



Filippo Basagni

Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie

Università di Bologna

filippo.basagni2@unibo.it

DOI: <http://dx.medra.org/10.17374/CI.2023.105.1.62>

(PRO)ELETTROFILI VS NEUROINFIAMMAZIONE

L'attività di ricerca insignita del "Premio Divisione di Chimica Farmaceutica per la miglior tesi di Dottorato" ha riguardato lo sviluppo di piccole molecole bioattive di natura elettrofila come potenziali sonde farmacologiche per lo studio dei processi infiammatori coinvolti nell'eziopatologia delle malattie neurodegenerative.

L'attività di ricerca per la quale ho ricevuto il "Premio Divisione di Chimica Farmaceutica per la miglior tesi di Dottorato" riguarda il lavoro svolto durante il mio percorso di dottorato presso il Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie dell'Università di Bologna, nel gruppo di ricerca di Chimica Farmaceutica della Prof.ssa Anna Minarini, sotto la supervisione della Prof.ssa Michela Rosini. Il progetto è dedicato allo sviluppo di nuovi composti di natura (pro)elettrofila per lo studio di patologie neurodegenerative a carattere multifattoriale, come le malattie di Alzheimer e di Parkinson, disturbi cronico-degenerativi generalmente associati all'età avanzata. In particolare, mi sono dedicato a progettazione e sintesi di piccole molecole che potessero consentire di approfondire lo studio dei processi infiammatori responsabili di molteplici eventi neurotossici tra loro strettamente correlati, che vedono il coinvolgimento in un circolo vizioso di processi di aggregazione e misfolding proteico, condizioni di eccitotossicità glutammatergica ed eventi ossidativi. Una migliore comprensione di questo complesso scenario potrebbe giocare un ruolo determinante per la ricerca di trattamenti terapeutici efficaci, dato che, ad oggi, per il trattamento di queste patologie sono disponibili solo cure in grado di rallentare il declino cognitivo/motorio, ma non di arrestarlo o revertirlo.

Ad ispirare questo lavoro di tesi sono state le promettenti attività biologiche di composti elettrofili coinvolti nella modulazione di diverse risposte neuroprotettive a livello cellulare. Gli elettrofili sono composti reattivi dotati di frammenti elettronicamente poveri in grado di formare legami covalenti

con residui nucleofili critici per la funzionalità proteica. L'elevata reattività chimica, se non propriamente direzionata, è stata spesso associata a tossicità indesiderata. Nonostante ciò, grazie alle loro peculiari caratteristiche di prolungata interazione ed (in)attivazione del target biologico identificato, molecole di natura elettrofila sono da sempre utilizzate per trattamenti terapeutici (penicilline, aspirina, ecc.) e, recentemente, stanno ricevendo sempre maggior attenzione nella ricerca farmaceutica [1]. In questo contesto, abbiamo quindi cercato di sfruttare la capacità degli elettrofili di modulare selettivamente e alternativamente determinate attività biologiche come un promettente strumento per investigare il complesso scenario innescato dai processi neuroinfiammatori. A questo scopo abbiamo identificato come ideale punto di partenza una serie di derivati tioesterei di acidi cinnamici, precedentemente sintetizzati nel laboratorio in cui ho svolto questo progetto di dottorato, in grado di

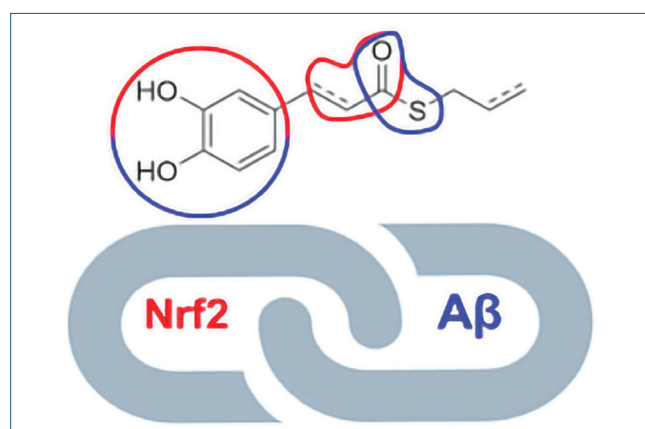


Fig. 1 - Immagine tratta da [2]

A Filippo Basagni è stato conferito il premio Miglior Tesi di Dottorato 2022 dalla Divisione di Chimica Farmaceutica.



combinare l'inibizione dell'aggregazione di β -amiloide ($A\beta$, responsabile della formazione di placche senili caratteristiche della malattia di Alzheimer) all'attivazione del fattore Nrf2 (sistema inducibile di trascrizione cellulare che modula la risposta antiossidante attraverso la biosintesi di proteine citoprotettive). In particolare, differenti requisiti strutturali di natura elettrofila e/o proelettrofila sono stati identificati come responsabili della regolazione di Nrf2 e dell'attività antiaggregante, offrendoci l'opportunità di modulare alternativamente e selettivamente le due attività biologiche (Fig. 1) [2].

Partendo da questi presupposti abbiamo condotto separatamente un duplice approfondimento a livello molecolare per cercare di ottimizzare e comprendere, da un lato, il ruolo funzionale dei frammenti (pro)elettrofili di questa classe di composti in grado di interferire con l'aggregazione di $A\beta$ e, dall'altro, di modulare differenti risposte citoprotettive inducibili, spostandoci dall'attivazione di Nrf2 all'inibizione di NF- κ B (fattori di trascrizione coinvolti nella modulazione della risposta cellulare antiossidante-antinfiammatoria).

Da studi di relazione struttura-attività sui derivati cinnamici precedentemente citati era emerso il ruolo essenziale svolto dal frammento catecolico per un'attività antiaggregante ottimale, individuando nei coniugati tioesterei i più potenti della serie (composto **1** in Fig. 2). Per investigare il ruolo svolto da questo frammento e cercare di determinarne il meccanismo d'azione, abbiamo sintetizzato gli analoghi *meta* e *para* sostituiti (composti **2** e **3** in Fig. 2) e ne abbiamo determinato le proprietà antiaggreganti nei confronti del peptide $A\beta$ [3].

Mentre i derivati *orto* e *para* si sono dimostrati in grado di ridurre notevolmente l'aggregazione di $A\beta$, l'analogo *meta* si è rivelato inefficace. Successive analisi elettrochimiche hanno evidenziato un'interessante correlazione tra l'attività antiaggregante e il potenziale di ossidazione di questi composti, suggerendo come il carattere proelettrofilo e la possibile conversione nella forma chinonica ossidata di questi derivati, non possibile per il composto *meta*, siano un prerequisito essenziale per tale attività. Per

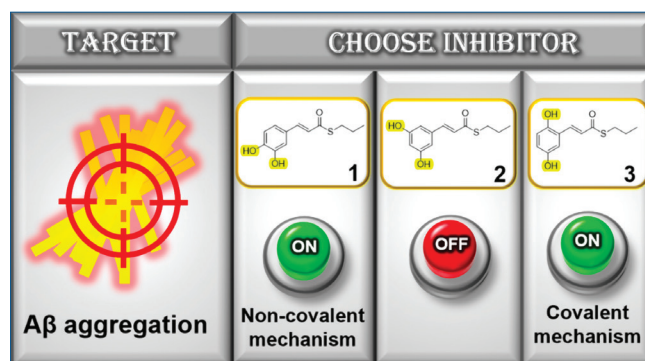


Fig. 2 - Immagine tratta da [3]

approfondire il meccanismo d'azione sono stati effettuati studi di spettrometria di massa che non hanno evidenziato alcuna interazione covalente tra il derivato catecolico e $A\beta$, per la cui efficacia antiaggregante giocano evidentemente un ruolo prioritario interazioni di tipo non-covalente, mentre l'analogo *para*-sostituito si è rivelato in grado di formare un addotto covalente con il residuo Lys16 di $A\beta$ (Fig. 2). Questa diversa modalità di interazione è associata anche ad un diverso profilo di tossicità, come evidenziato in una linea cellulare di neuroblastoma, dove i composti **1** e **2** hanno dimostrato di essere ben tollerati a tutte le concentrazioni testate, mentre **3**, unico dimostratosi in grado di formare addotti covalenti con residui nucleofili, a 10 μ M riduce più del 50% la vitalità cellulare.

In parallelo, modifiche sistematiche sono state condotte sul nucleo cinnamico per modularne l'efficacia antiossidante/antinfiammatoria attraverso la regolazione dei fattori di trascrizione Nrf2 e NF- κ B. In particolare, entrambi i fattori sono regolati a livello citosolico ad opera di repressori/attivatori redox-sensibili attraverso meccanismi di modulazione elettrofila su residui cisteinici specifici. In

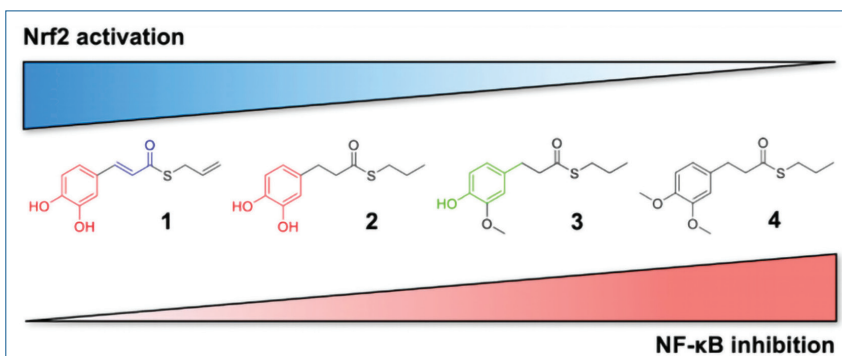


Fig. 3 - Immagine tratta da [4]

precedenza, tra i derivati tioesterei era emerso come fosse sufficiente la presenza di almeno un frammento elettrofilo, come il carbonile α,β -insaturo, o proelettrofilo, come il catecolo, per l'attivazione di Nrf2, individuando nel derivato **1** (Fig. 3) il più potente della serie. Successivamente, un piccolo set di molecole è stato progettato e sviluppato con l'obiettivo di rimuovere gradualmente da **1** tutti i frammenti (pro)elettrofili (ottenendo **2**, **3** e il non-elettrofilo **4**, Fig. 3) per valutare l'importanza di questi requisiti ai fini della modulazione della risposta antinfiammatoria Nrf2/NF- κ B-mediata [4].

I composti recanti frammenti elettrofili o proelettrofili come **1** e **2** si sono confermati induttori della via trascrizionale di Nrf2, mentre i derivati privi di frammenti (pro)elettrofili **3** e **4** non hanno presentato alcuna attività in merito. Inoltre, tutti i composti si sono dimostrati in grado di ridurre la secrezione di citochine proinfiammatorie in risposta a stimolo infiammatorio, anche se, mentre per **1** e **2** tale attività può essere attribuita all'attivazione di Nrf2, ciò non è valido per **3** e **4**. Infatti, da approfondimenti biologici successivi è emerso come tutti i composti eccetto **1** siano dei promettenti inibitori della via trascrizionale NF- κ B-mediata, con un importante effetto antinfiammatorio correlato (Fig. 3). Quindi, mentre per l'attivazione di Nrf2 risulta necessaria la presenza di un frammento (pro)elettrofilo, suggerendo un meccanismo covalente di attivazione, sia composti (pro)elettrofili che non elettrofili sono in grado di inibire l'attivazione di NF- κ B, suggerendo un differente meccanismo d'azione.

Da questi approfondimenti molecolari è emersa la possibilità di sfruttare il nucleo idrossicinnamico per modularne le proprietà neuroprotettive attraverso la manipolazione dei suoi frammenti (pro) elettrofili, influenzandone il meccanismo di azione antiaggregante e il profilo citotossico nel primo studio o la regolazione alternata e selettiva di diversi meccanismi di trascrizione nel secondo.

Successivamente i requisiti strutturali associati ad attività antiaggregante ed antinfiammatoria così identificati sono stati combinati con strutture farmacoforiche con note proprietà neuroprotettive riconducibili a differenti meccanismi d'azione, per ampliarne il profilo farmacologico ed approfondire le interconnessioni tra i meccanismi neurotossici che sottendono l'eziopatologia delle malattie neu-

rodegenerative. In particolare, il nucleo antiaggregante è stato opportunamente modificato per ottenere ibridi strutturali in grado di modulare anche il sistema endocannabinoide, dotato di una conclamata attività funzionale inducibile in condizioni infiammatorie. Inoltre, i requisiti strutturali dotati di attività Nrf2 e/o NF- κ B sono stati fusi con farmacofori in grado di contrastare condizioni di eccitotossicità o stress ossidativo, eventi caratteristici dei tessuti affetti da neurodegenerazione, per valutare il coinvolgimento di queste vie trascrizionali nelle diverse condizioni patologiche.

In conclusione, in questo progetto di dottorato, partendo dalle peculiari proprietà di frammenti (pro)elettrofili, abbiamo prima definito a livello molecolare i requisiti strutturali ed il supposto meccanismo di azione per le attività antiaggregante ed antinfiammatoria, per poi modificare sistematicamente i nuclei bioattivi identificati per modulare bersagli terapeutici addizionali che simultaneamente possono contribuire alla regolazione dei processi neuroinfiammatori.

Ringraziamenti

Ringrazio sentitamente il Consiglio Direttivo della Divisione di Chimica Farmaceutica per il riconoscimento assegnatomi.

BIBLIOGRAFIA

- [1] F. Basagni *et al.*, *Fut. Med. Chem.*, 2019, **11**(7), 707.
- [2] E. Simoni *et al.*, *ACS Chem. Neurosci.*, 2017, **8**, 1618.
- [3] F. Basagni *et al.*, *ACS Med. Chem. Lett.*, 2022, **13**, 1812.
- [4] F. Fagiani *et al.*, *Front. Pharmacol.*, 2020, **11**, 1256.

Pro(Electrophiles) vs Neuroinflammation

The research activity awarded with "Premio Divisione di Chimica Farmaceutica per la miglior Tesi di Dottorato" concerned the development of bioactive small molecules endowed with electrophilic character as potential pharmacological tools to study the role of inflammatory processes involved in the ethiopathology of neurodegenerative disorders.