



PROTAC (PROteolysis TARgeting Chimera)

La tecnologia PROTAC, capostipite della degradazione mirata di proteine bersaglio, rappresenta una nuova modalità per la modulazione di bersagli molecolari responsabili di stati patologici. Caratterizzata da un nuovo MoA, potrebbe essere complementare o sostitutiva degli approcci classici, con la speranza di ampliare l'orizzonte, andando oltre le limitazioni delle tecnologie attuali.

Tra le tecnologie farmacologiche emerse negli ultimi anni, la degradazione mirata di proteine (Targeted Protein Degradation, TPD) si è affermata come una delle più interessanti, con la promessa di raggiungere bersagli molecolari finora ritenuti difficili da colpire usando approcci convenzionali (*undrug-gable*). A dare una spinta decisiva alla TPD è stata una tecnologia denominata PROTAC (PROteolysis TARgeting Chimera), capace di indurre la degradazione della proteina bersaglio “dirottando” la macchina cellulare responsabile dell’eliminazione fisiologica delle proteine endogene. Il concetto generale su cui si basa questo approccio viene definito Prossimità Chimicamente Indotta (Chemical Induced Proximity, CIP [1]) in cui un induttore di prossimità recluta contemporaneamente la proteina bersaglio e una proteina endogena (effettore) di cui si vuole sfrutta-

re l’azione biologica attraverso la formazione di un complesso ternario (bersaglio-induttore-effettore). Questo complesso consente alla proteina “dirottata” di esercitare la sua funzione sul bersaglio (Fig. 1). Nel caso dei PROTAC, la proteina “dirottata” è un membro del macchinario cellulare adibito alla degradazione delle proteine, conosciuto come sistema ubiquitina-proteosoma (Ubiquitin Proteasome System, UPS) (Fig. 2).

L’UPS esercita il suo ruolo con la mediazione di diverse proteine e sfruttando le proprietà di una piccola proteina al centro del sistema: l’ubiquitina (Ub). Il meccanismo di ubiquitinazione, che rappresenta una delle più comuni modifiche post traslazionali cellulari, parte dall’attivazione di Ub da parte delle **E1** (ubiquitin activating enzymes), per poi essere successivamente trasferita ad un’altra

famiglia di proteine, le **E2** (ubiquitin conjugating enzymes). Le E2 cariche di Ub attivata vengono a loro volta reclutate dalle **E3** (E3 ligases), che hanno il compito di ingaggiare anche la proteina substrato, portandole in vicinanza l’una dell’altra. A questo punto l’E2 trasferisce l’Ub sul substrato tramite

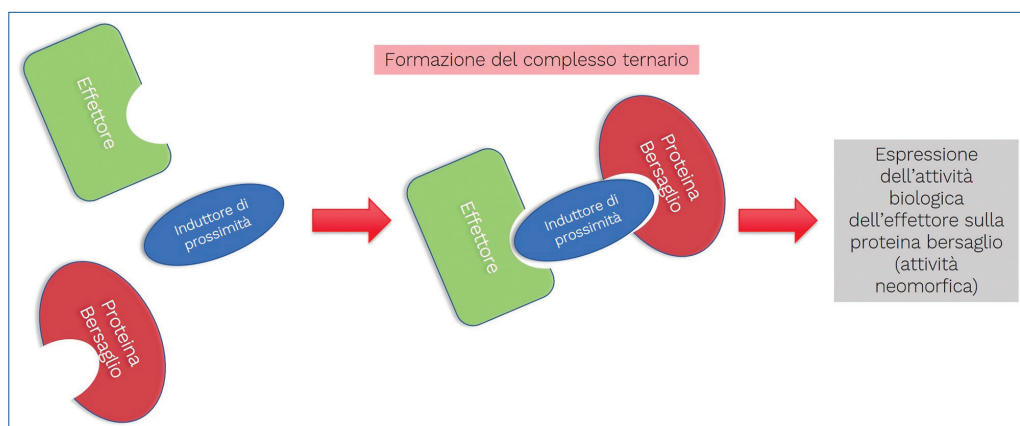


Fig. 1 - Complesso ternario generato nella prossimità chimicamente indotta (CIP)

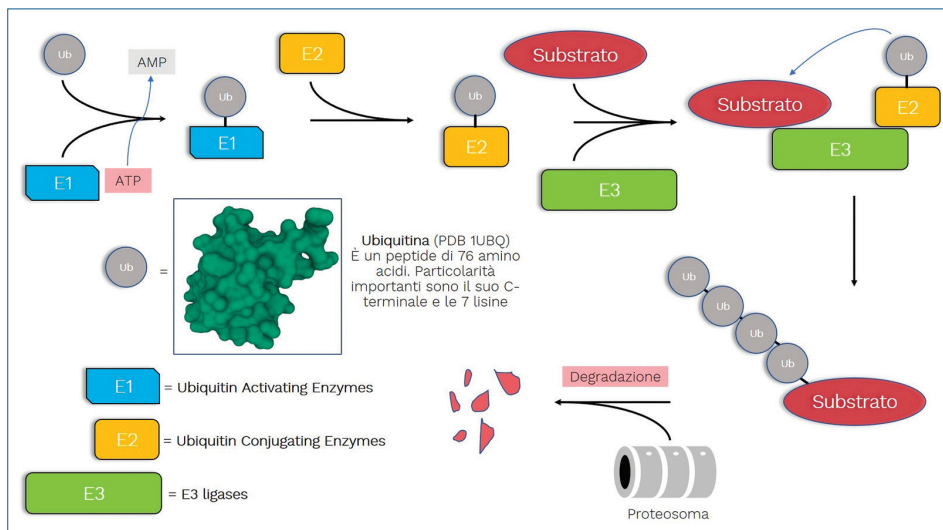


Fig. 2 - Meccanismo schematizzato di funzionamento dell'UPS

la formazione di un legame covalente con il gruppo amminico della catena laterale di una delle lisine superficiali del substrato stesso. In base alle proteine dell'UPS coinvolte, è possibile il trasferimento di una singola Ub o di piccole catene, lineari o ramificate di ubiquitina; ognuna di queste "etichette"

permette alla cellula di riconoscere la proteina così modificata e indirizzarla verso l'appropriato sistema cellulare. Per quanto riguarda il processo di degradazione, è universalmente accettato che la presenza di almeno quattro unità di Ub in sequenza lineare rappresentino il "tag" che porta alla degradazione tramite il proteosoma [2].

I PROTAC, che sfruttano l'UPS, sono molecole "bifunzionali" costituite da 3 parti: un ligando di una E3 ligasi, un

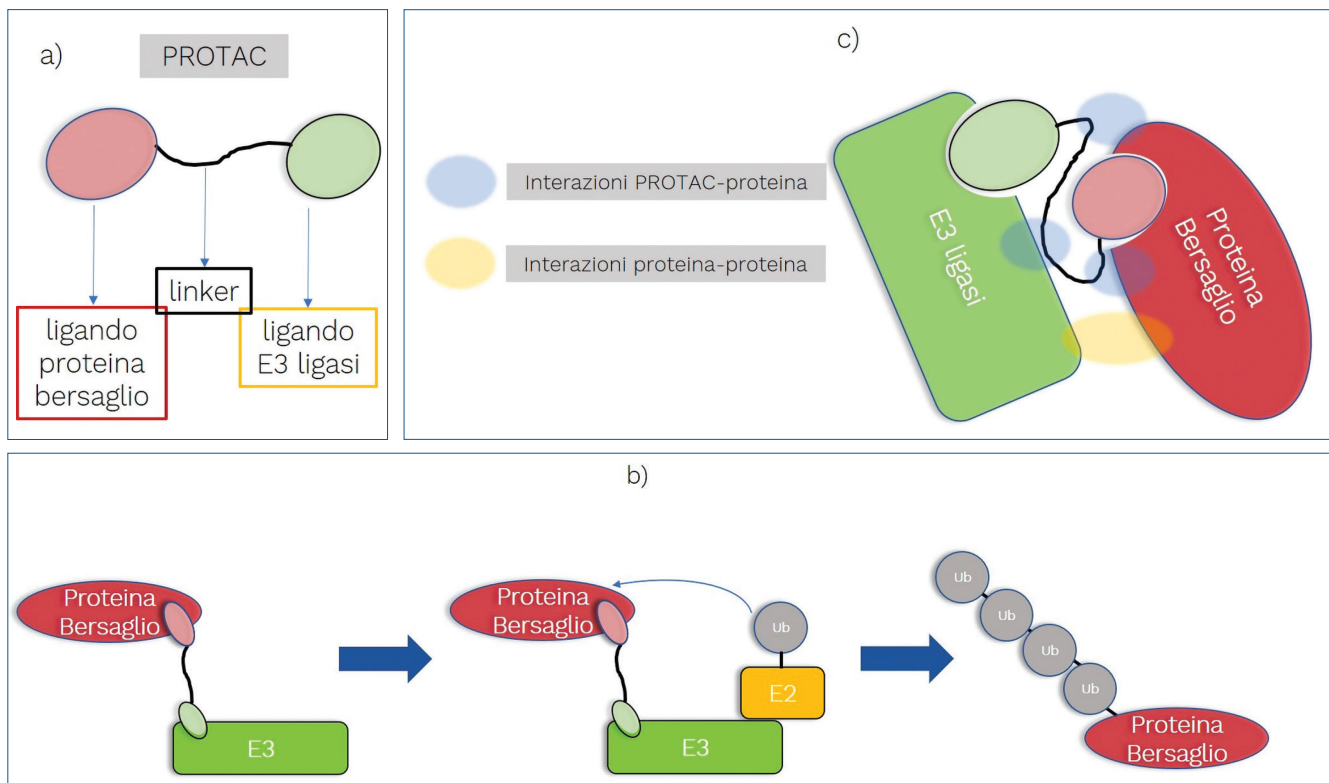


Fig. 3 - a) Struttura schematica di un PROTAC; b) prossimità indotta da un PROTAC; c) complesso ternario substrato-PROTAC-E3

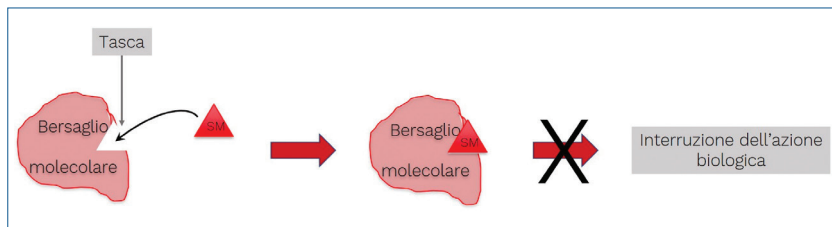


Fig. 4 - Schematizzazione del concetto di inibizione di un bersaglio molecolare

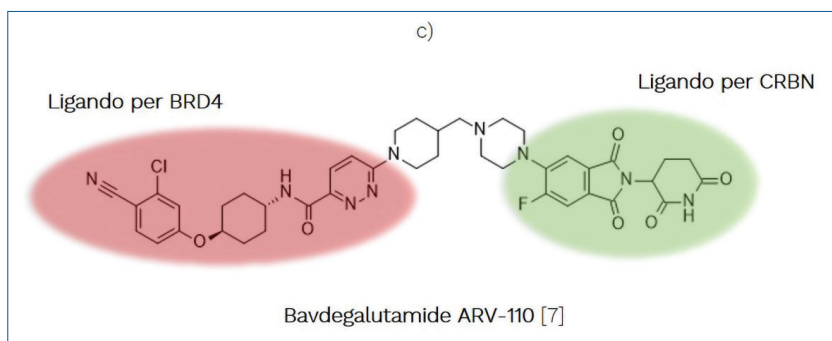
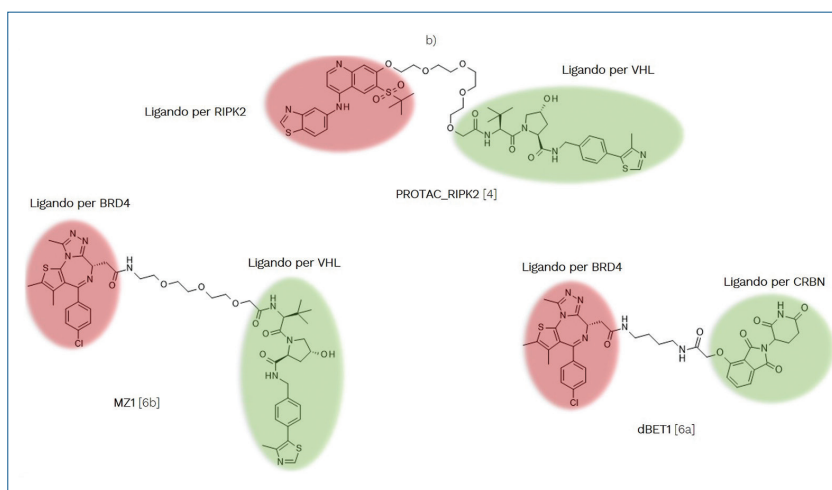
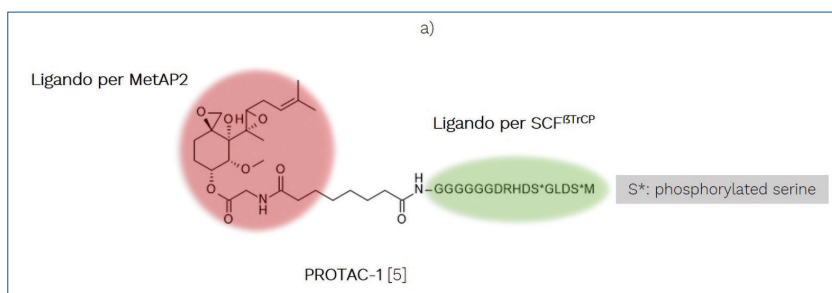


Fig. 5 - Evoluzione dei PROTAC: a) PROTAC-1, primo PROTAC pubblicato con ligando fosfopeptidico per la E3 ligasi SCF^{TRCP}; b) PROTAC_RIPK2, MZ1 e dBET1, PROTAC con ligandi più attraenti da un punto di vista farmacologico per le E3 ligasi; c) Bavdegalutamide (ARV-110), PROTAC somministrabile per via orale (attualmente in studio clinico di fase II per tumore prostatico metastatizzato resistente alla castrazione) [8]

Essendo il complesso ternario di natura transiente, una volta prodotto il trasferimento di ubiquitina, il PROTAC si distacca e forma un diverso complesso ternario con altre molecole bersaglio ed E3 ligasi; la reiterazione del processo lo rende catalitico [4], una caratteristica chiave della tecnologia. Nel caso del ligando della proteina bersaglio è importante sottolineare che esso non deve possedere necessariamente un'attività biologica intrinseca, ma deve semplicemente *legarsi* ad essa. Questa peculiarità, compatibile con il meccanismo d'azione (MoA) di un PROTAC, è in opposizione al concetto classico di interazione di una piccola molecola (small molecule, SM) con il suo bersaglio molecolare, nel quale il legame SM-bersaglio deve avere una conseguenza biologica diretta, come ad esempio l'inibizione (Fig. 4).

Il risultato dell'inibizione dipende dal legame SM-bersaglio (generalmente più è forte tale legame, più forte risulta l'inibizione). Per un PROTAC, invece, il risultato finale è frutto di una cascata di eventi:

- 1) legame con bersaglio ed E3 ligasi;
- 2) formazione del complesso ternario;
- 3) trasferimento dell'Ub;
- 4) degradazione tramite il proteosoma.

Il legame dei due ligandi con le loro rispettive proteine è solo il primo passo e spesso non il più importante. Infatti, facilità di formazione e stabilità del complesso ternario hanno un forte peso sull'esito finale del processo, così come la capacità e la velocità di trasferimento dell'Ub sulla proteina bersaglio. Di conseguenza, può non essere necessario avere ligandi particolarmente affini se il complesso ternario che si forma è sufficientemente stabile da permettere all'evento successivo (trasferimento dell'Ub) di av-

venire con una velocità adeguata. La conseguenza di questa caratteristica è quella di poter usare anche ligandi a bassa affinità. Inoltre, la qualità del complesso ternario (ma anche l'efficienza del trasferimento dell'Ub) dipende dalla natura del PROTAC, cioè dal sito di legame dei ligandi e da natura (flessibilità, per esempio) e lunghezza del linker. La formazione del complesso, infatti, dipende dalle possibili (nuove) interazioni che si vengono a creare tra il PROTAC e le due proteine, e, in misura ancora più importante, tra le proteine stesse, incidendo sulla qualità del complesso (Fig. 3c).

La tecnologia fu pubblicata per la prima volta nel 2001 [5] e utilizzava dei ligandi fosfopeptidici per la E3 ligasi scelta (SCF^{F^{TRCP}}) (Fig. 5a); nonostante il funzionamento fosse stato dimostrato, l'utilizzo farmacologico di tali molecole restava limitato a causa delle loro caratteristiche. L'interesse, specialmente dell'industria farmaceutica, è esploso a partire dal 2015, quando sono stati scoperti e resi noti PROTAC che usavano ligandi per le E3 ligasi con caratteristiche più compatibili con l'utilizzo farmacologico [6] (Fig. 5b) fino ad arrivare, in tempi più recenti, a PROTAC in grado di essere somministrati per via orale (Fig. 5c) [7].

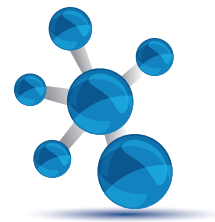
Al momento il numero di E3 ligasi usato per i PROTAC è sostanzialmente limitato a quattro proteine: **CRBN** (celebrin), **VHL** (Von Hippel Lindau), **MDM2** (Mouse Double Minute 2) e **IAP** (Inhibitor Of Apoptosis Protein); le prime due (CRBN e VHL) sono di gran lunga le più usate [9]. Tuttavia, visto che la qualità (stabilità ed efficacia) del complesso ternario dipende da diversi fattori, riconducibili alle superfici di contatto tra le due proteine e tra esse e il PROTAC, si può immaginare che cambiando la E3 ligasi potrebbe cambiare anche il possibile complesso ternario, incidendo profondamente sui risultati. Da qui la necessità di espandere il parco di E3 ligasi disponibili per la tecnologia PROTAC [10].

Dagli inizi dello sviluppo di questa tecnologia, o meglio dalla sua "riscoperta", avvenuta nel 2015, il numero di pubblicazioni e brevetti è cresciuto esponenzialmente. Attualmente ci sono 15 PROTAC in fase clinica di studio su varie patologie (cancro, malattie autoimmuni). Ma quali sono le caratteristiche della tecnologia che la rendono attraente, anche rispetto a quelle "convenzionali"?

Partiamo da quest'ultime, considerando il caso dell'inibizione (Fig. 4). Qui il legame di un farmaco con il corrispondente bersaglio molecolare è studiato per dare origine ad un effetto biologico desiderato. Tuttavia, il numero di proteine sensibili all'inibizione risulta essere una minoranza, mentre la maggior parte sono molto più difficili da trattare e storicamente vengono considerate *undruggable*. Inoltre, molto spesso è necessario che gli inibitori (SM), per produrre un effetto biologico, debbano legarsi ad un'alta percentuale di molecole di proteina bersaglio in cellula e per un tempo prolungato, creando la necessità di alti dosaggi e possibili effetti tossici del farmaco.

L'impiego dei PROTAC (e della TPD) invece comporta una serie di possibili vantaggi:

- a) la proteina viene totalmente eliminata, azzerandone qualsiasi attività (enzimatica e ogni altra sua funzione) per un tempo più lungo rispetto all'inibizione (in base alla velocità di sintesi della proteina bersaglio) [11];
- b) il ligando della proteina bersaglio può semplicemente legare la proteina, aggirando la necessità di esercitare un'attività biologica diretta e includendo i bersagli immaginabili a quelle proteine prive, per esempio, di attività enzimatica;
- c) il meccanismo d'azione catalitico permette ad una molecola di PROTAC di indurre la degradazione di più molecole di proteina bersaglio, richiedendo una quantità di farmaco inferiore, quindi riducendo teoricamente gli effetti collaterali;
- d) potendo usare ligandi con affinità minori, i PROTAC possono superare alcuni limiti degli inibitori, per esempio nell'insorgere di resistenze. Per un inibitore che lega fortemente il bersaglio è possibile l'insorgenza di resistenze dovute a mutazioni che diminuiscono la forza del legame, facendo ridurre o perdere la sua attività biologica; nel caso dei PROTAC, nonostante tale perdita di forza di legame, se il complesso ternario si forma adeguatamente il risultato (degradazione) può non cambiare [10];
- e) i PROTAC generalmente presentano una selettività maggiore rispetto all'inibizione. Anche usando come ligando della proteina bersaglio una molecola *promiscua* (che interagisce con diverse proteine, esprimendo potenza simile o paragonabile), i relativi PROTAC si dimostrano più selettivi dei loro progenitori [12]. Questa apparente eccentricità è lega-



ta al diverso meccanismo coinvolto nell'inibizione rispetto alla degradazione: la prima è governata da un "singolo evento" (legame diretto SM-bersaglio), mentre la seconda dipende da eventi consecutivi, dove il legame con il bersaglio è "solo" il primo step. Più nello specifico, la qualità dei complessi ternari formati da due proteine diverse può essere tanto differente da non portare ad una degradazione efficiente per una di esse, nonostante il PROTAC di fatto sia in grado di legarle entrambe.

Tuttavia, come per tutte le tecnologie, anche per i PROTAC è lecito porsi dei dubbi e chiedersi quali saranno i limiti che verosimilmente emergeranno durante il loro impiego nel corso del tempo. Ad esempio: a) essendo molecole complesse, presentano spesso caratteristiche che non li fanno rientrare nello spazio chimico farmaceutico convenzionale (secondo le regole di Lipinski), complicandone lo sviluppo. Tuttavia, composti di questo genere, chiamati bRo5 (beyond Rule of 5), sono stati approvati nel corso del tempo e la presenza di PROTAC in fase clinica, anche somministrabili oralmente, conferma che nonostante le difficoltà, è possibile superare questa limitazione. È importante sottolineare che, a causa dello sviluppo più difficoltoso, è necessaria una motivazione sufficiente per preferire la degradazione rispetto a, per esempio, l'inibizione di un bersaglio;

b) anche per questi composti sono stati trovati dei meccanismi di resistenza *in vitro*, che attendono conferme cliniche [13];

c) un timore iniziale sui PROTAC (e sulla TPD in generale) riguardava i possibili effetti collaterali di una degradazione *in vivo* che si sospettava potesse essere molto più pericolosa rispetto ad una convenzionale inibizione. Al momento, tuttavia, questa preoccupazione non sembra essere supportata dai dati clinici, dove i composti risultano avere una tollerabilità che rientra nella media;

d) il numero di E3 ligasi sfruttate è al momento limitato, circoscrivendo lo scopo della tecnologia, ma offrendo anche la possibilità di espandere tale numero, aggiungendo diversità e potenziale [9].

In conclusione, la tecnologia PROTAC, capostipite della degradazione mirata di proteine, rappresenta una nuova modalità per la modulazione di bersagli molecolari responsabili di stati patologici. Caratte-

rizzata da un nuovo meccanismo d'azione, questa tecnologia potrebbe essere complementare o sostitutiva degli approcci classici, presentando dei profili di applicazione diversi e ampliando l'orizzonte dei possibili bersagli biologici.

BIBLIOGRAFIA

- [1] D.G. Mirizzi, *La Chimica e L'Industria*, 2022, **5**, 48.
- [2] L. Deng *et al.*, *Signal Transduct. Target Therapy*, 2020, **5**, 11.
- [3] <https://www.arvinas.com/> e, in particolare <https://youtu.be/37SewuExJns> per l'illustrazione del funzionamento PROTAC.
- [4] D.P. Bondeson *et al.*, *Nat. Chem. Biol.*, 2015, **11**, 611.
- [5] K.M. Sakamoto *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci.*, 2001, **98**, 8554.
- [6] a) G.E. Winter *et al.*, *Sci.-express*, 2015, **348**, 1376; b) M. Zengerle *et al.*, *ACS Chem. Biol.*, 2015, **10**, 1770; c) [4]
- [7] X. Han *et al.*, *Cell Rep. Phys. Sci.*, 2022, **3**, 101062.
- [8] <https://ir.arvinas.com/news-releases/news-release-details/arvinas-protacr-protein-degrader-bavdegalutamide-arv-110>
- [9] H. Kim *et al.*, *Biomedicines*, 2022, **10**, 2100.
- [10] T. Ishida *et al.*, *SLAS Discov.*, 2021, **26**, 484.
- [11] G.M. Burslem *et al.*, *Cell Chem. Biol.*, 2018, **25**, 67.
- [12] a) H-T. Huang *et al.*, *Cell Chem. Biol.*, 2018, **25**, 88; b) D.P. Bondeson *et al.*, *Cell Chem. Biol.*, 2018, **25**, 78.
- [13] a) L. Zhang *et al.*, *Mol. Cancer Rep.*, 2019, **18**, 1302; b) R. Shirasaki *et al.*, *Cell Rep.*, 2021, **34**, 108532.

PROTAC

PROTAC technology represents the spearhead of Targeted Protein Degradation, a new paradigm that in the past recent years has become increasingly used in pharmacology. Characterized by a profoundly different mechanism of action compared to classic approaches, it can be useful in tackling elusive molecular targets and hopefully help dealing with difficult-to-treat diseases.