



PROSSIMITÀ CHIMICAMENTE INDOTTA

Tra le tecnologie emergenti in campo farmacologico, la Prossimità Chimicamente Indotta rappresenta un'interessante alternativa a quelle attualmente in uso, aprendo nuovi possibili orizzonti terapeutici. Il meccanismo si basa sull'uso di una piccola molecola capace di avvicinare tra loro due proteine che altrimenti non interagirebbero, innescando di conseguenza la risposta biologica desiderata.

La ricerca farmacologica necessita continuamente di nuovi approcci che possano ampliare l'arsenale di armi a disposizione per affrontare malattie notoriamente difficili da curare. Tuttavia, la crescita costante di conoscenze e tecnologie, specialmente negli ultimi 30-40 anni, ha permesso di raggiungere risultati eccezionali, proponendo cure efficaci contro malattie come il cancro.

Per una data patologia, una volta individuati origini e meccanismo, vengono ricercati i componenti cellulari (proteine, acidi nucleici, ecc.) che partecipano allo sviluppo della malattia stessa. Successivamente all'identificazione di tali componenti, sfruttando le conoscenze a disposizione, si cerca di bloccare tali meccanismi e indurre l'attenuazione o la scomparsa della condizione patologica.

Comunemente, le strutture cellulari coinvolte sono di diversa natura e richiedono approcci differenti. Nel caso delle proteine, bersagli molecolari (target) molto comuni, spesso accade che una loro disfunzione sia causa di un comportamento anomalo delle cellule, portando al nascere della malattia. Tra gli approcci più di successo che hanno segnato la storia della farmacologia c'è il concetto di *inibizione* di una proteina disfunzionale. Il farmaco agisce con un meccanismo che, semplificato, somiglia a quello di chiave-serratura (Fig. 1).

Affinché questo approccio possa funzionare, il sistema deve presentare alcune caratteristiche:

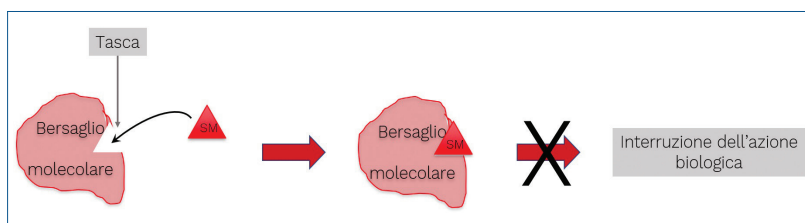


Fig. 1 - "Tasca" definisce la cavità intrinseca della proteina che solitamente ospita un ligando endogeno. "SM" = Small Molecule (piccola molecola). L'azione della SM è di prevenire l'utilizzo della tasca della proteina da parte del substrato endogeno, bloccandone l'attività

- comunemente la proteina deve avere un'attività (enzimatica, recettoriale, di conduzione di ioni);
- deve presentare una cavità (tasca) in cui far alloggiare la Small Molecule (SM);
- la tasca deve essere adatta all'interazione con una SM;
- tale interazione deve avere conseguenze biologiche (per esempio, inibire l'azione dell'enzima).

L'insieme di queste caratteristiche definiscono una proteina "*druggable*" (adatta ad essere farmacologicamente modulata). Di solito, affinché una SM possa essere efficace, è necessario che legni fino al 90% del totale della proteina in cellula e spesso per un periodo prolungato; queste particolarità influiscono direttamente sul dosaggio di un farmaco e, di conseguenza sui possibili effetti collaterali.

Tuttavia, nel proteoma (l'insieme delle proteine) umano, la quantità di proteine *druggable* è una minoranza (25% circa [1]), quindi il restante 75% non presenta siti adatti ad essere occupati con una SM ed è definito *undruggable* (Fig. 2).

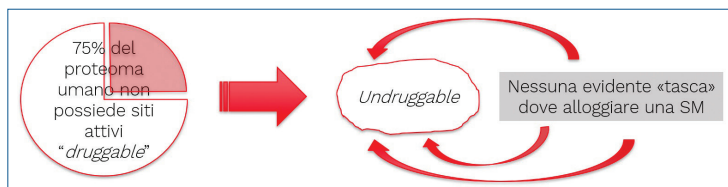
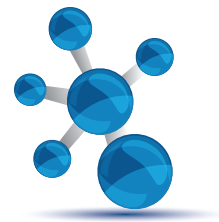


Fig. 2 - "Undruggable"

Sfortunatamente, molte proteine che ricadono in quest'ultima categoria hanno ruoli cruciali in una serie di patologie. Quindi, come colpire queste proteine intrinsecamente difficili da approcciare? Rispondere a questa domanda permetterebbe un avanzamento nella cura di malattie multifattoriali, come per esempio il cancro, dove proteine del genere si incontrano frequentemente.

Tra i vari approcci possibili ne esiste uno in particolare che ha recentemente suscitato un grande interesse sia in ambito accademico che industriale. Se con l'*inibizione* viene interrotta l'attività di una proteina disfunzionale, con la *degradazione*, la proteina viene eliminata del tutto.

Tutte le proteine vengono sintetizzate, modificate per compiere una funzione e poi, quando la cellula non ne ha più bisogno, degradate; i prodotti di tale degradazione sono "riciclati" dalla cellula stessa in un processo di continuo mutevole equilibrio, definito *proteostasi* e comprendente una serie di meccanismi cellulari che si sono evoluti per milioni di anni per controllare in maniera estremamente fine le varie funzioni cellulari. Tra i vari sistemi, il più importante è rappresentato dall'*Ubiquitin Proteasome System* (UPS) che utilizza la proteina più diffusa nelle cellule, chiamata, appunto, *ubiquitina*.

In maniera semplificata, l'ubiquitina viene usata per "marcare" le proteine substrato, indirizzandone il destino all'interno della cellula. Nel caso della degradazione, la proteina substrato opportunamente marcata viene riconosciuta dal complesso del proteosoma, che provvede alla sua degradazione.

Il meccanismo coinvolge diverse famiglie di proteine: le E1 (Ubiquitin Activating Enzymes) atti-

vano l'ubiquitina, che viene poi trasferita alle E2 (Ubiquitin Conjugating Enzymes), responsabili del trasferimento dell'ubiquitina sulla proteina substrato. A questo punto entrano in gioco le E3 (E3 ligases) che formano un complesso con il substrato e la E2 "carica" di ubiquitina, creando la prossimità corretta per il trasferimen-

to dell'ubiquitina sulla catena laterale di una lisina del substrato (Fig. 3). L'ubiquitinazione può essere singola o multipla (portando a catene lineari o ramificate), usando una sola lisina o lisine diverse (l'ubiquitina possiede sette lisine superficiali). Il numero e il tipo di legame che caratterizza la catena di ubiquitine decide il destino cellulare del substrato. Nel caso della degradazione, è riconosciuto che una catena di almeno 4 lisine sia il segnale minimo affinché il substrato così marcato possa essere riconosciuto dal proteosoma e quindi degradato [2].

Tornando alla farmacologia, degradare una proteina presenterebbe delle differenze rispetto all'inibizione, tra le quali:

- la proteina "dannosa" verrebbe eliminata per un tempo lungo tanto quanto la sua emivita (che dipende dalla velocità di sintesi cellulare della stessa);
- essendo un evento terminale, una volta degradata la proteina, non ci sarebbe più necessità di avere in circolo concentrazioni elevate del farmaco (la conseguenza sarebbe una teorica minore concentrazione nel tempo del farmaco che porterebbe ad una diminuzione dei rischi di effetti collaterali);

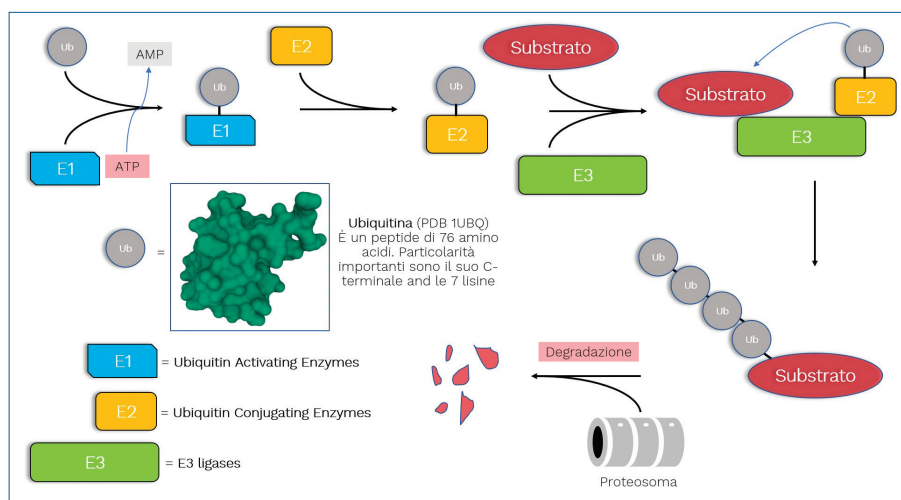


Fig. 3 - Meccanismo generale di funzionamento dell'UPS

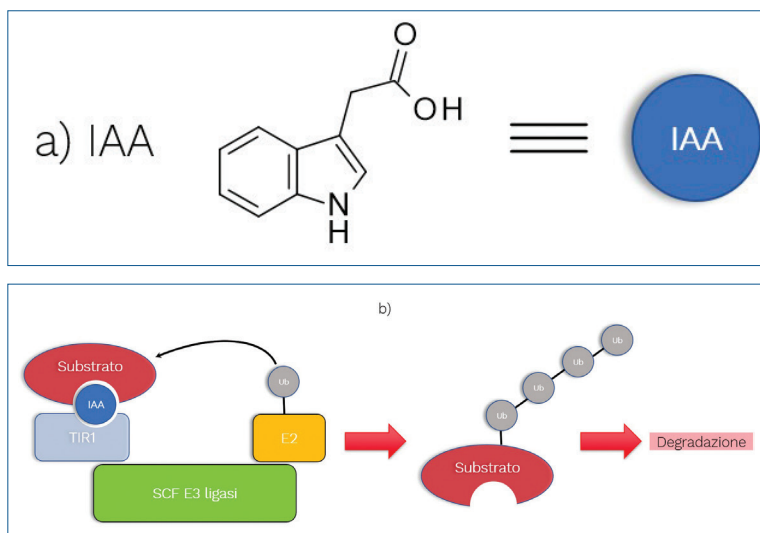


Fig. 4 - a) Auxina; b) meccanismo (semplificato) di funzionamento dell'IAA

c) con l'inibizione di un enzima viene di solito silenziata la sua attività enzimatica, mentre con la degradazione bloccheremmo tutte le attività della proteina bersaglio (per esempio, attività di supporto, chiamato scaffolding);

d) eliminando completamente la proteina potremmo avere effetti indesiderati legati al meccanismo generale più che al farmaco nello specifico. Naturalmente, come tutte le innovazioni, questo approccio necessita di risposte sperimentali, quindi, come fare ad indurre la degradazione mirata di una proteina? Sarebbe possibile usare un approccio del genere per allargare il campo a proteine *undruggable*?"

La risposta alla prima domanda e, in parte alla seconda, ce la offre la natura (Fig. 4). Le auxine, il cui esponente principale è l'acido 3-indolil acetico (IAA), sono dei fitormoni coinvolti in quasi ogni aspetto

dello sviluppo delle piante. La loro capacità di regolazione dell'espressione dei geni avviene tramite il legame con TIR1 (*Transport Inhibitor Response 1*), che si associa con la E3 ligasi SCF (*Skp, Cullin, F-box containing complex*), riconoscendo proteine chiave nella trascrizione genica e provocandone ubiquitinazione e degradazione [3]. Quindi una piccola molecola come l'acido 3-indolil acetico è in grado di indurre la degradazione di specifici substrati.

Momento cruciale del meccanismo è la formazione del complesso ternario (proteina substrato-IAA-E3 ligasi) che deve essere abbastanza stabile per portare al trasferimento dell'ubiquitina. Il riconoscimento della proteina substrato avviene tramite una caratteristica

strutturale (**degron**) della proteina stessa in cui si adatta l'IAA. Il meccanismo generale viene definito Prossimità Chimicamente Indotta (Chemical Induced Proximity, **CIP**) e rappresenta la capacità di una molecola di interagire con due proteine contemporaneamente, formando un complesso ternario e, appunto, avvicinandole tra loro. Tale prossimità può avere delle conseguenze biologiche per una delle due proteine, per esempio ubiquitinazione (e successiva degradazione) come nel caso dell'IAA (Fig. 5).

Prendendo spunto dalla natura, è possibile pensare a dei farmaci che diano origine a conseguenze biologiche desiderate (come per esempio la degradazione di una proteina cruciale in una patologia)? Anche qui la risposta è affermativa; esistono dei farmaci in commercio che agiscono tramite questo meccanismo (**CIP**), anche se a volte è stato scoperto solo successivamente al loro utilizzo, come

ciclosporina, rapamicina, tacrolimus, tasso, lenalidomide [4]. Tali molecole vengono definite Colle Molecolari (Molecular Glues, **MG**), un nome che esprime perfettamente il concetto di **CIP** (il concetto di MG verrà approfondito in un articolo successivo).

Tuttavia, sebbene supportata da evidenze nel mondo naturale (IAA) e nel mondo dei farmaci (i.e. lenalidomide), disegnare un induttore di prossimità chimica è un'impresa tutt'altro che semplice. A facilitare il compito

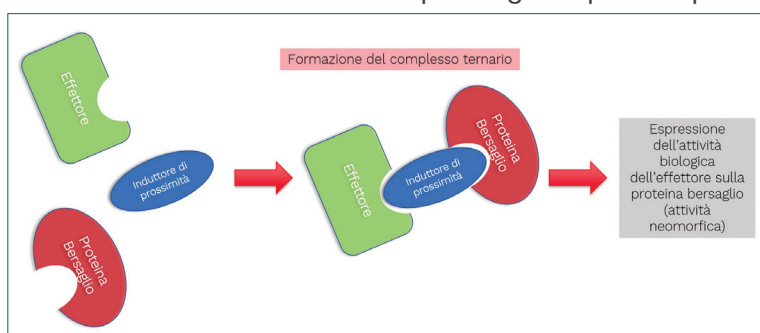


Fig. 5 - Prossimità Chimicamente Indotta

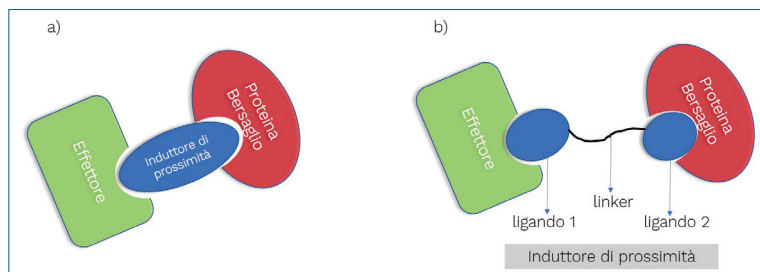
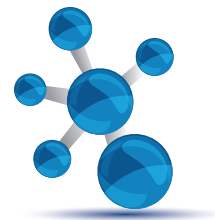


Fig. 6 - a) CIP “monofunzionale” rappresentato come una molecola “unica”; b) CIP “bifunzionale” rappresentato come una molecola composta da tre parti distinte: ligando 1 per l’effettore, ligando 2 per la proteina bersaglio e linker che li unisce covalentemente

è entrata in gioco una tecnologia lanciata nel 2001, ma affermata prepotentemente negli ultimi 6-7 anni (questa tecnologia, denominata comunemente PROTAC verrà approfondita in un articolo successivo) che, a cascata, ha accelerato la messa a punto di una varietà di tecnologie basate sul concetto di CIP. Innanzitutto, è necessario fare un distinguo tra colle molecolari “monofunzionali” e “bifunzionali” (Fig. 6). Queste due “classi” agiscono attraverso lo stesso meccanismo, avvicinando due proteine tra di loro; tuttavia tale distinzione, sebbene non propriamente corretta, permette un semplice distinguo tra una molecola che viene chiaramente rappresentata da tre parti (bifunzionale) e che lega in maniera ovvia sia l’effettore che la proteina bersaglio, rispetto ad una molecola dove non esiste una distinzione chiara tra le diverse parti che legano le due proteine. Le bifunzionali, quindi, possono essere “disegnate” unendo, tramite un linker, i ligandi delle due proteine. Questo è molto più complicato da fare per una monofunzionale il cui design è molto meno ovvio. Un’altra importante differenza riguarda il meccanismo: le bifunzionali legano sicuramente le due proteine anche separatamente, mentre le monofunzionali possono sicuramente farlo, ma più spesso legano fortemente una sola delle due proteine o a volte nessuna delle due [5], portando comunque alla formazione del complesso ternario.

A causa della loro natura, le molecole bifunzionali possono avere dimensioni superiori alla norma, ricadendo al di fuori delle “regola del cinque di Lipinski”, il che, almeno sulla carta, può portare a maggiori difficoltà in fase di sviluppo di un potenziale farmaco. D’altro canto, le monofunzionali, invece, hanno spesso l’aspetto più simile ad un farmaco “ordinario” (*drug likeness*), il che le rende attraenti dal punto di vista delle aziende farmaceutiche. Queste considerazioni, di natura

qualitativa e generale, trovano diverse eccezioni.

La possibilità di poter disegnare un induttore di prossimità con molecole bifunzionali ha fatto sorgere un numero importante di tecnologie [6], basate sul concetto che avvicinando una proteina bersaglio ad una proteina “effettrice”, quest’ultima esercita la sua funzione biologica sulla proteina bersaglio anche se essa non rappresenta il suo substrato naturale (esempio di neomorfismo) (Tab. 1).

Alcune di queste tecnologie hanno portato ad accordi milionari tra gli sviluppatori e big Pharma (PROTAC, LYTAC, CHAMP, per esempio), che si è

Nome	Proteine (classe) dirottate	Modalità
PROTAC [7]	E3 ligases	bifunzionale
TRAFTAC [8]	E3 ligases	bifunzionale
TF-PROTAC [9]	E3 ligases	bifunzionale
LYTAC [10]	Cation-independent mannose-6-phosphate receptor (CI-M6PR)	bifunzionale
PHICs [11]	Kinases	bifunzionale
PhosTAC [12]	Protein Phosphatase	bifunzionale
AceTAG [13]	Lysine acetyltransferase	bifunzionale
AUTAC [14]	Macroautophagy	bifunzionale
AUTOTAC [15]	Macroautophagy	bifunzionale
ATTEC [6]	Macroautophagy	monofunzionale
DUBTAC [16]	Deubiquinating Enzymes (DUBs)	bifunzionale
TF-DUBTAC [17]	Deubiquinating Enzymes (DUBs)	bifunzionale
CHAMP [18]	Chaperones	bifunzionale
RIBOTAC [19]	Ribonuclease L	bifunzionale
[20]	Methyl-lysine reader protein	bifunzionale
Mol. Glue Degradator [4]	E3 ligases	monofunzionale
Mol. Glue [4]	Various proteins	monofunzionale

Tab. 1 - Alcune delle tecnologie che impiegano il concetto di CIP, mono e bifunzionali

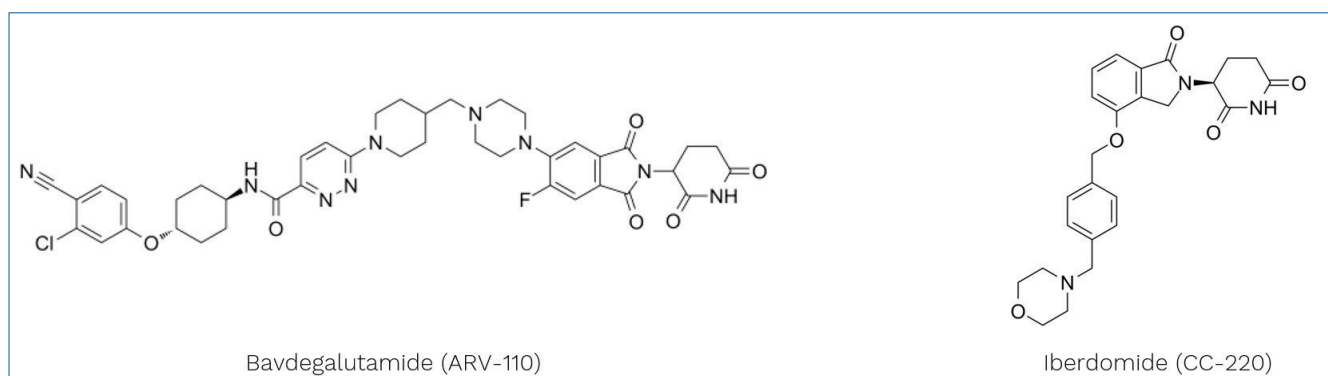


Fig. 7 - Esempi di strutture pubblicate di PROTAC (ARV-110, tumore della prostata resistente alla castrazione metastatica) e MG (CC-220, mieloma multiplo) attualmente in fase clinica

dimostrata molto interessata ad investire in questi nuovi approcci [21], in quanto potrebbero aprire un'area di possibili bersagli biologici che finora sono risultati elusivi (gli *undruggable*, per esempio, ma non solo). In particolare, i PROTAC (con 15 molecole) e i MG [22] hanno raggiunto gli studi di fase clinica per patologie come cancro e malattie autoimmuni e si spera presto sarà disponibile sul mercato il primo farmaco approvato basato sulla CIP, al netto di quelli già in commercio (lenalidomide, tassolo, etc.), ma il cui reale meccanismo è stato scoperto solo in un secondo momento (Fig. 7). In conclusione, la prossimità chimicamente indotta potrebbe rappresentare un nuovo paradigma per la ricerca farmacologica, con la grande potenzialità di sfruttare meccanismi cellulari endogeni e reindirizzarli secondo le nostre esigenze, con la speranza di riuscire ad ampliare l'arsenale a nostra disposizione per la cura sempre più efficace di patologie che, al momento, risultano difficili da contrastare.

BIBLIOGRAFIA

- [1] M. Tourè *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2016, **55**, 1966.
- [2] L. Deng *et al.*, *Signal Transduct. Target Therapy*, 2020, 11.
- [3] N.R. Cabej, *Epigenetic Principles of Evolution* (2nd Ed.), Academic Press, 2019, Ch. 15, 733-781.
- [4] S.L. Schreiber, *Cell*, 2021, **184**, 3.
- [5] Un esempio può essere trovato in D.E. Bussiere *et al.*, *Nat. Chem. Biol.*, 2020, **16**, 15.
- [6] S.B. Alabi *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2021, **296**, 100647.
- [7] Molte review sono disponibili, per esempio: M. Békés *et al.*, *Nat. Rev. Drug Disc.*, 2022, **21**, 181.
- [8] K.T.G. Samarasinghe *et al.*, *Cell Chem. Biol.*, 2021, **28**, 648.
- [9] J. Liu *et al.*, *J. Amer. Chem. Soc.*, 2021, **143**, 8902.
- [10] S.M. Banik *et al.*, *Nature*, 2020, 581.
- [11] S.U. Siriwardena *et al.*, *J. Amer. Chem. Soc.*, 2020, **142**, 14052.
- [12] a) S. Yamazoe *et al.*, *J. Med. Chem.*, 2020, **63**, 2807; b) P.-H. Chen *et al.*, *ACS Chem. Biol.*, 2021, **16**, 2808.
- [13] W.W. Wang *et al.*, *J. Amer. Chem. Soc.*, 2021, **143**, 16300.
- [14] D. Takahashi *et al.*, *Mol. Cell*, 2019, **76**, 797.
- [15] C.H. Ji *et al.*, *Nat. Comm.*, 2022, **13**, 904.
- [16] N.J. Henning *et al.*, *Nat. Chem. Biol.*, 2022, **18**, 412.
- [17] J. Liu *et al.*, *J. Amer. Chem. Soc.*, 2022, **144**, 12934.
- [18] <https://www.ranoktherapeutics.com/champ.html>
- [19] X. Liu *et al.*, *J. Amer. Chem. Soc.*, 2020, **142**, 6970.
- [20] D.A. Nalawansha *et al.*, *J. Amer. Chem. Soc.*, 2022, **144**, 5594.
- [21] a) <https://ir.arvinas.com/press-releases>; b) <https://lyciatx.com/news/>; c) <https://www.ranoktherapeutics.com/news.html>
- [22] J.M. Sasso, *Biochem.*, 2022, ASAP, (<https://doi.org/10.1021/acs.biochem.2c00245>).

Chemical Induced Proximity

The need of new pharmacology approaches for tackling challenging diseases has led to the discovery of several interesting technologies. Among them, Targeted Protein Degradation is one of the recent hottest topics, based on a general concept: Chemical Induced Proximity, defined as the capability of a small molecule to induce proximity between two proteins, generating a desired biological response.