

Università degli Studi di Napoli

“Federico II”

FACOLTÀ DI FARMACIA



DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZA DEL FARMACO

XIX CICLO

TESI SPERIMENTALE IN

MODELLISTICA MOLECOLARE

**PROGETTAZIONE DI NUOVI AGENTI ANTI INFETTIVI
PER IL TRATTAMENTO DELLA MALARIA
E DELLE INFEZIONI CAUSATE
DAL VIRUS DELL' HIV E DELL' HCV**

COORDINATORE

CH. MO PROF. ENRICO ABIGNENTE

CANDIDATO

DOTT. MARCO PERSICO

TUTOR

CH. MO PROF. CATERINA FATTORUSSO

SOMMARIO

SOMMARIO	2
LEGENDA DELLE ABBREVIAZIONI	4
PREFAZIONE	6
1.HIV	7
1.1 INTRODUZIONE.....	7
1.1a Aspetti generali:AIDS/HIV	7
1.1b Morfologia del virus dell'HIV.....	7
1.1c Genoma del virus dell'HIV	8
1.1d Ciclo vitale del virus dell'HIV	9
1.1e Terapia attuale.....	10
1.1f Trascrittasi inversa: struttura, funzione ed inibitori.....	12
1.2 BASI MOLECOLARI DELLA PROGETTAZIONE DI NUOVI NNRTI.....	15
1.3 RISULTATI E DISCUSSIONE	20
1.3a Studi SAR sui nuovi derivati pirrolobenzossazepinonici (13d-i).....	20
1.3b Studi di docking sui derivati pirrolobenzossazepinonici 13c e 13d: due modalità di legame diverse e simmetriche.....	21
1.3c Studi SAR sui nuovi derivati pirrolobenzossazepinonici (15a-l).....	27
1.3d Studi di docking sul composto 15c: interazione con la regione “primer grip” (F227, W229, M230) e con il $\beta 9$ - $\beta 10$ hairpin (Y181, Y188, Y183).....	29
1.3e Studi SAR sui derivati 21a e 21b: il ruolo del sistema tricyclico nell'attività anti-HIV	32
1.3f Saggi farmacologici: attività antivirale, citotossicità e sinergismo con AZT.....	33
1.3g Interazione con la regione “primer grip” della TI: ampio spettro d'azione e selettività per il complesso ternario.....	36
1.4 CONCLUSIONI	40
1.5 PARTE SPERIMENTALE	42
1.5a Analisi conformazionale dei composti 13c, 13d, 15c e 21b.....	42
1.5b Studi di docking sui composti 13c, 13d e 15c	43
2.HCV	47
2.1 INTRODUZIONE.....	47
2.1a Epidemiologia del virus dell'epatite C (HCV).....	47
2.1b Terapia attuale per la cura dell'HCV.....	48
2.1c Genoma del virus dell'HCV	48
2.1d NS3 elicasi: struttura, funzione ed inibitori.....	49
2.2 BASI MOLECOLARI DELLA PROGETTAZIONE DI INIBITORI SELETTIVI DELLA NS3H	51
2.3 RISULTATI E DISCUSSIONE	54

2.3a	<i>QU663, inibitore nucleosido-mimetico della NS3h</i>	54
2.3b	<i>Saggi farmacologici: inibitori competitivi e specifici dell'attività elicastica della proteina NS3</i>	59
2.3c	<i>Studi di docking sul derivato QU663</i>	62
2.4	CONCLUSIONI	66
2.5	PARTE SPERIMENTALE	68
2.5a	<i>Analisi delle proprietà chimico-fisiche dei nucleotidi e dei nuovi composti progettati</i>	68
2.5b	<i>Costruzione del modello della NS3h</i>	69
2.5c	<i>Generazione della struttura di partenza per gli studi di docking</i>	70
2.5d	<i>Studi di docking</i>	71
3.	MALARIA	73
3.1	INTRODUZIONE	73
3.1a	<i>Epidemiologia ed eziologia</i>	73
3.1b	<i>Modalità di trasmissione e ciclo vitale</i>	74
3.1c	<i>Terapia attuale, chemio-profilassi e farmaco-resistenza</i>	75
3.2	BASI MOLECOLARI DELLA PROGETTAZIONE DI NUOVI AGENTI ANTIMALARICI	79
3.3	RISULTATI E DISCUSSIONE	80
3.3a	<i>Progettazione di potenti agenti antimalarici basati sulla struttura del clotrimazolo e sviluppo di un farmaco innovativo</i>	80
3.3b	<i>Derivati endoperossidici estratti da organismi marini: identificazione dei requisiti strutturali necessari per l'attività antimalarica e ipotesi di meccanismo d'azione</i>	87
3.3c	<i>Progettazione di N1-ariliden-N2-chinolin e N2-acridinil idrazoni come potenti agenti antimalarici attivi contro i ceppi CQ-resistenti del Pf</i>	97
3.4	CONCLUSIONI	103
3.5	PARTE SPERIMENTALE	106
3.5a	<i>Studi di modellistica molecolare ed analisi bio-informatiche per la progettazione di nuovi agenti antimalarici strutturalmente correlati al CLT</i>	106
3.5b	<i>Studi di modellistica molecolare per la progettazione di nuovi agenti antimalarici 1,2-diossanici</i>	109
3.5c	<i>Studi di modellistica molecolare per la progettazione di nuovi agenti antimalarici chinolin-idrazonici e acridin-idrazonici</i>	110
	RINGRAZIAMENTI	112
	BIBLIOGRAFIA	113

LEGENDA DELLE ABBREVIAZIONI

gp: glicoproteina

HAART: *highly active antiretroviral therapy*

TI: trascrittasi inversa

NNRTI: inibitori non nucleosidici della trascrittasi inversa

NRTI: inibitori nucleosidici della trascrittasi inversa

PI: inibitori della proteasi

SAR: relazioni struttura-attività

PBO: pirrolobenzossazepinoni

PDB: *Protein DataBank*

IFN α : interferone alfa

NS3h: proteina non strutturale 3 con attività elicastica

RTP: ribavirin-5'-trifosfato

ATP- γ -S: adenosina-5'- γ -tio-trifosfato

QX: chinossalina

QU: chinolina

vdW: van der Waals

Pf: *Plasmodium falciparum*

CQ-S: cloroquina sensibile

CQ-R: cloroquina resistente

VD: vacuolo digestivo

CLT: clotrimazolo

PLK: plakortina

CQ: cloroquina

14-LD: citocromo P450 14 α -lanosterol-demetilasi

BHIA: *β -hematin inhibitory activity*

CSDS: *Cambridge Structural Database System*

PREFAZIONE

Il progetto di ricerca nell'ambito del quale ho svolto il mio lavoro di dottorato, riguarda lo sviluppo di nuovi potenziali farmaci per la cura delle seguenti malattie infettive: HIV, HCV e malaria, caratterizzate da un alto grado di mortalità e molto diffuse nei paesi del terzo mondo, e per la cura delle quali si rende estremamente necessario lo sviluppo di strategie terapeutiche innovative ed efficaci.

Tutti i composti, progettati attraverso l'utilizzo di metodiche computazionali, sono stati sintetizzati presso il Dipartimento Farmaco-Chimico Tecnologico dell'Università di Siena (Prof. Campiani). I saggi farmacologici dei composti sviluppati per la cura dell'HIV e dell'HCV sono stati eseguiti presso il CNR di Pavia (Dr. Maga), mentre, quelli dei composti sviluppati per la cura della malaria, sono stati svolti presso il Department of Infectious and Tropical Diseases della London School of Hygiene and Tropical Medicine (Dr. Simon Croft e Dr. Vanessa Yardley) e presso il Dipartimento di Sanità Pubblica-Microbiologia-Virologia dell'Università di Milano (Prof. Taramelli).

1.HIV

1.1 INTRODUZIONE

1.1a *Aspetti generali:AIDS/HIV*

L'AIDS è una malattia infettiva pandemica che ha causato negli ultimi anni 3 milioni di morti e, sempre più persone (5 milioni) stanno contraendo questa infezione soprattutto nelle zone dell'Africa sub-sahariana (dati WHO). L'agente eziologico di questa malattia è il virus dell'immunodeficienza umana (HIV, acronimo dall'inglese Human Immunodeficiency Virus)¹.

Il virus dell'HIV appartiene ad un sottogruppo della famiglia dei retrovirus conosciuti come lentivirus. In base alle attuali conoscenze, il virus dell'HIV è suddiviso in due ceppi: HIV-1 ed HIV-2. Il primo dei due è localizzato prevalentemente in Europa, in America ed in Africa centrale, mentre il ceppo HIV-2, è diffuso per lo più in Africa occidentale ed Asia e, determina una sindrome clinicamente più moderata rispetto al ceppo HIV-1.

1.1b *Morfologia del virus dell'HIV¹*

Il virus dell'HIV ha un diametro di circa 100 nm e presenta sia un capside con forma icosaedrica sia un involucro esterno costituito dalle proteine di membrana virali gp120 e gp41 (Figura1). Il materiale genetico del virus è costituito da due copie di RNA a polarità positiva, le quali sono legate a due proteine basiche denominate p7 e p9. Tale complesso, insieme alla trascrittasi inversa, alla proteasi ed all'integrasi, è contenuto in una sezione

centrale della particella virale denominata core (Figura1). Essa presenta una struttura cilindro/conica ed è costituito completamente da una sola proteina (p24). Tra il core e l'involucro lipoproteico si trova uno strato di materiale elettron denso costituito completamente dalla proteina virale p17.

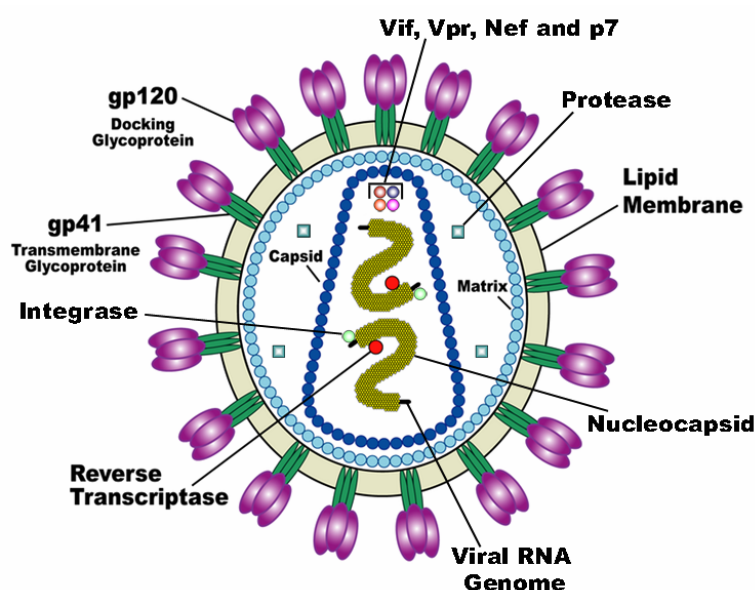


Figura1. Struttura del virus dell'HIV.

1.1c Genoma del virus dell'HIV

Come tutti i retrovirus, il virus dell'HIV¹ possiede tre geni fondamentali per la sua replicazione: Gag, Pol ed Env. Sia Gag che Pol sono trascritti in un unico mRNA che viene poi tradotto in una proteina di 180 Kd (p180). Dalla scissione di p180 si formano la proteasi (p10), la trascrittasi inversa (p51/p66), l'integrasi e una proteina di 55 Kd (p55). Dalla p55, sempre per proteolisi, derivano le proteine del core del virus: p24, p17, p9 e p7. Invece, il gene Env viene tradotto in una proteina di 88 Kd la quale, viene prima glicosilata (p160) e

poi, viene scissa, dando origine a due glicoproteine, costituenti l'involucro esterno del virus e responsabili dell'adesione cellulare: la gp120 e la gp41².

Oltre a questi geni, il virus dell'HIV contiene altri sette geni accessori, che hanno funzioni regolatorie del ciclo virale e della sintesi proteica³⁻⁴: Tat, Rev, Nef, Vpr, Tef, Vif, e Vpu, quest'ultimo nel genoma di HIV-2 non esiste ed è sostituito dal gene Vpx.

1.1d Ciclo vitale del virus dell'HIV

I ceppi HIV-1 e HIV-2 sono in grado di infettare tutte le cellule, che presentano sulla loro membrana i recettori CD4, CXCR4, e CCR5⁵⁻⁶ quali i linfociti, i macrofagi, le cellule della microglia e le cellule dendritiche⁷. Da alcuni esperimenti si è avanzata l'ipotesi secondo la quale possono essere infettati anche i timociti ed i precursori midollari forse appartenenti alla linea mieloide-monocitica⁷. Anche gli astrociti subiscono l'infezione da parte di HIV sebbene essa non sia produttiva⁷.

Le glicoproteine virali gp120 e gp41² sono responsabili del legame ai recettori cellulari e, dopo che è avvenuto questa interazione, si avviano i fenomeni che danno luogo alla fusione tra la membrana virale e quella della cellula. Dopo che il virus è penetrato nella cellula, il suo RNA viene trascritto come DNA ad opera della trascrittasi inversa e, successivamente, viene integrato nel genoma della cellula ospite dall'integrasi virale. Una volta, che il genoma virale si è integrato in quello dell'ospite, può rimanere inattivo dal punto di vista trascrizionale per un periodo di tempo compreso tra mesi ed anni. L'input che dà l'avvio alla trascrizione del genoma virale, si suppone sia costituito dall'insieme di stimoli che possono attivare la cellula infetta: antigeni, citochine o anche infezioni da parte di altri virus. L'espressione dei geni virali viene divisa in due fasi: precoce e tardiva. Nella prima vengono espressi i geni regolatori mentre nella seconda quelli strutturali. I geni regolatori, di

cui i più noti sono Tat, Nef e Rev³⁻⁴ e, la cui sintesi avviene nel citoplasma grazie ad eventi di splicing molteplici, consentono l'amplificazione della trascrizione genica ad opera della RNA polimerasi cellulare di tipo II e la stabilizzazione degli RNA messaggeri creati successivamente. Nella fase tardiva, avviene la sintesi dei geni strutturali, i cui trascritti vengono portati nel citoplasma e li sottoposti ad un solo splicing ed infine tradotti in proteine. Quando la sintesi viene completata le varie proteine strutturali si assemblano tra di loro determinando la formazione delle particelle virali che vengono poi rivestite da un involucro lipoproteico.

1.1e Terapia attuale

Attualmente, l'infezione da HIV viene trattata con la cosiddetta “*highly active antiretroviral therapy*” (HAART) nella quale si utilizzano opportune combinazioni di farmaci anti-HIV. Il suo utilizzo, a partire dal 1995, ha consentito di ridurre la mortalità degli individui che sono stati infettati dal virus. Tale terapia, inoltre, permette un sostanziale rallentamento nella progressione della malattia rispetto a terapie con un unico farmaco o due farmaci, determinando il ripristino della funzione del sistema immunitario e ritardando lo sviluppo di ceppi virali resistenti⁸⁻⁹. Attualmente l' HAART utilizza farmaci appartenenti a tre classi:

- 1) gli inibitori della trascrittasi inversa (TI), a loro volta distinti in inibitori nucleosidici, nucleotidici e non nucleosidici (NNRTI)¹⁰
- 2) gli inibitori della proteasi¹¹
- 3) gli inibitori della fusione¹²

Gli inibitori nucleosidici della trascrittasi inversa (AZT) per esplicare la loro azione devono venir trifosforilati dalle chinasi endocellulari e successivamente, competono con i

desossinucleotidi endogeni durante il processo di trascrizione. L'efficacia di tali composti dipende dalla loro concentrazione intracellulare e da quella dei desossinucleotidi, con cui si trovano a competere. Ciò significa che cellule come i macrofagi, che hanno un metabolismo limitato ed in conseguenza di ciò una concentrazione molto bassa di desossinucleotidi, sono assai sensibili all'azione di tali farmaci. Anche gli inibitori nucleotidici (Tenofovir) si comportano come inibitori competitivi della trascrittasi inversa ma, a differenza degli inibitori nucleosidici, presentano già un gruppo fosfato. Anche tale categoria di farmaci, così come gli inibitori nucleosidici, presenta un'azione maggiore sui macrofagi che sui linfociti infettati. Invece, gli inibitori non nucleosidici della trascrittasi inversa esplicano la loro attività di inibizione della trascrittasi inversa legandosi ad un sito allosterico dell' enzima. Tali farmaci sono indipendenti dal metabolismo cellulare in quanto non necessitano di alcuna modificazione e non risentono della concentrazione di desossinucleotidi. A seguito di ciò il loro effetto su monociti/macrofagi e linfociti sembra essere equivalente.

Gli inibitori della proteasi vanno a bloccare l'ultima parte del ciclo replicativo del virus dell' HIV, in quanto impediscono la maturazione delle proteine virali. Ciò determina un blocco dell'assemblaggio e del rilascio di nuovi virioni. Un tale meccanismo d'azione fa sì che gli inibitori della proteasi siano utili in tutte quelle situazioni in cui le fasi iniziali del ciclo virale sono già passate, rendendo perciò inutile l'uso degli inibitori della trascrittasi inversa. Gli inibitori della fusione sono una categoria di farmaci usciti di recente di cui, al momento, l'unico esponente è l' Enfuvirtide. Essi determinano un blocco del processo di fusione del virus con la membrana della cellula ospite. Enfuvirtide è un peptide che mima un motivo della glicoproteina gp41¹².

1.1f *Trascrittasi inversa: struttura, funzione ed inibitori*

Sebbene siano stati identificati diversi target terapeutici presenti nel ciclo vitale del virus dell'HIV, la trascrittasi inversa (TI) rimane il target farmacologico più interessante poiché è l'unico non presente anche nelle cellule eucariotiche³. La trascrittasi inversa, chiamata anche "DNA polimerasi RNA-dipendente", è il nome con cui si intende una famiglia di enzimi in grado di sintetizzare una molecola di DNA a partire da RNA. Questo enzima è un eterodimero, composto da due subunità denominate p66 e p51 in base al loro peso molecolare. La subunità p66, a sua volta, si suddivide in cinque sottodomini denominati *finger*, *palm*, *thumb*, *connection* e *RnaseH* (Figura 2).

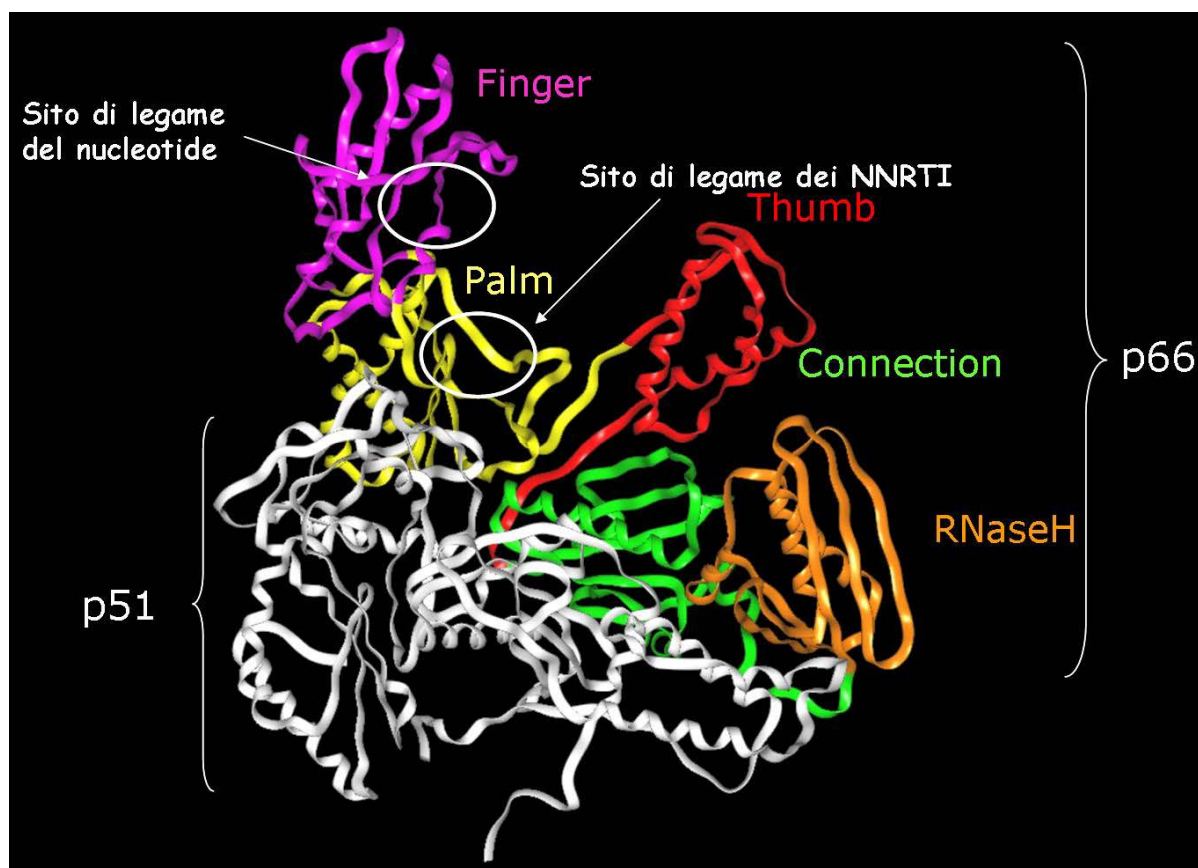


Figura2. Struttura generale della trascrittasi inversa del virus HIV-1

La trascrittasi inversa può svolgere due diverse attività: i) l'attività di DNA polimerasi attraverso la quale, è in grado di sintetizzare molecole di DNA a doppio filamento, usando come stampo sia una molecola di RNA o di DNA a singolo filamento, ii) l'attività di RNasi H, attraverso la quale riesce a degradare l'RNA dagli ibridi RNA-DNA formati durante la

reazione di polimerizzazione così da poter formare un doppio filamento di DNA a partire da un singolo filamento di RNA.

Gli inibitori della trascrittasi inversa, come già è stato scritto nel paragrafo precedente, si classificano in inibitori nucleosidici (NRTI; AZT **1** Figura 3), nucleotidici (NRTI; Tenofovir) e non-nucleosidici (NNRTI; nevirapina **2**, delavirdina **3** ed efavirenz **4** Figura 3)¹⁰. Mentre gli NRTI competono con i nucleotidi, substrato naturale della TI, gli NNRTI sono modulatori allosterici e non competitivi della TI. Quest'ultima classe di farmaci, per la buona tollerabilità e la bassa tossicità, insieme agli inibitori della proteasi (PI)¹¹, rappresenta una componente essenziale dell' HAART. Dagli studi clinici risulta che gli NNRTI spesso agiscono in maniera sinergica con gli NRTI (AZT **1** Figura 3) permettendo di semplificare le possibili terapie antivirali con il conseguente aumento del numero di pazienti che riesce a rispettarle.

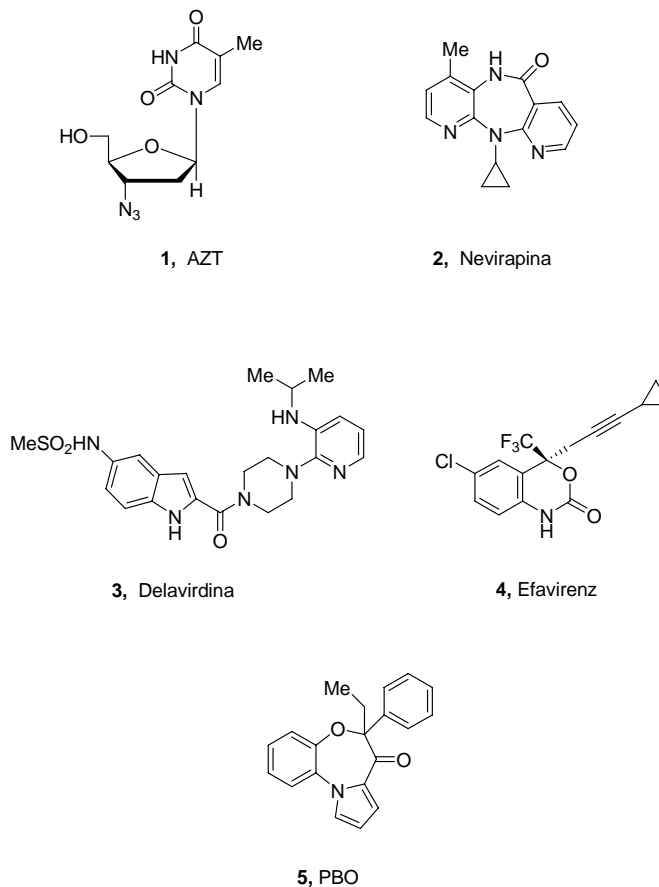


Figura 3. Strutture dell'AZT (**1**), Nevirapina (**2**), Delavirdina (**3**), Efavirenz (**4**) e PBO (**5**).

Gli NNRTI, a loro volta, si classificano in farmaci di “prima generazione” e di “seconda generazione”, sulla base delle loro proprietà farmacologiche. Infatti, i farmaci non-nucleosidici chiamati di “prima generazione”, quali nevirapina **2** e delavirdina **3** (Figura 3) sono generalmente molto sensibili agli effetti dovuti alla mutazione di un singolo aminoacido nel loro sito di legame^{9,14}; al contrario, i più recenti NNRTI di seconda generazione (efavirenz **4**, Figura 3) sono caratterizzati da un migliore profilo farmacologico che permette a tali farmaci di essere attivi contro i più comuni ceppi resistenti¹⁵.

Gli inibitori della TI attualmente in uso presentano diversi inconvenienti: i) farmacoresistenza; ii) tossicità (soprattutto gli analoghi nucleosidici); iii) difficoltà ad attraversare la barriera emato-encefalica; iv) tempo di emivita breve; v) antagonismo d'azione (NNRTI); vi) alto costo.

Quindi, la presenza di questi inconvenienti ed il possibile sviluppo di resistenza, con la conseguente riduzione di opzioni terapeutiche in caso di cure inefficaci, rende necessario lo sviluppo di nuovi e potenti agenti antivirali NNRTI i) con un ampio spettro d'azione verso i diversi ceppi virali resistenti; ii) che non inducano lo sviluppo di ulteriori ceppi resistenti e iii) che posseggano un'augmentata sinergia di azione con gli altri farmaci utilizzati nell' HAART.

1.2 BASI MOLECOLARI DELLA PROGETTAZIONE DI NUOVI NNRTI

Sebbene gli NNRTI attualmente noti presentino proprietà farmacodinamiche differenti, tutti si legano allo stesso sito allosterico caratterizzato da tre tasche idrofobiche, costituite rispettivamente da: i) Y181, Y183, Y188 e W229; ii) V179, I180, V189; iii) F227 e L234, e da una tasca che presenta tre lisine consecutive (Figura 4).

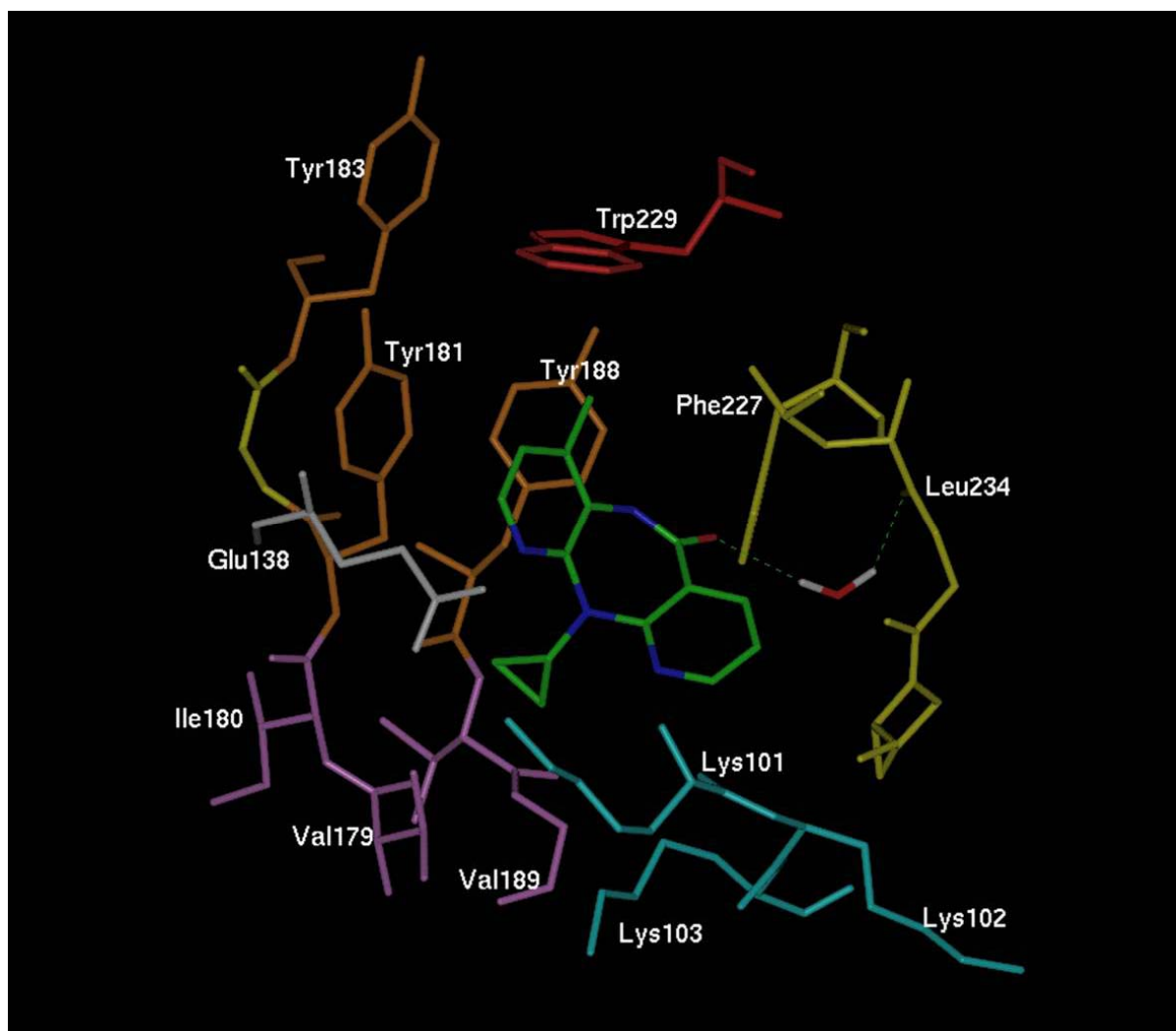


Figura 4. Struttura cristallografica del complesso Nevirapina/TI (codice PDB: 1VRT). Sono evidenziati i residui aminoacidici delle tre tasche idrofobiche: i) Y181, Y183, Y188 (arancione) e W229 (rosso); ii) V179, I180, V189 (viola); iii) F227 e L234 (giallo). I residui carichi positivamente sono in ciano; E138 (subunità p51) è in bianco. I carboni della nevirapina sono in verde, gli azoti in blu, gli ossigeni in rosso.

Quindi, al fine di stabilire quali siano i requisiti strutturali in grado di conferire l'attività verso la TI, sono state analizzate le strutture cristallografiche della TI nelle sue diverse forme e il modi in cui si legano numerosi inibitori non-nucleosidici caratterizzati da differenti capacità inibitorie verso il *wild type* ed i diversi ceppi virali mutati²³. In particolare, è stata messa in correlazione la capacità di legare le diverse sub-strutture aminoacidiche da parte dei gruppi farmacoforici, con l'affinità verso il *wild type* e verso i diversi ceppi mutati.

La scoperta che alcuni aminoacidi altamente conservati nel sito di legame degli NNRTI siano essenziali per il processo di replicazione del virus, ha permesso di avere informazioni per la progettazione razionale di nuovi farmaci anti-HIV. Infatti, una forte interazione con questi aminoacidi ha dato la possibilità di sviluppare nuovi NNRTI non sensibili alle comuni mutazioni della TI, che avvengono principalmente a livello dei seguenti aminoacidi: Y181, Y188, e K103. Sono stati identificati quattro residui altamente conservati tra quelli che costituiscono il sito di legame degli NNRTI: F227, W229, L234, e Y318. Con l'eccezione della Y318, tutti gli altri residui fanno parte del β -*hairpin* β 12- β 13 (F227-H235, *primer grip*), regione responsabile del posizionamento ottimale del *primer* per l'attacco nucleofilo dei dNTP¹⁶. Recentemente è stato dimostrato il ruolo cruciale del *primer grip* dal momento che diverse mutazioni in questa regione compromettono significativamente le attività DNA polimerasiche RNA- e DNA-dipendente della TI^{17a-d}. In particolare, le mutazioni del W229, includendo le mutazioni conservative W229F e W229Y, riducono l'attività della TI a valori inferiori al 2%^{17c}. Inoltre, la mutazione dell'aminoacido chiave W229 non è mai stata osservata in combinazione con altre mutazioni, indicando che mutazioni compensatorie per ristabilire l'attività dell'enzima mutato a livello del W229 non avvengono facilmente^{17c-d}. Quindi, il W229 è stato proposto essere essenziale per la corretto strutturazione della proteina e/o per la stabilizzazione del complesso tra TI e il *template-primer*^{17b,c}, come supportato dalle strutture cristallografiche della TI dell' HIV-1 in complesso con il DNA *template-primer*¹⁸

(complesso binario) e con il DNA *template-primer* e dNTP¹⁹ (complesso ternario) (Figura 5).

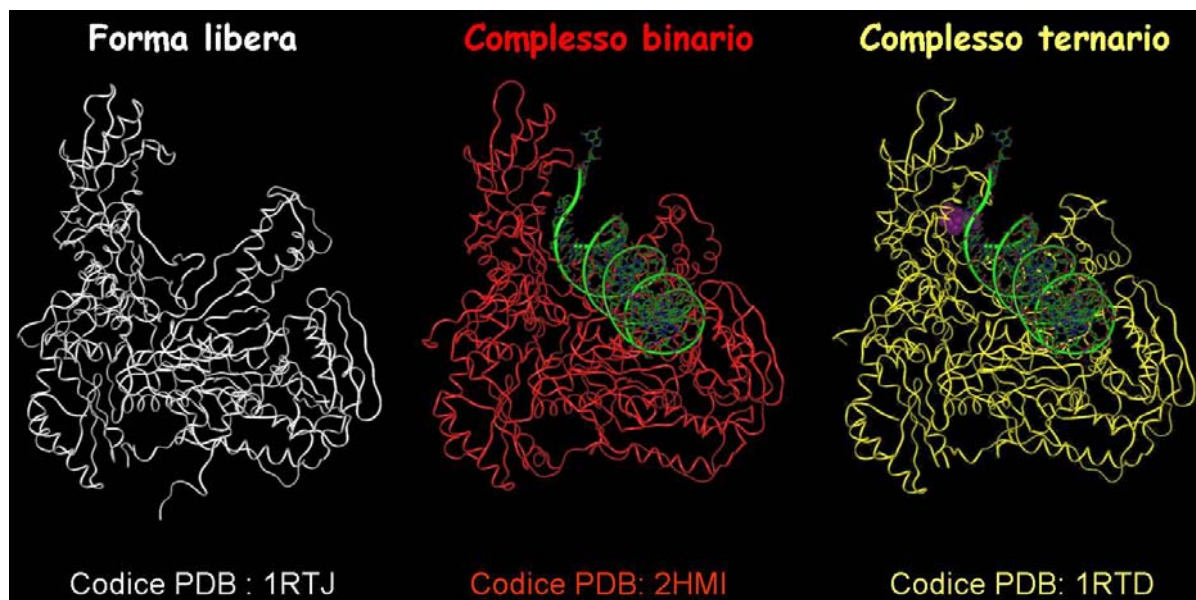


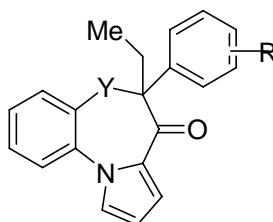
Figura5. La trascrittasi inversa nelle sue tre diverse forme funzionali: forma libera (bianca), complesso binario (rosso) e complesso ternario (giallo).

Le strutture cristallografiche della TI provano che il movimento della regione *primer grip* (W229) rispetto agli aminoacidi Y181 e Y188 (localizzati insieme ai residui catalitici D185 e D186 nel $\beta 9$ - $\beta 10$ hairpin) è cruciale per il funzionamento dell'enzima e quindi, una forte interazione con il W229 e il suo conseguente blocco, porterebbe alla scoperta di potenti NNRTI meno sensibili ai ceppi mutati e non in grado di indurre nuove mutazioni.

Sulla base di queste considerazioni, e utilizzando il nucleo pirrolobenzossazepinonico (Figura 3) già sviluppato dal gruppo di ricerca dove ho svolto il mio progetto di dottorato²⁰, attraverso un'analisi conformazionale dei ligandi in esame, seguita da calcoli di meccanica molecolare e studi di *docking* dinamico con l'enzima (i dettagli sono riportati nella parte sperimentale, paragrafo 1.5b), è stata progettata una nuova serie di composti (**13d-i** e **21a,b**; Tabella 1) al fine di estendere i precedenti studi SAR e, in particolare, valutare l'effetto sull'attività antivirale di specifici sostituenti del fenile legato al C-6 aventi diverse

caratteristiche steriche e/o elettroniche. Successivamente, sulla base dei risultati delle SAR, degli studi di *docking* e dell'analisi delle strutture cristallografiche della TI *wild type* e mutata (libera e in complesso con diversi NNRTI), prendendo anche in considerazione i differenti stati funzionali dell'enzima (forma libera, complesso binario e complesso ternario, Figura 5), sono stati progettati nuovi NNRTI capaci di interagire in maniera specifica con il residuo aminoacidico altamente conservato W229 (**15a-1**; Tabella 1). Questa strategia ha permesso di identificare una nuova serie di potenti inibitori con un profilo farmacologico promettente come agenti anti-HIV. Gli studi di modellistica molecolare e i risultati farmacologici sono descritti nei paragrafi successivi.

Tabella 1. Strutture e attività antivirale dei composti della serie (\pm)-13, (\pm)-15, (\pm)-21 contro la TI wt del virus HIV-1 e alcuni mutanti: L100I, K103N, V106A, Y181I e Y188L.



13a-i, 15a-l, 21a,b

Composti	Y	R	WT Ki (μ M) ^b	L100I Ki (μ M) ^b	K103N Ki (μ M) ^b	V106A Ki (μ M) ^b	Y181I Ki (μ M) ^b	Y188L Ki (μ M) ^b
(\pm)-13a ^a	O		0.19	0.75	7.7	3.9	>10	>10
(\pm)-13b ^a	O	3-CH ₃	0.07	0.1	1.1	0.25	4	1.9
(\pm)-13c ^a	O	3-OCH ₃	0.06	0.011	0.022	0.01	>10	>10
(\pm)-13d	O	3-Cl	0.036	0.6	NA	0.2	0.8	0.5
(\pm)-13e	O	3-I	0.05	>10	>10	0.13	>10	>10
(\pm)-13f	O	3-N ₃	NA ^c	NT ^c	NT ^c	NT ^c	NT ^c	NT ^c
(\pm)-13g	O	3-OEt	0.76	0.2	3.5	4.8	2.1	0.76
(\pm)-13h	O	3-NH ₂	0.3	NT ^c	2	1.6	>10	>10
(\pm)-13i	O	4-I	1.2	1.8	NA ^c	17.3	NA ^c	27
(\pm)-15a	O	3-CH ₂ OC ₆ H ₅	0.8	1.5	4.9	8.3	NA ^c	10
(\pm)-15b	O	4-CH ₂ Oisopentenil	2.8	NT ^c	>10	3.6	>10	>10
(\pm)-15c	O	4-CH ₂ OC ₆ H ₅	0.15	0.2	0.4	0.8	0.7	2.3
(\pm)-15d	O	4-CH ₂ NH-C ₆ H ₅	0.09	NT ^c	2.5	1.2	>10	>10
(\pm)-15e	O	4-CH ₂ O(2-ClC ₆ H ₅)	1	1.4	5	5	>10	>10
(\pm)-15f	O	4-CH ₂ O(3-ClC ₆ H ₅)	0.1	0.25	0.3	NT ^c	>10	>10
(\pm)-15g	O	4-CH ₂ O(2-COCH ₃)C ₆ H ₅	1.5	2	5	5.5	18	>10
(\pm)-15h	O	4-CH ₂ NH(3-FC ₆ H ₅)	0.4	2.5	2.3	1.5	>10	>10
(\pm)-15i	O	4-CH ₂ O(3-piridil)	0.4	0.3	2	2.5	40	39
(\pm)-15j	O	4-CH ₂ -[3-(2-imino-2,3-diidro)tiazolil]	1.6	NT ^c	5	>10	>10	>10
(\pm)-15k	O	-	NA ^c	NT ^c	NT ^c	NT ^c	NT ^c	NT ^c
(\pm)-15l	O	-	0.17	NT ^c	>10	>10	>10	>10
(\pm)-21a	CH	H	>10	NT ^c	NT ^c	NT ^c	NT ^c	NT ^c
(\pm)-21b	CH	Cl	3.3	10	10	10	>10	>10
Efavirenz	-	-	0.03	0.12	0.16	0.04	0.15	0.380
Nevirapina	-	-	0.4	9	7	10	36	18

^a Riferimento 20; ^b Ciascun valore è la media di almeno tre esperimenti; ^cNA = non attivo, inibizione \leq 10% a concentrazioni di farmaco di 100 μ M; NT = non testati.

1.3 RISULTATI E DISCUSSIONE

1.3a Studi SAR sui nuovi derivati pirrolobenzossazepinonici (13d-i)

Il gruppo di ricerca, nel quale ho svolto il mio lavoro di dottorato, ha riportato, in un precedente lavoro²⁰, come nuovi e potenti NNRTI, una serie di derivati pirrolobenzossapinonici (PBO). Alcuni di questi analoghi hanno mostrato i) una buona attività inibitoria sulla TI wt e su alcuni mutanti della TI; ii) un'azione sinergica in combinazione con l' AZT, e iii) un' elevata capacità di raggiungere alte concentrazioni nel cervello²¹. Quindi, per sviluppare nuovi agenti anti-HIV è stato scelto da questa serie di derivati PBO, come composto di riferimento, il derivato meta-sostituito **13c**. A partire da esso, al fine di ampliare le relazioni struttura-attività dei derivati PBO ed in particolare, al fine di valutare l'influenza dei sostituenti a livello del fenile legato al carbonio C-6 sull'inibizione della TI (*wild type* e mutata) del virus HIV-1, sono stati progettati e sintetizzati i nuovi analoghi **13d-i** (Tabella 1). I nuovi composti sono stati testati con saggi in vitro contro la TIwt del ceppo HIV-1 ed, al fine di valutare il loro spettro d'azione verso i diversi mutanti della TI, l'intera serie di composti attivi contro la TIwt è stata anche testata sui mutanti più comuni della TI quali: L100I, Y181I, V106A, K103N e Y188L. I risultati farmacologici ottenuti sono riassunti nella Tabella 1 e sono espressi in valori di K_i .

Il primo quesito che si è posti è stato se, espandendo gli studi SAR sulla classe degli agenti antivirali PBO, l'attività antivirale e l'ampiezza dello spettro d'azione potevano essere migliorati rispetto ai derivati PBO precedentemente descritti (**13a-c**)²⁰. Gli studi SAR sono stati condotti variando in maniera appropriata i sostituenti sull'anello fenilico legato al carbonio C-6. Come illustrato in Tabella 1, la sostituzione del gruppo metossi in posizione meta (**13c**) con un atomo di cloro (**13d**), ha determinato un aumento di due volte della attività ($K_i = 0.036 \mu\text{M}$) verso la TI wt ed un ampliamento dello spettro d'azione verso i mutanti

Y181I e Y188L (**13c**, K_{iY181I} e $K_{iY188L} > 10 \mu\text{M}$ vs **13d**, $K_{iY181I} = 0.8 \mu\text{M}$; $K_{iY188L} = 0.5 \mu\text{M}$).
Comunque, il derivato **13d** non ha mostrato alcuna attività inibitoria contro il mutante altamente resistente K103N.

La sostituzione dell'atomo di cloro in posizione meta (**13d**) con lo iodio, sostituente più grande e meno elettrone-attrattore, ha portato ad un potente inibitore della TIwt (**13e**, $K_i = 0.05 \mu\text{M}$) caratterizzato da una trascurabile attività contro gli enzimi mutati ad eccezione del mutante V106A ($K_{iV106A} = 0.13 \mu\text{M}$). L'introduzione di un atomo di iodio in posizione para (**13i**) ha permesso di ottenere un analogo con una scarsa attività contro la TIwt e i diversi mutanti (Tabella 1). Al contrario, la presenza di un gruppo amminico, idrofilico ed elettrone-donatore, in posizione meta (**13h**) ha determinato una diminuzione di attività enzimatica solo contro ceppi mutati. Al fine di valutare lo spazio disponibile a livello del sito di legame in prossimità della posizione meta dell'anello fenilico legato al carbonio C-6, è stato sintetizzato e testato il composto **13g**. La presenza del gruppo etossi in posizione meta ha fatto diminuire l'attività anti-TIwt di 13 volte, mentre è migliorata l'attività verso i mutanti Y181I and Y188L (**13g** vs **13c**). Inoltre, l'introduzione del sostituente azido (**13f**), gruppo conformazionalmente costretto e molto ingombrante, ha causato una perdita completa di attività contro TI-wt e tutti i mutanti.

1.3b Studi di docking sui derivati pirrolobenzossazepinonici 13c e 13d: due modalità di legame diverse e simmetriche.

Al fine di studiare le proprietà farmacodinamiche dei derivati PBO meta-sostituiti ed, in particolare, di individuare le basi strutturali necessarie per migliorare la sensibilità verso i mutanti, sono stati eseguiti studi di *docking* sui derivati **13c** and **13d** nel sito di legame degli NNRTI (codice PDB: 1VRT, i dettagli sono riportati nella parte sperimentale). Sono stati

scelti questi due composti **13c** e **13d** dal momento che sono derivati PBO con un particolare spettro d'azione caratterizzato da differenti attività inibitorie contro i mutanti K103N, Y181I e Y188L. In particolare, il composto **13c** è completamente inattivo contro i mutanti Y181I e Y188L, al contrario il derivato **13d** è completamente inattivo contro il mutante K103N.

In accordo con i risultati precedentemente ottenuti^{20,22}, in questi studi di *docking* sono stati utilizzati gli enantiomeri S di **13c** e **13d**.

Le strutture cristallografiche della TI-wt e dei mutanti, in forma libera e in complesso con diversi inibitori²³, hanno evidenziato che la tasca idrofobica che costituisce il sito di legame degli NNRTI può variare nelle dimensioni e nella forma in base allo stato conformazionale della proteina (forma libera, complesso binario, complesso ternario), e, nelle strutture legate agli NNRTI, in base alla natura degli inibitori²³. Inoltre, sono state riportate per le diverse classi di NNRTI, differenti modi di interazione ligando-enzima anche per composti simili dal punto di vista strutturale²⁴. Per questi motivi, al fine di permettere la massima adattabilità del sito di legame intorno all'inibitore, è stata utilizzata una procedura di *docking* flessibile caratterizzata dai metodi Monte Carlo e *Simulated Annealing*, che permettono la completa flessibilità del ligando e del sito di legame durante l'intera durata del calcolo. Inoltre, al fine di rendere più realistici i risultati dei *docking*, è stato aumentato il numero delle strutture di partenza, considerando **13c** and **13d**, sia nelle conformazioni con l'anello fenilico in posizione pseudo-assiale che in posizione pseudo-equatoriale, ed eseguendo, per i quattro complessi di partenza, due metodiche di calcolo di *docking* caratterizzate da diversi criteri energetici per la selezione delle strutture (vedi parte sperimentale, paragrafo 1.5b). Le strutture dei complessi ottenute dai calcoli di *docking* sono state classificate sulla base dell'energia del complesso e dell'energia di interazione ligando-enzima. I risultati sono riportati in Figura 6A, B.

I composti **13c** e **13d** tendono entrambi a legarsi alla TI con il fenile legato al carbonio C-6 in posizione assiale ma adottando due differenti modalità di legame (Figura 6A, **13c** e Figura 6B, **13d**).

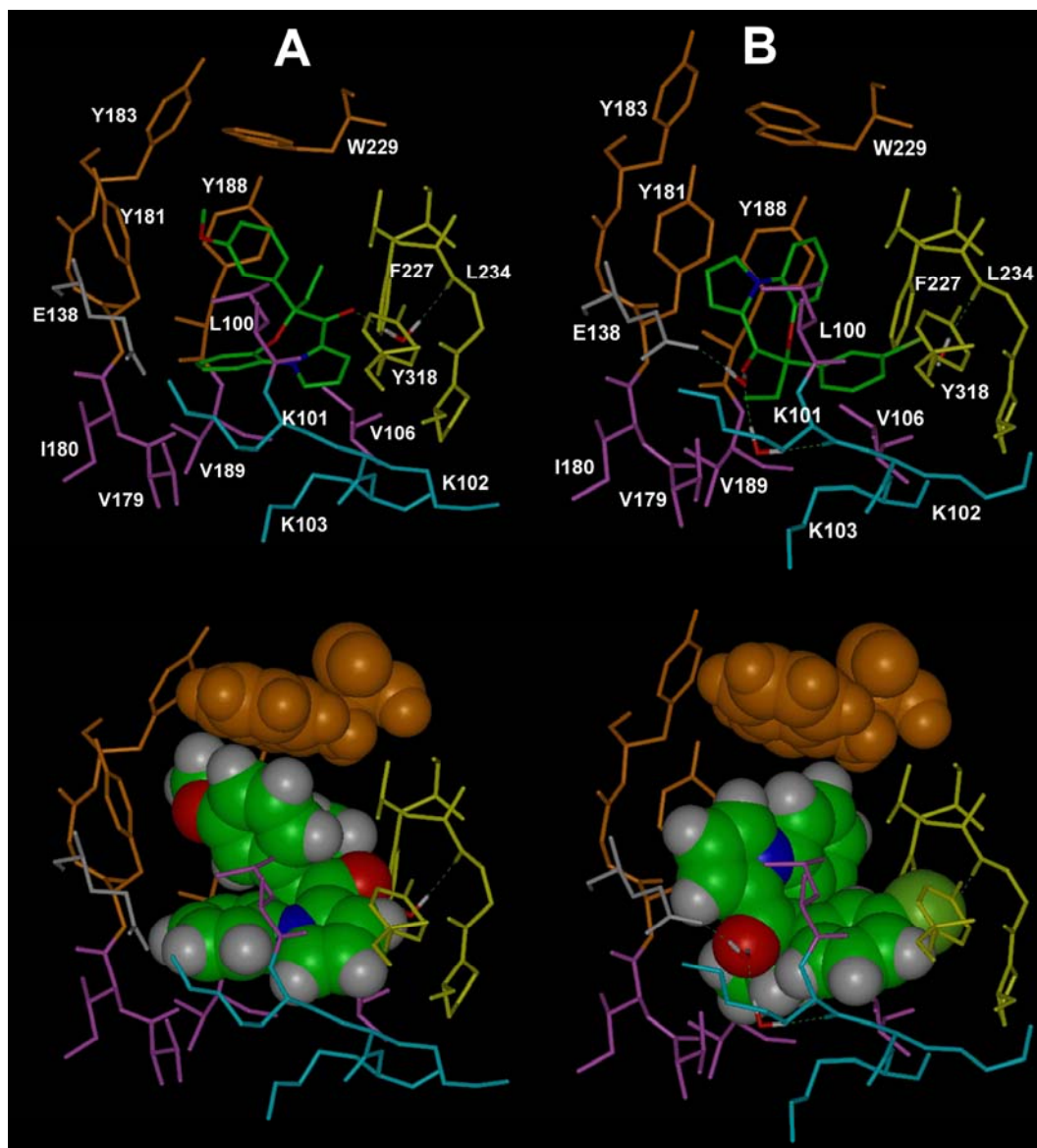


Figura 6. Ipotesi di legame dei composti **S-13c** (A) e **S-13d** (B) nel sito di legame degli NNRTI. I residui aminoacidici che delimitano le due tasche aromatiche: i) Y181, Y183, Y188 ($\beta 9$ - $\beta 10$ hairpin), e W229 ($\beta 12$ - $\beta 13$ hairpin, primer grip) e ii) F227 (primer grip) e Y318 ($\beta 15$), sono colorati, rispettivamente, in arancione e giallo; i residui aminoacidici della tasca alchilica sono colorati in viola; i residui carichi positivamente sono in ciano; E138 (subunità p51) è in bianco. I carboni dei due ligandi sono in verde, gli azoti in blu, gli ossigeni in rosso e gli idrogeni in bianco. Sotto: sono evidenziati i volumi di Van der Waals dei ligandi e del W229. I legami ad idrogeno sono evidenziati con linee tratteggiate in verde. Gli idrogeni dei residui aminoacidici e le molecole di acqua sono omessi per rendere la figura più chiara.

Il derivato **13c** si lega orientando l'etile verso la tasca idrofobica costituita dagli aminoacidi V106, L234 e F227 e stabilendo con essi interazioni di tipo van der Waals.

L'anello *m*-OMe-fenilico è posizionato all'interno della tasca delimitata dagli aminoacidi aromatici Y181 e Y188, interagendo attraverso interazioni polarizzate π - π con il W229. L'anello benzenico del sistema triciclico prende posizione tra la V179 e la L100, mentre il sistema pirrolico stabilisce interazioni polarizzate π - π con la Y318, un altro residuo altamente conservato. Inoltre, l'ossigeno del gruppo carbonilico del composto **13c** forma un legame ad idrogeno con l'ossigeno del gruppo carbonilico della L234 attraverso una molecola di acqua.

Il composto **13d** si orienta nel sito in maniera completamente differente: l'etile legato al carbonio C-6, come il gruppo ciclopropilico della nevirapina (codice PDB: 1VRT), si inserisce nella tasca idrofobica definita dagli aminoacidi V106, V179, I180 e V189, mentre l'anello pirrolico interagisce con la Y181 attraverso interazioni polarizzate π - π . L'anello benzenico del sistema triciclico è orientato in maniera simile all'anello *m*-OMe-fenilico del composto **13c**, stabilendo interazioni polarizzate π - π sia con la Y188 che con il W229. L'anello fenilico *m*-Cl-sostituito si accomoda, come l'anello pirrolico di **13c**, nella tasca idrofobica limitata da Y318, F227, V106, e L100. Infine, l'ossigeno del gruppo carbonilico dell'anello ossazepinonico interagisce con la catena laterale del E138 e il gruppo carbonilico della K101 attraverso un network di molecole d'acqua.

I risultati ottenuti per i due analoghi rappresentano un esempio di come due derivati di una stessa classe strutturale di NNRTI possano presentare due differenti modalità di legame e di conseguenza, presentare due differenti profili farmacologici contro i diversi mutanti. Le differenti modalità di legame trovate per i composti **13c** and **13d** possono essere spiegate, considerando le strutture dei PBO e l'architettura del loro sito di legame nell'enzima. Infatti, quest'ultimo presenta due tasche aromatiche principali caratterizzate da una differenti forma e da un differente grado di polarizzazione: i) Y181, Y183, Y188 (β 9- β 10 hairpin), e W229 (β 12- β 13 hairpin, primer grip) (Figura 6A, B arancione), e ii) F227 (primer grip) e Y318

(β 15), (Figura 6A, B giallo). In accordo con ciò, i differenti modi di legame trovati per gli analoghi **13c** e **13d** riflettono la diversa polarizzazione dei loro anelli fenilici (**13c**, 3-OMePh; **13d**, 3-ClPh). I momenti dipolari di **13c** e **13d** sono stati calcolati, considerando le cariche parziali ottenute dopo ottimizzazione geometrica con il metodo quantomeccanico AM1 e visualizzati come vettori con il modulo di Insight2005 Decipher (Accelrys, San Diego). I momenti dipolari dei due analoghi **13c** and **13d**, anche se i composti presentano modalità di legame completamente diversi, sono orientati in maniera molto simile rispetto al sito di legame, dando un'ulteriore conferma dell'attendibilità dei risultati ottenuti con gli studi di *docking*. (Figura 7 C, D). In accordo con questi risultati, è stata riscontrata un'orientazione simile del momento dipolare anche per altri inibitori, quali nevirapina e CP-94,707, per i quali sono disponibili le strutture cristallografiche in complesso con la TI (codici PDB: 1VRT e 1TV6) (Figura 7 A, B). Inoltre, si deve sottolineare che l'ossigeno del gruppo carbonilico dei PBO può essere perfettamente accomodato in entrambe le modalità di legame stabilendo legami idrogeno mediati da molecole d'acqua con l'ossigeno carbonilico della L234 (**13c**) o con la catena laterale del E138 e l'ossigeno carbonilico della K101 (**13d**) (Figura 6 A, B).

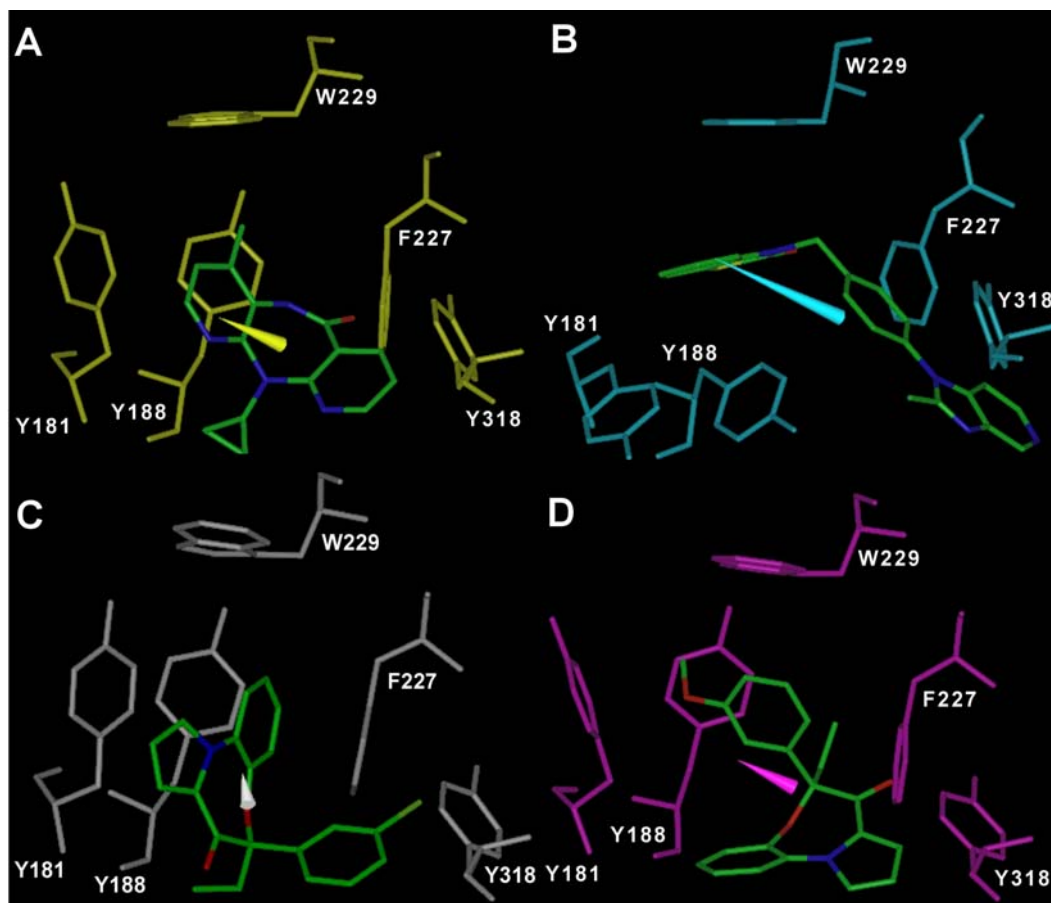


Figura 7. Confronto dei dipoli degli inibitori co-cristallizzati (A,B) con il dipolo dei nuovi ligandi sviluppati (C,D) orientati nel sito di legame degli NNRTI. (A) Nevirapine (PDB ID = 1VRT), (B) CP-94,707 (PDB ID = 1PW6), (C) **S-13d**, (D) **S-13c**. I momenti dipolari degli inibitori sono rappresentati da coni solidi che puntano verso il polo positivo del dipolo. Gli idrogeni e le molecole di acqua sono state omesse per rendere la figura più chiara.

Questi risultati suggeriscono che, a causa della simmetria del sito di legame degli NNRTI, la modalità di legame degli inibitori, che presentano gruppi aromatici con caratteristiche strutturali simmetriche, è determinato dall'orientazione del loro momento dipolare rispetto al dipolo totale del sito presente nella TI²⁵. Quando sono presenti nelle strutture degli inibitori sostituenti ingombranti e/o conformazionalmente costretti, come nel caso dell'efavirenz, la modalità di legame è, naturalmente anche guidata da altre forze quali le interazioni di van der Waals favorevoli/sfavorevoli.

Le differenti modalità di legame trovate per i composti **13c** e **13d** potrebbero spiegare la loro differente sensibilità verso i diversi mutanti della TI. La maggior parte delle mutazioni conosciute, implicate nella resistenza ai farmaci, causano cambiamenti conformazionali al

sito di legame degli NNRTI, determinando spesso una drastica riduzione dell'attività inibitoria di alcuni farmaci. In particolare, la principale differenza che si riscontra a livello del sito di legame dopo la mutazione K103N (codice PDB:1HQE) è che il W229 si chiude sulle Y181 e Y188 e la catena laterale di quest'ultima forma un legame idrogeno con la N103, chiudendo di conseguenza il sito di legame degli NNRTI. Sulla base di questi dati, si può ipotizzare che la capacità da parte degli NNRTI di superare la resistenza K103N potrebbe essere correlata alla loro abilità a penetrare nel sito stabilendo forti interazioni con il W229. In accordo con questa ipotesi, il gruppo 3-OMe-fenile del composto **13c** ($K_{iK103N} = 0.022 \mu\text{M}$) si accomoda nella tasca aromatica, formata dagli aminoacidi W229, Y181, e Y188, in maniera migliore rispetto al gruppo benzenico di **13d** ($K_{iK103N} = \text{NA}$), stabilendo interazioni più forti con il W229 (Figura 6A vs B).

1.3c Studi SAR sui nuovi derivati pirrolobenzossazepinonici (15a-l)

Sulla base dei risultati ottenuti sui composti **13c** e **13d**, è stata progettata una nuova serie di composti PBO (**15a-l**, Tabella 1), caratterizzati da un ulteriore sistema aromatico a livello del fenile legato al carbonio C-6, al fine di migliorare le interazioni dei derivati PBO con la regione *primer grip* (F227-H235) e di conseguenza, ampliare lo spettro d'azione contro i diversi mutanti della TI. Le SAR di questa nuova serie di NNRTI sono di seguito discusse.

I risultati farmacologici hanno indicato chiaramente che un sostituito fenilossimetil in posizione para dell'anello fenilico (**15c**) è capace di stabilire interazioni favorevoli con il sito di legame degli NNRTI, come dimostrato dal fatto che il composto **15c** sia otto volte più attivo del composto **13i** (**15c**, $K_i = 0.15 \mu\text{M}$; **13i** $K_i = 1.20 \mu\text{M}$, Tabella 1), e quasi sette volte più attivo dell'analogo PBO, che presenta nella stessa posizione un gruppo metilico ($K_i = 0.97 \mu\text{M}^{20}$). È interessante da sottolineare che lo stesso effetto non si osserva quando il

gruppo fenilossimetil si trova in posizione meta, come dimostrato dal profilo farmacologico del composto **15a** (TIwt $K_i = 0.80 \mu\text{M}$). Tra i composti della nuova serie, il **15c** può essere considerato il composto più interessante; esso è attivo contro la TIwt nell'ordine dei nanomolari e mostra un'attività costante contro tutti i comuni mutanti testati incluso il mutante K103N (Tabella 1). La presenza di un secondo anello aromatico è cruciale per l'attività come dimostrato dalla scarsa efficacia mostrata dai composti **15b** and **15j**. L'introduzione di un ulteriore fenile è risultata più efficace dell'introduzione di un anello piridinico (**15c** vs **15i**). Anche la natura chimica del linker tra i due fenili può influenzare l'attività inibitoria della TI; in particolare, poiché è necessario un certo grado di flessibilità per adattarsi all'architettura del sito attivo, l'introduzione di una catena trans-etilenica ha portato ad un analogo inattivo (**15k**). Inoltre, i risultati farmacologici ottenuti con i composti **15c**, **15d**, e **15l**, caratterizzati rispettivamente da un linker CH_2O -, $-\text{CH}_2\text{N}$ -, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2$ -, hanno evidenziato che i differenti *linker* non hanno influenzato l'attività inibitoria verso TIwt mentre i *linker* $-\text{CH}_2\text{N}$ - (**15d**) and $-\text{CH}_2\text{-CH}_2$ - (**15l**) hanno ridotto significativamente e/o annullato l'attività antivirale contro i mutanti della TI. Un effetto simile si è avuto anche con l'introduzione di un sostituito elettron-attrattore quale il cloro (**15f**) a livello del carbonio C-3 del secondo fenile; infatti tale sostituzione è risultata ben tollerata dalla TIwt, mentre ha ridotto l'attività inibitoria contro la maggior parte dei mutanti testati (**15f** vs **15c**). Il composto **15h**, nel quale il linker $-\text{CH}_2\text{N}$ - è stato combinato con un atomo di fluoro a livello del carbonio C-3 del secondo fenile, ha mostrato un profilo farmacologico simile a quello dell'analogo **15d**. Al contrario i composti **15e** e **15g**, caratterizzati da un sostituito a livello del carbonio C-2, rispettivamente cloro e acetile, hanno mostrato una debole attività inibitoria sia verso la TIwt che i diversi mutanti.

1.3d Studi di docking sul composto 15c: interazione con la regione “primer grip” (F227, W229, M230) e con il β 9- β 10 hairpin (Y181, Y188, Y183)

Sulla base dell'ipotesi di interazione molecolare con l'enzima formulata per gli analoghi PBO precedentemente descritti, si può pensare che l'ampio spettro d'azione del composto **15c** sia dovuto alla sua abilità a stabilire interazioni con i residui aromatici presenti nella regione *primer grip*. Per provare questa ipotesi, il composto **15c** è stato sottoposto agli stessi studi di *docking* eseguiti sugli analoghi **13c** e **13d**, considerando per il punto di partenza dei calcoli di *docking* flessibile, diversi conformeri del ligando e differenti orientazioni nel sito di legame degli NNRTI (vedi parte sperimentale sezione studi di *docking*). I vari complessi ottenuti dagli studi di *docking* sono stati classificati in base all'energia conformazionale e, il complesso con la migliore energia di interazione ligando-enzima è stato riportato in Figura 8. La modalità di legame proposta suggerisce che il sistema tricyclico sia posizionato in maniera simile a quello del composto **13c** (vedi Figura 6 A), con il gruppo benzenico che interagisce favorevolmente attraverso interazioni di van der Waals con gli aminoacidi L100 e V179, mentre il pirrolo stabilisce interazioni π - π con la Y318. Inoltre, l'etile interagisce favorevolmente con la V106 e la F227, mentre il gruppo 4-(fenilossimetil)fenil si inserisce nella tasca aromatica delimitata dagli aminoacidi Y188, Y181 e W229. Inoltre il composto **15c** stabilisce contatti con Y183, I94, P95, e Q91. In particolare, in questa ipotesi di *binding* possono essere individuate alcune interazioni chiavi: i) un'interazione π - π con il W229 (energia di interazione= -7.0 Kcal/mol), ii) un'interazione alchil-aril con la catena laterale della M230 (energia di interazione= -1.0 Kcal/mol), iii) interazioni polarizzate di tipo π - π con la Y181 (energia di interazione= -5.2 Kcal/mol), con la Y188 (energia di interazione= -4.9 Kcal/mol) e con la Y183 (energia di interazione= -2.5 Kcal/mol). Quest'ultimo aminoacido fa parte del motivo conservato YMDD (β 9- β 10 hairpin) presente a livello del sito attivo polimerasico, e la sua sostituzione, anche con un aminoacido

conservativo quale la fenilalanina, causa una riduzione dell'80% dell'attività polimerasica della TI¹⁶. Quindi, in accordo con i risultati di *docking* ottenuti, il secondo fenile del composto **15c** riesce a spingersi fino al sito catalitico dell'enzima interagendo sia con i residui aminoacidici del primer grip (F227, W229, M230) che con quelli del β 9- β 10 hairpin (Y181, Y188, Y183) (Figure 9).

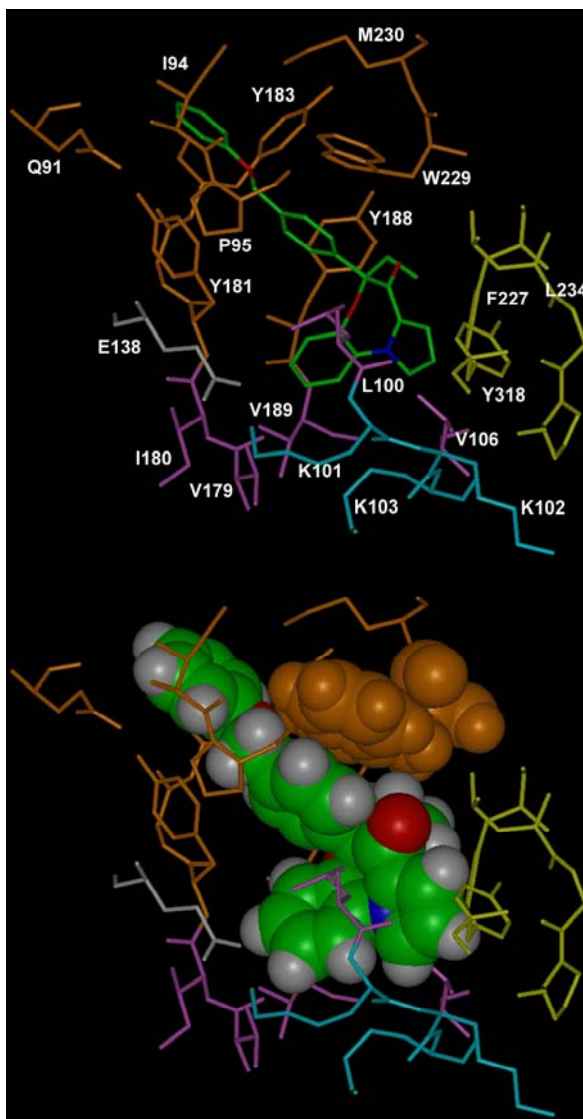


Figura 8. Ipotesi di interazione molecolare del composto **S-15c** nel sito di legame degli NNRTI. I residui aminoacidici che delimitano le due tasche aromatiche: i) Y181, Y183, Y188 (β 9- β 10 hairpin), e W229 (β 12- β 13 hairpin, primer grip) e ii) F227 (primer grip) e Y318 (β 15), sono colorati, rispettivamente, in arancione e giallo; i residui aminoacidici della tasca alchilica sono colorati in viola; i residui carichi positivamente sono in ciano; E138 (subunità p51) è in bianco. I carboni del ligando **S-15c** sono in verde, gli azoti in blu, gli ossigeni in rosso e gli idrogeni in bianco. Sotto: il ligando **S-15c** e il W229 sono mostrati con i loro volumi di Van der Waals. Gli idrogeni dei residui aminoacidici e le molecole di acqua sono omessi per rendere la figura più chiara.

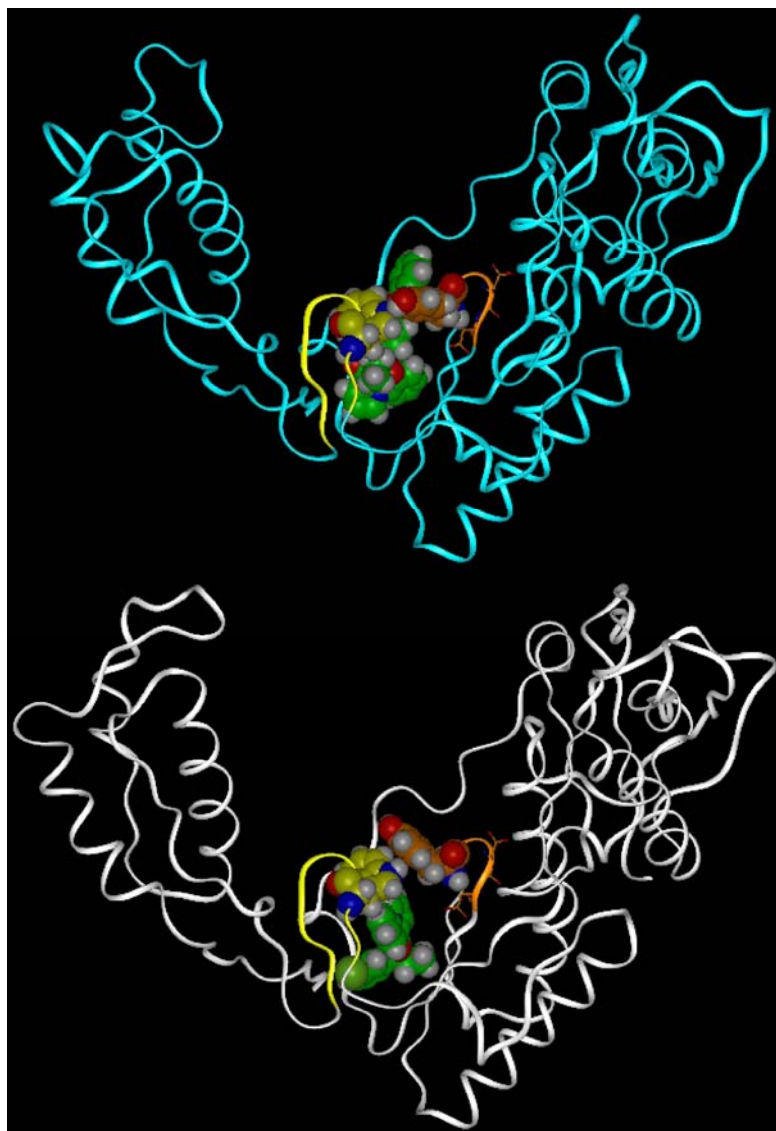


Figura 9. Ipotesi di interazione molecolare dei complessi **S-15c/ TI** (sopra) e **S-13d/ TI** (sotto). Sono mostrati come *ribbons* i domini thumb, palm e finger della TI. Il β 12- β 13 hairpin (primer grip) e il β 9- β 10 hairpin (sito catalitico) sono evidenziati, rispettivamente in giallo e arancione. Sono riportati i volumi di Van der Waals dei ligandi, del W229 e della Y188. D185 e D186 sono mostrati in stick. I carboni dei ligando **S-15c** e **S-13d** sono in verde, gli azoti in blu, gli ossigeni in rosso e gli idrogeni in bianco.

1.3e Studi SAR sui derivati 21a e 21b: il ruolo del sistema triciclico nell'attività anti-HIV

Al fine di estendere ulteriormente le SAR dei derivati PBO ed in particolare di analizzare il ruolo del sistema triciclico nella attività inibitoria contro la TI, sono stati progettati i composti **21a** e **21b**, nei quali l'atomo di ossigeno (ossazepina) è stato rimpiazzato con un gruppo metilenico (azepina). I nuovi composti (**21a** e **21b**) hanno mostrato una completa perdita di attività inibitoria sia contro la TIwt che i vari mutanti (Tabella 1). Al fine di spiegare l'inattività dei due nuovi derivati, è stato analizzato lo spazio conformazionale del composto **21b** attraverso 50 cicli di dinamica molecolare (*Simulated Annealing*) seguiti da calcoli di meccanica molecolare (vedi parte sperimentale, sezione). I risultati dei *docking* hanno evidenziato che, anche se gli NNRTI PBO presentino modalità di legame differenti, tutti i composti PBO assumono la stessa conformazione a livello del carbonio C-6 ($\tau_{C-7/C-6/C-1'/C-2'} = 20^\circ$), sebbene durante i calcoli di *docking* il loro spazio conformazionale sia stato dettagliatamente analizzato attraverso il metodo Monte Carlo (tutti i legami ruotabili; riduzione del 90% dei termini di van der Waals e coulombici, vedi parte sperimentale). Questo dato dimostra il ruolo cruciale di questa proprietà conformazionale per il legame dei PBO alla sito allosterico della TI. Mentre, per i composti **13c**, **13d** e **15c**, la “conformazione bioattiva” dell'anello fenilico legato al carbonio C-6 è energeticamente accessibile (ΔE dal minimo globale < 5 kcal/mol), la presenza del gruppo metilenico (**21b**) impedisce al fenile di assumere la giusta orientazione rispetto al sistema triciclico (ΔE dal minimo globale > 30 kcal/mol) a causa degli effetti repulsivi tra gli idrogeni del metilene e: i) l'idrogeno del carbonio C-5'; ii) gli idrogeni dell'etile legato al carbonio C-6 (Figura 10).

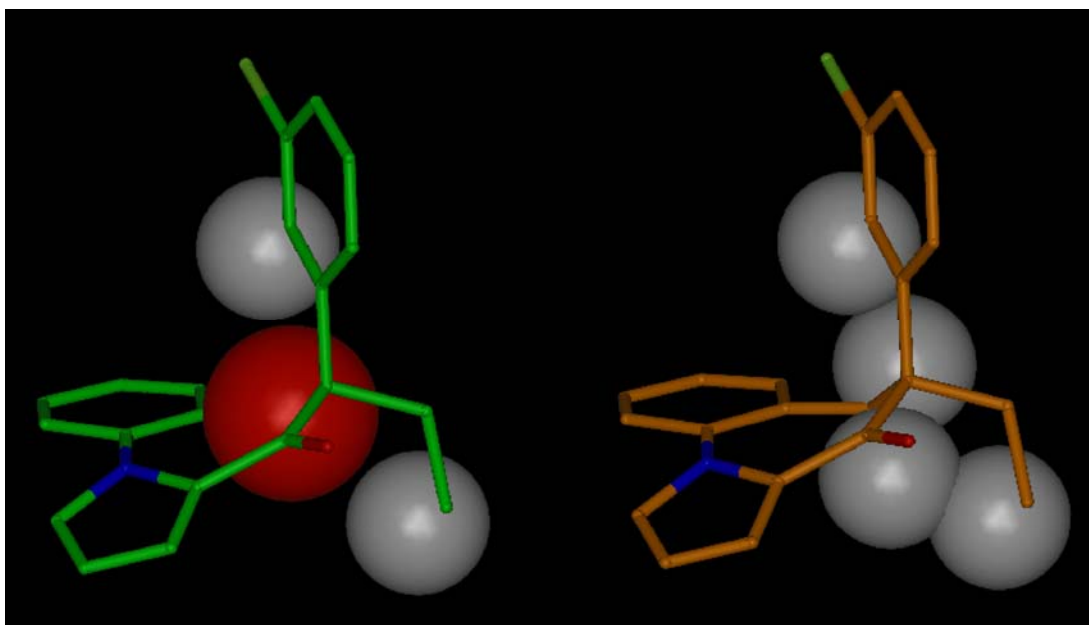


Figura 10. Confronto tra le conformazioni bioattive proposte per i composti **S-13c** e **S-21b**. E' evidenziato che nel composto **S-21b** i volume di van der Waals degli idrogeni del carbonio C5 si sovrappongono con quello del carbonio C2' e quelli del CH₃ dell'etile. I carboni sono colorati in verde (**S-13c**) ed in arancione (**S-21b**); gli ossigeni in rosso, gli azoti in blu, il cloro in verde chiaro. Gli idrogeni coinvolti nelle interazioni steriche sono mostrati con i volumi di vdW bianchi.

1.3f Saggi farmacologici: attività antivirale, citotossicità e sinergismo con AZT

Alcuni derivati PBO ((±)-**13d**, (±)-**13e**, (±)-**15c**, (±)-**15d**, (±)-**15f** e (±)-**15i**) sono stati sottoposti a specifici saggi enzimatici, al fine di valutare la loro abilità di inibizione della formazione di sincizia nelle cellule C8166 infettate con il virus *wild-type* HIV-1_{IIIB}. Inoltre, i composti **15c** e **15f**, come rappresentanti della nuova serie di agenti anti-HIV PBO, sono stati ulteriormente testati sui macrofagi infettati con HTLV-III per confermare la loro potenziale attività come agenti antivirali. Infine, per questi stessi agenti antivirali, sono stati condotti sia i saggi Ba-L MTT per misurare gli effetti citotossici su quattro differenti linee cellulari, ed è stata calcolata l'attività antivirale sinergica con AZT. I risultati sono presentati nelle tabella 2, 3 e 4.

Tabella 2. Saggi di inibizione delle cellule C8166 infette da HIV-IIIIB, e saggi di citotossicità sulle linee cellulari NSO di topo, Daudi umane (DH), sui fibroblasti 3T3 (3T3) e sui linfociti umani (HL).

Composti	Cellule C8166 ^a			TC ₅₀ (mM)			
	CC ₅₀ (μ M) ^b	EC ₅₀ (μ M) ^c	SI ^d	NSO	DH	3T3F	HL
(\pm)-13d	7.5	>2	<3.7	0.081	0.084	0.081	0.082
(\pm)-13e	14.1	1.3	10.8	0.079	0.080	0.078	0.077
(\pm)-15c	9.7	0.083	117	0.81	0.85	0.82	0.81
(\pm)-15d	15.1	0.75	20.1	0.62	0.65	0.63	0.66
(\pm)-15f	10.7	0.48	22.3	0.72	0.74	0.70	0.72
(\pm)-15i	18.2	0.18	101	0.51	0.52	0.50	0.54
8-CITIBO	50	0.030	1670				
AZT	>1	0.0019	>526				

^a Tutti i dati riportati sono stati confrontati con quelli ottenuti con l'AZT e l'8-CITIBO in saggi eseguiti nello stesso tempo. ^b Il valore di CC₅₀ rappresenta la concentrazione di farmaco che determina la sopravvivenza del 50% delle cellule C8166 non infette. ^c Il valore di EC₅₀ rappresenta la concentrazione di farmaco che determina la sopravvivenza del 50% delle cellule infette dall'HIV-1. ^d SI: indice di selettività (CC₅₀/EC₅₀).

Tabella 3. Inibizione della produzione di antigene HIV-1-p24 nei monociti-macrofagi da parte dei composti **15c** e **15f**.

Composti	CC ₅₀ (μ M) ^b	EC ₅₀ (μ M) ^c	SI ^d
(\pm)-15c	16.8	0.002	8400
(\pm)-15f	21.5	0.0084	2500
AZT	>100	0.053	>1886

^a Tutti i dati riportati sono stati confrontati con quelli ottenuti con l'AZT in saggi eseguiti nello stesso tempo. ^b Il valore di CC₅₀ rappresenta la concentrazione di farmaco che determina la sopravvivenza del 50% dei macrofagi non infetti. ^c Il valore di EC₅₀ rappresenta la concentrazione di farmaco che determina una riduzione del 50% di produzione dell'antigene HIV-1-p24 nei macrofagi infetti. ^d SI: indice di selettività (CC₅₀/EC₅₀).

Tabella 4. EC₅₀ e indice di combinazione per il composto (±)-**15c** in associazione con AZT^a.

Composti	EC ₅₀ (μM)			CI ^b	
	del composto da solo	del composto con AZT	di AZT con il composto	<i>mutually exclusive assumption</i>	<i>mutually nonexclusive assumption</i>
nessuno			0.06		
(±)- 15c	0.083	0.032	0.012	0.52	0.525

^a Cellule C8166 infettate con HIV-IIIB. ^b I valori di CI > 1, CI = 1, CI < 1 indicano rispettivamente attività antagonistiche, additive e sinergistiche. Il valore di CI è stato calcolato considerando un'attività antivirale del 50%.

Come si può vedere dalla tabella 2, per i composti della prima serie di PBO (**13d** e **13e**), è stata riscontrata una debole attività antivirale. Infatti, entrambi i composti hanno mostrato sulle cellule C8166 una EC₅₀ dell'ordine dei micromolari. Al contrario, per i composti della seconda serie di PBO (**15c,d,f,i**) è stata riscontrata una potente attività antivirale sulle cellule C8166 infettate. In particolare, il composto **15c** ha mostrato un'efficacia antivirale molto potente simile a quella 8-Cl TIBO, mentre il composto **15d** ha mostrato un'efficacia ridotta di ben 9 volte. L'introduzione di un atomo di cloro sull'anello fenilico di **15c** in posizione meta (**15f**) ha fatto diminuire leggermente l'attività antivirale (EC₅₀ = 0.28 μM). Anche la sostituzione del gruppo fenossi di **15c** con il gruppo 3-piridilossi (**15i**) ha portato ad un analogo caratterizzato da un'efficacia leggermente ridotta (**15c** EC₅₀ = 0.083 μM vs **15i** EC₅₀ = 0.18 μM).

L'infezione dei macrofagi è un importante evento nella patogenesi dell'AIDS. I macrofagi differiscono dalle cellule T per diversi aspetti che potrebbero influenzare l'attività anti-HIV di alcuni agenti antivirali. Nel nostro caso, (Tabella 3), **15c** è risultato essere estremamente potente in questo test, mostrando una EC₅₀ di 2.0 nM, mentre, **15f** ha confermato la sua ottima efficacia nell'ordine dei nanomolari anche se è risultato essere 4

volte meno attivo di **15c**. Il loro indice di selettività (SI) è altamente promettente (tabella 3). Considerando tutti insieme questi risultati ottenuti, utilizzando differenti linee cellulari, il composto **15c** può essere classificato tra i più potenti agenti anti-HIV di seconda generazione. La bassa citotossicità è stata confermata anche dai saggi MTT su diverse linee cellulari: NSO di topo, Daudi umane, i fibroblasti 3T3 di topo e i linfociti umani normali (Tabella 2). I composti **15c,d,f,i** hanno mostrato una scarsa citotossicità.

L'interesse per la resistenza nella cura dell'AIDS è molto alto e le attuali strategie terapeutiche tendono a favorire l'utilizzo di più farmaci attivi contro l'infezione da HIV-1 al fine di ridurre i dosaggi, la tossicità e la resistenza stessa. In accordo, al fine di valutare la loro potenziale efficacia nelle terapie multi-farmaci, è stata studiata l'attività antivirale sinergistica di **15c** in combinazione con l'analogo nucleosidico AZT (Tabella 4). Il composto testato ha dimostrato di essere capace di potenziare l'attività antivirale di AZT e viceversa AZT è stato capace di potenziare la sua attività (Tabella 4).

1.3g Interazione con la regione “primer grip” della TI: ampio spettro d'azione e selettività per il complesso ternario

Le strutture cristallografiche della TI wt e dei mutanti, in forma libera e in complesso con diversi inibitori²³, hanno evidenziato che la tasca idrofobica, che costituisce il sito di legame degli NNRTI, può variare nelle dimensioni e nella forma in base allo stato conformazionale della proteina (forma libera, complesso binario, complesso ternario), e, nelle strutture legate agli NNRTI, in base alla natura degli inibitori²³. Sulla base di queste conoscenze, sono state eseguite approfondite analisi bio-informatiche sulle diverse strutture cristallografiche, della TI-wt nelle sue tre forme e, del mutante K103N e, i risultati di queste analisi, sono stati comparati con i risultati di *docking* ottenuti sui PBO, al fine di identificare i requisiti

strutturali necessari per un ampio spettro d'azione anti-HIV e per una selettiva interazione con una singola forma della TI. Gli studi bio-informatici hanno evidenziato, come si può vedere nella figura 11, che: i) la conformazione del sito di legame degli NNRTI è diversa nel complesso ternario e nel mutante K103N, rispetto alla TI nella forma libera (Figura 11 A, B, C, D); ii) la principale differenza che si riscontra a livello del sito di legame dopo la mutazione K103N (codice PDB:1HQE) è che il W229 si chiude sulle Y181 e Y188 e la catena laterale di quest'ultima forma un legame idrogeno con la N103, chiudendo di conseguenza il sito di legame degli NNRTI (Figura 11 D) e iii) il W229 assume questa stessa posizione anche nel complesso ternario della TI (Figura 11 A, C).

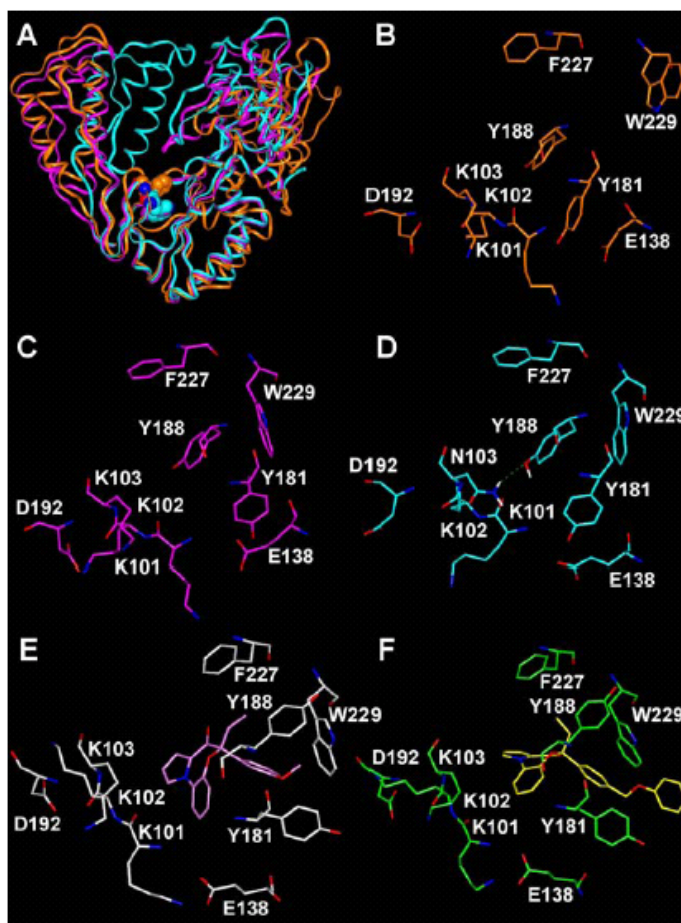


Figura 11. (A) Sovrapposizione dei domini thumb, palm e finger delle strutture cristallografiche della TI: forma libera (arancione), complesso ternario (magenta) e il mutante K103N (celeste). Le TI sono mostrate come ribbons; è evidenziato il volume di Van der Waals del W229. Zoom del sito attivo degli NNRTI della forma libera (B), del complesso ternario (C) e del mutante K103N (D). (E) Complesso (\pm)-PBO355 (rosa) / TI (bianco). (F) Complesso (\pm)-PBO431 (giallo) / TI (verde). Tutte le molecole sono colorate per tipo atomico (O=rosso; N=blu; H=bianco). Gli idrogeni sono omessi per rendere più chiara la figura con l'eccezione di quelli coinvolti nei legami idrogeni (linea verde tratteggiata).

In perfetto accordo con queste analisi, gli studi di *docking* sui composti **13c** e **15c** hanno evidenziato che il W229, partendo dalla sua posizione nella struttura cristallografica della TI-wt nella forma libera (Figura 11 B) assume, nella TI in complesso con i PBO, una posizione simile a quella presente nel mutante K103N e nel complesso ternario e che, questo movimento è dovuto alla forte interazione con il *primer grip* da parte dei derivati PBO (W229) (Figura 11 E, F).

Quindi, al fine di confermare l'ipotesi secondo la quale, il mutante K103N e il complesso ternario presentano una conformazione simile a livello della regione primer grip (W229) del sito di legame degli NNRTI e che, quindi, i composti, capaci di interagire con questa regione, possano mostrare una potente attività antivirale contro il mutante K103N ed una selettività verso il complesso ternario, sono stati eseguiti dei saggi biochimici su alcuni PBO (**13c**, **13d**, **13e**, **15a**, **15c** e **15f**) per valutare la loro affinità verso le tre forme della TI-wt e del mutante K103N. I parametri cinetici ottenuti sono mostrati in Tabella 5. I risultati biochimici hanno confermato tale ipotesi.

Tabella 5. Parametri cinetici dei PBO (**13c**, **13d**, **13e**, **15a**, **15c** e **15f**) sul TI-wt e il mutante K103N.

	Wild type								
	[E]			[E:DNA]			[E:DNA:dNTP]		
	K_i^{free} μM	k_{on} ($s^{-1}M^{-1}$) $\times 10^4$	k_{off} (s^{-1}) $\times 10^{-4}$	K_i^{bin} μM	k_{on} ($s^{-1}M^{-1}$) $\times 10^4$	k_{off} (s^{-1}) $\times 10^{-4}$	K_i^{ter} μM	k_{on} ($s^{-1}M^{-1}$) $\times 10^4$	k_{off} (s^{-1}) $\times 10^{-4}$
13d	0.12	0.4	5	0.1	0.8	8.5	0.039	6.4	2
15c	0.15	0.1	1.5	0.16	0.12	2	0.067	0.6	4
15f	0.2	0.2	4.4	0.26	0.8	21	0.05	10	50
13e	1.5	0.3	45	1.7	0.16	27	0.3	0.1	3
15a	1	0.1	10	1	0.09	11	0.6	0.4	24
13c	1.5	0.3	45	1.5	0.16	25	0.08	0.37	3
	K103N								
	[E]			[E:DNA]			[E:DNA:dNTP]		
	K_i^{free} μM	k_{on} ($s^{-1}M^{-1}$) $\times 10^4$	k_{off} (s^{-1}) $\times 10^{-4}$	K_i^{bin} μM	k_{on} ($s^{-1}M^{-1}$) $\times 10^4$	k_{off} (s^{-1}) $\times 10^{-4}$	K_i^{ter} μM	k_{on} ($s^{-1}M^{-1}$) $\times 10^4$	k_{off} (s^{-1}) $\times 10^{-4}$
13d	n.a. ^a	n.a. ^a	n.a. ^a	n.a. ^a	n.a. ^a	n.a. ^a	n.a. ^a	n.a. ^a	n.a. ^a
15c	13	0.007	9	14	0.009	12	0.3	0.3	8.5
15f	10	0.003	3	10	0.004	4	0.2	0.062	12
13e	n.a. ^a	n.a. ^a	n.a. ^a	n.a. ^a	n.a. ^a	n.a. ^a	n.a. ^a	n.a. ^a	n.a. ^a
15a	10	0.003	3	10	0.004	4	2	0.25	50
13c	13	0.007	9	11	0.009	12	0.2	0.45	9

^a n.a.= non attivo

Tutti i PBO hanno mostrato un aumento significativo nell'affinità per il complesso ternario rispetto all'enzima libero ed al complesso binario, sia per la TI-wt che per il mutante K103N. Al contrario, nessuno dei composti ha mostrato una variazione significativa nei valori della K_i per il complesso binario rispetto all'enzima libero. Inoltre, tutti i composti, attivi contro il mutante K103N, hanno mostrato un aumento maggiore nell'affinità per il complesso ternario di questo mutante rispetto a quello dell'enzima wt e, questo aumento è risultato essere correlato al valore delle k_i per il mutante K103N (Tabella 1). In particolare, i composti **15a**, **15c**, **15f** e **13c** hanno evidenziato una diminuzione del valore della k_i per il complesso ternario rispetto all'enzima libero rispettivamente di 5, 43, 50 e 65 volte nel caso del mutante K103N, mentre nel caso della TI-wt di 1.7, 2.2, 4 e 19 volte (Tabella 5). Questi studi biochimici hanno anche evidenziato che tutti i PBO attivi sul mutante, hanno migliorato la loro selettività per il complesso ternario aumentando principalmente la sola costante di associazione (k_{on} ; Tabella 5).

Quindi, tutti questi risultati suggeriscono che la selettività per il complesso ternario e la capacità di superare la mutazione K103N siano dovuti all'abilità dei PBO di stabilire forti interazioni con la regione *primer grip*, dimostrando che ottenere composti capaci di interagire con il W229 rappresenta un valido approccio per la progettazione di nuovi agenti anti-HIV utili per l'HAART.

1.4 CONCLUSIONI

Durante il mio lavoro di dottorato mi sono occupato della progettazione di potenti agenti antivirali caratterizzati da un sistema pirrolobenzossapinonico (PBO).

In una prima fase, attraverso studi computazionali caratterizzati dall'analisi conformazionale con la procedura del *Simulated Annealing*, calcoli di meccanica molecolare e studi di *docking* dinamico con l'enzima, è stata progettata una prima serie di analoghi PBO (**13d-i** e **21a,b**) che ha permesso di estendere gli studi SAR di derivati PBO già sintetizzati dal gruppo di ricerca in cui ho svolto il mio lavoro di dottorato, e, in particolare, di identificare, in questa prima serie, l'analogo **13d**, un potente NNRTI, caratterizzato da una discreta attività antivirale.

In una seconda fase, sulla base: i) dei risultati delle SAR della prima serie di analoghi PBO; ii) degli studi *docking* sui derivati **13c** e **13d** e iii) dell'analisi delle strutture cristallografiche della TI wild type e mutata (libera e legata a NNRTI), prendendo anche in considerazione i differenti stati funzionali dell'enzima, è stata sviluppata una seconda serie di NNRTI PBO (**15a-l**) caratterizzati da un sistema aromatico esteso a livello del carbonio C-6, con l'obiettivo di progettare analoghi più potenti e con un ampio spettro d'azione contro i più comuni mutanti della trascrittasi inversa del virus HIV-1. Gli studi di *docking* hanno evidenziato che il secondo fenile del derivato **15c** riesce a raggiungere il sito catalitico, andando ad interagire direttamente sia con la Y183, residuo aminoacidico che fa parte del motivo altamente conservato YMDD (sito attivo della polimerasi, β 9- β 10 hairpin) sia con i residui cruciali della regione *primer grip* (F227, W229, M230). L'interazione con i residui altamente conservati presenti nella regione *primer grip* e nel β -hairpin β 9- β 10 (sito catalitico) ha permesso al derivato PBO **15c** di essere molto attivo contro i mutanti più comuni della TI, incluso i ceppi altamente resistenti K103N, Y181I e Y188L, e di essere

selettivo verso il complesso ternario della TI. Inoltre, questo composto ha mostrato un profilo farmacologico altamente migliorato in termini di efficacia, spettro d'azione e bassa citossicità. L'ottima attività antivirale e le sue proprietà antivirali sinergistiche con il composto AZT, suggeriscono la sua potenziale utilità clinica nell'HAART soprattutto contro i ceppi mutanti altamente resistenti del virus HIV-1.

Questo lavoro è stato oggetto di una pubblicazione su rivista internazionale: Caterina Fattorusso, Sandra Gemma, Stefania Butini, Paul Huleatt, Bruno Catalanotti, Marco Persico, Meri De Angelis, Isabella Fiorini, Vito Nacci, Anna Ramunno, Manuela Rodriguez, Giovanni Greco, Ettore Novellino, Alberto Bergamini, Stefano Marini, Massimo Coletta, Giovanni Maga, Silvio Spadari, and Giuseppe Campiani. *Specific targeting highly conserved residues in the HIV-1 reverse transcriptase primer grip region. Design, synthesis, and biological evaluation of novel, potent, and broad spectrum NNRTIs with antiviral activity. J Med Chem.* **2005**, 17;48(23):7153-65.

1.5 PARTE SPERIMENTALE

Tutti gli studi di modellistica molecolare sono stati eseguiti sui Silicon Graphics Octane 2XR10000 e Indigo2 R10000. I composti **13c**, **13d**, **15c** e **21b** sono stati costruiti utilizzando il modulo Builder di Insight2005. Le strutture cristallografiche della TI del virus HIV-1²³ sono state scaricate dalla banca dati PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/>). Gli idrogeni sono stati aggiunti a tutte le strutture cristallografiche considerando un valore di pH di 7.2.

1.5a Analisi conformazionale dei composti 13c, 13d, 15c e 21b

Al fine di individuare il minimo globale, tutti i composti sono stati sottoposti alla procedura di *Simulated Annealing*. Lo spazio conformazionale di questi composti è stato analizzato attraverso 50 cicli di *Simulated Annealing* (campo di forza Tripos, software Sybyl, Tripos, San Louis). La temperatura iniziale è stata fissata a 1000 K per superare le barriere energetiche dei torsionali; la struttura è stata tenuta a quella temperatura per 1000 fs, poi la temperatura è stata ridotta a 0 K in 1000 fs, utilizzando una funzione di *annealing* esponenziale. I file delle strutture ottenute sono state trasferite nel programma Insight2005 (Accelrys, San Diego) per sottoporle al seguente protocollo di minimizzazione energetico di meccanica molecolare (MM). I potenziali e le cariche atomiche sono state assegnate utilizzando il campo di forza CVFF²⁶. Le conformazioni ottenute sono state ottimizzate geometricamente con il modulo Discover all'interno di Insight2005 (Accelrys, San Diego) utilizzando una costante dielettrica dipendente dalla distanza capace di mimare l'ambiente interno di una proteina ($\epsilon = 4*r$). La minimizzazione energetica è stata eseguita con l'algoritmo *Conjugate Gradient*²⁷, il criterio di convergenza è stato stabilito in modo che il massimo valore di RMS sulla derivata prima sia inferiore a 0.001 kcal/Å.

L'energia delle conformazioni proposte come bioattive per i composti **13c**, **13d**, **15c**, e **21b** è stata valutata attraverso una iterazione di minimizzazione energetica di MM ($\epsilon = 4 * r$) prendendo in considerazione l'iniziale valore energetico.

1.5b Studi di docking sui composti 13c, 13d e 15c

Gli studi di *docking* sono stati eseguiti sugli enantiomeri S^{20,22} dei composti **13c**, **13d**, e **15c**, utilizzando una metodologia di *docking* precedentemente applicata²⁸ (Affinity, SA_Docking; Insight2000.1, Accelrys, San Diego) che considera tutto il sistema (ligando, proteina e molecole d'acqua) flessibile. I parametri del *docking* sono stati appropriatamente selezionati, sulla base di una serie di test di calcoli di *docking* eseguiti sulle strutture cristallografiche della TI in complesso sia con la nevirapina (codice PDB:1VRT) che con l'efavirenz (codice PDB: 1FK9). In particolare, partendo da strutture iniziali modificate manualmente, sono stati scelti quei parametri che hanno permesso di riprodurre la modalità di legame della nevirapina (1VRT) e dell'efavirenz (1FK9). Per i calcoli di *docking* dei composti **13c**, **13d**, and **15c** è stata scelta la struttura cristallografica 1VRT, sia perché presenta la migliore risoluzione tra le tante strutture cristallografiche della TI, sia perché ha il più alto grado di solvatazione del sito attivo degli NNRTI. Per introdurre i composti **13c**, **13d**, and **15c** nel sito di legame, la nevirapina è stata rimossa dalla struttura cristallografica 1VRT utilizzando il comando unmerge nel modulo Biopolymer di Insight 2005 (Accelrys, San Diego). Al fine di ottenere risultati più attendibili, è stata aumentata la variabilità delle strutture di partenza, in particolare, sono stati utilizzati come punti di partenza dei calcoli di *docking* sia i conformeri di **13c**, **13d**, and **15c** che presentavano il fenile pendente in posizione pseudo-assiale sia quelli con il fenile pendente in posizione pseudo-equatoriale. Inoltre, sono stati adottati per la selezione delle strutture (vedi sotto), due criteri differenti di controllo energetico.

Ogni complesso di partenza è stato sottoposto ad una minimizzazione energetica preliminare (campo di forza CVFF²⁶, algoritmo Steepest Descent; $\epsilon=1$) fino a che il massimo valore di RMS sulla derivata prima fosse inferiore a 0.5 kcal/Å. Infatti la procedura di *docking* richiede formalmente una struttura di partenza ottimizzata sebbene nel protocollo successivo di *docking* flessibile il complesso è sottoposto sia alla procedura del metodo Monte Carlo che del *Simulated Annealing*. La procedura di *docking* flessibile è stata eseguita utilizzando la procedura di SA_Docking²⁹ e il metodo Cell_Multipole³⁰ per il calcolo delle interazioni nonbond presenti nel modulo Affinity del programma Insight2005. Il sito di legame dei nuovi composti è stato definito come un subset che includeva tutti i residui che avevano almeno un atomo entro i 6 Å da qualsiasi atomo dei ligandi. Durante l'intera durata dei calcoli di *docking*, tutti gli atomi inclusi nel sito di legame definito, sono stati lasciati liberi di muoversi, ad eccezione delle molecole di acqua il cui movimento è stato limitato da una costante di forza di 1 kcal/Å³¹. Sono state generate casualmente 20 strutture utilizzando la procedura combinata Monte Carlo/minimizzazione con un criterio di tolleranza energetico di 10⁶ kcal/mol per assicurare un'ampia variabilità delle strutture da minimizzare (2500 iterazioni; $\epsilon=1$). Durante questa fase il ligando è stato mosso attraverso la combinazione di movimenti traslazionali, rotazionali e, variando il valore degli angoli torsionali, al fine di analizzare sia lo spazio conformazionale del ligando e sia la sua orientazione rispetto al sito di legame. Al fine di ottenere una discreta mobilità delle molecole di acqua, durante questa fase la costante di forza applicata per limitare il loro movimento è stata scalata di un fattore pari a 0.1 (cioè il 10% del suo valore iniziale). In maniera simile, sono stati scalati anche i termini riguardanti le forze di van der Waals (vdW) e di Coulomb di un fattore pari a 0.1 al fine di evitare forti divergenze nelle energie di Coulomb e di vdW. Per selezionare soluzioni accettabili sono stati applicati sia un criterio di controllo di similitudine delle strutture (RMS tolerance = 0.3 Å) sia un criterio di energia. Come menzionato sopra, sono state eseguite due differenti procedure di *docking* su ogni complesso di partenza caratterizzati da due diversi

criteri energetici di controllo: i) l'*energy test* (intervallo di energia = 50 kcal/mol) o ii) il criterio Metropolis (temperatura = 310 K). I complessi selezionati sono stati prima minimizzati e poi sottoposti a 50 cicli di *Simulated Annealing*, ciascuno di 100 fs. Durante la durata di un ciclo di *Simulated Annealing* la temperatura del sistema è stata diminuita linearmente da 500K a 300K, contemporaneamente le forze di vdW e di Coulomb sono state riportate dal 10% del loro valore al 100%, mentre il valore della costante di forza applicata per limitare il movimento delle molecole d'acqua è stato mantenuto al 10% del suo valore. Alla fine dei calcoli di dinamica molecolare, ciascun complesso ottenuto è stato sottoposto ad una minimizzazione finale di 10^6 cicli. Dopo questa procedura, tutti i complessi sono stati classificati per la loro energia conformazionale.

L'energia di interazione ligando-enzima di ciascun complesso è stata valutata calcolando: i) l'energia totale di interazione tra ligando e il sito di legame (tutti i residui entro i 6 Å da ogni atomo del ligando), utilizzando il comando *Evaluate* nel modulo Docking di Insight2005 (energia di vdW ed elettrostatiche; no CUT_OFF); ii) l'energia di interazione nonbond tra il ligando e ciascun residuo all'interno del sito di legame, utilizzando il modulo Discover_3 di Insight 2005 (energia di vdW ed elettrostatiche; no CUT_OFF). I complessi a più bassa energia che presentavano un'energia di interazione ligando-enzima più alta sono stati ulteriormente minimizzati (campo di forza CVFF, $\epsilon=1$) combinando l'algoritmo Steepest Descent (valore massimo di RMS sulla derivata prima < 0.5 kcal/Å) con quello Conjugate Gradients (valore massimo di RMS sulla derivata prima < 0.1 kcal/Å) e successivamente sono stati risottoposti al calcolo dell'energia conformazionale e di interazione al fine di selezionare le strutture che potessero rappresentare il più probabile *binding mode*.

La geometria delle interazioni π - π è stata determinata considerando²⁵: i) la distanza tra i centroidi degli anelli aromatici, ii) l'angolo tra i piani degli anelli, iii) il valore di sfalsamento tra gli anelli e, iv) la direzione dei vettori dei dipoli.

Il momento dipolare totale della Nevirapina (1VRT), di CP-94,707 (1TV6) e dei composti **13c** e **13d** è stato calcolato utilizzando le cariche parziali ottenute dal metodo di quanto-meccanica AM1 (Ampac/Mopac, Accelrys, San Diego) ed è stato visualizzato come vettore (Decipher, Accelrys, San Diego).

2.HCV

2.1 INTRODUZIONE

2.1a Epidemiologia del virus dell'epatite C (HCV)

L'infezione da epatite C coinvolge complessivamente 170 milioni di pazienti nel mondo³² e rappresenta un serio problema socio-sanitario dal momento che più del 50% degli individui affetti dal virus sviluppa una malattia cronica e progressiva, caratterizzata da cirrosi epatiche che possono evolvere, nel 15-20% dei casi, in epatocarcinomi letali^{32,33}. In Italia vi sono circa 1,5 milioni di persone infette con un migliaio di nuovi casi all'anno. La co-infezione con HIV è molto comune ed è stato calcolato che il 30% degli individui affetti dal virus HIV sviluppa una co-infezione HIV/HCV. Attualmente sono disponibili test sierologici per rilevare l' infezione ed, attraverso l'uso della metodica PCR, si può individuare il genotipo preciso. Infatti, esistono undici differenti genotipi del virus dell'epatite C classificati per area geografica. Il genotipo 1a è il più comune nel Nord America, mentre in Europa è più diffuso l'1b. Le modalità di trasmissione della malattia sono tre:

- per via parenterale: scambio di siringhe infette, contatti con sangue e liquidi infetti, trasfusioni di sangue
- per via sessuale: sia eterosessuale che omosessuale
- per via perinatale

L'infezione viene portata, oltre che dai malati con infezione acuta, anche dai portatori cronici del virus (nel mondo sono circa 300 milioni). Anche se epatite A, epatite B e epatite

C hanno nomi simili (dato che tutte colpiscono il fegato), i virus sono completamente differenti e a differenza delle prime due, per l'epatite C non esiste un vaccino.

2.1b Terapia attuale per la cura dell'HCV

L' unica terapia attualmente utilizzata si basa principalmente sull'interferone alfa (IFN α), somministrato da solo o in combinazione con analoghi dei nucleotidi ed in particolare con la ribavirina. L'interferone- α è una glicoproteina di origine naturale con proprietà antivirali e immunomodulatorie capace di indurre la *clearance* del virus dell' HCV, ma che presenta alcuni effetti indesiderati, quali leucopenia e trombocitopenia. La ribavirina, invece, inibisce la sintesi di GTP e attraverso questo meccanismo d'azione inibisce l'attività polimerasica della proteina NS5B. Anche questo farmaco presenta diversi effetti indesiderati ed, in particolare, induce l'anemia emolitica dovuta al suo accumulo negli eritrociti.

Le diverse sottospecie del virus dell'epatite C rispondono in maniera diversa a questo tipo di terapia. Infatti, gli studi clinici rilevano una guarigione stabile di almeno il 75% per pazienti infetti dai genotipi di tipo 2 o di tipo 3 dell' HCV e solo del 50% per i pazienti infetti dal genotipo di tipo 1 (il più comune in Italia ed in Europa).

2.1c Genoma del virus dell'HCV

L'HCV, principale agente eziologico dell'epatite non-A e non-B, è un virus ad RNA membro della famiglia delle Flaviviridae. Durante l'infezione, il genoma del virus viene tradotto in un'unica poli-proteina, la cui successiva proteolisi genera diverse proteine strutturali quali:

- *Core*: interagisce con l'RNA virale e forma il nucleocapside

- *E1* ed *E2*: proteine altamente glicosilate del capsid virale che possono interagire con la membrana degli epatociti
- *p7*: è un canale ionico la cui funzione non è stata ancora identificata

e non-strutturali (NS) quali:

- *NS2-NS3*: metallo proteasi Zn-dipendente ad attività autocatalitica
- *NS3*: enzima con attività proteasica, elicastica e NTPasica
- *NS4A*: cofattore della proteina NS3
- *NS5B*: RNA-polimerasi RNA-dipendente

2.1d NS3 elicasi: struttura, funzione ed inibitori

NS3 è un enzima multifunzionale con attività serino-proteasica e NTPasi/elicastica (NS3h), implicato sia nel processo di traduzione della poliproteina virale sia nella duplicazione del genoma dell'HCV³⁴. Sebbene la NS3h rappresenti un target farmaceutico estremamente stimolante, ad oggi, sono stati riportati pochi inibitori di questo enzima con limitate proprietà terapeutiche.

La NS3h (Figura 12) è costituita da tre domini il cui movimento coordinato permette lo svolgimento di tutte le sue funzioni. In particolare, questo enzima attraverso la sua attività NTPasica che avviene a livello dei domini 1 e 2, idrolizza tutti i nucleosidi trifosfati sia quelli che presentano il ribosio sia quelli con il deossiribosio ed attraverso questa idrolisi fornisce l'energia necessaria per l'attività elicastica³⁴. Come per l'attività NTPasica anche per quella elicastica, che si svolge nella zona compresa tra i tre domini, non presenta una specificità di substrato, la NS3h svolge doppie eliche DNA-DNA, RNA-RNA e RNA-DNA. Questa

particolare mancanza di specificità di substrato sia per l'attività NTPasica sia per quella elicastica rende difficile l'identificazione di inibitori specifici³⁴.

Gli inibitori della NS3 NTPasi/elicasi, attualmente identificati, si possono classificare, sulla base del loro meccanismo d'azione, in competitivi e non-competitivi. Appartengono alla classe degli inibitori competitivi i) gli analoghi dei nucleotidi quali ribavirin-5'-trifosfato (RTP) e adenosina-5'- γ -tio-trifosfato (ATP γ -S), che impediscono il legame dell'ATP al proprio sito di *binding*, ii) alcuni derivati piperidinici, iii) diversi polinucleotidi ed aptameri di RNA, che inibiscono selettivamente l'attività elicastica competendo direttamente con il substrato naturale della NS3h (i.e. gli acidi nucleici) ma il loro potenziale terapeutico è limitato e iv) alcuni dimeri molecolari che sembrano agire a livello del sito di legame degli acidi nucleici senza influenzare l'attività ATPasica³⁵.

Agli inibitori non-competitivi, invece, appartengono i) alcuni intercalanti del DNA/RNA, quali antracicline e mitoxantrone, che deformando la struttura del substrato naturale o rendendola più rigida, bloccano la translocazione della NS3h lungo la catena polinucleotidica³²⁻³³ e ii) N9-CEG che inibisce la replicazione virale inducendo una sovrapproduzione di RNA a singolo filamento, il substrato della polimerasi virale.

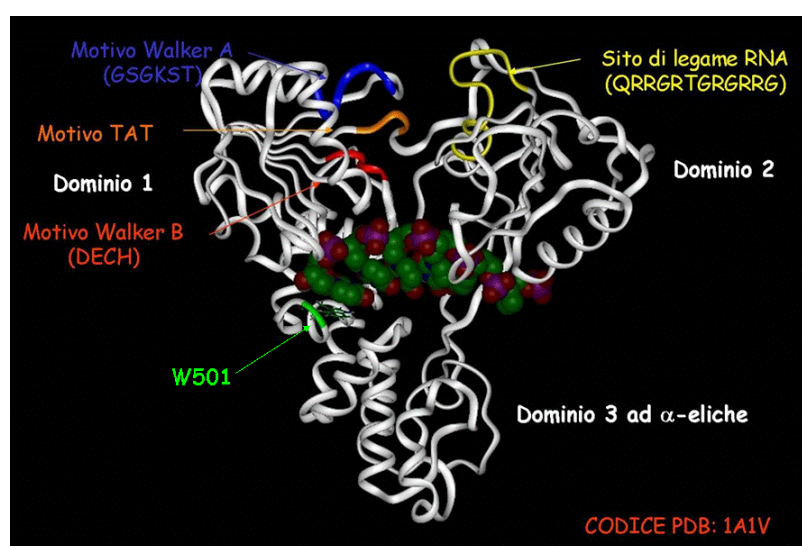


Figura 12. Struttura generale della NS3h (bianco) del virus HCV in complesso con l'inibitore poliU (C =verde, O = rosso, N = blu e P = viola). Sono evidenziati i motivi conservati che costituiscono il sito di legame dei nucleosidi trifosfati (Walker A, B, TAT, sito di legame RNA) e il triptofano 501 (verde) essenziale per l'attività elicastica.

2.2 BASI MOLECOLARI DELLA PROGETTAZIONE DI INIBITORI SELETTIVI DELLA NS3h

Alla luce di queste conoscenze, il mio lavoro si è incentrato sullo sviluppo di nuovi inibitori della NS3h attraverso studi di modellistica molecolare. Al fine di individuare un composto di riferimento non nucleosidico per la progettazione, considerando la forte analogia tra il virus dell'HIV e dell'HCV³⁶, sono stati testati sulla NS3h diversi inibitori non-nucleosidici della trascrittasi inversa (TI), precedentemente sviluppati dal gruppo di ricerca presso cui ho svolto il mio lavoro di dottorato³⁷⁻³⁸. Tra tutte le molecole che sono state testate, un derivato chinossalinico della famiglia degli agenti anti-HIV etiltioureidici (**QX432**, Figura 13) ha mostrato una debole doppia attività sia sulla TI che sulla NS3h (HIV-1 TI $K_i = 0.19 \mu\text{M}$; NS3h $K_i = 22.3 \mu\text{M}$, Tabella 6).

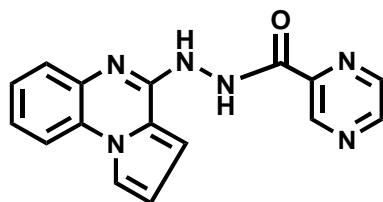


Figura 13. Struttura del derivato chinossalinico **QX432**.

Tabella 6. Attività antivirali verso la NS3h e la TI del virus HIV-1 del derivato **QX432**.

Composto	K_i per l'inibizione della NS3h di HCV (μM)	K_i per l'inibizione della HIV-1 RT (μM)
QX432	22.3	0.19

Quindi, il composto **QX432** è stato utilizzato come composto di riferimento ed è stato sottoposto a dettagliati studi di modellistica molecolare, al fine di individuare le caratteristiche molecolari necessarie per sviluppare una nuova classe di potenti e selettivi inibitori della NS3h nucleotido-mimetici.

Per identificare le proprietà conformazionali ed elettroniche di **QX432** essenziali per la sua attività inibitoria sulla NS3h, è stato calcolato, considerando tutte le possibili forme tautomeriche, il valore apparente di pka (ACD/pka DB version 7.00 software) e sono stati eseguiti studi combinati di dinamica e meccanica molecolare seguiti da calcoli semiempirici. Da questi studi computazionali, **QX432** ha mostrato una peculiare distribuzione elettronica, calcolata attraverso il metodo quanto-meccanico AM1, caratterizzata dalla presenza di una regione parzialmente negativa intorno al gruppo idrazidico, in perfetto accordo con i valori della costante di acidità calcolati (Figura 14, Tabella 7). Per confermare l'importanza di questa proprietà strutturale ed elettronica nell'inibizione della NS3h, sulla base dei risultati ottenuti sul composto **QX432** sono state progettate nuove molecole (Figura15).

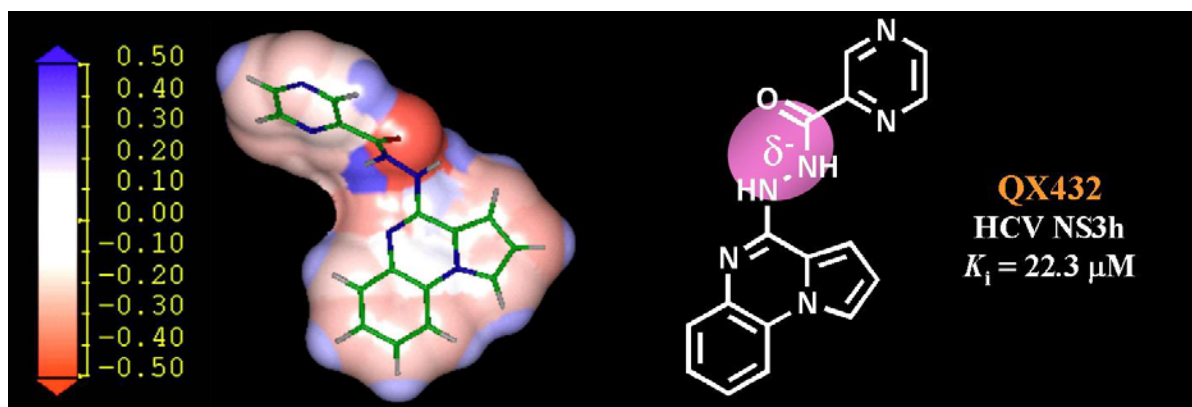


Figura 14. Modello molecolare del conformero a più bassa energia di QX432. QX432 è rappresentato sia in stick (C in verde, N in blu, O in rosso e H in bianco) sia con la sua superficie di Connolly colorata in base alle cariche parziali ottenute con il metodo quantomeccanico AM1.

Tabella 7. Percentuale di forme neutre/ioniche di **QX432** calcolata con i valori apparenti di pK_a ^a

	Tautomero A	Tautomero B	Tautomero C
% forma neutra	 98,5%	 42%	 93%
%forma anionica	 1,5%	 58%	 7%

^a Calcolata utilizzando il programma ACD/pKa DB 7.0 (Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Canada).

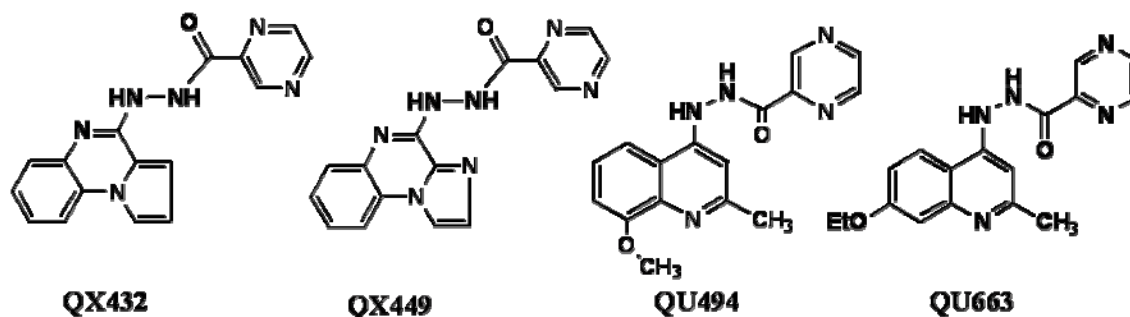


Figura 15. Strutture degli inibitori chinossalinici (QX) e chinolinici (QU) della NS3h.

Tabella 8. Attività antivirali verso la NS3h e la TI del virus HIV-1.

Composti	Ki per l'inibizione della NS3h di HCV (μM)	Ki per l'inibizione della HIV-1 RT (μM)
QX432	22.3	0.19
QX449	4.5	5.5
QU494	15.6	>50
QU663	0.75	NA ^a

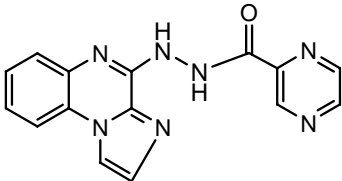
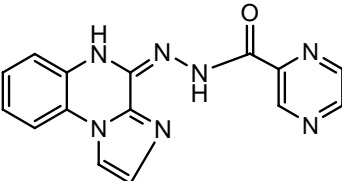
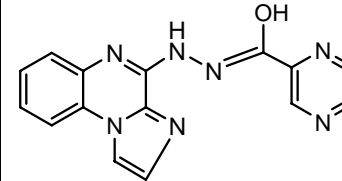
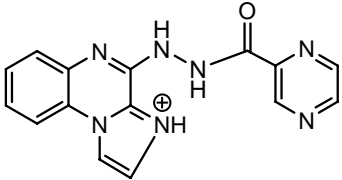
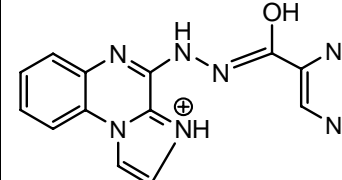
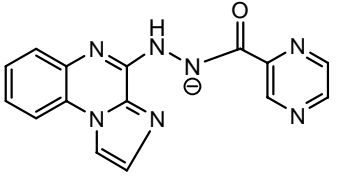
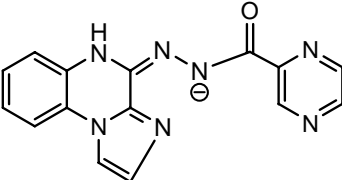
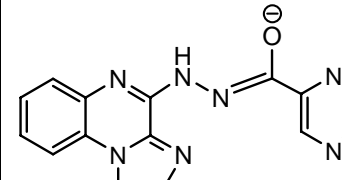
^a NA= non attivo

2.3 RISULTATI E DISCUSSIONE

2.3a QU663, inibitore nucleosido-mimetico della NS3h

Al fine di investigare l'importanza delle proprietà strutturali ed elettroniche, evidenziate con gli studi di modellistica molecolare eseguiti sul composto di riferimento **QX432**, nell'attività inibitoria e nella selettività verso la NS3h, è stato progettato un altro derivato chinossalinico **QX449** (Figura 15), con un azoto addizionale in posizione 3 per il quale è stata calcolata una maggiore percentuale di forma ionizzata (Tabella 9).

Tabella 9. Percentuale di forme neutre/ioniche di **QX449** calcolata con i valori apparenti di pK_a^a

	Tautomero A	Tautomero B	Tautomero C
% N ^b	 96%	 17%	 60%
% P ^b	 <0.5	N.P. ^c	 <0.5%
% A ^b	 4%	 83%	 40%

^a Calcolata utilizzando il programma ACD/pKa DB 7.0 (Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Canada). ^b N = forma neutra, P = forma protonata, A = forma anionica. ^c Non presente.

Come previsto, **QX449** è risultato essere più attivo di cinque volte rispetto a **QX432** (NS3h $K_i = 4.5 \mu\text{M}$, Tabella 8), confermando l'importanza di una regione carica

negativamente che potrebbe riprodurre la densità elettronica presente sui gruppi fosfato del substrato naturale dell'NS3h e permettere il riconoscimento con il sito attivo dell'enzima. Per rafforzare l'ipotesi che questi derivati possano realmente mimare le proprietà elettroniche del substrato naturale della NS3h, dal momento che le basi puriniche e pirimidiniche possiedono anche una zona carica positivamente distante, rispettivamente, ~ 5.8 Å e ~ 7.3 Å da quella negativa, sono stati progettati due nuovi composti **QU494** e **QU663** (Figura 15), caratterizzati dalla presenza di un nucleo chinolinico diversamente sostituito al posto di quello chinossalinico, al fine di valutare l'importanza di questa proprietà strutturale ai fini dell'attività. Infatti, i due nuovi composti, sottoposti agli stessi studi computazionali effettuati su **QX432**, hanno mostrato differenti proprietà steriche, elettroniche e di acidità (Figura 16). In particolare, il composto **QU494** ha mostrato proprietà elettroniche molto simili a quelle del **QX432** (Tabella 10 vs Tabella 7), confermate dalla simile attività inibitoria sull'NS3h (per **QX432**, $K_i = 22.3$ μM , e per **QU494**, $K_i = 15.6$ μM). Entrambi i composti **QX449** e **QU494** hanno mostrato un valore più basso nella costante di inibizione della TI del virus HIV-1 pari rispettivamente a 5.5 e >50 μM (**QX432** TI HIV-1, $K_i = 0.19$ μM , Tabella 8).

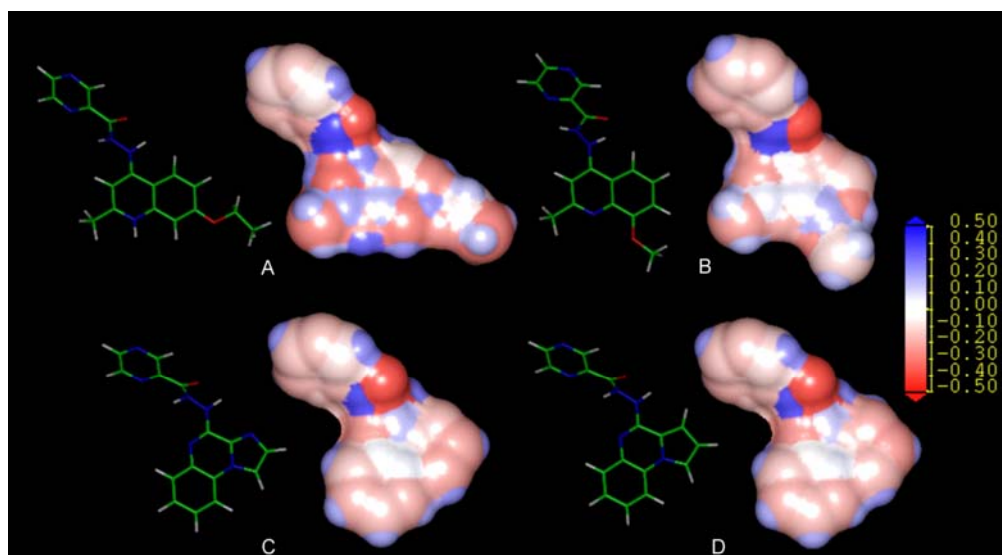


Figura 16. Modelli molecolari dei conformeri a più bassa energia di **QU663** (A), **QU494** (B), **QX449** (C) e **QX432** (D). A sinistra: le molecole sono rappresentate in stick e colorate sulla base del tipo atomico (C in verde, N in blu, O in rosso e H in bianco). A destra: le molecole sono rappresentate con la loro superficie di Connolly colorata in base alle cariche parziali ottenute con il metodo quantomeccanico AM1.

Tabella 10. Percentuale di forme neutre/ioniche di **QU494** calcolata con i valori apparenti di pK_a ^a

	Tautomero A	Tautomero B
% Forma neutra	 97%	 31%
% Forma zwitterionica	 <0.5%	 6%
% Forma protonata	 2%	 4%
% Forma anionica	 1%	 59%

^a Calcolata utilizzando il programma ACD/pKa DB 7.0 (Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Canada).

L'introduzione di un gruppo etossi a livello del carbonio C-7 sull'anello chinolinico ha portato alla progettazione del composto **QU663**, un selettivo inibitore della NS3h con una attività micromolare ($K_i = 0.75 \mu\text{M}$). Gli studi di modellistica molecolare eseguiti sul composto **QU663** hanno evidenziato alcune peculiarità (Tabella 11, Figura 16, A): i) un significativo grado di protonazione dell'azoto chinolinico a pH fisiologico; ii) una forte tendenza ad essere caricato negativamente per la perdita di un idrogeno dal gruppo idrazidico; iii) una distanza tra questi due gruppi altamente polari che va da 5.92 \AA a 6.23 \AA a seconda del conformero selezionato. In accordo con la nostra ipotesi, queste proprietà elettroniche e conformazionali hanno riprodotto quelle calcolate per i nucleotidi RNA/DNA, che costituiscono il substrato naturale della NS3h (Figura 17).

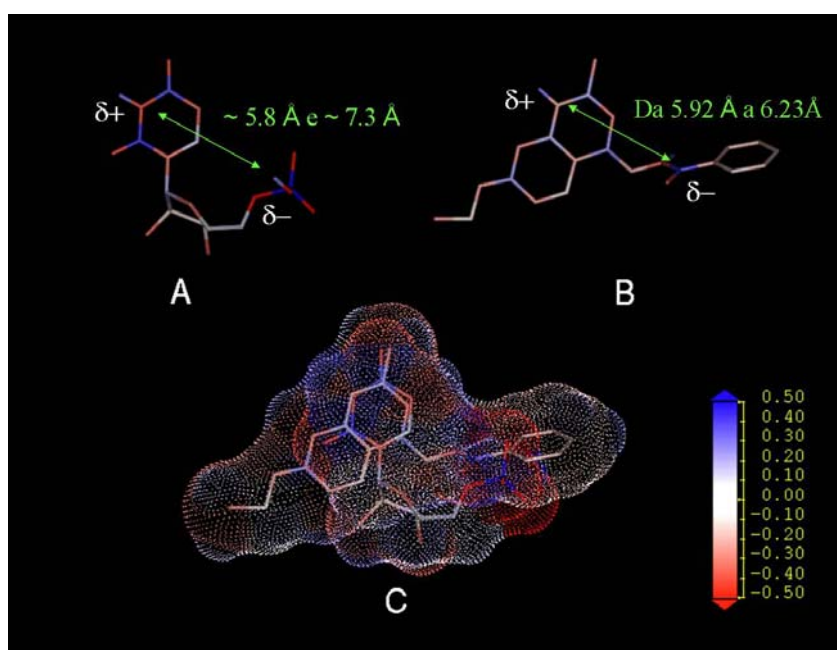
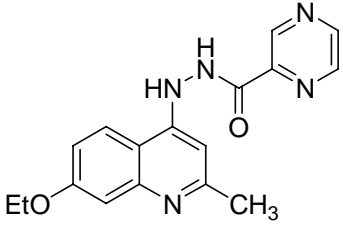
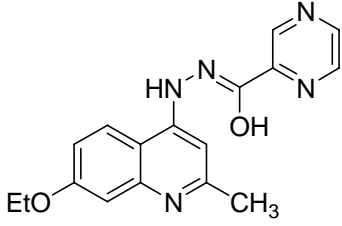
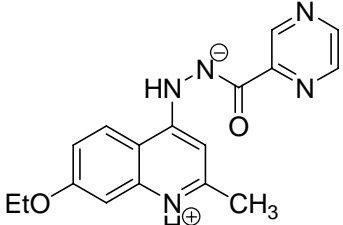
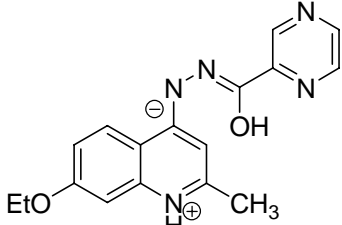
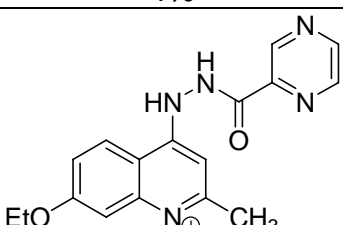
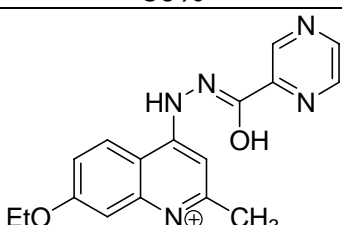
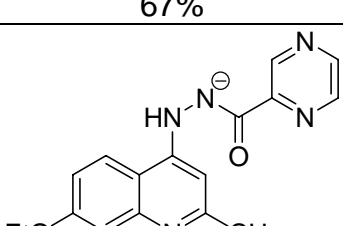
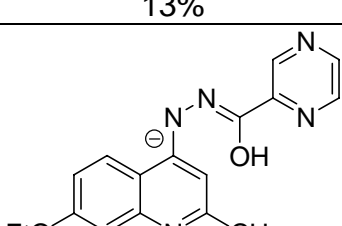


Figura 17. Conformeri ottenuti dai calcoli semiempirici AM1 di 5'-UMP (A) e **QU663** (B), colorati sulla base delle cariche parziali ottenute da AM1. (C) Sovrapposizione di 5'-UMP e **QU663** in base alle loro distribuzioni elettroniche. Sono mostrate le superfici di Connolly.

Il composto **QU663** è il più potente e selettivo inibitore della NS3h finora trovato (NS3h $K_i = 0.75 \mu\text{M}$; TI HIV-1 $K_i = \text{non attivo}$). Inoltre, in accordo con l'ipotesi, secondo la quale le sue caratteristiche strutturali ed elettroniche sono in grado di mimare quelle calcolate

per i nucleotidi (substrato naturale della NS3h), **QU663** rappresenta il primo esempio di inibitore nucleotido-mimetico dell'NS3h. Infine **QU663** non ha mostrato citotossicità verso le cellule 3T3, Daudi e i linfociti normali umani.

Tabella 11. Percentuale di forme neutre/ioniche di QU663 calcolata con i valori apparenti di pKa^a

	Tautomero A	Tautomero B
% Forma neutra	 29%	 2 %
% Forma zwitterionica	 4%	 80%
% Forma protonata	 67%	 13%
% Forma anionica	 <0.5%	 5%

^a Calcolata utilizzando il programma ACD/pKa DB 7.0 (Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Canada).

2.3b Saggi farmacologici: inibitori competitivi e specifici dell'attività elicastica della proteina NS3

Tutti i composti progettati sono stati sottoposti a specifici saggi farmacologici e biochimici per escludere la capacità di inibire l'attività ATPasica della NS3h, di legarsi e/o intercalarsi nel DNA e per confermare, quindi, la capacità di inibire, solo ed esclusivamente, l'attività elicastica della NS3h in maniera competitiva con il substrato naturale. Nei saggi per l'attività elicastica della NS3h in maniera competitiva con il substrato naturale. Nei saggi per l'attività NTPasica, l'ATP marcata è stata incubata con la proteina NS3 purificata e, i prodotti di reazione sono stati separati con la TLC. Dal cromatogramma di Figura 18 A è evidente che il composto QU663 è incapace di inibire l'attività NTPasica anche ad alte concentrazioni.

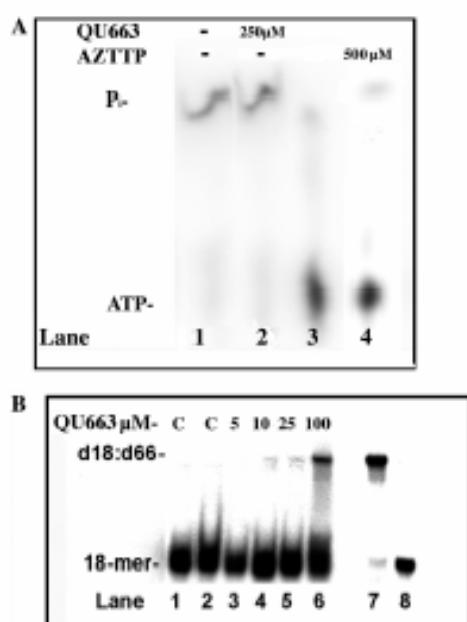


Figura 18. Inibizione delle attività NTPasica ed elicastica da parte di **QU663**. (A) Cromatogramma di una reazione ATPasica in assenza (lane 3) o in presenza di ATP marcata a 0.5 mM (lane 1 e 2) e in presenza di crescenti concentrazioni di **QU663**. Le posizioni dei segnali relativi al substrato (ATP) e al prodotto (Pi) sono indicate sul lato sinistro. Lane4 contiene un controllo positivo in presenza di 500 μ M di AZTT (B) Analisi elettroforetica su gel di poliacrilamide denaturato dei prodotti dell'attività elicastica in presenza di concentrazioni crescenti di QU663 (lanes 1-6). Lane 7 contiene una reazione mista incubata senza enzima. Lane 8 contiene una miscela casuale.

La Figura 18 B mostra i risultati di uno tipico saggio dell'attività elicastica: il substrato marcato è incubato con la NS3 senza e con diverse concentrazioni di **QU663** e successivamente il substrato a doppia elica è stato separato dall' oligonucleotide a singola

elica. Come indicato dall'aumento di segnale del substrato a doppia elica (Figura 18 B), **QU663** ha inibito significativamente l'attività elicastica della NS3 ad una concentrazione di 100 μM .

La capacità di inibire l'attività elicastica della NS3 in maniera competitiva da parte della **QU663**, è stata testata con l'analisi spettrofotometrica delle variazioni nell'assorbanza dovuta alla transizione degli acidi nucleici da doppia a singola elica in presenza di NS3. Queste analisi sono state eseguite in presenza di differenti concentrazioni di substrato marcato e di **QU663**. Come mostrato in Figura 19 A, in assenza di **QU663** e in presenza di 66 nM di substrato, l'assorbanza è aumentata nel tempo come conseguenza dell'attività elicastica della NS3.

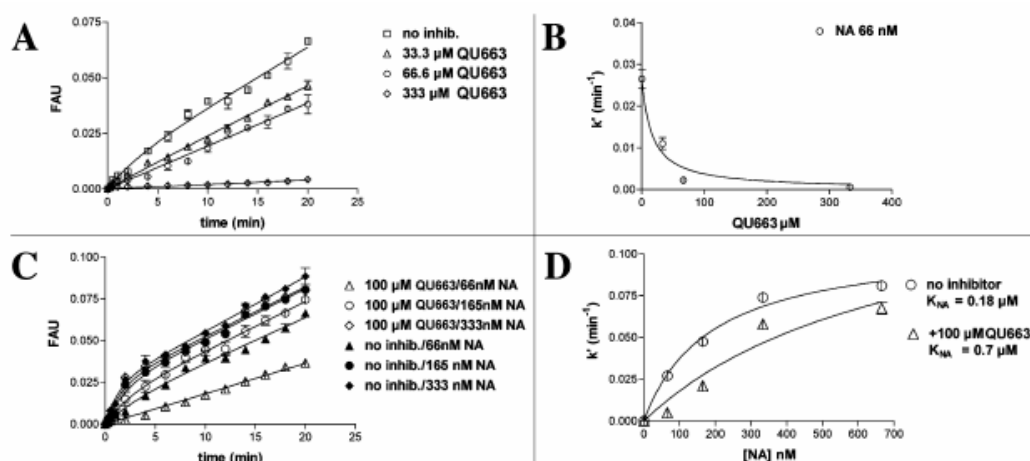


Figura 19. Analisi dell'inibizione dell'attività elicastica della NS3 da parte di **QU663** in presenza di substrato naturale. A) Analisi del profilo di assorbanza della reazione elicastica catalizzata dalla NS3 in presenza di 66 nM di acido nucleico e in assenza di esso o in presenza di aumentate concentrazioni di **QU663** [33.3, 66.6, e 333 μM] (B) Curva dose-risposta per l'inibizione della reazione della NS3h da parte di **QU663**. (C) Dipendenza dalla concentrazione di acido nucleico dell'inibizione della reazione elicastica da parte di **QU663**. Le reazioni sono state eseguite in presenza di tre concentrazioni di acido nucleico (66, 165 e 333 nM) in assenza o in presenza di 100 μM di **QU663**. (D) Variazione dell'affinità apparente della NS3 per l'acido nucleico come funzione della concentrazione di **QU663**. La variazione della velocità di reazione è stata calcolata in relazione alla concentrazione di **QU663**, in assenza o presenza di 100 μM di **QU663**.

Al contrario, come mostrato in Figura 19 A e B, quando si è aggiunto **QU663**, esso ha inibito, in maniera dipendente dalla concentrazione, la capacità di svolgere la doppia elica di DNA da parte della NS3. Quando una concentrazione fissa di **QU663** è stata testata in presenza di concentrazioni crescenti di substrato naturale, il livello di inibizione è diminuito

proporzionalmente all'aumento di concentrazione di substrato (Figura 19 C). Quando è stato controllato l'effetto del **QU663** sull'affinità del substrato per la NS3, **QU663** ha determinato una diminuzione dell'affinità dell'enzima per il substrato (Figura 19 D). Questi risultati hanno dimostrato che **QU663** è un inibitore competitivo della NS3h. Gli stessi esperimenti sono stati eseguiti anche sui i composti **QX432**, **QX449** e **QU494** e nessuno è risultato essere capace di inibire l'attività NTPasica, ma tutti hanno mostrato un'inibizione competitiva verso la NS3h rispetto al substrato naturale (dati non mostrati). Infine sono stati eseguiti due saggi al fine di determinare la capacità di intercalare il DNA: “*absorbance quenching measurements*” e “*electrophoretic mobility shift assays*”. Entrambi i saggi, come mostrato in Figura 20, hanno evidenziato che tutti i composti non legano e non si intercalano al DNA.

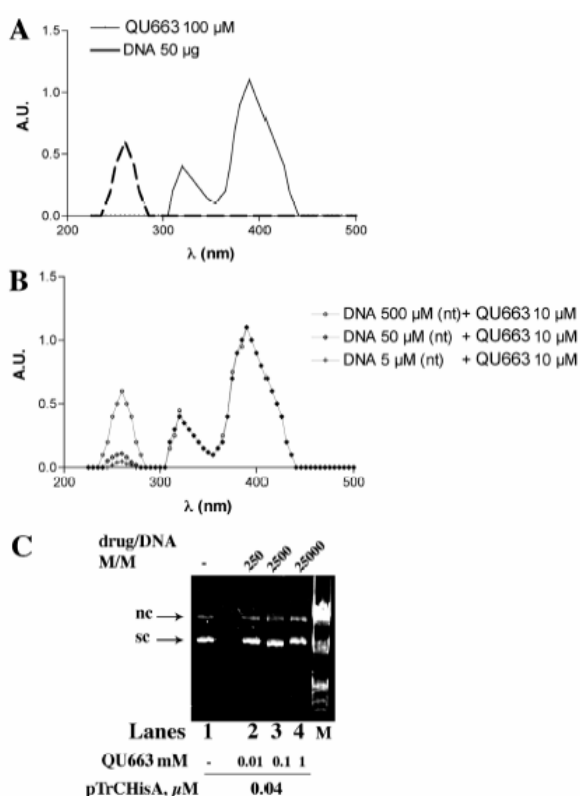


Figura 20. **QU663** non lega il DNA: *absorbance quenching measurements* (A e B) ed *electrophoretic mobility shift assays* (C). (A) Determinazione del picco di assorbanza per **QU663** e ctDNA. I dati sono stati ottenuti in presenza di 100 mM di **QU663** o 50 mg di ctDNA. (B) Determinazione dell'assorbanza per soluzioni di DNA/**QU663**. I campioni sono stati preparati miscelando 10 mM di **QU663** con 5, 50 e 500 mM di ctDNA. (C) Il plasmide pTrCHisA (0.04 mM) è stato miscelato con 0.01 (lane 2), 0.1 (lane 3), e 1 mM di **QU663** (lane 4). I campioni sono stati preparati ed analizzati attraverso l'elettroforesi: lane 1, solo pTrCHisA; lane M, DNA Eco/Hind.

2.3c Studi di docking sul derivato QU663

Sulla base dei risultati farmacologici, i miei studi di modellistica molecolare sono proseguiti con l'obiettivo di identificare il possibile sito di legame di **QU663** nella NS3h attraverso studi di *docking* flessibile (i dettagli sono riportati nella parte sperimentale). A tal fine è stata eseguita un'analisi dettagliata di tutte le strutture cristallografiche della NS3h presenti nella banca dati delle proteine (codice PDB: 1A1V, 8OHM, 1HEI e 1CU1) e, dal momento che, **QU663** è risultato essere un inibitore competitivo del substrato naturale e selettivo verso la sola attività elicastica, sulla base di tutti gli studi di mutagenesi finora eseguiti³⁹⁻⁴⁴, sono state escluse dai calcoli di *docking* le regioni della NS3h aventi residui coinvolti nell'attività ATPasica, focalizzando i calcoli su un'ampia regione intorno al sito di legame dell'inibitore poliU (codice PDB: 1A1V) come è mostrato nella Figura 21. Tutta la regione individuata è stata lasciata libera di muoversi durante le simulazioni meccaniche/dinamiche.

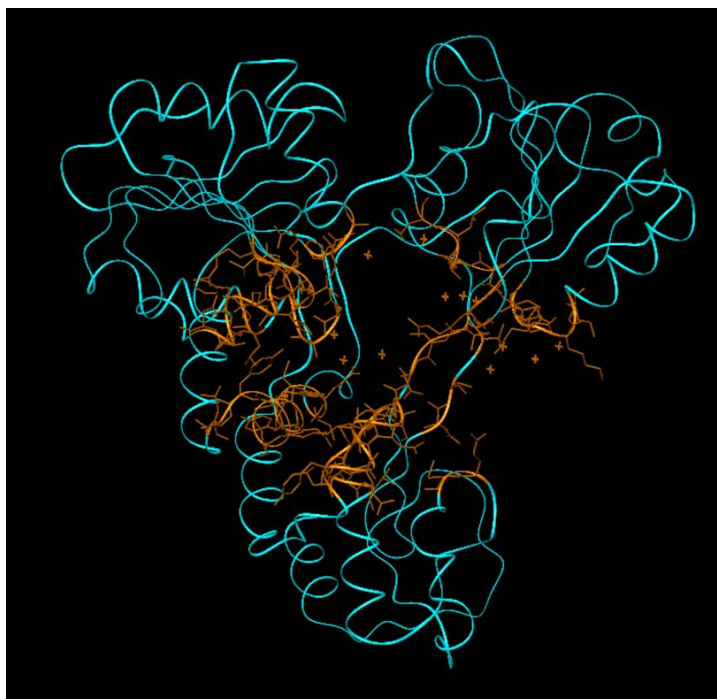


Figura 21. Regione della NS3h (arancione) sottoposta agli studi di *docking* flessibile caratterizzati da una combinazione del metodo Monte Carlo e del *simulated annealing*.

Da questi studi di *docking* flessibile è risultato che **QU663** ha mostrato una stringente complementarità con la regione delimitata dai residui triptofano 501 e arginina 393: i) stabilendo interazioni π - π con il triptofano 501 e la fenilalanina 557 attraverso l'anello chinolinico; ii) interagendo con l'arginina 393 sia attraverso l'ossigeno polarizzato negativamente del gruppo idrazidico sia attraverso un'interazione cation- π dell'anello pirazinicco; iii) stabilendo un'interazione ionica con l'aspartato 496 attraverso l'azoto protonato della chinolina, e iv) formando legami idrogeno con la treonina 298, la glutammina 434 ed il glutammato 493 (Figura 22). Inoltre, questi studi di *docking*, hanno evidenziato il cambiamento conformazionale del triptofano 501 indotto da **QU663** nel momento in cui interagisce con l'enzima (Figura 22).

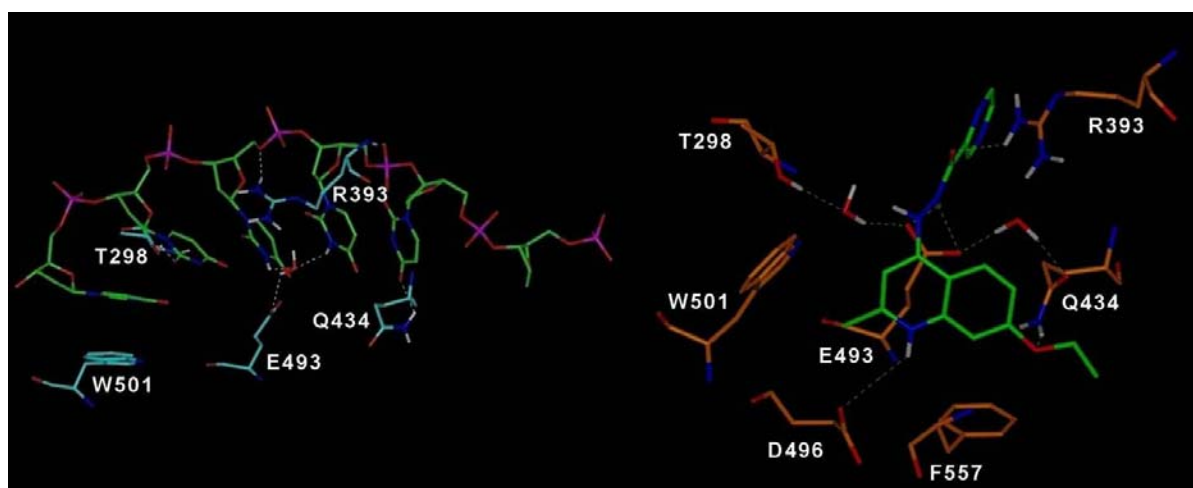


Figura 22. Interazioni ligando-enzima. A sinistra: principali interazioni del complesso cristallografico poliU (verde)-NS3h (ciano) (PDB:1A1V); a destra: principali interazioni del complesso **QU663** (verde) / NS3h (arancione). N = blu; O= rosso; P = viola e H = bianco. Gli idrogeni sono stati omessi per rendere più chiara la figura, ad eccezione di quelli coinvolti nei legami idrogeno (linea verde tratteggiata).

Questa ipotesi di legame di **QU663** è in perfetto accordo con gli studi di mutagenesi finora eseguiti³⁹⁻⁴⁴.

Per confermare la modalità di legame ipotizzata, è stata confrontata la struttura cristallografica della NS3h nella sua forma attiva come elicasi in complesso con l'inibitore poliU (codice PDB: 1A1V) con quella nella sua forma attiva come proteasi (codice PDB: 1CU1). Nella struttura 1A1V la distanza tra il C α dell'arginina 393 e del glutammato 555 è

risultata essere di 13.7 Å, mentre nella 1CU1 il dominio 2 (R393) è conformazionalmente spostato verso il dominio 3 (E555), fissando la distanza tra i Cα dell'arginina 393 e del glutammato 555 a 9.5 Å (Figura 23). Gli studi di *docking* hanno mostrato che **QU663**, andando ad interagire con la regione sopra citata, ha indotto uno spostamento conformazionale molto simile a quello presente in 1CU1, con una distanza tra l'arginina 393 ed il glutammato 555 di 8.9 Å (Figura 24), in accordo con la sua abilità di inibire competitivamente l'attività elicastica, impedendo il legame del substrato naturale.



Figura 23. Sovrapposizione tra la NS3h nella sua forma attiva come elicasi in complesso con l'inibitore poliU (colorata in celeste, codice PDB: 1A1V) e la NS3 nella sua forma attiva come proteasi (colorata in giallo, codice PDB: 1CU1).

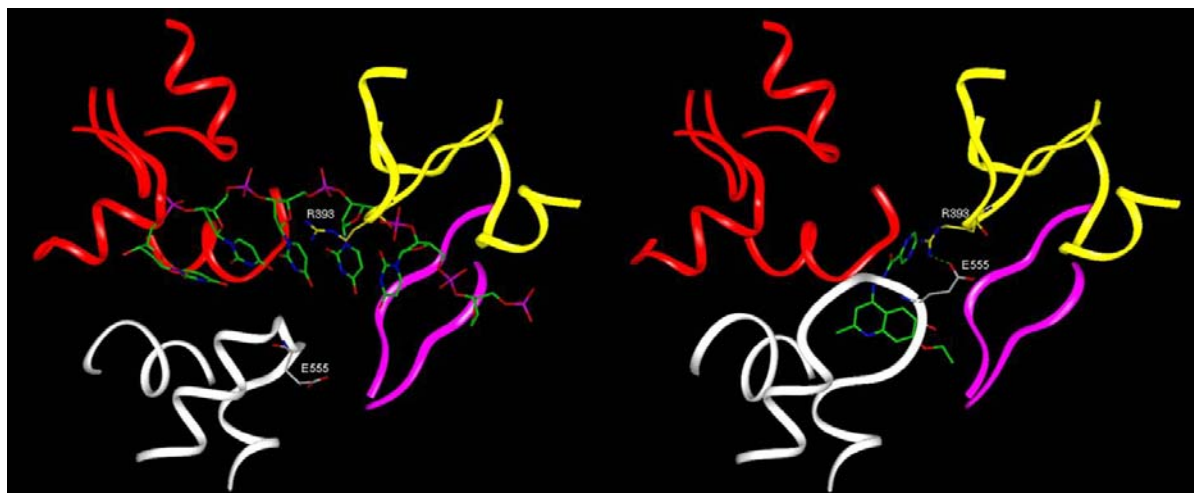


Figura 24. Confronto tra i cambiamenti conformazionali nella struttura cristallografica NS3h-poliU (sinistra) e nell'ipotesi molecolare di legame NS3h-**QU663** (destra). I ribbon del dominio 1 sono colorati in rosso, del dominio 2 in giallo, del dominio 3 in bianco e il Phe loop in viola. Sono evidenziati gli aminoacidi R393 e E555. I due ligandi sono colorati sulla base del tipo atomico (C = verde; N = blu; O= rosso; P = viola). Tutti gli idrogeni sono stati omessi per rendere più chiara la figura.

2.4 CONCLUSIONI

Gli studi di modellistica molecolare eseguiti durante il mio lavoro di dottorato hanno permesso di individuare le caratteristiche molecolari necessarie per sviluppare la prima classe di potenti e selettivi inibitori della NS3h nucleotido-mimetici a partire dal derivato chinossalinico della famiglia degli agenti anti-HIV etiltioureidici **QX432**, che ha mostrato una debole doppia attività sia sulla trascrittasi inversa che sulla NS3h.

Sulla base di questi studi preliminari è stato possibile progettare nuovi ligandi attivi e selettivi verso la NS3h e rafforzare l'ipotesi che questa nuova serie di derivati possa mimare le proprietà elettroniche del substrato naturale della NS3h. Tale ipotesi ha portato alla progettazione di **QU663**, il più potente e selettivo inibitore della NS3h finora trovato (NS3h $K_i = 0.75 \mu\text{M}$; HIV-1 RT $K_i = \text{non attivo}$) ed il primo esempio di inibitore nucleotido-mimetico dell'NS3h. Inoltre, sulla base dei risultati farmacologici e di mutagenesi, è stato possibile ipotizzare, attraverso studi di *docking*, il possibile sito di legame di **QU663** ed identificare i cambiamenti conformazionali indotti da esso una volta legatosi all'enzima NS3h.

In generale, questi studi computazionali effettuati hanno dimostrato che funzionalizzando in maniera appropriata molecole con strutture simili, si possono ottenere inibitori sia di enzimi dell'HIV sia dell'HCV, aprendo una nuova strada non solo per la progettazione razionale di inibitori competitivi della NS3h ma anche di potenti farmaci antivirali bifunzionali per il trattamento della coinfezione HIV/HCV.

Il risultato della ricerca svolta è stato oggetto di una pubblicazione su rivista internazionale e di una comunicazione poster:

1) G. Maga, S. Gemma, C. Fattorusso, G. A. Locatelli, S. Butini, M. Persico, G. Kukreja, M. P. Romano, L. Chiasserini, L. Savini, E. Novellino, V. Nacci, S. Spadari e G.

Campiani. *Specific Targeting of Hepatitis C Virus NS3 RNA Helicase. Discovery of the Potent and Selective Competitive Nucleotide-Mimicking Inhibitor QU663.* *Biochemistry*, **2005**, 44, 9637-9644.

2) S. Gemma, M. Persico, C. Fattorusso, S. Butini, I. Fiorini, V.Nacci, G. Maga, G. Campiani. *Specific targeting of hepatitis C virus NS3 RNA helicase. Discovery of potent and selective competitive nucleotide-mimicking inhibitors.* XXII Congresso Nazionale della Società Chimica Italiana. Firenze, 10-15 settembre 2006.

2.5 PARTE SPERIMENTALE

Tutti gli studi di modellistica molecolare sono stati eseguiti sui Silicon Graphics Octane 2XR10000 e Indigo2R10000.

2.5a Analisi delle proprietà chimico-fisiche dei nucleotidi e dei nuovi composti progettati

QX432, QX449, QU494 e QU663 sono stati costruiti utilizzando il modulo Builder di Insight 2000.1; le strutture molecolari della guanina, adenina, citosina, timidina e uracile sono state estratte dalla banca dati dei frammenti (Accelrys, San Diego). I valori apparenti di pKa dei nuovi composti progettati, nelle loro forme tautomeriche, sono state calcolate utilizzando il programma ACD/pKa DB versione 7.00 (Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Canada) e le percentuali di forme neutre/ioniche sono state calcolate sulla base dell'equazione di Handerson-Hasselbach.

Il gruppo chinolinico di **QU663**, sulla base dei risultati ottenuti dal calcolo dei valori apparenti di pKa, è stato considerato protonato in tutti gli studi eseguiti. Le cariche di **QU663** sono state assegnate manualmente confrontando le cariche parziali assegnate dal campo di forza CVFF²⁶ con quelle calcolate dal metodo quanto meccanico MNDO⁴⁵ sia sulle forme neutre che quelle cariche.

Tutte le strutture sono state sottoposte ad una ricerca conformazionale attraverso 50 cicli di Simulated Annealing (Tripos force field, Sybyl software, Tripos, San Louis). E' stata applicata una temperatura iniziale di 700K per superare le barriere energetiche dei torsionali, la struttura è stata mantentuta a quella temperatura per 1000 fs, poi la temperatura è stata ridotta fino a 0 K con un decremento di 0.5 K/fs. Le strutture ottenute sono state sottoposte ad una minimizzazione energetica utilizzando il modulo Discover di Insight 2000.1 (campo

di forza CVFF²⁶, algoritmo Coniugate Gradient²⁷; $\epsilon=80*r$), il criterio di convergenza è stato stabilito in modo che il massimo valore di RMS sulla derivata prima fosse inferiore a 0.001 kcal/Å. I conformeri ottenuti sono stati classificati in base al loro valore di energia conformazionale.

Al fine di analizzare le proprietà elettroniche di **QX432**, **QX449**, **QU494**, **QU663** e dei nucleotidi, i loro conformeri più stabili sono stati sottoposti ad una completa ottimizzazione geometrica attraverso i calcoli semiempirici, utilizzando il metodo quanto meccanico AM1 (MOPAC 6.0⁴⁵) presente nel modulo Ampac/Mopac di Insight 2000.1. Il valore di GNORM è stato fissato a 0.5; per raggiungere una completa ottimizzazione geometrica i criteri di terminazione per ogni ottimizzazione sono stati aumentati di un fattore pari a 100, utilizzando la keyword PRECISE.

Le superfici di Connolly sono state calcolate e colorate sulla base della distribuzione di cariche ottenute dai calcoli semiempirici. Le strutture ottenute sono state sovrapposte prendendo in considerazione le loro distribuzioni elettroniche.

2.5b Costruzione del modello della NS3h

Le strutture cristallografiche della NS3h sono state scaricate dalla banca dati PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/>). Gli idrogeni sono stati aggiunti a tutte le strutture cristallografiche considerando un valore di pH di 7.2.

La struttura cristallografica della NS3h in complesso con l'inibitore (dU₈) è stata selezionata per gli studi di *docking* (codice PDB: 1A1V). Dal momento che gli aminoacidi 415-417 mancavano nella struttura 1A1V, il loop 414-420, che dall'analisi di tutte le strutture cristallografiche disponibili è risultato essere altamente flessibile, è stato modellato utilizzando la procedura standard di costruzione di modelli prevista dal modulo Homology di

Insight 2000.1 (Accelrys, San Diego). Un confronto strutturale tra 1A1V e le altre strutture cristallografiche della NS3h ha fatto scegliere la struttura cristallografica 1HEI come struttura di riferimento per la costruzione del modello (valore più piccolo di RMSD sugli atomi del backbone degli aminoacidi 413 e 421). Inoltre, le catene laterali dei residui A195, A244, A357, A360, A372, A530, A541, A580 e A583, cambiati ad alanina nella struttura 1A1V a causa della scarsa densità delle catene laterali, sono state rimpiazzate con quelle realmente presenti nella sequenza aminoacidica dell'enzima.

Tutti i calcoli successivi sono stati eseguiti utilizzando il campo di forza CVFF per parametrizzare i residui aminoacidici della proteina e le molecole d'acqua, mentre è stata applicata al ligando la procedura di parametrizzazione descritta nel paragrafo precedente.

2.5c Generazione della struttura di partenza per gli studi di docking

La procedura di *docking* richiede formalmente una struttura di partenza ragionevole, sebbene nel protocollo successivo di *docking* flessibile il ligando venga sottoposto ad una esaustiva ricerca conformazionale (angoli torsionali, rotazione, translazione) dentro il sito attivo della proteina (completamente flessibile) con l'utilizzo combinato sia della procedura del metodo Monte Carlo che del *Simulated Annealing*.

Per introdurre **QU663** nella struttura NS3h, il ligando dU₈ presente nella struttura cristallografica è stato rimosso utilizzando il comando `unmerge` presente nel modulo Biopolymer di Insight 2000.1 (Accelrys, San Diego). Il conformero a più bassa energia di **QU663** è stato posizionato nel sito di legame di dU₈ prendendo in considerazione la sua attività inibitoria e i dati di mutagenesi dell'enzima disponibili³⁹⁻⁴⁴ (essendo un inibitore competitivo che non influenza l'attività ATPasica della NS3h). Tutte le molecole di acqua presenti in 1A1V sono state mantenute con l'eccezione di quelle che si sovrapponevano

stericamente alla struttura di partenza del ligando. Il complesso ottenuto è stato sottoposto ad una minimizzazione preliminare (algoritmo Steepest Descent; $\epsilon=1$) fino a che il massimo valore di RMS sulla derivata prima fosse inferiore a 0.5 kcal/Å al fine di generare un punto di partenza del *docking* razionale come richiesto dalla procedura di *docking* di Affinity.

2.5d Studi di docking

Il *docking* flessibile è stato eseguito utilizzando il modulo Affinity di Insight 2000.1 e selezionando la procedura di SA_Docking²⁹ e il metodo di calcolo delle interazioni di non legame Cell_Multipole³⁰. Il sito di legame del ligando è stato definito attraverso l'unione logica di: i) un subset che includeva il ligando più tutti i residui aminoacidici e le molecole di acqua che avevano almeno un atomo entro i 10 Å da ogni singolo atomo del ligando e ii) un subset che includeva tutti i residui aminoacidici e le molecole di acqua che avevano almeno un atomo entro i 5 Å da ogni singolo atomo del ligando dU₈. Durante l'intera durata dei calcoli di *docking* tutti gli atomi dei residui inclusi nel sito di legame sopra definito (71 aminoacidi, 15 molecole di acqua ed il ligando, Figura 21) sono stati lasciati liberi di muoversi, mentre una costrizione è stata applicata sulle 15 molecole di acqua incluse nel sito di legame, utilizzando una costante di forza di 10.0 kcal/Å (opportunamente scalata nelle varie fasi della simulazione, come sotto riportato), al fine di evitare la fuoriuscita non realistica delle molecole di acqua durante la fase di *Simulated Annealing*.

Sono state generate casualmente 20 strutture utilizzando la procedura combinata Monte Carlo/minimizzazione con un criterio di tolleranza energetico di 10⁶ kcal/mol per assicurare un'ampia variabilità delle strutture da minimizzare (2500 iterazioni; $\epsilon=1$). Durante questa fase il ligando è stato mosso attraverso la combinazione di movimenti traslazionali, rotazionali e variando il valore degli angoli torsionali (opzione Flexible_Ligand,

considerando tutti legami ruotabili), al fine di analizzare sia lo spazio conformazionale del ligando e sia la sua orientazione rispetto al sito di legame. Al fine di ottenere una discreta mobilità delle molecole di acqua, durante questa fase la costante di forza applicata per limitare il loro movimento è stata scalata di un fattore pari a 0.1 (cioè il 10% del suo valore iniziale). In maniera simile, sono stati scalati anche i termini riguardanti le forze di van der Waals (vdW) e di Coulomb di un fattore pari a 0.1 al fine di evitare forti divergenze nelle energie di Coulomb e di vdW. Per selezionare soluzioni accettabili, sono stati applicati sia il criterio Metropolis ad una temperatura di 310 K sia un criterio di controllo di similitudine delle strutture (RMS tolerance = 0.3 kcal/Å). I complessi selezionati sono stati prima minimizzati e poi sottoposti a 50 cicli di *Simulated Annealing*, ciascuno di 100 fs. Durante la durata di un ciclo di *Simulated Annealing* la temperatura del sistema è stata diminuita linearmente da 500K a 300K, contemporaneamente le forze di vdW e di Coulomb sono state riportate dal 10% del loro valore al 100%, così come il valore della costante di forza applicata per limitare il movimento delle molecole. Alla fine dei calcoli di dinamica molecolare, ciascun complesso ottenuto è stato sottoposto ad una minimizzazione finale di 10^6 cicli. Dopo questa procedura, tutti i complessi sono stati classificati per la loro energia conformazionale. E' stato selezionato il complesso ad energia minore.

3.MALARIA

3.1 INTRODUZIONE

3.1a *Epidemiologia ed eziologia*

La malaria è la più importante parassitosi causata da protozoi del genere Plasmodium. Il serbatoio del parassita sono gli individui infettati cronicamente. Gli ospiti intermedi sono le zanzare del genere Anopheles. È una malattia febbrile acuta che si manifesta con segni di gravità diversa a seconda della specie infettante⁴⁶⁻⁴⁷.

La malaria è la seconda malattia infettiva al mondo per mortalità dopo la tubercolosi, con 500 milioni di nuovi casi clinici all'anno (90% in Africa tropicale) e 2,5 milioni di morti all'anno (per lo più bambini africani). Il 40% della popolazione mondiale vive in zone endemiche. Ogni anno circa 10,000-30,000 viaggiatori europei e americani si ammalano di malaria⁴⁶⁻⁴⁷.

La maggior parte delle infezioni malariche sono dovute a quattro specie di Plasmodium:

- *P. falciparum* (Pf)
- *P. vivax*
- *P. ovale*
- *P. malariae*

In letteratura sono riportate anche infezioni dovute ad altre due specie quali il *P. knowlesi* e il *P. semiovale*⁴⁶⁻⁴⁷. La diagnosi delle specie è importante perché la malaria in alcuni casi, come quello del *P. falciparum*, è potenzialmente mortale.

3.1b Modalità di trasmissione e ciclo vitale

Gli sporozoiiti sono la forma infettante del plasmodio e vengono inoculati nell'organismo umano dalla puntura della zanzara femmina del genere *Anopheles*. Dopo una breve permanenza nel circolo ematico, gli sporozoiiti invadono gli epatociti (cellule del fegato). Si ha quindi il primo ciclo di moltiplicazione asessuata (eso-eritrocitario), con produzione di uno schizonte, plurinucleato, che si rompe e riversa in circolo nuovi merozoiti mononucleati, che infettano gli eritrociti. Il secondo ciclo asessuato (eritrocitario) si svolge all'interno del globulo rosso: il merozoite si muta in trofozoite (forma vegetativa) e poi in schizonte, per produrre altri merozoiti (dai 6 ai 36 per ogni schizonte), che rompono l'eritrocita, si liberano in circolo e ne infettano altri. Il ciclo si ripete ogni 48 ore per il *P. falciparum*, il *P. vivax* ed il *P. ovale*, e ogni 72 ore per il *P. malariae*. Nelle infezioni da *P. vivax* e *P. ovale* parte degli sporozoiiti possono persistere quiescenti nelle cellule epatiche (ipnozoiti, forme "dormienti"), e riattivandosi ciclicamente possono dare ricadute settimanali e/o mensili dopo la prima infezione. Dopo vari cicli, alcuni trofozoiti si differenziano in forme eritrocitarie sessuate (gametociti). Sono queste le forme che permettono il mantenimento del ciclo del plasmodio: l'uomo è il serbatoio dei gametociti da dove pescano le zanzare. Il microgametocita (maschio) e il macrogametocita (femmina) vengono ingeriti dall'*Anopheles* quando punge un individuo infetto. Il ciclo sessuato nella zanzara è detto sporogonico. Nello stomaco dell'insetto, i gametociti escono dal globulo rosso che li ospita: il nucleo del microgametocita subisce numerose divisioni mitotiche e forma tanti microgameti maschi, flagellati. Il macrogametocita matura nel gamete femminile e richiama i microgameti uno dei quali lo feconda e genera lo zigote, che successivamente evolve in oocinete. L'oocinete invade la parete dell'intestino della zanzara, dove diventa oocisti. L'oocisti cresce, si rompe, e libera gli sporozoiiti, che raggiungono le ghiandole salivari della zanzara e vengono inoculati nell'uomo alla successiva puntura. Il ciclo poi ricomincia daccapo. Il ciclo vitale del plasmodio⁴⁷ è riassunto nella Figura 25.

dare il cosiddetto cinchonismo (nausea, tinnito). È simile alla chinidina, farmaco anti-aritmico impiegato in cardiologia, quindi può dare aritmie fatali (fibrillazioni ventricolari, torsioni di punta) per allungamento del tratto Q-T.

- *Cloroquina fosfato*: è schizonticida ematico ed è efficace contro il P.vivax, P.ovale, P.malariae e contro i ceppi del P. falciparum sensibili (CQ-S). Si può usare anche nella profilassi. Ha molta affinità per la melanina perciò si può accumulare nei tessuti pigmentati (cute, retina), pertanto può dare prurito nei pazienti di pelle nera e può dare retinopatia. Gli effetti collaterali più comuni e reversibili sono gastro-enterici (nausea, vomito, diarrea, dolore addominale). Può dare manifestazioni neurologiche (psicosi, convulsioni).

- *Doxiciclina*: è un antibiotico che appartiene al gruppo delle tetracicline, che ha anche attività schizonticida ematica contro il P.falciparum e probabilmente anche contro gli altri plasmodi. Si può usare sia per nella cura sia nella profilassi. Si usa per il trattamento delle forme meflochino-resistenti (per es. in Thailandia). È controindicata nei bambini sotto i 12 anni di età e in gravidanza poiché si fissa nelle ossa ed interferisce con le terapie anticoagulanti orali.

- *Pirimetamina-sulfadossina (Fansidar)*: la combinazione di pirimetamina e sulfadossina (P/S) consente un'azione sinergica sul plasmodio perché interferisce sul metabolismo dei folati in due punti diversi. Agisce solo sulle forme intra-eritrocitarie asessuate soprattutto del P.falciparum e di meno su quelle del P.vivax. L'impiego è ormai limitato al solo trattamento perché le eventuali reazioni avverse, abbastanza frequenti, non lo rendono maneggevole per la profilassi e poiché i ceppi resistenti a P/S sono ormai molto diffusi nel mondo, anche in terapia non viene più impiegata di routine.

- *Meflochina (Lariam)*: si può usare nella profilassi e nella terapia contro i ceppi del P.falciparum CQ-R. È tra i farmaci malarici meglio tollerati. Gli effetti collaterali più frequenti, a dosi terapeutiche sono nausea, vomito, diarrea, vertigini, cefalea, e sono per lo più dose-dipendenti. In alcuni casi ha indotto psicosi.

- *Alofantrina (Halfan)*: è utilizzata contro i ceppi molto resistenti, e mostra resistenza e sensibilità crociata con la meflochina. Non si usa nella profilassi e non si deve usare nei pazienti che hanno fatto la profilassi con meflochina. Come effetti collaterali, può dare ipotensione ortostatica e aritmie cardiache fatali per allungamento del tratto Q-T, pertanto è controindicata nei cardiopatici e negli aritmici. È controindicata in gravidanza.

- *Proguanil (Paludrine)*: è un inibitore del metabolismo dei folati dei plasmodi. È uno dei farmaci antimalarici più sicuri. Ha una debole azione schizonticida, ematica e tissutale. Si usa prevalentemente nella profilassi, da solo o in combinazione con la cloroquina. È controindicato nell'insufficienza renale e in pazienti con ipersensibilità nota al farmaco.

- *Primachina*: non si impiega per il trattamento delle forme acute, ma per la bonifica dalle forme intraepatiche (ipnozoiti) del *P.vivax* e del *P.ovale*, per prevenire le recidive. Induce emolisi.

- *Artemisinina e suoi derivati*: l'artemisinina è uno schizonticida ematico molto potente e rapido; la diidro-artemisinina è un altro derivato per terapia orale; l'artemetere è un derivato dell'artemisinina che è disponibile per terapia orale e intramuscolare. L'artesunato si trova in formulazione per terapia endovenosa o intramuscolare. Sono farmaci generalmente ben tollerati: possono dare episodi di febbre iatrogena. Possono essere tossici per il feto nel primo trimestre di gravidanza. Sono particolarmente attivi contro i ceppi CQ-R.

La chemio-profilassi antimalarica si basa sul principio secondo il quale si raggiunge e si mantiene una concentrazione plasmatica di un farmaco anti-malarico a livelli bassi, tali per avere effetti curativi ed essere sufficienti a impedire che si sviluppi la malattia dopo una puntura della zanzara e l'infezione da parte del plasmodio. Tale concentrazione deve essere mantenuta per tutto il periodo in cui si è potenzialmente esposti alla malattia, cioè per tutto il periodo di permanenza in zona malarica e fino almeno a 4 settimane dopo il ritorno, pertanto, solitamente, si inizia la profilassi per tempo, 1 o 2 settimane prima di partire. Per la profilassi in zone malariche dove esistono ceppi clorochino-sensibili, si impiega efficacemente la

cloroquina. Per la profilassi in zone malariche dove si sono sviluppati ceppi clorochino-resistenti, si impiega la meflochina. Per la profilassi in zone malariche dove esistono ceppi resistenti alla cloroquina e alla meflochina (per es. in zone della Thailandia) si impiega la doxiciclina.

Le difficoltà associate alla preparazione di un efficace cura contro la malaria sono dovute, non solo alla complessità di questa patologia e alla variabilità delle sue manifestazioni cliniche nelle differenti zone del mondo, ma, soprattutto, all'insorgenza di resistenza in alcuni ceppi del Pf in seguito all'uso continuato di alcuni farmaci (cloroquina, meflochina).

In particolare, lo sviluppo e la diffusione di ceppi resistenti ai farmaci hanno causato l'insorgenza della malaria in quelle aree dove tale patologia era stata sradicata e della sua diffusione in nuove aree⁴⁸. La resistenza si è diffusa più velocemente di quanto i nuovi farmaci antimalarici sono stati sviluppati (il mercato dei farmaci antimalarici era molto ridotto prima dei finanziamenti pubblici) e, il numero di farmaci efficaci, disponibili per l'attuale terapia contro i ceppi resistenti, rimane esiguo. Quindi, la farmaco-resistenza ha indotto a sviluppare nuove strategie terapeutiche ed in particolare, ad identificare nuovi composti più efficaci, più sicuri, e strutturalmente non correlati agli agenti antimalarici già esistenti⁴⁹.

3.2 BASI MOLECOLARI DELLA PROGETTAZIONE DI NUOVI AGENTI ANTIMALARICI

Durante la fase intra-eritrocitaria del ciclo vitale del Pf, l'eme libero, prodotto dalla degradazione dell'emoglobina, è rilasciato nel vacuolo digestivo (VD), compartimento del parassita a pH acido (~ 5.5). A causa della sua alta tossicità, l'eliminazione dell'eme libero rappresenta una fase cruciale per la sopravvivenza del Pf ed anche piccole interferenze con i suoi meccanismi di detossificazione, possono portare alla morte del Pf, a causa della generazione di specie radicaliche. Il principale sistema di detossificazione dell'eme libero è la sua polimerizzazione in emozoina⁵⁰, specie non più reattiva dal punto di vista redox, che provvede all'eliminazione della maggior parte di eme nel VD; l'eme libero rimanente, invece, diffonde nel citoplasma attraverso la membrana del VD, dove è inattivato dai sistemi redox del glutatione e della tioredoxina⁵¹. L'interazione con l'eme libero e la conseguente alterazione degli equilibri redox necessari per la sopravvivenza del Pf rappresenta uno dei meccanismi ipotizzati per l'attività antimalarica di due delle più potenti classi di antimalarici conosciuti fino ad oggi, le 4-ammino-chinoline e gli endoperossidi⁵². Quindi, l'interazione con l'eme libero, la formazione di specie radicaliche e la conseguente induzione di stress ossidativo, possono rappresentare un approccio valido per la progettazione di nuovi agenti antimalarici e, a causa della mancanza, di un target proteico specifico, può far diminuire la possibilità di indurre la resistenza in seguito al continuato uso di un agente antimalarico.

Sulla base di questa ipotesi, il mio lavoro di dottorato si è incentrato, attraverso studi di modellistica molecolare, sullo sviluppo di nuovi agenti antimalarici efficaci, sicuri e facili da sintetizzare a partire dalla struttura del clotrimazolo (CLT), della plakortina (PLK) e della cloroquina (CQ) e, quindi, sulla determinazione dei requisiti strutturali in grado di conferire a queste nuove classi di antimalarici una potente attività antimalarica contro i ceppi resistenti.

3.3 RISULTATI E DISCUSSIONE

3.3a Progettazione di potenti agenti antimalarici basati sulla struttura del clotrimazolo e sviluppo di un farmacoforo innovativo

Prendendo in considerazione l'ipotesi descritta nel paragrafo precedente, il CLT (**2**, Figura 26) è stato scelto come composto di riferimento per lo sviluppo di nuovi agenti antimalarici, sia per le sue proprietà antimalariche già evidenziate in letteratura⁵³⁻⁵⁴ sia sulla base dell'ipotesi che esso possa interagire, attraverso il suo gruppo imidazolico con il ferro dell'eme, e, di conseguenza, possa generare un radicale tritilico.

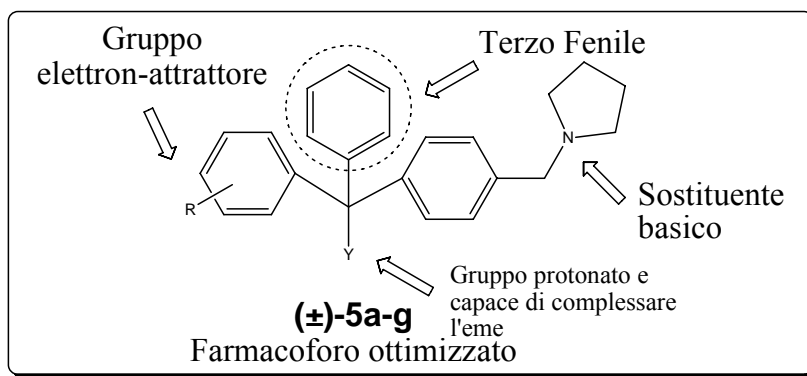
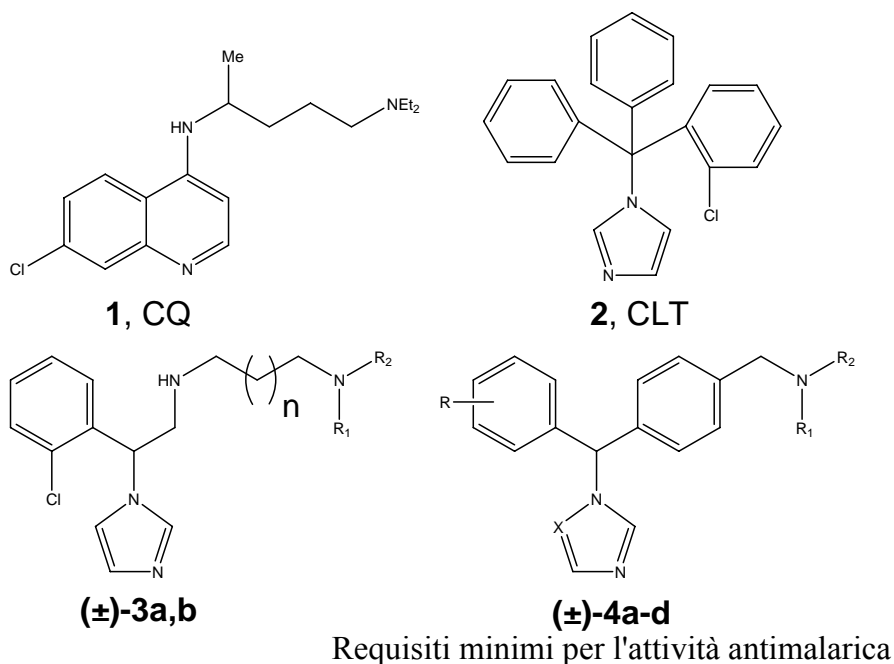


Figura 26. Struttura della CQ, del CLT e dei composti **3a-b**, **4a-d**, **5a-g**, e **14b**.

Il CLT ha mostrato una significativa attività antimalarica in vitro (W2, $IC_{50} = 0.55 \mu M$)⁵³⁻⁵⁴.

Diversi studi hanno cercato di chiarire il suo meccanismo d'azione e hanno dimostrato che il CLT è capace di inibire la polimerizzazione dell'eme libero in emozoina e di formare in vitro complessi con l'eme, nei quali l'anello imidazolico si comporta come un ligando assiale del Fe(III)⁵⁵.

Inoltre, è stato dimostrato che il CLT, in complesso con l'eme, induce emolisi con una potenza dieci volte superiore rispetto alla CQ⁵⁶ e, in presenza di H₂O₂ inibisce la emoperossidasi del Pf, proteina che contiene l'eme come gruppo prostetico, attraverso un meccanismo di tipo radicalico basato sulla formazione di un prodotto di ossidazione del CLT, il radicale tritilico⁵⁷.

Quindi, sulla base delle sue proprietà e dell'ipotesi sopra menzionate, ed al fine di identificare i requisiti strutturali minimi responsabili per l'attività antimalarica, la struttura del CLT è stata modificata (Figura 26: composti **3a-b**, **4a-d**, **5a-g**, e **14b** ((Campiani et al. EP06005307.1)), attraverso studi di modellistica molecolare, andando a modulare : i) la propensione a formare radicali attivi; ii) l'abilità di interagire selettivamente con l'eme libero e iii) il tropismo per il VD del Pf. (Figura26, Tabella 12).

Tutti i composti progettati (**3a-b**, **4a-d**, **5a-g**, e **14b**) sono stati sottoposti a saggi farmacologici per valutare la loro attività antimalarica su una serie diversa di ceppi del Pf, CQ-S, quali D10 e 3D7, e CQ-R, quali W2 e K1.

L'attività antimalarica ($IC_{50} \mu M$) è stata quantificata sulla base dell'inibizione di crescita del parassita, misurata per i ceppi D10 e W2 con la produzione di lattato deidrogenasi da parte del parassita⁵⁸ e per i ceppi 3D7 e K1 con l'incorporazione di [³H]-ipoxantine⁵⁹ (Tabella 12).

Tabella 12. Attività antiplasmodica dei composti **3a-b**, **4a-d**, **5a-g**, e **14b**

Comp	n	R	R ₁	R ₂	X	Y	Forma ionica prevalente ^a		D10 ^c	W2 ^d	3D7 ^c	K1 ^d
							(% at pH 7.4 ^b)	(% at pH 5.5 ^b)				
3a	1	-	Et	Et	-	-	DP (50.5)	TP (86.6)	n.t. ^f	n.t.	1.90	3.08
3b	0	-	-	-(CH ₂) ₄ -	-	-	P (80.5)	TP (79.9)	n.t.	n.t.	2.61	0.92
4a	-	2-Cl	-	-(CH ₂) ₄ -	CH	-	P (91.6)	DP (87.1)	2.18	1.70	0.011	0.11
4b	-	3-Cl	-	-(CH ₂) ₄ -	CH	-	P (89.4)	DP (89.9)	1.42	1.03	0.11	0.20
4c	-	4-Cl	-	-(CH ₂) ₄ -	CH	-	P (88.8)	DP (90.5)	1.66	1.13	0.31	0.17
4d	-	2-Cl	Et	Et	N	-	P (99.4)	P (99.9)	>10	>10	>10	0.79
5a	-	3-Cl	-	-	-	1H-imidazolo	P (93.1)	DP (84.0)	0.23	0.10	0.047	0.023
5b	-	4-Cl	-	-	-	1H-imidazolo	P (92.7)	DP (84.9)	0.27	0.15	0.0023	0.0046
5c	-	4-Cl	-	-	-	1H-1,2,4-triazolo	P (99.1)	P (99.9)	6.92	3.83	8.91	2.15
5d	-	4-Cl	-	-	-	pirrolidina	DP (62.3)	DP (99.2)	n.t.	n.t.	0.94	1.99
5e	-	4-Cl	-	-	-	CN	P (99.1)	P (100)	n.t.	n.t.	5.07	2.64
5f	-	4-	-	-	-	1H-imidazolo	P (90.7)	DP (88.4)	2.04	1.84	8.13	5.93
5g	-	OMe 4-Cl	-	-	-	-CH ₂ -1H-imidazolo	P (83.3)	DP (93.9)	n.t.	n.t.	0.75	0.52
14b	-	4-Cl	-	-	-	OH	P (99.5)	P (100)	n.t.	n.t.	>10	2.17
CLT, 2	-	-	-	-	-	-	N (95.0)	P (80.6)	0.55	0.49	0.060	0.25
CQ, 1	-	-	-	-	-	-	P (91.9)	DP (87.4)	0.022	0.28	0.010	0.26

^aTP = forma triprotonata DP = forma diprotonata, P = forma protonata, N = forma neutra (ACD/pKa DB version 9.00 software (Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Canada). ^b Tra parentesi la percentuale di forma ionica prevalente. ^cceppi CQ-S. ^dceppi CQ-R. ^eI valori di IC₅₀ sono la media di almeno tre determinazioni. ^fn.t. = Non testato.

Al fine di valutare il ruolo del sistema trifenilmetil del CLT per l'attività antimalarica, sono state progettate tre serie di composti (**3-5**) caratterizzate rispettivamente dalla presenza di: un gruppo fenilmetil (**3a-b**), un gruppo difenilmetil (**4a-d**) o un gruppo trifenilmetil (**5a-g**). In generale, la tendenza dell'attività antimalarica di queste tre serie è risultata essere la seguente: trifenilmetil (**5**) > difenilmetil (**4**) > fenilmetil (**3**). In particolare, i composti (**3a-b**) sono risultati essere significativamente meno attivi del CLT sia contro i ceppi CQ-S che contro i ceppi CQ-R, mentre un aumento di attività è stato notato quando è stato introdotto un secondo sostituente fenilico. I valori di IC₅₀ dei composti **4a-d** sono risultati essere nell'ordine tra i 0.01 μM e i 0.30 μM contro i ceppi del Pf 3D7 e K1, suggerendo che la presenza di un gruppo difenilmetil è un requisito minimo strutturale per l'attività antimalarica. Infine, quando è stato introdotto un ulteriore anello aromatico, l'attività

antimalarica è aumentata fortemente (Tabella 12: **5a vs 4b** e **5b vs 4c**) raggiungendo valori di IC_{50} sui ceppi CQ-S e CQ-R migliori sia del CLT che della CQ (Tabella 12) .

Una volta stabilito il ruolo fondamentale del sistema trifenilmetil, è stato valutato l'effetto dei sostituenti di diversa natura sulle proprietà elettroniche dei sistemi aromatici e quindi, sull'attività antimalarica. I dati farmacologici hanno confermato i risultati ottenuti dai calcoli quanto-meccanici sulla stabilità dei radicali in presenza dei diversi sostituenti. In particolare, mentre il cloro, gruppo elettron-attrattore, nelle posizioni orto, meta e para ha mostrato un debole effetto sull'attività dei composti **4a-c**, nella serie triarilmetil (**5**) esso è risultato essere responsabile, in base alla sua posizione, di una fine regolazione dell'attività antimalarica sia sui ceppi CQ-S che su quelli CQ-R (**5a vs 5b**). Inoltre, quando il cloro, gruppo elettron-attrattore, è stato sostituito con il gruppo metossi, elettron-donatore, (**5b vs 5f**) è stata osservata una perdita drammatica di attività in perfetto accordo con i risultati dei calcoli quanto-meccanici che avevano evidenziato la minore stabilità (1 kcal/Mol) del radicale para-metossi tritil rispetto al radicale para-cloro tritil.

Tenendo sempre in considerazione il meccanismo d'azione di tipo radicalico ipotizzato per il CLT (vedi inizio paragrafo), è stato studiato anche il ruolo dell'anello imidazolico per l'attività antimalarica in quanto gruppo responsabile dell'interazione con il ferro dell'eme e della generazione di un possibile radicale. La sostituzione dell'anello imidazolico sia con la pirrolidina (**5d**), un gruppo non capace di coordinare il ferro, sia con i gruppi idrossi (**14b**), ciano (**5e**) e triazolico (**4d** e **4c**), gruppi capaci di coordinare il ferro e presenti in diversi agenti antifungini, ha causato una drastica perdita di attività. Inoltre, una diminuzione di attività sia sui ceppi CQ-S che CQ-R è stata registrata anche quando il gruppo imidazolico è stato legato al sistema triarylmetil attraverso un ponte metilenico (**5b vs 5g**). Questi risultati hanno dimostrato il ruolo cruciale dell'imidazolo per l'attività antimalarica, facendo ipotizzare un doppio ruolo, quello di gruppo responsabile della formazione del complesso con l'eme, confermato dal fatto che è nota la sua capacità di dare una forte interazione con il

Fe (III) e quello di substrato di una reazione di ossidazione “*one electron*”, ipotizzabile sulla base della sua capacità di protonarsi al pH del vacuolo digestivo (5.5) rispetto agli altri gruppi coordinanti il ferro presi in considerazione (ACD/pKa DB version 9.00 software, Tabella 12).

E' noto che il CLT svolge la sua attività antimicotica attraverso l'inibizione del citocromo P450 14 α -lanosterol-demetilasi (14-LD). Inoltre, l'interazione con i citocromi umani P450 e, la conseguente interferenza con il suo metabolismo e quello di molecole endogene ed esogene, rappresentano un suo limite per la somministrazione sistemica. L'inibizione dei citocromi P450 è legata alla sua capacità di legare il ferro dell'eme nello stato ferrico attraverso l'azoto dell'anello imidazolico. Sulla base di queste conoscenze, una volta stabilito i requisiti strutturali minimi, il principale obiettivo di questo lavoro è stato quello di progettare nuovi agenti antimalarici, strutturalmente correlati al CLT, selettivi per l'eme libero e, quindi con effetti collaterali minimizzati. A tal proposito, il CLT è stato sottoposto a studi di *docking* flessibile nel modello della 14-LD di *C. Albicans*⁶⁰ (per i dettagli vedere parte sperimentale paragrafo 3.5a). Quindi, poiché le caratteristiche chimico-fisiche e steriche dei residui presenti nel sito attivo non sono le sole determinanti per la selettività del substrato, ma, possono avere un ruolo chiave anche le proprietà dei residui aminoacidici presenti a livello della superficie esterna e a livello del canale di accesso del substrato⁶¹, sono stati presi in considerazione in questi studi tutti gli aminoacidi presenti sia nel sito attivo che sulla sua superficie esterna. Gli studi di *docking* hanno evidenziato la presenza nel sito attivo di un aminoacido carico positivamente quale la K108 (Figura 27 A) e la presenza di diversi aminoacidi carichi positivamente a livello del canale di accesso del substrato (Figura 27 B e C). Dalle analisi bioinformatiche (vedere parte sperimentale paragrafo 3.5a) la maggior parte dei residui carichi positivamente identificati nella 14-LD di *C. Albicans*, incluso la K108, sono risultati essere conservati negli ortologi P450 di altri funghi e, inoltre, sovrapponendo il modello del complesso CLT/14-LD sul citocromo

CYP3A4 umano (codice PDB: 1W0E) (Figura 27 A), il più importante enzima nel metabolismo umano, è emerso che due residui di arginina occupano la stessa regione della K108.

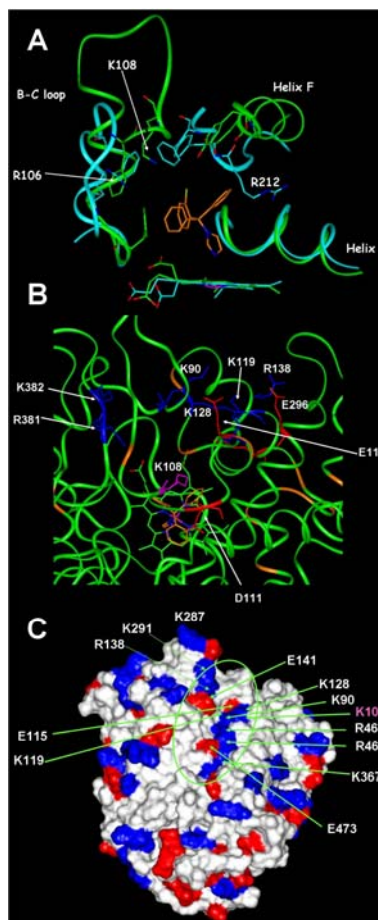


Figura 27. (A) Sovrapposizione del complesso CLT (arancione)/14-LD (verde) e della struttura cristallografica del citocromo umano P450 3A4 (celeste). Sono evidenziati gli aminoacidi carichi positivamente. Gli eteroatomi sono colorati: O = rosso, N = blu, Fe = magenta e Cl = verde chiaro. (B) Zoom del possibile canale di accesso del substrato. Sono evidenziati gli aminoacidi mutati (arancione), positivi (blu) e negativi (rossi). La lisina K108 è colorata in magenta. (C) Superficie di Connolly del modello della 14-LD: gli aminoacidi positivi, negativi, e neutri sono colorati rispettivamente in blu, rosso, e bianco.

Tabella 13. Attività antimicotica dei composti **4a**, **4b**, **4c**, **5b** e del CLT.

Quindi, sulla base dei risultati di questi studi di *docking* e delle analisi bioinformatiche, è stato introdotto nel farmacoforo già delineato, un sostituito basico, protonato a pH fisiologico, al fine di aumentare la selettività per l'eme libero rispetto all'eme come gruppo prostetico dei citocromi P450 (**4a**, **4b**, **4c** e **5b**). Questi risultati sono stati confermati dai saggi farmacologici eseguiti su questi composti per valutare la loro attività antifungina contro una serie diversa di funghi (*Aspergillus* spp., *Candida* spp. e *Cryptococcus neoformans*).

Come mostrato in Tabella 13 , tutti i composti, aventi un sostituito pirrolidinilmetil, sono risultati essere inattivi come antifungini.

Tabella 13. Attività antimicotica dei composti **4a**, **4b**, **4c**, **5b** e del **CLT**.

	4a MIC ^a	4b MIC	4c MIC	5b MIC	CLT, 2 MIC
<i>C. albicans</i>	>32	>32	>32	32	0.03
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	>32	>32	>32	16	2
<i>C. parapsilosi</i> ATCC 22019	>32	>32	>32	32	2
<i>C. neoformans</i>	>32	>32	>32	>32	2
<i>A. flavus</i> ATCC 204304	>32	>32	>32	>32	4
<i>A. fumigatus</i>	>32	>32	>32	>32	4
<i>A. fumigatus</i> R	>32	>32	>32	>32	4

^a Concentrazione minima di inibizione ($\mu\text{g/mL}$) calcolata dopo 24h di esposizione e i risultati sono stati confermati dopo 48h di esposizione.

Si deve evidenziare che un sostituito basico, protonato a pH fisiologico, è stato introdotto razionalmente anche per aumentare il tropismo verso il vacuolo digestivo del plasmodio. Infatti, al fine di raggiungere potenti attività sia sui ceppi CQ-S che CQ-R, un agente antimalarico dovrebbe accumularsi rapidamente ed attivarsi esclusivamente nel microambiente del VD del Pf (pH di 5.5, presenza di eme libero e potenziale redox di -250 mV) generando specie radicaliche. Quindi, si è pensato di introdurre un gruppo basico, protonabile a pH fisiologico (Tabella 12), in una struttura già contenente l'imidazolo, un gruppo protonabile solo al pH del VD (5.5) (Tabella 12). Tale combinazione ha permesso di ottenere composti monoprottonati a pH fisiologico capaci di penetrare facilmente nell'eritrocita infettato, che diprotonandosi a pH 5.5, sono capaci di accumularsi nel VD del Pf, mostrando una potente attività antimalarica (**5a** e **5b** vs CLT).

La combinazione di tutti i requisiti strutturali evidenziati sopra (Figura 26) ha portato alla progettazione di **5b** (3D7, $K_i = 2.3 \text{ nM}$ and K1, $K_i = 4.6 \text{ nM}$), composto più potente della CQ e del CLT sui ceppi CQ-R.

Il composto **5b** è stato sottoposto ai saggi di inibizione della formazione di β -ematina attraverso l'uso del saggio BHIA (β -hematin inhibitory activity: emina in dimetil sulfossido-acetato a pH 5.0, 37 °C, 18 h), mostrando una capacità di inibire in maniera dose-dipendente la formazione di β -ematina (Tabella 14).

Tabella 14. Saggi di inibizione di formazione di β -ematina sui composti: **5b**, CLT e CQ.

Composti	IC ₅₀ (μ M) ^a
5b	2.53
CLT, 2	2.50
CQ, 1	1.69

^a I valori di IC₅₀ sono la media di almeno tre determinazione.

In accordo con l'ipotesi di progettazione, sebbene il composto **5b** sia risultato più potente del CLT sui differenti ceppi del Pf, ha mostrato un'attività di inibizione di formazione di β -ematina simile a quella del CLT, confermando l'ipotesi che **5b** si potrebbe accumulare nel VD del Pf di più rispetto al CLT (Tabella 14). Inoltre, sebbene il composto **5b** e la CQ presentino un simile stato di protonazione sia a pH fisiologico che a pH del VD del Pf (Tabella 12), la migliore attività antimalarica del composto **5b** rispetto alla CQ, confrontata alla loro potenza inibitoria nei saggi BHIA, ha confermato che questa classe di agenti antimalarici, strutturalmente correlati al CLT, possa avere un meccanismo d'azione di tipo radicalico, oltre al solo meccanismo di inibizione della formazione di emozoina.

3.3b Derivati endoperossidici estratti da organismi marini: identificazione dei requisiti strutturali necessari per l'attività antimalarica e ipotesi di meccanismo d'azione

Sulla base dell'ipotesi di voler progettare nuovi agenti antimalarici capaci di interagire con il ferro dell'eme libero, di formare specie radicaliche e di indurre, di conseguenza, lo stress ossidativo nel Pf, è stata sviluppata una nuova serie di derivati 1,2-diossanici.

L'artemisinina, un lattone sesquiterpene contenente un ciclo perossidico estratto dalla pianta *Artemisia annua*, ha mostrato un'attività migliore sui ceppi CQ-R che sui ceppi CQ-S (D10 IC₅₀=0.05 μ M; W2 IC₅₀=0.01 μ M), ma il suo sviluppo e quello dei suoi derivati, è stato

limitato a causa degli alti costi necessari per la sua estrazione e a causa della complessità della sua sintesi chimica⁶². Per questo motivo, sono stati preferiti ad essa, come composti di riferimento per lo sviluppo di nuovi agenti antimalarici la plakortina (**1**) e i suoi derivati naturali⁶³⁻⁶⁵ diidroplakortina (**2**), epiplakortina (**3**) e plakortide Q (**4**) (Figura 28).

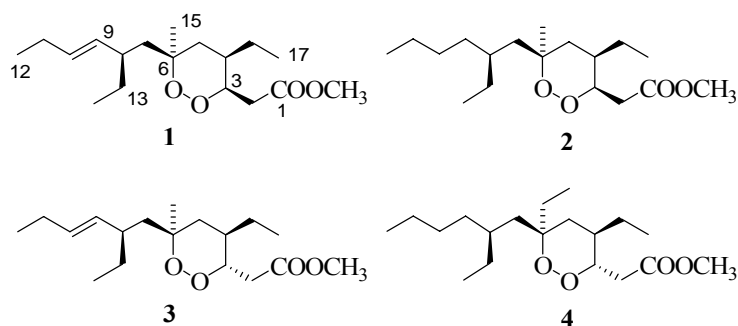
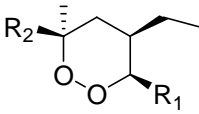
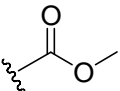
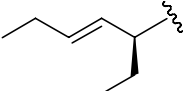
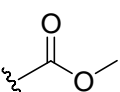
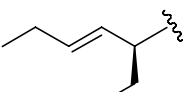
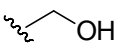
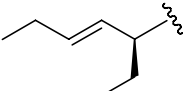
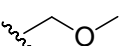
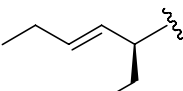
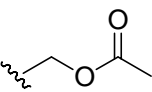
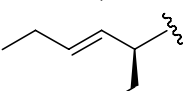
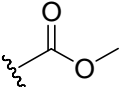
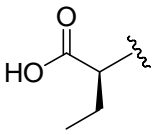
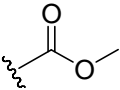
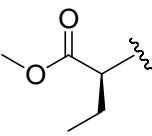
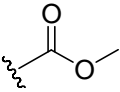
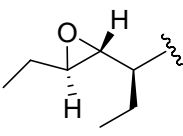
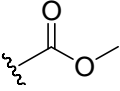
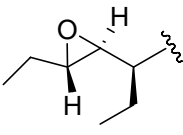


Figura 28. Strutture della plakortina (**1**), diidroplakortina (**2**), epiplakortina (**3**) e plakortide Q (**4**).

Essi sono dei derivati 1,2-diossanicici estratti dalla spugna marina Caraibica “*Plakortis simplex*” caratterizzati da: i) una struttura chimica semplificata rispetto all’artemisinina anche se con diversi stereocentri; ii) un’attività antimalarica nell’ordine dei submicromolari sia sui ceppi CQ-S che CQ-R⁶³⁻⁶⁵ (Tabella 15), iii) assenza di citotossicità⁶³⁻⁶⁴ e iv) presenza di gruppi funzionali facilmente modificabili quali il legame cicloperossidico, il doppio legame e il gruppo estereo.

Al fine di ottenere per questa nuova classe le necessarie relazioni struttura-attività (SARs), tali gruppi funzionali sono stati modificati, progettando in tal modo nuovi derivati semisintetici della plakortina (**5-12**) (Campiani et al EP060053063). Per valutare l’attività antimalarica in vitro sia sui ceppi CQ-S (D10) che CQ-R (W2), i nuovi derivati **5-12** sono stati sottoposti al saggio farmacologico pLDH. I risultati farmacologici sono riportati in Tabella 15.

Tabella 15 Attività antimalarica in vitro della plakortina (**1**), dei derivati naturali **2-4** e dei derivati semisintetici **5-12** contro i ceppi del *Plasmodium falciparum* D10 (CQ-S) and W2 (CQ-R).

				
	R ₁	R ₂	D10 IC ₅₀ in μM	W2 IC ₅₀ in μM
1			0.87 ± 0.22	0.41 ± 0.13
Diidroplakortina (2)	-	-	0.91 ± 0.20	0.51 ± 0.12
Epiplakortina (3)	-	-	1.06 ± 0.21	0.71 ± 0.13
Plakortide Q (4)	-	-	1.01 ± 0.20	0.56 ± 0.12
5^a			> 20	> 20
6			0.83 ± 0.12	0.48 ± 0.11
7			0.74 ± 0.25	0.41 ± 0.10
8			0.84 ± 0.20	0.46 ± 0.12
9			1.20 ± 0.20	1.23 ± 0.12
10			0.85 ± 0.18	0.78 ± 0.13
11			1.05 ± 0.13	0.50 ± 0.15
12			1.20 ± 0.13	0.70 ± 0.10
Cloroquina			0.05 ± 0.02	0.81 ± 0.31
Artemisinina			0.013 ± 0.004	0.009 ± 0.005

^a La funzione cicloperossidica è sostituita da una funzione diolica.

I dati farmacologici hanno evidenziato la completa inefficacia del derivato diolico **5**, dimostrando che, come riportato per l'artemisinina, il gruppo funzionale cicloperossidico gioca un ruolo chiave nell'attività antimalarica dei derivati 1,2-diossani. Inoltre, tutti i

nuovi composti semi-sintetici sono risultati essere più attivi sui ceppi W2 (CQ-R) che sui ceppi D10 (CQ-S), con l'eccezione del derivato **9** che ha mostrato un'attività simile su entrambi i ceppi.

Andando nel particolare, i risultati farmacologici hanno evidenziato altri aspetti molto interessanti quali: i) la sostituzione della funzione esterea (**1**) con il gruppo idrossi (**6**), metossi (**7**) e acetossi (**8**) non ha determinato nessun effetto né sull'attività antimalarica né sulla selettività verso uno specifico ceppo del Pf, anzi questi derivati hanno mostrato una collinearità nella variazione di attività tra i ceppi D10 (CQ-S) e W2 (CQ-R); ii) i cambiamenti sulla catena laterale "ovest" hanno determinato variazioni nelle attività antimalariche, influenzando diversamente l'attività sui ceppi D10 (CQ-S) e W2 (CQ-R). In particolare, la diminuzione di attività del composto **9** su entrambi i ceppi ha suggerito che la presenza di una funzione carbossilica determina un peggioramento delle proprietà farmacocinetiche e, in accordo con tale ipotesi, l'esterificazione del gruppo carbossilico (**10**) ha determinato un leggero miglioramento dell'attività antimalarica. D'altro canto, sebbene i derivati **11** e **12** abbiano mostrato un'attività simile a quella del derivato **9** sul ceppo D10 (CQ-S), essi sono risultati essere due volte più attivi sul ceppo W2 (CQ-R). I dati presenti in letteratura, relativi ad analoghi strutturali della plakortina, hanno confermato l'importanza della catena laterale "ovest" per l'attività antimalarica: i composti **17** e **18** (Figura 29) hanno mostrato un'attività antimalarica molto minore rispetto alla plakortina⁶⁶. In particolare, il composto **17** ha mostrato un'attività ridotta ($IC_{50} = 1.9 \mu M$) sul ceppo W2 (CQ-R), mentre il composto **18**, che differisce solo per l'assenza del gruppo chetonico, è risultato praticamente inattivo ($IC_{50} > 10 \mu M$) sul ceppo W2⁶⁶.

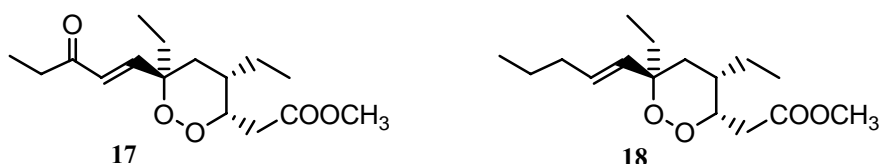


Figura 29. Strutture dei composti **17** e **18**⁶⁶

Sulla base di questi dati e, al fine di identificare i requisiti strutturali necessari per l'attività antimalarica, la plakortina e i suoi derivati naturali⁶³⁻⁶⁵, i suoi derivati di semisintesi **5-12**, e i composti 1,2-diossanicici aventi attività antimalarica presenti in letteratura **17-18**⁶⁶, sono stati sottoposti a calcoli di meccanica e dinamica molecolare ed, a calcoli quanto-meccanici (vedere parte sperimentale paragrafo 3.5b).

I conformeri ottenuti da questi studi computazionali sono stati raggruppati, sulla base della conformazione del ciclo diossanico, in quattro famiglie (Figura 30) chiamate: sedia A, sedia B, barca A e barca B (Tabella 16). In perfetto accordo con gli studi conformazionali eseguiti precedentemente sui cicli 1,2-diossanicici⁶⁷, tutti i composti, presi in considerazione, hanno mostrato una spiccata preferenza per le conformazioni a sedia, ed, in particolare, tutte le molecole (**1-4**, **6-12**) aventi una buona attività antimalarica ($IC_{50} < 1 \mu M$ sui ceppi CQ-R) hanno mostrato una preferenza conformazionale dell'anello diossanico per la sedia di tipo A (Tabella 16, Figura 30).

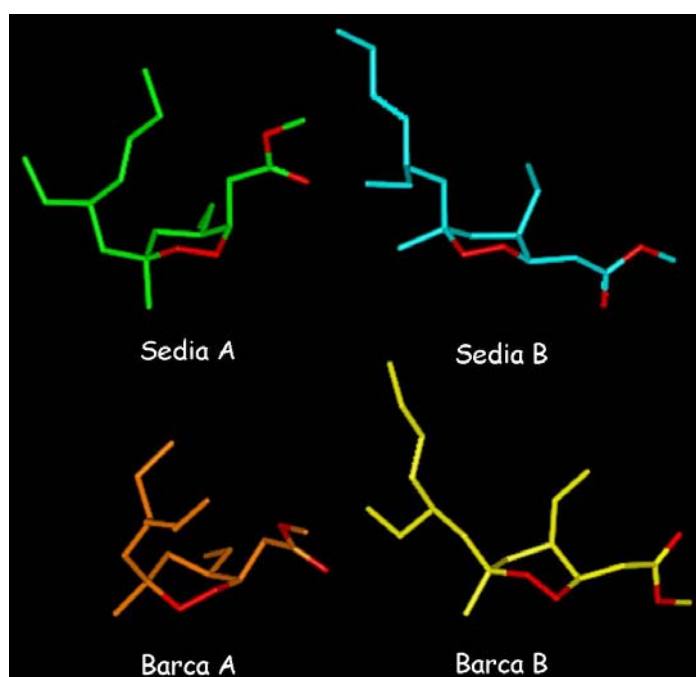


Figura 30. Minimi globali delle quattro famiglie della plakortina. I carboni sono in verde (sedia A), in celeste (sedia B), in arancione (barca A) e in giallo (barca B); gli ossigeni sono in rosso. Tutti gli idrogeni sono stati omessi per rendere la figura più chiara.

Tabella 16. Preferenze conformazionali degli anelli 1,2-diossanicici per i composti **1-4**, **6-12** e **17-18**.

Composti	Conformazioni dell'anello 1,2-Diossanicico	% di conformeri entro le 5 kcal/mol dal MG ^a	ΔE dal MG ^a dei conformeri a più bassa energia (kcal/mol)
1	Sedia A	92	0.00
	Sedia B	7	3.56
	Barca A	1	4.62
	Barca B	-	>5
2	Sedia A	82	0.00
	Sedia B	14	2.09
	Barca A	4	4.40
	Barca B	-	>5
3	Sedia A	95	0.00
	Sedia B	2.5	4.59
	Barca A	2.5	4.07
	Barca B	-	>5
4	Sedia A	98	0.00
	Sedia B	-	>5
	Barca A	2	4.49
	Barca B	-	>5
6	Sedia A	93	0.00
	Sedia B	7	4.39
	Barca A	-	>5
	Barca B	-	>5
7	Sedia A	86	0.00
	Sedia B	14	3.03
	Barca A	-	>5
	Boot B	-	>5
8	Sedia A	90	0.00
	Sedia B	10	3.53
	Barca A	-	>5
	Barca B	-	>5
9	Sedia A	77	0.00
	Sedia B	18	2.27
	Barca A	5	4.41
	Barca B	-	>5
10	Sedia A	97	0.00
	Sedia B	3	4.93
	Barca A	-	>5
	Barca B	-	>5
11	Sedia A	79	0.00
	Sedia B	21	3.61
	Barca A	-	>5
	Barca B	-	>5
12	Sedia A	84	0.00
	Sedia B	16	3.07
	Barca A	-	>5
	Boot B	-	>5
17	Sedia A	15	2.73
	Sedia B	78	0.00
	Barca A	-	>5
	Boot B	7	4.64
18	Sedia A	30	2.41
	Sedia B	64	0.00
	Barca A	-	>5
	Barca B	6	4.82

^a MG = minimo globale

Inoltre, deve essere sottolineato che, mentre l'epimerizzazione a livello del carbonio C-3 (composti **3** e **4**) non ha determinato nessun cambiamento sulla preferenza conformazionale dell'anello diossanico, il diverso comportamento conformazionale (Tabella 16) dei composti **17** e **18** è stato causato dall'epimerizzazione a livello del C-4, che ha cambiato l'orientazione relativa della catena etilica rispetto alla catena alchilica "ovest". L'effetto di ingombro sterico tra gli idrogeni dell'etile del C-4 e quelli dell'etile del C-6 ha reso la conformazione a sedia di tipo A dell'anello 1,2-diossanico sfavorita di circa 3 kcal/mol rispetto alla conformazione a sedia di tipo B (Figura 31).

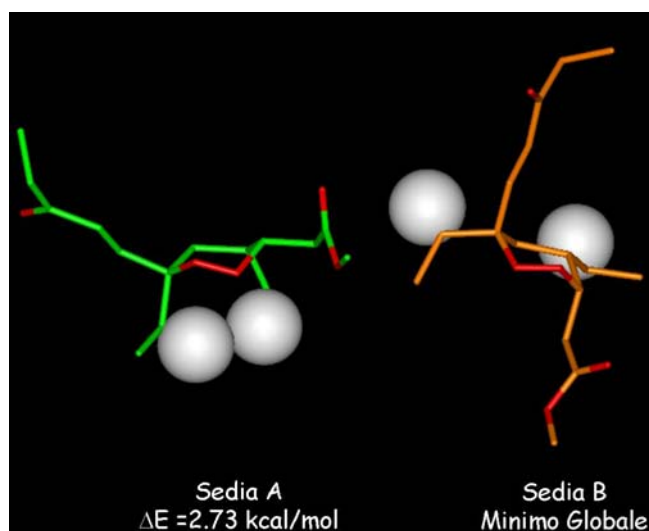


Figura 31. Confronto tra i conformeri a minima energia (Sedia A e Sedia B) del composto **17**. E' evidenziata la sovrapposizione dei volumi di vdW nel conformero a Sedia A degli idrogeni dei sostituenti etilici legati ai carboni C-4 e C-6. I carboni sono in verde (*Sedia A*) e in arancione (*Sedia B*); gli ossigeni sono in rosso. Gli idrogeni coinvolti nelle interazioni steriche sono mostrati come volumi di vdW colorati in bianco.

Infine, l'importanza della conformazione a sedia dell'anello endoperossidico dei derivati 1,2-diossanici è stata confermata dal confronto con la struttura dell'artemisinina. Infatti, la conformazione dell'anello diossanico della plakortina e dei suoi derivati, energeticamente più favorita (Sedia A), è risultata essere sovrapponibile, in maniera quasi perfetta, all'anello perossidico costretto dell'artemisinina (Figura 32) (vedere parte sperimentale paragrafo 3.5b).

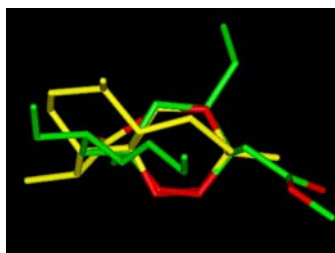


Figura 32. Sovrapposizione del minimo globale della Plakortina sulla struttura cristallografica dell'artemisinina (codice CSDS: QNGHSU). I carboni sono in verde (*PLK*) e in giallo (*artemisinina*); gli ossigeno sono in rosso. Tutti gli idrogeni sono omessi per rendere.

Il meccanismo d'azione della plakortina ed, in generale dei derivati 1,2-diossanici è ancora materia di dibattito. Comunque, gli studi eseguiti, oltre a confermare il ruolo cruciale dell'anello endoperossidico, hanno evidenziato altri requisiti strutturali fondamentali per l'attività antimalarica: i) la natura della catena alchilica "ovest"; ii) la conformazione dell'anello diossanico, iii) l'assenza di stereoselettività e iv) l'assoluta configurazione dei carboni stereogenici sull'anello 1,2-diossanico ma solo quando influenza la conformazione bioattiva dell'anello. Queste due ultime osservazioni, hanno suggerito l'assenza di un'interazione stereospecifica con un target molecolare del Pf, confermando, insieme al ruolo cruciale del legame endoperossidico, l'ipotesi di un meccanismo d'azione di tipo radicalico simile a quello proposto per l'artemisinina,.

Quindi, sulla base di questa ipotesi, al fine di progettare derivati sia con un'attività antimalarica migliore della plakortina sia con una struttura ancora più semplificata, è stato studiato il possibile meccanismo d'azione radicalico della plakortina e dei suoi derivati, prendendo in considerazione quello già proposto per l'artemisinina⁶⁸ (Figura 33). A tal proposito sono stati combinati studi ab-initio, eseguiti da gruppo del Prof. Barone, con analisi statistiche eseguite sui 500 conformeri della plakortina e della diidropalakortina, ottenuti dai calcoli di dinamica e meccanica molecolare, in modo tale da valutare sia la stabilità dei possibili radicali a livello degli ossigeni del legame endoperossidico sia la possibile evoluzione del radicale dagli ossigeni attraverso reazioni intramolecolari.

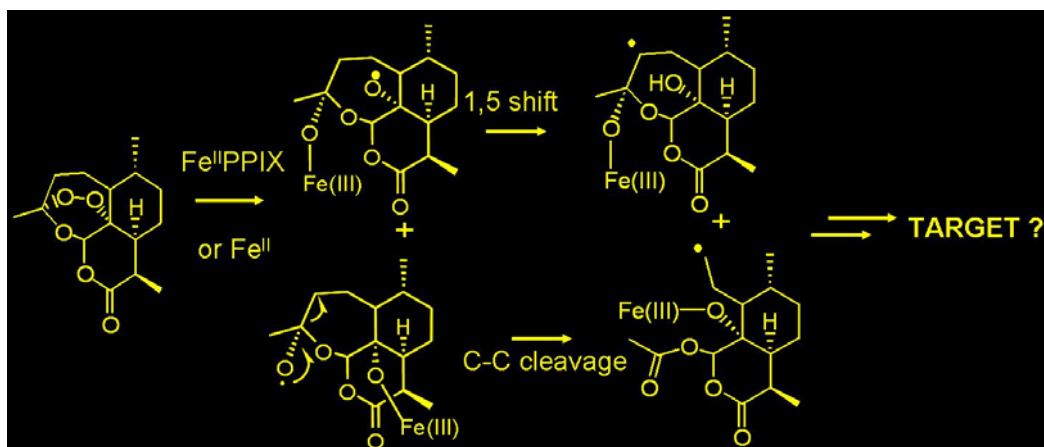


Figura 33. Meccanismo d'azione antimalarico proposto per l'artemisinina.

Dal momento che, gli studi ab-initio hanno dimostrato, per entrambi i composti, una maggior stabilità del radicale sull'ossigeno O1 (ossigeno vicino alla catena alchilica "ovest"), le analisi statistiche sono state eseguite sulle forme neutre e radicaliche della plakortina e della diidroplakortina, prendendo in considerazione tutti i loro conformeri entro le 5 kcal/mol dal minimo globale e tutti i possibili gruppi con una distanza inferiore ai 3 Å dall'ossigeno O1. Questi studi hanno dimostrato che il meccanismo d'azione più probabile per i derivati 1,2-diossanicici risulta essere il seguente: i) formazione del radicale sull'ossigeno O1 e ii) trasferimento di esso sulla catena alchilica "ovest", attraverso una reazione intramolecolare. In particolare, il doppio legame e il carbonio metilenico dell'etile presenti sulla catena "ovest", rispettivamente della plakortina e della diidroplakortina, sono risultati essere i gruppi più probabili come accettori del radicale dell'ossigeno O1 (Tabella 17). Tali risultati sono stati confermati dalla determinazione dei prodotti della reazione diretta della plakortina e della diidroplakortina con il FeCl₂, attraverso studi NMR eseguiti dal gruppo del prof. Ernesto Fattorusso (Figura 34).

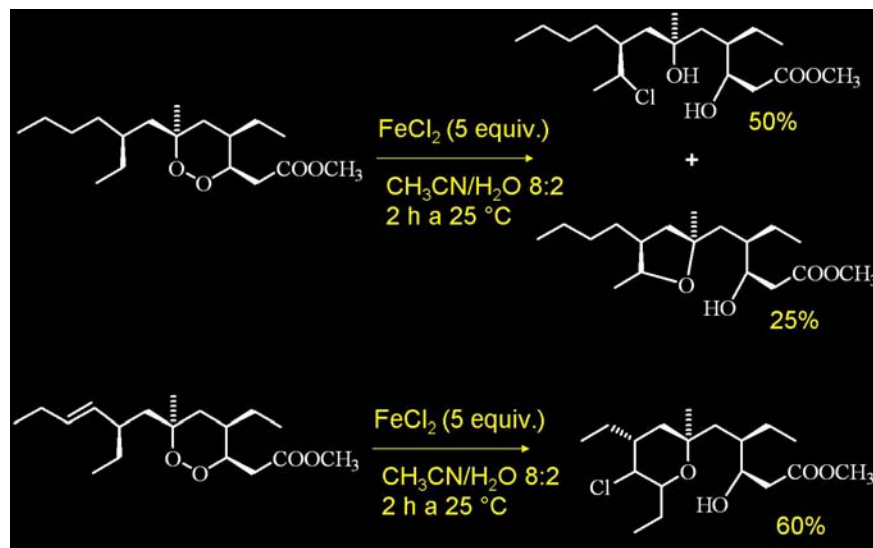
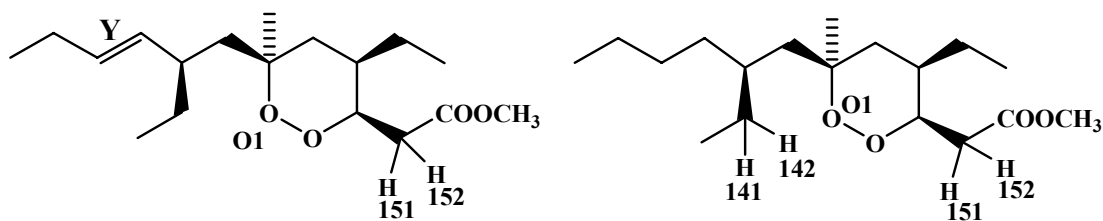


Figura 34. Prodotti della reazione della plakortina e della diidroplakortina con il FeCl_2 .

Tabella 17. Analisi statistiche dello spazio conformazionale della plakortina e della diidroplakortina.



Plakortina	% di conformeri entro le 5 Kcal/mol con distanza < 3 Å	Forma neutra	Forma radicalica	Diidroplakortina	% di conformeri entro le 5 Kcal/mol con distanza < 3 Å	Forma neutra	Forma radicalica
Distanza Y-O1	13	2.9 Å	2.6 Å	Distanza H141-O1	51	2.2 Å	2.2 Å
Distanza H151-O1	80	2.5 Å	3.0 Å	Distanza H151-O1	75	2.9 Å	3.6 Å
Distanza H152-O1		2.8 Å	3.4 Å	Distanza H152-O1		2.3 Å	3.5 Å

3.3c Progettazione di N1-ariliden-N2-chinolin e N2-acridinil idrazoni come potenti agenti antimalarici attivi contro i ceppi CQ-resistenti del Pf

Sulla base della stessa ipotesi utilizzata per la progettazione delle precedenti serie di nuovi agenti antimalarici, sono state prese in considerazione le strutture della CQ (**1**, Figura 35), della mepacrina (**2**, Figura 35) e di alcuni analoghi moderatamente attivi della CQ aventi un gruppo idrazinico o idrazonico⁶⁹, con l'obiettivo di ottenere composti capaci sia di interagire con il ferro III dell'eme libero sia di generare specie radicaliche tossiche per il Pf. A partire da questi composti di riferimento, è stata progettata una nuova serie di derivati idrazonici caratterizzata dalla presenza i) dell'anello chinolinico o dell'anello acridinico diversamente sostituiti come gruppi necessari per l'interazione con il ferro dell'eme, e ii) di un linker idrazonico capace di generare specie radicaliche (**4a-i** e **5a-c**; Figura 35). Tutti i composti progettati sono stati sottoposti a saggi farmacologici per valutare la loro attività antimalarica su una serie diversa di ceppi del Pf CQ-S, quali D10 e 3D7, e CQ-R quali W2 e K1. L'attività antimalarica (IC_{50} μ M) è stata quantificata sulla base dell'inibizione di crescita del parassita, misurata per i ceppi D10 e W2 con la produzione di lattato deidrogenasi da parte del parassita⁵⁸ e per i ceppi 3D7 e K1 con l'incorporazione di [³H]-ipoxantine⁵⁹. I risultati sono presentati in Tabella 18.

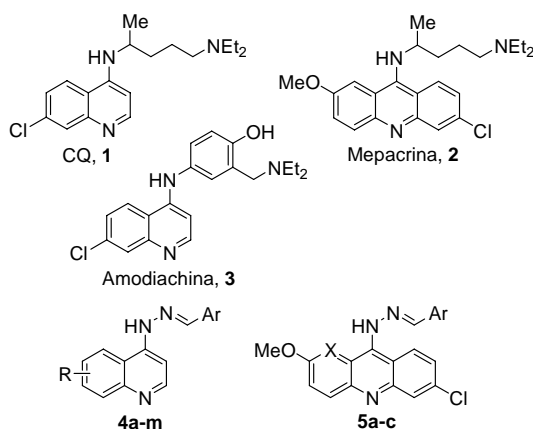

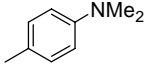
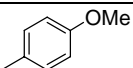
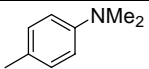
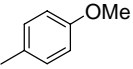
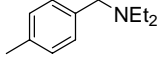
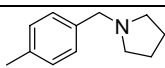

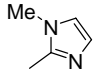


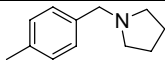


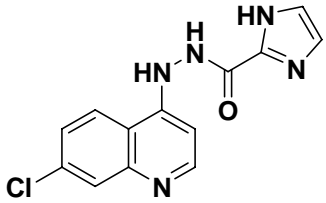


Figura 35. Strutture della CQ, mepacrina, amiodachina, **4a-i** e **5a-c**.

Tabella 18. Attività antiplasmodica dei composti **4a-i** e **5a-c**.

Comp	R	Ar	X	% forme ioniche ^{a,b} a pH 7.2	% forme ioniche ^{a,b} a pH 5.5	D10 ^c IC ₅₀ (nM) ^e	W2 ^d IC ₅₀ (nM) ^e	3D7 ^c IC ₅₀ (nM) ^e	K1 ^d IC ₅₀ (nM) ^e
4a	8-OMe		-	N (96.5)	P (64.5)	519	254	5703	NT ^f
4b	8-OMe		-	N (96.26)	P (64.02)	337	356	NT ^f	NT ^f
4c	6,7-(OCH ₂ O)		-	P (75.97)	P (99.37)	210	163	155	467
4d	6-OMe		-	P (67.07)	P (95.86)	83	104	NT ^f	NT ^f
4e	6-OMe		-	P (60.77)	P (98.73)	99	128	NT ^f	NT ^f
4f	6-OMe		-	DP (59.11)	DP (98.64)	39.2	79.0	11.0	55.1
4g	7-Cl		-	P (95.41)	DP (67.63)	28.8	58.3	19.1	16.4
4h	7-Cl		-	N (96.0)	P/ZW (59.1)	65	24	6	32
4i	7-Cl		-	N (97.3)	P/ZW (52.2)	200	87	61	27
4l	7-Cl		-	N (97.3)	P (56.9)	950	1400	170	820
4m	7-Cl		-	N (97.6)	P (54.0)	500	850	170	580
5a	-		CH	P (83.46)	DP (90.52)	97	137	112	NT ^f
5b	-		CH	N (83.00)	P/ZW (79.59)	62.6	30.8	1.0	4.5
5c	-		N	ZW (74.35)	P/ZW (93.29)	72	26.9	283	198
6				N (98.3)	N (53.5)	6500	>10000	5500	>10000
CQ	-	-	-	P (87.83)	DP (87.37)	22.5	280	10.1	258

^aDP = forma diprotonata, ZW = forma zwitterionica, P = forma protonata, N = forma neutra (ACD/pKa DB version 9.00 software (Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Canada). ^b Tra parentesi la percentuale di forma ionica prevalente. ^cceppi CQ-S. ^dceppi CQ-R. ^e I valori di IC₅₀ sono la media di almeno tre determinazioni. ^fn.t. = Non testato.

In generale, i nuovi composti sintetizzati (**4d-h** e **5a-c**) hanno mostrato un'attività antiplasmodica contro i ceppi D10 (CQ-S) dello stesso ordine di grandezza della CQ. Similmente, i composti **4f**, **4g** e **4h** hanno mostrato la stessa attività della CQ contro il ceppo

3D7 (CQ-S), mentre il composto **5b** è risultato essere 10 volte più potente della CQ. Inoltre, i dati farmacologici hanno dimostrato che la maggior parte dei composti testati è risultata essere molto attiva contro i ceppi CQ-R e che i tre analoghi **4h**, **5b** e **5c** sono risultati essere più attivi contro il ceppo W2 (CQ-R) rispetto al ceppo D10 (CQ-S).

Al fine di investigare i requisiti strutturali necessari per l'attività antimalarica, soprattutto sui ceppi CQ-R, questa nuova serie di agenti antimalarici è stata sottoposta a studi di modellistica molecolare volti ad analizzare le proprietà conformazionali ed elettroniche dei singoli composti (vedere parte sperimentale, paragrafo 3.5c). Questi studi computazionali hanno evidenziato alcuni aspetti molto interessanti, che hanno confermato l'ipotesi di meccanismo d'azione avanzata per la progettazione di questi nuovi derivati idrazonici (vedi sopra).

A livello dell'anello chinolinico, tutti i derivati idrazonici hanno mostrato una forte tendenza ad avere due diversi tautomeri. Tale tautomeria ha permesso di avere un aumento della densità elettronica sull'anello e quindi, una maggiore capacità di coordinare il ferro dell'eme (Figura 36).

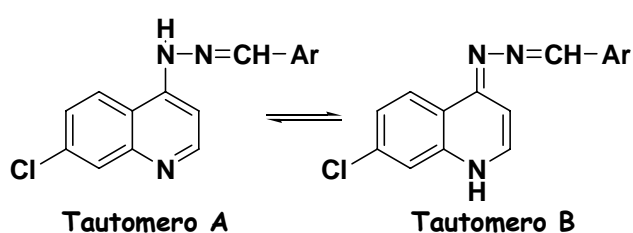


Figura 36. Possibili tautomeri a livello dell'anello chinolinico.

I risultati degli studi di quanto-meccanica sono stati confermati dai saggi farmacologici di inibizione di formazione di emozoina: i derivati **4g** e **4h** hanno mostrato una capacità di

inibire la formazione di emozoina dose-dipendente (rispettivamente $IC_{50} = 0.53$ e $0.35 \mu M$) e sono risultati essere più potenti della CQ ($IC_{50} = 0.91 \mu M$), (Figura 37).

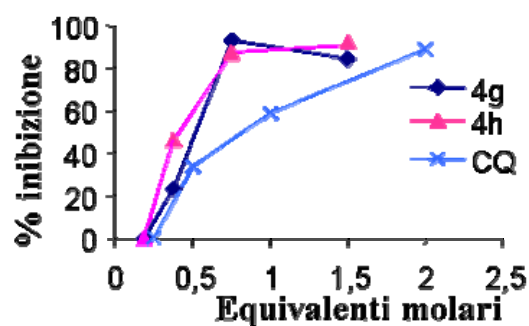


Figura 37. Saggio di inibizione di formazione di β -ematina (BHIA, dimetilsolfossidoacetato a pH 5.0, 18h) sui derivati **4g** e **4h**.

Inoltre, i sostituenti a livello dell'anello chinolinico sono risultati essere elementi molto influenti dell'attività antimalarica. In particolare, i sostituenti ingombranti nelle posizioni 7 e 8 quali l' 8-OMe e il 6,7-metilendiossi (**4a-c** vs **4d-h**), non permettendo all'azoto della chinolina di coordinare il ferro per effetto sterico con l'anello porfirinico dell'eme (Figura 38), hanno reso i derivati (**4a-c**) meno attivi dei derivati corrispondenti aventi il 6-OMe e il 7-Cl (**4d-h**).

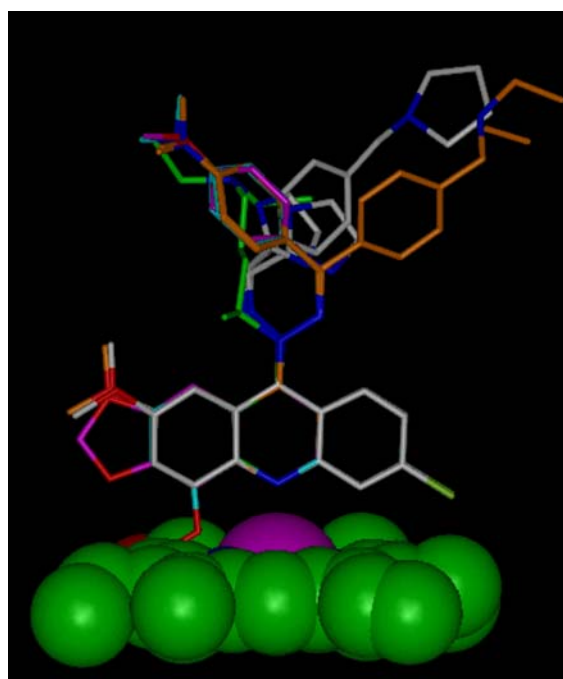


Figura 38. Sovrapposizione di tutti i minimi globali dei composti **4a-i** e **5a-c** sulla struttura cristallografica del complesso piridina/eme (verde) (codice CSDS: BAYDIP). Gli ossigeni sono in rosso, gli azoti in blu, il cloro

in verde chiaro e il ferro in magenta. I carboni hanno un colore diverso per ogni singolo composto. Gli idrogeni sono stati omessi per rendere la figura più chiara.

Al fine di valutare l'importanza del linker nell'attività antimalarica è stato progettato il derivato **6**. La sostituzione del linker idrazonico (**4h**), con uno idrazinico (**6**), ha determinato la completa perdita di attività antimalarica (Tabella 18), dimostrando che il linker idrazonico ha un ruolo cruciale per gli equilibri tautomerici e quindi, per l'interazione con il ferro e la conseguente generazione di radicali.

Infine, è stato studiato l'effetto sull'attività antimalarica dei sistemi idrazon-arilidenici e idrazon-eteroarilidenici, e dei sostituenti legati ad essi. L'introduzione di sostituenti idrazon-eteroarilidenici ricchi di elettroni (**4l-4m**) ha determinato la completa perdita di attività. Gruppi elettrondonatori quale il sostituito debolmente basico dimetilamminico (**4b**) (anche non protonato al pH di 5.5 del VD, Tabella 18) non ha determinato un aumento della attività antimalarica rispetto all'anello aromatico non sostituito (**4a**). Al contrario, un aumento significativo dell'attività contro i ceppi CQ-S e CQ-R è stato possibile osservarlo, quando è stato introdotto sull'anello aromatico il gruppo dietilamminometil già protonato al pH 7.2 del citoplasma (**4f vs 4d**), per mimare l'azoto distale della CQ e della amodiachina, cruciale per il sequestro del farmaco nel VD del Pf⁷⁰. Infatti, il diverso stato di ionizzazione dei composti (Tabella 18) è risultato essere cruciale per una potente attività in vitro contro i diversi ceppi CQ-R (W2 e K1): i composti diprotonati a pH 5.5 (**4f e 4g**) sono risultati essere molto più attivi dei derivati monoprottonati (**4d e 4e**). Un risultato diverso si è avuto, quando questo ulteriore azoto basico è stato introdotto nella serie delle acridine (**5a**), tale composto non ha mostrato un'attività antimalarica comparabile a quella dei derivati chinolinici diprotonati (**4f e 4g vs 5a**). Inoltre, un aspetto molto interessante è stato riscontrato quando il gruppo pirrolidinmetilfenil dei derivati **4g e 5a** è stato sostituito con un anello imidazolico. I composti risultanti (**4h e 5b**) hanno mostrato un profilo antimalarico ottimale su tutti i ceppi del Pf presi in considerazione, diventando molto attivi anche contro i ceppi CQ-R. Gli

imidazoli sono conosciuti essere degli eccellenti ligandi dell'eme; inoltre, come evidenziato dai calcoli di pKa e confermato dagli studi computazionali, l'anello imidazolico permette la formazione di un zwitterione intramolecolare, attraverso lo scambio di un protone tra l'azoto imidazolico e l'azoto idrazinico, estendendo la coniugazione e la tautomeria di questi derivati dal sistema chinolinico al sistema imidazolico (Figura 39). Tale ipotesi è stata confermata con la progettazione del derivato **4i** che, presentando un metile legato all'azoto 1 dell'imidazolo e, quindi, non potendo estendere la coniugazione necessaria per gli equilibri tautomerici al sistema imidazolico, è risultato essere molto meno attivo su tutti i ceppi considerati rispetto al derivato **4h**.

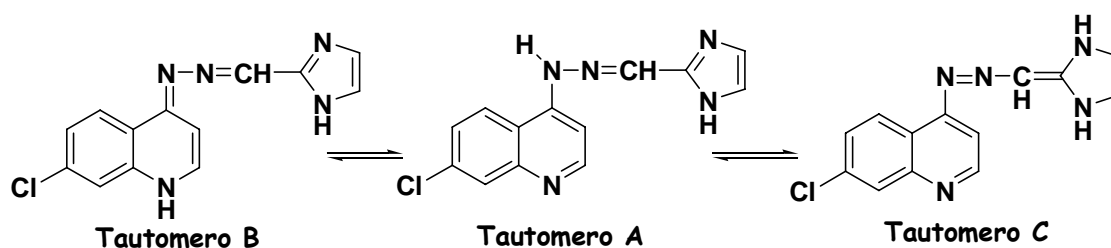


Figura 39. I possibili tautomeri del derivato **4h**.

Infine, l'introduzione di un ulteriore azoto nella posizione 5 del sistema acridinico (**5c**) ha permesso di mantenere invariata l'attività sui ceppi D10 e W2 ma di ridurre quella sui ceppi 3D7 e K1.

I composti più attivi (**4g** e **5b**) sono stati sottoposti ai saggi di citotossicità sulle cellule di fibrosarcoma di ratto (WEHI, clone 13), utilizzando il test MTT⁵⁸. Mentre il derivato **5b** ha mostrato una ED50 di 5.1 μM simile quella della CQ (ED50 = 9.7 μM), il composto **4g** (ED50 = 19.4 μM) è risultato essere molto meno tossico del **5b** e della CQ.

Sebbene, sulla base dei risultati ottenuti, sia possibile ipotizzare che tutti i derivati idrazonici siano capaci di interferire con il processo di detossificazione dell'eme e quindi, di indurre stress ossidativo nel Pf, sono in fase di svolgimento ulteriori studi per approfondire il

loro meccanismo d'azione ed in particolare, per migliorare ancora di più il loro profilo di attività.

3.4 CONCLUSIONI

Sulla base dell'ipotesi che l'interazione con l'eme libero, la formazione di specie radicaliche e la conseguente induzione di stress ossidativo, possano rappresentare una strategia valida per la progettazione di nuovi agenti antimalarici, attraverso gli studi di modellistica molecolare eseguiti durante il mio lavoro di dottorato, è stato possibile:

i) Identificare un nuovo farmacoforo sulla base della struttura del CLT, attraverso il quale è stata progettata una nuova serie di agenti antimalarici caratterizzati da: i) un'ottima propensione a formare radicali attivi; ii) una selettività verso l'eme libero e iii) tropismo per il VD del Pf. Il composto di riferimento di queste serie (**5b**) ha mostrato una potente attività antimalarica in vitro contro i ceppi CQ-resistenti (**5b**: K1, ED50 = 0.0046 mM; W2, IC50 = 0.15 mM vs CLT: K1, ED50= 0.25 mM; W2, IC50 = 0.55 µM), una bassa citotossicità (SI>100) e una bassa attività antimicotica verso diverse classi di funghi quali *Aspergillus* spp., *Candida* spp. e *Cryptococcus neoformans* (**5b**: MIC ~ 32 mg/mL vs CLT: MIC ~ 4 mg/mL). Sono in fase di svolgimento ulteriori studi volti a valutare l'attività antimalarica in vivo e le proprietà farmacocinetiche di questo promettente composto di riferimento.

ii) Ampliare gli studi SAR dei derivati 1,2-diossanici ed identificare i loro requisiti strutturali in grado di conferire una potente attività antimalarica sui ceppi CQ-R (IC50 ~ 1 µM sui ceppi CQ-resistenti) quali: i) la natura della catena alchilica "ovest"; ii) la conformazione dell'anello diossanico, iii) l'assenza di stereoselettività e iv) l'assoluta configurazione dei carboni stereogenici sull'anello 1,2-diossanico ma solo quando influenza la conformazione bioattiva dell'anello e, di ipotizzare, sulla base di essi, un possibile

meccanismo di azione di tipo radicalico utile per la progettazione futura di nuovi e potenti derivati 1,2-diossanicici con struttura semplificata.

iii) Progettare una nuova serie di derivati chinolin-idrazonici ed acridin-idrazonici ed identificare i loro requisiti strutturali in grado di conferire un'ottima attività antimalarica contro i ceppi CQ-R. Il composto di riferimento di questa nuova serie di agenti antimalarici, il derivato **4g** è risultato essere i) molto attivo sui ceppi CQ-R (K1, $IC_{50} = 16$ nM; W2, $IC_{50} = 58$ nM vs CQ : K1, $IC_{50} = 258$ nM; W2, $IC_{50} = 280$ nM); ii) capace di inibire il processo di detossificazione dell'eme ($IC_{50} = 0.53$ μ M vs CQ $IC_{50} = 0.91$ μ M) e iii) meno citotossico ($ED_{50} = 19.4$ μ M) della CQ ($ED_{50} = 9.7$ μ M). Sono in fase di svolgimento ulteriori studi farmacologici per valutare la sua biodisponibilità e la sua efficacia in vivo.

Questi studi sono stati oggetto di due pubblicazioni su riviste internazionali e di tre comunicazioni poster:

- 1) Gemma S, Kukreja G, Fattorusso C, Persico M, Romano MP, Altarelli M, Savini L, Campiani G, Fattorusso E, Basilico N, Taramelli D, Yardley V, Butini S. *Synthesis of N1-arylidene-N2-quinolyl- and N2-acrydinylhydrazones as potent antimalarial agents active against CQ-resistant P. falciparum strains.* *Bioorg Med Chem Lett.* **2006**, 16(20), 5384-8.
- 2) Fattorusso C., Campiani G., Catalanotti B., Persico M., Basilico N., Parapini S., Taramelli D., Campagnuolo C., Fattorusso E., Romano A., and Taglialatela-Scafati O. *Endoperoxide Derivatives from Marine Organisms: 1,2-Dioxanes of the Plakortin Family as Novel Antimalarial Agents.* *J Med Chem.* (Web Release Date: 27-Oct-2006).
- 3) M. Persico, C. Fattorusso, S. Gemma, S. Butini, G. Kukreja, B.P. Joshi, B. Catalanotti, D. Taramelli, N. Basilico, V. Yardley, G. Campiani. *Investigation of a novel pharmacophore for the development of innovative antimalarial agents.* XXII Congresso Nazionale della Società Chimica Italiana. Firenze, 10-15 settembre 2006.

- 4) A. Romano, O. Tagliatela-Scafati, M. Persico, C. Fattorusso, B.Catalanotti, D. Taramelli, N. Basilico, V. Yardley, P. Cimino, V. Barone, G. Campiani, E. Fattorusso. ***A multidisciplinary approach for the investigation of the antimalarial activity of natural endoperoxides.*** XXII Congresso Nazionale della Società Chimica Italiana. Firenze, 10-15 settembre 2006.
- 5) S. Butini, S. Gemma, C. Fattorusso, M. Persico, G. Kukreja, B. P. Joshi, E. Fattorusso, D. Taramelli, N. Basilico, V. Yardley, G. Campiani and V. Nacci. ***Design, synthesis, and in vitro biological evaluation of 7-chloro-4-quinolyldrazones as promising antimalarial agents.*** 3rd cost b22 annual congress "drug discovery and development for parasitic diseases". Atene, 1-4 Ottobre 2006

3.5 PARTE SPERIMENTALE

Tutti gli studi di modellistica molecolare sono stati eseguiti sui Silicon Graphics Octane 2XR14000 e Indigo2R10000.

3.5a Studi di modellistica molecolare ed analisi bio-informatiche per la progettazione di nuovi agenti antimalarici strutturalmente correlati al CLT

I valori apparenti di pKa della CQ, del CLT e dei nuovi composti progettati **3a-b**, **4a-d** e **5a-g** sono stati calcolati utilizzando il programma ACD/pKa DB versione 9.00 (Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Canada). Sulla base dei valori di pKa ottenuti, utilizzando l'equazione di Handerson-Hasselbach, sono state calcolate le percentuali di forme neutre/ioniche dei vari composti a diversi valori di pH: 7.4 (sangue), 7.2 (citoplasma) e 5.5 (VD del Pf).

Il CLT è stato costruito utilizzando il modulo Builder di Insight2005 (Accelrys, San Diego). Lo spazio conformazionale del CLT è stato analizzato con la procedura del Simulated Annealing (200 cicli, campo di forza CFF91⁷¹). Il protocollo utilizzato è stato il seguente: è stata applicata una temperatura iniziale di 1000K al sistema per 1000 fs con l'obbiettivo di superare le barriere energetiche dei torsionali; successivamente la temperatura è stata ridotta linearmente fino a 300 K con un decremento di 0.5 K/fs. Le strutture ottenute sono state sottoposte ad una minimizzazione energetica utilizzando il modulo Discover di Insight 2000.1 (campo di forza CFF91⁷¹, algoritmo *Coniugate Gradient*²⁷; $\epsilon=80*r$), il criterio di convergenza è stato stabilito in modo che il massimo valore di RMS sulla derivata prima sia inferiore a 0.001 kcal/Å. I conformeri ottenuti sono stati classificati in base al loro valore di energia conformazionale.

Al fine di analizzare le proprietà elettroniche del CLT , il suo minimo globale è stato sottoposto ad una completa ottimizzazione geometrica attraverso i calcoli semiempirici, utilizzando il metodo quanto meccanico AM1 (MOPAC 6.0⁴⁵; RHF, singoletto) presente nel modulo Ampac/Mopac di Insight 2000.1; invece, al fine di valutare l'effetto da parte di sostituenti di diversa natura sulla stabilità radicalica è stato sempre utilizzato il metodo quanto-meccanico AM1 ma è stato selezionato il metodo UHF e lo stato fondamentale di doppietto. Il valore di GNORM, per tutti i tipi di calcolo, è stato fissato a 0.5; per raggiungere una completa ottimizzazione geometrica i criteri di terminazione per ogni ottimizzazione sono stati aumentati di un fattore pari a 100, utilizzando la keyword PRECISE.

Gli studi di *docking* sono stati eseguiti sul minimo globale del CLT nel modello della 14-LD⁶⁰ di C. Albicans utilizzando una metodologia di *docking* (Affinity, SA_Docking; Insight2005, Accelrys, San Diego) che considera flessibili tutti i sistemi (ligando e proteina). Per questa simulazione molecolare è stato utilizzato l' Heme29.fr⁶⁰, campo di forza che include i parametri dell'eme. Sebbene nel protocollo di *docking* flessibile il complesso è sottoposto sia alla procedura del metodo Monte Carlo che del *Simulated Annealing* la procedura di *docking* richiede una struttura di partenza ottimizzata. Il CLT è stato posizionato manualmente nel sito attivo prendendo in considerazione il *binding mode* del fluconazolo (codice PDB: 1EA1) e del ketoconazolo (codice PDB: 1JIN) nei citocromi P450. Il complesso ottenuto è stato sottoposto ad una preliminare minimizzazione (algoritmo steepest descendent, $\epsilon = .80 \cdot r$) fino a che il massimo valore di RMS sulla derivata prima fosse inferiore a 5 kcal/Å al fine di generare un punto di partenza del *docking* razionale come richiesto dalla procedura di *docking* di Affinity. A questo punto è stata eseguita la procedura di *docking* flessibile attraverso il modulo Affinity di Insight2005, utilizzando la procedura SA-Docking²⁹ e Cell-Multipole, come metodo per il calcolo delle interazioni nonbond³⁰. Il sito di legame del ligando nel modello della 14-LD è stato definito come un subset che

includeva tutti i residui che avevano almeno un atomo entro i 6 Å da qualsiasi atomo del CLT. Durante l'intera durata dei calcoli di *docking*, tutti gli atomi dei residui inclusi nel sito di legame sopra definito e il CLT sono stati lasciati liberi di muoversi, mentre una costrizione è stata applicata sull' azoto del CLT che coordina il ferro, sui pirroli e il ferro dell'eme, utilizzando una costante di forza di 30.0 kcal/Å². Sono state generate casualmente 20 strutture utilizzando la procedura combinata Monte Carlo/minimizzazione con un criterio di tolleranza energetico di 10⁶ kcal/mol per assicurare un'ampia variabilità delle strutture da minimizzare (2500 iterazioni; ε=1). Durante questa fase il ligando è stato mosso attraverso la combinazione di movimenti traslazionali, rotazionali e variando il valore degli angoli torsionali (opzione Flexible_Ligand, considerando tutti legami ruotabili), al fine di analizzare sia lo spazio conformazionale del ligando e sia la sua orientazione rispetto al sito di legame. Al fine di evitare forti divergenze nelle energie di Coulomb e di vdW sono stati scalati i termini delle forze di van der Waals (vdW) e di Coulomb di un fattore pari a 0.1 (cioè il 10% del suo valore iniziale). Per selezionare soluzioni accettabili sono stati applicati sia il criterio Metropolis ad una temperatura di 310 K sia un criterio di controllo di similitudine delle strutture (RMS tolerance = 0.3 kcal/Å). I complessi selezionati sono stati prima minimizzati e poi sottoposti a 50 cicli di *Simulated Annealing*, ciascuno di 100 fs. Durante la durata di un ciclo di *Simulated Annealing* la temperatura del sistema è stata diminuita linearmente da 500K a 300K, contemporaneamente le forze di vdW e di Coulomb sono state riportate dal 10% del loro valore al 100%. Alla fine dei calcoli di dinamica molecolare, ciascun complesso ottenuto è stato sottoposto ad una minimizzazione finale di 10⁵ cicli. Tutti i complessi sono stati classificati per la loro energia conformazionale e per la geometria del legame di coordinazione imidazolo-ferro. Le distanze e gli angoli del legame di coordinazione sono state confrontate con quelle trovate dall'analisi dei complessi ferro-imidazolo nella banca dati CSDS (Cambridge Structural Database System, codici CSDS: CELWIZ, FEWXAG, KIWNIN, SIBZIM, SIBZOS, YILZIC, YILZOI, YIMYUO). Il complesso a più bassa

energia, che ha mostrato la migliore geometria di coordinazione, è stato selezionato come struttura rappresentante il più probabile *binding mode*. La superficie di Connolly è stata calcolata e colorata sulla base delle cariche formali degli aminoacidi.

Le strutture cristallografiche dei citocromi P450 (PDB IDs:1EA1,1JIN,1E9X, 1OXA, 1W0E, 1W0F, 1W0G) sono state scaricate dalla banca dati delle proteine PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/>). Gli idrogeni sono stati aggiunti a tutte le strutture cristallografiche considerando un valore di pH di 7.2. Le strutture cristallografiche dei citocromi P450 sono state sovrapposte prendendo in considerazione gli atomi dell'eme. Le sequenze dei citocromi P450 sono state scaricate dal Sequence Retrieval System (<http://srs.embl-heidelberg.de:8000/srs5>). Gli allineamenti sono stati eseguiti utilizzando ClustalW (WWW Service at the European Bioinformatics Institute, <http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) e Multiple_Alignment (Accelrys, San Diego). I risultati sono stati analizzati utilizzando il modulo Homology di Insight2005 (Accelrys, San Diego).

3.5b Studi di modellistica molecolare per la progettazione di nuovi agenti antimalarici 1,2-diossanici.

La plakortina (**1**) e i composti **2-12**, **17** e **18** sono stati costruiti utilizzando il modulo Builder di Insight2005 (Accelrys, San Diego). I valori apparenti di pKa dei nuovi composti progettati sono stati calcolati utilizzando il programma ACD/pKa DB versione 9.00 (Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Canada). Sulla base dei valori di pKa ottenuti, utilizzando l'equazione di Handerson-Hasselbach, sono state calcolate le percentuali di forme neutre/ioniche dei vari composti a diversi valori di pH: 7.4 (sangue), 7.2 (citoplasma) e 5.5 (VD del Pf). In tutti i calcoli eseguiti il derivato **9** è stato considerato deprotonato mentre tutti gli altri composti sono stati considerati nella forma neutra.

Lo spazio conformazionale di tutti i composti è stato analizzato con la procedura del Simulated Annealing (500 cicli, campo di forza CFF91⁷¹). Il protocollo utilizzato è stato il seguente: il sistema è stato riscaldato fino ad una temperatura di 1000K per 2000 fs; la temperatura di 1000K è stata mantenuta costante per 2000 fs con l'obiettivo di superare le barriere energetiche dei torsionali; successivamente la temperatura è stata ridotta linearmente fino a 300 K in 1000 fs con un decremento di 0.5 K/fs. Le strutture ottenute sono state sottoposte ad una minimizzazione energetica utilizzando il modulo Discover di Insight 2005 (campo di forza CFF91⁷¹, algoritmo *Conjugate Gradient*²⁷; $\epsilon=80*r$); il criterio di convergenza è stato stabilito in modo tale che il massimo valore di RMS sulla derivata prima fosse inferiore a 0.001 kcal/Å. I conformeri ottenuti sono stati classificati in base al loro valore di energia conformazionale e i valori degli angoli torsionali.

Al fine di analizzare le proprietà elettroniche, i loro conformeri a più bassa energia sono stati sottoposti ad una completa ottimizzazione geometrica attraverso i calcoli semiempirici, utilizzando il metodo quanto meccanico AM1 (MOPAC 6.0)⁴⁵ presente nel modulo Ampac/Mopac di Insight 2000.1. Il valore di GNORM, per tutti i tipi di calcolo, è stato fissato a 0.5; per raggiungere una completa ottimizzazione geometrica i criteri di terminazione per ogni ottimizzazione sono stati aumentati di un fattore pari a 100, utilizzando la keyword PRECISE.

Il conformero a più bassa energia della Plakortina (**1**) è stato sovrapposto sulla struttura cristallografica dell'artemisinina (codice CSDS: QNGHSU) prendendo in considerazione l'anello 1,2-diossanico e l'anello 1,2,4-triossanico.

3.5c Studi di modellistica molecolare per la progettazione di nuovi agenti antimalarici chinolin-idrazonici e acridin-idrazonici.

I composti **4a-i** e **5a-c** sono stati costruiti utilizzando il modulo Builder di Insight2005 (Accelrys, San Diego). I valori apparenti di pKa dei nuovi composti progettati sono stati

calcolati utilizzando il programma ACD/pKa DB versione 9.00 (Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Canada). Sulla base dei valori di pKa ottenuti, utilizzando l'equazione di Handerson-Hasselbach, sono state calcolate le percentuali di forme neutre/ioniche dei vari composti a diversi valori di pH: 7.4 (sangue), 7.2 (citoplasma) e 5.5 (VD del Pf). In tutti i calcoli eseguiti i derivati **4a-i** e **5a-c** sono stati considerati nelle loro forme neutre/ioniche più presenti ai diversi valori di pH considerati.

Lo spazio conformazionale di tutti i composti è stato analizzato con la procedura del Simulated Annealing (500 cicli, campo di forza CFF91⁷¹). Il protocollo utilizzato è stato il seguente: il sistema è stato riscaldato fino ad una temperatura di 1000K per 2000 fs; la temperatura di 1000K è stata mantenuta costante per 2000 fs con l'obiettivo di superare le barriere energetiche dei torsionali; successivamente la temperatura è stata ridotta linearmente fino a 300 K in 1000 fs con un decremento di 0.5 K/fs. Le strutture ottenute sono state sottoposte ad una minimizzazione energetica utilizzando il modulo Discover di Insight 2005 (campo di forza CFF91⁷¹, algoritmo *Conjugate Gradient*²⁷; $\epsilon=80*r$); il criterio di convergenza è stato stabilito in modo tale che il massimo valore di RMS sulla derivata prima fosse inferiore a 0.001 kcal/Å. I conformeri ottenuti sono stati classificati in base al loro valore di energia conformazionale e i valori degli angoli torsionali.

Al fine di analizzare le proprietà elettroniche, i loro conformeri a più bassa energia sono stati sottoposti ad una completa ottimizzazione geometrica attraverso i calcoli semiempirici, utilizzando il metodo quanto meccanico AM1 (MOPAC 6.0)⁴⁵ presente nel modulo Ampac/Mopac di Insight 2000.1. Il valore di GNORM, per tutti i tipi di calcolo, è stato fissato a 0.5; per raggiungere una completa ottimizzazione geometrica i criteri di terminazione per ogni ottimizzazione sono stati aumentati di un fattore pari a 100, utilizzando la keyword PRECISE.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il Prof. Campiani Giuseppe e la Prof. Fattorusso Caterina per avermi dato la possibilità di lavorare su questo progetto facendomi maturare sia sul piano professionale sia sul piano umano. Inoltre, ringrazio il Dott. Catalanotti Bruno, la dott. Borriello Marianna e Antonella Chianura per essermi stati vicini durante questi tre anni di dottorato.

BIBLIOGRAFIA

- (1). Gallo, R.C.; Montagnier, L. The discovery of HIV as the cause of AIDS. *N Engl J Med.* **2003**, 349(24), 2283.
- (2). Root, M.J.; Steger, H.K. HIV-1 gp41 as a target for viral entry inhibition. *Curr Pharm Des.* **2004**, 10(15), 1805.
- (3). Benko, D.M.; Schwartz, S.; Pavlakis, G.N.; Felber, B.K. A novel human immunodeficiency virus type 1 protein, tev, shares sequences with tat, env, and rev proteins. *J Virol.* **1990**, 64(6), 2505.
- (4). Schrofelbauer, B.; Yu, Q.; Landau, N.R. New insights into the role of Vif in HIV-1 replication. *AIDS Rev.* **2004**, 6(1), 34.
- (5). Dragic, T.; Litwin, V.; Allaway, G.P.; Martin, S.R.; Huang, Y.; Nagashima, K.A.; Cayanan, C.; Maddon, P.J.; Koup, R.A.; Moore, J.P.; Paxton, W.A. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature.* **1996**, 381(6584), 667.
- (6). Habasque, C.; Aubry, F.; Jegou, B.; Samson, M. Study of the HIV-1 receptors CD4, CXCR4, CCR5 and CCR3 in the human and rat testis. *Mol Hum Reprod.* **2002**, 8(5), 419.
- (7). Nowak, M.A.; Anderson, R.M.; Boerlijst, M.C.; Bonhoeffer, S.; May, R.M.; McMichael, A.J. HIV-1 evolution and disease progression. *Science.* **1996**, 274(5289), 1008.
- (8). Vella, S.; Palmisano, L. Antiretroviral therapy: state of the HAART. *Antiviral Res.* **2000**, 45, 1.
- (9). Richman, D. ; Shih, C.-K.; Lowy, I.; Rose, J.; Prodanovich, P.; Goff, S.; Griffin, J. Human immunodeficiency virus type 1 mutants resistant to nonnucleoside inhibitors

- of reverse transcriptase arise in tissue culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 11241.
- (10). De Clercq, E. HIV Inhibitors Targeted at the Reverse Transcriptase. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **1992**, *8*, 119.
- (11). Kaufmann, G. R.; Cooper, D. A. Antiretroviral therapy of HIV-1 infection: Established treatment strategies and new therapeutic options. *Curr. Opin. Microb.* **2000**, *3*, 508.
- (12). Jamjian, M.C. e McNicholl I.R. *Am J Health Syst Pharm* **2004**; *61*: 1242.
- (13). Mitsuya, H.; Yarchoan, R.; Broder, S. Molecular targets for AIDS therapy. *Science*, **1990**, *249*, 1533.
- (14). Schinazi, R.F.; Larder, B.A.; Mellors, J.W. Mutations in retroviral genes associated with drug resistance. *Int. Antiviral News* **1997**, *5*, 129.
- (15). Young, S.D.; Britcher, S.F.; Tran, L.O.; Payne, L.S.; Lumma, W.C.; Lyle, T.A.; Huff, J.R.; Anderson, P.S.; Olsen, D.B.; Carroll, S.S.; Pettibone, D.J.; O'Brien, J.A.; Ball, R.G.; Balani, S.K.; Lin, J.H.; Chen, I.-W.; Schleif, W.A.; Sardana, V.V.; Long, W.J.; Byrnes, V.W.; Emini, E.A. L-743,726 (DMP-266): a novel, highly potent nonnucleoside inhibitor of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1995**, *39*, 2602.
- (16). Jacobo-Molina, A.; Ding J.; Nanni, R. G.; Clark, A. D. Jr; Lu, X.; Tantillo, C.; Williams R. L.; Kamer G.; Ferris AL.; Clark P.; Hizi, A.; Hughes, S.H.; Arnold, E. Crystal structure of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase complexed with double-stranded DNA at 3.0 Å resolution shows bent DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1993**, *90*, 6320.
- (17). a) Wohrl, B. M.; Krebs, R.; Thrall, S. H.; Le Grice, S. F.; Scheidig, A. J.; Goody, R. S. Kinetic analysis of four HIV-1 reverse transcriptase enzymes mutated in the primer grip region of p66. Implications for DNA synthesis and dimerization. *J. Biol. Chem.*

- 1997, 272, 17581. b) Ghosh, M.; Williams, J.; Powell, M. D.; Levin, J. G.; Le Grice, S. F. Mutating a conserved motif of the HIV-1 reverse transcriptase palm subdomain alters primer utilization. *Biochemistry*, **1997**, 36, 5758. c) Pelemans, H.; Esnouf, R.; De Clerq, E.; Balzarini, J.; Mutational Analysis of Trp-229 of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase (RT) Identifies This Amino Acid Residue as a Prime Target for the Rational Design of New Non-Nucleoside TI Inhibitors *Mol. Pharmacol.* **2000**, 57, 954. d) Pelemans, H.; Esnouf, R.; Min, K., Parniak, M., De Clerq, E.; Balzarini, J.; Mutation at Amino Acid Positions 63, 189, and 396 of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase (RT) Partially Restore the DNA Polymerase Activity of a TRP229TYR Mutant RT. *Virology*, **2001**, 287, 143.
- (18). Ding J.; Das K.; Hsiou Y.; Sarafianos SG.; Clark AD Jr.; Jacobo-Molina A.; Tantillo C.; Hughes SH.; Arnold E. Structure and functional implications of the polymerase active site region in a complex of HIV-1 RT with a double-stranded DNA template-primer and an antibody Fab fragment at 2.8 Å resolution *J. Mol. Biol.*, **1998**, 284, 1095.
- (19). Huang, H.; Chopra, R.; Verdine, G. L.; Harrison S. C. Structure of a Covalently Trapped Catalytic Complex of HIV-1 Reverse Transcriptase: Implications for Drug Resistance. *Science*, **2004**, 306, 1901.
- (20). Campiani, G.; Morelli, E.; Fabbrini, M.; Nacci, V.; Greco, G.; Novellino, E.; Ramunno, A.; Maga, G.; Spadari, S.; Caliendo, G.; Bergamini, A.; Faggioli, E.; Uccella, I.; Bolacchi, F.; Marini, S.; Coletta, M.; Nacca, A.; Caccia, S. Pyrrolobenzoxazepinone Derivatives as Non-Nucleoside HIV-1 RT Inhibitors: Further Structure-Activity Relationship Studies and Identification of More Potent Broad-Spectrum HIV-1 RT Inhibitors with Antiviral Activity *J. Med. Chem.*, **1999**, 42, 4462, and references cited therein.

- (21). Maga, G.; Ramunno, A.; Nacci, V.; Locatelli, G. A.; Spadari, S.; Fiorini, I.; Baldanti, F.; Paolucci, S.; Zavattoni, M.; Bergamini, A.; Galletti, B.; Muck, S.; Hubsher, U.; Giorgi, G.; Guiso, G.; Caccia, S.; Campiani, G. The Stereoselective Targeting of a Specific Enzyme-Substrate Complex Is the Molecular Mechanism for the Synergic Inhibition of HIV-1 Reverse Transcriptase by (R)-(-)-PPO464 *J. Biol. Chem.* **2001**, *48*, 44653.
- (22). Campiani, G.; Nacci, V.; Fiorini, I.; De Filippis, M. P.; Garofalo, A.; Greco, G.; Novellino, E.; Altamura, S.; Di Renzo, L. Pyrrolobenzothiazepinones and Pyrrolobenzoxazepinones: Novel and Specific Non-Nucleoside HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitors with Antiviral Activity. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 2672.
- (23). Codici PDB: 1BQM, 1BQN, 1COT, 1COU, 1C1B, 1C1C, 1DTQ, 1DTT, 1EET, 1EP4, 1FK9, 1FKO, 1FKP, 1HAR, 2HMI, 1HMY, 1HNI, 1HPZ, 1HQE, 1HQU, 1HRH, 1HVU, 1HYS, 1IKV, 1IKW, 1IKX, 1IKY, 1J5O, 1JKH, 1JLA, 1JLB, 1JLC, 1JLE, 1JLF, 1JLG, 1JLQ, 1KLM, 1N5Y, 1N6Q, 1RT3, 1RT4, 1RTD, 1RTI, 1VRT, 1VRU.
- (24). Das, K.; Clark, A. D., Jr.; Lewi, P. J.; Heeres, J.; de Jonge, M. R.; Koymans, L. M. H.; Vinkers, H. M.; Daeyaert, F.; Ludovici, D. W.; Kukla, M. J.; De Corte, B.; Kavash, R. W.; Ho, C. Y.; Ye, H.; Lichtenstein, M. A.; Andries, K.; Pauwels, R.; de Bethune, M.-P.; Boyer, P. L.; Clark, P.; Hughes, S. H.; Janssen, P. A. J.; Arnold, E.; Roles of Conformational and Positional Adaptability in Structure-Based Design of TMC125-R165335 (Etravirine) and Related Non-nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors That Are Highly Potent and Effective against Wild-Type and Drug-Resistant HIV-1 Variants *J. Med. Chem.*, **2004**, *47*, 2550.
- (25). a) Cubero, E.; Luque, J.F.; Orozco, M. Is polarization important in cation- π interactions? *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **1998**, *95*, 5976. b) Singh, J. and Thornton, J.M. SIRIUS. An automated method for the analysis of the preferred packing

- arrangements between protein groups, *J. Mol. Biol.* **1990**, *211*, 595. c) Hunter, C.A.; Lawson, K.R.; Perkins, J.; Urch, C.J. Aromatic interactions, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **2001**, *2*, 651 d) Kim, K.S.; Tarakeshwar, P.; Yong Lee, J. Molecular clusters of π -Systems: Theoretical Studies of Structures, Spectra, and Origin of Interaction Energies, **2000**, *100*, 4145.
- (26). Dauber-Osguthorpe, P.; Roberts, V. A.; Osguthorpe, D. J.; Wolff, J.; Genest, M.; Hagler, A. T. Structure and energetics of ligand binding to proteins: E. coli dihydrofolate reductase-trimethoprim, a drug-receptor system, *Proteins: Structure, Function and Genetics*, **1988**, *4*, 31.
- (27). Fletcher, R. Unconstrained Optimization. In *Practical Methods of Optimization* John Wiley & Sons: New York **1980**, *Vol.1*.
- (28). a) Savini, L.; Gaeta, A.; Fattorusso, C.; Catalanotti, B.; Campiani, G.; Chiasserini, L.; Pellerano, C.; Novellino, E.; McKissic, D.; Saxena, A. Specific Targeting of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Recognition Sites. Rational Design of Novel, Selective, and Highly Potent Cholinesterase Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 1. b) Fattorusso, C.; Butini, S.; Gaeta, A.; Agnusdei, M.; Gemma, S.; Persico, M.; Catalanotti, B.; Campiani, G.; Savini, L.; Nacci, V.; Novellino, E.; Holloway, H. W.; Greig, N.; McKissic, D.; Saxena, A.; Specific Targeting of Extra Interaction Sites (Mid-Gorge and Peripheral) in Butyrylcholinesterases (BuChEs) active site gorge. Rational Design of Novel, Selective, and Highly Potent BuChE Inhibitors *J. Med. Chem.*, **2004**, *48*, 1919.
- (29). Senderowitz, H.; Guarnieri, F.; Still, W.C. A Smart Monte Carlo Technique for Free Energy Simulations of Multiconformational Molecules. Direct Calculations of the Conformational Populations of Organic Molecules, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 8211.

- (30). Ding, H. Q.; Karasawa, N.; Goddard, W. A., III Atomic level simulations on a million particles: The cell multipole method for Coulomb and London nonbond interactions, *J. Chem. Phys.* **1992**, *97*, 4309.
- (31). Mitsuya, H.; Yarchoan, R.; Broder, S. Molecular targets for AIDS therapy. *Science*, **1990**, *249*, 1533.
- (32). Tan, S.-L.; Pause, A.; Shi, Y.; e Sonenberg, N. Hepatitis C therapeutics: Current status and emerging strategies. *Nat. Rev.* **2002**, *1*, 867.
- (33). Di Bisceglie, A.; M., McHutchinson, J.; e Rice, C. M.; New therapeutic strategies for hepatitis C. *Hepatology* **2002**, *35*, 224.
- (34). Borowski, P., Schalinski, S., e Schmitz, H. Nucleotide triphosphatase/helicase of hepatitis C virus as a target for antiviral therapy. *AntiViral Res.* **2002**, *55*, 397.
- (35). Diana, G. D., and Bailey, T. R. Preparation of heterocyclic substituted carboxamides for treatment of hepatitis C. *U.S. Patent* **1997** *5*, 633, 388.
- (36). Pollard, R. B. Analogy of human immunodeficiency virus to hepatitis C virus: the human immunodeficiency model. *Am. J. Med.* **1999**, *107*, 41S.
- (37). Maga, G., Ramunno, A., Nacci, V., Locatelli, G. A., Spadari, S., Fiorini, I., Baldanti, F., Paolucci, S., Zavattoni, M., Bergamini, A., Galletti, B., Muck, S., Hubscher, U., Giorgi, G., Guiso, G., Caccia, S., and Campiani, G. The stereoselective targeting of a specific enzyme-substrate complex is the molecular mechanism for the synergic inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by (R)-(-)-PPO464: A novel generation of nonnucleoside inhibitors. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 44653.
- (38). Campiani, G., Aiello, F., Fabbrini, M., Morelli, E., Ramunno, A., Armaroli, S., Nacci, V., Garofalo, A., Greco, G., Novellino, E., Maga, G., Spadari, S., Bergamini, A., Ventura, L., Bongiovanni, B., Capozzi, M., Bolacchi, F., Marini, S., Coletta, M., Guiso, G., and Caccia, S. Quinoxalinyethylpyridylthioureas (QXPTs) as potent non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase (RT) inhibitors. Further SAR studies and

- identification of a novel orally bioavailable hydrazine-based antiviral agent. *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 305.
- (39). Lam, A. M. I., Keeney, D., and Frick, D. N. Two Novel Conserved Motifs in the Hepatitis C Virus NS3 Protein Critical for Helicase Action, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 44514.
- (40). Tai, C. L., Pan, W. C., Liaw, S. H., Yang, U. C., Hwang, L. H., and Chen, D. S. Structure-Based Mutational Analysis of the Hepatitis C Virus NS3 Helicase, *J. Virol.* **2001**, 75, 8289.
- (41). Kim, J. W., Seo, M. Y., Shelat, A., Kim, C. S., Kwon, T. W., Lu, H., Moustakas, D. T., Sun, J., and Han, J. H. Structurally Conserved Amino Acid W501 Is Required for RNA Helicase Activity but Is Not Essential for DNA Helicase Activity of Hepatitis C Virus NS3 Protein, *J. Virol.* **2003**, 77, 571.
- (42). Paolini, C., Lahm, A., De Francesco, R., and Gallinari, P. Mutational Analysis of Hepatitis C Virus NS3-Associated Helicase, Mutational Analysis of the Hepatitis C Virus RNA Helicase, *J. Gen. Virol.* **2000**, 81, 1649.
- (43). Kim, D. W., Kim, J., Gwack, Y., Han, J. H., and Choe, J. Mutational Analysis of the Hepatitis C Virus RNA Helicase, *J. Virol.* **1997**, 71, 9400.
- (44). Lin, C., and Kim, J. L. Structure-Based Mutagenesis Study of Hepatitis C Virus NS3 Helicase, *J. Virol.* **1999**, 73, 8798.
- (45). Stewart, J.J.P. MOPAC: A Semiempirical Molecular Orbital Program, *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **1990**, 4, 1.
- (46). Dati WHO: <http://www.who.int/en/>
- (47). Dati Centers for disease control and prevention: <http://www.cdc.gov/>
- (48). White, N. J. Antimalarial drug resistance. *J. Clin. Invest.* **2004**, 113, 1084.

- (49). Fidock, D. A.; Rosenthal, P. J.; Croft, S. L.; Brun, R.; Nwaka, S. Antimalarial drug discovery: efficacy models for compound screening. *Nature Rev. Drug Disc.* **2004**, *3*, 509.
- (50). Egan, T. J.; Combrinck, J. M.; Egan, J.; Hearne, G. R.; Marques, H. M.; Ntenti, S.; Sewell, B. T.; Smith, P. J.; Taylor, D.; van Schalkwyk, D. A.; Walden, J. C. Fate of haem iron in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochem. J.* **2002**, *365*, 343.
- (51). Famin, O.; Krugliak, M.; Ginsburg, H. Heme kinetics of inhibition of glutathione-mediated degradation of ferriprotoporphyrin IX by antimalarial Drugs. *Biochem. Pharmacol.* **1995**, *58*, 59.
- (52). Wiesner, J.; Ortmann, R.; Jomaa, H.; Schlitzer, M. New antimalarial drugs. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5274.
- (53). Tiffert, T.; Ginsburg, H.; Krugliak, M.; Elford, B. C.; Lew, V. L. Potent antimalarial activity of clotrimazole in *in vitro* cultures of *Plasmodium falciparum*. *Proceed. Nat. Acad. Sci.* **2000**, *97*, 331.
- (54). Saliba, K. J.; Kirk, K. Clotrimazole inhibits the growth of *Plasmodium falciparum* in vitro. *Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1998**, *92*, 666.
- (55). Chonga, C. R.; Sullivan Jr., D. J. Inhibition of heme crystal growth by antimalarials and other compounds: implications for drug discovery. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *66*, 2201.
- (56). Huy, N. T.; Kamei, K.; Yamamoto, T.; Kondo, Y.; Kanaori, K.; Takano, R.; Tajima, K.; Hara, S. Clotrimazole binds to heme and enhances heme-dependent hemolysis. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 4152.
- (57). Trivedi, V.; Chand, P.; Srivastava, K.; Puri, S. K.; Maulik, P. R.; Bandyopadhyay, U. Clotrimazole inhibits hemoperoxidase of *Plasmodium falciparum* and induces oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 41129.

- (58). Sparatore, A.; Basilico, N.; Parapini, S.; Romeo, S.; Novelli, F.; Sparatore, F.; Taramelli, D. 4-Aminoquinoline quinolizidinyl- and quinolizidinylalkyl-derivatives with antimalarial activity. *Bioorg. Med.Chem.* **2005**, 13, 5338.
- (59). Ponnudurai, T.; Leeuwenberg, A. D.; Meuwissen, J. H. Chloroquine sensitivity of isolates of Plasmodium falciparum adapted to in vitro culture. *Trop. Geogr. Med.* **1981**, 33, 50.
- (60). Holtje, H.D.; Fattorusso, C. Construction of a model of the Candida albicans lanosterol 14-alpha-demethylase active site using the homology modelling technique. *Pharm Acta Helv.* **1998**, 72, 271.
- (61). Winn, P.J.; Ludemann, S.K.; Gauges, R.; Lounnas, V.; Wade, R.C. Comparison of the dynamics of substrate access channels in three cytochrome P450s reveals different opening mechanisms and a novel functional role for a buried arginine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2002**, 99, 5361.
- (62). Ridley, R. G. Medical need, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs. *Nature* **2002**, 415, 686.
- (63). Cafieri, F.; Fattorusso, E.; Tagliatela-Scafati, O.; Ianaro, A. Metabolites from the sponge Plakortis simplex. Determination of absolute stereochemistry of plakortin. Isolation and stereostructure of three plakortin related compounds. *Tetrahedron* **1999**, 55, 7045.
- (64). Fattorusso, E.; Parapini, S.; Campagnuolo, C.; Basilico, N.; Tagliatela-Scafati, O.; Taramelli, D. Activity against Plasmodium falciparum of cycloperoxide compounds obtained from the sponge Plakortis simplex. *J. Antimicrob. Chemother.* **2002**, 50, 883.
- (65). Campagnuolo, C.; Fattorusso, E.; Romano, A.; Tagliatela-Scafati, O.; Basilico, N.; Parapini, S.; Taramelli, D. Antimalarial polyketide cycloperoxides from the marine sponge *Plakortis simplex*. *Eur. J.Org. Chem.* **2005**, 5077.

- (66). Hu, J.-F.; Gao, H.-F.; Kelly, M.; Hamann, M. T. Plakortides K.-N, four new cyclic peroxides from an undescribed Jamaican sponge *Plakortis* sp. (Homosclerophorida, Plakinidae). *Tetrahedron* **2001**, *57*, 9379.
- (67). (a) Freeman, F.; Lee, C.; Hehre, W. J.; Po, H. N. Ab initio molecular orbital calculations of 3,4-dihydro-1,2-dioxin, 3,6-dihydro-1,2-dioxin, 4H-1,3-dioxin (1,3-diox-4-ene), and 2,3-dihydro-1,4-dioxin (1,4-dioxene). *J. Comput. Chem.* **1997**, *18*, 1392. (b) Senthilkumar, K.; Kolandaivel, P. Structure, conformation and NMR studies on 1,2 dioxane and halogen substituted 1,2-dioxane molecules. *Comput. Biol. Chem.* **2003**, *27*, 173.
- (68). Jefford, C.W. Why Artemisinin and Certain Synthetic Peroxides are Potent Antimalarials. Implications for the Mode of Action *Curr. Med.Chem.*, **2001**, *8*, 1803.
- (69). Singh, T.; Stein, R. G.; Biel, J. H. Antimalarials. Unsaturation in Chloroquine Side Chain and antimalarial activity. *J. Med. Chem.* **1969**, *12*, 368.
- (70). Egan, T. J. Structure–function relationships in chloroquine and related 4-aminoquinoline antimalarials. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2001**, *1*, 113.
- (71). Maple, J. R.; Hwang, M. J.; Stockfisch, T. P.; Dinur, U; Waldman, M.; Ewig, C. S.; Hagler, A. T.; *J. Comput. Chem.* **1994**, *15*, 162.