



SONDE BIFUNZIONALI: L'UNIONE FA LA FORZA

La chemical biology si basa su sonde molecolari come strumenti di indagine biologica. Queste sonde per essere efficaci devono essere progettate razionalmente. La strategia di ibridazione molecolare permette di creare sonde bifunzionali combinando due entità bioattive. Tale approccio è stato utilizzato per lo studio degli eteromeri dei recettori oppioidi, per il design di ligandi bivalenti per la malattia di Alzheimer e per lo sviluppo dei PROTAC.

Premessa

Da un mero esercizio accademico, oggi la *chemical biology* si è evoluta in una disciplina matura che, applicata da tempo nelle grandi aziende farmaceutiche e più recentemente anche nelle piccole biotech, promette di rivoluzionare il *drug discovery* [1]. In un momento in cui ottenere nuovi farmaci sembra un'impresa irraggiungibile e con costi stratosferici, la *chemical biology* potrebbe aiutarci a trovare nuove strade e nuovi paradigmi per superare quella valle della morte ad oggi invalicabile.

Da un punto di vista squisitamente tecnico, la *chemical biology* è la scienza delle piccole molecole che operano in un sistema vivente, le cosiddette

chemical probes o sonde molecolari. Così come i farmaci, le sonde molecolari sono in grado di legarsi ad una macromolecola biologica (bersaglio molecolare), di modularne l'attività e di perturbare quei *pathway* in cui essa è inserita. Per poter riportare un'informazione che sia corretta e coerente, è quindi chiaro che il riconoscimento del bersaglio molecolare da parte della sonda deve avvenire attraverso un'interazione che sia potente e selettiva; cosa non diversa a quello che avviene per i farmaci. Tuttavia, al contrario dei farmaci, le sonde molecolari non devono possedere gli stringenti prerequisiti farmacocinetici e di tossicità e quindi sono degli strumenti inerentemente più versatili nelle mani dei chimici farmaceutici.

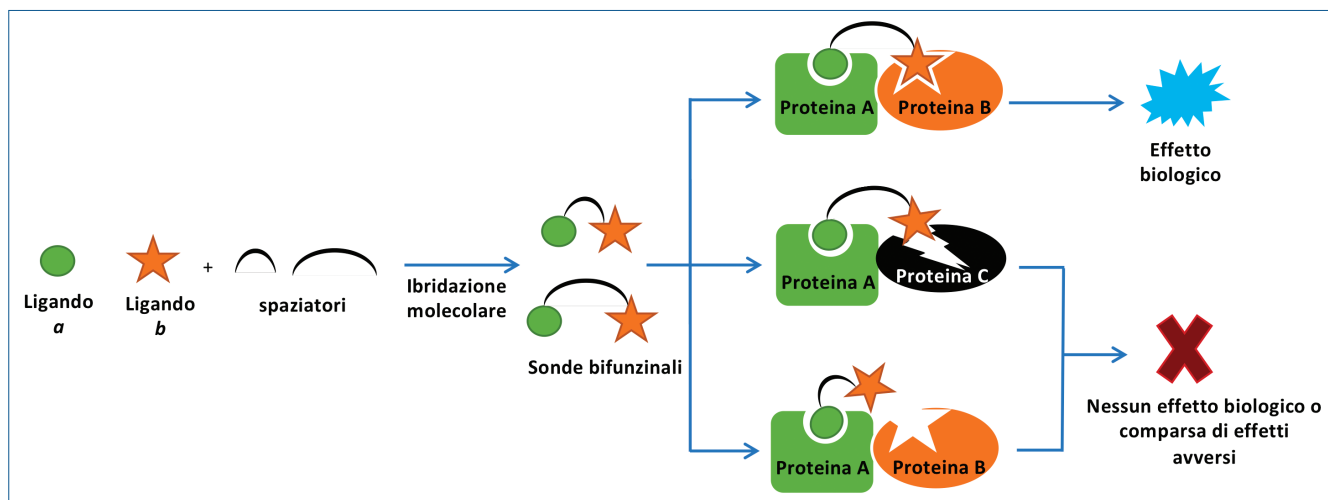


Fig. 1 - Progettazione e meccanismo di riconoscimento di sonde bifunzionali per le proteine target A e B a partire dai ligandi a e b

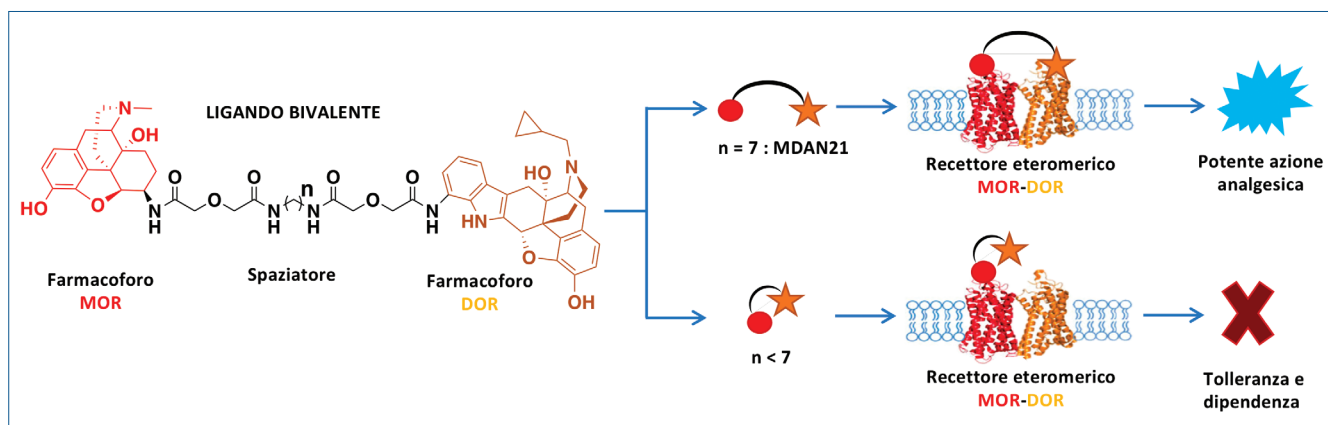


Fig. 2 - Progettazione del ligando bivalente MDAN21 per l'interazione con il recettore eteromero MOR-DOR

In ogni caso, per poter rispondere in maniera attendibile ad un quesito biologico, la *chemical biology* deve basarsi su molecole di qualità, fondate su ragionamenti e modelli concettuali. Per questo motivo è fondamentale, così come nel caso di farmaci, che le sonde molecolari siano progettate razionalmente.

Una tecnica di progettazione longeva e produttiva nel campo della *chemical biology* è l'ibridazione molecolare. Questo approccio affonda le sue radici negli anni Ottanta, quando fu anche denominato "approccio simbiotico" [2], ma è tuttora "caldo" e promettente. Esso è basato sulla combinazione di due diverse entità molecolari bioattive (o parti di esse), per dare nuove strutture ibride con una migliorata affinità rispetto alle molecole di partenza, o, più in generale, con proprietà potenziate [3, 4]. In particolare, partendo dai due ligandi *a* e *b* in grado di riconoscere due proteine target A e B, la loro combinazione tramite uno spaziatore permette il simultaneo riconoscimento di A e B, a patto che lo spaziatore sia di lunghezza opportuna (Fig. 1). Queste molecole sono state definite con diversi termini, quali ligandi bifunzionali, chimerici, dimerici, bivalenti, che sono usati in maniera piuttosto interscambiabile in letteratura, così come in questo articolo.

Ligandi bivalenti e recettori eteromerici

Un'area in cui l'idea dei ligandi bivalenti è stata mirabilmente sfruttata è quella dei recettori oppioidi. In questo contesto, il gruppo del prof. Portoghesi ha avuto il merito di dimostrare per primo

l'esistenza di recettori dimerici attraverso l'idea di "legare" due recettori vicini tramite ligandi costituiti da due farmacofori connessi da uno spaziatore di appropriata lunghezza [5]. Inoltre questo concetto ha portato a molecole con profilo terapeutico notevolmente migliorato. Da tempo si supponeva che eteromeri dei recettori oppioidi potessero essere costitutivamente attivi e che molti effetti avversi degli oppiacei derivassero proprio dall'interazione con questi eteromeri. Per esempio la tolleranza e la dipendenza della morfina si pensava fossero legate all'interazione cronica con il protomero μ (MOR) di un eteromero MOR-DOR. Questa convinzione era suffragata dal fatto che animali che non presentano il recettore delta (DOR) funzionale (ad esempio topi *knockout* o trattati con antisense o antagonisti delta), non mostrano questi effetti.

MDAN21 (Fig. 2), un ligando bivalente costituito da un agonista oppioide μ e un antagonista delta legati da uno spaziatore di 21 atomi, ha fornito supporto sperimentale al coinvolgimento del recettore eteromero MOR-DOR nei fenomeni di tolleranza e dipendenza mediati dagli oppioidi. È interessante notare che omologhi con spaziatori più corti producono tolleranza e dipendenza, in quanto danno luogo ad un'interazione monovalente con il solo protomero MOR dell'eteromero MOR-DOR (Fig. 2) [5].

Ligandi bivalenti: la scoperta della bis-tacrina

Un altro campo in cui l'idea dei ligandi bivalenti ha avuto particolare successo è quello delle colineste-

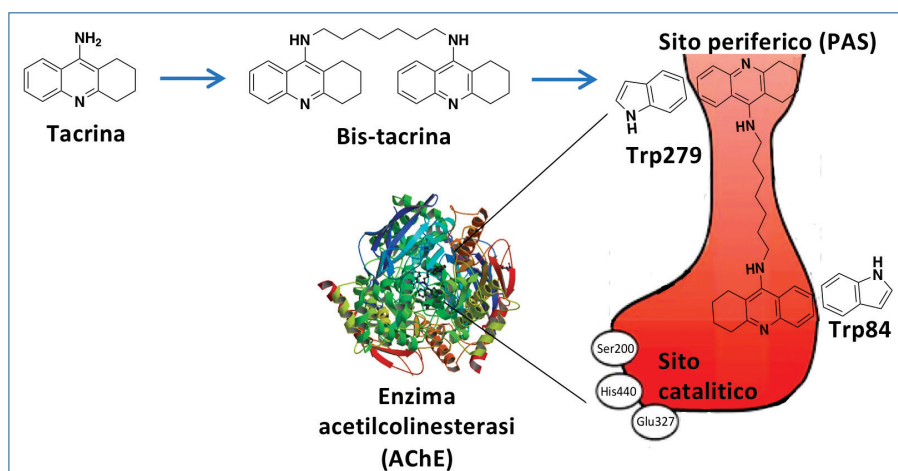


Fig. 3 - Progettazione della bis-tacrina ed interazione *dual binding* con i residui di Trp 279 e 84 all'interno della *gorge* dell'AChE

rasi. L'enzima acetilcolinesterasi (AChE), da sempre studiato per il suo coinvolgimento nella trasmissione colinergica, più di recente è stato riconsiderato per l'azione terapeutica nella malattia di Alzheimer, nonché da un punto di vista strutturale. Infatti, studi cristallografici avevano permesso di individuare, in aggiunta al sito catalitico, la presenza di un sito periferico (PAS) posto all'imboccatura della cosiddetta *gorge*. Questo sito, attraverso il residuo Trp279 che media un'interazione catione-pi con la testa cationica, permette il riconoscimento dell'acetilcolina ed il suo istradamento all'interno della lunga gola fino al sito catalitico, dove avviene il riconoscimento con un secondo Trp (Trp84) (Fig. 3). Attraverso un approccio razionale, Pang e collaboratori hanno progettato un ligando bivalente che fosse in grado di riconoscere entrambi i siti [6]. Partendo dall'evidenza cristallografica dello *stacking* dell'inibitore tacrina a livello del Trp del sito catalitico, si è pensato di andare a creare un ligando bivalente, attraverso una strategia di raddoppiamento molecolare della tacrina (Fig. 3). Lo spaziatore, costituito da unità metileniche, anche in questo caso ha il ruolo critico di consentire ai farmacofori di contattare contemporaneamente i Trp dei siti catalitico e periferico [6]. In una serie di omologhi, il dimero bis-tacrina, portante uno spaziatore eptametileno, si è rivelato quello dotato di una potenza inibitoria ed una selettività rispettivamente 1.000 e 10.000 volte maggiori rispetto al monomero tacrina, come effetto del simultaneo riconoscimento dei due siti. Questa scoperta ha

dato l'avvio ad un filone di ricerca tuttora molto prolifico basato sullo sviluppo di inibitori dimerici dell'AChE, definiti appunto "*dual binding*". Il successo di questa classe di molecole è stato supportato dalla scoperta che l'inibizione del PAS contrastasse l'attività pro-aggregante dell'AChE nei confronti del peptide beta-amiloide, responsabile dello sviluppo della malattia [7].

Dai ligandi bivalenti ai ligandi *multi-target*

Con l'avvento della *network pharmacology* [8], l'approccio dei ligandi dimerici ha vissuto una seconda giovinezza. Questo approccio prende l'avvio dalla considerazione che la maggior parte delle patologie che oggi non riusciamo a curare e che rappresentano la sfida più grande per la comunità farmaceutica, siano complesse e multifattoriali. Questo implica che farmaci cosiddetti *single-target*, cioè diretti verso un singolo bersaglio molecolare, siano inadeguati nel contrastare una tale complessa eziologia. Al contrario, molecole dirette contemporaneamente verso bersagli multipli (cosiddetti *multi-target*) presentano un'aumentata possibilità di successo, andando a contrastare i fenomeni di ridondanza tipici dei sistemi biologici. In questo modo, singole molecole dirette verso due *target* coinvolti nel *network* che sottende la patologia rappresentano un'alternativa sicuramente preferibile rispetto ai cocktail di farmaci per quanto riguarda la mancata possibilità di interazioni farmaco-farmaco. Sulla base di questo forte supporto razionale, negli ultimi vent'anni la strategia dell'ibridazione molecolare è stata rivisitata [9] e sono state sviluppate migliaia di ibridi molecolari diretti verso malattie complesse. Uno dei campi di applicazione più fertile è stato quello della malattia di Alzheimer, in cui il nostro gruppo di ricerca è stato pioniere [10]. In particolare, proprio la molecola della bis-tacrina ha rappresentato una pietra miliare per lo sviluppo di ligandi dimerici costituiti da due elementi farmacoforici identici, e quindi definiti omodimeri, o diversi (eterodimeri).

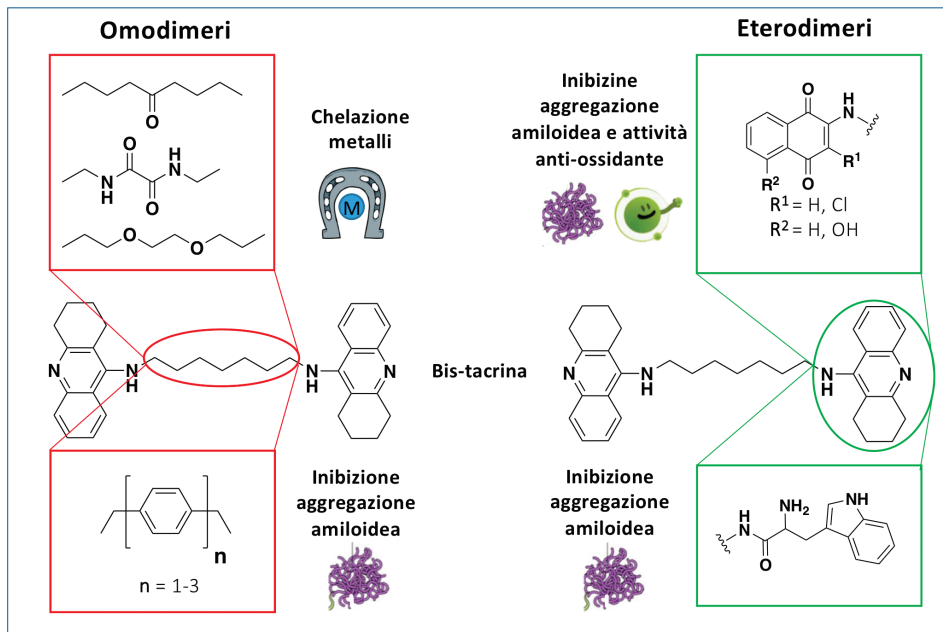
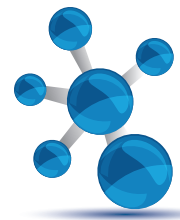


Fig. 4 - Derivati bifunzionali (*multi-target*) omodimerici ed eterodimerici della tacrina

Prendendo spunto dalla molecola della bis-tacrina, abbiamo rivolto la nostra attenzione a potenziali molecole trifunzionali, considerando che la catena spaziatrice potesse, oltre a rivestire un ruolo strutturale, essere fonte di attività aggiuntive. Questo principio è stato perseguito nel direzionare nuovi ligandi bivalenti verso un altro target importante per le malattie neurodegenerative, e cioè la disomeostasi dei metalli, mediante l'introduzione nello spaziatore eptametileno della bis-tacrina, di eteroatomi in grado di chelare metalli neurotossici quali rame e ferro (Fig. 4) [11]. Allo stesso modo, partendo da

evidenze sperimentali che considerano le interazioni di *pi-stacking* fondamentali nei processi di *misfolding* e aggregazione della proteina beta-amiloide, si sono progettati derivati in cui lo spaziatore è composto da unità aromatiche (Fig. 4) [12]. Seguendo un principio ispiratore simile, sono stati sviluppati eterodimeri della tacrina combinati attraverso lo spaziatore ad un frammento naftochinonico, con l'obiettivo di integrare l'attività anticolinesterasica con attività aggiuntive verso altri *target* validati nella malattia di Alzheimer. La progetta-

zione (Fig. 4) si è basata sulla considerazione che il nucleo naftochinonico può essere considerato privilegiato nel modulare i processi di aggregazione amiloidea e, allo stesso tempo, per le sue capacità redox di svolgere un'azione antiossidante, benefica contro la neurodegenerazione. Questa strategia ha portato ad una molecola che, oltre a mostrare un comportamento *dual-binding* e quindi una potente attività colinesterasica, ha mostrato attività anti-aggregante amiloidea e neuroprotettiva [13]. Con obiettivi simili, sono stati sviluppati ibridi della tacrina e dell'amminoacido Trp legati da spazia-

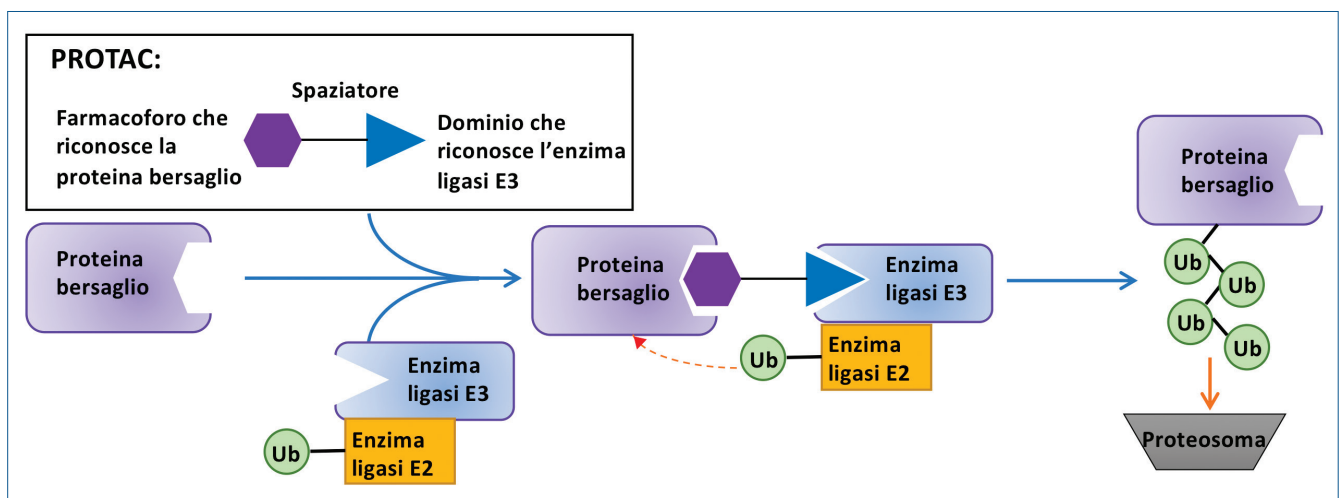


Fig. 5 - Rappresentazione schematica del meccanismo di funzionamento del PROTAC

tori di diversa lunghezza. Infatti, è noto che anche il Trp rivesta un ruolo chiave nei processi di *misfolding* di proteine amiloidogeniche (Fig. 4) [14].

Molecole bifunzionali come PROTAC

Un esempio recente e di successo è quello delle PROTAC (*Proteolysis targeting chimeras*) [15], molecole bifunzionali costituite da un frammento in grado di legare specificatamente una data proteina e un secondo frammento che riconosce una E3 ubiquitina ligasi. In questo modo si portano in contatto la proteina target con la E3 ubiquitina ligasi, favorendone la poli-ubiquitinazione e la successiva degradazione da parte del proteasoma (Fig. 5). Attraverso una piccola molecola bifunzionale si effettua un *knock-down* selettivo della proteina bersaglio, così come si potrebbe fare con un un siRNA.

Conclusioni

Le molecole bifunzionali non sono una novità nella *chemical biology*, ma continuano a fornire strumenti innovativi nelle mani dei chimici farmaceutici. Ad ulteriore conferma delle potenzialità ancora inesplorate, nel 2019 alcuni ricercatori hanno pensato di raccogliere tutte le molecole ibride riportate in letteratura nel database HybridMoIDB [16]. In un'era di *big data* come la nostra, è verosimile che una risorsa come questa possa ulteriormente favorire l'applicazione delle molecole bifunzionali nella ricerca di nuovi farmaci e nella delucidazione di *pathway* biologici.

Pensando, in particolare, ad un contesto italiano di ricerca accademica, riteniamo che le molecole bifunzionali possano essere ancora oggi un'idea da perseguire, soprattutto in un'ottica di *chemical biology*. Senza essere appesantiti da vincoli farmacocinetici, queste molecole potrebbero essere impiegate, ad esempio, nel contesto della polifarmacologia, in maniera più creativa per esplorare combinazioni di target innovative ma "rischiose". La creatività è stata riconosciuta come un *driver* fondamentale per la ricerca farmaceutica. In un momento di crisi come questo, come ricercatori accademici dovremmo assumerci il rischio di investire in strumenti meno convenzionali che, se traslati in maniera razionale e giudiziosa, potrebbero portare ad enormi vantaggi per la salute pubblica.

BIBLIOGRAFIA

- [1] M.P. Castaldi *et al.*, "Chapter Ten - Chemical Biology in Drug Discovery", in Annual Reports in Medicinal Chemistry, vol. 50, R.A. Goodnow (Ed.), Academic Press, 2017, pp. 335-370.
- [2] J.J. Baldwin *et al.*, *J. Med. Chem.*, 1979, **11**, 1284.
- [3] E.J. Ariëns, Drug Design: v. 1 (Medicinal Chemical Monograph), E.J. Ariëns (Ed.), Academic Press, New York, 1971.
- [4] C. Viegas-Junior *et al.*, *Curr. Med. Chem.*, 2007, **17**, 1829.
- [5] P.S. Portoghese *et al.*, *ACS Chem. Neurosci.*, 2017, **8**, 426.
- [6] Y.P. Pang *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 1996, **271**, 23646.
- [7] M. Bartolini *et al.*, *Biochem. Pharmacol.*, 2003, **65**, 407.
- [8] A.L. Hopkins, *Nat. Chim. Biol.*, 2008, **4**, 682.
- [9] R. Morphy *et al.*, *Drug Discovery Today*, 2004, **15**, 641
- [10] A. Cavalli *et al.*, *J. Med. Chem.*, 2008, **51**, 347.
- [11] M.L. Bolognesi *et al.*, *J. Med. Chem.*, 2007, **50**, 6446.
- [12] M.L. Bolognesi *et al.*, *ChemMedChem*, 2010, **5**, 1215.
- [13] E. Nepovimova *et al.*, *J. Med. Chem.*, 2014, **57**, 8576.
- [14] K. Chalupova *et al.*, *Eur. J. Med. Chem.*, 2019, **168**, 491.
- [15] P. Ottis, C.M. Crews, *ACS Chem. Biol.*, 2017, **12**, 892.
- [16] Y. Li, C. Zhao, B. Wei L. Wang, *bioRxiv*, 2019, 516765.

Bifunctional Chemical Probes: Strength through Unity

Chemical biology relies on chemical probes as tools for biological investigation. Such probes should be realized by rationale approaches. Molecular hybridization strategies allow to combine two bioactive entities into bifunctional chemical probes. This approach has been widely used for studying opioid receptor heteromers, designing bivalent ligands for Alzheimer's disease and for developing PROTAC.

