

靶向激酶的PROTAC研究进展

陈泉威, 王昭昭, 朱 雍, 陆 涛*

中国药科大学理学院, 江苏 南京

收稿日期: 2021年12月22日; 录用日期: 2022年1月13日; 发布日期: 2022年1月24日

摘 要

蛋白激酶(PK)失调与多种疾病过程相关, 多种蛋白激酶抑制剂得被开发用以治疗疾病。蛋白激酶抑制剂虽然得到了很好的研究, 但仍然面临耐药性及选择性不高等挑战。蛋白水解靶向嵌合体(PROTAC)这一技术的开发, 有效地解决了蛋白激酶抑制剂耐药以及低选择性等问题, 从而得到了广泛的关注。目前, 已经有多种激酶PROTAC项目进入临床前和临床研究。本文综述了专利及文献报道的靶向蛋白激酶的PROTAC研究进展。总结并展望靶向蛋白质降解技术的发展前景, 及面临的机遇与挑战。

关键词

蛋白激酶, 蛋白水解嵌合体, 耐药, 选择性

Progress in the Research of Kinases PROTAC

Quanwei Chen, Zhaozhao Wang, Yong Zhu, Tao Lu*

College of Science, China Pharmaceutical University, Nanjing Jiangsu

Received: Dec. 22nd, 2021; accepted: Jan. 13th, 2022; published: Jan. 24th, 2022

Abstract

Protein kinase (PK) disorders are associated with a variety of disease processes, and multiple protein kinase inhibitors have been developed to treat disease. Although protein kinase inhibitors are well developed, there still are challenges of drug resistance and low selectivity. The development of proteolytic targeted chimera (PROTAC) technology has effectively solved the drug resistance of the protein kinase inhibitor and side effects caused by low selectivity, which has received widespread attention. Currently, a variety of kinase PROTAC projects have entered preclinical and clinical studies. This article reviews the research progress of patented and literature-reported

*通讯作者。

PROTAC targeting protein kinases. Summarize and look forward to the development prospects of targeted protein degradation technology, as well as the opportunities and challenges.

Keywords

Protein Kinases, Proteolysis Targeting Chimera, Drug Resistance, Selectivity

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

蛋白激酶(Protein kinase, PK)是参与各种细胞功能的信号调节剂,包括代谢、细胞周期调节、存活和分化。蛋白激酶对靶蛋白磷酸化调控的异常均可导致肿瘤等疾病的发生发展。因此多种激酶抑制剂在临床实践中得到了广泛应用。然而激酶抑制剂的非特异活性等带来的副作用或突变引起的耐药,限制了这类药物的临床应用,迫切需要新颖的策略来克服这些缺点。蛋白水解靶向嵌合体(Proteolysis targeting chimera, PROTAC)技术作为一种新型的药物治疗方案,利用蛋白酶体途径招募 E3 连接酶,劫持目标蛋白从而水解靶向蛋白的机制,赋予了蛋白激酶抑制剂不同的药理特征。本文通过讨论已发表文献以及专利中靶向蛋白激酶的 PROTACs,总结并展望发展前景,及面临的机遇与挑战,来帮助研究者们了解 PROTACs,从而开发更具成药性的 PROTACs 药物。

2. 蛋白激酶以及 PROTAC 的结构、作用机制

蛋白质的激酶家族负责催化其特定底物的磷酸化,并广泛作用于细胞信号通路中的关键节点。一旦被激活,激酶通常会磷酸化目标蛋白上的丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸残基,导致目标蛋白的构象变化和随后的功能激活。在过去二十年中,蛋白激酶抑制剂引起了很多关注,并在多个临床实践中取得巨大成功。如 Imatinib, Gefitinib 等激酶抑制剂被批准用于癌症治疗。然而,尽管靶向药物疗效显著,但患者在经过一段时间的治疗后,往往会出现不同程度的耐药性,从而导致疾病的复发。蛋白质在细胞内执行各种功能,是细胞内环境稳态的关键。当细胞出现损伤,如错误折叠,错误表达时,为防止出现错误应答,细胞通过降解错误蛋白排除故障信号,以此来维持细胞正常状态。细胞内降解蛋白质的途径主要是自噬-溶酶体和泛素蛋白酶体介导的蛋白质降解(biquitin-proteasome system (UPS)-mediated protein degradation) [1]。泛素蛋白酶体降解过程如图 1: ① 目标蛋白被识别; ② 与 E3 泛素连接酶形成蛋白复合物; ③ 在降解信号下被多个泛素残基标记; ④ 被 26S 识别并降解[2]。降解后的氨基酸或是小肽会被吸收再利用,或者转运到细胞表面通过免疫细胞的检查。

PROTAC 代表一类新的异源双功能分子,具有同时结合靶蛋白和 E3 连接酶复合物,进而引起泛素转移并启动,最终导致靶蛋白被蛋白酶体降解的功能[3]。与抑制剂相比,这种作用机制赋予 PROTAC 以独特方式调节靶标的生物学能力,并且 PROTACs 可继续参与降解过程。这种特性使得 PROTAC 在低浓度下起效并且作用的持续时间取决于蛋白的再生速率,因此具有高效的特点。应用降解剂策略已经被广泛认为可以解决传统激酶抑制剂造成的耐药性,使非成药靶点,重新具备成药潜力[4]。各激酶 PROTAC 的常见蛋白配体以及 E3 连接酶如表 1 所示。

靶向蛋白激酶的 PROTAC 结构包括 E3 复合物结合剂、连接链部分以及蛋白激酶配体三个部分,而

这个双功能分子的生物功能是把 E3 连接酶召集到目标蛋白，导致目标蛋白的泛素化后被蛋白酶体降解，进而破坏目标蛋白的酶促和非酶促功能[3]。这样以不依赖酶促或信号传导活性的方式调节蛋白质，是一种极具潜力的药物开发策略。

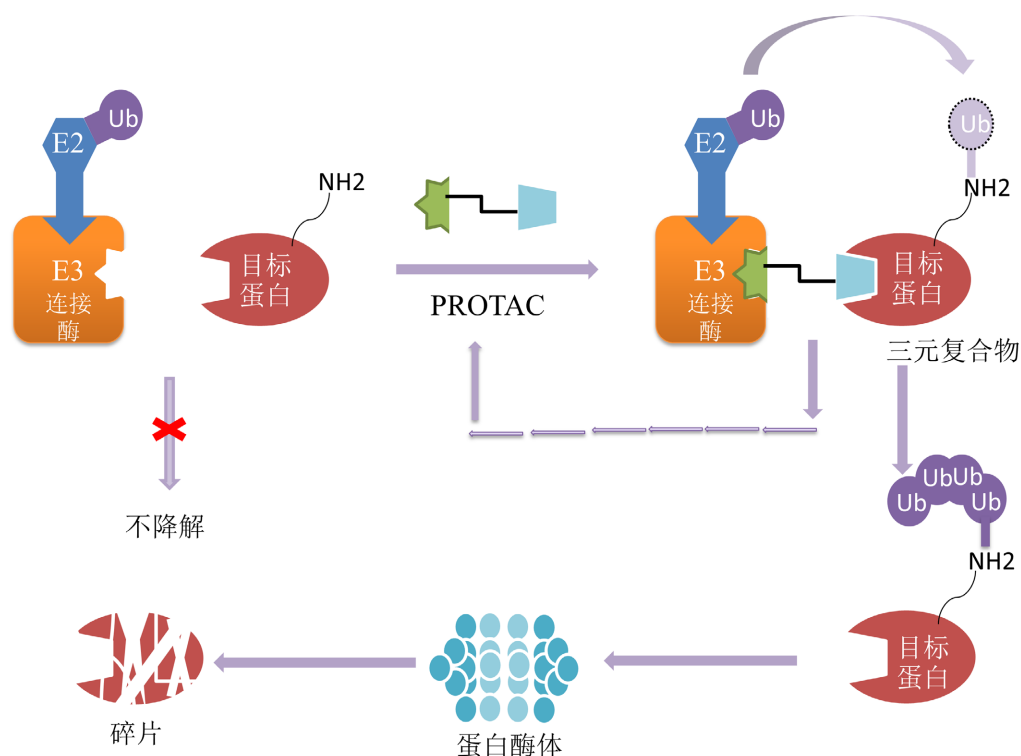


Figure 1. PROTAC-mediated degradation of target proteins through the UPS
图 1. 泛素蛋白酶体介导的 PROTAC 降解目标蛋白过程

Table 1. Ligand and E3 ligase of the protein kinase PROTAC
表 1. 激酶 PROTAC 的蛋白配体以及 E3 连接酶

激酶	靶标配体	E3 连接酶
BCR-ABL	imatinib, bosutinib, dasatinib, ponatinib	CRBN, VHL
BTK	Ibrutinib, CGI1746, zanubrutinib	CRBN, VHL, IAP
FAK	Defactinib, PND-1186, PF562271	CRBN, VHL
Wee1	AZD1775	CRBN, VHL
TRK	Entrectinib, GNF-8625	CRBN, VHL
IRAK4	/	CRBN, VHL, IAP, MDM2
LRKK2	DNL151, DNL201	CRBN, VHL
B-Raf	PLX8394, Vemurafenib	CRBN, VHL
CDK	Palbociclib, ribociclib, abemaciclib, SNS-032, Torin1, CCT251545, Cortistatin-17	CRBN, VHL, IAP, MDM2
TBK1	MRT67307	VHL
EGFR	Vandetanib, Canertinib, osimertinib	VHL, CRBN
FLT3	AC220	CRBN

3. 靶向激酶的 PROTACS

3.1. 酪氨酸激酶 PROTACS

酪氨酸激酶催化 ATP 的 γ -磷酸转移到底物蛋白的酪氨酸残基上, 在细胞信号转导通路中发挥重要作用, 其中很多成员是癌症治疗中具有特殊意义的生物靶点。酪氨酸激酶可分为两大类——非受体激酶和跨膜受体激酶[5]。

3.1.1. BCR-ABL PROTACS

断点簇区-Abelson 酪氨酸激酶(The breakpoint cluster region-Abelson tyrosine kinase, BCR-ABL)的降解剂策略有望用于治疗与该融合蛋白过度表达或不受控制激活相关的疾病[6], 尤其是费城染色体阳性肿瘤, 例如慢性粒细胞白血病(Chronic myeloid leukemia, CML)。这类疾病可以通过 BCR-ABL 抑制剂长期治疗。BCR-ABL 突变和治疗引起的耐药性, 这是治疗 CML 面临的巨大临床挑战[7]。BCR-ABL PROTACS 使用 VHL 和 cereblon E3 连接酶结合剂分别连接到 BCR-ABL 激酶抑制剂 imatinib、bosutinib 和 dasatinib [8] [9]。Dasatinib 作为蛋白配体的 PROTAC (化合物 1, 如图 2)是第一个 BCR-ABL PROTAC [10], 在 western blot 实验中, 可以同时降解 BCR-ABL 和 c-ABL。而在所有 VHL-PROTACS 中, 基于 dasatinib 改造的化合物被观察到只降解 c-ABL, 而不降解 BCR-ABL。imatinib 作为蛋白配体的 PROTAC 没有观察到 c-ABL 或 BCR-ABL 的降解。说明合适的 E3 连接酶以及靶蛋白招募配体才可以实现目标蛋白的有效降解。

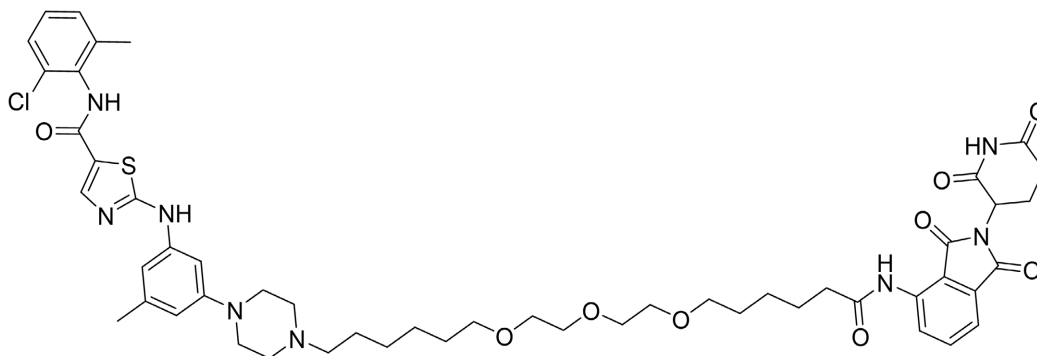


Figure 2. Compound 1
图 2. 化合物 1

3.1.2. BTK PROTACS

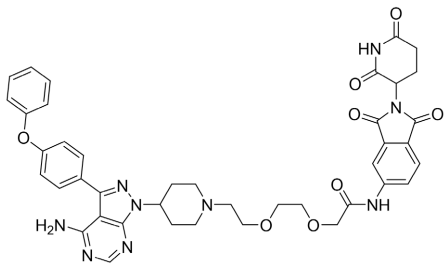
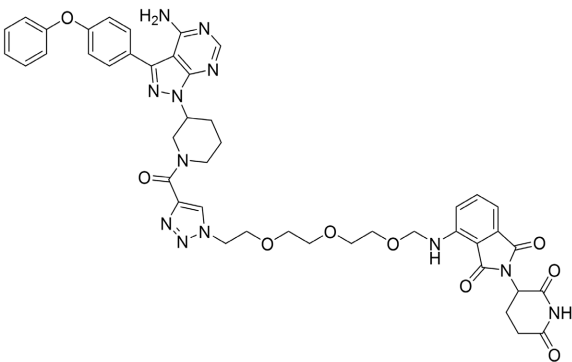
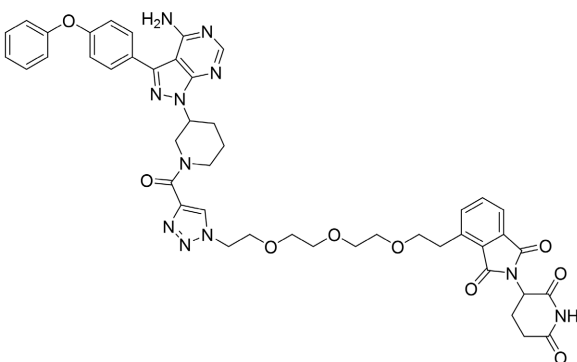
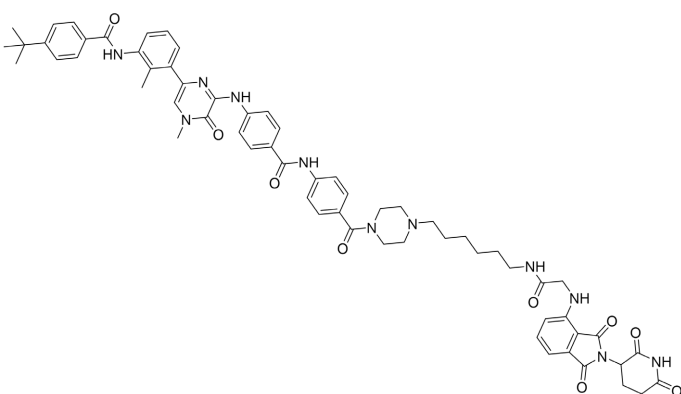
布鲁顿酪氨酸激酶(Bruton tyrosine kinase, BTK)是 Tec 家族的一类非受体酪氨酸激酶, 在除了 T 细胞, 自然杀手细胞和浆细胞外的所有造血细胞中都有表达, BTK 对 B 细胞的生长、分化和信号传导有非常重要的作用[11]。BTK 抑制剂, 如 ibrutinib, 用于治疗血液系统恶性肿瘤例如套细胞淋巴瘤(MCL), ibrutinib 通过 C481 与 BTK 共价结合抑制构象转化从而调节磷酸化信号。然而, C481S 突变引起对 ibrutinib 的耐药性, 导致抑制剂的效能下降[12]。尽管可逆的 BTK 抑制剂降低了对 C481 的依赖性, 但目前临床需求仍未得到满足。BTK PROTAC 被认为是解决 BTK 抑制剂耐药的方案[13]。常见的 BTK PROTACS 通常使用 VHL 和 cereblon 作为 E3 连接酶, 化合物 2 (如表 2)由 ibrutinib 以及 cereblon 构成, 其在 Namalwa 细胞中 BTK 的 DC_{50} 达到 9nm, 并且 $D_{max} > 99\%$ 。

化合物 3 (如表 2)将 Ibrutinib 和 cereblon 结合, 可以有效降解具有 Ibrutinib 抗性的 BTK-C481S [14]。为进一步改善水溶性, 开发了化合物 4 (如表 2) [15]。在外源性过表达的 BTK C481Smutant 中, 化合物 4 同样表现出优异的降解能力。化合物 5 (如表 2)是基于 CGI1746 通过脂肪酰胺链连接到 cereblon 组成的

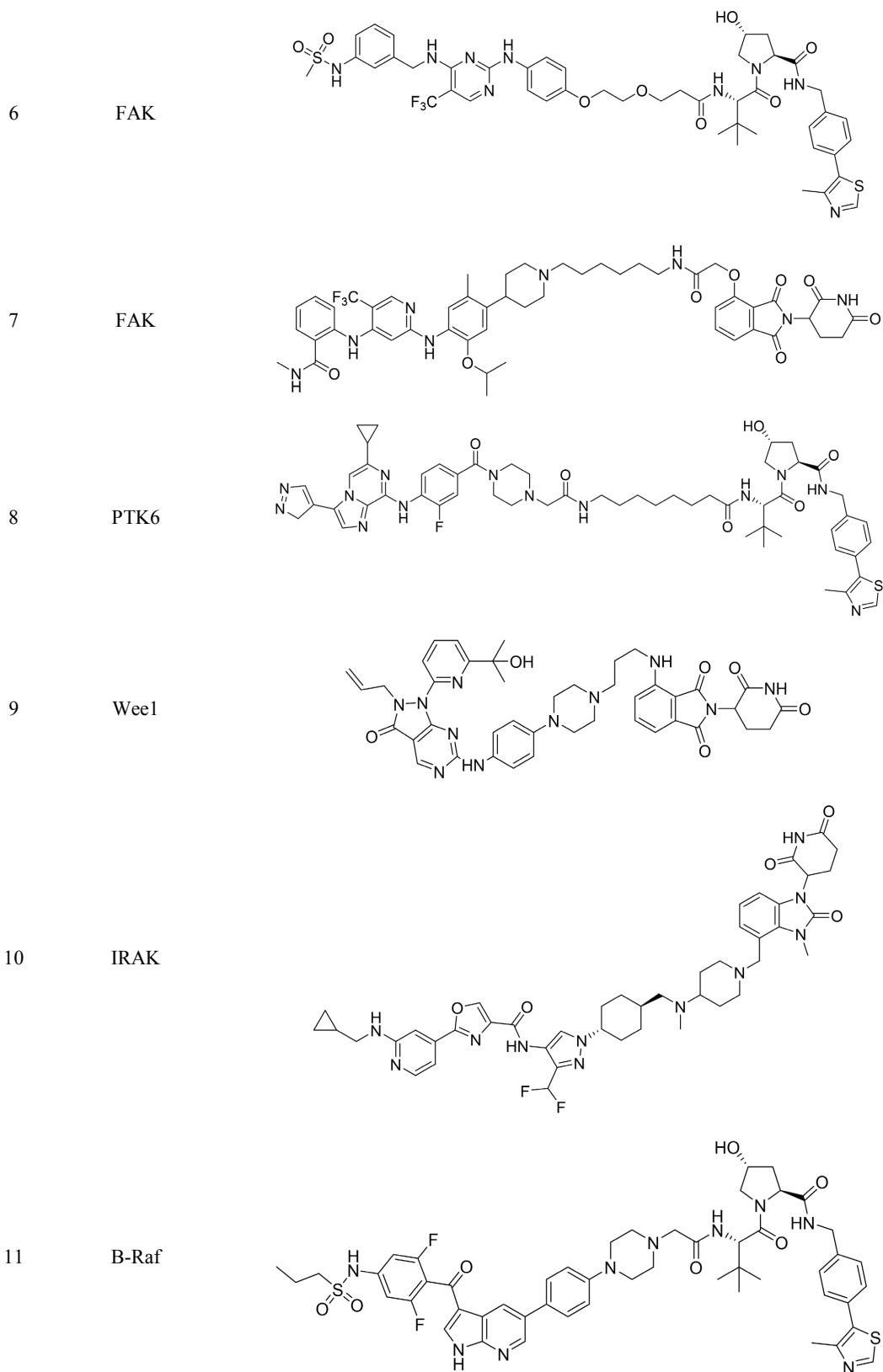
PROTAC。它在体内 PDX 模型中，显著降低小鼠的肿瘤大小并延长存活率[16]。因此 PROTAC 技术的应用确实可以克服点突变引起的耐药性。

Table 2. Representative compound of kinase PROTAC

表 2. 代表性激酶 PROTAC

化合物	靶点	结构
2	BTK	
3	BTK	
4	BTK	
5	BTK	

Continued



3.1.3. FAK PROTACs

粘着斑激酶(Focal adhesion kinase, FAK), 也称为蛋白酪氨酸激酶 2 (PTK2), 在某些癌症的生物学中发挥重要作用, 并且多种小分子 FAK 抑制剂已经在进行临床评估[17]。

化合物 6 (如表 2)采用 defactinib 改造而来的 PF-573,228 作为激酶配体[18], 使用碳链或者聚乙二醇链分别连接 cereblon 或 VHL。有着低纳摩尔的 DC_{50} 效力并且 $D_{max} \geq 85\%$, VHL 作为配体比 cereblon 有着更有效的降解能力, 并且中等长度连接子也具有良好的降解效能。此外, 该 PROTACs 有着比抑制剂 defactinib 更好的激酶选择性, 因此 FAK PROTAC 可能会带来更有效的治疗价值。

基于 PND-1186 改造的 FAK PROTACs, 在 PA-TU8988 T 细胞中展示出了显著的降解活性, 在 10 nm 浓度下降解 90%以上的 FAK。化合物 7 (如表 2)在 PA-TU-8988 T 裸鼠异种移植模型以 10 mg/kg 剂量给药, 可以观察到显著的 FAK 降解[19]。

3.1.4. PTK6 PROTACs

蛋白质酪氨酸激酶 6 (Protein Tyrosine Kinase 6, PTK6)是细胞内酪氨酸激酶 PTK6 家族中研究最多的成员。虽然它在胃肠道和皮肤再生上皮分化细胞中以最高水平表达, 但在包括不良预后相关的乳腺癌和前列腺癌在内的多种癌症中都检测到了 PTK6 的异常激活[20] [21]。PTK6 PROTACs (化合物 8, 如表 2) [22]可以在 MDA-MB231 三阴性乳腺癌细胞中降解 PTK6, 并且与单独使用 PTK6 抑制剂相比, 可以更有力地抑制 ER+ 乳腺癌细胞和铂耐药性卵巢癌细胞活力。

3.2. 丝氨酸/苏氨酸激酶 PROTAC

丝氨酸/苏氨酸激酶磷酸化底物肽上的丝氨酸或苏氨酸的羟基, 是激酶家族中的重要成员。

3.2.1. Wee1 PROTAC

Wee1 激酶通过磷酸化 CDK1 参与管控细胞周期, Wee1 激酶抑制剂的开发被认为对癌症治疗有着良好前景[23]。典型的 Wee1 PROTACs 将 Wee1 抑制剂 AZD1775 和 cereblon 以及 VHLE3 连接酶相连。其中, 化合物 9 (如表 2)的 Western blot 实验表明, Wee1 蛋白含量显著下调, 并且未观察到 PLK1 的下调。表明该 Wee1 PROTAC 有着与相应的 Wee1 抑制剂不同的激酶选择性[24]。

3.2.2. IRAK4 PROTACs

白细胞素 1 受体激活的激酶 4 (The interleukin-1 receptor-activated kinase 4, IRAK4)位于 toll 样受体的下游, 是先天免疫系统的一部分, 已被证实为治疗肿瘤和炎症的药物靶点[25], 目前没有 IRAK4 抑制剂药物获批上市。化合物 10 (如表 2)有着较好的口服生物利用度, 在 MYD88-mutant 的 OCI-LY10 的肿瘤模型中, 25mg/kg (PO, QD)剂量下, 对肿瘤生长有着很好的抑制效果, 在单钠尿酸盐引起的痛风模型中同样有效[26]。

3.2.3. B-Raf PROTACs

B-Raf 蛋白在激活 RAS--RAF-MEK-ERK 信号通路和促进正常细胞发育中起重要作用[27]。在大约 7% 的人类癌细胞中 B-Raf 激酶发生突变, 最常见的致癌突变是 V600E [28]。在不同类型的癌症中都发现了 B-Raf 信号通路的失调; 包括黑色素瘤、肝细胞、乳腺、结直肠癌等, 临床上通常与 MEK 抑制剂联合治疗[29]。B-Raf 有 30 多个致癌突变确定, 已经批准使用的药物, 如 Vemurafenib 和 dabrafenib 选择性抑制常见的野生型 V600 B-Raf 突变体的 B-Raf。目前已经报道的 B-Raf PROTAC 使用了 PLX8394 以及 Vemurafenib 作为蛋白配体[30]。化合物 11 (如表 2)由 VHL 以及 Vemurafenib 构成, 其 $DC_{50} < 10$ nm, 为选择性的野生型 B-Raf V600E、K601E 和 G466E B-Raf 突变体的降解剂。

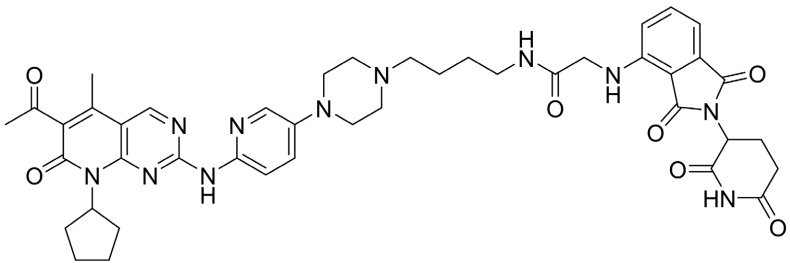
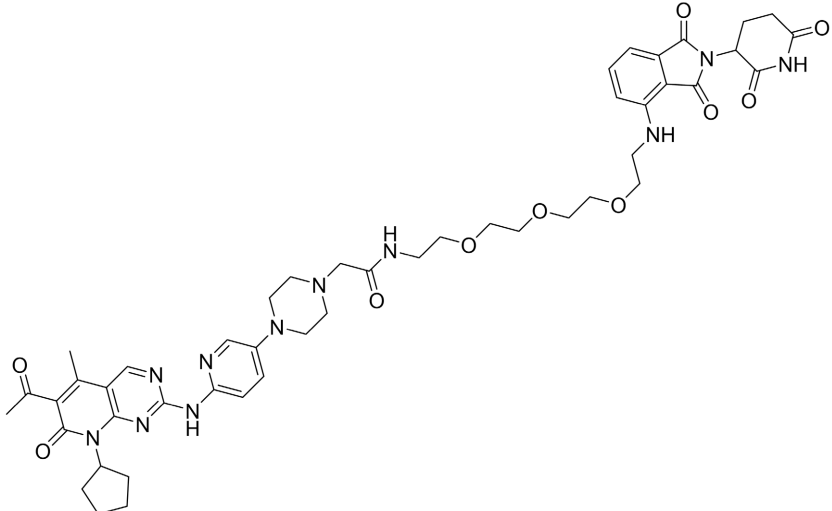
3.2.4. CDK family PROTACs

细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent protein kinases, CDK)家族在细胞周期调控和转录过程中发挥着重要的作用, CDK 蛋白的过度活化可导致细胞增殖失调, 进而促进肿瘤增殖, 抑制某些 CDK 家族成员已被证实是一种临床适用于癌症的治疗方法。各亚型发挥着不同的生理或病理功能, 并具有高度的同源性。因此, 如何提高靶标选择性是药学工作者面临的巨大挑战[31] [32]。由于 PROTAC 在提高选择性方面表现出显著的优势, 近年来在该领域取得了巨大的成就。目前已公布多项专利申请, 例如 CDK4/6、CDK8、CDK8/19 和 CDK9 PROTAC。Palbociclib、ribociclib 和 abemaciclib 与 cereblon 相连接构成 CDK4/6 PROTAC。化合物 12 (如表 3)只降解 CDK4, 其与化合物 13 (如表 3)仅在连接子上存在差异, 而化合物 13 却能同时降解 CDK4/6 [33] [34]。

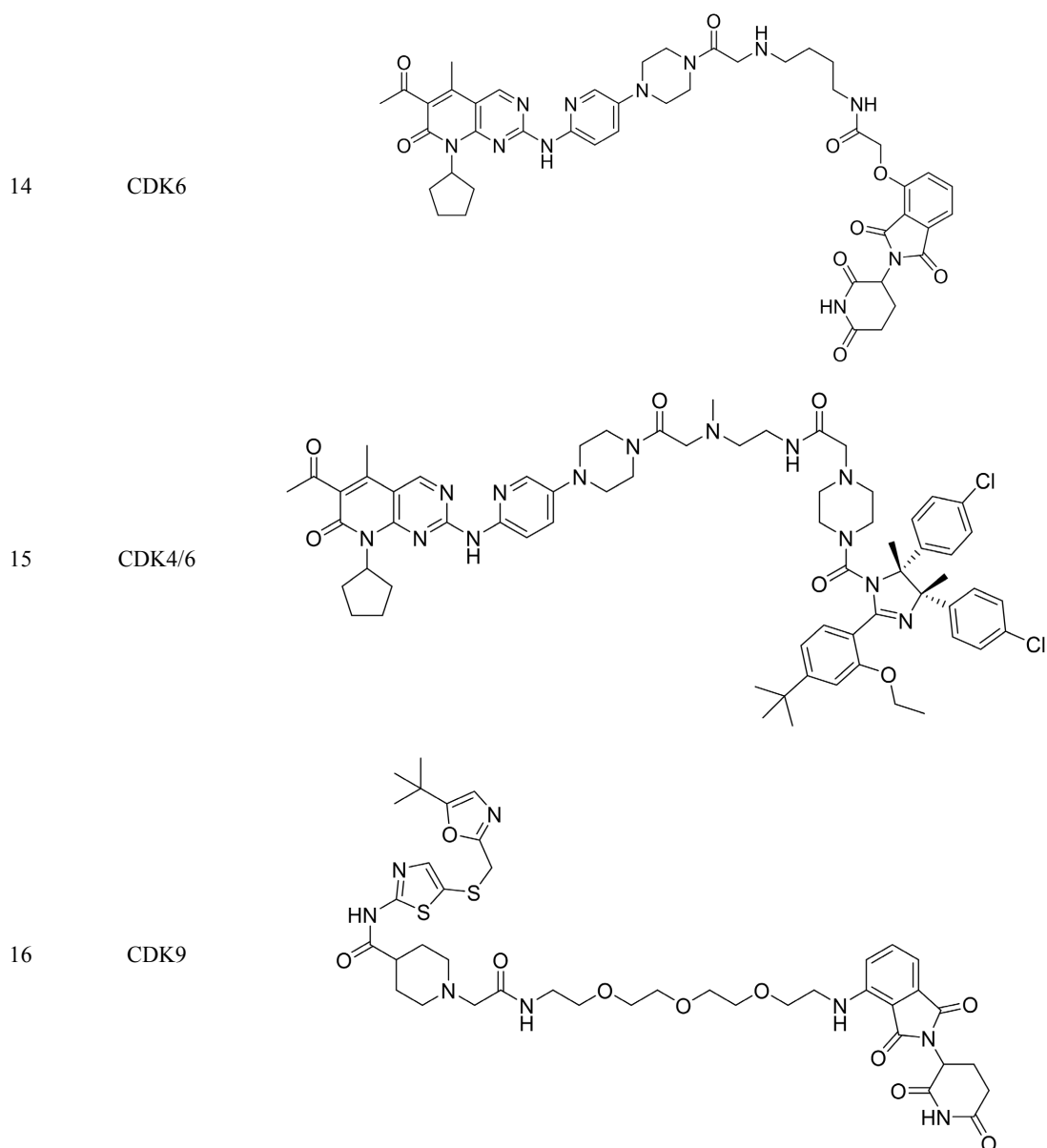
化合物 14 (如表 3)在肿瘤异种移植模型的体内实验中更偏向于降解 CDK6。有趣的是, 虽然结构相似, 但是化合物 12 有着相反的亚型选择性。而应用 MDM2 的化合物 15 (如表 3)却有着相近的 CDK4 和 CDK6 亚型降解活力[35]。

2017 年, Dana-Farber 癌症机构发表了 CDK9 的 PROTACs, 称其具有抗癌和治疗免疫失调疾病的效力。其结构使用了 CDK9 结合片段 SNS-032。以化合物 16 (如表 3)为代表的, 使用 cereblon 的结构在 western blot 实验中明显降解 CDK9, 而使用 VHL 作为 E3 连接酶的 PROTACs 没有展示出降解活性。实验中同时发现, 该类型 CDK9 PROTACs 还具有 CDK11/12 的降解活性[36]。

Table 3. Cyclin-dependent protein kinase family PROTAC
表 3. 细胞周期蛋白依赖性激酶家族 PROTAC

化合物	靶点	结构
12	CDK4	
13	CDK4/6	

Continued



3.2.5. TBK1 PROTACs

TANK 结合激酶-1 (TANK binding kinase-1, TBK1) 是 IKK 蛋白激酶家族的成员, 是由模式识别受体检测, 先天免疫系统对病毒感染的关键反应节点[37]。TBK 的激活导致转录因子 IRF-3 的磷酸化, 从而促进 IFN-1 的产生。TBK1 活跃异常与许多疾病有关, 尽管目前还没有批准上市的 TBK1 抑制剂药物, 但它在肿瘤中的异常激活使其成为目前研究的热点。化合物 17 (如图 3) 使用的蛋白配体是 TBK1/IKK ϵ 双靶点抑制剂, 在 Pan02.13 细胞中以 4 nM 的 K_d 与 TBK1 结合, 并且 DC₅₀ 为 32 nM, D_{max} 可以达到 96%。该结构是用聚丙二醇链替换了常用的聚乙二醇, 尽管对 TBK1 同源物 IKK ϵ 的结合亲和力 K_d 为 70 nM, 但它不会降解 IKK ϵ [38]。说明三元复合物的形成不仅仅由 PROTAC 的结合亲和力决定, 还与靶向的激酶蛋白与 E3 连接酶之间的作用有关。

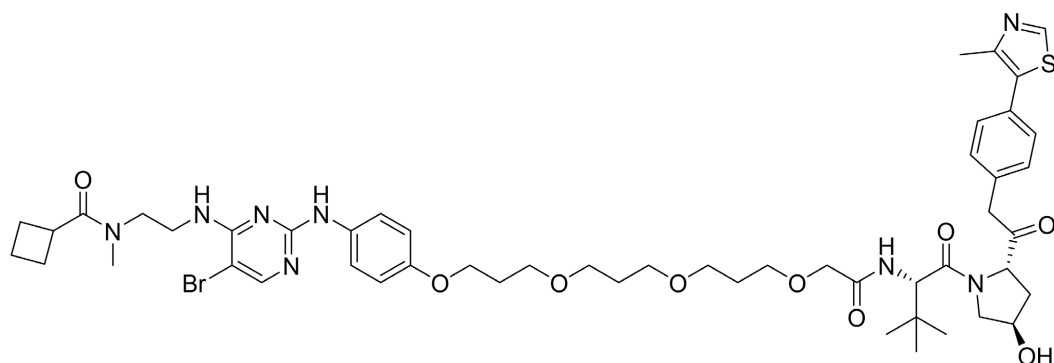


Figure 3. Coumpod 17

图 3. 化合物 17

4. 总结与展望

在过去几年里, PROTAC 技术在诱导蛋白质降解方面取得了成功, 并解决了传统小分子蛋白激酶抑制剂所面临的一些挑战, 耐药性、选择性、毒副作用、靶向多功能等。它不仅可以作为靶点以及机制研究的一种工具, 也提供了下一代更具广泛前景的治疗方法。

对于 PROTAC 的设计, 首先要有合适的靶蛋白结合配体, 然而配体的亲和力不是决定因素, 三元复合物形成的稳定性和效率是赋予 PROTAC 活性的主要因素。此外, E3 连接酶的选择有 VHL、IAP、cereblon 等。不同的 E3 连接酶对蛋白质降解表现出不同的活性和选择性。脂肪链、PEG 链和肽链是常见的连接子, 对 PROTAC 的结合亲和力以及渗透性影响较大。

激酶 PROTAC 也同样面临着挑战。由于 PROTACs 较大的分子质量和较差的理化性质, 使 PROTAC 的生物利用度较差。选择合适的连接子以及针对靶点的合适的配体选择可能会解决这一问题。也有文献报道了二价蛋白激酶 PROTAC, 这不失为激酶 PROTAC 研究的新的思路[39]。

与传统的小分子抑制剂相比, PROTACs 策略可以改变相应小分子激酶抑制剂的用药剂量、给药途径等, 也会带来不一样的药理特征。此外, PROTACs 介导的激酶降解也可用于调节磷酸化, 扩大 PROTACs 的应用范围。在过去的几十年中, 已经开发了许多选择性靶向激酶的配体作为竞争性或变构抑制剂, 这为 PROTAC 分子设计以及性质研究提供了坚实的基础。目前在国内外已经有许多公司推出的 PROTACs 分子处于临床试验的不同阶段, 临床前研究的 PROTACs 更是不计其数。随着 PROTACs 技术更加深入地研究, 相信在不远的将来 PROTACs 作为临床用药可以帮助患者远离癌症的侵扰。

参考文献

- [1] Kroemer, G., Marino, G. and Levine, B. (2010) Autophagy and the Integrated Stress Response. *Molecular Cell*, **40**, 280-293. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.023>
- [2] Pickart, C.M. (2000) Ubiquitin in Chains. *Trends in Biochemical Sciences*, **25**, 544-548. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)01681-9](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)01681-9)
- [3] Coleman, K.G. and Crews, C.M. (2018) Proteolysis-Targeting Chimeras: Harnessing the Ubiquitin-Proteasome System to Induce Degradation of Specific Target Proteins. *Annual Review of Cancer Biology*, **2**, 41-58. <https://doi.org/10.1146/annurev-cancerbio-030617-050430>
- [4] Martin-Acosta, P. and Xiao, X. (2021) PROTACs to Address the Challenges Facing Small Molecule Inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **210**, Article ID: 112993. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112993>
- [5] Soltan, O.M., Shoman, M.E., Abdel-Aziz, S.A., et al. (2021) Molecular Hybrids: A Five-Year Survey on Structures of Multiple Targeted Hybrids of Protein Kinase Inhibitors for Cancer Therapy. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **225**, Article ID: 113768. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113768>

- [6] Yang, Y.Q., Gao, H.Y., Sun, X.Y., *et al.* (2020) Global PROTAC Toolbox for Degrading BCR-ABL Overcomes Drug-Resistant Mutants and Adverse Effects. *Journal of Medicinal Chemistry*, **63**, 8567-8583. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00967>
- [7] Jiang, L., Wang, Y.T., Li, Q., *et al.* (2021) Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Bcr-Abl PROTACs to Overcome T315I Mutation. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, **11**, 1315-1328. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.11.009>
- [8] Liu, H.X., Ding, X.Y., Liu, L.Y., *et al.* (2021) Discovery of Novel BCR-ABL PROTACs Based on the Cereblon E3 Ligase Design, Synthesis, and Biological Evaluation. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **223**, Article ID: 113645. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113645>
- [9] Crews, C., Toure, M., Ko, E., *et al.* (2017) Proteolysis Targeting Chimera Compounds and Methods of Preparing and Using Same. Patent WO2017079267A1.
- [10] Lai, A.C., Toure, M., Hellerschmied, D., Salami, J., Jaime-Figueroa, S., Ko, E., Hines, J. and Crews, C.M. (2016) Modular PROTAC Design for the Degradation of Oncogenic BCR-ABL. *Angewandte Chemie International Edition in English*, **55**, 807-810. <https://doi.org/10.1002/anie.201507634>
- [11] Gabizon, R. and London, N. (2020) A Fast and Clean BTK Inhibitor. *Journal of Medicinal Chemistry*, **63**, 5100-5101. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00597>
- [12] Tasso, B., Spallarossa, A., Russo, E. and Brullo, C. (2021) The Development of BTK Inhibitors: A Five-Year Update. *Molecules*, **26**, 7411. <https://doi.org/10.3390/molecules26237411>
- [13] ShorerArbel, Y., Katz, B.-Z., Gabizon, R., Shraga, A., Bronstein, Y., Kamdjou, T., Globerson Levin, A., Perry, C., Avivi, I., London, N. and Herishanu, Y. (2021) Proteolysis Targeting Chimeras for BTK Efficiently Inhibit B-Cell Receptor Signaling and Can Overcome Ibrutinib Resistance in CLL Cells. *Frontiers in Oncology*, **11**, Article ID: 646971. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.646971>
- [14] Sun, Y., Zhao, X., Ding, N., *et al.* (2018) PROTAC-Induced BTK Degradation as a Novel Therapy for Mutated BTK C481S Induced Ibrutinib-Resistant B-Cell Malignancies. *Cell Research*, **28**, 779-781. <https://doi.org/10.1038/s41422-018-0055-1>
- [15] Sun, Y., Ding, N., Song, Y., *et al.* (2019) Degradation of Bruton's Tyrosine Kinase Mutants by PROTACs for Potential Treatment of Ibrutinib-Resistant Non-Hodgkin Lymphomas. *Leukemia*, **33**, 2105-2110. <https://doi.org/10.1038/s41375-019-0440-x>
- [16] Dobrovolsky, D., Wang, E.S., Morrow, S., Leahy, C., Faust, T., Nowak, R.P., Donovan, K.A., Yang, G., Li, Z.N., Fischer, E.S., Treon, S.P., Weinstock, D.M. and Gray, N.S. (2019) Bruton Tyrosine Kinase Degradation as a Therapeutic Strategy for Cancer. *Blood*, **133**, 952-961. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-07-862953>
- [17] Lu, Y. and Sun, H.Y. (2020) Progress in the Development of Small Molecular Inhibitors of Focal Adhesion Kinase (FAK). *Journal of Medicinal Chemistry*, **63**, 14382-14403. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c01248>
- [18] Crews, C.M., Cromm, P.M. and Crew, A.P. (2020) Preparation of Bifunctional Substituted Pyrimidines as Modulators of FAK Proteolysis. Patent WO2020023851A1.
- [19] Gray, N.S., Jiang, B., Nabet, B., *et al.* (2020) Degradation of FAK or FAK and ALK by Conjugation of FAK and ALK Inhibitors with E3 Ligase Ligands and Methods of Use. Patent WO2020069117A1.
- [20] Ito, K., Park, S.H., Katsyov, I., *et al.* (2017) PTK6 Regulates Growth and Survival of Endocrine Therapy-Resistant ER+ Breast Cancer Cells. *NPJ Breast Cancer*, **3**, 45. <https://doi.org/10.1038/s41523-017-0047-1>
- [21] Gilic, M.B. and Tyner, A.L. (2020) Targeting Protein Tyrosine Kinase 6 in Cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—Reviews on Cancer*, **1874**, Article ID: 188432. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2020.188432>
- [22] Jin, J., Irie, H., Liu, J., *et al.* (2020) Preparation as Heterocyclic Compounds as Protein Tyrosine Kinase 6 (PTK6) Degradation/Disruption Compounds and Methods of Use. Patent WO2020010204A1.
- [23] Matheson, C.J., Backos, D.S. and Reigan, P. (2016) Targeting WEE1 Kinase in Cancer. *Trends in Pharmacological Sciences*, **37**, 872-881. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.06.006>
- [24] Li, Z.N., Li, Z., Pinch, B.J., Olson, C.M., *et al.* (2020) Development and Characterization of a Wee1 Kinase Degradator. *Cell Chemical Biology*, **27**, 57-65.e9. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2019.10.013>
- [25] Bennett, J. and Starczynowski, D.T. (2022) IRAK1 and IRAK4 as Emerging Therapeutic Targets in Hematologic Malignancies. *Current Opinion in Hematology*, **29**, 8-19. <https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000693>
- [26] Mainolfi, N., Ji, N., Kluge, A.F., *et al.* (2020) Preparation of Bifunctional Compounds as IRAK Degraders and Uses Thereof. Patent WO2020113233A1.
- [27] Aoki, Y. and Matsubara, Y. (2013) Ras/MAPK Syndromes and Childhood Hemato-Oncological Diseases. *International Journal of Hematology*, **97**, 30-36. <https://doi.org/10.1007/s12185-012-1239-y>
- [28] Dietrich, J., Gokhale, V., Wang, X.D., *et al.* (2010) Application of a Novel [3+2] Cycloaddition Reaction to Prepare Substituted Imidazoles and Their Use in the Design of Potent DFG-Outallosteric B-Rafinhibitors. *Bioorganic & Medi-*

- cial Chemistry*, **18**, 292-304. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.10.055>
- [29] Thabit, M.G., Mostafa, A.S., Selim, K.B., *et al.* (2020) Design, Synthesis and Molecular Modeling of Phenyl Dihydropyridazinone Derivatives as B-Raf Inhibitors with Anticancer Activity. *Bioorganic Chemistry*, **103**, Article ID: 104148. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104148>
- [30] Crew, A.P., Hornberger, K.R., Wang, J., *et al.* (2020) Polycyclic Compounds and Methods for the Targeted Degradation of Rapidly Accelerated Fibrosarcoma Polypeptides. Patent WO2020051564A1.
- [31] Huang, J.H., Wang, X.R., Dong, R.N., *et al.* (2021) Discovery of N-(4-(3-isopropyl-2-methyl-2H-indazol-5-yl)pyrimidin-2-yl)-4-(4-methylpiperazin-1-yl)quinazolin-7-amine as a Novel, Potent, and Oral Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor against Haematological Malignancies. *Journal of Medicinal Chemistry*, **64**, 12548-12571. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c00271>
- [32] Freeman-Cook, K.D., Hoffman, R.L., Behenna, D.C., *et al.* (2021) Discovery of PF-06873600, a CDK2/4/6 Inhibitor for the Treatment of Cancer. *Journal of Medicinal Chemistry*, **64**, 9056-9077.
- [33] Gray, N., Zhang, T., Olson, C.M., *et al.* (2017) Degradation of Cyclin-Dependent Kinase 9 (cdk9) by Conjugation of cdk9 Inhibitors with e3 Ligase Ligand and Methods of Use. Patent WO2017185031A1.
- [34] Gray, N.S., Jiang, B., Zhang, T., *et al.* (2020) Degradation of Cyclin-Dependent Kinase 4/6 (cdk4/6) by Conjugation of cdk4/6 Inhibitors with E3 Ligase Ligand and Methods of Use. Patent WO2020023480A1.
- [35] Salvino, J., Calabretta, B., De Dominici, M., *et al.* (2020) Preparation of Pyrimidine Derivatives as Proteolysis-Targeting Chimeras (PROTACs). Patent WO2020092662A1.
- [36] Gray, N., Zhang, T., Olson, C.M., *et al.* (2017) Degradation of Cyclin-Dependent Kinase 9 (cdk9) by Conjugation of cdk9 Inhibitors with E3 Ligase Ligand and Methods of Use. Patent WO2017185023A1.
- [37] Taft, J., Markson, M., Legarda, D., *et al.* (2021) Human TBK1 Deficiency Leads to Autoinflammation Driven by TNF-Induced Cell Death. *Cell*, **184**, 4447-4463.e20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.07.026>
- [38] Crew, A.P., Wang, J., Dong, H., *et al.* (2016) Preparation of PROTAC Compounds as TANK-Binding Kinase 1 Inhibitors for Modulation of Proteolysis and Associated Methods of Use. Patent WO2016197114A1.
- [39] Zheng, M.Z., Huo, J.F., Gu, X.X., *et al.* (2021) Rational Design and Synthesis of Novel Dual PROTACs for Simultaneous Degradation of EGFR and PARP. *Journal of Medicinal Chemistry*, **64**, 7839-7852. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c00649>