

**Progetto e Piano formativo per un assegno di ricerca dal titolo: “Green Med Chem to discover innovative and sustainable anti-infective agents (benign-by-design)” – Tutor: Prof.ssa Maria Laura Bolognesi**

L'attività prevista per l'assegno di ricerca rientra nell'ambito del progetto INF-ACT, Research Node 5: “New therapeutic strategies”. Responsabile scientifico e titolare dei fondi: Prof.ssa Maria Laura Bolognesi.

INF-ACT ha come obiettivo lo sviluppo di strumenti terapeutici innovativi per il trattamento farmacologico di malattie infettive emergenti e ri-emergenti.<sup>1</sup> Un terzo di queste patologie sono trasmesse da vettori. In questo ambito, i flavivirus sono virus a RNA, tra cui Dengue (DENV), West Nile (WNV) e Zika virus (ZIKV), che rappresentano una minaccia per la salute dell'uomo, in quanto possono causare malattie potenzialmente gravi, tra cui epatite, sindrome da shock vascolare e encefalite.<sup>2</sup> Sebbene endemici nelle aree tropicali e subtropicali, i flavivirus rappresentano una crescente problematica anche in Europa e in Italia (es. West Nile virus).<sup>3</sup> Inoltre, un ulteriore fattore d'allarme è dato dal fatto che la maggior parte delle malattie infettive emergenti sono zoonotiche, si verificano all'interfaccia uomo-animale-ambiente e sono legate a eventi di “spill-over” interspecie.<sup>4</sup>

In questo contesto, è evidente che il problema delle infezioni (ri)emergenti vada affrontato in un'ottica One Health, considerando l'interconnessione sostanziale tra la salute umana, animale e ambientale. Di conseguenza, risulta di fondamentale importanza tenere in considerazione l'influenza dei cambiamenti ecologici, dell'uso di risorse naturali e del benessere degli animali che fungono da serbatoi per questi patogeni. In questo scenario, lo sviluppo di soluzioni terapeutiche ad ampio spettro<sup>5</sup> che rispettino i principi della sostenibilità è cruciale per prevenire l'esaurimento delle risorse naturali e ridurre l'impatto ambientale, garantendo al contempo l'efficacia a lungo termine dei trattamenti farmacologici.<sup>6</sup>

All'interno del progetto INF-ACT l'Unità dell'Università di Bologna è coinvolta in diverse “working pages”:

- **WP 5.2.2:** Identificazione di agenti antivirali e antimicrobici con bassa suscettibilità all'insorgenza di resistenza;
- **WP 5.2.7:** Green Med Chem to discover innovative and sustainable anti-infective agents (benign-by-design)
- **WP 5.3.7:** PROTACs with a double therapeutic effect by Ubiquitin-Proteasome system and stimulation of the cellular immune response through the generation of CD8<sup>+</sup>T-cells
- **WP 5.5:** Innovative antimicrobial materials-antibiofilm-drug delivery strategies

L'assegnista sarà inizialmente coinvolto nel WP 5.2.7 di INF-ACT, ovvero quello riguardante lo sviluppo di nuovi approcci basati sui principi cardine della *Green Chemistry* applicabili alla scoperta di agenti antifettivi innovativi e sostenibili (*benign-by-design*).

Partendo dall'olio di guscio di anacardo (*Cashew Nutshell Liquid*, CNSL), uno scarto agroindustriale largamente prodotto a livello mondiale, non edibile e a basso costo, verranno progettati e sintetizzati una serie di nuovi PROTACs, seguendo i 12 Principi della *Green Chemistry*. I PROTACs sono molecole eterobifunzionali, che, legandosi a un target specifico (*protein of interest*, POI) e una ligasi E3, determinano la formazione di un complesso ternario tra POI-PROTAC-E3 ligasi e promuovono la degradazione selettiva della proteina target attraverso il proteasoma.

Chimicamente, il CNSL è costituito da una miscela di lipidi fenolici (cardanoli, cardoli, 2-metilcardoli e tracce di acidi anacardici), caratterizzati da un anello fenolico e da una catena alchilica

laterale composta da 15 atomi di carbonio con diversi gradi di insaturazione. Le componenti del CNSL saranno opportunamente derivatizzate in modo da ottenere una serie di analoghi della talidomide e agenti immunomodulatori correlati (*immunomodulatory imide drugs*, IMiDs), in quanto noti ligandi di E3 ligasi. In primo luogo, verrà quindi sintetizzata una libreria di PROTACs derivati dal CNSL, combinando i nuovi composti ottenuti con ligandi della POI precedente descritti in letteratura (es. JQ-1, inibitore selettivo delle proteine del bromodominio)<sup>7</sup>, come *proof of concept* della capacità di questi analoghi di IMiDs di reclutare l'E3 ligasi umana e indurre degradazione proteica.

Successivamente, in caso di risultati promettenti, l'assegnista sarà coinvolto nella sintesi sostenibile di PROTAC antivirali utilizzando i nuovi composti ottenuti, nel contesto del WP 5.2.2.

Per quanto riguarda il WP 5.2.2 è stato proposto lo sviluppo di una serie di *Proteolysis Targeting Chimeras* (PROTAC) applicati alle infezioni da flavivirus. Mentre l'approccio PROTAC è già stato ampiamente esplorato nel campo dell'oncologia, dove nel 2019 è stata presentata la prima molecola in fase clinica, solo recentemente questo è stato applicato al campo delle infezioni da flavivirus<sup>8</sup> e, comunque, non sono mai stati individuati PROTAC in grado di agire simultaneamente su diversi agenti patogeni. Nell'ambito del WP 5.2.2, come punto di partenza per sviluppare nuove chimere antivirali, è stata individuata la proteasi virale NS2B–NS3, come target ampiamente studiato e validato. I virus DENV/WNV/ZIKV contengono un RNA a singolo filamento che codifica una poliproteina virale. Questa poliproteina viene scissa in modo sito-specifico dalla proteasi virale NS2B–NS3 e da diverse proteasi dell'ospite per produrre proteine funzionali. La proteasi NS2B–NS3 risulta quindi essenziale per la replicazione virale e, pertanto, rappresenta un promettente bersaglio farmacologico.<sup>9</sup> Inoltre, la proteasi NS2B–NS3 risulta essere conservata tra DENV/WNV/ZIKV e, di conseguenza, idonea allo sviluppo di un PROTAC attivo nei confronti di tutte e tre le specie. Inibitori allosterici di NS2B–NS3 sono riportati in letteratura, così come le strutture a raggi X di NS2B–NS3 di DENV e WNV sono disponibili sia nella forma apo che nella forma complessata con l'inibitore.

Alla progettazione e sintesi delle molecole seguiranno i saggi biologici per valutare (a) la capacità di questi composti di legarsi alla ligasi E3; (b) l'attività contro i flavivirus DENV/WNV/ZIKV; c) la capacità di causare l'ubiquitinazione e la degradazione della proteina target NS2B–NS3. Questi saggi saranno effettuati dagli altri gruppi di ricerca partecipanti al progetto con cui gli assegnisti collaboreranno attivamente.

Per portare avanti queste attività, risulta necessario attivare un assegno di ricerca per la progettazione e sintesi delle molecole nell'ambito dei progetti sopra descritti. Inoltre, l'assegnista potrà eventualmente anche essere coinvolto nei WP 5.3.7 e WP 5.5.

---

## References

- (1) Morens, D., Folkers, G. & Fauci, A. The Challenge of Emerging and Re-Emerging Infectious Diseases. *Nature* **2004**, *430*, 242–249. <https://doi.org/10.1038/nature02759>.
- (2) Pierson, T. C.; Diamond, M. S. The Continued Threat of Emerging Flaviviruses. *Nat. Microbiol.* **2020**, *5* (6), 796–812. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0714-0>.
- (3) Kaaijk, P.; Luytjes, W. Are We Prepared for Emerging Flaviviruses in Europe? Challenges for Vaccination. *Hum. Vaccines Immunother.* **2018**, *14* (2), 337–344. <https://doi.org/10.1080/21645515.2017.1389363>.
- (4) Pandit, P. S.; Doyle, M. M.; Smart, K. M.; Young, C. C. W.; Drape, G. W.; Johnson, C. K. Predicting

Wildlife Reservoirs and Global Vulnerability to Zoonotic Flaviviruses. *Nat. Commun.* **2018**, *9* (1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07896-2>.

- (5) Boldescu, V.; Behnam, M. A. M.; Vasilakis, N.; Klein, C. D. Broad-Spectrum Agents for Flaviviral Infections: Dengue, Zika and Beyond. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2017**, *16* (8), 565–586. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.33>.
- (6) Dye, C. One Health as a Catalyst for Sustainable Development. *Nat. Microbiol.* **2022**, *7* (4), 467–468. <https://doi.org/10.1038/s41564-022-01076-1>.
- (7) Wang, C.; Zhang, Y.; Yang, S.; Chen, W.; Xing, D. PROTACs for BRDs Proteins in Cancer Therapy: A Review. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2022**, *37* (1), 1694–1703. <https://doi.org/10.1080/14756366.2022.2081164>.
- (8) Liu, H. Y.; Li, Z.; Reindl, T.; He, Z.; Qiu, X.; Golden, R. P.; Donovan, K. A.; Bailey, A.; Fischer, E. S.; Zhang, T.; Gray, N. S.; Yang, P. L. Broad-Spectrum Activity against Mosquito-Borne Flaviviruses Achieved by a Targeted Protein Degradation Mechanism. *Nat. Commun.* **2024**, *15* (1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-49161-9>.
- (9) Yao, Y.; Huo, T.; Lin, Y. L.; Nie, S.; Wu, F.; Hua, Y.; Wu, J.; Kneubehl, A. R.; Vogt, M. B.; Rico-Hesse, R.; Song, Y. Discovery, X-Ray Crystallography and Antiviral Activity of Allosteric Inhibitors of Flavivirus NS2B-NS3 Protease. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141* (17), 6832–6836. <https://doi.org/10.1021/jacs.9b02505>.