

Abstract

L'infiammazione ed il cancro sono due complessi meccanismi patologici in cui risultano coinvolti una serie di differenti mediatori molecolari. La profonda connessione tra cancro ed infiammazione è ben nota e la modulazione di questi processi rappresenta uno dei principali obiettivi della moderna chimica farmaceutica.

L'identificazione di nuove entità molecolari capaci di interferire con target biologici coinvolti in questi due meccanismi è altamente auspicabile per lo sviluppo sia di nuovi potenziali farmaci sia di sonde molecolari utili per studiare aspetti biologici finora meno investigati. Tre principali target, coinvolti a vari livelli nell'infiammazione e nel cancro, sono stati investigati a fondo: le proteine contenenti *bromodomain* (BRD), l'enzima microsomiale prostaglandina E₂ sintasi di tipo 1 (mPGES-1) e lo chaperone *heat shock protein 90* (Hsp90). I risultati ottenuti possono essere riassunti in tre principali sezioni, in base al target di interesse:

a) Scoperta di nuovi modulatori dei *bromodomain* umani attraverso approcci *structure-based* e metodiche computazionali. I BRD sono moduli proteici evolutivamente conservati che fungono da “*readers*” del codice istonico, riconoscendo residui di acetil-lisina (Kac) sulle code istoniche. Il coinvolgimento delle proteine contenenti BRD è recentemente emerso in molteplici patologie, specialmente in processi tumorali. Allo scopo di identificare un nuovo chemotipo in grado di mimare Kac, è stato intrapreso un approccio *structure-based* partendo da frammenti a nucleo *9H*-purinico. Uno dei frammenti inizialmente identificati (**2a**), che era emerso come ligando dei BRD umani, è stato sistematicamente modificato impiegando approcci di sintesi organica in modo da ricavare un profilo di relazioni struttura attività da sfruttare nel successivo step di ottimizzazione strutturale. Questi studi hanno permesso di individuare ligandi con affinità nell'ordine del nanomolare per BRD9 (composti **7d** e **11**) e solo residua affinità micromolare per BRD4. Il legame di **7d** e **11** al *bromodomain* di BRD9 è stato investigato mediante esperimenti di cristallografia e di *docking* flessibile che hanno evidenziato un esteso riarrangiamento dei residui aminoacidici che formano la tasca di riconoscimento di Kac, suggerendo un meccanismo di interazione di tipo “*induced-fit*”. Infine, i composti non hanno esibito alcun effetto citotossico in cellule HEK293T e hanno efficacemente spiazzato il bromodomain di BRD9 dalla cromatina in saggi BRET (*Bioluminescence Resonance Energy Transfer*), influenzando solo parzialmente sul complesso BRD4/istone.

b) Identificazione ed ottimizzazione strutturale di inibitori dell'mPGES-1 a nucleo diidropirimidinico. L'mPGES-1 è un omotrimerico di membrane coinvolto nella cascata dell'acido arachidonico, che funge da enzima terminale nella via biosintetica delle cicloossigenasi (COX) catalizzando la formazione della prostaglandina (PG)₂ dal precursore PGH₂. L'inibizione dell'mPGES-1 può rappresentare un valido approccio terapeutico per modulare la formazione della PGE₂ indotta da stimoli infiammatori, permettendo di evitare interferenze con i prostanoidi costitutivamente prodotti. Al fine di individuare una nuova piattaforma molecolare per la modulazione dell'mPGES-1, è stato seguito un approccio *structure-based* focalizzato su una collezione di molecole a nucleo 3,4-diidropirimidin-2(1H)-onico (DHPM), utilizzando la prima struttura cristallografica ad alta risoluzione dell'enzima in forma attiva (PDB: 4AL0). Le interazioni con la controparte recettoriale sono state introdotte come filtro qualitativo per la selezione dei composti più promettenti da sintetizzare nella successiva fase di sintesi chimica. I risultati biologici ottenuti sono stati in accordo con i suggerimenti computazionali portando all'individuazione di due molecole (**48** e **49**) con una promettente attività inibitoria nei confronti dell'mPGES-1 da saggi *in vitro*. La più recente struttura cristallografica dell'mPGES-1 in complesso con l'inibitore noto LVJ (PDB: 4BPM) è stata utilizzata per ottimizzare il composto **48** (IC₅₀ = 4.16 ± 0.47 μM), portando al composto **53**, un inibitore con attività 10 volte maggiore rispetto al composto *lead* (IC₅₀ = 0.41 ± 0.02 μM).

Allo scopo di investigare ulteriormente questo complesso enzima, sono stati seguiti anche protocolli di espressione eterologa dell'mPGES-1 umano, seguiti da successivi studi di cristallizzazione bidimensionale.

c) Il nucleo diidropirimidinico come nuovo chemotipo per la modulazione del sito C-terminale di Hsp90. Hsp90 è uno chaperone molecolare ampiamente coinvolto nello sviluppo, sopravvivenza e proliferazione di cellule tumorali. I più noti inibitori di Hsp90 si legano alla regione N-terminale della proteina. Tuttavia, questo tipo di modulazione è associato in ambito clinico a problemi di somministrazione e di tossicità dovuti all'induzione della risposta da stress nelle cellule tumorali, un meccanismo citoprotettivo indesiderato. Sebbene meno investigata, l'inibizione del sito C-terminale di Hsp90 rappresenta un approccio alternativo molto promettente per lo sviluppo di nuovi potenziali farmaci antitumorali, in quanto esso non risulta essere associato agli effetti negativi causati dalla risposta da stress. Nel tentativo di identificare modulatori della regione C-terminale di Hsp90 non ispirati a composti naturali, una collezione di derivati a nucleo diidropirimidinico

(DHPM) è stata sintetizzata. Il razionale alla base di tale scelta deriva dall'analogia strutturale tra tale *scaffold* e l'uridina trifosfato, un nucleotide capace di legarsi selettivamente al C-terminale di Hsp90, ma non all'N-terminale. Saggi biologici hanno confermato che il nucleo diidropirimidinico può essere effettivamente considerato come un nuovo chemotipo per la modulazione della funzione chaperonica di Hsp90 attraverso l'interazione con la sua regione C-terminale. In particolare, il composto **54** è stato identificato come un nuovo promettente agente antiproliferativo capace di legarsi al C-terminale di Hsp90.