

Al Direttore del Dipartimento di  
Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e  
Farmaceutiche  
Università degli Studi di Palermo  
Prof. Silvestre Buscemi

Palermo, 06/08/2020

Oggetto: Relazione sull'attività di ricerca svolta dalla Dott.ssa MARIA VALERIA RAIMONDI durante il congedo straordinario per motivi di studio e di ricerca (D.R. n. 4444 del 9/12/2019) dal 10/01/2020 al 09/07/2020 presso il Dipartimento di Chimica Farmaceutica dell'Università di Vienna (Austria)

L'attività di ricerca della Dott.ssa Maria Valeria Raimondi, durante il periodo di congedo straordinario per motivi di studio e di ricerca (D.R. n. 4444 del 9/12/2019) dal 10/01/2020 al 09/07/2020, si è svolta presso il Dipartimento di Chimica Farmaceutica dell'Università di Vienna sotto la supervisione del Professore Thierry Langer, nell'ambito di un progetto di Drug Discovery volto all'identificazione di piccole molecole ad attività antitumorale selettive sull'isoforma 4 del recettore del fattore di crescita dei fibroblasti (FGFR4).

Il processo di Drug Discovery, che fin dall'inizio del secolo scorso è stato guidato dalla cosiddetta serendipity, rappresenta oggi un complesso processo in cui la stretta relazione tra biologia e chimica conduce all'identificazione di un target biologico ed a composti che presentano un effetto farmacologico su di esso. Il Drug Discovery può essere suddiviso in più fasi:

- 1) identificazione del target e sua validazione;
- 2) identificazione di Hit compounds;
- 3) generazione del Lead compound (Hit-to-Lead phase);
- 4) ottimizzazione del Lead compound.

La fase di sviluppo di un farmaco inizia con lo studio della patologia e l'identificazione di uno o più targets, al quale segue uno studio finalizzato alla validazione dei targets ed all'identificazione di Hit

compounds. Gli studi di generazione del Lead compound e la sua ottimizzazione di solito si sovrappongono o operano in cicli iterativi, non sempre seguendo una direzione lineare.

Allo scopo di individuare nuovi agenti antitumorali, sono stati scelti come targets i recettori del fattore di crescita dei fibroblasti (FGFRs), dei recettori tirosin-chinasici che svolgono un ruolo chiave nella regolazione di una pletora di processi biologici tra cui lo sviluppo embrionale, l'omeostasi dei tessuti ed il metabolismo. Ad oggi, sono stati individuati quattro recettori della tirosin-chinasi transmembrana appartenenti alla famiglia FGFR: FGFR1, FGFR2, FGFR3 e FGFR4. <sup>[1]</sup> Cambiamenti genetici ed epigenetici portano a mutazioni, amplificazioni, riarrangiamenti/fusioni responsabili di anomalie nei recettori del fattore di crescita dei fibroblasti e svolgono un ruolo chiave negli eventi di carcinogenesi in diversi tipi di tumore. <sup>[1-3]</sup> Ad esempio, mutazioni FGFRs sono state trovate nel 7% di circa cinquemila tumori solidi. <sup>[4]</sup>

Per ripristinare l'attività fisiologica di FGFRs o per ridurre/modulare le loro espressioni geniche, sono stati sviluppati con successo una serie di inibitori FGFRs che sono attualmente oggetto di studi preclinici e clinici. Gli inibitori FGFRs sono piccole molecole che si legano in modo competitivo alla tasca dell'ATP inibendo l'autofosforilazione della tirosina o la sua attività catalitica. <sup>[5]</sup>

Poiché i recettori del fattore di crescita dei fibroblasti condividono dal 74 al 77% di omologia strutturale nei loro domini chinasici, lo sviluppo di agenti selettivi FGFRs rappresenta una grande sfida. Tuttavia, piccoli cambiamenti nelle sequenze di aminoacidi possono aiutare ad individuare gli inibitori di specifiche isoforme di FGFR. Ad esempio, molti studi si sono concentrati sulla presenza della cisteina 522 (Cys522) nella hinge region della tasca di legame dell'ATP di FGFR4, corrispondente alla tirosina (Tyr522) nelle isoforme di FGFR1-3. <sup>[6,7]</sup>

Negli ultimi anni, è stata prestata molta attenzione alla scoperta degli inibitori selettivi di FGFR4 utili nel trattamento del carcinoma epatocellulare, dei tumori gastrici, del pancreas, delle ovaie e della mammella, orofaringeo e del carcinoma orale a cellule squamose. <sup>[8-13]</sup>

Lo scopo del progetto di ricerca svolto durante il periodo di congedo è stato identificare nuovi composti con attività selettiva su FGFR4 mediante un approccio computazionale structure-based. Partendo dalla struttura cristallina di FGFR4 complessata con il Ponatinib (codice PDB: 4UXQ), un potente inibitore multi-target della tirosin-chinasi utilizzato per il trattamento della leucemia mieloide cronica Bcr-Abl resistente all'imatinib, è stato generato un modello farmacoforo per il sito di legame di FGFR4 utilizzando LigandScout versione 4.4 Expert, e sono state esplorate le caratteristiche derivanti sia dal complesso proteina-ligando che dall'apostruttura dell'enzima.

Il modello farmacoforo, perfezionato e validato mediante costruzione della Receiver Operating Characteristic curve (ROC), è stato utilizzato per analizzare tre databases tramite virtual screening. Il

primo consiste in una hit list di 3.043 molecole ottenute dal database Aldrich Market Select (6,8 milioni di composti) mediante screening del modello farmacoforo del Ponatinib (codice PDB: 4UXQ) e consentendo l'omissione di massimo 3 features. Il secondo database è composto da 52 composti progettati modificando la struttura del Ponatinib nel sito di legame FGFR4 (codice PDB: 4UXQ), utilizzando lo strumento di Binding Affinity Score presente in LigandScout V4.4. Infine, un database di 327 flavonoidi ottenuti dal sito NPACT (Naturally Occurring Plant-based Anti-cancer Compound-Activity-Target).<sup>[14]</sup>

Gli studi ADMET *in silico* (assorbimento, distribuzione, metabolismo, eliminazione, tossicità) sono stati condotti su 2.690 hits, selezionati mediante virtual screening, con il software QikProp (versione 6.2, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2019) e hanno permesso di confrontare le proprietà fisico-chimiche e farmacocinetiche di ciascun hit con quelle del 95% dei farmaci presenti sul mercato.

Sono stati quindi selezionati 138 hits con caratteristiche drug-likeness che sono stati sottoposti a studi di docking al fine di studiare il binding mode dei ligandi all'interno del sito attivo di FGFR4 (codice PDB: 4UXQ). Tutte le strutture sono state disegnate in 3D e le loro conformazioni sono state ottimizzate. Gli studi di docking sono stati eseguiti con il software Autodock 4.2, applicando una tolleranza (Root Mean Square Deviation, RMSD) di 0,5 Å. Infine è stata effettuata un'ispezione visiva del binding mode dei ligandi per analizzare il modo in cui ciascun hit interagisce con i residui amminoacidici presenti nel sito attivo di FGFR4.

Questo lavoro ha permesso di identificare diversi Hit compounds che rappresentano un interessante punto di partenza per sviluppare e sintetizzare nuovi Lead compounds selettivi per FGFR4.

#### Bibliografia

- [1] Katoh, M. Fibroblast Growth Factor Receptors as Treatment Targets in Clinical Oncology. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2019, 16 (2), 105–122. <https://doi.org/10.1038/s41571-018-0115-y>
- [2] Sobhani, N.; Fan, C.; O. Flores-Villanueva, P.; Generali, D.; Li, Y. The Fibroblast Growth Factor Receptors in Breast Cancer: From Oncogenesis to Better Treatments. *Int J Mol Sci* 2020, 21 (6). <https://doi.org/10.3390/ijms21062011>
- [3] Brooks, A. N.; Kilgour, E.; Smith, P. D. Molecular Pathways: Fibroblast Growth Factor Signaling: A New Therapeutic Opportunity in Cancer. *Clin Cancer Res* 2012. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-0699>
- [4] The FGFR Landscape in Cancer: Analysis of 4,853 Tumors by Next-Generation Sequencing | *Clinical Cancer Research* <https://clincancerres.aacrjournals.org/content/early/2015/10/23/1078-0432.CCR-14-3212> (accessed Jun 17, 2020)
- [5] Zhang, J.; Yang, P. L.; Gray, N. S. Targeting Cancer with Small Molecule Kinase Inhibitors. *Nature Reviews Cancer* 2009, 9 (1), 28–39. <https://doi.org/10.1038/nrc2559>
- [6] Dai, S.; Zhou, Z.; Chen, Z.; Xu, G.; Chen, Y. Fibroblast Growth Factor Receptors (FGFRs): Structures and Small Molecule Inhibitors. *Cells* 2019, 8 (6). <https://doi.org/10.3390/cells8060614>
- [7] Lu, X.; Chen, H.; Patterson, A. V.; Smaill, J. B.; Ding, K. Fibroblast Growth Factor Receptor 4 (FGFR4) Selective Inhibitors as Hepatocellular Carcinoma Therapy: Advances and Prospects. *J. Med. Chem.* 2019, 62 (6), 2905–2915. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01531>

- [8] Miura, S.; Mitsuhashi, N.; Shimizu, H.; Kimura, F.; Yoshidome, H.; Otsuka, M.; Kato, A.; Shida, T.; Okamura, D.; Miyazaki, M. Fibroblast Growth Factor 19 Expression Correlates with Tumor Progression and Poorer Prognosis of Hepatocellular Carcinoma. *BMC Cancer* 2012, 12 (1), 56. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-56>
- [9] Futami, T.; Kawase, T.; Mori, K.; Asaumi, M.; Kihara, R.; Shindoh, N.; Kuromitsu, S. Identification of a Novel Oncogenic Mutation of FGFR4 in Gastric Cancer. *Scientific Reports* 2019, 9 (1), 14627. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51217-6>
- [10] Lang, L.; Teng, Y. Fibroblast Growth Factor Receptor 4 Targeting in Cancer: New Insights into Mechanisms and Therapeutic Strategies. *Cells* 2019, 8 (1), 31. <https://doi.org/10.3390/cells8010031>
- [11] Zaid, T. M.; Yeung, T.-L.; Thompson, M. S.; Leung, C. S.; Harding, T.; Co, N.-N.; Schmandt, R. S.; Kwan, S.-Y.; Rodriguez-Aguay, C.; Lopez-Berestein, G.; Sood, A. K.; Wong, K.-K.; Birrer, M. J.; Mok, S. C. Identification of FGFR4 as a Potential Therapeutic Target for Advanced-Stage, High-Grade Serous Ovarian Cancer. *Clin Cancer Res* 2013, 19 (4), 809–820. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-2736>
- [12] Tiong, K. H.; Tan, B. S.; Choo, H. L.; Chung, F. F.-L.; Hii, L.-W.; Tan, S. H.; Khor, N. T. W.; Wong, S. F.; See, S.-J.; Tan, Y.-F.; Rosli, R.; Cheong, S.-K.; Leong, C.-O. Fibroblast Growth Factor Receptor 4 (FGFR4) and Fibroblast Growth Factor 19 (FGF19) Autocrine Enhance Breast Cancer Cells Survival. *Oncotarget* 2016, 7 (36), 57633–57650. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9328>
- [13] Koole, K.; Kempen, P. M. W. van; Bockel, L. W. van; Smets, T.; Klooster, Z. van der; Dutman, A. C.; Peeters, T.; Koole, R.; Diest, P. van; Es, R. J. J. van; Willems, S. M. FGFR4 Is a Potential Predictive Biomarker in Oral and Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *PAT* 2015, 82 (6), 280–289. <https://doi.org/10.1159/000439536>
- [14] Manu Mangal, Parul Sagar, Harinder Singh, Gajendra P. S. Raghava, Subhash M. Agarwal. NPACT: Naturally Occurring Plant-based Anti-cancer Compound-Activity-Target database. *Nucleic Acids Research* 2013, 41 (D1), D1124–D1129. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1047>

Lo studio sopra riportato, condotto durante il periodo di congedo straordinario presso il Dipartimento di Chimica Farmaceutica dell'Università di Vienna, è attualmente in fase di stesura al fine di essere pubblicato su una rivista scientifica di chimica farmaceutica.

Alla presente relazione sull'attività di ricerca si allega la certificazione del Professore Thierry Langer.

Cordiali saluti,

F.to Maria Valeria Raimondi