

mgr farm. Adam Stasiulewicz

Poszukiwanie ligandów receptorów kannabinoidowych CB1 i CB2 wśród substancji leczniczych, związków pochodzenia naturalnego i związków syntetycznych

Układ endokannabinoidowy (ECS) to ważny system regulacyjny, biorący udział w kontroli szerokiego zakresu procesów fizjologicznych w ludzkim organizmie. Główne elementy białkowe ECS, receptory kannabinoidowe (CBR) typu 1 i 2 (CB1 i CB2), to kluczowe cele molekularne zarówno dla związków endogennych, jak i dla substancji leczniczych. Ligandy receptorów CB1 i CB2 są wykorzystywane lub badane pod kątem zastosowania w wielu chorobach. Rozwój skutecznych i bezpiecznych strategii terapeutycznych modulacji ECS to skomplikowane zadanie z uwagi na wielokierunkowy charakter układu i możliwe działania niepożądane spowodowane ośrodkową modulacją aktywności receptora CB1.

Obecnie znanych jest wiele potencjalnych rozwiązań mających na celu obejście problemów z bezpiecznym oddziaływaniem na ECS. Niewystarczająco często poruszaną kwestię stanowi wykorzystywanie istniejących już substancji leczniczych, zaprojektowanych z myślą o innych celach molekularnych. Najlepszy przykład to paracetamol, wywierający swoje działanie przeciwbólowe głównie poprzez wpływ jego aktywnego metabolitu na receptor CB1. Istotne oddziaływanie z CBR odkryto również dla metamizolu czy selektywnych modulatorów receptorów estrogenowych. Możliwe, że istnieją także inne substancje lecznicze lub ich metabolity, dla których mechanizmu działania ważne są kluczowe białka ECS.

W ostatnich latach renesans przeżywa również terapeutyczne stosowanie preparatów *Cannabis sativa*. Są one zazwyczaj dobrze tolerowane przez pacjentów, a zatem stanowią kolejny przykład bezpiecznej modulacji ECS. Korzystanie z nich wiąże się jednak z ryzykiem wystąpienia różnych działań niepożądanych, jak choćby zaburzenia funkcji kognitywnych. Z tego powodu część obecnych badań skupia się na poszukiwaniu ligandów CBR w innych roślinach. Znalezienie takich związków może pozwolić na zaproponowanie alternatywy dla *Cannabis sativa*.

Możliwość poszukiwania nowych, różnorodnych ligandów receptorów CB1 i CB2 była do niedawna ograniczona z powodu braku znajomości dokładnych struktur III-rzędowych tych białek. Krystalizacja receptora CB1 w 2016 r. otworzyła nowy rozdział w projektowaniu ligandów CB1. Pozwoliło to na racjonalne wykorzystanie metod obliczeniowych opartych na strukturze celu molekularnego, aby w efektywny sposób przesiewać duże zbiory związków. Jest to świetna okazja do identyfikacji ligandów CB1 wśród substancji leczniczych, ich metabolitów i związków pochodzenia naturalnego.

Wiele cennych działań terapeutycznych, w tym część wspólnych z efektami wpływu na receptor CB1, można osiągnąć także przez modulację receptora CB2. Ligandy CB2 wykazują

potencjalnie lepszy profil farmakologiczny, omijając ośrodkowe działania niepożądane związane z wpływem na CB1. Poznanie struktury III-rzędowej receptora CB2 w 2018 r. pozwala również na efektywne poszukiwanie nowych ligandów CB2.

Główne cele tej pracy to znalezienie nowych ligandów CB1 wśród substancji leczniczych, ich metabolitów i związków pochodzenia naturalnego. Dodatkowo, z uwagi na późniejszą krystalizację receptora CB2 i duży potencjał terapeutyczny związków modulujących jego aktywność, do celów dołączone zostało poszukiwanie nowych ligandów CB2.

Integralną częścią pracy był przegląd literatury dotyczący terapeutycznego potencjału białek ECS. Zebrano i podsumowano liczne, aktualne informacje nt. możliwości wykorzystania celów molekularnych ECS w projektowaniu leków i w farmakoterapii. Przegląd ten legitymizuje zasadność poszukiwania nowych ligandów CB1 i CB2.

W ramach realizacji założonych celów, wykorzystano szereg różnorodnych metod *in silico*. Na podstawie dokładnej walidacji stworzono wieloetapowe procedury wirtualnego przesiewu nakierowanego na identyfikację różnorodnych strukturalnie związków o możliwie jak najwyższym powinowactwie do receptorów CB1 albo CB2. Wykorzystano takie metody, jak dokowanie, dynamika molekularna, przesiew farmakoforowy i modele ilościowej zależności struktura-aktywność. Wyniki zostały zweryfikowane przy użyciu badań *in vitro*, przede wszystkim testu wypierania radioliganda.

Wirtualny przesiew w poszukiwaniu ligandów CB1 doprowadził do identyfikacji trawoprostu i ginkgetyny jako związków o niskim mikromolowym powinowactwie do tego receptora. Dodatkowo, znaleziono pięć związków zbliżonych strukturalnie do związków pochodzenia naturalnego o submikromolowym lub niskim mikromolowym powinowactwie, w tym nowego, strukturalnie odrębnego przedstawiciela mieszanych częściowych agonistów/antagonistów CB1.

W ramach poszukiwania nowych ligandów receptora CB2 odkryto cztery syntetyczne związki – dwa o wysokim i dwa o niskim powinowactwie do tego białka. Co ważne, wszystkie związki charakteryzują się wysoką selektywnością oraz różnorodnością strukturalną w porównaniu do dotychczas znanych ligandów CB2.

Oba etapy pracy pozwoliły również na opracowanie i przetestowanie nowych, efektywnych procedur wirtualnego przesiewu. Cechują się one niestosowanym dotąd w kontekście receptorów kannabinoidowych podejściem łączącym różne typy metod *in silico* i zarazem skupiającym się na technikach opartych na strukturze celu molekularnego. Ta niestandardowa strategia wykorzystuje jednocześnie szereg szeroko dostępnych narzędzi obliczeniowych, przez co opracowane procedury mogą z powodzeniem zostać wykorzystane do poszukiwania nowych ligandów CB1 i CB2 lub podobnych receptorów.