

THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Soutenue publiquement le 11 Mai 2021

Par M. KRAUPNER Nicolas

PROTAC[®]
Une application innovante des petites molécules en
drug-discovery

Membres du jury :

Président :

Monsieur le Professeur Jean-Louis CAZIN

Assesseur :

Madame la Professeur Rebecca DEPRez-POULAIN

Membre extérieur :

Monsieur le Docteur Philippe VERWAERDE

Membres du jury :

Président : Professeur Jean-Louis CAZIN :

- Professeur de Pharmacologie et Pharmacie Clinique à la Faculté de Pharmacie (Université de Lille)
- Docteur ès sciences pharmaceutiques
- Directeur du Centre de Pharmacologie et Pharmacie Clinique en Cancérologie au Centre Oscar Lambret de Lille (Centre Régional de Lutte Contre le Cancer des Hauts de France)
- Membre élu du bureau du Conseil Central de la Section H de l'Ordre National des pharmaciens
- Président du Conseil Scientifique de la Société Française de Pharmacie Oncologique

Assesseur : Professeur Rebecca DEPREZ-POULAIN

- Professeur de chimie thérapeutique à la Faculté de Pharmacie (Université de Lille)
- Docteur en Pharmacie
- Chef de groupe à l'U1177 Inserm, Institut Pasteur de Lille, ULille "Drugs and Molecules for Living Systems Lab"
- Membre honoraire de l'Institut Universitaire de France
- Membre du Labex EGID
- Présidente de la Société de Chimie Thérapeutique

Membre extérieur : Docteur Philippe VERWAERDE

- Président / Directeur Scientifique d'Alzprotect
- Co-fondateur de Vivactis, et iNovacia en tant que Vice-President pharmacologie moléculaire
- Docteur en biologie (université de Lille)



Faculté de Pharmacie
de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX
☎ 03.20.96.40.40 - 📠 : 03.20.96.43.64
<http://pharmacie.univ-lille2.fr>



Université de Lille

Président :	Jean-Christophe CAMART
Premier Vice-président :	Nicolas POSTEL
Vice-présidente formation :	Lynne FRANJIE
Vice-président recherche :	Lionel MONTAGNE
Vice-président relations internationales :	François-Olivier SEYS
Vice-président stratégie et prospective :	Régis BORDET
Vice-présidente ressources :	Georgette DAL
Directeur Général des Services :	Pierre-Marie ROBERT
Directrice Générale des Services Adjointe :	Marie-Dominique SAVINA

Faculté de Pharmacie

Doyen :	Bertrand DÉCAUDIN
Vice-doyen et Assesseur à la recherche :	Patricia MELNYK
Assesseur aux relations internationales :	Philippe CHAVATTE
Assesseur aux relations avec le monde professionnel :	Thomas MORGENROTH
Assesseur à la vie de la Faculté :	Claire PINÇON
Assesseur à la pédagogie :	Benjamin BERTIN
Responsable des Services :	Cyrille PORTA
Représentant étudiant :	Victoire LONG

Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie et Santé publique
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
M.	DÉCAUDIN	Bertrand	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
M.	DEPREUX	Patrick	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
M.	DINE	Thierry	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie - Virologie
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	ODOU	Pascal	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	POULAIN	Stéphanie	Hématologie
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	STAELS	Bart	Biologie cellulaire

Liste des Professeurs des Universités

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie - Biologie animale
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Biophysique et Laboratoire d'application de RMN
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	CHAVATTE	Philippe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences Végétales et Fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences Végétales et Fongiques
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Biophysique et application de RMN
Mme	DEPREZ	Rebecca	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants

M.	DEPREZ	Benoît	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences Végétales et Fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	FOLIGNÉ	Benoît	Bactériologie - Virologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie et Santé publique
Mme	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie industrielle
M.	GOOSSENS	Jean-François	Chimie analytique
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie thérapeutique
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie cellulaire
Mme	LESTRELIN	Réjane	Biologie cellulaire
Mme	MELNYK	Patricia	Chimie thérapeutique
M.	MILLET	Régis	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
Mme	MUHR-TAILLEUX	Anne	Biochimie
Mme	PERROY	Anne-Catherine	Législation et Déontologie pharmaceutique
Mme	ROMOND	Marie-Bénédicte	Bactériologie - Virologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SERGHERAERT	Éric	Législation et Déontologie pharmaceutique
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie industrielle
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie industrielle
M.	WILLAND	Nicolas	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants

Liste des Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	BALDUYCK	Malika	Biochimie
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie et Santé publique
Mme	GENAY	Stéphanie	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
M.	LANNOY	Damien	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	ODOU	Marie-Françoise	Bactériologie - Virologie

Liste des Maîtres de Conférences

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	AGOURIDAS	Laurence	Chimie thérapeutique
Mme	ALIOUAT	Cécile-Marie	Parasitologie - Biologie animale
M.	ANTHÉRIEU	Sébastien	Toxicologie et Santé publique
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie
M.	BANTUBUNGI-BLUM	Kadiombo	Biologie cellulaire
Mme	BARTHELEMY	Christine	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie - Virologie
M.	BELARBI	Karim-Ali	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	BERTHET	Jérôme	Biophysique et Laboratoire d'application de RMN
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie
M.	BOSC	Damien	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie

Mme	CARON-HOUDE	Sandrine	Biologie cellulaire
Mme	CARRIÉ	Hélène	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie - Biologie animale
Mme	CHARTON	Julie	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	CHEVALIER	Dany	Toxicologie et Santé publique
Mme	DANEL	Cécile	Chimie analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie - Biologie animale
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques
M.	DHIFLI	Wajdi	Biomathématiques
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire
M.	EL BAKALI	Jamal	Chimie thérapeutique
M.	FARCE	Amaury	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
M.	FLIPO	Marion	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
Mme	FOULON	Catherine	Chimie analytique
M.	FURMAN	Christophe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme	GOOSSENS	Laurence	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie et Santé publique
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie
M.	HAMONIER	Julien	Biomathématiques
Mme	HAMOUDI-BEN YELLES	Chérifa-Mounira	Pharmacotechnie industrielle
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie et Santé publique
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie
M.	KAMBIA KPAKPAGA	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique

M.	KARROUT	Younes	Pharmacotechnie industrielle
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie analytique
Mme	LEHMANN	Hélène	Législation et Déontologie pharmaceutique
Mme	LELEU	Natascha	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie analytique
Mme	LOINGEVILLE	Florence	Biomathématiques
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie
M.	MOREAU	Pierre-Arthur	Sciences Végétales et Fongiques
M.	MORGENROTH	Thomas	Législation et Déontologie pharmaceutique
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie et Santé publique
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Biochimie
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie et Santé publique
M.	POURCET	Benoît	Biochimie
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques / service innovation pédagogique
Mme	RAVEZ	Séverine	Chimie thérapeutique
Mme	RIVIÈRE	Céline	Pharmacognosie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie - Virologie
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie - Biologie animale
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie
M.	VILLEMAGNE	Baptiste	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants

M.	WELTI	Stéphane	Sciences Végétales et Fongiques
M.	YOUS	Saïd	Chimie thérapeutique
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques

Professeurs Certifiés

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	HUGES	Dominique	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

Professeur Associé - mi-temps

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	DAO PHAN	Haï Pascal	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	DHANANI	Alban	Législation et Déontologie pharmaceutique

Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	CUCCHI	Malgorzata	Biomathématiques
M.	DUFOSSEZ	François	Biomathématiques
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	GILLOT	François	Législation et Déontologie pharmaceutique
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques

AHU

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	CUVELIER	Élodie	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
Mme	DEMARET	Julie	Immunologie
M.	GRZYCH	Guillaume	Biochimie
Mme	HENRY	Héloïse	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	MASSE	Morgane	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière

ATER

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	GHARBI	Zied	Biomathématiques
Mme	FLÉAU	Charlotte	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
Mme	N'GUESSAN	Cécilia	Parasitologie - Biologie animale
M.	RUEZ	Richard	Hématologie
M.	SAIED	Tarak	Biophysique et Laboratoire d'application de RMN
Mme	VAN MAELE	Laurye	Immunologie

Enseignant contractuel

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	MARTIN MENA	Anthony	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière

Faculté de Pharmacie de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX

Tel. : 03.20.96.40.40 - Télécopie : 03.20.96.43.64

<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.

Remerciements

Aux membres et au président du jury,

Je souhaite remercier **Monsieur le Docteur Philippe Verwaerde** et **Madame la Professeur Rebecca Deprez-Poulain** d'avoir accepté de constituer mon jury de thèse d'exercice et d'avoir accepté de relire et d'évaluer mon manuscrit de thèse. Je tiens également à remercier **Monsieur le Professeur Jean Louis Cazin** de m'avoir fait l'honneur de présider le jury de ma thèse d'exercice.

A ma directrice de thèse,

Madame la Professeur Rebecca Deprez-Poulain

Je tiens à vous remercier de m'avoir suivi et soutenu dans mon cursus de pharmacien depuis la seconde année. Vous avez su conforter mes choix et mon envie de travailler dans la recherche et le développement en me faisant découvrir la discipline de chimie thérapeutique, dans laquelle j'ai décidé de m'orienter. Grâce à votre suivi pédagogique, vos enseignements ainsi que votre aide tout au long de mon parcours, j'ai eu la chance de trouver des terrains de stage qui me correspondent et qui m'ont permis de me former afin d'en arriver là où je suis aujourd'hui.

Je souhaite vous remercier pour l'intérêt que vous avez porté à mon travail de thèse d'exercice ainsi que pour vos conseils lors de la rédaction de ce manuscrit.

Enfin, c'est un plaisir de continuer à travailler quotidiennement avec vous dans votre équipe de recherche en continuant ma formation par une thèse Universitaire de Sciences.

Je souhaite également remercier :

Le Docteur Matthew Perry,

Grâce à vous, j'ai découvert la technologie PROTAC, sujet de ma thèse d'exercice. Je vous remercie pour votre disponibilité et pour avoir accepté de m'accueillir dans votre équipe afin d'encadrer mon stage de 5^{ème} année de Pharmacie. Je tiens également à remercier toute la « *fika team* » pour la bonne humeur que vous avez pu apporter en rendant mon stage et mon séjour en Suède encore plus agréable. Cette expérience a été très enrichissante sur le point professionnel et personnel, elle restera inoubliable.

Le Docteur Damien Bosc,

J'ai eu le plaisir d'avoir réalisé mon stage de master 2 sous ton encadrement et de continuer à travailler avec toi dans le cadre de ma thèse de Sciences que tu co-encadres. De par ta rigueur que tu me transmets, j'ai pu énormément apprendre à tes côtés.

Pour finir, je te remercie pour tes précieux conseils lors de la rédaction de ma thèse d'exercice.

Remerciements

Un grand merci :

A mes parents, Maman et Didier,

Merci d'avoir toujours cru en moi. Votre éducation et votre soutien, m'a poussé et m'a donné envie de toujours donner le meilleur de moi-même. Grâce à vous, vos encouragements, j'ai eu la possibilité de faire ces longues études et je vous en remercie profondément.

A mon grand frère Anthony et à ma petite sœur Mélanie,

Vous m'avez toujours soutenu et avez été là pour moi. Je suis heureux d'avoir été à vos côtés durant mon enfance et de continuer à passer de bons moments avec vous. Finalement, ce n'est peut-être pas si mal d'être l'enfant du milieu, cela veut aussi dire être bien entouré.

A ma famille et ma belle-famille,

Je vous remercie tous, **Maman, Didier, Anthony et Eve, Mélanie et Mathieu** ainsi que mes **grands parents** pour tous ces agréables moments en famille. J'apprécie chacun de ces moments qui me montrent que nous sommes une famille unie. Une pensée particulière à ma/mon futur(e) filleul(e), **bébé K**, qui je ne le doute pas, sera bien accueilli et recevra tout l'amour dont il aura besoin. Je suis déjà fier d'être son parrain.

Je tiens également à remercier mes beaux parents, **Janick, Marc et Eugénie** ainsi que toute ma belle-famille de me soutenir et d'être à mes côtés.

A mes Amis,

Je souhaite remercier tous mes amis notamment mes amis d'enfance, **Alexandre et Matthieu** pour ces vacances inoubliables passées ensemble ainsi pour ces sorties et ces repas ensemble depuis mon plus jeune âge.

Je remercie également mes amis pharma, **Antoine, Konny, Charles, Pauline, Valentin, et Clémence** pour toutes ces soirées passées ensemble, ces *footings* du jeudi mais, aussi pour cette entraide lors de nos études qui n'ont pas été de tout repos. Même si, pour certains, la distance nous sépare, je vous souhaite de continuer à passer, aussi souvent que possible, de bons moments ensemble tous réunis.

A ma moitié,

Je termine ces remerciements par toi, **Noémie** qui m'accompagne depuis bientôt 5 ans. Malgré ton séjour en Australie suivi du mien en Suède, nous avons toujours su être là l'un pour l'autre et se soutenir mutuellement. Ces superbes années passées ensemble et ce soutien quotidien m'ont aidé à réussir mes études de pharmacie et, ici, à les terminer par la réalisation de cette thèse d'exercice. Un immense merci pour tout, pour tes relectures de mon manuscrit de thèse d'exercice et pour le soutien que tu continues à m'apporter au quotidien.

Table des matières

I.	Introduction : le système ubiquitine protéasome	3
1.	Le protéasome.....	3
a.	Généralités	3
b.	Structure.....	4
c.	Mécanisme catalytique	6
2.	Le protéasome comme cible thérapeutique.....	7
3.	Ubiquitine	10
a.	Généralité et structure	10
b.	Le marquage par ubiquitination.....	12
c.	L'ubiquitination : la cascade ubiquitine E1-E2-E3 thioester.....	13
4.	Marquage par ubiquitine (adressage, dégradation, et autres rôles).....	16
II.	PROTACs®.....	19
1.	Concept.....	19
2.	Origine du concept PROTAC®	20
3.	Mécanisme d'action de PROTAC®	21
4.	Découverte.....	25
5.	Design d'un composé PROTAC®.....	26
a.	Le choix du E3RE.....	26
b.	L'impact du linker	29
c.	Le choix de la molécule ciblant la POI	31
6.	Avantages de la technologie PROTAC®.....	33
7.	Limites	37
8.	Exemple de PROTACs® existants	40
9.	CLIPTAC.....	44
10.	Une plateforme <i>click</i> pour la synthèse de PROTAC®.....	46
11.	Nouveaux concept émergents de la technologie PROTAC®.....	49
a.	LYTACs	49
b.	AUTAC/ATTEC.....	50
III.	PROTAC®, vers une application en clinique	53
1.	Les potentielles applications thérapeutiques.....	53
a.	Oncologie	53
b.	Inflammation	54
c.	Maladies neurodégénératives.....	56
d.	Immunologie et virologie	56
2.	PROTAC® en clinique	58
a.	ARV 110	58
b.	ARV 471	60
3.	Vers une arrivée en thérapeutique.....	62

Liste des figures

FIGURE 1: STRUCTURE DU PROTEASOME EUCARYOTIQUE (ADAPTE DE ⁴).....	4
FIGURE 2: REPRESENTATION DES SOUS-UNITES DU PROTEASOME 26S DEPLIEE (ADAPTEE DE ⁴).....	5
FIGURE 4: STRUCTURE DES IPS SUR LE MARCHE.....	9
FIGURE 5: REPRESENTATION DE LA STRUCTURE MOLECULAIRE D'UNE UBIQUITINE (ADAPTE DE ³⁴).....	11
FIGURE 6: REPRESENTATION DES DIFFERENTS TYPES D'UBIQUITINATIONS (ADAPTEE DE ⁴⁰).....	12
FIGURE 7: SCHEMA DE LA CASCADE UBIQUITINE E1-E2-E3 THIOESTER (ADAPTE DE ⁴⁴).....	14
FIGURE 8: REPRESENTATION DES MECANISMES D'ACTION DES FAMILLES D'UB LIGASES ⁴⁶	16
FIGURE 9: ILLUSTRATION DU MECANISME D'ACTION D'UN PROTAC [®]	19
FIGURE 10: REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UNE MOLECULE PROTAC [®]	20
FIGURE 11: SCHEMA REPRESENTANT LE RECRUTEMENT DE L'UBIQUITINE LIGASE E6-AP PAR HPV.....	21
FIGURE 12: MECANISME DE L'ACTION PROTEOLYTIQUE D'UN PROTAC [®]	21
FIGURE 13 : SCHEMA EXPLIQUANT LA DYNAMIQUE DU COMPLEXE TERNAIRE FORMEE.....	22
FIGURE 14: REPRESENTATION DE LA FORMATION DU COMPLEXE POI-PROTAC [®] -E3.....	23
FIGURE 15: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA FORMATION DU COMPLEXE TERNAIRE (ADAPTE DE ⁶⁷).....	24
FIGURE 16: STRUCTURE DU PROTAC [®] PEPTIDIQUE PROTAC_1 ⁶¹	25
FIGURE 17: EXEMPLE DE LIGANDS DE LIGASE UTILISES POUR LA SYNTHESE DE PROTAC [®]	27
FIGURE 18: ILLUSTRATION DE L'ETUDE <i>IN SILICO</i> DE COMPLEXES TERNAIRES (ADAPTE DE ⁷⁹).....	28
FIGURE 19: STRUCTURE CRISTALLOGRAPHIQUE DU COMPLEXE TERNAIRE ENTRE BRD4-PROTAC [®] -VHL ⁸¹	29
FIGURE 20: SELECTIVITE DE DEGRADATION DE DEUX PROTAC [®] _VHL_MAPK EN UTILISANT DEUX POINTS D'ACCROCHE DIFFERENTS DU LINKER AU LIGAND DU VHL.....	31
FIGURE 21: ILLUSTRATION DE LA SELECTIVITE D'UN PROTAC [®] DEPENDANT DE LA COMPATIBILITE DES CIBLES.....	32
FIGURE 22: ILLUSTRATION DE DE LA COUVERTURE THERAPEUTIQUE DU PROTEOME PAR LES PETITES MOLECULES TRADITIONNELLES...	34
FIGURE 23: REPRESENTATION GRAPHIQUE DES PROPRIETES MOLECULAIRES DES COMPOSES PROTAC ^{®104}	37
FIGURE 24: METHODES UTILISEES POUR LA FONCTIONNALISATION DE CHAINES PEG.....	40
FIGURE 25: PROTAC [®] _AR-MDM2.....	40
FIGURE 26: STRUCTURE DE PROTAC [®] _RIPK2 ET SES ACTIVITES CELLULAIRES SUR THP-1 ⁶⁶	42
FIGURE 27: DOCKING DE PROTAC [®] _SIRT2 SUR CRBN ET SIRT2 ⁸⁶	43
FIGURE 28: SYNTHESE DU COMPOSE PROTAC [®] _SIRT2 ⁸⁶	44
FIGURE 29: FORMATION <i>IN SITU</i> DE PROTACS [®] BRD4 ET ERK 1/2 (CLIPACTs) (ADAPTE DE ¹⁰⁷).....	45
FIGURE 30: PRINCIPE DU TEST ALPHA SCREEN.....	48
FIGURE 31: ILLUSTRATION DES NOUVEAUX CONCEPTS EMERGEANT DE PROTACS [®] (ADAPTE DE ¹¹⁹).....	51
FIGURE 32: PROTAC [®] _HDAC6-CRBN.....	55
FIGURE 33: RESULTATS PRECLINIQUES D'ARV-110 SUR MODELES RESISTANTS A L'ENZALUTAMIDE.....	59
FIGURE 34: RESULTAT PRECLINIQUES D'ARV-741 SUR MODELES XENOGREFE.....	61
FIGURE 36: SCHEMA DES ETAPES DU DEVELOPPEMENT DU MEDICAMENT.....	63

Abbreviations

- **Å** : Ångström = 10^{-10} mètre
- **µL** : Microlitre
- **19S RP** : particule régulatrice
- **20S CP** : protéasome 20S
- **ADME** : Absorption, distribution, métabolisation, élimination
- **AR** : Récepteur aux androgènes
- **CP** : corps du protéasome
- **C-ter** : C-terminal
- **CETSA** : *cellular thermal shift assay*
- **CLIPTACs[®]** : Dégradation protéique par assemblage *in cellulo* de *PROTAC[®]*
- **CNP** : Peptide natriurétique de type C
- **CMH** : complexe majeur d'histocompatibilité
- **CRBN** : Céréblon
- **kDa** : Kilo Dalton
- **DC₅₀** : Concentration dégradant 50 % du pool de protéines ciblées
- **DCM** : Dichlorométhane
- **DUB** : Enzyme déubiquitinante
- **E1** : Ub-activating Enzyme
- **E2** : Ub-conjugating enzyme
- **E3** : Ub-ligase
- **E3RE** : Élément recrutant l'E3
- **HDAC** : Histone désacétylase
- **EMA** : Agence européenne des médicaments
- **HIF** : *Hypoxia-Inducible Factor*
- **Hz** : Hertz
- **FDA** : *Food and Drug Administration*
- **IC₅₀** : Concentration inhibant 50 % de l'effet observé
- **IgG** : Immunoglobuline de type G
- **IPs** : Inhibiteurs du protéasome
- **kDa** : Kilo Dalton (10^3)
- **KDAC** : Lysine désacétylase
- **KO** : *Knock out*
- **Koff** : Constante de dissociation
- **KTGS** : Synthèse guidée par la cible
- **M \$** : Millions de dollars
- **MDa** : Méga Dalton (10^6)
- **MM** : Myélome Multiple
- **nM** : Nano molaire 10^{-9} mol/L
- **N-ter** : N-terminal
- **Ntn** : N-ter nucléophile
- **NHS** : N-hydroxy succinimide
- **pM** : Pico molaire 10^{-12} mol/L
- **PEG** : Polyéthylène glycol
- **POI** : Protéine d'intérêt
- **PPIs** : Interactions protéine-protéine
- **ppm** : Partie par million
- **PROTAC[®]** : PROteolysis TArgeting Chimera
- **PSA** : Aire de surface polaire (en Å²)
- **T_½** : Temps de demi-vie
- **TA** : Température ambiante
- **TCO** : Trans-cyclo-octene
- **THF** : Tétrahydrofurane
- **t_r** : Temps de rétention
- **RBR** : *RING Between RING*
- **Rd** : Rendement
- **RP** : Particule régulatrice
- **SARM** : Modulateur sélectif des AR
- **SU** : Sous-unité
- **UV** : Ultraviolet
- **Ub** : Ubiquitine
- **UBL** : *Ubiquitine like*
- **UPP** : Voie ubiquitine protéasome
- **UPS** : Système ubiquitine protéasome
- **SFC** : Chromatographie en phase supercritique

Introduction

PROTAC® (PROteolysis Targeting Chimeras) est une nouvelle approche de l'utilisation de petites molécules en thérapeutique ou en tant qu'outils chimiques d'exploration du vivant. Cette technologie contourne la machinerie cellulaire de dégradation protéique, le système ubiquitine-protéasome, pour induire la dégradation spécifique d'une protéine d'intérêt ou pathologique. Le système ubiquitine-protéasome est l'une des deux principales voies biologiques de dégradation protéique permettant le maintien de l'homéostasie. Ce système utilise un mécanisme appelé l'ubiquitination permettant de marquer les protéines n'étant plus désirées, donc à dégrader, et de les adresser au protéasome.

Ces molécules, catalysant la dégradation spécifique de protéines, s'avèrent être une stratégie et une arme efficace pour lutter en particulier contre le cancer. En effet, l'étiologie du développement de cancers est souvent une expression aberrante d'une protéine ou un développement protéique incontrôlé.

Cette thèse abordera tout d'abord, la structure et les fonctions du protéasome, pour expliquer les mécanismes biologiques du système ubiquitine-protéasome, puis le mécanisme de marquage par l'ubiquitine. Le concept, la découverte et le design de PROTAC® seront détaillés, en incluant leurs avantages et inconvénients, et des exemples concrets d'applications de ces molécules. Seront présentés enfin, les perspectives thérapeutiques de ces composés seront définies et illustrées notamment avec les deux molécules PROTACs®, actuellement, en phase 1 d'études cliniques pour des applications en oncologie.

I. Introduction : le système ubiquitine protéasome

Le renouvellement permanent des protéines est l'un des moyens efficaces et nécessaires pour maintenir l'homéostasie des organismes. Les cellules eucaryotes possèdent plusieurs voies de dégradation protéique comprenant : les protéases membranaires, les enzymes lysosomales, les protéases mitochondriales et le système protéasomal. Le système ubiquitine-protéasome (UPS) est l'une des deux voies principales, avec celle de l'autophagie, permettant la médiation de la dégradation protéique chez les cellules eucaryotes. La première mention de ce complexe date de 1983 sous l'appellation de « *multicatalytic proteinase complex* »¹. La découverte de ce système UPS a ensuite fait l'objet d'un prix Nobel en 2004². Ce système permet de dégrader des protéines en générant de petits oligopeptides de 3 à 25 acides aminés eux-mêmes ensuite dégradés en unité d'acides aminés par les peptidases cytosoliques. Dans les systèmes eucaryotes, la voie UPS joue également un rôle important dans la régulation de l'expression protéique, du trafic cellulaire et de la localisation intracellulaire des protéines. Ces différents devenir sont rendus possibles par la grande diversité du marquage protéique par ce système. Suite à différents signaux cellulaires et dans le but du maintien de l'homéostasie protéique cellulaire il va y avoir un marquage spécifique des protéines par une, ou plusieurs ubiquitines. Ce marquage spécifique par l'ubiquitine est rendu possible grâce à l'action de trois familles d'enzymes distinctes permettant d'activer et de transférer ces unités d'ubiquitines sur les protéines à moduler.

1. Le protéasome

a. Généralités

Le protéasome est une structure protéique volumineuse (2 500 KDa) conservée chez les eucaryotes, composée d'au minimum 28 sous-unités différentes formant un corps catalytique appelé protéasome 20S (20S CP) dû à son coefficient de sédimentation. Le protéasome possède une, ou deux parties terminales régulatrices appelées particules régulatrices 19S (19S RP) servant à reconnaître les substrats ubiquitylés, eux-mêmes composés de deux sous parties, une « base » et une « coiffe ».³

L'assemblage du protéasome 20S avec une ou deux 19S RP forme respectivement le protéasome 26S et 30S bien que ces deux dernières appellations soient souvent simplifiées en « protéasome 26S » sans distinguer les deux formes (Figure 1).

(1) Wilk, S.; Orłowski, M. *J. Neurochem.* **1983**, *40* (3), 842–849.

(2) The Nobel Prize in Chemistry 2004, (accessed Aug 22, 2019).

(3) Schweitzer, A.; et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2016**, *113* (28), 7816–7821.

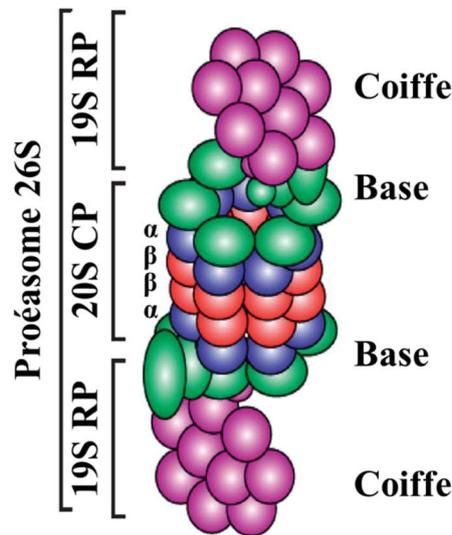


FIGURE 1: STRUCTURE DU PROTEASOME EUCARYOTIQUE (ADAPTE DE ⁴)

b. Structure

Le corps du protéasome est une structure cylindrique résultant de l'assemblage de quatre anneaux heptamériques empilés, deux anneaux β externes et deux anneaux α internes. Ces anneaux forment une structure $\alpha_{1-7}\beta_{1-7}\beta_{1-7}\alpha_{1-7}$ d'approximativement 150 Å de long et 115 Å de diamètre externe contenant l'activité protéolytique du protéasome.⁵ Seules les sous-unités (SU) β_1 , β_2 et β_5 possèdent une activité protéolytique. Cette activité est permise grâce à un résidu thréonine catalytique au niveau de leur partie N-terminale (N-ter) donnant une activité N-ter nucléophile (Ntn) hydrolase, hydrolysant de manière spécifique les liaisons peptidiques. Les SU β_1 , β_2 et β_5 sont respectivement associées à une activité caspase-like, trypsine-like et chymotrypsine-like permettant de cliver respectivement les liaisons peptidiques du côté C-terminal (C-ter) d'un acide aminé acide, basique et hydrophobe.⁶

Les anneaux α périphériques servent quant à eux de régulateurs et sont presque complètement fermés afin de prévenir l'entrée et la dégradation incontrôlée des protéines dans ce canal catalytique. L'ouverture des canaux catalytiques du protéasome par les anneaux α nécessite la liaison du corps du protéasome avec un régulateur comme par exemple une RP 19S.⁷

(4) Tanaka, K. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* **2009**, 85 (1), 12–36.

(5) Unno, M.; et al. *Structure* **2002**, 10 (5), 609–618.

(6) Groll, M.; et al. *Nature* **1997**, 386 (6624), 463–471.

(7) Rabl, J.; et al. *Mol. Cell* **2008**, 30 (3), 360–368.

En effet le protéasome enzymatiquement actif est généralement fixé par une, ou deux, particules régulatrices appelées RP 19S au niveau d'une ou de ces deux extrémités. Cette particule régulatrice, constituée de différentes sous-unités, permet de recruter les protéines marquées par une chaîne d'ubiquitines, de recycler la chaîne et de rendre possible l'entrée de la protéine dans le corps du protéasome pour y être dégradée.

Cette particule est composée d'une coiffe au niveau de sa partie externe et d'une base qui est la partie la plus proximale au corps catalytique. La coiffe est composée d'au moins neuf sous-unités non ATPase (Rpn3, Rpn5-9, Rpn11, Rpn12 et Rpn15) et a pour fonction principale de retirer la chaîne de polyubiquitine de la protéine substrat capturée pour la recycler. La base est composée de six sous-unités homologues ATPase (Rpt1-Rtp6) et de quatre sous-unités non ATPase qui sont Rpn1, Rpn2, Rpn10 et Rpn13 (Figure 2). La base de cette RP 19S a trois principaux rôles : capturer les protéines substrats par reconnaissance des ubiquitines, les dénaturer en rompant leurs structures tertiaires et ouvrir le canal du protéasome en modulant les sous-unités α .⁸⁻¹⁰

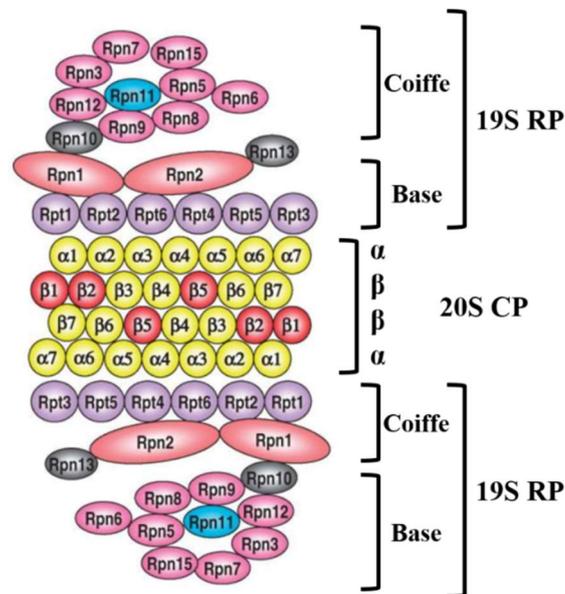


FIGURE 2: REPRESENTATION DES SOUS-UNITÉS DU PROTEASOME 26S (ADAPTEE DE 4)

(8) Stadtmueller, B. M.; Hill, C. P. *Mol. Cell* **2011**, 41 (1), 8–19.

(9) Rosenzweig, R.; et al. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2008**, 15 (6), 573–580.

(10) Lander, G. C.; et al. *Nature* **2012**, 482 (7384), 186–191.

c. Mécanisme catalytique

La dégradation des protéines de façon ubiquitine-dépendant nécessite quatre grandes étapes. Tout d'abord, il y a la capture de la protéine substrat par les sous-unités Rpn1, Rpn10 et Rpn13 de la base qui sont capables de reconnaître les motifs ubiquitines des protéines substrats. Ensuite, il y a l'ouverture de la porte α , c'est la liaison de protéines substrats par la RP 19S qui permet cette ouverture en induisant un changement conformationnel des sous-unités ATPase de la RP 19S. Ce changement de conformation permet au motif C-ter des sous-unités ATPase de la base de la RP19S d'interagir avec le CP 20S provoquant une rotation de 7° des sous-unités α sur elles-mêmes ainsi qu'une rotation de 4° de l'anneau α complet.^{7,8,11}

Une fois la cavité ouverte, il y a une dénaturation ATP-dépendante de la protéine substrat par la base de la particule régulatrice, c'est-à-dire la rupture de sa structure tridimensionnelle afin de provoquer son dépliement formant un filament d'acides aminés qui lui, moins volumineux, peut entrer dans ce canal dont l'ouverture mesure environ 13-20 Å de diamètre (contre 9 Å en conformation fermée) (Figure 5).^{4,7,12-14}

Pour terminer, il y a la déubiquitination de la protéine par la sous-unité Rpn11 de la coiffe. Rpn11 est une métalloisopeptidase à zinc et a pour rôle de cliver la chaîne de polyubiquitine de la protéine. Cette sous-unité fait partie de la famille des enzymes déubiquitinantes (DUBs). Cette chaîne est ensuite clivée par d'autres DUBs afin de la recycler en générant des unités monomériques d'ubiquitines réutilisables.¹⁵

La protéine, une fois dépliée et déubiquitinée, rentre dans le protéasome 20S par translocation pour s'y faire cliver par les sous-unités β 1, β 2 et β 5 qui ont respectivement des activités caspase-like, trypsine-like et chymotrypsine-like, permettant de cliver respectivement les liaisons peptidiques du côté C-ter d'un acide aminé acide (β 1), basique (β 2) et hydrophobe (β 5).⁶ Suite à l'action du protéasome 20S, des petits polypeptides de 2 à 25 acides aminés sont générés et ensuite clivés en acides aminés par des peptidases cytosoliques (Figure 3).

(11) Yu, Y.; et al. *EMBO J.* **2010**, *29* (3), 692–702.

(12) Bard, J. A. M.; et al. *Annu. Rev. Biochem.* **2018**, *87*, 697–724.

(13) Kenniston, J. A.; et al. *Cell* **2003**, *114* (4), 511–520.

(14) Collins, G. A.; Goldberg, A. L. *Cell* **2017**, *169* (5), 792–806.

(15) Verma, R.; et al. *Science* **2002**, *298* (5593), 611–615.

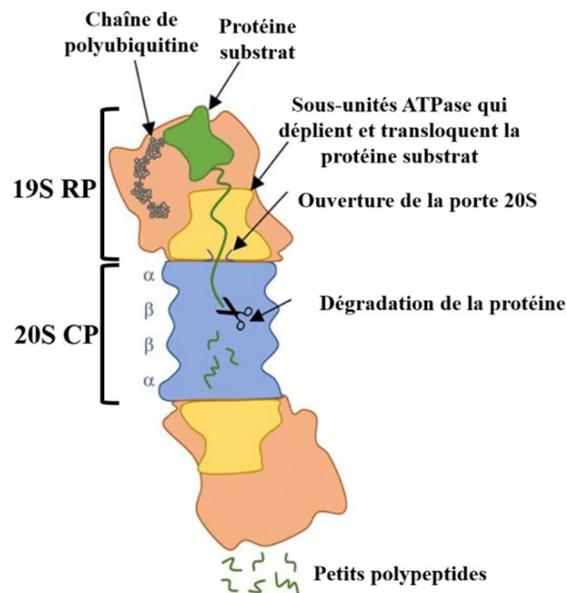


FIGURE 3: SCHEMA REPRESENTANT LA DEGRADATION D'UNE PROTEINE PAR LE PROTEASOME (ADAPTEE DE ¹⁶)

2. Le protéasome comme cible thérapeutique

Les protéines ayant une conformation anormale doivent être dégradées pour éviter d'endommager les cellules. La voie UPS permet la dégradation de ces protéines en les marquant pour les adresser au protéasome. Cette voie peut également éliminer rapidement une protéine régulatrice ou inhibitrice d'un système pour moduler la production ou l'activité de certaines protéines. Toutes ces fonctions permettent une bonne survie cellulaire en évitant l'agrégation de protéines non fonctionnelles voire toxiques.

Ce système est une voie biologique très importante et on peut y voir un intérêt thérapeutique dans sa modulation. L'inactivation ou l'atténuation de cette voie biologique entraîne une accumulation de protéines intracellulaires.

Cette accumulation non physiologique induit par divers signaux la voie pro-apoptotique des cellules et donc la mort cellulaire par apoptose. L'apoptose est une mort cellulaire programmée dite « douce », non inflammatoire et non nécrotique ayant pour but d'éliminer les cellules défectueuses afin de protéger l'ensemble du tissu. Les cellules apoptotiques déclenchent elles-mêmes leur autodestruction en exprimant sur le feuillet externe de leurs membranes plasmiques un phospholipide particulier, présent normalement uniquement sur le feuillet interne, la phosphatidylsérine.¹⁷

(16) Thibaudeau, T. A.; Smith, D. M. *Pharmacol. Rev.* **2019**, *71* (2), 170–197.

(17) Nagata, S. *Annu. Rev. Immunol.* **2018**, *36* (1), 489–517.

En effet, pour exploiter ce mécanisme en thérapeutique, il existe une classe de modulateurs de ce système représentée par les inhibiteurs du protéasome (IPs) qui sont à ce jour au nombre de trois. Le chef de file, le bortezomib approuvé en 2003 (FDA) et 2004 (EMA) est suivi du carfilzomib en 2012 (FDA) puis de l'ixazomib en 2015 (FDA).⁵³ Cette famille de médicaments est une des classes thérapeutiques les plus importantes dans le traitement du myélome multiple (MM), cancer hématologique touchant les plasmocytes.¹⁸

Ce cancer est caractérisé par une surproduction d'immunoglobulines de type G (IgG). C'est le second cancer hématologique le plus fréquent, après le lymphome non-hodgkinien, représentant 1,8 % de tous les cancers. Il y a eu plus de 30 000 nouveaux cas et a causé 12 590 morts en 2017 aux Etats-Unis avec une médiane de survie de cinq ans.¹⁹ L'une des caractéristiques de ce cancer est l'induction d'un stress protéotoxique important par la surproduction d'IgGs induisant une accumulation de protéines mal conformées dans le RE. Ici, les inhibiteurs du protéasome servent à accentuer ce stress protéotoxique présent dans les cellules cancéreuses en bloquant la dégradation protéique provoquant la mort cellulaire par apoptose et permettant le contrôle de la maladie.¹⁸

L'activité catalytique des SU du protéasome est portée par une thréonine N-terminale nucléophile de leurs structures. L'utilisation d'un pharmacophore ciblant cette thréonine N-ter catalytique est donc nécessaire afin d'obtenir une molécule inhibitrice du protéasome.²⁰ C'est pour cela que les inhibiteurs du protéasome sont composés d'un groupement électrophile, appelés « *warhead* », permettant de lier, et donc d'inhiber, les sous-unités catalytiques du protéasome.

La sous-unité $\beta 5$ est en particulier ciblée dû à la structure très hydrophobe de son site actif. Le groupement réactif de ces composés est soit un acide boronique, soit une époxycétone liant respectivement de façon réversible ou irréversible les SU afin de bloquer leurs actions protéolytiques.^{18,21}

(18) Gandolfi, S.; et al. *Cancer Metastasis Rev.* **2017**, 36 (4), 561–584.

(19) Siegel, R. L.; et al. *CA. Cancer J. Clin.* **2017**, 67 (1), 7–30.

(20) Jung, T.; et al. *Mol. Aspects Med.* **2009**, 30 (4), 191–296.

(21) *Cancer Cell* **2005**, 8 (5), 407–419.

Les IPs mis sur le marché sont des mimes de substrat, c'est-à-dire qu'ils ressemblent structurellement aux substrats naturels du protéasome, donc à un peptide. Le bortezomib, premier IP mis sur le marché, ressemble structurellement à un dipeptide phénylalanine-leucine avec un acide boronique remplaçant l'acide carboxylique de la leucine C-ter. Les autres IPs sont le carfilzomib, un peptide présentant une époxycétone afin de se lier irréversiblement au protéasome et l'ixazomib, un tripeptide présentant un acide boronique comme warhead (Figure 4).²²

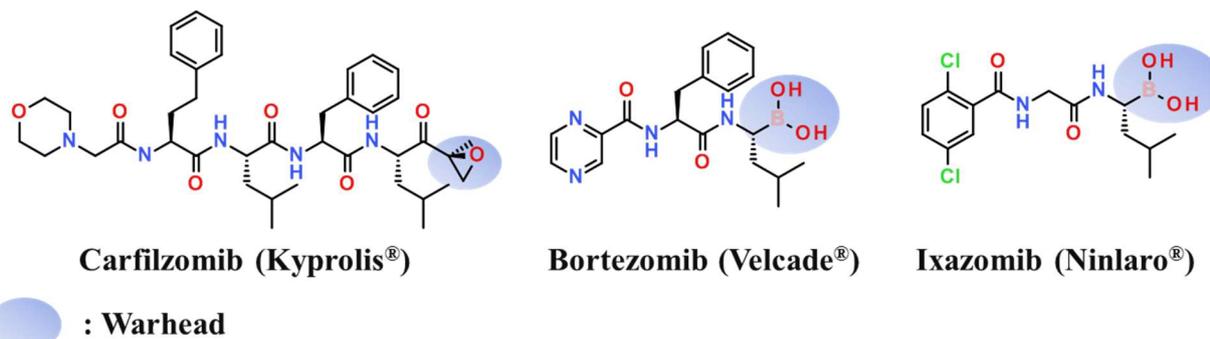


FIGURE 4: STRUCTURE DES IPs SUR LE MARCHÉ

L'inhibition du protéasome par les IPs s'est avérée être une stratégie efficace dans le traitement du myélome multiple révolutionnant le traitement de ce cancer. Le bortezomib, s'est montré efficace en première ligne de traitement ainsi qu'en cas de rechute. Cependant le MM reste une maladie incurable et les patients traités par IPs développent inévitablement une résistance au traitement et montrent des effets secondaires ce qui peut limiter l'utilisation de ces composés. Le bortezomib présente des effets secondaires graves tels qu'une neuropathie périphérique douloureuse, une toxicité hématologique par thrombocytopénie, une neutropénie, une lymphopénie et une anémie.^{23,24} Pour pallier aux phénomènes de résistance au bortezomib et augmenter la tolérance de ces thérapeutiques, des IPs de seconde génération sont apparus.

Les IPs de seconde génération, le carfilzomib et l'ixazomib, ont été approuvés dans le traitement du MM en cas de rechute et peuvent aider à surmonter les mécanismes de résistance et à accroître la tolérance du traitement en présentant moins d'effets indésirables.

Les inhibiteurs du protéasome sont très largement utilisés en clinique dans le traitement de différents cancers.

(22) Adams, J.; et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 8 (4), 333–338.

(23) Merin, N. M.; Kelly, K. R. *Pharmaceuticals* **2014**, 8 (1), 1–20.

(24) Kaplan, G. S.; et al. *Free Radic. Biol. Med.* **2017**, 103, 1–13.

Cependant, l'utilisation est toujours limitée avec l'apparition de résistance et de toxicités hématologiques qui représentent un effet indésirable de classe dépendant du mécanisme d'action d'inhibition du protéasome.^{23,24} La neuropathie périphérique représente l'effet secondaire inévitable du bortézomib, ce qui est également le cas de beaucoup d'autres chimiothérapies. Les connaissances actuelles sur le mécanisme sous-jacent de cette neuropathie périphérique sont très limitées. Les lésions du réticulum mitochondrial ainsi qu'un stress oxydatif semble avoir un rôle déterminant dans l'apparition de cet effet secondaire. Le bortézomib est, en effet, capable d'activer la voie apoptotique mitochondriale de façon calcium-dépendante entraînant des dommages au niveau des neurones sensoriels pouvant être la cause de cette neuropathie périphérique.^{25,26} Cependant, le système ubiquitine protéasome reste reconnu comme une cible efficace et intéressante pour accroître l'arsenal thérapeutique contre le cancer.

3. Ubiquitine

a. Généralité et structure

L'Ubiquitine (Ub) est une petite protéine (8,5 kDa) présente dans la grande majorité des organismes eucaryotes. Elle est composée de 76 acides aminés. Cette petite protéine est utilisée par les systèmes cellulaires comme marqueur protéique par un processus appelé l'ubiquitination. Cette conjugaison à d'autres protéines a d'abord été décrite comme étant un marqueur de dégradation protéique mais désormais nous savons que ce marquage peut être très divers et conduire à des devenir très différents. Chez les vertébrés et les plantes supérieures, l'ubiquitine (Ub) est une protéine dont la séquence est hautement conservée et les différences entre les Ubs animales, végétales et fongiques sont seulement de deux ou trois acides aminés. Ce degré remarquable de conservation suggère que l'ubiquitine de différentes espèces peut être fonctionnellement interchangeable facilitant l'étude et la compréhension de cette protéine.²⁷ L'Ub est une protéine de structure secondaire repliée composée de feuilletts β et d'hélices α enroulées (Figure 5).²⁸ Ces enroulements sur eux-mêmes sont possibles grâce à la présence d'un noyau hydrophobe de 16-17 acides aminés ainsi que d'importantes liaisons hydrogènes intramoléculaires.

(25) Alé, A.; et al. *NeuroToxicology* **2014**, *43*, 28–35.

(26) Argyriou, A. A.; et al. *Blood* **2008**, *112* (5), 1593–1599.

(27) Callis, J.; et al. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265* (21), 12486–12493.

(28) Peters, J.-M.; et al. *Ubiquitin and the Biology of the Cell*; Springer Science & Business Media, 2013.

L'ubiquitine a une grande stabilité structurelle grâce à son noyau hydrophobe, ses liaisons hydrogènes intramoléculaires et sa structure moléculaire très rigide la protégeant des enzymes métaboliques, L'Ub est une protéine présentant une thermostabilité exceptionnelle avec une température de fusion moléculaire (T_m) de 71 °C à pH 3 et supérieure à 90 °C à pH > 4, contrairement aux protéines typiques où le T_m est dans la gamme 20-85 °C.²⁹⁻³¹

La surface de l'Ub est complexe et présente de multiples fonctionnalités. Tout d'abord, la première boucle d'acides aminés, contenant la Leu-8, est capable d'adopter différentes conformations. Ceci est important pour l'interaction aux protéines fixant l'ubiquitine.³² Une autre région, composée de Ile-44, Leu-8, Val-70 et His-68, appelée le patch hydrophobe Ile-44 (*Ile-44 patch*), interagit avec le protéasome et d'autres protéines liant l'Ub. En plus de ce patch hydrophobe comprenant le résidu C-ter de la Leu-8 important pour la fixation, un autre élément de liaison aux protéines s'est avéré essentiel pour l'endocytose : c'est la région autour de la Phe-4, comprenant Thr-12 et Gln2. Il existe également d'autres surfaces, non essentielles à l'interaction, mais contribuant à divers autres rôles.³³

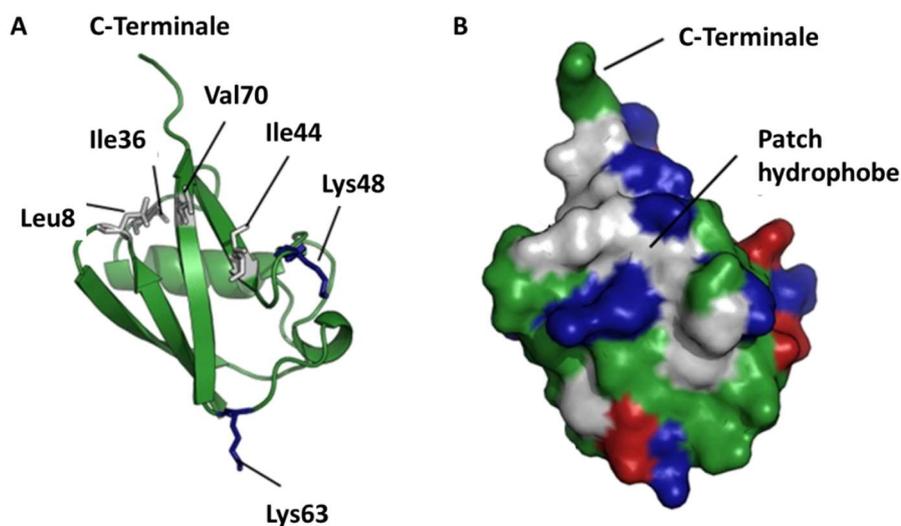


FIGURE 5: REPRESENTATION DE LA STRUCTURE MOLECULAIRE D'UNE UBIQUITINE (ADAPTE DE ³⁴)

(29) El-Baba, T. J.; et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139* (18), 6306–6309.

(30) Liu, F.; et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105* (7), 2369–2374.

(31) Waegelé, M. M.; Gai, F. *J. Chem. Phys.* **2011**, *134* (9), 095104.

(32) Lange, O. F.; et al. *Science* **2008**, *320* (5882), 1471.

(33) Callis, J. *Arab. Book Am. Soc. Plant Biol.* **2014**, *12*.

(34) Winget, J. M.; Mayor, T. *Mol. Cell* **2010**, *38* (5), 627–635.

b. Le marquage par ubiquitination

L'extrémité C-Ter de l'ubiquitine constitue son point d'ancrage et celle-ci peut être liée de façon covalente à une protéine substrat ou à une deuxième Ub via l'un de ses sept groupes lysyl ϵ -amino ou la partie amino N-ter de cette dernière, formant des chaînes d'Ubs. Ainsi, une protéine peut être marquée par une seule Ub (monoubiquitination) ou par plusieurs Ub mais sur différents sites du même substrat (multi-monoubiquitination) ou par des chaînes d'Ubs (polyubiquitination).

Ces chaînes peuvent être de type homotypique, c'est-à-dire reliées ensemble par le même résidu lysine de leur structure, de type mixtes, générées par polymérisation d'Ubs sur des lysines différentes, ou bien de type ramifiées (Figure 6).^{33,35}

De plus, les différentes liaisons Ub-Ub forment des conformations bien distinctes et différentes et par conséquent elles ont une interprétation différente donnant des signaux variés. La technique de spectrométrie de masse a été utilisée pour déterminer les types de liaisons Ub-Ub présents *in vivo* ainsi que les sites d'ubiquitinations sur les protéines substrats.

Les chaînes Ub les plus abondantes *in vivo* chez *Arabidopsis* sont des chaînes liées par les Lys-48 (K48), puis par Lys-63 (K63) et par Lys-11 (K11) suivies ensuite, à faible abondance, des chaînes liées par K33, K6- et K29.³⁶ La seule liaison Ub-Ub manquante est la Lys-27, qui est la seule lysine non exposée en surface.³⁷ Des liaisons Lys-27 Ub ont été identifiées dans des cellules de levures et de mammifères et nécessiteraient des changements de conformation pour exposer ce résidu.^{38,39}

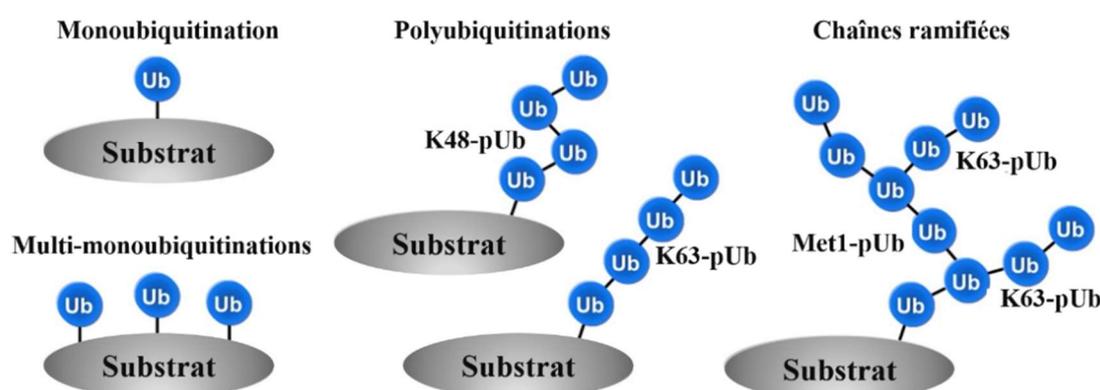


FIGURE 6: REPRESENTATION DES DIFFERENTS TYPES D'UBIQUITINATIONS (ADAPTEE DE ⁴⁰)

(35) Sadowski, M.; et al. *IUBMB Life* **2012**, 64 (2), 136–142.

(36) Maor, R.; et al. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **2007**, 6 (4), 601–610.

(37) Kim, D.-Y.; et al. *Plant Cell* **2013**, 25 (5), 1523–1540.

(38) Xu, P.; et al. *Cell* **2009**, 137 (1), 133–145.

(39) Meierhofer, D.; et al. *J. Proteome Res.* **2008**, 7 (10), 4566–4576.

(40) Emmerich, C. H.; Cohen, P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2015**, 466 (1), 1–14.

c. L'ubiquitination : la cascade ubiquitine E1-E2-E3 thioester

Le processus d'ubiquitination nécessite trois enzymes distinctes formant la cascade ubiquitine E1-E2-E3 thioester. La première enzyme de cette cascade est appelée l'enzyme activatrice de l'ubiquitine (*Ub activating* ou E1). Il n'existe qu'une ligase E1 connue chez l'homme possédant deux isoformes, une nucléaire et une cytoplasmique.⁴¹ En utilisant l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP, cette enzyme catalyse l'activation de la glycine C-Ter de l'Ub. Dans une première étape, il y a adénylation de l'Ub. Pour cela, l'E1 lie simultanément le complexe ATP-Mg²⁺ et l'Ub, permettant l'acyl-adénylation de la glycine C-ter de la molécule d'Ub. La deuxième étape est le transfert de l'Ub à un résidu cystéine actif de l'E1, avec libération d'AMP. Cette étape aboutit à la formation d'une liaison thioester entre la partie C-ter de l'Ub, ou une protéine de type Ub (UBLs), et la fonction thiol d'une cystéine de l'E1. Les UBLs sont de petites protéines, comme l'Ub, pouvant également marquer des protéines via la cascade Ub E1-E2-E3 thioester. Le marquage par UBLs est réversible et peut servir à modifier l'état fonctionnel des protéines.⁴²

La deuxième enzyme dans le processus est appelée l'enzyme conjugante de l'Ub (*Ub conjugating enzyme*, E2 ou UBC). Cette enzyme accepte l'Ub activée de l'E1 en la transférant sur un de ses résidus cystéines. Il existe environ 40 enzymes E2 différentes chez l'homme.⁴³

La troisième enzyme de ce système est l'ubiquitine ligase (ou E3) qui va recruter la protéine substrat pour l'ubiquitination. Les E3 catalysent la dernière étape de la cascade d'ubiquitination. Les enzymes E3 transfèrent l'ubiquitine, directement ou indirectement, à la protéine substrat pour permettre l'ubiquitination de celle-ci. Le transfert de l'Ub se fait en formant une liaison amide entre la glycine C-Ter de l'Ub et un résidu lysine du substrat. En cas de non présence ou accessibilité de lysine, l'Ub peut être exceptionnellement attachée à la partie aminée N-Ter du substrat (Figure 7). Il existe au moins 600 enzymes E3 connues chez l'homme et le choix de la ligase par le système UPS dépend de la capacité d'interaction entre celle-ci et la protéine polyubiquitinée.^{41,43}

(41) Iconomou, M.; Saunders, D. N. *Biochem. J.* **2016**, *473* (22), 4083–4101.

(42) Li, W.; Ye, Y. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **2008**, *65* (15), 2397–2406.

(43) Ye, Y.; Rape, M. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2009**, *10* (11), 755–764.

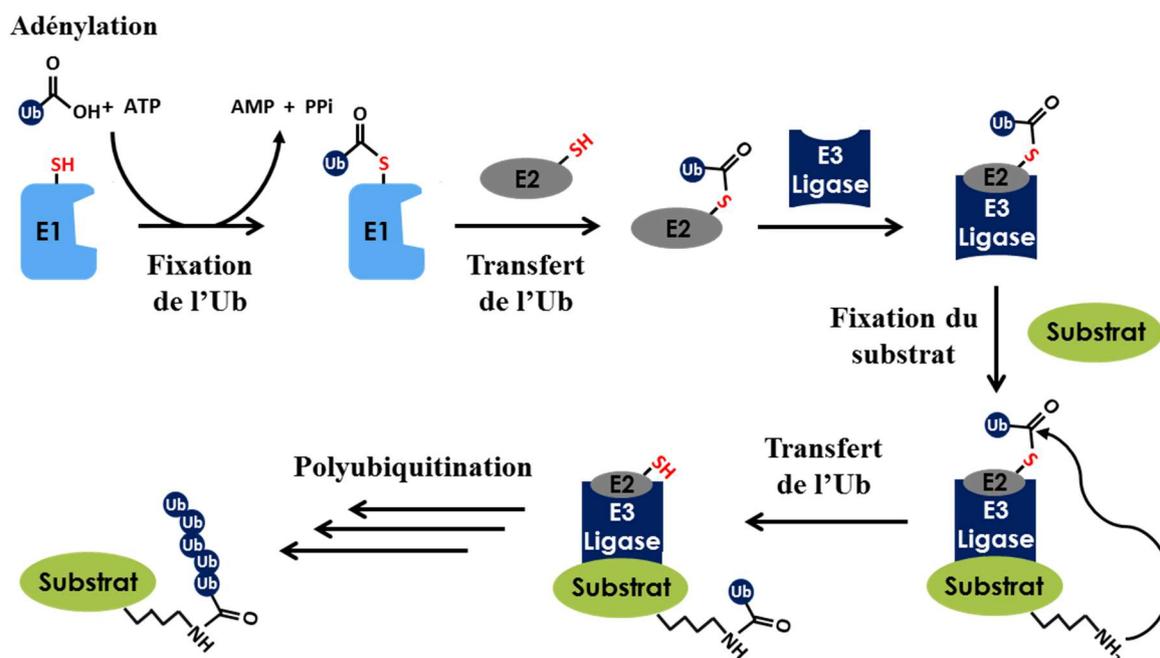


FIGURE 7: SCHEMA DE LA CASCADE UBIQUITINE E1-E2-E3 THIOESTER (ADAPTE DE ⁴⁴)

Dans cette cascade d'ubiquitination, les combinaisons possibles sont multiples. Chaque E1 peut se lier à plusieurs E2s, qui à leur tour peuvent se lier à des centaines d'E3s. Un seul E2 peut interagir avec différents E3 formant des complexes E2-E3s différents.

Afin d'étudier les interactions possibles entre les domaines catalytiques des E2 et E3, un criblage à haut débit a été réalisé sur des levures montrant que plus de 300 interactions E2-E3s de haute stabilité sont possibles en utilisant 35 E2s humains et 250 E3s de type RING (*Really Interesting New Gene*) montrant la grande diversité possible de ce système de marquage.⁴⁵

Ces ubiquitines ligases sont regroupées en trois grandes familles, dépendants de leurs similarités structurales. Il y a la famille des E3s de type HECT (*Homologous to E6AP C-terminus*), de type RING, également appelée U-box, et les E3s de type RBR (*Ring Between Ring*). Toutes ces familles d'Ubs ligases interagissent avec l'enzyme E2 et le substrat pour permettre le transfert de l'Ub mais de différentes façons dépendants de leurs types (Figure 8).⁴⁶

(44) Maupin-Furlow, J. *Nat. Rev. Microbiol.* **2012**, 10 (2), 100–111.

(45) van Wijk, S. J. L.; et al. *Mol. Syst. Biol.* **2009**, 5, 295.

(46) Berndsen, C. E.; Wolberger, C. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2014**, 21 (4), 301–307.

Ubiquitine ligase E3 de type RING

La famille des ligases de type RING est la famille la plus représentée des E3s. En effet, elle est codée par plus de 600 gènes, dépassant les 518 gènes des protéines kinases faisant donc d'elle la famille d'enzyme la plus abondante du génome humain. Cette famille est caractérisée par la présence d'un domaine de liaison au zinc appelé RING (*Really Interesting New Gene*) ou d'un domaine U-box apparenté mais ne contenant pas de zinc.^{47,48}

Les domaines RING ou U-box sont responsables de la fixation de l'enzyme E2 ubiquitinée et permettent le transfert direct de l'Ub sur la protéine d'intérêt en orientant correctement l'enzyme E2 (Figure 8). Cette famille d'E3 a la particularité de reconnaître le résidu déstabilisant N-ter de la protéine d'intérêt, marqueur de la nécessité de dégradation par le protéasome. Cette capacité est appelée « *N-end rule* » du fait de la nature des acides aminés qui se trouvent en position N-ter et qui déterminent sa stabilité *in vivo*.^{46,49}

Ligase E3 de type HECT

La famille E3 HECT (homologue C-terminal de l'E6AP) contient environ 60 gènes. Cette famille catalyse le transfert de l'Ub vers la protéine substrat par une réaction en deux étapes. L'Ub est d'abord transférée à une cystéine catalytique sur l'enzyme E3, puis de l'E3 au substrat (Figure 8). L'activité catalytique des E3s de type HECT est souvent régulée par des interactions intramoléculaires maintenant la ligase dans un état auto-inhibé dans les conditions physiologiques normales. L'inhibition est ensuite levée en réponse à divers signaux.^{43,46}

Ubiquitine ligase E3 de type RBR

Par analogie avec les E3s de type HECT, les E3s de type RBR (*RING-between-RING*) catalysent également le transfert d'Ub par une réaction en deux étapes en fixant premièrement l'Ub sur l'enzyme E3 avant de la transférer sur le substrat (Figure 8). Il existe environ 15 protéines RBR chez l'homme.⁵⁰ Le nom RBR provient de la présence de deux domaines RING (RING1 et RING2) séparés par un domaine "*in between-RING*" (IBR). RING1 recrute l'enzyme E2 ubiquitinée, puis transfère l'Ub à une cystéine catalytique présente dans le domaine RING2 (également appelé domaine Rcat (requis pour la catalyse)) qui transfère ensuite l'Ub activée au substrat. L'activité de ces enzymes est régulée de la même manière que pour la famille HECT avec une auto-inhibition de son activité en condition physiologique normale.⁴⁶

(47) Deshaies, R. J.; Joazeiro, C. A. P. *Annu. Rev. Biochem.* **2009**, *78* (1), 399–434.

(48) Borden, K. L. B. *J. Mol. Biol.* **2000**, *295* (5), 1103–1112.

(49) Tasaki, T.; et al. *Annu. Rev. Biochem.* **2012**, *81*, 261–289.

(50) Eisenhaber, B.; et al. *Genome Biol.* **2007**, *8* (3), 209.

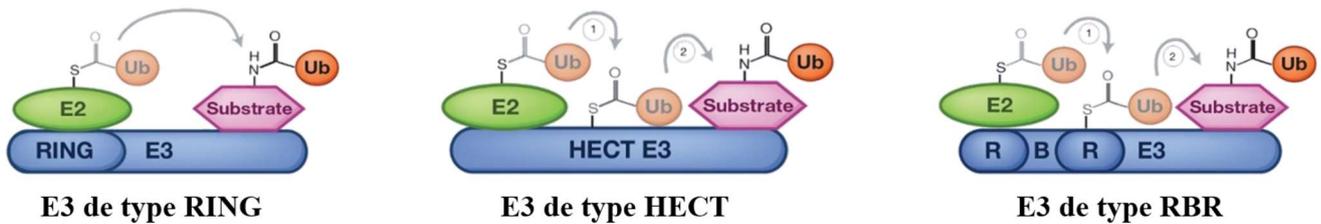


FIGURE 8: REPRESENTATION DES MECANISMES D'ACTION DES FAMILLES D'UB LIGASES⁴⁶

4. Marquage par ubiquitine (adressage, dégradation, et autres rôles)

Le marquage de protéines par une ou plusieurs Ubs peut induire différents devenir aux substrats. Ceci est permis par la grande diversité d'interactions structurellement différents possibles en fonction du type d'enchaînement et de configuration des Ubs. En effet, selon le résidu de lysine sur lequel l'ubiquitine est fixée, la polyubiquitination peut avoir des résultats très différents.

Par exemple, les marquages par des chaînes polyUbs K48 et K11, qui sont les plus fréquents, sont des signaux de dégradation par le protéasome. Ce marquage entraîne une dégradation protéasomale par le 26S en quelques secondes.⁵¹ Les marquages par des chaînes K29 et K33 sont décrits comme des signaux de dégradation lysosomale. Les protéines polyubiquitinées K63 sont associées à des réponses de dommages à l'ADN en recrutant des protéines réparatrices par la voie de la réponse aux dommages de l'ADN (DDR) tout comme certains marquages par monoubiquitination. Les chaînes linéaires d'Ubs reliées de type "tête à queue" sont associées à une activation du facteur NF- κ B.⁵²⁻⁵⁸

Le marquage par une ou plusieurs ubiquitines peut, par exemple, altérer la structure condensée de l'ADN, modifier l'expression de certains gènes et moduler l'activation de facteurs de transcription.

(51) Finley, D. *Annu. Rev. Biochem.* **2009**, 78, 477–513.

(52) Mansour, M. A. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2018**, 101, 80–93.

(53) Alpi, A. F.; et al. *Mol. Cell* **2008**, 32 (6), 767–777.

(54) Su, S.; et al. *Curr. Issues Mol. Biol.* **2020**, 59–84.

(55) Komander, D.; Rape, M. *Annu. Rev. Biochem.* **2012**, 81 (1), 203–229.

(56) Rahighi, S.; et al. *Cell* **2009**, 136 (6), 1098–1109.

(57) Chastagner, P.; et al. *EMBO Rep.* **2006**, 7 (11), 1147–1153.

(58) Feng, L.; Chen, J. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2012**, 19 (2), 201–206.

De plus, ces ubiquitines et chaînes d'Ubs peuvent aussi être modifiées par d'autres protéines de type UBLs comme, par exemple, les protéines de la famille SUMO ou NEDD. Les modifications par ces protéines sont respectivement appelées SUMOylation et NEDDylation. Ces modifications peuvent également être de type acylation ou phosphorylation augmentant considérablement la diversité possible de marquage.⁵⁹

(59) Swatek, K. N.; Komander, D. *Cell Res.* **2016**, *26*, 399.

II. PROTACs®

1. Concept

Les PROTACs® (proteolysis-targeting chimeras) sont de petites molécules, par opposition aux molécules biologiques (anticorps, protéines, siRNA...), hétérobifonctionnelles, qui lient simultanément une ubiquitine ligase (E3) et une protéine cible, permettant l'ubiquitination et la dégradation de celle-ci. PROTAC® est une nouvelle stratégie de découverte de médicaments basée sur le concept du recrutement simultanément d'une enzyme ubiquitine ligase et d'une protéine cible par une petite molécule chimique. Ce recrutement permet le rapprochement spatial et l'induction d'une interaction protéine-protéine (PPI) non physiologique entre l'ubiquitine ligase à la protéine cible forçant l'ubiquitination de celle-ci et donc sa dégradation spécifique par le système ubiquitine protéasome (Figure 9).⁶⁰ PROTAC®, technologie découverte par Craig Crews et son équipe en 2001,⁶¹ est donc une nouvelle stratégie thérapeutique détournant la machinerie cellulaire marquant spécifiquement une protéine intracellulaire indésirable à des fins de dégradation. Avec de meilleures propriétés pharmaceutiques que le siRNA et le CRISPR, les PROTACs® offrent une potentielle nouvelle modalité thérapeutique en dégradant spécifiquement les protéines pathogènes par le système ubiquitine protéasome.^{62,63}

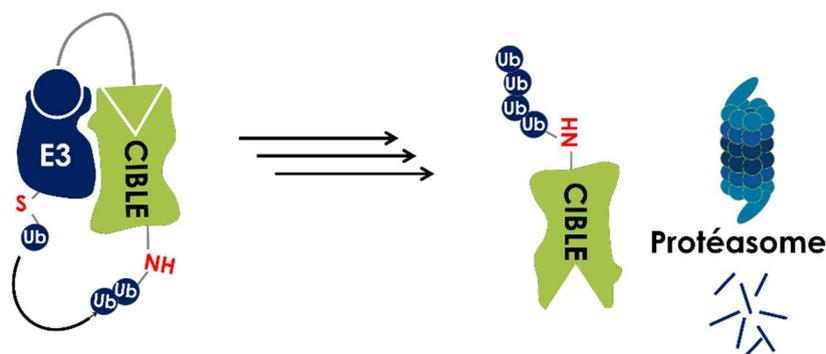


FIGURE 9: ILLUSTRATION DU MECANISME D'ACTION D'UN PROTAC®

Ces composés sont donc de petites molécules, par opposition aux biothérapies ou thérapies géniques, qui permettent de dégrader rapidement des protéines cibles que l'on appellera ici protéines d'intérêts (POI). Pour cela, une molécule PROTAC® doit être composée de deux molécules synthétiques reliées entre-elles par un *linker* chimique.

(60) Churcher, I. *J. Med. Chem.* **2018**, *61* (2), 444–452.

(61) Sakamoto, K. M.; et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98* (15), 8554–8559.

(62) josh@comocreative.com. Crews Laboratory.

(63) Paiva, S.-L.; Crews, C. M. *Gener. Ther.* **2019**, *50*, 111–119.

La première partie permet de fixer une protéine d'intérêt comme le ferait un ligand naturel ou une molécule thérapeutique. Et la seconde partie appelée E3RE (*E3 recruiting element*), reliée à l'autre partie par le biais d'un *linker* chimique, permet la liaison à une enzyme ubiquitine ligase (E3) (Figure 10).

Ce type de molécule permet donc de relier simultanément la POI à une enzyme induisant l'ubiquitination des protéines, une ubiquitine ligase (E3). Cette liaison va permettre le rapprochement spatial des deux protéines et forcer l'induction d'une PPI non physiologique provoquant le marquage de la POI par une chaîne d'ubiquitines dans le but de provoquer sa dégradation par adressage au protéasome.

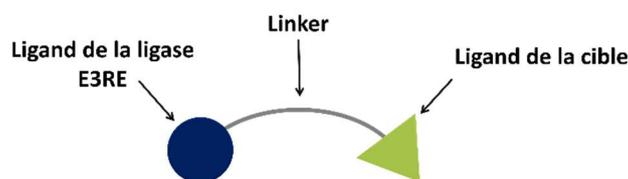


FIGURE 10: REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UNE MOLECULE PROTAC®

2. Origine du concept PROTAC®

L'infectiologie est à l'origine du concept PROTAC®. En effet, le mécanisme de défense du virus, le papillomavirus (HPV), engage l'ubiquitine ligase comme mécanisme d'échappement aux défenses antivirales en induisant la dégradation de P53.^{64,65}

Ce mécanisme de défense a été mis en évidence par M. Howley qui a montré la dégradation de cette protéine P53 par le système ubiquitine-protéasome dépendante d'une protéine virale d'HPV.^{64,65}

Quand un virus infecte une cellule, il se passe deux choses. Il prend le contrôle de la cellule pour se répliquer et essaie de combattre les mécanismes de défense cellulaire mis en place pour combattre l'infection virale. Un des mécanismes de défense dans les cellules eucaryotes implique la protéine P53, la protéine suppresseur de tumeur. Cette protéine détecte différents types de stress et active divers mécanismes de réponse à ces stress incluant l'apoptose pour induire la mort cellulaire de la cellule infectée. Le virus HPV produit un petit polypeptide appelé E6 qui va venir lier d'une part une ubiquitine ligase, appelée E6-AP pour protéine associée à E6, et d'autre part, P53. Cette petite protéine va donc former un pont moléculaire reliant la ligase E6-AP et la protéine P53 induisant l'ubiquitination de P53 et sa dégradation rapide par le système ubiquitine-protéasome. La protéine E6 du virus HPC permet donc de combattre un des mécanismes cellulaires de défenses antivirales contre l'infection au papillomavirus.

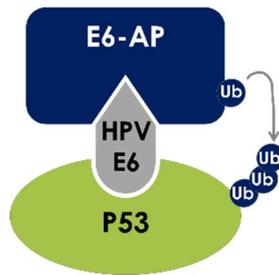


FIGURE 11: SCHEMA REPRESENTANT LE RECRUTEMENT DE L'UBIQUITINE LIGASE E6-AP PAR HPV (ADAPTE DE ⁶⁵)

3. Mécanisme d'action de PROTAC[®]

Le mode d'action d'un PROTAC[®] est de nature catalytique et se fait en plusieurs étapes. Tout d'abord, il y a une fixation simultanée de la molécule sur la POI et l'E3 ciblée. Cette fixation simultanée de ces deux protéines par le composé va permettre leur rapprochement spatial et l'induction d'une interaction protéine-protéine non physiologique entre la POI et l'E3 forçant l'ubiquitination de la cible. La fixation du PROTAC[®] étant un mécanisme dynamique, il y aura dissociation de l'enzyme E3 et de la POI mono-ubiquitinée avec recyclage de la molécule qui pourra se fixer à nouveau sur une autre enzyme E3 et la POI. L'enchaînement de plusieurs cycles va permettre de continuer l'ubiquitination pour provoquer à terme la polyubiquitination de la POI, marqueur de dégradation protéasomique. Ce mécanisme catalytique est par ailleurs bien illustré par l'inactivité d'un composé PROTAC[®] possédant une liaison irréversible à sa cible par rapport à son analogue direct réversible.⁶⁶ La dernière étape est l'adressage de cette protéine polyubiquitinée au protéasome 26S, par l'intermédiaire de sa particule régulatrice 19S, provoquant sa dégradation (Figure 12).⁶⁰

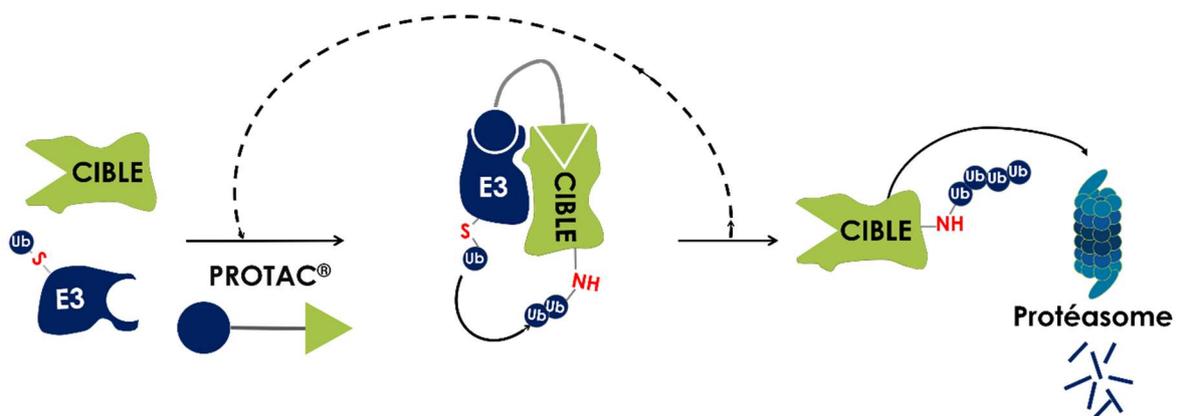


FIGURE 12: MECANISME DE L'ACTION PROTEOLYTIQUE D'UN PROTAC[®]

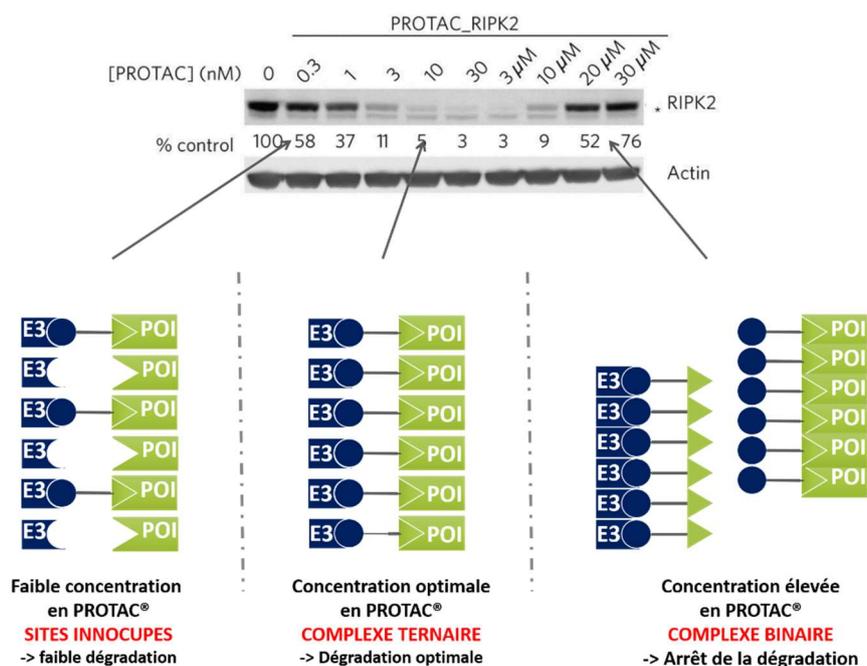
(64) Howley, P. M.; *Cell*. **1993**, 75 (3), 495-505.

(65) Deshaies, R. J ; Webinar (CDD), **2020**.

(66) Tinworth, C. P.; et al. *ACS Chem. Biol.* **2019**, 14 (3), 342–347.

Le mécanisme biologique d'un PROTAC® a lieu une fois qu'un complexe ternaire stable s'est formé entre la POI, PROTAC® et l'E3. C'est une fois ce complexe formé qu'il y a possibilité de transfert d'ubiquitine de l'enzyme E3 à la POI.

La mise en évidence de la nécessité de ce complexe ternaire peut être illustrée par la diminution de l'effet du PROTAC® sur la dégradation de la cible quand la concentration en molécule augmente favorisant donc la formation de complexe binaire et donc l'inhibition de la formation de complexes E3_PROTAC®_POI (Figure 13).



Western blot mesurant la dégradation dose dépendante du composé PROTAC®_RIPK2⁶⁷ illustré par l'équilibre entre le complexe ternaire et le complexe binaire

FIGURE 13 : SCHEMA EXPLIQUANT LA DYNAMIQUE DU COMPLEXE TERNAIRE FORME

Cet effet, appelé « *Hook effect* », est une particularité de PROTAC® représentant l'arrêt progressif de la dégradation du substrat lorsque les concentrations plasmatiques en composé augmentent.

Ceci est dû à la saturation univalente de la ligase et de la POI inhibant ainsi la formation du complexe ternaire au profit de complexes binaires PROTAC®-POI et PROTAC®-E3. Une fois que le composé arrive en excès, il y a suffisamment de ligands disponibles pour lier chacune des deux protéines ciblées, empêchant ainsi la formation de complexes ternaires au profit de complexes binaires entre d'une part, le composé et la cible et d'autre part, entre le composé et la ligase, empêchant la dégradation de la cible.⁶⁸

(67) Bondeson, D. P.; et al. *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11* (8), 611–617.

(68) Pettersson, M.; Crews, C. M. *Drug Discov. Today Technol.* **2019**, *31*, 15–27.

Coopérativité de liaison

Toutes protéines, dont l'ubiquitine ligase E3 et la protéine d'intérêt, ont une certaine forme et une polarité. C'est donc pour cela que chaque élément du PROTAC® a son importance dans l'action PROTAC®. En effet, ces protéines doivent être compatibles en regard de ces caractéristiques. Certaines combinaisons POI-E3s ne seront pas capables de former un complexe ternaire stable et donc ne permettront pas l'ubiquitination de la POI. Ainsi, dans le cas d'un complexe ternaire PROTAC® (ABC), l'affinité de liaison du PROTAC® "B" à une protéine partenaire "C" (liaison binaire) peut être augmentée ou réduite par la présence de la deuxième protéine partenaire "A" (liaison ternaire). Cet effet peut être quantifié par un indice de "coopérativité" (α), calculable par le ratio entre la constante de dissociation (K_D) du complexe binaire et celle du complexe ternaire. Cet indice peut être soit > 1 lorsque que des interactions protéines-protéines stabilisantes ont lieu entre les deux protéines favorisant la formation du complexe ternaire, soit < 1 lorsque l'interaction des deux partenaires rend difficile la formation du complexe ternaire ABC.⁶⁹

Différents mécanismes peuvent être attribués à une non-compatibilité entre la POI et l'E3 comme par exemple une répulsion des charges ou un clash stérique empêchant leur rapprochement spatial et donc la formation de ce complexe ternaire stable. (Figure 14).⁶⁸

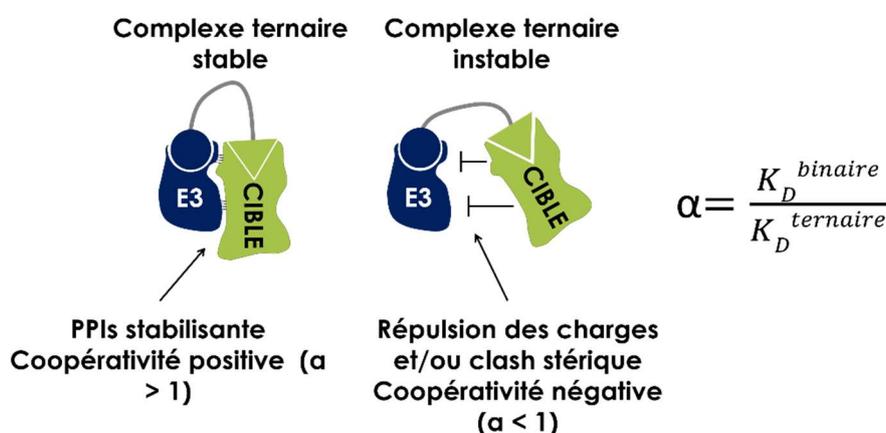


FIGURE 14: REPRESENTATION DE LA FORMATION DU COMPLEXE POI-PROTAC®-E3

Le paradigme thérapeutique actuel est basé sur le taux d'occupation, c'est-à-dire la proportion de fixation d'une molécule (K_d) à sa cible afin d'en affecter directement celle-ci. Dans ce paradigme, la maximisation du taux d'occupation d'un récepteur provoque un effet maximal. Cette stratégie nécessite une haute concentration en principe actif et peut conduire à des phénomènes de « off-target » c'est-à-dire des fixations non désirées du composé sur une ou plusieurs autres cibles entraînant donc des effets secondaires indésirables.

(69) Roy, M. J.; et al. *ACS Chem. Biol.* **2019**, *14* (3), 361–368.

PROTAC® apparaît comme un véritable changement de paradigme avec son mode d'action innovant basé sur un processus catalytique provoquant une diminution de la concentration plasmatique de protéines. De plus, comme dit précédemment l'importance dans le mécanisme de ce type de composé n'est plus tant l'affinité de liaison entre PROTAC® et ses ligands, mesurée par l'IC₅₀, mais la force de liaison permettant de stabiliser le complexe ternaire formé (Figure 15). La capacité de dégradation d'un ligand par PROTAC® est mesurée par la DC₅₀ (concentration de PROTAC® à laquelle 50 % de la protéine cible est dégradée) et en effet, celle-ci n'est pas strictement corrélée à l'IC₅₀ du composé à sa cible. Par exemple, un PROTAC®_RIPK2 ciblant comme ligase le VHL a montré une DC₅₀ de 1.4 nM alors que l'IC₅₀ du ligand VHL est que de 660 nM. Il y a donc, avec ce composé, 50% de dégradation à 1.4 nM alors qu'à cette concentration le PROTAC® n'est pas capable de fixer 50% de l'ubiquitine ligase. Ceci est expliqué par le mécanisme catalytique de PROTAC®, recyclant le composé chimérique à chaque cycle, et par la formation d'un complexe ternaire stable avec le composé permettant une bonne ubiquitination.^{63,67,70}

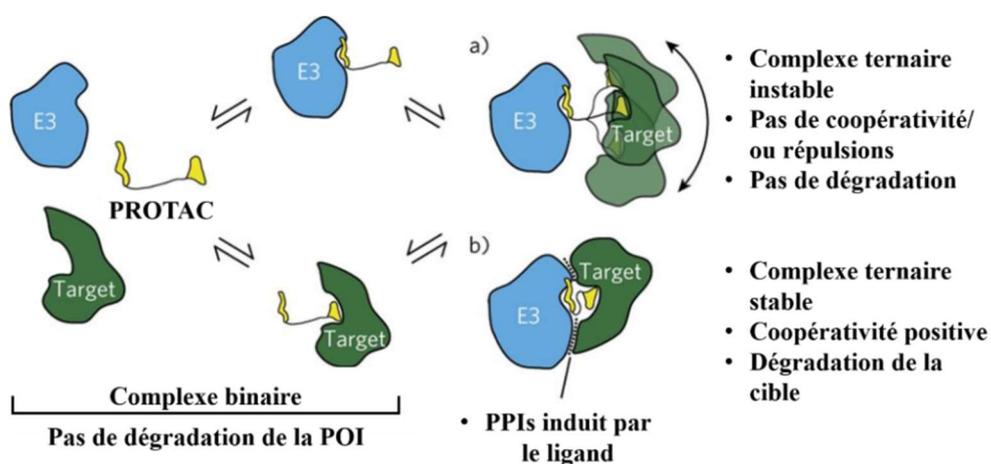


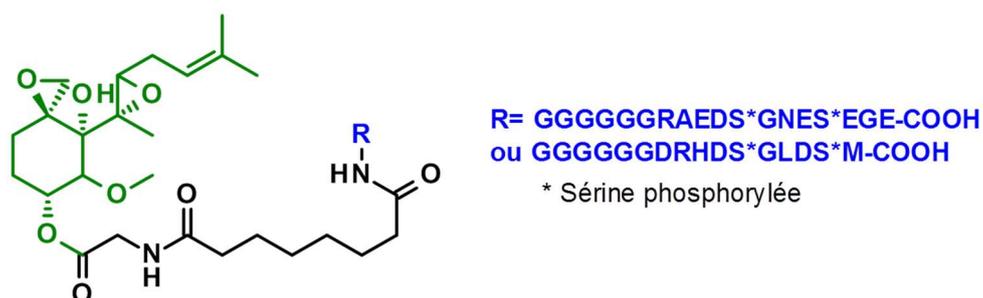
FIGURE 15: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA FORMATION DU COMPLEXE TERNAIRE (ADAPTE DE ⁶⁸)

Ce mécanisme d'action nécessitant la formation d'un complexe stable peut être illustré par un test de dégradation en utilisant différents composés PROTACs® ciblant les mêmes POI mais des E3s différentes. Foretinib, un inhibiteur non sélectif de kinase pouvant lier plus de 133 types de kinases à 10 µM, a été utilisé pour synthétiser deux PROTACs® ciblant deux différentes E3, le VHL et le CRBN. Les composés ont permis respectivement la dégradation de 9 et 14 kinases avec des profils de dégradation différents puisque seulement six kinases ont été dégradées simultanément par les deux composés.⁷¹ D'autres travaux similaires ont été réalisés montrant l'importance du choix de la E3RE, utilisée pour moduler l'activité d'un PROTAC®.⁷²⁻⁷⁴

(70) Xi, M.; et al. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *174*, 159–180.

4. Découverte

La première preuve de concept PROTAC[®] a été publiée par le laboratoire de Crews et Deshaies en 2001 sous le nom de PROTAC-1. La molécule était composée d'une part, d'un inhibiteur de l'angiogénèse, l'ovalicine, ligand covalent de l'aminopeptidase-2 méthionine (MetAP-2) et d'autre part de IκBα, un phospho-peptide naturel de 18 unités reconnu par la ligase E3, SCF^{β-TRCP} (Figure 16). En présence de PROTAC-1, MetAP-2 a été ubiquitinée par la ligase SCF^{β-TRCP} et dégradée par le système UPS. Cependant, en raison de son caractère peptidique, PROTAC-1 souffrait d'une faible perméabilité cellulaire et donc d'une faible activité, ce qui a limité la technologie PROTAC[®] dans le développement de nouvelles thérapies.⁶¹



Structure du PROTAC_1, ligand covalent de MetAP-2, l'ovalicine (vert), ligand phospho-peptidique de la ligase SCF^{β-TRCP} (bleu).

FIGURE 16: STRUCTURE DU PROTAC[®] PEPTIDIQUE PROTAC_1⁶¹

La première petite molécule PROTAC[®], c'est-à-dire composée uniquement de petites molécules, a été décrite en 2008. Ce PROTAC[®] permettait le recrutement de la ligase MDM2 grâce à un inhibiteur de PPI connu de cette ligase, la nutlin, et un ligand SARM (*selectif androgen receptor modulator*), ligand non stéroïdien des récepteurs aux androgènes provoquant l'ubiquitination du récepteur aux androgènes (AR) et sa dégradation par le protéasome.⁷⁵ Ces PROTACs[®] de seconde génération, de nature non-peptidique, ont été une véritable avancée scientifique significative dans la technologie PROTAC[®] car elles sont plus stables et possèdent des propriétés pharmacocinétiques plus compatibles avec une utilisation thérapeutique.

(71) Bondeson, D. P.; et al. *Cell Chem. Biol.* **2018**, 25 (1), 78-87.e5.

(72) Zoppi, V.; et al. *J. Med. Chem.* **2019**, 62 (2), 699–726.

(73) Hu, J.; et al. *J. Med. Chem.* **2019**, 62 (3), 1420–1442.

(74) Hines, J.; et al. *Cancer Res.* **2019**, 79 (1), 251–262.

(75) Schneekloth, A. R.; et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18 (22), 5904–5908.

Le Pr Crews, co-fondateur de Proteolix avec Dr. Raymond J. Deshaies, est à l'origine de la découverte du mode d'action de l'époxomycine, un produit naturel inhibiteur sélectif et puissant du protéasome. Son équipe a également développé le carfilzomib (Kyprolis®), analogue de l'époxomycine, mis sur le marché en 2012 par la FDA pour traiter le myélome multiple. Onyx Pharmaceuticals a fait l'acquisition de Proteolix en 2009 pour 850M \$ après le succès des études de phase II du carfilzomib.⁷⁶

En 2013, le Pr Crews fonde la société Arvinas, basée à New Haven, utilisant la technologie PROTAC® de son laboratoire pour développer des médicaments contre le cancer et d'autres maladies. Arvinas est en collaboration avec Pfizer, Bayer, Genentech et différents laboratoires académiques dans le but de développer l'utilisation de cette technologie et de permettre son utilisation sur un plus large nombre de cibles thérapeutiques.

5. Design d'un composé PROTAC®

a. Le choix du E3RE

Pour rappel, les E3s sont classées en trois grandes familles dépendant de la similarité de leurs structures. Il y a la famille de type HECT, de type RBR et la famille de type RING (également appelée U-box) qui est la famille la plus importante en nombre de ligases. Ayant plus de 600 E3s existantes, la technologie PROTAC® pourrait posséder un large choix quant à la ligase ciblée. Cependant, bien que le choix de cet élément est important dans le design de PROTAC®, assez peu de ligases ont été explorées et validées à ce jour, et toutes sont de la famille des RING E3. Les ligases E3 continuent d'être explorées afin de développer des ligands supplémentaires nécessaires à l'élaboration et au bon développement de cette technologie.⁷⁷

Dans le but d'améliorer la DC₅₀ d'un composé, il est possible de changer la ligase employée afin d'essayer de cibler une ligase présentant une meilleure compatibilité avec la POI et ainsi former un complexe ternaire plus stable permettant une meilleure ubiquitination et donc une augmentation de l'activité du composé.

(76) Onyx strikes \$851M deal to buy Proteolix, (accessed Sep 5, 2019).

(77) Blaquiere, N.; et al. *J. Med. Chem.* **2020**.

De nos jours, les ligases exploitées pour la synthèse de PROTAC® sont les ligases VHL, Céréblon (CRBN), IAP, MDM2 APC/C, ces deux dernières étant très faiblement utilisées (voir Annexe : Tableau 1). En effet ces ligases sont exploitées car elles possèdent des ligands connus permettant de les cibler spécifiquement comme par exemple, un ligand hydroxyproline, mime de l'hypoxia-inducible factor (HIF) pour la ligase VHL. Le lenalidomide, ainsi que les autres analogues de la Thalidomide qui ciblent la ligase céréblon (CRBN). Les Nutlins, dont la Nutlin 3, analogue de cis-imidazoline sont connus pour cibler la ligase MDM2. Pour finir, il existe des inhibiteurs ou ligand de la ligase IAP dont la bestatin permettant de cibler cette ligase (Figure 17).⁶³ De manière intéressante, lors du développement d'un PROTAC®_IAP_TACC3, il s'est avéré que la bestatin, originellement ligand de la ligase IAP, permettait, dans ce cas, le recrutement de la ligase APC/C pour induire l'ubiquitination de la protéine cible TACC3.⁷⁸

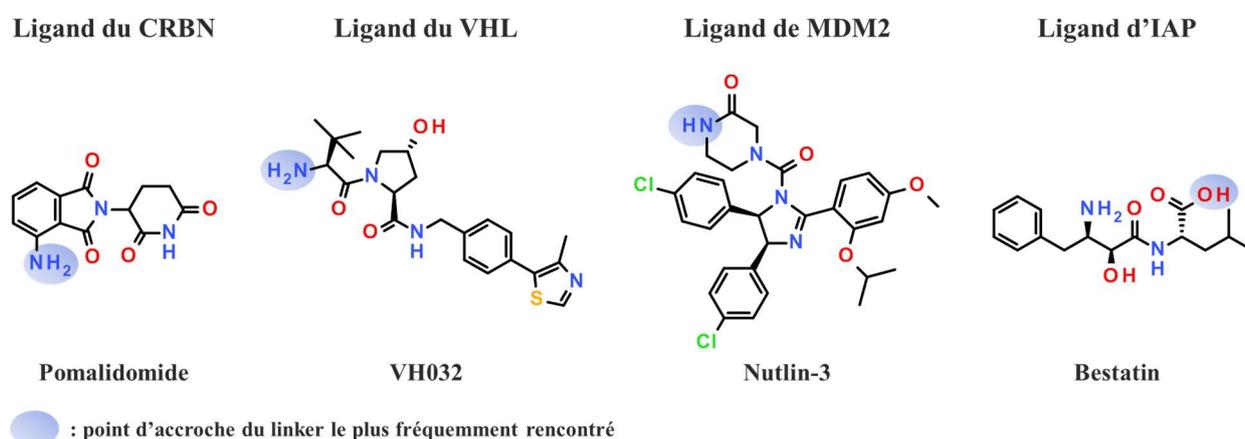


FIGURE 17: EXEMPLE DE LIGANDS DE LIGASE UTILISES POUR LA SYNTHESE DE PROTAC®

A ce jour, il n'existe pas de rationnel quant au choix de la ligase ou du ligand de ligase à utiliser pour la synthèse d'un PROTAC®. Cela est très dépendant de la compatibilité entre la structure de la ligase et la structure de la protéine cible et de leur possibilité à réaliser une interaction protéine-protéine stable. Lors de la découverte et du développement de PROTACs®, différents ligands de ligases ciblant différentes E3 sont souvent explorés afin de trouver la ligase ayant une meilleure compatibilité avec la protéine cible.

Plusieurs exemples montrent que le simple changement du ligand de ligase employé, donc le ciblage d'une autre ligase, tout en conservant le même ligand de la POI voire le même *linker*, peut provoquer une perte ou une diminution de l'activité du composé.^{71,74,79}

(78) Ohoka, N.; et al. *Cell Death Dis.* **2014**, *5* (11), e1513–e1513.

(79) Lai, A. C.; et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55* (2), 807–810.

Certaines équipes de recherches développent des outils de modélisation moléculaire (modèle *in silico*) pour aider le développement de composés PROTAC[®]. Différentes approches existent quant au choix du ligand de la POI et du point d'accroche du *linker*, mais la plus intéressante, et également la plus complexe à développer, est celle étudiant la formation du complexe ternaire et la compatibilité stérique et chimique entre la cible et les différents ligands possibles afin de sélectionner celle qui aurait la meilleure compatibilité (Figure 18).

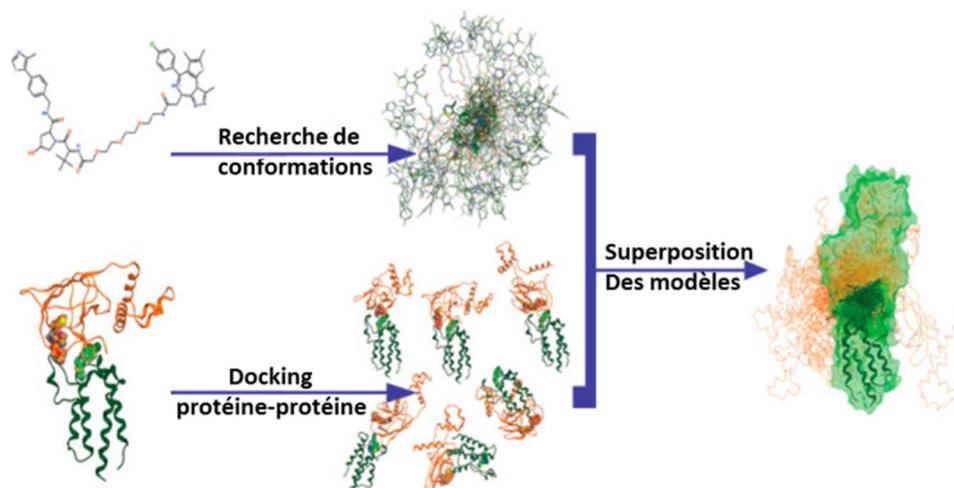


FIGURE 18: ILLUSTRATION DE L'ETUDE *IN SILICO* DE COMPLEXES TERNAIRES (ADAPTE DE⁸⁰)

Cependant, le manque de données cristallographiques d'interactions entre la POI et la ligase E3 médiée par le composé PROTAC[®] est un frein au développement de ces outils. A ce jour, par manque d'informations concernant la formation de ce complexe ternaire et les mécanismes de transfert d'ubiquitines, les outils de modélisations ne sont pas assez puissants pour permettre un bon développement *in silico* de composés PROTAC[®].⁸⁰

Cependant, la DC_{50} d'un composé PROTAC[®] n'étant pas strictement corrélée à son IC_{50} pour les protéines cibles, la modulation de cette partie ou du ligand de la protéine cible est possible pour améliorer l'activité ou les propriétés *drug-like* des composés même si cela est au dépend de l' IC_{50} . Il est également possible de modifier les points d'accroche des ligands au linker pour moduler le positionnement et l'orientation des molécules pour améliorer l'activité des composés en modulant l'orientation des protéines et essayer d'améliorer la formation du complexe ternaire POI-PROTAC[®]-E3.⁸¹

(80) Drummond, M. L.; Williams, C. I. *J. Chem. Inf. Model.* **2019**, *59* (4), 1634–1644.

(81) Smith, B. E.; et al. *Nat. Commun.* **2019**, *10* (1), 131–131.

b. L'impact du linker

Le *linker* du PROTAC[®] est tout aussi important que les deux autres parties dans l'activité du composé. En effet, le *linker* n'est pas juste une chaîne linéaire permettant de relier le ligand de la POI et l'E3RE. Celui-ci est une structure chimique pouvant lui aussi réaliser des interactions avec les protéines et donc favoriser l'interaction entre l'E3 et la POI, entraînant une coopérativité positive pour l'ubiquitination de la POI. L'étude cristallographique de l'interaction entre BRD4, un composé PROTAC[®] et VHL (PDB : 5T35) montrant le complexe ternaire formé a mis en évidence l'importance du *linker* dans cette interaction.

Son *linker*, composé de trois enchainements PEG, liés aux autres parties du composé par deux liaisons amides, réalise des liaisons hydrogènes ainsi que des interactions de type Van der Waals (VdW) entre les deux protéines permettant une stabilisation de l'interaction protéine-protéine formée entre deux partenaires (Figure 19).⁸²

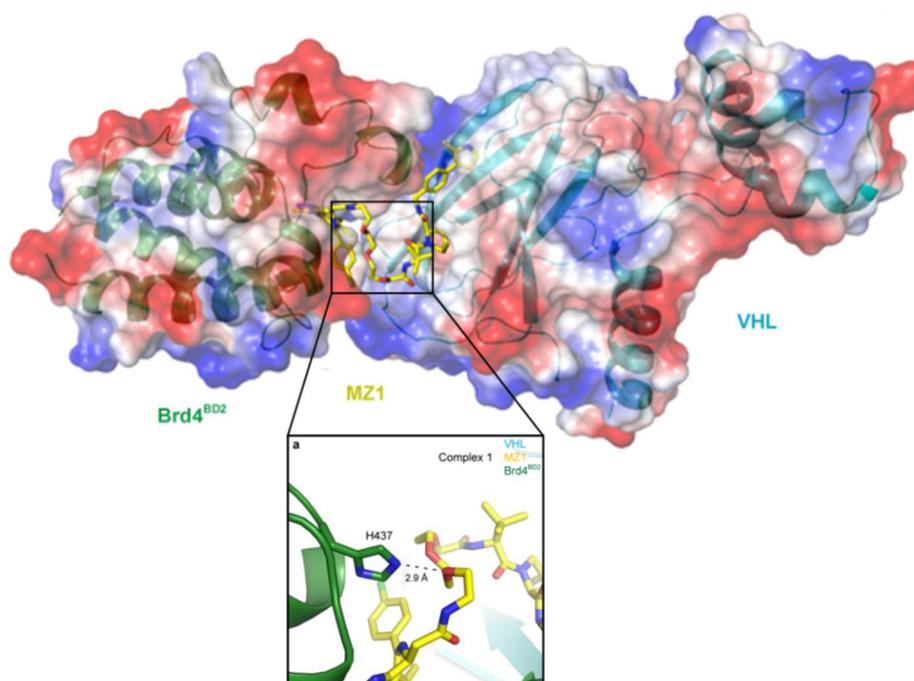


FIGURE 19: STRUCTURE CRISTALLOGRAPHIQUE DU COMPLEXE TERNAIRE ENTRE BRD4-PROTAC[®]-VHL⁸²

Le *linker* ainsi que son point d'attache aux différentes parties semblent donc aussi être un élément de modulation important afin d'améliorer l'activité du PROTAC[®] en améliorant le complexe ternaire formé. En effet, différents *linkers*, de structures et de tailles différentes, peuvent être employés.

(82) Gadd, M. S.; et al. *Nat. Chem. Biol.* **2017**, *13* (5), 514–521.

Tout d'abord, les plus fréquemment utilisés sont les *linkers* de type PEG avec un nombre d'unités variables, possédant des propriétés intéressantes permettant de donner une flexibilité au *linker* et également d'interagir avec les protéines et de stabiliser leurs orientations⁸³. L'introduction d'un *linker* contenant une pipéridine peut être une bonne stratégie pour améliorer la solubilité du composé.⁸⁴ Il existe aussi des *linkers* aliphatiques, des *linkers* de type amide ou composé d'un triazole, ayant l'avantage d'être obtenu facilement par une réaction chimique de type click.^{85,86}

De plus, ce triazole est une structure chimique permettant de réaliser une large gamme d'interactions comme par exemple des interactions dipolaires, des liaisons hydrogènes, des π -stacking et des interactions cations- π avec les protéines. De par sa structure le triazole permet également d'augmenter la solubilité et présente une certaine rigidité permettant d'aider à l'orientation spatiale du composé.^{82,87,88}

La taille du *linker* a également une importance dans l'activité du composé. Premièrement, si le lien entre les deux parties est trop petit les ligands ne pourront pas lier simultanément leurs cibles respectives à cause d'encombrements stériques empêchant donc la formation du complexe ternaire au profit de complexes binaires. Inversement, si le lien est trop long les deux protéines seront trop espacées et ne pourront pas interagir entre elles et permettre le transfert d'ubiquitines.⁸³ Lors de l'élaboration d'un PROTAC®, un *linker* assez long peut être préférentiellement utilisé suivi d'une diminution progressive de celui-ci jusqu'à perte de l'activité dans le but de trouver la meilleure combinaison possible. En effet, il n'existe pas de rationnel sur la taille ou la structure de celui-ci. La taille n'est pas corrélée à l'activité. Cela est très dépendant de la structure spatiale du complexe ternaire formé.⁷⁰ Pour synthétiser un composé de ce type il faut essayer plusieurs combinaisons afin de trouver la bonne structure permettant une bonne liaison aux différents partenaires mais surtout permettant la formation du complexe ternaire le plus stable possible.

Les points d'accroches du *linker* ont également un impact sur l'activité du composé.⁸¹ Ce point d'accroche se situe généralement sur la partie de la molécule exposée au solvant lorsqu'elle est liée à sa cible. Modifier ce point d'accroche peut permettre de changer l'orientation des protéines recrutées et donc la façon dont elles interagissent entre elles.

(83) Wang, Y.; et al. *Acta Pharm. Sin. B* **2020**, *10* (2), 207–238.

(84) Han, X.; et al. *J. Med. Chem.* **2019**, *62* (2), 941–964.

(85) Wurz, R. P.; et al. *J. Med. Chem.* **2018**, *61* (2), 453–461.

(86) Cyrus, K.; et al. *Mol. Biosyst.* **2011**, *7* (2).

(87) Schiedel, M.; et al. *J. Med. Chem.* **2018**, *61* (2), 482–491.

La variation du point d'accroche entre le *linker* et le ligand de la ligase VHL a permis par exemple de modifier la sélectivité de dégradation du composé PROTAC®_VHL_MAPK vis-à-vis de différentes isoformes (MAPK α et P38 δ) en orientant différemment la ligase VHL(Figure 20).⁸¹

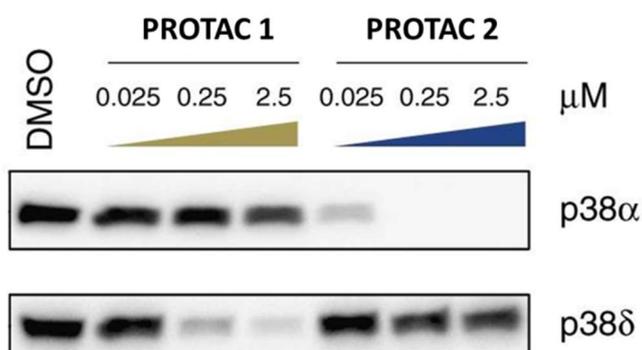


FIGURE 20: SELECTIVITE DE DEGRADATION DE DEUX PROTAC®_VHL_MAPK EN UTILISANT DEUX POINTS D'ACCROCHE DIFFERENTS DU LINKER AU LIGAND DU VHL

Des données cristallographiques de complexes ternaires pourraient donner des informations importantes permettant une meilleure compréhension de ce système et donc une meilleure conception de PROTAC®. Cependant un nombre limité de co-cristallisation montrant ce complexe entre POI-PROTAC®-E3 a été publié à ce jour.

c. Le choix de la molécule ciblant la POI

La partie contenant la molécule ciblant la POI permet de fixer et donc de cibler la protéine à dégrader. Ce n'est généralement pas la partie de la molécule la plus critique lors du développement de PROTAC®. Souvent cette partie utilise une molécule déjà décrite dans la littérature, une molécule étant déjà utilisée comme médicament et étant sur le marché ou bien une molécule vendue et utilisée comme outil chimique d'exploration du vivant. Cette molécule doit cependant posséder un point d'accroche du *linker*, souvent une fonction amine ou acide carboxylique et idéalement sur une zone de la molécule accessible au solvant. Si ce n'est pas le cas la structure de la molécule doit être adaptée de façon à y ajouter ce point d'accroche.

La molécule utilisée ne doit pas forcément être la molécule la plus sélective. En effet, plusieurs exemples de développement de composés PROTAC® sélectifs pour une seule cible existent malgré l'utilisation d'un ligand de POI non sélectif.

(88) Bozorov, K.; et al. *Bioorg. Med. Chem.* **2019**, 27 (16), 3511–3531.

Ceci est dû à la différence de compatibilité entre la ligase E3 et les protéines ciblées par le ligand de la POI, ce qui permet parfois une compatibilité de formation du complexe ternaire avec une seule des cibles de la molécule liant la POI.^{71,89,90} (Figure 21).

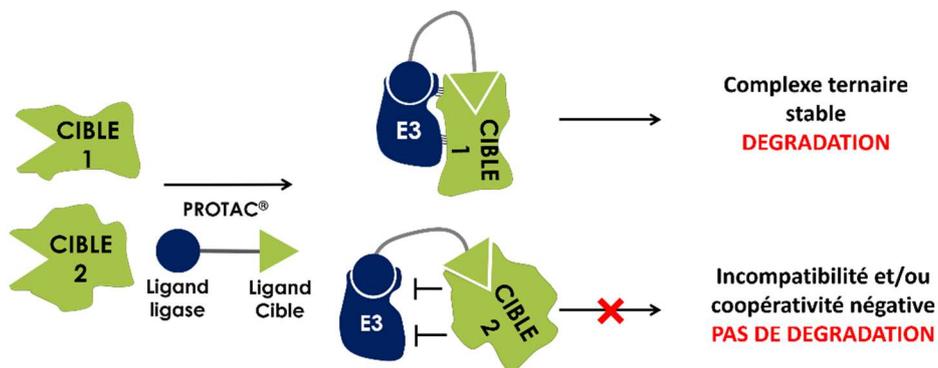


FIGURE 21: ILLUSTRATION DE LA SELECTIVITE D'UN PROTAC® DEPENDANT DE LA COMPATIBILITE DES CIBLES

Cette molécule ne doit pas non plus être la molécule la plus puissante, ni la plus affine pour sa cible pour permettre la synthèse d'un PROTAC® puissant. Par exemple, un PROTAC® possédant comme ligand de POI le foretinib ayant une faible affinité pour une de ses kinases cibles ($K_d = 11 \mu\text{M}$ pour p38 α) a permis la dégradation de cette kinase p38 α à faible concentration ($DC_{50} = 210 \text{ nM}$, $D_{\text{max}} = 91 \%$). Cette faible affinité pour p38 α a été compensé par des PPI stabilisantes, et donc une coopérativité positive, entre la ligase VHL et p38 α .⁷¹ Inversement, il a été montré qu'un PROTAC® contenant un ligand possédant une haute affinité pour BRD4 (I BET726 ($K_d = 4 \text{ nM}$)) possédait une moins bonne activité qu'un PROTAC® utilisant un ligand avec moins d'affinité pour sa cible, JQ1 ($K_d = 100 \text{ nM}$ pour BRD4). Pour expliquer cela il a été montré que la ligase VHL liait plus fortement le composé PROTAC®_I-BET726 ($K_d = 110 \text{ nM}$) seul qu'en présence de BRD2 ($K_d = 330 \text{ nM}$) ou BRD4 ($K_d = 180 \text{ nM}$) montrant une coopérativité négative sur la formation du complexe ternaire composé de la ligase, du PROTAC® et de la protéine cible.⁹¹ Cette observation met en évidence que la puissance d'un composé PROTAC® n'est pas strictement corrélé à la puissance et à l'affinité du ligand de POI pour sa cible.

(89) Yang, K.; et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2018**, 28 (14), 2493–2497.

(90) Zhang, X.; et al. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, 192, 112186.

(91) Chan, K.-H.; et al. *J. Med. Chem.* **2018**, 61 (2), 504–513.

6. Avantages de la technologie PROTAC®

Action à quantité sub-stœchiométrique

De par son mécanisme d'action, la technologie PROTAC® possède de nombreux avantages comparée à l'inhibition classique d'une molécule sur sa cible. PROTAC®, après avoir fixé une protéine d'intérêt et provoqué sa dégradation, est recyclée et peut être à nouveau recrutée dans un nouveau cycle. En effet, ces molécules agissent de manière catalytique c'est-à-dire qu'elles peuvent permettre la dégradation des protéines cibles même à très petite quantité car elles sont recyclées et peuvent réaliser plusieurs cycles de dégradation. Une molécule PROTAC® exerce son action en quantité sub-stœchiométrique, c'est-à-dire que la quantité de PROTAC® doit être largement inférieure à la quantité de protéine cible contrairement à une molécule inhibitrice classique qui nécessite d'être administrée en plus grande quantité pour avoir un maximum d'effet.^{67,70} L'activité de PROTAC® n'étant pas limitée par le taux d'occupation, les quantités requises pour obtenir l'effet désiré sont de l'ordre de 10-100 nM voir du pM, ce qui permet de limiter voire d'éviter le phénomène de « *off-target* ».⁹²

Ciblage d'une plus large partie du génome

Les thérapeutiques traditionnelles à petites molécules sont limitées aux cibles ayant un site de liaison comme les récepteurs et les enzymes. La FDA a approuvé des thérapeutiques contre environ seulement 400 protéines humaines dont plus de 90 % sont des enzymes, transporteurs, récepteurs couplés aux protéines G, canaux ioniques ou récepteurs nucléaires. Pourtant, il existe environ 3 000 maladies causées par une mutation de gène codant pour une protéine, ce qui fait que les thérapeutiques actuelles ciblent uniquement 13 % du protéome thérapeutique (Figure 22).⁹³

Ceci peut s'expliquer par le fait qu'une seule petite partie du protéome humain est pharmaceutiquement accessible selon la stratégie thérapeutique des petites molécules traditionnelles ciblant des protéines sur lesquelles elles peuvent directement agir. La majorité des protéines, comme par exemple les facteurs de transcription, les protéines chaperonnes, protéines non enzymatiques et les protéines structurales, demeurent "non ciblables" par le mécanisme d'action des petites molécules traditionnelles car elles n'ont pas d'activité directement modulable, et manquent de sites actifs où celui-ci est peu propice à des liaisons stables.⁹⁴

(92) Neklesa, T. K.; et al. *Pharmacol. Ther.* **2017**, *174*, 138–144.

(93) Rask-Andersen, M.; et al. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2011**, *10*, 579.

(94) Hopkins, A. L.; Groom, C. R. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1* (9), 727–730.

PROTAC[®], tout comme les modulateurs des interactions protéines-protéines ne requièrent pas de poche de liaison, ni de site actif pour agir. Un composé PROTAC[®] n'apporte pas son activité uniquement par sa liaison modulant l'activité de la cible mais par sa dégradation et possède donc un grand potentiel pour dégrader des protéines « non ciblables » par les inhibiteurs classiques, ou pour agir sur des protéines non enzymatiques. De plus il est plus facile de trouver une molécule se liant à une cible plutôt qu'un inhibiteur fonctionnel. Ceci permettrait d'augmenter considérablement le champs d'action thérapeutiques ouvrant la possibilité à des traitements innovants en ciblant des protéines encore jusque-ici non exploitées.⁹⁵

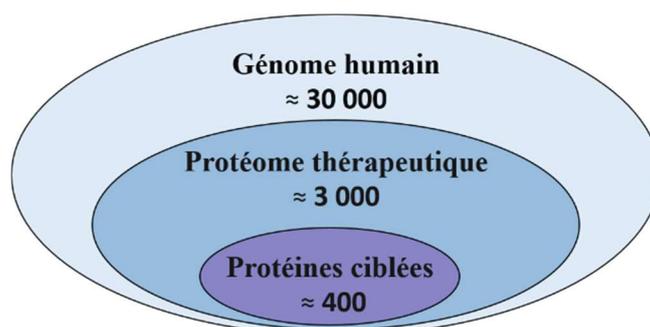


FIGURE 22: ILLUSTRATION DE LA COUVERTURE THERAPEUTIQUE DU PROTEOME PAR LES PETITES MOLECULES TRADITIONNELLES

Action prolongée de l'action et évite l'accumulation des protéines

Une fois le réservoir de protéines d'intérêts dégradé, PROTAC[®] a seulement besoin de recruter les protéines nouvellement synthétisées afin de les dégrader pour maintenir l'action. Son mécanisme d'action catalytique lui permet de maintenir son activité même à très faible concentration. Ainsi, lors de la diminution de sa concentration plasmatique suite au métabolisme cellulaire, celle-ci reste suffisante pour continuer à exercer son effet face aux nouvelles protéines lentement re-synthétisées. De plus, même après la clairance complète de la molécule, les cellules mettent un temps significatif avant de retrouver un niveau suffisant de protéines rétablissant les conditions physiologiques ce qui prolonge, de ce fait, également le temps d'action de ces composés.⁷⁰

D'autant plus, la liaison d'une molécule à une cible pour provoquer, par exemple, son inhibition va par mécanisme de stabilisation de la cible, induire son accumulation. Premièrement car la liaison à la protéine entraîne sa stabilisation et donc augmente sa demi-vie ($t_{1/2}$)⁹⁶.

(95) Toure, M.; Crews, C. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55 (6), 1966–1973.

(96) Martinez Molina, D.; Nordlund, P. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2016**, 56 (1), 141–161.

Deuxièmement, dans certaines circonstances, l'inhibition/antagonisme de la cible peut conduire à un feedback positif à un niveau transcriptionnel et donc augmentant sa synthèse⁹⁷. Les conséquences de cette accumulation de protéines deviennent apparentes lorsque la concentration en molécules actives tombe sous le niveau minimal requis pour l'inhibition. Ainsi, l'élimination de protéines cibles à l'aide d'un PROTAC[®] est particulièrement adaptée aux protéines qui pourraient échapper à l'activité d'un inhibiteur par leur stabilisation ou surexpression induisant donc une résistance aux thérapeutiques traditionnelles et un échappement au traitement.⁹² L'effet bénéfique de la dégradation des protéines par rapport à leur simple inhibition a été démontré, par exemple, avec la protéine BRD4. En effet, les inhibiteurs de BRD4 perdent rapidement leur efficacité en raison de la régulation positive de BRD4 entraînant son augmentation.⁹⁸ A la différence, des composés PROTACs[®] de BRD4 ont montré la stabilité de leur action en maintenant la répression de BRD4 pendant une période prolongée.⁹⁹

Surpasse les phénomènes de résistance

PROTAC[®] est capable de passer au-dessus de certains phénomènes de résistance. En cas d'inhibition d'une protéine, des mécanismes de compensation peuvent se mettre en place en surexprimant cette protéine, comme vu précédemment, ou en activant des voies alternatives en passant par d'autres voies biologiques pour maintenir l'effet de la protéine. Ces mécanismes ont pour conséquence de provoquer une résistance à la thérapeutique utilisée et un échappement au traitement. C'est le cas par exemple pour le bortezomib (VELCADE[®]), une molécule utilisée contre le myélome multiple. Ce traitement conduit inévitablement à une résistance par une réorganisation du métabolisme bloquant l'activité du composé en augmentant les défenses anti-oxydantes des cellules.¹⁰⁰

Les inhibiteurs de kinases, surtout ceux ayant une grande affinité, font aussi face à ce mécanisme de résistance expliqué par le dynamisme du kinome qui peut se réarranger rapidement en cas de perturbation suite à des *feedbacks*. Par son mécanisme catalytique, PROTAC[®] est capable de passer au-dessus de ces mécanismes car il ne provoquera pas l'inhibition de la protéine mais sa destruction. Celle-ci ne pourra donc pas induire de *feedback* au niveau la voie biologique, empêchant la survenue de résistance par ce mécanisme.²⁹

(97) Cai, C.; et al. *Cancer Cell* **2011**, 20 (4), 457–471.

(98) Duan, Y.; et al. *MedChemComm* **2018**, 9 (11), 1779–1802.

(99) Lu, J.; et al. *Chem. Biol.* **2015**, 22 (6), 755–763.

(100) Zaal, E. A.; et al. *Cancer Metab.* **2017**, 5.

De plus, des mutations au niveau de la structure des protéines ont fréquemment lieu. En particulier pour des cellules cancéreuses, pouvant modifier le site de liaison des protéines à leurs substrats les rendant insensibles à l'action des molécules thérapeutiques par impossibilité de liaison. La dégradation par PROTACs® n'étant pas conditionnée par le temps de résidence (k_{off}) ni par l'affinité (K_d) avec ses ligands, mais plutôt par l'association réversible et transitoire à leurs cibles afin de former transitoirement un complexe permettant le transfert d'ubiquitine. De ce fait, l'activité contre des protéines mutantes est donc conservée avec ce type de thérapeutique même si la protéine est devenue moins affine avec son ligand PROTAC®.¹⁰¹ C'est le cas par exemple du composé PROTAC® basé sur la structure de l'ibrutinib, inhibiteur irréversible de la kinase BRK, qui conserve son activité sur la forme C418S mutée de cette kinase alors que pourtant cette mutation induit une résistance à l'action de l'ibrutinib en empêchant sa liaison irréversible¹⁰¹. En effet, même si la liaison irréversible n'est plus possible, la molécule PROTAC® est capable de lier la kinase C418S BTK suffisamment longtemps et efficacement pour permettre son ubiquitination et donc sa dégradation.

Utilisation plus versatile, rapide et réversible

Des alternatives existent pour la régulation des niveaux de protéines pathogènes comme par exemple avec les ARN interférents (siRNAs), les oligonucléotides anti sens qui ciblent les gènes plus ou moins sélectivement afin de les mettre transitoirement sous silence et de bloquer la synthèse de protéines.¹⁰² Cependant, du fait de leurs immunogénicités, instabilités, non sélectivités ainsi que de leurs propriétés d'administration, l'utilisation de ces techniques restent compliquées. De plus, la mise au silence des gènes par ces techniques n'est jamais totale et donc des taux résidentiels de protéines persistent dans la cellule.

Plus récemment, la technique de CRISPR/Cas9 a fait son apparition qui est une technique d'édition du génome en exploitant une endonucléase naturelle appelée Cas9. Ceci offrant la possibilité de modifier directement le génome pour permettre, par exemple, la mise au silence d'un gène et d'empêcher la synthèse protéique.¹⁰³ Cette technique, qui n'est pas sélective, possède comme risque une modification irrévocable non désirée du génome.

(101) Buhimschi, A. D.; et al. *Biochemistry* **2018**, *57* (26), 3564–3575.

(102) Dana, H.; et al. *Int. J. Biomed. Sci. IJBS* **2017**, *13* (2), 48–57.

(103) Jiang, F.; Doudna, J. A. *Annu. Rev. Biophys.* **2017**, *46* (1), 505–529.

Tandis que PROTAC[®] ne bloque pas le gène ni sa traduction, cette technique montre une réversibilité d'effet, une action plus rapide ainsi qu'une meilleure sélectivité. En effet, en cas de liaison « *off-target* » PROTAC[®] n'induit pas forcément de dégradation de la protéine, car cette dégradation est très dépendante de la capacité de formation du complexe ternaire avec la ligase E3¹⁰⁴.

7. Limites

Propriétés pharmacocinétiques (passage membranaire, solubilité)

Avec un poids moléculaire se situant entre 700 et 1300 Da, ces types de composés sont des molécules dont plusieurs de leurs propriétés chimiques se situent en dehors de diverses lignes directrices comme la "règle des cinq" ou les règles de Weber (Figure 23).

Représentation graphique des différentes règles de conduite ainsi que la place des composés PROTACs dans cette espace chimique

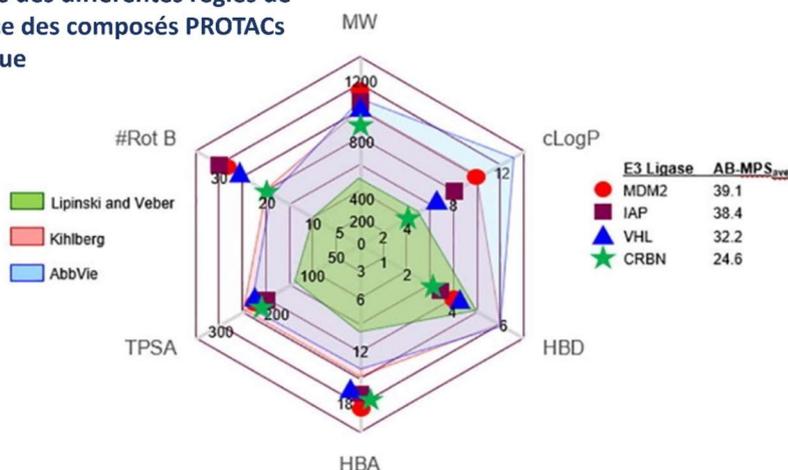


FIGURE 23: REPRESENTATION GRAPHIQUE DES PROPRIETES MOLECULAIRES DES COMPOSES PROTAC^{®105}

Ces différentes règles ont longtemps été considérées comme des lignes directrices permettant de prédire la biodisponibilité ou non des molécules bioactives. Au cours de ces dernières années, un certain nombre de médicaments ont été développés en dehors de ces règles tout en ayant des propriétés pharmacocinétiques et de biodisponibilités suffisantes. De ce fait, ces règles ne sont plus strictement à respecter, mais restent des critères d'évaluation parfois utilisés pour filtrer et sélectionner des molécules lorsqu'un choix doit être effectué lors de développements de composés.

(104) Lai, A. C.; Crews, C. M. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2017**, *16* (2), 101–114.

(105) Edmondson, S. D.; et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2019**, *29* (13), 1555–1564.

L'administration ainsi que la biodisponibilité de ces composés restent les plus grands obstacles dans le développement de ces molécules. Une fois absorbés et se trouvant dans la circulation, ces composés se comportent comme les petites molécules traditionnelles. En d'autres termes, s'ils sont administrés par voie intraveineuse, intrapéritonéale ou sous-cutanée, ces molécules présentent les comportements traditionnels de petites molécules avec une exposition proportionnelle à la dose et une bonne distribution tissulaire.⁹²

L'utilisation de stratégies de type « *pro-drug* », en utilisant par exemple, une structure facilitant le passage transmembranaire qui est ensuite modifiée par les enzymes hépatiques pour donner le composé actif, pourrait permettre d'aider l'administration orale de ces composés. De plus, utiliser d'autres formulations augmentant la perméabilité cellulaire peut être une option envisageable, comme par exemple, la co-administration avec des inhibiteurs des pompes d'efflux ou avec des cyclodextrines aidant le passage transmembranaire. Un composé PROTAC[®] de type « *pro-drug* », ciblant la dégradation des CDK 2/4/6 a très récemment été synthétisé. La fonction rajoutée sur le composé est un carbamate masquant l'azote d'un diamide cyclique rendant le composé biodisponible à 68%.¹⁰⁶

Les PROTACs[®] restent, cependant, administrables par de nombreuses voies augmentant les options d'utilisations thérapeutiques de ces composés bien que la voie orale reste la voie d'utilisation préférentiellement visée pour la plupart des thérapeutiques. L'assemblage intracellulaire de composés PROTACs[®] (CLIPTACs[®]) par une réaction biocompatible de type de chimie « click » (*click chemistry*)¹⁰⁷ peut être une stratégie envisageable pour raccourcir ces molécules hybrides lors de l'administration orale et donc favoriser leurs biodisponibilités. Cette technique permettrait d'administrer deux molécules distinctes au patient dans la même forme pharmaceutique et c'est ensuite, *in cellulo* que la molécule PROTAC[®] se formerait.¹⁰⁸

Un certain nombre de PROTACs[®] exercent leurs activités à des concentrations nanomolaires⁶⁷ voire même aux picomolaires¹⁰⁹. Le taux de pénétration membranaire peut donc être faible et lent, bien que les concentrations finales accumulées au site d'action soient suffisantes pour exercer l'effet pharmacologique.⁷⁰

(106) Wei, M.; et al. *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, *209*, 112903.

(107) Huisgen, R. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1963**, *2* (10), 565–598.

(108) Lebraud, H.; et al. *ACS Cent. Sci.* **2016**, *2* (12), 927–934.

(109) Zhou, B.; et al. *J. Med. Chem.* **2018**, *61* (2), 462–481.

Synthèse

Une autre limite de cette technique est la difficulté de synthèse. Avec leurs trois parties, les PROTACs® sont des molécules relativement complexes à synthétiser, nécessitant de nombreuses étapes diminuant ainsi le rendement global des composés. Des alternatives sont possibles en utilisant par exemple des synthèses convergentes, c'est-à-dire en synthétisant les trois parties de la molécule parallèlement et les relier ensuite. Les trois différentes parties sont ensuite reliées par des réactions simples et présentant de ³³ bons rendements comme par exemple des réactions de couplage par amidification ou par chimie click.⁷⁰ La synthèse chimique sur phase solide est aussi une possibilité permettant une synthèse plus rapide et plus facile.¹¹⁰

Pour la synthèse convergente les différentes parties doivent être fonctionnalisées par des groupements réactifs afin de pouvoir y introduire le *linker*.

Outre le fait du nombre d'étapes dû à la taille des composés pouvant induire des rendements faibles, le plus gros challenge est la modulation de la partie reliant les deux ligands. En effet lors du développement d'un PROTAC®, la partie nécessitant le plus de modulation est le *linker*, car la variation de sa taille ou de sa structure permet de moduler l'activité du composé. La chimie de cette partie est une chimie assez particulière utilisant la plupart du temps des groupements polyéthylènes glycol (PEG). La chimie des PEG est une chimie assez compliquée car le suivi de ces réactions se fait difficilement dû à leur difficulté de détection par les méthodes de suivi les plus courantes du fait de leur non visibilité aux UVs. Ce sont également, de par leurs structures, des molécules très hydrophobes ainsi il est généralement difficile de les isoler et de les purifier. Les PEG étant composés d'un enchainement du même motif éthylène glycol, les extrémités de ces chaînes ne possèdent pas de groupement réactif. Ceci est un obstacle car il faut réussir à moduler la taille de ces chaînes et également de les fonctionnaliser avec des groupements réactifs différents pour pouvoir lier ce *linker* aux deux différents ligands du PROTAC®. Deux approches sont couramment utilisées pour la fonctionnalisation de ces PEG. La première passe par une altération du groupement hydroxyle terminal par une série de réactions chimiques pour obtenir un groupement fonctionnel plus réactif.

La seconde fait réagir une des extrémités latérales de la chaîne PEG dans des conditions particulières et avec des groupement di-fonctionnalisés mais de réactivités différentes de sorte qu'un seul des groupements ne réagisse avec le PEG et que l'autre reste fonctionnalisé (Figure 24).¹¹¹

(110) Krajcovicova, S.; et al. *Chem. Commun.* **2019**, 55 (7), 929–932.

(111) Li, J.; Kao, W. J. *Biomacromolecules* **2003**, 4 (4), 1055–1067.

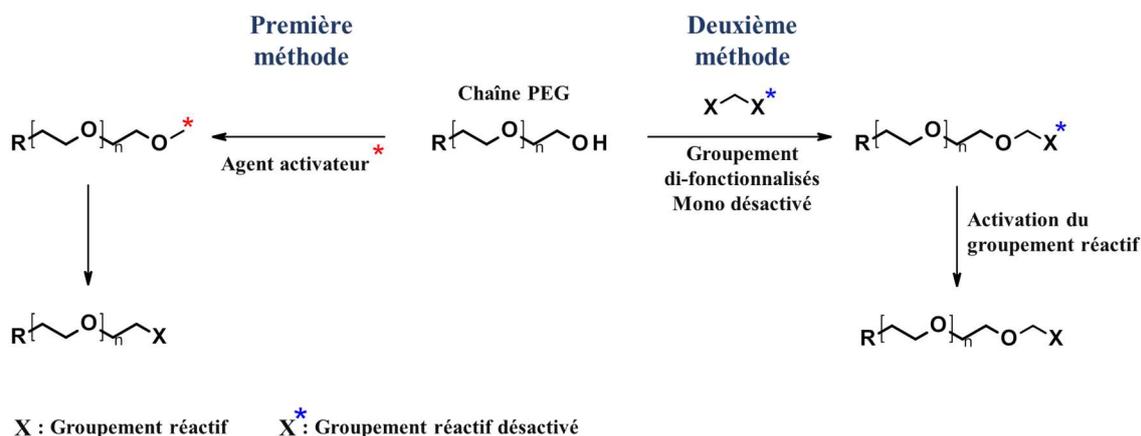
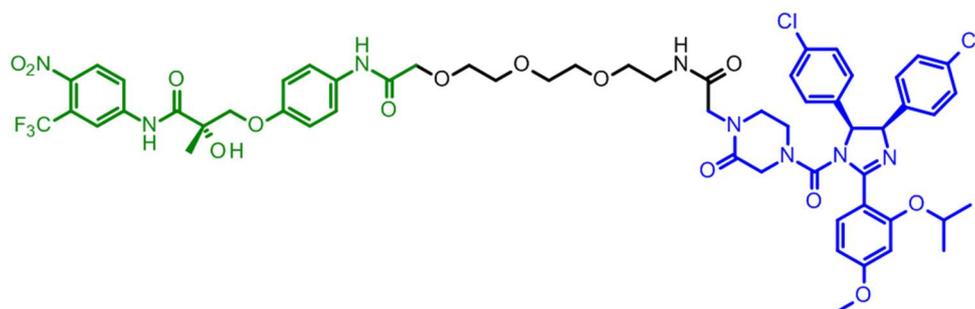


FIGURE 24: METHODES UTILISEES POUR LA FONCTIONNALISATION DE CHAINES PEG

8. Exemple de PROTACs® existants

PROTAC® AR-MDM2

En 2008, le premier PROTAC® composé entièrement de petites molécules, c'est-à-dire de molécules de faibles poids moléculaire (< 800 Da) a été décrit. Ceci a été un des plus gros progrès dans le développement de cette technologie en se démarquant de l'ancienne génération qui était composé d'au moins un fragment peptidique correspondant à un petit peptide mimant un ligand naturel d'une des protéines cibles. Ce premier PROTAC® petite molécule consistait en l'assemblage d'un ligand des récepteurs aux androgènes non stéroïdiens avec un ligand de la ligase MDM2, la nutlin, reliés ensemble par un *linker* de type PEG (Figure 25). Le récepteur aux androgènes est un récepteur nucléaire impliqué dans la régulation de l'expression des gènes permettant le maintien du phénotype masculin. Ce récepteur est surexprimé dans différents cancers et sa dégradation pourrait être un moyen thérapeutique efficace contre ces cancers. Ce PROTAC®_SARM-nutlin a montré une dégradation cellulaire des récepteurs aux androgènes dépendants de la voie UPS.⁷⁵



Structure du PROTAC®_AR-MDM2, ligand des récepteurs aux androgènes (vert), ligand MDM2 (bleu)

FIGURE 25: PROTAC®_AR-MDM2

PROTAC® RIPK2-VHL

RIPK2 est une serine-thréonine kinase connue pour être un médiateur important dans la signalisation de l'immunité innée. Une fois activée, cette kinase s'associe avec NOD1 et NOD2 pour recruter d'autres kinases impliquées dans l'activation des voies de signalisations NF-κB et MAPK. Une dysfonction de cette kinase RIPK2 est associée à des maladies auto-inflammatoires. Ainsi, provoquer la dégradation de RIPK2 lors de son dérèglement semble être une stratégie thérapeutique intéressante dans le traitement de ces pathologies.

En 2015, un PROTAC® provoquant une dégradation dose dépendante de RIPK2 à faible concentration plasmatique ($DC_{50} = 1,4$ nM) a été décrit (Figure 26B). Cette molécule PROTAC® possède un ligand de RIPK2 ($pIC_{50} = 8.6$) à une extrémité et de l'autre extrémité un E3RE spécifique de la ligase VHL.

L'extrémité E3RE est un mime du peptide HIF1α possédant une hydroxyproline, critique pour la liaison à VHL (Figure 26A). HIF (*hypoxia-inducible factor*) est un médiateur important dans la réponse cellulaire à l'hypoxie, en activant des voies métaboliques d'adaptations et de survies. Dans des conditions d'oxygénation physiologiquement normales, il y a hydroxylation d'une proline conservée dans sa structure peptidique. Cette hydroxylation est un marqueur de sa dégradation par le système UPS en recrutant la ligase VHL. Cette modification est dépendante du niveau d'oxygène et donc en cas d'hypoxie cellulaire, il n'y aura pas l'hydroxylation de cette proline sur HIF qui ne sera donc pas dégradée permettant ainsi l'induction de la transcription de plusieurs gènes.

Ceci provoque par exemple la synthèse de l'angiogénèse, en partie grâce à la production d'EPO, et l'augmentation du métabolisme anaérobique. L'ensemble de ces réponses permet, ainsi, de résister à des conditions d'hypoxie cellulaire.¹¹²

(112) Buckley, D. L.; et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (10), 4465–4468.

La dégradation de RIPK2 par ce PROTAC® a été observée sur monocyte humain de type THP-1 et une réversibilité d'effet, avec un retour à un niveau physiologique normal après 24h, a été montrée après lavage et élimination du composé (Figure 26C).⁶⁷

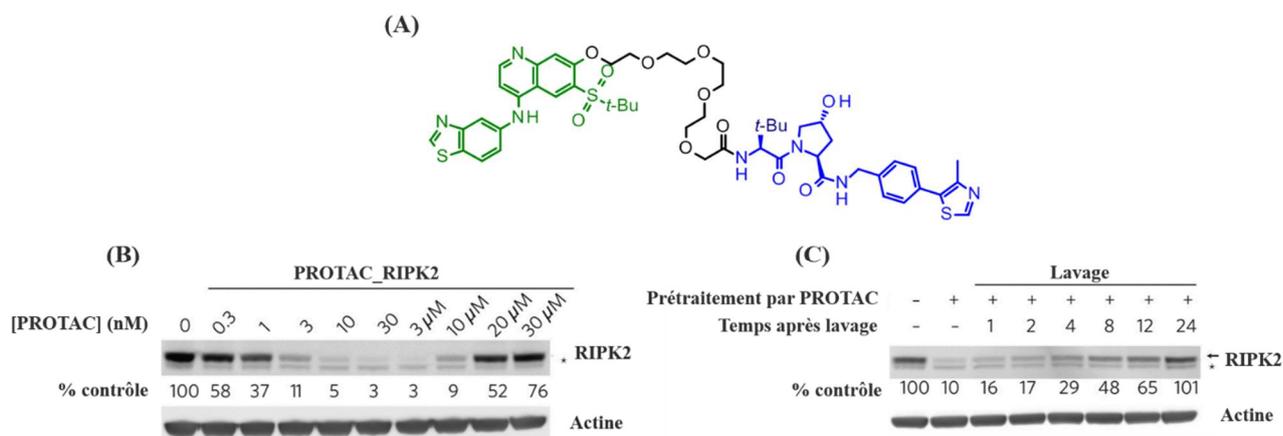


Fig. 26 A. Structure du PROTAC®_RIPK2-VHL, ligand de RIPK2 (vert), ligand VHL (bleu) ; Fig 26 B Western blot montrant l'activité concentration dépendante de PROTAC®_RIPK2 ; Fig 18 C Western blot montrant la réversibilité d'action de du PROTAC®_RIPK2 après étape de lavage. L'actine est utilisé comme contrôle négatif.

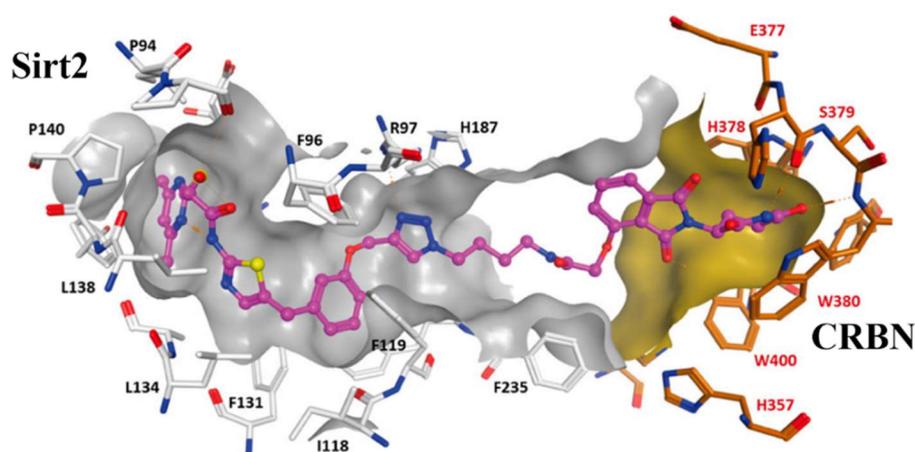
FIGURE 26: STRUCTURE DE PROTAC®_RIPK2 ET SES ACTIVITES CELLULAIRES SUR THP-1⁶⁷

PROTAC® Sirt2-CRNB

La sirtuine 2 ou Sirt2 est une histone désacétylase (HDAC) de type III, plus particulièrement une lysine désacétylase (KDAC) NAD dépendante. Cette enzyme utilise comme cofacteur le NAD⁺ tandis que les HDACs de type I, II et IV sont des métalloprotéases à zinc ayant donc comme cofacteur un ion zincique. Il existe sept isotypes de sirtuines différents par leurs activités catalytiques et leurs localisations. Sirt2 est majoritairement localisée dans le cytoplasme et a un rôle important dans le cycle cellulaire, l'autophagie, la myélination périphérique et dans les réponses immunitaires et inflammatoires. Des dérégulations de Sirt2 ont été montrées dans des infections bactériennes, dans le diabète de type 2, dans les maladies neurodégénératives et dans des cancers faisant donc de Sirt2 une cible intéressante en thérapeutique.

Cependant, son mécanisme n'est pas encore élucidé et il y a un besoin d'outils chimiques afin d'explorer et de mieux caractériser les effets cellulaires de cette enzyme et son lien dans ces pathologies.

Afin d'explorer cette enzyme, un PROTAC[®] basé sur un ligand de Sirt2 et la thalidomide, ligand de référence de la ligase CRBN, a été synthétisé par une équipe de recherche. Cette équipe avait déjà réalisé une sonde chimique spécifique sur cette protéine Sirt2 et connaissant donc déjà où introduire le *linker* sur leur molécule sans induire une perte de liaison ou de sélectivité. Afin de concevoir cette molécule une technique de modélisation moléculaire a été utilisée. Il s'agit du docking, consistant à réaliser virtuellement des ligands par ordinateur et d'étudier leurs capacités de liaison à leurs cibles et en l'occurrence, ici, la capacité de former un complexe ternaire stable avec le composé et ses protéines cibles. Pour ce docking ils se sont basés sur la co-cristallisation de la protéine Sirt2 avec son ligand permettant de déterminer la taille nécessaire du *linker* pouvant recruter la ligase CRBN à une distance suffisante pour induire une PPI entre Sirt2 et CRBN et permettre une ubiquitination de Sirt2 (Figure 27).

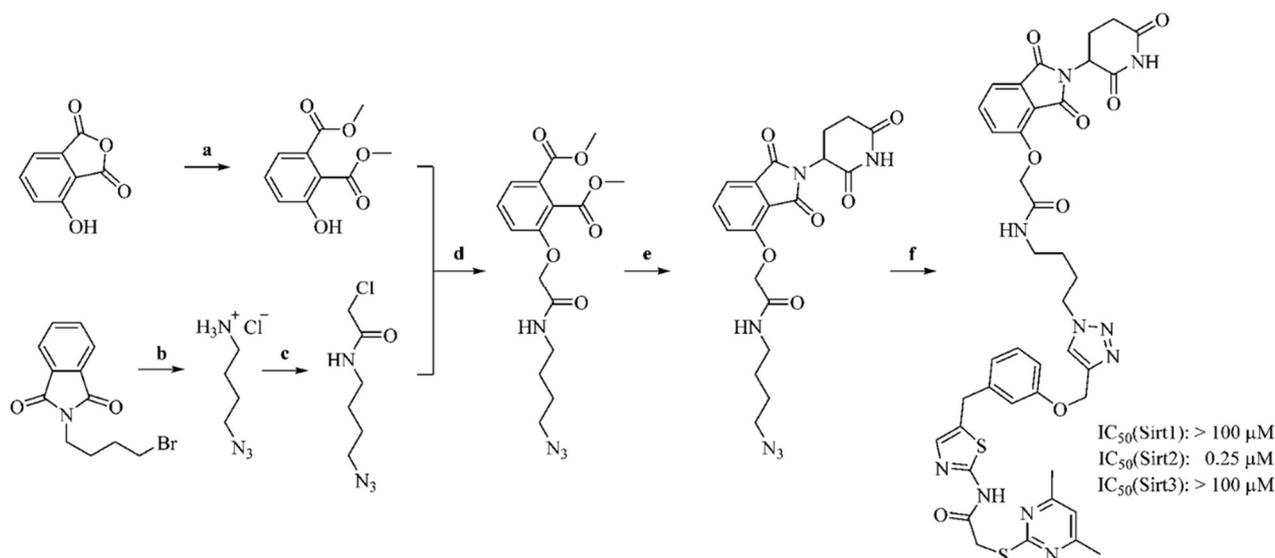


Sirt2 représenté en gris et la ligase CRBN en orange.

FIGURE 27: DOCKING DE PROTAC[®]_SIRT2 SUR CRBN ET SIRT2⁸⁷

La thalidomide, ligand du CRBN, et le ligand de la protéine cible sont reliés ensemble par un linker possédant un triazole formé par une réaction de Huisgen catalysée au cuivre. Ici, la réaction de Huisgen permet de faciliter la voie de synthèse et d'obtenir le composé en seulement six étapes (Figure 28).^{87,113}

(113) van Zundert, G. C. P.; et al. *J. Mol. Biol.* **2016**, 428 (4), 720–725.



Réactifs et conditions : (a) méthanol, chlorure de thionyle, 0–80 °C, 4 h, 63% de rendement; (b) NaN₃, DMF, TA, 12 h, puis hydrate d'hydrazine, éthanol, 0 °C à TA, 24 h, 99% de rendement; (c) Chlorure de chloroacétyle, triéthylamine, DMF, 0 °C à TA, 1 h, 82% de rendement; (d) Cs₂CO₃, acétonitrile, reflux, 5 h, puis à TA, 12 h, 88% de rendement; (e) NaOH, éthanol, TA, 1.5 h, puis hydroxychlorure de 3-aminopiperidine-2,6-dione, *N,N*-diméthylpyridin-4-amine, triéthylamine, DCM, *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide, 0 °C à TA, 22 h, 50% de rendement; (f) Ascrobate de sodium, CuSO₄, eau/*tert*-BuOH (1:1), 60 °C, 1 h, puis TA, 16 h, 33% de rendement.

FIGURE 28: SYNTHÈSE DU COMPOSÉ PROTAC®_Sirt2⁸⁷

Ce composé montre une haute sélectivité de liaison à Sirt2 vis-à-vis de deux autres isoformes, Sirt1 et Sirt3 ainsi qu'une sélectivité de dégradation sur Sirt2 avec un effet dose dépendant à des concentrations situées entre 0,05 μM et 5 μM. Ce composé PROTAC® est un nouvel outil d'exploration de Sirt2 afin d'étudier le rôle de cette enzyme et sa potentielle application en thérapeutique.

De plus, le ligand de CRBN présentant un *linker* avec un azoture terminal pourrait servir à synthétiser d'autres composés PROTAC® en le couplant à d'autres ligands de POI présentant un alcyne terminal.⁸⁷

9. CLIPTAC

Ces molécules PROTAC®, par leurs structures bi-fonctionnelles, sont des molécules volumineuses bien qu'elles restent classées, comparées aux thérapies cellulaires et aux anticorps, dans la catégorie des petites molécules. Ce haut poids moléculaire, allant de 700 à 1 200 Da, limite le passage membranaire, la solubilité ainsi que d'autres propriétés « *drug-like* ». ¹⁰⁵

La « *in-cell click-formed proteolysis targeting chimeras* » (CLIPTACs) consiste à former dans la cellule, par des réactions bio-compatibles, le PROTAC® assisté par la POI et la ligase en partant de précurseurs plus petits possédant donc de meilleures propriétés pharmacocinétiques. Ce principe a été publié en 2006 et a permis la dégradation cellulaire de deux protéines clés ciblées en oncologie, BRD4 et ERK1/2, en recrutant la ligase CRBN par un dérivé de la thalidomide. Pour cela, le dérivé de la thalidomide a été fonctionnalisé par une tétrazine et les ligands de BRD4 et d'ERK1/2 par un trans-cyclo-octène (TCO). Ces groupements chimiques peuvent réagir ensemble par une réaction de Diels Alder, la « *inverse electron demand Diels–Alder (IEDDA)* », une réaction appartenant à la famille des réactions de type « *click* ». ¹¹⁴

Cette réaction est bio-compatible, c'est-à-dire compatible avec le vivant, et se fait rapidement, sans l'aide de catalyseur et avec un haut rendement permettant donc de former *in situ* les composés PROTACs®. La formation des composés PROTACs® BRD4 et ERK 1/2 a été confirmée par des techniques de chromatographies liquides couplées à un spectromètre de masse quadripôle (LCMS-MS). L'inhibition du protéasome par le carfilzomib a permis de retrouver un taux normal de protéine cellulaire montrant que l'activité passe bien par le protéasome. ¹⁰⁸

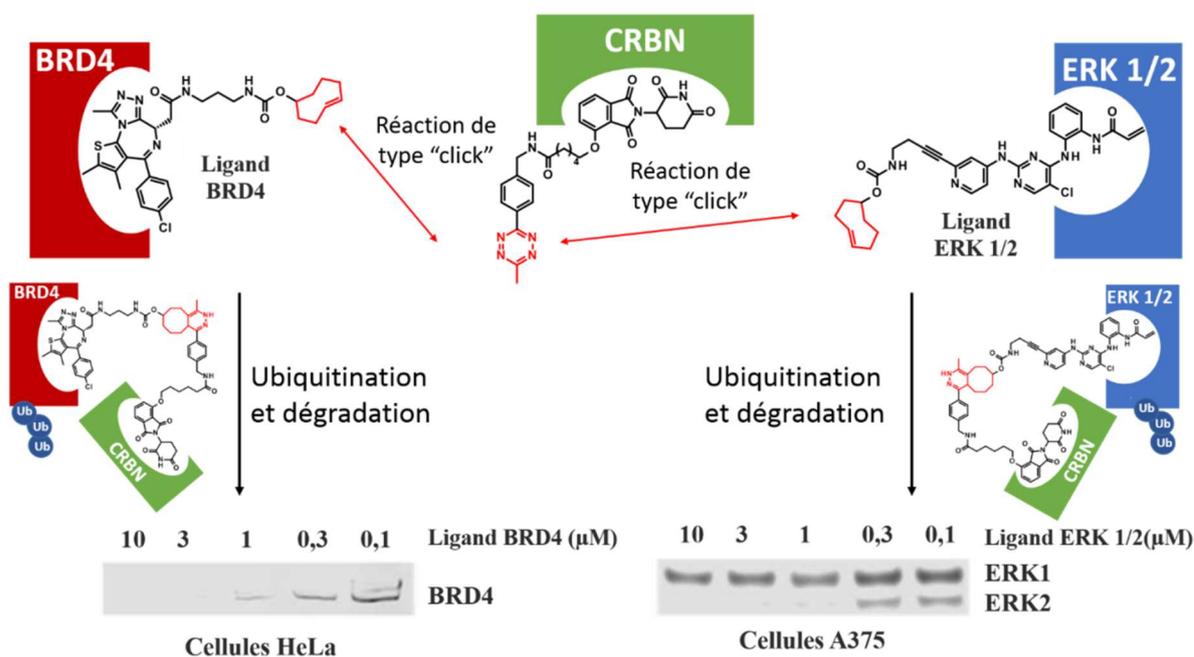


FIGURE 29: FORMATION *IN SITU* DE PROTACs® BRD4 ET ERK 1/2 (CLIPACTs) (ADAPTE DE¹⁰⁸)

(114) Oliveira, B. L.; et al. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, 46 (16), 4895–4950.

Ces résultats valident l'approche CLIPTAC et montrent qu'un ligand de recrutement de ligands E3 marqué avec un élément « clickable », tel qu'un tétrazole, pourrait fournir un moyen versatile d'exploiter un large éventail de protéines. De nombreuses réactions bioorthogonales existent, comme la réaction de cycloaddition de Huisgen, ce qui permettrait de pouvoir développer ce principe et l'étendre à d'autres ligands en utilisant d'autres réactions chimiques.¹¹⁵

Il est donc possible de synthétiser *in cellulo* des composés PROTACs[®] en utilisant deux précurseurs, une molécule liant la POI et une molécule liant la ligase, fonctionnalisés par des groupements chimiques permettant de former le linker de façon rapide et d'obtenir le PROTAC[®]. Pour ces composés bi-fonctionnels, la taille, la forme ainsi que la composition du linker ont une grande importance pour la bonne efficacité du PROTAC[®]. La bonne interaction entre la POI et la ligase permettant l'ubiquitination a une importance sur l'activité de la molécule. Le choix de la ligase dans la synthèse de ce type de composé est donc également important. Nous avons vu que la dégradation d'une protéine par un PROTAC[®] ne dépend pas uniquement de la composition du ligand de la POI qui va prendre en charge la cible mais aussi de la compatibilité physico-chimique entre la protéine cible et la ligase.⁷¹ En effet, un composé PROTAC[®] ciblant une ligase peut se montrer inefficace suite à la non-compatibilité avec la protéine cible empêchant l'interaction entre les deux protéines.

10. Une plateforme *click* pour la synthèse de PROTAC[®]

En 2018, une stratégie de liaison d'un ligand de POI avec plusieurs ligands de ligase a été développée afin de former rapidement plusieurs composés PROTACs[®] en faisant varier la ligase recrutée mais également la taille du *linker*. La réaction chimique utilisée était la cycloaddition 1,3 dipolaire de Huisgen permettant de relier un azoture terminal avec un alcyne terminal, formant un triazole. Cette réaction, catalysée au cuivre, est facile à mettre en place, rapide, possède de bons rendements et nécessite des quantités stœchiométriques de réactifs (1:1). De plus, les groupes fonctionnels possèdent une bonne compatibilité chimique avec d'autres conditions réactionnelles facilitant l'utilisation de ces groupements chimiques.⁸⁵

(115) Patterson, D. M.; et al. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9* (3), 592–605.

L'utilisation de cette plateforme permet de générer rapidement et facilement différents analogues de PROTAC® en modulant les deux parties les plus impactant, d'une part la ligase recrutée et d'autre part la taille du *linker*. Pour cela, d'une part le ligand de la POI, ici BRD4 de la famille des protéines BET, est fonctionnalisé par un amide contenant à son extrémité un azoture terminal nécessaire pour la réaction « *click* » de Huisgen. Et d'autre part, une librairie de différents ligands de ligases, ici les ligands du CRBN et du VHL, sont synthétisés et fonctionnalisés par un linker PEG de taille variable. Ici, de un à cinq enchainements PEG et possédant en bout de chaîne un alcyne terminal afin de pouvoir réagir avec l'azoture terminal du ligand de la POI. Ce ligand de POI est mis en réaction individuellement avec les différents ligands de ligase fonctionnalisés par un *linker* PEG afin de les relier ensemble par un triazole. Dix composés chimériques ont pu ainsi être synthétisés parallèlement par la réaction de Huisgen, cinq PROTACs® ciblant VHL et cinq ciblant la ligase CRBN avec des linker de tailles variables. Les dix composés synthétisés en parallèle ont été testés par alpha screen afin d'étudier leur capacité à permettre l'induction d'une PPI entre la ligase et la POI en formant le complexe ternaire POI-PROTAC®-Ligase.

Un test alpha screen (*amplified luminescent proximity homogeneous assay*) a été développé pour quantifier la formation du complexe ternaire par les composés PROTAC®. Ce test, basé sur la proximité physique de deux billes, une donneuse et une acceptrice, permet d'étudier la proximité spatiale de deux éléments, ici la POI et la ligase, par transmission d'énergie lumineuse entre la donneuse et l'acceptrice. Dans ce test, la bille donneuse d'énergie est une bille de glutathionne liée à la protéine BRD4 et la bille receveuse est fixée sur la ligase E3.

Le rapprochement spatial de ces deux billes va rendre possible la transmission de l'énergie lumineuse d'excitation d'une longueur d'onde X reçue par la bille donneuse à la bille acceptrice qui va ensuite émettre une lumière de longueur d'onde d'émission Y. S'il y a formation d'un complexe ternaire suite à la liaison par le PROTAC® l'énergie lumineuse reçue suite à l'excitation par un laser sera différente.

Cependant, s'il n'y a pas de formation de complexe ternaire elle sera de même énergie dans ce test alpha screen car il n'y aura pas eu la possibilité d'échange d'énergie entre les deux billes.

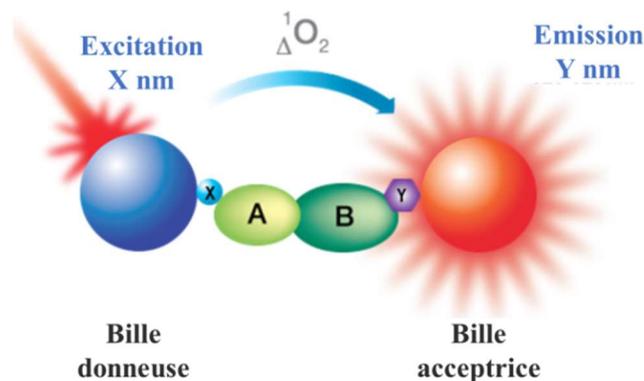


FIGURE 30: PRINCIPE DU TEST ALPHA SCREEN

Dans ce test, deux PROTACs[®] commercialement disponibles, un ciblant VHL et un ciblant CRBN ont été utilisés comme contrôle positif. Ce PROTAC[®] VHL_BRD4 a montré une relation dose-effet mettant en évidence l'équilibre entre le complexe ternaire et le complexe binaire avec dans les deux cas un impact de la taille du *linker*. Pour le PROTAC[®] VHL, on observe une différence d'un Log entre le composé synthétisé présentant un triazole dans le *linker* et le composé de référence avec un *linker* de même taille mais composé uniquement d'enchaînement PEG. Ce résultat montre ici un impact négatif du triazole, non présent pour le composé de référence.

Cette étude est la première étude montrant l'impact de la taille ainsi que de la structure du *linker* sur l'activité de PROTAC[®] à former un complexe ternaire stable.⁸⁵ Ce principe de chimie combinatoire pourrait être développé et réalisé à plus grande échelle en utilisant d'autres ligands de ligases pour cibler d'autres E3s, avec d'autres variabilités concernant le linker et son point d'accroche. Comme par exemple, la forme, la structure et la structure du lien tout en continuant à faire varier la taille, élément clé dans la conception d'un PROTAC, et en faisant varier le point d'accroche pour se *linker* pour moduler le complexe ternaire en orientant différemment les partenaires.

11. Nouveaux concept émergents de la technologie PROTAC®

Les composés PROTACs® sont capables d'agir uniquement sur des protéines intracellulaires. De ce fait, il existe des protéines échappant à cette stratégie comme par exemple les protéines membranaires et les protéines sécrétées. En effet, par exemple, le ciblage des protéines extracellulaires pour l'internalisation et la dégradation, comme les cytokines et les chimiokines qui se lient aux récepteurs extracellulaires présents à la surface des cellules, dépasse les capacités de la technologie actuelle des PROTACs®. Certaines variations intéressantes du concept originel élargissent la portée de celui-ci en permettant par exemple, la dégradation des protéines extracellulaires en détournant d'autres processus permettant ainsi l'adressage vers la voie de dégradation endolysosomale plutôt que protéosomale.

a. LYTACs

L'équipe de Carolyn Bertozzi à Stanford utilise des composés chimériques permettant un adressage direct aux lysosomes appelés LYTACs. Ces types de composés permettent de relier la protéine cible à un lysosome provoquant ainsi sa dégradation. Pour la conception de ces composés, l'équipe a exploité un récepteur présent sur la surface des lysosomes, le récepteur mannose-6-phosphate indépendant des cations (CI-M6PR), ce qui permet de cibler spécifiquement les lysosomes (Figure 31). Les composés LYTACs de l'équipe de C. Bertozzi sont composés d'une part d'un anticorps ciblant une protéine à dégrader, et d'autre part d'un glycopeptide synthétique agoniste du récepteur CI-M6PR. Pour prouver leur concept, ils ont utilisé un polypeptide possédant de multiples ligands affins pour ce récepteur CI-M6PR attachés à la biotine. Ils ont ensuite étudié, par microscopie à fluorescence, la localisation de la NeutrAvidine (NA-647), tétramère déglycosylé de l'avidine, possédant une très forte affinité pour la biotine. L'équipe a montré, par des études de colocalisation, que la NeutrAvidin été localisée spécifiquement dans les lysosomes et les endosomes en présence de la biotine_LYTAC®, montrant l'internalisation dans les lysosomes de la biotine LYTAC ayant liée au préalable la NeutrAvidin. Cette équipe a également synthétisé deux composés LYTAC qui ont montré leur efficacité sur test cellulaire, l'un ciblant le récepteur extracellulaire EGFR et l'autre ciblant le récepteur transmembranaire PD-L1, protéine ayant des implications dans différents cancers.

Pour cibler le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR), jouant un rôle dans la prolifération de cancers lymphoïdes, le cetuximab, un anticorps anti EGFR, a été conjugué à un glycopeptide possédant de multiples ligands du récepteur CI-M6PR.

Le traitement des cellules par le composé LYTAC[®] anti-EGFR, a permis de considérablement réduire la quantité d'EGFR par rapport au traitement témoin, ce qui montre la dégradation de ce récepteur par le composé.

En utilisant un LYTAC[®] couplé à un anticorps ciblant une autre protéine membranaire, PD-L1, un récepteur surexprimé sur les cellules cancéreuses, la quantité de PD-L1 à la surface des cellules a diminué dans deux lignées cellulaires différentes possédant des taux de CI-M6PR différents.

En rassemblant toutes ces données, la preuve de concept de Banik et al. de l'équipe de C. Bertozzi montre que ces composés chimériques appelés LYTACs[®] pourraient permettre la dégradation de protéines extracellulaires ou membranaires en ciblant, d'une part une protéine d'intérêt et d'autre part un récepteur membranaire lysosomal comme par exemple ici le CI-M6PR.¹¹⁶

b. AUTAC/ATTEC

Le système AUTAC (*autophagy-targeting chimera*) a une conception similaire à la technologie PROTAC[®]. Les molécules AUTACs et PROTACs[®] fonctionnent toutes deux en détournant la machinerie d'ubiquitination. Les molécules AUTAC déclenchent la polyubiquitination K63, qui est reconnue par la voie de l'autophagie sélective, conduisant ainsi à la dégradation de la protéine cible (Figure 31).

Une molécule AUTAC contient le marqueur de dégradation qui est un dérivé de guanine et un ligand de la POI pour assurer la spécificité de la cible. Le marqueur de dégradation imite la S-guanylation, une modification post-traductionnelle marqueur autonome d'une autophagie sélective en induisant une polyubiquitination K63 (Figure 31).¹¹⁷

Le concept de composé autophagosomique « autophagosome-tethering compounds » (ATTEC) illustre une stratégie plus directe visant à exploiter l'autophagie pour dégrader les protéines d'intérêts. Contrairement au PROTAC[®] et à l'AUTAC, les molécules ATTEC sont indépendantes de l'ubiquitination. Les molécules ATTEC se lient directement à la POI et aux autophagosomes afin de provoquer leur rapprochement pour former le phagophore et d'induire la dégradation autophagique de la protéine cible. Pour cela les molécules ATTECs sont conçues afin de pouvoir se lier d'une part à la protéine à dégrader et d'autre part à une protéine clé de l'autophagosome, LC3 (Figure 31).¹¹⁸

(116) Banik, S.; et al. **2019**.

(117) Takahashi, D.; et al. *Mol. Cell* **2019**, 76 (5), 797-810.e10.

(118) Li, Z.; et al. *Autophagy* **2020**, 16 (1), 185–187.

Cette protéine LC3 permet le recrutement du complexe de conjugaison sur l'autophagosome et permettrait également, une fois liée à la phosphatidyléthanolamine (PE) d'avoir une fonction structurale permettant l'élongation et la formation de l'autophagosome mature.¹¹⁹

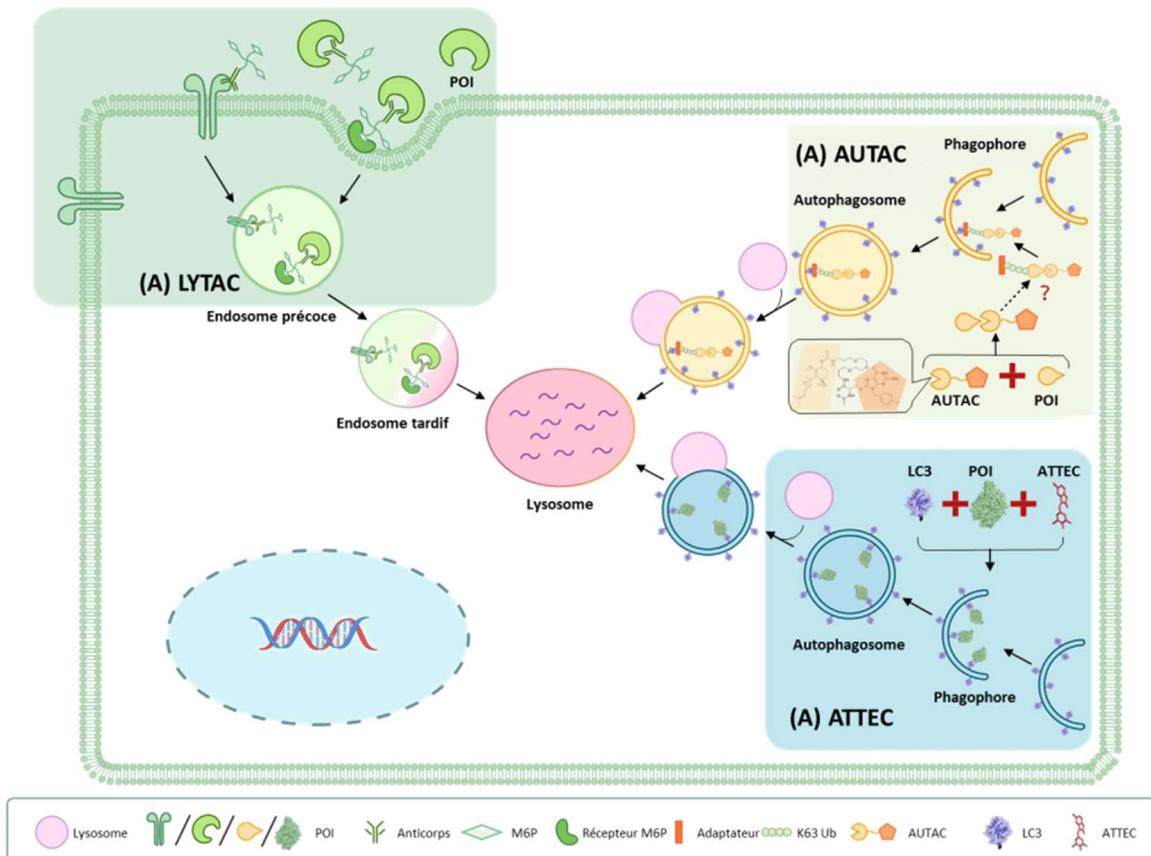


FIGURE 31: ILLUSTRATION DES NOUVEAUX CONCEPTS EMERGEANT DE PROTACS® (ADAPTE DE ¹²⁰)

(119) Tanida, I.; et al. *Methods in Molecular Biology*, NJ, **2008**; pp 77–88.

(120) Ding, Y.; et al. *Trends Pharmacol. Sci.* **2020**, *41* (7), 464–474.

III. PROTAC®, vers une application en clinique

1. Les potentielles applications thérapeutiques

L'application de ce type de thérapeutiques, permettant la dégradation spécifique d'une protéine cible, se situerait autour des pathologies, ou état pathologique, où il y aurait un bénéfice thérapeutique dans la modulation directe ou indirecte de la quantité d'une protéine spécifique. C'est par exemple le cas où il y aurait surexpression, ou accumulation pathologique d'une protéine suite à un défaut de dégradation.

Jusqu'à présent, ces types de composés ciblent un large nombre d'aires thérapeutiques qui sont : l'inflammation, l'immunologie, la virologie, la neurologie mais surtout l'oncologie. PROTAC® pourrait donc être une nouvelle technologie de traitements avec de larges applications dans plusieurs aires thérapeutiques.

a. Oncologie

Jusqu'à présent la plus grande majorité des composés PROTACs® synthétisés aurait une application dans cette aire thérapeutique. En effet, un grand nombre de cancers peut être attribué à une surexpression de protéines pro-oncogènes ou à un recrutement aberrant de protéines de signalisation. De plus, la prolifération de certains cancers peut également induire une surproduction de protéines qui, par leur accumulation au sein de la cellule, deviendrait pathologique. Dans les deux cas, la dégradation de ces protéines en excès ou non désirées, qu'elle soit la cause ou la conséquence du cancer, est nécessaire à une bonne stratégie thérapeutique. À ce jour, de nombreuses protéines pro-oncotiques ou ayant une implication dans le développement ou la progression de cancers ont déjà été ciblées par cette technologie PROTAC® comme par exemple, les récepteurs nucléaires aux œstradiols ou aux androgènes, des protéines kinases telles que BCR-Abl, RIPK2, des régulateurs transcriptionnels comme BDR4 ou HDAC6 qui pour ce dernier a une implication dans la métastase de certains cancers.¹²¹

(121) Zou, Y.; et al. *Cell Biochem. Funct.* **2019**, *37* (1), 21–30.

b. Inflammation

L'inflammation est l'ensemble des mécanismes réactionnels de défense par lesquels l'organisme reconnaît, détruit et élimine toutes les substances qui lui sont étrangères. La réaction inflammatoire est donc une réaction de défense et d'adaptation de l'organisme qui est utile au bon fonctionnement de l'organisme mais qui peut parfois être exacerbée et donc devenir néfaste.

Lors d'un processus inflammatoire, il y a recrutement ces cellules immunitaires, dont les polynucléaires neutrophiles, les lymphocytes T CD8 et CD4 et les macrophages qui eux libèrent des médiateurs de l'inflammation tels que les cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6 et TNF α) pouvant être la cause de symptômes cliniques généraux.

L'asthme et la BPCO (BronchoPneumopathie Chronique Obstructive) sont deux pathologies caractérisées par l'existence d'une inflammation bronchique chronique. Dans ces deux pathologies l'inflammation s'accompagne d'un processus de cicatrisation qui aboutit à un remodelage de la paroi bronchique avec une bronchoconstriction des fibres musculaires lisses, un épaississement des parois et une hypersécrétion bronchique. Ce remodelage va se traduire par une diminution progressive de la taille des bronches pouvant aller jusqu'à l'obstruction permanente induisant la clinicit  de ces pathologies qui est une gêne ou une difficulté respiratoire pouvant conduire à la nécessité d'une ventilation artificielle.

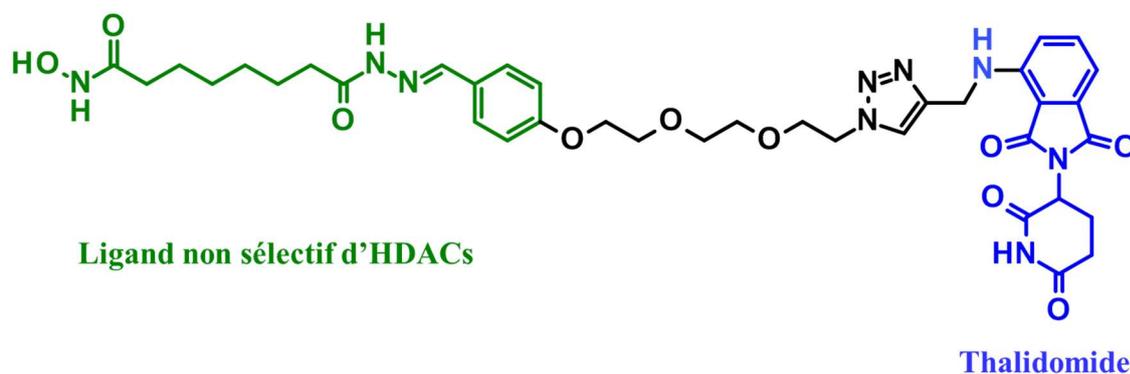
L'inflammation dans l'asthme et la BPCO est médiée par de multiples mécanismes de régulation, dont la signalisation cellulaire, régulée de façon critique par des modifications post-traductionnelles (PTM). Ces modifications de protéines sont des processus dynamiques permettant la modulation des propriétés de la protéine concernée et donc d'impacter son activité. La PTM la plus étudiée est l'acétylation, dans laquelle un groupe acétyle est ajouté à un résidu lysine par une histone acétyl transférase (HAT) ou enlevé par une histone désacétylase (HDAC). Cette acétylation permet leur interaction avec l'ADN favorisant donc la transcription de l'ADN. La perturbation de ce processus contribue à la pathog nese de l'asthme et de la BPCO.

Par exemple, l'inhibition sélective de l'HDAC8 a montré une diminution de l'hyperréactivité et de l'inflammation des voies respiratoires.

Une autre HDAC importante dans la physiopathologie de l'asthme est l'HDAC6 dont la fonction principale est la désacétylation de l' α -tubuline, intervenant dans le remodelage des voies respiratoires. La tubuline, un composant majeur du cytosquelette, est impliquée dans la motilité cellulaire et son acétylation par HDAC6 conduit à la stabilisation des microtubules, diminuant ainsi cette motilité.¹²²

L'inhibition d'HDAC6 pourrait ainsi atténuer le remodelage des voies respiratoires en cas d'inflammation. En effet, lors du traitement de souris asthmatiques avec l'inhibiteur sélectif d'HDAC6, la tubastatine A, l'hyperréactivité et l'inflammation des voies respiratoires ont été atténuées, de même que la diminution des marqueurs de remodelage des voies respiratoires.¹²³

Des molécules PROTAC[®] permettant la dégradation sélective de HDAC6 ont récemment été développées. Ces composés sont constitués d'un inhibiteur non sélectif d'HDACs, le crebinostat, et de la thalidomide comme ligand ciblant la ligase E3, le c \acute{e} réblon (Figure 32). La dégradation sélective d'HDAC6 vis-à-vis des ligases peut être expliquée par la formation d'un complexe ternaire stable avec l'HDAC6 et d'une coopérativité négative entraînant une non compatibilité avec les autres HDACs.⁸⁹



Structure du PROTAC[®]_HDAC6-CRBN, ligand non sélectif d'HDACs (vert), ligand CRBN (bleu)

FIGURE 32: PROTAC[®]_HDAC6-CRBN

(122) Hubbert, C.; et al. *Nature* **2002**, 417 (6887), 455–458.

(123) Ren, Y.; et al. *Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc. Al* **2016**, 65 (12), 995–1008.

c. Maladies neurodégénératives

Un grand nombre de maladies neurodégénératives sont liées à une accumulation de protéines au niveau cérébral. C'est le cas par exemple de la maladie de Parkinson où les patients présentent une agrégation de la protéine α synucléine au niveau des neurones synaptiques entraînant leur mort. Pour la maladie d'Alzheimer, il y a une accumulation de la protéine tau et des protéines β amyloïdes formant les plaques β amyloïdes appelées également plaques séniles.

Afin de traiter ces pathologies par des traitements ceux-ci ont la nécessité de franchir la barrière hémato-encéphalique (BHE) pour arriver au niveau du site d'action, le cerveau, où ils exerceront leurs effets. De par leur grande taille moléculaire, les molécules PROTAC[®] sont des composés qui semblent imperméables à cette barrière. De ce fait, peu de composés PROTAC[®] ont pour cibles ces pathologies et cette aire thérapeutique.⁸³ Cependant très récemment, la société Arvinas a montré la pénétration dans le cerveau d'un composé PROTAC[®] en pré-clinique et donc leur possibilité à franchir cette BHE ouvrant ainsi la voie au développement de composés de ce type dans cette aire thérapeutique.¹²⁴ La Société Arvinas a d'ailleurs deux projets de développement de PROTACs[®] dans cette aire thérapeutique avec des molécules visant à dégrader la protéine tau et la protéine α -synucléine.¹²⁵

d. Immunologie et virologie

Des composés PROTAC[®] ont déjà été étudiés dans ces aires thérapeutiques, comme par exemple, un composé PROTAC[®] visant à dégrader la protéine IRAK4 (Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 4). IRAK4 est une sérine/thréonine kinase intervenant dans les voies de transduction induit par les récepteurs de type Toll (TLR) et la famille des récepteurs de l'interleukine-1 (IL-1). Cette kinase 4, associée au récepteur de l'interleukine 1 (IRAK4), est un médiateur clé de l'immunité innée. Son hyperstimulation est, par ailleurs liée à plusieurs maladies inflammatoires auto-immunes telles que le lupus érythémateux systémique, le psoriasis, ou la polyarthrite rhumatoïde.

(124) Cacace, A.; Neuroscience, V. 22.

(125) <https://www.arvinas.com/pipeline-programs/neurodegeneration-next-generation-targets> (accessed Mar 24, 2020).

Une application intéressante en virologie a également été évaluée. Il s'agit d'un composé visant à dégrader la protéase NS3 du virus de l'hépatite C. La protéine NS3 a un rôle essentiel dans la réplication et donc dans la progression de l'infection du virus de l'hépatite C (VHC). Tout d'abord, cette protéine s'associe à la protéine NS4A pour former la protéase NS3/A4 permettant de cliver la polyprotéine du VHC provoquant la libération de protéines structurales (capsides et glycoprotéines d'enveloppes) et de protéines non structurales. Cette protéine NS3 joue aussi le rôle d'hélicase et permet la réplication de l'ARN virale qui pourra ensuite infecter d'autres cellules. Actuellement, des inhibiteurs de la protéase NS3/A4 existe comme traitement du VHC. Cependant certains patients atteints du VHC développent des résistances à ces traitements par l'émergence de virus mutant au niveau de cette protéine.¹²⁶

Le Pr. Yang et son équipe ont développé une série de nouveaux PROTACs[®] permettant la dégradation de la protéine NS3. Le composé a montré son efficacité à dégrader la protéine NS3 avec une ID₅₀ variant plus faiblement en fonction de différents mutants de la protéine par rapport à la variation de l'IC₅₀ composé de référence sur lequel le composé PROTAC[®] a été synthétisé. Ceci montre que son activité est moins sensible aux mutations de la cible. Ces résultats démontrent que la dégradation ciblée de protéines virales pourrait s'avérer être une stratégie efficace dans le traitement d'infections virales et pourrait diminuer l'émergence de mutations et donc de résistances aux traitements.¹²⁷

En plus des exemples d'applications précédemment cités, de très nombreux composés PROTACs[®] ont été développés ces dernières années et ce dans diverses aires thérapeutiques (voir Annexe : Tableau 1). Les nombreux efforts dans la recherche et le développement de cette technologie ont permis sa croissance, l'extension de sa diversité applications et l'amélioration des connaissances scientifiques relatives à ce mécanisme de dégradation.

La recherche autour des PROTACs[®] continuant, de nombreuses autres nouvelles applications dans des domaines de plus en plus variés en ciblant d'autres aires thérapeutiques et de nouvelles cibles jusque-là encore inexplorées verront sûrement le jour dans les années à venir.

(126) McPhee, F.; et al. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56* (7), 3670–3681.

(127) de Wispelaere, M.; et al. *Nat. Commun.* **2019**, *10* (1), 3468.

2. PROTAC® en clinique

A ce jour, il n'existe aucune molécule de ce type sur le marché mais très récemment, en mars et en août 2019, deux composés PROTACs® ont franchi une barrière qui est celle de l'évaluation chez l'Homme en entrant en phase 1 d'essai clinique. Ces deux molécules ARV-110 et ARV-471, dont les structures restent confidentielles et non dévoilées à ce jour, sont toutes les deux développées par la société Arvinas fondée par C. Crews.

Il existe également plusieurs molécules PROTAC® actuellement en études précliniques développées par différentes industries pharmaceutiques comme par exemple Kymera, un autre laboratoire pharmaceutique également spécialisé dans le développement de PROTACs®.

a. ARV 110

ARV-110 est un PROTAC® recrutant la ligase céréblon et ciblant le récepteur aux androgènes (AR) par une molécule dérivée de l'enzalutamide, un inhibiteur des récepteurs aux androgènes.¹²⁸ ARV-110 a pour indication potentielle le traitement du cancer de la prostate métastatique résistant à la castration (mCRPC) après inefficacité des thérapeutiques existantes. L'activité de ces récepteurs joue un rôle clé dans le développement du cancer de la prostate. La capacité à réguler leur signalisation est un moyen important pour contrôler la progression de la maladie. Chez l'homme, le cancer de la prostate est le deuxième cancer le plus répandu et la deuxième cause de décès par cancer. Les traitements standards actuels de la mCRPC, sont l'enzalutamide et de l'abiratérone, mais leur efficacité peut être réduite par l'émergence de mécanismes de résistances, notamment par une augmentation de la production d'androgènes et/ou de l'expression du récepteur aux androgènes. De ce fait, jusqu'à 25% des patients ne répondent pas ou plus à ces traitements, et la grande majorité des patients qui y répondent finiront par devenir résistants. L'émergence de ces résistances se traduit par un mauvais pronostic de ce cancer. Par son mécanisme d'action catalytique PROTAC® pourrait permettre, en provoquant une dégradation de ce récepteur AR, de ne pas être impacté par sa surexpression, sa mutation ni par l'augmentation du taux d'androgène et donc résister à ces trois mécanismes courants de résistance et d'échappement aux traitements actuels.

(128) Salami, J.; et al. *Commun. Biol.* **2018**, *1* (1), 100.

Dans les études précliniques, ARV-110 a montré une activité prometteuse en tant que dégradant ciblé de l'AR. Dans des modèles sensibles à l'enzalutamide, l'ARV-110 montre une réduction de l'antigène prostatique spécifique (PSA) similaire à celle de l'enzalutamide, mais à des doses de traitement plus faibles. Dans les modèles *in vivo* de résistance, acquise et intrinsèque à l'enzalutamide, il a été démontré que ARV-110 continuait à inhiber la croissance tumorale respectivement de 70% et 100%.^{129,130} (Figure 33)

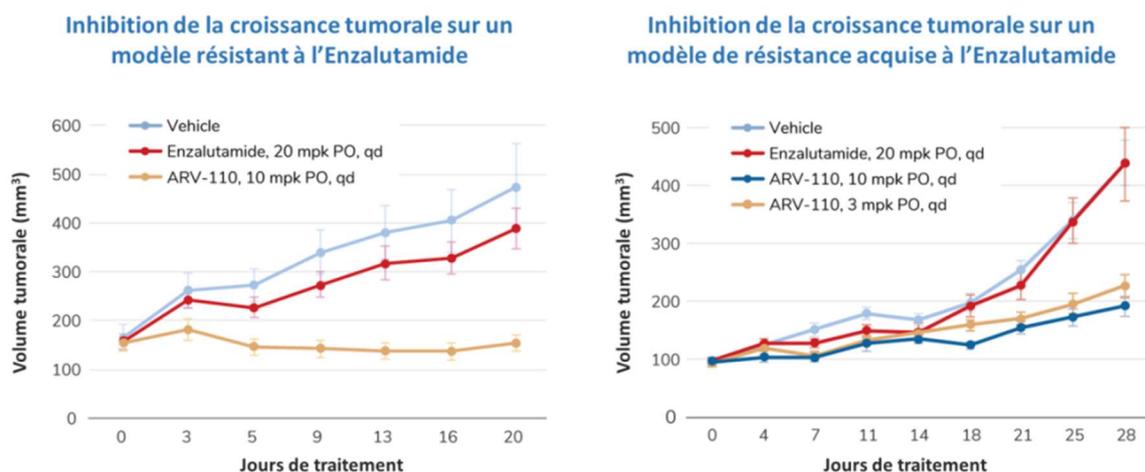


FIGURE 33: RESULTATS PRECLINIQUES D'ARV-110 SUR MODELES RESISTANTS A L'ENZALUTAMIDE

L'étude clinique d'ARV 110 est réalisée sur une cohorte de 36 patients atteints de cancer de la prostate métastatique résistant à la castration et ayant montré un échec thérapeutique à au moins deux thérapies systémiques existantes dont l'une d'entre elle est obligatoirement l'enzalutamide ou l'abiraterone avec une escalade de dose de 35 mg, 70 mg et 140 mg.¹³¹

(129) Neklesa, T.; et al. *J. Clin. Oncol.* **2019**, *37* (7_suppl), 259–259.

(130) Arvinas <https://www.arvinas.com/pipeline-programs/androgen-receptor> (accessed Mar 24, 2020).

(131) ClinicalTrials.gov NCT03888612 (accessed Mar 24, 2020).

b. ARV 471

ARV-471 est un PROTAC® recrutant la ligase céréblon par le lénalidomide et ciblant le récepteur aux œstrogènes (ER).¹³² ARV-471 a pour indication potentielle le traitement du sein localement avancé ou métastatique ER positif et HER2 négatif. Environ 80 % des cas de cancers du sein nouvellement diagnostiqués sont ER alpha-positif (ER⁺). Bien que les traitements approuvés aient produit un certain succès dans cette population de patients, de nombreux cancers du sein ER⁺ deviennent résistants aux thérapeutiques connues.

Aujourd'hui, le fulvestrant, un dégradant sélectif des récepteurs d'œstrogènes (SERD), est le traitement de référence pour le cancer du sein métastatique ER⁺ après échec d'une thérapie anti-œstrogénique. Cette molécule, un stéroïde synthétique dérivé de l'œstradiol, possède son action en fixant le récepteur aux estrogènes, le déstabilisant, provoquant son agrégation et sa dégradation par la machinerie cellulaire.¹³³

L'action pharmaceutique du fulvestrant a validé l'intérêt thérapeutique de la dégradation du récepteur ER. Cependant, jusqu'à 50 % des récepteurs peuvent subsister par mécanisme de résistance après une durée prolongée de traitement conduisant à un mauvais pronostic du patient. De récentes évaluations montrent que ce mécanisme de résistance serait provoqué par l'émergence de résistance par mutation du gène PIK3CA codant pour une sous-unité catalytique de la protéine PI₃K impliquée dans la voie biologique MAPK/ERK.¹³⁴

Contrairement au fulvestrant, qui est administré par injection intramusculaire, ARV-471, est une thérapie orale en cours de développement pour le traitement des femmes atteintes d'un cancer du sein métastatique ER⁺/HER2⁻. Dans les études précliniques, ARV-471 a montré une activité prometteuse en tant que dégradant des récepteurs ER en montrant une inhibition supérieure de la croissance tumorale par rapport au fulvestrant. La puissance d'ARV-471 a été montrée en monothérapie mais également en association avec des inhibiteurs de CDK4/6 connus pour améliorer l'activité du fulvestrant lorsqu'ils lui sont associés. En effet, il a été montré que les dysfonctionnements de la voie cycline D-kinases dépendante des cyclines (CDK) 4/6-INK4 contribuaient au mécanisme de résistance à l'hormonothérapie.^{133,135,136}

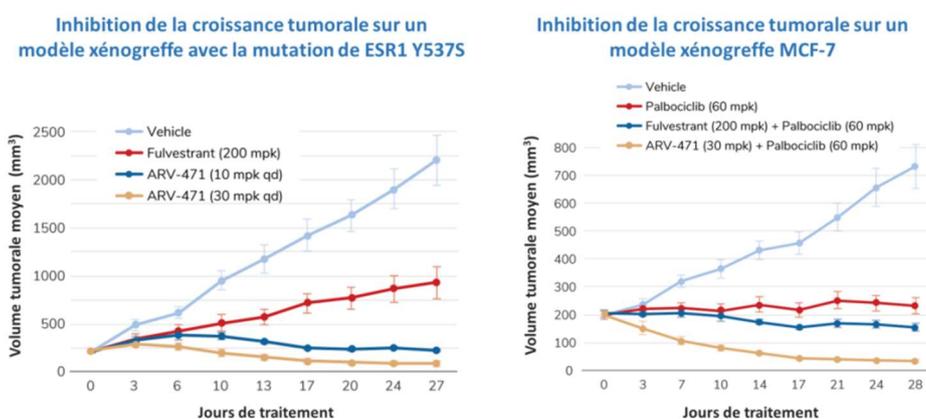


FIGURE 34: RESULTAT PRECLINIQUES D'ARV-741 SUR MODELES XENOGREFFE

(132) patent/US20180237418A1/en - Google Patents. US20180237418A1, January 26, 2018.

(133) Flanagan, J. J.; et al. 1. Poster presentation Arvinas, 2018

(134) Huang, D.; et al. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* 2017, 1868 (1), 148–156.

(135) Shah, M.; et al. *Oncol. Williston Park N* 2018, 32 (5), 216–222.

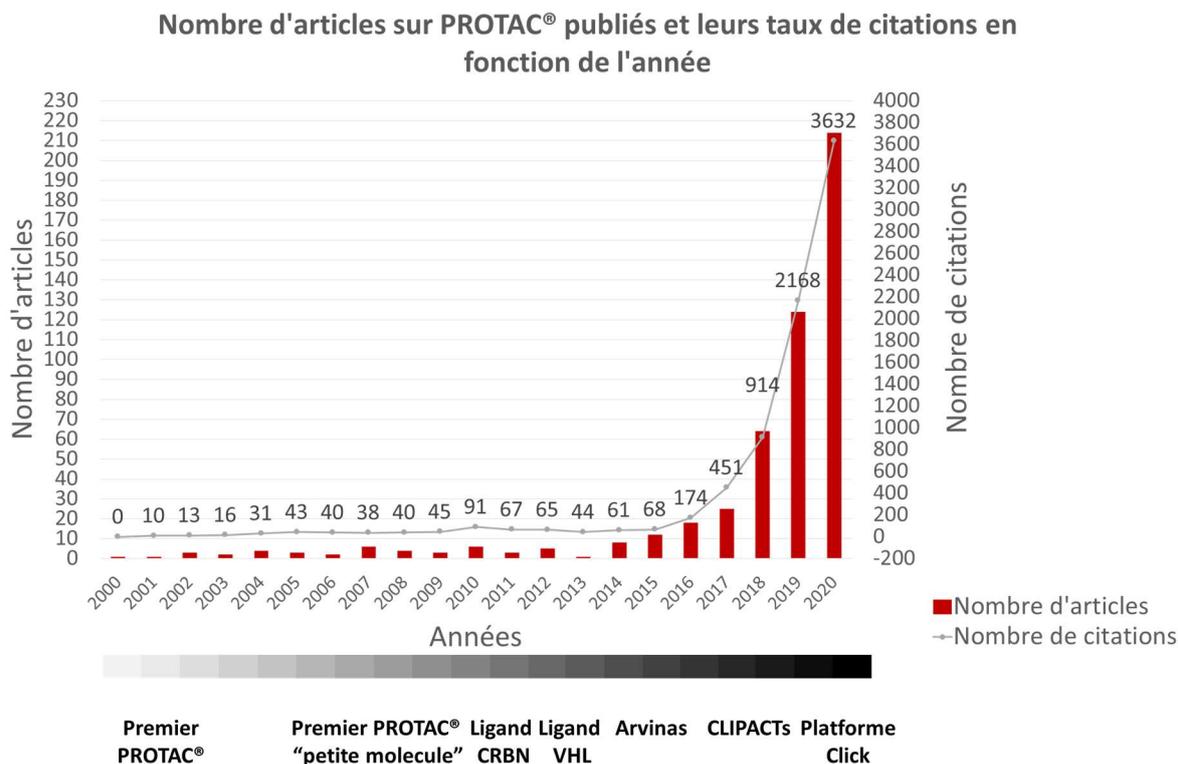
(136) <https://www.arvinas.com/pipeline-programs/estrogen-receptor> (accessed Mar 24, 2020).

3. Vers une arrivée en thérapeutique

De plus en plus d'articles scientifiques décrivant des PROTACs® paraissent chaque année. Cette explosion du nombre d'articles sur PROTAC® ainsi que leur taux de citation montrent l'effort réalisé par la communauté scientifique dans le développement de cette technique (Figure 35).

De nombreux PROTACs® sont désormais décrits, et ce avec diverses applications, permettant une meilleure compréhension des mécanismes biologiques associés à cette dégradation protéique mais également sur les mécanismes de liaisons des composés à leurs cibles permettant un design plus rationnel lors du développement et de la synthèse des composés de ce type.

Deux molécules PROTACs® ont déjà réussi à atteindre la phase 1 d'essai clinique et les progrès dans la compréhension et le développement de ces composés vont permettre d'aider le développement pharmaceutique de futurs composés PROTACs® leur permettant ainsi d'arriver sur le marché et d'être utilisés comme thérapeutiques dans diverses pathologies.



Le graphique représentant le nombre d'article PROTAC® et leur taux de citation de 2000 à 2020 a été généré par www.webofknowledge.com, mot clé « PROTAC® » et en excluant « protein C activator » sur toute les bases de données disponibles le 22/12/2020.

FIGURE 35: GRAPHIQUE DU NOMBRE D'ARTICLES PROTAC® ET DE LEURS CITATIONS EN FONCTION DE L'ANNEE

Le développement pharmaceutique d'un médicament est un processus long et coûteux prenant généralement entre 10 et 15 ans entre la découverte de la molécule active et son autorisation par les autorités de santé permettant sa mise sur le marché et son utilisation thérapeutique par les patients. (Figure 36)

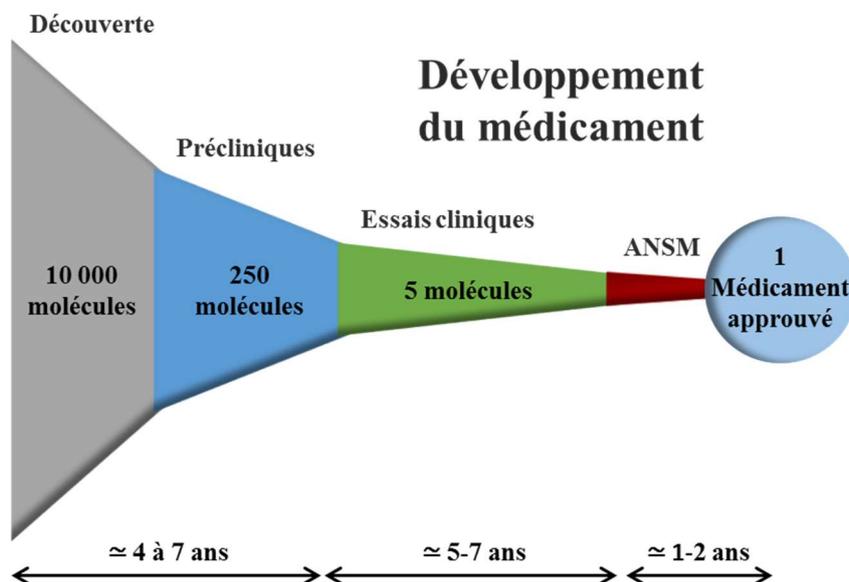


FIGURE 36: SCHEMA DES ETAPES DU DEVELOPPEMENT DU MEDICAMENT

En prenant en compte le temps du processus de développement et de mise sur le marché d'un médicament, encore plusieurs années de recherches et de développement sont à prévoir avant de voir une molécule PROTAC® arriver sur le marché.

CONCLUSION

PROTAC[®] (PROteolysis Targeting Chimeras) est une nouvelle approche de l'utilisation de petites molécules en thérapeutique ou en temps qu'outils chimiques d'exploration du vivant. Premièrement décrites par C. Crews et son équipe en 2001, elles connaissent depuis ces quelques dernières années un essor, avec notamment le premier PROTAC[®] composé uniquement de petites "molécules" en 2008. De nombreux composés commencent ainsi à être décrits améliorant les connaissances scientifiques dans ce domaine. Ces molécules hybrides bi-fonctionnelles lient à la fois l'ubiquitine ligase (E3) et une protéine cible entraînant sa polyubiquitination par le complexe ubiquitine ligase E3 provoquant sa dégradation par système ubiquitine-protéasome (UPS). Il s'agit d'une nouvelle approche des petites molécules qui pourrait offrir des interventions thérapeutiques dépassant les limites des approches actuelles et offrir des avantages considérables sur la robustesse et la sécurité thérapeutique du traitement. En effet, la stratégie thérapeutique actuelle, basée sur l'action directe de la molécule sur sa cible, ne permet pas de cibler toutes les protéines. Contrairement aux PROTAC[®] qui elles catalysent la dégradation des protéines cibles ce qui augmenterait les possibilités de traitement en ciblant des protéines jusque-là inexplorées. De plus, le mécanisme catalytique permis par PROTAC[®] permettrait de diminuer voire d'éviter la survenue de résistance aux traitements, entraînant un échappement thérapeutique, et permettrait une diminution de la concentration plasmatique nécessaire pour avoir un effet ceci permettant de diminuer la survenue d'effets indésirables.

A ce jour, aucune molécule PROTAC[®] n'existe sur le marché mais très récemment deux PROTACs[®] ont franchi une barrière qui est celle de l'évaluation chez l'Homme en entrant en phase 1 d'essai clinique montrant que ces types de molécules, autrefois controversées, pourraient avoir leur place en thérapeutique et être utilisées comme traitement chez l'Homme.

ANNEXE

E3	Ligand E3	Ligand de la POI	Protéines d'intérêts
MDM2	nutlin3	Ligand non stéroïdien des AR	AR ⁷⁵
		Dérivé du Niraparid	PARP1 ¹³⁷
	idasanutlin	JQ1	BRD4 ⁷⁴
IAP	bestatin	ATRA	CRABPs ^{138,139}
		Ch55	RAR α ¹⁴⁰
		dihydrotestostérone	AR ¹⁴⁰
		estrone, 4-OHT	ER α ¹⁴⁰⁻¹⁴²
	Inhibiteur d'IAP	Inhibiteur de JAK	JAK1,2, 3 et TYK2 ¹⁴³
		ibrutinib	BTK ⁶⁶
		navitoclax	BCL-X _L ¹⁴⁴
	Dérivé LCL161	4-OHT	ER α ¹⁴⁵
		JQ1	BRD4 ¹⁴⁶
		Inhibiteur de PDE4	PDE4 ¹⁴⁶
		dasatinib ; asciminib	BCR-ABL ^{146,147}
		Antagoniste AR : bicalutamide	AR ¹⁴⁸
		palbociclib	CDK4/6 ¹⁴⁹
APC/C	bestatin	KHS101	TACC3 ⁷⁸
RNF-114	nimbolide	dasatinib	BCR-ABL ¹⁵⁰
VHL	VH032	ligand basé sur la thiazolidinedione	ERR α ⁶⁷
		Inhibiteur de RIPK2	RIPK2 ⁶⁷
		JQ1 changer REF	BRD2/3/4 ^{82,151}
		JQ1	BRD4 ^{74,152}
		lapatinib	HER1 ¹⁵³
		foretinib	C-Met, p38, 9 kinases ^{71,153,154}
		enzalutamide	AR ¹²⁸
		IACS-7e	TRIM24 ¹⁵⁵
		TBK1 ligand	TBK1 ¹⁵⁶
		ceritinib	Protéine ALK ¹⁵⁷
		Dérivé d'hydroxyproline	VHL ¹⁵⁸
		dasatinib	C-ABL ⁷⁹
		HG-7-85-01	BCR-ABL ^{147,159}
		AC220	FLT3 ¹⁶⁰
		defactinib	Fak ¹⁶¹
		Dérivé benzamide inhibiteur d'HDACs	HDAC1/2 et 3 ¹⁶²
		palbociclib	CDK4/6 ¹⁴⁹
		brigatinib	ALK ¹⁶³
		Inhibiteur spécifique EGFR XTF-262, genfitinib	EGFR ¹⁶⁴⁻¹⁶⁶
		nexturastat A	HDAC6 ¹⁶⁷
		Inhibiteur de BCL-2/BCL-XL: navitoclax	BCL-X _L ^{90,168}
		Dérivé du raloxifène	ER α ¹⁶⁹
		Inhibiteur d'EGFR	EGFR ^{170,171}
ARI-16	AR ^{172,173}		

		Ligand dérivé d'EED226	PRC2 ¹⁷⁴
		JQ1	BRD2/4 ¹⁷⁵
		Ligand d'IRAK4 : PF-06650833	IRAK4 ¹⁷⁶
		Ligand ER	ER α ¹⁷⁷
		Inhibiteur SGK 308-R	SGK3 ¹⁷⁸
		MRTX849	KRAS ^{G12C} 179
		Inhibiteur d'SHP2 dérivé de SHP099	SHP2 ¹⁸⁰
		Ligand de l' α -Synucléine (α -syn)	α -syn ¹⁸¹
		RU-59063	AR ¹⁸²
		foretinib	MAPK p38 α & p38 β ⁸¹
		ABT-869	VEGFR-2 ¹⁸³
		SR-3558	HDAC3 ¹⁸⁴
		Ligand de SMARCA 2/4	SMARCA 2/4 ¹⁸⁵
	Dérivé du VH032	JQ1	BRD4 ^{82,186}
		chloroalkane	protéines de fusion HaloTag ⁷¹⁸⁷
		raloxigène	ER ⁷³
	Dérivé du VH298	antagonist AR	AR ⁸⁴
		BrdL1	BRD7/9, BET ⁷²
		Dérivé de l'inhibiteur KRAS 2	KRAS ¹⁸⁸
CRBN	pomalidomide	OTX015	BRD4 ^{99,189}
		BI-7273	BRD9 ¹⁹⁰
		wogonin	CDK9 ¹⁹¹
		AC220	FLT3 ¹⁹²
		RN486, dérivé d'ibrutinib, dérivé phényl pyrazole	BTK ^{101,193,194}
		ZSTK474	PI3K ¹⁹⁵
		ceritinib	protéines fusion ALK ¹⁹⁶
		CX-4945	CK2 ¹⁹⁷
		bosutinib, dasatinib	BCR-ABL/c-ABL ^{79,147}
		foretinif	14 kinases ⁷¹
		palbociclib	CDK4/6 ^{106,149,198}
		palbociclib	CDK2 ou CDK9 sélectif ¹⁴⁹
		palbociclib	CDK6 ¹⁹⁹
		Inhibiteur non sélectif d'HDAC : tubastatine A	HDAC6 ⁸⁹
		Inhibiteur sélectif d'HDAC6 : nexturastat A	HDAC6 ²⁰⁰
		BCL-2/BCL-XL Double inhibiteur : navitoclax	BCL-X _L ⁹⁰
		α -naphthoflavone	CYP1B1 ²⁰¹
		Dérivé de l'ibrutinib	Kinases BTK et BLK ²⁰²
		Inhibiteur BET sélectif BD1	BRD2/4 ²⁰³
		BI2536	BRD4 and PLK1 ²⁰⁴

	Ligand d'IRAK4	IRAK 4 ²⁰⁵
	dasatinib	TrkC ²⁰⁶
	entrectinib et GNF-8625	TRK ²⁰⁷
	Inhibiteur Bcl-2/Mcl-1	Bcl-2 and Mcl-1 ²⁰⁸
	rapamycine	FKBP12 ²⁰⁹
	Dérivé de l'epacadostat	IDO ₁ ²¹⁰
	Structure commune de deux ligands	IGF-1R et Src ²¹¹
	BMS-8	PD-L1 ²¹²
	Ligand SLC9A1	SLC Transporters ²¹³
	Dérivé de la deltazinone	PDE δ ²¹⁴
	PH-797804	MAPK p38 α & p38 β ²¹⁵
	Olaparib, veliparib et rucaparib	PARP1 ²¹⁶
	C1994	HDAC3 ²¹⁷
	Ligand de FAK : PF562271	FAK ²¹⁸
	epacadostat	IDO ₁ ²¹⁰
	prazosin	α_{1A} -AR ²¹⁹
thalidomide	SLF	FKBP12 ²²⁰
	JQ1, BETi-211	BRD2/3/4 ^{220,221}
	JQ1, JQ1-TCO	BRD4 ^{108,222}
	Dérivé d'aminopyrazole, SNS-032	CDK9 ^{223,224}
	Dérivé de 5-chloropyrimidine	BCL6 ²²⁵
	Analogue SirReal	Sirt2 ⁸⁷
	GSK4027	PCAF/GCN5 ²²⁶
	BrdL1	BRD9 ⁷²
	Apcin-A	Cdc20 ²²⁷
	A484954	eEF2K ²²⁸
	tinostamustine	HDAC ²²⁹
	Dérivé de Pyrrolotriazine (AZ)	IRAK3 ²³⁰
	alisertib	Kinase AURORA-A ²²⁴
	Acide pseudolaric	CD147 ²³¹
Analogue tricycle de la thalidomide	télaprevir	NS3/A4 protease ¹²⁷
lenalidomide	HJB97	BRD2/3/4 ¹⁰⁹
	QCA276	BRD2/3/4 ²³²
	I-BRD9	BRD7/9, BET ¹⁹⁰
	MI-1061	MDM2 ^{233,234}
	dasatinib	BCR-ABL ²³⁵
	Inhibiteur d'EGFR	EGFR ¹⁷⁰
	Inhibiteur non sélectif d'AKT : ipatasertib	AKT ²³⁶
	CJ-887	STAT3 ²³⁷
	Ligand d'IRAK4	IRAK4 ²⁰⁵
	JQ1	BET protein ²³⁸
	ibrutinib	BTK ⁶⁶

TABEAU 1: LISTE DES PROTACS[®] PUBLIES A CE JOUR SUR LA PATEFORME PUBMED

1. Wilk, S. & Orłowski, M. Evidence that Pituitary Cation-Sensitive Neutral Endopeptidase Is a Multicatalytic Protease Complex. *J. Neurochem.* **40**, 842–849 (1983).
2. The Nobel Prize in Chemistry 2004. *NobelPrize.org*
<https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2004/summary/>.
3. Schweitzer, A. *et al.* Structure of the human 26S proteasome at a resolution of 3.9 Å. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 7816–7821 (2016).
4. Tanaka, K. The proteasome: overview of structure and functions. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* **85**, 12–36 (2009).
5. Unno, M. *et al.* The Structure of the Mammalian 20S Proteasome at 2.75 Å Resolution. *Structure* **10**, 609–618 (2002).
6. Groll, M. *et al.* Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4Å resolution. *Nature* **386**, 463–471 (1997).
7. Rabl, J. *et al.* Mechanism of Gate Opening in the 20S Proteasome by the Proteasomal ATPases. *Mol. Cell* **30**, 360–368 (2008).
8. Stadtmueller, B. M. & Hill, C. P. Proteasome activators. *Mol. Cell* **41**, 8–19 (2011).
9. Rosenzweig, R., Osmulski, P. A., Gaczynska, M. & Glickman, M. H. The central unit within the 19S regulatory particle of the proteasome. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 573–580 (2008).
10. Lander, G. C. *et al.* Complete subunit architecture of the proteasome regulatory particle. *Nature* **482**, 186–191 (2012).
11. Yu, Y. *et al.* Interactions of PAN's C-termini with archaeal 20S proteasome and implications for the eukaryotic proteasome-ATPase interactions. *EMBO J.* **29**, 692–702 (2010).
12. Bard, J. A. M. *et al.* Structure and Function of the 26S Proteasome. *Annu. Rev. Biochem.* **87**, 697–724 (2018).
13. Kenniston, J. A., Baker, T. A., Fernandez, J. M. & Sauer, R. T. Linkage between ATP Consumption and Mechanical Unfolding during the Protein Processing Reactions of an AAA+ Degradation Machine. *Cell* **114**, 511–520 (2003).
14. Collins, G. A. & Goldberg, A. L. The Logic of the 26S Proteasome. *Cell* **169**, 792–806 (2017).
15. Verma, R. *et al.* Role of Rpn11 Metalloprotease in Deubiquitination and Degradation by the 26S Proteasome. *Science* **298**, 611–615 (2002).
16. Thibaudeau, T. A. & Smith, D. M. A Practical Review of Proteasome Pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **71**, 170–197 (2019).
17. Nagata, S. Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells. *Annu. Rev. Immunol.* **36**, 489–517 (2018).
18. Gandolfi, S. *et al.* The proteasome and proteasome inhibitors in multiple myeloma. *Cancer Metastasis Rev.* **36**, 561–584 (2017).
19. Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. Cancer statistics, 2017. *CA. Cancer J. Clin.* **67**, 7–30 (2017).
20. Jung, T., Catalgol, B. & Grune, T. The proteasomal system. *Mol. Aspects Med.* **30**, 191–296 (2009).
21. A novel orally active proteasome inhibitor induces apoptosis in multiple myeloma cells with mechanisms distinct from Bortezomib. *Cancer Cell* **8**, 407–419 (2005).
22. Adams, J. *et al.* Potent and selective inhibitors of the proteasome: Dipeptidyl boronic acids. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **8**, 333–338 (1998).
23. Merin, N. M. & Kelly, K. R. Clinical Use of Proteasome Inhibitors in the Treatment of Multiple Myeloma. *Pharmaceuticals* **8**, 1–20 (2014).
24. Kaplan, G. S., Torcun, C. C., Grune, T., Ozer, N. K. & Karademir, B. Proteasome inhibitors in cancer therapy: Treatment regimen and peripheral neuropathy as a side effect. *Free Radic. Biol. Med.* **103**, 1–13 (2017).
25. Alé, A., Bruna, J., Navarro, X. & Udina, E. Neurotoxicity induced by antineoplastic proteasome inhibitors. *NeuroToxicology* **43**, 28–35 (2014).

26. Argyriou, A. A., Iconomou, G. & Kalofonos, H. P. Bortezomib-induced peripheral neuropathy in multiple myeloma: a comprehensive review of the literature. *Blood* **112**, 1593–1599 (2008).
27. Callis, J., Raasch, J. A. & Vierstra, R. D. Ubiquitin extension proteins of *Arabidopsis thaliana*. Structure, localization, and expression of their promoters in transgenic tobacco. *J. Biol. Chem.* **265**, 12486–12493 (1990).
28. Peters, J.-M., Harris, J. R. & Finley, D. *Ubiquitin and the Biology of the Cell*. (Springer Science & Business Media, 2013).
29. El-Baba, T. J. *et al.* Melting Proteins: Evidence for Multiple Stable Structures upon Thermal Denaturation of Native Ubiquitin from Ion Mobility Spectrometry-Mass Spectrometry Measurements. *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 6306–6309 (2017).
30. Liu, F. *et al.* An experimental survey of the transition between two-state and downhill protein folding scenarios. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 2369–2374 (2008).
31. Waegele, M. M. & Gai, F. Power-law dependence of the melting temperature of ubiquitin on the volume fraction of macromolecular crowders. *J. Chem. Phys.* **134**, 095104 (2011).
32. Lange, O. F. *et al.* Recognition Dynamics Up to Microseconds Revealed from an RDC-Derived Ubiquitin Ensemble in Solution. *Science* **320**, 1471 (2008).
33. Callis, J. The Ubiquitination Machinery of the Ubiquitin System. *Arab. Book Am. Soc. Plant Biol.* **12**, (2014).
34. Winget, J. M. & Mayor, T. The Diversity of Ubiquitin Recognition: Hot Spots and Varied Specificity. *Mol. Cell* **38**, 627–635 (2010).
35. Sadowski, M., Suryadinata, R., Tan, A. R., Roesley, S. N. A. & Sarcevic, B. Protein monoubiquitination and polyubiquitination generate structural diversity to control distinct biological processes. *IUBMB Life* **64**, 136–142 (2012).
36. Maor, R. *et al.* Multidimensional protein identification technology (MudPIT) analysis of ubiquitinated proteins in plants. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **6**, 601–610 (2007).
37. Kim, D.-Y., Scalf, M., Smith, L. M. & Vierstra, R. D. Advanced proteomic analyses yield a deep catalog of ubiquitylation targets in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **25**, 1523–1540 (2013).
38. Xu, P. *et al.* Quantitative Proteomics Reveals the Function of Unconventional Ubiquitin Chains in Proteasomal Degradation. *Cell* **137**, 133–145 (2009).
39. Meierhofer, D., Wang, X., Huang, L. & Kaiser, P. Quantitative Analysis of global Ubiquitination in HeLa Cells by Mass Spectrometry. *J. Proteome Res.* **7**, 4566–4576 (2008).
40. Emmerich, C. H. & Cohen, P. Optimising methods for the preservation, capture and identification of ubiquitin chains and ubiquitylated proteins by immunoblotting. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **466**, 1–14 (2015).
41. Iconomou, M. & Saunders, D. N. Systematic approaches to identify E3 ligase substrates. *Biochem. J.* **473**, 4083–4101 (2016).
42. Li, W. & Ye, Y. Polyubiquitin chains: functions, structures, and mechanisms. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **65**, 2397–2406 (2008).
43. Ye, Y. & Rape, M. Building ubiquitin chains: E2 enzymes at work. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 755–764 (2009).
44. Maupin-Furlow, J. Proteasomes and protein conjugation across domains of life. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**, 100–111 (2012).
45. van Wijk, S. J. L. *et al.* A comprehensive framework of E2–RING E3 interactions of the human ubiquitin–proteasome system. *Mol. Syst. Biol.* **5**, 295 (2009).
46. Berndsen, C. E. & Wolberger, C. New insights into ubiquitin E3 ligase mechanism. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **21**, 301–307 (2014).
47. Deshaies, R. J. & Joazeiro, C. A. P. RING Domain E3 Ubiquitin Ligases. *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 399–434 (2009).
48. Borden, K. L. B. RING domains: master builders of molecular scaffolds? Edited by P. E. Wright. *J. Mol. Biol.* **295**, 1103–1112 (2000).

49. Tasaki, T., Sriram, S. M., Park, K. S. & Kwon, Y. T. The N-end rule pathway. *Annu. Rev. Biochem.* **81**, 261–289 (2012).
50. Eisenhaber, B., Chumak, N., Eisenhaber, F. & Hauser, M.-T. The ring between ring fingers (RBR) protein family. *Genome Biol.* **8**, 209 (2007).
51. Finley, D. Recognition and Processing of Ubiquitin-Protein Conjugates by the Proteasome. *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 477–513 (2009).
52. Mansour, M. A. Ubiquitination: Friend and foe in cancer. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **101**, 80–93 (2018).
53. Alpi, A. F., Pace, P. E., Babu, M. M. & Patel, K. J. Mechanistic Insight into Site-Restricted Monoubiquitination of FANCD2 by Ube2t, FANCL, and FANCI. *Mol. Cell* **32**, 767–777 (2008).
54. Su, S., Zhang, Y. & Liu, P. Roles of Ubiquitination and SUMOylation in DNA Damage Response. *Curr. Issues Mol. Biol.* 59–84 (2020) doi:10.21775/cimb.035.059.
55. Komander, D. & Rape, M. The Ubiquitin Code. *Annu. Rev. Biochem.* **81**, 203–229 (2012).
56. Rahighi, S. *et al.* Specific Recognition of Linear Ubiquitin Chains by NEMO Is Important for NF- κ B Activation. *Cell* **136**, 1098–1109 (2009).
57. Chastagner, P., Israël, A. & Brou, C. Itch/AIP4 mediates Deltex degradation through the formation of K29-linked polyubiquitin chains. *EMBO Rep.* **7**, 1147–1153 (2006).
58. Feng, L. & Chen, J. The E3 ligase RNF8 regulates KU80 removal and NHEJ repair. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 201–206 (2012).
59. Swatek, K. N. & Komander, D. Ubiquitin modifications. *Cell Res.* **26**, 399 (2016).
60. Churcher, I. PROTAC-Induced Protein Degradation in Drug Discovery: Breaking the Rules or Just Making New Ones? *J. Med. Chem.* **61**, 444–452 (2018).
61. Sakamoto, K. M. *et al.* PROTacs: chimeric molecules that target proteins to the Skp1-Cullin-F box complex for ubiquitination and degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 8554–8559 (2001).
62. josh@comocreative.com. Crews Laboratory. <http://crewslab.yale.edu/>.
63. Paiva, S.-L. & Crews, C. M. Targeted protein degradation: elements of PROTAC design. *Gener. Ther.* **50**, 111–119 (2019).
64. Scheffner, M., Huibregtse, J. M., Vierstra, R. D. & Howley, P. M. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* **75**, 495–505 (1993).
65. Webinar: From Kyprolis to PROTACs — Insights with Amgen’s Ray Deshaies. *Collaborative Drug Discovery Inc. (CDD)* <https://www.collaborativedrug.com/recorded-webinar-kyprolis-protacs-insights-amgen-ray-deshais/> (2020).
66. Tinworth, C. P. *et al.* PROTAC-Mediated Degradation of Bruton’s Tyrosine Kinase Is Inhibited by Covalent Binding. *ACS Chem. Biol.* **14**, 342–347 (2019).
67. Bondeson, D. P. *et al.* Catalytic in vivo protein knockdown by small-molecule PROTACs. *Nat. Chem. Biol.* **11**, 611–617 (2015).
68. Pettersson, M. & Crews, C. M. PROTeolysis TArgeting Chimeras (PROTACs) — Past, present and future. *Drug Discov. Today Technol.* **31**, 15–27 (2019).
69. Roy, M. J. *et al.* SPR-Measured Dissociation Kinetics of PROTAC Ternary Complexes Influence Target Degradation Rate. *ACS Chem. Biol.* **14**, 361–368 (2019).
70. Xi, M. *et al.* Small molecule PROTACs in targeted therapy: An emerging strategy to induce protein degradation. *Eur. J. Med. Chem.* **174**, 159–180 (2019).
71. Bondeson, D. P. *et al.* Lessons in PROTAC Design from Selective Degradation with a Promiscuous Warhead. *Cell Chem. Biol.* **25**, 78-87.e5 (2018).
72. Zoppi, V. *et al.* Iterative Design and Optimization of Initially Inactive Proteolysis Targeting Chimeras (PROTACs) Identify VZ185 as a Potent, Fast, and Selective von Hippel–Lindau (VHL) Based Dual Degradation Probe of BRD9 and BRD7. *J. Med. Chem.* **62**, 699–726 (2019).
73. Hu, J. *et al.* Discovery of ERD-308 as a Highly Potent Proteolysis Targeting Chimera (PROTAC) Degradation of Estrogen Receptor (ER). *J. Med. Chem.* **62**, 1420–1442 (2019).

74. Hines, J., Lartigue, S., Dong, H., Qian, Y. & Crews, C. M. MDM2-Recruiting PROTAC Offers Superior, Synergistic Antiproliferative Activity via Simultaneous Degradation of BRD4 and Stabilization of p53. *Cancer Res.* **79**, 251–262 (2019).
75. Schneekloth, A. R., Pucheault, M., Tae, H. S. & Crews, C. M. Targeted intracellular protein degradation induced by a small molecule: En route to chemical proteomics. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18**, 5904–5908 (2008).
76. Onyx strikes \$851M deal to buy Proteolix. *FierceBiotech* <https://www.fiercebitech.com/biotech/onyx-strikes-851m-deal-to-buy-proteolix>.
77. Blaquiére, N., Villemure, E. & Staben, S. T. Medicinal Chemistry of Inhibiting RING-Type E3 Ubiquitin Ligases. *J. Med. Chem.* (2020) doi:10.1021/acs.jmedchem.9b01451.
78. Ohoka, N. *et al.* Cancer cell death induced by novel small molecules degrading the TACC3 protein via the ubiquitin–proteasome pathway. *Cell Death Dis.* **5**, e1513–e1513 (2014).
79. Lai, A. C. *et al.* Modular PROTAC Design for the Degradation of Oncogenic BCR-ABL. *Angew. Chem. Int. Ed.* **55**, 807–810 (2016).
80. Drummond, M. L. & Williams, C. I. In Silico Modeling of PROTAC-Mediated Ternary Complexes: Validation and Application. *J. Chem. Inf. Model.* **59**, 1634–1644 (2019).
81. Smith, B. E. *et al.* Differential PROTAC substrate specificity dictated by orientation of recruited E3 ligase. *Nat. Commun.* **10**, 131–131 (2019).
82. Gadd, M. S. *et al.* Structural basis of PROTAC cooperative recognition for selective protein degradation. *Nat. Chem. Biol.* **13**, 514–521 (2017).
83. Wang, Y., Jiang, X., Feng, F., Liu, W. & Sun, H. Degradation of proteins by PROTACs and other strategies. *Acta Pharm. Sin. B* **10**, 207–238 (2020).
84. Han, X. *et al.* Discovery of ARD-69 as a Highly Potent Proteolysis Targeting Chimera (PROTAC) Degradator of Androgen Receptor (AR) for the Treatment of Prostate Cancer. *J. Med. Chem.* **62**, 941–964 (2019).
85. Wurz, R. P. *et al.* A “Click Chemistry Platform” for the Rapid Synthesis of Bispecific Molecules for Inducing Protein Degradation. *J. Med. Chem.* **61**, 453–461 (2018).
86. Cyrus, K. *et al.* Impact of linker length on the activity of PROTACs. *Mol. Biosyst.* **7**, (2011).
87. Schiedel, M. *et al.* Chemically Induced Degradation of Sirtuin 2 (Sirt2) by a Proteolysis Targeting Chimera (PROTAC) Based on Sirtuin Rearranging Ligands (SirReals). *J. Med. Chem.* **61**, 482–491 (2018).
88. Bozorov, K., Zhao, J. & Aisa, H. A. 1,2,3-Triazole-containing hybrids as leads in medicinal chemistry: A recent overview. *Bioorg. Med. Chem.* **27**, 3511–3531 (2019).
89. Yang, K. *et al.* Development of the first small molecule histone deacetylase 6 (HDAC6) degraders. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **28**, 2493–2497 (2018).
90. Zhang, X. *et al.* Discovery of PROTAC BCL-XL degraders as potent anticancer agents with low on-target platelet toxicity. *Eur. J. Med. Chem.* **192**, 112186 (2020).
91. Chan, K.-H., Zengerle, M., Testa, A. & Ciulli, A. Impact of Target Warhead and Linkage Vector on Inducing Protein Degradation: Comparison of Bromodomain and Extra-Terminal (BET) Degradators Derived from Triazolodiazepine (JQ1) and Tetrahydroquinoline (I-BET726) BET Inhibitor Scaffolds. *J. Med. Chem.* **61**, 504–513 (2018).
92. Neklesa, T. K., Winkler, J. D. & Crews, C. M. Targeted protein degradation by PROTACs. *Pharmacol. Ther.* **174**, 138–144 (2017).
93. Rask-Andersen, M., Almén, M. S. & Schiöth, H. B. Trends in the exploitation of novel drug targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* **10**, 579 (2011).
94. Hopkins, A. L. & Groom, C. R. The druggable genome. *Nat. Rev. Drug Discov.* **1**, 727–730 (2002).
95. Toure, M. & Crews, C. M. Small-Molecule PROTACS: New Approaches to Protein Degradation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **55**, 1966–1973 (2016).
96. Martínez Molina, D. & Nordlund, P. The Cellular Thermal Shift Assay: A Novel Biophysical Assay for In Situ Drug Target Engagement and Mechanistic Biomarker Studies. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **56**, 141–161 (2016).

97. Cai, C. *et al.* Androgen Receptor Gene Expression in Prostate Cancer Is Directly Suppressed by the Androgen Receptor Through Recruitment of Lysine-Specific Demethylase 1. *Cancer Cell* **20**, 457–471 (2011).
98. Duan, Y. *et al.* Targeting Brd4 for cancer therapy: inhibitors and degraders. *MedChemComm* **9**, 1779–1802 (2018).
99. Lu, J. *et al.* Hijacking the E3 Ubiquitin Ligase Cereblon to Efficiently Target BRD4. *Chem. Biol.* **22**, 755–763 (2015).
100. Zaal, E. A. *et al.* Bortezomib resistance in multiple myeloma is associated with increased serine synthesis. *Cancer Metab.* **5**, (2017).
101. Buhimschi, A. D. *et al.* Targeting the C481S Ibrutinib-Resistance Mutation in Bruton's Tyrosine Kinase Using PROTAC-Mediated Degradation. *Biochemistry* **57**, 3564–3575 (2018).
102. Dana, H. *et al.* Molecular Mechanisms and Biological Functions of siRNA. *Int. J. Biomed. Sci. IJBS* **13**, 48–57 (2017).
103. Jiang, F. & Doudna, J. A. CRISPR–Cas9 Structures and Mechanisms. *Annu. Rev. Biophys.* **46**, 505–529 (2017).
104. Lai, A. C. & Crews, C. M. Induced protein degradation: an emerging drug discovery paradigm. *Nat. Rev. Drug Discov.* **16**, 101–114 (2017).
105. Edmondson, S. D., Yang, B. & Fallan, C. Proteolysis targeting chimeras (PROTACs) in 'beyond rule-of-five' chemical space: Recent progress and future challenges. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **29**, 1555–1564 (2019).
106. Wei, M. *et al.* First orally bioavailable prodrug of proteolysis targeting chimera (PROTAC) degrades cyclin-dependent kinases 2/4/6 *in vivo*. *Eur. J. Med. Chem.* **209**, 112903 (2021).
107. Huisgen, R. 1,3-Dipolar Cycloadditions. Past and Future. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2**, 565–598 (1963).
108. Lebraud, H., Wright, D. J., Johnson, C. N. & Heightman, T. D. Protein Degradation by In-Cell Self-Assembly of Proteolysis Targeting Chimeras. *ACS Cent. Sci.* **2**, 927–934 (2016).
109. Zhou, B. *et al.* Discovery of a Small-Molecule Degradator of Bromodomain and Extra-Terminal (BET) Proteins with Picomolar Cellular Potencies and Capable of Achieving Tumor Regression. *J. Med. Chem.* **61**, 462–481 (2018).
110. Krajcovicova, S., Jorda, R., Hendrychova, D., Krystof, V. & Soural, M. Solid-phase synthesis for thalidomide-based proteolysis-targeting chimeras (PROTAC). *Chem. Commun.* **55**, 929–932 (2019).
111. Li, J. & Kao, W. J. Synthesis of Polyethylene Glycol (PEG) Derivatives and PEGylated–Peptide Biopolymer Conjugates. *Biomacromolecules* **4**, 1055–1067 (2003).
112. Buckley, D. L. *et al.* Targeting the von Hippel–Lindau E3 Ubiquitin Ligase Using Small Molecules To Disrupt the VHL/HIF-1 α Interaction. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 4465–4468 (2012).
113. van Zundert, G. C. P. *et al.* The HADDOCK2.2 Web Server: User-Friendly Integrative Modeling of Biomolecular Complexes. *J. Mol. Biol.* **428**, 720–725 (2016).
114. Oliveira, B. L., Guo, Z. & Bernardes, G. J. L. Inverse electron demand Diels–Alder reactions in chemical biology. *Chem. Soc. Rev.* **46**, 4895–4950 (2017).
115. Patterson, D. M., Nazarova, L. A. & Prescher, J. A. Finding the Right (Bioorthogonal) Chemistry. *ACS Chem. Biol.* **9**, 592–605 (2014).
116. Banik, S., Pedram, K., Wisnovsky, S., Riley, N. & Bertozzi, C. Lysosome Targeting Chimeras (LYTACs) for the Degradation of Secreted and Membrane Proteins. (2019) doi:10.26434/chemrxiv.7927061.v2.
117. Takahashi, D. *et al.* AUTACs: Cargo-Specific Degradators Using Selective Autophagy. *Mol. Cell* **76**, 797–810.e10 (2019).
118. Li, Z., Zhu, C., Ding, Y., Fei, Y. & Lu, B. ATTEC: a potential new approach to target proteinopathies. *Autophagy* **16**, 185–187 (2020).

119. I, T., T, U. & E, K. LC3 and Autophagy. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* vol. 445 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18425443/> (2008).
120. Ding, Y., Fei, Y. & Lu, B. Emerging New Concepts of Degradation Technologies. *Trends Pharmacol. Sci.* **41**, 464–474 (2020).
121. Zou, Y., Ma, D. & Wang, Y. The PROTAC technology in drug development. *Cell Biochem. Funct.* **37**, 21–30 (2019).
122. Hubbert, C. *et al.* HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* **417**, 455–458 (2002).
123. Ren, Y. *et al.* Therapeutic effects of histone deacetylase inhibitors in a murine asthma model. *Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc. Al* **65**, 995–1008 (2016).
124. Cacace, A. & Neuroscience, V. Discovery of Brain Penetrant PROTAC® Degradation Molecules That Target Pathologic Tau and alpha-Synuclein Protein Species. 22.
125. Neuroscience • Arvinas. *Arvinas* <https://www.arvinas.com/pipeline-programs/neurodegeneration-next-generation-targets>.
126. McPhee, F. *et al.* Resistance analysis of the hepatitis C virus NS3 protease inhibitor asunaprevir. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 3670–3681 (2012).
127. de Wispelaere, M. *et al.* Small molecule degraders of the hepatitis C virus protease reduce susceptibility to resistance mutations. *Nat. Commun.* **10**, 3468 (2019).
128. Salami, J. *et al.* Androgen receptor degradation by the proteolysis-targeting chimera ARCC-4 outperforms enzalutamide in cellular models of prostate cancer drug resistance. *Commun. Biol.* **1**, 100 (2018).
129. Neklesa, T. *et al.* ARV-110: An oral androgen receptor PROTAC degrader for prostate cancer. *J. Clin. Oncol.* **37**, 259–259 (2019).
130. Androgen Receptor • Arvinas. *Arvinas* <https://www.arvinas.com/pipeline-programs/androgen-receptor>.
131. A Phase 1 Clinical Trial of ARV-110 in Patients With Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer. - Full Text View - ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03888612>.
132. Modulators of estrogen receptor proteolysis and associated methods of use - patent/US20180237418A1/en - Google Patents. (2018).
133. Flanagan, J. J. *et al.* ARV-471, an oral estrogen receptor PROTAC™ protein degrader for breast cancer. 1.
134. Huang, D., Yang, F., Wang, Y. & Guan, X. Mechanisms of resistance to selective estrogen receptor down-regulator in metastatic breast cancer. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* **1868**, 148–156 (2017).
135. Shah, M., Nunes, M. R. & Stearns, V. CDK4/6 Inhibitors: Game Changers in the Management of Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer? *Oncol. Williston Park N* **32**, 216–222 (2018).
136. Estrogen Receptor • Arvinas. *Arvinas* <https://www.arvinas.com/pipeline-programs/estrogen-receptor>.
137. Zhao, Q., Lan, T., Su, S. & Rao, Y. Induction of apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells by a PARP1-targeting PROTAC small molecule. *Chem. Commun.* **55**, 369–372 (2019).
138. Itoh, Y., Ishikawa, M., Naito, M. & Hashimoto, Y. Protein Knockdown Using Methyl Bestatin-Ligand Hybrid Molecules: Design and Synthesis of Inducers of Ubiquitination-Mediated Degradation of Cellular Retinoic Acid-Binding Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 5820–5826 (2010).
139. Okuhira, K. *et al.* Specific degradation of CRABP-II via cIAP1-mediated ubiquitylation induced by hybrid molecules that crosslink cIAP1 and the target protein. *FEBS Lett.* **585**, 1147–1152 (2011).
140. Itoh, Y., Kitaguchi, R., Ishikawa, M., Naito, M. & Hashimoto, Y. Design, synthesis and biological evaluation of nuclear receptor-degradation inducers. *Bioorg. Med. Chem.* **19**, 6768–6778 (2011).

141. Okuhira, K. *et al.* Development of hybrid small molecules that induce degradation of estrogen receptor- α and necrotic cell death in breast cancer cells. *Cancer Sci.* **104**, 1492–1498 (2013).
142. Demizu, Y. *et al.* Design and synthesis of estrogen receptor degradation inducer based on a protein knockdown strategy. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **22**, 1793–1796 (2012).
143. Shah, R. R. *et al.* Hi-JAK-ing the ubiquitin system: The design and physicochemical optimisation of JAK PROTACs. *Bioorg. Med. Chem.* **28**, 115326 (2020).
144. Zhang, X. *et al.* Discovery of IAP-recruiting BCL-XL PROTACs as potent degraders across multiple cancer cell lines. *Eur. J. Med. Chem.* **199**, 112397 (2020).
145. Lebraud, H., Wright, D. J., Johnson, C. N. & Heightman, T. D. Protein Degradation by In-Cell Self-Assembly of Proteolysis Targeting Chimeras. *ACS Cent. Sci.* **2**, 927–934 (2016).
146. Ohoka, N. *et al.* In Vivo Knockdown of Pathogenic Proteins via Specific and Nongenetic Inhibitor of Apoptosis Protein (IAP)-dependent Protein Erasers (SNIPERs). *J. Biol. Chem.* **292**, 4556–4570 (2017).
147. Shibata, N. *et al.* Pharmacological difference between degrader and inhibitor against oncogenic BCR-ABL kinase. *Sci. Rep.* **8**, 13549 (2018).
148. Shibata, N. *et al.* Development of Protein Degradation Inducers of Androgen Receptor by Conjugation of Androgen Receptor Ligands and Inhibitor of Apoptosis Protein Ligands. *J. Med. Chem.* **61**, 543–575 (2018).
149. Anderson, N. A. *et al.* Selective CDK6 degradation mediated by cereblon, VHL, and novel IAP-recruiting PROTACs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **30**, 127106 (2020).
150. Tong, B. *et al.* A Nimbolide-Based Kinase Degradator Preferentially Degrades Oncogenic BCR-ABL. *ACS Chem. Biol.* **15**, 1788–1794 (2020).
151. Raina, K. *et al.* PROTAC-induced BET protein degradation as a therapy for castration-resistant prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, 7124–7129 (2016).
152. Zengerle, M., Chan, K.-H. & Ciulli, A. Selective Small Molecule Induced Degradation of the BET Bromodomain Protein BRD4. *ACS Chem. Biol.* **10**, 1770–1777 (2015).
153. Burslem, G. M. *et al.* The Advantages of Targeted Protein Degradation Over Inhibition: An RTK Case Study. *Cell Chem. Biol.* **25**, 67-77.e3 (2018).
154. Smith, B., Rogers, S. L., Blissett, J. & Ludlow, A. K. The role of sensory sensitivity in predicting food selectivity and food preferences in children with Tourette syndrome. *Appetite* **135**, 131–136 (2019).
155. Gechijian, L. N. *et al.* Functional TRIM24 degrader via conjugation of ineffectual bromodomain and VHL ligands. *Nat. Chem. Biol.* **14**, 405–412 (2018).
156. Crew, A. P. *et al.* Identification and Characterization of Von Hippel-Lindau-Recruiting Proteolysis Targeting Chimeras (PROTACs) of TANK-Binding Kinase 1. *J. Med. Chem.* **61**, 583–598 (2018).
157. Kang, C. H. *et al.* Induced protein degradation of anaplastic lymphoma kinase (ALK) by proteolysis targeting chimera (PROTAC). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **505**, 542–547 (2018).
158. Maniaci, C. *et al.* Homo-PROTACs: bivalent small-molecule dimerizers of the VHL E3 ubiquitin ligase to induce self-degradation. *Nat. Commun.* **8**, 830 (2017).
159. Burslem, G. M. *et al.* Targeting BCR-ABL1 in Chronic Myeloid Leukemia by PROTAC-Mediated Targeted Protein Degradation. *Cancer Res.* **79**, 4744–4753 (2019).
160. Burslem, G. M., Song, J., Chen, X., Hines, J. & Crews, C. M. Enhancing Antiproliferative Activity and Selectivity of a FLT-3 Inhibitor by Proteolysis Targeting Chimera Conversion. *J. Am. Chem. Soc.* **140**, 16428–16432 (2018).
161. Cromm, P. M., Samarasinghe, K. T. G., Hines, J. & Crews, C. M. Addressing Kinase-Independent Functions of Fak via PROTAC-Mediated Degradation. *J. Am. Chem. Soc.* **140**, 17019–17026 (2018).
162. Smalley, J. P. *et al.* PROTAC-mediated degradation of class I histone deacetylase enzymes in corepressor complexes. *Chem. Commun.* (2020) doi:10.1039/D0CC01485K.

163. Sun, N. *et al.* Development of a Brigatinib degrader (SIAIS117) as a potential treatment for ALK positive cancer resistance. *Eur. J. Med. Chem.* **193**, 112190 (2020).
164. Cheng, M. *et al.* Discovery of Potent and Selective Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Bifunctional Small-Molecule Degraders. *J. Med. Chem.* **63**, 1216–1232 (2020).
165. Xu, T. *et al.* C5-substituted pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-ones as highly specific kinase inhibitors targeting the clinical resistance-related EGFR T790M mutant. *MedChemComm* **6**, 1693–1697 (2015).
166. Zhang, X. *et al.* Design and synthesis of selective degraders of EGFR L858R/T790M mutant. *Eur. J. Med. Chem.* **192**, 112199 (2020).
167. Yang, K. *et al.* Development of Selective Histone Deacetylase 6 (HDAC6) Degraders Recruiting Von Hippel–Lindau (VHL) E3 Ubiquitin Ligase. *ACS Med. Chem. Lett.* (2020) doi:10.1021/acsmchemlett.0c00046.
168. Khan, S. *et al.* A selective BCL-XL PROTAC degrader achieves safe and potent antitumor activity. *Nat. Med.* **25**, 1938–1947 (2019).
169. Gonzalez, T. L. *et al.* Targeted degradation of activating estrogen receptor α ligand-binding domain mutations in human breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **180**, 611–622 (2020).
170. Zhang, H. *et al.* Discovery of potent epidermal growth factor receptor (EGFR) degraders by proteolysis targeting chimera (PROTAC). *Eur. J. Med. Chem.* **189**, 112061 (2020).
171. Zhao, H.-Y. *et al.* Discovery of potent small molecule PROTACs targeting mutant EGFR. *Eur. J. Med. Chem.* **208**, 112781 (2020).
172. Han, X. *et al.* Discovery of Highly Potent and Efficient PROTAC Degraders of Androgen Receptor (AR) by Employing Weak Binding Affinity VHL E3 Ligase Ligands. *J. Med. Chem.* **62**, 11218–11231 (2019).
173. Kregel, S. *et al.* Androgen receptor degraders overcome common resistance mechanisms developed during prostate cancer treatment. *Neoplasia N. Y. N* **22**, 111–119 (2020).
174. Potjewyd, F. *et al.* Degradation of Polycomb Repressive Complex 2 with an EED-Targeted Bivalent Chemical Degradator. *Cell Chem. Biol.* **27**, 47-56.e15 (2020).
175. Testa, A., Hughes, S. J., Lucas, X., Wright, J. E. & Ciulli, A. Structure-Based Design of a Macrocyclic PROTAC. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **59**, 1727–1734 (2020).
176. Nunes, J. *et al.* Targeting IRAK4 for Degradation with PROTACs. *ACS Med. Chem. Lett.* **10**, 1081–1085 (2019).
177. Kargbo, R. B. PROTAC-Mediated Degradation of Estrogen Receptor in the Treatment of Cancer. *ACS Med. Chem. Lett.* **10**, 1367–1369 (2019).
178. Tovell, H. *et al.* Design and Characterization of SGK3-PROTAC1, an Isoform Specific SGK3 Kinase PROTAC Degradator. *ACS Chem. Biol.* **14**, 2024–2034 (2019).
179. Bond, M. J., Chu, L., Nalawansa, D. A., Li, K. & Crews, C. Targeted Degradation of Oncogenic KRAS G12C by VHL-recruiting PROTACs. (2020) doi:10.26434/chemrxiv.12091176.v1.
180. Wang, M., Lu, J., Wang, M., Yang, C.-Y. & Wang, S. Discovery of SHP2-D26 as a First, Potent, and Effective PROTAC Degradator of SHP2 Protein. *J. Med. Chem.* (2020) doi:10.1021/acscjmedchem.0c00471.
181. Kargbo, R. B. PROTAC Compounds Targeting α -Synuclein Protein for Treating Neurodegenerative Disorders: Alzheimer's and Parkinson's Diseases. *ACS Med. Chem. Lett.* **11**, 1086–1087 (2020).
182. Kargbo, R. B. PROTAC Compounds Targeting Androgen Receptor for Cancer Therapeutics: Prostate Cancer and Kennedy's Disease. *ACS Med. Chem. Lett.* **11**, 1092–1093 (2020).
183. Shan, Y. *et al.* Discovery of novel anti-angiogenesis agents. Part 11: Development of PROTACs based on active molecules with potency of promoting vascular normalization. *Eur. J. Med. Chem.* **205**, 112654 (2020).
184. Xiao, Y. *et al.* Discovery of histone deacetylase 3 (HDAC3)-specific PROTACs. *Chem. Commun.* **56**, 9866–9869 (2020).

185. Kargbo, R. B. SMARCA2/4 PROTAC for Targeted Protein Degradation and Cancer Therapy. *ACS Med. Chem. Lett.* **11**, 1797–1798 (2020).
186. Testa, A. *et al.* 3-Fluoro-4-hydroxyprolines: Synthesis, Conformational Analysis, and Stereoselective Recognition by the VHL E3 Ubiquitin Ligase for Targeted Protein Degradation. *J. Am. Chem. Soc.* **140**, 9299–9313 (2018).
187. Buckley, D. L. *et al.* HaloPROTACS: Use of Small Molecule PROTACs to Induce Degradation of HaloTag Fusion Proteins. *ACS Chem. Biol.* **10**, 1831–1837 (2015).
188. Kargbo, R. B. PROTAC-Mediated Degradation of KRAS Protein for Anticancer Therapeutics. *ACS Med. Chem. Lett.* **11**, 5–6 (2020).
189. Zhang, F. *et al.* Discovery of a new class of PROTAC BRD4 degraders based on a dihydroquinazolinone derivative and lenalidomide/pomalidomide. *Bioorg. Med. Chem.* **28**, 115228 (2020).
190. Remillard, D. *et al.* Degradation of the BAF Complex Factor BRD9 by Heterobifunctional Ligands. *Angew. Chem. Int. Ed.* **56**, 5738–5743 (2017).
191. Bian, J. *et al.* Discovery of Wogonin-based PROTACs against CDK9 and capable of achieving antitumor activity. *Bioorganic Chem.* **81**, 373–381 (2018).
192. Huang, H.-T. *et al.* A Chemoproteomic Approach to Query the Degradable Kinome Using a Multi-kinase Degradator. *Cell Chem. Biol.* **25**, 88-99.e6 (2018).
193. Zorba, A. *et al.* Delineating the role of cooperativity in the design of potent PROTACs for BTK. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **115**, E7285–E7292 (2018).
194. Jaime-Figueroa, S., Buhimschi, A. D., Toure, M., Hines, J. & Crews, C. M. Design, synthesis and biological evaluation of Proteolysis Targeting Chimeras (PROTACs) as a BTK degraders with improved pharmacokinetic properties. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **30**, 126877 (2020).
195. Li, W. *et al.* Phthalimide conjugations for the degradation of oncogenic PI3K. *Eur. J. Med. Chem.* **151**, 237–247 (2018).
196. Zhang, C. *et al.* Proteolysis Targeting Chimeras (PROTACs) of Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK). *Eur. J. Med. Chem.* **151**, 304–314 (2018).
197. Chen, H., Chen, F., Liu, N., Wang, X. & Gou, S. Chemically induced degradation of CK2 by proteolysis targeting chimeras based on a ubiquitin–proteasome pathway. *Bioorganic Chem.* **81**, 536–544 (2018).
198. Zhou, F. *et al.* Development of selective mono or dual PROTAC degrader probe of CDK isoforms. *Eur. J. Med. Chem.* **187**, 111952 (2020).
199. Su, S. *et al.* Potent and Preferential Degradation of CDK6 via Proteolysis Targeting Chimera Degradators. *J. Med. Chem.* **62**, 7575–7582 (2019).
200. Yang, H. *et al.* Plasticity in designing PROTACs for selective and potent degradation of HDAC6. *Chem. Commun.* **55**, 14848–14851 (2019).
201. Zhou, L. *et al.* Design and synthesis of α -naphthoflavone chimera derivatives able to eliminate cytochrome P450 (CYP)1B1-mediated drug resistance via targeted CYP1B1 degradation. *Eur. J. Med. Chem.* **189**, 112028 (2020).
202. Xue, G. *et al.* Protein degradation through covalent inhibitor-based PROTACs. *Chem. Commun.* **56**, 1521–1524 (2020).
203. Jiang, F. *et al.* Discovery of novel small molecule induced selective degradation of the bromodomain and extra-terminal (BET) bromodomain protein BRD4 and BRD2 with cellular potencies. *Bioorg. Med. Chem.* **28**, 115181 (2020).
204. Mu, X., Bai, L., Xu, Y., Wang, J. & Lu, H. Protein targeting chimeric molecules specific for dual bromodomain 4 (BRD4) and Polo-like kinase 1 (PLK1) proteins in acute myeloid leukemia cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **521**, 833–839 (2020).
205. Kargbo, R. B. PROTAC Degradation of IRAK4 for the Treatment of Neurodegenerative and Cardiovascular Diseases. *ACS Med. Chem. Lett.* **10**, 1251–1252 (2019).
206. Zhao, B. & Burgess, K. TrkC-Targeted Kinase Inhibitors And PROTACs. *Mol. Pharm.* **16**, 4313–4318 (2019).

207. Kargbo, R. B. PROTAC Compounds Targeting TRK for Use in Cancer Therapeutics. *ACS Med. Chem. Lett.* **11**, 1090–1091 (2020).
208. Wang, Z. *et al.* Proteolysis Targeting Chimeras for the Selective Degradation of Mcl-1/Bcl-2 Derived from Nonselective Target Binding Ligands. *J. Med. Chem.* **62**, 8152–8163 (2019).
209. Sun, X. *et al.* A chemical approach for global protein knockdown from mice to non-human primates. *Cell Discov.* **5**, 1–13 (2019).
210. Hu, M. *et al.* Discovery of the first potent proteolysis targeting chimera (PROTAC) degrader of indoleamine 2,3-dioxygenase 1. *Acta Pharm. Sin. B* (2020) doi:10.1016/j.apsb.2020.02.010.
211. Manda, S., Lee, N. K., Oh, D.-C. & Lee, J. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Proteolysis Targeting Chimeras (PROTACs) for the Dual Degradation of IGF-1R and Src. *Molecules* **25**, 1948 (2020).
212. Cheng, B., Ren, Y., Cao, H. & Chen, J. Discovery of novel resorcinol diphenyl ether-based PROTAC-like molecules as dual inhibitors and degraders of PD-L1. *Eur. J. Med. Chem.* **199**, 112377 (2020).
213. Bensimon, A. *et al.* Targeted Degradation of SLC Transporters Reveals Amenability of Multi-Pass Transmembrane Proteins to Ligand-Induced Proteolysis. *Cell Chem. Biol.* (2020) doi:10.1016/j.chembiol.2020.04.003.
214. Cheng, J., Li, Y., Wang, X., Dong, G. & Sheng, C. Discovery of Novel PDE δ Degraders for the Treatment of KRAS Mutant Colorectal Cancer. *J. Med. Chem.* **63**, 7892–7905 (2020).
215. Optimal linker length for small molecule PROTACs that selectively target p38 α and p38 β for degradation. *Eur. J. Med. Chem.* **201**, 112451 (2020).
216. Cao, C. *et al.* Discovery of SK-575 as a Highly Potent and Efficacious Proteolysis-Targeting Chimera Degradator of PARP1 for Treating Cancers. *J. Med. Chem.* **63**, 11012–11033 (2020).
217. Cao, F. *et al.* Induced protein degradation of histone deacetylases 3 (HDAC3) by proteolysis targeting chimera (PROTAC). *Eur. J. Med. Chem.* **208**, 112800 (2020).
218. Gao, H. *et al.* Design, Synthesis, and Evaluation of Highly Potent FAK-Targeting PROTACs. *ACS Med. Chem. Lett.* **11**, 1855–1862 (2020).
219. Li, Z. *et al.* First small-molecule PROTACs for G protein-coupled receptors: inducing α 1A-adrenergic receptor degradation. *Acta Pharm. Sin. B* **10**, 1669–1679 (2020).
220. Winter, G. E. *et al.* Phthalimide conjugation as a strategy for in vivo target protein degradation. *Science* **348**, 1376–1381 (2015).
221. Bai, L. *et al.* Targeted Degradation of BET Proteins in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Res.* **77**, 2476–2487 (2017).
222. Nowak, R. P. *et al.* Plasticity in binding confers selectivity in ligand-induced protein degradation. *Nat. Chem. Biol.* **14**, 706–714 (2018).
223. Olson, C. M. *et al.* Pharmacological perturbation of CDK9 using selective CDK9 inhibition or degradation. *Nat. Chem. Biol.* **14**, 163–170 (2018).
224. Robb, C. M. *et al.* Chemically induced degradation of CDK9 by a proteolysis targeting chimera (PROTAC). *Chem. Commun.* **53**, 7577–7580 (2017).
225. McCoull, W. *et al.* Development of a Novel B-Cell Lymphoma 6 (BCL6) PROTAC To Provide Insight into Small Molecule Targeting of BCL6. *ACS Chem. Biol.* **13**, 3131–3141 (2018).
226. Bassi, Z. I. *et al.* Modulating PCAF/GCN5 Immune Cell Function through a PROTAC Approach. *ACS Chem. Biol.* **13**, 2862–2867 (2018).
227. Chi, J. J. *et al.* A novel strategy to block mitotic progression for targeted therapy. *EBioMedicine* **49**, 40–54 (2019).
228. Designing an eEF2K-Targeting PROTAC small molecule that induces apoptosis in MDA-MB-231 cells. *Eur. J. Med. Chem.* **204**, 112505 (2020).
229. Sinatra, L. *et al.* Hydroxamic Acids Immobilized on Resins (HAIRs): Synthesis of Dual-Targeting HDAC Inhibitors and HDAC Degraders (PROTACs). *Angew. Chem. Int. Ed.* **n/a**, (2020).

230. Degorce, S. L. *et al.* Discovery of Proteolysis-Targeting Chimera Molecules that Selectively Degrade the IRAK3 Pseudokinase. *J. Med. Chem.* **63**, 10460–10473 (2020).
231. Zhou, Z. *et al.* Targeted degradation of CD147 proteins in melanoma. *Bioorganic Chem.* **105**, 104453 (2020).
232. Qin, C. *et al.* Discovery of QCA570 as an Exceptionally Potent and Efficacious Proteolysis Targeting Chimera (PROTAC) Degradator of the Bromodomain and Extra-Terminal (BET) Proteins Capable of Inducing Complete and Durable Tumor Regression. *J. Med. Chem.* **61**, 6685–6704 (2018).
233. Li, Y. *et al.* Discovery of MD-224 as a First-in-Class, Highly Potent, and Efficacious Proteolysis Targeting Chimera Murine Double Minute 2 Degradator Capable of Achieving Complete and Durable Tumor Regression. *J. Med. Chem.* **62**, 448–466 (2019).
234. Yang, J. *et al.* Simple Structural Modifications Converting a Bona fide MDM2 PROTAC Degradator into a Molecular Glue Molecule: A Cautionary Tale in the Design of PROTAC Degradators. *J. Med. Chem.* **62**, 9471–9487 (2019).
235. Jin, Y.-H. *et al.* Azo-PROTAC: Novel Light-Controlled Small-Molecule Tool for Protein Knockdown. *J. Med. Chem.* (2020) doi:10.1021/acs.jmedchem.9b02058.
236. You, I. *et al.* Discovery of an AKT Degradator with Prolonged Inhibition of Downstream Signaling. *Cell Chem. Biol.* **27**, 66-73.e7 (2020).
237. Zhou, H. *et al.* Structure-Based Discovery of SD-36 as a Potent, Selective, and Efficacious PROTAC Degradator of STAT3 Protein. *J. Med. Chem.* **62**, 11280–11300 (2019).
238. Qiu, X. *et al.* Chemoselective Synthesis of Lenalidomide-Based PROTAC Library Using Alkylation Reaction. *Org. Lett.* **21**, 3838–3841 (2019).

Université de Lille
FACULTE DE PHARMACIE DE LILLE
DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
Année Universitaire 2020/2021

Nom : Kraupner

Prénom : Nicolas

Titre de la thèse : PROTAC[®], une application innovante des petites molécules en drug-discovery

Mots-clés : PROTAC[®], cancérologie, drug discovery, chimie médicinale, UPS, protéasome, protéolyse

Résumé : Après avoir présenté les structures biomoléculaires du protéasome et ce mécanisme protéolytique biologique médié par le système ubiquitine protéasome (UPS), il est montré comment les PROTACs[®], de petites molécules, sont capables de détourner ce système dans un but thérapeutique.

Par rapport au paradigme thérapeutique actuel des petites molécules qui est basé sur le taux d'occupation à sa cible afin de l'affecter directement, la stratégie PROTAC[®] tient son action en détournant la machinerie cellulaire de dégradation afin de provoquer la dégradation sélective et rapide d'une protéine pathogène. Un PROTAC[®] est une molécule hybride bi-fonctionnelle liant à la fois l'ubiquitine ligase (E3) et la protéine cible, entraînant sa polyubiquitination par le complexe ubiquitine ligase E3 et provoquant donc sa dégradation en exploitant le système UPS. Il s'agit d'une nouvelle approche qui pourrait offrir des interventions thérapeutiques dépassant les limites des approches actuelles et offrir des avantages considérables sur la robustesse et la sécurité thérapeutique du traitement.

Membres du jury :

Président : Monsieur le Professeur Jean-Louis Cazin

Assesseur : Madame la Professeur Rebecca Deprez-Poulain

Membre extérieur : Monsieur le Docteur Philippe Verwaerde