

13. Novembre

## TMI: small-molecule TNF inhibitor

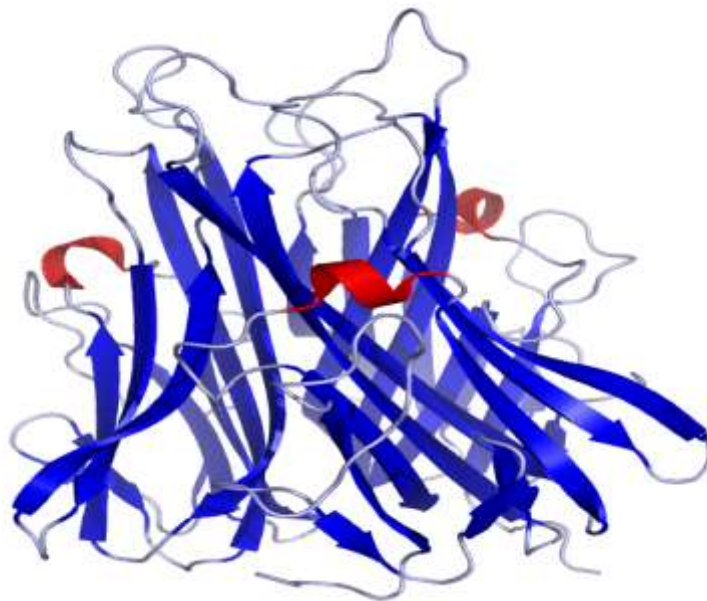
*Benedetti siano gli istanti,  
e i millimetri, e le ombre  
delle piccole cose.*  
Fernando Pessoa

La superfamiglia del **fattore di necrosi tumorale (TNF)** costituisce un gruppo di *citochine proinfiammatorie pleiotropiche* essenziali per diversi importanti processi fisiologici, come la protezione dell'ospite contro agenti patogeni e tumori

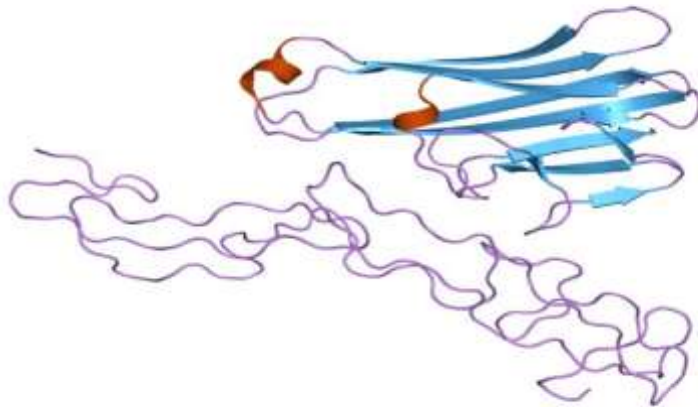
La segnalazione "disregolata" da parte dei membri della superfamiglia del **TNF** (in particolare il TNF stesso) è implicata in diverse condizioni patologiche, tra cui **l'artrite reumatoide (RA)**, **la psoriasi** e **la malattia infiammatoria intestinale**. La sovrapproduzione cronica di **TNF** è anche associata al **morbo di Alzheimer** alla **depressione maggiore** e al **cancro**. Pertanto, sono stati compiuti sforzi sostanziali per interrompere le vie di segnalazione anomale del **TNF** utilizzando una varietà di modulatori terapeutici.

Il **TNF** è inizialmente sintetizzato come una proteina transmembrana di **26 kDa**, costituita da **233** amminoacidi che viene rilasciata in seguito alla *scissione proteolitica* (dall'enzima di conversione del TNF- $\alpha$ ) come proteina solubile da **17 kDa**, **157 amminoacidi**. Il **TNF** solubile si assembla spontaneamente in un **omotrimerico stabile**, che è la forma biologicamente attiva di questa citochina

I



Il **TNF** è prodotto principalmente da **macrofagi**, **linfociti T** e **cellule natural killer** ed è riconosciuto da due recettori distinti, il recettore del **TNF 1 (TNFR1)** e il **TNFR2**, che provocano diversi eventi di segnalazione a valle



### Interazione TNF – Recettore

Sebbene **TNFR1** sia prodotto ubiquitariamente da tutti i tipi cellulari, la produzione di **TNFR2** è limitata alle cellule immunitarie; pertanto, il legame del TNF con entrambi i recettori provoca diverse conseguenze funzionali

La via di segnalazione a valle di **TNFR1** e **TNFR2** attiva tipicamente il fattore di trascrizione nucleare fattore  $\kappa$  potenziatore della catena leggera delle cellule B attivate (**NF- $\kappa$ B**) e membri delle cascate di segnalazione della proteina chinasi attivata da mitogeni (**MAPK**), come la chinasi regolata dal segnale extracellulare (**ERK**), **p38** e **c-Jun N-terminale chinasi (JNK)**.

Attiva anche *varie caspasi* che partecipano al processo di apoptosi. L'attivazione di **NF- $\kappa$ B** e **MAPKs** svolge un ruolo importante nell'induzione di citochine proinfiammatorie e immunoregolatori, montando una forte risposta infiammatoria che spesso provoca l'apoptosi o la necrosi della maggior parte dei tipi cellulari

L'attivazione del **TNFR2** partecipa anche allo sviluppo del cancro, il che lo rende un potenziale bersaglio per l'immunoterapia antitumorale

Una serie di evidenze sperimentali suggeriscono che la disregolazione della produzione di TNF è associata all'artrite cronica nei modelli murini e che l'applicazione di inibitori del TNF è efficace contro la malattia. Questa osservazione ha suscitato molto interesse tra i produttori di **anti-TNF**, portando ai primi studi clinici di successo nell'AR e in *altre malattie infiammatorie croniche, come il morbo di Crohn, la psoriasi, l'artrite psoriasica, l'artrite idiopatica giovanile, la spondiloartrite e il morbo di Behçet.*

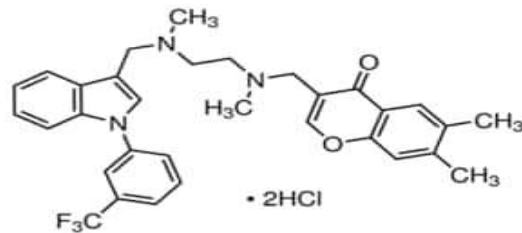
I farmaci attualmente approvati per il trattamento delle malattie infiammatorie sono anticorpi monoclonali sintetici, come **infliximab**, **adalimumab**, **certolizumab** e **golimumab**, o proteine di fusione dei recettori solubili come **etanercept (ETN)**; tutte queste terapie biologiche si legano al TNF solubile e ne impediscono l'associazione con il **TNFR1** o il **TNFR2** di superficie cellulare.

Sebbene questi farmaci biologici abbiano successo in clinica, sono molto costosi, non biodisponibili per via orale e spesso minano l'immunità dell'ospite contro infezioni latenti o ricorrenti.

Inoltre, i prodotti biologici ad alto peso molecolare non possono essere applicati alle malattie del sistema nervoso centrale associate all'alto segnale di TNF, come il **morbo di Alzheimer**.

Diversi composti a piccole molecole hanno avuto successo negli studi preclinici, dimostrando prospettive per future applicazioni cliniche. Pertanto, le terapie a base di piccole molecole sono considerate potenziali alternative all'inibizione del TNF da parte dei biologici.

La **Sunesis Pharmaceuticals** di San Francisco ha sviluppato e descritto la struttura cristallina del primo **antagonista a piccole molecole del TNF**, **SPD304**, che ha un valore di costante di dissociazione di equilibrio ( $K_D$ ) di 5,36  $\mu\text{M}$  e interrompe la trimerizzazione del TNF ha consentito ai ricercatori di sviluppare altri ligandi di piccole molecole attraverso la progettazione di farmaci basati sulla struttura.

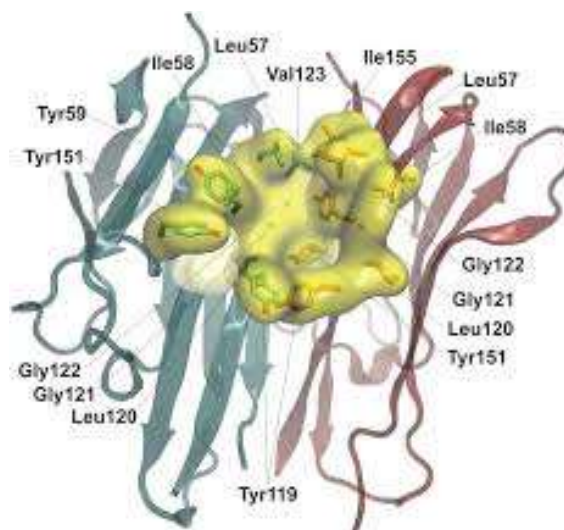


Il composto inibisce l'attività del **TNF-alfa** nei saggi biochimici e cellulari con concentrazioni inibitorie mediane rispettivamente di 22 e 4,6 micromolare. La formazione di un complesso intermedio tra il composto e il trimero intatto si traduce in un tasso di dissociazione della subunità accelerato di 600 volte che porta alla dissociazione del trimero.

La struttura risolta mediante *cristallografia a raggi X* rivela che una singola molecola composta sposta una subunità del trimero per formare un complesso con un dimerico di subunità TNF-alfa.

*He MM et al **Small-molecule inhibition of TNF- $\alpha$** . Science. 2005 Nov 11;310(5750):1022-5.*

Uno studio successivo ha rivelato la struttura del **TNF** legato a più molecole del composto JNJ525, indicando una possibile inibizione del **TNF** mediata dall'aggregazione. Gli studi hanno anche scoperto agenti a piccole molecole che si legano direttamente al **TNF** con concentrazioni inibitorie semimassime ( $IC_{50}$ ) comprese tra 1 e 50  $\mu\text{M}$  e bloccano le vie di segnalazione a valle mediate da **TNFR1** o **TNFR2**.



Il TNF- $\alpha$  ha un sito di legame del ligando poco profondo a cui si lega **SPD304** interagendo con residui specifici, la maggior parte dei quali sono idrofobici.

È stato anche scoperto che diversi composti simili a prodotti naturali inibiscono gli effetti cellulari mediati dal **TNF** in studi sia in vitro che in vivo. Nonostante il progresso preclinico delle terapie

candidate anti-TNF a piccole molecole, la bassa potenza e l'elevata tossicità di questi agenti chimici hanno limitato i loro test negli studi clinici.

Il team del **Department of Molecular Science and Technology** dell'Università di Ajou (Korea)



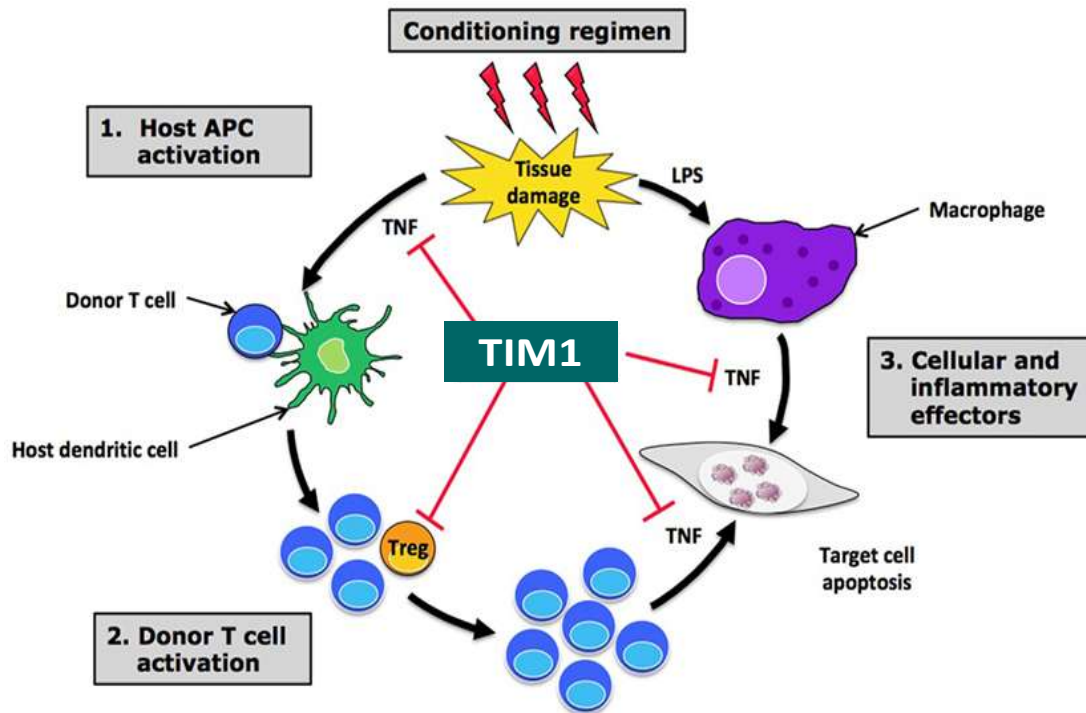
ha identificato un inibitore non tossico di piccole molecole chiamato **TIM1** che inibisce potentemente la segnalazione del **TNF** nel topo e nelle cellule umane.

Infatti i saggi biologici in vitro hanno rivelato che **TIM1** inibiva notevolmente la secrezione di citochine indotta dal **TNF** da parte delle linee cellulari umane e attenuava la morte indotta dal **TNF** nelle cellule umane e murine senza alcuna citotossicità fino a un concentrazione di 200  $\mu\text{M}$ .

Un'analisi *dell'interazione proteica reticolata* seguita dalla *spettroscopia di risonanza plasmonica di superficie (SPR)* e dalla *modellazione computazionale* ha suggerito che **TIM1** potrebbe occupare stabilmente la tasca idrofobica centrale nell'omodimero del **TNF** e prevenire così la formazione di un omotrimerico funzionale.

Uno dei potenti derivati **TIM1**, **TIM1c**, ha migliorato i sintomi e ritardato la progressione della malattia in un modello murino di artrite infiammatoria in misura simile all'iniezione di **etanercept**

Si prevede che la serie **TIM di ligandi** sarà preziosa per lo sviluppo di agenti terapeutici *a basso peso molecolare* mirati a malattie infiammatorie mediate dal **TNF** agire a più livelli e in più contesti  
*Viatico: Fai attenzione alle piccole cose, perché un giorno ti volterai e capirai che erano grandi. (Jim Morrison)*



*Javaid N et. [An orally active, small-molecule TNF inhibitor that disrupts the homotrimerization interface improves inflammatory arthritis in mice.](#) *Sci Signal.* 2022 Nov 8;15(759):eabi8713.*

## Un anno fa... Baedeker/Replay del 13. Novembre

*I nuovi scenari degli antivirali orali : ottimismo, precauzioni e molta prudenza  
Parte prima: gli inibitori delle proteasi*

I comunicati stampa degli ultimi giorni Merck e Pfizer sulle possibili terapie antivirali attraverso pillole da assumere ai "primi sintomi" di COVID-19 inducono ottimismo e speranza, ma anche in attesa di risultati pubblicati, una certa prudenza in base ai dati esistenti e consultabili. Lopinavir insieme a Ritonavir (LPV/r) è una combinazione orale approvata dalla FDA per il trattamento dell'HIV. Lopinavir agisce come un inibitore della proteasi dell'HIV-1 e Ritonavir ne aumenta l'attività inibendo sia la proteasi dell'HIV-1 che il metabolismo degli enzimi CYP con un aumento significativo della biodisponibilità. (vedi Baedeker)

Gli studi del team del Laboratorio di Biologia Strutturale, dell'Università di Pechino hanno dimostrato che 3-CL pro è una regione altamente conservata in diversi tipi di coronavirus in termini di sequenza e struttura 3D (Xue L et al 208) la letteratura ipotizza che gli inibitori della proteasi dell'HIV-1, LPV/r, sono dei potenziali candidati capaci di inibire il 3-CL pro .

Le proteasi sono essenziali per la replicazione e la generazione di nuovi virus. In accordo con la letteratura, il Chu Study Group della School of Public Health, LKS Facoltà di Medicina, Università di Hong Kong ha dimostrato attività in vitro contro SARS-CoV e MERS-CoV, questo dato ha promosso l'interesse della ricerca nella valutazione del potenziale terapeutico della combinazione per SARS-CoV-2. I primi rapporti che confrontavano LPV/r insieme alla ribavirina e un gruppo di controllo "storico" trattato con la sola ribavirina hanno rivelato una diminuzione dell'ARDS causata da SARS-CoV, tuttavia la natura "osservativa" del braccio di controllo ha impedito di trarre conclusioni definitive (Chu SARS Study Group 2004)

Negli studi sulla SARS-CoV-2, Lopinovir hanno mostrato una spiccata attività antivirale nelle cellule Vero E6 con una l'EC 50 stimata a (26,63 µM). Tuttavia un recente studio randomizzato, in aperto e controllato che includeva pazienti con COVID -19 ha ricevuto LPV/r (400 mg/100 mg) due volte al giorno per 14 giorni



rispetto alla cura standard non ha rivelato differenze significative nella clearance virale e nel tasso di mortalità (Cao et al 2020).

In particolare nei pazienti adulti ospedalizzati con Covid-19 grave, non è stato osservato alcun beneficio con il trattamento con lopinavir-ritonavir oltre le cure standard I risultati del team di Barlow dell'Università del Maryland, Baltimora, Maryland riportano il limitato beneficio terapeutico di LPV/r nel trattamento di COVID-19 ma anche un dato "inquietante". Il trattamento con LPV/r può causare infatti diversi problemi gastrointestinali come nausea, sensazione di vomito e diarrea. I pazienti in terapia intensiva con malattie epatiche preesistenti e malattie cardiache congenite sono portati rispettivamente a scompenso epatico e prolungamento dell'intervallo QT (Barlow et al. 2020).

Tutti questi effetti avversi di LPV/r possono esacerbare i sintomi di COVID-19 . Altri farmaci antiretrovirali che inibiscono la proteasi e l'integrasi sono stati identificati come potenziali molecole farmacologiche osservando la loro attività enzimatica. Darunavir ha dimostrato la sua attività contro SARS-CoV-2 in modelli cellulari in vitro. Sono necessari ulteriori studi clinici per il beneficio clinico dei farmaci antiretrovirali nel trattamento del COVID-19.

**(per i riferimenti vai al originale)**