



**TURUN
YLIOPISTO**

Matemaattis-luonnontieteellinen
tiedekunta

***In vitro* -yhteensopivat menetelmät molekyylihakojien seulontaan**

Sara Lahti

Detektioteknologian tutkimusryhmä

LuK-tutkielma

Laajuus: 6 op

25.5.2024

Turku

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu
Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

LuK-tutkielma

Pääaine: Kemia

Tekijä: Sara Lahti

Otsikko: *In vitro* -yhteensopivat menetelmät molekyylilihajottajien seulontaan

Ohjaaja: Kari Kopra

Sivumäärä: 25 sivua

Päivämäärä: 25.5.2024

Tällä hetkellä perinteisessä lääkekehityksessä on keskitytty sellaisten yhdisteiden kehittämiseen, jotka muokkaavat proteiinien toimintaa. Kuitenkaan kaikissa sairauksissa pelkän proteiinin toiminnan muokkaaminen ei riitä vaan koko proteiini on hajotettava. Tällöin esiin nousee kohdennettu proteiininen hajottaminen (engl. targeted protein degradation, TPD).

TPD on kehittymässä uudeksi lähestymistavaksi syöpäsairauksien, tulehdus- ja immuunisairauksien sekä infektioiden hoitoon. Viimeaikaiset edistysaskeleet ovat johtaneet sellaisten molekyylien kehittämiseen, joiden avulla solun oma hajotuskoneisto hajottaa proteiinin kokonaan sen toiminnan estämisen sijaan. Nämä molekyylit ovat parhaillaan ihmiskokeissa, ja osalla niistä on jo lupaavia kliinisiä tuloksia. TPD:ssä tutkittavat proteiinit hajotetaan ubikinaation ja proteasomivälitteisen hajoamisen avulla. Tämän lähestymistavan keskiössä on kolmiosainen kompleksi, joka muodostuu E3-ubikitiiniligaasista, kohdeproteiinista sekä hajottajamolekyylistä. Hajottajamolekyylit voivat olla joko yhden- tai kahdenarvoisia, riippuen molekyylin sisältämien eroteltavissa olevien kohdistusosien määrästä. Tällä hetkellä eniten käytetyt molekyylilihajottajaluokat TPD:ssä ovat yhdenarvoiset molekyyliliimahajottajat sekä kahdenarvoiset PROTACit. Yhdenarvoiset hajottajat ovat linkkerittömiä molekyylejä. Kahdenarvoiset hajottajat koostuvat linkkeristä sekä E3-ubikitiiniligaasin ja kohdeproteiinin ligandeista.

TPD:ssä muodostuvan kolmiosaisen kompleksin karakterisoimiseksi on kehitetty erilaisia kokeellisia tekniikoita ja määrittämiä. Yleisimmin käytetyt määrittäykset voidaan jakaa karkeasti kolmeen luokkaan: kohteen sitoutumiseen liittyviin määrittäyksiin, kolmiosaisen kompleksin muodostumiseen liittyviin määrittäyksiin sekä funktionaalisiin solututkimusmäärittäyksiin. Kohteen sitoutumista koskevilla määrittäyksillä mitataan molekyylilihajottajan kykyä sitoutua kohdeproteiiniin tai E3-ubikitiiniligaasiin. Näitä menetelmiä ovat esimerkiksi isoterminen titrauskalorimetria ja pintaplasmoniresonanssi. Kolmiosaisen kompleksin muodostumiseen kohdistuvia menetelmiä ovat aikaerotteinen Försterin resonanssienergiansiirto ja ALPHA-menetelmät. Määrittämiä käytetään hajottajien karakterisointiin, niiden spesifisyyden arviointiin sekä mahdollisten terapeuttisten hyötyjen määrittämiseen.

Avainsanat: kohdennettu proteiinien hajottaminen, molekyylilihajottajat, molekyyliliimahajottaja, PROTAC, molekyylilihajottajien seulonta

1	JOHDANTO	5
2	MOLEKYYYLIHAJOTTAJAT	6
2.1	Kahdenarvoiset molekyylihakottajat	7
2.2	Yhdenarvoiset molekyylihakottajat	9
2.3	Molekyylihakottajien erityispiirteet	11
2.4	Molekyylihakottajien ja inhibiittoreiden erot	12
3	MENETELMÄT MOLEKYYYLIHAJOTTAJIEN SEULONTAAN	13
3.1	<i>In cellulo</i> -menetelmät	13
3.2	<i>In vitro</i> -menetelmät	14
3.2.1	Läheisyyteen perustuvat menetelmät	14
3.2.2	Isoterminen titrauskalorimetria	16
3.2.3	Pintaplasmoniresonanssi ja biokerrosinterferometria	17
3.2.4	Muut menetelmät	19
4	MOLEKYYYLIHAJOTTAJIEN JA SEULONTAMENETELMIEN TULEVAISUUS	20
5	YHTEENVETO JA JOHTOPÄÄTÖKSET	21
	VIITTEET	23

Lyhenteet

BLI	Biokerrosinterferometria (engl. bio-layer interferometry)
FP	Fluoresenssipolarisaatio (engl. fluorescence polarization)
ITC	Isoterminen titrauskalorimetria (engl. isothermal titration calorimetry)
MS	Massaspektrometria (engl. mass spectrometry)
NMR	Ydinmagneettinen resonanssi (engl. nuclear magnetic resonance)
PPI	Proteiiniproteiini-interaktio (engl. protein-protein interaction)
PROTAC	Proteolyysiin kohdistuvat kimeerit (engl. proteolysis targeting chimeras)
SPR	Pintaplasmoniresonanssi (engl. surface plasmon resonance)
TPD	Proteiinin kohdennettu hajottaminen (engl. targeted protein degradation)
TR-FRET	Aikaerotteinen Försterin resonanssienergiansiirto (engl. time-resolved Förster resonance energy transfer)
UPS	Ubikitiini-proteosomijärjestelmä (engl. ubiquitin-proteasome system)

1 Johdanto

Kohdistettu proteiininen hajottaminen (engl. targeted protein degradation, TPD) on viime vuosikymmenien aikana noussut esiin merkittävänä uutena lääkemuotona, jonka avulla solunsisäisiä proteiineja voidaan hajottaa pienillä molekyyileillä. TPD:n avulla voidaan hoitaa aiemmin lääkkeettömiä kohteita, kuten kasvaimia ja autoimmuunisairauksia, joissa pelkkä proteiinin toiminnan muokkaaminen ei riitä.¹

TPD:stä on tullut merkittävä lähestymistapa proteiinien hajottamiseksi solun normaaliin toimintaan kuuluvan ubikinaation ja proteasomivälitteisen hajoamisen avulla.² Tähän mennessä suurin osa TPD:tä koskevasta tutkimuksesta on keskittynyt ubikitiini-proteasomijärjestelmän kautta tapahtuvaan hajottamiseen, joka kohdistuu pääasiassa solunsisäisiin proteiineihin.³ TPD on kehittymässä uudeksi lähestymistavaksi muun muassa syöpäsairauksiin, tulehdus- ja immuunisairauksiin sekä infektioihin, jotka johtuvat sairautta aiheuttavien proteiinien epänormaalia esiintyvyydestä.¹ Tässä lähestymistavassa keskiössä on kolmiosainen kompleksin, joka muodostuu E3-ubikitiiniligaasista, kohdeproteiinista sekä niiden välillä olevasta hajottajamolekyylistä.³ Hajottajamolekyylit voivat olla yhden- tai kahdenarvoisia. Yhdenarvoiset hajottajat ovat useimmiten pienimolekyyllisiä molekyyliimajahajottajia. PROTACit ovat kahdenarvoisia hajottajia, ja sisältävät erilliset kohdistusosat, jotka sitoutuvat ja muodostavat kolmiosaisen kompleksin.³

Hajottajien toimintamekanismeja tutkitaan laajasti *in vitro*- ja *in cellulo*-menetelmillä. Näillä määrityksillä pyritään saamaan tietoa hajottajien toiminnasta, erityisesti niiden vaikutuksesta kolmiosaisen kompleksin muodostumiseen ja siten kohdeproteiinin hajottamiseen. Nämä tiedot ovat tärkeitä, jotta voidaan ymmärtää molekyylihajottajien toimintaa ja mahdollista soveltuvuutta lääkekehityksessä. Vaikka *in vitro*-menetelmät tarjoavat merkittävää tietoa kompleksin muodostumisesta, on tärkeää tunnistaa niiden rajoitukset erityisesti solu ympäristössä. Tämän vuoksi *in cellulo*-menetelmiä tarvitaan täydentämään *in vitro*-tutkimusta ja varmistamaan hajottajien toiminnan tehokkuus ja soveltuvuus solutasolla.³

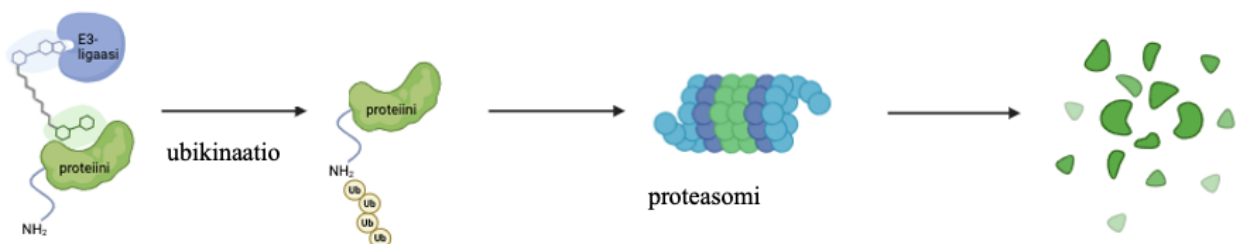
Sekä hajottajien että menetelmien kehittäminen on ajankohtaista, mutta tällä hetkellä molekyyliimajahajottajien löytäminen on ollut sattumanvaraista. Olisi löydettävä keino, jolla mahdollistettaisiin hajottajien rationaalinen suunnittelu. Molekyylihajottajat ovat lupaava kehityskohde lääkekehityksessä, ja niiden avulla voitaisiin tulevaisuudessa hoitaa sairauksia, joiden hoitoon on aiemmin käytetty perinteisiä pienimolekyyllisiä inhibiittoreita.

Tutkielmassa käsitellään aluksi kohdennettua proteiinien hajottamista ja siihen tarvittavia molekyylihajottajia sekä niiden ominaisuuksia ja eroja verrattuna perinteisiin inhibiittoreihin. Tutkielman painopisteenä on *in vitro*-yhteensopivat seulontamenetelmät. Lopuksi tarkastellaan molekyylihajottajien sekä niiden seulontamenetelmien tulevaisuutta.

2 Molekyyliahjottajat

Molekyyliahjottajat ovat keskiössä proteiinien kohdennetussa hajottamisessa. Ne ovat luokka läheisyyttä aiheuttavia molekyylejä, joilla on kyky sitoa kaksi proteiinia yhteen. Molekyyliahjottajat muodostavat kohdeproteiinin ja E3-ubikitiiniligaasin kanssa kolmiosaisen kompleksin, jonka kohdeproteiini merkitään hajotettavaksi ubikitiiniproteiinien avulla.

Kolmiosainen kompleksi on tärkeä, jotta proteiinin hajoaminen voi tapahtua ubikitiini-proteasomijärjestelmän (engl. ubiquitin-proteasome system, UPS) avulla.⁴ Kolmiosaisen kompleksin kohdeproteiini merkitään hajotettavaksi kiinnittämällä ubikitiini kovalenttisesti pinalysiinin sivuketjun aminoryhmään, jonka jälkeen merkityt proteiinit tunnistetaan proteaasikompleksin eli proteasomin avulla (Kuva 1). Ubikitiiniproteiini on 76 aminohappoa sisältävä polypeptidi, joka vapautuu hajoamisprosessissa ja se voidaan käyttää uudelleen.⁴ Itse ubikinaatio on monivaiheinen prosessi, joka alkaa ubikitiiniproteiinin kiinnittyessä kovalenttisesti ubikitiinia aktivoivaan entsyymiin E1. Tämän jälkeen ubikitiini siirtyy toiseen entsyymiin, jota kutsutaan ubikitiinikonjugoivaksi entsyymiksi E2. Lopullisen ubikitiinin konjugoinnin kohdeproteiiniin välittää kolmas entsyymi, E3-ubikitiiniligaasi, joka vastaa ubikitiinin siirtämisestä E2-entsyymistä kohdeproteiiniin. Kun ensimmäinen ubikitiini on kiinnittynyt, E3 voi muodostaa pidempiä ubikitiiniketjuja luomalla ubikitiini-ubikitiini-peptidisidoksia. E4-entsyymi on ketjun pidentämistekijä, joka voi katalysoida prosessia. Tämä prosessi johtaa lopulta proteiinin proteasomaaliseen hajoamiseen aminohapoiksi ja peptideiksi.⁵



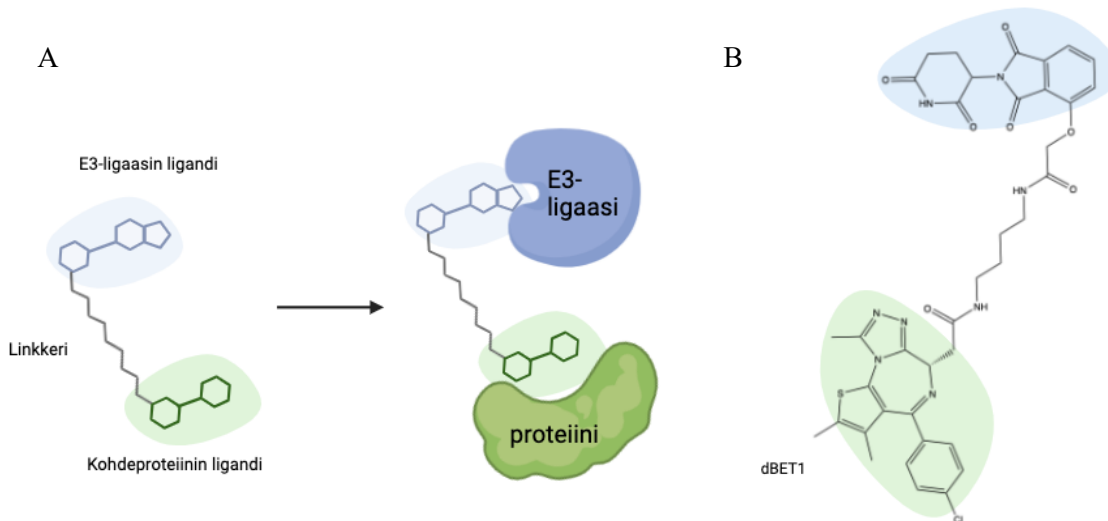
Kuva 1. Molekyyliahjottajavälitteinen kolmiosaisen kompleksin muodostuminen ja sen välittämä kohdeproteiinin ubikinaatio ja hajotus. Hajotettava proteiini merkitään ubikitiiniproteiineilla, jonka jälkeen proteasomi tunnistaa hajotettavan proteiinin ja hajottaa sen aminohapoiksi sekä peptideiksi.

Kolmiosaisen kompleksin ymmärtämiseksi on tehty paljon työtä, sillä sen tunteminen mahdollistaa myös hajoamisprosessin ymmärtämisen. Tämän nopeasti hajoavan kolmiosaisen välituotteen tutkiminen on osoittanut hyvin vaativaksi, mutta saaduilla tuloksilla on parannettu ymmärrystä molekyyliahjottajista. Seuraavaksi tarkastellaan molekyyliahjottajien rakennetta ja tarkemmin niiden jakoa yhden- ja kahdenarvoisiin hajottajiin.

2.1 Kahdenarvoiset molekyylihajottajat

Hajottajamolekyylien aiheuttama kolmiosainen kompleksinmuodostus voidaan saavuttaa bifunktionaalisilla eli kahdenarvoisilla hajottajilla. Tällaisia kahdenarvoisia hajottajia ovat proteolyysiin kohdistuvat kimeerit (engl. proteolysis targeting chimeras, PROTAC), jotka perustuvat E3-ligaasin ohjaamiseen haluttuun substraattiin, proteiinien kohdennettua hajottamista varten. PROTAC koostuu kohdeproteiinin ligandista, E3-ubikitiiniligaasin ligandista sekä nämä yhdistävästä linkkeristä (Kuva 2A). E3-ligaasin ligandi tunnistaa E3-ligaasin ja hankkii sen osaksi kolmiosaista kompleksia. Tällä hetkellä E3-ligandina käytetään pienikokoisia molekyyliä. Niillä on parempi solunläpäisevyys ja ne hajottavat kohteen nopeammin kuin ensimmäisen sukupolven PROTACien fosfopeptidit. Niiden ongelmana oli myös suuri molekyylipaino ja peptidisidoksen herkkyys, jotka rajoittivat peptidipohjaisten PROTACien kliinistä käyttöä.⁶ Kohdeproteiinin ligandi tunnistaa hajotettavan kohdeproteiinin sekä hankkii sen osaksi kolmiosaista kompleksia. Kohdeproteiinin ligandi valitaan hajotettavan kohteen mukaan ja on usein pienimolekyylinen inhibiittori.⁷ Sopiva kohdeproteiinin ligandi vaikuttaa myös lääkeaineen selektiivisyyteen.⁸ PROTACien hajottamistehokkuus ei riipu ainoastaan kohdeproteiinin ligandista ja E3-ligaasin ligandista, vaan myös linkkerin valinnalla on vaikutusta. Linkkerin pituus, kiinnityskohdat sekä rakenne ovat tärkeitä kolmiosaisen kompleksin muodostumiseen sekä hajoamisaktiivisuuden ja kohdeselektiivisyyden kannalta.⁹ Linkkeri yhdistää E3-ubikitiiniligaasin ja kohdeproteiinin ligandin toisiinsa kovalenttisesti, ja se sisältää yleensä 5–15 hiiltä tai muuta atomia.⁷

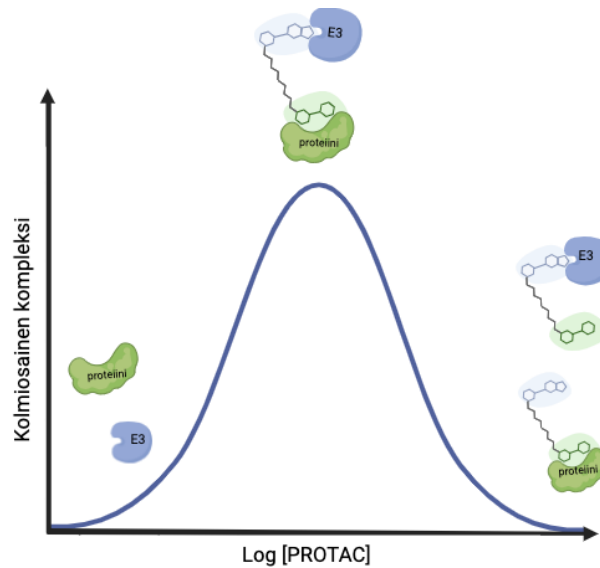
PROTACit ovat kemiallisista molekyyliyhdistelmästä tunnetuin, jolla saadaan aikaiseksi kohdeproteiinin hajottaminen.¹⁰ Sitoutumalla samanaikaisesti kohdeproteiiniin ja tiettyyn E3-ligaasiin, pystyvät PROTACit muodostamaan kolmiosaisen kompleksin, jolloin kohdeproteiini ja E3-ligaasi pysyvät lähellä toisiaan (Kuva 2A). E3-ligaasi sitoo polyubikitiiniketjun kohdeproteiiniin ja signaloii sen proteasomaalista hajottamista varten. Mikäli hajottajamolekyylien tutkimus keskittyy pääasiassa E3-ligaasin ja kohdeproteiinin välisiin vuorovaikutuksiin ja se suoritetaan *in vitro*, ei vaadita E2-entsyymin käyttöä.¹⁰



Kuva 2. Kolmiosaisen kompleksin muodostumisen esimerkkiyhdiste dBET1 avulla. (A) PROTAC koostuu E3-ligaasia kohdentavasta ligandista, linkkeristä ja kohdeproteiinin ligandista. Se sitoutuu samanaikaisesti kohdeproteiiniin ja E3-ubikitiiniligaasiin ja aiheuttaa kohdeproteiinin polyubikinaation ja hajottamisen. (B) Esimerkkiyhdiste dBET1 on spesifinen PROTAC-molekyyli, joka hajottaa BET-proteiineja.^{11,12}

Yksi tutkituista PROTACeista on dBET1 (Kuva 2B), joka on suunniteltu hajottamaan BET-proteiineja (engl. bromodomain and extra-terminal domain protein family). BET-proteiinit säätelevät geenien ilmentymistä ja ovat tärkeitä solujen kasvun ja jakautumisen kannalta. Niitä esiintyy myös monissa syövässä, joissa ne voivat edistää syöpäsolujen lisääntymistä. dBET1:llä on sopivat farmakokineettiset ominaisuudet ja se voi tehokkaasti estää kasvaimien kasvua, sillä BET-proteiinien hajottaminen estää syöpäsolujen lisääntymisen sekä edistää niiden solukuolemaa. dBET1 on kehitetty erityisesti akuutin myelooisen leukemian ja muiden hematologisten syöpien hoitoon.¹²

PROTACeilla on havaittu koukkuvaikutusta eli niiden teho heikkenee suurina pitoisuuksina. Tällöin kolmiosaisten kompleksien muodostuminen estyy, sillä molemmat proteiinit kompleksoituvat PROTACiin. Näin ollen muodostuu kaksiosaisia komplekseja ja havaitaan kellonmuotoinen annosvaste-käyrä (Kuva 3).³ Kun kolmiosaisen kompleksin muodostumista tutkitaan *in vitro*, PROTACin pitoisuuden kasvaessa muodostuu enemmän kolmiosaisia komplekseja, mutta maksimin saavutettua kolmiosaisia komplekseja ei enää muodostu vaan PROTACit sitoutuvat vain joko E3-ligaasiin tai kohdeproteiiniin. Kun kolmiosaisia komplekseja ei muodostu, estyy myös ubikinaatiovälitteinen hajoaminen.¹⁴ Koukkuvaikutus vaikeuttaa lääkkeen annostelua ja vaikuttaa sen turvallisuuteen, sillä kaksiosaisia kompleksien muodostumiselle on teoriassa haitallisia seurauksia. E3-PROTAC-kompleksin hajoamisaktiivisuus voi lisääntyä ulkopuolisiin kohteisiin, eli kohteisiin, joita ei ole tarkoitus hajottaa. Lisäksi mahdollista on farmakologisen vasteen muodostuminen, joka johtuu PROTAC-kohdeproteiini-kompleksin vuorovaikutuksista.¹⁵



Kuva 3. PROTACin koukkuvaikutus kuvattuna kolmiosaisen kompleksin muodostumisena PROTACin logaritmisena pitoisuuden funktiona. PROTACin pitoisuuden kasvaessa muodostuu enemmän kolmiosaisia komplekseja. Huipun kohdalla havaitaan optimaalinen PROTACin pitoisuus, jossa kolmiosaisia komplekseja muodostuu eniten. Kuitenkin PROTACin pitoisuuden noustessa lisää, kahdenarvoisia komplekseja muodostuu todennäköisemmin kuin kolmiosaisia komplekseja. Tämä vähentää kohdeproteiinin hajoamista sekä PROTACin tehoa liian korkeilla pitoisuuksilla. Lisäksi kaksiosaisien kompleksien muodostuminen voi aiheuttaa haittaa potilaalle, kohteen ulkopuolisen hajotuksen ja farmakologisen vasteen seurauksena.

Useat PROTACit ovat osoittautuneet erittäin lupaaviksi lääkkeiksi kliinisissä tutkimuksissa. PROTACien teknologiaan liittyy kuitenkin vielä monia haasteita, kuten PROTACien suuri koko, joka vaikuttaa muun muassa solun läpäisevyyteen. Lisäksi PROTACit saattavat aiheuttaa toksisuutta, sillä ne toimivat katalyyttisesti hajottaessa kohdeproteiineja. Tämä saattaa johtaa kohdeproteiinin hajottamisen pitkittymiseen. PROTACien katalyyttisyys vaikeuttaa myös PROTACin aktiivisuuden säätelyä, sillä silloin on hankala arvioida tarkasti kohteen hajottamiseen tarvittava PROTACin määrä. Lisäksi toksisuuteen vaikuttaa, että PROTACit voivat hajottaa kohdeproteiinin lisäksi muitakin kohteita.^{15,16}

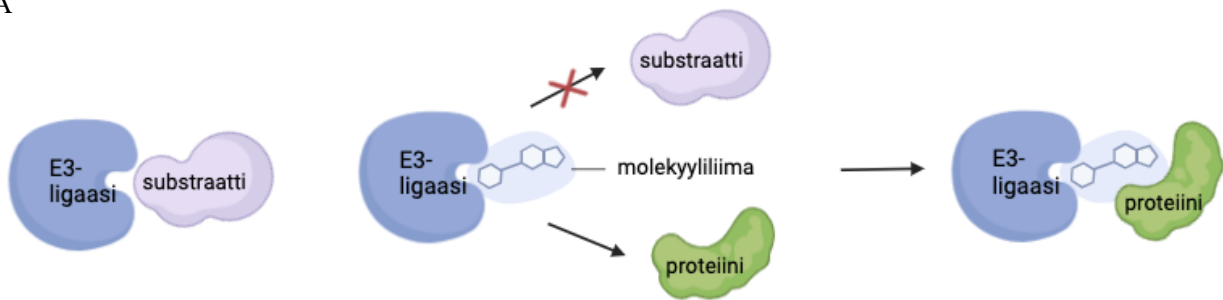
2.2 Yhdenarvoiset molekyylihajottajat

Kun PROTACien avulla oli onnistuttu saamaan aikaan proteiinin hajoaminen, on tätä lähestymistapaa pyritty laajentamaan yhdenarvoisiin hajottajiin, molekyylihiimoihin, jotka pystyisivät aiheuttamaan proteiinien läheisyyden ilman PROTACien tyyppisiä ligandeja sisältäviä linkkereitä.¹⁷

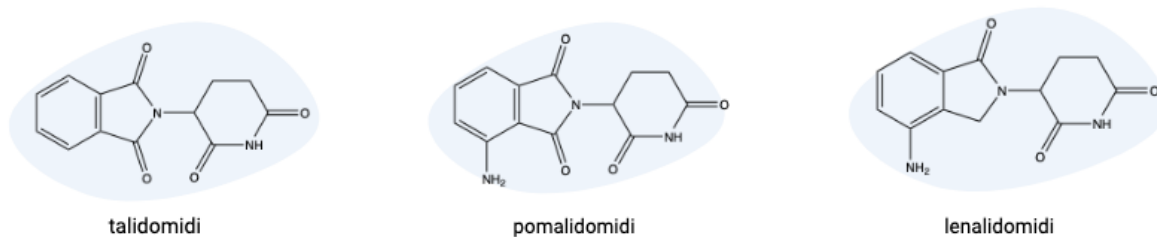
Yhdenarvoiset molekyylihajottajat ovat linkkerittömiä molekyyliä, jotka ovat pieniä, lääkemolekyylin kaltaisia yhdisteitä.³ Yhdenarvoisiin molekyylihajottajiin kuuluvat molekyylihiimajottajat, jotka muodostavat kolmiosaisen kompleksin E3-ubikitiiniligaasin ja

kohdeproteiinin kanssa (Kuva 4A). Molekyyliliimahajottajat tehostavat olemassa olevia heikkoja vuorovaikutuksia tai saavat aikaan uusia vuorovaikutuksia sellaisten molekyylien välille, jotka eivät normaalisti vuorovaikuttaisi keskenään.¹⁷ Molekyyliliimahajottajat vaikuttavat proteiinin hajoamiseen aiheuttamalla tai tehostamalla proteiini-proteiini-interaktiota (PPI) E3-ligaasin ja kohdeproteiinin välillä, joka siten johtaa proteiinin ubiquinaatioon ja hajottamiseen.^{1,10}

A



B



Kuva 4. Kolmiosaisen kompleksin muodostuminen yhdenarvoisen hajottajan avulla ja esimerkkiyhdisteet. (A) Molekyyliliiman sitoutuminen E3-ligaasiin muokkaa sitoutumiskohtaa, joka estää entsyymiä sitoutumasta substraattiinsa ja täten mahdollistaa sitoutumisen kohdeproteiiniin muodostaen kolmiosaisen kompleksin. (B) Molekyyliliimojen esimerkkiyhdisteet talidomidi, pomalidomidi ja lenalidomidi.¹¹

Molekyyliliimahajottajien löytäminen on useimmiten ollut sattumanvaraista. On kuitenkin löydetty tapoja, joissa inhibiittoreihin on tehty pieniä rakenteellisia muutoksia, jotka ovat muuttaneet nämä yhdisteet proteiinkompleksien hajottajiksi.² On siis erityisen tärkeää ymmärtää molekyyliliiman hajottajien rakenteellisia ja biologisia ominaisuuksia, jotta kohdennettujen proteiinien hajotusstrategiat voitaisiin siirtää käytännön kliinisiin sovelluksiin.

Tällä hetkellä kliiniseen käyttöön on hyväksytty kolme molekyyliliimaa, joita ovat talidomidi ja sen johdannaiset lenalidomidi ja pomalidomidi (Kuva 4B) ja ne kuuluvat immuunivälitteisten tulehdussairauksien lääkkeisiin (IMiD). Nämä molekyyliliimahajottajat pystyvät vaikuttamaan immuunijärjestelmään, vähentävät tulehduksia ja ne omaavat syöväntä vastaisia ominaisuuksia.¹⁴ Näiden molekyyliliimojen toimintamekanismit perustuvat niiden kykyyn sitoutua cerebloniin, joka

on osa E3-ubikitiiniligaasikompleksia. Kun talidomidi tai sen johdannaiset sitoutuvat cerebloniin, ne muuttavat sen substraattispesifisyyttä. Normaalisti cereblon tunnistaa tiettyjä proteiineja, jotka se merkitsee ubikitiinilla hajotettavaksi, mutta IMiD-lääkkeiden avulla se tunnistaa ja merkitsee uusia proteiineja hajotettavaksi. Tämä mekanismi on tärkeä muun muassa syövän hoidossa, sillä se voi johtaa syöpäsolujen eloojäämiselle kriitisten proteiinien hajottamiseen proteasomissa. Esimerkiksi multippelin myelooman hoidossa talidomidin johdannaiset tehostavat syöpäsolujen kuolemaa aiheuttamalla näiden solujen tarvitseman proteiinin hajottamisen. Lisäksi nämä molekyylihiimat vähentävät tulehdusta estämällä tulehdusta edistävien sytokiinien tuotantoa.¹⁸

PROTACEihin verrattuna molekyylihiimahajottajilla on pienempi molekyylipaino, ja niiden solunläpäisevyys ja imeytymisnopeus on parempi. Lisäksi molekyylihiimahajottajat sitoutuvat ensisijaisesti E3-ligaasiin, ja niiden affiniteetti kohdeproteiiniin on minimaalinen, joka minimoi myös koukkuvaikutuksen esiintymisen.¹⁴ Haasteena on kuitenkin molekyylihiimojen tunnistaminen, sillä monia tunnetuista yhdisteistä ei ole tunnistettu rationaalisen seulonnan avulla, vaan sattumanvaraisina löydöksinä. Painopiste on kuitenkin siirtymässä kohti menetelmiä, jotka mahdollistavat rationaalisen lähestymistavan.¹⁷

2.3 Molekyylihiijottajien erityispiirteet

Pienten molekyylien aiheuttamien kolmiosaisten kompleksien muodostumista ja toimivuutta voidaan kuvata useilla ominaisuuksilla, joita ovat esimerkiksi sitoutumisasento, stoikiometria, viipymäaika, affiniteetti ja yhteistoiminnallisuus.³

Sitoutumisasento kuvaa, kuinka E3-ligaasi, hajottajamolekyyli ja kohdeproteiini yhdistyvät muodostaakseen kolmiosaisten kompleksin. PROTACEilla linkkerin pituus ja tavat, joilla kaksi proteiinia ovat vuorovaikutuksessa keskenään, määrittävät sitoutumisasennon. Tämä asento määrää lopulta, onnistuuko proteiinin ubikinaatio ja hajottaminen.³

Hajottajien muodostamien kolmiosaisten kompleksien stoikiometria on 1:1:1 (E3:hajottaja:kohdeproteiini). Hajottajien katalyyttinen toimintatapa kolmiosaisten kompleksien kautta mahdollistaa annostelun pienemmillä pitoisuuksilla kohdeproteiinin hajoamisen aikaansaamiseksi. Viipymäajalla tarkoitetaan aikaa, jonka komponentit pysyvät kompleksina. Se riippuu kompleksin dissosiaationopeudesta. Hajottajien osalta tarvitaan riittävän hidas dissosiaationopeus, jotta kohdeproteiinin ubikinaatio ehtii tapahtua.³

Affiniteetti määrittää molekyylien taipumusta sitoutua toisiinsa, ja se ilmaistaan usein dissosiaatiovakion (K_d) avulla. Alhainen K_d -arvo osoittaa molekyylien välistä korkeaa affiniteettiä, eli koska todennäköisyys molekyylien väliselle hajoamiselle on pieni, on silloin molekyylien välillä korkea affiniteetti, eli taipumus sitoutua. PROTACEilla kummallakin ligandilla on affiniteetti

kohdeproteiinia tai E3-ligaasia kohtaan. Affiniteetti sekä kohdeproteiiniin että E3-ligaasiin on tärkeää kohteen sitoutumisen kannalta.³

Yhteistoiminnallisuus on tärkeä parametri molekyylilihajottajien muodostamien kolmiosaisen kompleksien ymmärtämiseksi. Yhteistoiminnallisuudella kuvataan kuinka yhden molekyylin sitoutuminen vaikuttaa toisen molekyylin sitoutumiseen, esimerkiksi muokkaamalla kohdemolekyylin rakennetta. Yhteistoiminnallisuus merkitään α :lla, ja se on mahdollista saada laskemalla kaksiosaisen ja kolmiosaisen kompleksin sitoutumisaffiniteettien suhde.¹⁹ Kun yhteistoiminnallisuus on positiivinen, eli $\alpha > 1$, kolmiosaisen kompleksin muodostuminen on suotuisaa. Kun $\alpha < 1$ on yhteistoiminnallisuus negatiivinen, mikä tarkoittaa, että kompleksin muodostuminen on epäsuotuisaa. Kun $\alpha = 1$ on kompleksi ei-yhteistoiminnallinen. PROTACien osalta positiivinen yhteistoiminnallisuus mahdollistaa heikkojen ligandien käytön ja parantaa hajoamisen tehokkuutta. Kuitenkin myös ei-yhteistoiminnalliset PROTACit voivat aiheuttaa voimakasta hajoamista. Molekyyliliimahajottajat ovat riippuvaisia yhteistoiminnallisten kompleksien muodostumisesta, sillä niiden sitoutumisaffiniteetti kompleksin proteiineihin on usein heikko.³

2.4 Molekyylilihajottajien ja inhibiittoreiden erot

Suuri osa hengenvaarallisista sairauksista on edelleen vaikeasti hoidettavissa perinteisten inhibiittoreiden avulla.³ Perinteisillä inhibiittoreilla on monimutkainen rakenne, ja ne estävät vain osan proteiinin toiminnasta, koska ne sitoutuvat yleensä vain tiettyihin aktiivisiin kohtiin. Tämä osittainen toiminnan esto voi johtaa riittämättömään terapeuttiseen vaikutukseen, koska jäljelle jäävä proteiiniaktiivisuus voi yhä ylläpitää sairauden ilmenemistä. Tämän vuoksi molekyylilihajottajia on alettu kehittämään inhibiittorien rinnalle erityisesti vaikeasti hoidettavissa oleville sairauksille.¹⁶

PROTACeilla on useita etuja perinteisiin pienimolekyylisiin inhibiittoreihin verrattuna. PROTACit hajottavat kohdeproteiinin ja poistavat siten kaikki sen toiminnot, toisin kuin inhibiittorit. PROTACien avulla on mahdollista myös minimoida lääkeresistenssin muodostuminen, sillä niitä voidaan käyttää vain pieninä pitoisuuksina. Tämä vähentää myös mahdollisten sivuvaikutuksien esiintymistä.¹⁶

PROTACien lisäksi myös molekyyliliimahajottajat soveltuvat sellaisille proteiineille, joita ei ole ennen pidetty lääkekohteiksi soveltuvina. Perinteiset inhibiittorit toimivat sitoutumalla kohdeproteiinissa olevaan ligandille sopivaan ”taskuun”. Sen sijaan molekyyliliimahajottajien toiminta ei edellytä kohdeproteiinin sitoutumistaskua, vaan ne aiheuttavat vuorovaikutuksen E3-ligaasin ja kohdeproteiinin välillä, jotka eivät normaalisti suoraan vuorovaikuttaisi keskenään.²⁰

Kuitenkin perinteisillä inhibiittoreilla on useita etuja, kuten suunnittelun ja synteysin helppous sekä hyvät farmakokineettiset ominaisuudet. Farmakokineettiset ominaisuudet kuvaavat, kuinka

mahdollinen lääkeaine imeytyy, jakautuu, kuinka sen aineenvaihdunta toimii ja miten se poistuu elimistöstä. PROTACeilla on usein huonot farmakokineettiset ominaisuudet, joka johtuu niiden suuresta molekyylipainosta. Molekyyliimahajottajien ongelmana on niiden suunnittelun haastavuus.¹⁴

3 Menetelmät molekyylihajottajien seulontaan

Hajottajien toimintamekanismeja tutkitaan erilaisilla *in vitro*- ja *in cellulo* -menetelmillä. Näillä määrittäyksillä saadaan tärkeää tietoa muun muassa affiniteetista, termodynamiikasta, kinetiikasta ja sitoutumisasennosta, jotka ohjaavat kolmiosisaisen kompleksin muodostumista, ja näin ollen kohdeproteiinin hajottamista.³ Yleisimmin käytetyt määrittäykset voidaan jakaa kolmeen luokkaan: kohteen sitoutumiseen liittyvät määrittäykset, kolmiosisaisen kompleksin muodostumisen määrittäykset sekä funktionaaliset solututkimusmäärittäykset. Kohteen sitoutumiseen kohdistuvissa määrittäyksissä mitataan hajottajan kykyä sitoutua kohdeproteiiniin tai E3-ubikitiiniligaasiin. Näitä menetelmiä ovat esimerkiksi pintaplasmoniresonanssi ja isoterminen titrauskalorimetria. Kolmiosisaisen kompleksin muodostumisen määrittäyksissä keskitytään kolmiosisaisen kompleksin muodostumiseen. Menetelmiä ovat aikaerotteinen Försterin resonanssienergiansiirto (engl. time-resolved Förster resonance energy transfer, TR-FRET) ja ALPHA-menetelmät (engl. amplifies luminescent proximity homogenous assay). Funktionaalisissa solututkimusmäärittäyksissä arvioidaan hajottajan kykyä aiheuttaa kohdeproteiinin hajoamista ja sen myöhempiä vaikutuksia solutoimintoihin. Näiden määrittäysten yhdistelmiä käytetään hajottajien karakterisoimiseksi sekä niiden spesifisyyden arvioimiseksi.²¹

Seuraavassa osassa tarkastellaan sekä *in cellulo* että *in vitro* -menetelmiä molekyylihajottajien seulontaan. Pääpaino on *in vitro* -menetelmissä, ja laskennalliset menetelmät on jätetty tarkastelun ulkopuolelle.

3.1 *In cellulo* -menetelmät

In cellulo -menetelmillä tarkoitetaan menetelmiä, jotka suoritetaan solun sisällä soluviljely-ympäristössä. Historiallisesti molekyylihajottajia on löydetty sattumalla eikä niinkään suunniteltua strategiaa noudattamalla.¹⁷ Jotta molekyylihajottajien toimintaa voidaan tutkia ja uusia suunnittelustrategioita kehittää, on tärkeää, että käytettävissä on menetelmiä, joilla saadaan tietoa kolmiosisaisen kompleksin kohdeproteiinin hajoamisesta myös solun sisällä.³ Tavoitteena *in cellulo* -menetelmille on varmistaa, että hajottajat saavat aikaan halutun kohdeproteiinin hajoamisen solu-ympäristössä. Yhtenä keskeisenä ongelmana on, ettei *in cellulo* -määrittäykset aina sovellu suurten molekyyli-määrien tehoseulontaan niiden monimutkaisuuden ja aikaa vievien protokollien vuoksi.

Tämän vuoksi menetelmiä käytetäänkin usein varmistamaan löydettyjen kandidaattiligandien vaikutus solujen sisällä.¹¹

Molekyyliahjottajien seulontaan solussa voidaan käyttää EFC:tä (engl. enzyme fragment complementation), NanoBRET- (engl. nanoluciferase bioluminescence resonance energy transfer) ja TR-FRET-menetelmiä. TR-FRET-menetelmässä solut hajotetaan ja niihin lisätään kullekin vuorovaikutuskumppanille spesifisiä leimattuja vasta-aineita. Vuorovaikutuskumppaneiden läheisyys aiheuttaa energian siirtymisen luovuttajan ja vastaanottajan välillä. NanoBRET-menetelmää käytetään mittamaan kolmiosaisen kompleksin sitoutumistapahtumia. BRETissä energiansiirto tapahtuu luovuttajan lusiferaasin ja vastaanottajan fluoroforin välillä. Näissä kahdessa menetelmässä detektiokomponentit voidaan tuottaa suoraan solun sisällä. EFC perustuu kahteen β -galaktosidaasi entsyymifragmenttiin, jotka toimivat vastaanottajana ja luovuttajana. Kun fragmentit yhdistetään muodostavat ne aktiivisen β -galaktosidaasi-entsyymin, joka hydrolysoi substraattinsa tuottaakseen kemiluminesenssisignaalin. Menetelmällä voidaan tutkia kolmiosaisen kompleksin kohdeproteiinin hajottamista.¹⁷

In cellulo -määrittämiä käytetään ensisijaisesti muiden seulontojen jälkeen, kun potentiaalisia molekyylejä on jo löydetty, ja joiden toiminta ja tehokkuus halutaan varmistaa solujen luonnollisessa ympäristössä.

3.2 *In vitro* -menetelmät

In vitro -menetelmissä tutkimus suoritetaan solun ulkopuolella käyttäen puhdistettuja proteiineja. Useimmissa *in vitro* -menetelmissä käytetään rekombinanttiproteiineja, jotka on luotu geeniteknikan avulla. *In vitro* -menetelmien edellytyksenä on, että kolmiosaisen kompleksin E3-ubikitiiniligaasi sekä kohdeproteiini ovat jo tiedossa. Silloin vuorovaikutuksen tutkimiseen voidaan käyttää pintaplasmoniresonanssia, isotermistä titrauskalorimetriaa, ALPHA- ja TR-FRET-menetelmiä.¹¹ Seuraavaksi käsitellään tarkemmin menetelmien toimintaperiaatteita, sekä kuinka niitä voidaan käyttää molekyyliahjottajien seulontaan.

3.2.1 Läheisyyteen perustuvat menetelmät

Läheisyyteen perustuvia menetelmiä ovat esimerkiksi TR-FRET ja ALPHA-menetelmät. Näitä menetelmiä käytetään karakterisoimaan kolmiosaisen kompleksin muodostumista sekä määrittämään konsentraatioalueita, joissa komplekseja muodostuu. Molemmat menetelmät mittaavat energian siirtymistä luovuttajan ja vastaanottajan välillä niiden ollessa lähekkäin. Kompleksien muodostumista tutkitaan titraamalla tutkittava yhdiste systeemiin, joka sisältää kahta kohdeproteiinia. Yhdisteen konsentraation lisääntyminen johtaa kolmiosaisen kompleksin populaation kasvuun ja siten

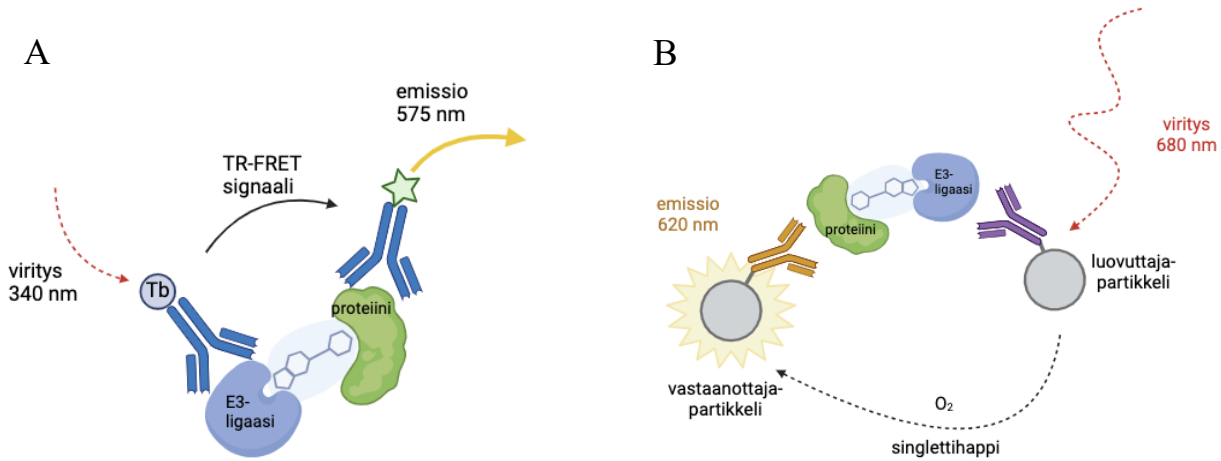
suurempaan signaaliin, kunnes saavutetaan maksimisignaali. Molekyyliliimahajottajien osalta parametrit, kuten EC50 ja saavutettu maksimivaste (E_{\max}) antavat tietoa tehosta ja yhteistoiminnallisuudesta. PROTACien tapauksessa havaitaan kellonmuotoinen käyrä, jossa kompleksin pitoisuus pienenee suurilla PROTACin pitoisuuksilla koukkuvaikutuksen seurauksena (Kuva 3). Saatuja vastekäyriä voidaan käyttää myös osoittamaan PROTACin yhteistoiminnallisuutta. Yhteistoiminnallisempi PROTAC muodostaa suuremman populaation kolmiosaisia komplekseja, joka johtaa korkeampaan maksimipiikin intensiteettiin laajemmalla pitoisuusalueella.³

TR-FRET-menetelmän peruseräiteena on energian siirto luovuttajan ja vastaanottajan fluoroforien välillä. Kun nämä osat ovat lähellä toisiaan, luovuttajan virittyminen valon vaikutuksesta johtaa energian siirtymiseen vastaanottajaan. Tämän jälkeen vastaanottaja lähettää fluoresenssisignaalin tietyllä aallonpituudella, joka riippuu käytetystä fluoroforista (Kuva 5A). Näin ollen molekyylien välisiä vuorovaikutuksia voidaan seurata kiinnittämällä fluoresoiva leima kumpaankin osapuoleen ja mittaamalla energiansiirtoaste.¹⁷

ALPHA-menetelmät ovat partikkelipohjaisia menetelmiä, joita käytetään molekyylien välisten vuorovaikutusten tutkimiseen. Menetelmä perustuu kahden tutkittavan proteiinin sitomiseen spesifisiin partikkeleihin. Kun nämä kaksi molekyyliä ovat lähekkäin ja vuorovaikuttavat keskenään, luovuttajapartikkelin laservirityksen jälkeen ympäristön happi muuntuu kiihdytettyyn singlettitilaan, joka sitten reagoi vastaanottajapartikkelin kanssa tuottaen kemiluminesenssisignaalin (Kuva 5B).¹⁷

Läheisyyteen perustuvat määrytykset ovat korkean läpimenon herkkiä ja homogeenisia tekniikoita, joilla voidaan mitata suoraan kolmiosaisen kompleksin muodostumista *in vitro* -olosuhteissa. TR-FRET-menetelmässä luovuttajan fluoresenssin elinikä on huomattavasti pidempi kuin taustafluoresenssin, joka vähentää mahdollisia yhdisteiden aiheuttamia häiriöitä, kuten autofluoresenssia. Yhdisteet voivat kuitenkin johtaa fluoroforin sammumiseen, mikä johtaa vääriin negatiivisiin tuloksiin. ALPHA-menetelmissä yhdisteiden aiheuttama häiriötä voi esiintyä esimerkiksi luovuttajapartikkelin virittyessä syntyvän singlettihapen vaimentamisesta. TR-FRET määrytyksillä on tyypillisesti kapeampi dynaaminen alue, alhaisemmat teoreettiset läheisyysrajat ja suurempi määrytyksen vaihtelu verrattuna ALPHA-menetelmiin. ALPHA-menetelmät ovat erittäin herkkiä muutoksille, jonka takia on harkittava huolellisesti, miten vältetään yhdisteiden pitkäaikaista altistumista ympäristön valolle ja lämpötilan muutoksille. Lisäksi ALPHA-menetelmät ovat erittäin kalliita ja vaativat erikoistuneemmat laitteet kuin TR-FRET.³ ALPHA-menetelmillä on kuitenkin merkittävä etu verrattuna TR-FRET-menetelmään, sillä energian siirto luovuttajan ja vastaanottajan välillä tapahtuu singlettihapen välityksellä, joka mahdollistaa jopa noin 200 nm sidontaetäisyyden. TR-FRET-menetelmässä luovuttajan ja vastaanottajan etäisyysväli, jolla

mentelmä toimii parhaiten ja energiansiirto tapahtuu, on noin 9 nm. Kuitenkin pitkä sidontaetäisyys voi olla haitallinen, sillä tällöin ei voida tietää tarkkaan, onko esimerkiksi kompleksi muodostunut.²³



Kuva 5 Läheisyyteen perustuvat menetelmät molekyylihajottajien seulontaan. (A) TR-FRET -menetelmän toiminta kolmiosaisen kompleksin muodostuessa. Terbium -vasta-aine toimii luovuttajana ja on sitoutuneena E3-ligaasiin. Energia siirtyy kohdeproteiiniin sitoutuneeseen fykoerytriiniin, joka emittoi aallonpituudella 575 nm.¹⁷ (B) ALPHA-menetelmän peruseriaate. Tutkittava kolmiosainen kompleksi sitoutuu luovuttaja- ja vastaanottajapartikkeliin. Kolmiosaisen kompleksin muodostuessa ja luovuttajapartikkelin laservirityksen jälkeen ilmakehän happi muuntuu singlettitilaan ja reagoi vastaanottajapartikkelin kanssa tuottaen signaalin. Tehty lähteessä 11 olevaa kuvaa mukaillen.

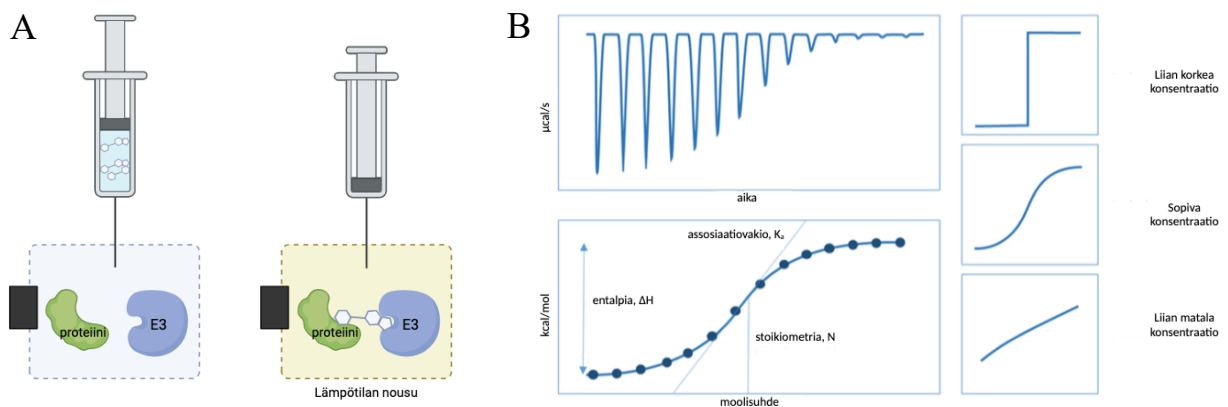
3.2.2 Isoterminen titrauskalorimetria

Isoterminen titrauskalorimetria (engl. isothermal titration calorimetry, ITC) on leimavapaa liuoksessa tapahtuva menetelmä, joka mittaa sitoutumistapahtumiin liittyviä lämmön muutoksia, ja sitä voidaan käyttää kolmiosaisen kompleksien muodostumisen termodynamiikan tutkimiseen.³ ITC:n avulla saadaan tietoa termodynaamisista parametreista, kuten assosiaatio- ja dissosiaatiovakioista (K_a ja K_d), sitoutumisen stoikiometriasta (N) sekä entalpiian (ΔH) ja entropian (ΔS) sekä Gibbsin vapaan energian (ΔG) muutoksista.²⁴ Hajottajamolekyylä lisätään ruiskun avulla näytekemnoon, jossa E3-ligaasi ja kohdeproteiini ovat. ITC mittaa lämpöä, joka vapautuu tai sitoutuu hajottajan sitoutuessa kohdeproteiiniinsa ja muodostaessa kolmiosaisen kompleksin (Kuva 6A).²¹

Kun näyte injektoidaan, ITC-laite havaitsee vuorovaikutuksesta syntyvän vapautuvan tai absorboituvan lämmön. Tämä tapahtuu mittaamalla tehon muutos, jota tarvitaan ylläpitämään isotermisiä olosuhteita. Injektiot suoritetaan toistuvasti, ja tuloksena on piikkejä, jotka pienenevät näytemolekyylin saturoituessa (Kuva 6B). Lopulta piikkien koot pysyvät vakioina, ja kuvaavat vain laimenemislämpöjä. Kun titraus on saatu päätökseen, laiteohjelmisto integroi yksittäiset piikit ja

esittää ne Wisemanin kuvaajana. Kuvaajasta saadaan tietoa sitoutumisentalpiasta, assosiaatiovakiosta ja stoikiometriasta. Näistä tiedoista voidaan laskea Gibbsin vapaan energian sekä entropian muutos.²⁵

ITC:tä rajoittaa kuitenkin hyvin alhainen läpäisykyky ja suuri proteiinkulutus, jonka vuoksi se ei sovellu suurten yhdistemäärien tutkimiseen. ITC vaatii suuren konsentraation ja tarkan olosuhteiden säätelyn. Esimerkiksi kaikkien materiaalien on oltava samassa puskurissa, jotta saadaan tarkkoja tuloksia. ITC:tä on sovellettu ymmärtämään entropian ja entalpiain vaikutusta sitoutumisaffiniteettiin.²⁴

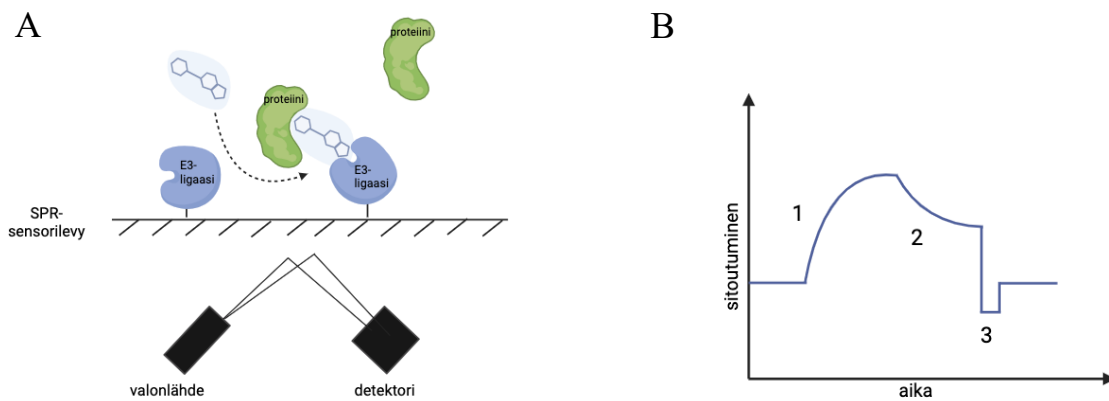


Kuva 6. ITC-menetelmä molekyylilihajottajien havaitsemiseksi. (A) ITC-menetelmässä hajottajamolekyylititratetaan näytekennoon pieninä annoksina ruiskun avulla. Molekyylilihajottajan muodostaessa kolmiosaisen kompleksin havaitaan lämpötilan nousu. Kuva tehty mukaillen lähdeä 11. (B) ITC-mittauksessa muodostuvat käyrät. Ylemmässä kuvaajassa havaitaan jokaisen injektioinnin tuottama lämpövirtauksen tehon piikki lämpökäyrässä. Alemmassa kuvaajassa on piirretty integroidut lämpöpiikit näytemolekyylin moolisuhteen funktiona. Sen avulla voidaan analysoida tutkittavan vuorovaikutuksen termodynaamisia parametreja. Kuvassa on esitetty myös, miten näytemolekyylin konsentraatio vaikuttaa kuvaajan muotoon. Muokattu Open Acces -kuvasta. Caulton, Simon, ITC Thermogram, CC BY 4.0, https://en.wikipedia.org/wiki/Isothermal_titration_calorimetry, 15.5.2024

3.2.3 Pintaplasmoniresonanssi ja biokerrosinterferometria

Termodynamiikan lisäksi kolmiosaisen kompleksin muodostumisen kinetiikka on tärkeä näkökulma hajottajien karakterisoinnissa ja optimoinnissa. Pintaplasmoniresonanssi (engl. surface plasmon resonance, SPR) on leimavapaa tekniikka, jota voidaan käyttää sitoutumisparametrien stoikiometrian ja kinetiikan eli assosiaatio ja dissosiaatio nopeusvakioiden määrittämiseen.³ Lisäksi sitä voidaan käyttää Gibbsin vapaan energian määrittämiseen kuvaamaan kompleksien stabiilisuutta. SPR-ilmiö syntyy valon ja johtavien elektronien kollektiivisen värähtelyn, niin sanottujen pintaplasmonien vuorovaikutuksesta metalli-dielektrin rajapinnassa (Kuva 7A). Kun polarisoitu valonsäde kohdistetaan metallipinnalle tietyssä kulmassa, se vuorovaikuttaa pintaplasmonien kanssa, jolloin muodostuu sähkömagneettinen aalto, joka etenee SPR-sensorilevyn rajapintaa pitkin. SPR-

tekniikassa käytetty sensorilevy on usein valmistettu ohuesta kerroksesta jalometallia ja se on päällystetty ohuella kerroksella dielektristä materiaalia. Sensorilevy on rakenteeltaan prisma, jotta SPR-ilmiön aikaansaaminen ja havaitseminen olisi helpompaa. Tutkittava näyte, joka sisältää hajottajamolekyylit sekä kohdeproteiinit, virtaa sensorilevyn yli ja vuorovaikuttaa pinnalle immobilisoidun E3-ubikitiiniligaasin kanssa (Kuva 7A). Seuraamalla muutoksia SPR-signaalin, joka mitataan tyypillisesti kulman tai aallonpituuden siirtymänä, on mahdollista saada tietoa immobilisoidun molekyylin ja näytteen välisistä sitoutumisvuorovaikutuksista (Kuva 7B).²⁴



Kuva 7. SPR-menetelmä molekyyliliimahajottajien havaitsemiseksi. (A) Tutkittava näyte virtaa sensorilevyn yli vaikuttaen sen pinnalle immobilisoidun E3-ligaasin kanssa. SPR-signaalin avulla on mahdollista saada tietoa kolmiosaisen kompleksin sitoutumisvuorovaikutuksista.²⁴ Kuva tehty mukailien lähdettä 11.

(B) SPR-menetelmän kuvaaja, joka kuvaa vuorovaikutuksen edistymistä ajan suhteen. Kohdassa 1 havaitaan kolmiosaisen kompleksin assosiaatio, kohdassa 2 dissosiaatio ja kohdassa 3 pinta puhdistetaan poistamalla jäljellä oleva sitoutunut analyytti.

Bioerrosinterferometriä (engl. bio-layer interferometry, BLI) on SPR:n ohella yleisimmin käytetty tekniikka biomolekyylien vuorovaikutusten ja niiden kineettisten parametrien tutkimiseen.²⁶ BLI on leimavapaa tekniikka, jonka toiminta perustuu sensorin pinnalta heijastuvan valon muutoksiin molekyylikompleksien muodostuessa. Menetelmässä seurataan valkoisen valon interferenssikuvioita, jotka heijastuvat kahdelta pinnalta: referenssikerroksesta ja biosensorin kärkeen sidotusta biomolekyylien kerroksesta. Kun analyytti sitoutuu immobilisoituun biomolekyyliin, toisen kerroksen paksuus kasvaa riippuen analyytin koosta ja affiniteetista kohdetta kohtaan. Tämä aiheuttaa muutoksen interferenssikuviossa, joka johtaa myös aallonpituuden siirtymään. Biosensoreiden kärjet on päällystetty materiaalilla, joka estää epäspesifisen sitoutumisen. Lääketutkimuksessa käytetään

useimmiten streptavidiniä, joka sisältää biotiinin sitoutumiskohtia, joihin biotinyloidut ligandit, kuten proteiinit, voidaan immobilisoida.²⁶

BLI:tä on käytetty menestyksekkäästi kolmiosaisen kompleksin tutkimiseen. Sen avulla saadaan samanlaista tietoa kompleksien affiniteetista ja kinetiikasta kuin SPR:llä. SPR ja BLI mahdollistavat kolmiosaisen kompleksin muodostumisen perusteellisen karakterisoinnin tehoseulonnalla ja pienemmällä näytetarpeella kuin esimerkiksi ITC:ssä.³

3.2.4 Muut menetelmät

Edellä esiteltyjen tekniikoiden lisäksi myös ydinmagneettista resonanssia (engl. nuclear magnetic resonance, NMR) ja fluoresenssipolarisaatiota (engl. Fluorescence polarization, FP) käytetään kompleksien muodostumisen tutkimiseen. Verrattuna ITC:hen, BLI:hin ja SPR:ään on FP tehokkaampi ja edullisempi vaihtoehto. FP:tä käytetään kolmiosaisten kompleksien muodostumisen, sitoutumisaffiniteetin ja selektiivisyyden tutkimiseen. Menetelmä perustuu leimatun pienmolekyylin pyörimisnopeuden muutokseen. Kompleksiin sitoutuneena sen pyörimisnopeus hidastuu. Tyypilliset määritykset edellyttävät leimaamattoman kohdeproteiinin titraamista leimatun pienmolekyylin kiinteään pitoisuuteen. PROTACien aiheuttaman kolmiosaisen kompleksin tutkimisessa FP:ssä sidotun fluoresoivan koettimen syrjäytyminen johtaa polarisoidun fluoresenssin häviämiseen.³

FP-mittaus ei vaikuta näytteisiin, joten niitä voidaan käsitellä ja analysoida uudelleen. FP:ssä pieni fluoresoiva molekyyli viritetään tasopolarisoidun valon avulla, jolloin emittoitunut valo on suurelta osin depolarisoitunutta. Jos merkkiaine sitoutuu suurempaan molekyyliin, sen tehollinen molekyylitilavuus kasvaa ja fluoresoivan ligandin pyöriminen hidastuu niin, että emittoitunut valo on samassa tasossa kuin viritysendergia. Kummallakin ligandiin sitoutuneella ja vapaalla tilalla on oma polarisaatioarvonsa: ligandiin sitoutuneella tilalla on korkea arvo ja vapaalla tilalla matala. Mitattu polarisaatio on näiden kahden arvon painotettu keskiarvo, jolloin saadaan tulos reseptoriin sitoutuneen merkkiaineen osuudesta.²⁷

FP:n etuna läheisyyteen perustuviin menetelmiin verrattuna on vaatimus vain pienmolekyylin leimaukseen sekä suunnittelun helppous. FP edellyttää kuitenkin, että fluoresoivan molekyylin pyörimisnopeus muuttuu sitoutumisen yhteydessä. Lisäksi yhdisteet, joilla on autofluoresenssia, voivat johtaa vääriin tuloksiin. Kuitenkin fluoresenssipolarisaatio on paljon käytetty menetelmä molekyylihajottajien seulontaan.³

NMR mahdollistaa kompleksin muodostukseen osallistuvien välitilojen tutkimisen. Tätä tekniikkaa voidaan käyttää monikomponenttiseoksista muodostuvien kolmiosaisten kompleksien tutkimiseen yhdellä kokeella. Vaikka NMR avulla voidaan arvioida PROTACien ja

molekyyliliimahajottajien aiheuttaman kolmiosaisen kompleksin muodostumisen tehokkuutta, se ei kuitenkaan anna arvoja termodynaamisille tai kineettisille parametreille.³

NMR-menetelmä on tehokas lähestymistapa proteiinien ja matalan affiniteetin omaavien ligandien välisten vuorovaikutuksien havaitsemiseen. NMR selvittää ligandin sitoutumisaffiniteetteja, sitoutumiskohtia, kemiallisia ympäristöjä ja reaktiotiloja. NMR on kuitenkin erittäin kallis hankkia ja ylläpitää, ja sen käyttö on haastavaa ja vaatii teknistä osaamista. Menetelmä on myös suhteellisen epätarkka ja vaatii suuria näytemääriä, jolloin monimutkaisten näytteiden analysointi vie aikaa. Lisäksi NMR soveltuu parhaiten pienten molekyyliden tutkimiseen, jolloin suurten molekyyliden tutkiminen voi olla haastavaa. Haasteista huolimatta NMR on toimiva menetelmä molekyyliliimahajottajien toiminnan tutkimiseen.²⁸

4 Molekyyliliimahajottajien ja seulontamenetelmien tulevaisuus

Molekyyliliimahajottajien ja niiden seulontamenetelmien tulevaisuus näyttää lupaavalta varsinkin, kun proteiinien kohdennettuun hajottamiseen perustuva lähestymistapa yleistyy. Tämän lähestymistavan, jossa koko proteiinin hajotetaan, vaikutukset ovat paremmat kuin aikaisemmin proteiinin toiminnan estämiseen perustuneissa lähestymistavoissa. Viimeaikaiset edistysaskeleet lääkekehityksen alalla ovat johtaneet proteiinien hajottamista aiheuttavien yhdisteiden kehittämiseen, ja osalla on jo lupaavia kliinisiä tuloksia.²⁹

Hajottajamolekyylit, erityisesti PROTACit, ovat yleensä suurempia kuin tavanomaiset pienimolekyyliset lääkkeet, joka aiheuttaa haasteita muun muassa solun läpäisevyydessä ja liukoisuudessa.²¹ Useat viimeaikaiset tutkimukset ovat osoittaneet, että PROTACien tapauksessa linkkereillä on tärkeä rooli kolmiosaisen kompleksin muodostumisessa. Siksi linkkerin suunnittelu ja optimointi ovat yksi PROTACien kehityksen painopisteistä, sillä tällä hetkellä niiden suunnittelulle ei ole olemassa yleisesti sovellettavia kehitysstrategioita.⁹ Tulevaisuudessa PROTACien kehittämiseksi olisi tärkeää uusien linkkerien löytämisen lisäksi myös useampien eri E3-ligaasien hyödyntäminen kolmiosaisen kompleksin muodostamisessa.

Molekyyliliimahajottajat ovat vielä melko uusi alue kohdennetussa proteiinien hajottamisessa ja niitä on tällä hetkellä löydetty vain sattuman kautta, joten niiden rationaaliseen kehittämiseen tulisi tulevaisuudessa panostaa. Syöpätaudit ovat kaikkien molekyyliliima luokkien aktiivisimmin tutkittu käyttökohde, mutta mahdollisuuksia on muillekin kohteille. Proteiinien hajotustekniikoiden spesifisyyden vuoksi jatkokehitys ja soveltaminen olisi suunnattava lääkkeisiin, joita tarvitaan nykyisen kysynnän mukaan.³⁰

Tulevaisuudessa tekoälyn rooli molekyyliliimahajottajien löytämisessä on merkittävä. Tekoälyn avulla on mahdollista ennustaa, sitoutuuko tietty yhdiste proteiiniin. Sen avulla voidaan verrata myös

mahdollisten kohdeproteiinien, ligandien ja linkkerien yhdistelmien sitoutumiskykyä kohteisiinsa. Tämä ennustava lähestymistapa voi myös arvioida hajottajien turvallisuutta, vähentäen siten lääkekandidaattien testaamisen kuluja sekä siihen käytettävää aikaa, sillä sellaisten yhdisteiden testaamista, joista tiedetään jo valmiiksi, että ne tulisivat olemaan vaaraksi potilaalle, ei tarvitse enää suorittaa.²⁰

Suunnittelustrategioiden puute rajoittaa molekyylihajottajien löytämisen tehokkuutta ja sovellettavuutta. Uusien laskennallisten menetelmien kehittäminen voisi olla hyödyllistä uusien hajottajien rationaalisessa suunnittelussa.²⁰ Laskennallinen mallintaminen onkin yleistymässä molekyylihajottajien suunnittelussa ja TPD:n ymmärtämisessä, mutta niiden tehokkuutta laskee tällä hetkellä vähäinen tunnettujen kolmiosaisen kompleksien määrä.³

Hajottajien tehokkuuteen liittyvässä tutkimuksessa on tällä hetkellä keskitytty lähinnä kohdeproteiinin hajoamisen seurantaan ja tämän seurauksena kolmiosaisen kompleksin perusteellinen biofysikaalinen ymmärtäminen usein puuttuu. Lisäksi nykyisin on keskitytty lähinnä PROTACien suunnitteluun, vaikka molekyyliimahajottajien rationaalisen suunnittelun kehittäminen olisi tärkeää. Uusien rakenteellisten ja biofysikaalisten tietojen saaminen molekyyliimahajottajista voi kuitenkin nopeuttaa suunnittelua.³ Edistyneiden biokemiallisten menetelmien, laskennallisten strategioiden ja solupohjaisten seulontojen yhdistäminen on tulevaisuudessa lupaava tapa molekyylihajottajien tehokkaaseen tunnistamiseen ja karakterisointiin.¹⁷

Molekyylihajottajat ovat tällä hetkellä nouseva trendi, jonka vuoksi tulevaisuudessa tullaankin keskittymään yhä enemmän hajottajien sekä niiden seulontamenetelmien kehittämiseen. Seulontamenetelmät tarvitsevat kuitenkin edelleen tutkimusta ja kehitystä kustannusten alentamiseksi ja menetelmien herkkyuden parantamiseksi. Myös menetelmien nopeutta, helppokäyttöisyyttä ja materiaalin vähäisempää kulutusta on kehitettävä, jotta niiden käyttö olisi tehokasta ja taloudellisesti kannattavaa.

5 Yhteenveto ja johtopäätökset

Molekyylihajottajat ovat keskeisessä roolissa proteiinien kohdennetussa hajottamisessa. Ne muodostavat kolmiosaisen kompleksin kohdeproteiinin ja E3-ubikitiiniligaasin kanssa, joka mahdollistaa kohdeproteiinin merkitsemisen ubikitiiniproteiinilla, ja joka täten johtaa kohdeproteiinin hajoamiseen. Kolmiosainen kompleksi on välttämätön, jotta kohdeproteiini voidaan hajottaa ubikitiini-proteasomijärjestelmän avulla.

Molekyylihajottajat, erityisesti PROTACit ja molekyyliimahajottajat tarjoavat lupaavia lähestymistapoja proteiinin kohdennettuun hajoamiseen ja mahdollistavat uusien lääkkeiden

kehityksen. Vaikka molekyylihajottajat tarjoavat etuja perinteisiin inhibiittoreihin verrattuna, niiden käytössä on monia haasteita, kuten PROTACien toksisuus ja suuresta koosta johtuva huono solunläpäisevyys sekä molekyyliimahajottajien haastava rationaalinen suunnittelu. Lisäksi PROTACien koukkuvaikutukseen tulisi kiinnittää huomiota ja ymmärtää, kuinka suuri haitta se olisi potilaalle. Tulevaisuudessa painopisteen tulisi olla näiden haasteiden ratkaisemisessa sekä uusien lähestymistapojen kehittämässä, jotta molekyylihajottajista saadaan entistä tehokkaampia ratkaisuja sairauksien hoitoon.

Vaikka *in vitro* -menetelmät tarjoavat arvokasta tietoa hajottajien toiminnasta ja kompleksien muodostumisesta, ne eivät ota huomioon solu ympäristön monimutkaisuutta ja siihen vaikuttavia tekijöitä. Käytännön sovelluksissa onkin tärkeää yhdistää erilaisia menetelmiä ja arvioida niiden tulosten yhtenäisyyttä ja sovellettavuutta solu ympäristössä tapahtuvaan toimintaan. Tämä monipuolinen lähestymistapa mahdollistaa luotettavamman ja kattavamman kuvan hajottajien toiminnasta ja niiden potentiaalista kliinisissä sovelluksissa. Seulontamenetelmien osalta tarvitaan kuitenkin jatkuvaa tutkimusta ja kehitystä kustannusten alentamiseksi, herkkyuden parantamiseksi sekä menetelmien nopeuttamiseksi ja materiaalien kulutuksen vähentämiseksi.

Lisäksi tarvitaan lisätietoa laskennallisista menetelmistä sekä molekyylihajottajien rakenteellisista ja biofysikaalisista ominaisuuksista. Alalla siirrytään sattumanvaraisista löydöksistä kohdennettuun ja tarkoitukselliseen hajottajien etsintään. Uudet seulontamenetelmät voidaan kohdistaa vaikeisiin tai muuten haastaviin kohteisiin, joissa perinteiset lähestymistavat ovat epäonnistuneet. Molekyylihajottajien kehityksessä ollaan tilanteessa, jossa teknologiset edistysaskeleet menetelmissä, biofysikaalisissa ja rakenteellisissa tutkimuksissa sekä tekoälyyn perustuvissa tietokonemallinnuksissa voivat yhdistää ymmärrystä hajottajien ominaisuuksista, jotka mahdollistavat uusia ja parannettuja proteiinien välisiä vuorovaikutuksia. Tämä avaa uusia mahdollisuuksia, jolloin molekyylihajottajista sekä niiden seulontamenetelmistä saadaan entistä tehokkaampia ja taloudellisesti kannattavampia metodeja lääkekehitykseen ja sairauksien hoitoon.

Viitteet

1. Kozicka, Z., et al. Haven't got a glue: protein surface variation for the design of molecular glue degraders, *Cell Chem. Biol.*, vol. 28 1032–1047, **2021**, <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2021.04.009>
2. Toriki, E. S., et al. Rational chemical design of molecular glue degraders, *ACS Cent Sci.*, vol. 9 915–926, **2023**, <https://doi.org/10.1021/acscentsci.2c01317>
3. Ward, J. A., et al. Biophysical and computational approaches to study ternary complexes: A ‘cooperative relationship’ to rationalize targeted protein degradation, *ChemBioChem*, vol. 24 e20230016, **2023**, <https://doi.org/10.1002/cbic.202300163>
4. Leissing, T. M., et al. Structure driven compound optimization in targeted protein degradation. *Drug Discov. Today Technol.* vol. 37 73–82, **2020**, <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2020.11.005>
5. Hughes, S. J., et al. Molecular recognition of ternary complexes: a new dimension in the structure-guided design of chemical degraders, *Essays in biochemistry*, vol. 61 505–516, **2017**, <https://doi.org/10.1042/EBC20170041>
6. Pei, H., et al. Small molecule PROTACs: an emerging technology for targeted therapy in drug discovery. *RSC Adv.* vol. 9 16967–16976, **2019**, <https://doi.org/10.1039/c9ra03423d>
7. Li, X., et al. Proteolysis-targeting chimera (PROTAC) for targeted protein degradation and cancer therapy. *J. Hematol. Oncol.* vol 13 1–14, **2020**, <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00885-3>
8. Graham, H. The mechanism of action and clinical value of PROTACs: A graphical review. *Cell. Signal.* vol. 99 110446, **2022**, <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2022.110446>
9. Cao, C., et al. Chemistries of bifunctional PROTAC degraders. *Chem. Soc. Rev.* vol. 51 7066–7114, **2022**, <https://doi.org/10.1039/d2cs00220e>
10. Kastl, J. M., et al. Small-Molecule Degraders beyond PROTACs—Challenges and Opportunities. *SLAS Discov.* vol. 26 524–533, **2021**, <https://doi.org/10.1177/247255522199110>
11. Lin, Z., et al. Methods to characterize and discover molecular degraders in cells. *Chem. Soc. Rev.* vol. 51 7115–7137, **2022**, <https://doi.org/10.1039/d2cs00261b>

12. Zhang, K. *et al.* A Novel BRD Family PROTAC Inhibitor dBET1 Exerts Great Anti-Cancer Effects by Targeting c-MYC in Acute Myeloid Leukemia Cells. *Pathol. Oncol. Res.* vol. 28 1610447, **2022**, <https://doi.org/10.3389/pore.2022.1610447>
13. Sasso, J. M. *et al.* Molecular Glues: The Adhesive Connecting Targeted Protein Degradation to the Clinic. *Biochem.* vol. 62 601–623, **2023**, <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.2c00245>
14. Peng, X. *et al.* Overview of epigenetic degraders based on PROTAC, molecular glue, and hydrophobic tagging technologies. *Acta Pharm. Sin. B.* vol. 14 533–578, **2024**, <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2023.09.003>
15. Moreau, K. *et al.* Proteolysis-targeting chimeras in drug development: A safety perspective. *Br. J. Pharmacol.* vol. 177 1709–1718, **2020**, <https://doi.org/10.1111/bph.15014>
16. Zhao, L., *et al.* Targeted protein degradation: mechanisms, strategies, and application. *Sig. Transduct. Target. Ther.* vol. 7 113, **2022**, <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00966-4>
17. Holdgate, G. A., *et al.* Screening for molecular glues – Challenges and opportunities. *SLAS Discov.* vol. 29 100136, **2023**, <https://doi.org/10.1016/j.slasd.2023.12.008>
18. Amare, G. G., *et al.* A drug repositioning success: The repositioned therapeutic applications and mechanisms of action of thalidomide. *J. Oncol. Pharm. Pract.* vol. 27 673–678, **2021**, <https://doi.org/10.1177/1078155220975825>
19. Wurz, R. P. *et al.* Affinity and cooperativity modulate ternary complex formation to drive targeted protein degradation. *Nat. Commun* vol. 14 4177, **2023**, <https://doi.org/10.1038/s41467-023-39904-5>
20. Dong, G., *et al.* Molecular Glues for Targeted Protein Degradation: From Serendipity to Rational Discovery. *J Med. Chem.* vol. 64 10606–10620, **2021**, <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c00895>
21. Mostofian, B. *et al.* Targeted Protein Degradation: Advances, Challenges, and Prospects for Computational Methods. *J. Chem. Inf. Model.* vol. 63 5408–5432, **2023**, <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.3c00603>
22. Attene-Ramos, M. S., *et al.* High throughput screening. 916–917, **2014**
23. Przytulski, K. *et al.* Comparative analysis of biophysical methods for monitoring protein proximity induction in the development of small molecule degraders. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, vol. 1867 130398, **2023**, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2023.130398>
24. Bingham, M., *et al.* Biophysical screening, and characterisation in medicinal chemistry. *Progress in Medicinal Chemistry* vol. 62 61–104, **2023**, <https://doi.org/10.1016/bs.pmch.2023.10.002>

25. Keller, S. *et al.* High-precision isothermal titration calorimetry with automated peak-shape analysis. *Anal Chem* vol. 84 5066–5073, **2012**
26. Jug, A., *et al.* Biolayer interferometry and its applications in drug discovery and development. *TrAC*, vol. 176 117741, **2024**, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2024.117741>
27. Heuvel, J. P. V. Receptor Theory and the Ligand–Macromolecule Complex. in *Comprehensive Toxicology: 2nd edition*, vol. 2-14 27–50 (Elsevier, **2010**). <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00203-7>
28. Chen, P., *et al.* Review of the impact of fragment-based drug design on PROTAC degrader discovery. *TrAC*, vol. 171 117539, **2024**, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2024.117539>
29. Békés, M., *et al.* PROTAC targeted protein degraders: the past is prologue. *Nat. Rev. Drug Discov.* vol. 21 181–200, **2022**, <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00371-6>
30. Yang, N. *et al.* Recent advances in targeted protein degraders as potential therapeutic agents. *Mol. Divers.* vol. 28 309–333, **2024**, <https://doi.org/10.1007/s11030-023-10606-w>