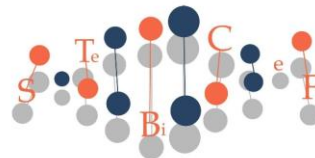




UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PALERMO

DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE
BIOLOGICHE CHIMICHE E FARMACEUTICHE (STEBICEF)



UNIONE EUROPEA
Fondo Sociale Europeo



PON Ricerca e Innovazione 2014 – 2020

Asse I “Capitale Umano”, Azione I.2 “Attrazione e mobilità ricercatori”

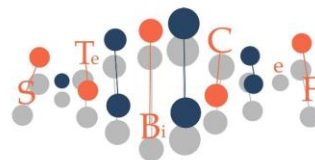
Bando AIM" (ATTRACTION AND INTERNATIONAL MOBILITY)

Codice progetto AIM1808223

Attività 1. – Area di Specializzazione Salute

I.Descrizione dello stato dell'arte delle attività Progettuali:

L'aneuploidia è una caratteristica peculiare dei tumori solidi umani che può rappresentare il tallone di Achille delle cellule tumorali. In particolare la riattivazione della via di segnalazione per la senescenza, scudo naturale contro la proliferazione tumorale, riveste un aspetto cruciale. La senescenza cellulare può essere indotta da molecole inibitrici delle protein-chinasi della fase G1 necessarie per la progressione cellulare. Tuttavia l'attivazione del pathway per indurre la senescenza cellulare in G1 non sempre blocca la proliferazione cellulare a causa di concomitanti mutazioni nelle cellule tumorali. La deregolazione del secreted-associated secretory phenotype (SASP) insieme all'aneuploidia può avere un ruolo tumor promoting. Eliminare le cellule aneuploidi/senescenti è dunque da considerarsi un importante approccio terapeutico per la salute, anche per sindromi geriatriche e malattie croniche degenerative caratterizzate dall'accumulo in molti tessuti di cellule aneuploidi. L'attività della chinasi CDK1 è aumentata nei tumori e ridotta nelle cellule senescenti e ne suggerisce l'utilizzo come bersaglio cellulare per indurre la senescenza in cellule tumorali in cui risulta inefficiente l'inibizione di altre protein-chinasi. A tal fine è utile individuare molecole specifiche inibitrici della chinasi CDK1 da abbinare a molecole con attività senolitica sia naturali sia di sintesi che promuovono selettivamente l'apoptosi di cellule senescenti disabilitando temporaneamente i pathways che consentono di resistere ai fattori pro-apoptotici e pro-infiammatori che esse secernono. Un aspetto importante per l'efficace somministrazione di molecole con attività farmacologica, specificatamente induttori di senescenza cellulare e/o agenti senolitici, è la loro biodisponibilità. L'impiego di materiali nanostrutturati argillosi o nanoparticelle metalliche può essere utilizzato per incrementare la veicolazione/biodisponibilità di queste molecole. Questo approccio è suggerito anche dal fatto che i tumori solidi sono spesso costituiti da una componente fibrotica che li rende difficilmente accessibili ai farmaci. Allosite, sepiolite e montmorillonite sono materiali naturali, biocompatibili a basso costo in grado di trasportare farmaci idrofobici a rilascio prolungato e controllato. Mediante l'utilizzo di allosite modificata si potrà ottenere un effetto sinergico tra una molecola legata covalentemente sulla superficie e una seconda caricata nel lume allositico. La combinazione di diverse tipologie di argille potrebbe migliorare e complementare le caratteristiche dei sistemi carrier. In questo ambito si inseriscono le linee di ricerca di alcuni gruppi dello STEBICEF (esperienza in: progettazione e sintesi di composti farmacologicamente attivi, relativa veicolazione e studio con sistemi targeting nanostrutturati, rilevamento dei livelli di metilazione del DNA e suoi effetti sui cromosomi, studio di nanoparticelle metalliche ed analisi proteomiche, nonché l'utilizzo di sistemi ex-vivo in contesti umani), che hanno portato a interessanti



risultati e ad un ottimo livello di produttività scientifica essenzialmente di I quartile (<http://www.unipa.it/dipartimenti/stebicef/ricerca/prodotti.html>).

Il Dipartimento STEBICEF presenta le risorse economiche e strutturali richieste per lo svolgimento della ricerca proposta, nonché la strumentazione disponibile nei laboratori del Dipartimento e presso ATeN Center dell'Università di Palermo (<http://www.atencenter.com/it>). Attualmente il dipartimento STEBICEF vanta collaborazioni utili allo svolgimento dell'attività di ricerca proposta con Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), HUJI (IL) (ClayTechMed0068), ABIEL srl (IT) (DRIVE645991; FutForm691128), Université de Lorraine (F) e King's college (UK).

II. Descrizione delle attività previste

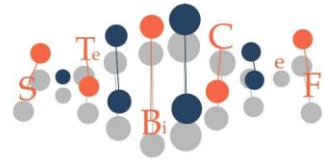
L'attività di ricerca prevede l'integrazione di conoscenze e strategie innovative per contrastare la proliferazione di cellule aneuploidi di patologie tumorali e cronico-degenerative ed è organizzata come di seguito riportato.

1. Design e sintesi di molecole inibitrici di CDK1

Saranno sintetizzate molecole utilizzando scaffold di analoghi prodotti naturali come la nortopsentina, che hanno potente attività inibitoria selettiva nei confronti di CDK1 (10.1016/j.ejmech.2017.02.008; 10.2174/09298673113206660307; J 10.1021/jm400842x) e la progettazione delle modificazioni strutturali sarà guidata da studi computazionali di modellistica molecolare. La sintesi verrà effettuata utilizzando metodologie innovative, economiche e a basso impatto ambientale, mediante reazioni multicomponente, microonde, reazioni sotto pressione e gas inerti. I composti sintetizzati saranno caratterizzati sfruttando tecniche analitiche standard. Per stabilire la natura e la forza del legame tra le molecole selezionate (guest) e il target CDK1 (host), verranno sfruttate le loro proprietà spettroscopiche in soluzione acquosa, per monitorare il legame host/guest e per ottenere la costante di legame (10.1016/j.jinorgbio.2017.10.010, 10.1039/c6dt00648e). A complemento di tali indagini i possibili cambiamenti strutturali che si verificano nelle CDK1 in soluzione saranno rivelati mediante dicroismo circolare (CD). Lo studio termodinamico sarà seguito anche da simulazioni di dinamica molecolare e da calcoli di meccanica quantistica/meccanica molecolare, per trovare siti e modalità di legame host/guest (10.1039/c7cc08406d). L'approccio computazionale sarà anche di supporto per la progettazione delle molecole guest.

2. Sviluppo e studio di sistemi nanostrutturati come agenti veicolanti.

La veicolazione di inibitori di CDK1 e di agenti senolitici sarà effettuata in modo singolo o in combinazione sfruttando le caratteristiche chimiche di diverse argille e loro ibridi e nanoparticelle funzionalizzate. Verranno presi in considerazione differenti approcci: 1) interazione supramolecolare con il carrier; 2) legame covalente sulle argille e/o sulle nanoparticelle per ottenere dei pro-farmaci che potranno essere rilasciati in seguito ad un determinato stimolo (pH, redox, luce, etc.), 3) funzionalizzazione di superficie con biomolecole specifiche per il targeting. I materiali ibridi argilla/pro-farmaco ottenuti saranno introdotti in matrici di idrogel biocompatibili e testati in vitro ed ex vivo. Per validare le attività di targeting e di rilascio controllato saranno allestite co-culture di cellule normali e tumorali in modo da seguire tramite marcatura con fluorocromi sia il targeting che gli effetti del carrier e l'uptake cellulare. Ulteriori verifiche sull'utilizzo di tali sistemi ibridi su masse tumorali solide si effettueranno su: 1) colture primarie, in un modello di wound healing che simula sia l'angiogenesi differenziativa dell'adulto che quella mesenchimale dei sistemi tumorali/rigenerativi; 2) colture di organoidi di cellule tumorali in gel di collagene, validando



contemporaneamente l'effetto delle collagenasi ricombinanti ABIEL sul processo di decompattazione di masse tumorali.

3. Analisi dei profili di espressione genica e proteica, metilazione del DNA in cellule aneuploidi/senescenti

Saranno utilizzate linee cellulari tumorali aneuploidi e cellule RPE-1, usate come sistema modello, in cui indurre l'aneuploidia con l'inibitore GSK 923295 di CENP-E. Le cellule tumorali/aneuploidi saranno trattate con le molecole inibitrici CDK1 note e di nuova sintesi e l'induzione di senescenza sarà confermata tramite citofluorimetria, rilevamento e di SA-beta-gal. Con analisi omiche si rileveranno i profili di espressione genica/proteica. Saranno valutati i pattern epigenetici di senescenza come l'ipermetilazione di foci eterocromatici (SAHF) e la perdita di metilazione dell'eterocromatica ai pericentromeri e telomeri tramite bisulfite sequencing e IF/FISH con sonde centromeriche. In parallelo verranno individuati i profili di metilazione di isole CpG di promotori di geni il cui silenziamento è spesso associato con la progressione tumorale e la senescenza cellulare. L'approccio epigenetico (metilazione del DNA) sarà usato per l'analisi di cellule ex vivo (PMBC) di soggetti sani centenari e figli di centenari ,controllo positivo, e soggetti malati. Inoltre sarà valutato il profilo SASP mediante analisi delle citochine infiammatorie (IL-1-6, 8) e marcatori dello stress ossidativo (Ros-NO). Sarà analizzato l'effetto di molecole con potenziale attività senolitica, naturali e di sintesi, anche in relazione alla stimolazione del sistema immunitario (linfociti T, CD8 e cellule NK).

III. Aspetti di coerenza della richiesta con l'area di specializzazione prevalente

Il progetto di ricerca si inserisce coerentemente nella linea Salute finalizzata al miglioramento della qualità della vita specialmente considerando alcuni aspetti legati all'invecchiamento della popolazione: incremento incidenza patologie tumorali e patologie croniche degenerative. Specificatamente mira a sviluppare strategie innovative per intervenire sulla individuazione di bersagli comuni per la distruzione di cellule tumorali aneuploidi e senescenti. A questo scopo saranno anche sviluppati approcci bio-nano tecnologici innovativi per migliorare il delivery e la conseguente biodisponibilità di molecole/farmaci contribuendo così all'arricchimento dell'armamentario a disposizione per contrastare le patologie summenzionate anche nell'ambito della medicina personalizzata. In sintesi i risultati del progetto di ricerca potranno contribuire a rispondere efficacemente alla crescente domanda di salute della popolazione. Inoltre il progetto terrà conto dei principi orizzontali (Art. 16 Reg. CE 1083/2006) per uno sviluppo sostenibile nell'utilizzo delle risorse richieste effettuando sia sintesi con sistemi alternativi a basso impatto ambientale e sistemi nanostrutturati bio ed ecocompatibili che la validazione delle collagenasi ricombinanti ABIEL in ambito clinico. In merito agli altri due obiettivi orizzontali , pari opportunità e parità di genere, verranno rispettati tutti i principi etici e riportati anche nella Carta Europea dei Ricercatori (2005/251/CE).