



## **TRABAJO FIN DE MÁSTER**

# **DEGRADACIÓN DE PROTEINAS COMO ESTRATEGIA NOVEDOSA EN EL DISEÑO DE FARMACOS**

***“PROTEIN DEGRADATION AS A NOVEL  
STRATEGY IN PHARMACEUTICAL DESIGN”***

**AUTORA: Samar Douh Cherif**

**DIRECTORA: Dra. María Jesús Pérez de Vega**

**TUTOR: Dr. Juan José Vaquero**

**CURSO: 2019/2020**



**Autorización de la presentación del TFM en Descubrimiento de Fármacos  
Curso 2019-2020**

**Nombre y apellidos Directores/as del TFM: María Jesús Pérez de Vega**

**Categoría Profesional: Científico Titular**

**Departamento/Unidad: Departamento de Biomiméticos para el  
Descubrimiento de Fármacos**

**Centro: Instituto de Química Médica - CSIC**

**CERTIFICA/N:**

Que el trabajo titulado:

**DEGRADACION DE PROTEINAS COMO ESTRATEGIA NOVEDOSA EN EL  
DISEÑO DE FARMACOS**

que ha realizado **D./Dña. Samar Douh Cherif** como Trabajo Fin de Máster, para el Máster Interuniversitario en Descubrimiento de Fármacos, ha sido realizado bajo su dirección y autorizan su presentación.

En Madrid, a 24 de junio de 2020

M. J. Pérez de Vega



**CEU**  
*Universidad  
San Pablo*



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE  
MADRID



Universidad  
de Alcalá

**Autorización de la presentación del TFM en Descubrimiento de Fármacos  
Curso 2019-2020**

**Nombre y apellidos Directores/as del TFM: María Jesús Pérez de Vega**

**Categoría Profesional: Científico Titular**

**Departamento/Unidad: Departamento de Biomiméticos para el  
Descubrimiento de Fármacos**

**Centro: Instituto de Química Médica - CSIC**

**CERTIFICA/N:**

Que el trabajo titulado:

**DEGRADACION DE PROTEINAS COMO ESTRATEGIA NOVEDOSA EN EL  
DISEÑO DE FARMACOS**

que ha realizado **D./Dña. Samar Douh Cherif** como Trabajo Fin de Máster, para el Máster Interuniversitario en Descubrimiento de Fármacos, ha sido realizado bajo su dirección y autorizan su presentación.

En Madrid, a 24 de junio de 2020

## RESUMEN

Las quimeras orientadas a proteólisis (PROTAC) son una nueva modalidad terapéutica que juegan un papel interesante en el descubrimiento de fármacos. Estas moléculas heterobifuncionales median la degradación de las proteínas diana al ser poliubiquitinadas por las E3 ligasas, generalmente Cereblon o Von Hippel-Lindau, a través del sistema de ubiquitina proteasoma (UPS). Los PROTACS presentan varias ventajas sobre otras estrategias terapéuticas, y han desencadenado un aumento del descubrimiento de fármacos en los últimos años que incluso, en algunos casos han llegado a ensayos clínicos. En esta revisión, se proporciona una descripción de la función de los PROTAC, su importancia y las oportunidades que aporta. Por otra parte, se hace referencia al desarrollo de PROTACS basados en moléculas pequeñas y ligandos derivados de las E3 ligasas con sus ejemplos, y también se menciona otra tecnología llamada “Hydrophobic tagging” que está muy relacionado con los PROTACs, pero en este caso se usa un grupo hidrófobo en vez de ligandos peptídicos o moléculas pequeñas. Además, se discuten los beneficios potenciales de la degradación de proteínas sobre la inhibición, así como los desafíos que se deben superar.

## ABSTRACT

*Proteolysis-oriented chimeras (PROTAC) are a new therapeutic modality that play an interesting role in drug discovery. These heterobifunctional molecules mediate the degradation of the target proteins by being polyubiquitinated by the E3 ligases, which are generally Cereblon or Von Hippel-Lindau, through the ubiquitin proteasome system (UPS). With several advantages over other therapeutic strategies, PROTACs have triggered an increase in drug discovery in recent years, and in some cases have reached clinical trials. This review provides a description of the role of PROTAC, its importance and the opportunities it brings. On the other hand, the development of PROTACs based on small molecules and ligands derived from E3 ligases with their examples, and another technology is also mentioned called "Hydrophobic tagging" that is closely related to PROTACs, but in this case is used a hydrophobic group instead of peptide or small molecule ligands. In addition, the potential benefits of protein degradation on inhibition are discussed, as well as the challenges to be overcome.*

# INDICE

1.Introducción	1
1.1. Qué son los PROTACs	3
1.2. Modo de acción y su importancia	4
2. PROTAC hetero-bifuncionales de moléculas pequeñas	10
2.2. PROTACs derivados de Von Hippel Lindau (VHL) E3 Ligasa	10
2.3. PROTACs derivados de Cereblon (CRBN) E3 Ligasa	13
3. Otros PROTACs	17
4. Hydrophobic Tags (HyTs)	19
5. Conclusiones	21
6. Bibliografía	22

## 1. Introducción

En la última década, ha surgido una nueva estrategia llamada degradación inducida de proteínas, basada en moléculas quiméricas diseñadas con ese fin denominadas quimeras orientadas a proteólisis (PROTACS, *proteolysis-targeting-chimers*). Esta estrategia consiste en la inhibición de la actividad biológica de una proteína objetivo a través de la formación de un complejo ternario entre una molécula quimérica, PROTAC, una ubiquitín ligasa y la proteína objetivo de inhibición [1]. Comparando los inhibidores del tipo molécula pequeña con esta nueva estrategia, vemos que la primera se basa en la ocupación de sitios activos en la diana para ejercer su actividad de inhibición, mientras que la segunda se basa en el empleo del sistema celular ubiquitina-proteasoma (UPS) para inducir la ubiquitinación de las proteínas diana y alcanzar la pérdida de su función a través de la destrucción de la misma. Además presenta la ventaja de que solo necesita una breve interacción con la proteína objetivo para conseguir que esta última pierda su función [2]. Después de la destrucción de la proteína objetivo, el PROTAC se recicla y lleva a cabo otro ciclo de degradación de la proteína diana [3]. Los PROTAC y la estrategia de marcado hidrofóbico (Hydrophobic Tags, HyTs) constituyen la primera generación de fármacos dirigidos a la degradación de proteínas, sin embargo, su aplicación clínica ha sido más costosa debido a ciertas complicaciones que con el tiempo se han ido superando [4].

Especialmente se ha demostrado su uso exitoso en la degradación de dianas proteicas relacionadas con una gran variedad de enfermedades como es el cáncer, infecciones víricas, enfermedades neurodegenerativas y trastornos del sistema inmunitario [5].

Esta estrategia comenzó a desarrollarse por primera vez hace aproximadamente dos décadas [6], [7], y desde entonces hasta el día de hoy, se ha observado un aumento del interés por la misma, que incluso ha llevado el descubrimiento de nuevos PROTACs por parte de compañías farmacéuticas, como es el caso de la pionera Arvinas, que ha desarrollado el fármaco ARV-110, que se encuentran ya en la primera fase de ensayos clínicos, y es un PROTAC que degrada el receptor de andrógenos siendo el principal impulsor del cáncer de

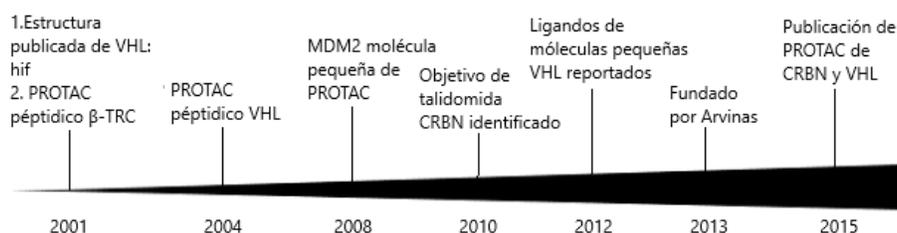
próstata resistente a la castración durante la transición de una enfermedad localizada a una enfermedad metastásica [8].

Con el tiempo, se han diseñado PROTAC que tienen un comportamiento similar a las moléculas pequeñas tradicionales, y que dado su modo de acción han cobrado un gran interés desde el punto de vista terapéutico estando actualmente en el punto de mira de la industria farmacéutica. Así, hoy en día diversas industrias farmacéuticas desarrollan programas de investigación basados en la estrategia PROTAC, dirigidos a una gran variedad de dianas terapéuticas, con el fin último de llegar a fármacos indicados para el tratamiento de diferentes enfermedades [7]:

- AstraZeneca: PROTAC dirigidos al linfoma de células B 6 (BCL6) [9].
- GlaxoSmithKline (GSK): factor asociado a P300 / CBP y control general no representable 5 (PCAF / GCN5) [10]; y quinasa 4 asociada a receptor de interleucina-1 (IRAK4) [11].
- Pfizer: tirosina quinasa (BTK) de Bruton [12].
- Boehringer Ingelheim: quinasa de adhesión (FAK) [13].
- Abbvie y sus investigadores descubrieron la resistencia causada por los PROTAC [14].
- Arvinas como se ha comentado anteriormente, ha descrito un PROTAC denominado ARV-110 de estructura no revelada que se encuentra en ensayo clínico de fase I [8]. Por otra parte, también en ensayos clínicos en fase I está el PROTAC ARV-471, degradador de estrógenos para el tratamiento en mujeres con cáncer de mama localmente avanzado o metastásico ER positivo / HER2 negativo [15].

La historia y evolución de los PROTAC comenzó con la primera prueba de concepto en 2001 (Fig. 1), cuando se demostró que una molécula quimérica era capaz de unirse a la proteína MetAP2 y la ubiquitina ligasa E3 SCF- $\beta$ -TRCP a la vez conduciendo a la poliubiquitinación de MetAP [6]. En el mismo año, se describió el modo de unión del péptido HIF $\alpha$  a E3 VHL ligasa. Entonces, se sabía que VHL media la degradación de HIF $\alpha$  [16]. Partiendo de la primera idea de SCF $\beta$ -TRCP, se pensó en incorporar péptidos cortos de hidroxiprolina en un PROTAC peptídico para reclutar la ligasa VHL E3 y como resultado se demostró que estos PROTACs conducían a la degradación de FKBP12 y el receptor de andrógenos (AR) [17].

Después, ligandos de MDM2 constituyeron la prueba de incorporación de estos ligandos como un resto reclutador de E3 en un entorno PROTAC [18]. Posteriormente, se desarrollaron inhibidores de moléculas pequeñas de la interacción HIF $\alpha$  y VHL. Con la estructura cristalina adquirida de VHL, el  $K_d$  de estos compuestos se consiguió mejorar a valores por debajo de 1  $\mu$ M y, lo que es más importante, es que las propiedades de estas moléculas PROTAC empezaron a asemejarse más a las de los fármacos [19].



**Figura 1.** Hitos históricos en el desarrollo de la tecnología PROTAC

A partir de 2015, se empieza a apreciar un ligero aumento en las publicaciones de PROTAC basadas en VHL de molécula pequeña. Al mismo tiempo el descubrimiento de que la talidomida interactúa con la ligasa E3 Cereblon despertó el interés en varios grupos de investigación por el diseño de PROTACs utilizando la talidomida y sus derivados como restos de reclutamiento de E3 ligasa [20]. Hasta día de hoy, se han descrito varios PROTAC basados en VHL y Cereblon, que además han sido validados.

### 1.1. Qué son los PROTAC

Los PROTAC son moléculas heterobifuncionales de diseño que se componen principalmente por 3 elementos (Fig. 2): ligando de la proteína de interés (POI), o de la diana terapéutica, por otro lado, ligando que se une a la ligasa E3 ubiquitina y, por último, el espaciador “*linker*” que conjuga los dos elementos anteriores. La ligasa E3 ubiquitina y la proteína diana unidas por el PROTAC, formando un complejo ternario, provocan la activación del sistema ubiquitina-proteosoma (UPS) promoviendo la degradación de la proteína diana. Una vez

ocurre la poliubiquitinación en la POI, esta es reconocida por el proteasoma que la digiere catalíticamente en aminoácidos y péptidos pequeños (Fig. 3) [21].

Debido a su naturaleza catalítica, los PROTAC se han descrito como "activadores esenciales programables" de enzimas ubiquitin-ligasas [22]. Se les llama programables ya que los PROTAC se pueden diseñar específicamente para apuntar a cualquier POI; por otra parte, se les llama esenciales ya que al no existir previamente la ubiquitinación de la proteína diana, la transferencia de ubiquitinas sobre la POI solo ocurrirá en un determinado momento y justo después tendrá lugar la degradación; y finalmente, como activadores ya que median la formación del complejo ternario de manera catalítica. Contemplar a los PROTAC como activadores puede proporcionar según los estudios, un marco más adecuado para un diseño PROTAC más robusto.



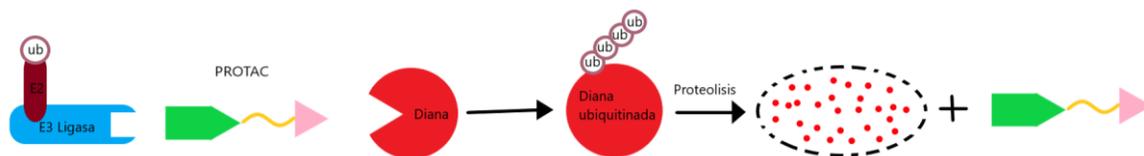
**Figura 2.** Representación de elementos de PROTAC

Los PROTAC destruyen las proteínas que causan enfermedades al atraer el UPS, en lugar de inhibirlos mediante el uso de inhibidores tradicionales, lo que proporciona una estrategia mejor y más eficiente. Además, la proteína diana podría ser cualquier proteína de interés terapéutico, lo que sugiere una gran utilidad para la aplicación de la tecnología PROTAC en el desarrollo de fármacos [6].

## 1.2. Modo de acción y su importancia

El mecanismo que abrió el campo de desarrollo de los PROTAC es el sistema ubiquitina-proteosoma (UPS). Esta es una de las principales vías responsables de la degradación de proteínas para el mantenimiento de la homeostasis celular. Este sistema se compone de:

ubiquitina, proteasoma, tres enzimas y proteínas diana intracelulares. Su papel es clave en varios procesos biológicos importantes, como la progresión del ciclo celular, la transducción de señales, el mantenimiento de la integridad del genoma y la génesis tumoral. La ubiquitinación de proteínas es una reacción enzimática dependiente de ATP mediada por las tres enzimas siguientes: la E1 como activadora de ubiquitina, E2 una enzima conjugadora de ubiquitina y E3 una ubiquitina ligasa [23]. El proceso implica tres pasos: primero, E1 activa una molécula de ubiquitina formando un mediador de ácido acilamida en el extremo C-terminal de la ubiquitina en una reacción dependiente de ATP. En segundo lugar, la ubiquitina activada se transfiere a un E2. Finalmente, una ligasa E3, que reconoce y recluta el sustrato de la proteína, cataliza la transferencia de la subiquitina del E2 a un residuo de lisina en el sustrato mediante la formación de un enlace covalente. La ubiquitina en sí misma contiene residuos de sietelisisina y un residuo de metionina N-terminal, sobre la cual se forman cadenas de poliubiquitina después de múltiples ciclos de esta reacción. Las proteínas poliubiquitinadas son reconocidas y destruidas de manera predominante por el proteasoma [24].



**Figura 3.** Esquema del mecanismo de degradación por parte de PROTAC

En definitiva, el mecanismo de degradación inducida por PROTAC depende de la formación de un complejo ternario (POI-PROTAC-E3) que permite la poliubiquitinación de POI y la posterior degradación proteasómica, como se ha detallado previamente (Fig. 4) [20].

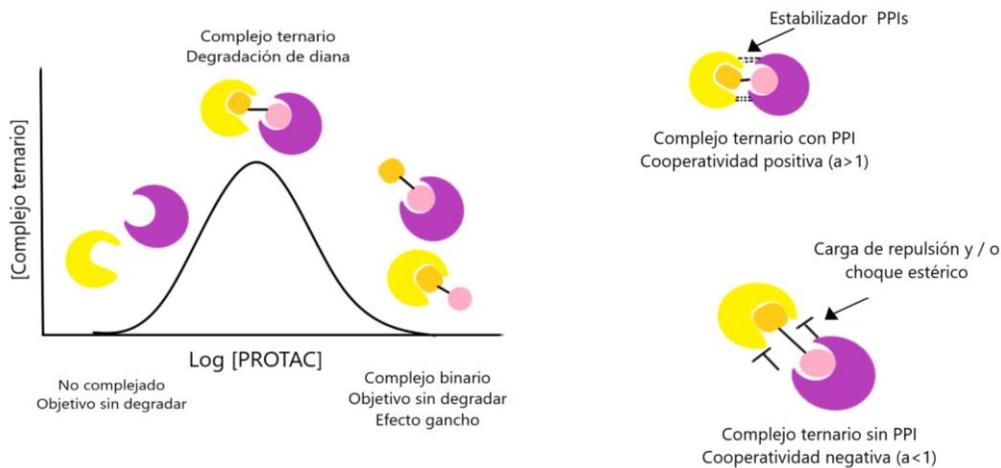
- Una vez que la POI ha sido ubiquitinada, el PROTAC no continúa uniéndose a la misma, sino que se disocia. De hecho, esto es una ventaja ya que una vez disociado, busca un nuevo objetivo para ser ubiquitinado. La unión muy fuerte del PROTAC a

la POI (covalente) produce una velocidad de desconexión lenta, y esto puede incluso reducir la eficiencia general del ligando. Es decir, en términos de enzimología, el tiempo de residencia del ligando PROTAC en la POI afectará en su grado de renovación catalítica. Este efecto puede tener una dependencia en forma de campana: tiempo de residencia demasiado corto (baja afinidad) y el E3 no tendrá tiempo suficiente para catalizar la transferencia de ubiquitina del E2 al POI [24]. Por otro lado, un tiempo de residencia demasiado largo puede ralentizar el viaje del ligando PROTAC entre diferentes POI. Por supuesto, una vez que se degrada la POI, se liberará la molécula PROTAC (no covalente) para que siempre pueda lograr su función. Esto sugiere que no hay necesidad de una afinidad exquisita del ligando por la POI. De hecho, un estudio meticuloso muestra claramente que los aglutinantes de quinasas muy potentes no son necesariamente degradadores efectivos [25].

- Una molécula PROTAC puede mostrar muy buena potencia para la ligasa E3 y POI, pero si estas no pueden formar un complejo adecuado, no se dará la ubiquitinación y con ello la degradación. Diferentes estudios han demostrado que no existe correlación entre la afinidad de la molécula PROTAC por las quinasas y el grado de degradación inducida. La afinidad del PROTAC por la proteína no es un factor determinante aquí, sino que es la formación del complejo ternario lo que proporciona la eficiencia [25]. Para explicar la formación de complejos ternarios (Fig. 5), existen modelos matemáticos establecidos que predicen una dependencia en forma de campana de la concentración de PROTAC. Por ejemplo, a altas concentraciones de PROTAC pueden observarse complejos binarios improductivos y este fenómeno se conoce como el efecto gancho. Además, las interacciones favorables o repulsivas entre el POI y el E3 pueden afectar la formación del complejo ternario. Se usa el término cooperatividad ( $\alpha$ ) para describir estas interacciones donde la cooperatividad positiva ( $\alpha > 1$ ) ocurre cuando la estabilización de los PPIs (interacciones proteína-proteína) entre el POI y E3 promueven la formación de complejos ternarios. En contraste, la cooperatividad negativa ( $\alpha < 1$ ) ocurre cuando la interacción invalida la formación del complejo ternario [26]. Se ha demostrado que la cooperatividad positiva minimiza la extensión del efecto de gancho, dando como resultado una formación de complejo

ternario productivo mejorado, y con ello una mayor potencia y selectividad del PROTAC para la degradación inducida de miembros individuales [27].

- La longitud del espaciador y su unión a los ligandos individuales POI y E3 juega un papel muy importante. La ligasa E3 y la POI no están destinadas a interactuar, por ello el conector determinará en su mayor parte la orientación relativa de las dos proteínas en el complejo ternario. Para que un espaciador sea eficaz tiene que posicionar las proteínas de tal forma que surja cierta complementariedad superficial, siendo las lisinas POI accesibles para la ligasa E3, a la vez que ocurra la mínima interacción [28].



**Figura 5.** Formación de complejo ternario mediada por PROTAC y efecto de gancho en función de la concentración de PROTAC. Compuesto PROTAC: ligando de la POI (naranja) ligando de la E3 (rosa) conectado por un enlazador (negro), POI (amarillo), E3 (púrpura).

A pesar de las significativas ventajas, quedan por abordar varios desafíos fundamentales que limitan las aplicaciones terapéuticas de los PROTAC como [5], [24], [29]

- 1) Alto peso molecular que afecta la biodisponibilidad, distribución y absorbabilidad en los tejidos diana.

- 2) Baja eficacia por la pobre permeabilidad celular debido al carácter peptídico, con lo que se administran altas dosis y posología más frecuente para arreglar esta limitación.
- 3) Dificultades para su uso por administración oral. El alto peso molecular y la lipofilia hacen que sea muy difícil lograr una buena solubilidad y permeabilidad, necesarias para la absorción oral [30].

Existen numerosas combinaciones para la síntesis de PROTAC debido a que, en primer lugar, se puede usar una gran variedad de ligandos PROTAC para unirse específicamente a las proteínas diana correspondientes y reclutar estas proteínas para la ligasa E3; y en segundo, el genoma humano codifica más de 600 E3 ligasas, haciendo posible el desarrollo de una amplia gama de PROTAC para el descubrimiento de fármacos. Esta flexibilidad como moléculas quiméricas, proporciona un gran potencial para aplicaciones prácticas para la eliminación condicional de proteínas promotoras de enfermedades. Sin embargo, las aplicaciones de esta tecnología sufren limitaciones como se han comentado anteriormente, lo que lleva al desarrollo de los PROTAC permeables a las células al modificar ligandos peptídicos o al reemplazar ligandos peptídicos con pequeñas moléculas para mejorar la permeabilidad, que se analiza a continuación [28].

Los PROTAC destacan por las interesantes oportunidades que presentan para el diseño y descubrimiento de fármacos:

- Superar la resistencia a los medicamentos, en concreto en el caso del cáncer [31], como es el caso del PROTAC ARV-110, que ha mostrado una actividad prometedora ante mecanismos de resistencia comunes como la mutación o sobreexpresión de receptores andrógenos producidos por terapias dirigidas a AR actualmente disponibles [8].
- Eliminación de las funciones de las quinasas enzimáticas y no enzimáticas [2]. Las moléculas inhibitorias se encargan principalmente de la inhibición enzimática, mientras que los PROTAC actúan tanto sobre la actividad enzimática como no enzimática de las proteínas, degradando la diana proteica. Por lo tanto, los PROTAC pueden llegar a más espacios farmacológicos y regular proteínas que son de difícil acceso por parte de los inhibidores tradicionales [5].

- Degradación de los “undruggable proteins” [2], hasta el día de hoy se conocen alrededor de un 20-25 % de proteínas diana alcanzables que son: las quinasas, receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), receptores de hormonas nucleares y canales iónicos. Todos ellos han sido y pueden ser objetivo en el descubrimiento de fármacos usando las modalidades convencionales detalladas anteriormente. Por otra parte, existen proteínas conocidas como “undruggable” es decir de no fácilmente accesibles usando las tecnologías tradicionales, y son todas las estructuras proteicas que carecen de actividad catalítica y / o tienen las funciones catalíticas independientes. Para este tipo de proteínas el uso potencial de PROTAC para atacarlas y degradarlas constituyen una oportunidad. Se entiende mejor, al hablar de un ejemplo como el transductor de señal y el activador de la transcripción 3 (STAT3) que se considera un objetivo terapéutico atractivo por su papel en la ruta de señalización múltiple, pero debido a la falta de un sitio farmacológico en la superficie de STAT3 limita el desarrollo de inhibidores convencionales que puedan inhibirlo. Por ello, en noviembre de 2019, el grupo de Shaomeng Wang informó por primera vez de un interesante PROTAC dirigido a STAT3 con potente actividad biológica in vitro e in vivo [3]. Este éxito confirma la clave de la tecnología PROTAC especialmente en el campo de los objetivos “undruggable”.
- Estrategia de eliminación química rápida y reversible in vivo. Las tecnologías tradicionales para la eliminación genética de proteínas generalmente tienen un ciclo largo, modo de acción irreversible y de alto coste, lo que trae consigo muchos inconvenientes para la investigación, especialmente en primates no humanos. Además, estos modelos genéticos a veces producen malentendidos en el fenotipo debido a la compensación o mutación genética. Por último, y no menos importante, los métodos tradicionales de genética no pueden ser usados para estudiar la función de genes embrionarios letales in vivo. Sin embargo, con los PROTAC es adecuado, ya que destruye las proteínas objetivo directamente, sin actuar a nivel de genoma. Entonces, los PROTAC debido a su acción sobre las POIs en un momento específico y permitir la recuperación de estas tras la retirada del tratamiento farmacológico,

constituyen un método de eliminación química rápida y reversible, y pueden utilizarse como una alternativa efectiva para las modalidades genéticas existentes [4], [5].

## 2. PROTAC hetero-bifuncionales de moléculas pequeñas

Para superar las limitaciones de los PROTAC peptídicos han surgido los PROTAC hetero-bifuncionales de moléculas pequeñas. Su diseño se basa en reclutadores de E3 ligasa no peptídicos de bajo peso molecular, lo que ha permitido mejorar las propiedades fisicoquímicas [2]. Estos nuevos PROTACs han mostrado una unión a las E3 ligasas con afinidades del orden micromolar dando lugar a una degradación rápida del objetivo y una mejor permeabilidad celular. Conjuntamente, presenta mejor estabilidad y biodistribución celular, así como la entrada celular pasiva [32]. Estas moléculas pequeñas han demostrado una alta afinidad por varias E3 ligasas, como son Von Hippel-Lindau (VHL), cereblon (CRBN), MDM2, cIAP1. Destacando las dos últimas, que son las más estudiadas y que han sido objetivo de gran parte del trabajo realizado en este campo, ya que la mayoría de small-PROTAC descritos en la literatura degradan proteínas específicas a través estas ligasas [5]. Teniendo en cuenta esto, a continuación, se comenta con más detalle el trabajo descrito en relación a dichas E3 ligasa, VHL y CRBN. Adicionalmente, el último apartado se dedicará a describir una estrategia muy relacionada con los PROTACs, llamada *Hydrophobic tagging* (HyT), también enfocada hacia la degradación de proteínas.

### 2.2. PROTACs derivados de Von Hippel Lindau (VHL) E3 Ligasa

El desarrollo de PROTAC de VHL como fármacos se ha visto un poco complicado, debido a la falta de ligandos de moléculas pequeñas de alta afinidad para secuestrar el complejo CRL2VHL. Por lo que se dedicó tiempo para el descubrimiento de moléculas pequeñas que se unen específicamente a HIF1 $\alpha$  que es el sitio de unión de VHL [33]. Se consiguió desarrollar un ligando de molécula pequeña con un resto de hidroxiprolina [34] que aporta alta afinidad y especificidad hacia VHL para poder crear nuevos PROTACs no peptídicos

basado en VHL que se encarguen de degradar el receptor alfa relacionado con el estrógeno ( $ERR\alpha$ ).

$ERR\alpha$  es un receptor nuclear huérfano que tiene como funciones: regular la homeostasis de la energía celular al controlar la transcripción de genes implicados en el metabolismo de la glucosa y los ácidos grasos y la biogénesis mitocondrial [19]. El primer PROTAC basado en VHL, fue PROTAC\_ $ERR\alpha$  (Tabla 1, entrada 1) que mostró actividad dosis-dependiente en la línea celular de cáncer de mama tipo MCF7 disminuyendo los niveles de  $ERR\alpha$  dependiente de VHL. Además, el PROTAC\_ $ERR\alpha$  a una concentración de 100 nM, regula a la baja los niveles de  $ERR\alpha$  en un 50%. Por otra parte, este PROTAC proporcionó una distribución tisular amplia y eficaz en ratones; conjuntamente, se observaron niveles reducidos de proteína  $ERR\alpha$  en xenoinjertos tumorales y tejidos múltiples, tales como tejidos cardíacos y renales [19].

De la misma forma, otro PROTAC denominado PROTAC\_RIPK2 (Tabla 1, entrada 2), contiene el mismo ligando de molécula pequeña para la unión a VHL, pero esta vez se dirige a la serina / treonina quinasa para la degradación de RIPK2. La función de este último es activar las vías de señalización NF- $\kappa$ B y MAPK y aparte, ejerce un papel fundamental en la respuesta inmune innata al interactuar con los sensores bacterianos NOD1 y NOD2 [38]. El PROTAC\_RIPK2 se utiliza también con vandetanib como inhibidor de la tirosina quinasa que se usa como medicamento para el tratamiento contra el cáncer, en concreto cáncer tiroideo medular, para reclutar la proteína objetivo RIPK2 [35].

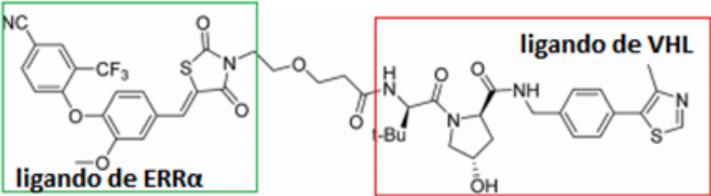
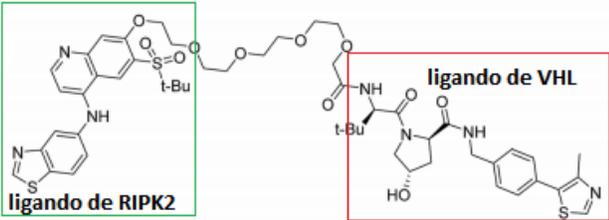
La degradación de RIPK2 por PROTAC\_RIPK2, se consideró potente, con un  $D_{max}$  de 95% a una concentración de 10 nM; de acción rápida, ya que se observó una reducción de proteínas de casi el 50% a una hora aproximadamente después del tratamiento y, además, se logró una degradación casi completa después de 4 h de tratamiento; y es altamente específico, ya que solo se observó degradación de RIPK2 y otras proteína no relacionadas con esta finalidad se degradaron. Además, no se observó toxicidad evidente a ninguna concentración de PROTAC\_RIPK2 [19].

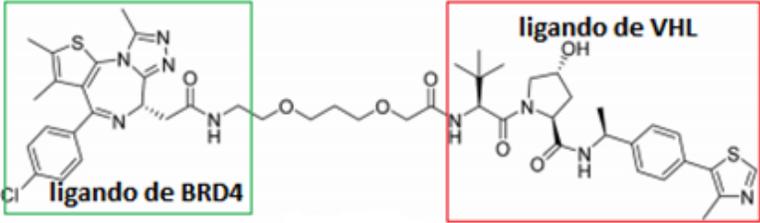
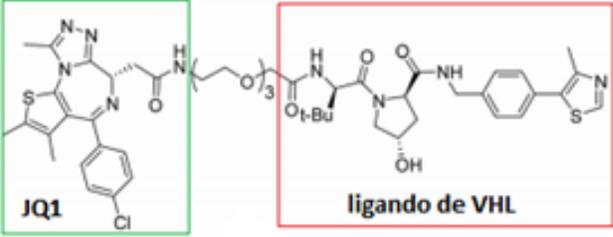
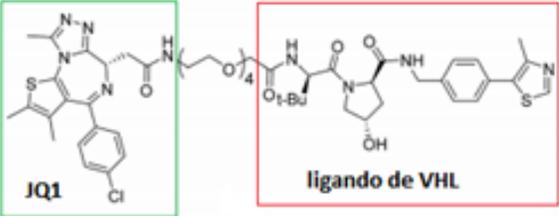
Los PROTAC basados en VHL de molécula pequeña también se han sido usados para degradar la diana BRD4. ARV-771 (Tabla 1, entrada 3) [36], un PROTAC degradador de

pan-BET a concentraciones picomolar basado en VHL, se encuentra bajo estudios clínicos, ya que ejerció una actividad mucho mejor y eficaz contra un xenoinjerto de ratón CRPC, que los PROTAC basados en CRBN (dBET1 y ARV-825), esto destaca la utilidad de la tecnología PROTAC para combatir tumores sólidos.

MZ1 (Tabla 1, entrada 4) y MZ2 (Tabla 1, entrada 5), otros dos PROTAC basados en VHL, se encargan de inducir la degradación de BRD4 en 24 h. Lo interesante de estos PROTAC es que eliminan de manera selectiva BRD4 sobre BRD2 y BRD3, en comparación con dBET1 y ARV-825, lo que indica que el reclutamiento de diferentes ligasas E3 puede dar como resultado diferentes perfiles de selectividad [37]. La eficacia de MZ1 que tiene un espaciador más corto se ha observado que es mayor que la de MZ2, lo que sugiere que la longitud del espaciador también es importante para la degradación [24].

**Tabla 1.** Representación de las estructuras de PROTAC derivados de VHL E3 ligasa, su diana y su aplicación biológica.

	Nombre del PROTAC	Estructura	Diana proteica	Aplicación biológica
1	PROTAC_ERR $\alpha$		ERR $\alpha$	Reducción de niveles de ERR $\alpha$ en el tratamiento de cáncer de mama [19].
2	PROTAC_RIPK2		RIPK2	Reducción de niveles de RIPK2 que se encuentran expresados en cáncer como tiroideo medular [19].

3	ARV-771		BRD4	Reducción de los niveles de AR en tratamiento de cáncer de próstata [36].
4	MZ1		BRD4	Degradación selectiva de BRD4 para el tratamiento de leucemia mieloide aguda y carcinoma ovárico [37].
5	MZ2		BRD4	Su diferencia con la anterior es que tiene un espaciador más largo y la degradación se ve reducida [1].

### 2.3. PROTACs derivados de Cereblon (CRBN) E3 Ligasa

Cereblon (CRBN), es un tipo de E3 ligasa, concretamente en el componente de reconocimiento de sustrato de la ubiquitin-ligasa CRL4CRBN. Recientemente, se ha descubierto que la talidomida y sus derivados, lenalidomida y pomalidomida interaccionan con Cereblon (CRBN), el componente de reconocimiento de sustrato de la ubiquitin ligasa CRL4CRBN implicada en la degradación de la proteína apoptótica Bcl2, el factor de regulación de interferón 4 (IRF4) mostrando actividad inmunomoduladora y antiproliferativa [32]. La talidomida, es un sedante indicado para las náuseas matutinas de las mujeres embarazadas, y comercializado en forma racémica. Posteriormente, su uso fue suspendido

en este tipo de pacientes cuando se descubrió que posee efectos teratogénicos provocados por uno de los isómeros, el isómero S [38].

El primer ejemplo de PROTAC basado en CRBN fue desarrollado por el equipo Crews y tiene como objetivo la degradación de la diana onco-proteína BRD4 [39]. Denominado ARV-825 (Tabla 2, entrada 1), está compuesto por OTX015 (ligando que se une a la proteína diana) y pomalidomida (ligando para reclutar CRBN). Esta última, es miembro de la familia de proteínas bromodominio y dominio extraterminal (BET), se considera una diana terapéutica interesante para varios tipos de cáncer, como es el cáncer de páncreas, jugando un papel fundamental en la regulación de la expresión esencial de oncogenes, como c-MYC, BCL-xL y BCL-6. De hecho, estudios independientes han demostrado que la eliminación de BRD4 desencadena la apoptosis en las células de leucemia mieloide aguda (AML), y los inhibidores de moléculas pequeñas de la familia BET (OTX015, JQ1,...) inducen la detención temprana del ciclo celular y la apoptosis en las líneas celulares leucémicas de fusión MLL [40]. El PROTAC ARV-825 ha demostrado una degradación rápida de BRD4, lo que conlleva a la supresión de la proliferación y la inducción de apoptosis en las líneas celulares de linfoma de Burkitt (BL). Los resultados del compuesto ARV-825 fueron espectaculares degradando casi al 100% la diana BRD4 a una concentración de 10 nmol/L en 6 h ( $DC_{50} < 1$  nmol/L), lo que explica su eficacia ante la degradación de proteínas patógenas. En comparación de este compuesto con los inhibidores originales de moléculas pequeñas como JQ1 y OTX015, ARV-825 originó una supresión más duradera de c-MYC, PIM1, CDK4 / 6, JAK2 y Bcl-xL y una inhibición de la proliferación más acentuada, además la inducción de apoptosis en todas las células BL analizadas [39]. Con todo esto, se puede decir que ARV-825 es un ejemplo de PROTAC interesante y prometedor que actúa eficazmente sobre las proteínas patogénicas.

Otro ejemplo de PROTAC inhibidor de BRD4 lo constituye d-BET1 (Tabla 2, entrada 2), descrito por el grupo Winter y sus colaboradores. Esta nueva quimera viene del; JQ1, que se conjugó a un derivado de talidomida, que tiene como objetivo la degradación de la misma diana que el anterior PROTAC, BRD4 (Fig.). Los resultados observados de d-BET1 demostraron que se da una degradación de más del 95% en células AML a una concentración creciente desde 100nM en 18h ( $DC_{50} = 430$  nmol/L). Comparando estos dos últimos PROTACs ARV-825 y d-BET1, ambos se componen de los mismos ligandos, pero se

diferencian en el espaciador. Los estudios indican que ARV-825 tiene una actividad de degradación mucho mejor que d-BET1 [38]. La diferencia observada en la actividad de degradación entre los PROTACs anteriores sugiere que la elección y diseño del espaciador puede mejorar tanto la afinidad y selectividad [4].

Ibrutinib es inhibidor covalente de la diana tirosina quinasa de Bruton (BTK) de primera elección para tratar tumores linfoides, incluidas la leucemia linfocítica crónica, el linfoma de células del manto y linfoma no Hodgkin [41]. La señalización de la diana BTK es crucial en el desarrollo y la activación de las células B, por lo que si se pierde su función por inhibición o degradación da como resultado un bloqueo de diferenciación de células B [42]. El tratamiento con ibrutinib presenta el inconveniente de una variedad de efectos secundarios debido a la inhibición de las quinasas de la familia EGFR, ITK y TEC al mismo tiempo. Por otra parte, la administración a largo plazo de ibrutinib puede causar la mutación C481S BTK, lo que puede provocar resistencia a los medicamentos [43]. Por ello surge el desarrollo de PROTAC P13I (Tabla 2, entrada 3), que se compone de ibrutinib como ligando de unión a la diana y pomalidomida para reclutar CRBN, y degradar BTK25. En los resultados, se observó que P13I degrada la diana BTK con la mutación C481S a 30 nM [43]. Además, no demostró actividad inhibitoria y degradación contra EGFR, ITK o TEC, con lo que se destaca que este PROTAC es improbable de causar los efectos adversos que se daban con el ibrutinib original. Esta interesante investigación nos hace ver mejor la importancia de la tecnología PROTAC como un tratamiento prometedor para los cánceres resistentes a los medicamentos [29].

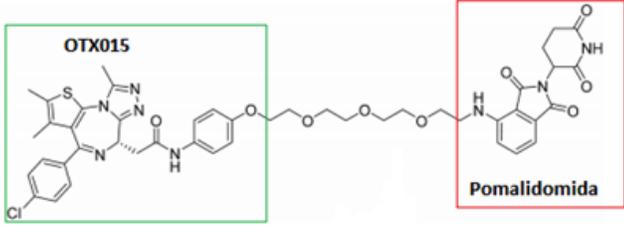
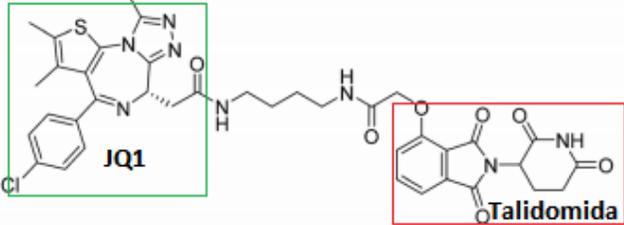
Además de los ejemplos anteriores y de las dianas comentadas, otros PROTAC basados en CRBN mostraron eficacia también frente CDK9, BTK, HDAC6, ALK, BCR-ABL. Entre los objetivos se encuentran receptores nucleares, reguladores de la transcripción y proteínas quinasas, mostrando la universalidad de los PROTAC como tratamientos contra el cáncer [4].

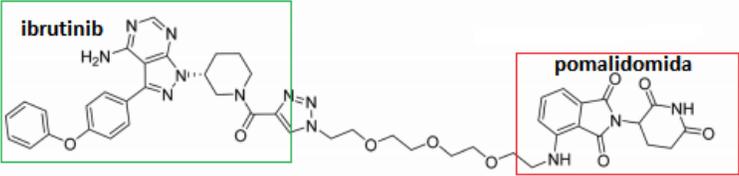
Otros estudios que utilizan los inhibidores de la tirosina quinasa: bosutinib y dasatinib que se dirigen hacia BCR-ABL y ABL quiméricos. Se hicieron para comparar PROTAC basados en VHL y CRBN. En los resultados se observó que la ligasa CRBN tiene un perfil diferente de degradación contra VHL, posiblemente debido a la flexibilidad del andamio de cullina 4A

del complejo CRBN. Esto explica que la selectividad de PROTAC dependen del tipo de molécula inhibidora, así como de la ligasa E3 reclutada [38].

Cabe destacar ARV-110, desarrollado por la compañía farmacéutica Arvinas y actualmente en la fase I de ensayos clínicos, como se ha comentado anteriormente como ejemplo. Es un PROTAC que se administra por vía oral y que degrada el receptor de andrógeno siendo este el principal impulsor del cáncer de próstata resistente a la castración durante la transición de una enfermedad localizada a una enfermedad metastásica [8].

**Tabla 2.** Representación de las estructuras de PROTAC derivados de CRBN E3 ligasa, su diana y su aplicación biológica.

	Nombre del PROTAC	Estructura	Diana proteica	Aplicación biológica
1	ARV-825		BRD4	Supresión de la proliferación y la inducción de apoptosis en las líneas celulares de linfoma de Burkitt [39].
2	d-BET1		BRD4	Reducción de niveles BRD4 en células de leucemia MV4-11 humanas sin afectar el los recuentos sanguíneos completos normales después del tratamiento de degradación [38].

3	P13I		BTK25	Degradación de la mutación sin sentido BTK de C481S debido a ibrutinib en pacientes con linfoma de células del manto (MCL) que han desarrollado esta resistencia [43].
---	------	--	-------	--

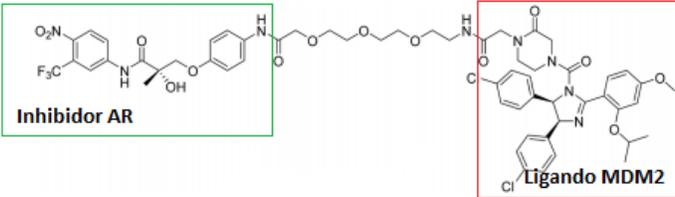
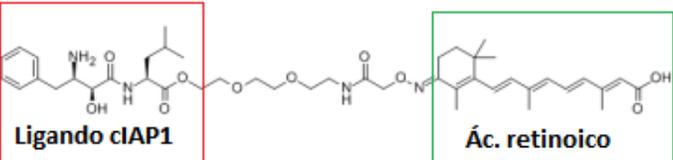
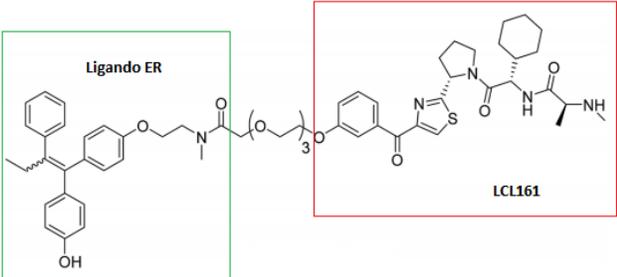
### 3. Otros PROTACs

También se han descrito PROTACs derivados de otras E3 ligasas como son MDM2, cIAP1. MDM2, fue en realidad la primera ligasa E3 utilizada para crear PROTAC basado en moléculas pequeñas, aparte, es un regulador celular negativo primario del supresor tumoral p53 [44]. Aprovechando esto, se creó un compuesto quimérico SARM-nutlin PROTAC 14 (Tabla 3, entrada 1) formado por: un inhibidor de AR no esteroideo, un conector de polietilenglicol (PEG) y un ligando MDM2 nutlin3, diseñado para la degradación de AR. El nivel de proteína AR se midió en células Hela tratadas a 10 mM. Pasadas 7 h, se observó una disminución significativa en AR. Se identificó que la degradación es dependiente del proteosoma, esto se observó suprimiendo previamente las líneas celulares con aproteasoma epoxomicina [45]. Sin embargo, el gran defecto de este PROTAC sí que es cierto que es permeable a las células pero se necesita una concentración muy alta, lo que lleva a que no sea mejor que los anteriores.

Por otra parte, otra E3 ligasa mencionada anteriormente es un inhibidor de la proteína de apoptosis 1 (cIAP1) que su función es la regulación negativa de la apoptosis, induciendo la progresión celular. En muchas células tumorales se encuentra sobreexpresada [46]. Conociendo esto, el grupo de Y. Hashimoto crearon PROTACs basados en esta última E3 ligasa para inducir la degradación de las proteínas de unión al ácido retinoico intracelular (CRABP-II), uniendo ésteres de bestatina con ácido retinoico, como es el PROTAC SNIPER-2 (Tabla 3, entrada 2) [47]. Sin embargo, se experimentaron varias limitaciones, como bajas potencias y la autodegradación de cIAP1. Para superarlo, se utilizó un antagonista de IAP LCL161 para reemplazar la bestatina, creando un nuevo PROTAC denominado

SNIPER(ER)-87 (Tabla 3, entrada 3), que recluta XIAP otro miembro de la familia de inhibidores de proteínas de apoptosis en lugar de cIAP1, degradando con éxito el objetivo ER a orden nanomolar [48].

**Tabla 3.** Representación de otros PROTACs derivados de E3 ligasas, su diana y aplicación biológica.

	Nombre del PROTAC	Estructura	Diana proteica	Aplicación biológica
1	SARM-nutlin 14	 <p>Inhibidor AR</p> <p>Ligando MDM2</p>	AR	Reducción de niveles de AR en cáncer de próstata [44].
2	SNIPER-2	 <p>Ligando cIAP1</p> <p>Ác. retinoico</p>	CRABP-II	Reducción de niveles de en el tratamiento de enfermedades como alzheimer y cáncer [47].
3	SNIPER(ER)-87	 <p>Ligando ER</p> <p>LCL161</p>	ER	Reducción de niveles de ER en cáncer ovárico [48].

#### 4. Hydrophobic Tags (HyTs)

El concepto de “Hydrophobic tagging” está muy relacionado con el de “Protein-targeting chimeric molecules” (PROTACs). En vez de usar un ligando que recluta una ligasa E3 específica, se utiliza un grupo hidrófobo, como es el adamantano, que se une a un péptido que reconoce de manera específica la proteína de interés, y con ello iniciar la maquinaria de degradación. La etiqueta hidrófoba voluminosa unida a la proteína de interés imita o induce un estado de mal plegamiento de la proteína que atrae a la maquinaria de las chaperonas para intentar replegar las proteínas de mal estado [49]. Pero debido a que se da una modificación covalente en la proteína diana, las chaperonas no pueden eliminar ese mal plegamiento, por lo que permanece desplegada y finalmente se elimina por degradación mediada directamente por el proteosoma [50]. En la mayoría de los compuestos, se ha elegido el grupo adamantano como grupo hidrófobo a unir, ya que ha demostrado en estudios anteriores ser una buena molécula para la formación de HyT al inducir la degradación del proteosoma [51]. Un ejemplo de esta modalidad lo constituye el estudio reciente llevado a por Crews y colaboradores:

Estudios recientes han demostrado que una sola mutación en el receptor de andrógenos (AR) tipo F876L convierte la acción quimioterapéutico antitumoral MDV3100 de un antagonista a un agonista. Por lo que se ha pensado en el desarrollo de una nueva clase de degradadores selectivos del receptor de andrógenos (SARDs) para tratar este mecanismo de resistencia. Este es el caso de SARD279 (Tabla 4, entrada 1), un compuesto que contiene un resto hidrófobo unido a un ligando-moléculas pequeñas del AR para inducir la degradación de este, e inhibe la proliferación celular de cáncer de próstata dependiente de andrógenos. Con estos estudios, se demostró que SARD279 exhibe efectos antiproliferativos y que al eliminar AR se puede superar los mecanismos de resistencia asociados a MDV3100 [52].

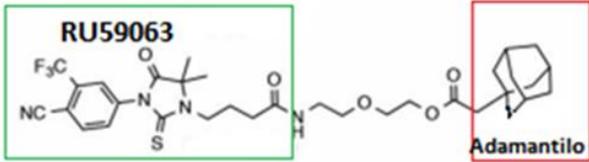
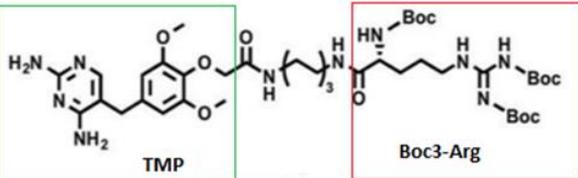
La mayor parte de la tecnología HyT se basó en derivados que contienen el resto adamantilo y se ha aplicado a una gran variedad de compuestos, pero además de este, también se ha descrito el uso de la arginina triplemente protegida con carbamato de terc-butilo (Boc<sup>3</sup>-Arg) como resto hidrófobo para la preparación de HyTs capaces de inducir la de proteínas [53]. El inconveniente de Boc<sup>3</sup>-Arg es que tiene un peso molecular mucho más alto que el

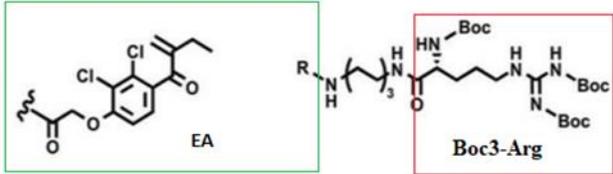
adamantano, pero su capacidad para inducir la degradación de proteínas fue confirmada en 2012 [54]. Sus mecanismos de degradación son varios, tenemos el primer caso, donde el resto Boc3-Arg se introduce en el proteasoma y este atrae la proteína diana a su cámara proteolítica. El segundo, el grupo Boc3-Arg se une a la POI para exponer su resto hidrófobo y de esta manera interactuar con el proteasoma para que se inicie la degradación, por último, Boc3 Arg puede interactuar con varios factores proteicos como HSP90 [4].

Como ejemplos se destacan los siguientes: TMP-B3A (Tabla 4, entrada 2) formado por un inhibidor no covalente trimetoprima (TMP) unido a Boc3-Arg, que como función se encarga de degradar la dihidrofolato reductasa (DHFR) a una concentración micromolar. De la misma forma, existe otro ejemplo de EA-B3A (Tabla 4, entrada 3) formado por la unión entre Boc3-Arg y el inhibidor covalente ácido etacrínico (EA) para degradar la Glutación-S-transferasa (GST) [54].

La tecnología HyT ha utilizado ligandos tanto covalentes, como no covalentes para iniciar la degradación de las proteínas diana. Sin embargo, para que se llegue hasta las fases de desarrollo clínico aún falta por mejorar sus propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas [4].

**Tabla 4.** Representación de otros moléculas HyT, su diana y aplicación biológica.

	Nombre	Estructura	Diana	Aplicación biológica
1	SARD279		AR	Reducción de AR en cáncer de próstata [52].
2	TMP-B3A		DHFR	Reducción de los niveles de DHFR que se encuentran en diversos tipos de cáncer [54].

3	EA-B3A		GST	Reducción de niveles de GST que se encuentra en altas concentraciones en células tumorales [54].
---	--------	--	-----	--

## 5. Conclusiones

La tecnología PROTAC ha demostrado un interés y un auge creciente, que ha ido en aumento durante la última década. Esta tecnología muestra muchas ventajas en comparación a los inhibidores de moléculas pequeñas, como inducir la degradación de las proteínas objetivo, superar la resistencia a los medicamentos causada por mutaciones, mejorar la selectividad hacia POI, reducir la dosis debido a su naturaleza catalítica subestequiométrica, la eliminación rápida y reversible in vivo, y lo más destacable es su potencial para degradar proteínas difícilmente abordables mediante las estrategias tradicionales llamadas “undruggable”. Aproximadamente el 85% del proteoma humano, está compuesto por: factores de transcripción, las proteínas de andamiaje y las proteínas no enzimáticas que carecen de actividad enzimática o interacciones funcionales, por lo que los inhibidores tradicionales no pueden actuar sobre ellas. Por el contrario, los PROTAC pueden interactuar con cualquier sitio de la proteína objetivo, en lugar de un sitio activo estacionario, lo que hace que estas proteínas “undruggable” puedan ser también dianas terapéuticas prometedoras para el tratamiento de diversas enfermedades. Además, se ha descrito otra tecnología relacionada HyT que también ha llevado a resultados interesantes con aplicación terapéutica. Hasta el momento, la mayoría de las investigaciones sobre PROTAC se han centrado especialmente en aplicaciones para el tratamiento contra el cáncer, pero también podría ser válida para otras patologías. Prueba del enorme potencial y aplicabilidad de los PROTAs, lo constituye el hecho de que ya es una realidad que al menos un par de PROTACs ha conseguido progresar a ensayos clínicos, ARV-110 y ARV-471, por lo que las perspectivas son muy prometedoras.

## 6. Bibliografía

- [1] S. Gu, D. Cui, X. Chen, X. Xiong, and Y. Zhao, “PROTACs: An Emerging Targeting Technique for Protein Degradation in Drug Discovery,” *BioEssays*, vol. 40, no. 4, Apr. 2018.
- [2] H. Lebraud and T. D. Heightman, “Protein degradation: A validated therapeutic strategy with exciting prospects,” *Essays in Biochemistry*, vol. 61, no. 5. Portland Press Ltd, pp. 517–527, 08-Nov-2017.
- [3] M. Petterson and C. M. Crews, “PROteolysis TArgeting Chimeras (PROTACs) — Past, present and future,” *Drug Discovery Today: Technologies*, vol. 31. Elsevier Ltd, pp. 15–27, 01-Apr-2019.
- [4] Y. Wang, X. Jiang, F. Feng, W. Liu, and H. Sun, “Degradation of proteins by PROTACs and other strategies,” *Acta Pharmaceutica Sinica B*, vol. 10, no. 2. Chinese Academy of Medical Sciences, pp. 207–238, 01-Feb-2020.
- [5] L. Xia, W. Liu, Y. Song, H. Zhu, and Y. Duan, “The Present and Future of Novel Protein Degradation Technology,” *Curr. Top. Med. Chem.*, vol. 19, no. 20, pp. 1784–1788, Oct. 2019.
- [6] K. M. Sakamoto, K. B. Kim, A. Kumagai, F. Mercurio, C. M. Crews, and R. J. Deshaies, “Protacs: Chimeric molecules that target proteins to the Skp1-Cullin-F box complex for ubiquitination and degradation,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 98, no. 15, pp. 8554–8559, Jul. 2001.
- [7] H. Gao, X. Sun, and Y. Rao, “PROTAC Technology: Opportunities and Challenges,” *ACS Medicinal Chemistry Letters*, vol. 11, no. 3. American Chemical Society, pp. 237–240, 12-Mar-2020.
- [8] T. Neklesa *et al.*, “ARV-110: An oral androgen receptor PROTAC degrader for prostate cancer,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 37, no. 7\_suppl, pp. 259–259, Mar. 2019.
- [9] W. McCoull *et al.*, “Development of a Novel B-Cell Lymphoma 6 (BCL6) PROTAC to Provide Insight into Small Molecule Targeting of BCL6,” *ACS Chem. Biol.*, vol. 13, no. 11, pp. 3131–3141, Nov. 2018.
- [10] Z. I. Bassi *et al.*, “Modulating PCAF/GCN5 Immune Cell Function through a PROTAC Approach,” *ACS Chem. Biol.*, vol. 13, no. 10, pp. 2862–2867, Oct. 2018.
- [11] J. Nunes *et al.*, “Targeting IRAK4 for Degradation with PROTACs,” *ACS Med. Chem. Lett.*, vol. 10, no. 7, pp. 1081–1085, Jun. 2019.
- [12] A. Zorba *et al.*, “Delineating the role of cooperativity in the design of potent PROTACs for BTK,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 115, no. 31, pp. E7285–E7292, Jul. 2018.
- [13] J. Popow *et al.*, “Highly Selective PTK2 Proteolysis Targeting Chimeras to Probe Focal Adhesion Kinase Scaffolding Functions,” *J. Med. Chem.*, vol. 62, no. 5, pp. 2508–2520, Mar. 2019.
- [14] K. M. Riching *et al.*, “Quantitative Live-Cell Kinetic Degradation and Mechanistic Profiling of PROTAC Mode of Action,” *ACS Chem. Biol.*, vol. 13, no. 9, pp. 2758–2770, Sep. 2018.

- [15] “Arvinas Presents Preclinical Data on Protein Degradar, ARV-471, at the 2018 San Antonio Breast Cancer Symposium (SABCS) | Arvinas.” [Online]. Available: <https://ir.arvinas.com/news-releases/news-release-details/arvinas-presents-preclinical-data-protein-degrader-arv-471-2018/>. [Accessed: 24-Jun-2020].
- [16] P. Jaakkola *et al.*, “Targeting of HIF- $\alpha$  to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation,” *Science* (80-. ), vol. 292, no. 5516, pp. 468–472, Apr. 2001.
- [17] S. Moon and B. H. Lee, “Chemically induced cellular proteolysis: An emerging therapeutic strategy for undruggable targets,” *Molecules and Cells*, vol. 41, no. 11. Korean Society for Molecular and Cellular Biology, pp. 933–942, 2018.
- [18] A. R. Schneekloth, M. Pucheault, H. S. Tae, and C. M. Crews, “Targeted intracellular protein degradation induced by a small molecule: En route to chemical proteomics,” *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, vol. 18, no. 22, pp. 5904–5908, Nov. 2008.
- [19] D. P. Bondeson *et al.*, “Catalytic in vivo protein knockdown by small-molecule PROTACs,” *Nat. Chem. Biol.*, vol. 11, no. 8, pp. 611–617, Aug. 2015.
- [20] T. K. Neklesa, J. D. Winkler, and C. M. Crews, “Targeted protein degradation by PROTACs,” *Pharmacology and Therapeutics*, vol. 174. Elsevier Inc., pp. 138–144, 01-Jun-2017.
- [21] S.-L. Paiva and C. M. Crews, “Targeted protein degradation: elements of PROTAC design,” *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 50, pp. 111–119, Jun. 2019.
- [22] S. L. Fisher and A. J. Phillips, “Targeted protein degradation and the enzymology of degraders,” *Current Opinion in Chemical Biology*, vol. 44. Elsevier Ltd, pp. 47–55, 01-Jun-2018.
- [23] S.-L. Paiva and C. M. Crews, “Targeted Protein Degradation: Elements of PROTAC Design.”
- [24] M. Scheepstra, K. F. W. Hekking, L. van Hijfte, and R. H. A. Folmer, “Bivalent Ligands for Protein Degradation in Drug Discovery,” *Computational and Structural Biotechnology Journal*, vol. 17. Elsevier B.V., pp. 160–176, 01-Jan-2019.
- [25] D. P. Bondeson *et al.*, “Lessons in PROTAC Design from Selective Degradation with a Promiscuous Warhead,” *Cell Chem. Biol.*, vol. 25, no. 1, pp. 78-87.e5, Jan. 2018.
- [26] C. Lu and Z. X. Wang, “Quantitative Analysis of Ligand Induced Heterodimerization of Two Distinct Receptors,” *Anal. Chem.*, vol. 89, no. 13, pp. 6926–6930, Jul. 2017.
- [27] M. S. Gadd *et al.*, “Structural basis of PROTAC cooperative recognition for selective protein degradation,” *Nat. Chem. Biol.*, vol. 13, no. 5, pp. 514–521, May 2017.
- [28] S. Gu, D. Cui, X. Chen, X. Xiong, and Y. Zhao, “PROTACs: An Emerging Targeting Technique for Protein Degradation in Drug Discovery,” *BioEssays*, vol. 40, no. 4, p. 1700247, Apr. 2018.
- [29] H. Pei, Y. Peng, Q. Zhao, and Y. Chen, “Small molecule PROTACs: An emerging technology for targeted therapy in drug discovery,” *RSC Advances*, vol. 9, no. 30. Royal Society of Chemistry, pp. 16967–16976, 29-May-2019.
- [30] P. D. Leeson and B. Springthorpe, “The influence of drug-like concepts on decision-making

- in medicinal chemistry,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 6, no. 11, pp. 881–890, Nov. 2007.
- [31] J. C. Kaczmarek, P. S. Kowalski, and D. G. Anderson, “Advances in the delivery of RNA therapeutics: From concept to clinical reality,” *Genome Medicine*, vol. 9, no. 1. BioMed Central Ltd., pp. 1–16, 27-Jun-2017.
- [32] S. Gu, D. Cui, X. Chen, X. Xiong, and Y. Zhao, “PROTACs: An Emerging Targeting Technique for Protein Degradation in Drug Discovery,” *BioEssays*, vol. 40, no. 4, p. 1700247, Apr. 2018.
- [33] D. L. Buckley *et al.*, “Targeting the von Hippel-Lindau E3 ubiquitin ligase using small molecules to disrupt the VHL/HIF-1 $\alpha$  interaction,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 134, no. 10, pp. 4465–4468, Mar. 2012.
- [34] C. Galdeano *et al.*, “Structure-guided design and optimization of small molecules targeting the protein-protein interaction between the von hippel-lindau (VHL) E3 ubiquitin ligase and the hypoxia inducible factor (HIF) alpha subunit with in vitro nanomolar affinities,” *J. Med. Chem.*, vol. 57, no. 20, pp. 8657–8663, Oct. 2014.
- [35] S. A. Wells *et al.*, “Vandetanib in patients with locally advanced or metastatic medullary thyroid cancer: A randomized, double-blind phase III trial,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 30, no. 2, pp. 134–141, Jan. 2012.
- [36] K. Raina *et al.*, “PROTAC-induced BET protein degradation as a therapy for castration-resistant prostate cancer,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 113, no. 26, pp. 7124–7129, Jun. 2016.
- [37] M. Zengerle, K. H. Chan, and A. Ciulli, “Selective Small Molecule Induced Degradation of the BET Bromodomain Protein BRD4,” *ACS Chem. Biol.*, vol. 10, no. 8, pp. 1770–1777, Aug. 2015.
- [38] G. E. Winter *et al.*, “Phthalimide conjugation as a strategy for in vivo target protein degradation,” *Science (80-. )*, vol. 348, no. 6241, pp. 1376–1381, Jun. 2015.
- [39] J. Lu *et al.*, “Hijacking the E3 Ubiquitin Ligase Cereblon to Efficiently Target BRD4,” *Chem. Biol.*, vol. 22, no. 6, pp. 755–763, Jun. 2015.
- [40] F. Jiang *et al.*, “Discovery of novel small molecule induced selective degradation of the bromodomain and extra-terminal (BET) bromodomain protein BRD4 and BRD2 with cellular potencies,” *Bioorganic Med. Chem.*, vol. 28, no. 1, Jan. 2020.
- [41] X. Sun *et al.*, “A chemical approach for global protein knockdown from mice to non-human primates,” *Cell Discov.*, vol. 5, no. 1, Dec. 2019.
- [42] D. K. Mohammad, B. F. Nore, and C. E. Smith, “Terminating B cell receptor signaling,” *Oncotarget*, vol. 8, no. 66. Impact Journals LLC, pp. 109857–109858, 2017.
- [43] Y. Sun *et al.*, “PROTAC-induced BTK degradation as a novel therapy for mutated BTK C481S induced ibrutinib-resistant B-cell malignancies,” *Cell Research*, vol. 28, no. 7. Nature Publishing Group, pp. 779–781, 01-Jul-2018.
- [44] S. Wang, Y. Zhao, A. Aguilar, D. Bernard, and C. Y. Yang, “Targeting the MDM2-p53 protein-protein interaction for new cancer therapy: Progress and challenges,” *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, vol. 7, no. 5. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 01-May-2017.

- [45] A. R. Schneekloth, M. Pucheault, H. S. Tae, and C. M. Crews, "Targeted intracellular protein degradation induced by a small molecule: En route to chemical proteomics," *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, vol. 18, no. 22, pp. 5904–5908, Nov. 2008.
- [46] R. Rathore, J. E. McCallum, E. Varghese, A. M. Florea, and D. Büsselberg, "Overcoming chemotherapy drug resistance by targeting inhibitors of apoptosis proteins (IAPs)," *Apoptosis*, vol. 22, no. 7. Springer New York LLC, pp. 898–919, 01-Jul-2017.
- [47] Y. Itoh, M. Ishikawa, M. Naito, and Y. Hashimoto, "Protein knockdown using methyl bestatin-ligand hybrid molecules: Design and synthesis of inducers of ubiquitination-mediated degradation of cellular retinoic acid-binding proteins," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 132, no. 16, pp. 5820–5826, Apr. 2010.
- [48] M. Xi *et al.*, "Small molecule PROTACs in targeted therapy: An emerging strategy to induce protein degradation," *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 174. Elsevier Masson SAS, pp. 159–180, 15-Jul-2019.
- [49] X. Huang and V. M. Dixit, "Drugging the undruggables: Exploring the ubiquitin system for drug development," *Cell Research*, vol. 26, no. 4. Nature Publishing Group, pp. 484–498, 01-Apr-2016.
- [50] S. L. Paiva and C. M. Crews, "Targeted protein degradation: elements of PROTAC design," *Current Opinion in Chemical Biology*, vol. 50. Elsevier Ltd, pp. 111–119, 01-Jun-2019.
- [51] A. C. Lai and C. M. Crews, "Induced protein degradation: an emerging drug discovery paradigm.," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 16, no. 2, pp. 101–114, 2017.
- [52] J. L. Gustafson *et al.*, "Small-Molecule-Mediated Degradation of the Androgen Receptor through Hydrophobic Tagging," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 54, no. 33, pp. 9659–9662, Aug. 2015.
- [53] T. K. Neklesa and C. M. Crews, "Chemical biology: Greasy tags for protein removal," *Nature*, vol. 487, no. 7407. Nature Publishing Group, pp. 308–309, 19-Jul-2012.
- [54] M. J. C. Long, D. R. Gollapalli, and L. Hedstrom, "Inhibitor mediated protein degradation," *Chem. Biol.*, vol. 19, no. 5, pp. 629–637, May 2012.