

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica

LARISSA LIMA DE ALMEIDA

**Aplicação da tecnologia de “Proteolysis Targeting
Chimeras (PROTACs)” para terapias oncológicas**

São Paulo

2022

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica

LARISSA LIMA DE ALMEIDA

**Aplicação da tecnologia de “Proteolysis Targeting
Chimeras (PROTACs)” para terapias oncológicas**

Trabalho de Conclusão do Curso de
Farmácia-Bioquímica da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo.

Orientador:

Prof. Dr. Roberto Parise Filho

São Paulo

2022

RESUMO

O câncer é uma doença que apresenta grandes dificuldades em seu tratamento farmacológico, isso pois nem todas as células possuem sensibilidade aos quimioterápicos utilizados e cria-se uma rápida resistência aos fármacos atuais, tornando a terapia ineficiente no controle da progressão do câncer. Assim, a tecnologia das PROTACs tem se demonstrado uma alternativa para terapias oncológicas, isso pois, essas moléculas possuem a capacidade de ligar uma proteína alvo a uma E3 ligase e ubiquitinar essa proteína por meio do sistema ubiquitina proteossoma, o que induz a degradação dessa proteína alvo. O seguinte trabalho tem como objetivo o levantamento bibliográfico do uso de PROTACs para terapias oncológicas, demonstrando seu modo de ação, histórico, vantagens quando comparado a moléculas tradicionais e principais desafios enfrentados por essa estratégia. Foi realizada pesquisa em bases de dados como Pubmed, Google Scholar e Web of Science, sendo considerados artigos dos últimos vinte anos. A estratégia das PROTACs tem demonstrado grande potencial para a aplicação em terapias oncológicas, isso pois possibilitam a degradação completa de proteínas que podem promover o crescimento tumoral, além de apresentarem alta seletividade para a proteína alvo, baixa suscetibilidade a mecanismos de resistência e doses terapêuticas baixas, proporcionando menores efeitos adversos a terapia. Até o momento duas moléculas estão em estudos clínicos para tratamento de câncer de mama e próstata, contudo alguns obstáculos podem ser enfrentados na utilização de PROTACs como a limitação de enzimas E3 ligase que podem ser utilizadas por moléculas PROTACs, compreensão da relação estrutura atividade dessas moléculas e possíveis efeitos que a degradação completa de proteínas pode acarretar ao organismo.

PALAVRAS-CHAVE: PROTACs, terapias oncológicas, sistema ubiquitina proteossoma, câncer, proteólise e terapias alvo direcionadas.

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|----------------|--|
| AR | Receptor Andr3geno |
| BET | Proteínas com bromodomínio e domínio extraterminal |
| CRABP II | Proteína de ligação ao ácido retin3ico celular II |
| CRBN | Proteína Cereblon |
| ERR- α | Receptor alfa relacionado ao estrogênio |
| ER | Receptor de estrogênio |
| HECT | Homologous to E6-AP C terminus |
| HER | Receptor do fator de crescimento epidérmico humano |
| HIF1- α | Fator induzido pela hip3xia |
| IAP | Proteína inibidora de apoptose |
| IMiD | Drogas Imunomoduladoras |
| MDM2 | Proteína Murino duplo minuto 2 |
| PEG | Polietilenoglicol |
| POI | Proteína de interesse |
| PROTAC | Proteolysis Targeting Chimeras |
| RBR | RING in between RING |
| RING | Really Interesting Gene |
| Ub | Ubiquitina |
| UPS | Sistema Ubiquitina Proteossoma |
| VHL | Proteína supressora tumoral Von Hippel-Lindau |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO: | 1 |
| 2. OBJETIVOS: | 4 |
| 4. SISTEMA UBIQUITINA PROTEOSSOMA: | 5 |
| 5. PROTACs: | 7 |
| 5.1.1. Peptídeo-PROTACs: | 10 |
| 5.1.2. VHL-PROTACs: | 11 |
| 5.1.3. MDM2-PROTACs: | 12 |
| 5.1.4. IAP-PROTACs: | 13 |
| 5.1.5. CRBN-PROTACs: | 14 |
| 5.2. Estrutura Cristalina das PROTACs: | 16 |
| 6. PROTACS EM DESENVOLVIMENTO CLÍNICO: | 17 |
| 6.1. ARV-110: | 18 |
| 6.2. ARV-471: | 19 |
| 7. DESAFIOS DAS PROTACS: | 21 |
| 8. MOLÉCULAS DEGRADADORAS ALVO DIRECIONADAS ALTERNATIVAS: PERSPECTIVAS | 22 |
| 9. CONCLUSÃO | 24 |
| 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS: | 25 |
| 11. ANEXOS: | 28 |

1. INTRODUÇÃO:

O câncer se tornou ao longo dos anos uma das principais causas de morte ao redor do mundo e, segundo a Organização Mundial da Saúde, encontra-se entre as três principais causas de morte antes dos 70 anos em cerca de 63% dos países do mundo, o que tem se tornado uma barreira para o aumento da expectativa de vida desses países (SUNG et al., 2021) .

Estima-se que cerca de 19,3 milhões de novos casos de cânceres foram diagnosticados no ano de 2020 em todo o mundo e, além disso, foram relatados aproximadamente 10 milhões de óbitos. A relação de incidência e mortes por câncer são diferentes em cada região do planeta, pois há diferenças genéticas, de densidade demográfica e de acesso ao tratamento (SUNG et al., 2021). Quando se trata do câncer, a busca por uma terapia medicamentosa que seja eficiente e contenha a progressão da doença é a maior dificuldade encontrada.

O câncer é uma patologia que possui diversas etapas, as quais possuem alterações genômicas e epigenômicas, que levam a proliferação desordenada de células anormais. Logo, um desequilíbrio na produção de proteínas torna-se uma vulnerabilidade de alguns cânceres, sendo alvo de terapias oncológicas (SUN; RAO, 2020).

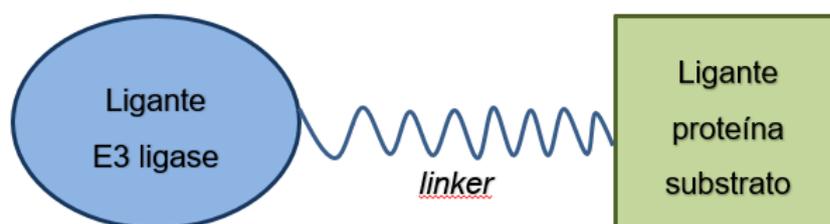
Em geral, grande parte das estratégias de terapia contra o câncer possui como modo de ação um mecanismo denominado *occupancy-driven*, o qual realiza a inibição reversível de proteínas de interesse. Essa estratégia possui boa eficiência em sítios ativos bem definidos, como receptores acoplados à proteína G, canais iônicos e quinases. Contudo, por se tratar de uma inibição geralmente reversível, é necessária uma manutenção constante da dose do medicamento, o que contribui para a ocorrência de efeitos adversos do fármaco. Além disso, é comum o desenvolvimento de mecanismos de resistência no organismo durante terapias oncológicas, o que ocasiona a inatividade do fármaco no alvo desejado (CROMM; CREWS, 2017).

Ademais, atualmente, apenas cerca de 20% dos alvos proteicos do organismo humano conhecidos podem ser alcançados por fármacos convencionais, como quinases, receptores acoplados à proteína G, hormônios, entre outros. As proteínas não enzimáticas ou que possuem funções catalíticas independentes são consideradas *undruggable targetings* (GAO; SUN; RAO, 2020).

A pesquisa por novas estratégias farmacológicas para oncologia tem recebido a atenção da academia, indústrias farmacêuticas e biotecnológicas. Assim, nos últimos 20 anos tem se estudado o desenvolvimento de fármacos com maior espectro de ação, não se limitando apenas a inibição reversível de alvos enzimáticos, mas alcançando também alvos não enzimáticos que, até então, eram considerados *undruggable targetings*. Dentre essas metodologias têm se desenvolvido pequenas moléculas voltadas para degradação de proteínas, denominadas *Proteolysis Targeting Chimeras* (PROTACs) (ARORA et al., 2021).

As PROTACs são pequenas moléculas heterobifuncionais que possuem como modo de ação a ativação do sistema ubiquitina proteossoma e, assim, realizam a degradação de proteínas alvo. Esse fenômeno acontece em função da a estrutura dessas moléculas, que é constituída por alguns elementos, a saber: i) dois elementos que compõem os pontos de ligação, sendo que um deles promove a interação com a proteína a ser clivada de interesse e outro, que se liga à enzima E3 do sistema ubiquitina ligase; ii) um elemento denominado *linker*, que serve como ponte entre aqueles dois pontos de ligação (ligantes) (Figura 1). Assim, essas moléculas quiméricas são capazes de induzir a ativação desse sistema ubiquitina proteossoma e direcioná-lo para proteínas alvo, o que induz a ubiquitinação da proteína e, conseqüentemente, sua proteólise por meio do proteossoma (GAO; SUN; RAO, 2020).

Figura 1: Estrutura PROTAC



Fonte: Elaboração própria

O uso de PROTACs como estratégia antitumoral torna a degradação de proteínas alvo mais eficiente quando comparada a estratégias tradicionais de pequenas moléculas inibidoras. Esse resultado se dá em razão dessas moléculas terem um efeito direto na inibição do tumor e, além disso, os PROTACs são continuamente reciclados durante o processo, bem como proporcionam uma inibição

constante das vias de sinalização, sendo mais eficiente que a regulação positiva compensatória de moléculas inibidoras (ZOU; MA; WANG, 2019).

Logo, a ideia das PROTACs é a de um tratamento anticancerígeno, contra diversos tipos de câncer, buscando terapias com efeitos adversos mais toleráveis, já que uma das características que tornam as atuais quimioterapias oncogênicas reconhecidas são seus graves efeitos adversos, debilitando o paciente e tornando o processo patológico ainda mais difícil (ARORA et al., 2021).

Dessa forma, este trabalho abordará a tecnologia das PROTACs e suas tendências como uma nova terapia oncológica, levando em consideração seu modo de ação, histórico, vantagens e desafios dessa estratégia.

2. OBJETIVOS:

Esse trabalho possui como objetivo a realização de uma revisão bibliográfica sobre a utilização de PROTACs (*Proteolysis Targeting Chimeras*) como uma nova estratégia farmacológica para terapias oncológicas. Ademais, busca-se analisar a possibilidade do uso dessas moléculas em diferentes tipos de cânceres, visando a uma terapia com maior eficiência e menos efeitos adversos aos pacientes.

3. MATERIAIS E MÉTODOS:

Por se tratar de uma revisão bibliográfica, foram utilizadas bases eletrônicas de dados, como: Pubmed, Google Scholar e Web of Science. A pesquisa foi realizada, utilizando palavras-chave como PROTACs, terapias oncológicas, sistema ubiquitina proteossoma, câncer, proteólise e terapias alvo direcionadas, nas línguas inglesa e portuguesa.

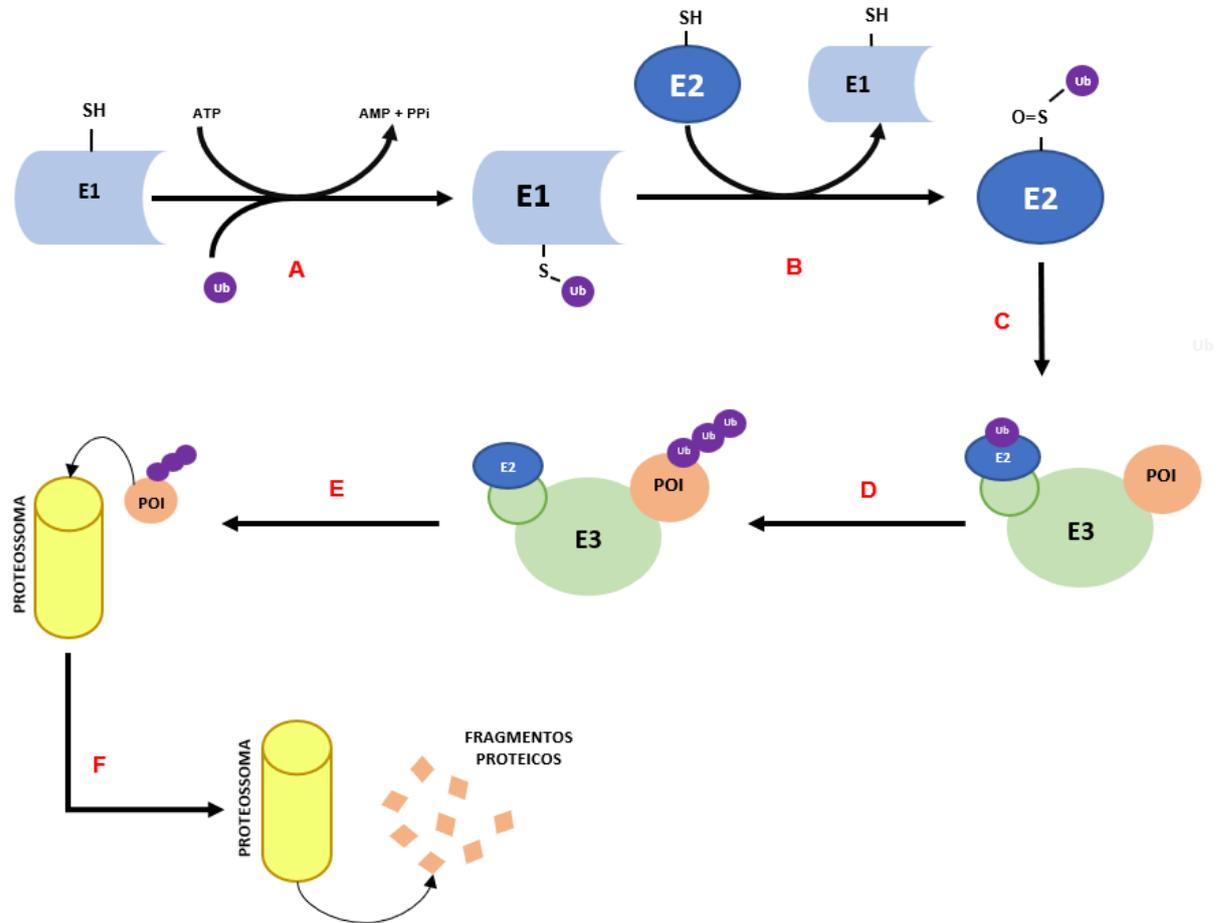
Serão considerados para este levantamento, o estudo de artigos dos últimos 20 anos que contenham material sobre PROTACs e seu desenvolvimento. Por fim, serão excluídos artigos duplicados e que não possuam relação com o tema proposto.

4. SISTEMA UBIQUITINA PROTEOSSOMA:

O sistema ubiquitina proteossoma (UPS) é um mecanismo do organismo para degradação de proteínas potencialmente patológicas, por meio do reconhecimento pelo proteossoma 26s. O UPS possui um mecanismo de ação intracelular que promove a proteólise através de cadeias de ubiquitina, um sinalizador celular que marca as proteínas-substrato para a degradação pelo proteossoma (JEVTIĆ; HAAKONSEN; RAPÉ, 2021).

A fixação da ubiquitina na proteína alvo é realizada por meio da ação em cascata de três classes enzimáticas, as enzimas ativadoras de ubiquitina (E1), enzimas conjugadoras de ubiquitina (E2) e enzimas ubiquitina-proteína ligases (E3). A primeira etapa do mecanismo ocorre por meio de uma reação ATP-dependente, onde a ubiquitina forma um tio éster em sua estrutura que interage com um resíduo de cisteína presente na enzima E1 (Figura 2A). Na segunda etapa, a ubiquitina, já ativada, é transferida da enzima E1 para a enzima E2, por meio da formação de uma ligação tiol entre um resíduo de cisteína da enzima E2 e a ubiquitina (Figura 2B), formando um intermediário denominado E2-Ub. Na terceira etapa, a enzima E3 ligase irá se ligar, simultaneamente, ao complexo E2-Ub e à proteína alvo (POI) (Figura 2C), mediando a transferência de ubiquitina para a proteína alvo (Figura 2D). Após a transferência da ubiquitina a proteína alvo se desprende do complexo com a enzima E3 e entra no proteossoma (Figura 2E), onde ocorrerá o desenrolamento da proteína expondo-a a ação das proteases, o que levará a sua degradação, por fim são liberados do proteossoma os fragmentos proteicos (Figura 2F). Dessa forma, a enzima E3 ligase tem um papel crucial dentro desse mecanismo, pois possui a função de aproximar os dois protagonistas da reação, guiando a forma como a transferência de ubiquitina irá ocorrer para a proteína-alvo (CROMM; CREWS, 2017).

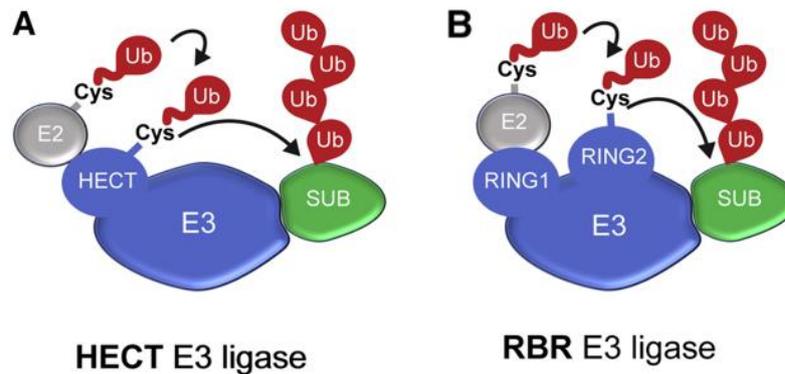
Figura 2: Mecanismo de ação do sistema ubiquitina proteossoma



Fonte: Elaboração Própria

As enzimas E3 ligases podem ser divididas em três tipos distintos, considerando diferenças em seus domínios que desempenham função E3 ubiquitina ligase, os quais são HECT E3 ligase (*homologous to E6-AP C terminus*), RBR E3 ligase (*RING in between RING*) e RING E3 ligase (*really interesting new gene*). A transferência de ubiquitina (Ub) mediada por E3 ligases que possuem o domínio HECT ou RBR é realizada em duas etapas, onde há, primeiramente, a formação de um intermediário entre Ub e o sítio ativo da E3 ligase, por meio de uma ligação com a cisteína de HECT. Posteriormente, a ubiquitina é transferida para a proteína alvo (SUB) (Figura 3A-B), marcando-a para proteólise por meio dos proteossomas presentes no citoplasma da célula (WANG et al., 2017).

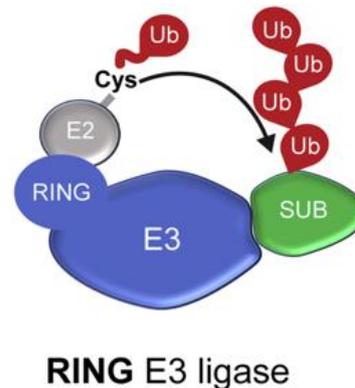
Figura 3: Transferência de ubiquitina para E3 ligases do tipo HECT e RBR



Fonte: JEVTIĆ; HAAKONSEN; RAPÉ, 2021.

Por outro lado, o domínio RING E3 ligase é considerado a principal forma de transferência de Ub para a proteína alvo, pois utiliza um modelo de transferência direto da enzima E2 para o substrato (Figura 4).

Figura 4: Transferência de ubiquitina para E3 ligases do tipo RING



Fonte: JEVTIĆ; HAAKONSEN; RAPÉ, 2021.

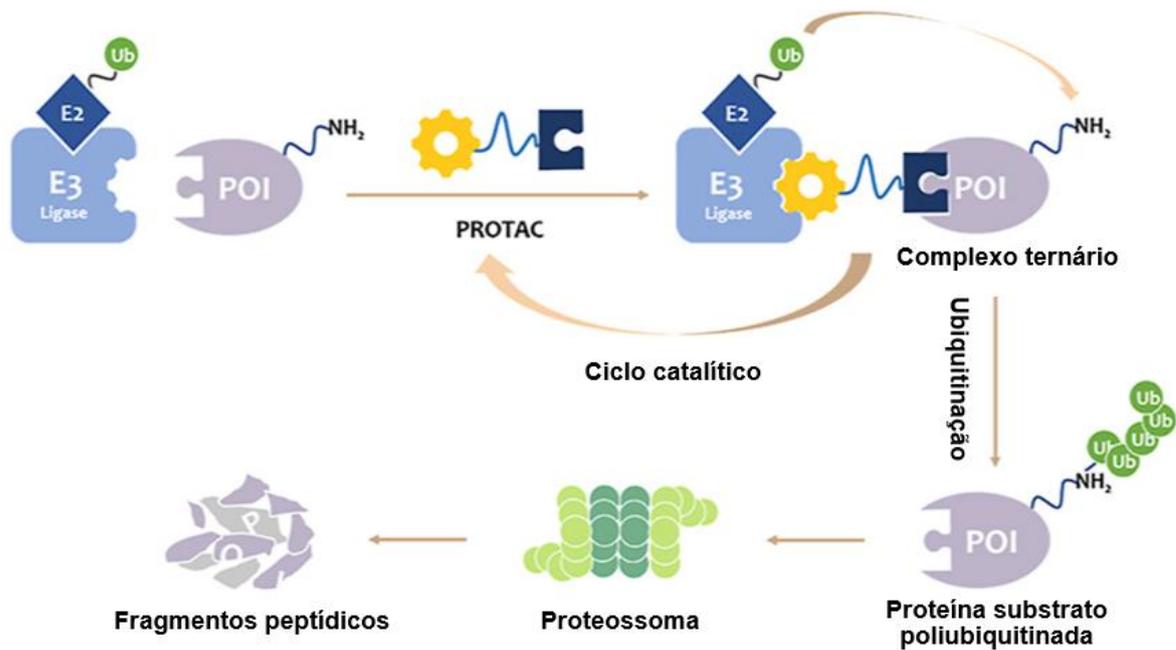
Dessa forma, a enzima E3 ligase possui um papel fundamental nesse mecanismo. Atualmente, sabe-se que o genoma humano abriga cerca de seiscentas E3 ligases, as quais se diferenciam quanto à quantidade de proteínas que são capazes de modificar e os produtos da atividade enzimática, podendo marcar a proteína alvo de diferentes formas e gerando resultados de degradação distintos na célula (JEVTIĆ; HAAKONSEN; RAPÉ, 2021).

5. PROTACs:

Em 2001, Crews e colaboradores descreveu, pela primeira vez, o conceito de PROTACs, definindo-as como pequenas moléculas heterobifuncionais, degradadores de proteínas que possuem três componentes chave, a saber: dois ligantes, um responsável por interagir com a proteína alvo e outro que faz uma ligação com a

enzima E3 ligase e, entre esses dois ligantes, um *linker* responsável pela união de ambos (Figura 5). Com base nessa estrutura, o PROTAC possui a capacidade de formar um complexo ternário estável entre ele, a proteína alvo e a E3 ligase. Uma vez formado o complexo, a E3 ligase é direcionada à proteína alvo e faz com que a enzima E2 (ubiquitina conjugadora) transfira suas cadeias de Ub para o substrato, marcando esse alvo para a ação do proteossoma (GRIMSTER, 2021).

Figura 5: Degradação mediada por PROTACs



Fonte: adaptado de WANG et al., 2022.

O advento das PROTACs criou grande expectativa quanto ao uso em terapias oncológicas, pois foram descritas cerca de trinta proteínas ligadas à sinalização, proliferação e sobrevivência celular, as quais eram suscetíveis ao mecanismo de ação das PROTACs. Dentre elas, destacam-se os receptores nucleares, proteínas quinases, proteínas de regulação transcricional, enzimas metabólicas, proteínas reguladoras e proteínas de fusão (ZOU; MA; WANG, 2019).

Acredita-se que as PROTACs possuam grandes vantagens quando comparadas a quimioterápicos inibidores tradicionais, como uma menor suscetibilidade ao desenvolvimento de mecanismos de resistência, pois diferentemente dos inibidores tradicionais, as PROTACs degradam completamente seu alvo e não somente o inibem por um determinado período. Estudos recentes demonstraram que a resistência aos inibidores pode ser contornada por meio da

degradação completa da oncoproteína através de uma PROTAC (NIETO-JIMÉNEZ et al., 2022).

Além disso, as PROTACs têm uma capacidade de degradar não somente as proteínas alvo enzimáticas como também proteínas que não possuem essas propriedades e são consideradas não drogáveis (*undruggable*). Logo, as PROTACs atuam em alvos que terapias tradicionais ainda não são capazes de alcançar, ampliando significativamente os possíveis alvos de ação de uma terapia (ARORA et al., 2021).

Uma propriedade vantajosa das PROTACs é que a degradação mediada por essas moléculas é sub-estequiométrica, ou seja, uma molécula PROTAC tem a capacidade de induzir a degradação de diversas proteínas alvo. Essa propriedade proporciona para a ação das PROTACs a necessidade de concentrações relativamente baixas para alcançar seu objetivo terapêutico, possibilitando doses baixas e intervalos de administração maiores, além de ocasionarem uma diminuição dos efeitos tóxicos da terapia (DING; FEI; LU, 2020).

Tendo isso em vista, nos últimos 20 anos diversos estudos acadêmicos se voltaram para essa tecnologia, voltando-se para a elucidação de seu modo de ação, estrutura de seus ligantes, interações realizadas, dentre outras propriedades. Atualmente, as PROTACs têm ampliado seus estudos além da academia para indústrias farmacêuticas e biotecnológicas, com estudos pré-clínicos e clínicos em andamento (GAO; SUN; RAO, 2020).

5.1. Classificação das PROTACs:

Conforme mencionado anteriormente, a E3 ligase é uma parte essencial do processo de degradação proteica mediado por PROTACs. Atualmente sabe-se que o genoma humano codifica mais de seiscentas E3 ligases as quais podem conter o domínio RING E3 ligase, HECT E3 ligase ou RBR E3 ligase. Dentre esses tipos, apenas as E3 ligases do tipo RING têm sido utilizadas por PROTACs, pois é o domínio predominante na maioria das E3 ligases (PEI et al., 2019).

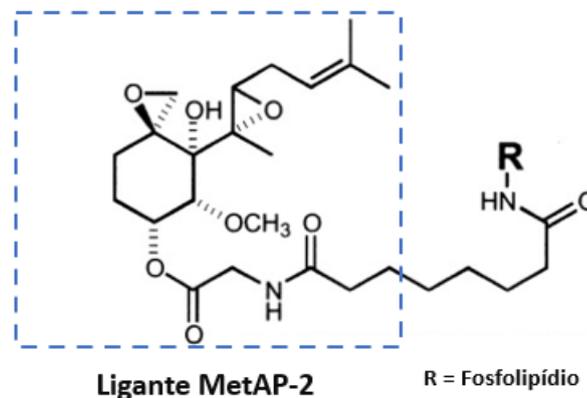
Com o passar dos anos, outras quatro enzimas E3 ubiquitina ligase foram descobertas para a ação de PROTACs, são essas *von Hippel-Lindau* (VHL), *murino duplo minuto 2* (MDM2), *Cereblon* (CRBN) e inibidor de apoptose (IAP), as quais serão detalhadas a seguir. As peptídeo-PROTACs são apenas descritas por questões históricas.

5.1.1. Peptídeo-PROTACs:

Em 2001, Sakamoto e colaboradores criou a primeira PROTAC, denominada PROTAC-1. O alvo dessa primeira PROTAC foi a metionina aminopeptidase-2 (MetAP-2), uma enzima importante no processo de proliferação celular, além participar ativamente na regulação da angiogênese (crescimento vascular). Neste sentido, a degradação é de grande interesse, pois pode impedir a progressão de tumores e cânceres (SAKAMOTO et al., 2001).

A estrutura dessa PROTAC consistiu em um fosfolipídio de dez aminoácidos como ligante E3 ligase, e uma estrutura ovalicina como ligante de MetAP-2 (Figura 6). Essa PROTAC gera uma ligação covalente entre a proteína MetAP-2 e a E3 ligase, sofrendo ubiquitinação e, posteriormente, a degradação da proteína MetAP-2. Ademais, é importante destacar que MetAP-2 não é um substrato endógeno dessa E3 ligase, e essa degradação não ocorre sem a introdução da PROTAC ao meio celular. Esse experimento ocorreu em extratos de ovos de *Xenopus laevis* não fertilizados (SAKAMOTO et al., 2001).

Figura 6: Estrutura PROTAC-1



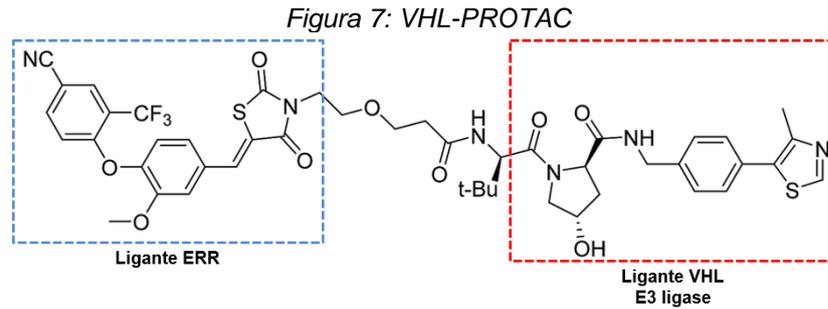
Fonte: Adaptado de SAKAMOTO et al., 2001.

Apesar de degradar a proteína MetAP-2, uma barreira encontrada na PROTAC-1 foi sua permeabilidade celular, pois seu grande tamanho molecular, devido a presença de um peptídeo em sua estrutura, limitava sua penetração na célula. Assim, essa primeira molécula de PROTAC é considerada uma “bioPROTAC”, pois não é uma pequena molécula, mas sim composta por peptídeo, utilizado como ligante para E3 ligase (BÉKÉS; LANGLEY; CREWS, 2022).

5.1.2. VHL-PROTACs:

A proteína supressora tumoral Von Hippel-Lindau possui ação como E3 ligase, agindo na degradação de fatores de transcrição, em especial na regulação negativa de fatores induzidos por hipóxia (HIFs). Esses fatores estão diretamente ligados ao crescimento tumoral, pois aumentam a angiogênese, o que permite maior vascularização do tumor, captando mais recursos para seu crescimento e tornando-o mais suscetível à metástase (GOSSAGE; EISEN; MAHER, 2015).

Em 2004, foi introduzido o sistema VHL-PROTACs, onde o peptídeo HIF1- α (*Fator indutor de hipóxia-1 subunidade α*) foi descoberto como importante ligante da VHL E3 ligase (BÉKÉS; LANGLEY; CREWS, 2022). Entretanto, devido à característica peptídica, sua atividade celular era baixa, tendo como principais obstáculos a baixa permeabilidade celular e o seu reconhecimento pelo sistema imunológico, o qual induzia a produção de anticorpos neutralizantes (ZOU; MA; WANG, 2019). Mesmo assim, a descoberta das VHL-PROTACs teve grande importância no desenvolvimento de novos sistemas não-peptídicos, pois, por meio do peptídeo HIF1- α , foram desenhadas pequenas moléculas miméticas, evoluindo a estrutura das PROTACs pela diminuição do tamanho, pela melhoria da seletividade e afinidade pelas proteínas alvo, bem como sua penetração celular (DING; FEI; LU, 2020). Neste sentido, em 2015, foi desenhada uma PROTAC em que o peptídeo HIF1- α foi substituído como ligante de VHL E3 ligase por uma pequena porção tiazolidinodiona, a qual possui uma estrutura mimética ao de HIF1- α . Essa mudança diminuiu o tamanho da molécula PROTAC, mantendo a afinidade pela VHL E3 ligase e aumentando a permeabilidade celular da molécula. Sua estrutura, além de possuir um ligante E3 ligase baseado numa tiazolidinodiona, continha uma porção hidroxiprolina, como ligante do receptor alfa relacionado ao estrogênio (ERR- α) (Figura 7) (ZOU; MA; WANG, 2019). O receptor ERR- α está associado a homeostase da energia celular, fosforilação oxidativa, regulação da biogênese e metabolismo de ácidos graxos e, assim, sua degradação parece ser importante para a retirada de recursos que proporcionem o crescimento tumoral. Essa VHL-PROTAC demonstrou degradação *in vivo* de 40% desses receptores em tumores cardíacos e renais murinos (PEI et al., 2019).



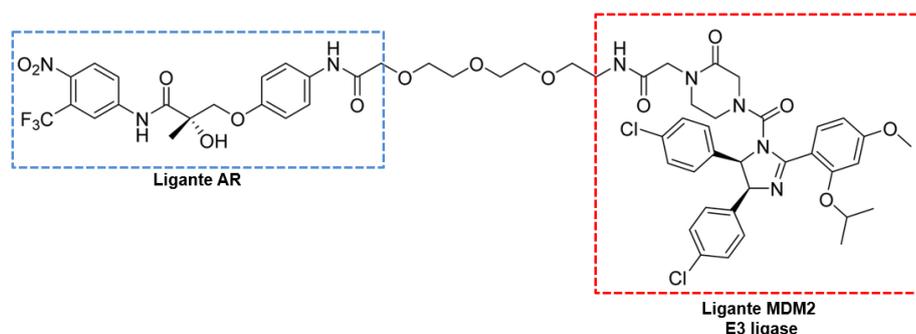
Fonte: Adaptado de PEI et al., 2019.

As VHL E3 ligases têm sido o principal alvo ligase das PROTACs, isso se deve principalmente, pois possui sítios de ligação bem definidos estruturalmente. Até o momento, já foram descobertas cerca de quarenta proteínas alvo que são substratos de VHL E3 ligases, sendo que aproximadamente trinta possui ação em diferentes tipos de cânceres e tumores (WANG et al., 2022).

5.1.3. MDM2-PROTACs:

A Minuto Duplo Murino 2 (MDM2) proteína é uma E3 ligase e têm sua expressão associada a diversos cânceres humanos (YANG et al., 2021). Em 2008, Scheneekloth et al. criou uma MDM2-PROTAC permeável às células, que teve como objetivo induzir a degradação de receptores androgênicos (AR) em câncer de próstata. A estimulação do AR por agonistas, como testosterona e a diidrotestosterona, promove o crescimento celular e, assim, a degradação desses receptores poderia evitar a progressão de tumores prostáticos (SCHNEEKLOTH et al., 2008). A MDM2-PROTAC é composta por um ligante de AR, denominado modulador seletivo de receptor androgênico (SARM), seguido de um *linker* de polietilenoglicol (PEG) e um ligante da MDM2 E3 ligase, chamado nutlina (Figura 8) (PEI et al., 2019).

Figura 8: PROTAC SARM-nutlina



Fonte: Adaptado de PEI et al., 2019.

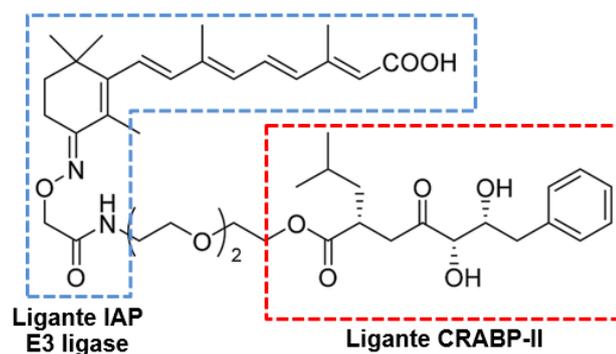
Sua composição possibilitou a ubiquitinação de receptores andrógenos e, conseqüentemente, a proteólise. Além disso, como o ligante nutlina se liga à MDM2 E3 ligase por meio de um bolso de ligação compartilhado com a proteína supressora de tumor p53, a degradação desta foi desviada por inibição competitiva. Contudo, a redução dos receptores andrógenos foi inferior quando comparada a degradação induzida por VHL E3 ligases, o que tornou as MDM2 E3 ligases menos promissoras como alvos para PROTACs (CROMM; CREWS, 2017).

5.1.4. IAP-PROTACs:

As proteínas inibidoras de apoptose (IAP) possuem sua função associada a inibição das caspases, enzimas responsáveis pela cascata de apoptose celular. As IAPs podem agir como enzimas E3 ligase, realizando a poliubiquitinação das caspases, o que leva a degradação dessas enzimas por meio da proteólise (GRIVICICH; REGNER; BRONDANI, 2007).

Hashimoto e colaboradores, em 2010, desenvolveram o sistema denominado IAP-PROTAC, o qual utiliza IAP E3 ligases para poliubiquitinação de proteínas como a CRABP-II (do inglês, *Cellular Retinoic Acid-Binding Protein II*), cuja função está relacionada ao crescimento, diferenciação e desenvolvimento da pele humana. Destaca-se a alta expressão da CRABP-II em diversos tipos de câncer como de mama, ovário, estômago, útero, melanomas, entre outros (ITOH et al., 2010).

Figura 9: IAP PROTAC com alvo em CRABP-II



Fonte: Adaptado de PEI et al., 2019.

O IAP-PROTAC foi construído pela ligação da metil-bestatina (ligante da enzima IAP-1 E3 ligase) e o ligante de CRABP-II, por meio de uma cadeia de polietilenoglicol (PEG). Como resultado, a molécula induziu a degradação seletiva de CRABP-II em concentrações satisfatórias (DING; FEI; LU, 2020).

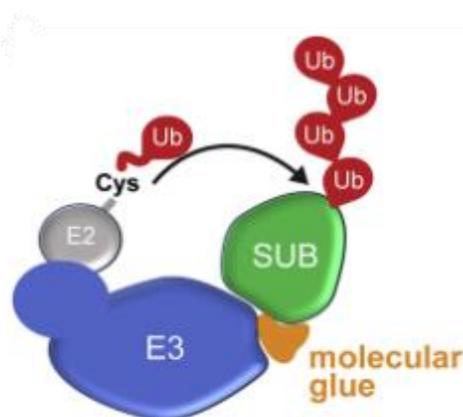
5.1.5. CRBN-PROTACs:

Simultaneamente à descoberta de pequenas moléculas como PROTACs, foi identificado o sistema proteico Cereblon (CRBN) que se localiza no citoplasma, núcleo e membrana periférica do cérebro humano, além de outros tecidos. CRBN apresenta múltiplas funções, como ação no metabolismo, proliferação e apoptose celular, além de possuir um complexo E3 ligase agindo na ubiquitinação de proteínas substrato (SHEN et al., 2021). A proteína CRBN está diretamente ligada ao mecanismo de teratogenicidade das “drogas” imunomoduladoras (IMiDs), como talidomida, lenalidomida e pomalidomida. Retirados do mercado em 1962, associado a má-formação congênita, identificou-se que a classe IMiD possui como alvo a proteína CRBN, inibindo a ação dessa proteína no crescimento de fibroblastos, o que ocasiona a má formação congênita e deformação dos membros (SHI; CHEN, 2017).

A partir desse estudo, descobriu-se, ainda, outras atividades dos IMiD, como antiangiogênese e efeitos anti-inflamatórios. Além dessas propriedades dos IMiDs, foi reportada a atividade antimieloma, pois são moléculas capazes de se ligar à CRBN E3 ligase e induzir a degradação de Ikaros (IKZF1) e Aiolos (IKF3), fatores de transcrição de células B importantes para a proliferação celular. Assim, a degradação desses dois fatores de transcrição induz a citotoxicidade em células de mieloma (SHI; CHEN, 2017).

Os IMiDs foram reconhecidos, posteriormente, como uma classe de “colas moleculares degradadoras” (do inglês, *Molecular glue degraders*) (Figura 10), ou seja, proteínas que orquestram interações diretas entre a ligase E3 ligase e uma proteína alvo (KOZICKA; THOMÄ, 2021).

Figura 10: Ilustração da função das colas moleculares



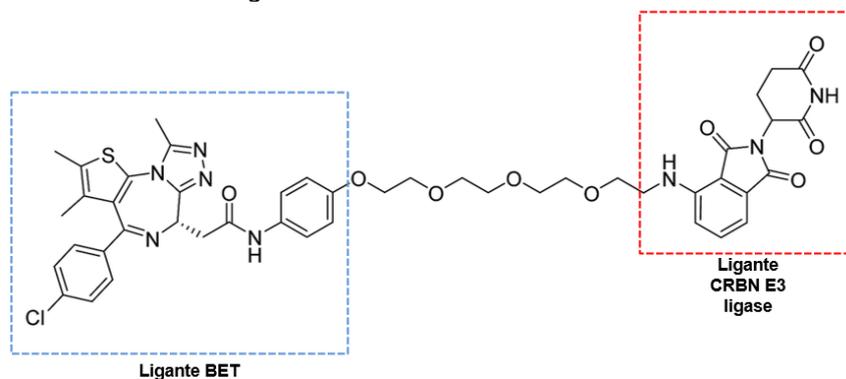
Fonte: JEVTIĆ; HAAKONSEN; RAPÉ, 2021.

Essa tecnologia de “colas moleculares” tem resultado na degradação de diversas proteínas associadas a cânceres como mieloma múltiplo, linfomas e leucemias e, neste sentido, tem favorecido o estudo de terapias oncológicas inovadoras. Até o momento, cerca de seis moléculas estão em estudo clínico, sendo que três estão em fase II e as demais em fase I (BÉKÉS; LANGLEY; CREWS, 2022).

A classe de CRBN-PROTACs também foi estudada em proteínas bromodomínio (BET, do inglês *Bromodomain and ExtraTerminal*), que são responsáveis pelo reconhecimento da acetilação de histonas e, ademais, constituídas pelas proteínas BRD2, BRD3 e BRD4. A expressão de proteínas da família BET tem um papel fundamental no desenvolvimento de diversas doenças e, principalmente, no câncer, pois, como têm sua função na transcrição de genes e regulação da cromatina, participam frequentemente da mutação e superexpressão de genes relacionados ao câncer (BÉKÉS; LANGLEY; CREWS, 2022).

A molécula ARV-825 foi desenhada com o objetivo de induzir a degradação de proteínas BET por meio da ubiquitinação dessas proteínas por CRBN E3 ligase. Essa molécula foi composta por um IMiD (pomalidomida), ligante da CRBN E3 ligase, uma porção triazolo-tienodiazepina acetamida (OTX015) ligante de BET, e um *linker* de polietilenoglicol (PEG) (Figura 11) (ARORA et al., 2021).

Figura 11: Estrutura BET-PROTAC



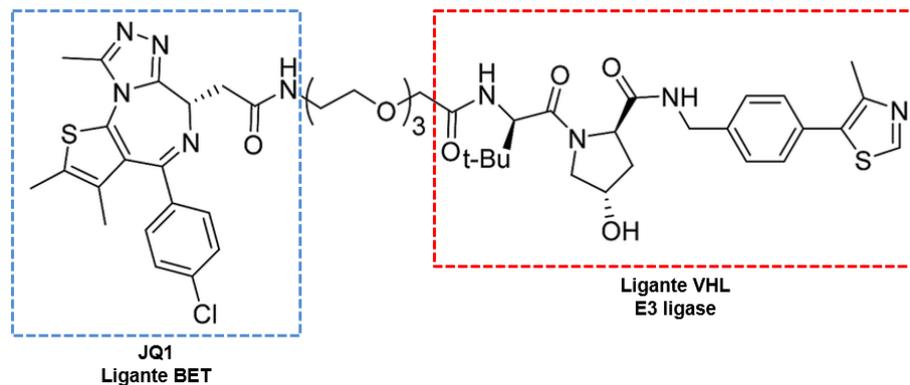
Fonte: Adaptado de PEI et al., 2019.

Estudos *in vitro* demonstraram redução dos níveis de BRD2 e BRD4 em células epiteliais de câncer de mama, diminuição dos níveis do gene regulador da mitose CDC25C, além de um aumento da morte celular programada (ARORA et al., 2021).

5.2. Estrutura Cristalina das PROTACs:

Ainda possuindo como alvo na família BET desenvolveu-se a primeira molécula a qual pode-se compreender sua estrutura cristalina complexada ao alvo molecular. Denominada MZ1 (Figura 12), essa PROTAC possui uma porção triazolotienodiazepina (JQ1, ligante BET), ligado a um composto ligante de VHL E3 ligase (denominado VH032) por meio *linker* PEG (ZOU; MA; WANG, 2019).

Figura 12: Molécula MZ1

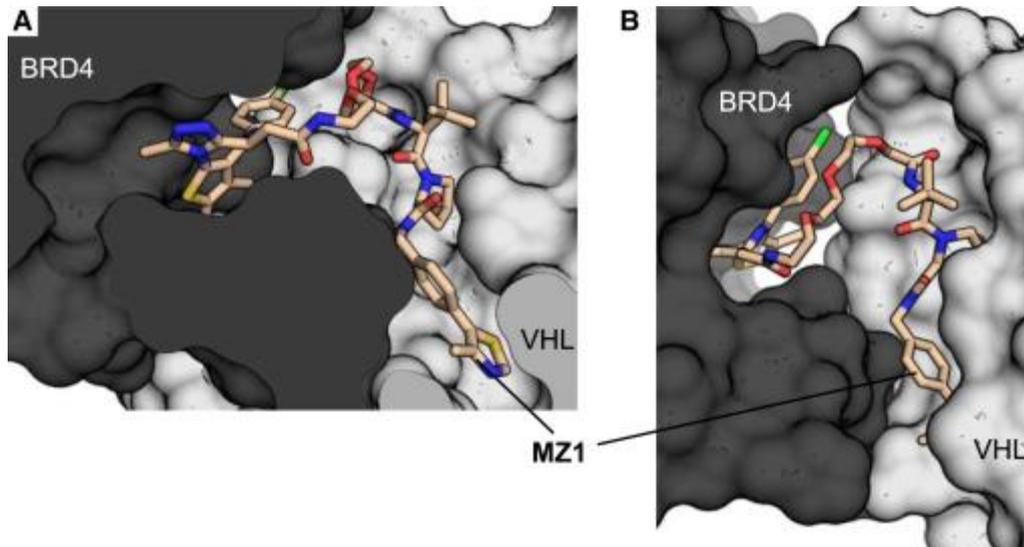


Fonte: Adaptado de PEI et al., 2019.

Nos resultados celulares foi demonstrada intensa *downregulation* de BRD2 e BRD4 em células epiteliais de câncer de mama MDA-MB-231, o que levou, posteriormente, ao aumento da apoptose celular (ARORA et al., 2021).

A figura 13 ilustra o complexo ternário BRD4-MZ1-VHL E3 ligase. MZ1 se encaixa nesse complexo entre as duas proteínas, de uma maneira que seus ligantes façam interações com suas respectivas proteínas. JQ1 se encaixa no bolso de ligação de acetilisina de BRD4, enquanto o ligante VH032 se liga na porção hidroxiprolina da VHL E3 Ligase. Além dessas interações, o *linker* PEG interage com o *loop* da BRD4 por meio de interações de Van der Waals (GADD et al., 2017). Cabe destacar que MZ1 dobra-se sobre si mesmo, fazendo com que seu *linker* PEG fique empacotado entre um grupo *terc*-butil do VH032 e o anel cloro-fenil de JQ1.

Figura 13: Estrutura conformacional do MZ1



Fonte: (CROMM; CREWS, 2017).

6. PROTACS EM DESENVOLVIMENTO CLÍNICO:

Atualmente, grandes empresas farmacêuticas têm investido em moléculas PROTACs, dentre eles AstraZeneca, GlaxoSmithKline, Boehringer Ingelheim, Pfizer, Sanofi e Bayer. Moléculas do tipo degradadoras de proteínas alvo têm sido motivo de contratos de milhões a bilhões de dólares. A capitalização total desse mercado no fim de novembro de 2021 chegou a cerca de US\$11 bilhões (GARBER, 2022).

Em 2019, as moléculas ARV-110 e ARV-471 deram início a era dos degradadores de proteína alvo em terapias humanas. Elas foram as moléculas pioneiras nos estudos pré-clínicos dessa modalidade e abriram portas para diversas outras moléculas que, atualmente, estão em estudos clínicos de fase II. Além dessas duas moléculas, em 2022, foram rastreadas cerca de nove moléculas em estudos clínicos de fase I (BÉKÉS; LANGLEY; CREWS, 2022)

Grande parte dessas moléculas têm sua atividade voltada para degradação de proteínas oncogênicas, em especial para o câncer de mama, em mulheres, e o câncer de próstata em homens, com alcance em receptores estrogênicos e proteínas do gene BCR e receptores androgênicos. Entretanto, algumas moléculas têm sido voltadas para outros tipos de câncer como linfomas, leucemias e tumores sólidos (BÉKÉS; LANGLEY; CREWS, 2022).

A tabela I apresenta as principais PROTACs desenvolvidas e outras informações relevantes sobre aspectos químicos, biológicos e fases clínicas.

Tabela 1: PROTACs em desenvolvimento clínico.

| Empresa | Molécula | Alvo | Indicações | E3 ligase | Via de administração | Fase clínica | Ensaio clínico |
|------------------------|----------|-------|---------------------------------|-----------|----------------------|--------------|----------------|
| Arvinas | ARV-110 | AR | Câncer de Próstata | CRBN | Oral | Fase II | NCT03888612 |
| Arvinas / Pfizer | ARV-471 | ER | Câncer de mama | CRBN | Oral | Fase II | NCT04072952 |
| Accutar BioTech | AC682 | ER | Câncer de mama | CRBN | Oral | Fase I | NCT05080842 |
| Arvinas | ARV-766 | AR | Câncer de Próstata | - | Oral | Fase I | NCT05067140 |
| Bristol Myers Squibb | CC-94676 | AR | Câncer de Próstata | CRBN | Oral | Fase I | NCT0442878 |
| Dialectic Therapeutics | DT2216 | BCL-X | Tumores sólidos e hematológicos | VHL | Intravenoso | Fase I | NCT0488662 |
| Foghorn Therapeutics | FHD-609 | BRD9 | Sarcoma sinovial | - | Intravenoso | Fase I | NCT04965753 |
| Kymera | KT-413 | IRAK4 | Linfoma | CRBN | Intravenoso | Fase I | - |
| Kymera | KT-333 | STAT3 | Tumores sólidos e hematológicos | - | - | Fase I | - |
| Nutrix Therapeutics | NX-2127 | BTK | Células B malignas | CRBN | Oral | Fase I | NCT04830137 |
| Nutrix Therapeutics | NX-5948 | BTL | Células B malignas | CRBN | Oral | Fase I | NCT05131022 |

Fonte: Adaptado de BÉKÉS; LANGLEY; CREWS, (2022).

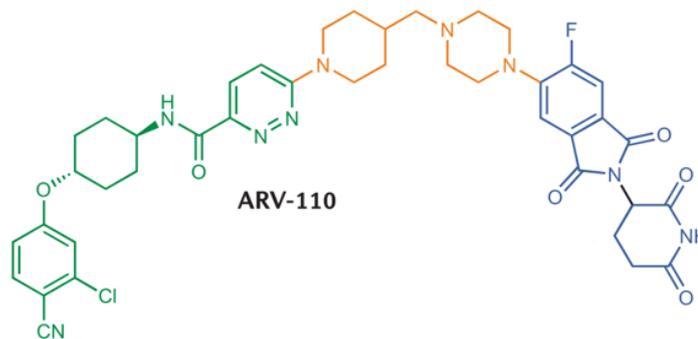
6.1. ARV-110:

A empresa Arvinas desenvolveu a molécula ARV-110 (Figura 14), uma PROTAC degradadora de receptores androgênicos no câncer de próstata em estado metastático resistente a enzalutamida, um antagonista andrógeno não esteroide. O ARV-110 regula de forma negativa genes responsivos ao androgênio, inibindo a proliferação celular e induzindo a apoptose em células dependentes de AR (L. SNYDER; ET AL., 2021).

Essa molécula possui uma boa biodisponibilidade, possibilitando a administração via oral e demonstrando, em estudos de pré-clínicos, uma degradação maior que 95% de AR em diferentes linhagens celulares com uma resposta dose-dependente. Seus resultados têm demonstrado alta seletividade para AR, além de diminuir a síntese de antígeno prostático específico (PSA), sendo considerada

eficiente para câncer de próstata castração-resistente metastático (mCRPC) amplificado por AR. Quanto à degradação de AR em linhagens selvagens, resultados similares foram demonstrados, porém em doses menores quando comparada à enzalutamida. Em tumores com resistência adquirida, houve inibição do crescimento tumoral de 70%, e para os tumores com resistência inerente o crescimento foi inibido em 100% (SUN; RAO, 2020).

Figura 14: Estrutura ARV-110



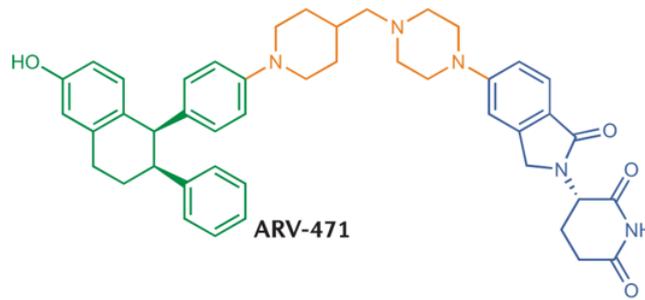
Legenda: A molécula é composta por um ligante de AR (verde), um *linker* (laranja) e um ligante E3 ligase (azul). Fonte: BÉKÉS; LANGLEY; CREWS, 2022.

Atualmente, a molécula encontra-se em estudos clínicos de fase II, os quais serão apresentados em 2023. Seu estudo tem seguido com pacientes com câncer prostático castração resistente metastático, que já receberam ao menos duas terapias anteriores. Esses receberam ARV-110 por via oral uma ou duas vezes ao dia. Seus objetivos principais são avaliar a dose recomendada para ser utilizada, além de observar a segurança do ARV-110. Resultados prévios têm demonstrado maior diminuição de PSA em pacientes com mutações em genes AR T7878A/S e H875Y, quando comparados a pacientes sem mutações. Os principais efeitos adversos relacionados foram náusea (42%), fadiga (27%), vômito (23%), diminuição do apetite (19%), diarreia (15%) e alopecia (19%) (GAO, et al. 2022).

6.2. ARV-471:

ARV-471 (Figura 15) é uma molécula PROTAC também desenvolvida pela empresa Arvinas, que recruta CRBN E3 ligases para a destruição de receptores de estrogênio em câncer de mama (ER+/HER-) em estado metastático avançado, sendo este receptor considerado o principal regulador na sinalização de estrogênio. Atualmente, o tratamento padrão se dá com fulvestranto, degradador seletivo do receptor de estrogênio. No entanto, ARV-471 tem demonstrado, também, potencial para terapia única ou em combinação com inibidores de CDK4/6 (SNYDER, 2021).

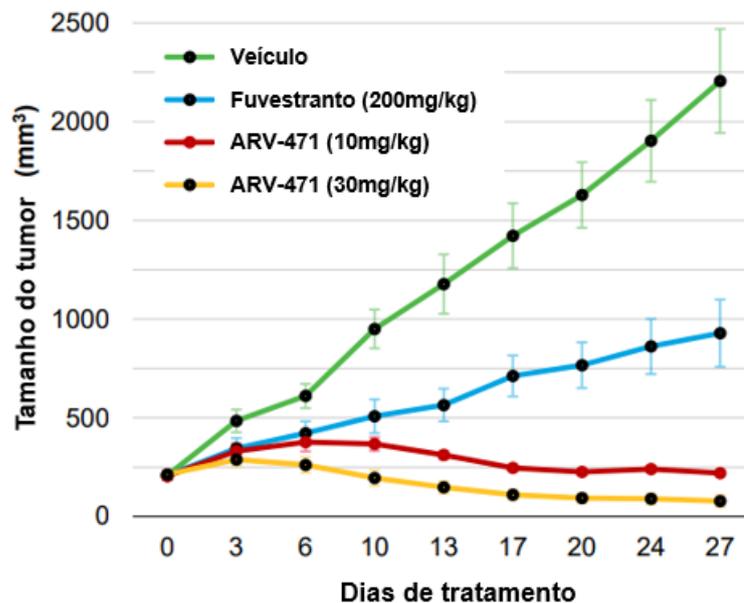
Figura 15: Estrutura ARV-471



Fonte: A molécula é composta por um ligante de ER (verde), um *linker* (laranja) e um ligante E3 ligase (azul). BÉKÉS; LANGLEY; CREWS, 2022.

Seus resultados *in vivo* pré-clínicos demonstraram uma destruição de 79% e 88% de ER nas respectivas doses via oral de 10 mg/kg e 30 mg/kg em um período de 28 dias, resultando em uma inibição de 99% e 106% do crescimento do tumor em modelos mutantes de genes do receptor de estrogênio mutado, respectivamente (Figura 16) (SUN; RAO, 2020).

Figura 16: Crescimento do tumor mamário pelo tempo de tratamento



Fonte: Adaptado de SNYDER, 2021.

O ARV-471 demonstrou maior eficiência na degradação de receptores ER em estágio clínico em comparação ao fuvestranto, que apresenta cerca de 63% de redução desses receptores. Atualmente, o ARV-471 está em fase II como monoterapia e em um estudo de fase 1b, avaliando-o em combinação com palbociclibe, inibidor CDK4/CDK6, sendo desenvolvido pela Arvinas em conjunto com Pfizer. (BÉKÉS; LANGLEY; CREWS, 2022).

Seu ensaio clínico de fase I teve como participantes pacientes com câncer de mama que receberam terapia endócrina anteriormente, visando avaliar segurança, tolerabilidade, dose terapêutica e farmacocinética do ARV-471. Assim, foi realizado um escalonamento de dose do ARV-471, o qual possuía como dose mínima 30mg e máxima de 700mg, não foi atingida uma dose máxima tolerada, além de não ser observada uma toxicidade limitante de dose. Os eventos adversos reportados foram náusea (24%), fadiga (12%) e vômito (10%). A análise de biópsia de 12 pacientes tratados com 30 a 360mg por dia de ARV-471 demonstrou até 90% de degradação de receptores estrogênicos em tumores ER mutantes. (HAMILTON, E, et al. 2022).

7. DESAFIOS DAS PROTACS:

As PROTACs têm apresentado grande potencial como nova estratégia para terapias no geral, contudo tem se encontrado alguns obstáculos em seu desenvolvimento. Como mencionado anteriormente, o ponto chave da degradação mediada pela PROTAC encontra-se no recrutamento da E3 ligase e sabe-se que o genoma humano abriga mais de seiscentas enzimas ligases. Porém, até o momento, apenas quatro dessas demonstraram viabilidade para o recrutamento das PROTACs, tornando essencial a busca por novas enzimas E3 ligase para abranger a utilização dessa estratégia (BÉKÉS; LANGLEY; CREWS, 2022).

Além disso, até o momento, não é claro o desenho racional de PROTACs, pois é necessária uma certa especificidade da molécula PROTAC para que essa realize interações suficientes proteína-proteína com seus ligantes e, assim, forme o complexo ternário. Como sua relação estrutura-atividade não está totalmente elucidada torna-se complexo a criação de novas moléculas PROTACs eficientes (GARBER, 2022)

Um ponto que tem chamado a atenção no desenvolvimento das PROTACs é os possíveis efeitos tóxicos que a degradação de proteínas pode trazer para a terapia, pois diferentes consequências são observadas quando comparadas a apenas a sua inibição. Neste sentido, é importante selecionar um alvo seguro que a clivagem não levará a produção de metabólitos tóxicos ao indivíduo (GARBER, 2022).

8. MOLÉCULAS DEGRADADORAS ALVO DIRECIONADAS ALTERNATIVAS: PERSPECTIVAS

Apesar de possuir um mecanismo promissor para a degradação de proteínas, algumas limitações podem ser observadas na tecnologia utilizada pelas PROTACs, dentre elas está a dependência de enzimas E3 ligases e do funcionamento do sistema UPS, o que impede seu funcionamento em células resistentes ao proteossoma e/ou que não possuam esses componentes. Assim, surgiram novas tecnologias de moléculas degradadoras, porém com diferentes alvos e mecanismo de ação (DING; FEI; LU, 2020).

Dentre essas novas tecnologias encontra-se a *Autophagy Targeting Chimeras*, (AUTACs), que possui abordagem similar a das PROTACs. Neste caso, o *linker* usual é um derivado de guanina, simulando uma S-guanilação, o que marca esse alvo para autofagia, por meio da indução da poliubiquitinação de K63. Esse mecanismo ainda não está totalmente elucidado e, desse modo, os efeitos e eficácia dessa estratégia necessitam de mais estudos (RAMADAS; KUMAR PAIN; MANNA, 2021).

Outra tecnologia alternativa de degradação proteica alvo-direcionada são as ATTECs, do inglês *Autophagosome-Tethering Compounds*. Essas moléculas são independentes do sistema ubiquitina proteossoma, pois possuem um ligante que aprisiona a proteína alvo aos autofagossomos, que ocorre por meio de uma ligação direta entre a proteína alvo e a proteína do fagossomo LC3. Assim, as ATTECs têm capacidade de degradar moléculas proteicas e não proteicas reconhecidas pela autofagia, como moléculas de DNA e RNA, organelas danificadas. Ademais, algumas das moléculas ATTECs são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE), despertando um potencial de seu uso para descoberta de fármacos com alvo no sistema nervoso central (DING; FEI; LU, 2020).

A estratégia *Lysosomal Targeting Chimeras* (LYTACs), à semelhança das anteriores, também são funcionais na degradação de proteínas intracelulares. Os lisossomos são organelas capazes de degradar ácidos nucleicos, polissacarídeos e outros materiais, logo, diferentemente das PROTACs que degradam apenas determinadas proteínas intracelulares, as LYTACs têm a capacidade de degradar proteínas agregadas, organelas danificadas e proteínas extracelulares, possuindo potencial para ação em cânceres e doenças autoimunes (PEI et al., 2021).

As LYTACs são compostas por dois anticorpos de ligação, uma a proteína de interesse e um 20 ou 90-mer de manose-6-fosfato, ligando-se covalentemente a este anticorpo. Assim, a LYTAC se liga à proteína alvo e ocorre um transporte intracelular por meio de receptores de lisossomos e, dentro da célula, essa proteína será degradada via endossomo ou lisossoma (DING; FEI; LU, 2020).

Cada uma dessas tecnologias possui seu próprio mecanismo de ação, além de apresentarem propriedades diferentes quanto a sua penetração celular e biodisponibilidade oral. Além disso, essas tecnologias são mais recentes que a tecnologia das PROTACs, o que demonstra menos conhecimento sobre seu modo de ação e eficiência, não possuindo validação clínica (Tabela 2) (BÉKÉS; LANGLEY; CREWS, 2022).

Tabela 2: Características de moléculas degradadoras

| Modalidade terapêutica | PROTACs | AUTACs | ATTECs | LYTACs |
|--|----------------|---------------|---------------|---------------|
| Alcance de <i>undruggable</i> proteínas | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| Mecanismo iterativo | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| Ampla penetração nos tecidos | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| Facilidade de produção | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| Biodisponibilidade e oral | ✓ | | | ✓ |
| Validação pré-clínica, prova de conceito estabelecida | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| Validação clínica | ✓ | | | ✓ |

Fonte: Adaptado de BÉKÉS; LANGLEY; CREWS (2022).

9. CONCLUSÃO

A partir deste trabalho pode-se concluir que a estratégia das PROTACs tem se demonstrado uma alternativa bastante promissora, principalmente para terapias oncológicas. As PROTACs mostraram eficácia em diversos tipos de cânceres, em particular nos cânceres de mama e próstata, para os quais já existem moléculas em níveis avançados dos ensaios clínicos.

Além disso, a terapia por PROTACS têm apresentado vantagens quando comparado a terapia tradicional, cuja degradação proteica pode ser mais eficiente do que a inibição da atividade de proteínas. Ademais, a concentração que é necessária para atingir a janela terapêutica das PROTACs tem se demonstrado baixa, o que mostra um provável regime terapêutico adequado para pequenas doses.

Contudo, se torna importante mais estudos voltados para essa tecnologia, para melhor elucidação de seu modo de ação, relação estrutura-atividade, quais interações proteína-proteína são essenciais para a eficiência da PROTAC, bem como a importância da formação do complexo ternário. Além disso, é necessário ultrapassar obstáculos como o repertório limitado de E3 ligases, já que o genoma humano é composto por seiscentas E3 ligases, porém apenas quatro dessas foram estudadas para aplicação de PROTACs. Ainda, estudos adicionais sobre os efeitos toxicológicos que a degradação completa de proteínas pode levar ao organismo humano são necessários.

Assim, entende-se que há um grande potencial no uso PROTACs, sendo uma estratégia muito eficiente para a terapia de doenças oncológicas, além da possibilidade de ampliação para outras condições, como doenças autoimunes, hematológicas e neurodegenerativas.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ARORA, P. et al. PROTACs in Treatment of Cancer: A Review. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 16, p. 2347–2360, 26 fev. 2021.

BÉKÉS, M.; LANGLEY, D. R.; CREWS, C. M. PROTAC targeted protein degraders: the past is prologue. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 21, n. 3, p. 181-200, 1 mar. 2022.

CROMM, P. M.; CREWS, C. M. Targeted Protein Degradation: from Chemical Biology to Drug Discovery. **Cell Chemical Biology**, v. 24, n. 9, p. 1181-1190, 21 set. 2017.

DING, Y.; FEI, Y.; LU, B. Emerging New Concepts of Degradation Technologies. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 41, n. 7, p. 464-474, 1 jul. 2020.

GADD, M. S. et al. Structural basis of PROTAC cooperative recognition for selective protein degradation. **Nature Chemical Biology**, v. 13, n. 5, p. 514–521, 1 maio 2017.

GAO, H.; SUN, X.; RAO, Y. PROTAC Technology: Opportunities and Challenges. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 11, n. 3, p. 237-240, 12 mar. 2020.

GAO, X. et al. Phase 1/2 study of ARV-110, an androgen receptor (AR) PROTAC degrader, in metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC). **Journal of Clinical Oncology**. V. 40, n. 6, p. 17-17. 20 fev. 2022.

GARBER, K. The PROTAC gold rush. **Nature biotechnology**, v. 40, n. 1, p. 12-16, 1 jan. 2022.

GOSSAGE, L.; EISEN, T.; MAHER, E. R. VHL, the story of a tumour suppressor gene. **Nature Reviews Cancer**, v. 15, n. 1, p. 55-64, 11 jan. 2015.

GRIMSTER, N. P. Covalent PROTACs: The best of both worlds? **RSC Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 9, p. 1452-1458, 1 set. 2021.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; BRONDANI, A. Morte Celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 25 jan, 2007.

HAMILTON, E, et al. Abstract PD13-08: First-IN-HUMAN SAFETY AND ACTIVITY OF arv-471, a novel PROTAC estrogen receptor degrader, in ER+/HER2- locally advanced or metastatic breast cancer. **Cancer Res**. V. 82, n. 4. Abstract PD13-08. 15 fev. 2022.

ITOH, Y. et al. Protein knockdown using methyl bestatin-ligand hybrid molecules: Design and synthesis of inducers of ubiquitination-mediated degradation of cellular retinoic acid-binding proteins. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 16, p. 5820–5826, 28 abr. 2010.

JEVTIĆ, P.; HAAKONSEN, D. L.; RAPÉ, M. An E3 ligase guide to the galaxy of small-molecule-induced protein degradation. **Cell Chemical Biology**, v. 28, n. 7, p. 1000-1013, 15 jul. 2021.

KOZICKA, Z.; THOMÄ, N. H. Haven't got a glue: Protein surface variation for the design of molecular glue degraders. **Cell Chemical Biology**, v. 28, n. 7, p. 1032-1047, 15 jul. 2021.

L. SNYDER; ET AL. Discovery of ARV-110, a first in class androgen receptor degrading PROTAC for the treatment of men with metastatic castration resistant prostate cancer. **American Association for Cancer Research**, v. 81, n. 13, p. 43, 1 jul. 2021.

PEI, H. et al. Small molecule PROTACs: An emerging technology for targeted therapy in drug discovery. **RSC Advances**, v. 9, n. 30, p. 16967-16976, 14 mai. 2019.

PEI, J. et al. Targeting Lysosomal Degradation Pathways: New Strategies and Techniques for Drug Discovery. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 64, n. 7, p. 3493-3507, 8 abr. 2021.

RAMADAS, B.; KUMAR PAIN, P.; MANNA, D. LYTACs: An Emerging Tool for the Degradation of Non-Cytosolic Proteins. **ChemMedChem**, v. 16, n. 19, p. 2951-2953, 6 out. 2021.

SAKAMOTO, K. M. et al. Protacs: Chimeric molecules that target proteins to the Skp1-Cullin-F box complex for ubiquitination and degradation. **PNAS**, v. 98, n. 15, p. 8554-8559, 10 mai. 2001.

SCHNEEKLOTH, A. R. et al. Targeted intracellular protein degradation induced by a small molecule: En route to chemical proteomics. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, n. 22, p. 5904-5908, 15 nov. 2008.

SHEN, C. et al. The E3 ubiquitin ligase component, Cereblon, is an evolutionarily conserved regulator of Wnt signaling. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, 1 dez. 2021.

SHI, Q.; CHEN, L. Cereblon: A Protein Crucial to the Multiple Functions of Immunomodulatory Drugs as well as Cell Metabolism and Disease Generation. **Journal of Immunology Research**, v. 2017, 15 ago. 2017.

SNYDER, L. B. The Discovery of ARV-471, an Orally Bioavailable Estrogen Receptor Degrading PROTAC® for the Treatment of Patients with Breast Cancer. **AACR Annual Meeting 2021**, 21 mai. 2021.

SUN, X.; RAO, Y. PROTACs as Potential Therapeutic Agents for Cancer Drug Resistance. **Biochemistry**, v. 59, p. 240-249, 29 out. 2020.

SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, mai. 2021.

WANG, C. et al. VHL-based PROTACs as potential therapeutic agents: Recent progress and perspectives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 227, 09 out. 2021.

WANG, D. et al. E3 ubiquitin ligases in cancer and implications for therapies. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 36, n. 4, p. 683–702, 1 dez. 2017.

YANG, Q. et al. E3 ubiquitin ligases: styles, structures and functions. **Molecular Biomedicine**, v. 2, n. 1, p. 02-23, 1 dez. 2021.

ZOU, Y.; MA, D.; WANG, Y. The PROTAC technology in drug development. **Cell Biochemistry and Function**, v. 37, n. 1. P. 21-30, 1 jan. 2019.

11. ANEXOS:18/10/2022 *Luísa Lima*

Data e assinatura do aluno (a)17/10/2022 *Roberto Sáez Filho*

Data e assinatura do orientador (a)