

· 综 述 ·

蛋白降解靶向嵌合体 (PROTAC) 药物的非临床评价策略分析

韩俊源^{1*}, 李亚娟^{1*}, 王海学², 王全军¹

(1. 军事科学院军事医学研究院毒物药物研究所, 抗毒物药物与毒理学国家重点实验室, 国家北京药物安全评价研究中心, 北京 100850; 2. 国家药品监督管理局药品审评中心, 北京 100022)

摘要: 蛋白降解靶向嵌合体 (PROTAC) 将靶向蛋白募集到 E3 泛素连接酶进行泛素化标记, 然后通过泛素-蛋白酶体途径将其降解, 从而将过表达和突变的致病蛋白清除。本文基于已有的文献报道, 总结 PROTAC 药物研发进展, 针对其存在的相对分子质量较大、生物利用度低、稳定性和血管穿透能力差等问题提出应对策略, 并从药理药效、代谢和安全性评价等方面对该类药物的非临床评价研究需要考虑的问题进行分析, 为制定 PROTAC 药物非临床评价研究方案提供参考。

关键词: 蛋白降解靶向嵌合体 (PROTAC); 非临床评价

中图分类号: R965

文献标志码: A

文章编号: 1000-3002-(2021)01-0065-07

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2021.01.009

蛋白降解靶向嵌合体 (proteolysis-targeting chimeras, PROTAC) 是将靶向蛋白募集到 E3 泛素连接酶进行泛素化标记, 然后通过泛素-蛋白酶体途径将其降解的新型药物分子。PROTAC 分子的发展经历了从第一代基于多肽片段的 PROTAC 设计到 2008 年开始的第二代小分子 PROTAC 设计^[1]。降解的靶蛋白从最早的甲硫氨酰氨肽酶、雄激素受体和细胞视黄酸结合蛋白等^[2-3]发展到最近的雌激素受体、tau 微管相关蛋白和激酶类等^[4-6]。目前涉及的疾病包括癌症、类风湿和神经退行性疾病等^[6-7]。基于其作用机制, PROTAC 在消除转录因子和非酶蛋白质等未成药蛋白靶标方面具有巨大潜力。然而, PROTAC 药物对正常功能性蛋白的非选择性降解及其稳定性和血管穿透能力差等, 决定了其非临床评价研究不容忽视。目前对于 PROTAC 药物的研究, 重点在于强调药物设计和作用机制, 对其非临床评价研究的报道很少。PROTAC 药物的研发的关注点之一就是药物的安全性问题。做好非临

床安全性评价, 有助于更全面地预测临床安全性, 更好地推动其进入临床研究, 最终用于人体疾病治疗。本文对 PROTAC 药物的发展历程以及其优缺点进行概述, 重点对 PROTAC 药物的非临床评价策略进行详细分析, 以期对 PROTAC 药物的研发提供参考。

1 PROTAC 药物研发概况

2004 年诺贝尔化学奖授予了以色列科学家 Aaron Ciechanover, Avram Hershko 和美国科学家 Irwin Rose, 以表彰他们共同发现了细胞是如何摧毁有害蛋白质的, 即泛素调节的蛋白质降解过程。利用泛素调节蛋白质降解这一机制, Crews 和 Deshaies 课题组在 2001 年最早提出了 PROTAC 这个概念^[8]。最初, PROTAC 只是被作为一种学术活动或如 CREWS 所说是一种“可爱的化学珍品”。之后, 经过将近 20 年的发展, PROTAC 被认为是一种新的药物发现模式并可能会成为重磅炸弹疗法^[9]。PROTAC 是一种异双功能小分子, 由 3 部分构成, 中间的连接体 (linker) 一端连接目标蛋白的抑制剂 (结合靶蛋白的配体), 另一端连接 E3 泛素连接酶的结合配体分子^[10-11]。PROTAC 将靶向蛋白募集到 E3 泛素连接酶进行泛素化标记, 然后通过泛素-蛋白酶体途径将其降解。泛素-蛋白酶体系统的正常生理功能是清除细胞中变性、突变或有害的蛋白质^[12]。PROTAC 是一种全新的药物设计策略, 通过设计这样的三联体药物, 理论上可以将任何过表达和突变的致病蛋白清除, 从而治疗疾病。

基金项目: 国家科技重大专项 (2018ZX09711003-007); 国家科技重大专项 (2018ZX09721003-001-005); 国家科技重大专项 (2018ZX09201017-003)

作者简介: 韩俊源, 博士研究生, 主要从事毒理学与药物非临床安全性评价研究; 李亚娟, 硕士, 助理实验师, 主要从事毒理学与药物非临床安全性评价研究。

通讯作者: 王全军, E-mail: wangquanjunbeijing@163.com;

王海学, E-mail: wanghx@cde.org.cn

*共同第一作者。

2001 年, Crews 和 Deshaies 课题组利用与泛素连接酶 E3 体系 S 期激酶相关蛋白 1-cullin-F 盒蛋白[S-phase kinase-associated protein 1 (Skp1)-cullin-F-box protein, SCF]结合的 10 肽, 加上甲硫氨酰氨肽酶 2 (methionine aminopeptidase 2, MetAP2) 的共价抑制剂 ovalicin (天然产物), 设计并合成了首个用于降解 MetAP2 的 PROTAC-1^[8]。蛋白试验验证了 PROTAC-1 可快速降解 MetAP2, 但由于使用的 10 肽上有磷酸化的丝氨酸, 导致 PROTAC 分子无法透过细胞膜。为解决这个问题, 研究者发现一个 7 肽 ALAPYIP 链接上一个 D-精氨酸多聚体, 可以使 PROTAC 成功透过细胞膜, 且不被非特异性蛋白酶水解^[13]。在这个 PROTAC 分子中, 用 ALAPYIP 取代抑制性核因子 κ B α (inhibitor kappa B alpha, I κ B α)-磷酸肽组分, 是一个人工配体共轭 AP21998 靶标 (F36V)FKBP12 蛋白质。这种能透过细胞膜的 PROTAC 已被证明可以在细胞中破坏其靶蛋白。在稳定表达增强型绿色荧光蛋白-(F36V)FKBP12 的 HeLa 细胞中, 加入 PROTAC 靶向的 (F36V)FKBP12, 观察到绿色荧光减弱。Western 印迹法也证实, PROTAC 导致 (F36V)FKBP12 发生降解。细胞渗透 PROTAC 的发展, 为靶向体内致病蛋白提供了可能, 在细胞生物学特别是药物开发中的应用展现出前景。2008 年以前的 PROTAC 均使用了多肽, 虽然已经可透过细胞膜, 但多肽 PROTAC 本身相对分子质量较大且肽键不稳定, 导致合成、纯化和稳定性方面的诸多问题。为克服这一系列问题, 研究者采用“全小分子”的 PROTAC 设计。全小分子 PROTAC 通过小分子配体去募集目标蛋白和 E3 泛素连接酶, 快速靶向降解蛋白, 有更好的细胞渗透性。苺林环连接酶 (culin-ring ligase, CRL) E3 泛素连接酶复合物 [如鼠双微体蛋白 2 (murine double minute 2, MDM2)、细胞凋亡抑制蛋白 1 (cellular inhibitor of apoptosis protein 1, cIAP1)、重组小脑蛋白和 VHL] 和与一些 E3 泛素连接酶或基质受体蛋白结合的多种小分子已用于 PROTAC 开发。

以磷酸化酪氨酸结构域 (phosphorylated tyrosine binding, PTB) 或非受体酪氨酸激酶同源结构域 (Src homology 2, SH2) 的招募蛋白为降解靶标, 可使酪氨酸激酶信号通路失活, 从而抑制肿瘤细胞增殖。基于这一理念, 有研究者开发了一种磷酸化依赖的 PROTAC (phosphoPROTAC)^[14]。phosphoPROTAC 通过靶向下效应蛋白降解, 从而使受体酪氨酸激酶信号通路激活, 而对正常细胞的毒性非常低, 因为它通常只抑制发生在癌细胞中的受

体酪氨酸激酶信号的激活。依靠酪氨酸激酶相互结合, 磷酸化多肽 PROTAC 可降解不同信号转导途径的靶蛋白, 在“无成药性”(undruggable) 靶蛋白的药物设计领域有所突破。另外, HEIGHTMAN 小组^[15]开发了一种名为 CLIPTAC 的先进 PROTAC 技术。CLIPTACS 是由 2 个小前体分子在细胞内组装成的 PROTAC, 该技术实际上是基于重组小脑蛋白的 PROTAC, 由四苯标记的沙利多米德衍生物 (Tz-thalidomide) 的快速反应形成, 在细胞中具有跨环八烯标记的配体。此 CLIPTAC 可以同时招募靶蛋白和 E3 连接酶重组小脑蛋白, 促进目标蛋白的蛋白酶体降解。2 个独立的小前体分子能够自组装, 在细胞中形成功能性 PROTAC, 因为其相对分子质量更小而具有更好的渗透性。

2013 年, Crews 创立了生物技术初创公司 ARVINAS, 为临床应用开发 PROTAC 技术。2017 年, ARVINAS 选择了用于治疗前列腺癌的雄激素受体 PROTAC 和乳腺癌的雌激素受体 PROTAC 作为首批临床试验候选药物^[16-17]。ARV-110 是 ARVINAS 临床评估的第一个 PROTAC 蛋白降解剂。目前, 在转移性抗性前列腺癌患者中, ARV-110 已经完成第一阶段的临床试验。结果显示, 35, 70 和 140 mg 剂量组耐受均良好, 无剂量限制毒性, 也未观察到 2, 3 或 4 级相关不良事件^[18]。

2 PROTAC 药物研发特点

2.1 PROTAC 药物优势

目前, 小分子抑制剂是靶向细胞内蛋白的主要治疗手段。然而小分子抑制剂有比较明显的局限性, 其靶蛋白通常是具有囊泡或者活性位点的酶和受体, 这就导致占人类蛋白组活性位点约 75% 的转录因子、支架蛋白和非酶蛋白在小分子抑制剂中无成药性^[19]。此外, 小分子抑制剂持续的高全身药物水平来维持足够的细胞内药物浓度达到治疗效果, 这往往会使小分子抑制剂由于其竞争的特性导致脱靶效应和不良反应。这些限制严重阻碍了小分子抑制剂的开发和临床使用。

PROTAC 是一种利用蛋白酶水解靶向复合体的蛋白质降解策略。将目标蛋白质募集到 E3 泛素连接酶进行泛素化标记, 然后由蛋白酶体介导降解。泛素-蛋白酶体系统的正常生理功能是清除细胞中变性、突变或有害的蛋白质。通过泛素-蛋白酶体系统破坏致病蛋白, 而不是使用传统的小分子抑制剂抑制它们, 从而提供了更有效的策略^[20]。许多

研究表明,降解蛋白质比抑制蛋白质具有更好的抗癌活性^[21]。PROTAC 药物的一个关键优势是可降解“无成药性”靶蛋白。

此外,理论上 PROTAC 只需少量的催化药物即可降解细胞内几乎所有的蛋白质(包括膜蛋白),因此其具有广阔的应用前景。

2.2 PROTAC 药物成药难点

尽管目前研究者已采用全小分子的 PROTAC 设计策略,但其相对分子质量高导致的水溶性、口服吸收和透膜性均较差,同时 PROTAC 药物的化学合成成本也较高。同时,必须意识到目标蛋白可能在其他正常生理活动中发挥作用,如果 PROTAC 药物不能区分正常和病理组织,那必将会引起程度不等的不良反应。

另外,PROTAC 药物的脱靶毒性更值得关注,因为泛素化标记不仅涉及到蛋白质降解,还关系到甲基化、乙酰化和磷酸化等过程;不仅涉及蛋白质,还涉及到 DNA。就像沙利度胺对胎儿的致畸性一样,其脱靶效应在非临床毒性筛选中不易检测和跟踪,其长期和生殖毒性是一个严峻的问题。

3 PROTAC 药物的非临床评价策略

全小分子设计的 PROTAC 药物与传统小分子药物在体内的行为类似,非临床安全性评价可以参考传统小分子药物进行,但研究过程中还需针对 PROTAC 的特性而对实验设计进行调整和优化。结构中含多肽的大分子 PROTAC 药物的非临床安全性评价,可以沿用多肽或抗体的评价思路进行。

3.1 药理药效评价

PROTAC 是事件驱动,而小分子抑制剂和抗体药物是占位驱动^[22]。占位驱动是经典受体药理学的一个标志,需要高药物浓度以保持目标占用水平,提供足够的临床疗效。然而,药物浓度高也与脱靶效应有关,可通过具有高特异性和良好的药理学特性的药物来降低脱靶效应。相反,PROTAC 具有催化作用,因此能够在较低含量催化诱导蛋白酶体降解靶标^[23]。

离体细胞水平已证实一些蛋白,如雄激素受体、雌激素受体、雌激素相关受体 α 和溴结构域蛋白 4, 已可通过 PROTAC 靶向破坏^[23-27]。在体药效研究中,PROTAC 药物的非临床评价首先需要确定种属,即建立能够表达 PROTAC 药物靶蛋白的动物模型。如果 PROTAC 药物的靶点仅在人体内表达,可通过开展替代分子在体药效研究进行验证;其次,动物药效模型需尽量选用能反映疾病发病机制的

模型,即应为致病蛋白(PROTAC 的靶蛋白)引起的疾病模型,才能更准确地模拟相应的疾病,验证 PROTAC 的药效;同时,药效研究需要设置不同的给药剂量对量效关系进行验证。药效除观察指标外,应尽量选择合适的药效标志物,如通过 Western 印迹法等对目标(致病)蛋白的表达量进行测定,以验证 PROTAC 药物对靶点的选择性。

此外,由于 PROTAC 在药理学方面与经典的抑制剂不同,高浓度时经常会观察到“HOOK 效应”^[28]。在高浓度情况下形成的 PROTAC:E3 连接酶和 PROTAC:POI 二元复合物,可阻碍靶蛋白降解所必需的三元复合物的形成。因此,药效实验要结合药理学/药效学参数设置给药剂量,避免二元复合物的形成,制定合理的给药方案。

3.2 代谢分析

PROTAC 分子必须与靶点蛋白和 E3 泛素连接酶形成有效的三元复合物,才能实现靶蛋白降解的特性。因此,只有成功透过细胞膜进入细胞的 PROTAC 才具有成药性^[22]。一旦进入细胞内,蛋白质降解分子必须同时与目标蛋白和 E3 泛素连接酶形成三元复合物,避免形成二元复合物。三元复合物一旦形成,泛素必须以足够的速率(快于三元复合物的本征寿命)转移到靶蛋白受体位点上(通常是表面赖氨酸),所需底物的诱导泛素化也应以同样的速率进行,以避免由二氢奎素酶竞争性去除泛素。最后,泛素转移到底物蛋白上的模式应允许蛋白酶体容易识别,从而开始实际降解^[30-32]。因此,在代谢研究中除关注 PROTAC 药物本身的药理学特性外,还需要重点关注三元复合物的形成和稳定性问题。如果是由小前体分子在细胞内组装成的 PROTAC 的前药,还要关注起药效作用的“组装产物”及其代谢产物的药理学特性。

生物利用度低、稳定性和血管穿透能力差是 PROTAC 应用受限的主要原因,因此在代谢研究中首先要通过质谱确定体内外代谢产物的种类和结构,包括是否存在二元复合物以及游离个体,弄清药物进入体内后的代谢途径。在 PROTAC 药物的动物种属选择上,需要考虑靶蛋白在各动物种属中的表达情况,需选取蛋白表达情况与人类相近的动物为相关种属;进一步的动物种属选择可参考小分子药物的种属选择方案,通过体外肝微粒体和肝细胞代谢实验,确定不同种属中代谢产物种类和比例,为种属选择以及毒理试验中需要监测的代谢产物提供参考依据。代谢研究需要药物对肝代谢酶的鉴定以及对代谢酶的诱导和抑制作用,为临床上

药物的相互作用提供参考。此外,基于 PROTAC 本身的作用特点,在代谢研究中需要关注药物与血浆蛋白结合的问题。综上所述,在进行代谢研究时,建议小分子 PROTAC 进行的实验包括不同动物种属体外肝微粒体和肝细胞代谢产物鉴定和稳定性实验,最好加做不同种属体内血浆中代谢产物的鉴定实验、CYP 酶亚型鉴定实验、CYP 酶诱导和抑制实验、血浆蛋白结合实验、血浆稳定性实验和相关种属的体内药动学、组织分布和排泄实验。

PROTAC 的相对分子质量范围一般为 70~1000,与传统小分子药物相比,较大的相对分子质量使 PROTAC 口服吸收更具挑战性。但一旦被吸收,PROTAC 与传统小分子药物在体内的循环无差异。经静脉、腹腔或皮下注射 PROTAC,其在体内表现出与传统小分子药物相似的代谢特点,暴露量与给药剂量相关,优化的 PROTAC 会有较低的肝清除率。另外,对于结构中含有多肽的大分子 PROTAC 药物,需参考大分子药物代谢研究程序,并且需对药物的免疫原性进行验证。

3.3 非临床安全性评价

PROTAC 药物安全性问题除需要考虑药物整体的安全性外,还需确定药物进入体内后 PROTAC 的连接子是否会断裂,组成药物的 3 个部分是否会分离,继而需要考虑各部分单独的安全性隐患。在毒理研究中,针对 PROTAC 的稳定性、生物分布和血管穿透能力差的特性,要充分考虑其代谢产物和(或)形成的复合物的毒性,及其因蓄积引起的脏器损伤问题。

安全性评价研究需进行一般毒理、安全药理、遗传毒理和生殖毒理等研究。基于 PROTAC 药物的作用机制特点,剂量-毒性反应关系可能有别于传统的小分子药物,所以在进行实验的剂量选择时,需进行充分的预实验探索,最终确定起效剂量与毒性反应剂量之间的关系。

PROTAC 药物的安全性评价中,动物种属的选择与其他药物相同,需要首先确定药物的相关种属。但针对 PROTAC 的特殊性,首先需要考虑动物种属中靶蛋白的表达情况,优先选取蛋白表达与人类相似的动物为相关种属。进一步的动物种属选择中全小分子 PROTAC 药物可参考小分子药物的种属选择方案,依据代谢产物研究的结果来确定;结构中含有多肽的大分子 PROTAC 药物,可参考多肽或抗体药物的安全性评价思路,使用多种技术(如免疫化学或功能活性评估)确定相关种属^[33];选取药物代谢与人类更为相似的动物种属进行安全性评价。

全小分子的 PROTAC 药物的剂量选择可参照小分子药物的实验设计思路,从单次给药剂量递增实验到不同剂量连续给药实验,确定正式实验的给药剂量。建议正式实验时根据前期的结果最少设置 3 个给药剂量,以确定剂量-毒性反应关系。由于 PROTAC 通过在亚化学计量的水平上催化诱导蛋白酶体降解靶标而起到药效作用,理论上其药效剂量相当于催化剂的量。所以在安全性评价尤其是安全药理研究中,在设计实验的低剂量时应充分考虑与药效剂量之间的关系。剂量选择不宜过高,与药效剂量相当或稍高于药效剂量即可。同时,基于使用高浓度 PROTAC 时会观察到“HOOK 效应”这一特性,在实验过程中 PROTAC 很可能会达到暴露量饱和的情况。但在非临床安全性评价研究中,建议在饱和时观察到的毒性反应严重程度较轻时,继续适当升高剂量或达到适当的限制剂量,在监测药物暴露量的基础上,观察在“HOOK 效应”形成二元复合物的情况下,药物潜在的毒性反应,以更好地指导临床安全性研究。针对大分子的 PROTAC 药物,剂量选择也应能提供反映剂量-反应关系的信息,包括毒性剂量和未见不良反应剂量(no observed adverse effect level, NOAEL);对于某些毒性很小或无毒性的产品,可能无法规定一个特定的最大给药剂量。在此情况下,应提供剂量选择依据及其预计的人体暴露量倍数。选择高剂量时,应该考虑其预期的药理和生理作用、合适受试物的可获得性及预期的临床应用^[28]。

PROTAC 药物的非临床安全性评价重复给药实验的给药周期,需结合临床试验以及药物上市后治疗期限进行综合考虑,实验的给药周期需长于药物的治疗期限以支持临床试验或药物上市(参考 ICH M3 的要求进行)。临床试验最长期限≤2 周的药物,重复给药实验最短期限为 2 周;6 个月的啮齿类动物实验和 9 个月的非啮齿类动物实验通常可支持给药期限≥6 个月的临床试验^[34]。同时,在一般毒理试验中,需要设置足够长时间的恢复期,以考察停药后不良反应的恢复情况。给药频率根据药物的药效/药代参数和临床拟用频率进行设计,试验中的给药频率需≥临床的给药频率。

在进行 PROTAC 药物安全性评价时,基于其独特的化学结构,除需要考虑药物整体的安全性外,也需要考虑各组分的潜在毒性问题。首先确定分子在不同动物种属内连接断开及其代谢情况,测定游离状态各组分及其代谢产物的占比。在安全性评价过程中,如果人体中游离状态的组分及其代谢

产物的暴露量超过动物中的暴露量时,需要单独对游离组分或其代谢产物进行非临床评价。

PROTAC 药物的安全性评价试验的检测项目及指标可参照常规药物的检测进行,在一般毒理试验中主要需包括临床观察、摄食量、体重、眼科检查、体温(仅非啮齿类)、血压和心电图检查(仅非啮齿类)、血液学和血液生化学检测、尿液观察和分析、大体剖检和组织病理学检查等;安全药理试验需要对中枢神经系统、心血管系统和呼吸系统的功能进行研究,同时针对可能存在引起人体其他系统担忧的特定 PROTAC 药物,需根据具体情况进行安全药理学的补充试验(如肾/泌尿系统、自主神经系统、胃肠道系统等)^[35];遗传毒理试验中,除需要将 PROTAC 当作一个整体,通过体外和体内遗传毒性试验组合的方法进行遗传毒性的研究外,针对在体内会发生连接断开和代谢的 PROTAC 药物,还需要对游离各组分进行遗传毒性的检测;生殖毒性试验针对临床用药人群,在适当的时候分阶段进行,可在其他药理和毒理试验已获得部分结果后,参考有关潜在生殖毒性信息的基础上开展研究^[36];重复给药试验的伴随毒代检测至关重要,可以通过暴露量作为风险控制的重要依据,PROTAC 药物除需要监测母药的暴露量外,还需结合不同种属中代谢产物鉴定的结果,对可能存在的表达量较高的游离组分、形成的复合物以及代谢物进行监测;大分子的 PROTAC 药物需要同时进行免疫原性评估,以及监测是否有抗药抗体的产生。

脱靶毒性是业界最为关注的问题之一。传统靶向蛋白活性的大分子和小分子药物,甚至小核苷酸,对蛋白活性的抑制一般不会太彻底,多不影响骨架蛋白的表达,这样虽然增加了耐药性发生的概率,但残留活性也可能保障正常细胞、组织器官基本的生理活性,降低潜在毒性。PROTAC 降解靶标更为彻底,即使是以前验证过的靶点,会不会带来严重的毒性需要进行确证。脱靶效应在毒性筛选中不易检测和跟踪,增加了后期开发的风险。因此,在非临床安全性评价研究中应对 PROTAC 的脱靶毒性进行重点关注。

4 结语

迄今为止,PROTAC 技术已被应用于不同的靶点,从蛋白酶到核激素受体、表观遗传因子和激酶等。PROTAC 技术在不可成药靶点的应用,有望解

决目前 80% 蛋白因无可作用靶点而缺少调控的现状,是未来可进一步研究和探索的内容。尽管 PROTAC 技术从肽到全小分子有了显著的提升,稳定性、溶解度、血管穿透能力和组织分布得到了一定程度的改善,但与传统的小分子药物相比,以上问题依然是非临床研究所面临的难题。改进 PROTAC 的药动学、生物利用度和组织分布,进一步降低相对分子质量和毒性,需今后进一步研究。

参考文献:

- [1] An S, Fu L. Small-molecule PROTACs: an emerging and promising approach for the development of targeted therapy drugs[J]. *Ebio Med*, 2018, 36(10): 553-562.
- [2] Wen S, Niu Y, Huang H. Posttranslational regulation of androgen dependent and independent androgen receptor activities in prostate cancer[J]. *Asian J Urol*, 2020, 7(3):203-218.
- [3] Ohoka N, Tsuji G, Shoda T, et al. Development of small molecule chimeras that recruit AHR E3 ligase to target proteins[J]. *ACS Chem Biol*, 2019, 14(12): 2822-2832.
- [4] Roberts BL, Ma ZX, Gao A, et al. Two-stage strategy for development of proteolysis targeting chimeras and its application for estrogen receptor degraders [J]. *ACS Chem Biol*, 2020, 15(6):1487-1496.
- [5] Lu M, Liu T, Jiao Q, et al. Discovery of a Keap1-dependent peptide PROTAC to knockdown Tau by ubiquitination-proteasome degradation pathway[J]. *Eur J Med Chem*, 2018, 146(2):251-259.
- [6] Jiang X, Zhou J, Wang Y, et al. PROTACs suppression of GSK-3 β , a crucial kinase in neurodegenerative diseases[J/OL]. *Eur J Med Chem*, 2020, 17(10): 112949 [2020-08-03]. <http://doi:10.1016/j.ejmech.2020.112949>.
- [7] Kargbo RB. SMARCA2/4 PROTAC for targeted protein degradation and cancer therapy[J]. *ACS Med Chem Lett*, 2020, 11(10):1797-1798.
- [8] Sakamoto KM, Kim KB, Kumagai A, et al. PROTACs: chimeric molecules that target proteins to the Skp1-Cullin-F box complex for ubiquitination and degradation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 8554-8559.
- [9] Scudellari M. Protein-slaying drugs could be the next blockbuster therapies[J]. *Nature*, 2019, 567(7748):298-300.
- [10] Buckley DL, Crews CM. Small-molecule control of intra

- cellular protein levels through modulation of the ubiquitin proteasome system[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2014, 53(9):2312-2330.
- [11] Toure M, Crews CM. Small-molecule PROTACs: new approaches to protein degradation[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2016, 55(6):1966-1973.
- [12] Mansour MA. Ubiquitination: friend and foe in cancer [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2018, 101(8):80-93.
- [13] Schneekloth JS, Fonseca FN, Koldobskiy M, et al. Chemical genetic control of protein levels: selective *in vivo* targeted degradation[J]. *J Am Chem Soc*, 2004, 126(12):3748-3754.
- [14] Hlnes J, Gough JD, Corson TW, et al. Posttranslational protein knockdown coupled to receptor tyrosine kinase activation with phosphoPROTACs[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(22):8942-8947.
- [15] Lebraud H, Wright DJ, Johnson CN, et al. Protein degradation by in-cell self-assembly of proteolysis targeting chimeras[J]. *ACS Cent Sci*, 2016, 2(12):927-934.
- [16] Wang Y, Jiang X, Feng F, et al. Degradation of proteins by PROTACs and other strategies[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2020, 10(2):207-238.
- [17] Lin X, Xiang H, Luo G. Targeting estrogen receptor α for degradation with PROTACs: a promising approach to overcome endocrine resistance [J/OL]. *Eur J Med Chem*, 2020, 206:112689 [2020-08-03]. <http://doi:10.1016/j.ejmech.2020.112689>.
- [18] US National Library of Medicine Clinical Trials. Phase A1 clinical trial of ARV-110 in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC) [EB/OL]. (2019-03-25) [2020-08-03]. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03888612?term=ARV-110&draw=2&rank=1>.
- [19] Rask-andersen M, Almen Ms, Schioth HB. Trends in the exploitation of novel drug targets[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2011, 10(8):579-590.
- [20] Buckley DI, Crews CM. Small-molecule control of intracellular protein levels through modulation of the ubiquitin proteasome system[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2014, 53(9): 2312-2330.
- [21] Neklesa TK, Winkler JD, Crews CM. Targeted protein degradation by PROTACs[J]. *Pharmacol Ther*, 2017, 174:138-144.
- [22] Salami J, Crews CM. Waste disposal-an attractive strategy for cancer therapy[J]. *Science*, 2017, 355(6330):1163-1167.
- [23] Bondeson DP, Mares A, Smith IE, et al. Catalytic *in vivo* protein knockdown by small-molecule PROTACs[J]. *Nat Chem Biol*, 2015, 11(8):611-617.
- [24] Schneekloth AR, Pucheault M, Tae HS, et al. Targeted intracellular protein degradation induced by a small molecule: en route to chemical proteomics[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, 18(22):5904-5908.
- [25] Lu J, Qian Y, Altieri M, et al. Hijacking the E3 ubiquitin ligase cereblon to efficiently target BRD4[J]. *Chem Biol*, 2015, 22(6):755-763.
- [26] Saenz DT, Fiskus W, Qian Y, et al. Novel BET protein proteolysis-targeting chimera exerts superior lethal activity than bromodomain inhibitor (BETi) against post-myeloproliferative neoplasm secondary(s) AML cells[J]. *Leukemia*, 2017, 31(9):1951-1961.
- [27] Winter GE, Buckley DL, Paulk J, et al. Phthalimide conjugation as a strategy for *in vivo* target protein degradation[J]. *Science*, 2015, 348(6241):1376-1381.
- [28] Roy RD, Rosenmund C, Stefan M. Cooperative binding mitigates the high-dose hook effect[J/OL]. *BMC Syst Biol*, 2017, 11(1): 74 [2020-08-03]. <https://doi.org/10.1186/s12918-017-0447-8>.
- [29] Paiva SL, Crews CM. Targeted protein degradation: elements of PROTAC design[J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2019, 50: 111-119.
- [30] Gadd MS, Testa A, Lucas X, et al. Structural basis of PROTAC cooperative recognition for selective protein degradation[J]. *Nat Chem Biol*, 2017, 13(5): 514-521.
- [31] Riching KM, Mahan S, Corona CR, et al. Quantitative live-cell kinetic degradation and mechanistic profiling of PROTAC mode of action[J]. *ACS Chem Biol*, 2018, 13(9):2758-2770.
- [32] Roy MJ, Winkler S, Hughes SJ, et al. SPR-measured dissociation kinetic of PROTAC ternary complexes influence target degradation rate[J]. *ACS Chem Biol*, 2019, 14(3):361-368.
- [33] International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Safety guideline, preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals [EB/OL]. (2011-06-12) [2020-08-03]. https://database.ich.org/sites/default/files/S6_R1_Guideline_0.pdf.
- [34] International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Multidisciplinary guidelines, guidance on non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals [EB/OL]. (2009-06-11) [2020-08-03]. https://database.ich.org/sites/default/files/M3_R2_Guideline.pdf.
- [35] International Council for Harmonisation of Technical

Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Safety guideline, safety pharmacology studies for human pharmaceuticals[EB/OL]. (2000-11-08) [2020-08-03]. https://database.ich.org/sites/default/files/S7A_Guideline.pdf.

[36] International Council for Harmonisation of Technical

Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Safety guideline, detection of toxicity to reproduction for medicinal products and toxicity to male fertility[EB/OL]. (2000-12-09) [2020-08-03]. <http://www.cde.org.cn/ichWeb/guidelch/downloadAtt/1/869609b97bd2e89654c6667553944e0e>.

Non-clinical evaluation strategy for proteolysis-targeting chimera (PROTAC) pharmaceuticals

HAN Jun-yuan^{1*}, LI Ya-juan^{1*}, WANG Hai-xue², WANG Quan-jun¹

(1. National Beijing Center for Drug Safety Evaluation and Research, State Key Laboratory of Medical Countermeasures and Toxicology, Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Sciences, Beijing 100850, China; 2. Center for Drug Evaluation, National Medical Products Administration, Beijing 100022, China)

Abstract: Proteolysis-targeting chimeras (PROTACs) recruit the target protein to E3 ubiquitin ligase for ubiquitination labeling to degrade it through the ubiquitin-proteasome pathway so as to eliminate the overexpressed or mutated pathogenic protein. A brief overview of research and development of PROTAC pharmaceuticals was given in this paper. Strategies were recommended to address the larger molecular mass, poor stability, low bioavailability and poor penetration of PROTACs. Problems related to non-clinical evaluation that need to be considered in terms of pharmacodynamics, metabolism and safety evaluation were also analyzed in this paper in order to provide reference for the non-clinical evaluation of PROTAC drugs.

Key words: proteolysis-targeting chimeras (PROTAC); non-clinical evaluation

Foundation item: National Science and Technology Major Project of China (2018ZX09711003-007); National Science and Technology Major Project of China (2018ZX09721003-001-005); and National Science and Technology Major Project of China (2018ZX09201017-003)

Corresponding author: WANG Quan-jun, E-mail: wangquanjunbeijing@163.com; WANG Hai-xue, E-mail: wanghx@cde.org.cn

*Co-first author.

(收稿日期: 2020-08-20 接受日期: 2020-12-07)

(本文编辑: 贺云霞)