

## Kanser Tedavisinde Yeni Bir Yaklaşım “Proteoliz Hedefli Kimera”

Seher SARUHAN<sup>1</sup>, Can Ali AGCA<sup>2\*</sup>

<sup>1,2</sup>Bingöl Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü 12000, Bingöl, Türkiye

<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0003-1641-8519>

<sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0002-0244-3767>

\*Sorumlu yazar: c.aliagca@gmail.com

### Derleme

#### Makale Tarihiçesi:

Geliş tarihi: 16.06.2022

Kabul tarihi: 20.10.2022

Online Yayınlanma: 05.07.2023

#### Anahtar Kelimeler:

PROTAC

UPS

İlaç keşfi

Kanser tedavisi

### ÖZ

Gelişmekte olan terapötik bir strateji olarak Proteoliz Hedefli Kimera (PROTAC), belirli bir hedef protein aktivitesinin inhibisyonundan ziyade, degradasyonuna yol açan iki işlevli bir moleküldür. PROTAC molekülleri, bir hedef protein ligandı, E3 ligaz ve bir bağlayıcı olmak üzere üç kısımdan oluşmakta ve farklı hedef proteinleri parçalamak için hücredeki ubiquitin proteozom sistemini kullanmaktadır. PROTAC teknolojisi, son yirmi yılda önemli ölçüde ilerlemiş ve günümüzde de dikkatleri üzerinde toplayarak kanser tedavisinde çığır açabilecek bir dönüm noktası haline gelmiştir. PROTAC yaklaşımı aynı zamanda ilaç keşif çalışmalarında çarpıcı bir değişikliğe sebep olmakla birlikte bu teknolojinin önünde yatan birçok potansiyel avantaj ve olağanüstü zorluklar tartışılmaktadır. Bu derlemede, PROTAC'ın geleneksel ve modern tedavi yöntemleri ile karşılaştırılarak, kanser tedavisine ve ilaç keşif çalışmalarına katkı sağlayacak avantaj ve zorluklarına yönelik bilgilere yer verilmektedir.

## A New Approach in Cancer Treatment “Proteolysis Targeting Chimera”

### Reviews

#### Article History:

Received: 16.06.2022

Accepted: 20.10.2022

Published online: 05.07.2023

#### Keywords:

PROTAC

UPS

Drug discovery

Cancer treatment

### ABSTRACT

As an emerging therapeutic strategy, Proteolysis Targeting Chimera (PROTAC) is a bifunctional molecule that leads to degradation rather than inhibition of the activity of a specific target protein. PROTAC molecules consist of three parts, a target protein ligand, E3 ligase, and a linker, and use the ubiquitin proteasome system in the cell to cleave different target proteins. PROTAC technology has advanced significantly in the last two decades and has become a breakthrough in cancer treatment by attracting attention today. While the PROTAC approach is also causing a devastating change in drug discovery studies, the many potential advantages and extraordinary challenges that lie ahead of this technology are discussed. In this review, information on the advantages and challenges of PROTAC that will contribute to cancer treatment and drug discovery studies is given by comparing it with traditional and modern treatment methods

**To Cite:** Saruhan S., Ağca CA. Kanser Tedavisinde Yeni Bir Yaklaşım “Proteoliz Hedefli Kimera”. Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 2023; 6(2): 1611-1640.

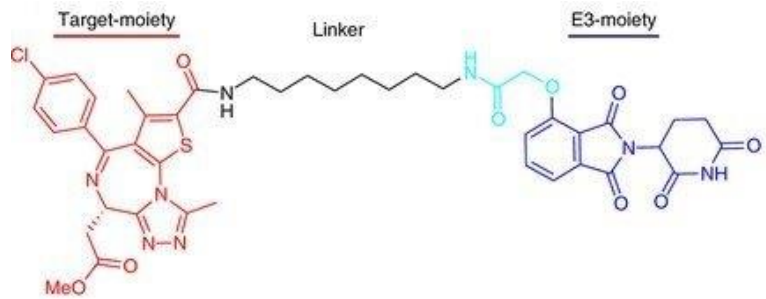
## 1. Giriş

Yunan mitolojisinde “Kimera”, bir aslanın kafasına, dişi keçinin gövdesine ve bir ejderhannın kuyruğuna sahip, ateş soluyan üç başlı bir yaratık olarak bilinmektedir. Söylentilere göre, kimera, boğazına saplanan kurşun uçlu mızrağı, ağzından çıkan alevle eriterek, kendi ölümüne sebep olmuştur (Öztürk, 2016). Kimera'nın eski Yunan mitolojisindeki bu efsanevi anlamından yola çıkarak Proteoliz Hedefli Kimera adı verilen (PROTAC) teknolojinin asıl amacını anlamlandırabilmekteyiz. PROTAC'lar, ilgilenilen bir proteini (Protein of Interest, POI) bağlayan bir savaş başlığı, esnek bir bağlayıcı ve bir E3 ligazına bağlanan, liganddan oluşan heterobifonksiyonel küçük moleküllerdir (Guang-Wei ve ark., 2016; Alabi ve ark., 2021). PROTAC'lar, kanseri tedavi etmede geleneksel ve modern tedavi yöntemlerinin aksine, belirli bir proteini hedefleyerek degradasyonuna sebep olan etkili bir strateji sunmaktadır. Hedef proteinlerin PROTAC molekülleri tarafından, ubiquitin-proteozom sistemi yardımıyla ortadan kaldırılması, kanser hücrelerinin ölümüne sebep olmakta ve bununla birlikte bu tür hastalıkları tedavi etmede potansiyel bir teknoloji olarak karşımıza çıkmaktadır (Albitar ve ark., 2007). Aynı zamanda PROTAC'lar, kazanılmış ilaç direncini yenme potansiyelini teşkil edebilmekte, bunları yaparken de birçok avantaj ve zorluğu da beraberinde getirmektedir (Liao ve ark., 2020; Qu ve ark., 2021).

A



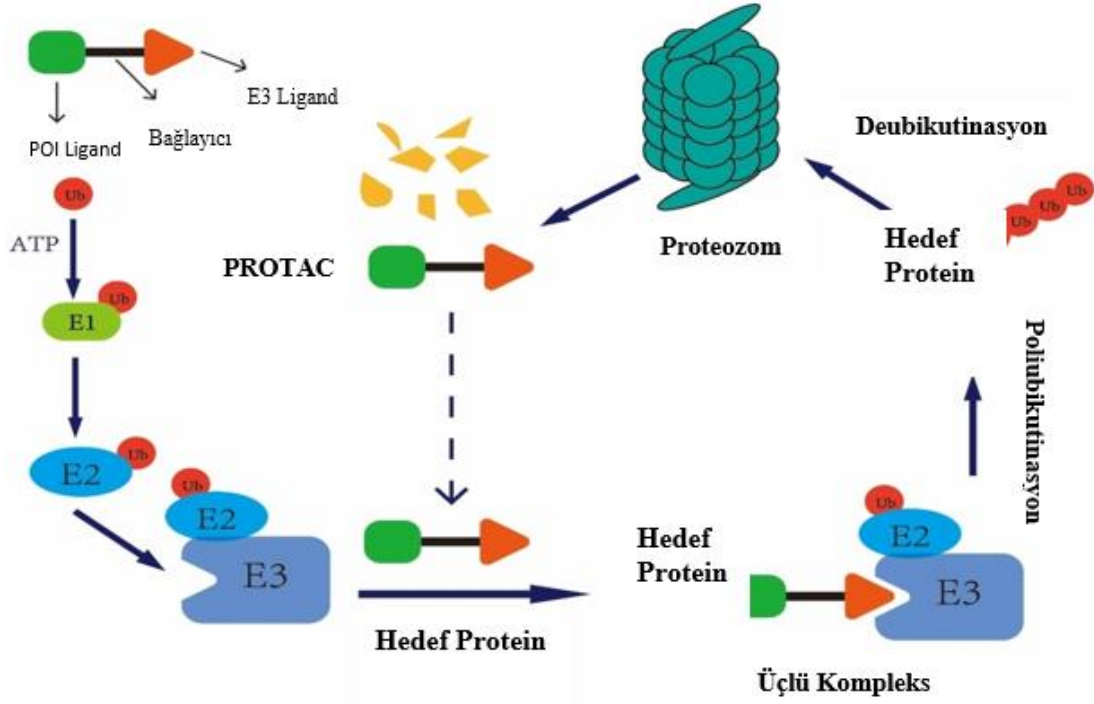
B



**Şekil 1.** (A) **Chimera** (Yunanca Χίμαιρα), **Khimera** veya **Kimera**, Yunan Mitolojisinde bir aslanın kafasına, dişi keçinin gövdesine ve ejderhannın kuyruğuna sahip ateş soluyan bir yaratık (Öztürk, 2016) (B) PROTAC'ın moleküler yapısı (Web, 2021)

PROTAC'lar ilk olarak E3 ligaz ve POI ile birbirine bağlanarak üçlü kompleks oluşturmaktadır. E1, E2 ve E3 ligazların etkisiyle ubiquitinler, sürekli olarak hedef proteine aktarılabilir ve bu da hedef proteinin poliubikutinleşmesine neden olabilmektedir (Hu ve ark., 2022). Poliubikutinleşmiş hedef protein, 26S proteozomu tarafından tanınarak deubikutinasyon ile proteozomal degradasyona neden

olmaktadır. Bu süreç gerçekleştikten sonra PROTAC molekülü ayrışarak bir sonraki degradasyon döngüsüne devam edebilmektedir (Li ve ark., 2022).

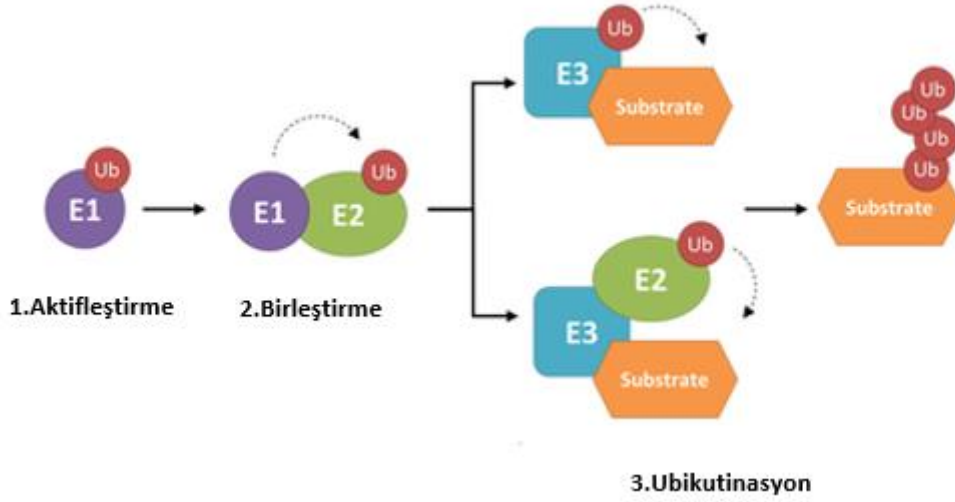


**Şekil 2.** PROTAC moleküllerinin *in vivo* etki mekanizması. Küçük bir PROTAC molekülü, hedef proteine ve E3 ligazına aynı anda bağlanabilir. Ubikütinler, E1, E2, E3 ligazın etkisi altında sürekli olarak hedef proteine aktarılabilir ve hedef proteinin poliubikütinleşmesine neden olur. Poliubikütinleşmiş hedef protein, 26S proteozomu tarafından tanınır ve deubikütinasyondan sonra bozular (Li ve ark., 2022).

### 1.1. Ubikütin-Proteozom Sistemi

Proteinlerin yanlış katlanması veya yanlış düzenlenmesi, nörodejeneratif hastalıklar, kanserler ve tip 2 diyabet (T2DM) dahil olmak üzere birçok hastalığın gelişmesine yol açmaktadır (Samarasinghe ve Crews, 2021). Bu nedenle hücreler normal proteomları korumak için protein yapılarını sürekli olarak düzenlemelidir. Yanlış katlanmış proteinler, kalite kontrol sistemleri tarafından yeniden katlanır, katlanamayan proteinler ise bozularak ortadan kaldırılır (Relini ve ark., 2014). Yanlış katlanmış proteinlerin fizyolojik koşullar altında ortadan kaldırılması, enzimler, şaperonlar, lektinler ve ATP ile yönlendirilen molekülleri içeren bir ağ tarafından kontrol edilmektedir (Wang ve ark., 2020). Proteinler, asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon ve ubikütinasyon dahil olmak üzere 200'den fazla translayon sonrası modifikasyon (PTM) ile değiştirilmektedir. Bu sayede spesifik yapı proteinlerinin farklı fonksiyon kazanmasına sebep olmaktadır (He ve ark., 2019). Farklı PTM türleri arasında ubikütinasyon, ökaryotik hücrelerde görev alan önemli bir süreçtir. Ubikütinasyon, merkezi 76 amino asitten oluşan küçük küresel bir protein olan ubikütinden oluşmaktadır ve bir C-terminal çift glisin kuyruğuna sahiptir (Yalçın, 2012). Ubikütin, E1 (ubikütin aktive edici enzim), E2 (ubikütin konjuge

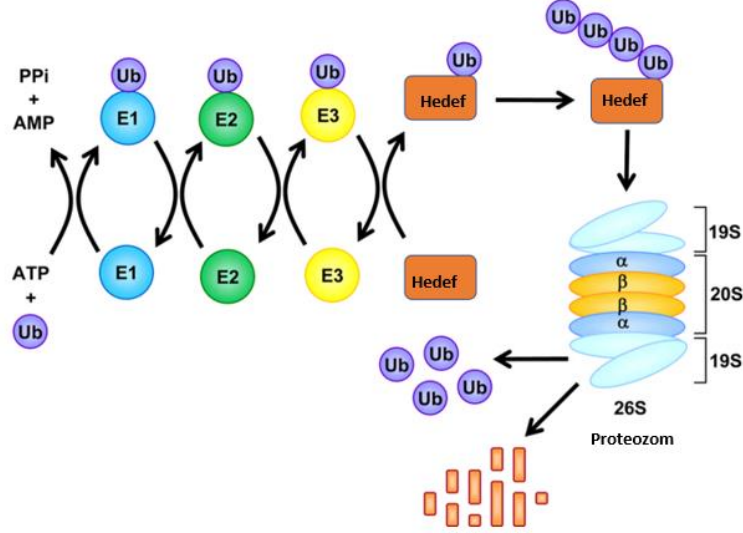
edici enzim) ve E3 (ubikutin ligaz) enzimatik kaskad tarafından katalize edilen, ubikütinasyon yoluyla diğer protein substratlarına bağlanabilme yeteneğine sahip bir moleküldür (Khalil, 2018).



**Şekil 3.** Ubikütinasyon aşamaları (Web, 2017). Ubikütini aktive eden bir enzim olan E1 ligazına bağlanması yoluyla ubikütinin aktivasyonu ile başlar. E1 ligaz daha sonra ubikütini, ubikütin-konjuge edici bir enzim olan bir E2 ligazına aktarır ve belirli bir E3 ligazına bağlanarak bir E2-E3-Ub kompleksi oluşturur. Bu E2-E3-Ub kompleksi, ubikütinin belirli bir E3 ligazına bağlanan spesifik bir proteine transferi için hazırlanır.

Ubikütinasyon esnasında ubikütin-lizin kalıntısı veya ubikütinin kendisi ile protein substratlarının N-terminal metionin rezidüsü arasında bir peptit bağı oluşmaktadır. Diğer yandan ubikütin, substratların sistein, serin ve treonin rezidülerinin yan zincirlerine bir ester bağı ile bağlanmaktadır (Paiva ve Crews, 2019). Ayrıca, ubikütin sırasıyla mono-ubikütinasyon ve multi-mono-mono ubikütinasyon olarak adlandırılan substrat kalıntılarında dahil edilebilir veya bunun yerine poliubikütin zinciri adı verilen bir dizi ubikütin molekülü substratlarla birleştirilebilmektedir. Poliubikütin zincirleri homojen, heterojen veya dallanmış olabilir, bu nedenle; ubikütin konjugatları ve poliubikütin zincirleri, protein substratlarının kaderini belirleyen “*ubikütin kodları*” olarak kabul edilmektedir (Li ve ark., 2021). Ubikütinasyonun rol oynadığı en önemli biyolojik süreçlerden biri protein degradasyonudur. E1-E2-E3 kademeli sistemi aracılığıyla degradasyonu amaçlanan proteinler, dallı ubikütin zincirleri gibi proteolize eğilimli ubikütin kodları ile modifiye edilmektedir. Ardından bu proteinler, ubikütin zincirlerinin proteozom yoluyla bağlandığı 26S proteozomuna aktarılmaktadır. Son olarak poliubikütin reseptörleri ve bağlı protein substratları, 26S proteozomun bir parçası olan 20S proteozomu içerisinde degradasyona maruz bırakılmaktadır (Chen ve Jin, 2020). Ubikütin Proteozom Sistemi (UPS), hücre içi protein homeostazını sürdürme sorumluluğunun yanı sıra ökaryotik hücrelerde DNA onarımı, stres tepkileri ve hücre çoğalması gibi birçok hücresel süreci düzenleyen önemli bir proteolitik sistemdir (Park ve ark., 2020). Hücresel protein homeostazı, şaperonlar ve proteolitik sistemi içeren bir ağ tarafından sürdürülmektedir. Şaperonlar, proteinlerin katlanma süreçlerinde aktif görevler

üstlenmektedirler (Luengo ve ark., 2019). 26S proteozom odaklı proteolitik sistem ise katlanmamış veya hasar görmüş proteinlerin degradasyonunda önemli rol oynamaktadır (Wang ve Zhou, 2018). 26S proteozomu, iki 19S düzenleyici alt birimlerinden ve bir 20S proteozom çekirdeğinden meydana gelmektedir (Samarasinghe ve Crews, 2021).



**Şekil 4.** Ubikutin-proteozom sistemi (Protein ve ark., 2015) Ubikutin (Ub), adenilasyon yoluyla Ub-aktif edici (E1) enzimleri tarafından aktive edilir ve yüksek enerjili ester bağı oluşur. Ardından enzimler Ub-konjugasyonuna (E2) aktarılır ve Ub-bağlayıcı (E3) enzimlerin yardımıyla, hedef proteinin lizin kalıntısı Ub sonunda bir reaktife aktarılır. Ubikitinlenmiş proteinler, 19S tarafından tanınır. 26S proteozomu ve oligopeptidlere parçalanması için 20S katalitik çekirdeği beslenir. Ub daha sonra geri dönüştürülmek üzere serbest bırakılır.

Proteozom bağlı bölünme esnasında degradasyonun gerçekleşebilmesi için ortaya çıkan etmenler, 19S partikülleri tarafından belirlenmekte ve 20S çekirdek partikülüne yönlendirilmektedir (Collins ve Goldberg, 2017). Proteozom parçalanma sürecinde ilk adım olarak E1 proteini, bir E1-Ubikutilasyon konjugatı oluşturmak için ATP'ye bağlı bir mekanizmada ubikutini aktive etmektedir (Paiva ve Crews, 2019). Daha sonra ubikutin, bir transtioesterifikasyon reaksiyonu yoluyla E1'den E2 enzime aktarılmaktadır. Son adımda ise E3-Ubikutin ligaz, hem E2-Ubikutini hem de substratı aynı anda bağlamaktadır. Bu işlemi gerçekleştirirken ubikutin transferini kolaylaştırabilmek için E2'den doğrudan substrata veya E3 ubikutin ligaz ile dolaylı olarak ubikutine bağlanması gerçekleştirilmektedir. Ubikutin ile etiketlenen substratlar, degradasyon için 26S proteozom tarafından hedeflenmektedir (Nalawansha ve Crews, 2020).

## 1.2. Protein Degradasyon Mekanizmaları

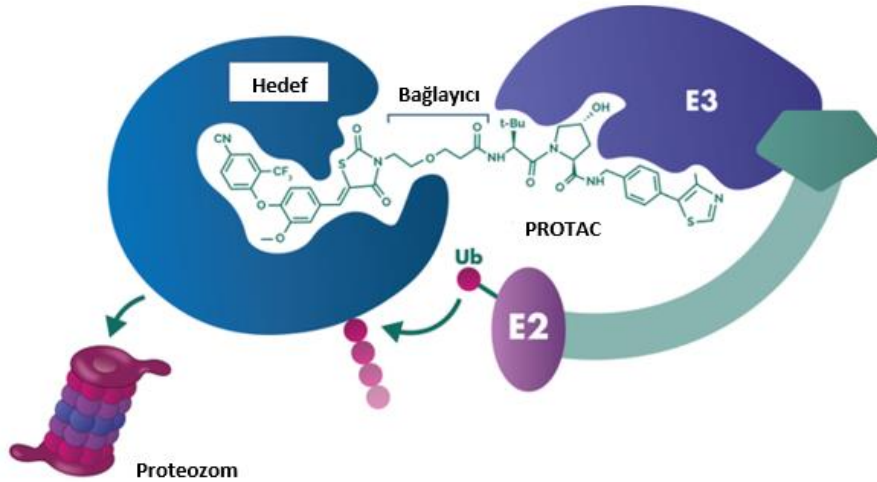
Ubikutin-proteozom sistemi (UPS) ve otofaji, proteinlerin doğal olarak yıkımı için hücrede bulunan iki ana mekanizmadır. Bu iki mekanizma arasında yakın koordinasyon olmasına rağmen, aslında farklı mekanizmalar olduğu bilinmektedir (Li ve ark., 2021). UPS, kısa ömürlü ve yanlış katlanmış

proteinlerin degradasyonundan sorumludur (Liu ve ark., 2016) Otofaji ise uzun ömürlü proteinleri, çözünmeyen protein kümelerini, organelleri (mitokondri, peroksizom gibi), makromoleküler bileşikler ve hatta parazitleri ortadan kaldırabilme yeteneğine sahip olduğu bilinmektedir (Li ve Zhang, 2019). Geleneksel küçük molekülü inhibitörler/ilaçlar, reseptörler (Li ve ark., 2020) ve enzimler (Savvidou ve ark., 2018) gibi izlenebilir bir ligand bağlama bölgesine sahip olan “druggable” olarak adlandırılan proteinlerle sınırlandırılmıştır (Bakhache ve ark., 2019). İnsan proteomunun yalnızca küçük bir kısmı (yaklaşık %25) yenilikçi ilaç stratejilerine dayalı farmasötik olarak erişilebilmektedir. Örneğin transkripsiyon faktörleri, yapı iskele proteinleri ve enzimatik olmayan proteinler degrade edilememektedir (Radchikov ve ark., 2021). Herhangi bir kemoterapötik ajan, hedef proteinin aktif bölgesini ne kadar uzun süre işgal edip bloke edebilirse, elde edilen klinik etkinin o kadar büyük olduğu fikri benimsenmektedir. Aynı zamanda bu durumun farmakolojik modellemenin bir ürünü olduğu da bilinmektedir (Wang ve Zhou, 2018). Bu modellemenin, druggable/aktif bölgeye sahip protein sınırlaması, yeterli inhibe edici konsantrasyon ( $IC_{90-95}$ ) elde edebilmek için yüksek doz kullanımı gibi birtakım zorlukları da beraberinde getirmektedir (Muddassir ve ark., 2020). Öngörülebilir doğal sonuçlar arasında, potansiyel “hedef dışı” (off-target) bağlanma (Jackson ve Linsley, 2010) ve istenmeyen yan etkiler (Helgason ve ark., 1998) yer almaktadır. Son yirmi yılda, hastalığa neden olan proteinlerin ekspresyonunu azaltmak için nükleik asit hedefli stratejiler kullanılmıştır. Bununla birlikte, antisens oligonükleotitleri ve RNA interferans gibi genetik yıkım teknikleri protein seviyelerini ortadan kaldırabilir veya azaltabilirken, metabolik, biyolojik dağılım ve hedef dışı etkileri terapötik faydalarını kısıtlamaktadır (Toure ve Crews, 2016). Konvansiyonel gen-hedefli protein nakavt teknolojiler arasında çinko parmak nükleazlar (ZFN), transkripsiyon aktivatörü benzeri efektör nükleazlar (TALEN) ve düzenli aralıklarla bölünmüş kısa palindromik tekrarlar/ilişkili protein nükleaz-9’lar (CRISPR-Cas-9) yer almaktadır. Bu teknolojiler, geri döndürülemez etki şekline ve yüksek maliyete sahip olmaları nedeniyle tedavi araştırmalarının önünde aşılması gereken büyük engeller olarak görülmektedir (Xia ve ark., 2019). Aynı zamanda, *in vivo* modeller ile yapılan araştırmalarda telafisi mümkün olmayan süreçlerin tetiklenmesine veya gen mutasyonu nedeniyle fenotipik yanlış anlaşılmalara (mis-understanding) neden olmaktadır. Daha da önemlisi, konvansiyonel genetik metotlar ile *in vivo*-embriyonik- genleri incelemede uygun bir yöntem olmadığı görülmüştür (Sun ve ark., 2020). Aynı zamanda RNAi ve CRISPR-Cas-9 teknolojileri, proteinlerin degradasyonuna neden olan yöntemlerdendir. Bu iki teknolojinin kullanımında bazı sınırlamalar mevcuttur. Örneğin, CRISPR-Cas-9 teknolojisi, *in vivo* uygulamayı sınırlayan, istenmeyen hedef dışı etkilere ve düşük verimliliğe sahiptir (Bondeson ve ark., 2015). Diğer yandan, *in vivo* hedef hücrelerin taşınımının verimsiz olması, sistemik ve/veya lokal uygulamayı takiben spesifik olmayan bağışıklık tepkileri gibi sorunlar, RNAi’nin klinik uygulaması için engel teşkil etmektedir. Bunların dışında ısı şok proteinlerinin (HSP’ler) de kinaz degradasyonunda önemli roller oynadığı bilinmektedir (Wang ve ark., 2020). Protein degradasyonunu kontrol etmek için yukarıda bahsedilen yöntemler, çoğunlukla biyomakromoleküller aracılığıyla gerçekleştirilmeye çalışılmaktadır. Son yıllarda araştırmacılar,

yeterince yüksek verimliliğe sahip daha geniş bir protein yelpazesini (undruggable-proteinlerinde dahil olduğu) hedeflemek adına, küçük moleküller kullanarak protein degradasyonu için yeni stratejiler geliştirdiler. Bu önemli stratejilerden biri de UPS'ı ele geçirerek proteinleri parçalayan Proteoliz Hedefli Kimera (Proteolysis Targeting Chimera PROTAC)'dır (Rathod ve ark., 2019). PROTAC'lar, genom düzeyinde müdahale yerine, hedef proteinleri doğrudan yok etmeyi amaçlamaktadır. Bu nedenle, yetişkin organizmalarda embriyonik-ölümcül proteinlerin fonksiyonel çalışması için gerekli şartların sağlanması gerekmektedir. Bu şartlardan biri de PROTAC'ların mükemmel bir zamansal kontrole sahip olmasıdır. Belirli bir süre zarfında, hedef proteinin yıkılmasına izin vererek tedavinin tamamlanmasını ve akabinde hedef proteinin geri kazanılmasını sağlamaktadırlar (Nguyen ve ark., 2022). Yeni, hızlı ve geri dönüşümlü bir protein degradasyon yöntemi olan PROTAC, mevcut genetik araçlara (RNAi) alternatif bir destek olarak kullanılabilir (Sun ve ark., 2020).

### 1.3. Proteoliz Hedefli Kimera

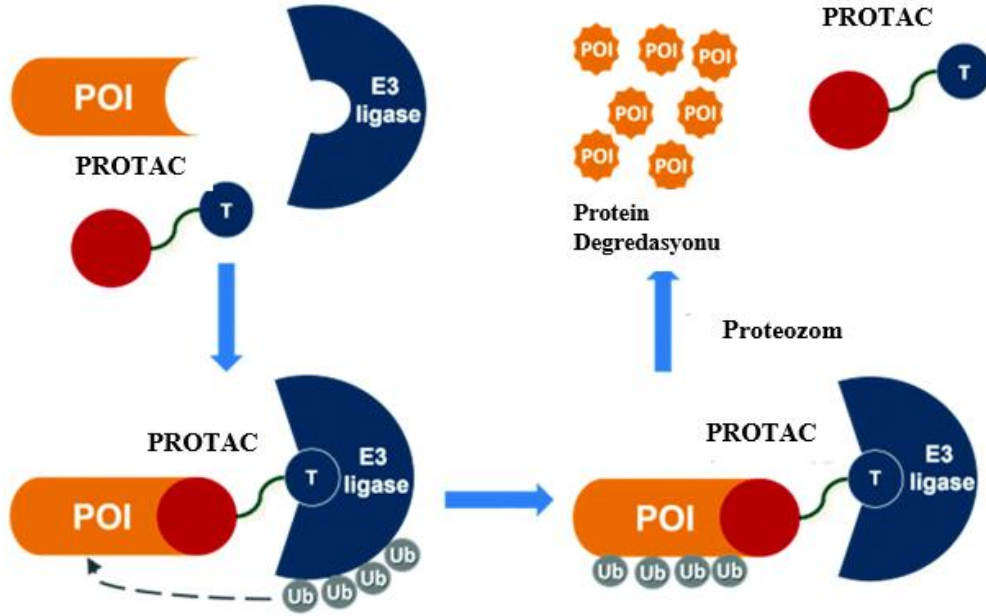
Proteoliz Hedefli Kimera, belirli bir proteini hedeflemek ve hücrede degradasyonunu indüklemek için ubiquitin-proteaz sistemini kullanan heterobifonksiyonel küçük moleküllerden oluşan bir yapıdır (Zou ve ark., 2019). Bu kompleks yapıyı oluşturan bir ligand, ilgili proteini kendi yapısına bağlarken, diğer taraftan bir E3 ubiquitin ligaz bu yapıya bağlanmaktadır. POI ve ligazın PROTAC tarafından eş zamanlı bağlanması ardından UPS, POI'nin degradasyonuna sebep olmaktadır. POI'nin degradasyonu sonrasında PROTAC, POI'nin başka bir kopyasını hedeflemek için geri dönüştürülmektedir (Békés ve ark., 2022).



Şekil 5. PROTAC ile protein degradasyonu (Web, 2022).

PROTAC, hücrelerden spesifik olarak hedeflenen proteinleri ortadan kaldırmak için hücrenin kendi geri dönüşüm mekanizmasını kullanmaktadır (Zou ve ark., 2019). Aynı zamanda PROTAC, ilgilenilen nükleer proteinin degradasyonunu indükleyen ve oldukça dikkat çekici bir tedavi yöntemi olarak da tanımlanmaktadır (Jin ve ark., 2020). PROTAC teknolojisi, transkripsiyon faktörleri (Zhuang ve ark.,

2022), iskelet proteinleri (Inuzuka ve ark., 2022), enzimler ve düzenleyici proteinler (Zheng ve ark., 2020) dahil olmak üzere birçok protein çeşidini hedeflemek için kullanılmıştır (Zou ve ark., 2019). Son zamanlarda bu teknoloji kanserden nörodejeneratif hastalıklara kadar farklı birçok alanda araştırmacının büyük ilgisini çekmektedir. Birçok çalışmada, kanseri tedavi etmek için bir proteini parçalayarak ortadan kaldırmanın, proteini inhibe etmekten daha etkili olduğu ortaya konmuştur (Sun ve ark., 2020).

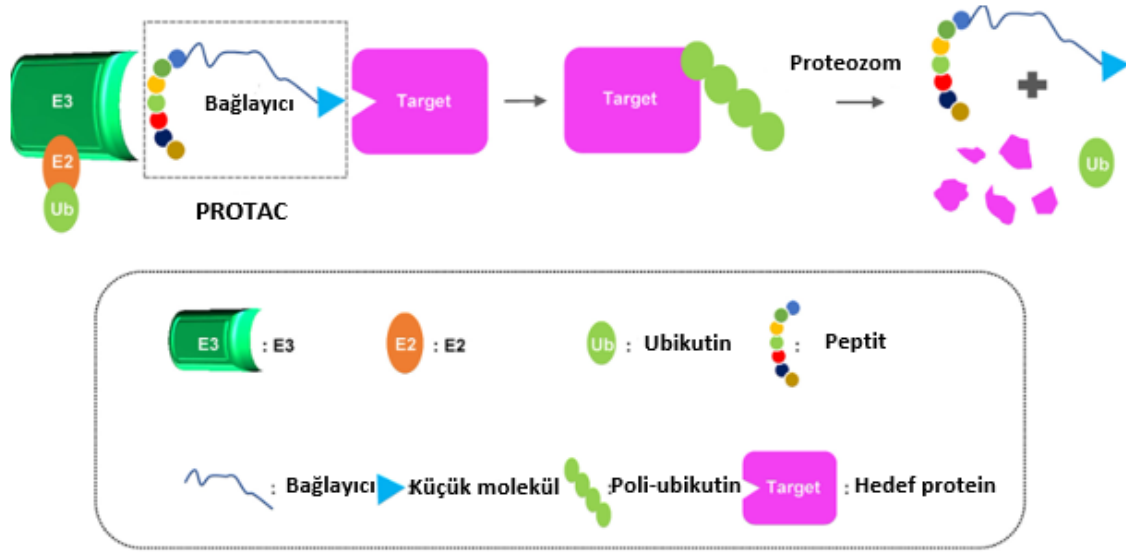


Şekil 6. PROTAC konjugatlarının etki mekanizması (POI: İlgili Protein, Ub: Ubikutin, T: Talidomid) (Soural, 2019)

#### 1.4. Peptit Bazlı PROTAC Teknolojisi

İlk PROTAC teknolojisi, bir E3 ubikutin ligazını tanımak için kısa peptit dizisinin elde edilmesiyle ortaya çıkmıştır. Bu nedenle araştırmacılar bu duruma peptit bazlı PROTAC (pPROTAC) adını vermişlerdir (Zou ve ark., 2019). İlk başarılı PROTAC aracılı degradasyon, bir pPROTAC kullanılarak elde edilmiştir. pPROTAC'larda önemli bir başarı elde edilmesine rağmen, peptit kararsızlığı ve zayıf hücre geçirgenliği gibi farmakolojik sınırlamalar nedeniyle, araştırmaların yönü küçük moleküllü PROTAC'lara çevrilmiştir (Hughes ve ark., 2021).



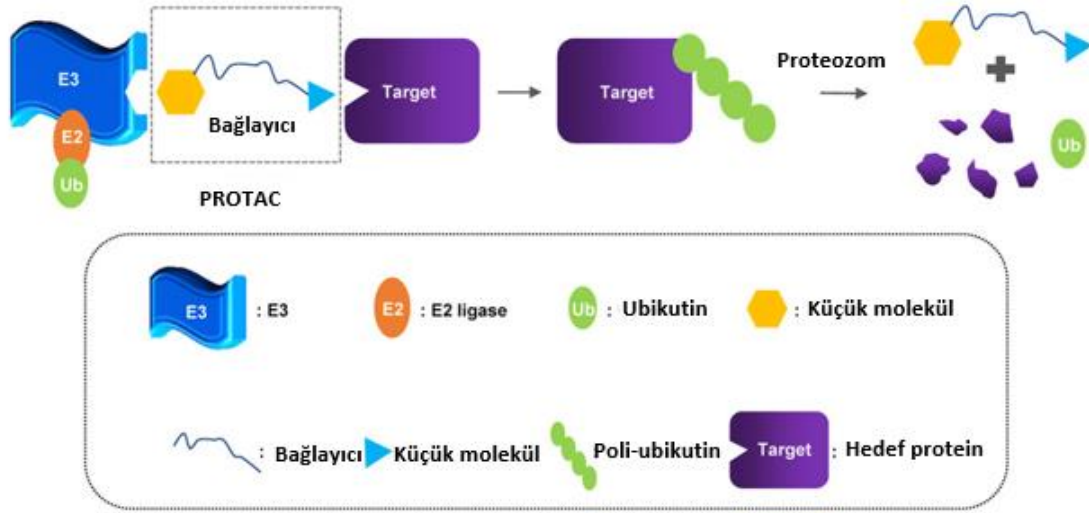


Şekil 7. Peptit bazlı PROTAC (Zou ve ark., 2019)

Yüksek moleküler ağırlık problemlerine rağmen peptit bazlı PROTAC'lar, POI ile ilaç üzerinde daha fazla modifikasyon uygulama kapasitesi yönüyle, küçük moleküler ilaçlara kıyasla daha avantajlıdır. Yapılan çalışmalar pPROTAC'ları diğer optimizasyon yollarıyla daha fazla araştırmak gerektiğine işaret etmektedirler (Liu ve ark., 2020). pPROTAC'lar ile hedeflenen protein degradasyonunun uyarılması ve bu proteinlerin aktivitesinin inhibe edilmesi oldukça zorlu bir süreçtir. Ancak bu pPROTAC'lar için hücre zarına nüfuz etmedeki zorluklar, hala önemli bir kısıtlayıcı olarak karşımıza çıkmaktadır (Zou ve ark., 2019). pPROTAC'lar için bir başka sorun ise bağışıklık sistemi tarafından antikor üretmek için tanınabilen kimerik moleküllerin boyutlarıdır. Üretilen antikorlar molekülün etkisini *in vivo* olarak nötralize edebileceğinden bu durum insandaki klinik uygulama çalışmalarını kısıtlamaktadır (Jiang ve ark., 2018).

### 1.5. Küçük Molekül Bazlı PROTAC Teknolojisi

Birinci nesil pPROTAC'lar, proteinin yarı ömrünü yenilemek için E3 ligazları hedeflemenin potansiyel ilaç geliştirmede uygun bir strateji olduğu kanıtlanmıştır (Ma ve ark., 2020).



Şekil 8. Küçük molekül bazlı PROTAC (Zou ve ark., 2019)

Küçük molekül PROTAC'ların pPROTAC'lara göre daha yüksek stabilite, daha geniş biyolojik dağılım ve potansiyel olarak daha iyi etki sağlaması gibi avantajları bulunmaktadır (Fang ve ark., 2020). Çeşitli E3 ligazları (MDM2, cIAP, CRBN ve VHL) için küçük molekül ligandların geliştirilmesi ve buna dahil edilmesi, PROTAC teknolojisini terapötik bir yaklaşım olarak ortaya çıkarmıştır (Toure ve Crews, 2016). Murin çift dakika 2 (MDM2), apoptoz proteini hücre inhibitörü (cIAP), cereblon (CRBN) ve von hippel lindav (VHL) E3 ligazları, küçük molekül PROTAC'lar için başarılı bir şekilde kullanılmakta ve bu moleküllerin terapötik aday olmaları beklenmektedir (Wang ve ark., 2020).

## 1.6. Kanser Tedavisinde PROTAC

Çeşitli sinyal yollarındaki proteinlerin aşırı ekspresyonu, kanserin başlamasının ve gelişmesinin temel nedeni olarak kabul edilmektedir (Memon ve Patel, 2022). Bu nedenle, insanları etkileyen kanser ve diğer hastalıkları tedavi etmek için etkili ilaçlar geliştirmeye yönelik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (Sakamoto ve ark., 2003). Uzun yıllar kanser tedavisinde küçük molekül inhibitörleri kullanılmış ve bu inhibitörlerin kanseri tedavi etmede belirli sınırlamaları olduğu ortaya çıkmıştır. Bu sınırlamaları ortadan kaldırmak için bazı yenilikçi terapötik yaklaşımlar tasarlamada çok fazla çaba sarf edilmiştir (Memon ve Patel, 2022). İnsan genom dizisinin yakın zamanda tamamlanması, akılcı ilaç tedavisi için makul bir hedef olarak hizmet edebilecek yüzlerce proteini ortaya çıkarmıştır (Kargbo, 2019). Ne yazık ki bu protein hedeflerinin çoğu, enzim olmadıkları ve işlevlerinin küçük molekül ilaçlarla nasıl inhibe edileceği açık olarak bilinmediği için bu proteinler, kolayca hedeflenememektedir. Bu nedenle biyokimyasal işlevi ne olursa olsun istenen herhangi bir protein hedefinin spesifik ve etkili

inhibisyonunu mümkün kılacak bir yöntemle sahip olması gerekmektedir (Sakamoto ve ark., 2003). PROTAC teknolojisi ile hastalıklar ve pro-onkojenik sürece katılan ilgili proteinler, proteozomal degradasyonu kolaylaştırmak için kullanılmaktadır (Ocaña ve Pandiella, 2020).

### **1.6.1. Prostat ve Meme Kanseri PROTAC**

Sınırlı terapötik seçeneklerin bulunduğu geniş bir protein ailesini temsil eden transkripsiyon faktörleri (TF) ve nükleer reseptörler, birkaç malignitenin onkojenik oluşumunda rol oynamaktadır. Aslında, c-MYC, FOXO1 veya androjen reseptöründeki genomik değişiklikler sırasıyla nöroblastom (Mariani ve ark., 2014), meme (Pietri ve ark., 2016) veya prostat (Barfeld ve ark., 2017) kanserinde tanımlanmıştır. Tasarlanan bir terapötik strateji ile bu proteinlerin degradasyonlarını indükleyerek ekspresyonlarının azaltılması sağlanmaktadır. Bu bağlamda, 2020 yılında, androjen reseptörü (AR) ve östrojen reseptörünü (ER) hedefleyen iki farklı PROTAC, prostat (ARV-110) (T. Neklesa ve ark., 2019) ve östrojen reseptörü (ERD-308) (Hu ve ark., 2019) çalışmalarda ele alınmıştır (Ocaña ve Pandiella, 2020). PROTAC'ların AR pozitif prostat kanseri hücrelerinde ve ER pozitif meme kanseri hücrelerinde etkili olup olmadığı test edilmiştir (Hu ve ark., 2019; Zhao ve ark., 2020). Androjene bağımlı prostat kanseri hücreleri HIF1 testesteron PROTAC ile tedavi edildiğinde, endojen AR seviyelerinde ve proliferasyonun inhibisyonunda önemli bir düşüş olduğu gözlemlenmiştir (Sakamoto ve ark., 2003). Androjenden bağımsız hücrelerde, PROTAC'ların AR seviyesi veya hücre proliferasyonu üzerinde hiçbir etkisi olmadığı belirlenmiştir. Benzer şekilde östrojene bağımlı MCF7 hücreleri, HIF1 östrojen PROTAC ile tedavi edildiğinde hücrelerin büyümesi durmuş ve ER seviyeleri azalmıştır (Liu ve ark., 2022). Bu sonuçlar doğrultusunda hormona bağımlı hücrelerin PROTAC ile tedavi edildiğinde reseptörlerin yalnızca aktivitesini azaltmakla kalmayıp, aynı zamanda fonksiyonel olarak da inhibe edilebileceğini göstermiştir (Sakamoto, 2010). PROTAC etki mekanizması, bir tümörde hedef protein degradasyonunun toksisiteye neden olabileceği ihtimalinden dolayı, diğer dokulardan bir E3 ligazının alınmasını gerektirmektedir (Han ve ark., 2019). Böyle bir yaklaşımı kolaylaştırabilecek en önemli durum, belirli bir E3 ligazın yüksek düzeyde tümöre özgü ekspresyonunun sağlanmasıdır. Hücre döngüsü fazına özgü E3 ligaz varlığı ya da E3 ekspresyon eksikliği, hedef protein degradasyonunun toksik yan etkilerine neden olmaktadır (He ve ark., 2020). PROTAC yaklaşımının en önemli rollerinden biri, hasarlı bir hücrenin sitoplazmasındaki veya çekirdeğindeki bir proteine uygulanabilir olmasıdır. Böylelikle proteomdaki büyük bir protein fraksiyonuna karşı terapötiklerin geliştirilmesini sağlayabilmektedir (Sakamoto ve ark., 2003).

### **1.6.2. Kan Kanseri (Lösemi) PROTAC**

PROTAC'lar, solid tümörler ve hematolojik maligniteler için farklı POI'lere karşı geliştirilmiş olup bazı kanser hücrelerine karşı aykırı bir davranış sergilemektedir. Örneğin, BRD4, BTK, BCR-ABL ve CDK-6'ya karşı PROTAC'lar lösemi tedavisinde önemli etkiler göstermiştir (He ve ark., 2020). Kronik miyeloid lösemi (KML), kan ve kemik iliğini etkileyen bir tür malign tümördür. Kemik iliğinin

normal hematopoezi inhibe etmek için çok sayıda olgunlaşmamış lökosit üretimi ile karakterizedir. BRC-ABL, kemik iliğinde beyaz kan hücrelerinin aşırı üretimini ve genişlemesini sağlayan sonunda da kemik iliğindeki normal hücreleri sıkıştıran KML'de kritik bir kinazdır. Crews lab, BRC-ABL1 proteini için bir dizi PROTAC geliştirmiştir. Bununla birlikte füzyon proteinini parçalamak için önceden geliştirilmiş E3 ligaz VHL ligandları kullanılmıştır. Bu sayede PROTAC, lösemi tedavisinde terapötik bir yöntem olmanın dışında biyolojiyi keşfetmede bir araç olarak kullanılmıştır (Qi ve ark., 2021) Bunun yanı sıra AR, ER, FAK, p38 gibi PROTAC'lar farklı solid tümör tedavilerinde, karşıt bir yaklaşım geliştirmişlerdir (Burslem ve ark., 2019).

### 1.6.3. Pankreas Kanseri PROTAC

PROTAC'lar, hedef proteinin degradasyonunu tetiklemek için E3 ubiquitin ligazına bağlanan pomalidomid adlı efektör liganda bir bağlayıcı ile bağlanan iki işlevli moleküllerdir. Bu yeni PROTAC ARV-825 (ARV), BRD4 proteinini hedefleyen OTX015 ve E3 ubiquitin ligaz sereblonunu hedefleyen pomalidomid ligandlarını içermektedir. Saraswat ve arkadaşlarının yakın zamanda yapmış oldukları çalışmada, BRD4'ün ARV aracılı degradasyonunun pankreas kanserini tedavi etmede potansiyel bir rolünün olduğu bildirilmiştir. Bu da ARV'nin pankreas kanseri hücrelerinde önemli sitotoksik ve apoptotik aktivite gösterdiği 2D ve 3D hücre kültürü deneylerinde gösterilmiştir (Minko, 2020). Bazı PROTAC'lar, lösemi ve katı tümör hücrelerini *in vitro* olarak etkin bir şekilde öldürebilen geniş spektrumlu anti tümör aktiviteye sahiptir. Bununla birlikte, katı tümörlere (Tang ve ark., 2020) karşı hematolojik malignitelerde, PROTAC stratejisi kullanılarak PROTAC'ların etkinliğini değerlendirmek ve hedef tümör tiplerini belirlemek önem arz etmektedir (He ve ark., 2020).

## 1.7. PROTAC'ların Küçük Molekül İnhibitörler ve Monoklonal Antikorlarla Karşılaştırılması

Geleneksel olarak küçük kimyasal moleküller, proteinin aktivitesini inhibe etmeyi amaçlayan spesifik proteinleri bağlamak için kapsamlı bir şekilde sentezlenmiş moleküllerdir. Tedavi sürecinde veya sonrasında oluşan ilaç direnci (DeGruttola ve ark., 2000), sıklıkla küçük molekülü inhibitörler kullanıldığında ortaya çıkmakta ve proteinlerin birikmesine yol açmaktadır (Zeng ve ark., 2021). Ayrıca tümör oluşumu sırasında belirli bir mutasyona sahip bazı proteinlerin dayanıklı yapıları nedeniyle gösterilen birçok çabaya rağmen küçük molekülü inhibitörleri tam anlamıyla tanımlamada başarısız olunmuştur (Wang ve ark., 2020). Son zamanlarda ilaç tasarımcıları küçük inhibitörleri geliştirmek için kritik olan protein-protein etkileşimini hedeflemeye odaklanmışlardır. Büyük uğraşlar sonucunda protein degradasyonunu indüklemek için gelecek vaat eden teknolojilerden biri olan PROTAC'ı keşfetmişlerdir (Nalawansa ve Crews, 2020). PROTAC'lar, geleneksel küçük molekül inhibitörlerine (SMI) kıyasla potansiyel olarak avantaj teşkil etmektedirler (He ve ark., 2020). Olaya dayalı farmakoloji gibi benzersiz etki mekanizmasıyla ilgili olarak bir PROTAC molekülü, çoklu POI

moleküllerinin degradasyonunu katalize etme yeteneğine sahiptir. Bu katalitik etki modu nedeniyle SMI'lerin toksisitelerini azaltabilecek, PROTAC'ların, SMI'lerden daha düşük konsantrasyonlarda olması gerekmektedir (Li ve ark., 2021). PROTAC'lar, işbirlikçi bir üçlü kompleks oluşturma gereksinimi nedeniyle ilave seçicilik katmanı sağlarken, SMI'leri ise hedeflerin afinitesine bağlı olarak etkinlik ve özgüllük kavramlarını oluşturabilmektedir (McCoull ve ark., 2018). Bu nedenle aktif bir bağlanma bölgesi veya mutasyona uğramış proteinler olmadan dayanıksız proteinleri etkilememektedir. PROTAC'lar, dayanıklı olmayan proteom ve mutasyona uğramış proteinleri hedefleyebilmekte (Sun ve ark., 2018) ve aynı zamanda, tümöre özgü E3 ligazları kullanarak tümör seçiciliğini elde edebilmektedir (He ve ark., 2020). PROTAC'lar, küçük molekül inhibitörlerinden daha güçlü anti-proliferatif aktivite sergilemektedirler. Geleneksel inhibitörler tarafından yönlendirilen doluluktan farklı olarak, PROTAC kaynaklı protein degradasyonu (Raina ve ark., 2016) olay güdümlüdür (bir olayın ardından ilgili metotların tetiklenmesi). Bu nedenle teorik olarak hedef protein degradasyonunu hızlandırmak için yalnızca katalitik miktarda PROTAC'lara ihtiyaç vardır (Weng ve ark., 2021). Ayrıca PROTAC'lar, küçük moleküller tarafından inhibe edilmesi zor olan hedeflerin degradasyonunu indükleyebilir ve yeni ilaç geliştirmek için hedef aralığını genişletebilmektedir (Zhang ve ark., 2020). İnhibitörler, bir protein alanına bağlanarak çalışmaktadır, fakat proteinler çoklu alanlardan oluşmakta ve bağlanamayan protein alanları bu durumdan etkilenmemektedir. Bağlayıcı bölgeleri olan proteinler, tüm proteomun yalnızca küçük bir bölümünü oluşturmakta ve inhibitörler tarafından işlenemeyen çok sayıda dayanıksız proteinleri barındırmaktadır (Pu ve ark., 2019). Bunun yanı sıra inhibitörlerin çalışması için yüksek ilaç konsantrasyonlarına ihtiyaç vardır ve yan etkileri de beraberinde getirmektedir (Zhou ve ark., 2020). Küçük molekül inhibitörleri, hedef proteinler üzerindeki bölgeleri işgal ederek POI'nın işlevini olumsuz yönde etkilemektedir. Ardından POI'dan ayrıldıktan sonra etkileri kaybolduğu için buna "doluluk odaklı model" adı verilmektedir. Protein inhibisyonu sitokiyometrikdir ve bir inhibitör molekülü sadece bir hedef protein molekülünü inhibe edebilmektedir. Öte yandan PROTAC'lar "olay odaklı model" aracılığıyla çalışır ve her yerde bulunan POI'nın degradasyonu, PROTAC'ların ayrılmasından sonra bile devam edebilmektedir (Hu ve Crews, 2022). Geleneksel inhibitörlerin rekabete dayalı ve doluluk odaklı sürecinden farklı olarak PROTAC'lar, düşük maruziyetlerde hedef protein degradasyonunu destekleyebilen katalitik etkiye sahiptir. PROTAC'lar, geleneksel terapi (inhibitör/aktivatör) ile elde edilemeyen hedef patojenik proteinleri parçalama ve ilgili sinyal yollarını düzenleme potansiyeline sahiptir (Saeki ve ark., 2012). Geleneksel küçük molekül inhibitörleri genellikle hedefin enzimatik aktivitesini inhibe ederken, PROTAC'lar sadece proteinin enzimatik aktivitesini değil, aynı zamanda tüm proteini parçalayarak enzimatik olmayan aktiviteyi de etkilemektedir (Klein ve ark., 2020). PROTAC, mevcut hedeflerin ilaçlanabilir alanını genişletebilmekte ve geleneksel küçük molekül inhibitörleri tarafından kontrol edilmesi zor olan proteinleri düzenleyebilmektedir (Sun ve ark., 2020). PROTAC'lar ile SMI'ler ve monoklonal antikolar (mAb'ler) arasında bir karşılaştırılma yapılmaktadır. Bu durumda PROTAC'lar, iskelet proteinlerini hedefleyebilir; "dengesiz" hedefleri bozabilir, SMI'ler ise iskelet

proteinlerini hedef alamaz ve dengesiz hedefi hedefleyemez. PROTAC'lar, oral olarak biyolojik yolla temin edilebilirken, mAb'ler oral olarak biyoyayarlı değildir ve yalnızca zar proteinlerini hedefleyebilmektedir (Liu ve ark., 2020). Geleneksel küçük molekül inhibitörleri, proteinin işlevini bloke ederek etki gösterirken, PROTAC'lar proteinleri proteozom yoluyla bozarak işlev görmektedir (Wang ve ark., 2022).

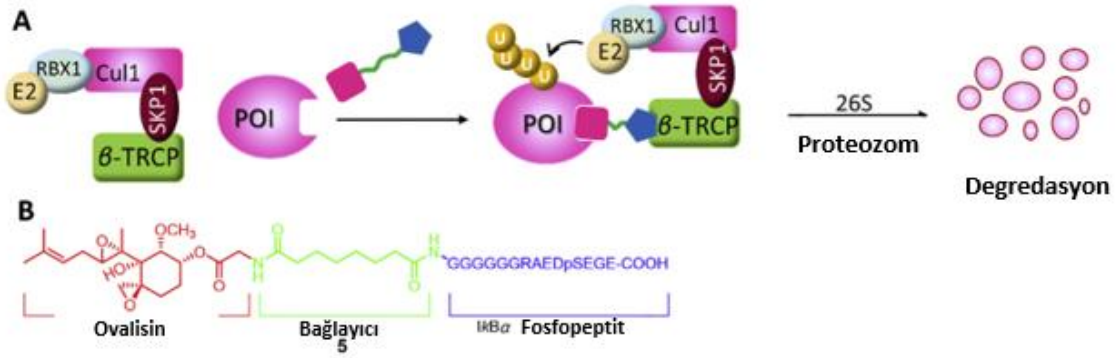
### **1.8. İlaç Direncinin Üstesinden Gelen PROTAC**

İlaç direnci, mevcut klinik tedavide büyük bir zorluk haline gelmektedir (Kordestani ve ark., 2012). Yeni hedeflerin ve ilaç keşif stratejilerinin gelişmesiyle birlikte patojenik proteinleri veya reseptörleri hedef alan, kanser tedavisinde kullanılabilecek güçlü ilaçlar ortaya çıkmaktadır (Wang ve Zhou, 2018). Özellikle son 20 yılda kinaz inhibitörlerinin güçlü gelişimi klinik uygulamada şaşırtıcı sonuçlar elde etmiş ve yaşam kalitesini büyük ölçüde iyileştirmiştir. Hedefe yönelik ilaçların önemli etkilerine rağmen, hastalar genellikle bir tedavi periyodundan sonra değişen derecelerde ilaç direnci geliştirmektedir. Oluşan bu ilaç direnci de hastalığın nüksetmesine neden olmaktadır. Bu nedenle kazanılmış ilaç direncinin üstesinden gelmek için yeni teknolojilerin geliştirilmesine önem verilmiştir (Sun ve ark., 2020). PROTAC teknolojisi, enzalutamide dirençli prostat kanseri için androjen reseptörünü hedeflerken (Barfeld ve ark., 2017), ilaca dirençli meme kanseri için östrojen reseptörünü hedeflemektedir (Pietri ve ark., 2016). Diğer yandan, İbrutinib dirençli lenfoma için BTK'yı ve kastrasyona dirençli prostat kanseri için BET proteinlerini hedefleme gibi ilaç direncinin üstesinden gelen onkojenik hedefi degrade etmede başarıyla kullanılmıştır (Zeng ve ark., 2021). PROTAC'lar, POI'nin mutasyonlarından kaynaklanan ilaç direncinin üstesinden gelmek için de kullanılabilmektedir. Örneğin BCR-ABL mutantları (Yang ve ark., 2020), reseptör tirozin kinazlar (RTK) (Buhimschi ve ark., 2018), östrojen reseptör alfa (ER $\alpha$ ) (Lin ve ark., 2020) ve Brutan tirozin kinaz (BTK) (Tinworth ve ark., 2019) gibi proteinlerin mutasyona uğramış formlarını hedefleyen PROTAC'lar rapor edilmiştir (He ve ark., 2020). Hedef proteine bağlanan bir ilacın kısa bir süre içerisinde birikmesine yol açabilmektedir. Bu durumu açıklayan iki mekanizma bulunmaktadır. İlk olarak ilaç bağlanması, proteini stabilize edebilmekte ve böylece yarı ömrünü uzatabilmektedir. Bu fenomen, bazen küçük moleküllü problemleri taramak, bazen de hedef etkileşimi doğrulamak için kullanılmaktadır. İlaça maruziyet durumunda, protein seviyelerinin yüksek miktarda ortamda birikmesi ve bununla eş zamanlı olarak inhibitör seviyelerinin en aza indirilmesi, protein stabilizasyonunun olumsuz bir sonucu olarak karşımıza çıkmaktadır (Neklesa ve ark., 2017). İkinci mekanizmada, belirli durumlarda hedefi antagonize ederek, transkripsiyonel seviyede telafi edilebilir yüksek ekspresyon seviyelerini göstermelerine yol açmaktadır. Örneğin, AR kendi transkriptinin transkripsiyonel bir baskılayıcısı olarak hareket etmektedir. İnhibitörlerle AR baskısı üzerine AR'nin mRNA seviyesi artar, bu da daha yüksek ve daha düşük AR seviyelerine eşlik ederek duyarlaşmaya neden olmaktadır (Rashighi ve Harris, 2017). İlaç hedefi birikiminin tüm mekanizmaları, inhibitörün etkinliğine zarar verebilmektedir. (Hu ve Crews, 2022). BRD4 PROTAC'lar ile yakın zamanda yayınlanan sonuçlar,

BRD4 inhibitörlerinin BRD4 artan regülasyonu nedeniyle hızla etkinliğini kaybederken, BRD4 PROTAC'ların BRD4 yıkımını ve transkripsiyonel olarak baskılandığını göstermektedir (Gadd ve ark., 2017). Yakın tarihli bir çalışmada, BRD4'e karşı VHL bazlı ve CRBN bazlı PROTAC'ların kullanılmasının, ilaç direncine yol açtığı bildirilmiştir. Ancak daha fazla kanıt ile elde edilen bu direncin, E3 ligaz kompleksinin çekirdek bileşenindeki genomik değişiklikten kaynaklandığı gösterilmiştir (Liu ve ark., 2020). Nokta mutasyonlarının ortaya çıkması, edinilmiş ilaç direncinin yaygın bir mekanizması olarak bilinmektedir. HIV tedavisinde antivirallere veya kanserde BCR-ABL, AGFR, ALK ve BTK inhibitörlerine karşı direncin ortaya çıkması durumunda, ilaç hedefindeki mutasyonlar neredeyse kaçınılmaz olmaktadır (Roskoski, 2017). Bu mutasyonların proksimal doğası, genellikle ilacın bağlanmasını önlemekte ve böylece etkinliğini bloke edebilmektedir. Yine de hedefin tamamen ortadan kaldırılmasının gerekli olduğu reseptör kompleksinde başka modifikasyonlar da yer almaktadır (Farnaby ve ark., 2021). PROTAC'lar tarafından hedeflenen protein degradasyonu, bu direnç mekanizmalarını hedeflemek için alternatif bir yaklaşım sunmaktadır. İlgili proteinin ortadan kaldırılması, inhibitörlere dirençli yardımcı proteinlerle ilaç hedef kompleksinin gelişmesini engellemektedir. Daha da önemlisi bu direnç mekanizmalarından bazıları klinik deneylerde direnç ortaya çıkana kadar tahmin edilemediğinden, PROTAC yönteminin ilaç geliştirme programlarının riskini de azaltabileceği düşünülmektedir (Neklesa ve ark., 2017). Kanser hücreleri hayatta kalabilmek için belirli bir hedefe bağlı olabilir ve bu hedefi ilaçlamak için alternatif stratejileri kullanarak etki sağlayabilmektedir. PROTAC teknolojisi kullanılarak proteinlerin parçalanması, bu stratejinin ilaç direncinin üstesinden gelebileceğini kanıtlamıştır. PROTAC'lar tarafından elde edilen bu etki modundaki değişiklik, kanser hücrelerinin yeniden duyarlı hale getirilmesine izin vermektedir (Rashighi ve Harris, 2017).

### **1.9. Geçmişten Geleceğe PROTAC Çalışmaları**

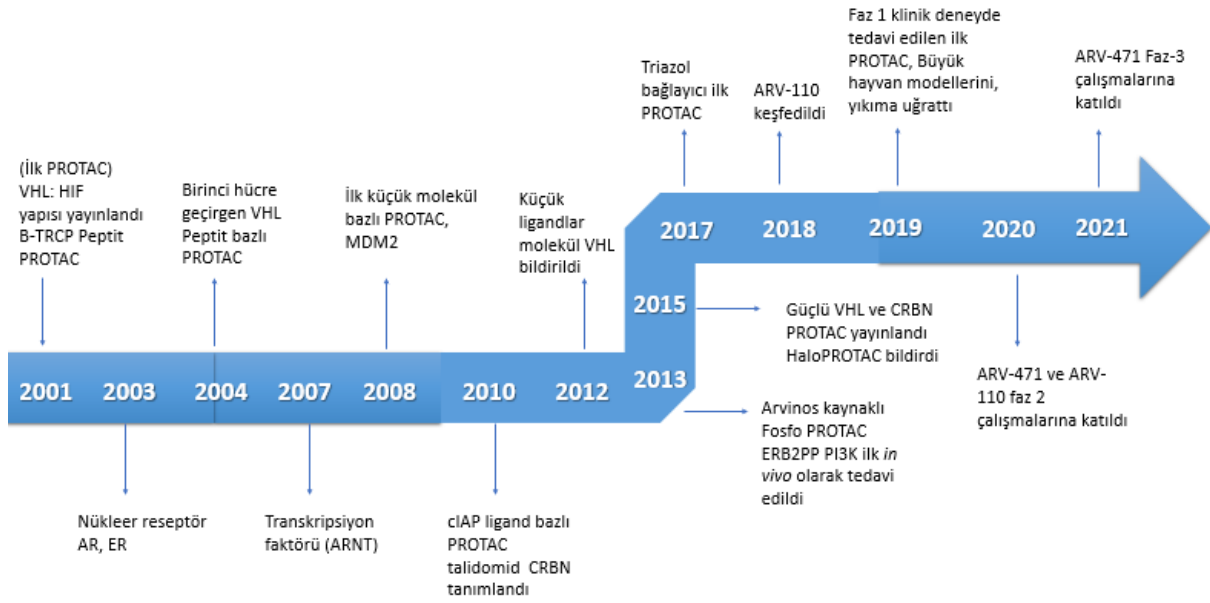
PROTAC çalışmalarına kronolojik sırayla bakacak olursak, 2000 yılında Zhou ve arkadaşları maya ve insan osteosarkom SARS-2 hücrelerinde pRB'yı hedeflemek için spesifik bir protein etkileşim alanı kullanarak SCF E3 ubiquitin ligaz kompleksini tasarlamışlardır (Zhou ve ark., 2000). Bu çabalar sonucunda Kathleen M. Sakamoto ve Raymond J. Deshaies tarafından Kyungbo Kim, Frank Mercurio ve Craig M. Crews ile birlikte 2001-2003 yıllarında geliştirilen bu çalışma, PROTAC'ların öncülü olarak kabul edilmektedir (Zou ve ark., 2019).



**Şekil 9.** İlk PROTAC. (A) PROTAC'ın ilk şematik diyagramı. Bu PROTAC, MetAP-2 ubiquitasyonu tetikleyen MetAP-2 ile bağlanmak için bir bağlayıcı ve ovalisin olan E3 ubiquitin ligaz SCFb-TRCP'yi almak için İKBa'dan türetilen bir fosfopeptid içerir. (B) Bileşik 5: Birinci PROTAC'ın yapısı, Mavi: hedef proteinler için ligand, Kırmızı: E3 ubiquitin ligazını almak için ligand (Wang ve ark., 2020).

Bu çalışmada, ubiquitin E3 ligazın, SCF  $\beta$ TrCP'ye bağlandığı bilinen bir İKBa fosfopeptid epitopuna bağlı küçük moleküllü MetAP2 inhibitörü kullanılmıştır. Diğer yandan, ovalisinin bir hibriti kullanılarak aminopeptidaz MetAP2'nin hücrel degradasyonu gerçekleştirilmiştir (Zhang, 2004). Proteolizi hedefleyen kimera (PROTAC) terimini ilk kez kullanan bu çalışmada, üçlü bir kompleks oluşumu yüksek PROTAC konsantrasyonlarında *Xenopus* özütlerinde gösterilmiştir (Sakamoto ve ark., 2001). Bu dönüm noktası niteliğindeki çalışma, konseptin uygulanabilirliğini göstermiş, fakat ligaz alımı için yüksek oranda yüklü bir peptid parçasına gereksinim duyulmuştur. Bu nedenle hücrel bir ortamda degradasyon olasılığının düşük olması ve böylelikle ilaç keşfine yönelik uygulamaların hala net olmaması düşünülmüştür (Békés ve ark., 2022). O zamanlar kimyasal biyoloji uygulamaları için protein yıkımı açık bir şekilde gerçekleşmesine rağmen, çalışma ilaç keşif gruplarından çok az ilgi görmüştür. Bu erken çığır açan çalışmaların bir başka ilginç tuhaflığı, kovalent bir etkileşim yoluyla MetAP2'ye bağlanan bir ovalisin türevinin seçiminden kaynaklanmıştır. Aynı zamanda bu kovalent etkileşim, PROTAC'ların katalitik etkisini engellemekte ve potansiyel olarak gözlenen degradasyon etkinliğini sınırlandırmaktadır (Churcher, 2018).





**Şekil 10.** PROTAC teknolojisinin tarihsel gelişimindeki kilometre taşları (Langley ve Crews, 2022)' den modifiye edilmiştir.

Sonraki yıllarda östrojen reseptörü (ER) (Hu ve ark., 2019) ve androjen reseptörü (AR) (Neklesa ve ark., 2019) gibi hedefleri bozmak için bir dizi ek PROTAC karakterize edilmiştir. Fakat yine de peptidik ligandlara olan güven bozulmamış ve hücreler için de bozulmayı göstermek için mikroenjeksiyon gerekmiştir. PROTAC'ların ilaç keşfinde kullanıma yönelik evrimindeki bir sonraki önemli adım, peptit olmayan E3 ligaz bağlayıcı kısımların degradasyon kanıtı göstermeye başladığı zaman olarak kabul edilmektedir (Hughes ve ark., 2021). Elde edilen bu veriler, cesaret vericiydi fakat aynı zamanda bir PROTAC'a dahil edilebilecek E3 ligazları için daha fazla ilaca benzer ligand bulma ihtiyacı gerekmekteydi. 2004'ün başlarında ilk peptidik PROTAC makalesi yayınlandığında (Zhang, 2004), iki makale HIFa peptidin E3 VHL'ye bağlanma modunu tanımladığını bildirmiştir (Song ve ark., 2020). VHL'nin HIFa'nın degradasyonuna aracılık ettiği biliniyordu (Maranchie ve ark., 2002) ve VHL'ye bağlanmadan önce gerçekleşmesi gereken HIFa üzerinde spesifik bir prolin P564 hidroksilasyonu olduğu gösterilmişti. SCF  $\beta$  TRCP, kısa hipoksiprolinpeptitler, VHL E3 ligazını almak için peptidik PROTAC'a dahil edilmiş ve bu PROTAC'ların FKBP12 ve AR'nin degradasyonuna yol açtığı gösterilmiştir (Schneekloth ve ark., 2004). PROTAC'taki HIFa parçasının peptidik yapısı, bunların *in vivo* kullanımını sınırlamış ancak hidroksiprolin çekirdeğinin iyonik olmayan yapısı ilaca benzer E3 ligaz elde edileceğini öne sürmüştür (Neklesa ve ark., 2017). 2008'de E3 ligaz MDM2'ye bağlandığı açıklanan bir Nutlin, hücrelerin içinde 10  $\mu$ M'lık bir konsantrasyonda peptidik olmayan PROTAC'lar verilerek androjen reseptörüne yönelik ligandlarla birleştirilmiştir (Xia ve ark., 2008). Degradasyonun, proteozomal bağımlı olduğu gösterilmiş olmasına rağmen, açıklanan sınırlı verilerden birçoğu AR ligandının kendilerinin aynı kökenli

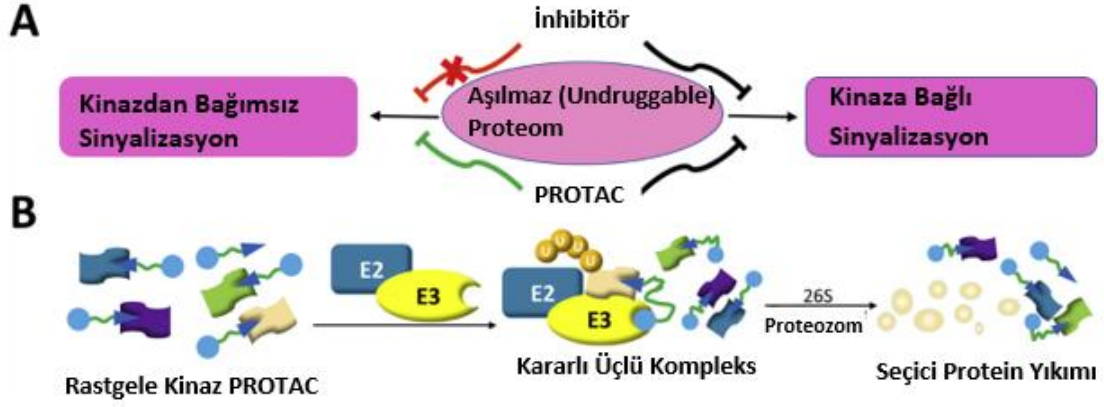
reseptörlerini kararsızlaştırdığını belirtmiştir. Aynı zamanda başka bir şekilde degradasyonuna izin verdiği göz önüne alındığında, MDM2 bağlanmasının gerekli olup olmadığını değerlendirmek zor olmuştur (Churcher, 2018). Bununla birlikte Nutlin'in MDM2 ligandlarının bir PROTAC ortamında, E3 ligaz toplama kısmının da dahil edilerek test edilmesi istenmiştir. Bunun sonucunda ne yazık ki PROTAC'ların güçleri buna yeterli olmamıştır (Neklesa ve ark., 2017). PROTAC'ların daha fazla ilerlemesinde önemli bir gelişme olarak 2010-2012'de daha fazla ilaca benzer E3 ligaz bağlayıcılarının tamamlanması ile gerçekleşmiştir. Craig Crews, Alessio Ciulli grupları ve ardından GSK'da küçük bir grup ilaç keşif bilimcisi, alt tabakası HIF-1a'ya bağlanan VHL'nin ayrıntılı X ışını ve biyofiziksel analizinden elde edilen bilgileri kullanmıştır. Sonrasında doğal peptidik VHL alt tabakasını taklit etmek için peptidik olmayan ligandları başarılı bir şekilde tanımlayarak parça-bazlı ilaç tasarım ilkelerini uygulamıştır (He ve ark., 2020). 2012'deki bir dizi yayın, HIFa ve VHL etkileşiminin küçük molekül inhibitörlerinin gelişimine katkı sağladığını bildirmiştir (Porta ve ark., 2012). PROTAC'ların geleneksel küçük moleküller gibi davranması sağlanabilmiş fakat bunların etki biçimleri kişiye yeni terapötik işlevler kazandırmıştır. 2013'te Arvinas'ın ve C4 Therapeutic'in kurulmasıyla kanıtlandığı gibi PROTAC'ların pazarlanan ilaçlara dönüştürmeye yönelik ticari bir ilgileri bulunmuştur (Neklesa ve ark., 2017) 2013 yılında reseptörlerle etkileşime giren protein kinaz-2'ye (RIPK2) bir ligand bağlandığında ilk kez 1 nm civarında, oldukça güçlü hücresel etkiler veren bir PROTAC keşfedilmiş ve bu PROTAC'ın önceki moleküllerden daha aktif olduğu görülmüştür (Lupfer ve ark., 2013). Önemli olarak degradasyonun E3 ligaz bağımlılığı, ligaz işlevini yerine getiremeyen ve degradasyona sebep olmayan bir VHL bağlayıcı olmayan enantiyomerik kontrol kullanılarak doğrulanmıştır (Gadd ve ark., 2017). Etki mekanizması, varsayılan üçlü kompleksin oluşumunun gösterilmesiyle daha da doğrulanmış ve substratın kullanımıyla PROTAC'ların etkisinin degradasyona aracılık ettiği gösterilmiştir. Bu önemli yaklaşım, diğer küçük moleküllü farmakolojik müdahalelerin çoğundan ayrılan benzersiz bir PROTAC eylemi yönünü doğrulamıştır. Yani doluluk odaklı farmakolojiden ziyade olay odaklı olduğu belirlenmiş, bununla birlikte mekanizmanın da oldukça seçici olduğu gösterilmiştir (Churcher, 2018). 2015 yılında hızlı bir şekilde art arda yayımlanan PROTAC'ların ilk kez ilaç keşfine gerçek bir uygulamalı yaklaşım olarak geldiği duyurulmuştur. PROTAC yaklaşımlarına yatırım ve ilgi düzeyi önemli ölçüde artmış, dikkatler PROTAC fikirlerinin test edilebilmesi için ele alınmasını gerektiren çok sayıda soru elde etmiştir (Dale ve ark., 2021). Yine 2015 yılı içerisinde küçük moleküllü VHL tabanlı PROTAC'lar hakkında bir dizi yayın yayınlanmıştır. VHL'nin yanı sıra talidomidin E3 ligaz Cereblon ile etkileşime girdiğinin anlaşılması nedeniyle birkaç grup tarafından E3 parçaları olarak talidomid analoglarının kullanıldığı ve bu nedenle PROTAC'ların oluştuğu belirtilmiştir (Lu ve ark., 2015). Şimdiye kadar hem VHL hem de Cereblon tabanlı PROTAC'lar keşfedilmiş, doğrulanmış ve yayınlanmıştır (Neklesa ve ark., 2017). İlk küçük moleküllü PROTAC'ın literatürde bildirilmesinden bu yana geçen 20 yıl içerisinde, akademiden birkaç teknoloji ve ilaç şirketinin klinik öncesi ve erken klinik gelişim programlarını yaydığı endüstriye geçilmiştir. 2018'de ilk PROTAC molekülleri klinik testlere girmiş, 2020'de bu denemeler

iki köklü kanser hedefine karşı modalite için ilk klinik kavram olan östrojen reseptörü (ER) ve androjen reseptörü (AR) olarak kanıtlanmıştır (Békés ve ark., 2022). 2020’de, ARV-110 ve ARV-471’in faz 1 denemelerinden (Cimas ve ark., 2020) bildirilen ilk olumlu veriler yalnızca bileşiklerin kendileri için değil, tüm TPD alanı için temel sorulara yanıt bulmuştur. Aynı zamanda tolere edilebilirlik ve etkinlik açısından umut verici veriler ortaya çıkarmıştır (Ishida ve Ciulli, 2021). PROTAC teknolojisi keşfedilmesinden bu yana hem temel biyolojik araştırmalarda hem de terapötik geliştirmede yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Yıllar boyunca PROTAC teknolojisi nükleer reseptörler, kinazlar, G- protein bazlı reseptörler (GPCR’ler), transmembran proteinler, epigenetik proteinler, küçük GTPaz’lar, transkripsiyon faktörleri ve protein agregatları gibi birçok protein sınıfına başarıyla uygulanmıştır (Nalawansha ve Crews, 2020). Yeni ve gelecek vaat eden teknikler olarak PROTAC’lar ilaca dirençli hedeflere karşı özel bir hassasiyet göstermiştir. Kemoterapi geleneksel olarak kanser tedavileri için ana tedavi yöntemi olarak yerini almıştır. Bu nedenle kemoterapi ilaçlarına karşı kazanılan direnç nedeniyle klinik uygulamalar engellenmiş ve hastalıkların nüksetmesi ile sonuçlanmıştır. Yeni hedefler ve yeni ilaç keşif teknolojileri üzerine araştırmaların ilerlemesiyle birlikte, onkojenik proteinlerin veya reseptörlerin işlevlerini doğrudan spesifik olarak küçük moleküller ile inhibe etmek için güçlü stratejiler ortaya çıkmaya devam etmektedir (Sun ve ark., 2019).

#### **1.10. PROTAC’ların Avantajları ve Gelecekteki Zorlukları**

Son yirmi yılda PROTAC’lar, dikkate değer başarılar elde etmiştir. Özellikle birinci ve ikinci oral PROTAC’ların klinik deneylere girmesiyle bu yeni teknoloji, ilaç geliştirme için yeni bir kapı açmıştır. Diğer yeni teknolojiler gibi PROTAC da benzeri görülmemiş fırsatlar ve zorluklar ile karşı karşıya kalmaktadır (Zeng ve ark., 2021). PROTAC teknolojisinin avantajlarına baktığımızda, ilk olarak PROTAC’lar düşük konsantrasyonlarda bile protein degradasyonunu etkili bir şekilde indükleyebilmektedir (Burslem ve ark., 2018). Bununla birlikte PROTAC’lar kinaz grubunda yeniden bağlanma endişesi olmaksızın daha etkili ve daha dayanıklı sinyal iletim inaktivasyonu ve büyüme inhibisyonu ile karşılaşmaktadır. PROTAC’lar aynı zamanda mutant proteinlerin ayrılmasını önlemek için degradasyonunu indükleyebilmektedir (Wang ve ark., 2020). PROTAC’ların diğer bir avantajı da izoform seçici protein bozulmasını indükler ve Pan inhibitörleri, izoform arasındaki dizi ve yapısal benzerlikler nedeniyle çoklu izoformları bağlayarak inhibe edebilmektedir. PROTAC’lar hem enzimatik hem de enzimatik olmayan rolleri ortadan kaldırmak için çok alanlı proteinlerin degradasyonunu uyarabilmektedir (Mares ve ark., 2020). Bunların yanı sıra PROTAC’lar rastgele ligandları seçici yıkıcılara dönüştürür ve rastgele inhibitörler birden fazla proteine bağlanır. Bununla birlikte rastgele inhibitörden türetilen PROTAC’lar, bağlı proteinlerin degradasyonunu indükleyemez. Son olarak PROTAC’lar, proteozomal degradasyon için çok bileşenli kompleksleri hedefleyebilmektedir. Bir kompleksteki tek bir proteine bağlanan inhibitörler, protein kompleksinin iskele fonksiyonlarını bloke etmede etkisizdir. PROTAC’lar protein kompleksine tek bir protein alt

birimi yoluyla bağlanır ve kompleks içindeki birçok proteinin degradasyonunu indükleyebilmektedir (Nalawansha ve Crews, 2020).



**Şekil 11.** PROTAC'ların avantajları. (A) PROTAC hem kinaza bağımlı hem de bağımlı olmayan proteini parçalamak için inhibitörlere göre avantajlıdır. (B) Degradasyon için E3 ile potansiyel bir substrat arasında kararlı bir üçlü kompleks gereklidir (Wang ve ark., 2020).

PROTAC'lar, potansiyel terapötik ajanlar olarak gelişimleriyle ilişkili benzersiz zorluklara sahiptir ve PROTAC'ların hücre zarına nasıl nüfuz ettiği ile ilgili mekanizma hala yeterince açık değildir. PROTAC'ların absorpsiyonunu, dağılımını, metabolizmasını, atılımını ve toksisitesini aydınlatmak için daha fazla teori ve uygulamaya gereksinim duyulmaktadır (Li ve ark., 2021). Farmakolojik aktivite için zorunlu PROTAC konsantrasyonunu korumak ve ideal fizikokimyasal özelliklere sahip moleküller elde etmek için hücre alımını, biyoyararlanımını arttırmak hala çok büyük bir zorluktur (Zeng ve ark., 2021). PROTAC teknolojisinin ilaç geliştirmede parlak bir geleceği olmasına rağmen, birçok zorlukla da karşı karşıya kalmaktadır. Şimdiye kadar uğraşılmaz bir hedef için rapor edilen yalnızca bir PROTAC örneği bulunmaktadır; fakat PROTAC'ların avantajlarını gelecekte uğraşılmaz hedeflerde kanıtlamak için daha fazla vakaya ihtiyaç duyulmaktadır. PROTAC, katalitik modda hareket ettiğinden geleneksel yöntemler PROTAC'ların farmakokinetik (PK) ve farmakodinamik (PD) özelliklerini doğru bir şekilde değerlendirememektedir (Liu ve ark., 2021). Bu nedenle PROTAC'lar için PK ve PD değerlendirme sistemleri oluşturularak daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. PROTAC'larda, özellikle de protein-protein etkileşimlerini hedefleyenlerde kullanılabilen hedef protein ligandlarının nasıl hızlı ve etkili bir şekilde taranacağı başka bir zorluk olarak bilinmektedir (Juan ve ark., 2022). Bozunma aktivitesinin, seçiciliğin ve olası hedef dışı etkilerin (farklı hedeflere, farklı hücre hatlarına ve farklı hayvan modellerine dayalı olarak) nasıl anlaşılacağı ve PROTAC'ların rasyonel olarak nasıl tasarlanacağı hala belirsizliğini korumaktadır. İnsan genomu 600'den fazla E3 ubiquitin ligazını kodlamaktadır. Ancak PROTAC'ların tasarımında kullanılan çok az sayıda E3 ligazı (VHL, CRBN, CIAP ve MDM2) bulunmaktadır (Li ve ark., 2020). E3 ubiquitin ligaz kapsamının nasıl genişletileceği bu alanda karşılaşılan bir diğer zorluktur. PROTAC teknolojisi hızla gelişmekte ve hem

akademi hem de endüstrideki çok sayıda bilim insanının ortak çabalarıyla bu sorunlar yakın gelecekte çözülmeyi beklemektedir (Sun ve ark., 2020).

## **2. Sonuç**

PROTAC teknolojisi, son yıllarda kanseri tedavi etme ve ilaç geliştirmede önemli başarılarla imza atmış bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte bu strateji, geleneksel tedavi yöntemlerinin yetersiz ve ilaç direncinin düşük olduğu durumlarda yeni bir modalite olarak karşımıza çıkmaktadır. PROTAC'ları diğer tedavi stratejilerinden ayıran en önemli özelliklerinden biri, hedeflerinin işlevsel olarak yıkılmasını sağlamak için geçici ve zayıf etkileşimleri kullanmalarıdır. PROTAC'lar bu yeteneklerinden yararlanarak doluluk odaklı paradigmalarda etkisiz hale getirilen ligandları yeniden devreye koyabilmektedir. Aynı zamanda PROTAC'ların geleneksel küçük molekül inhibitörlerine karşı önemli bir avantajı ise benzersiz katalitik etki modeline sahip olmasıdır. Teorik olarak benzersiz etki mekanizması ve katalitik karakteri sayesinde optimal farmakokinetik potansiyel teşkil etmektedir. Bununla birlikte PROTAC'lar, hedef protein rezervuarlarını hızlı ve verimli bir şekilde tüketmek için POI degradasyonunu indükleyebilmektedir. Önceden var olan POI rezervuarlarının çıkarılmasıyla yeni sentezlenen POI'yu parçalamak için az miktarda PROTAC molekülüne ihtiyaç duyulmaktadır. Fakat birçok proteinin oldukça yavaş çevrilmesi gibi durumlar göz önüne alındığında var olan PROTAC'ların düşük seviyelerde bile hedef proteinleri verimli bir şekilde degradasyona uğratabileceği bilinmektedir. PROTAC'lar, birçok çalışmada potansiyel hedef olarak kullanılmalarına rağmen, klinik uygulama ile ilgili pek çok endişe halen devam etmektedir. Hızla gelişmekte olan PROTAC teknolojisi hem akademide hem de endüstrideki çok sayıda bilim insanının ortak çabalarıyla bu sorunların yakın gelecekte çözülmesi beklenmektedir.

## **Teşekkür**

Bingöl Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Doktora öğrencisi Deniz Özdemir'e yardımlarından dolayı teşekkür ederiz.

## **Çıkar Çatışması Beyanı**

Makale yazarları herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

## **Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti**

Yazar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduğunu beyan eder.

## Kaynakça

- Alabi S., Jaime-Figueroa S., Yao Z., Gao Y., Hines J., Samarasinghe KTG., Vogt L., Rosen N., Crews CM. Mutant-selective degradation by BRAF-targeting PROTACs. *Nature Communications* 2021; 12(1): 1–11.
- Albitar L., Carter MB., Davies S., Leslie KK. Consequences of the loss of p53, RB1, and PTEN: Relationship to gefitinib resistance in endometrial cancer. *Gynecologic Oncology* 2007; 106(1): 94–104.
- Amiri-Kordestani L., Basseville A., Kurdziel K., Fojo AT., Bates SE. Targeting MDR in breast and lung cancer: Discriminating its potential importance from the failure of drug resistance reversal studies. *Drug Resistance Updates* 2012; 15(1–2): 50–61.
- Bakhache W., Neyret A., McKellar J., Clop C., Bernard E., Weger-Lucarelli J., Briant L. Fatty acid synthase and stearoyl-CoA desaturase-1 are conserved druggable cofactors of Old World Alphavirus genome replication. *Antiviral Research* 2019; 172(July): 104642.
- Barfeld SJ., Urbanucci A., Ikonen HM., Fazli L., Hicks JL., Thiede B., Rennie PS., Yegnasubramanian S., DeMarzo AM., Mills IG. c-Myc Antagonises the transcriptional activity of the androgen receptor in prostate cancer affecting key gene networks. *EBioMedicine* 2017; 18: 83–93.
- Békés M., Langley DR., Crews CM. PROTAC targeted protein degraders: the past is prologue. *Nature Reviews Drug Discovery* 2022; 21(3): 181–200.
- Bondeson DP., Mares A., Smith IED., Ko E., Campos S., Miah AH., Mulholland KE., Routly N., Buckley DL., Jeffrey L., Zinn N., Grandi P., Shimamura S., Bergamini G., Bantscheff M., Cox C., Gordon DA., Willard RR., Flanagan JJ., Craig M. Catalytic in vivo protein knockdown by small-molecule PROTACs. *HHS Public Access* 2015; 11(8): 611–617.
- Buhimschi AD., Armstrong HA., Toure M., Jaime-Figueroa S., Chen TL., Lehman AM., Woyach JA., Johnson AJ., Byrd JC., Crews CM. Targeting the C481S Ibrutinib-resistance mutation in Bruton's tyrosine kinase using PROTAC-mediated degradation. *Biochemistry* 2018; 57(26): 3564–3575.
- Burslem GM., Schultz AR., Bondeson DP., Eide CA., Stevens SLS., Druker BJ., Crews CM. Targeting BCR-ABL1 in chronic myeloid leukemia by PROTAC-mediated targeted protein degradation. *Cancer Research* 2019; 79(18): 4744–4753.
- Burslem GM., Smith BE., Lai AC., Jaime-Figueroa S., McQuaid DC., Bondeson DP., Toure M., Dong H., Qian Y., Wang J., Cre, AP., Hines J., Crews CM. The advantages of targeted protein degradation over inhibition: An RTK case study. *Cell Chemical Biology* 2018; 25(1): 67-77.
- Chen Y., Jin J. The application of ubiquitin ligases in the PROTAC drug design. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 2020; 52(7): 776–790.

- Churcher I. Protac-Induced protein degradation in drug discovery: Breaking the rules or just making new ones? *Journal of Medicinal Chemistry* 2018; 61(2): 444–452.
- Cimas FJ., Niza E., Juan A., Noblejas-López MDM., Bravo I., Lara-Sanchez A., Alonso-Moreno C., Ocaña A. Controlled delivery of bet-protacs: In vitro evaluation of MZ1-loaded polymeric antibody conjugated nanoparticles in breast cancer. *Pharmaceutics* 2020; 12(10): 1–11.
- Collins GA., Goldberg AL. The logic of the 26S proteasome. *Cell* 2017; 169(5): 792–806.
- Dale B., Cheng M., Park KS., Kaniskan HÜ., Xiong Y., Jin J. Advancing targeted protein degradation for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 2021; 21(10): 638–654.
- DeGruttola V., Dix L., D'Aquila R., Holder D., Phillip, A., Ait-Khaled M., Baxter J., Clevenbergh P., Hammer S., Harrigan R., Katzenstein D., Lanier R., Miller M., Para M., Yerly S., Zolopa A., Murray J., Patick A., Miller V., Mellors J. The relation between baseline HIV drug resistance and response to antiretroviral therapy: Re-analysis of retrospective and prospective studies using a standardized data analysis plan. *Antiviral Therapy* 2000; 5(1): 41–48.
- Fang Y., Liao G., Yu B. Small-molecule MDM2/X inhibitors and PROTAC degraders for cancer therapy: advances and perspectives. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 2020; 10(7): 1253–1278.
- Farnaby W., Koegl M., McConnell DB., Ciulli A. Transforming targeted cancer therapy with PROTACs: A forward-looking perspective. *Current Opinion in Pharmacology* 2021; 57: 175–183.
- Gadd MS., Testa A., Lucas X., Chan KH., Chen W., Lamont DJ., Zengerle M., Ciulli A. Structural basis of PROTAC cooperative recognition for selective protein degradation Accession codes Atomic coordinates and structure factors for hsBrd4 BD2-MZ1-hsVHL-hsEloC-hsEloB have been deposited in the Protein Data Bank (PDB) under accession number. *Nat Chem Biol* 2017; 13(5): 514–521.
- Gao H., Sun X., Rao Y. PROTAC technology: Opportunities and challenges [Article-commentary]. *ACS Medicinal Chemistry Letters* 2020; 11(3): 237–240.
- Gao H., Zheng C., Du J., Wu Y., Sun Y., Han C., Kee K., Rao Y. FAK-targeting PROTAC as a chemical tool for the investigation of non-enzymatic FAK function in mice. *Protein and Cell* 2020; 11(7): 534–539.
- Guang-Wei Zhang., Li Shen., Wen Zhong., Ying Xiong<sup>1</sup>., Li I. Zhang., Huizhong W. Tao<sup>2</sup>. HHS Public Access. *Physiology & Behavior* 2016; 176(1): 139–148.
- Han X., Zhao L., Xiang W., Qin C., Miao B., Xu T., Wang M., Yang CY., Chinnaswamy K., Stuckey J., Wang S. Discovery of highly potent and efficient PROTAC degraders of androgen receptor (AR) by employing weak binding affinity VHL E3 ligase ligands. *Journal of Medicinal Chemistry* 2019; 62(24): 11218–11231.
- He W., Wei L., Zou Q. Research progress in protein posttranslational modification site prediction. *Briefings in Functional Genomics* 2019; 18(4): 220–229.
- He Y., Khan S., Huo Z., Lv D., Zhang X., Liu X., Yuan Y., Hromas R., Xu M., Zheng G., Zhou D.

- Proteolysis targeting chimeras (PROTACs) are emerging therapeutics for hematologic malignancies. *Journal of Hematology and Oncology* 2020; 13(1): 1–24.
- Helgason ÁR., Adolfsson J., Dickman P., Fredrikson M., Steineck G. Distress due to unwanted side-effects of prostate cancer treatment is related to impaired well-being (quality of life). *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* 1998; 1(3): 128–133.
- Hu J., Hu B., Wang M., Xu F., Miao B., Yang CY., Wang M., Liu Z., Hayes DF., Chinnaswamy K., Delproposito J., Stuckey J., Wang S. Discovery of ERD-308 as a highly potent proteolysis targeting chimera (PROTAC) degrader of estrogen receptor (ER). *Journal of Medicinal Chemistry* 2019; 62(3): 1420–1442.
- Hu Z., Crews CM. Recent developments in PROTAC-mediated protein degradation: From bench to clinic. *ChemBioChem* 2022; 23(2).
- Hughes GR., Dudey AP., Hemmings AM., Chantry A. Frontiers in PROTACs. *Drug Discovery Today* 2021; 26(10): 2377–2383.
- Inuzuka H., Liu J., Wei W., Rezaeian AH. PROTAC technology for the treatment of Alzheimer's disease: advances and perspectives. *Acta Materia Medica* 2022; 1(1): 24–41.
- Ishida T., Ciulli A. E3 ligase ligands for PROTACs: How they were found and how to discover new ones. *SLAS Discovery* 2021; 26(4): 484–502.
- Jackson AL., Linsley PS. Recognizing and avoiding siRNA off-target effects for target identification and therapeutic application. *Nature Reviews Drug Discovery* 2010; 9(1): 57–67.
- Jiang Y., Deng Q., Zhao H., Xie M., Chen L., Yin F., Qin X., Zheng W., Zhao Y., Li Z. Development of stabilized peptide-based PROTACs against estrogen receptor  $\alpha$ . *ACS Chemical Biology* 2018; 13(3): 628–635.
- Jin J., Wu Y., Chen J., Shen Y., Zhang L., Zhang H., Chen L., Yuan H., Chen H., Zhang W., Luan X. The peptide PROTAC modality: A novel strategy for targeted protein ubiquitination. *Theranostics* 2020; 10(22): 10141–10153.
- Juan A., del Mar Noblejas-López M., Arenas-Moreira M., Alonso-Moreno C., Ocaña A. Options to improve the action of PROTACs in cancer: Development of controlled delivery nanoparticles. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 2022; 9(February): 1–13.
- Kargbo RB. PROTAC-mediated degradation of estrogen receptor in the treatment of cancer. *ACS Medicinal Chemistry Letters* 2019; 10(10): 1367–1369.
- Khalil R. Ubiquitin-proteasome pathway and muscle atrophy. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 2018; 1088: 235–248.
- Klein VG., Townsend CE., Testa A., Zengerle M., Maniaci C., Hughes SJ., Chan KH., Ciulli A., Lokey RS. Understanding and improving the membrane permeability of VH032-based PROTACs. *ACS Medicinal Chemistry Letters* 2020; 11(9): 1732–1738.
- Langley DR., Crews CM. PROTAC targeted protein degraders: the past is prologue. 2022; 21(March).
- Li H., Dong J., Cai M., Xu Z., Cheng XD., Qin JJ. Protein degradation technology: a



- strategic paradigm shift in drug discovery. *Journal of Hematology and Oncology* 2021; 14(1): 1–23.
- Li J., Liu J. PROTAC \*\*: A Novel Technology for Drug Development. 2018.
- Li Liang Mi D., Pei H., Duan Q., Wang X., Zhou W., Jin J., Li D., Liu M., Chen Y. In vivo target protein degradation induced by PROTACs based on E3 ligase DCAF15. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2020; 5(1): 4–6.
- Li Long Zhu X., Qian Y., Yuan X., Ding Y., Hu D., He X., Wu Y. Chimeric antigen receptor T-cell therapy in glioblastoma: Current and future. *Frontiers in Immunology* 2020; 11(November): 1–9.
- Li W., Zhang L. Regulation of ATG and autophagy initiation. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* 2019; (Vol. 1206).
- Li Z., Ma S., Yang X., Zhang L., Liang D., Dong G., Du L., Lv Z., Li M. Development of photocontrolled BRD4 PROTACs for tongue squamous cell carcinoma (TSCC). *European Journal of Medicinal Chemistry* 2021; 222: 113608.
- Liao H., Li X., Zhao L., Wang Y., Wang X., Wu Y., Zhou X., Fu W., Liu L., Hu HG., Chen YG. A PROTAC peptide induces durable  $\beta$ -catenin degradation and suppresses Wnt-dependent intestinal cancer. *Cell Discovery* 2020; 6(1): 1–12.
- Lin X., Xiang H., Luo G. Targeting estrogen receptor  $\alpha$  for degradation with PROTACs: A promising approach to overcome endocrine resistance. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2020; 206: 112689.
- Liu Jing Ma J., Liu Y., Xia J., Li Y., Wang ZP., Wei W. PROTACs: A novel strategy for cancer therapy. *Seminars in Cancer Biology* 2020; 67(January): 171–179.
- Liu Jinyuan Xue L., Xu X., Luo J., Zhang S. FAK-targeting PROTAC demonstrates enhanced antitumor activity against KRAS mutant non-small cell lung cancer. *Experimental Cell Research* 2021; 408(2): 112868.
- Liu L., Shi L., Wang Z., Zeng J., Wang Y., Xiao H., Zhu Y. Targeting oncoproteins for degradation by small molecule-based proteolysis-targeting chimeras (PROTACs) in sex hormone-dependent cancers. *Frontiers in Endocrinology* 2022; 13(March): 1–15.
- Liu WJ., Ye L., Huang WF., Guo LJ., Xu ZG., Wu HL., Yang C., Liu HF. P62 links the autophagy pathway and the ubiquitin-proteasome system upon ubiquitinated protein degradation. *Cellular and Molecular Biology Letters* 2016; 21(1): 1–14.
- Lu J., Qian Y., Altieri M., Dong H., Wang J., Raina K., Hines J., Winkler JD., Crew AP., Coleman K., Crews CM. Hijacking the E3 ubiquitin ligase cereblon to efficiently target BRD4. *Chemistry and Biology* 2015; 22(6): 755–763.
- Lupfer C., Thomas PG., Anand PK., Vogel P., Milasta S., Martinez J., Huang G., Green M., Kundu M., Chi H., Xavier RJ., Green DR., Lamkanfi M., Dinarello CA., Doherty PC., Kanneganti TD. Receptor interacting protein kinase 2-mediated mitophagy regulates inflammasome activation during virus infection. *Nature Immunology* 2013; 14(5): 480–488.

- Ma D., Zou Y., Chu Y., Liu Z., Liu G., Chu J., Li M., Wang J., Sun SY., Chang Z. A cell-permeable peptide-based PROTAC against the oncoprotein CREPT proficiently inhibits pancreatic cancer. *Theranostics* 2020; 10(8): 3708–3721.
- Maranchie JK., Vasselli JR., Riss J., Bonifacino JS., Linehan WM., Klausner RD. The contribution of VHL substrate binding and HIF1- $\alpha$  to the phenotype of VHL loss in renal cell carcinoma. *Cancer Cell* 2002; 1(3): 247–255.
- Mares A., Miah AH., Smith IED., Rackham M., Thawani AR., Cryan J., Haile PA., Votta BJ., Beal AM., Capriotti C., Reilly MA., Fisher DT., Zinn N., Bantscheff M., MacDonald TT., Vossenkamper A., Dace P., Churcher I., Benowitz AB., Harling JD. Extended pharmacodynamic responses observed upon PROTAC-mediated degradation of RIPK2. *Communications Biology* 2020; 3(1): 1–13.
- Mariani CJ., Vasanthakumar A., Madzo J., Yesilkamal A., Bhagat T., Yu Y., Bhattacharyya S., Wenger RH., Cohn SL., Nanduri J., Verma A., Prabhakar NR., Godley LA. TET1-mediated hydroxymethylation facilitates hypoxic gene induction in neuroblastoma. *Cell Reports* 2014; 7(5): 1343–1352.
- McCoull W., Cheung T., Anderson E., Barton P., Burgess J., Byth K., Cao Q., Castaldi MP., Chen H., Chiarparin E., Carbajo RJ., Code E., Cowan S., Davey PR., Ferguson AD., Fillery S., Fuller NO., Gao N., Hargreaves D., Wilson DM. Development of a novel B-Cell lymphoma 6 (BCL6) PROTAC to provide insight into small molecule targeting of BCL6. *ACS Chemical Biology* 2018; 13(11): 3131–3141.
- Memon H., Patel BM. PROTACs: Novel approach for cancer breakdown by breaking proteins. *Life Sciences* 2022; 300(April): 120577.
- Minko T. Trends in pharmacological sciences nanoformulation of PROTAC : Improving druggability to target the ‘ Undruggable ’ MYC in pancreatic cancer trends in pharmacological sciences. *Trends in Pharmacological Sciences* 2020; 41(10): 684–686.
- Morán Luengo T., Mayer MP., Rüdiger SGD. The Hsp70–Hsp90 chaperone cascade in protein folding. *Trends in Cell Biology* 2019; 29(2): 164–177.
- Muddassir M., Soni K., Sangani CB., Alarifi A., Afzal M., Abduh NAY., Duan Y., Bhadja P. Bromodomain and BET family proteins as epigenetic targets in cancer therapy: Their degradation, present drugs, and possible PROTACs. *RSC Advances* 2020; 11(2): 612–636.
- Nalawansa DA., Crews CM. PROTACs: An emerging therapeutic modality in precision medicine. *Cell Chemical Biology* 2020; 27(8): 998–1014.
- Neklesa TK., Winkler JD., Crews CM. Targeted protein degradation by PROTACs. *Pharmacology and Therapeutics* 2017; 174: 138–144.
- Neklesa T., Snyder LB., Willard RR., Vitale N., Pizzano J., Gordon DA., Bookbinder M., Macaluso J., Dong H., Ferraro C., Wang G., Wang J., Crews CM., Houston J., Crew AP., Taylor I. ARV-110: An oral androgen receptor PROTAC degrader for prostate cancer. *Journal of Clinical Oncology*

- 2019; 37(7): 259–259.
- Nguyen TTL., Kim JW., Choi HI., Maeng HJ., Koo TS. Development of an LC-MS/MS method for ARV-110, a PROTAC molecule, and applications to pharmacokinetic studies. *Molecules* 2022; 27(6).
- Ocaña A., Pandiella A. Proteólisis dirigida a quimeras (PROTACs) en la terapia del cáncer. *Revista de Investigación Experimental y Clínica Del Cáncer* 2020; 39(1): 2–9.
- Paiva SL., Crews CM. Targeted protein degradation: elements of PROTAC design. *Current Opinion in Chemical Biology* 2019; 50: 111–119.
- Park J., Cho J., Song EJ. Ubiquitin–proteasome system (UPS) as a target for anticancer treatment. *Archives of Pharmacal Research* 2020; 43(11): 1144–1161.
- Pietri E., Conteduca V., Andreis D., Massa I., Melegari E., Sarti S., Ceconetto L., Schirone A., Bravaccini S., Serra P., Fedeli A., Maltoni R., Amadori D., De Giorgi U., Rocca A. Androgen receptor signaling pathways as a target for breast cancer treatment. *Endocrine-Related Cancer* 2016; 23(10): R485–R498.
- Porta C., Sabbatini R., Procopio G., Paglino C., Galligioni E., Ortega C. Primary resistance to tyrosine kinase inhibitors in patients with advanced renal cell carcinoma: State-of-the-science. *Expert Review of Anticancer Therapy* 2012; 12(12): 1571–1577.
- Protein C., Yang H., Landis-piwowar KR. Natural Compounds with Proteasome Inhibitory Activity for Cancer Prevention and Treatment. *NIH Public Access* 2008; 9(3): 227-239.
- Pu L., Govindaraj RG., Lemoine JM., Wu HC., Brylinski M. Deepdrug3D: Classification of ligand-binding pockets in proteins with a convolutional neural network. *PLoS Computational Biology* 2019; 15(2): 1–23.
- Qi S., Dong J., Xu Z., Cheng X., Zhang W. PROTAC : An effective targeted protein degradation strategy for cancer therapy. 2021; 12(May): 1–13.
- Qu X., Liu H., Song X., Sun N., Zhong H., Qiu X., Yang X., Jiang B. Effective degradation of EGFR L858R+T790M mutant proteins by CRBN-based PROTACs through both proteasome and autophagy/lysosome degradation systems. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2021; 218: 113328.
- Radchikov VF., Besarab GV., Sapsaleva TL., Baranikov VA., Glushenko AV., Spivak ME. Rationing of non-degradable protein in diets for breeding steers. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 2021; 848(1).
- Raina K., Lu J., Qian Y., Altieri M., Gordon D., Rossi AMK., Wang J., Chen X., Dong H., Siu K., Winkler JD., Crew AP., Crews CM., Coleman KG. PROTAC-induced BET protein degradation as a therapy for castration-resistant prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2016; 113(26): 7124–7129.
- Rashighi M., Harris JE. HHS public access. *Physiology & Behavior* 2017; 176(3): 139–148.
- Rathod D., Fu Y., Patel K. BRD4 PROTAC as a novel therapeutic approach for the treatment of

- vemurafenib resistant melanoma: Preformulation studies, formulation development and in vitro evaluation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2019; 138(July): 105039.
- Relini A., Marano N., Gliozzi A. Misfolding of amyloidogenic proteins and their interactions with membranes. *Biomolecules* 2014; 4(1): 20–55.
- Roskoski R. Anaplastic lymphoma kinase (ALK) inhibitors in the treatment of ALK-driven lung cancers. *Pharmacological Research* 2017; 117: 343–356.
- Saeki Y., Tanaka K., Wijk SJL, Van Bienko M., Dikic I., Lysine M., Besche HC., Goldberg AL., Kim HT. Ubiquitin family modifiers and the proteasome. *Methods in Molecular Biology* 2012; 832(1): 423–432.
- Sakamoto KM. Protacs for treatment of cancer. *Pediatric Research* 2010; 67(5): 505–508.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001; 98(15): 8554–8559.
- Sakamoto KM., Kim KB., Verma R., Ransick A., Stein B., Crews CM., Deshaies RJ. Development of Protacs to target cancer-promoting proteins for ubiquitination and degradation. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP* 2003; 2(12): 1350–1358.
- Samarasinghe KTG., Crews CM. Targeted protein degradation: A promise for undruggable proteins. *Cell Chemical Biology* 2021; 28(7): 934–951.
- Savvidou MG., Katsabea A., Kotidis P., Mamma D., Lymperopoulou TV., Kekos D., Kolisis FN. Studies on the catalytic behavior of a membrane-bound lipolytic enzyme from the microalgae *Nannochloropsis oceanica* CCMP1779. *Enzyme and Microbial Technology* 2018; 116: 64–71.
- Schneekloth JS., Fonseca FN., Koldobskiy M., Mandal A., Deshaies R., Sakamoto K., Crews CM. Chemical genetic control of protein levels: Selective in vivo targeted degradation. *Journal of the American Chemical Society* 2004; 126(12): 3748–3754.
- Song M, Emilsson L, Bozorg SR, Nguyen LH, Joshi AD, Staller K. HHS public access. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2020; 5(6): 537–547.
- Soural M. Solid-phase synthesis for thalidomide-based proteolysis-targeting chimeras (PROTAC). 2019; 929–932.
- Sun X., Gao H., Yang Y., He M., Wu Y., Song Y., Tong Y., Rao Y. Protacs: Great opportunities for academia and industry. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2019; 4(1).
- Sun Y., Zhao X., Ding N., Gao H., Wu Y., Yang Y., Zhao M., Hwang J., Song Y., Liu W., Rao Y. PROTAC-induced BTK degradation as a novel therapy for mutated BTK C481S induced ibrutinib-resistant B-cell malignancies. *Cell Research* 2018; 28(7): 779–781.
- Tang K., Jia YN., Yu B., Liu HM. Medicinal chemistry strategies for the development of protein tyrosine phosphatase SHP2 inhibitors and PROTAC degraders. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2020; 204: 112657.

- Tinworth CP., Lithgow H., Dittus L., Bassi ZI., Hughes SE., Muelbaier M., Dai H., Smith IED., Kerr WJ., Burley GA., Bantscheff M., Harling JD. PROTAC-mediated degradation of Bruton's tyrosine kinase is inhibited by covalent binding. *ACS Chemical Biology* 2019; 14(3): 342–347.
- Toure M., Crews CM. Small-molecule PROTACS: New approaches to protein degradation. *Angewandte Chemie - International Edition* 2016; 55(6): 1966–1973.
- Wang C., Zheng C., Wang H., Zhang L., Liu Z., Xu P. The state of the art of PROTAC technologies for drug discovery. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2022; 235: 114290.
- Wang P., Zhou J. Proteolysis targeting chimera (PROTAC): A paradigm-shifting approach in small molecule drug discovery. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2018; 18(16): 1354–1356.
- Wang Y., Jiang X., Feng F., Liu W., Sun H. Degradation of proteins by PROTACs and other strategies. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 2020; 10(2): 207–238.
- Weng G., Li D., Kang Y., Hou T. Integrative modeling of PROTAC-mediated ternary complexes. *Journal of Medicinal Chemistry* 2021; 64(21): 16271–16281.
- Xia L., Liu W., Song Y., Zhu H., Duan Y. The present and future of novel protein degradation technology. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2019; 19(20): 1784–1788.
- Xia M., Knezevic D., Tovar C., Huang B., Heimbrook DC., Vassilev LT. Elevated MDM2 boosts the apoptotic activity of p53-MDM2 binding inhibitors by facilitating MDMX degradation. *Cell Cycle* 2008; 7(11): 1604–1612.
- Yalçın A. Posttranslasyonel modifikasyon ve protein fonksiyonu giriş. *Uludag Univ. J Fac. Vet. Ned* 2012; 31(1): 29–37.
- Yang Y., Gao H., Sun X., Sun Y., Qiu Y., Weng Q., Rao Y. Global PROTAC toolbox for degrading BCR-ABL overcomes drug-resistant mutants and adverse effects. *Journal of Medicinal Chemistry* 2020; 63(15): 8567–8583.
- Zeng S., Huang W., Zheng X., Liyan cheng Zhang Z., Wang J., Shen Z. Proteolysis targeting chimera (PROTAC) in drug discovery paradigm: Recent progress and future challenges. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2021; 210: 112981.
- Zhang D. Targeted degradation of droteins by small molecules: A novel tool for functional proteomics†. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 2004; 7(7): 689–697.
- Zhang H., Zhao HY., Xi XX., Liu YJ., Xin M., Mao S., Zhang JJ., Lu AX., Zhang SQ. Discovery of potent epidermal growth factor receptor (EGFR) degraders by proteolysis targeting chimera (PROTAC). *European Journal of Medicinal Chemistry* 2020; 189: 112061.
- Zhao L., Han X., Lu J., McEachern D., Wang S. A highly potent PROTAC androgen receptor (AR) degrader ARD-61 effectively inhibits AR-positive breast cancer cell growth in vitro and tumor growth in vivo. *Neoplasia (United States)* 2020; 22(10): 522–532.
- Zhou P., Bogacki R., McReynolds L., Howley PM. Harnessing the ubiquitination machinery to target the degradation of specific cellular proteins. *Molecular Cell* 2000; 6(3). 751–756.
- Zhou X., Dong R., Zhang JY., Zheng X., Sun LP. PROTAC: A promising technology for cancer

treatment. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2020; 203: 112539.

Zhuang J., jing Liu Q., Wu D., lei Tie L. Current strategies and progress for targeting the “undruggable” transcription factors. *Acta Pharmacologica Sinica* 2022; December 2021: 1–8.

Zou Y., Ma D., Wang Y. The PROTAC technology in drug development. *Cell Biochemistry and Function* 2019; 37(1): 21–30.