

Abstract

Nell'ultimo decennio, il legame tra infiammazione e cancro è risultato sempre più evidente; di conseguenza, l'identificazione di nuove molecole in grado di interferire con i targets biologici chiave coinvolti in queste patologie risulta estremamente necessaria. Alla luce di ciò, il mio lavoro di tesi si è concentrato sulla sintesi di nuove small molecules, prendendo di mira tre proteine coinvolte in queste patologie: bromodomain-containing protein 9 (BRD9), microsomal prostaglandin E₂ synthase-1 (mPGES-1), and soluble epoxide hydrolase (sEH).

La proteina BRD9, una subunità del complesso mammifero switch/saccarosio non-fermentabile (SWI/SNF), è emersa come un bersaglio importante per la terapia antitumorale a causa della sua overespressione in diversi tipi di cancro, in particolare nelle leucemie.

mPGES-1, invece, è l'enzima terminale della cascata di acido arachidonico, responsabile della produzione di prostaglandina E2 in condizione di stimoli pro-infiammatori. Pertanto, l'inibizione selettiva di mPGES-1 può essere considerata un valido approccio terapeutico per interferire con la formazione di PGE2 indotta dall'infiammazione. Inoltre, tale enzima è sovra-espresso nelle patologie tumorali, e per questo motivo, è considerato anch'esso un buon target antitumorale. Inoltre, sempre facente parte della cascata dell'acido arachidonico, è l'enzima idrossido epossidico solubile (sEH), la cui inibizione porta ad un aumento degli acidi epossieicosatrienoici (EETs), anch'essi mediatori anti-infiammatori.

Il workflow generale, che è stato seguito in questo progetto di dottorato, ha previsto vari step di cui il primo è rappresentato dal drug design in silico (Task1). I composti più promettenti sono stati, poi, selezionati, sintetizzati (Task2) e infine valutati mediante saggi di binding nei confronti delle proteine bersaglio (Task 3). Questo passaggio è stato eseguito attraverso un saggio di AlphaScreen lì dove il target bersaglio era BRD9; mentre, sono stati effettuati saggi cell-free in collaborazione con il gruppo del Prof. Oliver Werz per le molecole progettate per mPGES-1 e sEH,. Infine, le molecole migliori sono state sottoposte a test in vivo in collaborazione con il Prof. Maione (Task 4) dell'Università di

Napoli Federico II. Al contrario, le molecole che non hanno dato dei risultati soddisfacenti sui target per cui erano state progettate, sono state rivalutate mediante la metodica dell'Inverse Virtual Screening (IVS) (Task 5) su tutto il pannello proteico antinfiammatorio e antitumorale, con lo scopo di essere riposizionate su altri targets farmacologici.

I risultati ottenuti nel corso dei miei tre anni di Ph.D. sono riportati nelle tre sezioni principali, con riferimento alle proteine targets di nostro interesse:

Bromodomain-containing protein 9 (BRD9). Su questo target, il mio interesse è stato rivolto alla sintesi delle molecole selezionate, precedentemente valutate attraverso un approccio computazionale dal gruppo di ricerca di cui faccio parte, e dalla valutazione del binding con la controparte proteica tramite il saggio di AlphaScreen. In particolare, gli scaffold presi in considerazione per lo sviluppo di questi potenziali ligandi sono stati suddivisi in due gruppi, in funzione dell'approccio utilizzato per la progettazione in silico (capitolo 1).

Interaction-based approach (IBA). Gli scaffold considerati sono stati scelti in quanto avevano delle porzioni strutturali che potevano mimare la lisina dell'acetile dell'istone H4, ligando naturale della proteina BRD9.

La selezione delle molecole è stata poi basata sulle interazioni con gli amminoacidi chiave per il binding con la proteina, dopo aver eseguito degli esperimenti di molecular docking. Pertanto, sono stati sintetizzati ventotto composti a scaffold isoxazolo[2,3-c][1,3,5]tiadiazepina-2-one, quattro composti a scaffold di 4-etil-benzo[d]tiazolo-2-ammina e sette a scaffold di 1,8-naftilridinone. I risultati preliminari di AlphaScreen hanno evidenziato l'incapacità di questi composti di legare BRD9. D'altra parte, gli studi di repurposing in silico eseguite sull'insieme dei composti sintetizzati hanno evidenziato un legame promettente di ciascuna serie di molecole rispettivamente contro il recettore dell'estrogeno, l'epossido idrolasi solubile e le chinasi della tirosina,

Structure-based three-dimensional pharmacophore-based approach (SBPA). Tutti i composti sono stati sottoposti ad uno screening col modello farmacoforico dopo aver eseguito i calcoli docking. In particolare, tra le ventuno molecole con 2,4-diidro-3H-1,2,4-triazol-3-one sintetizzato, due (D22 e D25) sono state in grado di legare BRD9 con un IC₅₀ nel basso micromolare. Queste molecole hanno anche mostrato un alto profilo di selettività quando sono state testate contro un pannello di ulteriori nove bromodomini. Partendo da questi dati incoraggianti, altri dieci derivati sono stati sintetizzati e la valutazione del binding ha rivelato che sette di questi composti (D26, D28, D30, D31, D32, D34, D35) erano in grado di legare selettivamente BRD9 tra il pannello dei bromodomains selezionati.

I composti a nucleo quinazolina-4(3H)-one, invece, rappresentano la seconda serie di molecole sviluppate in seguito allo screening con il modello farmacoforo. Le quattordici molecole selezionate, sono stati sintetizzate per il successivo screening biologico applicando una strategia sintetica multistep. Il saggio di AlphaScreen ha mostrato la capacità moderata di due molecole (E7 e E13) nel legame BRD9 (percentuale di legame: 40%). Pertanto, in questo caso, abbiamo esplorato le relazioni struttura-attività, sintetizzando sette nuovi derivati basati su considerazioni strutturali delle molecole più promettenti. La valutazione del binding di questi nuovi derivati deve ancora essere effettuata.

Microsomal prostaglandin E₂ synthase-1 (mPGES-1) and soluble epoxide hydrolase (sEH).

Nell'ambito del mio progetto Ph.D. utilizzando tecniche di chimica computazionale, sono state costruite 6 librerie combinatorie decorando gli scaffold selezionati con elementi chimici disponibili sul database Merck. L'approccio computazionale, descritto nel Capitolo 3, ha portato all'identificazione di un insieme di molecole selezionate per la successiva fase sintetica, attualmente in corso.

Nel secondo caso, 23 composti a base di tiazolidin-4-one sono stati sintetizzati utilizzando una reazione one-pot multicomponent. 5 di queste molecole (F1, F2, F4, F14, F22) hanno dimostrato di essere promettenti per mPGES-1. Queste molecole sono state anche valutate su altri enzimi della cascata di acido arachidonico per migliorare la loro efficacia nel trattamento della patologia di nostro

interesse, come descritto nel capitolo 3. I composti a base di tiazolidin-4-one sintetizzati sono stati prima valutati in silico contro sEH; dopo di che, undici molecole scelte tra quelle sintetizzate sono state testate in un saggio cell free per corroborare le previsioni computazionali. I composti F2, F4, F8 hanno dimostrato di essere i più promettenti, mostrando un'alta affinità per il target ($IC_{50}=6.3 \pm 0.4 \mu\text{m}$, $IC_{50}=6.1 \pm 0.3 \mu\text{m}$, $IC_{50}=6.2 \pm 0.6 \mu\text{M}$, rispettivamente). Inoltre, i saggi cell free su COXs e 5-LO con i composti F2, F4, F8 hanno ampliato le nostre indagini sull'interferenza con la biosintesi lipido-mediata correlata all'infiammazione, rivelando il composto F4 come un promettente inibitore della 5-LO.

Infine, 8 composti a scaffold benzotiazinonica sono stati sintetizzati seguendo la strategia selezionata (capitolo 3), e i test biologici (effettuati dal gruppo del Prof. Oliver Werz) sono attualmente in corso.

D'altra parte, quattro composti, inizialmente progettati per BRD9, sono stati rivalutati su un pannello di proteine coinvolte nei processi infiammatori e tumorali attraverso l'approccio di invers virtual screening(capitolo 1). Di conseguenza, i quattro composti sono stati riposizionati con successo sull'enzima epossido idrolasi solubile, e B3 è stato identificato come un nuovo inibitore dell'enzima, confermando l'affidabilità della previsione dell'approccio IVS applicato e la sua utilità per il riposizionamento dei farmaci.

Infine, ho rivolto la mia attenzione ai composti fluorurati, considerando la loro crescente importanza in medicinal chemistry a causa delle loro migliori proprietà fisico-chimiche e la loro maggiore affinità con le proteine target rispetto ai composti non fluorurati. In particolare, durante il periodo presso il Dipartimento di Chimica dell'Università della California, Berkeley, sotto la supervisione del Prof. F. Dean Toste, ho lavorato sul miglioramento delle condizioni di reazione in funzione del tipo di substrato nel contesto di una nuova strategia per la sintesi stereoselettiva dei fluorodieni. Inoltre, utilizzando questi fluorodieni come substrati, ho condotto esperimenti volti a sviluppare una nuova reazione enantioselettiva di Diels-Alder (DA). Nonostante la reazione di Diels-Alder sia una reazione ben nota da tempo, è riportata in letteratura riportata solo una procedura DA con dieni fluorurati;

questo perchè questi dieni reagiscono in modo diverso dai dieni non fluorurati, e, pertanto, oggetto di nostro interesse.

Infine, la novità del nostro metodo consiste nella possibilità di applicare la DA ai fluorodieni senza alcun gruppo attivante e, ulteriormente, generare composti enantiopuri con l'uso di un catalizzatore chirale (Capitolo 4).