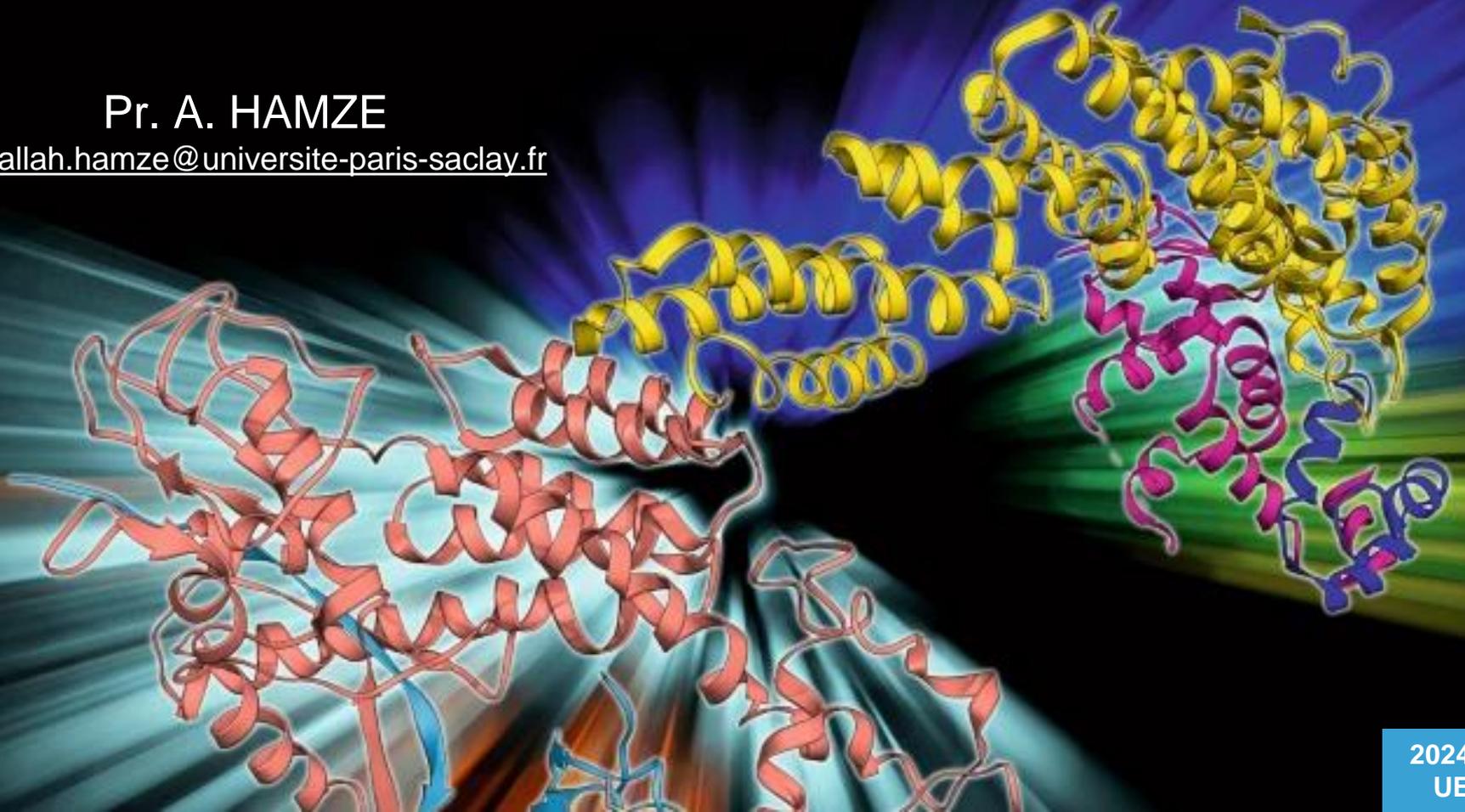


# Chap07 : Drugging The Undruggable

## “Dégradation ciblée des protéines à l'aide de PROTAC”

Pr. A. HAMZE

[abdallah.hamze@universite-paris-saclay.fr](mailto:abdallah.hamze@universite-paris-saclay.fr)



# Plan

1- Introduction

2- Protéasome : cible thérapeutique

3- Protéasome : structure et fonctions

4- Inhibiteurs du protéasome

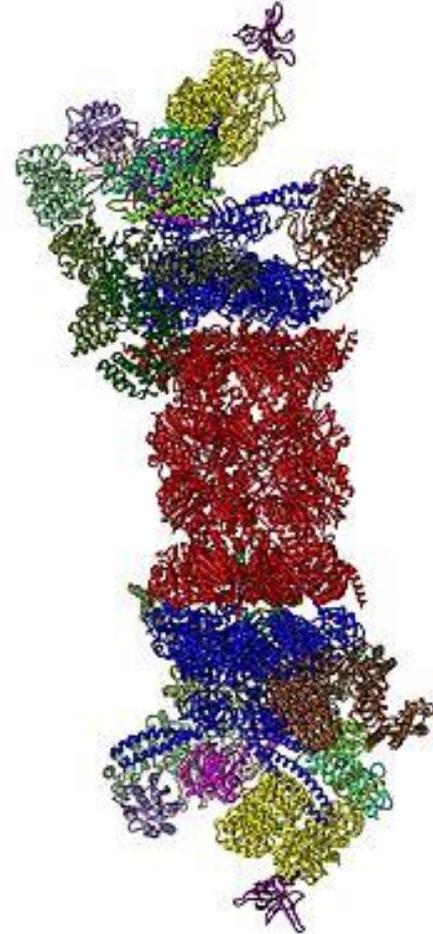
5- Conception rationnelle de principes actifs :  
une approche inédite qui cible la dégradation des protéines :  
*Proteolysis-Targeting Chimera Protein Degraders (PROTAC)*

6- PROTAC Cases studies

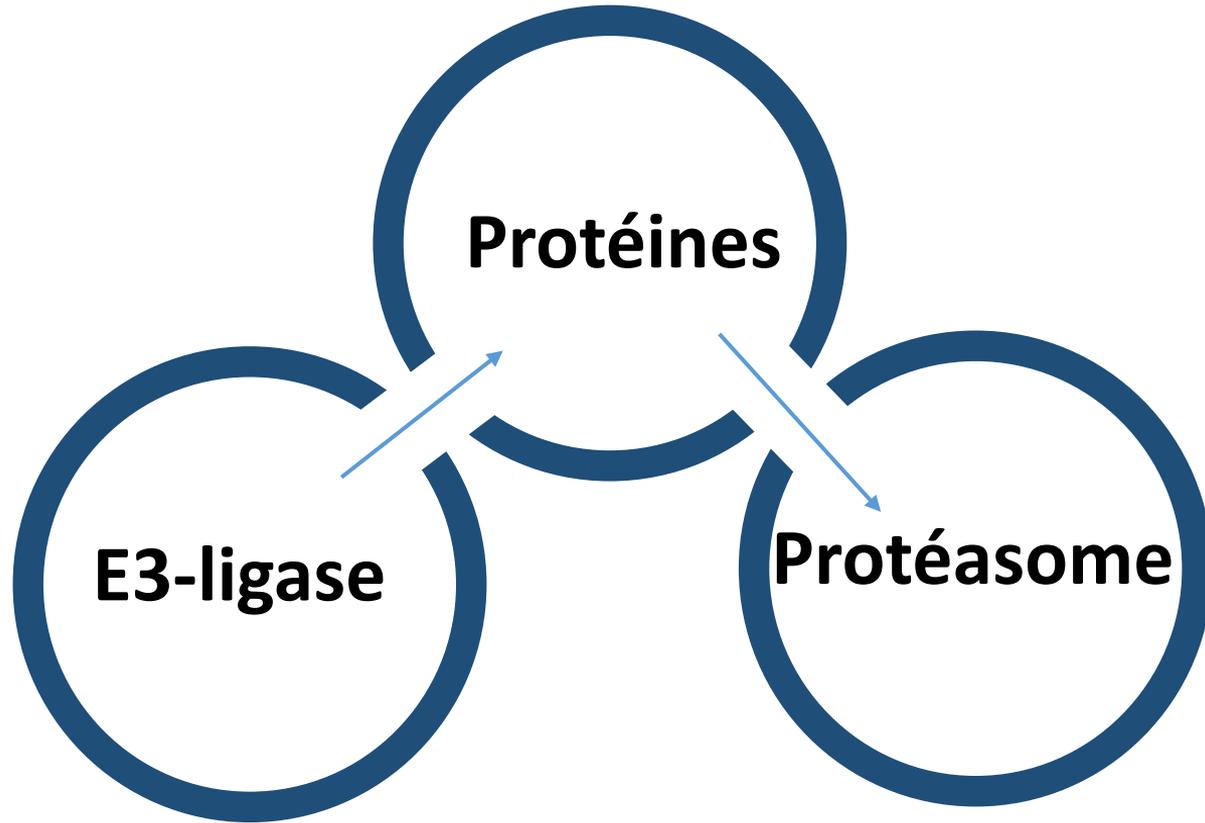
7- Protac : études cliniques

8- Outils en ligne

9- Conclusion



# 1. Introduction



# 1. Introduction

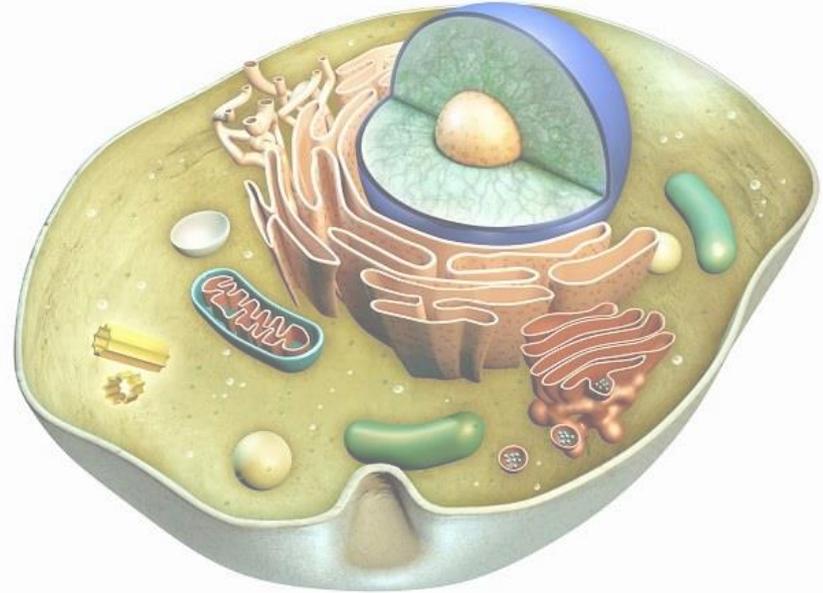
**Cellule**  
Dégradation des protéines en  
Acides Aminés

Dans un  
compartiment  
endomembranaire

**LYSOSOME**

Dans un complexe  
protéique

**PROTÉASOME**



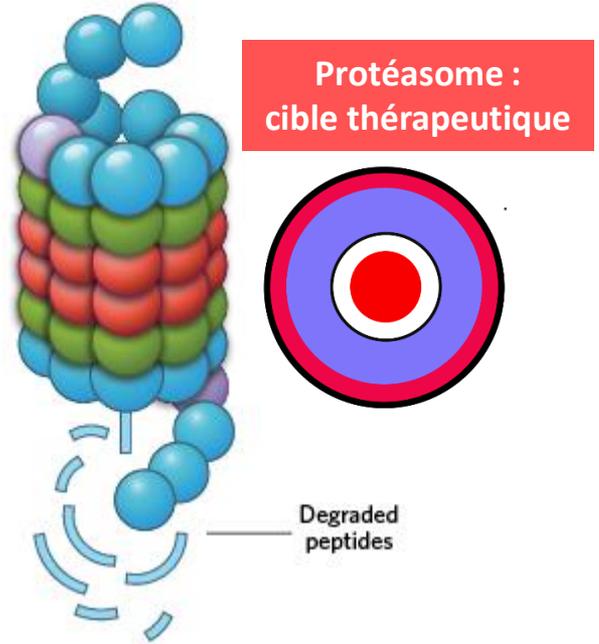
# 2. Protéasome : cible thérapeutique à double intérêt



Dégradation de protéines PRO-APOPTOTIQUES



CANCÉROGENÈSE



PROTÉASOME

Complexe de plus de 30 protéines



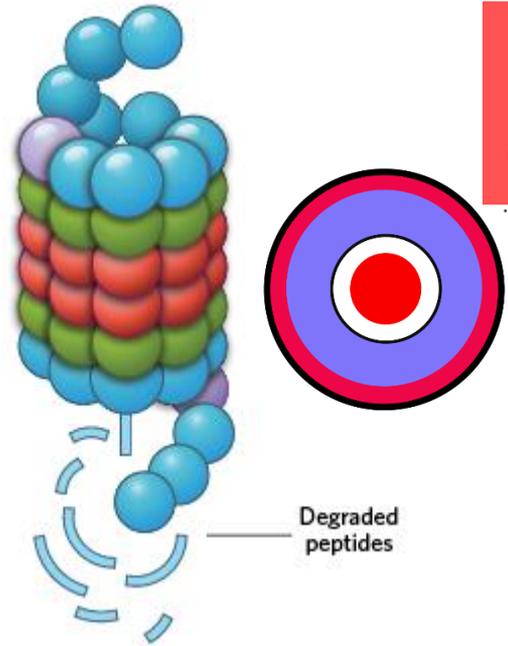
Activation de la dégradation de protéines ONCOGÉNIQUES



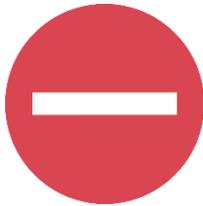
EFFET ANTITUMORAL

# 2. Protéasome : cible thérapeutique à double intérêt

Protéasome :  
cible thérapeutique

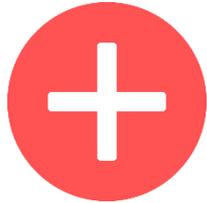


Inhibiteurs  
protéasome

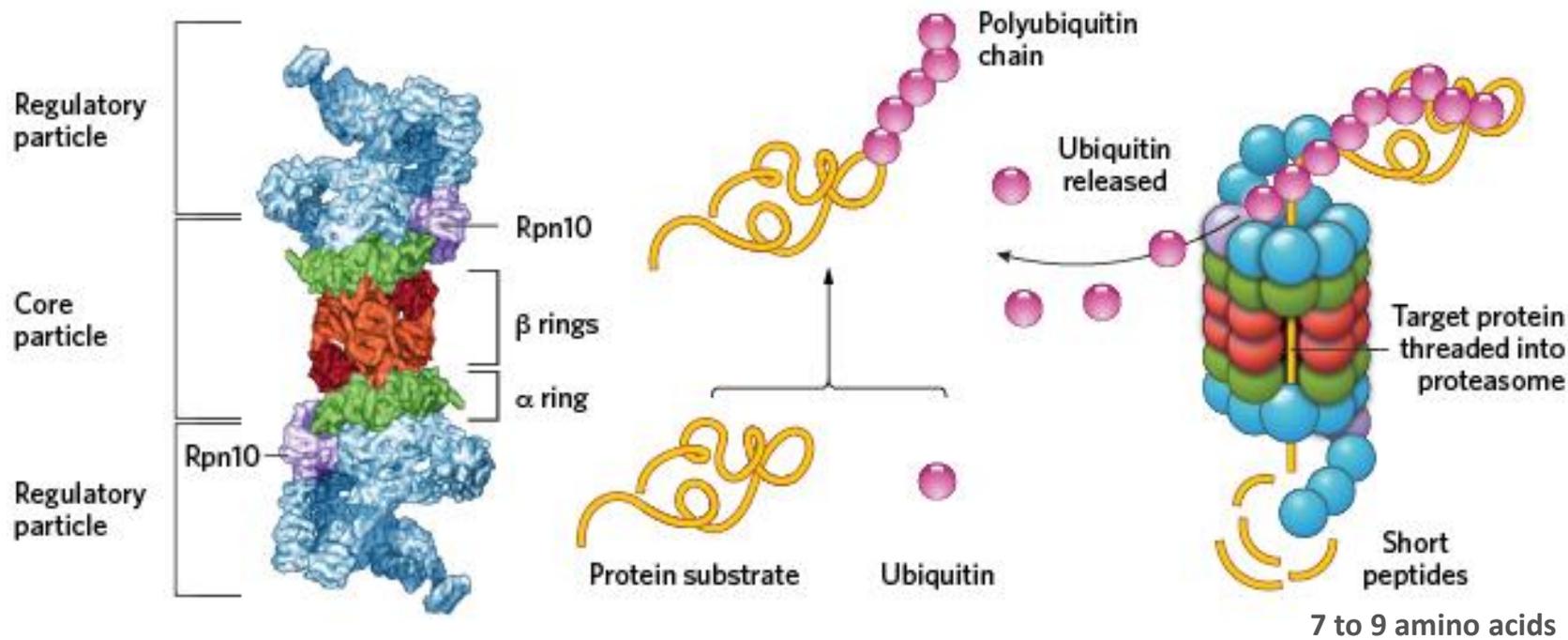


Bortézomib Velcade<sup>®</sup>

Activation naturelle de  
la dégradation des  
protéines (PROTAC)



# 3. Protéasome : structure et fonctions

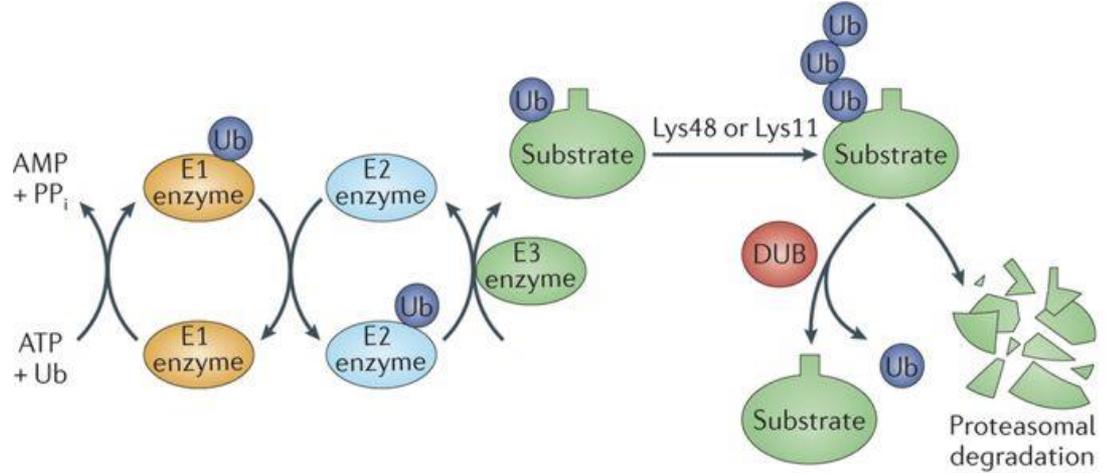


Dégradation des protéines mal repliées, dénaturées ou obsolètes

# 3. Protéasome : structure et fonctions

## Dégradation des protéines cellulaires

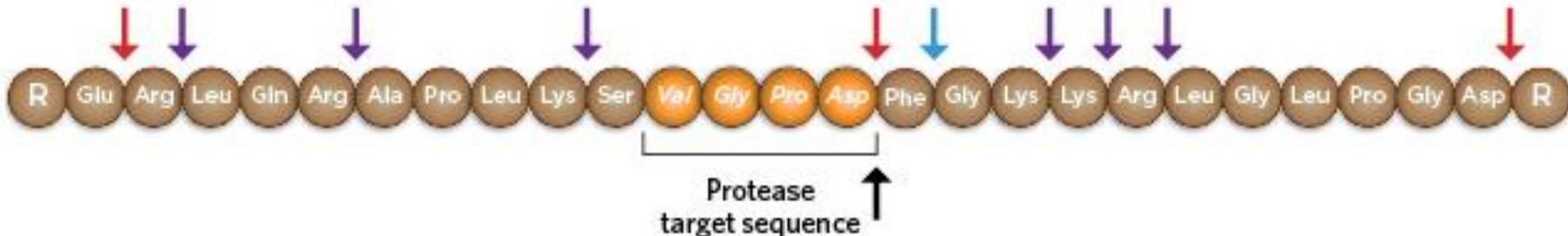
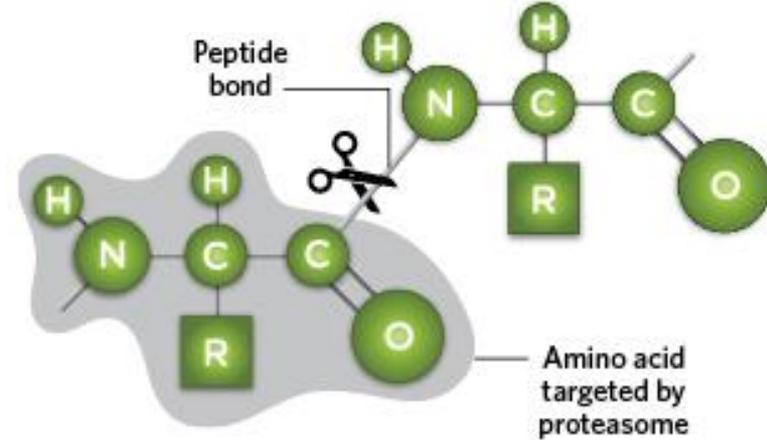
- La dégradation des protéines est un processus cellulaire essentiel et hautement réglementé;
- Elle est contrôlée principalement par le système **ubiquitine-protéasome**;
- **Les protéines ciblées pour la destruction sont « taggées » par un « code barre » constitué d'une chaîne d'ubiquitine créée via les enzymes E1 (activation), E2 (conjugaison) et E3 (ubiquitine ligase).**



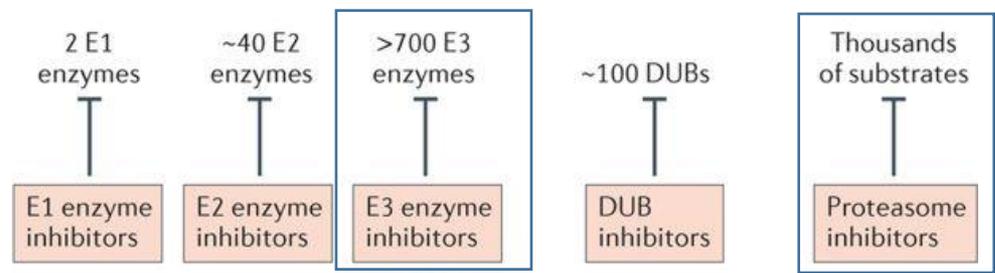
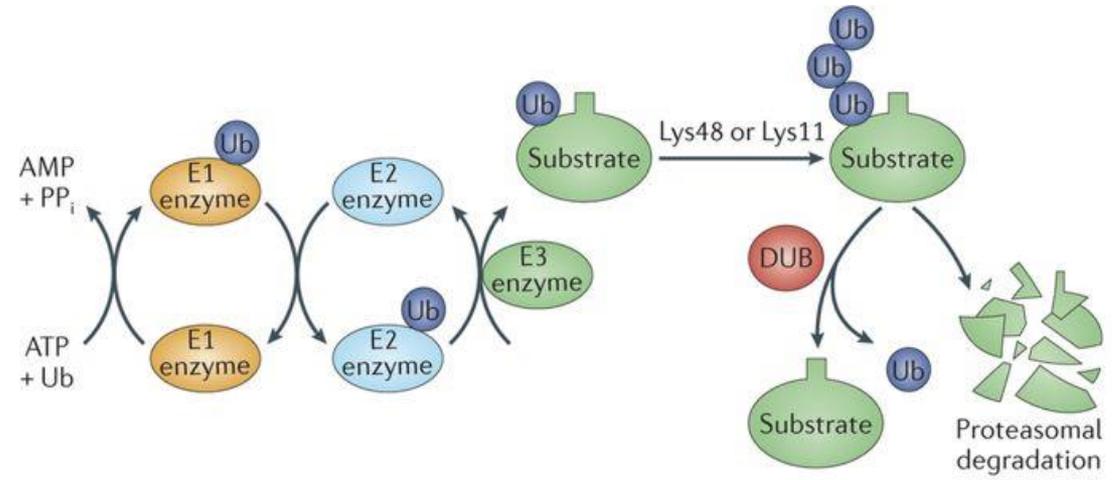
DUBs = **deubiquitylating** enzymes

# 3. Protéasome : structure et fonctions

- Le protéasome hydrolyse les protéines ciblées sur certains types d'acides aminés spécifiques. Les résidus thréonine dans trois sous-unités  $\beta$  distinctes de la particule centrale attaquent la liaison peptidique de l'acide aminé cible (flèches colorées).
- **Chymotrypsine-like (flèche bleue)**: clivage du côté carboxyle des acides aminés **hydrophobes** encombrants de la protéine cible
- **Trypsin-like (flèches violettes)**: clivage du côté carboxyle des acides aminés **basiques**
- **Caspase-like (flèches rouges)**: coupe du côté carboxyle des acides aminés **acides**



# 3. Protéasome : structure et fonctions

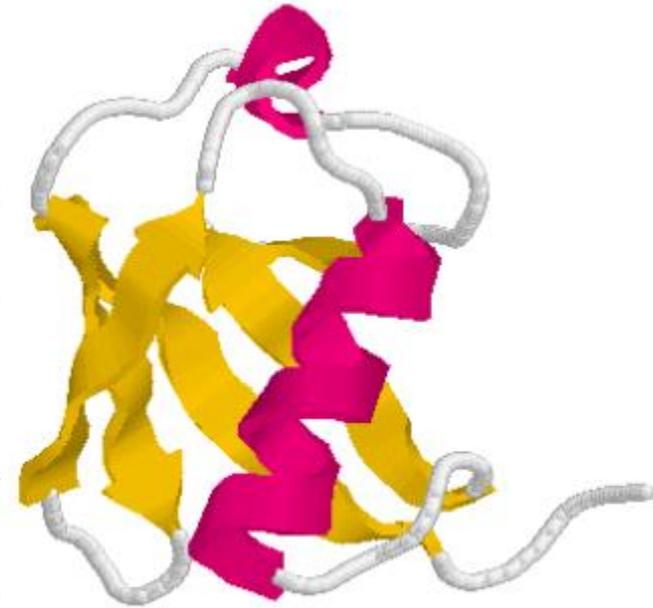


Selectivity

DUBs = **deubiquitinating** enzymes

### 3. Ubiquitine : structure et fonctions

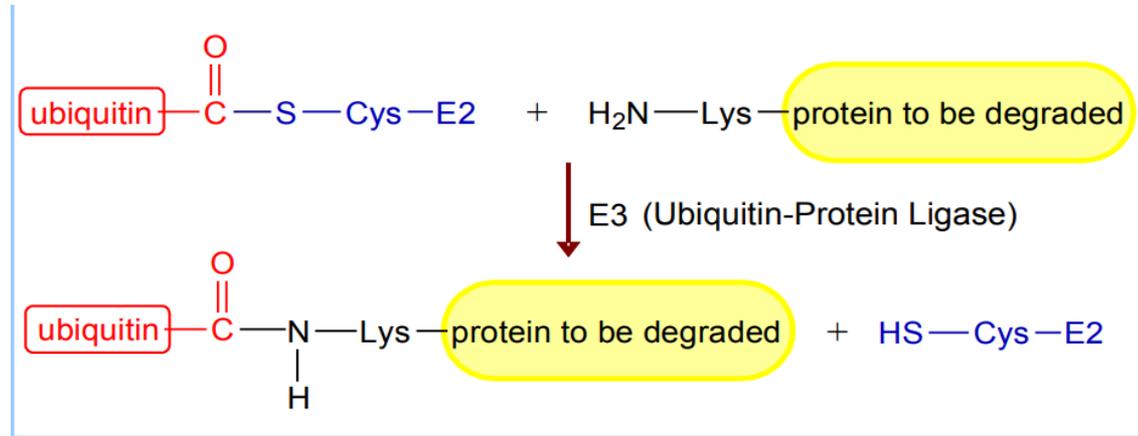
- ~ **76** acides aminés
- **Marqueur de protéines**
- **Ubiquitaire** : elle est localisée dans tous les compartiments subcellulaires de toutes les cellules des organismes
- L'ubiquitination désigne la fixation (covalente, ATP dépendante grâce à une cascade d'enzymes E1, E2, E3) spécifique et régulée d'une ou plusieurs ubiquitines sur une protéine cible.



ubiquitin PDB 1TBE

# 3. Protéasome : structure et fonctions

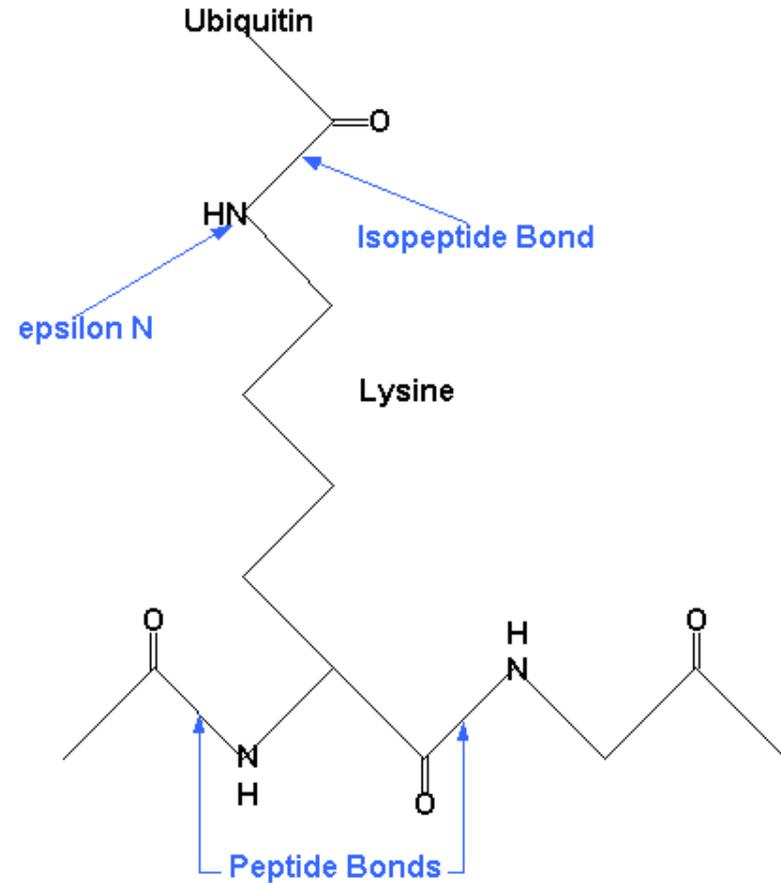
**Ubiquitylation** : les protéines sont généralement marquées pour la destruction sélective dans des complexes protéolytiques (protéasomes) par fixation covalente de l'ubiquitine, une protéine compacte hautement conservée.



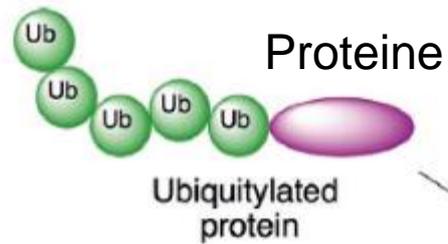
Une Ubiquitine-Protéine Ligase (E3) favorise le transfert de l'ubiquitine de E2 au groupe  $\epsilon$ -**amino** d'un résidu Lys d'une protéine reconnue par cette E3, formant une liaison isopeptidique.

# 3. Protéasome : structure et fonctions

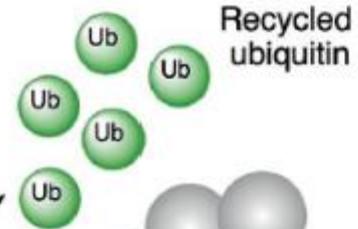
Une Ubiquitine-Protéine Ligase (E3) favorise le transfert de l'ubiquitine de E2 au groupe  $\epsilon$ -amino d'un résidu Lys d'une protéine reconnue par cette E3, formant une liaison *isopeptidique*.



# Protéasome : structure et fonctions

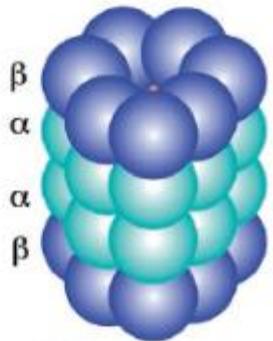


ATP



Chaîne d'ubiquitines >4 →

Reconnaissance des protéines par le protéasome

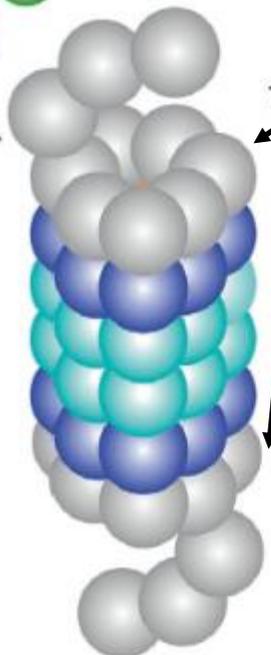


20S proteasome

28 subunits

four stacked heptameric rings

ATP



26S proteasome

19S Regulatory complex

recognizes ubiquitylated proteins



Active form *in vivo*



# Plan

1- Introduction

2- Protéasome : cible thérapeutique

3- Protéasome : structure et fonctions

4- Inhibiteurs du protéasome

5- Conception rationnelle de principes actifs :  
une approche inédite qui cible la dégradation des protéines :

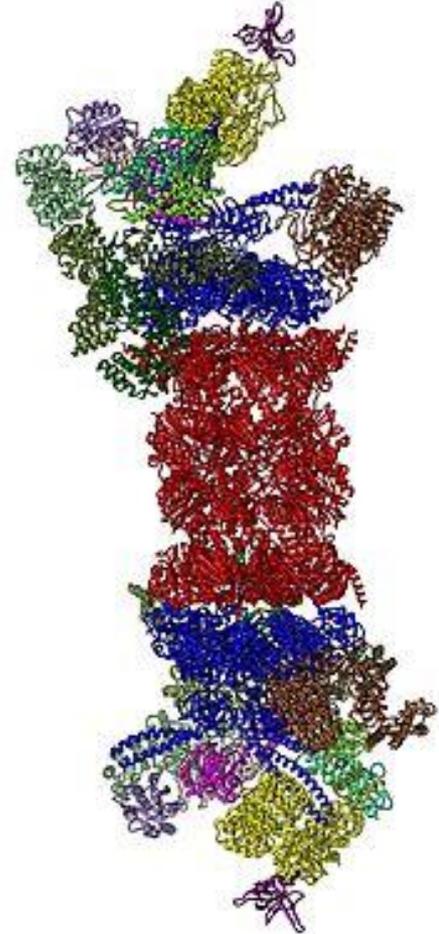
*Proteolysis-Targeting Chimera Protein Degraders (PROTAC)*

6- PROTAC Case study

7- Protac : études cliniques

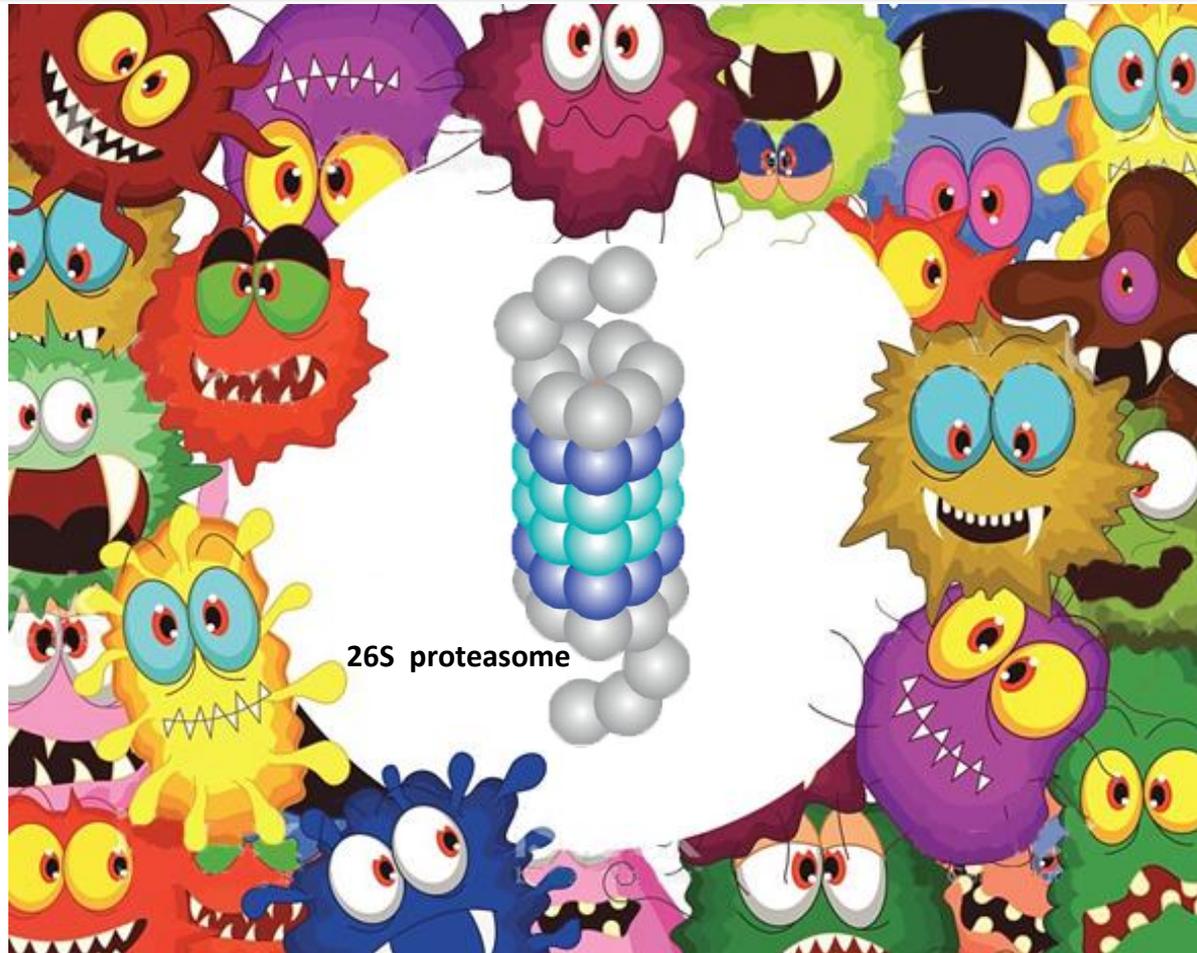
8- Outils en ligne

9- Conclusion



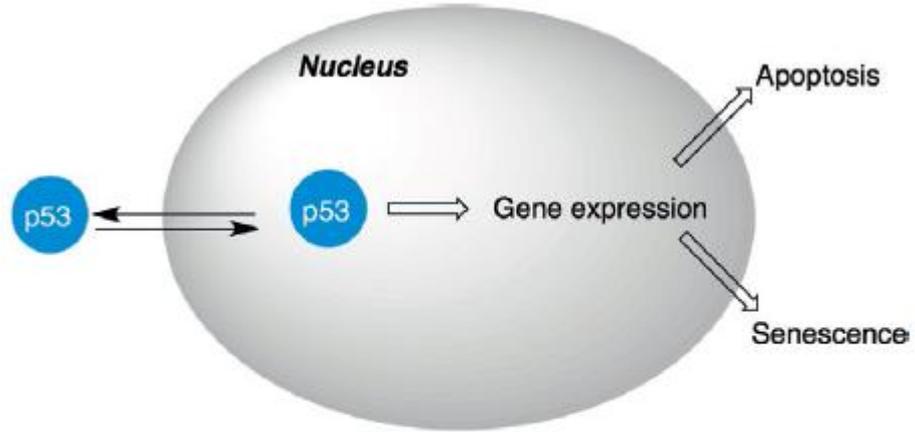
## 4. Inhibiteurs du protéasome

# Protéasome et cellule tumorale



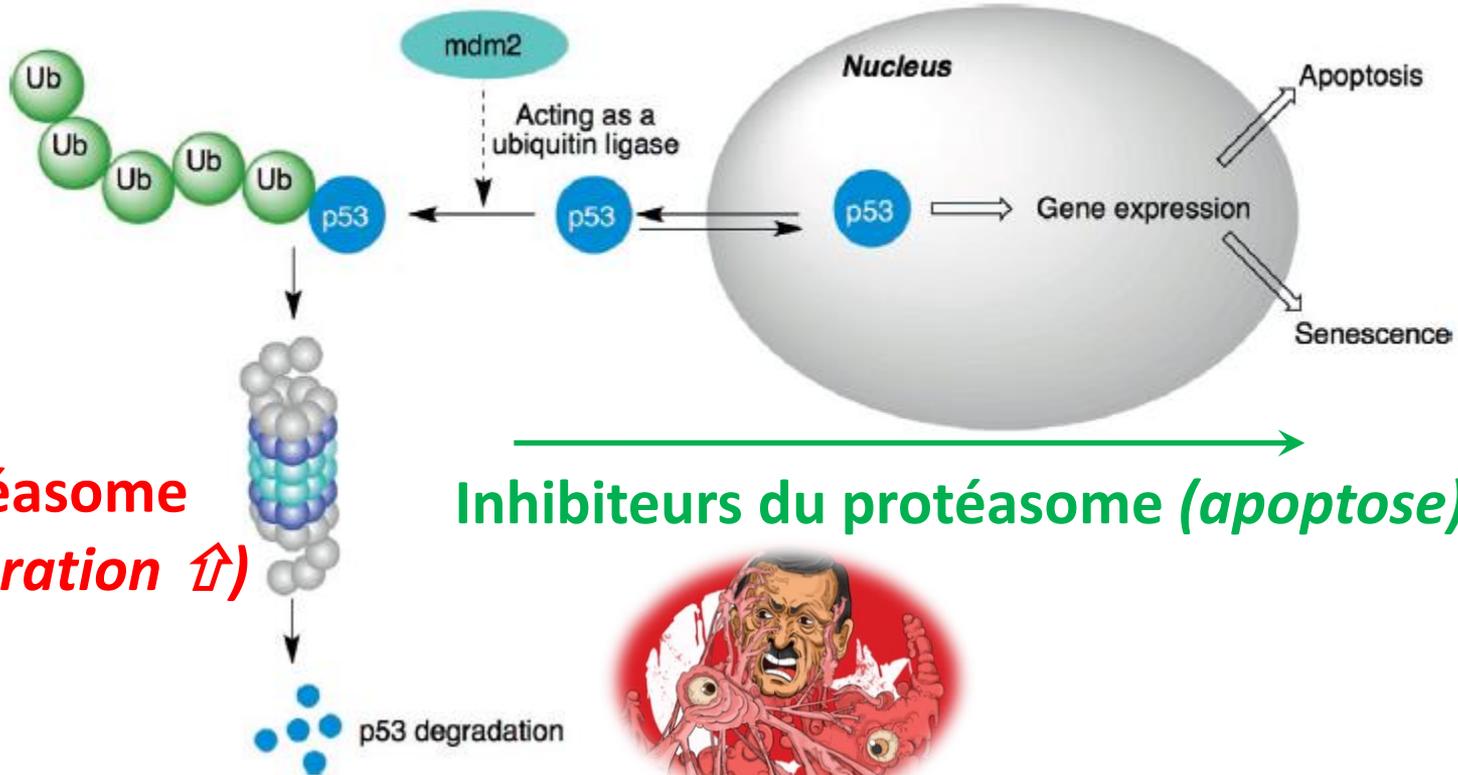
26S proteasome

## Tumor-suppressing factor p53

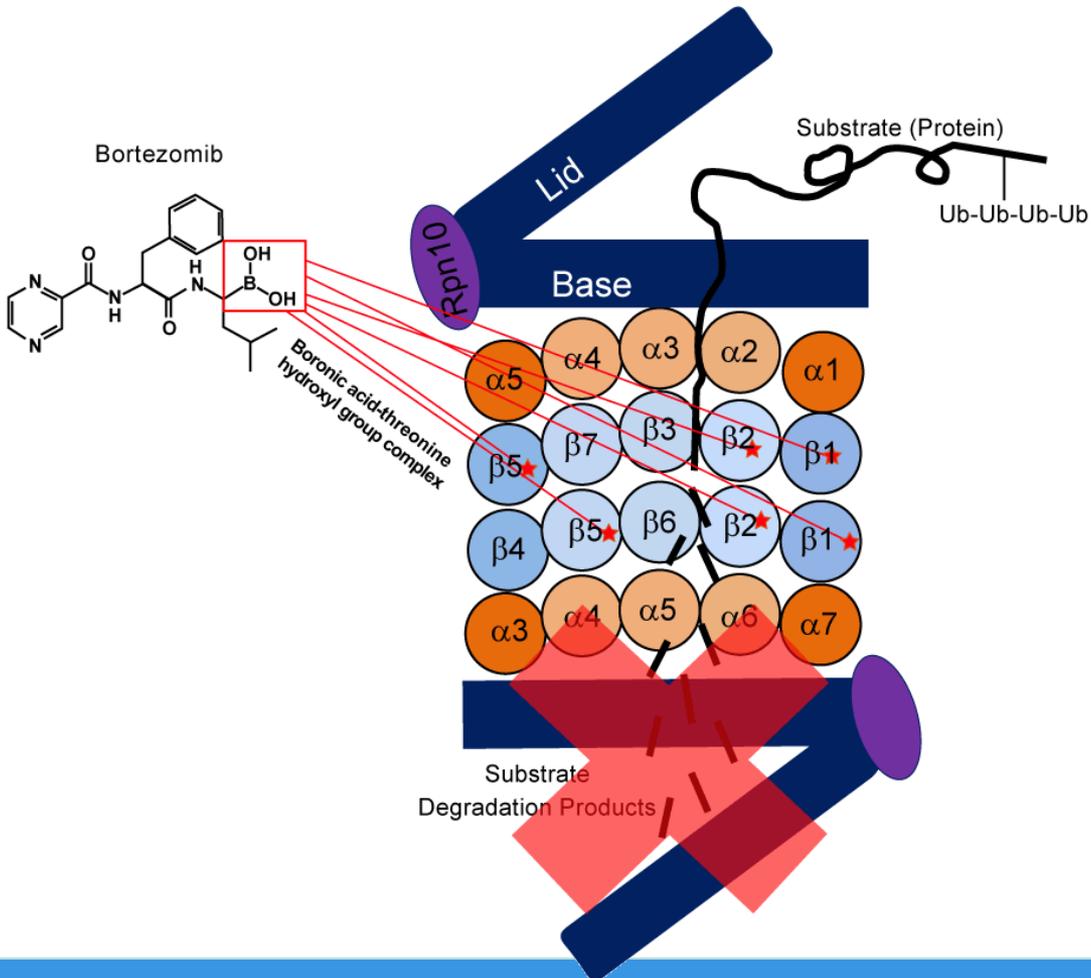
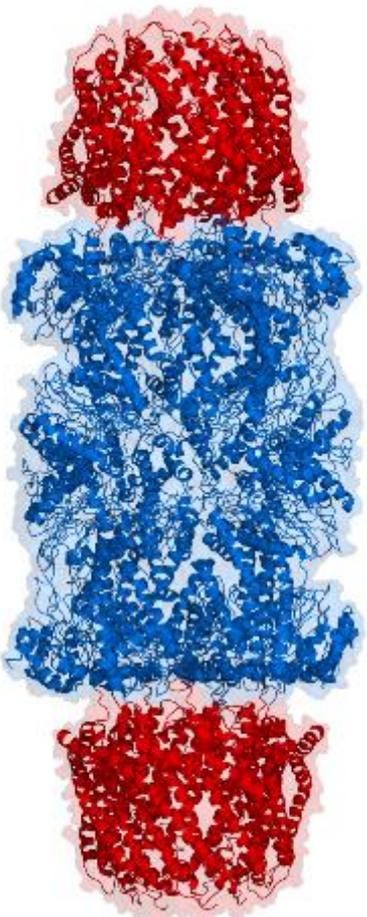


# Protéasome et cellule tumorale

Protein Mdm2 = E3 ubiquitin ligase, **encoded by the MDM2 oncogene**

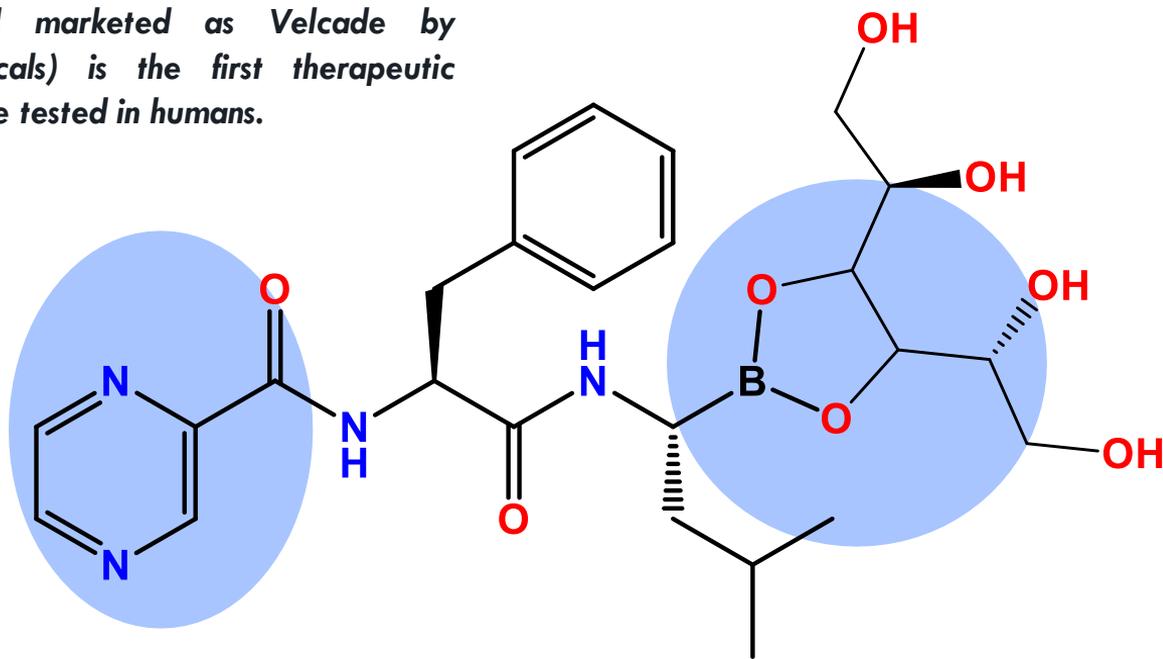


# Inhibiteurs du Protéasome



## Bortezomib Velcade®

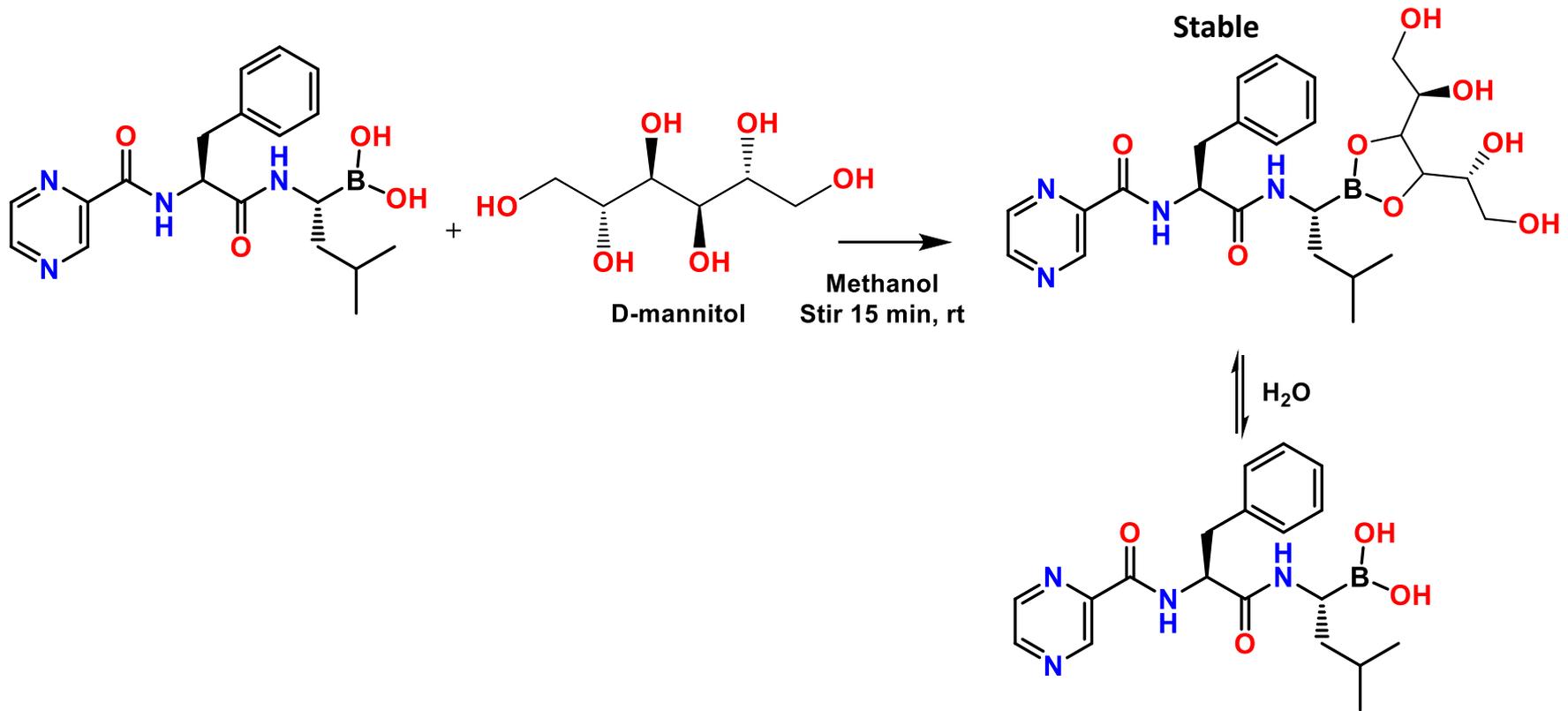
(originally PS-341 and marketed as Velcade by Millennium Pharmaceuticals) is the first therapeutic proteasome inhibitor to be tested in humans.



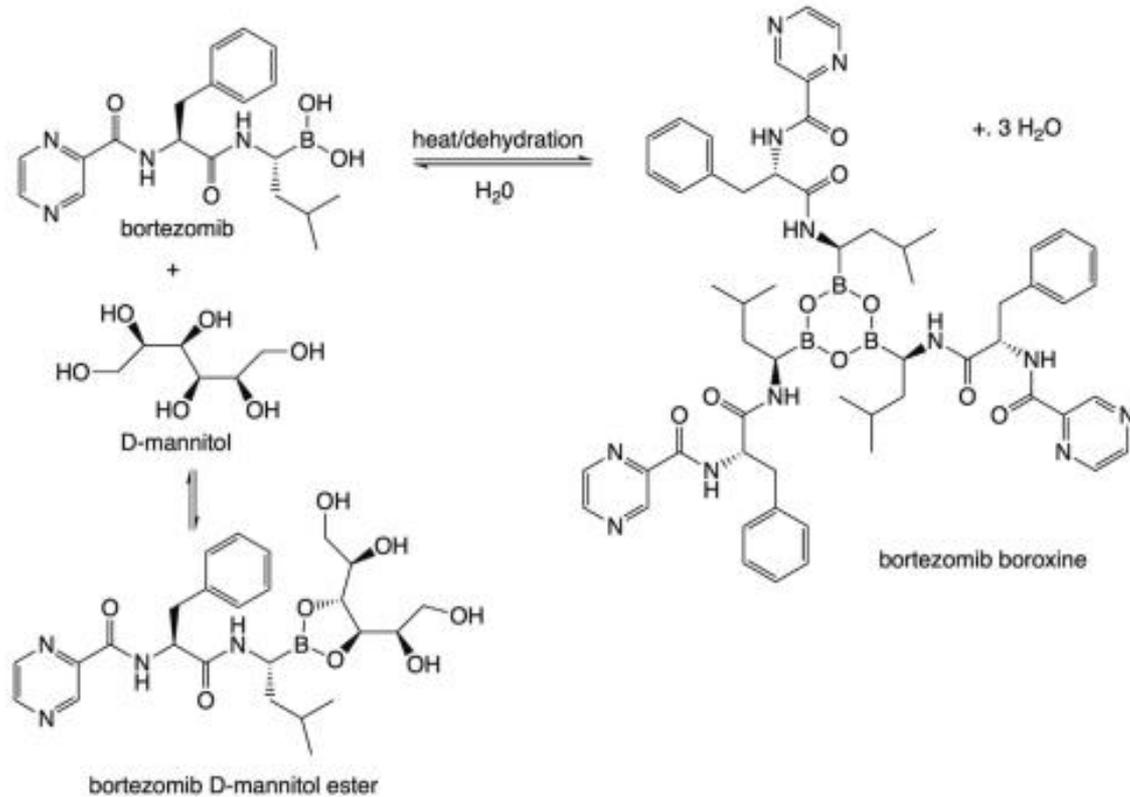
Pyrazine – Phe – Leu - B(OH)<sub>2</sub>

Bortezomib is a dipeptide analogue of boric acid administered as a mannitol ester (HOH<sub>2</sub>C-(CHOH)<sub>4</sub>-CH<sub>2</sub>OH)

# Inhibiteurs du Protéasome



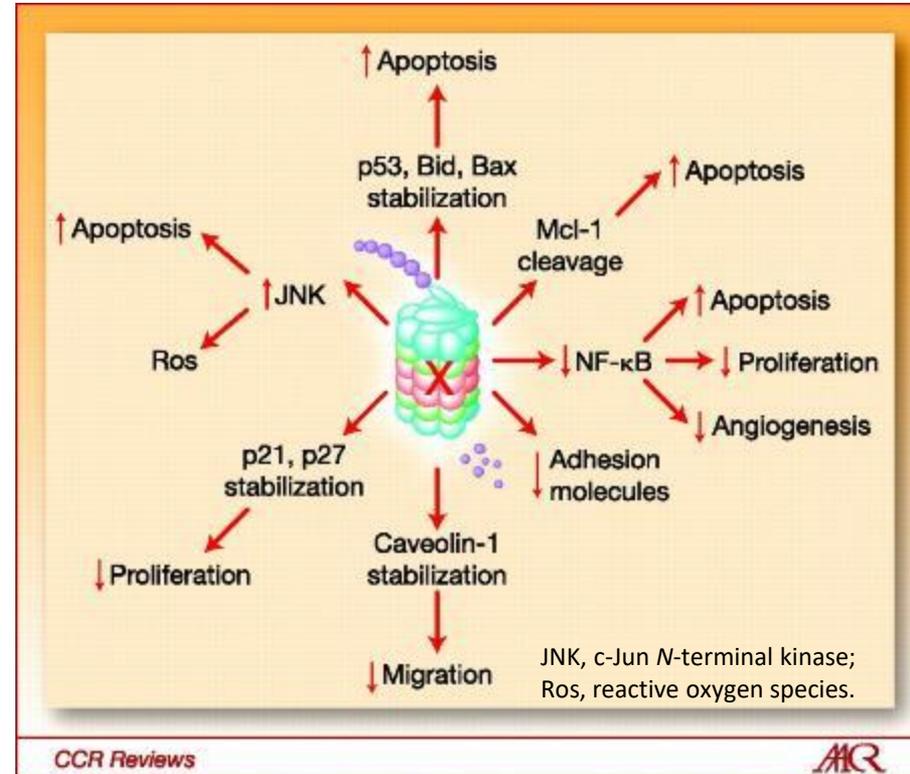
# Inhibiteurs du Protéasome



# Inhibiteurs du Protéasome

- The boron atom within bortezomib catalytically binds the active site of the 26S proteasome with high affinity and specificity, thereby resulting in cell cycle arrest and apoptosis.
- **In normal cells**, the proteasome is involved in degradation of ubiquitylated proteins that have been tagged for destruction because they are damaged or unneeded by the cell.
- **In cancerous cells**, proteasome activity degrades **pro-apoptotic proteins** such as **p53** that would normally result in programmed cell death of the dysfunctional cells. Proteasome inhibitors such as bortezomib interrupt this process, resulting in destruction of cancerous cells.

**Indication: treatment of relapsed multiple myeloma and mantle cell lymphoma**



# Plan

1- Introduction

2- Protéasome : cible thérapeutique

3- Protéasome : structure et fonctions

4- Inhibiteurs du protéasome

**5- Conception rationnelle de principes actifs :  
une approche inédite qui cible la dégradation des protéines :**

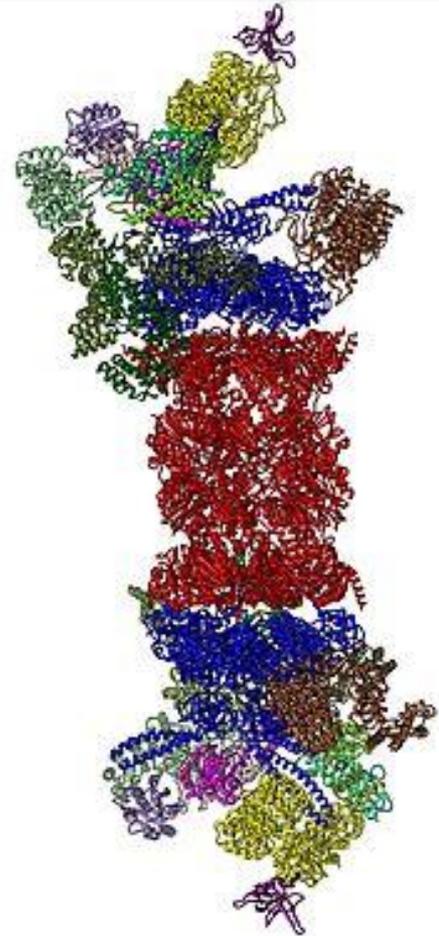
*Proteolysis-Targeting Chimera Protein Degraders (PROTAC)*

**6- PROTAC Cases studies**

**7- Protac : études cliniques**

**8- Outils en ligne**

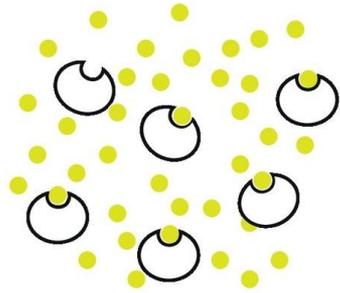
**9- Conclusion**



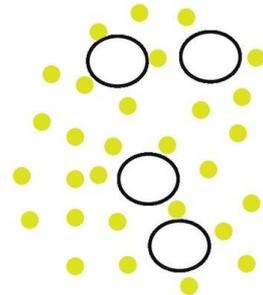
# Limites des petites molécules inhibitrices

a

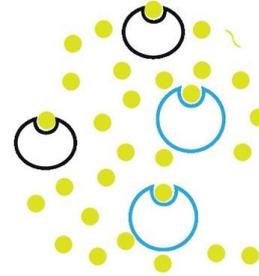
## Several limitations of small molecular inhibitors



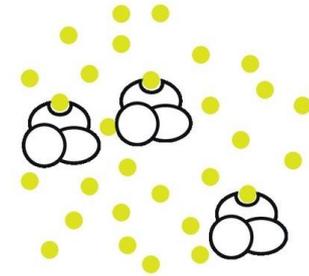
Inhibition induced by occupying the active site of the target protein



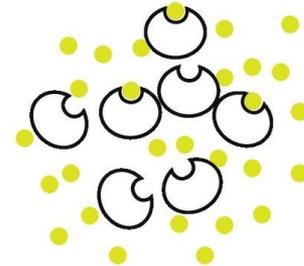
Undruggable proteins owing to the lack of active sites



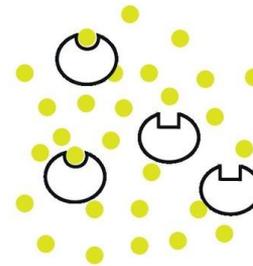
Off-target effects



Reservation of other activities for multidomain proteins



Accumulation of the target protein; Incomplete inhibition

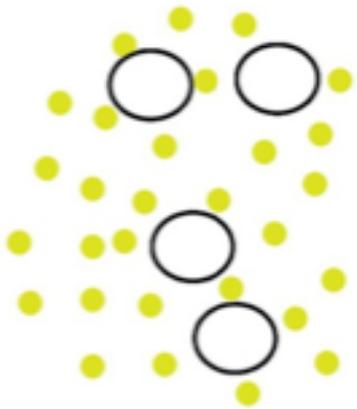


Drug resistance due to mutations

-  Proteins without active sites
-  Off-targets with similar active sites
-  Targets with changed conformation
-  Multidomain proteins

# Limites des petites molécules inhibitrices

*One of the biggest current challenges in treating human disease is targeting the so-called “undruggable” portion of the proteome.*



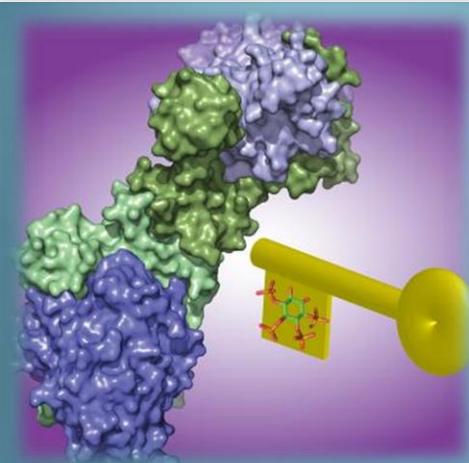
Undruggable proteins owing to the lack of active sites



PROTACs have the potential to target previously "undruggable" proteins. This opens up completely new possibilities in the development of new drugs and therapeutic modalities.

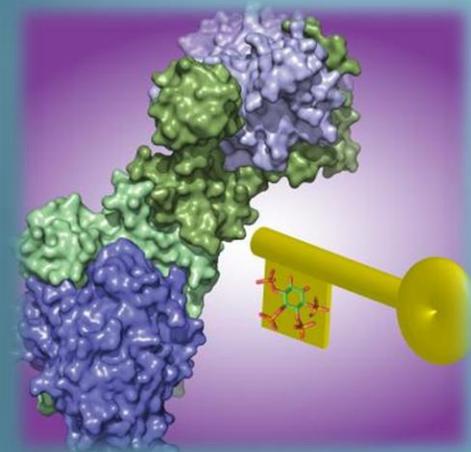
**5. Conception de PA :  
une approche inédite  
qui cible la  
dégradation des  
protéines**

**Proteolysis-Targeting  
Chimera Protein  
Degraders (PROTAC)**



## Paradigme actuel

- Aujourd'hui, jusqu'à **80% du protéome humain** est toujours considéré comme "undruggable" par de petites molécules.
- De **nombreuses cibles médicamenteuses validées**, y compris des cibles cancéreuses telles que les sous-unités **RAS, MYC, SWI/SNF** ou des **facteurs de transcription**, sont considérées comme pharmacologiquement **inaccessibles**.



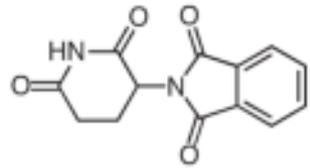
*Nécessité de concevoir  
des traitements innovants  
aux champs d'action plus larges.*



*Au lieu d'empêcher  
la fixation des protéines cibles  
sur l'effecteur,  
l'idée est de les dégrader  
après formation.*

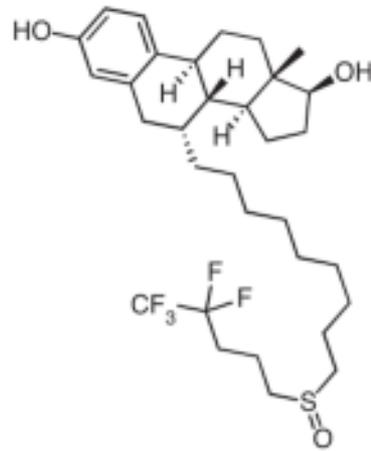
# Dégradation des protéines : différentes stratégies

Molecular-glue degrader



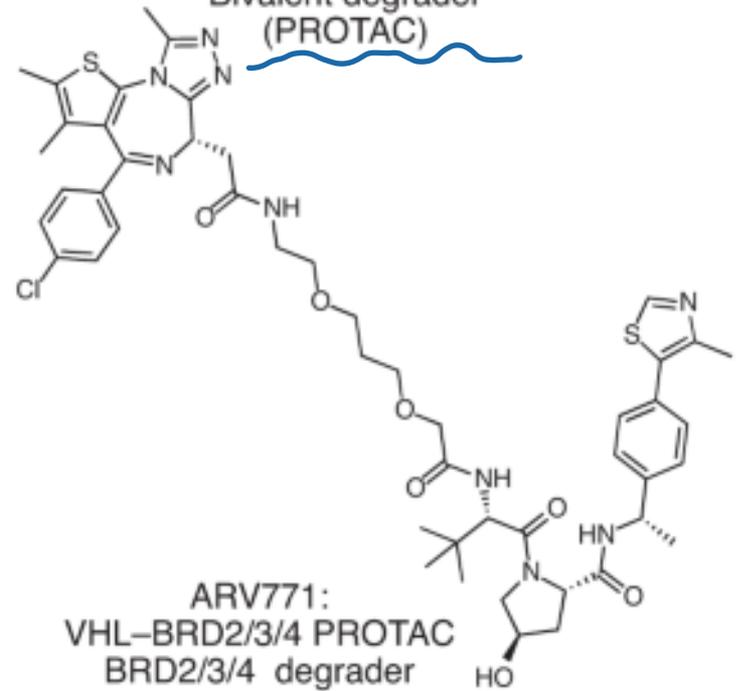
Thalidomide:  
IKZF1/3 degrader

Monovalent degrader



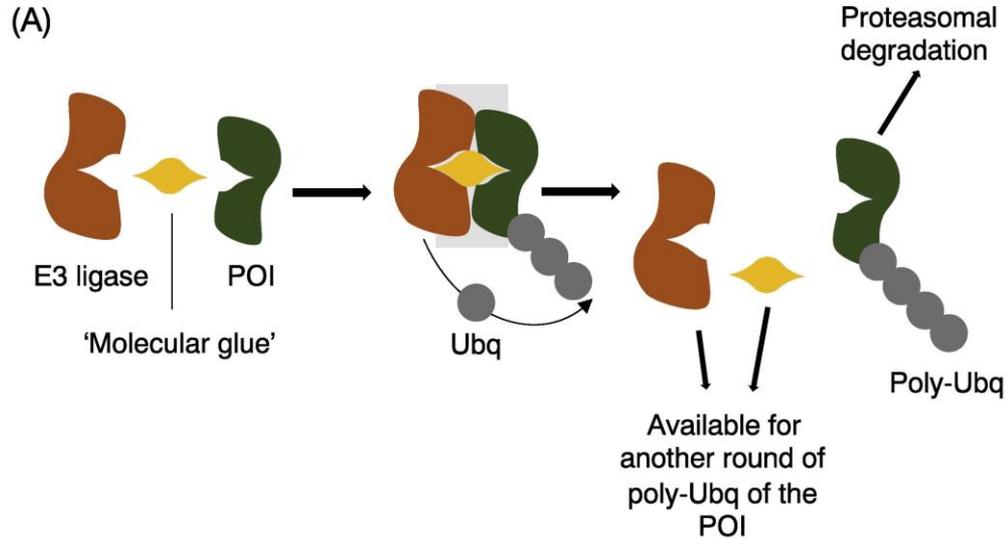
Fulvestrant:  
ER $\alpha$  degrader

Bivalent degrader  
(PROTAC)



ARV771:  
VHL-BRD2/3/4 PROTAC  
BRD2/3/4 degrader

# Dégradation des protéines : molecular glues “MG”



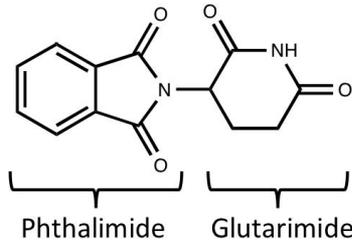
Les **colles moléculaires “Molecular Glues” MG** induisent de nouveaux **PPI\*** entre la ligase E3 et la protéine cible qui contribuent à la formation d'un complexe trimère **E3:MG:protéine cible**.

Bien que cela laisse entrevoir la possibilité excitante de dégrader des protéines non ligandables “unligandable proteins”, la **découverte de MG modulatrices E3 a jusqu'à présent été essentiellement fortuite et ne peut être facilement généralisée à d'autres cibles et classes de cibles**.

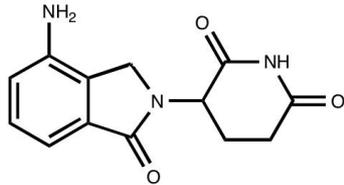
# Immunomodulatory imide drug "IMiDs"

## Clinically approved IMiDs

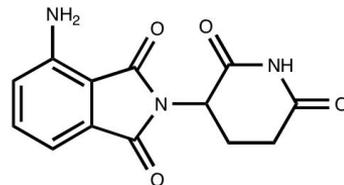
### A Thalidomide (*Thalidomid*)



### B Lenalidomide (*Revlimid*)



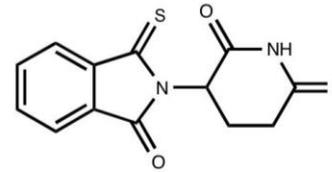
### Pomalidomide (*Pomalyst*)



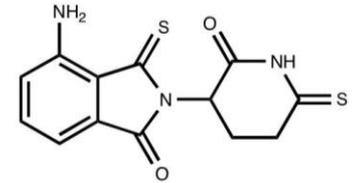
IMiDs can be structurally altered to enhance function, increase bioavailability, and reduce adverse side effects.

## IMiDs under development

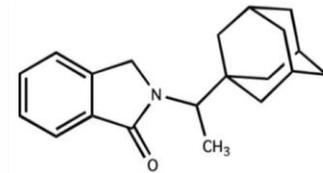
### 3,6'-Dithiothalidomide



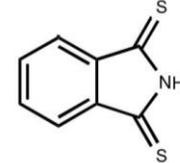
### 3,6'-DithioPomalidomide



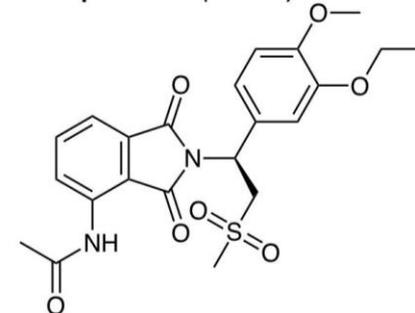
### N-adamantyl phthalimidine



### Dithiophthalimide (isoindolin-1,3 dithione)



### Apremilast (*Otezla*)



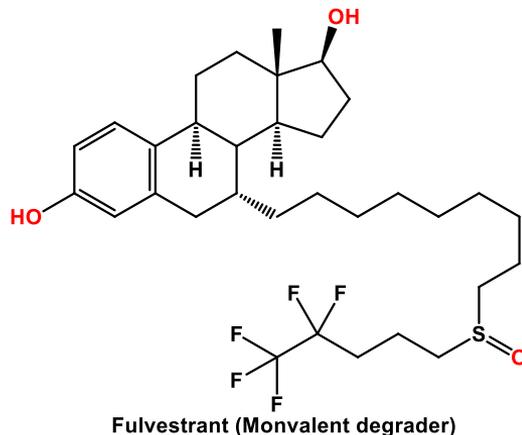


# SERD: Selectively Estrogen Receptor Down-regulators

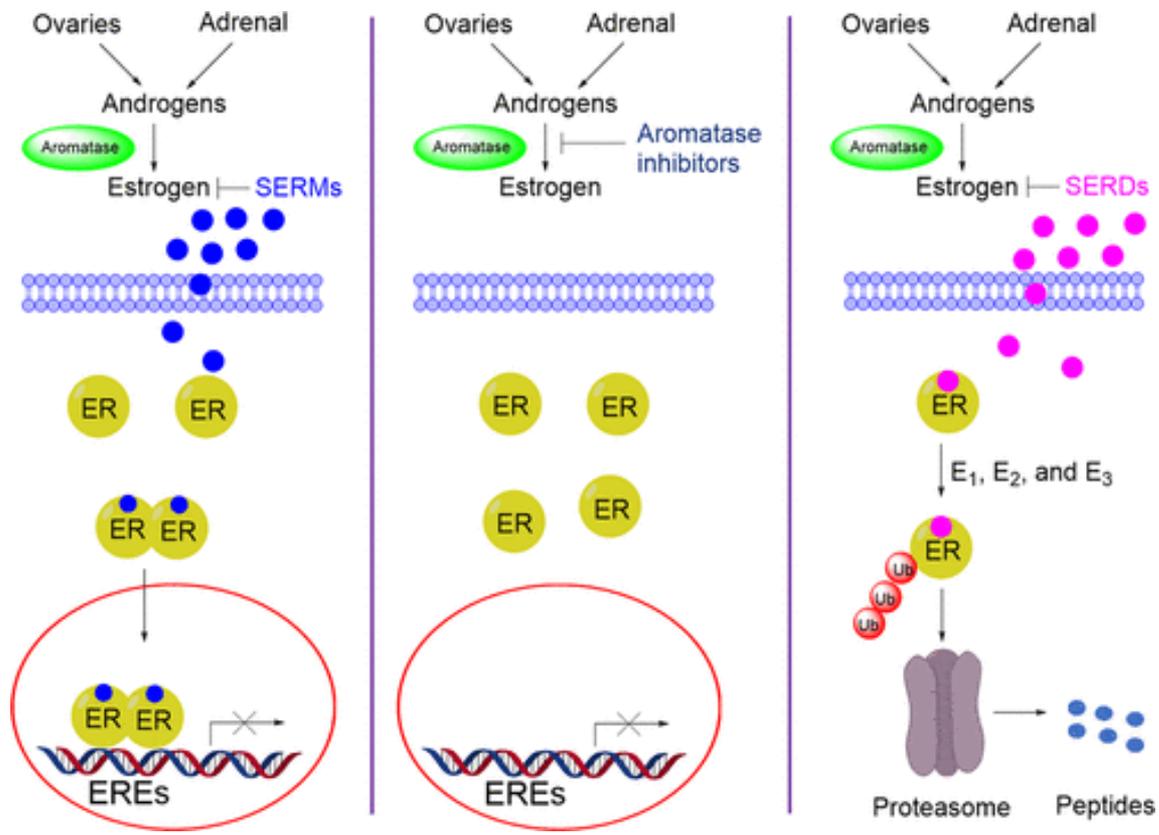


Les premières molécules identifiées comme dégradant sélectivement la protéine cible sont des régulateurs négatifs des récepteurs des œstrogènes (**SERD**, **S**electively **E**strogen **R**eceptor **D**own-regulators), ciblant spécifiquement le récepteur des œstrogènes  $\alpha$ , contrôlant la signalisation oncogénique dans le cancer (sein).

Ex : Fulvestrant régulateur sélectif qui se lie au récepteur RE  $\rightarrow$  le blocage provoque sa dégradation et bloque la signalisation.



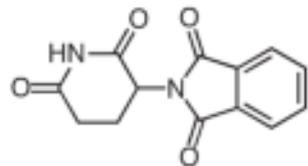
# SERD: Selectively Estrogen Receptor Down-regulators



Fulvestrant : Lack of cross-resistance with tamoxifen

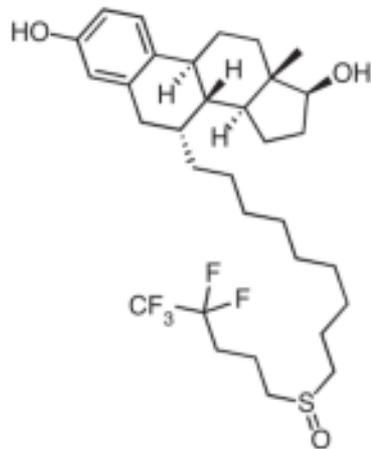
# Dégradation des protéines : différentes stratégies

Molecular-glue degrader



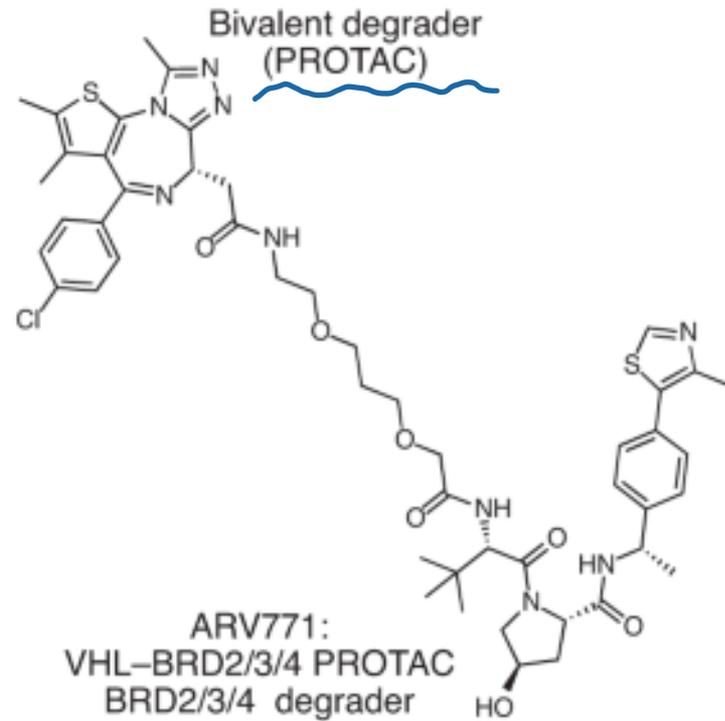
Thalidomide:  
IKZF1/3 degrader

Monovalent degrader



Fulvestrant:  
ER $\alpha$  degrader

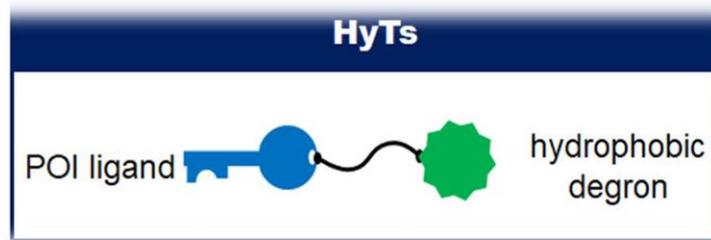
Bivalent degrader  
(PROTAC)



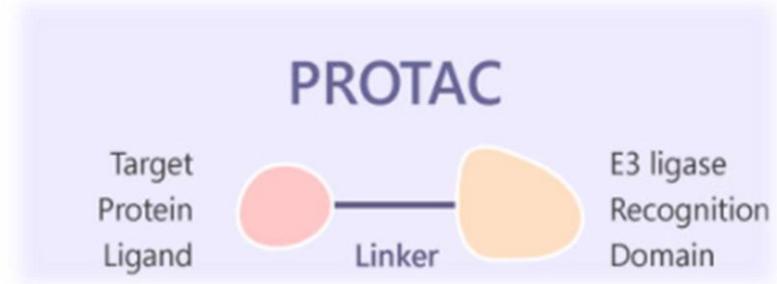
ARV771:  
VHL-BRD2/3/4 PROTAC  
BRD2/3/4 degrader

# Technologies de dégradation induite des protéines

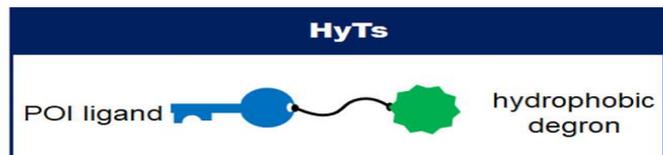
- A) Hydrophobic Tags (HyTs)



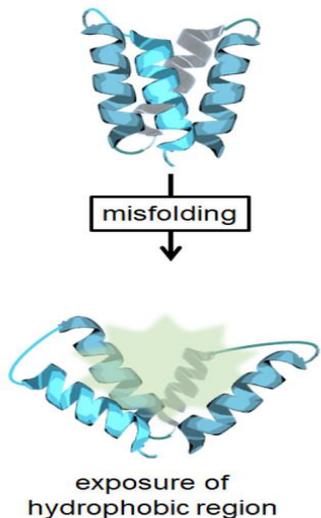
- B) PROTAC



# Technologies de dégradation induite des protéines (HyT)

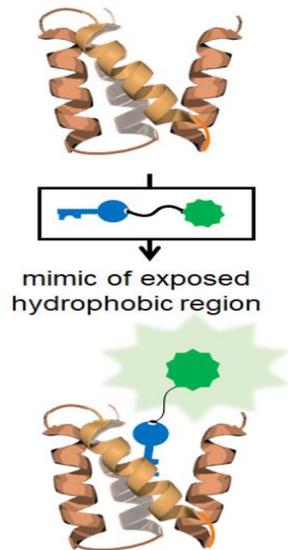


## Protein Quality Control



recruitment of HSP70/CHIP machinery  
& proteasomal degradation

## Hydrophobic Tagging



## • A) Hydrophobic Tags (HyTs)

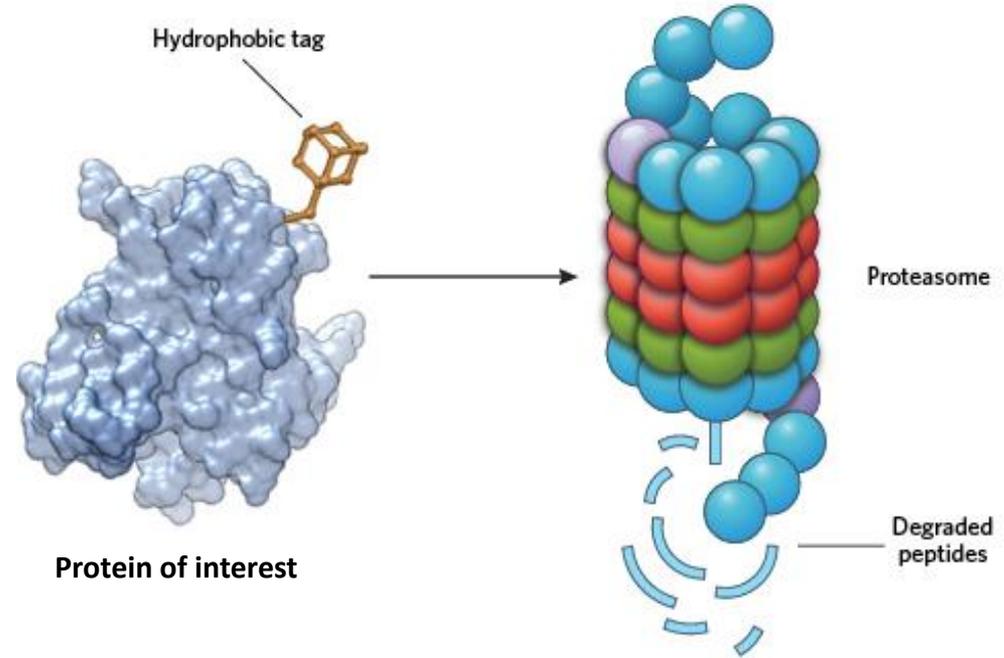
L'enfouissement de résidus hydrophobes au cœur d'une protéine est l'une des principales forces motrices du repliement des protéines ; en revanche, l'exposition de ces régions hydrophobes est considérée par la cellule comme la signature d'une protéine non repliée "unfolded protein" → donc appelée à être dégradée.

# Technologies de dégradation induite des protéines (HyT)

## PROTAC À PETITES MOLÉCULES



En ajoutant une grande fraction hydrophobe à la surface de la protéine cible, le HyT (hydrophobic tag) conserve à la protéine sa forme «non repliée» (“unfolded”), reconnue par les protéines chaperons de la cellule qui la dirigent vers le protéasome en vue de sa dégradation.



# Technologies de dégradation induite des protéines (HyT)

Mutant Huntingtin Degradé par des Étiquettes Hydrophobes de Petite Molécule

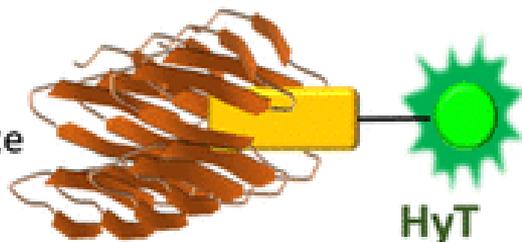
## Étiquette hydrophobe (HyT)



aggregate binder

hydrophobic decon

protein  
aggregate



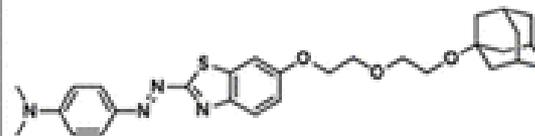
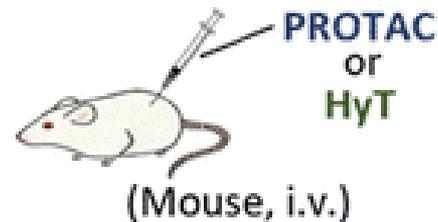
HyT

HSP70



**proteasomal  
degradation**

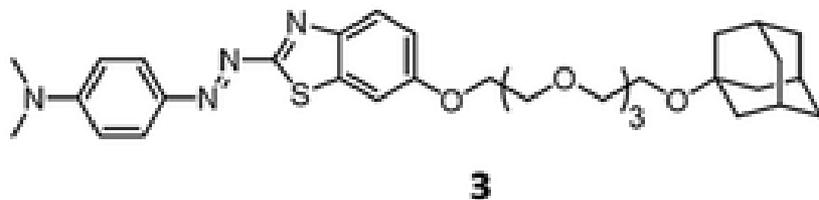
**In vivo brain  
permeability analysis**



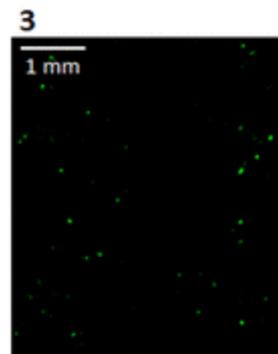
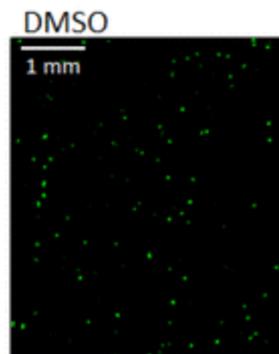
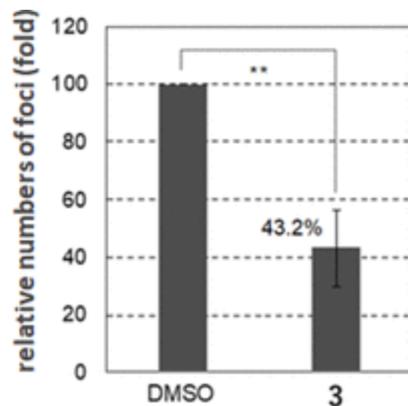
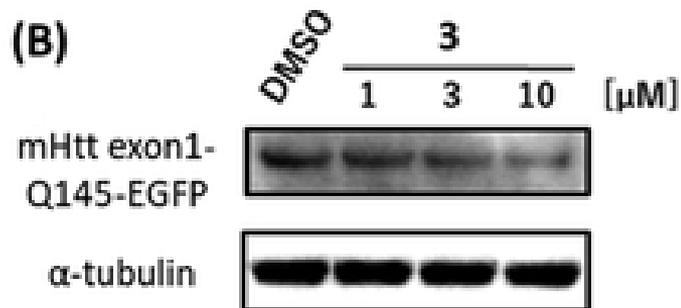
$K_{p, \text{brain}}$ : **4.89**

# Technologies de dégradation induite des protéines (HyT)

(A)



(B)

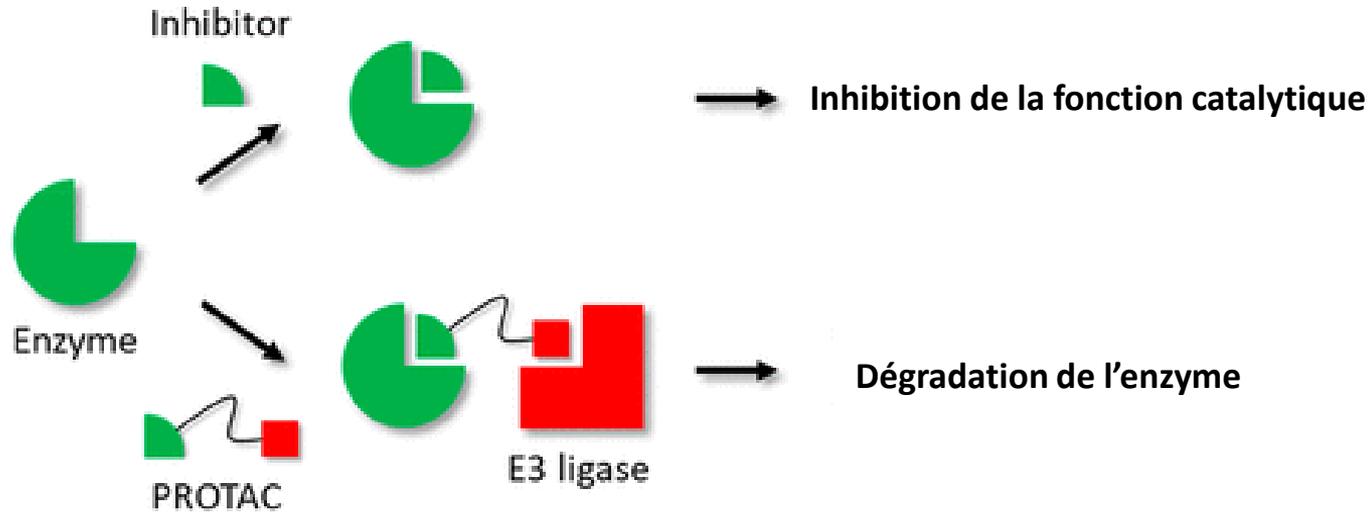


← Fluorescence microscopy

HyT 3 decreases mHtt aggregates in cells. HeLa cells transiently expressing mHtt exon 1-Q145-EGFP were treated with DMSO or 10 μM HyT 3 and incubated for 24 h.

# B) PROTAC :

## Proteolysis-targeting chimaera (PROTAC) technology



# IUPAC Top Ten Technologies selection for 2021.



## IUPAC Top Ten Emerging Technologies in Chemistry 2021



Blockchain



Semisynthetic life



Superwettability



Artificial humus



RNA synthesis



Sonochemical coating



Chemoluminescence



Sustainable ammonia

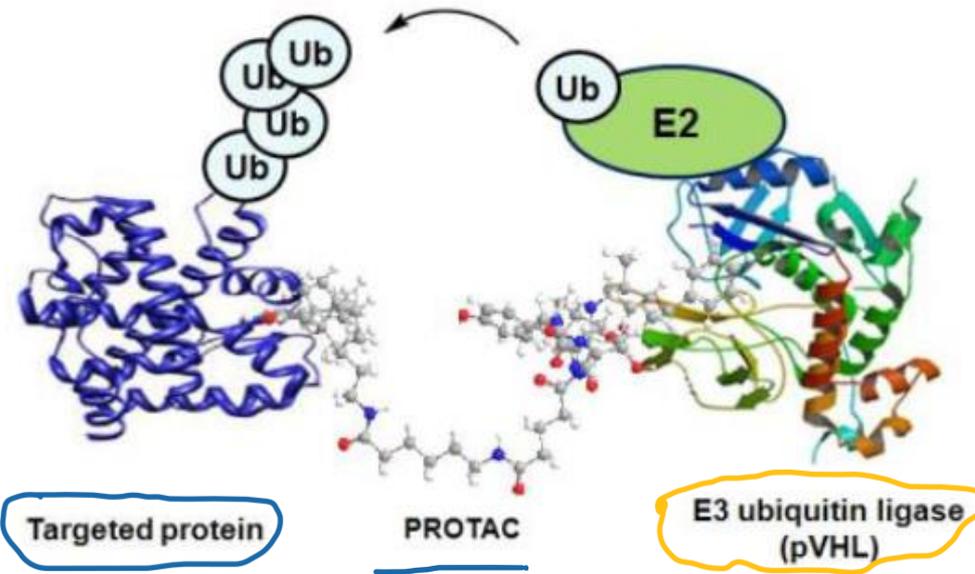


Targeted protein degradation



Single-cell metabolomics

# B) PROTAC : mécanisme

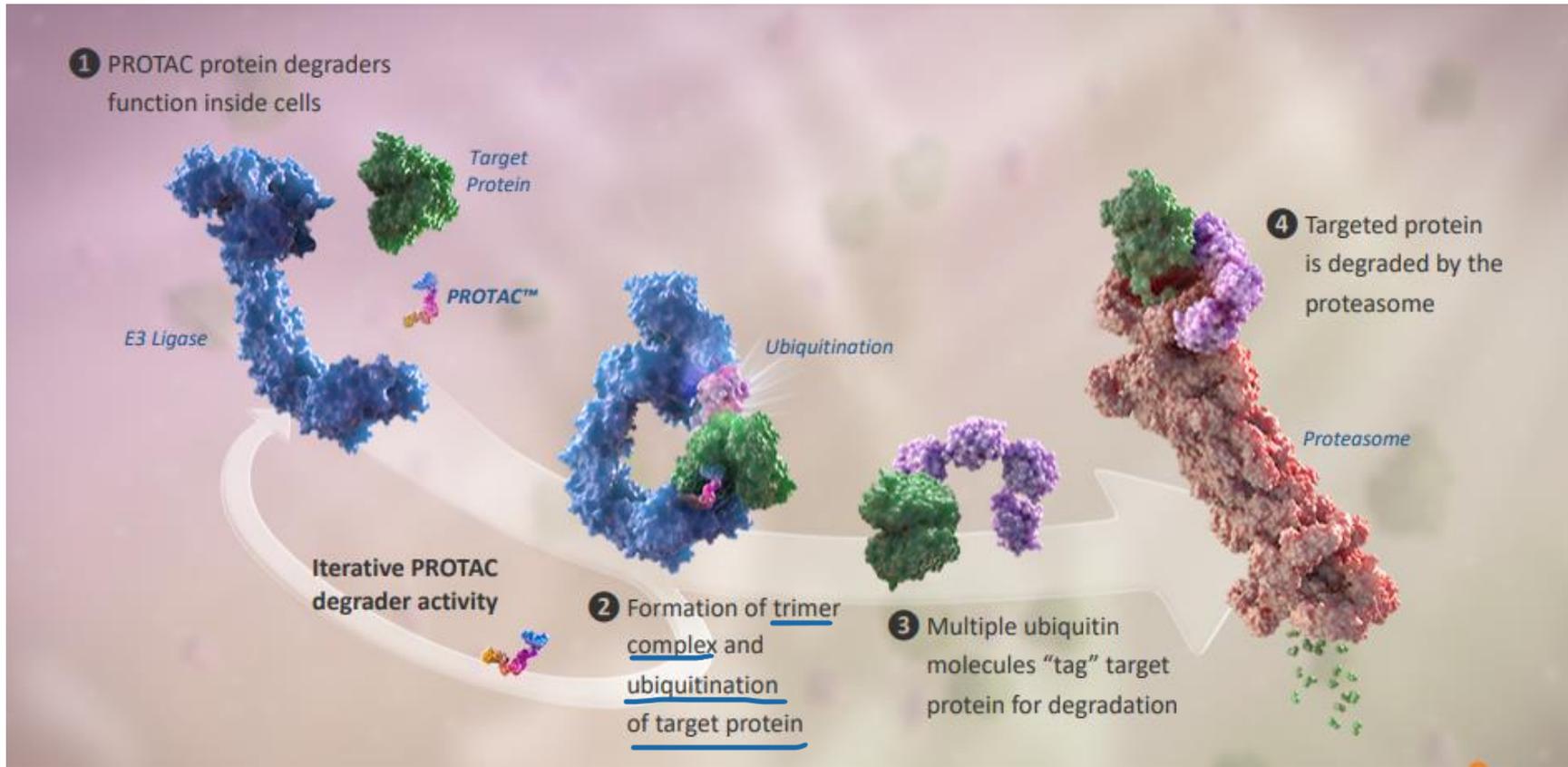


PROTAC, candidats médicaments, encore appelés « Dégronimides™ » sont des molécules **bifonctionnelles** : une partie se lie à la **protéine ciblée** et l'autre partie **recrute l'enzyme E3 ligase** afin d'induire une ubiquitinylation sélective, les deux parties fonctionnelles étant reliées par un bras « espaceur ».

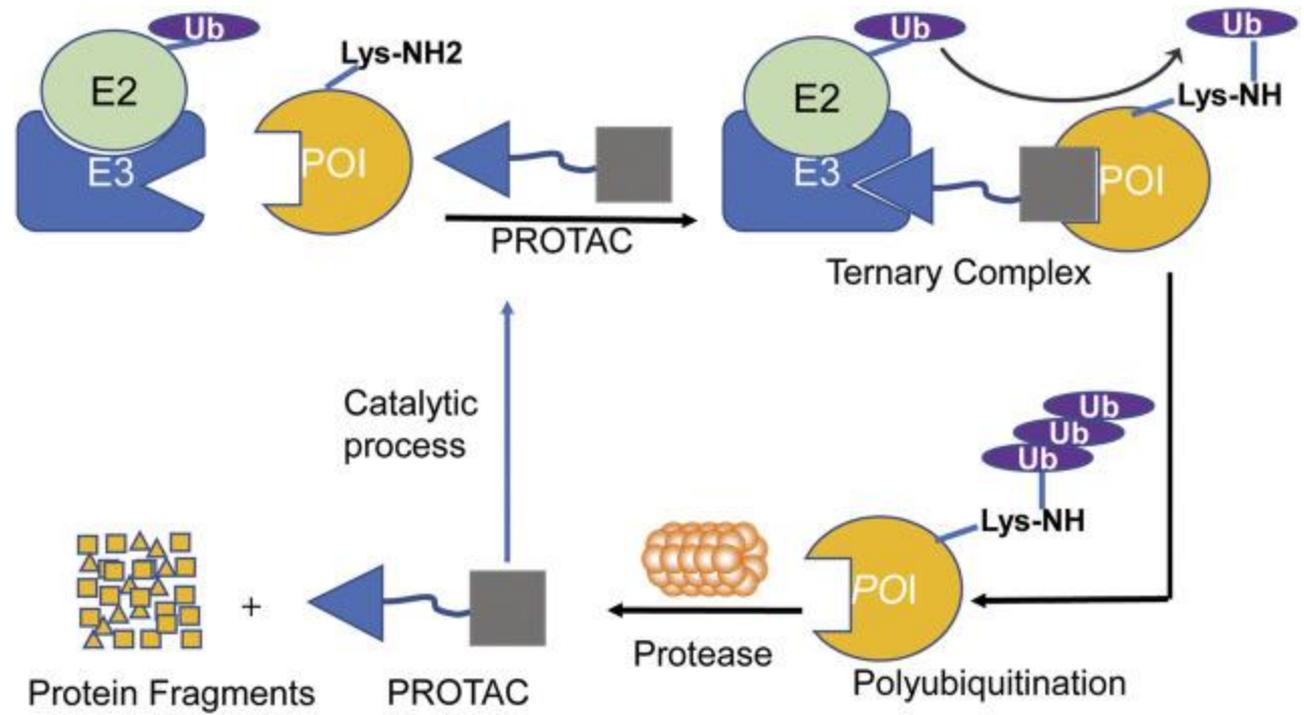
- The idea: 1998, Crews/Deshaies



# PROTAC : mécanisme d'action

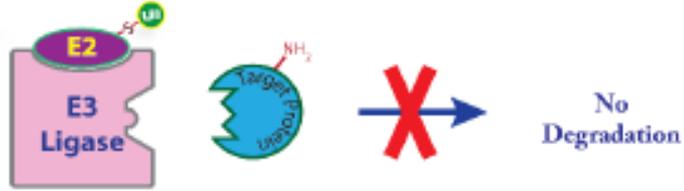


# PROTAC : mécanisme d'action

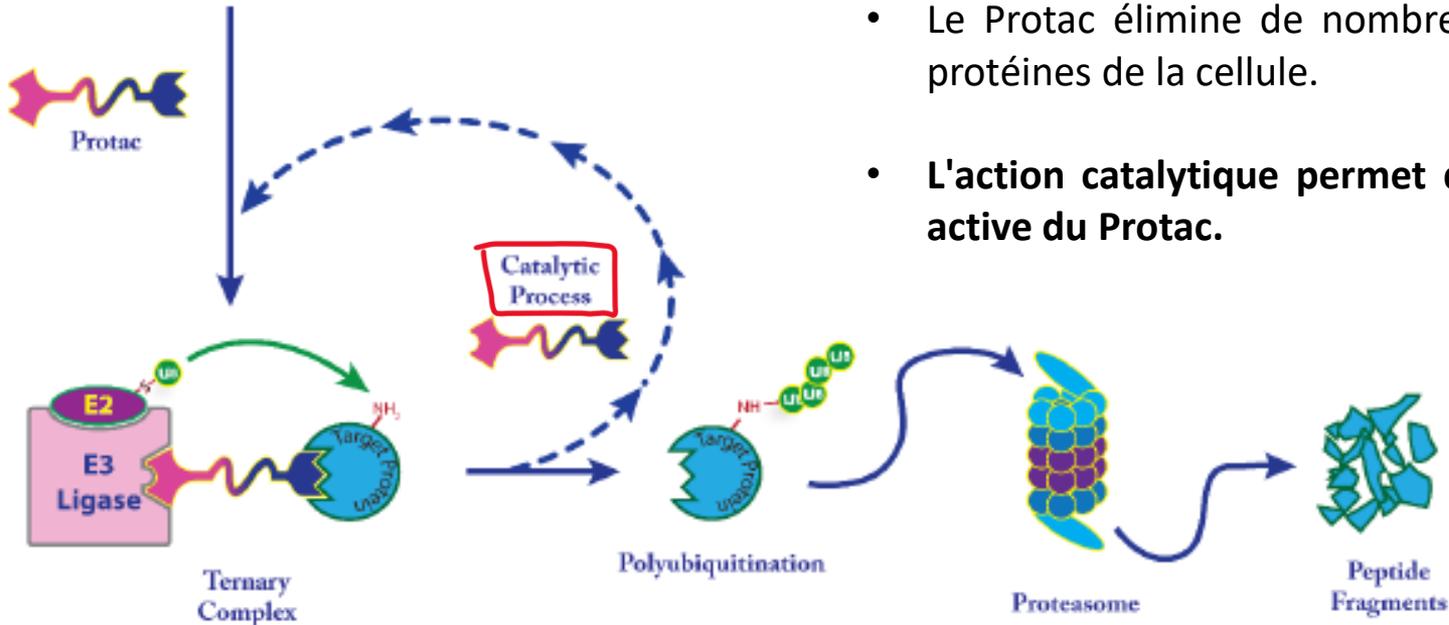


# PROTAC : mécanisme

## B) Proteolysis-targeting chimaera (PROTAC) technology



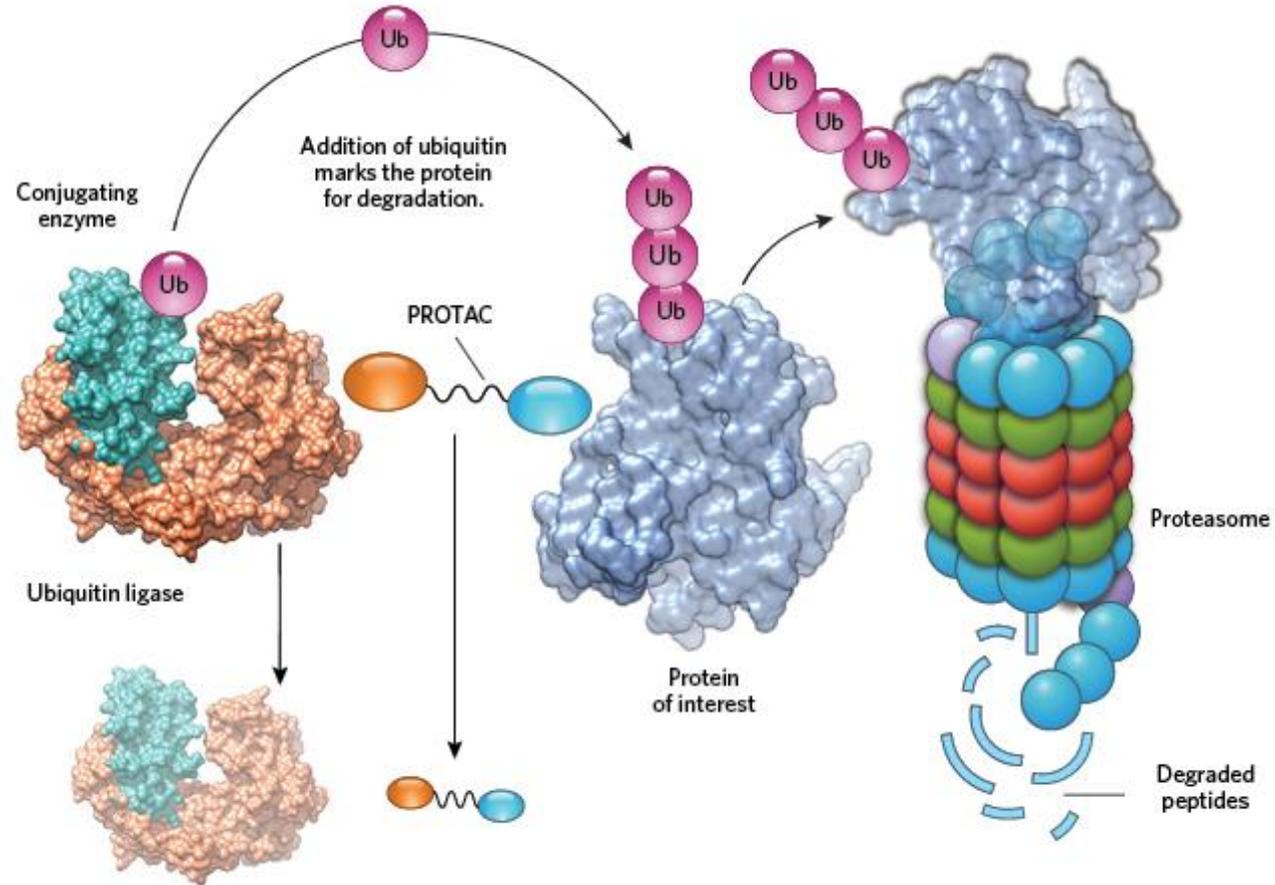
- Le Protac recrute (« pirate ») une ligase E3 pour marquer la protéine cible avec l'ubiquitine, qui la dirige vers sa dégradation *via* le protéasome.
- Le Protac élimine de nombreuses molécules de protéines de la cellule.
- **L'action catalytique permet de libérer la forme active du Protac.**



# PROTAC : mécanisme

## Propriétés des Protac :

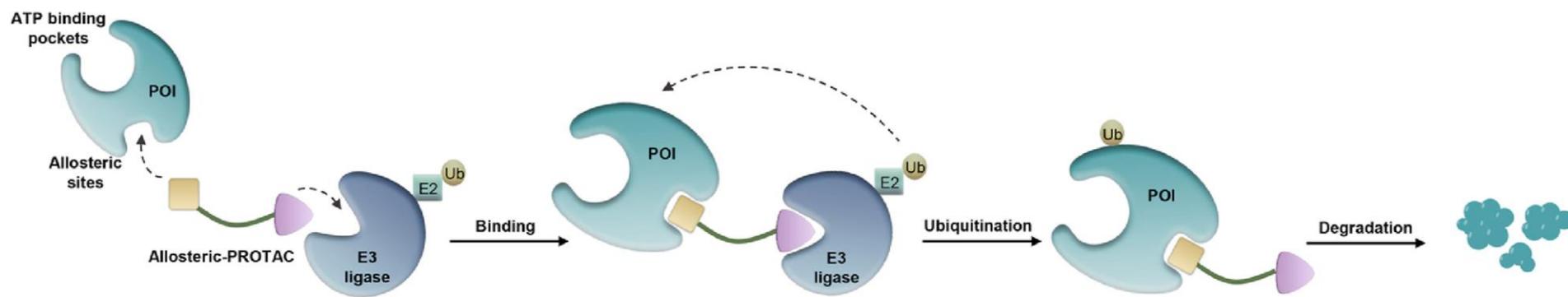
- Affinité et sélectivité pour la(les) cible(s) à dégrader.
- PK appropriée :  
Bonne absorption cellulaire, biodistribution...



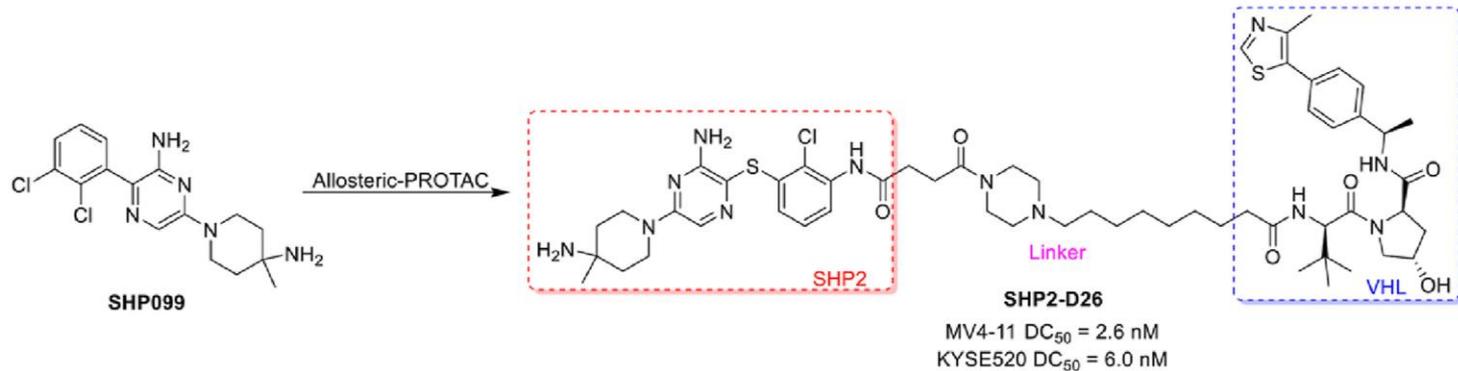
- Effet pharmacodynamique d'une durée notablement supérieure à la durée déduite de leurs propriétés pharmacocinétiques, le temps que les cellules synthétisent à nouveau la protéine dégradée.
- Les résistances au traitement induites notamment par des mutations ou une augmentation du nombre de récepteurs (aux androgènes par exemple) devraient être réduites, puisque ce mécanisme catalyse la dégradation d'une protéine, quelle que soit sa forme.

# Allosteric-PROTACs

a)



b)



# Glue Degraders vs. PROTACs

## Degrading Disease Causing Proteins

### *Bifunctional vs. Glue Degraders – Two Faces of the same Coin*

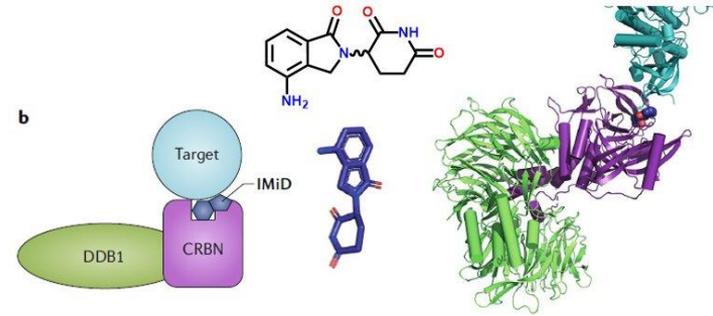
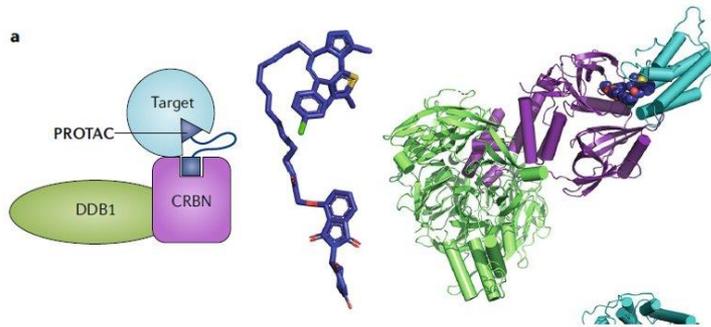
#### Bifunctional Degraders

- Beyond Rule-of-5 property space
- + Predictable target space (?)
- + High target specificity
- + Modular design approach
- $\mu\text{M}$  affinity on both ends, Hook effect



#### Glue Degraders

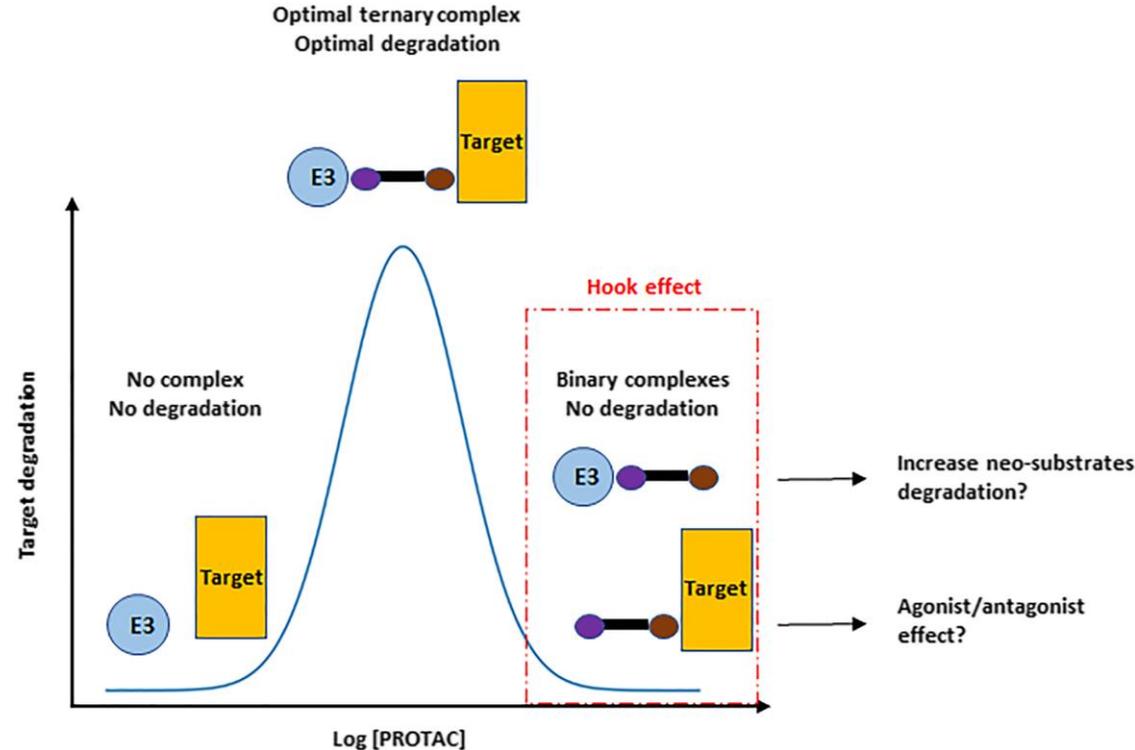
- + Drug-like, Rule-of-5 compliant
- Limited target space (degron)
- Prone to polypharmacology (?)
- Identification by serendipity (?)
- $\mu\text{M}$  affinity for one binding partner



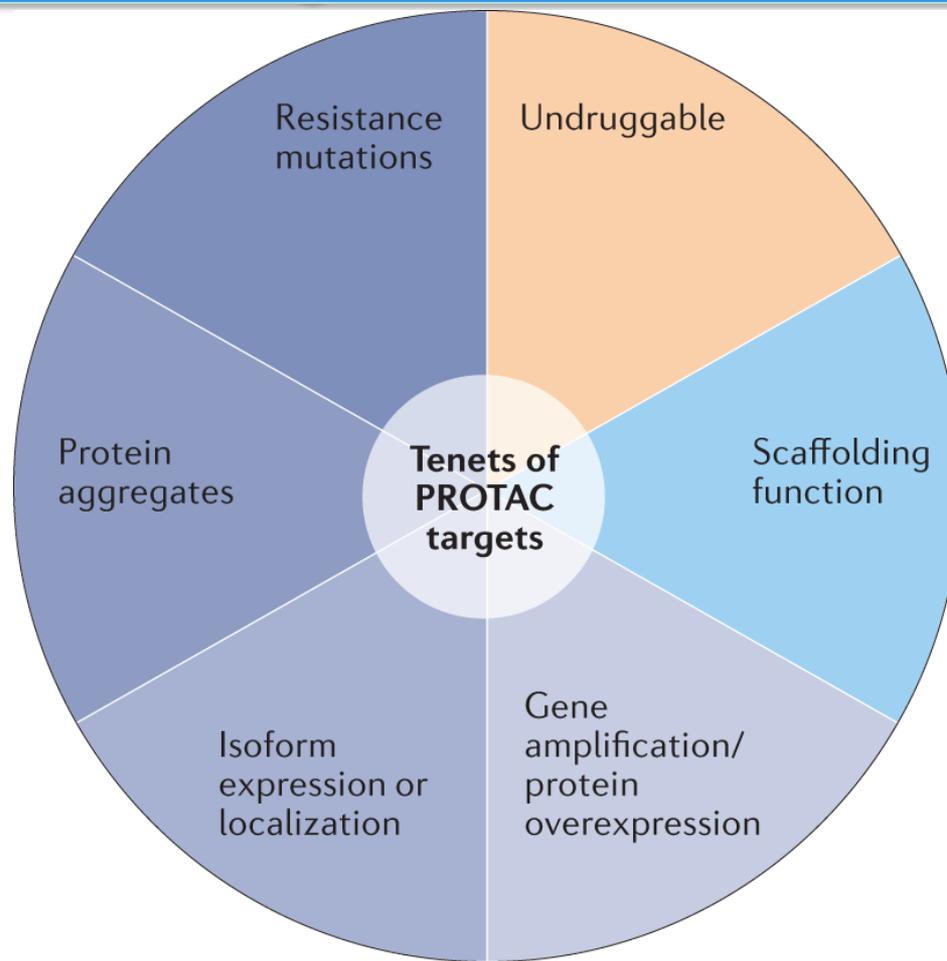
# Glue Degradors vs. PROTACs

## Effet de saturation avec PROTAC: effet Hook

- À des concentrations intracellulaires élevées de PROTAC, les complexes binaires sont favorisés par rapport aux complexes ternaires, ce qui entraîne une réduction de la dégradation de la cible.

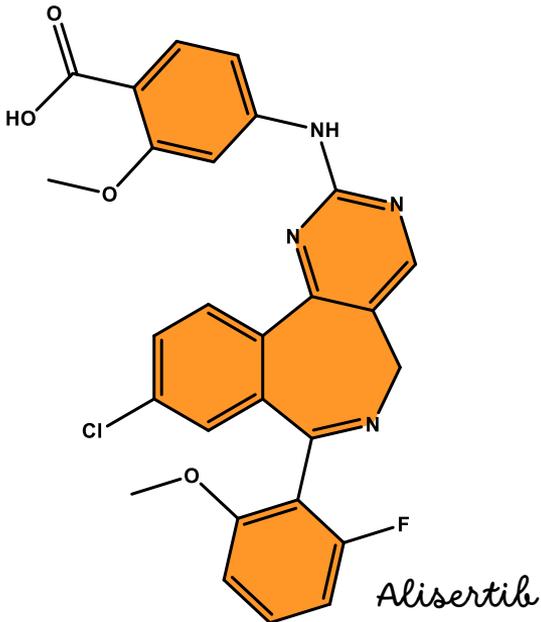


# The tenets of PROTAC targets..

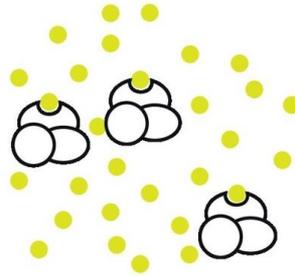


# B) PROTAC targets scaffolding function

Pourquoi l'alisertib (inhibiteurs ATP-compétitifs sélectif d'AURORA-A) a présenté de faibles taux de réponse dans la suppression de la croissance tumorale dans plusieurs essais cliniques ?



## B) PROTAC targets scaffolding function



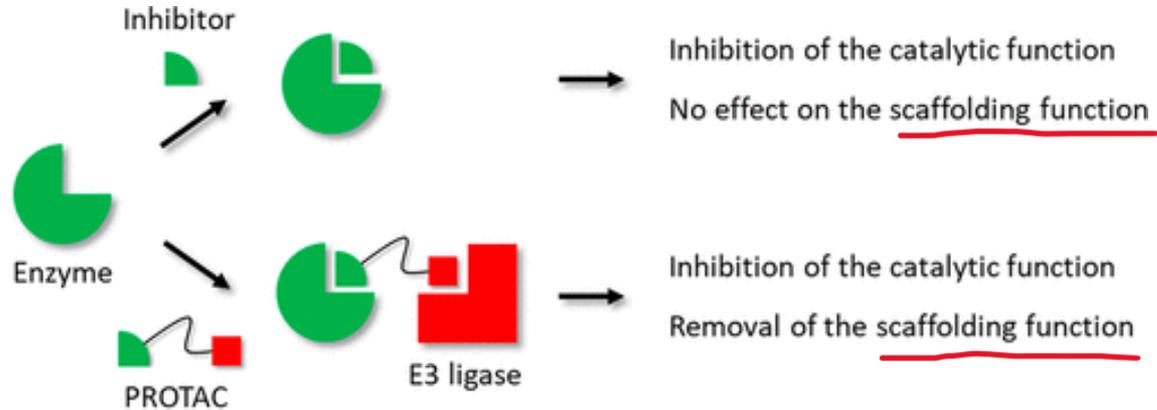
Reservation of other activities  
for multidomain proteins

AURORA-A est une kinase qui est impliquée de manière essentielle dans la régulation de la mitose. Quand elle est amplifiée, AURORA-A se comporte comme une véritable oncoprotéine.

De plus, AURORA-A régule les proto-oncoprotéines de la famille **MYC** et **empêche leur dégradation, de manière indépendante de l'activité kinase (scaffolding function)**.

Ces résultats suggèrent que la **fonction non catalytique d'AURORA-A** peut également être un facteur clé de la croissance tumorale (par exemple, *via* la stabilisation de MYC).

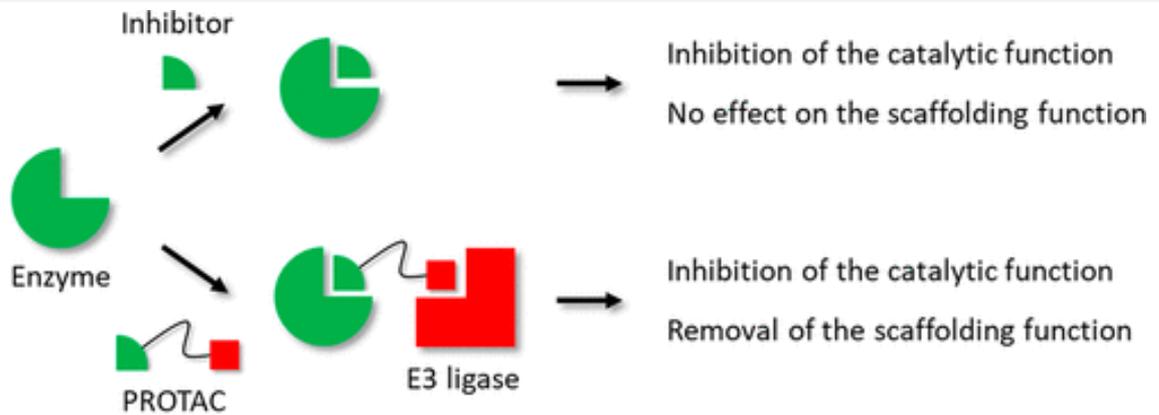
# B) PROTAC targets scaffolding function



Jusqu'à présent, les inhibiteurs ATP-compétitifs puissants d'AURORA-A (par exemple, l'**alisertib**) ont présenté de **faibles taux de réponse dans la suppression de la croissance tumorale** dans plusieurs essais **cliniques**.

→ La dégradation d'AURORA-A par le Protac a provoqué un arrêt sévère de la phase S et la mort cellulaire qui s'en est suivie, ce qui n'a pas été observé avec les inhibiteurs de la kinase AURORA-A compétitifs en ATP.

# B) PROTAC targets scaffolding function



**Comparison of a Small-Molecule Inhibitor and a PROTAC-Based Degradator**

	small-molecule inhibitor	PROTAC-based degrader
structure	often active site-directed (i.e., ATP for kinases and NAD <sup>+</sup> for PARPs)	two functional ligands (i.e., target-binding ligand and E3 ligase ligand) bridged by a linker
target	enzymes that have catalytic functions with a suitable active site	enzymes that have both catalytic functions and scaffolding roles
selectivity	enzyme–inhibitor interactions restricted to the active site, with potential off-target effects	potentially enhanced selectivity owing to ternary complex formation
mechanism of action	direct inhibition of the enzymatic activity	direct inhibition of the enzymatic activity targeted protein degradation to remove the scaffolding functions (i.e., via the ubiquitin–proteasome system)
effect	reversible and competitive inhibition potential to develop acquired drug resistance (e.g., via gatekeeper mutation)	sustained target depletion via a catalysis-based mechanism less likely to develop acquired drug resistance

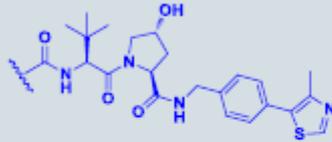
## Quelle ubiquitine ligase E3 choisir ?

Plus de 600 protéines à activité ubiquitine ligase E3 sont connues.

Mais seules quelques protéines possédant cette activité enzymatique sont actuellement utilisées : **protéines VHL, céréblon, IAP** ou encore la protéine Mdm2.

Ligase d'Ubiquitine E3 :

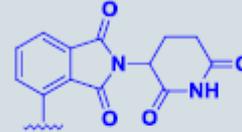
Von Hippel Lindau (VHL)



- VHL binder (HIF1 $\alpha$  mimetic)
- E3  $K_d \sim 0.5 \mu\text{M}$
- $\text{DC}_{50}$  down to low nM

*Nat Chem Biol* 2015, 11, 611  
See also *ACS Chem Biol* 2015, 10, 1770

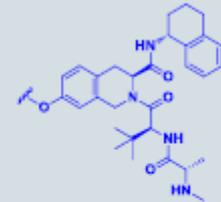
cereblon



- Cereblon binder (thalidomide-based)
- E3  $K_d \sim 1 \mu\text{M}$
- $\text{DC}_{50}$  down to low/sub-nM

*Chem & Biol* 2015, 22, 755  
*Science* 2015, 348, 1376

Inhibitor of Apoptosis Protein (IAP) Family

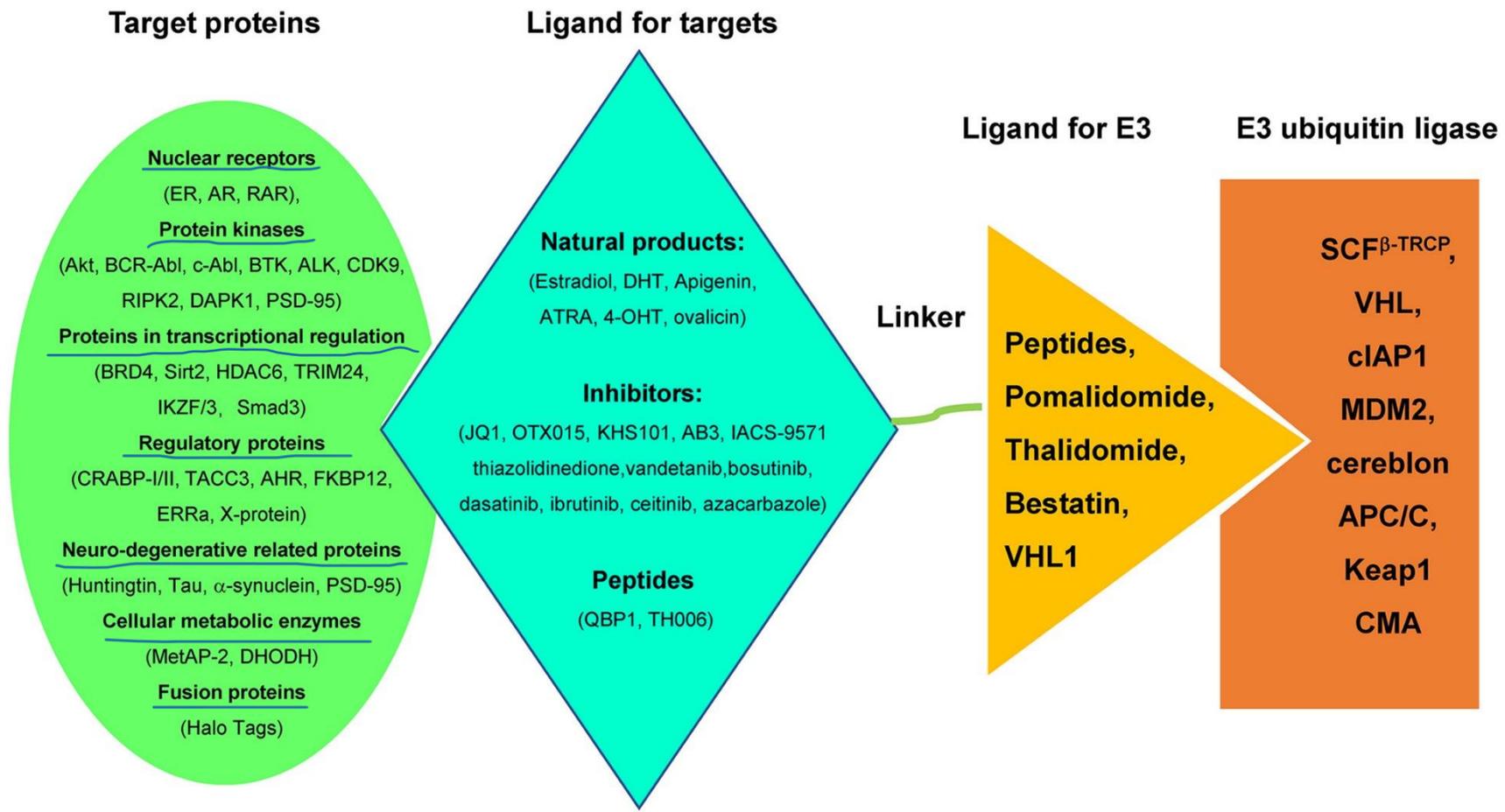


- Many cIAP binders identified
- E3  $K_d$  low nM across family
- $\text{DC}_{50}$  down to low/sub-nM

*Cancer Sci* 2013, 104, 1492  
*J Biol Chem* 2017, 292, 4556-70

Ligand :

# PROTAC : quelques exemples



# PROTAC : les bonnes réponses !

## Ligand : liaison avec la cible

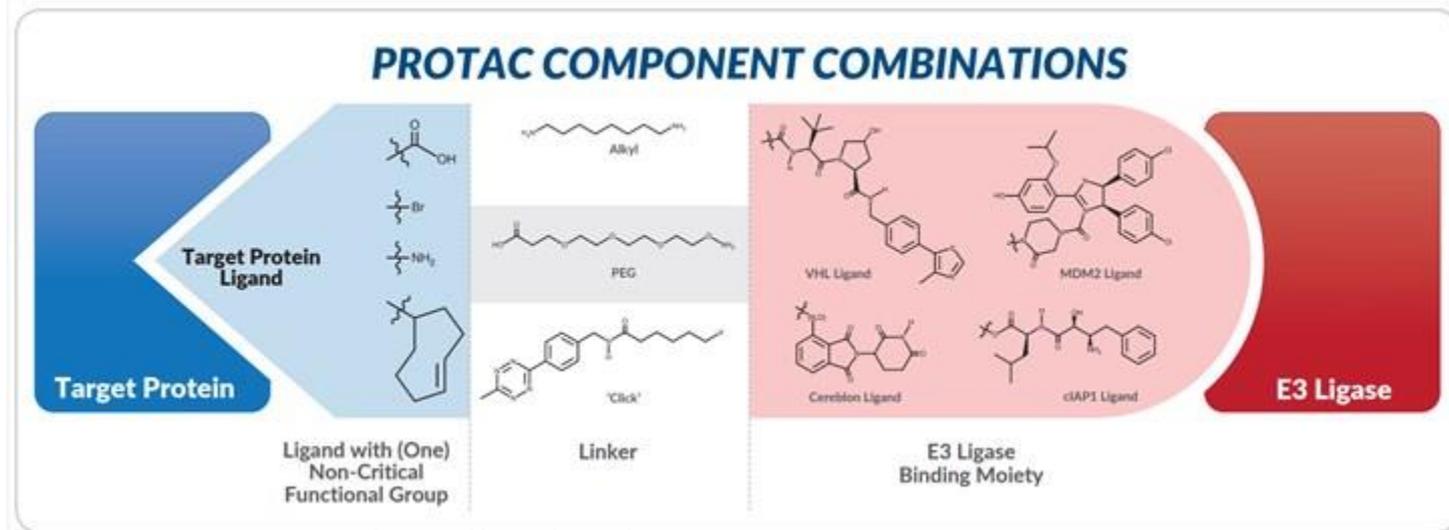
- Affinité plus élevée (généralement meilleure)  $K_d < 1\mu\text{M}$
- Un ligand sélectif provoque une dégradation sélective.

## Linker

- Permet le positionnement correct du complexe.
- Induit des interactions secondaires.
- Contrôle les prop. physico-chimiques.

## Ligand de recrutement de l'ubiquitine ligase E3

Peut recruter les protéines à activité ubiquitine ligase E3 telles que VHL, le céréblon, IAP, ou mdm2...



Overall Molecular size 800-1500 Da

# Plan

1- Introduction

2- Protéasome : cible thérapeutique

3- Protéasome : structure et fonctions

4- Inhibiteurs du protéasome

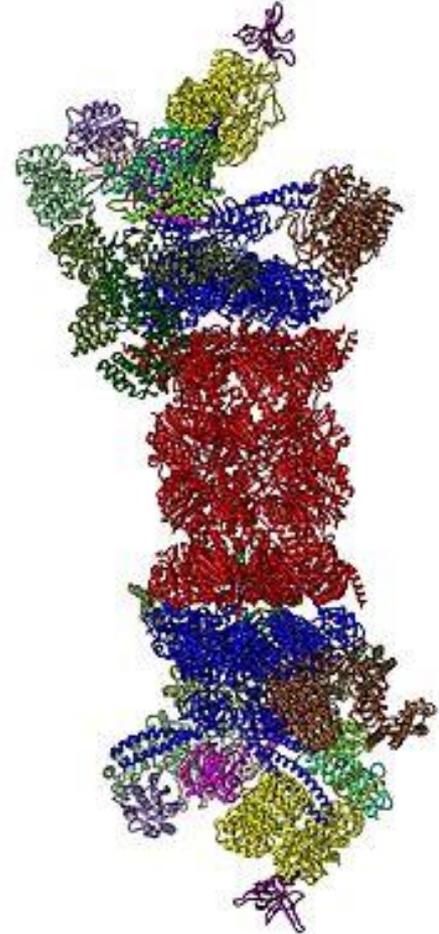
5- Conception rationnelle de principes actifs :  
une approche inédite qui cible la dégradation des protéines :  
*Proteolysis-Targeting Chimera Protein Degraders (PROTAC)*

**6- PROTAC Cases studies**

**7- Protac : études cliniques**

**8- Outils en ligne**

**9- Conclusion**



**Weak or  
Promiscuous  
Ligands Can Be  
Converted  
into Potent and  
Selective PROTAC  
Degraders, e.g.  
Foretinib**

**6. PROTAC  
Case study 01**

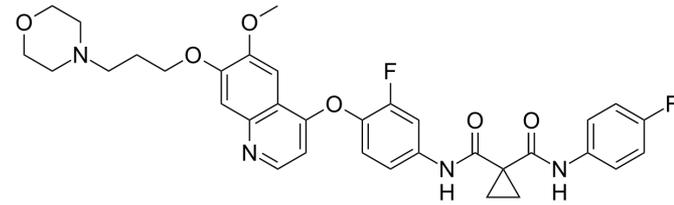


Even the weak become  
strong when they are united.

Friedrich Schiller

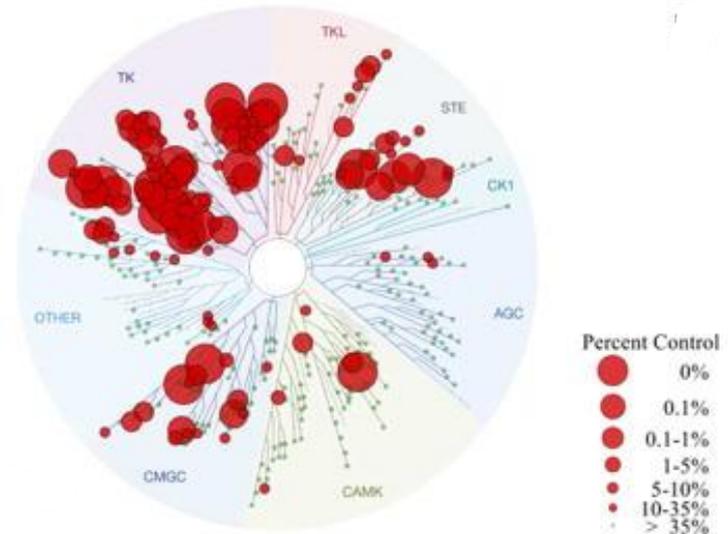
# PROTAC : exemple

When developed into PROTAC degraders, weak binders can become potent degraders

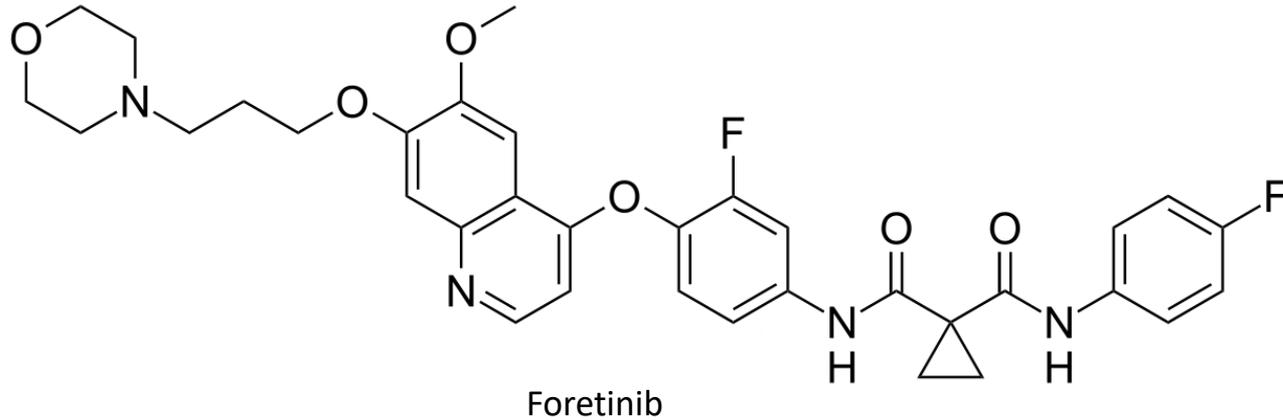


Foretinib

- **Foretinib** is a c-Met tyrosine kinase inhibitor and is a relatively weak binder to p38 $\alpha$
- foretinib's relatively promiscuous inhibition of multiple kinases
- At 10  $\mu$ M foretinib binds to **133 different kinases**



# PROTAC : exemple



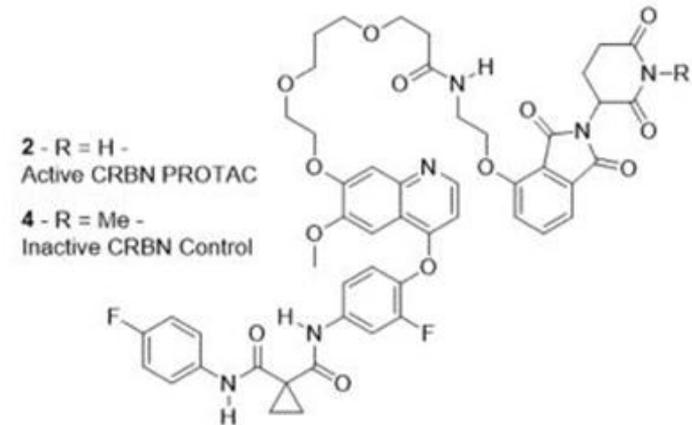
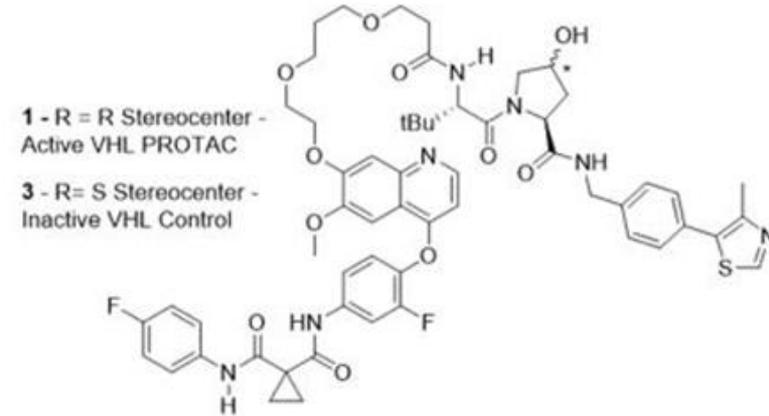
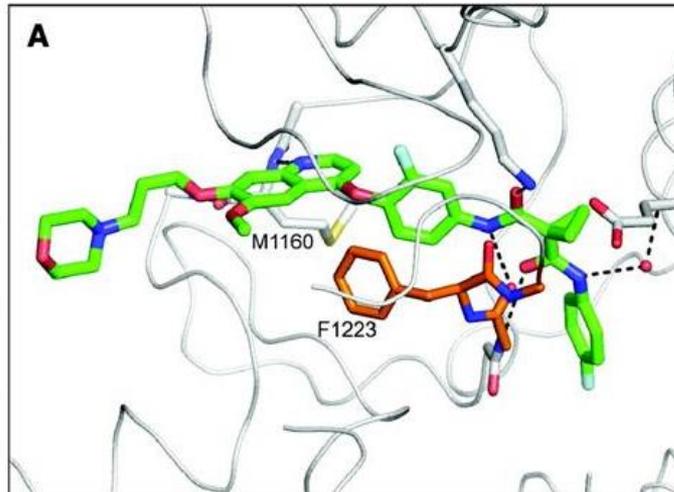
Sur quelle partie de Foretinib sera fixé le linker pour concevoir des PROTACs ?



# PROTAC : exemple

- Based on the co-crystal structure of foretinib bound to the c-Met kinase domain, the disordered and solvent-exposed morpholine of foretinib was dispensable for affinity
- Utilizing the solvent-exposed morpholine of foretinib as a linker attachment point for E3 ubiquitin ligase-recruiting molecules.

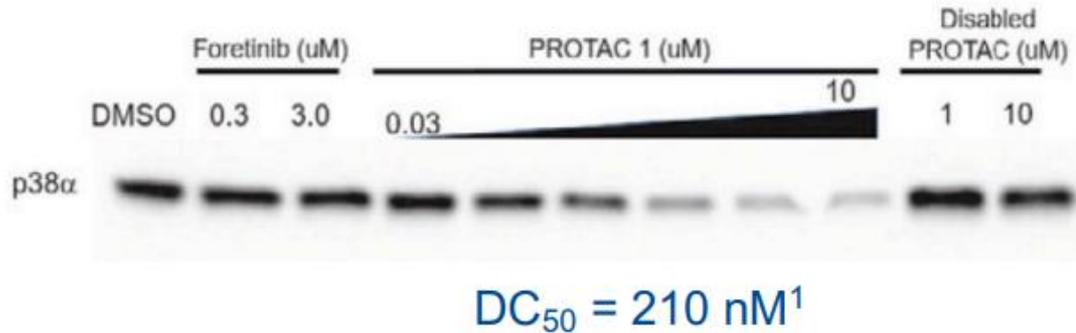
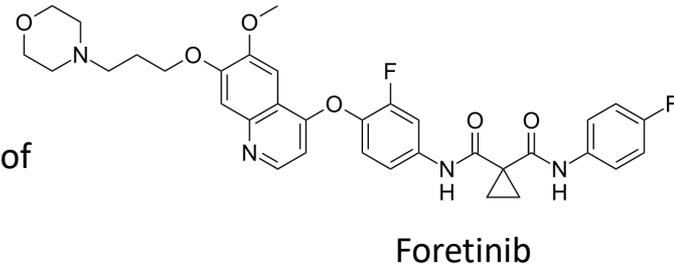
**Two Generated Protacs: VHL-Recruiting PROTAC and CRBN-Recruiting PROTAC**



# PROTAC : exemple

When developed into PROTAC degraders, weak binders can become potent degraders

- **PROTAC 1** is a foretinib-based PROTAC degrader with a p38a binding affinity of 11  $\mu\text{M}$
- Despite its 11  $\mu\text{M}$  binding affinity, **PROTAC 1** has a  $\text{DC}_{50}$  of 210  $\text{nM}^1$
- Based on experience, optimization of potency better than 210  $\text{nM}$  is likely.

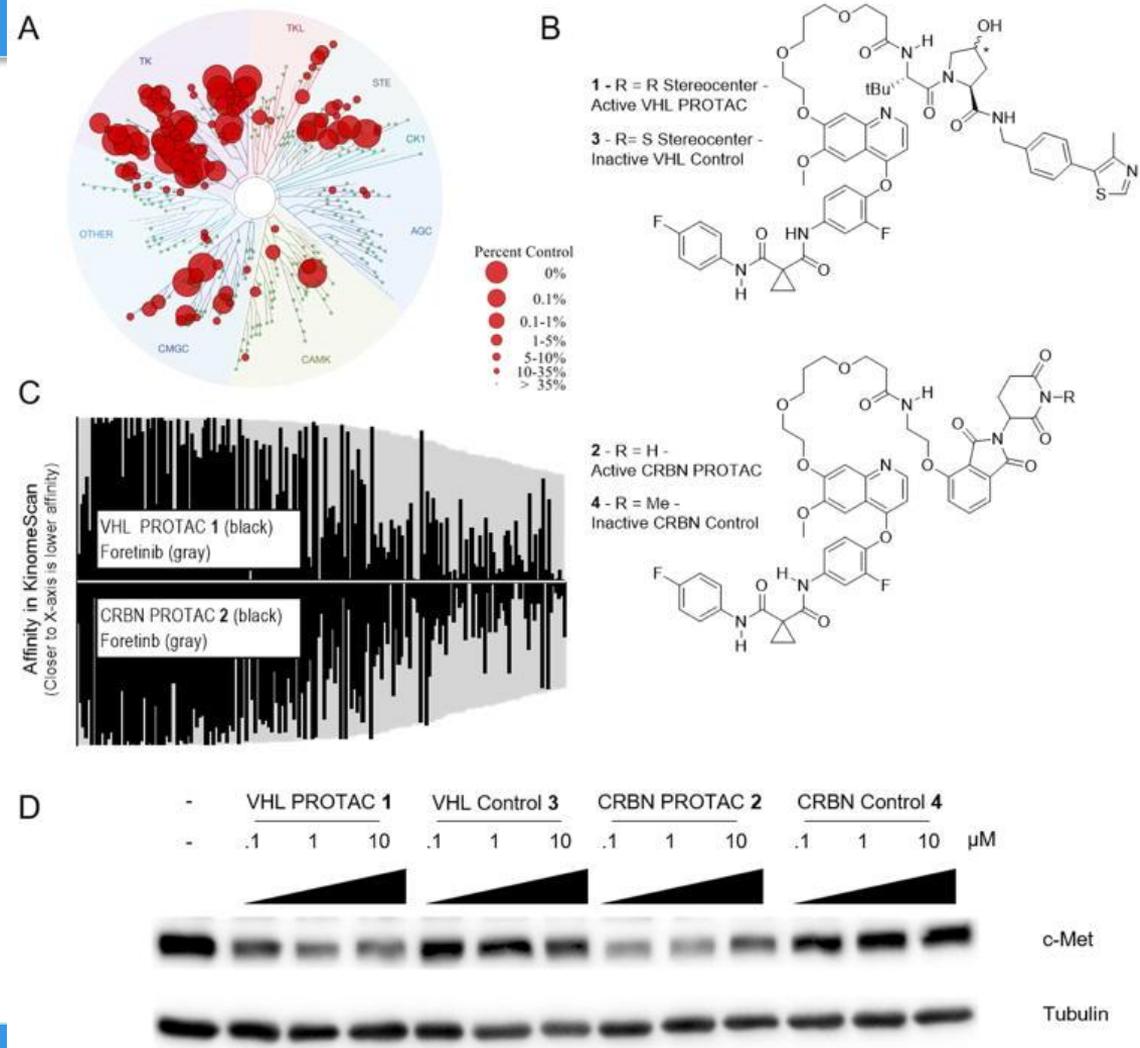


<sup>1</sup>  $\text{DC}_{50}$  = Half-maximal **degradation concentration**

# PROTAC : exemple

When developed into PROTAC degraders, promiscuous ligands can become selective degraders

- Foretinib binds to 133 protein kinases (left panel)
- In cells treated with a foretinib-based PROTAC degrader, only a small subset of cellular proteins are degraded.



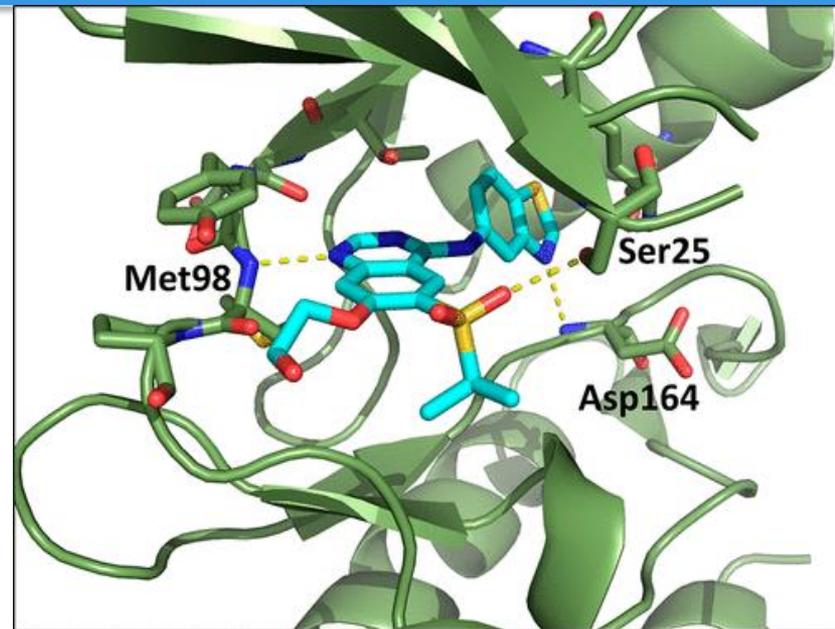
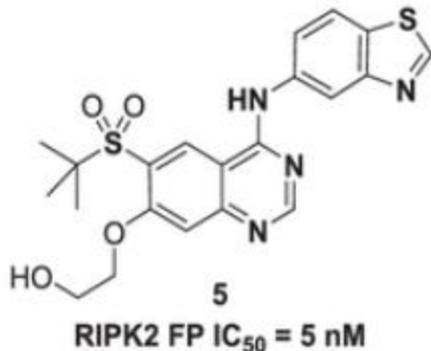
# **RIP2 en tant que cible prototype de dégradation de protéine**

## **6. PROTAC Case study 02**

# PROTAC : exemple

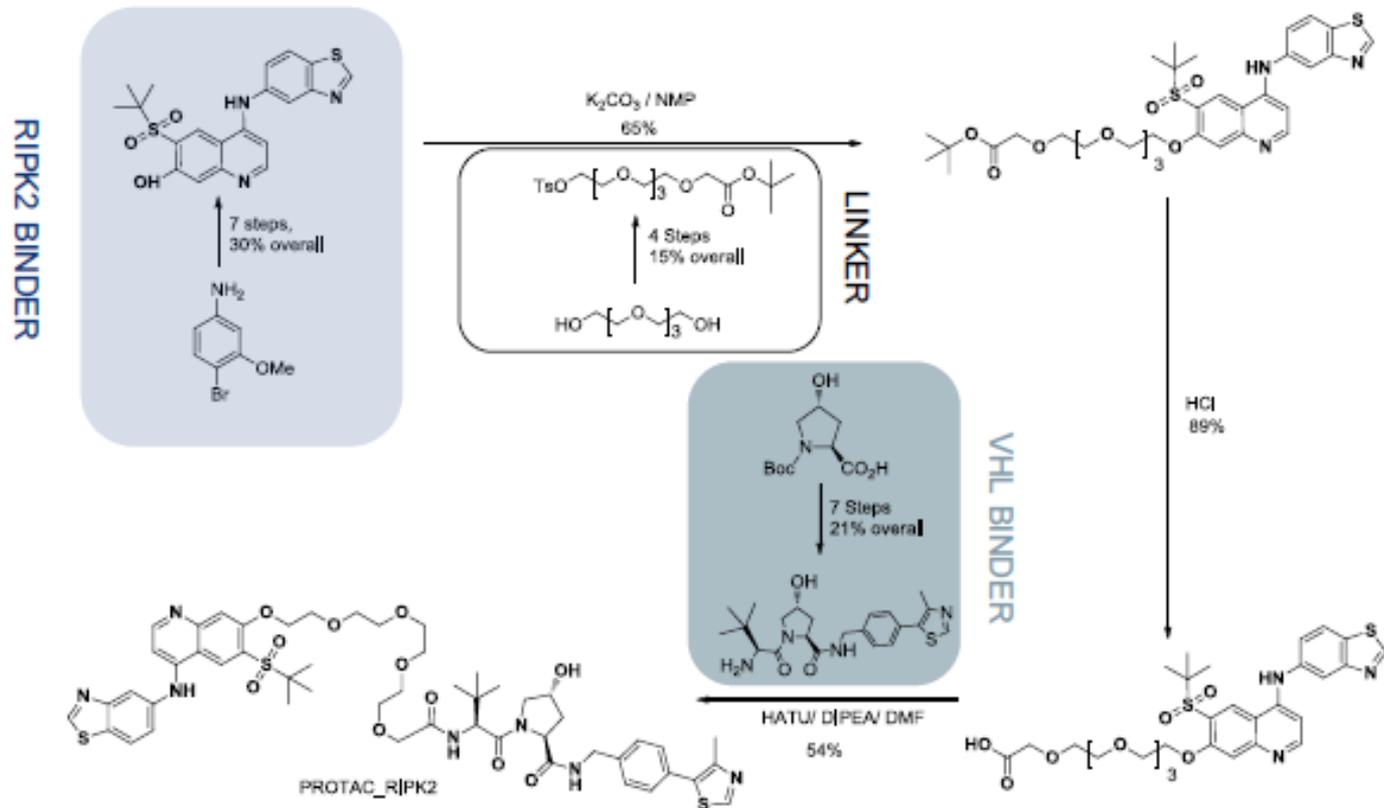
## RIP2 (Receptor-interacting protein kinase-2)

- RIP2 est une **cible thérapeutique** prometteuse pour de nombreuses maladies auto-immunes.
- **Intérêt thérapeutique** : réduire l'activité de cette cible présenterait un intérêt dans la maladie de Crohn, l'asthme, la polyarthrite rhumatoïde et la sclérose en plaques.



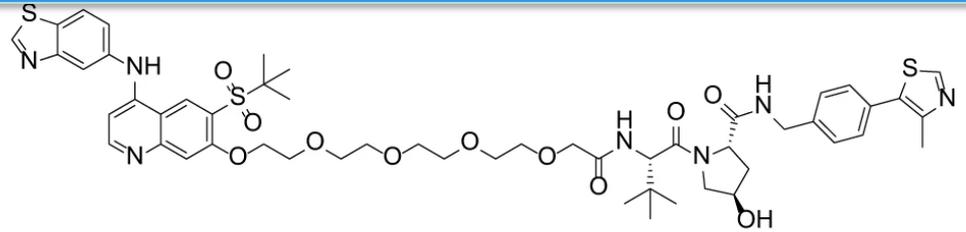
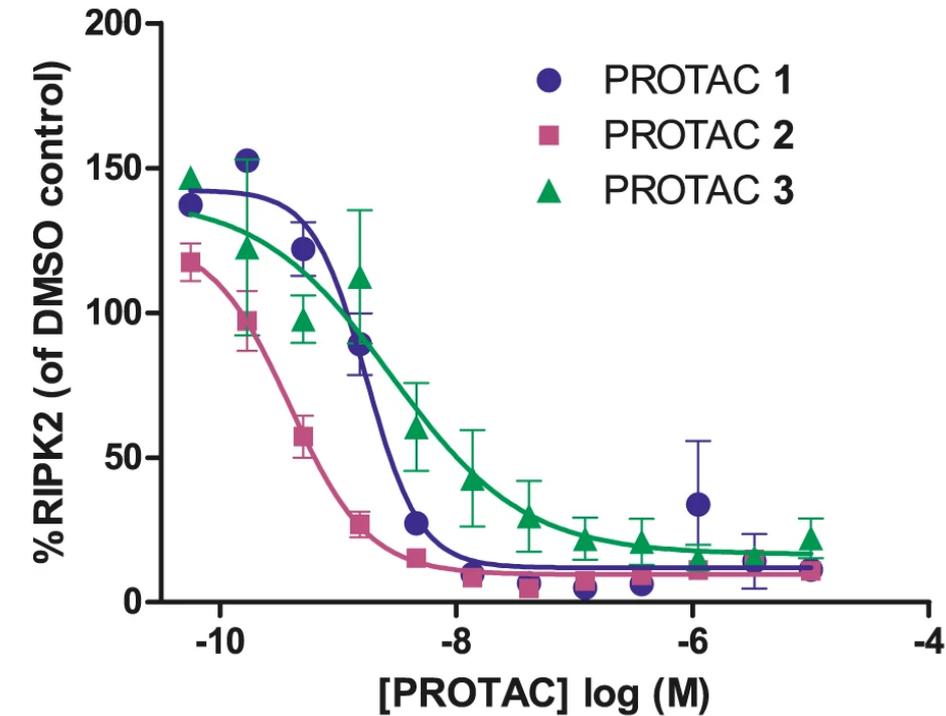
Cocrystal structure of **5** bound within the ATP binding pocket of RIP2 kinase (2.62 Å, PDB code 6RNA).

# PROTAC : une synthèse convergente

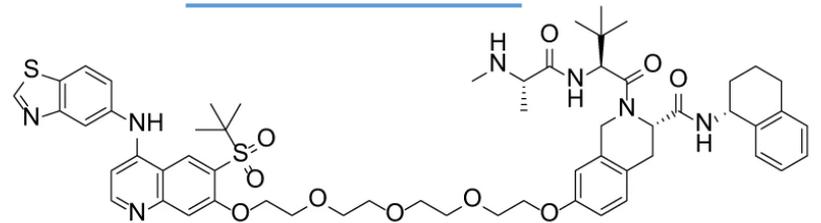


- Syntheses are modular - longest linear sequence 10 steps
- Efficient and scalable

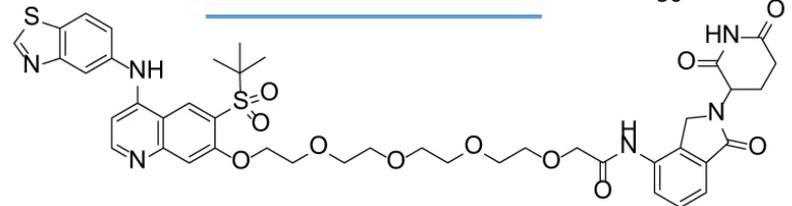
# PROTAC : affinité sur la cible



VHL based RIPK2 PROTAC 1 DC<sub>50</sub> 2 nM



IAP based RIPK2 PROTAC 2 DC<sub>50</sub> 0,2 nM

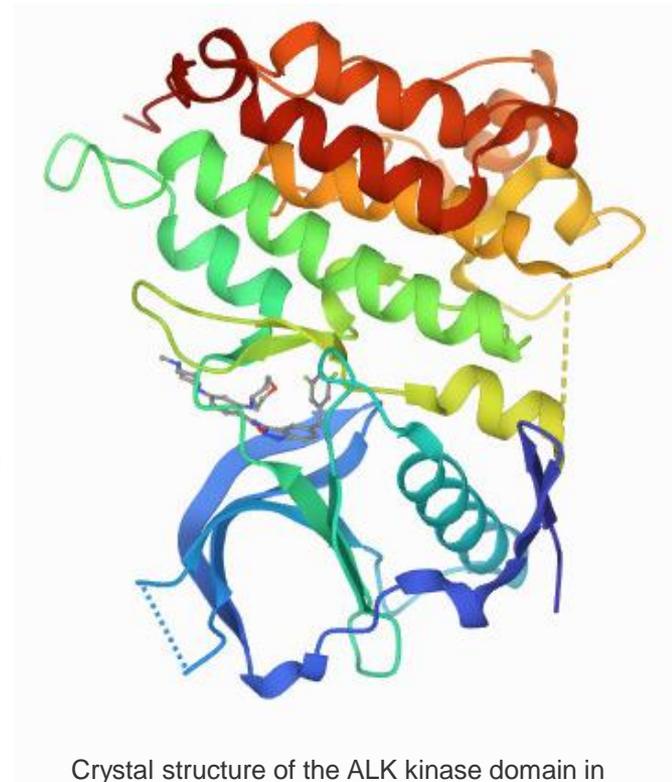


Cereblon based RIPK2 PROTAC 3 DC<sub>50</sub> 6 nM

# **EML4-ALK Fusion Gene**

## **6. PROTAC Case study 03a**

- ALK = **Anaplastic Lymphoma Kinase** est une tyrosine kinase de la sous-famille des récepteurs de l'insuline (IR) kinase
- **L'activation oncogène de l'ALK est étroitement liée à la survenue et au développement de nombreux cancers humains,** y compris :
  - le lymphome diffus à grandes cellules B,
  - le lymphome anaplasique non hodgkinien à grandes cellules,
  - le carcinome de l'œsophage, cancer du poumon non à petites cellules (NSCLC),
  - le cancer du rein (RCC), neuroblastome,
  - le cancer de la thyroïde,
  - le cancer de l'ovaire,
  - le carcinome du côlon
  - et le cancer du sein

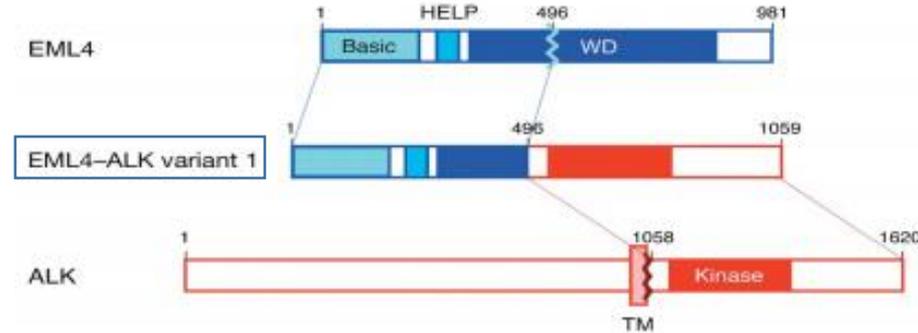


Crystal structure of the ALK kinase domain in complex with Entrectinib

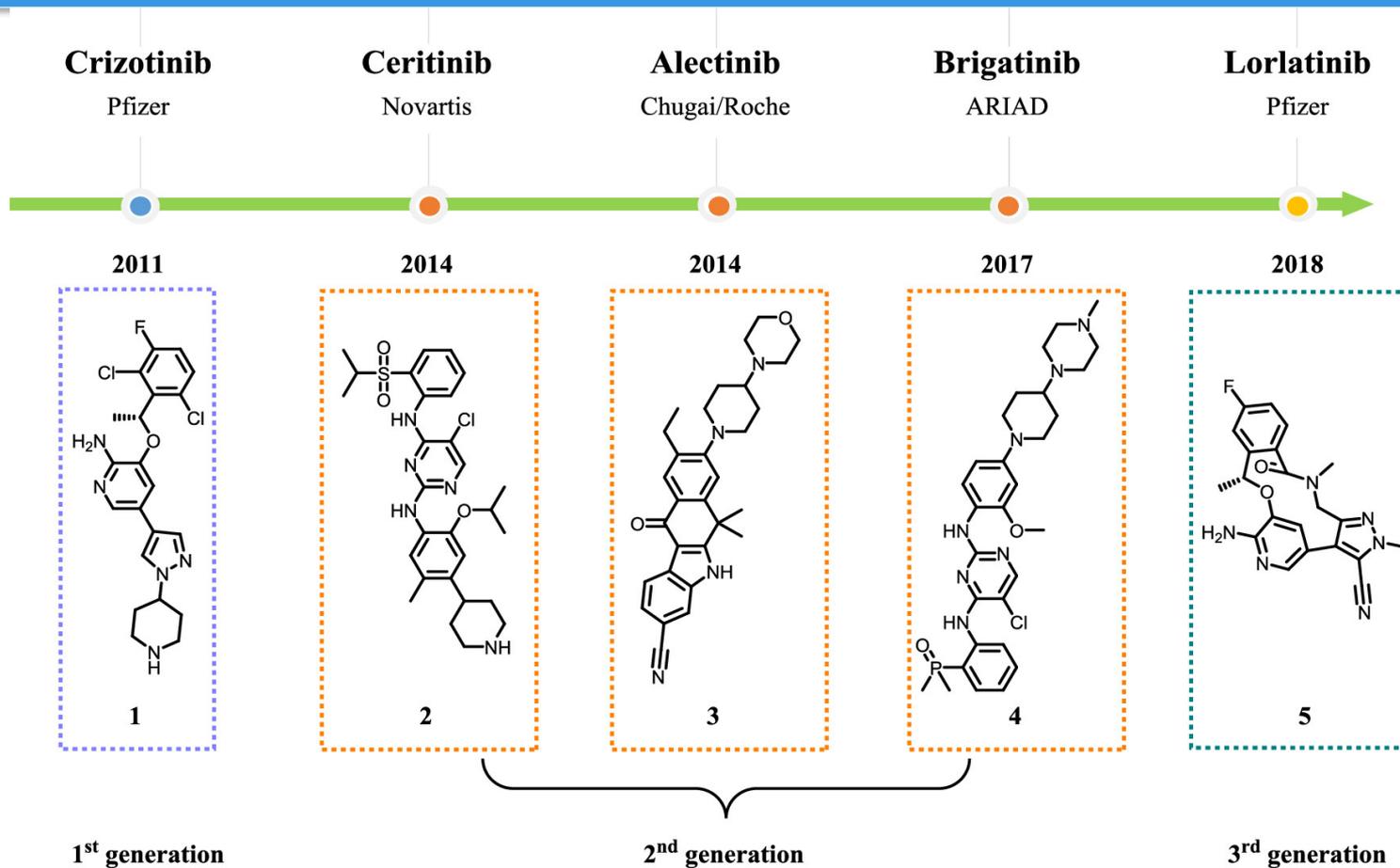
# Le gène de fusion EML4-ALK

- Près de **30 types** différents d'une **protéine de fusion ALK** ont été identifiés, et parmi eux, les formes fusionnées de **EML4-ALK**, NPM-ALK, KIF5B-ALK et TGF-ALK ont été couramment trouvées dans différents types de cancer
- Le gène **EML4-ALK** a été identifié pour la première fois dans le cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC) en 2007
- Une inversion dans le chromosome 2p entraîne la **fusion** des gènes **EML4** et **ALK**
- La **fusion** entraîne une **redistribution du domaine ALK kinase de la membrane cellulaire au cytoplasme**.

## Identification of the transforming *EML4-ALK* fusion gene in non-small-cell lung cancer



# Chronologie des progrès rapides réalisés dans le traitement de l'ALK +



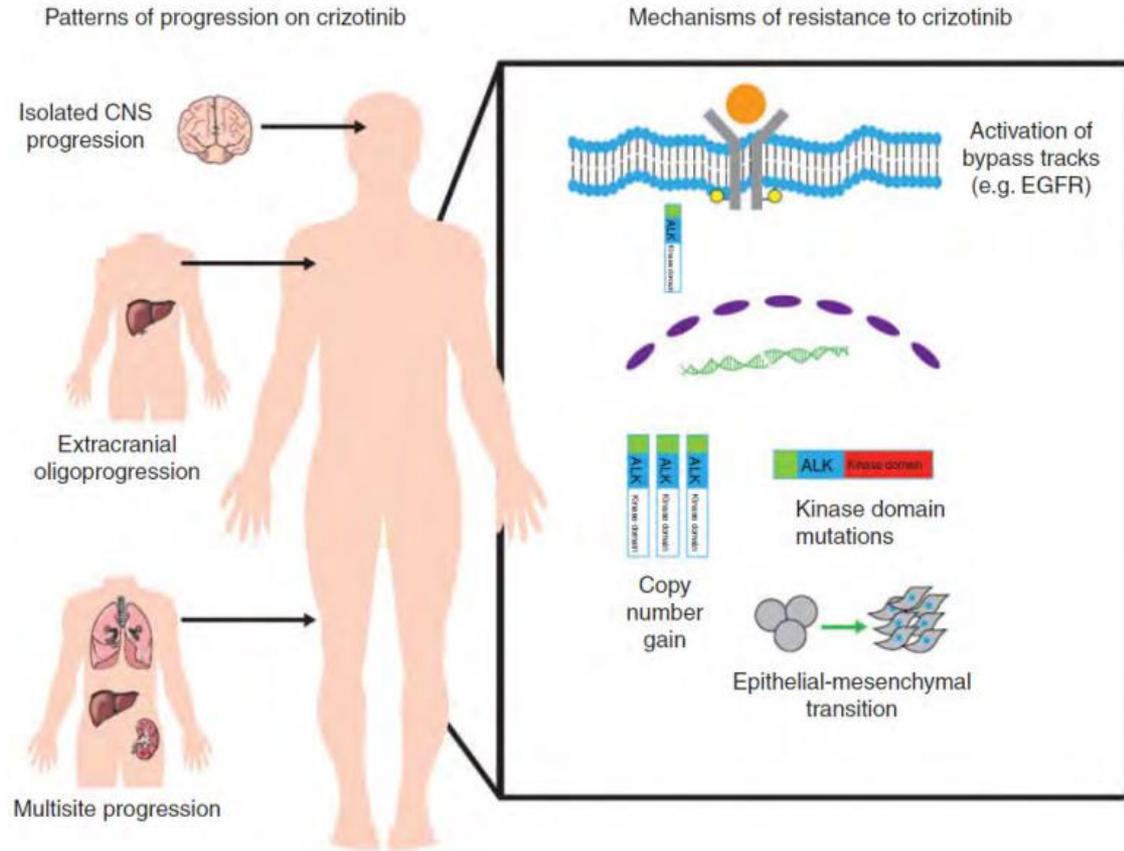
Chemical structures of FDA-approved ALK small-molecule inhibitors.

# Résistance à la crizotinib

À ce jour, cinq inhibiteurs de l'ALK, dont l'**alectinib**, le **brigatinib**, le **céritinib**, le **crizotinib** et le **lorlatinib**, ont été approuvés par la FDA pour le traitement du CPNPC ALK-positif.

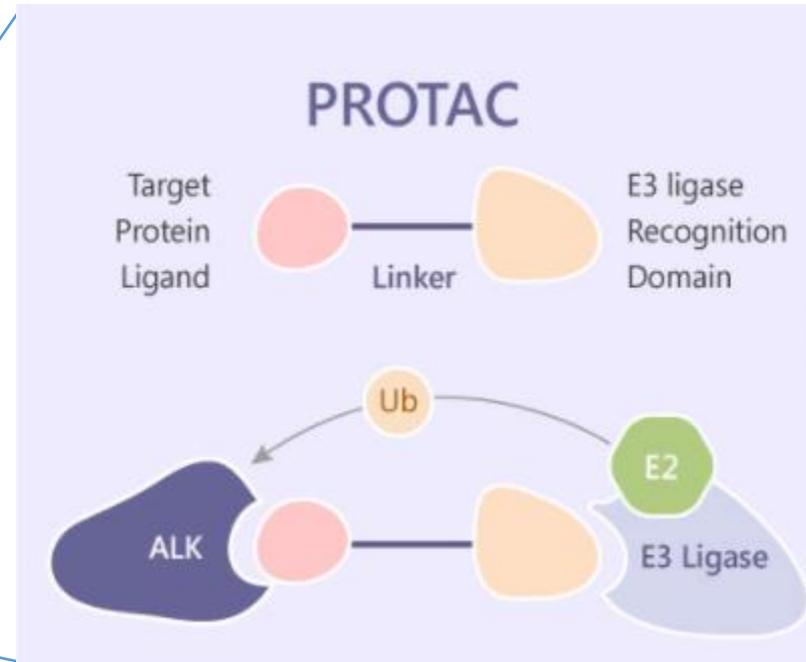
Malgré une réponse initiale à ces inhibiteurs, ***une résistance aux médicaments a été observée dans 1–2 ans chez la majorité des patients.***

→ Ainsi, de nouvelles approches thérapeutiques sont nécessaires de toute urgence pour surmonter la résistance aux médicaments.

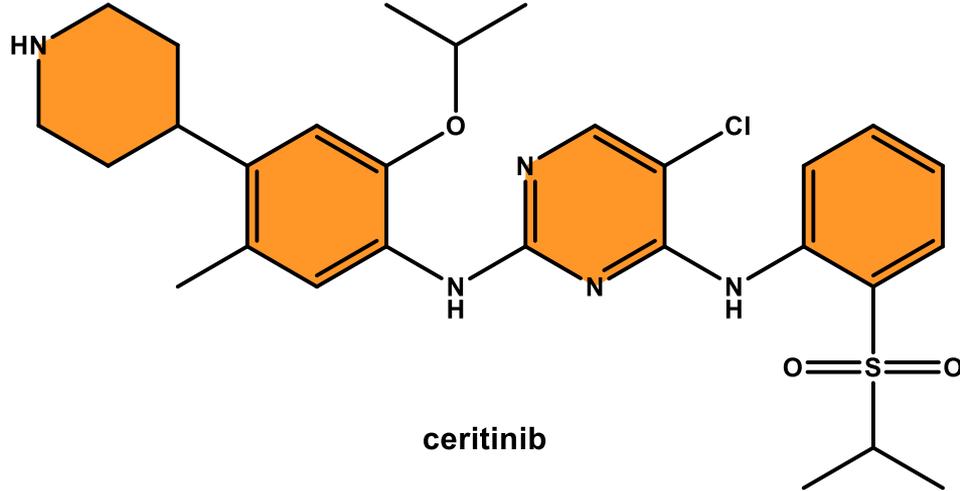




→ Ainsi, de nouvelles approches thérapeutiques sont nécessaires de toute urgence pour surmonter la résistance aux médicaments.



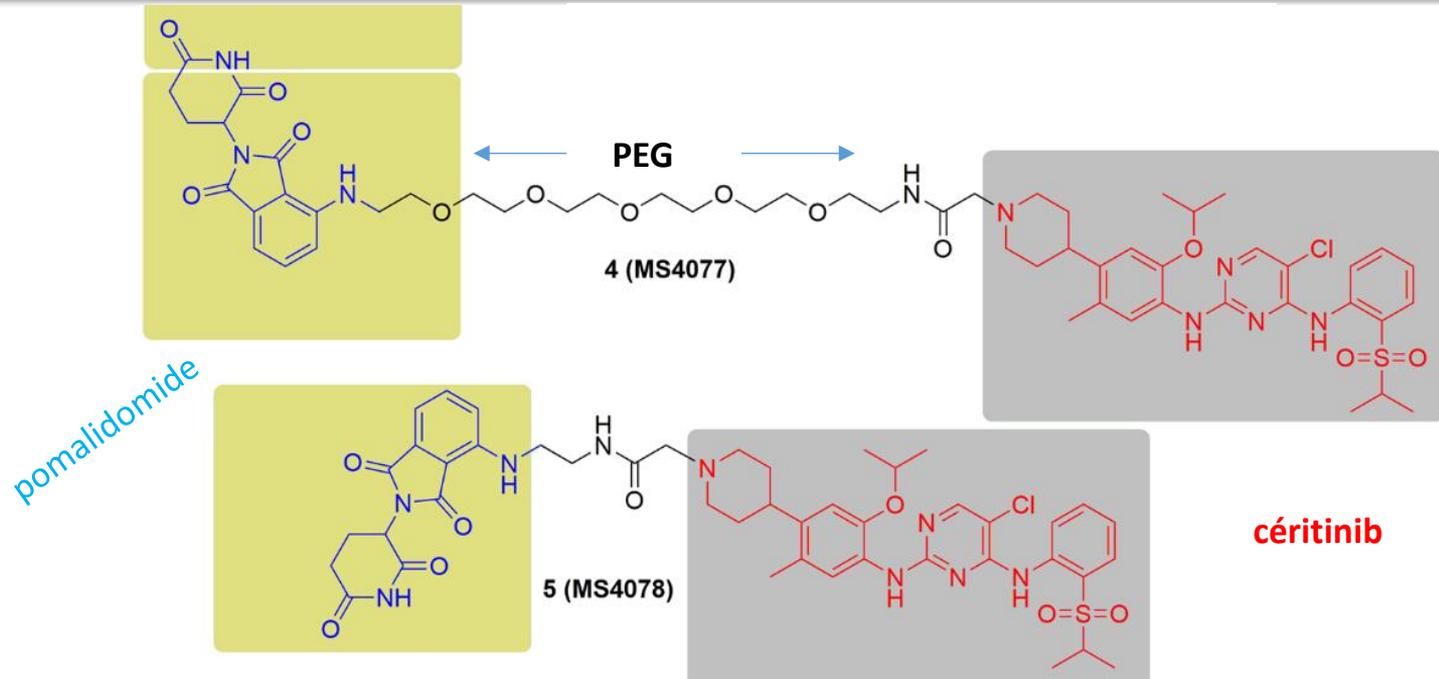
Point d'ancrage



ceritinib

céritinib

# PROTAC conjugués avec des inh. de l'ALK

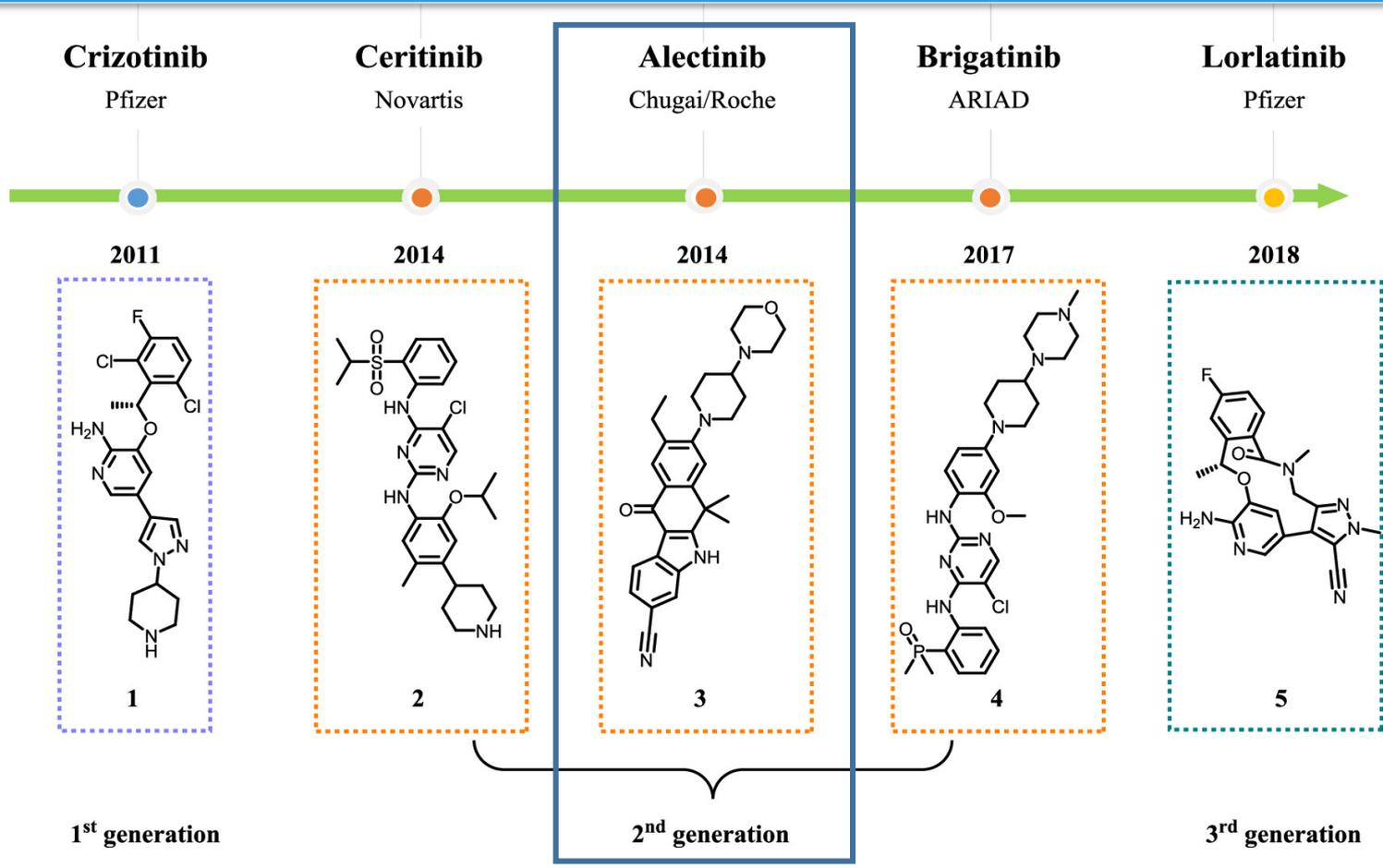


- En plus de dégrader **NPM-ALK** et **EML4-ALK**, MS4077 et MS4078 pourraient inhiber la phosphorylation d'ALK et de STAT3. MS4077 et MS4078 ont montré une puissante activité antiproliférative dans les cellules SU-DHL-1 (Large Cell Lymphoma). En outre, MS4078 a présenté une bonne exposition plasmatique chez la souris, et les souris testées ont été bien tolérées à une dose de 50 mpk (mg/kg).

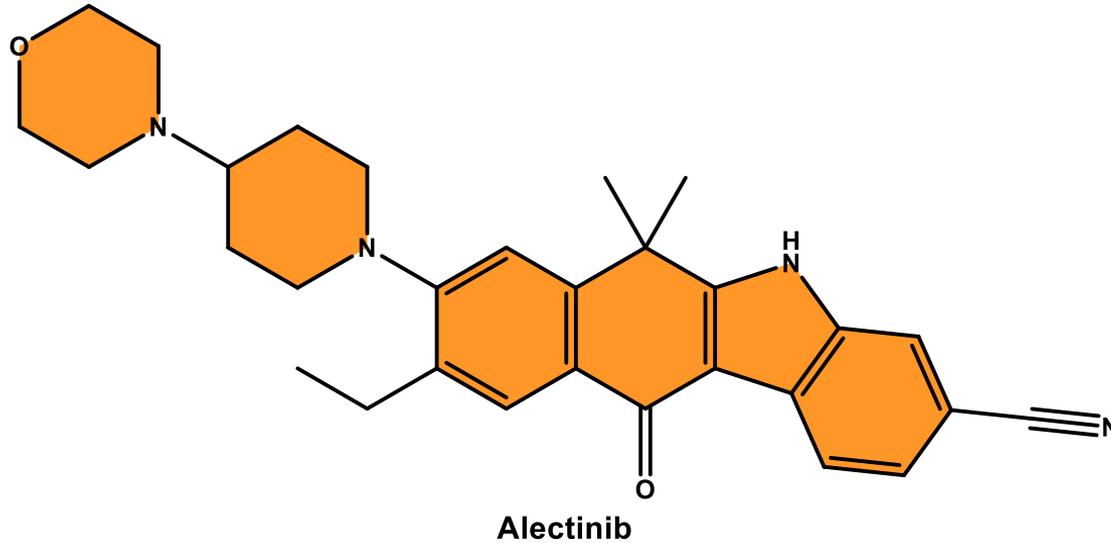
**Alectinib-Based  
PROTACs as Novel  
Potent Degraders  
Anaplastic Lymphoma  
Kinase (ALK)**

**6. PROTAC  
Case study 03b**

# PROTAC conjugués avec des inh. de l'ALK

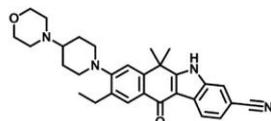
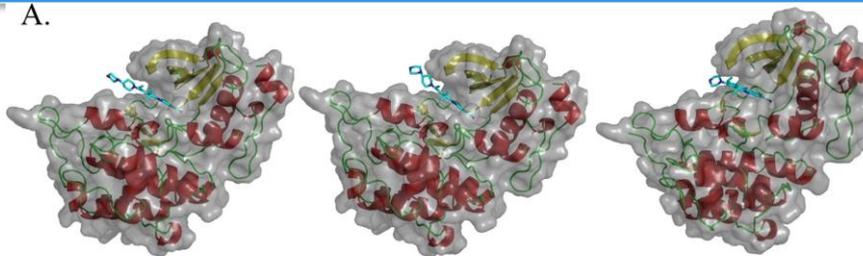


Absence d'un  
point d'ancrage

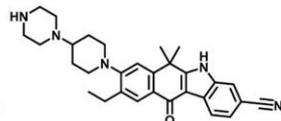


# PROTAC conjugués avec des inh. de l'ALK

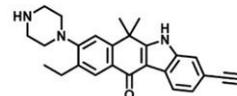
A.



Alectinib (3)  
MW: 482.6

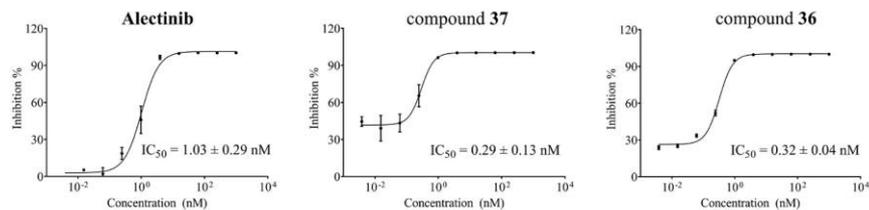


37  
MW: 481.6

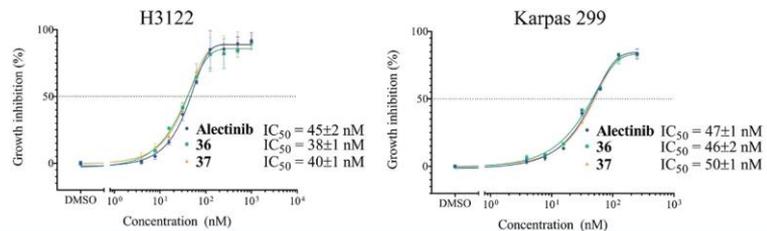


36  
MW: 398.5

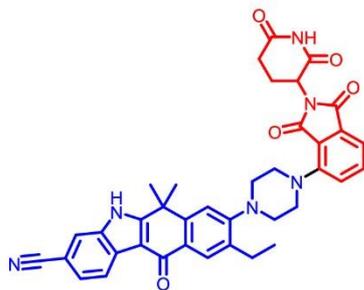
B.



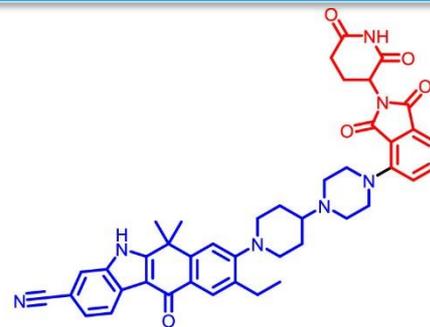
C.



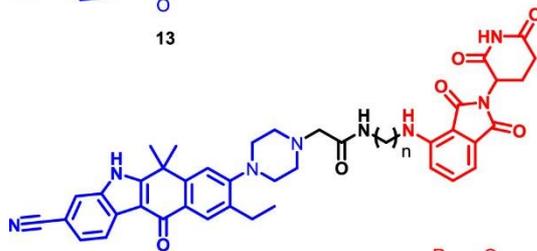
# PROTAC conjugués avec des inh. de l'ALK



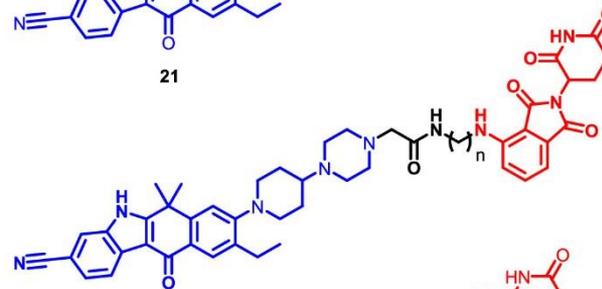
13



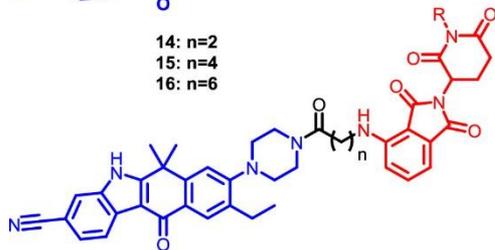
21



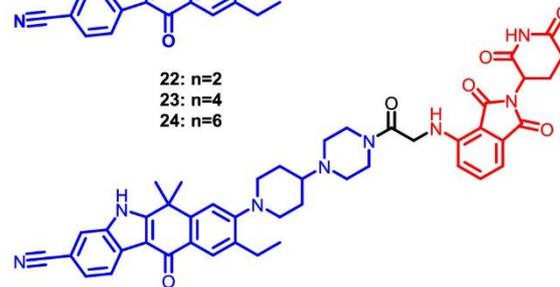
14: n=2  
15: n=4  
16: n=6



22: n=2  
23: n=4  
24: n=6



17: n=1, R=H  
18: n=3, R=H  
19: n=5, R=H  
20: n=1, R=Me



25

Chemical structures of designed alectinib-based ALK degraders and negative control **20**.

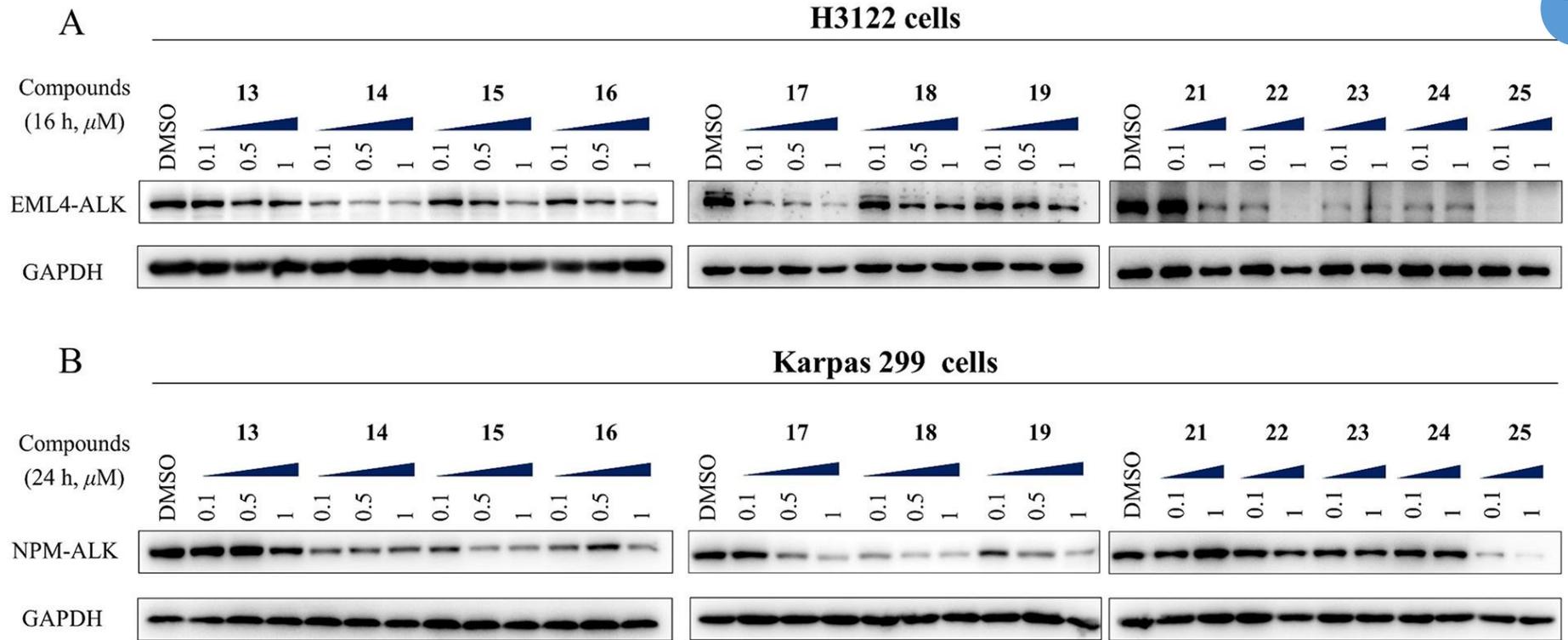


Figure 5. Effects of compounds **13–19** and **21–25** on reducing the ALK protein level in (A) H3122 cells and (B) Karpas 299 cells. Both cell lines were treated with the indicated compounds and concentrations for 16 or 24 h, respectively.

# PROTAC conjugués avec des inh. de l'ALK

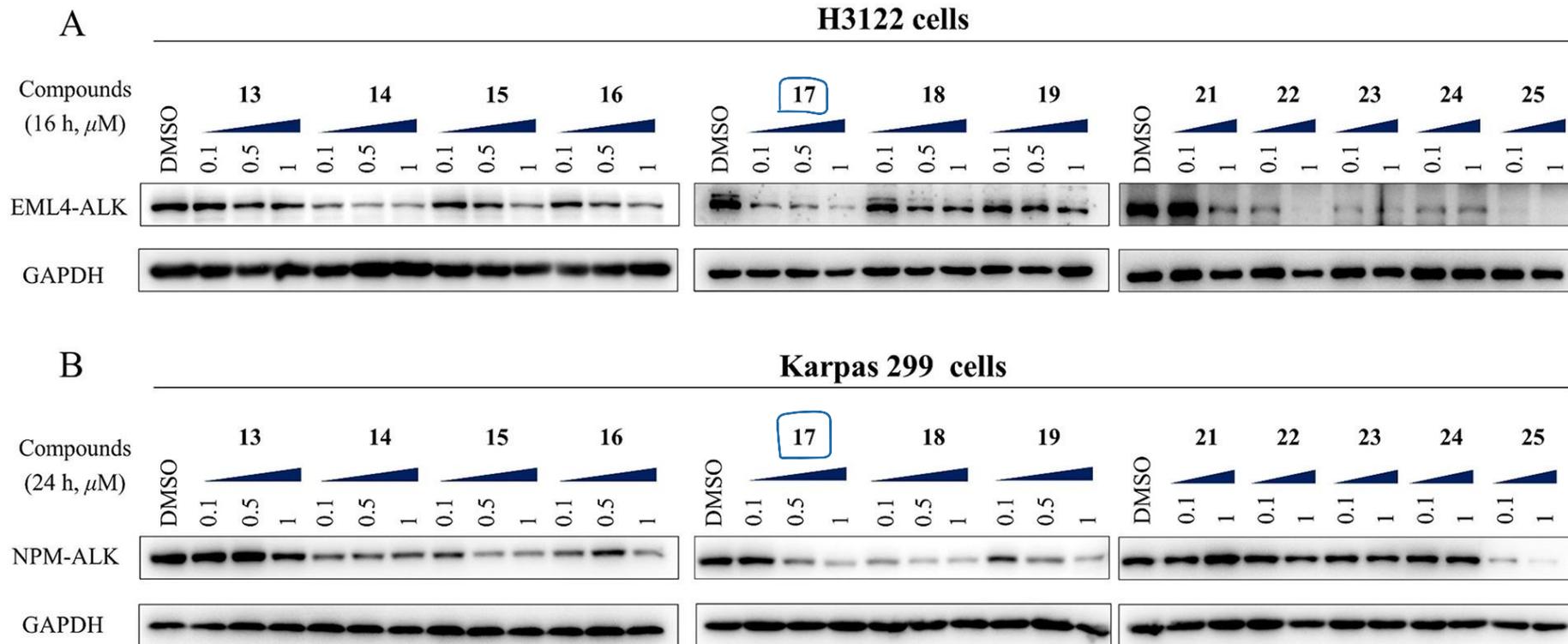
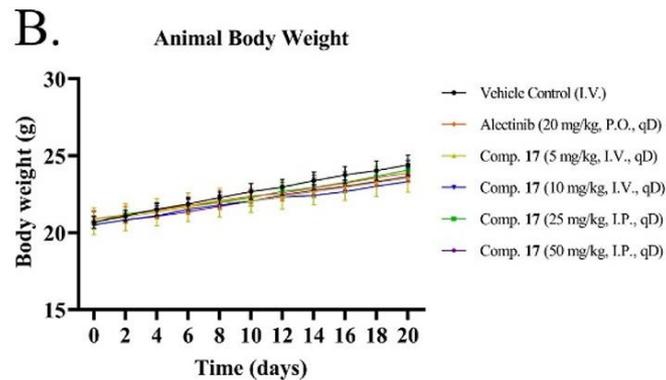
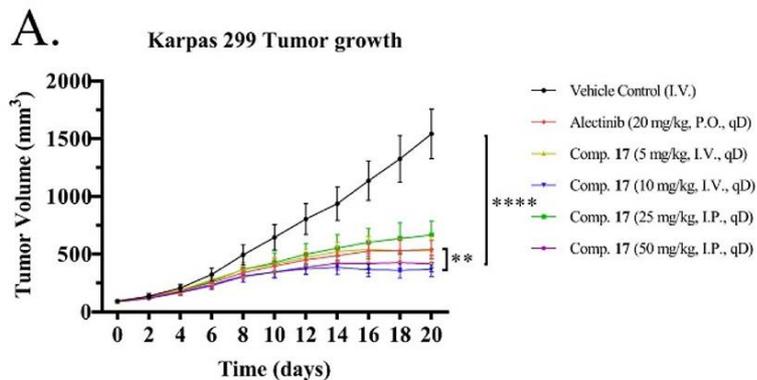
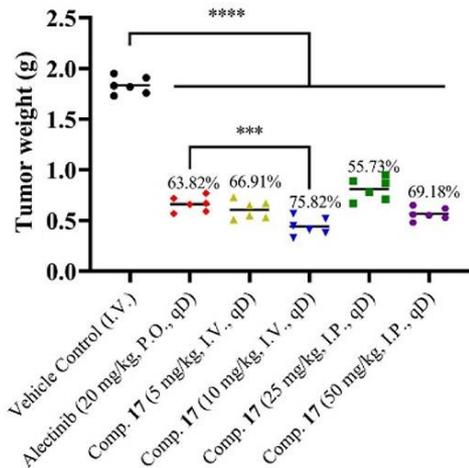


Figure 5. Effects of compounds **13–19** and **21–25** on reducing the ALK protein level in (A) H3122 cells and (B) Karpas 299 cells. Both cell lines were treated with the indicated compounds and concentrations for 16 or 24 h, respectively.



**C. Tumor weight at the end of treatment**

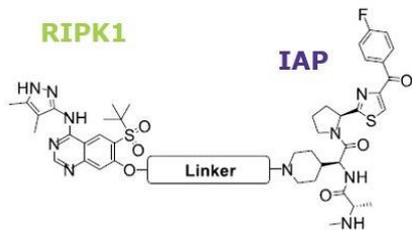


**D.**



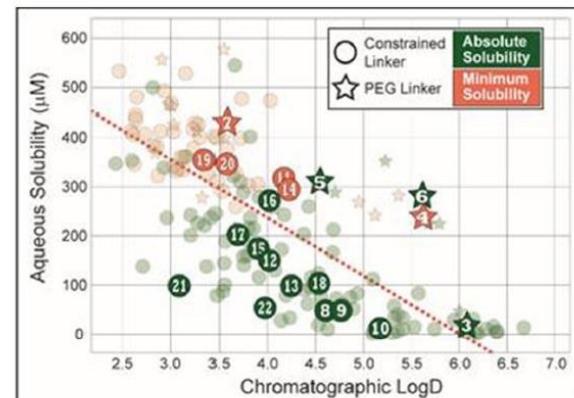
## Good Practice: After Identifying an Active PROTAC, Rigidify the Linker

- ❑ **Maximize positive cooperativity** between target protein & E3 ligase
  - ❑ More potent & **complete degradation**, widening of the bell-shaped curve
  - ❑ **Increased degrader selectivity** when starting from promiscuous target binder
- ❑ **Modulate ADME & PhysChem properties:**
  - ❑ Less flexibility = higher metabolic stability
  - ❑ Optimize **solubility** (e.g. mildly basic linker) & **permeability** (reduce #HBD, optimize logD)

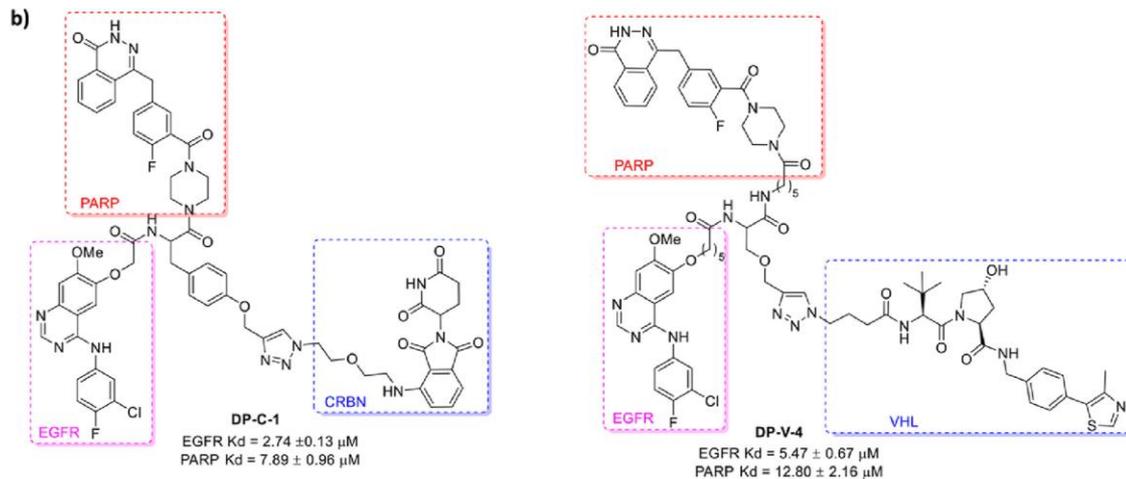
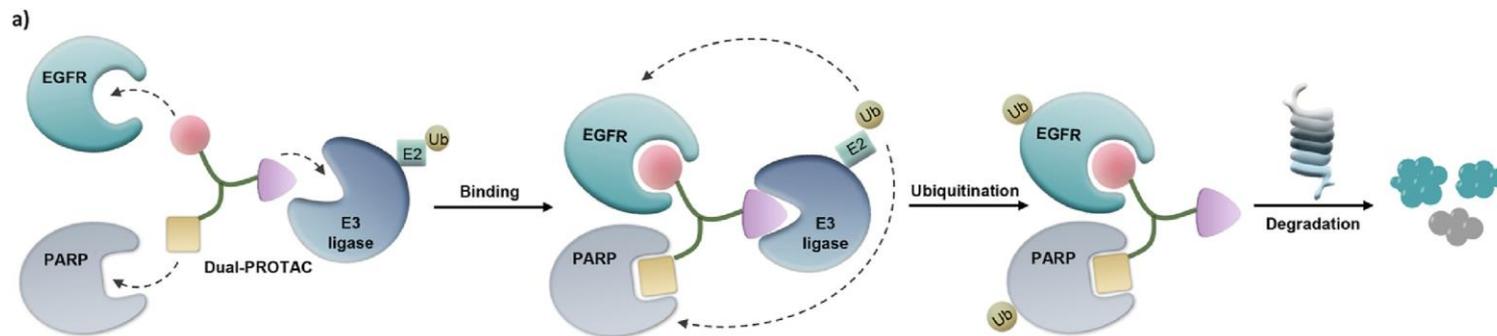


Mia et al. *J. Med. Chem.*  
2021, 64, 12978.

Cpnd	Linker	RIPK2 pIC <sub>50</sub>	hWB pIC <sub>50</sub>	CLND Sol.	Chrom logD <sub>7.4</sub>	CL <sub>int</sub> Human	CL <sub>int</sub> Rat
7		6.8±0.11	7.2±0.10	>429	3.6	3.07	0.84
8		8.0±0.07	7.6±0.06	51	4.6	2.48	<0.46
9		7.4±0.12	7.8±0.05	34	4.8	2.22	0.61
10		7.5±0.0	8.5±0.17	14	5.2	3.64	0.66
11		6.6±0.02	7.7±0.05	>311	4.2	0.74	0.48
12		8.1±0.06	8.7±0.15	154	4.0	1.27	0.78
13		7.5±0.1	7.9±0.08	97	4.3	ND	ND
14		6.9±0.06	8.0±0.05	>304	4.2	1.17	0.55
15		8.0±0.06	8.1±0.12	170	3.9	<0.4	0.64
16		6.8±0.04	7.8±0.05	271	4.0	0.57	<0.46
17		7.9±0.04	8.8±0.09	180	3.7	0.68	0.72



# Dual-PROTACs



# Plan

1- Introduction

2- Protéasome : cible thérapeutique

3- Protéasome : structure et fonctions

4- Inhibiteurs du protéasome

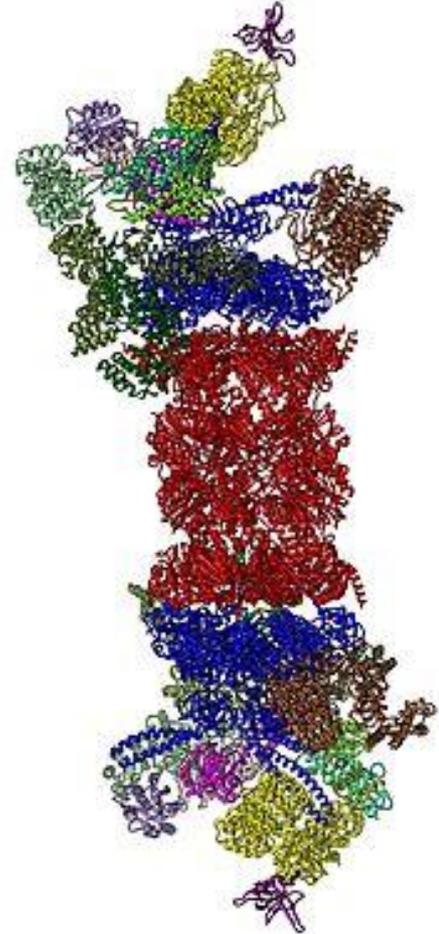
5- Conception rationnelle de principes actifs :  
une approche inédite qui cible la dégradation des protéines :  
*Proteolysis-Targeting Chimera Protein Degraders (PROTAC)*

6- PROTAC Cases studies

7- Protac : études cliniques

8- Outils en ligne

9- Conclusion

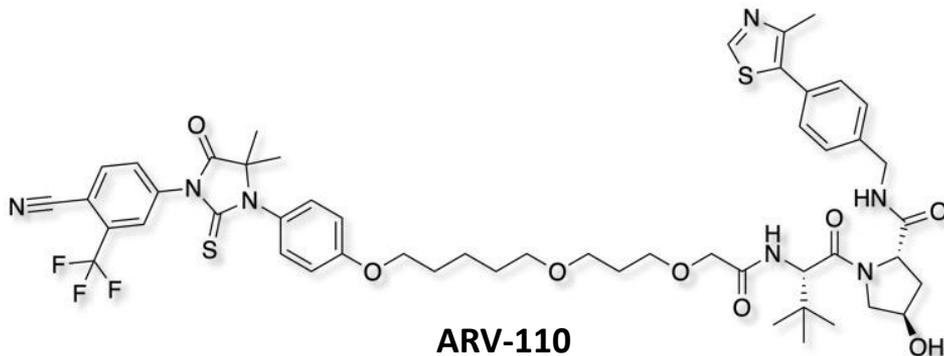




## 7. Protac : études cliniques

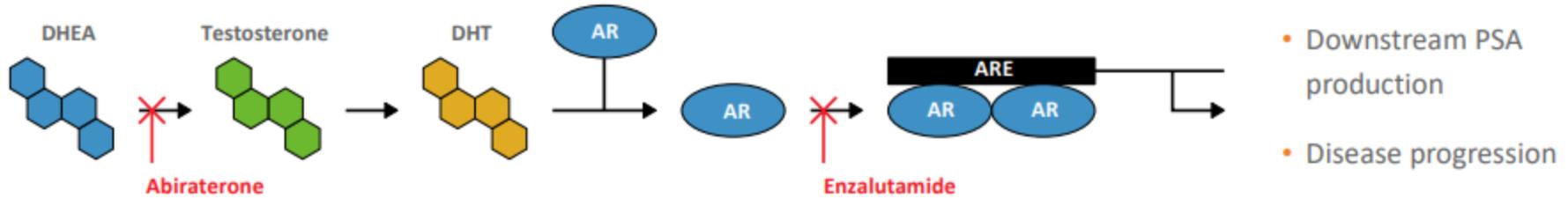
Prostate Cancer

The 2<sup>nd</sup> most prevalent cancer in men



# 7. PROTAC : études cliniques

Prostate cancer is the second leading cause of cancer death in men in the U.S. (~160k diagnosed/yr1);



## Androgen Receptor (AR) Activity Drives Prostate Cancer<sup>2</sup>

- Current agents work by decreasing androgen levels (abiraterone) or blocking androgen binding to AR (enzalutamide)
- 15-25% of patients do not respond to abiraterone or enzalutamide (intrinsic resistance)

## Acquired Resistance Mechanisms to Abiraterone and Enzalutamide

- AR gene amplification (40-60% of patients)
- AR gene enhancer amplification (>70% of patients)
- AR point mutations (~15% of patients)
- Intra-tumoral androgen production

1. American Cancer Society  
2. DHEA, dehydroepiandrosterone; DHT, dihydrotestosterone; AR, androgen receptor; ARE, androgen response element; Prostate Specific Antigen (PSA)

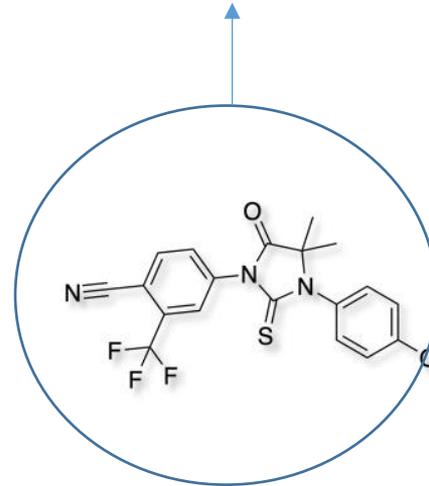
# 7. PROTAC : études cliniques



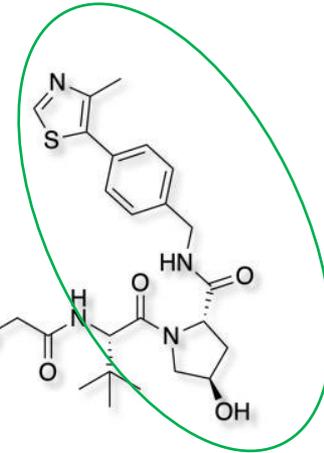
**ARV-110** est un agent PROTAC de dégradation de la protéine conçu en vue de la **dégradation sélective du récepteur des androgènes (RA)**.

en cours de développement dans le traitement du cancer de la prostate résistant à la castration métastatique (**CPRCm**).

Ligand RA:  
Dérivé de l'enzalutamide



Ligand de la protéine VHL



**ARV-110**

*Le premier PROTAC est entré en essai clinique au début de 2019.*



# Plan

1- Introduction

2- Protéasome : cible thérapeutique

3- Protéasome : structure et fonctions

4- Inhibiteurs du protéasome

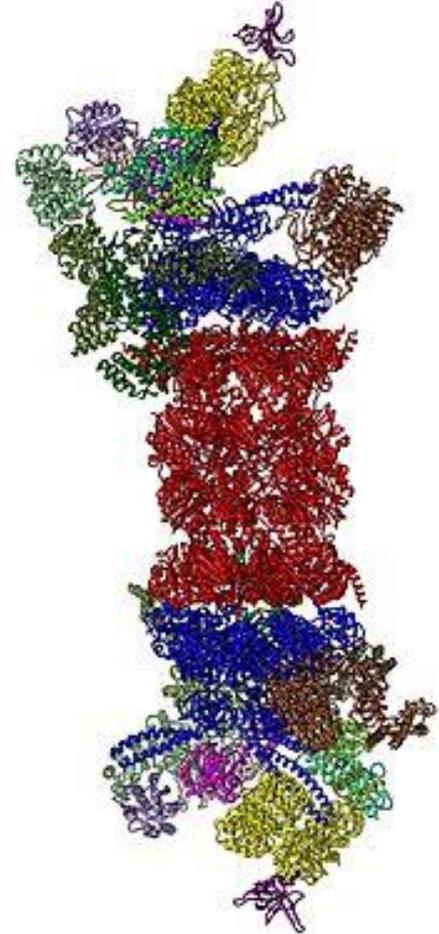
5- Conception rationnelle de principes actifs :  
une approche inédite qui cible la dégradation des protéines :  
*Proteolysis-Targeting Chimera Protein Degraders (PROTAC)*

6- PROTAC Cases studies

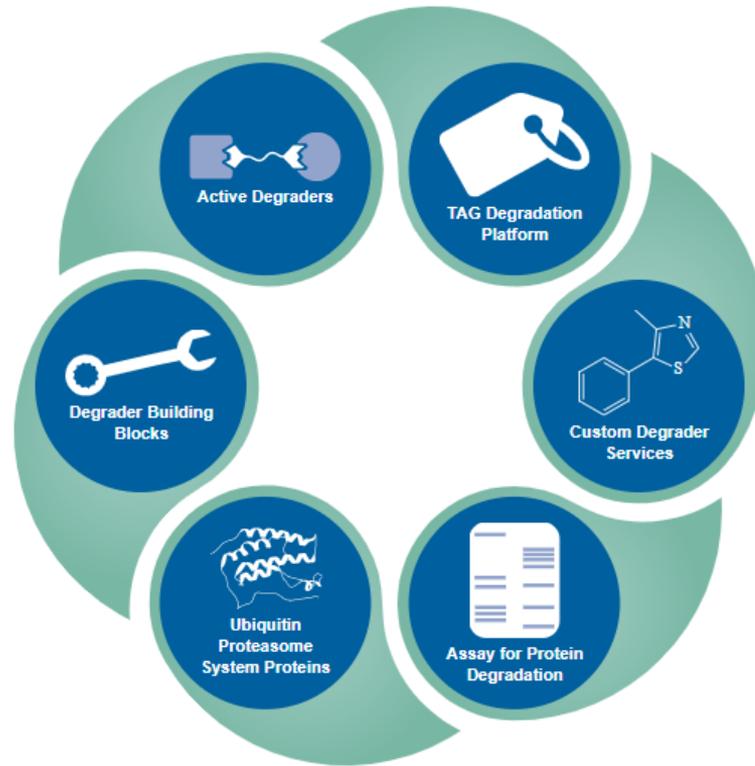
7- Protac : études cliniques

**8- Outils en ligne**

**9- Conclusion**



# 8. Outils en ligne



<https://www.tocris.com/product-type/targeted-protein-degradation>

# 8. Outils en ligne

View PROTAC<sup>®</sup>

Panel Builder

+  1. E3 Ligand + exit vector - select one from the list

- |  |  |
|--|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> Thalidomide 4'-ether |  <a href="#">view structure</a> |
| <input type="checkbox"/> Thalidomide 4'-oxyacetamide     |  <a href="#">view structure</a> |
| <input type="checkbox"/> Thalidomide 5'-amine            |  <a href="#">view structure</a> |
| <input type="checkbox"/> Lenalidomide 4'                 |  <a href="#">view structure</a> |
| <input type="checkbox"/> Pomalidomide 4'                 |  <a href="#">view structure</a> |
| <input type="checkbox"/> A 410099.1 amide                |  <a href="#">view structure</a> |
| <input type="checkbox"/> VH 032 phenol                   |  <a href="#">view structure</a> |
| <input type="checkbox"/> VH 032 amide                    |  <a href="#">view structure</a> |
| <input type="checkbox"/> VH 101 phenol                   |  <a href="#">view structure</a> |
| <input type="checkbox"/> LCL 161, phenol                 |  <a href="#">view structure</a> |

# 8. Outils en ligne

+  1. E3 Ligand + exit vector - select one from the list

+  2. Linker - select as many Linkers as you would like from the list

- PEG1
- PEG2
- PEG3
- PEG4
- PEG5
- PEG6
- alkylC1
- alkylC2
- alkylC3
- alkylC4
- alkylC5
- alkylC6
- alkylC7
- alkylC8
- alkylC9
- alkylC10

View PROTAC<sup>®</sup>

Panel Builder

# 8. Outils en ligne

View PROTAC<sup>®</sup>

Panel Builder

+  **1. E3 Ligand + exit vector** - select one from the list

+  **2. Linker** - select as many Linkers as you would like from the list

+  **3. Functional Group** (reactive handle on Linker for onward chemistry) - select one from the list

- amine
- acid
- alkyne
- azide
- alcohol

# 8. Outils en ligne

View PROTAC<sup>®</sup>

Panel Builder

+  1. **E3 Ligand + exit vector** - select one from the list

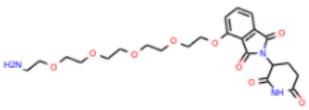
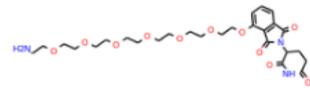
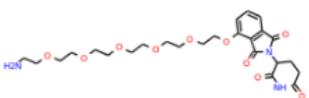
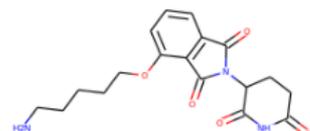
+  2. **Linker** - select as many Linkers as you would like from the list

+  3. **Functional Group** (reactive handle on Linker for onward chemistry) - select one from the list

+  4. **Quantity Required**

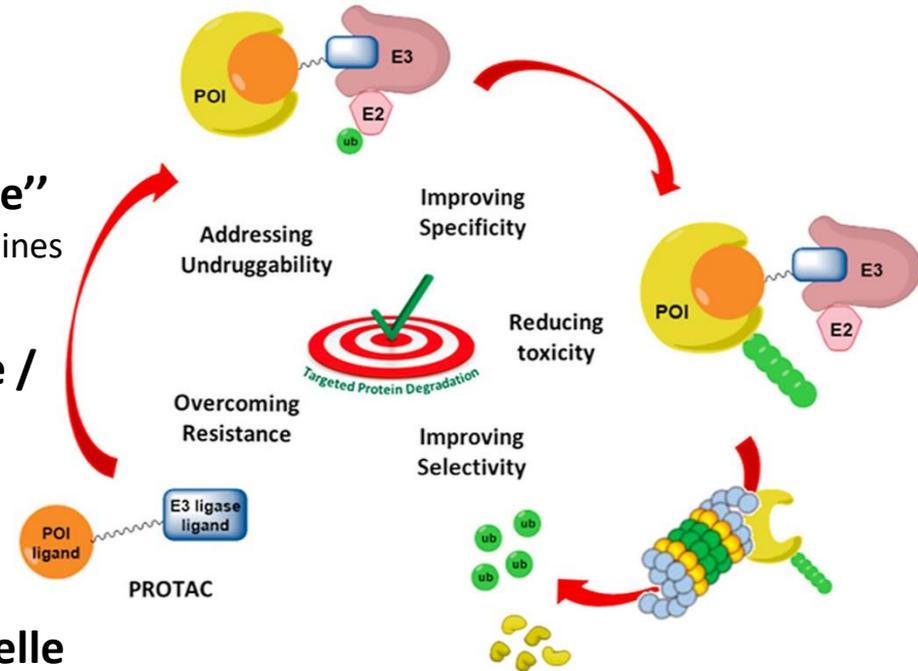


# 8. Outils en ligne

Structure	Linker	Name			
 <p>The image shows the chemical structure of Thalidomide 4'-ether-PEG4-amine. It features a thalidomide core (a benzimidazole ring system with a phthalimide group and a glutarimide ring) attached to a PEG4 linker (a chain of four ethylene glycol units) which terminates in a primary amine group (H2N).</p>	PEG4	Thalidomide 4'-ether-PEG4-amine	 <p>The image shows the chemical structure of Thalidomide 4'-ether-PEG6-amine. It features a thalidomide core attached to a PEG6 linker (a chain of six ethylene glycol units) which terminates in a primary amine group (H2N).</p>	PEG6	Thalidomide 4'-ether-PEG6-amine
 <p>The image shows the chemical structure of Thalidomide 4'-ether-PEG5-amine. It features a thalidomide core attached to a PEG5 linker (a chain of five ethylene glycol units) which terminates in a primary amine group (H2N).</p>	PEG5	Thalidomide 4'-ether-PEG5-amine	 <p>The image shows the chemical structure of Thalidomide 4'-ether-alkylC5-amine. It features a thalidomide core attached to a five-carbon alkyl linker (a pentyl chain) which terminates in a primary amine group (H2N).</p>	alkylC5	Thalidomide 4'-ether-alkylC5-amine

# Conclusion : Pourquoi administrer les PROTACs ?

- La dégradation d'une protéine constitue une approche pharmacologique, alternative à l'inhibition de l'activité enzymatique.
  - Effet pharmacologique prolongé, même après élimination du PA.
- Nouvelle approche pour des cibles "undruggable"
  - Une sonde d'affinité est seulement nécessaire pour les protéines où le site fonctionnel est absent.
- Potentiel catalytique pour une puissance élevée / faible dose
  - Des problèmes de formulation et de toxicité surviennent souvent avec les inhibiteurs classiques à fortes doses.
- Grande sélectivité fonctionnelle par rapport à celle de l'inhibiteur correspondant.



# PROTAC : Pour aller plus loin

Protac-Induced Protein Degradation in Drug Discovery: Breaking the Rules or Just Making New Ones? *J. Med. Chem.* **2018**, 61, 2444-452.

<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01272>

PROteolysis TARgeting Chimeras (PROTACs) — Past, present and future.

*Drug Discovery Today: Technologies*, **2019**, 31, Pages 15-27

<https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2019.01.002>

PROTAC-induced BET protein degradation as a therapy for castration-resistant prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2016**, 113 (26), 7124-7129.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1521738113>

NEWS · 06 MARCH 2019

## First targeted protein degrader hits the clinic

New therapeutics that harness cellular machinery to degrade targets are entering clinical trials, led by a PROTAC anticancer candidate developed by Arvinas.

*Nature Reviews Drug Discovery* **18**, 237-239 (2019)

PROTACs to Address the Challenges Facing Small Molecule Inhibitors

*Eur. J. Med. Chem.* 2020 <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112993>



nature  
REVIEWS DRUG  
DISCOVERY

---

**Merci de votre attention**

---

