Otkriće i razvoj lijekova za ciljanu razgradnju proteina

Pavić, Kristina

Postgraduate specialist thesis / Završni specijalistički

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:017166

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Kristina Pavić

OTKRIĆE I RAZVOJ LIJEKOVA ZA CILJANU RAZGRADNJU PROTEINA

Specijalistički rad

Zagreb, 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Kristina Pavić

OTKRIĆE I RAZVOJ LIJEKOVA ZA CILJANU RAZGRADNJU PROTEINA

Specijalistički rad

Zagreb, 2024.

Poslijediplomski specijalistički studij: Razvoj lijekova

Mentor rada: prof. dr. sc. Zrinka Rajić

Specijalistički rad je obranjen dana 27. rujna 2024. na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu u Zagrebu, pred povjerenstvom u sastavu:

1. prof. dr. sc. Anita Hafner
2. prof. dr. sc. Zrinka Rajić
3. prof. dr. sc. Donatella Verbanac

Rad ima 189 listova.

Predgovor

Ovaj specijalistički rad izrađen je na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Zrinke Rajić.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Zrinki Rajić na savjetima, stručnom vodstvu i strpljenju koje mi je pružila tijekom pisanja specijalističkog rada.

Zahvaljujem se kolegama sa Zavoda za farmaceutsku kemiju na savjetima, podršci i razumijevanju.

Također, veliko hvala mami, tati i Tinu na nesebičnoj podršci tijekom studija i pisanja rada.

SAŽETAK

Cilj istraživanja:

Cilj ovog specijalističkog rada je provesti sustavan pregled saznanja o ciljanoj razgradnji proteina (TPD) kao novom terapijskom modalitetu. U radu su opisani molekularni principi TPD-a, dan je pregled razvoja molekula degradera te kliničkih ispitivanja degradera. Detaljno su obrađeni različiti pristupi ciljanoj razgradnji proteina koji iskorištavaju: UPS (kimere koje usmjeravaju ciljanu proteolizu (PROTAC), molekulska ljepila, selektivni degraderi estrogenih receptora (SERD), selektivni degraderi androgenih receptora (SARD) i dr.) i lizosomski put (kimere koje usmjeravaju lizosomsku proteolizu (LYTAC), PROTAC-i temeljeni na protutijelima (AbTAC), kimere koje usmjeravaju autofagiju (AUTAC, ATTEC i AUTOTAC) i dr.). Opisane su prednosti i mane TPD-a, mehanizam djelovanja degradera formiranjem ternarnog kompleksa, dizajn degradera, te optimiranje farmakokinetičkih (PK) i farmakodinamičkih (PD) svojstava degradera za oralnu primjenu.

Materijali i metode:

Za izradu ovog specijalističkog rada korišteni su originalni znanstveni radovi, stručni i pregledni radovi te ostala znanstvena i stručna literatura na engleskom jeziku koja obuhvaća informacije o tehnologiji TPD. Podaci su dobiveni pretraživanjem bibliografskih baza podataka PubMed i Science Direct te baze podataka kliničkih ispitivanja (clinicaltrials.gov).

Rezultati:

Provedeno istraživanje rezultiralo je sustavnim pregledom trenutnih saznanja o TPD-u. U ovom specijalističkom radu detaljno su opisane različite vrste molekula degradera (PROTAC-i, molekulska ljepila, destabilizacijske domene i destabilizatori – SERD i SARD te oznake za

razgradnju, LYTAC, AbTAC, AUTAC, ATTEC, AUTOTAC, šaperonom posredovana autofagija (CMA) i dr.) te je opisan njihov mehanizam djelovanja, prednosti i mane. Detaljno je opisan razvoj PROTAC-a. Posebno je objašnjeno nastajanje ternarnog kompleksa i pojam kooperativnosti te dizajn, sinteza i evaluacija biološkog djelovanja PROTAC-a. Opisana su farmakokinetička svojstva PROTAC-a te njihova optimizacija. Dan je pregled aktivnih kliničkih ispitivanja i opis PROTAC-a, molekulskih ljepila i SERD-ova.

Zaključak:

Koncept TPD-a inovativna je terapijska strategija koja je posljednjih godina iznimno aktualna u farmaceutskoj industriji i akademskoj zajednici. Trenutno se u kliničkim istraživanjima nalazi više od 30 molekula degradera. Uspješne studije faza I i II kliničkih ispitivanja već su dokazale da se PROTAC-i mogu uspješno optimizirati za primjenu kod ljudi. Pojavom degradera otvorila se mogućnost djelovanja na mete koje su tradicionalnim lijekovima bile nepristupačne, što je posebno obećavajuće za liječenje raka, autoimunih i neurodegenerativnih bolesti. U narednim godinama sigurno ćemo svjedočiti razvoju novih kandidata za klinička ispitivanja, koji bi mogli donijeti značajne napretke u medicini.

SUMMARY

Objectives:

The aim of this research is to systematically review existing literature on targeted protein degradation (TPD) as a new therapeutic modality. The paper explains the molecular principles of TPD, discusses the development of degraders, and provides an overview of degraders in clinical trials. It explores various approaches to targeted protein degradation, including those that utilize the ubiquitin-proteasome system (proteolysis targeting chimeras (PROTACs), molecular glues, selective estrogen receptor degraders (SERDs), selective androgen receptor degraders (SARDs)) and the lysosomal pathway (lysosome targeting chimeras (LYTACs), antibody-based PROTACs (AbTACs), autophagy-targeting chimeras (AUTAC, ATTEC, and AUTOTAC, etc.). The thesis covers the advantages and disadvantages of TPD, the mechanism of action of degraders through ternary complex formation, degrader design, and optimization of pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of orally available degraders.

Materials and methods:

The thesis was written using original scientific and review articles, professional papers, and other scientific and professional literature in English containing information on TPD technology. The data was gathered by searching bibliographic databases such as PubMed and ScienceDirect, as well as the clinical trials database (clinicaltrials.gov).

Results:

The conducted research resulted in a systematic review of current knowledge about TPD. This thesis discusses different types of degrader molecules (PROTACs, molecular glues, destabilizing domains, and destabilizers – SERD and SARD, as well as degradation tags, LYTACs, AbTACs,

AUTACs, ATTECs, AUTOTACs, chaperone-mediated autophagy (CMA). Each type is described in detail, including their mechanisms of action, advantages, and disadvantages. The text provides a detailed explanation of the development of PROTACs, including ternary complex formation and cooperativity, design, synthesis, and biological evaluation. It also discusses the pharmacokinetic properties of PROTACs and their optimization. It provides lists and descriptions of PROTACs, molecular glues, and SERDs in active clinical trials.

Conclusion:

TPD is an innovative therapeutic strategy that has gained significant attention in the pharmaceutical industry and the academia in recent years. Currently, over 30 degraders are undergoing clinical trials. Successful Phase I and II trials have already demonstrated that PROTACs can be effectively optimized for human use. The emergence of degraders has opened up the possibility of targeting previously undruggable proteins, which holds great promise for the treatment of cancer, autoimmune and neurodegenerative diseases. It is anticipated that new clinical candidate degraders will emerge in the upcoming years, potentially leading to significant advancements in medicine.

SADRŽAJ

1. Uvod i pregled područja istraživanja 1

1.1. Razgradnja proteina u eukariotskim stanicama 3

1.1.1. Ubikvitin-proteasomski sustav (UPS) 3

1.1.1.1. Ubikvitin ligaze (E3) 7

1.1.2. Lizosomska proteoliza i autofagija 15

2. Cilj istraživanja 18

3. Materijali i metode – sustavni pregled saznanja o temi 19

3.1. Ciljana razgradnja proteina (TPD) u eukariotskim stanicama 19

3.1.1. Pregled povijesnog razvoja TPD-a i degradera 21

3.1.2. Ciljana proteasomska razgradnja proteina 26

3.1.2.1. PROTAC 27

3.1.2.1.1. Mehanizam djelovanja 27

3.1.2.1.2. Nastajanje ternarnog kompleksa i kooperativnost 29

3.1.2.1.3. Razvoj PROTAC-a 32

3.1.2.1.4. Dizajn PROTAC-a 42

3.1.2.1.5. Sinteza PROTAC-a 57

3.1.2.1.6. Biološka evaluacija PROTAC-a 60

3.1.2.1.7. Farmakokinetička svojstva PROTAC-a 64

3.1.2.1.8. PROTAC-i u kliničkim ispitivanjima 74

3.1.2.2. Molekulska ljepila degraderi 95

3.1.2.2.1. Slučajna otkrića molekulskih ljepila 99

3.1.2.2.2. Racionalni razvoj molekulskih ljepila 102

3.1.2.2.3. Molekulska ljepila u kliničkim ispitivanjima 105

3.1.2.3. Destabilizatori 110

3.1.2.3.1. Destabilizacijske domene 111

3.1.2.3.2. Označavanje molekula 113

3.1.2.3.3. SERD 116

3.1.2.3.4. SARD 122

3.1.3. Ciljana lizosomska razgradnja proteina 123

3.1.3.1. TPD strategije koje se temelje na endosomsko-lizosomskom putu 123

3.1.3.1.1. LYTAC 123

3.1.3.1.2. AbTAC 125

3.1.3.1.3. GlueTAC 125

3.1.3.1.4. Bispecifične aptamerne kimere 126

3.1.3.2. TPD strategije koje se temelje na autofagiji i lizosomskoj razgradnji 127

3.1.3.2.1. AUTAC 127

3.1.3.2.2. ATTEC 128

3.1.3.2.3. AUTOTAC 128

3.1.3.2.4. Degraderi koji se temelje na CMA 129

4. Rasprava 131

5. Zaključak 148

6. Literatura 150

7. Životopis 190

1. Uvod i pregled područja istraživanja

Ljudski genom čini oko 20 000 gena koji kodiraju proteine (1). Razvojem proteomike i genomike otkriveno je da je hipoteza „jedan gen–jedan protein“ prejednostavna te se danas procjenjuje da ljudski proteom čini između 80 000 i 400 000 proteina (2). Tijekom svog života, proteini se sintetiziraju, stupaju u interakcije s drugim proteinima ili malim molekulama te u konačnici umiru. Svi ovi procesi u stanici strogo su regulirani i koordinirani. Malim molekulama, kao što su lijekovi ili kemijske probe, možemo utjecati na život proteina u stanici, a time i na živote pacijenata. Međutim, samo 20–25 % ukupnog proteoma čine proteini „na koje se može djelovati“ tradicionalnim lijekovima, malim molekulama (engl. *druggable*). Takvi proteini imaju dobro definirano vezno mjesto na koje se velikim afinitetom vežu male molekule, kao što su inhibitori enzima ili agonisti/antagonisti receptora. Značajno veći udio ljudskog proteoma (oko 80 %) čine proteini koji su tradicionalno smatrani proteinima „na koje se ne može djelovati“ malim molekulama (engl. *undruggable*) zbog njihovog širokog i plitkog područja vezanja liganada. Takvi proteini su primjerice transkripcijski faktori i konstrukcijski (engl. *scaffold*) proteini koji stupaju u protein-protein interakcije (PPI) i/ili čine višeproteinske komplekse (3,4). Upravo proteini „na koje ne možemo djelovati“ predstavljaju velik izazov u razvoju novih lijekova jer mnogi ključni patološki proteini nisu mete tradicionalnih lijekova.

Razvijene su različite tehnologije molekularne biologije koje mogu smanjiti ekspresiju specifičnih proteinskih meta. Među njima su najznačajniji antisense oligonukleotidi i interferirajuće RNA koje uključuju upotrebu nukleotida. Iako predstavljaju vrlo koristan i moćan alat u temeljnim istraživanjima, razvoj lijekova koji se temelje na ovim tehnologijama otežan je zbog njihove ograničene bioraspoloživosti i značajnog djelovanja na ne-ciljne proteine. CRISPR/Cas9

tehnologija uređivanja genoma posebno je moćan istraživački alat. Međutim, za utišavanje gena potrebna je genetička manipulacija što značajno ograničava primjenu ove tehnologije u klinici.

Za razliku od prethodno opisanih tehnologija, ciljana razgradnja proteina (engl. *targeted protein degradation*, TPD) tzv. molekulama degraderima, poput kimera koje usmjeravaju ciljanu proteolizu (engl. *proteolysis targeting chimeras*, PROTACs) i molekulskih ljepila, potiče razgradnju proteina na posttranslacijskoj razini (5). TPD je inovativna terapijska strategija sa sposobnošću proširenja kemijskog prostora lijekova na dio proteoma „na koji se ne može djelovati“ tradicionalnim pristupima. TPD iskorištava stanične mehanizme za razgradnju proteina, ubikvitin-proteasomski sustav (UPS) ili lizosomsku proteolizu, te na taj način kontrolira koncentraciju ciljnog proteina (engl. *protein of interest*, POI) (6). Za razliku od klasičnog pristupa u otkriću i razvoju novih lijekova kojim se nastoje razviti male molekule visokog afiniteta prema POI koje modificiraju njegovu aktivnost, kod TPD-a je dovoljno da se degraderi samo vežu na POI kako bi usmjerili njegovu razgradnju pri čemu snažna inhibicija mete nije potrebna (7). Drugim riječima, mehanizam djelovanja degradera temelji se na određenom događaju (engl. *event-driven pharmacology*) – razgradnji proteina koju degraderi potiču i tako reguliraju koncentraciju POI-a, dok se mehanizam djelovanja tradicionalnih lijekova zasniva na zauzetosti veznog mjesta (engl. *occupancy-driven pharmacology*). Osim što imaju terapijski potencijal, degraderi su i vrijedni alati u kemijskoj biologiji, tzv. kemijske probe, za validaciju i dublje razumijevanje funkcije proteina i staničnih putova (8).

Koncept ciljane razgradnje proteina posljednjih godina iznimno je aktualan u farmaceutskoj industriji i akademskoj zajednici te se trenutno u kliničkim ispitivanjima nalazi više od 30 molekula degradera.

1.1. Razgradnja proteina u eukariotskim stanicama

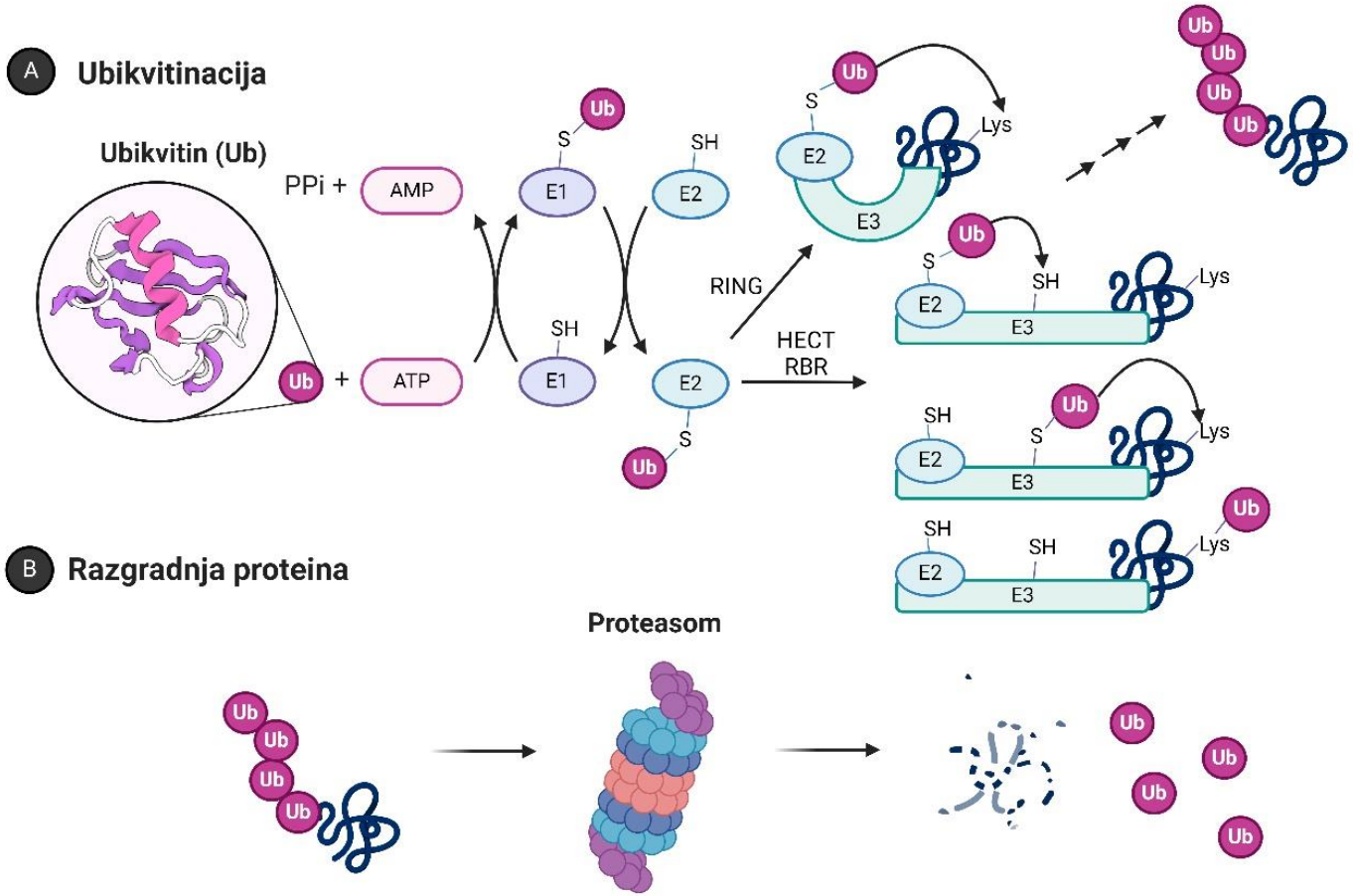
Homeostaza proteina (proteostaza) ključna je za normalno funkcioniranje stanica i obuhvaća procese od sinteze do razgradnje proteina. Razgradnja proteina esencijalan je proces održavanja stanične proteostaze jer se njome regulira koncentracija neželjenih ili pogrešno smotanih proteina. Poremećaji u ovim visoko reguliranim i koordiniranim procesima mogu dovesti do nakupljanja takvih patoloških proteina te razvoja i progresije različitih bolesti kao što su rak, dijabetes, autoimune, neurodegenerativne i kardiovaskularne bolesti (9). Vremena poluživota proteina u stanici značajno se razlikuju i mogu iznositi od nekoliko minuta do nekoliko dana, a različite brzine razgradnje proteina važan su aspekt regulacije staničnih procesa. Mnogi proteini kratkog vremena poluživota djeluju kao regulatorne molekule (npr. transkripcijski faktori), a brza sinteza i razgradnja ovih proteina nužna je radi odgovora na vanjske podražaje (10). Iskorištavanje staničnih puteva razgradnje proteina za TPD zahtijeva razumijevanje ovih puteva na molekulskoj razini.

U eukariotskim stanicama postoje dva glavna puta razgradnje proteina: ubikvitin-proteasomski sustav (UPS) koji je primarni put razgradnje unutarstaničnih proteina i alternativni put autofagija i lizosomska proteoliza kojom se uglavnom razgrađuju izvanstanični proteini i stanični organeli (10).

1.1.1. Ubikvitin-proteasomski sustav (UPS)

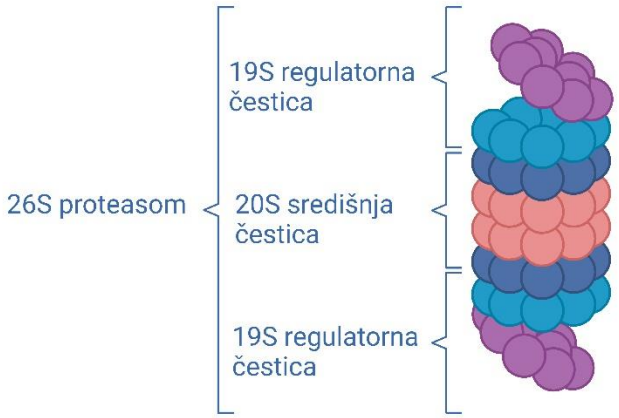
U središtu UPS-a je ubikvitin (Ub), visokoočuvani polipeptid kod svih eukariota (kvasaca, životinja i biljaka). Ub je izgrađen od 76 aminokiselina, koji tijekom posttranslacijskih modifikacija selektivno označava proteine za razgradnju ili modulaciju njihove funkcije. Proteine obilježene poliubikvitinskim lancem prepoznaje i razgrađuje 26S proteasom (10,11).

Ubikvitinacija ili označavanje proteina Ub-om (Slika 1A) složen je proces koji se odvija u više koraka međusobno usklađenih djelovanjem ubikvitinirajućih enzima: enzima koji aktivira Ub (E1), enzima koji konjugira Ub (E2) i Ub ligaze (E3) (11). U prvom koraku aktivira se Ub uz utrošak adenozin-trifosfata (ATP) vezanjem karboksilne skupine na C-kraju Ub-a s tiolnom skupinom cisteina enzima E1 pri čemu nastaje tioesterska veza. Zatim se transtioesterifikacijom Ub prenosi na tiolnu skupinu cisteinskog ostatka u aktivnom mjestu enzima E2. Konačno se ubikvitinacija događa kada E3 ligaza istovremeno veže supstratni protein i enzim E2 tioesterificiran Ub-om dovodeći ih na taj način blizu kako bi se Ub mogao prenijeti izravno ili preko E3 na supstrat. Ubikvitinacijom supstratnog proteina nastaje izopeptidna veza između karboksilne skupine Ub-a i ε-amino skupine lizinskog ostatka supstrata ili njegovog *N*-kraja. Monoubikvitinirani supstrat može disocirati s E3 ligaze, dodatno se ubikvitinirati pri čemu može nastati poliubikvitinski lanac ili deubikvitinirati uz katalitički učinak deubikvitinirajućih enzima (DUB) (11,12). Vrste Ub-lanaca određuju sudbinu supstratnih proteina, što se označava pojmom „ubikvitinski kod“ (13). Poliubikvitinski lanac sastavljen od barem četiri molekule Ub-a, povezanih međusobno preko ostataka Lys48, označava unutarstanične proteine za razgradnju putem 26S proteasoma (Slika 1B), ali razgradnja proteina putem proteasoma događa se i u slučajevima kada je Ub vezan preko Lys11 ili Lys29 supstrata (13). S druge strane, monoubikvitinirani proteini i neke vrste poliubikvitinskih lanaca (npr. Ub-i povezani preko Lys63) uglavnom modificiraju funkciju supstratnog proteina ili usmjeravaju lizosomsku proteolizu (11,12). E3 ligaza je ujedno odgovorna za selektivno uparivanje supstratnog proteina i E2 te katalizu prijenosa Ub-a na supstratni protein. Strukturni motivi koji E3 ligaze prepoznaju na supstratnom proteinu nazivaju se „degroni“ te za većinu E3 ligaza još uvijek nisu otkriveni (14).



Slika 1. *Ubikvitin-proteasomski put razgradnje proteina (kreirano u BioRender.com, prilagođeno prema* (11)*). Ub – ubikvitin; ATP – adenozin-trifosfat; AMP – adenozin-monofosfat; PPi – pirofosfat; E1 – enzim koji aktivira Ub; E2 – enzim koji konjugira Ub; E3 – Ub ligaza; RING – RING (engl. really interesting new gene) tip E3 ligaze; HECT – tip E3 ligaze homologan C-kraju proteina povezanog s E6 (engl. homologous to the E6-assocoiated protein carboxyl terminus); RBR – RBR (engl. RING-in between-RING) tip E3 ligaze.*

Eukariotski 26S proteasom (Slika 2) je veliki, višepodjedinični unutarstanični proteazni kompleks izgrađen od središnje čestice 20S bačvastog oblika i regulatornih čestica 19S smještenih na polovima 20S središnje čestice (15). Regulatorne čestice 19S, koje se sastoje od baze i poklopca, nužne su za vezanje supstratnog proteina i njegovo odmotavanje uz utrošak ATP-a. Baza sadrži receptore za Ub (engl. *regulatory particle non-ATPase 1, 10 and 13*, Rpn1, 10 i 13), konstrukcijski protein Rpn2 i šest podjedinica ATP-aza povezanih s različitim staničnim aktivnostima (engl. *ATPases associated with various cellular activities*, AAA+) koje čine heteroheksamerni prstenasti motor. U poklopcu su smješteni DUB i nekoliko strukturnih Rpn podjedinica. Kako bi 26S proteasom mogao učinkovito prepoznati supstratne proteine, oni moraju biti označeni poliubikvitinskim lancem koji se veže na receptore za Ub. Osim toga, moraju imati nestrukturiranu regiju koja stupa u interakciju s ATP-aznim motorom koji mehanički odmotava i usmjerava supstrat u šupljinu 20S čestice gdje se odvija proteoliza. Prije premještanja supstrata u središnju česticu, DUB deubikvitiniraju supstrat (16).



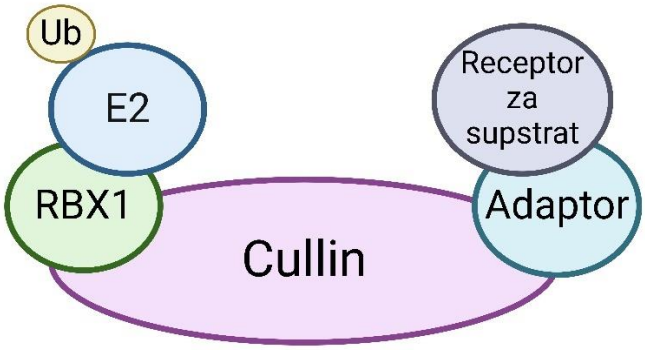
Slika 2. *Građa 26S proteasoma (kreirano u BioRender.com)*

1.1.1.1. Ubikvitin ligaze (E3)

Stanice sisavaca posjeduju samo dva enzima E1, oko 40 enzima E2 i preko 600 različitih E3 ligaza koje čine humani E3-om. Procjenjuje se da je oko 40 % E3 ligaza uključeno u UPS (17). Ovisno o mehanizmu prijenosa Ub-a, razlikuju se tri osnovne vrste E3 ligaza:

1) HECT tip E3 ligaza (tip E3 ligaza homologan C-kraju proteina povezanog s E6; engl. *homologous to the E6-assocoiated protein carboxyl terminus*) koje tvore tioestersku vezu s Ub-om prije nego što se Ub prenese na supstrat (12,14,17),
2) RING tip E3 ligaza (engl. *really interesting new gene*) koje preko RING domene vežu konjugat E2 i Ub-a te kataliziraju izravan prijenos Ub-a s E2 na supstrat (12,14,17) i
3) RBR tip E3 ligaza (engl. *RING-in between-RING*) su hibridi između RING i HECT tipova E3 ligaza koje, poput RING-tipa E3, preko jedne RING domene vežu konjugat E2 i Ub-a, a druga domena RING posjeduje cistein u aktivnom mjestu koji tvori tioestersku vezu s Ub-om prije prijenosa Ub-a na supstratni protein, analogno HECT-tipu E3 (12,14,17).

U TPD-u najviše se iskorištavaju E3 ligaze RING tipa. Domene na koje se veže supstrat i RING domene mogu pripadati istom ili različitim proteinima koji čine višepodjedinične komplekse. Potonje E3 ligaze su Cullin RING ligaze (CRL) koje čine najveću porodicu E3 ligaza. CRL (Slika 3) se sastoje od konstrukcijskog proteina Cullina, supstratnog receptora koji specifično prepoznaje supstrat putem PPI, RING domene prsta (engl. *Ring-box protein 1*, RBX1) koja veže konjugat E2 i Ub-a te adaptorskog proteina koji povezuje supstratni receptor s Cullinom (8).



Slika 3. *Shematski prikaz organizacije podjedinica u kompleksu CRL koji sadrži supstratni receptor, adaptorski protein, konstrukcijski protein Cullin i RBX podjedinicu koja veže konjugat E2 i Ub-a (kreirano u BioRender.com).*

Selektivnost prema supstratima postiže se pomoću supstratnog receptora kao što je Cereblon (CRBN) ili von Hippel-Lindau protein (VHL), adaptorskih proteina (DDB1 (engl. *DNA damage-binding protein 1*) kod CRBN-a i elongina B i C kod VHL-a) i enzima E2. Strukturne studije otkrile su da su kompleksi CRL-a veliki i modularni te izgledom nalik na slovo U (engl. *U-box*) što omogućuje pozicioniranje E2 blizu supstratnog proteina i prijenos Ub-a (17).

Od svih vrsta E3 ligaza, CRL su najbolje istražene i u TPD-u se najviše iskorištavaju $CRL4^{CRBN}$ i $CRL2^{VHL}$ te RING tip E3 ligaza iz porodice proteina staničnih inhibitora apoptoze (cIAP) i *mouse dobule minute 2* homolog (MDM2) koje ne pripadaju CRL ligazama (8,18).

Manje od 2 % svih E3 ligaza danas se koristi u TPD-u, a razlog tome je što su E3 ligaze općenito vrlo zahtjevne mete za razvoj lijekova malih molekula, odnosno pripadaju dijelu proteoma „na koji se ne može djelovati“ tradicionalnim lijekovima. Razvoj molekula degradera koji iskorištavaju stanični sustav za razgradnju proteina ima veliki potencijal za liječenje različitih bolesti (14).

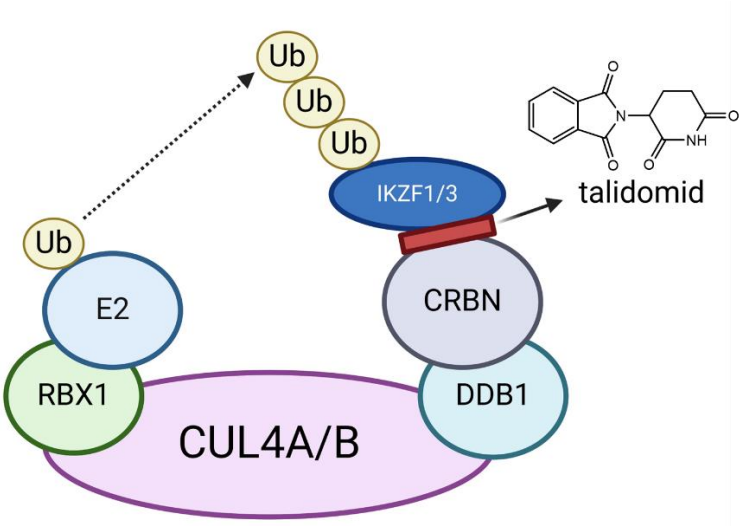
Ekspresija različitih E3 ligaza značajno varira u različitim stanicama i tkivima, a CRBN i MDM2 su najšire eksprimirane ligaze. Izazovi u razvoju degradera koji se temelje na iskorištavanju E3 ligaza svakako je razgradnja ne-ciljnih proteina (engl. *off-target proteins*) i razvoj rezistencije. Iskorištavanje dodatnih E3 ligaza koje su selektivno eksprimirane u određenim tkivima ili stanicama značajno može proširiti primjenjivost degradera u terapiji različitih bolesti (8,14).

Cereblon (CRBN)

CRBN je supstratni receptor u kompleksu CUL4-RBX1-DDB1-CRBN ($CRL4^{CRBN}$) E3 ligaze koja pripada porodici faktora povezanih s DDB1 i Cullinom 4 (engl. *DDB1-associated and Cul4-associated factor*, DCAF) unutar superporodice CRL (14). Njegovi endogeni supstrati uključuju α-podjedinicu kinaze ovisne o adenozin-monofosfatu (AMP), glutamin sintetazu i protein prekursor amiloida (14).

Imunomodulator (IMiD) talidomid i njegovi analozi, koji se danas koriste u terapiji multiplog mijeloma i drugih malignih bolesti, ligandi su CRBN-a te usmjeravaju TPD posredujući interakcije između CRBN-a i neosupstrata kao što su transkripcijski faktori ikar (IKZF1, grč. *Ikaros*) i eol (IKZF3, grč. *Aiolos*) (Slika 4). Neosupstrati postaju supstrati CRBN-a tek nakon vezanja IMiD-a na CRBN pri čemu dolazi do indukcije novih PPI. Ligandi temeljeni na IMiD-ima koriste se kao dijelovi struktura PROTAC molekula ili kao tzv. molekulska ljepila (engl. *molecular glues*) koja iskorištavaju CRBN za razgradnju različitih neprirodnih supstrata, kao što su o ciklinu ovisne kinaze (engl. *cyclin-dependent kinase*, CDK), protein 4 koji sadrži bromodomenu (engl. *bromodomain-containing protein 4*, BRD4), kinaza A tropomiozinskog receptora (engl. *tropomyosin receptor kinase A*, TrkA), indolamin-2,3-dioksigenaza 1 (engl. *indoleamine-2,3-*

dioxygenase 1, IDO1), antiapoptotički protein velikostaničnog limfoma B stanica (engl. *anti-apoptotic protein B cell lymphoma extra-large*, Bcl-xL) i dr. (14).

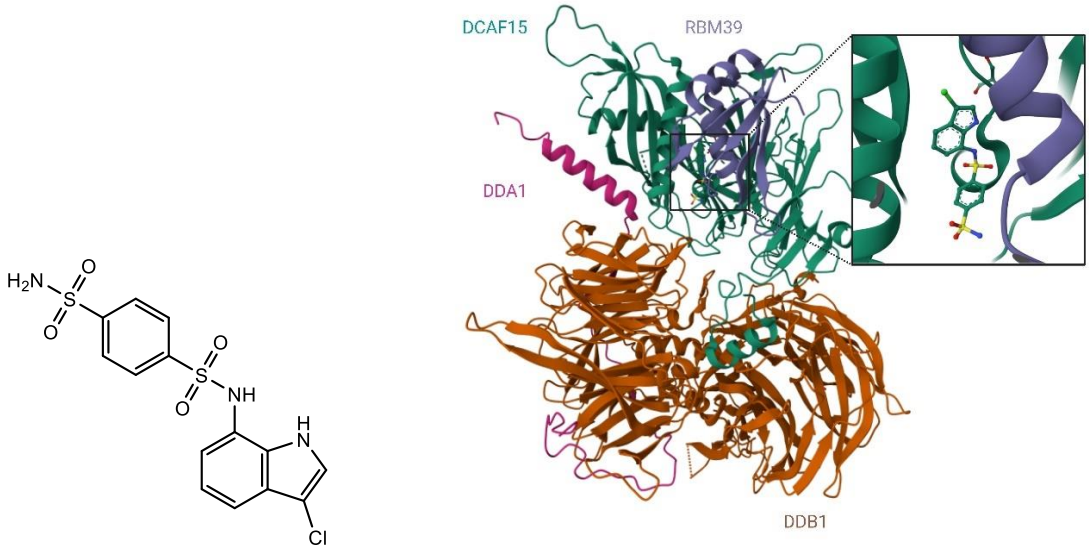


Slika 4. *Kompleks E3 ligaze CUL4-RBX1-DDB1-CRBN (CRL4^{CRBN}) (kreirano u BioRender.com).*

Ostale DCAF E3 ligaze

Osim CRBN-a, iz porodice DCAF u TPD-u se koriste i supstratni receptori DCAF15, DCAF16 te receptor aromatskih ugljikovodika (engl. *arylhydrocarbon receptor*, AhR) (14). DCAF15 je također široko rasprostranjen u različitim tkivima i vrstama stanica, a njegovi endogeni ligandi su proteini važni u održavanju strukture kromosoma 1A i 3 (SMC1A i SMC3) (19). Antitumorski aromatski sulfonamidi, kao što je indisulam (Slika 5a), preko DCAF15 posreduju ubikvitinaciju i razgradnju proteina 39 koji veže RNA motiv (engl. *RNA-binding motif protein 39*, RBM39), a koji je uključen u ekspresiju gena specifično uključenih u karcinogenezu i alternativno izrezivanje (20). Zanimljivo je da se indisulam vrlo slabo veže na DCAF15 kompleks E3 ligaze (K_D ~50 μM) te da se uopće ne veže na RBM39. Međutim, kada su prisutni i DCAF15 i RBM39, K_D iznosi 200 nM,

a iz kristalne strukture je vidljivo da se indisulam veže kao molekulsko ljepilo između DCAF15 i RBM39 (Slika 5b) (21).



a) b)

***Slika 5**. a) Struktura indisulama, liganda DCAF15; b) Struktura ternarnog kompleksa između RBM39, proteinskog kompleksa E3 ligaze DCAF15-DDB1-DDA1 i indisulama (Protein Data Bank kod: 6UD7* (21)*).*

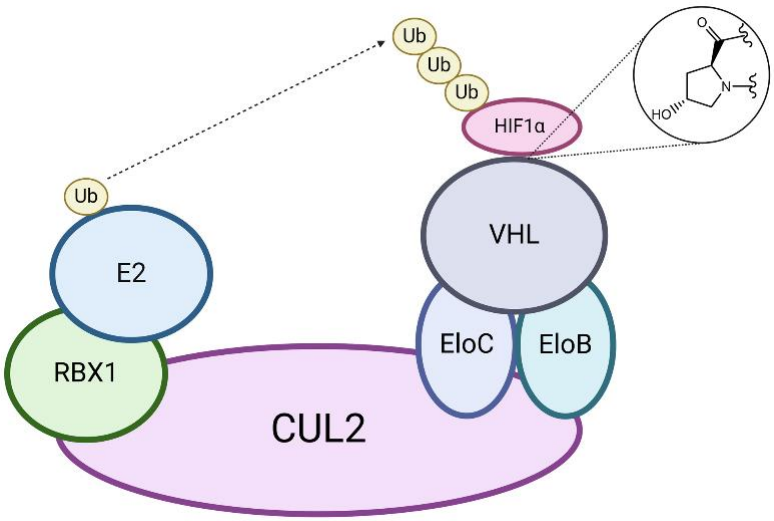
DCAF16 je supstratni receptor CUL4-DDB1 kompleksa E3 ligaze smješten u jezgrama stanica različitih tkiva koji se može koristiti kao meta elektrofilnih PROTAC-a koji potiču TPD u jezgri (22).

AhR je protein s dvojakom funkcijom. Djeluje kao transkripcijski faktor aktiviran ligandom i kao E3 ligaza te je široko eksprimiran u različitim tkivima, ali u nešto manjoj mjeri nego CRBN. Poznato je da je transkripcijska aktivacija AhR povezana s razvojem karcinoma (23). U kompleksu E3 ligaze Cullin 4B-AhR ($CUL4B^{AHR}$), AhR je supstratni receptor za steroidne receptore

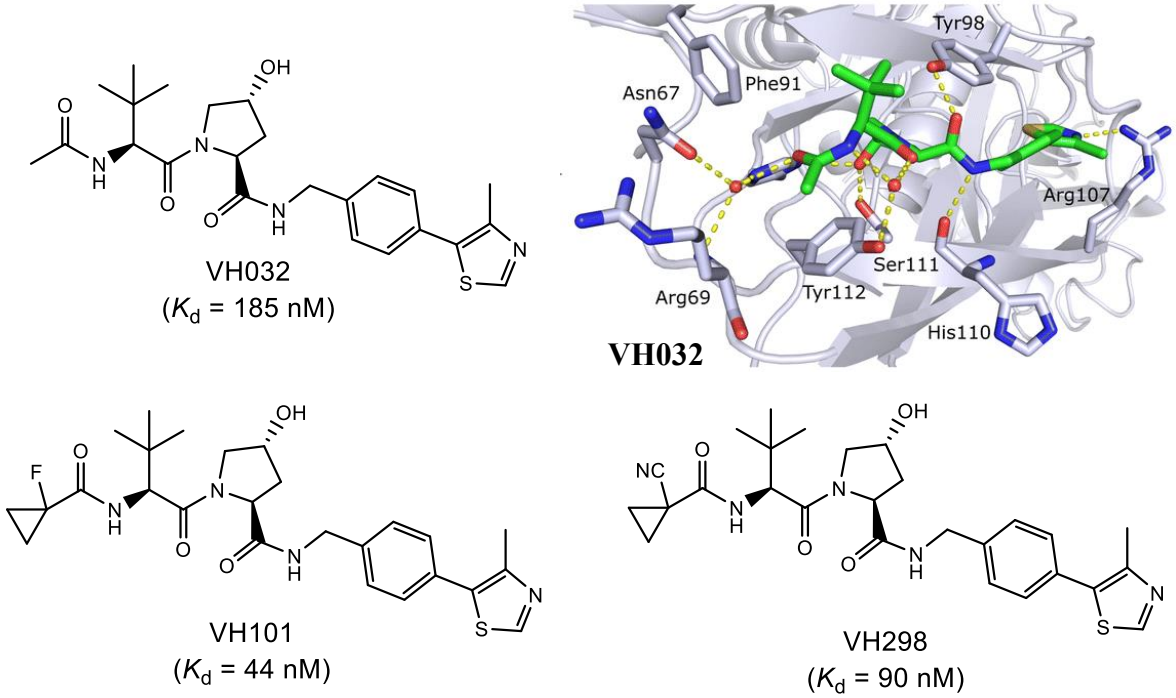
(estrogene receptore (ER) α i β i androgene receptore (AR)) čiju ubikvitinaciju i razgradnju posreduje (24).

Von Hippel-Lindau (VHL) protein

VHL je supstratni receptor u kompleksu E3 ligaze CUL2-RBX1-ElonginB-ElonginC-VHL ($CRL2^{VHL}$) (Slika 6) koji specifično prepoznaje hidroksiprolinske ostatke u hipoksijom induciranom faktoru 1α (HIF1α). HIF1α je tumor supresorski protein mutiran u VHL bolesti koji, osim što potiče stvaranje eritropoetina u uvjetima hipoksije, sudjeluje u različitim biološkim procesima kao što su metaboličko reprogramiranje, sprječavanje stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta, angiogeneza i metastaziranje tumorskih stanica. U uvjetima normoksije prolin hidroksilaza katalizira hidroksilaciju Pro564 u strukturi HIF1α, što omogućuje vezanje hidroksiliranog HIF1α na VHL i posljedičnu ubikvitinaciju i proteasomsku razgradnju. HIF1α se dakle konstitutivno ubikvitinira i razgrađuje pri normalnom parcijalnom tlaku kisika. Ligandi za VHL dizajnirani su racionalnim dizajnom temeljenim na strukturi (engl. *structure-based drug design*, SBDD) i na fragmentima (engl. *fragment-based drug discovery*, FBDD) budući da su i visokoprotočni probir (engl. *high throughput screening*, HTS) i *in silico* probir bili uglavnom neuspješni u identificiranju liganada za VHL (25). Ciulli i Crews su na temelju strukture kokristala veznog mjesta na VHL proteinu i hidroksi-HIF1α dizajnirali nove ligande za VHL oponašajući ključne PPI između prirodnog supstrata hidroksi-HIF1α i VHL-a (26). Utvrđeno je da je (2*S*,4*R*)-hidroksiprolin nužan strukturni motiv za prepoznavanje HIF1α putem VHL-a te je izabran kao početna okosnica za *de novo* dizajn malih molekula liganada za VHL. Inhibitori PPI između VHL-a i HIF1α, VH032, VH101 i VH298 (Slika 7), dizajnirani SBDD pristupom, imaju dobar afinitet vezanja za VHL i poboljšana fizikalno-kemijska svojstva što je ključno za dizajn i razvoj PROTAC-a (27).



Slika 6. *Kompleks E3 ligaze CUL2-RBX1-EloB-EloC-VHL (CRL2^{VHL}) s HIF1α (kreirano u BioRender.com).*



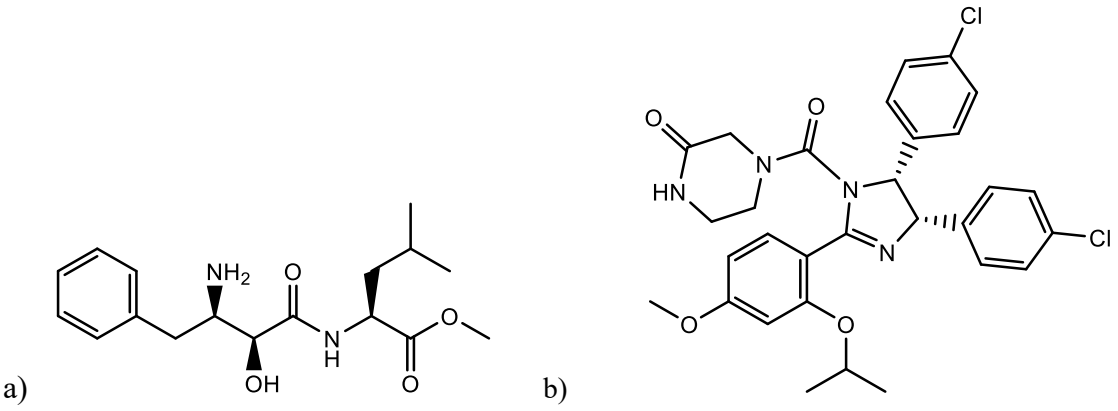
Slika 7. *Strukture inhibitora VHL-a (VH032, VH101 i VH298) i kristalna struktura kompleksa VHL i VH032 (prilagođeno iz ref.* (27) *uz dopuštenje Royal Society of Chemistry).*

Protein inhibitor apoptoze (IAP)

Porodica proteina IAP ima ulogu u inhibiciji apoptoze. Pet od osam članova ove porodice, uključujući cIAP i X-vezani IAP (XIAP) također imaju RING domenu pa se stoga ponašaju kao E3 ligaze. Metil-bestatin (MeBS) (Slika 8a) se veže na cIAP1 te potiče autoubikvitinaciju cIAP1 i posljedičnu proteasomsku razgradnju (25).

Mouse double minute 2 homolog (MDM2)

MDM2 je E3 ligaza koja inducira ubikvitinaciju i razgradnju tumor-supresorskog transkripcijskog faktora p53 uključenog u regulaciju popravka oštećenja DNA, staničnog ciklusa i apoptoze. Nutlin (Slika 8b) je ligand MDM2 koji, vežući se za MDM2, onemogućuje MDM2-p53 PPI i jedna je od prvih otkrivenih malih molekula koje se vežu na E3 ligaze (28).



Slika 8. *Strukture: a) metil-bestatina (MeBS), liganda cIAP1 i b) nutlina, liganda MDM2.*

1.1.2. Lizosomska proteoliza i autofagija

Lizosomska proteoliza (Slika 9) je drugi glavni put razgradnje proteina u eukariotskim stanicama prilikom koje se razgrađuju izvanstanični ili membranski proteini uneseni endocitozom te stanične organele i dugoživući citosolni proteini. Lizosomi su organele okružene membranom koje sadrže više od 50 različitih hidrolaza za razgradnju proteina, nukleinskih kiselina, polisaharida i lipida. Supstrati za lizosomsku razgradnju dopremaju se u lizosom autofagijom i vezikularnim transportom (13). Izvanstanični i membranski proteini u stanicu ulaze endocitozom kao oblikom vezikularnog transporta, dok fagocitozom ulaze virusi, bakterije i druge velike čestice. Autofagija je proces koji stanice koriste za uklanjanje nefunkcionalnih staničnih organela, proteina i unutarstaničnih patogena. Razlikuju se makroautofagija, mikroautofagija i autofagija posredovana šaperonima (29).

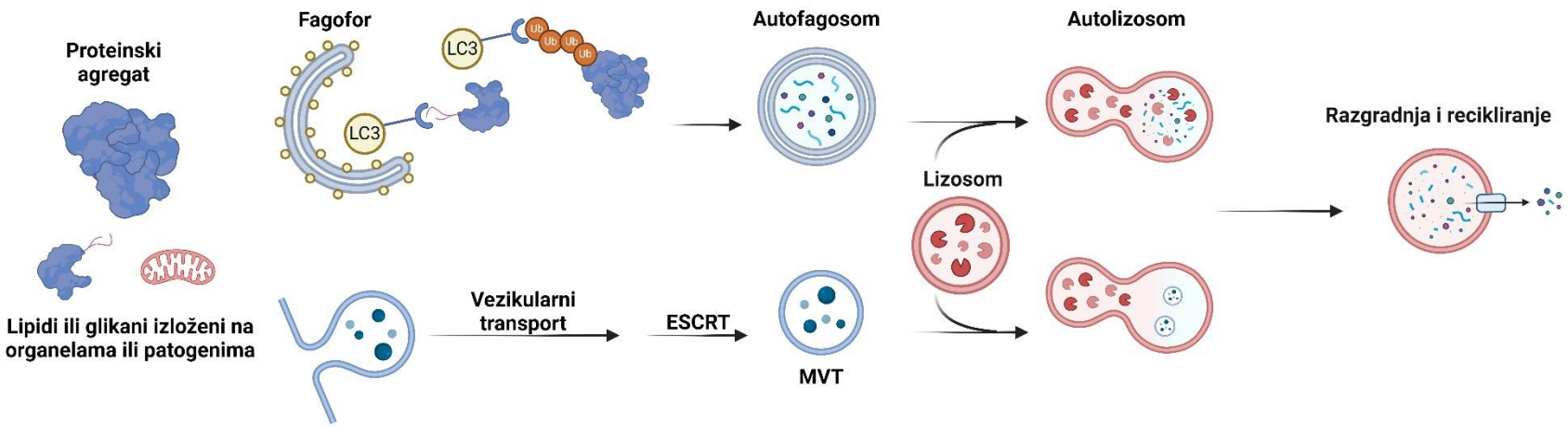
Tijekom makroautofagije (Slika 9) nastaju dvomembranske vezikule (autofagosomi) unutar kojih se nalaze mali dijelovi citoplazme ili stanične organele. Autofagosom preko mikrotubula dospijeva do lizosoma pri čemu dolazi do fuzije njihovih membrana i predaje sadržaja autofagosoma lizosomu za razgradnju (10). U mikroautofagiji sadržaj za razgradnju ulazi izravno u lizosom (29). Poseban put dostave sadržaja u lizosome je autofagija posredovana šaperonima koja zaobilazi stvaranje autofagosoma i fuziju, a ciljni proteini, nakon što ih odabere šaperon, izravno ulaze u lumen lizosoma preko odgovarajućeg transportera (30). Razgradnjom sadržaja lizosoma nastaju građevni blokovi (aminokiseline) koji se zatim recikliraju u citoplazmi (31).

Ovisno o sadržaju za razgradnju, autofagija može biti neselektivna ili selektivna. Kod neselektivne autofagije veliki dijelovi citoplazme izdvajaju se prekursorima autofagosoma, fagoforima, za razgradnju kako bi se osigurali nutrijenti u stanici, zbog čega se uglavnom aktivira tijekom stresa i gladovanja. S druge strane, selektivna autofagija je strogo regulirani proces kojim se održava broj

i integritet staničnih organela te štiti stanica od patogena (9). Sadržaj autofagosoma kod selektivne autofagije tako mogu činiti mitohondriji, dijelovi citoplazme, ribosomi, peroksisomi, lipidne kapljice, proteinski agregati, feritin i dr. (32). Sadržaj se odabire pomoću selektivnih receptora autofagije koji služe kao most koji povezuje sadržaj za lizosomsku razgradnju s fagoforom (9). Ovi receptori omogućuju selektivno prepoznavanje šećera, lipida ili ubikvitinske oznake na supstratu od strane nastajućeg autofagosoma na način da povezuju supstrat za razgradnju s jedne strane s proteinima LC3/GABARAP na membrani fagofora s druge strane (Slika 9). LC3 je protein konjugiran s fosfatidiletanolaminskim lipidima i jedan je od ključnih proteina koji sudjeluju u stvaranju i dozrijevanju autofagosoma te je vrlo zanimljiv protein za iskorištavanje lizosomskog puta razgradnje proteina u TPD-u (6,9).

Selektivno usmjeravanje lizosomske razgradnje membranskih proteina može se regulirati ubikvitinacijom, fosforilacijom, acetilacijom i oligomerizacijom (9). Ubikvitinske signale prepoznaju i proteini vezikularnog transportnog sustava ili sustava endosomskog sortirajućeg kompleksa potrebnog za transport (ESCRT) koji potiče nastajanje multivezikularnih tijela (MVT) stvarajući intraluminalne vezikule koje se mogu u potpunosti razgraditi u lizosomima (Slika 9) (33). S obzirom da je ubikvitinska signalizacija uključena i u proteasomsku i lizosomsku razgradnju, potrebno je do kraja razjasniti ubikvitinski kod.

Neovisno o putu dopreme sadržaja (vezikularnim transportom ili autofagijom), lizosomska razgradnja uglavnom zahtjeva fuziju lizosoma s odgovarajućom dostavnom vezikulom kako bi sadržaj postao dostupan hidrolitičkim lizosomskim enzimima. Iako je otkriveno da su za fuziju ključni membranski proteinski kompleksi SNARE (engl. *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*) i Rab GTP-aza, još uvijek nije do kraja razjašnjen mehanizam (34).



Slika 9. *Lizosomki put razgradnje proteina u eukariotskim stanicama* (13).

2. Cilj istraživanja

Cilj ovog specijalističkog rada je napraviti sustavan pregled saznanja o TPD-u kao novom terapijskom modalitetu. U radu će biti opisani molekularni principi TPD-a, bit će dan pregled razvoja molekula degradera te kliničkih ispitivanja degradera. Detaljno će biti obrađeni različiti pristupi ciljanoj razgradnji proteina koji iskorištavaju:

1) UPS (PROTAC, molekulska ljepila, selektivni degraderi estrogenih receptora (SERD), selektivni degraderi androgenih receptora (SARD) i dr.) i
2) lizosomski put (kimere koje usmjeravaju lizosomsku proteolizu (engl. *lysosome targeting chimera*, LYTAC), PROTAC-i temeljeni na protutijelima (engl. *antibody-based PROTAC*, AbTAC), kimere koje usmjeravaju autofagiju AUTAC (engl. *autophagy targeting chimera*), ATTEC (engl. *autophagosome tethering compounds*) i dr.).

Bit će opisane prednosti i mane TPD-a, mehanizam djelovanja degradera formiranjem ternarnog kompleksa, dizajn degradera, te optimiranje farmakokinetičkih (PK) i farmakodinamičkih (PD) svojstava degradera za oralnu primjenu.

Hipoteza istraživanja:

Ciljana razgradnja proteina molekulama degraderima predstavlja inovativnu tehnologiju u otkriću i razvoju novih lijekova koja omogućuje selektivnu degradaciju patogenih proteina, čime se postižu potencijalno efikasniji klinički ishodi u usporedbi s tradicionalnim lijekovima.

3. Materijali i metode – sustavni pregled saznanja o temi

Za potrebe pisanja specijalističkog rada korišteni su originalni znanstveni radovi, stručni i pregledni radovi te ostala znanstvena i stručna literatura na engleskom jeziku koja obuhvaća informacije o tehnologiji TPD. Podaci su dobiveni pretraživanjem bibliografske baza podataka (PubMed), baze podataka s cjelovitim tekstom (Science Direct) te baze podataka kliničkih ispitivanja (clinicaltrials.gov) korištenjem ključnih riječi ili kombinacija ključnih riječi: *targeted protein degradation*; *ubiquitine-proteasome system*; *E3 ligase; lyososome pathway*; *autophagy*; *PROTAC*; *molecular glue*; *SARD*; *SERD*; *LYTAC*; *AbTAC; GlueTAC; AUTAC*; *ATTEC*; *AUTOTAC*; *dTAG*; *HyTag*; *degradation tag*; *degron*; *ternary complex*. Odabrani izvori detaljno su proučeni i izdvojeni su najvažniji rezultati, rasprave i zaključci te je napravljen sustavan pregled saznanja o temi. Za dodatna saznanja pregledane su i relevantne reference navedene u publikacijama. Istraživanje se provodilo u razdoblju od ožujka do srpnja 2024., a pretraživana je relevantna znanstvena literatura od 2000. godine do danas.

3.1. Ciljana razgradnja proteina (TPD) u eukariotskim stanicama

TPD predstavlja inovativan i obećavajući pristup u otkriću i razvoju novih lijekova, ali i alat u istraživanjima funkcije proteina u staničnoj biologiji. U fokusu TPD-a su molekule degraderi – kemijski alati koji mogu kontrolirati endogene puteve razgradnje proteina. Degraderi ostvaruju biološki učinak induciranjem razgradnje POI-a i posljedičnom promjenom stanične funkcije (13,29).

Tradicionalan pristup djelovanju na proteine uključene u patofiziologiju različitih bolesti jest pomoću malih molekula, kao što su inhibitori enzima. Ovaj pristup je uglavnom bio vrlo uspješan kroz povijest, međutim, nemaju svi proteini enzimsku funkciju ili dobro definirano vezno mjesto na receptoru na koje se može vezati mala molekula i potaknuti biološki odgovor. Djelovanje na takve proteine „na koje se ne može djelovati“ tradicionalnim lijekovima jedna je od prednosti TPD strategije. Upravo male molekule inhibitori predstavljaju idealne početne točke za dizajn degradera u TPD-u (13).

S obzirom na strukturu, degraderi se mogu podijeliti u dvije osnovne skupine:

1) monovalentne i
2) bivalentne degradere.

Monovalentni degraderi su molekulska ljepila i destabilizatori poput SERD-a i SARD-a te hidrofobnih oznaka (HyTag), dok su bivalentni degraderi različite hibridne molekule koje induciraju razgradnju proteina iskorištavajući UPS (npr. PROTAC) ili lizosomski put (npr. LYTAC) (6). Osim navedenih osnovnih skupina degradera, postoje i trovalentni PROTAC-i (35). Degraderi mogu biti male molekule, peptidi, proteini i nukleinske kiseline (36).

Danas se većina postojećih strategija u TPD-u zasniva na UPS-u i cilja unutarstanične proteine, ali iskorištavanje lizosomske proteolize značajno bi moglo proširiti spektar mogućih proteinskih meta (29). TPD strategije koje se temelje na UPS-u iskorištavaju E3 ligaze za razgradnju POI jer su E3 odgovorne za prepoznavanje supstrata te su u ljudskom proteomu zastupljene u značajno većem broju nego enzimi E1 i E2. Osim već spomenutih PROTAC-a i molekulskih ljepila, na UPS-u se zasnivaju i SERD, SARD, oznake za razgradnju, uključujući HyTag, specifični i negenetički

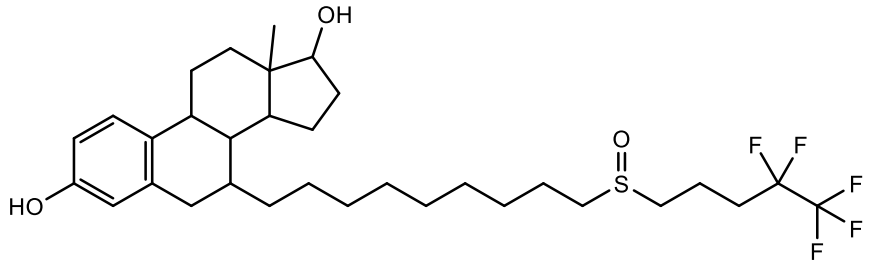
proteinski brisači ovisni o IAP-u (engl. *specific and nongenetic IAP-dependent protein eraser*, SNIPER) i dr. (29).

3.1.1. Pregled povijesnog razvoja TPD-a i degradera

Znanstveno područje razgradnje proteina počelo se razvijati sredinom 20. st. Belgijski biolog Christian de Duve 1963. g. opisao je koncept autofagije, procesa u kojem stanice izdvajaju vlastite komponente za lizosomsku razgradnju. Desetljeće ranije de Duve je otkrio lizosome, a 1974. za to je dobio Nobelovu nagradu, što je dodatno potvrdilo značaj njegovih otkrića za razumijevanje stanične biologije (37). Nakon što je 1975. g. Gideon Goldstein otkrio Ub, sljedeća dva desetljeća su Irwin Rose, Avram Hershko i Aaron Ciechanover intenzivno istraživali proces ubikvitinacije i mehanizme razgradnje proteina u stanicama, a njihov rad doveo je 1980. g. do otkrića puta razgradnje proteina neovisnog o lizosomu – UPS-a (38). Za otkriće ubikvitinskog koda ili tzv. „molekulskog poljupca smrti“ kojeg stanica daje neželjenim proteinima, Rose, Hershko i Ciechanover dobili su Nobelovu nagradu za kemiju 2004. g. (39). Proteasom je otkriven 1988., a kristalna struktura mu je razriješena 1997. g. (40). Ova otkrića postavila su temelje za današnje razumijevanje održavanja stanične proteostaze.

Inspirirano prethodno opisanim otkrićima, krajem 1990.-ih godina javlja se interes za iskorištavanjem staničnih sustava za razgradnju proteina molekulama degraderima u svrhu TPD-a. Prve bivalentne kimerne molekule za ciljanu proteolizu, PROTAC-i, otkrivene su na Sveučilištu Yale 2001. g. u istraživačkoj skupini prof. Crewsa. Prvi PROTAC-i bili su peptidne strukture, a pomoću njih je *in vitro* dokazan koncept da je moguća inducirana proteoliza bez genetičke modifikacije POI-a (41).

Nedugo nakon otkrića prvog PROTAC-a na tržište je došao fulvestrant (Slika 10) kao prvi predstavnik monovalentnih degradera iz skupine SERD-a za liječenje karcinoma dojke (42). Mehanizam djelovanja fulvestranta otkriven je slučajno tijekom razvoja antiestrogena početkom 1990.-ih kada je uočen neobičan fenomen da fulvestrant, iako pokazuje dva puta manji afinitet prema ER od estradiola, smanjuje odgovor stanica na estradiol (42). Otkriveno je da fulvestrant ne blokira samo funkciju ER-a djelujući antagonistički, nego i izravnim smanjenjem koncentracije ER-a u stanici što u konačnici dovodi do smanjenog odgovora na estrogen. Takvi lijekovi novog mehanizma djelovanja nazvani su SERD i još uvijek su jedni od najkorištenijih lijekova za ER^+ karcinom dojke. SERD sprječavaju dimerizaciju receptora i stvaraju nestabilan proteinski kompleks koji dovodi do proteasomske razgradnje ER-a (43). Od tada svjedočimo značajnom napretku u razumijevanju mehanizma djelovanja SERD-a i drugih molekula degradera. Na temelju boljeg razumijevanja interakcija između liganda i receptora dizajnirani su novi SERD poboljšanih svojstava (44). Međutim, unatoč intenzivnom istraživanju posljednjih 30 godina, točan mehanizam djelovanja fulvestranta i dalje nije poznat (42).



Slika 10. *Struktura fulvestranta, prvog SERD-a odobrenog za liječenje ER^+ karcinoma dojke.*

Prva generacija PROTAC-a zbog svoje peptidne strukture imala je lošu staničnu permeabilnost pa zlatna groznica u području TPD-a započinje 2004. g. pojavom stanično permeabilnih PROTAC-a

i traje sve do danas. Drugu generaciju PROTAC-a nepeptidne strukture opisali su također Crews i sur. 2008. g. (45).

Do kraja 2000.-ih godina postignut je značajan napredak u području ciljane razgradnje proteina: otkriveni su novi ligandi za E3 ligaze (CRBN, VHL i cIAP) i nove strategije za ciljanu razgradnju proteina (42). Nishimura i sur. su 2009. g. opisali sustav degrona induciranih auksinom (engl. *auxin-inducible degron*, AID). Genetičkim modifikacijama pripravljeni su rekombinantni fuzijski proteini POI-AID, a razgradnja je inducirana auksinom koji djeluje kao molekulsko ljepilo (46). Itoh i sur. su 2010. g. predstavili SNIPER-e, heterobifunkcionalne kimere koje preko cIAP E3 ligaze usmjeravaju razgradnju proteina koji veže retinoičnu kiselinu (47), a godinu nakon su Crews i sur. opisali hidrofobno označavanje pomoću HyTag-a kao novu strategiju u TPD-u pomoću koje se oponaša nepravilno smatanje proteina i na taj način usmjerava razgradnja (48). Ciulli i Crews su se ranih 2010.-ih usmjerili na istraživanje liganada za VHL te su koristeći FBDD i SBDD dizajnirali male molekule peptidomimetičke analoge hidroksiliranog HIF1α (26).

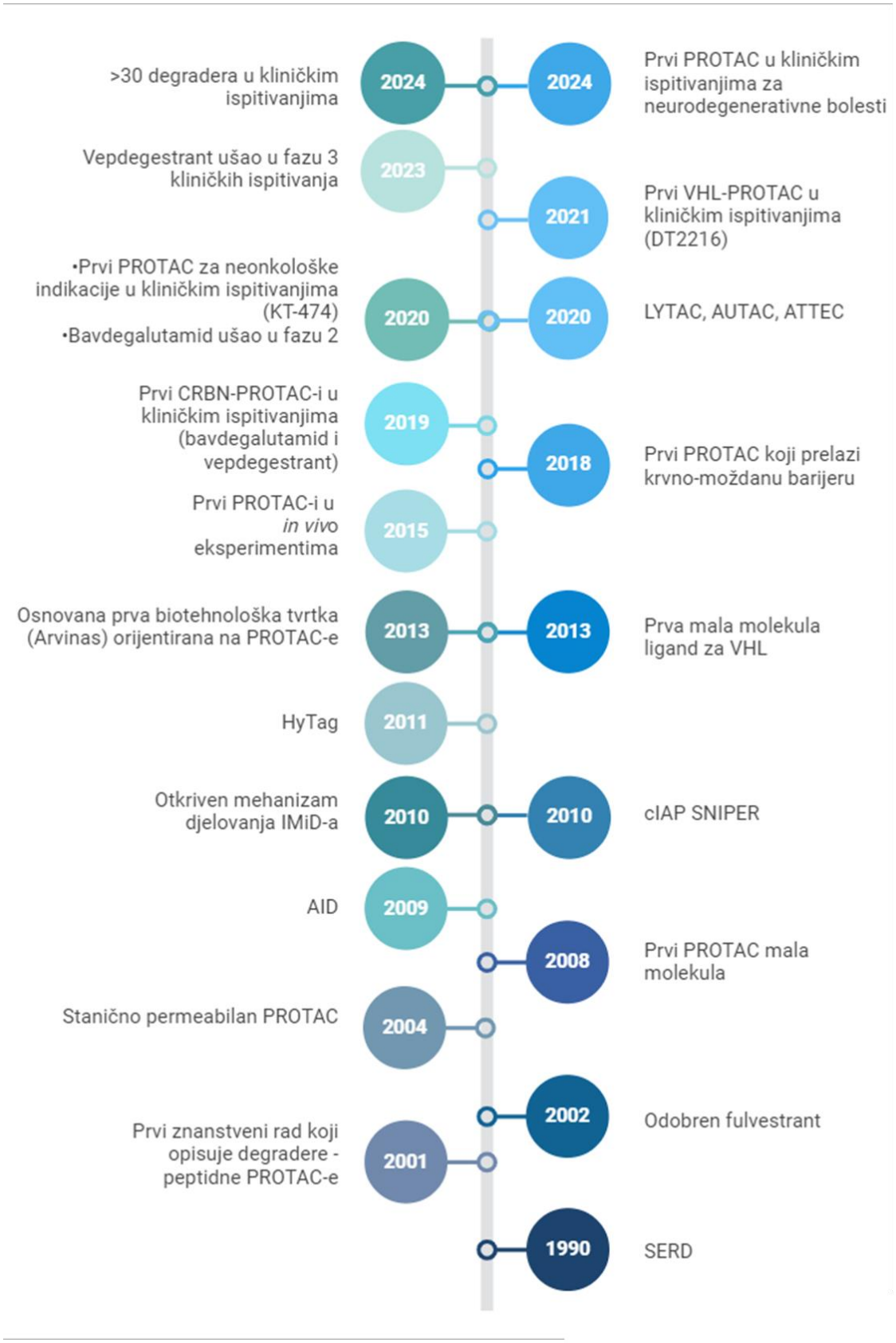
Prvi *in vivo* eksperimenti ispitivanja učinkovitosti PROTAC-a provedeni su 2015. g. (49), a već 2019. prvi PROTAC-i degraderi AR-a (bavdegalutamid) i degraderi ER-a (ARV-471) ušli su u klinička ispitivanja za liječenje karcinoma prostate, odnosno dojke (50). Iako je većina degradera koji se nalaze u kliničkim ispitivanjima za onkološke indikacije, KT-474 i NX-5948 se ispituju za liječenje autoimunih bolesti (42).

Osim PROTAC-a i SERD-a, molekulska ljepila su još jedna zanimljiva skupina malih molekula, monovalentnih degradera, koje, slično PROTAC-ima, induciraju PPI između POI i E3 ligaze. Prva otkrivena molekulska ljepila bili su imunosupresivi ciklosporin A i takrolimus, a 2010. g. otkriveno je da IMiD-i (talidomid, lenalidomid, pomalidomid i derivati) također djeluju kao molekulska ljepila koja posreduju razgradnju neosupstrata preko E3 ligaze CRBN (51,52).

Potaknute dosadašnjim uspjehom TPD-a i potvrdom da se pomoću bifunkcionalnih molekula mogu inducirati funkcionalne PPI, brojne istraživačke skupine intenzivno razvijaju slične modalitete koji mogu kontrolirati koncentraciju ciljnog proteina. Istraživačka skupina Matthew Disneya 2018. g. dizajnirala je kimere koje ciljaju ribonukleaze (engl. *ribonuclease targeting chimera*, RIBOTAC) i usmjeravaju razgradnju miRNA (53).

Osim iskorištavanja UPS-a, danas se sve više radi na degraderima koji usmjeravaju lizosomsku proteolizu. Banik i sur. su 2020. g. opisali kimere temeljene na protutijelima, LYTAC-e, koje potiču razgradnju izvanstaničnih i membranskih proteina te staničnih organela iskorištavajući lizosomski put razgradnje (54). Za razgradnju membranskih proteina opisani su 2021. g. AbTAC-i (55), dok su kimere koje usmjeravaju autofagiju (AUTAC, AUTOTAC i ATTEC) male molekule (56).

Uz degradere, danas se istražuju i bifunkcionalne hibridne molekule koje, umjesto ubikvitinacije, induciraju fosforilaciju ili defosforilaciju, deubikvitinaciju, acetilaciju i druge biološke procese (42). Danas se u kliničkim ispitivanjima nalazi više od 30 molekula degradera, većinom u fazama 1 ili 2. Trenutno je jedan PROTAC, vepdegestrant, u fazi 3 kliničkih ispitivanja za liječenje uznapredovalog karcinoma dojke, te četiri SERD-a i tri molekulska ljepila, također za onkološke indikacije (57,58). Početkom 2024. g. najavljena je *first-in-human* studija PROTAC-a za liječenje neurodegenerativnih bolesti (59). Na slici 11 kronološki je prikazan tijek razvoja TPD-a (42).



Slika 11. *Kronološki tijek razvoja TPD-a* (42,57,58).

3.1.2. Ciljana proteasomska razgradnja proteina

Kako bi došlo do inducirane proteasomske razgradnje proteina u eukariotskim stanicama, trebaju biti zadovoljeni određeni preduvjeti: potrebno je ostvariti interakciju s metom, odnosno POI, mobilizirati ubikvitinacijski sustav te ostvariti interakciju s proteasomom (13).

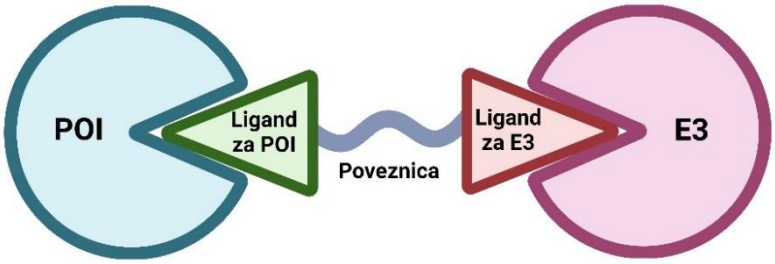
Za uspješnu TPD ključno je stupanje POI u interakciju s ubikvitinacijskim sustavom na razini E3 ligaze. E3 ligaze prepoznaju odgovarajuće signale na površini POI, dovodeći lizinske ostatke POI-a u fizičku blizinu konjugata E2 i Ub-a, odnosno E3 i Ub-a, ovisno o vrsti E3 ligaze. E3 ligaze mogu komunicirati s POI izravno ili preko adaptorskih proteina. Kod višepodjediničnih E3 ligaza, kao što su ligaze iz porodice CRL, središnji konstrukcijski proteini stupaju u interakcije s različitim adaptorskim proteinima kako bi imali sposobnost vezati različite mete (12). TPD pristupi temelje se na principu da induciranje blizine E3 ligaze i POI-a rezultira poliubikvitinacijom i degradacijom POI-a.

Najznačajnije vrste degradera koji na ovaj način induciraju razgradnju POI-a su svakako PROTAC-i i molekulska ljepila. Proteasomska razgradnja proteina može se postići i pomoću SERD-a, SARD-a, različitih sustava označavanja (tzv. TAG sustava), kao što su dTAG, HaloPROTAC ili HyTag. TAG sustavi uglavnom induciraju razgradnju rekombinantnih fuzijskih proteina mobilizirajući E3 ligaze pa se stoga više upotrebljavaju u eksperimentalne svrhe u molekularnoj biologiji (36).

3.1.2.1. PROTAC

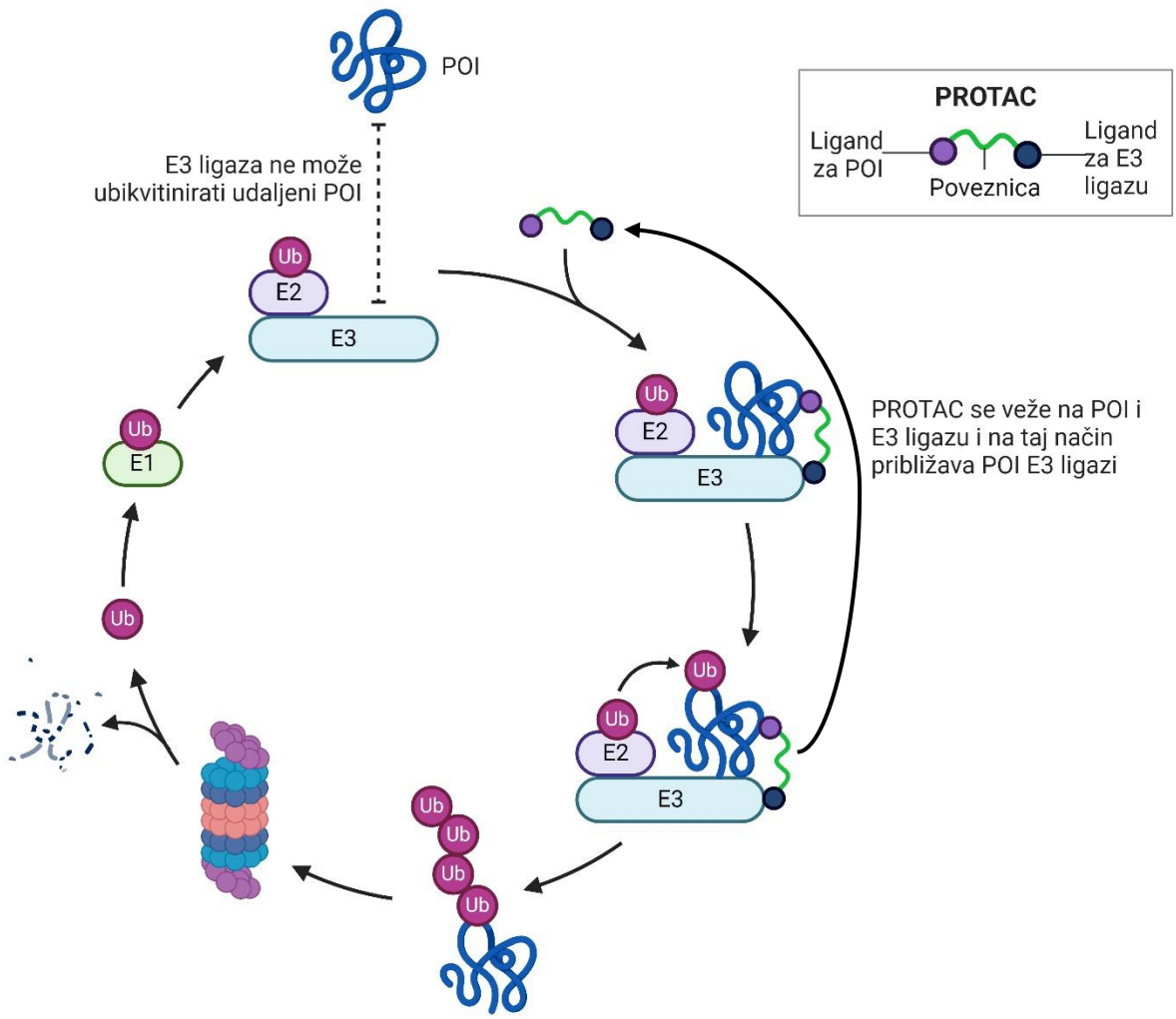
3.1.2.1.1. Mehanizam djelovanja

PROTAC-i su heterobifunkcionalne kimerne molekule posebno dizajnirane za indukciju TPD-a. Sastoje se od tri dijela: liganda za POI, liganda za E3 ubikvitin ligazu i poveznice koja ih spaja (Slika 12). Istovremenim vezanjem PROTAC-a na POI i E3 ligazu nastaje ternarni kompleks što približava POI E3 ligazi te je omogućena ubikvitinacija POI i posljedična razgradnja pomoću UPS-a (Slika 13).



Slika 12. *Shematski prikaz PROTAC-a (kreirano u BioRender.com).*

Za razliku od mehanizma djelovanja tradicionalnih lijekova koji se zasniva na zauzetosti veznog mjesta, PROTAC-i djeluju katalitički. U substehiometrijskoj koncentraciji potiču razgradnju POI-a i na taj način utječu na sve funkcije proteina. Primjerice kinaze, osim enzimske, imaju i funkciju konstrukcijskog proteina, odnosno djeluju kao okosnice oko kojih se formiraju proteinski kompleksi koji sudjeluju u staničnoj signalizaciji. Prednost razgradnje kinaza u odnosu na inhibiciju je eliminacija svih funkcija proteina (36).



Slika 13. *TPD posredovana PROTAC-om (kreirano u BioRender.com).*

Zbog vrlo modularne strukture, PROTAC-i, te općenito multivalentni degraderi, se u teoriji mogu pripraviti za usmjeravanje razgradnje bilo koje mete povezivanjem liganada za različite POI i E3 ligaze preko poveznice. To je jedan od razloga zašto broj predstavnika ove skupine degradera puno brže raste u usporedbi s monovalentnim molekulskim ljepilima. Do danas su razvijeni mnogobrojni PROTAC-i za razgradnju različitih POI uključenih u patofiziologiju brojnih bolesti, a više od 25 PROTAC-a se trenutno nalazi u kliničkim ispitivanjima (36,57,58).

3.1.2.1.2. Nastajanje ternarnog kompleksa i kooperativnost

Nastajanje ternarnog kompleksa POI-PROTAC-E3 ključni je događaj u mehanizmu djelovanja PROTAC-a i drugih degradera (60).

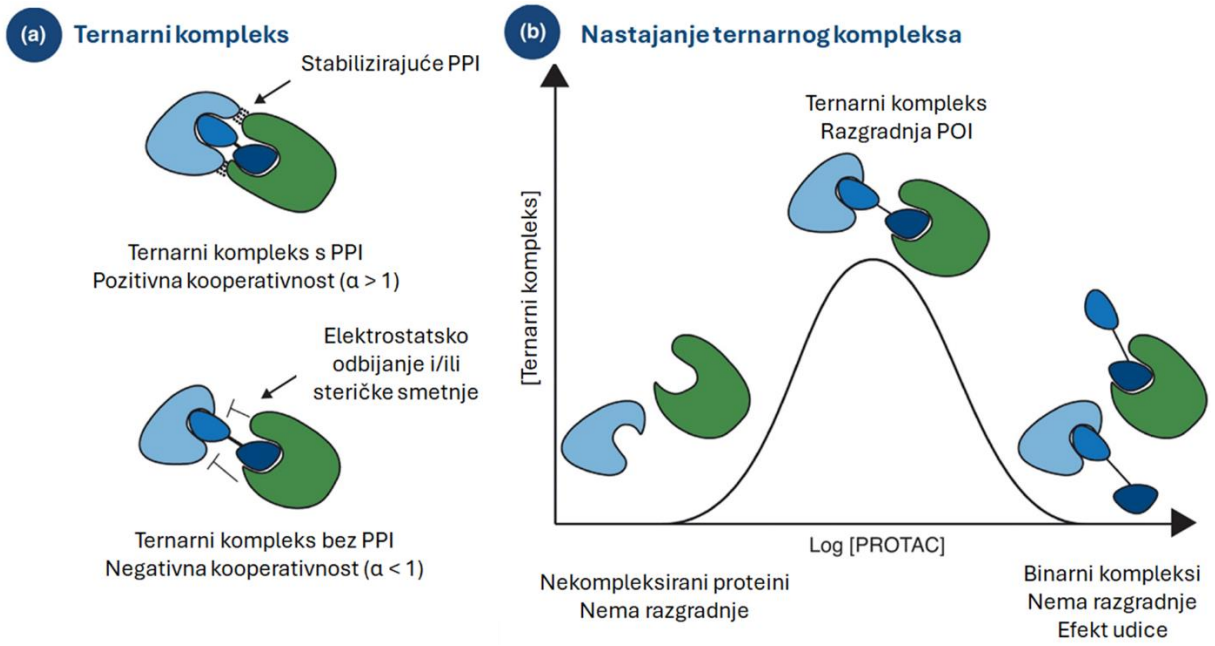
Orijentacija i pozicioniranje PROTAC-a prilikom vezanja na POI i E3 ligazu ključno je za učinkovitu ubikvitinaciju POI. Prava vezna poza omogućuje optimalne interakcije između PROTAC-a, POI i E3 ligaze što povećava afinitet vezanja. Vezna poza ovisi o načinu na koji su se PROTAC veže na POI i E3 ligazu, svojstvima poveznice te načinu na koji proteini stupaju u međusobne interakcije (60).

Kooperativnost ternarnog kompleksa je mjera kojom se opisuje koliko je jači ili slabiji afinitet vezanja unutar ternarnog kompleksa u odnosu na zbroj individualnih binarnih afiniteta vezanja (POI-PROTAC i E3-PROTAC). Kooperativnost se pojednostavljeno izražava faktorom kooperativnosti α, koji predstavlja omjer afiniteta vezanja binarnog i ternarnog kompleksa (jednadžba (1)) (60). Afinitet vezanja izražen je ravnotežnom konstantom disocijacije (K_d).

$$\alpha = \frac{K_d\ (binarni)}{K_d\ (ternarni)} \qquad (1)$$

Ako vezanje PROTAC-a na jedan protein povećava afinitet vezanja na drugi protein, govorimo o pozitivnoj kooperativnosti. Drugim riječima, afinitet vezanja ternarnog kompleksa tada je veći od afiniteta vezanja binarnog kompleksa ($K_d\ (binarni) > K_d\ (ternarni)$) i vrijedi $\alpha > 1$ (Slika 14a, gore). U tom slučaju je nastajanje ternarnog kompleksa favorizirano i nastaju dodatne PPI. U obrnutom slučaju, kada je $\alpha < 1$, govorimo o negativnoj kooperativnosti, što znači da nastajanje binarnog kompleksa ometa nastajanje ternarnog zbog steričkih smetnji, elektrostatskog odbijanja i/ili nepovoljne entropije vezanja (Slika 14a, dolje). U slučaju kada je $\alpha = 1$, sustav je

nekooperativan, tj. binarni kompleks nema utjecaj na nastajanje ternarnog kompleksa i afinitet vezanja je nepromijenjen (61).



Slika 14. *a) Pozitivna kooperativnost je postignuta kada su prisutne stabilizirajuće PPI između POI i E3 (gore), dok se negativna kooperativnost primjećuje kada dolazi do elektrostatskog odbijanja i/ili steričkih smetnji između POI i E3 (dolje), b) Nastajanje ternarnog kompleksa i efekt udice. POI je označen svijetloplavo, E3 ligaza zeleno, POI ligand plavo, E3 ligand tamnoplavo i poveznica crno (prilagođeno prema* (62)*, uz licencu CC BY-NC-ND).*

Kod PROTAC-a kooperativnost potiču interakcije između dva proteina (POI i E3) u induciranom ternarnom kompleksu, ali i nove interakcije i konformacijske promjene unutar samog PROTAC-a koje dodatno potiču nastajanje ternarnog kompleksa ili ga otežavaju. Kooperativnost se uglavnom ostvaruje slabim interakcijama između površina dva proteina koje su udaljene od veznog mjesta (60).

Stehiometrija vezanja je još jedan ključni faktor kod PROTAC-a jer ternarni kompleks tipično treba biti u obliku 1 : 1 : 1, tj. jedna molekula PROTAC-a veže jednu molekulu POI i jednu molekulu E3. Pri niskim koncentracijama PROTAC se učinkovito veže na E3 ligazu i POI pri čemu nastaje stabilni ternarni kompleks. Kako koncentracija PROTAC-a raste, nastaje sve više ternarnog kompleksa i razgradnja postaje maksimalno učinkovita. Međutim, pri vrlo visokim koncentracijama PROTAC-a može doći do tzv. efekta udice (engl. *hook effect*) (Slika 14b) kada se učinkovitost razgradnje smanjuje. Do ovoga dolazi zbog zasićenja veznih mjesta na oba proteina pa prevladavaju neproduktivni binarni kompleksi umjesto ternarnog. Potrebno je odrediti optimalan raspon koncentracija PROTAC-a unutar kojeg je nastajanje ternarnog kompleksa maksimizirano, a efekt udice izbjegnut. Osim pažljivim izborom koncentracije, efekt udice se može izbjeći i optimiziranjem poveznice (60).

Vrijeme trajanja interakcija u ternarnom kompleksa je također važno. PROTAC mora dovoljno dugo biti vezan za dva proteina kako bi se mogla uspješno odvijati ubikvitinacija. To se uglavnom odražava na konstantu brzine disocijacije kompleksa (k_{off}). Manje vrijednosti k_{off} bi trebale osigurati dovoljno vremena ubikvitinacijskom sustavu za uspješnu ubikvitinaciju POI koji se u ternarnom kompleksu nalazi na ograničenom prostoru u blizini supstratnog receptora. S druge strane, veće vrijednosti k_{off} bi mogle skratiti vrijeme trajanja interakcija u ternarnom kompleksu toliko da ne može doći do uspješne ubikvitinacije, što se nekad može nadoknaditi ako je konstanta brzine nastajanja ternarnog kompleksa k_{on} dovoljno velika. Međutim, male vrijednosti k_{off} mogle bi onemogućiti dovoljno brzu disocijaciju kompleksa pa učinkovita razgradnja POI neće biti moguća zbog katalitičke prirode PROTAC-a (60).

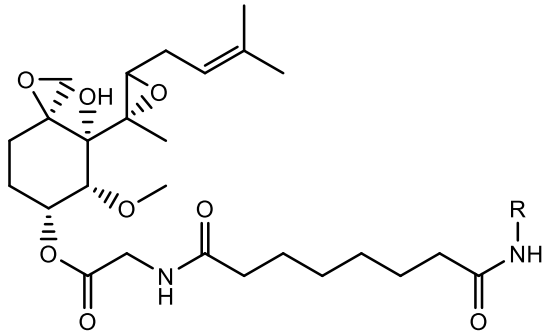
Kod PPI koncept plastičnosti predstavlja mogućnost zauzimanja različitih konformacija, odnosno stupanja u interakcije s veznim partnerom na više različitih načina. Kako PROTAC-i uglavnom

induciraju slabe PPI, vjerojatno će postojati više različitih veznih poza s jednako slabim induciranim PPI koje doprinose nastajanju ternarnog kompleksa. Visoka plastičnost može povećati sposobnost induciranja razgradnje za određeni par E3-POI. Zbog velikog broja veznih poza ili dinamičnije fleksibilnosti spriječeno je zaključavanje kompleksa u neproduktivnom obliku (60).

Svi ternarni kompleksi posjeduju određen stupanj fleksibilnosti i dinamičnosti. Međutim, dok je mnogo degradera potentno zbog visoke fleksibilnosti ternarnih kompleksa, kod drugih uspješnih degradera izgleda da je broj veznih poza ograničen. Još uvijek ne postoje sustavne studije dinamične prirode ternarnih kompleksa induciranih degraderima jer je fleksibilnost intrinzično teško proučavati, ali sigurno postoje određeni parametri koji usmjeravaju produktivnu razgradnju (60).

3.1.2.1.3. Razvoj PROTAC-a

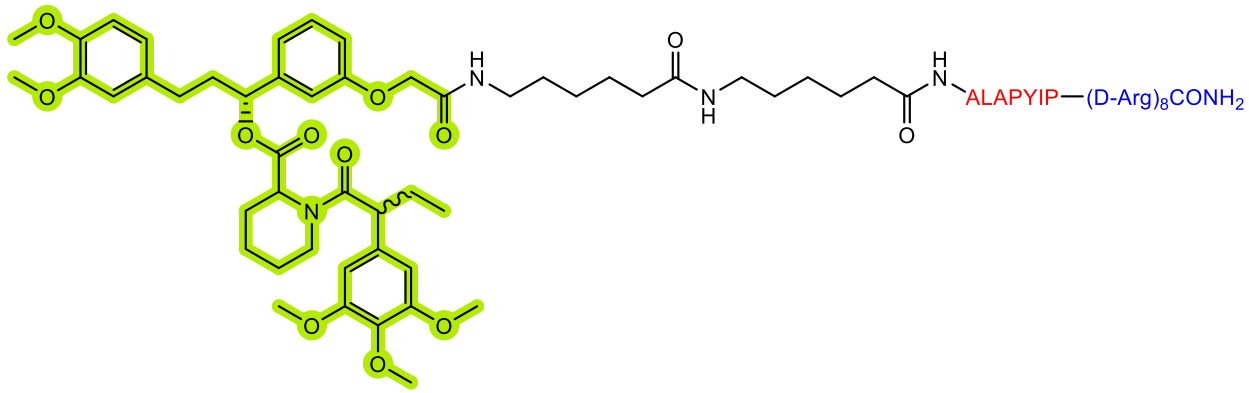
Prvi PROTAC-i su bili peptidne strukture i razvijeni su 2001. g. u grupi prof. Crewsa. Protac-1 (Slika 15) pripravljen je kako bi potaknuo razgradnju metionin aminopeptidaze-2 (MetAP-2) posredovanu kompleksom E3 ligaze Skp1-Cullin-F-box (SCF) (41). Za interakciju sa SCF bio je potreban dvostruko fosforiliran IκBα dekapeptid kojeg prepoznaje F-box protein. U Protac-1, IκBα povezan je poliglicil-suberatnom poveznicom s ovalicinom, kovalentnim ligandom za MetAP-2. Jednako kao i ovalicin, Protac-1 se kovalentno veže na MetAP-2 i iz tog razloga ne djeluje substehiometrijski, za razliku od PROTAC-a novijih generacija. Također, Protac-1 ne ulazi u stanicu zbog čega je morao biti mikroinjektiran u stanicu te su jedino bili mogući *in vitro* eksperimenti bili ograničeni na (41).



Slika 15. *Struktura prvog PROTAC-a objavljena 2001. g.* (41).

Nedugo nakon otkrića PROTAC-a prve generacije, ista istraživačka skupina je postigla je razgradnju ER i AR koristeći dva nekovalentna PROTAC-a s prethodno opisanim bisfosforiliranim dekapeptidom kao ligandom za E3. Iako je dokazan koncept kemijske razgradnje proteina te su ovi PROTAC-i djelovali katalitički, još uvijek nisu mogli ući u stanicu (63).

Otkriće hidroksiliranog HIF1α koji se veže na $CRL2^{VHL}$ (64) omogućilo je dizajn permeabilnih PROTAC-a koji mogu inducirati razgradnju velikog broja unutarstaničnih POI. Crews i Deshaies su 2004. g. prethodno korišten ligand za E3 ligazu, bisfosforilirani dekapeptid, zamijenili heptapeptidom, odnosno najmanjim mogućim dijelom strukture HIF1α koji je nužan za vezanje na VHL. Kako bi se postigla stanična permeabilnost, ovi PROTAC-i su bili označeni poliargininskim lancem vezanim na odgovarajući ligand za POI (Slika 16), a inducirali su razgradnju AR-a ili fluorescentno obilježenog mutiranog proteina koji veže FK506 i rapamicin (FKBP) (26,65). Peptidni PROTAC-i koji mobiliziraju VHL pripravljeni su za uspješnu razgradnju različitih POI – ER (66–68), AhR (69,70), X-proteina virusa hepatitisa B (71), Akt (72), Smad3 (73) i proteina tau (74).

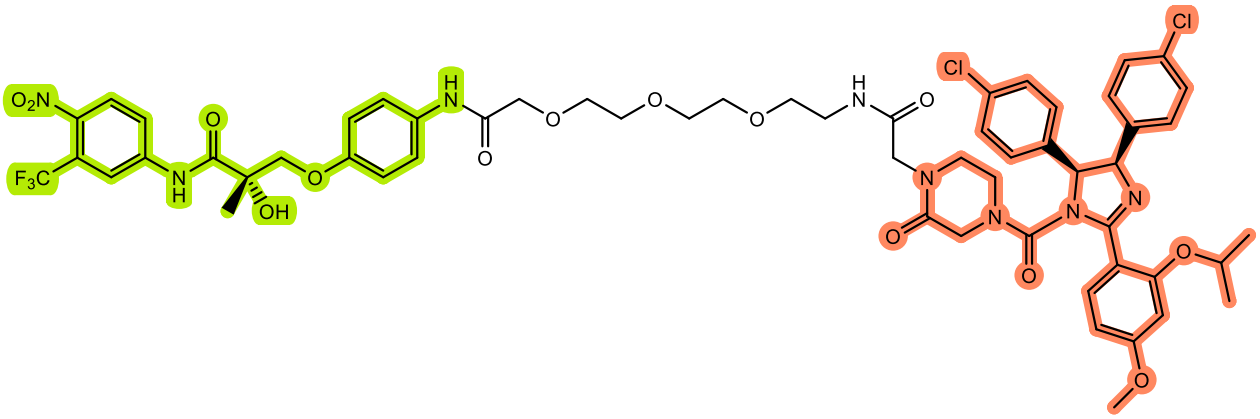


Slika 16. *Struktura PROTAC-4 za razgradnju fluorescentno obilježenog mutiranog FKBP. Zeleno je označen AP21998 (ligand za mutirani FKBP), crno je poveznica, crveno najmanji aminokiselinski slijed nužan za vezanje na VHL (ligand za E3 ligazu), a plavo poliargininski lanac koji omogućuje ulazak u stanicu* (65).

Prvi PROTAC-i koji su proučavani *in vivo* bili su dipeptidi ovisni o fosforilaciji (PhosphoPROTAC). PhosphoPROTAC-i su prolijekovi čija aktivacija ovisi o fosforilaciji uz TrkA ili uz eritroblastozni onkogen (ErbB3), nakon čega ih prepoznaju njihove prave mete, tj. nizvodni signalni proteini receptor faktora rasta fibroblasta 2α ili fosfatidilinozitol-3-kinaza (PI3K), redom, koji se potom ubikvitiniraju i razgrađuju putem UPS-a. Ovi prolijekovi PROTAC-a pokazali su određenu *in vivo* učinkovitost nakon ponovljene intraperitonealne primjene na mišjem modelu karcinoma, unatoč maloj statističkoj značajnosti (75).

Iako su ova otkrića bila od izuzetne važnosti za područje TPD-a, peptidni PROTAC-i bili su učinkoviti tek u mikromolarnoj koncentraciji i vrlo često osjetljivi na djelovanje endogenih fosfataza, zbog čega je postojala potreba za istraživanjem PROTAC-a prikladnijih fizikalno-kemijskih svojstava za lijekove (7).

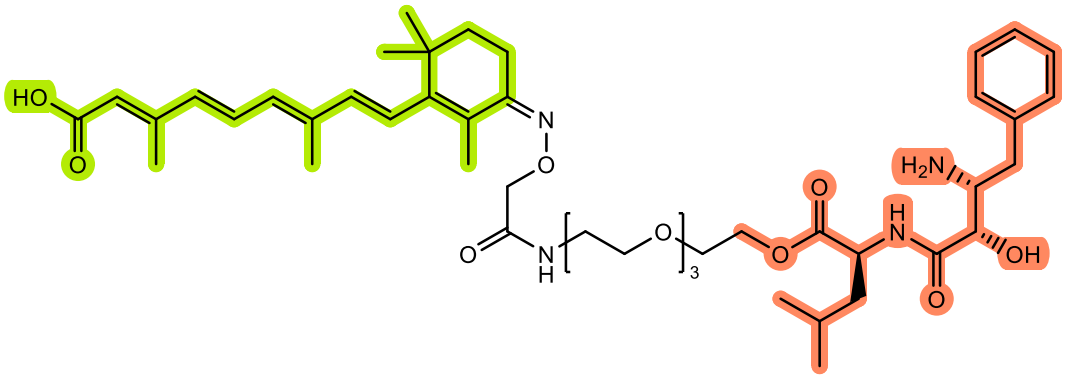
Istraživačka skupina prof. Crewsa 2008. g. dizajnirala je prvi PROTAC malu molekulu koristeći ligand za MDM2 E3 ligazu nutlin-3a koji je zamijenio prethodno korištene peptidne ligande. Nutlin-3a je bio povezan s nesteroidnim antagonistom AR-a pomoću polietilenglikolne (PEG) poveznice (Slika 17) te je uzrokovao razgradnju AR-a u humanim stanicama karcinoma grlića maternice (HeLa) (45). Međutim, razgradnja AR-a posredovana MDM2 bila je ograničena te je otkriveno da nutlini mogu bez posredovanja E3 ligaze izravno inducirati razgradnju AR-a zbog čega MDM2 u pravilu nije dobar odabir E3 ligaze (42).



Slika 17. *Struktura prvog PROTAC-a male molekule koji inducira razgradnju AR-a posredovanjem MDM2. Zeleno je označen ligand za AR, crno PEG poveznica, a narančasto nutlin-3a (ligand za MDM2)* (42).

Druga generacija PROTAC-a malih molekula bili su tzv. SNIPER-i koji pomoću liganda za cIAP, MeBS-a, induciraju razgradnju staničnog proteina koji veže retinoičnu kiselinu (CRABP-I i -II), pri čemu ja kao ligand za CRABP-I i -II korištena *sve-trans*-retinoična kiselina (engl. *all-trans-retinoic acid*, ATRA) (Slika 18) (47). Spektar meta SNIPER-a proširen je na receptor za retinoičnu kiselinu (RAR), ER, AR, BCR-ABL tirozin kinazu i dr. (7). No usprkos boljoj permeabilnosti, SNIPER-i su uzrokovali autoubikvitinaciju i razgradnju cIAP E3 ligaze, zbog čega je učinkovitost razgradnje SNIPER-ima bila ograničena (42). Ohoka i sur. su iz tog razloga zamijenili MeBS

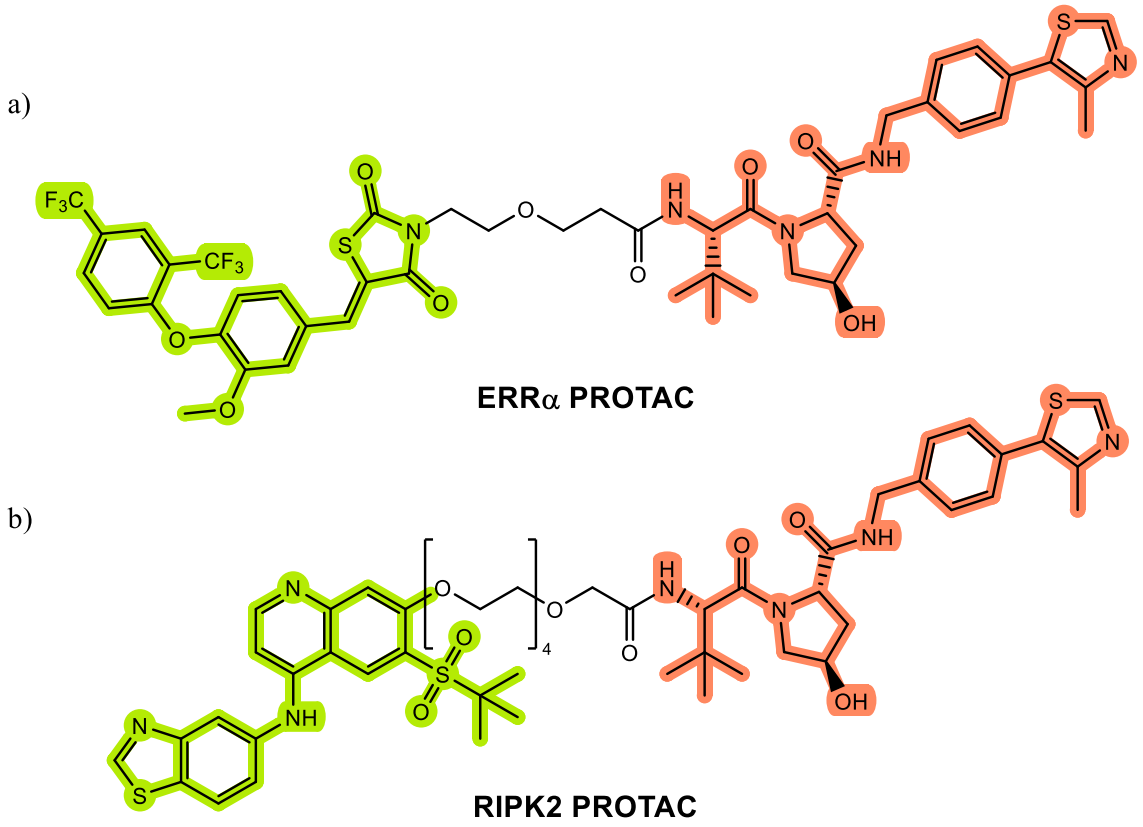
peptidomimetičkim antagonistima IAP te su postigli razgradnju ER *in vivo* na mišjem modelu ER^+ karcinoma dojke. Ovi SNIPER-i su u manjoj mjeri uzrokovali razgradnju samog IAP-a (76,77).



Slika 18. *Struktura prvog SNIPER-a. Zeleno je označena ATRA (ligand za CRABP-I i -II), crno PEG poveznica, a narančasto MeBS (ligand za cIAP)* (47).

Pravi uzlet područja TPD-a dogodio se 2015. g. kada je dokazana selektivna razgradnja ciljnih proteina i učinkovitost PROTAC-a *in vivo* (49,78). Otkriće nepeptidnih malih molekula inhibitora VHL-a, kao što su VH032, VH101 i VH298 (26), omogućilo je racionalan dizajn potentnih i selektivnih PROTAC-a poboljšanih fizikalno-kemijskih svojstava koji se temelje isključivo na malim molekulama (49). Ovi ligandi za VHL u strukturi imaju zadržan središnji (2*S*,4*R*)-hidroksiprolin, ali su im smanjene peptidna priroda i relativna molekulska masa (~400 Da). Pomoću dostupne kristalne strukture VHL-a i kombinacije SBDD-a i FBDD-a, K_d ovih spojeva smanjen je ispod 1 μM, a fizikalno-kemijska svojstva, kao što su topološka ploština polarne površine (TPSA), logaritam koeficijenta razdjeljenja (log *P*) te broj donora i akceptora vodikove veze (HBD i HBA, redom), većinom su zadovoljavala Lipinskijeva i Veberova pravila za oralno bioraspoložive lijekove (26,79). Za razliku od peptidnih PROTAC-a, vjerojatnije je da će PROTAC-i koji su u potpunosti male molekule biti permeabilni te da će se moći u odgovarajućem

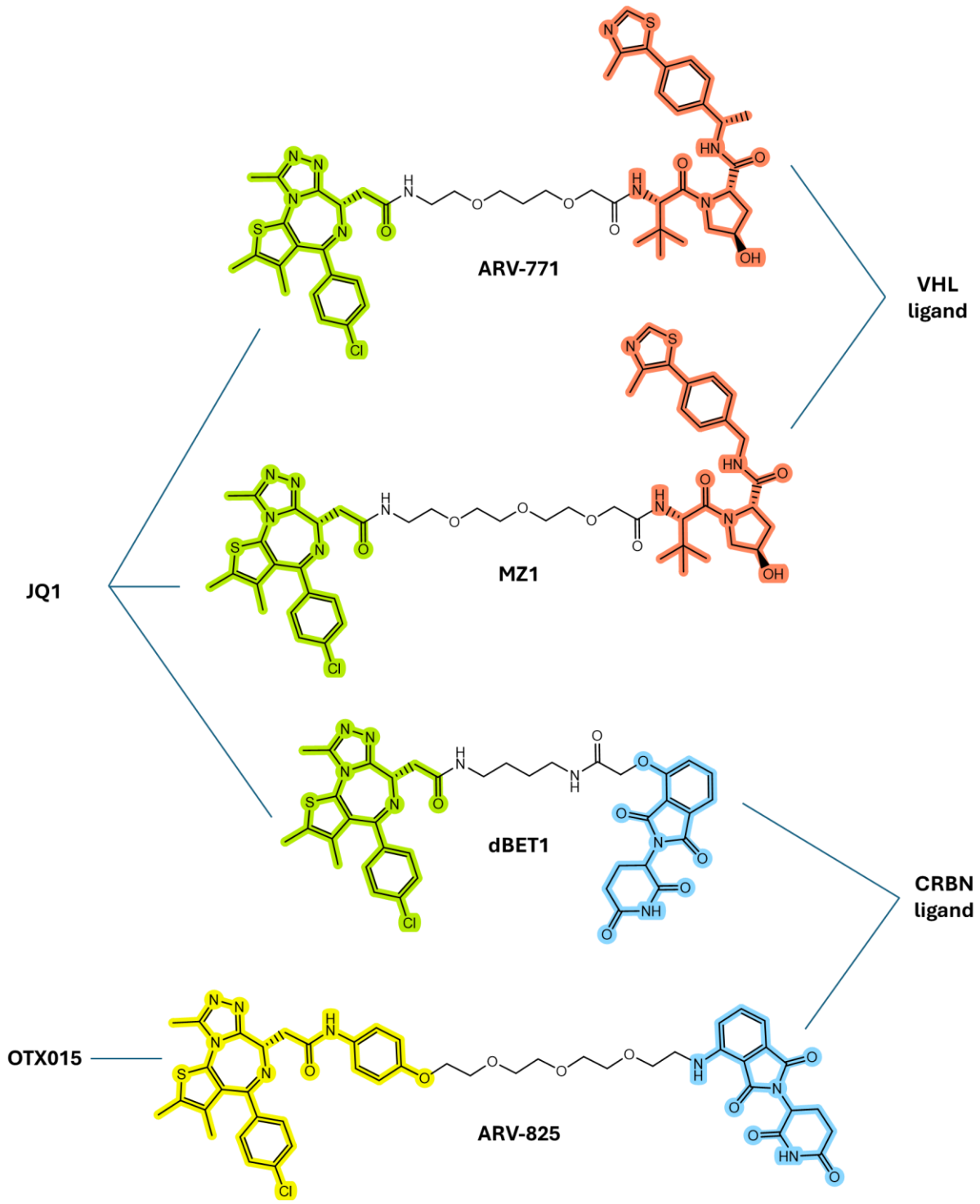
opsegu apsorbirati što je jedan od preduvjeta za uspješan razvoj lijekova. Bondenson i sur. su upotrijebili upravo takve peptidomimetike kao ligande za VHL kako bi postigli razgradnju receptora α povezanog s estrogenim receptorima (engl. *estrogen receptor-related receptor alpha*, ERRα) i serin/treonin protein-kinaze RIPK2 kod miševa te su dokazali da PROTAC-i djeluju substehiometrijski (Slika 19) (49).



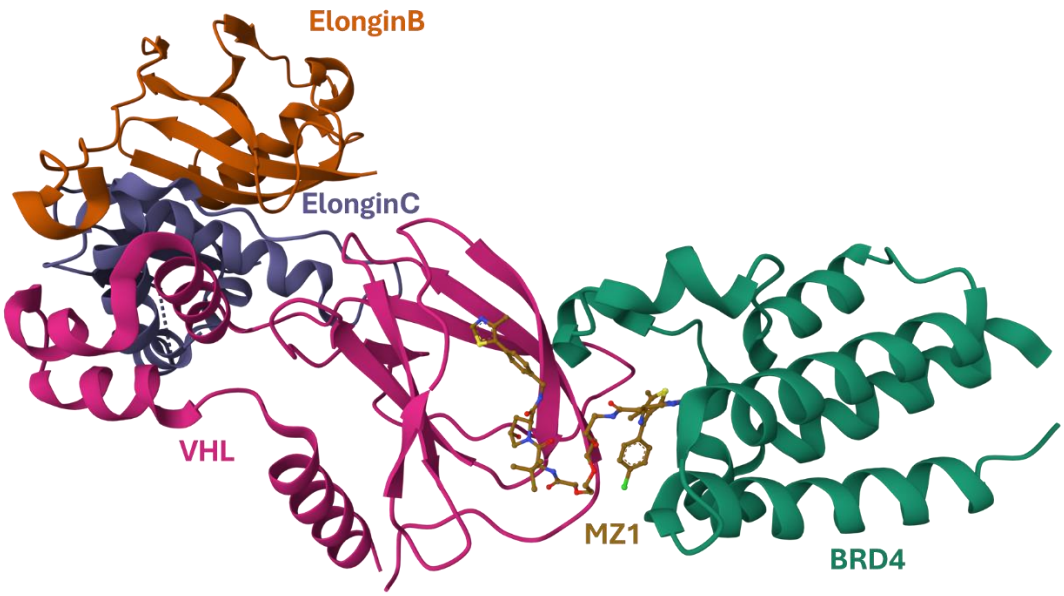
Slika 19. *Strukture VHL PROTAC-a koji induciraju in vivo razgradnju: a) ERRα i b) RIPK2* (49). *Zeleno su označeni ligandi za ERRα (a) i RIPK2 (b), crno poveznice, a narančasto VHL ligand.*

PROTAC ARV-771 je mala molekula, neselektivni degrader proteina bromodomene i ekstraterminalne domene (engl. *bromodomain and extraterminal domain*, BET) koji se sastoji od BET inhibitora JQ1 i VH032 kao liganda za VHL E3 ligazu (Slika 20) (80). (+)-JQ1 je potentan

neselektivni triazolodiazepinski inhibitor BET proteina aktivan *in vivo* koji se kompetitivno veže na bromodomene BET proteina (K_d 50–90 nM) čime su spriječene PPI s acetiliranim histonima i transkripcijskim faktorima (81,82). U odnosu na inhibiciju BET pomoću JQ1, ARV-771 je *in vitro* i *in vivo* pokazao značajno poboljšanu učinkovitost na karcinom prostate ovisan o kastraciji (engl. *castration-resistant prostate cancer*, CRPC) (80). PROTAC mala molekula MZ1 (Slika 20) prvi je selektivni degrader BRD4 koji se zasnivao na VHL-u. MZ1 se također sastojao od BET inhibitora JQ1, a u odnosu na ARV-771, selektivna razgradnja BRD4 postignuta je variranjem duljine poveznice (83). BRD4 je transkripcijski koaktivator iz porodice BET proteina uključen u regulaciju genske ekspresije te staničnu proliferaciju i preživljavanje, a poremećena aktivnost BRD4 povezana je s ekspresijom onkogena, karcinogenezom i upalom (84). Gadd i sur. objavili su kristalnu strukturu MZ1 u ternarnom kompleksu s VHL i BRD4 (Slika 21) (85). To je prva ikada objavljena kristalna struktura ternarnog kompleksa PROTAC-a, a omogućila je uvid u mehanizam njihovog djelovanja. Iz kristalne strukture je vidljivo da se PROTAC smota prilikom vezanja u šupljinu između VHL i BRD4 zbog čega dolazi do približavanja VHL i BRD4 te ovi proteini stupaju u snažne PPI što rezultira izrazitom stabilnošću i kooperativnošću kompleksa.



Slika 20. *Strukture PROTAC-a koji potiču razgradnju BET proteina* (78,80,83,86).



Slika 21. *PROTAC MZ1 u kompleksu s drugom bromodomenom BRD4 i VHL:ElonginC:ElonginB dijelu CRL2^{VHL} (PDB kod: 5T35).*

Potaknuti otkrićem mehanizma djelovanja talidomida i njegovih analoga (52), nekoliko istraživačkih skupina iskoristilo je talidomid ili njegove derivate kao ligande za CRBN podjedinicu E3 ligaze te pomoću takvih PROTAC-a postiglo učinkovitu razgradnju BRD4 *in vitro* i *in vivo*. Winter i sur. su pripravili PROTAC-e za razgradnju BRD4 koji su se, kao i prethodno opisani PROTAC-i, sastojali od JQ1 inhibitora BRD4, ali su umjesto VHL liganda imali CRBN ligand 4-hidroksitalidomid. Najučinkovitiji PROTAC bio je dBET1 (Slika 20) koji je uzrokovao razgradnju BRD2, BRD3 i BRD4 na mišjem modelu leukemije u niskoj nanomolarnoj koncentraciji (78). Lu i sur. su opisali vrlo potentan PROTAC ARV-825 (Slika 20) koji se sastojao od neselektivnog BET inhibitora OTX015 i CRBN liganda pomalidomida. ARV-825 je u pikomolarnoj koncentraciji uzrokovao selektivnu razgradnju BRD4 u staničnoj liniji Burkittovog limfoma (BL) te je značajno pojačao apoptozu stanica limfoma u usporedbi s OTX015 (86). U daljnjim studijama pokazao je

učinkovitost i na *in vivo* modelu akutne mijeloične leukemije (AML) (87). Ovi PROTAC-i su u odnosu na roditeljske male molekule BET inhibitore bili učinkovitiji i selektivniji (78,86). Ovim studijama je pokazano da se selektivnost PROTAC-a može postići odabirom E3 ligaze, izlaznog vektora na E3 ligandu te variranjem vrste i duljine poveznice.

Weng i sur. su kreirali bazu PROTAC-a (PROTAC-DB) koja objedinjuje podatke o kemijskim strukturama, biološkom djelovanju (koncentraciji koja uzrokuje razgradnju 50 % proteina (DC_{50}), maksimalnom postotku razgradnje (D_{max}) ili postotku razgradnje pri određenoj koncentraciji, koncentraciji koja uzrokuje 50 %-tnu inhibiciju enzima (IC_{50}) ili 50 %-tnu inhibiciju rasta stanica (GI_{50})), fizikalno-kemijskim svojstvima (afinitetu vezanja izraženom kao K_d, termodinamičkim parametrima vezanja) te PK parametrima (stanična permeabilnost, T_{max}, $t_{1/2}$, C_{max}, AUC, klirens, bioraspoloživost i dr.) PROTAC-a, ovisno o dostupnosti podataka u literaturi (88). Baza PROTAC-a se od kraja 2022. do danas gotovo udvostručila te trenutno sadrži 6111 PROTAC-a, 569 liganada za POI, 107 E3 liganada, 2753 poveznice i 959 modela ternarnih kompleksa (89).

3.1.2.1.4. Dizajn PROTAC-a

Prilikom dizajna PROTAC-a prvenstveno je potrebno odabrati metu, odnosno POI i njen ligand, a zatim E3 ligazu i poveznicu. Strukturna raznolikost i optimizacija PROTAC-a postiže se variranjem liganada za POI i E3 ligazu, vrste i duljine poveznice te mjesta povezivanja i izlaznih vektora.

Odabir mete (POI)

Tradicionalan pristup otkriću i razvoju novih lijekova uglavnom je usmjeren na razvoj kompetitivnih ili alosteričkih inhibitora enzima ili agonista/antagonista receptora velikog afiniteta vezanja. Iako je ovaj pristup relativno uspješan, ne rješava problem djelovanja na proteine sa širokom i plitkom površinom na koje se ligandi teško mogu vezati. Logičan odabir mete PROTAC-a bi bili upravo takvi proteini „na koje se ne može djelovati“ tradicionalnim lijekovima ili za koje ne postoje dobri inhibitori, s obzirom na veliku relativnu molekulsku masu PROTAC-a i loša PK svojstva. Naime, PROTAC-i ne podliježu Lipinskijevom pravilu 5 za oralno bioraspoložive lijekove, već pripadaju području tzv. molekula „izvan pravila 5“ (engl. *beyond rule of 5*, bRo5) (57).

Za odabir mete PROTAC-a ne postoje uvriježena pravila. Međutim, općenito se smatra da idealna meta, osim što se na nju ne može djelovati, treba biti patološki promijenjen protein (npr. pretjerano eksprimiran, mutiran, agregiran ili eksprimiran u krivom tkivu), treba imati površinu preko koje može stupiti u interakcije s E3 ligazom, nestrukturiranu regiju koja će ga usmjeriti u proteasom i vezno mjesto za malu molekulu kojem E3 ligaza može pristupiti (50). Vrlo zanimljivi proteini za razgradnju PROTAC-ima su konstrukcijski proteini, transkripcijski faktori i drugi signalni proteini

na koje se inače ne može djelovati tradicionalnim lijekovima. Primjeri meta „na koje se ne može djelovati“ tradicionalnim lijekovima, a čija je razgradnja postignuta PROTAC-ima su protein tau (90), signalna molekula KRAS (engl. *Kirsten rat sarcoma virus*) GTP-aza (91) i signalni transduktor i aktivator transkripcije 3 (engl. *signal transducer and activator of transcription 3*, STAT3) (92). Čak i kada je odabrani ligand za POI neselektivan, PROTAC-ima se može postići selektivna razgradnja mutiranih proteina i izoformi karakterističnih za određenu bolest, dok je malim molekulama teško postići selektivnu inhibiciju takvih meta (57).

Međutim, nisu sve mete pogodne za razgradnju. Kemoproteomika omogućava sustavno pretraživanje meta podložnih razgradnji pomoću masene spektrometrije. Pomoću neselektivnih degradera koji induciraju razgradnju više različitih meta, tzv. pandegradera, procjenjuje se podložnost proteina razgradnji na razini cijelog proteoma ili dijela proteoma (npr. kinoma) (93). Za bolje razumijevanje i procjenu podložnosti POI razgradnji, Zhang i sur. su razvili model strojnog učenja (engl. *Model-based Analysis of Protein Degradability*, MAPD) koji procjenu temelji na intrinzičnim svojstvima proteina. Proteini s većom vrijednosti MAPD imaju veću vjerojatnost za razgradnju TPD-om. Međutim, proteini s manjim MAPD neće nužno biti teže razgrađeni, nego imaju manje strukturnih karakteristika koje su važne za TPD, primjerice manji broj lizinskih ostataka dostupnih za vezanje Ub-a (94).

Odabir liganda za POI

U klasičnom dizajnu PROTAC-a korišteni su dostupni ligandi za odabranu metu, većinom inhibitori enzima. Razvojem proteomike identificirane su nove mete pogodne za razgradnju. Međutim, za takve mete nisu poznati ligandi i smatraju se metama na koje se „ne može djelovati“,

zbog čega su istraživanja liganada za takve mete iznimno aktualna. Velika prednost PROTAC-a je što odabir liganda za POI nije ograničen na potentne i selektivne inhibitore koji se moraju čvrsto vezati na metu, odnosno nije bitno dolazi li do određenog farmakološkog učinka uslijed vezanja liganda na metu (50). Na primjer, IACS-9571, snažan ligand za bromodomenu TRIM24, transkripcijski regulator čija je ekspresija povećana u različitim vrstama karcinoma, sam po sebi nema antitumorsko djelovanje, ali kada čini dio strukture PROTAC-a, pospješuje selektivnu razgradnju TRIM24 posredovanu VHL-om i ima antiproliferativno djelovanje (95). Uglavnom se smatra da ligandi mogu imati umjereni afinitet vezanja (≥ 1–500 nM) (50).

U odabiru odgovarajućeg liganda za odabrani POI mogu pomoći različite baze podataka o objavljenim ligandima i proteinima na koje se vežu. DrugBank (https://go.drugbank.com/) i ChEMBL (https://www.ebi.ac.uk/chembl/) su najveće baze koje sadrže informacije vezane za lijekove i dobra su početna točka u dizajnu PROTAC-a. BindingDB (www.bindingdb.org) je baza koja sadrži podatke o interakcijama ligand–protein i patentima (96).

Jedna od metoda pronalaska liganada za mete „na koje se ne može djelovati“ je pomoću DNA-kodirajućih knjižnica (DKK) koje sadrže molekule označene jedinstvenim oligonukleotidnim slijedom (kodom) (97). Prednost ovog pristupa je što ne gleda biološko djelovanje liganda (npr. inhibiciju enzima), već isključivo afinitet vezanja. Osim toga, mjesto vezanja DNA koda na ligandu odgovara mjestu vezanja poveznice u budućem PROTAC-u, što dodatno olakšava daljnji dizajn PROTAC-a (98). DKK tehnologija se koristi i za identifikaciju monovalentnih degradera molekulskih ljepila, liganada za E3 ligaze i samih PROTAC-a (25,99,100).

E3 ligaza mora imati osiguran pristup površini ciljnog proteina kako bi se mogla dogoditi ubikvitinacija. Odabir veznog mjesta liganda za POI posebno je važan kod konstrukcijskih proteina jer POI može biti skriven unutar kompleksa, odnosno samo djelomično izložen i dostupan

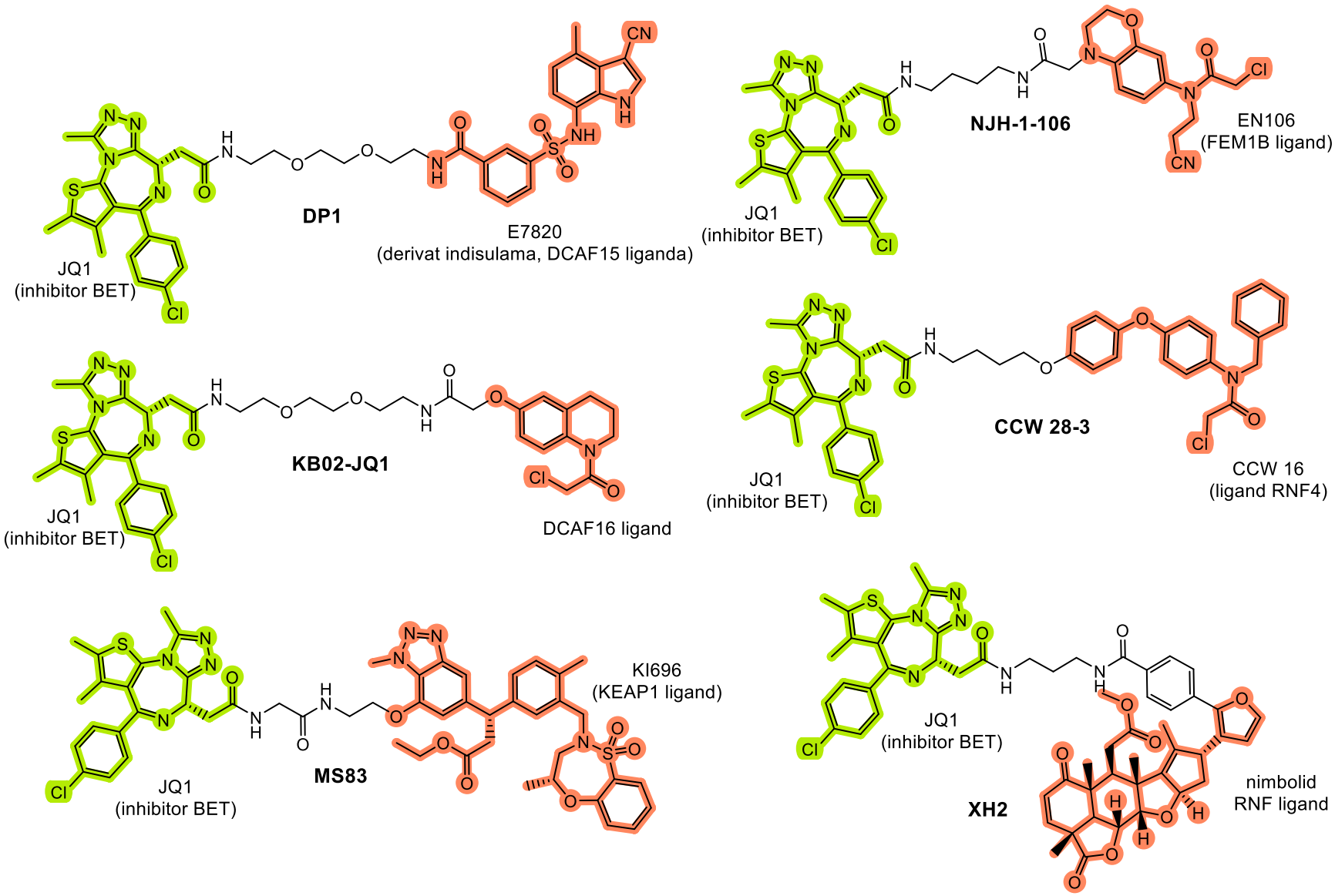
E3 ligazi. Umjesto samog POI, moguće je i neizravno utjecati na razinu POI razgradnjom susjednog proteina u kompleksu. Osim za konstrukcijske proteine i višekomponentne proteinske komplekse, ovaj pristup je koristan za razgradnju transkripcijskih faktora i nekih membranskih proteina (50).

Proteini stanične površine trenutno se ne smatraju dobrim metama PROTAC-a jer je UPS aktivan unutar stanice. Međutim, pomoću sustava za označavanje dTAG, o kojima će kasnije biti riječ, Bensimon i sur. uspjeli su inducirati o UPS-u ovisnu razgradnju transmembranskog transportera iz porodice SLC (engl. *solute carrier*) čiji supstrati ni inhibitori nisu poznati (101). Također, Wang i sur. su pokazali da PROTAC koji se zasniva na CRBN-u potiče *in vitro* razgradnju proteina stanične površine liganda 1 programirane stanične smrti (PDL1) (102).

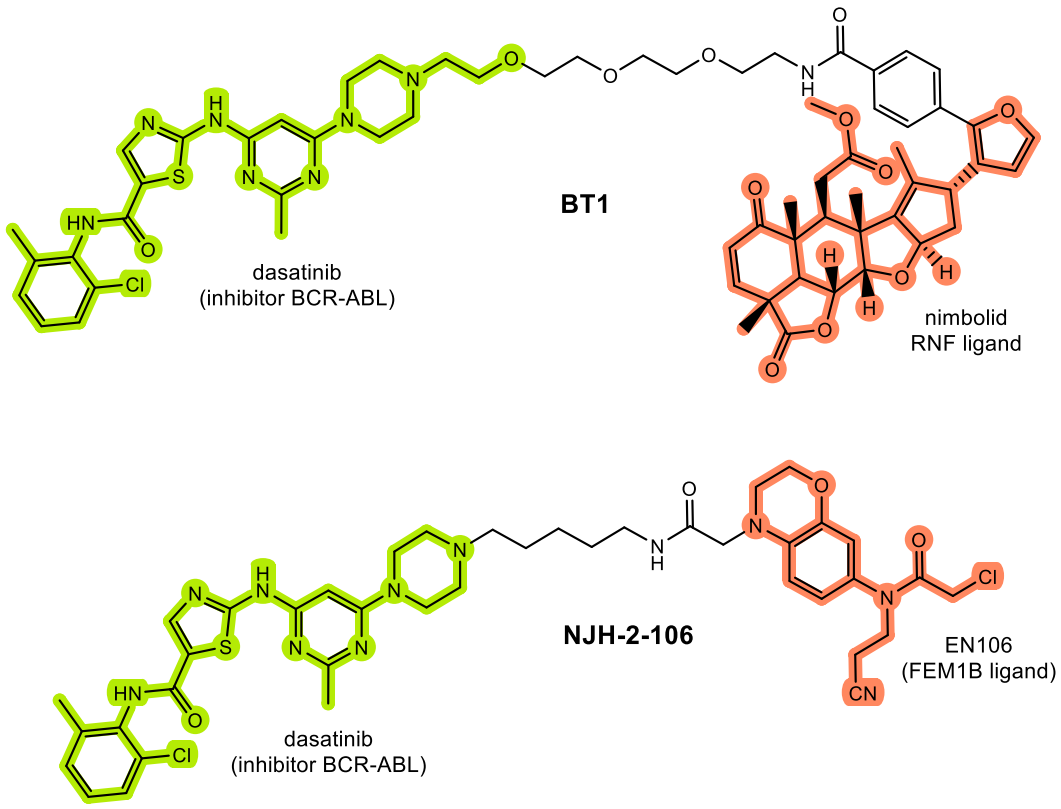
Odabir E3 ligaze

Iako postoji preko 600 različitih E3 ligaza u ljudskom proteomu, za dizajn PROTAC-a je iskorišteno samo 13 E3 ligaza (CRBN, VHL, AhR, cIAP, XIAP, DCAF11, DCAF15, DCAF16, KEAP1, MDM2, RNF4, RNF114, FEM1B), što čini oko 2 % ukupnog E3-oma. Razlog tome je nedostatak njihovih dobrih i selektivnih liganada (103). Najčešće korištene E3 ligaze u TPD-u su CRBN i VHL zbog široke rasprostranjenosti u različitim stanicama i tkivima, dostupnosti malih molekula liganada te mogućnosti razgradnje velikog broja različitih proteina. Važno je napomenuti da svi PROTAC-i u kliničkim ispitivanjima djeluju isključivo preko CRBN-a, s nekoliko izuzetaka koji potiču razgradnju preko VHL-a (57), a o čemu će biti riječ naknadno u poglavlju o kliničkim ispitivanjima.

Danas su vrlo intenzivna istraživanja liganada za druge E3 ligaze koje bi bile prikladne za TPD u čemu u velikoj mjeri pomaže kemoproteomika (104–107). BRD4 je modelna meta koja je vrlo podložna razgradnji putem PROTAC-a te se često koristi kao POI za identifikaciju novih E3 ligaza za PROTAC-e. Primjeri PROTAC-a koji su uspješno inducirali razgradnju BRD4 koristeći nove E3 ligaze (navedene u zagradi) su (Slika 22): DP1 (DCAF15) (108), KB02-JQ1 (DCAF16) (106), MS83 (KEAP1) (109), NJH-1-106 (FEM1B) (110), CCW 28-3 (RNF4) (104) i XH2 (RNF114) (107). PROTAC-i koji su inducirali razgradnju alternativnih meta također koristeći nove E3 ligaze su: PROTAC 21-ARL inducira razgradnju AR-a posredovanu DCAF11 E3 ligazom (111), dok PROTAC-i BT1 i NJH-2-142, koji se sastoje od dasatiniba kao inhibitora tirozin kinaza BCR-ABL i c-ABL te nimbolida ili EN106 kao liganada za RNF114 i FEM1B E3 ligaze, redom, pospješuju selektivnu razgradnju onkogenog fuzijskog proteina BCR-ABL (Slika 23) (105,110).



Slika 22. *Strukture PROTAC-a koji induciraju razgradnju BRD4 posredovanu neuobičajenim E3 ligazama.*



Slika 23. *Strukture PROTAC-a koji induciraju razgradnju BCR-ABL.*

Unatoč činjenici da je uspješna razgradnja BRD4 postignuta posredstvom gotovo svih ispitanih E3 ligaza, ipak nisu sve E3 ligaze pogodne za razgradnju svih meta. Primjer su KEAP1 PROTAC-i koji su potaknuli uspješnu razgradnju BRD4 i kinaze fokalne adhezije (FAK), ali nisu imali utjecaja na Brutonovu tirozin kinazu (BTK), BRD4, CDK4/6 i receptor za epidermalni faktor rasta (EGFR). Ove mete su bile uspješno razgrađene posredstvom CRBN i VHL PROTAC-a (112). Iz tog razloga je u ranoj fazi istraživanja preporučljivo ispitati više različitih ligaza jer se slaba aktivnost PROTAC-a ponekad može poboljšati zamjenom E3 ligaze (96).

Različita ekspresija E3 ligaza u različitim stanicama i tkivima može se iskoristiti za selektivnu TPD, gdje se kao primjer ističe degrader antiapoptotičkog proteina Bcl-xL DT2216 koji, za razliku

od male molekule inhibitora koji čini ligand za POI, ne uzrokuje trombocitopeniju jer je VHL slabo eksprimiran u trombocitima (113). Za razvoj antitumorskih PROTAC-a zanimljive su E3 ligaze koje su pojačano eksprimirane u tumorskom tkivu kako bi se postigla ciljana razgradnja POI u tumoru, a smanjila toksičnost na druga tkiva (50). Međutim, takve E3 ligaze često su eksprimirane i u drugim stanicama koje se brzo dijele (50,114).

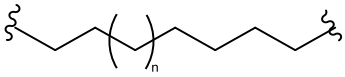
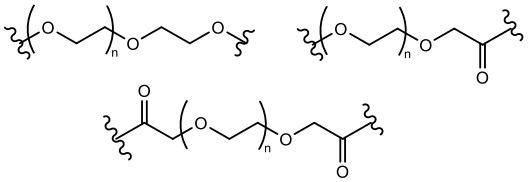
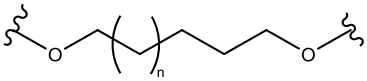
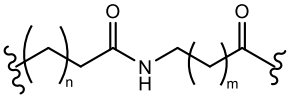
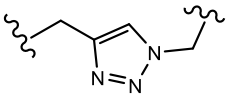
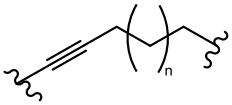
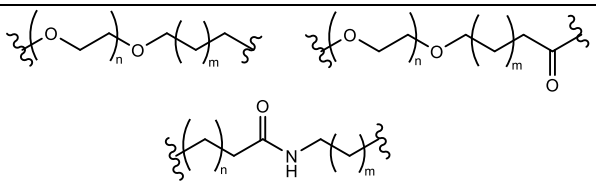
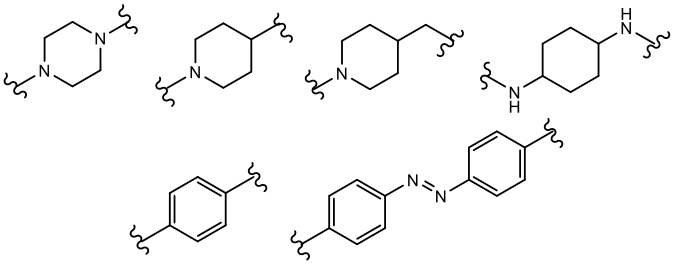
Idealan ligand za E3 ligazu veže se visokim afinitetom na E3 i vrlo sporo disocira. Kovalentno vezanje PROTAC-a na E3 ligazu moglo bi imati prednosti jer tada, umjesto ternarnog, nastaje pseudobinarni kompleks između supstrata i adukta E3-PROTAC, što pojednostavljuje kinetiku vezanja (50,115). Trenutno postoji ograničen broj metoda za selektivno kovalentno vezanje na protein *in situ*. Primjeri elektrofilnih E3 liganada koji se kovalentno vežu na pripadajuće E3 ligaze su prethodno spomenuti nimbolid (RNF ligand) te derivati kloralkana EN106 (FEM1B ligand), KB02 (DCAF16) i CCW 16 (RNF4 ligand). Ovi kovalentni E3 ligandi korišteni su u dizajnu PROTAC-a koji djeluju preko neuobičajenih E3 ligaza. Napretkom bioortogonalne kemije, odnosno kemijskih reakcija koje se odvijaju *in situ* s minimalnim učinkom na funkciju biomakromolekule, vjerojatno će biti moguće dizajnirati PROTAC-e dužeg djelovanja i veće katalitičke učinkovitosti (116).

Liu i sur. su 2023. g. sistematično karakterizirali E3 ligaze s obzirom na njihova temeljna obilježja relevantna za razvoj PROTAC-a koristeći kemoproteomiku i 30-ak dostupnih baza podataka. Identificirali su 76 E3 ligaza koje su najbolji kandidati za PROTAC-e te su razvili i lansirali web portal (https://hanlaboratory.com/E3Atlas/) koji istraživačima pomaže u bržem odabiru E3 ligaza za specifične mete (117).

Odabir poveznice

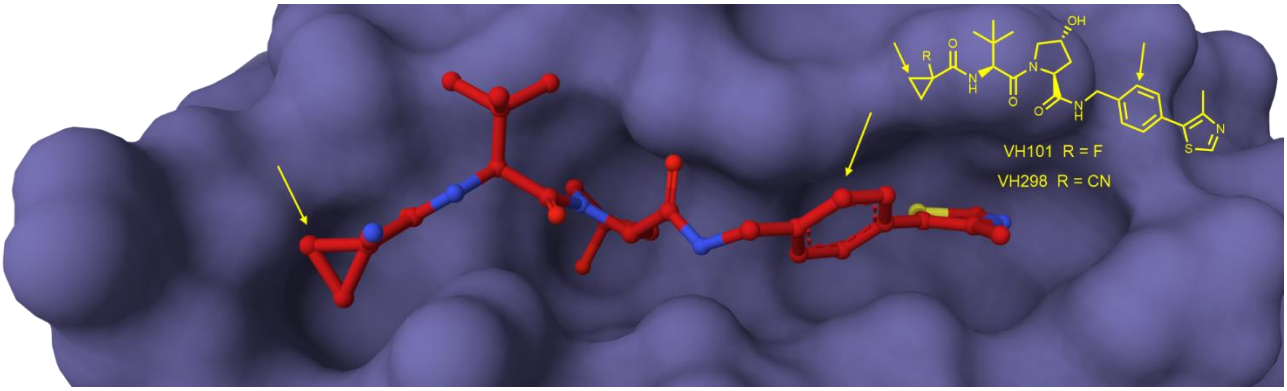
Dizajn i optimizacija poveznice su od ključne važnosti u razvoju PROTAC-a jer vrsta i duljina poveznice igra veliku ulogu u staničnoj permeabilnosti i nastajanju kooperativnog ternarnog kompleksa, što u konačnici ima utjecaj na učinkovitost razgradnje i selektivnost prema POI. Međutim, niti u ovom slučaju ne postoje opće prihvaćena pravila. Zbog dostupnosti i jednostavne sinteze, najčešće se započinje s kratkim i jednostavnim alkilnim ili PEG lancima te se iterativno metodom pokušaja i pogreške optimizira poveznica (118). Najčešće vrste poveznica prikazane su u Tablici 1 (118).

Tablica 1. *Najčešći strukturni motivi poveznica u PROTAC-ima* (118).

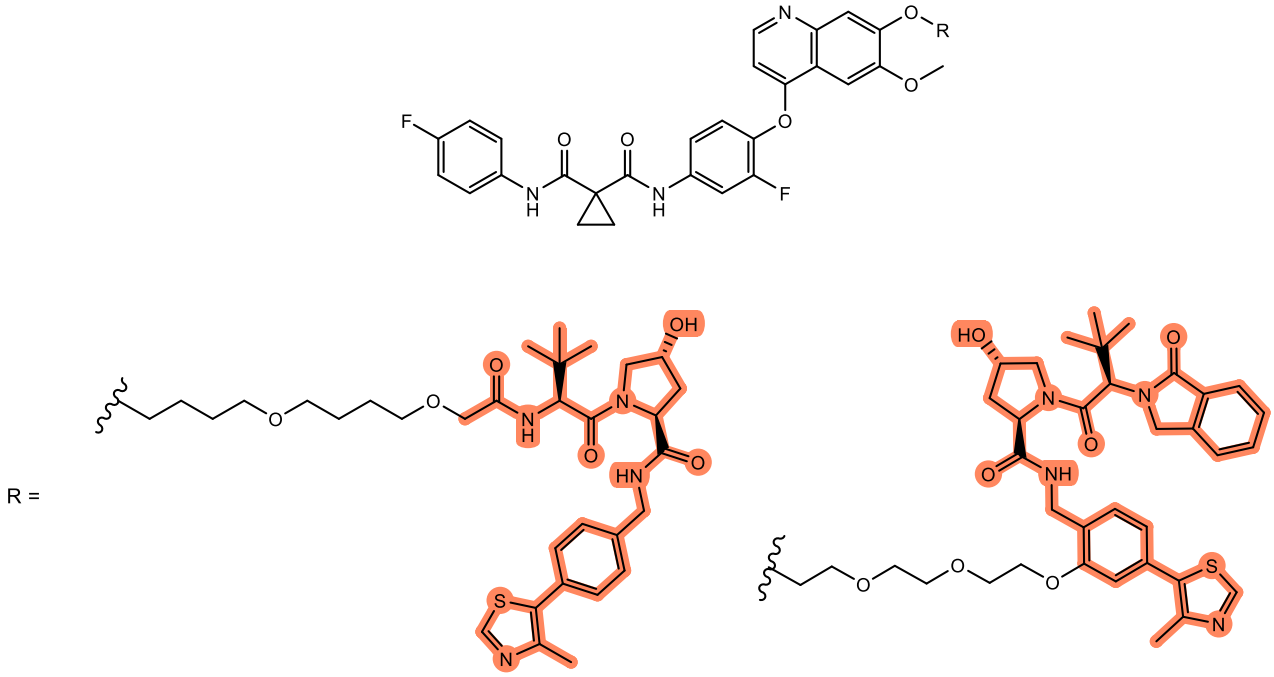
Karakteristike poveznica	**Poveznica**	**Struktura poveznice**
Fleksibilne	Alkilne	
	PEG	
	Drugi glikoli	
	Aminokiselinske	
	Triazolske	
	Alkinilne	
	Ostale	
Rigidne	Zasićeni heterociklički ili aromatski prsteni	

Prilikom dizajna poveznice prvo je potrebno odabrati mjesta povezivanja i prikladne izlazne vektore na ligandima za POI i E3 ligazu. Kod većih liganada se prilikom vezanja poveznice može izostaviti dio strukture koji nije bitan za vezanje na protein. Zbog sintetske dostupnosti, najčešće se kao izlazni vektori odabiru karboksilne ili amino skupine na ligandu. Idealno mjesto spajanja poveznice na ligand predstavlja onaj dio liganda koji ne ulazi u ključne interakcije s POI ili E3 ligazom kako se ne bi utjecalo na vezanje između male molekule i njenog ciljnog proteina, a to je često potrebno i eksperimentalno potvrditi. To je najčešće dio liganda koji je izložen otapalu (118). Na kokristalnim strukturama VHL-a (Slika 24a) i CRBN-a (Slika 25a) s njihovim ligandima primjećuju se dijelovi strukture izloženi otapalu. Variranjem mjesta povezivanja može se utjecati na sposobnost razgradnje, ali i na selektivnost što je vidljivo na primjerima PROTAC -a za razgradnju izoformi p38α i δ (Slika 24b) (119). S druge strane, na primjerima CRBN PROTAC-a za razgradnju poli(ADP-riboza) polimeraze 1 (PARP1) (Slika 25b) pokazano je kako promjena mjesta povezivanja na E3 ligandu (iz *orto*- u *meta*-položaj) smanjuje razgradnju vjerojatno zbog destabilizacije ternarnog kompleksa (120). Međutim, PROTAC-i u kliničkim ispitivanjima, kao što su ARV-110 i ARV-471, uglavnom imaju poveznicu u *meta*-položaju na derivatu talidomida (118). Bricelj i sur. su pokazali da mjesto povezivanja CRBN liganda s poveznicom može utjecati i na stabilnost derivata talidomida u otopini te na razgradnju neosupstrata (121). Pomoću poveznica se mogu optimizirati i PK svojstva (57).

a)



b)

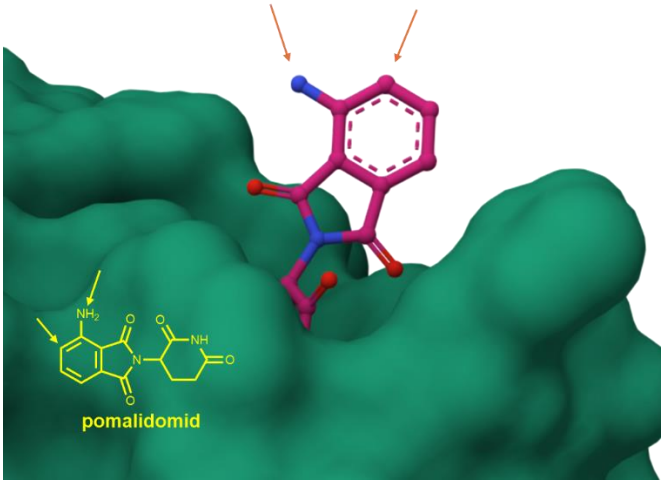


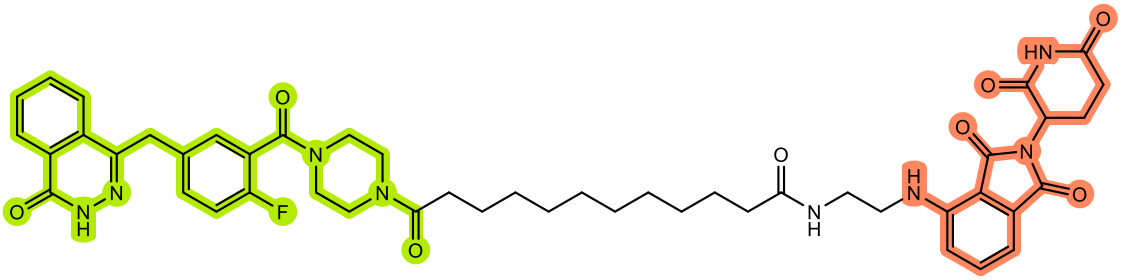
SJFα
p38α DC_{50} = 7,16 nM, D_{max} = 97,4 %

SJFβ
p38β DC_{50} = 46,17 nM, D_{max} = 99,4 %

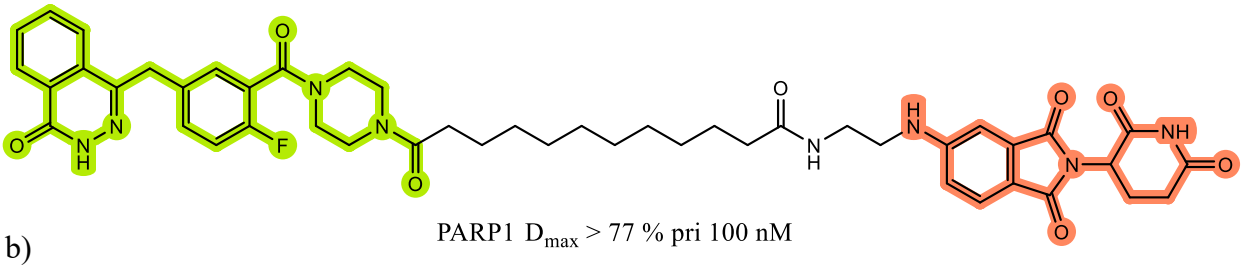
Slika 24. *a) Kristalna struktura kompleksa VHL i njegovog liganda VH101 (PDB:5LLI), b) racionalan dizajn VHL PROTAC-a za selektivnu razgradnju izoformi p38* (119).

a)





PARP1 DC_{50} = 1,26 nM, D_{max} > 99 % pri 100 nM



PARP1 D_{max} > 77 % pri 100 nM

b)

Slika 25. *a) Kristalna struktura kompleksa CRBN i njegovog liganda pomalidomida (PDB: 4TZU), b) racionalan dizajn CRBN PROTAC-a za razgradnju PARP1* (119).

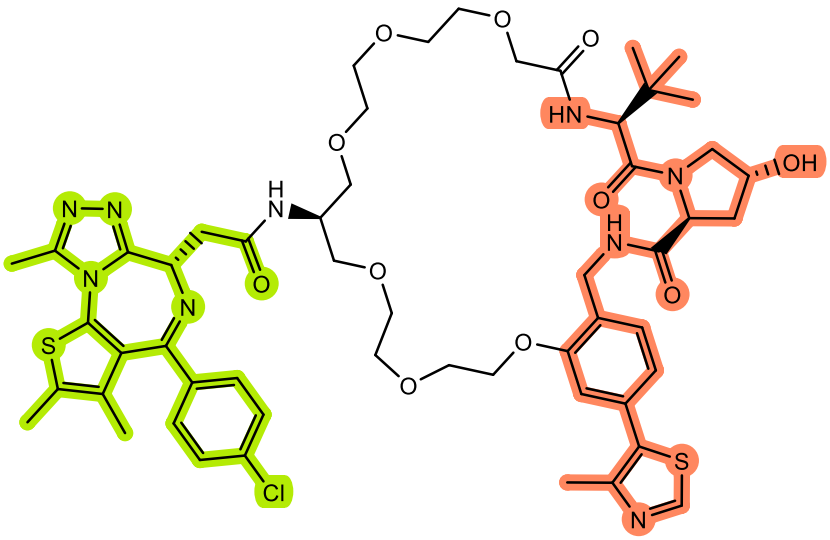
PROTAC-i s prekratkom poveznicom često će preferirano tvoriti binarne umjesto ternarnih kompleksa. S druge strane, preduge poveznice će destabilizirati ternarni kompleks ili će otežavati ulazak PROTAC-a u stanicu (114) pa bi u početnim eksperimentima trebalo ispitati različite vrste i duljine poveznica. Osim položaja poveznice na E3 ligandu, i duljina poveznice utječe na selektivnost PROTAC-a. Primjer su PROTAC-i s lapatinibom kao ligandom za POI za razgradnju EGFR i humanog epidermalnog faktora rasta 2 (HER2). PROTAC s dvije PEG jedinice neselektivno potiče razgradnju EGFR i HER2, dok produženje poveznice za samo jednu PEG jedinicu daje PROTAC za selektivnu razgradnju EGFR (122). Na sličan način postignuta je i selektivna razgradnja CDK6 (123).

U sintezama PROTAC-a često se koristi *click* kemija zbog dobrih iskorištenja, brzine i blagih reakcijskih uvjeta te je triazolski prsten vrlo često prisutan u poveznicama (118).

Optimizacijom poveznice mogu se poboljšati fizikalno-kemijska svojstva kao što su TPSA, topljivost i fleksibilnost i utjecati na permeabilnost PROTAC-a i kooperativnost ternarnog kompleksa. Kooperativnost može smanjiti efekt udice pri visokim koncentracijama (61). Nunes i sur. su zamjenom dugog fleksibilnog alkilnog lanca spirocikličkim piridinom zaključali poveznicu u odgovarajućoj konformaciji i poboljšali topljivost (124).

Makrociklizacija je metoda zaključavanja molekule u njenoj bioaktivnoj konformaciji, a makrocikli također mogu djelovati na induciranje PPI i povećanje koopearivnosti ternarnih kompleksa. Primjeri iz prirode su makrolidni spojevi ciklosporin i rapamicin koji kao molekulska ljepila induciraju stvaranje ternarnih kompleksa (118). Testa i sur. su pomoću SBDD-a na temelju kristalne strukture ternarnog kompleksa VHL:MZ1:BRD4^{BD2} razvili makrociklički PROTAC (Slika 26) dodajući poveznicu pomoću koje su ciklizirali BET PROTAC MZ1. Duga poveznica između JQ1 i VHL liganda odabrana je tako da je zadržan način vezanja linearnog PROTAC-a, a

ciklizacijom su pospješene PPI koje doprinose stvaranju stabilnog i kooperativnog ternarnog kompleksa. MacroPROTAC je bio selektivan prema drugoj bromodomeni (BD2) BRD4, BRD2 i BRD3 u odnosu na prve bromodomene ovih proteina. Iako je afinitet vezanja binarnog kompleksa macroPROTAC-BRD4 smanjen, *in vitro* razgradnja BRD4 usporediva je s MZ1 (125).



Slika 26. *Makrociklički PROTAC (zeleno je označen BET inhibitor JQ1, narančasto VHL ligand, a crno poveznice)* (125).

Računalno modeliranje ternarnog kompleksa i optimizacija poveznice

Nekoliko računalnih modela koji se temelje na strukturi proteina razvijeno je u svrhu racionalnog SBDD dizajna kooperativnih PROTAC-a. Pomoću tih modela moguće je predvidjeti strukture ternarnih kompleksa te optimizirati ligande ili poveznicu kako bi se osigurao optimalan kontakt unutar ternarnog kompleksa. Skraćivanjem poveznice mogu se pospješiti čvršće ili specifičnije interakcije, dok se promjenom vrste poveznice može usmjeriti vezanje u odgovarajućoj pozi. Neki primjeri računalnih modela su CHARMM, Rosetta, Model 4B, PRosettaC, PROTAC-ternary i

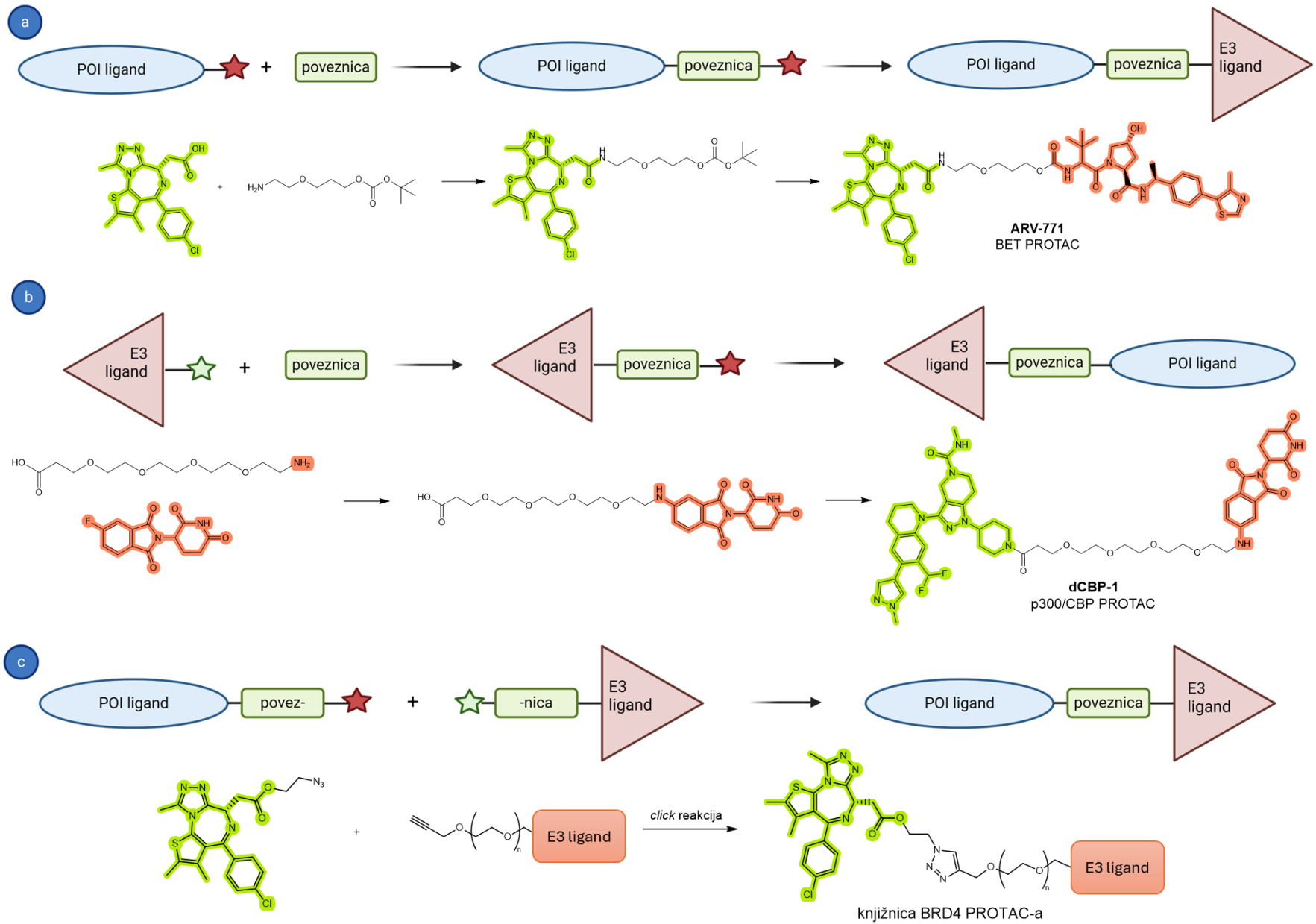
PROTAC-Model. Oni mogu predvidjeti poznate vezne poze te u određenoj mjeri i očekivane (60). Rosetta je software u otvorenom pristupu (www.rosettacommons.org) koji se koristi za sidrenje (engl. *docking*) ternarnog kompleksa na temelju čega se dizajnira poveznica između dva liganda ili se iterativno sidre dva proteina i ispituju različite konformacije PROTAC-a koji se veže na njih. Računalnim metodama može se racionalizirati sinteza novih molekula. Ograničenje ovog pristupa je u smanjenoj točnosti sidrenja ternarnog kompleksa kada kristalna struktura proteina i liganda nije dostupna (125).

Unatoč velikom interesu za povećanje pozitivne kooperativnosti, postoji puno primjera uspješne razgradnje uz nekooperativne ili čak negativno kooperativne PROTAC-e, kao što su dBET6, dBET23 i dBET57, koji imaju $\alpha < 0{,}4$ (126,127). Pomoću fleksibilnih poveznica, kojima se mogu izbjeći steričke smetnje (126), ili s druge strane, rigidnih poveznica kojima se izbjegavaju neproduktivne konformacije (124), može se postići uspješna razgradnja neovisno o kooperativnosti.

3.1.2.1.5. Sinteza PROTAC-a

PROTAC-i se pripravljaju konjugacijom prethodno sintetiziranih funkcionaliziranih liganada i poveznice na nekoliko načina (Slika 27). U prvom pristupu može se pripraviti konjugat liganda za POI i poveznice, nakon čega se nastali međuprodukt povezuje s E3 ligandom (Slika 27a). Drugi način uključuje obrnuto povezivanje E3 liganda s poveznicom, nakon čega slijedi povezivanje s ligandom za POI (Slika 27b). U trećoj strategiji, koja je vrlo česta, prvo se priprave međuprodukti konjugati liganda za POI i dijela poveznice, odnosno E3 liganda i dijela poveznice koji se zatim spajaju jednostavnom kemijskom reakcijom kao što je *coupling* reakcija ili *click* reakcija (Slika

27c). Već spomenuti triazolski prsten čest je u strukturama PROTAC-a zbog jednostavne sinteze, ali i zbog mogućeg povećanja topljivosti i metaboličke stabilnosti. Osim toga, triazolski prsten je rigidan i može tvoriti vodikove veze s nekim aminokiselinama POI-a i E3 ligaze, što može doprinijeti stabilnosti ternarnog kompleksa (118).



Slika 27. *Pregled strategija i reprezentativnih primjera sinteze PROTAC-a* (118).

3.1.2.1.6. Biološka evaluacija PROTAC-a

Slika 28 prikazuje tipičan hodogram u TPD projektu. Nakon odabira mete te dizajna i sinteze preliminarnih PROTAC-a na temelju poznatih liganada za POI i E3 ligazu i upotrebom najčešćih poveznica, potrebno je ispitati razgradnju proteina, identificirati aktivne degradere i validirati mehanizam djelovanja. Validacija spoja uzora je nužna te može usmjeriti dizajn selektivnijih degradera i osigurati napredak do *in vivo* ispitivanja (61).

Ispitivanje razgradnje

Najčešća i najdostupnija metoda za ispitivanje razgradnje proteina je kvantifikacija koncentracije proteina u stanici pomoću Western blota. Druge metode koje se koriste za kvantifikaciju proteina su primjerice označavanje POI ili E3 ligaze fluorescentnim ili luminescentnim biljegom (npr. zelenim fluorescentnim proteinom ili nanoluciferazom) i praćenje gubitka signala tijekom vremena. Za praćenje razgradnje je ključan odabir vremenskih točaka, a najčešće se odabiru i kraći (4–8 h) i duži (12–24 h) vremenski intervali. Evaluacija razgradnje u vremenskim intervalima dužim od 8 h omogućava detekciju spore ili djelomične razgradnje. Razgradnja se najčešće ispituje u koncentracijskom nizu. Kada se utvrdi optimalna vremenska točka, može se izraditi krivulja odnosa doze i učinka iz kojih proizlaze D_{max} i DC_{50}. Iako ne postoji standardna potentnost, idealni kandidati za daljnji razvoj ili optimizaciju trebali bi pokazati razgradnju u koncentraciji pri kojoj meta nije zasićena da se osigura mehanizam djelovanja koji se zasniva na događaju, a ne na zauzetosti veznog mjesta (61).

Ispitivanje permeabilnosti

PROTAC-i su molekule velike relativne molekulske mase što može utjecati na permeabilnost i posljedično razgradnju. Uobičajeni modeli koji se koriste za ispitivanje stanične permeabilnosti

malih molekula, kao što su test propusnosti na umjetnim membranama (engl. *parallel artificial membrane permeability assay*, PAMPA) ili stanični modeli Caco-2, MDCKII ili LLC-PK1, mogu se koristiti i za PROTAC-e (61). Međutim, zbog izazovnih fizikalno-kemijskih svojstava PROTAC-a, stanični modeli imaju prednost pred PAMPA testom, ali i tu je često potrebna prilagodba eksperimentalnih uvjeta zbog slabe topljivosti i nespecifičnog vezanja (128).

Ispitivanje vezanja na POI i E3 ligazu

Ispitivanje interakcija između proteina i liganda može se provesti na staničnim modelima, ali za odabir odgovarajućih liganada i mjesta vezanja poveznice, prednost imaju biofizikalne tehnike s pročišćenim proteinima jer se na taj način izravno ispituje vezanje. Tehnike koje se koriste za ispitivanje afiniteta binarnih i ternarnih kompleksa su AlphaLISA, vremenski razlučiv fluorescentni rezonantni prijenos energije (TR-FRET), polarizacija fluorescencije, mikroskalarna termoforeza, ^{19}F nuklearna magnetska rezonancija, izotermna titracijska kalorimetrija, rezonancija površinskih plazmona, bioslojna interferometrija i dr. (60,61).

Ispitivanje nastajanja ternarnog kompleksa

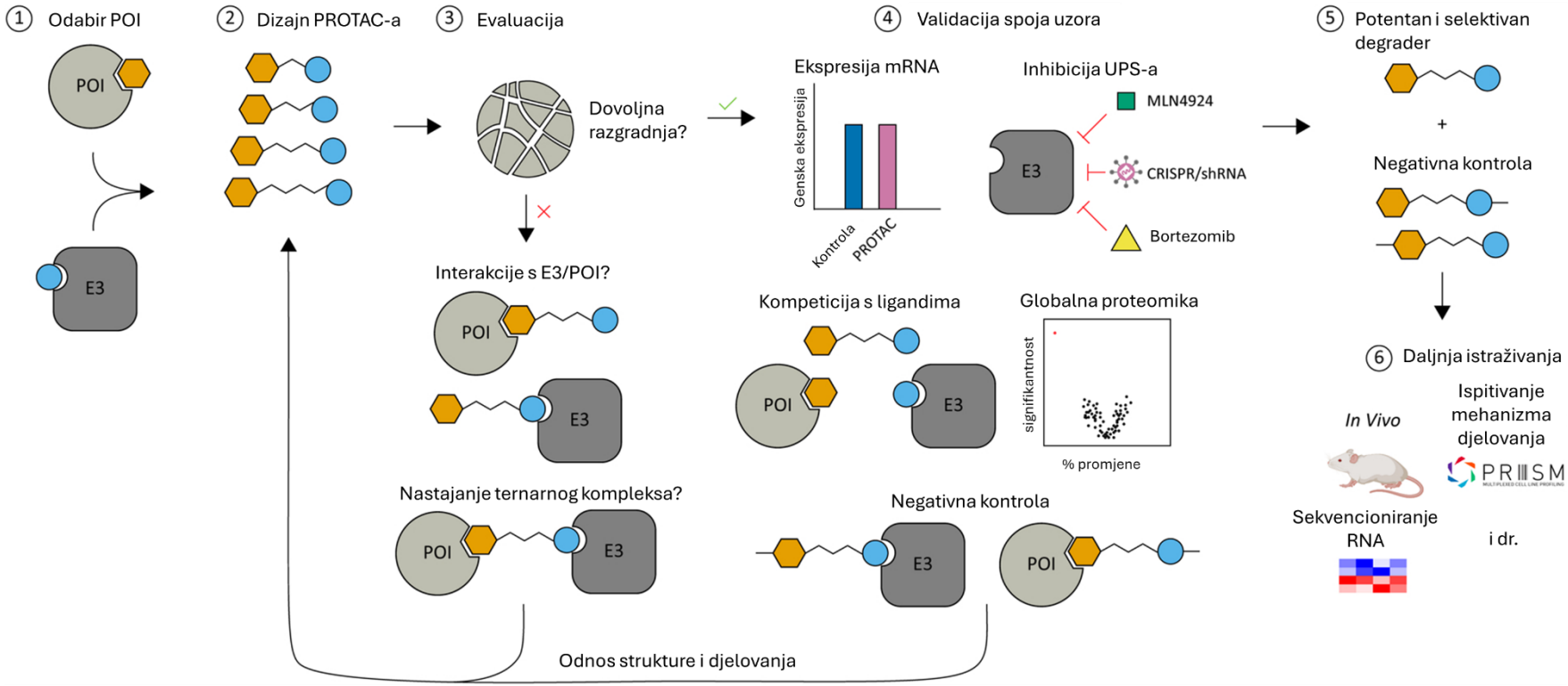
Potvrda da razgradnja POI-a ovisi o nastajanju ternarnog kompleksa nužna je prije optimizacije PPI u ternarnom kompleksu. Ispitivanje nastajanja ternarnog kompleksa u živim stanicama provodi se bioluminescentnim tehnikama. NanoBiT je metoda koja se temelji na NanoLuc luciferazi podijeljenoj na dva fragmenta koji su rekombinantno povezani s E3 ligazom i POI. Kada se POI i E3 povežu preko degradera, dolazi do rekonstitucije luciferaze što generira luminescenciju. Stvaranje ternarnog kompleksa u stanicama moguće je pratiti i tehnikom koimunoprecipitacije, fluorescentnim rezonantnim prijenosom energije (FRET), bioluminescentnim rezonantnim prijenosom energije (BRET) i afinitetnim tehnikama u

kombinaciji s Western blotom. Tehnike ispitivanja nastajanja ternarnog kompleksa zahtijevaju upotrebu inhibitora proteasoma (npr. bortezomib) kako bi se spriječila razgradnja mete (61).

Validacija spoja uzora

Kada je identificiran potentan PROTAC kandidat, prije daljnjih bioloških pokusa potrebno je validirati mehanizam djelovanja i selektivnost PROTAC-a. Prvi korak je potvrda da je smanjenje koncentracije proteina posljedica razgradnje, a ne smanjenja transkripcije. To se ispituje mjerenjem razine mRNA POI-a u stanicama tretiranim PROTAC-om, pri čemu ne smije doći do značajne promjene u razini mRNA nakon tretiranja PROTAC-om. Također, kompeticijskim studijama s ishodišnim ligandima utvrđuje se ovisnost razgradnje o formiranju ternarnog kompleksa. Kako bi se potvrdilo da je razgradnja ovisna o E3 ligazi, može se utišati ekspresija E3 ligaze ili koristiti negativna kontrola koja se ne veže na E3 ni POI. Negativna kontrola se uglavnom pripravlja promjenom stereokemije na ligandu za POI i E3 ligazu (61).

Globalna proteomika je ključna za provjeru selektivnosti PROTAC-a na cijelom proteomu. Kraća vremena inkubacije (< 6 h) koriste se za identifikaciju izravnih meta PROTAC-a (61).



Slika 28. *Primjer hodograma u TPD projektu (prilagođeno prema* (61) *uz dopuštenje izdavača John Wiley & Sons).*

3.1.2.1.7. Farmakokinetička svojstva PROTAC-a

PROTAC-i su velike fleksibilne molekule koje uglavnom ne zadovoljavaju Lipiniskijevo pravilo 5 (Ro5) ni Veberova pravila koja su u farmaceutskoj industriji dugo bila zlatni standard za racionalan dizajn malih oralno bioraspoloživih molekula. Molekule čija fizikalno-kemijska i ADME svojstva izlaze iz okvira Ro5, ali i dalje posjeduju dovoljnu oralnu bioraspoloživost, nazivaju se bRo5 molekule, te se u zadnje vrijeme sve više razvijaju. Predikcije koje se koriste za klasične male molekule manje su prediktivne za bRo5 molekule, a time i PROTAC-e. Tome u prilog ide i činjenica da je više PROTAC-a koji se nalaze u kliničkim ispitivanjima oralno bioraspoloživo, iako ne zadovoljavaju Ro5 (8,128).

Maple i sur. su analizirali fizikalno-kemijska svojstva PROTAC-a objavljenih između 2014. i 2019. g. i usporedili s učinkovitošću razgradnje. Jedino je log *P* pozitivno korelirao s razgradnjom, pri čemu su najpotentniji degraderi imali log *P* oko 6. Autori također preporučuju da se HBD drži na ili ispod 5 i TPSA ispod 250 $Å^2$, dok je broj HBA manje kritičan. TPSA je kod analiziranih PROTAC-a bio generalno niži u usporedbi s drugim bRo5 molekulama, što upućuje na to da je vjerojatno to svojstvo uspješno optimizirano (129).

Volak i sur. su tijekom 2021. g. proveli istraživanje o iskustvu farmaceutske industrije s karakterizacijom i optimizacijom ADME svojstava degradera (130). U tablici 2 prikazana su poželjna svojstva za oralno bioraspoložive degradere na temelju rezultata istraživanja.

Tablica 2. *Fizikalno-kemijska svojstva poželjna za oralno bioraspoložive degradere* (130).

M_r	< 900
HBA	< 14
HBD	< 5
log *D*	3–5
TPSA	100–200 Å^2

Zanimljivo je da jedino broj HBD odgovara Ro5. Broj HBD je vjerojatno povezan s kameleonskim svojstvima degradera koja označavaju sposobnost molekula da se prilagode lipofilnosti ili hidrofilnosti okoliša zbog svoje fleksibilnosti i tvorbe intramolekulskih vodikovih veza (130). Kameleonska svojstva nisu jedinstvena za PROTAC-e, već su i karakteristika makrocikličkih lijekova, nekih antivirotika i dr. lijekova (131) i moguće su objašnjenje za oralnu bioraspoloživost PROTAC-a. Međutim, PROTAC-i za oralnu primjenu koji se nalaze u kliničkim ispitivanjima dokazuju da poveznica ne mora biti previše fleksibilna za postizanje odgovarajuće oralne bioraspoloživosti.

Lipofilnost se smatra ključnim svojstvom koje utječe na permeabilnost, topljivost, oralnu apsorpciju, efluks posredovan transportnim proteinima, vezanje na proteine plazme, potencijal interakcija s drugim lijekovima, metaboličku stabilnost i klirens. Optimalna lipofilnost osigurava istovremenu topljivost i permeabilnost molekule. Međutim, lipofilnost PROTAC-a nije lako odrediti metodom izmućkivanja zbog ograničene topljivosti te se preporučuje korištenje surogatnih kromatografskih metoda (npr. chromLogD) ili imobiliziranih umjetnih membrana (Δ log K_{ow}) (128).

Za predviđanje kameleonskih svojstava PROTAC-a uvedeni su novi molekulski deskriptori, kao što su eksperimentalno određena izložena ploština polarne površine (engl. *experimentally*

determined exposed polar surface area, EPSA) i deskriptor kameleonskih svojstava (ChameLogD) (132,133), koji uzimaju u obzir dinamičke intramolekulske vodikove veze u svrhu postizanja bolje korelacije fizikalno-kemijskih svojstava s eksperimentalno određenom permeabilnosti (3).

Generalno je uočeno da su CRBN PROTAC-i boljih fizikalno-kemijskih svojstava za oralnu bioraspoloživost nego PROTAC-i koji iskorištavaju druge E3 ligaze. Kod dizajna degradera poželjno je odmah odabrati ligande manje veličine i polarnosti, pogotovo ako je poželjna oralna apsorpcija (134).

Permeabilnost i aktivni transport

Stanična permeabilnost veliki je izazov u razvoju PROTAC-a zbog njihove veličine i polarnosti. Očekivano, spojevi koji imaju manju M_r i manji broj HBA i HBD, u pravilu su permeabilniji. Dizajn molekula koje pokazuju kameleonsko ponašanje jedan je od načina kako poboljšati permeabilnost. Kao što je već spomenuto, testove permeabilnosti je često potrebno prilagoditi za PROTAC-e. PAMPA test ne uzima u obzir transportne proteine, već mjeri isključivo pasivnu permeabilnost, zbog čega stanični modeli imaju prednost (134).

Interakcije između degradera i transportnih proteina, kao što je P-glikoprotein (P-gp), uglavnom su slabo istražene. Aktivni efluks posredovan P-gp-om i drugim transportnim proteinima može ograničiti učinkovitost PROTAC-a, a istovremena primjena inhibitora P-gp-a (npr. ciklosporina A) može povećati učinkovitost razgradnje POI-a u stanicama. Međutim, ovi pokusi se uglavnom odnose na permeabilnost u ciljnim stanicama, a ne na oralnu bioraspoloživost (134). Iako je razumijevanje aktivnog transporta bRo5 molekula ograničeno, modeli koji se zasnivaju na odnosu strukture i djelovanja (SAR) Ro5 i bRo5 molekula pokazali su neke generalne trendove. Porastom broja vodikovih veza u pravilu efluks raste. Osim toga, na efluks imaju utjecaj i veličina i oblik

molekule (135). Općenito, spojevi koji pokazuju visoku pasivnu permeabilnost imaju najmanji potencijal biti supstrati P-gp-a, za razliku od spojeva umjerene pasivne permeabilnosti. Efluks transportnim proteinima, osim za apsorpciju u gastrointestinalnom sustavu, značajan je i za djelovanje PROTAC-a u središnjem živčanom sustavu jer je P-gp u velikoj mjeri eksprimiran i na krvno-moždanoj barijeri (KMB). S druge strane, postoje primjeri PROTAC-a koji prelaze KMB što upućuje na vjerojatan aktivni transport. Također, aktivni transport mogao bi objasniti renalnu, intestinalnu i bilijarnu eliminaciju PROTAC-a (130).

Topljivost

Topljivost PROTAC-a općenito je vrlo niska i izazovno ju je ispitati koristeći standardne metode. Dobra strategija povećanja topljivosti PROTAC-a jest modifikacija poveznice, pri čemu su se najbolje pokazale PEG i piperidinske poveznice (136). Napredne formulacije, kao što su amorfni ili samoemulgirajući terapijski sustavi te nanoformulacije, mogu pospješiti topljivost i permeabilnost (134).

Primjena računalnih metoda za predviđanje topljivosti PROTAC-a ograničena je jer trening setovi dostupnih modela uglavnom ne pokrivaju bRo5 molekule, stoga je preporučljivo eksperimentalno odrediti topljivost (134). U ranoj fazi istraživanja najpraktičnije je određivanje kinetičke topljivosti jer je potrebna velika protočnost zbog velikog broja spojeva. Međutim, kod fleksibilnih molekula precipitacija će se događati relativno sporo pa ova metoda nije najpogodnija za određivanje topljivosti PROTAC-a. Određivanje termodinamičke topljivost trebalo bi dati relevantnije i realističnije podatke o topljivosti. Cantrill i sur. usporedili su topljivost PROTAC-a dobivenu kinetičkom i termodinamičkom metodom. Za određivanje termodinamičke topljivosti koristili su metodu izmućkivanja nakon dodatka degradera u obliku krutine u puferiranu 10 %-tnu otopinu (2-hidroksipropil)-β-ciklodekstrina (HP-β-CD) u vodi, dok je za određivanje kinetičke topljivosti

degrader prvo otopljen u PEG400 i zatim dodan puferiranoj otopini HP-β-CD. Neki degraderi su pokazali sličnu kinetičku i termodinamičku topljivost, dok su se kod drugih vrijednosti značajno razlikovale. Jedno od mogućih objašnjenja jest utjecaj pufera na topljivost i taloženje te sugerira da je kinetička topljivost ovisna o eksperimentalnim uvjetima koji se moraju uzeti u obzir kod interpretacije rezultata (134).

Vezanje na proteine plazme

Vezanje lijeka na proteine plazme utječe na koncentraciju slobodnog, nevezanog lijeka u plazmi koja može doći na mjesto djelovanja te određuje in vivo učinkovitost i farmakokinetiku lijekova. Zbog velike lipofilnosti, degraderi su uglavnom u visokom postotku vezani na proteine plazme. Niska koncentracija nevezanog lijeka u praksi je problematična za određivanje. Umjesto standardne metode dijalize koja zahtjeva dugo vrijeme za postizanje ravnoteže, najprikladnija metoda za određivanje vezanja PROTAC-a na proteine plazme je ultracentrifugiranje, pri čemu treba uzeti u obzir stabilnost degradera u plazmi u odgovarajućem vremenu. Ultrafiltracija uglavnom nije prikladna metoda zbog vjerojatnosti nespecifičnog vezanja na membranu ili dijelove aparature. Drugi problem jest određivanje koncentracije jer su potrebne vrlo osjetljive analitičke metode zbog niske koncentracije nevezanog lijeka (134).

Metabolizam PROTAC-a

PK svojstva degradera moraju biti takva da osiguraju dovoljnu količinu intaktnog lijeka na mjestu djelovanja kako bi moglo doći do stvaranja ternarnog kompleksa te uspješne razgradnje POI *in vivo* i biološkog učinka. Metabolički nestabilni degraderi metaboliziraju se i eliminiraju iz organizma prije nego što uspiju ispoljiti svoje djelovanje. Također, metaboliti mogu tvoriti

neproduktivne binarne i ternarne komplekse koji onemogućuju uspješnu ubikvitinaciju i razgradnju (128).

Utvrđeno je da PROTAC-i podliježu reakcijama I i II faze metabolizma jednako kao i klasične male molekule, pri čemu su najznačajniji enzimi za metabolizam PROTAC-a citokromi P450 (CYP), posebno CYP3A4, te u određenoj mjeri i aldehid oksidaze (AOX) te UDP-glukuronoziltranferaze. Njihov metabolizam ne može se predvidjeti na temelju metabolizma individualnih liganada (136).

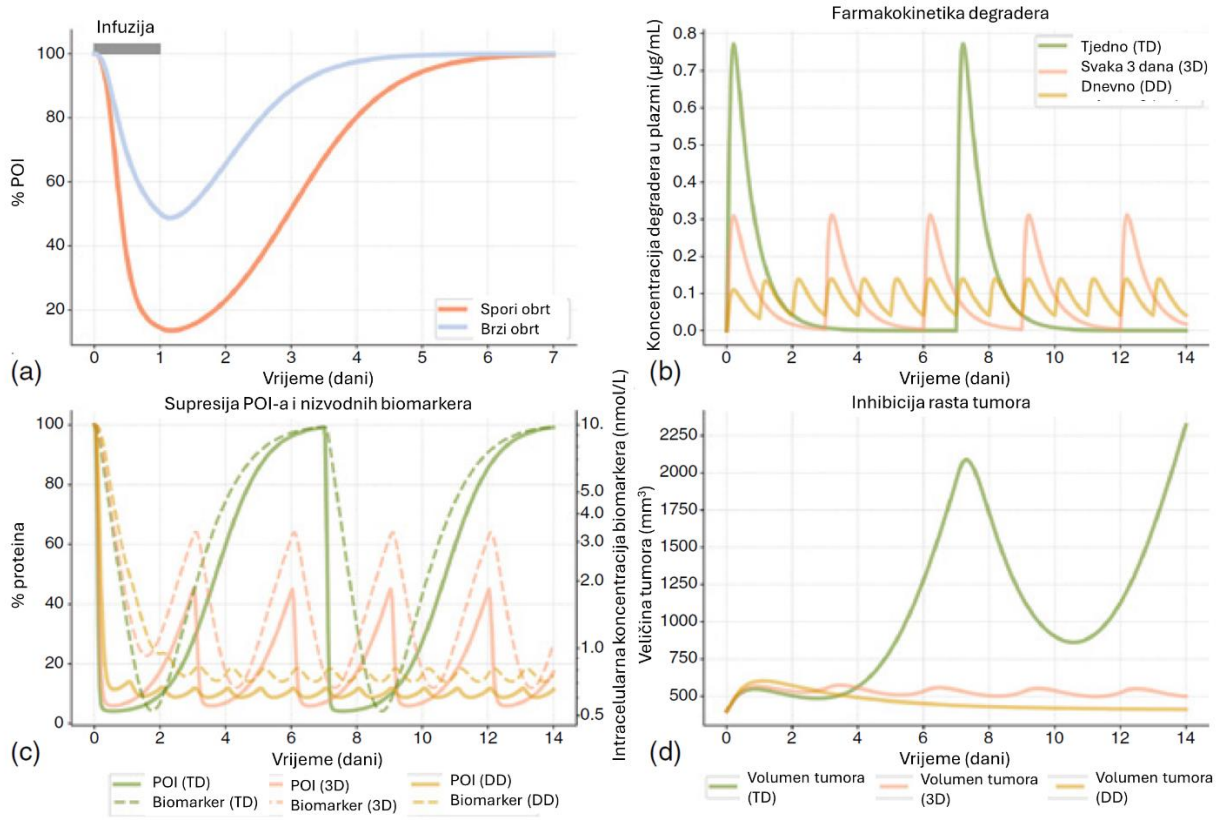
Na metaboličku stabilnost najviše utječe poveznica i način vezanja s ligandima. Metabolički najosjetljiviji položaj u PROTAC-ima jest mjesto vezanja poveznice na ligande, pri čemu se u najvećoj mjeri odvijaju reakcije *N*-dealkilacije ili hidrolize. Bez obzira na to, amidne veze su vrlo česte zbog jednostavne sinteze. PEG poveznice su u pravilu metabolički nestabilnije od alkilnih te je primijećen velik broj reakcija *O*-dealkilacije. Međutim, ukupna metabolička stabilnost PEG PROTAC-a usporediva je s PROTAC-ima koji imaju alkilnu poveznicu, pri čemu su vremena polueliminacije PEG PROTAC-a bila usporediva ili čak duža. No, zaštita velikog broja metabolički osjetljivih položaja kod PEG PROTAC-a sintetski je puno zahtjevnija. Poveznice do četiri jedinice vrlo su stabilne u usporedbi s dužim poveznicama te u pravilu vrijedi da su kraće linearne poveznice stabilnije od dužih vjerojatno zbog steričkih smetnji susjednih liganada i nemogućnosti pristupa katalitičkom mjestu enzima. Međutim, duže poveznice se vrlo često koriste kod optimizacije aktivnosti PROTAC-a. Upotreba cikličkih poveznica dobra je strategija povećanja metaboličke stabilnosti (136).

Što se tiče E3 liganada, CRBN PROTAC-i, koji u strukturi imaju derivate talidomida, podliježu ne-enzimskoj hidrolizi ftalimida i glutarimida u vodenom mediju. Kod VHL liganada, 5-feniltiazol podložan je oksidaciji uz katalitički učinak AOX (136).

PK/PD studije i modeliranje

Cilj PK/PD modeliranja je utvrđivanje terapijskog raspona, kvantifikacija odnosa između izloženosti lijeku i biološkog odgovora, utvrđivanje optimalne doze i režima doziranja. Vezanje na metu i posljedična razgradnja posljedica je prisutnosti lijeka na mjestu djelovanja. Predviđanje izloženosti pacijenta lijeku nakon primjene određene doze počiva na dobrom razumijevanju fizikalno-kemijskih i ADME svojstava lijeka, kao što su permeabilnost, topljivost, vezanje na proteine plazme i oralna apsorpcija. Razumijevanje PK degradera i povezanosti s PD učincima ključno je za predviđanje trajanja supresije POI-a, što ima utjecaj na režim doziranja. PK/PD modeli su korisni za utvrđivanje tih odnosa. Produljeni učinak degradera u velikoj mjeri ovisi o brzini resinteze POI-a. Ako je brzina obrta proteina mala, znači da je i resinteza POI-a spora, zbog čega će nakon maksimalne razgradnje POI-a biti potrebno neko vrijeme da se koncentracija proteina vrati na normalne vrijednosti. S druge strane, koncentracija POI-a će puno brže doseći početnu kod proteina s velikom brzinom obrta. To je razlog zašto degraderi pokazuju nelinearan odnos PK/PD. Za razliku od tradicionalnih inhibitora čiji se mehanizam djelovanja temelji na zauzetosti veznog mjesta, kod PROTAC-a se ne očekuje korelacija između koncentracije lijeka u plazmi i farmakodinamičkog odgovora u određenom trenutku. U trenutku kada je koncentracija lijeka u plazmi visoka, razgradnja POI-a može biti vrlo niska ili se ne mora uopće događati jer još uvijek nije prošlo dovoljno vremena da proces učinkovite razgradnje započne. S druge strane, koncentracija POI-a može biti vrlo niska ili može biti u potpunosti razgrađen u trenutku kada degradera više nema u plazmi. Na slici 29a prikazana je kinetika razgradnje POI-a. Vrijeme obrta proteina može se pronaći u literaturi ili odrediti eksperimentalno na način da se stanice inkubiraju s različitim koncentracijama degradera tijekom određenom vremenskog intervala (npr. 24–36 h), nakon čega se isperu te se prati koncentracija proteina kroz određeni vremenski period. Treba imati

na umu da se isti protein može imati drugačiji životni vijek u različitim vrstama stanica te za pokus treba odabrati relevantne stanične linije kako bi se rezultati mogli preslikati na *in vivo*. Na slici 29b su prikazani PK profili degradera u plazmi pri različitim režimima doziranja s jednakom ukupnom izloženošću. Slika 29c prikazuje odgovarajuće razine POI-a i njegovih nizvodnih markera, dok je na slici 29d vidljiv rast tumora. PK/PD modeli razvijeni na temelju PK/PD studije mogu biti korisni za procjenu učinka različitih režima doziranja na razinu POI-a, biomarkera i terapijski učinak. S obzirom da kod degradera nije relevantna koncentracija na mjestu djelovanja, smanjenje koncentracije POI-a uzima se umjesto koncentracije degradera.



Slika 29. *Simulirani PK/PD profili hipotetskog degradera. a) Postotak razgradnje POI-a sa sporim (crveno) ili brzim (plavo) obrtom nakon 24-satne infuzije degradera. Osim jače razgradnje, koncentracija POI-a nakon prestanka infuzije duže se održava niskom kod proteina sa sporim obrtom; b-d) Utjecaj režima doziranja na terapijski učinak; b) Tri simulirana režima doziranja: jednom tjedno (TD – zeleno), svaka tri dana (3D – crveno) i jednom dnevno (DD – žuto) rezultiraju različitim profilima koncentracije degradera u plazmi; c) Kinetika razgradnje POI-a (puna linija) i njegovih nizvodnih biomarkera (iscrtkana linija) razlikuje se ovisno o režimu doziranja. Doziranje jednom dnevno održava nisku razinu POI-a i biomarkera bez značajnih fluktuacija. d) Terapijski učinak na rast tumora. Doziranje jednom dnevno uzrokuje produženu inhibiciju rasta tumora, dok tjedno doziranje, osim jačeg inicijalnog odgovora, ne inhibira rast tumora u kasnijim vremenskim točkama. Doziranje svaka tri dana ima učinak između ova dva režima doziranja (prilagođeno prema* (128)*, uz dopuštenje izdavača John Wiley & Sons).*

Toksičnost PROTAC-a

Iako je na mnogo primjera pokazano da su PROTAC-i, zbog svog jedinstvenog mehanizma djelovanja koji zahtjeva stvaranje ternarnog kompleksa, u pravilu selektivniji u odnosu na ligande iz kojih su razvijeni, postoji mogućnost razgradnje i ne-ciljnih proteina. Za ispitivanje selektivnosti, a time i potencijalne toksičnosti degradera, danas se koristi globalna proteomika (137).

Rizik od djelovanja na ne-ciljne proteine posebno je izražen kod CRBN PROTAC-a, s obzirom da IMiD-i mogu potaknuti razgradnju nekoliko neosupstrata (npr. IKZF1, proteina 4 sličnog Sal-u (engl. Sal-like protein 4, SALL4), kazein kinaze 1α (CK1α) i dr.) posredovanu CRBN-om (14). Primjerice, Ishoey i sur. 2018. g. pripravili su PROTAC-e sastavljene od IMiD-a i promiskuitetnog inhibitora kinaza koji su bili učinkoviti protiv stanica leukemije zbog razgradnje ne-ciljnog proteina faktora 1 terminacije translacije prijelaza iz G1 u S fazu (engl. *the translation termination factor G1-to-S phase transition 1*, GSPT1) iako nisu imali sposobnost potaknuti razgradnju kinaza (138). Također, PROTAC-i s pomalidomidom u strukturi koji ciljaju BTK istovremeno potiču i razgradnju neosupstrata IKZF1, IKZF3, ZNF 827 i ZFP91 (126). Međutim, malim promjenama u strukturi molekule, na primjer mijenjanjem vrste poveznice, čak i bez promjene njene duljine, može se spriječiti razgradnja neosupstrata CRBN-a (139). Osim toga, i vrsta CRBN liganda može odrediti specifičnost prema supstratu. Tako primjerice, lenalidomid potiče razgradnju CK1α, za razliku od talidomida i pomalidomida (140).

Rizik povezan s degraderima koji se temelje na IMiD-ima je zadržavanje neželjenih svojstava IMiD-a kao što su prethodno opisana kemijska nestabilnost, inverzija konfiguracije *in vivo* i teratogenost (141). Nedavne studije su pokazale da je razgradnja embrijskog transkripcijskog faktora SALL4 posredovana CRBN-om povezana s teratogenim učincima IMiD-a i degradera koji se na njima temelje, iako još uvijek treba utvrditi je li to jedini razlog teratogenosti (141,142). Kod pacijenata oboljelih od refraktornog

mijeloma uočen je razvoj rezistencije na IMiD-e što se povezuje s mutacijama na genu za CRBN (143), te predstavlja dodatan poticaj za pronalaženje novih E3 ligaza koje se mogu iskoristiti za TPD.

3.1.2.1.8. PROTAC-i u kliničkim ispitivanjima

U tablici 3 dan je prikaz kliničkih ispitivanja PROTAC-a. Trenutno se u fazama I–III nalazi 22 PROTAC-a (58). U nastavku su prikazani podaci koji su dostupni u znanstvenim publikacijama ili sažecima sa znanstvenih skupova, dok podaci iz novinskih članaka ili web stranica farmaceutskih tvrtki nisu prikazani. U tablici su zvjezdicom označena klinička ispitivanja koja su završena, s dvije zvjezdice ona koja su iz bilo kojeg razloga prekinuta te s tri zvjezdice suspendirana studija. S obzirom da službeni razlozi prekida ili suspenzije studija nisu objavljeni u znanstvenoj literaturi, o tim degraderima nije diskutirano.

Tablica 3. *Popis PROTAC-a u kliničkim ispitivanjima* (58).

Degrader	POI	E3 ligaza	Identifikator clinicaltrials.gov	Faza	Indikacija	Put primjene
ABBV-101	BTK	Nepoznato	NCT05753501	I	B-stanični limfom	Oralno
AC176	AR	Nepoznato	NCT05241613**	I	mCRPC	Oralno
			NCT05673109**	I	mCRPC	Oralno
AC682	ER	CRBN	NCT05080842**	I	Lokalno uznapredovali ili metastatski $ER^{+}HER2^{-}$ karcinom dojke	Oralno (prelazi KMB)
AC699	ER	Nepoznato	NCT05654532	I	Lokalno uznapredovali ili metastatski $ER^{+}HER2^{-}$ karcinom dojke	Oralno
ARV-102	*LRRK2*	*Nepoznato*	-	*IND*	*Neurodegenerativne bolesti*	*Oralno (prelazi KMB)*
Bavdegalutamid (ARV-110)	AR	CRBN	NCT03888612	I/II	mCRPC	Oralno

			NCT05177042	Ib	mCRPC rezistentan na abirateron	Oralno (kombinacija s abirateronom)
ARV-393	BCL6	CRBN	NCT06393738	I	Relapsni/refraktorni ne-Hodgkinov limfom	Oralno
Vepdegestrant (ARV-471)	ER	CRBN	NCT05654623	III	Uznapredovali metastatski karcinom dojke	Oralno
			NCT05909397	III	Uznapredovali $ER^{+}HER2^{-}$ karcinom dojke	Oralno (monoterapija ili kombinacija s palbociklibom
			NCT05549505	II	Lokalizirani $ER^{+}HER2^{-}$ karcinom dojke	Oralno
			NCT05501769	Ib	Uznapredovali $ER^{+}HER2^{-}$ karcinom dojke	Oralno (kombinacija s everolimusom)
			NCT04072952	I/II	Uznapredovali $ER^{+}HER2^{-}$ karcinom dojke	Oralno (monoterapija ili kombinacija s palbociklibom)
			NCT06125522	I/II	Uznapredovali ili metastatski karcinom dojke	Oralno (kombinacija s samuraciklibom)
			NCT05548127	I/II	Uznapredovali $ER^{+}HER2^{-}$ karcinom dojke	Oralno (kombinacija s abemaciklibom)
			NCT05573555	I/II	Uznapredovali $ER^{+}HER2^{-}$ karcinom dojke	Oralno (kombinacija s ribociklibom)
			NCT06206837	I/II	Uznapredovali metastatski karcinom dojke	Oralno (kombinacija s PF-07220060)
			NCT05463952	I	Uznapredovali $ER^{+}HER2^{-}$ karcinom dojke	Oralno
			NCT05732428	I	Uznapredovali $ER^{+}HER2^{-}$ karcinom dojke	Oralno
Luksdegalutamid (ARV-766)	AR	CRBN	NCT05067140	I/II	mCRPC	Oralno (monoterapija ili kombinacija s abirateronom)
BGB-16673	BTK	CRBN	NCT05006716	I	B-stanični limfom	Oralno
			NCT05294731	I	B-stanični limfom	Oralno

BMS-986458	BCL6	CRBN	NCT06090539	I/II	Relapsni/ refraktorni ne-Hodgkinov limfom	Oralno (monoterapija ili kombinacija s rituksimabom)
CC-94676	AR	CRBN	NCT04428788	I	mCRPC	Oralno
			NCT06417229	I		Oralno
			NCT06433505	I		Oralno
CFT8634	BRD9	CRBN	NCT05355753**	I/II	Uznapredovali sinovijalni sarkom ili SMARCB1neg tumori	Oralno
CFT1946	$BRAF^{V600E}$	CRBN	NCT05668585	I/II	Uznapredovali solidni tumori s mutacijom $BRAF^{V600E}$	Oralno (monoterapija ili kombinacija s trametinibom)
GT20029	AR	Nepoznato	NCT05428449*	I	Androgena alopecija, acne vulgaris	Topikalno
			NCT05428449	I	Androgena alopecija, acne vulgaris	Topikalno
HP518	AR	Nepoznato	NCT05252364*	I	mCRPC	Oralno
			NCT06155084 (Kina)	I	mCRPC	Oralno
HSK29116	BTK	CRBN	NCT04861779	I	B-stanični limfom	Oralno
KT-474 (SAR444656)	IRAK4	CRBN	NCT06058156	II	Umjereni do teški atopijski dermatitis	Oralno
			NCT06028230	II	Umjereni do teški hidradenitis supurativa	Oralno
LT-002-158	IRAK4	Nepoznato	NCT06082323	I	Hidradenitis supurativa ili atopijski dermatitis	Oralno
NX-2127	BTK	CRBN	NCT04830137	I	B-stanični limfom	Oralno
NX-5948	BTK	CRBN	NCT05131022	I	B-stanični limfom	Oralno (prelazi KMB)
ASP3082	$KRAS^{G12D}$	Nepoznato	NCT05382559	I	Uznapredovali solidni tumori s mutacijom $KRAS^{G12D}$	Intravenski (monoterapija ili kombinacija s cetuksimabom)
DT2216	Bcl-xL	VHL	NCT04886622*	I	Relapsne i/ili refraktorne maligne bolesti	Intravenski
FHD-609	BRD9	Nepoznato	NCT04965753**	I	Uznapredovali sinovijalni sarkom ili SMARCB1neg tumori	Intravenski

KT-253	MDM2	MDM2?	NCT05775406	I	Relapsne i/ili refraktorne mijeloična maligna oboljenja ili solidni tumori	Intravenski
KT-333	STAT3	VHL	NCT05225584	I	Leukemije, limfomi i solidni tumori	Intravenski
KT-413	IRAK4	CRBN	NCT05233033***	I	Ne-Hodgkinov limfom B-stanica	Intravenski
PRT3789	SMARCA2	VHL	NCT05639751	I	Uznapredovali ili metastatski solidni tumori sa SMARCA4 mutacijom	Intravenski (monoterapija ili kombinacija s docetakselom)

** završila; ** prekinuta; *** suspendirana;*
BTK – Brutonova tirozin kinaza; AR – androgeni receptor; ER – estrogeni receptor; mCRPC – metastatski karcinom prostate otporan na kastraciju; CRBN – Cereblon; LRRK2 – leucinom bogata ponavljajuća kinaza 2; IND – (engl. investigational new drug) ; KMB – krvno-moždana barijera; BCL6 – protein B staničnog limfoma 6; TRK – kinaza tropomiozinskog receptora; BRD9 – protein 9 koji sadrži bromodomenu; $BRAF^{V600E}$ – B-Raf serin/treonin protein kinaza s mutacijom V600E; $EGFR^{L858R}$ – receptor za epidermalni faktor rasta s mutacijom L858R; HER2 – receptor za epidermalni faktor rasta 2; IRAK4 - kinaza 4 pridružena receptoru za interleukin-1; $KRAS^{G12D}$ – Kirsten rat sarcoma virus s mutacijom G12D; Bcl-xL – antiapoptotički protein velikostaničnog limfoma B stanica; STAT3 – signalni transduktor i aktivator transkripcije 3; SMARCA2 – katalitička podjedinica SWI/SNF (engl. SWItch/Sucrose Non-Fermentable) kompleksa; MDM2 – mouse dobule minute 2 homolog; VHL – von Hippel Lindau; IKZF1/3 – ikar i eol.

Prvi PROTAC-i koji su 2019. g. ušli u klinička ispitivanja su bavdegalutamid (ARV-110) i vepdegestrant (ARV-471). Vepdegestrant je napredovao u fazu III kliničkih ispitivanja, dok se bavdegalutamid nalazi u fazi II. Većina PROTAC-a u kliničkim ispitivanjima indicirana je za liječenje različitih vrsta raka.

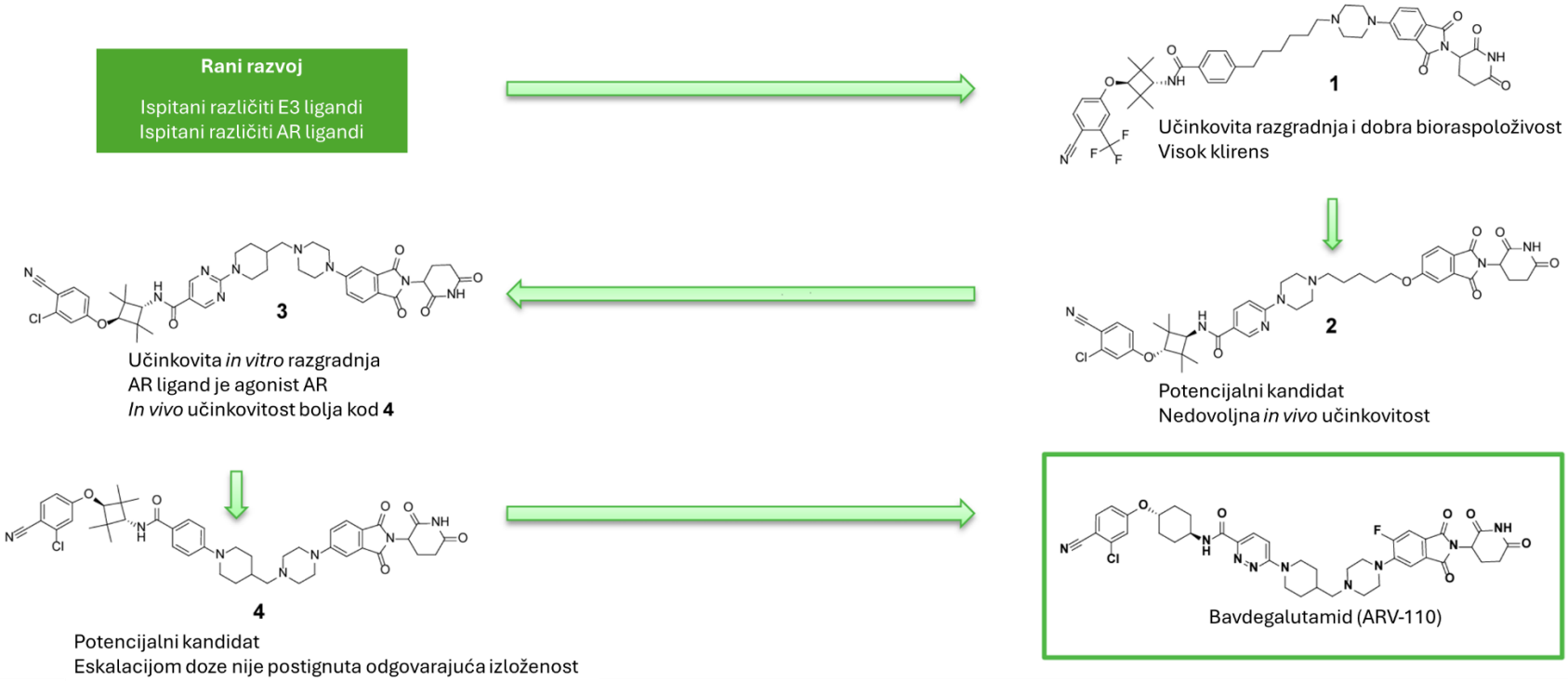
Degraderi AR-a

Prva linija liječenja karcinoma prostate je antiandrogena terapija kojom se snižava razina androgena ili blokira AR. Međutim, antiandrogena terapija neučinkovita je kod oko 15–25 % pacijenata te AR predstavlja vrlo zanimljivu metu za razgradnju degraderima. Bavdegalutamid prvi je PROTAC koji je ušao u klinička ispitivanja kao degrader AR-a za liječenje metastatskog karcinoma prostate rezistentnog na kastraciju (mCRPC) (57). Trenutno je, osim bavdegalutamida,

još četiri AR PROTAC-a (AC176, ARV-766, CC-94676 i HP518) u kliničkim ispitivanjima za liječenje mCRPR, a GT20029 se ispituje za liječenje androgene alopecije i akni (58).

Bavdegalutamid (ARV-110) (Slika 30) se sastoji od ariloksicikloheksanskog liganda za AR i CRBN liganda talidomida koje spaja kratka i rigidna poveznica sastavljena od piperazinskog i piperidinskog prstena međusobno odvojenih metilenskim mostom. Na slici 30 prikazan je razvoj bavdegalutamida. Neki od izazova koji su se javili tijekom optimizacije strukture i razvoja bavdegalutamida su bili povećan klirens, nedovoljna *in vivo* učinkovitost, agonizam AR-a i premala izloženost usprkos eskalaciji doze (137,144).

Pretklinička ispitivanja su pokazala da bavdegalutamid inducira potentnu razgradnju AR-a (DC_{50} ~1 nM) u staničnim linijama karcinoma prostate (VCaP i LNCaP). Globalnom proteomikom dokazana je selektivnost bavdegalutamida prema razgradnji AR-a u odnosu na 4000 ostalih proteina (D_{max} = 85 % pri 10 nM). Osim divljeg tipa AR-a, uzrokovao je razgradnju i nekoliko mutiranih varijanata koje su povezane s razvojem rezistencije na abirateron i enzalutamid (144,145).



Slika 30. *Razvoj AR PROTAC-a bavdegalutamida (ARV-110)* (144).

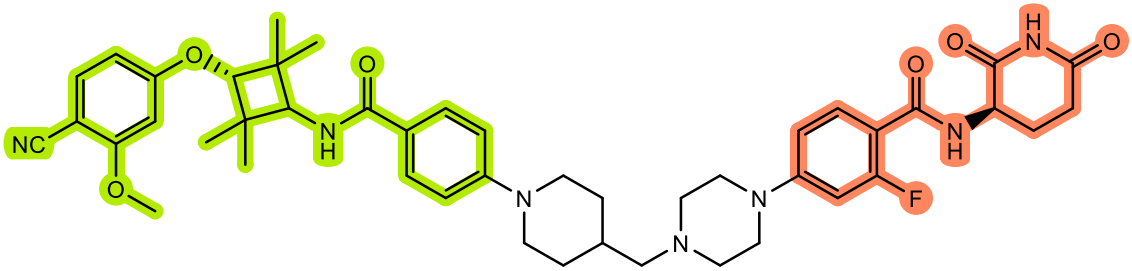
U usporedbi s enzalutamidom, bavdegalutamid je jače inhibirao sintezu prostata specifičnog antigena (PSA) i proliferaciju stanica karcinoma prostate te je uzrokovao jaču apoptozu stanica. Učinkovitost bavdegalutamida ispitana je na različitim životinjskim modelima karcinoma prostate. Kod kastriranih i nekastriranih miševa s VCaP karcinomom prostate, uzrokovao je značajno jače smanjenje rasta tumora u odnosu na enzalutamid. Na mišjem modelu karcinoma prostate doveo je do 100 %-tne inhibicije rasta tumora i više od 90 %-tne redukcije koncentracije PSA (144,145).

Na mišjim modelima karcinoma prostate rezistentnim na odobrenu hormonsku terapiju, uključujući enazalutamid i abiratereon, u odnosu na kontrolu je inhibirao rast tumora za 60 % pri dozi od 3 mg/kg, odnosno 70 % pri dozi od 10 mg/kg (145). U pretkliničkoj studiji koja je provedena u tri faze na kastriranim miševima, evaluirani su abirateron, enzalutiamid, odnosno bavdegalutamid u monoterapiji te kombinacije abiraterona i bavdegalutamida (faza 1). Nakon toga je slijedilo tretiranje s abirateronom do pojave rezistencije (faza 2) te je u fazi 3 randomizirana terapija s abirateronom ili bavdegalutamidom. Rezultati faze 1 pokazali su da je kombinacija abiraterona i bavdegalutamida superiornija u odnosu na monoterapije, dok je u fazi 3 bavdegalutamid doveo do smanjenja veličine tumora rezistentnog na abirateron u usporedbi sa samim abirateronom. Rezultati ove studije su ukazali na prednost kombinacije abiraterona i bavdegalutamida kao i na potencijal bavdegalutamida za dodatnu terapiju u slučaju porasta PSA vrijednosti kako bi se nadvladala rezistencija na abirateron, što se trenutno ispituje u fazi Ib kliničkih ispitivanja (NCT05177042) (146).

Početno kliničko ispitivanje faze I/II bavdegalutamida (NCT03888612) usmjereno je na pacijente s mCRPC koji su prethodno liječeni hormonskom terapijom. Cilj ovog ispitivanja na ljudima bilo je procijeniti sigurnost i podnošljivost bavdegalutamida, odrediti maksimalnu toleriranu dozu i identificirati preporučenu dozu za fazu II. U ispitivanju eskalacije doze, doze su se kretale od 35

mg do 700 mg jednom dnevno ili 140 mg do 420 mg dva puta dnevno kod muškaraca koji su primili barem dvije prethodne terapije, uključujući abirateron i/ili enzalutamid (144,147,148). Odabrana je doza od 420 mg/dnevno zbog toga što je njome postignuta izloženost veća od gornje granice učinkovitosti predviđene na pretkliničkom modelu karcinoma rezistentnog na enzalutamid (144). Nadalje, poboljšana aktivnost je zabilježena kod pacijenata s tumorima koji sadrže AR T878 i/ili H875 mutacije, odgovorne za rezistenciju na hormonsku terapiju. U ovoj podskupini, 40 % pacijenata imalo je smanjenje PSA ≥ 50 % (148). Na temelju pretkliničkih rezultata i ovih rezultata iz faze I, dizajnirana je faza II u kojoj su pacijenti bili podijeljeni u podskupine s obzirom na prethodno primljene terapije i sekvencioniranje DNA tumora. Ispitivanje je pokazalo kliničku učinkovitost bavdegalutamida kod prethodno liječenih pacijenata s mCRPC, posebno onih s AR T878 i H875 mutacijama, koji vjerojatno predstavljaju posebno osjetljivu populaciju na bavdegalutamid. Lijek je pokazao podnošljiv sigurnosni profil, što podržava daljnja klinička ispitivanja u ovoj populaciji pacijenata (148).

Luksdegalutamid (ARV-766) (Slika 31), degrader AR-a, sastoji se od ariloksitetrametilciklobutanskog AR liganda i CRBN liganda, a razvijen je iz ARV-110 optimizacijom oba liganda. Pretkliničke studije su pokazale supresiju rasta tumora čak pri vrlo visokim razinama androgena. Kliničke studije su napredovale u fazu II (NCT05067140) za liječenje mCRPC-a u monoterapiji ili u kombinaciji s abirateronom (149).



Slika 31. *Struktura AR PROTAC-a luksdegalutamida (ARV-766). AR ligand označen je zeleno, CRBN ligand narančasto, a poveznica crno* (149).

Podaci o ostalim AR PROTAC-ima koji se nalaze u kliničkim ispitivanjima nisu dostupni.

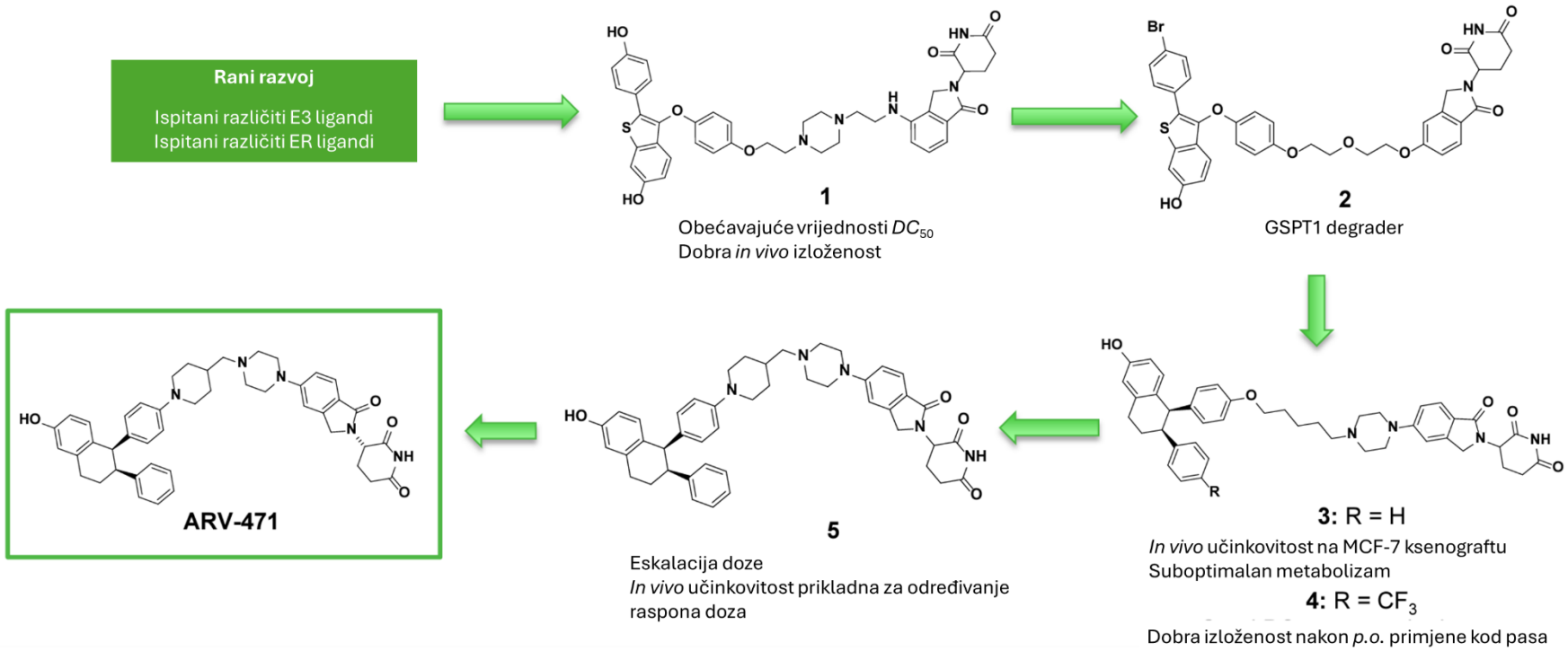
Degraderi ER-a

ER^+ karcinom dojke najčešći je oblik karcinoma dojke kod žena. Endokrina terapija koristi se za blokiranje aktivnosti ER-a čime se usporava rast tumora. Primjeri lijekova koji se koriste u endokrinoj terapiji su SERM, inhibitori aromataze i SERD. Fulvestrant je antagonist ER-a i SERD kojim je potvrđena vrijednost razgradnje ER-a kao terapijskog pristupa u liječenju ER^+ karcinoma dojke. Međutim, zbog nepotpune razgradnje ER-a i mutacija koje dovode do rezistencije, potrebni su učinkovitiji degraderi ER-a. Vepdegestrant je prvi PROTAC degrader ERα koji je 2019. g. ušao u klinička ispitivanja. Osim njega, trenutno se u kliničkim ispitivanjima nalazi još jedan ER PROTAC (AC699) te čak 11 SERD-ova (58).

Vepdegestrant (ARV-471) (Slika 32) se sastoji od ER liganda i lenalidomida kao CRBN liganda koje spaja jednaka poveznica kao u bavdegalutamidu i luksdegalutamidu. Na slici 32 prikazan je razvoj vepdegestranta (150).

U pretkliničkim ispitivanjima vepdegestrant je inducirao razgradnju ER-a u nekoliko staničnih linija ER^+ karcinoma dojke, uključujući staničnu liniju adenokarcinoma dojke MCF-7 (DC_{50} = 1,8

nM) i stanične linije s ESR1 mutacijom. Na animalnom modelu PDX s mutacijom ESR1 (ER^{Y537S}) inhibirao je rast tumora za 99 % nakon oralne dnevne doze od 10 mg/kg, odnosno 106 % pri dozi od 30 mg/kg. Western blot analiza je pokazala razgradnju ER-a za 79 % pri dozi od 10 mg/kg i 88 % pri dozi od 30 mg/kg, u odnosu na fulvestrant koji je uzrokovao 63 % razgradnje. Također, kombinacija vepdegestranta i palbocikliba pokazala je jaču inhibiciju rasta tumora nego svaki lijek zasebno (150).



Slika 32. *Razvoj ER PROTAC-a vepdegestranta (ARV-471)* (150).

U kliničke studije faze I i II (NCT04072952) bili su uključeni pacijenti s lokalno uznapredovalim ili metastatskim $ER^{+}HER2^{-}$ karcinomom dojke, koji su prethodno bili liječeni palbociklibom ili endokrinom terapijom. U dozama od 30 do 500 mg, farmakokinetički parametri su bili ovisni o dozi. Klinički dokaz koncepta bila je razgradnja ER-a od 64 % (srednja vrijednost) s maksimumom od 89 % pri dozi od 500 mg, dok je fulvestrant uzrokovao 40–50 % razgradnje ER-a. Razgradnja je dokazana i kod karcinoma dojke s ESR1 mutacijom.

U fazi II ispitivane su doze vepdegestranta od 200 i 500 mg jednom dnevno. Vepdegestrant je pokazao obećavajuću pretkliničku i kliničku učinkovitost u liječenju ER^{+} raka dojke, posebno kod pacijenata s ESR1 mutacijama. Razina kliničke koristi kod pacijenata koji su prethodno bili liječeni CDK4/6 inhibitorima, hormonskom terapijom i/ili kemoterapijom, bila je oko 40 % kod obje ispitane doze. Među pacijentima s ESR1 mutacijom, stope su bile 47 % za dozu od 200 mg i 55 % za dozu od 500 mg. Lijek pokazuje dobar sigurnosni profil (150). Doza od 200 mg jednom dnevno odabrana je za studije faze III. Trenutno su aktivne dvije randomizirane studije faze III u kojima se uspoređuje monoterapija vepdegestrantom s terapijom fulvestrantom (NCT05654623, VERITAC-2), odnosno kombinacija vepdegestranta i palbocikliba s kombinacijom letrozola i palbocikliba (NCT05909397, VERITAC-3) kod pacijenata s uznapredovalim metastastatskim $ER^{+}HER2^{-}$ karcinomom dojke (58).

AC699 je ER PROTAC u fazi I kliničkih ispitivanja za liječenje $ER^{+}HER2^{-}$ karcinoma dojke (NCT05654532). Prelimirani rezultati studije faze I pokazuju obećavajući sigurnosni profil, podnošljivost i antitumorsko djelovanje u dozama do 300 mg *p.o.* jednom dnevno (151). Osim ovih ograničenih podataka, o AC699 nije dostupna druga literatura kao ni za ostale degradere ER-a iz skupine PROTAC-a koji se nalaze u kliničkim ispitivanjima.

BTK PROTAC-i

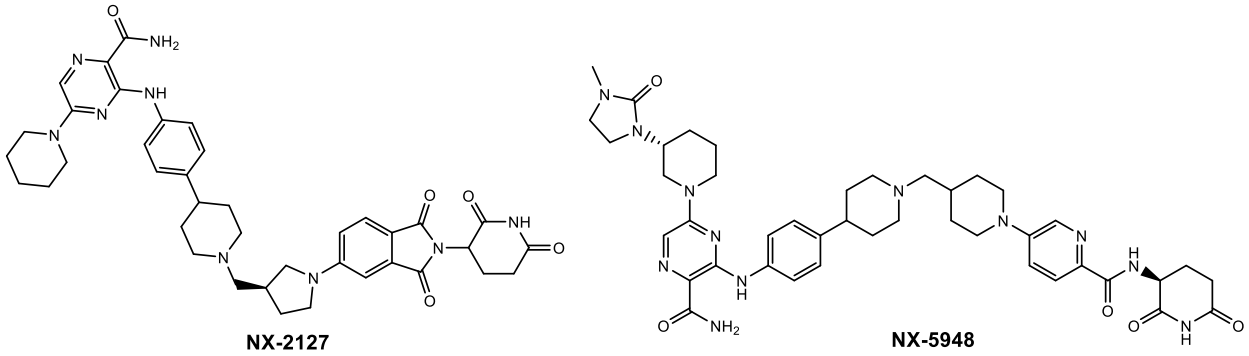
BTK je ključna kinaza u signalnim putevima koji vode do aktivacije, proliferacije i preživljenja B stanica. Nekoliko malih molekula inhibitora BTK je odobreno (npr. ibrutinib, acalabrutinib) ili je u kliničkom razvoju za liječenje malignih oboljenja B stanica. Međutim, učinkovitost ovih lijekova je ograničena zbog razvoja rezistencije uslijed mutacija *BTK*. Četiri CRBN PROTAC-a koji potiču razgradnju BTK (NX-2127, NX-5948, BGB-16673, HSK29116) i jedan PROTAC čiji E3 ligand nije poznat (ABBV-101) nalaze se u kliničkim ispitivanjima za liječenje limfoma B stanica (57).

NX-2127 (Slika 33) inducira razgradnju divljeg tipa BTK u staničnim linijama difuznog velikostaničnog limfoma B stanica (DLBCL) (DC_{50} = 4 nM) i limfoma stanica plašta (MCL) (DC_{50} = 4–6 nM te mutiranog BTK rezistentnog na ibrutinib (BTK^{C481S}) (DC_{50} = 13 nM). Također, sprječava proliferaciju DLBCL stanica. NX-2127 djeluje slično IMiD-ima s obzirom na razgradnju neosupstrata IKZF1/3, što dovodi do aktivacije T stanica i stvaranja interleukina-2. U pretkliničkim ispitivanjima inhibirao je rast tumora na mišjem modelu limfoma u dozama od 30 i 90 mg/kg. Kod majmuna je uzrokovao značajnu razgradnju BTK pri dozama od 1, 3 i 10 mg/kg (152). Među ostalim, NX-2127 je pokazao značajno antiproliferativno djelovanje na stanične linije DLBCL i MCL te je uzrokovao smanjenje ekspresije gena koji kodiraju proteine uključene u replikaciju i popravak DNA (153,154).

Studija faze I kliničkih ispitivanja provedena je na pacijentima s relapsnim ili refraktornim malignim oboljenjem B stanica koji su bili na prethodnim terapijama BTK inhibitorima. NX-2127 pokazao je dobar sigurnosni profil te značajnu ranu kliničku učinkovitost u razgradnji BTK, uključujući njegov mutirani oblik (155).

Za razliku od NX-2127, NX-5948 (Slika 33) inducirao je vrlo učinkovitu razgradnju BTK bez utjecaja na IKZF1/3 (DC_{50} (divlji tip) = 0,32 nM, DC_{50} (BTKC481S) = 1 nM) *in vitro*. Na mišjem

modelu DLBCL-a rezistentnom na ibrutinib, inhibirao je rast tumora za 36 % pri dozi od 3 mg/kg, odnosno 99 % pri 10 mg/kg. Važno je naglasiti da NX-5948 ima sposobnost prelaska KMB, što je dovelo do > 80 % razgradnje BTK u implantiranim DLBCL stanicama i mikroglijama u mozgu (156). Podaci iz rane faze I kliničkih ispitivanja ukazuju na dobru podnošljivost te brzu, učinkovitu i održanu razgradnju BTK, neovisno o vrsti tumora (157).



Slika 33. *Strukture BTK PROTAC-a NX-2127 i NX-5948.*

Preliminarni rezultati studije faze I kliničkih ispitivanja BTK PROTAC-a BGB-16673 pokazuju podnošljiv sigurnosni profil i klinički odgovor kod pacijenata s malignim oboljenjima B stanica, uključujući pacijente s rezistencijom na BTK inhibitore koji su prethodno primali terapiju. Zabilježeno je značajno smanjenje razine BTK u perifernoj krvi i tumorskom tkivu čime je dokazan koncept snažnog djelovanja na metu (158).

Ostali PROTAC-i u kliničkim ispitivanjima za liječenje raka

S obzirom da rezultati kliničkih ispitivanja ostalih PROTAC-a nisu dostupni, prikazani su rezultati pretkliničkih ispitivanja, također ovisno o dostupnosti. Na slici 34 su prikazane objavljene strukture opisanih PROTAC-a.

Oralni CRBN PROTAC CFT1946 je selektivni degrader $BRAF^{V600E}$ (DC_{50} = 14 nM nakon 24 h) mutiranog oblika serin/treonin protein kinaze B-Raf koja igra važnu ulogu u različitim vrstama raka, pogotovo kod melanoma. CFT1946 također inhibira fosforilaciju kinaze aktivirane izvanstaničnim signalom (ERK). Na mišjem modelu $BRAF^{V600E}$ melanoma, značajno je inhibirao rast tumora u dozi 10 mg/kg dva puta dnevno, a bio je učinkovit i na mutantni oblik rezistentan na BRAF inhibitore. U kombinaciji s inhibitorom mitogenom aktivirane protein kinaze (MEK) trametinibom pokazao je jaču inhibiciju fosforilacije ERK-a i rasta tumora nego kombinacija enkorafeniba i trametinib ili svaki lijek zasebno. Osim V600E mutanata, CFT1946 bio je učinkovit i na druge BRAF mutante. Zbog potencijala za ciljanu terapiju karcinoma s $BRAF^{V600E}$ mutacijom i nadvladavanje rezistencije, trenutno se nalazi u fazi I/II kliničkih ispitivanja (NCT05668585) za liječenje uznapredovalih solidnih tumora koji nose mutaciju $BRAF^{V600E}$ kao monoterapija ili u kombinaciji s trametinibom.

ARV-393 je CRBN PROTAC za oralnu primjenu koji inducira potentnu ciljanu razgradnju proteina B staničnog limfoma 6 (BCL6) u staničnim linijama DLBCL i BL (DC_{50} i GI_{50} < 1 nM). U pretkliničkim ispitivanjima na nekoliko mišjih modela limfoma demonstrirao je učinkovitu razgradnju BCL6 i inhibiciju rasta tumora (159) te je 2024. g. ušao u fazu I kliničkih ispitivanja za liječenje relapsnog/refraktornog ne-Hodgkinovog limfoma (NCT06393738) (58).

ASP3082 je PROTAC za intravensku primjenu koji selektivno cilja $KRAS^{G12D}$ mutaciju K-Ras proteina koji sudjeluje u RAS/MAPK signalnom putu važnom za staničnu proliferaciju i

preživljenje. Osim što je u *in vitro* ispitivanjima inducirao potentnu razgradnju $KRAS^{G12D}$ u stanicama karcinoma gušterače, također je inhibirao fosforilaciju ERK-a. U pretkliničkim ispitivanjima na mišjem modelu duktalnog adenokarcinoma gušterače se $KRAS^{G12D}$ mutacijom, ASP3082 primijenjen jednom tjedno uzrokovao je smanjenje rasta tumora, uključujući i potpunu regresiju (160). Trenutno se nalazi u fazi I kliničkih ispitivanja za liječenje uznapredovalih solidnih tumora s mutacijom $KRAS^{G12D}$ kao monoterapija ili u kombinaciji s cetuksimabom (NCT05382559) (58).

DT2216 je prvi PROTAC u kliničkim ispitivanjima koji djeluje preko VHL E3 ligaze, a primjenjuje se intravenski. DT2216 inducira potentnu i selektivnu razgradnju Bcl-xL te potiče apoptozu u stanicama tumora ili čini stanice tumora osjetljivijim na kemoterapiju. Bcl-xL pripada porodici Bcl-2 antiapoptotičkih proteina koji, osim što potiče rast tumora, dovodi i do rezistencije. Stoga je razvoj novih lijekova koji ciljaju Bcl-xL od iznimne važnosti. VHL je racionalno odabrana E3 ligaza jer je vrlo slabo eksprimirana u trombocitima, pa za razliku od inhibitora Bcl-xL, DT2216 ne uzrokuje trombocitopeniju (113). U pretkliničkim ispitivanjima na mišjem modelu akutne limfoblastične leukemije T stanica doveo je do značajne inhibicije rasta tumora i razgradnje Bcl-xL primijenjen jednom tjedno (113,161,162). Faza I kliničkih ispitivanja za relapsne i/ili refraktorne maligne bolesti (NCT04886622) završena je krajem 2023. g., ali rezultati još uvijek nisu objavljeni (58).

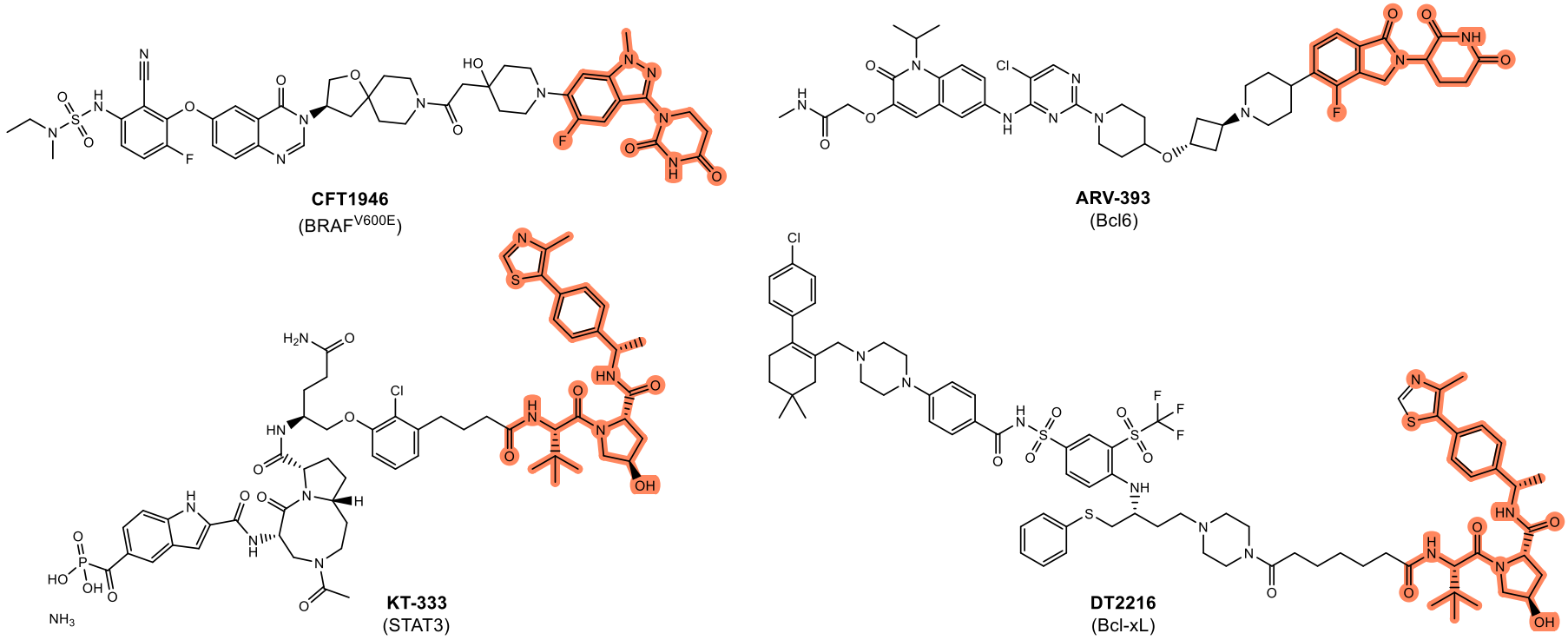
KT-333 je VHL PROTAC koji cilja STAT3, transkripcijski aktivator uključen u staničnu proliferaciju i preživljenje, a koji je prethodno smatran proteinom „na kojeg se ne može djelovati“. KT-333 inducira potentnu razgradnju STAT3 u različitim vrstama stanica, uključujući stanice solidnih tumora i limfoma, kao i primarne imunosne stanice, s DC_{50} vrijednostima uglavnom nižim od 10 nM. Razgradnja STAT3 posebno je selektivna u stanicama limfoma. KT-333 učinkovito

smanjuje proliferaciju i inducira apoptozu stanica *in vitro*. U pretkliničkim ispitivanjima na mišjem modelu limfoma, KT-333, primijenjen intravenski jednom ili dva puta tjedno, značajno smanjuje rast tumora (163). Trenutno se nalazi u fazi I kliničkih ispitivanja za liječenje leukemija i solidnih tumora (NCT05225584) (58).

KT-253 je intravenski PROTAC koji potiče razgradnju E3 ligaze MDM2, onkoproteina ključnog za razgradnju i inaktivaciju tumor supresorskog proteina p53. U odnosu na MDM2 inhibitore, KT253 pokazuje i do 200 puta jaču inhibiciju rasta tumora i indukciju apoptoze *in vitro* jer sprječava povećanje ekspresije MDM2 ovisno o p53. U pretkliničkim ispitivanjima na mišjem modelu akutne mijeloične leukemije i akutne limfoblastične leukemije, jedna doza KT-253 uzrokovala je značajnu i brzu apoptozu te produljenu regresiju tumora, a utvrđena doza je iznosila 1 mg/kg svaka tri tjedna. Na modelu leukemije rezistentnom na venetoklaks, došlo je do jače i dulje inhibicije rasta tumora kada je KT-253 primijenjen u kombinaciji s venetoklaksom nego svaki lijek posebno (164). Nalazi se u fazi I kliničkih ispitivanja za liječenje visokog stupnja mijeloičnih oboljenja, akutne limfocitne leukemije, limfoma i solidnih tumora (NCT05775406) (58).

PRT3789 je potentan i selektivan PROTAC za intravensku primjenu koji potiče razgradnju SMARCA2 u stanicama tumora. SMARCA2 i SMARCA4 su katalitičke podjedinice SWI/SNF (engl. *SWItch/Sucrose Non-Fermentable*) kompleksa koji sudjeluje u remodeliranju kromatina i na taj način regulira gensku ekspresiju. Kod nekih vrsta raka dolazi do gubitka ekspresije SMARCA4 te stanice raka postaju jako ovisne o SMARCA2. Na stanicama karcinoma pluća ne-malih stanica (NSCLC) i animalnom modelu NSCLCL PRT3789 je imao antiproliferativno djelovanje, dok na stanice koje eksprimiraju SMARCA4 nije djelovao (165). Trenutno se nalazi u fazi I kliničkih

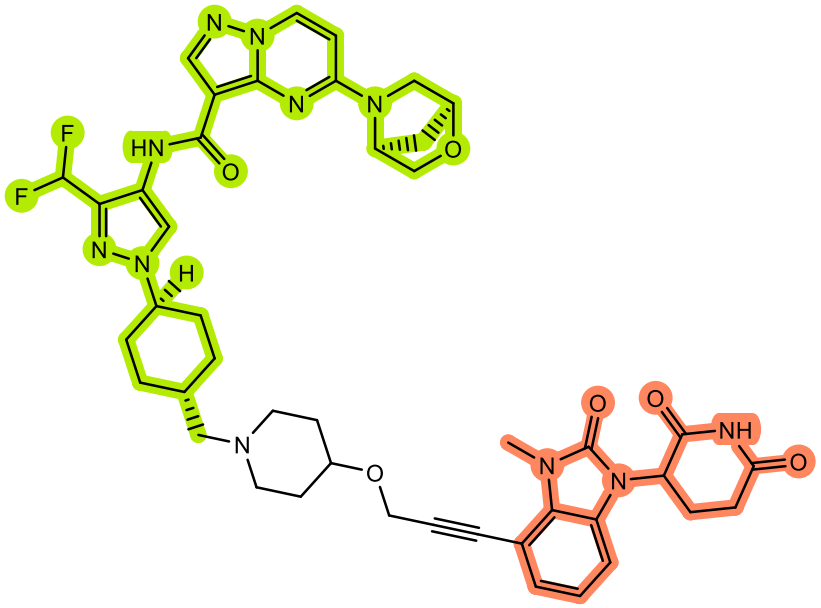
ispitivanja za liječenje uznapredovalih ili metastatskih solidnih tumora sa SMARCA4 mutacijom kao monoterapija ili u kombinaciji s docetakselom (NCT05639751) (58).



Slika 34. *Strukture PROTAC-a u kliničkim ispitivanjima za liječenje raka, izuzev degradera AR, ER i BTK. U zagradi su navedene mete. Narančasto je označen E3 ligand (gornji red CRBN, a donji VHL). Strukture ostalih PROTAC-a u kliničkim ispitivanjima nisu objavljene.*

PROTAC-i u kliničkim ispitivanjima za ostale indikacije

Prvi PROTAC za neonkološke indikacije koji je ušao u klinička ispitivanja bio je KT-474 (Slika 35), degrader kinaze 4 pridružene receptoru za interleukin-1 (engl. *interleukin-1 receptor-associated kinase 4*, IRAK4). Iako je dobro poznata važna uloga IRAK4 u upalnim bolestima i limfomima B stanica, još uvijek ne postoje odobreni lijekovi koji specifično ciljaju IRAK4. Nekoliko inhibitora IRAK4 nalazi se u kliničkim ispitivanjima za liječenje autoimunih bolesti. Međutim, inhibitori mogu jedino blokirati kinaznu funkciju IRAK4, a ne mogu djelovati na konstrukcijsku funkciju, koja je vrlo značajna u TLR (engl. *Toll-like receptor*) signalizaciji, te upravo tu leži potencijal degradera. KT-474 je CRBN PROTAC za oralnu primjenu.



Slika 35. *Struktura PROTAC-a KT-474 za ciljanu razgradnju IRAK4 u atopijskom dermatitisu i hidradenitisu suppurativa. Narančasto je označen CRBN ligand, a zeleno IRAK4 ligand.*

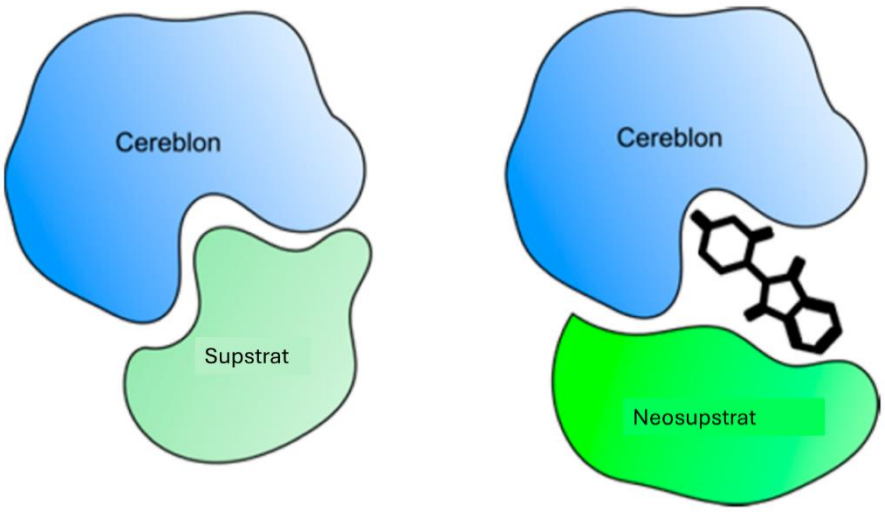
Podaci iz faze I kliničkih ispitivanja za liječenje atopijskog dermatitisa i hidradenitis suppurativa pokazali su da kod zdravih ispitanika dolazi do ≥ 95 % razgradnje IRAK4 nakon 14 dana terapije. Rezultati studije na pacijentima bili su slični rezultatima na zdravim ispitanicima te je dokazan koncept razgradnje IRAK4 za liječenje atopijskog dermatitisa i hidradentisa suppurative . Trenutno se KT-474 nalazi u dvije studije faze II kliničkih ispitivanja za liječenje atopijskog dermatitisa (NCT06058156) i hidradenitisa suppurative (NCT06028230) (58).

LT-002-158 je također PROTAC degrader IRAK4 koji je u fazi I kliničkog ispitivanja za liječenje atopijskog dermatitsa i hidradenitisa suppurative (58), ali podataci o njemu nisu dostupni u literaturi.

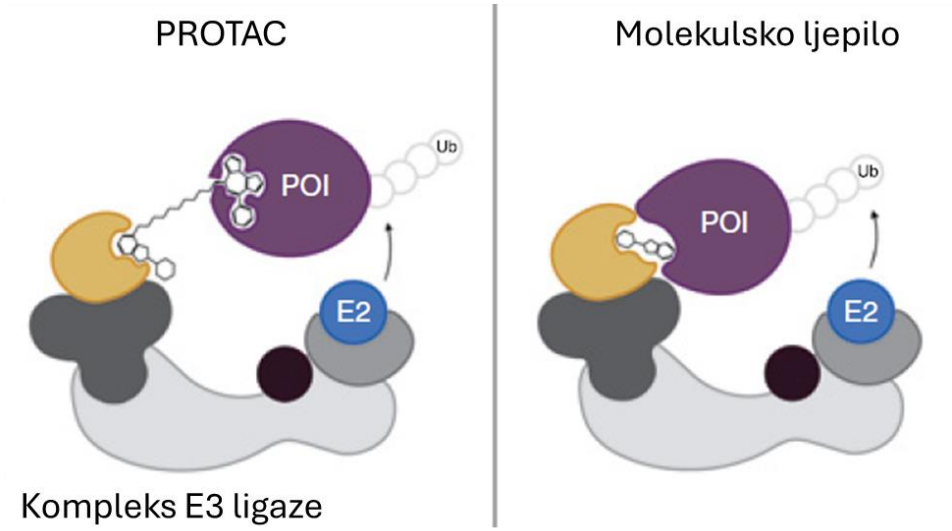
S obzirom da je jedno od glavnih svojstava degradera sposobnost razgradnje proteina „na koje se ne može djelovati“ tradicionalnim lijekovima, područje neurodegenerativnih bolesti je u tom smislu izuzetno aktualno. Nepravilno smotani agregirani proteini (tau, mutirani huntingtin, α-sinuklein), kinaze i histon deaacetilaze predstavljaju pogodne mete degradera (50). Farmaceutska tvrtka Arvinas najavila je fazu I kliničkih ispitivanja oralnog PROTAC-a ARV-102 za ciljanu razgradnju leucinom bogate ponavljajuće kinaze 2 (LRRK2), kinaze uključene u patofiziologiju neurodegenerativnih bolesti kao što su Parkinsonova bolest i progresivna supranuklearna paraliza. ARV-102 prelazi KMB. Osim LRRK2 PROTAC-a, u pretkliničkim ispitivanjima nalaze se degraderi α-sinukleina, mutiranog huntingtina i proteina tau (166).

3.1.2.2. Molekulska ljepila degraderi

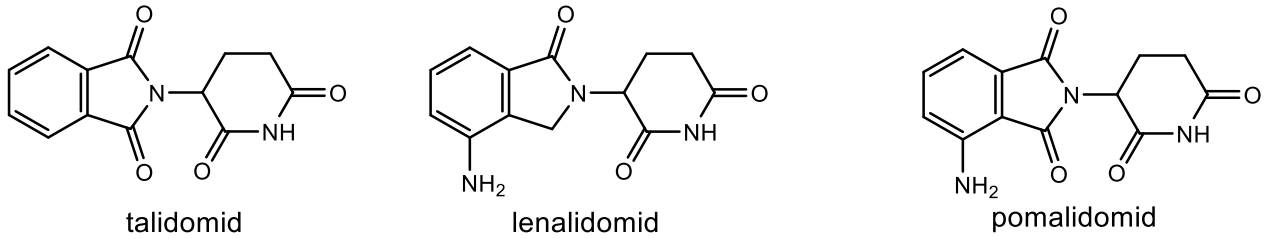
Molekulska ljepila degraderi pripadaju skupini monovalentnih degradera koji stabiliziraju ili *de novo* induciraju vrlo kooperativne PPI između E3 ligaze i POI-a. Na taj način proteini koji nisu prirodno supstrati E3 ligaze, postaju tzv. neosupstrati (Slika 36). Iako i PROTAC-i i molekulska ljepila degraderi iskorištavaju UPS za kontrolu koncentracije proteina unutar stanice, postoje određene razlike u njihovom mehanizmu djelovanja (Slika 37). PROTAC-i su heterobifunkcionalne hibridne molekule koje istovremeno stupaju u interakcije s POI i E3 ligazom. S druge strane, molekulska ljepila su monovalentna i mogu stupati u interakcije samo s jednim proteinom i inducirati ili stabilizirati interakcije među proteinima. Primjeri odobrenih molekulskih ljepila degradera su talidomid i njegovi derivati (IMiD-i) (Slika 38). Dok je kod PROTAC-a moguć prethodno opisan racionalan dizajn, otkriće molekulskih ljepila je i dalje uglavnom slučajno (167).



Slika 36. *Vezanje molekulskog ljepila (IMiD-a) na CRBN inducira PPI s neosupstratima (preuzeto iz* (168) *uz dopuštenje izdavača, American Chemical Society, 2017.).*



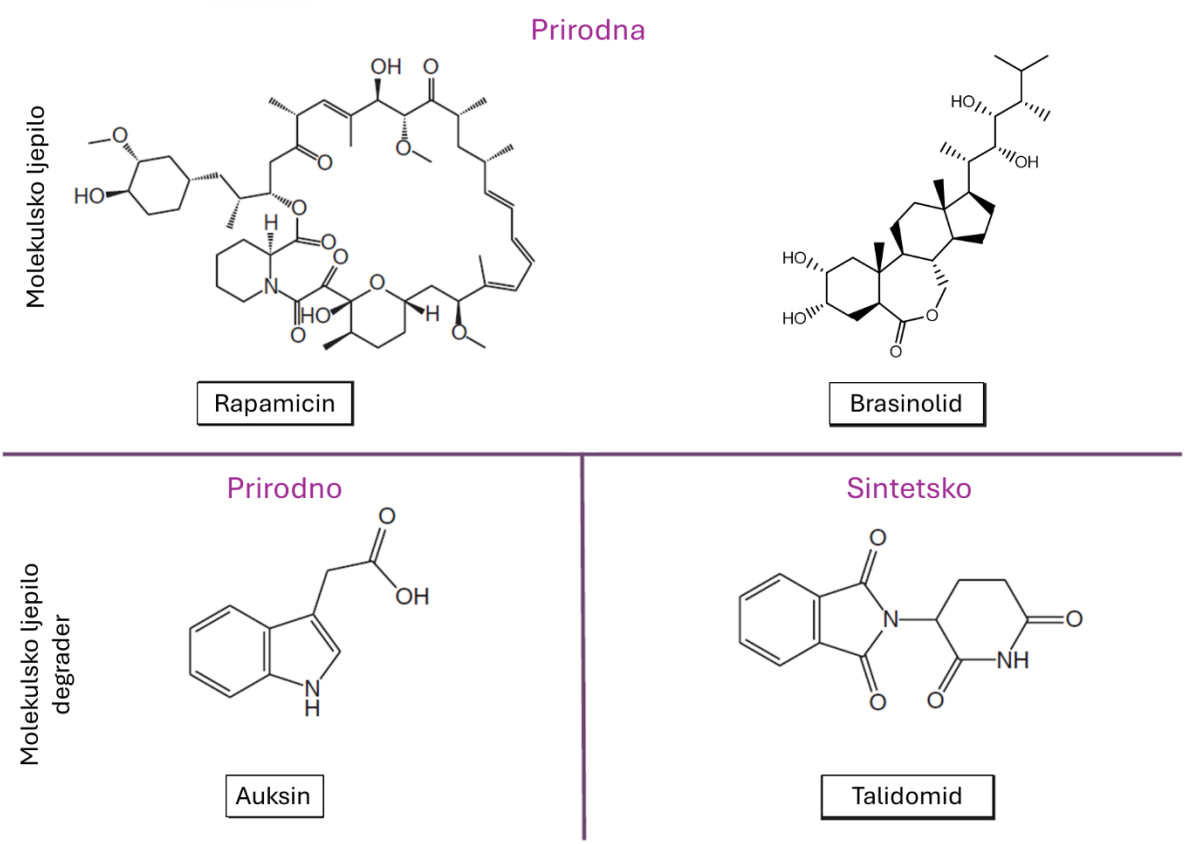
Slika 37. *Usporedba mehanizama djelovanja bivalentnih PROTAC-a i monovalentnih molekulskih ljepila (prilagođeno prema* (167) *uz dopuštenje izdavača John Wiley & Sons).*



Slika 38. *Strukture imunomodulatora (IMiD-a) talidomida, lenalidomida i pomalidomida, molekulskih ljepila liganada CRBN E3 ligaze.*

Procjenjuje se da se u ljudskim stanicama odvija oko 300 000 PPI koje su uključene u sve fiziološke procese (169), stoga PPI predstavljaju vrlo zanimljive, ali još uvijek nedovoljno istražene mete lijekova. Otkrićem skupine prirodnih produkata koji induciraju PPI dokazalo se da ih je moguće ciljati (170,171), iako ovaj pristup i danas predstavlja izazov (167,172). Takve molekule nazvane su molekulskim ljepilima jer induciraju (ili stabiliziraju) PPI između proteina

koji normalno ne stupaju u interakciju. Koncept „molekulskih ljepila“ uveden je u ranim 1990.-im godina kako bi se opisao mehanizam djelovanja imunosupresivnih mikrobnih makrolida takrolimusa (FK506) i rapamicina (Slika 39) te cikličkog peptida ciklosporina A. Takrolimus i rapamicin se vežu na FKBP12 i induciraju nove interakcije s kalcineurinom, odnosno mTOR-om (engl. *mammalian target of rapamycin*). Ciklosporin A inducira dimerizaciju kalcineurina i ciklofilina (167). Međutim, svojstva molekulskih ljepila nemaju samo molekule tako složenih struktura, već i strukturno puno jednostavnije molekule, kao što je fungalni metabolit makrociklički lakton brefeldin A (173).



Slika 39. *Strukture prirodnih molekulskih ljepila rapamicina i brasinolida te molekulskih ljepila degradera fitohormona auksina i sintetskog talidomida (prilagođeno prema* (167)*).*

Primjeri molekulskih ljepila u biljnom svijetu su fitohormoni poput brasinosteroida (Slika 39) (174), metil-jasmonata (175) i auksina (176). Auksin (Slika 39) se veže na TIR1 podjedinicu E3 ligaze SCF^{TIR1} i inducira PPI s transkripcijskim korepresorom AUX/IAA, što dovodi do njegove proteasomske razgradnje i rasta biljke (176,177). Kod virusa također postoje primjeri molekulskih ljepila koji sudjeluju u obrani virusa od imunosnog sustava domaćina (178,179). Primjer je čimbenik infektivnosti virusa humane imunodeficijencije.

Međutim, veliki interes za ovu vrstu molekula pojavio se tek kada je otkriveno da i sintetske molekule mogu djelovati kao molekulska ljepila. Najznačajniji primjeri su svakako IMiD-i (167). Talidomid (Slike 37 i 38) vezanjem na $CRL4^{CRBN}$ E3 ligazu omogućuje interakciju CRBN-a s IKZ1/3 koji postaju neosupstrati, te dolazi do njihove razgradnje posredovane UPS-om (52,180). Na sličan način djeluju aromatski sulfonamidi, kao što je indisulam, koji vezanjem na $CRL4^{DCAF15}$ potiču razgradnju RBM39 i RBM23 (20). Svim molekulskim ljepilima degraderima zajednička je osobina sposobnost indukcije razgradnje meta koje su do tada smatrane metama „na koje se ne može djelovati“. Osim toga, molekulska ljepila iskorištavaju E3 ligaze koje pripadaju najvećoj porodici E3 ligaza – CRL, pri čemu se najčešće vežu na receptorski supstrat u kompleksu CRL (167).

Molekulska ljepila imaju određene prednosti u odnosu na PROTAC-e. To je pogotovo izraženo u povoljnijim fizikalno-kemijskim svojstvima molekulskih ljepila. S obzirom da ne posjeduju poveznicu, mnogo su manja u odnosu na PROTAC-e ($M_r < 500$) te uglavnom imaju dobru oralnu bioraspoloživost i bolju staničnu permeabilnost (141). Osim toga, pomoću njih je već dokazan koncept TPD-a u klinici (181–189). Međutim, molekulska ljepila je jako teško dizajnirati i uglavnom su otkrivena slučajno, ali danas se veliki napori ulažu u sustavna otkrića molekulskih

ljepila. Također treba naglasiti i neosporan utjecaj molekulskih ljepila, pogotovo IMiD-a, na razvoj PROTAC-a, koji je opisan u prethodnom poglavlju.

3.1.2.2.1. Slučajna otkrića molekulskih ljepila

Talidomid se kasnih 1950.-ih godina koristio za liječenje jutarnje mučnine i kao sedativ u trudnoći, ali je vrlo brzo povučen s tržišta zbog katastrofalnog teratogenog učinka (190). Kasnije je otkriveno da talidomid posjeduje druga važna djelovanja te je 1998. g. odobren za liječenje lepre, a 1999. za liječenje multiplog mijeloma (191). Ovo otkriće potaknulo je razvoj strukturnih analoga talidomida – pomalidomida i lenalidomida, koji su 2006. g. odobreni za liječenje relapsnog ili refraktornog multiplog mijeloma zbog svog imunomodulatornog i antiangiogenog učinka (192). Potrebno je naglasiti da su IMiD-i odobreni prije nego je njihov mehanizam djelovanja bio poznat. Gotovo 50 godina nakon što se talidomid počeo upotrebljavati, Handa i sur. otkrili su da se izravno veže na CRBN podjedinicu E3 ligaze $CRL4^{CRBN}$ (52). U početku se smatralo da talidomid samo inhibira djelovanje $CRL4^{CRBN}$ te tako doprinosi teratogenosti, ali je kasnije otkriveno da omogućuje E3 ligazi da preuzme nove funkcije, odnosno vezanjem na CRBN IMiD-i induciraju proteasomsku razgradnju neosupstrata transkripcijskih faktora kao što su IKZF1 i IKZF3 (180,193–196). Lenalidomid dodatno potiče razgradnju CK1α (140), čime je dokazano da i samo male promjene u strukturi mogu značajno utjecati na selektivnost prema supstratima. Od tada je otkriveno mnogo drugih neosupstrata čiju razgradnju potiču IMiD-i (197). Danas se IMiD-i koriste za liječenje multiplog mijeloma, ne-Hodgkinovog limfoma, mijelodisplastičnog sindroma i Kaposijevog sarkoma (182).

Prve kristalne strukture IMiD-a vezanih na CRBN u kompleksu CRBN-DDB1 objavljene su 2014. g. (198,199). Otkriveno je da glutarimidni prsten, prisutan u svim strukturama IMiD-a, stupa u interakcije s hidrofobnim džepom CRBN-a kojeg čine tri triptofanska ostatka i fenilalaninski bočni lanac, dok je varijabilni dio IMiD-a (ftalimid ili izoindolinonske skupine) izložen otapalu (Slika 25a). Iako su transkripcijski faktori proteini cinkovog prsta (IKZF1/3) najčešće mete IMiD-a, prve kristalne strukture ternarnih kompleksa su bile kompleks CRBN-a s lenalidomidom i CK1α (200) te kompleks CRBN-a s molekulskim ljepilom CC-885 i GSPT1 (201). Ove kristalne strukture su bile definitivna potvrda da IMiD-i djeluju kao molekulska ljepila, a tek kasnije je potvrđeno da IMiD-i tvore ternarne komplekse s različitim proteinima cinkovog prsta (202,203). Pomoću kristalnih struktura utvrđeno je kakve strukturne karakteristike moraju imati degroni za prepoznavanje pomoću E3 ligaze (204).

Farmaceutska industrija posebno mnogo ulaže u razvoj novih derivata talidomida. Posebno su privlačni novi IMiD-i koji mogu nadvladati rezistenciju na talidomid ili, djelujući na druge POI, biti učinkoviti u novim indikacijama. Lenalidomid je bio treći na listi najprepisivanijih lijekova 2019. i 2020. g., a prvi kao mala molekula (205,206). S obzirom na velik broj potencijalnih neosupstrata IMiD-a povećan je rizik toksičnosti molekulskih ljepila, kao što je već diskutirano kod PROTAC-a. Teratogenost talidomida povezana je s razgradnjom neosupstrata SALL4 (142), PLZF (207) i p63 (208).

CRBN pokazuje veliku fleksibilnost u smislu vezanja neosupstrata induciranog IMiD-ima. Međutim, nisu sve E3 ligaze tako feksibilne. Primjerice DCAF15, čiji ligandi su aromatski sulfonamidi, ima puno ograničeniji spektar meta od CRBN-a. Aromatski sulfonamidi antitumorskog djelovanja druga su skupina sintetskih molekulskih ljepila koji su otkriveni slučajno. Reprezentativni primjer je indisulam spomenut u uvodnom dijelu, a koji je otkriven

fenotipskim probirom (209). On se veže na DCAF15 supstratni receptor E3 ligaze $CRL4^{DCAF15}$ te potiče razgradnju RBM39. Za razliku od IMiD-a koji se visokim afinitetom vežu na CRBN i mijenjaju njegovu konformaciju tako da postane povoljna za interakcije s neosupstratima, aromatski sulfonamidi pokazuju puno manji afinitet prema samom DCAF15. Vezanje arilsulfonamida pospješuje velika dodirna površina između dva proteina te ternarni kompleks nastaje kada se sve tri molekule nađu u blizini (21). Time je pokazano da i E3 ligaze za koje ne postoje dobri visokoafinitetni ligandi mogu biti mete u razvoju novih lijekova. Danas još uvijek nije odobren ni jedan aromatski sulfonamid. Rane studije faze II kliničkih ispitivanja indisulama bile su usmjerene na pacijente s uznapredovalim solidnim tumorima, ali su pokazale ograničenu učinkovitost (210–212). Također je i razvoj DCAF15 PROTAC-a puno zahtjevniji nego CRBN ili VHL. Međutim, uspješno je pripravljen već spomenut DP1, DCAF15 PROTAC za razgradnju BRD4 (108).

Istraživanja BCL6 inhibitora dovela su do otkrića malih molekula koje djeluju kao molekulska ljepila te potiču proteasomsku razgradnju BCL6, transkripcijskog faktora uključenog u karcinogenezu limfoma (213). Studije mehanizma djelovanja BI-3802 pokazale su da dolazi do destabilizacije BCL6 uslijed polimerizacije potaknute molekulskim ljepilom BI-3802. Polimerizacija je okidač za ubikvitinaciju BCL6 E3 ligazom SIAH1 i posljedičnu proteasomsku razgradnju (214). Ovaj mehanizam djelovanja je na granici između molekulskih ljepila i druge skupine monovalentnih degradera destabilizatora zbog toga što BI-3802 „ne lijepi“ izravno E3 ligazu na BCL6, već uzrokuje polimerizaciju nakon koje se odvija ubikvitinacija. Ovakva posebna molekulska ljepila pružaju nove mogućnosti u razvoju TPD-a.

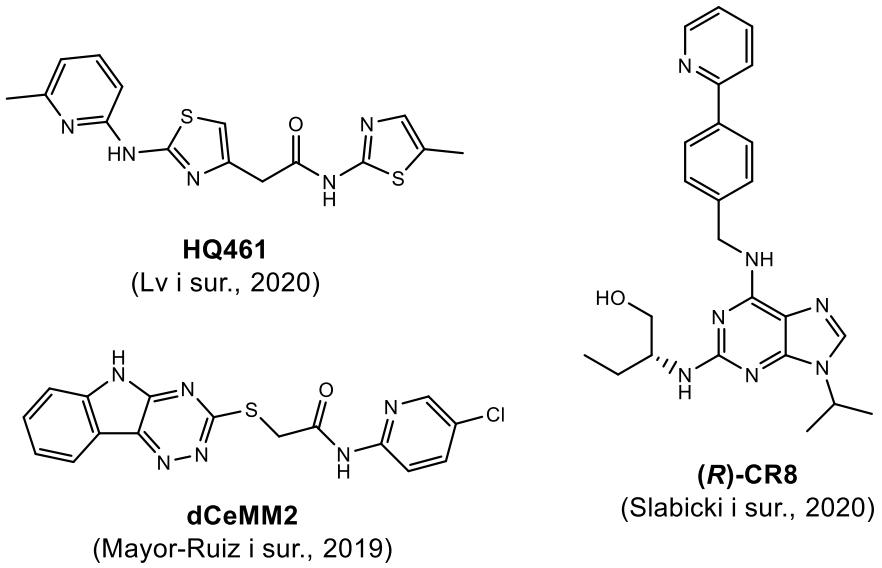
3.1.2.2.2. Racionalni razvoj molekulskih ljepila

Iako je većina molekulskih ljepila otkrivena slučajno, danas se nastoji racionalizirati razvoj ove skupine degradera. Ovdje će biti prikazani prvi primjeri molekulskih ljepila dobivenih racionalnim dizajnom.

Simonetta i sur. su 2019. g. opisali malu molekulu koja inducira interakcije između E3 ligaze $CRL1^{\beta\text{-}TrCP}$ i mutiranog β-katenina. Ta mala molekula je racionalno dizajnirana na temelju poznate strukture mete i E3 ligaze te predstavlja prvi primjer molekulskog ljepila koji inducira nativne PPI promijenjene u raku (215). β-katenin je često mutiran u dijelu degrona kojeg prepoznaje E3 ligaza, zbog čega je takav mutirani β-katenin manje podložan proteasomskoj razgradnji te može doći do razvoja raka. Molekulska ljepila u ovom slučaju pospješuju PPI između takvog mutiranog proteina i $CRL1^{\beta\text{-}TrCP}$ zbog čega je ponovno moguća ubikvitinacija i razgradnja β-katenina.

Tri istraživačke skupine su 2020. g. opisale otkriće strukturno vrlo različitih molekulskih ljepila degradera ciklina K (216–218), proteina uključenog u regulaciju staničnog ciklusa, kontrolu transkripcije i odgovora na oštećenje DNA. Ciklin K predstavlja vrlo značajnu metu u istraživanju novih lijekova protiv raka, a zanimljiv je i kao meta degradera molekulskih ljepila. Iako su imali različite pristupe u istraživanju i razvoju, sve tri skupine su došle do molekulskih ljepila istog mehanizma djelovanja. Slabicki i sur. te Mayor-Ruiz i sur. su koristili metode koje su agnostične s obzirom na metu i E3 ligazu, dok su Lv i sur. slučajno otkrili degradere ciklina K, među kojima i HQ461 (Slika 40) pokušavajući dizajnirati inhibitore NRF2 na temelju strukture NRF2. Slabicki i sur. su primjenjujući bioinformatičke metode otkrili da ekspresija DCAF15 korelira s osjetljivošću stanica na aromatske sulfonamide i da citotoksičnost (*R*)-CR8 (Slika 40), poznatog inhibitora CDK, korelira s ekspresijom CRL adaptora DDB1 (217). Mayor-Ruiz i sur. razvili su strategiju kemijskog profiliranja u stanicama s poremećenom aktivnošću CRL, što je dovelo do

otkrića nekoliko degradera ciklina K, među kojima i dCeMM2 (Slika 40) (216). Mehanizmi djelovanja ovih degradera ciklina K otkriveni su studijama multiomike i strukturnom analizom kompleksa. Sva molekulska ljepila vezala su se na CDK12 te pospješivala dimerizaciju između CDK12:ciklina K i adaptora DDB1 CRL E3 ligaze, što je induciralo ubikvitinaciju ciklina K (217). Još jedan strukturno različit degrader ciklina K otkriven je slučajno 2021. g. (218). Otkrića ovih degradera su dokazala da se CRL adaptor može reprogramirati za vezanje supstrata, odnosno da se ne mora vezati supstrat nužno preko supstratnog receptora. Kao što su aromatski sulfonamidi pokazali da je moguća mobilizacija DCAF15, tako su degraderi ciklina K to pokazali s DDB1 adaptorom. Kako je moguće da su strukturno toliko različite molekule degraderi ciklina K, i dalje ostaje nepoznanica (51).



Slika 40. *Strukture molekulskih ljepila degradera ciklina K.*

Koduri i sur. su primijenili fenotipski probir za pronalazak novih molekulskih ljepila degradera IKZF1. Koristili su fuzijski protein IKZF1 i enzima koji aktivira protoksin u toksin. U slučaju da

dođe do razgradnje IKZF1, konverzija protoksina u toksin bit će onemogućena. Pretražili su knjižnicu spojeva koja je sadržavala prethodno opisane molekule slične IMiD-ima i oko sto novosintetiziranih analoga pomalidomida (219). Iako su u ovom probiru korišteni samo različiti analozi IMiD-a, ova strategija ima velik potencijal za pronalazak novih strukturno različitih molekulskih ljepila.

Wang i sur. su 2021. g. opisali otkriće molekulskih ljepila za razgradnju transkripcijskog faktora heliosa (IKZF2), koja je također posredovana CRBN E3 ligazom (220). Klasični IMiD-i induciraju razgradnju isključivo IKZF1 (ikara) i IKZF3 (eola). Glutaminski ostatak u njihovoj drugoj domeni cinkova prsta omogućuje razgradnju induciranu IMiD-ima, dok ju histidinski ostatak kod IKZF2 sprječava (196). S obzirom da analog IMiD-a CC-885 može inducirati slabe interakcije između CRBN i mutiranog oblika IKZF1, gdje je glutamin zamijenjen histidinom, Wang i sur. su pretpostavili da CRBN može vezati i IKZF2. Pretraživanjem male fokusirane knjižnice spojeva otkrili su molekulska ljepila koja dodatno potiču razgradnju IKZF2, od kojih su neka bila isključivo selektivna prema IKZF2 (220). Iako je otkriće ovih molekulskih ljepila namjerno, ono počiva na velikoj količini strukturnih informacija o drugim proteinima iz porodice IKZF i njihovim kompleksima s IMiD-ima te će se tek vidjeti kako se slična strategija može primijeniti za druge E3 ligaze i POI.

Molekulska ljepila koja djeluju preko VHL-a opisana su nedavno na nekoliko znanstvenih skupova. Tutter i sur. su koristeći proteinske čipove (engl. *protein arrays*) otkrili malu molekulu koja se veže na vezno mjesto za HIF1α na VHL-u te djeluje kao molekulsko ljepilo degrader neosupstrata cistein dioksigenaze, ključnog regulatora metabolizma cisteina (221). Kod ovog pristupa poznata je E3 ligaza, ali nije struktura mete. Schreiberova grupa je u istraživanju VHL molekulskih ljepila koristila DNA kodirajuće knjižnice spojeva (99). Upotreba proteinskih čipova

i DNA kodirajućih knjižnica predstavlja nove mogućnosti za ciljano otkrivanje molekulskih ljepila degradera.

3.1.2.2.3. Molekulska ljepila u kliničkim ispitivanjima

Danas se intenzivno razvijaju novi derivati talidomida s povećanom selektivnošću i potentnošću koji zaobilaze rezistenciju na odobrene IMiD-e (222). Ovi CRBN modulatori nove generacije temelje se na modifikacijama koje mijenjaju dodirnu površinu između POI-a i CRBN-a. Trenutno se 11 molekulskih ljepila nalazi u kliničkim ispitivanjima (Tablica 4). Većinom djeluju preko CRBN-a i ciljaju IKZF1/3 (Slike 41 i 42), a samo četiri molekulska ljepila potiču razgradnju drugih meta, od kojih jedno djeluje preko DCAF15 (Slika 43) (58).

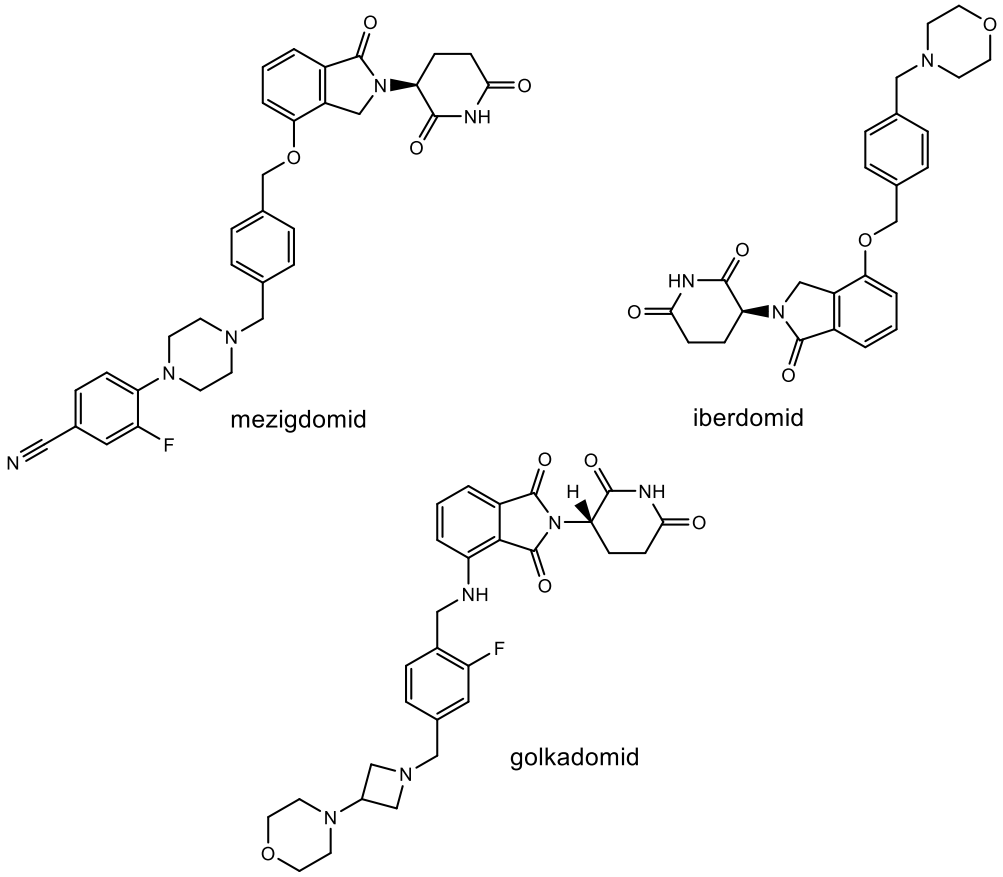
Tablica 4. *Popis molekulskih ljepila degradera u kliničkim ispitivanjima* (58).

Degrader	POI	E3 ligaza	Identifikator clinicaltrials.gov	Faza	Indikacija	Put primjene
			Molekulska ljepila			
Avadomid (CC-122)	IKZF1/3, ZFP91	CRBN	NCT05688475	I	Solidni tumori, ne-Hodgkinov limfom, multipli mijelom (nastavak studije kod pacijenata koji su pokazali kliničku korist)	Oralno
Iberdomid (CC-220)	IKZF1/3	CRBN	NCT05827016	III	Multipli mijelom	Oralno
			NCT04975997	III	Relapsni ili refraktorni multipli mijelom	Oralno (u kombinaciji s daratumumabom i deksametazonom)
			NCT06107738	II	Terapija održavanja nakon transplantacije autolognih matičnih stanica kod multiplog mijeloma	Oralno (kombinacija s daratumumabom)
			NCT04464798	I	Relapsni ili refraktorni limfomi	Oralno (monoterapija ili u

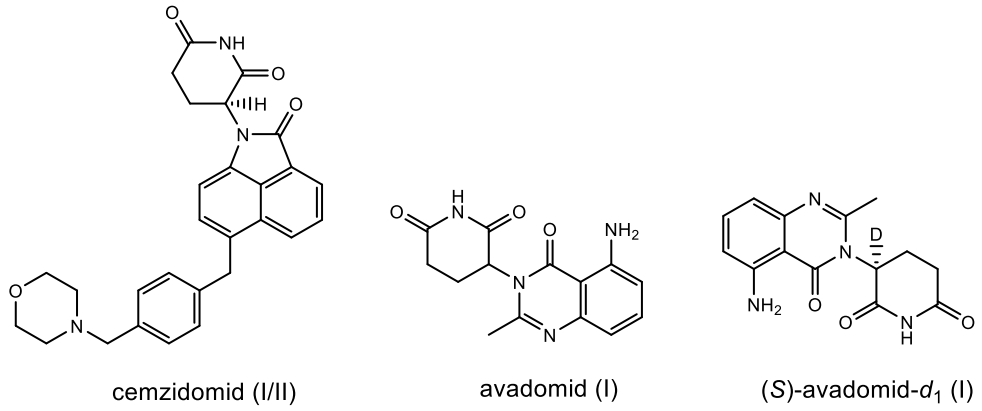
						kombinaciji s anti-CD20 protutijelom)
			NCT05560399	I	Relapsni ili refraktorni multipli mijelom	Oralno (u kombinaciji s elotuzumabom i deksametazonom)
			NCT02773030	I/II	Relapsni ili refraktorni multipli mijelom	Oralno (u monoterapiji ili kombinaciji s drugim lijekovima za liječenje multiplog mijeloma)
			NCT04392037	II	Relapsni ili refraktorni multipli mijelom	Oralno (u kombinaciji s ciklofosfamidom i deksametazonom
			NCT06215118	I	Relapsni ili refraktorni multipli mijelom	Oralno (u kombinaciji s elranatamabom)
Mezigdomid (CC-92480)	IKZF1/3	CRBN	NCT05552976	III	Relapsni ili refraktorni multipli mijelom	Oralno (u kombinaciji s karfilzomibom i deksametazonom)
			NCT05519085	III	Relapsni ili refraktorni multipli mijelom	Oralno (u kombinaciji s bortezomibom i deksametazonom)
			NCT03374085 NCT03374085	II I	Relapsni ili refraktorni multipli mijelom	Oralno (monoterapija ili u kombinaciji s deksametazonom)
			NCT03989414 NCT05372354 NCT06050512 NCT06163898 NCT02343042	I/II	(Relapsni ili refraktorni) multipli mijelom	Oralno (u kombinacijama)
			NCT05981209	I	Relapsni ili refraktorni multipli mijelom	Oralno (u kombinaciji s elotuzumabom i deksametazonom)
			NCT06048250 NCT06318676	I	Relapsni multipli mijelom (nakon terapije T-stanicama kimernim antigenskim receptorom)	Oralno

Golkadomid (CC-99282)	IKZF1/3	CRBN	NCT06356129	III	Velikostanični limfom B-stanica	Oralno (u kombinaciji s rituksimabom, ciklofosfamidom, doksorubicinom, vinkristinom i prednizonom)
			NCT06108232 NCT05788081	II	Folikularni limfom	Oralno (u kombinacijama)
			NCT03930953	I/II	Relapsni ili refraktorni ne-Hodgkinov limfom	Oralno (monoterapija i u kombinacijama)
			NCT06035497	I/II	Refraktorni limfom T-stanica	Oralno
			NCT04434196	Ib	Kronična limfocitna leukemija, mali limfocitni limfom	Oralno (u kombinaciji s obinutuzumabom)
			NCT06209619	I	Relapsni ili refraktorni ne-Hodgkinov limfom (nakon CART terapije)	Oralno (u kombinaciji s rituksimabom)
Cemzidomid (CFT7455)	IKZF1/3	CRBN	NCT04756726	I/II	Relapsni ili refraktorni ne-Hodgkinov limfom, multipli mijelom	Oralno (monoterapija ili u kombinaciji s deksametazonom)
(*S*)-avadomid-d_1 (SP-3164)	IKZF1/3	CRBN	NCT05979857	I	Relapsni ili refraktorni ne-Hodgkinov limfom	Oralno
ICP-490	IKZF1/3	CRBN	NCT05719701	I/II	Relapsni ili refraktorni multipli mijelom	Oralno
DKY709	Helios	CRBN	NCT03891953	I	Uznapredovali solidni tumori	Oralno (monoterapija ili u kombinaciji sa spartalizumabom)
FL118	DDX5	Nepoznato	NCT06206876	I	Duktalni adenokarcinom gušterače	Oralno
MRT-2359	GSPT1	CRBN	NCT05546268	I/II	Solidni tumori	Oralno
E7820	RBM39	DCAF15	NCT05024994	II	Relapsne ili refraktorne mijeloične maligne bolesti	Oralno

** završila; ** prekinuta; CRBN – Cereblon; IKZF1/3 – ikar i eol; DDX5 – engl. DEAD-box helicase 5; GSPT1 – faktor 1 terminacije translacije prijelaza iz G1 u S fazu; DCAF15 – faktor 15 povezan s DDB1 i Cullinom 4; RBM39 – protein 39 koji veže RNA motiv.*



Slika 41. *Strukture CRBN molekulskih ljepila degradera IKZF1/3 u fazi III kliničkih ispitivanja.*



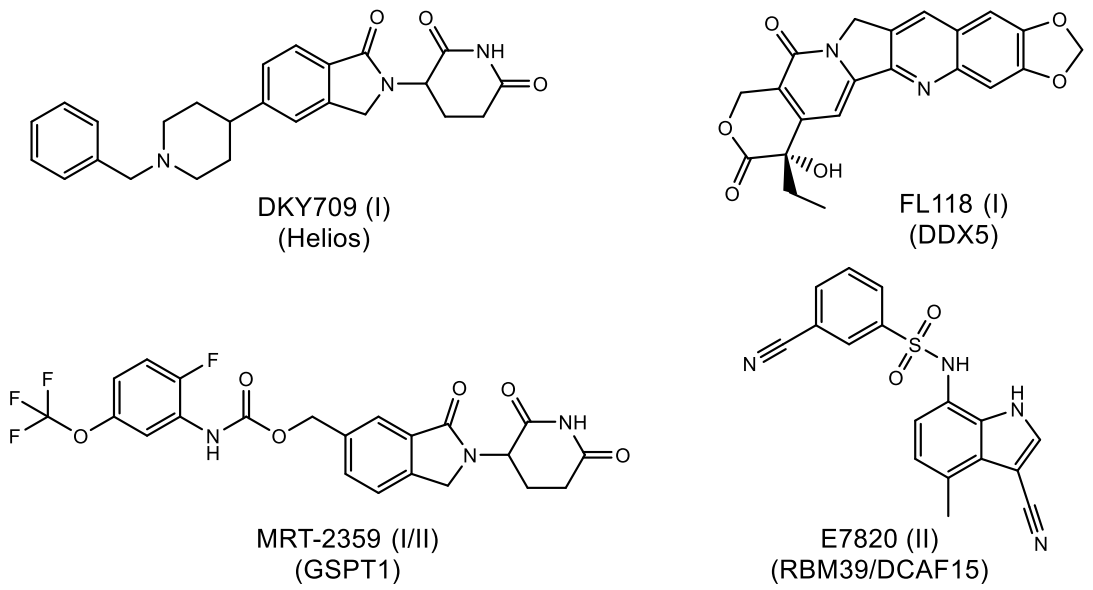
Slika 42. *Strukture CRBN molekulskih ljepila degradera IKZF1/3 u fazama I–II kliničkih ispitivanja.*

Iberdomid, mezigdomid i golkadomid (Slika 41) su CRBN degraderi IKZF1/3 koji se nalaze u studijama faze III kliničkih ispitivanja. *In vitro* je mezigdomid pokazao antiproliferativno djelovanje na staničnim linijama multiplog mijeloma, uključujući stanične linije rezistentne na lenalidomid i pomalidomid, a osim toga ima i imunostimulativno djelovanje. U studijama faze I/II u kombinaciji s deksametazonom bio je dobro podnošljiv i pokazao je dobru učinkovitost kod relapsnog i refraktornog multiplog mijeloma, sa stopom odgovora između 40 i 50 % (223). Trenutno se ispituje u kombinacijama sa standardnim terapijama multiplog mijeloma u studijama faze I/II te u dvije studije faze III u kombinaciji s inhibitorima proteasoma i deksametazonom (58).

Iberdomid je dobio status lijeka siročića 2018. g. za liječenje multiplog mijeloma, a trenutno se, osim za liječenje multiplog mijeloma, nalazi i u kliničkim ispitivanjima za liječenje limfoma (58). U studiji faze II pokazao je učnkovitost u terapiji održavanja nakon transplantacije autolognih matičnih stanica kod multiplog mijeloma (224). Također je u studiji faze II ispitivana učinkovitost iberdomida za liječenje sistemskog eritematoznog lupusa (SLE), ali su potrebne duže studije na više ispitanika kako bi se utvrdila učinkovitost i sigurnost primjene kod SLE (225). Iberdomid je u biokemijskim testovima pokazo veći afinitet vezanja na CRBN od lenalidomida i pomalidomida te jaču indukciju razgradnje IKZF1/3 u stanicama, a u fazi I/II kliničkih ispitivanja u kombinaciji s deksametazonom imao je dobru podnošljivost i učinkovitost kod pacijenata s relapsnim i refraktornim multiplim mijelom koji su prethodno primali terapiju (226). Aktivne su studije faze II i III u kojima se ispituje učinkovitost iberdomida u kombinacijama s drugim lijekovima za liječenje multiplog mijeloma (58).

Golkadomid je ušao u studije faze III kliničkih ispitivanja za liječenje velikostaničnog limfoma B stanica u kombinaciji s ciklofosfamidom, doksorubicinom, vinkristinom i prednizonom na temelju pozitivnih rezultata studija faze I i II (227).

E7820 (Slika 43) je jedino molekulsko ljepilo u kliničkim ispitivanjima koje djeluje preko DCAF15. To je novi aromatski sulfonamid koji potiče razgradnju RBM39, a trenutno je u studiji faze II za liječenje relapsnih ili refraktornih mijeloičnih malignih bolesti (58).



Slika 43. *Strukture molekulskih ljepila degradera u kliničkim ispitivanjima koji djeluju na mete različite od IKZF1/3. U zagradi su navedene faze kliničkih ispitivanja u kojima se nalaze i mete.*

3.1.2.3. Destabilizatori

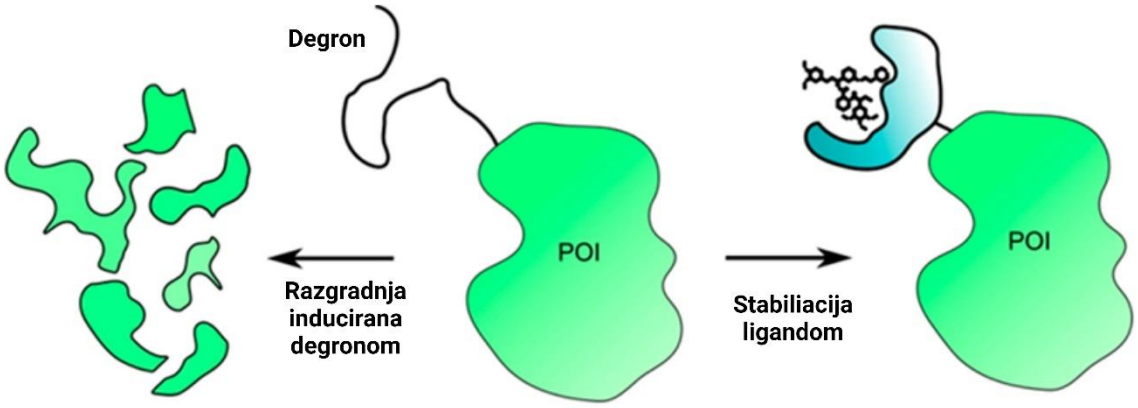
Destabilizatori su široka skupina monovalentnih degradera koji neizravno induciraju PPI između E3 ligaze i POI-a. Djeluju na način da destabiliziraju POI, odnosno na različite načine (npr. izlaganjem degrona, povećanjem površinske hidrofobnosti, polimerizacijom mete, sprječavanjem protektivnih PPI) dovode POI u stanje koje može prepoznati E3 ligaza. Primjer destabilizatora je odobreni lijek antiestrogen fulvestrant, koji inducira razgradnju ERα, te neki inhibitori kinaza koji također djeluju destabilizirajuće .

Interakcija E3 i POI postiže se na temelju odgovarajućih signala na površini POI. Primjerice, promjene konformacije proteina i njegovog sklapanja te posttranslacijske modifikacije mogu utjecati na podložnost razgradnji, a time i na vrijeme poluživota proteina (228). U nastavku će biti opisano kako hidrofobni ostaci i degroni, odnosno dijelovi strukture koje prepoznaju E3 ligaze i aktiviraju UPS, služe kao modulatori razgradnje proteina kada su izloženi na njihovoj površini. Također, degroni služe za dizajn liganada heterobifunkcionalnih hibridnih molekula, kao što su PROTAC-i (13).

Razvoj malih molekula selektivnih liganada proteina koji potiču njegovu TPD zahtjevan je i dugotrajan proces. Ponekad prednost mogu imati pristupi gdje se male molekule genetičkim modifikacijama fuzioniraju s metom te se na taj način iskoriste prednosti i malih molekula i genetičkih modifikacija. Ovaj pristup je čest u molekularnoj biologiji za istraživanje funkcije i validaciju mete.

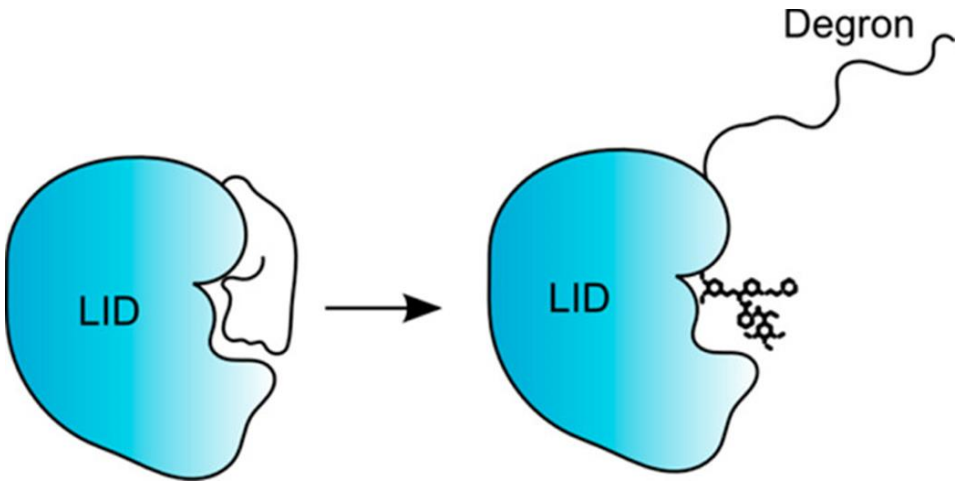
3.1.2.3.1. Destabilizacijske domene

Jedna od strategija razgradnje proteina jest inkorporiranje destabilizacijskih domena u strukturu različitih proteina genetičkim modifikacijama, pri čemu nastaju nestabilni fuzijski proteini. Smatanje takvih fuzijskih proteina može se kontrolirati malim molekulama (229). Na primjer, destabilizirane varijante dihidrofolat reduktaze (DHFR) i FKBP12 zadržavaju pravilnu konformaciju u prisutnosti liganada trimetoprima i Shielda-1, redom, dok se nakon uklanjanja liganada, fuzijski proteini prepoznaju kao pogrešno smotani i razgrađuju putem UPS-a (Slika 44) (168).



Slika 44. *Destabilizacijska domena kontrolirana malom molekulom (prilagođeno prema (168) uz dopuštenje izdavača American Chemical Society, 2017.).*

Postoje i strategije sa suprotnim učinkom, gdje ligand destabilizira proteinsku domenu ili vezanjem izaziva izlaganje hidrofobnih ostataka na površini proteina. Specifični aminokiselinski ostaci na *N*- ili *C*-krajevima mogu služiti kao degroni. Proteini mogu biti kratkoživući upravo zbog izloženih destabilizirajućih degrona. Degroni se ugrađuju u strukturu proteina odmah za vrijeme sinteze ili kasnije tijekom posttranslacijskih modifikacija (13). Fuzija degronskih slijedova s POI može poslužiti kao strategija u TPD-u. Vezanje liganda može dovesti do promjene konformacije i izlaganja degrona na površini POI-a što predstavlja okidač za razgradnju, a poznato je kao ligandom inducirana razgradnja (engl. *ligand-induced degradation*, LID) (Slika 45) (168). S druge strane, vezanje liganda može spriječiti i posttranslacijsko izrezivanje degrona čime se opet potiče razgradnja POI-a (13). Osim vezanjem male molekule, degroni se mogu aktivirati i pomoću svjetlosti ili temperature (8) ili uvesti posttranslacijskim modifikacijama, poput fosforilacije. Pomoću hibridnih malih molekula koje induciraju fosforilaciju (PHIC) i kimera koje usmjeravaju fosforilaciju (engl. *phosphorylation targeting chimera*, PhosTAC) moguća je mobilizacija kinaza ili fosfataza za fosforilaciju ili defosforilaciju POI, što utječe na razgradnju POI-a .(13)



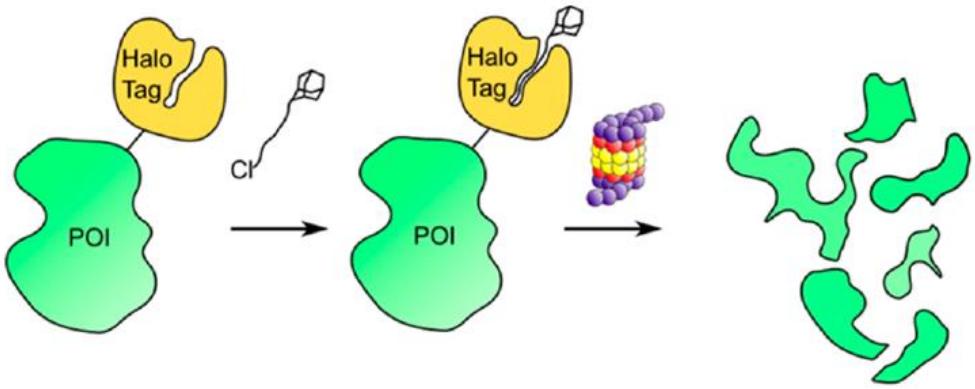
Slika 45. *Shematski prikaz LID (preuzeto iz (168) uz dopuštenje izdavača American Chemical Society, 2017.).*

3.1.2.3.2. Označavanje molekula

Specifično označavanje meta predstavlja vrlo moćan pristup u TPD-u kojim se može postići razgradnja vrlo raznolikih meta bez potrebe za identifikacijom odgovarajućih liganada. Uglavnom se koriste u eksperimentalne svrhe u molekularnoj biologiji. U ovom slučaju molekula degradera prepoznaje specifičnu oznaku na POI-u, što rezultira učinkovitom razgradnjom označenog proteina. Primjeri takvih metoda označavanja su HaloTag i dTAG sustavi u kojima molekule degraderi induciraju razgradnju HaloTag, odnosno $FKBP^{F36V}$ fuzijskih proteina. Slično kao kod PROTAC-a, bifunkcionalni degrader približava E3 ligazu i označeni POI te omogućuje ubikvitinaciju i razgradnju takvog označenog POI-a.

Proteinska oznaka (HaloTag) je modificirana bakterijska dehalogenaza genetičkim modifikacijama uvedena u strukturu POI-a koja kovalentno veže sintetske ligande (HaloTag

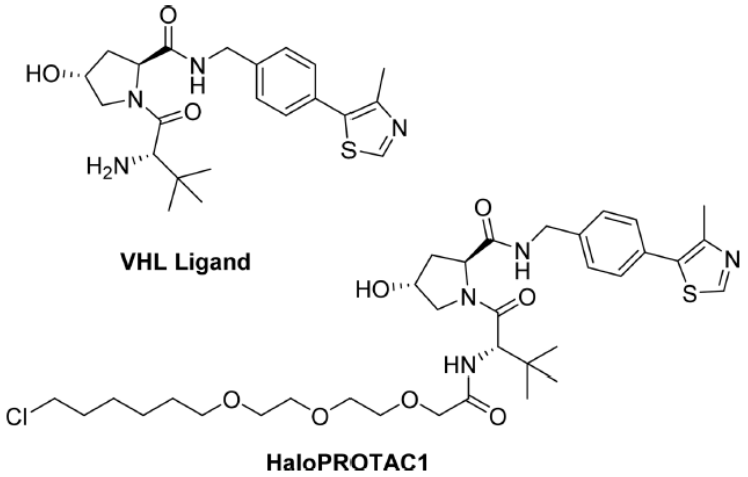
ligande). HaloTag ligandi mogu biti fluorescentne boje, afinitetne oznake, čvrsti nosači, ligandi za E3 ligaze (uglavnom VHL) ili hidrofobne skupine (npr. adamantil) koji preko poveznice imaju vezanu kloralkansku skupinu (Slika 46). Kovalentna veza između HaloTag oznake na proteinu i kloralkanske skupine nastaje vrlo brzo pri fiziološkim uvjetima i uglavnom je ireverzibilna (230). Karakteristična osobina pogrešno smotanih proteina su izložene hidrofobne regije na površini proteina, što aktivira stanični sustav za kontrolu kvalitete proteina koji će ili pokrenuti proces pravilnog smatanja ili razgradnju. Kako bi spriječili nakupljanje potencijalno toksičnih, nepravilno smotanih proteina, molekulski šaperoni štite hidrofobne površine proteina i pomažu ponovno uspostavljanje nativne konformacije (231). To se može postići pomoću takvih HaloTag hidrofobnih oznaka koje se kovalentno vežu preko kloralkanske poveznice na HaloTag označene fuzijske proteine i destabiliziraju ih, što aktivira sustav za kontrolu kvalitete proteina i pokreće razgradnju.



Slika 46. *Shematski prikaz HaloTag sustava u kojem vezanje HaloTag liganda destabilizira POI (prilagođeno prema* (168) *uz dopuštenje izdavača American Chemical Society, 2017.).*

Iako ne pripadaju skupini monovalentnih degradera, HaloPROTAC-i (Slika 47) su obrađeni ovdje jer se temelje na HaloTag tehnologiji. To su kovalentni PROTAC-i koji sadrže VHL ligand i

kloralkansku skupinu koja reagira s HaloTag fuzijskim proteinom, što dovodi do brze i gotovo potpune razgradnje takvih označenih proteina. S obzirom da se kovalentno vežu na POI, ne djeluju substehiometrijski, što je nedostatak ove vrste PROTAC-a (168).



***Slika 47**. Struktura VHL liganda i HaloPROTAC1 (preuzeto iz* (168)*, uz dopuštenje izdavača American Chemical Society, 2017.).*

Hidrofobne oznake (HyTag) se, osim na kloralkan, mogu kovalentno vezati i na ligand za POI, što uzrokuje destabilizaciju proteina uslijed vezanja liganda i posljedičnu razgradnju POI-a (48). HyT uglavnom sadrže hidrofobne skupine u svojoj strukturi (npr. adamantil ili *tert*-butoksikarbamatarginin (Boc_3Arg)). HyTag tehnologija je uspješno primijenjena za razgradnju AR-a i nekih kinaza, iako se uglavnom koristi u eksperimentalne svrhe ili za razgradnju HaloTag fuzijskih proteina, što je prethodno spomenuto i prikazano na slici 46. Nedostaci HyT tehnologije su loša bioraspoloživost i nepotpuna razgradnja POI-a.

dTAG sustav koristi sintetski ligand za $FKBP^{F36V}$ fuzijski protein koji je povezan s derivatom IMiD-a kako bi se mobilizirala CRBN E3 ligaza za razgradnju $FKBP^{F36V}$ obilježenog POI-a. $FKBP^{F36V}$ se može uvesti pomoću CRISPR/Cas tehnologije u strukturu POI-a (232). Pomoću dTAG sustava uspješno su i selektivno razgrađeni BRD4, histonska deacetilaza 1, $KRAS^{G12V}$ i

drugi proteini (233). Međutim, nedostatak ovog pristupa je potreba za genetičkom modifikacijom POI-a. Razvijeni su i brojni drugi sustavi za označavanje koji se temelje na opisanim HaloTag i dTAG, a uglavnom se koriste u eksperimentalne svrhe te nisu obrađeni.

3.1.2.3.3. SERD

Osim u molekularnoj biologiji, destabilizacija proteina danas se uspješno koristi i u terapiji. Primjer je fulvestrant, koji djeluje kao SERD, a koristi se preko 20 godina za liječenje karcinoma dojke (234). Za razliku od selektivnih modulatora ER-a (SERM), kao što su tamoksifen, raloksifen i toremifen, koji djeluju kao kompetitivni antagonisti ER-a (ili agonisti, ovisno o tkivu), SERD uzrokuju destabilizaciju ER-a i posljedično njihovu razgradnju (235). Prednost SERD-ova je što zbog svog mehanizma djelovanja imaju sposobnost nadvladati rezistenciju na SERM i inhibitore aromataze (236).

Vezanjem fulvestranta na ERα dolazi do konformacijske promjene receptora i izlaganja hidrofobnih aminokiselina na površini receptora, što privlači E3 ligazu i proteasom te inducira razgradnju. Za razliku od SERM-a, fulvestrant je čisti antagonist ER-a te ne povećava rizik od karcinoma maternice (235,237). Pokazao je učinkovitost u terapiji ER^+ karcinoma dojke kao prva (238) i druga (239) linija liječenja. Trenutno je odobren kao monoterapija ili u kombinaciji s citostaticima iz različitih skupina kao što su inhibitori CDK4/6, PI3K i AKT, a u kliničkim studijama se ispituje i kombinacija s lijekovima iz drugih skupina (237). Fulvestrant ima lošu oralnu bioraspoloživost te se primjenjuje jednom mjesečno intramuskularno u obliku uljne suspenzije. Međutim, zbog ovakvog načina primjene i režima doziranja dolazi do velikih fluktuacija u plazmatskoj koncentraciji fulvestranta i suboptimalne razgradnja ER-a. Tijekom

posljednjih 15 godina veliki napori se ulažu u istraživanje SERD-ova nove generacije boljih antiestrogenih i PK svojstava (237).

Sedam SERD-ova nalazi se u kliničkim ispitivanjima za liječenje $ER^{+}HER2^{-}$ karcinoma dojke (Tablica 5). To su kamizestrant, giredestrant, imlunestrant, borestrant, SCR-6852 te već odobreni elacestrant, pri čemu su kamizestrant, giredestrant i imlunestrant napredovali u fazu III (58).

Uz iznimku fulvestranta i borestranta koji su steroidne strukture, nesteroidni SERD-ovi se mogu podijeliti u dvije osnovne skupine: s akrilnim postraničnim lancem i s bazičnom amino skupinom u postraničnom lancu, koji jače induciraju razgradnju ER-a (240).

Tablica 5. *Popis SERD i SARD u kliničkim ispitivanjima* (58).

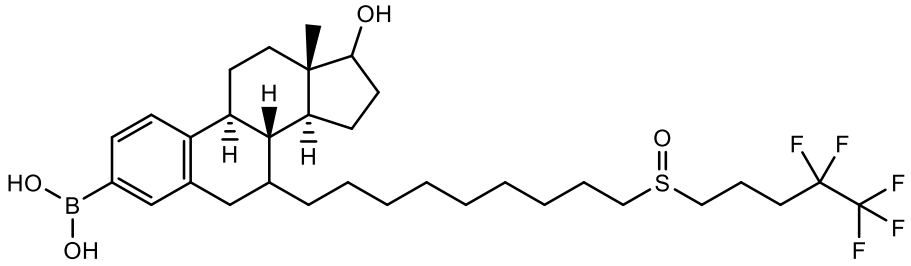
Degrader	POI	Identifikator clinicaltrials.gov	Faza	Indikacija	Put primjene
Elacestrant	SERD	NCT03778931 NCT06492616 NCT05512364	III	Uznapredovali ili relapsni $ER^{+}HER2^{-}$ karcinom dojke	Oralno
		NCT05596409 NCT05618613 NCT05982093 NCT04791384 NCT05386108 NCT06201234 NCT05963997 NCT06062498 NCT05563220	I/II ili II	$ER^{+}HER2^{-}$ karcinom dojke	Oralno (u kombinacijama)
		NCT06126575	I	$ER^{+}HER2^{-}$ karcinom dojke	Oralno
Borestrant (ZB716)	SERD	NCT04669587	I/II	$ER^{+}HER2^{-}$ karcinom dojke	Oralno (monoterapija ili u kombinaciji)
Kamizestrant	SERD	NCT06380751 NCT05952557 NCT05774951 NCT04711252 NCT04964934	III	$ER^{+}HER2^{-}$ karcinom dojke	Oralno (monoterapija ili u kombinaciji)

		NCT04214288	II	ER^+HER2^- karcinom dojke	Oralno
		NCT03616587	I	ER^+HER2^- karcinom dojke	Oralno (monoterapija ili u kombinaciji)
Giredestrant	SERD	NCT04961996 NCT04546009 NCT06065748 NCT05296798 NCT05306340	III	ER^+HER2^- karcinom dojke	Oralno (monoterapija ili u kombinaciji)
		NCT05634499 NCT04486352	II I/II	Karcinom endometrija	Oralno
		NCT06259929 NCT05659563 NCT05896566 NCT04436744 NCT04802759 NCT04576455	I/II ili II	ER^+HER2^- karcinom dojke	Oralno (monoterapija ili u kombinaciji)
		NCT03332797	I	ER^+HER2^- karcinom dojke	Oralno (monoterapija ili u kombinaciji)
Imlunestrant	SERD	NCT04975308 NCT05514054	III	ER^+HER2^- karcinom dojke	Oralno (monoterapija ili u kombinaciji)
		NCT04188548	I	Metastatski karcinom dojke ili endometrija	Oralno
Taragarestrant (D-0502)	SERD	NCT03471663*	I	ER^+HER2^- karcinom dojke	Oralno (monoterapija ili u kombinaciji)
SCR-6852	SERD	NCT05293964	I	ER^+HER2^- karcinom dojke	Oralno (monoterapija ili u kombinaciji) (prelazi KMB)
ONCT-534	SARD	NCT05917470	I/II	mCRPC	Oralno

POI – ciljni protein; ER – estrogeni receptor; HER2 – receptor za epidermalni faktor rasta 2; SERD – selektivni degrader estrogenih receptora; SARD – selektivni degrader androgenih receptora; mCRPC – metastatski karcinom prostate otporan na kastraciju.

Borestrant (ZB716) (Slika 48) ili fulvestrant-3-boronska kiselina je strukturni analog fulvestranta kojem je fenolna skupina zamijenjena boronskom kiselinom kako bi se povećala oralna bioraspoloživost i učinkovitost. *In vitro* ima sličan profil fulvestrantu, djeluje antiproliferativno

(IC_{50} = 4,1 nM) te uzrokuje razgradnju ERα receptora u stanicama karcinoma dojke osjetljivim i rezistentnim na tamoksifen. Postiže puno više koncentracije lijeka u tumoru nakon oralne primjene u odnosu na fulvestrant nakon supkutane primjene te je na pretkliničkim animalnim modelima karcinoma dojke bio učinkovitiji u inhibiranju rasta tumora nego fulvestrant (240). Trenutno je aktivna faza I/II kliničkog ispitivanja (58).



Slika 48. *Struktura borestranta (ZB716).*

SERD-ovi s bazičnom amino skupinom u postraničnom lancu

Elacestrant (Slika 49) je drugi SERD koji je na tržište Europske unije došao krajem 2023. g. Odobren je kao druga linija liječenja uznapredovalog ili metastatskog karcinoma dojke kod žena u postmenopauzi ili odraslih muškaraca s $ER^{+}HER2^{-}$ karcinomom dojke s ESR1 mutacijom. Elacestrant posjeduje svojstva i SERM-a i SERD-a. U odnosu na fulvestrant, pokazao je superiorniji antiestrogeni učinak kod pacijenata s ESR1 mutacijom uz prihvatljiv sigurnosni profil, dok kod pacijenata bez ESR1 mutacije nije pokazao kliničku korist (241,242). Trenutno su aktivne tri studije faze III, devet studija faze II ili I/II u kojima se evaluira učinkovitos kombinacija s CDK4/6 inhibitorom abemaciklibom kod pacijenata s progresivnim metastazama na mozgu te jedna studija faze I (58,240).

Kamizestrant (Slika 49) je oralni SERD i potpuni antagonist ERα s 3-(fluormetil)azetidinskim bočnim lancem. U različitim staničnim linijama ER^{+} karcinoma dojke doveo je do vrlo učinkovite

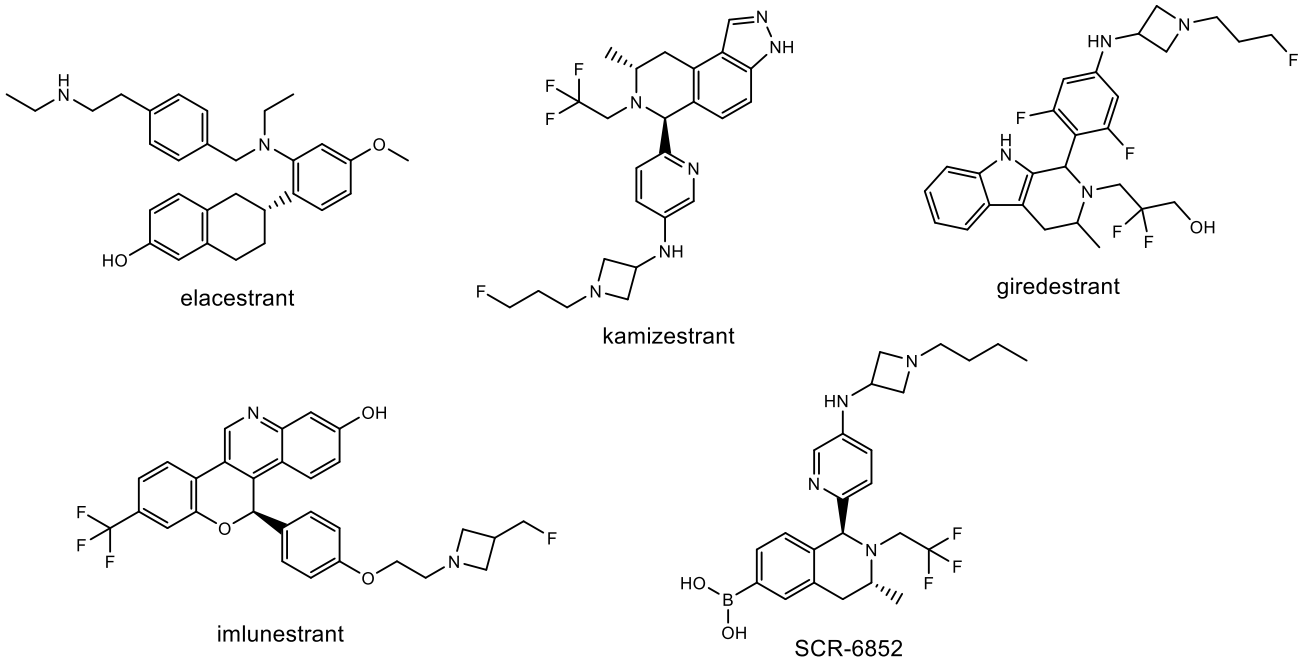
razgradnje ERα, pri čemu je maksimalna razgradnja bila slična kao kod fulvestranta (243). U pretkliničkim studijama pokazao je učinkovito antitumorsko djelovanje na različitim animalnim modelima, uključujući one s mutacijama ER-a (244). U kliničkim studijama faze I pokazao je dobru podnošljivost i antitumorsko djelovanje u monoterapiji ili u kombinaciji s palbociklibom (244), a u fazi II bolju učinkovitost u odnosu na fulvestrant kod žena s uznapredovalim $ER^{+}HER2^{-}$ karcinomom dojke i ESR1 mutacijom te je napredovao u fazu III kliničkih studija (245). Trenutno je aktivno pet studija faze III u kojima se uspoređuje kamizestrant sa standardnom endokrinom terapijom raka dojke (58).

Giredestrant (Slika 49) je potentni oralni SERD s tetrahidro-β-karbolinskim prstenom i difluorpropilnim bočnim lancem vezanim na dušik tetrahidropiperidinskog prstena. U usporedbi s fulvestrantom, inducirao je značajno jaču razgradnju divljeg i mutiranog tipa ER-a u MCF-7 staničnoj liniji (246). Rezultati studija faze II pokazali su obećavajuće antiproliferativno i antitumorsko djelovanje te dobru podnošljivost giredestranta u monoterapiji i u kombinaciji s palbociklibom te je napredovao u fazu III (247). Trenutno je aktivno pet studija faze III u kojima se uspoređuje učinkovitost i sigurnost primjene giredestranta u monoterapiji ili u kombinaciji s palbociklibom, everolimusom ili monoklonskim protutijelima u odnosu na standardnu endokrinu terapiju kod pacijenata s $ER^{+}/HER2^{-}$ uznapredovalim i/ili metastatskim karcinomom dojke (58).

Imlunestrant (LY3484356) (Slika 49) je oralni SERD čija struktura oponaša steroidni prsten estradiola (240). Pokazao je antitumorsko djelovanje u pretkliničkim ispitivanjima na mišjem modelu karcinoma dojke, uključujući ESR1 mutaciju sam ili u kombinaciji s abemaciklibom, everolimusom i alpelisibom.(240). U aktivnoj fazi I ispituje se učinkovitost imlunestranta u liječenju ER^{+} karcinoma dojke kao monoterapija ili u kombinaciji s abemaciklibom, everolimusom, alpelisibom, trastuzumabom ili inhibitorima aroamtaze. Trenutno su aktivne i dvije

studije faze III gdje se uspoređuje učinkovitost imlunestranta samog ili u kombinaciji s abemaciklibom u odnosu na fulvestrant ili eksemestan za liječenje uznapredovalog ER^+ karcinoma dojke (58).

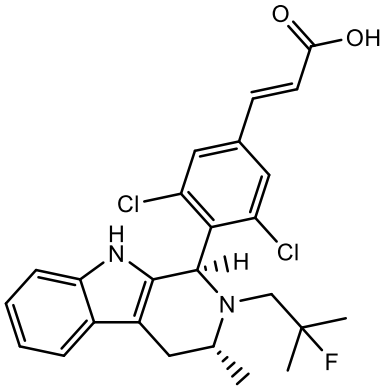
SCR-6852 (Slika 49) je vrlo potentan i učinkovit SERD *in vitro* i *in vivo* na animalnim modelima sam ili u kombinaciji s inhibitorima CDK4/6. Vrlo učinkovito prelazi KMB, što je potvrđeno na različitim animalnim modelima (248). Trenutno je aktivna faza I kliničkih ispitivanja za liječenje uznapredovalog ili metastatskog ER^+HER2^- karcinoma dojke u monoterapiji ili u kombinaciji s palbociklibom ili everolimusom (58).



Slika 49. *Strukture SERD-ova s bazičnom amino skupinom u postraničnom lancu koji su u kliničkim ispitivanjima.*

SERD s akrilnom kiselinom u postraničnom lancu

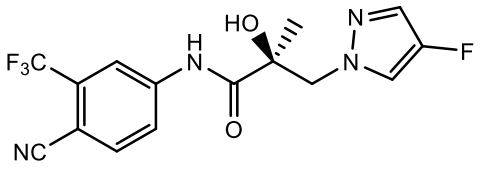
Taragarestrant (D-0502) (Slika 50) je oralni SERD tetrahidro-β-karbolinskim prstenom s akrilnom kiselinom u bočnom lancu koji pokazuje antiproliferativno djelovanje na različite stanične linije ER^+ karcinoma dojke te antitumorsko djelovanje na animalne modele karcinoma dojke, uključujući s ESR1 mutacijama. Studija faze I je završena te je utvrđena maksimalna tolerirana doza i dobar sigurnosni profil kada se primjenjuje u monoterapiji ili u kombinaciji.



Slika 50. *Struktura taragarestranta, SERD-a s akrilnom kiselinom u postraničnom lancu.*

3.1.2.3.4. SARD

SARD-ovi, analogno SERD-ovima, induciraju razgradnju AR-a kod karcinoma prostate (249). Trenutno se jedan SARD, ONCT-534 (Slika 51), nalazi u kliničkim ispitivanjima faze I/II za liječenje mCRPC-a (58). Osim ovog pristupa analognog SERD-u, razvijaju se i degraderi AR-a koji potiču disocijaciju šaperona Hsp90 nužnog za stabilizaciju AR-a (249).



Slika 51. *Struktura jedinog SARD-a ONCT-534 u kliničkim ispitivanjima (faza I/II)* (249).

3.1.3. Ciljana lizosomska razgradnja proteina

Dok molekulska ljepila i PROTAC-i usmjeravaju razgradnju unutarstaničnih proteina preko UPS-a, degraderi temeljeni na lizosomskom putu razgradnje mogu potaknuti razgradnju izvanstaničnih i transmembranskih proteina te unutarstaničnih proteinskih agregata i staničnih organela, čime se nadvladavaju nedostaci TPD-a temeljenog na proteasomskoj razgradnji proteina. Selektivno usmjeravanje proteina na razgradnju u lizosomima posredovano je autofagijom i vezikularnim transportom (endocitozom) koji se mogu iskoristiti u TPD-u.

Razvijene su brojne strategije u TPD-u koje se temelje na lizosomskom putu razgradnje proteina, a mogu se podijeliti na strategije koje se temelje na endosomsko-lizosomskom putu (LYTAC, AbTAC, GlueTAC i bispecifične aptamerne kimere) i autofagiji (ATTEC, AUTAC, AUTOTAC i šaperonom posredovana autofagija (CMA)) (232).

3.1.3.1. TPD strategije koje se temelje na endosomsko-lizosomskom putu

3.1.3.1.1. LYTAC

LYTAC (engl. *lysosome targeting chimera*) (Slika 52) su skupina bifunkcionalnih degradera koji primarno ciljaju izvanstanične i membranske proteine mobilizirajući POI prema receptorima

stanične površine koji usmjeravaju u lizosom. LYTAC predstavlja dobru komplementarnu strategiju PROTAC-ima jer izvanstanični i membranski proteini čine više od 40 % svih proteina te su uključeni u patofiziologiju raka, neurodegenerativnih i autoimunih bolesti. Oni se istovremeno vežu za izvanstanični protein ili izvanstaničnu domenu membranskog proteina i receptor koji usmjerava u lizosom pri čemu nastaje ternarni kompleks. To je okidač za internalizaciju proteina endocitozom posredovanom klatrinom te razgradnju u lizosomu (29,232).

Prvi LYTAC-i temeljili su se na receptoru za manoza-6-fosfat neovisnom o kationima (CI-MPR ili IGF2R) koji sudjeluje u unutarstaničnom prometu lizosomskih enzima (250). Nizak pH u kasnim lizosomima dovodi do disocijacije CI-MPR i lizosomskih enzima modificiranih *N*-glikanima s manoza-6-fosfatom (M6P) na krajevima. Lizosomski enzimi se razgrađuju u lizosomima, dok se CI-MPR reciklira transportirom u Golgijev aparat i na staničnu površinu (251). Ovaj prirodni proces je iskorišten kod prvih LYTAC-a, koji su se sastojali od malih molekula ili protutijela fuzioniranih sa sintetiziranim ligandom za CI-MPR (poli-manoza-6-fosfatom) (250). Ova strategija dala je obećavajuće rezultate u razgradnji nekoliko terapijski zanimljivih proteina. Primjerice, LYTAC kojeg čine kovalentno povezana poli-M6P i EGFR protutijelo cetuksimab specifično je inducirao razgradnju EGFR u različitim vrstama stanica (250).

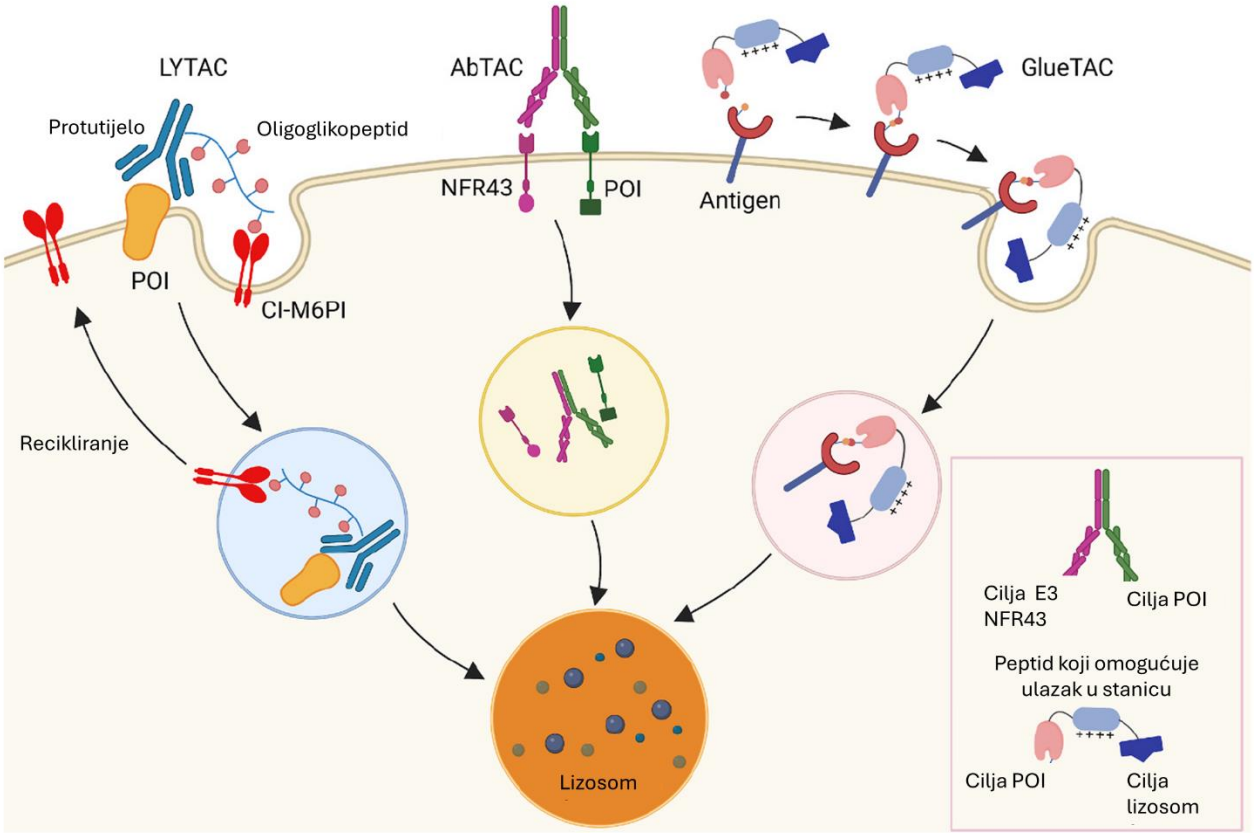
Nedostatak iskorištavanja CI-MPR receptora je njegova ubikvitarna ekspresija, zbog čega potencijalno može doći do toksičnosti LYTAC-a. Stoga su pripravljeni LYTAC-i koji iskorištavaju asijaloglikoproteinski receptor (ASGPR) specifičan za jetru (252). Također, optimizacija LYTAC-a slična je optimizaciji velikih bioloških molekula te predstavlja izazov i potrebne su detaljnije studije kojima bi se ispitala njihova PK svojstva i toksičnost (253). Međutim, LYTAC-i svakako predstavljaju obećavajuću strategiju za ciljanu razgradnju izvanstaničnih i membranskih proteina.

3.1.3.1.2. AbTAC

AbTAC (engl. *antibody-based PROTAC*) (Slika 52) je još jedna nova strategija u TPD-u za razgradnju membranskih proteina (254). Iako u nazivu sadrže PROTAC, srodni su LYTAC-ima. AbTAC koriste bispecifična protutijela kod kojih jedan kraj cilja transmembranski POI, a drugi transmembransku E3 ligazu, kao što je NFR43. Vezanjem AbTAC-a dolazi do internalizacije i posljedične lizosomske razgradnje POI (255). Iako i AbTAC-i iskorištavaju endosomsko-lizosomski put, mehanizam djelovanja AbTAC-a nije u potpunosti razjašnjen kao kod LYTAC-a. Nije poznato dolazi li do ubikvitinacije unutarstanične domene POI-a prije endocitoze te, u slučaju da dolazi, kako to doprinosi internalizaciji kompleksa. Također se ne zna može li se NFR43 reciklirati kao receptori koje iskorištavaju LYTAC-i (29).

3.1.3.1.3. GlueTAC

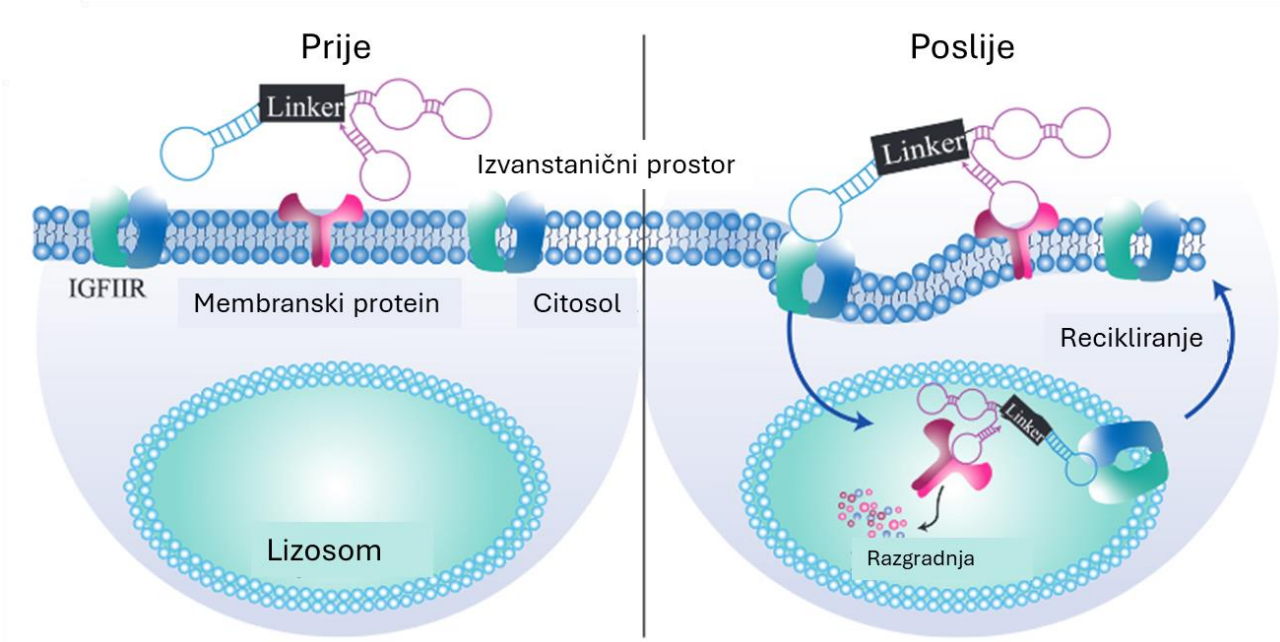
Zhang i sur. su 2021. g. predstavili GlueTAC-e (Slika 52) kao još jednu lizosomsku strategiju za razgradnju membranskih proteina. GlueTAC-i se sastoje se od tri dijela: kovalentnog nanotijela (GlueBody), peptida koji omogućuje ulazak u stanicu i aminokiselinskog slijeda koji usmjerava u lizosom. Nanotijelo se kovalentno veže na antigene na staničnoj površini, a peptid i aminokiselinski slijed omogućuju internalizaciju i lizosomsku razgradnju POI-a. Zhang i sur. su pomoću GlueTAC-a postigli uspješnu razgradnju proteina 1 programirane stanične smrti (PD-L1) (256). Iako GlueTAC-i imaju određene prednosti poput visokog afiniteta zbog kovalentnog vezanja, upravo kovalentno vezanje je povezano s toksičnosti (257). Osim toga, uglavnom koriste neprirodne aminokiseline za pospješivanje vezanja na membranski antigen, što potencijalno isto može dovesti do toksičnosti.



Slika 52. *Shematski prikaz degradera koji iskorištavaju endosomsko-lizosomki put razgradnje (preuzeto iz* (232) *uz dopuštenje izdavača).*

3.1.3.1.4. Bispecifične aptamerne kimere

Bispecifične aptamerne kimere (Slika 53) slične su LYTAC-ima, ali koriste DNA aptamere za vezanje na CI-MPR i transmembranske POI. Aptamerne kimere mogu usmjeriti lizosomsku razgradnju receptorske tirozin kinaze MET i PTK-7, pri čemu nema učinak na ne-ciljne proteine (258). Nukleinske kiseline imaju brojne prednosti u odnosu na protutijela, uključujući jednostavnu sintezu i veću stabilnost (29).



Slika 53. *Bispecifične aptamerne kimere (preuzeto iz* (258) *uz dopuštenje izdavača John Wiley & Sons).*

3.1.3.2. TPD strategije koje se temelje na autofagiji i lizosomskoj razgradnji

3.1.3.2.1. AUTAC

AUTAC (engl. *autophagy targeting chimera*) je strategija u TPD-u koja iskorištava autofagiju, a može se primijeniti za razgradnju unutarstaničnih proteina i organela. AUTAC-i se sastoje od liganda za POI ili staničnu organelu, poveznice i specifične cGMP oznake za razgradnju koja se veže na 8-nitro-cGMP, važnu molekulu koja posreduje uklapanje u autofagosom. AUTAC vezanjem na POI pomoću cGMP oznake imitira *S*-gvanilaciju koja potiče ubikvitinaciju POI-a preko Lys63. Takav ubikvitinirani POI prepoznaju receptori za autofagiju, što posljedično dovodi do lizosomske razgradnje (259,260). Za razliku od AUTAC-a, PROTAC-i induciraju ubikvitinaciju preko Lys48. Takashi i sur. su razvili AUTAC4 koji potiče mitofagiju fragmentiranih mitohondrija tako što se preko 2-fenilindolskog liganda veže na transporter na vanjskoj membrani

mitohondrija. Tretiranje stanica s AUTAC4 dovelo je do uspostavljanja mitohondrijskog membranskog potencijala i stvaranja ATP-a (259). Ovi rezultati upućuju na moguću široku primjenu AUTAC-a, primjerice za razgradnju proteinskih agregata. U odnosu na UPS strategije, pomoću AUTAC-a je moguće ciljati širi spektar meta. S druge strane, kako je autofagija vrlo složen proces, utjecaj na čitav stanični proteom još uvijek nije poznat.

3.1.3.2.2. ATTEC

ATTEC-i (engl. a*utophagy tethering compounds*) (Slika 54) su degraderi koji povezuju POI s autofagosomom, na sličan način kao AUTAC-i. Razlika je u tome što se ATTEC-i izravno vežu na receptor na autofagosomu LC3 te induciraju autofagiju proteina i lizosomsku razgradnju. Li i sur. su opisali ATTEC-e za indukciju selektivne razgradnje mutiranog huntingtina (mHTT) kojeg prepoznaju preko poliglutaminskog dijela na mHTT-u (261). Osim proteina, ATTEC-i mogu inducirati razgradnju staničnih organela te DNA i RNA (262). Li i sur. su također opisali ATTEC-e koji ciljaju lipidne kapljice u stanici povezujući kapljice s receptorom LC3 (263). Nakupljanje lipidnih kapljica u stanici prisutno je kod kardiovaskularnih bolesti, šećerne bolesti tipa 2, masne jetre, ateroskleroze, upalnih bolesti, pretilosti i raka, a specifična razgradnja lipidnih kapljica može predstavljati novu potencijalnu strategiju za liječenje ovih bolesti. S obzirom na nisku relativnu molekulsku masu, izravno ciljanje autofagosoma, potencijalno širok spektar meta i učinkovitost pri niskim koncentracijama (264), ATTEC-i će se vrlo vjerojatno razvijati u budućnosti.

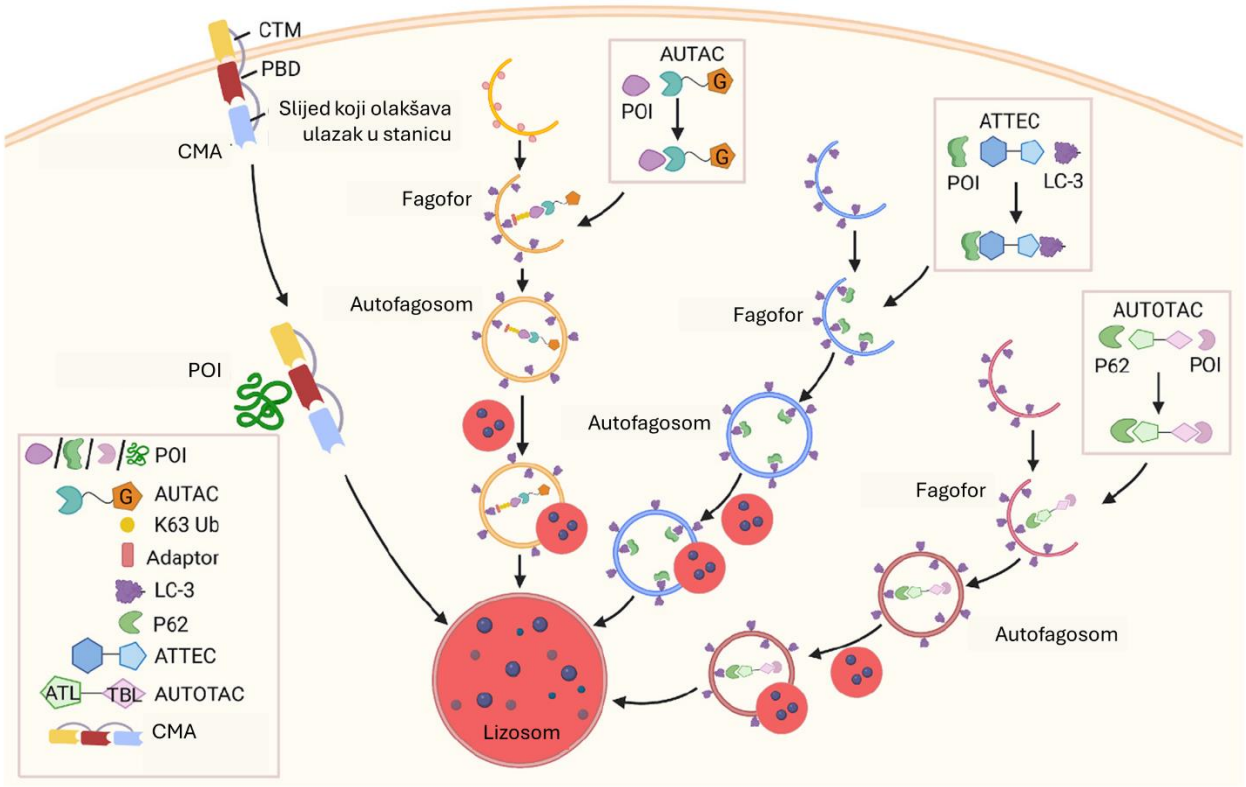
3.1.3.2.3. AUTOTAC

AUTOTAC (engl. *AUTOphagy Targeting Chimera*) (Slika 54) su bifunkcionalne molekule koje usmjeravaju stvaranje autofagosoma preko receptora autofagije p62. p62 sadrži domenu za vezanje Ub-a i domenu za interakciju s LC3 te povezuje označeni poliubikvitinirani protein s autofagosomom. Vezanjem poliubikvitiniranog sadržaja na p62, dolazi do promjene konformacije

p62 i izlaganja dijela strukture koji stupa u interakcije s LC3 na autofagosomu. AUTOTAC-i se sastoje od liganda za POI i liganda za receptor autofagije p62 koji su međusobno vezani poveznicom. Razgradnja proteina posredovana AUTOTAC-ima ne ovisi o ubikvitinaciji POI-a. AUTOTAC-i mogu posredovati razgradnju i agregata proteina, što su pokazali Ji i sur. na primjeru proteina tau (265).

3.1.3.2.4. Degraderi koji se temelje na CMA

CMA (engl. *chaperone-mediated autophagy*) (Slika 54) je lizosomski put selektivne razgradnje unutarstaničnih proteina. Molekulski šaperon Hsp70 prepoznaje citosolne proteine s aminokiselinskim slijedom KFERQ. Kompleks Hsp70-POI se veže na membranski protein 2A povezan s lizosomom (LAMP2) koji se nalazi na membrani lizosoma te pomaže translokaciju POI u lumen lizosoma za razgradnju (266). CMA su bifunkcionalni degraderi koji se sastoje od tri dijela: slijeda koji olakšava ulazak u stanicu, domene koja se veže na POI i slijeda koji se veže na Hsp70 (267). Ova strategija je također upotrijebljena za razgradnju mHTT-a (268) te proteinske kinaze 1 povezane sa smrću (DAPK1) i α-sinukleina (269). Najveći nedostaci ovog pristupa su nestabilnost degradera i učinkovitost dostave u stanicu (232).



Slika 54. *Shematski prikaz degradera koji iskorištavaju autofagiju (preuzeto iz* (232) *uz dopuštenje izdavača).*

4. Rasprava

U posljednjih nekoliko desetljeća napretkom genetike, genomike i proteomike, otkriveno je mnogo novih potencijalnih meta lijekova. Međutim, novootkrivene mete često predstavljaju proteine na koje se ne može djelovati tradicionalnim lijekovima. Također, terapija raka, neurodegenerativnih ili autoimunih bolesti još uvijek nije zadovoljavajuća te je razvoj novih lijekova drugačijeg mehanizma djelovanja imperativ. Klasičan razvoj lijekova uglavnom je usmjeren na male molekule (inhibitore enzima i agoniste/antagoniste receptora) ili biološke lijekove. Ovi lijekovi djeluju samo na mali dio humanog proteoma (20–25 %) te ne mogu djelovati na cijelu skupinu proteina kao što su transkripcijski faktori, konstrukcijski proteini, proteinski agregati ili drugi ne-enzimski proteini.

Revolucionarni pristup u razvoju lijekova je TPD koji se temelji na primjeni molekula degradera za razgradnju dereguliranih proteina. TPD predstavlja alternativnu strategiju jer kombinira svojstva malih molekula s unutarstaničnom regulacijom koncentracije proteina te može zaobići ograničenja tradicionalne farmakoterapije i ciljati proteine na koje do sada nije bilo moguće djelovati. Osim kao potencijalni lijekovi, degraderi i destabilizacijske domene se koriste i kao kemijski alati u eksperimentalne svrhe za istraživanje funkcije proteina.

Zadnja dva desetljeća svjedočimo procvatu različitih TPD tehnologija. TPD iskorištava dva glavna puta razgradnje proteina u eukariotskim stanicama koji sudjeluju u održavanju stanične proteostaze: UPS koji je primarni unutarstanični put razgradnje proteina ili alternativnu lizosomsku proteolizu kojom se mogu razgrađivati izvanstanični proteini, unutarstanični proteinski agregati i/ili stanični organeli.

Degraderi se na temelju strukture dijele u dvije osnovne skupine: monovalentne i bivalentne degradere. Monovalentni degraderi su molekulska ljepila i destabilizatori kao što su SERD, SARD i hidrofobne oznake. Bivalentni degraderi su različite kimerne molekule koje usmjeravaju ciljanu proteolizu (npr. PROTAC-i koji induciraju razgradnju proteina iskorištavajući UPS te LYTAC, AbTAC, GlueTAC, bispecifične aptamerne kimere, AUTAC, ATTEC, AUTOTAC i CMA koji iskorištavaju lizosomski put).

TPD strategije počivaju na posebnom mehanizmu djelovanja koji se temelji na određenom događaju – razgradnji proteina. To je u suprotnosti s mehanizmom djelovanja tradicionalnih lijekova malih molekula koji se temelji na zauzetosti veznog mjesta. Kod tradicionalnih lijekova uglavnom je potrebna visoka koncentracija lijeka na mjestu djelovanja, koju je često vrlo izazovno postići i održavati te su potrebni lijekovi koji imaju visok afinitet za POI. Mehanizam djelovanja degradera, s druge strane, ne ovisi o blokiranju funkcije proteina te se ne moraju visokim afinitetom vezati na POI. Njihova uloga je posredovati prolazne PPI između dva proteina – POI, kojeg želimo razgraditi, i proteina koji sudjeluje u UPS-u (najčešće E3 ligaza) ili lizosomskom putu razgradnje proteina (npr. receptori koji usmjeravaju u lizosom ili receptori autofagije). Takva inducirana privrženost ovih proteina omogućuje odigravanje svih događaja koji prethode razgradnji POI-a posredovanoj staničnim sustavima za razgradnju proteina (kod UPS-a to je ubikvitinacija katalizirana E3 ligazom). Pod uvjetom da se ne vežu kovalentno na metu, degraderi djeluju katalitički, te koncentracije na mjestu djelovanja ne moraju biti visoke. Kako je dovoljno da degraderi mobiliziraju POI, čak se i agonisti nekog proteina mogu uspješno koristiti kao dijelovi strukture degradera.

Brojne su prednosti razgradnje proteina u odnosu na klasičnu inhibiciju enzima: osim katalitičkog učinka u niskim koncentracijama, degraderi su selektivniji, eliminiraju sve funkcije proteina, a

posebno su zanimljivi za mete nepristupačne malim molekulama te za nadvladavanje problema rezistencije na tradicionalne lijekove.

Najnaprednije i najveće skupine degradera su heterobifunkcionalni PROTAC-i i monovalentna molekulska ljepila koji se temelje na UPS-u, a koriste se za razgradnju unutarstaničnih proteina.

Prvi PROTAC-i bili su peptidne strukture te su, usprkos ključnoj ulozi u razvoju TPD-a, ostali nezapaženi gotovo 15 godina zbog nezadovoljavajućih fizikalno-kemijskih svojstava i nemogućnosti ulaska u stanicu. Unatoč brojnim nedostacima ovih prvih PROTAC-a, pomoću njih je dokazano da mala molekula može potaknuti TPD bez potrebe za genetičkom modifikacijom POI. Dokazi o *in vivo* učinkovitosti i superiornosti u odnosu na ishodiše molekule te otkriće malih molekula liganada za E3 ligaze koje osiguravaju bolju permeabilnost, doveli su do eksplozije područja TPD-a jer je farmaceutska industrija uvidjela stvaran terapijski potencijal TPD-a u odnosu na male molekule.

Ključni događaj u mehanizmu djelovanja PROTAC-a i drugih degradera je stvaranje ternarnog kompleksa POI-degrader-E3 ligaza (ili drugi protein staničnog sustava za razgradnju proteina). Upravo zbog uključivanja E3 ligaze i stvaranja ternarnog kompleksa, PROTAC-i su selektivniji nego lijekovi tradicionalnog mehanizma djelovanja čime se potencijalno smanjuje toksičnost zbog djelovanja na druge proteine. Iako se naizgled čini da je nastajanje ternarnog kompleksa jednostavan proces približavanja dvije molekule pomoću treće, mnogo čimbenika utječe na samo nastajanje, ali i sposobnost razgradnje ciljnog proteina. To uključuje veznu pozu, afinitet i kooperativnost, stehiometriju vezanja, vrijeme trajanja interakcija u ternarnom kompleksu, plastičnost i fleksibilnost. Primjerice razlike u kooperativnosti mogu dovesti do razlika u selektivnosti razgradnje jer različiti POI i E3 ligaze imaju različite površine koje mogu biti komplementarne pa su kod nekih degradera određeni parovi POI-E3 ligaza favorizirani. Nadalje,

može doći do neželjenog efekta udice kod prevelike koncentracije PROTAC-a. PROTAC se u tom slučaju natječe sam sa sobom za vezanje na POI i E3 ligazu zbog čega se smanjuje vjerojatnost istovremenog vezanja oba proteina. Drugim riječima, većina PROTAC-a je zarobljena u neproduktivnim binarnim kompleksima (POI-PROTAC ili PROTAC-E3) jer su vezna mjesta na POI i E3 zasićena. Efekt udice može se nadvladati visoko kooperativnim ternarnim kompleksima. U slučaju takvih kooperativnih kompleksa, pri puno nižoj koncentraciji PROTAC-a dolazi do potpune razgradnje mete. Prilikom proučavanja ternarnog kompleksa zapravo se postavlja pitanje dovodi li baš taj kompleks do razgradnje. Niti jedna dostupna tehnologija ne može sa sigurnošću utvrditi kako se ternarni kompleksi ponašaju u otopini ili u stanicama. Moguće je da postoji više različitih populacija ternarnog kompleksa, no u određenom trenutku može se uhvatiti samo jedna vrsta ternarnog kompleksa. Stoga se određena vezna poza zapravo ne bi trebala smatrati ternarnim kompleksom već dominantnim kompleksom u široj populaciji kompleksa. Kod vrlo stabilnih kompleksa s velikim dodirnim površinama među proteinima, veća je vjerojatnost da je upravo to stanje koje vidimo ternarni kompleks. Međutim, ne može se isključiti postojanje alternativnih kompleksa koji također mogu biti značajni.

Dizajn PROTAC-a uglavnom je empirijski proces pokušaja i pogreške. Primarno je potrebno odabrati metu koja je pogodna za razgradnju. Mete koje imaju veliku brzinu obrta (razgradnje i ponovne sinteze), odnosno kratko vrijeme poluživota, uglavnom neće biti prikladne i neće se moći postići potpuna razgradnja. Danas se još uvijek kao ligandi za POI najčešće koriste poznati inhibitori enzima, ali napretkom proteomike sve više proteina postaje zanimljivo za terapiju različitih bolesti. Pronalazak odgovarajućih liganada za te proteine vrlo je izazovno jer su to uglavnom proteini „na koje se ne može djelovati“. DKK je metoda koja je pogodna za pronalazak takvih liganada. Primjer uspješne primjene DKK je otkriće novih liganada za ERα koji su

iskorišteni u dizajnu PROTAC-a (98). Velika je prednost što se ligandi za POI ne moraju velikim afinitetom vezati na metu, odnosno dovoljno je i poželjno da se PROTAC-i samo prolazno vežu na POI.

Odabir E3 ligaze, a time i liganda, ograničen je na E3 ligaze s poznatim ligandima, većinom VHL i CRBN. S obzirom da je oko 98 % E3 ligaza još uvijek neistraženo, otkrivanjem novih liganada za te E3 ligaze širi se i repertoar meta na koje će se moći djelovati strategijama TPD-a. Kod istraživanja novih E3 ligaza koje su prikladne za PROTAC-e, uglavnom je BRD4 preferirani POI jer je vrlo podložan razgradnji. Međutim, baš zbog toga su od izuzetnog značaja otkrića razgradnje drugih meta. Za razliku od liganda za POI koji se mogu slabo vezati na metu, idealan ligand za E3 ligazu veže se visokim afinitetom na E3 i vrlo sporo disocira. Kao što je već rečeno, u slučaju da se PROTAC kovalentno veže na POI, gubi se njegovo katalitičko djelovanje, ali ako se veže kovalentno na E3 ligazu, više ne nastaje ternarni, već pseudobinarni kompleks između supstrata i adukta E3-PROTAC. To pojednostavljuje kinetiku vezanja jer „problem tri tijela“ postaje „problem dva tijela“ te se povećava katalitička učinkovitost. E3 ligaze specifične za određene stanice i tkiva vrlo su zanimljive za PROTAC-e jer bi se iskorištavajući takve E3 ligaze moglo djelovati ciljano i izbjeći rizik od razgradnje mete u ne-ciljnim stanicama, pogotovo ako je meta ubikvitarna. Primjerice, povećana ekspresija određenih E3 ligaza ponekad znači da su tumori postali ovisni o toj E3 ligazi. Tako se potencijalno smanjuje i vjerojatnost razvoja rezistencije na takve PROTAC-e jer je manja vjerojatnost da će se dogoditi mutacija esencijalne E3 ligaze, za razliku od rezistencije koja je opažena na PROTAC-e koji koriste CRBN i VHL E3 ligaze (50). Međutim, takve E3 ligaze često su povezane sa staničnim ciklusom i eksprimirane su i u drugim stanicama koje se brzo dijele kao što su stanice imunosnog sustava ili hematopoetske stanice, što povećava rizik od toksičnosti (50,114).

Pronalazak potentnog i selektivnog PROTAC-a dobrih PK svojstava danas se većinom svodi na problem pronalaska odgovarajuće poveznice u ogromnom kemijskom prostoru mogućih poveznica. Međutim, otkrivanjem novih E3 ligaza i njihovih liganada optimizacija strukture PROTAC-a zasigurno će se okrenuti i prema E3 ligazama. Iako *click* kemija može olakšati kombinatornu sintezu velikih knjižnica spojeva, postoji nebrojeno mnogo kombinacija liganada za POI i E3 ligazu, poveznica i mjesta povezivanja. Otkrivanjem novih E3 ligaza broj mogućih kombinacija samo raste, iako su one prijeko potrebne. Kao i kod svih bRo5 molekula, sinteza PROTAC-a često je dugotrajna, sastoji se od mnogo sintetskih koraka te je stoga vrlo skupa. Ovaj proces se može racionalizirati, olakšati i ubrzati računalnim metodama. SBDD dizajn PROTAC-a danas je uglavnom moguć zbog sve više dostupnih kristalnih struktura ternanih kompleksa. Dostupno je nekoliko računalnih programa (CHARMM, Rosetta, Model 4B, PRosettaC, PROTAC-ternary i PROTAC-Mode) za modeliranje ternarnih kompleksa koji mogu predvidjeti poznate vezne poze te u određenoj mjeri i očekivane (60). Međutim, točnost im ovisi o dostupnosti kristalnih struktura kompleksa proteina s ligandima. Iako su računalne metode za PROTAC-e sada još u začecima, daljnjim razvojem molekulskog modeliranja i umjetne inteligencije, sigurno će postajati sve moćnije.

Zlatni standard u ispitivanju razgradnje PROTAC-a je Western blot, a njegov glavni nedostatak je niska protočnost. Kod početnih ispitivanja ključni su odabir koncentracija i vremenskih točaka u kojima se prati razgradnja. U slučaju da je prekratak vremenski period, možda još nije postignuta maksimalna razgradnja, a s druge strane, duži vremenski intervali nose rizik lažno pozitivnih rezultata koji se javljaju zbog drugih utjecaja na koncentraciju proteina, kao što su promjene u nizvodnoj signalizaciji zbog produljene inhibicije mete ili utjecaja na stanični ciklus. Zbog toga se u početnim ispitivanjima uvijek odabiru i kraći (4–8 h) i duži (12–24 h) vremenski intervali (61).

Također, koncentracije spojeva se moraju pomno odabrati jer bivalentni degraderi pri visokim koncentracijama mogu izgubiti učinak zbog efekta udice. Stoga je preporučljivo ispitati razgradnju pri nizu koncentracija. Prilikom biološke evaluacije PROTAC-a, u slučaju da nema aktivnih molekula, rezultati dobiveni ispitivanjem permeabilnosti, vezanja PROTAC-a na POI i E3 ligazu te nastajanja ternarnog kompleksa koriste se za racionalnu optimizaciju nove generacije PROTAC-a.

Modifikacije PROTAC-a u svrhu poboljšanja PD i PK svojstava (npr. topljivosti, metaboličke stabilnosti, permeabilnosti) zahtijevaju dugotrajan i naporan rad u usporedbi s molekulama manje veličine koja zadovoljavaju Lipinskijeva i Veberova pravila. Optimizacija oralne bioraspoloživosti PROTAC-a još uvijek je u začecima te je definicija optimalnih svojstava molekula podložna značajnim promjenama. Veliki izazov u razvoju PROTAC-a je postići odgovarajuću topljivost i permeabilnost, a to se postiže uglavnom optimizacijom poveznice. Napredni terapijski sustavi, kao što su nanoformulacije, mogu pospješiti topljivost i permeabilnost, ali primjena ovih tehnologija dodatno komplicira i ovako izazovan razvoj, stoga bi trebala biti krajnja opcija kada se bolja topljivost u biorelevantnom mediju ne može postići promjenom kemijske strukture (134). PROTAC-i u kliničkim ispitivanjima su dokaz da je permeabilnost moguće optimizirati. Osim toga, već i mala koncentracija PROTAC-a u stanici može biti dovoljna za učinkovitu razgradnju zbog njihovog katalitičkog djelovanja.

Zbog svoje veličine i lipofilnosti, PROTAC-i su vjerojatno supstrati efluksnih proteina, poput P-gp-a, koji kontroliraju koncentraciju lijeka u stanici te mogu ograničiti apsorpciju i prelazak KMB-a. Međutim, PROTAC-i koji prelaze KMB vjerojatno iskorištavaju aktivni transport influksnim proteinima jer je mala vjerojatnost da mogu pasivno prijeći KMB. S toksikološkog stajališta najveća bojazan je mogućnost razgradnje ne-ciljnih proteina. Iako su PROTAC-i puno selektivniji

u odnosu na ishodišne molekule, rizik je moguć, pogotovo u slučaju PROTAC-a s CRBN ligandima IMiD-ima. Stoga je kod razvoja PROTAC-a nužno globalnom proteomikom koja se zasniva na masenoj spektrometriji provjeriti utjecaj na cijeli stanični proteom. Na toksičnost se također može utjecati optimizacijom poveznice ili odabirom E3 liganda.

PROTAC-i zbog lipofilnosti i veličine podliježu reakcijama biotransformacije kataliziranim enzimima CYP, ponajviše CYP3A4, koji je odgovoran za metabolizam većine lijekova i ksenobiotika. Zanimljiva je činjenica da PROTAC-i ne podliježu istim metaboličkim reakcijama kao ligandi od kojih su sastavljeni te se molekula PROTAC-a mora promatrati kao cjelina. Metabolički najosjetljiviji dio strukture PROTAC-a i drugih bivalentnih degradera je poveznica te mjesto vezanja poveznice na ligande. Suprotno očekivanju, PROTAC-i s PEG poveznicama koje su metabolički labilnije, gotovo su jednako metabolički stabilni kao i PROTAC-i s alkilnim poveznicama.

Računalne metode za točno predviđanje fizikalno-kemijskih svojstava, stanične permeabilnosti i apsorpcije iz GIT-a nužne su za daljnji razvoj ovog područja jer bi omogućile racionalan odabir i prioritizaciju pojedinih spojeva prije sinteze. Trenutno dostupni računalni modeli razvijeni su za male molekule te uglavnom ne mogu točno predvidjeti ove parametre za kompleksne kimerne degradere. Tako je primjerice nemoguće precizno predvidjeti najpovoljniju vrstu i duljinu poveznice niti konformaciju potrebnu za uspješnu ubikvitinaciju POI pomoću odabrane E3 ligaze. Jedan od razloga je što PROTAC-i, slično makrociklima, pokazuju kameleonska svojstva za razliku od klasičnih malih molekula. Stoga je u svrhu predviđanja PK svojstava potrebno uvesti nove molekulske deskriptore, kao što su EPSA i ChameLogD (133). Danas su još uvijek ograničeni podaci o tome kako se zapravo optimizacija PK u pretkliničkoj fazi translatira u kliniku. S obzirom na ograničene podatke o PK degradera iz kliničkih ispitivanja teško je uspostaviti PK modele za

predviđanje PK svojstava degradera kod ljudi i utvrditi jesu li jednako dobri kao modeli za tradicionalne male molekule.

Kod PK/PD modeliranja degradera bitno je imati na umu da koncentracija degradera neće biti proporcionalna farmakološkom djelovanju. Takva farmakokinetika je karakteristična za degradere jer je potrebno određeno vrijeme da dođe do razgradnje proteina. S obzirom da je potrebno i neko vrijeme za resintezu proteina, učinak deplecije proteina bit će prisutan i nakon eliminacije degradera iz organizma, a trajanje učinka ovisit će o brzini obrta proteina.

Razvoj degradera doživio je relativno brz uspjeh – od dizajna i optimizacije molekula, preko biološke evaluacije u pretkliničkim ispitivanjima, do potvrde koncepta u kliničkim studijama. Objavljeni rezultati pretkliničkih ispitivanja čvrsto podupiru tezu o selektivnosti PROTAC-a, ali i potentnosti u inhibiciji rasta tumora u usporedbi s malim molekulama inhibitorima. Također, rezultati pretkliničkih ispitivanja indiciraju da su PROTAC-i aktivni na stanice tumora koje su razvile rezistenciju nakon terapije malim molekulama inhibitorima. Rezultati kliničkih studija, iako ograničeni, pokazuju učinkovitost PROTAC-a kod pacijenata s uznapredovalim stadijem karcinoma prostate, dojke i kronične limfocitne leukemije, uključujući one s rezistentnim mutacijama AR-a, ER-a i BTK. Posebno je važno naglasiti izuzetno dobru podnošljivost PROTAC-a kod pacijenata. Nema naznaka da je neki od štetnih događaja izravno povezan sa samom tehnologijom i iskorištavanjem UPS-a, ali će se tek na većim populacijama pacijenata vidjeti učinkovitost i sigurnost primjene.

Iako najveća prednost i potencijal PROTAC-a leži u mogućnosti razgradnje meta „na koje se ne može djelovati“ tradicionalnim lijekovima, prvi PROTAC-i koji su ušli u klinička ispitivanja induciraju razgradnju upravo klasičnih, validiranih meta „na koje se može djelovati“ (AR, ER i BTK). Ovaj pristup u dizajnu PROTAC-a omogućuje iskorištavanje postojećih znanja o tim

metama i inhibitorima te nudi brojne prednosti. Validirane mete su većinom nedvojbeno uključene u patofiziologiju bolesti te je djelovanje na takve mete s toksikološkog aspekta sigurno ili su rizici poznati. Nadalje, poznati inhibitori su prošli rigoroznu evaluaciju sigurnosti i učinkovitosti, poznat je SAR te je u konačnici veća vjerojatnost napredovanja takvih PROTAC-a do kliničkih ispitivanja. Upotreba validiranih meta i poznatih inhibitora predstavlja čvrst temelj za dizajn i razvoj PROTAC-a jer smanjuje rizik neuspjeha u kliničkim ispitivanjima i povećava vjerojatnost uspješne razgradnje odabrane mete. Razgradnja proteina i terapijska učinkovitost dokazana je na PROTAC-ima bavdegalutamidu (razgradnja AR-a), vepdegestrantu (razgradnja ER-a) i NX-2127 (razgradnja BTK), te se očekuje da će ih vrlo brzo slijediti ostali PROTAC-i u kliničkim ispitivanjima. Ključna prekretnica bit će dokaz kliničke učinkovitosti PROTAC-a na mete „na koje se ne može djelovati“ tradicionalnim lijekovima inhibitorima.

Mnogi PROTAC-i su pokazali obećavajuće rezultate u kliničkim ispitivanjima što ukazuje na njihova prihvatljiva PK i PD svojstva. Trenutno se u aktivnim studijama faze I–III kliničkih ispitivanja nalazi 22 PROTAC-a većinom za liječenje različitih malignih bolesti (mCRPC, $ER^{+}HER2^{-}$ karcinom dojke, limfomi, sarkomi, različiti solidni tumori). Vepdegestrant, PROTAC za ciljanu razgradnju ER-a, nalazi se u fazi III kliničkih ispitivanja. Dva PROTAC-a u kliničkim ispitivanjima djeluju na imunosni sustav te se ispituje njihova učinkovitost za liječenje hidradenitisa suppurative i atopijskog dermatitisa. Jedan PROTAC se ispituje za liječenje androgene alopecije i akni. Mnogo PROTAC-a su tzv. „me-too“ degraderi. Pet PROTAC-a u kliničkim ispitivanjima djeluje na AR, dva na ER te četiri na BTK. Većina PROTAC-a iskorištava CRBN kao E3 ligazu. Tri su VHL PROTAC-a u fazama I kliničkih ispitivanja. Klinička ispitivanja nekoliko PROTAC-a su prekinuta zbog strateških razloga ili zbog vjerojatnog odabira krive mete, kao što je slučaj s BRD9 degraderima koji nisu pokazali dovoljnu učinkovitost u kliničkim

ispitivanjima (270). Razvoj DCAF15 PROTAC-a puno je zahtjevniji nego CRBN ili VHL. Zbog veznog mjesta arilsulfonamida koji se nalazi duboko u džepu DCAF15 i zbog velike površine preko koje DCAF15 i RBM39 stupaju u interakcije, nije lako napraviti tranziciju iz molekulskog ljepila u PROTAC-e.

Unatoč preprekama i na prvi pogled nepovoljnim fizikalno-kemijskim svojstvima PROTAC-a, neosporivo je postignut ogroman napredak u ovom području te su uspješno pripravljeni i PROTAC-i koji ciljaju mete „na koje se ne može djelovati“ kao što su transkripcijski faktori. PROTAC-i za ciljanu razgradnju takvih meta na koje se ne može djelovati tradicionalnim lijekovima, KT-333 (razgradnja STAT3) i PRT3789 (razgradnja SMARCA2), ušli su u klinička ispitivanja. Suprotno očekivanjima, mnogo PROTAC-a jest oralno bioraspoloživo, a neki prelaze i KMB. Najavljena je faza I kliničkih ispitivanja LRRK2 PROTAC-a za liječenje neurodegenerativnih bolesti.

Zanimljivo je da PROTAC-i u kliničkim ispitivanjima imaju rigidne poveznice koje sadrže heterocikličke prstenove pri čemu je najčešća poveznica sastavljena od piperazinskog i piperidinskog prstena međusobno odvojenih metilenskim mostom.

Iako su PROTAC-i do sada u pretkliničkim i kliničkim ispitivanjima pokazali obećavajuću učinkovitost i sigurnosni profil, još uvijek nije poznato hoće li se i na njih razvijati rezistencija. Pretklinički podaci o rezistenciji na PROTAC-e su ograničeni, a najviše primjera pojave rezistencije uzrokovano je mutacijama nekih od sastavnica UPS-a, primjerice gubitkom E2 Ub-konjugirajućeg enzima, različitih domena kompleksa E3 ligaza ili regulatora aktivnosti E3 ligaza (216,271–273).

Druga najveća i najznačajnija skupina degradera su molekulska ljepila. Ova vrsta degradera počela se intenzivno razvijati otkrićem mehanizma djelovanja odobrenih lijekova IMiD-a. Molekule koje djeluju kao molekulska ljepila puno su češće nego što se smatralo te nude važne lekcije za razvoj učinkovitih degradera. Za razliku od PROTAC-a koji imaju dva liganda (za POI i E3 ligazu), molekulska ljepila degraderi su monovalentni i vežu se na samo jedan protein (češće E3 ligazu) što mijenja njegovu konformaciju na način da može stupiti u PPI s drugim proteinom koji mu prirodno nije supstrat. Procjenjuje se da molekulska ljepila mogu poticati interakcije između otprilike 600 E3 ligaza i više od 20 000 potencijalnih meta, zbog čega su vrlo vrijedni kao alati za istraživanje funkcija proteina i kao lijekovi male molekule (274).

U odnosu na PROTAC-e, molekulska ljepila imaju bolja fizikalno-kemijska svojstva poželjna za lijekove zbog manje relativne molekulske mase, bolje permeabilnosti i oralne bioraspoloživosti. Klinička učinkovitost talidomida je dokazala da je indukcija TPD-a mehanizmom molekulskih ljepila obećavajuća terapijska strategija u razvoju novih lijekova. Ova otkrića djelovala su katalitički na razvoj područja TPD-a.

Većina molekulskih ljepila, i prirodnih (ciklosporin A, rapamicin, takrolimus, biljni hormoni i dr.) i sintetskih (IMiD-i), otkrivena je slučajno te će fenotipsko pretraživanje vjerojatno i dalje ostati ključno za ovu vrstu degradera. Racionalan dizajn molekulskih ljepila vrlo je izazovan te je i dalje u povojima, a očekuje se da će se razvijati prema naprednijim i sofisticiranijim pristupima temeljenim na strukturi mete. Osim slučajnog otkrića mehanizma djelovanja, kao što je bio slučaj s IMiD-ima, razvijaju se metode racionalnijeg, namjernog razvoja molekulskih ljepila, kao što su HTS, kemoproteomičko profiliranje ili sustavno rudarenje podataka. Ove metode se uglavnom temelje na iscrpnom probiru, nakon kojeg slijedi validacija mehanizma djelovanja. Nedostatak metoda za racionalni dizajn molekulskih ljepila ograničava njihovu primjenu i učinkovitost.

Razvoj novih računalnih metoda za predviđanje strukturnih karakteristika koje mogu odrediti vjerojatnost da će se neki supstrat vezati ovim mehanizmom te načina induciranja PPI pomoću molekulskih ljepila, bio bi koristan za virtualno pretraživanje i SBDD. Osim toga, umjetna inteligencija bi mogla poboljšati učinkovitost rudarenja podataka i molekulskog dizajna. Algoritmi strojnog učenja mogli bi pomoći u izradi pouzdanog modela na temelju mnoštva podataka dobivenih HTS-om, multiomikom i istraživanjem PPI koji bi mogao precizno predvidjeti potencijalne kombinacije proteina i molekulskih ljepila. Strojno učenje je korisno i za dizajn i optimizaciju novih molekulskih ljepila izgradnjom modela na temelju dostupnih informacija o strukturi i SAR-u.

Drugi važan problem u vezi molekulskih ljepila je njihov razvoj do učinkovitih lijekova. IMiD-i su poznati lijekovi čiji je mehanizam djelovanja otkriven naknadno. Iako je mehanizam djelovanja novootkrivenih molekulskih ljepila dobro definiran, njihovi PK/PD profili su još uvijek nepoznati što ograničava njihovu optimizaciju do kliničkih kandidata. U tu svrhu je važno odrediti endogenu brzinu sinteze proteina, konstantu razgradnje proteina molekulskim ljepilima i njihova PK svojstva. Međutim, izazovno je uračunati sva svojstva bitna za kliničke kandidate ako SAR nije poznat ili ga je teško utvrditi. Dok za PROTAC-e postoje relativno dobro definirane metode optimizacije strukture liganada i poveznice, kod molekulskih ljepila još uvijek nije jasno kako ih racionalno optimizirati.

Prvi racionalno razvijen PROTAC CC-900009, CRBN degrader GSPT1, povučen je iz kliničkih ispitivanja zbog nuspojava (275). S obzirom da molekulska ljepila u kliničkom razvoju ciljaju mete „na koje se ne može djelovati“ tradicionalnim lijekovima, rizik neuspjeha je puno veći. Međutim, to je nužno da bi se doista dokazala prednost TPD-a u odnosu na male molekule inhibitore.

Trenutno je 11 molekulskih ljepila u fazama I–III kliničkih ispitivanja za liječenje različitih malignih oboljenja, većinom multiplog mijeloma i limfoma. Tri molekulska ljepila iberdomid, mezigdomid i golkadomid napredovala su u fazu III. Većina ih djeluje preko CRBN-a, a potiču razgradnju transkripcijskih faktora IKZF1 i 3. Jedno molekulsko ljepilo u kliničkim ispitivanjima, aromatski sulfonamid E7820, koristi DCAF15 E3 ligazu za razgradnju RBM39.

Iako su istraživanja vrlo intenzivna, područje racionalnog razvoja molekulskih ljepila je na samom početku te će se tek morati potvrditi je li moguće uspješno racionalno razviti učinkovit i siguran degrader molekulsko ljepilo.

Osim talidomida, lenalidomida i pomalidomida kao molekulskih ljepila, još je jedna skupina degradera u kliničkoj primjeni. To su SERD-ovi koji pripadaju vrlo širokoj skupini molekula destabilizatora, monovalentnih degradera koji, kako im samo ime govori, destabiliziraju POI pri čemu on postaje podložan razgradnji. Fulvestrant je prvi SERD koji se dugi niz godina koristi za liječenje ER^+ karcinoma dojke, a njegov mehanizam djelovanja je također slučajno otkriven prilikom razvoja antiestrogena. Važan mehanizam rezistencije na endokrinu terapiju je razvoj ESR1 mutacije, koja se često javlja u tumorima koji su prethodno bili izloženi SERM-u ili inhibitorima aromataze. Iako je karcinom dojke s ESR1 mutacijom otporan na nove inhibitore aromataze, osjetljiv je na SERD-ove poput fulvestranta. Međutim, klinička primjena fulvestranta ograničena je intramuskularnom formulacijom koja se dozira jednom mjesečno te dovodi do nepotpune razgradnje ER-a. Oralni SERD-ovi se razvijaju kao potencijalna zamjena za fulvestrant u liječenju karcinoma dojke.

Trenutno se sedam SERD-ova nalazi u kliničkim ispitivanjima, pri čemu je čak četiri u fazi III. Elacestrant je prvi oralni SERD koji je u 2023. g. odobren za liječenje metastatskog ER^+HER2^- karcinoma dojke s ESR1 mutacijom. Mnogo drugih SERD-ova bilo je u različitim fazama

kliničkih ispitivanja, pri čemu je amcenestrant bio čak u fazi III, ali je zbog nedovoljne kliničke učinkovitosti ili toksičnosti, njihov daljnji razvoj zaustavljen te nisu ovdje prikazani (240). Nedostatak tumora s ESR1 mutacijom može djelomično objasniti negativne rezultate, stoga je ključno testiranje na ESR1 mutaciju.

S obzirom na uspjeh SERD-ova u terapiji karcinoma dojke, aktivna su istraživanja SARD-ova koji bi, analogno razgradnji ER-a, inducirali razgradnju AR-a kod karcinoma prostate. Trenutno je jedan SARD u fazi I/II kliničkih ispitivanja za liječenje mCRPC-a.

Osim navedenih destabilizatora, postoje različite tehnologije destabilizacije proteina, kao što su uvođenje destabilizacijskih domena ili hidrofobno označavanje molekula (HyTag, dTAG) koje se uglavnom koriste kao alternativa genetičkim metodama u molekularnoj biologiji za istraživanje funkcije mete i signalnih puteva.

U posljednjih nekoliko godina pojavile su se tehnologije koje iskorištavaju lizosomski put razgradnje proteina čime se mogu nadvladati nedostaci TPD-a temeljenog na proteasomskoj razgradnji proteina. S obzirom na mehanizam djelovanja, mogu se podijeliti u skupine koje iskorištavaju endosomsko-lizosomski put za razgradnju izvanstaničnih i membranskih proteina (LYTAC, AbTAC, bispecifične aptamerne kimere i GlueTAC) ili autofagiju (AUTAC, ATTEC, AUTOTAC, CMA) za razgradnju pogrešno smotanih proteina, proteinskih agregata ili oštećenih organela.

U usporedbi s PROTAC-ima, tri vrste degradera (ATTEC, AUTAC i AUTOAC) imaju širi spektar potencijalnih meta jer za TPD iskorištavaju autofagiju te je moguća razgradnja i staničnih organela (AUTAC i ATTEC) ili proteinskih agregata kao što su neurofibrilarni snopići proteina tau (AUTOTAC i ATTEC) (265). Usprkos tome, ove tehnologije za sada imaju nekoliko ograničenja.

Dizajn ATTEC-a je u vrlo ranom stadiju te još uvijek nema sustavnih metoda probira spojeva koji ciljaju proteine uključene u autofagiju, kao što je LC3. Niska stopa razgradnje pomoću AUTAC-a i AUTOTAC-a značajno ograničava njihovu primjenu u medicinskim istraživanjima zbog neizravnog ciljanja LC3. Također, potrebna su dodatna istraživanja točnog mehanizma razgradnje ovim vrstama degradera.

Iskorištavanje šaperonima posredovane autofagije pomoću CMA i endosomsko-lizosomskog puta pomoću LYTAC-a i AbTAC-a također predstavlja zanimljive pristupe TPD-u koji imaju potencijal za razvoj novih lijekova, ali također zahtijevaju dodatna istraživanja.

Prije translacije u kliniku potrebno je razmotriti i izazove u dostavi degradera koji iskorištavaju autofagiju do ciljnih tkiva i stanica. Jedno od mogućih rješenja moglo bi biti uklapanje u nanočestice koje se istražuje kod PROTAC-a. Na ovaj način bi se moglo smanjiti neželjeno djelovanje na ostale stanice i povećati učinkovitost dostave do ciljnog tkiva te ubrzati translaciju u kliniku. Napredak postignut u TPD-u potaknuo je interes za ove srodne terapijske modalitete te će njihov razvoj biti fascinantno pratiti u narednim godinama.

Konačno, koncept TPD-a posljednjih godina je iznimno aktualan u farmaceutskoj industriji i akademskoj zajednici. Trenutno se u kliničkim istraživanjima nalazi više od 30 molekula degradera. Još uvijek nije moguće predvidjeti hoće li neki od mnogih kliničkih programa dovesti do uspješnih i revolucionarnih novih opcija liječenja za pacijente jer je neuspjeh u razvoju novih lijekova uobičajen. Međutim, malo je vjerojatno da će PROTAC-i, ali i molekulska ljepila, biti samo prolazna moda u otkriću i razvoju novih lijekova. Veliko pitanje bilo je hoće li se nekonvencionalne molekule, kao što su PROTAC-i, moći uspješno optimizirati za primjenu kod ljudi, a to je već dokazano uspješnim studijama faza I i II kliničkih ispitivanja. Rizik od neuspjeha trenutačnih kliničkih projekata degradera vjerojatni nije puno drugačiji od rizika bilo kojeg lijeka

male molekule. Pojavom degradera otvorila se mogućnost djelovanja na mete koje su tradicionalnim lijekovima bile nepristupačne, što posebno obećava u liječenju neurodegenerativnih bolesti. U narednim godinama sigurno ćemo svjedočiti razvoju novih kandidata za klinička ispitivanja, od kojih će neki možda postići uspjeh i dovesti do značajnih napredaka u medicini.

5. Zaključak

Ovaj specijalistički rad pruža sveobuhvatan pregled inovativne terapijske strategije TPD-a, koja koristi molekule degradere za selektivno uklanjanje patogenih proteina unutar stanica. Razvoj tehnologija kao što su PROTAC-i i molekulska ljepila pokazuje značajan potencijal za proširenje terapijskog prostora na dio proteoma koji je bio nedostupan tradicionalnim lijekovima malim molekulama.

U radu su prikazani osnovni molekularni principi TPD-a u eukariotskim stanicama. Detaljno su obrađeni različiti pristupi ciljanoj razgradnji proteina koji iskorištavaju: UPS (PROTAC-i, molekulska ljepila, destabilizatori) i lizosomski put (LYTAC-i, AbTAC-i, AUTAC-i, ATTEC-i i dr.) te su opisane razlike bivalentnih i monovalentnih degradera.

Mehanizam djelovanja degradera temelji se na određenom događaju – razgradnji proteina koju degraderi potiču i tako reguliraju koncentraciju POI-a, dok se mehanizam djelovanja tradicionalnih lijekova zasniva na zauzetosti veznog mjesta. Osim što imaju terapijski potencijal, degraderi su i vrijedni alati u kemijskoj biologiji, tzv. kemijske probe, za validaciju i dublje razumijevanje funkcije proteina i signalnih putova. Nastajanje ternarnog kompleksa središnji je događaj u mehanizmu djelovanja degradera te je postizanje kooperativnog ternarnog kompleksa jedan od izazova u optimizaciji PK i PD svojstava degradera.

Brojne su prednosti razgradnje proteina u odnosu na klasičnu inhibiciju enzima. Degraderi djeluju katalitički u niskim koncentracijama, selektivniji su, eliminiraju sve funkcije proteina, a posebno su zanimljivi za mete nepristupačne malim molekulama te za nadvladavanje problema rezistencije na tradicionalne lijekove.

Ključni izazovi u razvoju degradera su njihov racionalan dizajn i optimizacija farmakokinetike i farmakodinamike, čemu će sigurno pomoći daljnji napredak računalnih metoda i umjetne inteligencije. Unatoč tim izazovima, dosadašnji napredak u ovom području obećava daljnji razvoj specifičnih i učinkovitih terapeutskih strategija.

Trenutno je više od 30 molekula degradera (PROTAC-i, SERD i molekulska ljepila) u kliničkim ispitivanjima. Jedan PROTAC, četiri SERD-a i tri molekulska ljepila su u studijama faze III. Uspjeh koji su prvi PROTAC-i doživjeli u kliničkim ispitivanjima potvrđuje njihov status perspektivnih novih terapijskih modaliteta i naglašava potencijal PROTAC-a da postanu lijekovi izbora za djelovanje na različite mete.

U narednim godinama očekuje se daljnji razvoj TPD-a i pojava novih kliničkih kandidata, od kojih će neki možda postići uspjeh i dovesti do značajnih napredaka u medicini. Razvoj i optimizacija degradera, uključujući i one koji iskorištavaju lizosomski put, obećava značajan napredak u liječenju raznih bolesti, uključujući neurodegenerativne bolesti, rak i autoimune poremećaje. Ovi inovativni pristupi otvaraju nove mogućnosti za liječenje bolesti koje su do sada bile neizlječive tradicionalnim terapijama.

6. Literatura

1. Amaral P, Carbonell-Sala S, De La Vega FM, i sur. The status of the human gene catalogue. Nature 2023;622:41–47.
2. Max Planck research: The Protein Puzzle. *Available at: https://www.mpg.de/11447687/W003_Biology_medicine_054-059.pdf. Accessed June 20, 2024.*
3. Qin L, Dai H, Wang J. Key Considerations in Targeted Protein Degradation Drug Discovery and Development. Front Chem 2022:10;934337.
4. Crews CM. Targeting the Undruggable Proteome: The Small Molecules of My Dreams. Chem Biol 2010;17:551–555.
5. Coleman KG, Crews CM. Proteolysis-Targeting Chimeras: Harnessing the Ubiquitin-Proteasome System to Induce Degradation of Specific Target Proteins. Annu Rev Cancer Biol 2018;2:41–58.
6. Cromm P. ur. Inducing targeted protein degradation: from chemical biology to drug discovery and clinical applications. Wiley-VCH; 2023, str. 1–24.
7. Cromm PM, Crews CM. Targeted Protein Degradation: from Chemical Biology to Drug Discovery. Cell Chem Biol 2017;24:1181–2290.
8. Luh LM, Scheib U, Juenemann K, Wortmann L, Brands M, Cromm PM. Prey for the Proteasome: Targeted Protein Degradation—A Medicinal Chemist's Perspective. Angew Chem Int Ed 2020;59:15448–15466.
9. Gubas A, Dikic I. A guide to the regulation of selective autophagy receptors. FEBS J 2022;289:75–89.

10. Cooper GM, ur. The Cell A Molecular Approach, 8. izd. Oxford University Press; 2019, str. 315-351.

11. Berndsen CE, Wolberger C. New insights into ubiquitin E3 ligase mechanism. Nat Struct Mol Biol 2014;21:301–307.

12. Zheng N, Shabek N. Ubiquitin Ligases: Structure, Function, and Regulation. Annu Rev Biochem 2017;86:129-157.

13. Diamantino J, Hellerschmied D. Cellular Principles of Targeted Protein Degradation. U: Cromm P., ur. Inducing Targeted Protein Degradation: from Chemical Biology to Drug Discovery and Clinical Applications. Wiley-VCH, 2023; str. 25–62.

14. Kannt A, Đikić I. Expanding the arsenal of E3 ubiquitin ligases for proximity-induced protein degradation. Cell Chem Biol 2021;28:1014–1031.

15. Huang X, Luan B, Wu J, Shi Y. An atomic structure of the human 26S proteasome. Nat Struct Mol Biol. 2016;23:778–785.

16. Chen X, Htet ZM, López-Alfonzo E, Martin A, Walters KJ. Proteasome interaction with ubiquitinated substrates: from mechanisms to therapies. FEBS J 2021;288:5231–5251.

17. Schapira M, Calabrese MF, Bullock AN, Crews CM. Targeted protein degradation: expanding the toolbox. Nat Rev Drug Discov. 2019;18:949–963.

18. Krönke J, Steinebach C, Ng YLD, i sur. Systematic exploration of different E3 ubiquitin ligases: An approach towards potent and selective CDK6 degraders. Chem Sci 2020;11:3474–3486.

19. Pech MF, Fong LE, Villalta JE, i sur. Systematic identification of cancer cell vulnerabilities to natural killer cell-mediated immune surveillance. Elife. 2019;8: e47362.

20. Han T, Goralski M, Gaskill N i sur. Anticancer sulfonamides target splicing by inducing RBM39 degradation via recruitment to DCAF15. Science (1979). 2017 Apr 28;356(6336).

21. Bussiere DE, Xie L, Srinivas H, Shu W, Burke A, Be C i sur. Structural basis of indisulam-mediated RBM39 recruitment to DCAF15 E3 ligase complex. Nat Chem Biol 2019;16:15–23.

22. Zhang X, Thielert M, Li H, Cravatt BF. SPIN4 Is a Principal Endogenous Substrate of the E3 Ubiquitin Ligase DCAF16. Biochemistry 2021;60:637–642.

23. Leclerc D, Staats Pires AC, Guillemin GJ, Gilot D. Detrimental activation of AhR pathway in cancer: an overview of therapeutic strategies. Curr Opin Immunol 2021;70:15–26.

24. Ohtake F, Kato S. The E3 Ubiquitin Ligase Activity of Transcription Factor AHR Permits Nongenomic Regulation of Biological Pathways. U: Pohjanvirta R, ur. The AH Receptor in Biology and Toxicology. Wiley-VCH; 2011, str. 143–56.

25. Ishida T, Ciulli A. E3 Ligase Ligands for PROTACs: How They Were Found and How to Discover New Ones. SLAS Discov 2021;26:484–502.

26. Buckley DL, Van Molle I, Gareiss PC i sur. Targeting the von Hippel-Lindau E3 ubiquitin ligase using small molecules to disrupt the VHL/HIF-1α interaction. J Am Chem Soc 2012;134:4465–4468.

27. Diehl CJ, Ciulli A. Discovery of small molecule ligands for the von Hippel-Lindau (VHL) E3 ligase and their use as inhibitors and PROTAC degraders. Chem Soc Rev 2022; 51:8216–8257.

28. Vassilev LT, Vu BT, Graves B i sur. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. Science 2004; 303:844–848.

29. Zhao L, Zhao J, Zhong K, Tong A, Jia D. Targeted protein degradation: mechanisms, strategies and application. Signal Transduct Target Ther 2022;7:113.

30. Kaushik S, Cuervo AM. The coming of age of chaperone-mediated autophagy. Nat Rev Mol Cell Biol 2018;19:365–381.

31. Mercer TJ, Gubas A, Tooze SA. A molecular perspective of mammalian autophagosome biogenesis. J Biol Chem 2018;293:5386–5395.

32. Johansen T, Lamark T. Selective Autophagy: ATG8 Family Proteins, LIR Motifs and Cargo Receptors. J Mol Biol 2020;432:80–103.

33. Migliano SM, Teis D. ESCRT and Membrane Protein Ubiquitination. Prog Mol Subcell Biol 2018;57:107–35.

34. Nakamura S, Yoshimori T. New insights into autophagosome-lysosome fusion. J Cell Sci 2017;130:1209–1216.

35. Imaide S, Riching KM, Makukhin N i sur. Trivalent PROTACs enhance protein degradation via combined avidity and cooperativity. Nat Chem Biol 2021;17:1157–1167.

36. Liu X, Ciulli A. Proximity-Based Modalities for Biology and Medicine. ACS Cent Sci 2023;9:1269–12384.

37. Klionsky DJ. Autophagy revisited: A conversation with Christian de Duve. Autophagy 2008;4:740–743.

38. Kresge N, Simoni RD, Hill RL. The Discovery of Ubiquitin-mediated Proteolysis by Aaron Ciechanover, Avram Hershko, and Irwin Rose. J Biol Chem 2006;281:32–36.

39. Giles J. Molecular kiss of death. Nature 2004; https://doi.org/10.1038/news041004-9

40. Tanaka K. The proteasome: Overview of structure and functions. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci 2009;85:12./

41. Sakamoto KM, Kim KB, Kumagai A, Mercurio F, Crews CM, Deshaies RJ. Protacs: chimeric molecules that target proteins to the Skp1-Cullin-F box complex for ubiquitination and degradation. Proc Natl Acad Sci U S A 2001;98:8554–8559.

42. O Donovan DH, Luh LM, Cromm PM. Targeted Protein Degradation – The Story So Far. U: Cromm P, ur. Inducing Targeted Protein Degradation: from Chemical Biology to Drug Discovery and Clinical Applications. 2022, str. 1–24.

43. Osborne CK, Wakeling A, Nicholson RI. Fulvestrant: an oestrogen receptor antagonist with a novel mechanism of action. Br J Cancer 2004;90(Suppl 1):S2-6.

44. Mottamal M, Kang B, Peng X, Wang G. From Pure Antagonists to Pure Degraders of the Estrogen Receptor: Evolving Strategies for the Same Target. ACS Omega 2021;6:9334–9343.

45. Schneekloth AR, Pucheault M, Tae HS, Crews CM. Targeted intracellular protein degradation induced by a small molecule: En route to chemical proteomics. Bioorg Med Chem Lett 2008;18:5904–5908.

46. Nishimura K, Fukagawa T, Takisawa H, Kakimoto T, Kanemaki M. An auxin-based degron system for the rapid depletion of proteins in nonplant cells. Nat Methods 2009;6:917–922.

47. Itoh Y, Ishikawa M, Naito M, Hashimoto Y. 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 2010;132:5820–5826.

48. Neklesa TK, Tae HS, Schneekloth AR i sur. Small-molecule hydrophobic tagging–induced degradation of HaloTag fusion proteins. Nat Chem Biol 2011;7:538–543.

49. Bondeson DP, Mares A, Smith IED i sur. Catalytic in vivo protein knockdown by small-molecule PROTACs. Nat Chem Biol 2015;11:611–617.

50. Békés M, Langley DR, Crews CM. PROTAC targeted protein degraders: the past is prologue. Nat Rev Drug Discov 2022;21:181–200.

51. Dewey JA, Delalande C, Azizi SA, Lu V, Antonopoulos D, Babnigg G. Molecular Glue Discovery: Current and Future Approaches. J Med Chem 2023;66:9278–96.

52. Ito T, Ando H, Suzuki T i sur. Identification of a Primary Target of Thalidomide Teratogenicity. Science 2010;327:1345–1350.

53. Costales MG, Matsumoto Y, Velagapudi SP, Disney MD. Small Molecule Targeted Recruitment of a Nuclease to RNA. J Am Chem Soc 2018;140:6741–6744.

54. Banik SM, Pedram K, Wisnovsky S, Ahn G, Riley NM, Bertozzi CR. Lysosome-targeting chimaeras for degradation of extracellular proteins. Nature 2020;584:291–297.

55. Cotton AD, Nguyen DP, Gramespacher JA, Seiple IB, Wells JA. Development of Antibody-Based PROTACs for the Degradation of the Cell-Surface Immune Checkpoint Protein PD-L1. J Am Chem Soc 2021;143:593–598.

56. Paudel RR, Lu D, Roy Chowdhury S, Monroy EY, Wang J. Targeted Protein Degradation via Lysosomes. Biochemistry 2023;62:564.

57. Chirnomas D, Hornberger KR, Crews CM. Protein degraders enter the clinic - a new approach to cancer therapy. Nat Rev Clin Oncol 2023;20:265–278.

58. ClinicalTrials.gov *Available at: https://clinicaltrials.gov/search?term=degrader&page=1. Accessed July 20, 2024.*

59. Arvinas Announces First-in-Human Dosing of ARV-102, an Investigational PROTAC® Protein Degrader for Neurodegenerative Disease. Available at:

https://ir.arvinas.com/news-releases/news-release-details/arvinas-announces-first-human-dosing-arv-102-investigational Accessed July 11, 2024.

60. Gadd MS, Aublette MC. A Structural and Biophysical Perspective of Degrader Activity Through Ternary Complex Formation. U. Cromm P, ur. Inducing Targeted Protein Degradation: from Chemical Biology to Drug Discovery and Clinical Applications 2023, str. 107–49.

61. Tran NL, Leconte GA, Ferguson FM. Targeted Protein Degradation: Design Considerations for PROTAC Development. Curr Protoc 2022;2:e611.

62. Pettersson M, Crews CM. PROteolysis TArgeting Chimeras (PROTACs) — Past, present and future. Drug Discov Today Technol 2019;31:15–27.

63. Sakamoto KM, Kim KB, Verma R i sur.. Development of Protacs to target cancer-promoting proteins for ubiquitination and degradation. Mol Cell Proteomics 2003;2:1350–1358.

64. Hon WC, Wilson MI, Harlos K i sur. Structural basis for the recognition of hydroxyproline in HIF-1 alpha by pVHL. Nature 2002;417:975–978.

65. Schneekloth JS, Fonseca FN, Koldobskiy M i sur. Chemical Genetic Control of Protein Levels: Selective in Vivo Targeted Degradation. J Am Chem Soc 2004;126:3748–3754.

66. Zhang D, Baek SH, Ho A, Kim K. Degradation of target protein in living cells by small-molecule proteolysis inducer. Bioorg Med Chem Lett 2004;14:645–648.

67. Cyrus K, Wehenkel M, Choi EY, Lee H, Swanson H, Kim KB. Jostling for Position: Optimizing Linker Location in the Design of Estrogen Receptor-targeting PROTACs. ChemMedChem. 2010;5:979.

68. Rodriguez-Gonzalez A, Cyrus K, Salcius M i sur. Targeting steroid hormone receptors for ubiquitination and degradation in breast and prostate cancer. Oncogene 2008;27:7201–7211.

69. Puppala D, Lee H, Kyung BK, Swanson HI. Development of an aryl hydrocarbon receptor antagonist using the proteolysis-targeting chimeric molecules approach: a potential tool for chemoprevention. Mol Pharmacol 2008;73:1064–1071.

70. Lee H, Puppala D, Choi EY, Swanson H, Kim KB. Targeted degradation of the aryl hydrocarbon receptor by the PROTAC approach: a useful chemical genetic tool. Chembiochem 2007;8:2058–2062.

71. Montrose K, Krissansen GW. Design of a PROTAC that antagonizes and destroys the cancer-forming X-protein of the hepatitis B virus. Biochem Biophys Res Commun 2014;453:735–740.

72. Henning RK, Varghese JO, Das S i sur. Degradation of Akt using protein-catalyzed capture agents. J Pept Sci 2016;22:196–200.

73. Wang X, Feng S, Fan J, Li X, Wen Q, Luo N. New strategy for renal fibrosis: Targeting Smad3 proteins for ubiquitination and degradation. Biochem Pharmacol 2016;116:200–209.

74. Chu TT, Gao N, Li Q i sur. Specific Knockdown of Endogenous Tau Protein by Peptide-Directed Ubiquitin-Proteasome Degradation. Cell Chem Biol 2016;23:453–461.

75. Hines J, Gough JD, Corson TW, Crews CM. Posttranslational protein knockdown coupled to receptor tyrosine kinase activation with phosphoPROTACs. Proc Natl Acad Sci U S A 2013;110:8942–8947.

76. Ohoka N, Okuhira K, Ito M i sur. In Vivo Knockdown of Pathogenic Proteins via S pecific and N ongenetic I nhibitor of Apoptosis Protein (IAP)-dependent P rotein Er asers (SNIPERs). J Biol Chem 2017;292:4556–4570.

77. Ohoka N, Morita Y, Nagai K i sur. Derivatization of inhibitor of apoptosis protein (IAP) ligands yields improved inducers of estrogen receptor α degradation. J Biol Chem 2018;293:6776–6790.

78. Winter GE, Buckley DL, Paulk J i sur. Phthalimide conjugation as a strategy for in vivo target protein degradation. Science 2015;348:1376–1381.

79. Neklesa TK, Winkler JD, Crews CM. Targeted protein degradation by PROTACs. Pharmacol Ther 2017;174:138–144.

80. Raina K, Lu J, Qian Y i sur. PROTAC-induced BET protein degradation as a therapy for castration-resistant prostate cancer. Proc Natl Acad Sci U S A 2016;113:7124–7129.

81. Shi J, Vakoc CR. The Mechanisms behind the Therapeutic Activity of BET Bromodomain Inhibition. Mol Cell 2014;54:728–736.

82. Filippakopoulos P, Qi J, Picaud S i sur. Selective inhibition of BET bromodomains. Nature 2010;468:1067.

83. Zengerle M, Chan KH, Ciulli A. Selective Small Molecule Induced Degradation of the BET Bromodomain Protein BRD4. ACS Chem Biol 2015;10:1770–1777.

84. Belkina AC, Denis G V. BET domain co-regulators in obesity, inflammation and cancer. Nature Reviews Cancer 2012;12:465–477.

85. Gadd MS, Testa A, Lucas X i sur. Structural basis of PROTAC cooperative recognition for selective protein degradation. Nat Chem Biol 2017;13:514–521.

86. Lu J, Qian Y, Altieri M i sur. Hijacking the E3 Ubiquitin Ligase Cereblon to Efficiently Target BRD4. Chem Biol 2015;22:755–763.

87. Saenz DT, Fiskus W, Qian Y i sur. Novel BET protein proteolysis-targeting chimera exerts superior lethal activity than bromodomain inhibitor (BETi) against post-myeloproliferative neoplasm secondary (s) AML cells. Leukemia 2017;31:1951–1961.

88. Weng G, Cai X, Cao D i sur. PROTAC-DB 2.0: an updated database of PROTACs. Nucleic Acids Res 2023;51(D1):D1367–1372.

89. PROTAC-DB Server Available at: http://cadd.zju.edu.cn/protacdb/ Accessed on July 16, 2024.

90. Silva MC, Ferguson FM, Cai Q i sur. Targeted degradation of aberrant tau in frontotemporal dementia patient-derived neuronal cell models. Elife. 2019;8: e45457.

91. Bond MJ, Chu L, Nalawansha DA, Li K, Crews CM. Targeted Degradation of Oncogenic KRASG12Cby VHL-Recruiting PROTACs. ACS Cent Sci 2020;6:1367–1375.

92. Zhou H, Bai L, Xu R i sur. SD-91 as A Potent and Selective STAT3 Degrader Capable of Achieving Complete and Long-Lasting Tumor Regression. ACS Med Chem Lett 2021;12:996–1004.

93. Donovan KA, Ferguson FM, Bushman JW i sur. Mapping the Degradable Kinome Provides a Resource for Expedited Degrader Development. Cell 2020;183:1714-1731.e10.

94. Zhang W, Roy Burman SS, Chen J i sur. Machine Learning Modeling ofProtein-intrinsic Features Predicts Tractability of Targeted Protein Degradation. Genom Proteom Bioinform 2022;20:882–898.

95. Gechijian LN, Buckley DL, Lawlor MA i sur. Functional TRIM24 degrader via conjugation of ineffectual bromodomain and VHL ligands. Nat Chem Biol 2018;14:405–412.

96. Tran NL, Leconte GA, Ferguson FM. Targeted Protein Degradation: Design Considerations for PROTAC Development. Curr Protoc 2022;2:e611.

97. Goodnow RA, Dumelin CE, Keefe AD. DNA-encoded chemistry: enabling the deeper sampling of chemical space. Nat Rev Drug Discov 2016;16:131–147.

98. Disch JS, Duffy JM, Lee ECY i sur. Bispecific Estrogen Receptor α Degraders Incorporating Novel Binders Identified Using DNA-Encoded Chemical Library Screening. J Med Chem 2021;64:5049–5066.

99. Mason JW, Chow YT, Hudson L i sur. DNA-encoded library-enabled discovery of proximity-inducing small molecules. Nat Chem Biol 2023;20:170–179.

100. Chana CK, Maisonneuve P, Posternak G i sur. Discovery and Structural Characterization of Small Molecule Binders of the Human CTLH E3 Ligase Subunit GID4. J Med Chem 2022;65:12725–12746.

101. Bensimon A, Pizzagalli MD, Kartnig F i sur. Targeted Degradation of SLC Transporters Reveals Amenability of Multi-Pass Transmembrane Proteins to Ligand-Induced Proteolysis. Cell Chem Biol 2020;27:728-739.e9.

102. Wang Y, Zhou Y, Cao S i sur. In vitro and in vivo degradation of programmed cell death ligand 1 (PD-L1) by a proteolysis targeting chimera (PROTAC). Bioorg Chem 2021;111: 104833.

103. Rutherford KA, McManus KJ. PROTACs: Current and Future Potential as a Precision Medicine Strategy to Combat Cancer. Mol Cancer Ther 2024;23:454–463.

104. Ward CC, Kleinman JI, Brittain SM i sur. Covalent Ligand Screening Uncovers a RNF4 E3 Ligase Recruiter for Targeted Protein Degradation Applications. ACS Chem Biol 2019;14:2430–2440.

105. Tong B, Spradlin JN, Novaes LFT i sur. A Nimbolide-Based Kinase Degrader Preferentially Degrades Oncogenic BCR-ABL. ACS Chem Biol 2020;15:1788–1794.

106. Zhang X, Crowley VM, Wucherpfennig TG, Dix MM, Cravatt BF. Electrophilic PROTACs that degrade nuclear proteins by engaging DCAF16. Nat Chem Biol 2019;15:737–746.

107. Spradlin JN, Hu X, Ward CC i sur. Harnessing the Anti-Cancer Natural Product Nimbolide for Targeted Protein Degradation. Nat Chem Biol 2019;15:747.

108. Li L, Mi D, Pei H, Duan Q i sur. In vivo target protein degradation induced by PROTACs based on E3 ligase DCAF15. Signal Transduct Target Ther 2020;5:1–3.

109. Wei J, Meng F, Park KS i sur. Harnessing the E3 Ligase KEAP1 for Targeted Protein Degradation. J Am Chem Soc 2021;143:15073–15083.

110. Henning NJ, Manford AG, Spradlin JN i sur. Discovery of a Covalent FEM1B Recruiter for Targeted Protein Degradation Applications. J Am Chem Soc 2022;144:701–708.

111. Zhang X, Luukkonen LM, Eissler CL i sur. DCAF11 Supports Targeted Protein Degradation by Electrophilic Proteolysis-Targeting Chimeras. J Am Chem Soc 2021;143:5141–5149.

112. Du G, Jiang J, Henning NJ i sur. Exploring the Target Scope of KEAP1 E3 Ligase-based PROTACs. Cell Chem Biol 2022;29:1470.

113. Khan S, Zhang X, Lv D i sur. A selective BCL-XL PROTAC degrader achieves safe and potent antitumor activity. Nat Med 2019;25:1938–1947.

114. Wang S, He F, Tian C, Sun A. From PROTAC to TPD: Advances and Opportunities in Targeted Protein Degradation. Pharmaceuticals 2024;17:100.

115. Zhang X. Insights and Future Perspectives of Covalent Protein Degraders. U: Cromm P, ur. Inducing Targeted Protein Degradation: from Chemical Biology to Drug Discovery and Clinical Applications. 2023, str. 215–43.

116. Lossouarn A, Renard PY, Sabot C. Tailored Bioorthogonal and Bioconjugate Chemistry: A Source of Inspiration for Developing Kinetic Target-Guided Synthesis Strategies. Bioconjug Chem 2021;32:63–72.

117. Liu Y, Yang J, Wang T i sur. Expanding PROTACtable genome universe of E3 ligases. Nat Comm 2023;14:1–17.

118. Cao C, He M, Wang L, He Y, Rao Y. Chemistries of bifunctional PROTAC degraders. Chem Soc Rev 2022;51:7066–7114.

119. Smith BE, Wang SL, Jaime-Figueroa S i sur. Differential PROTAC substrate specificity dictated by orientation of recruited E3 ligase. Nat Commun 2019;10:131.

120. Cao C, Yang J, Chen Y i sur. Discovery of SK-575 as a Highly Potent and Efficacious Proteolysis-Targeting Chimera Degrader of PARP1 for Treating Cancers. J Med Chem 2020;63:11012–11033.

121. Bricelj A, Dora Ng YL, Ferber D i sur. Influence of Linker Attachment Points on the Stability and Neosubstrate Degradation of Cereblon Ligands. ACS Med Chem Lett 2021;12:1733–1738.

122. Burslem GM, Smith BE, Lai AC i sur. The Advantages of Targeted Protein Degradation Over Inhibition: An RTK Case Study. Cell Chem Biol. 2018;25:67-77.e3.

123. Anderson NA, Cryan J, Ahmed A i sur. Selective CDK6 degradation mediated by cereblon, VHL, and novel IAP-recruiting PROTACs. Bioorg Med Chem Lett. 2020;30:127106.

124. Nunes J, McGonagle GA, Eden J i sur. Targeting IRAK4 for Degradation with PROTACs. ACS Med Chem Lett 201910:1081–1085.

125. Testa A, Hughes SJ, Lucas X, Wright JE, Ciulli A. Structure-Based Design of a Macrocyclic PROTAC. Angew Chem Int Ed Engl 2020;59:1727.

126. Zorba A, Nguyen C, Xu Y, Starr J i sur. Delineating the role of cooperativity in the design of potent PROTACs for BTK. Proc Natl Acad Sci U S A. 2018;115:E7285–7292.

127. Nowak RP, Deangelo SL, Buckley D i sur. Plasticity in binding confers selectivity in ligand-induced protein degradation. Nat Chem Biol 2018;14:706–714.

128. Rynn C, Van De Vyver A, Walz A, Cantrill C, Wittwer M. Taming the Beast: How to Optimize DMPK–PD Properties of Oral Degraders. U: Cromm P, ur. Inducing Targeted Protein Degradation: from Chemical Biology to Drug Discovery and Clinical Applications. 2022, str. 313–36.

129. Maple HJ, Clayden N, Baron A, Stacey C, Felix R. Developing degraders: principles and perspectives on design and chemical space. Medchemcomm 2019;10:1755–1764.

130. Volak LP, Duevel HM, Humphreys S i sur. Industry Perspective on the Pharmacokinetic and ADME Characterization of Heterobifunctional Protein Degraders. Drug Metab Dispos 2023;51:792–803.

131. David L, Wenlock M, Barton P, Ritzén A. Prediction of Chameleonic Efficiency. ChemMedChem 2021;16:2669–8265.

132. Caron G, Kihlberg J, Goetz G, Ratkova E, Poongavanam V, Ermondi G. Steering New Drug Discovery Campaigns: Permeability, Solubility, and Physicochemical Properties in the bRo5 Chemical Space. ACS Med Chem Lett 2021;12:13–23.

133. Ermondi G, Vallaro M, Goetz G, Shalaeva M, Caron G. Updating the portfolio of physicochemical descriptors related to permeability in the beyond the rule of 5 chemical space. Eur J Pharm Sci 2020;146:105274.

134. Cantrill C, Chaturvedi P, Rynn C, Petrig Schaffland J, Walter I, Wittwer MB. Fundamental aspects of DMPK optimization of targeted protein degraders. Drug Discov Today;25:969–82.

135. Matsson P, Doak BC, Over B, Kihlberg J. Cell permeability beyond the rule of 5. Adv Drug Deliv Rev 2016;101:42–61.

136. Goracci L, Desantis J, Valeri A, Castellani B, Eleuteri M, Cruciani G. Understanding the Metabolism of Proteolysis Targeting Chimeras (PROTACs): The Next Step toward Pharmaceutical Applications. J Med Chem 2020;63:11615–11638.

137. Araujo EMV, Hornberger KR. PROTAC® Protein Degraders: Bridging the Divide from Chemical Biology Tools to Clinical Candidates. U: Cromm P, ur. Inducing Targeted Protein Degradation: from Chemical Biology to Drug Discovery and Clinical Applications. 2022, str. 337–59.

138. Ishoey M, Chorn S, Singh N i sur. Translation Termination Factor GSPT1 Is a Phenotypically Relevant Off-Target of Heterobifunctional Phthalimide Degraders. ACS Chem Biol 2018;13:553–560.

139. Brand M, Winter GE. Stick it to E3s. Nat Chem Biol 2019;15:655–656.

140. Krönke J, Fink EC, Hollenbach PW i sur. Lenalidomide induces ubiquitination and degradation of CK1α in del(5q) MDS. Nature 2015;523:183–188.

141. Chamberlain PP, Hamann LG. Development of targeted protein degradation therapeutics. Nat Chem Biol 2019;15:937–944.

142. Matyskiela ME, Couto S, Zheng X i sur. SALL4 mediates teratogenicity as a thalidomide-dependent cereblon substrate. Nat Chem Biol 2018;14:981–987.

143. Gooding S, Ansari-Pour N, Towfic F i sur. Multiple cereblon genetic changes are associated with acquired resistance to lenalidomide or pomalidomide in multiple myeloma. Blood 2021;137:232-237.

144. Snyder LB. Discovery of ARV-110, a first in class androgen receptor degrading PROTAC for the treatment of men with metastatic castration resistant prostate cancer. Cancer Res 2021;81(13_Supplement):43.

145. Neklesa TK, Snyder LB, Willard RR i sur. ARV-110: an oral androgen receptor PROTAC degrader for prostate cancer. J Clin Oncol 2019;36:381.

146. Shore ND, Shen J, Devitt ME i sur. Phase 1b study of bavdegalutamide, an androgen receptor PROTAC degrader, combined with abiraterone in patients with metastatic prostate cancer Study Design. Clin Oncol 2022, *Available at: https://www.arvinas.com/wp-content/uploads/2022/09/Shore-ASCO-2022.pdf Accessed on July 20, 2024.*

147. Petrylak DP, Gao X, Vogelzang NJ i sur. First-in-human phase I study of ARV-110, an androgen receptor (AR) PROTAC degrader in patients (pts) with metastatic castrate-resistant prostate cancer (mCRPC) following enzalutamide (ENZ) and/or abiraterone (ABI). J Clin Oncol 2020;38(15_suppl):3500–3500.

148. Gao X, III HAB, Vuky J i sur. Phase 1/2 study of ARV-110, an androgen receptor (AR) PROTAC degrader, in metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC). https://doi.org/101200/JCO2022406_suppl017 [Internet]. 2022 Feb 16 [cited 2024 Jul 20];40(6_suppl):17–17. Available from: https://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2022.40.6_suppl.017

149. Chen QH, Munoz E, Ashong D. Insight into Recent Advances in Degrading Androgen Receptor for Castration-Resistant Prostate Cancer. Cancers 2024;16:663.

150. Snyder LB. The Discovery of ARV-471, an Orally Bioavailable Estrogen Receptor Degrading PROTAC® for the Treatment of Patients with Breast Cancer. Cancer Res 2021;81(13_Supplement):44.

151. Patel MR, Layman RM, Danso MA i sur. Preliminary results from a phase 1 study of AC699, an orally bioavailable chimeric estrogen receptor degrader, in patients with advanced or metastatic breast cancer. 2024;42(16_suppl):3074–3074.

152. Robbins DW, Kelly A, Tan M i sur. Nx-2127, a Degrader of BTK and IMiD Neosubstrates, for the Treatment of B-Cell Malignancies. Blood 2020;136(Supplement 1):34–34.

153. Robbins D. NX-2127, a Degrader of BTK and IMiD Neosubstrates, for the Treatment of B-Cell Malignancies. Blood 2020;136(Supplement)34.

154. Montoya S, Bourcier J, Thompson MC i sur. Kinase Dead BTK Mutations Confer Resistance to Covalent and Noncovalent BTK Inhibitors but Are Susceptible to Clinical Stage BTK Degraders. Blood 2022;140(Supplement 1):1811–1813.

155. Mato A, Danilov A, Patel MR i sur. A First-in-Human Phase 1 Trial of NX-2127, a First-in-Class Oral BTK Degrader With Immunomodulatory Activity, in Patients With Relapsed and Refractory B-Cell Malignancies. Blood 2023;142(Supplement 1):4463.

156. Robbins DW, Noviski M, Rountree R i sur. Nx-5948, a Selective Degrader of BTK with Activity in Preclinical Models of Hematologic and Brain Malignancies. Blood 2021;138(Supplement 1):2251–2251.

157. El-Sharkawi D, Searle E, Forconi F i sur. Initial findings from a first-in-human Phase 1a/b trial of NX-5948, a selective BTK degrader. Blood 2023;142(Supplement 1):4473.

158. Seymour JF, Cheah CY, Parrondo R i et. First Results from a Phase 1, First-in-Human Study of the Bruton's Tyrosine Kinase (BTK) Degrader Bgb-16673 in Patients (Pts) with Relapsed or Refractory (R/R) B-Cell Malignancies (BGB-16673-101). Blood 2023;142(Supplement 1):4401–4401.

159. Sherman D. Abstract ND05: The discovery of ARV-393, a potent, orally bioavailable BCL6 targeting PROTAC® for the treatment of Non-Hodgkin's Lymphoma. Cancer Res 2024;84(7_Supplement):ND05–ND05.

160. Nagashima T, Inamura K, Nishizono Y i sur. ASP3082, a First-in-class novel KRAS G12D degrader, exhibits remarkable anti-tumor activity in KRAS G12D mutated cancer models. Eur J Cancer 2022;174:S30.

161. Kolb R, De U, Khan S i sur. Proteolysis-targeting chimera against BCL-XL destroys tumor-infiltrating regulatory T cells. Nat Comm 2021;12:1–9.

162. He Y, Koch R, Budamagunta V i sur. DT2216-a Bcl-xL-specific degrader is highly active against Bcl-xL-dependent T cell lymphomas. J Hematol Oncol 2020;13:95.

163. Liu PC, Dixit V, Mayo M i sur. A First-in-Class STAT3 Degrader KT-333 in Development for Treatment of Hematologic Cancers. Blood 2021;138(Supplement 1):1865–1865.

164. Mayo M, Chutake Y, Karnik R i sur. Development of KT-253, a Highly Potent and Selective Heterobifunctional MDM2 Degrader for the Treatment of Acute Myeloid Leukemia. Blood 2022;140(Supplement 1):6239–6240.

165. Hulse M, Agarwal A, Wang M i sur. Abstract 3263: Preclinical characterization of PRT3789, a potent and selective SMARCA2 targeted degrader. Cancer Res 2022;82(12_Supplement):3263–3263.

166. PROTAC Protein Degrader Pipeline. *Available at: https://www.arvinas.com/research-and-development/pipeline/ Accessed on July 22, 2024*

167. Nieto-Barrado L, Domostegui A, Mayor-Ruiz C. Molecular Glue Degraders: From Serendipity to Hunting and Design. U: Cromm P, ur. Inducing Targeted Protein Degradation: from Chemical Biology to Drug Discovery and Clinical Applications. 2023, str. 177–204.

168. Burslem GM, Crews CM. Small-Molecule Modulation of Protein Homeostasis. Chem Rev 2017;117:11269–11301.

169. Zhang QC, Petrey D, Deng L i sur. Structure-based prediction of protein–protein interactions on a genome-wide scale. Nature 2012;490: 556–560.

170. Milroy LG, Grossmann TN, Hennig S, Brunsveld L, Ottmann C. Modulators of protein-protein interactions. Chem Rev 2014;114:4695–4748.

171. Stanton BZ, Chory EJ, Crabtree GR. Chemically induced proximity in biology and medicine. Science 2018;359:eaao5902

172. Scott DE, Bayly AR, Abell C, Skidmore J. Small molecules, big targets: drug discovery faces the protein–protein interaction challenge. Nat Rev Drug Discov 2016;15:533–550.

173. Schreiber SL. A Chemical Biology View of Bioactive Small Molecules and a Binder-Based Approach to Connect Biology to Precision Medicines. Isr J Chem 2019;59:52–59.

174. Santiago J, Henzler C, Hothorn M. Molecular mechanism for plant steroid receptor activation by somatic embryogenesis co-receptor kinases. Science 2013;341:889–892.

175. Sheard LB, Tan X, Mao H i sur. Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1–JAZ co-receptor. Nature 2010;468:400–540.

176. Gray WM, Kepinski S, Rouse D, Leyser O, Estelle M. Auxin regulates SCFTIR1-dependent degradation of AUX/IAA proteins. Nature 2001;414:271–276.

177. Tan X, Calderon-Villalobos LIA, Sharon M i sur. Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. Nature 2007;446:640–645.

178. Mahon C, Krogan NJ, Craik CS, Pick E. Cullin E3 Ligases and Their Rewiring by Viral Factors. Biomolecules 2014;4:897.

179. Zhang Y, Li LF, Munir M, Qiu HJ. RING-domain E3 ligase-mediated host-virus interactions: Orchestrating immune responses by the host and antagonizing immune defense by viruses. Front Immunol 2018;9:1083.

180. Gandhi AK, Kang J, Havens CG i sur. Immunomodulatory agents lenalidomide and pomalidomide co-stimulate T cells by inducing degradation of T cell repressors Ikaros and Aiolos via modulation of the E3 ubiquitin ligase complex CRL4(CRBN.). Br J Haematol 2014;164:811–881.

181. Dimopoulos M, Spencer A, Attal M i sur. Lenalidomide plus Dexamethasone for Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. N Eng J Med 2007;357:2123–2132.

182. Jan M, Sperling AS, Ebert BL. Cancer therapies based on targeted protein degradation — lessons learned with lenalidomide. Nat Rev Clin Oncol 2021;18:401–417.

183. FDA grants accelerated approval to pomalidomide for Kaposi sarcoma. *Available at: https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-grants-accelerated-approval-pomalidomide-kaposi-sarcoma Accessed on 24 July, 2024.*

184. Kaur I, Dogra S, Narang T, De D. Comparative efficacy of thalidomide and prednisolone in the treatment of moderate to severe erythema nodosum leprosum: a randomized study. Australas J Dermatol 2009;50:181–185.

185. Leonard JP, Trneny M, Izutsu K i sur. AUGMENT: A Phase III study of lenalidomide plus rituximab versus placebo plus rituximab in relapsed or refractory indolent lymphoma. J Clin Oncol 2019;37:1188–1199.

186. List A, Dewald G, Bennett J i sur. Lenalidomide in the Myelodysplastic Syndrome with Chromosome 5q Deletion. N Eng J Med 2006;355:1456–1465.

187. Rajkumar SV, Blood E, Vesole D, Fonseca R, Greipp PR. Phase III clinical trial of thalidomide plus dexamethasone compared with dexamethasone alone in newly diagnosed

multiple myeloma: a clinical trial coordinated by the Eastern Cooperative Oncology Group. J Clin Oncol 2006;24:431–436.

188. Rajkumar SV, Hayman S, Gertz MA i sur. Combination therapy with thalidomide plus dexamethasone for newly diagnosed myeloma. J Clin Oncol 2002;20:4319–4323.

189. Weber DM, Chen C, Niesvizky R i sur. Lenalidomide plus Dexamethasone for Relapsed Multiple Myeloma in North America. N Eng J Med 2007;357:2133–2142.

190. Stephens TD, Brynner R. Book: Dark Remedy: The Impacct of Thalidomide and its Revival as a Vital Medicine. Br Med J 2001;322:1608.

191. Kim JH, Scialli AR. Thalidomide: the tragedy of birth defects and the effective treatment of disease. Toxicol Sci 2011;122:1–6.

192. Bartlett JB, Dredge K, Dalgleish AG. The evolution of thalidomide and its IMiD derivatives as anticancer agents. Nat Rev Cancer 2004;4:314–322.

193. Lu G, Middleton RE, Sun H i sur. The myeloma drug lenalidomide promotes the cereblon-dependent destruction of Ikaros proteins. Science 2014;343:305–309.

194. Zhu YX, Braggio E, Shi CX i sur. Cereblon expression is required for the antimyeloma activity of lenalidomide and pomalidomide. Blood 2011;118:4771–4779.

195. Lopez-Girona A, Mendy D, Ito T i sur. Cereblon is a direct protein target for immunomodulatory and antiproliferative activities of lenalidomide and pomalidomide. Leukemia 2012;26:2326–2335.

196. Krönke J, Udeshi ND, Narla A i sur. Lenalidomide causes selective degradation of IKZF1 and IKZF3 in multiple myeloma cells. Science 2014;343:301–305.

197. Kozicka Z, Thomä NH. Haven't got a glue: Protein surface variation for the design of molecular glue degraders. Cell Chem Biol. 2021;28:1032–1047.

198. Fischer ES, Böhm K, Lydeard JR i sur. Structure of the DDB1–CRBN E3 ubiquitin ligase in complex with thalidomide. Nature 2014;512:49–53.

199. Chamberlain PP, Lopez-Girona A, Miller K i sur. Structure of the human Cereblon–DDB1–lenalidomide complex reveals basis for responsiveness to thalidomide analogs. Nat Struct Mol Biol 2014;21:803–809.

200. Petzold G, Fischer ES, Thomä NH. Structural basis of lenalidomide-induced CK1α degradation by the CRL4CRBN ubiquitin ligase. Nature 2016;532:127–130.

201. Matyskiela ME, Lu G, Ito T i sur. A novel cereblon modulator recruits GSPT1 to the CRL4CRBN ubiquitin ligase. Nature 2016;535:252–257.

202. Matyskiela ME, Clayton T, Zheng X i sur. Crystal structure of the SALL4–pomalidomide–cereblon–DDB1 complex. Nat StructMole Biol 2020;27:319–322.

203. Sievers QL, Petzold G, Bunker RD i sur. Defining the human C2H2 zinc finger degrome targeted by thalidomide analogs through CRBN. Science 2018;362:eaat0572.

204. Matyskiela ME, Zhu J, Baughman JM i sur. Cereblon Modulators Target ZBTB16 and Its Oncogenic Fusion Partners for Degradation via Distinct Structural Degrons. ACS Chem Biol 2020;15:3149–3158.

205. Urquhart L. Top companies and drugs by sales in 2020. Nat Rev Drug Discov. 2021;20:253.

206. Urquhart L. Top companies and drugs by sales in 2019. Nat Rev Drug Discov. 2020;19:228.

207. Yamanaka S, Murai H, Saito D i sur. Thalidomide and its metabolite 5-hydroxythalidomide induce teratogenicity via the cereblon neosubstrate PLZF. EMBO J 2021;40:e105375.

208. Asatsuma-Okumura T, Ando H i sur. p63 is a cereblon substrate involved in thalidomide teratogenicity. Nat Chem Biol 2019;15:1077–1084.

209. Supuran CT. Indisulam: an anticancer sulfonamide in clinical development. Expert Opin Investig Drugs 2003;12:283–287.

210. Haddad RI, Weinstein LJ, Wieczorek TJ i sur. A phase II clinical and pharmacodynamic study of E7070 in patients with metastatic, recurrent, or refractory squamous cell carcinoma of the head and neck: modulation of retinoblastoma protein phosphorylation by a novel chloroindolyl sulfonamide cell cycle inhibitor. Clin Cancer Res 2004;10:4680–4687.

211. Talbot DC, Von Pawel J, Cattell E i sur. A randomized phase II pharmacokinetic and pharmacodynamic study of indisulam as second-line therapy in patients with advanced non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res 2007;13:1816–1822.

212. Smyth JF, Aamdal S, Awada A i sur. Phase II study of E7070 in patients with metastatic melanoma. Ann Oncol 2005;16:158–161.

213. Bellenie BR, Cheung KMJ, Varela A i sur. Achieving in Vivo Target Depletion through the Discovery and Optimization of Benzimidazolone BCL6 Degraders. J Med Chem 2020;63:4047–4068.

214. Słabicki M, Yoon H, Koeppel J i sur. Small-molecule-induced polymerization triggers degradation of BCL6. Nature 2020;588:164–168.

215. Simonetta KR, Taygerly J, Boyle K i sur. Prospective discovery of small molecule enhancers of an E3 ligase-substrate interaction. Nat Comm 2019;10:1–12.

216. Mayor-Ruiz C, Jaeger MG, Bauer S i sur. Plasticity of the Cullin-RING Ligase Repertoire Shapes Sensitivity to Ligand-Induced Protein Degradation. Mol Cell 2019;75:849-858.e8.

217. Słabicki M, Kozicka Z, Petzold G i sur. The CDK inhibitor CR8 acts as a molecular glue degrader that depletes cyclin K. Nature 2020;585:293–297.

218. Lv L, Chen P, Cao L i sur. Discovery of a molecular glue promoting cdk12-ddb1 interaction to trigger cyclin k degradation. Elife. 2020;9:1–34.

219. Koduri V, Duplaquet L, Lampson BL i sur. Targeting oncoproteins with a positive selection assay for protein degraders. Sci Adv 2021;7:6263.

220. Wang ES, Verano AL, Nowak RP i sur. Acute pharmacological degradation of Helios destabilizes regulatory T cells. Nat Chem Biol 2021;17:711–717.

221. Tutter A, Buckley D, Golosov AA i sur. A small molecule VHL molecular glue degrader for cysteine dioxygenase 1. bioRxiv https://doi.org/10.1101/2024.01.25.576086

222. Mullard A. Targeted protein degraders crowd into the clinic. Nat Rev Drug Discov. 2021;20:247–250.

223. Richardson PG, Trudel S, Quach H i sur. Mezigdomide (CC-92480), a Potent, Novel Cereblon E3 Ligase Modulator (CELMoD), Combined with Dexamethasone (DEX) in Patients (pts) with Relapsed/Refractory Multiple Myeloma (RRMM): Preliminary Results from the Dose-Expansion Phase of the CC-92480-MM-001 Trial. Blood 2022;140(Supplement 1):1366–1368.

224. van de Donk N, Touzeau C, Terpos E i sur. Iberdomide Maintenance after Autologous Stem-Cell Transplantation in Newly Diagnosed MM: First Results of the Phase 2 EMN26 Study. Blood 2023;142(Supplement 1):208.

225. Merrill JT, Werth VP, Furie R i sur. Phase 2 Trial of Iberdomide in Systemic Lupus Erythematosus. N Eng J Med 2022;386:1034–1045.

226. Donk NWCJ van de, Popat R, Hulin C i sur. P07: RESULTS FROM THE CC-220-MM-001 DOSE-EXPANSION PHASE OF IBERDOMIDE PLUS DEXAMETHASONE IN PATIENTS WITH RELAPSED/REFRACTORY MULTIPLE MYELOMA. Hemasphere 2022;6(Suppl):14–5.

227. Hoffmann M, Munoz J, Westin JR i sur. Golcadomide (GOLCA; CC-99282), a Novel CELMoD Agent, Plus R-CHOP in Patients (pts) with Previously Untreated Aggressive B-Cell Lymphoma (a-BCL): Safety and Efficacy Results from Phase 1b Dose Expansion. Blood;142(Supplement 1):4459-4459.

228. Faust TB, Donovan KA, Yue H, Chamberlain PP, Fischer ES. Small-Molecule Approaches to Targeted Protein Degradation. Annu Rev Cancer Biol 2020;5:181–201.

229. Sebastian RM, Shoulders MD. Chemical Biology Framework to Illuminate Proteostasis. Annu Rev Biochem 2020;89:529–555.

230. Los G V., Encell LP, McDougall MG i sur. HaloTag: A novel protein labeling technology for cell imaging and protein analysis. ACS Chem Biol 2008;3:373–382.

231. Kim YE, Hipp MS, Bracher A, Hayer-Hartl M, Ulrich Hartl F. Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis. Annu Rev Biochem 2013;82:323–355.

232. Song J, Hu M, Zhou J, Xie S, Li T, Li Y. Targeted protein degradation in drug development: Recent advances and future challenges. Eur J Med Chem 2023;261: 115839.

233. Nabet B, Roberts JM, Buckley DL i sur. The dTAG system for immediate and target-specific protein degradation. Nat Chem Biol 2018;14:431–441.

234. Patel HK, Bihani T. Selective estrogen receptor modulators (SERMs) and selective estrogen receptor degraders (SERDs) in cancer treatment. Pharmacol Ther 2018;186:1–24.

235. Bentrem DJ, Dardes RC, Liu H, Macgregor-Schafer J, Zapf JW, Jordan VC. Molecular mechanism of action at estrogen receptor α of a new clinically relevant antiestrogen (GW7604) related to tamoxifen. Endocrinology. 2001;142:838–846.

236. Cornella-Taracido I, Garcia-Echeverria C. Monovalent protein-degraders – insights and future perspectives. Bioorg Med Chem Lett 2020;30:127202.

237. Wang Y, Tang SC. The race to develop oral SERDs and other novel estrogen receptor inhibitors: recent clinical trial results and impact on treatment options. Cancer Metastasis Rev 2022;41:975-990.

238. Ellis MJ, Llombart-Cussac A, Feltl D i sur. Fulvestrant 500 mg Versus Anastrozole 1 mg for the First-Line Treatment of Advanced Breast Cancer: Overall Survival Analysis From the Phase II FIRST Study. J Clin Oncol 2015;33:3781–3786.

239. Ciruelos E, Pascual T, Arroyo Vozmediano ML i sur. The therapeutic role of fulvestrant in the management of patients with hormone receptor-positive breast cancer. Breast 2014;23:201–208.

240. Rej RK, Thomas JE, Acharyya RK, Rae JM, Wang S. Targeting the Estrogen Receptor for the Treatment of Breast Cancer: Recent Advances and Challenges. J Med Chem 2023;66:8339–8381.

241. Orserdu | European Medicines Agency. *Available at: https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/orserdu Accessed on July 23, 2024.*

242. Shah M, Lingam H, Gao X i sur. US Food and Drug Administration Approval Summary: Elacestrant for Estrogen Receptor–Positive, Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Negative, ESR1-Mutated Advanced or Metastatic Breast Cancer. J Clin Oncol 2024;42:1193–1201.

243. Scott JS, Moss TA, Balazs A i sur. Discovery of AZD9833, a Potent and Orally Bioavailable Selective Estrogen Receptor Degrader and Antagonist. J Med Chem 2020;63:14530–14559.

244. Im SA, Hamilton EP, Cussac AL i sur. SERENA-4: A phase 3 comparison of AZD9833 (camizestrant) plus palbociclib, versus anastrozole plus palbociclib, for patients with ER-positive, HER2-negative advanced breast cancer who have not previously received systemic treatment for advanced disease. J Clin Oncol 2021;39(15_suppl):TPS1101–TPS1101.

245. Lawson M, Cureton N, Ros S i sur. The Next-Generation Oral Selective Estrogen Receptor Degrader Camizestrant (AZD9833) Suppresses ER+ Breast Cancer Growth and Overcomes Endocrine and CDK4/6 Inhibitor Resistance. Cancer Res 2023;83:3989.

246. Liang J, Zbieg JR, Blake RA i sur. GDC-9545 (Giredestrant): A Potent and Orally Bioavailable Selective Estrogen Receptor Antagonist and Degrader with an Exceptional Preclinical Profile for ER+ Breast Cancer. J Med Chem 2021;64:11841–11856.

247. Hurvitz SA, Bardia A, Quiroga V i sur. Neoadjuvant palbociclib plus either giredestrant or anastrozole in oestrogen receptor-positive, HER2-negative, early breast cancer (coopERA Breast Cancer): an open-label, randomised, controlled, phase 2 study. Lancet Oncol 2023;24:1029–1041.

248. Zhou F, Yang G, Xue L i sur. SCR-6852, an oral and highly brain-penetrating estrogen receptor degrader (SERD), effectively shrinks tumors both in intracranial and subcutaneous ER + breast cancer models. Breast Cancer Res 2023;25:1–16.

249. Chen QH, Munoz E, Ashong D. Insight into Recent Advances in Degrading Androgen Receptor for Castration-Resistant Prostate Cancer. Cancers 2024;16:663.

250. Banik SM, Pedram K, Wisnovsky S, Ahn G, Riley NM, Bertozzi CR. Lysosome-targeting chimaeras for degradation of extracellular proteins. Nature 2020 584:291–297.

251. Ghosh P, Dahms NM, Kornfeld S. Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale. Nat Rev Mol Cell Biol 2003;4:202–213.

252. Ahn G, Banik SM, Miller CL, Riley NM, Cochran JR, Bertozzi CR. LYTACs that engage the asialoglycoprotein receptor for targeted protein degradation. Nat Chem Biol 2021;17:937–946.

253. Whitworth C, Ciulli A. New class of molecule targets proteins outside cells for degradation. Nature 2021;584:193–194.

254. Cotton AD, Nguyen DP, Gramespacher JA, Seiple IB, Wells JA. Development of Antibody-Based PROTACs for the Degradation of the Cell-Surface Immune Checkpoint Protein PD-L1. J Am Chem Soc 2021;143:593–598.

255. Zebisch M, Xu Y, Krastev C i sur. Structural and molecular basis of ZNRF3/RNF43 transmembrane ubiquitin ligase inhibition by the Wnt agonist R-spondin. Nat Comm 2013;4:1–12.

256. Zhang H, Han Y, Yang Y i sur. Covalently Engineered Nanobody Chimeras for Targeted Membrane Protein Degradation. J Am Chem Soc 2021;143:16377–16382.

257. Singh J. The Ascension of Targeted Covalent Inhibitors. J Med Chem 2022;65:5886–5901.

258. Miao Y, Gao Q, Mao M i sur. Bispecific Aptamer Chimeras Enable Targeted Protein Degradation on Cell Membranes. Angew Chem Int Ed 2021;60:11267–11271.

259. Takahashi D, Moriyama J, Nakamura T i sur. AUTACs: Cargo-Specific Degraders Using Selective Autophagy. Mol Cell 2019;76:797-810.e10.

260. Takahashi D, Arimoto H. Targeting selective autophagy by AUTAC degraders. Autophagy 2020;16:765.

261. Li Z, Wang C, Wang Z i sur. Allele-selective lowering of mutant HTT protein by HTT–LC3 linker compounds. Nature 2019;575:203–209.

262. Ding Y, Fei Y, Lu B. Emerging New Concepts of Degrader Technologies. Trends Pharmacol Sci 2020;41:464–474

263. Fu Y, Chen N, Wang Z, Luo S, Ding Y, Lu B. Degradation of lipid droplets by chimeric autophagy-tethering compounds. Cell Research 2021 3;31:965–979.

264. Li Z, Zhu C, Ding Y, Fei Y, Lu B. ATTEC: a potential new approach to target proteinopathies. Autophagy 2020;16:185–187.

265. Ji CH, Kim HY, Lee MJ i sur. The AUTOTAC chemical biology platform for targeted protein degradation via the autophagy-lysosome system. Nat Comm 2022;13:1–14.

266. Dong S, Wang Q, Kao YR i sur. Chaperone-mediated autophagy sustains haematopoietic stem-cell function. Nature 2021;591:117–123.

267. Zhou QQ, Xiao HT, Yang F, Wang YD, Li P, Zheng ZG. Advancing targeted protein degradation for metabolic diseases therapy. Pharmacol Res 2023;188:106627.

268. Bauer PO, Goswami A, Wong HK i sur. Harnessing chaperone-mediated autophagy for the selective degradation of mutant huntingtin protein. Nat Biotechnol 2010;28:256–263.

269. Fan X, Jin WY, Lu J, Wang J, Wang YT. Rapid and reversible knockdown of endogenous proteins by peptide-directed lysosomal degradation. Nat Neurosci 2014;17:471–480.

270. Wang C, Zhang Y, Yang S, Chen W, Xing D. PROTACs for BRDs proteins in cancer therapy: a review. J Enzyme Inhib Med Chem 2022;37:1694

271. Shirasaki R, Matthews GM, Gandolfi S et al. Functional Genomics Identify Distinct and Overlapping Genes Mediating Resistance to Different Classes of Heterobifunctional Degraders of Oncoproteins. Cell Rep 2021;34:108532.

272. Zhang L, Riley-Gillis B, Vijay P, Shen Y. Acquired Resistance to BET-PROTACs (Proteolysis-Targeting Chimeras) Caused by Genomic Alterations in Core Components of E3 Ligase Complexes. Mol Cancer Ther 2019;18:1302–1311.

273. Ottis P, Palladino C, Thienger P i sur. Cellular Resistance Mechanisms to Targeted Protein Degradation Converge Toward Impairment of the Engaged Ubiquitin Transfer Pathway. ACS Chem Biol 2019;14:2215–2223.

274. Baek K, Schulman BA. Molecular glue concept solidifies. Nat Chem Biol 2020;16:2–3.

275. Garber K. The glue degraders. Nat Biotechnol 2024;42:546–550.

Popis skraćenica

AAA+	ATP-aze povezane s različitim staničnim aktivnostima
AbTAC	PROTAC-i temeljeni na protutijelima (engl. *antibody-based PROTAC*)
AhR	receptor aromatskih ugljikovodika (engl. *arylhydrocarbon receptor*)
AID	degroni inducirani auksinom
AML	akutna mijeloična leukemija
AMP	adenozin-monofosfat
AOX	aldehid oksidaza
AR	androgeni receptor
ASGPR	asijaloglikoproteinski receptor
ATP	adenozin-trifosfat
ATRA	*sve-trans*-retinoična kiselina (engl. *all-trans-retinoic acid*)
ATTEC	engl. *autophagosome tethering compounds*
AUTAC	kimere koje usmjeravaju autofagiju (engl. *autophagy targeting chimera*)
AUTOTAC	kimere koje usmjeravaju autofagiju (engl. *AUTOphagy Targeting Chimera*)
BCL6	protein B staničnog limfoma 6

Bcl-xL	antiapoptotički protein velikostaničnog limfoma B stanica (engl. *anti-apoptotic protein B cell lymphoma extra-large*)
BD2	druga bromodomena
BET	proteina bromodomene i ekstraterminalne domene (engl. *bromodomain and extraterminal domain*)
BRAF	B-Raf serin/treonin protein kinaza
BRD	protein koji sadrži bromodomenu (engl. *bromodomain-containing protein*)
BRET	bioluminescentni rezonantni prijenos energije
bRo5	izvan okvira pravila 5
BTK	Brutonova tirozin kinaza
cIAP	protein stanični inhibitor apoptoze
CDK	o ciklinu ovisne kinaze (engl. *cyclin-dependent kinase*)
CI-MPR	manoza-6-fosfat neovisan o kationima
CK1α	kazein kinaza 1α
CMA	šaperonom posredovana autofagija (engl. *chaperone-mediated autophagy*)
CRABP	stanični protein koji veže retinoičnu kiselinu
CRBN	Cereblon
CRL	Cullin RING ligaze
CRPC	karcinom prostate ovisan o kastraciji

CYP	citokrom P450
D_{max}	maksimalni postotak razgradnje
DAPK1	proteinska kinaza 1 povezana sa smrću
DC_{50}	koncentracija koja uzrokuje razgradnju 50 % proteina
DCAF	faktori povezani s DDB1 i Cullinom 4 (engl. *DDB1-associated and Cul4-associated factor*)
DDB1	engl. *DNA damage-binding protein 1*
DHFR	dihidrofolat reduktaza
DKK	DNA-kodirajuća knjižnica
DUB	deubikvitinirajući enzimi
E1	enzim koji aktivira Ub
E2	enzim koji konjugira Ub
E3	Ub ligaza
EGFR	receptor za epidermalni faktor rasta
EPSA	izložena ploština polarne površine (engl. *experimentally determined exposed polar surface area*)
ER	estrogeni receptor
ERK	kinaza aktivirana izvanstaničnim signalom

ERRα	receptor α povezan s estrogenim receptorima (engl. *estrogen receptor-related receptor alpha*)
ESCRT	endosomski sortirajući kompleks potreban za transport
FAK	kinaza fokalne adhezije
FBDD	dizajnom temeljenim na fragmentima (engl. *fragment-based drug discovery*)
FKBP	protein koji veže FK506 i rapamicin
FRET	fluorescentni rezonantni prijenos energije
GSPT1	faktor 1 terminacije translacije prijelaza iz G1 u S fazu
HBA	broj akceptora vodikove veze
HBD	broj donora vodikove veze
HECT	homologan C-kraju proteina povezanog s E6 (engl. *homologous to the E6-assocoiated protein carboxyl terminus*)
HeLa	humana stanična linija karcinoma grlića maternice
HER2	humani epidermalni faktor rasta 2
HIF1α	hipoksijom induciran faktor 1α
HP-β-CD	(2-hidroksipropil)-β-ciklodekstrin
HTS	visokoprotočni probir
HyTag	hidrofobna oznaka

IDO1	indolamin-2,3-dioksigenaza 1
IKZF1	ikar
IKZF3	eol
IMiD	imunomodulator
IND	engl. *investigational new drug*
IRAK4	kinaza 4 pridružena receptoru za interleukin-1
K_d	ravnotežna konstanta disocijacije
KMB	krvno-moždana barijera
KRAS	Kirsten rat sarcoma virus
LAMP2	membranski protein 2A povezan s lizosomom
LID	ligandom inducirana razgradnja
log *P*	logaritam koeficijenta razdjeljenja
LRRK2	leucinom bogata ponavljajuća kinaza 2
LYTAC	kimere koje usmjeravaju lizosomsku proteolizu (engl. *lysosome targeting chimera*)
M6P	manoza-6-fosfat
mCRPC	metastatski karcinom prostate otporan na kastraciju
MCF-7	stanična linija adenokarcinoma dojke
MDM2	*mouse dobule minute 2* homolog

MeBS	metil-bestatin
MEK	mitogenom aktivirana protein kinaza
MetAP-2	metionin aminopeptidaza-2
mHTT	mutirani huntingtin
MVT	multivezikularna tijela
PAMPA	test propusnosti na umjetnim membranama (engl. *parallel artificial membrane permeability assay*)
PARP1	poli(ADP-riboza) polimeraza 1
PD	farmakodinamički
P-gp	P-glikoprotein
PhosTAC	kimere koje usmjeravaju fosforilaciju (engl. *phosphorylation targeting chimera*)
PI3K	fosfatidilinozitol-3-kinaza
PK	farmakokinetički
POI	ciljni protein (engl. *protein of interest*)
PPI	protein-protein interakcije
PROTAC	kimere koje usmjeravaju ciljanu proteolizu (engl. *proteolysis targeting chimeras*)
PSA	prostata specifični antigen

RBM39	proteina 39 koji veže RNA motiv (engl. *RNA-binding motif protein 39*)
RBR	*RING-in between-RING*
RBX1	RING domena prsta 1 (engl. *Ring-box protein 1*)
RIBOTAC	kimere koje ciljaju ribonukleaze (engl. *ribonuclease targeting chimera*)
RING	engl. *really interesting new gene*
Ro5	Lipiniskijevo pravilo 5
Rpn1, 10 i 13	receptori za Ub (engl. *regulatory particle non-ATPase 1, 10 and 13*)
SALL4	protein 4 sličnog Sal-u
SARD	selektivni degraderi androgenih receptora
SBDD	dizajn temeljen na strukturi (engl. *structure-based drug design*)
SCF	kompleks E3 ligaze Skp1-Cullin-F-box
SERD	selektivni degraderi estrogenih receptora
SERM	selektivni modulator ER-a
SLE	sistemski eritematozni lupus
SMARCA2	katalitička podjedinica SWI/SNF (engl. SWItch/Sucrose Non-Fermentable) kompleksa
SMC1A	protein važan u održavanju strukture kromosoma 1A
SMC3	protein važan u održavanju strukture kromosoma 3

SNARE	engl. *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*
SNIPER	specifični i negenetički proteinski brisači ovisni o IAP-u (engl. *specific and nongenetic IAP-dependent protein erase*r)
STAT3	signalni transduktor i aktivator transkripcije 3
TPD	ciljana razgradnja proteina (engl. *targeted protein degradation*)
TPSA	topološka ploština polarne površine
TR-FRET	vremenski razlučiv fluorescentni rezonantni prijenos energije
TrkA	kinaza A tropomiozinskog receptora (engl. *tropomyosin receptor kinase A*)
Ub	ubikvitin
UPS	ubikvitin-proteasomski sustav
VHL	von Hippel-Lindau protein
XIAP	X-vezani IAP

7. Životopis

OSNOVNI PODACI

doc. dr. sc. Kristina Pavić, mag. pharm.

e-mail: kristina.pavic@pharma.unizg.hr

RADNO ISKUSTVO

12.12.2022. – danas

DOCENTICA, SVEUČILIŠTE U ZAGREBU FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

- Zavod za farmaceutsku kemiju
- Voditeljica obaveznog predmeta Biokemija lijekova (F)
- Suradnica na predmetima Farmaceutska kemija 1 i 2 te na Farmaceutskoj kemiji 1 i 2 na studiju farmacije Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci
- Voditeljica izbornih predmeta Medicinal Chemistry i Odabrana poglavlja iz farmaceutske kemije
- znanstveni rad: sinteza i karakterizacija potencijalnih biološki aktivnih tvari – derivata kinolina i harmina kao potencijalnih citostatika, antimikrobnih lijekova i antioksidativnih agenasa te molekula degradera tzv. PROTAC-a

1.5.2019. – 11.12.2022.

POSLIJEDOKTORANDICA, SVEUČILIŠTE U ZAGREBU FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

13.4.2016. – 30.4.2019.

ASISTENTICA, SVEUČILIŠTE U ZAGREBU FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

2.1.2015. – 18.2.2016.

ASISTENTICA NA ZAMJENI, SVEUČILIŠTE U ZAGREBU FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

9.10.2013. – 31.12.2014.

MAGISTRA FARMACIJE, ZU LJEKARNE BARIČEVIĆ, ZAGREB

- pripravnički staž magistra farmacije

1.10.2012. – 1.10.2013.

ASISTENTICA NA ZAMJENI, SVEUČILIŠTE U ZAGREBU FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

OBRAZOVANJE

28.2.2013. – 6.10.2017.

Doktorica znanosti, Poslijediplomski doktorski studij Farmaceutsko-biokemijske znanosti, Sveučilište u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijski fakultet

1.10.2007. – 14.6.2012.

Magistra farmacije, Sveučilište u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijski fakultet

2003. – 2007.

III. gimnazija, Osijek

ZNANSTVENO-ISTRAŽIVAČKI PROJEKTI

Suradnica na projektima:

2024. – 2025. Svjetlošću pogonjena funkcionalizacija nereaktivnih pozicija korištenjem oksidacijske aminacije

2023. – 2024. The role of transthyretin in sporadic Alzheimer's diseaseassociated leptomeningeal and cerebrovascular amyloidosis and neuroprotective potential of a brain directed tafamidis prodrug, PFIZER INC. Program Junior Investigator Global Attr Amyloidosis Research Aspire (73521469)

2018. – 2023. Derivati harmina kao potencijalni antimalarici, HRZZ (UIP-2017-05-5160)

2015. – 2019. Dizajniranje, sinteza i evaluacija derivata primakina, vorinostata i sorafeniba kao potencijalnih citostatika, HRZZ (IP-09-2014-1501)

2018. – 2019. Testing a new prodrug nanoparticle formulation of niclosamide as a novel therapy for osteosarcoma, Consortium for canine comparative oncology (Duke Cancer Institute I Nc State University College)

MENTORSTVO

- Mentorica 8 diplomskih radova i 1 rada nagrađenog Rektorovom nagradom
- Komentorica 2 rada nagrađena Rektorovom nagradom

ČLANSTVA

2013.– danas Hrvatsko farmaceutsko društvo (predsjednica Sekcije farmaceuta juniora od 2019.)

2014. – danas Hrvatska ljekarnička komora

2016. – danas Hrvatsko kemijsko društvo

LICENCE

2014. – danas Odobrenje za samostalan rad Hrvatske ljekarničke komore

NAGRADE I PRIZNANJA

2023. Nagrada Hrvatskog farmaceutskog društva

2019. Nagrada za najboljeg mladog znanstvenika za 2018. g. – Sveučilište u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijski fakultet

2018. Stipendija Hrvatskog kemijskog društva za poslijedoktorande za sudjelovanje na XXV EFMC International Symposium on Medicinal Chemistry (EFMC-ISMC 2018)

2015. i 2017. Akademska mobilnost Sveučilišta u Zagrebu za doktorande

2015. Stipendija Austrijskog farmaceutskog društva za 24th Scientific Congress of the Austrian Pharmaceutical Society, Beč, Austria

2015. Stipendija Sveučilišta u Zagrebu za doktorske studente

2014. Stipendija Osječko-baranjske županije za doktorske studente

2010. Pohvala Dekanice za izvrstan uspjeh tijekom studija

2007.–2012. Stipendije Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta RH i Grada Osijeka za izvrsne studente

2007. Nagrada Rotary Club Osijek za najboljeg maturanta III. gimnazije, Osijek

ORGANIZACIJA ZNANSTVENIH I STRUČNIH SKUPOVA

16.–19.5.2024. 7. hrvatski kongres farmacije s međunarodnim sudjelovanjem, Dubrovnik

Članica Znanstveno-stručnog odbora

22.10.2022. 10. Simpozij studenata farmacije i medicinske biokemije FARMEBS 2022 (predsjednica Programskog odbora i urednica Knjige sažetaka)

23.–25.9.2021. PHARMACRO 2021 (članica Organizacijskog odbora)

2015. – 2021. 4.–9. Simpozij studenata farmacije i medicinske biokemije FARMEBS (članica Organizacijskog ili Programskog odbora i tehnička urednica Knjige sažetaka (2017. – 2021.))

BORAVAK NA STRANIM INSTITUCIJAMA

1.10.2018. – 30.9.2019. POSLIJEDOKTORSKO USAVRŠAVANJE, DUKE UNIVERSITY SCHOOL OF MEDICINE

- Department of Medicine, Division of Oncology, Durham, Sjeverna Karolina, SAD
- PK/PD Core Laboratory
- Mentor: izv. prof. dr. sc. Ivan Spasojević

PUBLIKACIJE

- 17 znanstvenih radova objavljenih u časopisima koji su zastupljeni u bazi podataka Web of Science Core Collection
- 6 stručnih radova
- 1 znanstveno-popularizacijski članak
- 50 posterskih i 7 usmenih priopćenja, od toga 30 na međunarodnim skupovima
- 2 pozvana predavanja
- 5 osvrta

POPULARIZACIJA ZNANOSTI

2017, 2023 Festival znanosti

2016, 2017 Dani otvorenih vrata FBF-a