



A.D. MDLXII

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE E TECNOLOGIE CHIMICHE

INDIRIZZO: SCIENZE FARMACEUTICHE

**Studi sui Metalloenzimi come Bersaglio per l'Attività
Farmacobiologica: HIV-1 Integrasi e Anidrasi Carbonica**

COORDINATORE:

Prof. Giuseppe Baldovino Suffritti

SUPERVISORE:

Dott. Mario Sechi

DOTTORANDO:

Dott. Nicolino Pala

XXII CICLO
(Triennio 2008-2010)

Citazione

*Misura ciò che è misurabile,
e rendi misurabile ciò che non lo è.*

(Galileo Galilei, 15 febbraio 1564 – 8 gennaio 1642)

Nicolino Pala

Studi sui metalloenzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

Ringraziamenti

Il primo e più sentito ringraziamento va al Dr. Mario Sechi per avermi dato la possibilità di cimentarmi in questa impresa, guidandomi e sopportandomi in questi tre anni.

Desidero, inoltre, ringraziare tutti coloro che hanno partecipato alla realizzazione della presente tesi:

- Il Dr. Fabrizio Carta per i consigli e la collaborazione nei vari progetti, oltreché per le ore in laboratorio spese insieme.
- La Dr.ssa Maria Orecchioni ed il Sig. Paolo Fiori per gli spettri NMR e per la loro umanità e amicizia.
- La Dr.ssa Vanna Sanna perché con il suo esempio dimostra quanto valgano l'amore e la dedizione per il proprio lavoro.
- I Sig.ri Alessandro Dessi e Roberto Dallochio per i lavori di *Molecular Modelling*, per la disponibilità e l'incoraggiamento.
- Il Dr. Mohamed Fathy Youssef per il tempo trascorso assieme in laboratorio e le "infinite discussioni metafisiche".
- La Sig.ra Paola Manconi per gli esperimenti di spettroscopia di massa e la Sig.ra Giuseppina Dessi per gli esperimenti di HPLC e elettroforesi capillare.
- Il Prof. Mauro Carcelli, la Dr.ssa Dominga Rogolino, la Prof.ssa Alessia Bacchi e la Prof.ssa Emilia Fiscaro dell'Università di Parma per gli studi complessometrici, di potenziometria e cristallografia a raggi X.
- Tutti quelli che mi hanno accolto ed aiutato durante il periodo trascorso presso la Cardiff University ed in particolar modo il Dr. Andrea Brancale, raro esempio di simpatia e competenza, assieme a Marco Derudas e Maria Elena Canu ai quali va la mia stima e gratitudine.

Nicolino Pala

Studi sui metalloenzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

- Un sentito ringraziamento va anche a tutti quelli che hanno reso questi anni speciali, tra tutti la Dr.ssa Paola Corona, il Dr. Michele Palomba, il Prof. Ugo Azzena ed il Dr. Gabriele Murineddu.

Nicolino Pala

Studi sui metalloenzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

Prefazione

I tre anni trascorsi nel Gruppo del Dr. Sechi sono stati un percorso di crescita e maturazione continui dal punto di vista professionale ed umano. Il presente lavoro di tesi racchiude in forma organica quelle che sono state le idee, le esperienze, il lavoro ed i risultati maturati durante il Dottorato.

Dei tre capitoli che formano l'elaborato, la parte predominante è incentrata sugli studi condotti sui metalloenzimi. Nello specifico, il primo capitolo prosegue e, per certi versi, conclude il lavoro portato avanti in questi anni dal Dr. Sechi, volto alla comprensione delle proprietà complessanti degli inibitori dell'HIV-1 integrasi ed il loro ruolo nella modulazione dell'attività farmacobiologica.

Nel secondo capitolo saranno presentati due progetti indipendenti fra loro che vedono coinvolto l'enzima anidrasi carbonica. Il primo è uno studio di *Virtual Screening* volto all'individuazione di inibitori non-classici dell'enzima, mentre il secondo mira all'acquisizione di informazioni riguardanti le interazioni tra l'anidrasi carbonica e la classe più rappresentativa dei suoi inibitori, le arilsolfonammidi, sfruttando la tecnica del *Photoaffinity Labelling*.

L'ultimo capitolo, sebbene riconducibile per alcuni aspetti all'HIV-1 integrasi, ne esula nei contenuti, e viene trattato a parte. Questo capitolo ha preso spunto dal tentativo di preparare una serie di derivati del 4-benzilidene-2-(2-idrossibenzoil)-5-metil-2,4-diidro-3H-pirazol-3-one, precedentemente individuati come inibitori dell'HIV-1 integrasi e come composti ad attività antiproliferativa. Un'analisi strutturalistica retrospettiva, delle vie sintetiche riportate per l'ottenimento di tali derivati, combinata con uno studio computazionale effettuato tramite tecniche *ab initio*, ha consentito di indagare e delucidare, con il supporto di evidenze sperimentali, il possibile percorso meccanicistico invocato per la formazione di tali prodotti e nel contempo dimostrarne la non praticabilità.

Contemporaneamente è stato predisposto un versatile approccio sintetico, alternativo alle metodiche di sintesi descritte in letteratura, che sarà presentato e discusso.

Nicolino Pala

Studi sui metalloenzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

Dedica

*Ad Alessandra, perché, mentre
io credevo in un sogno, Lei credeva in me*

Nicolino Pala

Studi sui metalloenzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

Indice

Parte generale: I metalloenzimi	
Generalità	1
Capitolo 1: HIV-1 integrasi	
1.1 Introduzione	3
1.1.1 AIDS	3
1.1.2 HIV	6
1.1.3 Terapie anti-HIV	9
1.2 HIV-1 integrasi	13
1.1.2 Struttura	13
1.2.2 Il processo di integrazione	15
1.2.3 Il ruolo dei cofattori metallici nel processo di integrazione	16
1.2.4 Il blocco del processo d'integrazione come strategia antivirale	17
1.3 I MCINI (Metals Chelator Integrase Inhibitors)	20
1.3.1 L'inibizione interfacciale come meccanismo d'azione dei MCINI	23
1.3.2 Razionale	24
1.3.3 Progettazione dei ligandi modello	25
1.3.4 Approccio sintetico	28
1.3.5 Titolazioni potenziometriche	33
1.3.6 Preparazione dei complessi	36
1.3.7 Cristallografia a raggi X	37
1.3.8 Modello farmacoforico	40
1.3.9 Inibizione enzimatica	41
1.3.10 Discussione e Conclusioni	43

Nicolino Pala

Studi sui metalloenzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

Capitolo 2: anidrase carbonica

2.1 Introduzione	46
2.1.1 α -CAs	47
2.1.2 Struttura e meccanismo d'azione della CA	47
2.1.3 Funzioni e patologie legate alla α -CA	51
2.1.4 Inibitori dell'anidrase carbonica (CAIs)	52
2.2 Identificazione di possibili inibitori della hCA-II tramite la tecnica del <i>Virtual Screening</i>	56
2.2.1 Cenni sul <i>Virtual Screening</i>	56
2.2.2 Razionale	57
2.2.3 Metodo	57
2.2.4 Saggi enzimatici	63
2.2.5 Docking fine	63
2.2.6 Conclusioni	64
2.2.7 Work in Progress.	64
2.3 Predisposizione di un protocollo di <i>Photoaffinity Labelling</i> per lo studio delle interazioni hCA-inibitore	65
2.3.1 Cenni sul <i>Photoaffinity Labelling</i>	65
2.3.2 Razionale	68
2.3.3 Sintesi dei photoprobes	69
2.3.4 Molecular Modelling	72
2.3.5 Saggi	74
2.3.6 Conclusioni	74

Capitolo 3: pirazoloni

3.1 Introduzione	75
3.2 Premessa	76
3.3 Studio sintetico e discussione	77
3.4 Conclusioni	85

Parte sperimentale	
Chimica	86
Parte generale	86
Capitolo 1	88
Capitolo 2	102
Capitolo 3	108
Tecniche computazionali	119
Capitolo 1: modello farmacoforico dell'integrasi	119
Capitolo 2: <i>docking</i> fine del composto zinc04324216	119
Capitolo 2: <i>docking</i> dei <i>photoprobes</i>	119
Capitolo 3: calcoli <i>ab initio</i>	119
Saggi enzimatici	
Saggi di inibizione enzimatica dell'IN	120
Saggi di inibizione enzimatica della CA	121
Bibliografia	122

Nicolino Pala

Studi sui metalloenzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

Parte Generale

I Metalloenzimi

Generalità

Gli enzimi sono il principale bersaglio dei farmaci attualmente in uso e di quelli in via di sviluppo. Tra di essi, la classe dei metalloenzimi si distingue perché i suoi membri necessitano di uno o più cationi metallici per svolgere la loro attività. Il cofattore metallico può esplicare la sua funzione con diverse modalità: può essere direttamente coinvolto nell'attività catalitica; può promuovere e/o stabilizzare lo stato attivo dell'enzima; può favorire lo stato di transizione della reazione senza intervenire direttamente nel meccanismo di reazione.¹

Poiché i cofattori sono indispensabili per l'attività enzimatica, la generica interferenza o la più specifica chelazione verso tali ioni metallici stanno emergendo come moderni approcci nello studio di nuovi inibitori enzimatici.²

In natura esistono diversi cationi metallici che sono stati identificati come cofattori enzimatici; tra questi rivestono un ruolo di primo piano gli ioni Zn^{2+} e Mg^{2+} . Il primo è stato dimostrato essere il cofattore di più di 300 enzimi appartenenti a tutte e sei le classi di enzimi note (ossidoreduttasi, transferasi, idrolasi, liasi, isomerasi e ligasi). Lo ione magnesio, a sua volta, riveste notevole importanza sia perché è molto presente nell'organismo umano (è il terzo catione per

Nicolino Pala

Studi sui metallo-enzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

concentrazione all'interno delle cellule dopo potassio e sodio), sia perché spesso associato agli enzimi che interagiscono direttamente con il DNA, come le polinucleotidil transferasi.

La scelta di compiere degli studi sull'HIV-1 integrasi, contenente Mg(II) e Zn(II), e sull'anidraasi carbonica, contenente Zn(II), ha portato all'inevitabile confronto con le problematiche, e le opportunità, legate alla presenza di questi due metalli.

Sebbene i due enzimi siano differenti filogeneticamente, strutturalmente e funzionalmente, esistono, tuttavia, degli elementi che possono essere considerati al fine di contemplare delle tematiche di ricerca comuni. Per esempio, le conoscenze sugli zinco enzimi potrebbero essere utili se si volesse considerare il dominio N-terminale dell'integrasi, contenente anch'esso Zn, come un possibile nuovo bersaglio terapeutico. Inoltre, la possibilità di correlare i dati sugli inibitori complessanti per entrambi gli enzimi potrebbe portare ad un reciproco e sinergico scambio di conoscenze. Il presente progetto si propone di investigare i meccanismi coinvolti nell'inibizione dei suddetti enzimi da parte di inibitori riconosciuti, come anche l'individuazione di elementi comuni che possano essere generalizzati ed in seguito sfruttati per lo sviluppo di nuovi prototipi di farmaci in grado di inibire altre tipologie di metalloenzimi.

Nicolino Pala

Studi sui metallo-enzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidraasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

Capitolo 1

HIV-1 integrasi

1.1 Introduzione

1.1.1 AIDS

Sono passati 28 anni (1981) da quando il CDC (Centers for Disease Control and Prevention) di Atlanta, il maggior centro a livello mondiale per lo studio delle malattie infettive, rese noto il primo rapporto relativo a pazienti omosessuali affetti da patologie considerate rare, quali il sarcoma di Kaposi ed alcune forme infettive di polmonite. I dati ponevano in luce un quadro sintomatologico con elementi comuni caratterizzato dall'incapacità, spesso totale, dell'organismo ospite di instaurare e sostenere un efficace processo di difesa immunitaria, da cui un'estrema vulnerabilità del soggetto a tutti quei processi patologici che vedono nel sistema immunitario il principale ostacolo al loro sviluppo con conseguenze spesso letali.^{3,4} La patologia venne denominata AIDS o sindrome da immunodeficienza acquisita.

Dovettero passare altri due anni (1983) prima che, indipendentemente, i gruppi di ricerca di Luc Montagnier⁵ e di Robert Gallo⁶ identificassero l'**HIV-1** (*Human Immunodeficiency Virus type-1*) come l'agente eziologico dell'AIDS, in seguito definita da Montagnier stesso: "la peste del 2000".⁷

Nicolino Pala

Studi sui metallo-enzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

L'AIDS è infatti diventata rapidamente uno dei più grandi problemi epidemiologici del genere umano con un tributo stimato in 25 milioni di morti e un numero di sieropositivi che ha raggiunto nel 2006 i 40 milioni. Guardando ottimisticamente al futuro, questo valore potrebbe essere l'apice della curva di crescita dell'epidemia, dato che gli ultimi dati segnalano una riduzione apprezzabile sia degli infetti (scesi a 33 ± 3 milioni), sia del tasso di mortalità annua (sceso di circa 200 mila unità) (Figura 1.1).⁸

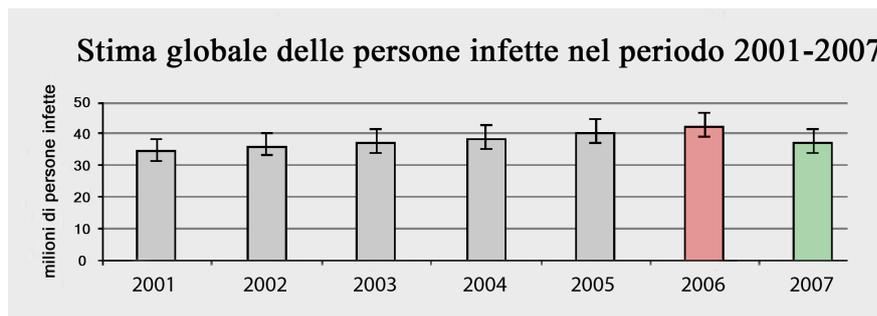


Figura 1.1. Quadro epidemiologico generale dell'AIDS secondo l'UNAIDS.⁸

Per quanto riguarda la diffusione dell'epidemia, gli ultimi dati relativi alla popolazione mondiale, risalenti al 2007, mostrano che il 96% dei nuovi sieropositivi vive nei paesi a basso e medio reddito (Figura 1.2).

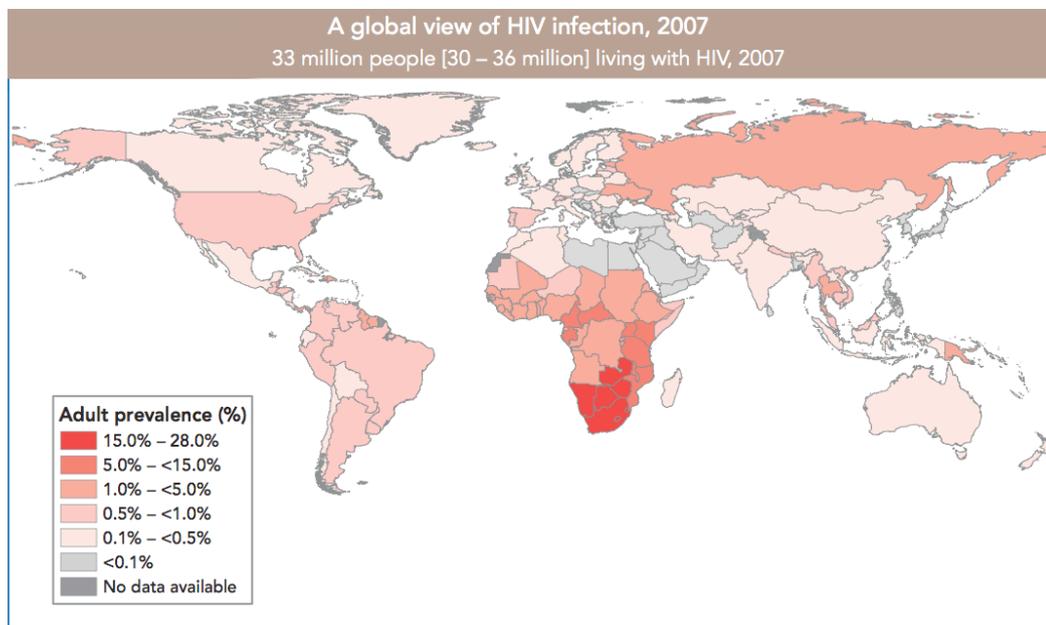


Figura 1.2. Mappa della densità di popolazione dei sieropositivi relativa al 2007.⁸

Nicolino Pala

Studi sui metallo-enzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

L'Africa continua ad essere il principale bacino dell'AIDS con circa i 2/3 dei nuovi infetti, ed il 75% dei decessi concentrati in questo continente (**Figura 1.3**).

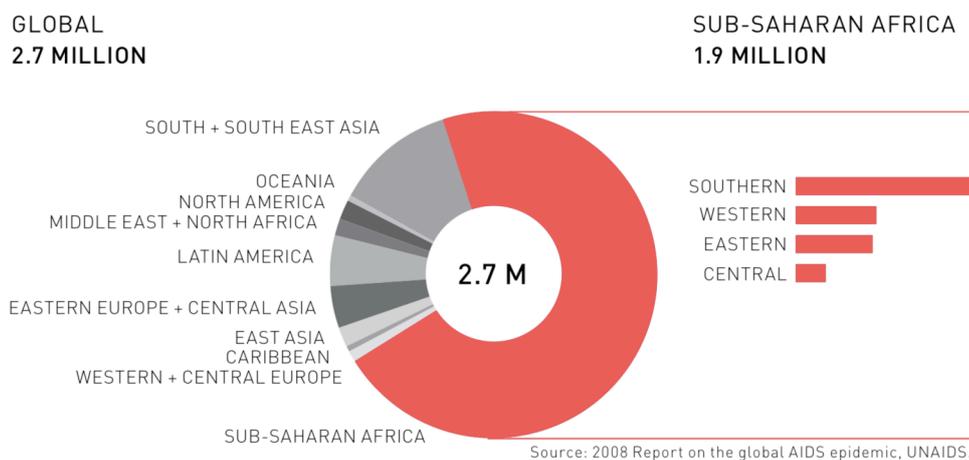


Figura 1.3. Rapporto dell'UNAIDS: distribuzione dei sieropositivi del 2007.⁸

Nonostante ciò, le regioni che oggi destano le maggiori preoccupazioni sono l'Indonesia, la Russia e i suoi paesi satelliti, dove l'infezione è ancora in fase di espansione. Notizie più incoraggianti arrivano dalle nazioni maggiormente industrializzate dove, grazie ad una maggiore consapevolezza della patologia, da cui consegue una più attenta prevenzione, e grazie ai notevoli progressi scientifici, l'AIDS non è più annoverata tra le malattie letali ma tra quelle croniche a lento decorso.⁹

In questo contesto l'eradicazione della patologia, sebbene ancora distante nel tempo, potrà essere realizzabile se verranno raggiunti gli obiettivi indicati dalla comunità internazionale:

Prevenzione.
Ricerca di un vaccino.
Miglioramento delle attuali terapie farmacologiche.
Accesso universale alle cure.
Miglioramento delle condizioni socio-sanitarie dei paesi maggiormente colpiti.
Eradicazione dei pregiudizi e delle discriminazioni legati alla patologia.

1.1.2 HIV

L'HIV è un virus, genere *Lentivirus*, famiglia *Retroviridae*, di cui si conoscono due sottotipi, HIV-1 e HIV-2. Poiché le infezioni dovute al sottotipo 2 sono una minima parte del totale e solitamente producono un quadro clinico più moderato, gli studi individuano nell'HIV-1, ritenuto più pericoloso, il loro bersaglio principale. La sua struttura presenta delle differenze rispetto a quella degli altri retrovirus. Morfologicamente il virione maturo si presenta con una forma sferoidale dal diametro di circa 120 nm (**Figura 1.4**).

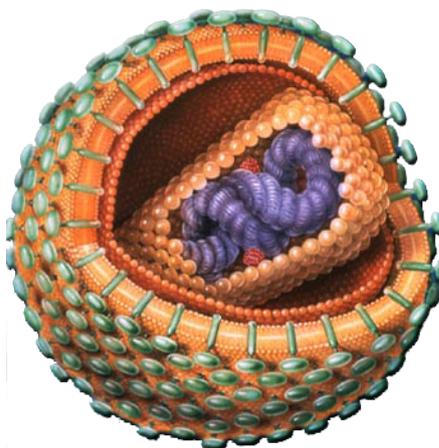


Figura 1.4. Struttura del virus HIV-1.

Esternamente la superficie del virione risulta rivestita da un *envelope* a doppio strato fosfolipidico acquisito durante la fase di gemmazione. In esso sono presenti proteine di membrana derivate della cellula infettata di origine, tra le quali le componenti di classe I e II del complesso maggiore di istocompatibilità responsabili del mimetismo del virione. Dall'*envelope* protrudono verso l'esterno circa 70 copie di una struttura virale fungiforme. Tale complesso proteico, noto come *env*, comprende una porzione apicale, formata da un trimero di glicoproteina *gp120*, e da uno stelo, anch'esso trimerico, formato dalla glicoproteina *gp41*. L'importanza del complesso *env* è legata al suo ruolo nel riconoscimento della cellula bersaglio e nella promozione della fusione.¹⁰⁻¹³ L'*envelope*, che racchiude e protegge il capsido o *core*, a simmetria icosaedrica e forma conica, risulta composto dall'assemblaggio di circa 2000 capsomeri di proteina *p24*. Lo spazio tra *core* e *envelope* è interamente occupato da una matrice di proteina *p17* che funge da cementante tra i due involucri e assicura la resistenza strutturale della particella virale (**Figura 1.5**).

Nicolino Pala

Studi sui metallo-enzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

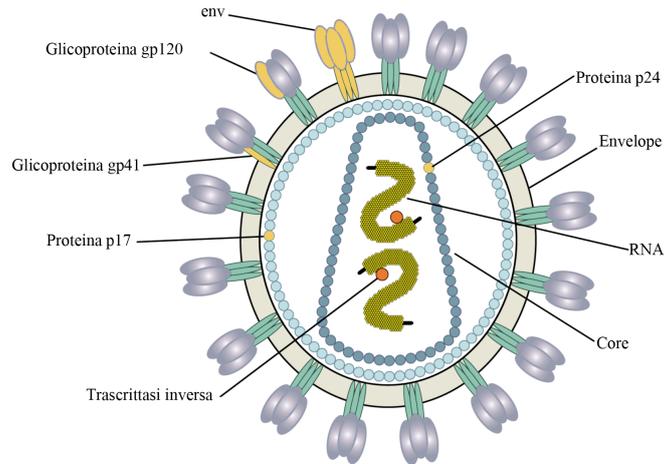


Figura 1.5. Rappresentazione schematica del virus HIV-1.

All'interno del *core* sono presenti i tre enzimi essenziali per il ciclo vitale del virus: trascrittasi inversa (RT), integrasi (IN) e proteasi (PR). Nel *core* sono inoltre presenti due proteine basiche (*p7* e *p9*), strettamente legate al materiale genetico del virus. Quest'ultimo è rappresentato da 2 copie identiche di RNA monofilamento con sequenza positiva codificante per 9 geni che verranno tradotti nelle 19 proteine che costituiscono il fenotipo virale (**Figura 1.6**).

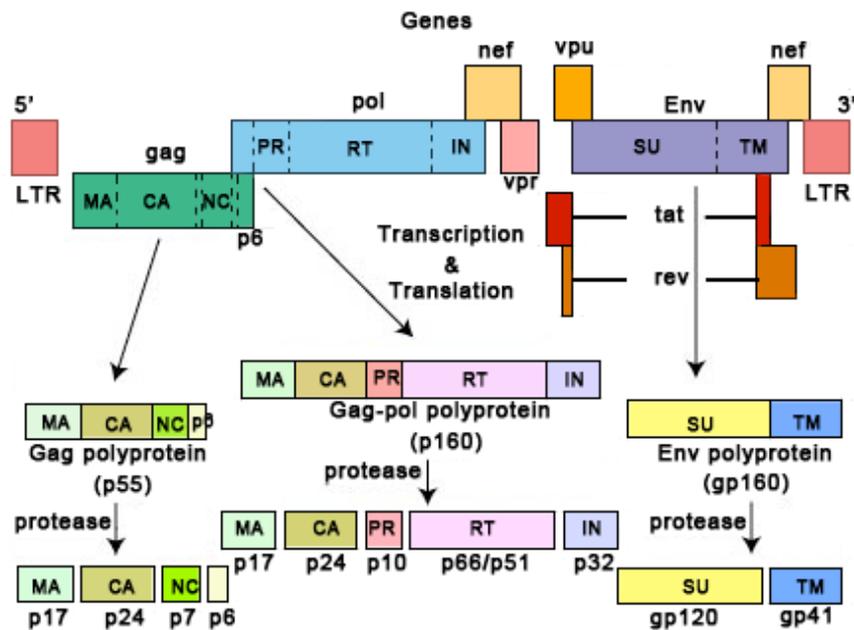


Figura 1.6. Schema del genoma virale e delle proteine correlate.

Nicolino Pala

Studi sui metallo-enzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

Come riassunto in **Tabella 1.1** i geni virali e le rispettive proteine sono funzionalmente divisibili in 3 categorie.

Classe	Gene	Proteina codificata	Funzioni
Strutturali	gag	<i>p6, p7, p17, p24</i>	Costituiscono le strutture del virione maturo.
	pol	PR, RT, IN	Presiedono alle attività enzimatiche proprie del virus.
	env	<i>gp41, gp120</i>	Permettono il riconoscimento e l'adesione alla cellula da infettare.
Regolatori	tat	<i>tat</i>	Funge da attivatore dell'espressione genica virale.
	rev	<i>rev</i>	Favorisce il trasporto dal nucleo al citosol dei trascritti virali.
	nef	<i>nef</i>	Sostiene la replicazione e promuove l'evasione del virus dalla risposta immunitaria
Accessori	vpr	vpu	Favorisce la formazione ed il rilascio dei virioni
	<i>vpr</i>	<i>vpu</i>	Implicata nella replicazione virale e nel trasporto del PIC nel nucleo

Tabella 1.1. Classificazione e funzioni delle componenti virali.

Il ciclo biologico dell'HIV si sviluppa in fasi cronologicamente distinte. Inizia con la fase di riconoscimento ed adesione alla cellula bersaglio, a cui segue la fusione dell'*envelope* con la membrana plasmatica e l'internalizzazione del *core* "nudo", il quale disgregandosi libera il suo contenuto nel citoplasma. A questo punto, la RT trascrive, e contemporaneamente degrada, l'RNA virale in cDNA. La sintesi del filamento complementare al cDNA porta alla formazione del DNA virale a doppio filamento. Quest'ultimo viene "integrato" nel genoma della cellula ospite dando vita al *provirus*. La trascrizione del genoma virale, ad opera dell'apparato cellulare, genera nuove copie di RNA virale che si localizzano nel citosol dove vengono tradotte in precursori polipeptidici che fungono da substrato per diverse proteasi che li tagliano ad ottenere le proteine virali. L'assemblaggio dei nuovi virioni è seguito dalla gemmazione, con ritenzione della membrana

Nicolino Pala

Studi sui metallo-enzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

cellulare. Il taglio di *gag-pol* ad opera della proteasi, all'interno del *core*, conclude la maturazione del virione (**Figura 1.7**).

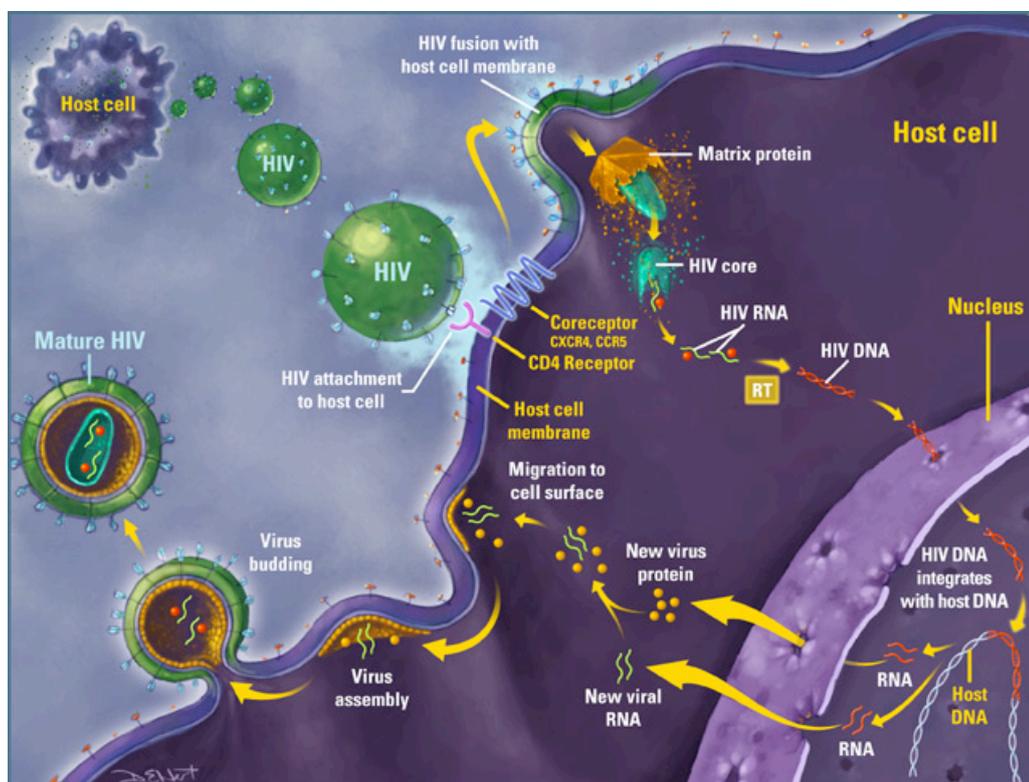


Figura 1.7. Ciclo biologico dell'HIV-1.

1.1.3 Terapie anti-HIV.

La conoscenza della struttura e del ciclo biologico del virus ha permesso l'individuazione dei possibili target per lo sviluppo di farmaci (**Tabella 1.2**).¹⁴⁻¹⁶

Fase del ciclo biologico	Possibile intervento
Riconoscimento e legame della cellula bersaglio	Anticorpi diretti verso i recettori virali o cellulari. Down-modulation dei recettori cellulari CD4. Antagonisti dei CXCR4 e CCR5.
Fasi iniziali della penetrazione	Inibitori della fusione. Farmaci in grado di bloccare il processo di <i>uncoating</i> .
Trascrizione del RNA virale in cDNA	Inibitori della trascrittasi inversa.
Degradazione dell'ibrido	Inibitori della RNAsi H.

Nicolino Pala

Studi sui metallo-enzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

RNA-cDNA	
Espressione del genoma virale	Costrutti antisenso. Inibitori delle proteine <i>tat</i> e <i>art/trs</i> .
Produzione ed assemblaggio delle componenti virali	Inibitori della proteasi. Inibitori della miristolazione di <i>p17</i> . Inibitori della glicosilazione delle proteine virali.
Gemmazione	Interferoni.

Tabella 1.2. Possibili target per lo sviluppo di farmaci anti-HIV.

Grazie ai progressi compiuti nella ricerca, attualmente vi sono in terapia 25 farmaci anti-HIV, appartenenti a 7 classi differenti (**Tabella 1.3**).¹⁷

Class	Drug	Approval date by FDA
Entry inhibitors (CRIs)	Maraviroc (UK-427,857, Selzentry®)	06 August 2007
Fusion inhibitors (FIs)	Enfuvirtide (T20, Fuzeon®)	13 March 2003
Integrase inhibitors (INIs)	Raltegravir (MK-0518, Isentress®)	12 October 2007
Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors (NRTIs)	Abacavir (ABC, Ziagen®)	17 December 1998
	Didanone (ddI, Videx®)	09 October 1991
	Emtricitabine (FTC, Emtriva®)	02 July 2003
	Stavudine (d4T, Zerit®)	24 June 1994
	Lamivudine (3TC, Epivir®)	17 November 1995
	Zalcitabine (ddC, Hivid®)	19 June 1992
Zidovudine (AZT, Retrovir)	19 March 1987	
Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors (NtRTIs)	Tenofovir (DF, Viread®)	26 October 2001
Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors (NNRTIs)	Delavirdine (DLV, Rescriptor®)	4 April 1997
	Efavirenz (EFV, Sustiva®)	17 September 1998
	Etravirine (TMC125, Intelence®)	18 January 2008
	Nevirapine (NVP, Viramune®)	21 June 1996

Nicolino Pala

Studi sui metallo-enzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

Protease inhibitors (PIs)	Amprenavir (AMP, Agenerase®)	15 April 1999
	Atazanavir (ATZ, Reyataz®)	20 June 2003
	Darunavir (TMC-114, Prezista®)	23 June 2006
	Fosamprenavir (GW-433908, Lexiva®)	20 October 2003
	Indinavir (IDV, Crixivan®)	13 March 1996
	Lopinavir (ABT-378, Kaletra®)	15 September 2000
	Nelfinavir (NFV, Viracept®)	14 March 1997
	Ritonavir (RTV, Norvir®)	01 March 1996
	Saquinavir (SQV, Fortovase®, Invirase®)	07 November 1997
	Tipranavir (TPV, Aptivus®)	22 June 2005

Tabella 1.3. Farmaci anti-HIV usati in terapia (adattata da rif. 17).

L'impossibilità di assicurare la completa eradicazione dell'infezione, ha spinto la comunità scientifica a considerare efficaci le terapie in grado di ridurre la carica virale del soggetto infetto al di sotto dei limiti rilevabili.¹⁷ Tale risultato, pur non consentendo la completa guarigione, permette comunque una condotta di vita ritenuta accettabile.

Uno dei problemi maggiori nella lotta all'AIDS è costituito dall'elevato tasso di mutazione dell'HIV che gli consente di sviluppare selezioni clonali farmacoresistenti rendendo non solo inutile, ma anche dannosa la monoterapia.¹⁸ È anche per questo che la moderna pratica medica considera come unica strategia vincente la terapia multifarmacologica che prevede l'adozione di una serie di collaudati protocolli terapeutici che vanno sotto il nome di *High Antiretroviral Therapy* (HAART).^{19,20} Essa prevede, nei regimi più comuni, l'assunzione combinata di almeno 3 farmaci differenti, appartenenti ad almeno due classi distinte (tra PRI, NNRTI, e NRTI), assicurando in tal modo una copertura che rimane attiva in media circa 13 anni prima di dover essere integrata o sostituita.⁸ Recenti studi riportano come l'aspettativa di vita media di un sieropositivo giovane, che abbia accesso alle terapie adatte, sia quantificabile in 35 anni.²¹ Nonostante questo la HAART soffre di limitazioni importanti che ne impongono una rivisitazione, tra queste: a) solo il 20-50% dei soggetti risponde positivamente al trattamento farmacologico (la percentuale è più bassa in pazienti che sono stati trattati precedentemente con la monoterapia); b) il riscontro che un sempre maggiore numero di nuovi sieropositivi risulta portatore di ceppi virali naturalmente resistenti ai farmaci in uso;²² c) l'incapacità dei protocolli HAART di eradicare completamente il virus, il quale sopravvive nei "santuari" dai quali può, in caso di sospensione della cura, riprendere la sua marcia di conquista del sistema immunitario e, cosa ancora più drammatica, nei quali può evolvere in ceppi resistenti alla terapia in atto;⁹ d) i costi, ancora proibitivi per la maggior parte della popolazione mondiale che convive con l'HIV; e) gli effetti

Nicolino Pala

Studi sui metallo-enzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

collaterali, e i problemi di posologia come tempi, modi e frequenza di assunzione dei singoli farmaci che diminuendo la *compliance* dei pazienti riducono di fatto l'efficacia della HAART.

Appare quindi chiara l'esigenza di sviluppare una nuova generazione di farmaci in grado di ridurre o minimizzare i problemi mostrati da quelli attualmente in uso. In questo contesto l'HIV-1 integrasi si è dimostrato un valido target per lo sviluppo di nuovi farmaci anti-HIV poiché è essenziale per la replicazione virale, non esiste nell'organismo ospite una controparte che potrebbe produrre problemi di selettività, e permette la possibilità di poter predisporre una terapia multifarmacologica diretta su tutti e tre gli enzimi funzionali del virus.^{9,15,16,23-32}

Nicolino Pala

Studi sui metallo-enzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

1.2 HIV-1 integrasi

1.2.1 Struttura

Membro della famiglia delle polinucleotidil transferasi e codificato dal gene *pol*, l'IN è un metalloenzima di 32 kDa con una struttura primaria composta da 288 amminoacidi (**Figura 1.8**).³³⁻³⁷

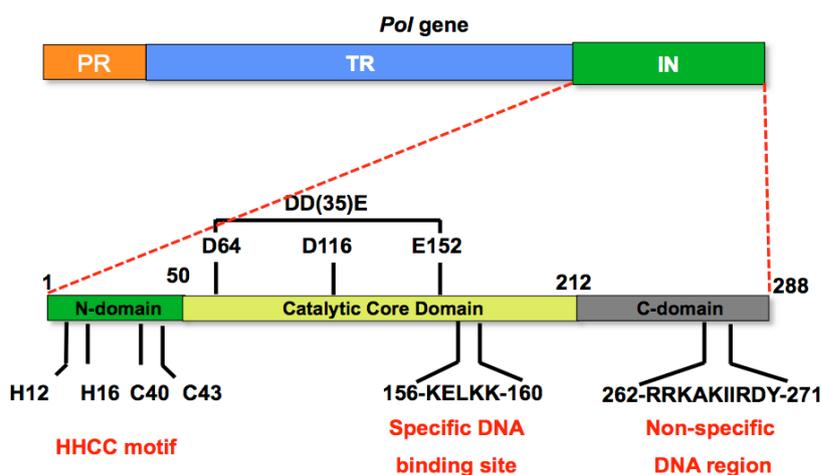
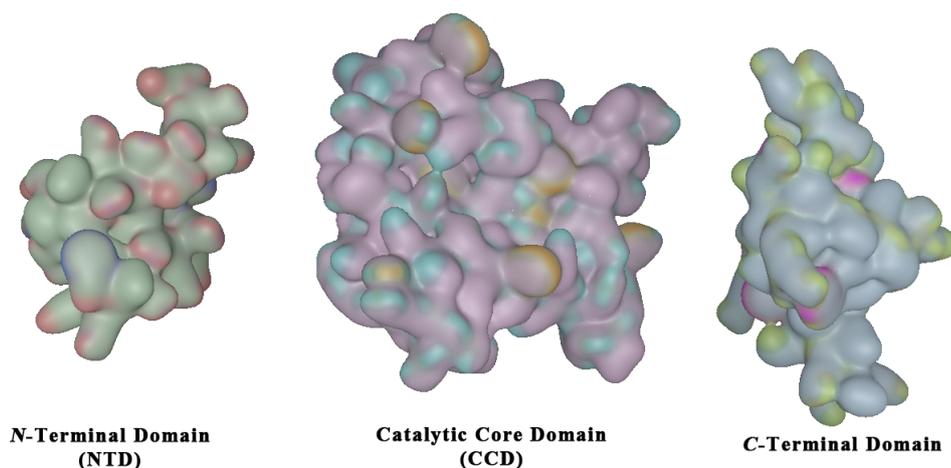


Figura 1.8. Schema semplificato della struttura primaria dell'IN.²⁴

Strutturalmente nell'IN è possibile distinguere tre domini topologicamente distinti: un dominio N-terminale, uno spezzone o *core* centrale ed un dominio C-terminale (**Figura 1.9**).^{36,37}



Nicolino Pala

Studi sui metallo-enzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

Figura 1.9. Struttura dei tre domini funzionali dell'HIV-1 IN.

La regione N-terminale (*N-Terminal Domain*, NTD), essenziale per la multimerizzazione, comprende i residui da 1 a 49. La struttura del NTD è altamente conservata nelle integrasi dei retrovirus^{38,39} e contiene una regione in grado di legare lo Zn^{2+} (ZBD o *Zinc Binding Domain*) costituita da quattro residui (H12, H16, C40 e C43) disposti a formare una struttura tipo *zinc finger*.⁴⁰

Il *Catalytic Core Domain* (CCD) si estende tra i residui 50 e 212 e risulta il più grande e strutturalmente complesso dominio dell'IN. Il CCD è caratterizzato dalla presenza di tre residui acidi (D64, D116 e E152) i quali concorrono a formare una struttura altamente conservata in tutte le integrasi retrovirali detta *triade catalitica* o *DDE motif*.^{41,42} Il suo ruolo, come anche quello dei metalli covalenti da essa coordinati, è essenziale per l'attività catalitica dell'IN tanto che l'assenza dei cofattori metallici o mutazioni a carico della triade aboliscono completamente il processo di integrazione.^{43,44} Per quanto riguarda i cofattori metallici, i dati strutturali disponibili sono in grado di confermare solamente la presenza di un catione metallico coordinato dai due aspartati D64 e D116, ma le analogie con le altre polinucleotidil polimerasi fanno ragionevolmente prevedere la possibilità che un secondo catione metallico sia presente nello spazio tra D64 e E152 (**Figura 1.10**).^{45,46}

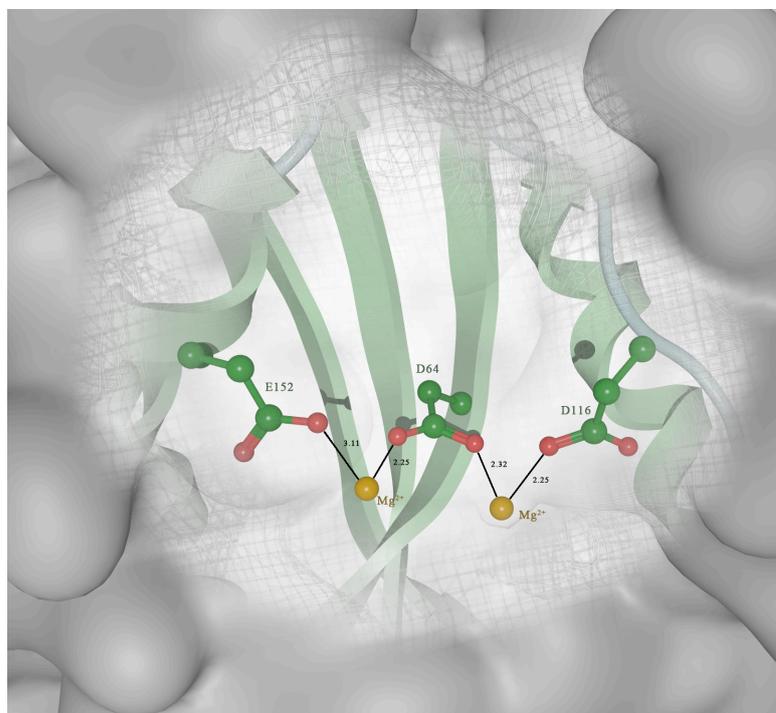


Figura 1.10. Triade catalitica dell'IN coordinata con due cationi Mg^{2+} .

Nicolino Pala

Studi sui metallo-enzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

Anche la natura del catione è dibattuta; infatti, mentre dagli studi *in vitro* si osserva un'attività dell'enzima 10 volte superiore in presenza di Mn^{2+} rispetto al Mg^{2+} ,⁴⁷⁻⁴⁹ la maggiore abbondanza nelle cellule di quest'ultimo ($\sim 10^{-3}$ M contro 10^{-7} M del Mn^{2+}) lo rendono il cofattore più probabile *in vivo*.^{36,50}

La regione C-terminale (*C-Terminal Domain*, CTD; residui 213-288) si presenta come quella meno conservata dal punto di vista della sequenza amminoacidica, caratteristica comune a tutte le integrasi retrovirali.⁵¹ Dal punto di vista funzionale, essa è coinvolta soprattutto nei processi associativi quali la multimerizzazione, le interazioni con la RT nel PIC (vedi oltre) e con il DNA.^{46,48, 51-53} La sua importanza è dimostrata dal fatto che l'assenza del CTD abolisce l'attività catalitica dell'enzima.

Stando alle evidenze sperimentali, l'IN sembrerebbe agire come omo-oligomero a simmetria pari (dimero o tetramero). Con il termine IN si indicano quindi non solo la singola catena polipeptidica ma anche la sua forma multimerica attiva.

1.2.2 Il processo di integrazione

La funzione dell'IN è quella di permettere l'integrazione del DNA virale nel genoma della cellula ospite. L'IN presiede due importanti sequenze di eventi distinti tra loro spazialmente, temporalmente e strutturalmente: il *3'-Processing* (3'P) e lo *Strand Transfer* (ST).^{36,48,49,54} Non appena la RT termina la trascrizione del DNA virale duplex, l'IN si lega ad esso riconoscendone una particolare sequenza virus specifica (TCTCTACAGT) localizzata alle estremità del doppio filamento e detta *Long Terminal Repeat* (LTR).⁵⁵ Il complesso IN-DNA virale costituisce in tal modo il nucleo del *complesso di preintegrazione* (PIC), alla formazione del quale concorrono proteine virali (RT, *p17* e *p24*) e cellulari (LEDGF/p75, INI1, BAF e HMGA1). Il PIC provvede a promuovere, guidare ed assicurare il corretto svolgimento del processo di integrazione. In seguito alla formazione del PIC ha inizio la fase del 3'P durante la quale l'IN, probabilmente associata in forma di dimero, rimuove gli ultimi due nucleotidi (GT) da entrambe le estremità 3' del DNA virale. A questo punto il PIC trasloca dal citosol nel nucleo dove l'IN, probabilmente come dimero di dimeri,⁵⁶ dapprima si lega in maniera aspecifica al DNA ospite, ed in seguito promuove l'integrazione del DNA virale all'interno di una sequenza di 5 paia di basi del DNA ospite. La modalità di inserzione crea un ibrido fra i due genomi che presenta in entrambi i filamenti un'interruzione costituita da un gap di 3 paia di basi seguita in direzione 5' da due coppie di basi non complementari. L'escissione di queste ultime ed il riempimento dei due gap, probabilmente, ad opera degli enzimi cellulari, completa la formazione del provirus (**Figura 1.11**).

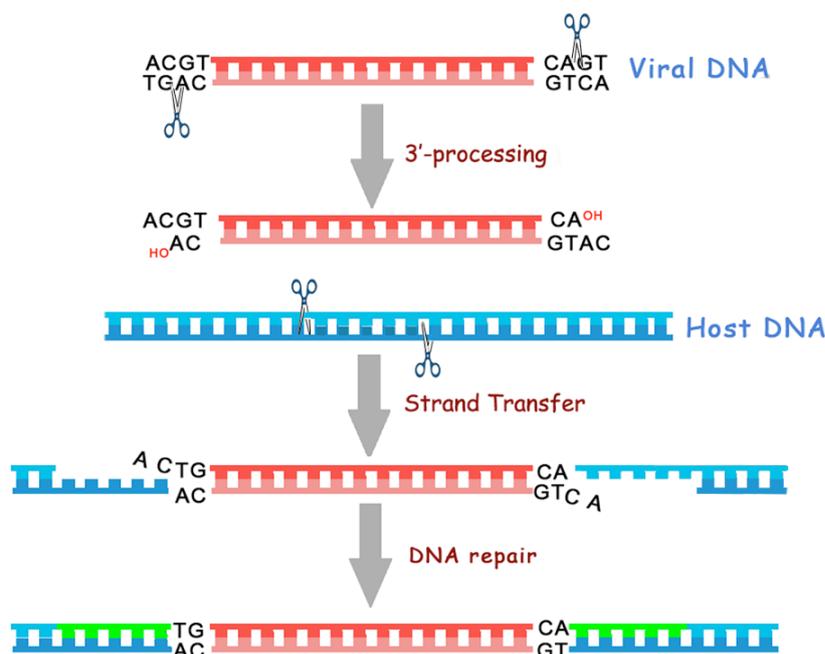


Figura 1.11. Rappresentazione del processo di integrazione.

1.2.3 Il ruolo dei cofattori metallici nel processo di integrazione

A livello molecolare il meccanismo di integrazione può essere spiegato invocando la teoria del “Two Metal Ions” (Figura 1.12).⁵⁷ In accordo con tale ipotesi meccanicistica, durante il 3’P la penultima (G) e la terzultima base (A) del filamento di DNA virale vengono a trovarsi nel sito catalitico in prossimità di entrambi i cofattori metallici. Di questi, quello coordinato da D64 e D116, agendo da acido di Lewis, aumenta l’elettrofilia del fosforo favorendo in tal modo l’attacco nucleofilo di una molecola d’acqua secondo un meccanismo di tipo S_N2-similare, mentre il secondo catione agisce da stabilizzante dell’intermedio pentaedrico formatosi e favorisce l’escissione della base in 3’ (Figura 1.12, parte superiore).

Durante lo ST il nucleofilo è rappresentato dall’ossidrile libero dell’estremità 3’ del DNA virale mentre il legame fosfoestereo che subisce l’attacco appartiene al DNA ospite. Il meccanismo di reazione è sempre del tipo S_N2-similare, mentre il gruppo uscente in questo caso è l’estremità 3’ del DNA ospite (Figura 1.12, parte inferiore).

Nicolino Pala

Studi sui metallo-enzimi come bersaglio per l’attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

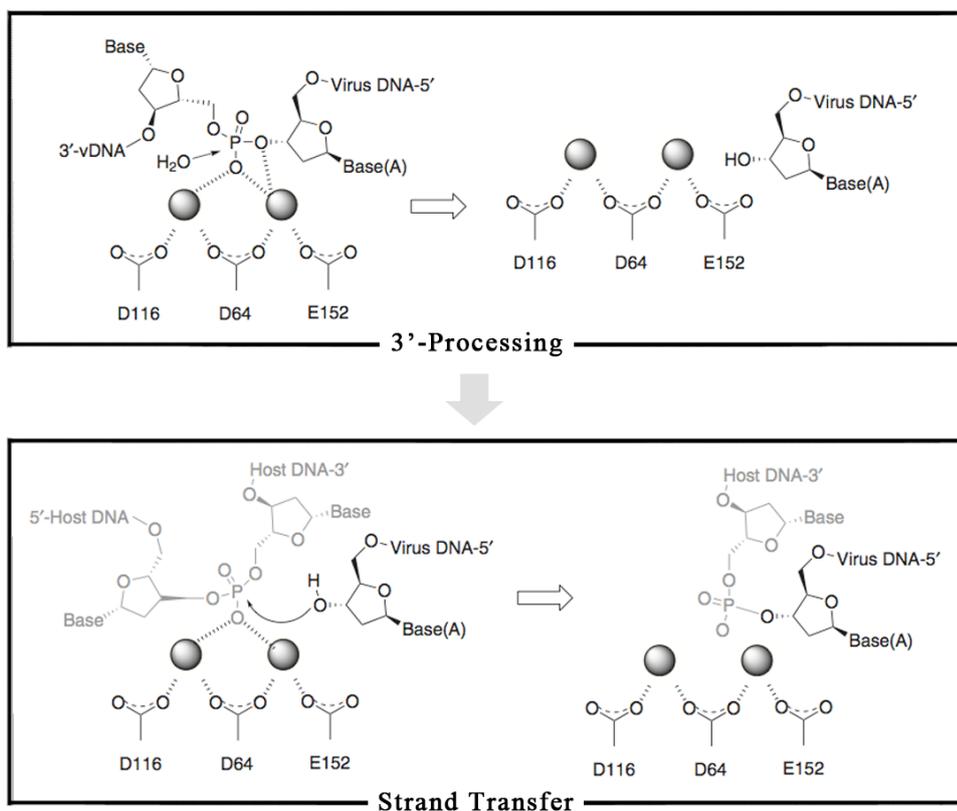


Figura 1.12. Meccanismo d'azione dell'IN secondo la "Two Metal Ion Theory".

Recentemente, una nuova ipotesi tenta di chiarire il differente ruolo dei cofattori metallici durante il 3'P e lo ST. Secondo quest'ipotesi il catione coordinato dai due aspartati rivestirebbe un ruolo preminente nel 3'P tanto da poter essere l'unico coinvolto in questa fase. Il secondo cofattore sarebbe necessario solo per lo ST e potrebbe occupare la sua posizione nel sito catalitico solo dopo il 3'P. Tale ipotesi è consistente con il meccanismo di reazione proposto (S_N2), che presuppone come il diverso peso dei cofattori nei due step catalitici dipenda dalla loro funzione, basti pensare che nello ST le posizioni del gruppo uscente e del nucleofilo risultano invertite rispetto al 3'P.⁵⁸

1.2.4 Il blocco del processo d'integrazione come strategia antivirale

Nella concezione moderna di *Drug Discovery* (DD) gli elementi portanti per lo sviluppo di un farmaco sono il riconoscimento del target molecolare e delle sue funzioni, insieme ai meccanismi che portano all'interazione farmaco-recettore ed alle risposte che questi evocano nell'organismo. In quest'ottica, progettare e realizzare farmaci in grado di bloccare il processo d'integrazione appare una sfida difficile, ulteriormente complicata da alcune caratteristiche peculiari di tale

Nicolino Pala

Studi sui metallo-enzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

processo catalitico in generale, e dell'IN in particolare, che ne hanno notevolmente rallentato lo sviluppo:

Complessità del processo che si sviluppa in steps separati spazialmente e temporalmente.
Aspetti meccanicistici più intimi dell'integrazione non chiariti completamente.
Coinvolgimento di componenti virali e cellulari che differiscono per numero e funzioni nelle varie fasi del processo.
Ruolo, numero e modalità d'azione dei cofattori metallici ancora dibattuti.
Scarsa solubilità dell'IN che ostacola la possibilità di ottenere dati di cristallografia a raggi X dell'intero enzima (con o senza inibitori cocristallizzati e/o DNA).

Si rimanda alla **tabella 1.4** per una panoramica dei possibili inibitori dell'integrazione comparsi in letteratura.^{22,59-63}

Localizzazione cellulare	Step	Target	Approccio antivirale	Inibitori noti
Virione Citoplasma Nucleo	Multimerizzazione dell'IN	IN	<ul style="list-style-type: none"> • Anticorpi specifici diretti verso le regioni deputate alla multimerizzazione. • Inibitori dello Zinc Binding Domain. • Shiftides: promuovono e stabilizzano oligomeri non attivi. • Multimerization disruptor: interferiscono con la multimerizzazione impedendola. • Peptidi antisenso: mimano i domini di multimerizzazione. 	Fab35 Mab17 YFLILL
Citoplasma	IN-DNA complex	IN BAF HMG1 LTR	<ul style="list-style-type: none"> • Composti in grado di mascherare le regioni LTR. • Promotori la degradazione delle LTR. • Oligonucleotidi antisenso. 	G-quartets Acido L-cicorico MAP30 GAP 31
Citoplasma	PIC assembly	RT IN BAF HMG1	<ul style="list-style-type: none"> • Anticorpi specifici diretti verso i componenti del PIC. • Peptidi antisenso. • Inibitori allosterici dell'assembly. 	
Citoplasma	3'P	IN	<ul style="list-style-type: none"> • Inibitori selettivi del 3'P 	Piranodipirimidine
Pori nucleari	Migrazione del PIC nel nucleo	Vpr MA IN cPPT LEDGF	<ul style="list-style-type: none"> • Peptidi che mimano i segnali di localizzazione nucleare. • Inibitori dei sistemi di trasporto. 	CNI-H0294
Nucleo	Selezione del sito di integrazione	IN DNA ospite INI LEDGF	<ul style="list-style-type: none"> • Composti in grado di impedire il riconoscimento PIC-DNA ospite. • Stabilizzanti la cromatina. 	
Nucleo	ST	IN INI LEDGF	<ul style="list-style-type: none"> • Inibitori del sito catalitico. • Inibitori allosterici. • Multimerization disruptor e shiftidi. • Composti in grado di impedire il complesso IN-LEDGF 	Dichetoacidi e loro derivati ^a
Nucleo	Gap-filling	Enzimi cellulari	<ul style="list-style-type: none"> • Inibitori dei processi riparativi del DNA. 	

^{a)} Al momento il composto Merck Raltegravir è l'unico inibitore del processo di integrazione entrato in terapia.

Tabella 1.4. Schema riassuntivo dei possibili inibitori dell'integrasi.⁶³

Nicolino Pala

Studi sui metallo-enzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

1.3 I MCINI (*Metals Chelator Integrase Inhibitors*)

In questo lavoro verranno analizzati gli aspetti riguardanti i β -diceto acidi (DKAs) e i loro derivati, caratterizzati da uno spezzone riconducibile all'acido 2,4-diosso-4-butanoico, e attualmente considerati la più importante famiglia di inibitori dell'IN. Per i composti appartenenti a questa categoria è stata dimostrata una inibizione selettiva del secondo processo catalitico dell'IN, quello dello ST, e per questo vengono indicati anche come *Integrase Strand Transfer Inhibitors* (INSTIs). Il meccanismo tramite il quale i DKAs esplicano la loro attività prevede probabilmente una interazione di tipo chelante con gli ioni metallici presenti nel sito catalitico (vedi oltre). Tale capacità complessante è stata recentemente investigata, e dimostrata, per alcuni analoghi di questa classe, dal presente gruppo di ricerca.^{65,66} Pertanto, nel considerare altri composti strutturalmente correlati ai DKAs, e dei quali rappresentano una evoluzione, si ritiene opportuno proporre anticipatamente per tale classe generale di inibitori l'acronimo MCINI (*Metals Chelator Integrase Inhibitors*). Tale denominazione consente un più semplice riferimento ogni qualvolta si renda necessario menzionare tali composti, favorendo nel contempo una più scorrevole discussione. Inoltre, in questo modo si identifica nella capacità di inibire lo ST tramite la chelazione dei cofattori metallici la caratteristica funzionale comune ai componenti di questa classe di composti. Poiché appartenenti alla classe più generale degli INSTIs, i MCINI devono, necessariamente, soddisfarne i requisiti, vale a dire:³⁰

agire unicamente durante la fase di integrazione;

favorire l'accumulo dei prodotti del 3'P;

indurre la selezione di ceppi virali resistenti che presentano modificazioni a carico dell'IN.

In aggiunta, per essere considerato un MCINI un composto deve anche:

esplicitare la sua azione interagendo nel sito catalitico;

prevedere un meccanismo d'azione che coinvolga

l'interazione con i cofattori metallici presenti nel CCD.

I DKAs sono stati la prima classe di composti identificata come INSTIs (e anche come MCINI), nell'ambito di due progetti di ricerca condotti indipendentemente dalla Merck Research Laboratories⁶⁷ e dalla Shionogi & Co. Ltd.⁶⁸ Essi si sono dimostrati immediatamente dei promettenti *lead compounds*, selettivi verso lo ST e capaci di bloccare il processo di integrazione sia *in vitro* sia nei saggi sulle cellule infettate, a concentrazioni che, per diversi componenti della classe, rientrano nel range nanomolare.⁶⁷ Questo ha promosso un'intensa fase di ricerca ed ottimizzazione di tali strutture che ha portato alla realizzazione di numerosi derivati contenenti la funzione dicheto acida propriamente detta o una sua modificazione bioisosterica. Come risultato di questi sforzi, diversi DKAs sono entrati in sperimentazione clinica. Sfortunatamente, però, nessuno di essi è riuscito a concluderla positivamente.

L'analisi strutturale dei DKAs ha permesso di identificare le caratteristiche responsabili dell'attività inibitoria enzimatica. Tale struttura generale è costituita da tre domini distinti (**Figura 1.13**).

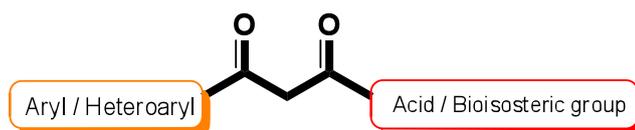


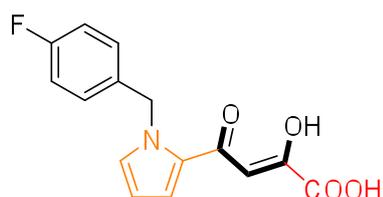
Figura 1.13. Struttura generale dei β -dicheto acidi e dei loro derivati.

La funzione acida, deprotonata in condizioni fisiologiche, è essenziale per l'attività inibitoria ed è solitamente costituita da un gruppo carbossilico o da un suo bioisostero, eventualmente di natura eterociclica. Essa è connessa con una porzione β -dichetonica centrale, presente prevalentemente nella forma cheto-enolica come dimostrato dai risultati degli studi strutturalistici effettuati su di essi tramite la cristallografia a raggi X e la spettroscopia NMR.^{65,66} La porzione aromatica, pur indispensabile per l'attività e per la potenza intrinseca, può essere suscettibile di modificazioni anche rilevanti, come la modificazione dei sostituenti, la complicazione molecolare, o la sostituzione con sistemi bi- e policiclici condensati.

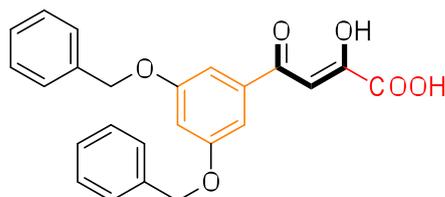
Alcuni β -dicheto acidi, tra i quali due dei capostipiti della classe, L-731,988 e L-708,906, sono stati selezionati dalla Merck R&L tramite un *in-house library High Throughput Screening* di 250 mila strutture. Questi composti hanno mostrato una potenza antivirale nel range nanomolare come conseguenza di un'azione selettiva sull'integrasi, dimostrata in saggi sulle cellule infettate.⁶⁷

Parallelamente, il derivato tetrazolico, il 5CITEP (Shionogi & Co), è stato individuato come inibitore appartenente formalmente alla stessa classe, e successivamente co-cristallizzato con il dominio catalitico dell'HIV-1 IN, fornendo la prima piattaforma per il *rational drug design*.

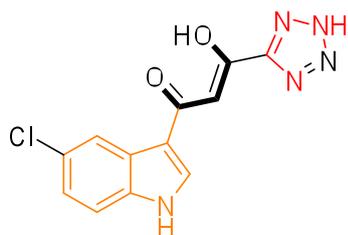
La Shionogi & Co ha successivamente sviluppato anche il primo bioisostero di tipo dichetotriazolico, l'S-1360, ritirato dalla sperimentazione durante gli studi clinici di Fase I per problemi di natura farmacocinetica.^{69,70}



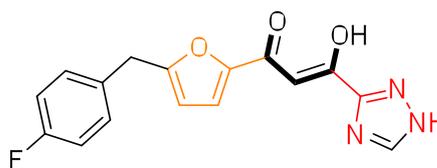
L-731,988



L-708,906



5CITEP



S-1360

Il successivo tentativo di ottimizzare il farmacoforo β -idrossi-chetonico, da parte della Merck R&L, ha portato all'individuazione dei composti 8-idrossi-1,6-naftiridin-7-carbossamidici, che presentano un'ottima attività insieme ad un interessante profilo farmacocinetico, come dimostrato dai composti L-870,812 e L-870,810,⁷¹ quest'ultimo comunque ritirato dalla fase di sperimentazione clinica I a causa della sua tossicità. Nel 2006, la Gilead Science e la Japan Tabacco Inc. hanno reso noti i dati relativi ad una nuova classe di MCINI sviluppata modificando la struttura degli antibiotici chinolonici. Questo ha portato al composto GS-9137, che possiede una capacità inibitoria enzimatica selettiva nei confronti dello strand transfer, in analogia agli altri componenti della classe, oltre ad un'attività antivirale (infezione acuta di HIV-1) e bassa citotossicità, per un profilo farmacologico complessivo molto simile al raltegravir (vedi oltre). Il GS-9137 si trova in Fase II/III di sperimentazione clinica e si attende un suo eventuale ingresso in terapia. Nello stesso periodo, la Merck portava avanti un progetto, in parallelo allo sviluppo dei

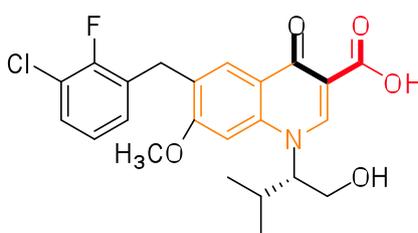
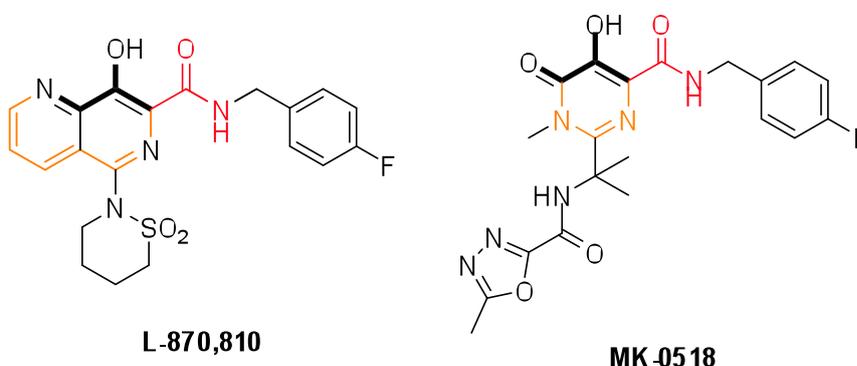
Nicolino Pala

Studi sui metallo-enzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

composti di struttura naftiridinica, basato sull'ottimizzazione di uno scaffold pirimidinico, grazie al quale è stato ottenuto il composto MK-0518, o Raltegravir, il primo inibitore selettivo dell'IN ad entrare in terapia con il nome di Isentress.⁷²⁻⁷⁴



1.3.1 L'inibizione interfacciale come meccanismo d'azione dei MCINI

Nonostante i numerosi studi sintetici e biologici effettuati sui MCINI (soprattutto DKAs), il meccanismo intimo attraverso il quale essi inibiscono l'IN non è stato ancora compreso, anche se è ormai accettata l'ipotesi che essi possano esplicare la loro attività biologica tramite la chelazione di uno o entrambi i cofattori metallici dell'IN.

L'alta selettività dei MCINI per lo ST ha portato ad ipotizzare un modello che propone un meccanismo d'azione definito *inibizione interfacciale*, secondo il quale i MCINI inibirebbero selettivamente lo ST legandosi all'interfaccia del complesso integrasi-DNA (**Figura 1.14**).^{30,67,75}

Come illustrato in **Figura 1.14**, l'integrasi avrebbe due siti di legame, un *sito donatore* (per il DNA virale) ed un *sito accettore* (per il DNA dell'ospite), organizzati attorno ai tre residui catalitici DDE e al(i) cofattore(i) metallico(i), nel complesso integrasi-DNA. Il *sito donatore* lega l'estremità 3' del DNA virale e catalizza il 3'P. Questo comporta una modificazione strutturale dell'integrasi che consente il legame del DNA ospite nel *sito accettore* per lo ST. I MCINI si

Nicolino Pala

Studi sui metallo-enzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

legherebbero selettivamente ad un'unica conformazione strutturale del *sito accettore*, successiva al legame del DNA virale e al 3'P, causando in esso un'ulteriore modifica conformazionale che impedirebbe il verificarsi dello ST.

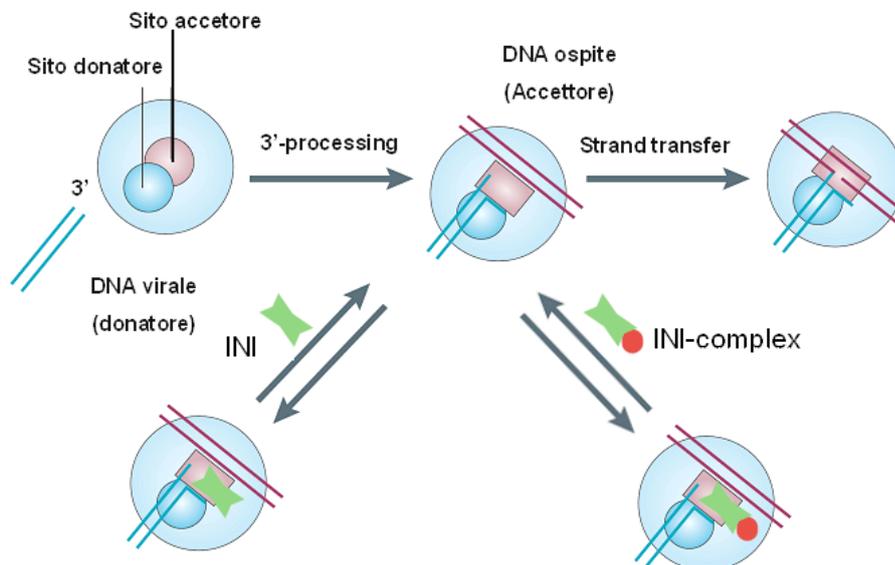


Figura 1.14. Meccanismo proposto di inibizione interfacciale dei MCINI.

La **Figura 1.14** mostra anche l'ipotetico legame dei DKA all'interfaccia del complesso integrasi-DNA-metalli divalenti. L'estremità 3' del DNA virale è legata all'integrasi e pronta ad attaccare un legame fosfodiesterico del DNA dell'ospite, ma i MCINI, interagendo con il metallo nel sito catalitico, stabilizzano il complesso nella conformazione di 3'P, impedendo in tal modo la reazione di ST.

1.3.2 Razionale

Un progetto di ricerca intrapreso già da diversi anni dal gruppo di ricerca del Dipartimento Farmaco Chimico Tossicologico e coordinato dal Dr. Sechi, ha permesso lo studio delle caratteristiche strutturali e del comportamento fisico-chimico di alcuni inibitori contenenti una funzione β -dicheto acida, che potevano essere correlate con il loro meccanismo d'azione. In questo contesto, è stata studiata l'azione complessante di alcuni derivati β -dicheto acidi nei confronti di ioni metallici divalenti partendo dal presupposto che inibitori contenenti tale farmacoforo potevano coordinare ioni in soluzione prima di interagire con il loro presunto sito di legame. Tale possibilità di coordinazione, qui denominata "pre-binding complexation", costituisce il cardine su cui poggia parte del razionale della presente lavoro.

Nicolino Pala

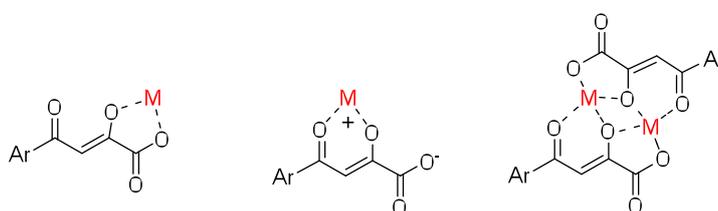
Studi sui metallo-enzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

Gli studi eseguiti sui due β -diceto acidi scelti come modello, l'acido (2Z)-2-idrossi-4-osso-4-fenil-2-butenico (**1**), e l'acido (2Z)-4-[1-(4-fluorobenzil)-1H-pirrol-2-il]-2-idrossi-4-osso-2-butenico (**2**) (**Figura 1.15a**), in una prima fase hanno contemplato la loro determinazione strutturale, e successivamente l'esecuzione di misure potenziometriche in presenza di ioni Mg^{2+} e Mn^{2+} in diverse condizioni sperimentali al fine di verificare se alcuni dei complessi ipotizzati erano rivelabili in soluzione. In accordo con le ipotesi anticipate, per entrambi i composti sono state rilevate diverse specie ed equilibri in soluzione. Queste osservazioni hanno spinto a sintetizzare dei complessi, utilizzando gli stessi ligandi modello e diversi ioni metallici divalenti (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Pd^{2+} , Pt^{2+}), che sono stati sottoposti a valutazione biologica (**Figura 1.15b**).

a)

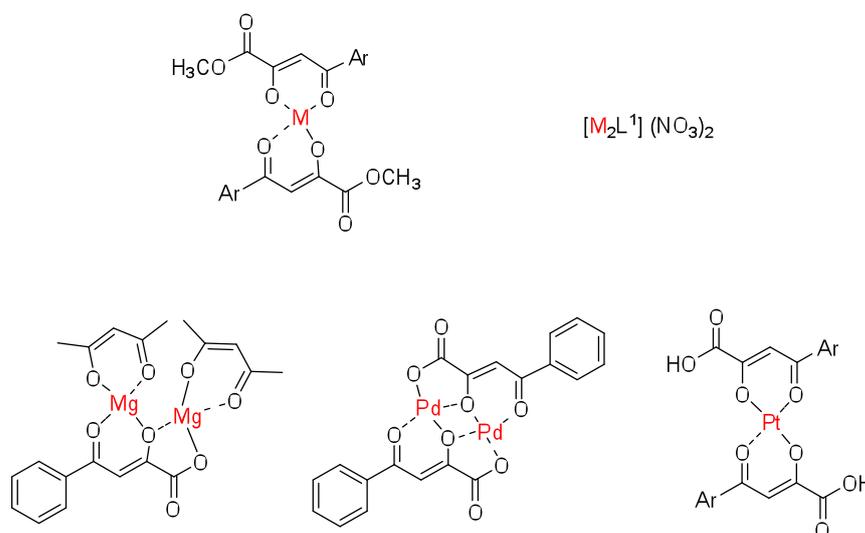


a) hydroxy-carboxylate (HC)

b) acetyl-acetonate (AA)

c) dimer

b)



Ar = phenyl

Ar = (4-Fluorobenzil)-1H-pyrrol-2-yl

 L^1 = (2Z)-2-oxido-4-oxo-4-phenylbut-2-enoateM = Divalent metal: **a** = Mg(II), **b** = Mn(II), **c** = Ni(II), **d** = Co(II), **e** = Cu(II), **f** = Zn(II)

Figura 1.15. Ipotesi strutturale per i complessi precedentemente sintetizzati.

Nicolino Pala

Studi sui metallo-enzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

Il razionale della possibile complessazione *pre-binding* era inoltre supportato dalla valutazione delle concentrazioni del cofattore metallico richieste per la catalisi nei saggi e a livello intracellulare. Poichè queste concentrazioni sono più alte del numero di molecole di IN (40-100 molecole di IN sono presenti in ogni particella virale) la formazione dei complessi in soluzione risulterebbe favorita. Si ricorda inoltre che, come generalmente accettato, è lo ione Mg^{2+} il più importante cofattore per l'integrazione nelle cellule, mentre lo ione Mn^{2+} sembra essere preferito *in vitro*.

Le specifiche attività dell'IN sono almeno 10 volte maggiori usando Mn^{2+} rispetto a Mg^{2+} nelle stesse condizioni.

Le costanti di equilibrio dei ligandi **1** e **2** e le costanti di formazione dei complessi con Mg^{2+} , Mn^{2+} e Ca^{2+} sono state quindi studiate tramite potenziometria. I relativi diagrammi di distribuzione, a pH fisiologico, hanno confermato la presenza di diverse specie per entrambi i ligandi con gli ioni considerati.

L'analisi retrospettiva dei dati di inibizione enzimatica suggeriva inoltre la possibilità che alcune specie di complessi in soluzione potessero essere rappresentative delle "specie attive" nelle condizioni fisiologiche e sperimentali. Inoltre, i risultati indicavano alcune combinazioni metallo-ligando ottimali per alcune specie di complessi esistenti in soluzione. Tali risultati fornivano elementi di discussione, oltre ad una possibile spiegazione del perché composti aventi proprietà fisico-chimiche simili presentano notevole differenze nell'attività inibitoria.

Il presente lavoro è quindi volto alla comprensione delle proprietà complessanti degli inibitori dell'HIV-1 integrasi appartenenti alla classe dei MCINI, e si propone di fornire nuove informazioni sulla possibilità da parte di validati inibitori dell'IN di operare mediante chelazione di ioni metallici, di fornire delucidazione sul sito di interazione di questi con l'enzima, di definire il loro ruolo nella modulazione dell'attività farmaco biologica, e di individuare possibilmente un unico putativo modello farmacoforico per la classe dei MCINI.

Si è, perciò, reso necessario uno studio multidisciplinare esteso ai composti più rappresentativi della classe dei MCINI, con particolare riferimento a quelli oggetto di sperimentazione clinica (vedi oltre). Per ognuno di questi composti era infatti individuabile uno spezzone farmacoforico in grado di fornire interazioni di tipo chelante, potenzialmente simili a quelle dimostrate dai modelli DKAs **1** e **2**. Le fasi sperimentali previste in questo studio sono state le seguenti: a) progettazione e sintesi di ligandi modello di inibitori; b) studio degli equilibri inibitore/ione metallico in soluzione; c) sintesi e caratterizzazione dei complessi metallici; d) analisi cristallografica dei ligandi e dei complessi; e) generazione di un modello farmacoforico; e) valutazione biologica dei ligandi e dei complessi.

Nicolino Pala

Studi sui metallo-enzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

Questo lavoro è stato realizzato nell'ambito di una collaborazione multidisciplinare instaurata con un gruppo di ricerca del Dipartimento di Chimica Inorganica, Chimica Analitica, Chimica Fisica dell'Università di Parma, e con il Prof. Nouri Neamati della University of Southern California di Los Angeles.

Si ritiene opportuno precisare che la parte relativa alla preparazione dei complessi, alla loro caratterizzazione ed al dettaglio sugli esperimenti di potenziometria e di cristallografia è contemporaneamente riportata come complemento in future dissertazioni previste presso l'Università di Parma e sarà presentata in manoscritti da sottoporre per la pubblicazione a breve.

1.3.3 Progettazione dei ligandi modello

Oltre ai due composti più rappresentativi dei DKAs (**1** e **2**), lo studio è stato esteso considerando i ligandi modello dei più rappresentativi inibitori MCINI di rilevanza clinica.

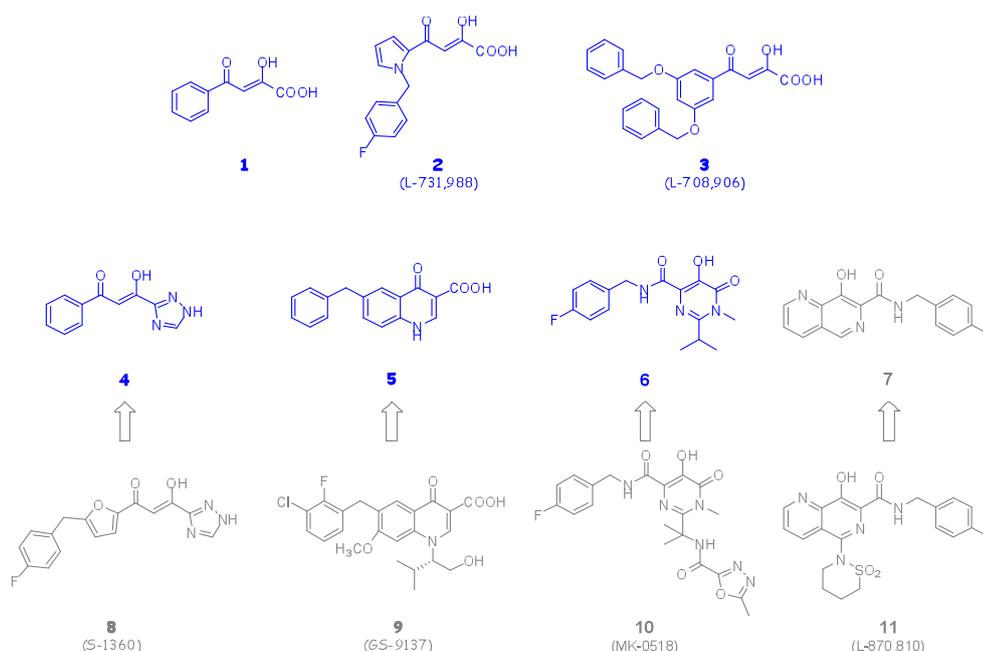


Figura 1.16. Struttura dei composti modello progettati e realizzati (in blu).

Sono stati, quindi progettati l'acido (*Z*)-4-(3,5-bis(benzilossi)fenil)-2-idrossi-4-ossobut-2-enoico (Merck L-708,806, **3**), inteso come ulteriore modello della classe dei DKAs; il (*2Z*)-3-idrossi-1-fenil-3-(1*H*-1,2,4-triazol-3-il)prop-2-en-1-one (**4**), riconducibile al dicheto triazolo S-1360

Nicolino Pala

Studi sui metallo-enzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

(Shionogi/GS&K); l'acido 6-benzil-4-osso-1,4-diidrochinolin-3-carbossilico (**5**), derivato del chinolone GS-9137 (Gilead); l'*N*-(4-fluorobenzil)-5-idrossi-2-isopropil-1-metil-6-osso-1,6-diidropirimidina-4-carbossammide (**6**), modello del farmaco Raltegravir (Merck MK-0518); e la *N*-(4-fluorobenzil)-8-idrossi-1,6-naftiridin-7-carbossammide (**7**), correlata al derivato naftiridinico L-870,810 (Merck). I modelli sono stati progettati in modo da riportare sia lo scaffold, sia la porzione farmacoforica degli inibitori selezionati in una combinazione strutturale semplificata, che potesse risultare facilmente gestibile in termini sintetici e preparativi (**Figura 1.16**).

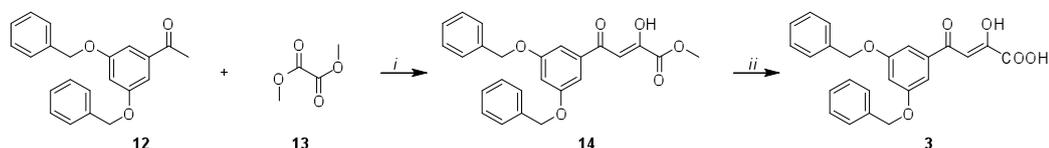
1.3.4 Approccio sintetico

Il lavoro sintetico ha visto la preparazione dei composti modello considerati e progettati, da sottoporre alle fasi successive dell'impianto progettuale e sperimentale predisposto.

A tal fine sono stati ripreparati i composti **1** e **2**, necessari per il completamento degli studi preliminari precedentemente menzionati, per la cui sintesi si rimanda ai dati riportati in letteratura.⁶⁵

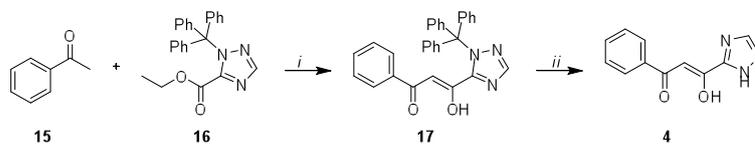
Il composto **3** è stato ottenuto per idrolisi alcalina dell'estere **14**, preparato per reazione di Claisen dal 3,5-dibenzilossiacetofenone (**12**) con il dimetilossalato (**13**) (**Schema 1.1**).

Schema 1.1.



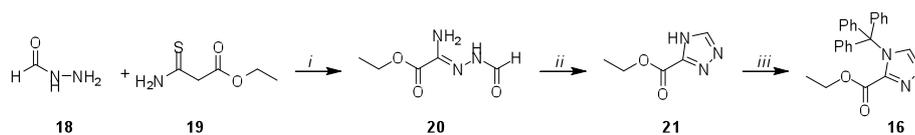
Reagenti e condizioni: *i*) DMF anidra, NaH a 0-5 °C, 65-70 °C per 5 ore. *ii*) NaOH 2 N, metanolo, 5 ore, 1 N HCl.

Il composto **4** è stato ottenuto per trattamento dell'acetofenone (**15**) e dell'intermedio **16** con LHMDS in THF a basse temperature e successiva deprotezione del risultante prodotto **17** con HCl in diossano a riflusso (**Schema 1.2**). Come nel caso degli analoghi β -dicheto acidi, anche questo composto è risultato esistere prevalentemente nella forma cheto-enolica (79%), evidenziata tramite esperimenti $^1\text{H-NMR}$ in $\text{DMSO-}d_6$, dal singoletto a $\delta_{\text{H}} = 7.28$ ppm riferibile al CH enolico della porzione idrossi-chetonica.

Schema 1.2.


Reagenti e condizioni: *i)* LHMDS 1 M in THF, THF anidro, -70 °C → t.a., 1.5 h; *ii)* HCl 3N, diossano, 80 °C, 30 min.

L'estere triazolico **21**, precursore dell'intermedio **16**, è stato ottenuto, seguendo il metodo riportato da Vanek *et al.*,⁷⁶ per riscaldamento a secco della formilidrazina (**18**) con la tioammide **19** a dare l'acilamminodrazone **20**, il quale, in seguito, è stato convertito per ciclizzazione in Diglyme a riflusso nel ciclo **21** in buone rese (83%). La successiva protezione con tritilcloruro ha portato al desiderato sintone **16** (Schema 1.3).

Schema 1.3.


Reagenti e condizioni: *i)* 65 °C, 1 h; *ii)* Diglyme, riflusso, 1.5 h; *iii)* Clorotrifetilmetano, TEA, DMA anidra, t.a., 16 ore.

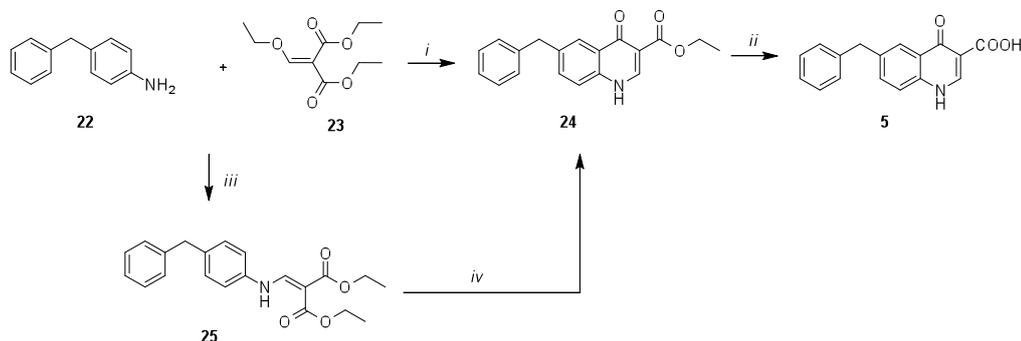
Il composto **5** è stato ottenuto per idrolisi alcalina con NaOH 2% a riflusso dell'estere **24**, preparato per trattamento della *p*-benzilnilina (**22**) con il dietil etossimetilmalonato (EMME, **23**) in Dowtherm A a 225-230 °C per 5 ore. Poiché la tecnica *one-pot* non garantiva rese accettabili, è stata adottata una sintesi alternativa che prevedeva la formazione iniziale del diestere **25**, per reazione della *p*-benzilnilina (**22**) in EMME a riflusso, e susseguente ciclizzazione in Dowtherm A (Schema 1.4).

Nicolino Pala

Studi sui metallo-enzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

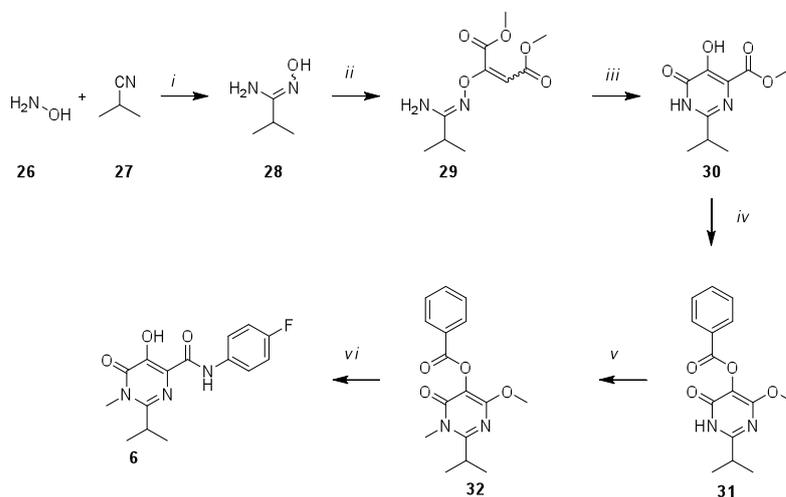
Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

Schema 1.4.


Reagenti e condizioni: *i)* Dowtherm A, 225-230 °C, 5 ore; *ii)* NaOH 2%, riflusso, 2.5 ore; *iii)* 130 °C, 2.5 ore; *iv)* Dowtherm A, 225-230 °C, 3 ore.

Il composto **6**, sviluppato come modello dell'MK-0518, è stato preparato seguendo la via sintetica riportata nello **Schema 1.5**. In questa procedura, l'intermedio **28** è stato ottenuto per reazione tra il nitrile **27** e idrossilamina (**19**) in etanolo e TEA a riflusso. Successivamente, per reazione di Michael dell'amino-ossima **28** con dimetilacetilene dicarbossilato (DMAD) si è avuta la formazione del diestere **29** che, per ciclizzazione in xilene a riflusso, ha fornito la diidrossipirimidina sostituita **30**, il cui gruppo ossidrilico in posizione 5 è stato protetto con un gruppo benzoile per trattamento con anidride benzoica in piridina.

Schema 1.5.


Reagenti e condizioni: *i)* TEA, EtOH, riflusso, 5 ore. *ii)* DMAD, CHCl₃, t.a., 1 ora. *iii)* xilene, riflusso, 12 ore. *iv)* anidride benzoica, piridina, t.a., 20 ore. *v)* CsCO₃, MeI, THF anidro, t.a., 2 ore. *vi)* *p*-F-benzilamina, MeOH anidro, tubo chiuso, 70 °C, 3 ore.

Nicolino Pala

Studi sui metallo-enzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

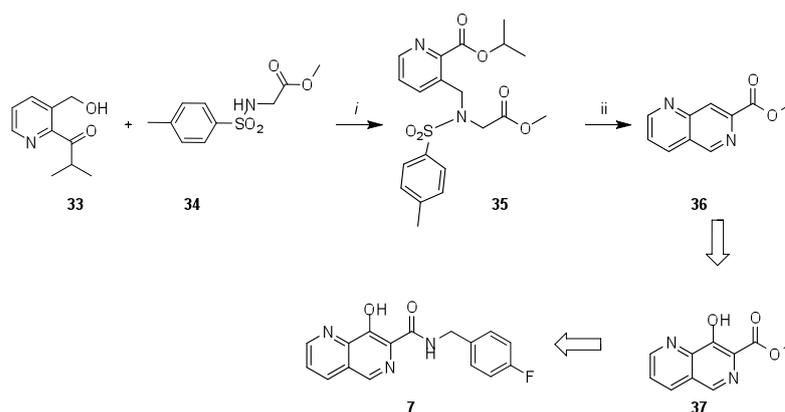
Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

Il composto **31** così ottenuto è stato metilato selettivamente sull'azoto con iodometano e cesio carbonato per dare il composto **32**. Infine, una doppia reazione di amidazione e contemporanea rimozione del gruppo protettore benzoilico per trattamento in tubo chiuso a 70 °C di **32** con *p*-fluorobenzilammina ha fornito il desiderato **6** (Schema 1.5).

Per quanto riguarda la sintesi del composto **7**, modello di semplificazione molecolare dell'inibitore Merck L-870,810, essa è tuttora in corso. La via sintetica predisposta prevede la realizzazione dell'intermedio chiave a struttura naftiridinica **36**, ottenibile per ciclizzazione termica dell'addotto **35**. Quest'ultimo è stato preparato per reazione di Mitsunobu tra l'alcol **33** ed il tosilglicinato di metile (**34**) in presenza di trifenilfosfina (TPP) e l'appropriato azodicarbossilato (Schema 1.6). Il successivo trattamento in tubo chiuso di **36** con *p*-fluorobenzilammina, in analogia a quanto seguito per il modello **6**, dovrebbe fornire il desiderato composto **7**.

Schema 1.6.



Reagenti e condizioni: *i*) DIAD o DEAD, TPP, THF, 0 °C, 4 ore *ii*) CH₃ONa, CH₃OH anidro, riflusso, 5 ore.

Per la sintesi dell'intermedio **33**, l'anidride piridin-2,3-dicarbossilica (**38**) è stata esterificata con isopropanolo (**32**) a dare l'intermedio acido **40**. Quest'ultimo è stato convertito nel corrispondente cloruro acilico **41** per trattamento con cloruro di tionile a 80°C. **41** è stato quindi ridotto, senza isolarlo, a **33** con boroidruo di sodio in THF anidro (Schema 1.7).

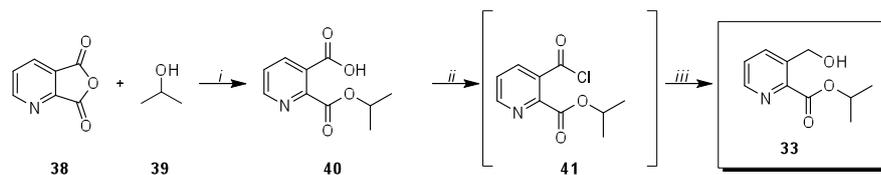
Nicolino Pala

Studi sui metallo-enzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

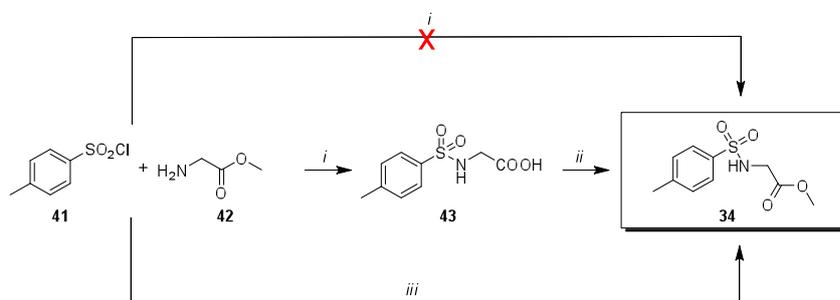
Schema 1.7.



Reagenti e condizioni: *i)* refluxo, 48 ore; *ii)* cloruro di tionile, refluxo, 3 ore; *iii)* NaBH₄, THF, 0 °C, 1 ora.

Secondo quanto riportato in una procedura sperimentale per la preparazione del L-870,810, il composto **34** avrebbe dovuto essere preparato per tosilazione del glicinato di metile (**42**) con il cloruro di p-toluensolfonile (**41**). Sfortunatamente, i tentativi per ottenere **34** secondo questa via portavano all'isolamento del solo acido libero **43**, il quale necessitava dell'esterificazione con metanolo a refluxo, in presenza di H₂SO₄ concentrato, per fornire il desiderato composto **34**. Un successivo approccio sintetico alternativo ha permesso di ottenere direttamente il composto **34** in ottime rese mantenendo inalterati i prodotti di partenza e variando semplicemente le condizioni di reazione (**Schema 1.8**).

Schema 1.8.



Reagenti e condizioni: *i)* NaOH 0,3 M, pH 9, 5 ore; *ii)* CH₃OH, H₂SO₄ conc., refluxo, 5 ore. *iii)* TEA, CH₂Cl₂, t.a., 24 ore.

Nicolino Pala

Studi sui metallo-enzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

1.3.5 Titolazioni potenziometriche

Le costanti di formazione dei complessi con Mg^{2+} e Mn^{2+} sono state studiate tramite titolazione potenziometrica e condotte in una soluzione metanolo/acqua 9:1 (v/v) ad una forza ionica di KCl 0.1 M e a 25 ± 0.1 °C, nel range di pH 2-12, sotto atmosfera d'azoto.

Per il comportamento in soluzione dei DKAs **1** e **2** con lo ione Mg^{2+} , i più favorevoli parametri statistici sono stati ottenuti in generale per le specie MgL_2^{2-} , Mg_2L^{2+} , Mg_2L_2 , e, a $pH > 11$, $Mg_2L_2(OH)^-$, ma la loro costante di formazione cumulativa differiva significativamente. I diagrammi di distribuzione **(a)** e **(b)** in **Figura 1.17**, mostrano le quantità relative delle specie a pH fisiologico per i due sistemi: la specie Mg_2L^{2+} è quella predominante per il ligando **1**, mentre per **2** la specie Mg_2L_2 risulta essere la più abbondante (vedi anche **Figura 1.18**).

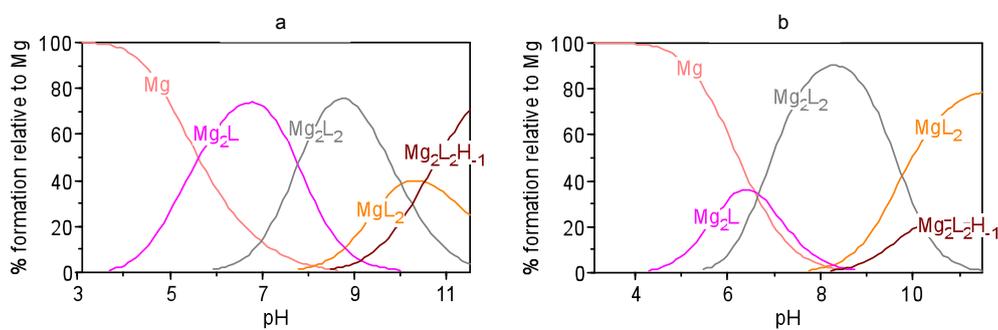


Figura 1.17. Diagrammi di distribuzione per i sistemi dei ligandi **1** e **2** con Mg^{2+} studiati: L: Mg = 2: 1. **a)** L=1; **b)** L= 2.

Dalle misure effettuate considerando gli stessi modelli **1** e **2** con gli ioni Mn^{2+} (estesa anche agli ioni Ca^{2+}), i migliori parametri statistici sono stati ottenuti per le specie riscontrate in soluzione nella titolazione degli stessi ligandi con Mg^{2+} , ma con maggiori costanti di formazione, a dimostrazione della più elevata stabilità dei complessi con Mn^{2+} . Come riportato nei diagrammi di distribuzione in **Figura 1.18**, a pH fisiologico la specie M_2L_2 è la più abbondante per entrambi i ligandi, sia con Mn^{2+} sia con Ca^{2+} . Le specie M_2L si formano in condizioni di pH nettamente acidi. Per le specie ML_2 le modalità di complessazione proposte sono formate dalla coordinazione dell'enolato e del carbossilato con lo ione metallico (**Figura. 1.15**).

Inoltre, come mostrato nei diagrammi di distribuzione dei sistemi L:Ca (**a** e **b**) e L:Mn (**c** e **d**) di **Figura 1.18**, i due sistemi non differiscono significativamente per le quantità relative delle specie presumibilmente formate a pH fisiologico, diversamente da quanto osservato nella precedente

titolazione $L:Mg^{2+}$ (**Figura 1.17**). In generale la specie Mg_2L_2 risulta essere quella predominante sia per il ligando **1** che per **2** per entrambi gli ioni considerati (vedi anche **Figura 1.17**)

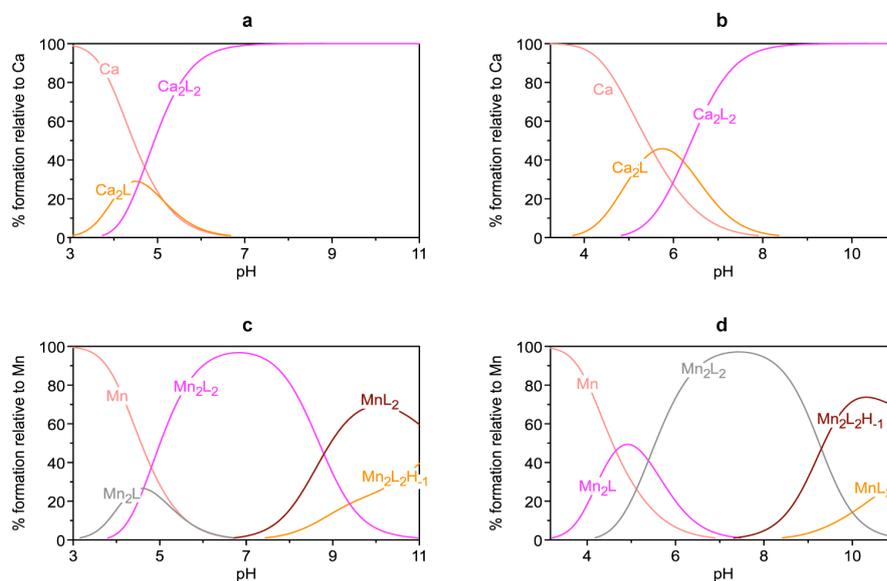


Figura 1.18. Diagrammi di distribuzione per i sistemi studiati per **1** e **2** con Mn^{2+} e Ca^{2+} : $L:M=2:1$.
a) $L=1$, $M=Ca(II)$; **b)** $L=2$, $M=Ca(II)$; **c)** $L=1$, $M=Mn(II)$; **d)** $L=2$, $M=Mn(II)$.

Il comportamento in soluzione del DKA modello **3** non è stato esplorato sperimentalmente in quanto presumibilmente riconducibile a quello mostrato dai composti precedenti (in particolare dal composto **2**).

Per quanto riguarda il modello triazolico **4**, i diagrammi di distribuzione **(a)** e **(b)** in **Figura 1.19**, mostrano le quantità relative delle specie a pH fisiologico per i due sistemi: la specie ML_2 risulta essere quella predominante sia nel caso del Mg^{2+} , sia del Mn^{2+} , anche se con un'abbondanza relativa superiore nel caso del primo catione (**Figura 1.19**).

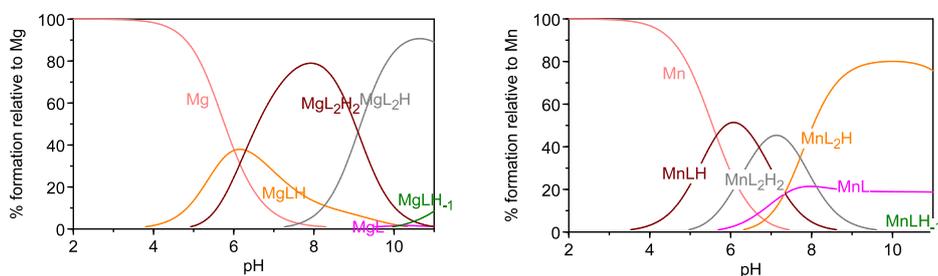


Figura 1.19. Diagrammi di distribuzione per i sistemi studiati per **4** con Mg^{2+} e Mn^{2+} : $L:M=2:1$. **a)** $L=4$, $M=Mg(II)$, **b)** $L=4$, $M=Mn(II)$

Nicolino Pala

Studi sui metallo-enzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

Lo studio relativo al comportamento in soluzione del composto **5** non è stato completato a causa di problemi inerenti la scarsa solubilità delle specie a pH superiori a 6. Al momento è allo studio la possibilità di superare l'impasse tramite la modificazione strutturale del composto **5** al fine di ottenere un derivato più solubile.

Infine, è stato studiato il comportamento in soluzione del ligando **6** (Figura 1.20). In questo caso i migliori parametri statistici sono stati ottenuti per le specie ML e ML_2 con entrambi i cationi, anche se con costanti di formazione più elevate per i complessi con Mn^{2+} rispetto alle specie con Mg^{2+} .

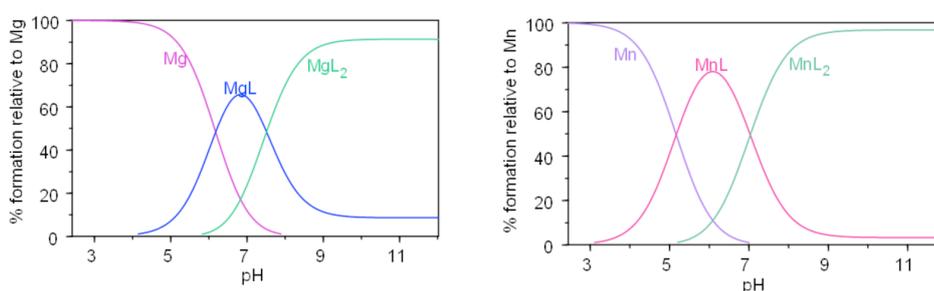


Figura 1.20. Diagrammi di distribuzione per i sistemi studiati per **6** con Mg^{2+} e Mn^{2+} : L:M=2: 1. **a)** L=6, M=Mg(II), **b)** L=6, M=Mn(II).

Tali informazioni hanno permesso di stabilire che in soluzione il ligando si comporta da legante bidentato, in grado di formare complessi di tipo ML ed ML_2 sia con Mg^{2+} , sia con Mn^{2+} . I dati sperimentali hanno inoltre evidenziato che, diversamente da quanto osservato per gli altri inibitori recanti la funzione β -dicheto acida, in questo caso non si ha la formazione di specie dinucleari.

Le misure e le analisi potenziometriche sono state condotte nel laboratorio della Prof.ssa Emilia Fiscaro dell'Università di Parma.

1.3.6 Preparazione dei complessi

Sulla base di questi risultati, è stata intrapresa la sintesi di un altro set di complessi, progettati al fine di acquisire ulteriori informazioni in termini di relazione struttura-attività.

Per reazione dei ligandi **3-6** con Mg(II) e Mn(II) in opportune condizioni sperimentali sono stati ottenuti i complessi rappresentati **Figura 1.21**. Come i precedenti, anche questi complessi sono stati caratterizzati tramite tecniche di spettroscopia IR, NMR, spettrometria di massa (ESI e FAB) ed analisi elementare. Per alcuni composti è stato anche possibile determinare la struttura tramite la cristallografia a raggi X (vedi oltre).

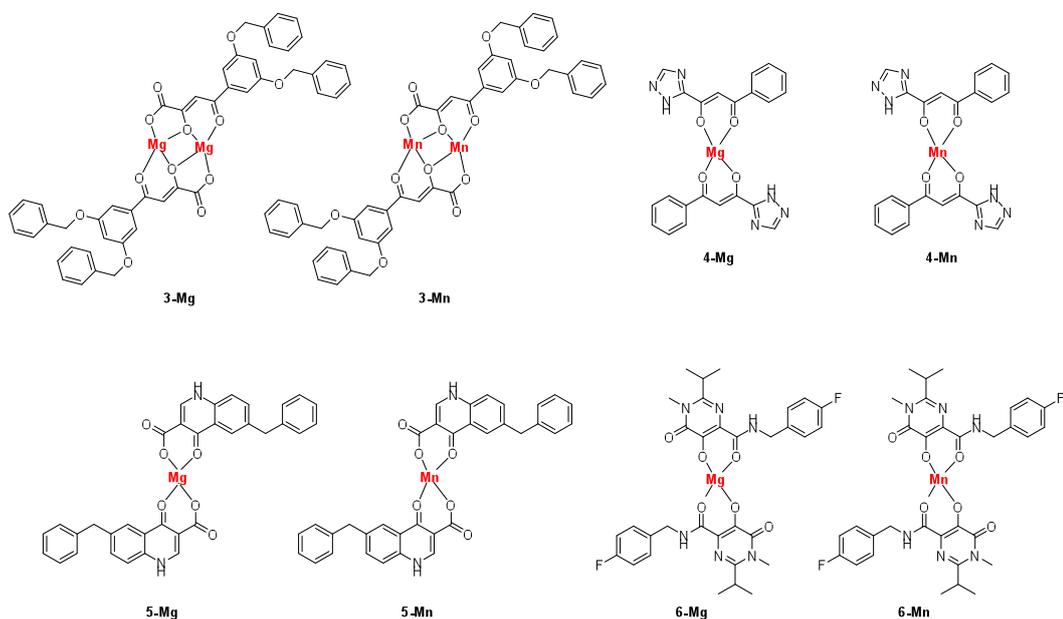


Figura 1.21. Rappresentazione schematica dei complessi ottenuti.

I complessi sono stati ottenuti in stechiometria definita, in linea con quanto precedentemente riscontrato dai dati di potenziometria. In particolare, i complessi formati per reazione tra il ligando **3** e i due cationi hanno fornito specie con stechiometria M_2L_2 , con entrambi i siti di coordinazione impegnati a formare una struttura dimerica (**Figura 1.21**), in accordo con le misure potenziometriche ottenute per i ligandi **1** e **2**.

Diversamente, i complessi ottenuti dai ligandi **4** e **6** presentavano un rapporto stechiometrico di tipo ML_2 , in perfetto accordo con quanto rilevato dal comportamento in soluzione per i rispettivi ligandi.

Nicolino Pala

Studi sui metallo-enzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

Infine, sono stati preparati i complessi del ligando **5**, sempre in stechiometria ML_2 . Sebbene il risultato non sia al momento confrontabile con i dati potenziometrici, esso è comunque coerente con quanto determinato per strutture simili, che presentano lo stesso modello di coordinazione.

I complessi sono stati preparati nel laboratorio del Prof. Mauro Carcelli e della Dott.ssa Dominga Rogolino dell'Università di Parma.

1.3.7 Cristallografia a raggi X

Tramite la cristallografia a raggi X sono state inequivocabilmente dimostrate le strutture dei ligandi modello sintetizzati e di alcuni dei rispettivi complessi isolati. In particolare l'ottenimento delle strutture cristalline dei complessi ha permesso di ricavare dati importanti sulla loro esatta geometria, sull'impacchettamento cristallino, e sulla modalità di coordinazione.

Di seguito vengono riportati le immagini delle strutture relative ai ligandi e ai complessi per i quali è stato possibile ottenere il cristallo da sottoporre ad analisi cristallografica (**Figure 1.22-27**).

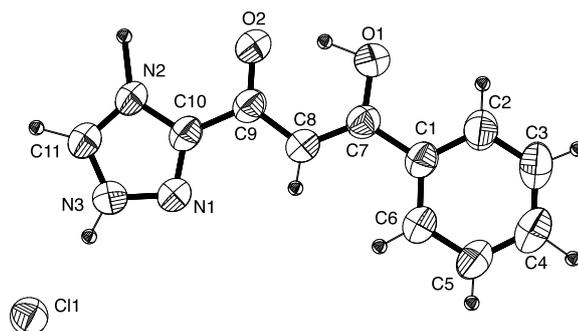


Figura 1.22. Rappresentazione ORTEP del composto **4**, ottenuto come cloridrato. Da notare che in questa forma la funzione enolica del sistema dichetonico è presente nelle posizioni 3 e 4 dello spezzone dichetotriazolico.

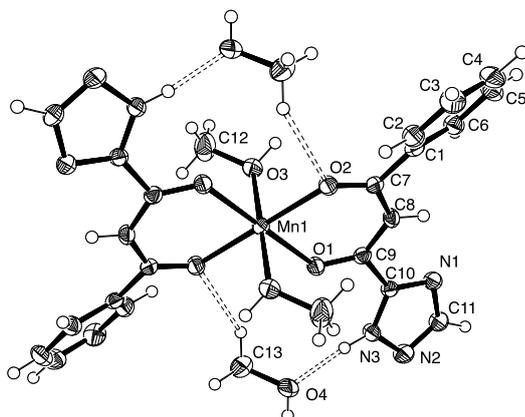


Figura 1.23. Rappresentazione ORTEP del complesso **4-Mn**. Il Mn^{2+} occupa un centro di simmetria. Le linee tratteggiate indicano i legami idrogeno con le molecole di metanolo non coordinate.

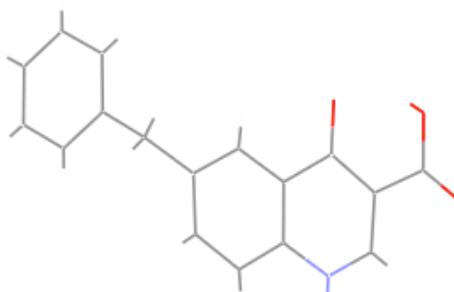


Figura 1.24. Struttura del ligando **5**.

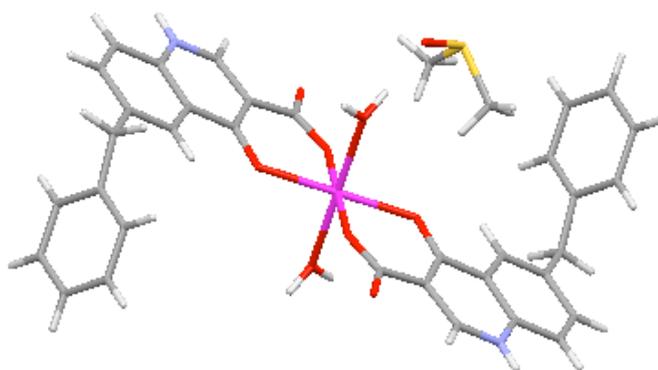


Figura 1.25. Struttura del complesso **5-Mn**.

Nicolino Pala

Studi sui metallo-enzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

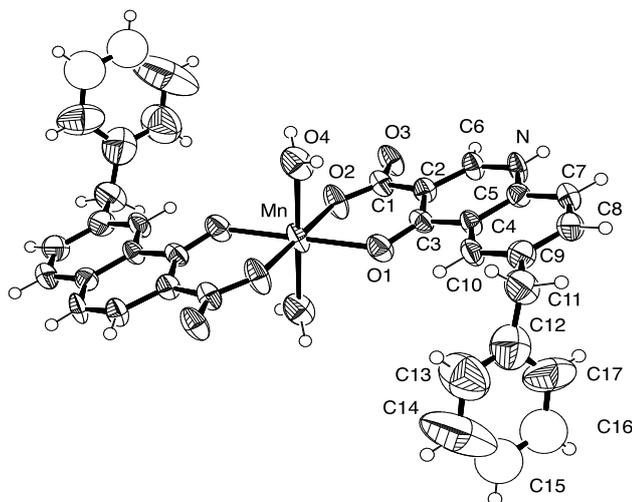


Figura 1.26. Struttura molecolare del complesso centrosimmetrico 5-Mn.

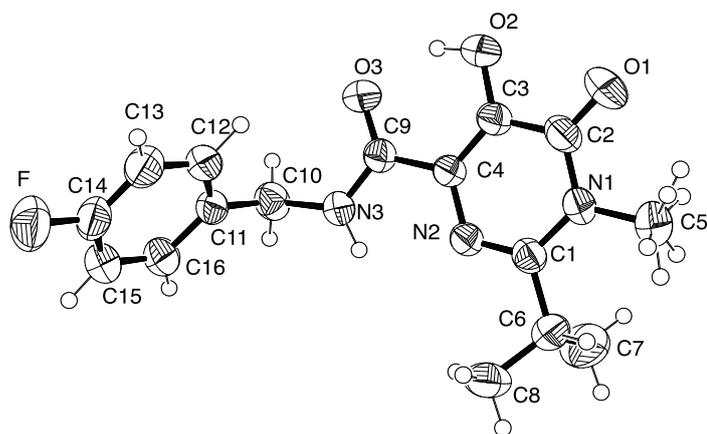


Figura 1.27. Rappresentazione ORTEP del composto 6.

Le analisi cristallografiche sono state eseguite ed elaborate dalla Prof.ssa Alessia Bacchi, dal Prof. Mauro Carcelli e dalla Dott.ssa Dominga Rogolino dell'Università di Parma.

Nicolino Pala

Studi sui metallo-enzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

1.3.8 Modello farmacoforico

I composti **1-7** sono stati utilizzati per la costruzione di un modello farmacoforico 3D a 5 punti in grado di descrivere le caratteristiche che accomunano le varie classi di INIs considerate (**Figura 1.28**).

Il modello, generato tramite le funzioni implementate nel programma MOE (Molecular Operating Environment), è stato ottenuto utilizzando la tecnica del *flexible alignment*, in esso è possibile identificare un sistema, costituito da due gruppi donatori di legami idrogeno inframmezzati da un gruppo ambivalente donatore/accettore di legami idrogeno, corrispondente alla funzione β -dicetico acida, o similare. Tale sistema costituisce la porzione chelante del farmacoforo, mentre le restanti due funzioni del modello a 5 punti descrivono rispettivamente lo scaffold recante la porzione chelante e la catena laterale. In entrambi i casi, si tratta di funzioni di tipo aromatico di cui la seconda è prevalentemente costituita da uno spezzone *p*-F-benzilico, o comunque di natura benzilica, che è quasi sempre presente nei più potenti INSTI. Questi due punti, costituiti da gruppi non polari, riconosciuti come essenziali per l'attività, sono in grado di stabilizzare il complesso enzima/inibitore e di permettere il corretto orientamento della molecola nel sito attivo.

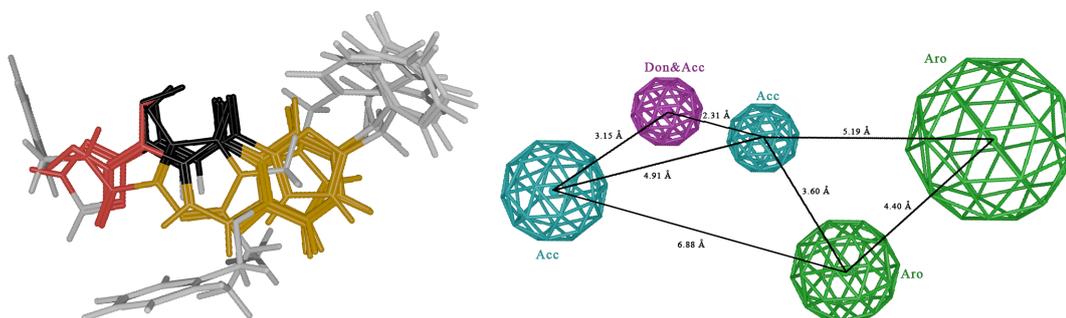


Figura 1.28. Modello farmacoforico. Sovrapposizione spaziale dei composti **1-7** (a sinistra); rappresentazione 3D dei punti farmacoforici individuati (a destra). In azzurro sono indicati i punti accettori di legami idrogeno, in viola i donatori di legami idrogeno e in verde le porzioni apolari.

Il modello farmacoforico realizzato, potrà essere un valido aiuto sia per aumentare la predittività di eventuali esperimenti di *Virtual Screening*, sia per la progettazione e lo sviluppo razionali di nuovi composti in grado di inibire l'HIV-1 integrasi.

Nicolino Pala

Studi sui metallo-enzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

1.3.9 Inibizione enzimatica

I ligandi **1-6** e i rispettivi complessi ottenuti sono stati testati per valutare la loro capacità di inibire l'attività catalitica *in vitro* dell'HIV-1 IN, impiegando l'enzima purificato, sia nei confronti dello *strand transfer* (ST), sia del *3'-processing* (3'P). Tutti i complessi testati hanno mostrato attività inibitoria verso l'enzima in un *range* di concentrazione dell'ordine nanomolare/micromolare, con una maggiore potenza verso lo ST (IC_{50s} = da 0.14 ± 0.03 a 69 ± 4 μ M) rispetto al 3'P, come evidenziato dai rispettivi indici di selettività (**Tabella 1.5**).

Al fine di valutare la capacità inibitoria in differenti condizioni sperimentali, alcuni composti sono stati testati in due saggi distinti, uno usando come cofattore metallico Mn^{2+} , l'altro usando Mg^{2+} . L'alta affinità mostrata in soluzione verso Mn^{2+} da parte di tutti i ligandi, rilevata dalle costanti di formazione, potrebbe in parte spiegare perché diversi inibitori identificati tramite *High-Throughput Screening* usando Mn^{2+} come cofattore sono poi risultati inattivi quando testati in presenza di Mg^{2+} . È interessante notare che, nel caso del presente studio, per i complessi **3-Mg**, **3-Mn** e **5-Mg** l'attività inibitoria aumentava di circa 2 volte in presenza del cofattore Mg^{2+} nel saggio enzimatico.

In generale, i ligandi differivano notevolmente per la loro attività inibitoria come precedentemente riportato, confermando che, sia la natura del supporto aromatico (in **1** rispetto a **2** e **3**), sia lo scaffold strutturale (**1-6**) influenzano significativamente la potenza inibitoria. Con l'eccezione dei complessi formati tra il ligando **5** e gli ioni Mn^{2+} e Mg^{2+} (in cui si è osservato un incremento di potenza inibitoria di circa 3÷7 volte rispetto al ligando libero), il comportamento presentato da tutti i ligandi testati era sostanzialmente traslabile verso i rispettivi complessi.

Diversamente da quanto già visto precedentemente nel primo set di complessi preparati e testati (**Figura 1.15**),^{65,66} una particolare metallo-dipendenza per l'attività inibitoria è stata evidenziata soltanto per i complessi **3-Mn** e **4-Mn**, con un incremento di potenza di circa 2 volte rispetto ai complessi con il Mg^{2+} , indipendentemente dal cofattore presente nel test enzimatico.

Infine, il composto **6**, modello del MK-0518 ($IC_{50} = 0.14 \pm 0.03$ e 10 ± 8 μ M, per lo ST ed il 3'P) ed il complesso **3-Mn** ($IC_{50} = 0.15 \pm 0.03$ e 3 ± 0.01 μ M, per lo ST ed il 3'P), complesso dell'inibitore L-708,906, risultavano i più potenti tra i composti testati.

Composto	3 ^o Processing (IC ₅₀ μM)	Strand Transfer (IC ₅₀ μM)	IS ^a
1	>333	69 ± 4	>5
1-Mg	>333	44 ± 3	>8
1-Mn	>333	42 ± 4	>8
2	15 ± 2	0.54 ± 0.08	28
2-Mg	6 ± 1	0.26 ± 0.04	23
2-Mn	7 ± 1	0.99 ± 0.62	7
3	9 ± 2	0.5 ± 0.3	18
	^b (Mg): 6 ± 1	^b (Mg): 0.2 ± 0.1	30
3-Mg	70 ± 4	1.6 ± 0.4	43
	^b (Mg): 52 ± 18	^b (Mg): 0.9 ± 0.5	58
3-Mn	4 ± 1	0.3 ± 0.1	13
	^b (Mg): 3 ± 0.01	^b (Mg): 0.15 ± 0.03	20
1.4	>100	43 ± 7	>2
4-Mg	100	42 ± 16	2
	^b (Mg): >100	^b (Mg): 49 ± 22	>2
4-Mn	87 ± 7	19 ± 4	5
	(Mg): >33	(Mg): 29	>1
1.5	>100	12 ± 5	>8
5-Mg	89 ± 16	4 ± 2	22
	^b (Mg): >100	^b (Mg): 1.6 ± 0.3	>62
5-Mn	>250	2 ± 0.1	>125
1.6	10 ± 8	0.14 ± 0.03	71
6-Mg	22	<<11	<<2
6-Mn	19	<<11	<<2

(Tabella 1.5). Valori di inibizione delle attività catalitiche dell'enzima HIV-1 IN da parte dei ligandi e dei complessi oggetto dello studio. ^aIS: Indice di selettività.

^bValori ottenuti per aggiunta di Mn²⁺ nel medium.

I saggi relativi alla valutazione dell'attività inibitoria nei confronti dell'enzima HIV-1 integrasi per i ligandi 1-6 e tutti i complessi ottenuti sono stati eseguiti nel laboratorio del Prof. Nouri Neamati dell'University of Southern California, Los Angeles.

Nicolino Pala

Studi sui metallo-enzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

1.3.10 Discussione e Conclusioni

I dati sperimentali in corso di acquisizione permettono di confermare la presenza di una funzione chelante in tutti i MCINI più rappresentativi. Un allineamento tra le funzioni chelanti per tali composti è riportato in **Figura 1.29**.

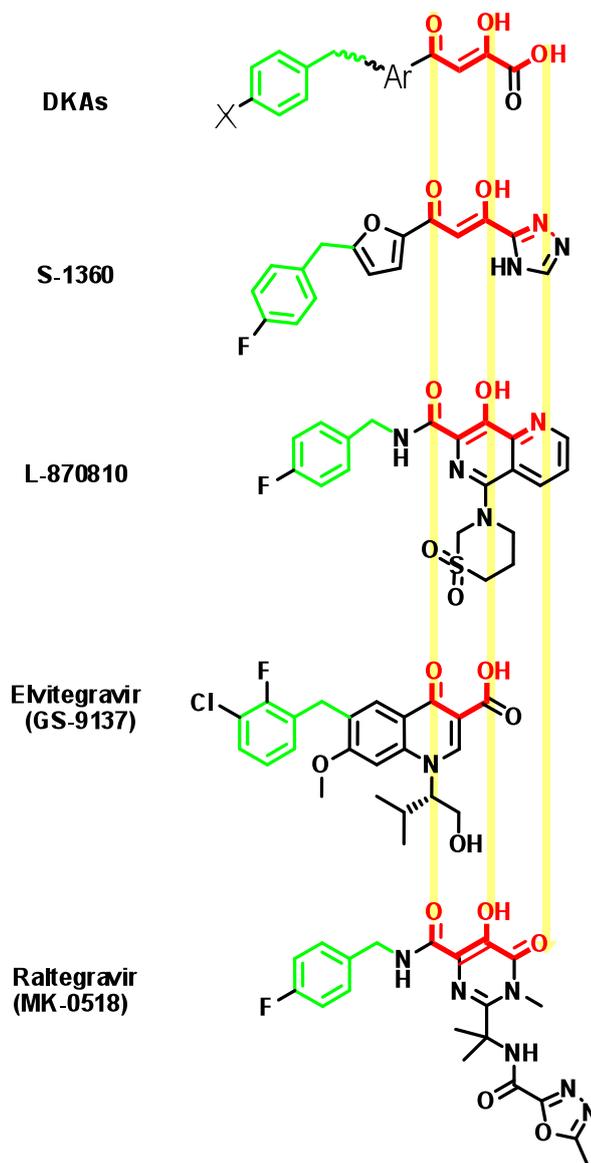


Figura 1.29. Allineamento dei punti farmacoforici dei MCINI

Tale capacità di stabilire delle interazioni con gli ioni metallici era stata prima ipotizzata, ed in seguito confermata, per i composti recanti il motivo strutturale β -dicheto acido. È stato, inoltre, dimostrato come lo stesso gruppo funzionale, costituito da un γ -chetone, un α -enolo, ed un gruppo acido carbossilico, risulta essere determinante per l'attività inibitoria enzimatica. Una simile proprietà è riscontrabile anche per lo spezzone riferibile alla struttura cheto-enol-triazolica del composto S-1360, dove l'azoto eterociclico mima l'ossigeno carbossilico. In seguito, la porzione farmacoforica è stata incorporata in un sistema eterociclico, come nel caso dei composti MK-0518 e L-870,810, quest'ultimo riproponendo l'interscambiabilità tra un azoto eterociclico recante un doppietto donatore di elettroni, in questo caso del nucleo piridinico, e l'ossigeno carbossilico dei DKAs. Nel caso del composto MK-0518, invece, è un gruppo carbonilico a mimare l'ossigeno carbossilico, a conferma che non è tanto la carica, quanto la disposizione spaziale e la disponibilità di un doppietto di elettroni a determinare l'attività. Da osservare, inoltre, come in entrambi i composti, l' α -enolo del sistema β -dicheto acido originale è stato sostituito da un ossidrilico di tipo fenolico.

Sia il sistema β -dicheto acido, sia i suoi bioisosteri sino ad ora considerati, presentano un sistema di tre funzioni chelanti disposti in modo complanare e in grado, eventualmente, di coordinare due cationi.

Il composto chinolonico GS-9137 sembra discostarsi da questo modello, infatti, esso contiene soltanto due gruppi funzionali complanari, per i quali poteva essere ipotizzata la possibilità di coordinare un solo ione. Di recente, si sta discutendo l'ipotesi che anche il GS-9137 possa essere in grado di complessare due ioni, adottando magari una disposizione alternativa nel sito attivo dell'IN. In ogni caso, alla luce del profilo farmacobiologico complessivo, tale sistema planare monocheto acido può comunque essere considerato un ottimo bioisostero dei precedenti sistemi. Un altro elemento differenziante il GS-9137 è il ruolo che riveste lo spezzone benzilico. Infatti, mentre negli altri MCINI, esso, quando presente, ha soprattutto un effetto potenziante l'attività enzimatica, nel caso dello *scaffold* chinolonico è stato osservato come la sua presenza è necessaria per l'attività inibitoria. È possibile, quindi, che lo spezzone benzilico possa sopperire, tramite la formazione di interazioni accessorie, alla perdita di un gruppo chelante, a spiegazione del fatto che la complessazione di un solo ione potrebbe comunque portare all'inibizione dell'enzima. Nel secondo caso, vale a dire, la complessazione di entrambi gli ioni, la differente disposizione spaziale della molecola sarebbe possibile, solo, grazie all'effetto stabilizzante dello spezzone benzilico.

I dati sperimentali indicano un comportamento comune dei ligandi a formare dei complessi stabili in soluzione in presenza di cationi divalenti, È, quindi, più che ragionevole ipotizzare la loro

Nicolino Pala

Studi sui metallo-enzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

presenza nell'intorno dell'enzima. Inoltre, è stato dimostrato sperimentalmente che tali complessi, sono in grado di inibire l'IN. Al momento non è, però, possibile stabilire quali siano le specie coinvolte nel processo di inibizione dello ST se, siano esse i complessi, o i loro ligandi liberi. Restano quindi aperte le seguenti tre ipotesi:

il complesso si lega “come tale” all'enzima, occupando il sito catalitico con conseguente spiazzamento dei cofattori metallici legati all'enzima.
in seguito al <i>binding</i> con l'enzima, potrebbe essere invocato uno scambio dinamico tra gli ioni coinvolti nella complessazione: il complesso rilascia i metalli e forma un nuovo complesso con i cofattori metallici presenti nel sito attivo.
il complesso è in equilibrio dinamico con il suo ligando libero ed è quest'ultimo a legare l'enzima.

In ogni caso, il risultato sarebbe la formazione di un complesso ternario ligando/metalli/enzima che potrebbe portare la specie attiva ad agire come “inibitore interfacciale” interferendo con l'integrasi ed il DNA substrato a livello della reazione di *strand transfer*, come già ipotizzato per i β -dicheto acidi.

Capitolo 2

Anidraasi Carbonica

2.1 Introduzione

L'Anidraasi Carbonica (CA) è una classe di metalloenzimi presente in tutti e tre i Regni viventi: *Archaea*, *Bacteria* e *Eucarya*.⁷⁷ Formata dall'evoluzione convergente di almeno cinque famiglie di geni (α , β , γ , δ e ζ)⁷⁸, deve la sua ubiquitarietà alla capacità di catalizzare la reazione di interconversione tra anidride carbonica e ione idrogenocarbonato, una reazione semplice ma essenziale per gli esseri viventi.⁷⁹



Famiglia genica	Distribuzione
α	Vertebrati, batteri, alghe, piante verdi.
β	Batteri, funghi, alghe, cloroplasti di mono- e dicotiledoni.
γ	Archea e alcuni batteri.
δ	Alcune diatomee marine.
ζ	Alcune diatomee marine. ⁷⁹⁻⁸⁸

Nicolino Pala

Studi sui metallenzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidraasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

L'International Union of Biochemistry classifica la CA come una liasi con codice indicativo EC 4.2.1.1. Fatta eccezione per la famiglia ζ , cadmio dipendente,⁸⁹ tutte le altre CA conosciute utilizzano lo Zn(II) quale cofattore metallico.^{78,90,91}

2.1.1 α -CAs

Nell'uomo sono state individuate almeno 16 isoforme distinte di α -CAs (**Tabella 2.1**), distinguibili per origine filogenetica, struttura proteica, capacità catalitica, localizzazione cellulare e tissutale, funzione biologica e suscettibilità agli inibitori noti. La classificazione tiene conto della cronologia di isolamento delle varie isoforme, le quali sono indicate con numeri romani progressivi.⁸³ Nel caso delle isoforme umane si fa precedere il suffisso *h* (Human) all'acronimo CA seguito dall'indicativo dell'isoforma: es. l'isoforma II umana si abbrevia hCA-II, ed in questo caso l'uso della lettera alfa è pleonastico in quanto nell'uomo, come in tutti i vertebrati, la α è l'unica famiglia di CA presente.

	Localizzazione	Denominazione
Etero-enzimi	Citoplasma	I, II, III, VII e XIII
	Legate alla membrana	IV
	Transmembrana	IX, XII e XIV
	Mitocondriali	VA e VB
	Secrete	VI ⁸¹
Isoforme acatalitiche CARP	Citoplasma	VIII, X e XI. ⁸³

Tabella 2.1. Isoforme della CA identificate nell'uomo.

Fra le varie isoforme la CA-VI è l'unica che svolge le sue funzioni nel medium extracellulare, essendo secreta nella saliva e nel latte. Esistono inoltre, delle isoforme dette CARPs (*Carbonic Anhydrase Related Proteins*), che non sono in grado di attuare la catalisi pur presentando una struttura simile alle isoforme attive e di cui non si conoscono le funzioni.

2.1.2 Struttura e meccanismo d'azione della CA

Tutte le α -CAs, pur differendo nel numero e nella sequenza amminoacidica, presentano una struttura secondaria molto conservata da cui deriva una struttura terziaria di tipo globulare

Nicolino Pala

Studi sui metallenzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

comune a tutti gli isozimi. Le dimensioni sono indicativamente comprese in un parallelepipedo di 50x40x40 Å (Figura 2.1).⁹⁰

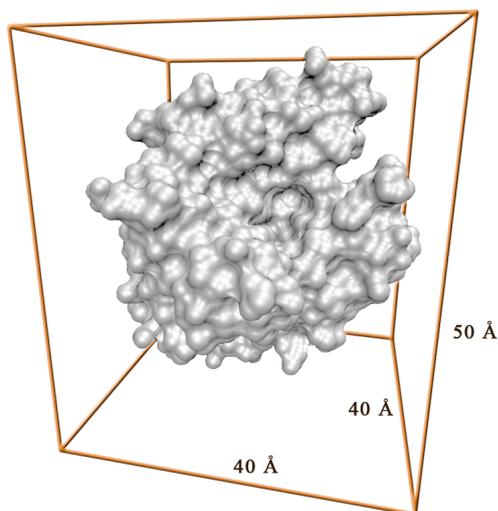


Figura 2.1. Dimensioni medie della CA.

Visto il ruolo preminente rivestito dalla hCA-II nel presente lavoro di tesi, saranno descritti nel dettaglio la struttura ed il meccanismo d'azione di questa, mentre eventuali dati relativi alle altre isoforme saranno riportati all'occorrenza.

L'hCA-II, formata da 260 residui e con un peso molecolare di 29 kDa, è caratterizzata da uno scheletro centrale costituito da un esteso foglietto- β antiparallelo circondato da strutture tipo α -elica e da ulteriori filamenti- β .⁹⁰

Il foglietto- β identifica una cavità imbutiforme profonda circa 15 Å che delimita il sito catalitico dell'enzima e ospita nel fondo il cofattore metallico (Figura 2.2).^{83,90}

All'interno dell'imbuto è possibile individuare due regioni distinte, una con caratteristiche idrofobiche (residui 121,131,141,143,198 e 207), la seconda, al contrario, idrofila (residui 62,64,67 e 92).

Lo Zn è presente come ione Zn^{2+} ed è coordinato sia con tre istidine, sia con una molecola di H_2O /ione idrossido. A ridosso del sistema Zn- H_2O si trovano due residui altamente conservati in tutte le α -CAs: Thr199 e Glu106. Questi sono legati fra loro da un legame idrogeno e agiscono da "door keeper" del sito catalitico.^{83,84,85,91}

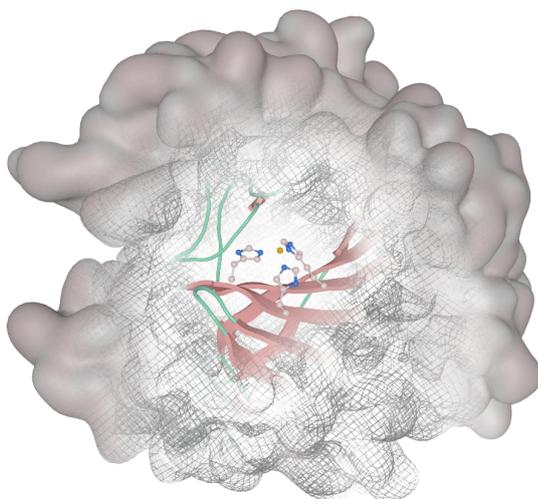


Figura 2.2. Rappresentazione della hCA-II con in evidenza l'atomo di zinco coordinato con le tre istidine His94, His96, His119 (pdb 1CIL).

Gli studi cristallografici evidenziano inoltre la presenza di una seconda molecola di H₂O, denominata *deep water* (**Figura 2.3**).⁹⁰ La rete di legami idrogeno che si instaura tra *deep water*, *door keeper* e la molecola d'acqua legata al metallo, crea un intorno che aumenta la nucleofilicità di questa ultima. Favorisce, inoltre, l'orientamento della molecola di CO₂ incrementandone la suscettibilità a subire l'attacco nucleofilo.^{83,90}

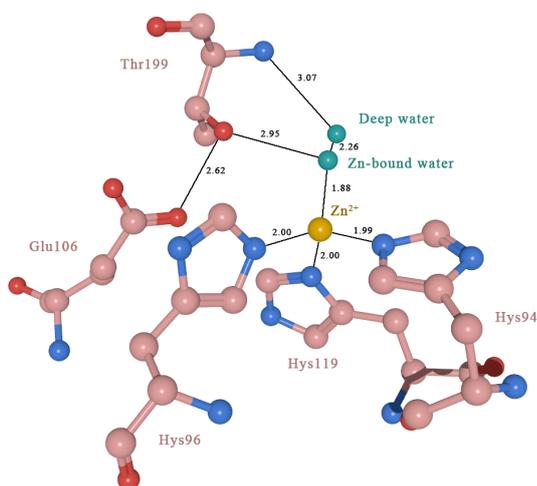


Figura 2.3. Sito attivo dell'hCA-II con lo ione Zn(II) coordinato con le tre istidine (His94, His96, His119), i due residui Thr199 e Glu106 e le due molecole d'acqua implicate nella catalisi.⁷⁹

Nicolino Pala

Studi sui metallenzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

Con riferimento alla **Figura 2.4**, il meccanismo ipotizzato per la reazione di idratazione della CO_2 prevede che lo ione idrossido legato alla Zn, agendo da specie nucleofila (**A**), in presenza di una molecola di substrato opportunamente orientata (**B**), è in grado di attaccarla per formare uno ione idrogenocarbonato coordinato con lo Zn (**C**). La successiva sostituzione con una molecola d'acqua, libera lo ione idrogenocarbonato e origina una specie cataliticamente inattiva (**D**). La deprotonazione della molecola d'acqua attraverso l'intervento di una specie basica come il residuo His64 o semplicemente per mezzo del buffer acquoso, permette la rigenerazione dell'enzima nel suo stato attivo (**A**).

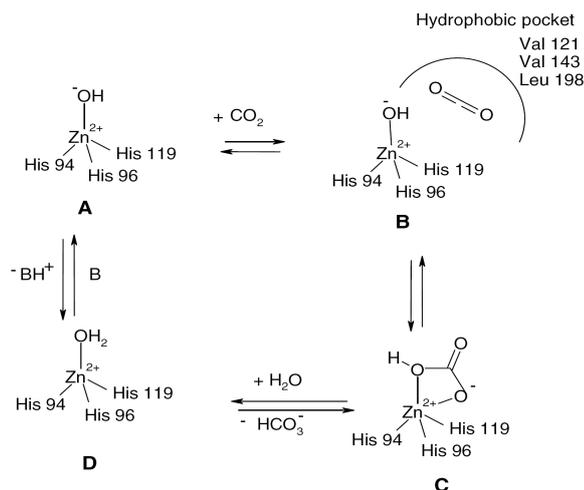


Figura 2.4. Rappresentazione schematica del meccanismo catalitico dell'hCA-II.

Nello step B è schematizzata la parte di tasca idrofobica che interagisce con il substrato.^{79,83}

Il passaggio limitante del ciclo catalitico è rappresentato dalla generazione della specie Zn-idrossido. Le isoforme ad elevata attività catalitica possiedono il citato residuo His64 che permette di accelerare questo processo agendo da *proton shuttle* nella rimozione del protone dalla molecola d'acqua e rendendo l'enzima notevolmente più efficiente. Per esempio, la hCA-II, con una k_{cat}/K_m pari a $1.5 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, è uno degli enzimi più attivi che si conoscano, con una velocità di reazione prossima a quella di diffusione.

Per le altre famiglie geniche rimane molto probabile il meccanismo descritto, anche se in alcune isoforme β non si osservano molecole d'acqua coordinate direttamente con lo Zn.⁹⁰

L'idratazione dell'anidride carbonica non è l'unica reazione catalizzata dalle α -CAs. Esse, infatti, possiedono un'elevata versatilità di substrato essendo in grado di catalizzare differenti processi idrolitici come: l'idratazione di cianato ad acido carbammico o di cianammide ad urea, l'idratazione delle aldeidi a dioli geminali, l'idrolisi di esteri carbossilici e sulfonici, così come la meno nota idrolisi degli alogeno derivati e degli arilsulfonil alogenuri. Non è chiaro, al momento, se queste reazioni rivestono un ruolo rilevante in condizioni fisiologiche.⁹⁰

Nicolino Pala

Studi sui metallenzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

2.1.3 Funzioni e patologie legate alla α -CA^{79,83,90,92-96}

Nell'uomo le diverse isoforme della CA sono implicate, a diverso titolo, in vari processi fisiopatologici. Gli isozimi I, II e IV svolgono un ruolo importante nella respirazione e nella regolazione dell'omeostasi acido/base: attraverso il trasporto di CO₂/bicarbonato fra tessuti e siti di escrezione (reni e polmoni); facilitando l'escrezione di CO₂ nei capillari e nel tessuto microvascolare dei polmoni; eliminando ioni H⁺ nei tubuli renali e nei dotti collettori; riassorbendo ioni bicarbonato nell'orletto a spazzola intestinale e nel tratto ascendente dell'ansa di Henle nei reni. Gli isozimi II, IV e XII sono coinvolti nell'arricchimento in bicarbonato dell'umore acqueo nell'occhio. La hCA-II è coinvolta nello sviluppo del tessuto osseo e nella differenziazione degli osteoclasti. Alcune isoforme partecipano alla secrezione degli elettroliti in diversi organi e tessuti, rendendo possibile la formazione del liquido cerebrospinale, della saliva, del succo gastrico, della bile e del succo pancreatico. Alcune CAs sono implicate nei meccanismi olfattivi e gustativi, nella protezione gastrica, nella regolazione del pH del liquido seminale, nella funzione muscolare e nei fenomeni adattativi ai processi di stress cellulare. Altre, come la V, entrano nei processi di trasmissione dei segnali cellulari. hCA-II, VA e VB sono coinvolti in importanti processi metabolici quali: la gluconeogenesi, la biosintesi *de novo* degli acidi grassi⁹⁷ e la sintesi dei derivati pirimidinici.^{83,90}

Dal punto di vista patologico l'anidasi carbonica è coinvolta attivamente nel glaucoma, una patologia degenerativa cronica dell'occhio caratterizzata da elevati valori della pressione intraoculare (IOP intraocular pression) con conseguente danneggiamento del nervo ottico che porta ad una progressiva perdita della funzione visiva ed eventualmente alla cecità.⁸¹ Anche altre patologie oculari come l'edema maculare e la degenerazione maculare risentono beneficamente di una terapia inibitoria mirata della CA.¹ Il coinvolgimento nella regolazione omeostatica dei fluidi corporei ha importanti ripercussioni in patologie sistemiche quali l'ipertensione ed i problemi cardiovascolari. Anche patologie come l'osteoporosi, l'epilessia e l'obesità hanno mostrato di essere suscettibili all'attività di alcune isoforme di CA.⁸¹ Attualmente le ricerche si stanno indirizzando verso lo studio degli isozimi IX, XII e CARP VIII, ampiamente espressi nelle cellule tumorali, sono molto probabilmente implicati nei processi oncogenetici e di progressione tumorale.^{83,97}

Nicolino Pala

Studi sui metallenzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

2.1.4 Inibitori dell'anidraasi carbonica (CAIs)

Dalle osservazioni riportate nel paragrafo precedente consegue l'importanza che riveste la possibilità di modulare l'azione delle varie isoforme della hCA. Tralasciando lo sviluppo di farmaci in grado di aumentare l'attività della CA perchè ancora in fase embrionale,⁸³ l'approccio più comune al momento resta l'inibizione enzimatica.

Attualmente si conoscono due grandi classi di CAIs:

Anioni complessanti i metalli.

Arilsolfonammidi non sostituite sull'azoto e derivati.
--

I componenti di entrambe le classi esercitano la loro azione coordinando il cofattore metallico.⁸¹

La prima classe, prevalentemente costituita da ioni inorganici tra cui spiccano per potenza gli ioni cianato e tiocianato (**Figura 2.5**), era nota già dal 1933,⁹⁸ I suoi componenti possiedono la capacità di agire sia da inibitori competitivi, legando lo Zn in luogo del substrato, sia da inibitori non competitivi. In quest'ultimo caso, gli inibitori legano il cofattore metallico in presenza del substrato alterando lo stato di coordinazione dello Zn che passa da planare-bipiramidale a trigonale bipiramidale.^{83,90}

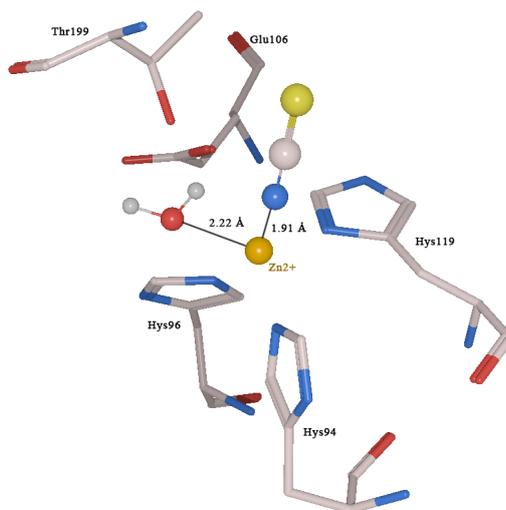


Figura 2.5. Modalità di *binding* dello ione tiocianato.

Nonostante il doppio meccanismo d'azione, gli anioni complessanti i metalli non trovano nessuna applicazione in terapia a causa dei numerosi effetti collaterali dovuti alla loro scarsa selettività che li porta ad interagire con svariati bersagli cellulari. Oltre a questo aspetto, il loro interesse scientifico è limitato anche dalle ridotte dimensioni che rende complicata, se non impossibile, l'ottimizzazione della loro struttura.⁸³

Nicolino Pala

Studi sui metallenzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidraasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

Diverso è il discorso per quanto riguarda la classe dei derivati arilsulfonammidici. Anche in questo caso la loro attività è nota da tempo; Krebs nel 1948 fu il primo a riconoscerne l'azione inibitoria sulla CA.⁹⁹ Da allora i CAIs entrati in terapia sono stati diverse decine, anche se, per alcuni di questi, l'attività anti-CA è stata riconosciuta solo in un secondo momento e non sempre si è dimostrata una proprietà desiderata (**Figura 2.6**).^{83,90,100,101}

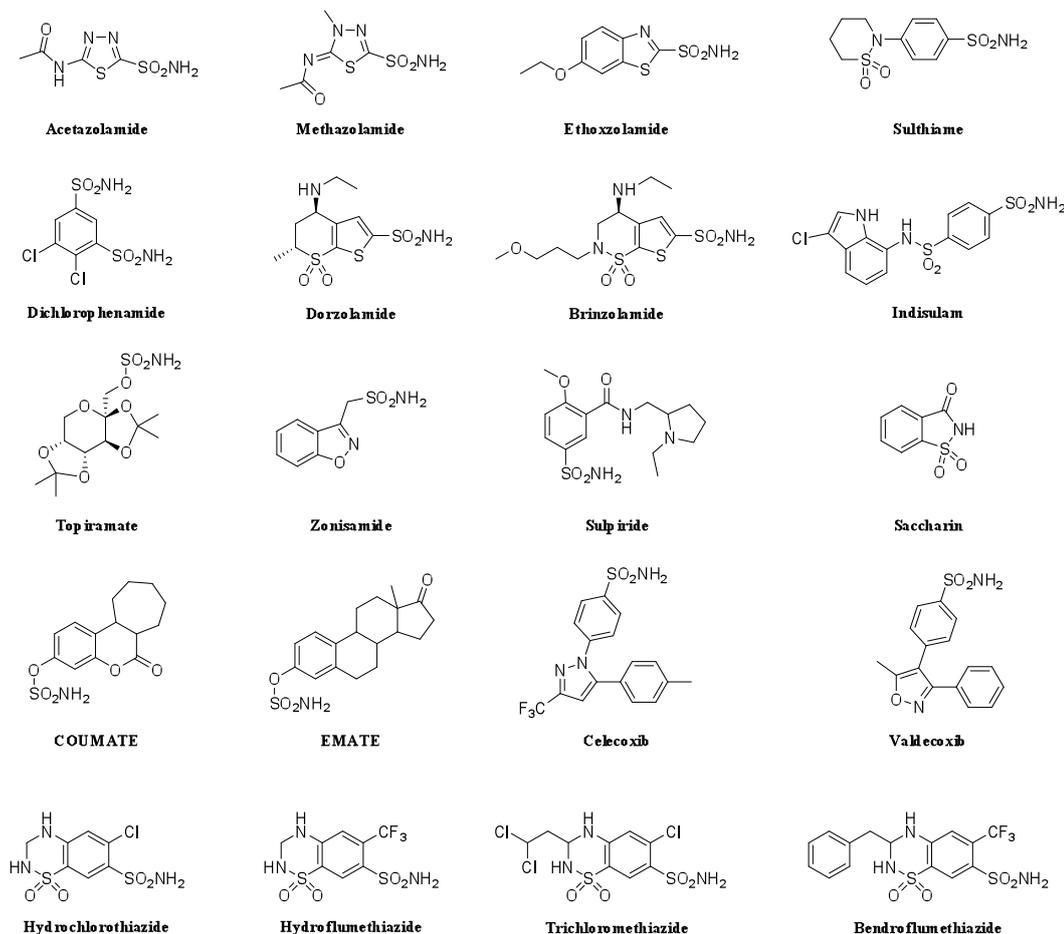


Figura 2.6. Esempi di solfonammidi usate in terapia.

Anche in questo caso il meccanismo d'azione prevede l'interazione dell'inibitore con il cofattore metallico. Infatti, il gruppo solfonammidico, complice l'ambiente acido del sito catalitico si deprotona e forma un legame dativo con lo Zn(II) per sostituzione dello ione idrossido. Il complesso così formato è stabilizzato da due legami idrogeno tra il gruppo solfonammidico ed il residuo Thr199.^{1,81,83,90} alcuni CAI sono in grado di formare un secondo legame con il cofattore metallico tramite uno degli ossigeni solfonammidici (**Figura 2.7**).

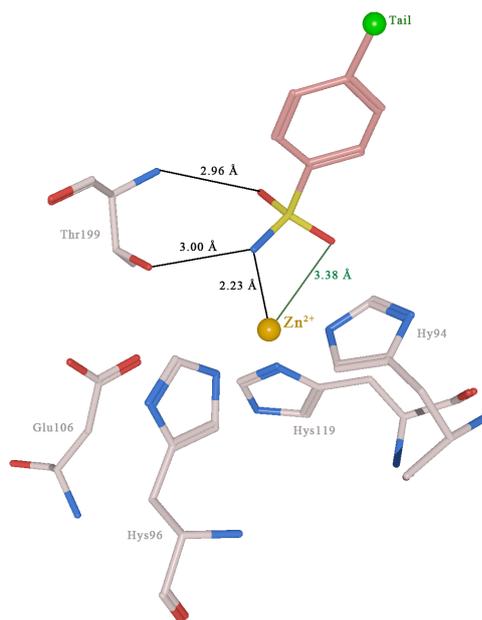


Figura 2.7. Modalità di *binding* dei CAI arilsolfonammidici.

Negli anni la ricerca di nuovi CAIs ha dovuto fare i conti con l'impossibilità di sviluppare un inibitore basato sul substrato a causa dell'estrema semplicità strutturale dell'anidride carbonica e dello ione idrogeno carbonato.¹ Questo ha portato le arilsolfonammidi a divenire il modello di riferimento per la sintesi dei CAIs. Sono stati condotti numerosi studi di correlazione struttura attività che, assieme ai dati strutturali derivati dalla cristallografia a raggi X, hanno permesso di identificare le caratteristiche principali di questa classe di composti:

Una funzione legante lo zinco (ZBF o <i>Zinc Binding Function</i>).
Una struttura aromatica o eteroaromatica legata alla ZBF.
Una coda o <i>tail</i> .

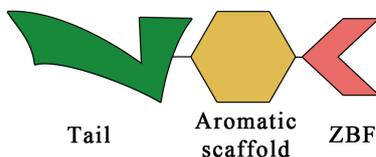


Figura 2.8. Rappresentazione schematica di un generico CAI.

Nicolino Pala

Studi sui metallenzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

I dati sperimentali concordano nell'indicare nella ZBF il requisito fondamentale per l'attività inibitoria. Accanto alla ZBF, anche la porzione aromatica riveste un ruolo importante in quanto favorisce il corretto orientamento della ZBF e ne stabilizza la posizione per interazione con i residui idrofobici della tasca enzimatica. Una maggiore variabilità è concessa al *tail*, la quale è comunque preferibilmente presente in una posizione di tipo *para* rispetto alla ZBF; ad essa sono riconducibili tutte quelle interazioni accessorie in grado di aumentare la stabilità del complesso enzima/inibitore.^{1,81,83,90} L'inconveniente maggiore di questa classe di composti è la scarsa selettività tra le varie isoforme, tanto che è opinione comune come un suo aumento si tradurrebbe direttamente in una riduzione/abolizione degli effetti indesiderati e, cosa più importante, permetterebbe di estendere le applicazioni al trattamento di altre patologie, tra le quali i tumori e l'obesità.^{81,83,90}

Sfruttando queste conoscenze, negli anni sono state esplorate le possibili modificazioni strutturali al modello generale. Anche la ZBF di tipo solfonammidico è stata oggetto di intense ricerche che hanno portato alla scoperta di diverse varianti (**Figura 2.9**), da cui sono originati centinaia di composti.

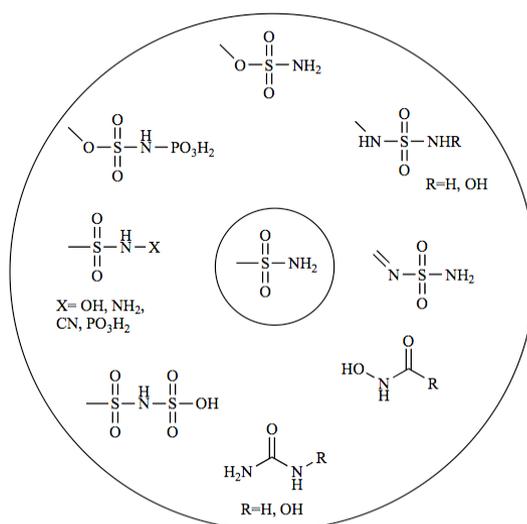


Figura 2.9. ZBF derivate dal gruppo solfonammidico.¹

2.2 Identificazione di possibili inibitori della hCA-II tramite la tecnica del *Virtual Screening*

2.2.1 Cenni sul *Virtual Screening*

Il *Virtual Screening* (VS) è una tecnica computazionale che ha come obiettivo principale l'analisi automatica di grandi librerie di composti al fine di selezionare degli *hit compounds*, ossia composti potenzialmente bioattivi, aventi le maggiori probabilità di interagire con un target biologico definito.¹⁰²

Insieme agli altri approcci quali l'*High Throughput Screening* e la chimica combinatoriale, il VS si sta affermando come una tecnica routinaria grazie soprattutto alla comprovata efficienza, ai costi non proibitivi ed ai tempi relativamente contenuti.^{102,111}

Tra i fattori che influenzano l'esecuzione ed i risultati del VS vanno ricordati: la disponibilità di dati strutturali del target biologico; l'esistenza di almeno una molecola in grado di interagire inequivocabilmente con il target; il numero e la tipologia dei composti da vagliare; le risorse informatiche (hardware e software) disponibili.

Il tipo di esperimento di VS che si può predisporre dipende in prima analisi dalla disponibilità, o meno, di un modello strutturale del recettore. Ci si indirizzerà, quindi, verso un approccio di tipo *Structure Based Drug Design* (SBDD) in caso siano disponibili i dati strutturali del target, ovvero verso un approccio *Ligand Based Drug Design* (LBDD) se ad essere note sono solo le proprietà del/i ligando/i (Figura 2.10).

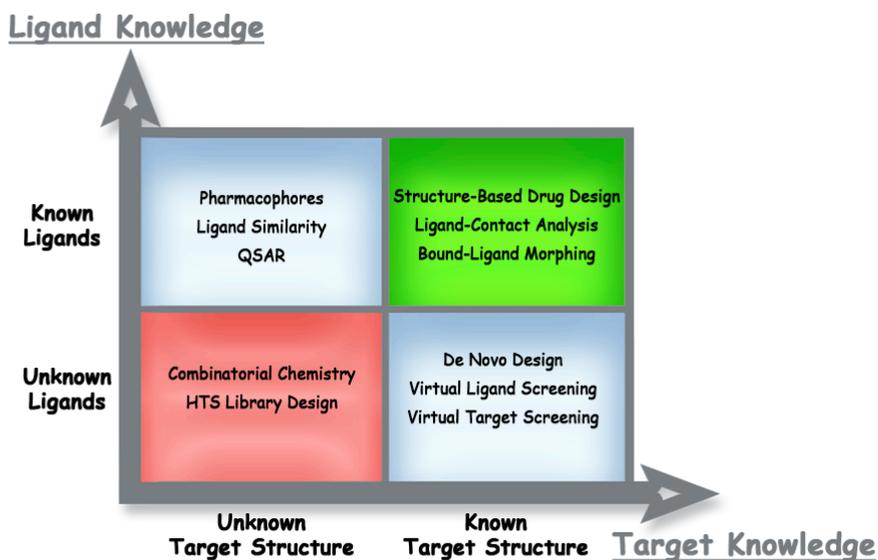


Figura 2.10. Possibili strategie di *Rational Drug Discovery*.

Nicolino Pala

Studi sui metallenzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

2.2.2 Razionale

Come menzionato precedentemente, l'hCA-II è un enzima estensivamente studiato e del quale sono note diverse strutture derivate da studi di cristallografia a raggi X, sia in forma isolata, sia in forma di complesso con i suoi inibitori. Partendo da questi dati sperimentali disponibili, è stato progettato un esperimento di VS di tipo SBDD avente come scopo la ricerca di possibili nuovi ed originali inibitori dell'hCA-II. La novità del progetto risiede nel fatto che, diversamente dagli altri studi di VS sulla CA noti in letteratura, in questo caso si è scelto volutamente di filtrare i risultati in modo da ottenere dei composti che fossero privi del ZBF solfonammidico, con la massima diversità molecolare.

2.2.3 Metodo

Il primo passo è stato quello di individuare un opportuno modello enzimatico. L'analisi delle strutture cristallografiche depositate presso il *RCSB Protein Data Bank*¹¹² ha permesso di individuare 34 complessi hCA-II/inibitore. Tra questi è stato selezionato il complesso con codice pdb **2NNO**, la scelta è motivata dall'alta risoluzione (1.01 Å) del modello cristallografico e dalla potenza dell'inibitore cocristallizzato ($K_i = 0.8 \mu\text{M}$). La risoluzione rende conto della maggiore accuratezza delle distanze e degli angoli di legame. La presenza di un inibitore con una K_i inferiore a $10 \mu\text{M}$, valore al di sotto del quale un composto può essere considerato un *lead compound*,¹¹³ assicura invece che la conformazione dell'enzima cocristallizzato è quella corretta per ospitare un eventuale nuovo inibitore. Nonostante fosse possibile optare per modelli cristallografici recanti composti ad attività inibitoria maggiore, essi non sono stati considerati ai fini del progetto, proprio in relazione al fatto che, un'attività inibitoria troppo marcata, si sarebbe tradotta in un'interazione inibitore/enzima troppo forte e quindi scarsamente riproducibile. Sfruttando le potenzialità della piattaforma computazionale MOE (*Molecular Operating Environment*)¹¹⁴, **2NNO** è stato rifinito tramite rimozione del solvente, individuazione del sito catalitico, rimozione del ligando e assegnazione delle cariche (**Figura 2.11-A**). Parallelamente, tutti i 34 complessi sono stati sovrapposti spazialmente (**Figura 2.11-B**), dapprima considerando l'intera struttura proteica (RMDS = 0.31 Å) e poi tenendo conto dei soli residui del *binding-pocket* (RMDS = 0.25 Å). Questo, oltre a dimostrare la straordinaria sovrapposibilità delle varie strutture, ha permesso la creazione, a partire dai ligandi sovrapposti, di un modello farmacoforico a 4 punti (**Figura 2.12**), che è stato perfezionato con la creazione delle restrizioni steriche generate dal *binding-pocket*.

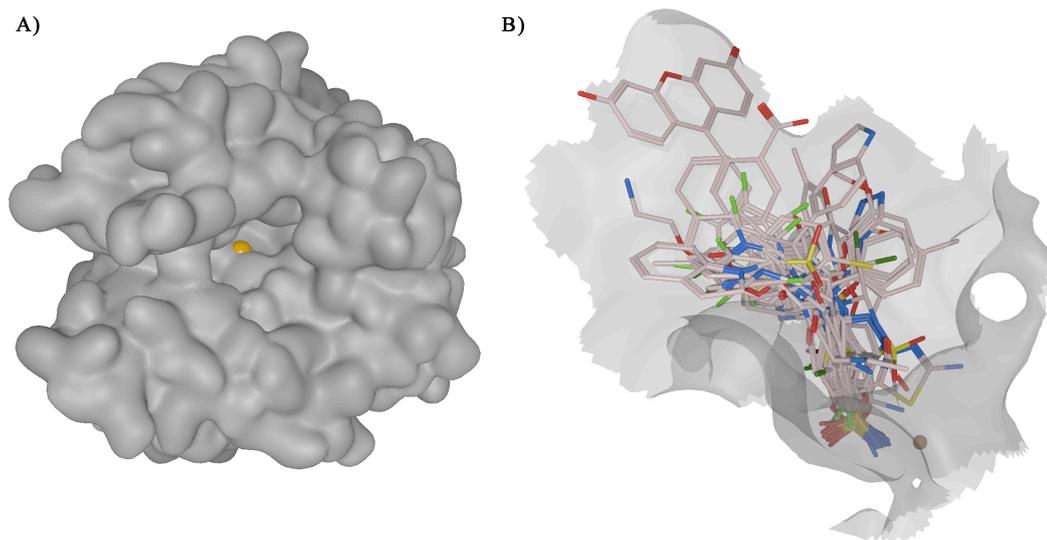


Figura 2.11. A) Struttura del pdb 2NNO dove si evince la forma imbutoforme del sito catalitico (in giallo il cofattore metallico). B) *Snapshot* del sito catalitico con i 34 ligandi superimposti nel sito catalitico.

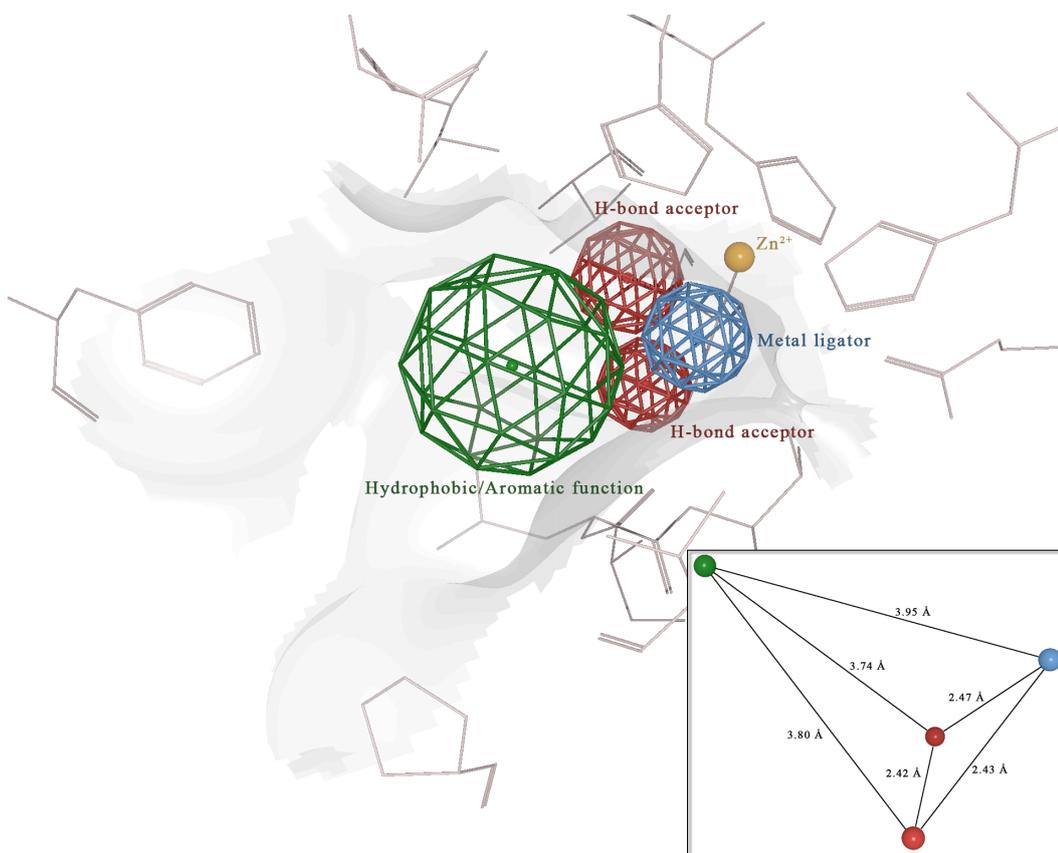


Figura 2.12. Modello farmacoforico sviluppato.

Nicolino Pala

Studi sui metallenzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

I modelli enzimatico e farmacoforico ed i settaggi del modulo di docking di MOE sono stati sottoposti ad una validazione preliminare usando un database contenente 566 inibitori noti dell'AC-II, appositamente preparato utilizzando i dati noti in letteratura. Il risultato del test ha permesso di identificare 417 composti, pari al 75 % dei composti presenti nel database. Tale valore è in parte giustificabile se si sommano le seguenti considerazioni: 1) il database-test include al suo interno sostanze con K_i che vanno da 10^{-3} a 10^{-10} M (questo vuol dire che una certa percentuale di composti ha un'attività del tutto trascurabile); 2) il modello farmacoforico è stato sviluppato a partire da inibitori di potenza compresa tra 10^{-7} e 10^{-10} M; 3) la conformazione ad imbuto del sito catalitico è di per se un efficace filtro che può impedire il riconoscimento anche di molecole attive se, come avviene nel VS, le conformazioni generate non coprono del tutto lo spazio conformazionale dei composti saggiati. Alla luce di ciò, si è ritenuto di poter procedere con l'esperimento.

Come libreria di composti è stato utilizzato il database "ZINC-lead like/2007" contenente 972'608 molecole e reperibile gratuitamente dal sito zinc.docking.org/.

Trattandosi di un database creato appositamente per la ricerca di possibili *lead compound* e rispettando i seguenti parametri: $\log P \leq 3.5$; peso molecolare ≤ 350 e numero di legami rotabili ≤ 7 , è stato ritenuto superfluo applicare un pre-filtro di tipo *Lipinski's rules* o similare. L'intero database è stato comunque sottoposto ad un processo di *washing* (implementato in MOE) al fine di eliminare eventuali molecole non congruenti (errori nel numero dei legami, cariche non corrette, presenza di composti di transizione, ionizzazione di gruppi acidi e basici). Il primo passo è stato il *pharmacophore search*, unito all'analisi conformazionale dei composti presenti nel database. In tal modo sono state ritenute solo quelle strutture (37'398) rispondenti ai parametri del farmacoforo. Queste sono state ulteriormente vagliate attraverso un parametro di discriminazione che ha portato alla creazione di un database contenente 4'603 molecole caratterizzate dall'assenza di atomi di S. Le restanti molecole sono state salvate in un database accessorio per eventuali studi futuri. Le 4'603 molecole della prima libreria sono state vagliate tramite il programma di docking FlexX, ottenendo così una *library* di 688 *poses* appartenenti a 29 molecole, alcune delle quali stereoisomeri (**Figura 2.13**).

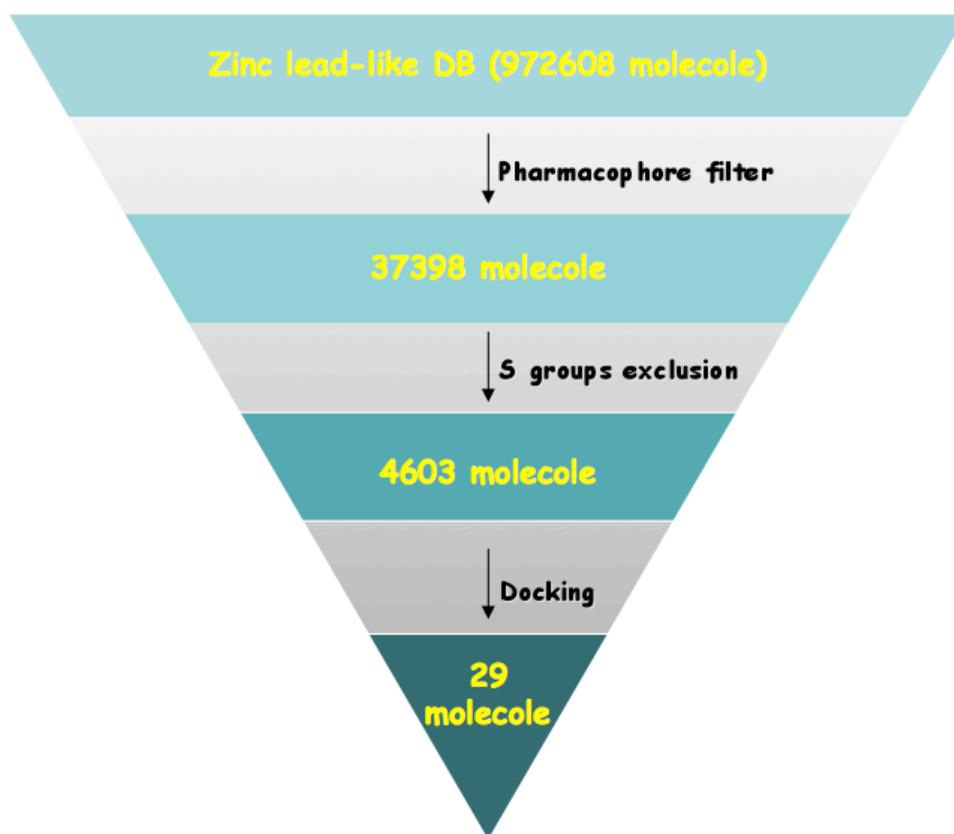


Figura 2.13. Schema riassuntivo delle fasi di filtraggio.

In **Tabella 2.2** sono riportati a titolo di esempio i *best score* relativi a ciascuna molecola selezionata.

molecola	mseq	S ^a	E _{place}
ZINC04521191	51298	-24,9450	-24,9450
ZINC00388306	52193	-24,2550	-24,2550
ZINC00389623	51705	-23,5400	-23,5400
ZINC04641523	24571	-21,9740	-21,9740
ZINC00163530	29963	-21,4250	-21,4250
ZINC04081934	64918	-21,2330	-21,2330
ZINC02552108	31247	-20,9640	-20,9640
ZINC06490567	40142	-19,9150	-19,9150
ZINC04007683	36648	-19,0510	-19,0510
ZINC04324216	78389	-17,5960	-17,5960
ZINC02122676	67655	-15,8750	-15,8750
ZINC03080954	3047	-14,9040	-14,9040
ZINC03881595	6112	-14,4800	-14,4800
ZINC04010953	42976	-13,1910	-13,1910
ZINC04021975	48286	-13,1290	-13,1290
ZINC04403650	21304	-13,0350	-13,0350
ZINCO4566047	64404	-12,3630	-12,3630
ZINC04403358	21228	-12,1650	-12,1650
ZINC03206934	52402	-11,9510	-11,9510
ZINC00394978	22283	-11,6580	-11,6580
ZINC00057285	438	-10,4920	-10,4920
ZINC06667736	75269	-9,3920	-9,3920
ZINC00403270	74450	-9,2890	-9,2890
ZINC00403272	51232	-7,9740	-7,9740
ZINC05131996	13348	-6,9790	-6,9790
ZINC04329252	80202	-6,5290	-6,5290
ZINC01663278	71116	-6,0780	-6,0780
ZINC00388541	70804	-5,4030	-5,4030
ZINC04915581	31165	-4,3400	-4,3400

Tabella 2.2. Best scores ottenuti dall'esperimento di VS.

^a Le strutture sono in ordine decrescente di affinità predetta (S score).

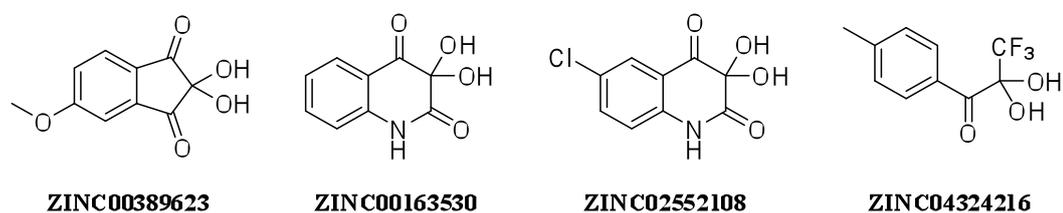
Nicolino Pala

Studi sui metallo-enzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

Delle 29 strutture individuate con il VS, 4 sono scelte per essere acquistate e sottoposte ad una prima serie di saggi di inibizione enzimatica.



La **Figura 2.14** mostra (in ordine progressivo) la *pose* migliore di ciascun composto. Dalla *Visual Inspection* si osserva come tutte e quattro le molecole sono ben posizionate all'interno del sito catalitico ed in prossimità del cofattore metallico, similmente a quanto sperimentalmente osservato per gli inibitori noti della hCA-II.

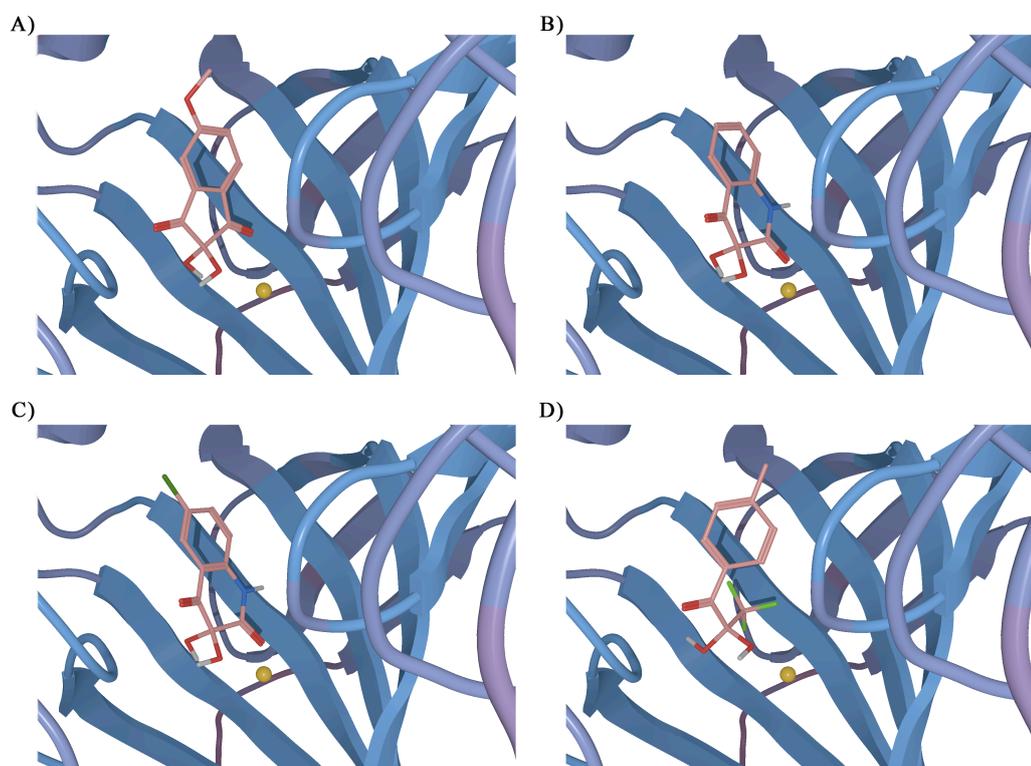


Figura 2.14. *Snapshot* delle *pose* migliori dei composti selezionati.

Nicolino Pala

Studi sui metallo-enzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

2.2.4 Saggi enzimatici

Per ognuna delle 4 molecole selezionate sono stati eseguiti i saggi di inibizione enzimatica non solo sulla hCA-II come previsto, ma anche sull'isoforma I (**Tabella 2.3**).

Molecola	hCA-I K _i (mM)	hCA-II K _i (mM)	Indice di selettività (K _{i(CA-I/CA-II)})
zinc00389623	0.56	0.84	0.66
zinc00163530	2.02	1.34	1.50
zinc02552108	2.30	1.14	2.01
zinc04324216	0.41	0.009	44.94

Tabella 2.3. Valori di inibizione enzimatica dei composti dopo 6 ore di incubazione.

Considerata la preliminarità dei dati di inibizione enzimatica, è comunque possibile trarre alcune interessanti considerazioni che sono di seguito illustrate. Innanzitutto si evince come le prime tre strutture (**zinc00389623**, **zinc00163530** e **zinc02552108**) abbiano attività a concentrazioni nell'ordine millimolare e quindi risultano poco interessanti nell'ottica di un possibile processo di ottimizzazione e potenziale sviluppo, inoltre, anche la loro selettività, rispetto alle due isoforme considerate, è praticamente nulla. Diversamente, il composto **zinc04324216** appare molto promettente. Esso mostra, infatti, una costante di inibizione verso la hCA-II pari a 9 μM, un valore ritenuto accettabile per un buon *hit compound* o addirittura per un *lead compound*.¹¹³ In aggiunta, poiché la sua attività inibitoria verso la hCA-I è 0.41 mM, l'indice di selettività di **zinc04324216**, verso l'isoforma II rispetto alla I, è pari a 45. Tale valore permette di fare delle speculazioni per quanto riguarda la possibilità di discriminare l'attività nelle varie isoforme.

2.2.5 Docking fine

Sono in corso di esecuzione degli esperimenti di docking fine utilizzando il programma AutoDock 4.2.1, su modelli ottimizzati con Gaussian 03W, al fine di valutare la capacità di *binding* dei composti in forma ionizzata. In **Figura 2.15** è mostrato il *binding mode* di **zinc04324216** dal quale si evince come anche la forma ionizzata tende ad interagire con il sito catalitico. Autodock ha permesso di calcolare la costante di inibizione stimata (**Tabella 2.4**). Dal confronto diretto tra le K_i trovata (9 μM) e calcolata (0.3 μM) si osserva che il programma di docking, pur sovrastimando di circa un ordine di grandezza la potenza del nostro composto, è comunque in grado di fornire un'indicazione soddisfacente della capacità di legame di **zinc04324216** con l'enzima.

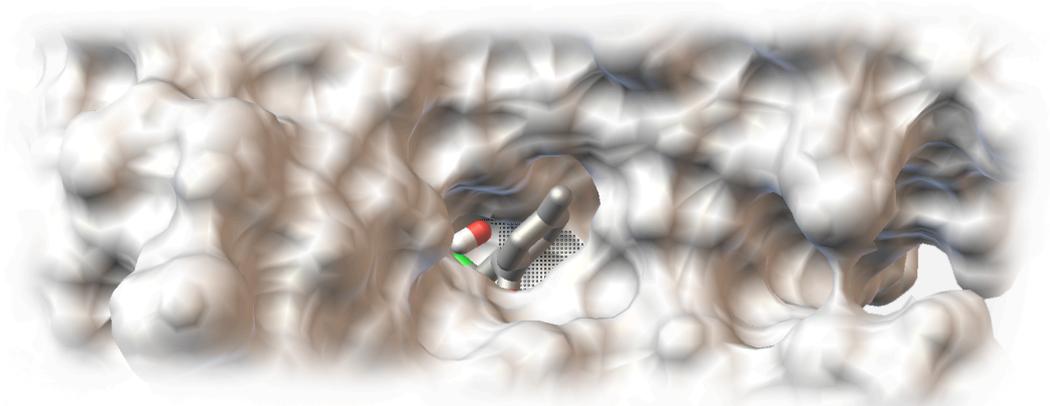


Figura 2.15. Rappresentazione del complesso tra l'inibitore ionizzato e l'hCA-II.

Ligando	^a f _{occ}	^b M.B.E.	^c E.F.E.B	^d E.I.C., Ki
zinc04324216	5/5	-7,62	-8,84	333,98 nM

Tabella 2.4. Risultati del docking fine.

^af_{occ} = Number of distinct conformational clusters found, out of 100 runs/ Number of multi-member conformational clusters found, out of 100 runs. ^bM.B.E.= Mean binding energy. ^cE.F.E.B= Estimated free energy of binding. ^dE.I.C., Ki= Estimated inhibition constant, Ki.

2.2.6 Conclusioni

La possibilità di individuare nuovi inibitori della CA dotati di selettività e privi degli effetti collaterali posseduti dai farmaci attualmente in uso, ha portato a sviluppare una piattaforma di VS con l'intento di individuare dei possibili CAI recanti delle ZBF che non presentassero il gruppo solfonammidico. Partendo dai risultati ottenuti dal VS sono state selezionate 4 strutture che sono state sottoposte ai saggi di inibizione enzimatica nei confronti delle isoforme I e II della hCA. Tra queste, la molecola **zinc04324216** ha mostrato un'attività, nei confronti della CA-II, pari a 9 µM ed un indice di selettività, verso la CA-II rispetto alla CA-I, pari a 45. Questi risultati, ottenuti da un composto privo del gruppo funzionale solfonammidico, o similare, candidano a buon diritto **zinc04324216** come modello per il possibile sviluppo di una nuova classe di inibitori della hCA-II.

2.2.7 Work in Progress.

Sfruttando le conoscenze acquisite è già in corso di realizzazione un progetto che ha come finalità l'affinamento della tecnica di VS utilizzata e l'estensione della stessa verso le altre isoforme di α-CA.

Si ringraziano sentitamente il Dr. Andrea Brancale per il periodo trascorso presso la Cardiff University e per l'utilizzo della piattaforma computazionale; il Gruppo del Dr. Claudiu T. Supuran, dell'Università di Firenze, per l'acquisto e l'analisi di inibizione enzimatica dei composti.

Nicolino Pala

Studi sui metallo-enzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

2.3 Predisposizione di un protocollo di *Photoaffinity Labelling* per lo studio delle interazioni hCA-inibitore

2.3.1 Cenni sul *Photoaffinity Labelling*

Le tecniche di *affinity labelling* sfruttano la capacità dei ligandi di riconoscere specificamente i loro bersagli macromolecolari. La possibilità di trasformare le interazioni non-covalenti che si instaurano nel complesso ligando-bersaglio in legami covalenti stabili permette il riconoscimento e l'esplorazione dei siti di legame delle macromolecole.^{115,116} Il *photoaffinity labelling* (PAL) sfrutta la capacità di alcuni gruppi funzionali (*fotofori*)¹¹⁵ di formare specie reattive in grado di creare legami covalenti se irradiati con particolari lunghezze d'onda. L'incorporamento di una particolare entità strutturale fotoattivabile, il fotoforo appunto, in una data molecola ligando origina un *photoprobes*, vale a dire un prototipo in grado di interagire selettivamente con una regione ben definita della macromolecola bersaglio e, una volta fotoattivata, di legarsi ad essa in maniera irreversibile.¹¹⁷⁻¹¹⁹

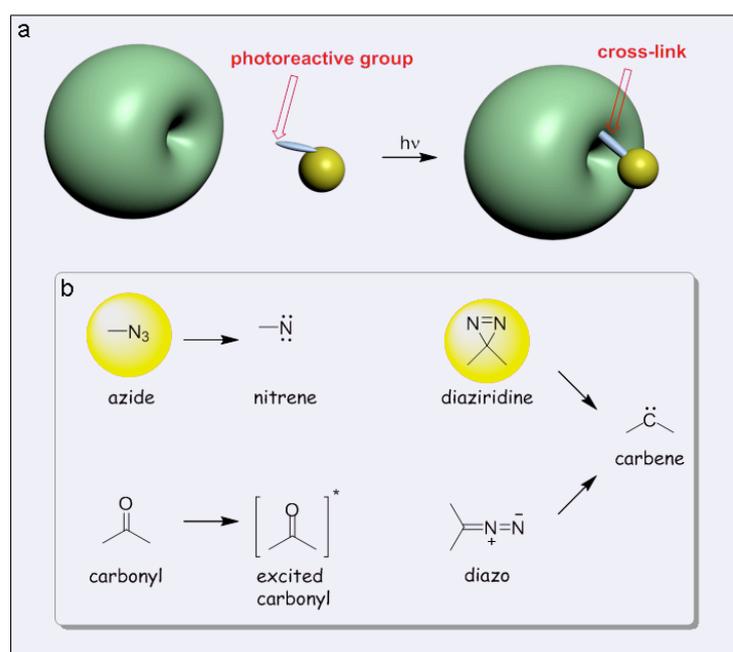


Figura 2.16. a) Rappresentazione schematica del *photo-linkage*.

b) Principali fotofori e relative specie attivate.

Il PAL è stato sviluppato circa 40 anni fa, ma solo di recente ha iniziato ad affermarsi come tecnica di indagine versatile ed affidabile, questo grazie alla scoperta di nuovi e più efficienti

Nicolino Pala

Studi sui metallo-enzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

fotofori e, soprattutto, allo sviluppo di tecniche separative ad alta risoluzione (HPLC, elettroforesi) e di strumenti di rivelazione altamente sensibili.¹¹⁹ Nel caso dello studio dell'interazione tra ligandi noti ed il loro putativo sito d'azione, si procede alla creazione di un *photoprobe* derivato da un inibitore noto.

Il PAL, quindi, integrandosi con la cristallografia a raggi X, l'NMR, gli studi di mutagenesi e omologia è in grado di svelare o validare la struttura fine delle macromolecole e la loro capacità di interagire con i ligandi.¹¹⁶

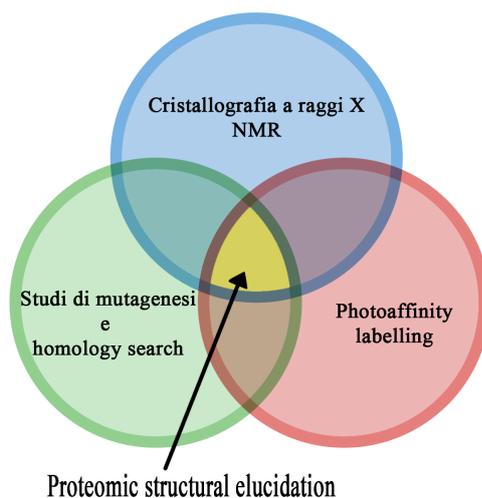


Figura 2.17. Schematizzazione delle relazioni tra PAL e le altre tecniche analitiche.

L'analisi dei complessi *photoprobe*-macromolecola bersaglio può essere condotta a tre livelli (**Figura 2.18**):

1	Macro	Permette il riconoscimento dell'avvenuto <i>photolinkage</i> . Può essere utile anche nel caso in cui l'identità del target sia sconosciuta in fase di studio.
2	Semi-micro	Il complesso, una volta isolato, è sottoposto a digestione enzimatica ed i frammenti ottenuti sono isolati e sequenziati.
3	Micro:	Il complesso è ulteriormente risolto sino ad ottenere il frazionamento nelle singole sequenze amminoacidiche.

In questo modo è possibile riconoscere i frammenti (semi-micro) ed i residui (micro) direttamente legati al *photoprobe* e quindi risalire alla composizione del sito di legame.¹¹⁹

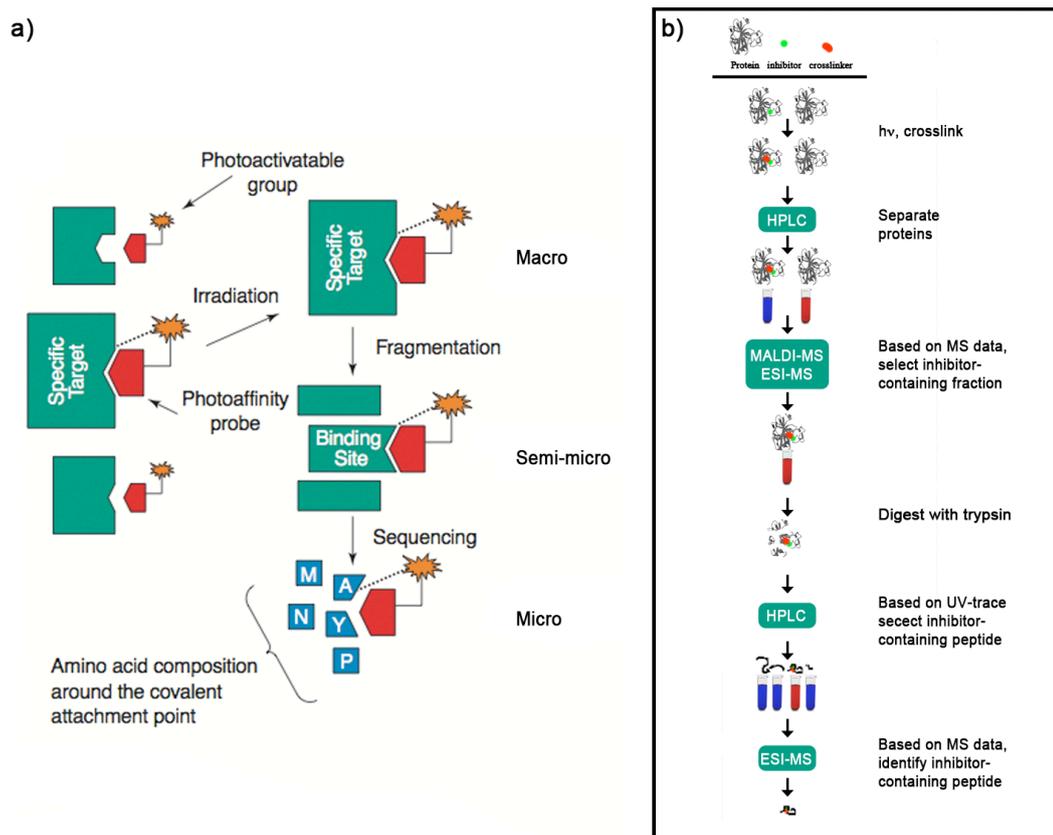


Figura 2.18. Fasi del PAL.

Affinchè sia possibile eseguire il PAL, i *photoprobes* devono soddisfare alcune condizioni di base.

Essere sufficientemente stabili alla luce da poter essere maneggiati.
Avere una lunghezza d'onda di attivazione tale da non compromettere l'integrità del target.
Consentire la formazione di un singolo legame covalente.
Avere un'affinità verso il target sufficiente a permettere la formazione del <i>photolink</i> .

Nel caso in cui il target sia un enzima, è considerata ottimale un'attività del *photoprobes* dello stesso ordine di grandezza dell'inibitore usato come modello per la sua. Comunque, nella pratica, si sono dimostrati utili *photoprobes* con attività anche 1000 volte inferiori rispetto ai composti "progenitori".

Nicolino Pala

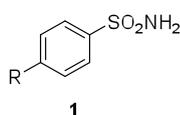
Studi sui metallo-enzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

2.3.2 Razionale

Nonostante la CA sia una delle famiglie enzimatiche maggiormente studiate,¹²⁰ a tutt'oggi gli studi di PAL riportati sono meno di una decina, e nessuno di essi contempla l'utilizzo della tecnica a fini strutturali e di identificazione delle modalità di binding di specifici ligandi con questo enzima. In questo contesto, è stato intrapreso un progetto di ricerca che, durante il periodo di tesi ha visto la progettazione e la sintesi di un piccolo set di *photoprobes* in grado di interagire selettivamente con la hCA-II, al fine di delucidare l'interazione stabilita da composti appartenenti alla classe delle solfonammidi con il sito attivo dell'enzima. Poiché i *photoprobes* dovevano ritenere l'attività inibitoria, la struttura benzenesolfonammidica para-sostituita **1**, comune a molti inibitori, è stata scelta come *scaffold* generale per il loro sviluppo.



Come gruppi fotoreattivi sono stati selezionati il gruppo fenilazido, il suo analogo polifluorurato ed il gruppo benzofenonico (**Figura 2.19**).



Figura 2.19. Fotofori selezionati per il progetto.

Oltre alle comprovate proprietà di fotofori,¹¹⁹ i gruppi scelti possiedono altre importanti caratteristiche che ne hanno promosso la selezione. Per quanto riguarda i fotofori recanti il sostituito azido, essi sono stati scelti tenendo conto che la hCA-II (come tutte le altre CA) presenta una tasca enzimatica molto stretta, appariva quindi un utile soluzione quella di operare una sostituzione dell'anello aromatico della generica benzenesolfonammide piuttosto che procedere alla formazione del *photoprobes* per aggiunta del fotoforo (**Figura 2.20a**). Un secondo intento, strettamente collegato al primo, era quello di disporre di uno, o più, *photoprobes* in grado di interagire con l'enzima in stretta vicinanza del sito catalitico. La scelta del benzofenone, invece, partiva dall'esigenza di disporre di un composto ad elevata *stickiness*. Infatti dei tre fotofori scelti, il benzofenone è quello più suscettibile all'irradiazione (**Figura 2.20b**).

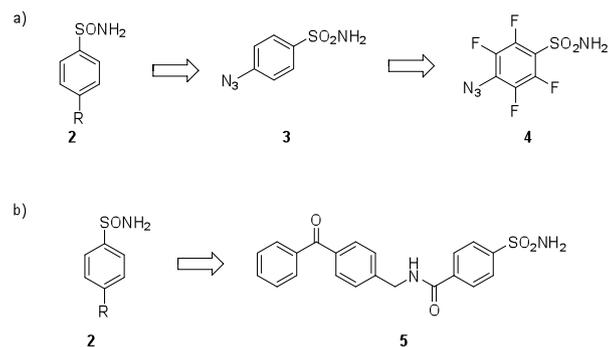
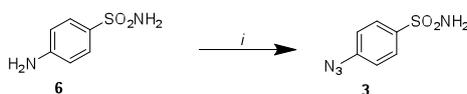


Figura 2.20. Struttura dei photoprobes progettati.

2.3.3 Sintesi dei photoprobes

Il primo composto della serie è la *p*-azidobenzensulfonammide **3**, già nota in letteratura, e dotata di comprovata e rilevante attività enzimatica sulla hCA-II ($K_i = 4.7$ nM).¹²¹ **3** è stato sintetizzato per azidazione diretta, in condizione blande, della sulfanilammide (**6**) con sodio azide in *t*-butanolo e *t*-butilnitrito (**Schema 2.1**).

Schema 2.1.



Reagenti e condizioni: NaN_3 , *t*-butanolo, *t*-butilnitrito, r.t., 5 gg.

La progettazione del composto **4** ha preso spunto dall'analogia strutturale con il composto **3** di cui formalmente è un bioisostero poli-fluorurato. La sintesi è stata eseguita per azidazione della pentafluorobenzensulfonammide (**8**) con sodio azide in una miscela di acqua e acetone a refluxo. L'intermedio **8** è stato ottenuto a partire dal pentafluorosolfonil cloruro (**7**), disponibile commercialmente, per trattamento con NH_4OH concentrato (**Schema 2.2**).

Schema 2.2.



Reagenti e condizioni: *i*) $\text{NH}_4\text{OH}_{\text{conc}}$, r.t., 7 ore; *ii*) NaN_3 , acetone, H_2O , refluxo, 6 ore.

Nicolino Pala

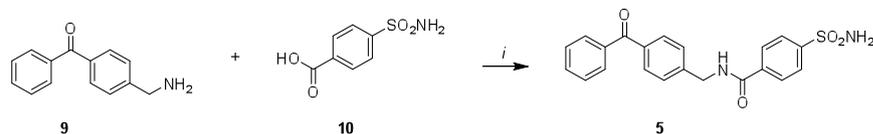
Studi sui metallo-enzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

La sintesi del composto **5** prevedeva come ultimo step, l'ammidazione, condotta in *mild conditions*, tra l'intermedio **9** e l'acido *p*-sulfamoilcarbossilico (**10**) in presenza di EDC e *N*-idrossibenzotriazolo (**Schema 2.3**).

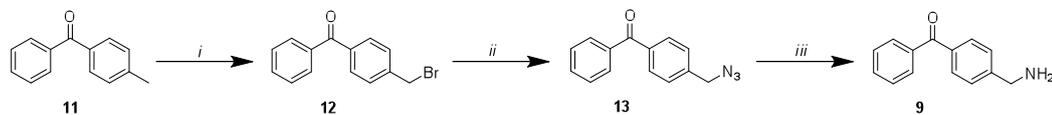
Schema 2.3.



Reagenti e condizioni: EDC, HOBt, DMA/CH₂Cl₂, r.t., 6 ore.

L'approccio ottimale per la realizzazione dell'intermedio *p*-metilammino benzofenonico **9** ha visto come passaggio iniziale la bromurazione, catalizzata da dibenzoilperossido, del *p*-metilbenzofenone (**11**) con *N*-bromosuccinimide in CCl₄ a riflusso. L'intermedio **12**, così ottenuto, è stato convertito nell'ammino-derivato **9** per reazione di azidazione con sodio azide in DMF a t.a. seguita da una riduzione secondo Staudinger utilizzando trifenilfosfina in una miscela metanolo/acqua (**Schema 2.4**).

Schema 2.4.



Reagenti e condizioni: i) NBS, dibenzoilperossido, CCl₄, riflusso, 5 ore; ii) NaN₃, DMF, r.t., 5 ore; iii) PPh₃, MeOH, H₂O, r.t., 18 ore.

Completato l'obiettivo preposto, è parso utile estendere il set di *photoprobes* realizzati. Sono stati, quindi, progettati i composti **14-16** in modo da presentare, in para al gruppo solfonammidico, un piccolo *spacer* in grado di assicurare la mobilità del fotoforo (**Figura 2.21**).

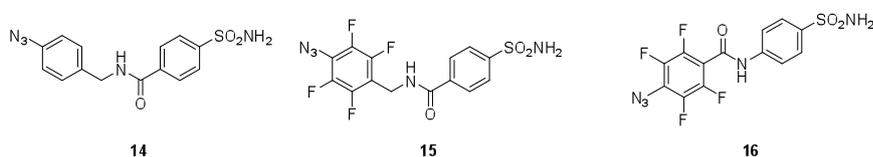


Figura 2.21. Struttura dei nuovi *photoprobes* progettati.

Nicolino Pala

Studi sui metallo-enzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

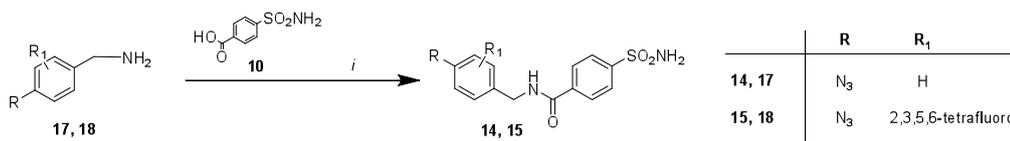
Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

La scelta di separare le porzioni fotoattivabile e farmacoforica con un gruppo ammidico (**16**), ed un eventuale gruppo metilenico (**14** e **15**), permetteva di soddisfare due condizioni: 1) la funzione ammidica appariva un'ottima strategia per legare fra loro i due gruppi funzionali dei *photoprobes*, in analogia con la sintesi del composto **5**; 2) considerata la struttura imbutiforme del sito catalitico era ragionevole aspettarsi che, man mano che ci si sarebbe allontanati dal fondo della tasca, le pareti dell'enzima si sarebbero distanziate dall'inibitore eventualmente legato al cofattore metallico. In questa situazione, la presenza di una funzione ammidica dovrebbe costringere il fotoforo a disporsi in maniera angolare rispetto alla porzione solfonammidica, permettendo al gruppo azidico di interagire meglio con i residui adiacenti.

Di seguito verranno illustrate le vie sintetiche progettate e tuttora in corso di attuazione per la realizzazione dei *photoprobes* **14-16**. In particolare, lo schema sintetico proposto per i composti **14** e **15** ripercorre nel suo passaggio finale la reazione, già usata per **5**, di amidazione dell'acido *p*-sulfamoilcarbossilico **10** con l'appropriato fotoforo **17**, **18**. (Schema 2.5).

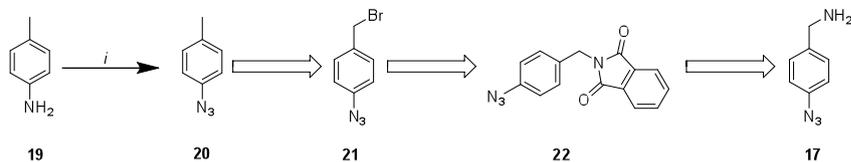
Schema 2.5.



Reagenti e condizioni: EDC, HOBt, DMA/CH₂Cl₂, r.t., 6 ore.

Nel caso del fotoforo **17**, la sua sintesi ha visto la realizzazione dell'intermedio **20** attraverso una reazione di diazotazione della 4-metil-anilina (**19**) con sodio nitrito in acido trifluoroacetico a 0 °C, seguita dall'azidazione per addizione di sodio azide al sale di diazonio formatosi. A questo punto si prevede di convertire l'azide **20** nel bromoderivato **21**, il quale, secondo una metodica riportata in letteratura,¹²² per trattamento con potassio ftalimide fornirebbe l'addotto **22**. Quest'ultimo, per reazione con idrazina dovrebbe portare al desiderato composto **17** (Schema 2.6).

Schema 2.6.



Reagenti e condizioni: *i*) NaNO₂, TFA, 0 °C, 20 min.; *ii*) NaN₃, r.t., 24 ore.

Nicolino Pala

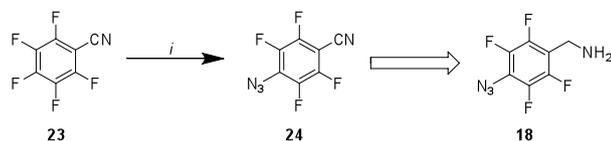
Studi sui metallo-enzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

Il composto polifluorurato **18**, può essere ottenuto secondo la metodica descritta da Keana *et al.*,¹²³ che prevede la riduzione con $\text{BH}_3\text{-THF}$ del nitrile **24** preparato per azidazione con sodio azide del pentafluoronitrile **23** in una miscela acqua/acetone a riflusso (**Schema 2.7**).

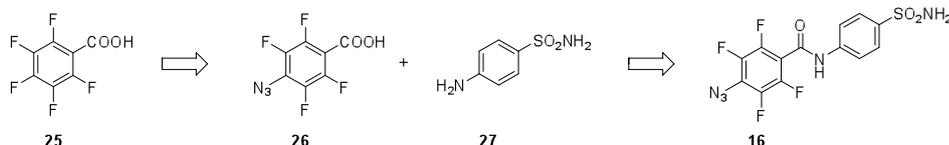
Schema 2.7.



Reagenti e condizioni: *i*) NaN_3 , H_2O , acetone, riflusso, 8 ore.

Infine il composto **16**, dotato di uno *spacer* formato dalla sola funzione ammidica, peraltro invertita, è stato pensato come prodotto di amidazione tra la sulfanilammide (**27**) e l'acido *p*-azido-tetrafluorobenzoico (**26**), utilizzando le stesse condizioni di reazione dei composti precedenti. Anche la sintesi dell'intermedio **26** per azidazione dell'acido pentafluorobenzoico (**25**) ripercorrerà la sintesi nota in letteratura¹²³ (**Schema 2.8**).

Schema 2.8.



2.3.4 Molecular Modelling

Uno studio di docking utilizzando il software AutoDock 4.2.1 è stato condotto con l'obiettivo di valutare la possibile capacità di interazione ed il *binding-mode* dei *photoprobes* sintetizzati con l'enzima. La **Tabella 2.5** riassume i dati ottenuti. Da notare come, anche in questo caso, l'algoritmo implementato in AutoDock 4.2.1 è in grado di fornire una stima abbastanza affidabile, per il composto **3**, della costante di inibizione enzimatica predetta (~28 nM) in relazione al dato sperimentale (~5 nM). Nella **Figura 2.22** sono mostrate le *poses* migliori di ciascun composto. Da esse si evince come i *photoprobes* siano disposti nel sito attivo in posizione favorevole per interagire con il cofattore metallico, un dato questo confermato anche della completa sovrapposibilità delle *poses* proposte con il ligando naturale del complesso enzima-inibitore usato come modello proteico (dati non mostrati). Tale risultato è ancora più interessante se si tiene conto del fatto che durante l'esecuzione degli esperimenti di docking i composti sono stati posizionati ad una distanza di 20 Å dall'atomo di zinco, e quindi completamente al di fuori della tasca

Nicolino Pala

Studi sui metallo-enzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

enzimatica. Questa strategia permette al programma di valutare il *binding mode* ottimale dei composti senza artifici che potrebbero influenzare i risultati.

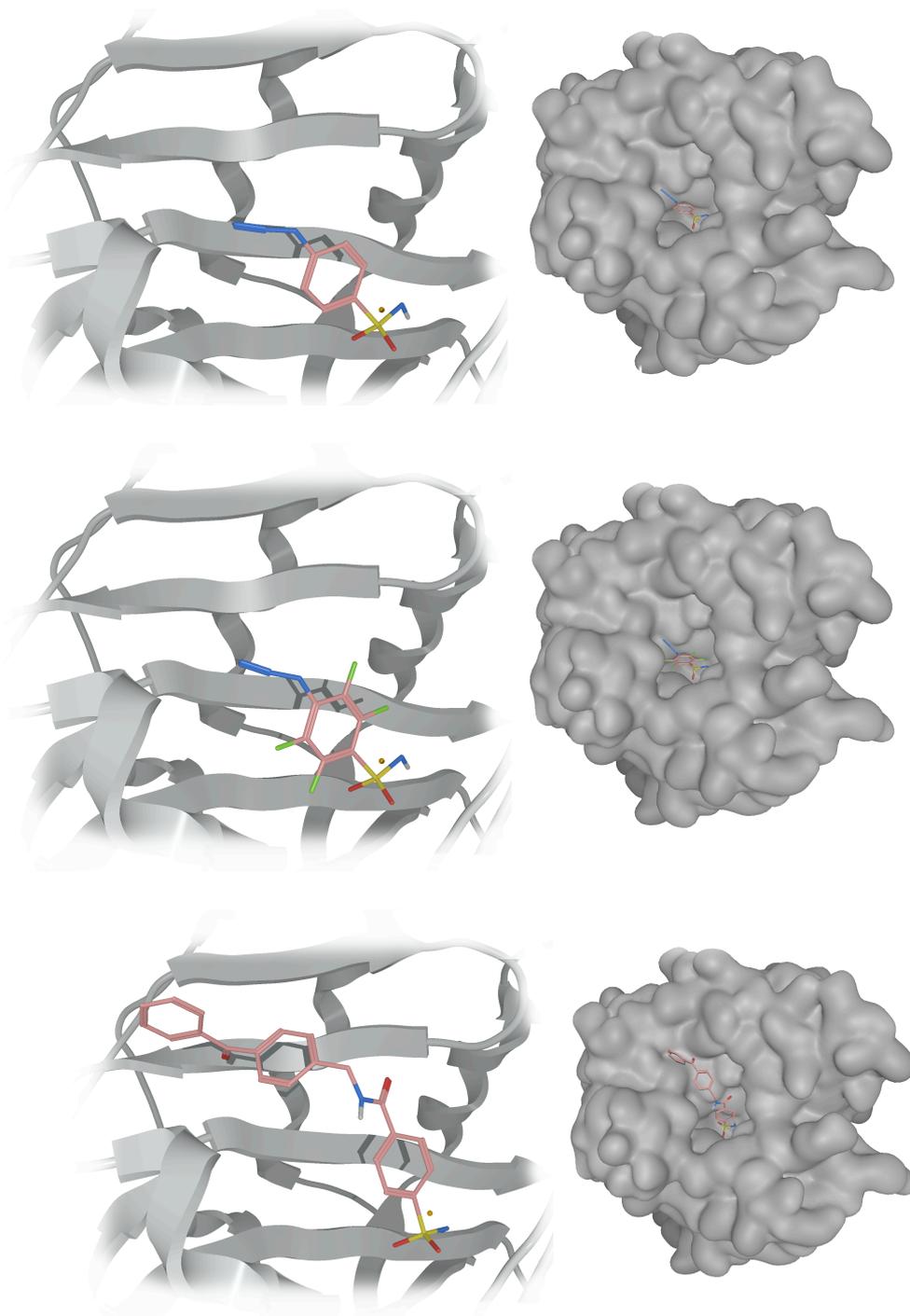


Figura 2.22. In ordine decrescente il dettaglio (a sinistra) e la veduta d'insieme (a destra) delle *pose* migliori dei composti **3**, **4** e **5**.

Nicolino Pala

Studi sui metallo-enzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

Ligando	^a f _{occ}	^b M.B.E.	^c E.F.E.B	^d E.I.C., Ki
3	2/2	-10.02	-10.31	27.89 nM
4	3/2	-9.41	-9.87	58.19 nM
5	10/8	-11.35	-12.37	851.28 pM

Tabella 2.5. Risultati del docking fine.

^af_{occ} = Number of distinct conformational clusters found, out of 100 runs /Number of multi-member conformational clusters found, out of 100 runs. ^bM.B.E.= Mean binding energy. ^cE.F.E.B= Estimated free energy of binding. ^dE.I.C., Ki= Estimated inhibition constant, Ki.

2.3.5 Saggi

I *photoprobes* 3-5 sono stati inviati al Dr. Claudiu Supuran e sono al momento in corso di valutazione biologica per l'attività inibitoria enzimatica su un panel di isoforme della CA. Parallelamente, è stato acquisito l'enzima hCA-II ed è in corso di predisposizione un esperimento preliminare di PAL con lo scopo di appurare la capacità foto-legante dei *photoprobes* e che si avvarrà di esperimenti combinati di tecniche spettrometriche di massa (MALDI-TOF ed ESI).

2.3.6 Conclusioni

Una serie di arilsolfonammidi appositamente progettate per agire da *photoprobes* verso l'anidrasa carbonica è stata realizzata in previsione di uno studio di *photo affinity labelling* in grado di fornire nuove informazioni strutturistico-funzionali del complesso enzima-inibitore. In quest'ottica, è parso subito opportuno estendere il set di *photoprobes* in modo da aumentare lo spazio topologico esplorabile dell'enzima. Parallelamente gli inibitori già sintetizzati sono stati avviati agli studi di inibizione enzimatica per valutarne la loro attività nei confronti di un panel (in corso di definizione) di isoforme di CA. Gli stessi inibitori saranno a breve utilizzati per l'esecuzione degli esperimenti preliminari di PAL dove verranno valutati sia la capacità di fotoattivazione sia i metodi di rilevazione dei complessi covalenti formati.

Nicolino Pala

Studi sui metallo-enzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasa carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

Capitolo 3

Pirazoloni

3.1 Introduzione

Nel corso di un ampio progetto condotto da un team di ricerca del *National Cancer Institute* (NCI) di Bethesda volto all'individuazione di inibitori dell'HIV-1 integrasi, utilizzando tecniche di VS su database di composti depositati presso la stessa organizzazione, è stata selezionata una serie di composti correlati alle strutture di formula generale **I** e **II** (**Figura 3.1**).¹²⁴⁻¹²⁷ Sebbene i saggi biologici avevano evidenziato una certa attività anti-integrasica, il loro successivo sviluppo è stato interrotto a causa di problemi legati alla citotossicità. Questo non ha impedito che il loro scaffold strutturale venisse comunque preso in considerazione da diversi gruppi di ricerca nella predisposizione di modelli farmacoforici che potevano essere utilizzati per lo sviluppo di nuovi INIs.¹²⁸⁻¹³³

In seguito, proprio per la dimostrata citotossicità,¹³⁴ tali composti sono stati di recente valutati come potenziali antitumorali. In particolare, uno studio di Neamati *et al* riportava i risultati ottenuti *in vitro* sull'attività antiproliferativa nei confronti di linee cellulari ormono-dipendenti positive di alcuni componenti delle serie **I** e **II** (**Ia** e **IIa-d**).

Nicolino Pala

Studi sui metallo-enzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

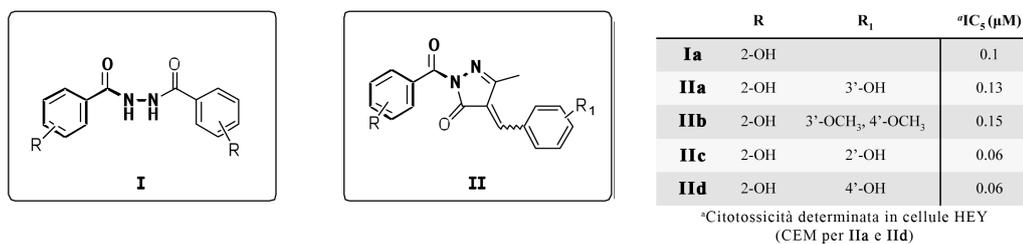


Figura 3.1.

Tali risultati vennero supportati da studi *in vivo* eseguiti testando alcuni derivati bisidrazidici, tra cui **Ia**, su modelli xenografici di cancro alla prostata (PC3) nei ratti. Ulteriori esperimenti evidenziarono un effetto d'induzione dell'apoptosi e conseguente blocco del ciclo cellulare nella fase G₀/S₁.¹³⁴

3.2 Premessa

In questo contesto, durante il periodo di Tesi di Laurea,¹³⁵ è stato intrapreso un progetto di ricerca, in collaborazione con il Prof Nouri Neamati, volto alla realizzazione di una piccola collezione di composti appartenenti alla serie **II** (**IIa-f**) al fine di studiarne l'attività antiproliferativa (**Figura 3.2**) ed eventualmente ottimizzarne l'attività attraverso la progettazione e la realizzazione di nuovi derivati. Poiché i composti considerati erano in gran parte noti, per la loro preparazione è stata inizialmente ripercorsa la via sintetica riportata in letteratura. Da un'attenta ricerca bibliografica è stato possibile reperire solo tre articoli, peraltro riferibili ai medesimi autori, dai quali è stato possibile estrapolare con una certa difficoltà la procedura sintetica descritta per i composti desiderati.¹³⁶⁻¹³⁸

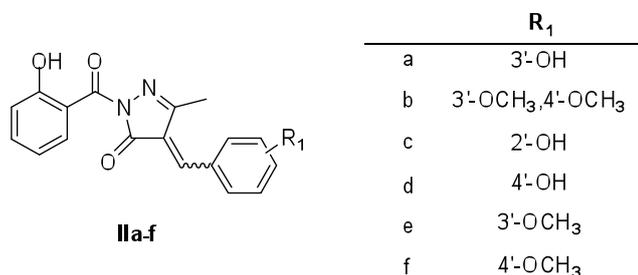


Figura 3.2. Struttura dei composti selezionati per il progetto.

Nicolino Pala

Studi sui metallo-enzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

3.3 Studio sintetico e discussione

La via sintetica nota in letteratura descrive l'iniziale condensazione della generica benzidrazide **1** con l'acetoacetato di etile (**2**) a dare il benzoilidrazone **3**, che per ciclizzazione termica forma il benzoilpirazolone **4**. Quest'ultimo condensa secondo *Knoevenagel* con la benzaldeide **5** per formare il generico composto **II** (Figura 3.3).

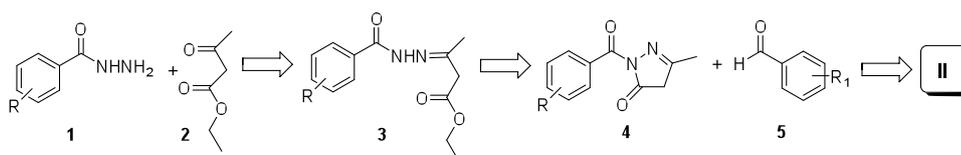
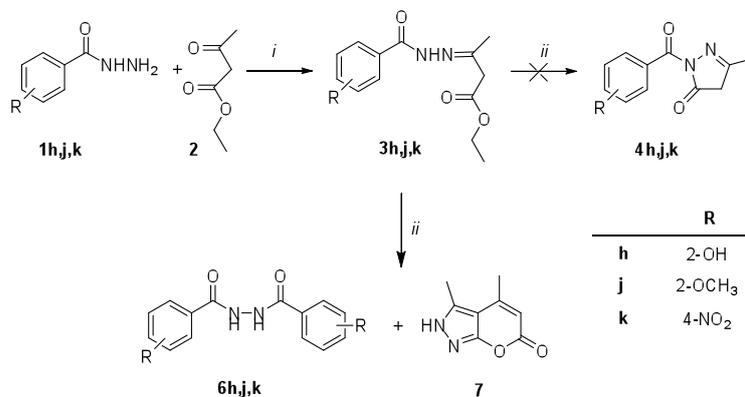


Figura 3.3. Schema sintetico noto per la sintesi dei derivati II.

In questo contesto è stata dapprima considerata la preparazione del composto modello **4h** (Schema 3.1). Nonostante la reazione di condensazione tra la 2-idrossibenzidrazide (**1h**) e l'acetoacetato di etile (**2**), condotta in diossano a riflusso, forniva con rese accettabili il 2-idrossibenzoilidrazone **3h**. I numerosi tentativi di ottenere **4h** per ciclizzazione di **3h** in *o*-diclorobenzene a riflusso fallivano. Con l'intento di esplorare tale inaspettato comportamento, la reazione di ciclizzazione è stata ripercorsa utilizzando altri due benzoilidrazoni (**3j** e **3k**), anch'essi riportati in letteratura. Come nel caso precedente, la reazione non permetteva l'ottenimento dei preventivati derivati **4j** e **4k**. Un'approfondita analisi dei prodotti ottenuti ha permesso di osservare come durante tale reazione si aveva la formazione di una coppia di composti (**6** e **7**), in rapporto equimolare, che sono stati isolati e caratterizzati (Schema 3.1).

Schema 3.1.



Reagenti e condizioni: *i)* diossano, riflusso, 5 ore. *ii)* *o*-diclorobenzene, riflusso, 5 ore.

Mentre il primo componente, la bis-benzidrazide *R*-sostituita **6**, è stato identificato con le normali tecniche spettroscopiche, la risoluzione della struttura del composto **7** ha richiesto un'attenta analisi dei dati ottenuti tramite tecniche spettroscopiche e spettrometriche più fini, insieme al determinante ed inequivocabile contributo della cristallografia a raggi X (**Figura 3.4**).

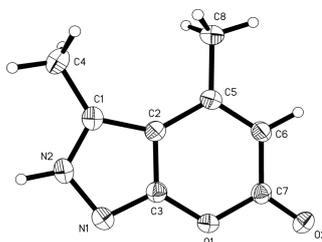


Figura 3.4. Immagine ORTEP del composto **7**.

Successivamente è stato condotto uno studio retrosintetico con l'intento di ottenere i desiderati prodotti della serie **II** e, nel contempo, chiarire gli inattesi risultati derivati dall'applicazione della via sintetica nota. Sono state considerate tre possibili alternative sintetiche (**Figura 3.5**).

Nicolino Pala

Studi sui metallo-enzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

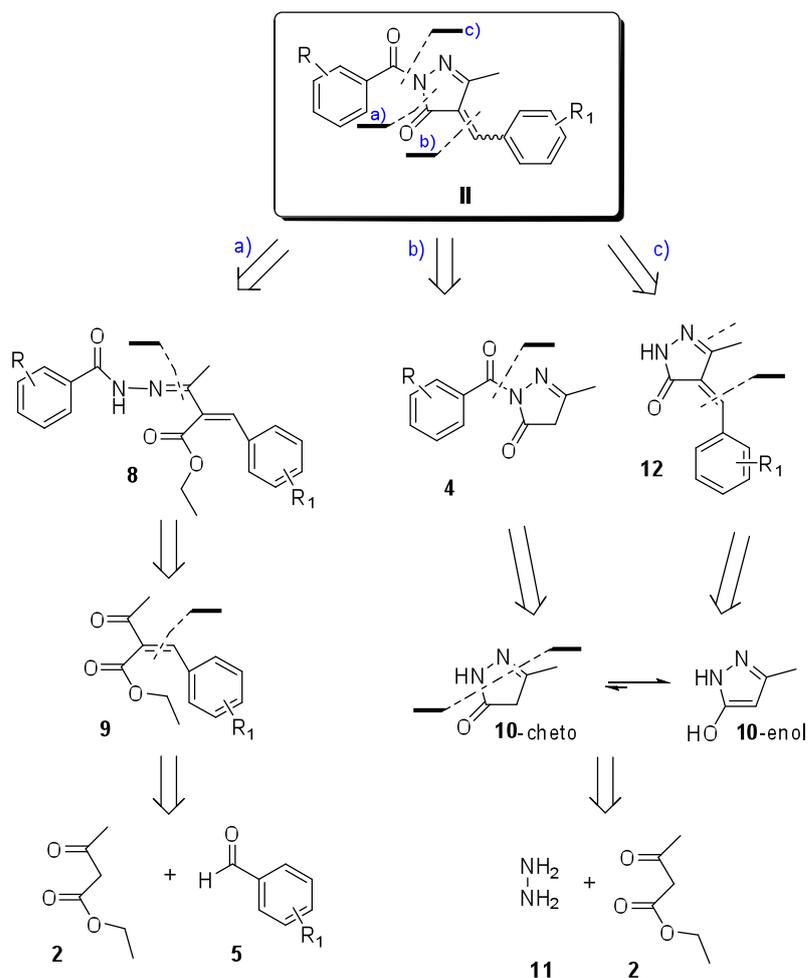


Figura 3.5. Schema retrosintetico per la sintesi di **II**.¹³⁵

Ripercorrendo la via **a)**, il derivato benzilidenico **9b**, ottenuto per reazione tipo *Knoevenagel* dell'aldeide **5b** con l'acetoacetato di etile (**2**), avrebbe dovuto condensare con la benzidrazide **1j** a dare il derivato **13**. Diversamente da quanto preventivato, la reazione ha portato all'ottenimento della benziliden benzidrazide **14**, formalmente ottenuta attraverso la reazione retroaldolica di **9b** a ricostituire **5b** e successiva sua condensazione con **1j** per dare **14** (Schema 3.2).

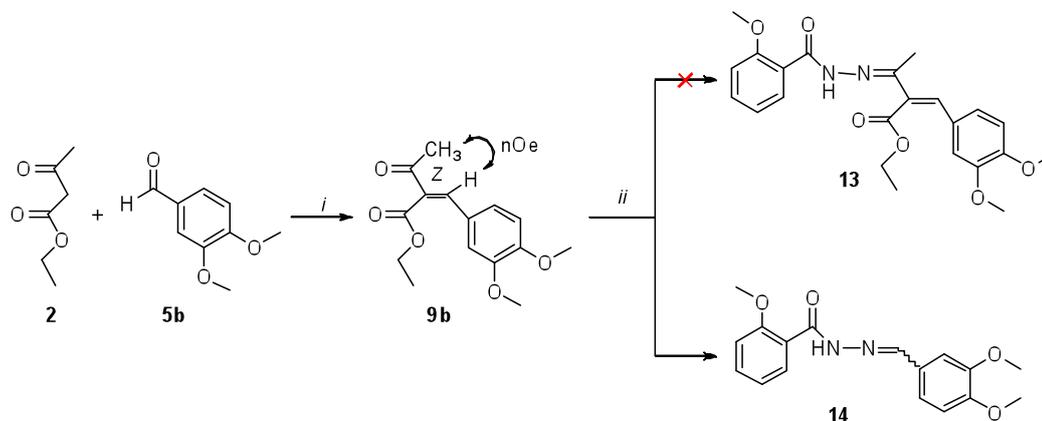
Nicolino Pala

Studi sui metallo-enzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

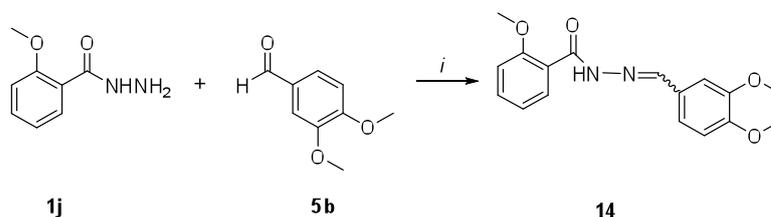
Schema 3.2.



Reagenti e condizioni: *i*) toluene, piperidina, AcOH, riflusso, 3 ore; *ii*) 2-metossibenzidrazide (**1j**), diossano, riflusso, 6 ore.

La formazione di **14** è stata confermata per reazione diretta di **1j** e **5b** nelle stesse condizioni sperimentali (**Schema 3.3**).

Schema 3.3.



Reagenti e condizioni: *i*) 2-metossibenzidrazide (**1j**), diossano, riflusso, 6 ore.

Proseguendo nello schema retrosintetico riportato in **Figura 3.5**, i percorsi **b**) e **c**) prevedono il coinvolgimento del sintone chiave **10**. La realizzazione di tale composto è stata agevolmente ottenuta per reazione dell'acetoacetato di etile (**2**) con idrazina (**11**) in diossano a riflusso (**Schema 3.4**). I dati di spettroscopia NMR hanno confermato la presenza del solo tautomero enolico.

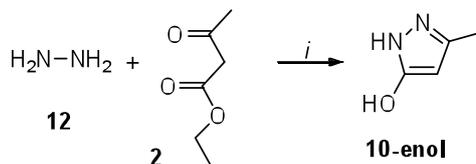
Nicolino Pala

Studi sui metallo-enzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

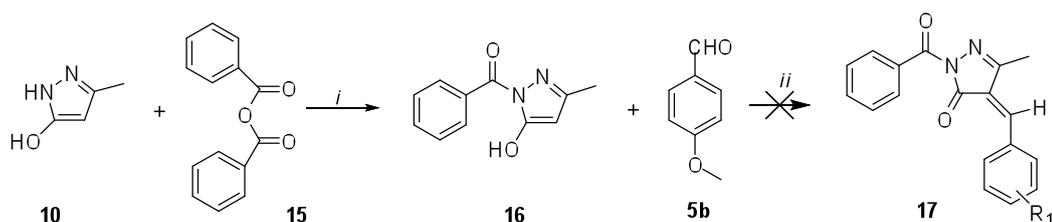
Schema 3.4



Reagenti e condizioni: *i*) diossano, riflusso, 15-25 min.

A questo punto, seguendo la strategia **b**), è stata proposta la sintesi del derivato **16**, privo di sostituenti sull'anello benzenico, come modello generale dell'intermedio chiave benzoil-5-idrossi-3-metilpirazolonico **4**. **16** è stato sintetizzato per trattamento del composto **10** con sodio benzoato in anidride benzoica fusa e riscaldando la miscela di reazione a 80°C per mezz'ora. I tentativi di ottenere **17** per successiva condensazione di **16** con la *p*-metossibenzaldeide **5b** hanno dato esito negativo (**Schema 3.5**).

Schema 3.5.



Reagenti e condizioni: *i*) sodio benzoato, 80 °C, 30 min.; *ii*) TEA, diossano, 60 °C.

È stata infine percorsa la via sintetica **c**) derivata dall'inversione dei passaggi sintetici descritti nel percorso **b**). La reazione coinvolta nel primo step, che prevedeva il tentativo di formazione del benzilidene **13** per condensazione tipo *Knoevenagel* tra l'aldeide **5b** e il pirazolo **10**, è stata condotta per riscaldamento dei prodotti di partenza in anidride acetica a 80 °C e in presenza di acetato di sodio come base. Sfortunatamente, tale reazione non consentiva di ottenere l'atteso prodotto **13**. La successiva analisi strutturale effettuata sul prodotto di reazione ha permesso di identificare il composto **18**, isolato nella sola forma *Z*, probabilmente stericamente favorita, come evidenziato dall'interazione NOE stabilita tra l'idrogeno vinilico ed il metile dell'anello pirazolonico (**Schema 3.6**).

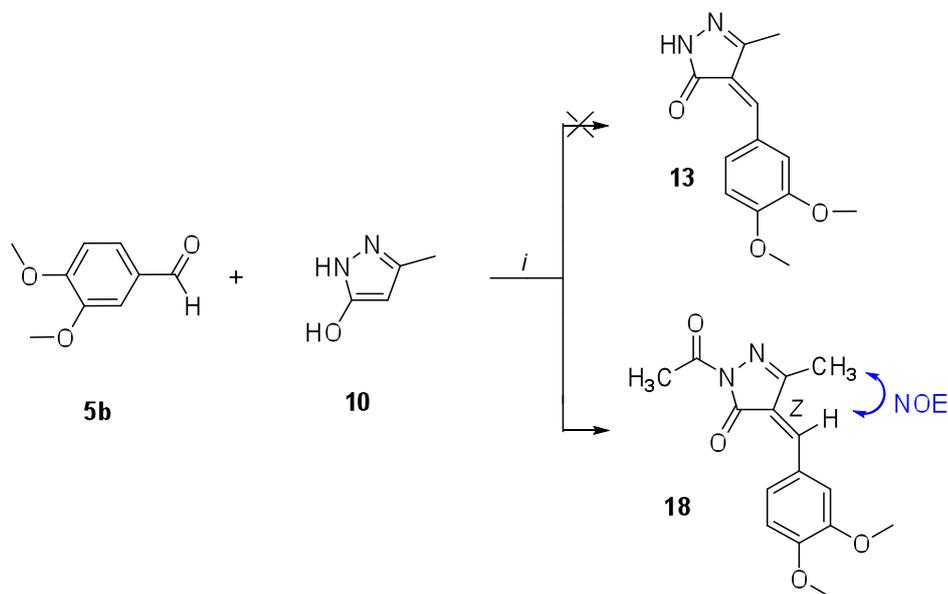
Nicolino Pala

Studi sui metallo-enzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

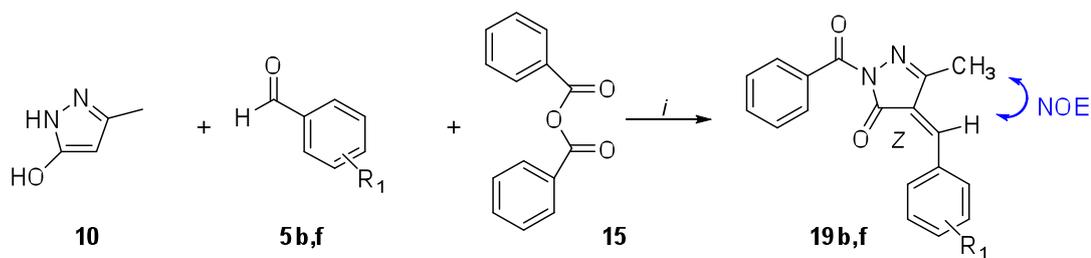
Schema 3.6.



Reagenti e condizioni: *i*) acetato di sodio, anidride acetica, 80 °C, 30 min.

Sfruttando la reattività di **10**, sperimentalmente osservata, è stata messa a punto una procedura sintetica che ha consentito di ottenere i derivati **19b,f** in un singolo passaggio, per trattamento del metilpirazolo **10** con le aldeidi **5b,f** in presenza di anidride benzoica e benzoato di sodio (Schema 3.7). Anche in questo caso i composti **19b,f** sono stati isolati nella sola forma *Z*.

Schema 3.7.



Reagenti e condizioni: *i*) Sodio benzoato, 65 °C, 30 min.

Parallelamente alla realizzazione dei composti appartenenti alla serie **II**, uno studio strutturistico retrospettivo sulla via sintetica descritta in **Figura 3.3** ha consentito di proporre tre possibili percorsi di reazione per la formazione della coppia di composti **6** e **7** a partire dall'idrazone **3** (**Figura 3.6**).

Nicolino Pala

Studi sui metallo-enzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

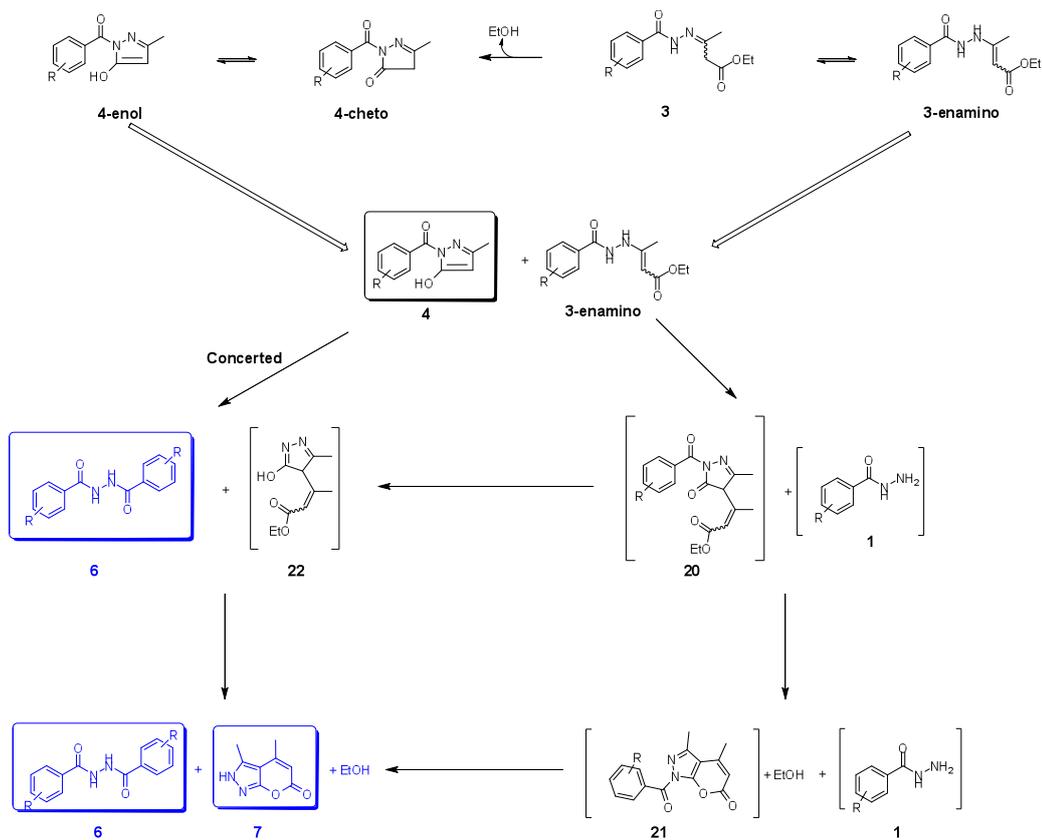


Figura 3.6. Percorsi di reazione proposti per la formazione di **6** e **7**.

Gli intermedi coinvolti nei percorsi proposti sono stati sottoposti ad una serie di calcoli *ab initio*, effettuati tramite il programma Gaussian 03W, che hanno permesso di tracciare i rispettivi profili energetici e di individuare quello maggiormente favorito (**Figura 3.7**). I calcoli quantomeccanici consentono di trarre una plausibile spiegazione del mancato ottenimento del prodotto di ciclizzazione **4**. Infatti, sebbene la formazione di tale composto sia energeticamente favorita, il gap energetico per lo step successivo è relativamente contenuto (+ 10.07 Kcal/mol). Di conseguenza la reazione non si arresta a **4** ma evolve sino all'ottenimento dei composti **6** e **7**, con un guadagno netto di energia pari a -15.93 Kcal/mol (**Figura 3.7**).

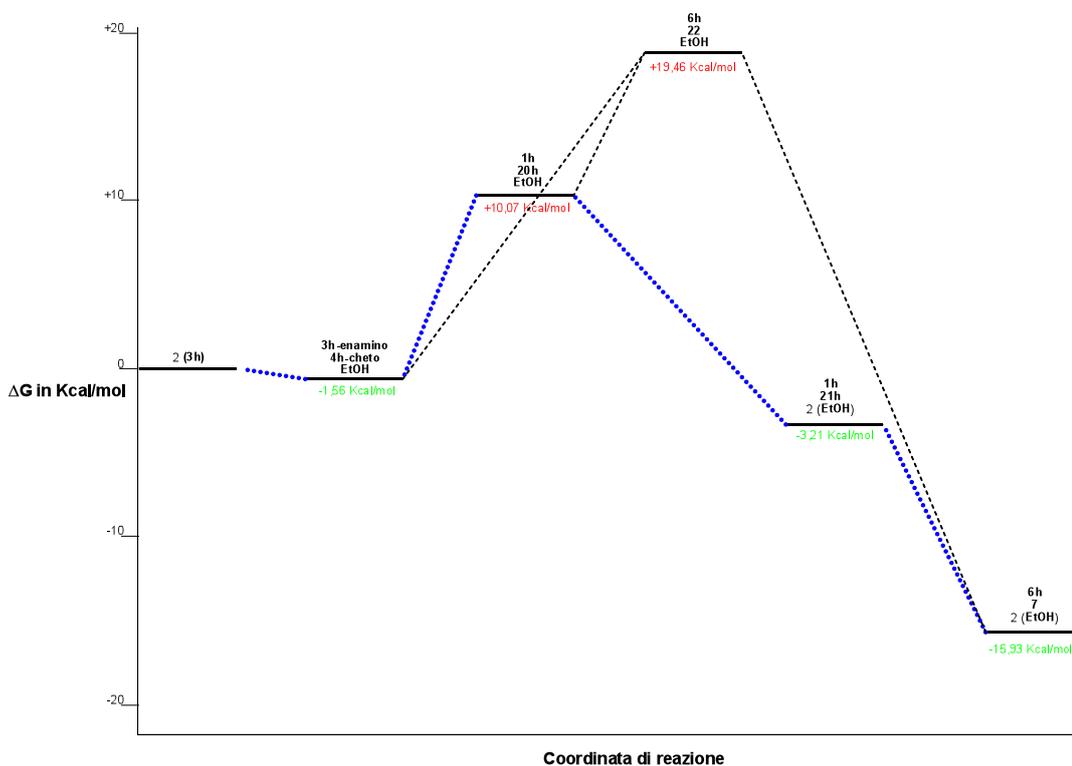
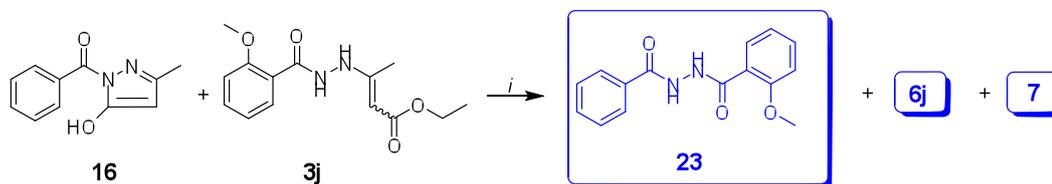


Figura 3.7. Grafico dei possibili percorsi di reazione calcolati usando come modello il composto **3h**. La linea tratteggiata blu indica il percorso energeticamente favorito. (I valori energetici sono calcolati rispetto al composto **3h** e sono espressi in Kcal/mol).

L'ipotesi che i benzoilpirazoloni di formula generale **4** sono in grado di reagire con i loro diretti precursori **3** per dare i composti **6** e **7** è stata sperimentalmente dimostrata tramite la realizzazione del composto "ibrido" **23**, originato dalla reazione tra il 2-metossibenzoilidrazone **3j** e il benzoilpirazolo **16** in *o*-diclorobenzene a riflusso. (Schema 3.8).

Schema 3.8.



Reagenti e condizioni: *i*) *o*-diclorobenzene, riflusso, 5 ore.

Nicolino Pala

Studi sui metallo-enzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

3.4 Conclusioni

Allo stato attuale si possono proporre le seguenti considerazioni:

- l'impraticabilità della via sintetica nota in letteratura (**Figura 3.3**) è stata dimostrata inconfutabilmente attraverso studi di carattere chimico, spettroscopico e computazionale;
- i presunti composti della serie **II**, testati inizialmente come inibitori dell'IN e poi come induttori dell'apoptosi, provenienti dalla libreria del NCI, sono da considerarsi costituiti dalla miscela (~1:1) dei composti **6** e **7**;
- l'attività inibitoria verso l'HIV-1 IN come anche quella antiproliferativa, inizialmente attribuita ai composti della serie **II**, dovrebbe essere invece riferita alla miscela di **6** e **7**. Peraltro, l'eterociclo **7** non possiede alcuna attività biologica intrinseca nei confronti di HIV-1 IN o citotossica (dati non riportati).

Alla luce dei punti precedenti, è opportuno segnalare come i modelli farmacoforici degli INIs sviluppati basandosi anche sui dati della serie **II** debbano essere opportunamente riconsiderati ed eventualmente rielaborati.

Parte Sperimentale

Chimica

Parte generale

I solventi, i solventi anidri ed i reattivi di partenza sono stati acquistati da: Aldrich, Merck, AlfaAesar e Carlo Erba. Tutte le reazioni che necessitavano dell'ambiente anidro sono state effettuate in atmosfera di azoto tramite l'impiego di apposite linee-vuoto, con l'utilizzo di siringhe e setti. I punti di fusione sono stati determinati usando un apparecchio *kofler* e non sono stati corretti. I composti sono stati purificati o mediante cristallizzazione o mediante flash-cromatografia su gel di silice Merck Silica gel 60 con dimensioni delle particelle 0.040-0.063 mm (230-400 mesh ASTM). Le analisi di Gaschromatography/Mass sono state eseguite con un gascromatografo Hewlett Packard HP 5790A utilizzando il detector HP 5970A ed usando una colonna A HP1 100% Polydimethylsiloxane (Hewlett Packard 25 m x 0.2 mm i.d., 0.2 μ m film thickness). Tutte le analisi sono state eseguite nelle seguenti condizioni: oven temperature program, 100 °C (held for 3 min.) to 300 °C at 20°/min.; carrier gas He, pressure 10 p.s.i.; injection volume was 5 μ L. L'acquisizione dei dati è stata determinata con una chemstation Pascal system HP 9000 series 300. Gli spettri IR sono stati registrati in film o in emulsione con nujol in dischi di KBr utilizzando uno spettrofotometro Perkin-Elmer 781 e gli assorbimenti indicati in numero d'onda ν (cm^{-1}). Gli esperimenti di Risonanza Magnetica Nucleare ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, $^{19}\text{F-NMR}$, DEPT/ATP, HETCOR, HMBC, NOESY, NOE difference e COSY) sono stati eseguiti a temperatura ambiente con i seguenti spettrofotometri: Varian XL-200 (200 MHz); Varian VXR-300 (300 MHz); Bruker Advance III (400 MHz); Bruker AMX-500 (500 MHz), usando CDCl_3 , DMSO e loro miscela (3:1) come solventi; i *chemical shifts* sono espressi in unità δ (p.p.m.)

Nicolino Pala

Studi sui metalloenzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

rispetto al TMS usato come standard interno. Gli *splitting patterns* sono stati considerati come di seguito riportato: s, singoletto; d, doppietto; t, tripletto; q, quadrupletto; sp, settetto, m, multipletto; bs, singoletto allargato; dd, doppio doppietto. La determinazione di protoni scambiabili (OH, NH) è stata confermata per addizione di D₂O. Tutti i dati spettroscopici confermano le strutture assegnate. Le analisi elementari sono state condotte utilizzando uno strumento Perkin-Elmer 2400 presso il Laboratorio di Microanalisi del Dipartimento di Chimica dell'Università di Sassari ed i risultati erano compresi tra ± 0.4 % rispetto ai valori teorici.

Nicolino Pala

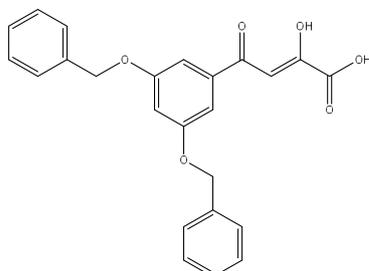
Studi sui metalloenzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

Capitolo 1

Acido (Z)-4-(3,5-bis(benzilossi)fenil)-2-idrossi-4-osso-2-butenoico.[3]¹³⁹



Una soluzione di **14** (1.0 mmol) in metanolo (15 mL) è stata addizionata di una soluzione di NaOH 2 N (4.0 mmol) ed agitata a t.a. per 5 ore. Dopo diluizione con acqua, la miscela di reazione è stata acidificata con HCl 1 N. Il precipitato formatosi è stato filtrato, lavato con acqua e ricristallizzato da una soluzione di esano/acetato di etile. **Resa:** 76 %.

Rf: 0.17 (etere di petrolio/acetato di etile = 1/9).

Pf: 171 °C.

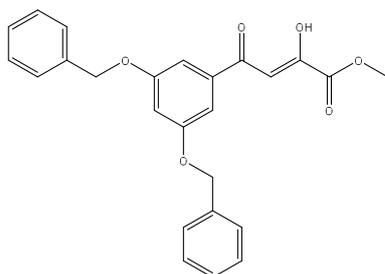
IR (nujol) ν cm^{-1} = 1707 (C=O acido), 1623 (C=O chetone).

¹H-NMR-200 MHz (DMSO-*d*₆): δ 7.35-7.55 (m, 10H, Ar-H), 7.27 (d, 2H, Ar-H), 7.09 (s, 1H, Ar-H), 6.99 (s, 1H, CH), 5.19 (s, 4H, CH₂).

MS: m/z 404 (M⁺).

Analisi elementare: per C₂₄H₂₀O₆ Calcolato: C 71.26%; H 4.99%. Trovato: C 71.00%; H 4.07%.

(Z)-4-(3,5-bis(benzilossi)fenil)-2-idrossi-4-osso-2-butenoato di metile.[14]¹⁴⁰



Ad una soluzione 3,5-dibenzilossi-acetofenone (**12**, 8.3 mmol) e dimetil ossalato (**13**, 10.0 mmol) in DMF (10 mL), è stato aggiunto NaH (dispersione in olio 60%, 10.0 mmol) a 5 °C. La miscela è stata agitata a t.a. per 3.5 h e poi scaldata a 50 °C per 1 ora. Dopo raffreddamento in un bagno di

Nicolino Pala

Studi sui metalloenzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

ghiaccio, la miscela è stata addizionata di acqua ed acidificata con HCl 3 N a dare un residuo solido che è stato filtrato e lavato più volte con acqua. **Resa:** 73 %.

Rf: 0.71 (etere di petrolio/acetato di etile = 2/8)

Pf: 91 °C.

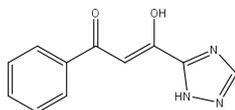
IR (nujol) ν cm^{-1} = 1725 (C=O acid), 1625 (C=O chetone).

¹H-NMR-200 MHz (DMSO-*d*₆): δ 7.34-7.60 (m, 10H, Ar-H), 7.27 (s, 2H, Ar-H), 7.14 (s, 1H, Ar-H), 7.01 (s, 1H, CH), 5.19 (s, 4H, CH₂), 3.86 (s, 3H, OCH₃).

MS: m/z 418 (M⁺).

Analisi elementare: per C₂₅H₂₂O₆ Calcolato: C 71.75%; H 5.30%. Trovato: C 71.68%; H 5.61%.

Metodo di sintesi di (2-*Z*)-3-idrossi-1-fenil-3-(1*H*-1,2,4-triazol-3-il)prop-2-en-1-one.[4]



Ad una soluzione di **17** (2.1 mmol) in diossano (30 mL) è stato aggiunto HCl 3 N (8 mL) e la miscela è stata agitata a 85 °C per 1 ora. Dopo raffreddamento a temperatura ambiente, il diossano è stato evaporato, il residuo disciolto in etere etilico ed estratto con NaOH 1N . La fase acquosa è stata acidificata con HCl 3N ed il precipitato formatosi è stato filtrato e lavato abbondantemente con acqua. **Resa:** 85%

Rf: 0.18 (etere di petrolio/acetato di etile = 2/8).

Pf: 197-198 °C.

IR (nujol) ν cm^{-1} = 1610, 1573 (C=C).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ 8.73 (s, 1H, Ar-H), 8.08-7.97 (m, 2H, Ar-H), 7.71-7.51 (m, 3H, Ar-H), 7.28 (s, 1H, COCH).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): δ 184.9, 177.7, 170.8, 156.7, 134.0, 133.5, 129.3, 127.3, 94.8.

MS: m/z 215 (M⁺).

Analisi elementare. Per C₁₁H₉N₃O₂ Calcolato: C 61.39%; H 4.22%; N 19.53%. Trovato: C 61.50%; H 4.34%; N 19.80%.

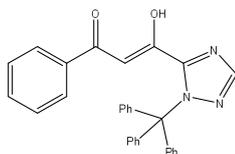
Nicolino Pala

Studi sui metalloenzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

Metodo di sintesi di (2Z)-3-idrossi-1-fenil-3-(1-tritil-1H-1,2,4-triazol-3-il)prop-2-en-1-one.[17]



Ad una soluzione di LHMDS 1.0 M in THF anidro (8.3 mL) a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, è stata aggiunta, goccia a goccia, una soluzione di acetofenone (**15**, 4.2 mmol) in THF anidro (12 mL) e la reazione è stata agitata a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ per 2 ore. Successivamente la miscela è stata raffreddata a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ e una soluzione di **16** (6.2 mmol) in THF anidro (40 mL) è stata aggiunta goccia a goccia. La miscela è stata portata a t.a. e agitata per 15 ore. Al termine la reazione è stata spenta per aggiunta di una soluzione satura di NH_4Cl e acidificata con HCl 3 N. La soluzione risultante è stata estratta con acetato di etile. Le fasi organiche sono state essiccate e concentrate sotto vuoto a dare un residuo arancione che è stato sgranato con una miscela di etere di petrolio/etere etilico/metanolo. Il solido bianco formatosi è stato filtrato e lavato con etere di petrolio. **Resa:** 89%.

Rf: 0.39 (etere di petrolio/acetato di etile = 7/3).

Pf: 169-171 $^{\circ}\text{C}$.

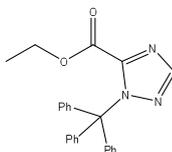
IR (nujol) $\nu\text{ cm}^{-1}$ = 1610 (C=C).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ 8.31 (s, 1H, Ar-H), 8.02 (d, 1H, Ar-H), 7.70-7.25 (m, 12H, Ar-H), 7.22 (s, 1H, COCH) 7.20-6.92 (m, 7H, Ar-H).

MS: m/z 457 (M^+).

Analisi elementare. Per $\text{C}_{30}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_2$ Calcolato: C 78.75%; H 5.07%; N 9.18. Trovato: C 79.02%; H 5.26%; N 9.50%.

Metodo di sintesi di 1-tritil-1H-1,2,4-triazol-3-etil estere.[16]



Ad una soluzione del composto **21** (3.2 mmol) in dimetilformammide anidra (11 mL) sono stati aggiunti, a temperatura ambiente, la trietilammina (6.34 mmol) ed il clorotrifetilmetano (3.4 mmol). La miscela è stata tenuta in agitazione per 16 ore ed è stata spenta con acqua. Il precipitato formatosi è stato filtrato e lavato prima con acqua e poi con etere etilico a dare un solido bianco.

Resa: 77%.

Nicolino Pala

Studi sui metalloenzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

Pf: 157-158 °C.

Rf: 0.52 (etere di petrolio/acetato di etile = 7/3).

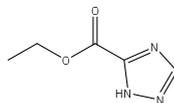
IR (nujol) ν cm^{-1} = 1739 (C=O, estere), 1248 e 1210 (stretching C-O-C).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ 8.37 (s, 1H, Ar-H), 7.55-7.30 (m, 9H, Ar-H), 7.18-6.95 (m, 6H, Ar-H), 4.32 (q, 2H, CH_2), 1.28 (t, 3H, CH_3).

MS: m/z 383 (M^+).

Analisi elementare. Per $\text{C}_{24}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_2$ Calcolato: C 75.16%; H 5.52%; N 10.96%. Trovato: C 74.93%; H 5.71%; N 10.65%.

Metodo di sintesi di 1*H*-1,2,4-triazol-3-etil estere.[21]



Una sospensione dell'intermedio **20** (6.3 mmol) in Diglyme (4 mL) è stata lasciata a riflusso per 1.5 ore. Dopo raffreddamento, il precipitato è stato filtrato e lavato con esano a dare un solido bianco. **Resa:** 83%.

Pf: 168-169 °C.

Rf: 0.48 (cloroformio/metanolo = 9/1).

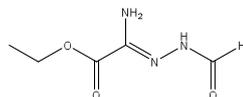
IR (nujol) ν cm^{-1} = 1737 (C=O, estere).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 8.53 (s, 1H, Ar-H), 4.53 (q, 2H, CH_2), 1.47 (t, 3H, CH_3).

GC/MS: m/z 141 (M^+).

Analisi elementare. Per $\text{C}_5\text{H}_7\text{N}_3\text{O}_2$ Calcolato: C 42.54%; H 5.00%; N 29.78%. Trovato: C 43.01%; H 5.23%; N 29.60%.

Metodo di sintesi di etil-(2*Z*)-ammino(formilidrazono)acetato.[20]



Una miscela di etil tioxammato **19** (7.5 mmol) e formilidrazina (**18**, 8.0 mmol) è stata scaldata a 67 °C per 1 ora. Dopo raffreddamento, il prodotto grezzo è stato raccolto per filtrazione e lavato con etanolo a dare un solido giallo pallido. **Resa:** 80%.

Nicolino Pala

Studi sui metalloenzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

Rf: 0.43 (cloroformio/metanolo = 9/1).

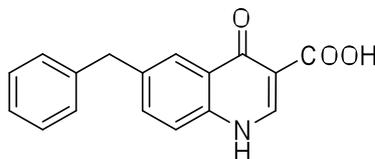
Pf: 148-149 °C.

IR (nujol) ν cm^{-1} = 3311 (NH₂), 3199 (NH, ammido), 1735 (C=O, estere), 1645 (C=O, ammido).

¹H-NMR (CDCl₃ + DMSO-*d*₆): δ 10.40 (bs, 1H, NH), 8.62 (s, 1H, CHO), 6.18 (bs, 2H, NH₂), 4.32 (q, 2H, CH₂), 1.36 (t, 3H, CH₃).

MS: m/z 159 (M⁺).

Preparazione dell'acido 6-benzil-4-osso-1,4-diidrochinolin-3-carbossilico.[5]¹⁴¹



Una soluzione formata da **24** (1.9 mmol) e NaOH 2% (11 mL) è stata agitata a riflusso per 3 ore e, una volta raffreddata a t.a., acidificata con HCl 1 N. Il precipitato formatosi è stato isolato per filtrazione e ricristallizzato da acqua/etanolo a dare un solido beige. **Resa:** 97 %.

Rf: 0.17 (etere di petrolio/acetato di etile = 2/8).

Pf: 234-235 °C (Decomp).

IR (nujol) ν cm^{-1} = 1712 (C=O acido), 1644 (C=O chetone).

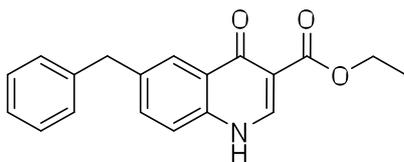
¹H NMR-200 MHz (DMSO-*d*₆): δ 15.41 (bs, 1H, OH), 13.43 (bs, 1H, NH), 8.85 (s, 1H, CH), 8.11 (s, 1H, Ar-H), 7.76 (s, 2H, Ar-H), 7.27 (m, 5H, Ar-H), 4.14 (s, 2H, CH₂).

¹³C NMR-50.3 MHz (DMSO-*d*₆): δ 178.2, 166.6, 144.8, 140.6, 139.9, 138.1, 135.1, 128.9, 128.7, 126.3, 124.5, 124.1, 120.0, 107.5, 40.6.

MS: m/z 279 (M⁺).

Analisi elementare: per C₁₇H₁₃NO₃ Calcolato: C 73.11%; H 4.69%; N 5.02%. Trovato: C 72.87%; H 4.55%; N 4.73%.

Preparazione del 6-benzil-4-osso-1,4-diidrochinolin-3-carbossilato di etile.[24]



Metodo a)¹⁴¹

Una soluzione di Dowtherm A (2 mL) è stata scaldata in condizioni anidre. Una volta raggiunta la temperatura di 180 °C, sono stati aggiunti, sotto agitazione, 4-benzilanilina (**22**, 1.6 mmol) e EMME (**23**, 3.3 mmol). La miscela di reazione è stata agitata a 225-230 °C per 5 ore al termine delle quali è stata lasciata raffreddare a t.a. e successivamente addizionata di etere di petrolio. Il precipitato formatosi è stato filtrato lavandolo con abbondante etere di petrolio a dare un solido beige. **Resa:** 27 %.

Metodo b)¹⁴²

Una soluzione di **25** (26.9 mmol) in Dowtherm A (30 mL) è stato agitato a riflusso per 3 ore e quindi raffreddato a t.a. L'aggiunta di etere di petrolio ha permesso di ottenere un precipitato beige che è stato filtrato e lavato con abbondante etere di petrolio. **Resa:** 40 %.

Rf: 0.14 (etere di petrolio/acetato di etile = 4/6).

Pf: 277-278 °C.

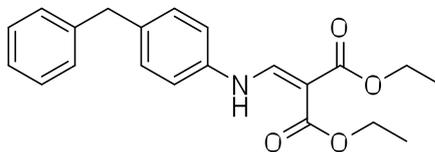
IR (nujol) ν cm⁻¹ = 1744 (C=O estere), 1631 (C=O chetone).

¹H NMR-200 MHz (DMSO-*d*₆): δ 12.33 (bs, 1H, NH), 8.51 (s, 1H, CH), 7.97 (s, 1H, Ar-H), 7.56 (m, 2H, Ar-H), 7.30-7.19 (m, 5H, Ar-H), 4.23 (q, 2H, OCH₂), 4.07 (s, 2H, CH₂), 1.27 (t, 3H, CH₃).

MS: *m/z* 307 (M⁺).

Analisi elementare: per C₁₉H₁₇NO₃ Calcolato: C 74.25%; H 5.58%; N 4.56%. Trovato: C 74.63%; H 5.76%; N 4.12%.

Preparazione del 2-((4-benzilfenilammino)metilen)malonato di etile.[25]¹⁴³



Operando in condizioni anidre, una miscela di 4-benzilanilina (**22**, 26.9 mmol) e EMME (**23**, 26.7 mmol) è stata agitata a 130 °C per 2 ore. Dopo raffreddamento, le componenti volatili sono state

rimosse per evaporazione ad ottenere un olio scuro che è stato utilizzato senza ulteriori purificazioni.

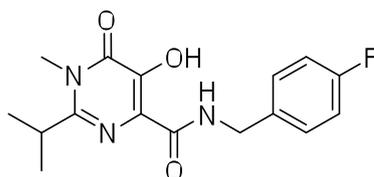
Rf: 0.57 (etere di petrolio/acetato di etile = 7/3).

Pf: olio a t.a.

IR (nujol) ν cm^{-1} = 1752 (C=O estere), 1645 (C=O estere).

$^1\text{H-NMR-200 MHz (CDCl}_3\text{)}$: δ 11.01 (d, 1H, $J=14$ Hz, NH), 8.50 (d, 1H, $J=14$ Hz, CH), 7.34-7.17 (m, 5H, Ar-H), 7.06 (d, 2H, Ar-H), 4.30 (q, 2H, OCH₂), 4.27 (q, 2H, OCH₂), 3.97 (s, 2H, CH₂), 1.38 (t, 3H, CH₃), 1.32 (t, 3H, CH₃).

Preparazione del N-(4-fluorobenzil)-5-idrossi-2-isopropil-1-metil-6-osso-1,6-diidropirimidin-4-carbossamide.[6]¹⁴⁴



Una soluzione di **32** (1.5 mmol) e 4-fluorobenzilammina (3.8 mmol) in metanolo anidro (70 mL) è stata agitata in tubo chiuso a 70 °C per 3.5 ore. Dopo raffreddamento a t.a., il solvente è stato rimosso e l'olio giallo ottenuto è stato purificato dapprima tramite cromatografia flash in gradiente (eluenti: etere di petrolio/acetato di etile = da 7/3 a 3/7) ed in seguito per ricristallizzazione da acqua/etanolo a dare un solido beige. **Resa:** 45 %.

Rf: 0.18 (etere di petrolio/acetato di etile = 3/7).

Pf: 117-118 °C.

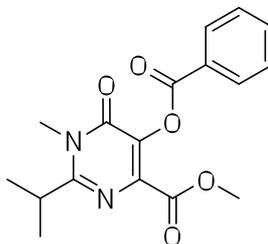
IR (nujol) ν cm^{-1} = 3420 (NH ammido), 1763 (C=O estere), 1648 (C=O ammido), 1632 (C=O chetone).

$^1\text{H-NMR-200 MHz (CDCl}_3\text{)}$: δ 7.92 (bs, 1H, OH), 7.36-7.25 (m, 2H, Ar-H), 7.10-6.97 (m, 2H, Ar-H), 4.59 (d, 2H, CH₂), 3.85 (s, 1H, NH), 3.61 (s, 3H, NCH₃), 3.06 (sp, 1H, CH), 1.26 (d, 6H, CH₃).

MS: m/z 319 (M^+).

Analisi elementare: per C₁₆H₁₈FN₃O₃ Calcolato: C 60.16%; H 5.68%; N 13.16%. Trovato: C 59.97%; H 5,81%; N 13.20%.

Preparazione del 5-(benzoilossi)-2-isopropil-1-metil-6-osso-1,6-diidropirimidin-4-carbossilato di metile.[32]¹⁴⁵



Una sospensione di **31** (1.6 mmol) e cesio carbonato (3.2 mmol) in THF anidro (150 mL) è stata agitata in condizioni anidre e a t.a. per 2 min. al termine dei quali è stato aggiunto ioduro di metile (4.8 mmol) goccia a goccia. La miscela è stata agitata per 10 ore e, successivamente, acidificata con HCl 1 N ed estratta con acetato di etile. La fase organica è stata dapprima essiccata con Na₂SO₄ e poi evaporata ad ottenere un olio marrone che è stato purificato tramite cromatografia flash (eluenti: etere di petrolio/acetato di etile = 6.5/3.5). Ottenuto un olio giallo. **Resa:** 80 %.

Rf: 0.52 (etere di petrolio/acetato di etile = 5/5).

Pf: olio a t.a.

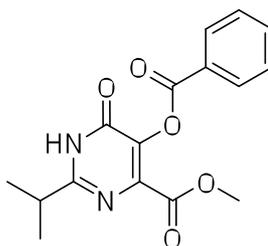
IR (nujol) ν cm⁻¹ = 1763 (C=O estere), 1734 (C=O estere), 1632 (C=O chetone).

¹H-NMR-200 MHz (CDCl₃): δ 8.18 (d, 2H, Ar-H), 7.67-7.46 (m, 3H, Ar-H), 3.82 (s, 3H, OCH₃), 3.64 (s, 3H, NCH₃), 3.18 (sp, 1H, CH), 1.36 (d, 6H, CH₃).

MS: m/z 330 (M⁺).

Analisi elementare: per C₁₇H₁₈N₂O₅ Calcolato: C 61.80%; H 5.50%; N 8.48%. Trovato: C 62.06%; H 5.43%; N 8.54%.

Preparazione del 5-(benzoilossi)-2-isopropil-6-osso-1,6-diidropirimidin-4-carbossilato di metile.[31]¹⁴⁴



5-idrossi-2-isopropil-6-osso-1,6-diidropirimidin-4-carbossilato di metile (**30**, 5.6 mmol) e anidride benzoica (5.6 mmol) sono stati dissolti in piridina anidra (83 mL) a formare una soluzione di colore giallo pallido che è stata agitata a t.a. per 30 ore. Al termine la miscela è stata diluita con HCl 1 N (150 mL) ed estratta con acetato di etile. Le fasi organiche riunite sono state lavate con

Nicolino Pala

Studi sui metalloenzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

HCl 1 N (3 volte), con una soluzione satura di cloruro di sodio (2 volte), ed in seguito essiccate con Na₂SO₄ anidro ed evaporate a dare un solido bianco che è stato purificato per cromatografia flash (eluenti: etere di petrolio/acetato di etile = 7/3). Resa: **100 %**.

Rf: 0.43 (di petrolio/acetato di etile = 3/7).

Pf: 176-178 °C.

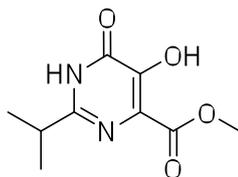
IR (nujol) ν cm⁻¹ = 1765 (C=O estere), 1734 (C=O estere), 1632 (C=O chetone).

¹H NMR-200 MHz (DMSO-*d*₆): δ 13.30 (bs, 1H, NH), 8.07 (d, 2H, Ar-H), 7.80-7.75 (m, 1H, Ar-H), 7.66-7.59 (m, 2H, Ar-H), 3.75 (s, 3H, OCH₃), 2.92 (sp, 1H, CH), 1.23 (d, 6H, CH₃).

MS: *m/z* 316 (M).

Analisi elementare: per C₁₆H₁₆N₂O₅ Calcolato: C 60.74%; H 5.10%; N 8.86%. Trovato: C 60.52%; H 5.19%; N 9.17%.

Preparazione del 5-idrossi-2-isopropil-6-osso-1,6-diidropirimidin-4-carbossilato di metile.[30]¹⁴⁴



Una soluzione di **29** (43.4 mmol) in *o*-xilene (250 mL) è stata agitata a riflusso per 24 ore. Una volta raffreddata la miscela è stata addizionata di etere di petrolio. Il precipitato formatosi è stato filtrato e ricristallizzato a caldo da acetato di metile a dare un solido beige. **Resa:** 41 %.

Rf: 0.29 (CH₂Cl₂/metanolo = 9.5/0.5).

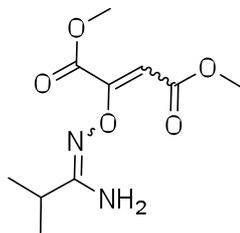
Pf: 235-236 °C, decomposizione.

¹H NMR-200 MHz (DMSO-*d*₆): δ = 12.50 (bs, 1H, NH), 6.74 (bs, 1H, OH), 3.81 (s, 3H, OCH₃), 2.77 (sp, 1H, CH), 1.16 (d, 6H, CH₃).

MS: *m/z* 212 (M⁺).

Analisi elementare: per C₉H₁₂N₂O₄ Calcolato: C 50.92%; H 5.70%; N 13.21%. Trovato: C 51.12%; H 5.45%; N 13.23%.

Preparazione del 2-(1-amino-2-metilpropilideneamminossi)but-2-endioato di metile.[29]¹⁴⁴



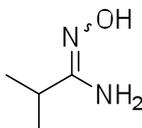
Ad una soluzione di **28** (40.7 mmol) in CHCl_3 anidro (60 mL), DMAD (48.8 mmol) è stato aggiunto goccia a goccia. La miscela di reazione è stata agitata a refluxo per 16 ore. Per rimozione del solvente è stato ottenuto un olio marrone. **Resa:** 100 %.

Rf: 0.30 (etere di petrolio/acetato di etile = 3/7).

Pf: olio a temperatura ambiente.

¹H NMR-200 MHz (CDCl₃): δ 5.85 (s, 1H, =CH), 5.10 (bs, 1H, NH), 4.72 (bs, 1H, NH), 3.87 (s, 3H, OCH₃), 3.70 (s, 3H, OCH₃), 2.50 (sp, 1H, CH), 1.20 (d, 6H, CH₃).

Preparazione della N'-idrossi-2-metilpropil-immid-ammide.[28]¹⁴⁵

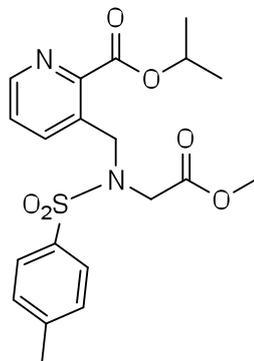


Ad una soluzione di idrossilammina cloridrato (**26**, 111.4 mmol) in metanolo (200 mL), è stata aggiunta KOH *pellets* (122.6 mmol). La miscela è stata agitata vigorosamente per 30 min., al termine dei quali il precipitato formatosi è stato eliminato per filtrazione usando metanolo (~60 mL) come soluzione di lavaggio. La soluzione limpida ottenuta è stata addizionata di **27** (111.4 mmol) ed agitata a refluxo per 24 ore. Per rimozione del solvente è stato ottenuto un olio incolore opaco. **Resa:** 85 %.

Pf: olio a t.a.

¹H-NMR-200 MHz (CDCl₃): δ 8.60 (bs, 1H, OH), 4.48 (bs, 2H, NH₂), 2.44 (sp, 1H, CH), 1.18 (d, 6H, CH₃).

Preparazione del 3-((N-(2-metossi-2-osso-etil)-4-metilsolfonammido)metil)picolinato di isopropile.[35]



Ad una soluzione formata da **33** (1.5 mmol), **34** (1.5 mmol) e trifenilfosfina (1.5 mmol) in THF anidro (3 mL), DIAD (1.5 mmol) è stata aggiunto, goccia a goccia, in condizioni anidre, sotto agitazione ed alla temperatura di 0 °C. La miscela di reazione è stata quindi agitata a t.a. per 20 ore. Spenta con acqua ed estratta con acetato di etile. Le fasi organiche riunite sono state essiccate con Na₂SO₄ anidro ed evaporate a dare un olio arancione che per purificazione tramite cromatografia flash (eluenti: etere di petrolio/acetato di etile = 4/6) ha fornito un solido bianco.
Resa: 65.5 %.

Rf: 0.34 (etere di petrolio/acetato di etile = 5/5).

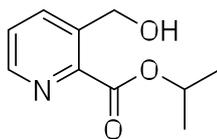
Pf: 113-115 °C.

IR (nujol) ν cm⁻¹ = 1763 (C=O estere), 1760 (C=O estere).

¹H-NMR-200 MHz (DMSO-d₆): δ 8.58 (d, 1H, Ar-H), 8.03 (d, 1H, Ar-H), 7.73 (d, 2H, Ar-H), 7.62 (m, 1H, Ar-H), 7.44 (d, 2H, Ar-H), 5.14 (sp, 1H, CH), 4.68 (s, 2H, CH₂), 4.11 (s, 2H, CH₂), 3.50 (s, 3H, OCH₃), 2.43 (s, 3H, CH₃), 1.32 (d, 6H, CH₃).

MS: m/z 420 (M⁺).

Analisi elementare: per C₂₀H₂₄N₂O₆S Calcolato: C 57.12%; H 5.76%; N 6.67%. Trovato: C 57.10%; H 5,84%; N 6.57%.

Sintesi del 3-idrossimetil-picolinato di isopropile.[33]¹⁴⁸

Una soluzione di **40** (38.2 mmol) in SOCl_2 (40 mL) è stata agitata a refluxo per 6.5 ore. Il cloruro di tionile in eccesso è stato rimosso per evaporazione usando THF. L'olio bruno ottenuto è stato dissolto in THF anidro (40 mL) e, alla temperatura di 0 °C, addizionato di NaBH_4 (45.9 mmol). La miscela di reazione è stata agitata in atmosfera di azoto per 2 ore a 0 °C e per ulteriori 3 ore a t.a. Successivamente, la reazione è stata spenta su ghiaccio ed estratta con CH_2Cl_2 . Le fasi organiche riunite sono state lavate con una soluzione satura di cloruro di sodio, essiccate con Na_2SO_4 ed evaporate a dare un olio arancione. La purificazione tramite cromatografia flash (eluenti: diclorometano/metanolo = 9.8/0.2) ha prodotto un solido giallo pallido. **Resa:** 59 %.

Rf: 0.74 (diclorometano/metanolo = 9.2/0.8).

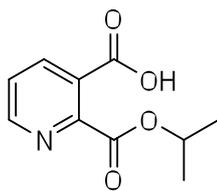
Pf: 55.5-57 °C.

IR (nujol) $\nu \text{ cm}^{-1}$ = 3350 (OH alcol), 1766 (C=O estere).

$^1\text{H-NMR-200 MHz (DMSO-}d_6)$: δ 8.51 (d, 1H, Ar-H), 8.04 (d, 1H, Ar-H), 7.58-7.55 (m, 1H, Ar-H), 5.42 (t, 1H, OH), 5.15 (sp, 1H, CH), 4.72 (d, 2H, CH_2), 1.30 (d, 6H, CH_3).

MS: m/z 195 (M^+).

Analisi elementare: per $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}_3$ Calcolato: C 61.51%; H 6.72%; N 7.18%. Trovato: C 61.36%; H 7.08%; N 6.88%.

Sintesi dell'acido 2-(isopropil-ossi-carbonil)nicotinico.[40]¹⁴⁸

Una sospensione di anidride 2,3-piridin-dicarbossilica (**38**, 33.5 mmol) in 2-propanolo (**39**, 335. mmol) è stata agitata a refluxo sino ad omogeneità e poi alla temperatura di 80 °C per 48 ore. Una volta raffreddata la miscela di reazione è stata filtrata a dare un solido bianco che è stato purificato tramite cromatografia flash (eluenti: etere di petrolio/acetato di etile = 4/6). **Resa:** 70 %.

Rf: 0.56 (etere di petrolio/acetato di etile = 3/7).

Pf: 142-143 °C.

Nicolino Pala

Studi sui metalloenzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

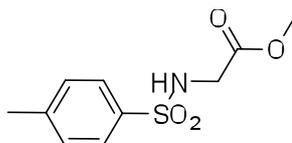
IR (nujol) ν cm^{-1} = 1765 (C=O estere), 1704 (C=O acido).

$^1\text{H-NMR-200 MHz (DMSO-}d_6)$: δ 8.76 (d, 1H, Ar-H), 8.27 (d, 1H, Ar-H), 7.70-7.63 (m, 1H, Ar-H), 5.20 (sp, 1H, CH), 1.30 (d, 6H, CH_3).

MS: m/z 209 (M^+).

Analisi elementare: per $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{NO}_4$ Calcolato: C 57.40%; H 5.30%; N 6.70%. Trovato: C 57.49%; H 5,11%; N 6.24%.

Sintesi del 2-(4-metilfenilsolfonammido)acetato di metile.[34]



Metodo a)¹⁴⁶

Una soluzione di acido **43** (27.2 mmol) e H_2SO_4 concentrato (0.05 mL) in metanolo (5 mL) è stata agitata a riflusso per 4.5 ore. Una volta raffreddata, è stata neutralizzata con NH_4OH . Il precipitato formatosi è stato allontanato per filtrazione. L'aggiunta di una miscela di acqua e ghiaccio al filtrato ha prodotto la formazione di un precipitato bianco che è stato isolato per filtrazione. **Resa:** 80 %.

Metodo b)¹⁴⁷

Ad una soluzione di glicinato di metile cloridrato (**42**, 0.8 mmol) e TEA (1.44 mmol) in CH_2Cl_2 (2 mL) è stato aggiunto, goccia a goccia, cloruro di *p*-toluensolfonile (**41**, 0.8 mmol) a 0 °C. La miscela di reazione è stata agitata a t.a. per 18 ore ed in seguito diluita con acqua ed estratta con etere etilico. Le fasi organiche riunite sono state trattate con Na_2SO_4 anidro ed evaporate a dare un solido rosa. **Resa:** 98 %.

Rf: 0.60 (etere di petrolio/acetato di etile = 4/6).

Pf: 89 °C.

IR (nujol) ν cm^{-1} = 1760 (C=O estere).

$^1\text{H-NMR-200 MHz (CDCl}_3)$: δ 7.75 (d, 2H, Ar-H), 7.32 (d, 2H, Ar-H), 5.16 (t, 1H, NH), 3.79 (d, 2H, CH_2), 3.64 (s, 3H, OCH_3), 2.43 (s, 3H, CH_3). **(DMSO-}d_6)**: δ 8.10 (s, 1H, NH), 7.67 (d, 2H, Ar-H), 7.38 (d, 2H, Ar-H), 3.67 (s, 2H, CH_2), 3.52 (s, 3H, OCH_3), 2.38 (s, 3H, CH_3).

MS: m/z 243 (M^+).

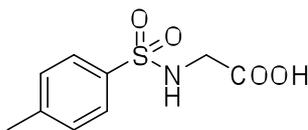
Analisi elementare: per $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}_4\text{S}$ Calcolato: C 49.37%; H 5.39%; N 5.76%. Trovato: C 49.55%; H 5,81%; N 5.68%.

Nicolino Pala

Studi sui metalloenzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

Sintesi dell'acido 2-(4-metilsolfammido)acetico.[43]¹⁴⁹

Ad una soluzione di glicinato di metile cloridrato (**42**, 39.8 mmol) in NaOH 0.3 N (25 mL) è stato aggiunto cloruro di *p*-toluensolfonile (39.9 mmol). La reazione è stata agitata vigorosamente per 4.5 ore, mantenendo il pH della soluzione intorno a 9.0 per aggiunta di NaOH 0.3 N. Al termine la miscela di reazione è stata filtrata e la soluzione limpida risultante è stata estratta con acetato di etile (4 volte). Le fasi organiche riunite sono state essiccate con Na₂SO₄ anidro ed evaporate a dare un solido bianco. **Resa:** 87 %.

Rf: 0.29 (etere di petrolio/acetato di etile = 5/5).

Pf: 147 °C.

IR (nujol) ν cm⁻¹ = 1710 (C=O acido).

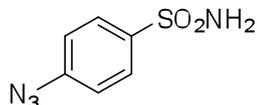
¹H-NMR-200 MHz (DMSO-d₆): δ 7.95 (s, 1H, NH), 7.68 (d, 2H, Ar-H), 7.37 (d, 2H, Ar-H), 3.55 (s, 2H, CH₂), 2.38 (s, 3H, CH₃).

MS: *m/z* 229 (M⁺).

Analisi elementare: per C₉H₁₁NO₄S Calcolato: C 47.15%; H 4.84%; N 6.11%. Trovato: C 47.20%; H 5.12%; N 6.01%.

Capitolo 2

Preparazione del 4-azidobenzenesolfonammide.[3]¹²¹



Ad una soluzione di sodio azide (29.0 mmol) e acqua (0.6 mL) è stato aggiunto il *t*-butanolo (4 mL) e la miscela di reazione è stata agitata a t.a. per 5 min. Successivamente stati aggiunti la sulfanilammide (**6**, 2.9 mmol) ed a seguire, goccia a goccia, il *t*-butilnitrito (4 mL). La miscela è stata agitata a t.a. per 56 ore, al termine delle quali è stata estratta con acetato di etile. La fase organica, trattata con Na₂SO₄, è stata evaporata ed il solido giallo ottenuto è stato purificato tramite cromatografia flash (eluenti: etere di petrolio/acetato di etile = 4/6) a dare un solido bianco. **Resa:** 80%.

Rf: 0.67 (etere di petrolio/acetato di etile = 4/6).

Pf: 117-118 °C.

IR (nujol) ν cm⁻¹ = 2096 (N₃), 1376 (SO₂NH₂).

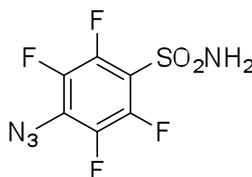
¹H-NMR-400 MHz (DMSO-d₆): δ 7.86 (d, 2H, Ar-H), 7.41 (s, 2H, SO₂NH₂), 7.33 (d, 2H, Ar-H).

¹³C-NMR-100 MHz (DMSO-d₆): δ 143.8, 141.4, 128.5, 120.4.

MS: m/z 198 (M⁺).

Analisi elementare: per C₆H₆N₄O₂S Calcolato: C 36.36%; H 3.05%; N 28.27%. Trovato: C 34.28%; H 2.91%; N 27.94.

Preparazione del 4-azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzensolfonammide.[4]¹⁵⁰



Ad una soluzione agitata a t.a. di **8** (2.0 mmol), acqua (0.4 mL) e acetone (2 mL) è stata aggiunto NaN₃ (2.0 mmol). La miscela di reazione è stata scaldata a riflusso per 7 ore, in seguito raffreddata, diluita con acqua ed estratta con etere etilico. Le fasi organiche riunite sono state essiccate con Na₂SO₄ ed evaporate a dare un solido bianco che è stato purificato tramite flash cromatografia (eluenti: etere di petrolio/acetato di etile = 8/2). **Resa:** 60%.

Nicolino Pala

Studi sui metalloenzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

Rf: 0.87 (etere di petrolio/acetato di etile = 5/5).

Pf: 138 °C, decomposizione.

IR (nujol) ν cm^{-1} = 2131 (N_3), 1377 (SO_2NH_2).

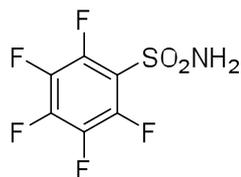
$^1\text{H-NMR-400 MHz}$ (CDCl_3): δ 5.50 (bs, 2H, SO_2NH_2).

$^{19}\text{F-NMR-376.5 MHz}$ (CDCl_3): δ -138,24 (m, 2F, Ar-F), -149.41 (m, 2F, Ar-F). (**DMSO- d_6**): δ -140.27 (m, 2F, Ar-F), -150.82 (m, 2F, Ar-F).

MS: m/z 270 (M^+).

Analisi elementare per $\text{C}_6\text{F}_4\text{H}_2\text{N}_4\text{O}_2\text{S}\cdot 12(\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3)$: Calcolato: C 27.72%; H 1.06%; N 19.96. Trovato: C 28.10%; H 1.28%; N 20.36.

Preparazione del 2,3,5,6-pentafluorobenzensulfonammide.[8]¹⁵¹



2,3,4,5,6-pentafluorobenzensulfonil cloruro (7, 3.4 mmol) è stato agitato a t.a. per 5 ore in NH_4OH ~30% in acqua (6 mL). In seguito la miscela di reazione è stata diluita con acqua ed acidificata con HCL 12 N, il precipitato beige formatosi è stato filtrato. **Resa:** 65%.

Rf: 0.33 (etere di petrolio/acetato di etile = 2.5/7.5).

Pf: 152-154 °C.

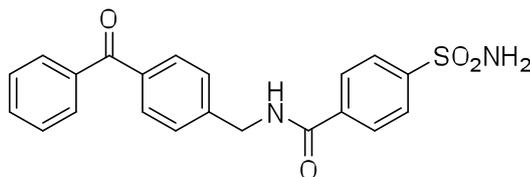
IR (nujol) ν cm^{-1} = 1376 (SO_2NH_2).

$^1\text{H-NMR-200 MHz}$ (CDCl_3): δ 5.46 (bs, 2H, SO_2NH_2).

MS: m/z 247 (M^+), 69 (base).

Analisi elementare: per $\text{C}_6\text{H}_2\text{F}_5\text{NO}_2\text{S}$ Calcolato: C 29.16%; H 0.82%, N 5.67%. Trovato: C 29.05%; H 1.17%, N 5.99%.

Preparazione del *N*-(4-benzoilbenzil)-4-sulfamoilbenzammide.[5]¹⁵²



Una soluzione composta da acido 4-sulfamoil-benzoico (**10**, 1.4 mmol), **9** (2.7 mmol), EDC (1.6 mmol) e *N*-idrossibenzotriazolo (1.6 mmol) in DMA/CH₂Cl₂=1/1 (5 mL) è stata agitata a t.a. per 8 ore. Successivamente, la miscela di reazione è stata diluita con acqua ed estratta con etere etilico. Le fasi organiche sono state riunite ed essiccate con Na₂SO₄. L'evaporazione del solvente ha prodotto un solido giallo che per purificazione tramite cromatografia flash (eluenti: etere di petrolio/acetato di etile = 8/2) ha dato un solido bianco. **Resa:** 95%.

Rf: 0.64 (etere di petrolio/acetato di etile = 1/9).

Pf: 178-179 °C.

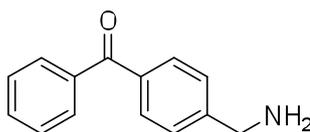
IR (nujol) ν cm⁻¹ = 1688 (C=O amide), 1655 (C=O chetone), 1377 (SO₂NH₂).

¹H-NMR-200 MHz (DMSO-d₆): δ 10.14 (bs, 2H, SO₂NH₂), 9.36 (t, 1H, CONH), 8.10-7.91 (m, 4H, Ar-H), 7.76-7.51 (m, 9H, Ar-H), 4.61 (d, 2H, CH₂).

MS: m/z 394 (M⁺).

Analisi elementare: per C₂₁H₁₈N₂O₄S Calcolato: C 63.95%; H 4.60%; N 7.10%. Trovato: C 63.78%; H 4.92%; N 6.82%.

Preparazione del 4-(amminometil)fenil(fenil)metanone.[9]¹⁵³



Ad una soluzione di **13** (6.7 mmol) in acqua (2 mL) e metanolo (4 mL) è stata aggiunta trifetilfosfina (10.0 mmol). La reazione è stata agitata a t.a. per 18 ore ed in seguito diluita con acqua, acidificata con HCl 1 N ed estratta con acetato di etile. La fase acquosa è stata alcalinizzata con una soluzione satura di NaHCO₃ e poi contro-estratta con acetato di etile. Le fasi organiche ottenute dalla seconda estrazione sono state riunite, essiccate con Na₂SO₄ ed evaporate a dare un olio giallo. **Resa:** 56%.

Rf: 0.88 (etere di petrolio/acetato di etile = 7/3).

Pf: olio a t.a..

Nicolino Pala

Studi sui metalloenzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

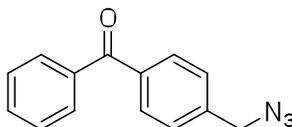
IR (nujol) ν cm^{-1} = 3370 (NH₂), 1658 (C=O chetone).

¹H-NMR-200 MHz (CDCl₃): δ 7.81-7.77 (m, 4H, Ar-H), 7.63-7.42 (m, 5H, Ar-H), 3.97 (s, 2H, CH₂), 1.64 (bs, 2H, NH₂).

MS: m/z 211 (M⁺).

Analisi elementare: per C₁₄H₁₃NO Calcolato: C 79.59%; H 6.20%; N 6.63%. Trovato: C 79.26%; H 6.47%; N 6.44%.

Preparazione del 4-(azidometil)fenil(fenil)metanone.[13]¹⁵⁴



Una soluzione di **12** (14.5 mmol) e NaN₃ (15.4 mmol) in DMF (25 mL) è stata agitata a t.a. per 8 ore. La reazione, a completezza visualizzata tramite monitoraggio con tlc, è stata diluita con acqua ed estratta con etere etilico. La fase organica, lavata con acqua, è stata essiccata con Na₂SO₄ ed evaporata a dare un olio arancione. **Resa:** 94%.

Rf: 0.60 (etere di petrolio/acetato di etile = 3/7).

Pf: olio a t.a.

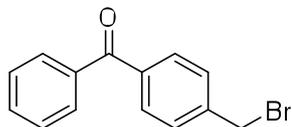
IR (puro) ν cm^{-1} = 2104 (N₃), 1658 (C=O chetone).

¹H-NMR-200 MHz (CDCl₃): δ 7.85-7.78 (m, 4H, Ar-H), 7.64-7.43 (m, 5H, Ar-H), 4.46 (s, 2H, CH₂).

MS: m/z 237 (M⁺).

Analisi elementare: per C₁₄H₁₁N₃O Calcolato: C 70.87%; H 4.67%; N 17.71%. Trovato: C 71.02%; H 4.89%; N 17.54%.

Preparazione del (4-(bromometil)fenil(fenil)metanone.[12]¹⁵⁵



N-bromosuccinimide (30.6 mmol) è stata aggiunta ad una soluzione di **11** (25.5 mmol) in CCl₄ (135 mL). Successivamente è stato aggiunto il dibenzoilperossido (2.04 mmol) e la risultante miscela di reazione è stata agitata a riflusso per 48 ore. Il precipitato bianco formatosi è stato

rimosso per filtrazione e la soluzione limpida è stata concentrata a dare un olio giallo che col tempo è solidificato a dare un solido giallo. **Resa:** 82%.

Rf: 0.65 (etere di petrolio/acetato di etile = 8/2).

Pf: 110 °C.

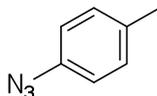
IR (nujol) ν cm⁻¹ = 1643 (C=O chetone).

¹H-NMR-200 MHz (CDCl₃): δ 7.83-7.77 (m, 4H, Ar-H), 7.61-7.45 (m, 5H, Ar-H), 4.54 (s, 2H, CH₂).

MS: m/z 274 (M⁺).

Analisi elementare: per C₁₄H₁₁BrO Calcolato: C 61.11%; H 4.03%. Trovato: C 61.37%; H 3.86%.

Preparazione del 1-azido-4-metilbenzene.[20]¹⁵⁶



Ad una soluzione di *p*-toluidina (**19**, 23.3 mmol) in acido trifluoroacetico (60 mL) è stata aggiunta goccia a goccia, sotto agitazione e ad una temperatura di 0-5 °C, una soluzione di NaNO₂ (140.0 mmol) in acqua (60 mL). La miscela di reazione è stata agitata sempre a 0-5 °C per 20 min. ed in seguito un'ulteriore soluzione formata da NaN₃ in acqua (60 mL) è stata aggiunta goccia a goccia. La reazione è stata agitata a t.a. per 20 ore al termine dei quali la miscela è stata alcalinizzata con una soluzione satura di Na₂CO₃ ed estratta con etere etilico. In seguito ad essiccamento con Na₂SO₄ la fase organica evaporata e forniva un olio giallo che è stato purificato per cromatografia flash (eluenti: etere di petrolio/acetato di etile = 9.6/0.4). **Resa:** 71%.

Rf: 0.88 (etere di petrolio/acetato di etile = 9/1).

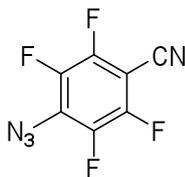
Pf: olio a t.a.

IR (nujol) ν cm⁻¹ = 2104 (N₃).

¹H-NMR-200 MHz (CDCl₃): δ 7.13 (d, 2H, Ar-H), 6.90 (d, 2H, Ar-H).

MS: m/z 133 (M⁺).

Analisi elementare: per C₇H₇N₃ Calcolato: C 63.14%; H 5.30%; N 31.56%. Trovato: C 62.90%; H 5.48%; N 31.25%.

Preparazione del 4-azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzonitrile.[24]¹⁵⁰

Ad una soluzione di pentafluorobenzonitrile (**23**, 16.2 mmol) in acqua (3 mL) e acetone (16 mL), è stata addizionata NaN_3 (16.2 mmol). La miscela di reazione è stata agitata a riflusso per 8 ore, raffreddata a t.a., diluita con acqua ed estratta con etere etilico. La fase organica è stata essiccata con Na_2SO_4 ed evaporata a dare un olio scuro. **Resa:** 53%.

Rf: 0.50 (etere di petrolio/acetato di etile = 0.6/9.4).

Pf: olio a t.a.

IR (nujol) $\nu \text{ cm}^{-1}$ = 2247 (CN), 2127 (N_3).

^{13}C -NMR-100 MHz (DMSO- d_6): δ 149.2, 146.6, 142.2, 139.8, 127.9, 108.9, 90.1. (**CDCl_3**): δ 149.1, 146.5, 141.8, 139.3, 127.0, 107.4, 89.4.

^{19}F -NMR-376.5 MHz (CDCl_3): -132.5, -149.0. (**DMSO- d_6**): -135.2, -150.0.

MS: m/z 216 (M^+).

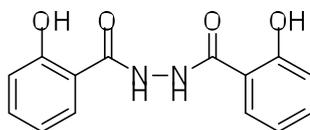
Analisi elementare: per $\text{C}_7\text{F}_4\text{N}_4$ Calcolato: C 38.91%; N 25.93%. Trovato: C 38.68%; H 26.02%.

Capitolo 3

Metodo generale dei tentativi di ciclizzazione dei derivati 3-(2-(*R*-benzoil)idrazono)butanoato di etile.¹³⁷

Una soluzione dell'appropriato 3-(2-(*R*-benzoil)idrazono)butanoato di etile **3h,j,k** (1.9 mmol) in *o*-diclorobenzene (4 mL) è stato agitato a riflusso per 5 ore in atmosfera inerte. La miscela di reazione è stata fatta raffreddare e poi lasciata a riposo a t.a. per 12 ore. Il precipitato formatosi è stato filtrato e purificato tramite cromatografia flash.

2-idrossi-*N'*-(2-idrossibenzoil)benzidrazide. [6h]



Eluenti usati per la cromatografia flash: etere di petrolio/acetato di etile = 2/8. Ottenuto solido bianco. **Resa:** 32%.

Rf: 0.63 (CH₂Cl₂/metanolo = 9/1).

Pf: 315 °C.

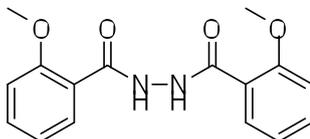
IR (nujol): ν cm⁻¹ 3090 (NH), 1652 (C=O).

¹H-NMR-200 MHz (DMSO-*d*₆): δ 11.60 (bs, 2H), 10.90 (bs, 2H), 7.94 (dd, 2H, Ar-H), 7.46 (m, 2H, Ar-H), 6.98 (m, 4H, Ar-H). **¹³C-NMR-200 MHz (DMSO-*d*₆):** δ _C 165.8, 158.6, 134.1, 128.8, 119.2, 117.3, 115.0.

GC/MS: *m/e* 272 (M⁺).

Analisi elementare: per C₁₄H₁₂N₂O₄ Calcolato: C 61.75%; H 4.44%; N 10.29%. Trovato: C 61.70%; H 4.67%; N 10.11%.

2-metossi-*N'*-(2-metossibenzoil)benzidrazide. [6j]



Eluenti usati per la cromatografia flash: etere di petrolio/acetato di etile = 0.5/9.5. Ottenuto solido rosa. **Resa:** 30%.

Nicolino Pala

Studi sui metalloenzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

Rf: 0.74 (etere di petrolio/acetato di etile = 2/8).

Pf: 203 °C.

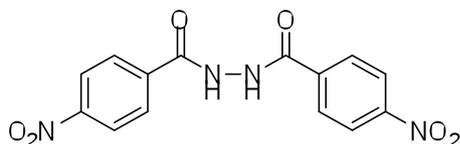
IR (nujol): ν cm⁻¹ 3086 (NH), 1650 (C=O).

¹H-NMR-200 MHz (DMSO-d₆): δ 10.36 (bs, 2H, NH), 7.88 (d, 2H, Ar-H), 7.58 (m, 2H, Ar-H), 7.23 (d 2H, Ar-H), 7.16 (m, 2H, Ar-H), 3.97 (s, 6H, OCH₃). **(CDCl₃):** δ 11.27 (bs, 2H, NH), 8.25 (m, 2H, Ar-H), 7.51 (m, 2H, Ar-H), 7.12 (m, 2H, Ar-H), 7.04 (m, 2H, Ar-H), 4.10 (s, 6H, OCH₃). **APT-200 MHz (CDCl₃/DMSO-d₆):** δ _C 158.8(C), 156.7(C), 132.8(CH), 130.8(CH), 120.5(CH), 117.9(C), 110.8(CH), 55.5(CH₃)

GC/MS: *m/e* 300 (M⁺).

Analisi elementare: per C₁₆H₁₆N₂O₄ Calcolato: C 63.98%; H 5.37%; N 9.33%. Trovato: C 63.70%; H 5,81%; N 8.96%.

4-nitro-*N'*-(4-nitrobenzoil)benzidrazide. [6k]



Eluenti usati per la cromatografia flash: etere di petrolio/acetato di etile = 3/7. Ottenuto solido rosa.

Resa: 27%.

Rf: 0.48 (etere di petrolio/acetato di etile = 3/7).

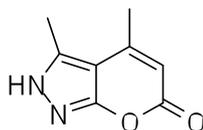
Pf: 297 °C.

¹H-NMR-200 MHz (DMSO-d₆): δ 11.02 (bs, 2H, NH), 8.40 (d, 4H, Ar-H), 8.16 (d, 4H, Ar-H). **APT-200 MHz (CDCl₃/DMSO-d₆):** δ _C 164.3 (C), 149.5 (C), 137.9 (C), 129.1 (CH), 123.9 (CH).

GC/MS: *m/e* 330 (M⁺).

Analisi elementare: per C₁₄H₁₀N₄O₆ Calcolato: C 50.90%; H 3.05%; N 16.97%. Trovato: C 51.03%; H 3.12%; N 16.75%.

3,4-dimetilpirano[2,3-*c*]pirazol-6(2*H*)-one. [7]



Rf: 0.42 (etere di petrolio/acetato di etile = 9/1).

Pf: 246 °C.

IR (nujol): ν cm⁻¹ 3193, 1687, 1604.

Nicolino Pala

Studi sui metalloenzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

¹H-NMR-200 MHz (DMSO-d₆): δ 12.97 (bs, 1H), 5.81 (s, 1H, CH), 2.48 (s, 3H, CH₃), 2.36 (s, 3H, CH₃). **(CDCl₃/DMSO-d₆):** δ 12.47 (bs, 1H), 5.78 (s, 1H, CH), 2.52 (s, 3H, CH₃), 2.37 (s, 3H, CH₃).

¹H-NMR-500 MHz (DMSO-d₆): δ 12.97 (bs, 1H), 5.82 (s, 1H, CH), 2.48 (s, 3H, CH₃), 2.36 (s, 3H, CH₃). **APT-50.3 MHz (CDCl₃/DMSO-d₆):** δ_C 161.4 (C), 158.7 (C), 150.9 (C), 135.6 (C), 107.0 (CH), 100.2 (C), 18.5 (CH₃), 11.1(CH₃). **¹³C-500 MHz (DMSO-d₆):** δ_C 161.2, 159.0, 152.5, 136.8, 106.8, 100.4, 18.6, 11.3.

GC/MS: *m/e* 164 [M]⁺.

ESI: *m/e* 187 [M+Na]⁺.

EI: *m/e* 164 [M]⁺.

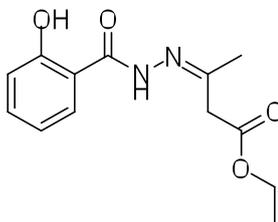
CI: *m/e* 165 [M+1]⁺.

Analisi elementare: per C₈H₈N₂O₂ Calcolato: C 58.52%; H 4.91%; N 17.07%. Trovato: C 58.71%; H 5.05%; N 16.89%.

Metodo generale di sintesi dei derivati 3-(2-(R-benzoil)idrazono)butanoato di etile.¹³⁷

Ad una soluzione dell'appropriata benzidrazide **1h,j,k** (10.0 mmol) in diossano (20 mL) è stato addizionato acetoacetato di etile (**2**, 50.0 mmol), in atmosfera inerte, . La miscela di reazione è stata agitata a riflusso per 5 ore. ed in seguito lasciata a t.a. per 12 ore in assenza di agitazione.

3-(2-(2-idrossibenzoil)idrazono)butanoato di etile. [3h]



Il precipitato formatosi è stato filtrato e lavato con acqua a dare un solido bianco. **Resa:** 67%.

Rf: 0.46 (etere di petrolio/acetato di etile = 3/7).

Pf: 139 °C.

¹H-NMR-200 MHz (DMSO-d₆): δ 11.09 (bs, 1H, NH), 7.93 (m, 1H, Ar-H), 7.43 (m, 1H, Ar-H), 7.00 (m, 2H, Ar-H), 4.11 (q, 2H, CH₂CH₃), 3.62 (s, 2H, CH₂CO), 1.99 (s, 3H, CH₃), 1.20 (t, 3H, CH₂CH₃).

GC/MS: *m/e* 264 (M⁺).

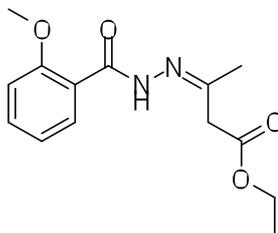
Analisi elementare: per C₁₃H₁₆N₂O₂ Calcolato: C 67.21%; H 6.95%; N 12.07%. Trovato: C 67.03%; H 6.87%; N 11.79%.

Nicolino Pala

Studi sui metalloenzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

3-(2-(2-metossibenzoil)idrazono)butanoato di etile. [3j]

L'olio ambrato ottenuto per rimozione del solvente è stato purificato tramite cromatografia flash (eluenti: etere di petrolio/acetato di etile = 8/2) a dare un solido bianco. **Resa:** 71%.

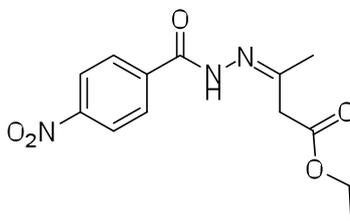
Rf: 0.49 (etere di petrolio/acetato di etile = 2/8).

Pf: 91-93 °C.

¹H-NMR-200 MHz (DMSO-*d*₆): δ 10.7 (s, 1H, NH), 7.86 (dd, 1H, Ar-H), 7.54 (m, 1H, Ar-H), 7.23 (m, 1H, Ar-H), 7.15 (m, 1H, Ar-H), 4.11 (q, 2H, CH₂CH₃), 3.98 (s, 3H, OCH₃), 3.44 (s, 2H, CH₂C=N), 2.01 (s, 3H, CH₃C=N), 1.24 (t, 3H, CH₂CH₃).

GC/MS: *m/e* 278 (M⁺).

Analisi elementare: per C₁₄H₁₈N₂O₄ Calcolato: C 60.40%; H 6.52%; N 10.07%. Trovato: C 59.14%; H 6.88%; N 9.76%.

3-(2-(4-nitrobenzoil)idrazono)butanoato di etile. [3k]

La rimozione del solvente ha prodotto un olio marrone che per purificazione tramite cromatografia flash (eluenti: etere di petrolio/acetato di etile = 3/7) ha fornito un solido giallo. **Resa:** 64%.

Rf: 0.47 (etere di petrolio/acetato di etile = 3/7).

Pf: 104 °C.

¹H-NMR-200 MHz (DMSO-*d*₆): δ 10.92 (bs, 1H, NH), 8.36 (m, 2H, Ar-H), 8.10 (m, 2H, Ar-H), 4.06 (q, 2H, CH₂CH₃), 3.27 (s, 2H, CH₂CO), 2.0 (s, 3H, CH₃), 1.18 (t, 3H, CH₂CH₃).

GC/MS: *m/e* 293 (M⁺).

Analisi elementare: per C₁₃H₁₅N₃O₅ Calcolato: C 53.22%; H 5.16%; N 14.33%. Trovato: C 53.25%; H 5.12%; N 14.27%.

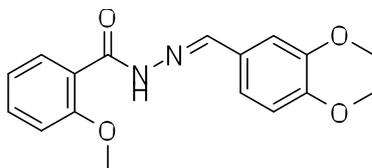
Nicolino Pala

Studi sui metalloenzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

Preparazione della *N'*-(3,4-dimetossibenzilidene)-2-metossibenzidrazide. [14]¹³⁷



Operando in ambiente anidro ed in atmosfera d'azoto, ad una soluzione di 2-metossibenzidrazide (**1j**, 1,8 mmol) in diossano (4 mL) è stato aggiunto **9b** (1.8 mmol), la miscela di reazione è stata agitata a riflusso per 8 ore. In seguito, il solvente è stato rimosso ad ottenere un olio giallo che, sgranato con etere di petrolio, ha fornito un solido giallo, il quale è stato ulteriormente purificato tramite cromatografia flash (eluenti: etere di petrolio/acetato di etile = 6/4) ottenendo così un solido beige. **Resa:** 32%.

Rf: 0.55 (etere di petrolio/acetato di etile = 2/8).

Pf: 145°C.

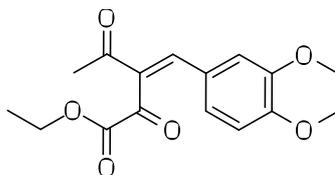
¹H-NMR-200 MHz (CDCl₃): δ 10.79 (bs, 1H, NH), 8.30 (d, 1H, Ar-H), 8.14 (s, 1H, CH), 7.59-7.44 (m, 2H, Ar-H), 7.14 (s, 1H, Ar-H), 7.00 (m, 1H, Ar-H), 6.83 (m, 1H, Ar-H), 4.00 (s, 3H, OCH₃), 3.95 (s, 3H, OCH₃), 3.89 (s, 3H, OCH₃).

¹³C-NMR-200 MHz (CDCl₃): δ_C 161.9, 157.1, 151.2, 149.3, 148.2, 133.3, 132.7, 126.9, 122.7, 121.7, 120.4, 111.3, 110.4, 108.3, 55.9 (m, 9H, OCH₃).

GC/MS: *m/e* 314 (M⁺).

Analisi elementare: per C₁₇H₁₈N₂O₄ Calcolato: C 64.94%; H 5.78%; N 8.92%. Trovato: C 64.85%; H 5,80%; N 8.83%.

Preparazione del (*Z*)-2-(3,4-dimetossibenzilidene)-3-ossobutanoato di etile. [9b]¹⁵⁷



Ad una soluzione omogenea di 3,4-dimetossibenzaldeide (**5b**, 17.3 mmol) e acetoacetato di etile (**2**, 15.7 mmol) in toluene (1 mL) sono stati addizionati piperidina (1.01 mmol) e acido acetico glaciale (0.3 mL). La miscela è stata tenuta a riflusso per 3 ore sotto agitazione. Lasciata raffreddare, quindi è stata diluita con etere etilico (5 mL), lavata con acido acetico diluito (2 volte) e con H₂O (1 volta). La fase organica è stata essiccata con Na₂SO₄ anidro ed evaporata ad ottenere un olio giallo, il quale

Nicolino Pala

Studi sui metalloenzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

è stato sottoposto a cromatografia flash in gradiente (eluenti: etere di petrolio/acetato di etile = da 2/8 a 7/3). Ottenuto un olio mobile giallo pallido che sgranato con etere di petrolio ha fornito un solido giallo pallido. **Resa:** 25%.

Rf: 0.84 (etere di petrolio/acetato di etile = 2/8).

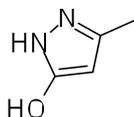
Pf: 76 °C.

¹H-NMR-200 MHz (CDCl₃): δ 7.50 (s, 1H, CH=C), 7.12-7.04 (m, 2H, Ar-H), 6.88 (d, 1H, Ar-H), 4.36 (q, 2H, CH₂), 3.92 (s, 3H, OCH₃), 3.88 (s, 3H, OCH₃), 2.41 (s, 3H, CH₃), 1.32 (t, 3H, CH₃).

GC/MS: *m/e* 278 (M⁺).

Analisi elementare: per C₁₅H₁₈O₅ Calcolato: C 64.72%; H 6.52. Trovato: C 65.00%; H 6.64%.

Preparazione del 3-metil-5-idrossi-1H-pirazolo. [10]



Una soluzione, formata da idrazina idrata (**11**, 20.6 mmol), diossano (42 mL) e acetoacetato di etile (**2**, 20.6 mmol), è stata tenuta a riflusso per 35 min. La soluzione è stata lasciata raffreddare a t.a. per 4 ore e successivamente filtrata, usando come liquido di lavaggio etere di petrolio ad ottenere un solido bianco. **Resa:** 98%.

Pf: 227-229 °C.

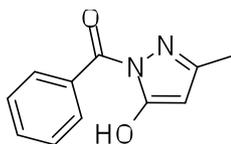
Rf: 0.25 (diclorometano/metanolo = 9/1).

¹H-NMR -200 MHz (DMSO-d₆): δ 10.23 (bs, 1H, NH), 5.21 (s, 1H, CH), 2.09 (s, 3H, CH₃). **¹³C-NMR-200 MHz (DMSO-d₆):** δ_C 161.2, 139.5, 89.0, 11.2.

GC/MS: *m/e* 98 (M⁺).

Analisi elementare: per C₄H₆N₂O₂ Calcolato: C 42.09%; H 5.30%; N 24.56%. Trovato: C 41.70%; H 5.27%; N 24.18%.

Preparazione del (5-idrossi-3-metil-1H-pirazol-1-il)(fenil)metanone. [16]¹⁵⁸



In un pallone è stata scaldata a fusione l'anidride benzoica (6.0 mmol), in seguito è stato aggiunto

Nicolino Pala

Studi sui metalloenzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

10 (5.0 mmol). La miscela di reazione è stata scaldata sotto agitazione a 80 °C per 1.5 ore e, a raffreddamento avvenuto, è stata triturrata con etere di petrolio a dare un solido beige che è stato isolato per filtrazione. **Resa:** 60%.

Rf: 0.33 (etere di petrolio/acetato di etile = 5/5).

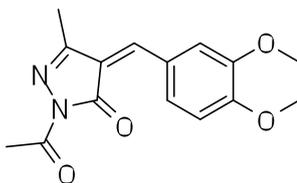
Pf: 104-105 °C.

¹H-NMR-200 MHz (DMSO-d₆): δ 8.12 (dd, 2H, Ar-H), 7.74 (dd, 1H, Ar-H), 7.63 (dd, 2H, Ar-H), 5.96 (s, 1H, CH), 2.25 (s, 3H, CH₃).

GC/MS: *m/e* 202 (M⁺).

Analisi elementare: per C₁₁H₁₀N₂O₂ Calcolato: C 65.32%; H 4.99%; N 13.86%. Trovato: C 65.40%; H 5.23%; N 13.50%.

Preparazione del (Z)-1-acetil-4-(3,4-dimetossibenzilidene)-3-metil-1H-pirazol-5(4H)-one.
[18]¹⁵⁹



Una miscela composta da 3,4-dimetossibenzaldeide (**5b**, 1.9 mmol), **10** (3.1 mmol), acetato di sodio (**2**, 2.0 mmol) e anidride acetica (5.4 mmol) è stata agitata per 30 min. ad una temperatura di 80 °C. A raffreddamento avvenuto, la soluzione, limpida e di colore arancio, è stata addizionata di H₂O e filtrata a dare un solido giallo-arancio. **Resa:** 42%.

Pf: 149-151 °C.

Rf: 0.37 (etere di petrolio/acetato di etile = 3/7).

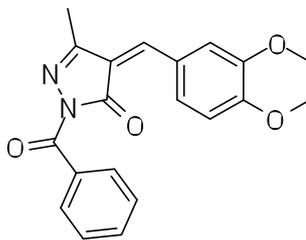
¹H-NMR-200 MHz (CDCl₃): δ 8.79 (s, 1H, Ar-H), 7.66 (d, 1H, Ar-H), 7.33 (s, 1H, CH=C), 6.96 (d, 1H, Ar-H), 4.03 (s, 3H, OCH₃), 4.00 (s, 3H, OCH₃), 2.60 (s, 3H, CH₃), 2.33 (s, 3H, CH₃).

(DMSO-d₆): δ 8.60 (s, 1H, Ar-H), 8.05 (d, 1H, Ar-H), 7.73 (s, 1H, CH=C), 7.18 (d, 1H, Ar-H), 3.90 (s, 3H, OCH₃), 3.85 (s, 3H, OCH₃), 2.44 (s, 3H, CH₃), 2.27 (s, 3H, CH₃).

GC/MS: *m/e* 288 (M⁺).

Analisi elementare: per C₁₅H₁₆N₂O₄ Calcolato: C 62.48%; H 5.60%; N 9.72%. Trovato: C 62.66%; H 5.93%; N 10.07%.

Preparazione del (Z)-1-benzoil-4-(3,4-dimetossibenzilidene)-3-metil-1H-pirazol-5(4H)-one. [19b]



Una miscela composta da 3,4-dimetossibenzaldeide (**5b**, 1.9 mmol), anidride benzoica (5.4 mmol) e benzoato di sodio (2.0 mmol) è stata scaldata a 45 °C. Una volta fusa l'anidride benzoica è stato aggiunto **11** (3.1 mmol). La reazione è stata portata ad una temperatura di 80 °C per 30 min. A raffreddamento avvenuto, la soluzione, limpida e di colore arancio, è stata spenta con H₂O ed estratta 3 volte con acetato di etile. La soluzione organica ottenuta è stata lavata con una soluzione acquosa satura di NaCl ed evaporata a dare un solido giallo arancio che sottoposto a cromatografia flash (eluenti: etere di petrolio/acetato di etile = 4/6) ha fornito il prodotto finale in forma di solido giallo. **Resa:** 38%.

Pf: 136-138 °C.

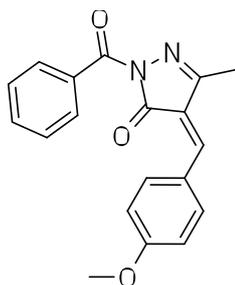
Rf: 0.40 (etere di petrolio/acetato di etile = 6/4).

¹H-NMR-200 MHz (DMSO-d₆): δ 8.56 (s, 1H, Ar-H), 8.08 (d, 1H, Ar-H), 7.76 (d, 1H, Ar-H), 7.70-7.53 (m, 3H, Ar-H), 7.50 (s, 1H, CH=C), 7.18 (d, 1H, Ar-H), 3.90 (s, 3H, OCH₃), 3.83 (s, 3H, OCH₃), 2.27 (s, 3H, CH₃). **(CDCl₃):** δ 8.79 (s, 1H, Ar-H), 7.86 (d, 1H, Ar-H), 7.80-7.40 (m, 4H, Ar-H), 7.35 (s, 1H, CH=C), 6.96 (d, 1H, Ar-H), 4.00 (s, 3H, OCH₃), 3.98 (s, 3H, OCH₃), 2.32 (s, 3H, CH₃).

GC/MS: *m/e* 350 (M⁺).

Analisi elementare: per C₂₀H₁₈N₂O₄ Calcolato: C 68.55%; H 5.18%; N 8.00%. Trovato: C 68.46%; H 5.31%; N 7.79%.

Preparazione del (Z)-1-benzoil-4-(4-metossibenzilidene)-3-metil-1H-pirazol-5(4H)-one. [19f]



Ad una soluzione di 4-metossibenzaldeide (**4f**, 8.2 mmol), anidride benzoica (23.5 mmol) e sodio benzoato (8.6 mmol) in agitazione a 60 °C, è stato aggiunto **11** (11.7 mmol). La miscela di reazione è stata agitata alla temperatura di 80 °C per 50 min. Una volta raffreddata, la miscela di reazione è stata diluita con una soluzione satura di cloruro di sodio ed estratta con acetato di etile. La fase organica è stata prima lavata con una soluzione satura di cloruro di sodio e NaOH 0.1 N, successivamente è stata trattata con Na₂SO₄ anidro ed evaporata a dare un olio giallo che è stato purificato per cromatografia flash (eluenti: etere di petrolio/acetato di etile = 7/3). La successiva triturazione con etere di petrolio ha permesso di ottenere un solido ceroso arancione. **Resa:** 33%.

Rf: 0.27 (etere di petrolio/acetato di etile = 5/5).

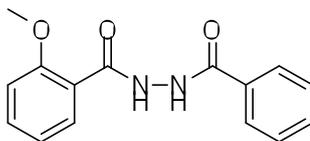
Pf: 89-90 °C.

¹H-NMR-200 MHz (DMSO-d₆): δ 8.56 (dd, 2H, Ar-H), 7.79 (s, 1H, CH), 7.77-7.49 (m, 5H, Ar-H), 3.89 (s, 3H, OCH₃), 2.29 (s, 3H, CH₃).

GC/MS: *m/e* 320 (M⁺).

Analisi elementare: per C₁₉H₁₆N₂O₃ Calcolato: C 71.22%; H 5.04%; N 8.75%. Trovato: C 71.09%; H 5,11%; N 8.56%.

Preparazione del N'-benzoil-2-metossibenzidrazide. [23]¹³⁷



Una soluzione di **3j** (1.4 mmol) e **16** (1.4 mmol) in *o*-diclorobenzene (6 mL) è stata agitata a refluxo per 6 ore in atmosfera inerte. La miscela di reazione è stata fatta raffreddare e poi lasciata a riposo a t.a. per 12 ore. Il precipitato arancione formatosi è stato filtrato e purificato tramite cromatografia flash (eluenti: etere di petrolio/acetato di etile = 2/8). Ottenuto solido bianco costituito dalla miscela di N'-benzoil-2-metossibenzidrazide (**23**) e 2-metossi-N'-(2-metossibenzoil)benzidrazide (**6j**). **Resa:** non quantificabile.

Nicolino Pala

Studi sui metalloenzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

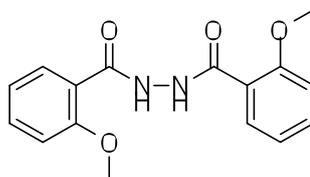
Rf: 0.74 (etere di petrolio/acetato di etile = 2/8).

IR (nujol): ν cm^{-1} 3090 (NH), 1653 (C=O).

$^1\text{H-NMR-200 MHz (DMSO-}d_6\text{):}$ δ 10.66 (bs, 1H, NH), 10.07 (bs, 1H, NH), 7.96 (d, 2H, Ar-H), 7.86 (d, 1H, Ar-H), 7.78 (m, 1H, Ar-H), 7.62-7.54 (m, 3H, Ar-H), 7.25-7.08 (m, 2H, Ar-H), 3.94 (s, 3H, OCH_3).

GC/MS: m/e 270 (M^+), 300 (M^+).

Conferma della 2-metossi- N' -(2-metossibenzoil)benzidrazide. [6j]



2-metossibenzydrazide (**1j**, 0.5 mmol) è stata scaldata a 180 °C sotto agitazione per 15 min., quindi raffreddata e filtrata a dare un solido rosa. **Resa:** 63%.

Rf: 0.74 (etere di petrolio/acetato di etile = 2/8).

Pf: 203 °C.

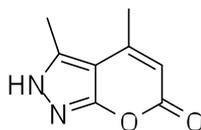
IR (nujol): ν cm^{-1} 3086 (NH), 1650 (C=O).

$^1\text{H-NMR-200 MHz (DMSO-}d_6\text{):}$ δ 10.4 (bs, 2H, NH), 7.8 (m, 2H, Ar-H), 7.5 (m, 2H, Ar-H), 7.2 (m, 2H, Ar-H), 7.1 (m, 2H, Ar-H), 3.9 (s, 6H, OCH_3). **(CDCl_3):** δ 11.3 (bs, 2H, NH), 8.2 (m, 2H, Ar-H), 7.5 (m, 2H, Ar-H), 7.1 (m, 2H, Ar-H), 7.0 (m, 2H, Ar-H), 4.1 (s, 6H, OCH_3).

GC/MS: m/e 300 (M^+).

Analisi elementare: per $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4$ Calcolato: C 63.98%; H 5.37%; N 9.33%. Trovato: C 63.67%; H 5.58%; N 9.00%.

Conferma del 3,4-dimetilpirano[2,3- c]pirazol-6(2H)-one. [7]



Una soluzione di **11** (7.9 mmol) e acetoacetato di etile (**2**, 7.9 mmol) in *o*-diclorobenzene (10 mL) è stata agitata a riflusso in condizioni anidre per 5 ore. Il precipitato formatosi è stato isolato per filtrazione e purificato tramite cromatografia flash (etere di petrolio/acetato di etile = 2/8) a dare un

Nicolino Pala

Studi sui metalloenzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

solido beige. **Resa:** 42%.

Rf: 0.42 (etere di petrolio/acetato di etile = 9/1).

Pf: 246 °C.

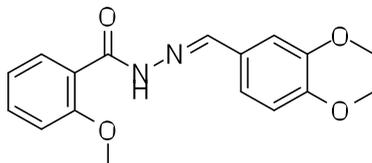
IR (nujol): ν cm⁻¹ 3193, 1687, 1604.

¹H-NMR-200 MHz (DMSO-d₆): δ 12.97 (bs, 1H), 5.82 (s, 1H, CH), 2.48 (s, 3H, CH₃), 2.36 (s, 3H, CH₃).

GC/MS: *m/e* 164 [M]⁺.

Analisi elementare: per C₈H₈N₂O₂ Calcolato: C 58.52%; H 4.91%; N 17.07%. Trovato: C 58.56%; H 5.10%; N 17.23%.

Conferma della *N'*-(3,4-dimetossibenzilidene)-2-metossibenzidrazide.[14]



Operando in atmosfera d'azoto e condizioni anidre, una soluzione formata da 2-metossibenzidrazide (**1j**, 3.0 mmol), diossano (6 mL) e 3,4-dimetossibenzaldeide (**5b**, 3.0 mmol) è stata tenuta a riflusso, sotto agitazione, per 4 ore. A raffreddamento avvenuto il solvente è stato rimosso ed il residuo filtrato usando etere di petrolio come liquido di lavaggio. Dalla filtrazione si è ottenuto un solido beige. **Resa:** 55%.

Pf: 146 °C.

Rf: 0.55 (etere di petrolio/acetato di etile = 2/8).

¹H-NMR-200 MHz (CDCl₃): δ 10.82 (bs, 1H, NH), 8.31 (d, 1H, Ar-H), 8.14 (s, 1H, CH), 7.59-7.46 (m, 2H, Ar-H), 7.15 (s, 1H, Ar-H), 7.00 (m, 1H, Ar-H), 6.83 (m, 1H, Ar-H), 4.01 (s, 3H, OCH₃), 3.95 (s, 3H, OCH₃), 3.89 (s, 3H, OCH₃).

¹³C-NMR-200 MHz (CDCl₃): δ_C 161.8, 156.9, 151.0, 149.1, 148.1, 133.1, 132.4, 126.8, 122.6, 121.4, 120.3, 111.2, 110.2, 108.2, 55.8 (m, 9H, OCH₃).

GC/MS: *m/e* 314 (M⁺).

Analisi elementare: per C₁₇H₁₈N₂O₄ Calcolato: C 64.94%; H 5.78%; N 8.92%. Trovato: C 65.10%; H 5.98%; N 8.68%.

Nicolino Pala

Studi sui metalloenzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

Tecniche computazionali

Capitolo 1: modello farmacoforico dell'integrasi

Un database contenente i 7 ligandi modello minimizzati è stato costruito con il programma MOE. La procedura di *Flexible Alignment* è stata eseguita incrementalmente: partendo dai composti **1** e **2** è stata generata una serie di conformazioni sovrapposte la migliore delle quali è stata utilizzata per una nuova ricerca utilizzando il terzo ligando e così via sino ad esaurire i ligandi. I parametri sono stati mantenuti di default (max 200 interazioni, failure limit=10, cutoff 10). Al termine del processo è stato generato il modello farmacoforico usando la funzione *Pharmacophore Query Editor* implementata in MOE.

Capitolo 2: docking fine del composto zinc04324216

La molecola è stata minimizzata con il programma Sybyl e data la sua rigidità non è stato ritenuto utile fare la ricerca conformazionale. Utilizzando il programma Gaussian 98 (Calculation Type = OPT+FREQ, Calculation Method = RB3LYP, Basis Set = 6-311G) la molecola è stata esplorata al fine di valutarne la coerenza, in seguito è stata deprotonata e sono state assegnate le cariche ai vari atomi secondo Gasteiger-Marsili. La molecola così preparata è stata sottoposta a *docking* rigido usando software AutoDock 4.2.1 e come target la struttura proteica presente nel file 2ILI.pdb precedentemente preparata.

Capitolo 2: docking dei photoprobes

Le molecole sono state costruite e minimizzate con Sybyl. Per ognuna di esse sono state assegnate le cariche secondo Gasteiger-Marsili. Il *docking* rigido usando software AutoDock 4.2.1 è stato eseguito posizionando ciascuna molecola ad una distanza di 20 Å dal target che nella fattispecie era lo stesso utilizzato per il *docking* di zinc04324216.

Capitolo 3: calcoli *ab initio*

I modelli molecolari delle strutture presenti in **Figura 3.7** sono stati costruiti con MOE e minimizzati con sybyl. Tutte le strutture hanno raggiunto un punto stazionario, come confermato dall'assenza di frequenze immaginarie. I calcoli sono stati eseguiti con Gaussian 98 (Metodo: B3LYP Basis set: 6-311g). Durante i calcoli sono state simulate le seguenti condizioni operative: temperatura = 480 K; pressione 1 Atm.

Saggi enzimatici

Saggi di inibizione enzimatica dell'IN

Materiali ed enzimi

Tutti i composti sono stati solubilizzati in DMSO e le soluzioni conservate a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Il γ [^{32}P]-ATP è stato acquistato o da Amersham Biosciences o ICN. I sistemi di espressione per wild-type IN e il mutante solubile IN^{F185KC280S} sono stati donati dal Dr. Robert Craigie, Laboratory of Molecular Biology, NIDDK, NIH, Bethesda, MD.

Preparazione degli oligonucleotidi substrato

L'oligonucleotide 21 top, 5'-GTGTGGAAAATCTCTAGCAGT-3' e 21 bot, 5'-ACTGCTAGAGATTTCCACAC-3' sono stati acquistati dal Norris Cancer Center Core Facility (University of Southern California) e purificati tramite "UV shadowing" su gel di poliacrilammide. Per analizzare l'avanzamento del 3'-processing e dello strand transfer usando substrati marcati al terminale 5', il 21 top è stato marcato al 5' usando la chinasi T4 polinucleotide (Epicentre, Madison, WI) e γ [^{32}P]-ATP (Amersham Biosciences or ICN). La chinasi è stata inattivata per mezzo del calore e il 21 bot è stato aggiunto con un eccesso di 1.5 M. La miscela è stata scaldata a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, lasciata raffreddare lentamente a temperatura ambiente, e passata su una colonna spin 25 mini (USA Scientific) per separare gli oligonucleotidi a doppia elica dal materiale non incorporato.

Saggi sull'integrasi

Per determinare l'avanzamento del 3'-processing e dello strand transfer, il wild-type IN è stato preincubato ad una concentrazione finale di 200 nM con l'inibitore in un tampone di reazione (50 nM NaCl, 1 nM HEPES, pH 7.5, 50 μM EDTA, 50 μM dithiothreitol, 10% glicerolo (w/v), 7.5 nM MnCl_2 , 0.1 mg/mL di albumina di siero bovino, 10 nM 2-mercaptoetanol, 10% DMSO e 25 nM MOPS, pH 7.2) a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ per 30'. In seguito è stato aggiunto l'oligonucleotide substrato lineare marcato con ^{32}P all'estremità 5' (20 nM), e l'incubazione è stata proseguita per un'ulteriore ora. Le reazioni sono state spente tramite aggiunta di un uguale volume (16 μL) di "loading dye" (98% di formammide deionizzata, 10 mM EDTA, 0.025% di xilenecianolo e 0.025% di blu di bromofenolo). Un'aliquota (5 μL) è stata sottoposta ad elettroforesi su un gel di poliacrilammide denaturato al 20% (0.09 M tris-borato pH 8.3, 2 mM EDTA, 20% acrilammide, 8M urea).

I gel sono stati asciugati, esposti in un "PhosphorImager cassette", analizzati usando un Typhoon 8610 Variable Mode Imager (Amersham Biosciences) e quantificati tramite ImageQuant 5.2. La percentuale di inibizione (%I) è stata calcolata usando la seguente equazione:

$$\%I = 100 \times [1 - (D-C) / (N-C)]$$

Nicolino Pala

Studi sui metalloenzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

dove C, N e D sono le frazioni del substrato 21-mer convertito nel 19-mer (prodotto del 3'-processing) o i prodotti dello strand transfer per il solo DNA, il DNA più IN e IN più il farmaco, rispettivamente. I valori di IC_{50} sono stati determinati riportando su un grafico il logaritmo della concentrazione del farmaco in funzione della percentuale di inibizione ad ottenere la concentrazione che produceva il 50% di inibizione.

Saggi di inibizione enzimatica della CA

L'attività inibitoria sull'enzima CA è stata valutata tramite l'utilizzo di un apparecchiatura *stopped-flow* della Applied Photophysics. Le analisi sono state registrate ad un'assorbanza massima di 557 nm usando come indicatore il rosso fenolo (0.2 mM), come *buffer* è stata usata una soluzione 10-20 mM di HEPES (pH 7.5) e 20 mM di Na_2SO_4 . Sono state preparate delle *stock solutions* 10 mM, in acqua distillata, degli inibitori, da cui sono state preparate delle diluizioni con concentrazioni superiori a 0.01 nM. L'enzima è stato incubato in presenza dell'inibitore per un tempo di 15 minuti (dato non riportato) e 6 ore a t.a. prima dell'esecuzione dei saggi per permettere la completa formazione del complesso di inibizione. Un minimo di tre determinazioni sono state eseguite per ogni diluizione. I dati medi analizzati secondo il metodo dei minimi quadrati con PRISM 3 hanno permesso di risalire alle costanti di inibizione.

Bibliografia

1. Winum, J. Y.; Scozzafava, A.; Montero, J. L.; Supuran, C. T. Metal binding functions in the design of carbonic anhydrase inhibitors. *Curr Top Med Chem* **2007**, 7, 835-848.
2. Kirschberg, T.; Parrish, J. Metal chelators as antiviral agents. *Curr Opin Drug Discov Devel* **2007**, 10, 460-472.
3. Hoffmann, C.; Rockstroh, J.; Kamps, B. *HIV Medicine 2006*. Flying Publisher, **2006**.
4. Weiss, R. A. Gulliver's travels in HIVland. *Nature* **2001** 410, 963-967.
5. Barre-Sinoussi, F.; Chermann, J. C.; Rey, F.; Nugeyre, M. T.; Chamaret, S.; Gruest, J.; Dauguet, C.; Axler-Blin, C.; Vezinet-Brun, F.; Rouzioux, C.; Rozenbaum, W.; Montagnier, L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **1983**, 220, 868-871.
6. Broder S, Gallo RC. A pathogenic retrovirus (HTLV-III) linked to AIDS. *N Engl J Med* **1984**, 311, 1292-1297.
7. Montagnier L. *Aids. L'uomo contro il virus. La lotta alla peste del 2000 nella cronaca dello scienziato che l'ha scoperta*. Giunti editore, **1995**.
8. AIDS OUTLOOK/09. UNAIDS World AIDS Day Report, **2008**.
9. Turpin, J. A. The next generation of HIV/AIDS drugs: novel and developmental antiHIV drugs and targets. *Exp Rev Anti Infect Ther* **2003**, 1, 97-128.
10. HIV Sequence Compendium **2008**.
11. Chan, D. C.; Fass, D.; Berger, J. M.; Kim, P. S. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* **1997**, 89, 263-273.
12. Brown, P. O. *In Retroviruses* (Coffin, J. M., Hughes, S. H., and Varmus, H. E., eds). Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, 161-203, **1998**.

Nicolino Pala

Studi sui metalloenzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

13. Turner B.G. Summers M.F. Structural biology of HIV. *J Mol Biol* **1999**, 285, 1-32.
14. De Clercq, E. New developments in anti-HIV chemotherapy. *Current Medicinal Chemistry* **2001**, 8, 1543-1572.
15. De Clercq, E. New approaches toward anti-HIV chemotherapy. *J Med Chem* **2005**, 48, 5, 1297-1313.
16. Mehellou, Y.; De Clercq, E. Twenty-Six Years of Anti-HIV Drug Discovery: Where Do We Stand and Where Do We Go? *J Med Chem* **2009**.
17. Greene, W. C.; Debysier, Z.; Ikeda, Y.; Freed, E. O.; Stephens, E.; Yonemoto, W.; Buckheit, R. W.; Este, J. A.; Cihlar, T. Novel targets for HIV therapy. *Antiviral Res* **2008**, 80, 251-265.
18. Meadows C., Gervay-Hague J. Current developments in HIV chemotherapy. *ChemMedChem* **2006**, 1, 16-29.
19. Richman, D. D. HIV chemotherapy. *Nature* **2001**, 410, 995-1001.
20. Barbaro, G.; Scozzafava, A.; Mastrolorenzo, A.; Supuran, C. T. Highly active antiretroviral therapy: current state of the art, new agents and their pharmacological interactions useful for improving therapeutic outcome. *Curr Pharm Des* **2005**, 11, 1805-1843.
21. Lohse, N.; Hansen, A. B.; Pedersen, G.; Kronborg, G.; Gerstoft, J.; Sorensen, H. T.; Vaeth, M.; Obel, N. Survival of persons with and without HIV infection in Denmark, 1995-2005. *Ann Intern Med* **2007**, 146, 87-95.
22. Little, S. J.; Holte, S.; Routy, J. P.; Daar, E. S.; Markowitz, M.; Collier, A. C.; Koup, R. A.; Mellors, J. W.; Connick, E.; Conway, B.; Kilby, M.; Wang, L.; Whitcomb, J. M.; Hellmann, N. S.; Richman, D. D. Antiretroviral-drug resistance among patients recently infected with HIV. *N Engl J Med* **2002**, 347, 385-394.
23. De Clercq, E. Strategies in the design of antiviral drugs. *Nature Rev Drug Discovery* **2002**, 1, 13-25.
24. Semenova, E. A.; Marchand, C.; Pommier, Y. HIV-1 integrase inhibitors: update and perspectives. *Adv Pharmacol* **2008**, 56, 199-228.
25. Pommier Y.; Neamati, N. Inhibitors of human immunodeficiency virus integrase. *Adv Virus Res* **1999**, 52, 427-458.
26. Neamati, N.; Marchand, C.; Pommier, Y. HIV-1 integrase inhibitors: past, present, and future. *Adv Pharmacol* **2000**, 49, 147-165.
27. Neamati, N. Structure-based HIV-1 integrase inhibitor design: a future perspective. *Exp Opin Invest Drugs* **2001**, 10, 281-296.
28. D'Angelo, J.; Mouscadet, J. F.; Desmaele, D.; Zouhiri, F.; Leh, H. HIV-1 integrase: the next target for AIDS therapy? *Pathol Biol* **2001**, 49, 237-246.

Nicolino Pala

Studi sui metalloenzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

29. Anthony, N. J. HIV-1 integrase: a target for new AIDS chemotherapeutics. *Curr Top Med Chem* **2004**, 4, 979-990.
30. Pommier, Y.; Johnson A. A.; Marchand, C. Integrase inhibitors to treat HIV/AIDS. *Nature Rev Drug Discovery* **2005**, 4, 236-248.
31. Summa, V.; Petrocchi, A.; Bonelli, F.; Crescenzi, B.; Donghi, M.; Ferrara, M.; Fiore, F.; Gardelli, C.; Gonzalez Paz, O.; Hazuda, D. J.; Jones, P.; Kinzel, O.; Laufer, R.; Monteagudo, E.; Muraglia, E.; Nizi, E.; Orvieto, F.; Pace, P.; Pescatore, G.; Scarpelli, R.; Stillmock, K.; Witmer, M. V.; Rowley, M. Discovery of raltegravir, a potent, selective orally bioavailable HIV-integrase inhibitor for the treatment of HIV-AIDS infection. *J Med Chem* **2008**, 51, 5843-5855.
32. Marinello, J.; Marchand, C.; Mott, B. T.; Bain, A.; Thomas, C. J.; Pommier, Y. Comparison of raltegravir and elvitegravir on HIV-1 integrase catalytic reactions and on a series of drug-resistant integrase mutants. *Biochemistry* **2008**, 47, 9345-9354.
33. Steitz, T. A. A mechanism for all polymerases. *Nature* **1998**, 391, 231-232.
34. Dyda, F.; Hickman, A. B.; Jenkins, T. M.; Engelman, A.; Craigie, R.; Davies, D. R. Crystal structure of the catalytic domain of HIV-1 integrase: similarity to other polynucleotidyl transferases. *Science* **1994**, 266, 1981-1986.
35. Rice, P. A.; Baker, T. A. Comparative architecture of transposase and integrase complexes. *Nature Struct Biol* **2001**, 8, 302-307.
36. Asante-Appiah, E.; Skalka, A.M. Molecular mechanism in retrovirus DNA integration. *Antiviral Research* **1997**, 36, 139-156.
37. Neamati, N.; Marchand, C.; Winslow, H.; Pommier, Y. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Integrase-Targeted Inhibitor Design. *Antiretroviral therapy* **2001**, 5, 87-103.
38. Zheng, R.; Jenkins, T. M.; Craigie, R. Zinc folds the N-terminal domain of HIV-1 integrase, promotes multimerization, and enhances catalytic activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **1996**, 93, 13659-13664.
39. Bushman, F. D.; Engelman, A.; Palmer, I.; Wingfield, P.; Craigie, R. Domains of the integrase protein of human immunodeficiency virus type 1 responsible for polynucleotidyl transfer and zinc binding. *Proc Natl Acad Sci USA* **1993**, 90, 3428-3437.
40. Johnson, M. S.; McClure, M. A.; Feng, D. F.; Gray, J.; Doolittle, R. F. Computer analysis of retroviral pol genes: assignment of enzymatic functions to specific sequences and homologies with nonviral enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* **1986**, 83, 7648-7652.
41. Grobler, J. A.; Stillmock, K.; Hu, B.; Witmer, M.; Felock, P.; Espeseth, A. S.; Wolfe, A.; Egbertson, M.; Bourgeois, M.; Melamed, J.; Wai, J. S.; Young, S.; Vacca, J.; Hazuda, D. J. Diketo acid inhibitor mechanism and HIV-1 integrase: Implications for metal binding

Nicolino Pala

Studi sui metalloenzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

- in the active site of phosphotransferase enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* **2002**, 99, 6661-6666.
42. Kulkosky, J.; Jones, K. S.; Katz, R. A.; Mack, J. P.; Skalka, A. M. Residues critical for retroviral integrative recombination in a region that is highly conserved among retroviral/retrotransposon integrases and bacterial insertion sequence transposases. *Mol Cell Biol* **1992**, 12, 2331-2338.
 43. Esposito, D.; Craigie, R. HIV integrase structure and function. *Adv Virus Res* **1999**, 52, 319-333
 44. Chiu, T. K.; Davies, D. R. Structure and function of HIV-1 integrase. *Curr Top Med Chem* **2004**, 4, 671-686.
 45. Marchand, C.; Johnson, A. A.; Karki, R. G.; Pais, G. C.; Zhang, X.; Cowansage, K.; Patel, T. A.; Nicklaus, M. C.; Burke, T. R. Jr.; Pommier, Y. Metal-dependent inhibition of HIV-1 integrase by beta-diketo acids and resistance of the soluble double-mutant (F185K/C280S). *Mol Pharmacol* **2003**, 64, 600-609.
 46. Lutzke, R. A.; Plasterk, R. H. Structure-based mutational analysis of the C-terminal DNA-binding domain of human immunodeficiency virus type 1 integrase: critical residues for protein oligomerization and DNA binding. *J Virol* **1998**, 72, 4841-4848.
 47. Brown, P. O. *Integration In Retroviruses* Coffin J. C.; Hughes S. H.; Varmus, H. E., Eds.; Cold Spring Harbor Press: Plainview, NY, **1999**.
 48. Bushman, F. D.; Craigie, R. Activities of human immunodeficiency virus (HIV) integration protein in vitro: specific cleavage and integration of HIV DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **1991**, 88, 1339-1343.
 49. Engelman, A.; Mizuuchi, K.; Craigie, R. HIV-1 DNA integration: mechanism of viral DNA cleavage and DNA strand transfer. *Cell* **1991**, 67, 1211-1221.
 50. Asante-Appiah, E.; Skalka, A. M. HIV-1 integrase: structural organization, conformational changes, and catalysis. *Adv Virus Res* **1999**, 52, 351-369.
 51. Engelman, A.; Bushman, F. D.; Craigie, R. Identification of discrete functional domains of HIV-1 integrase and their organization within an active multimeric complex. *EMBO J* **1993**, 12, 3769-3775.
 52. Jenkins, T. M.; Engelman, A.; Ghirlando, R.; Craigie, R. A soluble active mutant of HIV-1 integrase: involvement of both the core and carboxyl-terminal domains in multimerization. *J Biol Chem* **1996**, 271, 7712-7718.
 53. Pommier, Y.; Marchand, C.; Neamati, N. Retroviral integrase inhibitors year 2000: update and perspectives. *Antiviral Res* **2000**, 47, 139-148.

Nicolino Pala

Studi sui metalloenzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

54. Engelman, A.; Craigie, R. Identification of conserved amino acid residues critical for human immunodeficiency virus type 1 integrase function in vitro. *J Virol* **1992**, *66*, 6361–6369.
55. Van Maele, B.; Debyser, Z. HIV-1 integration: an interplay between HIV-1 integrase, cellular and viral proteins. *AIDS Rev* **2005**, *7*, 26-43.
56. Wang, J. Y.; Ling, H.; Yang, W.; Craigie, R. Structure of a two-domain fragment of HIV-1 integrase: implications for domain organization in the intact protein. *EMBO J* **2001**, *20*, 7333-7343.
57. Beese, L. S.; Steitz, T. A. Structural basis for the 3'-5' exonuclease activity of Escherichia coli DNA polymerase I: a two metal ion mechanism. *EMBO J* **1991**, *10*, 25-33.
58. Steitz, T. A.; Steitz, J. A. A general two-metal-ion mechanism for catalytic RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1993**, *90*, 14, 6498-6502.
59. Neamati, N. Patented small molecule inhibitors of HIV-1 integrase: a ten-year saga. *Exp Opin Ther Pat* **2002**, *12*, 709-724.
60. Dayam, R.; Neamati, N. Small-molecule HIV-1 integrase inhibitors: the 2001-2002 update. *Curr Pharm Des* **2003**, *9*, 1789-1802.
61. Gupta, S. P.; Nagappa, A. N. Design and development of integrase inhibitors as anti-HIV agents. *Curr Med Chem* **2003**, *10*, 1779-1794.
62. Maurin, C.; Bailly, F.; Cotelle, P. Structure-activity relationship of HIV-1 integrase inhibitor-enzyme-ligand interaction. *Curr Med Chem* **2003**, *10*, 1795-1810.
63. Johnson, A. A.; Marchand, C.; Pommier, Y. HIV-1 integrase inhibitors: a decade of research and two drugs in clinical trial. *Curr Top Med Chem* **2004**, *4*, 671-686.
64. Witvrouw, M.; Van Maele, B.; Vercammen, J.; Hantson, A.; Engelborghs, Y.; De Clercq, E.; Pannecouque, C.; Debyser, Z. Novel inhibitors of HIV-Integrase. *Current Drug Metabolism* **2004**, *5*, 291-304.
65. Sechi, M.; Bacchi, A.; Carcelli, M.; Compari, C.; Duce, E.; Fiscaro, E.; Rogolino, D.; Gates, P.; Derudas, M.; Al-Mawsawi, L. Q.; Neamati, N. From ligand to complexes: inhibition of human immunodeficiency virus type 1 integrase by beta-diketo acid metal complexes. *J Med Chem* **2006**, *49*, 14, 4248-4260.
66. Bacchi, A.; Biemmi, M.; Carcelli, M.; Carta, F.; Compari, C.; Fiscaro, E.; Rogolino, D.; Sechi, M.; Sippel, M.; Sottriffer, C. A.; Sanchez, T. W.; Neamati, N. From ligand to complexes. Part 2. Remarks on human immunodeficiency virus type 1 integrase inhibition by beta-diketo acid metal complexes. *J Med Chem* **2008**, *51*, 22, 7253-7264.
67. Hazuda, D. J.; Felock, P.; Witmer, M.; Wolfe, A.; Stillmock, K.; Grobler, J. A.; Espeseth, A.; Gabryelski, L.; Schleif, W.; Blau, C.; Miller, M. D. Inhibitors of strand transfer that prevent integration and inhibit HIV-1 replication in cells. *Science* **2000**, *287*, 646-650.

Nicolino Pala

Studi sui metalloenzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

-
68. Goldgur, Y.; Craigie, R.; Cohen, G. H.; Fujiwara, T.; Yoshinaga, T.; Fujishita, T.; Sugimoto, H.; Endo, T.; Murai, H.; Davies, D. R. Structure of the HIV-1 integrase catalytic domain complexed with an inhibitor: a platform for antiviral drug design. *Proc Natl Acad Sci USA* **1999**, *96*, 13040-13043.
 69. Yoshinaga, T. S.; Fujishita, T.; Fujiwara, T. In vitro activity of a new HIV-1 integrase inhibitor in clinical development. Presented at the *9th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections*, Seattle, WA, **2002**.
 70. Billich, A. S-1360 Shionogi-GlaxoSmithKline. *Curr Opin Investig Drugs* **2003**, *4*, 2, 206-209.
 71. Young, S. L-870,810: A potent antiviral HIV integrase inhibitor with potential clinical utility. Presented at the *XIV International AIDS Conference*, West Point, PA, **2002**.
 72. Palmisano, L. Role of integrase inhibitors in the treatment of HIV disease. *Expert Rev Anti Infect Ther* **2007**, *5*, 1, 67-75.
 73. Summa, V.; Petrocchi, A.; Bonelli, F.; Crescenzi, B.; Donghi, M.; Ferrara, M.; Fiore, F.; Gardelli, C.; Gonzalez Paz, O.; Hazuda, D. J.; Jones, P.; Kinzel, O.; Laufer, R.; Monteagudo, E.; Muraglia, E.; Nizi, E.; Orvieto, F.; Pace, P.; Pescatore, G.; Scarpelli, R.; Stillmock, K.; Witmer, M. V.; Rowley, M. Discovery of raltegravir, a potent, selective orally bioavailable HIV-integrase inhibitor for the treatment of HIV-AIDS infection. *J Med Chem* **2008**, *51*, 18, 5843-5855.
 74. Rowley, M. The discovery of raltegravir, an integrase inhibitor for the treatment of HIV infection. *Prog Med Chem* **2008**, *46*, 1-28.
 75. Marchand, C.; Zhang, X.; Pais, G. C.; Cowansage, K.; Neamati, N.; Burke, T. R., Jr.; Pommier, Y. Structural determinants for HIV-1 integrase inhibition by beta-diketo acids. *J Biol Chem* **2002**, *277*, 15, 12596-12603.
 76. Vanek, T.; Velková, V.; Gut, J. Preparation of 3- and 3,5-substituted-1,2,4 triazole. *Collect Czech Chem Commun* **1984**, *49*, 2492-2495.
 77. Ferry, J. G. The gamma class of carbonic anhydrases. *Biochim Biophys Acta* **2009**.
 78. Vomasta, D.; Innocenti, A.; Konig, B.; Supuran, C. T. Carbonic anhydrase inhibitors: two-prong versus mono-prong inhibitors of isoforms I, II, IX, and XII exemplified by photochromic cis-1,2-alpha-dithienylethene derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* **2009**, *19*, 5, 1283-1286.
 79. Supuran C. T.; Scozzafava A. Carbonic anhydrases as targets for medicinal chemistry. *Bioorg Med Chem*, *15*, **2007**, 4336-4350.
 80. Krishnamurthy, V. M.; Kaufman, G. K.; Urbach, A. R.; Gitlin, I.; Gudiksen, K. L.; Weibel, D. B.; Whitesides, G. M. Carbonic anhydrase as a model for biophysical and

- physical-organic studies of proteins and protein-ligand binding. *Chem Rev* **2008**, *108*, 3, 946-1051.
81. Supuran, C. T. Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nat Rev Drug Discov* **2008**, *7*, 2, 168-181.
82. Chiche, J.; Ilc, K.; Laferriere, J.; Trottier, E.; Dayan, F.; Mazure, N. M.; Brahimi-Horn, M. C.; Pouyssegur, J. Hypoxia-inducible carbonic anhydrase IX and XII promote tumor cell growth by counteracting acidosis through the regulation of the intracellular pH. *Cancer Res* **2009**, *69*, 1, 358-368.
83. Supuran, C. T., Scozzafava, A., Conway J. Carbonic anhydrase: its inhibitors and activators Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, **2004**.
84. Supuran, C. T.; Scozzafava, A.; Casini, A. Carbonic anhydrase inhibitors. *Med Res Rev* **2003**, *23*, 2, 146-189.
85. Innocenti, A.; Scozzafava, A.; Parkkila, S.; Puccetti, L.; De Simone, G.; Supuran, C. T. Investigations of the esterase, phosphatase, and sulfatase activities of the cytosolic mammalian carbonic anhydrase isoforms I, II, and XIII with 4-nitrophenyl esters as substrates. *Bioorg Med Chem Lett* **2008**, *18*, 7, 2267-2271.
86. Zimmerman, S. A.; Ferry, J. G.; Supuran, C. T. Inhibition of the archaeal beta-class (Cab) and gamma-class (Cam) carbonic anhydrases. *Curr Top Med Chem* **2007**, *7*, 9, 901-908.
87. Klengel, T.; Liang, W. J.; Chaloupka, J.; Ruoff, C.; Schroppel, K.; Naglik, J. R.; Eckert, S. E.; Mogensen, E. G.; Haynes, K.; Tuite, M. F.; Levin, L. R.; Buck, J.; Muhlschlegel, F. A. Fungal adenylyl cyclase integrates CO₂ sensing with cAMP signaling and virulence. *Curr Biol* **2005**, *15*, 22, 2021-2026.
88. Cox, E. H.; McLendon, G. L.; Morel, F. M.; Lane, T. W.; Prince, R. C.; Pickering, I. J.; George, G. N. The active site structure of *Thalassiosira weissflogii* carbonic anhydrase 1. *Biochemistry* **2000**, *39*, 40, 12128-12130.
89. Lane, T. W.; Saito, M. A.; George, G. N.; Pickering, I. J.; Prince, R. C.; Morel, F. M. Biochemistry: a cadmium enzyme from a marine diatom. *Nature* **2005**, *435*, 42.
90. Supuran C. T.; Winum J.-Y. Drug Design of Zinc-Enzyme Inhibitors: Functional, Structural, and Disease Applications. Wiley: New York, **2009**.
91. Supuran, C.T.; Scozzafava, A. Applications of carbonic anhydrase inhibitors and activators in therapy. *Expert Opin Ther Patents* **2002**, *12*, 217-242.
92. Breton, S. The cellular physiology of carbonic anhydrases. *JOP* **2001**, *2*, 159-164.
93. Mincione, F.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. The development of topically acting carbonic anhydrase inhibitors as anti-glaucoma agents. *Curr Top Med Chem* **2007**, *7*, 9, 849-854.

Nicolino Pala

Studi sui metalloenzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

-
94. Supuran, C. T. Carbonic anhydrases as drug targets--an overview. *Curr Top Med Chem* **2007**, *7*, 9, 825-833.
95. Scozzafava, A.; Mincione, F.; Menabuoni, L.; Supuran, C. T. Carbonic anhydrase inhibitors: topically acting antiglaucoma sulfonamides incorporating phthaloyl and phthalimido moieties. *Drug Des Discov* **2001** *17*, 4, 337-348.
96. Casini, A.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. Cysteine-modifying agents: a possible approach for effective anticancer and antiviral drugs. *Environ Health Perspect* **2002**, *110*, Suppl 5, 801-806.
97. Poulsen, S. A.; Wilkinson, B. L.; Innocenti, A.; Vullo, D.; Supuran, C. T. Inhibition of human mitochondrial carbonic anhydrases VA and VB with para-(4-phenyltriazole-1-yl)-benzenesulfonamide derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* **2008**, *18*, 16, 4624-4627.
98. Meldrum, N. U.; Roughton, F. J. Carbonic anhydrase. Its preparation and properties. *J Physiol* **1933**, *80*, 2, 113-142.
99. Krebs, H. A. Inhibition of carbonic anhydrase by sulphonamides. *Biochem J* **1948**, *43*, 4, 525-528.
100. Dogne, J. M.; Hanson, J.; Supuran, C.; Pratico, D. Coxibs and cardiovascular side-effects: from light to shadow. *Curr Pharm Des* **2006**, *12*, 8, 971-975.
101. Knudsen, J. F.; Carlsson, U.; Hammarstrom, P.; Sokol, G. H.; Cantilena, L. R. The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib is a potent inhibitor of human carbonic anhydrase II. *Inflammation* **2004**, *28*, 5, 285-290.
102. Walters, W. P.; Matthew, T. S.; Murcko, M. A. Virtual Screening - an overview. *Drug Discovery Today* **1998**, *7*, 17, 903-911.
103. DiMasi, J. A.; Hansen, R. W.; Grabowski, H. G. The price of innovation: new estimates of drug development costs. *J Health Econ* **2003**, *22*, 2, 151-185.
104. Gruneberg, S.; Stubbs, M. T.; Klebe, G. Successful virtual screening for novel inhibitors of human carbonic anhydrase: strategy and experimental confirmation. *J Med Chem* **2002**, *45*, 17, 3588-3602.
105. Vangrevelinghe, E.; Zimmermann, K.; Schoepfer, J.; Portmann, R.; Fabbro, D.; Furet, P. Discovery of a potent and selective protein kinase CK2 inhibitor by high-throughput docking. *J Med Chem* **2003**, *46*, 13, 2656-2662.
106. Jorgensen, W. L. The many roles of computation in drug discovery. *Science* **2004**, *303*, 5665, 1813-1818.
107. Desai, P. V.; Patny, A.; Gut, J.; Rosenthal, P. J.; Tekwani, B.; Srivastava, A.; Avery, M. Identification of novel parasitic cysteine protease inhibitors by use of virtual screening. 2. The available chemical directory. *J Med Chem* **2006**, *49*, 5, 1576-1584.

Nicolino Pala

Studi sui metalloenzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

108. Huang, D.; Luthi, U.; Kolb, P.; Cecchini, M.; Barberis, A.; Caflisch, A. In silico discovery of beta-secretase inhibitors. *J Am Chem Soc* **2006**, *128*, 16, 5436-5443.
109. Brown, S. P.; Muchmore, S. W. High-throughput calculation of protein-ligand binding affinities: modification and adaptation of the MM-PBSA protocol to enterprise grid computing. *J Chem Inf Model* **2006**, *46*, 3, 999-1005.
110. Kolb, P.; Huang, D.; Dey, F.; Caflisch, A. Discovery of kinase inhibitors by high-throughput docking and scoring based on a transferable linear interaction energy model. *J Med Chem* **2008**, *51*, 5, 1179-1188.
111. Kolb, P.; Kipouros, C. B.; Huang, D.; Caflisch, A. Structure-based tailoring of compound libraries for high-throughput screening: discovery of novel EphB4 kinase inhibitors. *Proteins* **2008**, *73*, 1, 11-18.
112. <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>
113. Neamati, N.; Barchi, J. J., Jr. New paradigms in drug design and discovery. *Curr Top Med Chem* **2002**, *2*, 3, 211-227.
114. Chemical Computing Group MOE: Molecular Operating Environment, versions 2007.09 ed.
115. Harvey, J. H.; Trauner, D. Regulating enzymatic activity with a photoswitchable affinity label. *Chembiochem* **2008**, *9*, 2, 191-193.
116. Sadakane, Y.; Hatanaka, Y. Photochemical fishing approaches for identifying target proteins and elucidating the structure of a ligand-binding region using carbene-generating photoreactive probes. *Anal Sci* **2006**, *22*, 2, 209-218.
117. Hatanaka, Y.; Sadakane, Y. Photoaffinity labeling in drug discovery and developments: chemical gateway for entering proteomic frontier. *Curr Top Med Chem* **2002**, *2*, 3, 271-288.
118. Chen, G.; Heim, A.; Riether, D.; Yee, D.; Milgrom, Y.; Gawinowicz, M. A.; Sames, D. Reactivity of functional groups on the protein surface: development of epoxide probes for protein labeling. *J Am Chem Soc* **2003**, *125*, 27, 8130-8133.
119. Dorman, G.; Prestwich, G. D. Using photolabile ligands in drug discovery and development. *Trends Biotechnol* **2000**, *18*, 2, 64-77.
120. Se si inserisce come chiave di ricerca "carbonic anhydrase" in PubMed si ottengono circa 11.000 risultati (Nov. 2009).
121. Wilkinson, B. L.; Bornaghi, L. F.; Houston, T. A.; Innocenti, A.; Vullo, D.; Supuran, C. T.; Poulsen, S. A. Carbonic anhydrase inhibitors: inhibition of isozymes I, II, and IX with triazole-linked O-glycosides of benzene sulfonamides. *J Med Chem* **2007**, *50*, 7, 1651-1657.

122. Wombacher, R.; JaÅsÄschke, A. Probing the Active Site of a Diels,àAlderase Ribozyme by Photoaffinity Cross-Linking. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 27, 8594-8595.
123. Keana, J. F. W.; Cai, S. X. New reagents for photoaffinity labeling: synthesis and photolysis of functionalized perfluorophenyl azides. *The Journal of Organic Chemistry* **2002**, *55*, 11, 3640-3647.
124. Zhao, H.; Neamati, N.; Sunder, S.; Hong, H.; Wang, S.; Milne, G. W.; Pommier, Y.; Burke, T. R., Jr. Hydrazide-containing inhibitors of HIV-1 integrase. *J Med Chem* **1997**, *40*, 6, 937-941.
125. Neamati, N.; Hong, H.; Owen, J. M.; Sunder, S.; Winslow, H. E.; Christensen, J. L.; Zhao, H.; Burke, T. R., Jr.; Milne, G. W.; Pommier, Y. Salicylhydrazine-containing inhibitors of HIV-1 integrase: implication for a selective chelation in the integrase active site. *J Med Chem* **1998**, *41*, 17, 3202-3209.
126. Neamati, N.; Lin, Z.; Karki, R. G.; Orr, A.; Cowansage, K.; Strumberg, D.; Pais, G. C.; Voigt, J. H.; Nicklaus, M. C.; Winslow, H. E.; Zhao, H.; Turpin, J. A.; Yi, J.; Skalka, A. M.; Burke, T. R., Jr.; Pommier, Y. Metal-dependent inhibition of HIV-1 integrase. *J Med Chem* **2002**, *45*, 26, 5661-5670.
127. Hong, H.; Neamati, N.; Wang, S.; Nicklaus, M. C.; Mazumder, A.; Zhao, H.; Burke, T. R., Jr.; Pommier, Y.; Milne, G. W. Discovery of HIV-1 integrase inhibitors by pharmacophore searching. *J Med Chem* **1997**, *40*, 6, 930-936.
128. Yuan, H.; Parrill, A. L. QSAR studies of HIV-1 integrase inhibition. *Bioorg Med Chem* **2002**, *10*, 12, 4169-4183.
129. Mustata, G. I.; Brigo, A.; Briggs, J. M. HIV-1 integrase pharmacophore model derived from diverse classes of inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* **2004**, *14*, 6, 1447-1454.
130. Makhija, M. T.; Kulkarni, V. M. Molecular electrostatic potentials as input for the alignment of HIV-1 integrase inhibitors in 3D QSAR. *J Comput Aided Mol Des* **2001**, *15*, 11, 961-978.
131. Makhija, M. T.; Kulkarni, V. M. Eigen value analysis of HIV-1 integrase inhibitors. *J Chem Inf Comput Sci* **2001**, *41*, 6, 1569-1577.
132. Deng, J.; Lee, K. W.; Sanchez, T.; Cui, M.; Neamati, N.; Briggs, J. M. Dynamic receptor-based pharmacophore model development and its application in designing novel HIV-1 integrase inhibitors. *J Med Chem* **2005**, *48*, 5, 1496-1505.
133. Yuan, H.; Parrill, A. Cluster analysis and three-dimensional QSAR studies of HIV-1 integrase inhibitors. *J Mol Graph Model* **2005**, *23*, 4, 317-328.
134. Plasencia, C.; Dayam, R.; Wang, Q.; Pinski, J.; Burke, T. R., Jr.; Quinn, D. I.; Neamati, N. Discovery and preclinical evaluation of a novel class of small-molecule compounds in

Nicolino Pala

Studi sui metalloenzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

- hormone-dependent and -independent cancer cell lines. *Mol Cancer Ther* **2005**, *4*, 7, 1105-1113.
135. Pala N. *Approccio multidisciplinare nel Drug Design. Studio dell'interazione molecolare con il DNA tramite tecniche computazionali, analisi strutturale retrospettiva, sintesi e attività biologica preliminare di nuovi prototipi eterociclici come DNA-binders e induttori dell'apoptosi*. Tesi di Laurea in Chimica e Tecnologia Farmaceutica, **2006**.
136. Pathak, R. B.; Bahel, C. Synthesis of some N₁-Substituted-3,5-Dimethyl Pirazoles and N₁-Substituted-3-Methyl-5-Pyrazolones and Related Compounds as Potential Fungicides. *J Indian Chem Soc* **1980**, *57*, 1108-1111.
137. Hogale, M. B.; Pawar, B. N. Synthesis and biological activity of N₂-substituted-3-methyl-5-pyrazolones and related compounds. *J Indian Chem Soc* **1989**, *66*, 135-138.
138. Balakrishna Kalluraya; Jancy K. Jhon; B. Shivarama Holla. Studies on the Synthesis and Biological Activity of some 4-(5-aryl-2-furfurylidene)-1,3-disubstituted-2-pyrazolin-5-ones. *J Indian Chem Soc* **1995**, *72*, 99-101.
139. Sechi, M.; Derudas, M.; Dallochio, R.; Dessi, A.; Bacchi, A.; Sannia, L.; Carta, F.; Palomba, M.; Ragab, O.; Chan, C.; Shoemaker, R.; Sei, S.; Dayam, R.; Neamati, N. Design and synthesis of novel indole beta-diketo acid derivatives as HIV-1 integrase inhibitors. *J Med Chem* **2004**, *47*, 21, 5298-5310.
140. Pais, G. C.; Zhang, X.; Marchand, C.; Neamati, N.; Cowansage, K.; Svarovskaia, E. S.; Pathak, V. K.; Tang, Y.; Nicklaus, M.; Pommier, Y.; Burke, T. R., Jr. Structure activity of 3-aryl-1,3-diketo-containing compounds as HIV-1 integrase inhibitors. *J Med Chem* **2002**, *45*, 15, 3184-3194.
141. McKenzie, L.; Hamilton, C. S. The Synthesis of some Substituted Pyrido[3,2-h]Cinnolines. *The Journal of Organic Chemistry* **2002**, *16*, 9, 1414-1416.
142. Jonsson, S.; Andersson, G.; Fex, T.; Fristedt, T.; Hedlund, G.; Jansson, K.; Abramo, L.; Fritzson, I.; Pekarski, O.; Runstrom, A.; Sandin, H.; Thuvesson, I.; Bjork, A. Synthesis and biological evaluation of new 1,2-dihydro-4-hydroxy-2-oxo-3-quinolinecarboxamides for treatment of autoimmune disorders: structure-activity relationship. *J Med Chem* **2004**, *47*, 8, 2075-2088.
143. Lager, E.; Andersson, P.; Nilsson, J.; Pettersson, I.; Nielsen, E. O.; Nielsen, M.; Sterner, O.; Liljefors, T. 4-quinolone derivatives: high-affinity ligands at the benzodiazepine site of brain GABA A receptors. synthesis, pharmacology, and pharmacophore modeling. *J Med Chem* **2006**, *49*, 8, 2526-2533.
144. Gardelli, C.; Nizi, E.; Muraglia, E.; Crescenzi, B.; Ferrara, M.; Orvieto, F.; Pace, P.; Pescatore, G.; Poma, M.; Ferreira Mdel, R.; Scarpelli, R.; Homnick, C. F.; Ikemoto, N.; Alfieri, A.; Verdirame, M.; Bonelli, F.; Paz, O. G.; Taliani, M.; Monteagudo, E.; Pesci,

Nicolino Pala

Studi sui metalloenzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

- S.; Laufer, R.; Felock, P.; Stillmock, K. A.; Hazuda, D.; Rowley, M.; Summa, V. Discovery and synthesis of HIV integrase inhibitors: development of potent and orally bioavailable N-methyl pyrimidones. *J Med Chem* **2007**, *50*, 20, 4953-4975.
145. Summa, V.; Petrocchi, A.; Matassa, V. G.; Taliani, M.; Laufer, R.; De Francesco, R.; Altamura, S.; Pace, P. HCV NS5b RNA-dependent RNA polymerase inhibitors: from alpha,gamma-diketoacids to 4,5-dihydropyrimidine- or 3-methyl-5-hydropyrimidinonecarboxylic acids. Design and synthesis. *J Med Chem* **2004**, *47*, 22, 5336-5339.
146. Kaiser, E.; Gunther, E. P. Alcoholysis of Esters with Aluminum Alcoholates. *J Am Chem Soc* **2002**, *78*, 15, 3841-3843.
147. Yip, K.-T.; Li, J.-H.; Lee, O.-Y.; Yang, D. Aerobic Oxidative Cyclization under Pd(II) Catalysis: A Regioselective Approach to Heterocycles. *Org Lett* **2005**, *7*, 25, 5717-5719.
148. Ornstein, P. L.; Schaus, J. M.; Chambers, J. W.; Huser, D. L.; Leander, J. D.; Wong, D. T.; Paschal, J. W.; Jones, N. D.; Deeter, J. B. Synthesis and pharmacology of a series of 3- and 4-(phosphonoalkyl)pyridine- and -piperidine-2-carboxylic acids. Potent N-methyl-D-aspartate receptor antagonists. *J Med Chem* **1989**, *32*, 4, 827-833.
149. Izumiya, N.; Francis, J. E.; Robertson, A. V.; Witkop, B. Participation of Isolated Double Bonds in the Cleavage of Peptides with N-Bromosuccinimide. *J Am Chem Soc* **2002**, *84*, 9, 1702-1709.
150. Birchall, M.; Haszeldine, R. N.; Jones, M. E. Polyfluoroarenes. Part XVII. Some reactions of pentafluorobenzonitrile. *J Chem Soc C* **1971**, 1343-1348.
151. Robson, P.; Smith, T. A.; Stephens, R.; Tatlow, J. C. Aromatic polyfluoro-compounds. Part XIII. Derivatives of penta- and 2,3,5,6-tetra-fluorothiophenol. *J Chem Soc* **1963**, 3692-3703.
152. Rodenko, B.; Detz, R. J.; Pinas, V. A.; Lambertucci, C.; Brun, R.; Wanner, M. J.; Koomen, G. J. Solid phase synthesis and antiprotozoal evaluation of di- and trisubstituted 5'-carboxamidoadenosine analogues. *Bioorg Med Chem* **2006**, *14*, 5, 1618-1629.
153. Xie, H.; Ng, D.; Savinov, S. N.; Dey, B.; Kwong, P. D.; Wyatt, R.; Smith, A. B., 3rd; Hendrickson, W. A. Structure-activity relationships in the binding of chemically derivatized CD4 to gp120 from human immunodeficiency virus. *J Med Chem* **2007**, *50*, 20, 4898-908.
154. Sechi, M.; Angotzi, G.; Dallochio, R.; Dessi, A.; Carta, F.; Sannia, L.; Mariani, A.; Fiori, S.; Sanchez, T.; Movsessian, L.; Plasencia, C.; Neamati, N. Design and synthesis of novel dihydroxyindole-2-carboxylic acids as HIV-1 integrase inhibitors. *Antivir Chem Chemother* **2004**, *15*, 2, 67-81.

Nicolino Pala

Studi sui metalloenzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari

155. Tanaka, A.; Terasawa, T.; Hagihara, H.; Sakuma, Y.; Ishibe, N.; Sawada, M.; Takasugi, H.; Tanaka, H. Inhibitors of acyl-CoA:cholesterol O-acyltransferase. 2. Identification and structure-activity relationships of a novel series of N-alkyl-N-(heteroaryl-substituted benzyl)-N'-arylureas. *J Med Chem* **1998**, *41*, 13, 2390-2410.
156. Faucher, N.; Ambroise, Y.; Cintrat, J.-C.; Doris, E.; Pillon, F.; Rousseau, B. Highly Chemoselective Hydrogenolysis of Iodoarenes. *The Journal of Organic Chemistry* **2002**, *67*, 3, 932-934.
157. Koo, J. Syntheses in the Indene Series1. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *75*, 8, 2000-2001.
158. Evans, N. A.; Whelan, D. J.; Johns, R. B. Tautomerism in the 5-pyrazolone series : 1(H)-5-pyrazolones and indazolones. *Tetrahedron*, **1965**, *21*, 12, 3351-3361.
159. Coutts, R. T.; Edwards, J. B. The preparation of 9-hydroxypyrazolo[3,4-b]quinolines. *Can J Chem* **1966**, *44*, 17: 2009-2014.

Nicolino Pala

Studi sui metalloenzimi come bersaglio per l'attività farmacobiologica: HIV-1 integrasi e anidrasi carbonica.

Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche; XXII ciclo

Università di Sassari