSA 技术利用蛋白结构、化学浓度和亲和力变化都会引起蛋白质热稳定性变化的特性，将细胞或组织提取物暴露于不同的温度，以检测 PROTACs 与 POI 的结合情况。该法甚至可用

于准确分析膜蛋白的结合情况[23]。McCOULL 等[10]通过定量质谱和 CETSA 技术验证了 B 细胞淋巴瘤 6(B-cell lymphoma 6，BCL 6) 蛋白抑制剂的高选择性和细胞靶向性，并通过免疫分析 (immunoassay，IA) 技术研究了 BCL 6 蛋白抑制剂的渗透性与其降解 POI 效率的相关性。结果显示，CP 系列 (5- 氯嘧啶衍生物)BCL 6 结合剂具有更好的渗透性 (P_{app} 值为 20.1×10^{-6} cm/s)，解决了早期 PP 系列 (吡唑并 [1,5-*a*] 嘧啶衍生物)BCL 6 结合剂因渗透性不足 (P_{app} 值：7.1×10^{-6} cm/s) 而无法有效进入细胞核、降解效率受限的问题。基于上述结论，McCOULL 等开发了可靶向降解 BCL 6 的 PROTACs。

同样，蛋白质周转率 (protein turnover ratio，PTR) 是预测有效 PROTACs 反应剂量的重要参数之一，也是影响 PK 的重要因素之一[24]。POI 合成速度较慢时有助于深入分析PK和药效动力学(pharmacodynamics，PD) 特性。SILAC 技术利用同位素标记，通过质谱分析展示蛋白质在不同阶段的表达水平，以反映蛋白靶向效率，是研究细胞内蛋白质周转和合成特征的有效手段，可为评估 PROTACs 提供一定的置信指标。MANEIRO 等[25]通过 SILAC 技术在蛋白表面进行同位素标记并示踪研究了 PROTACs 的蛋白靶向效率。结果显示，抗体与 PROTACs 形成的缀合物可用于组织特异性递送 PROTACs，在人表皮生长因子受体 2(human epidermal growth factor receptor 2，HER 2) 阳性肿瘤中降解 BRD4 的效果显著。100 nmol/L 抗体 -PROTACs 缀合物处理 4 h 即可实现 BRD4 的近完全降解；在短时暴露 (处理 1 h 后洗脱) 条件下，24 h 后仍可维持显著的降解效果。

2.3 蛋白质组学技术用于鉴定三元络合物的稳定性

由于 PROTACs 降解 POI 是采用“事件驱动”而不是“占用驱动”的作用机制[26]，因此三元络合物的形成及其稳定性是影响 PROTACs 催化效率的重要因素[27—28]。ZORBA 等[29]通过观测 BRD4-MZ1 VHL 三元络合物 (PDB：5T35) 的晶体结构，证实了 PROTACs 诱导 POI 和 E3 连接酶之间产生的表面静电相互作用对稳定三元络合物具有重要作用。但值得注意的是，高度稳定的三元络合物可能不是发挥药效的理想状态，因为稳定性太强可能会阻碍有效的催化循环[30]。

蛋白质组学技术能通过解析蛋白质复合物的结构和动态，分析其表达、修饰和相互作用，从而判断三元络合物的稳定性。JI 等[31]合成了一系列 PROTACs，对比其在人急性淋巴母细胞白血病细胞 (MOLT-4 细胞) 中降解磷脂酰肌醇 -5- 磷酸 4- 激酶 γ 亚型 (phosphatidylinositol-5-phosphate 4-kinase gamma，PI5P4Kγ) 的效率。质谱监测结果显示，虽然化合物 jWZ-1-80 与 PI5P4Kγ 的结合能力较弱，但在 1 μmol/L 的剂量下与 MOLT-4 细胞孵育 6 h 后，使 PI5P4Kγ 的表达减少了 75%，原因可能是其具有的独特 L4 结合侧，提高了降解效率。这进一步证实三元络合物的形成能力对 PROTACs 开发的重要性。如果 PROTACs 设计得当，能促进 POI 与 E3 连接酶间的有利蛋白 - 蛋白相互作用，即使是采用低亲和力配体或与非抑制位点结合的配体，也能获得对 POI 有显著降解效果的 PROTACs。因此，利用蛋白质组学可深度覆盖、系统分析细胞内蛋白质理化特性这一优势，能高通量地筛选出可稳定形成三元络合物的 PROTACs[32]，同时鉴定其是否能循环催化降解反应。

3 蛋白质组学技术协助优化 PROTACs

通过调整 POI 配体的分子结构[33]、筛选连接子的合适材料[34]与长度[13]，以及筛选合适的 E3 连接酶[35]，可对已有 PROTACs 进行优化，增强其对 POI 的选择性和亲和力。化学蛋白质组学技术的高特异性及能实时监测的可视化追踪特性，有助于鉴定 PROTACs 与靶标的结合情况，从而指导 PROTACs 分子的优化[36]。

3.1 蛋白质组学技术用于 PROTACs 优化

3.1.1 POI 配体的优化

基于 POI 配体亲和力对于构建 PROTACs 的重要性，以及相关的原则与要求，研究者可采用数据库搜索、高通量筛选或基于结构的药物设计 (structure-based drug design，SBDD) 法配合计算机辅助药物设计 (computer-aided drug design，CADD) 初步筛选符合要求的 POI 配体，并在此基础上进行

优化。随着相关技术的不断成熟和发展，DNA 编码化合物库（DNA encoded compound library，DEL）筛选与基于表型的筛选技术也被广泛用于 POI 配体的优化。

3.1.1.1 靶向选择性

POI 配体的靶向选择性对 PROTACs 降解 POI 的效率、提高疗效、减轻不良反应和延长半衰期均有重要影响[37]。结合蛋白质组学技术的分子结构研究成果，研究者可更有效率地筛选出 POI 配体的结合位点和优化策略。例如，SCHIEDEL 等[38]根据分子晶体结构的研究结果，使用基于沉默信息调节因子（sirtuin）的重排配体 SirReals 构建了用于降解沉默信息调节因子 2（sirtuin 2，Sirt 2）的 PROTACs，同时通过分子探针技术验证了 SirReals 对 Sirt 2 靶点优异的特异性与选择性。此外，经蛋白质组学明确 POI 配体的结合位点后，还可通过调整 POI 配体的结构改善其结合和降解能力，实现优化目标。SPRADLIN 等[1]用活性探针标记肿瘤蛋白 53（tumor protein 53，TP53），并采用基于质谱的肽段分析技术检测被标记的肽段。结果显示，化合物 EN4 可以共价结合到 TP53 上的 C171 位点。随后，通过进一步优化 EN4 的分子结构，获得了选择性更强的分子 JNS1-40。此外，基于 TMT 的同量异位蛋白质组学也已被应用于研究 PROTACs 靶向降解 POI 的特异性，例如：Kirsten 大鼠肉瘤病毒癌基因同源物（Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog，K-RAS）[39]、血清 / 糖皮质激素调节激酶 3（serum/glucocorticoid regulated kinase 3，SGK-3）[40]和富亮氨酸重复激酶 2（leucine-rich repeat kinase 2，LRRK2）[41]。SUN 等[33]运用 TMT-MS 方法分析、评估了 2 种 BRD/ 含溴结构域和额外终端域蛋白家族（bromodomain and extra-terminal domain family，BET）的降解剂，以及 3 种激酶［黏着斑激酶（focal adhesion kinase，FAK）、间变性淋巴瘤激酶（anaplastic lymphoma kinase，ALK）和 BTK］降解剂的降解特异性。结果显示，BRD/BET 降解剂显著降低了靶蛋白 BRD2 的丰度；FAK 降解剂能靶向 FAK 及其同源蛋白 PTK2B，分别导致其降解量增大 3.0 倍和 4.2 倍；但 ALK 和 BTK 在 HEK293 细胞中未被检测到（可能因表达量极低或未表达），因此未观察到预期靶标的降解。该研究体现了深度蛋白质组覆盖对全面解析 PROTACs 靶向机制的重要性。

3.1.1.2 亲和力活性

一般而言，POI 配体亲和力对 PROTACs 的结合效率有决定性影响。但近期研究[17]表明，降低 POI 配体亲和力，可能有利于增大 PROTACs 的生物活性，并有利于其对 POI 的降解。这可能是因为 PROTACs 的活性还依赖于 E3 连接酶，导致其在不同的细胞类型、组织或物种中有不同的表现。SCHEEPSTRA 等[42]研究表明，BRD4 和 CRBN 的蛋白质间接触对 PROTACs 整体结合亲和力的贡献相对较小。因此优化 POI 配体时，应关注其晶体结构，重点改善渗透性和稳定性，并确保 POI 配体与 POI 的结合亲和力适中。

亲核配体的靶向选择性高，但设计复杂、反应性弱。因此，目前的研究正转向亲电配体的设计和优化。利用蛋白质组学技术能针对蛋白质的特定基团进行修饰这一优势，采用活性位点映射（active site mapping）[43]、亲和纯化[44]技术可解决亲电配体的筛选与优化问题。ZHANG 等[45]通过检验不同细胞的蛋白质组来增加筛选出活性 PROTACs 的可能性，并借助免疫分析方法确定 21 号 FKBP 合成配体（21-synthetic ligand of FKBP，21-SLF）可诱导胞质和细胞核中的 FK506 结合蛋白 12（FK506-binding protein 12，FKBP 12）发生多泛素化，从而构造出可识别并降解 FKBP12 的亲电 PROTAC。该亲电 PROTAC 可通过与底物适配蛋白 DDB 1 和 CUL 4 相关因子 11（DDB1 and CUL4 associated factor 11，DCAF 11）发挥作用，促进 FKBP12 的降解。

3.1.2 连接子优化

连接子一般链长较短，以增强细胞渗透性和亲水性[46]；同时，要保持一定的刚性和可扭曲性，使 PROTACs 与 POI 有较大的接触面，借助 PPI 提高靶标的结合效率与降解效率[47]。蛋白质组学技术可帮助研究者筛选合适的连接子种类及合适的连接子长度。ZHANG 等[48]通过点击反应将 VHL E3 连接酶

的配体（*S*,*R*,*S*）-4-[3-（1- 金刚烷基）-4- 羟基苯基]- 苯基 -PEG3- 叠氮化物直接连接到二苯并环辛炔标记的一种鸟嘌呤富集寡核苷酸（AS1411）适配体上，通过同位素标记的相对和绝对定量（isobaric tags for relative and absolute quantitation，iTRAQ）法检验该 PROTAC 在细胞中的降解能力。结果显示，该 PROTAC 的细胞渗透性与 PK 效果较好，对 POI 的降解效率达到预期值。

3.1.3 E3 连接酶的优化

表 1 列举了常见的 E3 连接酶及其作用机制。VHL 和 CRBN 等 E3 连接酶可能会因细胞毒性、突变性而引发耐药性等问题，因而开发可用于构建 PROTACs 的新型 E3 连接酶也是热门研究方向 [49]。LIU 等 [50] 利用转录组学和蛋白质组学数据库建立模型，从多个数据库［包括癌症基因组图谱（The Cancer Genome Atlas，TCGA）和基因型 - 组织表达（Genotype-Tissue Expression，GTEx）等］中收集了 E3 连接酶在多种恶性肿瘤类型中的转录组学表达数据，并通过设定阈值来确定在特定肿瘤类型中高表达的 E3 连接酶。接着，又从人类蛋白质图谱数据库中获取了 E3 连接酶在多种恶性肿瘤类型中的蛋白质组学表达数据，采用同样的方法筛选出高表达的 E3 连接酶。然后，通过对转录组学和蛋白质组学数据进行比较和分析，观察到二者具有高度一致性，即那些在转录组学上高表达的 E3 连接酶在蛋白质组学上也表现出高表达。最后，该研究进一步分析了 E3 连接酶在正常组织中的表达情况，结果显示一些 E3 连接酶在肿瘤中高表达而在正常组织中低表达，提示其可能成为开发 PROTACs 的新方向。

3.2 蛋白质组学技术鉴定 PROTACs 的靶标结合情况

在鉴定 PROTACs 靶标结合情况的过程中，如遇到化合物特异性探针不可用或与靶标的亲和力太低而无法富集时，通常可使用分子探针如 Aza-BODIPY Probe（ABPP，一种基于氮杂氟硼二吡咯的荧光探针）来分析和鉴定与 PROTACs 相互作用的蛋白质，以深入了解作用机制 [51]。有研究 [52] 开发了简化的基于半胱氨酸活性的蛋白质分析（streamlined cysteine activity-based protein profiling，SLC-ABPP）法，通过相对分子质量较低的脱硫生物素 - 碘乙酰胺探针、TMT 多重检测以及使用实时数据库搜索来提高样品通量。这种方法对于更快、更深入地筛选更大的化合物库非常有用 [53]，也为鉴定 PROTACs 的靶标结合情况提供了有力的技术手段。

与此同时，需要考虑“挂钩效应”对 PROTACs 降解靶标蛋白的影响。HAID 等 [54] 在探寻 PROTACs 浓度 - 降解谱的过程中拟合得到了“挂钩效应”的机制模型，能直观体现“挂钩效应”对 PROTACs 降解效率的影响，为后续优化分子、研发药物提供理论支持。

4 蛋白质组学技术在靶标降解后效率评价中的应用

在优化 PROTACs 时，需定期检查其对 POI 的降解效果。这通常涉及比较对照组与试验组 POI 的表达水平，从而确定 PROTACs 能否有效降低 POI 的表达。SCHOLES 等 [55] 提出用蛋白质组学技术对细胞内的蛋白质网络进行分析，以揭示 PROTACs 可能引发的连锁反应。首先，构建稳定表达靶蛋白 -

表 1　常用的 E3 连接酶

Tab.1　Commonly Used E3 Ligases

E3 连接酶	介绍
CRBN	Cullin-RING E3 泛素连接酶 4（CRL4）的底物受体，由 DDB1、CUL4 和 RBX1 组成。在与沙利度胺和其他 IMiDs 结合后，能识别新的底物，如转录因子 IKZF3
VHL	AdPROM（affinity-directed protein missile）系统的一个关键组成部分，作为 Cul2-Rbx1 E3 连接酶复合体的底物受体，可招募低氧诱导因子（hypoxia-inducible factor，HIF）1α 进行泛素化和降解
小鼠双微体 2 同系物（murine double minute 2，MDM 2）	E3 连接酶配体取代了 MDM 2 和肿瘤抑制因子 p53 之间的相互作用；在 PROTACs 中常用于降解 AR
DCAF 16	CUL4-DDB1 E3 泛素连接酶复合体的一个底物识别组件，该复合体负责识别和结合特定的蛋白质底物，引导其进行泛素化修饰，最终导致这些蛋白质的降解
DCAF 15	与 CRL4 形成的一个复合体，可与磺胺衍生物和辅激活因子 RBM39 相结合，引发 RBM39 诱导的泛素化和蛋白酶体降解
Kelch 样 ECH 关联蛋白 1（Kelch-like ECH-associated protein 1，Keap1）	核转录因子红系 2 相关因子 2（nuclear factor-erythroid 2 related factor 2，Nrf2）的负调控因子，通过与 Nrf2 结合并促进其泛素化和蛋白酶体降解，抑制 Nrf2 的活性

绿色荧光蛋白（green fluorescence protein，GFP）融合蛋白的细胞系，并采用 PROTACs 处理；再通过检测 GFP 荧光信号的变化来评价化合物诱导靶蛋白降解的效率。SPRADLIN 等[56]为了评估 E3 泛素蛋白连接酶 RNF114 和 CDK 抑制因子 p21/p57 在印苦楝内酯（nimbolide）作用机制中的参与程度，采用 RNA 干扰技术敲除了上述 2 个基因，并通过增殖试验和双向凝胶电泳试验检测和评估了敲除效率。结果显示，*RNF114* 或 *p21*/*p57* 基因的敲除能在一定程度上减弱印苦楝内酯对细胞增殖的抑制作用，提示 RNF114 和 p21/p57 在印苦楝内酯发挥抗增殖作用的过程中扮演了重要角色。

目前常用的泛素化分析富集手段——串联重复泛素结合实体（tandem ubiquitin binding entities，TUBE）存在难以识别免疫沉淀中共洗脱的泛素化位点和污染蛋白的问题。TMT 的同量异位标记提供了可用于样品比较的多重定量蛋白质组分析[57]，能够识别降解剂的脱靶效应和 POI 降解效果。2021 年，HANSEN 等[58]通过整合二甘氨酸抗体介导的富集技术、基于 Orbitrap 的优化 DIA 技术，找到了一种高灵敏度方法，对包含超过 90 000 种二甘氨酸肽的全面光谱库进行检索，鉴定出 35 000 种二甘氨酸肽段。这些新方法也可用于比较对照品和降解剂处理的泛素组图谱，从而揭示 PROTACs 的降解作用模式。

5 蛋白质组学技术在通路验证中的应用

一般，通过敲除或抑制 PROTACs 对 POI 的表达作用，或使用 E3 连接酶抑制剂来验证 PROTACs 是否通过预期的机制来诱导 POI 的降解。定量蛋白质组学是识别 PROTACs 降解靶蛋白之外的其他蛋白质的有力工具[59]。BAGKA 等[60]设计并合成了基于 HPI-1（一种 Hedgehog 通路抑制剂）的 PROTAC（HPP-9），通过比较 HPP-9 和 HPI-1 抑制 Hedgehog 通路和降解 BET 蛋白的效果，验证了 BET 是 HPI-1 的靶标。NG 等[61]利用 TMT、固化金属离子亲合色谱（immobilized metal ion affinity chromatography，IMAC）技术分析了经泊马度胺（pomalidomide）、帕博西尼（palbociclib）、CDK6 特异性 PROTAC BSJ-03-123 单独以及组合处理后的人多发性骨髓瘤细胞（MM.1S 细胞），鉴定出 7 460 个蛋白质，其中分别有 240 个和 179 个蛋白质在受到泊马度胺或帕博西尼处理后表达水平有显著变化；且与单独处理相比，泊马度胺和帕博西尼的组合处理能更有效地降低与多发性骨髓瘤复发相关的蛋白质的表达水平，如 TRIP 13、RRM 1 等。这说明同时抑制 CDK 6 和 IMiDs 的靶标能产生协同效应，从而提高对多发性骨髓瘤的疗效，对该类 PROTACs 的后续开发和优化提供了可行思路。

6 总结与展望

本文综述了蛋白质组学技术在靶向蛋白质降解研究中的应用，涵盖靶标确定、配体的设计与筛选、配体优化、靶标结合情况的鉴定、靶标敲除后的效率评价以及通路验证等方面（图 2）。蛋白质组学技术的高通量筛选优势使其在研究蛋白质相互作用、筛选可形成 PROTACs 的潜在 POI 等方面发挥了重要作用。此外，蛋白质组学技术还可用于评估靶标配体亲和力、评价细胞渗透性与 PK、鉴定三元络合物稳定性等，从而协助 PROTACs 的靶标结合强度评估、配体优化以及靶标敲除后效率评价。

目前蛋白质组学在 PROTACs 领域的应用发展仍存在一些局限性。例如，高通量的蛋白质组学在评估 PROTACs 时会产生庞大数据量，需要进行复杂数据处理与分析，并需要其他试验辅助以验证其生物学意义。一些成熟技术如有限蛋白水解偶联质谱技术（limited proteolysis-coupled mass spectrometry，LIP-MS）[62]、氢氘交换质谱（hydrogen deuterium exchange mass spectrometry，HDX-MS）[63]等在药物靶点研究上运用广泛，却未曾用于 PROTACs 的设计、研发和评价。这些方法未来或许都可与蛋白组学相结合，用于 PROTACs 或靶向蛋白降解的研究。

参考文献：

[1] SPRADLIN J N, ZHANG E, NOMURA D K. Reimagining druggability using chemoproteomic platforms [J]. *Acc Chem Res*, 2021, **54**(7): 1801-1813.

[2] GAO J, JIANG X Y, LEI S M, *et al*. A region-confined PROTAC nanoplatform for spatiotemporally tunable protein

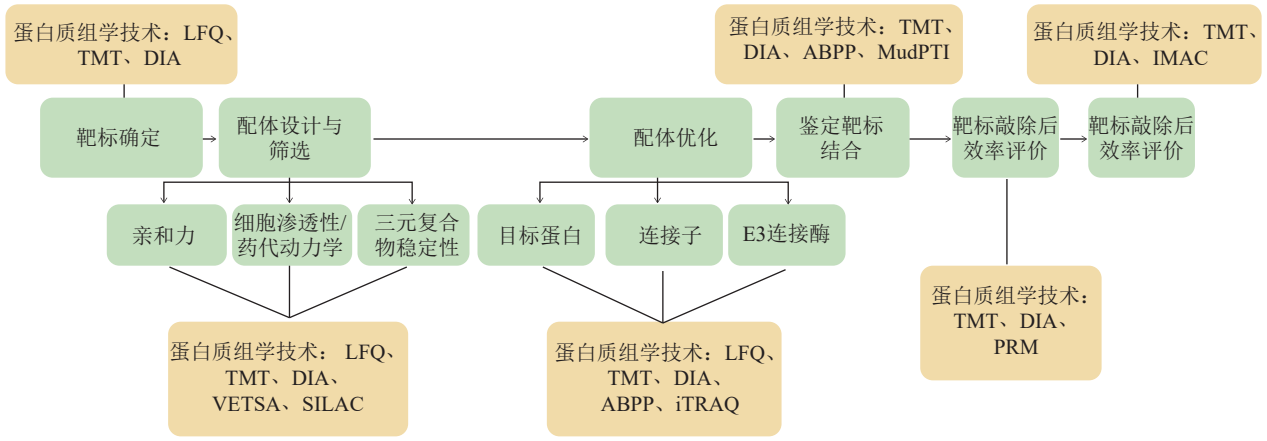


图 2　蛋白质组学方法在 PROTACs 开发中的应用

Fig.2　Application of Proteomics Methods in the Development of PROTACs

degradation and enhanced cancer therapy [J]. *Nat Commun*, 2024, **15**(1): 6608.

[3] BÉKÉS M, LANGLEY D R, CREWS C M. PROTAC targeted protein degraders: the past is prologue [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2022, **21**(3): 181-200.

[4] 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 U S A*, 2001, **98**(15): 8554-8559.

[5] BEMIS T A, LA CLAIR J J, BURKART M D. Unraveling the role of linker design in proteolysis targeting chimeras [J]. *J Med Chem*, 2021, **64**(12): 8042-8052.

[6] YANG J Z, CHANG Y, TIEN J C, *et al*. Discovery of a highly potent and selective dual PROTAC degrader of CDK12 and CDK13 [J]. *J Med Chem*, 2022, **65**(16): 11066-11083.

[7] CHEN M Q, LI J, ZHANG L, *et al*. CDK8 and CDK19: positive regulators of signal-induced transcription and negative regulators of mediator complex proteins [J]. *Nucleic Acids Res*, 2023, **51**(14): 7288-7313.

[8] AN Z X, LV W X, SU S, *et al*. Developing potent PROTACs tools for selective degradation of HDAC6 protein [J]. *Protein Cell*, 2019, **10**(8): 606-609.

[9] CHEN S Q, BI K J, LIANG H X, *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, **63**: 219-230.

[10] McCOULL W, CHEUNG T, ANDERSON E, *et al*. Development of a novel B-Cell lymphoma 6(BCL6) PROTAC to provide insight into small molecule targeting of BCL6 [J]. *ACS Chem Biol*, 2018, **13**(11): 3131-3141.

[11] 刘广苑, 李亚慧, 张　炜, 等. 非修饰靶点发现细胞热位移分析技术的变革与应用进展 [J]. 药学学报, 2024, **59**(1): 25-34.

[12] ZHANG X Y, CROWLEY V M, WUCHERPFENNIG T G, *et al*. Electrophilic PROTACs that degrade nuclear proteins by engaging DCAF16 [J]. *Nat Chem Biol*, 2019, **15**(7): 737-746.

[13] CHAN K H, ZENGERLE M, TESTA A, *et al*. Impact of target warhead and linkage vector on inducing protein degradation: comparison of bromodomain and extra-terminal(BET) degraders derived from triazolodiazepine(JQ1) and tetrahydroquinoline(I-BET726) BET inhibitor scaffolds [J]. *J Med Chem*, 2018, **61**(2): 504-513.

[14] 牟　伊, 文　帅, 王　燕, 等. 可控性蛋白降解靶向嵌合体(PROTACs)技术研究进展 [J]. 药学学报, 2023, **58**(8): 2193-2202.

[15] NI Z H, SHI Y, LIU Q L, *et al*. Degradation-based protein profiling: a case study of celastrol [J]. *Adv Sci* (Weinh), 2024, **11**(25): e2308186.

[16] DALE B, CHENG M, PARK K S, *et al*. Advancing targeted protein degradation for cancer therapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2021, **21**(10): 638-654.

[17] SATHE G, SAPKOTA G P. Proteomic approaches advancing targeted protein degradation [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2023, **44**(11): 786-801.

[18] GUI W J, GIARDINA S F, BALZARINI M, *et al*. Reversible

assembly of proteolysis targeting chimeras [J]. *ACS Chem Biol*, 2023, **18**(7): 1582-1593.

[19] YANG K, ZHAO Y, NIE X Q, *et al*. A cell-based target engagement assay for the identification of cereblon E3 ubiquitin ligase ligands and their application in HDAC6 degraders [J]. *Cell Chem Biol*, 2020, **27**(7): 866-876. e8.

[20] BONDESON D P, SMITH B E, BURSLEM G M, *et al*. Lessons in PROTAC design from selective degradation with a promiscuous warhead [J]. *Cell Chem Bio*, 2018, **25**(1): 78-87. e5.

[21] THOMAS B A I, LEWIS H L, JONES D H, *et al*. Central nervous system targeted protein degraders [J]. *Biomolecules*, 2023, **13**(8): 1164.

[22] TU Y B, TAN L H, TAO H X, *et al*. CETSA and thermal proteome profiling strategies for target identification and drug discovery of natural products [J]. *Phytomedicine*, 2023, **116**: 154862.

[23] KAWATKAR A, SCHEFTER M, HERMANSSON N O, *et al*. CETSA beyond soluble targets: a broad application to multipass transmembrane proteins [J]. *ACS Chem Biol*, 2019, **14**(9): 1913-1920.

[24] ZHANG A X, CASSIDY K, DAHL G, *et al*. The vital role of proteomics in characterizing novel protein degraders [J]. *SLAS Discov*, 2021, **26**(4): 518-523.

[25] MANEIRO M A, FORTE N, SHCHEPINOVA M M, *et al*. Antibody-PROTAC conjugates enable HER2-dependent targeted protein degradation of BRD4 [J]. *ACS Chem Biol*, 2020, **15**(6): 1306-1312.

[26] ZENG S X, HUANG W H, ZHENG X L, *et al*. Proteolysis targeting chimera (PROTAC) in drug discovery paradigm: recent progress and future challenges [J]. *Eur J Med Chem*, 2021, **210**: 112981.

[27] NEKLESA T K, WINKLER J D, CREWS C M. Targeted protein degradation by PROTACs [J]. *Pharmacol Ther*, 2017, **174**: 138-144.

[28] ZHANG Y, LOH C, CHEN J, *et al*. Targeted protein degradation mechanisms [J]. *Drug Discov Today Technol*, 2019, **31**: 53-60.

[29] ZORBA A, NGUYEN C, XU Y R, *et al*. Delineating the role of cooperativity in the design of potent PROTACs for BTK [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, **115**(31): E7285-E7292.

[30] SATHE G, ALBERT M, DARROW J, *et al*. Quantitative proteomic analysis of the frontal cortex in Alzheimer's disease [J]. *J Neurochem*, 2021, **156**(6): 988-1002.

[31] JI W Z, WANG E S, MANZ T D, *et al*. Development of potent and selective degraders of PI5P4Kγ [J]. *Eur J Med Chem*, 2023, **247**: 115027.

[32] MILROY L G, GROSSMANN T N, HENNIG S, *et al*. Modulators of protein-protein interactions [J]. *Chem Rev*, 2014, **114**(9): 4695-4748.

[33] SUN H, YANG K, ZHANG X, *et al*. Evaluation of a pooling chemoproteomics strategy with an FDA-approved drug library [J]. *Biochemistry*, 2023, **62**(3): 624-632.

[34] CHEN M, ZHOU P, KONG Y, *et al*. Inducible degradation of oncogenic nucleolin using an aptamer-based PROTAC [J]. *J Med Chem*, 2023, **66**(2): 1339-1348.

[35] GOODING S, ANSARI-POUR N, TOWFIC F, *et al*. Multiple cereblon genetic changes are associated with acquired resistance to lenalidomide or pomalidomide in multiple myeloma [J]. *Blood*, 2021, **137**(2): 232-237.

[36] NIPHAKIS M J, CRAVATT B F. Ligand discovery by activity-based protein profiling [J]. *Cell Chem Biol*, 2024, **31**(9): 1636-1651.

[37] 王美军, 杨翠慧, 张美慧, 等. 蛋白降解靶向嵌合体的研究进展 [J]. 中国药物化学杂志, 2023, **33**(4): 303-314.

[38] SCHIEDEL M, HERP D, HAMMELMANN S, *et al*. Chemically induced degradation of sirtuin 2 (Sirt2) by a proteolysis targeting chimera (PROTAC) based on sirtuin rearranging ligands (SirReals) [J]. *J Med Chem*, 2018, **61**(2): 482-491.

[39] RÖTH S, MACARTNEY T J, KONOPACKA A, *et al*. Targeting endogenous K-RAS for degradation through the affinity-directed protein missile system [J]. *Cell Chem Biol*, 2020, **27**(9): 1151-1163. e6.

[40] TOVELL H, TESTA A, ZHOU H, *et al*. Design and characterization of SGK3-PROTAC1, an isoform specific SGK3 kinase PROTAC degrader [J]. *ACS Chem Biol*, 2019, **14**(9): 2024-2034.

[41] LIU X G, KALOGEROPULOU A F, DOMINGOS S, *et al*. Discovery of XL01126: a potent, fast, cooperative, selective, orally bioavailable, and blood-brain barrier penetrant PROTAC degrader of leucine-rich repeat kinase 2 [J]. *J Am Chem Soc*, 2022, **144**(37): 16930-16952.

[42] SCHEEPSTRA M, HEKKING K F W, VAN HIJFTE L, *et al*. Bivalent ligands for protein degradation in drug discovery [J]. *Comput Struct Biotechnol J*, 2019, **17**: 160-176.

[43] KUSTER D J, MARSHALL G R. Validated ligand mapping

of ACE active site [J]. *J Comput Aided Mol Des*, 2005, **19**(8): 609-615.

[44] LIU G Z, DU Y N, FU T, *et al*. Profiling protein interactions by purification with capillary monolithic affinity column in combination with label-free quantitative proteomics [J]. *J Chromatogr A*, 2022, **1676**: 463273.

[45] ZHANG X Y, LUUKKONEN L M, EISSLER C L, *et al*. DCAF11 supports targeted protein degradation by electrophilic proteolysis-targeting chimeras [J]. *J Am Chem Soc*, 2021, **143**(13): 5141-5149.

[46] CAO F Y, DE WEERD S, CHEN D, *et al*. Induced protein degradation of histone deacetylases 3 (HDAC3) by proteolysis targeting chimera (PROTAC) [J]. *Eur J Med Chem*, 2020, **208**: 112800.

[47] WANG P Y, ZHOU J. Proteolysis targeting chimera (PROTAC): a paradigm-shifting approach in small molecule drug discovery [J]. *Curr Top Med Chem*, 2018, **18**(16): 1354-1356.

[48] ZHANG L, LI L, WANG X, *et al*. Development of a novel PROTAC using the nucleic acid aptamer as a targeting ligand for tumor selective degradation of nucleolin [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2022, **30**: 66-79.

[49] 钱　浩, 周伟澄, 蔡正艳. 蛋白降解靶向嵌合体药物的研究进展 [J]. 中国医药工业杂志, 2024, **55**(6): 750-760.

[50] LIU Y, YANG J W, WANG T L, *et al*. Expanding PROTACtable genome universe of E3 ligases [J]. *Nat Commun*, 2023, **14**(1): 6509.

[51] LI G, MOELLERING R E. Chemical probes for spatially resolved measurement of active enzymes in single cells [J]. *Methods Enzymol*, 2019, **628**: 243-262.

[52] YANG F, JIA G G, GUO J Z, *et al*. Quantitative chemoproteomic profiling with data-independent acquisition-based mass spectrometry [J]. *J Am Chem Soc*, 2022, **144**(2): 901-911.

[53] 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]. *Nat Biotechnol*, 2021, **39**(5): 630-641.

[54] HAID R T U, REICHEL A. A mechanistic pharmacodynamic modeling framework for the assessment and optimization of proteolysis targeting chimeras (PROTACs) [J]. *Pharmaceutics*, 2023, **15**(1): 195.

[55] SCHOLES N S, MAYOR-RUIZ C, WINTER G E. Identification and selectivity profiling of small-molecule degraders via multi-omics approaches [J]. *Cell Chem Biol*, 2021, **28**(7): 1048-1060.

[56] SPRADLIN J N, HU X R, WARD C C, *et al*. Harnessing the anti-cancer natural product nimbolide for targeted protein degradation [J]. *Nat Chem Biol*, 2019, **15**(7): 747-755.

[57] SIMPSON L M, FULCHER L J, SATHE G, *et al*. An affinity-directed phosphatase, AdPhosphatase, system for targeted protein dephosphorylation [J]. *Cell Chem Biol*, 2023, **30**(2): 188-202. e6.

[58] HANSEN F M, TANZER M C, BRÜNING F, *et al*. Data-independent acquisition method for ubiquitinome analysis reveals regulation of circadian biology [J]. *Nat Commun*, 2021, **12**(1): 254.

[59] BURSLEM G M, CREWS C M. Proteolysis-targeting chimeras as therapeutics and tools for biological discovery [J]. *Cell*, 2020, **181**(1): 102-114.

[60] BAGKA M, CHOI H, HÉRITIER M, *et al*. Targeted protein degradation reveals BET bromodomains as the cellular target of Hedgehog pathway inhibitor-1 [J]. *Nat Commun*, 2023, **14**(1): 3893.

[61] NG Y L D, RAMBERGER E, BOHL S R, *et al*. Proteomic profiling reveals CDK6 upregulation as a targetable resistance mechanism for lenalidomide in multiple myeloma [J]. *Nat Commun*, 2022, **13**(1): 1009.

[62] FONTANA A, DE LAURETO P P, SPOLAORE B, *et al*. Probing protein structure by limited proteolysis [J]. *Acta Biochim Pol*, 2004, **51**(2): 299-321.

[63] MASSON G R, JENKINS M L, BURKE J E. An overview of hydrogen deuterium exchange mass spectrometry (HDX-MS) in drug discovery [J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2017, **12**(10): 981-994.