

Abstract

Elevati livelli di colesterolo LDL (LDL-C) rappresentano il principale fattore di rischio per le malattie cardiovascolari, la principale causa di morte nel mondo. Ad oggi sono state valutate tre principali strategie terapeutiche per ridurre il LDL-C tra cui: a) inibizione degli step critici della sintesi del colesterolo, b) regolazione dell'espressione epatica del recettore delle LDL (LDLR) e c) inibizione dell'interazione LDLR / proproteina convertasi subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9).

La berberina (BBR) è un noto agente ipolipidizzante in grado di sovraregolare l'espressione di LDLR. Questo alcaloide è inoltre dotato di proprietà ipoglicemicizzanti, antitumorali, antivirali, antiossidanti e neuroprotettive. Tuttavia, la BBR ha una scarsa biodisponibilità orale, è substrato della glicoproteina P (P-gp) e può influenzare il sistema CYP450. Pertanto, è incoraggiato lo sviluppo di nuovi analoghi della BBR al fine di ottenere nuovi composti ipolipidici con un migliore profilo farmacocinetico/farmacodinamico.

È noto che in condizioni fisiologiche, l'LDL-C presente in circolo, si lega all'LDLR e il complesso viene endocitato negli epatociti. In seguito, l'LDL-C viene degradato nel lisosoma, mentre l'LDLR viene riportato sulla superficie cellulare. Invece, in presenza della PCSK9, l'LDLR non viene riciclato e l'intero complesso viene indirizzato ai lisosomi; pertanto, l'inibizione dell'interazione PCSK9/LDLR determina un aumento di LDLR sulla superficie degli epatociti e migliora l'assorbimento delle LDL da parte del fegato. Ad oggi, solo due mAbs (alirocumab ed evolocumab) diretti contro PCSK9 sono stati approvati dall'FDA. Tuttavia, questi farmaci devono essere somministrati per via parenterale, sono costosi e questi aspetti possono influenzare notevolmente l'aderenza alla terapia.

Pertanto, small molecules, disponibili per via orale e più economiche, in grado di inibire l'interazione PCSK9/LDLR, rappresentano una valida strategia nel trattamento delle dislipidemie.

Questo progetto di ricerca è stato incentrato sullo sviluppo di nuovi agenti ipolipemizzanti attraverso due diversi approcci: a) modulazione dell'espressione dell'LDLR e b) inibizione dell'interazione PCSK9/LDLR.

Nello specifico, per il primo approccio è stata progettata e sintetizzata una piccola libreria di analoghi della BBR con l'obiettivo di migliorarne la biodisponibilità, e far luce sui requisiti strutturali minimi per la sua azione ipolipidemizzante. La citotossicità di un piccolo insieme di analoghi della BBR sintetizzati è stata valutata mediante saggio MTT sulle linee cellulari HepG2 e HaCaT, utilizzando la BBR come composto di riferimento. I risultati ottenuti sono stati utilizzati per selezionare tre promettenti analoghi, **18l**, **31** e **25a** che sono stati testati per valutare la loro capacità di ridurre i livelli di colesterolo totale (TCHO) e trigliceridi (TG) nelle cellule HepG2 dopo 48 ore di trattamento a 5, 10 e 30µM. Il composto **25a** si è rivelato quello più attivo mostrando a 30µM un tasso di inibizione del 60% e dell'88% dei livelli di TCHO e TG rispettivamente. Infine, i composti **18l** e **31** sono stati testati mediante qRT-PCR e sono risultati essere in grado di aumentare l'espressione di LDLR. Al momento sono in corso ulteriori studi per valutarne il meccanismo d'azione e le proprietà farmacocinetiche.

Per il secondo approccio, due serie di derivati a scaffold pirrolico sono stati razionalmente progettati attraverso studi di docking molecolare, al fine di mimare i residui critici dell'LDLR implicati nell'interazione con la proteina partner PCSK9. Gli studi computazionali sono stati eseguiti utilizzando la struttura cristallografica della PCSK9 complessata con Pep2-8, un noto inibitore peptidico dell'interazione PCSK9/LDLR (codice PDB: 4NMX). Per un piccolo gruppo di composti sintetizzati è stato eseguito un test di legame *in vitro* (SPR) e due derivati hanno mostrato una K_D di circa 7 volte inferiore rispetto a quella di Pep2-8, usato come composto di riferimento.