



IL PROMETEO

Bollettino di Dottorato

ANNO X

Direttore: Prof. Filippo Drago



Strategie innovative per la veicolazione ed il rilascio di farmaci nel sistema nervoso centrale



DOTTORATO
INTERNAZIONALE
IN
NEUROSCIENZE



Università degli Studi di Catania



Viale Andrea Doria, 6 - Catania

Tel.: +39 095 7384237

Tel.: +39 095.7384238

il_prometeo@email.it
<http://www.unict.it/dfsc>

Solo in Europa si stima che il 38% della popolazione, soffre di disturbi di natura neurologica come epilessia, malattia di Parkinson, Alzheimer, Sclerosi Multipla, ictus e cefalee; patologie con un impatto rilevante non solo sulla vita delle persone che ne sono affette, ma anche su quella dei loro familiari. Hanno ricadute economiche e socio-assistenziali considerevoli. Nonostante i numerosi progressi nella ricerca farmacologica, queste patologie rappresentano ancora un'importante sfida per il settore. Sebbene siano state scoperte molecole potenzialmente attive nei confronti di alcuni disturbi a carico del sistema nervoso centrale (SNC), di fatto poi non trovano applicazione terapeutica in quanto non riescono ad oltrepassare la barriera emato-

encefalica (BEE).

Il gruppo di ricerca guidato dal Professore Puglisi, di cui faccio parte, si sta occupando da diversi anni dello studio di approcci innovativi atti a superare questo limite mediante la progettazione di un sistema nanotecnologico che permetta al farmaco di raggiungere il distretto interessato. Questi sistemi innovativi utilizzati per la veicolazione dei farmaci, hanno dimensioni nanometriche e sono caratterizzati da un sistema di targeting sito-specifico e rilascio controllato.

Tra i drug delivery systems (DDS) più noti abbiamo selezionato le nanoparticelle polimeriche (NP) che riscuotono particolare interesse in quanto è possibile controllarne le dimensioni, la forma, la superficie e proget-

tarle "su misura" in relazione a:

i) le caratteristiche della molecola che dev'essere veicolata;

ii) la via di somministrazione selezionata.

Si tratta di particelle colloidali solide che possono essere preparate con polimeri naturali o sintetici e offrono molteplici vantaggi: sono in grado di proteggere il farmaco dalla degradazione chimica e biologica, ne migliorano la stabilità e riducono gli effetti periferici, che si riflette in un aumento considerevole della quantità di principio attivo nel distretto interessato.

Negli ultimi anni la somministrazione intranasale di farmaci a target cerebrale sta suscitando particolare interesse in quanto il principio attivo sarebbe in grado di raggiungere direttamente il cervello attraverso i nervi trigemino e olfattivo, bypassando la BEE. Questo è sicuramente un metodo non invasivo che garantisce una nuova alternativa alle vie di somministrazione convenzionali.

La via naso-cervello e le nanotecnologie, obiettivo del mio progetto di Dottorato, rappresentano un'innovazione per il trattamento delle patologie a carico del SNC.

Durante lo sviluppo del mio progetto di Dottorato è nata una collaborazione tra il laboratorio di tecnologia farmaceutica guidato dal Prof. Puglisi e la UCL School of Pharmacy guidata dalla Prof.ssa Uchegbu, dove ho avuto il piacere di lavorare.

Ho avuto quindi la possibilità di dedicarmi a due progetti paralleli, affini ed accomunati dalla combinazione sinergica di due approcci innovativi: ovvero l'impiego della nanotecnologia e il nose to brain delivery. Lo sviluppo di entrambi i progetti ha previsto il susseguirsi di diversi steps.

Il primo step relativo alla fase di design e preparazione dei sistemi carriers; il secondo basato sulla caratterizzazione chimico-fisica e tecnologica dei sistemi colloidali preparati e gli ultimi steps dedicati alla sperimentazione biologica sia *in vitro* che *in vivo*.

Grazie all'ausilio del gruppo di ricerca catanese, mi sono occupata della preparazione di sistemi nanoparticellari impiegando diverse matrici polimeriche commercialmente disponibili. È stato effettuato uno screening preliminare atto a selezionare le formulazioni dotate dei migliori requisiti tecnologici e chimico-fisici, i risultati ottenuti sono oggetto di un paper che è stato sottomesso alla rivista *Drug Development and Industrial Pharmacy* (Bonaccorso et al., 2015; submitted).

I sistemi carriers selezionati e contenenti una sonda sono stati somministrati per via intranasale sull'animale da laboratorio per verificarne la distribuzione cerebrale. Da questo studio è emerso che sono diverse le regioni in cui è presente una distribuzione nanoparticellare la quale sembra essere tempo-dipendente (risultati oggetto di un lavoro scientifico in fase di stesura). L'ippocampo è una regione in cui si è manifestata un'abbondante distribuzione particellare, ed essendo implicata nella sindrome epilettica. Nei Paesi industrializzati 1 persona su 100 è affetta da epilessia. In Italia la malattia interessa circa 500mila persone, soprattutto bambini, giovani adulti e anziani. Ad oggi i farmaci disponibili sono indirizzati al controllo dei sintomi attraverso la somministrazione cronica di farmaci anticonvulsivanti. Il 30% delle crisi convulsive resta comunque incontrollato e nessuno dei farmaci attualmente disponibili né di vecchia né di nuova generazione rappresenta un rimedio nella prevenzione o nella progressione della sindrome. Questo ci ha stimolati nello studio e nello sviluppo di nuovi approcci terapeutici.

Abbiamo messo a punto un modello di epilessia sull'animale da laboratorio e stiamo valutando la possibile azione neuroprotettiva di un farmaco antiepilettico veicolato mediante il sistema carrier selezionato.

Insieme al gruppo di ricerca londinese mi sono oc-

cupata di terapia genica come strategia utile nel combattere un'altra condizione a carico del SNC, i tumori cerebrali. Terapia anti-tumorale mediata da small interfering RNA (siRNA). Il siRNA è una molecola di RNA lunga tra 19-21 nucleotidi in grado di svolgere numerosi ruoli biologici ed è coinvolta nella pathway della RNA interference, un processo di silenziamento genico che avviene a livello post-trascrizionale, in grado di sopprimere in modo specifico l'espressione di un gene. Dal momento che i processi patologici dipendono spesso da una espressione genica sregolata, la somministrazione di siRNA rappresenterebbe una strategia molto interessante perché capace di spegnere tale espressione. La scarsa stabilità in condizioni fisiologiche ha fortemente ostacolato l'impiego di queste molecole come agenti terapeutici. Grazie all'intervento della nanotecnologia è possibile proteggere il siRNA dalla degradazione enzimatica e migliorarne il targeting cellulare, tissutale ed il rilascio intracellulare. Nel nostro studio abbiamo investigato l'impiego di due polimeri "homemade" per la sintesi di carriers atti alla veicolazione ed al rilascio di siRNA. Sono stati effettuati analisi tecnologico-formulative e studi di citotossicità su cellule tumorali, l'ottenimento di risultati soddisfacenti ci ha spinto verso la sperimentazione *in vivo* con l'obiettivo di valutare il silenziamento genico sull'animale da laboratorio dopo somministrazione intranasale della formulazione oggetto del nostro studio.

In conclusione, l'impiego della nanotecnologia e della via naso-cervello sembra essere una valida soluzione per il rilascio di composti attivi a target cerebrale. I risultati promettenti ci incoraggiano ad approfondire le nostre ricerche in quanto l'applicazione clinica, nel trattamento delle patologie neurologiche e dei tumori cerebrali, di farmaci mediante DDS rappresenterebbe un vantaggio anche di tipo economico sia sui costi che sui tempi della sperimentazione e l'impiego della via naso-cervello un beneficio in termini di sicurezza e facilità di utilizzo specie in età pediatrica.

Tutti gli studi effettuati per la messa a punto di sistemi nanotecnologici sono state condotti presso il Dipartimento di Scienze del Farmaco (Laboratory of Pharmaceutical Technology), dell'Università di Catania. Gli studi biologici *in vivo* relativi al progetto svolto a Catania sono stati effettuati in collaborazione con la Prof. Francesca Serapide presso il Dipartimento di Scienze Biomediche e Biotecnologiche (Sezione di Fisiologia), dell'Università di Catania e la Dott.ssa Pellitteri (Istituto di Scienze Neurologiche, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Catania).

Il progetto di ricerca svolto in ambito internazionale, è stato condotto presso il Department of Pharmaceutics della UCL School of Pharmacy, University College London, London, UK. Colgo l'occasione per ringraziare il mio tutor Prof. Giovanni Puglisi ed il mio co-tutor Dott.ssa Teresa Musumeci che mi guidano con costanza e dedizione trasmettendomi le loro profonde conoscenze e insegnamenti di cui faccio tesoro. La mia profonda gratitudine va anche alla Prof.ssa Ijeoma Uchegbu che mi ha permesso di ampliare i miei orizzonti conoscitivi sul mondo della ricerca, consentendomi di accostarmi ad un aspetto della ricerca a me nuovo. La mia esperienza di ricerca all'estero, si è rivelata altamente formativa da un punto vista scientifico, professionale e personale. Desidero ringraziare il Professore Filippo Drago e il Prof. Salvatore Salomone per avermi dato l'opportunità di intraprendere il mio percorso scientifico all'interno del Dottorato in Neuroscienze, che incoraggia fortemente alla partecipazione a progetti di ricerca in ambito internazionale.

Angela Bonaccorso

ABSTRACT

Connexin involvement in the protective effect of Olfactory Ensheathing Cells conditioned medium in SH-SY5Y Cell Line during hypoxia/re-oxygenation stress

N. Vicario¹, A. Zappalà¹, R. Pellitteri², V. Cardile¹, R. Parenti¹

¹ Dept Biomedical and Biotechnological Sciences, Physiology Section, University of Catania, Italy

² Inst. Neurological Sciences, National Research Council, Section of Catania, Catania, Italy

It has been demonstrated that the expression of connexins (Cxs), the core proteins of gap junctions and hemichannels, is involved in neuroprotection in stress conditions. Olfactory Ensheathing Cells (OECs), a special population of glial cells sharing properties with both Schwann cells and astrocytes, are able to synthesise several trophic factors exerting a neuroprotective action and promoting growth and functional recovery both in vivo and in vitro models. In this study, SH-SY5Y cells were cultured in medium supplemented with different percentages of OECs-conditioned medium. Following hypoxia/re-oxygenation and serum deprivation stress, we investigated cell viability through MTT assay and Cxs expression by immunocytochemistry. The results demonstrated that, compared to controls, OECs-conditioned medium protected both hypoxic or serum deprivation cultures. Moreover, Cx36 and Cx43 showed a dynamic expression that likely suggests their implication in cell survival and proliferation. These evidences configure connexins like an important player in neuroprotection against hypoxic and serum deprivation conditions.

Molecular features of interaction between VEGFA and anti-angiogenic drugs used in retinal diseases: A computational approach

Platania, C.B.^a, Paola, L.D.^b, Leggio, G.M.^a, Romano, G.L.^a, Drago, F.^a, Salomone, S.^a, Bucolo, C.^a

^a Section of Pharmacology, Department of Biomedical and Biotechnological Sciences, School of Medicine, University of Catania, Catania, Italy

^b School of Engineering, University Campus Bio-Medico, Roma, Italy

Anti-angiogenic agents are biological drugs used

for treatment of retinal neovascular degenerative diseases. In this study, we aimed at in silico analysis of interaction of vascular endothelial growth factor A (VEGFA), the main mediator of angiogenesis, with binding domains of anti-angiogenic agents used for treatment of retinal diseases, such as ranibizumab, bevacizumab and aflibercept. The analysis of anti-VEGF/VEGFA complexes was carried out by means of protein-protein docking and molecular dynamics (MD) coupled to molecular mechanics-Poisson Boltzmann Surface Area (MM-PBSA) calculation. Molecular dynamics simulation was further analyzed by protein contact networks. Rough energetic evaluation with protein-protein docking scores revealed that aflibercept/VEGFA complex was characterized by electrostatic stabilization, whereas ranibizumab and bevacizumab complexes were stabilized by Van der Waals (VdW) energy term; these results were confirmed by MM-PBSA. Comparison of MM-PBSA predicted energy terms with experimental binding parameters reported in literature indicated that the high association rate (K_{on}) of aflibercept to VEGFA was consistent with high stabilizing electrostatic energy. On the other hand, the relatively low experimental dissociation rate (K_{off}) of ranibizumab may be attributed to lower conformational fluctuations of the ranibizumab/VEGFA complex, higher number of contacts and hydrogen bonds in comparison to bevacizumab and aflibercept. Thus, the anti-angiogenic agents have been found to be considerably different both in terms of molecular interactions and stabilizing energy. Characterization of such features can improve the design of novel biological drugs potentially useful in clinical practice

Involvement of Sphingosine 1 Phosphate receptor on the Blood Brain Barrier properties upon inflammatory stimuli?

S.F. Spampinato^{1,2}, B. Obermeier^{1,3}, A. Cotleur^{1,3}, Y. Takeshita^{1,4}, R.M. Ransohoff^{1,3}

¹Neuroinflammation Research Center, Dept of Neurosciences, Lerner Research Institute, Cleveland Clinic, Cleveland, Ohio, United States of America ²Dept of Biomedical and Biotechnological Sciences, section of Pharmacology, University of Catania, Italy ³Biogen, 14 Cambridge Center, Massachusetts, United States of America ⁴Dept of Neurology and Clinical Neuroscience, Yamaguchi University, Japan

The blood brain barrier (BBB) maintains the proper environment and facilitates the central nervous system (CNS) functions. The principal cellular constituents are endothelial cells, astrocytes and pericytes, and they all interact to increase its barrier's properties. Several CNS affections involve the BBB either primarily or as a consequence of the disease. In multiple sclerosis (MS), for instance, leaky BBB together with demyelinated multifocal lesions are the typical hallmarks. Several pharmacological approaches have been developed to modify the course of MS, and recently the immune modulator fingolimod has been introduced in the treatment of relapsing forms of the pathology. The drug is structurally similar to the bioactive sphingosine 1 phosphate (S1P), and is able to interact with the same receptors. Acting as a functional S1P1 antagonist it prevents the egress of leukocytes from the lymph nodes, thus reducing the rate of relapses. As its biological counterpart, fingolimod can exert several activity on endothelial cells and astrocytes, both expressing S1P receptors. Here we investigated whether key BBB properties are modified by S1P receptors modulation, addressing in particular the role exerted by the immunomodulator fingolimod. For this purpose, we used an *in vitro* co-culture model that allowed us to investigate the effects of S1P receptors modulation on endothelial cells and astrocytes. The effects of S1P and fingolimod were investigated either on endothelial cells and astrocytes independently or in a more physiological condition in which the two cell types could interact. Modulation of S1P receptors, and specifically modulation of S1P1, rescued endothelial cells from death upon cytokine challenge, either directly, or indirectly through stimulation of astrocytes. When astrocytes were exposed to S1P modulators they released trophic factors able to prevent endothelial cells death induced by cytokines exposure. Upon the other factors, we identified in granulocytes and macrophages colony growing factor (GM-CSF) the one mostly involved in these effects. Modifications in the barrier properties induced by S1P1 receptor signaling were finally investigated in a *in vitro* BBB model incorporating shear stress; once again, the modulation of the receptor increased barrier properties, thus reducing leukocytes migration. The data here reported point out the possibility that fingolimod, already in use for the treatment of relapsing remitting forms of MS, acting at the BBB, can further reduce the access of leukocytes in the CNS, reinforcing barrier properties upon cytokines stimuli.

In silico identification and pharmacological evaluation of 5-Methoxyflavone as a neuro-protective agent against β -amyloid-induced toxicity.

Sara Merlo, Livia Basile, Maria Laura Giuffrida, Maria

Angela Sortino, Salvatore Guccione, Agata Copani.

According to the "cell cycle hypothesis of Alzheimer's disease (AD)", apoptotic death is the result of a failed attempt of neurons to divide. Consistent with this assumption, DNA replication has emerged as an obligatory step in the apoptotic pathway triggered by the β -amyloid protein (A β) in neurons. Neuronal DNA replication is unusual, since it is carried-out by DNA polymerase- β (DNA pol- β) and likely lasts months before the occurrence of neuronal death (Copani et al., 2008). DNA pol- β might therefore represent a relevant target for neuroprotection in AD. Known DNA pol- β inhibitors are not selective for the enzyme. Dideoxycytidine, which we have shown to prevent A β -induced DNA replication and apoptosis (Copani et al., 2002), is a preferential inhibitor of DNA pol- β over other polymerases.

In the present work, we searched for selective DNA pol- β inhibitors by virtual screening of a database containing more than 4,000 natural and over 20,000 drug-like compounds. Nine compounds were selected for their best scores, and 5-methoxyflavone (5-MF) was a top-scored compound when docked into the 8-kDa lyase domain of DNA pol- β .

All selected compounds were tested on both wild type and DNA pol- β -null mouse fibroblasts, which are hypersensitive to the DNA-methylating agent methylmethanesulfonate (MMS). Among the tested compounds, only 5-MF was able to enhance cellular sensitivity to MMS in wild type but not DNA pol- β null cultures. MMS sensitivity resulting from 5-MF exposure in wild type cells mimicked that observed in cells devoid of pol- β , showing that 5-MF was able to inhibit the base-excision repair activity of DNA pol- β required for MMS resistance. Similarly, 5-MF directly inhibited human DNA pol- β activity on a gapped DNA substrate in a cell-free assay. In pure cultures of rat cortical neurons, 5-MF was devoid of intrinsic toxicity when applied for 48 h and up to a concentration of 10 μ M. These cultures are a useful model to investigate potential inhibitors of A β -induced DNA replication and apoptosis (Copani et al., 2002). Consistent with an inhibition of DNA pol- β , 5-MF (5-10 μ M) was able to reduce both the number of S-phase neurons and apoptosis triggered by A β . To our knowledge, this is the first demonstration that a flavonoid compound is able to halt the apoptotic pathway triggered by A β via a definite mechanism, thus achieving the status of promising drug candidate