



SVILUPPO DI NUOVI FARMACI

I ricercatori della Fondazione Ri.MED sono impegnati in progetti propri ed in collaborazione con centri di ricerca che mirano ad elucidare i meccanismi patofisiologici di malattie ad oggi senza rimedio.

Attraverso lo studio dei *pathway* biomolecolari integrati con dati di genomica, proteomica, metabolica e secretomica, si è arrivati alla validazione funzionale di nuovi target terapeutici per patologie neurodegenerative come per esempio la malattia di Parkinson, le malattie tumorali e patologie infiammatorie.

Alcuni di questi progetti sono oggi nella fase di ricerca e sviluppo preclinico di potenziali farmaci. Il processo parte dallo studio delle proteine bersaglio tramite approcci di biofisica e chimica computazionale e dalla messa a punto di saggi di *screening* biofisico, biochimico o cellulare. Grazie alla piattaforma integrata di *virtual screening* sviluppata durante il 2017, si è iniziato a selezionare, tramite tecniche *structure-based (docking)* e *ligand-based (pharmacophore)*, centinaia di molecole di origine sintetica e naturale. Le molecole selezionate vengono poi sintetizzate o acquisite per essere testate biologicamente e validate con *screening* ortogonali.

Nella fase successiva, le molecole biologicamente attive verranno ottimizzate tramite chimica medicinale per poi arrivare alla sperimentazione preclinica, allo studio dell'efficacia tramite studi *in vivo* integrati con *imaging* molecolare ed alla caratterizzazione del profilo farmacocinetico e tossicologico adatto per la sperimentazione clinica su pazienti. In parallelo sono in via di sviluppo metodi predittivi per monitorare l'efficacia dei potenziali farmaci e stratificare pazienti rispondenti alla terapia.



Meccanismi molecolari di patologie da misfolding proteico: funzione fisiologica versus aggregazione

Caterina Alfano, PhD

Ruolo dei macrofagi nell'induzione delle sialyltransferasi nel cancro al colon

Sandra Cascio, PhD

Ruolo dell'inflammasoma NLRP3 e alterazioni immuno-metaboliche nella broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO)

Chiara Cipollina, PhD

Sviluppo di algoritmi per modellizzare il network di interazione di microRNA e relativi target

Claudia Coronello, PhD

Interazione NOX2/mitocondrio nella patogenesi della malattia di Parkinson

Roberto Di Maio, PhD

Farmacocinetica degli elettrofilici acidi grassi nitrati (NO₂-FA)

Marco Fazzari, PhD

Azioni protettive degli acidi grassi nitrati (NO₂-FA) nella malattia di Parkinson

Marco Fazzari, PhD

Farmacologia dei lipidi nitro-nitrati

Marco Fazzari, PhD

Progettazione di modulatori della Istone lisina demetilasi 4 (KDM4) come agenti antitumorali

Ugo Perricone, PhD

Meccanismi molecolari di patologie da misfolding proteico: funzione fisiologica versus aggregazione

Caterina Alfano, PhD
calfano@fondazionerimed.com

COLLABORAZIONI

Department of Basic and Clinical Neuroscience - King's College London, Londra, Regno Unito
Dipartimento di Fisica e Chimica - Università degli Studi di Palermo, Palermo, Italia

AREA TERAPEUTICA

Patologie dell'invecchiamento

PIPELINE



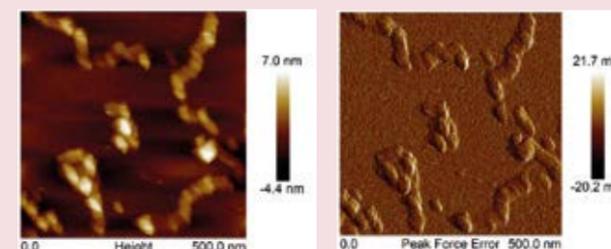
BREVE DESCRIZIONE

Le malattie neurodegenerative sono una crescente minaccia della nostra società moderna che invecchia sempre più. Gli attuali trattamenti sono nel migliore dei casi palliativi e non specifici, riflettendo il fatto che la comprensione dettagliata delle basi molecolari della maggior parte di queste malattie è ancora carente. Noi miriamo a comprendere tali meccanismi molecolari e ci basiamo sul concetto che la conoscenza della funzione fisiologica e della rete di interazione delle proteine aggregogeniche sia uno strumento chiave per progettare molecole che possono competere specificamente con l'aggregazione patologica. Le interazioni proteina-proteina nativa potrebbero infatti fornire importanti mezzi per alterare e controllare la funzione

e l'assemblaggio di quelle proteine coinvolte nelle malattie neurodegenerative e potrebbero svolgere un ruolo protettivo contro l'aggregazione aberrante. I dati preliminari forniscono un forte sostegno a questa ipotesi e incoraggiano ulteriori studi su questa linea, aprendo nuove possibilità per affrontare lo sviluppo di molecole terapeutiche per tali malattie. Noi abbiamo scelto come sistema modello la proteina atassina-3, la proteina responsabile della malattia ereditaria Machado-Joseph (MJD) o atassia spinocerebellare di tipo 3. In caso di successo, le conoscenze acquisite su atassina-3 saranno molto utili per comprendere in generale gli eventi che portano a patologie dovute a *misfolding* di proteine e fornirebbero nuovi strumenti per prevenirle.

IMPATTO

Il progetto di ricerca affronta questioni chiave, ed ancora senza risposta, nell'ambito della biologia strutturale e cellulare e che sono essenziali per ottenere nuove conoscenze per la comprensione delle malattie neurodegenerative. Le conoscenze di base fornite possono aiutare ad affrontare la progettazione di terapie specifiche finora assenti. Inoltre, la formazione di aggregati amiloidi non è solo legata alle malattie neurodegenerative ma, forse ancora più importante, può contenere indizi sul fenomeno fondamentale del ripiegamento e assemblaggio delle proteine aprendo così la possibilità di utilizzare le fibrille amiloidi come potenziali candidati per lo sviluppo di nuovi biomateriali. Il presente progetto, pertanto, potrebbe contribuire a migliorare l'eccellenza della ricerca non solo nella medicina, ma anche nel campo dei biomateriali aggiungendo anche un vantaggio socio-economico.



Aggregati di atassina-3 rilevati mediante microscopia a forza atomica ad alta risoluzione.

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2018

Nel corso di quest'anno ci siamo concentrati sull'analisi dei processi di aggregazione di atassina-3 *wild-type* (con ripetizioni di 18 Gln) e di atassina-3 patologica (con 50 ripetizioni di Gln) e su come questi processi sono influenzati dalla presenza di catene di poli ubiquitina (polyUb), partner di legame naturale di atassina-3. A tale scopo, abbiamo usato: I) tecniche spettroscopiche, come la spettroscopia di assorbimento e fluorescenza, per studiare le variazioni conformazionali di entrambe le proteine; II) Dicroismo circolare per determinare la struttura secondaria e le sue possibili variazioni; III) diffusione della luce per l'analisi della crescita degli aggregati. Queste analisi hanno confermato che la forma patologica di atassina-3 ha una maggiore propensione a formare aggregati e la sua struttura secondaria cambia più drammaticamente rispetto alla forma *wild-type*. I nostri risultati hanno anche confermato che la formazione di aggregati di atassina-3 è fortemente inibita dalla presenza di catene polyUb. Inoltre, abbiamo lavorato alla creazione di linee cellulari inducibili stabili in grado di esprimere alti livelli delle due forme di atassina-3 in condizioni controllate. Queste linee cellulari ci permetteranno di avere un sistema *in-cell* adatto per studiare l'aggregazione e testare potenziali molecole terapeutiche, che potrebbero modificare il processo di aggregazione di atassina-3.

OBIETTIVI PER IL 2019

Avviare un approccio di *drug design* su atassina-3 al fine di identificare molecole che imitando gli interattori naturali della stessa atassina-3 sono in grado di agire come modulatori della malattia. Le proprietà di interazione tra queste molecole ed atassina-3 e il loro effetto come modulatori dell'aggregazione saranno esaminate *in vitro* usando tecniche biofisiche. Le molecole che risulteranno positive negli studi *in vitro* saranno quindi testate in cellula utilizzando le linee cellulari inducibili stabili create *ad hoc* per questo scopo.

CONFERENZE

UK-Israel Synergy Symposium - Protein misfolding in ageing and neurodegeneration: from basic biology to drug development, Marzo, 2018, Londra, Regno Unito.

PUBBLICAZIONI

Martínez-Lumbreras S, Alfano C, Evans NJ, Collins KM, Flanagan KA, Atkinson RA, Krysztofinska EM, Vydyanath A, Jackter J, Fixon-Owoo S, Camp AH, Isaacson RL. (2018) Structural and Functional Insights into Bacillus subtilis Sigma Factor Inhibitor, CsfB. *Structure*, 26(4):640-648. doi: 10.1016/j.str.2018.02.007.

Pecci A, Ragab I, Bozzi V, De Rocco D, Barozzi S, Giangregorio T, Ali H, Melazzini F, Sallam M, Alfano C, Pastore A, Balduini CL, Savoia A. (2018) Thrombopoietin mutation in congenital megakaryocytic thrombocytopenia treatable with romiplostim. *EMBO Mol Med*. 10(1):63-75. doi: 10.15252/emmm.201708168.

PRODOTTI: BIOMARCATORI

Ruolo dei macrofagi nell'induzione delle sialyltransferasi nel cancro al colon

Sandra Cascio, PhD
scascio@fondazionerimed.com



COLLABORAZIONI

Department of Immunology, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, U.S.A.
Department of Gastroenterology, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, U.S.A.
Department of Engineering, University of Pittsburgh, Pittsburgh, U.S.A.



AREA TERAPEUTICA

Cancro

PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

I macrofagi costituiscono una popolazione eterogenea che si differenzia in diversi sottotipi che sono schematicamente categorizzati in M1 e M2. I macrofagi M1 producono alti livelli di citochine pro-infiammatorie ed hanno una attività tumoricida, mentre i macrofagi M2 producono citochine anti-infiammatorie e sono coinvolti nel rimodellamento del tessuto e nella progressione tumorale. I macrofagi associati ai tumori, conosciuti come TAMs, presentano un fenotipo condiviso sia dalla popolazione M1 che M2, che dipende dal bilancio dei fattori pro-ed anti-infiammatori rilasciati dal microambiente circostante. In questo progetto, studiamo la funzione dei macrofagi che infiltrano il tessuto in siti di infiammazione. In particolare, testiamo

la loro abilità ad indurre l'espressione dei glico-antigeni sulle cellule epiteliali infiammate e tumorali. I glico-antigeni tumorali, fra cui alcune glicoforiche di MUC1, attivano segnali intracellulari infiammatori ed oncogenici che a loro volta promuovono la perpetuazione dell'infiammazione cronica. Al momento, stiamo verificando l'ipotesi che i macrofagi, secernendo fattori infiammatori, promuovono l'espressione genica di glicosiltransferasi causando quindi una iper-espressione dei glico-antigeni tumorali di MUC1. Le cellule epiteliali sane esprimono bassi livelli della forma iperglicosilata di MUC1 mentre le cellule tumorali esprimono alti livelli di forme ipoglicosilate di MUC1 fra cui T, Tn, e le loro rispettive forme sialilate sT ed sTn.

IMPATTO

Il micro-ambiente tumorale gioca un ruolo fondamentale nella progressione dei tumori. I macrofagi rappresentano la popolazione più abbondante dei tessuti infiammati e tumorali del colon. Una caratteristica fondamentale dei macrofagi è la loro plasticità ed abilità di cambiare facilmente il loro fenotipo e funzione in risposta ai segnali dell'ambiente circostante. Bisogna ancora chiarire il ruolo specifico dei macrofagi nello sviluppo della patogenesi dell'infiammazione cronica e progressione del cancro al colon. Il nostro gruppo ha scoperto che i macrofagi secernono citochine infiammatorie, fra cui IL-6 e TNF, che inducono forme alterate di MUC1 nelle cellule epiteliali del colon. Nell'ambiente tumorale si instaura un *feedback* positivo fra le forme alterate di MUC1 e le citochine infiammatorie che aggrava l'infiammazione cronica e promuove tumorigenesi. L'identificazione di specifiche forme alterate di MUC1, come per esempio MUC1-sT, MUC1-sTn, così come le glicosiltransferasi che le producono ST3GAL1 e ST6GALNAC1, ci permetterà di selezionare nuovi targets importanti per la prevenzione e trattamento del cancro al colon.



RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2018

I meccanismi che regolano lo stato di O-glicosilazione di MUC1 durante l'infiammazione cronica intestinale e cancro al colon non sono ancora del tutto chiari. I nostri risultati *in vivo* suggeriscono che i tessuti infiammati di colon presentano un elevato numero di macrofagi. Per verificare che i macrofagi siano direttamente coinvolti nel controllo di forme alterate di MUC1, abbiamo utilizzato modelli di co-cultura. Brevemente, monociti umani sono stati differenziati nei sottotipi in M1 o M2 e poi messi in co-cultura con cellule epiteliali tumorali per tre giorni. Abbiamo trovato che i macrofagi M1 and M2 inducono l'iper-espressione della forma tumorale di MUC1. In aggiunta, lo studio dell'espressione genica di 84 geni associati alla glicosilazione, ha rivelato che i macrofagi M2 modulano l'espressione delle glicosiltransferasi, fra cui

ST6GalNAC1 e ST3GAL1, che sono appunto coinvolti nella biosintesi dei glico-antigeni tumorali. Usando modelli di studio *in vitro* ed *in vivo*, abbiamo identificato nuovi meccanismi molecolari con cui i macrofagi modulano l'espressione di ST6GALNAC1 ST3GAL1 e di conseguenza della forma MUC1-sTn e MUC1-sT.



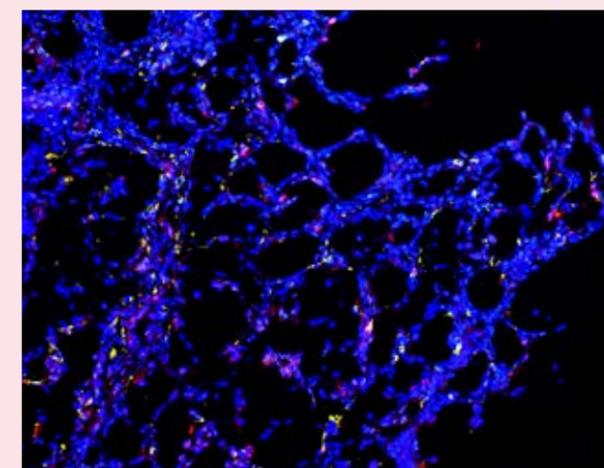
OBIETTIVI PER IL 2019

Il nostro obiettivo è determinare il network che si stabilisce fra i macrofagi e i glico-antigeni tumorali di MUC1 nelle malattie croniche dell'intestino e nel tumore al colon. Ci proponiamo quindi di determinare un nuovo modello di comunicazione fra le cellule infiammate e/o tumorali ed il microambiente circostante. Al tal fine, valuteremo il ruolo delle forme alterate di MUC1 nella modulazione della polarizzazione e funzione dei macrofagi. I nostri risultati hanno rivelato che uno degli antigeni tumorali di MUC1 comunemente espresso nei tessuti infiammati e tumorali di colon è il MUC1-sTn. ST6GalNAC1 è l'enzima che aggiungendo acido dialico sui residui GalNAc degli O-glicani, forma questo antigene. Valuteremo se l'assenza del gene murino St6galNAC1 inibirà la formazione della struttura MUC1-sTn e conseguentemente la sua potenziale interazione con i macrofagi infiltranti il tessuto. Ci aspettiamo che prevenendo questa interazione intercellulare inibiremo la formazione dei macrofagi con un fenotipo pro-tumorale e quindi riusciremo ad inibire la progressione tumorale.



CONFERENZE

American Association of Immunologists (AAI), Maggio, 2018, Austin (TX), USA.
4th Annual Immuno-Oncology Young Investigator Forum, Aprile, 2018, Houston (TX), USA.



iNOS, CD206, F4/80
Infiltrazione dei macrofagi associati al tumore (TAMs) nel tessuto di colon di topi MUC1. Tg dopo il trattamento con AOM e DSS.
Immunofluorescenza Confocale. La colorazione è stata effettuata utilizzando l'anticorpo specifico per F4/80, un marker noto dei TAMs. Gli anticorpi anti-CD206 ed anti-iNOS sono serviti per identificare le sottopopolazioni dei macrofagi M1 and M2.

Ruolo dell'inflammasoma NLRP3 e alterazioni immuno-metaboliche nella broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO)

Chiara Cipollina, PhD
ccipollina @fondazionerimed.com

COLLABORAZIONI

- Istituto di Biomedicina ed Immunologia Molecolare "Alberto Monroy (IBIM) - CNR, Palermo, Italia
- Istituto Mediterraneo per i Trapianti (IRCCS - ISMETT), Palermo, Italia
- Institut de la Vision, Parigi, Francia
- Ospedale Civico Di Cristina Benfratelli, Palermo, Italia
- Università degli Studi di Palermo, Palermo, Italia

AREA TERAPEUTICA

Patologie dell'invecchiamento



BREVE DESCRIZIONE

La broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO) è la quarta causa di morte al mondo. È una patologia prevalentemente associata all'invecchiamento e caratterizzata da una riduzione progressiva e irreversibile del flusso respiratorio. Ad oggi non esiste una terapia in grado di bloccare la progressione della BPCO, ed è quindi necessario lo sviluppo di nuovi farmaci. Rimodellamento delle vie aeree, senescenza cellulare, attivazione dell'epitelio bronchiale e disfunzione immunitaria insieme all'infiammazione cronica contribuiscono alla patogenesi della BPCO. Questi eventi coinvolgono sia le cellule strutturali (come le cellule epiteliali e i fibroblasti) sia le cellule immunitarie (come i macrofagi).

Negli ultimi anni, ci siamo occupati di studiare l'immunità innata in modelli sperimentali di BPCO, analizzando la risposta infiammatoria a carico dei macrofagi e dell'epitelio bronchiale. In particolare, ci siamo focalizzati sul ruolo dell'inflammasoma NLRP3 e sul metabolismo cellulare e su come il loro *cross-talk* contribuisca alla patogenesi della BPCO. Lo studio dei meccanismi molecolari alla base di questa patologia è necessario al fine di individuare nuovi target per lo sviluppo di terapie innovative. In parallelo, poiché NLRP3 è un target validato per numerose patologie infiammatorie croniche, in collaborazione con il gruppo di *Drug Design* della Fondazione, stiamo lavorando allo sviluppo di nuovi inibitori selettivi di NLRP3.

IMPATTO

Il progetto contribuirà alla scoperta e alla caratterizzazione di nuovi meccanismi molecolari coinvolti nella patogenesi della BPCO. Questo, a sua volta, consentirà di individuare nuovi potenziali target per lo sviluppo di nuove terapie. Inoltre, il lavoro svolto in collaborazione con il gruppo di *Drug Design* contribuirà allo sviluppo di inibitori selettivi del recettore NLRP3 da utilizzare per lo sviluppo di nuovi farmaci. L'impatto di questo lavoro è trasversale e va oltre il contesto specifico della BPCO. Infatti, l'attivazione del recettore NLRP3 contribuisce alla patogenesi di numerose patologie croniche tra cui l'aterosclerosi, il diabete di tipo II e le malattie neurodegenerative.

RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2018

Il fumo di sigaretta è uno dei maggiori fattori di rischio per la BPCO. L'utilizzo di modelli sperimentali *in vitro/ex-vivo* di infiammazione associata a fumo di sigaretta è in grado di mimare il contesto infiammatorio tipico delle vie aeree di un paziente BPCO. Utilizzando cellule epiteliali bronchiali e macrofagi (linee cellulari e macrofagi derivati da monociti isolati dal sangue periferico, MDM) esposte a fumo di sigaretta abbiamo osservato una risposta opposta nei due tipi cellulari in riferimento all'inflammasoma NLRP3. I nostri dati suggeriscono che l'esposizione a fumo causi induzione dell'inflammasoma nell'epitelio bronchiale e al contrario inibisca l'inflammasoma NLRP3 nei macrofagi. Al contempo, il fumo appare attivare la caspasi-1 causando un importante danno metabolico. Questi dati contribuiscono a spiegare lo scenario tipico della BPCO dove l'epitelio genera infiammazione non controllata e il macrofago ha un'attività ridotta (disfunzione immunitaria). I nostri dati suggeriscono inoltre che l'attivazione della caspasi-1 associata a riduzione di NLRP3 sia un nuovo meccanismo patogenetico della BPCO e aprono nuove possibilità di intervento al fine di bloccare la progressione della malattia.

OBIETTIVI PER IL 2019

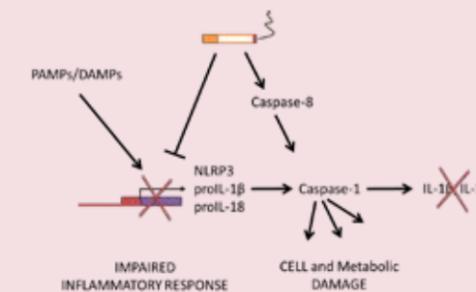
Uno dei principali obiettivi sarà la validazione e l'espansione dei dati fino ad ora ottenuti, utilizzando cellule e campioni isolati da pazienti con BPCO. Lavoreremo inoltre per comprendere i meccanismi che correlano l'inflammasoma NLRP3 con il metabolismo cellulare e la risposta infiammatoria e per capire come la regolazione congiunta di questi eventi moduli l'assetto immunitario e il fenotipo secretorio. Sul fronte dello sviluppo di inibitori di NLRP3, l'obiettivo sarà la messa a punto di saggi per *high throughput screening* al fine di testare librerie commerciali di piccole molecole e collezioni di molecole selezionate attraverso approcci di *Computer Aided Drug Design* e *Virtual Screening*.

CONFERENZE

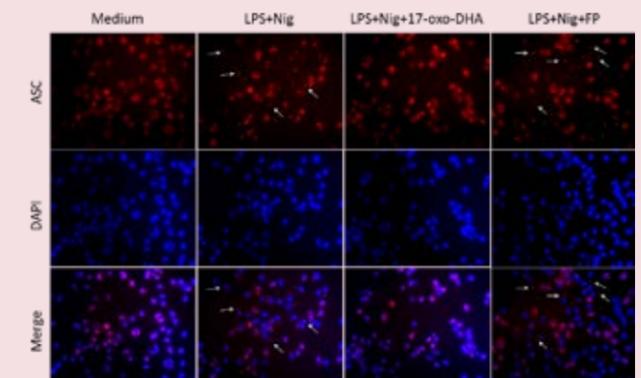
The inflammasomes-EMBO Workshop, 25-28 Settembre, 2018, Martinsried (Germania)

PUBBLICAZIONI

- Siena L*, Cipollina C*, Di Vincenzo S, Ferraro M, Bruno A, Gjomarkaj M, Pace E. (2018) Electrophilic derivatives of omega-3 fatty acids counteract lung cancer cell growth. *Cancer Chemother Pharmacol*, 81, 705-716. doi: 10.1007/s00280-018-3538-3.
- Di Vincenzo S, Heijink IH, Noordhoek JA, Cipollina C, Siena L, Bruno A, Ferraro M, Postma DS, Gjomarkaj M, Pace E. (2018) SIRT1/FoxO3 axis alteration leads to aberrant immune responses in bronchial epithelial cells. *J Cell Mol Med*, 22:2272-2282. doi: 10.1111/jcmm.13509.



Proposed model: cigarette smokes inhibits the NLRP3 inflammasome in macrophages thus impairing immune responses; at the same time cigarette smoke activates Caspase-1 leading to cell and metabolic damage. PAMP, pathogen-associated molecular patterns; DAMPs, damage-associated molecular patterns.



PRODOTTI: BIOMARCATORI

Sviluppo di algoritmi per modellizzare il network di interazione di microRNA e relativi target

Claudia Coronello, PhD
ccoronello@fondazionerimed.com

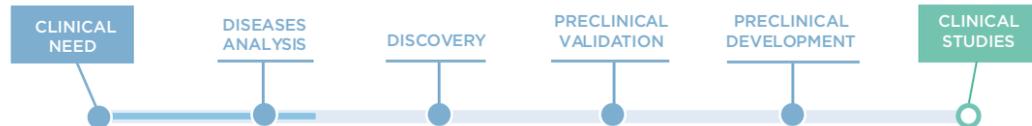
COLLABORAZIONI

Istituto di Biomedicina ed Immunologia Molecolare "Alberto Monroy (IBIM) - CNR, Palermo, Italia
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e Farmaceutiche (STEBICEF) - UNIPA, Palermo, Italia
Dipartimento di Scienze Economiche, Aziendali e Statistiche (SEAS) - UNIPA, Palermo, Italia
Dipartimento di Biologia Computazionale (CSB) - University of Pittsburgh, Pittsburgh (PA), Stati Uniti

AREA TERAPEUTICA

Cancro

PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

I microRNA sono piccoli filamenti di RNA con l'importante funzione di regolare l'espressione genica dei loro target, tra i quali sono inclusi gli RNA messaggeri (mRNA) codificanti per proteine. Ad oggi sono stati riconosciuti circa 2.000 microRNA e ciascuno di essi regola l'espressione di migliaia di target. Poiché il genoma umano comprende circa 20.000 geni codificanti per proteine, ci troviamo di fronte a una fitta e complessa rete di interazioni. Lo scenario è in più complicato dal fatto che ciascun tessuto cellulare possiede uno specifico profilo di espressione genica, per cui la rete di interazioni che effettivamente si manifestano è diversa in ciascun tessuto. In questo progetto, ci proponiamo di modellizzare la rete

di interazione specifica di un qualsiasi tessuto cellulare, focalizzando lo studio su tessuti tumorali per individuare le anomalie sulla rete di interazioni rispetto ai rispettivi tessuti sani. I profili di espressione di microRNA e mRNA utili a modellizzare la rete di interazione specifica di un tessuto possono essere ricavati attraverso tecniche *high throughput data analysis*, come ad esempio le tecnologie basate su *microarray* o *Next Generation Sequencing*. Con le suddette tecnologie è possibile misurare contemporaneamente i livelli di espressione di tutti i microRNA e mRNA presenti nel tessuto in analisi. Sarà obiettivo dei nostri algoritmi sfruttare tali dati per modellizzare e confrontare le reti di interazione tra microRNA e target di tessuti diversi.

IMPATTO

Ricchissime sono oggi le banche dati che rendono pubblicamente accessibili *Big Data* biologici. Infatti, è ormai necessario, per pubblicare sulle più importanti riviste scientifiche, rendere pubblici i dati utilizzati per ottenere i risultati descritti, e qualora si tratti di profili di espressione genica, ci si avvale di banche dati come *Gene Expression Omnibus* o *ArrayExpress*. Se un ricercatore è interessato ad un particolare tessuto cellulare è probabile che abbia già a disposizione un corredo di profili di espressione da studi già pubblicati. Tali dati offrono informazione sull'espressione dell'intero genoma nei tessuti di interesse e vengono soprattutto utilizzati per eseguire un primo *screening* e individuare su quali marcatori focalizzare la ricerca.

A fronte di una enorme mole di dati disponibili, ciò che manca sono algoritmi di analisi di dati in grado integrare più fonti di *Big Data*. Mentre sono ormai consolidati algoritmi utili ad individuare i geni o i microRNA differenzialmente espressi tra due tipologie di tessuto cellulare, utili per individuare le anomalie nei profili di espressione di microRNA e di mRNA, non esiste ad oggi alcun metodo per individuare quali anomalie si ripercuotono sulle interazioni tra microRNA e i mRNA. Lo sviluppo di tali metodi porterà nuovi strumenti per la comprensione delle cause di patologie come il cancro, arricchendo la ricerca di "quali sono i geni coinvolti" con l'informazione su "quali sono le interazioni tra geni coinvolte".

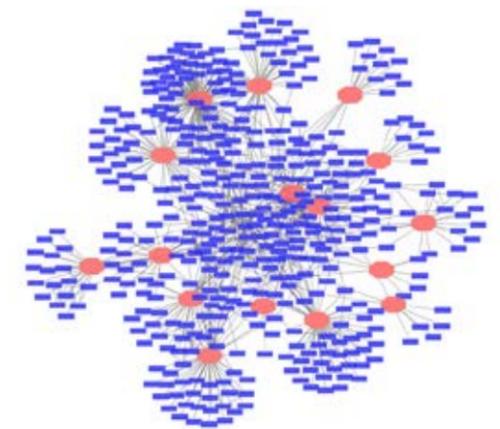
RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2018

Nel 2018 ci siamo dedicati alla realizzazione di un algoritmo in grado di ottenere il network di interazione microRNA-mRNA specifico di un tessuto tumorale. L'algoritmo si basa sul confronto dei profili di espressione di microRNA e di RNA-messaggero in tessuti tumorali

e tessuti normali, e ha l'obiettivo di associare ad ogni possibile interazione tra microRNA e RNA messaggero, un punteggio ottenuto attraverso una validazione statistica. I dati analizzati sono i dati contenuti nell'archivio *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), in particolare i profili di espressione in tumore mammario e renale. L'algoritmo sviluppato risulta più selettivo rispetto ad altri algoritmi basati sulle correlazioni tra i profili di espressione e le interazioni evidenziate riguardano una lista di geni che sono funzionalmente più coordinati e sono maggiormente raggruppati nelle stesse classi di geni (*Gene Ontology*).

OBIETTIVI PER IL 2019

Nel 2019 ci proponiamo di testare e validare ulteriormente l'algoritmo sviluppato finora. La principale difficoltà consiste nel fatto che non esiste una tecnica sperimentale in grado di evidenziare tutte le interazioni tra microRNA e RNA messaggero esistenti in un tessuto, ed è pertanto impossibile fare una validazione diretta dei network di interazione calcolati. Per proseguire con la validazione, quindi, useremo il network ricavato attraverso il nostro algoritmo come informazione aggiuntiva per ComiR, un algoritmo di predizione di target di set di microRNA che ci proponiamo di aggiornare. Ad oggi, ComiR utilizza in input il profilo di espressione dei microRNA e ne predice i target. La nuova versione di ComiR sfrutterà anche il profilo di espressione di RNA messaggero, utilizzandolo per calcolare il network di interazione con il nostro algoritmo. Ci aspettiamo di migliorare le predizioni di target ottenute dalla versione originale di ComiR, in primo luogo perché ci limiteremo a considerare solo i geni effettivamente espressi nel tessuto in esame. In secondo luogo, anche le interazioni microRNA - RNA messaggero saranno limitate a quelle predette come funzionali dal nostro algoritmo, e confidiamo di dimostrare e validare la sua efficacia riscontrando un ulteriore aumento di performance nell'individuazione dei target.



Esempio di network bipartito tra microRNA e mRNA. I nodi rossi rappresentano i microRNA, ciascuno dei quali regola centinaia di geni, rappresentati dai nodi blu. Il nostro algoritmo calcola quali relazioni tra microRNA e geni sono statisticamente significative.

Interazione NOX2/mitocondrio nella patogenesi della malattia di Parkinson

Roberto Di Maio, PhD
rdimaio@fondazionerimed.com



COLLABORAZIONI

Department of Pharmacology, University of Pittsburgh, U.S.A.



AREA TERAPEUTICA

Malattie Neurodegenerative

PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

Durante gli ultimi anni, vi è stato un crescente consenso sul fatto che i complessi eventi responsabili della patogenesi della malattia di Parkinson, siano correlati a fenomeni di stress ossidativo nella *substantia nigra pars compacta* (SNpc), eventi che influenzano la fisiologia dei neuroni dopaminergici nigrostriatali. Mentre si ritiene generalmente che lo stress ossidativo e il danno neuronale osservati nel Parkinson derivino da disfunzioni mitocondriali, recenti evidenze riportano che l'enzima NADPH ossidasi 2 (NOX2), una delle principali fonti di specie reattive dell'ossigeno (ROS) nelle cellule cerebrali, può avere un ruolo importante nell'insorgenza della malattia. Infatti, la funzione mitocondriale e NOX2 sono intimamente correlati in un processo biochimico recentemente definito "ROS-induced ROS production" (RIRP).

Sebbene ci siano pochissime informazioni sul ruolo dell'attività di NOX2 nella malattia di Parkinson, precedenti evidenze hanno fornito dati che supportano il contributo di NOX2 allo sviluppo della malattia. I nostri ultimi risultati suggeriscono che l'attività di NOX2 gioca un ruolo nella disfunzione mitocondriale, nell'attivazione di LRRK2 e nelle modificazioni neurotossiche dell'alfa-sinucleina, eventi cruciali fortemente correlati alla patogenesi del Parkinson. Questo studio si propone di fornire evidenze di neuroprotezione contro la patogenesi PD associata a NOX2 utilizzando nuovi composti che mirano specificamente a inibirne l'attività. Gli studi preclinici condotti lo scorso anno forniscono risultati promettenti che ci porteranno a ulteriori approfondimenti sull'argomento ed a possibili "trials" clinici.

IMPATTO

I meccanismi esatti della progressiva perdita di neuroni dopaminergici nella malattia di Parkinson sono ancora poco noti. Per questa ragione, i trattamenti attuali per il Parkinson hanno mostrato bassa efficacia nel rallentare o revertire la progressione della malattia. Inoltre, il costante aumento dei casi di PD nella popolazione mondiale, indica l'urgenza di fornire approcci terapeutici nuovi ed efficaci nell'immediato futuro. In questo contesto, stiamo testando nuovi inibitori altamente specifici di NOX2 che possono avere un'efficacia "multitarget", considerato il coinvolgimento di NOX2 in diversi eventi cruciali correlati alla patogenesi del Parkinson, inclusa l'attivazione di LRRK2, la disfunzione mitocondriale, l'accumulo di alfa-sinucleina e l'attivazione di processi neuroinfiammatori. Risultati positivi di questo studio possono fornire strumenti nuovi ed efficaci per l'approccio clinico ai pazienti.



RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2018

Completato (pubblicato) studio *in vitro/in vivo* sulla rilevanza dell'attività della chinasi LRRK2 nella malattia di Parkinson idiopatica, identificando NOX2 come suo possibile modulatore. Completati (inediti) studi *in vitro/in vivo* sui meccanismi cellulari modulati dall'attività NOX2 durante la patogenesi del Parkinson.

Fondi di ricerca ottenuti e/o gestiti

NIH/NINDS: 1R01 NS095387 (RDM Co-I) α -Synuclein inhibition of mitochondrial protein import
NIH/NINDS: 1R01NS100744-01 (RDM Co-I) Role of LRRK2 in idiopathic Parkinson's disease

Premi conseguiti

Research Award: "A central role for LRRK2 in idiopathic Parkinson disease"; PSG - Meeting, Portland - OR

Attività di docenza

University of Pittsburgh - Pittsburgh, PA
Guest Lecturer: Neuropharmacology; - Undergraduate Neuroscience Program spring 2018
Lecturer: Graduate Course of Neuropharmacology; spring 2018.



OBIETTIVI PER IL 2019

Il principale obiettivo futuro è completare lo studio in modelli pre-clinici per definire la farmacocinetica (PK) e l'efficacia degli inibitori di NOX2 nel bloccare gli eventi patogenici della malattia di Parkinson. L'obiettivo a lungo termine è proporre i nuovi inibitori NOX2 per gli studi clinici come nuove terapie contro il Parkinson.



CONFERENZE

"A central role of LRRK2 in idiopathic Parkinson's disease". Neuroscience 2018, San Diego, CA Nov. 11-16, 2018.

"NOX2/mitochondria interplay in Parkinson's disease". Neuroscience 2018, San Diego, CA - Nov. 11-16, 2018.

"NOX2/mitochondria interplay in Parkinson's disease". Gordon Research Conference, Maggio, 2018.

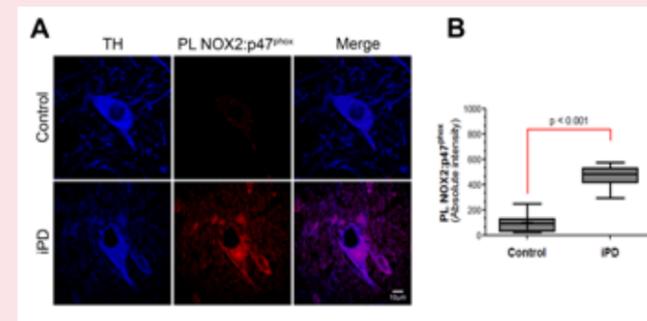


PUBBLICAZIONI

R. Di Maio, E. K. Hoffman, E. M. Rocha, M. T. Keeney, L. H. Sanders, B. R. De Miranda, A. Zharikov, A. Van Laar, A. F. Stepan, T. A. Lanz, J. K. Kofler, E. A. Burton, D. R. Alessi, T. G. Hastings, J. Timothy Greenamyre, LRRK2 activation in idiopathic Parkinson's disease. *Sci. Transl. Med.* 10, eaar5429 (2018).

D'Aiuto L, Naciri J, Radio N, Tekur S, Clayton D, Apodaca G, Di Maio R, Zhi Y, Dimitrion P, Piazza P, Demers M, Wood J, Chu C, Callio J, McClain L, Yolken R, McNulty J, Kinchington P, Bloom D, Nimgaonkar V. (2018) Generation of three-dimensional human neuronal cultures: application to modelling CNS viral infections. *Stem Cell Res Ther.* 2018 May 11;9(1):134. doi: 10.1186/s13287-018-0881-6. PMID: 29751846.

Delicata F, Bombardi C, Pierucci M, Di Maio R, De Deurwaerdère P, Di Giovanni G. Preferential modulation of the lateral habenula activity by serotonin-2A rather than -2C receptors: Electrophysiological and neuroanatomical evidence. *CNS Neurosci Ther.* 2018 Feb 25. doi: 10.1111/cns.12830. PMID: 29479825.



A) Iperattività di NOX2 nella malattia di Parkinson idiopatica. Il metodo "Proximity Ligation Assay" (PLA) per rilevare l'interazione NOX2:p47phox - un evento cruciale per l'attivazione di NOX2 - nel tessuto cerebrale umano post-mortem rivela una significativa aumentata attività di NOX2 in campioni derivati da pazienti affetti da Parkinson, mettendo in evidenza la rilevanza di questo enzima nella malattia umana. B) Analisi quantitativa dell'attività NOX2 nei neuroni dopaminergici.

Farmacocinetica degli elettrofili acidi grassi nitrati (NO₂-FA)

Marco Fazzari, PhD
mfazzari@fondazionerimed.com



COLLABORAZIONI

Department of Pharmacology & Chemical Biology – University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, U.S.A.
Department of Medicine, University of California San Francisco, San Francisco, U.S.A.



AREA TERAPEUTICA

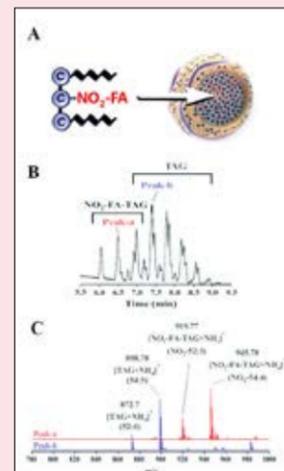
Insufficienze d'organo

PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

L'elettrofilo acido oleico nitrato (10-NO₂-OA) ha mostrato risposte benefiche del segnale cellulare in studi preclinici, ha superato con successo i test di tossicità in Fase I ed è ora sottoposto a studi clinici di Fase II per il trattamento delle malattie croniche polmonari e renali. La comprensione dettagliata della farmacocinetica del 10-NO₂-OA è complicata dalla capacità di alchilare i tioli in modo reversibile, di essere esterificato in vari lipidi complessi e dall'instabilità della porzione nitroalchenica durante l'idrolisi enzimatica e basica. Questo progetto di ricerca è stato ideato per migliorare la nostra comprensione riguardo la farmacocinetica di questo mediatore del segnale cellulare e nuovo candidato farmaco. Abbiamo mostrato: 1) l'esterificazione in trigliceridi come meccanismo primario della distribuzione sistemica di 10-NO₂-OA e 2) la misurazione e la caratterizzazione degli isomeri di 10-NO₂-OA *in vivo*.



A) Esterificazione dei NO₂-FA in trigliceridi e trasporto in lipoproteine plasmatiche. B) Caratterizzazione tramite cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa ad alta risoluzione (HPLC-HR-MS) dei trigliceridi (TAG) e dei trigliceridi contenenti NO₂-FA (NO₂-FA-TAG) delle lipoproteine plasmatiche. C) L'analisi degli spettri di massa dei picchi (a) in rosso e (b) in blu mostrano rispettivamente che i NO₂-FA-TAG posseggono massa dispari mentre i normali TAG hanno una massa pari.

IMPATTO

Abbiamo mostrato che gli acidi grassi nitrati elettrofili (NO₂-FA) posseggono una farmacocinetica unica, con il principale meccanismo di distribuzione tissutale che coinvolge l'esterificazione in trigliceridi (TAG). Questa compartimentalizzazione può limitare le reazioni elettrofile con nucleofili ed enzimi metabolici, come la prostaglandina reduttasi-1 (PtGR-1), e può garantire una migliore farmacocinetica e sicurezza degli elettrofili lipidici, specie che sono state tipicamente considerate tossiche. Inoltre, la preferenziale distribuzione plasmatica di 10-NO₂-OA in trigliceridi suggerisce un'incorporazione nei trigliceridi dei chilomicroni e conseguente riversamento nella circolazione sistemica attraverso la vena succlavia. Ciò impedisce l'inattivazione epatica del carattere elettrofilo di 10-NO₂-OA consentendo una distribuzione efficiente a organi bersaglio. Infine, la misurazione, la caratterizzazione, i nuovi metodi analitici e la descrizione *in vivo* degli isomeri di 10-NO₂-OA rivelano nuove direzioni per una migliore comprensione della nitratura degli acidi grassi durante il metabolismo, l'infiammazione, e lo sviluppo di lipidi omologhi sintetici mediatori del segnale cellulare aventi migliori caratteristiche farmacocinetiche.



RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2018

Abbiamo riportato il meccanismo e la cinetica dell'assorbimento, del metabolismo e della distribuzione dell'acido oleico nitrato in posizione 10 (10-NO₂-OA) nei cani dopo somministrazione orale. Supportati dall'analisi tramite cromatografia liquida-accoppiata alla spettrometria di massa ad alta risoluzione (HPLC-HR-MS) di trigliceridi sintetici e plasmatici contenenti 10-NO₂-OA, abbiamo dimostrato che l'esterificazione iniziale in lipidi complessi è un meccanismo chiave della distribuzione dei NO₂-FA. L'analisi quantitativa delle frazioni lipidiche plasmatiche non-esterificate ed esterificate ha confermato l'incorporazione preferenziale tempo-dipendente di 10-NO₂-OA in trigliceridi rispetto al suo principale metabolita acido stearico nitrato in posizione 10 (10-NO₂-SA). Infine, abbiamo identificato nuovi isomeri di 10-NO₂-OA *in vivo* ed abbiamo caratterizzato la loro reattività elettrofila e il loro metabolismo.



OBIETTIVI PER IL 2019

Definiremo il meccanismo di assorbimento intestinale e la distribuzione plasmatica di 10-NO₂-OA nei roditori. Stabiliremo il ruolo dei chilomicroni e di altre lipoproteine sull'assorbimento e trasporto di 10-NO₂-OA. Verrà utilizzato un modello di ratto con vena porta e dotto linfatico cannulati e separeremo ed analizzeremo le lipoproteine plasmatiche da campioni di sangue umani. A questo proposito, abbiamo sviluppato un'analisi cromatografica liquida-accoppiata alla spettrometria di massa (HPLC-MS/MS) per rilevare i trigliceridi contenenti 10-NO₂-OA e un metodo di idrolisi acida per quantificare 10-NO₂-OA non-esterificato ed esterificato nella linfa mesenterica, plasma portale e frazioni lipoproteiche. Determineremo anche l'effetto di 10-NO₂-OA e dei lipidi nitro-nitrati nella regolazione dell'assorbimento dell'acqua a livello intestinale. L'azione modulatrice ed i recettori

bersaglio di 10-NO₂-OA nell'omeostasi idrica intestinale chiariranno le feci acquose trovate nei modelli animali preclinici sottoposti a somministrazione orale. Il confronto tra 10-NO₂-OA ed i lipidi nitro-nitrati potrebbe potenziare il valore di questi ultimi come potenziali profarmaci senza questo sgradevole effetto gastrointestinale.



CONFERENZE

Comunicazione orale

M. Fazzari. L'esterificazione dell'elettrofilo acido 10-nitro oleico (10-NO₂-OA) è il principale meccanismo di distribuzione e trasporto sistemico. 1st Ri.MED Research Retreat, Ottobre 11-2018, Palermo, Italia.

Poster

M. Fazzari, S.R. Salvatore, D.A. Vitturi, S.R. Woodcock, B.A. Freeman and F.J. Schopfer. Distribuzione dell'acido nitro-oleico nei trigliceridi delle lipoproteine. ASBMB Deuel Conference on Lipids, 6-9 Marzo 2018, San Diego, California, U.S.A.



PUBBLICAZIONI

Fazzari M., Vitturi D.A., Woodcock R.S., Salvatore S., Freeman B.A. & Schopfer F.J. Esterification of electrophilic 10-nitro-oleic acid is the principal mechanism of systemic transport and distribution. Journal of Lipid Research – doi:10.1194/jlr.M088815.

Buchan G.R.*, Bonacci G.*, Fazzari M., Salvatore S., Wendell S.G. Nitro-fatty acid formation and metabolism. Nitric Oxide, 2018, 79, 38-44 – doi:10.1016/j.niox.2018.07.003.

Chartoumpakis D.V., Yagishita Y., Fazzari M., Palliyaguru D.L., Rao U.N.M., Zaravinos A., Khoo N.K.H., Schopfer F.J., Weiss K.R., Michalopoulos G.K., Sipula I., O'Doherty R.M., Kensler T.W., Wakabayashi N. Nrf2 prevents Notch-induced severe insulin resistance and tumorigenesis in mice. JCI Insight, 2018, 3 (5), e97735 – doi:10.1172/jci.insight.97735.

Chartoumpakis D.V., Palliyaguru D.L., Wakabayashi N, Fazzari M., Khoo N.K.H., Schopfer F.J., Sipula I., Yagishita Y., Michalopoulos G.K., O'Doherty R.M., Kensler T.W. Dissecting the effects of Nrf2 deletion in adipocytes and hepatocytes during high-fat diet-induced obesity in mice. American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism, 2018, 315: E180-E195 – doi:10.1152/ajpendo.00311.2017.

D'Amore A., Fazzari M., Jiang H.B., Luketich S.K., Luketich M.E., Hoff R.F., Jacob D.E., Gu X., Badylak S.F., Freeman B.A., and Wagner W.R. Nitro-oleic acid (NO₂-OA) release enhances regional angiogenesis in a rat abdominal wall defect model. Tissue Engineering Part A, 2018, Vol. 24, No. 11-12, pp-889-904 – doi:10.1089/ten.TEA.2017.0349.



PROPRIETÀ INTELLETTUALE

Domanda provvisoria di brevetto internazionale (PCT) No. PCT/US2018/061862. Titolo: Nitro-oleic acid (NO₂-OA) controlled release platform to induce regional angiogenesis in abdominal wall repair. Registrata: Nov-19-2018. Inventori: D'Amore A., Fazzari M., Freeman B., Wagner W.R.

Azioni protettive degli acidi grassi nitrati (NO₂-FA) nella malattia di Parkinson

Marco Fazzari, PhD
mfazzari@fondazionerimed.com



COLLABORAZIONI

Department of Pharmacology & Chemical Biology - University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, U.S.A.
Pittsburgh Institute for Neurodegenerative Diseases (PIND), Department of Neurology, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, U.S.A.



AREA TERAPEUTICA

Patologie dell'invecchiamento

PIPELINE



IMPATTO

L'attivazione di risposte farmacologiche pleiotropiche da parte degli elettrofili NO₂-FA rappresenta una strategia farmacologica sicura ed efficace per il trattamento di malattie come il Parkinson, che hanno una patogenesi complessa. È importante sottolineare che i NO₂-FA hanno superato diversi studi umani di Fase 1 ed è in corso di valutazione in studi di Fase II relativi a malattie infiammatorie croniche.

I nostri attuali obiettivi di ricerca sono progettati per chiarire la bio-distribuzione nel cervello, il reclutamento dei target cellulari, le azioni antinfiammatorie e le risposte citoprotettive dei NO₂-FA in modelli preclinici ben noti di Parkinson. Il completamento del progetto di ricerca proposto offrirà nuove informazioni sul metabolismo, la distribuzione e le concentrazioni dei NO₂-FA nelle aree nigrostriatali dei ratti sia maschi che femmine. Inoltre, il nostro piano di ricerca valuterà la neuroprotezione dei NO₂-FA, attraverso una riduzione dello stress ossidativo, neuroinfiammazione e miglioramento dei sintomi motori. Poiché la malattia di Parkinson è una malattia sinora incurabile, il nostro contributo è significativo perché i NO₂-FA potrebbero fornire un nuovo approccio farmacologico



RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2018

Abbiamo dimostrato che i NO₂-FA attraversano la barriera emato-encefalica nei ratti dopo somministrazione orale. Inoltre, abbiamo valutato la distribuzione mitocondriale di un omologo dei NO₂-FA nei macrofagi dopo la reazione "click". Questa specifica localizzazione cellulare è stata ottenuta sintetizzando un alchino derivato dei NO₂-FA che può rispettivamente reagire con i residui proteici della cisteina e indurre la reazione "click" con una specifica sonda fluorescente in cellule. Inoltre, abbiamo sviluppato e convalidato un nuovo test di legame della prossimità (PL) che può fornire rapidamente informazioni sullo stato di attivazione e sulla localizzazione cellulare di Nox2.

È importante sottolineare che le NADPH ossidasi (Noxs) generano specie reattive dell'ossigeno (ROS) nei neuroni e nelle cellule della microglia ed è stato recentemente suggerito il loro coinvolgimento nel morbo di Parkinson. Quindi, utilizzando questo nuovo saggio, abbiamo osservato che i NO₂-FA inibiscono in modo consistente l'attività Nox2 nelle cellule N27 neurali dopaminergiche trattate con rotenone.



OBIETTIVI PER IL 2019

Gli obiettivi di questa linea di ricerca sono: 1) Definire il potenziale neuroprotettivo dei NO₂-FA attraverso la modulazione dell'espressione genica di Nrf2- e NF-κB-dipendente e l'inibizione dell'attività di Nox-2 in un modello in vitro di Parkinson, 2) Valutare la farmacocinetica dei NO₂-FA nel mesencefalo e i suoi effetti neuroprotettivi in un modello di rotenone di Parkinson nel ratto. Questi risultati sveleranno i meccanismi di protezione dei NO₂-FA nel Parkinson e stabiliranno una solida premessa scientifica per un finanziamento RO1 volto a tradurre questi risultati in modelli animali preclinici altamente rilevanti tra cui il modello di ratto con sovraespressione dell'α-sinucleina umana nella *substantia nigra* mediata dal virus 2 adeno-associato (AAV2).

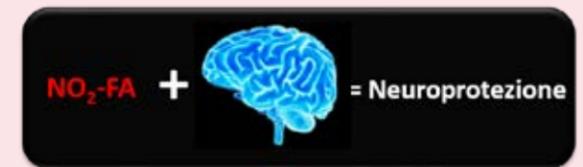


BREVE DESCRIZIONE

Una cura efficace per la malattia di Parkinson è un'esigenza non soddisfatta, poiché i trattamenti attuali non sono riusciti a rallentare o invertire la progressione della malattia. Gli esatti meccanismi della perdita selettiva delle cellule nigrostriatali nella malattia di Parkinson sono ancora poco compresi, ma vi è un crescente consenso sul fatto che lo stress ossidativo e la neuroinfiammazione giocano un ruolo fondamentale. A questo proposito, nuove strategie farmacologiche basate sull'attivazione antiossidante Nrf2-dipendente, sulle risposte

di riparazione tissutale, sull'inibizione dell'espressione delle citochine proinfiammatorie e molecole di adesione NF-κB-dipendente e sull'attività della NADPH ossidasi-2 (NOX-2), hanno mostrato risultati promettenti nella terapia del Parkinson. Gli elettrofili acidi grassi nitrati (NO₂-FA) hanno dimostrato azioni protettive e anti-infiammatorie in multipli modelli preclinici, hanno superato 5 studi clinici di Fase 1 in 107 soggetti e sono ora in studi di Fase II correlati al trattamento delle malattie croniche polmonari e renali. In particolare, abbiamo

appena scoperto che i NO₂-FA attraversano facilmente la barriera emato-encefalica. Da questa osservazione, si ipotizza che i NO₂-FA accedano alla regione nigrostriatale del cervello e inibiscano lo stress ossidativo e la neurodegenerazione nel Parkinson attraverso la modulazione dell'espressione genica Nrf2- e NF-κB-dipendente e l'inibizione della compromissione mitocondriale e dell'attività proinfiammatoria dell'NADPH ossidasi-2 (Nox-2). Quindi, proponiamo di studiare modelli preclinici per definire l'efficacia dei NO₂-FA nel limitare la patogenesi del Parkinson.



Farmacologia dei lipidi nitro-nitrati

Marco Fazzari, PhD
mfazzari@fondazionerimed.com



COLLABORAZIONI

Department of Pharmacology & Chemical Biology - University of Pittsburgh Medical Center, Pittsburgh, U.S.A.



AREA TERAPEUTICA

Patologie dell'invecchiamento

PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

L'ambiente acido gastrico favorisce un'efficace nitratura degli acidi grassi insaturi e la formazione endogena di acidi grassi nitrati (NO₂-FA). Queste specie mediano effetti salutari in numerose malattie infiammatorie attraverso modificazioni proteiche post-traslazionali che modulano percorsi significativi del segnale cellulare. L'acido linoleico coniugato (CLA) è un substrato preferenziale per la nitratura degli acidi grassi ed in presenza di nitrito (NO₂-) e di basso pH gastrico viene convertito nell'elettrofilo acido linoleico coniugato nitrato (NO₂-CLA). Recentemente, nelle stesse condizioni abbiamo scoperto e caratterizzato gli endogeni CLA nitro-nitrati (NO₂+NO₃-CLA).

Questi sono profarmaci che si attivano a pH fisiologico generando acido linoleico coniugato nitrato (NO₂-CLA) e rilasciando specie nitrosanti derivati dell'ossido nitrico (NO), con una potenziale modulazione rispettivamente dei percorsi cGMP-indipendenti/dipendenti. Quindi, la decomposizione di NO₂+NO₃-CLA potrebbe indurre non solo azioni antiossidanti e citoprotettive proprie dei NO₂-FA ma anche vasodilatazione mediata dall'ossido nitrico (NO). La ricerca proposta definirà i meccanismi di generazione mediati dalla dieta e dall'infiammazione, i percorsi ottimali per la sintesi organica e i percorsi del segnale cellulare di questa classe di lipidi strutturalmente unica.



IMPATTO

La ricerca proposta fornirà informazioni sulla generazione e sulle funzioni biologiche protettive dei derivati lipidici nitro-nitrati, una nuova classe di mediatori del segnale cellulare già coperti da una recente domanda provvisoria di brevetto internazionale (PCT).

L'importanza fondamentale del progetto di ricerca è la caratterizzazione di un prodotto metabolico e infiammatorio endogeno sia come mediatore del segnale cellulare che come potenziale strategia farmacologica per limitare il danno vascolare e cardiopolmonare derivante da stress metabolico e infiammatorio.

Questo progetto crea una base di conoscenza per il potenziale sviluppo di questo nuovo prodotto di reazioni nitrossidative come nuovo candidato farmaco.



RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2018

I derivati NO₂+NO₃-CLA sono stati caratterizzati utilizzando l'analisi biochimica, l'etichettatura isotopica e l'analisi spettrometrica di massa accoppiata alla cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC-MS).

È importante notare che l' NO₂+NO₃-CLA incorporato nei trigliceridi (NO₂+NO₃-CLA-TAG) è stato anche isolato mediante cromatografia su strato sottile (TLC) e analizzato mediante analisi UV-Vis e spettroscopia all'infrarosso (IR).

La cinetica e i meccanismi di decomposizione in NO₂-CLA sono stati studiati in soluzioni organiche e soluzioni tampone a pH acido e basico. Inoltre, abbiamo descritto la cinetica che porta alla formazione di specie nitrosanti da NO₂+NO₃-CLA non-esterificato, rispetto a quelle che si scatenano dopo l'idrolisi lipasica di NO₂+NO₃-CLA-TAG per produrre NO₂-CLA. Infine, è stata formulata una strategia per la sintesi chimica dei derivati NO₂-NO₃-CLA.



OBIETTIVI PER IL 2019

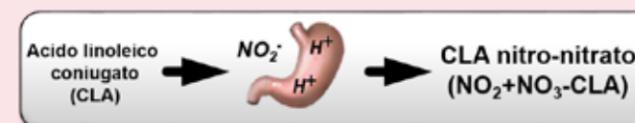
Dopo aver ideato ed eseguito strategie di sintesi organica per ottenere grammi di NO₂+NO₃-CLA standard puri non-esterificati ed esterificati, definiremo i meccanismi digestivi e infiammatori che portano al posizionamento concertato sia del gruppo -NO₂ che del gruppo -ONO₂ su un acido grasso insaturo ed esterificato in TAG. Il piano di ricerca valuterà quindi a) il metabolismo dei derivati NO₂+NO₃-CLA e b) le risposte *in vitro* e *in vivo* a NO₂+NO₃-CLA, con particolare attenzione al potenziale per questa classe di mediatori del segnale cellulare di agire tramite meccanismi cGMP-dipendente e cGMP-indipendente.

I dati preclinici e clinici attuali supportano che la somministrazione orale di NO₂-FA induce risposte salutari a livello di espressione genica mitigando eventi patogeni indotti dall'obesità e dall'infiammazione. Prevediamo che i derivati NO₂+NO₃-CLA possano essere anche i precursori del NO₂-FA già rilevati nei roditori, nell'uomo e nelle piante.



PROPRIETÀ INTELLETTUALE

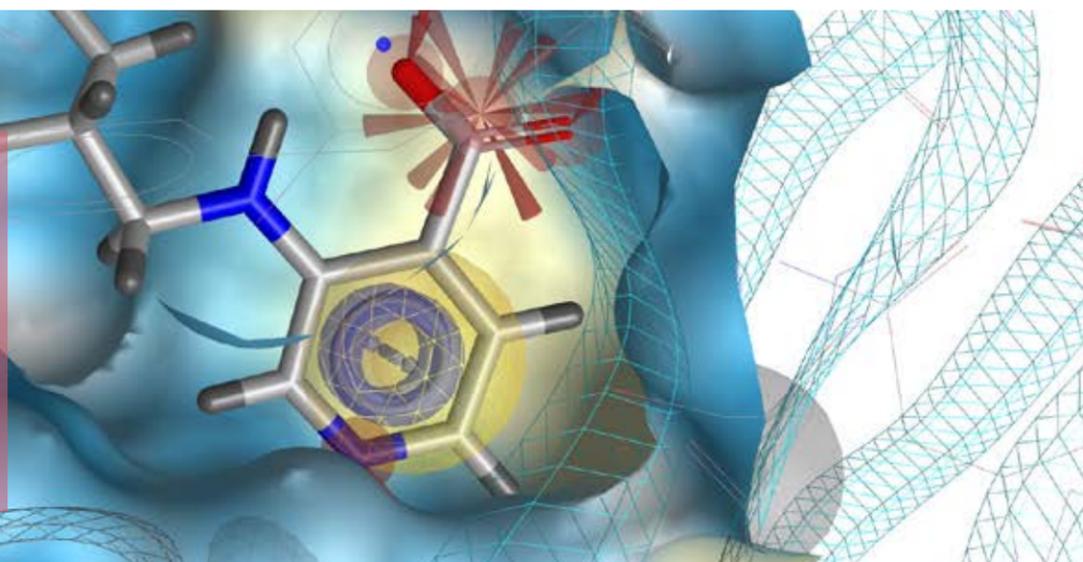
Domanda di Brevetto internazionale N. PCT/US2017/055154.
Titolo: Novel reversible nitroxide derivatives of nitroalkenes that mediate nitrosating and alkylating reactions. Filed: Oct-04, 2017.
Inventors: Fazzari M., Schopfer F. and Freeman B.



PRODOTTI: FARMACI

Progettazione di modulatori della Istone lisina demetilasi 4 (KDM4) come agenti antitumorali

Ugo Perricone, PhD
uperricone@fondazionerimed.com



OBIETTIVI PER IL 2019

Per il 2019 l'obiettivo del progetto è la progettazione e la sintesi di molecole *in house* da cui verrà scelta una *hit* con attività nel range basso uM con buon profilo di tossicità e selettività verso la KDM4A rispetto alle altre KDMs da poter sviluppare ulteriormente ottimizzandone il profilo come *lead compound*. Particolare attenzione verrà data inoltre alla capacità di modulazione delle due principali forme di demetilasi coinvolte nella patologia tumorale oggetto di studio (KDM4A e KDM4C). L'attività della molecola sarà valutata sia dal punto di vista biologico con saggi enzimatici (sulle isoforme A e C dell'enzima) e saggi cellulari che tecniche biofisiche (ITC, NMR) che consentiranno di elucidare le porzioni maggiormente coinvolte nell'interazione *host-guest*. Ciò permetterà inoltre l'ulteriore elucidazione del *binding mode* e la conseguente validazione prospettiva dei modelli *In Silico* utilizzati per la predizione del modo di *binding* delle molecole.



COLLABORAZIONI

Università della Campania Luigi Vanvitelli, - Dipartimento di Medicina di Precisione - Napoli Italia



AREA TERAPEUTICA

Cancro

PIPELINE



BREVE DESCRIZIONE

I processi epigenetici sono meccanismi essenziali nello sviluppo e nel funzionamento fisiologico dei modelli di espressione genica cellulari. I cambiamenti globali nello scenario epigenetico sono infatti segnali distintivi dell'iniziazione e progressione del cancro. L'N-Metilazione dei residui lisina e arginina è uno dei più frequenti meccanismi di regolazione epigenetica trascrizionale negli eucarioti. Nell'uomo sono due le famiglie di enzimi che catalizzano la demetilazione dei residui lisinici (KDMs). La famiglia delle KDM2-7 è la più grande classe di demetilasi ed è costituita da 20 enzimi. In particolare modo, KDM4A è frequentemente amplificato e overespresso in diversi tipi di tumori umani, ad esempio nel cancro alle ovaie, al colon

o nel carcinoma a cellule squamose. L'obiettivo principale del progetto di ricerca è la progettazione razionale e la sintesi di *small molecules* in grado di modulare i meccanismi epigenetici regolati dalla Istone lisina demetilasi 4 (KDM4) alla base delle patologie tumorali. Il disegno razionale delle molecole prevede diversi approcci tra cui la creazione di modelli *In Silico* creati sulle proteine target, oggetto del nostro studio, e la loro validazione in modo retrospettivo. Questi modelli vengono utilizzati per il *virtual screening* e il *molecular modeling* al fine di identificare potenziali *Hit compounds*, attraverso tecniche computazionali e guidare la sintesi chimica verso composti che passano da un profilo di *hit compound* a uno di *lead compound*.



IMPATTO

I recenti progressi nel campo dell'epigenetica del cancro hanno messo in luce l'importanza dei meccanismi epigenetici nello sviluppo della patologia tumorale. Particolare importanza è stata data alla metilazione del DNA, le modificazioni degli istoni, e le modifiche di espressione dei microRNA. La natura reversibile delle aberrazioni epigenetiche nelle cellule tumorali ha fin dalle prime scoperte sottolineato l'aspetto promettente della terapia epigenetica quale valida strategia terapeutica in campo oncologico. In questo contesto, i farmaci con target epigenetici agiscono in duplice modo, prevenendo la formazione di cellule progenitrici del cancro, e uccidendo al tempo stesso le cellule cancerose solitamente resistenti ad altri agenti terapeutici. Sebbene negli ultimi anni diversi farmaci epigenetici siano stati approvati dalle istituzioni pubbliche competenti per l'attività regolatoria, sono ad oggi in corso numerosi studi clinici, e risultano pertanto numerose le possibilità di sviluppare nuovi farmaci che agiscano a livello dei meccanismi epigenetici.



RISULTATI RAGGIUNTI NEL 2018

Durante il 2018 sono stati messi a punto i modelli computazionali che potessero servire per la progettazione razionale di molecole ad attività inibitoria sul target. In particolare ci si è concentrati sull'utilizzo di algoritmi di *docking* molecolare, farmacofori structure- e ligand-based e approcci chemoinformatici basati sull'utilizzo di *fingerprint* molecolari. La validazione retrospettiva dei modelli computazionali e la loro applicazione nelle campagne di *virtual screening* su librerie commerciali ha permesso l'identificazione di 3 molecole *hit* che sui saggi biochimici preliminari hanno mostrato attività uM su KDM4. Le stesse molecole hanno dato risultati interessanti anche dal punto di vista dell'inibizione della proliferazione cellulare su cellule di tipo HCT-116. Sulla base dei risultati ottenuti dagli *screening*, si è passati alla progettazione di analoghi strutturali delle *hit series* con l'obiettivo di migliorarne il profilo di attività.



Raggio X dell' Inibitore QC6352 legato al sito di binding di KDM4A