

TARČNA RAZGRADNJA PROTEINOV Z UPORABO HIMERNIH MOLEKUL

UTILIZING PROTEOLYSIS- TARGETING CHIMERAS FOR TARGETED PROTEIN DEGRADATION

AVTORJI / AUTHORS:

asist. Aleša Bricelj, mag. farm.
prof. dr. Marko Anderluh, mag. farm.
doc. dr. Izidor Sosič, mag. farm.

*Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,
Aškerčeva cesta 7, 1000 Ljubljana*

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:
E-mail: izidor.sosic@ffa.uni-lj.si

1 UBIKVITIN-PROTEASOMSKI SISTEM

Za vzdrževanje homeostaze so celice razvile dinamičen sistem samouravnavaanja, s pomočjo katerega se prilagajajo

POVZETEK

V zadnjih letih se je razvoj himernih molekul, ki izkoriščajo ubikvitin-proteasomski sistem za proteolitično razgradnjo tarčnih proteinov, izkazal za izjemno obetaven pristop v farmacevtski kemiji. Tovrstne himerne razgrajevalce imenujemo molekule PROTAC (*proteolysis-targeting chimeras*), sestavljeni pa so iz treh delov: liganda za izbrano ubikvitin ligazo E3, ustreznega distančnika oz. vmesnika in liganda, ki se veže na tarčni protein. Zaradi svojega mehanizma delovanja lahko te molekule v nizkih koncentracijah in z visoko selektivnostjo dosežejo razgradnjo tarčnega proteina. Tovrsten farmakološki pristop se je že izkazal za boljšo alternativo klasičnemu farmakološkemu modelu zasedenosti receptorjev ali encimov predvsem pri patoloških stanjih, pri katerih se pogosto razvije odpornost na klasične zaviralce proteinov, bodisi zaradi kompenzatornega povečanja izražanja ali mutacije tarčnega proteina.

KLJUČNE BESEDE:

himerni razgrajevalci, ligaze E3, proteasom, razgradnja proteinov

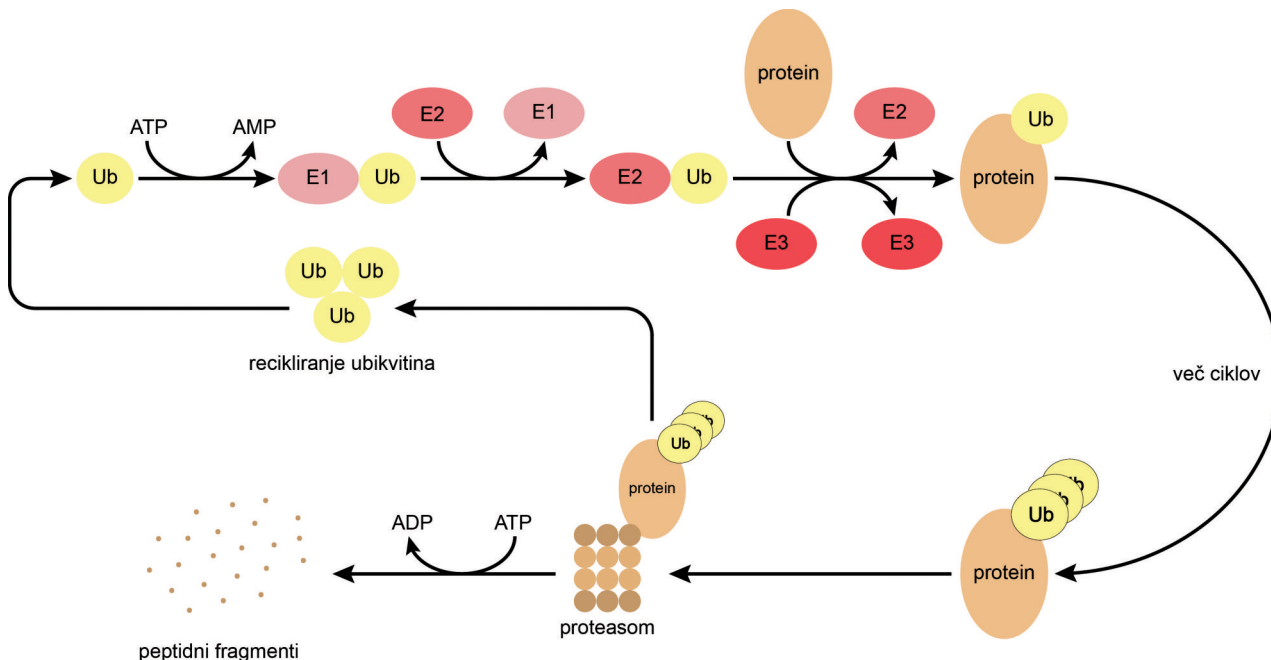
ABSTRACT

A novel approach using chimeric molecules that utilise the ubiquitin-proteasome system to induce proteolytic degradation of targeted proteins has been discovered recently. These bifunctional compounds are termed proteolysis-targeting chimeras or PROTACs and are comprised of three elements: a ligand for the E3 ligase, a ligand binding to the protein of interest and a linker connecting the two. The mechanism of action allows PROTACs to induce the degradation of a targeted protein in low concentrations and with high selectivity. This event-driven pharmacological approach represents a better alternative to the occupancy-driven strategy, particularly in diseases, in which resistance to classical protein inhibitors or their compensatory over-expression often develop.

KEY WORDS:

proteolysis-targeting chimeras, E3 ligases, proteasome, protein degradation

na spremembe okolja in preprečujejo okvare. Kakovost proteinov med drugim uravnava sistem ubikvitin-protea-



Slika 1: Razgradnja proteinov preko poti ubikvitin-proteasom (2).

Figure 1: The ubiquitin-proteasome system's involvement in protein degradation (2).

som, preko katerega v največjem obsegu poteka odstranjevanje poškodovanih, nefunkcionalnih in odsluženih znotrajceličnih proteinov. Veliki cilindrični proteinski kompleksi, imenovani proteasomi, so zadolženi za razgradnjo z ubikvitinom kovalentno označenih proteinov. Pripenjanje 76 aminokislin dolgih ubikvitinskih oznak poteka v treh stopnjah (slika 1):

1. encim E1 tvori tioestersko vez z ubikvitinom,
2. konjugacija z encimom E2, ki katalizira prenos ubikvitina z E1 na aktivno mesto E2 s trans(tio)esterifikacijo,
3. ubikvitin ligaza E3 tvori izopeptidno vez med C-terminalnim glicinom ubikvitina in lizinom tarčnega proteina.

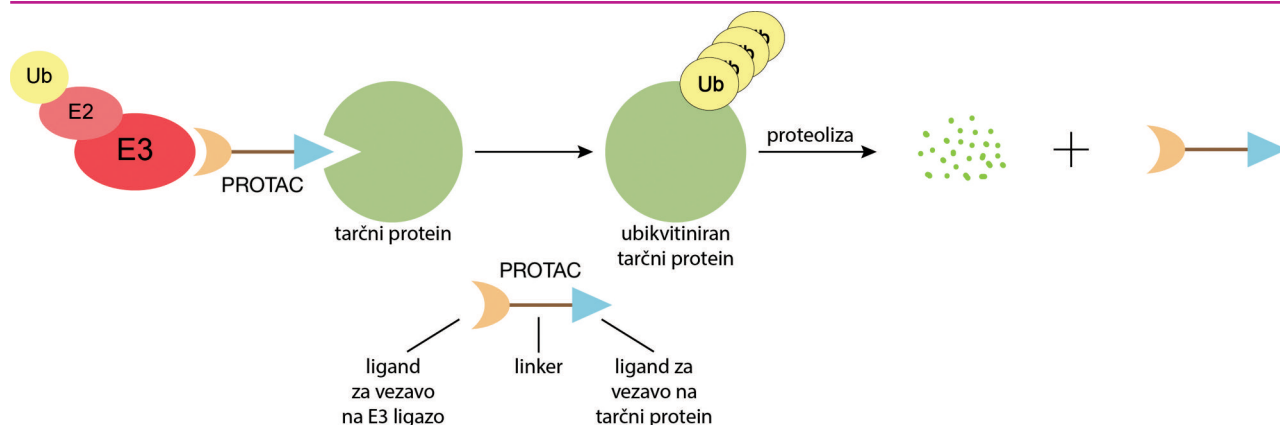
Zadnji korak se lahko večkrat ponovi, tako da nastane poliubikvitinska veriga (več zaporedno vezanih ubikvitinskih enot preko lizinskih ostankov predhodno vezanih ubikvitinov) na ϵ -amino stranski skupini lizina tarčnega proteina. Proteasom tako označene proteine prepozna in jih proteolitično razgradi na manjše fragmente (1, 2). Humani genom kodira za dva encima E1 in za okoli 50 encimov E2, medtem ko poznamo več kot 600 različnih ubikvitin ligaz E3. Slednje narekujejo tudi substratno specifičnost ter tako odločilno vplivajo na prepoznavanje ustreznih tarčnih proteinov (1).

2 MOLEKULE PROTAC: SESTAVA IN MEHANIZEM DELOVANJA

Bifunkcionalne molekule, ki za svoje farmakološko delovanje izkoriščajo ubikvitin-proteasomski sistem, so t. i. himerne molekule, ki povzročajo razgradnjo tarčnega proteina (PROTACs, proteolysis-targeting chimeras¹). Vsaka molekula PROTAC je sestavljena iz treh delov: liganda za izbrano ubikvitin ligazo E3, ustreznega distančnika oz. vmesnika in liganda, ki se veže na tarčni protein (slika 2). Učinkovita molekula PROTAC je sposobna namestiti tarčni protein na ustrezni razdalji in v pravilni orientaciji glede na ligazo E3, da lahko potečeta njegova ubikvitinacija in nadaljnja razgradnja s proteasomom (3).

3 PREDNOSTI STRATEGIJE PROTAC

Tako dedne kot tudi pridobljene bolezni so pogosto posledica abnormalnega delovanja proteinov (npr. ko pride do



Slika 2: Princip delovanja molekul PROTAC (4).

Figure 2: PROTAC-mediated protein degradation (4).

njihovega prekomernega izražanja). Tradicionalen pristop načrtovanja učinkovin se v večji meri poslužuje uporabe klasičnih zaviralcev, ki delujejo po principu farmakološkega modela zasedenosti (*occupancy-driven model*). Za zadosten farmakološki učinek tovrstni zaviralci zahtevajo konstantno vzdrževanje visokih lokalnih koncentracij učinkovine, visoki odmerki pa pogosto vodijo v pojavnost učinkov na netarčne makromolekule (*off-target effects*). Spojine PROTAC delujejo po alternativnem pristopu, in sicer po farmakološkemu modelu dogodka (*event-driven model*), pri katerem se delovanje patoloških proteinov obvladuje z zniževanjem njihove koncentracije (5).

Mehanizem delovanja spojin PROTAC ima številne prednosti, in sicer je ena izmed bistvenih predvsem ta, da se po ubikvitinaciji tarče molekula PROTAC sprosti z obeh vezavnih mest in je zmožna cikla svojega delovanja večkrat ponoviti. Na ta način deluje kot katalizator in je sposobna tudi v substehiometričnih količinah doseči skoraj popolno razgradnjo tarčnega proteina. Ko se ta začne ponovno izražati, mora PROTAC razgraditi le majhno število novonastalih proteinov. Tudi po neizogibnem metabolizmu spojine PROTAC se bo njen učinek obdržal tako dolgo, dokler celice ne sintetizirajo patološko relevantnih količin proteina. V teoriji bi tako za doseganje farmakološkega učinka potrebovali mnogo nižje odmerke zdravilne učinkovine v primerjavi s klasičnimi nizkomolekularnimi učinkovinami (3). Spojine PROTAC lahko ustrezno učinkovitost dosežejo tudi ob majhni zasedenosti tarče, zato je mogoče pri načrtovanju uporabiti ligande z nižjo afiniteto, ki bi jih sicer opustili v razvoju klasičnih nizkomolekularnih učinkovin. Ker moramo želeno tarčo le pripeljati do ligaze E3, se lahko ligand veže na kateri koli del proteina in ne nujno na mesto, ki bo zaviralo njegovo delovanje. Pristop je zato uporaben za

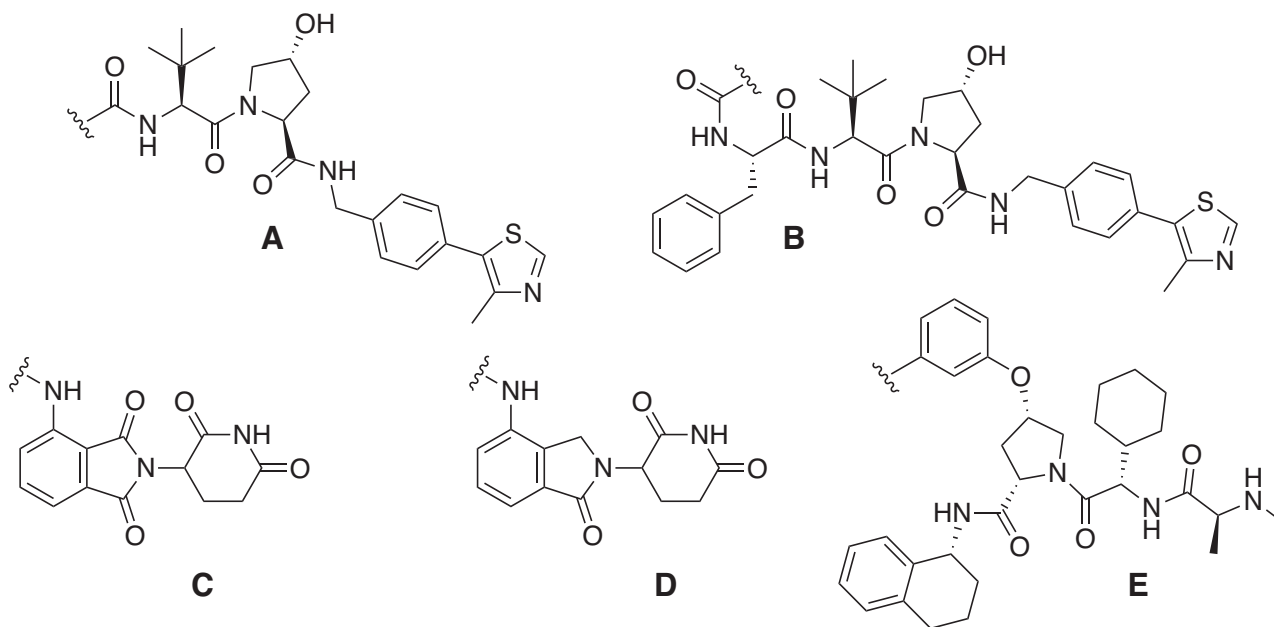
del proteoma, kjer aktivno mesto makromolekul ni ustrezno definirano ali pa je težko načrtovati molekule, ki bi se nanje vezale z visoko afiniteto, na primer transkripcijski faktorji in ogrodni proteini (3).

Zaradi možnosti vezave liganda na kateri koli del proteina si lahko pri načrtovanju spojin izberemo tako mesto, ki se pojavlja le na izbrani tarči, ne pa tudi na sorodnih proteinih. Učinkovitost spojin PROTAC je odvisna od interakcij protein-protein med ligazo E3 in tarčnim proteinom, te pa večinoma narekujejo aminokislinski ostanki na površini proteina, zato lahko molekula PROTAC deluje z večjo selektivnostjo med sorodnimi proteini kot klasične nizkomolekularne učinkovine. Številne raziskave so pokazale, da selektivnost razgradnje celo presega selektivnost vezave izbranega proteinskega liganda, tako da netarčna vezava molekule PROTAC ne povzroči nujno tudi razgradnje vezanega proteina. Ta dodaten nivo specifičnosti lahko uravnavamo tudi z izbiro ligaze E3 in distančnika (3).

Pristop tarčne razgradnje proteinov obeta možnost izogibanja fiziološkim kompenzacijskim mehanizmom, pri katerih pride do pojava pridobljene odpornosti ob redni uporabi zaviralcev patogenih proteinov, bodisi preko prekomernega izražanja tarčnega proteina ali pa njegove mutacije (6).

4 LIGAZE E3 IN LIGANDI ZANJE

Humani genom kodira za več kot 600 različnih ligaz E3, vendar so do sedaj s spojinami PROTAC ciljali le peščico



Slika 3: Kemijske strukture ligandov za VHL-1 (A) in VHL-2 (B) (9), cereblon (pomalidomid (C) in lenalidomid (D)) in IAP (angl. 'inhibitor of apoptosis'; apoptozo zavirajoči protein) (E) (3).

Figure 3: Chemical structures of ligands for VHL-1 (A) and VHL-2 (B) (9), cereblon (pomalidomide (C) and lenalidomide (D)) and IAP (E) (3).

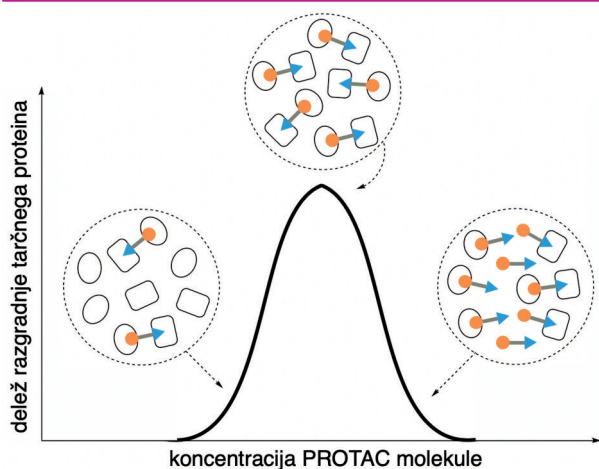
teh encimov. Obstaja velika verjetnost, da je na voljo veliko alternativnih, še neraziskanih ligaz E3, ki delujejo mnogo bolje od že raziskanih (7). Najpogosteje izkoriščeni ligazi E3 sta von Hippel-Lindau (VHL) in cereblon, saj sta oba sposobna ubikvitinirati citosolne, membranske ter jedrne proteine in omogočata izkoriščanje te metodologije pri širokem naboru potencialnih tarč, poleg tega pa so zanju specifični ligandi v literaturi dobro opisani (slika 3) (8).

Cereblon je primarna tarča imunomodulatornih učinkovin iz skupine imidov, kot so talidomid, lenalidomid in pomalidomid. Njihova vezava ojača interakcijo med cereblonom in dvema limfoidnima transkripcijskima faktorjema, IKZF1 (Ikaros) in IKZF3 (Aiolos), kar vodi v njuno ubikvitinacijo in razgradnjo. Omenjena interakcija ponuja možnost posrednega vrednotenja prehajanja molekul PROTAC skozi celično membrano in vezave na cereblon preko razgradnje IKZF1 in IKZF3 (8, 10).

Pri načrtovanju molekul PROTAC ne smemo spregledati dejstva, da v nekaterih primerih ni sočasne ekspresije ligaze E3 in tarčnega proteina v istem tkivu, kar lahko raziskovalcem predstavlja pomembno oviro in izziv. Upoštevati je potrebno tudi značilnosti uporabljenih ligandov za ligazo E3: njihovo metabolno stabilnost, fizikalno-kemijske lastnosti (v primeru, da je ligand za tarčni protein

zelo lipofilan, lahko hidrofilan ligand za cereblon uravnovesi lastnosti končne molekule PROTAC), varnostni profil, tkivno in tumorsko specifičnost ter morebitne vplive na neosubstrate, tj. makromolekule, ki lahko postanejo tarča ligaze E3 po tem, ko se nanjo veže kakršenkoli ligand (11, 12).

Čas zasedanja in afiniteta vezave obeh ligandov do ligaze E3 ter tarčnega proteina imata pomemben vpliv na razgradnjo. Ob zelo močni afiniteti in posledični vezavi s počasno disociacijo lahko pride do zmanjšanja učinkovitosti, saj spojina PROTAC ne more delovati katalitično. Nasprotno ob prekratnem času vezave in nizki afiniteti vezave ligaza E3 nima dovolj časa, da bi katalizirala prenos ubikvitina na tarčni protein (3). Kot pri ostalih trikomponentnih sistemih pa lahko tudi pri spojinah PROTAC pride do pojave t. i. Hookovega efekta, ki je oblika negativne interference. Pri koncentracijah spojine PROTAC, ki bistveno presegajo koncentracijo, pri kateri je dosežena 50-odstotna razgradnja tarče (DC_{50}), pride do avtoinhibicije tvorbe kompleksov ligaza E3-PROTAC-tarčni protein zaradi povečanih nivojev binarnih kompleksov PROTAC-ligaza E3 in PROTAC-tarčni protein (slika 4). Posledica tega je, da se z naraščajočo koncentracijo spojine PROTAC količina stabilnih ternarnih kompleksov zmanjšuje, namesto da bi se povečevala (4).



Slika 4: Pojavnost Hookovega efekta v odvisnosti od koncentracije PROTAC spojine in posledičen vpliv na delež razgradnje tarčnega proteina (4).

Figure 4: A high concentration of PROTAC results in a Hook effect, where the formation of ternary complexes is precluded, thus reducing the degradation of the target protein (4).

5 IZBIRA VMESNIKA

Premišljena izbira distančnika oz. vmesnika je eden izmed najpomembnejših aspektov načrtovanja himernih molekul in lahko pomeni razliko med zelo dobro ali neuporabno spojino PROTAC. Poleg njegove dolžine in sestave sta odločilna tudi mesto in način vezave na oba liganda (12). Sterične omejitve so eden izmed glavnih dejavnikov, ki preprečijo razgradnjo tarče. Stabilni ternarni kompleksi ligaza E3-PROTAC-tarča so odvisni od ugodnih interakcij protein-protein, te pa dosežemo le z idealno orientacijo ligaze E3 napram tarčnemu proteinu, ki jo omogočajo ustrezni distančniki. Crews in sodelavci so ob testiranju selektivnih razgrajevalcev androgenih receptorjev opazili 50-odstotni padec razgradnje receptorja ob podaljšanju pegiliranega distančnika z 8 na 13 ogljikovih atomov, kar dokazuje, da struktura in dolžina distančnika narekujeta aktivnost končne molekule (13). Pri seriji spojin PROTAC, ki so bile sestavljene iz identičnega liganda za tarčni protein in distančnika ter so se razlikovale le v afiniteti liganda do ligaze E3 VHL, so ugotovili, da je ustrezen distančnik vseeno omogočil tvorbo ugodnih interakcij protein-protein, ki so lahko kompenzirale zmanjšano afiniteto do ligaze E3 in povzročile tvorbo ternarnih kompleksov z zadostno stabilnostjo za potek ubiquitinacije (8).

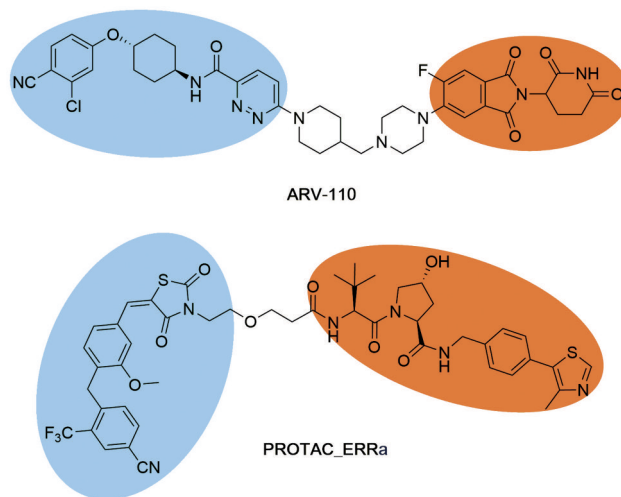
Poleg vpliva na moč in selektivnost delovanja imajo strukturne značilnosti distančnika vpliv tudi na fizikalno-kemijske lastnosti celotne molekule ter posledično na njeno celično permeabilnost, vodotopnost, metabolno stabilnost in porazdeljevanje. Racionalno načrtovanje trenutno še ni mogoče, saj pravil za izbiro distančnikov, ki bi zagotovili optimalno orientacijo, še ni na voljo (3).

6 FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI SPOJIN PROTAC

Z vidika fizikalno-kemijskih lastnosti je očitno, da himerne molekule krepko presegajo pravila po Lipinskem, ki za doseganje peroralne aplikacije preferirajo spojine z molekulska maso med okoli 300 in 500 Da. V splošnem se molska masa molekul PROTAC giblje med 700 in 1000 Da in več, zaradi česar bi pričakovali manjšo verjetnost peroralne aplikacije ter vprašljive metabolno stabilnost, vodotopnost in sposobnost prehajanja bioloških membran (14). Kljub temu veliko avtorjev opisuje uspešno prehajanje teh spojin v celice, zelo spodbudna so tudi objavljena testiranja na miših, podganah, prašičih Bama in opicah rezus *in vivo*, pri katerih so razgradnjo preiskovanega proteina FKBP12 po peroralni aplikaciji dosegli v večini organov in tkiv, razen v možganih, kjer je bilo za učinek potrebno molekulo injicirati intracerebroventrikularno (15).

7 RAZVOJ IN PERSPEKTIVNOST TARČNE RAZGRADNJE S SPOJINAMI PROTAC

Področje se je začelo razvijati leta 2001, ko so Sakamoto, Crews in Deshaies s sodelavci opisali prvi primer, pri katerem so izkoristili aktivnost ligaze E3 za razgradnjo metionin aminopeptidaze 2, katere funkcija je med drugim spodbujanje angiogeneze pri nekaterih vrstah raka (16). Do sedaj so molekule PROTAC opisali že na več kot 30 proteinskih tarčah, ki so kritične za razvoj bolezni, med katere spadajo jedrni receptorji (estrogenski in androgenski receptorji (slika 5), receptorji retinojske kisline), protein kinaze (anaplastična limfomna kinaza, Brutonova tirozin kinaza, protein kinaza B), regulatorji transkripcije (BRD4, sirtuin 2, histon deacetilaza 6), regulatorni proteini (celični vezavni protein za retinojsko kislino I/II, estrogenu soroden



Slika 5: Primera struktur delujočih spojin PROTAC. ARV-110 povzroči s cereblonom inducirano razgradnjo androgenega receptorja, PROTAC_ERRa pa preko VHL ligaze E3 povzroči razgradnjo receptorja ERRa. Liganda za vezavo na tarčni protein sta obarvana z modro, liganda za izbrano ligazo E3 pa z oranžno barvo (18, 19).

Figure 5: Examples of active PROTACs. ARV-110 induces the degradation of the androgen receptor by hijacking cereblon for its E3 ligase activity, while PROTAC_ERRa causes the degradation of the estrogen-related receptor alpha by recruiting VHL. Ligands, binding to the protein of interest, are marked in blue, whereas the ligands for E3 ligase are coloured orange (18, 19).

receptor α), proteini, ki so povezani z nevrodegenerativnimi boleznimi (Huntingtin, Tau, alfa sinuklein), fuzijski proteini in mnogi drugi (17). Strnjen pregled relevantnih molekul PROTAC skupaj z njihovo potencialno uporabo je predstavljen v referenci 18.

Ugodni rezultati testiranj in vivo so potisnili metodologijo PROTAC v središče pozornosti razvoja novih zdravilnih učinkovin. Trenutno vodilno biotehnoško podjetje na tem področju, Arvinas, je v začetku leta 2019 omogočilo začetek prve faze kliničnih testiranj z molekulo PROTAC ARV-110 (slika 5) za razgradnjo androgenskih receptorjev pri metastatskem, na kastracijo odpornem raku prostate, kasneje istega leta pa so v prvo fazo kliničnih preizkušanj vpejali še molekulo PROTAC ARV-471 za razgradnjo estrogenskih receptorjev pri raku dojke (20). Zaenkrat dostopni podatki o klinični varnosti in farmakokinetiki za obe testirani spojini kažejo, da so pacienti učinkovini dobro prenašali in sta primerni za nadaljnji razvoj zdravil (21).

8 SKLEP

Tarčna razgradnja proteinov z uporabo molekul PROTAC predstavlja izjemno obetaven pristop na področju načrto-

vanja novih učinkovin, predvsem zaradi katalitičnega mehanizma delovanja in možnosti doseganja visoke selektivnosti razgradnje zelene tarče. Metoda ima velik potencial tudi v terapiji bolezni, katerih patogeneza vključuje proteine in encime, ki jih težko ciljamo in zaviramo s klasičnimi nizkomolekularnimi zaviralci, ter v primerih, kjer je ob uporabi nizkomolekularnih učinkovin prišlo do razvoja neodzivnosti, kar se pogosto pojavi pri številnih rakavih obolenjih.

9 LITERATURA

1. Pohl C, Dikic I. Cellular quality control by the ubiquitin-proteasome system and autophagy. *Science*. 2019 Nov 15;366(6467):818-22.
2. Eldridge AG, O'Brien T. Therapeutic strategies within the ubiquitin proteasome system. *Cell Death Differ*. 2010 Jan;17(1):4-13.
3. Scheepstra M, Hekking KFW, van Hijfte L, Folmer RHA. Bivalent Ligands for Protein Degradation in Drug Discovery. *Comput Struct Biotechnol J*. 2019;17:160-76.
4. An S, Fu L. Small-molecule PROTACs: An emerging and promising approach for the development of targeted therapy drugs. *EBioMedicine*. 2018 Oct;36:553-62.
5. Cromm PM, Crews CM. Targeted Protein Degradation: from Chemical Biology to Drug Discovery. *Cell Chem Biol*. 2017 Sep;24(9):1181-90.

6. Wang P, Zhou J. Proteolysis Targeting Chimera (PROTAC): A Paradigm-Shifting Approach in Small Molecule Drug Discovery. *Curr Top Med Chem*. 2018 Nov 26;18(16):1354-6.
7. Chamberlain PP, Hamann LG. Development of targeted protein degradation therapeutics. *Nat Chem Biol*. 2019 Oct;15(10):937-44.
8. Bondeson DP, Smith BE, Burslem GM, Buhimschi AD, Hines J, Jaime-Figueroa S, et al. Lessons in PROTAC Design from Selective Degradation with a Promiscuous Warhead. *Cell Chem Biol*. 2018 Jan;25(1):78-87.e5.
9. Zengerle M, Chan K-H, Ciulli A. Selective Small Molecule Induced Degradation of the BET Bromodomain Protein BRD4. *ACS Chem Biol*. 2015 Aug 21;10(8):1770-7.
10. Krönke J, Fink EC, Hollenbach PW, MacBeth KJ, Hurst SN, Udeshi ND, et al. Lenalidomide induces ubiquitination and degradation of CK1 α in del(5q) MDS. *Nature*. 2015 Jul;523(7559):183-8.
11. Moon S, Lee B-H. Chemically Induced Cellular Proteolysis: An Emerging Therapeutic Strategy for Undruggable Targets. *Mol Cells [Internet]*. 2018 Nov 30 [cited 2020 Mar 17];41(11). Available from: <https://doi.org/10.14348/MOLCELLS.2018.0372>
12. Churcher I. Protac-Induced Protein Degradation in Drug Discovery: Breaking the Rules or Just Making New Ones? *J Med Chem*. 2018 Jan 25;61(2):444-52.
13. Toure M, Crews CM. Small-Molecule PROTACS: New Approaches to Protein Degradation. *Angew Chem Int Ed*. 2016 Feb 5;55(6):1966-73.
14. Neklesa TK, Winkler JD, Crews CM. Targeted protein degradation by PROTACs. *Pharmacol Ther*. 2017 Jun;174:138-44.
15. Guo J, Liu J, Wei W. Degrading proteins in animals: "PROTAC"tion goes in vivo. *Cell Res*. 2019 Mar;29(3):179-80.
16. Sakamoto KM, Kim KB, Kumagai A, Mercurio F, Crews CM, Deshaies RJ. Protacs: Chimeric molecules that target proteins to the Skp1-Cullin-F box complex for ubiquitination and degradation. *Proc Natl Acad Sci*. 2001 Jul 17;98(15):8554-9.
17. Zou Y, Ma D, Wang Y. The PROTAC technology in drug development: The PROTAC technology in drug development. *Cell Biochem Funct*. 2019 Jan;37(1):21-30.
18. Sun X, Gao H, Yang Y, He M, Wu Y, Song Y, et al. PROTACs: great opportunities for academia and industry. *Signal Transduct Target Ther*. 2019 Dec;4(1):64.
19. Halford B. Arvinas unveils PROTAC structures. *Chemical & Engineering News* 2021 Apr;99(14)
20. Protein-slaying drugs could be the next blockbuster therapies [Internet]. *Nature: news feature*; 2019 [updated 2019 March 20; cited 2020 Mar 17]. Available from: <https://www.nature.com/articles/d41586-019-00879-3#ref-CR4>
21. Arvinas Reports Fourth Quarter and Full Year 2019 Financial Results and Provides Corporate Update [Internet]. Arvinas: press release; [updated 2019 March 16; cited 2020 Mar 20]. Available from: <https://ir.arvinas.com/news-releases/news-release-details/arvinas-reports-fourth-quarter-and-full-year-2019-financial>