



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PISA**

**FACOLTÀ DI FARMACIA**

**CORSO DI LAUREA SPECIALISTICA IN FARMACIA**

**TESI DI LAUREA**

**Potenziale attività terapeutica degli inibitori  
della MAGL, enzima del sistema  
endocannabinoide**

Relatrice:

Prof.ssa Clementina Manera

Candidato:

Valentina Dal Canto

ANNO ACCADEMICO 2014/2015

1.	SISTEMA ENDOCANNABINOIDE (ECS).....	3
1.1.	RECETTORI CANNABINOIDI .....	3
1.2.	LIGANDI PER I RECETTORI CANNABINOIDI.....	6
1.2.1.	AGONISTI.....	6
1.2.2.	ANTAGONISTI.....	7
1.3.	ENDOCANNABINOIDI .....	8
1.3.1.	MECCANISMO DI SEGNALAZIONE NEURONALE DEGLI ENDOCANNABINOIDI .....	9
1.3.2.	BIOSINTESI DEGLI ENDOCANNABINOIDI .....	12
1.4.	GLI ENZIMI COINVOLTI NELLA DEGRADAZIONE DEGLI ENDOCANNABINOIDI .....	15
1.4.1.	FAAH.....	16
1.4.2.	MAGL.....	18
1.4.3.	ABHD6.....	19
1.4.4.	ABDH12.....	20
2.	MONOACILGLICEROLO LIPASI (MAGL) .....	22
2.1.	MAGL: STRUTTURA E RESIDUI PIÙ IMPORTANTI .....	22
3.	POTENZIALITÀ TERAPEUTICHE DELLE MAGL.....	26
3.1.	IL RUOLO DI MAGL NEL DOLORE E NELL'INFIAMMAZIONE .....	27
3.2.	IL RUOLO DEL MAGL NELLE MALATTIE NEURODEGENERATIVE, ANSIA E DIPENDENZA .....	29
3.2.1.	PROBLEMI DI ABUSO DI DROGA .....	32
3.2.2.	SVILUPPO DELLA TOLLERANZA .....	33
3.3.	MAGL E METABOLISMO LIPIDICO .....	34
3.3.1.	RUOLO DEL MAGL NEL CANCRO .....	35
4.	INIBITORI DEL MAGL.....	40
4.1.	GENERALI INIBITORI DELLA SERINA IDROLASI.....	40
4.2.	INIBITORI STRUTTURALMENTE SIMILI AL SUBSTRATO ENDOGENO.....	41
4.2.1.	ANALOGHI DEL 2-AG .....	41
4.2.2.	ANALOGHI DEL 1-AG .....	46
4.3.	INIBITORI DI SINTESI DE NOVO .....	47
4.3.1.	INIBITORI CARBAMMICI.....	47
4.3.2.	DERIVATI ORGANOFOSFORICI (OP) INIBITORI DEL MAGL .....	56
5.	Bibliografia .....	59

## 1. SISTEMA ENDOCANNABINOIDE (ECS)

Le proprietà terapeutiche della *Cannabis sativa* sono note da millenni, il suo principale componente il  $\Delta^9$ -tetraidrocannabinolo ( $\Delta^9$ -THC), è stato isolato e sintetizzato solo negli anni '60 e soltanto negli anni '90 è stato possibile clonare il primo recettore cannabinoide CB<sub>1</sub> (CB<sub>1</sub>R) seguito poi dall'identificazione del secondo recettore cannabinoide CB<sub>2</sub> (CB<sub>2</sub>R). Dalla scoperta di questi recettori, studi più approfonditi hanno portato all'identificazione di un sistema complesso, il sistema endocannabinoide composto dagli stessi recettori cannabinoidi, dai loro ligandi endogeni (gli endocannabinodi), dagli enzimi coinvolti nella loro biosintesi e metabolismo e dalle proteine trasportatrici degli endocannabinoidi<sup>1</sup>. Questo sistema è di grande importanza per il normale funzionamento dell'organismo ed è stato identificato nei mammiferi, negli uccelli, negli anfibi, nei pesci, nei ricci di mare, nei molluschi e nelle sanguisughe.

### 1.1. RECETTORI CANNABINOIDI

A causa dell'alta lipofilia dei cannabinoidi naturali, per molto tempo fu creduto che il loro meccanismo d'azione risiedesse nelle capacità di stabilire interazioni aspecifiche con i lipidi di membrana, alterandone così la fluidità. Tuttavia, l'osservazione che i cannabinoidi possedevano una certa stereoselettività, come evidenziato dalla forte perdita di potenza degli enantiomeri del  $\Delta^9$ -THC in svariati test comportamentali, rendeva plausibile l'ipotesi di un'interazione specifica. I cannabinoidi esercitano infatti molti dei loro effetti legandosi selettivamente ai recettori localizzati a livello della membrana cellulare. I recettori dei cannabinoidi (CBRs) sono una classe di recettori metabotropici appartenenti alla superfamiglia dei recettori accoppiati alle proteine G (GPCRs). Dopo lo screening verso vari recettori orfani accoppiati a proteine G, che hanno mostrato affinità con il THC, il primo recettore specifico, il tipo 1 (CB<sub>1</sub>) dei recettori cannabinoidi, è stato identificato e

poi clonato. Oggi, sono noti due sottotipi di recettori cannabinoidi: i recettori CB<sub>1</sub> (CB<sub>1</sub>R) e i recettori CB<sub>2</sub> (CB<sub>2</sub>R), quest'ultimo identificato con omologa clonazione<sup>2</sup>. I recettori CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub>, possiedono sette segmenti transmembranalni idrofobici e due domini: uno N-terminale extracellulare con siti di glicosilazione e l'altro C-terminale intracellulare accoppiato ad un complesso proteico composto da proteine di tipo G. La distinzione tra questi recettori si basa sulle differenze nella loro sequenza amminoacidica, sui meccanismi di segnalazione, sulla distribuzione tissutale e sulla affinità che possiedono nei confronti di diversi agonisti e antagonisti, selettivi per l'uno o per l'altro tipo di recettore. I recettori dei cannabinoidi CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> condividono il 44% della loro sequenza amminoacidica<sup>3</sup>. (Fig.1)

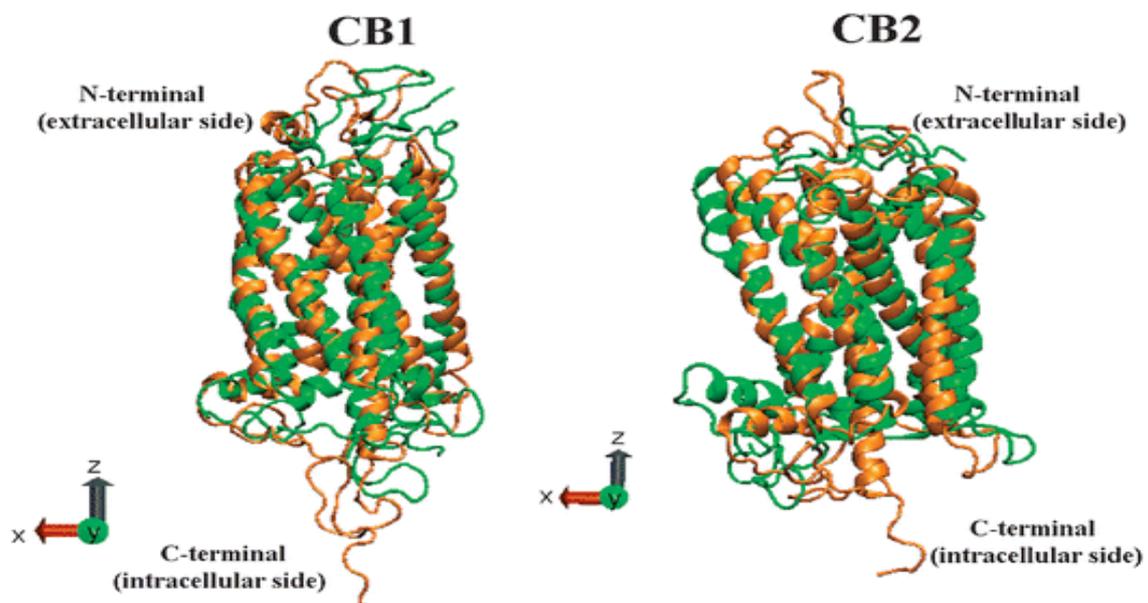


Fig.1 Strutture dei recettori CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub><sup>4</sup>.

Il primo recettore cannabinoido identificato, il CB<sub>1</sub> è stato clonato nel 1990. I recettori CB<sub>1</sub> sono presenti in numerosi mammiferi, incluso l'uomo e sono particolarmente abbondanti in alcune regioni cerebrali. Sono espressi nell'encefalo, in particolare nei gangli basali, globus pallidus e substantia nigra e in misura minore, nell'ippocampo, nel cervelletto, nel nucleo caudato, nel putamen, nell'ipotalamo e nell'amigdala<sup>3,5</sup>. Sono stati inoltre individuati, ma con minor densità, anche nei polmoni, nel fegato, nei reni e nelle cellule dell'apparato riproduttivo sia maschile

che femminile. I recettori CB<sub>1</sub> sono invece assenti nel midollo allungato, che è la parte del sistema nervoso che presiede al controllo delle funzioni respiratorie e cardiovascolari. Esiste una forte e peculiare correlazione tra la distribuzione dei recettori CB<sub>1</sub> e gli effetti delle loro attivazioni in vivo. L'elevata densità dei recettori nei gangli basali e nel cervelletto, cioè a livello dei sistemi motori, è infatti fortemente collegato alle alterazioni dell'attività motoria indotta dai cannabinoidi. I recettori cannabinoidi corticali sono senz'altro coinvolti in alcuni degli effetti psicoattivi dei cannabinoidi, quali l'euforia iniziale, l'alterato senso del tempo, la difficoltà a concentrarsi, allucinazioni e disforia, mentre l'alta densità del recettore nell'ippocampo potrebbe essere alla base delle alterazioni della memoria e dell'apprendimento indotte dai cannabinoidi. Quindi la stimolazione dei recettori CB<sub>1</sub> è responsabile degli effetti euforizzanti dei cannabinoidi ma anche della loro azione antiemetica, antiossidante, ipotensiva, immunosoppressiva, antiinfiammatoria, analgesica, antispastica e stimolante dell'appetito. Inoltre, nelle malattie neurodegenerative, come il morbo di Parkinson e la malattia di Huntington, si evidenzia una diminuzione dell'espressione del legame: queste patologie sono caratterizzate da disturbi neurologici riguardanti il sistema extrapiramidale, dove i recettori CB<sub>1</sub> sono fortemente espressi e sono coinvolti nella modulazione del dolore. Così, i recettori CB<sub>1</sub> sono altamente espressi nelle zone che comprendono il grigio periacqueduttale e il corno dorsale del midollo spinale e sono coinvolti nella modulazione del dolore.

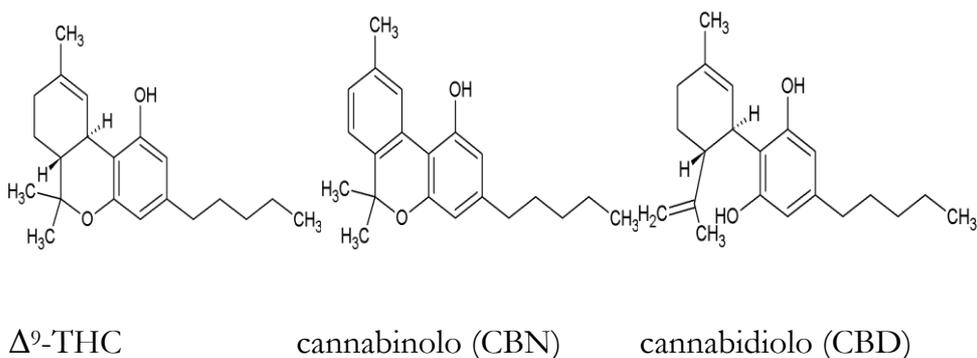
I recettori CB<sub>2</sub> sono principalmente localizzati nel sistema immunitario, in particolare nella zona marginale della milza, nelle tonsille e nelle cellule immunocompetenti. Quindi i recettori CB<sub>2</sub> sono localizzati prevalentemente in cellule coinvolte nelle risposte immunitarie ed infiammatorie. Anche se inizialmente si è pensato che fossero espressi soltanto in periferia, i recettori CB<sub>2</sub> sono stati evidenziati anche nel cervelletto, nel tronco cerebrale e nelle cellule microgliali, dove possono svolgere un ruolo centrale nel controllo di diverse malattie neurodegenerative<sup>3,5</sup>. La modulazione dei recettori CB<sub>2</sub> è stata implicata anche in diversi processi come l'analgesia, la fibrosi epatica, la crescita ossea e l'aterosclerosi e

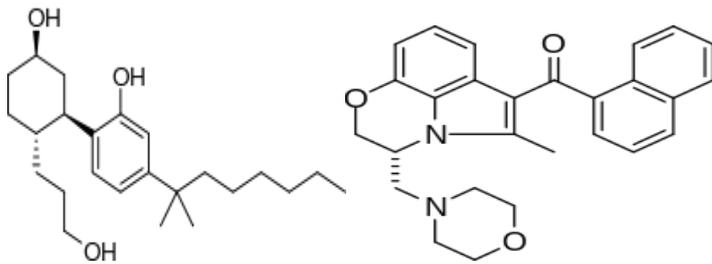
nel controllo di alcune forme di tumore <sup>3,5</sup>. Oltre ai recettori CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub>, ci sono alcune evidenze dei recettori CB-like aggiuntivi (come GPR55, GPR18, canali TRPV, ecc) ed esistono inoltre preliminari evidenze farmacologiche di altri sottotipi di recettori cannabinoidi la cui caratterizzazione molecolare non è stata identificata<sup>6,7</sup>.

## 1.2. LIGANDI PER I RECETTORI CANNABINOIDI

### 1.2.1. AGONISTI

La conoscenza della struttura primaria delle proteine recettoriali ha permesso nell'ultimo decennio lo sviluppo di numerosi agonisti per i due recettori cannabinoidi, a partire da modifiche strutturali nella molecola del THC. In accordo con la loro struttura chimica, gli agonisti vengono suddivisi in quattro gruppi. Il primo gruppo è costituito dai derivati benzopiranicici, tra cui i costituenti naturali della *cannabis*, quali il  $\Delta^9$ -THC, il  $\Delta^8$ -THC, il cannabinolo ed il cannabidiolo il costituente non psicoattivo della cannabis, nonché alcuni agonisti selettivi per il recettore CB<sub>2</sub> quali il SWH133 e LHW308. Il secondo gruppo comprende i composti biciclici il cui principale esponente è il CP-55,940<sup>8</sup>. Al terzo gruppo appartengono gli amminoalchilindoli, rappresentati dal WIN-55212-2 e dal JWH015, selettivi per il recettore CB<sub>2</sub>, mentre il quarto gruppo comprende i ligandi endogeni per i recettori cannabinoidi. (Fig.2)





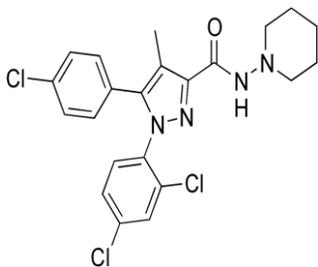
CP-55,940

WIN-55212-2

*Fig.2 Agonisti dei recettori cannabinoidi*

### 1.2.2. ANTAGONISTI

La ricerca nel campo dei cannabinoidi è progredita ulteriormente, grazie alla sintesi di composti antagonisti selettivi per i due tipi di recettori cannabinoidi CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub>. Il primo composto disponibile è stato l'SR141716A, antagonista ad alta affinità per il recettore centrale CB<sub>1</sub><sup>9</sup>. Esso è attivo anche per via orale e questo lo rende interessante per un suo possibile impiego terapeutico. Nei test comportamentali, l'SR141716A antagonizza pienamente i classici effetti indotti dai cannabinoidi, ma alcuni studi riportano una sua capacità di indurre effetti opposti a quelli degli agonisti cannabici, suggerendo un comportamento da agonista inverso ed è attivo anche per via orale. (Fig. 3)



SR141716A

*Fig.3 Antagonisti dei recettori cannabinoidi*

### 1.3. ENDOCANNABINOIDI

La scoperta dei recettori cannabinoidi e la disponibilità di agonisti cannabinoidi altamente selettivi e potenti, ha portato anche alla rapida identificazione di una famiglia di mediatori lipidici che funzionano da ligandi naturali per i recettori cannabinoidi. L'anandamide (AEA) è stato il primo agonista endogeno dei recettori cannabinoidi identificato e quindi capostipite degli endocannabinoidi stessi. L'AEA lega entrambe i recettori CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub>, anche se per quest'ultimo ha un'affinità più bassa, comportandosi come agonista parziale, ed è presente ad elevate concentrazioni nell'ippocampo, nella corteccia, nel talamo e nel cervelletto, ma anche nel sistema limbico, nel diencefalo, nel mesencefalo di specie animali diverse, incluso l'uomo. All'interno del cervello, i livelli di AEA equivalenti a quelli della dopamina e della serotonina, sono correlati con la distribuzione dei recettori CB<sub>1</sub>. In seguito alla scoperta di questo ligando, sono stati caratterizzati altri derivati di acidi grassi polinsaturi che si comportano come agonisti funzionali dei recettori dei cannabinoidi. Tra questi composti, nel tentativo di cercare un ligando selettivo per i recettori CB<sub>2</sub>, è stato identificato nel 1995, il 2-arachidonoilglicerolo (2-AG). Questo secondo endocannabinoide, differisce dal AEA per il fatto di comportarsi come agonista su entrambi i recettori cannabinoidi. Il 2-AG presenta la stessa localizzazione del AEA sia a livello periferico che centrale, ma a livello del sistema nervoso centrale è presente a concentrazioni circa duecento volte maggiori di quelle del AEA. Un analogo del AEA, è la virodamina. La sua distribuzione sembra uguale a quella del AEA mostrando simili concentrazioni nel sistema nervoso centrale. Sui recettori CB<sub>2</sub> agisce come agonista, mentre mostra attività di agonista parziale verso i recettori CB<sub>1</sub>. Altre molecole attive sui recettori CB<sub>1</sub> sono il N-arachidonildopamina (NADA) e il 2 arachidonil-gliceril-etero. ( Fig. 4)

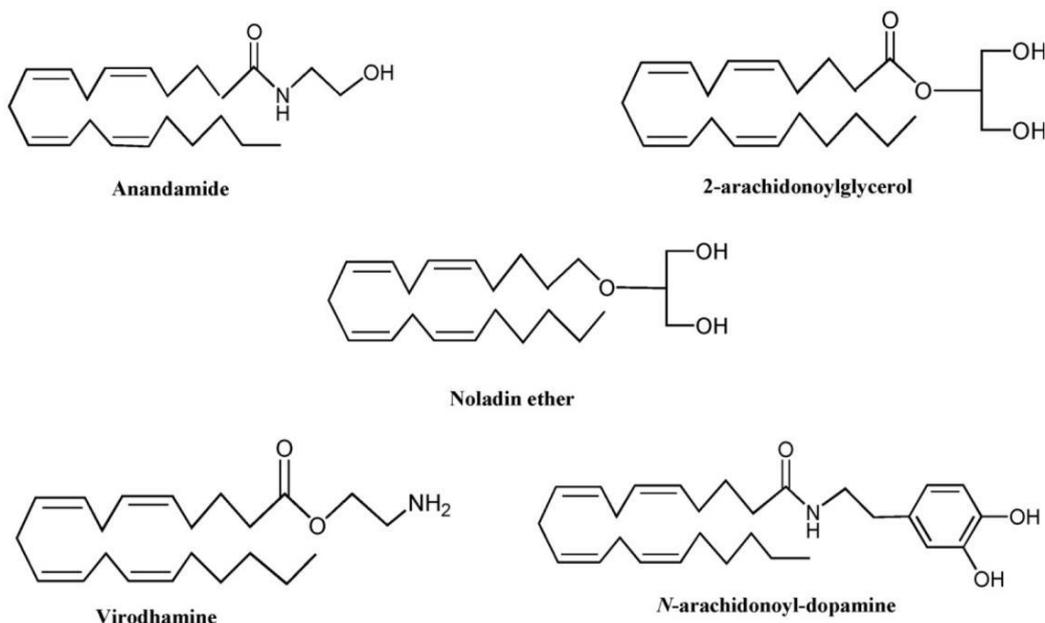


Fig.4 Strutture dei ligandi endogeni per i recettori cannabinoidi<sup>10</sup>.

### 1.3.1. MECCANISMO DI SEGNALAZIONE NEURONALE DEGLI ENDOCANNABINOIDI

I meccanismi di segnalazione degli endocannabinoidi, sono diversi da quelli dei sistemi dei neurotrasmettitori classici (es colinergici, aminergici e monoaminergici). Nel modello classico di neurotrasmissione, un potenziale d'azione arriva al neurone presinaptico e provoca il rilascio di neurotrasmettitori, che attraversano la fessura sinaptica, si legano e attivano i recettori sul neurone postsinaptico. Gli endocannabinoidi non vengono accumulati a livello delle vescicole sinaptiche, ma si formano nelle membrane cellulari, immagazzinati come precursori lipidici e rilasciati dopo l'attivazione degli enzimi che catalizzano l'idrolisi dei precursori stessi <sup>11</sup>. Gli endocannabinoidi sono sintetizzati e secreti dai neuroni postsinaptici, attraversano la fessura sinaptica in modo tale da stimolare i recettori CB<sub>1</sub> sul terminale dell'assone presinaptico; per questo motivo, è stato ipotizzato che funzionino come messaggeri retrogradi <sup>12,13</sup>. I recettori CB<sub>1</sub> attivati si accoppiano principalmente alle proteine G

di tipo inibitorio di classe Gi/Go agendo sui canali del calcio e potassio e riducendo così la probabilità di rilascio del neurotrasmettitore e stimolando la via delle Map kinasi<sup>14,15</sup>(Fig.5). Anche il recettore CB<sub>2</sub> trasduce il segnale mediante le proteine G ma non è in grado di modulare i canali ionici, è negativamente accoppiato all'adenilato ciclastasi e al contrario del recettore CB<sub>1</sub> è in grado di attivare le Map kinasi<sup>14,16</sup>.

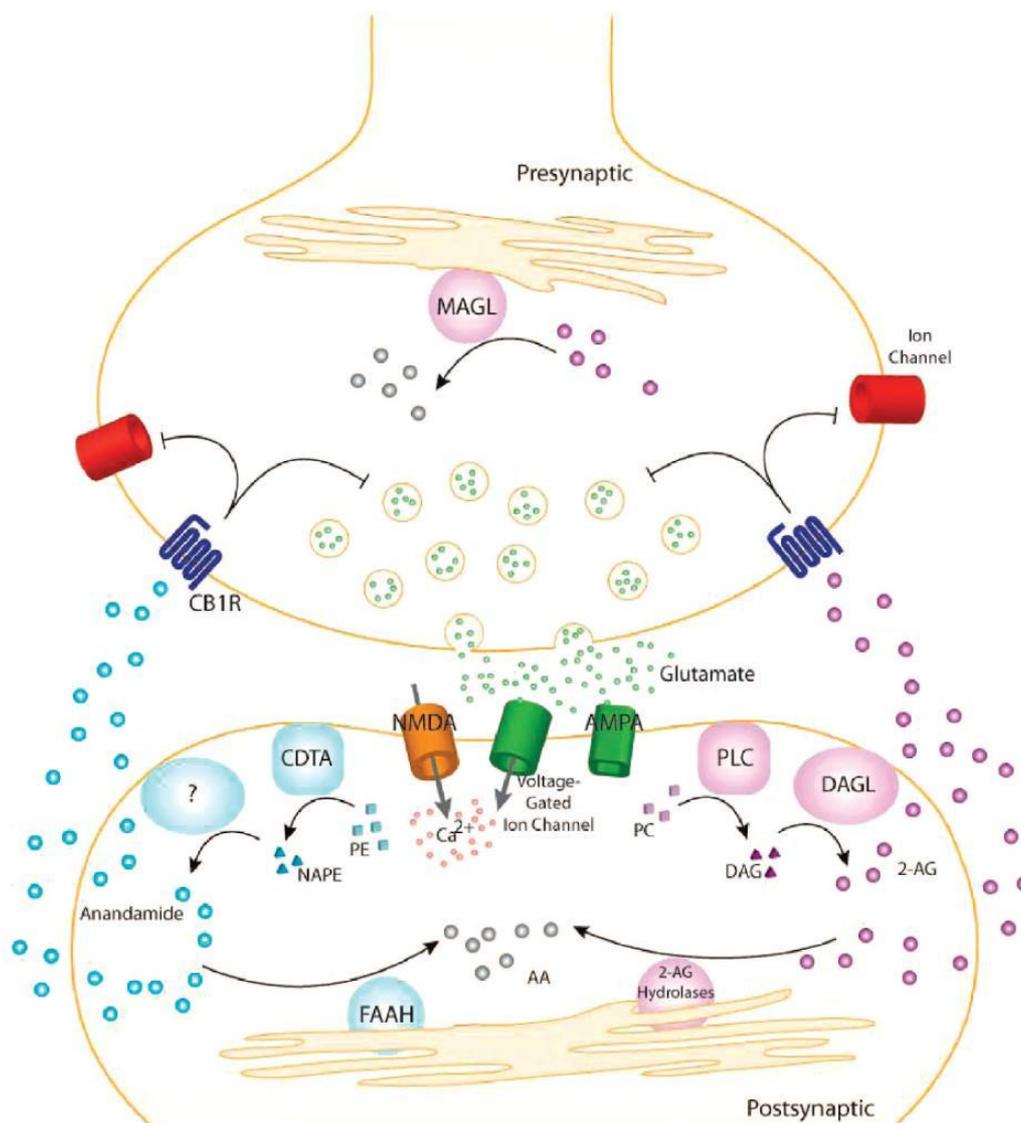


Fig.5 Modello generale per la segnalazione retrograda degli endocannabinoidi. Recettori post-sinaptici come AMPA e NMDA e canali ionici voltaggio-dipendenti sono attivati attraverso il rilascio di neurotrasmettitori, consentendo un' afflusso di  $Ca^{2+}$  e una biosintesi degli endocannabinoidi. L'anandamide e il 2-AG migrano dai neuroni postsinaptici ai recettori  $CB_1$  situati sui neuroni presinaptici. Una volta attivato, i recettori  $CB_1$  accoppiati alle proteine G appartenenti alla classe  $G_i/G_o$  regolano i canali ionici e inibiscono il rilascio dei neurotrasmettitori. La segnalazione retrograda degli endocannabinoidi termina mediante l'attivazione degli enzimi degradativi: FAAH nel neurone post-sinaptico, MAGL nel neurone presinaptico<sup>5</sup>.

### 1.3.2. BIOSINTESI DEGLI ENDOCANNABINOIDI

Gli endocannabinoidi sono prodotti all'interno delle cellule neuronali attraverso vie biosintetiche multiple e a differenza degli altri neurotrasmettitori, non vengono immagazzinati in vescicole ma vengono sintetizzati “on demand” a partire da precursori fosfolipidici. Il processo di biosintesi è attivato da uno stimolo che provoca depolarizzazione della membrana cellulare<sup>17</sup>. Il precursore del AEA è N-arachidonoilfosfatidiletanolamina (NarPE) prodotta a partire da fosfolipi e fosfatidiletanolamina, mediante una N- aciltransferasi calcio-dipendente e una calcio-indipendente (NATs)<sup>18</sup>. In pratica NarPE è prodotta per trasferimento dell'AA dalla posizione sn-1 dei fosfolipidi all'atomo di azoto della fosfatidiletanolamina<sup>19</sup>, poi una fosfolipasi D N-acilfosfatidiletanolamina-specifica (NAPE-PLD) converte direttamente NarPE in AEA<sup>20,21</sup>. (Fig.6)

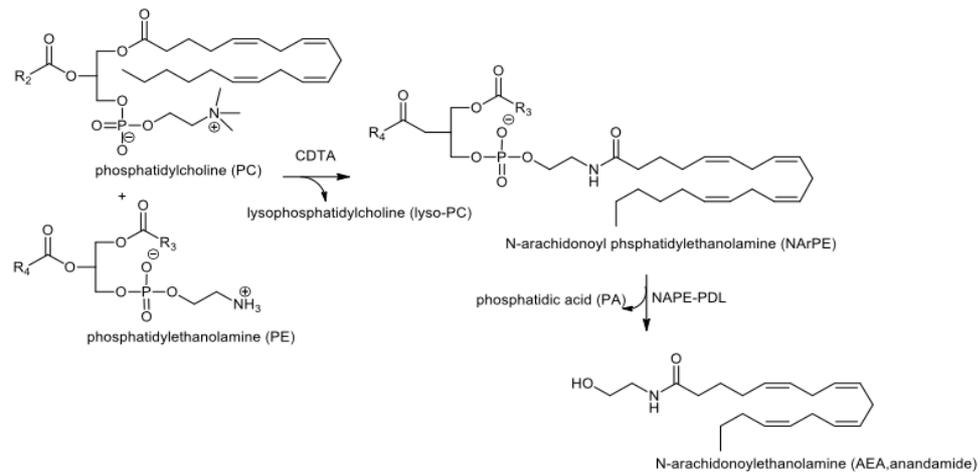


Fig.6 Biosintesi diretta dell'anandamide.

Altri etanolammidi di acidi grassi possono essere formati attraverso queste vie, che non necessariamente si legano ai recettori CB con alta affinità e agiscono su differenti recettori, ad esempio composti come la palmitoiletanolammide (PEA), ad azione anti-infiammatoria e l'oleoiletanolammide (OEA), mediatore

anoressizzante<sup>22</sup>.(Fig.7)

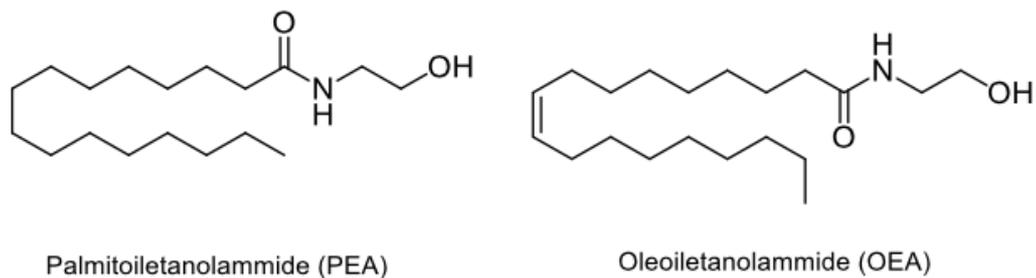


Fig.7 Palmitoiletanolamide e Oleoiletanolamide.

La scoperta che nei topi NAPE-PLD “knock out” i livelli tissutali di AEA non sono ridotti, ha suggerito l'esistenza di altre vie biosintetiche con enzimi alternativi<sup>21</sup>. Si presume che AEA possa essere prodotta per idrolisi sequenziale di NarPE in *liso*-NarPE e in glicerofosfo-ammide, ad opera di un  $\alpha,\beta$ -idrolasi 4 (ABHD4) (Fig. 8), seguita da un'ulteriore idrolisi ad opera della glicerofosfodiesterasi-1 (GDE1)<sup>23</sup>. La formazione di *liso*-NarPE sembra imputabile anche alla fosfolipasi A<sub>2</sub> solubile, seguita dalla conversione diretta in AEA, catalizzata dalla *liso*-fosfolipasi D<sup>24</sup>. Un'altra possibile via biosintetica prevede la formazione di fosfo-anandamide dall'idrolisi di NarPE mediante fosfolipasi C e successiva conversione in AEA tramite la proteina fosfatasi N22 o la inositolo fosfatasi SHIP2<sup>25</sup>. (Fig.8)

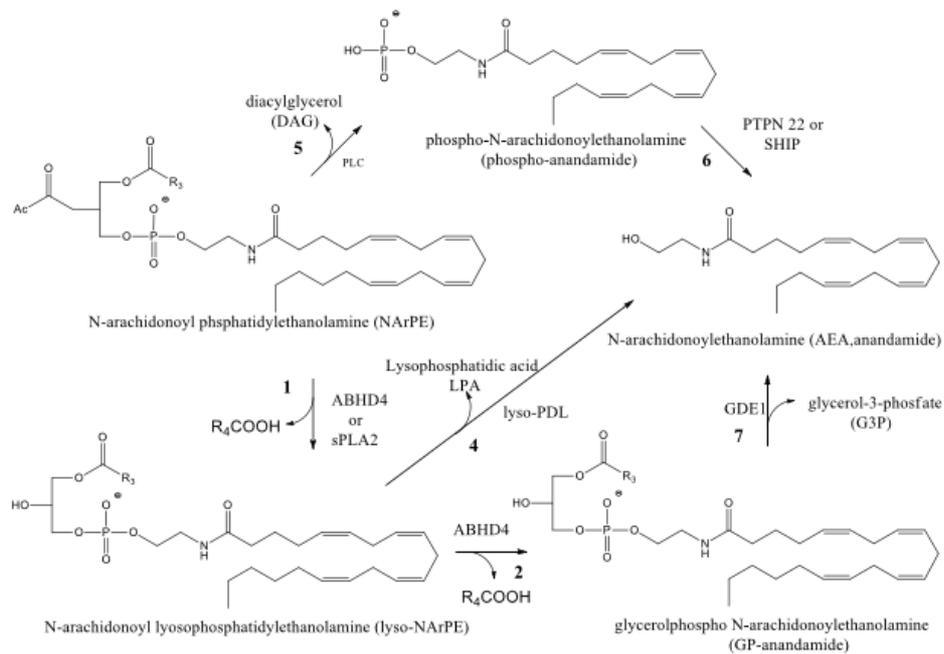


Fig.8 Meccanismi alternativi per la biosintesi dell'anandamide<sup>26</sup>.

Il 2-AG è prodotto quasi esclusivamente dall'idrolisi di sn-1-acil-2-arachidonoilgliceroli (AAGs) ad opera sn-1-diacilglicerolo lipasi, DAGL $\alpha$  o DAGL $\beta$  (Fig. 9). L'isoforma  $\alpha$  è più abbondante nei tessuti nervosi adulti, la  $\beta$  in quelli in via di sviluppo<sup>20</sup>. Gli sn-1-acil-2-arachidonoilgliceroli (AAGs) sono prodotti a partire dai fosfatidilinositoli di membrana per mezzo della fosfolipasi C/ $\beta$ <sup>18</sup>.

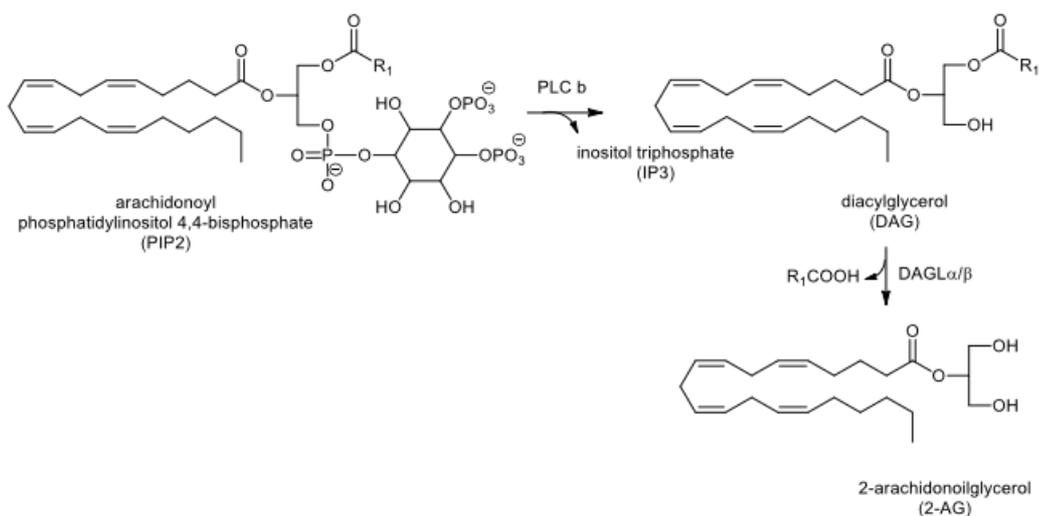


Fig.9 Biosintesi del 2-arachidonoilglicerolo (2-AG).

#### 1.4. GLI ENZIMI COINVOLTI NELLA DEGRADAZIONE DEGLI ENDOCANNABINOIDI

L'AEA e il 2-AG, dopo essere stati rilasciati nello spazio sinaptico e dopo aver completato le loro azioni biologiche, sono degradati da un sistema di metabolizzazione costituito principalmente da due enzimi appartenenti alla famiglia della serina idrolasi: Fatty acid amide hydrolase (FAAH), che è l'enzima che idrolizza il gruppo ammidico dell'anandamide e la monoacylglycerol lipase (MAGL) che è l'enzima che idrolizza il gruppo estereo del 2-AG. Recentemente sono stati scoperti due enzimi della famiglia delle α/β idrolasi che agiscono come i due precedenti enzimi e che sono la ABDH6 e la ABDH12.

### 1.4.1. FAAH

L'enzima FAAH è una proteina di membrana di 60 kDa con un singolo dominio transmembranale N-terminale, composto da una sequenza di 579 amminoacidi e in grado di metabolizzare diversi ammidi degli acidi grassi. Esso contiene una regione altamente conservata di 56 amminoacidi ricchi in particolare di serina, glicina, alanina che è tipica delle amidasi. Allo stesso tempo, può essere considerata una serina idrolasi. Infatti il PMSF (fenil metil solfonil fluoruro) che è un potente inibitore delle FAAH, svolge la sua azione attraverso la formazione del legame con gli ossidrili della serina. A differenza di molte serina idrolasi, che utilizzano un residuo di istidina come base catalitica, la FAAH impiega una lisina per la stessa funzione catalitica, peculiarità che consente al FAAH di idrolizzare sia ammidi ed esteri in modo equivalente. Studi sperimentali, utilizzando inibitori di tale enzima, hanno confermato la presenza di una triade catalitica serina-serina-lisina (Ser241-Ser217-Lys142), tipico delle amidasi e diversa dalla triade catalitica serina-istidina-acido aspartico, sequenza comune alla maggior parte delle serina idrolasi<sup>27</sup>. FAAH si trova nelle membrane intracellulari del neurone post sinaptico ed è il principale responsabile del metabolismo dell' AEA, da cui libera etanolamina e acido arachidonico. (Fig. 10)

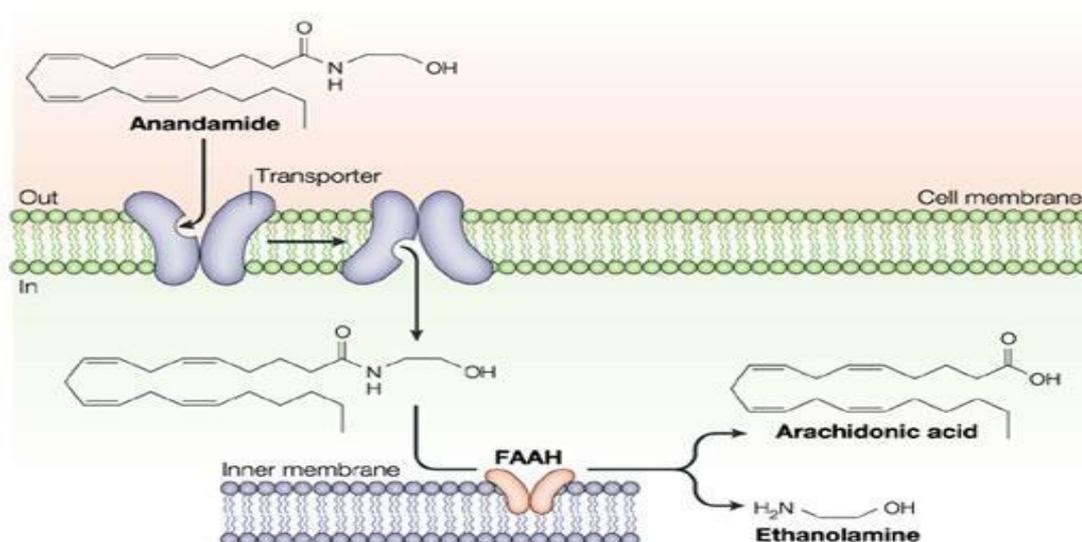


Fig.10 Degradazione dell' anandamide da parte del FAAH<sup>28</sup>.

FAAH è distribuita in varie zone del corpo, si trova nel cervello, fegato, testicoli, utero, reni, tessuti oculari, milza, polmoni, mentre non si trova nel muscolo scheletrico o cardiaco. In particolare nel cervello, l'espressione del FAAH varia da regione a regione, le attività più elevate sono presenti nel globo pallido e ippocampo, mentre l'attività più bassa è presente nel midollo. In tutto il cervello e nella retina, FAAH ha una espressione e una localizzazione cellulare complementare a quella dei recettori CB<sub>1</sub>. Altre vie metaboliche sono responsabili del blocco dell'AEA, ad esempio, la COX-2 (la forma inducibile della COX) ha la capacità di degradare l'AEA; ciò è confermato nei modelli di topi in patologie neurodegenerative. In modelli di topi in cui non è espresso l'enzima FAAH si ha un forte aumento dell'attività delle COX-2, in questo caso la somministrazione di AEA esogena porta alla produzione di livelli rilevabili di prostanoidei. Inoltre, la lipoossigenasi (12-LOX e 15-LOX) e il citocromo P450, inclusa la sua principale isoforma nel cervello CYP2D6, convertono l'AEA in metaboliti biologicamente attivi che esercitano le loro azioni biologiche attraverso due recettori, PPAR e TRPV1 legati anche loro al sistema endocannabinoide. Tuttavia, il ruolo funzionale di queste sostanze nel sistema nervoso centrale non è stato determinato<sup>27,29</sup>. (Fig.11)

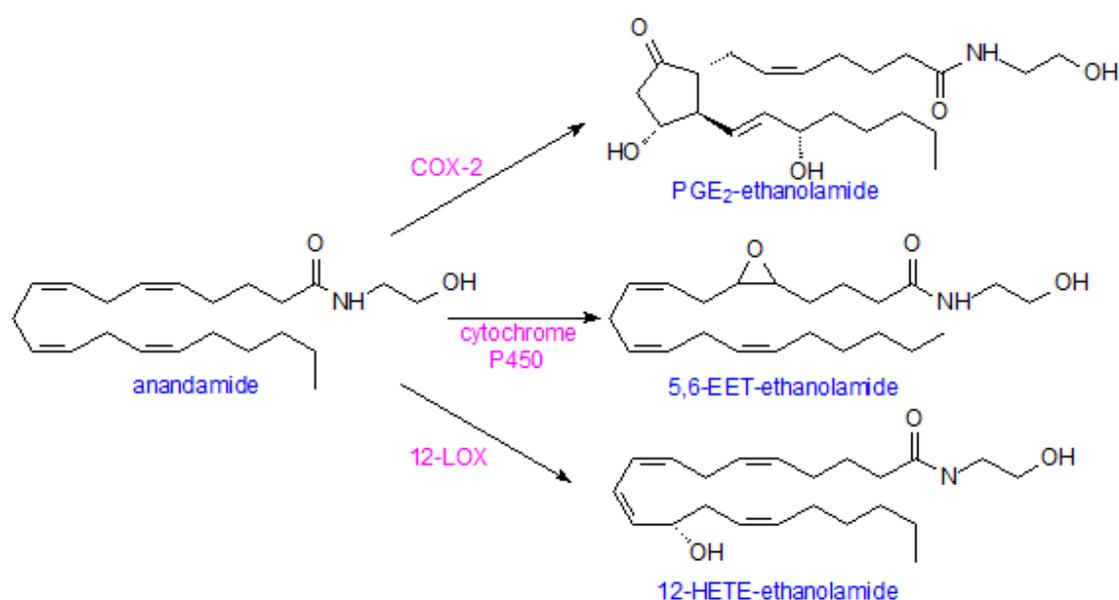
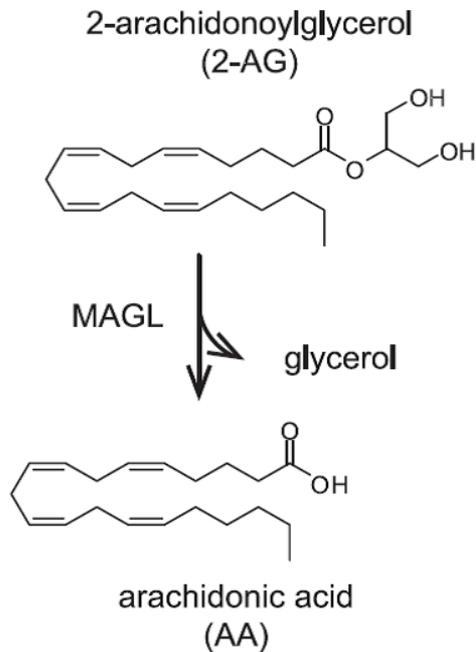


Fig.11 Percorsi alternativi della degradazione dell'anandamide <sup>30</sup>.

### 1.4.2. MAGL

Il percorso enzimatico più importante per il 2-AG è l'inattivazione da parte dell'enzima MAGL che genera l'acido arachidonico e il glicerolo. MAGL è stato originariamente purificato e clonato dal tessuto adiposo, di conseguenza si pensò che avesse una funzione lipolitica, ma diversi studi hanno dimostrato il suo ruolo centrale in altri processi, come nell'infiammazione, nel dolore, nel cancro, nelle malattie neurodegenerative. MAGL è espresso nel fegato e nel tessuto adiposo ma la sua massima espressione è nel cervello, in particolare nelle regioni che comprendono il cervelletto, la corteccia, il talamo e l'ippocampo ed è localizzato nei terminali presinaptici, dove sono localizzati anche i recettori CB<sub>1</sub>. Il 2-AG può essere metabolizzato dall'enzima FAAH, anche se nei neuroni intatti l'idrolisi si ha principalmente ad opera delle MAGL e il 2-AG similmente all' AEA, è un presunto substrato di enzimi COX e LOX <sup>31</sup>.(Fig.12)



*Fig.12 Nel sistema nervoso, nel fegato e nel tessuto adiposo il 2-AG è degradato principalmente da MAGL<sup>32</sup>.*

All'inizio, importanti osservazioni sull'attività delle MAGL a livello cerebrale furono rese possibili grazie agli inibitori. Il metil arachidonoil fluoro fosfonato (MAFP) è uno dei più potenti inibitori delle MAGL. Il MAFP è un inibitore irreversibile ma non è selettivo, perché blocca anche l'azione della maggior parte degli enzimi appartenenti alla famiglia degli enzimi serina idrolasi. In seguito, è stata studiata l'azione inibitoria di un altro inibitore irreversibile il N-arachidonoil maleimmide (NAM). La principale differenza tra i due composti è l'attività residua nell'idrolisi del 2-AG: il MAFP blocca totalmente l'idrolisi del 2-AG nel cervello mentre circa il 15% di attività residua rimane a seguito dell'azione del NAM. Recenti studi hanno evidenziato che l'attività residua dell'azione del NAM è bloccata da altri due enzimi che appartengono alla famiglia delle  $\alpha/\beta$  idrolasi il ABHD6 e ABHD12. Recentemente, JZL184, un nuovo composto a struttura carbammica, è stato riportato come un inibitore potente e specifico nei confronti di MAGL. Inoltre, recenti studi *in vitro* e *in vivo* che utilizzano inibitori potenti e selettivi delle MAGL hanno dimostrato che questo enzima svolge un ruolo determinante non solo nella regolazione dei livelli cerebrali di 2-AG ma anche nelle varie risposte cellulari dipendenti dall'attivazione dei recettori CB<sub>1</sub><sup>31,33</sup>.

### 1.4.3. ABHD6

ABHD6 è una proteina di 30 kDa le cui funzioni fisiologiche sono poco note; alcuni studi indicano che ABHD6 potrebbe essere utilizzato come un nuovo marcatore diagnostico in certe forme di tumori, nelle quali un'alta espressione di ABHD6 è stata osservata. ABHD6 è una proteina integrale di membrana caratterizzata dalla triade catalitica altamente conservata (residui amminoacidici Ser246-Asp333-Hys372), della famiglia  $\alpha/\beta$  idrolasi e lipasi (GHSLG). La localizzazione (Fig. 13) di ABHD6 nei neuroni è post-sinaptica e non è espresso nella microglia; è stato dimostrato che l'inibizione della ABHD6 *in vivo* in modelli di topo con trauma cranico ha prodotto effetti antiinfiammatori e neuroprotettivi<sup>33</sup>.

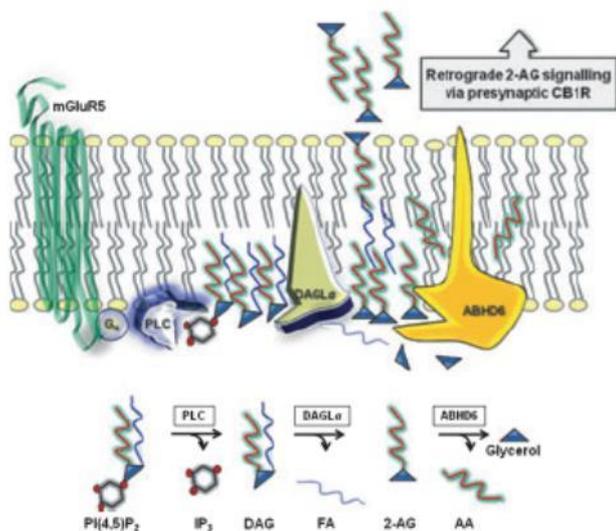


Fig.13 Regolazione dei livelli di 2-AG presso il sito della sua generazione per ABHD6<sup>33</sup>.

#### 1.4.4. ABDH12

L'enzima ABHD12 è stata recentemente identificata ma le sue funzioni fisiologiche sono largamente sconosciute. Utilizzando ABPP (Activity-based protein profiling, è una tecnologia proteomica) è stato dimostrato che l'attività del ABHD12 riguarda il 9% dell'idrolisi totale del 2 AG. Attualmente, il 2-AG è l'unico substrato noto per l'ABHD12, ma è possibile che l'enzima utilizzi anche altri substrati. È composto da un tipico dominio proteico  $\alpha/\beta$  idrolasi, e caratterizzata da una triade catalitica è costituita da residui amminoacidi Ser 148-Asp-278-His306. Studi recenti hanno dimostrato che una riduzione dell'espressione dell'enzima causa una malattia neurodegenerativa la PHARC caratterizzata da polineuropatia, perdita dell'udito, atassia, retinite pigmentosa. È stato suggerito che ABHD12 agisca con funzioni fisiologiche essenziali nel sistema nervoso e che la malattia PHARC può essere considerata come un modello umano in cui si ha una ridotta espressione di ABHD12. L'espressione di questo enzima è stata evidenziata in varie regioni del

cervello e in particolare in microglia, ma sono anche abbondanti in altre cellule correlate, come macrofagi e osteoclasti<sup>33</sup>.

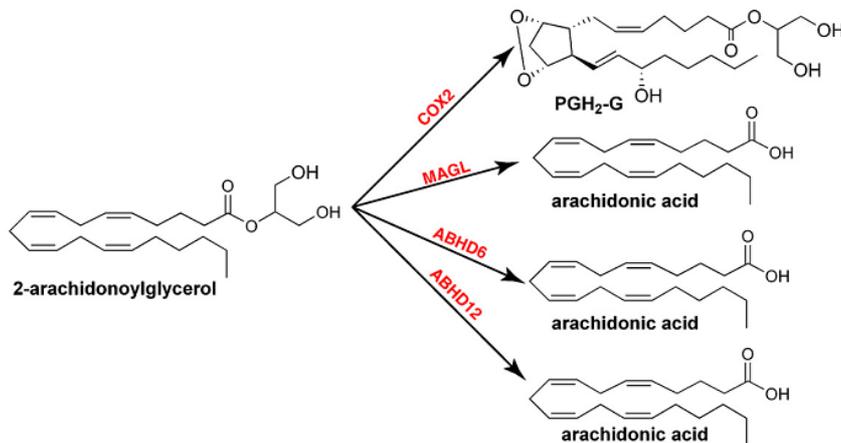


Fig. 14 Rappresentazione schematica dei percorsi inattivanti il 2-AG<sup>34</sup>.

In sintesi, anche se ABHD6 e ABHD12 hanno un contributo limitato a degradare il 2-AG, è possibile che le diverse localizzazioni subcellulari o cellulari di questi due enzimi ABHD6 e di ABHD12 rispetto alla localizzazione più generale del MAGL, possa permettere a ciascuno dei due enzima di accedere in maniera più selettiva a distinti pool del 2-AG. Lo sviluppo di inibitori più selettivi nei confronti degli enzimi FAAH, MAGL, ABHD6 e ABHD12 che regolano i livelli dell'AEA, potranno permettere di comprendere l'azione specifica del 2-AG e dei suoi metaboliti sia in condizioni fisiologiche che patologiche<sup>33,35</sup>. (Fig. 14)

## 2. MONOACILGLICEROLO LIPASI (MAGL)

### 2.1. MAGL: STRUTTURA E RESIDUI PIÙ IMPORTANTI

MAGL è stato isolato e clonato dal tessuto adiposo, ed è un enzima coinvolto nel processo del catabolismo dei trigliceridi. MAGL è una serina idrolasi, appartenente alla famiglia delle  $\alpha/\beta$  idrolasi, con un peso molecolare di 33 kDa e con una buona omologia nella sequenza amminoacidica nel uomo, topo, ratto. Fin dalla sua prima identificazione, la localizzazione di MAGL è stata estesa a molti tessuti ed è ormai noto che questa serina idrolasi costituisce un enzima espresso ubiquitariamente. La struttura cristallina di MAGL è stata risolta ed ottenuta indipendentemente da due laboratori. Gli enzimi appartenenti alla superfamiglia delle  $\alpha/\beta$  idrolasi, come il MAGL, condividono una struttura comune chiamata ripiegamento delle  $\alpha/\beta$  idrolasi, costituita da otto foglietti- $\beta$  affiancati su entrambi i lati da  $\alpha$ -eliche. La MAGL a differenza delle  $\alpha/\beta$  idrolasi presenta due eliche che costituiscono un “coperchio” in modo da proteggere la struttura del MAGL dal possibile accesso alla triade catalitica. I tre residui amminoacidici sono posizionati sul fondo di una tasca a forma di tunnel la cui entrata è occupata dal dominio (“coperchio”). Il fondo del tunnel è chiuso ma possiede un piccolo foro, dal quale si pensa che fuoriesca il substrato una volta che ha subito l'idrolisi. In linea generale si può descrivere la tasca come un tunnel idrofobico largo e allungato avente un'estremità polare, adatta ad accogliere molecole formate da lunghe catene alifatiche con una testa polare, proprio come il 2-arachidonoilglicerolo<sup>36</sup>. (Fig. 15)

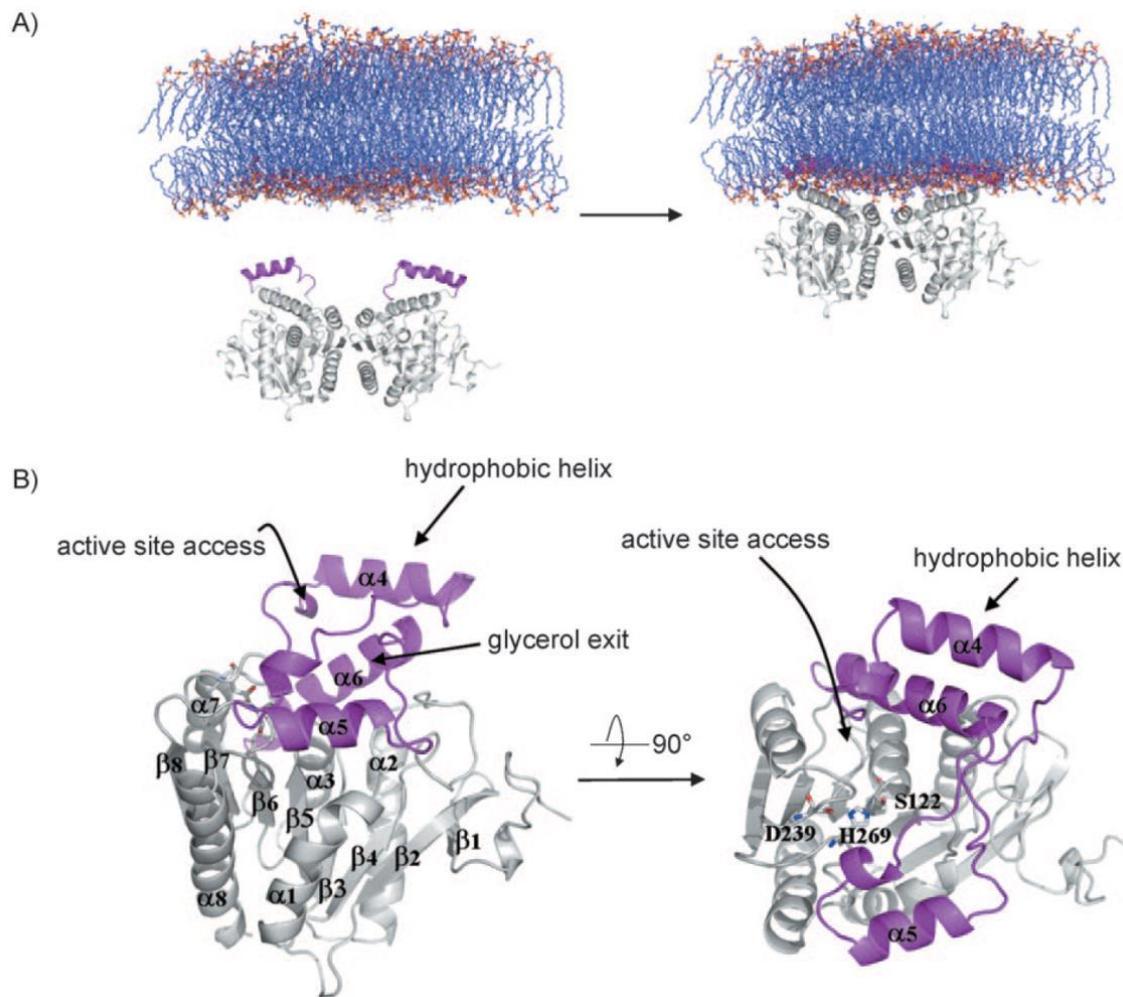


Fig.15 Struttura di MAGL.

A) Unità asimmetrica di MAGL. L' elica  $\alpha 4$  è colorata in magenta. B) A sinistra: Vista laterale di un monomero di MAGL, con la triade catalitica rappresentata mediante dei bastoni, e il dominio colorato in rosso magenta. A destra: Vista migliore della stessa subunità di MAGL<sup>37</sup>.

L'enzima si presenta in due principali stati conformazionali, una forma chiusa ed una forma aperta (autori hanno suggerito l'ipotesi che l'enzima naturalmente adotti una conformazione aperta in soluzione)<sup>37</sup>. Il cambiamento che si osserva nella forma aperta dell'enzima libero e in quella chiusa con il complesso, comporta un movimento rotazionale di circa  $180^\circ$  in senso antiorario dell'elica  $\alpha 4$  attorno al sito attivo. L'effetto di questo avvolgimento verso l'interno determina un accesso al sito attivo più ingombrato e comporta il blocco del composto all'interno della proteina. La piccola apertura localizzata nei pressi del sito attivo, che determina la fuoriuscita

del substrato idrolizzato, viene anch'essa completamente occlusa a seguito del riarrangiamento strutturale. Il passaggio fra le due conformazioni (aperta e chiusa) porta a dei cambiamenti nel potenziale elettrostatico del MAGL, che possono condurre al distacco della proteina stessa dalla membrana citoplasmatica durante il ciclo catalitico<sup>38</sup>. La tasca di legame del MAGL è localizzata fra le eliche  $\alpha 4$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha 7$  e  $\alpha 5$ . La triade catalitica, è costituita da residui Ser122-His269-Asp239 individuati inizialmente da studi di mutagenesi e successivamente dallo studio della struttura cristallina del MAGL. La struttura tridimensionale fornisce quindi la prima prova dell'identità di questa triade catalitica, in precedenza individuata sulla base di studi di mutagenesi, portando all'evidenza di come questi tre amminoacidi fossero essenziali per l'attività dell'enzima<sup>38</sup>. Inoltre è stata evidenziata la presenza di due residui di cisteina (C208 e C242), a breve distanza dal sito attivo ed entrambe queste cisteine possono essere coinvolte nei legami con gli inibitori<sup>37</sup>. (Fig. 16)

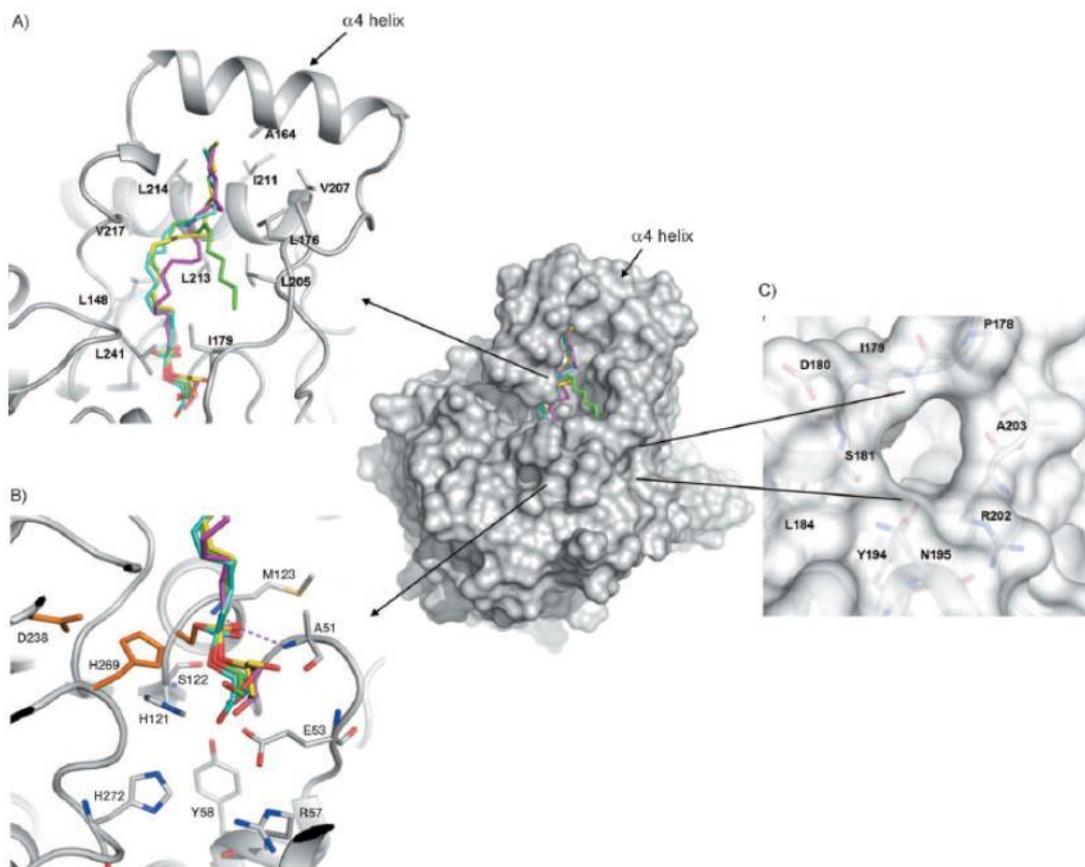
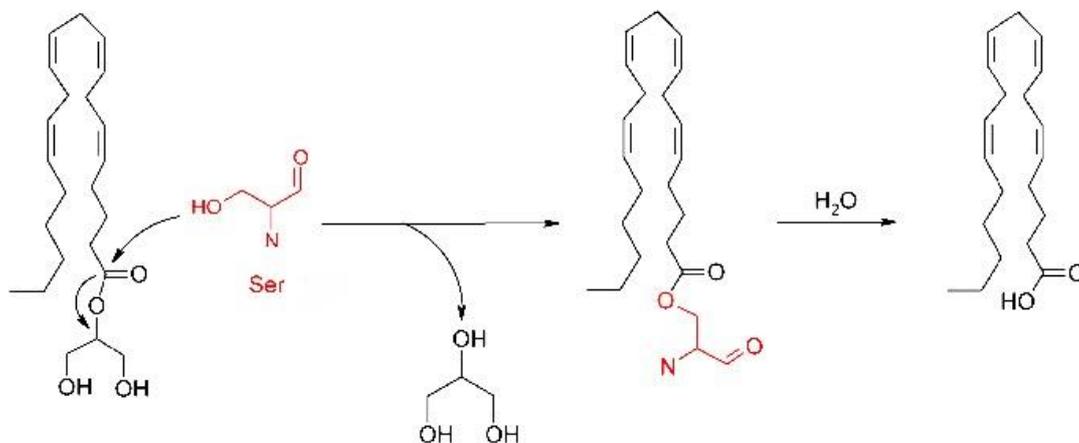


Fig.16 Aggancio del 2-AG nel sito attivo<sup>37</sup>.

## 2.2 MECCANISMO CATALITICO



*Fig.17 Meccanismo catalitico.*

La catalisi procede attraverso la formazione di un intermedio acil-enzima in cui è implicata la serina del sito attivo, seguita dalla saponificazione del prodotto indotta dall'acqua con rigenerazione del residuo libero di serina che può rientrare nel successivo ciclo catalitico<sup>39,40</sup>.

### 3. POTENZIALITÀ TERAPEUTICHE DELLE MAGL

La produzione di acido arachidonico (AA) e glicerolo che derivano dall'attività delle MAGL, possono direttamente o indirettamente, in processi patologici come l'infiammazione e la carcinogenesi. Infatti l'idrolisi del 2-AG per azione dell'enzima MAGL determina il rilascio dell' AA che è il principale precursore per la sintesi di eicosanoidi pro-infiammatori in specifici tessuti come il cervello, fegato e polmoni. Inoltre, nelle cellule tumorali aggressive, MAGL determina la produzione di acidi grassi liberi necessari per la produzione di lipidi pro-oncogeni. Entrambe le azioni evidenziano il potenziale terapeutico degli inibitori delle MAGL<sup>31</sup>.(Fig. 18)

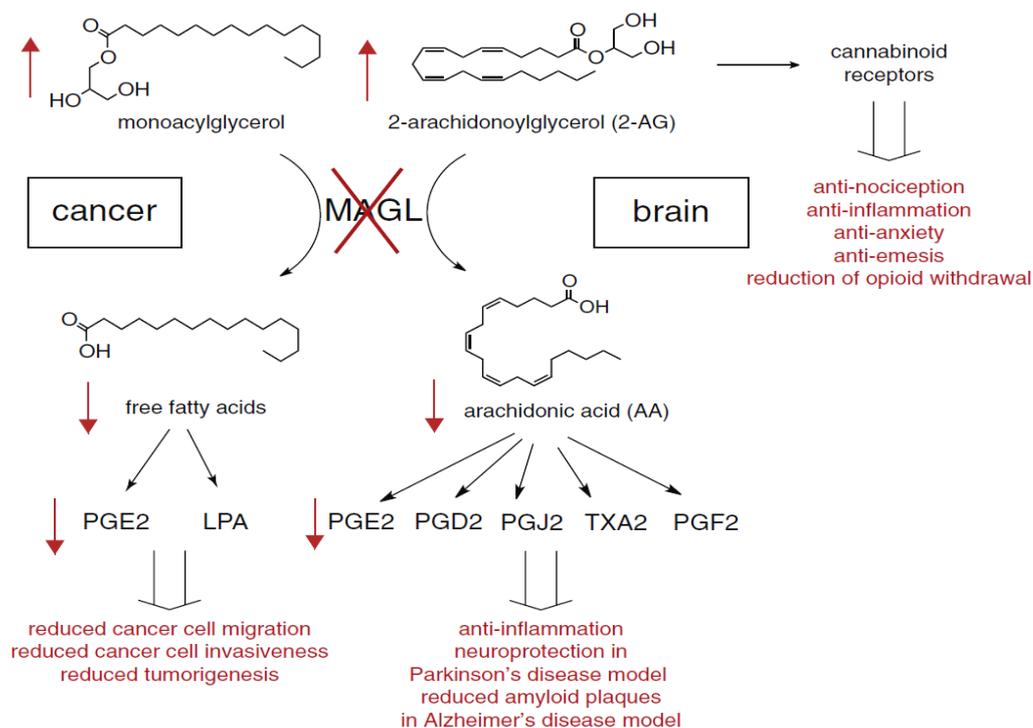


Fig.18 MAGL regola molteplici vie di segnalazione dei lipidi. Il blocco di MAGL porta ad un accumulo dell'endocannabinoide 2-AG che attiva i recettori CB1 e CB2. In alcuni tessuti, come il cervello, fegato e polmoni, MAGL controlla il pool dell'AA che è il precursore per la produzione di prostaglandine pro-infiammatorie. L'attività del MAGL gioca un ruolo distinto anche nel controllo degli acidi grassi liberi<sup>31</sup>.

### 3.1. IL RUOLO DI MAGL NEL DOLORE E NELL'INFIAMMAZIONE

L'uso di *CANNABIS SATIVA*, non solo a scopo ricreativo, ma anche per i suoi effetti terapeutici, è da tempo noto. È stato dimostrato che il blocco della trasmissione nocicettiva e la percezione del dolore è strettamente correlata all'attivazione dei recettori CB<sub>1</sub> che è accompagnata anche da effetti psicoattivi. Recentemente è stato riportato che gli inibitori delle FAAH, e gli inibitori della MAGL, producono una serie di effetti confrontabili a quelli degli agonisti dei recettori CB<sub>1</sub> tra cui l'analgesia in modelli animali di dolore acuto e cronico. Tuttavia, né gli inibitori delle FAAH e ne quelli delle MAGL producono effetti catalettici osservati direttamente dai recettori CB<sub>1</sub> agonisti. Questi risultati, indicano che il blocco di FAAH o di MAGL può conservare alcuni degli effetti benefici mediati dall'attivazione dei recettori CB<sub>1</sub>, senza avere quelli negativi. Gli inibitori degli enzimi metabolici degli endocannabinoidi producono effetti anti-nocicettivi e anti-infiammatori, attraverso una duplice azione: aumento dei livelli degli endocannabinoidi e la riduzione di AA.

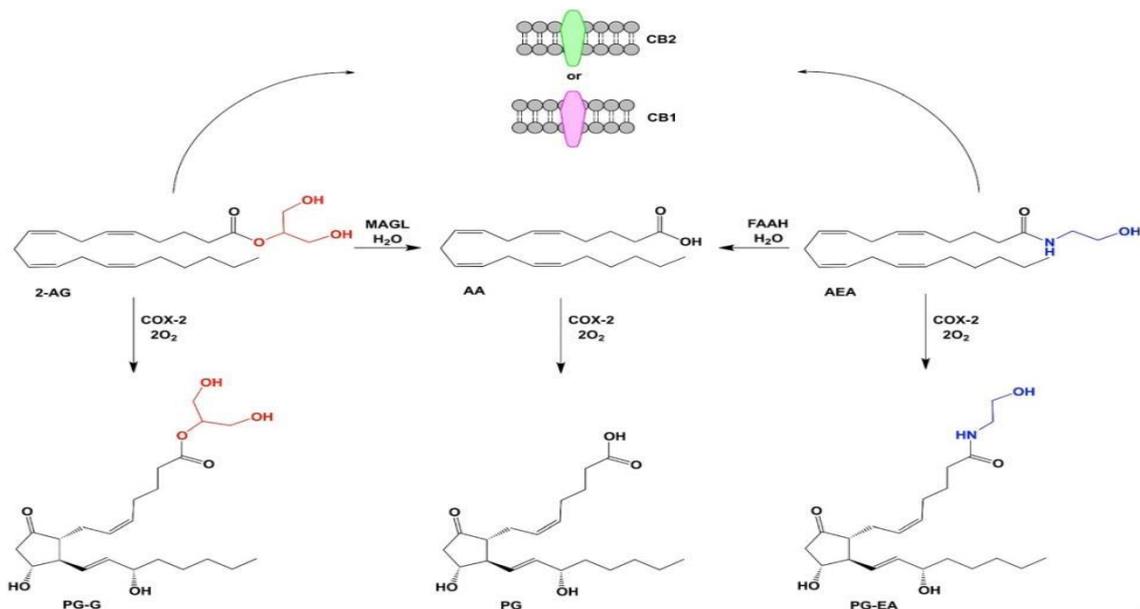


Fig. 19 Interconnessioni tra l'attività catalitica della COX-2 e MAGL / FAAH<sup>41</sup>.

L' AA, che è il substrato degli enzimi COX, risulta essere il precursore biosintetico di prostaglandine, trombossano, e prostaglandine, che mediano diversi effetti fisiologici e fisiopatologici, come il dolore, la febbre, l'infiammazione, l'emostasi, la funzione e il mantenimento dell'integrità della mucosa gastrica. Ci sono due isoforme di COX, la COX-1 e la COX-2; che hanno una omologia del 65% con siti catalici quasi identici: infatti, Ile523 della COX-1 è sostituita con una valina in COX-2. COX-1 è considerata l'iso-forma costitutivamente espressa nei tessuti dei mammiferi, mentre la COX-2 è l'iso-forma inducibile presente nei tessuti dei mammiferi a livelli molto bassi che aumentano a seguito di stimoli quali citochine e i fattori di crescita<sup>42</sup>. In tali condizioni la COX-2 ossida l'AA per generare prostaglandine pro-infiammatorie come PGE2 e PGD2 perciò l'effetto anti-infiammatorio dovuto agli inibitori delle MAGL è correlata quindi ad una ridotta produzione di queste prostaglandine. È possibile quindi affermare che gli effetti analgesici e anti infiammatori indotti dall'inibizione delle MAGL possono essere dipendenti da due meccanismi: il primo direttamente correlato ad un aumento dei livelli del 2-AG, e il secondo legato ad un abbassamento dei livelli dell'AA. Perciò le MAGL potrebbero rappresentare un link di legame tra il sistema endocannabinoide e il sistema ecosainoide. Gli inibitori delle MAGL hanno un effetto anti-infiammatorio confrontabile a quello dei fans, come l'aspirina o l'ibuprofene, che sono ampiamente usati nel trattamento del dolore, della febbre e dell'infiammazione e che agiscono attraverso il blocco delle cicloossigenasi riducendo in tal modo i livelli di prostaglandine e trombossani<sup>43,44</sup>.

Recentemente, sono stati esaminati inibitori selettivi delle MAGL come URB602, questo composto determina un aumento dei livelli di 2-AG senza alterare i livelli di AEA sia *in vitro* che *in vivo*. Studi *in vivo* hanno dimostrato che la somministrazione dell'URB602 ha effetto nella neuro-infiammazione ed ha anche effetto analgesico nei confronti del dolore neuropatico<sup>45</sup>. Tuttavia, se è utilizzato sistematicamente URB602 risulta essere meno selettivo e infatti inibisce anche FAAH. Un altro inibitore selettivo, il JZL184 ha mostrato effetti positivi in modelli di colite e nell'infiammazione cronica intestinale (IBD) legati all'aumento dei livelli di 2-AG. In

tutti i casi, la somministrazione prolungata di JZL184, induce tolleranza ed una perdita di efficacia<sup>44,46</sup>. Un altro inibitore selettivo attualmente disponibile è il KML29 che ha dimostrato di inibire selettivamente le MAGL anche a seguito della somministrazione di alte dosi o somministrazioni ripetute. Questo composto determina un' effetto analgesico senza produrre effetti cannabomimetici. (Fig. 20)

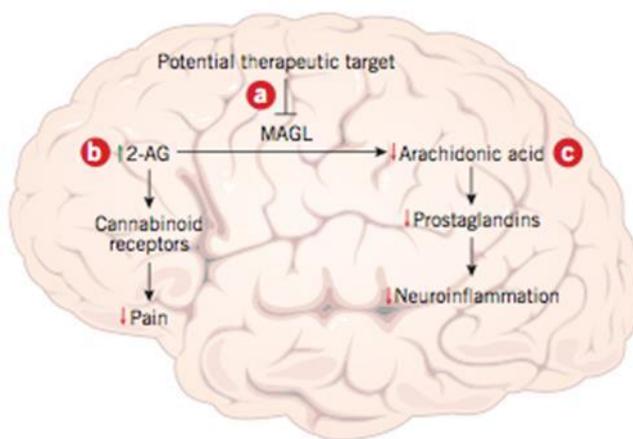


Fig.20 L'inibizione di MAGL a livello centrale provoca: (a) aumento dei livelli di 2-AG, (b) attivazione dei recettori CB<sub>1</sub>, provocando una diminuzione del dolore, (c) diminuzione della produzione di AA e conseguentemente delle prostaglandine riducendo i processi neuro-infiammatori<sup>47</sup>.

### 3.2. IL RUOLO DEL MAGL NELLE MALATTIE NEURODEGENERATIVE, ANSIA E DIPENDENZA

Al giorno d'oggi, è ben noto che l'infiammazione è una componente di diversi disturbi neurologici, tra cui il dolore cronico, traumi cerebrali, malattie neurodegenerative come il Parkinson, l'Alzheimer, la sclerosi multipla e l'ictus<sup>48</sup>. Nel sistema nervoso il processo infiammatorio è supportato dall'attività della COX (COX-1 e COX-2), localizzate in neuroni e in cellule gliali, che mediano la conversione dell'AA in prostaglandine. La fosfolipasi A2 (PLA2) e la fosfolipasi citosolica

(cPLA2) in particolare, sono le principali fonti di AA per la produzione di prostaglandine; tuttavia, si è osservato nei topi, che hanno una cPLA2 difettosa, che i livelli nel cervello di AA restano inalterati inoltre, l'inattivazione del MAGL, nei topi, ha evidenziato una forte diminuzione dei livelli di AA. Queste evidenze provano che ci sono diversi meccanismi che regolano la produzione di prostaglandine a livello centrale<sup>33,44</sup>. Inoltre, il 2-AG agisce come messaggero retrogrado nella regolazione o nella modulazione della trasmissione sinaptica, con proprietà antinfiammatorie e neuroprotettive, promuovendo la neurogenesi. Numerosi studi dimostrano che il MAGL è cruciale nel regolare l'attività degli endocannabinoidi e la produzione di prostaglandine al livello centrale; la sua inattivazione può sopprimere la neuro-infiammazione, impedire la neurodegenerazione e mantenere l'omeostasi delle funzioni cerebrali, migliorando la plasticità sinaptica a lungo termine, attraverso meccanismi recettoriali CB<sub>1</sub><sup>49</sup>. Un blocco genetico e farmacologico delle MAGL, mostra infatti un'attività anti-infiammatoria nel cervello ed ha effetti neuroprotettivi, nella malattia di Parkinson e nel morbo di Alzheimer. L'inattivazione di MAGL, non attraverso meccanismi dipendenti dai recettori CB<sub>1</sub> o CB<sub>2</sub>, sopprime l'induzione dei LPS (lipopolisaccaridi), che determina il rilascio di citochine pro-infiammatorie e l'attivazione della microglia e quindi tale inattivazione determina la riduzione di eicosanoidi neuroinfiammatori. In un modello di malattia di Parkinson, in cui le MAGL sono inibite dalla somministrazione di JZL184 si è evidenziata una riduzione della neurodegenerazione legata al sistema dopaminergico e alla soppressione degli eicosanoidi pro-infiammatori. Analogamente diversi studi, riguardanti la malattia dell'Alzheimer, hanno dimostrato la presenza di elevati livelli di endocannabinoidi e di eicosanoidi legati a tale malattia. È stato osservato che in un modello di topo a cui è stato indotto l'Alzheimer, l'inattivazione di MAGL riduce i livelli di eicosanoidi, riduce

L'attivazione microgliale, i livelli di TNF $\alpha$ , l'espressione di COX-2 e i livelli delle placche  $\beta$  amiloidi. Poiché il blocco cronico di MAGL porta ad una riduzione delle capacità funzionali del sistema endocannabinoide, l'attività anti-neuro-infiammatoria finale è dovuta esclusivamente al blocco della sintesi degli eicosanoidi<sup>50</sup>.

Nella sclerosi multipla, le proprietà anti-infiammatorie dei cannabinoidi sono associate ad una riduzione dell'attività microgliale a livello del midollo spinale. Nella sclerosi multipla le microglia insieme alle altre cellule immunitarie, invadono il sistema nervoso e sono responsabili del rilascio di citochine tossiche e dei radicali liberi, che rappresentano in grande parte il danno neurodegenerativo; questi effetti possono diminuire mediante l'azione degli endocannabinoidi, i quali inibendo l'infiammazione, esercitano un'azione neuro-protettiva indiretta. L'azione neuro-protettiva diretta degli endocannabinoidi, tuttavia, coinvolge i recettori CB<sub>1</sub> che limitano l'azione del glutammato e i danni eccitotossici in diverse malattie neurodegenerative, quale anche la sclerosi laterale amiotrofica, una malattia neuro-degenerativa grave che produce danni ai motoneuroni<sup>51</sup>.

La MAGL sembra avere inoltre un'applicazione nel trattamento dell'ansia. Il blocco delle MAGL previene lo stress cronico e la depressione legata alla trasmissione GABAergica, indicando che l'aumento del segnale endocannabinoide ha un'azione favorevole per contrastare lo stress cronico. In generale, gli inibitori MAGL sembrano essere promettenti nella riduzione dell'ansia<sup>52</sup>. Gli effetti indesiderati come l'ansia e la depressione, osservati a seguito dell'uso clinico di Rimonabant, antagonista selettivo dei recettori CB<sub>1</sub>, sottolineano il ruolo chiave svolto dal sistema endocannabinoide nella modulazione degli stati emotivi<sup>53</sup>. Inoltre, somministrando URB597, che è un inibitore delle FAAH e somministrando JZL184 che è un inibitore delle MAGL, sono

stati evidenziati effetti positivi in diversi modelli di animali aventi disturbi ansiogeni, depressivi e comportamenti compulsivi<sup>54</sup>. Dalla lettura è evidente che gli inibitori delle MAGL, non sono stati sperimentati in studi clinici, mentre alcuni inibitori delle FAAH, sono stati utilizzati in studi clinici e alcuni hanno raggiunto la fase 2 tra questi il AA-5-HT #, il PF-04457845, VI58866. I risultati ottenuti, non sono soddisfacenti, in quanto non hanno evidenziato gli effetti confrontabili a quelli ottenuti dai saggi in vitro.

### **3.2.1. PROBLEMI DI ABUSO DI DROGA**

È stato provato che il sistema endocannabinoide modula la dipendenza da droghe<sup>55</sup>. Si è osservato, mediante studi, che sia l'agonista del recettore cannabinoide  $\Delta^9$ -THC che il blocco del MAGL, riducono l'intensità dell'astinenza da morfina nel topo, in modo CB<sub>1</sub> dipendente. Il blocco del MAGL influenza la risposta recettoriale dei recettori dopaminergici D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub> agli agonisti. Gli inibitori di MAGL potrebbero quindi essere utili per modulare la dipendenza da oppiacei e THC<sup>56</sup>.

Nelle cavie, gli inibitori della FAAH o del MAGL, di per sé non producono la gamma di comportamenti associati all'uso del  $\Delta^9$ -THC. Si è osservato, nei test per la discriminazione delle droghe, che gli inibitori della FAAH o del MAGL non hanno gli stessi effetti del  $\Delta^9$ -THC<sup>57</sup>. Tuttavia, a seguito di ripetute somministrazioni, è stato evidenziato un effetto cannabimimetico nelle cavie<sup>58</sup>. Gli effetti dell'inibitore FAAH, il PF-04457845, sono stati studiati in volontari sani, per la valutazione delle variazioni delle funzioni cognitive associate all'aumento dei livelli di AEA nel plasma<sup>59</sup>. Nessun effetto simil cannabimimetico è stato osservato quando l'inibitore PF-04457845 è stato somministrato a

pazienti per un periodo di 2 settimane<sup>60</sup>. Inoltre, uno studio con trattamento sistematico con URB597 sui ratti, non ha evidenziato nessun aumento del desiderio di assumere etanolo volontariamente. Altro esempio è dato dall'effetto, che si è manifestato nei ratti, determinato dalla somministrazione di URB597, nei quali si è ridotto il desiderio di ricerca della nicotina e nei quali si è ridotto il comportamento ansiogeno, dopo 34 ore dalla sospensione della nicotina<sup>61,62</sup>. Possiamo affermare che gli inibitori possono essere utilizzati per attenuare gli effetti comportamentali dell'abuso di sostanze e in alternativa possono essere utilizzati per attenuare i sintomi osservati nel momento in cui la somministrazione di tali sostanze venga sospesa.

### **3.2.2. SVILUPPO DELLA TOLLERANZA**

Le molecole che attivano i recettori cannabinoidi CB<sub>2</sub> potrebbero mostrare tolleranza dopo somministrazioni ripetute. Questo non sembra essere un problema per gli inibitori della FAAH, che sono stati somministrati più volte in cavie da laboratorio, senza evidenziare la perdita degli effetti biologici (come ad esempio una riduzione di allodinia meccanica nei topi con problemi nervosi). Tuttavia, JZL184, ad una dose di 40 mg/kg, produce rapidamente tolleranza nei topi. Questo sembra non legato a una perdita di inibizione di MAGL, poiché i livelli di 2-AG rimangono elevati, ma è piuttosto causato da una down-regulation dei recettori CB<sub>1</sub> nel cervello<sup>63</sup>. La tolleranza nei topi è stata osservata anche dopo somministrazioni ripetute di un altro inibitore irreversibile MAGL, il KML29, con una dose di 40 mg/kg per 6 giorni<sup>64</sup>. Dosi però superiori possono causare una completa e prolungata inibizione del MAGL producendo una tolleranza. E' possibile che gli inibitori reversibili MAGL possano aggirare questo problema evitando alti e prolungati livelli

di inibizione dell'enzima osservati con gli inibitori irreversibili, tuttavia i dati al riguardo di ciò non sono ancora disponibili.

### **3.3.MAGL E METABOLISMO LIPIDICO**

Il metabolismo lipidico è un processo altamente regolato, il cui scopo è il mantenimento dell' equilibrio tra la richiesta e la domanda degli acidi grassi. Essi vengono immagazzinati negli adipociti come triacilgliceroli sotto forma di gocce lipidiche, idrolizzati e immessi nel circolo sanguigno<sup>65</sup>. La funzione degli acidi grassi è quella di essere utilizzati come substrati per produrre energia e per sintetizzare molecole lipidiche, le quali possono rappresentare lipidi di membrana e molecole segnale. La loro importanza è evidenziata dal fatto che tutti gli organismi, a partire da carboidrati o metaboliti proteici, sono in grado di produrne *ex novo*. Un eccesso nella produzione di acidi grassi risulta essere molto pericolosa, in quanto può portare ad un'alterazione nell'omeostasi acido-base delle cellule, alla distruzione dell'integrità delle membrane e alla formazione di lipidi bioattivi dannosi. Nel complesso, questi effetti negativi sono definiti come lipotossicità e possono portare a stress del reticolo endoplasmatico, disfunzioni mitocondriali, infiammazione e morte cellulare. Le cellule mantengono l'omeostasi in quanto sono in grado, attraverso esterificazione con glicerolo, di "detossificare" gli acidi grassi liberi, portando alla formazione di trigliceridi che possono essere immagazzinati nel tessuto adiposo, specializzato a questo scopo. MAGL gioca un ruolo nel processo catabolico degli acidi grassi. L'idrolisi di triacilgliceroli in acidi grassi e glicerolo richiede tre passaggi con la rispettiva azione di tre enzimi principali: ATGL (triacilglicerol lipasi del tessuto adiposo) catalizza lo step iniziale della lipolisi, convertendo i triacilgliceroli in diacilgliceroli; HSL (lipasi ormone sensibile) è

responsabile principalmente dell'idrolisi dei diacilgliceroli in monoacilgliceroli; infine MAGL si occupa di idrolizzare i monoacilgliceroli in glicerolo ed acidi grassi.

### **3.3.1. RUOLO DEL MAGL NEL CANCRO**

Le cellule tumorali derivano dalla trasformazione delle cellule normali, attraverso diverse modifiche, che riguardano le vie metaboliche, come la regolazione della glicolisi, le reazioni anaplerotiche glutammino dipendenti e la produzione di lipidi. Ad oggi, anche se è ben chiaro che un metabolismo sregolato sia una caratteristica fondamentale del cancro, non è altrettanto chiaro come avvengono i cambiamenti biochimici e se sono cruciali nella progressione della malattia. Tra le vie metaboliche sregolate correlate a malignità tumorale, l'esempio più rappresentativo e documentato è lo spostamento dal metabolismo ossidativo del glucosio alla glicolisi diretta dall'acido lattico. Oltre a questo, anche le cellule tumorali richiedono processi anabolici per aumentare la sintesi di proteine, acidi grassi e lipidi. Le cellule tumorali adattano il loro metabolismo attraverso lo sviluppo di un fenotipo lipogenico, caratterizzato da sintesi *ex novo* di acidi grassi, che è strettamente correlato con l'elevata espressione del MAGL. Queste caratteristiche delle cellule cancerose favoriscono la crescita tumorale in modelli animali e sono correlate a una prognosi infausta in vari tipi di tumori umano<sup>65</sup>. L'aumento della lipogenesi sembra contribuire alla crescita tumorale, attraverso più meccanismi come la generazione di substrati energetici e la costruzione dei precursori di membrane cellulari o di lipidi oncogenici. Gli acidi grassi sintetizzati sono rapidamente incorporati nelle riserve lipidiche cellulari; si pensa che le cellule cancerose possano possedere una via lipolitica complementare atta a sfruttare la struttura acilica di

queste riserve per generare molecole segnale. Pertanto, è stato dimostrato che livelli elevati di FAS, che è l'enzima che catalizza la biosintesi degli acidi grassi da acetato e da malonil CoA, sono collegati alla prognosi infausta di pazienti con cancro al seno. L'inibizione della FAS porta ad una ridotta proliferazione cellulare, ad una perdita di vitalità cellulare e ad una ridotta crescita tumorale *in vivo*. FAS può promuovere la crescita del cancro fornendo substrati metabolici per la produzione di energia, tramite ossidazione degli acidi grassi<sup>66</sup>. Inoltre, ci sono altre caratteristiche della biochimica dei lipidi che sono indispensabili per la neoplasia delle cellule tumorali, compresa anche la produzione, di membrane di nuova sintesi, attraverso la combinazione di componenti di partenza “building block” per favorire alti tassi di proliferazione; la composizione e regolazione delle strutture di membrane che coordinano la trasduzione dei segnali (cioè la conversione di un segnale da fuori della cellula ad una variazione funzionale all'interno della cellula) e la loro motilità; la biosintesi di un gruppo di molecole di segnalazione cancerogeni. Alcuni esempi di messaggeri lipidici coinvolti nel cancro, sono il fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato [PI (3,4,5) P3], che attiva la proteina chinasi B/Akt per promuovere la proliferazione e la sopravvivenza cellulare; l'acido lisofosfatidico (LPA), stimola l'aggressività del cancro attraverso una famiglia di recettori accoppiati a proteine G; e le prostaglandine formate dalla ciclossigenasi, facilitano le interazioni e la migrazione del tumore ospite<sup>66</sup>. Questa evidenza, correla il MAGL alla sua azione nella crescita del cancro. Nomura e altri. (2010) hanno notato, attraverso un approccio proteomico, che la MAGL risulta altamente espressa in linee cellulari aggressive, occupandosi della massiccia deplezione di monoacilgliceroli per incrementare il livelli di acidi grassi liberi e glicerolo nelle cellule aggressive. Questo è un processo fondamentale, per la generazione di precursori, per la sintesi dei lipidi e delle membrane lipidiche o nella segnalazione dei mediatori.

Inizialmente il ruolo regolatorio del MAGL nella lipolisi non era stato considerato per l'azione limitante dell'enzima HSL lipasi ormone sensibile; gli adipociti dei topi carenti di HSL accumulavano DAG in diversi tessuti indicando che HSL aveva un limite per l'idrolisi di DAG<sup>67</sup>. Solo di recente è stato riportato che un'alterazione del percorso lipolitico nei tumori umani coinvolge il MAGL, che è altamente espresso in cellule umane tumorali aggressive e nei tumori primari. Diversi studi hanno dimostrato, per mezzo dell'inibizione farmacologica o genetica, che MAGL è anche legata all'elevata proliferazione all'invasività nella crescita tumorale in vivo. Ad esempio, MAGL è sovraespresso nel carcinoma del colon, ed i suoi livelli sono correlati all'indice di massa corporea, che è un fattore prognostico negativo nel colon e in altri tipi di cancro. Inoltre, è anche sovraespresso in cellule tumorali della prostata androgeno-indipendente. La crescita tumorale è promossa da parte di MAGL a causa di un aumento degli acidi grassi liberi, in particolare di C16: 0 e di C18: 1. La maggiore parte degli acidi grassi liberi sono convertiti in mediatori lipidici oncogenici attraverso numerosi enzimi, come l'aciltransferasi e la ciclossigenasi, che fanno parte di una rete cancerogena, insieme a MAGL. Questo è un'ulteriore ragione per focalizzare la ricerca sull'azione sinergica sia sul MAGL che su COX.

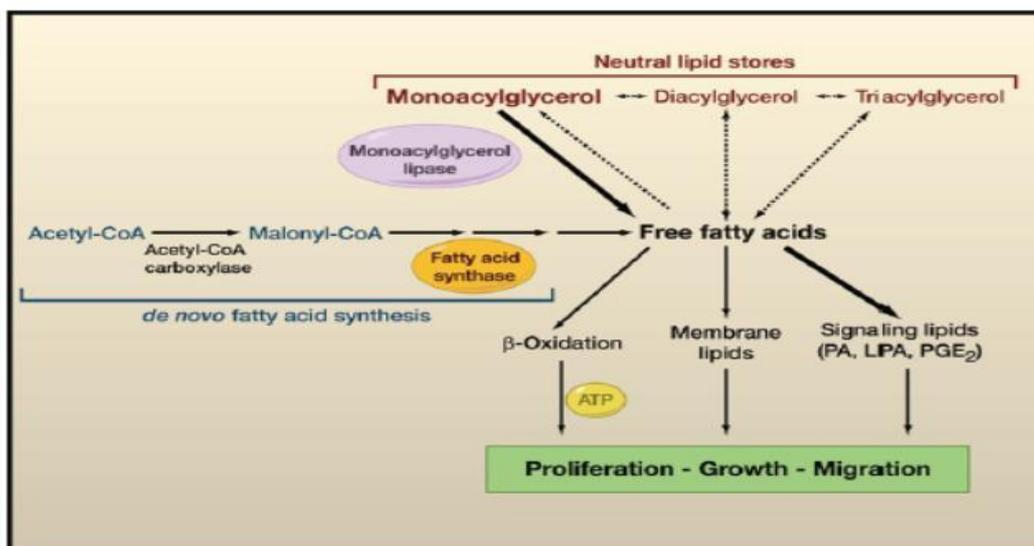


Fig. 21 Vie metaboliche della produzione di acidi grassi liberi <sup>68</sup>

Per comprendere il ruolo centrale del MAGL nel controllo degli acidi grassi liberi, il trattamento con C75, inibitore del FAS, non ha ridotto i livelli di FFA nelle cellule tumorali, ma ha suggerito la stretta relazione tra FFA e MAGL. Diversi studi hanno dimostrato, che le cellule tumorali aggressive acquisiscono la capacità di liberare FFA immagazzinati in lipidi neutri, come conseguenza di un aumento dell'espressione di MAGL. MAGL e i suoi prodotti FFA sono risultati essere sovraespressi in cellule cancerogene aggressive umane in più tessuti di origine; ulteriori prove a sostegno di questa premessa nascono da studi nella proliferazione dell'espressione genica, che hanno individuato un aumento dei livelli di MAGL nei tumori primari della mammella umana rispetto ai tumori meno maligni del seno midollare. Non può essere escluso un ruolo determinante, legato all'aumento del tono degli endocannabinoidi sugli effetti antitumorali per inibizione delle MAGL; infatti molte sono le prove farmacologiche sulle proprietà antitumorali degli agonisti dei recettori cannabinoidi agonisti. Ad esempio, nel cancro della prostata, gli effetti antitumorali per inibizione di MAGL erano totalmente annullati per azione dell'antagonista del recettore CB<sub>1</sub> SR141716. Questo risultato

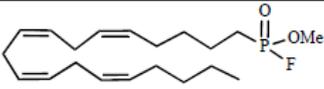
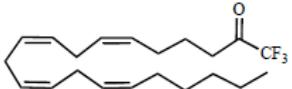
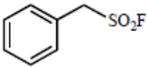
indica che un incremento degli endocannabinoidi e una diminuzione nel fornire acidi grassi liberi per idrolisi enzimatica del MAGL contribuisce agli effetti antitumorali osservati.

Dato che gli agonisti cannabinoidi mostrano un ampio spettro di proprietà palliative nel cancro, il blocco di MAGL potrebbe essere una strategia interessante per attenuare i sintomi scatenati da parte del cancro. È stato dimostrato che l'inibizione del MAGL con conseguente aumento del 2-AG riduce la nausea, il vomito, l'iperalgia e il dolore dato dal cancro osseo in un modello di topi. Tuttavia, l'aumento a lungo termine dei livelli di 2-AG nel sistema nervoso, indotto da JZL184 e dal blocco di MAGL causano una down-regulation dei recettori CB<sub>1</sub> e una tolleranza verso gli agonisti cannabinoidi e gli inibitori MAGL stessi. Oltretutto, nei tumori del cervello, come i gliomi, in cui un incremento del tono endocannabinoide ha effetti protettivi e pro-proliferativi, l'inibizione di MAGL può essere dannosa così come in neoplasie ematologiche, perché le cellule emopoietiche e le cellule progenitrici migrano in risposta al 2-AG<sup>68,69,70</sup>.

## 4. INIBITORI DEL MAGL

### 4.1. GENERALI INIBITORI DELLA SERINA IDROLASI

Solo recentemente sono stati studiati inibitori selettivi in grado di bloccare l'attività di MAGL. Quest'ultimo è sensibile agli inibitori della serina idrolasi come il MAFP, ATFMK, HDSF E PMSF (Tab. 1). Tuttavia, questi composti inibiscono anche la FAAH e quindi non sono appropriati per distinguere le funzioni di questi due enzimi; è stato quindi necessario concentrare l'attenzione sulla ricerca di specifiche caratteristiche strutturali per determinare in modo selettivo una maggiore inibizione nei confronti di MAGL rispetto a FAAH<sup>71</sup>.

Compound	Structure	IC <sub>50</sub> MAGL (μM)	IC <sub>50</sub> FAAH (μM)
MAFP		0.0022 ± 0.0003 <sup>a</sup> ; 0.8 ± 0.05 <sup>b</sup> ; 0.10 ± 0.02 <sup>c</sup>	0.0025 <sup>e</sup>
ATFMK		2.5 ± 0.04 <sup>b</sup> ; 66 ± 9 <sup>d</sup>	1.9 <sup>e</sup>
HDSF	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>15</sub> -SO <sub>2</sub> F	0.241 ± 0.017 <sup>a</sup> ; 6.2 ± 0.1 <sup>b</sup>	0.0102 <sup>f</sup>
PMSF		155 ± 7 <sup>a</sup>	0.9 <sup>e</sup>

Values from references <sup>a</sup>[43], <sup>b</sup>[74], <sup>c</sup>[77], <sup>d</sup>[118], and <sup>e</sup>[34]. <sup>f</sup>75% inhibition at 1 mM, reference [75].

Tab.1 Generali inibitori non selettivi della serina idrolasi<sup>71</sup>.

Ulteriori studi hanno dimostrato che MAGL, diversamente dalle altre serina idrolasi, è inibita anche da composti quali l'acido para cloro mercurio benzoico, il cloruro mercurico e la N-etilmaleimide (NEM), che hanno la capacità di dare legami con i gruppi sulfidrilici dimostrando quindi la presenza di un residuo di cisteina nel sito di legame.

Tutti i composti in grado di inibire MAGL si differenziano in base al tipo di interazione con l'enzima che può essere reversibile o non reversibile.

Inibitori MAGL comprendono strutture diverse di seguito elencati <sup>71,72</sup>.

## 4.2. INIBITORI STRUTTURALMENTE SIMILI AL SUBSTRATO ENDOGENO

### 4.2.1. ANALOGHI DEL 2-AG

Nella struttura del 2-AG possiamo individuare tre regioni suscettibili a modifiche strutturali: la catena degli acidi grassi e glicerolo, e i linker di legame.

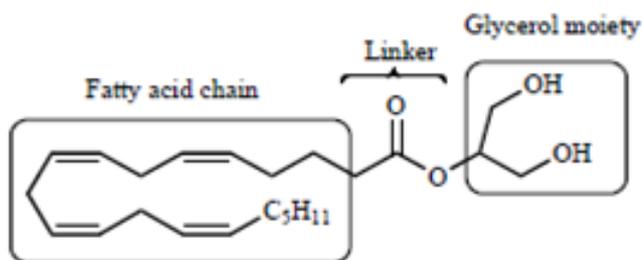


Fig.22 Punti delle modifiche strutturali in 2-AG<sup>71</sup>.

Diversi studi hanno dimostrato che analoghi del 2-AG hanno la capacità di inibire l'attività di MAGL citosolico ed inoltre anche l'isomero del 1-AG può essere ugualmente affine all'enzima in una serie di strutture analoghe al 2-AG (Tab. 2)<sup>33,71</sup>. Dati sperimentali dimostrano che anche l'isomero 1-AG ha la capacità di legarsi alle MAGL con un  $IC_{50}$  confrontabile al substrato endogeno (Tab. 2).

Compound	Structure	IC <sub>50</sub> (μM) MAGL <sup>a</sup>	IC <sub>50</sub> (μM) FAAH <sup>b</sup>
2-AG		13	37% <sup>b</sup>
1-AG		17	42% <sup>b</sup>
2-OG	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7$ esterified to glycerol at the 2-position.	15	2.5
2-LG	Two linoleic acid chains esterified to glycerol at the 2-position.	12	22
O2204		14 <sup>a</sup>	35
Arachidonoylserinol		73	78
Noladin ether		36	3
O1502		39% <sup>b</sup>	19
CAY10402		14% <sup>b</sup>	10
VDM11		20	2.6

Tab.2 Inibizione di FAAH e MAGL da parte di strutture analoghe al 2-AG<sup>71</sup>.

Tra i primi derivati ispirati alla struttura del 2-AG, si distinguono per la loro attività il N-arachidonoil maleimmide (NAM), che è un inibitore irreversibile del MAGL che ha dimostrato di ridurre a livello delle membrane cerebrali di ratto l'attività delle MAGL del ~90% e di aumentare gli effetti legati alla somministrazione esogena di 2-AG.

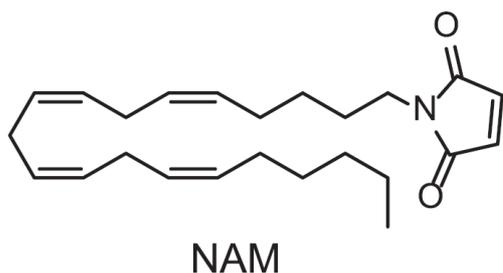


Fig.23 NAM<sup>72</sup>.

Questo composto presenta un  $IC_{50}$  di  $0.14 \mu M$ <sup>73</sup>; studi effettuati allo scopo di chiarire il suo meccanismo di inibizione enzimatico, hanno dimostrato che il doppio legame olefinico presente a livello del gruppo maleimidico è altamente suscettibile all'attacco nucleofilo, da parte di nuclei sulfidrilici. Il meccanismo di interazione è stato indicato come un'addizione di Michael al doppio legame, dimostrato dal fatto che il corrispondente analogo saturo è incapace di comportarsi come accettore di Michael, avendo un'attività inibitoria notevolmente inferiore. Il NAM inibisce l'attività dell'enzima in maniera irreversibile, indicando così un'interazione di tipo covalente. L'attività del MAGL, in particolare, non viene completamente abolita, in quanto tale composto si lega ad una cisteina localizzata vicino alla triade catalitica e non ai residui della triade catalitica stessa. Questo indica che l'inibizione del MAGL ad opera di NAM e più in generale delle maleimidi studiate, è dovuta ad un ingombro sterico e non ad un cambiamento di conformazione dell'enzima. Altri derivati maleimidici, sono stati studiati prendendo in considerazione la struttura del NAM. I composti più promettenti sono l'1-bifenil-4-metilmaleimide, che presenta uno spaziatore metilenico fra l'anello maleimidico e la porzione bifenilica e l'1,4-bis-(maleimido)xylene, che ha una struttura bis-maleimidica. Entrambi questi composti hanno un  $IC_{50}$  nel basso micromolare<sup>74</sup>.

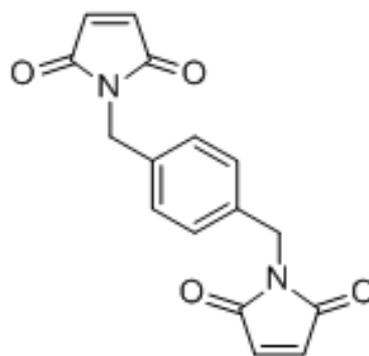
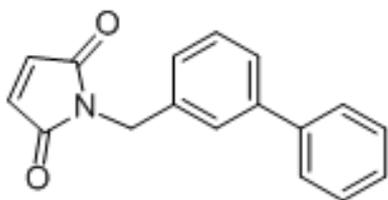


Fig 22. Strutture del 1-bifenil-4-metilmaleimide (sinistra) e 1,4-bis(maleimido)xilene (destra).

Il Disulfiram, noto inibitore dell'aldeide deidrogenasi usato per il trattamento dell'alcolismo, è in grado di inibire MAGL umano con affinità micromolare, avendo sempre come target le cisteine 208 e 242. Sono stati sviluppati recentemente inibitori basati su questa struttura<sup>75</sup>.

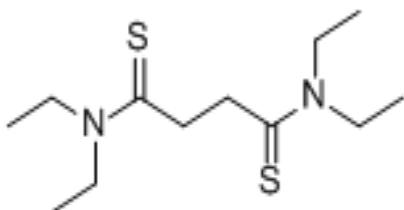


Fig23. Disulfiram

Nel tentativo di caratterizzare ulteriormente il ruolo dei residui di cisteina del MAGL è stata identificata una nuova famiglia di potenti inibitori enzimatici a struttura isotiazolinonica. Fra queste molecole, il 2-octil-4-isotiazolin-3-one è quello che mostra il profilo più interessante in quanto è in grado di legarsi covalentemente alla Cys208, inibendo MAGL in vitro con un IC<sub>50</sub> pari a 88 nM<sup>76</sup>.

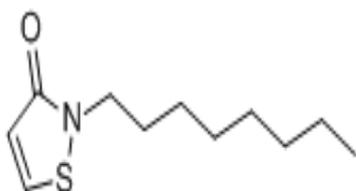
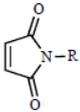
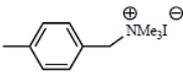
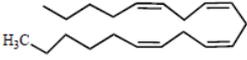
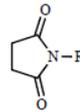
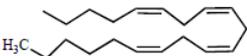


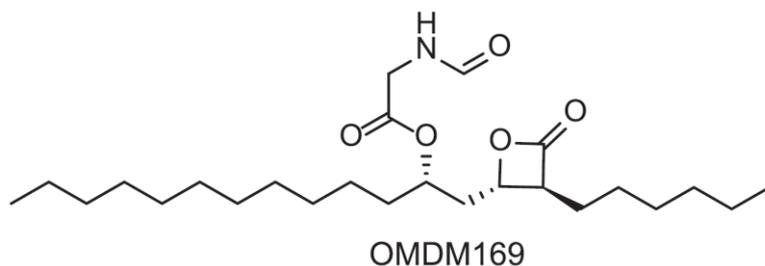
Fig24. 2-octil-isotiazol-3-one

	
R	IC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>
H	70 ± 6
Et	53 ± 7
Pr	53 ± 6
c-Hex	51 ± 6
Ph	44 ± 6
OH	413 ± 23
	68 ± 7
	9.2 ± 0.8
	0.140 ± 0.005
	
R	IC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>
H	b
	c

<sup>a</sup>Data from reference [71]. No inhibition at <sup>b</sup>10 mM or <sup>c</sup>1 mM.

Tab.3 Derivati della maleimide.

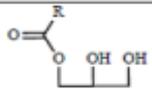
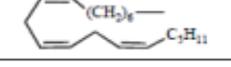
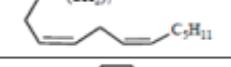
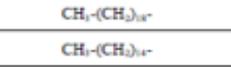
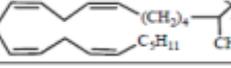
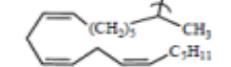
Infine il derivato tetrahydrolipstatin OMDM169, inibisce MAGL con selettività 10 volte superiore rispetto al FAAH. È stato dimostrato che la somministrazione sistemica di OMDM169 nei topi, ha un effetto nocicettivo nei topi soggetti al test con formalina, senza determinare un aumento dei livelli di 2-AG a livello centrale<sup>71</sup>.



*Fig.25 OMDM169<sup>71</sup>.*

#### 4.2.2. ANALOGHI DEL 1-AG

Un gruppo di analoghi del 1-AG sono stati studiati come inibitori di MAGL, per la loro stabilità in soluzioni biologiche e perché è stata dimostrata che l'1-AG ha una potenza simile nel legarsi con MAGL rispetto al 2-AG ( $IC_{50}$  (1-AG) = 17  $\mu$ M e  $IC_{50}$  (2-AG) = 13  $\mu$ M). I derivati differiscono per la lunghezza della catena (14-22 atomi di carbonio) e per il numero di insaturazioni (0-5) delle catene degli acidi grassi (Tabella 3). I risultati indicano che per MAGL citosolico, il numero di insaturazioni non influenza significativamente l'interazione con i valori di  $IC_{50}$  che sono compresi tra 4,5 e 21  $\mu$ M; inoltre, per i composti completamente saturi come il glicerolo 1-palmitoil (C16) e il 1-miristoil glicerolo (C-14) non vi è un decadimento di inibizione nei confronti del MAGL<sup>77</sup>.(Tab. 4)

			
Compd	R	IC <sub>50</sub> (μM) MAGL*	IC <sub>50</sub> (μM) FAAH*
1-AG		7.1; 17 <sup>b</sup>	6.2; 42% <sup>b,c</sup>
O3832		8.2	7.6
O3872		4.5	14
O3846		7.5	23
O3907		5.1	5.7
O3908		21	11
O4066		19	10
l-arachidinylglycerol	CH <sub>1</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>18</sub> -	19±5 <sup>d</sup>	10±3 <sup>d</sup>
l-palmitinylglycerol	CH <sub>1</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> -	12	8.0
l-myristinylglycerol	CH <sub>1</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>12</sub> -	32	18
O1428		15	28±3 <sup>d</sup>
O4081		5.8	5.1
O3973		4.2	2.4

Data from reference [180] and [75]. \*Percentage of inhibition at 100 μM.

Tab.4 Inibitori di FAAH e MAGL analoghi di 1-AG<sup>71</sup>.

### 4.3. INIBITORI DI SINTESI DE NOVO

Sono essenzialmente composti che presentano una funzione carbammica.

#### 4.3.1. INIBITORI CARBAMMICI

URB602 ([1,10-biphenyl]-3-yl-carbamic acid, cyclohexyl ester) è un inibitore con una potenza relativamente bassa, che ha dimostrato un'azione selettiva verso MAGL, ma non un'azione competitiva verso le stesse, infatti non influenza le attività delle lipasi e della COX-2. Questo composto ha mostrato di indurre un aumento dell'effetto

analgesico a livello centrale e di attenuare la nocicezione del dolore acuto, infiammatorio e neuropatico nei modelli di roditori<sup>71,78</sup>.

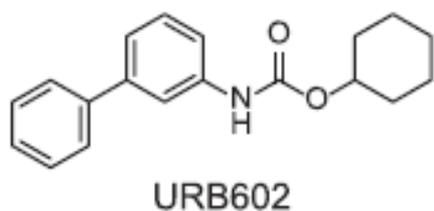


Fig.26 Il composto carbammato URB602<sup>72</sup>.

Nel 2011, è stata riportata la struttura cristallina di MAGL, legato all'URB602, dimostrando che tale inibitore si lega all'enzima attraverso la porzione carbammica.

Recentemente sono stati sviluppati due inibitori selettivi per MAGL attivi *in vivo*, il derivato carbammico JZL184 e Ly 2183240 (IC<sub>50</sub> pari a 20 nM); entrambi mancano però di selettività<sup>79</sup>.

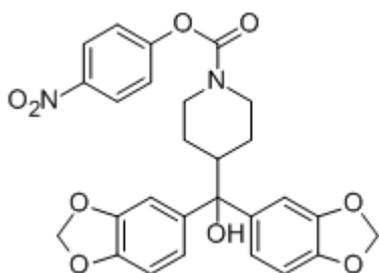


Fig27. JZL184<sup>72</sup>

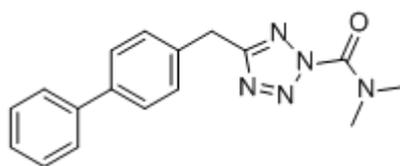


Fig.28. Ly 2183240

Il composto JZL184 è una piperidina carbammato che inibisce MAGL attraverso una carbamilazione irreversibile legandosi all'enzima catalitico della serina; questo composto ha una selettività verso MAGL 100 volte maggiore rispetto a FAAH. MAGL bloccato da JZL184, riduce l'85% del 2-AG tramite idrolisi, nelle membrane cerebellari di topo; una singola iniezione di JZL184 può inibire MAGL nel cervello del topo per 24 ore, senza alterare i livelli di AEA. Tuttavia è stato dimostrato, a livello cerebrale, che JZL184, quando viene somministrato a dosi

elevate o ripetute possiede una parziale attività inibitoria nei confronti di FAAH, causando un modesto miglioramento dei livelli di AEA a livello periferico; JZL184 può inibire, come altri derivati del carbammato, ulteriori enzimi del sistema endocannabinoide.

Da quanto sopra riportato si può notare che esistono numerosi e potenti inibitori che agiscono con un meccanismo di tipo irreversibile, legandosi covalentemente all'enzima. Possiamo affermare che l'inibizione irreversibile non è però auspicabile nella prospettiva di un'applicazione terapeutica; fra gli effetti clinici indesiderati ricordiamo l'insorgenza di dipendenza e tolleranza agli agonisti dei recettori CB<sub>1</sub> e la compromissione della plasticità delle sinapsi del sistema endocannabinoide, a seguito di somministrazioni ripetute di inibitori irreversibili nelle cavie.

Sono stati presi in considerazione solo pochi inibitori reversibili e solo uno di essi è stato cristallizzato con l'enzima, in modo da fornirci la conformazione bioattiva. Il composto in questione (la cui struttura è mostrata in Fig.29), interagisce con l'enzima attraverso legami a idrogeno, senza interazioni di tipo covalente. Esso si inserisce nella tasca di legame, localizzata tra le eliche  $\alpha_4$ ,  $\alpha_6$ ,  $\alpha_7$  e  $\alpha_5$ . Anche se la superficie di composto, accessibile al solvente, è piuttosto vasta, esso è circondato quasi totalmente dalla proteina grazie alla presenza del "dominio coperchio", che regola l'accesso al sito di legame, in base allo stato di legame della proteina con la membrana. Il carbonile ammidico punta nella cavità dell'ossanione del recettore e forma un legame a idrogeno con la metionina 123 e l'alanina 51. La cavità dell'ossanione comprende un ripiegamento nucleofilo contenente la serina 122 e serve a stabilizzare lo stato di transizione anionico della reazione catalitica. La parte azetidina-piperazina-pirimidinica del ligando, si posiziona in un sito stretto ed anfifilico e occupa completamente lo spazio disponibile. Questa porzione del ligando non forma legami a idrogeno con la proteina, ma uno dei due azoti pirimidinici forma un ponte a idrogeno, mediato da due molecole d'acqua, con la catena laterale dei residui Glu53, Arg57 e His272. Una ulteriore interazione di tipo  $\pi$ -stacking avviene tra l'anello pirimidinico e la tirosina 194. La porzione

benzossazolica del ligando è collocata in una tasca idrofobica costituita prevalentemente da catene laterali di residui alifatici, mentre la porzione cicloesamica è proiettata in una cavità più spaziosa. Queste due porzioni del ligando sono le uniche accessibili al solvente nello stato legato dell'enzima<sup>38</sup>.

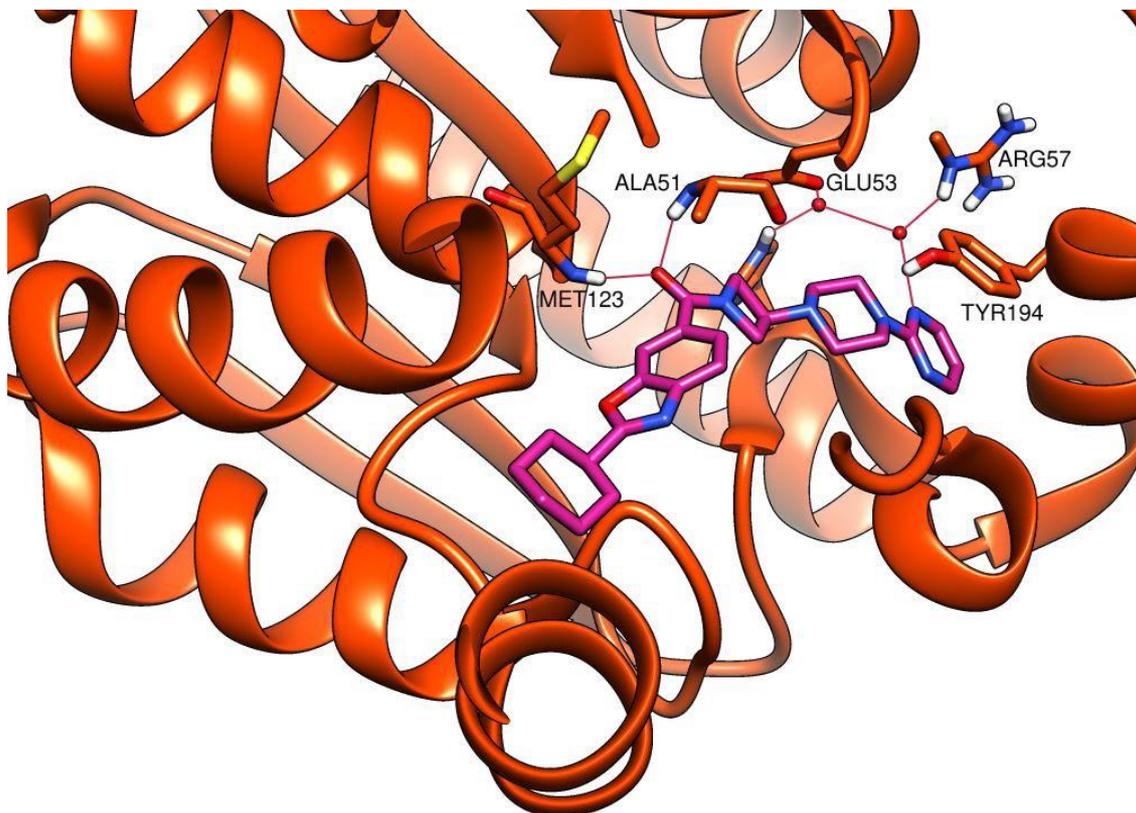


Fig.29 Complesso cristallizzato con l'inibitore reversibile e interazioni (PDB code 3PE6).

Studiando i derivati di JZL184 è stato osservato come la porzione carbammica sia un residuo fondamentale per la progettazione di nuovi inibitori potenti e selettivi<sup>72,80</sup>.

Un derivato che ha mostrato una migliore selettività nei confronti delle FAAH, è l'analogo O-Hexafluorisopropyl Carbamates di JZL184 il KML29, che conserva la stessa potenza verso il MAGL, ma migliora la selettività nei confronti degli enzimi FAAH sia *in vitro* che *in vivo*. Dosi ripetute di KML29, che presenta nella sua struttura gruppi trifluoro metilici, hanno dimostrato di non inibire le FAAH in maniera selettiva, nei topi a livello cerebrale (Tab. 5). Nei ratti, KML29 inibisce

MAGL del 90% ed aumenta di dieci volte i livelli cerebrali di 2-AG, senza determinare un cambiamento dei livelli di AEA<sup>81</sup>.

Inhibitor IC50 (nM)		
	JZL184	KML29
<b>Mouse</b>		
MAGL	10 <sup>a</sup>	15 (11–21)
FAAH	4,690 <sup>a</sup>	>50,000
ABHD6	3,270 <sup>a</sup>	4,870 (4,120–5,760)
<b>Rat</b>		
MAGL	262 (188–363)	43 (36–52)
FAAH	3,570(2,540-5,020)	>50,000
ABHD6	2,940 (1,441–6,010)	1,600 (1,260–2,040)
<b>Human</b>		
MAGL	3.9 (1.8–8.1)	5.9 (4.0–9.9)
FAAH	>50,000	>50,000

*Tab.5 Valori di JZL184 e di KML29 nei confronti di topo, ratto e umani<sup>81</sup>.*

Questo composto, rappresenta un inibitore versatile per indagare le funzioni di MAGL in modelli cellulari di roditori e umani, sia a seguito di una somministrazione di un'alta dose che a seguito di dosi ripetute <sup>72,81</sup>.

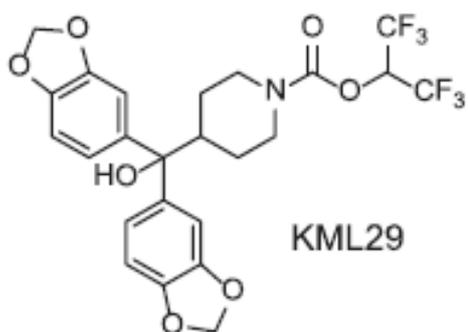
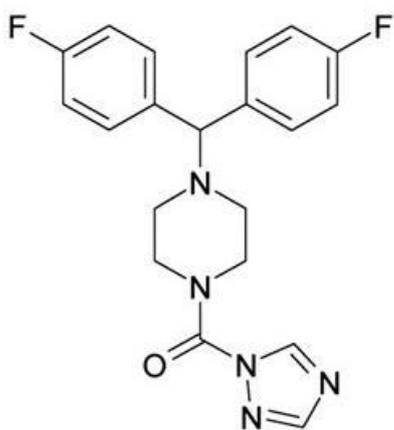


Fig.28 KML29<sup>72</sup>.

Il derivato carbossamide triazolico SAR 629, è un derivato caratterizzato non più dalla presenza del gruppo carbammico ma dalla presenza di un raggruppamento ureico; ha mostrato una attività nanomolare.



SAR629

Fig.29 SAR 629<sup>82</sup>.

Il meccanismo di SAR 629, imita l'idrolisi del 2-AG tramite MAGL, per mezzo di un carbammato relativamente stabile insieme ad una serina catalitica, che è invece relativamente labile nei confronti dell'estere<sup>82</sup>.

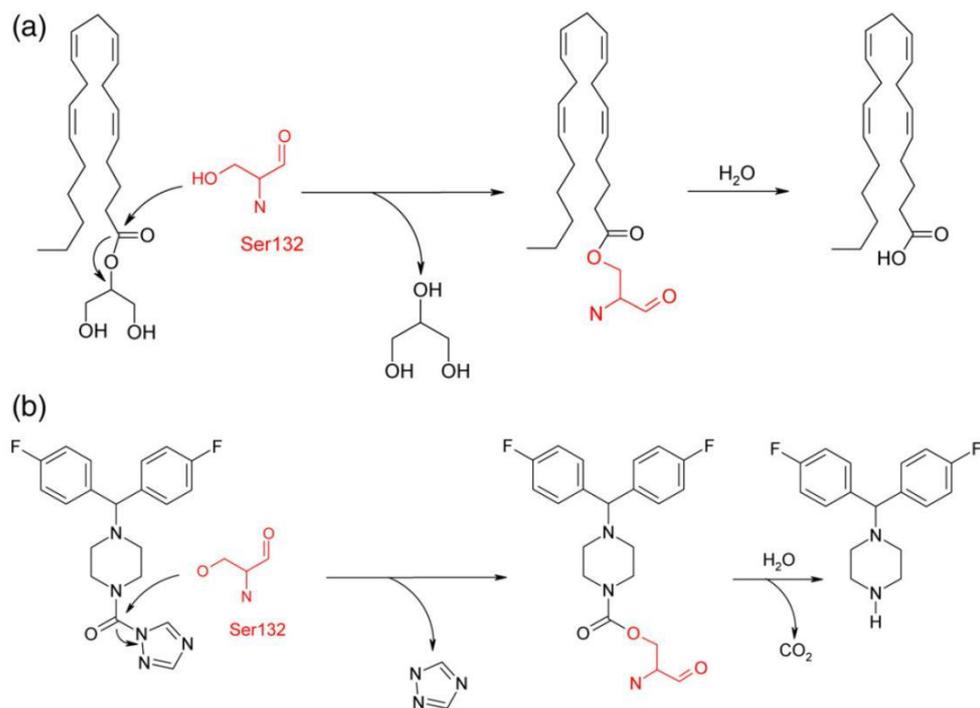


Fig. 30 a) idrolisi del 2-AG da parte di MAGL. b) idrolisi di SAR 629 per MAGL<sup>82</sup>

Nell'analisi di un modello in cui SAR 629 è legato covalentemente al MAGL, il composto adotta una forma a Y con le sue due porzioni del fluorofenil e si dispone in direzioni opposte e perpendicolari tra loro (Fig.30).

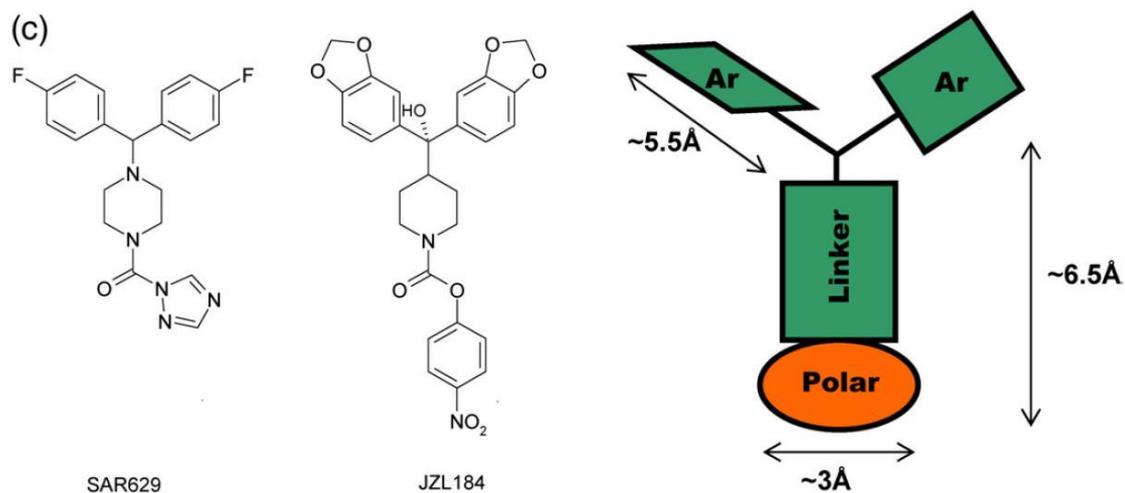


Fig.31 Modello di farmacofori SAR629 e JZL184. (Gli elementi in verde scuro rappresentano le porzioni dei farmacofori piatte ed idrofobiche, mentre l'elemento in arancione raffigura un farmacoforo polare. (Ar, aromatico)<sup>82</sup>

Queste porzioni, sono perpendicolari al linker di legame della piperidina che adotta una conformazione a sedia. SAR629 interagisce con MAGL mediante interazioni idrofobiche ed ha poche interazioni polari, oltre al legame covalente con Ser122. Interazioni mediate dall'acqua, si verificano tra l'azoto della piperazina, o gli atomi di ossigeno della sua funzione carbammato, e la catena laterale His269, o la catena principale ossigeno carbonilico, Ala61 (Fig. 31).

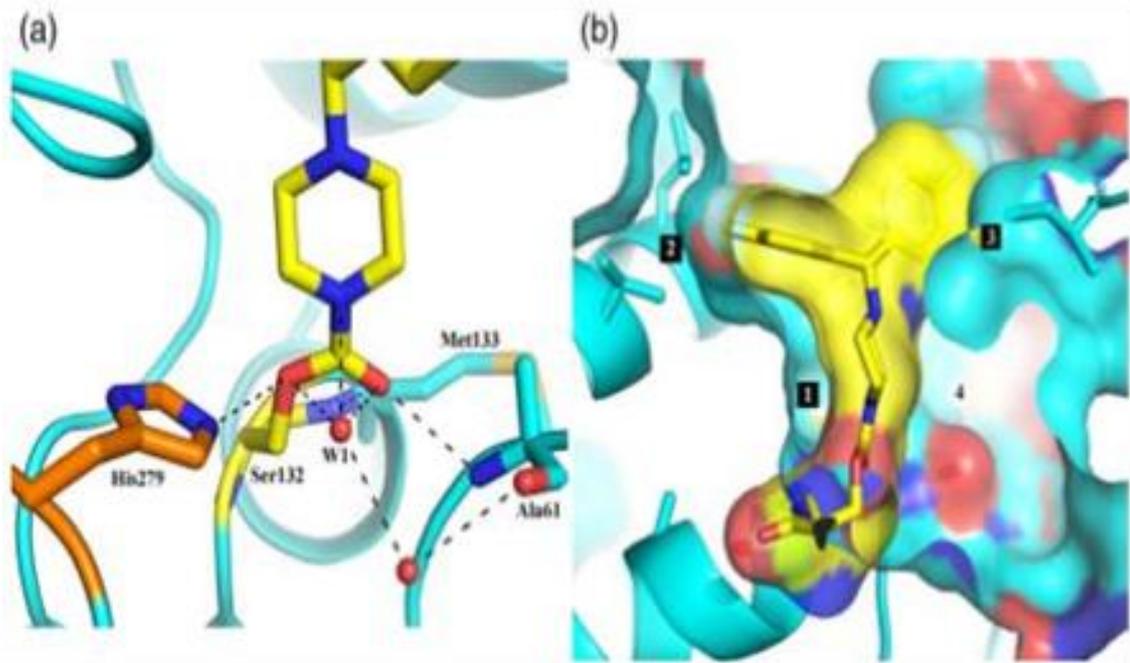


Fig. 32 A) studi nei confronti della porzione di aggancio del SAR629 nel sito attivo dell'enzima, B) interazioni van der Waals nella porzione della piperazina<sup>82</sup>.

Il ruolo della piperazina è di orientare le altre porzioni verso punti farmacofori, che potrebbero, probabilmente, essere sostituiti da altri sostituenti. L'inibitore JZL184, indicato per MAGL ha una struttura chimica molto vicina a quella di SAR629 (Fig.32). Il suo meccanismo di inibizione e la sua modalità di riconoscimento dovrebbero essere simili (Fig. 30/32)<sup>82</sup>.

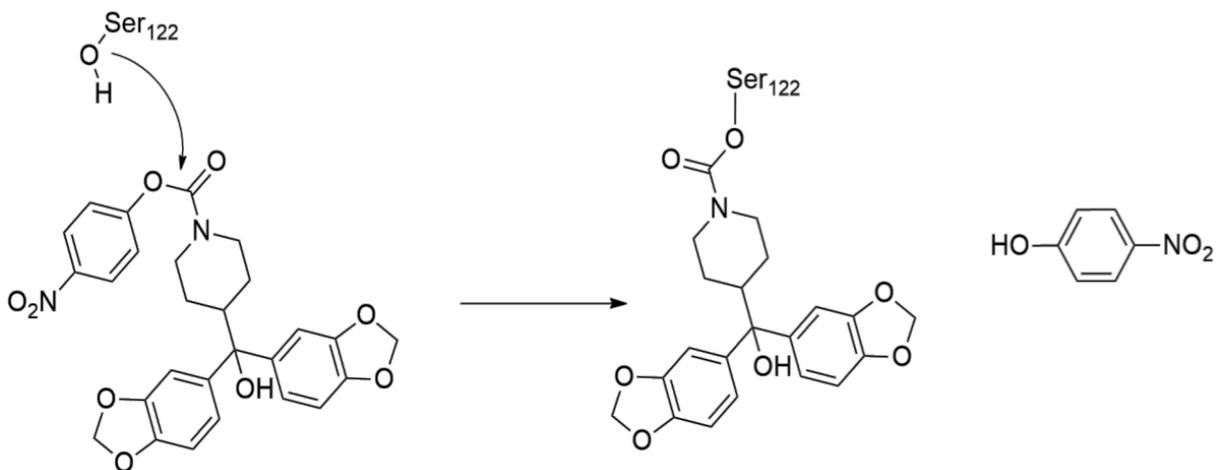


Fig. 33 Idrolisi di JZL184 da parte da MAGL

### 4.3.2. DERIVATI ORGANOFOSFORICI (OP) INIBITORI DEL MAGL

I derivati organofosforici (OP) con struttura generale mostrata in fig. 34, sono un'altra classe di inibitori potenziali nei confronti di MAGL e possono interagire con i diversi componenti del sistema cannabinoide.

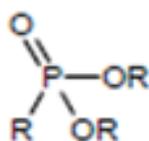
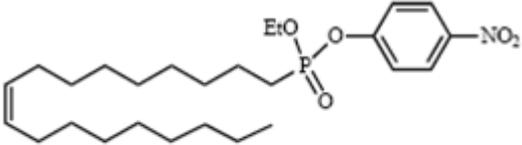


Fig.34 Struttura generale dei derivati organofosforici

Casida ed altri, hanno affermato che alcuni derivati OP, inibiscono l'attività di MAGL *in vitro*; ciò porta ad aumentare i livelli di 2-AG nei topi a livello cerebrale, mostrando che la maggior parte dei composti OP possiedono una certa selettività per MAGL maggiore rispetto a FAAH. Uno dei composti più rappresentativi di questa classe di derivati è UP101, che ha mostrato, come si può vedere dalla tabella 6, un'elevata attività inibitoria nei confronti dell'enzima del sistema endocannabinoide, ma non selettività verso MAGL.



Target	IC <sub>50</sub> (μM)*
MAGL (COS cell cytosol)	3.2 ± 0.17
DAGLα (human recombinant)	3.7 ± 0.2
FAAH (rat brain membranes)	0.18 ± 0.14

Tab.6 Attività inibitoria di UP101

Altri derivati OP, che non hanno mostrato alta selettività per MAGL rispetto a FAAH, sono CPO e Paraox<sup>83,84,85</sup>.

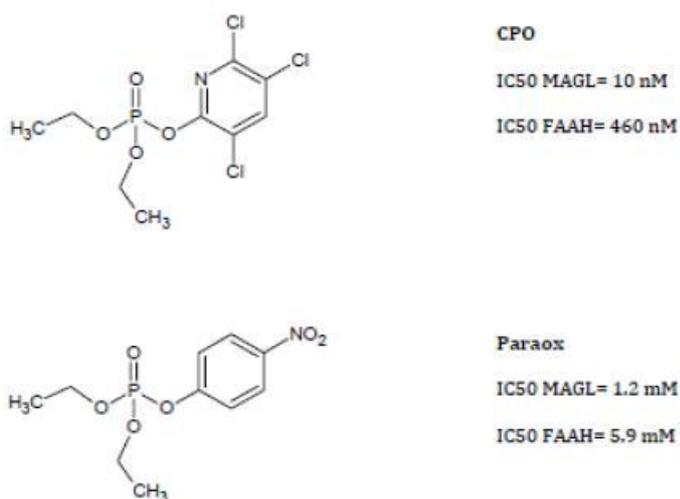
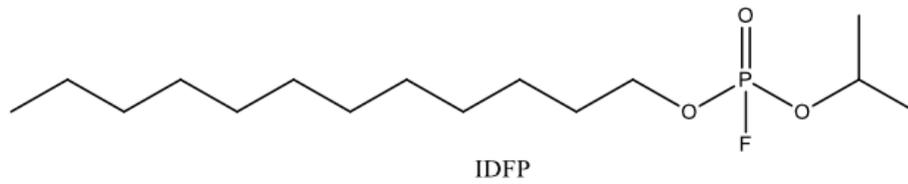


Fig.36 Derivati organofosforici: CPO e Paraox

Un altro composto organo fosforico OP che non ha dimostrato un'alta selettività per MAGL è il IDFP (Isopropyl Dodecyl Fluorophosphonate); è un potente inibitore della FAAH e di MAGL (valori di IC<sub>50</sub> di 3 e 0,8 nM, rispettivamente), ma anche di molte altre serina idrolasi, come il 2-AG. IDFP somministrato ai topi,

causa un aumento considerevole dei livelli di endocannabinoidi cerebrali (10 volte), ma gli effetti collaterali osservati nei topi trattati con questo composto sono stati molteplici: ipotermia, catalessi, ipomotilità, così come la morte (mediante un meccanismo indipendente dal recettore CB1)<sup>72</sup>



*Fig. 37 IDFP*

## 5. BIBLIOGRAFIA

1. Di Marzo V. *Nature Reviews Drug Discovery* 3, 771-784 (September 2004) | doi:10.1038/nrd1495
2. Di Marzo V. *Pharmacol Res.* 2009 Aug;60(2):77-84. doi: 10.1016/j.phrs.2009.02.010. Epub 2009 Mar 4.
3. I. Sviženská, *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 90 (2008) 501–511
4. Dissimilar interaction of CB1/CB2 with lipid bilayers as revealed by molecular dynamics simulation. J. Ramos et al. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2011,13, 3660- 3668
5. Takako Ohno-Shosaku *Neuron*, Vol. 29, 729–738, March, 2001
6. Munro S. et al. 1993; 365: 61–5.
7. A. C. Howlett et al. *Pharmacol Rev* 54:161–202, 2002
8. Melvin L.S., Milne G.M., Johnson M.R., Subramaniam B., Wilken G.H., Howlett A.C. (1993) Structure-activity relationships for cannabinoid receptor-binding and analgesic activity: studies of bicyclic cannabinoid analogs. *Mol. Pharmacology* 44,1008-1015
9. Rinaldi-Carmona M., Congy C., Cantucci V., Simiand J., Gautret B., Neliat G., Labeeuw B., Le Fur G., Sobrie P., Breliere JC. (1992) Biochemical and pharmacological properties of ST 46349B, a new potent and selective 5-hydroxytryptamine<sub>2</sub> receptor agonist. *J Pharmacol Exp Ther.* 262(2): 759-768.
10. B.M. Fonseca et al. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators Volumes* 102–103, April–May 2013, Pages 13–30
11. Anatol C. Kreitzer et al. *Neuron*, Vol. 29, 717–727, March, 2001
12. Piomelli, D. *Nat. Rev. Neurosci.* 2003, 4, 873
13. Chevalere, V.; Takahashi, K. A.; Castillo, P. E. *Annu. Rev. Neurosci.* 2006, 29, 37
14. Ahn K, et al. *Chem Rev.*, 2008; 108:1687–1707
15. Mackie, K. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2006, 46, 101.
16. Balapal S Basavarajappa *Curr Neuropharmacol.* Jun 2007; 5(2): 81–97.

17. Di Marzo V., Natur Publishing Group, 2008, 7, 438-55.
18. Di Marzo, Nature Sci. 2011, 14, 9-15.
19. Cadas H. et al., J. Neurosci., 1997, 17, 1226–42.
20. Di Marzo V., et al., Curr. Opin. Lipidol., 2007, 18, 129-140.
21. Liu J. et al., Neuropharmacology, 2008, 54, 1-7.
22. Kirkham T.C. et al., J. Pharmacol. ,2002, 136, 550-57.
23. Leung D. et al., Biochemistry, 2006, 45, 4720–6. 22. Simon G. M. et al., J. Biol. Chem., 2006, 281, 26465–72.
24. Sun Y. X. et al., Biochem. J., 2004, 380, 749–56. 24. Liu J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2006, 103, 13345–50.
25. Liu J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2006, 103, 13345–50.
26. Blankman J. L. et al. Pharmacol Rev 65:849–871, April 2013).
27. Christopher J. Fowler et al. Biochemical Pharmacology 62 (2001) 517–526
28. Endocannabinoid system: key regulatory enzymes and physio-pathological implications, Sonila Vathi 2014
29. Benjamin F. Cravatt et al. Current Opinion in Chemical Biology 2003, 7:469– 475
30. W.W. Christie, lipidlibrary.aocs.org April 2014
31. Melinda M. Mulvihill et al. Life Sciences 92 (2013) 492–497
32. J. L. Blankman et al. Pharmacol Rev 65:849–871, April 2013
33. J. R. Savinainen, S. M et al. Acta Physiol 2012, 204, 267–276
34. Giulio G. Muccioli Drug Discovery Today \_ Volume 15, Numbers 11/12 \_ June 2011
35. A. Giuffrida et al. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2010 April ; 91(3-4): 90– 103. doi:10.1016/j.prostaglandins. 2009.05.004.

36. Bertrand, T.; Augé, F. *Journal of Molecular Biology*, 2010, 396, 663-673.
37. G. Labar et al. *ChemBioChem* 2010, 11, 218–227
38. Schalk-Hihi, C.; Schubert, C.; Alexander, R.; Bayoumy, S.; Clemente, J.C.; Deckman, I.; Desjarlais, R.L.; Dzordzorme, K.C.; Flores, C.M.; Grasberger, B.; Kranz, J.K.; Lewandowski, F.; Liu, L.; Ma, H.; Maguire, D.; Macielag, M.J.; McDonnell, M.E.; Mezzasalma Haarlander, T.; Miller, R.; Milligan, C.; Reynolds, C.; Kuo, L.C. *Protein Science*, 2011; 20, 670-683.
39. Abdel-Aal, Y.A.; Hammock, B.D. *Science*, 1986, 233, 1073.
40. Cravatt, B.F.; Giang, D.K.; Mayfield, S.P.; Boger, D.L.; Lerner, R.A.; Gilula, N.B. *Nature*, 1996, 96, 14694.
41. Carol A. Rouzer, Vanderbilt institute of chemical biology, october 2011
42. R. G. Kurumbail et al. 2001, 11:752–760
43. AG Hohmann *British Journal of Pharmacology* (2007) 150, 673–675
44. Ignatowska-Jankowska B. M. et al. *British Journal of Pharmacology* (2014) 171 1392–1407
45. MD Jhaveri et al. *British Journal of Pharmacology* (2007) 152, 624–632
46. F. Comelli et al. *British Journal of Pharmacology* (2007) 152, 787–794
47. J. Kotz *Science–Business eXchange*, 2011 Nature Publishing Group.
48. Glass, C.K.; Saijo, K.; Winner, B.; Marchetto, M.C.; Gage, F.H. *Cell.*, 2010, 140, 918–934.
49. R. Chen et al. *Cell Reports* 2, 1329–1339, November 29, 2012
50. Schlosburg, J.E.; Blankman, J.L.; Long, J.Z.; Nomura, D.K.; Pan, B.; Kinsey, S.G.; et al. *Nature Neuroscience*, 2010, 13, 1113–1119.
51. D. Centonze et al. *INTERNATIONAL REVIEW OF NEUROBIOLOGY*, VOL. 82 DOI: 10.1016/S0074-7742(07)82009-5
52. Sumislawski, J.J.; Ramikie, T.S.; Patel, S. *Neuropsychopharmacology*, 2011, 36, 2750–2761

53. Van Gaal, L., Pi-Sunyer, X., Després, J.-P., McCarthy, C., Scheen, A., 2008. Efficacy and safety of rimonabant for improvement of multiple cardiometabolic risk factors in overweight/obese patients: pooled 1-year data from the Rimonabant in Obesity (RIO) program. *Diabetes Care* 31 (2), S229–S240 Suppl
54. Dzirasa, K., Covington 3rd, H.E., 2012. Increasing the validity of experimental models for depression. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1265, 36–45.
55. Parolaro, D.; Rubino, T. *Drug News & Perspectives*, 2008, 21, 149–157.
56. Seif, T.; Makriyannis, A.; Kunos, G.; Bonci, A.; Hopf, F.W. *Neuroscience*, 2011, 193, 21–33.
57. Kathuria, S., Gaetani, S., Fegley, D., Valiño, F., Duranti, A., Tontini, A., Mor, M., Tarzia, G., La Rana, G., Calignano, A., Giustino, A., Tattoli, M., Palmery, M., Cuomo, V., Piomelli, D., 2003. Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. *Nat. Med.* 9, 76–8
58. wiley, J.L., Walentiny, D.M., Wright Jr., M.J., Beardsley, P.M., Burston, J.J., Poklis, J.L., Lichtman, A.H., Vann, R.E., 2014. Endocannabinoid contribution to  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol discrimination in rodents. *Eur. J. Pharmacol.* 737, 97–105.
59. Li, G.L., Winter, H., Arends, R., Jay, G.W., Le, V., Young, T., Huggins, J.P., 2011. Assessment of the pharmacology and tolerability of PF-04457845, an irreversible inhibitor of fatty acid amide hydrolase-1, in healthy subjects. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 73, 706–716.
60. Huggins, J.P., Smart, T.S., Langman, S., Taylor, L., Young, T., 2012. An efficient randomised, placebo-controlled clinical trial with the irreversible fatty acid amide hydrolase-1 inhibitor PF-04457845, which modulates endocannabinoids but fails to induce effective analgesia in patients with pain due to osteoarthritis of the knee. *Pain* 153, 1837–1846
61. Scherma, M., Panlilio, L., Fadda, P., Fattore, L., Gamaledin, I., Le Foll, B., Justinová, Z., Mikics, E., Haller, J., Medalie, J., Stroik, J., Barnes, C., Yasar, S., Tanda, G., Piomelli, D., Fratta, W., Goldberg, S., 2008b. Inhibition of anandamide hydrolysis by cyclohexyl carbamic acid 30-carbamoyl-3-yl ester (URB597) reverses abuse-related behavioral and neurochemical effects of nicotine in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 327, 482–490
62. Cippitelli, A., Canella, N., Braconi, S., Duranti, A., Tontini, A., Bilbao, A., Rodríguez de Fonseca, F., Piomelli, D., Ciccocioppo, R., 2008. Increase of brain endocannabinoid anandamide levels by FAAH inhibition and alcohol abuse behaviours in the rat. *Psychopharmacology* 198, 449–460.

63. Schlosburg, J.E., Blankman, J.L., Long, J.Z., Nomura, D.K., Pan, B., Kinsey, S.G., Nguyen, P.T., Ramesh, D., Booker, L., Burston, J.J., Thomas, E.A., Selley, D.E., Sim-Selley, L.J., Liu, Q.-s., Lichtman, A.H., Cravatt, B.F., 2010. Chronic mono-acylglycerol lipase blockade causes functional antagonism of the endocannabinoid system. *Nat. Neurosci.* 13, 1113–1119.
64. Ignatowska-Jankowska, B.M., Ghosh, S., Crowe, M.S., Kinsey, S.G., Niphakis, M.J., Abdullah, R.A., Tao, Q., St, O.N., Walentiny, D.M., Wiley, J.L., Cravatt, B.F., Lichtman, A.H., 2014. In vivo characterization of the highly selective monoacylglycerol lipase inhibitor KML29: antinociceptive activity without cannabimimetic side effects. *Br. J. Pharmacol.* 171, 1392–1407.
65. Cravatt, B.F.; Demarest, K.; Patricelli, M.P.; Bracey, M.H.; Giang, D.K.; Martin, B.R.; Lichtman, A.H. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98, 9371-9376.
66. Menendez, J.A.; Lupu, R. *Nature Reviews Cancer*, 2007, 7, 763-777.
67. D. K. Nomura et al. *Cell* 140, 49–61, January 8, 2010
68. A. Lass et al. *Progress in Lipid Research* 50 (2011) 14–27
69. J. L. Yecies et al. *Cell* 140, January 8, 2010 ©2010 Elsevier Inc.
70. S. Pisanti et al. *Trends in Pharmacological Sciences*, May 2013, Vol. 34, No. 5
71. Alma Viso et al. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2008, 8, 231-246
72. J. L. Blankman et al. *Pharmacol Rev* 65:849–871, April 2013
73. Saario, S. M.; Salo, O. M.; Nevalainen, T.; Poso, A.; Laitinen, J.T.; Jarvinen, T.; Niemi, R. *Chemistry & Biology*, 2005, 12, 649-656.
74. Matuszak, N.; Muccioli, G.G.; Geoffroy, L.; Lambert, D.M. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2009, 52, 7410-7420.
75. Labar, G.; Bauvois, C.; Muccioli, G. G.; Wouters, J.; Lambert, D.M. Disulfiram is an inhibitor of human purified monoacylglycerol lipase, the enzyme regulating 2-arachidonoylglycerol signaling. *Chembiochem.*, 2007, 8, 1293-7.
76. King, A.R.; Lodola, A.; Carmi, C.; Fu, J.; Mor, M.; Piomelli, D. *British Journal of Pharmacology*, 2009, 157, 974-983.
77. Labar et al. *Chembiochem* 2007, 8, 1293-7

78. F. Comelli et al. *British Journal of Pharmacology* (2007) 152, 787–794
79. Szabo, M.; Agostino, M.; Malone, D.T.; Yuriev, E.; Capuano, B. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2011, 21, 6782-6787.
80. J. Z. Long et al. *Chemistry & Biology* 16, 744–753, July 31, 2009
81. J. W. Chang et al. *Chemistry & Biology* 19, 579–588, May 25, 2012
82. T. Bertrand et al. *J. Mol. Biol.* (2010) 396, 663–673
83. G. B. Quistad et al. *Tox. Appl. Pharm.* 2006; 211: 78-83
84. D. K. Nomura et al. *Nat Chem Biol.* 2008 June ; 4(6): 373–378.
85. *Toxicology and Applied Pharmacology*. Volume 211, Issue 1, 15 February 2006, 78–83