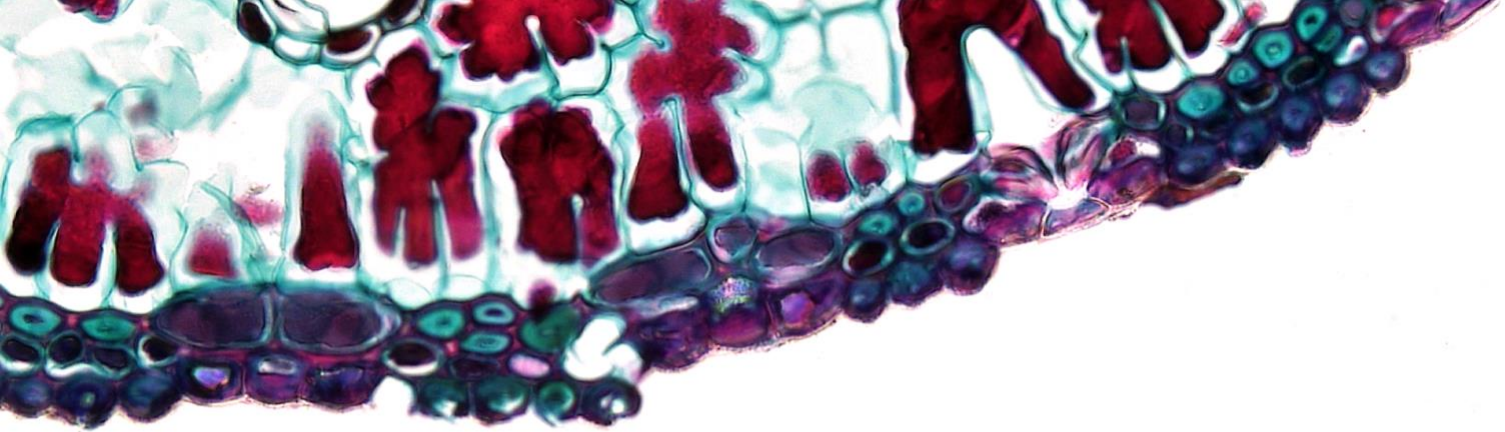




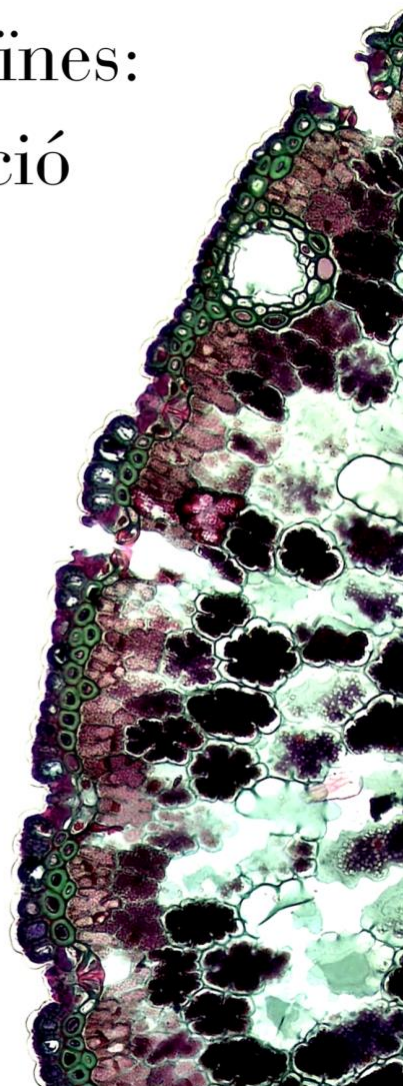
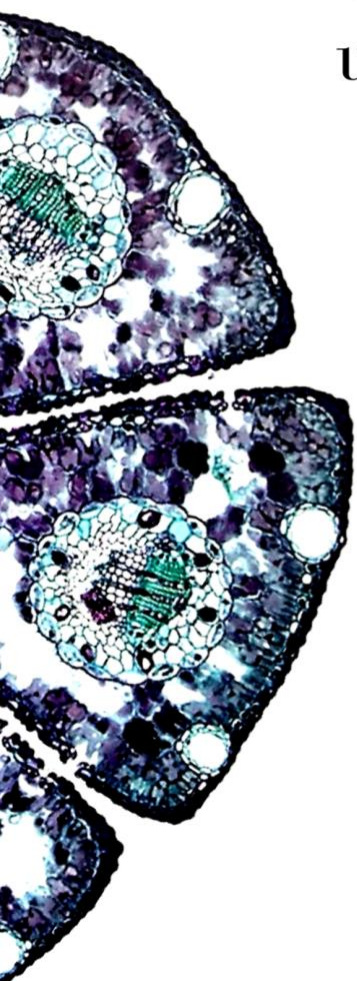
UNA DIANA, UNA OPORTUNITAT

Degradació dirigida de proteïnes:
una innovadora aproximació
clínica al càncer.

Pseudònim: Esperança



UNIVERSITAT DE
BARCELONA



ABSTRACT

Castellano

Este *Treball de Recerca* (TdR) pretende profundizar en el estudio de la enfermedad del cáncer y los tratamientos farmacológicos oncológicos actuales, así como concienciar a la sociedad sobre la complejidad de enfrentarse a esta patología. El objetivo principal de este trabajo es analizar el mecanismo de acción de los degradadores de proteínas, conocidos como *PROteolysis TARgeting Chimeras* (PROTAC), y evaluar su eficacia como nueva estrategia terapéutica para el tratamiento del cáncer. A lo largo de la investigación, se ha examinado la capacidad de un PROTAC para degradar la proteína c-Myc, un oncogén relacionado con la proliferación de diversos tipos de cáncer, utilizando la técnica de Western blot. Como resultado y conclusión, se muestra una degradación significativa y dependiente de la dosis de la proteína c-Myc, lo que confirma el potencial de los PROTAC como prometedoras herramientas terapéuticas. De este modo, este hallazgo sugiere que los PROTAC permiten tratar proteínas que previamente, se consideraban *undruggables*, pudiendo representar una alternativa efectiva a las terapias convencionales. Además, al dirigirse a proteínas específicas en el crecimiento tumoral, los PROTAC ofrecen una vía terapéutica más precisa y menos invasiva, siendo un gran avance en la lucha contra el cáncer, una enfermedad que, hoy en día, sigue sin cura definitiva.

Palabras clave: cáncer, terapias dirigidas, degradación de proteínas, PROTAC, c-Myc.

English

This *Treball de Recerca* (TdR) aims to further the study of cancer disease and its current oncological pharmacological treatments, as well as raise society's awareness of the complexity of dealing with this pathology. The main objective of this research is to analyse the mechanism of action of protein degraders, known as PROteolysis TARgeting Chimeras (PROTAC), and to evaluate their efficacy as a new therapeutic strategy for the treatment of cancer. Throughout the research, the capacity of a PROTAC to degrade the c-Myc protein, an oncogene related to the proliferation of various types of cancer, has been examined using the Western blot technique. As a result, and conclusion, a significant and dose-dependent degradation of c-Myc protein is shown, confirming the potential of PROTAC as promising therapeutic tools. In this way, this finding suggests that PROTAC allow targeting proteins that were previously considered undruggable and may represent an effective alternative to conventional therapies. Moreover, by targeting specific proteins in tumour growth, PROTAC offer a more precise and less invasive therapeutic option, representing a breakthrough in the fight against cancer, a disease that, to date, remains without a definitive cure.

Keywords: cancer, targeted drugs, protein degradation, PROTAC, c-Myc.

GLOSSARI D'ABREVIACIONS

APS *Ammonium persulfate*
Baf-A1 *Bafilomycin A1*
BCA *Bicinchoninic Acid*
CRL *Cullin-RING Ligases*
DMSO *Dimetilsulfòxid*
HRP *Horseradish Peroxidase*
IMiDs *Immunomodulatory Drugs*
LH... *Limfoma de Hodgkin*
LLA..... *Leucèmia Limfocítica Aguda*
LLC..... *Leucèmia Limfocítica Crònica*
LMA..... *Leucèmia Mieloide Aguda*
LMC..... *Leucèmia Mieloide Crònica*
LNH... *Limfoma No Hodgkin*
MG-132 *Inhibidor del proteasoma*
MLN4924..... *Inhibidor de NEDD8*
NAE..... *NEDD8-Activating Enzyme*
ODS..... *Objectiu de Desenvolupament Sostenible*

PBS..... *Phosphate-Buffered Saline*
POI *Protein of Interest*
PROTAC *PROteolysis TArgeting Chimeras*
PVDF *Polifluorur de vinilidè*
RIPA *Radioimmunoprecipitation Assay Buffer*
SDS-PAGE *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*
TBST-T..... *Tris-Buffered Saline with Tween 20*
TdR *Treball de Recerca*
TEMED *Tetrametiletilendiamina*
Ub *Ubiquitina*
UPS..... *Sistema Ubiquitina-Proteasoma*
UV *Ultraviolat*

ÍNDEX

INTRODUCCIÓ	8
MARC TEÒRIC	10
1. Càncer.....	10
1.1. Definició i característiques	10
1.2. Cicle cel·lular.....	11
1.2.1. Gens protooncogens.....	12
1.2.2. Gens supressors de tumors.....	14
1.3. Factors de risc	14
1.4. Tipus de càncer i manifestacions.....	16
2. Tractaments farmacològics oncològics.....	20
2.1. Quimioteràpia.....	20
2.2. Radioteràpia.....	21
2.3. Immunoteràpia.....	22
2.4. Teràpies dirigides	24
3. Degradació Dirigida de Proteïnes	25
3.1. Funcionament	25
3.1.1. Procés d'ubiquitinització	26
3.1.2. Procés de degradació al proteasoma.....	27
3.2. Comparació de la degradació dirigida de proteïnes amb la farmacologia clàssica	28
3.3. Impacte futur	28
4. PROteolysis TARgeting Chimeras.....	29
4.1. Introducció històrica	29
4.2. Funcionament	31
4.3. Parts d'un PROTAC.....	31
4.4. Mecanisme d'acció.....	32
4.5. Oportunitats i desafiaments	33

MARC PRÀCTIC.....	35
5. Avaluació de l'eficàcia d'un PROTAC per a la degradació de c-Myc en cèl·lules oncològiques.....	35
5.1. Introducció.....	35
5.2. Materials	37
5.3. Mètodes.....	40
5.3.1. Preparació de la mostra	40
5.3.2. Electroforesi en gel	44
5.3.3. Transferència gel-membrana	47
5.3.4. Immunodetecció	47
5.3.5. Detecció per quimioluminescència	48
5.4. Resultats.....	50
5.5. Conclusions i discussió	52
CONCLUSIONS.....	53
BIBLIOGRAFIA I WEGRAFIA.....	55
ANNEXOS.....	58
Annex I: Imatges complementàries a la part pràctica d'aquest treball	58
Annex II: Protein degraders enter the clinic – a new approach to cancer therapy	60
Annex III: PROTAC targeted protein degraders: the past is prologue	63

ÍNDEX D'IMATGES

<i>Imatge 1: Tipus de tumors. Dreta: maligne. Esquerra: benigne.....</i>	<i>10</i>
<i>Imatge 2: Cicle cel·lular i punts de control.....</i>	<i>12</i>
<i>Imatge 3: Conseqüències de l'activació d'un oncogèn, fent que la cèl·lula es converteixi en cancerosa.....</i>	<i>13</i>
<i>Imatge 4: Dibuix d'un tall transversal de la pell, amb les diferents capes i cèl·lules que conté.....</i>	<i>16</i>
<i>Imatge 5: Diferenciació de les diferents cèl·lules sanguínies a partir de les cèl·lules mare a la medul·la òssia.....</i>	<i>18</i>
<i>Imatge 6: Sistema limfàtic.....</i>	<i>19</i>
<i>Imatge 7: Divisió cel·lular per mitosi on s'observen els microtúbuls del fus mitòtic, els quals ajuden a la separació equitativa dels cromosomes entre les cèl·lules filles.....</i>	<i>21</i>
<i>Imatge 8: Actuació dels fàrmacs inhibidors dels punts de control immunitari presents en cèl·lules canceroses com a tractament contra el càncer.....</i>	<i>23</i>
<i>Imatge 9: Passos a seguir en la teràpia de transferència de cèl·lules T com a tractament contra el càncer.....</i>	<i>23</i>
<i>Imatge 10: Funcionament de la degradació dirigida de proteïnes, amb tots els seus participants.....</i>	<i>25</i>
<i>Imatge 11: Procés d'ubiquitinització.....</i>	<i>26</i>
<i>Imatge 12: Parts principals del proteasoma en el procés de degradació.....</i>	<i>27</i>
<i>Imatge 13: Parts que componen un PROTAC.....</i>	<i>32</i>
<i>Imatge 14: Mecanisme d'acció d'un PROTAC.....</i>	<i>33</i>
<i>Imatge 16: Estructura química de l'inhibidor MLN4924.....</i>	<i>36</i>
<i>Imatge 15: Estructura química de l'inhibidor MG-132.....</i>	<i>36</i>
<i>Imatge 17: Estructura química de l'inhibidor Baf-A1.....</i>	<i>36</i>
<i>Imatge 18: Scraper.....</i>	<i>39</i>
<i>Imatge 19: Flascons per cultiu cel·lular.....</i>	<i>39</i>
<i>Imatge 21: Peròxid d'hidrogen i luminol.....</i>	<i>39</i>
<i>Imatge 20: Centrífuga.....</i>	<i>39</i>
<i>Imatge 22: Amersham Imager 680.....</i>	<i>39</i>
<i>Imatge 23: RIPA buffer i cocktail d'inhibidors.....</i>	<i>39</i>
<i>Imatge 24: Cèl·lules vives resuspeses en medi RPMI nou dins un tub falcon.....</i>	<i>40</i>
<i>Imatge 25: Procés de formació del pellet cel·lular dins la centrífuga.....</i>	<i>41</i>
<i>Imatge 26: Plaques de 6 pous on s'han sembrat les cèl·lules oncològiques i s'ha aplicat el pretractament amb els inhibidors. Dreta: sembra de les cèl·lules amb la pipeta; Esquerra: distribució dels inhibidors al llarg de la placa.....</i>	<i>41</i>
<i>Imatge 27: Distribució dels diferents inhibidors i del PROTAC (a 50 µM), en una placa de sis pous que conté cèl·lules oncològiques.....</i>	<i>42</i>
<i>Imatge 28: Ultracentrifugació de les cèl·lules per obtenir-ne el pellet cel·lular. Dreta: ultracentrifuga utilitzada. Esquerra: Tub Eppendorf amb el pellet d'interès, un cop eliminat el sobrenadant.....</i>	<i>43</i>
<i>Imatge 29: Polimerització del gel separador i empaquetador dins del cassette d'electroforesi.....</i>	<i>45</i>
<i>Imatge 30: Dibuix del gradient de concentració existent entre el gel empaquetador i els separadors, de menys a més, per permetre la separació de les proteïnes segons la seva grandària.....</i>	<i>46</i>
<i>Imatge 31: Electroforesi en gels de SDS-PAGE per separar les proteïnes de les mostres segons la seva mida.....</i>	<i>46</i>
<i>Imatge 32: Muntatge de dos sandvitx de transferència per transferir les proteïnes del gel, d'aspecte llefiscós, a la membrana de PVDF, situada sota dels gels.....</i>	<i>47</i>
<i>Imatge 33 Immunodetecció de les proteïnes sobre les membranes, utilitzant anticossos primaris contra la proteïna c-Myc, i la vinculina, i anticossos secundaris conjugats a l'HRP.....</i>	<i>48</i>
<i>Imatge 34: Detecció per quimioluminescència de la proteïna d'interès immunodetectada prèviament.....</i>	<i>49</i>
<i>Imatge 35: Imatge que mostra la quantitat de proteïna c-Myc present en les mostres oncològiques (prenent com a referència la quantitat de vinculina), després de ser pretractades amb diferents inhibidors i tractades amb 10 µM de PROTAC.....</i>	<i>50</i>
<i>Imatge 36: Imatge que mostra la quantitat de proteïna c-Myc present en les mostres oncològiques tractades en concentracions decreixents de PROTAC (sense pretractaments), prenent com a referència la quantitat de proteïna vinculina, com a control de càrrega i transferència.....</i>	<i>51</i>
<i>Imatge 37: Cèl·lules oncològiques mortes després del tractament amb el PROTAC a una concentració de 50 µM.....</i>	<i>52</i>
<i>Imatge 38: Cèl·lules oncològiques vives just abans del tractament amb el PROTAC.....</i>	<i>52</i>

AGRAÏMENTS

Per començar, m'agradaria agrair a la meva tutora per ser un pilar fonamental al llarg de tot aquest procés. No només m'ha proporcionat el seu valuós coneixement científic, sinó que també ha estat un suport personal imprescindible. Gràcies a ella, he après que la ciència va més enllà dels resultats, requereix compromís i col·laboració. Per tot això, aquest treball no només reflecteix el meu esforç, sinó també el seu.

Seguidament, voldria expressar el meu agraïment al Carles Galdeano, qui em va donar l'oportunitat de realitzar el marc pràctic del meu Treball de Recerca al seu laboratori de la Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació de la Universitat de Barcelona. El coneixement que m'ha transmès ha estat clau per valorar la complexitat de la recerca i la seva importància en l'avenç científic.

També vull donar les gràcies a tota la gent que em va acompanyar durant la meva estada al laboratori, per acollir-me des del primer moment i transmetre'm el seu treball en equip. A més, gràcies a l'Ainoa Sánchez per la seva disposició a ajudar-me constantment i compartir el seu coneixement de la millor manera, el seu paper ha estat imprescindible per al meu aprenentatge i experiència.

Finalment, m'agradaria agrair a la meva família, qui ha estat al meu costat, donant-me ànims i suport en tot moment. Sense el seu suport, no hauria estat possible arribar fins aquí.

INTRODUCCIÓ

El càncer ha tingut, té i tindrà sempre un paper crucial en les nostres vides. Sempre m'ha encuriat aquesta malaltia, però va ser quan es va apropar a la meua vida que vaig començar a sentir por per ella. Com pot una malaltia canviar-te la vida? Per què ens fa tanta por, sense saber gairebé res d'ella? Aquest temor, relacionat amb la manca de coneixement general sobre la malaltia, és un dels motius pels quals vaig decidir endinsar-me en la investigació sobre el càncer. Volia entendre'l i, si fos possible, aportar alguna cosa que ajudés a combatre'l.

Després de fer-me moltes preguntes sobre el càncer em vaig adonar que hi havia algunes qüestions a les quals podia donar resposta. Així doncs, vaig veure en el meu Treball de Recerca (TdR) l'oportunitat perfecta per buscar respostes. Volia saber què és, com es desenvolupa, quines són les seves causes principals, quins tractaments hi ha actualment i, sobretot, quines vies d'investigació estan en curs per trobar nous i millors tractaments. A més d'aquesta visió teòrica, volia experimentar de primera mà com es treballa en un laboratori d'investigació i poder aportar el meu granet de sorra en el llarg camí d'aquesta recerca.

En l'actualitat, existeixen diversos tractaments contra el càncer, com la quimioteràpia, la radioteràpia, la immunoteràpia i les teràpies dirigides. No obstant això, encara que aquestes opcions poden ser eficaces per eliminar les cèl·lules canceroses o reduir la mida dels tumors, solen tenir efectes secundaris significatius. Aquests efectes adversos poden afectar greument la qualitat de vida dels pacients, especialment d'aquells que ja es troben en un estat de salut fràgil o en una etapa avançada de la malaltia. Per aquest motiu, la meua part pràctica se centra a buscar un tractament menys agressiu per les persones que estan en l'estat més vulnerable de la seva vida. Per aconseguir-ho, investigaré sobre noves teràpies com la degradació dirigida de proteïnes, ja que ofereix un enfocament innovador per atacar selectivament les proteïnes implicades en el creixement i la proliferació de les cèl·lules canceroses, minimitzant al mateix temps el dany als teixits sans.

Per tot això, els objectius que busco assolir amb aquest TdR són els següents:

1. Investigar els factors que condueixen a la formació i propagació de cèl·lules canceroses per millorar la prevenció de diferents tipus de càncer i la qualitat de vida de les persones.
2. Descriure els tractaments farmacològics oncològics actuals: la quimioteràpia, la radioteràpia, la immunoteràpia i les teràpies dirigides.

3. Realitzar una cerca exhaustiva sobre les molècules de tipus PROTAC, actualment en fase clínica per al tractament innovador de diferents càncers, analitzant les seves característiques moleculars i clíniques per així comprendre millor el seu funcionament i el seu mecanisme d'acció.
4. Avaluar els resultats d'una molècula PROTAC per comprendre el seu impacte potencial en el tractament del càncer i contribuir al desenvolupament d'una estratègia terapèutica més efectiva i menys agressiva per als pacients oncològics.
5. Divulgar aquesta investigació per conscienciar a la societat sobre les noves opcions terapèutiques en oncologia per garantir una vida sana i promoure el benestar per a tots, tal com s'indica en l'Objectiu de Desenvolupament Sostenible 3 (ODS 3).

I la hipòtesi que busco confirmar és la següent:

Potser el tractament basat en PROTAC disminueix els nivells cel·lulars de l'oncogen c-Myc en cèl·lules oncològiques, revertint els seus trets cancerosos.

L'estructura d'aquest treball, per tant, està organitzada en una primera part teòrica, l'anomenat marc teòric, i una segona part de disseny experimental, l'anomenat marc pràctic. La redacció de la primera part es basa en una recerca bibliogràfica extensa, abordant temes com la biologia del càncer, les teràpies convencionals i les noves estratègies terapèutiques basades en PROTAC. La segona part, experimental, consisteix en una estada al laboratori del Dr. Galdeano, a la Universitat de Barcelona, on es tracta una línia de cèl·lules oncològiques amb un PROTAC capaç de degradar el factor de transcripció c-Myc implicat en el desenvolupament del càncer. Després del tractament amb el PROTAC, s'utilitza la tècnica Western blot per avaluar els nivells cel·lulars de la proteïna c-Myc i comprovar si el tractament té l'efecte desitjat, el què és essencial per validar l'eficàcia d'aquest tipus de teràpia experimental.

En definitiva, aquest TdR pretén ajudar a entendre el funcionament dels PROTAC com a tractament innovador del càncer i a donar una visió més àmplia i esperançadora de les noves oportunitats en el camp de la investigació oncològica.

MARC TEÒRIC

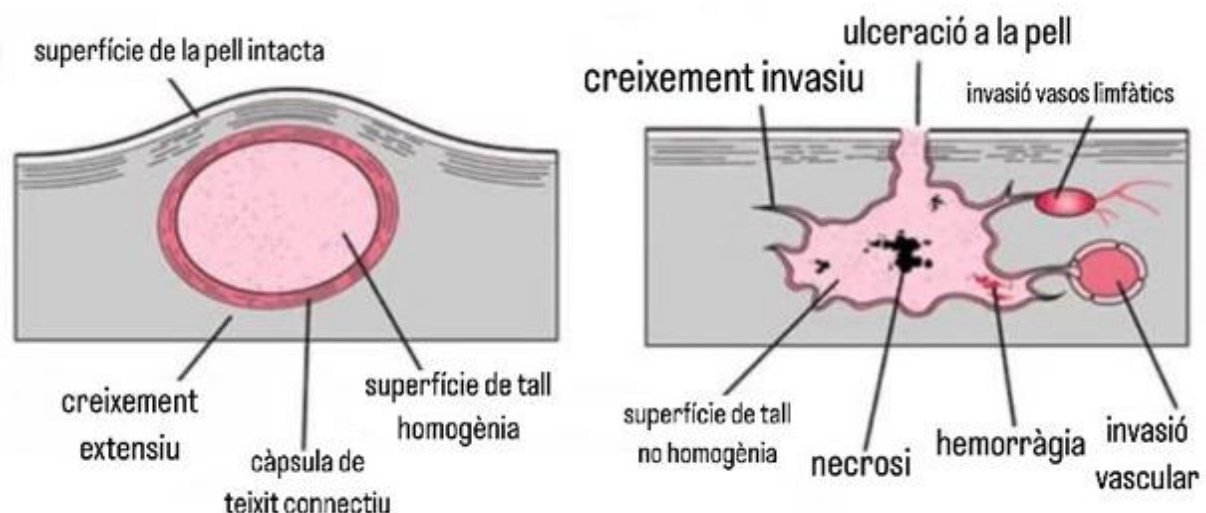
1. Càncer

El càncer és una malaltia complexa que implica una alteració biològica i genètica de les cèl·lules que formen els teixits dels nostres òrgans. ^[1]

1.1. Definició i característiques

Les cèl·lules canceroses apareixen quan els gens responsables de regular el cicle cel·lular, incloent-hi la divisió, es modifiquen i/o no s'expressen correctament. De fet, la carcinogènesi¹ és causada per mutacions i/o epimutacions del material genètic de les cèl·lules, fet que altera l'equilibri normal entre la proliferació i la mort cel·lular. Això causa que les cèl·lules comencin a créixer descontroladament, donant lloc a un tumor, una massa de teixit anormal. El tumor es converteix en maligne quan és capaç d'envair els teixits i òrgans propers, causant danys significatius a les estructures corporals. Aquesta disseminació més enllà del lloc d'origen es realitza a través del sistema sanguini o limfàtic i aquest procés de propagació i formació de tumors secundaris s'anomena metàstasi. ^[1]

Certament, no tots els tumors són malignes, n'hi ha que creixen lentament i no es disseminen ni infiltren en teixits propers; aquests tumors s'anomenen benignes (vegeu imatge 1). Es poden extirpar sense complicacions i, en general, no tornen a aparèixer després de la cirurgia. Tot i això, alguns poden arribar a ser grans i, depenent de la seva



Imatge 1: Tipus de tumors. Dreta: maligne. Esquerra: benigne. Adaptat de ^[40]

¹ Procés pel qual les cèl·lules normals es transformen en cèl·lules canceroses.

ubicació, causar símptomes greus o posar en perill la vida, com els tumors benignes al cervell o l'encèfal. Per tant, tot i tenir un millor pronòstic, requereixen un seguiment mèdic per evitar riscos i complicacions. ^[2]

1.2. Cicle cel·lular

El cicle cel·lular és una sèrie ordenada d'esdeveniments en què la cèl·lula realitza els processos de creixement i divisió. Aquest cicle es divideix en diverses fases que garanteixen el seu correcte funcionament:

- **Fase G1:** És la fase inicial, on la cèl·lula creix, consumint una gran quantitat d'energia per sintetitzar les proteïnes, i els orgànuls, necessàries per a les següents fases. És un període crucial de preparació, per assegurar que la cèl·lula tingui els recursos suficients per replicar el seu ADN. ^[3]
- **Fase S:** La cèl·lula duplica el seu material genètic, i es prepara per a la divisió amb dues còpies del seu material genètic. D'aquesta manera, com a resultat de la replicació de l'ADN, cada cromosoma, inicialment format per una cromàtide, un cop duplicat, queda constituït per dues cromàtides germanes.
- **Fase G2:** Després de la replicació de l'ADN, les cèl·lules continuen creixent i es preparen per a la divisió cel·lular. Durant aquesta fase, les cèl·lules transcriuen i tradueixen els gens que codifiquen les proteïnes essencials per a la divisió.
- **Fase M:** En aquesta fase, generalment anomenada mitosi², la cèl·lula es divideix en dues cèl·lules filles idèntiques. La mitosi es divideix en diverses etapes (profase, metafase, anafase i telofase), les quals asseguruen una distribució equitativa dels cromosomes entre les cèl·lules filles. Al final d'aquest procés de divisió es produeix la citocinesi, on també es divideix el citoplasma i els orgànuls entre les dues noves cèl·lules. ^[3]

A més, existeix una fase fora del cicle cel·lular anomenada **G0**, en què les cèl·lules es troben en un estat quiescent³, sense proliferació ni divisió. Les cèl·lules entren en aquesta fase per diverses raons, així com la falta de senyals de creixement o la necessitat de diferenciar-se.

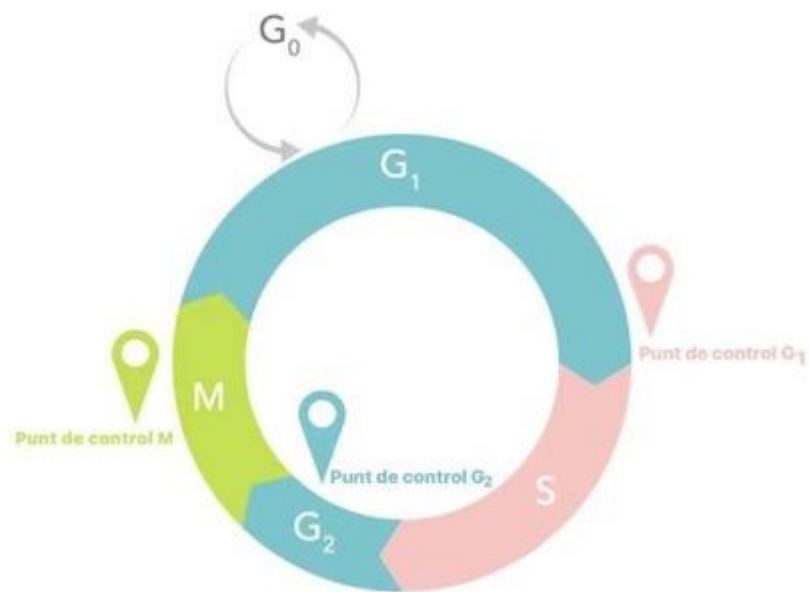
²Mentre que en la mitosi les cèl·lules precursors somàtiques finalitzen el procés de divisió formant dues cèl·lules idèntiques i amb el mateix nombre de cromosomes, en la meiosi les cèl·lules precursors de cèl·lules sexuals el finalitzen formant quatre cèl·lules diferents entre elles i amb la meitat dels cromosomes.

³ Estat temporalment tranquil i no actiu.

La progressió del cicle cel·lular està controlada per múltiples factors de creixement, els quals determinen el comportament de la cèl·lula, incloent-hi la decisió de créixer, diferenciar-se o morir. Tots aquests factors actuen en el cicle cel·lular i el regulen.

De la mateixa manera, el pas d'una fase a una altra del cicle cel·lular és gestionat pels punts de control (vegeu imatge 2). Aquests són mecanismes de seguretat que verifiquen i modulen la progressió de

les cèl·lules en resposta a senyals intracel·lulars o de l'entorn. Si la cèl·lula no detecta correctament els senyals o no està preparada per respondre-hi adequadament, aquesta pot començar a dividir-se descontroladament i convertir-se en cancerosa. Per això, els punts de control i la pèrdua de la regulació normal del cicle cel·lular són factors crucials en la transformació d'una cèl·lula sana en cancerosa. ^[4]

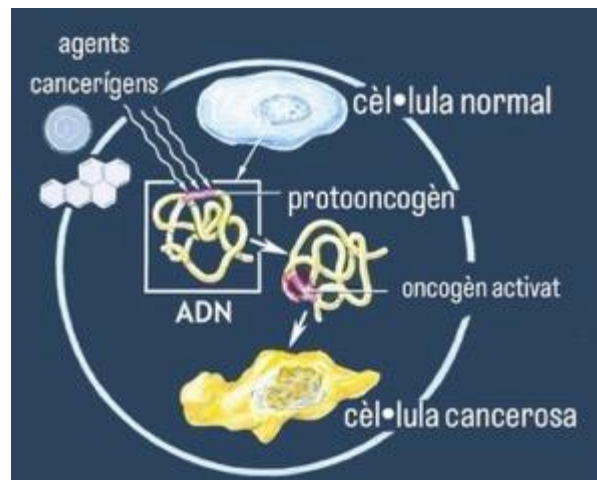


Imatge 2: Cicle cel·lular i punts de control. Adaptat de ^[41]

1.2.1. Gens protooncogenes

Els protooncogenes són uns gens que donen lloc a proteïnes que promouen el creixement i la divisió cel·lular. De fet, els protooncogenes codifiquen per factors de transcripció que estimulen l'expressió d'altres gens en molècules de transducció de senyals, que a la vegada estimulen la divisió cel·lular i regulen el cicle cel·lular, facilitant la progressió de la cèl·lula a través d'aquest cicle. En condicions normals, l'expressió d'aquests gens ajuda les cèl·lules a créixer i dividir-se per crear cèl·lules noves o a mantenir-se vives. ^[5]

No obstant això, quan un protooncogen és modificat, per exemple per mutacions, pot activar-se quan no ha de fer-ho i, en aquest moment, es converteix en un oncogen (vegeu imatge 3). Quan això succeeix, empenyen la cèl·lula a travessar els punts de control sense les condicions adequades, començant a créixer de manera descontrolada, el què pot causar un càncer.⁴ [5]



En les cèl·lules, els oncogens poden activar-se de diferents maneres, com les indicades a continuació:

Imatge 3: Conseqüències de l'activació d'un oncogen, fent que la cèl·lula es converteixi en cancerosa. Adaptat de [42]

- **Mutacions genètiques:** això succeeix quan canvia la seqüència de nucleòtids i així, els aminoàcids corresponents segons el codi genètic, ocasionant que l'oncogen romanguí actiu constantment. Aquestes mutacions poden ser heretades d'un dels progenitors o poden aparèixer durant la vida d'una persona, a causa d'errors en la còpia del gen (replicació de l'ADN) durant la fase S del cicle cel·lular.
- **Canvis epigenètics:** les cèl·lules també tenen mecanismes per activar o inhibir els gens sense que hi hagi modificacions directes en la seqüència de nucleòtids. Es tracta de l'addició o eliminació de grups químics del material genètic, tant de l'ADN com de l'ARN, com de les seves histones, per afectar la seva expressió. Si aquests canvis epigenètics activen un oncogen, desencadenen un creixement cel·lular descontrolat.
- **Reordenaments cromosòmics:** els cromosomes són llargues estructures d'ADN, presents en totes les cèl·lules, que contenen els gens. Algunes vegades, durant la divisió cel·lular, la seqüència d'ADN d'un cromosoma es pot veure alterada. En aquest sentit, es pot col·locar un gen que actua com a interruptor de l'expressió al costat d'un protooncogen, de manera que el manté activat fins i tot quan no hauria d'estar-ho. Aquest nou oncogen pot provocar que la cèl·lula creixi de manera descontrolada. [5]

⁴ Un càncer correspon al creixement anormal d'un teixit que sempre és maligne, en canvi, un tumor és el creixement anormal d'un teixit que pot ser benigne o maligne.

- **Duplicació de gens:** algunes cèl·lules tenen còpies addicionals d'un mateix gen, el que pot resultar en una producció excessiva d'una determinada proteïna. Aquesta sobreproducció pot produir un comportament cel·lular anormal, contribuint a l'activació d'un oncogen i al desenvolupament del càncer.

1.2.2. Gens supressors de tumors

Els gens supressors de tumors són gens la funció derivada dels quals és desaccelerar la divisió cel·lular o indicar a les cèl·lules que han de morir en un moment determinat, un procés conegut com a apoptosi o mort cel·lular programada, així reduint la probabilitat que la cèl·lula comenci a proliferar de manera excessiva. De fet, en les cèl·lules, les proteïnes resultants dels gens supressors de tumors, en resposta a danys en l'ADN cel·lular o a senyals de supressió del creixement provinents del medi, aturen la progressió del cicle cel·lular afavorint la reparació del dany i, si aquest no es pot reparar, l'apoptosi cel·lular. [5]

Així mateix, l'eliminació o mutació d'aquests gens augmenta la probabilitat que es generi un tumor, perquè les cèl·lules no responen als punts de control i són incapaces de reparar el dany o dur a terme l'apoptosi, donant lloc al creixement descontrolat. En definitiva, la funció resultant dels gens supressors de tumors és inhibir i evitar que la cèl·lula es transformi en cancerosa, tal com el seu nom indica.

1.3. Factors de risc

Un factor de risc és qualsevol element que fa augmentar les possibilitats que una persona pugui desenvolupar una malaltia. En general, no és possible saber amb exactitud per què una persona pateix càncer i una altra no, però existeixen uns factors de risc que poden augmentar la possibilitat de l'aparició del càncer. [6,7]

A continuació s'indiquen alguns factors de risc per a la malaltia del càncer que es poden controlar:

- **Tabac:** és la principal causa de càncer i de mort per càncer, sent responsable del 30% de la mortalitat per neoplàsies.⁵ Aquest hàbit està associat amb almenys 19 tipus de càncer, incloent-hi els més freqüents com el càncer de pulmó, bufeta urinària i mucosa oral. En el fum d'un cigarret es troben més de 4.000 substàncies

⁵ Formació anormal d'un teixit de caràcter tumoral, benigne o maligne, de manera descontrolada, autònoma i independent a la resta de teixits.

nocives, de les quals 60 són probablement cancerígenes⁶, destacant el quitrà i el benzè. [7,8]

- **Alimentació, obesitat i sedentarisme:** en termes generals, les dietes riques en fruites i vegetals aporten nutrients, antioxidants i fibra que protegeixen les cèl·lules dels agents cancerígens. En canvi, els greixos saturats, especialment d'origen animal, poden contribuir a l'obesitat i a l'augment d'hormones relacionades amb el creixement de cèl·lules canceroses, augmentant el risc de càncers com el de mama, còlon, esòfag, ronyó i úter. En el mateix sentit, l'exercici regular té beneficis sobre el pes corporal i també sobre el metabolisme, reduint així el risc del descontrol cel·lular; de fet, la manca d'activitat física pot afavorir la progressió del càncer. Per tot això, hi ha evidències epidemiològiques que subratllen la importància d'adoptar hàbits de vida saludables per a la prevenció de la malaltia. [8]
- **Exposició solar:** el sol produeix rajos ultraviolats (UV) que penetren les capes de la pell i poden causar danys significatius, alteracions i mutacions, en el material genètic de les seves cèl·lules. Si aquests danys a l'ADN cel·lular no es reparen eficaçment, les cèl·lules poden desencadenar un creixement cel·lular descontrolat, el què és la base per al desenvolupament del càncer de pell. Per tant, és crucial prendre mesures preventives, com l'ús de protector solar, roba protectora i evitar les hores de màxima intensitat solar per reduir el risc de desenvolupar aquest càncer.

Ara bé, també existeixen alguns factors de risc inevitables, com els següents:

- **Antecedents familiars:** només una petita part dels casos de càncer són hereditaris. Tot i així, és important considerar els antecedents familiars a l'hora de valorar el risc de desenvolupar càncer. Si el càncer és freqüent en la família, és possible que hi hagi mutacions genètiques que es transmetin d'una generació a la següent. I aquestes poden augmentar significativament el risc de patir certs tipus de càncer. Per exemple, mutacions en els gens BRCA1 i BRCA2 estan associades amb un major risc de càncer de mama i d'ovari.
- **Envel·liment:** la majoria de casos de càncer es diagnostiquen en persones de més de 65 anys. Això es deu al fet que, amb el temps, les cèl·lules del cos acumulen més danys en el seu ADN. A mesura que envellim, l'organisme experimenta canvis biològics i ambientals que poden afectar la seva capacitat per mantenir l'ADN intacte

⁶ Cancerigen vol dir que afavoreix l'aparició de càncer, en canvi, cancerós vol dir que està afectat per càncer.

i que les cèl·lules funcionin correctament, augmentant les possibilitats de mutacions i epimutacions que poden conduir al càncer. [6]

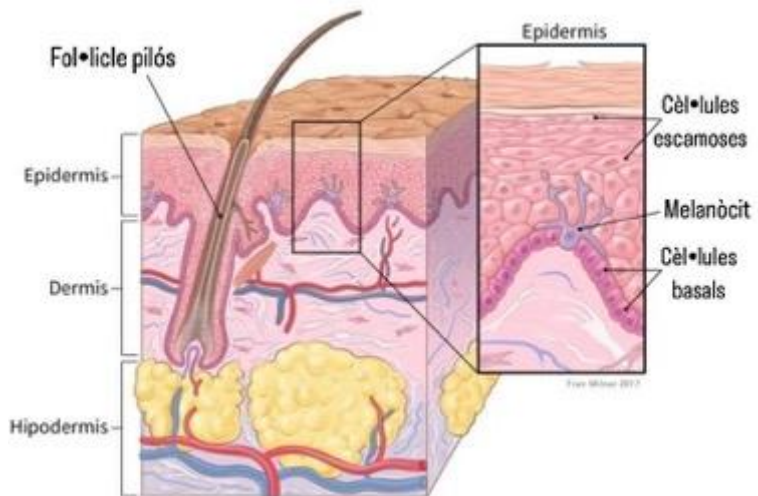
Convé recalcar que la majoria dels factors de risc per al càncer s'identifiquen en estudis epidemiològics inicials, quan els científics analitzen grups grans de persones i comparen als qui pateixen càncer amb els qui no en pateixen. Aquests estudis mostren com les persones que presenten càncer probablement s'han comportat d'una certa manera o s'han exposat a unes certes substàncies, diferent dels qui no en presenten, els anomenats factors de riscs.

1.4. Tipus de càncer i manifestacions

La paraula càncer és un terme molt ampli que abasta més de 200 tipus de malalties, cadascuna d'elles amb característiques diferents, fet que comporta que es puguin considerar gairebé malalties independents, amb les seves causes, la seva evolució i els seus tractaments específics. No obstant això, totes tenen un denominador comú, ja que les cèl·lules canceroses adquireixen la capacitat de multiplicar-se i disseminar-se per tot l'organisme sense control. [9]

A continuació s'especifiquen alguns tipus de càncer en funció del tipus cel·lular inicialment afectat:

- **Carcinomes:** són el tipus més comú de càncer i tenen el seu origen en les cèl·lules epitelials. Aquestes són les cèl·lules que recobreixen tant les parts internes com les externes del cos. És per això que els carcinomes es classifiquen segons el tipus cel·lular epitelial on s'inicien:



Imatge 4: Dibuix d'un tall transversal de la pell, amb les diferents capes i cèl·lules que conté. Adaptat de [43]

- **Adenocarcinoma:** es forma en el teixit glandular que revesteix alguns òrgans interns. Aquest tipus de teixit produeix i secreta substàncies, com moc, suc digestiu i altres líquids, en el cos. La majoria dels càncers de mama, còlon i pròstata són adenocarcinomes. [10]

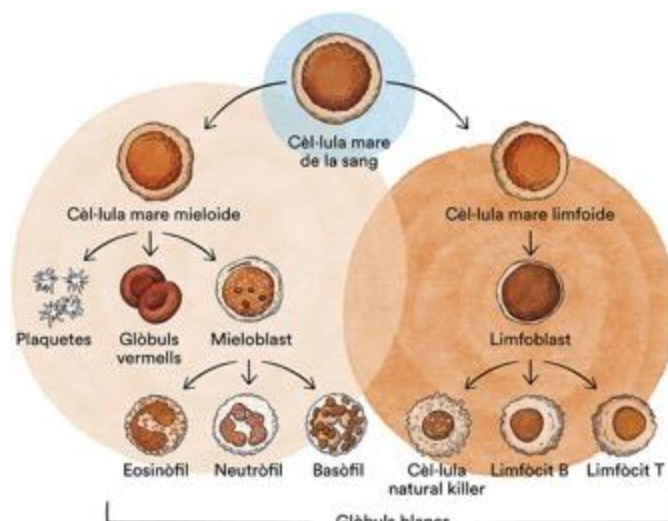
- **Carcinoma de cèl·lules escamoses:** es forma en les cèl·lules escamoses, que són cèl·lules epitelials que estan just sota la superfície externa de la pell (vegeu imatge 4). També recobreixen molts altres òrgans, com l'estómac, els intestins, el pulmó, la bufeta i els ronyons. Els símptomes són nafres⁷ que no cicatritzen, nòduls o taques que no desapareixen.
 - **Carcinoma de cèl·lules basals:** es forma en la capa inferior o base de l'epidermis, que són cèl·lules de la capa externa de la pell (vegeu imatge 4). És possible que aparegui una lesió blanca, marró, negra o blava que pot augmentar de grandària progressivament. ^[11]
 - **Carcinoma de cèl·lules transicionals:** s'inicia en un teixit anomenat epiteli de transició, el qual conté moltes capes de cèl·lules epitelials que han incrementat la seva grandària. Es troba en el revestiment de la bufeta, els urèters i la pelvis renal. Els símptomes d'alerta són sang en l'orina, cansament, pèrdua de pes, dolor en orinar i malestar d'esquena permanent.
- **Sarcoma:** és el càncer que es forma en els ossos i els teixits tous del cos. Aproximadament un 80% dels sarcomes comença als teixits tous del cos (cartílags, músculs, greix i tendons), mentre que l'altre 20% s'origina als ossos.
- **Sarcoma en teixits tous:** es desenvolupa en teixits no ossis com els músculs, el greix i altres teixits de suport. Els símptomes solen ser una massa o tumor indolor, amb efectes com inflamació, restricció del moviment o problemes funcionals, depenent de la ubicació. ^[12]
 - **Sarcoma en teixit ossi:** són tumors malignes que es localitzen en les extremitats, especialment al genoll o a la pelvis. Els símptomes típics inclouen dolor, inflamació i dificultat per moure l'articulació afectada. Aquests tumors poden ser agressius, amb una alta taxa de creixement i una tendència a derivar en metàstasi als pulmons i altres òrgans.
- **Leucèmia:** és el càncer de la sang. Comença en la medul·la òssia, un teixit tou, suau i esponjós, amb molts vasos sanguinis, que es troba al centre dels ossos, on hi ha les cèl·lules mare productores de totes les cèl·lules sanguínies (vegeu imatge 5).

⁷ Ferida oberta dels teixits orgànics que, sovint, supura.

Si aquestes cèl·lules es converteixen en canceroses, afecten i impedeixen la producció de glòbuls vermells, plaquetes i glòbuls blancs madurs (leucòcits) saludables. I la baixa concentració de cèl·lules sanguínies sanes restants fa que sigui més difícil pel cos portar oxigen als teixits, controlar el sagnat o combatre les infeccions, respectivament. Tot això fa que aquest tipus de càncer presenti símptomes potencialment mortals. [13]

A continuació es defineixen 4 tipus de leucèmies, dividides entre agudes (progressen ràpidament) i cròniques (progressen més lentament):

- **Leucèmia limfocítica aguda (LLA):** es presenta quan es produeix, a la medul·la òssia, una gran quantitat de limfoblasts immadurs, una forma cancerosa dels limfòcits.



Imatge 5: Diferenciació de les diferents cèl·lules sanguínies a partir de les cèl·lules mare a la medul·la òssia. Font: [44]

Els limfoblasts anormals

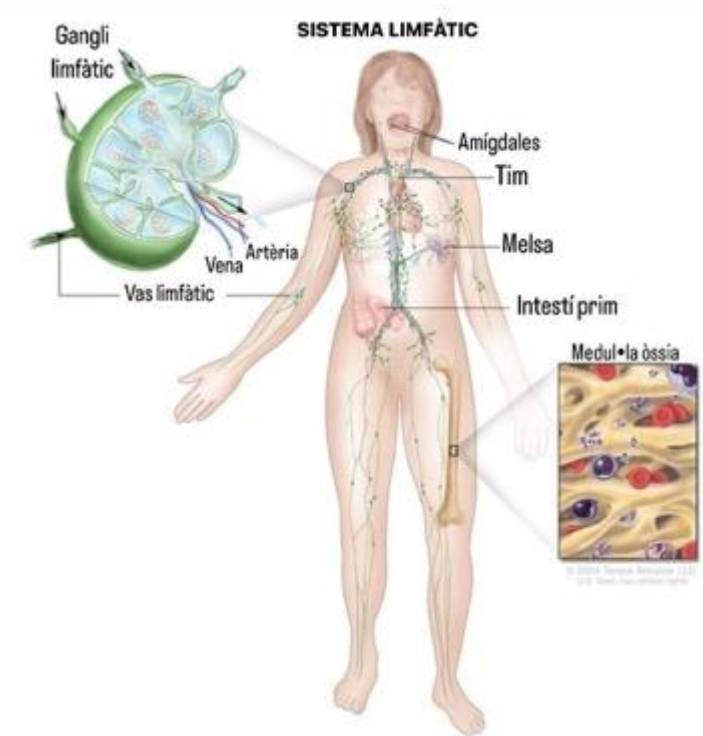
creixen ràpidament i reemplacen les cèl·lules funcionals de la medul·la òssia, evitant la producció de les cèl·lules sanguínies que en deriven. Aquest càncer afecta generalment nens de 3 a 7 anys i els símptomes són potencialment mortals. [14]

- **Leucèmia limfocítica crònica (LLC):** és un càncer causat per un increment dels glòbuls blancs del tipus limfòcits B. Aquestes cèl·lules canceroses provoquen que la medul·la òssia perdi la seva funció i, a més a més, en propagar-se aquestes a través de la sang, poden afectar els ganglis o nòduls limfàtics i/o altres òrgans. És un tipus de càncer que afecta principalment persones d'edat avançada, a partir dels 60 anys. [15]

- **Leucèmia mieloide aguda (LMA):** s'inicia dins la medul·la òssia, però en la majoria dels casos, s'estén ràpidament a través de la sang. El càncer apareix en unes cèl·lules que normalment es convertirien en glòbuls blancs sans, però es mantenen en cèl·lules immadures anormals anomenades mieloblasts o blasts mieloides. Aquestes no segueixen el procés de maduració normal, amb el que això comporta, i, interfereixen també en la producció de glòbuls vermells. És de les leucèmies més comunes en persones adultes.

- **Leucèmia mieloide crònica (LMC):** és un càncer que comença dins la medul·la òssia. Hi ha un creixement incontrolable de cèl·lules immadures que formen una cèl·lula precursora de glòbuls blancs anomenada mieloide. Les cèl·lules malaltes s'acumulen en la medul·la òssia, i també en la sang, causant que la medul·la òssia perdi la seva funció. La causa principal de la malaltia és deguda a una anomalia cromosòmica. Es presenta més comunament en adults de mitjana edat i en nens. [16]

- **Limfoma:** és un càncer que s'inicia en els limfòcits (cèl·lules T o cèl·lules B), un tipus de glòbuls blancs que protegeixen contra les infeccions provocant la mort de la cèl·lula infectada directament o generant anticossos per eliminar la cèl·lula infectada de manera indirecta respectivament, però creixen de manera descontrolada, s'acumulen i afecten els ganglis i vasos limfàtics (vegeu imatge 6).



Els principals dos tipus de limfoma són:

Imatge 6: Sistema limfàtic. Adaptat de [45]

- **Limfoma de Hodgkin (LH):** generalment afecta els ganglis limfàtics del coll o l'àrea situada entre els pulmons i darrere de l'estèrnum. Si aquest limfoma es dissemina, es pot propagar al braç, fetge, medul·la òssia o ossos. Tot i que no és molt freqüent, també es pot estendre a altres àrees del cos. Sovint presenta símptomes. És potencialment curable amb tractament, però sense aquest és mortal en qüestió de mesos. [17]
- **Limfoma no Hodgkin (LNH):** aquest limfoma es forma i afecta el teixit limfàtic, que es troba en la majoria de les parts del cos i té la funció de protegir l'organisme davant infeccions i/o malalties. Aquest tipus de limfoma pot fer metàstasi cap a qualsevol òrgan. Es pot formar als ganglis limfàtics, al fetge, a la melsa o la medul·la òssia, i pot afectar l'estómac, els intestins, la pell, la glàndula tiroïdal, el cervell, o qualsevol altra part del cos. Normalment, són asimptomàtics en el moment del

diagnòstic, per la qual cosa sovint es descobreixen casualment en les revisions mèdiques. En general, són incurables, però permeten als pacients portar una vida normal durant molts anys sense necessitat de tractament immediat, per això només es tracten quan presenten símptomes. ^[17]

En aquest subapartat s'ha volgut posar èmfasi en alguns dels càncers més presents en la societat, oferint-ne una breu explicació. Tot i això, actualment existeix una classificació molt més àmplia d'aquests, en la qual no entrarem en detall per no allargar-nos en excés.

2. Tractaments farmacològics oncològics

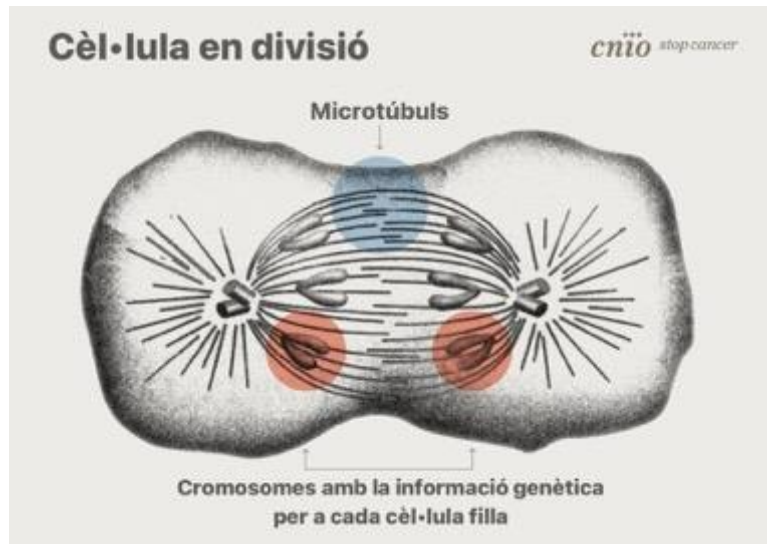
Un cop s'ha realitzat el diagnòstic del pacient, i s'ha detectat càncer, s'ha de seguir un tractament o teràpia. Els tractaments són intervencions destinades a corregir les causes o l'origen de la malaltia. N'hi ha de molts tipus i la seva elecció depèn de cada cas en particular. De fet, per escollir els tractaments adequats cal tenir en compte el tipus i localització del càncer, el diagnòstic de càncer, el grau de creixement i extensió del tumor, com aquest afecta a les funcions normals del cos i l'estat general de salut de cada pacient. A continuació s'indiquen alguns dels tractaments farmacològics oncològics actuals. ^[18]

2.1. Quimioteràpia

La quimioteràpia és un tractament farmacològic, un dels més importants i utilitzats en la malaltia del càncer. I és un tractament sistèmic, ja que els medicaments utilitzats recorren tot el cos per eliminar les cèl·lules canceroses que s'han propagat a través de la metàstasi a parts del cos llunyanes del tumor primari. ^[19]

Aquests fàrmacs o substàncies químiques actuen en les diferents fases del cicle cel·lular de les cèl·lules. Durant el creixement, alteren el material genètic de la cèl·lula tumoral, la qual s'està multiplicant molt més ràpid de l'habitual (vegeu apartat 1.1. i 1.2.). Ho fan interaccionant directament amb el seu ADN, danyant la seva estructura i funcionament. D'aquesta manera, comprometen la viabilitat de la cèl·lula, sigui provocant l'autodestrucció o impedit la seva multiplicació. Seguidament, durant la divisió, la quimioteràpia actua sobre els microtúbuls del fus mitòtic (vegeu imatge 7), alterant i impedit la correcta divisió i reproducció cel·lular.

Ara bé, els medicaments utilitzats en quimioteràpia ataquen tant les cèl·lules canceroses com les cèl·lules sanes, sempre que tinguin un alt ritme de divisió. El no diferenciar entre ambdós tipus de cèl·lules pot causar efectes secundaris no desitjats en els pacients. Per aquest motiu, quan s'administra la quimioteràpia s'intenta balancejar la destrucció de les cèl·lules canceroses i la preservació de les cèl·lules normals, per reduir els efectes secundaris. [20]



Imatge 7: Divisió cel·lular per mitosi on s'observen els microtúbuls del fus mitòtic, els quals ajuden a la separació equitativa dels cromosomes entre les cèl·lules filles. Adaptat de [46]

En alguns casos, la quimioteràpia pot ser l'únic tractament utilitzat per combatre el càncer. Tanmateix, és més habitual combinar-lo amb altres tipus de tractaments. És l'oncòleg qui determina quina combinació de tractaments aplicar, així com la dosi, la forma d'administració, la freqüència i la durada del tractament.

2.2. Radioteràpia

La radioteràpia és un tractament local del càncer que utilitza radiacions ionitzants per destruir o reduir les cèl·lules tumorals d'una zona específicament delimitada, d'aquesta manera causant el mínim dany als teixits sans del voltant. Es fa servir per tractar alguns tipus de càncer, però no tots. [21]

La radioteràpia es pot administrar de tres maneres diferents, descrites tot seguit, mostrant totes elles certs avantatges i inconvenients.

- **Radiació externa:** es fa servir una màquina per dirigir els raigs d'alta energia des de fora del cos cap al tumor. Aquesta màquina no toca al pacient, però es mou al seu voltant, de manera que envia la radiació des de moltes direccions diferents. En tractar-se d'una radiació externa no queden restes de material radioactiu en el pacient i no s'han de seguir precaucions especials de seguretat un cop a casa. En ser un tractament local, només tracta una part específica del cos i el seu objectiu és

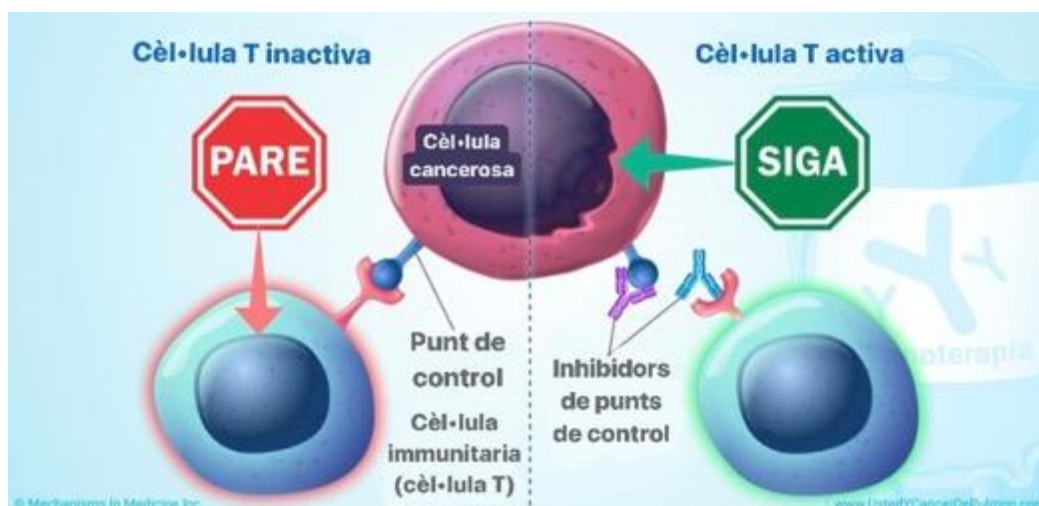
dipositar la màxima dosi possible de radiació al tumor sense afectar el teixit normal del voltant. ^[22]

- **Radiació interna:** és un tractament en què la font de radiació se situa dins del cos. Per això, se segella la substància radioactiva a l'interior de materials que poden implantar-se al cos, com grànuls, llavors, cintes, filferros, agulles o càpsules, directament en el tumor o prop d'aquest. L'implant es diposita a través d'un petit tub flexible anomenat catèter o un dispositiu aplicador. És possible mantenir-lo allí durant uns minuts, molts dies o la resta de la vida d'una persona. En aquest cas, es necessiten precaucions de seguretat especials, almenys durant un temps. No obstant això, si la radiació interna es deixa en el cos, a mesura que passi el temps deixarà d'emetre radiació. ^[23]
- **Radiació sistèmica:** és un tractament que consisteix a utilitzar material radioactiu que viatja per tot el cos a través de la sang cap a les cèl·lules canceroses, en lloc de ser dirigit i fixat en una àrea. Els medicaments radioactius, radiofàrmacs o radionúclids són líquids compostos per una substància radioactiva que es poden administrar per via oral o es poden injectar per vena. És important ajustar la dosi precisa de radiació que arribarà i s'administrarà al tumor o a l'àrea on es troben les cèl·lules canceroses.

2.3. Immunoteràpia

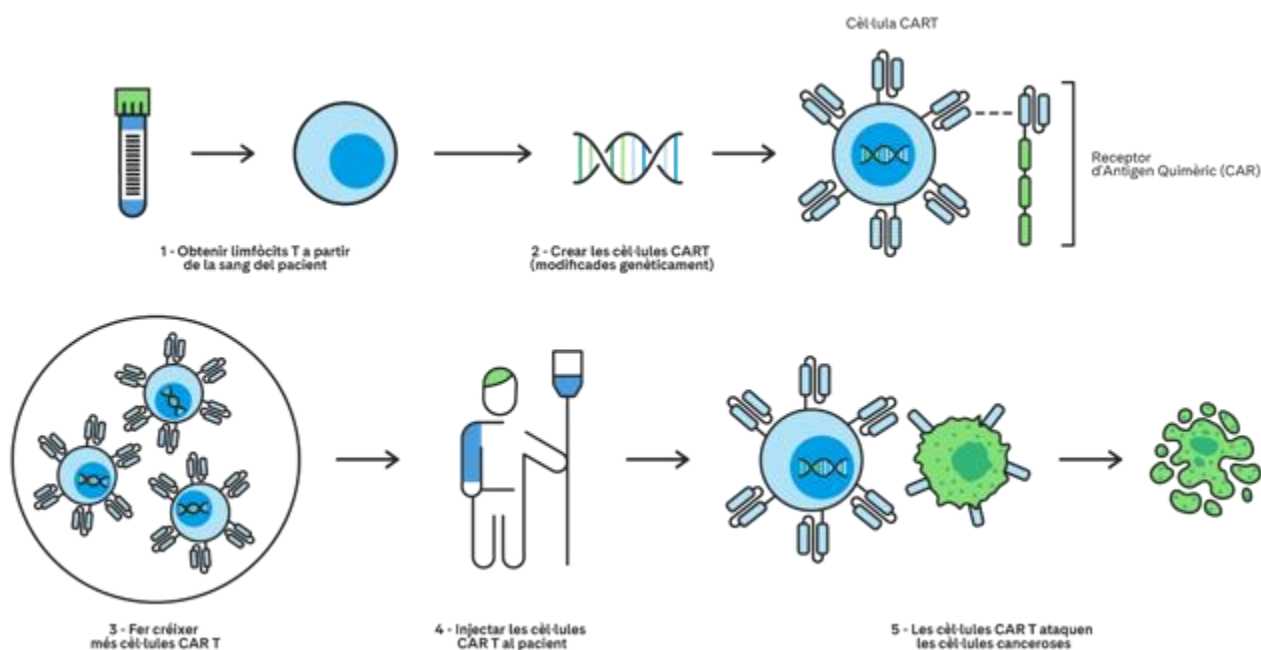
La immunoteràpia és un conjunt de tractaments que consisteixen a administrar substàncies per estimular el sistema immunitari de l'organisme, amb la finalitat de lluitar contra diferents malalties, en aquest cas, certs càncers hematològics o tumors sòlids. Hi ha alguns tipus d'immunoteràpia que encara estan en estudi, però també n'hi ha que són principals i s'utilitzen actualment, com les exposades a continuació. ^[24]

- **Inhibidors de punts de control immunitari:** són fàrmacs que bloquegen específicament els punts de control immunitari, unes proteïnes elaborades per alguns tipus de cèl·lules, com algunes cèl·lules canceroses. Els punts de control tenen com a funció evitar que la resposta immunitària sigui molt eficient, fet que pot, en alguns casos, impedir que els glòbuls blancs, o els limfòcits T, destrueixin cèl·lules canceroses. Per això, quan s'inhibeix l'acció d'aquests punts de control, les cèl·lules T són capaces d'identificar i atacar amb més eficàcia les cèl·lules canceroses, afavorint la seva destrucció (vegeu imatge 8).



Imatge 8: Actuació dels fàrmacs inhibidors dels punts de control immunitari presents en cèl·lules canceroses com a tractament contra el càncer. Adaptat de [47]

- **Anticossos monoclonals:** són unes proteïnes del tipus immunoglobulines, anomenades anticossos monoclonals, creades al laboratori amb l'objectiu d'unir-se a dianes específiques de les cèl·lules canceroses. Aquestes proteïnes diferencien les cèl·lules canceroses perquè siguin vistes i destruïdes pel sistema immunitari. [25]
- **Teràpia de transferència de cèl·lules T:** és un tractament que enforteix la capacitat natural de les cèl·lules T per a combatre el càncer. En aquest tractament, algunes cèl·lules T de la sang del pacient s'extreuen i es modifiquen amb un vector viral per tal que aprenguin a reconèixer les cèl·lules tumorals. Aquestes cèl·lules T modificades es multipliquen i es retornen al cos del pacient a través d'una infusió, ja capaces de trobar el tumor, unir-s'hi i eliminar-lo (vegeu imatge 9). [25]



Imatge 9: Passos a seguir en la teràpia de transferència de cèl·lules T com a tractament contra el càncer. Font: [48]

- **Vacunes contra el càncer:** són vacunes que tenen com a objectiu preparar el sistema immunitari perquè llanci un atac eficient contra les cèl·lules canceroses en l'organisme. Aquestes vacunes volen avisar al cos de la possibilitat d'aparició d'un tumor concret o ampliar la resposta immunitària contra un tumor ja existent. Aquestes vacunes es componen de les cèl·lules canceroses, parts d'aquestes o antigens purs provinents d'elles.

[26]

2.4. Teràpies dirigides⁸

Les teràpies dirigides són un tipus de tractament contra el càncer, basat en medicaments micromoleculars o altres substàncies, com anticossos monoclonals, que es dirigeix a proteïnes que controlen com creixen, es divideixen i es propaguen les cèl·lules canceroses. Així es pot detectar i bloquejar aquestes dianes presents en les cèl·lules canceroses i afectar la seva supervivència.

Els medicaments utilitzats en les teràpies dirigides funcionen de diverses maneres, o bé desactivant el procés de creixement i propagació de les cèl·lules canceroses, o bé fent que les cèl·lules canceroses morin per si soles o bé eliminant directament aquestes cèl·lules. [27]

- **Medicaments micromoleculars:** són pastilles o microcàpsules d'administració oral que contenen molècules de baix pes molecular, així penetren fàcilment a les cèl·lules tumorals, que s'uneixen específicament a les dianes moleculars o proteïnes internes per acabar amb la destrucció cel·lular.
- **Anticossos monoclonals:** són proteïnes immunoglobulines dissenyades en un laboratori i administrades per via intravenosa, a través d'una agulla que s'insereix directament en una vena sanguínia, per unir-se a dianes moleculars específiques dins de les cèl·lules canceroses. Alguns anticossos marquen les cèl·lules canceroses perquè el sistema immunitari les identifiqui millor i les destrueixi (és la immunoteràpia explicada anteriorment amb anticossos monoclonals), d'altres actuen de forma directa frenant la multiplicació de les cèl·lules canceroses, forçant la seva autodestrucció o transportant toxines cap a elles amb la mateixa fi. [28]

Les teràpies dirigides són actualment un tipus important de tractament contra el càncer, amb un futur prometedor. A mesura que es comprenguin millor els canvis específics que succeeixen en les cèl·lules canceroses, els investigadors desenvoluparan més

⁸ Targeted Drugs

medicaments per tractar-los de manera dirigida. De moment, només alguns tipus de càncers es tracten rutinàriament amb aquests medicaments.

3. Degradació Dirigida de Proteïnes

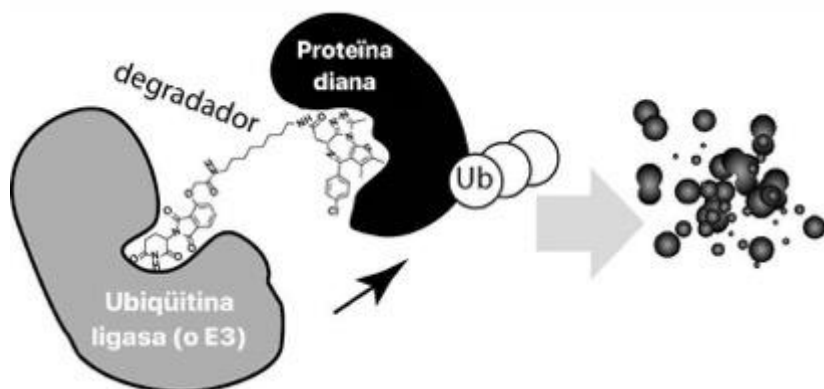
La degradació dirigida de proteïnes és una estratègia farmacològica innovadora que deriva de les teràpies dirigides i assegura una regulació eficient i controlada de les proteïnes a la cèl·lula. Aquesta permet eliminar aquelles proteïnes que estan danyades, mal plegades, que causen una malaltia o que ja no són necessàries. [29]

3.1. Funcionament

Per tal que el procés de degradació dirigida de proteïnes funcioni correctament cal dissenyar bé i crear unes molècules químiques sintètiques anomenades degradadors. Aquests permeten la unió i degradació específica de les proteïnes després de la seva traducció, aconseguint així degradar proteïnes que no es poden tractar per cap altra alternativa farmacològica i proteïnes que no compten amb funció o dominis catalítics i no catalítics involucrats en la biologia de la malaltia. [29]

Els degradadors són heterobifuncionals, és a dir, estan formats per dues parts diferenciades, una part s'uneix a la proteïna diana d'interès, per exemple, una proteïna essencial per al creixement tumoral, i una altra part que s'uneix a la ubiquitina ligasa o E3. Fins al moment, la majoria dels degradadors desenvolupats recluten E3s de la família de les *Cullin-RING* ligases (CRLs), una família proteica molt nombrosa d'E3 ligases, amb uns 250 membres, que presenten una regulació molt dinàmica. [30] L'E3 s'encarrega de reconèixer i etiquetar amb ubiquitina (Ub) la proteïna diana (vegeu apartat 3.1.1.) per a la seva posterior destrucció al proteasoma

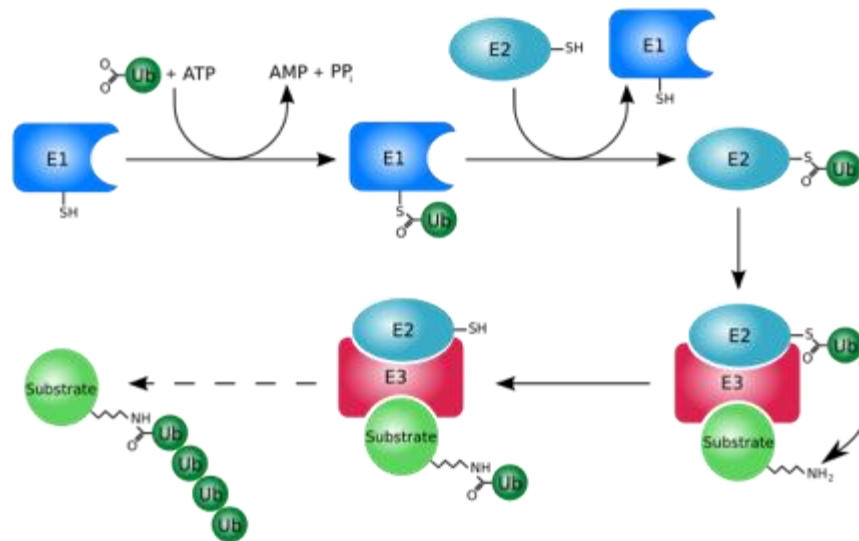
(vegeu apartat 3.1.2.), el principal sistema de degradació de proteïnes present en les nostres cèl·lules (vegeu imatge 10). Allí, les proteïnes es degraden mitjançant una proteòlisi o reacció química que trenca els enllaços peptídics.



Imatge 10: Funcionament de la degradació dirigida de proteïnes, amb tots els seus participants. Adaptat de [49]

3.1.1. Procés d'ubiquitinització

El procés de la degradació dirigida de proteïnes és complex i específic. Dins d'aquest procés, en aquest subapartat ens centrarem a explicar el procés concret de la ubiquitinització, l'addició d'Ub damunt la proteïna d'interès, el qual segueix tres passos on intervenen diferents enzims. Aquest procés es pot repetir per afegir cada vegada més ubiquïtines a la cadena de poliubiquitinització (vegeu Imatge 11).



Imatge 11: Procés d'ubiquitinització. Font: [50]

1. **Activació de la ubiquitina:** la ubiquitinització comença quan l'enzim **E1** s'uneix a la ubiquitina en una reacció dependent d'ATP. Aquesta reacció forma un enllaç tioèster⁹ entre el grup carboxil terminal de la ubiquitina i un residu de cisteïna en l'E1. [31]
2. **Transferència de la ubiquitina:** l'enzim **E2** transfereix la ubiquitina activada des d'E1 a l'enzim conjugador de la ubiquitina E2. Aquest procés també implica la formació d'un enllaç tioèster entre la ubiquitina i un residu de cisteïna en l'E2. [31]
3. **Conjugació de la ubiquitina:** el procés finalitza quan la ubiquitina és conjugada damunt la proteïna d'interès a través de l'enzim ubiquitina ligasa o **E3**, el qual reconeix i facilita la transferència de la ubiquitina des d'E2 a la proteïna diana

⁹ Enllaç d'alta energia producte de l'esterificació entre un àcid carboxílic i un tiol.

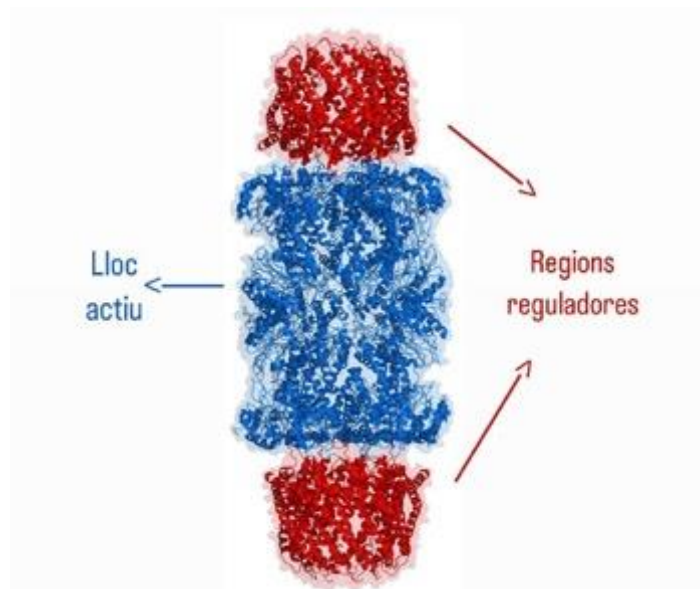
d'interès. Llavors, l'E3 catalitza la formació d'un enllaç isopeptídic¹⁰ entre el grup carboxil de la ubiquitina i el grup amino d'una lisina en la proteïna diana. [31]

De fet, en la cascada d'ubiquitinització, l'enzim E1 troba dotzenes d'E2 per enllaçar-se, que es troben alhora amb centenars d'E3 de forma jeràrquica. Així doncs, el procés d'ubiquitinització es torna més específic a mesura que avança, ja que de cada enzim en tenim més que de l'anterior.

3.1.2. Procés de degradació al proteasoma

Quan una proteïna està marcada amb aquesta cadena de poliubiquitina, és reconeguda pel proteasoma, un complex proteic amb funció de degradació, que consta d'unes regions reguladores i un lloc actiu (vegeu imatge 12).

Les regions reguladores del proteasoma identifiquen la cadena d'ubiquitina i comencen a desenllaçar-la, alliberant molècules d'ubiquitina, que seran utilitzades novament en futurs processos de degradació, alhora que la proteïna diana es desnatura, és a dir, es desplega i es descompon. Un cop la proteïna està desnaturada, és translocada a la part central del proteasoma, el lloc actiu o nucli proteolític, que trenca diversos enllaços peptídics de la cadena produint un conjunt de pèptids d'aproximadament 8 aminoàcids de longitud. Finalment, per una ruta desconeguda, els pèptids es descomponen en aminoàcids individuals. [32]



Imatge 12: Parts principals del proteasoma en el procés de degradació. Adaptat de [51]

¹⁰ Enllaç covalent que es forma entre dues molècules quan el grup carboxil d'una reacciona amb el grup amino de l'altra, alliberant una molècula d'aigua.

3.2. Comparació de la degradació dirigida de proteïnes amb la farmacologia clàssica

Abans del segle XXI, els únics tractaments per als pacients amb càncer eren la quimioteràpia, la radioteràpia i la cirurgia. Encara que les tres modalitats continuen sent fonamentals en la teràpia contra el càncer, la quimioteràpia i la radioteràpia presenten limitacions importants, ja que poden causar toxicitats, morbiditats¹¹ i efectes adversos a llarg termini. Això es deu principalment a la seva falta d'especificitat, pel fet que no només afecten les cèl·lules malignes, sinó també les cèl·lules sanes. Amb el temps, es van descobrir inhibidors que es dirigien als centres actius¹² de proteïnes específiques involucrades en la patogènesi del càncer, les teràpies dirigides, sense alterar les cèl·lules no canceroses. Aquest descobriment va obrir una nova era en la medicina de precisió. I més endavant, va aparèixer la degradació dirigida de proteïnes, oferint encara dos avantatges més en comparació amb la inhibició proteica de les teràpies dirigides tradicionals. [33]

En primer lloc, en la degradació dirigida els degradadors actuen a través d'una unió transitòria en lloc d'una ocupació competitiva del centre actiu de la proteïna, i es dissocien amb èxit després de promoure la poliubiquitinització de la proteïna causant de la malaltia. És més, un sol degradador pot destruir moltes còpies d'una proteïna patògena, proporcionant així una major eficiència en dosis molt petites. En segon lloc, mentre que els inhibidors de proteïnes només bloquegen el centre actiu de la proteïna patogènica, els degradadors destrueixen totes les seves funcions, proporcionant una major sensibilitat quan es tracta de dianes resistents als fàrmacs o proteïnes sense un centre actiu clar. Per això, presenten una oportunitat més en la medicina de precisió. [33]

3.3. Impacte futur

La ciència que sustenta la degradació dirigida de proteïnes ha crescut de forma exponencial i ha madurat substancialment en els darrers anys. I durant els pròxims anys aquesta teràpia continuarà avançant, centrant-se en els següents quatre punts d'inflexió:

- **Definició i demostració clínica de la classe de proteïnes diana que es beneficien més de la degradació que de la inhibició:** sabem que no totes les proteïnes responen de la mateixa manera a la degradació i a la inhibició. Per això, identificar i validar clínicament quines proteïnes, quan són degradades, ofereixen

¹¹ Quantitat de persones que pateixen una malaltia en un lloc i temps determinat.

¹² Regió de la molècula enzimàtica que s'uneix al substrat.

avantatges terapèutics superiors als aconseguits amb la seva inhibició és crucial i pot orientar el desenvolupament de futurs tractaments. [34]

- **Ampliació de l'abast de les E3 ligases emprades clínicament per possibilitar la medicina de precisió:** actualment, només un nombre limitat d'E3 ligases s'utilitzen en la degradació dirigida de proteïnes. Ampliar el repertori d'E3 ligases disponibles permetria una major personalització i selectivitat en els tractaments, adaptant-los a les necessitats específiques dels pacients i a les característiques de les seves malalties.
- **Extensió de l'abast clínic de la degradació dirigida de proteïnes més enllà de l'oncologia:** tot i que la major part de la investigació i dels avenços en la degradació dirigida de proteïnes s'han centrat en l'oncologia, hi ha un enorme potencial per aplicar aquesta tecnologia a altres àrees terapèutiques. Expandir l'ús clínic més enllà del càncer podria obrir noves vies per tractar diverses malalties cròniques i degeneratives.
- **Validació d'altres modalitats de degradació dirigida de proteïnes, més enllà dels PROTAC, en entorns clínics:** actualment, les modalitats de degradació dirigida de proteïnes més investigades i desenvolupades són els PROTAC, juntament amb les *IMmunomodulatory Drugs* (IMiDs). Tanmateix, hi ha altres enfocaments prometedors que necessiten ser explorats i validats clínicament. La validació d'aquestes noves modalitats podria ampliar encara més les possibilitats terapèutiques de la degradació dirigida de proteïnes. [34]

Amb el temps, s'espera que aquests avenços en la degradació dirigida de proteïnes portin a una millora significativa en el tractament de diverses malalties i a oferir teràpies més efectives i específiques.

4. PROteolysis TArgeting Chimeras

Els *PROteolysis TArgeting Chimeras* (PROTAC) són eines moleculars que permeten la degradació específica i controlada de proteïnes, induint el reconeixement de la proteïna d'interès per la maquinària de degradació proteica de la cèl·lula. [35]

4.1. Introducció històrica

La tecnologia PROTAC va ser proposada per primera vegada el 2001, quan el grup de recerca de Craig Crews i Raymond Deshaies van sintetitzar el primer lot de molècules bifuncionals PROTAC per induir la degradació de la Metionina AminoPeptidasa 2, un enzim que en humans està codificat pel gen MetAP2, que catalitza l'eliminació hidrolítica dels

residus de la metionina N-terminal de les proteïnes. Això va establir les bases per a la primera generació de PROTAC, dissenyats a partir de fragments de pèptids. ^[36]

Seguidament, el grup de recerca de Crews va continuar dissenyant PROTAC millorats per la degradació d'aquests enzims i altres andrògens. Van descobrir que, després de microinjectar aquestes molècules a les cèl·lules, aquestes podien unir-se específicament a la proteïna diana i degradar-la. Ara bé, els PROTAC de primera generació contenien seqüències de pèptids d'un pes molecular relativament alt, amb enllaços peptídics làbils, amb una penetració cel·lular deficient i amb una potència baixa típicament del rang micromolar, fent aquestes deficiències que aquestes PROTAC fossin pobres candidats farmacèutics.

Per superar les debilitats dels PROTAC basats en pèptids, es van crear nous PROTAC basats en molècules petites. El primer PROTAC basat en molècules petites, el SARM-nutlin PROTAC, va ser publicat el 2008, i va desencadenar la ubiquïtinització i la degradació d'un receptor d'andrògens. L'activitat del fàrmac no era alta, però millorava la dels PROTAC de primera generació. ^[36]

El 2012, el grup de recerca de Crews va dissenyar una sèrie de molècules que es podien unir a la E3 ligasa amb alta afinitat i amb un pes molecular optimitzat (aproximadament 400 Daltons), cosa que permet millorar la capacitat de fàrmac. I el 2013, es va descobrir un PROTAC capaç de degradar eficientment la proteïna diana de la cèl·lula en el rang nano molar (1 nM).

El 2015, el grup de Crews, juntament amb GlaxoSmithKline, una empresa de productes farmacèutics, van desenvolupar una molècula PROTAC capaç de degradar la proteïna serina/treonina quinasa, a concentracions nanomolars baixes i utilitzant una molècula petita pel reconeixement d'E3 ligasa. A la vegada, l'equip de James Bradner va dissenyar un PROTAC per degradar la família BET, és a dir, per degradar de manera efectiva proteïnes diana de tumors humanitzats en cèl·lules i ratolins. A partir d'aquest moment, oficialment es va iniciar l'auge dels PROTAC. ^[36,37]

Més endavant, el 2019, es va construir amb èxit una molècula PROTAC capaç de degradar, de manera controlada, les proteïnes Brd4 i BTK sota la llum ultraviolada de 365 nm. I posteriorment, el 2020, a aquestes molècules PROTAC controlades per la llum se'ls va afegir un grup fotosensible, i així la degradació s'aconseguia sota la irradiació de llum visible i llum ultraviolada.

Aquests avenços permeten un control cada vegada més precís de la degradació de proteïnes, obrint noves possibilitats en la investigació i en el desenvolupament de teràpies.

4.2. Funcionament

Els PROTAC són un tipus de degradadors basats en molècules petites que dirigeixen les proteïnes no desitjades cap al sistema d'eliminació de proteïnes de la cèl·lula, a través del sistema Ubiquitina - Proteasoma (UPS). De fet, els PROTAC estan dissenyats per degradar selectivament proteïnes causants de malalties, presentant una nova oportunitat per a la intervenció terapèutica.

Les cèl·lules sintetitzen constantment proteïnes que duen a terme les seves funcions en l'organisme. Tanmateix, també és necessari eliminar algunes proteïnes, quan estan danyades o són innecessàries, en un procés de proteòlisi, en el proteasoma (vegeu apartat 3.1.2.). Aquest sistema de degradació és un procés cel·lular que elimina els residus cel·lulars, recicla els aminoàcids per sintetitzar noves proteïnes necessàries, garanteix un ús eficient dels recursos cel·lulars i manté un equilibri adequat en la quantitat de proteïnes presents en les cèl·lules, sent un sistema crucial per al correcte funcionament de l'expressió gènica i del cicle cel·lular. ^[35]

Per seleccionar les proteïnes a degradar, aquestes es marquen unint-hi unitats d'ubiquitina. Aquesta marca permet al proteasoma identificar i degradar la proteïna indicada, assegurant així que només les proteïnes assenyalades estiguin afectades i protegint les proteïnes que són necessàries i funcionals per la cèl·lula.

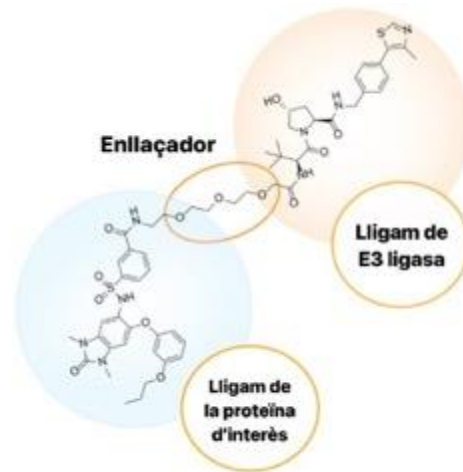
En definitiva, els PROTAC ofereixen una estratègia innovadora per eliminar completament les proteïnes diana d'interès mitjançant la seva degradació dirigida, en lloc de simplement inhibir-les. Així, aquests obren una nova oportunitat terapèutica oferint una solució més eficaç i durable en el desenvolupament de fàrmacs.

4.3. Parts d'un PROTAC

Els PROTAC són uns degradadors petits compostos principalment per 3 elements, dos lligams i un enllaç de poca longitud. En concret, un lligam de la proteïna d'interès (POI) o diana terapèutica, un lligam de la E3 ligasa i, finalment, un espaiador o *linker* que conjuga els dos elements anteriors (vegeu Imatge 13).

- **Lligam de la proteïna d'interès (POI):**

Aquesta part del PROTAC és la responsable de reconèixer i unir-se específicament a la proteïna que es vol degradar, coneguda com la proteïna d'interès o diana terapèutica. Aquest lligand està dissenyat per tenir una alta afinitat i especificitat per la POI, cosa que permet que el PROTAC s'uneixi amb precisió a la proteïna que es desitja eliminar. [38]



- **Lligam de l'E3 ligasa:** Aquesta part del PROTAC s'uneix a una E3 ligasa, l'enzim

Imatge 13: Parts que componen un PROTAC. Adaptat de [52]

que intervé en el marcatge de les proteïnes

per a la degradació (vegeu apartat 3.1.1.). La funció d'aquest lligam és portar l'E3 ligasa a prop de la proteïna d'interès, facilitant la transferència de les ubiquïtines a la POI.

- **Espaiador o linker:** L'espaiador és l'element que connecta els dos lligams anteriors. La seva funció és proporcionar la flexibilitat i la distància necessària perquè el PROTAC pugui formar un complex ternari estable entre la POI i l'E3 ligasa. Aquest espaiador és crucial perquè el PROTAC aconseguixi una configuració que permeti una transferència d'ubiquïtina eficient.

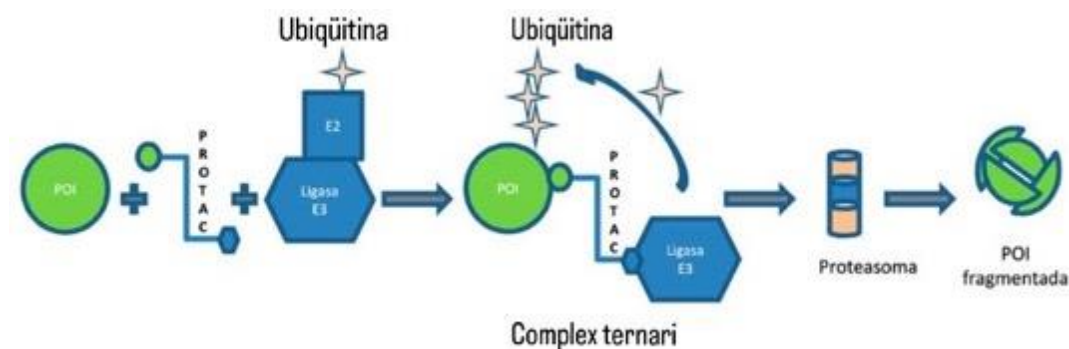
L'E3 ligasa i la POI unides pel PROTAC formen un complex ternari que activa l'UPS, promovent la degradació de la proteïna en qüestió. És a dir, aquest complex promou la poliubiquitinació de la POI, que serà reconeguda pel proteasoma i digerida catalíticament en pèptids petits i aminoàcids.

4.4. Mecanisme d'acció

El desenvolupament dels PROTAC està inspirat en l'UPS, la via que inclou el procés de ubiquitinització i el procés de degradació al proteasoma. D'aquesta manera, els PROTAC es converteixen en una peça clau en la progressió del cicle cel·lular, mantenint l'homeòstasi cel·lular¹³, i regulant en definitiva la gènesi tumoral. [33]

¹³ La tendència a mantenir l'equilibri i l'estabilitat interns en els diferents sistemes biològics.

El mecanisme d'actuació d'un PROTAC per desfer-se d'una proteïna patològica com les que es donen al càncer comença aproximant la POI a l'E3 ligasa perquè aquesta última pugui ubiquïtinar la primera. De fet, quan el PROTAC arriba al lloc d'acció, s'uneix simultàniament als seus dos substrats pels corresponents extrems i forma el complex POI-PROTAC-E3 ligasa, el complex ternari, el qual té l'activitat de fàrmac. Per això, a continuació, el complex indueix l'activació de la cascada de poliubiquïtinització sobre la POI i, una vegada marcada, aquesta es reconeguda i degradada pel proteasoma, fent efectiu el tractament (vegeu imatge 14). ^[33]



Imatge 14: Mecanisme d'acció d'un PROTAC. Adaptat de ^[53]

En resum, els PROTAC són una eina terapèutica molt útil perquè degraden completament la proteïna diana, eliminant-la de manera definitiva i impedit que recuperi la seva funció, i a més a més, poden ser reutilitzats dins la cèl·lula, oferint una degradació contínua de les proteïnes diana.

4.5. Oportunitats i desafiaments

Per una banda, els PROTAC presenten alguns avantatges respecte als fàrmacs tradicionals, ja que són capaços d'eliminar completament les proteïnes d'interès en lloc d'inhibir directament el seu mecanisme d'acció. En aquest sentit, els PROTAC afecten a totes les funcions de la proteïna no només bloquegen el seu centre actiu, desapareixent així la possibilitat de desenvolupar resistència al fàrmac i evitant l'acumulació de POI inhibida a la cèl·lula. Així mateix, tenen el potencial de reclutar a qualsevol proteïna, també les *undruggable*. A més, aconseguixen disminuir la dosi farmacològica administrada al pacient, perquè el PROTAC es recupera en cada cicle de poliubiquïtinització, reduint la quantitat de reaccions adverses i mantenint la qualitat de vida del pacient. I finalment, aquests demostren eficàcia via oral, suposant una major comoditat pel pacient en tractament crònic.

^[33]

Per altra banda, els PROTAC també tenen limitacions. Aquests es limiten principalment a degradar proteïnes intracel·lulars, encara que ja s'han creat versions que poden actuar sobre algunes proteïnes extracel·lulars, a través d'endosomes. També, s'han observat algunes mutacions genòmiques en el proteasoma, així com en les E3 ligases, que poden suposar una resistència al tractament, necessitant recerques addicionals sobre aquest aspecte. I en últim lloc, alguns PROTAC han mostrat certa toxicitat, encara que evitable a través de teràpies addicionals com la teràpia fotodinàmica. ^[35]

MARC PRÀCTIC

5. Avaluació de l'eficàcia d'un PROTAC per a la degradació de c-Myc en cèl·lules oncològiques.

La redacció del marc pràctic d'aquest treball seguirà l'estructura típica d'un article científic, amb les següents parts: introducció, materials, mètodes, resultats, discussió i conclusions. D'aquesta manera pretenem comunicar de manera clara, eficient i estructurada els resultats d'aquesta investigació.

5.1. Introducció

En aquest experiment s'avaluarà l'eficàcia d'un PROTAC, desenvolupat pel grup de recerca del Dr. Galdeano, a la Universitat de Barcelona, per degradar el factor de transcripció proteic c-Myc present en una línia de cèl·lules oncològiques. Després del tractament, la tècnica Western blot permetrà conèixer els nivells cel·lulars d'aquesta proteïna que resten a les cèl·lules tractades amb el PROTAC.

C-MYC és un gen localitzat al cromosoma 8 humà, que s'expressa constitutivament¹⁴ i provoca l'expressió de molts altres gens (es creu que regula l'expressió del 15% de tots els gens), alguns dels quals estan implicats en la proliferació cel·lular i contribueixen a la formació de càncer. En conseqüència, la inhibició o eliminació de la proteïna c-Myc que en resulta, podria desencadenar una ràpida regressió tumoral en models oncològics animals, amb uns efectes secundaris mínims i reversibles, fet que el converteix en una estratègia terapèutica prometedora. [39]

La principal tècnica de laboratori utilitzada en aquesta pràctica serà el Western blot, una tècnica analítica àmpliament utilitzada en biologia molecular per detectar i quantificar les proteïnes d'interès en una mostra cel·lular o teixit lisat, utilitzant anticossos que s'uneixen específicament a seqüències d'aminoàcids molt específiques de la proteïna, anomenats epítops. Per això, s'agafarà el cultiu cel·lular tractat amb el PROTAC, i amb inhibidors que explicarem més endavant, i s'extrauran les proteïnes. Seguidament, se separaran en funció de la seva mida gràcies a una electroforesi en gel SDS-PAGE, es transferiran del gel a una membrana mitjançant l'aplicació de corrent elèctric, i un cop a la membrana, aquestes proteïnes es processaran amb anticossos primaris específics contra la proteïna diana d'interès. Després, amb anticossos secundaris units a un enzim contra els anticossos

¹⁴ Expressió gènica d'un gen que es transcriu i es tradueix constantment.

Es treballarà amb un cultiu de cèl·lules oncològiques que es troba en el medi RPMI 1640, on s'afegiran 3 inhibidors i finalment es tractarà amb el PROTAC. Els inhibidors utilitzats són els següents:

-

NS(=O)(=O)O[C@H]1C[C@H](C[C@@H]1O)[C@H]2C=C[C@H](C3=CC4=CC=CC=C3C4N)N2COC(=O)C1=CC(=C(C)C)C(=C(C)C)OC1[C@H](C)[C@H](O)[C@@H](C)[C@@H](O[C@H]2C[C@@H](C)[C@H](OC)[C@@H](O)[C@H]2C)C

36

En definitiva, l'objectiu d'aquest marc pràctic és avaluar la capacitat del PROTAC de reduir els nivells de c-Myc, per validar la seva eficàcia i viabilitat com a agent terapèutic potencial i innovador en oncologia. En aquest sentit, la hipòtesi d'aquest estudi és que potser el tractament PROTAC de cèl·lules canceroses redueix significativament els nivells intracel·lulars de c-Myc, contribuint així a la regressió dels seus trets cancerosos.

5.2. Materials

Taula 1: Llistat de material utilitzat en la part pràctica d'aquest TdR

Medi de cultiu RPMI 1640	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (PBS)
Flascons per cultiu cel·lular (vegeu imatge 19)	Tubs de microcentrifugació
Tripsina	<i>Dimethylsulfoxide</i> (DMSO)
MLN4924 (inhibidor de les CRLs ¹⁵)	MG -132 (inhibidor del proteasoma)
Baf-A1 (inhibidor del lisosoma)	PROTAC en diferents concentracions (50 µM, 10 µM, 5 µM, 1 µM i 0.5 µM)
Plaques de 6 pous	Tubs falcon (15 mL i 50 mL)
Rascador o <i>Scraper</i> (vegeu imatge 18)	Tubs Eppendorf (1.5 mL i 2 mL)
Pipetes automàtiques	Puntes de pipeta estèrils
Centrífuga (vegeu imatge 20)	Còctel d'inhibidors de proteases i fosfatases (vegeu imatge 23)
<i>Radio-Immunoprecipitation Assay</i> (RIPA) <i>buffer</i> (detergents) (vegeu imatge 23)	Solució estàndard de <i>bicinchoninic acid</i> (BCA)
Components del gel separador (<i>resolving gel</i>)	Components del gel empaquetador (<i>stacking gel</i>)
Pinta per formar els pous	Tanc d'electroforesi

¹⁵ Superfamília de les E3 ligases d'ubiquitina, implicades en la regulació d'una sèrie de funcions cel·lulars.

Font d'alimentació per l'electroforesi	Marcador de pes molecular
Tampó de càrrega (<i>loading buffer</i>)	<i>Running buffer Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)</i>
Incubadora (37°C)	Microscopi (opcional, per observar cèl·lules)
Peròxid d'hidrogen (vegeu imatge 21)	Luminol (vegeu imatge 21)
<i>Amersham Imager 680</i> ¹⁶ (vegeu imatge 22)	Gel
Etanol	Membrana de fluorur de polivinilidè (PVDF)
Llet per bloquejar la membrana	<i>Tris-buffered saline with Tween 20 (TBS-T)</i>
Anticòs primari	Anticòs secundari - <i>Horseradish peroxidase (HRP)</i>
Vinculina	

¹⁶ Instrument per analitzar imatges digitals d'alta resolució de mostres de proteïnes i ADN en gels i membranes.



Imatge 18: Scraper. Font: elaboració pròpia.



Imatge 19: Flascons per cultiu cel·lular.
Font: elaboració pròpia.



Imatge 22: Amersham Imager 680.
Font: elaboració pròpia.



Imatge 20: Centrífuga. Font: elaboració pròpia.



Imatge 21: Peròxid d'hidrogen i luminol.
Font: elaboració pròpia.



Imatge 23: RIPA buffer i cocktail d'inhibidors.
Font: elaboració pròpia.

5.3. Mètodes

El protocol que s'ha seguit per realitzar aquesta part pràctica es divideix en la preparació de la mostra, la separació de les proteïnes extretes per electroforesi, la transferència de les proteïnes del gel d'electroforesi a una membrana, immunodetecció de la proteïna d'interès de la membrana amb anticossos i detecció i observació d'aquesta per quimioluminescència.

5.3.1. Preparació de la mostra

Partim d'un cultiu cel·lular oncològic inicialment en medi de cultiu RPMI 1640.

- Eliminar el líquid sobrant (medi de cultiu RPMI 1640) del cultiu cel·lular oncològic i netejar suaument el flascó on es troba, per eliminar les cèl·lules mortes, amb una solució de PBS, una dissolució salina amb fosfat que evita la ruptura de les cèl·lules objecte d'estudi per osmosi¹⁷.
- Afegir 2 mL de tripsina al flascó anterior per aixecar les cèl·lules de la superfície i posar tota la barreja 2 minuts a la incubadora (37 °C) per agilitzar el procés enzimàtic (la tripsina trenca enllaços proteics).

Un cop fora la incubadora, donar petits cops a la superfície del flascó per aixecar les cèl·lules de manera mecànica i ajudar a continuar el procés.

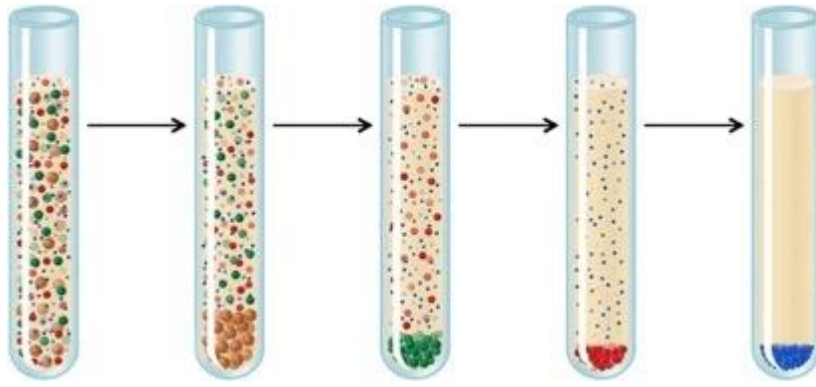
- Addicionar 8 mL de medi RPMI 1640 al flascó per neutralitzar la tripsina i traspasar tota la barreja a un tub falcon per centrifugar.
- Després de la centrifugació, llençar el sobrenadant que queda sobre el pellet de cèl·lules vives i afegir medi RPMI nou amb la intenció de sembrar aquestes cèl·lules novament en unes plaques d'interès. Per això, cal haver calculat prèviament la quantitat de

medi necessari per trobar les cèl·lules en una confluència del 70% el dia de la sembra (vegeu imatge 24 i 25).



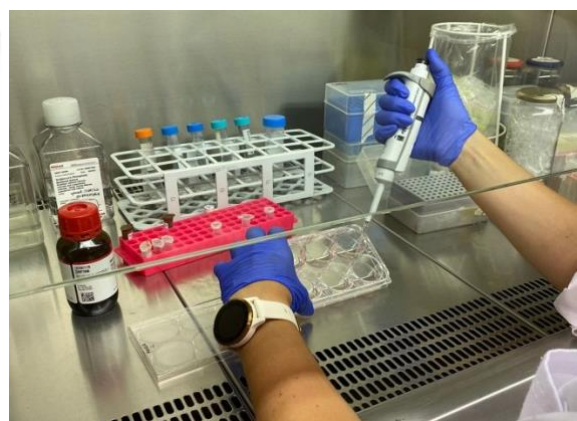
Imatge 24: Cel·lules vives resuspeses en medi RPMI nou dins un tub falcon. Font: elaboració pròpia.

¹⁷ Moviment d'aigua a través de la membrana cel·lular. El PBS té una concentració salina equilibrada que evita que les cèl·lules es trenquin per desequilibris osmòtics durant el procés de neteja.



Imatge 25: Procés de formació del pellet cel·lular dins la centrífuga. Font: elaboració pròpia.

- Sembrar les cèl·lules anteriors amb medi RPMI 1640 nou, amb l'ajuda d'una pipeta, a quatre dels sis pous de la placa, assegurant que cada pou tingui la mateixa concentració de cèl·lules.
- Afegir a cadascun d'aquests pous respectivament (vegeu imatge 26) DMSO, com a control, inhibidor MLN4924, inhibidor MG-132 i inhibidor Baf-A1, a una concentració de 10 μ M.
- Repetir paral·lelament el procediment dels dos punts anteriors sis vegades per tenir sis plaques sembrades idèntiques.
- Incubar la barreja de les cèl·lules amb els inhibidors durant 1 hora a 37 °C per un correcte pretractament.



Imatge 26: Plaques de 6 pous on s'han sembrat les cèl·lules oncològiques i s'ha aplicat el pretractament amb els inhibidors. Dreta: sembra de les cèl·lules amb la pipeta; Esquerra: distribució dels inhibidors al llarg de la placa. Font: elaboració pròpia.

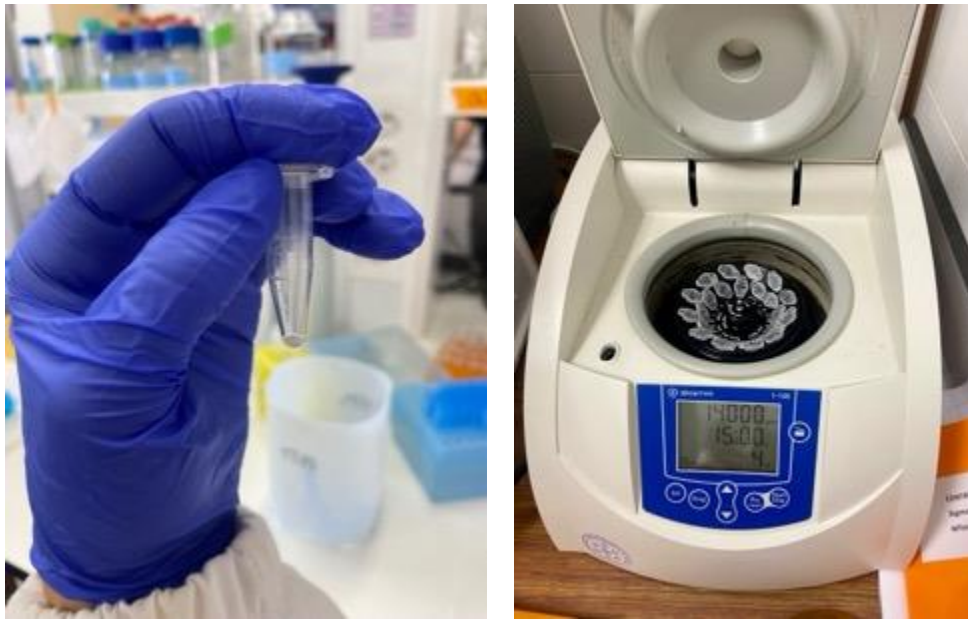
- Afegir el PROTAC a les sis plaques anteriors amb les cèl·lules pretractades per saber si, un cop els inhibidors han fet la seva funció, la proteïna es degrada o no. Si la proteïna es degrada, l'experiment indica que el mecanisme d'acció d'aquest PROTAC no depèn del procés o sistema inhibït (E3, proteasoma o acidificació del lisosoma), ja que tot i no funcionar no s'ha impedit la seva degradació. En canvi, si la proteïna no es degrada, es pot deduir que la seva degradació depèn del sistema inhibït. El PROTAC s'afegeix en les diferents dosis: 50 μ M, 10 μ M, 5 μ M, 1 μ M, 0.5 μ M i 0 μ M; a cada una de les sis plaques una dosi diferent. Això serveix per avaluar la dependència entre el PROTAC i el sistema inhibït, determinar la relació entre la concentració de PROTAC i la quantitat de proteïna degradada i establir la dosi òptima per aconseguir el màxim efecte (vegeu imatge 27).

PLACA AMB 50 μ M DE PROTAC



Imatge 27: Distribució dels diferents inhibidors i del PROTAC (a 50 μ M), en una placa de sis pous que conté cèl·lules oncològiques. Font: elaboració pròpia

- Incubar les cèl·lules amb el tractament PROTAC durant 24 hores a 37 °C.
- Recollir 0,5 mL de les cèl·lules de cada pou en tubs Eppendorfs, mitjançant una micropipeta, i mantenir-les en gel durant 30 minuts per aconseguir el xoc tèrmic, el qual assegura la lisi cel·lular i l'estabilització de les proteïnes per la seva anàlisi posterior. Per desenganxar les cèl·lules adherides als pous s'utilitza un rascador (vegeu imatge 18).
- Ultracentrifugar totes les mostres a 14.000 rpm durant 15 minuts a 4 °C, separar el sobrenedant amb les restes cel·lulars i obtenir el pellet amb les cèl·lules d'interès. (vegeu imatge 28)



Imatge 28: Ultracentrifugació de les cèl·lules per obtenir-ne el pellet cel·lular. Dreta: ultracentrífuga utilitzada. Esquerra: Tub Eppendorf amb el pellet d'interès, un cop eliminat el sobrenadant. Font: elaboració pròpia

- Preparar un tampó de lisi, el qual conté detergents (RIPA buffer), i en el que s'afegeix també un còctel d'inhibidors de proteases i fosfatases per prevenir la degradació proteica durant el procés de lisi.
- Afegir 60 μ M del tampó de lisi anterior sobre el pellet cel·lular de cada Eppendorf i pipetejar la barreja amunt i avall diverses vegades per assegurar que el pellet quedi resuspès completament en aquest tampó. Això trenca les membranes i l'ADN i allibera les proteïnes.
- Incubar les mostres en gel 30 minuts i ultracentrifugar-les de nou per separar les restes cel·lulars no lisades de les proteïnes alliberades al sobrenadant. Traspasar el sobrenadant a un nou tub Eppendorf de microcentrifugació.
- Preparar una sèrie de dilucions conegudes d'una solució estàndard de BCA per crear una recta patró. I determinar la concentració de proteïna de les mostres dels lisats anteriors (sobrenadant) interpolant les seves absorbàncies en les absorbàncies de la recta patró. Això permet quantificar la concentració de proteïna amb més precisió i afavorir una major fiabilitat en l'anàlisi posterior.
- Calcular la quantitat de mostra de cada cultiu que es necessita per 20 mg de proteïna, ja que es vol carregar 20 mg de proteïna de cada mostra (sis plaques tractades amb diferents concentracions de PROTAC i en cadascuna quatre

pretractaments amb diferents inhibidors són un total de 24 mostres) en un pouet diferent d'un gel SDS-PAGE (vegeu apartat 5.3.2.).

5.3.2. Electroforesi en gel

Després de determinar la concentració de proteïnes dels lisats cel·lulars, prepararem les mostres per carregar i córrer en els gels de SDS-PAGE.

- Preparar els reactius necessaris per elaborar ambdós gels de SDS-PAGE a utilitzar, el gel separador i el gel empaquetador (vegeu taules 2 i 3) .
 - Tampó A (temperatura ambient): *Acrylamide* i *bis-acrylamide*, 40% SDS
 - Tampó B (temperatura ambient): 1.5 M Tris pH 8.8, 0.4% SDS
 - Tampó C (temperatura ambient): 0.5 M Tris pH 6.8, 0.4% SDS
 - APS 10% (-20°C)
 - TEMED (4°C)

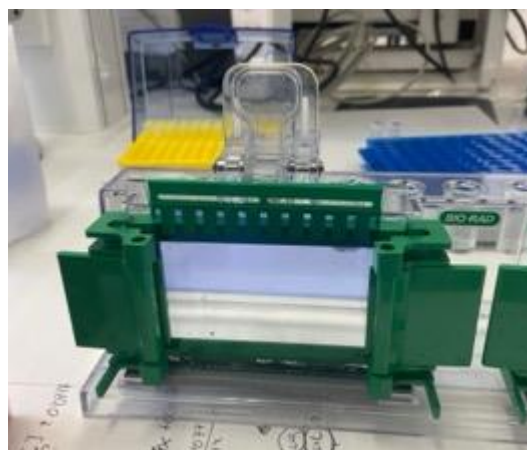
Taula 2: Composició del gel separador.

Gel separador	10%
Tampó A (mL)	1.25
Tampó B (mL)	1.25
MQH ₂ O (mL)	2.4
APS 10% (µL)	50
TEMED (µL)	2.5
Volum final (mL)	5

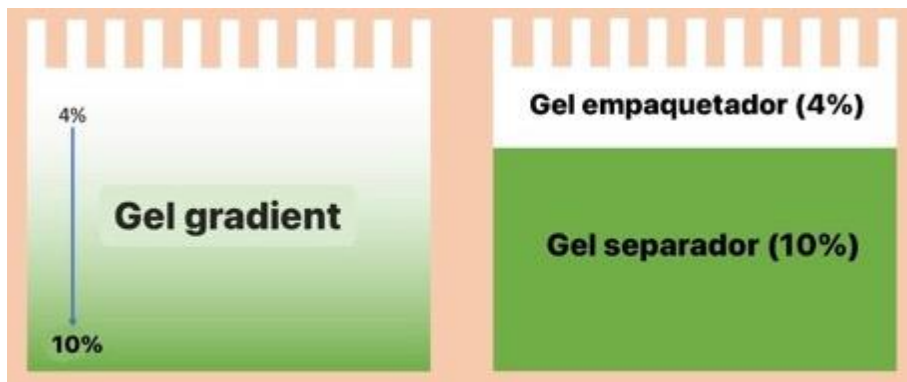
Taula 3: Composició del gel empaquetador.

Gel empaquetador	4%
Tampó A (mL)	0.25
Tampó C (mL)	0.625
MQH ₂ O (mL)	1.6
APS 10% (μL)	25
TEMED (μL)	2.5
Volum final mL)	2.5

- Per aconseguir-ho, cal barrejar els components necessaris per a la solució del gel separador i abocar-los ràpidament al *cassette*. Cobrir la superfície del gel separador amb una capa fina d'etanol per evitar la formació de bombolles entre aquest gel i el següent que abocarem a sobre més endavant, per així facilitar la polimerització. Deixar polimeritzar el gel separador durant 30 minuts. Barrejar els components necessaris per a la solució del gel empaquetador i abocar-los ràpidament de nou al *cassette*, sobre el gel separador, un cop retirada la capa d'etanol per decantació. A continuació, inserir un pinte sobre el gel empaquetador per formar els pouets on es carregaran les mostres. Deixar polimeritzar el gel empaquetador durant 30 minuts (vegeu imatges 29 i 30). Aquest procés es repeteix varies vegades per obtenir diversos gels SDS-PAGE per l'electroforesi de totes les mostres.

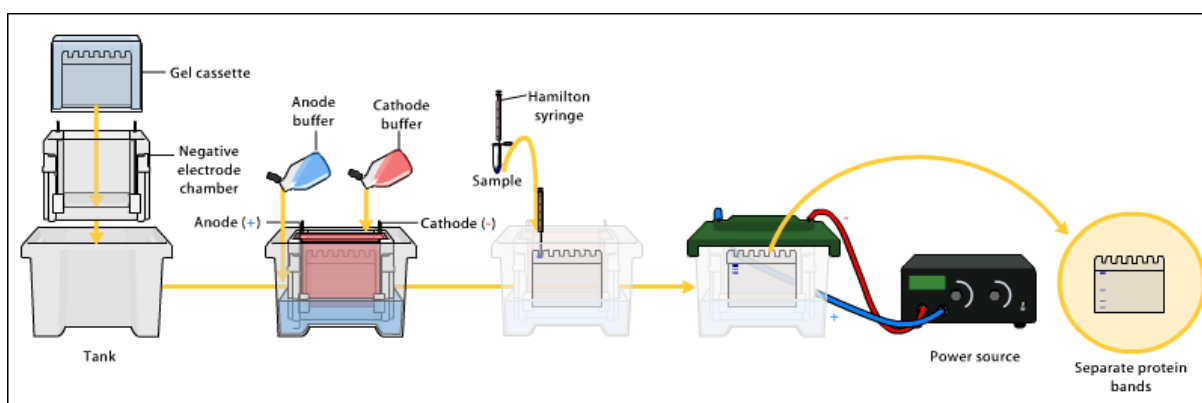


*Imatge 29: Polimerització del gel separador i empaquetador dins del cassette d'electroforesi.
Font: elaboració pròpia.*



Imatge 30: Dibuix del gradient de concentració existent entre el gel empaquetador i el separador, de menys a més, per permetre la separació de les proteïnes segons la seva grandària. Font: adaptat de [54]

- Retirar els pintes dels gels i afegir dos cassettes d'electroforesi en cada tanc d'electroforesi, coberts amb una solució electrolítica que afavorirà la transmissió del corrent elèctric (vegeu imatge 31).
- Carregar les mostres als pouets. En primer lloc, al pou número 1, es carrega un marcador de pes molecular proteic, i a continuació, les diferents mostres desnaturalitzades (les 24 mostres amb 20 mg de proteïnes es deixen prèviament 2 minuts a 90 °C).
- Connectar els tancs d'electroforesi a unes fonts d'alimentació a un voltatge constant de 120 V per començar l'electroforesi. En aplicar el camp elèctric a través dels gels, les proteïnes carregades negativament es mouen cap al pol positiu, les més petites més ràpidament que les més grans, resultant en una separació efectiva de les proteïnes al llarg del gel.



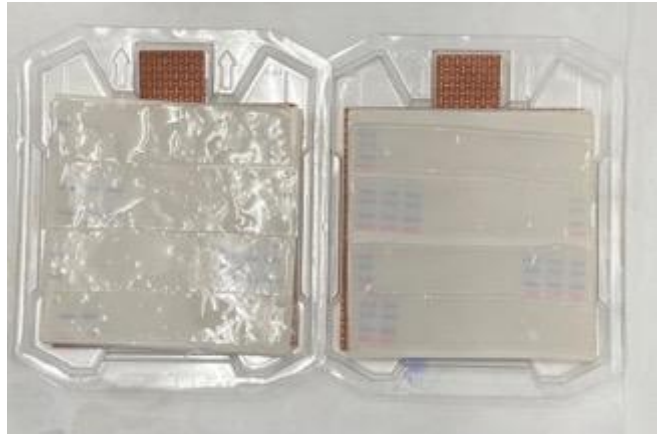
Imatge 31: Electroforesi en gels de SDS-PAGE per separar les proteïnes de les mostres segons la seva mida. Font: [55]

- Un cop completada l'electroforesi, submergir els gels en una solució de tinció (*Coomassie Brilliant Blue*) i incubar 1 hora en agitació suau. Tot seguit, rentar els gels amb una solució per destenyir (metanol) fins que les bandes de proteïna siguin clarament visibles.

5.3.3. Transferència gel-membrana

- Preparar la transferència de les proteïnes separades dels gels a unes membranes de fluorur de polivinilidè (PVDF), desenvolupades per permetre la incubació posterior amb diferents anticossos. Per procedir amb la transferència, es necessita muntar els diversos sandvitxos de transferència. Cada sandvitx conté una membrana de PVDF (la qual s'ha pre-activat submergint-la en metanol durant uns segons, després aigua i finalment tampó de transferència), en contacte directe amb el gel, i diversos papers de filtres i esponges humides disposats estratègicament (vegeu imatge 32).

- Col·locar els sandvitxos anteriors, coberts amb tampó de transferència, dins un tanc de transferència i aplicar un corrent elèctric de 100 V durant 1-2 hores per permetre la transferència de les proteïnes del gel, situat prop de l'elèctrode negatiu, a la membrana de PVDF situada prop l'elèctrode positiu.



*Imatge 32: Muntatge de dos sandvitxos de transferència per transferir les proteïnes del gel, d'aspecte llefiscós, a la membrana de PVDF, situada sota dels gels.
Font: elaboració pròpia.*

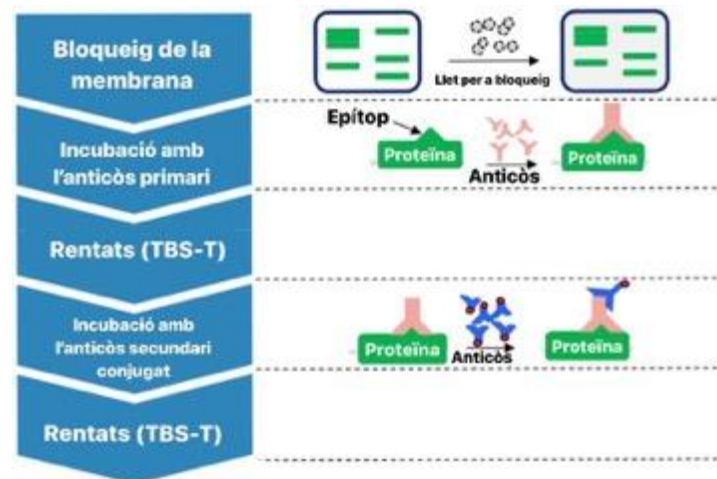
5.3.4. Immunodetecció

- Després de la transferència, submergir les membranes, que contindran les proteïnes de les mostres, en una solució de bloqueig composta per 5% de llet en tampó TBS-T, per prevenir així les unions no específiques dels anticossos amb les membranes. Deixar incubar la membrana en aquesta solució durant una hora a temperatura ambient amb agitació suau. En aquest experiment s'utilitzen dos anticossos primaris, un per detectar la proteïna d'interès c-Myc, i l'altre per detectar la proteïna vinculina¹⁸, la qual serveix de control de l'experiment, ja que la seva detecció ens permetrà

¹⁸ La vinculina és una proteïna del citoesquelet amb un pes de 117 kDa.

comprovar que els nivells de proteïna carregats són els adequats i que la proteïna de la mostra s'ha transferit correctament tot i els nivells que detectem de c-Myc.

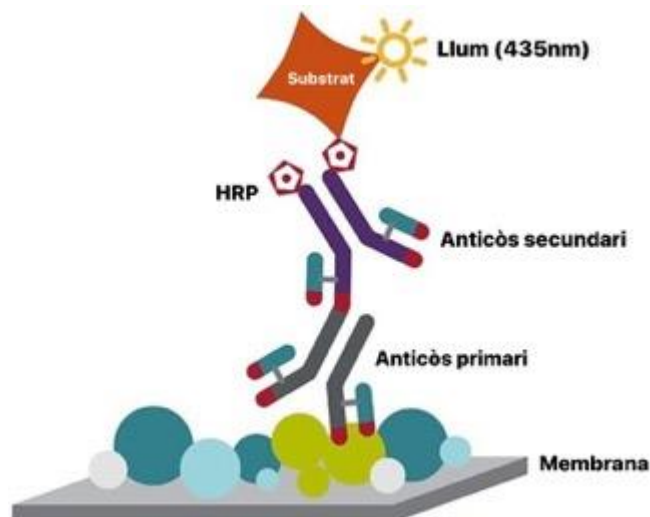
- L'endemà al matí, realitzar tres rentats successius de les membranes amb tampó TBS-T, per eliminar l'excés d'anticòs primari (aquell anticòs primari que no està unit a cap proteïna de la mostra).
- Preparar la solució d'anticòs secundari, el qual porta conjugat l'enzim HRP, en solució de bloqueig i incubar les membranes en aquesta solució durant una hora a temperatura ambient amb agitació suau.
- Realitzar tres rentats successius de les membranes amb tampó TBS-T, per eliminar l'excés d'anticòs secundari (aquell anticòs secundari que no està unit a cap anticòs primari) (vegeu imatge 33).



Imatge 33 Immunodetecció de les proteïnes sobre les membranes, utilitzant anticossos primaris contra la proteïna c-Myc, i la vinculina, i anticossos secundaris conjugats a l'HRP. Adaptat de [56]

5.3.5. Detecció per quimioluminescència

- Preparar una solució per revelar la immunodetecció amb luminol i peròxid d'hidrogen i incubar les membranes en aquesta solució. Les membranes tenen les proteïnes transferides i detectades amb els anticossos primaris, i aquests detectats amb els anticossos secundaris units a l'enzim HRP. L'enzim HRP, en presència de la solució anterior, catalitza una reacció entre el luminol i el peròxid d'hidrogen que resulta en la producció d'un derivat del luminol que emet llum a una longitud d'ona de 435 nm (vegeu imatge 34).

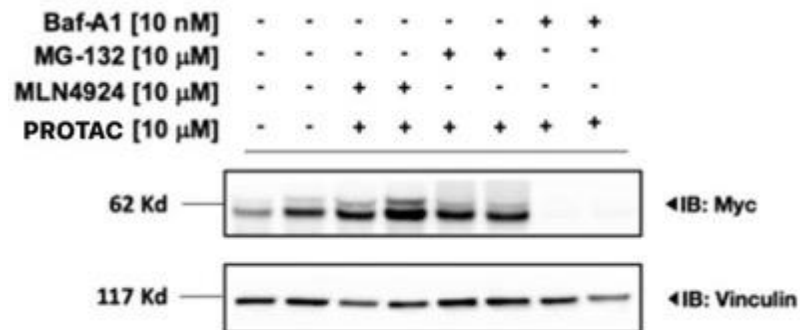


Imatge 34: Detecció per quimioluminescència de la proteïna d'interès immunodetectada prèviament. Adaptat de ^[57]

- Utilitzar el dispositiu de quimioluminescència *Amersham Imager 680* per detectar la llum emesa de les mostres.
- Analitzar les bandes de proteïnes que emeten llum per determinar la presència i quantitat de la proteïna d'interès c-Myc, en comparació amb la proteïna vinculina, que actua com a control de càrrega i de transferència.
- Finalment, quantificar totes les bandes de proteïna amb el programa ImageLab. Per això, es determina la intensitat lumínica de la banda (àrea) que resulta de la detecció de la proteïna c-Myc i la intensitat lumínica de la banda (àrea) que resulta de la detecció de la proteïna vinculina, per cada mostra. I a continuació, s'obté la relació entre la llum emesa per c-Myc i la llum emesa per la vinculina, normalitzant els valors obtinguts, ja que els valors de vinculina es mantenen constants en totes les mostres. Aquesta normalització és essencial per corregir possibles variacions en la càrrega de la proteïna o en el procés de transferència, assegurant així que les quantificacions són precises i comparables.

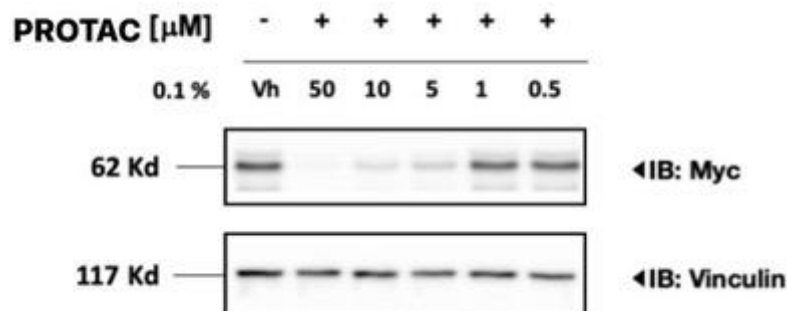
5.4. Resultats

A la imatge 35 es presenten alguns dels resultats més significatius obtinguts després de realitzar la tècnica Western blot.



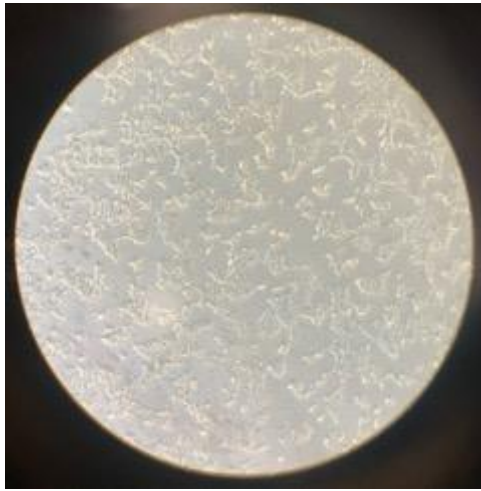
*Imatge 35: Imatge que mostra la quantitat de proteïna c-Myc present en les mostres oncològiques (prenent com a referència la quantitat de vinculina), després de ser pretractades amb diferents inhibidors i tractades amb 10 μM de PROTAC.
Font: elaboració pròpia.*

La imatge 35 mostra, en les dues primeres columnes, com en absència d'inhibidors i de PROTAC, i per tant amb un bon funcionament de les E3, del proteasoma i amb l'acidificació necessària, els nivells de c-Myc són relativament baixos. En les dues columnes següents s'observa com, després d'afegir el PROTAC un cop fet el pretractament amb l'inhibidor d'E3 i sense un bon funcionament de les E3 ligases, els nivells de c-Myc augmenten considerablement. En les dues columnes posteriors s'observa com, després d'afegir el PROTAC un cop fet el pretractament amb l'inhibidor del proteasoma, que detecta i degrada les proteïnes ubiquïtinades, els nivells de c-Myc continuen força elevats, i finalment, en les dues últimes columnes s'observa com, després d'afegir el PROTAC un cop fet el pretractament amb l'inhibidor de la bomba de protons V-ATPasa del lisosoma, que permet l'acidificació necessària per a la degradació, els nivells de c-Myc es mostren de nou molt baixos. Tot i les variacions en els nivells de c-Myc, s'observa, però que els nivells de la proteïna vinculina, utilitzada com a control de càrrega i transferència, són semblants en totes les mostres.



Imatge 36: Imatge que mostra la quantitat de proteïna c-Myc present en les mostres oncològiques tractades en concentracions decreixents de PROTAC (sense pretractaments), prenent com a referència la quantitat de proteïna vinculina, com a control de càrrega i transferència. Font: elaboració pròpia.

La imatge 36 mostra un estudi dosi-resposta, ja que mostra els efectes de tractar les mostres oncològiques amb diferents concentracions de PROTAC (50, 10, 5, 1, 0,5 μM), utilitzant 0,1% de DMSO com a vehicle. En la primera columna, sense el tractament PROTAC, es veuen els nivells habituals de c-Myc en les mostres oncològiques. En la segona columna, després de tractar les mostres amb 50 μM de PROTAC, els nivells de c-Myc disminueixen dràsticament. Seguidament, en la tercera, quarta, cinquena i sisena columna, després de tractar les mostres amb una concentració decreixent de PROTAC de 10, 5, 1 i 0.5 μM respectivament, es veu com els nivells de proteïna c-Myc augmenten progressivament fins a gairebé els nivells mostrats en la primera columna. Com en la imatge 35, tot i les variacions en els nivells de c-Myc, s'observa, però que els nivells de la proteïna vinculina, utilitzada com a control de càrrega i transferència, són semblants en totes les mostres.



*Imatge 38: Cèl·lules oncològiques vives just abans del tractament amb el PROTAC.
Font: elaboració pròpia.*



*Imatge 37: Cèl·lules oncològiques mortes després del tractament amb el PROTAC a una concentració de 50 µM.
Font: elaboració pròpia.*

Finalment, la imatge 37 i 38 mostren el cultiu cel·lular oncològic amb el qual es va dur a terme l'experiment, observat a través d'un microscopi òptic. La imatge de l'esquerra correspon a les cèl·lules oncològiques abans del tractament amb el PROTAC, amb una morfologia característica i molt viables i abundants, mentre que la imatge de la dreta representa les mateixes cèl·lules després del tractament amb una concentració de 50 µM de PROTAC, amb una morfologia diferent i molt menys abundants. Això pretén aportar unes dades més visuals als resultats experimentals anteriors.

5.5. Conclusions i discussió

A partir dels resultats obtinguts en aquesta investigació, podem concloure dos aspectes fonamentals sobre l'acció del PROTAC en la degradació de la proteïna c-Myc. En primer lloc, hem confirmat que el mecanisme d'acció del PROTAC és clarament dependent del sistema proteasoma i de les CRLs, ja que a l'experiment anterior (vegeu imatge 35) es mostra com els nivells de c-Myc són elevats, no hi ha degradació, quan les cèl·lules són pretractades amb l'inhibidor del proteasoma (MG-132) i amb l'inhibidor de les E3 (MLN4924), tot i ser tractades amb el PROTAC. En canvi, el mecanisme d'acció del PROTAC no depèn de la via lisosomal per degradar c-Myc, ja que s'observen uns nivells baixos de proteïna c-Myc (hi ha degradació) quan les cèl·lules són pretractades amb Baf-A1 i es bloqueja la bomba de protons dins dels lisosomes.

En segon lloc, s'ha evidenciat que la degradació de c-Myc induïda pel PROTAC és dosi dependent, perquè després de l'estudi dosi-resposta (vegeu imatge 36) es veu com hi ha una degradació de gairebé el 100% de c-Myc quan s'utilitza un tractament de 50 µM de PROTAC, del 80% quan s'utilitza una dosi de 10 µM i del 60% quan s'utilitza una dosi de

5 μ M, per la qual cosa això subratlla l'eficàcia creixent i l'efectivitat major del PROTAC amb dosis més elevades de tractament.

En definitiva, confirmem que aquest PROTAC és una estratègia terapèutica interessant per al tractament del càncer. Així mateix, aquest experiment proporciona una base sòlida per a futures investigacions sobre el PROTAC, tant per optimitzar la dosi com per millorar la seva eficàcia davant aquesta i altres proteïnes d'interès terapèutic.

CONCLUSIONS

En iniciar aquest treball, em vaig plantejar diverses qüestions que van esdevenir el punt de partida de la meva recerca. Ara, una vegada finalitzat el TdR, puc afirmar que, d'una banda, he après sobre el càncer, estudiant els diferents tipus que existeixen i els seus respectius tractaments farmacològics oncològics actuals. També he après sobre l'impacte, tant en l'actualitat com en el futur, dels projectes de recerca relacionats amb el desenvolupament de noves teràpies farmacològiques per aquesta malaltia. D'altra banda, gràcies a l'ajuda d'experts de la recerca de nous fàrmacs, he avaluat l'eficàcia d'un PROTAC, amb un futur prometedor en l'àmbit de la degradació dirigida de proteïnes. Aquesta nova estratègia terapèutica redueix els efectes adversos en els pacients, contribuint a millorar la seva qualitat de vida en moments de vulnerabilitat. Tanmateix, encara no s'ha trobat la cura definitiva d'aquesta malaltia, però la recerca avança ràpidament per arribar a complir aquesta fita.

Per tant, les conclusions que extrec del meu TdR són:

1. Existeixen factors genètics i ambientals que influeixen en la formació i propagació de les cèl·lules canceroses.
2. Els tractaments farmacològics oncològics actuals són fonamentals, però és essencial explorar noves estratègies terapèutiques.
3. La degradació dirigida de proteïnes és una teràpia prometedora per al càncer, presentant nombrosos avantatges respecte als tractaments tradicionals, com ara efectes més efectius i menys agressius.
4. Després d'avaluar una molècula PROTAC, s'ha demostrat que aquesta redueix la proliferació de cèl·lules tumorals.

Aquesta investigació ha divulgat les noves opcions terapèutiques en oncologia per garantir una vida sana i promoure el benestar per a tots. Així doncs, ara podem validar i argumentar la hipòtesi d'aquest treball: el tractament basat en PROTAC disminueix els nivells cel·lulars de l'oncogen c-Myc en cèl·lules oncològiques, revertint els seus trets cancerosos. Per tant, aquesta estratègia terapèutica ofereix una via prometedora per combatre el càncer, especialment en aquells casos en què els tractaments tradicionals resulten insuficients o provoquen efectes adversos greus.

En resum, aquest TdR vol fer visible que, tot i els avenços significatius en la recerca d'aquest camp impulsats per noves tecnologies com els PROTAC, el càncer continua sent una malaltia complexa, influenciada per factors genètics, ambientals i biològics. És precisament aquesta complexitat la que exigeix un enfocament multidisciplinari i constant per desenvolupar tractaments cada vegada més efectius. Aconseguir un equilibri entre l'eficàcia del tractament i la seguretat dels pacients és un desafiament fonamental per combatre de manera efectiva aquesta malaltia devastadora.

BIBLIOGRAFIA I WEGRAFIA

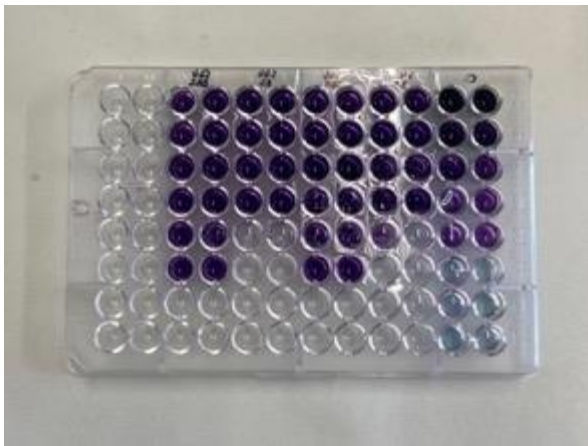
1. Institut Valencià d'Oncologia. *Què és el càncer?* [Internet]. [citat 7 maig 2024]. Disponible a: <https://www.ivo.es/val/el-cancer/que-es-el-cancer/>
2. Instituto Nacional del Cáncer. *¿Qué es el cáncer?* [Internet]. [citat 7 maig 2024]. Disponible a: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es#:~:text=El%20c%C3%A1ncer%20es%20una%20enfermedad,formado%20por%20billones%20de%20c%C3%A9lulas.>
3. Wikipedia. *Ciclo celular* [Internet]. [citat 10 maig 2024]. Disponible a: <https://es.wikipedia.org/wiki/Ciclo celular>
4. Wikipedia. *Punto de control del ciclo celular* [Internet]. [citat 10 maig 2024]. Disponible a: <https://es.wikipedia.org/wiki/Punto de control del ciclo celular>
5. American Cancer Society. *Oncogenes, genes supresores de tumores y genes reparadores del ADN* [Internet]. [citat 19 maig 2024]. Disponible a: <https://www.cancer.org/es/cancer/entendimiento-del-cancer/genetica-y-cancer/oncogenes-genes-supresores-de-tumores-y-genes-reparadores-del-adn.html>
6. Canal Salut. *Factores de risc del càncer* [Internet]. [citat 26 maig 2024]. Disponible a: <https://canalsalut.gencat.cat/ca/salut-a-z/c/cancer/prevencio/factors-risc/index.html>
7. Instituto Nacional del Cáncer. *Causas y prevención del cáncer: factores de riesgo* [Internet]. [citado 26 maig 2024]. Disponible a: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/causas-prevencion/riesgo>
8. Pérez Altozano, Javier. *Tipos de factores de riesgo* [Arxiu PDF]. https://seom.org/images/1_Presentacion_Javir_Perez_Altozano.pdf
9. El Iris. *Parlem del càncer?* [Internet]. 2023. [citat 12 setembre 2024]. Disponible a: <https://www.eliris.cat/2023/12/15/parlem-del-cancer/>
10. Instituto Nacional del Cáncer. *Adenocarcinoma* [Internet]. [citat 3 juny 2024]. Disponible a: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/adenocarcinoma>
11. Unilabs. *Carcinoma* [Internet]. 2024. [citat 3 juny 2024]. Disponible a: <https://www.unilabs.es/glosario/carcinoma>
12. Canal Salut. *Sarcoma de teixit tou* [Internet]. [citat 4 juny 2024]. Disponible a: <https://canalsalut.gencat.cat/ca/salut-a-z/c/cancer/tipus/infantil/sarcoma-teixit-tou/index.html>
13. MedlinePlus. *Leucemia* [Internet]. 2024. [citat 4 juny 2024]. Disponible a: <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/001299.htm>
14. MedlinePlus. *Leucemia linfocítica aguda (LLA)* [Internet]. [citat 5 juny 2024]. Disponible a: <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/000541.htm>
15. MedlinePlus. *Leucemia linfocítica crónica (LLC)* [Internet]. [citat 6 juny 2024]. Disponible a: <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/000532.htm>
16. MedlinePlus. *Leucemia mielògena crónica (LMC)* [Internet]. [citat 6 juny 2024]. Disponible a: <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/000570.htm>
17. Clínic Barcelona. *Què és el limfoma?* [Internet]. [citat 10 juny 2024]. Disponible a: <https://www.clinicbarcelona.org/ca/asistencia/malalties/limfoma>
18. Canal Salut. *Tractaments del càncer* [Internet]. [citat 12 juny 2024]. Disponible a: <https://canalsalut.gencat.cat/ca/salut-a-z/c/cancer/tractaments/index.html>
19. American Cancer Society. *Cómo se usa la quimioterapia para tratar el cáncer* [Internet]. [citat 12 juny 2024]. Disponible a: <https://www.cancer.org/es/cancer/como-sobrellevar-el-cancer/tipos-de-tratamiento/quimioterapia/como-la-quimioterapia-es-usada-para-tratar-el-cancer.html>

20. Instituto Nacional del Cáncer. *Quimioterapia* [Internet]. [citat 13 juny 2024]. Disponible a: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/quimioterapia>
21. Canal Salut. *Radioteràpia* [Internet]. [citat 13 juny 2024]. Disponible a: <https://canalsalut.gencat.cat/ca/salut-a-z/c/cancer/tractaments/radioterapia/index.html>
22. Instituto Nacional del Cáncer. *Radioterapia* [Internet]. [citat 13 juny 2024]. Disponible a: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/radioterapia>
23. Instituto Nacional del Cáncer. *Radioterapia interna* [Internet]. [citat 14 juny 2024]. Disponible a: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/radioterapia-interna>
24. Hospital Clínic de Barcelona. *Immunoteràpia* [Internet]. [citat 17 juny 2024]. Disponible a: <https://www.clinicbarcelona.org/ca/asistencia/proves-i-procediments/immunoterapia>
25. Instituto Nacional del Cáncer. *Inmunoterapia* [Internet]. [citat 17 juny 2024]. Disponible a: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/inmunoterapia#como-funciona-la-inmunoterapia-contr-el-cancer>
26. American Cancer Society. *Vacunas contra el cáncer* [Internet]. [citat 25 juny 2024]. Disponible a: <https://www.cancer.org/es/cancer/como-sobrellevar-el-cancer/tipos-de-tratamiento/inmunoterapia/vacunas-contr-el-cancer.html>
27. MedlinePlus. *Instrucciones de cuidados: quimioterapia* [Internet]. [citat 25 juny 2024]. Disponible a: <https://medlineplus.gov/spanish/ency/patientinstructions/000902.htm>
28. Instituto Nacional del Cáncer. *Terapia dirigida* [Internet]. [citat 25 juny 2024]. Disponible a: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/terapia-dirigida>
29. Grupo Health Care. *Degradación dirigida de proteínas* [Internet]. [citat 27 juny 2024]. Disponible a: <https://ghc.com.mx/index.php/2022/05/17/degradacion-dirigida-de-proteinas/>
30. Genotipia. *Degradación dirigida de proteínas* [Internet]. [citat 27 juny 2024]. Disponible a: https://genotipia.com/genetica_medica_news/degradacion-de-proteinas-dirigida/
31. TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas. Vol. 15, Nº. 2, 2012, págs. 134-141. ISSN 2395-8723.
32. Viquipèdia. *Proteasoma* [Internet]. [citat 28 juny 2024]. Disponible a: <https://ca.wikipedia.org/wiki/Proteasoma>
33. Chirnomas, D., Hornberger, K.R. & Crews, C.M. *Protein degraders enter the clinic — a new approach to cancer therapy*. *Nat Rev Clin Oncol* **20**, 265–278 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41571-023-00736-3>
34. Békés, M., Langley, D.R. & Crews, C.M. *PROTAC targeted protein degraders: the past is prologue*. *Nat Rev Drug Discov* **21**, 181–200 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00371-6>
35. SEBBM. *PROTACs: una estrategia novedosa para el desarrollo de fármacos frente al cáncer y las enfermedades neurodegenerativas* [Internet]. [citat 30 juny 2024]. Disponible a: <https://sebbm.es/rincon-del-aula/protacs-una-estrategia-novedosa-para-el-desarrollo-de-farmacos-frente-al-cancer-y-las-enfermedades-neurodegenerativas/>
36. Biochempeg. *PROTACs and targeted protein degradation technology* [Internet]. [citat 2 juliol 2024]. Disponible a: <https://www.biochempeg.com/article/116.html>
37. Biomed Central. *Proteolysis targeting chimeras (PROTACs) are emerging therapeutics for hematologic malignancies* [Internet]. [citat 2 juliol 2024]. Disponible a: <https://jhoonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13045-020-00924-z>
38. Douh Cherif. *Degradación de proteínas como estrategia novedosa en el diseño de fármacos* [Internet]. [citat 2 juliol 2024]. Disponible a: https://ebuah.uah.es/dspace/bitstream/handle/10017/47091/TFM_Douh_Chерif_2020.pdf?sequence=1&isAllowed=y

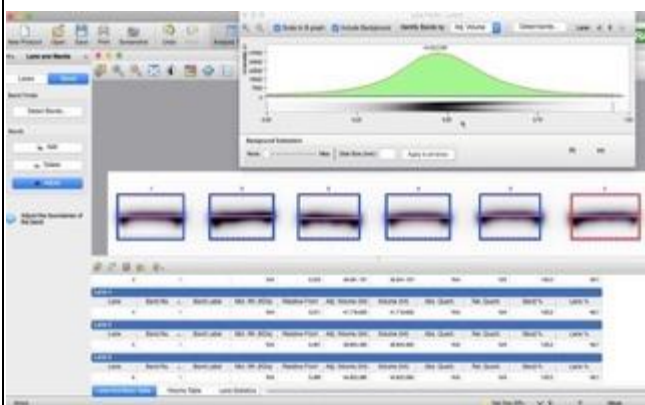
39. Viquipèdia. *Myc* [Internet]. [citat 2 juliol 2024]. Disponible a: <https://ca.wikipedia.org/wiki/Myc>
40. Top Doctors. *Tumores benignos: qué es, síntomas y tratamiento* [Internet]. [citat 2 juny 2024]. Disponible a: [Tumores Benignos: qué es, síntomas y tratamiento | Top Doctors](#)
41. Freepik. *Cell Cycle Checkpoints* [Internet]. [citat 4 juny 2024]. Disponible a: https://www.freepik.es/vector-premium/grafico-ilustracion-vector-ciencia-puntos-control-ciclo-celular_58555982.htm
42. Wikipedia. *Oncogén* [Internet]. [citat 4 juny 2024]. Disponible a: <https://es.wikipedia.org/wiki/Oncog%C3%A9n>
43. American Cancer Society. *Células de la piel: epidermis* [Internet]. [citat 5 juny 2024]. Disponible a: <https://www.cancer.org/adobe/dynamicmedia/deliver/dm-aid--f3dace2b-ae00-4001-b788-1890775128c2/skin-cells-epidermis.jpg?quality=82&preferwebp=true>
44. Fcarreras. *Hematopoesi* [Internet]. [citat 5 juny 2024]. Disponible a: https://fcarreras.org/wp-content/uploads/2023/05/05_Hematopoyesis_CAT.jpg
45. Instituto Nacional del Cáncer. *Definición de ganglio linfático* [Internet]. [citat 7 juny 2024]. Disponible a: <https://nci-media.cancer.gov/pdq/media/images/664393-571.jpg>
46. CNIO. *Célula en división* [Internet]. [citat 7 juny 2024]. Disponible a: <https://www.cnio.es/wp-content/uploads/2024/02/microtubulos-esp-scaled.jpg>
47. ABOH. *Usted y el cáncer de pulmón* [Internet]. [citat 15 juny 2024]. Disponible a: <https://www.ustedycancerdepulmon.com/es-cp/view/m601-s07-comprender-la-inmunoterapia-para-el-cáncer-de-pulmón-presentación-de-diapositivas>
48. Clinicbarcelona. *Teràpia cel·lular CART* [Internet]. [citat 15 juny 2024]. Disponible a: https://www.clinicbarcelona.org/media/cache/1536_webp/uploads/media/default/0011/28/63e7fe90fd575f9f879169e2cbb300e7c57fe32.webp
49. Genotipia. *Degradación proteica dependiente de ubiquitina* [Internet]. [citat 2 juliol 2024]. Disponible a: https://genotipia.com/wp-content/uploads/2019/08/DPD_CMayor.jpg
50. Wikimedia Commons. *Ubiquitylation* [Internet]. [citat 2 juliol 2024]. Disponible a: [600px-Ubiquitylation.svg.png](#)
51. LibreTexts. *Proteasoma estructura lateral* [Internet]. [citat 2 juliol 2024]. Disponible a: https://bio.libretexts.org/@api/deki/files/5956/Proteasome_1fnt_side.png
52. Catapult. *Estructura de E3 ligasa* [Internet]. [citat 4 juliol 2024]. Disponible a: <https://md.catapult.org.uk/wp-content/uploads/2020/08/ptw-e3-l-w.png>
53. SEBBM. *Diagrama de proteínas y su degradación* [Internet]. [citat 4 juliol 2024]. Disponible a: <https://sebbm.es/wp-content/uploads/rincon-aula-abril-2024-1200x497.jpg>
54. BitesizeBio. *Figura sobre degradación de proteínas* [Internet]. [citat 7 juliol 2024]. Disponible a: <https://bitesizebio.com/wp-content/uploads/2020/03/Figure1.png>
55. Wikimedia Commons. *Electroforesis SDS-PAGE* [Internet]. [citat 7 juliol 2024]. Disponible a: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/46/SDS-PAGE_Electrophoresis.png
56. Google Images. *Diagrama de ubiquitinación* [Internet]. [citat 8 juliol 2024]. Disponible a: <https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcT6lLZJQSoP12FIG6AXhsJakLRggXN-hihLag&s>
57. Google Images. *Imagen de estructura proteica* [Internet]. [citat 8 juliol 2024]. Disponible a: https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcQN0zNSNbsv-QoGhYWRAUZVDTh_SexxSEZQU3Wa0L6UlmoDtcryue62U7WCi89fJHsJRG4&usqp=CAU

ANNEXOS

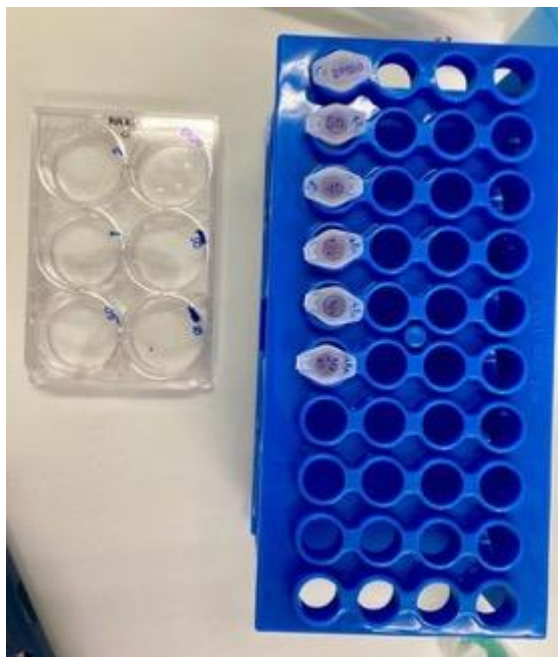
Annex I: Imatges complementàries a la part pràctica d'aquest treball



Mini BCA Protein Assay: és un assaig colorimètric que desenvolupa un color violeta, el qual es correlaciona amb la concentració de proteïnes. L'assaig es basa en la capacitat dels enllaços peptídics d'una proteïna per reduir els ions Cu^{2+} a Cu^{1+} de manera dependent de la concentració. Aleshores, els ions Cu^{2+} són quelats per l'àcid bicinconínic per formar una solució de color violeta que s'absorbeix al màxim a 562 nm. Per millorar la sensibilitat respecte a l'assaig estàndard de BCA, el test mini BCA utilitza reactius més concentrats en 3 solucions.



Programa *Image Lab*: serveix per a realitzar la quantificació del Western blot. És a dir, mesurar el senyal emès per les bandes de proteïnes d'interès. La intensitat del senyal de la banda és directament proporcional a la concentració de la proteïna diana. Mitjançant l'anàlisi de la intensitat del senyal, es pot determinar si l'expressió de la proteïna diana en una mostra ha augmentat o disminuït en relació amb la mostra control.



Observem diversos tubs *Eppendorf*, marcats amb les diferents concentracions de PROTAC i un d'ells amb DMSO com a vehicle. Les concentracions utilitzades pel tractament són de 50 μM , 10 μM , 5 μM , 1 μM i 0,5 μM , reflectint una escala de dilucions. Les concentracions decreixents permeten avaluar la resposta del tractament amb PROTAC des de dosis altes fins a les més baixes, amb l'objectiu de trobar la dosi òptima: mínima concentració capaç d'aconseguir l'efecte terapèutic desitjat, reduint la proliferació de cèl·lules canceroses, però sense generar efectes adversos significatius. Establir aquest punt és crucial, ja que permet maximitzar l'eficàcia del tractament minimitzant-ne la toxicitat.

Protein degraders enter the clinic – a new approach to cancer therapy

Deborah Chirnomas¹✉, Keith R. Hornberger¹✉ & Craig M. Crews^{2,3,4}✉

Abstract

Heterobifunctional protein degraders, such as PROteolysis Targeting Chimera (PROTAC) protein degraders, constitute a novel therapeutic modality that harnesses the cell's natural protein-degradation machinery – that is, the ubiquitin–proteasome system – to selectively target proteins involved in disease pathogenesis for elimination. Protein degraders have several potential advantages over small-molecule inhibitors that have traditionally been used for cancer treatment, including their event-driven (rather than occupancy-driven) pharmacology, which permits sub-stoichiometric drug concentrations for activity, their capacity to act iteratively and target multiple copies of a protein of interest, and their potential to target nonenzymatic proteins that were previously considered ‘undruggable’. Following numerous innovations in protein degrader design and rigorous evaluation in preclinical models, protein degraders entered clinical testing in 2019. Currently, 18 protein degraders are in phase I or phase I/II clinical trials that involve patients with various tumour types, with a phase III trial of one initiated in 2022. The first safety, efficacy and pharmacokinetic data from these studies are now materializing and, although considerably more evidence is needed, protein degraders are showing promising activity as cancer therapies. Herein, we review advances in protein degrader development, the preclinical research that supported their entry into clinical studies, the available data for protein degraders in patients and future directions for this new class of drugs.

Sections

Introduction
Protein degrader mechanism of action
Protein degrader design and advances
Preclinical evidence
Available clinical evidence
Future directions for protein degraders
Potential challenges for protein degraders
Conclusions

¹Arvinas Operations, Inc., New Haven, CT, USA. ²Department of Molecular, Cellular & Developmental Biology, Yale University, New Haven, CT, USA. ³Department of Pharmacology, Yale University, New Haven, CT, USA. ⁴Department of Chemistry, Yale University, New Haven, CT, USA. ✉e-mail: debbie.chirnomas@arvinas.com; keith.hornberger@arvinas.com; craig.crews@yale.edu

Review article

Key points

- The concept of harnessing the natural, intracellular protein-degradation machinery (that is, the ubiquitin–proteasome system) to eliminate disease-causing proteins was proposed more than two decades ago.
- Since then, numerous primary papers and review articles have described the mechanistic development of protein degraders and their potential as a new therapeutic approach, including for patients with cancer.
- As of 8 January 2023, 18 heterobifunctional protein degraders are under evaluation in clinical trials in patients with various solid tumours and haematological cancers, and the first clinical data on these molecules are now emerging.
- Preclinical data that have been disclosed for the protein degraders currently in clinical development support their target specificity and their potency in inhibiting tumour growth compared with small-molecule inhibitors.
- Preliminary data for protein degraders that target the androgen receptor, the oestrogen receptor and BTK have shown encouraging clinical activity in patients with prostate cancer, breast cancer and chronic lymphocytic leukaemia, respectively, and results from additional ongoing clinical studies are anticipated.

Introduction

Before the turn of the twenty-first century, the mainstays of treatment for patients with cancer were chemotherapy, radiotherapy and surgery. Although all three modalities remain key pillars of cancer therapy, cytotoxic chemotherapy and radiotherapy have well-recognized limitations relating to toxicities, morbidities and important long-term adverse effects that result from nonspecific targeting of nonmalignant cells in addition to malignant cells. The discovery of small-molecule inhibitors that target the active sites of specific proteins involved in the pathogenesis of cancer and leave noncancerous cells largely untouched ushered in a new era of precision medicine. Imatinib, a small-molecule inhibitor of the constitutively active BCR–ABL1 tyrosine kinase fusion protein, which is the hallmark of chronic myeloid leukaemia, was the first of these agents to be approved by the FDA in 2001 (ref. 1). Since then, scores of small-molecule inhibitors have been approved by the FDA and globally as treatments for solid tumours and haematological cancers^{2,3}.

Despite the promise of small-molecule inhibitors, their current widespread use and continued development, these treatments have limitations as cancer therapies. A primary shortcoming is that inhibition by these drugs requires that the target protein has a suitable binding pocket, rendering 85% of the proteome (including transcription factors and scaffolding proteins) ‘undruggable’ by small-molecule inhibitors⁴. In addition, high local concentrations of small-molecule inhibitors must be continuously present for these drugs to exert their therapeutic effects (occupancy-driven pharmacology)⁵. Chronic, elevated drug exposure might increase the risk of certain adverse effects as well as cause cumulative toxicities⁶. Continual treatment with small-molecule inhibitors might also select for mutations

in their target proteins or induce activation of compensatory mechanisms that lead to drug resistance, which has been reviewed in detail elsewhere^{3,7–13}.

Heterobifunctional protein degraders, including PROteolysis Targeting Chimera (PROTAC) protein degraders, are a new class of agents that eliminate, rather than just inhibit, their target proteins. The protein degrader mechanism of action, first proposed more than two decades ago¹⁴, is anticipated to ameliorate some of the drawbacks associated with small-molecule inhibitors. After substantial efforts to optimize these drugs in the laboratory, heterobifunctional protein degraders first entered clinical testing in 2019, and initial safety, efficacy and pharmacokinetic results in patients with cancer are now emerging. Herein, we provide an overview of the progress of heterobifunctional protein degrader development, review the preclinical and clinical data for protein degraders currently in clinical trials for patients with cancer, and consider prospects and potential challenges for these agents.

Protein degrader mechanism of action

The ubiquitin–proteasome system is a principal cellular pathway for protein homeostasis. In brief, unneeded or misfolded proteins are tagged with multiple units of ubiquitin and thus marked for degradation by the 26S proteasome. This tagging function is carried out through the concerted actions of several enzymes: an E1 ubiquitin-activating enzyme, an E2 ubiquitin-conjugating enzyme and an E3 ubiquitin ligase. The E3 subset is involved in the recognition of protein substrates to be degraded. The detailed structure and function of ubiquitin ligases and the proteasome have been reviewed elsewhere^{15–19}.

More than 20 years have elapsed since the first report to describe the use of fully synthetic chemical biology tools to leverage an E3 ubiquitin ligase to trigger the degradation of a target protein that is not its natural substrate¹⁴. Heterobifunctional protein degrader molecules are tripartite, bivalent molecules consisting of a target–protein binder, an E3 ligase binder and a linker that joins the two binders. By bringing the target protein and E3 ligase into close physical proximity, the ubiquitin ligase machinery can be co-opted to transfer ubiquitin to the target protein, leading to its degradation by the proteasome (Fig. 1).

Heterobifunctional protein degraders, which contain separate moieties to engage both the target protein and E3 ligase, share many similarities, and some important differences, with the related molecular glue degraders^{20,21} (Box 1). The heterobifunctional proximity-inducing concept pioneered with protein degraders has also been shown to extend to other modes of degradation, as well as to post-translational modifications beyond ubiquitination²² (Box 2); however, this article focuses on heterobifunctional protein degraders.

Heterobifunctional protein degraders have features that differentiate their pharmacology from that of traditional small-molecule inhibitors (Fig. 1). First, because protein degraders orchestrate the formation of a transient and reversible ternary complex (consisting of the target protein, E3 ligase and the protein degrader) and because the subsequent proteasomal degradation is kinetically irreversible, protein degraders can promote the degradation of multiple target molecules in a sub-stoichiometric manner. Protein degraders are thus freed from the occupancy-driven paradigm of traditional pharmacology and are instead best described as having event-driven pharmacology. Second, protein degrader ternary complexes can be positively or negatively cooperative owing to induced protein–protein interactions between the target protein and E3 ligase²³. Therefore, limited direct relationships might exist between the binary binding affinity of the protein degrader for the target or E3 ligase and the overall binding affinity of the ternary

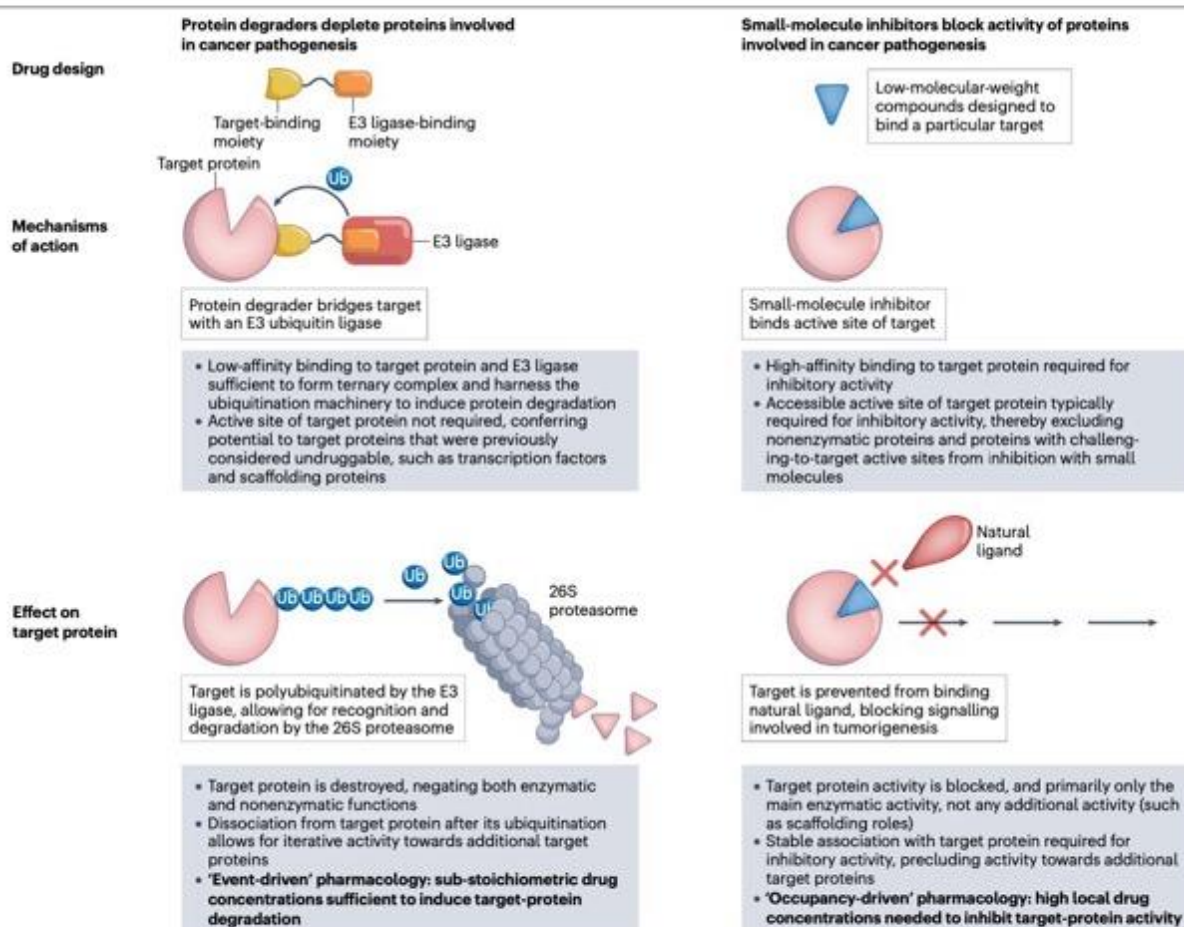


Fig. 1 | Targeting proteins involved in cancer pathogenesis with protein degraders versus small-molecule inhibitors. Heterobifunctional protein degraders mediate a transient interaction between an E3 ligase and a target

protein, leading to ubiquitin (Ub) tagging of the target protein and its subsequent degradation by the proteasome. Small-molecule inhibitors bind to an active site or allosteric site on a target protein to block its activity.

complex and/or the subsequent degradation efficiency²⁴. The lack of these direct relationships, as discussed in further detail below, might lead to unexpected and counterintuitive phenomena, including the generation of potent degraders from target-protein binders with low affinity for the protein of interest and dramatic improvements in the selectivity of target degradation compared with inhibition. The requisite ternary complex might also lead to a bell-shaped dose-response curve (termed the 'hook effect') with protein degraders, resulting from binary complex formation outcompeting ternary complex formation at high degrader concentrations²⁵. Therefore, new terminology has arisen to describe protein degraders, notably the concentration to achieve half-maximal degradation (DC_{50}) of target proteins and the maximal degradation achieved (D_{max})²⁶. Attention has also been dedicated to understanding the kinetics that underlie the mechanism of protein degrader action, the time dependence of DC_{50} and D_{max} , and additional descriptors beyond DC_{50} and D_{max} ²⁷.

The earliest examples of protein degraders were peptidic in nature²⁴. Protein degraders composed entirely of small molecules

were first described in 2008 (ref. ²⁸) (Fig. 2). The discovery of 'all-small-molecule' protein degraders, together with the identification of high-quality, small-molecule E3 ligase ligands, has triggered a landslide of academic and industrial research activity (Fig. 2), culminating in the founding of multiple protein degrader-focused companies to explore the human therapeutic potential of the modality.

Protein degrader design and advances

Target selection

When considering the therapeutic potential of protein degraders, a crucial early decision related to which targets to pursue. Given the pharmacokinetic burden of relatively large, 'beyond rule of 5' molecules such as heterobifunctional protein degraders (see 'Pharmacokinetic considerations' section), the logical targets to pursue were those for which other therapeutic modalities had been tried and failed or could not be tried at all. A framework, the tenets of protein degrader targets, was proposed to inform target selection²⁹. This framework consists of six general areas poised to take advantage of the unique, event-driven



PROTAC targeted protein degraders: the past is prologue

Miklós Békés¹ , David R. Langley¹ and Craig M. Crews^{2,3,4}

Abstract | Targeted protein degradation (TPD) is an emerging therapeutic modality with the potential to tackle disease-causing proteins that have historically been highly challenging to target with conventional small molecules. In the 20 years since the concept of a proteolysis-targeting chimera (PROTAC) molecule harnessing the ubiquitin–proteasome system to degrade a target protein was reported, TPD has moved from academia to industry, where numerous companies have disclosed programmes in preclinical and early clinical development. With clinical proof-of-concept for PROTAC molecules against two well-established cancer targets provided in 2020, the field is poised to pursue targets that were previously considered ‘undruggable’. In this Review, we summarize the first two decades of PROTAC discovery and assess the current landscape, with a focus on industry activity. We then discuss key areas for the future of TPD, including establishing the target classes for which TPD is most suitable, expanding the use of ubiquitin ligases to enable precision medicine and extending the modality beyond oncology.

Targeted protein degradation (TPD) is attracting substantial interest owing to its potential to therapeutically modulate proteins that have proved difficult to target with conventional small molecules. Some have been intractable because their active sites are broad, shallow pockets that are difficult to bridge with small molecules; others have ‘smooth’ surfaces that offer few sites for a small molecule to bind. Many of these targets have key roles in cancer and other diseases, and so have remained of great therapeutic interest, despite their recalcitrance to small-molecule inhibitors.

A major class of molecules that may enable such proteins to be modulated through TPD are known as proteolysis-targeting chimera (PROTAC) protein degraders. These are heterobifunctional small molecules consisting of two ligands joined by a linker: one ligand recruits and binds a protein of interest (POI) while the other recruits and binds an E3 ubiquitin ligase. Simultaneous binding of the POI and ligase by the PROTAC induces ubiquitylation of the POI and its subsequent degradation by the ubiquitin–proteasome system (UPS), after which the PROTAC is recycled to target another copy of the POI (FIG. 1). It is this catalytic-type mechanism of action (MoA) and event-driven pharmacology that distinguishes PROTACs from classical inhibitors, which have a one-to-one relationship with the POI and whose pharmacology is driven by stoichiometry and, usually, by interactions with a catalytic site.

There are also several other types of targeted protein degrader. Molecular glues, based on the serendipitous discovery that thalidomide and its analogues act

as degrader molecules, constitute another important therapeutic class^{1–4}. Although not heterobifunctional in the manner of PROTAC molecules, molecular glues promote ubiquitylation of a POI by enhancing a protein–protein interaction (PPI) between a ligase and a potential substrate (FIG. 2; BOX 1).

In the 20 years since the first small-molecule PROTAC was reported in the literature⁵, the technology has moved from academia to industry, where several biotech and pharmaceutical companies have disclosed programmes in preclinical and early clinical development (FIG. 3). In 2019, the first PROTAC molecules entered clinical testing; in 2020, these trials provided the first clinical proof-of-concept for the modality against two well-established cancer targets: the oestrogen receptor (ER) and the androgen receptor (AR). With this success in hand, the TPD field is now poised to tackle ‘undrugged’ targets and other classes of difficult protein target.

In this Review, we briefly summarize the first two decades of PROTAC development, as it has been extensively reviewed elsewhere (for example^{10–13}) and the current status of clinical translation of TPD. We then focus on discussing key questions relevant to what TPD could achieve therapeutically and what is needed to move the field forwards over the next 20 years.

Foundations of TPD

Ubiquitin-dependent proteolysis is a major pathway that degrades intracellular proteins as part of normal cellular maintenance processes. In this pathway, proteins are targeted for degradation by the proteasome in a three-step

¹Arvinas, Inc., New Haven, CT, USA.

²Department of Molecular, Cellular & Developmental Biology, Yale University, New Haven, CT, USA.

³Department of Pharmacology, Yale University, New Haven, CT, USA.

⁴Department of Chemistry, Yale University, New Haven, CT, USA.

[✉]e-mail: miklos.bekes@arvinas.com; david.langley@arvinas.com; craig.crews@yale.edu

<https://doi.org/10.1038/s41573-021-00371-6>

Event-driven pharmacology

This refers to the mechanism of action of a small-molecule drug, whereby its function is transiently recruited to a target protein in a catalytic manner (for example, ubiquitylation by an E3 ligase recruited by a proteolysis-targeting chimera (PROTAC)), resulting in a pharmacological effect (degradation of the protein) that drives a phenotype. This contrasts with occupancy-driven pharmacology, whereby the function of a target protein is directly blocked by a small-molecule inhibitor.

process involving ubiquitin-activating enzymes (E1), ubiquitin-conjugating enzymes (E2) and, finally, ubiquitin-protein ligases (E3), which coordinate the transfer of ubiquitin molecules to the target protein (substrate)¹⁴. The human genome is estimated to encode more than 600 E3 ligases¹⁵, each with specificity for a different subset of proteins.

The concept of harnessing this natural degradation system for therapeutic purposes was inspired by early studies of viruses and plants (BOX 2), which highlighted the possibility of deliberately designing small molecules that co-opt E3 ligases and recruit them for degradation of a POI. The initial work to co-opt E3 ligases focused on two areas of research. One involved using ligase-recruiting ligands to probe the biology and phenotype of a POI as an alternative to targeted inhibition, gene knockout or gene knockdown. Another area explored engineered E3 ligases as a potential novel therapeutic modality for targeting proteins that had proved difficult to drug with conventional small-molecule inhibitors, such as the small GTPase KRAS¹⁶ and the transcription factor MYC¹⁷.

In vitro proof of concept for the first fully synthetic PROTAC, dubbed Protac-1, was reported in 2001 (REF.⁹). Protac-1 was designed to target methionyl aminopeptidase 2 (METAP2), the putative target of the potent angiogenesis inhibitors ovalicin and fumagillin, and consisted of two domains: ovalicin, and a 10-amino acid phosphopeptide from nuclear factor- κ B inhibitor- α (NF- κ B α ; also known as I κ B α) that is recognized by the E3 ligase β -transducin repeat-containing E3 ubiquitin-protein ligase (β -TRCP). Protac-1 acted as a tether between METAP2 and β -TRCP, enabling the ligase to ubiquitylate METAP2 in extracts from unfertilized *Xenopus laevis* eggs.

The subsequent discovery of a peptide from hypoxia-inducible factor 1 subunit- α (HIF1 α) that bound the E3

ligase von Hippel-Lindau tumour suppressor (VHL)^{18,19} led to the design of cell-penetrating PROTACs that degraded a range of POIs. Technically, these early PROTACs are now considered 'bioPROTACs' because they are not fully small-molecule structures but instead contain peptide ligands for the E3 ligase. The discovery of small-molecule mimetics of the HIF1 α peptide^{20,21} opened the door to the rational design of PROTACs based wholly on small molecular structures — for example, the first PROTACs based on the bromodomain protein inhibitor JQ1 that recruited VHL to degrade bromodomain-containing protein 4 (BRD4)^{22,23}.

In parallel with the development of these early PROTAC molecules, the E3 ligase cereblon (CRBN) was identified as the target of thalidomide and its analogues lenalidomide and pomalidomide⁶, which are known as immunomodulatory imide drugs (IMiDs) in the context of cancer therapy. These drugs co-opt CRBN to target IKAROS family zinc finger 1 (IKZF1) and IKZF3 for degradation^{3,4,24}, and are now considered as pioneering examples of molecular glues.

Additionally, the sulfonamide indisulam, a small-molecule cell-cycle inhibitor used to treat some solid tumours and leukaemias, was shown to function in a similar manner by facilitating the interaction between the E3 ligase damage-specific DNA damage-binding protein 1 (DDB1) and CUL4-associated factor 15 (DCAF15) and the pre-mRNA splicing factor RNA-binding motif protein 39 (RBM39)^{25–27} and the related splicing factor RBM23 (REFS^{28,29}).

Over the past two decades, evidence for the broad therapeutic potential of PROTACs and other TPD molecules has moved from studies in cell lysates and cell culture to studies in animals and animal models of disease. In the same time frame, TPD molecules have progressed from being based on peptides to fully synthetic, rationally designed small molecules. Although the exploration

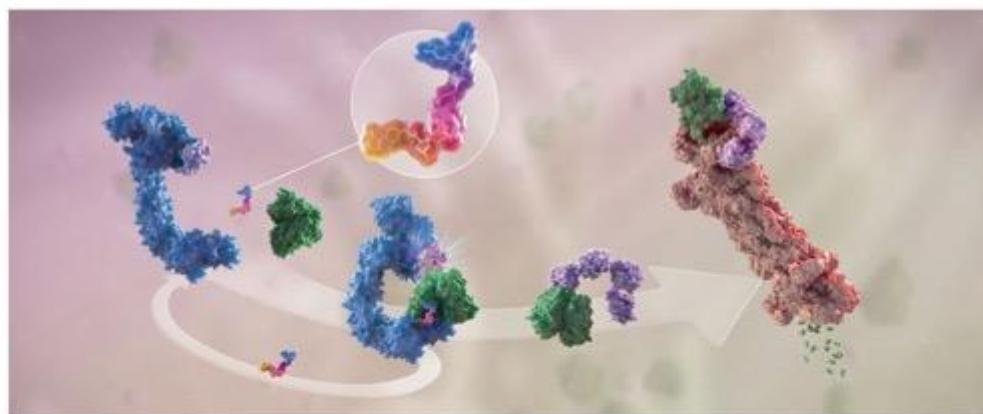


Fig. 1 | The mechanism of PROTAC-mediated targeted protein degradation. Schematic representation of the mechanism of action of proteolysis-targeted chimera (PROTAC) molecules. The PROTAC molecule (enlarged in the circle) is a heterobifunctional molecule bridging a ubiquitin ligase (in blue) and a target protein (in green). As a first step, PROTACs induce the proximity of the ligase and the substrate, such that ubiquitin (in pink) will be conjugated to the recruited substrate by the activity of the ligase. This is a catalytic step that a single PROTAC molecule can perform iteratively, enabling multiple turnover of ubiquitylation reactions, resulting in formation of ubiquitin chains on a substrate. Ubiquitin chains are then recognized by the proteasome (in red), shuttling the ubiquitylated substrate through its proteolytic chamber and degrading the target protein into small peptides (in green). Figure reproduced with permission from Arvinas, Inc.

specific POI targets in mind, which has driven the rapid expansion of this TPD approach across diverse therapeutic targets and disease indications.

For any new therapeutic modality, the selection of well-known targets is important for establishing proof of concept because it introduces just one variable (the modality), not two (the modality and a novel target) into the equation. So, the initial wave of heterobifunctional degraders in the clinic (TABLE 1) has focused on proteins with a combination of well-characterized biological and biochemical properties, clinically validated roles in diseases with clear unmet medical need, and previously established clinical efficacy for their inhibition. The ER in breast cancer^{38,39} and the AR in prostate cancer³⁵ are the leading examples of such targets.

Clinical proof of concept for PROTACs

Before 2020, four key questions remained unanswered about heterobifunctional degrader molecules. Would they have drug-like properties? Would they be safe in humans? Would they work against the target protein as expected? Would they have a therapeutic effect?

In 2020, initial positive data reported from the phase I trials of ARV-110 and ARV-471 answered all four foundational questions in the affirmative — not just for the compounds themselves but for the entire TPD field. Given the importance of these findings for the TPD modality, we briefly summarize them here.

The AR degrader ARV-110 was evaluated in heavily pretreated patients with metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC). The phase I trial

(NCT03888612) was an excellent test case for PROTAC degraders because AR is a well-known driver of prostate cancer, and patients with mCRPC, especially this heavily pretreated subset, have limited therapeutic options owing to insensitivity or resistance to anti-androgenic therapies that are the mainstays of prostate cancer treatment. Initial trial data showed that ARV-110 was well tolerated at doses up to 420 mg. The data also demonstrated ARV-110-mediated degradation of the protein target in tumours — the first such evidence for a PROTAC molecule in humans — and revealed early signs of antitumour activity, as measured by reductions in levels of prostate specific antigen (PSA) and/or by RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors). These data support the continued development of ARV-110, and the phase II ARDEN trial began in October 2020 with a dose of 420 mg (REF.⁴⁰).

ARV-471, an ER degrader, entered clinical trials as a monotherapy for patients with ER⁺/HER2⁻ locally advanced or metastatic breast cancer. The interim data for ARV-471 revealed a manageable tolerability profile with robust signals of clinical efficacy⁴¹, a 42% clinical benefit rate in a heavily pretreated population and evidence of better ER degradation than fulvestrant and other clinical-stage selective ER degraders (SERDs) when compared at the same stage of development. ARV-471 has now progressed to phase II (VERITAC; NCT04072952) in metastatic breast cancer as a single agent, and a phase Ib study evaluating ARV-471 in combination with the cyclin-dependent kinase 4/cyclin-dependent kinase 6 (CDK4/CDK6) inhibitor palbociclib has also commenced. ARV-471 is now being co-developed by Arvinas and Pfizer to treat ER⁺/HER2⁻ metastatic breast cancer.

The early but strong clinical profiles for these two PROTAC degraders, in two very different populations, in which they demonstrated desirable safety, efficacious exposure and signs of clinical efficacy with meaningful benefits for patients, are solidifying the therapeutic viability of the modality. Twenty years after its theoretical conception, at least 15 targeted protein degraders, among them heterobifunctional PROTACs and molecular glues, had entered the clinic by the end of 2021 (REF.³⁰) (TABLES 1, 2), and many more are expected to follow.

Outlook for the next 20 years of TPD

Beyond the current slate of compounds in clinical testing and others in the development pipelines of multiple companies, where can — and even should — the TPD field aim to go in the next 20 years? What challenges and possibilities remain for the field, and what more might be accomplished when those are explored and addressed? What additional tools — E3 ligases, ligands and targeted protein degrader classes — might be useful in which diseases?

The basic science behind TPD has grown exponentially and matured substantially in the past few years (for example, as reviewed in REFS^{42–44}). In our opinion, the next milestones in this 'new era' of TPD will focus on four clinical translation inflexion points, namely, defining and clinically demonstrating the target classes best served by degradation over inhibition; expanding the scope of E3 ubiquitin ligases employed clinically in a

Box 1 | Strategies for discovery of molecular glues

Rational degrader discovery using the modular proteolysis-targeting chimera (PROTAC) strategy (FIG. 2) can be complemented by the purposeful discovery of degrader compounds known as molecular glues. Molecular glues can enhance complex formation between an E3 ligase and a target by wedging between protein–protein interfaces. Although the best-known examples of molecular glues today are compounds that induce protein degradation, there are many examples of additional intramolecular and intermolecular glues that function outside the ubiquitin–proteasome system (UPS), such as the allosteric protein tyrosine phosphatase non-receptor type 11 (PTPN11; also known as SHP2) inhibitor SHP099 (REF.²³⁰), which stabilizes a closed conformation of SHP2 (intramolecular); and cyclosporin²³¹, which induces the proximity of calcineurin and cyclophilin (intermolecular). Two excellent recent reviews describe a plethora of molecular glue approaches, ranging from small molecules to multi-specific antibodies, and paint a promising picture for proximity-induced pharmacology in modern medicine^{232,233}.

Although historically, molecular glue degraders were discovered retrospectively — that is, the mechanism of action of cytotoxic compounds such as thalidomide were determined after their FDA approval — the recent rise in interest in targeted protein degradation as a therapeutic modality has led to a focus on identifying compounds with this mode of action from the beginning of the drug discovery process. The first rational discovery of molecular glues between a ligase and a substrate involved a series of compounds that restored binding affinity between the β -TRCP ligase and its mutated phospho-degron, discovered in a biochemical screen²³⁴. More recently, targeted discovery of degrader compounds against oncoproteins in a cell-based system has enabled the discovery of novel cereblon (CRBN)-dependent and CRBN-independent IKAROS family zinc finger 1 (IKZF1) degraders²³⁵, suggesting that screening for degraders against a target of choice is a strategy that can yield a bounty of phenotypically relevant degrader molecules. Lastly, multiple recent papers have described agnostic screening approaches for degrader molecules^{64–66} (as described in more detail in the main text) that were also highlighted by a comprehensive review, which offers guidelines for discovering E3 ligase modulators by phenotypic screening strategies⁶⁶.

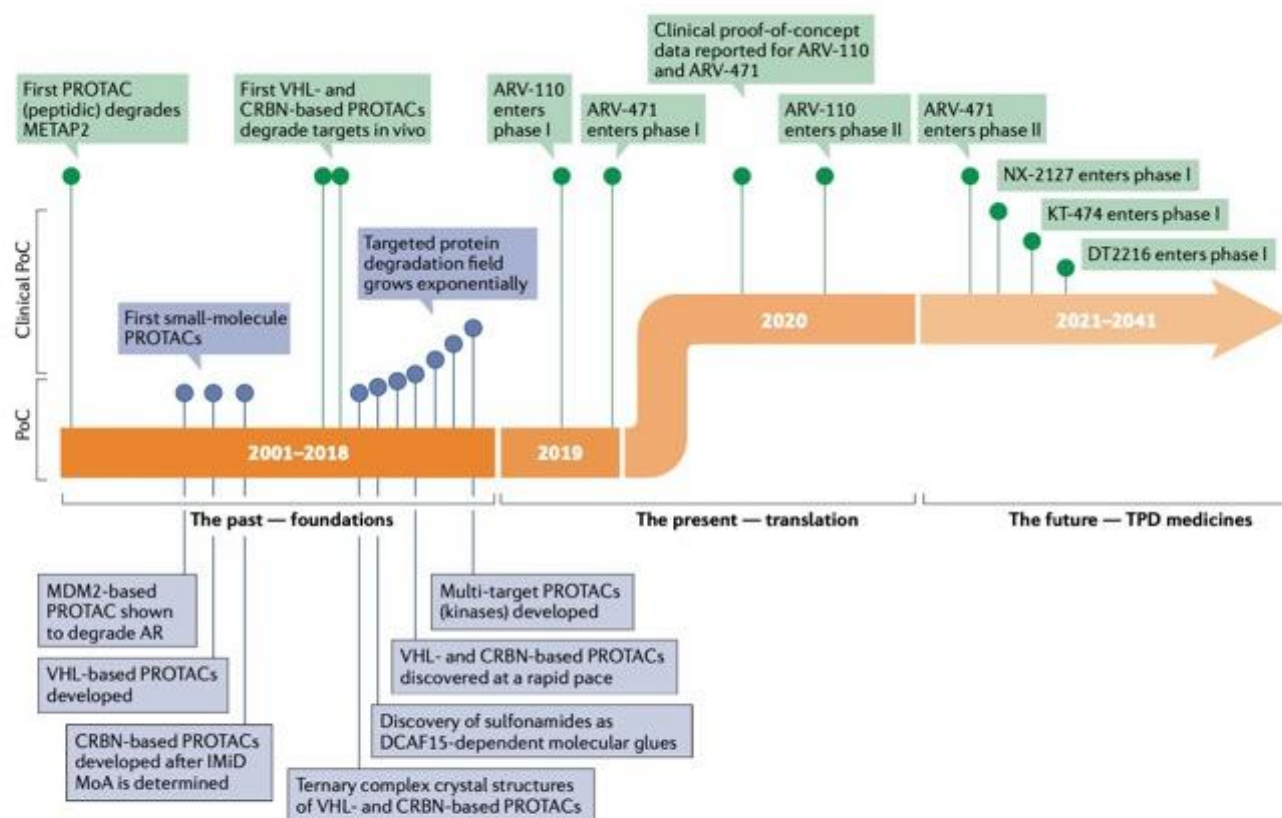


Fig. 3 | Timeline of PROTAC discoveries. The first era of targeted protein degradation (TPD) began with publication of the pivotal proteolysis-targeting chimera (PROTAC) paper by Sakamoto et al.⁹ in 2001, which was the first demonstration of the concept that protein targets could be intentionally dragged to a ubiquitin ligase to induce their degradation using chemical tools. Between then and today, the field has grown exponentially and has moved from peptide-based tool degraders to multiple classes of fully synthetic small molecules that can induce proximity between a ligase and a protein of interest, leading to its degradation. This foundational era of TPD was capped by the first rational heterobifunctional PROTAC degrader entering clinical trials in 2019, ARV-110, which targets the androgen receptor (AR) by recruiting it to the Cullin-RING ligase 4–cereblon (CRL4–CRBN) ligase complex. The current era of TPD can be considered its initial translational phase, in which multiple molecules designed to degrade disease-causing proteins are entering the clinic with the hope of providing meaningful benefits to patients. DCAF15, DDB1- and CUL4-associated factor 15; IMiD, immunomodulatory imide drug; MoA, mechanism of action; METAP2, methionyl aminopeptidase 2; PoC, proof of concept; VHL, von Hippel–Lindau.

targeted fashion to enable precision medicine; extending the clinical reach of the modality beyond oncology; and validating TPD modalities beyond IMiDs and PROTACs (BOX 3) in clinical settings. In this section, we discuss each of these points and what excites us for the next 20 years of degrader discovery and development.

Targets best suited for degradation

As described above, the first wave of clinical-stage protein degraders is aimed at classically drugged targets that have clinically validated roles in disease and readily available chemical matter. Success against these targets has begun to solidify PROTACs as a therapeutic modality and underscores the potential of these molecules to become best-in-class medicines by way of degrading a target instead of inhibiting it. However, the true promise of the modality is reaching targets that are currently difficult to drug with existing modalities or have not yet been drugged at all.

To date, traditional small-molecule drug discovery research for intracellular targets has often focused on developing high-affinity inhibitors that target either the active site or an allosteric site on an enzyme to shut down the function of the POI (occupancy-driven pharmacology). Although this has been a highly effective approach, it has left potential drug targets undrugged or underdrugged⁴⁵. PROTACs bring the degradation function to the target (event-driven pharmacology), negating the need for an active site and redefining undruggable targets as simply undrugged.

The optimal targets for PROTAC therapy, which we have dubbed ‘Tenets of PROTAC targets’ (FIG. 4) can have several common characteristics, including: a change away from the natural state, via overexpression, mutation, aggregation, isoform expression or localization, that results in a disease-causing gain of function; a binding surface that is approachable by an E3 ligase; and ideally, an unstructured region to thread into the proteasome^{46,47}.

