

**Relazione della Dott.ssa ANNA CARBONE sul progetto di ricerca svolto durante il congedo per motivi di studio e di ricerca dal 04-09-2019 al 03-03-2020**

presso la linea di ricerca D3-PharmaChemistry dell'Istituto Italiano di Tecnologia (IIT), Genova

Identificazione di nuove molecole ad attività antifibrotica

L'attività di ricerca della Dott.ssa Anna Carbone, durante l'ultimo periodo di congedo, si è svolta sempre presso i laboratori della D3-PharmaChemistry Line (D3-P) di IIT, sotto la supervisione del Dott. Tiziano Bandiera, nell'ambito del progetto volto all'identificazione di piccole molecole attivatrici del segnale delle BMP ("Bone morphogenetic proteins") utili come potenziali agenti antifibrotici.

Le proteine BMP, appartenenti alla superfamiglia dei fattori di crescita e differenziazione (TGFs-beta), giocano un ruolo fondamentale in diversi processi durante la formazione ed il mantenimento di vari organi come ossa, cartilagine, reni, polmoni, muscoli, vasi sanguigni. Tali proteine trasducono i loro segnali attraverso i recettori serina-treonina di tipo I e II ed i loro effettori intracellulari a valle includono le proteine SMAD [1].

La fibrosi è un processo patologico associato a diverse malattie croniche a carico di diversi organi e caratterizzata dalla deposizione di matrice extracellulare (ECM) che comporta la distruzione della normale architettura dei tessuti con conseguente mancato funzionamento degli organi coinvolti. [2,3] Il trattamento della fibrosi rappresenta un problema ad alto interesse sociale poiché solo pochi agenti antifibrotici sono stati approvati dalla "Food and Drug Administration (FDA)" ed inoltre circa il 45% della mortalità nei paesi industrializzati è legata a complicazioni dovute a malattie fibroproliferative croniche. [4-6]

Un importante regolatore di fibrosi tissutale è la citochina "Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )" il cui effetto pro-fibrotico *in vivo* è stato studiato poiché risulta sovraespressa in molti tessuti fibrotici. [7,8]. Inoltre è stato dimostrato, in diversi modelli di fibrosi d'organo, come il suo effetto pro-fibrotico sia antagonizzato dall'attivazione del pathway delle BMP.

Nell'ambito di una collaborazione tra la linea di ricerca D3-PharmaChemistry dell'Istituto Italiano di Tecnologia (IIT) e il laboratorio U.O.C. Genetica Medica dell'Istituto Giannina Gaslini (IGG) di Genova, è stato precedentemente condotto un high throughput screening (HTS) di una libreria di composti di IIT (ca 11.000) utilizzando un saggio messo a punto nei laboratori IGG. [9] Tale screening ha portato alla identificazione di composti (hits) in grado di attivare il segnale delle BMPs. Inoltre test in saggi secondari hanno portato alla identificazione di hits "confermati". In particolare, sono stati identificati quattro hits attivatori appartenenti a chemotipi diversi tra i quali, per ragioni di attività biologica, fattibilità chimica, e copertura brevettuale, il composto indentificato come ARN8580 è stato scelto come punto di partenza per la sintesi di analoghi più attivi. Contemporaneamente ai saggi precedentemente descritti è stato messo a

punto, presso il laboratorio D3-P di IIT, un nuovo saggio di screening [10,11] che ha permesso di evidenziare un'attività antifibrotica dell'hit attivatore selezionato. L'attività di disegno e sintesi dei nuovi analoghi dell'hit è stata condotta, durante tutto il periodo di congedo dalla Dott.ssa Carbone. In particolare, la Dott.ssa Carbone si è inizialmente occupata della risintesi dell'hit selezionato in maniera da confermarne la struttura chimica. Successivamente l'attenzione si è focalizzata sulla sintesi di analoghi dell'hit di riferimento ottenendo un set di circa 100 composti. Tutti i nuovi analoghi sono stati testati, con il saggio precedentemente descritto, per evidenziarne la loro potenziale attività antifibrotica. I composti risultati più interessanti sono stati ulteriormente testati in dose-risposta ed è stata valutata la loro potenziale citotossicità. Tra i composti testati, il derivato ARN24319 ha mostrato il miglior profilo di attività e assenza di tossicità ed è stato selezionato come "lead compound" per una ulteriore estensione della Relazione Struttura-Attività (SAR) e per migliorare le proprietà "drug-like" dei composti. A tale scopo, un altro set di circa 60 analoghi sono stati disegnati e sintetizzati dalla Dott.ssa Carbone. Alcuni tra questi nuovi derivati in particolare ARN24500, ARN24701 e ARN24690, hanno mostrato un'attività antifibrotica nettamente superiore al "lead compound" a dosi più basse. Nel corso dell'ultimo periodo di congedo, la Dott.ssa Carbone si è occupata della sintesi di un altro set di analoghi dei composti risultati più interessanti per completare lo studio delle Relazioni Struttura-Attività. Questo studio ha permesso di selezionare i composti più promettenti che verranno caratterizzati mediante l'utilizzo di saggi funzionali addizionali.

## References

- 1) T. Katagiri, T., et al. *Biol.* **2016**, *8*, pii: a021899.
- 2) Wynn, T. A., et al. *Nat. Med.* **2012**, *18*, 1028-1040.
- 3) Juillerat-Jeanneret, L., et al. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 9811-9840.
- 4) Li, X., et al. *Front. Pharmacol.* **2017**, *8*, article 855.
- 5) Rosenbloom, J., et al. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1832*, 1088-1103.
- 6) Wynn, T. A. *J. Pathol.* **2008**, *214*, 199-210.
- 7) Igotz, R. A., et al. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 4337-4345.
- 8) Branton M. H., et al. *Microbes Infect.* **1999**, *1*, 1349-1365.
- 9) Cappato, S., et al. *Dis. Model. Mech.* **2016**, *9*, 685-696.
- 10) Xu, Q., Et al. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* **2007**, *293*, F631-F640.
- 11) Hu, Q., et al. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2009**, *24*, 3033-304.

- Il lavoro svolto durante il periodo di congedo, sul progetto di ricerca principale sugli agenti antifibrotici, è stato oggetto di un contributo scientifico al congresso “XXVI National Meeting in Medicinal Chemistry. XII Young Medicinal Chemists’ Symposium. Milano, 16-19 Luglio 2019. Lo stesso lavoro sarà oggetto di due prossime pubblicazioni una volta completati gli studi biologici che sono in corso.
- Inoltre, la partecipazione della Dott.ssa Carbone ad altri progetti di ricerca minori ha permesso:
  - la sottomissione alla rivista “Nature Communications” del seguente manoscritto dal titolo “Rational backbone redesign of a Fructosyl Peptide Oxidase to widen its active site access tunnel” attualmente *under revision*.
  - la stesura di un manoscritto su inibitori dell’enzima “N-acylethanolamine acid amide hydrolase (NAAA)” di prossima sottomissione alla rivista Journal of Medicinal Chemistry.

Genova, 12-03-2020

F.to dott.ssa Anna Carbone