



Pietro Picconi, PhD

Dept. of Medicinal Chemistry & Drug Design  
Nerviano Medical Sciences Srl, Nerviano (MI)  
[pietro.picconi@nervianoms.com](mailto:pietro.picconi@nervianoms.com)

# MOLECULAR GLUES: UN DIVERSO APPROCCIO IN DRUG DISCOVERY

***Le interazioni proteina-proteina (PPI) svolgono un importante ruolo nello sviluppo di patologie. Le molecular glues sono composti monofunzionali che promuovono la stabilizzazione o la creazione di PPI per generare una risposta biologica voluta. L'efficacia clinica di questa classe di composti ha generato interesse per questa modalità, che rappresenta un approccio alternativo in drug discovery per la modulazione di processi cellulari.***

I processi biologici a livello cellulare sono regolati da un complesso network di controllo che coinvolge meccanismi diversi, atti a regolare lo stato fisiologico del sistema. In caso di alterazioni di questi meccanismi intracellulari, si può incorrere in stati patologici. I protagonisti principali di questa rete di controllo sono le proteine che, in associazione con altre e diversamente organizzate proteine e macromolecole, assumono ruoli differenti, formando complessi omo/etero-oligomerici.

Fra tutti i meccanismi di regolazione, le interazioni proteina-proteina (protein-protein interaction, PPI) ricoprono un ruolo fondamentale per lo sviluppo di processi fisiologici e di stati patologici a livello cellulare [1]. Per questo motivo, i ricercatori coinvolti nel processo di drug discovery sono interessati a identificare proteine target coinvolte in questo tipo di interazioni in stati patologici e nella valutazione di strategie farmacologiche che, attraverso l'utilizzo di piccole molecole, favoriscano o blocchino questi processi cellulari, ottenendo l'effetto biologico desiderato.

Questo diverso, e in parte, innovativo approccio si affianca al più classico paradigma applicato nella ricerca di nuovi farmaci, legato all'inibizione dell'attività enzimatica di una proteina in seguito all'occupazione del suo sito attivo da parte di una piccola molecola e sta riscuotendo un forte interesse, a livello accademico e industriale, come op-

portunità per lo sviluppo di nuove entità chimiche farmacologicamente attive.

Diverse molecole, attualmente in fase clinica di sperimentazione o già approvate dai principali enti regolatori [2], svolgono la loro funzione attraverso la modulazione di PPI che avvengono a livello cellulare per ottenere un effetto biologico desiderato. Recentemente, una delle principali linee di ricerca in questo ambito riguarda la possibilità di usare piccole molecole in grado di favorire/stabilizzare la formazione di PPI. Queste molecole vengono chiamate in maniera intuitiva "colle molecolari" (molecular glues, MGs) e, sfruttando il concetto di prossimità chimicamente indotta [3], funzionano favorendo la formazione di legami aggiuntivi fra proteine capaci di interagire fisiologicamente (stabilizzazione di complesso) o fra proteine che solitamente non instaurano interazioni (formazione *de novo*), provocando in questo modo un effetto biologico a livello cellulare [4].

Una definizione rigorosa di MGs è stata proposta in una recente pubblicazione, con lo scopo di determinare alcune caratteristiche peculiari di questo tipo di composti [5]. Secondo gli autori, le MGs sono definite come molecole in grado di favorire la formazione di PPI aggiuntive in un complesso ternario fra due proteine partner, mostrando affinità misurabili per almeno una delle due proteine.

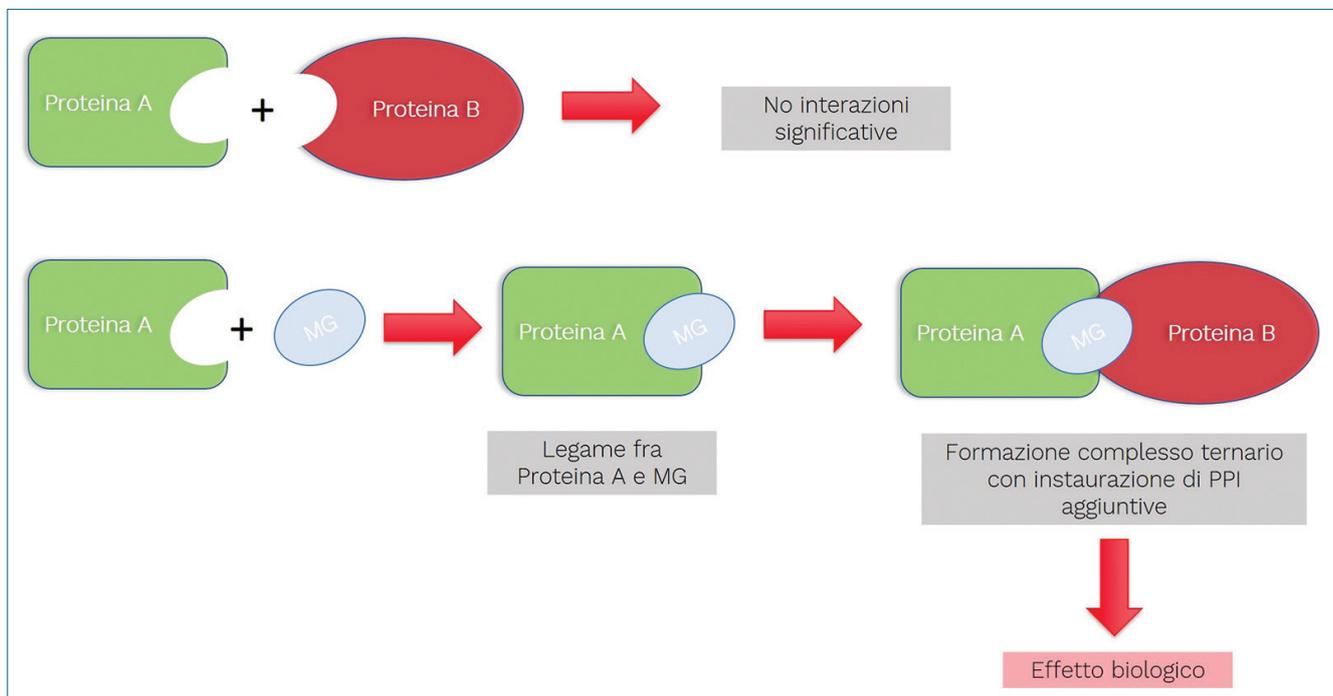
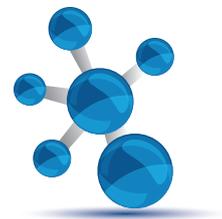


Fig. 1 - Rappresentazione schematica del meccanismo di azione delle MGs. La proteina A e la proteina B non interagiscono in condizioni naturali. Il legame della MG con la proteina A favorisce la formazione di un complesso ternario fra proteina A, MG e proteina B. La formazione del complesso ternario è sostenuta dall'instaurazione di PPI aggiuntive fra le superfici delle proteine coinvolte grazie all'ausilio della MG

Tuttavia, in letteratura sono riportati casi in cui la capacità di interagire singolarmente con entrambe le proteine risulta trascurabile [6]. In termini generali, le PPI aggiuntive si hanno tramite diretto contatto delle superfici delle proteine coinvolte, in seguito a legame con la MG, capace di causare un cambiamento della porzione superficiale, responsabile dell'interazione, della proteina a cui si lega (Fig. 1).

Questa precisazione permette di sottolineare la natura monofunzionale delle MGs, aiutando nella distinzione con altre entità chimiche induttori di prossimità, come ad esempio i PROTAC (Proteolysis Targeting Chimera), aventi natura di molecole bifunzionali. Queste ultime, infatti, sono caratterizzate da affinità misurabile con entrambe le proteine facenti parti del complesso ternario, rendendo necessaria la presenza di una qualsivoglia interazione misurabile (molecola-proteina) nei confronti di entrambe le proteine. Storicamente, il termine molecular glue è comparso per la prima volta in una

serie di pubblicazioni descrittive il meccanismo d'azione della ciclosporina A (CsA) e di tacrolimus (FK506) [7]. Questi composti, isolati da fonti naturali e aventi struttura rispettivamente di polipeptide ciclico e di macrolide polichetidico (Fig. 2), sono caratterizzati da una forte azione immunosoppressiva e utilizzati per le loro proprietà farmacologiche in ambito clinico.

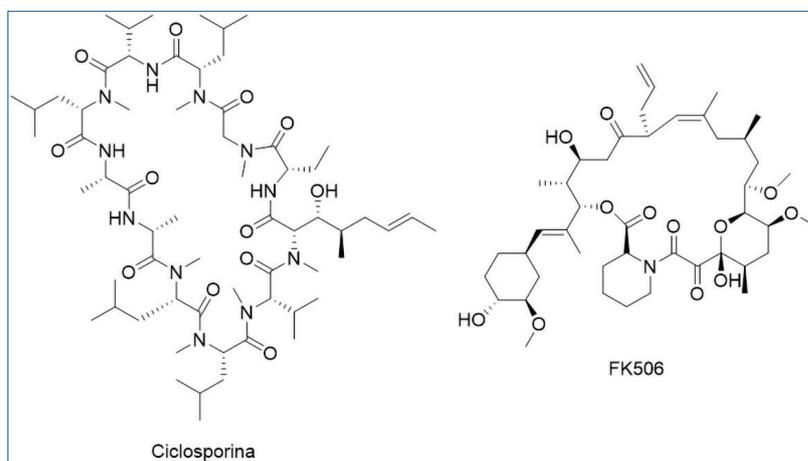


Fig. 2 - Struttura di ciclosporina e FK506, composti agenti come MGs

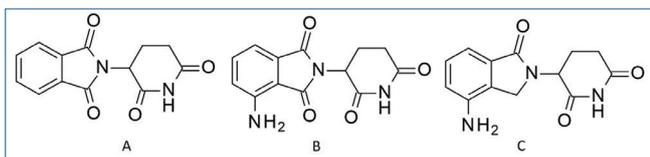


Fig. 3 - Struttura della talidomide (A) e dei suoi analoghi pomalidomide (B) e lenalidomide (C) (IMiDs)

CsA e FK-506 funzionano come MGs, promuovendo la formazione di PPI aggiuntive, e quindi di un complesso ternario, fra proteine diverse (immunofilline e FKBP12 rispettivamente) e la calcineurina, inibendo in questo modo *pathway* cellulari coinvolti nello sviluppo della risposta immunitaria. Il meccanismo d'azione di questi composti naturali è stato determinato a posteriori, in seguito al loro utilizzo clinico, aprendo le porte all'identificazione di altri composti aventi simile attività biologica [7]. Negli anni successivi il termine *molecular glue* è stato utilizzato per descrivere in modo più generale composti capaci di favorire l'interazione e la stabilizzazione di complessi proteina-proteina, come, ad esempio, il tassolo [7], farmaco chemioterapico, o le auxine [8], ormoni vegetali. In questo contesto, la definizione di MGs è stata applicata in seguito all'identificazione del meccanismo d'azione molecolare della talidomide e dei suoi analoghi (IMiDs - immunomodulatory imide drugs) [9], principali esponenti della classe di composti definiti successivamente *molecular glue degraders* (colle molecolari inducenti degradazione). Questa sottoclasse comprende composti monofunzionali in grado di provocare un processo di degradazione della proteina coinvolta nella formazione del complesso ternario come risposta biologica finale [10]. Più precisamente, la talidomide e i suoi analoghi lenalidomide e pomalidomide (Fig. 3), sono in grado di interagire con cereblon, una subunità proteica facente parte del complesso E3 ubiquitina ligasi chiamato CRL4<sup>CRBN</sup>. Tale interazione causa una modifica della porzione superficiale della proteina stessa, rendendola capace di interagire, attraverso la formazione di PPI addizionali e di un complesso ternario, con proteine

diverse denominate neosubstrati, in quanto questa interazione non avviene in condizioni cellulari naturali. In seguito alla formazione del complesso ternario, essendo una delle proteine partner una E3 ligasi, si verifica un processo iterativo di ubiquitinazione della proteina neosubstrato, che viene quindi successivamente riconosciuta e degradata dal proteosoma, attraverso il sistema ubiquitina-proteosoma (ubiquitin proteasome system, UPS) [11]. Il grande interesse suscitato dalle IMiDs è dovuto alla loro efficacia clinica, specialmente in campo oncologico, ma anche al fatto che la loro attività è legata all'azione di degradazione che svolgono nei confronti di una serie di proteine facenti parte della classe dei fattori di trascrizione, considerati difficili da approcciare con le classiche strategie di drug discovery (undruggable target). Il meccanismo d'azione che contraddistingue questa classe di MGs è stato, inoltre, collegato al grave problema degli effetti teratogeni riportati in seguito all'utilizzo della talidomide sul finire degli anni Sessanta, quando questa molecola veniva prescritta alle donne in gravidanza per il controllo delle nausee mattutine [12]. Parallelamente alla scoperta del meccanismo d'azione delle IMiDs, ricerche in campo di biologia strutturale hanno contribuito all'identificazione

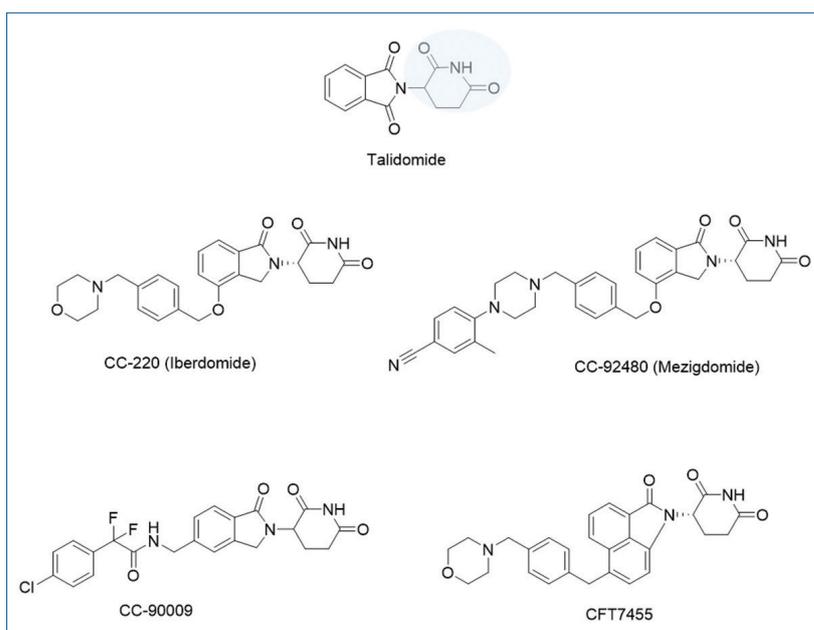
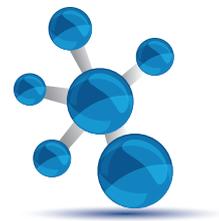


Fig. 4 - Strutture della talidomide e di CELMoDs attualmente in fase clinica. In azzurro è evidenziata la porzione dell'anello glutarimidico responsabile dell'interazione con Cereblon



dell'anello glutarimmidico come porzione responsabile dell'interazione fra queste molecole e il loro target cereblon, aprendo una corsa verso progettazione e sintesi di nuovi analoghi della talidomide da parte di gruppi industriali e accademici. Una serie di successivi studi di relazione struttura-attività hanno dimostrato che, mantenendo inalterata la porzione dell'anello glutarimmidico, modifiche strutturali della molecola comportano il reclutamento nel complesso ternario e la successiva degradazione di neosubstrati diversi, anche non appartenenti alla classe dei fattori di trascrizione [13]. L'applicazione di questi studi risulta chiara dalle strutture di alcuni analoghi della talidomide attualmente in sviluppo clinico (Fig. 4) chiamati collettivamente CELMoDs (Celebron E3 Ligase Modulating Drugs). Le variazioni strutturali introdotte sono in grado di modulare la potenza e il profilo di selettività di degradazione, mantenendo intatta la capacità di legame con cereblon. Queste modifiche, secondo il meccanismo descritto in precedenza, alterano la natura e le caratteristiche della porzione superficiale di cereblon disponibile per il legame con i neosubstrati, permettendo l'instaurarsi di interazioni discriminanti per la formazione (o meno) del complesso ternario. Sebbene la natura delle proteine neosubstrato reclutate in seguito a legame con gli analoghi della talidomide non possa essere determinata specificatamente, a priori, durante l'attività di progettazione delle molecole sono stati individuati motivi strutturali comuni fra le proteine colpite per la degradazione. Questo ha permesso di definire il requisito strutturale minimo (anche chiamato "degron") che deve essere posseduto da una proteina per poter essere riconosciuta, per la degradazione, in seguito a legame di cereblon con un analogo della talidomide [14].

Gli sforzi compiuti in ambito di ricerca di base e preclinica per approfondire il meccanismo di funzionamento degli IMiDs hanno avuto un forte impatto traslazionale e hanno portato allo sviluppo clinico di una serie di molecole derivati della talidomide (Tab. 1), attualmente in fase clinica I e II per diverse indicazioni, principalmente in campo oncologico [15].

La caratteristica di molecola monofunzionale delle MGs e la difficoltà nell'individuare a priori l'identità della proteina partner nel complesso ternario, ren-

Molecular glue	Indicazione clinica	Sponsor	Fase clinica
CC-220	Mieloma multiplo	BMS	Ph. II
CC-92480	Mieloma multiplo	BMS	Ph. II
CC-90009	Leucemia mieloide acuta	BMS	Ph. II
CC-99282	Linfoma Non-Hodgkin	BMS	Ph. I
CFT7455	Mieloma multiplo	C4 Ther.	Ph. I
DKY709	Tumori solidi	Novartis	Ph. I
MRT-2359	Tumori solidi	Monte Rosa Ther.	Ph. I

Tab. 1 - Molecular glue degraders (CELMoDs) in fase clinica. Update agosto 2022

de difficile un design razionale di questa tipologia di composti. A conferma di questo fatto, la scoperta del meccanismo d'azione di MGs (anche quelle approvate per l'uso clinico) è sempre avvenuta a posteriori. Come evidenziato dallo sviluppo degli analoghi della talidomide, la ricerca in questo campo si sta concentrando principalmente nella generazione di molecole derivanti dalla ottimizzazione strutturale di entità chimiche monofunzionali aventi un meccanismo noto di azione nell'ambito dell'induzione chimica di prossimità. Particolare interesse da parte di gruppi di ricerca accademici e compagnie farmaceutiche/biotecnologiche si sta sviluppando nei confronti dei molecular glue degraders, viste le migliori caratteristiche di drug-likeness (basso peso molecolare, migliori caratteristiche ADME, etc.) in confronto ad altre entità chimiche inducenti simile risposta biologica, come i PROTAC.

Nonostante le difficoltà di natura tecnologica descritte, l'interesse scientifico ed economico nel campo delle MGs sta conducendo allo sviluppo di tecniche di screening basate su combinazioni di approcci molecolari e cellulari utili all'identificazione di molecole agenti con questo meccanismo [16]. Si può, quindi, prevedere per i prossimi anni uno sviluppo ulteriore nel campo delle MGs, con l'individuazione di nuove entità chimiche e classi di composti monofunzionali capaci di svolgere l'attività biologica desiderata sfruttando il concetto di prossimità chimicamente indotta, secondo le caratteristiche descritte in precedenza.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] U. Stelzl *et al.*, *Cell*, 2005, **122**, P957
- [2] H. Lu *et al.*, *Signal transduction and targeted therapy*, 2020, **5**, 213
- [3] C.S.C. Ng *et al.*, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2022, **67**, 102107
- [4] L. Soini *et al.*, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2022, **69**, 102169
- [5] S. Cao *et al.*, *Nature Comm.*, 2022, **13**, 815
- [6] D.E. Bussiere *et al.*, *Nat. Chem. Biol.*, 2020, **16**, 15.
- [7] S.L. Schreiber, *Cell*, 2021, **184**, 3.
- [8] X. Tan *et al.*, *Nature*, 2007, **446**, 640.
- [9] P. Chamberlain *et al.*, *ACS Med. Chem. Lett.*, 2019, **10**, 1592
- [10] G. Dong *et al.*, *J. Med. Chem.*, 2021, **64**, 10606.
- [11] T. Ito *et al.*, *Cell Chemical biology*, 2021, **28**, 987.
- [12] K.A. Donovan *et al.*, *eLife*, 2018, 7:e38430.
- [13] Ad esempio, G. Petzold, *Nature*, 2016, **532**, 127.
- [14] Per una recente review sull'argomento: J. Yamamoto *et al.*, *Chem. Soc. Rev.*, 2022, **51**, 6234.
- [15] a) M. Bekes *et al.*, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2022, **21**, 181; b) <https://www.clinicaltrials.gov/>, codice identificativo trial NCT05546268 per MRT-2359.
- [16] A. Domostegui *et al.*, *Chem. Soc. Rev.*, 2022, **51**, 5498.

### Molecular Glues,

#### a Diverse Approach in Drug Discovery

Protein-protein interactions (PPI) have an important role in the development of diseases. Molecular glues are monofunctional compounds that promote the stabilization or the creation of PPI, to generate a desired biological response. The clinical efficacy of this class of molecules is generating interest by pharmaceutical industry and academic research groups, representing an alternative approach in drug discovery for the modulation of cellular processes.