



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO
TÍTULO: PROTAC (*Proteolysis Targeting Chimera*)

Autor: Claudia García Hernández

Fecha: julio 2020

Tutor: Mercedes Villacampa Sanz

ÍNDICE

1. Resumen	2
2. Introducción	2
3. Objetivos	5
4. Material y métodos	5
5. Resultados y discusión	5
5.1. Elementos de un PROTAC	6
A) Ligando de unión a la ligasa E3 de ubiquitina	6
B) Ligando de unión a la proteína de interés	9
C) Conector.....	11
5.2. Otros tipos de PROTACs	14
5.3. Otras estrategias de degradación proteica	17
5.4. Ventajas y limitaciones	18
6. Conclusiones.....	18
7. Bibliografía	19

1. RESUMEN

Existen muchas enfermedades que cursan con una actividad exacerbada de ciertas proteínas. El primer ejemplo que viene a la cabeza es el cáncer, pero no es el único, puesto que en algunas demencias como en el Alzheimer, la proteína *Tau* se acumula en el cerebro formando unos “ovillos” característicos. Esta proteína ha sido considerada frecuentemente como “*undruggable*”, que literalmente quiere decir que no puede ser diana farmacológica de un fármaco.

Hasta ahora la terapia de primera línea para el tratamiento de estas patologías se ha basado en una inhibición directa y competitiva de las proteínas problemáticas. Sin embargo, esto plantea ciertos problemas. Entre ellos se encuentra la falta de eficiencia a largo plazo, que podría fomentar el aumento de la dosis, favoreciendo así el desarrollo de resistencias y el incremento de las reacciones adversas por falta de especificidad. Este mecanismo de acción tampoco solucionaría el problema mencionado de las proteínas *undruggable*. Estas se escapan de la inhibición, puesto que requiere de una unión muy concreta que todavía no se ha podido conseguir.

Un PROTAC (*Proteolysis Targeting Chimera*) es una heteromolécula bifuncional que consta de tres elementos: el ligando que se une a la proteína de interés, el ligando de unión a la ligasa E3 de ubiquitina y un elemento conector que unifica a los dos primeros. Para ejercer su acción necesita formar el complejo ternario *proteína de interés – PROTAC – ligasa*.^[1]

La principal ventaja de esta terapia de degradación dirigida es que la proteína va a ser degradada en vez de inhibida. Esta degradación se consigue a través del sistema natural endógeno de eliminación de residuos, que es el **sistema ubiquitina – proteasoma (UPS)**, el cual es activado por la ligasa asociada al PROTAC.^{[1], [2]}

Los PROTACs ofrecen las soluciones a las limitaciones de los inhibidores tradicionales: menos dosis, menos efectos adversos, etc. Con ellos, se plantea un avance muy prometedor en el tratamiento de enfermedades crónicas que afectan a un gran número de personas. Además, esta nueva línea terapéutica podría resolver el conflicto de las proteínas *undruggable*, ya que su mecanismo de acción no requiere de una interacción perfecta con las mismas.

Palabras clave: cáncer, degradación, PROTAC, proteasoma.

2. INTRODUCCIÓN

El organismo necesita ciertas estructuras endógenas capacitadas para degradar y romper proteínas. Una de las razones es la necesidad de sintetizar proteínas propias, y este suministro es aportado por los aminoácidos. Es mucho más sencillo romper una molécula ya construida y obtener de ella los aminoácidos, que la síntesis *de novo* de los mismos. Además, también se requiere de una degradación proteica con función protectora, puesto que la presencia de proteínas que no son necesarias, que suponen un exceso o que están dañadas, podría estar relacionada con diversas enfermedades.

Para suplir estas funciones, se cuenta con dos estructuras celulares. Por un lado, se encuentran los **lisosomas**, que son sistemas capaces de endocitar proteínas extracelulares o de transmembrana y desencadenar su acción proteolítica una vez hayan sido endocitadas.

Por otro lado, está el sistema **proteasoma – ubiquitina (UPS)**. Este complejo actúa principalmente sobre proteínas deterioradas o no indispensables, localizadas en el núcleo y el citoplasma. Todo ello ocurre en el interior celular, dado que es donde se encuentra dicho complejo. [3]

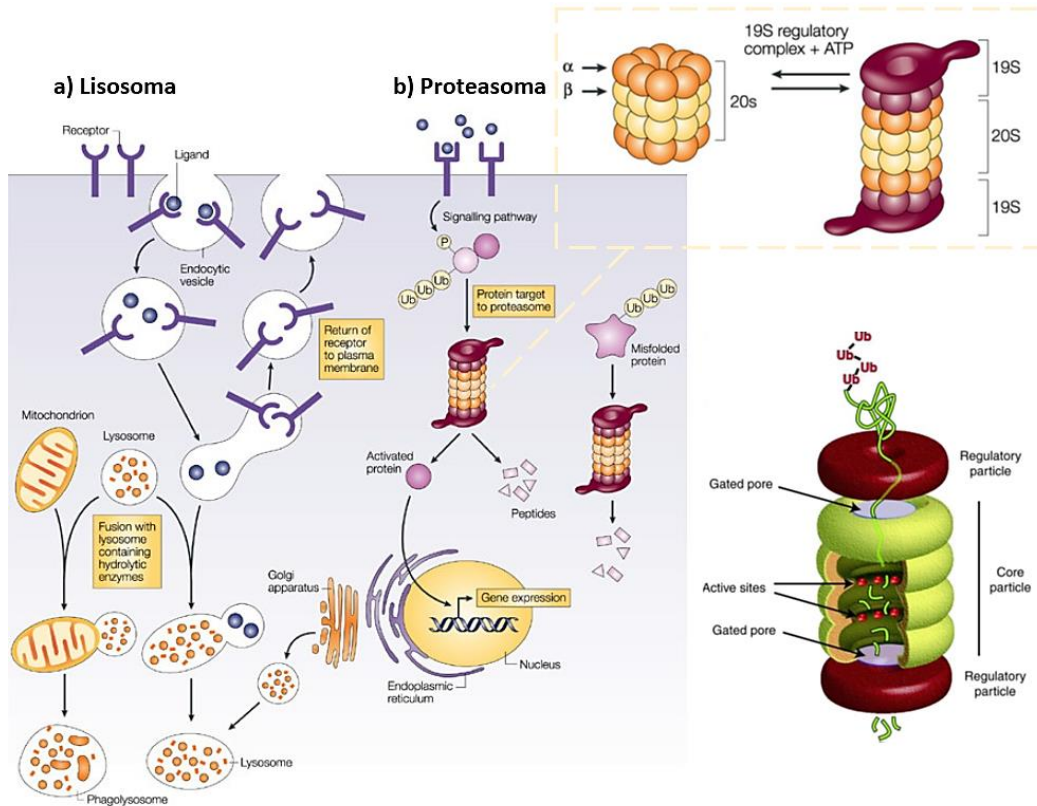


Fig.1. Estructuras responsables de la degradación proteica celular. a) Lisosoma. b) Proteasoma: Subunidades 19S y 20S del proteasoma y sus funciones. [4]

El **proteasoma (26S)** es un gran complejo proteico formado por tres subunidades: dos de 19S y una de 20S. Esta última compone el núcleo del proteasoma, y tiene cuatro anillos heptaméricos, es decir, constan de siete proteínas cada uno. Los dos localizados en los extremos son denominados α y los dos centrales, β . Esta disposición genera un poro en el interior donde se desencadenan las reacciones, que concretamente ocurren en la cara interior de los anillos β .

Las dos subunidades 19S están situadas en los extremos y actúan como partículas reguladoras. Esta regulación se logra gracias a la actividad ATPasa que poseen y a los sitios de unión a ubiquitina, necesarios para el reconocimiento de la misma.

La **ubiquitina** tiene una función marcadora, es la que se encarga de señalar aquellas proteínas que deben ser degradadas. De esta manera, se protegen las que son necesarias, ya que el proteasoma va a ejercer su acción exclusivamente sobre las que reconozca, es decir, sobre las que hayan sido marcadas por la ubiquitina. Tras este reconocimiento, que conlleva la fijación a la subunidad 19S del proteasoma, se produce la hidrólisis de la ubiquitina y la entrada de la proteína sustrato al poro, donde se va a fragmentar. Dicha hidrólisis requiere de energía, que es aportada por ATP mediante una reacción llevada a cabo por las subunidades 19S, que como ya se ha comentado, tienen actividad ATPasa. [3]

El proceso de ubiquitinación consiste en la unión covalente de la ubiquitina a un residuo de lisina de la proteína sustrato, tras una serie de reacciones en cascada. Esta cascada tiene tres fases, realizadas por tres tipos de ligasa de ubiquitina diferentes:

- A. Ligasa E1 de ubiquitina – activación: mediante el consumo de ATP, se genera un sustrato reactivo de ubiquitina-adenilato, de ahí que esta reacción sea la de activación. Este sustrato activado se convierte en un intermedio tioéster a través de un enlace covalente a un residuo de cisteína del sitio activo de la enzima E1.
- B. Ligasa E2 de ubiquitina – conjugación: hay una reacción de translocación del enlace tioéster, donde la ubiquitina pasa del residuo de cisteína de la enzima E1 a otro residuo de cisteína de la ligasa E2.
- C. Ligasa E3 de ubiquitina – unión: la aproximación entre las ligasas E2 y E3, que se encuentra unida a la proteína a degradar, favorece la transferencia de la ubiquitina a su sustrato final, que es la proteína diana. Se forma un enlace peptídico entre el residuo carboxilo de la ubiquitina y otro de lisina de la diana.^[5]

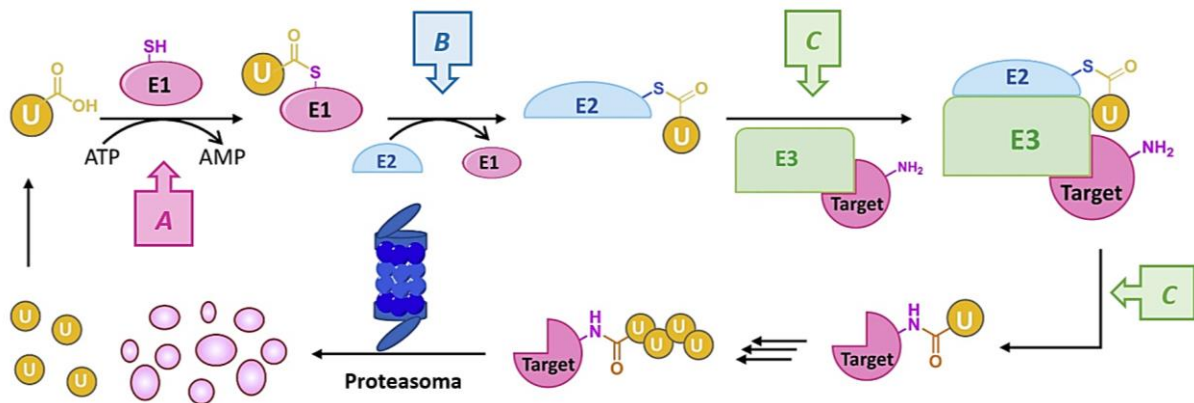


Fig.2. Ciclo de la cascada de reacciones de las ligasas de ubiquitina E1, E2 y E3. Reacción de activación (A), reacción de conjugación (B), reacción de unión (C).^[6]

Esta cascada de reacciones es en realidad un ciclo, puesto que, una vez marcada la proteína, la subunidad 19S del proteasoma va a escindir a la ubiquitina y esta puede ser reutilizada más adelante. El ciclo se repite varias veces para asegurar la degradación de la proteína sustrato, proceso que se conoce como poliubiquitinación.^{[5], [6]}

Un **PROTAC** aprovecha la capacidad proteolítica del proteasoma para deshacerse de proteínas patológicas como las que se dan en el cáncer. Su mecanismo consiste en aproximar la POI a la ligasa E3 para que esta última pueda asociarse a la primera. Para ello, consta de tres partes: el ligando de unión a la ligasa E3, el conector y el ligando de unión a la proteína diana.

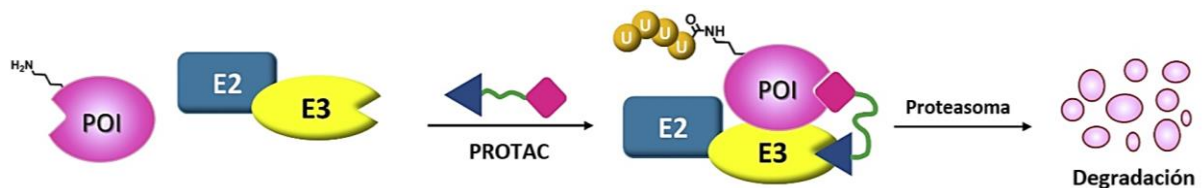


Fig.3. Mecanismo de un PROTAC. El PROTAC se une de simultáneamente a la proteína de interés (POI) y a la ligasa E3 de ubiquitina (E3) para inducir la formación del complejo ternario. La POI es entonces degradada por el proteasoma 26S.^[6]

Cuando el PROTAC llega al lugar de acción, se une simultáneamente a sus dos sustratos por sus correspondientes extremos, y se forma el complejo *proteína diana – PROTAC – ligasa*. Este sistema se conoce como **complejo ternario**, y es el que confiere actividad al fármaco. La formación del complejo ternario induce la activación de la cascada de poliubiquitinación sobre la proteína diana, la cual una vez marcada por la ubiquitina va a ser reconocida y degradada por el proteasoma.

3. OBJETIVOS

Mediante una revisión bibliográfica se pretende recopilar información actualizada de los PROTACs, un tipo de estrategia consistente en la degradación de proteínas que están alteradas en ciertas enfermedades, especialmente en el cáncer.

El objetivo de este trabajo es profundizar en el mecanismo, la estructura y las aplicaciones de estos fármacos que, a pesar de que solo haya dos compuestos en ensayos clínicos, ofrecen un futuro muy prometedor.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

La información bibliográfica necesaria para redactar este trabajo ha sido contrastada en diferentes fuentes. Se ha buscado tanto en libros de química farmacéutica como en bases de datos como *PubMed*, mediante palabras clave como “PROTAC” o “degradación dirigida”. Algunas de las revistas consultadas son: *Acta Pharmaceutica Sinica B*, *Medicinal Chemistry Letters*, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *Nature*, etc. También se han consultado páginas webs de instituciones relevantes como el CIMA o la EMA, además de laboratorios farmacéuticos de interés. Para la elaboración de figuras que facilitan las explicaciones, se han utilizado herramientas *online* como *BioRender*.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Un PROTAC es un fármaco que consta de tres partes:

- Ligando de unión a la ligasa E3. Este ligando reconoce y se une a la ligasa E3.
- Ligando de unión a la proteína de interés (POI). La POI es la proteína diana, aquella que se quiere eliminar. Para que un PROTAC funcione debe enlazarse a su diana concreta, aunque no es necesario que los enlaces entre ambos sean muy fuertes. Al unirse los dos sustratos en sendos extremos del PROTAC se genera la forma activa o complejo ternario (POI – PROTAC – ligasa E3).
- Conector. Se encarga de ensamblar los dos ligandos anteriores. La función del conector es esencial, ya que garantiza la unión simultánea al PROTAC de los dos sustratos, ligasa E3 y proteína diana, imprescindible para que se inicie el proceso de degradación.

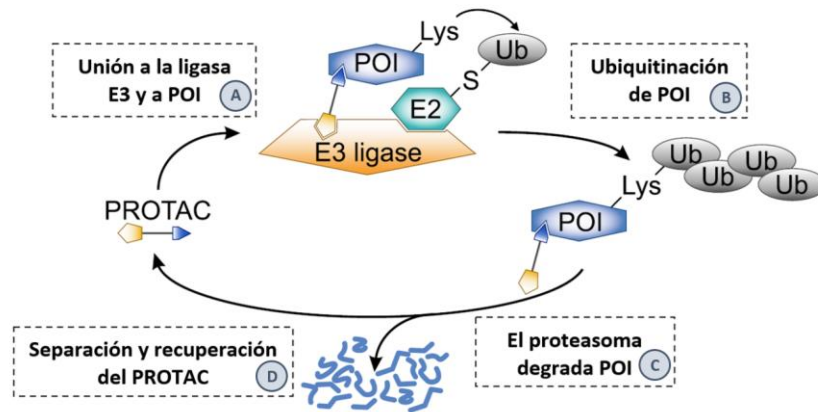


Fig.4. **Partes de un PROTAC y mecanismo de acción.** A) El ligando de unión a la ligasa E3 (pentágono amarillo) y el ligando de unión a la POI (triángulo azul) se unen a sus correspondientes sustratos (ligasa E3 y POI, respectivamente). B) La ligasa E2 transfiere la ubiquitina a la POI, que queda marcada para su degradación por el proteasoma. C) El proteasoma degrada la proteína diana. D) El PROTAC se libera y puede iniciar un nuevo ciclo.^[7]

5.1. ELEMENTOS DE UN PROTAC

A la hora de diseñar un PROTAC se tienen en cuenta varios factores. El primero de ellos es decidir qué proteína se va a enlazar, tanto en un ligando como en otro. También hay que valorar las limitaciones que puedan surgir y cómo abordarlas. El objetivo del diseño de un PROTAC, al igual que en cualquier otro fármaco, es conseguir una buena actividad, selectividad y especificidad. De esta manera se disminuyen las reacciones adversas, la dosis administrada y la duración del tratamiento.

A continuación, se explica cómo proceder al diseño de las partes de un PROTAC para que la formación del complejo ternario sea exitosa.

A) Ligando de unión a la ligasa E3 de ubiquitina

Tal y como ya se ha comentado, el proceso de ubiquitinación consta de tres reacciones: activación, conjugación y unión. En cada uno de ellos hay un tipo de ligasa de ubiquitina que lo cataliza, siendo la última (ligasa E3) la de mayor interés. La unión de la proteína diana a la ligasa E3 es el primer paso en el proceso de la degradación.

Se sabe que el organismo humano tiene alrededor de 600 ligasas E3, aunque de muchas de ellas no se conoce demasiado. Las más estudiadas son: *cereblon (CRBN)*, *inhibitor of apoptosis protein (IAP)*, *murine doble minute 2 (MDM2)*, y *Von Hippel–Lindau (VHL)*.^[8]

A pesar de que todas las ligasas E3 tienen la función mencionada, hay que seleccionar muy bien cuál va a ser la que se una al PROTAC, la elección no debe ser aleatoria. Los principales factores a tener en cuenta son: disponibilidad de la misma en el tejido diana, especificidad y funcionabilidad de la ligasa.

En cuanto a la disponibilidad de la ligasa en los tejidos diana, hay que estudiar cómo está distribuida por los distintos niveles del organismo. El genoma es universal para todas las células que componen un mismo individuo (excepto las sexuales), pero el proteoma puede variar. No todas las células tienen las mismas secuencias de aminoácidos, de manera que cuando se produzca la traducción proteica, no se va a generar la misma proporción de

proteínas para todas ellas. Por eso es tan importante comprobar que la ligasa diana está presente. Por otro lado, esto podría suponer una ventaja ya que, si una ligasa solo está disponible en los tejidos diana, la especificidad será muy buena. Con esta especificidad se conseguiría disminuir los efectos adversos y no deseados en otras partes del organismo. No es imprescindible que la ligasa esté solo y exclusivamente en dichos tejidos, sino que con encontrarse sobreexpresada en ellos es suficiente. Actualmente las investigaciones se están volcando en estos conceptos, ya que de momento no se tiene tanta información.^[8]

La especificidad del PROTAC por la proteína que se quiere degradar (POI) puede verse influida por la ligasa enlazada. Esto ha sido demostrado en varios estudios, donde se compararon varios PROTACs que modificaban su especificidad por la POI en función de la ligasa E3 asociada. Esta variación puede ser positiva en un PROTAC con respecto a otro, pero lo más llamativo es que también puede situarse por encima de la especificidad que ofrecen los ligandos competitivos tradicionales de la POI.^{[8], [9]}

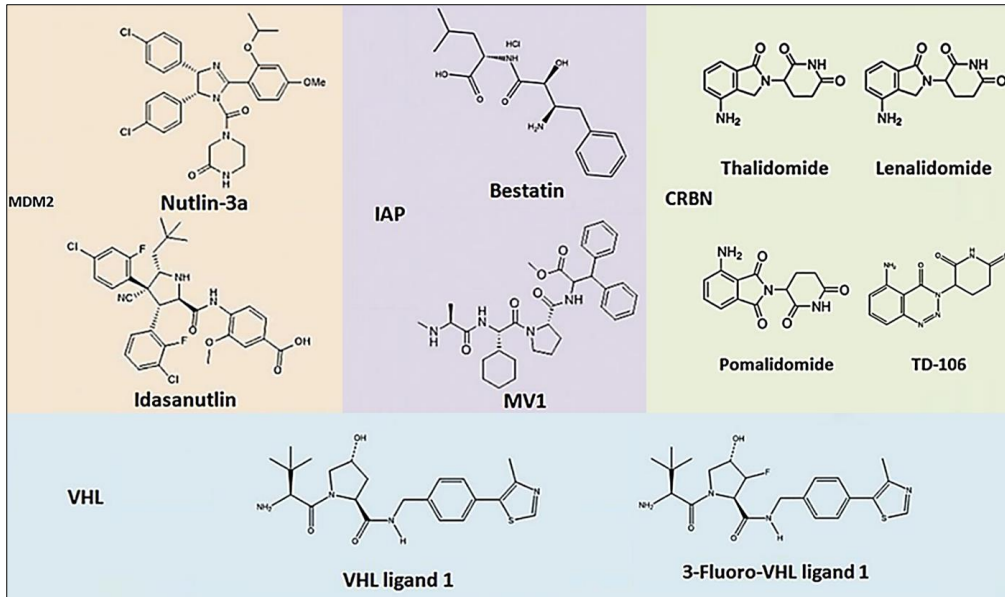
La cuestión más importante a valorar es la funcionabilidad de la ligasa. Por muy buena que sea la unión con el PROTAC o la disponibilidad en los tejidos diana, es esencial que la ligasa siga marcando a la POI para que sea reconocida por el UPS. Sin este reconocimiento, el PROTAC sería inactivo.

Por esta razón, normalmente no sirven los inhibidores competitivos como ligandos del PROTAC. Dichos fármacos funcionan como antagonistas, de forma que intentan inhibir lo mejor posible a su sustrato. Por ello su mecanismo de acción podría suponer la ocupación del sitio activo de la ligasa. Este sitio es el encargado de interactuar con el proteasoma y si se encuentra ocupado, la proteína en cuestión nunca sería degradada, por muy buena estabilidad que tenga el complejo ternario.

Por otro lado, algunos principios activos ya comercializados sí podrían servir. Los ligandos más utilizados para captar a la ligasa CRBN son inmunomoduladores (IMiD) como *talidomida*, *pomalidomida*, o *lenalidomida*. Los IMiD son fármacos con diversas indicaciones, donde alguna de ellas ha tenido que ser retirada. Es el caso de la *talidomida* y su indicación para las náuseas durante el embarazo, dado que producía teratogenia. Sin embargo, al estudiar más a fondo este principio activo, se dieron cuenta de que podía tener otras indicaciones: la *talidomida* se usa actualmente (en España como medicamento extranjero) para tratar el mieloma múltiple y ciertas afecciones de la piel, como la psoriasis.^[2] La *lenalidomida* también está comercializada en España para el tratamiento del linfoma de células del manto (MCL), mieloma múltiple y síndrome mielodisplásico.^[10]

En la *Fig.5*. se muestran algunos de los ligandos más frecuentemente empleados para enlazar las ligasas mejor estudiadas (MDM2, IAP, CRBN y VHL).

Fig.5. Principales ligasas E3 estudiadas y sus ligandos.^[8]



Las ligasas pueden tener más funciones, algunas beneficiosas y otras no tanto. Hay estudios que indican que cuando una ligasa es enlazada por un PROTAC, esta pierde el resto de sus funciones. Cuando una de ellas suponga una ventaja, no compensa inhibirla; solo interesa bloquear aquellas funciones desfavorables. Por ejemplo, en el tratamiento del cáncer con un PROTAC se prefiere que las ligasas asociadas sean aquellas que fomenten el desarrollo tumoral. Así el PROTAC actuaría como antitumoral mediante dos mecanismos simultáneos: la presentación de la POI al UPS para ser degradada, y la inactivación de una ligasa conflictiva.^[8]

El compuesto *A1874* es un PROTAC antitumoral que cumple con lo que se acaba de exponer. Tiene como diana farmacológica una proteína del complejo BET (*Bromodomain and extraterminal domain*), conocida como BRD4 (*Bromodomain Containing 4*) y que participa en procesos neoplásicos. La ligasa E3 que une es MDM2, que se encuentra sobreexpresada en algunos cánceres. Dicha ligasa tiene como sustrato a p53, una proteína supresora de tumores, por lo que interesa que no disminuya. Al administrar *A1874*, la ligasa MDM2 va a dejar de presentar p53 al proteasoma, para presentar en su lugar a BRD4 a través del PROTAC. De esta manera, p53 deja de ser degradada y puede desempeñar su función supresora de tumores con normalidad.^{[6], [8]}

El ligando de unión a MDM2 es el fármaco *idasanutlin*, que se encuentra entre las fases I y II de ensayos clínicos. De momento, *A1874* solo está disponible para la investigación. No está aprobado para uso humano porque *idasanutlin* está dando problemas gastrointestinales y citopenias.^[9] Aun así, tiene un importante potencial como base en futuras terapias antitumorales.^{[6], [8], [11]}

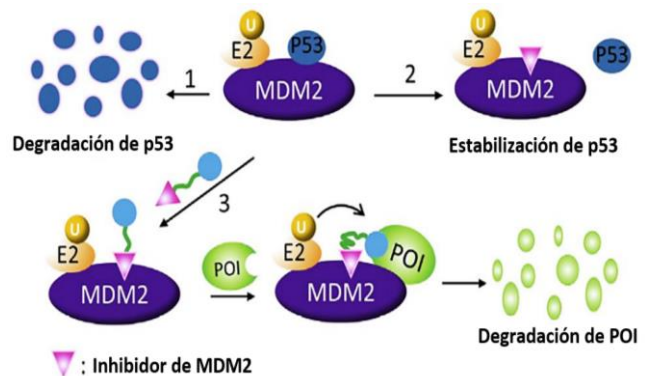


Fig.6. Mecanismo de acción de *A1874*. (1) Cuando no se inhibe MDM2, p53 es degradada. (2) Si se inhibe MDM2 con *idasanutlin* (triángulo rosa), p53 se estabiliza y puede actuar como supresora de tumores. (3) Con un PROTAC como *A1874*, además de la inhibición de MDM2, se puede reclutar a una proteína de interés (POI) para que sea degradada por el proteasoma, de manera que tendría dos mecanismos de acción antitumorales.^[6]

B) Ligando de unión a la proteína de interés

Antes de iniciar el desarrollo de un fármaco para una enfermedad determinada, hay que estudiar muy bien la fisiopatología de la misma. Las investigaciones deben centrarse en descubrir cuáles son las proteínas más conflictivas. Una vez descubiertas, se diseña un ligando capaz de asociarlas, es decir, un ligando de unión a la proteína diana.

Para ello, lo más fácil sería fijarse en los fármacos agonistas ya comercializados de esta proteína. El ligando es apropiado siempre que sea afín a la diana, y no hay nada que tenga mayor afinidad que un agonista. Esto mismo puede aplicarse también a los antagonistas.^[7]

En este sentido no sería lógico contar exclusivamente con los fármacos que estén en el mercado. Hay muchos principios activos que no han podido comercializarse porque fallaron las últimas fases de los ensayos clínicos. Esto pudo deberse a que no consiguieron alcanzar una concentración adecuada *in vivo*, a que su tiempo de semivida fue muy limitado, etc. En resumen, no mostraron suficiente efectividad. Sin embargo, el hecho de formar parte del ligando de unión a la POI de un PROTAC, podría darles una segunda oportunidad. Además, la fase preclínica se podría omitir, puesto que, para haber llegado a ensayos clínicos *in vivo*, tienen que haber demostrado previamente eficacia *in vitro*.^[7]

En cuanto a la búsqueda de un ligando para las proteínas *undruggable*, lo anterior no es válido. Estas proteínas se denominan así porque no se ha podido encontrar (de momento) un compuesto que las asocie lo suficiente como para que se dé una actividad terapéutica razonable. Esto se explica porque tienen varios sitios catalíticos, o bien porque carecen de uno concreto.^[6] No obstante, los PROTAC parecen tener ventaja en esta cuestión con respecto a los inhibidores tradicionales, ya que no requieren de una unión tan directa ni tan precisa con su sustrato de interés.^{[7], [9]}

A la hora de estudiar la estructura concreta de una nueva proteína como diana farmacológica, en los inhibidores tradicionales hay que hacer un *screening* en profundidad para conocer todos los residuos presentes en el sitio activo de la proteína. Una vez localizados estos residuos, se diseña el fármaco para que encaje perfectamente en el sitio activo.

En el caso de los PROTACs no hace falta hacer un estudio tan exhaustivo. Técnicas como la resonancia magnética nuclear (NMR) o la resonancia del plasmón superficial (SPR) son suficientes para localizar qué residuos son los más accesibles, y con ellos cuáles son los enlaces más sencillos de conseguir. Simplemente se necesita que el PROTAC se una a la POI. No se requiere de enlaces complejos para que la unión sea estable.^[9]

Un ejemplo de proteína de interés del ligando de un PROTAC es BRD4 (del complejo BET), que es diana farmacológica frecuente en el tratamiento del cáncer. Su potencial terapéutico recae en que, al ocupar un lugar en el genoma (*loci*) muy próximo al de algunos oncogenes, BRD4 podría ser un mediador clave del desarrollo carcinogénico. De ahí su interés como diana, ya que se podrían seleccionar a las células cancerosas sin dañar a las fisiológicas.^[12]

La proteína BRD4 es sustrato de fármacos con diferentes mecanismos de acción, como algún inhibidor de las proteínas BET (iBET), o algún PROTAC como A1874 (visto en el apartado anterior).

En un estudio se evaluaron tres principios activos diferentes y sus posibles combinaciones en el tratamiento del linfoma de las células del manto (MCL): *ibrutinib*, un iBET (*OTX015*) y un PROTAC (*ARV-825*).

El *ibrutinib* es un inhibidor potente de la tirosina-quinasa de Bruton (BTK), indicado en MCL en fases refractarias o con recaídas.^[13] Sin embargo, el 40% de los pacientes en tratamiento presentan resistencia al fármaco. Esta resistencia se explica por un concepto genético: unas mutaciones son responsables de la activación patológica de la cascada de señalización del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B (NFkB), que desencadena el linfoma.^{[14], [15]}

Para combatir la resistencia en estos pacientes, se propuso una terapia combinada de dos fármacos, que en un principio tuvo éxito. El *ibrutinib* se administró junto con un iBET, conocido como *OTX015* (*birabresib*) y con una estructura base análoga a *JQ1*, primer iBET descubierto. Los iBET actúan reprimiendo la transcripción de oncoproteínas y del factor nuclear NFkB, interrumpiendo el crecimiento y la supervivencia de las células cancerígenas del linfoma. La asociación *ibrutinib*-*OTX015* retrasó la letalidad en ratones con injertos de células humanas de MCL.^[14]

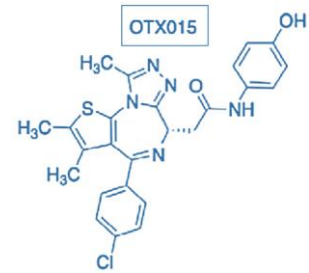


Fig.7. Estructura de OTX015.^[3]

El problema de estos dos formatos de inhibidores es que la inhibición es reversible, tanto para *ibrutinib* como para *OTX015*. Esta reversibilidad genera una acumulación de proteínas BRD4, que desplaza a los fármacos de manera competitiva. Todo esto se traduce en una falta de apoptosis inducida y en una escasa actividad antiproliferativa, generándose de nuevo resistencia al tratamiento.^{[12], [16]}

Con el fin de solucionar estas limitaciones, probaron con *ARV-825* (Fig.8). Este PROTAC tiene también a BRD4 como diana y su ligando de unión es un fragmento derivado de *OTX15*. A través de un derivado de *pomalidomida*, se une la ligasa E3 CRBN. El hecho de que ambos ligandos de *ARV-825* sean fragmentos de fármacos ya existentes, demuestra que no es necesario partir de cero para diseñar un PROTAC.

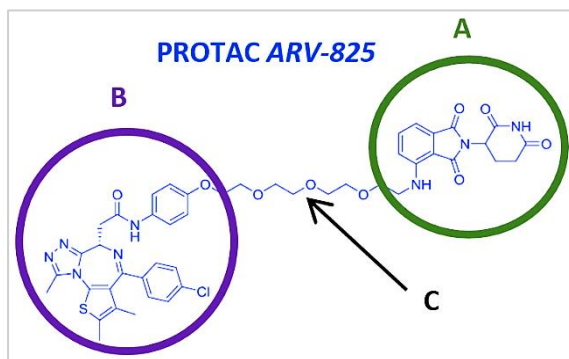


Fig.8. Estructura de ARV-825. Las partes señaladas corresponden con el ligando de unión a la ligasa E3 CRBN (A), el ligando de unión a BRD4 (B) y el conector (C).^[12]

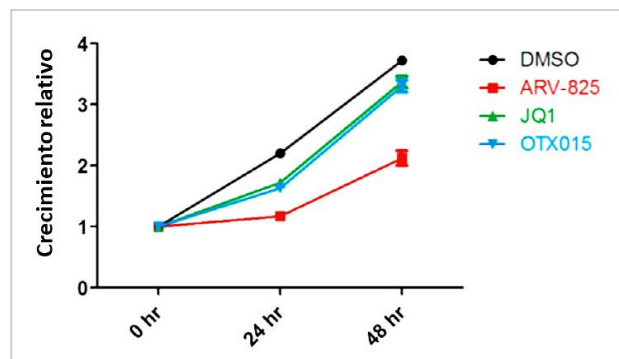


Fig.9. Crecimiento relativo de células de cultivo tras el tratamiento durante 24 horas, seguido de la retirada de los componentes activos.^[12]

El estudio comprobó que en concentraciones equimolares, la monoterapia con el PROTAC era más potente que la del iBET. El fármaco ARV-825 degradó la misma cantidad de BRD4 en menos tiempo y con menos dosis que OTX015, convirtiéndose en el más eficaz. Además, al retirar los fármacos, los niveles de BRD4 se mantuvieron constantes durante 24 horas con el PROTAC, mientras que en el iBET el lapso fue de tan solo 4 horas (Fig.9). Esto implica que la regulación de la dosis es más cómoda con los PROTACs.^[12]

Luego se probó la asociación iBET-PROTAC. Se observó que ARV-825 ayudaba a OTX015 a deshacerse de las proteínas BRD4 que este último no era capaz de abarcar, dado que un PROTAC degrada en vez de inhibir, es decir, la proteína desaparecía. También se probó la combinación *ibrutinib*-PROTAC y se llegó a la misma conclusión. Estos resultados son esperanzadores ya que los pacientes podrían ser tratados exitosamente con la asociación sinérgica *ibrutinib*-PROTAC, independientemente de ser sensibles o resistentes al *ibrutinib*.^[14]

Mediante la observación de células *in vivo*, los ensayos clínicos en curso para ARV-825 están evaluando dicho sinergismo. Se centran en el progreso en la inducción de apoptosis e interrupción del crecimiento celular, prestando especial atención a los casos resistentes al tratamiento habitual.^{[12], [16]}

C) Conector

La función del conector es unir a los dos ligandos recién explicados, tal y como su propio nombre indica. No obstante, esta función no es tan simple como parece. Tiene la responsabilidad de que el complejo ternario POI – PROTAC – ligasa E3 se establezca, y para ello hay que valorar distintas cualidades de este conector:

- Longitud: dependiendo de la longitud que tenga va a permitir o no la formación de dicho complejo. Si es demasiado corto, el PROTAC no puede alcanzar a los dos sustratos a la vez, ya que el impedimento estérico es muy grande. Por el contrario, si es demasiado largo, las interacciones proteína-proteína se ven también afectadas, dificultando la posterior ubiquitinación. En los PROTACs, el hecho de que haya muchas interacciones no es sinónimo de una mayor eficacia. Se busca que el PROTAC se una a sus sustratos, pero lo que mide la actividad no es la calidad de las interacciones, sino la cantidad de proteína sustrato degradada.^[17]
- Flexibilidad: debe ser lo suficientemente rígido como para que la estructura sea estable, pero hay que equilibrarlo con cierto grado de flexibilidad, de manera que el PROTAC pueda unir simultáneamente ambos sustratos.^[6]
- Solubilidad: modificando los grupos funcionales del conector se puede incrementar la solubilidad del PROTAC. En este sentido, el grupo piperidina funciona bastante bien.^[6]
- Lipofilia: las propiedades farmacocinéticas dependen mucho de la lipofilia, ya que si es muy poco lipófilo complica la entrada del PROTAC al interior celular. En los primeros PROTACs, esta cuestión estaba dificultada por el elevado peso molecular que tenían. Sin embargo, tenían actividad. Varios estudios comprobaron que al incluir péptidos en la estructura del PROTAC, la membrana celular podía reconocerlos e incluirlos en su interior gracias a sus transportadores de aminoácidos.^[9]

Es complicado que un PROTAC cumpla la Regla de Lipinski, o la Regla del Cinco. Esta regla evalúa si una molécula tiene buena biodisponibilidad *in vivo* cuando se administra por vía oral en humanos. La molécula en cuestión debe tener menos de 5 donadores de hidrógeno y menos de 10 aceptores, su peso molecular no debe superar los 500 Da y su log P (siendo P el coeficiente octanol-agua) debe ser menor de 5. Para que cumpla dichos requisitos, la molécula debe ser muy pequeña y muy lipófila.^[18]

Normalmente la vía oral es la preferida para la administración de fármacos. Por ello, las investigaciones se están centrando en hacer que los PROTACs cumplan la Regla de Lipinski en la medida de lo posible.

La estructura del conector juega un papel esencial en la permeabilidad celular del PROTAC y en el éxito de la ubiquitinación.^[7] Esto ha sido demostrado en varios estudios que han comparado dos PROTACs con ligandos idénticos, pero con ligeras modificaciones en los conectores: cambios en la longitud y en las uniones de los ligandos a los mismos.

En uno de estos estudios se diseñó *PROTAC 1*, que atacaba a las proteínas ATPasas SMARCA2 (*BRM*) y SMARCA4 (*BRG1*) del complejo BAF (*BRM or BRG1 associated factors*). Este complejo se encuentra alterado en el 20% de los cánceres, generando las mencionadas proteínas. Por esta razón, dichas ATPasas fueron las dianas de *PROTAC 1*, y fueron marcadas por la ligasa VHL enlazada en el extremo opuesto del mismo. El complejo ternario que se formó fue SMARCA2/4 – *PROTAC 1* – VHL. Hicieron varios prototipos de conectores para *PROTAC 1*, todos ellos con una estructura base de polietilenglicol.

El PROTAC demostró que inducía la degradación de SMARCA2 y 4, pero en menor proporción con respecto a un inhibidor de las mismas. Observaron que el conector era demasiado flexible: se formaba un bucle lipofílico que dificultaba la óptima actividad de *PROTAC 1*. Los resultados en la permeabilidad tampoco fueron buenos, ya que la mayor parte de la absorción se producía a través de los transportadores y no por difusión pasiva, que es lo que se prefiere.

Por ello decidieron hacer cambios en el conector y no en los ligandos, ya que no querían modificar la cantidad de donantes de hidrógeno. Se añadió un benceno a la estructura, que no modificó su longitud, pero sí aumentó su lipofilia, y con ella la permeabilidad. Este nuevo compuesto, *PROTAC 2*, también incrementó la afinidad hacia las proteínas SMARCA, manteniendo las interacciones del complejo ternario anterior. La energía libre de Gibbs del *PROTAC 2* fue de 1,4 kcal/mol menos que la de *PROTAC 1*; esto se traduce en una mayor estabilidad en la adquisición de la forma activa, que es el complejo ternario.

Viendo el potencial que tenía la modificación del conector, estos investigadores quisieron profundizar un poco más. Crearon *ACBI1*, un PROTAC que solo se diferenció de los anteriores

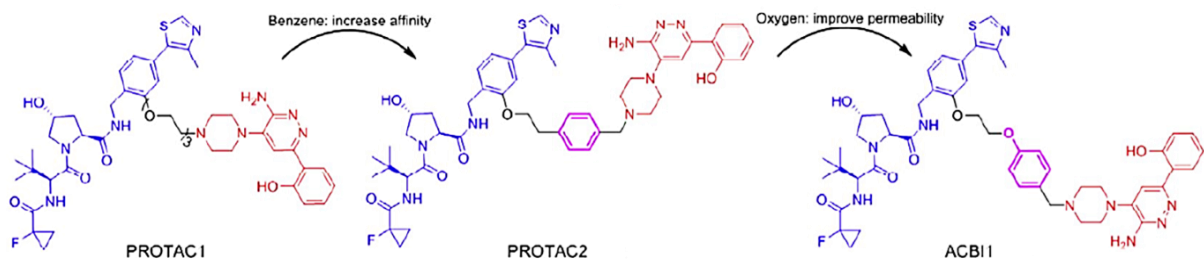


Fig.10. Cambios en el conector para aumentar la afinidad y la permeabilidad de PROTAC 1.^[6]

en que se añadió un oxígeno al conector por la parte que se unía al ligando de VHL (Fig.10). El PROTAC *ABC11* demostró un nuevo aumento de la permeabilidad, además de una completa degradación de las proteínas sustrato (tanto SMARCA 2 como SMARCA 4).^[19]

En otro estudio se plantearon hacer que un PROTAC seleccionase exclusivamente una isoforma de una proteína, de entre todas las integrantes de una misma familia. La esencia del estudio estaba en que solamente querían variar el conector, aunque se dieron un margen: tenían la posibilidad de cambiar la orientación de la ligasa E3 enlazada, que fue VHL. La proteína diana fue p38, perteneciente a la familia de las MAPK. Consiguieron reclutar diferentes isoformas (p38 α y p38 δ) simplemente con la variación del conector.

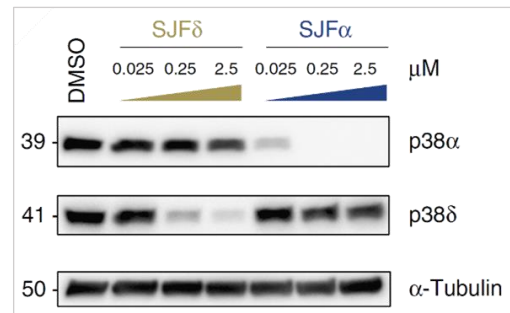


Fig.11. Degradaciones selectivas de p38 α y p38 δ por SJF α y SJF δ , respectivamente. SJF δ no degrada la isoforma α , dado que sigue apareciendo en la revelación, y viceversa.^[20]

El PROTAC con un conector de cadena larga, *SJF α* , mostró selectividad por p38 α ; mientras que *SJF δ* , cuyo conector era de cadena corta, se inclinó por la isoforma p38 δ (Fig.11). Demostraron que, dependiendo del conector empleado, la selectividad de un PROTAC puede ser dirigida para optimizar el tratamiento, en función de la patología que sea.^[20]

En definitiva, lo mejor para encontrar al PROTAC ideal es probar las múltiples combinaciones que aportan los tres componentes explicados: conector y ligandos de unión a ligasa E3 y POI. Para diseñarlo, se debe investigar cada patología concreta para saber cuál es la proteína que más interesa degradar. Una vez seleccionada, hay que buscar los mejores ligandos para la misma, así como para la ligasa E3, que a su vez debe ser también estudiada. Por último, la importancia del conector no debe pasar desapercibida, dados los muchos estudios que han demostrado lo influyente que puede llegar a ser tanto para la estabilidad del complejo ternario (proteína diana – PROTAC – ligasa), como para la selectividad del PROTAC.^{[7], [19], [20]}

En este momento existen dos PROTACs muy avanzados. Se trata de los compuestos *ARV-110* y *ARV-471*, diseñados por la compañía *Arvinas* y que se encuentran en la fase I de ensayos clínicos. A continuación, se muestran las indicaciones que tienen según la página web del laboratorio biofarmacéutico:^[21]

- **ARV-110:** diseñado para el tratamiento potencial del cáncer de próstata resistente a castración (mCRPC). Su diana es el receptor de andrógenos (AR), que influye notablemente en el crecimiento descontrolado de estas células cancerosas. Además, la sobreexpresión y la mutación de este receptor son los dos principales mecanismos de resistencia que aparecen en las terapias actualmente empleadas en este cáncer.
- **ARV-471:** diseñado para el tratamiento potencial del cáncer de mama localmente avanzado o metastásico ER positivo / HER2 negativo. Estas pacientes deben haber sido tratadas previamente con quimioterapia y terapia hormonal para poder formar parte del estudio. Este PROTAC demostró mayor eficacia en la fase preclínica en comparación con la terapia actual: el antagonista de los receptores estrogénicos *fulvestrant* (Fig.12).

Las resistencias que surgen con el tratamiento tradicional se deben a que su mecanismo de acción favorece la sensibilización de los receptores hormonales. Esto se traduce en una falta de eficacia, puesto que, al haber más receptores, la dosis administrada no puede abarcar a todos ellos. Como los PROTACs degradan el receptor, no puede darse dicha sensibilización.

Por ello presentan mejores resultados y tienen expectativas más esperanzadoras. De ARV-110 y ARV-471 se sabe que se administra una única dosis diaria vía oral. Pero al encontrarse aún en ensayos clínicos, su estructura concreta no es pública. [21]

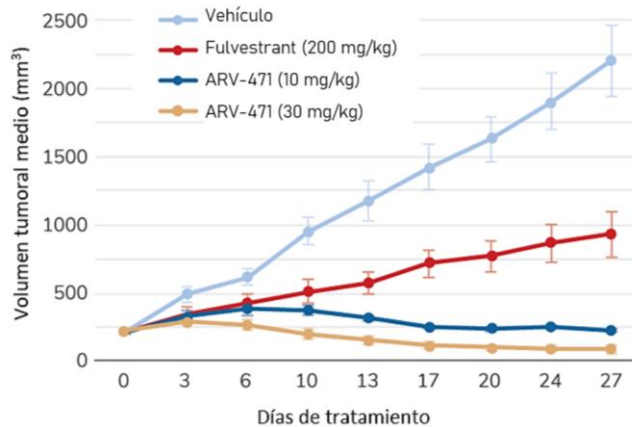


Fig.12. *Inhibición del crecimiento tumoral en modelo de xenoinjerto derivado de paciente (cáncer de mama localmente avanzado o metastásico ER positivo / HER2 negativo). Comparación de tratamientos: fulvestrant y ARV-471.* [21]

5.2. OTROS TIPOS DE PROTACs

→ HomoPROTACs

Son un tipo de PROTAC donde ambos ligandos enlazan una ligasa E3 de ubiquitina, de forma que tienen una estructura simétrica. Una de las ligasas va a tener su función de siempre, mientras que la otra va a actuar como proteína diana. Tal y como se ha explicado previamente, existen patologías en las que la proteína problemática es una ligasa E3. [6], [17]

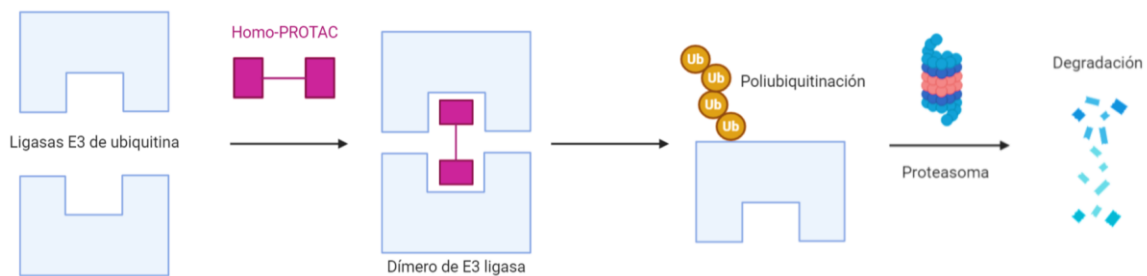


Fig.13. *Estructura y mecanismo de los HomoPROTACs. Los dos ligandos del HomoPROTAC son idénticos, ya que la ligasa E3 es también proteína diana.*

→ ENDTACs

Una de las limitaciones de los PROTACs estándar es que solo pueden degradar proteínas que se encuentren en el interior celular. Los ENDTACs (“endosome targeting chimera”) pretenden ser activos en proteínas extracelulares. A través de una ruta de endosomas mediada por receptores, dichas proteínas se pueden internalizar para permitir su posterior degradación,

que en este caso sería llevada a cabo por lisosomas en vez de por el proteasoma. Por lo tanto, uno de los extremos del ENDTAC se une a una proteína diana extracelular, mientras que el otro se une a los receptores de la membrana responsables de la endocitosis.^[6]

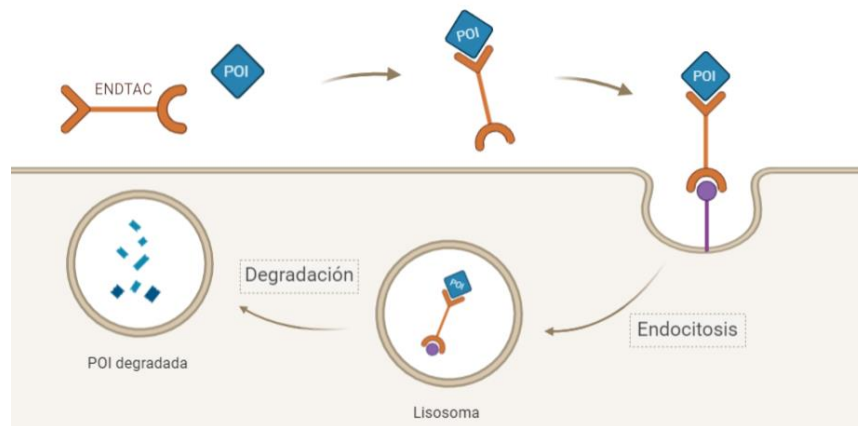


Fig.14. **Mecanismo de los ENDTACs.** Uno de los ligandos del ENDTAC se une a la proteína de interés (POI) extracelular, mientras que el otro se une a un receptor de membrana encargado de la endocitosis. Una vez internalizada la POI, los lisosomas son los encargados de su degradación.

→ PhosphoPROTACs

La fosforilación proteica es una de las modificaciones postraduccionales más frecuentes, y en condiciones fisiológicas no tiene por qué suponer un riesgo. Sin embargo, se ha visto que ciertas proteínas sobreexpresadas en el cáncer han sido generadas por una activación patológica de la cascada de fosforilación. Estas proteínas son activadas por tirosinas quinasas mediante una fosforilación. Para ello, reconocen secuencias de fosforilación en las quinasas, de manera que una proteína fosforilada puede activar a otras, iniciándose así la cascada de reacciones.

Los phosphoPROTACs tienen como diana proteínas mediadoras de dicha cascada. Poseen la estructura estándar de un PROTAC, pero además tienen una secuencia de fosforilación que hace que la POI lo confunda con la tirosina quinasa, de forma que va a ser fosforilada por el fármaco en vez de por la quinasa. Por el otro extremo del phosphoPROTAC se une la ligasa E3 y se forma el complejo ternario que posibilita la degradación de la POI por el proteasoma. Al degradarla, se impide la activación de la cascada de fosforilación, y con ella la acumulación de productos responsables de la progresión del cáncer.^{[6], [8]}

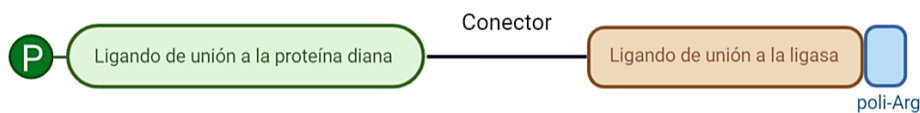


Fig.15. **Estructura de los phosphoPROTACs.** El ligando que une la proteína diana (verde) consta de una secuencia de fosforilación (P). Unido mediante un conector está el ligando de unión a la ligasa E3 (naranja) que tiene un residuo de poli-arginina para mejorar la permeabilidad celular.

La actividad de un phosphoPROTAC depende de la existencia de una secuencia de fosforilación. Esto es una gran ventaja, ya que implica un aumento de selectividad, y por lo tanto una reducción de la dosis y duración del tratamiento. A pesar de que esta estrategia no haya tenido mucho éxito dadas las dificultades farmacocinéticas, ha fomentado el desarrollo de otras estrategias de activación selectiva, como la terapia fotodinámica.

→ Terapia fotodinámica

La terapia fotodinámica busca selectividad en los tratamientos antitumorales, ya que estos producen toxicidad a niveles distintos del lugar de acción. La activación de esta terapia se dirige mediante la irradiación con una longitud de onda determinada, de tal forma que, al irradiar exclusivamente en el lugar de acción, se consigue especificidad y poca toxicidad. Por ello, han surgido ciertos modelos de PROTACs basados en este concepto:

▪ **opto-PROTACs / pc-PROTACs**

Cuentan con los tres elementos generales de un PROTAC, y además se le ha incorporado un “*caging group*”, que es el que proporciona la activación selectiva. El procedimiento de estos fármacos consiste en administrarlos al paciente y una vez distribuidos, irradiar el tejido diana desde fuera, con la longitud de onda que active al opto-PROTAC, de tal manera que el *caging group* se escinde y el fármaco tiene libertad para ejercer su acción.^[8]

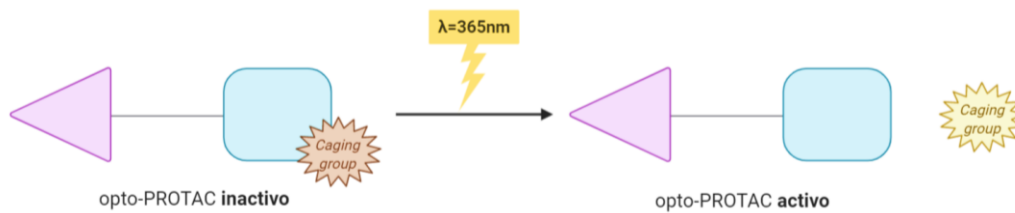


Fig.16. **Primer opto-PROTAC diseñado.** Posee un *caging group* de nitroveratriloxicarbonilo (NOVC) unido al ligando de la ligasa E3 (azul) que se escinde del fármaco tras ser irradiado con $\lambda=365\text{nm}$. El ligando de unión a la proteína diana (rosa) está enlazado al anterior por un conector.

▪ **PHOTACs y photoPROTACs**

Son muy parecidos a los anteriores, pero además de activarse, también pueden inactivarse. Tienen una especie de interruptor compuesto de azobenceno que varía en función de las longitudes de onda que se irradian. La forma inactiva de un PHOTAC tiene una conformación *trans*, que tras ser irradiada ($\lambda=390\text{nm}$) cambia a *cis*, su forma activa. La longitud de onda que lo inactiva de nuevo es de 525nm.

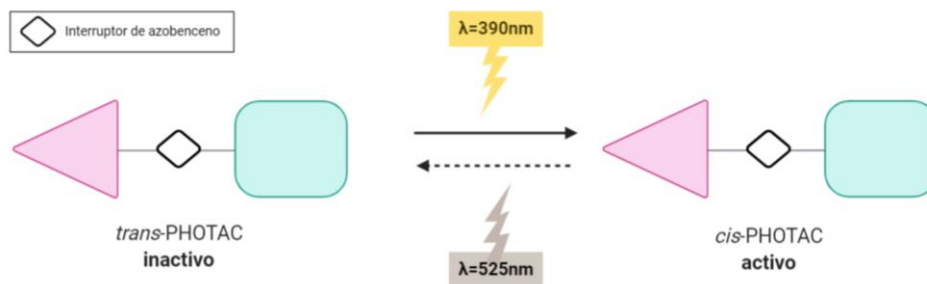


Fig.17. **Mecanismo de un PHOTAC.** La longitud de onda de 390nm enciende el interruptor de azobenceno, y el PHOTAC pasa de su conformación inactiva, *trans*, a su activa, *cis*. Si se irradia con 525nm se vuelve a la forma inactiva o *trans*.

Los photoPROTACs actúan justo al revés: su forma inactiva es *cis*, que si se irradia con 415nm se convierte en su forma activa o *trans*, la cual puede volver a ser inactivada con luz de 530nm.

La principal limitación de la terapia fotodinámica está en el tipo de luz utilizada. El uso de la luz ultravioleta está muy restringido dada su capacidad mutagénica. El futuro de esta terapia está en emplear unas longitudes de onda menos dañinas, como pueden ser los infrarrojos.^[8]

5.3. OTRAS ESTRATEGIAS DE DEGRADACIÓN PROTEICA

→ Inhibidores de proteínas de choque térmico (*Heat Shock Proteins Inhibitors*, iHSP)

Las proteínas de choque térmico, conocidas como HSP por sus siglas en inglés, están elevadas en algunas patologías cancerígenas, como es el caso de la chaperona HSP90. Las chaperonas son proteínas endógenas que participan en el plegamiento correcto de otras proteínas para que puedan desarrollar adecuadamente su función. Conociendo esto, se desarrollaron inhibidores de esta molécula (iHSP90), ya que cuando una proteína no es capaz de plegarse correctamente, el proteasoma la destruye dada su disfuncionalidad.

Existe más de una treintena de ensayos clínicos con inhibidores de HSP90, aunque ninguno de ellos está aún comercializado. Esto se debe a que tienen cierta hepatotoxicidad, además de que han mostrado baja efectividad en ensayos con animales de experimentación. [7], [9]

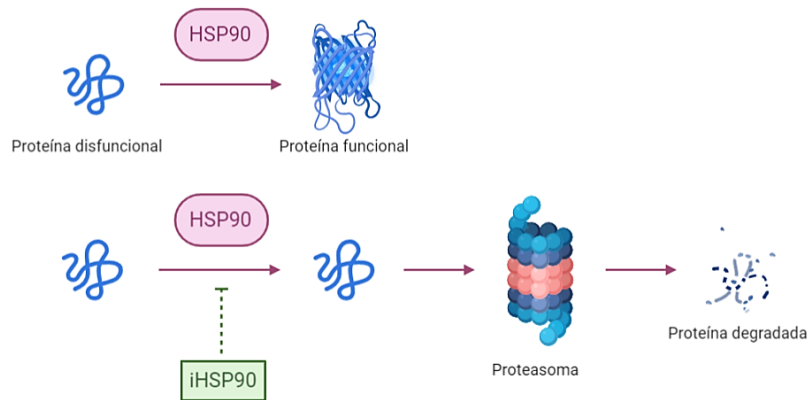


Fig.18. **Mecanismo de los iHSP90.** La chaperona HSP90 participa en el plegamiento proteico correcto. Al ser inhibida, las proteínas se mantienen disfuncionales y el proteasoma las destruye.

→ Hydrophobic tagging (HyT)

Esta terapia tiene un fundamento parecido al de los iHSP, ya que inducen el plegamiento proteico incorrecto y su consecuente degradación. Existen dos teorías en cuanto a su mecanismo de acción. En la primera, el fármaco crea un bucle hidrofóbico en la superficie de la proteína diana al unirse a ella, de forma que esta se desestabiliza y va a ser secuestrada por una chaperona. La segunda postula que la chaperona ya reconoce a la proteína como disfuncional antes de que sea desestabilizada, solo por el hecho de encontrarse unida al HyT. En cualquiera de los dos casos, la POI no puede plegarse adecuadamente, y la degradación por el proteasoma se hace inevitable. Esta técnica demostró buena selectividad y con ella baja toxicidad. [6], [7], [9]

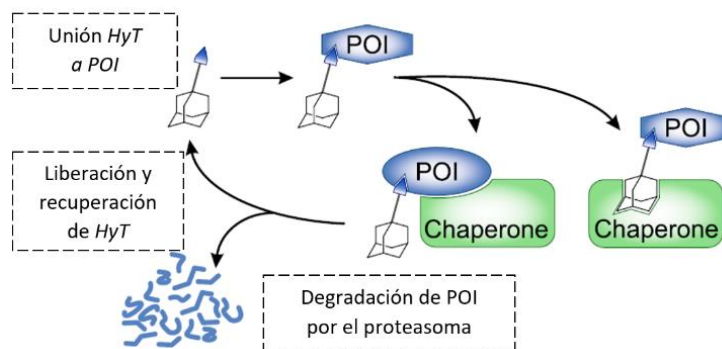


Fig.19. **Mecanismo de degradación proteica de HyT.** Este fármaco concreto tiene un derivado de adamantano, afín a la chaperona, y un ligando que une la POI (triángulo azul). [7]

5.4. VENTAJAS Y LIMITACIONES

La principal ventaja de los PROTACs con respecto a los inhibidores tradicionales es que degradan a la proteína problemática en vez de inhibirla. Con esto desaparece el desarrollo de resistencias, primero porque se impide la sensibilización o mutación de receptores; segundo porque se evita la acumulación de la POI ya que, al ser eliminada, no se establece un equilibrio entre POI libre y POI inhibida. En ambos casos se consigue una disminución de la dosis administrada al paciente, la cual está también fomentada por el hecho de que el PROTAC se recupera en cada ciclo de poliubiquitinación. La reducción de la dosis también implica una menor cantidad de reacciones adversas. Esto es interesante dado que, al estar indicados en patologías graves, no interesa disminuir aún más la calidad de vida del paciente.^[6]

Esta reducción de la toxicidad ya ha sido observada previamente en los anticuerpos monoclonales (mAB), los cuales han dado muy buenos resultados. Estos fármacos tienen una estructura parecida a los PROTACs, ya que tienen un ligando de unión a la POI y un conector. Sin embargo, su tercer componente es un principio activo citotóxico muy potente, el cual nunca podría ser administrado individualmente dada dicha toxicidad.^[22] El principal inconveniente de los mAB es que, hasta ahora, solo pueden ser administrados mediante una vía invasiva (intravenosa, intramuscular). Los PROTACs ha demostrado eficacia vía oral, lo que supone una comodidad para el paciente en tratamiento crónico. Además, las dianas de los mAB se reducen a las proteínas de membrana. Los PROTACs tienen el potencial de reclutar a cualquier proteína, incluyendo las denominadas *undruggable*.

Por otro lado, los PROTACs también tienen limitaciones. Se han notificado mutaciones genómicas en el proteasoma, así como en algunas ligasas E3 de ubiquitina, que podrían suponer la resistencia (intrínseca) al tratamiento. Algunos PROTACs también han mostrado cierta toxicidad, aunque esta podría evitarse a través de terapias selectivas como la terapia fotodinámica.^{[7], [8], [17]}

6. CONCLUSIONES

Los PROTACs han demostrado tener buenas propiedades como fármacos en potencia. Tienen buena estabilidad, solubilidad, permeabilidad y distribución. También han demostrado que pueden ser muy específicos y selectivos, de forma que la posible toxicidad que tengan se vea reducida. Por todo ello se presentan como candidatos perfectos para el tratamiento de enfermedades de elevada morbilidad, como son el cáncer y algunas demencias, donde los tratamientos tradicionales han desarrollado ciertas limitaciones, como puede ser la falta de eficacia por el desarrollo de resistencias.

Sin embargo, para optimizar dichas cualidades, todavía hay muchas cuestiones que deber ser estudiadas: análisis completo de las ligasas E3 de ubiquitina del organismo, así como las sobreexpresadas en los tejidos diana; actuación de los inhibidores actuales como posibles ligandos; búsqueda de nuevos ligandos para las proteínas *undruggable*, y con ella conseguir la vulnerabilidad completa del proteoma; estudio de especificidad, selectividad y afinidad de los ligandos con sus sustratos; optimización del conector; estudio farmacogenético de pacientes, para localizar mutaciones como posibles causantes de resistencias, etc.

Si se abarcan todas ellas, quizá en un futuro, las limitaciones que actualmente están mostrando estos principios activos de degradación dirigida, parecerán insignificantes.

7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Gao, H., Sun, X., Rao, J. (2020). PROTAC Technology: Opportunities and Challenges. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 11, 237-240. DOI: 10.1021/acsmedchemlett.9b00597
- [2] Scudellari, M. (2019). Protein-slaying drugs could be the next blockbustertherapies. *Nature*, 567, 298-300. DOI: 10.1038/d41586-019-00879-3
- [3] Avedaño, C., Menéndez, J.C. (2015). *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs* (2 ed.), Elsevier, 325-350 & 493-499. DOI: 10.1016/B978-0-444-62649-3.00008-9
- [4] Adams, J. (2004). The proteasome: a suitable antineoplastic target. *Nature Reviews. Cancer*, 4, 349-360. DOI: 10.1038/nrc1361
- [5] Schapira, M., Calabrese, M. F., Bullock, A. N., & Crews, C. M. (2019). Targeted protein degradation: Expanding the toolbox. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 18, 949-963. DOI: 10.1038/s41573-019-0047-y
- [6] Wang, Y., Jiang, X., Feng, F., Liu, W., Sun, H. (2020). Degradation of proteins by PROTACs and other strategies. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 10, 207-238. DOI: 10.1016/j.apsb.2019.08.001
- [7] Cromm, P. M., Crews C. M. (2017). Targeted Protein Degradation: from Chemical Biology to Drug Discovery. *Cell Chemical Biology*, 24, 1181-1190. DOI:10.1016/j.chembiol.2017.05.024
- [8] Liu, J., Ma J., Liu, Y., Xia, J., Li, Y., Wang, Z. P., Wei, W. (2020). PROTACs: A novel strategy for cancer therapy. *Seminars in Cancer Biology*. DOI: 10.1016/j.semcancer.2020.02.006
- [9] Lai, A. C., Crews, C. M. (2017). Induced protein degradation: an emerging discovery paradigm. *Nature Reviews, Drug Discovery*, 16, 101-114. DOI: 10.1038/nrd.2016.211
- [10] CIMA, Centro de Información online de Medicamentos de la AEMPS [Internet]. España, 2017: Ficha técnica Revlimid®, [consultado 03/04/20]. Disponible en: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/07391002/FT_07391002.html
- [11] Pei, H., Peng, Y., Zhao, Q., Chen, Y. (2019). Small molecule PROTACs: an emerging technology for targeted therapy in drug discovery. *RSC Advances, Royal Society of Chemistry*, 9, 16967-16976. DOI: 10.1039/C9RA03423D
- [12] Lu, J., Qian, Y., Altieri, M., Dong, H., Wang, J., Raina, K., Hines, J., Winkler, J. D., Crew, A. P., Coleman, K., Crews, C. M. (2015). Hijacking the E3 Ubiquitin Ligase Cereblon to Efficiently Target BRD4. *Chemistry & Biology*, 22, 755-763. DOI: 10.1016/j.chembiol.2015.05.009
- [13] CIMA, Centro de Información online de Medicamentos de la AEMPS [Internet]. España, 2017: Ficha técnica Imbruvica® [consultado 04/04/20]. Disponible en: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/114945002/FT_114945002.html
- [14] Bhalla, K., Sun, B., Fiskus, W., Zhang, L., Saenz, D., Mill, C., Wang, M. (2016). Novel BRD4-Degrading Proteolysis Targeting Chimera (PROTACs) Exert Potent Single Agent and Synergistic Activity with Ibrutinib and Venetoclax Against Human Mantle Cell Lymphoma (MCL) Cells. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*, 16, S108-S109. DOI: 10.1016/j.clml.2016.07.157
- [15] Colomer, D., Campo, E. (2014). Unlocking New Therapeutic Targets and Resistance Mechanisms in Mantle Cell Lymphoma. *Cancer Cell*, 25, 7-9. DOI: 10.1016/j.ccr.2013.12.011

- [16] Sun, B., Fiskus, W., Qian, Rajapakshe, K., Raina, K., Coleman, K. G., Crew, A. P., Shen, A., Saenz, D. T., Mill, C.P., Nowak, A. J., Jain, N., Zhang, L., Wang, M., Khoury, J. D., Coarfa, C., Crews, C. M., Bhalla, K. N. (2018). BET protein proteolysis targeting chimera (PROTAC) exerts potent lethal activity against mantle cell lymphoma cells. *Nature, Leukemia*, 32, 343–352. DOI: 10.1038/leu.2017.207
- [17] An, S., Fu, L. (2018). Small-molecule PROTACs: An emerging and promising approach for the development of targeted therapy drugs. *EBioMedicine*, 36, 553-562. DOI: 10.1016/j.ebiom.2018.09.005
- [18] Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., Feeney, P. J. (1997). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and Development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 23, 3-25. DOI: 10.1016/S0169-409X(96)00423-1
- [19] Farnaby, W., Koegl, M., Roy, M.J., Whitworth, C., Diers, E., Trainor, N., Zollman, D., Steurer, S., Karolyi-Oezguer, J., Riedmueller, C., Gmaschitz, T., Wachter, J., Dank, C., Galant, M., Sharps, B., Rumpel, K., Traxler, E., Gerstberger, T., Schnitzer, R., Petermann, O., Greb, P., Weinstabl, H., Bader, G., Zoephel, A., Weiss-Puxbaum, A., Ehrenhöfer-Wölfer, K., Wöhrle, S., Boehmelt, G., Rinnenthal, J., Arnhof, H., Wiechens, N., Wu, M. Y., Owen-Hughes, T., Ettmayer, P., Pearson, M., McConnell, D. B., Ciulli, A. (2019). BAF complex vulnerabilities in cancer demonstrated via structure-based PROTAC design. *Nature Chemical Biology*, 15, 672-680 DOI: 10.1038/s41589-019-0294-6
- [20] Smith, B. E., Wang, S. L., Jaime-Figueroa, S., Harbin, A., Wang, J., Hamman, B. D., & Crews, C. M. (2019). Differential PROTAC substratespecificity dictated by orientation of recruited E3 ligase. *Nature Communications*, 10, 1-13. DOI: 10.1038/s41467-018-08027-7
- [21] Arvinas [Internet]. New Haven, Connecticut (2019): Arvinas Presents a Platform Update, Including Initial Data from the First Two Clinical Trials of PROTAC® Targeted Protein Degraders [consultado 02/04/20]. Disponible en: <https://ir.arvinas.com/news-releases/news-release-details/arvinas-presents-platform-update-including-initial-data-first>
- [22] Bashraheel, S. S., Domling, A., Goda, S. K. (2020). Update on targeted cancer therapies, single or in combination, and their fine tuning for precision medicine. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 125, 1-16. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110009