



LIGANDI BITOPICI PER I RECETTORI CANNABINOIDI

L'attività di ricerca per la quale ho ricevuto il "Premio Miglior Tesi di Dottorato 2024", conferito dalla Divisione di Chimica Farmaceutica della Società Chimica Italiana, si è focalizzata su progettazione, sintesi e valutazione biologica di ligandi bitopici per i recettori cannabinoidi (recettori CB). Questo lavoro è stato condotto durante il mio dottorato presso l'Università di Pisa, sotto la guida della prof.ssa Clementina Manera.

I recettori CB, proteine di membrana della superfamiglia dei recettori accoppiati a proteine G, insieme ai mediatori endogeni, enzimi e proteine coinvolte nella loro sintesi, captazione e metabolismo, sono componenti chiave del sistema endocannabinoide (ECS). Questo complesso sistema di comunicazione cellulare regola molte funzioni vitali dell'organismo. Finora sono stati identificati due sottotipi di recet-

tori CB: il recettore di tipo 1 (recettore CB1) e di tipo 2 (recettore CB2). I due recettori differiscono nella loro distribuzione tissutale (Fig. 1). Il recettore CB1 è espresso principalmente nel sistema nervoso centrale, dove regola cognizione, memoria, movimento e percezione del dolore. Il recettore CB2, abbondante nelle cellule immunitarie e nel sangue, modula l'infiammazione e la risposta immunitaria. Inoltre, studi

recenti hanno rilevato la sua presenza in cellule cerebrali sane e la sua sovraespressione in condizioni patologiche, suggerendo un ruolo rilevante nella neuroprotezione [1].

Nonostante il loro grande potenziale terapeutico, i recettori CB presentano sfide significative, poiché la modulazione ortosterica di questi bersagli, che interviene sul medesimo sito di legame del ligando endogeno, ha spesso causato effetti avversi come ansia, depressione, psicotropismo e disfunzioni immunitarie, ostacolando così il loro sviluppo clinico. Queste scoperte hanno indirizzato la ricerca verso strategie innovative, come i modulatori allosterici, che si legano a siti alternativi rispetto a quelli ortosterici, alterando la conformazione del

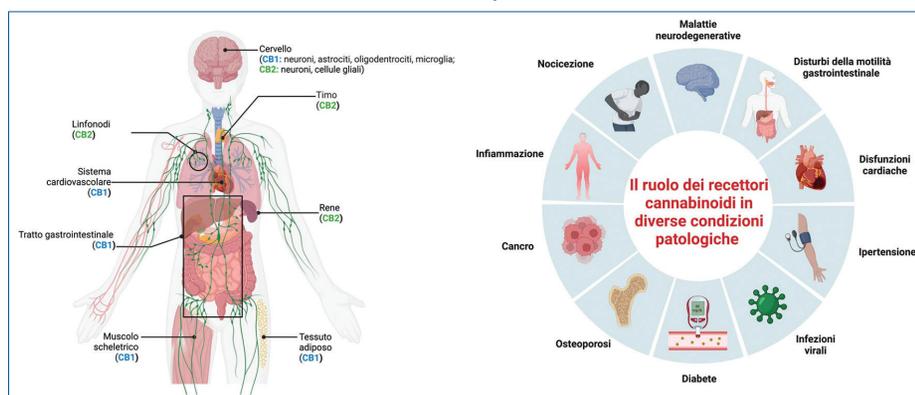


Fig. 1 - Distribuzione tissutale (sinistra) e ruolo in diversi contesti patologici (destra) dei recettori CB

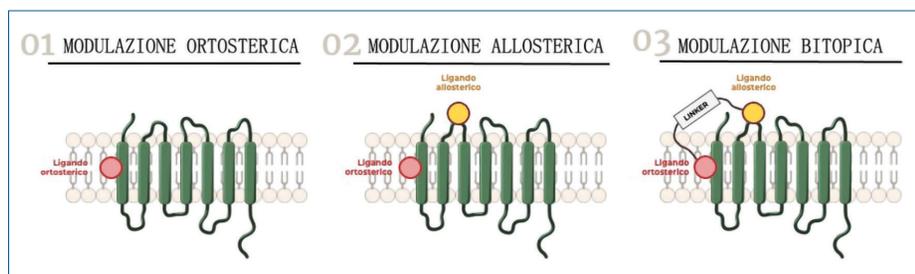


Fig. 2 - Diverse modalità di interazione ligando-recettore: modulazione ortosterica, allosterica e bitopica



recettore e facilitando (modulazione positiva) o ostacolando (modulazione negativa) la sua attivazione dopo il legame con il ligando specifico (Fig. 2). L'azione sul sito allosterico offre maggiore specificità per il sottotipo recettoriale, selettività tissutale e modulazione mirata delle vie di segnalazione, favorendo lo sviluppo di farmaci più sicuri e con minori effetti collaterali. Un'ulteriore strategia innovativa per modulare l'ECS è l'uso di "multi-target drugs," molecole che agiscono attraverso meccanismi multipli con un effetto "pro-cannabinoide." Tra queste, i ligandi "bivalenti" si distinguono come composti ibridi che uniscono due unità farmacoforiche distinte tramite un linker appropriato. In particolare, i *ligandi bitopici* si legano simultaneamente ai siti ortosterico e allosterico dello stesso recettore, combinando l'elevata affinità dei ligandi ortosterici con la selettività recettoriale, tissutale e funzionale dei ligandi allosterici (Fig. 2). Questa combinazione crea agenti con profili farmacologici ottimizzati, migliorando l'efficacia terapeutica e riducendo gli effetti collaterali rispetto alla modulazione a singolo bersaglio.

Sulla base di queste premesse, abbiamo deciso di esplorare l'approccio della modulazione bitopica, riuscendo a identificare i primi due ligandi bitopici etero-bivalenti per il recettore CB2.

Il nostro approccio è iniziato selezionando due composti progenitori, uno ortosterico e uno allosterico, dalla nostra libreria. Questi ligandi sono stati testati insieme in studi funzionali per valutare se il ligando allosterico potenziasse l'effetto di quello ortosterico. Dopo aver confermato l'azione di modulazione allosterica positiva, abbiamo analizzato l'effetto in cellule microgliali, osservando una riduzione nel rilascio di interleuchine proinfiammatorie e un aumento nel rilascio di quelle antinfiammatorie [2]. Questi risultati hanno supportato la combinazione delle due unità farmacoforiche per sviluppare un agente terapeutico più potente e neuroprotettivo.

Abbiamo quindi combinato chimicamente le due unità farmacoforiche, guidati da studi di struttura-attività per ottimizzare l'attacco del linker senza compromettere l'attività dei singoli componenti. Sono state sviluppate diverse serie di composti,

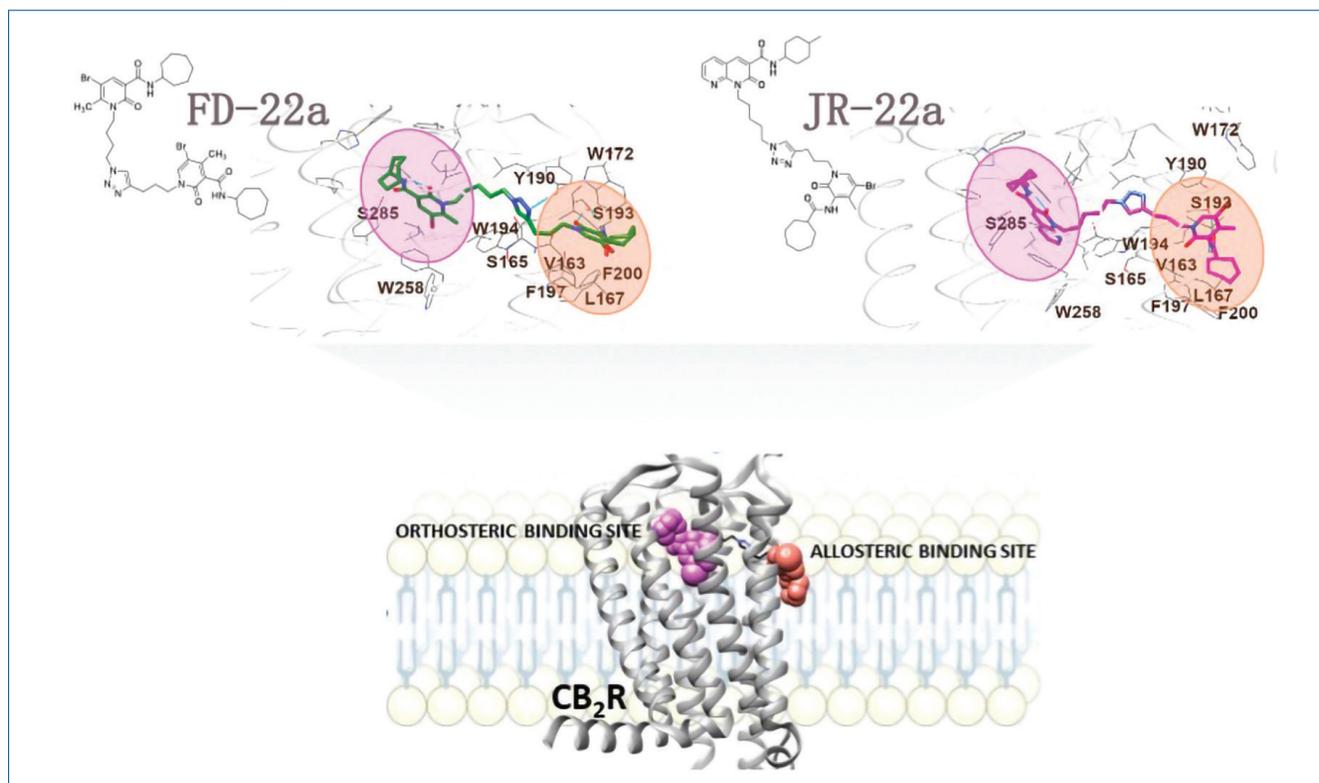


Fig. 3 - Pose di legame dei modulatori bitopici FD-22a e JR-22a per il recettore CB2. I farmacofori sono evidenziati con colori corrispondenti alle tasche: viola per la tasca ortosterica e arancione per quella allosterica

mantenendo il farmacoforo allosterico e variando il farmacoforo ortosterico, il punto di attacco del linker e la sua natura chimica.

Durante il mio periodo di ricerca presso il laboratorio del prof. Robert Laprairie all'Università del Saskatchewan (Canada), ho condotto studi farmacologici sui composti sintetizzati, utilizzando sia saggi di binding competitivo con radioligandi di riferimento sia saggi funzionali su vie di segnalazione attivate dal recettore CB2. Questi studi hanno permesso di identificare i migliori modulatori del recettore CB2, caratterizzati da un'elevata affinità e selettività verso CB2 rispetto a CB1, oltre che da una distinta selettività funzionale rispetto al progenitore ortosterico. Questa caratteristica risulta cruciale per una regolazione più precisa della risposta recettoriale.

Per confermare la natura bitopica, abbiamo poi sviluppato una strategia farmacologica combinando i migliori ligandi identificati con un antagonista di riferimento o con un eccesso del composto allosterico progenitore. In presenza dell'antagonista, l'aumento della concentrazione del ligando bitopico annullava l'antagonismo, suggerendo che il composto occupava il sito ortosterico, come confermato dai test di binding e funzionali. Quando combinato con il composto allosterico progenitore, l'attività del ligando rimaneva invariata, confermando che il sito allosterico era già occupato dal ligando bitopico.

Sono stati due i composti, FD-22a e JR-22a, che hanno mostrato un comportamento pienamente coerente con una farmacologia bitopica, rappresentando i primi ligandi bitopici etero-bivalenti per il recettore CB2 descritti in letteratura [3-5]. I risultati farmacologici sono stati ulteriormente supportati dalle indagini computazionali, che hanno confermato la capacità di entrambi i composti di occupare simultaneamente i due siti di legame del recettore CB2 (Fig. 3). Lo studio del potenziale terapeutico di FD-22a e JR-22a, realizzato in collaborazione con diversi gruppi di ricerca, ha rivelato una potente attività antinfiammatoria in un modello di infiammazione delle cellule microgliali umane [3, 5]. Inoltre, FD-22a ha dimostrato una notevole capacità di contrastare gli effetti dannosi della β -amiloide nelle cellule gliali umane, evidenziando il suo potenziale come agente terapeutico contro la neu-

rodegenerazione [6]. Ha inoltre mostrato proprietà antinocicettive in un modello murino di dolore neuropatico [3].

Un filone parallelo di ricerca ha esplorato l'applicazione del concetto di modulazione bitopica al recettore CB1. I ligandi progettati, mirati a ottenere agonisti più potenti, hanno invece mostrato un cambiamento funzionale imprevisto, agendo come antagonisti/agonisti inversi. I risultati hanno sottolineato un nuovo aspetto dell'alleanza molecolare ortosterica-allosterica, ossia il cambiamento del profilo funzionale rispetto ai composti progenitori [7].

In sintesi, il nostro studio sulla modulazione ibrida ortosterica-allosterica dei recettori CB ha evidenziato non solo le complesse sfide legate alla progettazione di questi ligandi, ma anche le promettenti opportunità terapeutiche che tale approccio può offrire per le patologie correlate all'ECS, aprendo la strada allo sviluppo di farmaci più efficaci, selettivi e con minori effetti collaterali off-target.

BIBLIOGRAFIA

- [1] R. Ferrisi *et al.*, *Pharmacological Research*, 2021, **170**, 105607.
- [2] B. Polini *et al.*, *Life (Basel)*, 2020, **10**, 333.
- [3] F. Gado, R. Ferrisi *et al.*, *Journal of Medicinal Chemistry*, 2022, **65**, 9918.
- [4] R. Ferrisi *et al.*, *Frontiers in Chemistry*, 2022, **10**, 984069.
- [5] R. Ferrisi *et al.*, *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, **24**, 2135.
- [6] B. Polini *et al.*, *Cells*, 2024, **13**, 875.
- [7] R. Ferrisi *et al.*, *Journal of Medicinal Chemistry*, 2025, Epub ahead of print.

Bitopic Ligands for Cannabinoid Receptors

The research activity related to the 'Best PhD Thesis Award 2024' of the Division of Pharmaceutical Chemistry of the Italian Chemical Society focuses on the development of the first bitopic ligands for the CB2 receptor, opening up possibilities for CB1 as well. This innovative strategy promises to improve the treatment of endocannabinoid-related diseases by offering more effective and selective drugs with fewer side effects.