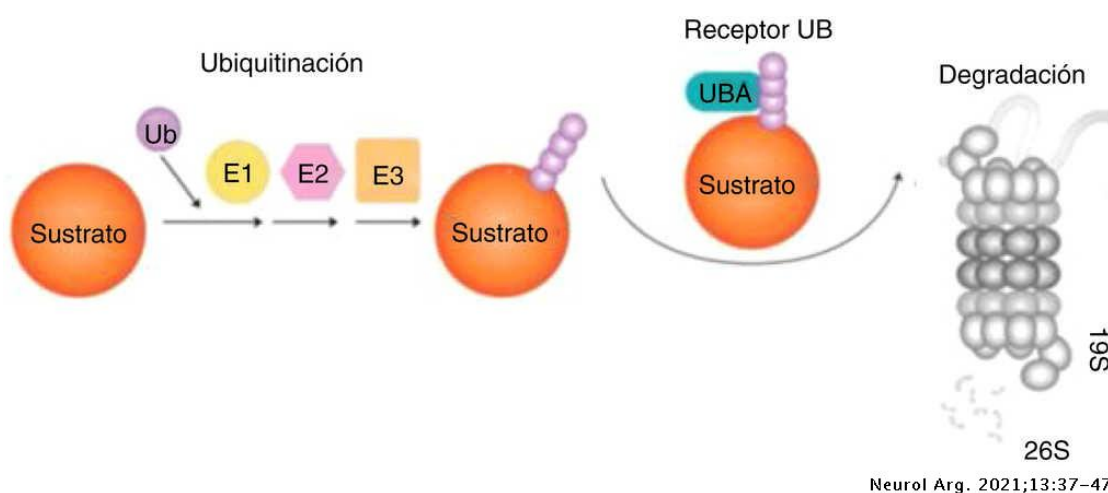


## **Degradación dirigida de proteínas: tipos, diseño, síntesis y aplicaciones**



### **TRABAJO DE FIN DE GRADO**

*Noelia María Rodríguez Ramos*

*Tutorizado por el Dr. José M. Padrón y Adrián Puerta*

*Grado en Farmacia*

*Julio 2022*

La presente memoria de revisión bibliográfica ha sido realizada por Noelia María Rodríguez Ramos durante el curso académico 2021-2022 y bajo la dirección del Dr. José M. Padrón y de Adrián Puerta.

*La Laguna, a 23 de junio de 2022*

## ÍNDICE:

---

Abreviaturas.....	4-5
Resumen .....	6
Abstract .....	7
Introducción .....	8-11
Objetivos .....	12
Materiales y métodos .....	12
Resultados y discusión	
PROTACS.....	13-15
LYTACS.....	16-18
AUTACS.....	19
ATTECS.....	20
AbTACS.....	21-23
Nuevas posibilidades para la clínica.....	24
dTAG.....	25-26
Conclusión .....	27
Bibliografía .....	28-30

## Abreviaturas:

AbTAC: PROTAC basado en anticuerpos;  
ADC: conjugado anticuerpo-fármaco;  
ApoE4: apolipoproteína E4;  
ASGPR: receptor de asialoglicoproteína;  
ATTEC: compuestos de orientación del autofagosoma;  
AUTAC: quimera de orientación de la autofagia;  
BCN: ciclopropano ciclooctano;  
bsAbs: Anticuerpos biespecíficos;  
BTK: tirosin quinasa de Bruton  
CI-M6PR: receptor de manosa-6-fosfato independiente de cationes;  
DBCO: dibenzociclooctano;  
dTAG: sistema de degradación;  
EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico;  
Gal: galactosa;  
GalNAc: glicoproteínas con N-acetilgalactosamina;  
IgG: inmunoglobulinas G;  
IMiD: inmunomodulador  
KIHS: Knobs-into-holes (pomos en los agujeros)  
LIMP: proteína de membrana integral lisosomal;  
LTR: receptor dirigido al lisosoma;  
LYTAC: quimera de orientación del Lisosoma;  
mAb: anticuerpo monoclonal  
MR: receptor de manosa;  
M6P: manosa-6-fosfato;  
PD-L1: ligando de muerte programada 1;  
POI: proteína de interés;  
PROTAC: quimera de orientación de la proteólisis;  
RNF43: dedo anular de la ubiquitina E3 transmembrana de la superficie celular;  
TAM: macrófago asociado a tumor;  
TPD: degradación dirigida de proteínas;

tri-GalNAc: glicoproteínas triantennarias con N-acetilgalactosamina;

UPS: sistema ubiquitina proteasoma

VEGFR: receptor del factor de crecimiento endotelial vascular;

ZNRF3: zinc y dedo anular de la ubiquitina E3 transmembrana de la superficie celular

## Resumen:

La manera clásica de desarrollar fármacos se focaliza principalmente en la regulación de la actividad de las proteínas. En cambio, la degradación dirigida de proteínas (TPD) es una modalidad terapéutica emergente con la posibilidad de acercarse a las proteínas causantes de enfermedades que históricamente han sido muy difíciles de atacar con moléculas convencionales pequeñas. El proceso se respalda en la ubiquitinación de las proteínas diana, provocando su degradación por el proteasoma. El desarrollo y la aplicación, particularmente de los inhibidores de la actividad de las proteínas, ha sido la corriente fundamental en el desarrollo de fármacos. Desde hace unos años, la tecnología *Proteolysis Targeting Chimeras* (PROTAC), quimeras dirigidas a la proteólisis, ha generado uno de los enfoques más prometedores para eliminar proteínas específicas asociadas a enfermedades, aprovechando la propia maquinaria de destrucción de las células. Más allá de los PROTAC, están emergiendo muchas estrategias distintas de degradación dirigida de proteínas, entre otras, LYTAC, que son quimeras dirigidas al lisosoma y AbTAC basada en anticuerpos. Estas tecnologías han expandido el alcance de la degradación dirigida de proteínas y también han aportado nuevos conocimientos sobre el descubrimiento de fármacos.

## Abstract:

Classical drug discovery focuses primarily on the regulation of protein activity. In contrast, targeted protein degradation (TPD) is an emerging therapeutic modality with the potential to approach disease-causing proteins that have historically been very difficult to target with conventional small molecules. The process relies on ubiquitination of target proteins, leading to their degradation by the proteasome. The development and application, particularly of protein activity inhibitors, has been the main stream in drug development. In recent years, Proteolysis Targeting Chimeras (PROTACs), or proteolysis-targeting chimeras, have generated one of the most promising approaches to eliminate specific disease-associated proteins by harnessing the cells' own destruction machinery. Beyond PROTACs, many different targeted protein degradation (TPD) strategies are emerging, including LYTACs, which are lysosome-targeted chimeras, and antibody-based AbTACs. These technologies have expanded the scope of targeted protein degradation and have also provided new insights into drug discovery.

## 1. Introducción

La degradación dirigida de proteínas tiene como propósito disminuir la cantidad de proteínas relevantes para la enfermedad [1]. Se trata de una estrategia emergente que emplea pequeñas moléculas para catalizar la ubiquitinación de las proteínas diana, provocando su degradación por el proteasoma [2].

Las proteínas se sintetizan en los ribosomas asociados con el Retículo Endoplásmico y se degradan en los lisosomas por vía endocítica, reflejado en la Figura 1, donde también se observa que las proteínas intracelulares se sintetizan en los ribosomas del citoplasma y siguen la degradación mediada por ubiquitina en los proteasomas [3].

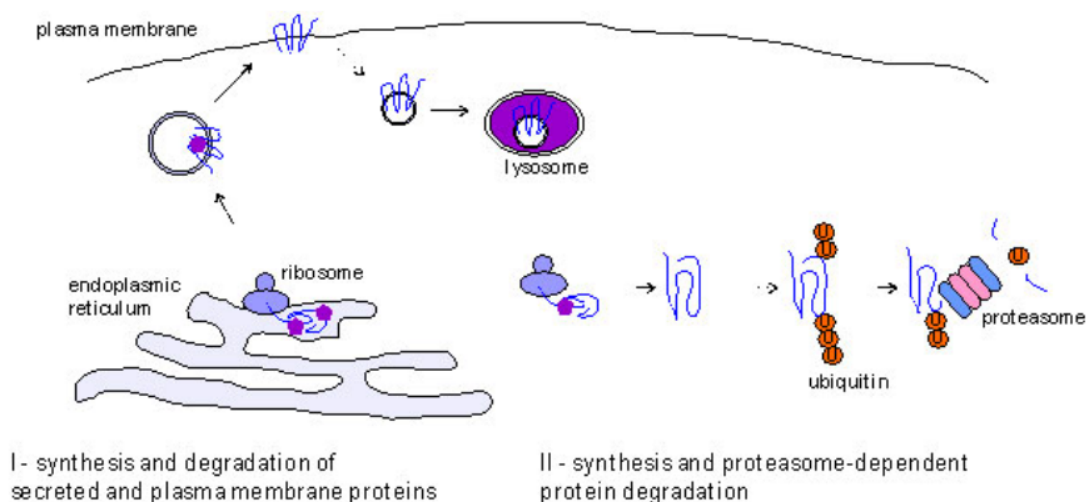


Figura 1.- La vida de una proteína. Extraída de: [3]

La conjugación de proteínas con ubiquitina es la base de una degradación dependiente del proteasoma mediado por ubiquitina, un mecanismo altamente regulado que involucra tres tipos de enzimas [4].

- Enzima activadora de ubiquitina: E1 → crea la forma tiol-éster activa de ubiquitina.
- Enzima conjugadora de ubiquitina: E2 → se une a la ubiquitina activada
- Ligasa E3 → recluta la proteína celular destinada a la degradación y media la transferencia de ubiquitina a un residuo de lisina de la proteína diana, representado en la Figura 2.



Este proceso es reiterado, lo que lleva a la extensión de la cadena de ubiquitina porque poseen un grupo lisina. Las proteínas poliubiquitinadas son reconocidas posteriormente por el proteasoma 26S, compuesto por el núcleo 20S y las proteínas reguladoras 19S que están presentes en uno o ambos extremos. Las partículas 19S distinguen las proteínas poliubiquitinadas como sustratos y el núcleo 20S efectúa la degradación de las proteínas [4].

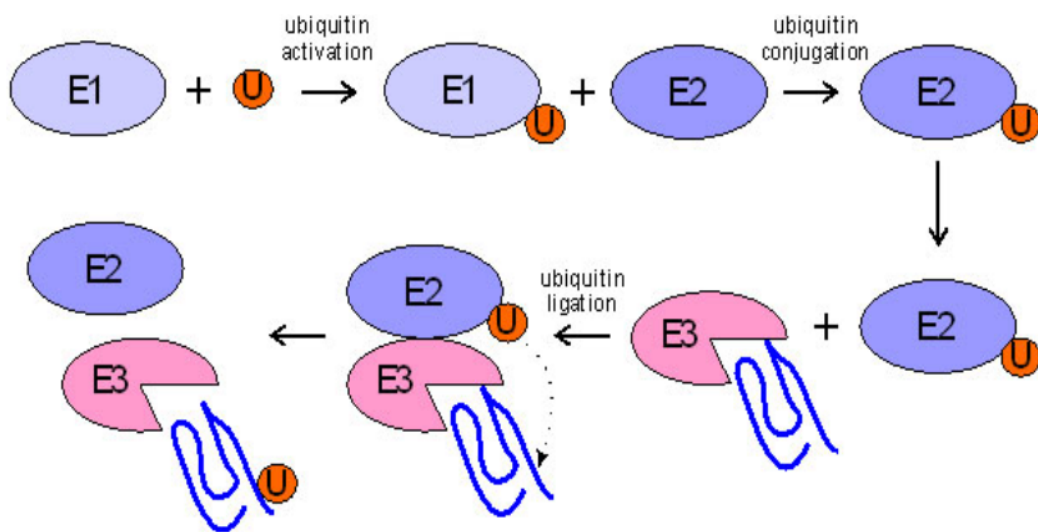


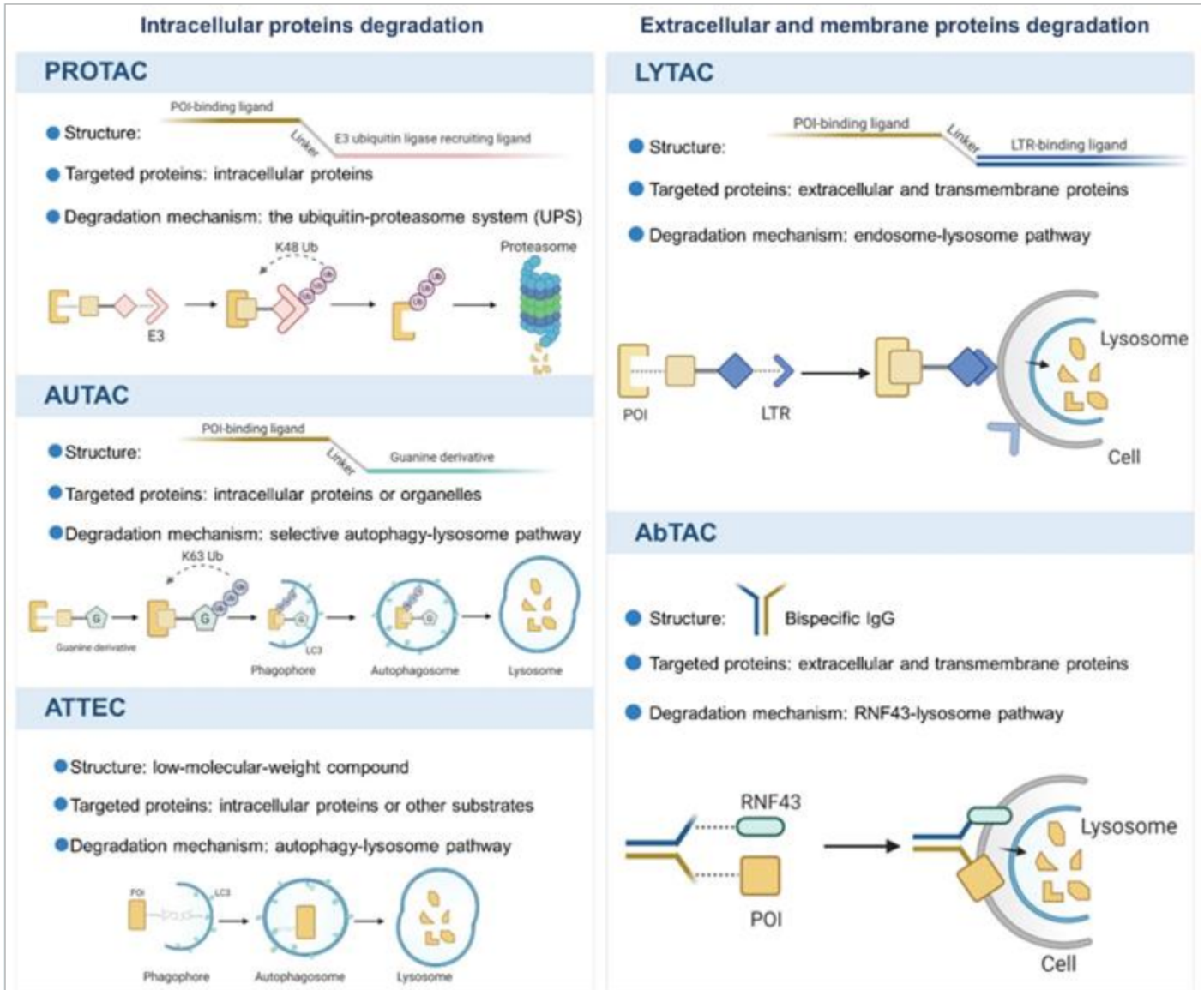
Figura 2.- Ubiquitinación de proteínas. Extraída de: [3]

Los inhibidores clásicos de moléculas pequeñas que se dirigen a las proteínas patógenas suelen depender de los sitios de unión accesibles para lograr una ocupación prolongada e influir en las funciones de las proteínas. Las estrategias emergentes de TPD están revolucionando la modalidad convencional de descubrimiento de fármacos para dirigirse a proteínas de interés (POI) que antes se catalogaban como no quimiomodulables, pero estas estrategias están limitadas dentro de las POI intracelulares [4].

Las nuevas tecnologías de degradación han progresado con éxito para incrementar el alcance a las proteínas extracelulares y de membrana, satisfaciendo necesidades médicas no cubiertas, siendo estas nuevas estrategias:

- Quimeras dirigidas a la proteólisis (PROTACs)
- Quimeras dirigidas a los lisosomas (LYTACs)
- Quimeras dirigidas a la autofagia (AUTACs)
- Compuestos de fijación a los autofagosomas (ATTECs)
- PROTACs basados en anticuerpos (AbATCs)
- dTAG: sistema de degradación

En la Figura 3 se muestran las nuevas tecnologías de TPD. LYTAC y AbTAC utilizan el sistema de lisosomas para degradar las proteínas extracelulares y de membrana. Las proteínas intracelulares de interés se dirigen y se degradan mediante PROTAC a través del sistema ubiquitina proteasoma (UPS). Las tecnologías AUTAC y ATTEC aprovechan el sistema autofagia-lisosoma para degradar selectivamente las proteínas intracelulares e incluso los orgánulos [4].



*Figura 3.- Una visión general de las nuevas tecnologías de degradación de proteínas. Extraído de: [4]*

## **2. Objetivos**

El objetivo principal de este estudio es la revisión bibliográfica de las diferentes tecnologías de degradación dirigida de proteínas reportadas en la literatura científica en los cinco años anteriores.

## **3. Materiales y métodos**

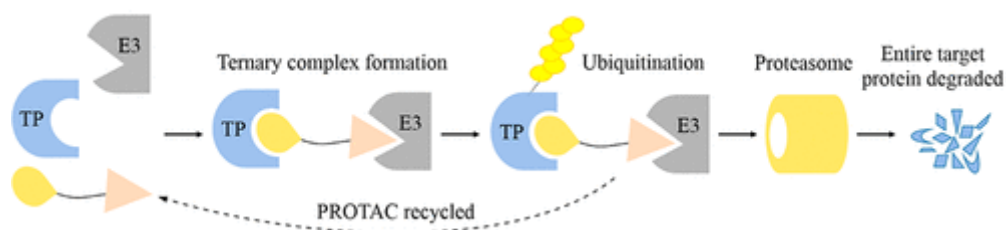
Para la realización de esta revisión bibliográfica, hemos buscado información en páginas web científicas como National Center for Biotechnology Information (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>), la biblioteca nacional de medicina (<https://medlineplus.gov/spanish/>) y en diferentes artículos, publicaciones y libros buscados a través de google académico, con el filtro de búsqueda entre los años [2017-2022].

Para una búsqueda más exacta hemos buscado palabras clave como: degradación de proteínas, ubiquitina, proteasoma, biotecnología, descubrimiento de fármacos.

## 4. Resultados

### 4.1 PROTAC: Quimeras dirigidas a la proteólisis

La quimera dirigida a la proteólisis se trata de una molécula heterobifuncional que contiene un ligando dirigido a la proteína de interés (POI), un ligando que se une covalentemente a una ubiquitina ligasa E3 y un enlazador para conjugar estos dos ligandos [5]. Cuando se efectúa la ubiquitinación de la proteína, se somete a degradación mediada por el proteasoma plasmado en la Figura 4 [6]. La primera generación de PROTAC empleó péptidos derivados de ligandos naturales de ligasas E3 para su reclutamiento, que proporcionaban la actividad deseada pero no eran permeables a las células, o exigían concentraciones micromolares para una degradación competente del objetivo. Un cambio hacia el uso de ligandos de ligasa E3 de molécula pequeña modificados redujo su peso molecular, mejoró la permeabilidad y la potencia de las células.



*Figura 4.- Resumen de los pasos de la degradación completa de la proteína objetivo por parte de los PROTAC. TP: proteína objetivo. Extraído de: [6]*

Ofrecen ventajas sobre los inhibidores tradicionales respecto a potencia, selectividad y resistencia a los fármacos. En las últimas décadas se han desarrollado muchos PROTAC prometedores, especialmente los de moléculas pequeñas [7].

Los PROTAC han proporcionado oportunidades excepcionales a la industria y al mundo académico, que se evidencian en:

- Superar la resistencia a los fármacos del cáncer.
- Eliminar tanto las funciones enzimáticas como las no enzimáticas de la cinasa.
- Degradar la diana proteica “imposible de tratar”.
- Estrategia de knockdown (técnica donde un organismo es genéticamente modificado para tener una expresión reducida de uno o más de sus genes) químico rápido y reversible in vivo [8].

#### **4.1.1. Limitaciones de los PROTAC**

Los PROTAC tienen limitaciones para dirigirse a proteínas no quimiomodulables con grandes superficies, así como a las proteínas extracelulares. Las moléculas pequeñas y los péptidos son las principales cabezas de orientación utilizadas en el diseño de PROTAC.

Estos ligandos tienen sus respectivas limitaciones:

- Las moléculas pequeñas dependen de los bolsillos de unión de la POI
- La aplicación del ligando peptídico está limitada por la escasa inclusión en la membrana celular y la estabilidad in vivo.

Además, los PROTAC se han enfrentado a retos como la ampliación de las ligasas E3 humanas, la disminución de la toxicidad fuera del objetivo y la resolución de la longitud óptima de los enlaces, que han entorpecido su desarrollo [4].

#### **4.1.2. Ejemplos de PROTAC**

Los inhibidores de la quinasa se han desarrollado energicamente en los últimos 20 años en la terapia contra el cáncer y han conseguido excelentes efectos clínicos, mejorando la calidad de vida y aumentando la supervivencia de los pacientes con cáncer. Aunque son muy eficaces, los pacientes suelen desarrollar resistencia, lo que provoca la recaída de la enfermedad. Por ello, la resistencia a los fármacos es un problema notable que afronta la investigación del cáncer.

PROTAC puede vencer la resistencia de los tumores a los fármacos causada por las mutaciones de BTK. Por ejemplo, el inhibidor covalente de la tirosina quinasa de

Bruton (BTK), Ibrutinib, se utiliza como fármaco de tratamiento para el linfoma que inducirá la mutación C481S de BTK y superará la resistencia al fármaco [6].

Los dos tipos más comunes de terapias son las moléculas pequeñas y los anticuerpos monoclonales (mAb).

- Las moléculas pequeñas son bastante versátiles y pueden actuar tanto en dianas extracelulares como intracelulares. Penetran mejor en los tejidos debido a su bajo peso molecular, con una vida media y una farmacodinamia más corta.

- Los mAb se dirigen predominantemente a proteínas extracelulares. Proporcionan una alta especificidad y baja toxicidad.

Ambos median la unión a una molécula diana para prevenir su actividad, inhibir la unión con otros socios o activar una determinada vía [3].

## **4.2 LYTAC: Quimeras dirigidas a los lisosomas**

Es una estrategia novedosa que se dirige a proteínas extracelulares y/o de membrana para inducir su degradación aprovechando la vía del endosoma/lisosoma. Se trata de un conjugado bifuncional que se une simultáneamente al dominio extracelular de una diana y a un receptor dirigido al lisosoma (LTR) de la superficie celular para formar un complejo ternario, que conduce a la internalización de la proteína a través de la endocitosis mediada por clatrina. Los LYTAC son capaces de inducir la degradación de la proteína diana con un alto grado de selectividad hacia las POI y los tejidos [4].

### **4.2.1. Ligandos de unión a LTR**

- PolyM6Pn: el receptor de manosa-6-fosfato independiente de cationes (CI-M6PR), uno de los miembros de la familia de LTR de la superficie celular, puede encerrar hidrolasas u otras cargas en los endosomas, y posteriormente entregar esas proteínas a los lisosomas para su eliminación. Con el fin de aumentar la afinidad, estabilidad y evitar la citotoxicidad, se diseñaron y probaron múltiples análogos de M6P y se obtuvo un ligando apropiado, el glucopolipéptido M6Pn.

- Tri-GalNac: el receptor de asialoglicoproteína (ASGPR) es un LTR altamente expresado en los hepatocitos. Debido a su especificidad del ligando y a la capacidad de aguantar múltiples rondas de captación, el ASGPR tiene un gran potencial para la degradación específica de proteínas en las células hepáticas. Las glicoproteínas que llevan ligandos de N-acetilgalactosamina (GalNac) o galactosa (Gal) pueden ser reconocidas por el ASGPR e internalizadas a través de la endocitosis mediada por la clatrina. Los GalNac ya se han aplicado como agentes terapéuticos de ácidos nucleicos en entornos preclínicos o clínicos. Tri-GalNac se une con mayor afinidad a ASGPR que GalNac [4].

En la tabla 1 se muestran las ventajas y desventajas de los dos tipos de ligandos a LTR.



Tabla 1.- Ventajas y desventajas de PolyM6Pn y Tri-GalNac

	<u>Ventajas</u>	<u>Desventajas</u>
<b>PolyM6Pn</b>	Alta afinidad Sobreexposición en células cancerosas específicas	Inhomogeneidad compleja de la estructura proceso de síntesis complicado
<b>Tri-GalNac</b>	Estructura homogénea Degradación específica del tipo de célula	Limitación en las células del hígado

Tabla 1 Adaptada de: [4]

#### **4.2.2. Ligandos de unión a la Proteína de interés:**

La capacidad de degradación de LYTAC depende de la afinidad entre la proteína diana y su ligando. Para dirigirse a las proteínas significativas de la enfermedad hay tres opciones de ligandos de la POI: anticuerpos, pequeñas moléculas y péptidos. Los anticuerpos de alto peso molecular a veces tienen menor permeabilidad tisular que las moléculas pequeñas y además, necesitan ser miniaturizados. Con el desarrollo de la biología de estructuras y el cribado virtual, se escogen cabezas moleculares pequeñas que poseen alta afinidad. Teniendo en cuenta su inhabilidad para dirigirse a las proteínas no quimiomodulables con gran superficie, los investigadores han dirigido su atención hacia los péptidos de unión específica, que tienen las ventajas de menor coste de producción y facilidad de síntesis química. Los péptidos poseen un mayor potencial de modificación estructural por mutación puntual o truncamiento que las moléculas pequeñas. En general, basándose en la estructura cristalina del complejo endógeno de la POI y la proteína de unión, se pueden analizar los residuos clave que interactúan para diseñar las cabezas peptídicas. Para comprender estos ligandos de la POI, comparamos las ventajas y desventajas entre ellos en la Tabla 2 [4].

*Tabla 2.- Ventajas y desventajas de los ligandos de unión a la proteína de interés*

	<u>Ventajas</u>	<u>Desventajas</u>
<b>Anticuerpos</b>	Afinidad específica con POI	Alto costo Baja estabilidad y permeabilidad de los tejidos Inmunogenicidad potencial
<b>Pequeñas moléculas</b>	Alta estabilidad Buena penetrabilidad	Incapacidad para dirigirse a las proteínas no tratables
<b>Péptidos</b>	Bajo costo Fácil de sintetizar	Baja estabilidad Penetrabilidad limitada

*Tabla 2 Adaptada de: [4]*

El primer LYTAC albergaba una fracción de oligoglicopéptido (polyM6Pn) que funcionaba como ligando para el receptor de manosa-6-fosfato independiente de cationes (CI-M6PR) y que inducía eficazmente la degradación de diferentes clases de proteínas extracelulares y transmembrana. El receptor CI-M6PR es esencial para la internalización y eliminación de la diana mediada por LYTAC, por lo que las variaciones del tipo de célula en los niveles de expresión de este receptor ubicuo afectan directamente a las eficiencias de degradación. Lo más importante es que el uso de un receptor CI-M6PR expresado de forma ubicua no permite el control espacial ni temporal de la degradación de la diana, una limitación importante si se administra de forma sistémica [9].

Un nuevo tipo de LYTAC utiliza el receptor de asialoglicoproteína (ASGPR), un receptor lisosomal específico del hígado, para dirigir la degradación de los complejos conjugados con N-acetilgalactosamina (GalNac). En una serie de experimentos se probó que el tratamiento con un anticuerpo bloqueador contra el EGFR unido a GalNac (Ctx-GalNac) conducía a una marcada reducción de los niveles de EGFR tanto en líneas celulares como en ratones. En estudios futuros se abordarán otras cuestiones relativas al potencial de los LYTAC para inducir múltiples rondas de degradación de la diana, de forma similar a los PROTAC, así como las propiedades metabólicas y farmacocinéticas de los LYTAC en condiciones normales y de enfermedad [9].

### **4.3 AUTACs: Quimeras dirigidas a la autofagia**

Recientemente se han desarrollado los primeros degradadores mediados por la autofagia, denominados AUTAC, a partir de las observaciones realizadas en un estudio de xenofagia [10].

Una molécula AUTAC consiste en un pequeño aglutinante molecular de la proteína objetivo y un derivado de guanina como etiqueta de degradación para desencadenar la poliubiquitinación K63. Las proteínas de interés ubiquitinadas son reconocidas por receptores de autofagia y se unen a los fagoforos a través de la región que interactúa con LC3. A pesar de las ventajas únicas de AUTAC por su ámbito de degradación específico y amplio, los mecanismos subyacentes de la autofagia selectiva y sus efectos sobre el conjunto de las proteínas celulares siguen dudosos y necesitan más investigación [4].

La eliminación autofágica de los estreptococos del grupo A (GAS) es una autofagia selectiva mediada por ubiquitina, aunque no se ha identificado la ubiquitina ligasa implicada, se ha descubierto que la guanilación de la superficie bacteriana por un nucleótido endógeno (8-nitro-cGMP) promueve la ubiquitinación del GAS. Esto condujo a investigar la posibilidad de reclutar la maquinaria de autofagia utilizando derivados de guanina como etiqueta. Un AUTAC típico está formado por una pequeña unidad que se une a un sustrato y un derivado de guanina (etiqueta de degradación) conectado por un enlazador flexible [11].

#### **4.4 ATTECs: Compuestos de fijación a los autofagosomas**

Los compuestos dirigidos a los autofagosomas (ATTEC) dirigen las proteínas patógenas a la degradación autofágica. Dado que la macroautofagia es capaz de degradar un amplio espectro de sustratos, incluyendo biomoléculas no proteicas, los ATTEC también deberían ser capaces de dirigir esas biomoléculas no proteicas para su degradación autofágica. En un estudio reciente, se ha demostrado esta posibilidad empleando gotas de lípidos (LD) como objetivo ejemplar. Las LDs son estructuras intracelulares que almacenan lípidos neutros, que pueden ser degradados por la autofagia. Basándonos en el concepto de ATTEC, los compuestos que se unen tanto a las LD como a la proteína clave del fagoforo y del autofagosoma, LC3, pueden dirigir las LD a la degradación autofágica. Se diseñó y sintetizó tales compuestos conectando las moléculas identificadas de unión a LC3 con sondas conocidas de unión a LD mediante un enlazador químico. En concentraciones micromolares, estos compuestos disminuyeron drásticamente las LDs a través de la autofagia mediante el mecanismo previsto, y rescataron los fenotipos relacionados con las LDs en células y en dos modelos de ratón independientes con lipidosis hepática. El estudio de prueba de concepto demuestra la posibilidad de aprovechar la autofagia para degradar biomoléculas no proteicas mediante ATTEC [12].

Al igual que el AUTAC, basado en el sistema autofagia-lisosoma, el ATTEC es un compuesto enlazador que ata la POI al autofagosoma interactuando con las proteínas y LC3. Debido a las ventajas de su pequeño tamaño, ATTEC manipula los niveles de proteína de forma más efectiva [4].

#### **4.5 AbTAC: PROTACs basados en anticuerpos**

Otra perspectiva es el AbTACs, donde se utiliza un anticuerpo específico para ampliar el alcance de la degradación dirigida a través de ligasas E3 transmembrana.

Los AbTAC explotan el potencial del nuevo anticuerpo biespecífico para la degradación de proteínas. Aunque se han realizado progresos sustanciales en el desarrollo de TPD, los enfoques de degradación emergentes exigen elevados requisitos técnicos y cada uno de ellos se enfrenta a sus propios desafíos en su camino hacia la clínica.

Los AbTAC representan un nuevo arquetipo de LYTAC con capacidad para degradar proteínas de la superficie celular. A pesar de su gran promesa en la degradación de proteínas, no está claro cómo los AbTAC reclutan ligasas E3 unidas a la membrana para inducir la degradación de las POI de la superficie celular a través de la vía del lisosoma. Sólo cuando se dilucide el proceso de regulación detallado, podremos aprovechar mejor esta vía de degradación [7].

Los anticuerpos biespecíficos (bsAbs) se refieren a una gran familia de moléculas que reconocen dos epítopos o antígenos diferentes. El AbTAC es una inmunoglobulina G (IgG) biespecífica totalmente recombinante que puede reclutar simultáneamente a las ligasas E3 transmembrana ring finger 43 (RNF43) y a las proteínas de la superficie celular, induciendo la internalización de los complejos proteicos RNF43-AbTAC y la posterior degradación lisosomal de la POI. Sin embargo, su mecanismo de acción sigue siendo principalmente esquivo. En particular, se desconoce si RNF43 ubiquitina las regiones intracelulares de POI para inducir la endocitosis. Mientras tanto, es necesario aclarar qué proteínas son necesarias para el sistema AbTAC y si la forma de degradación dependiente de RNF43 conduce a otros cambios en las funciones celulares. Aunque no hay una gran perturbación celular en la proteómica de células enteras, la seguridad celular de AbTAC requiere más pruebas. Además, cuando se selecciona el AbTAC para

obtener una eficiencia de degradación óptima, también debemos tener en cuenta la especificidad celular de RNF43 y la cinética de endocitosis.

Para entender las técnicas planteadas y elegir la apropiada, comparamos las ventajas y desventajas de las estrategias de degradación de proteínas intracelulares y extracelulares, como se muestra en la Tabla 3 [4].

Tabla 3.- Ventajas y desventajas de las cinco tecnología de degradación dirigida de proteínas

Proteína de interés	Tecnología	Ventajas	Desventajas
Proteínas intracelulares	<b>PROTAC</b>	Mecanismos de acción claros Acción dirigida por eventos Actividad de degradación catalítica	Limitación al dominio citosólico de las proteínas De manera dependiente del proteasoma Es necesario resolver la escasa penetración celular
Proteínas intracelulares	<b>AUTAC</b>	Dirigirse a los orgánulos y a las proteínas intracelulares Autofagia selectiva	Hay que seguir investigando los mecanismos de degradación
Proteínas intracelulares	<b>ATTEC</b>	Bajo peso molecular Degradación selectiva Propiedad similar a la de un fármaco	Difícil de diseñar
Proteínas extracelulares	<b>LYTAC</b>	Dirigirse las proteínas extracelulares y unidas a la membrana Alta selectividad en POI y tipos de células	Escasa permeabilidad tisular Síntesis compleja de ligandos LTR M6Pn Posible respuesta inmune in vivo Falta de estudios
Proteínas extracelulares	<b>AbTAC</b>	Dirigirse a las proteínas de la membrana Alta bioespecificidad	Alto coste Inmunogenicidad potencial Mecanismo de endocitosis poco claro

Tabla 3 Adaptada de: [4]

## 5. Nuevas posibilidades para la clínica

La resistencia a los fármacos y la recaída son dos obstáculos importantes en el tratamiento del cáncer, que pueden evitarse mediante una politerapia racional dirigida a distintos mecanismos patogénicos. Basándonos en este hecho, se plantea la hipótesis de que los LYTACs de "molécula estrella" de múltiples cabezas podrían ser capaces de superar la resistencia con alta eficiencia y baja toxicidad.

Los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) son anticuerpos monoclonales conjugados con agentes citotóxicos mediante enlazadores que responden al entorno, lo que permite que los fármacos tradicionales tengan una alta especificidad y potencia tumoral. Desde entonces, cinco ADCs han logrado la aprobación de la FDA y más de 40 están ahora en ensayos clínicos o a punto de hacerlo. Tras el diseño racional del AbTAC vinculado a un fármaco, el conjugado AbTAC-fármaco (ATDC) es capaz de degradar la proteína de membrana para bloquear la señal ascendente, y además ser internalizado rápidamente para entregar el fármaco vinculado intracelularmente.

Se requiere que el enlazador sea estable en la circulación sanguínea pero que sea fácilmente escindible en el lugar de destino. Los futuros estudios sobre el MdA del AbTAC posiblemente ayudarán a desarrollar aún más el AbTAC como una tecnología madura y a descubrir un agente multiobjetivo eficaz [4].



## **5.1 dTAG: sistema de degradación**

Los métodos de TPD sirven para evaluar la función de una proteína en una variedad de sistemas modelo; se han aplicado a modelos de cultivo de células de mamíferos, lo que permite un control temporal sin precedentes de la función de las proteínas. La eficacia de estos sistemas a nivel de tejidos y organismos in vivo no está bien establecida. Se prueba la funcionalidad del sistema de degradación (dTAG) en el desarrollo de los mamíferos, generando un ratón knock-in homocigoto con una etiqueta FKBP12F36V fusionada al locus del factor de elongación negativo b (Nelfb), un regulador de la transcripción expresado de forma ubicua. En la validación de la degradación selectiva de proteínas endógenas a lo largo del desarrollo y la edad adulta de los mamíferos, se demuestra que, independientemente de la vía de administración, el sistema dTAG no es tóxico, es rápido y eficiente en embriones desde el cigoto hasta la mitad de la gestación [13].

Las perturbaciones genéticas están limitadas por los efectos fuera del objetivo, la complejidad de los componentes y la irreversibilidad. La mayor limitación es el tiempo necesario entre la modulación y la medición experimental. Para permitir el control inmediato y selectivo de la abundancia de una sola proteína, se ha creado un sistema de biología química que aprovecha la potencia de los degradadores heterobifuncionales permeables a las células. Esta plataforma tecnológica conferirá resolución cinética a la investigación biológica y proporcionará la validación de objetivos en el contexto del descubrimiento de fármacos [14].

El sistema de degradación dTAG se basa en la reciente descripción de una solución totalmente química para la degradación de proteínas específica de un objetivo. Esta investigación demostró la degradación selectiva de los coactivadores transcripcionales de bromodominios BET (BRD2, BRD3 y BRD4) utilizando degradadores heterobifuncionales que unen los bromodominios BET a una ubiquitina ligasa E3 (cereblon, CRBN). La actividad bioquímica de tipo catalítico de estas pequeñas moléculas permite un recambio rápido y específico de la diana sin degradación del ligando. Las sondas químicas establecidas por este enfoque

permitirán el estudio de la biología de la diana; sin embargo, cada una de ellas requiere la identificación previa de un ligando selectivo de la diana. Por lo tanto, se prevé un enfoque único y generalizable para degradar rápidamente quimeras proteicas específicas de los alelos para la investigación biológica y la validación temprana de la diana [14].

## 6. Conclusión

1. La revisión bibliográfica realizada para el periodo 2017-2022 revela que la degradación de proteínas mediada por el proteasoma es un tema de gran relevancia como lo muestra el gran número de trabajos publicados cada año.
2. La degradación dirigida de proteínas ha sido reconocida como una estrategia que cambia el juego al inducir la degradación de las dianas no quimiomodulables.
3. Se observa que los sustratos de los PROTACs se limitan a las proteínas intracelulares a través de la eliminación proteasomal. Los LYTACs y AbTACs han surgido como potenciales terapéuticos al aprovechar el sistema lisosomal para degradar proteínas extracelulares y de membrana relevantes para distintas enfermedades.
4. Existen muchos desafíos en este campo naciente, como los estudios limitados sobre la longitud del enlazador, la optimización de la estructura, el equilibrio del complejo ternario y la farmacocinética.
5. El concepto de estrategia de degradación ofrece posibilidades para degradar el genoma del ARN, estableciendo más herramientas terapéuticas a nivel de degradación genética.

## 7. Bibliografía

[1] Hanzl, A., & Winter, G. E. (2020). Targeted protein degradation: current and future challenges. *Current opinion in chemical biology*, 56, 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.11.012>  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31901786/>

[2] Fisher, S. L., & Phillips, A. J. (2018). Targeted protein degradation and the enzymology of degraders. *Current opinion in chemical biology*, 44, 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.05.004>  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29885948/>

[3] Karolina Szczesna, Proteintech. Uso de la degradación de proteínas para apuntar a los intolerables. Publicado 7 de mayo de 2020.  
<https://www.news-courier.com/proteomics/articles/using-protein-degradation-to-target-the-undruggable-334483>

[4] Lin, J., Jin, J., Shen, Y., Zhang, L., Gong, G., Bian, H., Chen, H., Nagle, D. G., Wu, Y., Zhang, W., & Luan, X. (2021). Emerging protein degradation strategies: expanding the scope to extracellular and membrane proteins. *Theranostics*, 11(17), 8337–8349. <https://doi.org/10.7150/thno.62686>  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8344007/>

[5] Békés, M., Langle, D. R., & Crews, C. M. (2022). PROTAC targeted protein degraders: the past is prologue. *Nature reviews. Drug discovery*, 21(3), 181–200. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00371-6>  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8765495/>

[6] Hongying Gao, Xiuyun Sun & Yu Rao; ACS Med. Chem. Lett 2020, 11, 3, 237-240. Publication Date: March 12, 2020.  
<https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.9b00597>  
<https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acsmchemlett.9b00597#>

[7] Wan, Y., Yan, C., Gao, H., & Liu, T. (2020). Small-molecule PROTACs: novel agents for cancer therapy. *Future medicinal chemistry*, 12 (10), 915-938. <https://doi.org/10.4155/fmc-2019-0340>.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32270707/>

[8] He, M., Lv, W., & Rao, Y. (2021). Opportunities and Challenges of Small Molecule Induced Targeted Protein Degradation. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9, 685106. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.685106>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8261656/>

[9] Eldeeb, M.A., Zorca, C.E. & Goiran, T. Extracellular protein degradation via the lysosome. *Commun Chem* 3, 149 (2020). <https://doi.org/10.1038/s42004-020-00397-8>

<https://www.nature.com/articles/s42004-020-00397-8>

[10] Takahashi, D., & Arimoto, H. (2020). Targeting selective autophagy by AUTAC degraders. *Autophagy*, 16(4), 765–766. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1718362>

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31958028/>

[11] Takahashi, D., & Arimoto, H. (2020). Targeting selective autophagy by AUTAC degraders. *Autophagy*, 16(4), 765–766.

<https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1718362>

[12] Yuhua Fu & Boxun Lu (2021) Targeting lipid droplets for autophagic degradation by ATTEC, *Autophagy*, 17:12, 4486-4488, DOI: 10.1080/15548627.2021.1967616

<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15548627.2021.1967616>

[13] Abuhashem, A., Lee, A. S., Joyner, A. L., & Hadjantonakis, A. K. (2022). Rapid and efficient degradation of endogenous proteins in vivo identifies stage-specific roles of RNA Pol II pausing in mammalian development. *Developmental cell*, 57(8), 1068–1080.e6. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2022.03.013>

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35421370/>

[14] Nabet, B., Roberts, J.M., Buckley, D.L. *et al.* The dTAG system for immediate and target-specific protein degradation. *Nat Chem Biol* 14, 431–441 (2018).

<https://doi.org/10.1038/s41589-018-0021-8>

<https://www.nature.com/articles/s41589-018-0021-8>