



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO
Proteolysis Targeting Chimera (PROTAC) I

Autora: YANWEI NIE

Fecha: JULIO 2020

Tutora: DRA. MERCEDES VILLACAMPA SANZ

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	- 2 -
2. INTRODUCCIÓN	- 2 -
2.1. Sistema ubiquitina-proteosoma.....	- 3 -
2.2. Quimeras dirigidas a la proteólisis (PROTACs)	- 4 -
3. OBJETIVOS.....	- 5 -
4. METODOLOGÍA	- 5 -
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	- 5 -
5.1. Primera generación: PROTACs peptídicas.....	- 5 -
5.2. Segunda generación: PROTACs basadas en moléculas pequeñas	- 6 -
5.3. Otras variantes de PROTAC.....	- 7 -
5.3.1. CLIPTACs (in-cell click-formed proteolysis targeting chimeras).....	- 7 -
5.3.2. Homo-PROTACs	- 8 -
5.3.3. PhosphoPROTACs.....	- 9 -
5.3.4. PROTACs foto-inducibles	- 10 -
5.3.5. SNIPERs (specific and non-genetic inhibitor of apoptosis protein-dependent protein erasers).....	- 11 -
5.3.6. LYTACs (lysosome targeting chimeras).....	- 12 -
5.3.7. AUTACs (autophagy targeting chimeras).....	- 13 -
5.4. Ensayos clínicos.....	- 14 -
5.5. Ventajas	- 15 -
5.6. Limitaciones y Retos	- 16 -
6. CONCLUSIONES	- 17 -
7. BIBLIOGRAFÍA.....	- 18 -

1. RESUMEN

La PROTAC consiste en una molécula quimérica hetero-bifuncional formada por un ligando de la diana, otro ligando que recluta una ligasa E3 y un conector. Induce la proximidad entre la diana y la ligasa E3 favoreciendo la ubiquitinación y la degradación de la diana por el sistema ubiquitina-proteosoma.

La biodisponibilidad y la potencia de las PROTACs de primera generación son moderadas debido a la naturaleza peptídica del ligando de ligasa E3. Dichos problemas son resueltos por las PROTACs de segunda generación, que están completamente basadas en moléculas pequeñas. Al mismo tiempo, surgieron una serie de variantes que poseen ventajas adicionales. Las CLIPTACs presentan una mejor penetración celular gracias a la capacidad de autoensamblaje de los precursores. Las homo-PROTACs utilizan la propia ligasa E3 causante de enfermedad para eliminarse a sí misma. Las fosfoPROTACs consiguen una mayor selectividad tisular aprovechando la actividad enzimática de los receptores de tirosina quinasa. Y las PROTACs foto-inducibles permiten el control no solo espacial sino también temporal de acción mediante la irradiación de los grupos fotosensibles. En los SNIPERs tanto la diana como la ligasa E3 son degradados debido a la capacidad de auto-ubiquitinación de IAPs. Y finalmente, las LYTACs y las AUTACs emplean otras maquinarias endógenas, la vía lisosomal y la autofagia, que amplían las dianas accesibles. Hasta el momento dos PROTACs de molécula pequeña han llegado a la fase 1 de ensayos clínicos para tratar el cáncer de mama y de próstata. Además de poder atacar las dianas no “drogables”, la farmacología promovida por evento de PROTAC le aporta mayores potencia y duración de efecto. Una vez provocado el evento que es la degradación de su diana, queda libre y repite el ciclo eliminando cantidades súper-estequiométricas de diana. Se puede aumentar la selectividad a distintos niveles y prevenir las resistencias farmacológicas más frecuentes. Pero aún quedan muchos problemas por resolver, como el procedimiento de desarrollo largo y laborioso, el efecto gancho, los mecanismos de resistencia peculiares, etc. Las futuras investigaciones se deben centrar en explorar más ligasas E3 y dianas, así como en optimizar y estandarizar el procedimiento de desarrollo y análisis. Teniendo todo esto en cuenta, la PROTAC supone un método alternativo excelente para el tratamiento de muchas enfermedades, especialmente los distintos tipos de cáncer.

Palabras clave: PROTAC, proteólisis dirigida, proteosoma, ubiquitinación, ubiquitín ligasa E3, VHL, CRBN, CLIPTAC, PHOTAC, LYTAC, AUTAC, SNIPER

2. INTRODUCCIÓN

Hoy en día la mayoría de los fármacos pertenece a la clase llamada moléculas pequeñas, que pueden ser inhibidoras o activadoras. Los agentes inhibidores actúan bloqueando un sitio específico de la proteína diana y, si procede, también interrumpen la vía de señalización en que participa la diana. Este modo de acción se denomina el modelo farmacológico promovido por ocupación (occupancy-driven pharmacology model). Una de las principales limitaciones de este tipo de fármacos es el requerimiento de mantener un grado elevado de ocupación de la diana. Como consecuencia, se necesitan dosis altas para obtener el efecto deseado, conduciendo de esta forma a una mayor probabilidad de la aparición de efectos “off-target” [1]. Otro gran problema que presenta es que solo el 22% del ADN humano codificante es farmacológicamente accesible por este tipo de medicamentos [2], el resto del proteoma humano permanece no “drogable” (undruggable) debido bien a que el sitio activo sea desconocido o bien a que esté ausente el sitio activo adecuado para la unión de los fármacos. Tampoco son útiles frente a dianas con múltiples sitios activos. Entre estas dianas están los factores de transcripción, las proteínas de andamiaje, otras proteínas que carecen de la actividad enzimática, etc.

Por otro lado, se están desarrollando los anticuerpos monoclonales capaces de reconocer los epítomos específicos de las dianas. A pesar de las elevadas afinidad y selectividad por sus dianas, están limitados a las proteínas extracelulares y las asociadas a la superficie celular debido a su baja permeabilidad de la membrana plasmática [1]. Además, como son fármacos de naturaleza proteica, la biodisponibilidad oral tampoco es favorable y su administración está restringida a la vía parenteral.

Múltiples fármacos basados en ARN interferentes se encuentran tanto en ensayos preclínicos como clínicos y, con ellos se intentan superar los inconvenientes que tienen los fármacos anteriormente mencionados. No obstante, presentan numerosas dificultades características del oligonucleótido a vencer, por ejemplo, la inestabilidad frente a nucleasas, la distribución limitada dentro del organismo y la falta de selectividad tisular que requieren un diseño muy delicado del sistema de liberación [4].

Ante esta situación, la idea de aprovechar las vías proteolíticas endógenas, como el sistema ubiquitina-proteosoma, la vía lisosomal y la autofagia, para eliminar las dianas no “drogables” tanto intracelulares como extracelulares causantes de enfermedades resulta muy atractiva.

2.1. Sistema ubiquitina-proteosoma

El sistema ubiquitina-proteosoma es una de las principales maquinarias de que disponen las células eucariotas para degradar las proteínas. Este sistema consta de 3 familias de enzimas (E1, E2, E3) y el proteosoma 26S que actúan en cascada. La ubiquitina, que es un polipéptido de 76 aminoácidos altamente conservado, sirve como el marcador de la proteína a degradar para que pueda ser reconocida y degradada por el proteosoma.

En el primer paso que es ATP-dependiente, la enzima de activación E1 se une a la ubiquitina gastando una molécula de ATP, el resultado es la formación de un enlace tioéster entre el residuo del C-terminal de ubiquitina y un residuo de cisteína situado en el sitio activo de E1. Después la ubiquitina activada es transferida a la siguiente enzima, la enzima de conjugación E2, y finalmente la E2 conjugada con la ubiquitina se une a la ubiquitín ligasa E3 a la que también está unida la proteína a degradar. La ubiquitín ligasa E3 es la que se encarga de transferir la ubiquitina al sustrato. En general la ubiquitinación ocurre en un residuo de lisina del sustrato formándose un enlace isopeptídico con el C-terminal de la ubiquitina [5]. Las proteínas pueden conjugarse tanto con una molécula de ubiquitina como con varias dando lugar a una cadena de poliubiquitina. La monoubiquitinación se relaciona con la regulación de la actividad y la localización de diversas proteínas celulares [6] mientras que la poliubiquitinación está implicada principalmente en la degradación proteica.

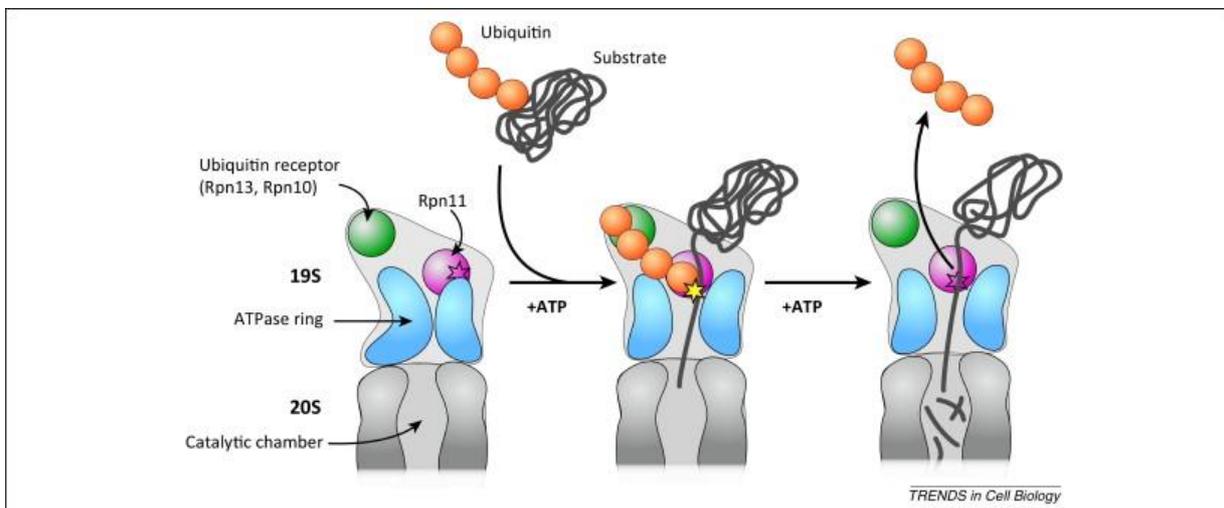


Figura 1. Mecanismo del sistema ubiquitina-proteosoma.

Ahora la proteína poliubiquitinada puede ser reconocida por el proteosoma 26S, que es un complejo proteico formado por un núcleo 20S central y dos partículas reguladoras 19S situadas en los extremos. En primer lugar, el complejo entra en contacto con la proteína diana mediante los receptores Rpn13 y Rpn10 asociados a la partícula 19S, en seguida el Rpn11 corta la cadena de poliubiquitina desde la proteína (figura 1) [5]. Al mismo tiempo se está llevando a cabo la reorganización de la conformación del canal de 19S, que tiene la forma de un anillo formado por seis ATPasas encargadas de promover la translocación del sustrato. Gracias a esto la proteína consigue entrar en el núcleo 20S para sufrir la proteólisis posterior. El núcleo 20S consta de cuatro anillos, los dos exteriores están compuestos por subunidades α , de función estructural, que se encargan del anclaje a las partículas 19S, y los anillos interiores se componen de subunidades β , de naturaleza catalítica, que son los responsables de hidrolizar el sustrato en pequeños péptidos.

2.2. Quimeras dirigidas a la proteólisis (PROTACs)

Aunque a veces las moléculas pequeñas inhibitoras también son capaces de inducir la degradación de su proteína diana, se han observado varios casos en los que el propio inhibidor produce un efecto contrario contribuyendo a un incremento del nivel de la diana, por ejemplo, los inhibidores de BRD4, JQ1 y OTX015, pueden provocar la acumulación de BRD4 en función de la dosis [7]. Por lo tanto, realizar una degradación dirigida de proteínas utilizando la tecnología de PROTAC (Proteolysis Targeting Chimera) puede ser un método más factible y predecible. Una PROTAC consiste en una molécula quimérica hetero-bifuncional formada por tres partes: un ligando de la proteína de interés, un ligando que recluta una ligasa E3 y un conector que los conecta [1]. Se va a formar un complejo ternario con el sustrato y la ligasa E3 que induce la proximidad entre los dos facilitando su interacción. Al reclutar la enzima E2 por parte de la ligasa E3, empieza la poliubiquitinación del sustrato y la consecuente degradación por el proteosoma 26S.

El término proteolysis-targeting chimera (PROTAC) fue introducido por primera vez en un estudio de Sakamoto *et al.*, 2001 [8] en que se diseñó una molécula quimérica capaz de unirse simultáneamente a la metionina aminopeptidasa 2 (MetAP2), una proteína con función proliferativa, y a la ligasa E3 SCF ^{β -TRCP} (figura 2) y se consiguió demostrar *in vitro* su capacidad de provocar la poliubiquitinación y degradación de la MetAP-2 por el sistema ubiquitina-proteosoma. Esa primera PROTAC recibió el nombre de PROTAC-1.

Gracias a este primer estudio de PROTAC muy ilustrativo, surgieron en los siguientes años sucesivos estudios de PROTACs dirigidos hacia diferentes dianas como los receptores de andrógeno y estrógeno (AR y ER), el receptor de hidrocarburos de arilos (ARNT) [9][10], entre otras. Sin embargo, el componente peptídico de estas PROTACs de primera generación hace que su permeabilidad celular sea insuficiente. Además, estos compuestos presentan una potencia moderada, es decir, para que sean activas hay que alcanzar una concentración de nivel micromolar.

Más tarde, el descubrimiento de ligandos no peptídicos de varias ligasas E3 dio un gran paso en el campo de la proteólisis dirigida por quimeras y, como resultado, se generaron numerosas PROTACs completamente basadas en moléculas pequeñas [1].

Las investigaciones recientes también se han enfocado en desarrollar PROTACs de mayor precisión de las que se puede tener un mejor control. A medida que se profundiza el conocimiento en cuanto al lisosoma, a la autofagia, a la fotofarmacología, etc., van apareciendo distintas variantes derivadas de PROTAC. Los ejemplos más representativos son: CLIPTAC, homo-PROTAC, phosphoPROTAC, pc-PROTAC, PHOTAC, LYTAC y AUTAC, algunos de ellos presentan una selectividad tisular excelente o permiten un control espaciotemporal preciso. Vamos a revisar las variantes más relevantes a lo largo de este trabajo.

3. OBJETIVOS

Los objetivos principales consisten en obtener una visión general en el área de la degradación dirigida por moléculas quiméricas, el fundamento, la evolución desde la primera generación hasta los últimos descubrimientos, las ventajas y limitaciones frente a otros tipos de fármacos como las moléculas pequeñas tradicionales, la terapia génica y los medicamentos biológicos así como las futuras aplicaciones clínicas dado que en el momento de escribir este trabajo hay 2 medicamentos desarrollados a base de esta tecnología que se encuentran en fase 1 de ensayos clínicos.

El objetivo secundario reside en discutir sobre los obstáculos o retos a superar durante el diseño, síntesis u otros procesos del desarrollo y las posibles direcciones de futuras investigaciones.

4. METODOLOGÍA

El método utilizado en este trabajo es la revisión bibliográfica de los artículos científicos procedentes de distintas revistas científicas mediante la búsqueda en las fuentes de información y bases de datos como NCBI, PubMed, Wiley Online Library, ScienceDirect, ResearchGate, PNAS, clinicaltrials.gov, etc. utilizando las palabras clave: ubiquitina, ubiquitinación, proteosoma, ligasa E3, proteólisis dirigida, PROTAC, CLIPTAC, homo-PROTAC, PHOTAC, LYTAC, AUTAC, SNIPER, VHL, CRBN, IAPs, entre otras.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Primera generación: PROTACs peptídicas

La ligasa E3 reclutada por la primera PROTAC (PROTAC-1) [8] es la $SCF^{\beta-TRCP}$, que es un complejo tetramérico formado por Skp1, Cull1, Hrt1 y $\beta-TRCP$ (figura 2). Se seleccionó esta ligasa E3 porque tiene un sustrato endógeno bien identificado, el $I\kappa B\alpha$, que es un regulador negativo del factor nuclear $NF\kappa B$. En procesos inflamatorios el $I\kappa B\alpha$ es degradado y, como consecuencia, se activa el $NF\kappa B$ que regula la respuesta inmune. La unión del $I\kappa B\alpha$ al complejo $SCF^{\beta-TRCP}$ es mediada por una secuencia de 10 aminoácidos. Como respuesta a varias señales inflamatorias, la $I\kappa B\alpha$ quinasas fosforila los dos residuos de serina de ese decapeptido de $I\kappa B\alpha$ dando lugar a un fosfopéptido capaz de ser reconocido por la subunidad $\beta-TRCP$ del complejo $SCF^{\beta-TRCP}$. Entonces los investigadores diseñaron el ligando de $SCF^{\beta-TRCP}$ a partir de ese fosfopéptido de $I\kappa B\alpha$ (IPP). Por otra parte, una molécula pequeña inhibidora de MetAP-2, la ovalicina, formó el ligando de la proteína de interés. La molécula quimérica resultante, PROTAC-1, mostró su capacidad de degradar específicamente la MetAP-2 en los extractos del huevo de *Xenopus*. La MetAP-2 cataliza la eliminación de los residuos de metionina en N-terminal de diversos polipéptidos, y su actividad está correlacionada con la proliferación de las células endoteliales. En teoría, la reducción de sus niveles puede causar la suspensión del ciclo celular en las células endoteliales en la fase G1 por un mecanismo dependiente de p53 y de tal forma, la proliferación celular queda bloqueada.

En las siguientes PROTACs 2 y 3 [9] se utiliza el mismo fosfopéptido procedente de $I\kappa B\alpha$ y son dirigidas hacia los receptores de estrógeno y andrógeno, respectivamente, que están estrechamente relacionados con algunos cánceres humanos. Todas estas PROTACs mostraron *in vitro* el efecto deseado de inducir la poliubiquitinación y degradación de su diana, pero presentaron una penetración celular nula, probablemente debido al componente peptídico. Además, la potencia también resultó relativamente baja como consecuencia de la susceptibilidad del fosfopéptido a las fosfatasa.

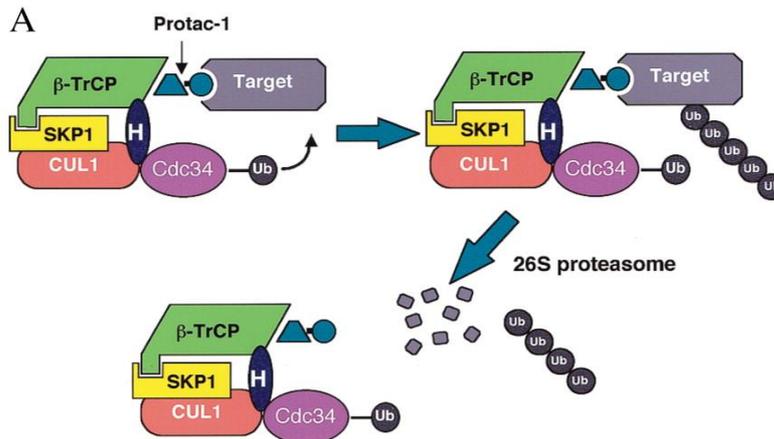


Figura 2 [8]. Mecanismo de acción de Protac-1. H, Hrt1; Cdc34, enzima E2 de conjugación; Ub, ubiquitina.

Con el fin de aumentar la permeabilidad celular, el grupo de Crews elaboró las PROTACs 4 y 5 [11] donde la parte que atrae la ligasa E3 es una secuencia de siete aminoácidos con una hidroxiprolina derivada del factor inducible por hipoxia-1 α (HIF1 α), el cual es un sustrato de la proteína supresora de tumor von Hippel-Lindau (VHL) que forma parte del complejo de la ligasa E3 CRL2^{VHL}. Al C-terminal de este heptapéptido se le añadió una cadena de ocho argininas que facilita la penetración en las células mimetizando el mecanismo de las proteínas Tat de HIV [12]. Más tarde, los investigadores mejoraron el diseño reduciendo la cadena peptídica a un pentapéptido unido a una cadena de nueve argininas a través de dos residuos de glicina. La PROTAC resultante (PROTAC-AA) [13] mostró una mayor potencia comparando con la versión sin la cadena poli-Arg (PROTAC-A). Aunque se ha incrementado la permeabilidad celular, todavía quedan problemas de estabilidad, de biodisponibilidad, del proceso de síntesis, etc. a resolver.

5.2. Segunda generación: PROTACs basadas en moléculas pequeñas

La primera PROTAC totalmente basada en moléculas pequeñas es la SARM–nutlin PROTAC desarrollada por Schneekloth *et al.* [14], que recluta la ligasa E3 MDM2 al receptor de andrógeno. La parte que interacciona con la diana es un ligando no esteroídico denominado modulador selectivo del receptor de andrógeno (SARM) mientras que el ligando de MDM2 es derivado de la nutlina, los dos están conectados por un conector de polietilenglicol (PEG). Según se ampliaba el rango de diana, se incrementó de forma explosiva el número de PROTACs dirigidas a diferentes proteínas, especialmente aquellas implicadas en el proceso tumoral, como los receptores de hormonas, proteínas con bromodominio y motivo extraterminal (BET), la proteína de fusión BCR-ABL, los receptores de tirosina quinasa (RTKs), etc. A pesar de la diversidad de dianas, las ligasas E3 reclutadas siguen siendo poco variadas, se concentran sobre todo en MDM2, VHL, cereblon (CRBN) y las proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs). Estas últimas forman parte de un tipo peculiar de PROTAC llamado SNIPERs (Specific and non-genetic IAP-dependent protein eraser) que se comentarán más adelante.

En cuanto a las VHL-PROTACs basadas en molécula pequeña, el grupo de Crews encontró un ligando de molécula pequeña de VHL al que llamó ligando 1 de VHL, que fue empleado en la PROTAC-ERR α y la PROTAC-RIPK2 con las que se consiguió una potencia mucho más elevada que las PROTACs de primera generación, de modo que la DC₅₀ de la PROTAC-RIPK2 llegó a ser 1,4nM en los monocitos THP-1 humano [15]. Al mismo tiempo, se descubrió que los fármacos inmunomoduladores (IMiDs) pueden interactuar con la subunidad CRBN de la ligasa E3 CRL4^{CRBN}. A partir de este hecho, diferentes equipos de investigación desarrollaron

con éxito una serie de CRBN-PROTACs utilizando IMiDs como pomalidomida, talidomida y lenalidomida.

Sin embargo, la desventaja común de todas estas PROTACs es la falta de selectividad tisular, la cual puede conducir a efectos indeseados. Un ejemplo representativo es la PROTAC-ERR α del grupo de Crews, pues en el ensayo *in vivo* se detectó la reducción de los niveles de ERR α no solo en los tumores MDA-MB-231, sino también en el corazón y los riñones [15]. Por este motivo, el principal objetivo para las siguientes generaciones de PROTAC se asienta en aumentar la selectividad tisular.

5.3. Otras variantes de PROTAC

5.3.1. CLIPTACs (in-cell click-formed proteolysis targeting chimeras)

A pesar de que las PROTACs basadas en moléculas pequeñas ya poseen un peso molecular mucho más bajo que el de las PROTACs peptídicas, los investigadores siguen intentando disminuir aún más el peso molecular y el área de superficie polar para conseguir una mejor permeabilidad celular. Recurrieron a la química clic para desarrollar la PROTAC capaz de autoensamblarse a partir de dos precursores pequeños administrados después de entrar en la célula [16]. Entre las reacciones bio-ortogonales actualmente conocidas eligieron la reacción de cicloadición de Diels-Alder de demanda inversa de electrones (IEDDA) entre tetrazina (Tz) y *trans*-cicloocteno (TCO) por su gran rapidez, alto rendimiento y sin necesidad de usar catalizadores [17].

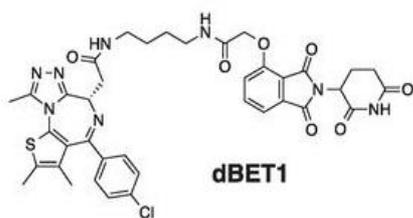


Figura 3 [18]. dBET1

La PROTAC de base de la primera CLIPTAC es dBET1 (figura 3) [18], formada por JQ1, el ligando de las proteínas de bromodominio (BRDs), y talidomida, el ligando del CRBN. Basado en los previos análisis de estructura mediante cristalografía de rayos X, se marcaron la talidomida y el JQ1 con tetrazina y *trans*-cicloocteno respectivamente en las posiciones indicadas en la figura 4 dando lugar a los precursores de la JQ1-talidomida

CLIPTAC: Tz-talidomida (1) y JQ1-TCO (2) [16]. En los ensayos posteriores se comprobó que la incorporación de tetrazina y *trans*-cicloocteno en tales posiciones no tenía impacto en la unión de JQ1 y talidomida a sus dianas correspondientes. Después se evaluó la degradación de BRD4 por la CLIPTAC. Se vio que la actividad de JQ1-CLIPTAC era selectiva y dependiente de las concentraciones de los precursores y del tiempo de incubación con las células HeLa. Tras 16 horas de incubación con 10 μ M de ambos precursores se empezó a detectar la bajada de los niveles de BRD4, que tiene un efecto negativo sobre la proliferación de células tumorales.

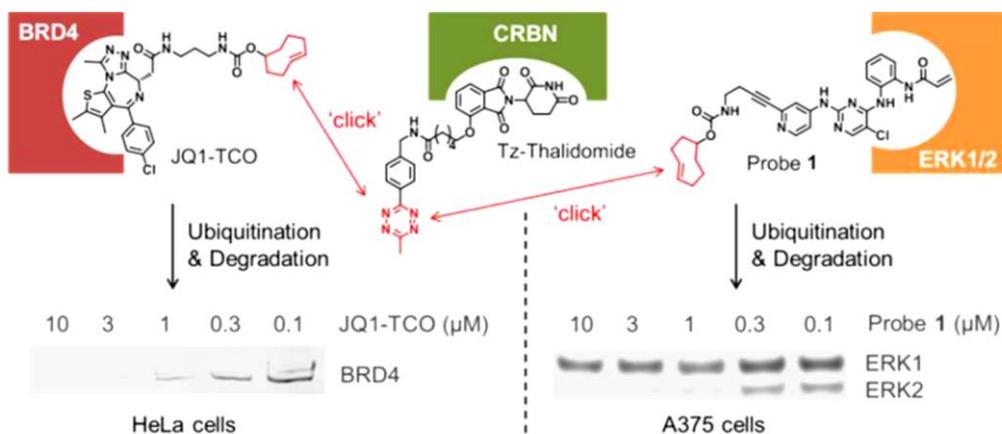


Figura 4 [16]. Los precursores de JQ1-CLIPTAC y ERK-CLIPTAC.

A continuación, el mismo equipo sustituyó el JQ1-TCO por un derivado de un inhibidor covalente de ERK1/2, también marcado por TCO (figura 4), junto con la Tz-talidomida se va a formar la ERK-CLIPTAC una vez dentro de las células. Esta CLIPTAC presentó un perfil similar al de JQ1-CLIPTAC solo que requiere menos concentraciones y tiempo de incubación. El ERK es un elemento de la cascada de señalización RAS/RAF/MEK/ERK, que está implicada en el desarrollo de numerosos cánceres.

Finalmente se confirmó que la proteólisis solo es posible cuando la formación clic de CLIPTAC ocurre intracelularmente, porque al añadir las CLIPTACs preformadas a las líneas celulares no se observó la disminución de los niveles de BRD4 y ERK1/2. Esto indica que el peso molecular o el área de superficie polar de la CLIPTAC ya ensamblada es demasiado elevado y hace imposible el paso a través de la membrana celular. Así que un inconveniente potencial de este tipo de PROTAC puede ser la reacción clic de los precursores fuera de las células con la consiguiente pérdida de permeabilidad celular. Una posible solución será modular la velocidad de reacción o recurrir a una reacción alternativa con una cinética más lenta.

5.3.2. Homo-PROTACs

En las homo-PROTACs los dos ligandos situados en ambos lados del conector son iguales, cuya función es reclutar dos moléculas de la misma ligasa E3, una de las cuales se encarga de inducir la ubiquitinación y la otra se convierte en la diana a degradar [19]. La inhibición de las ligasas E3 presenta muchas dificultades como la falta de acceso al sitio activo y, además, al ser complejos enzimáticos multifuncionales con varios dominios y subunidades, aunque se consiguiera bloquear un sitio activo, el resto permanecería intacto y no perdería su funcionalidad. Por tanto, es más factible su degradación que su inhibición.

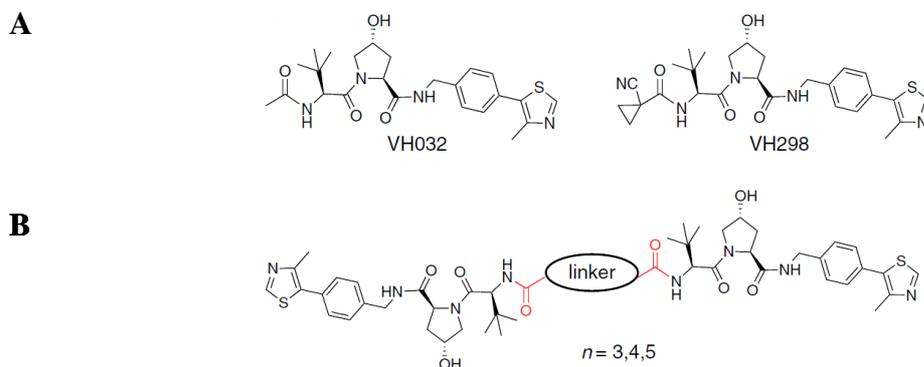


Figura 5 [19]. A: los ligandos sintéticos de VHL; B: las VHL-homo-PROTACs activas. El n indica la longitud del conector de PEG.

Maniaci *et al.* [19] diseñaron una serie de VHL homo-PROTACs basadas en los dos potentes ligandos sintéticos ya existentes de VHL, VH032 y VH298 [20] (figura 5A). Estas moléculas quiméricas difieren en la longitud del conector, el sitio y el tipo de enlace a través del cual el conector está unido a los ligandos. Los compuestos activos obtenidos (figura 5B) mostraron una preferencia hacia la isoforma larga de VHL (pVHL30) [19]. El mecanismo por el que presentan dicha selectividad todavía no está claro.

El producto más potente es el CM11, con una DC_{99} de 10nM, mucho menor que el simple ligando VH032 cuya concentración intracelular efectiva está alrededor de 100 μ M. Esta última concentración del inhibidor puede provocar la acumulación del HIF-1 α , el sustrato endógeno de VHL, dando lugar a la respuesta hipóxica dependiente de HIF. Pero bajo una concentración a nivel nanomolar, solo se observó un mínimo incremento del HIF-1 α , incapaz de inducir la correspondiente respuesta. La isoforma corta de VHL (pVHL19) que queda sin degradar también contribuye a mantener niveles bajos de HIF-1 α evitando los efectos indeseados.

Otra clase de homo-PROTAC destacada son las CRBN homo-PROTACs desarrolladas por Steinebach *et al.* [21] donde la molécula responsable de reclutar el CRBN del complejo E3 $CRL4^{CRBN}$ es la pomalidomida. Presentan una potencia similar a las VHL homo-PROTACs induciendo la depleción de CRBN mediante la formación del complejo ternario en una estequiometría 2:1. Y como consecuencia de la actividad farmacológica remanente de la pomalidomida, pueden producir un ligero descenso de los niveles de IKZF1 e IKZF3, factores relacionados con la proliferación de células de mieloma múltiple [22]. En contraste, el pretratamiento de las líneas celulares de mieloma múltiple con la CRBN homo-PROTAC anuló el efecto antiproliferativo de los IMiDs posteriormente añadidos dado que estos actúan induciendo la degradación de IKZF1/3 por CRBN.

En ambos casos, las homo-PROTACs resultan útiles para investigar la función biológica de las biomoléculas, por ejemplo, la actividad específica de las distintas isoformas de VHL [19] o el papel fisiológico que desempeña el CRBN, proporcionando información adicional sobre el mecanismo molecular de los IMiDs [21]. Asimismo, el descubrimiento de patologías asociadas a la mutación de CRBN como el retraso mental no sindrómico [23] confiere a las CRBN homo-PROTACs la posibilidad de ser empleadas en el ámbito clínico.

5.3.3. PhosphoPROTACs

Muchos receptores de tirosina quinasa (RTK) desempeñan un papel importante en el desarrollo de diferentes tumores. Se activan por la unión del agonista en la región extracelular, se dimerizan y se autofosforilan o transfosforilan en la región intracelular, y los residuos de tirosina fosforilados sirven como el punto de unión para las proteínas efectoras con dominio PTB (phosphotyrosin-binding) y SH2 (Scr homology 2) [24] que van a activar diferentes vías de señalización. Basado en este mecanismo, Hines *et al.* [25] crearon un tipo de PROTAC cuya actividad es inducible o condicional denominado fosfoPROTAC.

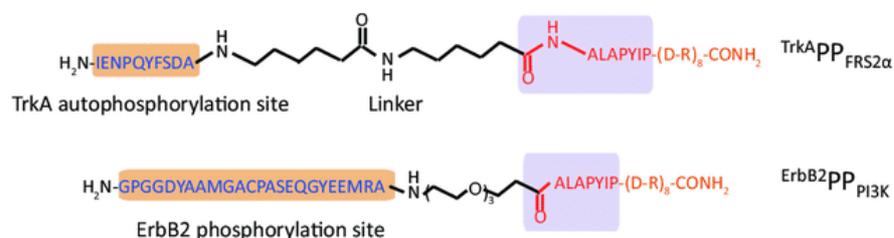


Figura 6 [26]. Estructura de las fosfoPROTACs.

La primera fosfoPROTAC ($TrkA^{PP}_{FRS2\alpha}$) (figura 6) consiste en un decapeptido derivado de la tropomiosina receptor quinasa A (TrkA) conectado al ligando de VHL. Tras la unión del factor de crecimiento nervioso (NGF) a TrkA y la consiguiente dimerización, éste además de autofosforilarse también fosforila la tirosina del decapeptido de la fosfoPROTAC permitiendo la unión de los siguientes efectores de la señalización, entre los cuales destaca el sustrato 2α del factor de crecimiento de fibroblasto (FRS2 α) con dominio PTB, que es la principal proteína efectora y esencial en la diferenciación neuronal [27]. La incubación de células de feocromocitoma PC12 bajo diferentes concentraciones de esta fosfoPROTAC durante 7 horas reveló que una concentración de 40 μ M era capaz de reducir en un 50% los niveles de FRS2 α . El tratamiento con NFG debe inducir la diferenciación neuronal que se puede cuantificar a través de la medición de la expresión de neurofilamentos. Pero el co-tratamiento con $TrkA^{PP}_{FRS2\alpha}$ bloqueó este fenómeno, lo que confirmó la interrupción de la señalización [25].

Más tarde estos mismos investigadores diseñaron otra fosfoPROTAC, la $ErbB2^{PP}_{PI3K}$ (figura 6), contra la vía de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K), implicada tanto en la mitogénesis como en la supresión de la apoptosis. El componente que recluta la ligasa E3 es el mismo que en el

caso anterior, mientras que el ligando del sustrato es un péptido de 24 aminoácidos derivado de la región intracelular del receptor ErbB3 donde se va a unir la PI3K. El receptor, al ser activado por el agonista neuregulina (NRG), forma un heterodímero con el ErbB2 [28] que se encarga de fosforilar el propio ErbB3 y las dos tirosinas que contiene el ligando de sustrato de la $\text{ErbB}^2\text{PP}_{\text{PI3K}}$, permitiendo la unión de PI3K a la fosfoPROTAC para la poliubiquitinación y la degradación. A continuación, los investigadores ensayaron la $\text{ErbB}^2\text{PP}_{\text{PI3K}}$ *in vivo* utilizando ratas que tenían implantadas subcutáneamente las células tumorales OVCAR8. Después de 47 días, el peso medio de tumor en las ratas tratadas con $\text{ErbB}^2\text{PP}_{\text{PI3K}}$ (10mg/kg/día) se redujo en un 40% con respecto al grupo control [25].

Ambas fosfoPROTACs han demostrado su actividad antitumoral bien *in vitro* o bien *in vivo*. A diferencia de las PROTACs convencionales que degradan la proteína diana de forma sistémica, las fosfoPROTACs presentan una selectividad tisular ya que requieren una activación previa por un RTK específico y activo, cuando este receptor esté inactivo no llevará a cabo su actividad. El hecho de que estos RTKs suelen estar sobreexpresados o sobreactivados en los tejidos tumorales contribuye aún más a la selectividad de las fosfoPROTACs [28].

También existen desventajas como la baja potencia. A pesar de la adición de la cadena de poli-Arg para aumentar la permeabilidad celular, la concentración eficaz sigue encontrándose entre 40-60 μM [25] lo que se puede explicar por la naturaleza peptídica de los dos ligandos.

5.3.4. PROTACs foto-inducibles

Otra metodología que puede aumentar la especificidad de las PROTACs es incorporar un grupo foto-controlable de modo que en ausencia de la luz de una determinada longitud de onda estas moléculas permanecen inactivas. Así se consigue un control espaciotemporal de su acción que minimiza los efectos “off-targets”.

Existen dos tipos de PROTACs foto-inducibles. Una de ellas es activada de forma irreversible y se denomina photocaged-PROTAC (pc-PROTAC) [29]. Consiste en incorporar un grupo foto-controlable a una PROTAC ya existente que actúa como una tapa bloqueando la formación del complejo ternario con la proteína diana y la ligasa E3.

Al irradiarlo con luz de la longitud de onda adecuada, este grupo se separa de la pc-PROTAC dejando la PROTAC funcional libre. Entre los grupos foto-controlables de este tipo destacan la dietilamino cumarina (DEACM) (figura 7) [30], que es eliminada bajo radiación de 405 nm, y el 4,5-dimetoxi-2-nitrobenilo (DMNB) (figura 8) [29], liberado bajo radiación de 365 nm. Más tarde, Naro *et al.* utilizaron otro grupo foto-controlable, el 6-nitropiperoniloximetilo (NPOM) (figura 7), también sensible a la luz de 365 nm, porque es más estable en medio acuoso y tiene un pK_a más razonable ($\text{pK}_a=14$) comparando con el de DEACM ($\text{pK}_a=30-40$) debido a la amina alifática de este último grupo.

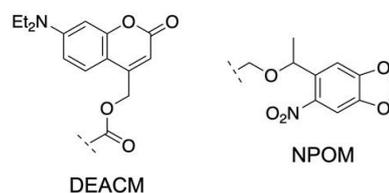


Figura 7 [30]. DEACM y NPOM

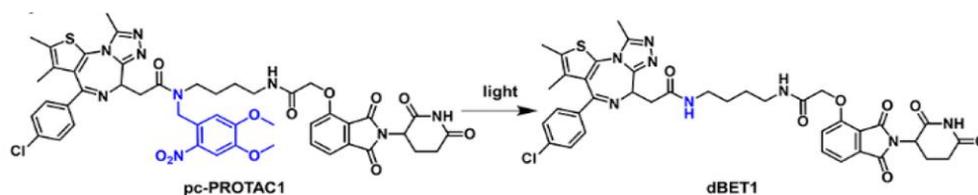


Figura 8 [29]. pc-PROTAC1 al ser irradiada genera 50% del producto deseado.

La fotoactivación de todas estas pc-PROTACs se produjo en un intervalo de 2-3 minutos dando lugar a la liberación eficaz de la PROTAC funcional. La potencia es similar a las PROTACs de que se derivan. El grupo foto-controlable puede incorporarse a las tres partes de PROTAC, el

sitio más adecuado es diferente en cada PROTAC, esto implica un estudio detallado de todas las posibilidades.

El segundo tipo son las PHOTACs o foto-PROTACs que se pueden activar e inactivar reversiblemente en función de la longitud de onda de la luz que incide. La longitud del conector de una PROTAC es crítica para su actividad y cada una tiene su óptima distancia entre los dos ligandos [31]. De allí surgió la idea de introducir al conector un agente foto-conmutable cuya conformación puede alterarse por el estímulo luminoso para controlar la activación e inactivación de PROTAC. El azobenceno fue elegido candidato porque la diferencia de la longitud entre los isómeros *cis* y *trans* es suficiente para separar la forma activa de la inactiva [32]. No obstante, la forma más estable es la *trans* y esto puede generar algún inconveniente. Un ejemplo es la PHOTAC-I-3 (figura 9) desarrollada por Reynders *et al.* [33], cuya forma activa es la *cis* que se obtiene por el estímulo luminoso de 390 nm. Al retirar la luz, la *cis* PHOTAC-I-3 se va isomerizando al isómero más estable, el *trans*, con una vida media de 8,8 horas a 37°C. Esto implica que para lograr un efecto prolongado se necesitan múltiples ciclos de fotoactivación. Sin embargo, el isómero *cis* del *o*-F4-azobenceno es térmicamente estable y su vida media puede llegar hasta 2 años [34], lo que le convierte en un interruptor excelente y fue empleado por Pfaff *et al.* [32] para sintetizar la photoPROTAC-1 biostable (figura 10).

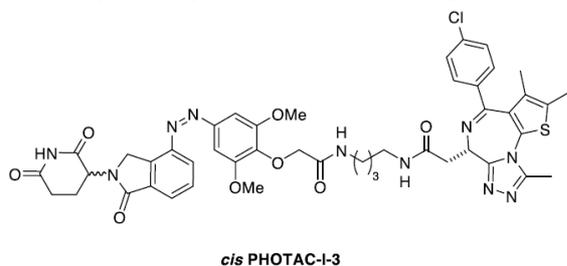


Figura 9 [33]. *cis*-PHOTAC-I-3.

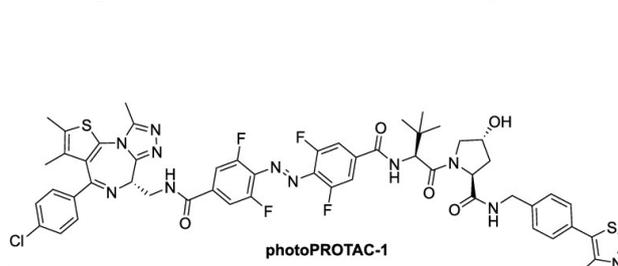


Figura 10 [32]. *trans*-photoPROTAC-1

En la oscuridad tenemos una mezcla de *trans*- y *cis*-photoPROTAC-1 que presenta una actividad muy reducida. La irradiación por la luz de 415 nm induce la transformación completa a *trans* que es la forma activa. En el ensayo *in vitro* con 0,5µM photoPROTAC-1, la máxima degradación de su diana BRD2 se llegó siete horas después de la primera irradiación por la luz de 415 nm y permaneció durante todo el ensayo. Luego una segunda irradiación por la luz de 530 nm hizo que se convirtiera de nuevo en la forma inactiva *cis* perdiendo su funcionalidad. La combinación de fotofarmacología y degradación dirigida ha generado una mayor precisión espaciotemporal de PROTAC. Los siguientes estudios deben dedicarse a encontrar compuestos sensibles a radiaciones infrarrojas para aumentar la capacidad de penetración tisular.

5.3.5. SNIPERs (specific and non-genetic inhibitor of apoptosis protein-dependent protein erasers)

Las proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs) intervienen en múltiples procesos biológicos como apoptosis, inflamación, etc. [35]. Algunas tienen actividad ligasa de ubiquitina con la peculiaridad de que, además de la ubiquitinación del sustrato asociado, también induce la auto-ubiquitinación conduciendo a su propia degradación. En numerosos cánceres se ha observado la sobreexpresión de algunos miembros (XIAP, cIAP1, cIAP2) de esta familia que le hace ser una nueva diana en la lucha contra el cáncer [36].

Hace años se descubrió que la metil-éster bestatina (MeBS) (figura 11) es capaz de interactuar con el dominio BIR3 de cIAP1, causando la auto-ubiquitinación mediada por el dominio RING, también de cIAP1 [37]. Este es el fundamento de los SNIPERs de primera generación donde se combina la MeBS (figura 11A) con ligandos de diferentes dianas. Buscando nuevos ligandos de IAPs para mejorar la potencia (>10µM) de estos SNIPERs,

surgieron MV1 y LCL161 (figura 11B, C), los dos ligandos de cIAP1, cIAP2 y XIAP. SNIPER (ER)-87, que incorpora LCL161 en su estructura, mostró una potencia muy superior, de manera que era capaz de reducir en un 50% su diana ER α a una concentración de 3nM [38]. La degradación simultánea de la IAP y la proteína implicadas en el desarrollo tumoral puede tener un efecto sinérgico en el tratamiento de cáncer.

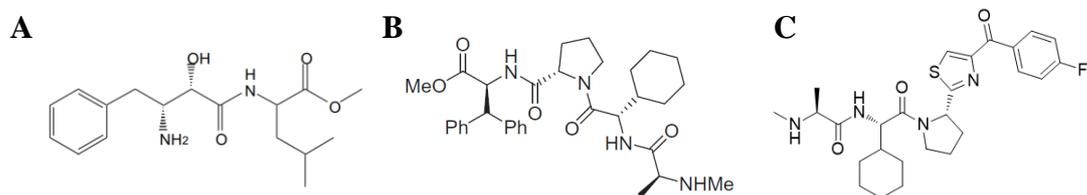


Figura 11. A: MeBS; B: MV1; C: LCL161.

Hay SNIPERs multi-dianas potencialmente útiles para tratar enfermedades neurodegenerativas puesto que sus dianas son las agregaciones proteicas o proteínas con tendencia a agregarse denominadas proteínas poliglutamina o poliQ, que tienen en común la estructura de láminas β cruzadas. Yamashita *et al.* [39] diseñaron dos SNIPERs usando BTA y PDB como ligandos del agregado y BE04 que recluta cIAP1 (figura 12). Consiguieron reducir los niveles de todas las proteínas poliQ del ensayo, que son: ataxina-1, ataxina-7 y atrofina-1, relacionadas con la ataxia espinocerebelosa (SCA) y la atrofia dentato-rubro-pálido-luisiana (DRPLA) [40].

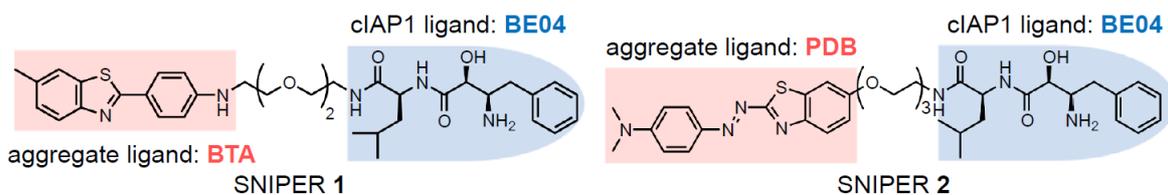


Figura 12 [39]. SNIPERs que atacan proteínas agregadas.

Curiosamente, aquí el efecto gancho que se puede observar en todas PROTACs solo afecta a la degradación de la proteína diana mientras que la degradación de IAPs se mantiene intacta. El efecto gancho consiste en que cuando hay un exceso de un compuesto bifuncional, se empiezan a formar dímeros inactivos entre la PROTAC y la diana o la ligasa E3 en lugar del complejo ternario funcional. Como consecuencia, se disminuye la eficacia de la PROTAC [1]. Una explicación es que algunas IAPs como la cIAP1 es capaz de llevar a cabo la auto-ubiquitinación tras la unión con su antagonista sin necesidad de formar el complejo ternario, el dímero compuesto por SNIPER y cIAP1 resulta suficiente para degradar la propia cIAP1. En el caso de XIAP donde el complejo ternario formado por el SNIPER, la XIAP y la diana es imprescindible para su auto-ubiquitinación, la causa es diferente. La XIAP es reclutada preferentemente por el SNIPER (BRD)-1 que presenta mayor afinidad por BRD4. No obstante, a concentraciones muy elevadas, éste empieza a unirse a otras dianas de menor afinidad como BRD2 y BRD3, disminuyendo la degradación de BRD4. Como la XIAP sigue permaneciendo en el complejo ternario, aunque la diana incorporada al SNIPER es diferente, su auto-ubiquitinación no se ve afectada [41].

5.3.6. LYTACs (lysosome targeting chimeras)

Hasta ahora, todas las variantes de PROTAC mencionadas están limitadas a dirigirse a las dianas proteicas intracelulares. Las proteínas asociadas a la membrana celular y las secretadas permanecen inaccesibles al estar fuera del alcance del sistema ubiquitina-proteosoma. Estas proteínas se eliminan por la vía lisosomal.

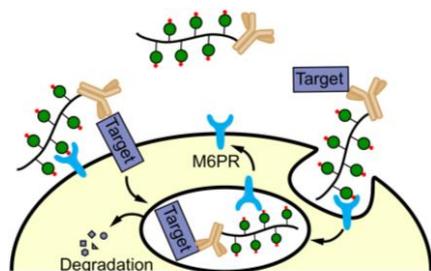


Figura 13 [42]. Esquema general del mecanismo de acción de LYTAC

Banik *et al.* [42] eligieron el receptor de manosa-6-fosfo cación-independiente (CI-M6PR), el prototipo de los receptores dirigidos al lisosoma (LTR o IGF2R) implicado en el transporte de proteínas extracelulares (sobre todo el IGF-II) al sistema endosomal-lisosomal [43], para obtener las LYTACs que se unen simultáneamente al LTR y a las proteínas extracelulares induciendo la internalización y la posterior digestión lisosomal de la diana. Las proteínas transportadas por este receptor se caracterizan por tener grupos N-glicanos que terminan en manosa-6-fosfato.

Una LYTAC consta de un anticuerpo anti-proteína diana conjugado con un glicopolipéptido agonista del receptor CI-M6PR. Emplearon el poli(manosa-6-fosfonato) o poli(M6Pn) en lugar del poli(manosa-6-fosfato) por su mayor estabilidad frente a fosfatasas y ha mostrado en un ensayo previo una afinidad por el CI-M6PR similar incluso superior a la del poli(M6P) [42].

Para determinar si este tipo de moléculas quiméricas es capaz de guiar agentes extracelulares al lisosoma nació la LYTAC Ab-1 compuesta del anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón conjugado con el glicopolipéptido poli(M6Pn). Tras incubar la línea celular K562 con la apoE4, el anticuerpo primario anti-ApoE4 de ratón y Ab-1, se observó un incremento de 13 veces en la captura de ApoE4 comparando con el grupo control.

De forma similar, se sintetizó la Ab-2 con el objetivo de evaluar el efecto acelerador de la degradación de proteínas asociadas a la membrana plasmática. Esta LYTAC es constituida por el anticuerpo anti-EGFR cetuximab (ctx) y el mismo glicopéptido poli(M6Pn). La incubación con células HeLa durante 24 horas condujo a una degradación substancial del EGFR. El mismo efecto fue producido por la LYTAC Ab-3 o anti-PD-L1-M6Pn sobre el nivel de PD-L1 superficial en las células de linfoma Hodgkin. El PD-L1 es un factor importante en el proceso tumoral porque ayuda a las células tumorales a evadir el sistema inmune.

Viendo los resultados, las LYTACs han mostrado la capacidad de acelerar la degradación de las proteínas extracelulares. Una gran cantidad de ellas desempeñan un papel importante en el desarrollo de diferentes cánceres y enfermedades neurodegenerativas (ApoE4).

5.3.7. AUTACs (autophagy targeting chimeras)

Takahashi *et al.* [44] propusieron una nueva estrategia de la degradación dirigida que ya no está restringida a eliminar dianas de naturaleza proteica, la cual se denomina AUTAC donde la maquinaria endógena implicada es la autofagia, o macroautofagia en concreto, que además de dar respuestas en situación de ayuno, también se encarga de eliminar las proteínas agregadas, patógenos y orgánulos dañados para mantener la homeostasis celular. Esta última función es de mayor interés en el área de degradación dirigida ya que ocurre de manera selectiva.

Diferentes formas de poliubiquitinación del sustrato pueden llevarlo a distintos destinos. La macroautofagia está mediada principalmente por la cadena de poliubiquitina donde las unidades de ubiquitina se unen a la Lys63 de la unidad anterior [45]. El adaptador autofágico, p62 o SQSTM-1, al poseer el dominio asociado a ubiquitina (UBA) y la región de interacción con LC3 (LIR), que es un marcador anclado en la membrana del autofagosoma, participa en el reclutamiento del sustrato poliubiquitinado al autofagosoma [45]. Reconoce preferentemente la cadena de poliubiquitina con enlaces en Lys63 [45].

Estos investigadores descubrieron que la S-guanilación del sustrato por GMPc puede acelerar el proceso autofágico por estar correlacionada con la poliubiquitinación en Lys63 [44]. Pero debido a que el GMPc puede activar la proteína quinasa GMPc-dependiente dando lugar a efectos indeseados, decidieron emplear la p-fluorobencilguanina (FBnG) en lugar de GMPc mimetizando el proceso endógeno de S-guanilación.

Todas las AUTACs sintetizadas contienen una unidad de FBnG, unida al ligando de la diana mediante un conector de PEG. Todas ellas redujeron con éxito los niveles de su diana. Pero la limitación principal de AUTAC es que la autofagia solo ocurre en el citoplasma. Por ejemplo, la diana de AUTAC3 es BRD4, perteneciente a la familia BET, que está localizada en el núcleo celular. Como la autofagia no se lleva a cabo en el núcleo, la AUTAC3 únicamente es activa durante la mitosis que es cuando desaparece la envoltura nuclear y la maquinaria de autofagia puede entrar en contacto con las proteínas nucleares. Su actividad depende del ciclo celular.

A continuación, los investigadores dirigieron la atención hacia dianas no proteicas y prepararon la AUTAC4 (figura 15) [44], destinada a inducir la mitofagia que es el proceso por el cual se eliminan selectivamente las mitocondrias dañadas y se regula el número de mitocondrias [47]. La AUTAC4 consiste en una unidad de FBnG, el conector PEG y un derivado de 2-fenilindol, el ligando de la proteína translocadora situada en la membrana mitocondrial externa. Al anclarse en la membrana mitocondrial sirve como una etiqueta de guanina que induce la poliubiquitinación de la mitocondria. En el ensayo, trataron las células HeLa con AUTAC4 y carbonilcianuro-*m*-clorofenilhidrazona (CCCP) que es un agente despolarizante para crear mitocondrias dañadas. Se detectó la formación de mitocondrias lisosomales. Sin embargo, la cantidad total de mitocondrias se mantuvo constante, por lo que se supuso que existía una regeneración paralela a la degradación de mitocondrias. Este hecho se verificó después mediante la detección de la activación de la biogénesis mitocondrial por la vía AMPK-PGC1 α .

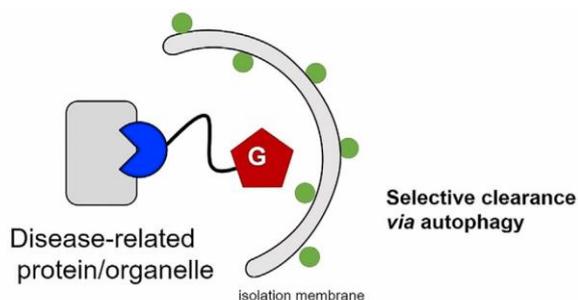


Figura 14 [44]. Mecanismo de acción de AUTAC.

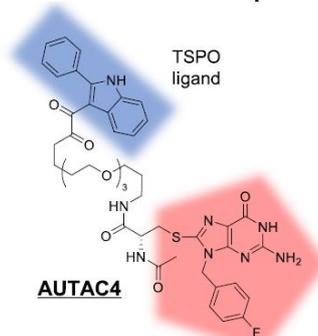


Figura 15 [44]. AUTAC4.

Posteriormente se aplicó la AUTAC4 a las células Detroit 532 que son fibroblastos procedentes de un paciente con trisomía 21, la cual es una patología genética acompañada de disfunción mitocondrial. La eliminación de las mitocondrias dañadas y la regeneración de las normales fueron observadas a la vez 24-72 horas después del tratamiento.

En resumen, la guanilación dirigida de mitocondrias utilizando AUTAC promueve la mitofagia que ayuda a recuperar eficazmente la homeostasis mitocondrial y mantener el nivel de ATP intracelular evitando la apoptosis celular inducida por agentes tóxicos.

5.4. Ensayos clínicos

Actualmente, hay 2 ensayos clínicos de PROTAC, ambos de fase 1. La primera PROTAC que entró en el ensayo clínico recibió el nombre de ARV-110 (NCT03888612) [65]. Se trata de una PROTAC basada en moléculas pequeñas y oralmente biodisponible, dedicada a inducir la degradación del receptor de andrógeno para tratar el cáncer de próstata metastásico y resistente a la castración (mCRPC). En la última reunión de la Sociedad Estadounidense de Oncología Clínica (ASCO) se publicaron los primeros datos del ensayo, que mostraron, además de un perfil de seguridad favorable, la señal de actividad antitumoral en el ser humano. Pues en 2 de los 8 pacientes evaluados que han recibido una dosis diaria ≥ 140 mg de ARV-110 se detectó una declinación mayor a 50% del antígeno prostático específico (PSA) (74% y 97%), un marcador del cáncer de próstata. Y también se confirmó la reducción en un 80% del tamaño

tumoral por RECIST en uno de ellos [66]. Teniendo todo esto en cuenta, se podrán utilizar dosis mayores en la fase 2.

La otra PROTAC, ARV-471 (NCT04072952), también basada en molécula pequeña, está dirigida hacia el receptor de estrógeno α para el tratamiento del cáncer de mama metastásico en pacientes con ER+/HER2- [67].

5.5. Ventajas

Rango de aplicación

En un estudio de 2017 se estimó que solo un 22% de los genes humanos codificadores de proteína era “drogable” [2]. La mayoría de las proteínas carecen del centro activo específico apto para unirse al ligando de molécula pequeña. Se incluyen las proteínas que no tienen actividad enzimática como los factores de transcripción, las proteínas de andamiaje, la agregación de proteínas, etc. Algunas actúan mediante las interacciones proteína-proteína de gran superficie para las cuales es difícil diseñar la correspondiente molécula pequeña inhibidora, mientras que otras son multifuncionales que poseen varios dominios catalíticos, por lo que el bloqueo de un dominio resulta ineficaz [3]. Sin embargo, el objetivo de las PROTACs es degradar la diana en lugar de inhibirla, teóricamente pueden unirse a cualquier sitio de la diana sin tener en cuenta el efecto de dicha unión porque su misión es simplemente reclutar la ligasa E3, que es la que realmente lleva a cabo la función de PROTAC. Sumándose a las distintas variantes de PROTAC, se cubren potencialmente todas las proteínas asociadas a las enfermedades, tanto intracelulares como extracelulares, e incluso las dianas no proteicas como los orgánulos.

Potencia y duración del efecto

La farmacología de las moléculas pequeñas inhibidoras está basada en la ocupación del sitio activo de las dianas, con lo cual hay que alcanzar un alto nivel de ocupación para obtener el efecto deseado. Esto se traduce en el requerimiento de dosis altas del fármaco que aumentan la toxicidad y el riesgo de efectos “off-target” [3]. Al contrario, PROTAC adopta la estrategia llamada farmacología promovida por evento (event-driven pharmacology), esto es, la unión entre el fármaco y la diana va a provocar un evento que es la disminución de los niveles de la diana. Una vez degradada la diana, el fármaco queda libre y puede unirse a la siguiente molécula y así sucesivamente. Este proceso catalítico permite la obtención del efecto farmacológico deseado a concentraciones muy bajas del fármaco. Además de la mayor potencia, PROTAC también posee una mayor duración del efecto. Dicha ventaja consigue especial relevancia cuando la proteína diana es de vida media larga, de manera que el efecto farmacológico puede persistir incluso después de la eliminación del fármaco como resultado de la resíntesis lenta [48]. Por lo tanto, cabe la posibilidad de tener una pauta posológica más simple.

Selectividad

Se puede modular la selectividad de PROTAC en 3 niveles. El primer nivel, como todos los fármacos, se basa en la selección del ligando con una selectividad intrínseca adecuada. Mientras que el segundo nivel consiste en elegir la ligasa E3 que induce selectivamente la degradación de determinadas dianas. Por ejemplo, las PROTACs DAS-VHL y DAS-CRBN, a pesar de tener el mismo ligando de diana (dasatinib) presentaron diferente comportamiento. El DAS-VHL indujo la degradación de c-ABL con éxito mientras que la proteína de fusión oncogénica BCR-ABL se mantenía intacta. No obstante, al sustituir el DAS-VHL por el DAS-CRBN la degradación de ambas proteínas fueron observada [49]. El último nivel depende del conector,

pues su longitud, posición, estructura, etc. pueden contribuir a estabilizar preferentemente algún complejo ternario específico aportando la selectividad adicional entre dianas muy similares, como por ejemplo las proteínas de la misma familia. Este fenómeno fue demostrado por la estructura cristalina del complejo BRD4:MZ1:VHL, la cual reveló la capacidad del conector de MZ1 de establecer interacciones de Van der Waals y un enlace de hidrógeno con la diana BRD4, lo que explica la mayor potencia de degradación de BRD4 que la de BRD2, pese a la misma afinidad que posee el ligando JQ1 por ambas proteínas [50].

Farmacorresistencia

En primer lugar, varios fármacos inhibidores de molécula pequeña han mostrado el efecto estabilizador de la proteína diana con la prolongación de su vida media, como JQ1 y OTX015, que son los inhibidores de BRD4, pero al mismo tiempo inducen la acumulación de BRD4, y el lapatinib, que también aumenta el número de su diana HER2 en la superficie celular [7][51]. En segundo lugar, la antagonización de ciertos receptores puede activar la sobreexpresión de estos como mecanismo de compensación. De esta forma, se aumenta la sensibilidad frente a los agonistas endógenos y el efecto inhibitor del fármaco queda debilitado.

La mutación de las dianas terapéuticas es un mecanismo común de la resistencia farmacológica adquirida, especialmente en las terapias antimicrobiana y antineoplásica. Algunas mutaciones bloquean la unión del ligando antagonista y otras, en cambio, transforman los antagonistas en agonistas. Un ejemplo típico consiste en que las mutaciones F877L y T878A en el receptor de andrógeno (AR) pueden convertir el compuesto antiandrogénico enzalutamida en un agonista del AR, incrementando la actividad mediada por el AR [52]. Por el contrario, la PROTAC basada en enzalutamida, ARCC-4, es capaz de degradar los AR mutantes sin provocar el aumento de la actividad del AR, así como los niveles del PSA en las células del cáncer de próstata. Cuando las células que expresan los AR mutantes eran tratados por la enzalutamida, se observó una elevación substancial de los niveles de PSA [53].

5.6. Limitaciones y Retos

El tiempo que se tarda en desarrollar una nueva PROTAC es relativamente largo debido a que los procesos del diseño y la optimización son generalmente empíricos [1] y, además, la secuencia de síntesis también es compleja y larga. Durante el diseño hay que considerar las propiedades de todos los componentes incluso las del conector, puesto que muchas PROTACs poseen una combinación de estas propiedades que dificulta la caracterización analítica y la optimización. Los comportamientos farmacodinámicos y farmacocinéticos resultantes pueden generar efectos farmacológicos no deseados y limitaciones intrínsecas de biodisponibilidad como la inestabilidad metabólica [3].

En la fase temprana del desarrollo los principales retos residen en la selección de la ligasa E3 que se quiere reclutar y en el diseño del conector.

Normalmente se prefieren atraer las ligasas E3 oncogénicas, porque a veces la función endógena de la ligasa puede ser inhibida tras unirse a la PROTAC. Esta pérdida, por ejemplo, de la función de MDM2, ofrece el efecto antiproliferativo adicional gracias a la estabilización del supresor de tumor p53, lo que aumenta la eficacia del tratamiento de cáncer [54]. Pero otras veces la selección depende de la especificidad intrínseca que tiene la ligasa, que puede ser inactiva [49] o menos eficaz frente a determinados sustratos como el caso de las PROTACs contra la tirosina quinasa de Bruton (BTK), entre las cuales aquellas basadas en CRBN eran más eficaces que las basadas en MDM2 [55]. La disponibilidad de un ligando de molécula pequeña adecuada también es un elemento importante que considerar, el ligando ideal debería incluir las características de elevada especificidad, baja toxicidad, que no interfiere en la

farmacología de la PROTAC, entre otras. Si no se dispone de dicho ligando, se puede recurrir al diseño y la síntesis *de novo* que cuestan más tiempo.

El conector no solo sirve para conectar los dos ligandos sino también presenta gran impacto en cuanto a las propiedades y la eficacia de la PROTAC. El tipo de enlace mediante el cual el conector se une al ligando afecta sobre todo a la permeabilidad celular [56] y la estabilidad de la PROTAC. Pues las PROTACs que reclutan VHL al receptor de estrógeno (ER) con el conector unido al O17 del estradiol formando un enlace éster son más susceptibles a hidrolizarse por las esterasas. Un enlace carbono-carbono entre el conector y el estradiol aporta una mayor estabilidad, más aun, cuando este enlace se encuentra en la posición C7 α del estradiol la potencia y la afinidad de la PROTAC son óptimas [57]. En relación con la longitud, los investigadores utilizaron la misma PROTAC modificando la longitud del conector situado en el C7 α del estradiol y descubrieron que el conector de 16 átomos era más potente en la degradación de ER y más efectivo en la inhibición de la proliferación de las células tumorales. A veces la longitud también afecta a la selectividad de PROTAC, como en el caso de las PROTACs basadas en lapatinib, la longitud del conector determinó la selectividad entre EGFR y HER2 [58]. Sin embargo, no mostró impacto en la afinidad por la diana [31].

Uno de los inconvenientes de la PROTAC es el efecto gancho (ver el apartado de SNIPERs), típico de los compuestos bifuncionales. Afortunadamente, las PROTACs son muy potentes y su concentración efectiva se encuentra muy por debajo de la concentración a la que se produce dicho fenómeno.

Aunque es mucho menos frecuente que en los fármacos de molécula pequeña, los efectos “off-target” pueden ocurrir en PROTACs. Al disponer el conector y el ligando de la ligasa E3 de una determinada forma, la PROTAC puede dedicarse a degradar otra molécula diferente a la diana teórica para la cual es diseñada [59]. Esto subraya otra vez la importancia de la estructura y la disposición de los componentes de PROTAC.

Al igual que todos los fármacos, la resistencia farmacológica siempre es un problema inevitable. Pero a diferencia de las moléculas pequeñas inhibitoras, la resistencia adquirida frente a PROTACs se debe a las alteraciones genómicas asociadas a la vía de ubiquitinación en vez de mutaciones de la diana. Se han revelado los mecanismos de resistencia desarrollados por las células OVCAR8 (cáncer de ovario) que han recibido el tratamiento prolongado con las BET-PROTACs. Los clones O1R eran resistentes a ARV-771, una BET-PROTAC basada en VHL, por múltiples alteraciones genómicas que afectan al gen que codifica CUL2, que es un componente esencial para el funcionamiento del complejo CRL2^{VHL}. Y los clones O3R desarrollaron la resistencia a ARV-825, que recluta el CRBN, mediante la delección cromosómica del gen de CRBN [60]. En cambio, las células MV4-11 (leucemia mieloide agudo) tratadas con dBet1, otra BET-PROTAC, produjeron la resistencia a nivel transcripcional de una enzima E2 llamada UBE2G. Adicionalmente, también puede existir resistencia intrínseca en diferentes tipos de tumor, con lo cual un estudio genético previo para detectar los biomarcadores relacionados con la resistencia en los pacientes resulta esencial [61].

6. CONCLUSIONES

A pesar de todas las posibilidades que lleva, la PROTAC sigue siendo un área muy joven de la que no hay mucha experiencia. En este apartado se discute sobre las posibles direcciones de futuras investigaciones.

Existen más de 600 ubiquitin ligasas E3 humanas [62], solo muy pocas de ellas han sido utilizadas en el desarrollo de PROTAC (SCF ^{β -TRCP}, CRL2^{VHL}, CRL4^{CRBN}, MDM2, IAPs, DCAF16, CRL3Keap1, RNF4 y RNF14). Podemos esperar la explotación de más ligasas E3 para diversificar la PROTAC y ampliar su aplicación. Asimismo, cabe la posibilidad de reclutar

directamente otros miembros del sistema ubiquitina-proteosoma como la enzima de conjugación E2 incluso el propio proteosoma para elaborar futuras PROTACs [3].

Varias ventajas teóricas de PROTAC carecen de la comprobación, ya que hasta ahora solo existe un ejemplo de PROTAC cuya diana es la que se define tradicionalmente como no “drogable”, el transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3) [63]. Se necesitan más ejemplos a propósito de consolidar dicha ventaja. Tampoco se ha verificado que todas las localizaciones subcelulares son accesibles. Ya existen PROTACs dirigidas a dianas situadas en el citoplasma, el núcleo y el endosoma, pero aún faltan ejemplos capaces de degradar las proteínas no procesadas en el retículo endoplasmático y en el aparato de Golgi [64].

En general, los procesos del desarrollo de PROTAC son empíricos haciendo que todo el procedimiento sea muy largo y laborioso [1]. Con el fin de acelerar y optimizarlo hay que establecer estrategias o principios generales del desarrollo de PROTAC y métodos analíticos fiables y estandarizados porque debido a la naturaleza quimérica y catalítica, los comportamientos tanto farmacocinético como farmacodinámico son difícilmente predecibles. Los ligandos de la diana y de la ligasa E3 pueden ser predeterminados, así que el principal obstáculo del diseño consiste en la determinación de la distancia entre los dos ligandos y la posición que adopta el conector. Desgraciadamente todavía no existe un criterio universal para el diseño del conector, se debe realizar caso por caso [31].

Sin duda, la PROTAC supone una nueva estrategia excelente en la lucha contra las enfermedades. Las PROTACs más recientes basadas en moléculas pequeñas han conseguido una potencia muy favorable y las variantes derivadas han mejorado esta tecnología en diferentes dimensiones como la penetración celular, la selectividad tisular, el rango de dianas accesibles, entre otras. Su ventaja más relevante es indiscutiblemente la capacidad de dirigirse hacia las proteínas no “drogables”, ya que muchas de ellas participan en múltiples cánceres y enfermedades neurodegenerativas, que son una de las causas de muerte más importantes de hoy en día. Aunque quedan muchos retos por superar, la farmacología promovida por evento de PROTAC que le confiere mayores potencia y duración de efecto, junto con la elevada selectividad y la capacidad de prevenir las resistencias farmacológicas más habituales hace que se convierta en una oportunidad extraordinaria para abrir brecha en el desarrollo de nuevos fármacos.

7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Pettersson M, Crews CM. PROteolysis TArgeting Chimeras (PROTACs) — Past, present and future. *Drug Discov. Today*. **2019**; *31*: 15-27.
- [2] Finan C, Gaulton A, Kruger FA, Lumbers RT, Shah T, Engmann J, Galver L, Kelley R, Karlsson A, Santos R, Overington JP, Hingorani AD, Casas JP. The druggable genome and support for target identification and validation in drug development. *Sci. Transl. Med.* **2017**; *9*(383): eaag1166.
- [3] Churcher I. Protac-Induced Protein Degradation in Drug Discovery: Breaking the Rules or Just Making New Ones? *J. Med. Chem.* **2018**; *61*: 444-452.
- [4] Bobbin M, Rossi JJ. RNA Interference (RNAi)-Based Therapeutics: Delivering on the Promise? *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2016**; *56*(1): 103-122.
- [5] Kleiger G, Mayor T. Perilous journey: a tour of the ubiquitin–proteasome system. *Trends Cell Biol.* **2014**; *24*(6): 352-359.
- [6] Hicke L. Protein regulation by monoubiquitin. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2001**; *2*: 195–201.
- [7] Lu J, Qian Y, Altier M, Dong H, Wang J, Raina K, Hines J, Winkler JD, Crew AP, Coleman K, Crew CM. Hijacking the E3 Ubiquitin Ligase Cereblon to Efficiently Target BRD4. *Chem. Biol.* **2015**; *22*: 755-763.
- [8] 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. U.S.A.* **2001**; *98*(15): 8554-8559.
- [9] Sakamoto KM, Kim KB, Verma R, Ransick A, Stein B, Crews CM, Deshaies RJ. Development of Protacs to Target Cancer-promoting Proteins for Ubiquitination and Degradation. *Mol. Cell. Proteomics.* **2003**; *2*(12): 1350-1358.

- [10] Lee H, Puppala D, Choi E-Y, Swanson H, Kim KB. Targeted Degradation of the Aryl Hydrocarbon Receptor by the PROTAC Approach: A Useful Chemical Genetic Tool. *ChemBioChem*. **2007**; *8*(17): 2058-2062.
- [11] Schneckloth JS, Fonseca FN, Koldobskiy M, Mandal A, Deshaies R, Sakamoto K, Crews CM. Chemical Genetic Control of Protein Levels: Selective in Vivo Targeted Degradation. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**; *126*(12): 3748-3754.
- [12] Wender PA, Mitchell DJ, Pattabiraman K, Pelkey ET, Steinman L, Rothbard JB. The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **2000**; *97*(24): 13003-13008.
- [13] Rodriguez-Gonzalez A, Cyrus K, Salcius M, Kim K, Crews CM, Deshaies RJ, Sakamoto KM. Targeting steroid hormone receptors for ubiquitination and degradation in breast and prostate cancer. *Oncogene*. **2008**; *27*(57): 7201-7211.
- [14] Schneckloth AR, Pucheault M, Tae HS, Crews CM. Targeted intracellular protein degradation induced by a small molecule: en route to chemical proteomics, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**; *18*(22): 5904-5908.
- [15] Bondeson DP, Mares A, Smith IE, Ko E, Campos S, Miah AH, Mulholland KE, Routly N, Buckley DL, Gustafson JL, Zinn N, Grandi P, Shimamura S, Bergamini G, Faelth-Savitski M, Bantscheff M, Cox C, Gordon DA, Willard RR, Flanagan JJ, Casillas LN, Votta BJ, Besten W, Famm K, Kruidenier L, Carter PS, Harling JD, Churcher I, Crews CM. Catalytic in vivo protein knockdown by small-molecule PROTACs. *Nat. Chem. Biol.* **2015**; *11*(8):611-617.
- [16] Lebraud H, Wright DJ, Johnson CN, Heightman TD. Protein degradation by in-cell self-assembly of proteolysis targeting chimeras. *ACS Cent. Sci.* **2016**; *2*: 927-934.
- [17] Blackman ML, Royzen M, Fox JM. Tetrazine Ligation: Fast Bioconjugation Based on Inverse-Electron-Demand Diels-Alder Reactivity. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**; *130*: 13518-13519.
- [18] Winter GE, Buckley DL, Paulk J, Roberts JM, Souza A, Dhe-Paganon S, Bradner JE. Phthalimide conjugation as a strategy for in vivo target protein degradation. *Science*. **2015**; *348*: 1376-1381.
- [19] Maniaci C, Hughes SJ, Testa A, Chen W, Lamont DJ, Rocha S, Alessi DR, Romeo R, Ciulli A. Homo-PROTACs: bivalent small-molecule dimerizers of the VHL E3 ubiquitin ligase to induce self-degradation. *Nat. Commun.* **2017**; *8*(1): 830.
- [20] Frost J, Galdeano C, Soares P, Gadd MS, Grzes KM, Ellis L, Epemolu O, Shimamura S, Bantscheff M, Grandi P, Read KD, Cantrell DA, Rocha S, Ciulli A. Potent and selective chemical probe of hypoxic signalling downstream of HIF- α hydroxylation via VHL inhibition. *Nat. Commun.* **2016**; *7*: 13312.
- [21] Steinebach C, Lindner S, Udeshi ND, Mani DC, Kehm H, Köpff S, Carr SA, Gütschow M, Krönke J. Homo-PROTACs for the Chemical Knockdown of Cereblon. *ACS Chem. Biol.* **2018**; *13*(9): 2771-2782.
- [22] Krönke J, Udeshi ND, Narla A, Grauman P, Hurst SN, McConkey M, Svinkina T, Heckl D, Comer E, Li X, Ciarlo C, Hartman E, Munshi N, Schenone M, Schreiber SL, Carr SA, Ebert BL. Lenalidomide causes selective degradation of IKZF1 and IKZF3 in multiple myeloma cells. *Science* **2014**; *343*(6168): 301-305.
- [23] Lee KJ, Lee KM, Jo S, Kang KW, Park CS. Induction of cereblon by NF-E2-related factor 2 in neuroblastoma cells exposed to hypoxia-reoxygenation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**; *399*(4): 711-715.
- [24] Schlessinger J, Lemmon MA. SH2 and PTB domains in tyrosine kinase signaling. *Sci. STKE*. **2003**; *2003*(191): RE12.
- [25] Hines J, Gougha JD, Corson TW, Crews CM. Posttranslational protein knockdown coupled to receptor tyrosine kinase activation with phosphoPROTACs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2013**; *110*(22): 8942-8947.
- [26] Gu S, Cui D, Chen X, Xiong X, Zhao Y. PROTACs: An Emerging Targeting Technique for Protein Degradation in Drug Discovery. *BioEssays*. **2018**; *40*(4): 1700247.
- [27] Kao S, Jaiswal RK, Kolch W, Landreth GE. Identification of the mechanisms regulating the differential activation of the mapk cascade by epidermal growth factor and nerve growth factor in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* **2001**; *276*(21):18169-18177.
- [28] Holbro T, Beerli RR, Maurer F, Koziczak M, Barbas III CF, Hynes NE. The ErbB2/ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2003**; *100*(15): 8933-8938.
- [29] Xue G, Wang K, Zhou D, Zhong H, Pan Z. Light-Induced Protein Degradation with Photocaged PROTACs. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**; *141*(46): 18370-18374.
- [30] Naro Y, Darrach K, Deiters A. Optical control of small molecule-induced protein degradation. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**; *142*(5): 2193-2197.
- [31] Cyrus K, Wehenkel M, Choi EY, Han HJ, Lee H, Swanson H, Kim KB. Impact of linker length on the activity of PROTACs. *Mol. Biosyst.* **2011**; *7*(2): 359-364.
- [32] Pfaff P, Samarasinghe K, Crews CM, Carreira EM. Reversible Spatiotemporal Control of Induced Protein Degradation by Bistable PhotoPROTACs. *ACS Cent. Sci.* **2019**; *5*(10): 1682-1690.
- [33] Reynders M, Matsuura B, Bérouti M, Simoneschi D, Marzio A, Pagano M. PHOTACs Enable Optical Control of Protein Degradation. *Sci. Adv.* **2020**; *6*(8): eaay5064.

- [34] Knie C, Utecht M, Zhao F, Kulla H, Kovalenko S, Brouwer AM, Saalfrank P, Hecht S, Bléger D. ortho-Fluoroazobenzenes: Visible Light Switches with Very Long-Lived Z Isomers. *Chem. - Eur. J.* **2014**; *20*(50): 16492-16501.
- [35] Gyrð-Hansen M, Meier P. IAPs: From caspase inhibitors to modulators of NF- κ B, inflammation and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2010**; *10*: 561–574.
- [36] Naito M, Ohoka N, Shibata N. SNIPERs—Hijacking IAP activity to induce protein degradation. *Drug Discov. Today Technol.* **2019**; *31*: 35-42.
- [37] Sekine K, Takubo K, Kikuchi R, Nishimoto M, Kitagawa M, Abe F, Nishikawa K, Tsuruo T, Naito M. Small molecules destabilize cIAP1 by activating auto-ubiquitylation. *J. Biol. Chem.* **2008**; *283*: 8961–8968.
- [38] Ohoka N, Okuhira K, Ito M, Nagai K, Shibata N, Hattori T, Ujikama O, Shimokawa K, Sano O, Koyama R, Fujita H, Teratani M, Matsumoto H, Imaeda Y, Nara H, Cho N, Naito M. In vivo knockdown of pathogenic proteins via specific and nongenetic inhibitor of apoptosis protein (IAP)-dependent protein erasers (SNIPERs). *J. Biol. Chem.* **2017**; *292*(11): 4556–4570.
- [39] Yamashita H, Tomoshige S, Nomura S, Ohgane K, Hahimoto Y, Ishikawa M. Application of Protein Knockdown Strategy Targeting β -Sheet Structure to Multiple Disease-associated Polyglutamine Proteins. *Bioorganic. Med. Chem.* **2019**; *28*(1): 115175.
- [40] Fan H, Ho L, Chi C, Chen S, Pent G, Chan T, Lin S, Harn H. Polyglutamine (PolyQ) Diseases: Genetics to Treatments. *Cell Transplant.* **2014**; *23*(4-5): 441-458.
- [41] Ohoka N, Ujikawa O, Shimokawa K, Sameshima T, Shibata N, Hattori T, Nara H, Cho N, Naito M. Different degradation mechanisms of inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) by the specific and nongenetic IAP-dependent protein eraser (SNIPER). *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **2019**; *67*(3): 203-209.
- [42] Banik SM, Pedram K, Wisnovsky S, Riley NM, Bertozzi CR. Lysosome Targeting Chimeras (LYTACs) for the Degradation of Secreted and Membrane Proteins. *ChemRxiv.* **2019**; Preprint.
- [43] Ghosh P, Dahms MN, Kornfel S. Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2003**; *4*: 202–213.
- [44] Takahashi D, Moriyama J, Tomoe N, Erika M, Takahashi E, Sato A, Akaike T, Itto-Nakama K, Arimoto H. AUTACs: Cargo-Specific Degradation Using Selective Autophagy. *Mol. Cell* **2019**; *76*(5): 797-810.e10.
- [45] Kwon YT, Ciechanover A. The Ubiquitin Code in the Ubiquitin-Proteasome System and Autophagy. *Trends Biochem. Sci.* **2017**; *42*(11): 873-886.
- [46] Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Heidi O, Øvervatn A, Bjørkøy G, Johansen T. p62/SQSTM1 Binds Directly to Atg8/LC3 to Facilitate Degradation of Ubiquitinated Protein Aggregates by Autophagy. *J. Biol. Chem.* **2007**; *282*: 24131-24145.
- [47] Youle RJ, Narendra DP. Mechanisms of mitophagy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2011**; *12*(1): 9-14.
- [48] Neklesa TK, Winkler JD, Crews CM. Targeted protein degradation by PROTACs. *Pharmacol. Ther.* **2017**; *174*: 138-144.
- [49] Lai AC, Toure M, Hellerschmied D, Salami J, Jaime-Figueroa S, Ko E, Hines J, Crews CM. Modular PROTAC Design for the Degradation of Oncogenic BCR-ABL. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**; *55*(2): 807-810.
- [50] Gadd MS, Testa A, Lucas X, Chan KH, Chen W, Lamont DJ, Zengerle M, Ciulli A. Structural basis of PROTAC cooperative recognition for selective protein degradation. *Nat. Chem. Biol.* **2017**; *13*(5): 514–521.
- [51] Scaltriti M, Verma C, Guzman M, Jimenez J, Parra JL, Pedersen K, Smith DJ, Landolfi S, Ramon y Cajal S, Arribas J, Baselga J. Lapatinib, a HER2 tyrosine kinase inhibitor, induces stabilization and accumulation of HER2 and potentiates trastuzumab-dependent cell cytotoxicity. *Oncogene* **2009** *28*(6): 803–814.
- [52] Prekovic S, Royen ME, Voet AR, Geverts B, Houtman R, Melchers D, Zhang KYJ, Broeck TV, Smeets E, Spans L, Houtsmuller AB, Joniau S, Claessens F, Helsen C. The Effect of F877L and T878A Mutations on Androgen Receptor Response to Enzalutamide. *Mol. Cancer Ther.* **2016**; *15*(7):1702–12.
- [53] Salami J, Alabi S, Willard RR, Vitale NJ, Wang J, Dong H, Jin M, McDonnell DP, Crew AP, Neklesa TK, Crews CM. Androgen receptor degradation by the proteolysis-targeting chimera ARCC-4 outperforms enzalutamide in cellular models of prostate cancer drug resistance. *Commun. Biol.* **2018**; *1*: 100.
- [54] Hines J, Lartigue S, Dong H, Qian Y, Crews CM. MDM2-Recruiting PROTAC Offers Superior, Synergistic Antiproliferative Activity via Simultaneous Degradation of BRD4 and Stabilization of p53. *Cancer Res.* **2019**; *79*(1):251-262.
- [55] Sun Y, Zhao X, Ding N, Gao H, Wu Y, Yang Y, Zhao M, Hwang J, Song Y, Liu W, Rao Y. PROTAC-induced BTK degradation as a novel therapy for mutated BTK C481S induced ibrutinib-resistant B-cell malignancies. *Cell Res.* **2018**; *28*: 779–781.
- [56] Burslem GM, Schultz AR, Bondeson DP, Eide CA, Savage Stevens SL, Druker BJ, Crews CM. Targeting BCR-ABL1 in Chronic Myeloid Leukemia by PROTAC-Mediated Targeted Protein Degradation. *Cancer Res.* **2019**; *79*(18): 4744-4753.

- [57] Cyrus K, Wehenkel M, Choi EY, Lee H, Swanson H, Kim KB. Jostling for Position: Optimizing Linker Location in the Design of Estrogen Receptor-Targeting PROTACs. *ChemMedChem*. **2010**; 5(7):979-985.
- [58] Burslem GM, Smith BE, Lai AC, Jaime-Figueroa S, McQuaid DC, Bondeson DP, Toure M, Dong H, Qian Y, Wang J, Crew AP, Hines J, Crews CM. The Advantages of Targeted Protein Degradation Over Inhibition: An RTK Case Study. *Cell Chem. Biol.* **2018**; 25(1): 67-77.
- [59] Ishoey M, Chorn S, Singh N, Jaeger MG, Brand M, Paulk J, Bauer S, Erb MA, Parapatics K, Müller AC, Bennett KL, Ecker GF, Bradner JE, Winter GE. Translation Termination Factor GSPT1 Is a Phenotypically Relevant Off-Target of Heterobifunctional Phthalimide Degraders. *ACS Chem. Biol.* **2018**; 13(3): 553-560.
- [60] Zhang L, Riley-Gillis B, Vijay P, Shen Y. Acquired Resistance to BET-PROTACs (Proteolysis-Targeting Chimeras) Caused by Genomic Alterations in Core Components of E3 Ligase Complexes. *Mol. Cancer. Ther.* **2019**; 18(7): 1302-1311.
- [61] Ottis P, Plladino C, Thienger P, Britschgi A, Heinching C, Berrera M, Julien-Laferrriere A, Roudnicky F, Kam-Thong T, Bischoff JR, Martoglio B, Pettazoni P. Cellular Resistance Mechanisms to Targeted Protein Degradation Converge Toward Impairment of the Engaged Ubiquitin Transfer Pathway. *ACS Chem. Biol.* **2019**; 14: 2215-2223.
- [62] Clague MJ, Heride C, Urbé S. The demographics of the ubiquitin system. *Trends Cell Biol.* **2015**; 25(7):417-426.
- [63] Bai L, Zhou H, Xu R, Zhao Y, Chinnaswamy K, McEachern D, Chen J, Yang C, Liu Z, Wang M, Liu L, Jiang H, Wen B, Kumar P, Meagher JL, Sun D, Stuckey JA, Wang S. A Potent and Selective Small-Molecule Degradator of STAT3 Achieves Complete Tumor Regression In Vivo. *Cancer Cell.* **2019**; 36(5):498-511.e17.
- [64] Burslem GM, Crews CM. Proteolysis-Targeting Chimeras as Therapeutics and Tools for Biological Discovery. *Cell.* **2020**; 181(1):102-114.
- [65] ClinicalTrials.gov [Internet]. U.S.: ClinicalTrials; 2019 [actualizado 5 Jun 2019; citado 31 May 2020]. Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03888612>
- [66] Petrylak DP, Gao X, Vogelzang NJ, Garfield MH, Taylor I, Moore MD, Peck RA, Burris HA. First-in-human phase I study of ARV-110, an androgen receptor (AR) PROTAC degrader in patients (pts) with metastatic castrate-resistant prostate cancer (mCRPC) following enzalutamide (ENZ) and/or abiraterone (ABI). *J. Clin. Oncol.* **2020**; 38(15): 3500-3500
- [67] ClinicalTrials.gov [Internet]. U.S.: ClinicalTrials; 2019 [actualizado 27 May 2020; citado 31 May 2020]. Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04072952>
- [68] Neklesa T, Snyder LB, Willard RR, Vitale N, Raina K, Pizzano J, Gordon DA, Bookbinder M, Macaluso J, Dong H, Ferraro C, Wang G, Wang J, Crews CM, Houston J, Crew AP, Taylor I. Abstract 5236: ARV-110: An androgen receptor PROTAC degrader for prostate cancer. *Cancer Res.* **2018**; 78(13): 5236