



**TURUN  
YLIOPISTO**

Matemaattis-luonnontieteellinen  
tiedekunta

# Proteiinien kohdennettu pilkkominen lääkekehityksessä

PROTACien avulla

Iris Tuomi

Bio-orgaanisen kemian tutkimusryhmä

LuK-tutkielma

Laajuus: 6 op

18.3.2024

Turku

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu

Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

LuK-tutkielma

**Pääaine:** Kemia

**Tekijä:** Iris Tuomi

**Otsikko:** Proteiinien kohdennettu pilkkominen lääkekehityksessä – PROTACien avulla

**Ohjaaja:** Satu Mikkola

**Sivumäärä:** 16 sivua

**Päivämäärä:** 18.3.2024

---

Kohdennettu proteiinien pilkkominen (TPD, engl. targeted protein degradation) on uusi potentiaalinen menetelmä sairautta aiheuttavien proteiinien toiminnan estämiseksi. Erityisesti se, että TPD:n avulla voitaisiin vaikuttaa aiemmin lääkekehityksen saavuttamattomissa olleisiin kohdeproteiineihin, on tehnyt siitä kiinnostavan kohteen lääkekehitykselle.

Proteiinien kohdennettu pilkkominen voidaan toteuttaa PROTACien (engl. proteolysis targeting chimera) avulla. PROTACit ovat pieniä bifunktionaalisia molekyyliä, jotka käyttävät hajotustoiminnassaan solun normaaliin toimintaan kuuluvaa proteolyyttistä ubikitiini-proteasomijärjestelmää. PROTACit koostuvat kolmesta osasta: kohdeproteiiniligandista, E3-ligaasiligandista sekä linkkeristä, joka yhdistää ligandiosat. PROTACit sitovat kohdeproteiinia ja E3-ligaasia samanaikaisesti muodostaen kolmen komponentin rakenteen (kohdeproteiini-PROTAC-E3-ligaasi). Tällöin PROTAC tuo kohdeproteiinin riittävän lähelle E3-ligaasia, jolloin kohdeproteiini ubikinoituu ja päättyy proteasomin hajotettavaksi.

PROTACeilla on useita hyviä ominaisuuksia, minkä vuoksi niitä pidetään lupaavina lääkekehityksen kohteina. Useita PROTACeja onkin edennyt klinisiin tutkimuksiin ja niillä on saavutettu lupaavia tuloksia, mutta ne eivät kuitenkaan ole vielä edenneet lääkekäyttöön. PROTACien heikot fysikokemialliset ominaisuudet rajoittavat niiden muuntamista lääkeaineisiksi. Erityisesti PROTACien suuri koko tuottaa haasteita, sillä se vaikeuttaa PROTACien oraalista annostelua. Fysikokemiallisia ominaisuuksia on kuitenkin onnistuttu parantamaan optimoimalla PROTACin rakennetta.

Myös PROTACien heikko selektiivisyys rajoittaa niiden käyttöä lääkeaineena. Selektiivisyyteen voidaan vaikuttaa PROTACin rakenteen suunnittelulla. Selektiivisyyttä voidaan parantaa myös kontrolloimalla PROTACien aktiivisuutta olosuhteiden mukaan. Potentiaalisia strategioita olosuhteiden avulla kontrolloitaviin PROTACeihin ovat valon avulla kontrolloitavat PROTACit, hypoksia-aktivoituvat PROTACit sekä folaattikonjugoidut PROTACit.

PROTACien kehittämisessä lääkekäyttöön soveltuviksi on vielä useita haasteita ratkottavana. Tärkeimpiä kehityskohteita ovat uusien spesifisten E3-ligaasien löytäminen, linkkerin rakenteen optimointi, selektiivisyyden parantaminen sekä oralisesti annosteltavien PROTACien kehittäminen.

---

**Avainsanat:** lääkekehitys, proteiinien kohdennettu pilkkominen

# Sisällysluettelo

<b>1</b>	<b>Johdanto</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>PROTAC-teknologia</b>	<b>2</b>
<b>2.1</b>	<b>PROTACien rakenteen suunnittelu ja kehitys</b>	<b>4</b>
2.1.1	E3-ligaasiligandi	4
2.1.2	Kohdeproteiiniligandi	6
2.1.3	Linkkeri	7
<b>3</b>	<b>PROTACien selektiivisyys</b>	<b>7</b>
<b>3.1</b>	<b>Valon avulla kontrolloitavat PROTACit</b>	<b>8</b>
3.1.1	pc-PROTACit	8
3.1.2	Valon avulla päälle kytkettävät PROTACit	10
<b>3.2</b>	<b>Hypoksia-aktivoitavat PROTACit</b>	<b>11</b>
<b>3.3</b>	<b>Folaattikonjugoidut PROTACit</b>	<b>12</b>
<b>4</b>	<b>PROTACien saaminen lääkekäyttöön</b>	<b>14</b>
<b>5</b>	<b>Johtopäätökset ja yhteenveto</b>	<b>16</b>
	<b>Viiteluettelo</b>	<b>17</b>

## *Lyhenteet*

CRBN	cereblon
EGFR	epidermaalisen kasvutekijän reseptori (engl. epidermal growth factor receptor)
FDA	ruoka ja elintarvikevirasto (engl. Food and Drug Administration)
FOLR1	folaattireseptori-1
HALG	hypoksia-aktivoitu lähtevä ryhmä (engl. hypoxia-activated leaving group)
HIF1 $\alpha$	hypoksiaindusoitava tumatekijä-1 $\alpha$ (engl. hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ )
NTR	nitroreduktaasi
pc-PROTAC	(engl. photocaged PROTAC)
PEG	polyetyleeniglykoli
PROTAC	(engl. proteolysis targeting chimera)
pVHL	(engl. von Hippel-Lindau tumor-suppressor protein)
TPD	kohdennettu proteiinien pilkkominen (engl. targeted protein degradation)
VHL	von Hippel-Lindau

# 1 Johdanto

Ihmisen proteomi koostuu noin 20 300 proteiinista. Elimistö säätelee niiden toimintaa tarkasti, jotta proteiinien homeostaasi, proteostaasi, säilyy. Usein sairauden puhkeamisen syynä ovatkin poikkeavuudet proteiinien toiminnassa ja ilmentymisessä.<sup>1</sup>

Tällä hetkellä proteiinien toimintahäiriöiden aiheuttamiin sairauksiin käytetään pienimolekyylisiä lääkeaineita, jotka toimivat patogeenisten proteiinien inhibiittoreina. Patogeenisen proteiinin toiminta estetään kohdentamalla inhibitorinen lääkeaine entsyymin tai reseptorin aktiiviseen tai säätelevään osaan.<sup>1</sup> Tällaiset perinteiset inhibitoriset lääkeaineet ovat kuitenkin rajoittuneet proteiineihin, joissa on ligandin sitoutumiselle aktiivinen kohta, kuten entsyymeihin ja reseptoreihin.<sup>2</sup> Näiden proteiinien lisäksi on vielä monia muita patogeenisiä proteiineja, kuten esimerkiksi transkriptiotekijät, jotka ovat merkittäviä tekijöitä monissa sairauksissa, kuten syövässä. Transkriptiotekijät ovat sellaisia proteiineja, joilla ei ole ligandin sitoutumiselle aktiivista kohtaa ja ovat siten olleet lääkekehityksen saavuttamattomissa.<sup>3</sup>

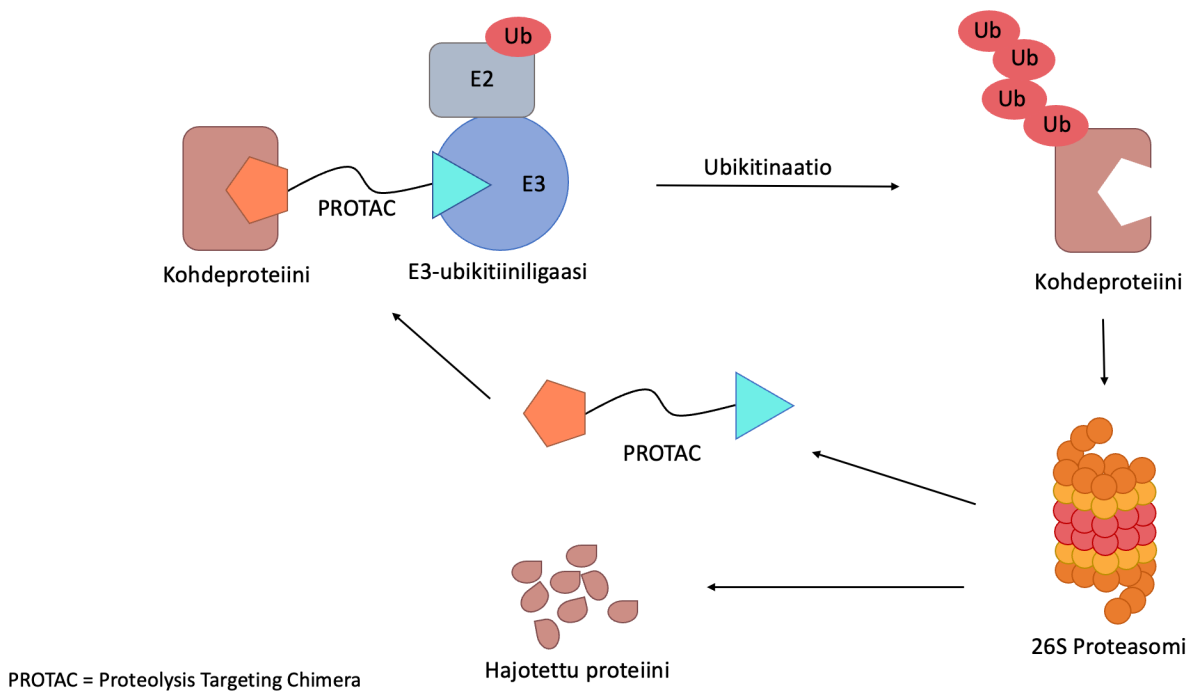
Pienimolekyylisten inhibiittorien käytössä lääkeaineena on myös muita haasteita. Niitä pitää käyttää suurina annoksina, jotta haluttu terapeuttinen vaikutus saavutettaisiin. Suuret annostukset puolestaan voivat johtaa epätoivottuihin sivuvaikutuksiin.<sup>1,2</sup> Lisäksi inhibiittoreilla kyetään tyypillisesti vaikuttamaan proteiinissa vain yhden domeenin toimintaan, jolloin muiden domeenien aktiivisuudet ja vuorovaikutukset muiden proteiinien kanssa säilyvät.<sup>1</sup> Proteiinien toiminnan estämisessä on siis haasteensa, minkä vuoksi on pyritty kehittämään menetelmiä, joilla patogeeniset proteiinit saataisiin hajotettua kokonaan.<sup>1</sup>

Kohdennetusta proteiinien pilkkomisesta (TPD, engl. targeted protein degradation) on tullut potentiaalinen menetelmä patogeenisten proteiinien aiheuttamien sairauksien hoitoon. TPD-menetelmässä on monia etuja inhibitoristen lääkeaineiden käyttöön nähden.<sup>4</sup> TPD:ssä voidaan käyttää pienempiä annostuksia, jolloin myös mahdollisia sivuvaikutuksia ilmenee vähemmän. TPD:n avulla voidaan vaikuttaa kaikkiin proteiineihin ja proteiinin pilkkoutumisen yhteydessä koko proteiinin toiminta estyy.<sup>4</sup> Hajotusprosessi menetelmässä perustuu pääasiassa kahteen solujen normaaliin toimintaan kuuluvaan proteolyttiseen järjestelmään, joita ovat ubikitiini-proteasomijärjestelmä sekä lysosomaalinen hajoamisreitti.<sup>4</sup>

Tässä tutkielmassa keskitytään ubikitiini-proteasomijärjestelmän toimintaan perustuvan PROTAC-tekniikan (PROTAC, engl. proteolysis targeting chimera) käyttöön proteiinien kohdennetussa pilkkomisessa lääkekehityksessä. Tutkielmassa käsitellään PROTACien toimintaa, rakennetta, selektiivisyyttä sekä PROTACien saamista lääkekäyttöön.

## 2 PROTAC-teknologia

PROTAC-teknologian käyttämisestä proteiinien kohdennetussa pilkkomisessa on tullut potentiaalinen menetelmä sairauksien hoitoon.<sup>5</sup> PROTACit ovat bifunktionaalisia pieniä molekyyliä. Ne koostuvat E3-ligaasiligandista, kohdeproteiiniligandista sekä linkkeristä, joka yhdistää ligandiosat.<sup>6</sup> Solun luonnollisessa hajotustoiminnassa E3-ubikitiiniligaasi liittyy ubikitiinin hajotettavaan proteiiniin, jolloin proteiini päätyy proteasomin hajotettavaksi. PROTACit kykenevät sitomaan E3-ubikitiiniligaasia sekä kohdeproteiinia samanaikaisesti, jolloin muodostuu kolmen komponentin rakenne (kohdeproteiini-PROTAC-E3-ubikitiiniligaasiligandi). Kolmen komponentin rakenteen muodostuminen tuo kohdeproteiinin riittävän lähelle E3-ubikitiiniligaasia, mikä saa aikaan kohdeproteiinin ubikinoitumisen.<sup>6,7</sup> Ubikinoitumisen seurauksena proteasomi pilkkoo kyseisen proteiinin peptideiksi ja aminohapoiksi. Kohdeproteiinin hajoamisen yhteydessä PROTAC vapautuu takaisin käyttöön.<sup>6</sup> PROTACin toimintamekanismi on esitetty kaaviossa 1.

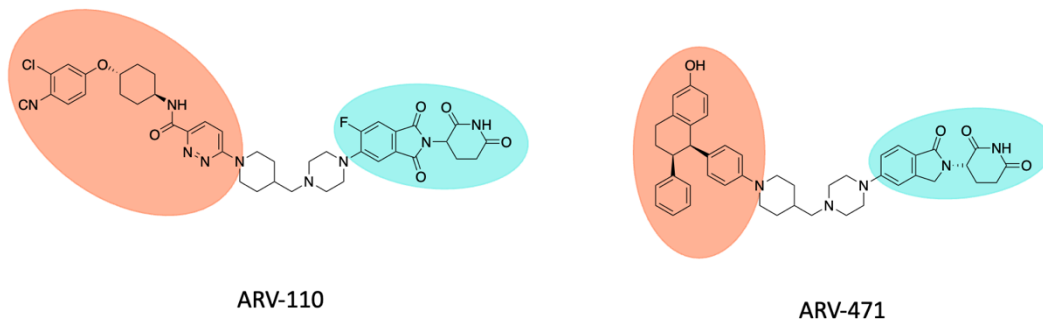


**Kaavio 1.** PROTACin toimintamekanismi. Kaavio on piirretty viitteessä 6 esitettyä kaaviota mukailleen.

PROTACeilla on useita hyviä ominaisuuksia, joiden ansiosta ne voisivat toimia potentiaalisina lääkeaineina sairauksissa, joita proteiinien toimintahäiriöt aiheuttavat.<sup>7</sup> Farmakodynamiikan kannalta PROTACin vapautuminen takaisin käyttöön on merkittävän tärkeää, sillä PROTAC kykenee toimimaan katalyyttisesti eli yksi PROTAC kykenee hajottamaan useita proteiineja.<sup>8</sup> PROTACien

katalyyttinen luonne mahdollistaa lääkeaineen pitkäkestoisen vaikutuksen, mikä mahdollistaa pienten annostuksien käyttämisen.<sup>9</sup> PROTACit kykenevät sitoutumaan mihin tahansa kohtaan kohdeproteiinissa, mikä mahdollistaa myös sellaisten proteiinien pilkkomisen, joissa ei ole ligandin sitoutumiselle aktiivista kohtaa, jolloin yhä useampien proteiinien toimintaan sekä ilmentymiseen voitaisiin vaikuttaa.<sup>6,7</sup>

Ensimmäinen PROTAC raportoitiin vuonna 2001.<sup>1</sup> Viime vuosikymmenen aikana PROTACien kehittäminen on ollut todellisessa suosiossa ja yli 25 PROTAC-molekyyliä on edennyt kliinisiin tutkimuksiin.<sup>10</sup> Proteiinien kohdennettuun pilkkomiseen suuntaavan lääkeyhtiön Arvinan kaksi PROTACia eteni kliinisiin tutkimuksiin vuonna 2019. Kummankin PROTACin rakenne on esitetty kuvassa 1. Toinen PROTACeista, ARV-110, pilkkoo kohdennetusti androgeenireseptoria. Tutkimuksen tulokset osoittivat, että ARV-110 on tehokas ja turvallinen hoitomenetelmä eturauhassyövän hoitoon. Toinen PROTAC, ARV-47, pilkkoo kohdennetusti tyypin 1 estrogeenireseptoria, mikä tarjoaa potentiaalisen hoitomenetelmän rintasyövän hoitoon.<sup>1</sup>



**Kuva 1.** PROTACien ARV-110 ja ARV-471 rakenne. Oranssilla pohjalla on kohdeproteiiniligandi ja sinisellä pohjalla E3-ubikitiiniligaasiligandi. Ligandeja yhdistää linkkeri. Kuva on piirretty viitteessä 1 esitettyä kuvaa mukailten.

Vaikka useita PROTACeja on edennyt kliinisiin tutkimuksiin, on vielä monia haasteita ratkottavana, jotta ne saataisiin lääkekäyttöön.<sup>10</sup> Yhtenä merkittävänä haasteena on PROTACien mahdollinen toksisuus sekä kohteessa että kohteen ulkopuolella. Toksisuudella kohteessa viitataan proteiinin pitkittyneeseen pilkkomiseen, joka johtuu PROTACien katalyyttisestä luonteesta. Katalyyttisyys hankaloittaa PROTACien aktiivisuuden säätelyä annostelulla, sillä on vaikeaa määrittää hajotukseen tarvittava PROTACin määrä. Kohteen ulkopuolisella toksisuudella

tarkoitetaan muiden kuin kohdeproteiinien pilkkomista.<sup>8</sup> Tästä syystä on pyritty suunnittelemaan PROTACien rakenne niin, että saataisiin aikaan mahdollisimman hyvä kohde- ja kudosselektiivisyys.<sup>11</sup> Lisähaasteita tuottaa PROTACien suuri koko, joka on tyypillisesti 700–1000 Da, kun taas optimaalinen koko pienimolekyyliselle lääkeaineelle on 300–500 Da.<sup>6</sup>

## 2.1 PROTACien rakenteen suunnittelu ja kehitys

### 2.1.1 E3-ligaasiligandi

E3-ligaasiligandin tehtävänä on tunnistaa ja värvätä E3-ligaasi osaksi kolmen komponentin rakennetta. Ensimmäisen sukupolven PROTACeissa käytettiin E3-ligaasiligandina fosfopeptidiä.<sup>12</sup> Fosfopeptidien heikkoutena on niiden huono pysyvyys solussa, sillä ne hydrolysoituvat fosfataasin seurauksena.<sup>1</sup> Molekyylin pysyvyys solussa vaikuttaa merkittävästi lääkeaineen vaikutuksen kestoon.<sup>1</sup> Myöskään fosfopeptidien suuri molekyylimassa ei ole optimaalinen ominaisuus, sillä suuret lääkeaineet kyetään annostelemaan ainoastaan mikroinjektiolla eikä oraalisesti, mikä olisi toivottava ominaisuus lääkeaineelle.<sup>10,12</sup> Fosfopeptidien käyttöön lääkeaineena liittyy haasteita, minkä vuoksi on alettu kehittämään lääkeaineeksi soveltuvampia ei-peptidisiä E3-ligaasiligandeja.<sup>12</sup>

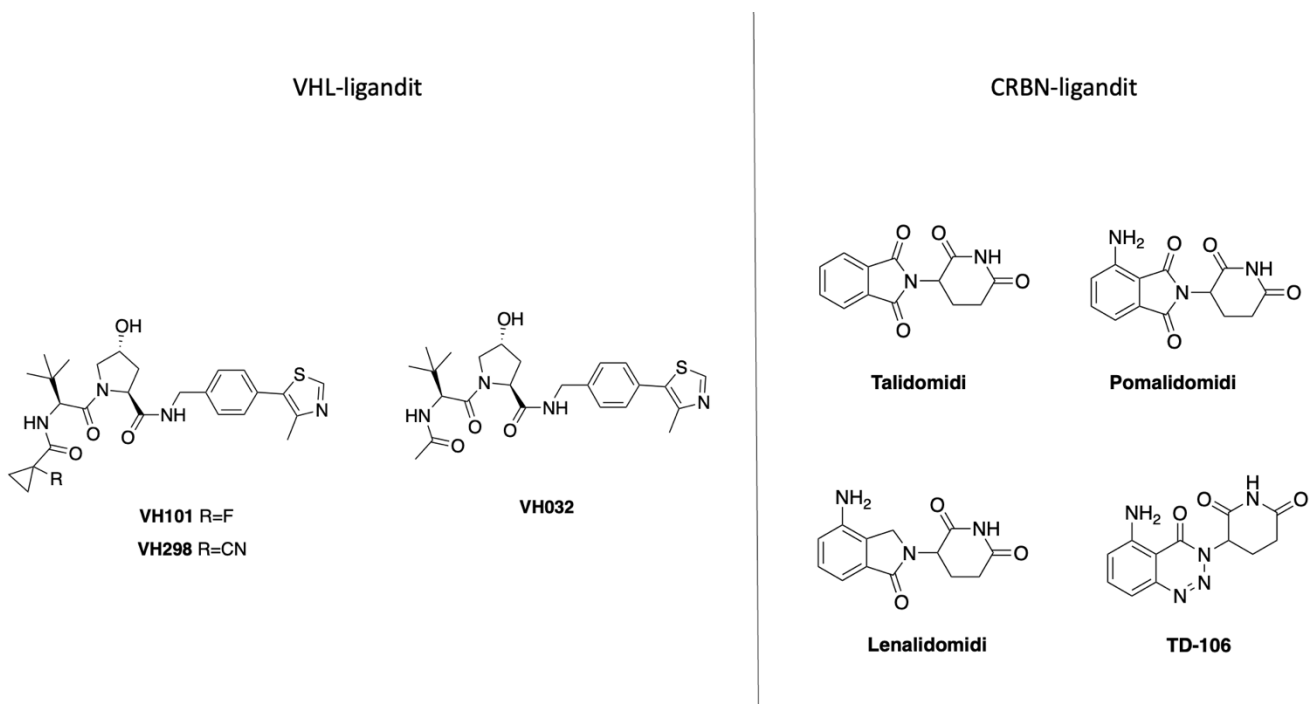
Uuden sukupolven PROTACeissa käytetään E3-ligaasiligandina pieniä molekyyliä. Pienimolekyylisten ligandien käytöllä on saavutettu parempi pysyvyys solussa sekä nopeampi kohdeproteiinien hajotus.<sup>12</sup> Haasteena on kuitenkin se, että pienimolekyylisten PROTACien kehittämisessä pystytään käyttämään vain muutamia E3-ligaaseja, vaikka ihmisen genomista niitä on identifioitu yli 600 erilaista.<sup>6</sup> Tämä johtuu siitä, että pienimolekyylisiä spesifisiä E3-ligaasien ligandeja tunnetaan hyvin vähän.<sup>1</sup> Kahdelle E3-ligaasille on kuitenkin onnistuttu löytämään pienimolekyylisiä E3-ligaasiligandeja, joita voidaan hyödyntää PROTACien kehityksessä. Nämä E3-ligaasit ovat von Hippel-Lindau (VHL) sekä cereblon (CRBN).<sup>1,8</sup>

VHL-ligandien kehitys sai alkunsa hypoksiaindusoitavan tumatekijän HIF1 $\alpha$ :n (engl. hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ ) sekä pVHL-proteiinin (engl. von Hippel-Lindau tumor-suppressor protein) vuorovaikutuksen selvittämisestä.<sup>13</sup> Hypoksiaindusoitava tumatekijä HIF1 $\alpha$  säätelee hypoksisissa eli vähähappisissa olosuhteissa, kuten syöpäkasvaimessa, ilmentyviä genejä sekä edistää syövän etenemistä. Hypoksisissa olosuhteissa pVHL-proteiinia ei ilmenny, jolloin HIF1 $\alpha$  ilmentyä ja toimii hallitsemattomasti.<sup>14</sup> Soluissa, joissa taas hapen osapaine on normaali, HIF1 $\alpha$ :aan muodostuu hydroksylaation seurauksena proliinitähteitä, jolloin muodostuu sitoutumiskohta pVHL-proteiinille.<sup>13</sup> pVHL-proteiini on CRL2<sup>VHL</sup>-E3-ligaasin substraattireseptori, jolloin HIF1 $\alpha$ :n sitoutuminen pVHL-proteiiniin aiheuttaa HIF1 $\alpha$ :n ubikitoitumisen ja siten proteosomaalisen hajotuksen.<sup>1</sup> PROTACien kehityksessä tämä tarkoitti sitä, että HIF1 $\alpha$ :aa voitaisiin käyttää E3-



ligaasiligandina.<sup>1,13</sup> Ensimmäisissä pVHL-proteiinin ja HIF1 $\alpha$ :n vuorovaikutukseen perustuvissa PROTACeissa käytettiinkin seitsemän aminohapon pituisia HIF1 $\alpha$ :aa VHL-E3-ligaasin tunnistajana. Näissä peptidiketju oli huomattavasti lyhyempi kuin fosfopeptideissä, joten ne kyettiin annostelemaan ilman mikroinjektiota ja niitä voitiin käyttää pienempinä pitoisuuksina. Peptideillä on kuitenkin huono pysyvyys solussa, mikä on johtanut pienimolekyylisten VHL-ligandien kehittämiseen. Ensimmäinen pienimolekyylinen VHL-ligandi on VH032 (kuva 2.) ja myöhemmin raportoitiin myös pienimolekyylliset VH101 ja VH298 VHL-ligandit (kuva 2.).<sup>1</sup>

Talidomidia ja sen johdannaisia, kuten pomalidomidia ja lenalidomidia, on käytetty jo pitkään immunologisina lääkeaineina. Myöhemmin on huomattu, että talidomidi sitoutuu CRBN:ään, joka on Cullin-RING-E3-ligaasin substraattireseptori. Viime vuosina tehdyt tutkimukset ovat osoittaneet, että talidomidin ja sen johdannaisten glutaari-imidi -rakenne sitoutuu CRBN:ään aiheuttaen spesifisesti kohdeproteiinien, kuten transkriptiotekijöiden, ubikinoitumisen ja päätyminen proteasomin hajotettavaksi.<sup>1</sup> Talidomidi ja sen johdannaiset soveltuvat hyvin lääkeaineiksi niiden ominaisuuksien takia ja sen vuoksi niitä käytetään laajalti PROTACien suunnittelussa. Talidomidin ja sen johdannaisten rakenteen perusteella on kehitetty uusia E3-ligaasiligandeja, kuten TD-106 (kuva 2.).<sup>1</sup>



**Kuva 2.** VHL- ja CRBN-ligandit. Kuva on piirretty viitteessä 1 esitettyä kuvaa mukailen.

PROTACien hajotustoiminta pystytään kohdistamaan tiettyyn soluun tai kudokseen hyödyntämällä E3-ligaaseja, joita ilmenee rajoitetusti.<sup>9</sup> Esimerkiksi valitsemalla E3-ligaasi, jota ilmenee pääasiassa sairaassa kudoksessa eikä juurikaan normaalissa kudoksessa, saadaan mahdollisesti aikaan tehokkaampi terapeuttinen vaikutus haluttuun kohteeseen.<sup>9,11</sup> Tällaisella

lähestymistavalla voidaan välttää PROTACien aiheuttama hajotustoiminta terveissä kudoksissa.<sup>8</sup> PROTACien yksi kehityskohteista onkin löytää spesifisiä E3-ligaaseja ja niiden ligandeja, joita voitaisiin käyttää tietyissä soluissa tai kudoksissa.<sup>6</sup>

### 2.1.2 Kohdeproteiiniligandi

Kohdeproteiiniligandin on tunnistettava kohdeproteiini sekä värvättävä kohdeproteiini osaksi kolmen komponentin rakennetta.<sup>11</sup> PROTACeissa käytettäviä kohdeproteiiniligandeja suunnitellaan sen perusteella, mikä kohdeproteiini halutaan tunnistaa. Kohdeproteiiniligandeilla voidaan tunnistaa selektiivisesti proteiinien alatyyppejä, proteiinikomplekseja sekä aiemmin lääkekehityksen saavuttamattomissa olleita proteiineja.<sup>1</sup> Sopivan kohdeproteiiniligandin käyttämisellä voidaan vaikuttaa lääkeaineen selektiivisyyteen sekä oraalisen lääkeaineen biologiseen hyötyosuuteen, eli siihen osuuteen, joka lääkeannoksesta päätyy verenkiertoon.<sup>1</sup>

Ensimmäisissä kliinisiin tutkimuksiin edenneissä PROTACeissa kohdeproteiineina ovat perinteiset lääkekohteet, kuten androgeeni- ja estrogeenireseptorit.<sup>9</sup> Tällaisilla kohdeproteiineilla oli jo olemassa lääkekäytössä oleva inhibiittori, jota voitiin käyttää kohdeproteiiniligandina.<sup>15</sup> Perinteisiin lääkekohteisiin kohdistuvien PROTACien menestyminen kliinisissä tutkimuksissa on osoittanut, että PROTACit voisivat olla paras lääkemuoto kyseisten kohdeproteiinien aiheuttamien sairauksien hoitoon, koska ne hajottavat kohdeproteiinin pelkän inhiboimisen sijaan.<sup>15</sup>

Elintarvike ja lääkevirasto FDA (engl. Food and Drug Administration) on hyväksynyt lääkekäyttöön ligandeja noin 400 ihmisessä ilmentyvälle proteiinille. Niistä yli 90 % on rajoittunut entsyymeihin ja reseptoreihin sekä muihin proteiineihin, jotka ovat helppoja kohteita lääkekehitykselle. On kuitenkin arvioitu, että on olemassa yli 3000 geeniä, jotka aiheuttavat sairauksia. Tällöin noin 85 % taudinaiheuttajaproteiinia on lääkekehityksen saavuttamattomissa.<sup>5</sup> PROTACeilla ei ole perinteisten inhibiittorien tapaan vaatimuksia estää proteiinien katalyyttistä aktiivisuutta tai proteiinin vuorovaikutuksia muiden proteiinien kanssa. Tämä mahdollistaa sen, että kohdeproteiiniligandi voi sitoutua mihin tahansa kohtaan kohdeproteiinia ja värvätä kohdeproteiini E3-ligaasin hajotettavaksi. Koska PROTACit kykenevät sitoutumaan mihin tahansa kohtaan kohdeproteiinia, on PROTACeilla mahdollista vaikuttaa myös aiemmin lääkekehityksen saavuttamattomissa oleviin proteiineihin.<sup>5</sup> Esimerkiksi syöpäsoluissa suurissa määrin esiintyvää ja aktiivisesti toimivaa STAT3-proteiinia on pitkään pidetty klassisena lääkekohteena syövänhoitoon, mutta elintarvike ja lääkevirasto FDA ei ole hyväksynyt yhtäkään STAT3-proteiiniin kohdistuvaa lääkeainetta. STAT3-proteiini säätelee geenejä, jotka vaikuttavat syöpäsolujen elossapysymiseen, lisääntymiseen, etäpesäkkeiden syntyyn ja lääkeresistenssiin, minkä vuoksi inhiboimalla STAT3-proteiini aktiivisuutta voitaisiin saada aikaan kasvainten kasvua estävä vaikutus.<sup>1</sup> Lupaavia STAT3-

proteiiniin hajotukseen kohdistuvia PROTACeja on onnistuttu kehittämään. Esimerkiksi SD-91 - PROTACilla pystyttiin selektiivisesti vähentämään STAT3-proteiiniin pitoisuutta syöpäkudoksessa.<sup>1</sup>

### 2.1.3 Linkkeri

PROTACien ominaisuudet ja toiminta kohdeproteiinien pilkkomisessa eivät riipu ainoastaan kohdeproteiiniligandin ja E3-ligaasiligandin valinnasta, vaan myös oikeanlaisen linkkerin valinnalla on merkitystä.<sup>1</sup> Linkkerin pituudella, rakenteella ja kiinnityskohdilla on tärkeä merkitys kolmen komponentin rakenteen muodostumisessa, hajotusaktiivisuudessa ja selektiivisyydessä. Linkkeri vaikuttaa myös molekyylin fysikokemiallisiin ominaisuuksiin sekä oraalisen lääkeaineen biologiseen hyötyosuuteen.<sup>11</sup> Fysikokemialliset ominaisuudet vaikuttavat siihen, miten elimistö käsittelee lääkeaineita eli esimerkiksi oraalisesti annosteltavan lääkkeen imeytymiseen.<sup>16</sup> Koska linkkeri on tärkeässä roolissa PROTACin toiminnassa, on linkkerin suunnittelu ja optimointi yhtenä tärkeänä kehityskohteenä PROTACien kehittämisessä. Optimoinnin kohteena ovat linkkerin pituus, rakenne, jäykkyys sekä ligandien kiinnityskohdat.<sup>1</sup>

Linkkerille ei kuitenkaan ole olemassa yleisesti sovellettavissa olevaa strategiaa, jolla optimaalinen rakenne saataisiin muodostettua. Yleensä lyhyitä ja rakenteeltaan yksinkertaisia alkyyliketjuja tai lineaarista synteettisesti valmistettua polyetyleeniglykoliketjua (PEG) käytetään linkkerin pohjana. Niihin tulee tehdä kuitenkin modifikaatioita, sillä alkyyliketju sekä PEG-ketju ovat kuitenkin alttiita oksidatiiviselle aineenvaihdunnalle, mikä vähentää lääkeaineen pitoisuutta elimistössä ja siten lyhentää lääkeaineen vaikutuksen kestoa.<sup>6</sup> Modifikaatioita tehdään iteratiivisen tutkimuksen sekä puutteiden perusteella, jolloin ketjun rakennetta muokataan tarpeiden mukaiseksi.<sup>1</sup> Linkkereitä, jotka sisältävät sekä alkyyliketjun että PEG-ketjun, käytetään yleisimmin PROTACien suunnittelussa.<sup>1</sup>

## 3 PROTACien selektiivisyys

PROTACien käyttämisessä lääkeaineena on useita turvallisuusriskejä, jotka johtuvat PROTACien selektiivisyydestä. PROTACit voivat aiheuttaa kohdeproteiinien lisäksi myös muiden proteiinien hajoamisen, mikä vaikeuttaa farmakologian ennustettavuutta.<sup>8</sup> Esimerkiksi proteiini, joka ei ole suoraan sitoutunut PROTACiin voi ubikinoitua ja päätyä proteasomin hajotettavaksi osana kolmen komponentin rakennetta. Myös PROTACin kohdeproteiiniligandi voi sitoutua binäärisesti kohdeproteiinin lisäksi myös muihin proteiineihin aiheuttaen näiden ubikinoitumisen ja siten niiden pilkkoutumisen.<sup>8</sup> Lisäksi PROTACit käyttävät solun luonnollista proteolyttistä ubikitini-proteasomijärjestelmää, minkä vuoksi ne kilpailevat E3-ligaasista luonnollisten substraattien kanssa.

Tämä voi johtaa luonnollisten substraattien kertymiseen, mikä häiritsee solun normaalia toimintaa.<sup>8</sup> Nämä selektiivisyyden puutteeseen liittyvät riskit rajoittavat PROTACien käyttöä lääkeaineena.<sup>6</sup> Lääkeaineen selektiivinen vaikutus haluttuun kohdeproteiiniin on keskeistä niiden kehityksessä, jotta kohteen ulkopuoliset rakenteet eivät vaurioituisi.<sup>9</sup> Tämän vuoksi on kehitetty PROTACeja, joilla on parempi solu tai kudosselektiivisyys.<sup>6,9</sup>

PROTACien rakenteen suunnittelulla voidaan vaikuttaa niiden selektiivisyyteen, mutta silti ongelmia tuottaa se, että niiden aktiivisuuden kontrollointi on haastavaa, jolloin myös haitallisten sivuvaikutusten estäminen hankaloituu.<sup>1</sup> Tästä syystä on kehitetty PROTACeja, jotka voidaan aktivoida tietyissä olosuhteissa. Tällöin PROTACien toimintaa pystytään kontrolloimaan siten, että ne toimivat oikeaan aikaan oikeassa paikassa, jolloin välttyttäisiin mahdollisilta haitallisilta sivuvaikutuksilta.<sup>1</sup> Olosuhteiden avulla kontrolloitaviin PROTACeihin potentiaalisia strategioita ovat valon avulla kontrolloitavat PROTACit, hypoksia-aktivoitavat PROTACit sekä folaattikonjugoidut PROTACit.<sup>1</sup>

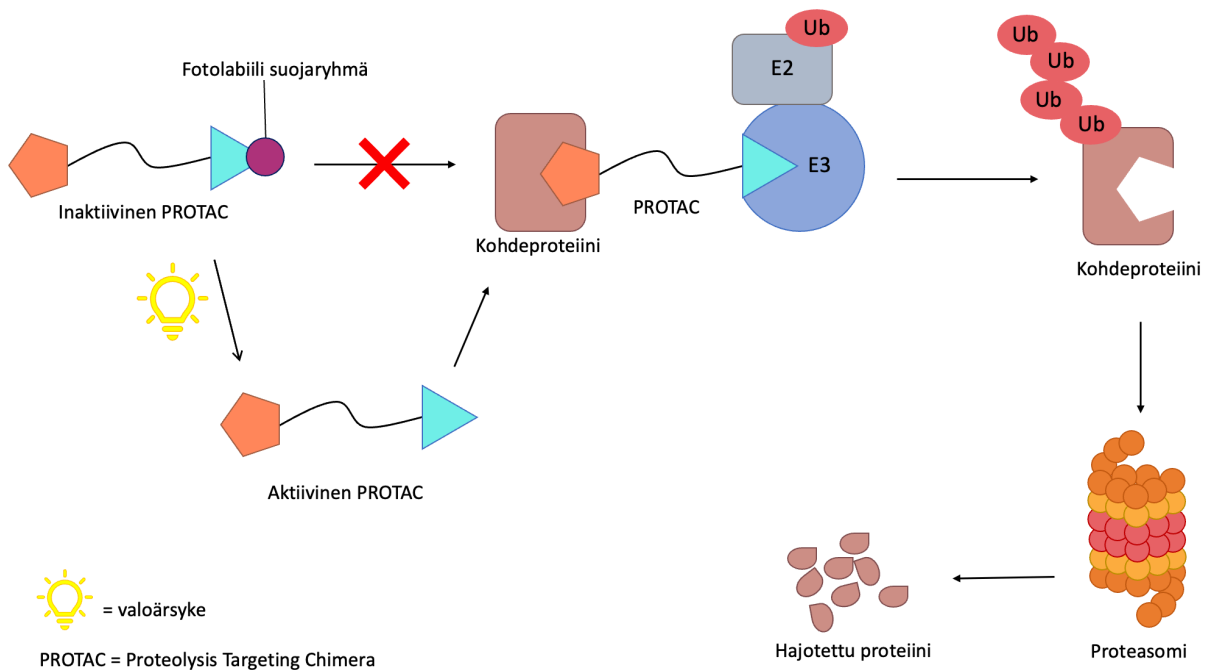
### **3.1 Valon avulla kontrolloitavat PROTACit**

PROTACien aktiivisuutta pystytään kontrolloimaan valon avulla. Valoa on jo aiemmin käytetty menestyksekkäästi biologisten prosessien kontrolloimisessa.<sup>17</sup> PROTACien toiminnan säätely valon avulla perustuu kahteen päästrategiaan: fotolabiilin suojaryhmän liittäminen molekyyliin sekä valon avulla säädeltävän kytkimen liittäminen molekyyliin. Strategiat perustuvat PROTACin inaktiivisen ja aktiivisen muodon ilmenemisen säätelyyn valon avulla.<sup>17</sup>

#### **3.1.1 pc-PROTACit**

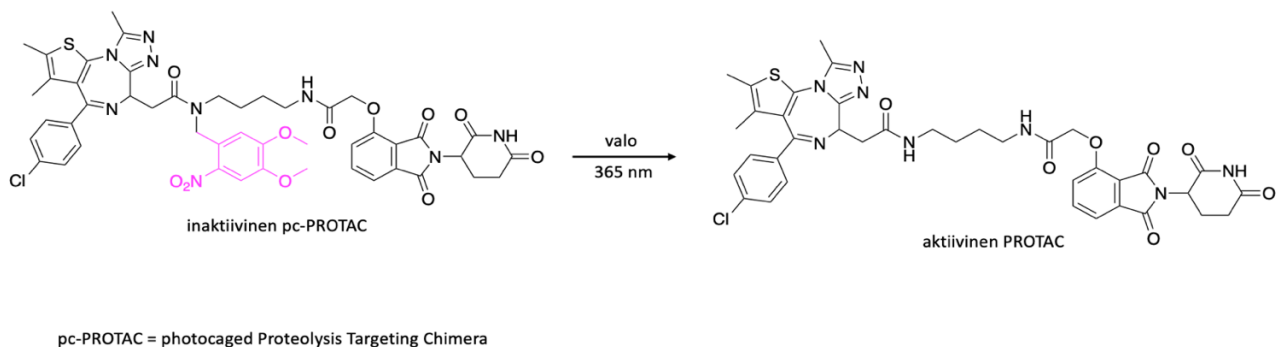
Fotolabiililla suojaryhmällä suojattujen PROTACien, pc-PROTACien (engl. photocaged PROTACs), suunnitteleminen on suhteellisen helppoa, koska aktiivisen PROTACin rakenne tunnetaan yleensä etukäteen ja ligandien kemialliset ominaisuudet ovat yleisesti saatavilla.<sup>17</sup> Tarvitsee siis vain valita sopiva fotolabiili eli valon säteilyn vaikutuksesta irtoava suojaryhmä.<sup>18,19</sup> Fotolabiilin suojaryhmän valinnassa tulee ottaa huomioon, että sen sitoutuminen PROTACiin estää tämän toiminnan. Suojaryhmä voidaan kiinnittää mihin tahansa PROTACin osaan eli E3-ligaasiligandiin, kohdeproteiiniligandiin tai linkkeriin.<sup>17</sup> Kun fotolabiili suojaryhmä on kiinnitettynä E3-ligaasiin, se estää PROTACin sitoutumisen E3-ligaasiin, jolloin kolmen komponentin rakenne ei pääse muodostumaan eli PROTAC on inaktiivisessa muodossa. Kun PROTAC altistetaan

valoärsykkeelle, fotolabiili suojarahmä irtoaa ja PROTAC aktivoituu.<sup>18</sup> Fotolabiililla suojarahmällä suojatun PROTACin toiminta on esitetty kaaviossa 2.



**Kaavio 2.** Fotolabiililla suojarahmällä suojatun PROTACin toimintamekanismi. Kaavio on piirretty viitteessä 6 esitettyä kaaviota mukaillen.

Useissa solututkimuksissa on käytetty fotolabiilina suojarahmänä 4,5-dimetoksi-2-nitrobentsyyli-ryhmää, joka pystytään irrottamaan valonsäteilyn aallonpituudella 365 nm.<sup>19</sup> 4,5-dimetoksi-2-nitrobentsyyli-ryhmän irtoaminen PROTACista valonsäteilyn vaikutuksesta on esitetty kaaviossa 3.



**Kaavio 3.** Fotolabiililla 4,5-dimetoksi-2-nitrobentsyyli-suojaryhmällä suojatun PROTACin aktivoituminen. Kaavio on piirretty viitteessä 19 esitettyä kaaviota mukaillen.

Fotolabiilin suojaryhmän liittäminen PROTACiin ei tee molekyylistä täysin inaktiivista. Vaikutus PROTACin aktiivisuuteen riippuu siitä, mihin kohtaan PROTACin rakennetta suojaryhmä liitetään. Fotolabiilin suojaryhmän liittäminen E3-ligaasiligandiin tekee PROTACista inaktiivisen proteiinien pilkkomisen suhteen, mutta se kuitenkin säilyttää kohdeproteiinia inhiboivan aktiivisuuden eli kohdeproteiini kykenee sitoutumaan kohdeproteiiniligandiin.<sup>17</sup> Suojaryhmän liittäminen kohdeproteiiniligandiin ehkäisee sekä kohdeproteiinin pilkkomisen että kohdeproteiinia inhiboivan vaikutuksen. PROTACit, joissa suojaryhmä on liitettynä kohdeproteiiniligandiin, kykenevät kuitenkin toimimaan molekyyliin tavoin värväämällä neo-substraatteja eli muita kuin kohdeproteiineja E3-ligaasille. On myös mahdollista, että ulkopuoliset proteiinit sitoutuvat suojaryhmällä varustettuun kohdeproteiiniligandiin, jolloin ne saattavat tahattomasti joutua hajotetuiksi.<sup>17</sup> Suojaryhmä voidaan myös liittää ligandien välillä sijaitsevaan linkkeriin. Tällä tavoin suojatulla PROTACilla voi silti olla inhiboivaa aktiivisuutta molemmissa päissä sekä se voi värvätä sellaisia proteiineja pilkkottavaksi, joita ei pitäisi pilkkoa.<sup>17</sup>

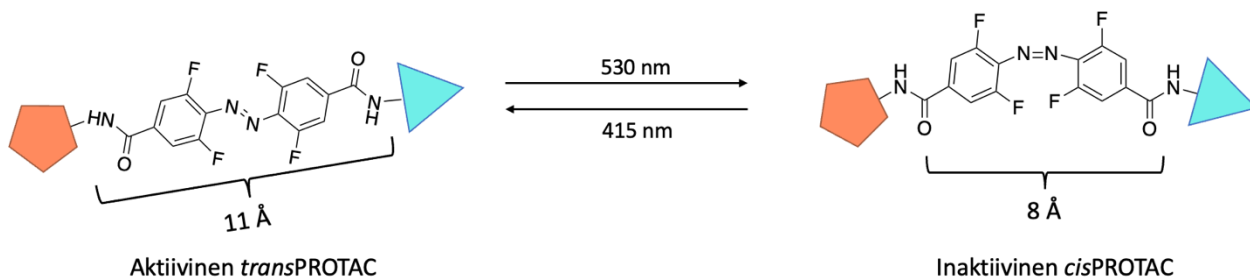
Fotolabiililla suojaryhmällä suojatut PROTACit eivät ole täysin optimaalisesti toimivia selektiivisyyden kannalta, sillä myös inaktiivisella muodolla on joko inhiboiva aktiivisuus tai mahdollisuus saattaa muita proteiineja hajotettavaksi. Ongelmien ratkaisemiseksi voitaisiin ajatella useamman suojaryhmän käyttämistä, mutta se aiheuttaisi molekyylin koon kasvamisen. Suurempi koko hankaloittaisi PROTACin kulkeutumista soluihin.<sup>17</sup> Myös aktiivisen PROTACin tehokas ja puhdas fotokemiallinen vapautuminen on merkittävä tekijä suojaryhmällä suojattujen PROTACien toiminnassa. Epätäydellisen suojauksen poistamisen tai fotokemiallisten sivutuotteiden seurauksena jäljelle jäänyt yhdiste voisi kilpailla PROTACin kanssa E3-ligaasin tai kohdeproteiinin sitoutumisesta.<sup>17</sup> Fotolabiililla suojaryhmällä suojattujen PROTACien käytössä on myös turvallisuusriskinsä sen vuoksi, että ne vapauttavat aktiivisia PROTACEja peruuttamattomasti UV-valon säteilyn vaikutuksesta.<sup>6</sup> Tähän valon avulla päälle kytkettävät PROTACit toisivat toisenlaisen lähestymistavan, sillä ne voidaan myös tarpeen tullen muuttaa takaisin inaktiiviseen muotoon.<sup>6,17</sup>

### 3.1.2 Valon avulla päälle kytkettävät PROTACit

PROTACien aktiivisuutta voidaan säädellä valon avulla säädeltävän kytkimen avulla. Suurimassa osassa tapauksista valokytkimellä varustettu PROTAC on inaktiivisessa muodossa pimeässä ja valolle altistaminen saa aikaan PROTACin aktivoitumisen.<sup>17</sup> Valokytkin voi olla kiinnitettynä E3-ligaasiligandiin, linkkeriin tai kohdeproteiinia sitovaan ligandiin. Toisin kuin fotolabiili suojaryhmä, valokytkin ei poistu rakenteesta valolle altistamisen jälkeen. Valokytkin on upotettuna PROTACin rakenteeseen, mikä tekee valokytkimellä varustetun PROTACin suunnittelusta haastavampaa kuin fotolabiililla suojaryhmällä suojattujen PROTACien. Kytkimen avulla kuitenkin saadaan lisättyä

aktiivisuuden hallintaa eikä myrkyllisiä sivutuotteita muodostumaan valokytkimen ollessa pysyvä osa PROTACin rakennetta.<sup>17</sup>

Valokytkimen liittäminen E3-ligaasiligandiin on kaikkein yleisintä.<sup>17</sup> Jos valokytkin halutaan upottaa linkkeriin, täytyy ottaa huomioon linkkerin pituus. PROTACin ligandien tulee olla tietyn minimietäisyyden päässä toisistaan, jotta ne kykenevät sitoman kohdeproteiinia sekä E3-ligaasia samanaikaisesti.<sup>20,21</sup> Valon avulla päälle kytkettävä PROTAC on onnistuttu valmistamaan käyttämällä linkkerinä *ortho*-F<sub>4</sub>-atsobentseeniä (engl. *o*-F<sub>4</sub>-azobenzene). PROTACin pohjana käytettiin Arvinaksen ARV-771-PROTACia, jonka ligandien välinen etäisyys on 11 Å.<sup>21</sup> ARV-771:n linkkeri korvattiin *ortho* tetrafluori atsobentseenillä, jolloin muodostui *cis*- ja *trans*-isomeerit. Aktiivisen *trans*PROTACin ligandien välinen etäisyys oli 11 Å, mikä on optimaalinen pituus ARV-771-PROTACin toiminnalle. Inaktiivisen *cis*PROTACin ligandien välinen etäisyys taas oli 8 Å.<sup>20</sup> Kriittisen eron linkkerin pituudessa aktiivisen ja inaktiivisen muodon välillä onkin osoitettu olevan noin 3 Å useissa tutkimuksissa.<sup>20</sup> Kun inaktiivinen *cis*PROTAC altistetaan säteilylle, jonka aallonpituus on 415 nm, muodostuu aktiivinen *trans*PROTAC (kuva 3.). Kun taas aktiivinen *trans*PROTAC altistetaan säteilylle, jonka aallonpituus on 530 nm, PROTAC palaa takaisin inaktiiviseen *cis*-muotoonsa (kuva 3.).<sup>20</sup>



**Kuva 3.** PROTACin, jossa valokytkin on upotettuna linkkeriin, *cis*- ja *trans*-isomeeri rakenteet sekä säteilyn vaikutus *cis*-ja *trans*-isomeerien muodostumiseen. Kuva on piirretty viitteessä 20 esitettyä kuvaa mukaillen.

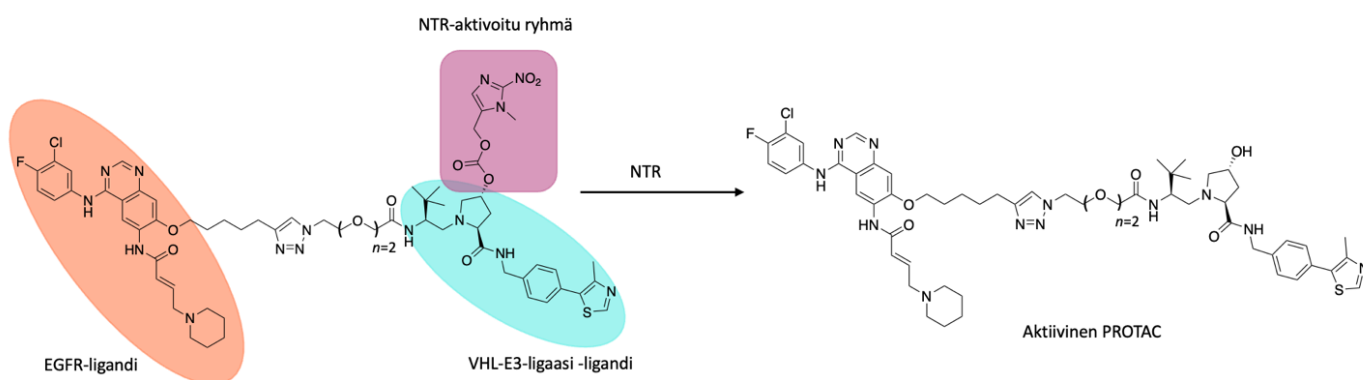
### 3.2 Hypoksia-aktivoidut PROTACit

Hypoksiaa esiintyy useissa pahalaatuisissa syöpäkasvaimissa ja sitä voidaan hyödyntää kudosspesifisten PROTACien kehittämisessä.<sup>22,23</sup> Hypoksia on vähähappinen tila, joka on seurausta kasvaimen alhaisesta hapensaannista.<sup>23</sup> Kasvaimen mikroympäristössä hypoksia aiheuttaa lukuisten

syövän kasvua edistävien proteiinien, kuten epidermaalisen kasvutekijän reseptorin, EGFR:n (engl. epidermal growth factor receptor)<sup>6</sup>, tuotannon.<sup>24</sup>

Hypoksia-aktivoitunut PROTACit muodostetaan samankaltaisella periaatteella kuin valohäkkiin sidotut PROTACit, eli hypoksia-aktivoitu lähtevä ryhmä, HALG (engl. hypoxia-activated leaving group), liitetään kohdeproteiini- tai E3-ligaasiligandiin. Hypoksialle altistuessaan HALG irtoaa, jolloin PROTAC-molekyyli aktivoituu.<sup>6</sup>

Hypoksiasta seuraa myös nitroreduktaasin (NTR) ylituotanto. Nitroreduktaasin määrä normaaleissa kudoksissa ja soluissa on todella alhainen tai sitä ei esiinny lainkaan, minkä vuoksi NTR-aktivoitunut PROTACit pystyttäisiin kohdistamaan syöpäsoluihin ja -kudoksiin.<sup>22</sup> Ensimmäinen NTR-aktivoitu PROTAC on esitetty kaaviossa 4. Siinä NTR-aktivoitu lähtevä ryhmä on liitetty VHL-E3-ligaasi-ligandiin. NTR:lle altistuessaan lähtevä ryhmä irtoaa, jolloin aktiivinen PROTAC-molekyyli vapautuu ja alkaa tehokkaasti hajottamaan EGFR-proteiinia (kaaviossa 4).<sup>22</sup>



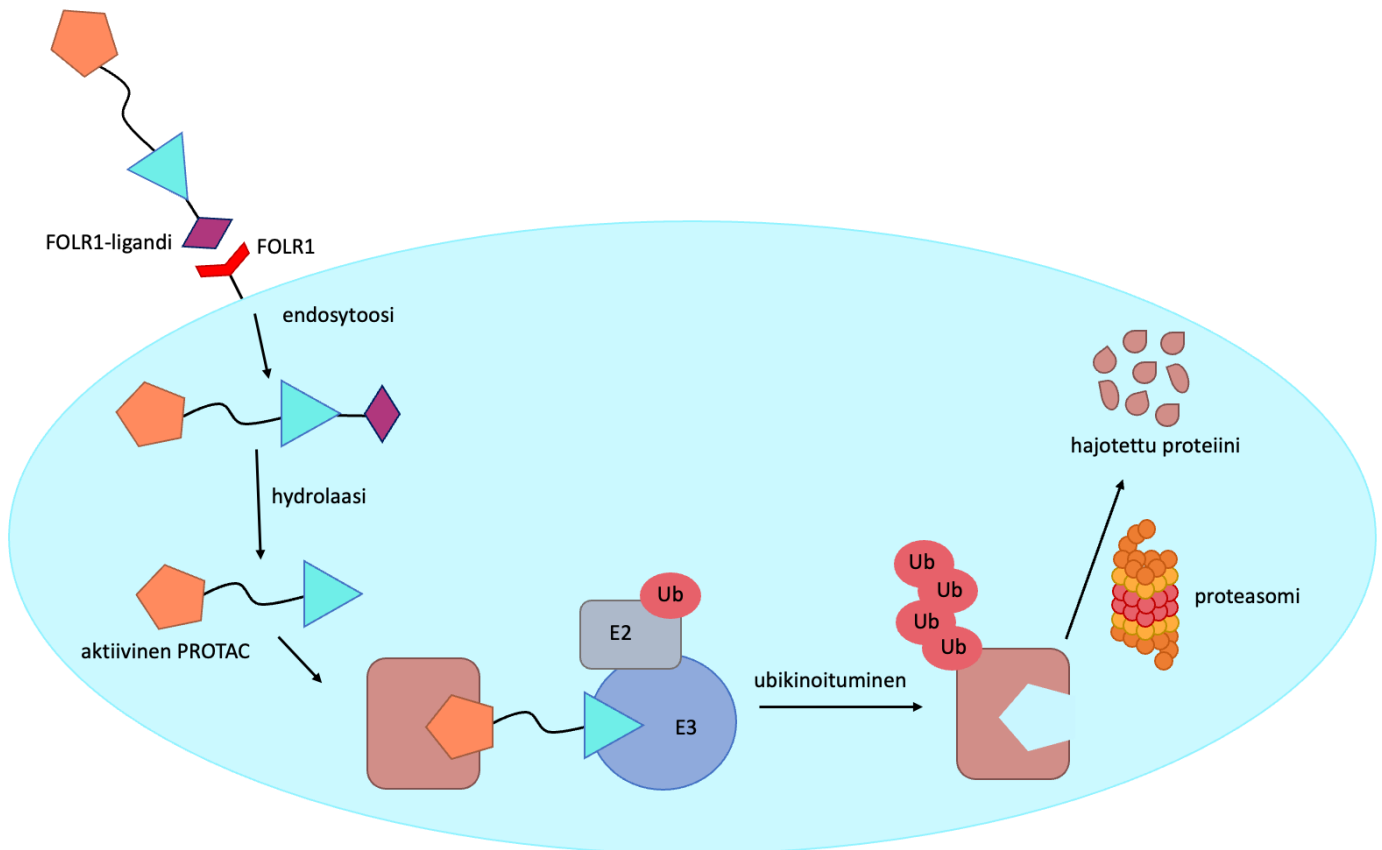
**Kaavio 4.** NTR-aktivoituneen EGFR-proteiinia hajottavan PROTACin rakenne ja sen aktivoituminen NTR:lle altistumisen seurauksena. Kaavio on piirretty viitteessä 22 esitettyä kaaviota mukailleen.

### 3.3 Folaattikonjugoidut PROTACit

Yksi yleisimmistä lääkeaineen kuljetustrategioista perustuu siihen, että lääkeaine konjugoidaan folaattiin eli ligandiin, joka elimistössä sitoutuu folaattireseptoreihin.<sup>1,6</sup> Folaattireseptori-1:a (FOLR1) ilmentyy erityisesti syöpäkudoksissa, mutta vain vähän terveessä kudoksessa.<sup>1,6</sup> Ilmentymiserojen vuoksi folaattikonjugointia, esimerkiksi FOLR1-ligandilla, voidaan käyttää PROTACien kohdennettuun kuljetukseen syöpäsoluihin.<sup>6</sup>

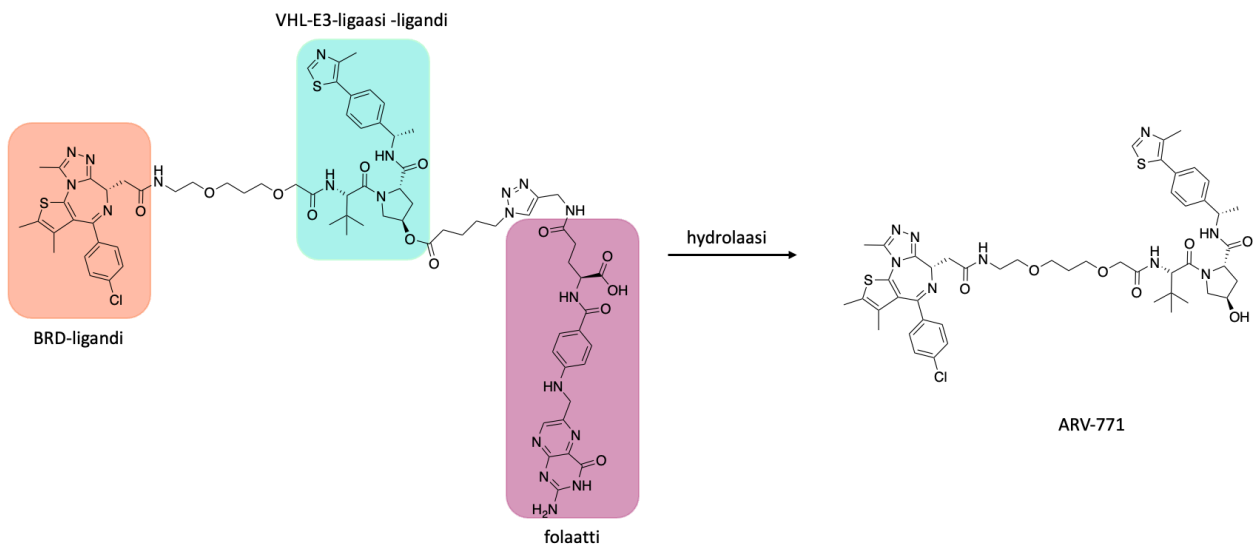


Folaattikonjugoidut PROTACit muodostetaan kiinnittämällä FOLR1-ligandi E3-ligaasiligandiin sellaisella linkkerillä, joka lohkeaa helposti. Folaattikonjugoitu PROTAC kuljetetaan soluun FOLR1 reseptorin avulla (kuvassa 8). Solun sisällä FOLR1-ligandi irtoaa PROTACin rakenteesta endogeenisen hydrolaasin katalysoimana aktiivinen PROTAC vapautuu ja kykenee hajottamaan kohdeproteiinia.<sup>6</sup> Folaattikonjugoidun PROTACin toiminta on esitetty kaaviossa 5.



**Kaavio 5.** Folaattikonjugoidun PROTACin toimintaperiaate. Kaavio on piirretty viitteessä 6 esitettyä kaaviota mukaillen.

Kuten aiemmin on esitetty, aktiivisissa PROTACeissa on kolme toiminnallista osaa: kohdeproteiiniligandi, E3-ligaasiligandi sekä linkkeri. Konjugoitujen PROTACien suunnittelussa on tärkeää ottaa huomioon, että kaikki kolme toiminnallista osaa pystyvät konjugoinnin jälkeen toimimaan normaalisti.<sup>25</sup> Esimerkiksi VHL-ligandin hydroksyyliiryhmä on edellytys VHL-E3-ligaasin värväämiselle, minkä vuoksi folaattikonjugoidussa ARV-771 PROTACissa folaatti on liitetty VHL-ligandin hydroksyyliiryhmään esterisidoksella, joka saadaan hajotettua hydrolaasi entsyymien toiminnan seurauksena.<sup>25</sup> Folaattikonjugoidun ARV-771:n rakenne sekä ARV-771:n aktivoituminen endogeenisen hydrolaasin seurauksena on esitetty kaaviossa 6.



**Kaavio 6.** Folaattikonjugoidun ARV-77 -PROTACin rakenne sekä aktivoituminen hydrolaasi entsyymien toiminnan seurauksena. Kaavio on piirretty viitteessä 25 esitettyä kaaviota mukaillen.

#### 4 PROTACien saaminen lääkekäyttöön

Vaikka PROTACeilla on monia lupaavia ominaisuuksia, niiden lääkeainekäyttöön sisältyy myös haasteita. PROTACien annostelu oraalisesti on haastavaa erityisesti niiden suuren koon vuoksi. Verenkiertoon päätyessään PROTACit kuitenkin toimivat perinteisten pienimolekyylisten lääkeaineiden tavoin: PROTACien altistusannos kohteessa on verrannollinen annostukseen, PROTACin levinneisyys kudoksessa on hyvä sekä PROTACin kertyminen verenkierrosta maksaan on alhainen.<sup>26</sup> Tällöin suoraan verenkiertoon injektoitavien strategioiden käyttäminen PROTACien annostelussa olisi potentiaalinen vaihtoehto. Tällaisia strategioita ovat: suonensisäinen injektio, subkutaaninen injektio sekä intraperitoneaalinen injektio eli injektioiminen vatsaonteloon. Useat eri julkaisut ovatkin osoittaneet PROTACien hajottavan vakaasti kohdeproteiinia prekliinisissä tutkimuksissa. Esimerkiksi subkutaanisesti eli ihonalaisesti injektioimalla Brd4-proteiinia hajottava PROTAC kykenee pilkkomaan Brd4-proteiinia syöpäkudoksessa jopa > 90 % tehokkuudella.<sup>26</sup> Prekliiniset tutkimukset ovat osoittaneet, että PROTACien katalyyttisen luonteen takia riittävä tehokkuus proteiinien pilkkomiseen voidaan saavuttaa PROTACien alhaisella, noin 100–200 nM, konsentraatiolla plasmassa. Jos riittävä PROTACin tehokkuus, kuten syöpäsolun täydellinen tuhoaminen, voidaan saavuttaa jaksottaisella annostuksella, tällöin suonensisäinen annostelu voisi olla helpoin tapa saada PROTACit lääkekäyttöön.<sup>26</sup>

Oraalinen annostelu on kuitenkin suositeltavin pienimolekyylisten lääkkeiden kuljetusreitti.<sup>6,26</sup> PROTACien lääkekäytön yhtenä merkittävänä haasteena onkin oraalisesti biosaatavien PROTACien kehittäminen.<sup>10</sup> Ideaalisen lääkeaineen fysikokemialliset ominaisuudet noudattavat Lipinskin viiden sääntöä (Ro5), sillä viiden säännön toteuttavan lääkeaineen biologinen aktiivisuus oraalisesti annosteltuna pystytään ennustamaan. Viiden säännön mukaan lääkeaineen tulisi täyttää seuraavat ehdot: molekyyli­massan tulisi olla alle 500 Da, hydrofobisuutta kuvaavan log P:n arvon tulisi olla alle 5, polaarisen pinta-alan tulisi olla alle 140 Å tai tasan 140 Å ja rakenteessa saa olla enintään 10 kiertyvää sidosta, enintään viisi vetysidoksen donoria ja enintään 10 vetysidoksen akseptoria.<sup>10,27</sup> PROTACien fysikokemialliset ominaisuudet eivät toteuta miltään osin viiden sääntöä. Heikot fysikokemialliset ominaisuudet aiheuttavat lääkeaineen huonon imeytyvyyden sekä epäedulliset farmakokineettiset ominaisuudet *in vivo*, mitkä vaikuttavat negatiivisesti lääkkeen oraaliseen biologiseen hyötyosuuteen.<sup>10</sup> PROTACien imeytyvyyttä on kuitenkin mahdollista parantaa lisäämällä läpäisevyyden voimistajia ja ulosvirtauksen inhibiittoreita lääkevalmisteeseen.<sup>6</sup> Oraalisesti annosteltavien ja riittävän biologisen hyötyosuuden omaavien PROTACien kehityksen kannalta tärkeimpiä kehityskohteita ovat moolimassan ja vetysidosdonorien määrään laskeminen sekä linkkerin joustavuuden optimointi, jolla voidaan säädellä ligandien etäisyyttä sopivaksi.<sup>10</sup> Myös kohdeproteiini- sekä E3-ligaasiligandien optimoinnilla voidaan vaikuttaa otollisten farmakokineettisten ominaisuuksien saavuttamiseksi *in vivo*.<sup>10</sup>

Vaikka PROTACien oraalinen biosaatavuus tuottaa haasteita, muutamia oraalisesti annosteltavia PROTACeja on raportoitu. Arvinaksen ARV-110 on ensimmäinen oraalisesti annosteltava PROTAC, joka on edennyt kliinisissä tutkimuksissa. Alkuperäisen ARV-110:an rakennetta on optimoitu, jotta saavutettaisiin riittävä biologinen hyötyosuus oraalisesti annosteltuna. Alkuperäisessä rakenteessa E3-ligaasiligandina oli VH-032-ligandi (kuva 2.). Kyseinen PROTAC kykeni hajottamaan androgeenireseptoria 95 % tehokkuudella testatuissa solulinjoissa. PROTAC ei kuitenkaan imeytynyt verenkiertoon eikä siten päässyt kulkeutumaan haluttuun kohteeseen. Optimoidussa PROTACissa E3-ligaasiligandiksi vaihdettiin talidomidi sekä kohdeproteiiniligandia muokattiin, jolloin saavutettiin lupaava biologinen hyötyosuus. Lisäksi optimoidun rakenteen linkkeriä muokattiin sekä ligandeihin tehtiin muutamia pieniä muutoksia, jolloin saavutettiin rakenne, jonka androgeenireseptorin hajotustehokkuus oli yli 90 % ja biologinen hyötyosuus hiirillä 37,89 %. Tällä hetkellä ARV-110:aa tutkitaan eturauhassyövän hoitomenetelmänä Faasi-II vaiheessa kliinisissä tutkimuksissa.<sup>10</sup>

PROTACien annostelureitteihin liittyvien haasteiden lisäksi on vaikeaa ennustaa kuinka suuria määriä PROTACia tulisi annostella. Liian suuri PROTACin konsentraatio saattaa johtaa kahden dimeerin muodostumiseen kolmen komponentin rakenteen muodostumisen sijaan, mikä estää

PROTACia toimimasta kunnolla. <sup>6</sup> PROTACien toiminnan havainnointi *in vivo* ja *in vitro* on kuitenkin osoittanut, että kolmen komponentin rakenteen muodostaminen saattaa olla molekyyllille suotuisampi vaihtoehto kuin kahden dimeerin muodostaminen, mikä on vähentänyt huolta aiheesta.<sup>26</sup>

## 5 Johtopäätökset ja yhteenveto

Proteiinien kohdennettu pilkkominen lääkekehityksessä PROTAC-tekniikan avulla tarjoaa potentiaalisen hoitomuodon patogeenisten proteiinien aiheuttamien sairauksien hoitoon. Erityisesti se, että PROTACien avulla voitaisiin kohdentaa hajotustoiminta sellaisiin proteiineihin, jotka ovat aiemmin olleet lääkekehityksen saavuttamattomissa, tekee PROTACeista kiinnostavan kohteen lääkekehityksessä.

Useita PROTACeja on edennyt kliinisiin tutkimuksiin ja niillä on saavutettu lupaavia tuloksia. On kuitenkin vielä useita haasteita ratkottavana, jotta PROTACeja voitaisiin käyttää lääkkeenä. Selektiivisyys on yksi suurimmista huolenaiheista PROTACien käyttämisessä. Siitä syystä PROTACien rakenteen suunnitteleminen vaatii kehitystyötä, sillä olisi tärkeää löytää uusia spesifisiä E3-ligaasi- ja kohdeproteiiniligandeja sekä optimoida linkkerin rakennetta, jotta saavutettaisiin riittävä selektiivisyys. Myös PROTACien heikot fysikokemialliset ominaisuudet tuottavat haasteita, joista merkittävämpänä haasteena on se, että PROTACit ovat suurikokoisia, minkä vuoksi niiden annostelu oraalisesti on hankalaa.

PROTACien selektiivisyyttä on onnistuttu parantamaan ligandivalinnoilla sekä linkkerin optimoinnilla. Myös olosuhteiden avulla kontrolloitavia PROTACeja on onnistuttu valmistamaan, jolloin niiden selektiivisyyttä on saatu parannettua. PROTACien fysikokemiallisia ominaisuuksia on pystytty parantamaan ja siten onnistuttu valmistamaan oraalisesti annosteltava PROTAC, jolla on myös riittävän hyvä biologinen hyötyosuus. PROTAC-tekniikka on siis kehittynyt huomasti viimeisen vuosikymmenen aikana ja PROTACien saaminen lääkekäyttöön on merkittävä kehityskohde lääkekehityksessä.

## Viiteluettelo

- 1 C. Cao, M. He, L. Wang, Y. He and Y. Rao, *Chem. Soc. Rev.*, **2022**, 51, 7066–7114.
- 2 M. Pettersson and C. M. Crews, *Drug. Discov. Today. Technol.*, **2019**, 31, 15–27.
- 3 M. J. Henley and A. N. Koehler, *Nat. Rev. Drug. Discov.*, **2021**, 20, 669–688.
- 4 J. Song, M. Hu, J. Zhou, S. Xie, T. Li and Y. Li, *Eur. J. Med. Chem.*, **2023**, 261, 223–5234.
- 5 S. L. Paiva and C. M. Crews, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2019**, 50, 111–119.
- 6 N. I. Sincere, K. Anand, S. Ashique, J. Yang and C. You, *Molecules*, **2023**, 28, 4014.
- 7 T. K. Neklesa, J. D. Winkler and C. M. Crews, *Pharmacol. Ther.*, **2017**, 174, 138–144.
- 8 K. Moreau, M. Coen, A. X. Zhang, F. Pachl, M. P. Castaldi, G. Dahl, H. Boyd, C. Scott and P. Newham, *Br. J. Pharmacol.*, **2020**, 177, 1709–1718.
- 9 R. G. Guenette, S. W. Yang, J. Min, B. Pei and P. R. Potts, *Chem. Soc. Rev.*, **2022**, 51, 5740–5756.
- 10 S. Zeng, Y. Ye, H. Xia, J. Min, J. Xu, Z. Wang, Y. Pan, X. Zhou and W. Huang, *Eur. J. Med. Chem.*, **2023**, 261, 115793.
- 11 L. Qin, H. Dai and J. Wang, *Front. Chem.*, **2022**, 10, 2296–2646.
- 12 H. Pei, Y. Peng, Q. Zhao and Y. Chen, *RSC Adv.*, **2019**, 9, 16967–16976.
- 13 T. Ishida and A. Ciulli, *SLAS Discovery*, **2021**, 26, 484–502.
- 14 K. Iwai, K. Yamanaka, T. Kamura, N. Minato, R. C. Conaway, J. W. Conaway, R. D. Klausner and A. Pause, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **1999**, 96, 12436–12441.
- 15 M. Békés, D. R. Langley and C. M. Crews, *Nat. Rev. Drug. Discov.*, **2022**, 21, 181–200.
- 16 J. F. Blake, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2000**, 11, 104–107.
- 17 M. Reynders and D. Trauner, *Cell. Chem. Biol.*, **2021**, 28, 969–986.
- 18 C. S. Kounde, M. M. Shchepinova, C. N. Saunders, M. Muelbaier, M. D. Rackham, J. D. Harling and E. W. Tate, *Chemical Communications*, **2020**, 56, 5532–5535.
- 19 G. Xue, K. Wang, D. Zhou, H. Zhong and Z. Pan, *J. Am. Chem. Soc.*, **2019**, 141, 18370–18374.
- 20 P. Pfaff, K. T. G. Samarasinghe, C. M. Crews and E. M. Carreira, *ACS Cent. Sci.*, **2019**, 5, 1682–1690.
- 21 A. P. Crew, K. Raina, H. Dong, Y. Qian, J. Wang, D. Vigil, Y. V. Serebrenik, B. D. Hamman, A. Morgan, C. Ferraro, K. Siu, T. K. Neklesa, J. D. Winkler, K. G. Coleman and C. M. Crews, *J. Med. Chem.*, **2018**, 61, 583–598.
- 22 S. Shi, Y. Du, Y. Zou, J. Niu, Z. Cai, X. Wang, F. Qiu, Y. Ding, G. Yang, Y. Wu, Y. Xu and Q. Zhu, *J. Med. Chem.*, **2022**, 65, 5057–5071.
- 23 Y. Li, L. Zhao and X. F. Li, *Front. Oncol.*, **2021**, 11, 2234–943X.
- 24 F. W. Hunter, B. G. Wouters and W. R. Wilson, *Br. J. Cancer.*, **2016**, 114, 1071–1077.
- 25 J. Liu, H. Chen, Y. Liu, Y. Shen, F. Meng, H. Ü. Kaniskan, J. Jin and W. Wei, *J. Am. Chem. Soc.*, **2021**, 143, 7380–7387.
- 26 T. K. Neklesa, J. D. Winkler and C. M. Crews, *Pharmacol. Ther.*, **2017**, 174, 138–144.

