

**RAPPORTO FINALE SUI RISULTATI DEL PROGETTO COMUNE DI RICERCA
FINAL REPORT ON RESULTS OF JOINT RESEARCH PROJECT**

1. Accordo /Agreement CNR / ASM anni/ years 2015/2016	
2. Titolo del progetto Sintesi di derivati guanidinici di natura terpenoidica con rilevante attività biologica e potenziale interesse terapeutico.	
2. Title of the project Synthesis of guanidine-functionalized terpenoids with relevant biological activity and therapeutical potential.	
Parole chiave (massimo 3) Metaboliti marini; acilguanidine; terpeni Key words (max. 3) Marine secondary metabolites; acylguanidine; terpenoids	
(solo per parte italiana) Area scientifica / Scientific area (tabella 1/ table1) Dipartimento scienze chimiche e dei materiali	
3. Responsabili del progetto Project leaders	
Responsabile italiano Dott.ssa Marianna Carbone	Moldavia project leader Prof. Dr. Nikon Ungur
Istituto di appartenenza Istituto di Chimica Biomolecolare - ICB Indirizzo Via Campi Flegrei 34 80078 Pozzuoli (Napoli)	Affiliation Academy of Sciences of Moldova, Institute of Chemistry. Address Academiei str. 3, MD-2028 Chisinau, Moldova
4. Obiettivi del progetto	
Il progetto di ricerca "Sintesi di derivati guanidinici di natura terpenoidica con rilevante attività biologica e potenziale interesse terapeutico" è stato finalizzato alla preparazione di molecole ispirate a prodotti naturali con potenziale applicativo in settori connessi al benessere dell'uomo. Esso ha previsto l'integrazione di competenze relative all'identificazione di prodotti naturali, alla loro sintesi e alla valutazione delle loro proprietà biologiche. In particolare le ricerche sono state focalizzate al perseguimento di	

due principali obiettivi:

- (1) elaborazione di una strategia sintetica per preparare un nuovo composto guanidinico, l'actinofide, recentemente isolato presso l'ICB da un organismo marino, il mollusco *Actinocyclus papillatus*, in modo da reperire quantità sufficienti per effettuare una valutazione delle sue proprietà biologiche;
- (2) preparazione di una serie di molecole strutturalmente correlate da testare in saggi di inibizione della crescita su linee di cellule tumorali, al fine di elaborare rapporti struttura-attività.

4. Aims of the project

The project "Synthesis of guanidine-functionalized terpenoids with relevant biological activity and therapeutical potential" was aimed at synthesizing natural product-inspired compounds with potential applications for human health. It involved skills in the isolation, identification and synthesis of natural compounds, as well as in the evaluation of biological properties. In particular the research activities in the frame of this project were developed to achieve two main goals:

- 1) Elaboration of a synthetic strategy for preparing a marine acylguanidine terpenoid, actinofide, recently isolated by ICB research team from the marine mollusc *Actinocyclus papillatus* with the aim at getting a larger amount of product to carry out the screening of the biological activities.
- 2) Synthesis of a series of actinofide structurally-related compounds to be tested for the *in vitro* growth inhibitory activity assays on different tumor cell lines in comparison with the natural compound actinofide.

5. Risultati ottenuti per obiettivo (1 pagina)

Nell'ambito del primo obiettivo, la sintesi dell'actinofide è stata realizzata seguendo, in parte, una procedura sintetica riportata in letteratura per un composto naturale, il dotofide, avente forti analogie strutturali con l'actinofide. Questa sintesi, che si è basata sull'accoppiamento della guanidina, in due step successivi, con gli opportuni acidi terpenoidici attivati, ha confermato la struttura proposta per l'actinofide sulla base di esperimenti di Risonanza Magnetica Nucleare (NMR) e di spettrometria di massa. La sintesi ha inoltre fornito la quantità di actinofide necessaria ad intraprendere uno studio farmacologico fortemente motivato dalla presenza in questo composto di un'unità guanidinica. La guanidina ed i suoi derivati, infatti, rivestono un ruolo di particolare rilievo nel settore della chimica medicinale dove il gruppo guanidinico rappresenta uno degli "scaffold" maggiormente utilizzato nella progettazione e sintesi di nuovi farmaci.

Nell'ambito del secondo obiettivo sono state realizzate le sintesi di una serie di analoghi strutturali dell'actinofide e sono stati intrapresi i primi studi sulle proprietà biologiche dei composti sintetizzati. In particolare, gli analoghi sono stati preparati seguendo la stessa procedura utilizzata per l'actinofide, variando semplicemente la combinazione di tre acidi terpenoidici lineari, gli acidi senecioico (C5), geranico (C10) e farnesoico (C15). Sono stati sintetizzati, in totale, nove composti caratterizzati da catene aciliche lineari aventi un differente grado di polimerizzazione dell'unità terpenoidica.

La valutazione delle proprietà biologiche e, in particolare, degli effetti di inibizione sulla crescita di cellule tumorali dei composti sintetizzati e dei prodotti naturali actinofide e dotofide, è stata condotta nell'ambito di una collaborazione scientifica esistente da anni tra il gruppo di sostanze naturali dell'ICB ed il gruppo del professore Robert Kiss dell'Université Libre de Bruxelles - Faculté de Pharmacie-Laboratoire de Toxicologie. Per questi studi sono state utilizzate sei linee cellulari con diversa origine istologica e diversa sensibilità agli stimoli pro-apoptotici: due linee di carcinoma umano di origine epiteliale (MCF-7 e A549); due linee di carcinoma umano di origine gliale (HS683 e U373); due linee di melanoma, una di topo (B16F10) e una umana (SKMEL-28).

5. Achieved results (one page)

- 1) In the frame of the first objective, the synthesis of actinofide was performed by using, partially, a procedure reported in the literature for natural dotofide. This procedure is based on the coupling of guanidine, in two sequential steps, with activated farnesoic and senecioic acids. The synthesis allowed to confirm the structure of actinofide which was proposed by using spectroscopic (mostly NMR spectroscopy) and spectrometric methods, and gave the opportunity to undertake a biological activity screening. Interest in the evaluation of actinofide biological properties was motivated by the occurrence in this molecule of a guanidine moiety. In fact, this functional group plays an important role in the medicinal chemistry due to its capability to establish interactions with biological targets.
- 2) Under the second objective the synthesis of a series of actinofide analogs differing in the terpenoid moiety linked to guanidine have been carried out by using the same synthetic procedure. A total of nine analogs were synthesized by coupling in different combination senecioic, geranoic and farnesoic acids with guanidine. The evaluation of their biological properties together with those of natural actinofide, have been carried out in the frame of collaboration with pharmacologists from the "Faculté de Pharmacie-Laboratoire de Toxicologie - Université Libre de Bruxelles". In these studies the growth inhibitory effects of actinofide and its synthetic analogs were assayed on six cancer cell lines of distinct histological origins and displaying various levels of sensitivity to pro-apoptotic stimuli: two human carcinoma cancer cell lines [MCF-7 (breast) and A549 (nonsmall cell lung cancer; NSCLC)] of epithelial origin; two human cancer cell lines from glial origin [i.e., the Hs683 oligodendroglioma, and the U373 glioblastoma (of astrocytic origin) models]; two melanoma models (i.e., the mouse B16F10, and the human SKMEL-28 cell lines).

6. Prodotti del progetto / Results obtained

	n./no.
Publicaz. scient. su riviste internaz./ scientific publications on international reviews con IF	1
Publicaz. in atti congressi internaz./	1

publications in international congress proceedings	
Pubblicazioni in atti congressi nazionali / publications in national congress proceedings	
Pubblicazione libri nazionali / Publication of national books	
Pubblicazione libri internazionali / Publication of international books	
Altre pubblicazioni / other publications	
Brevetti / Patents	
Prototipi / Prototypes	
Strumentazione / Equipment and /or Devices	
Programmi software / Software	
Banche dati / Data bases	
Protocolli / Protocols	
Nuovi Materiali / New Materials	
Nuovi processi / New processes	
Cataloghi/inventari/repertori / Catalogues/Inventories	
Atlanti/Carte/Mappe / Atlases/Charts/Maps	
Progetti di ricerca / Reserch project	
Trasferimento innovazioni / Knowledge transfer	
Laboratori congiunti / Joint laboratories	
Alta formazione / Training	
Altro / Other	1

7. Informazioni dettagliate sui risultati indicati sub 6

I risultati ottenuti nell'ambito di questo progetto si sono concretizzati nella pubblicazione sulla rivista Journal of Natural Products (IF 3.662 per il 2015) del seguente articolo:

Marine terpenoid diacylguanidines: structure, synthesis and biological evaluation of naturally occurring actinofide and synthetic analogs. Autori: **M. Carbone**, M. L. Ciavatta, V. Mathieu, A. Ingels, R. Kiss, P. Pascale, E. Mollo, **N. Ungur**, Y.-W. Guo, M. Gavagnin.

Questi risultati sono stati presentati nell'ambito di un'*invited lecture* tenuta al "8th Shanghai International Conference on Traditional Chinese Medicine and Natural Medicine", il 21-23 ottobre 2015, da M. Gavagnin, partecipante al progetto.

Inoltre, parte del lavoro svolto nell'ambito di questo progetto ha rappresentato l'attività di ricerca svolta dalla studentessa Paola Pascale durante il suo periodo di tesi sperimentale presso i laboratori dell'ICB nell'anno 2015 che si è concluso con la discussione di una tesi sperimentale dal titolo "Terpeni guanidinici da molluschi marini: struttura, sintesi ed attività biologica".

7. Detailed information on results indicated under point 6

The scientific results obtained in the frame of this project have been reported in the

following article published in Journal of Natural Products (IF 3.662 for 2015):
Marine terpenoid diacylguanidines: structure, synthesis and biological evaluation of naturally occurring actinofide and synthetic analogs. Autori: **M. Carbone**, M. L. Ciavatta, V. Mathieu, A. Ingels, R. Kiss, P. Pascale, E. Mollo, **N. Ungur**, Y.-W. Guo, M. Gavagnin.

These results have been also presented (invited lecture) by M. Gavagnin, participant to the project, at the "8th Shanghai International Conference on Traditional Chinese Medicine and Natural Medicine", that was held in Shanghai on 21-23 October 2015.

In addition, part of the research activity under this project has been reported in the experimental thesis titled "Guanidine Terpenes from Sea Molluscs: Structure, Synthesis and Biological Activity" discussed by the student Paola Pascale that worked at this project during her training at ICB.

8. Formazione di giovani ricercatori

Durante le settimane di soggiorno effettuate nei due anni di progetto dai ricercatori dell'ICB presso l'Istituto di Chimica dell'ASM in Chisinau, il responsabile per parte moldova, il Prof. Nicon Ungur, ha organizzato delle giornate di incontri con giovani ricercatori e con accademici dell'ASM e dell'Università di Moldova, presso l'istituto. Tali eventi hanno previsto la presentazione di seminari tematici da parte degli ospiti italiani e di ricercatori dell'ASM e una discussione finale sulle ricerche condotte nell'ambito del progetto.

8. Training of young researchers

During their stages in 2015 and 2016 at the ASM Chemistry Institute in Chisinau, the ICB researchers were involved in a series of conferences with students and young researchers from both ASM and the Moldova State University. In these meetings, organized by the ASM project leader Prof. Nicon Ungur, the ICB researchers together with professors of ASM gave seminars on their research activities and discussion on the results obtained under this project.

9. Motivazione degli sviluppi della collaborazione negli anni successivi

(eventuali estensione ad altri paesi, collaborazioni multilaterali, contratti nazionali o internazionali)


Il rinnovo del presente progetto offrirà la possibilità ai ricercatori coinvolti dell'ICB e dell'ASM di consolidare ulteriormente la loro fruttuosa e duratura collaborazione, permettendo attraverso lo scambio delle rispettive competenze scientifiche di sviluppare ulteriormente le ricerche già in corso nei due gruppi e promuoverne di nuove. In particolare l'eventuale prosieguo del progetto consentirà di approfondire gli studi intrapresi sui composti guanidinici di natura terpenoidica, completando le sintesi di alcuni derivati ciclici, già iniziate nel corso del precedente biennio, progettandone di nuove e valutando le attività biologiche dei composti sintetizzati così come fatto per i composti lineari. L'ampliamento di questa collezione di terpeni guanidinici permetterà di intraprendere degli studi di SAR, volti all'ottimizzazione del profilo di attività biologica, e di comprensione del meccanismo di azione. Infatti, come avvenuto durante il biennio 2015/2016 la partecipazione al progetto sarà allargata anche a gruppi di farmacologi appartenenti ad altre istituzioni di ricerca sia nazionali che internazionali con cui i ricercatori dell'ICB hanno collaborazioni già in essere. L'accordo permetterà pertanto di avvicinare più realtà scientifiche con competenze diverse, e da questo scambio si auspica possano essere sviluppate proposte progettuali più ampie per partecipare a bandi internazionali per accedere a finanziamenti europei o di altra natura.

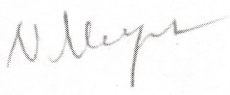
9. Reasons for cooperative project developments in the following years, if any

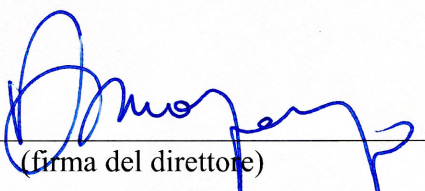
(extension to other countries, multilateral collaboration, national or international contracts)

The renewal of this proposal will give the opportunity to further consolidate the fruitful and long-lasting collaboration between the ICB and ASM teams involved in this project allowing them to further develop their research and to promote new ones. In particular, the renewal of this project could enable to continue the study of terpenoidic guanidine compounds by completing the synthesis of some cyclic derivatives started during the previous two years, and by designing new guanidine derivatives, as well as by evaluating the biological properties of all synthesized compounds as made for linear derivatives. The extension of our collection of guanidine terpenes will enable SAR studies aimed at optimizing the biological activity profile, and understanding the mechanism of action of this class of compounds. Indeed, as already done during the 2015/2016, the participation at the project will be extended to pharmacologists belonging to other national and international research institutions collaborating with ICB researchers. Thus the project will continue to bring together several scientific groups with different skills. Starting from this exchange of scientific interest and expertise we hope to develop broader project proposals to participate to international calls to access to European or other kind of funding.

15/05/2017


(firma del responsabile italiano del progetto)


(signature of the ASM project leader)


(firma del direttore)