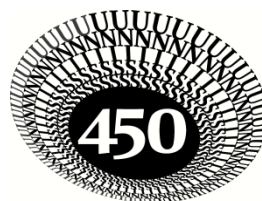




A.D. MDLXII



UNISS

SVSCEPTVM PERFICE MVNVS

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI
FACOLTÀ DI FARMACIA
DIPARTIMENTO SCIENZE DEL FARMACO

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE E TECNOLOGIE CHIMICHE
INDIRIZZO: SCIENZE FARMACEUTICHE
(XXIV CICLO)

SINTESI E VALUTAZIONE DI
SISTEMI AZOTATI TRICICLICI
AROMATICI COME POSSIBILI
AGENTI ANTIVIRALI

Candidato: Dott.ssa Irene Briguglio

Tutor: Prof. Antonio Carta

Direttore: Prof. Giuseppe Baldovino Suffritti

Premessa

Il progetto sviluppato nel corso del mio dottorato di ricerca si inserisce in un più ampio programma portato avanti negli anni presso la Facoltà di Farmacia dell'Università di Sassari dal gruppo del Prof. Giuseppe Paglietti prima e del Prof. Antonio Carta poi, con la collaborazione di diversi ricercatori, quali la Dott.ssa Sandra Piras e la Dott.ssa Paola Corona, che sin da ora ringrazio per aver condiviso con me la loro decennale esperienza.

Un particolare ringraziamento al Prof. Antonio Carta, che mi ha accolto nel suo laboratorio e che negli anni si è dimostrato un tutor attento e partecipe, prodigo di consigli e assolutamente non avaro nell'insegnare e nello spronarmi a migliorare e ad interessarmi sempre a cose nuove.

L'obiettivo principale di questa tesi è dunque quello di indagare la valenza di diversi sistemi azotati tricyclici aromatici quali possibili agenti antivirali, in particolar modo nei confronti dei virus a RNA, quali quelli appartenenti alle

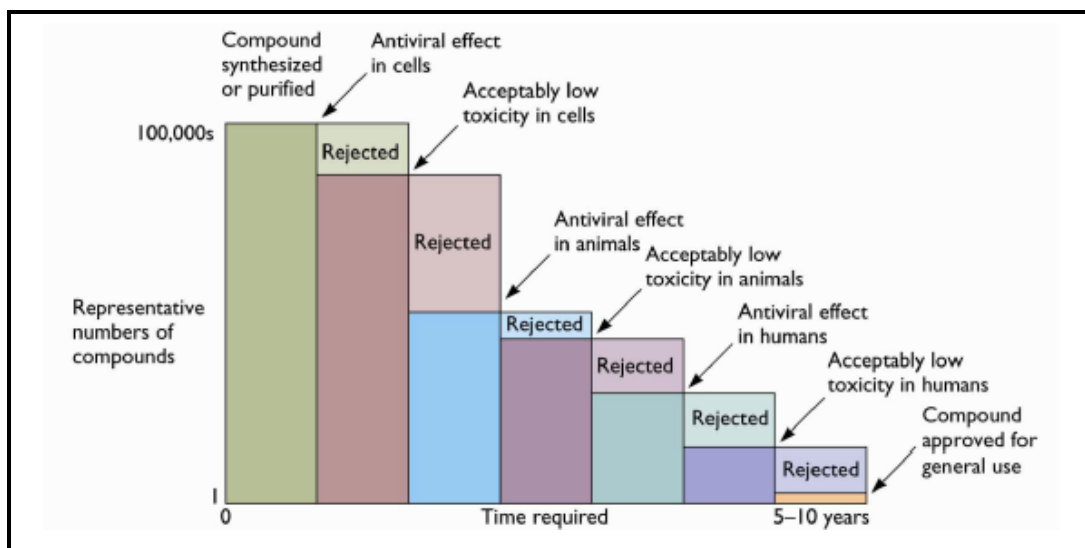


famiglie Flaviviridae, Coronaviridae e Picornaviridae. Fra di essi si trovano gli agenti patogeni responsabili di malattie ad elevato impatto epidemiologico, quali l'HCV (causa dell'Epatite di tipo C), diffusa anche in Europa, ma anche e soprattutto agenti responsabili di malattie caratterizzate da un alto grado di mortalità e molto comuni nei paesi del cosiddetto Terzo Mondo, per le quali attualmente non esiste un adeguato ed efficace trattamento terapeutico. Unica possibilità è rappresentata dai vaccini creati negli anni, ma questi ovviamente possono essere impiegati solo ad uso preventivo e risultano assolutamente inefficaci nel caso di individui già infetti.

L'unica alternativa resta dunque lo sviluppo di nuovi farmaci. Il mercato degli antivirali rimane infatti a tutt'oggi alquanto contenuto, e sebbene molto sia stato fatto negli ultimi 50 anni, solo 60 farmaci sono oggi disponibili, la maggior parte dei quali hanno come target HIV o Herpes virus. Dunque il nostro arsenale farmaceutico resta in questo ambito pericolosamente

limitato. Ciò è dovuto alle numerose difficoltà che si incontrano nelle diverse fasi di sviluppo dei farmaci, sia a livello pratico che teorico. È da ricordare, ad esempio, che molti virus patogeni sono estremamente pericolosi o addirittura mortali per gli operatori se maneggiati nella maniera non adeguata (es. Ebola virus, Lassa fever virus, Smallpox virus). Per alcuni di essi risulta difficile o impossibile allestire adeguate culture in laboratorio (es. Hepatitis B e C virus, Papilloma virus), per altri non sono conosciuti modelli animali della corrispondente malattia umana (es. Smallpox virus, HIV). Inoltre, poiché parliamo di parassiti intracellulari obbligati, è estremamente difficile ottenere una molecola che sia in grado di agire solo ed esclusivamente a livello virale, senza avere effetto secondari, e generalmente avversi, sulla cellula ospite.

Tutto ciò si traduce in un enorme sforzo sintetico che in un lungo arco di tempo può portare alla possibile immissione in commercio di una sola molecola su centinaia di migliaia inizialmente preparate, in un processo il cui costo oscilla intorno ai 200 milioni di dollari.



Lo sforzo richiesto può quindi apparire enorme, ma deve essere sostenuto sia per motivi etici che, più realisticamente, economici. Ricordando in primis che l'Europa negli ultimi anni ha dovuto affrontare patologie praticamente sconosciute e per le quali era impreparata, quale la SARS nel 2003, o l'influenza H1N1 del 2009, esiste in realtà un problema diverso, che con il passare degli anni diviene sempre più pressante sulla società occidentale, ovvero quello delle

Irene Briguglio, *Sintesi e valutazione di sistemi azotati tricyclici aromatici come possibili agenti antivirali*.
Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, indirizzo Scienze Farmaceutiche (XXIV ciclo),
Università degli studi di Sassari.

resistenze farmacologiche. Patologie che si credeva controllabili, o addirittura debellate, oggi infatti si ripropongono in maniera prepotente in una forma mutata e praticamente incurabile con i classici presidi farmacologici attualmente utilizzati. Questo è poi un problema che si presenta soprattutto quando il paziente deve seguire una terapia per una malattia cronica, come nel caso di HCV, HBV, HIV... La notevole efficienza di replicazione e l'elevata frequenza di mutazione del genoma virale rappresentano in questo caso un problema che il chimico farmaceutico dovrebbe affrontare sin dall'inizio della progettazione di un nuovo farmaco, al fine di poterlo successivamente arginare. Purtroppo ad oggi sono stati segnalati casi di mutanti virali che sono resistenti a qualunque trattamento antivirale praticamente in tutto il mondo, e questo deve suonare come un campanello di allarme per tutta la società scientifica.

Il lavoro condotto in questa tesi è per tali motivi focalizzato sullo sviluppo di composti attivi contro virus a RNA, in quanto a tale gruppo appartengono la maggior parte dei virus patogeni per l'uomo. Fra questi ci si è interessati essenzialmente alla famiglia dei Flaviviridae, cui appartiene il virus dell'Epatite C (HCV), ma non solo; le analisi sono state infatti condotte anche su tutta una serie di altri agenti virali, tutti patogeni, per i quali si rende necessario lo sviluppo di strategie terapeutiche innovative ed efficaci.

Tutti i composti presentati sono stati da me sintetizzati presso il Dipartimento di Scienze del Farmaco della Facoltà di Farmacia dell'Università di Sassari, mentre i saggi farmacologici sono stati eseguiti presso il Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche dell'Università di Cagliari, sotto la supervisione del Prof. Paolo la Colla. Gli studi di modellistica molecolare preliminari sono stati da me condotti presso la Facoltà di Ingegneria dell'Università di Trieste, con il coordinamento della Prof.ssa Sabrina Pricl.

1. INTRODUZIONE

1.1 I virus

I virus sono entità non biologiche che necessitano di un organismo ospite, solitamente una cellula eucariotica o un batterio, per poter attivare il loro complesso sistema di riproduzione. Sono dunque responsabili di patologie in organismi appartenenti a tutti i regni biologici, sottolineando che l'infezione virale può non essere produttiva qualora i meccanismi cellulari di difesa riescano ad escludere l'interferenza virale dal ciclo biologico proprio della cellula stessa.

Il parassitismo cellulare obbligato è giustificato dal fatto che i virus sono elementi strutturalmente molto semplici, composti da un involucro esterno di natura proteica (chiamato capside, i cui monomeri proteici sono detti capsomeri) a simmetria variabile, che avvolge e protegge il patrimonio genico, composto da molecole degli acidi nucleici DNA e RNA, mai presenti contemporaneamente.

L'associazione tra genoma e capside forma un complesso indicato con il nome di nucleocapside, dal quale sporgono le proteine (spikes o spicole) necessarie per il riconoscimento recettoriale indispensabile per l'infezione. Questi virus prendono il nome di virus nudi.

Molti virus hanno invece un secondo rivestimento di natura fosfolipidica, derivato dalla membrana cellulare dell'ospite, e per tale motivo vengono definiti rivestiti. Questo involucro, chiamato envelope o peplos, o pericapside, si forma a seguito della sostituzione di una parte di proteine della membrana plasmatica della cellula infetta con proteine virus-codificate, processo cui segue la gemmazione del virione attraverso il tratto membranale così modificato. Il rivestimento dei nuovi virioni avviene dunque attraverso il coinvolgimento di proteine fusogene virus-codificate che da una parte sono legate al nucleo-capside del virus, dall'altra si inseriscono appunto nella membrana plasmatica dell'ospite: a seguito di questa interazione il virione viene avvolto dalla membrana (ora peplos) e rilasciato nello spazio extracellulare (fig. 1A-B).

Questo meccanismo di rilascio del virus è compatibile con la vita della cellula ospite, ed è caratteristico di tutti i virus provvisti di peplos, al contrario del rilascio

di virus sprovvisti di peplos, che implica la lisi cellulare e quindi la morte cellulare [1].

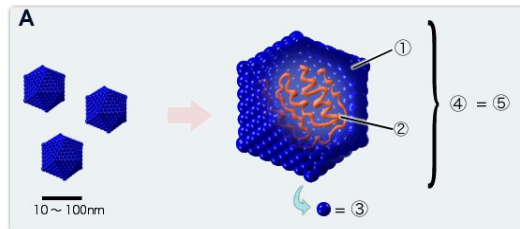


Figura 1A: virus nudo a simmetria icosaedrica. 1) Capside, 2) Acido Nucleico, 3) Capsomero, 4) Nucleocapside, 5) Virione.

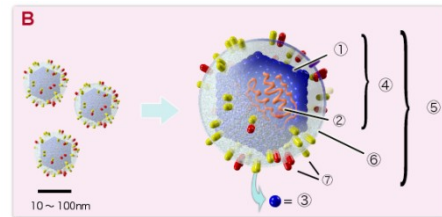


Figura 1B: virus rivestito. 1) Capside, 2) Acido Nucleico, 3) Capsomero, 4) Nucleocapside, 5) Virione, 6) Rivestimento proteico, 7) Rivestimento glicoproteico (spikes).

I virus sono quindi entità talmente semplici da trovarsi sulla linea di confine tra la materia vivente e non vivente. Strutturalmente poveri, essi hanno bisogno dell'appoggio di una cellula ospite per riprodursi, in quanto pur dotati di un programma genetico che permetterebbe loro di guidarne la replicazione, questi non possiedono sistemi enzimatici e strutturali in grado di condurre la duplicazione del cromosoma e di presiedere alle diverse sintesi organiche. La necessità che i virus hanno di sfruttare l'apparato biosintetico cellulare al fine di ottenere la propria replicazione ne giustifica dunque il parassitismo obbligato.

La classificazione dei virus tiene conto di alcuni criteri di varia natura. Per prima cosa se ne osserva la grandezza, espressa generalmente in nanometri (nm), poi si considera il corredo genetico e la sua peculiarità, ovvero se è formato da DNA o RNA, e la tipologia di catena. Infine si tiene conto del bersaglio preferito del virus che può essere, in linea generale, una cellula eucariotica animale, una cellula eucariotica vegetale, un fungo od un batterio.

Attualmente esistono due sistemi di classificazione ufficiali.

La classificazione secondo Baltimore (fig. 2) focalizza l'attenzione su natura (DNA o RNA, a singolo o a doppio filamento), polarità (+ o -) e tipo di replicazione del genoma virale, descrivendo così efficientemente le relazioni obbligatorie tra esso e il suo mRNA. Si identificano sette diverse classi:

- **Classe I:** Virus a DNA a doppio filamento [ds DNA] (*Adeno, Herpes, Papilloma, Polio, Pox*)
- **Classe II:** Virus a RNA a doppio filamento [ss DNA] (*Circo, Parvo*)
- **Classe III:** Virus a RNA a doppio filamento [ds RNA] (*Birna, Reo*)
- **Classe IV:** Virus a RNA a singolo filamento a senso positivo [ss (+) RNA] (*Corona, Flavi*)
- **Classe V:** Virus a RNA a singolo filamento a senso negativo [ss (-) RNA] (*Arena, Filo*)
- **Classe VI:** Virus a RNA a singolo filamento a senso positivo con intermedio DNA [ss (+) RNA](*Retro*)
- **Classe VII:** Virus a DNA a doppio filamento con intermedio RNA [ds DNA] (*Hepadna*)

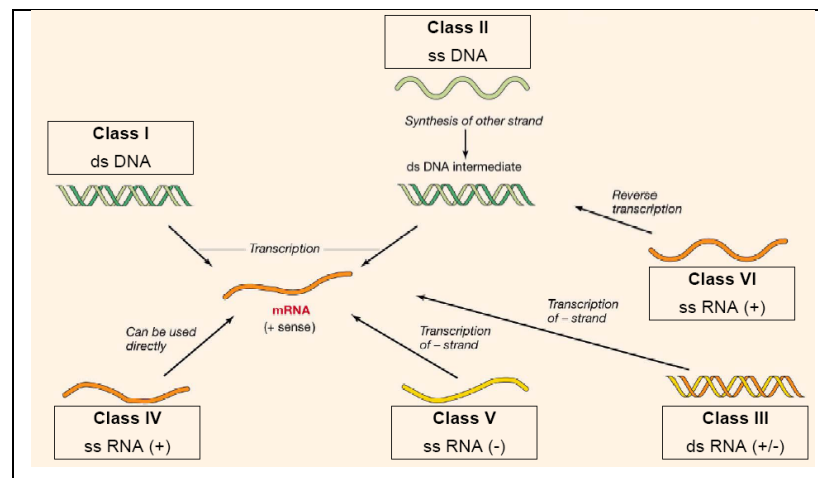


Figura 2: Classificazione secondo Baltimore

La diversità a livello del genoma giustifica dunque le diverse strategie virali nel processo di replicazione del patrimonio genico.

Nel sistema di classificazione “misto” (o Hierarchical virus classification system), invece, i caratteri virali primari (tipologia dell’acido nucleico; simmetria del capsido, presenza o meno dell’envelope) sono associati alle caratteristiche architettoniche del genoma (che definiscono la classe secondo Baltimore) e ad altre proprietà (dimensioni del capsido e del genoma) che contribuiscono alla descrizione delle Famiglie (che portano il suffisso –viridae, mentre i genera portano quello –virus), come mostrato nella figura 3.

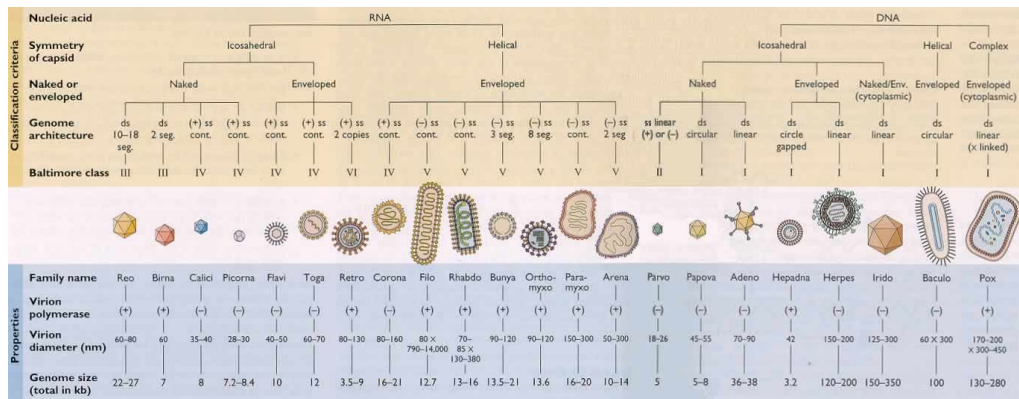


Figura 3: Hierarchical virus classification system

1.2 Ciclo replicativo virale

Come detto prima, il virus necessita di un ospite per potersi riprodurre, purché questi sia compatibile con il corredo genetico virale e possa essere infettato. Non tutti i virus, infatti, possono attaccare diversi ospiti e, ad esempio, classi di virus batteriofagi riescono a penetrare e riprodursi solo in determinati tipi di batteri. La replicazione, dunque, avviene a patto che la cellula parassitata sia **sensibile**, capace cioè di fare esprimere completamente il genoma virale (sensibilità strettamente condizionata dalla presenza di adeguati recettori cellulari che permettono l'attacco del virus alla cellula), e **permissiva**, carattere che dipende da tutti quei meccanismi molecolari-cellulari che risultano adeguati alla completa trascrizione del genoma virale e alla sintesi di tutte le proteine virus-codificate.

L'infezione, però, può avere esiti diversi. Si parla di infezione produttiva quando a seguito della contatto con l'ospite il virione è in grado di portare a buon fine la produzione di una progenie, in numero variabile a seconda del tipo di virus o di cellula. Si può però anche avere un'infezione abortiva (quando ad esempio il virus infettante è difettivo, magari perché mancante di parti essenziali del proprio genoma, o quando la cellula consente l'espressione solo di alcuni geni virali) o infine, di un'infezione restrittiva, che si sviluppa quando le cellule sono permissive solo in una certa fase del loro ciclo vitale. Queste ultime due forme sono estremamente pericolose in quanto possono consentire la persistenza del virus all'interno della cellula ospite in un'infezione latente, in quanto il genoma

virale integrato in quello cellulare in forma episomale è replicato ad ogni ciclo e può riattivarsi qualora le condizioni ambientali diventino favorevoli.

Una volta attaccato l'ospite ed introdotto il proprio genoma, dunque, il virione può controllarne il metabolismo e utilizzarne l'apparato sintetico per la generazione di proteine terze proprie, costituenti che si combineranno in modo da formare i nuovi virioni che, liberati, estenderanno l'infezione ad altre cellule dell'ospite, fino a provocare danni strutturali e funzionali dell'eventuale intero organismo.

Sono cinque i momenti essenziali del ciclo replicativo virale (fig. 4):

ADESIONE: si tratta di un processo di riconoscimento altamente specifico poiché ogni virione possiede, nel suo involucro esterno, complessi proteici, detti anticettori, in grado di interagire con componenti recettoriali specifici della superficie cellulare. Ovviamente i recettori sono strutture che nella cellula svolgono normalmente una funzione fisiologica ben precisa, ma che i virus si sono evolutivamente adattati ad utilizzare ai propri scopi. Inoltre la specificità di questo legame determina il tropismo virale, cioè la proprietà dei virus di infettare prevalentemente (o addirittura esclusivamente) determinate specie animali (o tessuti e organi). Sottolineiamo comunque che l'adsorbimento è un processo che richiede solo una partecipazione passiva della cellula.

PENETRAZIONE: in questa fase è necessario un intervento attivo da parte della cellula e può avvenire in diversi modi:

- **Traslocazione:** l'intero virione oltrepassa la membrana citoplasmatica ed entra come tale nel citoplasma (virus nudi);
- **Endocitosi:** l'adesione del virus sulla membrana ne provoca l'introflessione che trasporta il virus nel citoplasma racchiuso in un vacuolo fagocitario (virus nudi, virus con involucro);
- **Fusione:** l'involucro lipoproteico del virus si fonde con la membrana plasmatica ed il nucleocapside entra nel citoplasma. In alcuni virus (*Paramyxovirus*, *Herpesvirus*) questo processo è facilitato da proteine fusogene (virus con involucro).

DECAPSIDIZZAZIONE O UNCOATING: è l'evento che segue l'entrata del virus nella cellula e che precede la replicazione del genoma, durante il quale il patrimonio

genico virale viene esposto, separandosi dalle proteine che lo rivestono. Il meccanismo con cui ciò avviene non è ben chiaro ed è possibile che lo stesso virus possa seguire vie diverse a seconda delle situazioni e del tipo di cellula ospite. Per molti virus le proteine virali si disaggregano spontaneamente o grazie all'intervento di proteasi cellulari o enzimi lisosomiali che si riversano all'interno dei vacuoli fagocitari (fagolisosomi o virosomi).

La difesa cellulare contro gli attacchi virali si concentra in questa fase in quanto ora possono essere sfruttati una serie di meccanismi di attacco contro l'invasione da parte di acidi nucleici esogeni. La restrizione è uno di essi. Specifici enzimi (detti appunto "di restrizione") ad attività endonucleasica sono infatti in grado di riconoscere particolari siti del DNA o dell'RNA virale (sequenze palindrome a 4, 6 o più basi) sui quali fanno partire un attacco mirato, volto a tagliare in più frammenti l'informazione genica. La cellula ospite, d'altra parte, protegge il proprio corredo genetico mediante la metilazione delle basi sensibili, quelle cioè soggette ad idrolisi enzimatica. Ovviamente alcuni virus riescono a superare i meccanismi di restrizione dell'ospite modificando, a loro volta, il proprio genoma per metilazione o glucosilazione, rendendolo così resistente all'attacco restrittivo. È a seguito del rilascio nell'ambiente citoplasmatico che inizia, per il virus, il periodo di cosiddetta eclissi virale, in cui il virione non è più reperibile nella cellula come entità morfologica, e che terminerà con la maturazione della progenie virale.

REPLICAZIONE DEL GENOMA VIRALE E PRODUZIONE DELLE PROTEINE VIRALI: in questa fase il virus deve introdurre il proprio messaggio genico nel flusso delle informazioni genetiche della cellula infettata sia per ottenerne la replicazione, sia per ottenere la sintesi delle proteine virali necessarie per creare nuovi virioni. Ovviamente questa integrazione determina una trasformazione permanente della cellula sia nella sua morfologia sia nella maniera in cui interagisce con le altre cellule con cui viene a contatto. Avendo già descritto la classificazione virale secondo Baltimore, però, appare chiaro come classi diverse di virus debbano attuare strategie diverse per ottenere la propria replicazione. Per poter sintetizzare le proteine, infatti, è necessario che l'informazione genetica venga trascritta in una

Irene Briguglio, *Sintesi e valutazione di sistemi azotati tricyclici aromatici come possibili agenti antivirali*.
Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, indirizzo Scienze Farmaceutiche (XXIV ciclo),
Università degli studi di Sassari.

molecola di mRNA, che servirà da stampo per la fase di traduzione. Come già detto, le sequenze nucleotidiche virali possono presentare una polarità identica (+) a quella della molecola dell'mRNA e per questo essere direttamente traducibili o, viceversa, presentare una polarità opposta (-) e non essere direttamente traducibili. Ma questo non è il solo problema! I virus possiedono infatti DNA o RNA a singola e doppia elica, ed è vero che utilizzano “in toto” le strutture presenti dentro la cellula, come i ribosomi o i mitocondri. Tali strutture però sono progettate per funzionare all'interno di una cellula sana e non in una infetta. Prendiamo ad esempio l'RNA polimerasi, un enzima altamente specifico capace di lavorare esclusivamente con una doppia elica di DNA.

Se il virus possiede DNA a doppia elica appare evidente che non ci sono problemi nella traduzione, ma se il DNA è a singola elica deve necessariamente essere convertito in DNA a doppia elica per poter sfruttare la DNA polimerasi cellulare. La replicazione del DNA virale per la progenie avviene invece ad opera di enzimi virali neoformati.

Se poi il virus possiede un genoma a RNA, la RNA polimerasi cellulare non funzionerà affatto (in quanto DNA dipendente) e per portare a termine la sintesi proteica è necessario che il virus si affidi ad una RNA polimerasi RNA dipendente (RpRd) di origine virale.

Se il genoma possiede polarità positiva (+)RNA può legarsi direttamente a livello ribosomiale comportandosi da mRNA e portando alla sintesi di diverse proteine, fra cui proprio una RNA polimerasi RNA dipendente necessaria per la duplicazione del genoma. Inoltre il filamento serve da stampo ad una molecola complementare di (-)RNA sintetizzato ad opera di una polimerasi virale, molecola di (-)RNA che a sua volta serve come stampo per la sintesi di molecole di (+)RNA identiche al genoma virale. Le nuove molecole (+)RNA possono a loro volta servire sia da mRNA per la traduzione di altre proteine, sia da genoma per i virus neoformati

Se invece il virus possiede polarità negativa, il genoma non può legarsi direttamente a livello ribosomiale ma deve essere convertito in molecole complementari a polarità positiva ad opera sempre di una RNA polimerasi RNA

dependente associata direttamente al virione. La molecola di (+)RNA servirà poi anche come stampo per la sintesi di molecole di (-)RNA che costituiranno il genoma dei nuovi virioni.

Infine il caso dei retrovirus (o ribovirus a genoma diploide), il cui genoma è costituito da due molecole di RNA lineare a polarità positiva, (+)RNA, legate insieme a formare un dimero. Questo genoma ovviamente non può funzionare da mRNA, e la sua sola funzione è di fungere da stampo per la sintesi di DNA bcatenario. In questo caso è coinvolta una DNA polimerasi RNA dipendente virale, o trascrittasi inversa, che sintetizza filamenti di DNA a partire da RNA. Il nuovo DNA migra poi nel nucleo e si integra nel genoma della cellula ospite (provirus), per mezzo di una integrasi virale. Il DNA integrato può trascrivere una serie di (+)RNA: alcuni sono mRNA per la sintesi di proteine virali, altri formano il genoma della progenie virale.

ASSEMBLAGGIO E RILASCIO DI VIRIONI MATURI: una volta sintetizzati i genomi e le proteine, questi componenti si associano in modo da costituire i nuovi virioni. Le nuove particelle virali a questo punto fuoriescono dalle cellule in cui si sono

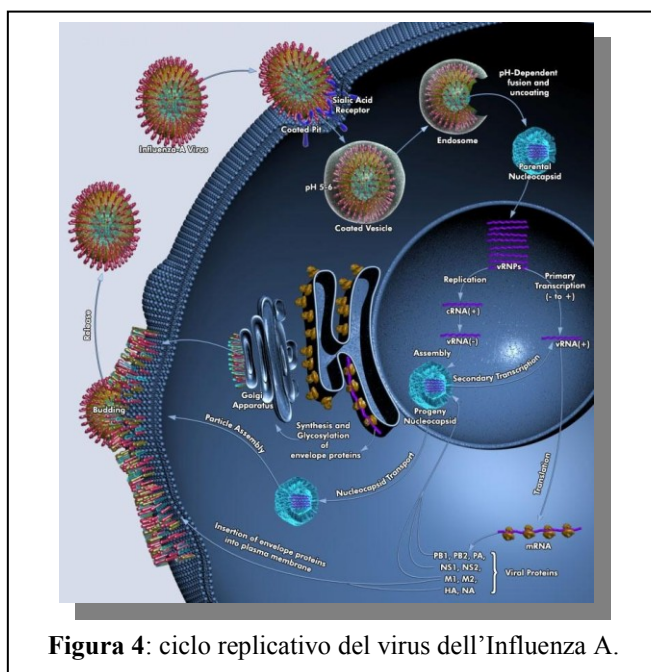


Figura 4: ciclo replicativo del virus dell'Influenza A.

formate al fine di propagare l'infezione. Tale rilascio può avvenire per gemmazione o lisi cellulare.

A questo punto, realizzatasi l'infezione ed avvenuta la diffusione virale, negli organi o tessuti interessati si verificano diversi tipi di lesioni anatomico-funzionali che portano alla manifestazione dell'azione patogena del virus in esame

(per i sintomi clinici si pensi all'influenza, all'herpes, all'epatite, all'AIDS...). Avvenuta la diagnosi si dovrebbe intervenire tempestivamente con un adatto

Irene Briguglio, Sintesi e valutazione di sistemi azotati tricyclici aromatici come possibili agenti antivirali.
Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, indirizzo Scienze Farmaceutiche (XXIV ciclo),
Università degli studi di Sassari.

trattamento farmacologico, sebbene il fatto che i sintomi si possano manifestare quando il danno cellulare è ormai elevato possa inficiare l'efficacia della terapia.

1.3 Patologie virali e loro importanza sociale

Fin dagli albori dell'uomo, le malattie infettive sono state la principale causa di morte, falciando soprattutto i soggetti più deboli, quali i bambini, le puerpere, gli anziani... Anche oggi mantengono saldo questo primato mondiale e soltanto nelle nazioni avanzate la prima causa di morte è rappresentata dalle malattie cardiocircolatorie.

I virus inducono infatti patologie spesso pericolose e fatali. Tra queste la rabbia, le febbri emorragiche, le encefalite, la poliomielite, la febbre gialla, l'epatite e la sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS) sono le più note e studiate. La maggior parte dei virus causa, tuttavia, malattie che in genere provocano solo disturbi acuti, a meno che il paziente non sviluppi gravi complicazioni. Alcune di queste malattie sono il raffreddore, che colpisce milioni di persone ogni anno, l'influenza, il morbillo, la parotite, l'herpes simplex e zoster, la varicella, alcune malattie respiratorie, la diarrea acuta e le verruche. Altri virus, come il virus della rosolia e il citomegalovirus, possono indurre, se contratte all'inizio della gravidanza, teratogenesi o morte del feto.

Le malattie virali devono quindi essere considerate una minaccia da non sottovalutare, anche nei paesi più evoluti. Il rischio di pandemie è sempre presente, basti ricordare l'influenza spagnola (H1N1) che fra il 1918 e il 1919 ha causato all'incirca 100 milioni di morti, con un tasso di mortalità insolitamente alto fra gli adulti ed i giovani sani. E' stata la peggiore pandemia della storia dell'umanità, che in meno di 2 anni si è diffusa in tutto il mondo. Ma non fu l'unica: a seguito di riassortimento genico del virus H1N1 del 1918, nel 1957 apparve l'Influenza Asiatica (H2N2), che causò circa 5 milioni di morti, e da questa nel 1968 l'Influenza di Honk Kong (H3N2), altrettanto mortale. Un simile rischio è oggi sempre più presente se si pensa all'incremento avuto negli ultimi 50 anni dei flussi migratori internazionali. Gli spostamenti di gruppi di popolazione sono infatti un ottimo veicolo per qualunque infezione. Le immigrazioni massicce

Irene Briguglio, *Sintesi e valutazione di sistemi azotati tricyclici aromatici come possibili agenti antivirali*.
Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, indirizzo Scienze Farmaceutiche (XXIV ciclo),
Università degli studi di Sassari.

(spesso in condizioni di clandestinità, quindi di igiene precaria) da un lato e, dall'altro, i viaggi (di lavoro o per turismo) in aree un tempo non accessibili favoriscono infatti il riemergere, nel mondo sviluppato, di infezioni che si pensavano sotto controllo. La ricerca di nuovi antivirali deve dunque divenire prioritaria.

Come detto nell'introduzione, lo sviluppo di composti efficaci per la profilassi e la terapia delle malattie virali ha presentato problemi maggiori di quelli incontrati nella ricerca di farmaci per infezioni sostenute da altri microrganismi, ed un considerevole impulso alla ricerca in questo settore si ebbe solo a partire dagli anni 80, quando si scoprì che l'agente eziologico dell'AIDS era un virus.

Al relativo successo dei farmaci antivirali ha contribuito poi in maniera determinante lo sviluppo della genomica virale, un settore della genetica che si occupa di decifrare la sequenza degli acidi nucleici. Disponendo infatti della sequenza genomica totale, o anche parziale, dell'agente infettivo si possono ricavare molti particolari circa i meccanismi molecolari con cui tale virus provoca una malattia, ed individuare quali fasi del processo siano particolarmente vulnerabili dal punto di vista terapeutico.

Virus	Malattia	Anno del sequenziamento
Poliovirus umano	Poliomielite	1981
Virus dell'influenza A	Influenza	1981
Virus dell'epatite B	Epatite B	1984
Rinovirus umano tipo 14	Raffreddore	1984
HIV-1	AIDS	1985
Papillomavirus umano tipo 16	Cancro della cervice uterina	1985
Virus della dengue tipo 1	Dengue	1987
Virus dell'epatite A	Epatite A	1987
Virus dell'herpes simplex tipo 1	Herpes simplex	1988
Virus dell'epatite C	Epatite C	1990
Citomegalovirus	Infezioni retiniche	1991
Virus del vaiolo	Vaiolo	1992

Virus Ebola	Febbre emorragica Ebola	1993
Virus respiratorio sinciziale	Infezioni respiratorie infantili	1996
Virus umano della parainfluenza 3	Infezioni respiratorie infantili	1998

L'approccio farmacologico si rivela in genere più efficace durante la fase iniziale dell'infezione, prima che il virus abbia avuto il tempo di diffondersi in tutto l'organismo e di provocare i primi sintomi. È in questo stadio che i vaccini si dimostrano utili, proprio perché stimolano il sistema immunitario a distruggere specificamente l'agente patogeno responsabile di quella malattia.

Tradizionalmente i vaccini funzionavano esponendo il paziente all'agente infettivo ucciso o indebolito in modo tale da essere incapace di replicarsi a sufficienza e di provocare la malattia. Oggi l'alternativa più comune sono i cosiddetti vaccini a subunità, che contengono semplici frammenti dell'agente patogeno; questi non possono di per sé scatenare un'infezione, ma se selezionati in maniera appropriata possono indurre una risposta immunitaria protettiva.

Attualmente, la storia delle vaccinazioni ha raggiunto un traguardo importante. In tutto il mondo è scomparso il virus del vaiolo, grazie alle campagne vaccinali a tappeto su tutta la popolazione mondiale. Due campioni del virus esistono ancora, ma blindati in altrettanti laboratori, uno negli Stati Uniti e l'altro nella Repubblica Russa, a scopo di puro archivio biologico. Tuttavia, per molte infezioni virali non sono disponibili vaccini efficaci; pertanto diventano di vitale importanza le strategie terapeutiche alternative.

1.4 I farmaci ad attività antivirale

I farmaci antivirali già in commercio o ancora in fase di sperimentazione agiscono con diversi meccanismi e sono stati progettati e sintetizzati per interagire proprio su fasi specifiche della replicazione virale. Tali farmaci possono essere divisi in base alla loro struttura chimica in tre grandi classi: analoghi dei nucleosidi, analoghi dei nucleotidi e derivati non nucleosidici.

Oppure possono essere classificati in base al loro meccanismo di azione in inibitori della trascrittasi inversa, inibitori della proteasi, inibitori della polimerasi, bloccanti il rivestimento virale, bloccanti il capping dell'mRNA virale, ...

Deve comunque essere evidenziato come, sebbene per alcuni pazienti i trattamenti antivirali costituiscano una cura, purtroppo attualmente per la maggior parte di essi la terapia riesce solo a ridurre la gravità dell'infezione virale.

FARMACO	MECCANISMO D'AZIONE	SPETTRO D'AZIONE
Ribavirina	Probabilmente blocca il capping dell'mRNA virale	RSV, influenza A e B, HCV
Cidofovir	Inibitore della polimerasi virale	CMV, herpes simplex
Amantadina	Blocca il rivestimento virale	Influenza A
Foscarnet	Inibitore della polimerasi virale	Herpesvirus, HIV-1, HBV
Ganciclovir	Inibitore della polimerasi virale	CMV
Acyclovir	Inibitore della polimerasi virale	Herpesvirus
Nevirapina	Inibitore della trascrittasi inversa	HIV-1
Ritonavir	Inibitore di proteasi dell'HIV	HIV-1, HIV-2
Vidarabina	Inibitore della polimerasi virale	Herpesvirus, HBV
Zidovudina (AZT)	Inibitore della trascrittasi inversa	HIV-1, HIV-2, HBV

È dunque evidente che la chiave di volta per lo sviluppo di un nuovo antivirale giace nella selettività della sua azione. Un farmaco di successo deve infatti interferire con una specifica funzione virale (ad esempio un enzima necessario per il suo ciclo vitale) o con una funzione cellulare di cui il virus necessita per replicarsi. In questo ultimo caso tale funzione deve essere cruciale per il virus ma non per la cellula, oppure il farmaco deve essere in grado di uccidere solo la cellula infettata dal virus. Vanno poi affrontati i problemi di farmacocinetica, ed idealmente un farmaco dovrebbero essere idrosolubile, chimicamente e metabolicamente stabile, facilmente assorbibile, ed al contempo non tossico, cancerogeno, mutageno o teratogeno.

Ovviamente l'espansione delle nostre conoscenze sulle strutture e sulla genetica virali ha permesso di sviluppare enormemente la nostra capacità di progettare nuovi farmaci. Le tecniche di drug design e drug discovery si sono infatti rapidamente modificate ed ampliate nelle ultime tre decadi. Per questo motivo i

Irene Briguglio, *Sintesi e valutazione di sistemi azotati tricyclici aromatici come possibili agenti antivirali*.
Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, indirizzo Scienze Farmaceutiche (XXIV ciclo),
Università degli studi di Sassari.

nuovi composti non nascono più semplicemente dall'immaginazione e dalle conoscenze del chimico, ma bensì rappresentano il risultato diretto del dialogo fra chimico e biologo. Il chimico farmaceutico deve quindi essere in grado di comprendere appieno i meccanismi d'azione biochimici dei farmaci in esame, nonché la struttura e la funzione del target, al fine di poter procedere nella fase di sviluppo [2].

2. RNA-VIRUS e OBIETTIVI DELLA TESI

Da alcuni anni un gruppo di ricercatori del Dipartimento di Scienze del Farmaco coordinato dai Proff. Paglietti e Carta partecipa ad un vasto programma di ricerca indirizzato alla scoperta di nuovi farmaci ad attività antivirale. In particolare queste ricerche sono rivolte all'individuazione di molecole capaci di contrastare le infezioni causate da virus a RNA.

A questo gruppo appartengono infatti più di 350 agenti patogeni umani diversi e la maggior parte degli agenti eziologici di malattie emergenti o ri-emergenti. Fra questi ricordiamo i virus della gastroenterite (1 milione di morti all'anno), dell'influenza (≈ 100 milioni di casi), della febbre dengue (300 milioni di casi), gli enterovirus (che causano diversi milioni di casi di meningite ogni anno), il virus dell'epatite C (oltre 150 milioni di soggetti infetti) [3]. Purtroppo ad oggi le risorse terapeutiche e profilattiche contro tali virus sono molto limitate, e stupisce il fatto che, nonostante la loro importanza, la caratterizzazione genomica e strutturale degli RNA virus non sia stata considerata prioritaria se non in tempi recenti.

Gli RNA virus di interesse clinico possono essere distinti in tre grandi gruppi a seconda della natura del genoma, come riportato in Figura 5.

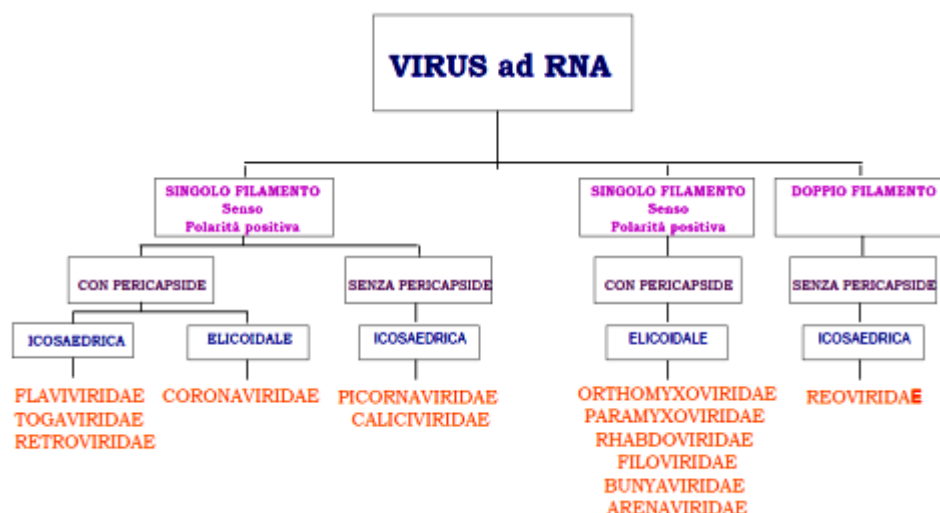


Figura 5: classificazione dei virus a RNA

Virus a singolo filamento a polarità positiva. Fra questi la famiglia dei Flaviviridae, che include più di 75 virus patogeni per i mammiferi, fra cui importanti agenti emergenti come i virus Yellow fever, Dengue, Hepatitis C... Questa è sicuramente una delle famiglie più studiate, la cui caratterizzazione genomica è attualmente ben sviluppata. Vanno inoltre ricordate le famiglie delle Picornaviridae e dei Coronaviridae, che contengono patogeni in grado di superare le barriere animale-uomo. Per quel che riguarda le strategie di replicazione, questi virus non hanno inizialmente bisogno di trascrivere il proprio genoma perché il loro RNA può essere subito utilizzato per la trascrizione a livello ribosomale. Tuttavia, mentre nei Picornavirus e nei Flavivirus il prodotto della traduzione è un'unica poliproteina che viene successivamente scissa nelle varie proteine codificate per opera di proteasi virali, nei Coronavirus viene prima tradotto un tratto del genoma all'estremità 5', che codifica per proteine funzionali, e dopo la replicazione del genoma vengono prodotti mRNA sub-genomici per le proteine strutturali corrispondenti all'estremità 3'.

Virus a singolo filamento a polarità negativa. Fra questi ricordiamo la famiglia delle Arenaviridae, che comprende agenti responsabili di severe forme di febbre emorragica, che potrebbero essere utilizzate per bio-terrorismo. In questo caso il genoma non può funzionare come mRNA, ma ha una doppia funzione di stampo,

Irene Briguglio, *Sintesi e valutazione di sistemi azotati tricyclici aromatici come possibili agenti antivirali.*
Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, indirizzo Scienze Farmaceutiche (XXIV ciclo),
Università degli studi di Sassari.

in quanto viene usato sia per la trascrizione dei messaggeri che per la propria replicazione (sintesi di un intermedio di (+)RNA). La trascrizione avviene grazie ad una trascrittasi virale presente nel virione, e la nuova molecola di RNA a polarità positiva viene usata come stampo per la sintesi di (-)RNA che costituirà il genoma dei nuovi virioni.

Virus a doppio filamento. Solo la famiglia dei Reoviridae contempla patogeni umani.

La nostra attenzione si è focalizzata sulla famiglia delle Flaviviridae, vista la loro crescente importanza come patogeni umani ed animali. Questa famiglia comprende tre generi principali (più due gruppi di virus, i GBV-A e i GBV-C, che aspettano una formale classificazione):

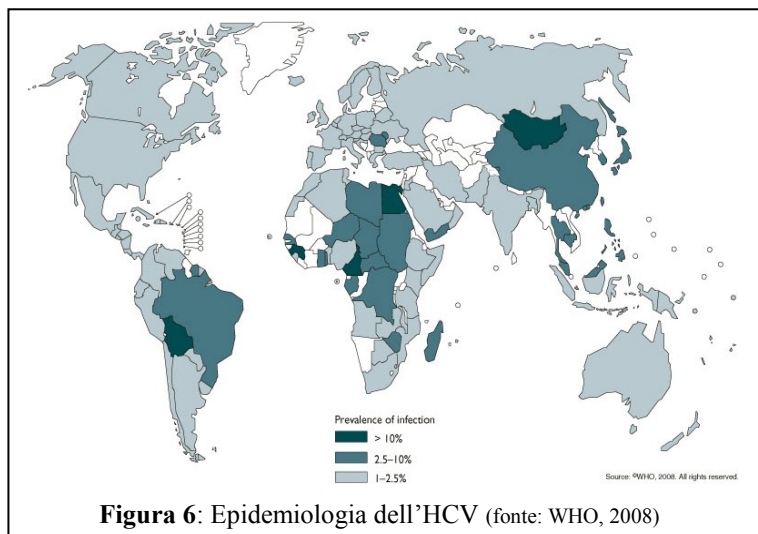
- **genus Flavivirus:** comprende più di 70 virus, molti dei quali patogeni umani che causano diversi tipi di malattie, quali encefaliti e febbri emorragiche. Di importanza mondiale sono il Dengue virus (DENV), cui è associata la febbre emorragica dengue (DHF) e la dengue shock syndrome (DSS), il Japanese encephalitis virus (JEV), il West Nile virus (WNV), lo Yellow Fever virus (YFV) e il Tick-Borne Encephalitis virus (TBEV). Lo YFV è endemico dell'Africa centrale ed occidentale a sud del Sahara, mentre il DENV è endemico in gran parte del Sud-Est Asiatico, in Africa, in America Centrale e Meridionale, in Oceania. La mortalità per febbre gialla nelle regioni endemiche si aggira abitualmente intorno al 5%, ma nelle manifestazioni epidemiche può arrivare, negli adulti, al 50%. La letalità della Dengue nei casi non trattati o trattati in modo improprio può arrivare al 40-50%, mentre nei casi trattati adeguatamente è inferiore al 2%. Il primo vaccino attenuato sviluppato nei confronti di un Flavivirus, YFV strain 17D [4], permise a Max Theiler di ottenere il premio Nobel nel 1951, ma a tutt'oggi esistono pochissimi vaccini efficaci su virus appartenenti a questa famiglia. Ricordiamo i vaccini attenuati per TBEV e JEV per uso umano, ed il WNV attenuato per uso animale [5].

- **genus Pestivirus:** si tratta di patogeni animali estremamente importanti a livello economico per quel che riguarda l'industria agro-alimentare. Questo genus comprende il virus della peste bovina (bovine viral diarrhoea virus o BVDV), il virus della peste suina (classical swine fever virus o CSFV), ed il border disease virus (BDV) delle pecore [6]. In particolare al BVDV è dovuto il complesso di patologie noto come Diarrea Virale Bovina – Malattia delle Mucose (BVD-MD). Questa è una malattia a diffusione cosmopolita responsabile di ridotta fertilità, malformazioni congenite, ritardi di accrescimento e decessi negli allevamenti bovini colpiti. Un ruolo cardine per il mantenimento dell'infezione è svolto dai soggetti persistentemente infetti (PI), animali cioè capaci di eliminare il virus per tutta la durata della loro vita. Studi condotti recentemente in tutto il mondo hanno cercato di quantificare il danno economico arrecato dalla presenza di soggetti PI in allevamento. In Europa si stima che la presenza di un singolo soggetto PI determini una perdita nell'allevamento fra i 21 e i 135 € per capo. La perdita raggiunge i 340 € per gli stipiti ad elevata virulenza [7]. La precoce individuazione dei PI con metodi sensibili e specifici è fondamentale per il successo dei piani di controllo.
- **genus Hepacivirus:** comprende i GB virus B ma soprattutto l' Hepatitis C virus (HCV), che rappresenta il maggiore responsabile di epatiti nell'uomo.

Il nostro gruppo ha quindi focalizzato la propria attenzione sul virus HCV, considerando che l'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO) valuta che oltre 170 milioni di persone universalmente attualmente presentino tale infezione.

2.1 L'epatite C

Con il termine di epatite virale s'intende un'inflammazione delle cellule epatiche causata da virus che si moltiplicano all'interno del fegato. Attualmente sono noti sei tipi di virus molto diversi tra loro per forma, dimensione e caratteristiche genetiche. A seconda dell'agente eziologico le epatiti si classificano come A, B, C, D, E e G, mentre le forme più diffuse sono i tipi A, B e C [8]. Il virus HCV è in particolare responsabile della maggior parte di epatiti acute e croniche ed è probabilmente il più pericoloso, sia per la gravità delle sue ripercussioni a lungo termine, sia perché non esiste un vaccino capace di prevenirne il contagio (disponibile invece per le epatiti A e B). Identificato per la prima volta nel 1989 dai ricercatori del gruppo Chiron grazie a tecniche di clonazione del cDNA derivato dal plasma di scimpanzé infettato [9], oggi HCV è classificato in 6 genotipi maggiori, che differiscono per più del 30% a livello nucleotidico, e oltre 90 sottotipi [10]. I genotipi HCV differiscono per distribuzione mondiale, modalità di trasmissione e decorso patologico. Il genotipo 1 è sicuramente il più comune, ma è soprattutto il più difficile da trattare con le attuali terapie [11]. In Italia il genotipo prevalente è l'1b, che infetta il 55% dei pazienti affetti da HCV. La trasmissione può avvenire per via parenterale apparente (trasfusioni di sangue o emoderivati, anche se l'introduzione, nel 1990, di controlli accurati sul sangue destinato ad essere trasfuso ha ridotto sensibilmente tale rischio [12]) o inapparente (per via percutanea). La modalità di trasmissione che ha maggiormente contribuito alla diffusione dell'infezione su ampia scala è stata quella per via percutanea, prevalentemente negli anni '60-'70, con l'uso di strumenti non perfettamente sterilizzati e impiegati consecutivamente per più pazienti durante pratiche di chirurgia ambulatoriale, quali cure odontoiatriche, agopuntura... Oggi il medesimo rischio si ripropone col diffondersi di pratiche quali l'esecuzione di cure estetiche (manicure e pedicure) con strumentario non personalizzato, i tatuaggi, il piercing e ogni altra procedura invasiva con strumenti non monouso. La trasmissione sessuale e materno-fetale, invece, sono infrequenti (< 3 %, al contrario di ciò che accade per l'HBV).



L'epatite C è purtroppo una malattia subdola in quanto una volta avvenuta l'infezione, questa resta spesso asintomatica, soprattutto negli stadi iniziali. Quando presente, la

sintomatologia è piuttosto vaga e perlopiù limitata alla comparsa di nausea, mancanza di appetito, affaticamento fisico, dolori addominali. In assenza di cura, la maggior parte delle infezioni da epatite C cronicizza (80% dei casi), minando, a poco a poco, la salute del fegato. Anche in questo caso, il paziente può sentirsi bene e non avvertire disturbi particolari, addirittura per 10-30 anni. Purtroppo il 30% di questi pazienti infettati cronicamente vedrà l'evoluzione della patologia in cirrosi epatica, che si accompagna a sintomi importanti, come l'ittero (colorazione giallastra della pelle e degli occhi), ascite (aumento di volume dell'addome), prurito, piastrinopenia associata ad alterazioni della coagulazione e facili sanguinamenti (ecchimosi e petecchie). Infine la cirrosi predispone a malattie quali l'insufficienza epatica ed l'epatocarcinoma, tanto da rappresentare oggi la maggior causa di trapianto di fegato negli Stati Uniti [13]

Purtroppo attualmente non esistono farmaci veramente efficaci per la cura dell'epatite cronica, in quanto solo circa il 40% dei pazienti trattati sviluppa una risposta sostenuta nel tempo (SVR), né vaccini per la prevenzione del tipo C.

2.2 Epidemiologia

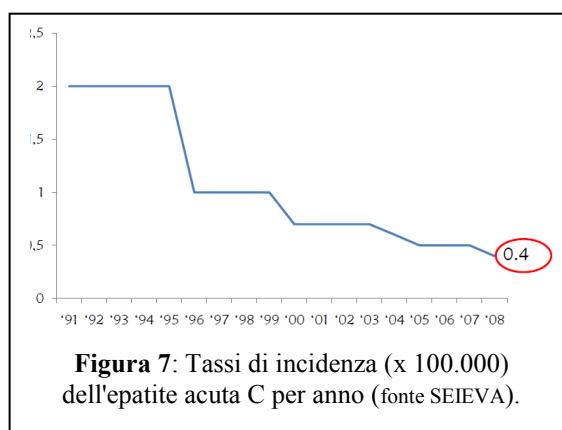
Secondo i dati dell' Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), si calcola che circa il 2.5% della popolazione mondiale abbia contratto l'infezione e che circa 160 milioni di persone siano portatori del virus senza saperlo (figura 6) [14]. Negli USA l'epatite C è ritenuta responsabile di oltre un quarto (circa 12.000

all'anno) dei decessi per malattia cronica del fegato, e costituisce comunque l'indicazione più frequente per il trapianto di fegato [15].

L'OMS ha inoltre calcolato che ogni anno si registrano 3-4 milioni di nuovi casi di epatite C. Tali dati potrebbero rappresentare una sottostima del reale quadro epidemiologico globale dell'epatite C, in quanto chi contrae l'infezione può non manifestare anche per molti anni alcun segno della malattia. Negli ultimi 20 anni in Occidente l'incidenza dell'infezione da HCV è notevolmente diminuita soprattutto grazie ad un maggior controllo sulle donazioni e trasfusioni di sangue e per il miglioramento delle condizioni sanitarie. Resta il problema dell'assunzione di droghe per via endovenosa (diventato in Europa il principale fattore di rischio per la trasmissione di HCV) e dell'immigrazione irregolare e non controllata di persone che vivono in aree ad elevata distribuzione del virus.

Nel nostro Paese la percentuale di soggetti infettati dall'HCV è di circa il 2% della popolazione, con un gradiente che aumenta dal Nord verso il Sud e le isole e con l'età (il 60% dei pazienti con epatite C è ultrasessantacinquenne). Secondo le stime, in Italia oggi gli ammalati di epatite C sono circa 1 milione. Nel 2004 il Sistema Epidemiologico Integrato dell'Epatite Virale Acuta (SEIEVA) ha registrato 0,5 nuovi casi di infezione ogni 100.000 abitanti, con un tasso di mortalità dovuta all'infezione acuta dello 0,23% nel periodo 1997-2004. Il tasso di incidenza è però in costante calo e nel 2008 ha raggiunto il minimo storico di 0,4 (fig. 7) [16].

In Italia l'HCV, da solo o in combinazione con altri fattori quali alcol o virus dell'epatite B, è il maggior responsabile di cirrosi (72%, quinta causa di morte con 10.000 decessi all'anno) e di tumore del fegato (76%). Purtroppo il nostro Paese detiene il triste primato europeo per la prevalenza delle malattie epatiche ed è ai primi posti per i trapianti di fegato.



2.3 L'infezione

Quando particelle virali dell'HCV presenti in circolo raggiungono le cellule suscettibili, in particolare gli epatociti, si legano ad un complesso recettoriale specifico che facilita l'ingresso del virus nella cellula. Fra questi importante sono il componente CD81, appartenente alla famiglia delle tetraspanine, che si lega saldamente alla glicoproteina virale E2, ed il recettore scavenger classe B di tipo I (SR-BI) [17-19].

In particolare il recettore CD81 è espresso da molti tipi cellulari, ma ad eccezione degli epatociti, le cellule esprimenti associano ad esso un'altra proteina, chiamata EWI-2wint (figura 8), la quale previene il riconoscimento del recettore CD81 da parte del virus HCV, impedendo di fatto la penetrazione virale [20].

A seguito di questa interazione il virus penetra nella cellula per endocitosi, perde il

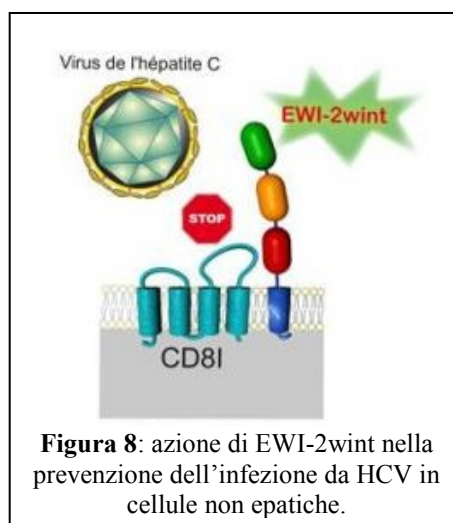


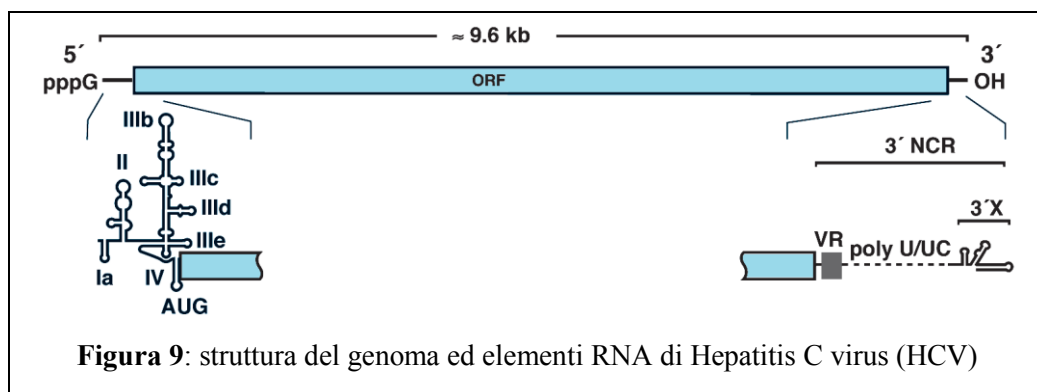
Figura 8: azione di EWI-2wint nella prevenzione dell'infezione da HCV in cellule non epatiche.

rivestimento lipoproteico e libera nell'ambiente citoplasmatico il proprio RNA. Il genoma virale si comporta quindi come un mRNA e viene utilizzato come stampo a livello ribosomale.

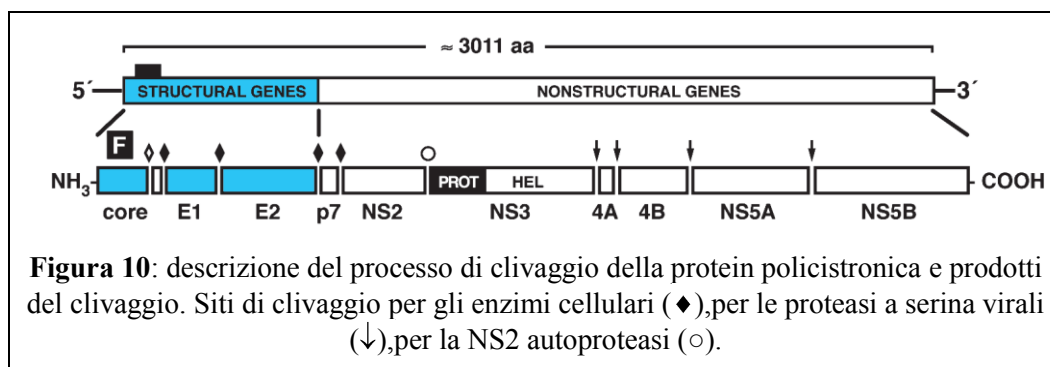
Più precisamente ricordiamo che l'organizzazione genomica dell'HCV è costituita da una catena singola di RNA a polarità positiva che inizia in posizione 5' terminale con una regione non codificante (5'NTR) seguita da un'unica e lunga sequenza di lettura (ORF) che termina in prossimità della posizione 3' finale non codificante (3'NTR), come riportato in figura 9. Il lungo ORF codifica una proteina policistronica che solo successivamente viene processata in una serie di prodotti distinti.

L'inizio della trascrizione dell'ORF dell'HCV non richiede una struttura cap all'estremità 5', ma è diretto da un segmento di RNA di 341 nucleotidi che si trova nella 5'NTR. Questa regione, altamente conservata e quindi probabilmente fondamentale per la replicazione virale, funziona come sito interno d'entrata dei

ribosomi (IRES) e permette il legame diretto dei ribosomi in prossimità del codone d'inizio dell'ORF [21]. La 3'NTR, invece, ha una struttura tripartita composta da una sequenza variabile di circa 40 nucleotidi a valle del codone di stop dell'ORF, un tratto interno di poliU di lunghezza eterogenea ed una sequenza altamente conservata di 98 nucleotidi essenziale per la replicazione in vivo, in particolare per l'inizio della sintesi del filamento negativo [22].



È dunque a livello ribosomale che avviene la traduzione del genoma di HCV in una proteina policistronica che solo co- e post-trascrizionalmente viene processata in dieci prodotti differenti, strutturali e non, ad opera di proteasi sia virali che cellulari. In particolare, come si può vedere dalla figura 10, la regione C-NS2 è processata da peptidasi dell'ospite, che “clivano” a livello delle giunzioni C/E1, E1/E2, E2/p7, p7/NS2, mentre la regione NS3-NS5B viene processata da proteasi virali a serina senza un preciso ordine di clivaggio: NS3/4A, NS5A/B, NS4A/B, NS4B/5A. Infine, il processamento tra NS2 e NS3 è compiuto dalla NS2-3 proteasi in una rapida reazione intramolecolare.



A livello N-terminale vengono dunque codificate le seguenti proteine strutturali virali:

- la proteina Core o Capside [23], che forma il nucleocapside ma sembra svolgere anche altre funzioni come la modulazione di parecchi processi cellulari in cellule di origine epatocitaria e fibroblastica [24-25]
- le proteine dell'envelope E1 ed E2, considerate proteine transmembrana di tipo I glicosilate, con un ectodominio al NH₂-terminale e una regione idrofobica d'ancoraggio al COOH-terminale.
- la proteina p7, un polipeptide altamente idrofobico con probabile funzione di canale ionico (viroporina) con funzione sconosciuta, ma essenziale per l'infettività di HCV in vitro [26]

La maggior parte dell'ORF codifica invece per varie proteine non strutturali, la maggior parte delle quali (NS2-5B) sono necessarie per la replicazione dell'RNA virale:

Complesso NS2-NS3: assieme le due proteine costituiscono un complesso metallo proteasico Zn-dipendente ad attività auto catalitica, in quanto catalizza il clivaggio al sito NS2-3. Tale taglio viene operato grazie all'attività della proteina NS2, il cui dominio C-terminale (aa 907 - 1026) presenta un sito attivo contenente residui amminoacidici (His-952, Glu-972, e Cys- 993) tipici di una cisteina proteasi, e la cui unica funzione nota è proprio quella del clivaggio sulla giunzione NS2/3 [27-30].

Proteina NS3: si tratta di una proteina polifunzionale contenente da una parte un dominio N-terminale ad attività serina-proteasica responsabile del processamento a livello dei siti NS3/4A, NS4A/B, NS4B/5A e NS5A/B, dall'altra un dominio C-terminale ad attività di NTPasi/elicasa, essenziale per la trascrizione e la replicazione del genoma di HCV [28, 31]

Proteina NS4A e NS4B: mentre NS4B è una proteina idrofobica la cui funzione è tuttora sconosciuta, NS4A è un co-fattore essenziale per la proteasi NS3, necessaria inoltre per l'efficienza del processamento della proteina policistronica virale [32-33].

Proteina NS5A: è una proteina altamente fosforilata il cui ruolo nella replicazione virale non è stato ancora scoperto, ma analogie con altri virus ad RNA, dove le fosfoproteine sono importanti regolatori della replicazione, farebbero assumere che giochi un ruolo simile anche nell'HCV [34].

Proteina NS5B: è il più importante enzima nella replicazione dell'HCV, identificato nel ruolo di RNA polimerasi-RNA dipendente (RdRp) [35-36], in quanto gioca un ruolo fondamentale nella catalizzazione della sintesi del filamento negativo e positivo dell'RNA [37]. Ricordiamo infatti che la replicazione del genoma virale avviene a livello citoplasmatico procedendo attraverso un intermedio a RNA a polarità negativa (detto intermedio di replicazione) prodotto dalla NS5B e che funziona come stampo per produrre nuove molecole di RNA a polarità positiva. Queste nuove molecole ad RNA positivo potranno essere a turno utilizzate per la sintesi di nuovi filamenti negativi, per l'espressione della poliproteina o per l'impacchettamento all'interno della progenie virale [38].

All'interno della cellula infettata avviene quindi sia la replicazione del genoma virale che la sintesi delle proteine strutturali necessarie per la creazione di nuove particelle virali. Quando tutto è pronto avviene l'assemblaggio degli elementi: i nuovi virioni si rivestono di un strato lipidico superficiale e vengono liberati dalla cellula infetta. L'assemblaggio delle particelle virali di HCV non è mai stato studiato dettagliatamente a causa della mancanza di adeguati modelli in vitro. Tuttavia si ipotizza che avvenga con un'elevata efficienza e si calcola che un ammalato di epatite C produca sino a 1.000 miliardi di particelle virali al giorno, con un'emivita di 2-3 ore [39]!

Irene Briguglio, *Sintesi e valutazione di sistemi azotati tricyclici aromatici come possibili agenti antivirali*.
Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, indirizzo Scienze Farmaceutiche (XXIV ciclo),
Università degli studi di Sassari.

2.4 La terapia

Come detto sin dall'inizio, attualmente nel mondo circa 170 milioni di persone sono portatori di infezione da HCV, e negli USA circa 4 milioni di persone manifestano ora i sintomi della malattia. Questo non dipende da nuove infezioni, che anzi sono diminuite dell'80% nell'ultima decade, soprattutto grazie ai severi controlli sui prelievi e le trasfusioni di sangue, ma dipende dall'evoluzione patologica dell'infezione estremamente lenta. L'epatite evolve dunque in maniera asintomatica per lungo tempo (10-30 anni), e per questo le persone colpite non sono individuate fino a quando la malattia non è in una fase avanzata. Solo in epoca recente, dunque, un numero sempre maggiore di quaranta-cinquantenni apprende di avere un'infezione da HCV contratta in età giovanile. A causa di ciò la mortalità annuale (circa 10.000 vittime negli USA), dovrebbe aumentare secondo le stime nella prossima decade fino a 30.000 l'anno (con un costo sociale di circa 11 miliardi di dollari), per poi declinare [40]. Appare quindi evidente che i problemi sanitari e sociali associati a questa patologia diverranno sempre più significativi, soprattutto in assenza di un adeguato trattamento farmacologico dei pazienti.

Da un punto di vista terapeutico il primo agente utilizzato ad aver dimostrato una parziale efficacia è stato l'interferone α , una proteina naturale presente nell'organismo umano. Citochina, coinvolta nel processo di immunità naturale, l'interferone agisce inducendo a livello cellulare uno stato di resistenza transitoria contro l'infezione di una vasta gamma di agenti virali, fra cui HCV. Fra i meccanismi indotti abbiamo la trascrizione di proteine ad attività enzimatica quali la 2',5'-oligoadenil-sintetasi e la proteinchinasi P1. La prima attiva la ribonucleasi L che degrada l'RNA virale e rende inadeguato l'RNA messaggero cellulare per la replicazione del virus, mentre la seconda blocca l'inizio della sintesi della catena polipeptidica virale.

Utilizzato in monoterapia come tale, l'interferone α deve essere somministrato per via sottocutanea per 3 volte alla settimana a causa della sua breve emivita (4 ore). Per questo motivo è stato sottoposto a pegilazione al fine di allungarne l'emivita. Sono attualmente in commercio due forme di interferone pegilato:

Irene Briguglio, *Sintesi e valutazione di sistemi azotati tricyclici aromatici come possibili agenti antivirali*.
Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, indirizzo Scienze Farmaceutiche (XXIV ciclo),
Università degli studi di Sassari.

- a) PegInterferone α -2a (*Pegasys*), costituito da una catena di polietilenglicole di 40 kD legata all'Interferone mediante un legame stabile, con un'emivita di 50-150 ore.

- b) PegInterferone α -2b (*PegIntron*), costituito da una catena di polietilenglicole di 12 kD legata all'Interferone mediante un legame instabile all'Interferone, con un'emivita di circa 40 ore.

Grazie alla loro lunga emivita i PegInterferoni richiedono una sola somministrazione alla settimana per via sottocutanea, migliorando sicuramente la compliance da parte del paziente ma soprattutto migliorandone l'efficacia. La durata del trattamento in monoterapia è di 48 settimane, ed in pazienti mai trattati induce una risposta virologica sostenuta (SVR, definita come negatività all'RNA del virus dell'epatite C cronica, 6 mesi dopo il trattamento) del 38% [42], la maggior parte dei quali vanno incontro ad un lungo periodo (circa 6 anni) privo di recidive. Purtroppo però più della metà dei pazienti che inizialmente rispondono al trattamento in monoterapia recidivano entro 6 mesi dalla cessazione della terapia, andando incontro anche al problema della resistenza farmacologica.

Inoltre è da sottolineare il fatto che la terapia con Interferone α non è ben tollerata nella maggior parte dei pazienti. Dopo ogni iniezione sono comuni sintomi simil-influenzali, mentre circa la metà delle persone presenta debolezza, cefalea, piressia, mialgia, insonnia e/o nausea. Infine un quarto dei pazienti soffre di perdita di capelli, artralgia, brividi, irritabilità, prurito, dermatite, riduzione dell'appetito e soprattutto depressione. Sono soprattutto i sintomi psichiatrici ad indurre il paziente a sospendere il trattamento, con un dropout che varia dal 7 al 14%.

Dal 1998 all'Interferone α è stato accoppiato l'impiego di un altro farmaco ad attività antivirale, la Ribavirina. Analogo nucleosidico con ampio spettro di attività contro i virus ad RNA, la ribavirina da sola non ha alcun effetto sull'HCV, ma in combinazione con l'interferone- α ha mostrato un effetto enhancer (favorente), inducendo in pazienti mai trattati una SVR del 56% [42], quasi

Irene Briguglio, *Sintesi e valutazione di sistemi azotati tricyclici aromatici come possibili agenti antivirali*.
Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, indirizzo Scienze Farmaceutiche (XXIV ciclo),
Università degli studi di Sassari.

raddoppiando il numero dei successi rispetto alla monoterapia. La durata del trattamento con la terapia di combinazione è di 24 settimane per le persone infettate con genotipi 2/3 e di 48 settimane per coloro che sono infettati con genotipo 1 di HCV. Purtroppo anche questo trattamento è scarsamente tollerato, e gli effetti indesiderati sono simili nel tipo e nella frequenza a quelli della monoterapia [43]. In più i pazienti trattati con Ribavirina devono essere monitorati con continuità per la possibile insorgenza di anemia emolitica. Per questo motivo l'interruzione del trattamento è più frequente (10-20%) nella terapia di combinazione che nella monoterapia.

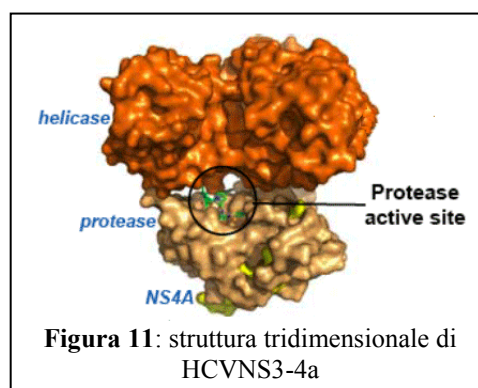
Per quel che riguarda il successo terapeutico, possiamo dire che approssimativamente il 20-50% dei pazienti non rispondono agli attuali trattamenti farmacologici o vanno rapidamente incontro a recidive. Sono molti i fattori che influenzano l'efficacia del trattamento di combinazione, fra cui ricordiamo la carica virale, l'età del paziente, il periodo intercorso fra infezione e trattamento, i livelli di ALT prima della terapia, ma soprattutto il genotipo di HCV. Gli studi rilevano una guarigione di oltre l'80% per i genotipi 2 o 3 e di circa il 40% per il genotipo 1, che rappresenta purtroppo quello più diffuso ma al contempo il fattore virale maggiormente non responsivo.

Avendo visto le limitazioni dell'attuale terapia per l'epatite C appare chiara l'esigenza di ottenere nuovi derivati caratterizzati da una buona attività anti-HCV. La ricerca è attualmente orientata all'individuazione di nuovi composti che implementino il nostro arsenale farmacologico identificando molecole in grado di migliorare l'efficacia della terapia di combinazione nei confronti di HCV genotipo 1 e di diminuire il periodo di trattamento (permettendo al paziente di sopportarne per un minore lasso di tempo gli effetti collaterali e diminuendone il dropout).

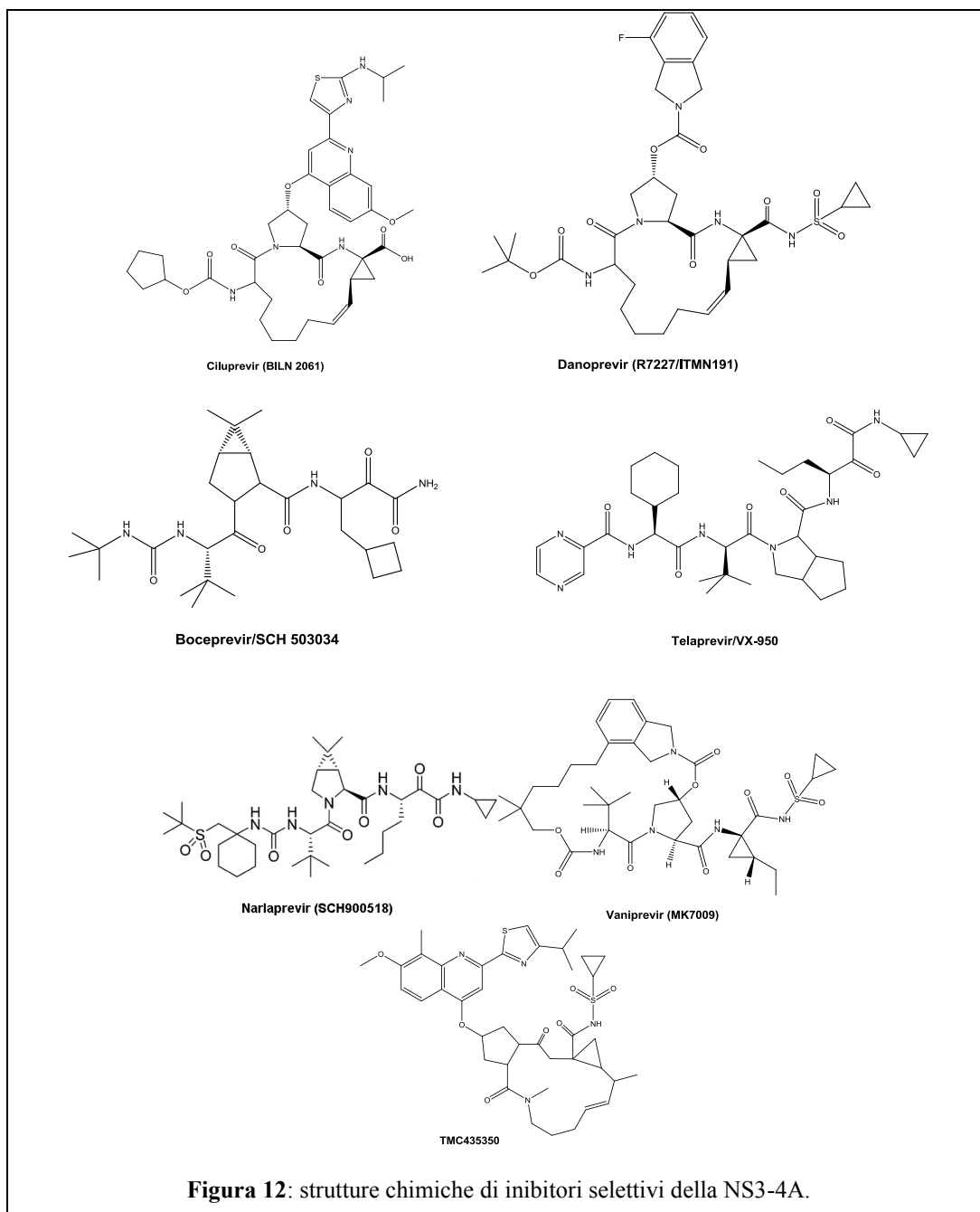
2.5 Possibili targets molecolari

La ricerca di nuovi composti ad attività anti-HCV è volta all'individuazione di composti in grado di inibirne o bloccarne il processo di replicazione. Oggi, grazie all'importante contributo fornito negli dagli studi della genomica virale, insieme a quello fornito dalle consolidate tecniche di isolamento e purificazione enzimatica, le nostre conoscenze sul virus HCV si sono notevolmente ampliate e ciò ha permesso di individuare alcuni promettenti targets molecolari, rappresentati soprattutto da enzimi critici nella replicazione virale, che possiamo analizzare nel dettaglio.

Serina Proteasi (HCV NS3-4a serine protease). Questa proteina (fig. 11) è un enzima polifunzionale in cui il dominio C-terminale ha un'attività elicastica ATP e RNA dipendente, mentre il dominio N-terminale media la proteolisi della proteina policistronica alle giunzioni NS3/4A, NS4A/4B, NS4B/5A e NS5A/5B. Tale attività richiede però un cofattore attivante, rappresentato dalla NS4A. È stato infatti dimostrato che in assenza di NS4A solo la giunzione



NS5A/NS5B viene parzialmente processata dalla sola proteasi a serina NS3 [44]. L'inibizione di questa proteasi rende inattivo il virus che non può più replicarsi. Attualmente sono note due classi di molecole: gli inibitori macrociclici ed i derivati lineari a struttura α -chetoamidica ad attività peptidomimetica. In figura 12 si riportano le strutture chimiche di inibitori selezionati.



Fra i macrolidi ricordiamo il Ciluprevir (BILN 2061) (Boehringer-Ingelheim), primo macrolide peptidomimetico riconosciuto come inibitore della NS3-4A proteasi di HCV ad entrare in un trial clinico [45], che fu abbandonato a causa della cardiocitotossicità indotta nei modelli animali, ed il Danoprevir (R7227/ITMN191, Intermune and Roche Pharmaceuticals), che in vitro mostra un'azione sinergica con i PegIFN e che in studi di fase 1b non hanno mostrato effetti collaterali particolarmente severi [46]. Fra le α -chetoamidi, invece, si hanno

Irene Briguglio, *Sintesi e valutazione di sistemi azotati tricyclici aromatici come possibili agenti antivirali*.
Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, indirizzo Scienze Farmaceutiche (XXIV ciclo),
Università degli studi di Sassari.

avuto i maggiori successi. Fra di essi infatti sono recentemente emersi due composti approvati dalla FDA (Food and Drug Administration) Americana, e più recentemente dalla Commissione Europea, quindi avviati all'immissione in commercio. Si tratta del Boceprevir [47] (nome commerciale Victrelis), approvato il 19 luglio 2011, e del Telaprevir [48] (nome commerciale in Europa Incivo, in America Incivek), approvato il 22 settembre 2011. Questi non vanno assunti in ionoterapia ma agiscono sinergicamente con PegIFN e Ribavirina in una triplice polichemioterapia.

Altri inibitori della NS3-4A sono arrivati a studi di fase 1-2. Fra questi ricordiamo: Vaniprevir (MK7009), Narlaprevir (SCH9005118), BI201335, TMC435350, BMS-650032, PHX1766, ACH-1625, IDX320, ABT-450, MK-5172, GS-9256, GS-9451. Per molti di questi derivati è stata osservata un'attività antivirale comparabile a quella del telaprevir e boceprevir in pazienti infetti da HCV genotipo 1, e studi di tripla chemioterapia sono stati iniziati [49-51].

RNA elicasi (HCV NS3 helicase)

La NS3 elicasi di HCV agisce attaccandosi al singolo filamento del RNA virale e catalizzandone lo svolgimento in un processo ATP-dipendente. Essenziale per la replicazione virale, questo enzima rappresenta in attraente target per processi di drug design di nuovi agenti antivirali. Diversi inibitori sono ora sottoposti a studi preclinici, ma nessuno è ancora passato allo studio clinico. Esempi di molecole che hanno dimostrato un'attività anti-elicasi sono: benzimidazoli e benzotriazoli, l'inibitore QU663 a struttura simil-nucleotidica, derivati tropologici, derivati acridonici, derivati del trifenilmetano [52]...

RNA polimerasi (HCV NS5B)

Si tratta di una proteina RNA dipendente del peso di 65 kDa considerata essenziale per la replicazione virale. L'enzima possiede una cosiddetta struttura a "palmo e dita". Proteina dotata di tre domini, assomiglia infatti ad una mano destra con pollice, dita e palmo (Figura 13A). Il palmo contiene il sito catalitico,

associato al neo-RNA, mentre lo stampo a singolo filamento viene piegato in modo da passare o meno fra pollice e dita (Figura 13B).

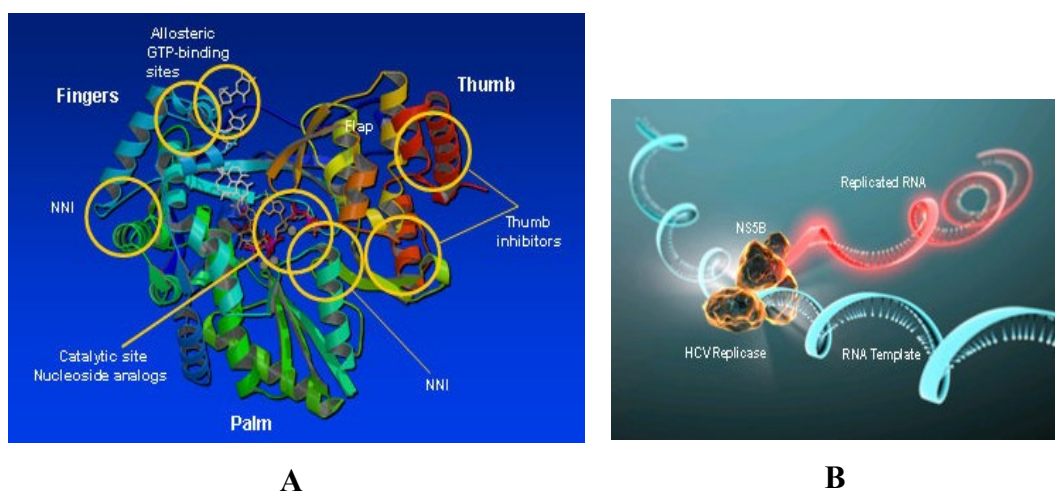


Figura 13: A) Struttura di HCV NS5B e siti di legame dei diversi inibitori. B) Meccanismo d'azione della RNA polimerasi

La HCV polimerasi rappresenta un interessante target farmacologico per inibitori diretti. Sono stati sviluppati a questo scopo sia inibitori a struttura nucleosidica che non nucleosidica, e molti sono o sono stati sottoposti a studi clinici.

Gli analoghi nucleosidici (tutti analoghi ribonucleosidici) mimano il naturale substrato enzimatico, ma grazie alla loro struttura chimica causano l'interruzione e/o un aumento della frequenza di errori nella polimerizzazione. In genere mantengono la loro efficacia su tutti i genotipi, in virtù del fatto che il sito catalitico è ben conservato nei diversi tipi. Fra questi ricordiamo: la **Valopicitina** (NM283) (Idenix Pharmaceuticals), profarmaco della 2'-C-metilcitidina (NM107) [53], entrata in studi clinici di fase I e II nel 2004 ma abbandonata nel 2008 per gli effetti collaterali dimostrati a livello gastrointestinale; il **Balapiravir** (R1626) (Roche and Phamasset), profarmaco dell'analogo nucleotidico 4'-azidocitidina (R1479) [54], entrato in fase II nel 2006 e abbandonato nel 2008 a causa dell'induzione di linfocitopenia nei soggetti trattati; la **Mericitabina** (R7128) (Roche and Phamasset), pro farmaco diisobitirato del PSI-6130, un analogo nucleotidico della citidina (β -D-2'-deossi-2'-fluoro-2'-C-metilcitidina) [55], assai promettente. Valutato in primis per una terapia PegIFN free, il pro farmaco ha dimostrato di essere in grado di liberare in maniera efficiente il PSI-6130 e di

Irene Briguglio, *Sintesi e valutazione di sistemi azotati tricyclici aromatici come possibili agenti antivirali*.
Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, indirizzo Scienze Farmaceutiche (XXIV ciclo),
Università degli studi di Sassari.

ridurre la carica virale sia quando usato in monoterapia, sia in combinazione con PegIFN e Ribavirina, senza indurre resistenze. Questo composto sta ora entrando in fase II in polichemioterapia [56]. Tutti i composti menzionati sono riportati in figura 14.

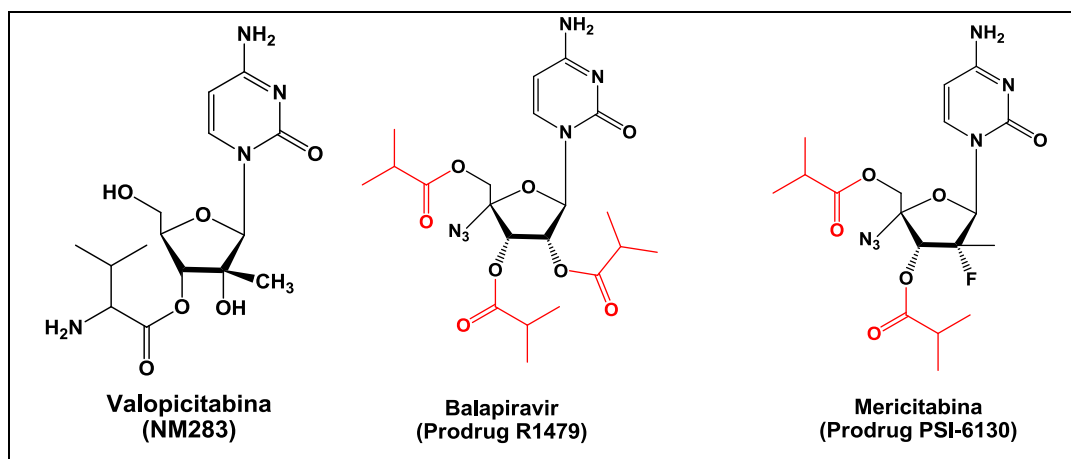


Figura 14: strutture chimiche dei prodrug analoghi nucleosidici presentati

Più eterogenea è la classe degli inibitori a struttura non nucleosidica. Appartengono a questa categoria molecole in grado di legarsi alla NS5B a livello di diversi siti di legame, come riportato in figura 13A, a seconda della struttura chimica riportata. Tali composti si legano all'enzima inibendone l'efficienza catalitica, bloccando le modificazioni conformazionali richieste per iniziare la sintesi dell'RNA. In letteratura sono riportate molte serie di inibitori di NS5B strutturalmente molto diversi; fra questi ricordiamo le classi dei benzofurani, dei derivati del benzimidazolo, delle benzotiazine e del tiofene. In effetti sull'enzima sono stati identificati almeno 4 siti di legame per inibitori a struttura non nucleosidica (NNI-binding sites):

NNI-binding sites I: ancora a livello del palmo (palm 1), è adiacente al sito attivo, vicino al putativo canale legante l'RNA, che comprende la più larga cavità della forma apo dell'enzima e che contiene il motivo E (aa 362-376, che collegano il palmo al pollice), noto anche come primer grip. È riconosciuto come il sito di legame dei derivati a struttura benzotiadiazinica, ma anche

delle proline, delle solfonammidi, del benzilidene e dell'acido acrilico.

NNI-binding sites II: si trova a livello del palmo (palm 2), direttamente sopra il sito di legame degli ioni metallici, nel centro catalitico della polimerasi. È riconosciuto come il sito di legame dei derivati a struttura benzofuranica, ma anche dei chetoacidi e degli acidi carbossilici.

NNI-binding sites III: si trova in una regione della polimerasi dove il sub dominio del finger prende contatto con la parte posteriore del subdominio del pollice attraverso una serie di loop che formano un collegamento interdominio noto come fingertip (thumb 1). È riconosciuto come il sito di legame dei derivati a struttura benzimidazolica o indolica.

NNI-binding sites IV: è situato sul perimetro esterno del sottodominio del pollice vicino alla sito dove i residui della porzione C-terminale della NS5B escono dal sottodominio e girano attorno alla parte frontale della polimerasi, prima di ripiegarsi indietro verso il putativo canale legante l'RNA (thumb 2). È riconosciuto come il sito di legame dei derivati a struttura tiofenica, ma anche dei piranoindoli, diidropirani e delle fenilalanine.

Usando un'immagine tratta dal lavoro di Hang et al. [57] (fig.15) in cui vengono presentati i diversi siti di legame su HCV-NS5B ottenuti usando i composti a struttura benzofuranica HCV-796, benzotiadiazinica NNI-1, tiofen-2-acido carbossilico NNI-3, e benzimidazolica NNI-4, di proprietà della Roche, possiamo vedere come la conferma dell'effettivo legame al target sia confermato da specifiche mutazioni, che si ripetono per le diverse classi. Il processo di selezione dei mutanti resistenti, infatti, non solo conferma il bersaglio biologico, ma anche e soprattutto il sito di legame. Così:

P495L → resistenza selezionata dei composti a struttura benzoimidazolica

M423T → resistenza selezionata dei composti a struttura tiofenica

L419M → resistenza selezionata dei composti a struttura benzotiadiazinica

S365T → resistenza selezionata dei composti a struttura benzofuranica

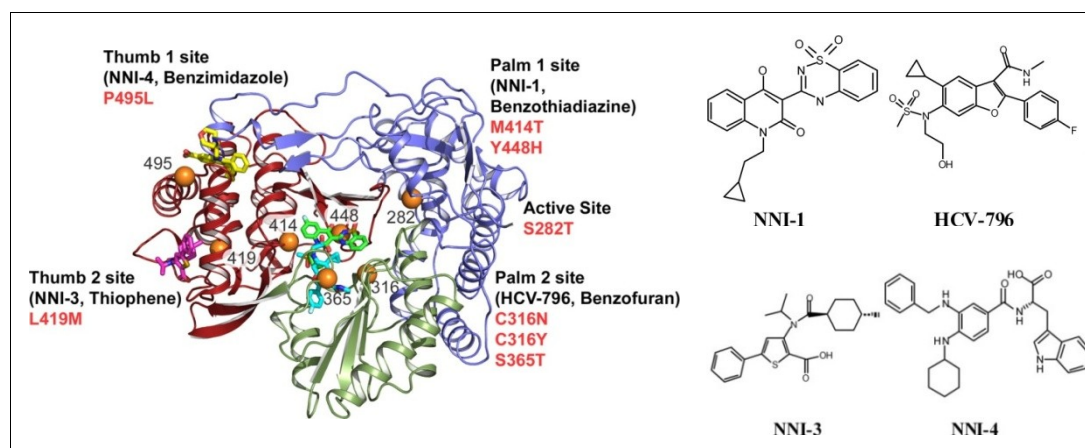


Figura 15: localizzazione dei siti di legame sulla HCV-NS5B dei quattro NNIs usati come riferimento. Il dominio del finger è riportato in blu, quello del palmo in verde e quello del pollice in rosso. Le mutazioni selezionate sono rappresentate da sfere arancioni.

Gli inibitori non nucleosidici rappresentano una classe di composti estremamente interessante da un punto di vista farmaceutico, in quanto il loro meccanismo d'azione differisce completamente da quello degli analoghi nucleosidici, coi quali potrebbero dunque essere utilizzati in una terapia di combinazione al fine di ridurre al minimo la possibilità di selezione di ceppi virali resistenti.

2.6 Sistemi per lo studio della replicazione virale di HCV

Ad oggi lo studio del virus HCV è stato ostacolato dall'impossibilità di allestire semplici linee cellulari che permettessero di assicurarne l'intero ciclo replicativo. Ricordiamo che il virus HCV infetta essenzialmente gli epatociti, ma è stato a lungo impossibile ottenere culture di questo tipo che fossero stabili e completamente funzionali così da risultare permissive. Per questo motivo lo studio su questo virus si è basato sull'utilizzo di modelli animali, modelli murini e virus correlati.

2.6.1. Modelli animali e modelli murini

A causa del tropismo strettamente umano di HCV, questo virus può infettare solo l'uomo e primati altamente evoluti quali lo scimpanzé [38]. Ovviamente un modello di questo tipo è molto attraente: questo animale, infatti, è geneticamente molto simile all'uomo (sovrapposizione genoma: 98.5%), viene infettato in maniera efficace da tutti i cinque principali virus delle epatiti (A, B, C, D, E) ed in esso la progressione della malattia segue un decorso clinico molto simile a quello osservato nei pazienti umani. Sia l'uomo che lo scimpanzé passano dunque per una fase acuta della malattia, in seguito alla quale si ha lo sviluppo di una risposta immune. Inoltre in entrambi l'infezione tende a persistere nel tempo e a cronicizzare provocando evidenti danni epatici, che possono evolvere anche nell'animale in epatocarcinoma.

Questo modello però presenta al contempo anche diversi limiti. Il suo utilizzo e il suo mantenimento richiedono elevati costi e mezzi, se si pensa alla durata della vita di questi animali, alla loro frequenza di riproduzione, al tempo necessario al raggiungimento della maturità sessuale, alle loro dimensioni... Inoltre ragioni etiche ne limitano l'uso [58]. Ricordiamo poi che anche altri mammiferi, quali per esempio la tupaia e la marmotta, sembrano permissivi all'infezione da HCV, ma vengono comunque poco utilizzati [59-60].

Per questo motivo negli anni sono stati ricercati altri modelli di più facile gestione, con animali più adatti a studi di tipo biologico quali sono i roditori. A causa del periodo di gestazione estremamente breve (20 gg), delle dimensioni e del basso costo di mantenimento, ratti e topi rappresentano i soggetti più adatti a questo tipo di studio. Sono stati così creati così una serie di modelli murini, dove con questo termine si intendono sia l'uso di topi transgenici, sia l'uso di topi immunosoppressi trapiantati con cellule di fegato umano infettato da HCV.

Per i modelli rappresentati da topi manipolati geneticamente, questi sono stati creati al fine di comprendere quali siano i potenziali effetti patogeni delle singole proteine virali, quali ad esempio la proteina strutturale core [61] o le glicoproteine E1 ed E2 [62] direttamente sugli epatociti. Alcuni di questi esperimenti hanno

permesso di dimostrare, ad esempio, che la proteina core induce epatocarcinoma se espressa in topi transgenici.

Altri modelli murini sono quelli uPA/SCID, Trimerica e Immunotolerized. Questi sono basati sull'innesto di tessuto epatico umano infetto in topi o ratti (per Immunotolerized) immunocompromessi [63-64]. In realtà in questi modelli non si riesce a sostenere in maniera ottimale lo sviluppo e la replicazione di HCV, ma è invece possibile fare in modo che gli epatociti mantengano *in vivo* una serie di interazioni con le altre cellule del fegato e ricevano una serie di fattori di crescita che ne permettono lo svolgimento di tutte le principali funzioni, cosa che naturalmente risulta impossibile *in vitro*. Questi modelli, dunque, non sono finalizzati tanto allo studio del decorso dell'infezione o della replicazione virale, ma principalmente al mantenimento delle funzioni caratteristiche degli epatociti al fine di permetterci lo studio della risposta dell'ospite al virus in un contesto fisiologico.

2.6.2. Virus correlati

Come detto in precedenza HCV appartiene alla famiglia dei *Flaviviridae*, ma è strettamente correlato con i Pestivirus, come il virus della diarrea bovina (BVDV) e con il virus dell'epatite G (GBV) [38]. In particolare BVDV è stato a lungo utilizzato come surrogato di HCV in quanto, sebbene le identità di sequenza a livello del genoma fra questo virus e HCV siano poche, sono invece molte le somiglianze a livello organizzativo del genoma e funzionale. Come HCV, BVDV causa nell'ospite un'infezione cronica, utilizza i recettori LDL per entrare nelle cellule, usa un IRES funzionalmente simile per la trascrizione, usa un analogo cofattore NS4A per la proteasi NS3, presenta una NS3 elicasi/NTPasi e una NS5B meccanicamente simili a quelle di HCV, un equivalente meccanismo di maturazione, assemblaggio e liberazione dei virioni. Questo è dunque un modello estremamente attraente, anche e soprattutto perché in commercio sono disponibili cloni citopatogenici di BVDV e linee cellulari efficienti e permissive [65-68].

In base alle similarità genetiche, dunque, possiamo presupporre che lo schema di replicazione del pestivirus sia simile a quello di HCV. L'utilizzo di BVDV può quindi permettere di chiarire come HCV si replichi all'interno della cellula ospite. Lo studio quindi di questi virus correlati potrebbe aiutare per esempio a chiarire come HCV si replichi all'interno della cellula ospite. Bisogna però tener presente che, a parte queste somiglianze, esistono comunque differenze sostanziali che non possono essere trascurate. Per esempio, il replicon di BVDV descritto da Behrens *et al.* [69] ha dimostrato di essere in grado di replicarsi in diverse linee cellulari sia di origine animale che umana, fra cui le cellule derivate da epatoma HepG2 and Huh-7. Al contrario, il replicon di HCV sviluppato da Lohmann *et al.* [70] si replica limitatamente solo in cellule Huh-7, suggerendo che la capacità infettiva dei due virus dipende da distinti fattori cellulari.

2.6.3. Replicon system

I modelli finora presentati hanno permesso una più ampia conoscenza del virus HCV e della sua patogenesi, ma non hanno permesso un modello affidabile per lo studio in vitro della replicazione virale. Ricordiamo che HCV si replica lentamente e con poca efficienza solo in colture cellulari epatiche e cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC). Nelle migliori condizioni possibili, la replicazione di HCV viene determinata intorno a 10^4 equivalenti genomici rilasciati da 10^6 cellule in coltura [38]. Questo problema è stato in parte risolto nel 1999 grazie al replicon di HCV sviluppato da Lohmann *et al.* [70].

Con il termine replicon (o repliconi) intendiamo una serie di copie sub-genomiche dell'RNA di HCV genotipo 1b opportunamente modificato e riprodotte in vitro mediante l'uso di un opportuno plasmide in cui il genoma virale viene reintegrato e successivamente trascritto ad opera della RNA polimerasi del fago T7.

Le modifiche apportate al genoma di HCV interessano essenzialmente la componente che codifica per gli elementi strutturali del virus, quali gene core, E1 ed E2 (Fig. 16). Più precisamente si è proceduto a:

Irene Briguglio, *Sintesi e valutazione di sistemi azotati tricyclici aromatici come possibili agenti antivirali*.
Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, indirizzo Scienze Farmaceutiche (XXIV ciclo),
Università degli studi di Sassari.

- 1) delezione della regione che codifica per le proteine strutturali da core (C) a p7 e spesso anche a NS2, non indispensabile per la replicazione di HCV;
- 2) inserzione di un gene che codifica per la neomicina fosfotrasferasi (Neo) che conferisce alla cellula resistenza contro l'antibiotico G418;
- 3) inserzione dell'IRES del virus dell'encefalomiocardite (EMCV) fra il gene Neo e la regione che codifica per le proteine virali non strutturali

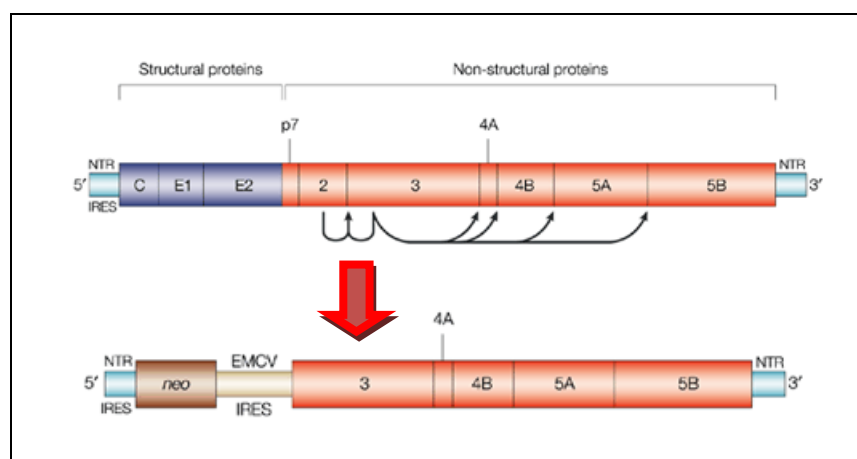


Figura 16: struttura del genoma di HCV replicon

Il replicone risulta bicistronico, poiché la traduzione del primo cistrone (neo) è diretta dall'IRES di HCV, mentre quella del secondo cistrone (NS(2)3 – 5B) dall'IRES di EMCV. A questo punto il nuovo genoma può essere transfettato cellule di epatoma umano (HuH-7) che vengono quindi incubate in un mezzo di coltura contenente l'antibiotico G418 (Figura 17). Cellule che non sono state transfettate (bianche in figura) e cellule in cui incapaci di replicare l'RNA virale (arancioni) moriranno a causa dell'effetto tossico del G418, in quanto nel mezzo sopravvivono solo le cellule che sono state trasfettate e che sostengono l'amplificazione del replicon (in quanto, esprimendo il gene Neo, diventano resistenti all'antibiotico nel mezzo) le cellule sopravvissute al trattamento formeranno delle colonie che possono essere isolate dalla piastra ed espanse per creare una linea cellulare in cui si abbia stabilmente la replicazione dell'HCV-replicon (fig.17).

Purtroppo però, sebbene i repliconi si replichino ad un livello più elevato rispetto al genoma virale completo, dopo trasfezione e selezione si ottiene solo un basso numero di cloni [71].

La possibilità comunque di avere a disposizione questo sistema ha permesso fino ad oggi di poter studiare *in vitro* la replicazione di HCV e di studiare nel loro

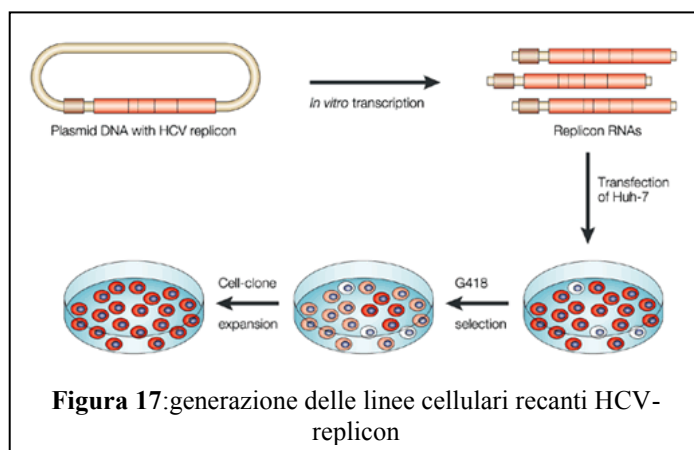


Figura 17: generazione delle linee cellulari recanti HCV-replicon

complesso tutte le proteine virali non strutturali e le loro interazioni. Il sistema del replicon può essere quindi utilizzato per studiare l'effetto di nuove molecole che esplicano la propria azione biologica

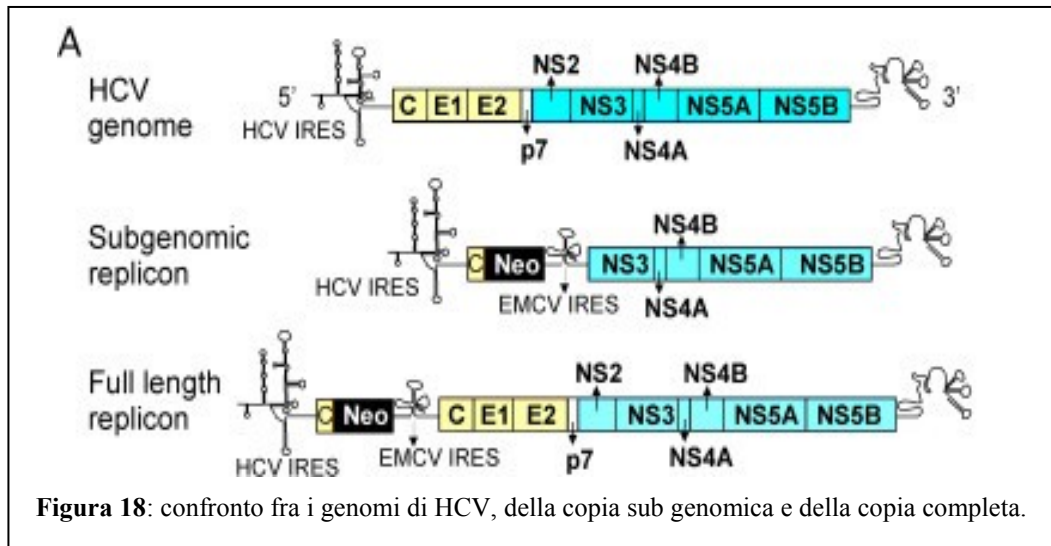
mediante interazione con le diverse proteine non strutturali.

È in questa ultima affermazione che risiede però anche il limite del sistema del replicon: mancando la possibilità di sintetizzare proteine strutturali, nelle cellule transfettate il virus HCV non può andare incontro ad un ciclo replicativo completo e non può dare luogo alla formazione di virioni maturi che possano essere rilasciati e che siano in grado di infettare altre cellule. Dunque in questo sistema non si possono testare farmaci che hanno come target le fasi iniziali e tardive del ciclo.

Questo problema fu risolto nel 2005, quando fu messo a punto un sistema che supportasse la replicazione del genoma completo di HCV *in vitro*, permettendo la formazione di una progenie di particelle virali [72]. Il genoma completo di HCV utilizzato in questo caso appartiene al genotipo virale 2a (FL-JFH), che si replica efficientemente in cellule Huh7 senza richiedere alcuna mutazione adattativa. Anche in questo caso il genoma è stato modificato, ma senza effettuare delezioni, in quanto il gene che codifica per la neomicina fosfotrasferasi (Neo) viene aggiunto prima dell'IRES del virus dell'encefalomiocardite (EMCV), in questo caso offre il codone di inizio alla trascrizione delle proteine non strutturali (fig. 18).

Irene Briguglio, Sintesi e valutazione di sistemi azotati tricyclici aromatici come possibili agenti antivirali.
Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, indirizzo Scienze Farmaceutiche (XXIV ciclo),
Università degli studi di Sassari.

In questa maniera si è ottenuto un “replicone completo”, competente per la replicazione e che produce particelle virali infettive. È stato dunque creato un modello che permette di infettare cellule Huh7, e di studiare fasi del ciclo vitale di HCV, come l’ingresso o il rilascio dei nuovi virioni, che era impossibile studiare con l’utilizzo dei modelli precedenti.

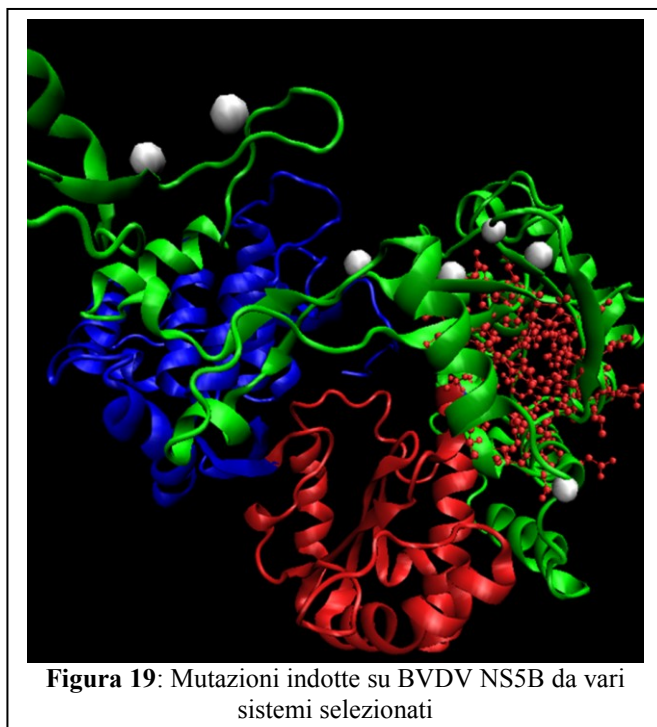


3. LA RICERCA

Come appena descritto, capiamo che sono diversi i targets che sarebbe possibile colpire nell'intento di generare nuove molecole ad attività anti-HCV. L'attenzione del gruppo di ricerca del prof. Carta si è però concentrata su sull'HCV-RNA polimerasi RNA-dipendente (HCV-NS5B) per due motivi principali, ormai evidenti da quanto prece demente riportato. Il primo è legato all'assoluta necessità di questo enzima per il funzionamento del ciclo virale. Il secondo fattore è la promettente attività della Mericitabina (R7128), analogo nucleotidico per il quale si spera nell'immissione in commercio. È naturalmente evidente che l'individuazione di un secondo farmaco a struttura non nucleosidica che inibisca selettivamente la NS5B-HCV sarebbe di grande aiuto se associato al primo. In questo caso, infatti, la possibilità che si instauri una resistenza crociata sarebbe molto bassa, presentandosi solo qualora si abbia di selezione di un ceppo virale che presenti una doppia mutazione determinata contemporaneamente dai due farmaci, cosa che è quattro volte meno probabile delle singole mutazioni. Inoltre l'effetto sinergico dei due farmaci aumenterebbe notevolmente l'efficacia terapeutica, permettendo di ridurre la durata della terapia e quindi aumentando la compliance del paziente, purché ovviamente venga preservato un profilo di tossicità ottimale.

Nel corso degli ultimi anni nel Dipartimento Farmaco Chimico Tossicologico prima citato sono state sottoposte al Prof. La Colla, direttore della Sezione di Microbiologia e Virologia Generale e Biotecnologie Microbiche del Dip. di Scienze e Tecnologie Biomediche dell'Università di Cagliari, varie centinaia di molecole per un ampio ed approfondito screening, con l'intento di valutarne l'attività in vitro nei confronti del Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) e Yellow Fever Virus (YFV), quali surrogati dell'HCV, non facilmente coltivabile in vitro. Sui derivati più interessanti (per attività, selettività e bassa citotossicità) sono stati condotti studi di inibizione sugli enzimi isolati appartenenti sia a BVDV che ad HCV, nonché saggi di selezione di ceppi resistenti e analisi delle mutazioni.

Irene Briguglio, *Sintesi e valutazione di sistemi azotati tricyclici aromatici come possibili agenti antivirali*.
Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, indirizzo Scienze Farmaceutiche (XXIV ciclo),
Università degli studi di Sassari.

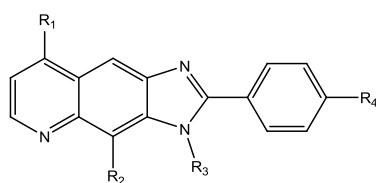


Inoltre presso il Laboratorio MOSE dell'Università di Trieste, diretto dalla Prof Pricl, è stata fatta una ricostruzione al computer della RNA-polimerasi RNA dipendente di BVDV (NS5B-BVDV).

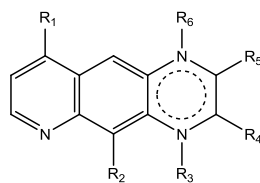
I risultati di questi saggi hanno messo in evidenza la capacità di alcune molecole di inibire in vitro la proliferazione virale, proprio

mediante azione sulla NS5B (come si può vedere nella figura 19, in cui vengono messe in evidenza globalmente tutte le mutazioni indotte sull'NS5B-BVDV da tutti i derivati saggiati).

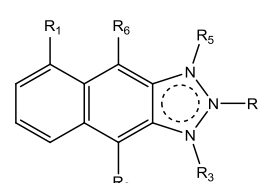
La struttura chimica delle molecole che hanno manifestato possedere, a vari livelli, attività antivirale è generalmente associata alla presenza di tre anelli aromatici azotati, linearmente condensati. Di alcuni di questi derivati erano state precedentemente pubblicate sia la sintesi che altre attività biologiche [73-76], mentre altri sono nuovi composti non ancora pubblicati.



Imidazo[4,5-g]chinoline



Pirido [3,2-g]chinossaline



[1,2,3]triazolo[4,5-g]chinoline

Vengono qui riportati i risultati delle analisi condotte su alcune delle molteplici molecole prodotte, in particolare 4 molecole a struttura imidazochinolinica e 3 a struttura piridochinossalinica:

Irene Briguglio, *Sintesi e valutazione di sistemi azotati tricyclici aromatici come possibili agenti antivirali*.
Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, indirizzo Scienze Farmaceutiche (XXIV ciclo),
Università degli studi di Sassari.

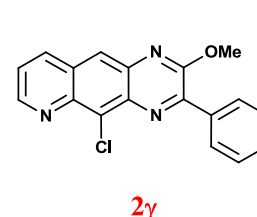
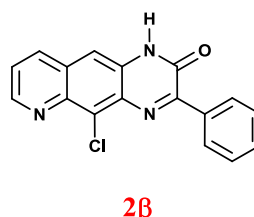
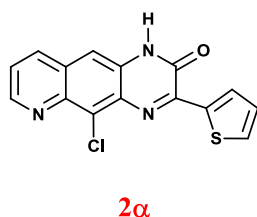
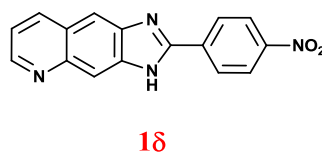
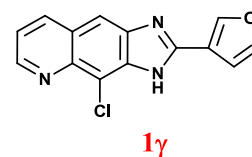
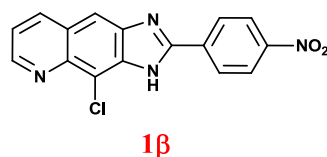
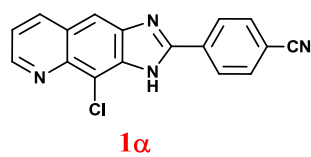


Tabella 1: Screening biologico dei 7 hits proposti

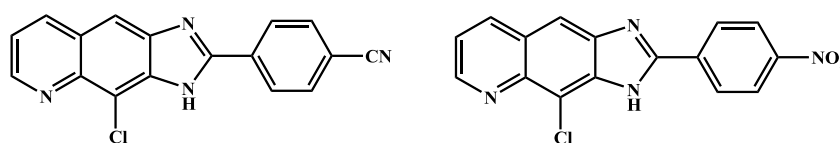
Cpd	Anti BVDV Activity (μM)			HCV Replicon		Drug Resistant Viruses			IC50 (μM) on NS5B	
	CC ₅₀	EC ₅₀	SI	HUH	GS	×EC ₅₀	Target	Mutations	BVDV	HCV
1α	69	0.3	230	>75	30	128×	NS5B	I261M	1	4
							NS3	none		
1β	>100	1.2	>83	12.0	3.1	32×	NS5B	S176R	0.06	8
							NS3	none		
1γ	72	1.9	37	31.0	8.0	-	-	-	120	11
1δ	>100	20	>5	7	4.1	-	-	-	-	-
2α	>100	6	>16	21	7.5	-	-	-	40	0.4
2β	>100	11	>9.0	-	-	16×	NS5B	I261T	1	10
							NS3	none		
2γ	>100	4	>25	-	-	16×	NS5B	S176R, A392E	7	7
							NS3	none		

Irene Briguglio, *Sintesi e valutazione di sistemi azotati tricyclici aromatici come possibili agenti antivirali.*
 Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, indirizzo Scienze Farmaceutiche (XXIV ciclo),
 Università degli studi di Sassari.

L'attività biologica è stata valutata sia su cellule infettate da BVDV, sia su cellule derivate da epatociti (HUH e GS) permissive nei confronti dell'HCV replicon.

Per i derivati più promettenti è stato poi identificato il target biologico, poi confermato da analisi su enzima isolato. Dai dati ottenuti si vede come i derivati imidachinolinici siano risultati più potenti (EC_{50} 0.3 – 1.9 μ M) di quelli piridochinossalinici (EC_{50} 4 – 11 μ M), e che fra i primi quattro composti i derivati **1 α** e **1 β** risultino essere i più selettivi.

La nostra attenzione si è dunque focalizzata su queste due molecole, la cui attività è supportata da buoni dati sul replicon. Si è quindi condotto un test di resistenza virale e si è visto come le mutazioni che selezionano un ceppo resistente alla molecola interessino la NS5B e non la NS3. L'individuazione del target è stata quindi confermata dai test sull'enzima isolato sia di BVDV che di HCV. Avendo colpito il target inizialmente selezionato, abbiamo identificato i nostri lead compound.



4-(4-cloro-3H-imidazo[4,5-g]chinolin-2-il)benzotrile

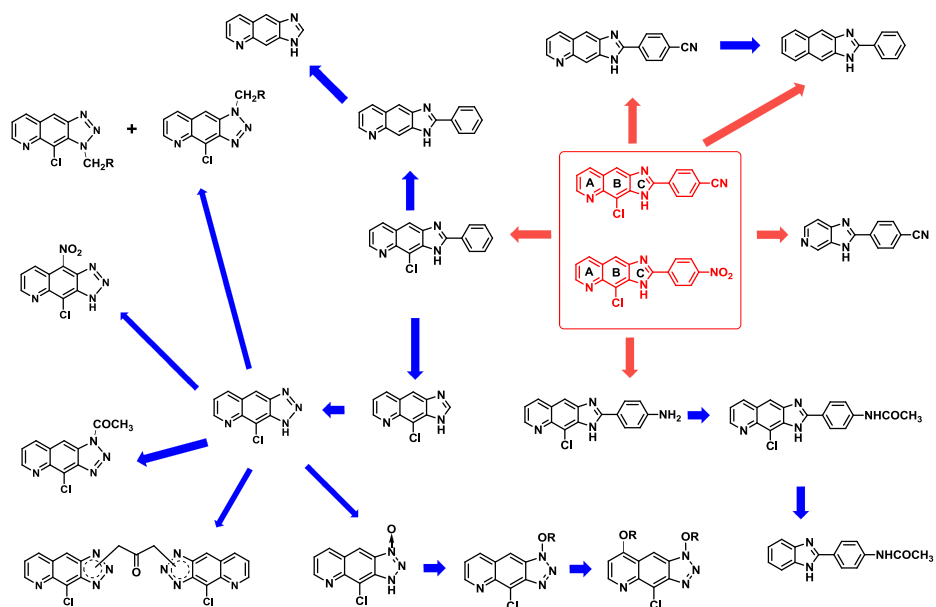
compound 1

4-cloro-2-(4-nitrofenil)-3H-imidazo[4,5-g]chinolina

compound 2

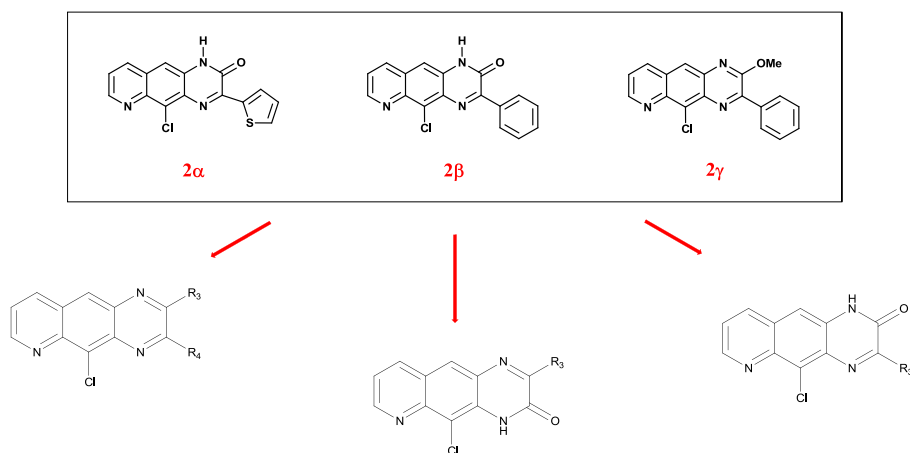
Appare evidente l'importanza che i sistemi azotati tricyclici aromatici linearmente condensati rivestono nella progettazione di composti ad attività antivirale, con particolare attenzione per il virus HCV. Scopo di questa tesi è stato quello di indagare ulteriormente queste strutture sintetizzando e valutando biologicamente una serie di derivati di semplificazione molecolare e sostituzione bioisosterica sia dei due lead imidazo[4,5-g]chinolinici, che dei derivati pirido[2,3-g]chinossalinici. Lo studio è volto all'identificazione di quelli che sono gli elementi strutturali essenziali o modulanti l'attività biologica, al fine di ottenere un'esauriente descrizione delle relazioni che intercorrono fra la struttura chimica e l'attività biologica. Le informazioni ottenute verranno di seguito utilizzate nel processo di drug design volto alla generazione di composti dotati di un migliore profilo per quel che riguarda efficienza e selettività d'azione, possibilmente accompagnato da una scarsa o assente citotossicità.

Nel seguente schema 1 si presenta globalmente il processo concettuale seguito nello svolgimento della presente tesi, che ha quindi guidato le sintesi qui riportate per i sistemi derivati dai lead imidazo e triazolo[4,5-g]chinolinici.



Schema 1: descrizione concettuale della valutazione dei sistemi imidachinolinici e triazolochinolinici.

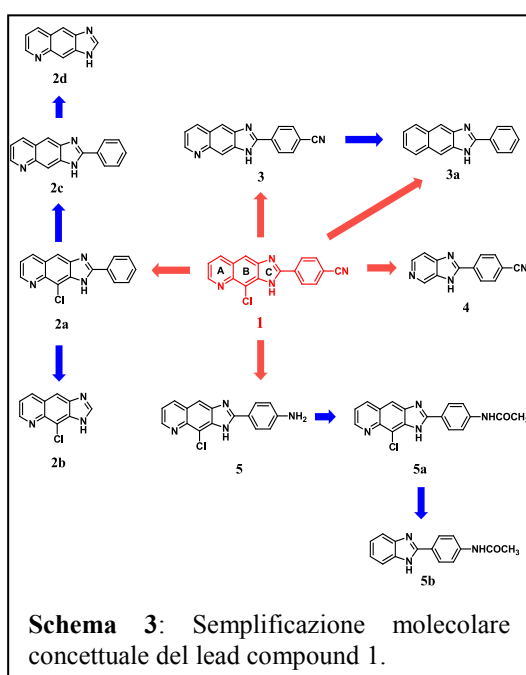
Egual spirito ha guidato invece la valuta dei sistemi a struttura piridochinossalinica (schema 2):



Schema 2: descrizione concettuale della valutazione dei sistemi piridochissalinici.

3.1 Preparazione di derivati di semplificazione molecolare del 4-(4-cloro-3H-imidazo[4,5-g]chinolin-2-il)benzonnitrile

Visti gli interessanti risultati ottenuti dallo screening biologico riportato in Tabella 1, si è deciso di effettuare una serie di semplificazioni strutturali dei lead al fine di ottenere una prima valutazione SAR. L'analisi è stata condotta sul 4-(4-cloro-3H-imidazo[4,5-g]chinolin-2-il) benzonnitrile o lead 1(1), dimostratosi fra i due leads il più selettivo. Come riproposto nello Schema 3, il processo di semplificazione molecolare è stato condotto al fine di comprendere quale siano, nella molecola



stessa, le componenti fondamentali e modulatorie l'attività biologica.

Innanzitutto ci si è indirizzati a ricercare la struttura minima necessaria per avere l'attività biologica. Con questo in mente si è proceduto alla sintesi dei derivati della serie 2. Pertanto sono stati eliminati progressivamente il cianogruppo dell'anello fenilico della catena laterale (2a), l'atomo di cloro anulare (3), l'intera catena laterale (2b), contemporaneamente l'atomo di cloro

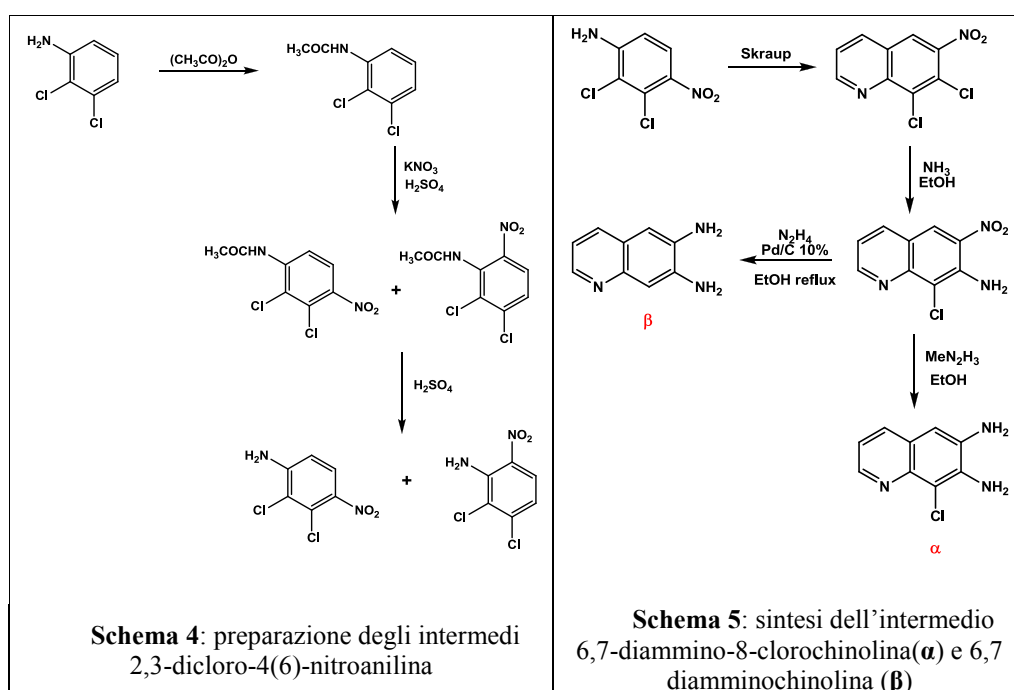
anulare e il cianogruppo (2c) e per finire il Cl, il fenile e il cianogruppo, sino ad ottenere il nucleo base imidazochinolinico (2d).

Un'altra modificazione ha previsto la riduzione della superficie molecolare dello scaffold, previa eliminazione dell'anello centrale B (e quindi dell'atomo di cloro ad esso legato) e contemporaneamente lo spostamento della posizione dell'azoto chinolinico (4).

Un secondo aspetto della ricerca si è focalizzato nella valutazione dell'effettiva necessità dell'atomo di azoto chinolinico; si è quindi sintetizzato il corrispondente derivato naftalenico (3a). In questo caso è stato necessario eliminare anche l'atomo di cloro che altrimenti avrebbe potuto falsare l'analisi SAR.

Infine si è deciso di modificare il sostituente in para al fenile per valutare se la sostituzione del cianogruppo (elettronattrattore) con un gruppo elettrondonatore, magari più idrosolubile, potesse potenziarne l'attività. Si è quindi proceduto all'introduzione di un gruppo amminico (**5**) o acetammidico (**5a**). Su quest'ultimo modello si è anche proceduto ad una nuova riduzione della superficie, operando ancora una volta l'eliminazione di un anello del sistema triciclico (**5b**). L'eliminazione dell'anello azotato A (ancora una volta finalizzato a valutare l'importanza del sistema a tre cicli condensati linearmente) è anche in questo caso accompagnata dall'eliminazione dell'atomo di cloro legato all'anello centrale.

In primis è stato ripreparato il 4-(4-cloro-3H-imidazo[4,5-g]chinolin-2-il) benzonitrile, ottenuto passando per la preparazione di un intermedio chiave, la 6,7-diammino-8-clorochinolina che, come successivamente riportato, ci permette di assicurare la struttura chiave alogenata del sistema triciclico in essere. Si riportano di seguito gli schemi di sintesi seguiti (Schemi 4 e 5).



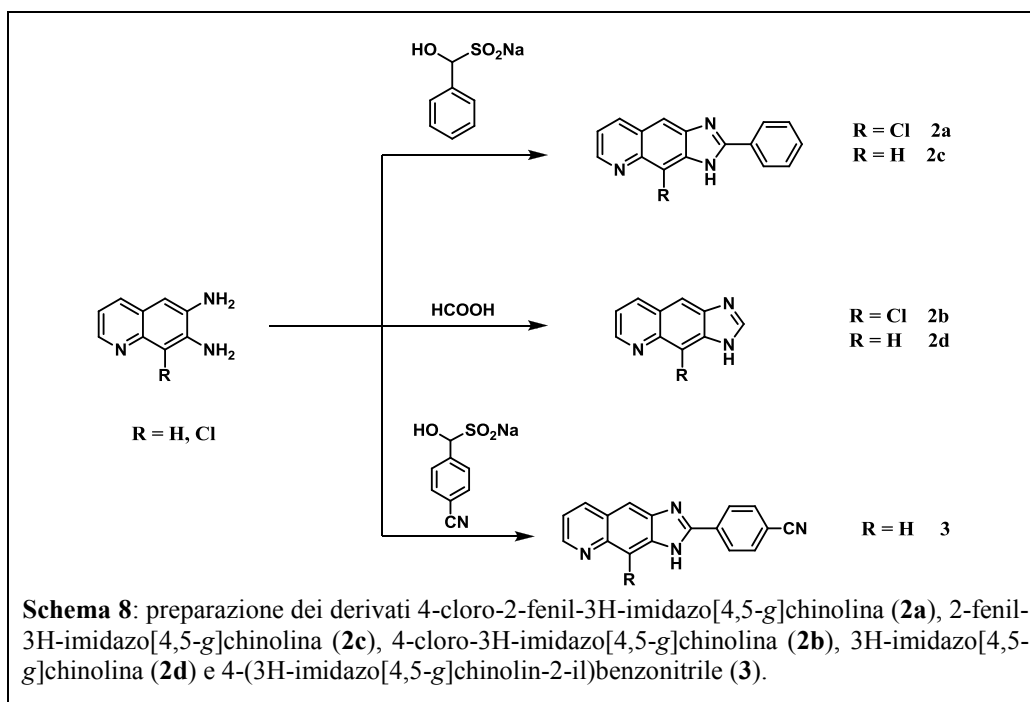
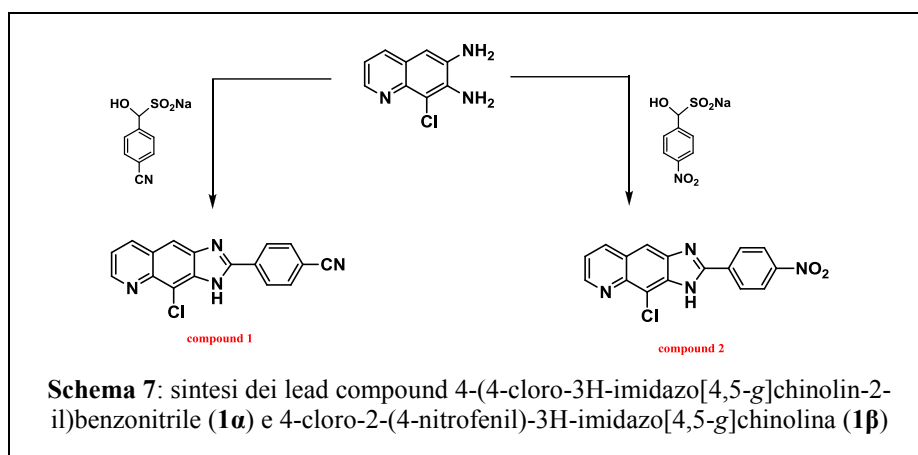
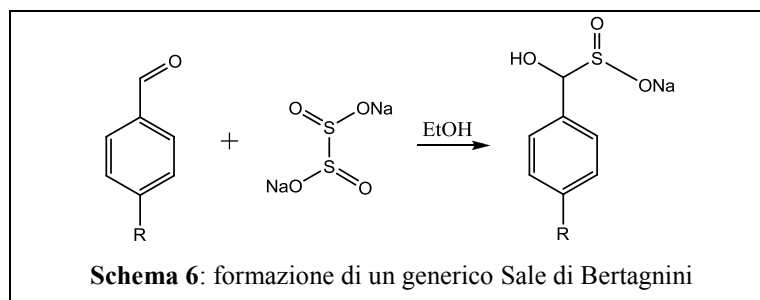
La preparazione dell'intermedio parte dall'acetilazione mediante impiego di anidride acetica della 2,3-dicloroanilina da cui si ottiene la corrispondente acetanilide [77]; questa sottoposta a nitratura in miscela solfonitrica fornisce i

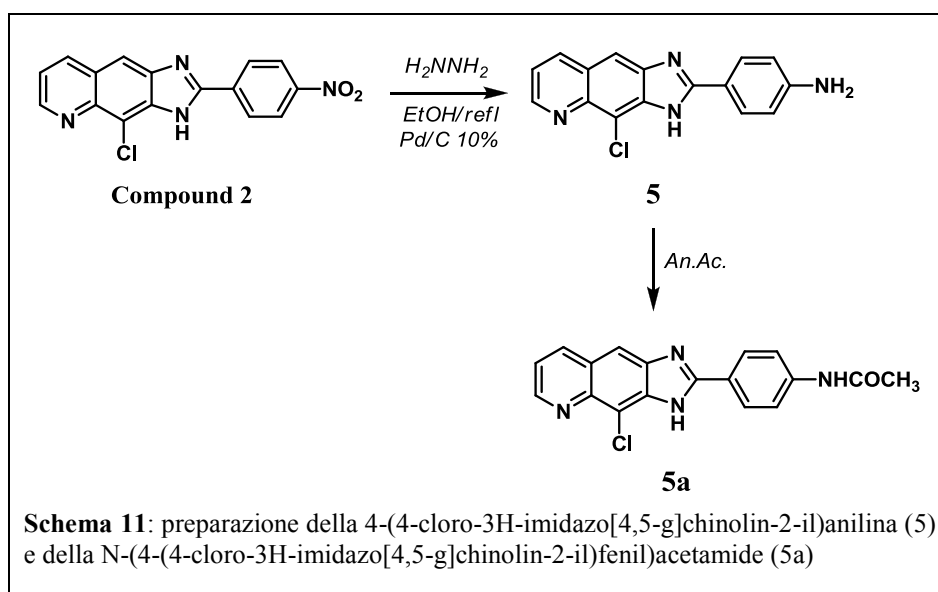
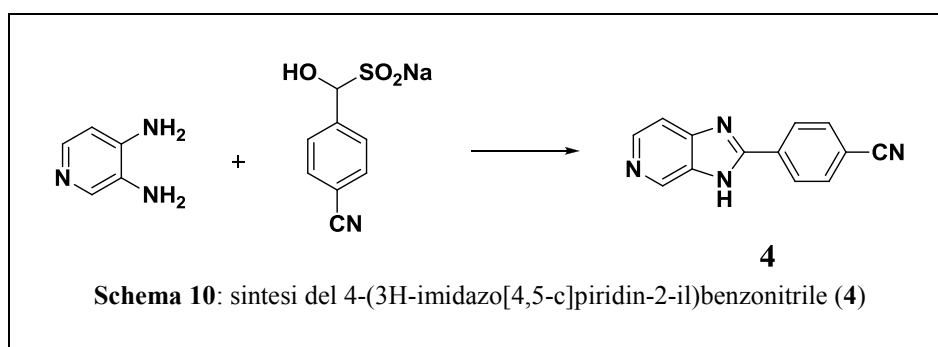
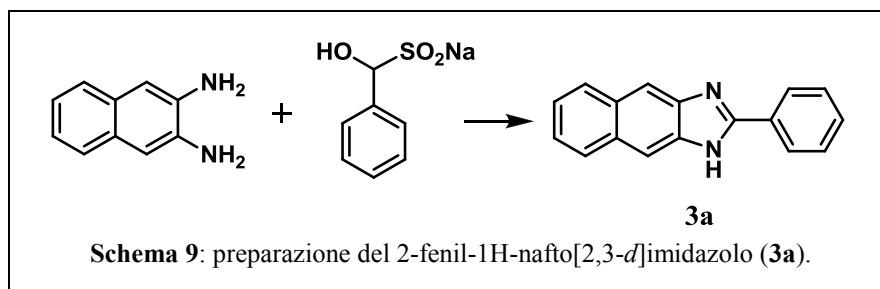
due derivati di nitrizzazione in orto e para. La miscela di 3 e 4, idrolizzata tal quale consentendo di isolare una miscela di 2,3-dicloro-6-nitroanilina e 2,3-dicloro-4-nitroanilina, poi risolta via flash cromatografia utilizzando una miscela di etere etilico:etere di petrolio = 7:3.

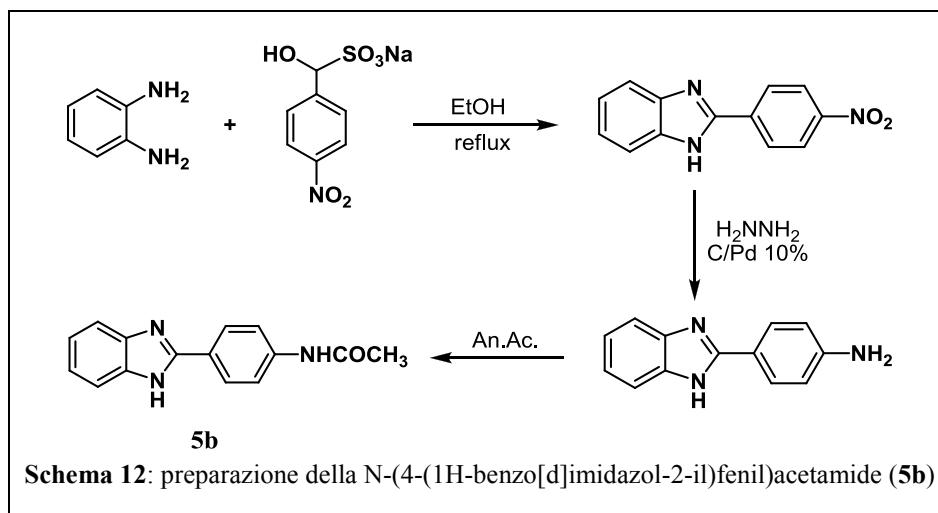
La 2,3-dicloro-4-nitroanilina è stata quindi sottoposta a classica sintesi di Skraup, ottenendo la 7,8-dicloro-6-nitrochinolina. Per trattamento della diclorochinolina con ammoniaca etanolica si ha la sostituzione dell'atomo di cloro in posizione 8 con un gruppo amminico, ottenendo la 8-cloro-6-nitrochinolin-7-amina [73]. Si è infine proceduto con la riduzione del nitro gruppo, passaggio chiave della via e modificato rispetto a ciò che è riportato in bibliografia. È infatti noto che a temperature superiori ai 25 °C l'utilizzo di idrazina provoca, oltre alla riduzione del nitro gruppo anche lo spiazzamento del cloro in posizione 7, dando la 6,7-diamminochinolina (**β**). Si è pertanto utilizzato la metil-idrazina al fine di modulare il rilascio di idrogeno in soluzione, ed in presenza di C/Pd 10% in etanolo a refluxo si è ottenuto la 6,7-diammino-8-clorochinolina (**α**) desiderata [78].

Ultimo passaggio per la formazione del 4-(4-cloro-3H-imidazo[4,5-g]chinolin-2-il) benzonitrile (**1α**) vede quindi la condensazione fra 6,7-diammino-8-clorochinolina con la specifica aldeide, il 4-formil benzonitrile, opportunamente attivata mediante formazione del suo Sale di Bertagnini (mentre la condensazione col sale derivato dalla para-nitro-benzaldeide porta alla formazione del 4-cloro-2-(4-nitrofenil)-3H-imidazo[4,5-g]chinolina, **1β**). Il composto bisolfito di addizione viene ottenuto in alte rese trattando l'aldeide con Na₂S₂O₅ in etanolo (schema 6 e 7).

Si è dunque proceduto alla preparazione dei diversi prodotti di semplificazione molecolare partendo dalle opportune diammine, mono o bicicliche, aromatiche o eteroaromatiche a seconda delle esigenze sintetiche. Le procedure adottate per la preparazione dei nuovi derivati vengono descritte negli schemi 8-12.







Nello schema 8 si riporta la preparazione di diversi composti a partire da un'opportuna diammino-chinolina, rappresentate dalla 6,7-diammino-8-clorochinolina (R=Cl), e dalla 6,7-diammino-chinolina (R=H), da noi sintetizzate. I derivati 4-cloro-2-fenil-3H-imidazo[4,5g]chinolina (**2a**), 2-fenil-3H-imidazo[4,5g]chinolina (**2c**) sono ottenuti dalla rispettiva diammina condensata col Sale di Bertagnini derivato dalla benzaldeide, con rese del 50-90%. I derivati 4-cloro-3H-imidazo[4,5-g]chinolina (**2b**) e 3H-imidazo[4,5-g]chinolina (**2d**) vengono invece ottenuti per trattamento a caldo della corrispondente diammina con acido formico; le rese vanno dal 60 al 90%. Il 4-(3H-imidazo[4,5-g]chinolin-2-il)benzotrile (**3**) si ottiene infine per condensazione della diammina con il sale ottenuto a partire dal 4-formilbenzotrile; la resa è del 70%.

Nello schema 9 si presenta invece la preparazione del 2-fenil-1H-nafto[2,3-d]imidazolo (**3a**), ottenuto con resa dell'80% per trattamento del 2,3-diammino-naftalene con il sale di Bertagnini derivato dalla benzaldeide. In maniera analoga si riporta nello schema 10 la sintesi del 4-(3H-imidazo[4,5-c]piridin-2-il)benzotrile (**4**) ottenuta partendo dalla 3,4-diaminopiridina.

La preparazione della 4-(4-cloro-3H-imidazo[4,5-g]chinolin-2-il)anilina (**5**) e della N-(4-(4-cloro-3H-imidazo[4,5-g]chinolin-2-il)fenil)acetamide (**5a**) vengono descritte nello schema 11. La 4-cloro-2-(4-nitrofenil)-3H-imidazo[4,5-g]chinolina (**1β**) viene sottoposta a riduzione del nitro gruppo utilizzando idrazina in presenza di C/Pd 10% in etanolo a refluxo, con resa del 90%, mentre l'acetanilide viene

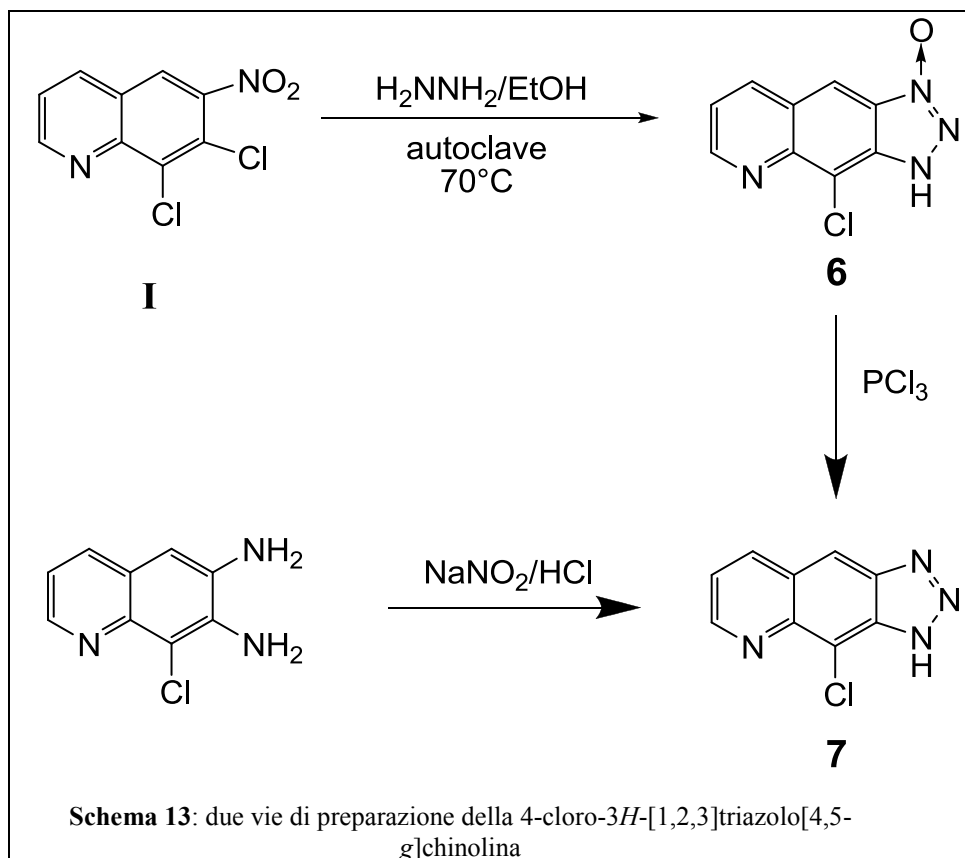
ottenuta per sostituzione nucleofila acilica dell'ammina **5** con anidride acetica (resa 88%).

Infine nello schema 12 è presentata la preparazione della N-(4-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)fenil)acetamide (**5b**) ottenuta per acetilazione della 4-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)anilina, la cui sintesi è stata condotta come riportato in letteratura [79-81]

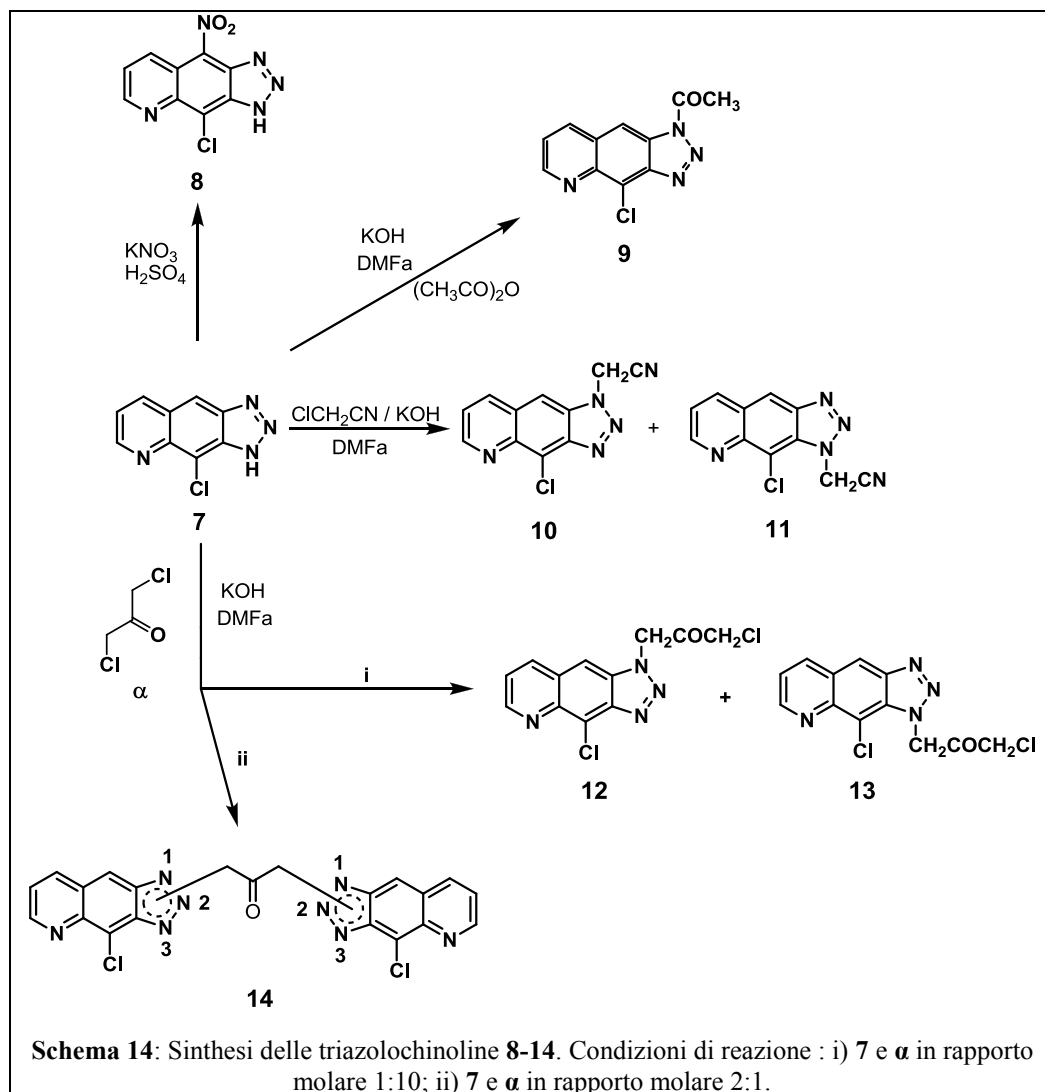
3.2 Preparazione di derivati di sostituzione bioisosterica del sistema imidazolico: le triazolo[4,5-g]chinoline

Una seconda serie di derivati sono stati preparati al fine di valutare quale sia l'importanza al fine dell'analisi SAR della componente azotata del sistema tricyclico linearmente condensato. Si è pertanto deciso di effettuare una sostituzione bioisosterica dell'anello imidazolico con un anello triazolico, opportunamente modulato. Sono state quindi sintetizzate una serie di triazolo[4,5-g]chinoline variamente sostituite.

Il nucleo base, rappresentato dalla 4-cloro-3*H*-[1,2,3]triazolo[4,5-g]chinolina (**7**), necessario per le successive sintesi, è stato ripreparato secondo letteratura [82]. Tale molecola può essere preparata secondo due vie sintetiche (Schema 13). Secondo una prima via questo composto può essere ottenuto, in basse rese (25%), tramite una reazione a due steps: 1) si tratta l'intermedio di reazione 8-dicloro-6-nitrochinolina (**I**) [76] con un largo eccesso di idrazina idrata in etanolo in autoclave a 70 °C per 90 h, ottenendo con rese variabili (56-90%) il corrispondente triazolo[4,5-g]chinolin-1-ossido (**6**): 2) l'N-ossido viene sottoposto a deidrogenazione per trattamento con PCl₃. Purtroppo nessun tentativo di migliorare le rese ha avuto successo, e la preparazione per diazotazione della 6,7-diammino-8-clorochinolina con NaNO₂ resta la via migliore, con rese superiori al 55%.



A questo punto vengono sintetizzati una serie di derivati in cui abbiamo modulato essenzialmente la componente benzotriazolica, con eccezione della 4-cloro-9-nitro-3*H*-[1,2,3]triazolo[4,5-*g*]chinolina (**8**) [75], ottenuta per trattamento del nucleo base con miscela solfo nitrica con rese purtroppo basse (21%). Le vie sintetiche seguite sono descritte nel seguente schema 14.



Il 1-(4-cloro-1*H*-[1,2,3]triazolo[4,5-*g*]chinolin-1-il)etanone (**9**) è stato invece ottenuto per trattamento dell'intermedio benzotriazolico con anidride acetica con resa del 70%. Per alchilazione con cloroacetonitrile in dimetilformamide anidra (DMFa) catalizzata con KOH si ottiene invece una miscela dei composti 2-(4-cloro-1*H*-[1,2,3]triazolo[4,5-*g*]chinolin-1-il)acetonitrile (**10**) e 2-(4-cloro-1*H*-[1,2,3]triazolo[4,5-*g*]chinolin-3-il)acetonitrile (**11**) in rapporto 1:1 (resa: 70%).

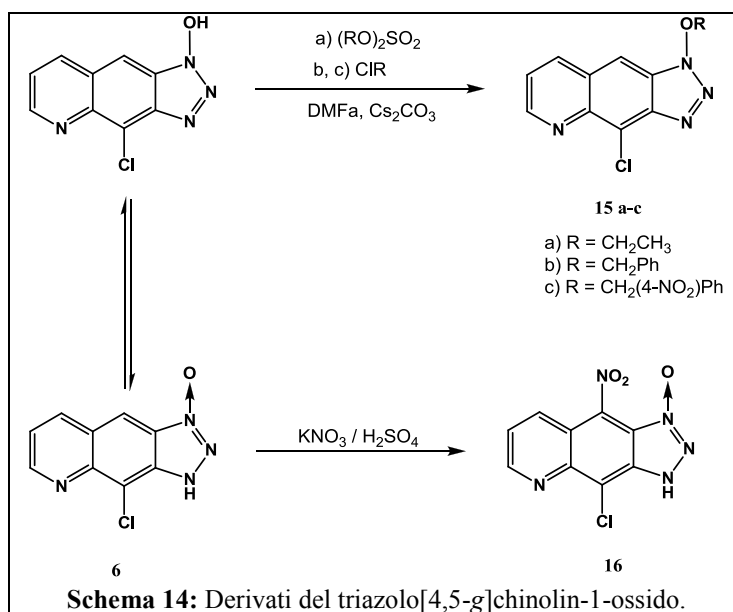
La condensazione della 4-cloro-3*H*-[1,2,3]triazolo[4,5-*g*]chinolina con 1,3-dicloroacetone in dimetilformamide anidra (DMFa) catalizzata con KOH, infine, ha avuto esito diverso a seconda delle delle condizioni di reazione utilizzate; infatti:

- 1) quando il rapporto molare fra i reagenti è di 1:10 a favore dell'agente acilante si forma una miscela di 1-cloro-3-(4-cloro-1*H*-[1,2,3]triazolo[4,5-*g*]chinolin-1-il)propan-2-one (**12**) e 1-cloro-3-(4-cloro-3*H*-[1,2,3]triazolo[4,5-*g*]chinolin-3-il)propan-2-one (**13**), separabili per via cromatografica;
- 2) quando il rapporto molare fra i reagenti è di 2:1 a favore del nucleo benzotriazolico si forma una miscela di 1,3-bis-(4-cloro-1*H*(3*H*)-triazolo[4,5-*g*]chinolin)propan-2-one in rapporto 1:1 (**14**), che purtroppo non si è riusciti a risolvere cromatograficamente.

3.3 Preparazione di derivati di alchilazione del nucleo triazolo[4,5-*g*]chinolin-1-ossido

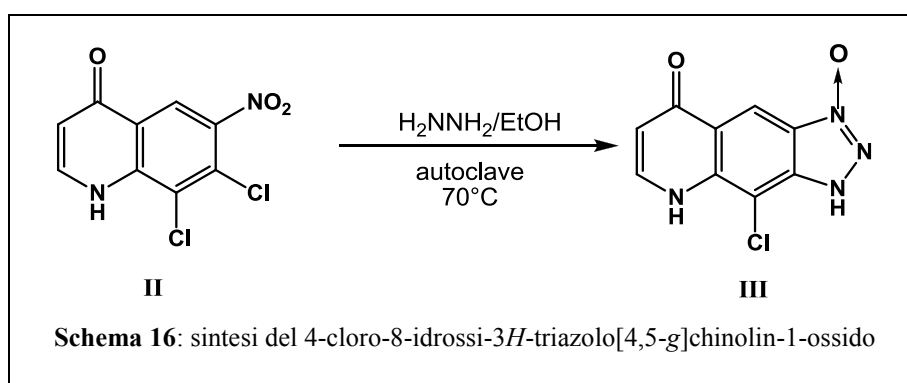
Ancora nell'ottica di valutare quale siano le variazioni ammissibili sul nuovo sistema triciclico a base triazolico generato, si è proceduto a generare una serie di composti di alchilazione derivati dal dal triazolo[4,5-*g*]chinolin-1-ossido (**6**). Queste molecole, la cui chimica è nota in letteratura [83], sono state ripreparate e purificate per la valutazione biologica. I derivati **15 a-c** vengono ottenuti con alte rese: ciò non sorprende in quanto l'atomo di ossigeno presente nella struttura si trova in equilibrio tautomerico con la forma N-OH, ottimale per la formazione degli alcossiderivati.

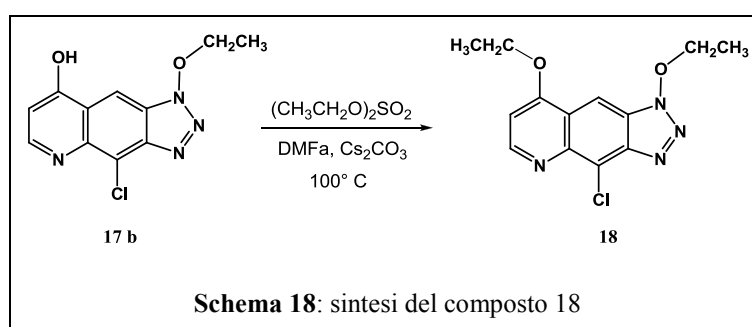
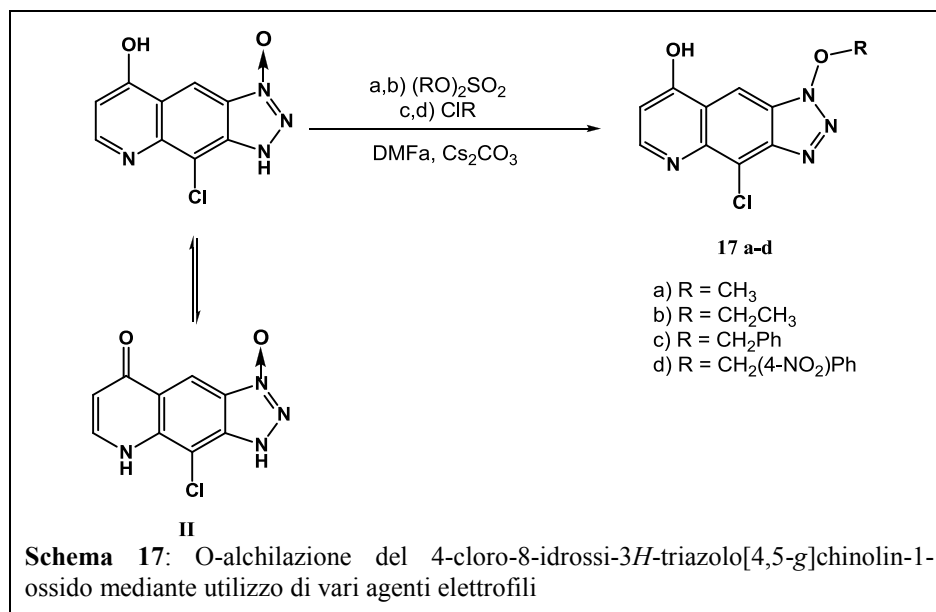
Ancora una volta, si è andati a modulare la componente benzotriazolico, soffermandosi sulla valutazione dell'effetto che i sostituenti sull'*N*1 possono avere sull'eventuale attività antivirale. Un'ulteriore modificazione ha visto infine l'introduzione di un nitro gruppo sull'anello centrale del sistema triciclico, al fine di generare un termine di paragone (**16**) per il composto triazolochinolico **8**.



3.4 Preparazione di derivati del triazolo[4,5-g]chinolin-8-ol-N-ossido

Questa serie di derivati viene invece preparata sulla falsariga dei composti **19 a-c**, in cui però viene modulata la componente chinolinica mediante introduzione di un gruppo ossidrilico in para all'azoto eterociclico. In questo caso viene ripreparato il 7,8-dicloro-6-nitrochinolin-4(1*H*)-one (**II**), composto la cui sintesi è stata studiata e messa a punto dal gruppo di ricerca del prof. Antonio Carta, come anche la formazione del corrispondente triazolo N-ossido (**III**) [75]. Vengono anche ripreparati una serie di alcoli derivati (**17 a-d**, **18**), la cui chimica è stata già presentata, ma di cui non si era valutata l'attività antivirale [83]. Di seguito vengono riportati i rispettivi schemi di sintesi (schemi 16-19).





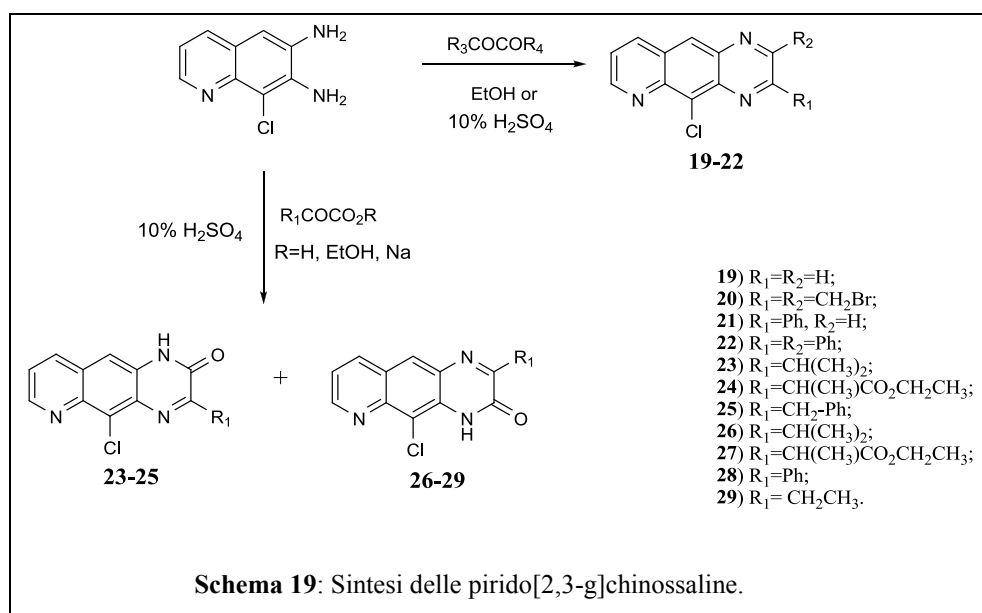
3.5 Preparazione di derivati a struttura pirido[2,3-*g*]chinossalinica

Per l'ultima serie di derivati preparata, si è deciso di modificare ulteriormente la componente poliazotata del sistema triclico, sostituendo il nucleo imidazolico o triazolico con un anello chinossalinico. Facendo riferimento alla Tabella 1, è già stata messa in evidenza l'attività antivirale di diverse molecole a struttura piridochinossalinica e piridochinossalinonica, per le quali la NS5B è stata identificata come target biologico. Queste molecole, purtroppo, sebbene assolutamente non citotossiche, presentano una limitata attività biologica (EC_{50} 4-11 μ M) accompagnata da un moderato indice di selettività ($SI = 16-25$). Al fine quindi di migliorarne il profilo farmacologico si è deciso di ripreparare e valutare la possibile attività antivirale sia del nucleo base 5-cloropirido[3,2-

g]chinossalinico (**19**) (considerando l'attività dell'hit 7), sia della nota 2,3-bis(bromometil)-5-cloropirido[3,2-g]chinossalina [73, 84].

Sono stati di seguito sintetizzati nuovi derivati variamente sostituiti sulla componente chinossalinica o chinossalinonica, sia in posizione 3 che 4, cercando di introdurre gruppi stericamente ingombranti, sia alifatici che aromatici, sulla falsa riga degli hits dimostrati tisi più efficaci.

Ancora una volta la 6,7-diammino-8-clorochinolina rappresenta l'intermedio chiave della sintesi dei nuovi derivati, ottenuti facendo reagire la diammina con opportuni composti 1,2 dicarbonilici, come riportato nello schema 19.



4 VALUTAZIONE BIOLOGICA

Tutte le triazolo[4,5-g]chinoline, imidazo[4,5-g]chinoline e pirido[2,3-g]chinossaline sintetizzate in questo lavoro (Schema 20) sono state sottoposte ad analisi in vitro nei confronti non solo di virus a RNA a polarità positiva, ma anche a polarità negativa e a DNA.

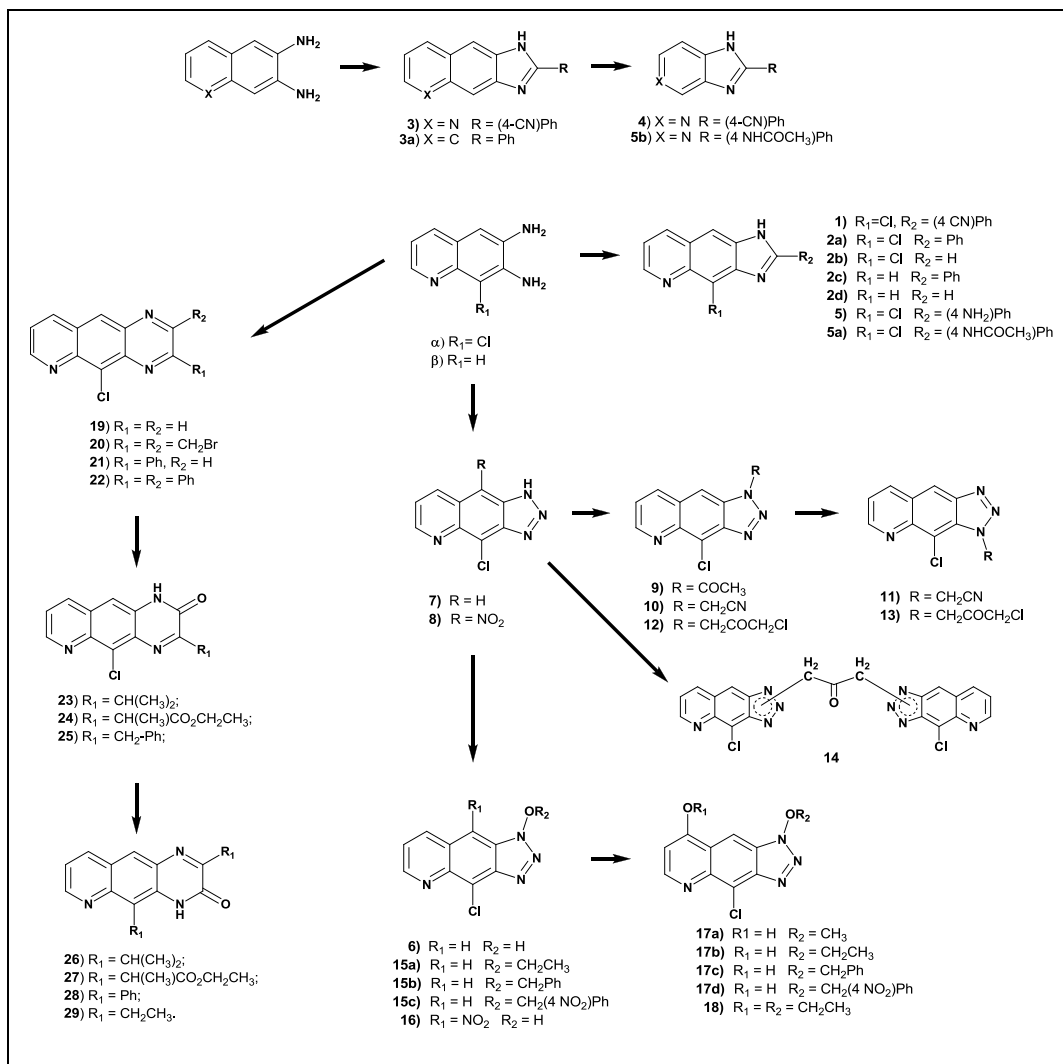
Fra i virus ssRNA⁺ ritroviamo lo human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) (*Retroviridae*), il bovine viral diarrhoea virus (BVDV) e lo yellow fever virus (YFV) (*Flaviviridae*), due appartenenti alle *Picornaviridae*, lo human enterovirus B (coxsackie virus B5, CVB-5,) e lo human enterovirus C (polio virus type-1, Sb-1). Fra i virus ssRNA⁻ viruses, invece, lo human respiratory syncytial virus (RSV) (*Paramyxoviridae*) ed il vesicular stomatitis virus (VSV) (*Rhabdoviridae*). Fra i dsRNA viruses, è stato utilizzato il reovirus type-1 (Reo-1) (*Reoviridae*). Infine sono stati inclusi nello studio anche due rappresentanti a DNA: il vaccinia virus (VV) (*Poxviridae*) e lo human herpesvirus 1 (herpes simplex type-1, HSV-1) (*Herpesviridae*).

La citotossicità è stata valutata in parallelo con l'attività antivirale usando Efavirenz, 2'-C-metil-guanosina, 2'-C-metilcitidina, 2'-C-etinil-citidina, 6-azauridina, acido micofenolico e acyclovir come composti di riferimento. A tale scopo sono state impiegate linee cellulari specifiche a seconda della capacità che queste hanno dimostrato nell'assicurare la replicazione e crescita virale. In particolare sono state utilizzate linee MT-4 (CD4⁺ human T-cells containing an integrated HTLV-1 Genome) per HIV-1; MDBK (Madin Darby Bovine Kidney) per BVDV; BHK-21 (Baby Hamster Kidney) per YFV e Reo-1, e infine Vero-76 (Monkey kidney) per CVB-5, Sb-1, VV, HSV-1 e RSV. La citotossicità dei nostri composti è stata valutata sulle sole cellule non infettate, mentre l'attività antivirale è dimostrata dalla capacità che ciascun composto ha di determinare un'inibizione dell'effetto citopagenico virale.

Tutti i composti sono stati disciolti in dimetilsolfossido (DMSO) in concentrazione 100 µM ed addizionati al mezzo di cultura cellulare. I tests in vitro sono stati condotti presso il Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche

Irene Briguglio, *Sintesi e valutazione di sistemi azotati tricyclici aromatici come possibili agenti antivirali*.
Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, indirizzo Scienze Farmaceutiche (XXIV ciclo),
Università degli studi di Sassari.

dell'Università di Cagliari, sotto la supervisione del Prof. Paolo la Colla. I risultati ottenuti sono riportati nelle seguenti tabelle (Tabella 2-3).



Schema 20: prospetto riassuntivo dei nuovi derivati triciclici aromatici azotati sintetizzati.

Tabella 2: citotossicità ed attività antivirale delle imidazo[4,5-g]chinoline (**1-5**), triazolo[4,5-g]chinoline (**6-18**) e pirido[2,3]chinossaline (**19-29**) nei confronti di virus ssRNA+ (HIV-1, BVDV, YFV, CBV-5, Sb-1), ssRNA – (RSV, VSV) dsDNA (Reo-1) e DNA (VV, HSV-1).

Compd	MT-4	HIV-1	MDBK	BVDV	BHK	YFV	Reo-1	Ver0-76	CVB-5	Polio-1	RSV	VSV	VV	HSV-1 ⁿ
	CC ₅₀	EC ₅₀	CC ₅₀	EC ₅₀	CC ₅₀	EC ₅₀	CC ₅₀	EC ₅₀						
1α	>100	>100	69	0.3	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
1β	>100	>100	>100	1.2	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	44
2a	29	>29	65	4	35	>35	10	>100	36	53	>100	>100	>100	>100
2b	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	ND	>100	>100	>100
2c	28	>28	>28	10	40	>40	13	>100	19	37	>100	>100	>100	>100
2d	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	ND	>100	>100	>100
3	34	>34	>34	4	100	100	52	100	100	67	100	100	100	100
3a	39	>39	>39	9	27	>27	>27	25	9	>25	7	>25	>25	>25
4	100	100	100	9	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
5	15	>15	45	10	42	>42	>42	>100	78	>100	>100	>100	>100	>100
5a	>100	>100	>100	11	>100	>100	51	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
6	>100	>100	>100	>100	>100	>100	ND	>100	86	>100	>100	>100	>100	>100
7	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
8	>100	>100	>100	23	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
9	46	>46	30	>30	72	>72	ND	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
10	62	>62	>100	23	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	51
11	100	ND	>100	100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
12	21	>21	53	>53	85	>85	>85	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
13	23	>23	21	>21	65	>65	>65	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
14	>100	ND	>100	1	>100	>100	50	>100	>100	>100	>100	>100	ND	>100
15a	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
15b	20	>20	>100	31	>100	>100	>100	15	>15	>15	>15	>15	>15	>15

15c	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
16	>100	>100	>100	>100	>100	>100	ND	>100	>100	>100	>100	>100	>100	ND
17a	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
17b	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
17c	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	75	>75	>75	>75	>75	>75	>75
18	>80	>80	>80	>80	>80	>80	>80	>80	>80	>80	>80	>80	>80	>80
19	82	>82	6.5	>6.5	70	>70	>70	90	50	>90	>90	>90	57	90
20	16	>16	20	>20	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
21	>100	>100	>100	18	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
22	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
23	100	>100	>100	100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
24	11	>11	>100	10	75	50	>75	>100	>100	>100	62	>100	>100	>100
25	15	>15	>100	2.6	>100	>100	>100	88	>88	>88	>88	>88	>88	>88
26	48	>48	100	5	>100	>100	47	>100	>100	>100	38	62	>100	>100
27	59	>59	>100	19	>100	>100	>100	>100	>100	≥100	>100	≥100	>100	≥100
28	61	>61	>100	5	>100	>100	100	>100	>100	>100	>100	100	39	>100
29	51	>51	75	6.5	95	>95	36	100	>100	>100	18	35	>100	>100
EFV	40	0.002												
2'-MG			>10	1.1	>10	1.9								
2'-MC					>100		16							
2'-EC								>100	27	23				
6-AU								≥12.5			1.2			
MA								≥12.5					1.5	
ACG								>100						3 (33)

I dati rappresentano la media dei valori ottenuti su tre determinazioni indipendenti. La variazione dei duplicati è inferiore al 15%.

ND = Non determinato.

EFV = Efavirenz; 2'-MG = 2'-C-metil-guanosina; 2'-MC = 2'-C-metil-citidina; 2-EC = 20-C-ethynyl-cytidine; 6-AU = 6-aza-uridina; MA = acido micofenolico acid; ACG = acicloguanosina.

CC₅₀ = concentrazione molare del composto (μM) che riduce la crescita cellulare del 50% in riferimento al numero di cellule presenti in un controllo non trattato.

EC₅₀ = concentrazione molare del composto (μM) che riduce del 50% l'effetto citopatico virale

Tabella 3: indice di selettività dei composti attivi su BVDV.

Compd	BVDV EC ₅₀ (μM)	S.I.	Compd	BVDV EC ₅₀ (μM)	S.I.
1α	0.3	230	21	18	6
1β	1.2	80	24	10	10
2a	4	16	25	2.6	38
2c	10	8	26	5	20
5	10	5	27	19	5
5a	11	9	28	5	20
8	23	4	29	6.5	12
10	23	4			
14	1	>100	2'-MG	1.1	9

I dati rappresentano la media dei valori ottenuti su tre determinazioni indipendenti. La variazione dei duplicati è inferiore al 15%.

2'-MG = 2'-C-metil-guanosina;

EC₅₀ = concentrazione molare del composto (μM) che riduce del 50% l'effetto citopatico virale

SI = indice di selettività (calcolato come il rapporto tra il valore di CC₅₀ e di EC₅₀)

Dallo screening biologico condotto possiamo vedere come nessun composto è risultato attivo nei confronti di HIV-1 e che solo alcuni derivato hanno dimostrato una limitata attività contro YFV, Sb-1, VSV,VV e HSV-1. Fra i derivati di semplificazione molecolare del lead compound **1α**, invece, si riscontrano attività più varie, accompagnate da una modesta citotossicità; i composti a struttura imidazochinolinica, infatti, sono risultati moderatamente attivi nei confronti di Reo-1 (10-13 μM), CVB-5 (36-19 μM) e Polio-1 (53-37 μM), ma è soprattutto il composto **3a** a struttura imidazonaftalenica a spiccare per la sua interessante attività su CVB-5 (9 μM) ma soprattutto su RSV, una delle cause più frequenti di infezioni respiratorie acute nei bambini piccoli [85], la cui morbilità e mortalità sono più elevate nei neonati, nei pazienti debilitati o con malattie cardiopolmonari croniche o con disfunzioni immunitarie [86], nonché nei pazienti trapiantati, in cui la letalità di una malattia da RSV va dal 20 a più dell'80 % [87]. Le infezioni nosocomiali da RSV costituiscono un problema importante nelle unità che ospitano neonati e pazienti trapiantati, in quanto a tutt'oggi non esiste un trattamento farmacologico mirato ed efficace. Viene utilizzata in maniera

assolutamente generalistica la Ribavirina, cosa che si traduce nell'intraprendere una terapia spesso inefficace e gravata da effetti collaterali importanti.

Procedendo nell'analisi, è possibile notare come composti appartenenti a tutte le classi generate riportino un'interessante attività anti-BVDV. In tal senso possiamo utilizzare i dati ottenuti per stendere un primo rapporto sulle relazioni che intercorrono fra la struttura chimica riportata dai derivati e questa loro specifica attività biologica (studio SAR), usando come prodotto di riferimento il composto **1a**, che abbiamo visto essere il più potente di tutti i composti sintetizzati.

Vista la totale inefficacia dei nuclei base alogenati **2b**, **7** e **19** possiamo capire quale sia l'importanza della sostituzione laterale. Infatti già dall'analisi dei derivati di imidazo[4,5-g]chinolinici si conferma (confronto **2a,2c/2b,2d**) che la mancanza del fenile legato all'anello imidazolico porti alla totale perdita dell'attività. Si evince poi che i sostituenti in posizione 4' hanno essenzialmente una funzione modulatrice, e che la loro assenza (composti **2a** e **2c**) porta ad ampliare lo spettro d'azione verso Coxsackie, Polio e Reovirus, mentre la presenza di gruppi elettronattrattori migliora l'attività anti-BVDV. Sempre dal confronto dei derivati **2a** e **2c** capiamo che anche la presenza di un atomo di cloro legato in posizione 4 modula positivamente l'attività biologica. Il sistema tricyclico azotato sull'anello A risulta quindi ottimale per l'ottenimento di un'attività anti-BVDV, e confrontando i derivati **4** e **5b** vediamo che l'unica variazione ammessa è l'eliminazione dell'anello centrale. L'azoto chinolinico, infine, è essenziale per ottenere un'azione contro BVDV, in quanto a sostituzione del nucleo eterociclico con quello naftalenico (composto **3a**) porta alla manifestazione di attività nei confronti di RSV.

Nell'ottica quindi di mantenere costante la componente chinolinica alogenata, la modulazione dell'anello C ha portato a risultati diversi.

La sostituzione dell'anello imidazolico con un anello triazolico variamente sostituito ha portato alla generazione di una classe di composti purtroppo meno attivi delle altre due. Uniche eccezioni sono i composti **8** e **10**, ma soprattutto la miscela **1m**, che si è dimostrata estremamente potente ($EC_{50} = 1 \mu M$) e selettiva, accompagnata da un'assoluta non citotossicità ($CC_{50} > 100$, $SI > 100$). In questo

Irene Briguglio, *Sintesi e valutazione di sistemi azotati tricyclici aromatici come possibili agenti antivirali*.
Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, indirizzo Scienze Farmaceutiche (XXIV ciclo),
Università degli studi di Sassari.

caso l'impossibilità di separare i due isomeri non ci permette di speculare in maniera esatta sulle strutture molecolari, ma appare fin qui evidente che la costruzione di sistemi a struttura nastriforme permettano ai derivati di interagire al meglio a livello della tasca di legame a livello enzimatico.

Fra le pirido[2,3-g]chinossaline, infine, troviamo il maggior numero di derivati farmacologicamente attivi (**21**, **24-29**), con un range di attività fra 2.6 e 18 μM . dall'analisi SAR si conferma l'importanza di sostituenti aromatici laterali, più efficaci di catene laterali alifatiche (confronto composti **28** e **25** con **24**, **27** e **29**). Le chinossaline 19-22 sono infine risultate meno potenti dei chinossalinoni, ed il 2-oxo-derivato **25** è risultato il più attivo in vitro (2.6 μM), probabilmente grazie alla componente benzilica che assicura alla catena laterale una componente aromatica ingombrante stericamente ma dotata di un maggior numero di gradi di libertà rispetto ad un sistema aromatico direttamente legato al sistema eterociclico (lead **2 β** , $\text{EC}_{50} = 11 \mu\text{M}$).

Globalmente, dunque, non sono stati ottenuti miglioramenti per quel che riguarda i composti a struttura imidazochinolinica, che invece ci hanno fornito importanti direttive per quel che riguarda l'analisi SAR, mentre sono emersi dall'analisi i nuovi lead **14** e **25**, che sono stati sottoposti ad ulteriore analisi biologica.

Utilizzando ancora una volta i composti **1 α** e **1 β** come riferimento, i derivati **14** e **25** sono stati saggiati su una linea cellulare derivata da epatoma umano (GS4.1) usando l'HCV in replicazione subgenomica (sistema del replicon). Da questa analisi si evince purtroppo che i nostri nuovi derivati risultano totalmente inattivi rispetto ai due leads, che al contempo presentano comunque un basso indice di selettività. Questo potrebbe essere eventualmente giustificato da problemi di uptake cellulare ed in generale a problemi di ordine farmacocinetico.

Si è infatti proceduto anche all'analisi dell'attività inibente su enzima isolato NS5B sia di BVDV che di HCV, target confermato nell'ipotesi iniziale per i composti **1 α** e **1 β** , su cui quest'ultimo si è dimostrato decisamente più attivo su BVDV che su HCV, su cui è 100 volte meno potente. I composti 14 e 25, purtroppo, si sono dimostrati attivi solo nei confronti della BVDV-NS5B, come riportato in tabella 4.

Tabella 4. Comparazione dell'attività dei composti **1a**, **1b**, **14** e **25** nei confronti di BVDV ed HCV, in test in vitro e su enzima isolato.

Cpd	^a Cell-based				^a RdRp	
	BVDV		HCV-1b		BVDV	HCV-1b
	^b CC ₅₀ (μ M)	^c EC ₅₀ [μ M]	^d CC ₅₀ [μ M]	^e EC ₅₀ [μ M]	^f IC ₅₀ [μ M]	
1a	69 \pm 0.05	0.3 \pm 0.04 (230)	>75	30 \pm 0.5 (>2.5)	1 \pm 0.03	4 \pm 0.09
1b	>100	1.2 \pm 0.07 (>80)	12 \pm 0.9	3.1 \pm 0.3 (4)	0.06 \pm 0.01	8.0 \pm 0.8
14	>100	1.0 \pm 0.09 (>100)	>100	>100	0.4 \pm 0.05	>10
25	>100	2.6 \pm 0.3 (>38)	65 \pm 0.9	>65	1.2 \pm 0.2	>10

^a I dati rappresentano la media dei valori ottenuti su tre determinazioni indipendenti..

^b concentrazione molare del composto (μ M) che riduce la crescita di cellule MDBK infettate da BVDV del 50% in riferimento al numero di cellule presenti in un controllo non trattato.

^c concentrazione molare del composto (μ M) che riduce del 50% l'effetto citopatico di BVDV su cellule MDBK non infettate.

^d concentrazione molare del composto (μ M) che riduce la crescita di cellule GS4.1 infettate da HCV-1 del 50% in riferimento al numero di cellule presenti in un controllo non trattato.

^e concentrazione molare del composto (μ M) che riduce del 50% l'effetto citopatico di HCV-1 su cellule GS4.1 non infettate.

^f concentrazione molare del composto (μ M) che riduce del 50% la produzione di RNA da parte della NS5B di BVDV e HCV.

() = indice di selettività

Sono infine state costruite le curve dose-risposta per i composti **1b**, **14** e **25** su NS5B. Per **1b** l'analisi è stata condotta sia su BVDV che su HCV (enzima isolato RprRd NS5B), ed il profilo ottenuto è analogo, ma si dimostra come questo sia più 100 volte più potente in BVDV rispetto ad HCV. Il rapporto fra le IC₅₀ sui due substrati è infatti di 133 a favore di BVDV, come riportato in figura 20.

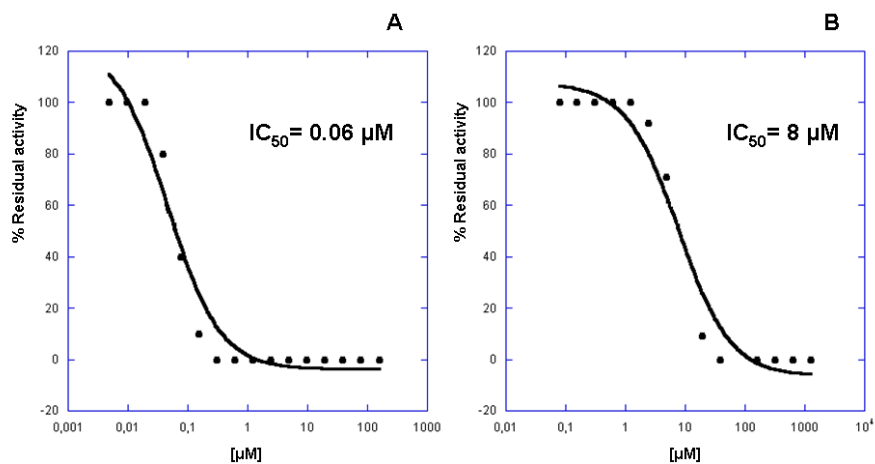


Figura 20: curva dose-risposta di **1β** su RpRd NS5B di BVDV (A) e HCV (B)

Lo stesso è stato fatto per i composti **14** e **25** su NS5B del solo BVDV (fig. 21). Anche in questo caso il profilo di inibizione è simile, e dai valori di IC₅₀ si evince la potenza del composto **14**, 3 volte superiore a quella del composto **25**.

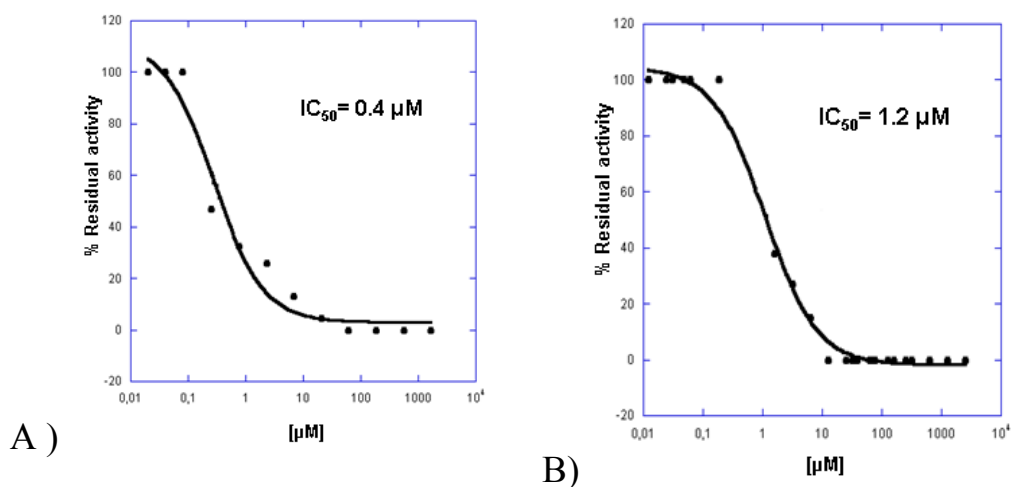
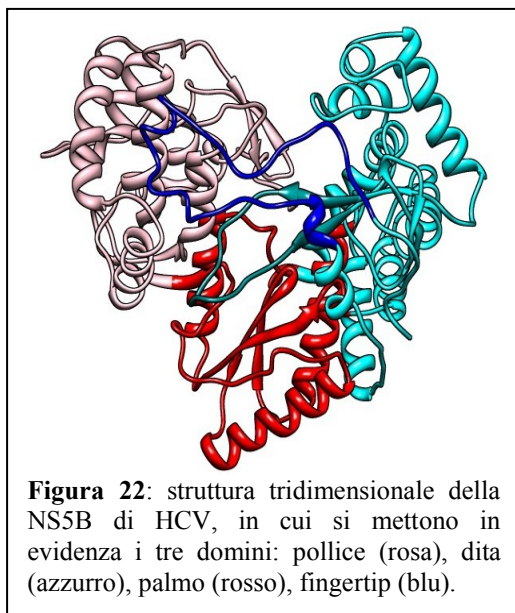


Figura 21. curva dose-risposta di **14** (A) e **25** (B) su RpRd NS5B di BVDV.

5 MODELLISTICA MOLECOLARE

La RNA polimerasi RNA dipendente (NS5B) di HCV è stata identificata come il target molecolare dei composti presentati in questa tesi. Purtroppo studi di selezione di mutanti resistenti sono ancora in corso, e le uniche evidenze biologiche sono a tutt'oggi riconducibili ai soli leads compounds riportati in tabella 1. Utilizzando il composto **1a** come riferimento, è stato però condotto un



preliminare studio di modellistica molecolare.

In primis è stata studiata in maniera approfondita la struttura tridimensionale della NS5B sia di HCV che di BVDV, riconosciuto come surrogato del primo per i motivi descritti in precedenza [88], ricordando che questi sono enzimi strutturalmente distinti dalle relative RNA e DNA polimerasi dei mammiferi, e che perciò rappresentano un attraente bersaglio molecolare al fine di ottenere

una selettività d'azione la più elevata possibile.

Abbiamo detto che questo enzima è essenziale per la replicazione virale e contiene motivi condivisi da tutte le RdRps, inclusa la sequenza Gly-Asp-Asp (GDD) del sito catalitico, dove si pensa che vengano legati ioni magnesio, fondamentali per l'attività enzimatica. La HCV-NS5B è una proteina da 66 KDa che possiede una regione C-terminale altamente idrofobica responsabile dell'ancoraggio alla membrana del reticolo endoplasmatico [89] (ed in genere le proteine cristallizzate presentano una delezione di 20-90 aminoacidi di questa porzione proprio al fine di aumentarne la solubilità).

Questo enzima presenta la classica struttura “a mano destra”(fig. 22) in cui si distinguono caratteristiche riscontrabili in molte polimerasi [90], come i tre domini strutturali chiamati dita (fingers, residui 1-187, 228-286, composto da 8

motivi ad α -eliche e 4 a β -foglietto), palmo (palm, residui 188-227, 287-370, composto da 3 motivi ad α -eliche e 3 a β -foglietto) e pollice (thumb, residui 371-563, composto da 7 motivi ad α -eliche e 2 a β -foglietto; queste ultime, antiparallele, formano la flap region, una struttura che pare giochi un ruolo importante nell'iniziazione del processo di polimerizzazione) [91]. Si osserva poi un'estensione della struttura delle dita, chiamata "fingertip subdomain" che contiene due loop detti $\Lambda 1$ (short loop, residui 139-160) e $\Lambda 2$ (long loop, residui 11-45). Infine si identifica un β loop (residui 443-454) che protrude all'interno del sito catalitico, interferendo probabilmente col legame dell'enzima all'RNA a causa dell'ingombro sterico causato [92].

L'organizzazione di queste componenti conferisce all'enzima una struttura relativamente sferica e chiusa, e la cavità del sito attivo (cui l'RNA template e i NTP hanno accesso mediante un tunnel carico positivamente) è completamente circondato. È dunque all'interno di questa organizzazione strutturale che si identificano i diversi binding sites per gli inibitori non nucleosidici (NNI), come descritto precedentemente (paragrafo 2.5). La ricerca e lo sviluppo di nuovi derivati NNI è estremamente interessante se si pensa alla possibilità di affiancare tali composti a nuovi inibitori nucleosidici (NI), in quanto studi *in vitro* suggeriscono che un tale piano terapeutico ridurrebbe al minimo la possibilità di sviluppo di ceppi portanti doppie resistenze [93].

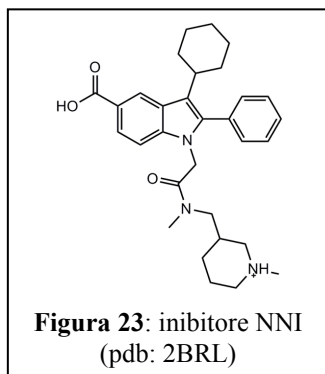
In particolare, analizzando le analogie strutturali fra gli NNI ufficialmente riconosciuti e quella del nostro lead **1a** (imidazochinolinico), abbiamo focalizzato la nostra attenzione sul binding site III, riconosciuto come sito di legame per benzimidazoli ed indoli.

Lo studio di questi inibitori ha messo in evidenza la presenza di una tasca di legame sul pollice in cui è presente un corto loop ad α -elica che, nella forma apo dell'enzima, forma una porzione del fingertip, il quale si estende al di fuori del sub-dominio del finger e prende contatto col dominio del pollice. Poiché la maggior parte di questi inibitori presentano un anello aromatico o alifatico legato all'eterociclo (come nel caso del nostro lead) si pensa che l'azione inibente sia proprio dovuta proprio alla capacità che questi sostituenti hanno di interferire nei

Irene Briguglio, *Sintesi e valutazione di sistemi azotati triciclici aromatici come possibili agenti antivirali*.
Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, indirizzo Scienze Farmaceutiche (XXIV ciclo),
Università degli studi di Sassari.

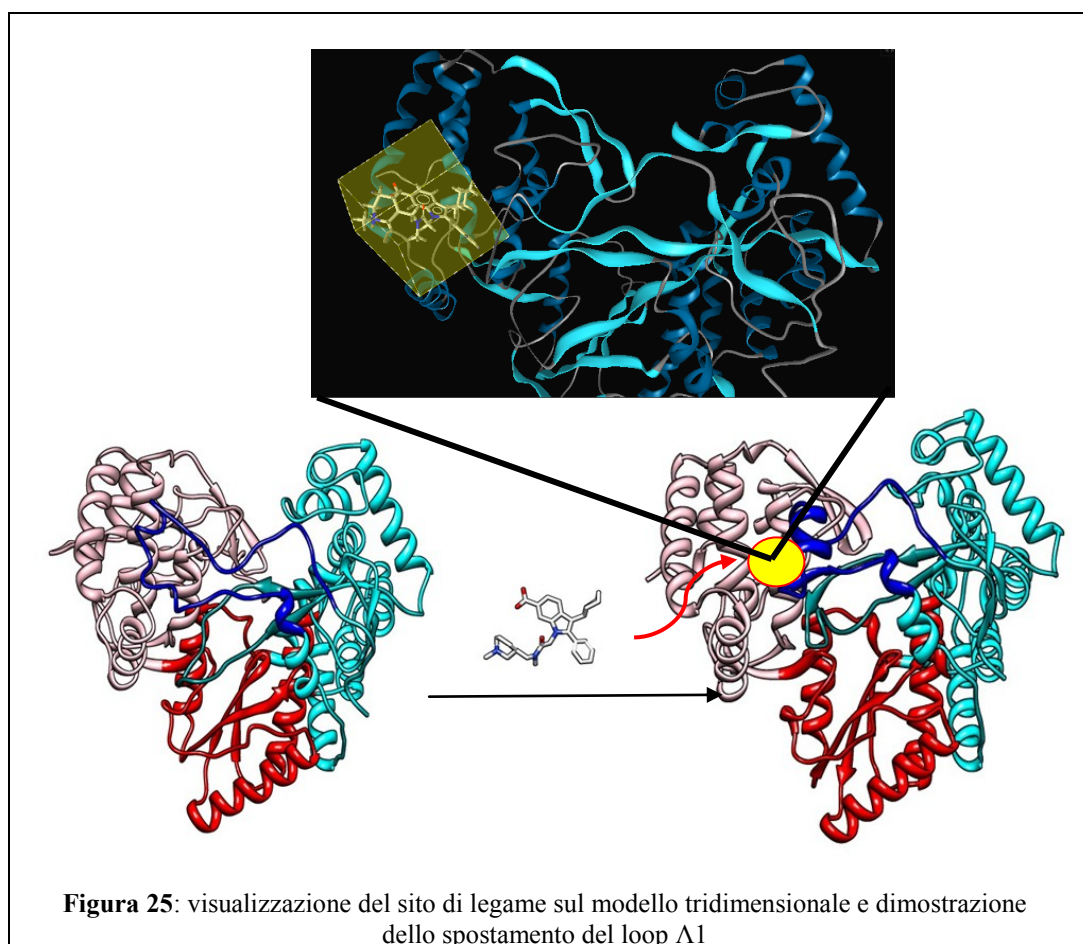
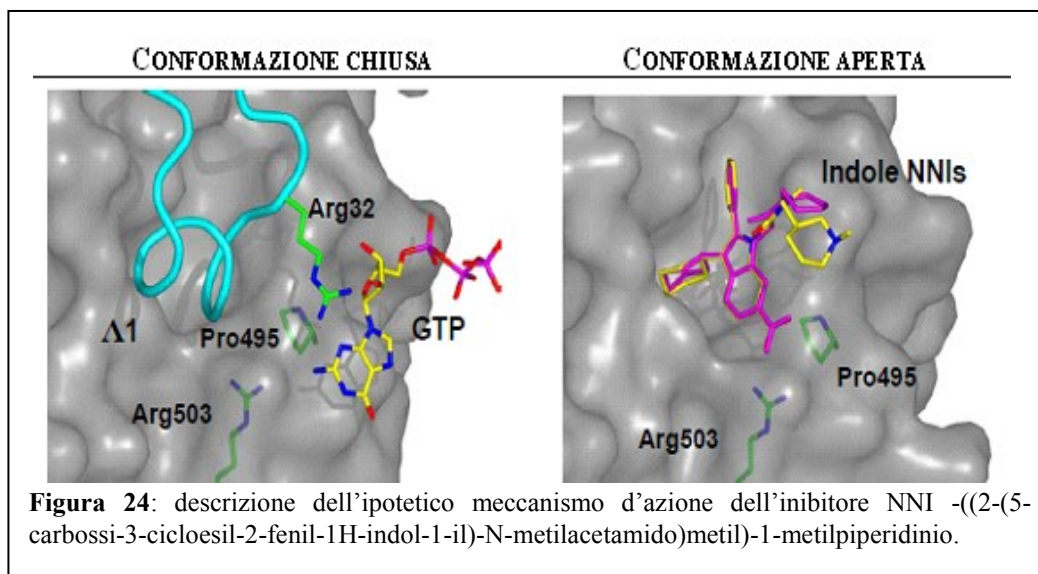
contatti interdominio legandosi ad una tasca prevalentemente idrofobica, mentre la parte acida della molecola forma un ponte salino con l'Arg 530, sulla superficie enzimatica [94]. Si è infine dimostrato che gli inibitori che si legano in questo sito si comportano come inibitori non competitivi (rispetto agli analoghi nucleosidici) e che agiscono prima che l'enzima entri nella modalità di elongazione dell'RNA.

Per i nostri studi è stato quindi un inibitore allosterico a struttura imidazolica, il 3-



((2-(5-carbossi-3-cicloesil-2-fenil-1*H*-indol-1-il)-*N*-metilacetamido)metil)-1-metilpiperidinio (fig. 23, pdb code: 2BRL). Usiamo quindi questa molecola ed il suo corrispondente modello 3D di HCV NS5B, basato sull'analisi cristallografica del prodotto di cocristallizzazione farmaco-enzima.

È dallo studio di questo derivato che è stata avanzata un'ipotesi circa il meccanismo d'azione di tali inibitori. È stato infatti dimostrato che la HCV NS5B esiste in due conformazioni base [95]: una chiusa ed una aperta. Le due forme differiscono soprattutto nell'orientamento e disposizione dei due loop $\Lambda 1$ e $\Lambda 2$ del fingertip, coinvolte quindi nel cambiamento conformazionale dell'enzima. Nella forma aperta, infatti, la conformazione della punta del fingertip (loop $\Lambda 1$) si allontana dal dominio del pollice e passa dalla conformazione ad α -elica della forma chiusa a quella di un β -foglietto. In questa forma il GTP si lega all'enzima (in un pocket adiacente alla tasca appena lasciata libera) e stimola la polimerizzazione. L'inibitore, invece, si lega proprio nel pocket lasciato libero dall' α -elica, congelando l'enzima nella forma aperta ed alterando le interazioni fra i loop $\Lambda 1$ e $\Lambda 2$ che lo stabilizzano, di fatto bloccando il procedere della sintesi del neo RNA (fig. 24-25) [94].



A questo punto ipotizziamo che questo sia il meccanismo d'azione anche dei nostri inibitori, basandoci purtroppo solo su analogie strutturali, in quanto non sono stati ancora raccolti i dati di selezione dei mutanti resistenti su HCV. Come

possiamo vedere dalla figura 26, in cui si descrivono le componenti elettrostatiche del farmacoforo, l'azoto chinolinico del lead compound **1a** si comporta da accettore di legami idrogeno (HBD), come HBD si comportano anche l'azoto imidazolico sp^3 e nitrilico, mentre l'azoto imidazolico sp^2 rappresenta l'unico elemento in grado di formare legami idrogeno, comportandosi come un donatore di legame H (HBA).

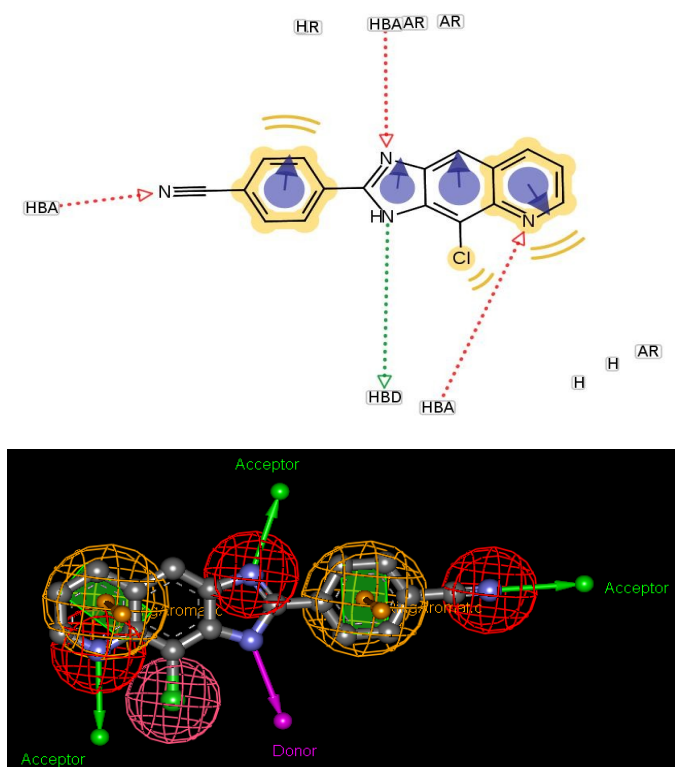


Figura 26: descrizione del comportamento elettrostatico dei costituenti strutturali del lead **1a**.

La funzione carbossilica del composto di riferimento può quindi essere sostituita da una di quelle appena riportate. La componente idrofobica (rappresentata in questo caso dal cloro e dai sistemi aromatici) permette invece a tutti e due i composti di instaurare adeguate interazioni π - π all'interno del binding site (fig. 27).

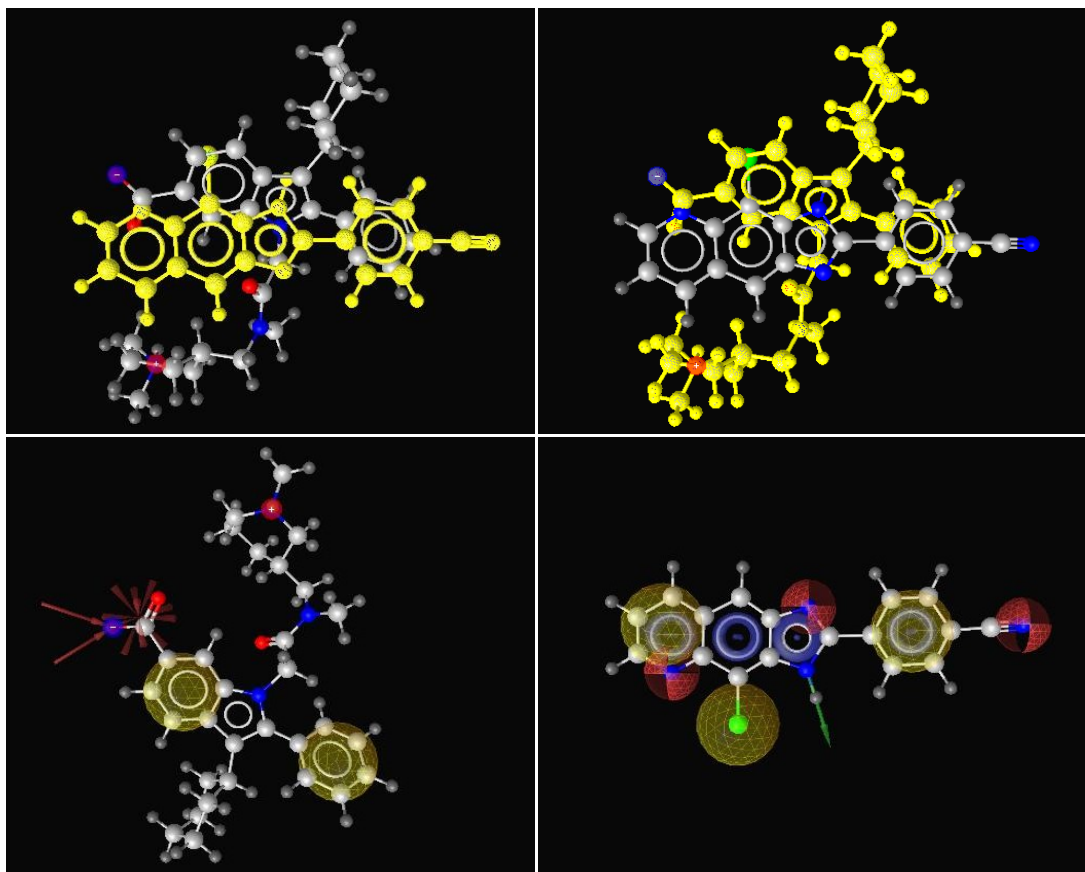


Figura 27: Superimposition del composto di riferimento 3-((2-(5-carbossi-3-cicloesil-2-fenil-1H-indol-1-il)-N-metilacetamido)metil)-1-metilpiperidinio ed il lead **1a**.

Sono inoltre in corso studi di docking dei nostri lead sulla NS5B di HCV e di BVDV, e primi riscontri su HCV suggeriscono che il binding site sia effettivamente quello ipotizzato (fig. 28, dati non disponibili).

Tuttavia siamo rimasti perplessi nel condurre il



Figura 28: snapshot di dinamica molecolare del lead **1a** all'interno del sito di legame della HCV-NS5B.

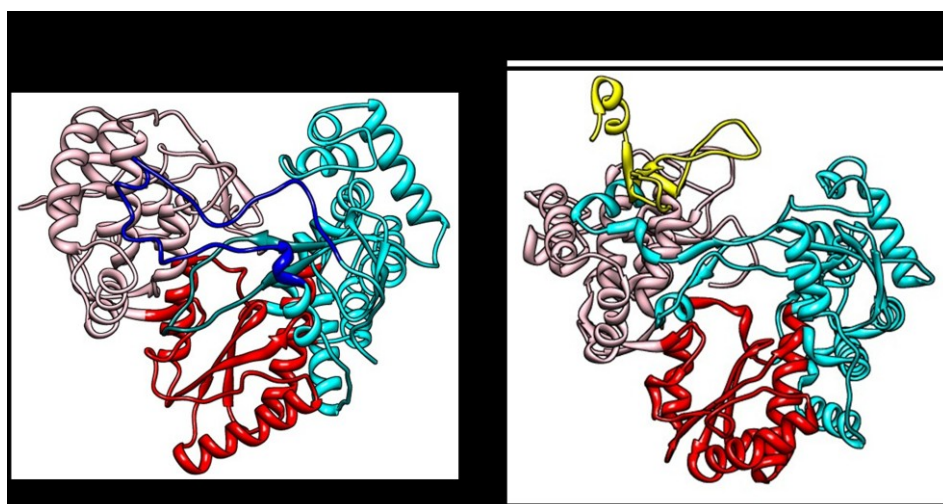
docking sulla polimerasi di BVDV. Purtroppo, infatti, a tutt'oggi non esistono dati

cristallografici di inibitori di BVDV-NS5B. Non esiste dunque la possibilità di visualizzare quali siano sull'enzima i possibili binding sites, individuabili purtroppo solo per speculazione dai dati di selezione dei mutanti resistenti. È quest'analisi che ci ha dunque portato a dubitare, ancora una volta, dell'utilità e dell'affidabilità di questo modello.

Analizzando la struttura di BVDV NS5B, infatti, si può vedere come le analogie strutturali (e soprattutto molecolari) con HCV NS5B siano assolutamente limitate.

Come in HCV, il genoma di BVDV (12,6 KD) codifica per una proteina policistronica che va incontro a successivo taglio proteolitico. Anche questa RNA polimerasi RNA dipendente NS5B si associa alla membrana del reticolo endoplasmatico mediante un motivo α -elica della porzione N terminale [96]. Anche in questo caso l'enzima presenta la caratteristica forma “a mano destra” in cui si individuano i tre caratteristici domini: dita (finger, residui 139-313, 315-410, composto da 12 motivi ad α -eliche e 11 a β -foglietto), palmo (palm, residui 314-350, 411-500, composto da 3 motivi ad α -eliche e 4 a β -foglietto) e pollice (thumb, residui 501-679, composto da 8 motivi ad α -eliche e 5 a β -foglietto, di cui 2 si pensa agiscano da flap). Ancora, si identifica il subdominio del fingertip (residui: 260-288 più N-terminale), che fa parte del finger ed interagisce col pollice. Mentre però in BVDV sono identificabili 3 foglietti, in HCV se ne trovano 4 (fig. 29). Il core della proteina è quindi formalmente comune alla polimerasi dell'HCV, ma presenta un dominio N-terminale unico (residui: 71-138, con 71-91 altamente disorganizzati) di cui non si identifica analogo in HCV NS5B.

La struttura cristallografica della BVDV RdRp mostra dunque interessanti differenze relativamente alla HCV RdRp. Mentre infatti il dominio del palmo resta fortemente conservato, e si ritrova il motivo Gly-Asp-Asp (GDD) essenziale per l'attività catalitica [97], i dominio delle dita e soprattutto del pollice mostrano significative disuguaglianze strutturali che permettono alla BVDV RdRp di presentare una flessibilità conformazionale non riscontrabile nell'analogo enzimatico di HCV, che risulta perciò più chiuso e compatto.

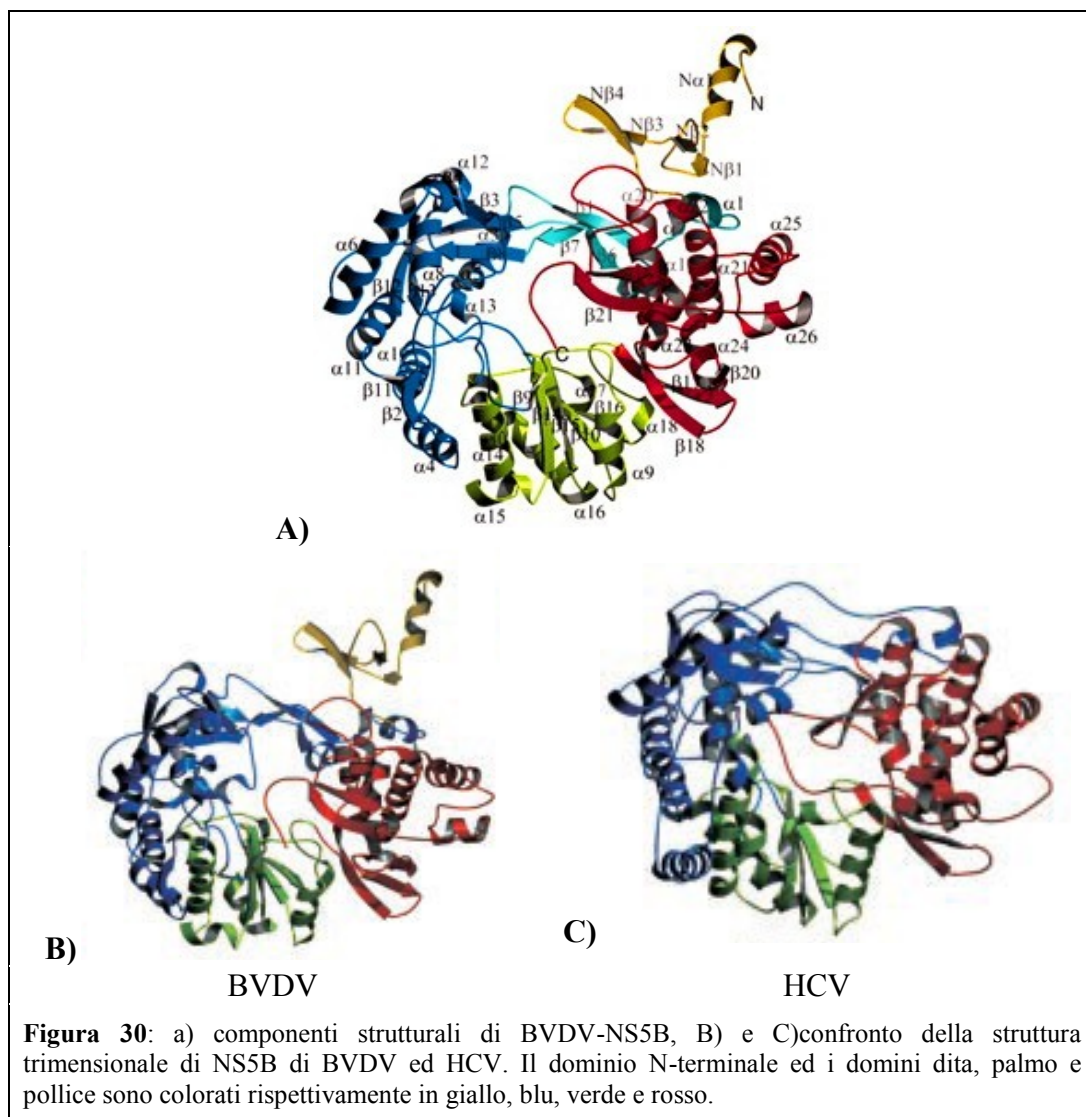


	α -HELIX		β -STRAND	
	<i>HCV</i>	<i>BVDV</i>	<i>HVC</i>	<i>BVDV</i>
FINGER	8	12	4	11
THUMB	7	8	2	5
PALM	3	3	3	4

Figura 29: confronto strutturale fra HCV e BVDV NS5B. Si riportano i domini e sub-domini più importanti: palmo (rosso), dita (celeste), pollice (rosa), fingertip (blu), dominio N-terminale (giallo).

Per quel che riguarda la topologia strutturale del dominio delle dita, a parte le già citate differenze circa il fingertip, per il resto risulta allineabile con quello dello di HCV ed altre polimerasi [98].

La regione che presenta il maggior numero di differenze, dunque, è il pollice. Più grande dell'analogo dominio di HCV, in BVDV non è ben definita la flap region, e i 2 β -foglietti che dovrebbero costituirla assumono un'orientazione e una posizione diversa da quella osservata in HCV [98]. I 5 β -foglietti costituiscono invece la β -thumb region, in cui i due foglietti 19 (residui 585-589) e 21 (residui 675-681, che non ha analogo in HCV) ed il loro loop di connessione (residui 670-679) occludono la cavità del sito attivo, e questo porta a pensare che le modificazioni conformazionali indotti dall'RNA template sulla BVDV NS5B siano più limitate rispetto ad HCV (fig. 30). Anche HCV presenta una protrusione simile (residui 446-463), ma ha origine da un parte diversa del pollice.



A questo punto è chiaro che esiste una differenza strutturale fra le NS5B di HCV e BVDV. Ma le differenze non si limitano a questo. Confrontando infatti la sequenza primaria delle due proteine, si ottiene solo un 28,5% di omologia, a significare che esiste una profonda distanza evolutiva fra le due (fig. 31).

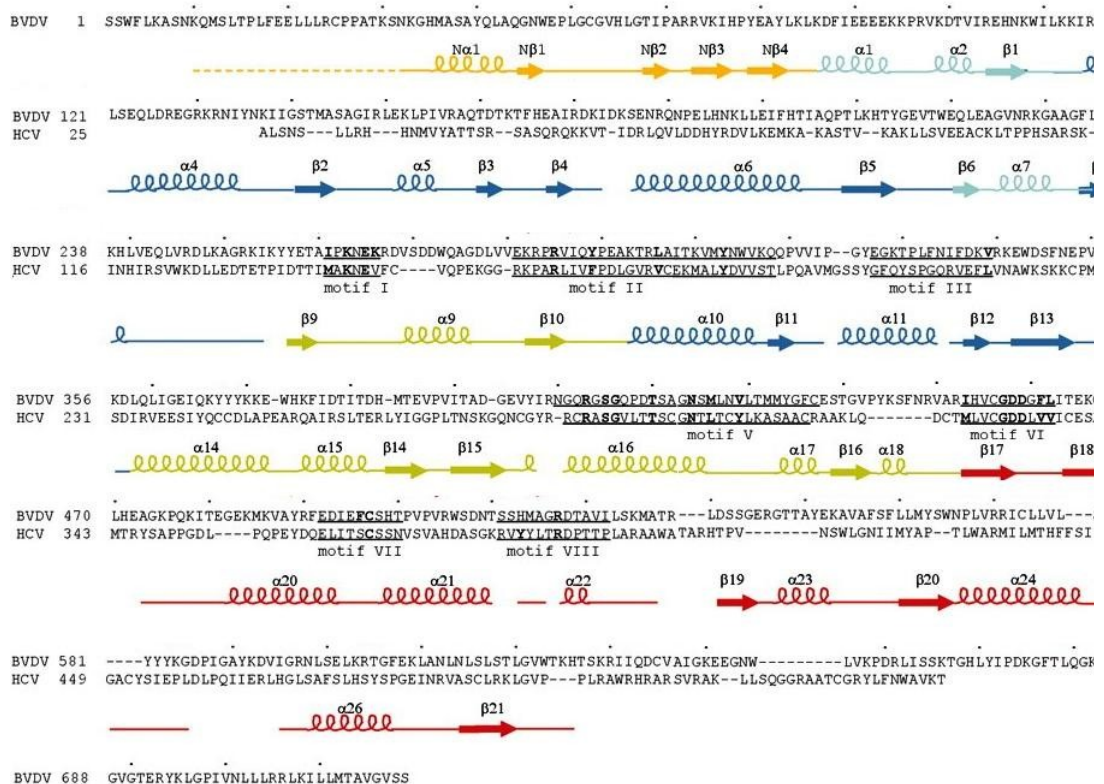


Figura 31: allineamento della sequenza primaria di HCV e BVDV. Gli otto motivi fondamentali delle polimerasi sono sottolineati, mentre i residui completamente conservati sono riportati in grassetto. Il dominio N-terminale ed i domini dita, palmo e pollice sono colorati rispettivamente in giallo, blu, verde e rosso [98].

Il basso numero di aminoacidi conservati suggeriscono quindi anche una probabile diversa interazione fra substrato enzimatico ed inibitori non nucleosidi. Evidenze farmacologiche, infatti, dimostrano che le mutazioni selezionate nei ceppi resistenti a questi inibitori determinano si trovano essenzialmente a livello del dominio delle dita. Fra queste è importante la sostituzione della fenilalanina 224 con una Serina (F224S) [99], che si trova nel sub dominio del fingertip di BVDV.

Ora, come dimostrato da studi precedenti (e riportato in figura 19) anche i nostri derivati azotati tricyclici selezionano mutazioni in questo dominio di BVDV, ed il lead **1a** determina una selezione I261M. (fig. 32). Al fine dunque di ottenere un composto ad attività anti-BVDV potente e selettivo, l'intorno dell'aminoacido 224 è fondamentale, rappresentando probabilmente una parte del binding site.

Siamo quindi ragionevolmente sicuri di quale sia il sito di legame del nostro inibitore su BVDV e che dunque il dominio interessato sia quello delle dita (in particolare il fingertip). Sorge però una domanda. Considerando quanto detto fino ad ora, su HCV il nostro inibitore dovrebbe legarsi a livello del sito NNI 3, situato nel pollice, in quanto ad

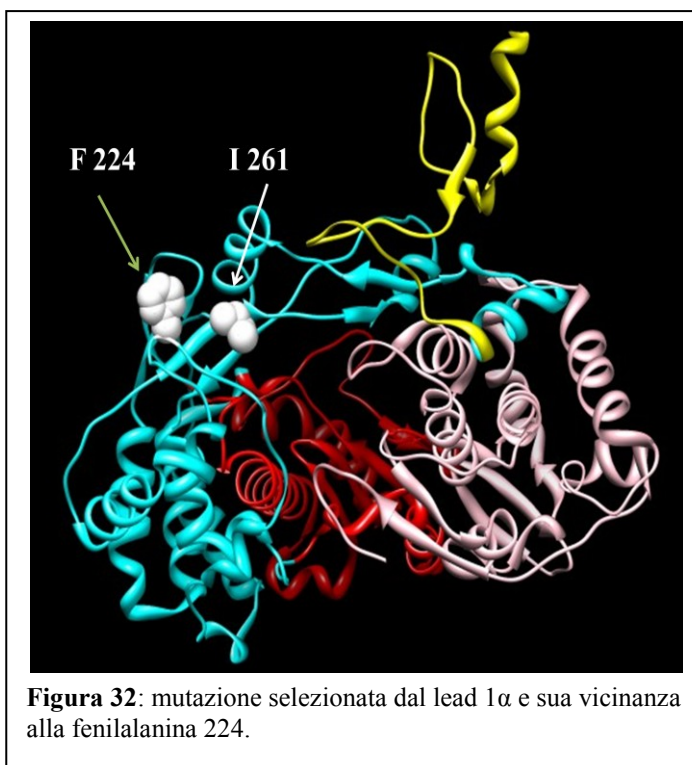


Figura 32: mutazione selezionata dal lead 1 α e sua vicinanza alla fenilalanina 224.

oggi non esiste una molecola che espliciti azione inibente su HCV-NS5B mediante legame a livello del dominio delle dita (men che meno sul fingertip). Il finger di HCV, infatti, presenta una configurazione diversa da quella di BVDV, ed in particolare il loop che porta l'aminoacido F224 in BVDV è assente in HCV [100]!

È dunque plausibile ipotizzare che meccanismo d'azione con cui i nostri derivati inibiscono la replicazione di BVDV ed HCV, rispettivamente, sia diverso, come già ipotizzato per altre classi di inibitori che presentano questa duplice azione [101]. Questa ipotesi è ora oggetto di ulteriori studi che passano per la selezione di mutanti resistenti in HCV e le simulazioni di dinamica molecolare dei nostri derivati sul fingertip di BVDV (fig.33).

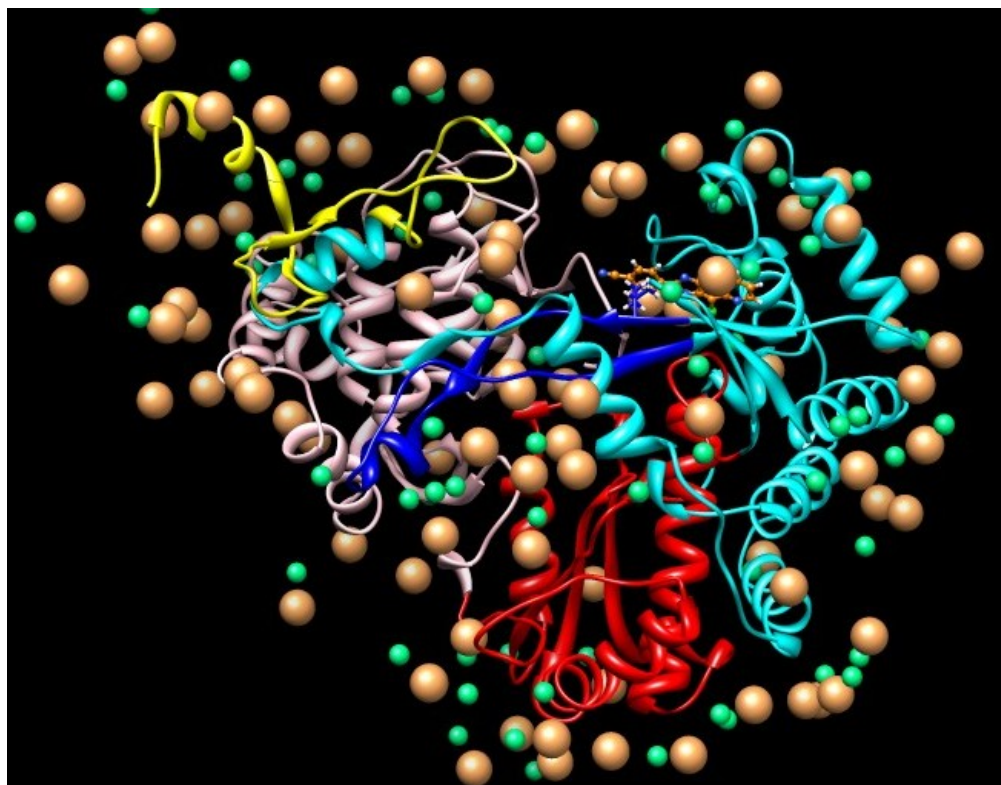


Figura 33: snapshot di dinamica molecolare del lead compound 1 α posto nel sito di legame del figertip. Gli aminoacidi interessati nel binding appartengono tutti al dominio delle dita: PHE 133, LEU 225, THY 257, ILE 261 (mutazione), ILE 287, TYR 289, GLU 291, PRO 290.

6 CONCLUSIONI

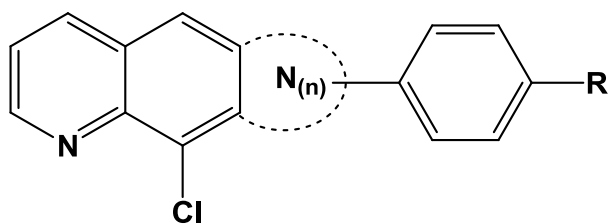
Il lavoro svolto nella presente tesi ha portato alla generazione di una trentina di molecole a struttura tricyclica lineare aromatica azotata variamente sostituiti che sono stati valutati come possibili agenti antivirali, con particolare attenzione allo sviluppo di composti in grado di agire su virus appartenenti alla famiglia delle Flaviviridae, quali BVDV ma soprattutto HCV. Si tratta di molecole ottenute per espansione del sistema 8-clorochinolinico per condensazione con anelli imidazolici, triazolici e chinossalinici; sono state così create una serie di imidazo[4,5-g]chinoline, triazolo[4,5-g]chinoline e pirido[2,3-g]chinossaline. I derivati, testati su un largo panel di virus, hanno mostrato una spiccata e spesso selettiva attività contro BVDV. Solo alcuni di essi, infatti, sono risultati attivi anche su virus quali CVB-5, Polio-1 e Reo-1. Eccezione alcuni derivati di semplificazione molecolare del lead compound **1a**, fra i quali spicca il composto **3a** a struttura naftalenica per la sua interessante attività su RSV e quindi candidato a lead per una successiva e mirata ricerca.

Delle tre classi generate, purtroppo quella delle triazolo[4,5-g]chinoline è risultata essere la meno potente, mentre un maggior numero di risultati interessanti sono stati riportati dalle pirido[2,3-g]chinossaline, fra cui il composto **25** è risultato il più potente, con un'attività comparabile con quella della 2'-C-guanosina, un analogo nucleotidico. È però da sottolineare la potenza della miscela **14** come eccezione nella categoria dei triazoli: in questo caso la struttura dimerica dei derivati permette di ottenere un'attività ben superiore a quella del composto di riferimento, accompagnata da un indice di selettività superiore a 100.

Studi di modellistica molecolare potranno in futuro confermare l'ipotesi avanzata secondo la quale il binding site sulla RNA polimerasi RNA dipendente NS5B di BVDV e HCV accolgano in migliore maniera molecole dotate di un elevato numero di gradi libertà, condizione associata a strutture nastriformi in cui importanti sono i gruppi in grado di generare legami apolari all'interno del pocket, quali appunto i diversi sostituenti laterali aromatici.

Purtroppo sia il composto **14** che **25**, sebbene promettenti nei test in vitro, si sono rivelati inattivi su HCV nei test sul sistema del replicon, soprattutto a causa della loro citotossicità, in quanto i test su enzima isolato sia di BVDV che di HCV mostrano ancora una certa efficacia dei due derivati (sebbene sempre più a favore del pestivirus).

In generale è stato condotto un primo studio SAR, che andrà arricchito dallo sviluppo di ulteriori molecole. Ad oggi possiamo dire che al fine di ottenere un'attività antivirale nei confronti di BVDV:



- 1) la mancanza di gruppi aromatici laterali legati al sistema ciclico poliazotato porta alla totale perdita dell'attività;
- 2) il cloro legato all'anello centrale rappresenta un elemento modulatore dell'attività;
- 3) il sostituito in posizione 4' ha funzione modulatoria, ed i risultati migliori sono stati ottenuti con gruppi elettronattrattori;
- 4) la presenza del sistema tricyclico è importante per l'attività e l'unica variazione ammessa è l'eliminazione dell'anello centrale.
- 5) l'introduzione di un anello triazolico al posto di quello imidazolico del lead compound **1a** porta ad una drastica riduzione dell'attività biologica,
- 6) l'introduzione di un sistema 2-oxo-chinossalinico permette di mantenere la selettività d'azione, sebbene diminuisca la potenza e aumenti la citotossicità rispetto ai leads presentati
- 7) sistemi i più lineari possibile associati a un numero elevato di gradi di libertà che portano a molecole che possiamo definire a struttura nastriforme assicurano i migliori risultati di inibizione enzimatica.

Infine, per quel che riguarda l'attività mostrata dalle imidazo[4,5-g]chinoline nei confronti di altri virus, ribadiamo che:

- la mancanza di sostituenti in 4' porta ad ampliare lo spettro d'azione verso Coxsackie, Polio e Reovirus;
- la sostituzione del nucleo chinolinico con quello naftalenico porta alla manifestazione di un'interessante attività nei confronti di RSV.

Attualmente sono in corso test di selezione di mutanti resistenti e analisi di modellistica molecolare volti a dimostrare alcune nostre ipotesi, quali il fatto che il binding site su NS5B di HCV e BVDV per la medesima classe di molecole si trovi su porzioni differenti dell'enzima, e che i leads 1 α e 1 β agiscono sui due enzimi con un meccanismo d'azione completamente differente, come già ipotizzato da altri gruppi di ricerca [101].

7 PARTE SPERIMENTALE

7.0 METODI SINTETICI

I punti di fusione sono stati determinate mediante utilizzo di apparecchi Digital Electrothermal IA9100 in capillare aperto e Kofler, e non sono corretti. Gli spettri ^1H NMR sono stati registrati con apparecchio Varian XL-200 in soluzione CDCl_3 , DMSO o loro miscela usando TMS come standard interno. I valori di chemical shift sono riportati in ppm (d) e le costanti di accoppiamento (J) in Hertz (Hz). La molteplicità di segnale è riportata come segue: s (singoletto), d (doppietto), dd (doppietto di doppietti), t (tripletto), q (quadrupletto) e m (multipletto). Gli spettri MS sono stati registrati con apparecchio combinato Liquid Chromatograph-Agilent 1100 series Mass Selective Detector (MSD). Le colonne cromatografiche sono state eseguite utilizzando gel di silice a 70-230 mesh (Merck silica gel 60). Le reazioni sono state monitorate usando TLC Merck F-254. L'errore nel calcolo delle analisi elementari varia entro il range ± 0.4 % del valore teorico.

7.1. MATERIALI DI PARTENZA, INTERMEDI E COMPOSTI NOTI IN LETTERATURA.

Aldeidi, derivati a,b-dicarbonilici e a-chetocarbossilici, cloroacetone, anidride acetica, 1,3-dicloroacetone, cicloesilamina, e reagenti inorganici sono disponibili commercialmente (Sigma-Aldrich). Le diclorochinoline **I-II** e le 6,7-diaminochinoline **a-b**, intermedi di reazione, sono state preparate seguendo procedure precedentemente descritte [78]. I sali di Bertagnini sono stati preparati per reazione dell'opportuna aldeide commerciale con Na_2SO_4 in soluzione idroalcolica [102]. I dati analitici e spettroscopici delle note triazolo[4,5-g]chinoline **6-11**, **15a-c**, **16**, **17a-c** e **18**, dei derivati imidazolici **2b,d** e piridochinossalici **19-20**, **23-24**, **26-27** sono stati riportati in letteratura [73, 75, 82-84].

7.2. METODI DI PREPARAZIONE DELLE IMIDAZO[4,5-g]CHINOLINE

7.2.1. Metodo generale di preparazione delle imidazo[4,5-g]chinoline **2b,d**.

Si pone sotto agitazione magnetica una miscela composta dall'opportuna diamina (**a-b**) (5 mmol) ed acido formico a 100 °C per 2 h. Dopo raffreddamento a

Irene Briguglio, *Sintesi e valutazione di sistemi azotati tricyclici aromatici come possibili agenti antivirali*.
Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, indirizzo Scienze Farmaceutiche (XXIV ciclo),
Università degli studi di Sassari.

temperatura ambiente, la soluzione viene neutralizzata con una soluzione di NaOH 50% fino a pH = 5. Il precipitato ottenuto viene filtrato, lavato con etanolo ed asciugato per dare le imidazo[4,5-g]chinoline **2b,d** con rese dell' 80-90% [73,83].

7.2.2. Metodo generale di preparazione delle imidazo[4,5-g]chinoline **1 α - β , 2a,c, 3.**

I composti richiesti sono stati ottenuti per condensazione dall'opportuna diamina (**a-b**) (1-3 mmol) con un'adeguata aldeide attivata (sale di Bertagnini) in rapporto equimolare, rispettivamente in etanolo (10-30 mL) per 8 h o in DMF (dimetilformamide) at 130 °C per 4 h.. Dopo raffreddamento la soluzione è stata filtrata, eliminando il residuo inorganico, mentre le madri vengono evaporate a secco. Il residuo solido, con colore dall'arancio al rosso scuro, è stato purificato per cristallizzazione da etanolo dando le imidazo[4,5-g]chinoline **1 α - β , 2a,c** con buone rese.

7.2.2.1. 4-(4-cloro-3H-imidazo[4,5-g]chinolin-2-il)benzonnitrile (1 α). Solvente DMF. Tempo di reazione 4 h. Resa 95%. Mp > 300 °C. ¹H-NMR (CDCl₃ + DMSO-d₆): δ 8.98 (d, 1H, J = 4.2 Hz, H-6), 8.55 (d, 2H, J = 8.0 Hz, H-3',5'), 8.45 (d, 1H, J = 8.2 Hz, H-8), 8.09 (s, 1H, H-9), 7.94 (d, 2H, J = 8.6 Hz, H- 2',6'), 7.47 (dd, 1H, J = 8.2 e 4.2 Hz, H-7). LC/MS: 307 (M+H). Analisi elementare per (C₁₇H₉ClN₄): C, 67.00; H, 2.98; Cl, 11.63; N, 18.39. Trovato: C, 67.15; H, 3.18; Cl, 12.04; N, 18.98.

7.2.2.2. 4-Cloro-2-(4-nitrofenil)-3H-imidazo[4,5-g]chinolina (1 β). Solvente DMF. Tempo di reazione 4 h. Resa 76 %. Mp > 300 °C. ¹H-NMR (CDCl₃ + DMSO-d₆): δ 8.97 (d, 1H, J = 4.0 Hz, H-6), 8.67 (d, 2H, J = 8.0 Hz, H-3',5'), 8.42 (d, 2H, J = 8.0 Hz, H- 2',6'), 8.10 (d, 1H, J = 8.2 Hz, H-8), 8.02 (s, 1H, H-9), 7.49 (dd, 1H, J = 8.2 e 4.0 Hz, H-7). LC/MS: 327 (M+H). Analisi elementare per (C₁₆H₉ClN₄O₂): C, 59.18; H, 2.79; Cl 10.92; N, 17.25, O, 9.85. Trovato: C, 59.51; H, 3.01; Cl 11.25; N, 17.51, O, 10,06

7.2.2.3. 4-Cloro-2-fenil-3H-imidazo[4,5-g]chinolina (2a). Solvente etanolo. Tempo di reazione 8 h. Resa 82 %. Mp 185-187 °C. ¹H-NMR (CDCl₃ + DMSO-d₆): δ 8.96 (dd, 1H, *J* = 4.0 e 1.8 Hz, H-6), 8.47 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H-8), 8.40-8.32 (m, 2H), 8.06 (s, 1H, H-9), 7.60-7.56 (m, 3H), 7.45 (1H, dd, *J* = 8.1 e 4.0 Hz, H-7). LC/MS: 282 (M+H). Analisi elementare per (C₁₆H₁₀ClN₃): C, 68.70; H, 3.60; Cl 12.67; N, 15.02. Trovato: C, 69.04; H, 3.38; Cl 12.29; N, 15.31.

7.2.2.4. 2-Fenil-3H-imidazo[4,5-g]chinolina (2c). Solvente etanolo. Tempo di reazione 8 h. Resa 60 %. Mp 162-164 °C. ¹H-NMR (CDCl₃ + DMSO-d₆): δ 9.01 (d, 1H, *J* = 4.0 Hz, H-6), 8.85 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H-8), 8.47 (s, 1H, H-4), 8.40-8.30 (m, 3H), 7.60-7.50 (m, 4H). LC/MS: 246 (M+H). Analisi elementare per (C₁₆H₁₁N₃): C, 78.35; H, 4.52; N, 17.13. Trovato: C, 78.61; H, 4.32; N, 17.40.

7.2.2.5. 4-(3H-imidazo[4,5-g]chinolin-2-il)benzonnitrile (3). Solvente etanolo. Tempo di reazione 8 h. Resa 65 %. Mp > 300 °C. ¹H-NMR (CDCl₃ + DMSO-d₆): δ 9.06 (d, 1H, *J* = 4.0 Hz, H-6), 8.91 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz, H-8), 8.52 (d, 2H, *J* = 8.0 Hz, H-3',5'), 8.43 (s, 1H, H-9), 8.06 (s, 1H, H-4), 7.98 (d, 2H, *J* = 8.0 Hz, H-2',6'), 7.72 (dd, 1H, *J* = 8.2 e 4.0 Hz, H-7). LC/MS: 271 (M+H). Analisi elementare per (C₁₇H₁₀N₄): C, 75.54; H, 3.73; N, 20.73. Trovato: C, 75.92; H, 3.65; N, 21.08.

7.2.3. Metodo di preparazione del 2-fenil-1H-nafto[2,3-d]imidazolo (3a).

Composto noto in letteratura, il 2-fenil-1H-nafto[2,3-d]imidazolo (3a) viene preparato in maniera alternativa sottoponendo a condensazione 0,15 g (0.95 mmol) di naftalen-2,3-diammina preparata secondo bibliografia con la benzaldeide attivata (sale di Bertagnini) in rapporto equimolare, in etanolo (10 ml) a refluxo per 8 h. Dopo raffreddamento la soluzione è stata filtrata, eliminando il residuo inorganico, mentre le madri sono state evaporate a secco. Il residuo solido è stato purificato per cristallizzazione da etanolo. I dati analitici e spettroscopici del

derivato sono conformi con quanto riportato in bibliografia [103] Robert J. Perry, B. David Wilson, J.Org.Chem. 1993, vol.58, 25 7016-21]

7.2.4. Metodo di preparazione del 4-(3*H*-imidazo[4,5-*c*]piridin-2-il)benzotrile (4)

Il composto biciclico è stato ottenuto per condensazione della 3,4-diaminopiridina commerciale (1.83 mmol) con una quantità equimolare del 4-formilbenzotrile attivato (sale di Bertagnini) in 3 ml di dimetilformamide (DMF), a 130 °C per 2 h. Il precipitato formatosi viene quindi filtrato, lavato ed asciugato. L'aggiunta di acqua alle madri provoca ulteriore precipitazione. I due solidi vengono riuniti e il prodotto finale viene ottenuto per cristallizzazione da etanolo.

7.2.4.1. 4-(3*H*-imidazo[4,5-*c*]piridin-2-il)benzotrile (4) Resa 52%. Mp > 300 °C. ¹H-NMR (CDCl₃ + DMSO-*d*₆): δ 8.99 (s, 1H, H-4), 8.41 (d, 2H, J = 8.4 Hz, H-3',5') 8.33 (d, 1H, J = 5.4 Hz, H-6), 7.96 (d, 2H, J = 8.2 Hz, H-2',6'), 7.62 (d, 1H, J = 5.8 Hz, H-7). LC/MS: 221 (M+H). Analisi elementare per (C₁₃H₈N₄): C, 70.90; H, 3.66; N, 25.44. Trovato: C, 71.30; H, 4.01; N, 25.87

7.2.5. Metodo generale di preparazione delle imidazolo[4,5-*g*]chinoline 5 e 5a.

Una soluzione di 4-cloro-2-(4-nitrofenil)-3*H*-imidazo[4,5-*g*]chinoline (**1β**) (4 mmol) e carbone palladiato 10% (0.20 g) viene posta in idrogenatore in Parr a 20-25 °C e 3 atm per 3 h. Dopo filtrazione del catalizzatore, il solvente viene evaporato ed il solido residuo, purificato per cristallizzazione da etanolo, dà la imidachinolina **5** in buone rese. Il composto **5** (2 mmol) viene quindi sospeso in anidride acetic e la miscela di reazione viene scaldata a 90 °C per 1 h. l'eccesso di solvente viene rimosso per evaporazione ed il solido ottenuto cristallizzato da etere etilico da l'acetil derivato **5a** in buone rese.

7.2.5.1. 4-(4-Cloro-3*H*-imidazo[4,5-*g*]chinolin-2-il)anilina (5).

Resa 88 %. Mp > 300 °C. ¹H-NMR (CDCl₃ + DMSO-*d*₆): δ 8.89 (dd, 1H, J = 4.0 e 1.4 Hz, H-6), 8.38 (d, 1H, J = 8.2 Hz, H-8), 8.07 (d, 2H, J = 8.8 Hz, H-2',6'),

8.07 (s, 1H, H-9), 7.41 (dd, 1H, $J = 8.2$ e 4.0 Hz, H-7), 6.75 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz, H-3',5'), 5.57 (s, 2H, NH₂). LC/MS: 297 (M+H). Analisi elementare per (C₁₆H₁₁ClN₄): C, 65.20; H, 3.76; Cl, 12.03; N, 16.01. Trovato: C, 64.88; H, 4.02; Cl, 12.31; N, 18.87.

7.2.5.2. N-(4-(4-Cloro-3H-imidazo[4,5-g]chinolin-2-il)fenil)acetamide (5a).

Resa 83 %. Mp > 300 °C. ¹H-NMR (CDCl₃ + DMSO-d₆): δ 10.32 (s, 1H, NHCO), 9.01 (d, 1H, $J = 4.0$ Hz, H-6), 8.72 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, H-8), 8.34 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz, H-2',6'), 8.09 (s, 1H, H-9), 7.86 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz, H-3',5'), 7.63 (dd, 1H, $J = 8.2$ and 4.0 Hz, H-7), 2.16 (s, 3H, CH₃). LC/MS: 339 (M+H). Analisi elementare per (C₁₈H₁₃ClN₄O): C, 64.19; H, 3.89; Cl, 10.53; N, 16.64. Trovato: C, 63.91; H, 4.04; Cl, 10.88; N, 16.33.

7.2.6. Metodo di preparazione del N-[4-(2H-benzimidazol-2-il)fenil]acetilcarbossamide (5b)

Sotto agitazione magnetica, una sospensione del 2-(4-aminofenil)benzimidazolo (1.5 mmol) in anidride acetica (3 mL) viene scaldata a 100 °C per 2 h. Dopo raffreddamento, il precipitato ottenuto viene filtrato, lavato con acqua ed asciugato, ottenendo l'amide desiderata **5b** (Schema 12). I dati analitici e spettroscopici del derivato sono riportati in bibliografia [79-81].

7.3. METODI DI PREPARAZIONE DELLE TRIAZOLO[4,5-g]CHINOLINE

7.3.1. Metodo generale di preparazione delle triazolo[4,5-g]chinolin-1-ossido **6**, e della 4-cloro-1H-triazolo[4,5-g]chinolina (**7**)

3 g, (12.3 mmol) di 8-dicloro-6-nitrochinolina (**I**) disciolti in 100 ml di etanolo vengono addizionati di un largo eccesso di idrazina idrata (7 mL, 144 mmol). La soluzione viene posta in autoclave e portata a 70 °C per 86 h. Dopo raffreddamento il precipitato ottenuto viene filtrato, lavato con etanolo ed asciugato a dare il 4-Cloro-1H-triazolo[4,5-g]chinoline-1-ossido (**6**) come solido puro (2.60 g, 90% yield). Il composto **6** (1 g, 4.5 mmol) viene quindi sospeso in

Irene Briguglio, *Sintesi e valutazione di sistemi azotati tricyclici aromatici come possibili agenti antivirali*.
Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, indirizzo Scienze Farmaceutiche (XXIV ciclo),
Università degli studi di Sassari.

PCl₃ (25 mL) e scaldato a refluxo per 144 h. Si ottiene un residuo insolubile che viene filtrato e lavato con etere. Il solido ottenuto viene cromatografato usando come eluente una miscela di etere etilico ed etanolo in rapporto 8:2. Si ottengono 0,2g (22%) di 4-Cloro-1H-triazolo[4,5-g]chinolina (**7**). I dati analitici e spettroscopici dei derivati sono riportati in letteratura [82].

7.3.2. Metodo di preparazione della 4-cloro-9-nitro-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-g]chinolina (8**).**

Ad una soluzione di 3 mmol della the 4-Cloro-1H-triazolo[4,5-g]chinolina (**7**) disciolta in 4 ml di acido solforico concentrato si aggiunge goccia a goccia una soluzione di nitrato di potassio (9 mmol) in acido solforico concentrato (5 ml). Si porta quindi la temperatura di reazione a 50 °C per 3 h sotto agitazione continua. La miscela di reazione viene quindi raffreddata e versata in ghiaccio (50 g) ed il pH aggiustato a 9 con utilizzo di ammoniaca concentrata. Il solido formato viene filtrato, lavato con acqua e asciugato, ottenendo il derivato desiderato con resa del 90%. I dati analitici e spettroscopici dei derivati sono riportati in letteratura [82].

7.3.3. Metodo generale di preparazione delle triazolo[4,5-g]chinoline **9-14.**

Ad una soluzione della triazolo[4,5-g]chinolina **7** (5 mmol) in dimetilformamide (DMF) viene aggiunto KOH in pellets (5.5 mmol) e si lascia sotto agitazione a temperatura ambiente fino a completa dissoluzione. A questa soluzione si aggiungono rispettivamente 10 mL di anidride acetica (a 120 °C per 100 h); 10 mmol di acetonitrile in 5 mL di dimetilformamide (a 120 °C per 22 h); 50 mmol di 1,3- dicloroacetone in 10 mL di dimetilformamide (a 120 °C per 24 h); 2.5 mmol di 1,3-dichloroacetone in 10 mL di dimetilformamide (a 120 °C per 120 h). Dopo raffreddamento, la miscela di reazione viene versata in 150 ml di ghiaccio. Il solido ottenuto per ogni reazione viene filtrato, lavato con acqua e asciugato a dare rispettivamente il composto **9**, una miscela di **10** e **11** (resa 70% con rapporto 1:1), una miscela di **12** e **13** (resa 70% con rapporto 1:1) e la miscela **14** (resa 35% con rapporto 1:1).

Irene Briguglio, *Sintesi e valutazione di sistemi azotati tricyclici aromatici come possibili agenti antivirali*.
Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, indirizzo Scienze Farmaceutiche (XXIV ciclo),
Università degli studi di Sassari.

Il composto (**9**) viene estratto con etere etilico, ed il solido ottenuto viene cristallizzato da etanolo. La miscela **10/11** è stata risolta mediante cromatografia utilizzando come eluente una miscela etere etilico/acetone in rapporto 9:1, ottenendo nell'ordine il composto **11** (resa 30%) e **10** (resa 37%) [82]. La miscela **12/13** è stata risolta cromatograficamente utilizzando come eluente una miscela etere etilico/etanolo in rapporto 95:5, ottenendo nell'ordine il composto **13** (resa 33%) e **12** (resa 40%). La corretta attribuzione alle due strutture chimiche è stata ottenuta mediante esperimenti NOE. Il composto identificato come 1-cloro-3-(4-cloro-1*H*-triazolo[4,5-*g*]chinolin-1-il)propan-2-one (**12**) presenta un effetto NOE negativo su H-9 quando si irradia il singoletto a 6.01 ppm. Nessun effetto NOE, invece, è stato osservato per l'altro composto quando si irradia il metilene a 6.31 ppm, evento in accordo con la struttura del 1-cloro-3-(4-cloro-3*H*-triazolo[4,5-*g*]chinolin-1-il)propan-2-one (**13**). La miscela di 1,3-bis-(4-cloro-1*H*(3*H*)-triazolo[4,5-*g*]chinoline)propan-2-one in rapporto 1:1 (**14**) non è stata risolta cromatograficamente.

7.3.3. 1-Cloro-3-(4-cloro-1*H*-triazolo[4,5-*g*]chinolin-1-il) propan-2-one (12**).** Mp >300 °C. ¹H-NMR (CDCl₃ + DMSO-*d*₆): δ 9.11 (dd, 1H, J = 4.2 e 1.6 Hz, H-6), 8.35 (dd, 1H, J = 8.6 e 1.6 Hz, H-8), 7.93 (s, 1H, H-9), 7.54 (dd, 1H, J = 8.6 e 4.2 Hz, H-7), 6.01 (s, 2H, N-CH₂), 4.44 (s, 2H, Cl-CH₂). LC/MS: 295 (M+H). Analisi elementare per (C₁₂H₈Cl₂N₄O): C, 48.84; H, 2.73; N, 18.98; Cl, 24.03. Trovato: C, 49.07; H, 3.01; N, 19.30; Cl, 23.80. 5.1.5.3.

7.3.3.2. 1-Cloro-3-(4-cloro-3*H*-triazolo[4,5-*g*]chinolin-3-il) propan-2-one (13**).** Mp >300 °C. ¹H-NMR (CDCl₃ + DMSO-*d*₆): δ 9.13 (dd, 1H, J = 4.0 e 1.4 Hz, H-6), 8.64 (s, 1H, H-9), 8.52 (dd, 1H, J = 8.6 e 1.4 Hz, H-8), 7.53 (dd, 1H, J = 8.6 e 4.0 Hz, H-7), 6.31 (s, 2H, N-CH₂), 4.59 (s, 2H, Cl-CH₂). LC/MS: 295 (M+H). Analisi elementare per (C₁₂H₈Cl₂N₄O): C, 48.84; H, 2.73; N, 18.98; Cl, 24.03. Trovato: C, 48.51; H, 2.98; N, 18.79; Cl, 24.31.

7.3.3.3. Miscela 1,3-bis-(4-cloro-1*H*(3*H*)-triazolo[4,5-*g*]chinolin) propan-2-one in rapporto 1:1 (14). Mp 245 °C (dec.). ¹H-NMR (CDCl₃ + DMSO-d₆): δ 9.10–8.90 (m, 4H), 8.60–8.20 (m, 8H), 7.40–7.60 (m, 4H), 6.51–6.34 (m, 8H). LC/MS: 463 (M+H). Anal. Calcd for (C₂₁H₁₂Cl₂N₈O): C, 54.44; H, 2.61; N, 24.19; Cl, 15.31. Found: C, 54.71; H, 2.89; N, 24.50; Cl, 15.02.

7.4. METODI DI PREPARAZIONE DELLE TRIAZOLO[4,5-*g*]CHINOLINE N-OSSIDO O SOSTITUITE

7.4.1. Metodo generale di condensazione della triazolo[4,5-*g*]chinolina N-ossido per ottenere i derivati 15a-c, 17 a-d e 18.

Ad una soluzione del triazolo[4,5-*g*]chinolin-1-ossido (**6**) (5 mmol) in 25 ml di DMF vengono aggiunte 5 mmol di Cs₂CO₃ e la soluzione viene scaldata a 60 °C (a temperatura ambiente nel caso del 4-cloro-8-idrossi-3*H*-triazolo[4,5-*g*]chinolin-1-ossido **II**) per 15 min. Dopo di che:

- una soluzione dell'adeguato alchilsolfato (5 mmol in 10 ml di DMF) viene aggiunta per gocciolamento, dopo di che si lascia sotto agitazione per 6 h. Quando la reazione giunge a completezza, dopo eventuale raffreddamento, la soluzione viene filtrata e portata a secco. Il solido ottenuto viene purificato mediante flash cromatografia con etere etilico a dare il derivato O₁-alchilato **15a** (da **6**) e **17a-b** (da **II**). Scaldando una soluzione del composto monoalchilato **17b** in DMF in presenza di una quantità equivalente di etile solfato per 24h si ottiene il dietil derivato **18**.
- si aggiungono per gocciolamento 15 mmol di benzilcloruro, dopo di che si lascia sotto agitazione per 24 h. Quando la reazione giunge a completezza, dopo raffreddamento, la soluzione viene filtrata e diluita con 250 ml di acqua. Dopo 12h a 0 °C si forma un precipitato che viene filtrato, lavato con acqua e purificato mediante flash cromatografia con una miscela cloroformio:metanolo = 9:1 a dare il derivato O₁-alchilato **15b** e **17c**. lo stesso procedimento con 4-nitrobenzilcloruro porta ai derivati **15c** e **17d**.

7.4.2. Metodo preparazione della 4-cloro-9-nitro-1*H*-triazolo[4,5-*g*]chinoline-1-ossido (16).

Ad una soluzione di triazolo[4,5-*g*]chinolin-1-ossido (**6**) (0.8 g, 3.6 mmol), sciolto in 4 ml di acido solforico concentrato, si aggiunge per gocciolamento a temperatura ambiente una soluzione di nitrato di potassio (1.2 g, 12 mmol) in acido solforico concentrato (3 ml). Si porta quindi la temperatura di reazione a 50 °C per 3h sotto agitazione magnetica. Dopo raffreddamento la soluzione viene versata in ghiaccio (50 ml) e la soluzione viene alcalinizzata ammoniacca 30% (soluzione acquosa). Il precipitato formatosi viene filtrato, lavato con acqua ed asciugato a dare il composto **16** (0.20 g, resa 21%).

I dati analitici e spettroscopici dei derivati di O-alchilazione e nitrurazione sono riportati in bibliografia [83].

7.5. METODI DI PREPARAZIONE DELLE PIRIDO[2,3-*g*]CHINOSSALINE.

7.5.1. Metodo generale di preparazione delle pirido[2,3-*g*]chinossaline 19-20.

Le piridochinossaline 19-20 sono note in letteratura. Vengono preparate per lenta aggiunta, goccia a goccia, sotto agitazione magnetica, di gliossale (60 mmol, soluzione acquosa 40%) ad una soluzione a refluxo della 6,7 diammin-8-clorochinolina (**β**) (4 mmol) in etanolo (20 ml). Si lascia sotto agitazione per altre 2 h. Dopo raffreddamento la soluzione viene portata a secco ed il solido ottenuto viene purificato per flash cromatografia usando come eluente una miscela di etere etilico-acetone in rapporto 7:3 ottenendo il composto **19** con resa del 80%. Nelle medesime condizioni (tempo di reazione 1h) la condensazione con 1,4-dibromobutano porta al composto **20** con resa del 45% [73,75].

7.5.2. Metodo generale di preparazione delle pirido[2,3-*g*]chinossaline 21-29

A una soluzione della 6,7-diamino-8-clorochinolina (**β**) (3 mmol) in 15 ml H₂SO₄ 1 M vengono aggiunte 4 mmol rispettivamente di 2-oxo-fenilacetaldeide, benzile, 2-oxobutanoato di sodio o 2-oxo-3-fenilpropanoato di sodio. Si porta la

Irene Briguglio, *Sintesi e valutazione di sistemi azotati tricyclici aromatici come possibili agenti antivirali*.
Tesi di dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, indirizzo Scienze Farmaceutiche (XXIV ciclo),
Università degli studi di Sassari.

temperatura di reazione a 60 °C sotto agitazione magnetica per 1 h. dopo raffreddamento il precipitato ottenuto viene filtrato mentre le madri acide vengono neutralizzate mediante utilizzo di NaOH 2M. Il solido ottenuto viene riunito al precedente, lavato, asciugato e cristallizzato da etanolo per dare rispettivamente i composti **21**, **22**, **29** e **25** come prodotti unitari. Al contrario, la reazione della diamminochinolina con etil 3-metil-2-oxobutanoato di sodio, dietil 2-metil-3-oxosuccinato di sodio o acido 2-oxo-2-fenilacetico da, rispettivamente, la miscela **23/26**, **24/27** e **28/2β** Queste miscele sono state risolte cromatograficamente usando come miscela eluente etere /acetone in rapporto 8:2.

7.5.2.1. 5-Cloro-3-fenilpirido[3,2-g]chinossalina (21). Resa 87%. Mp 280–282 °C. ¹H NMR (DMSO-d₆): δ 9.82 (s, 1H, H-2), 9.41 (d, 1H, J = 4.6 Hz, H-7), 9.30 (d, 1H, J = 8.6 Hz, H-9), 9.01 (s, 1H, H-10), 8.54 (m, 2H, H-20,60), 8.07 (dd, 1H, J = 8.6 e 4.6 Hz, H-8), 7.67 (m, 3H, H-30,40,50). LC/MS: 294 (M+H). Analisi elementare per (C₁₇H₁₀ClN₃): C, 69.99; H, 3.45; Cl, 12.15; N, 14.40. Trovato: C, 70.32; H, 3.19; Cl, 11.88; N, 14.73.

7.5.2.2. 5-Cloro-2,3-difenilpirido[3,2-g]chinossalina (22). Resa 69%. Mp 95–97 °C. ¹H NMR (DMSO-d₆): δ 8.10–7.85 (m, 5H), 7.80–7.70 (m, 4H), 7.65–7.50 (m, 5H). LC/MS: 370 (M+H). Analisi elementare per (C₂₃H₁₄ClN₃): C, 75.10; H, 3.84; Cl, 9.64; N, 11.42. Trovato: C, 75.41; H, 3.59; Cl, 9.94; N, 11.17.

7.5.2.3. 5-Cloro-3-isopropilpirido[3,2-g] chinossalin -2(1H)-one (23). Resa 15%. Mp 287–288 °C. ¹H NMR (CDCl₃ +DMSO-d₆): δ 12.51 (s, 1H, NH), 8.96 (d, 1H, J = 4.2 Hz, H-7), 8.34 (d, 1H, J = 8.2 Hz, H-9), 7.64 (s, 1H, H-10), 7.56 (dd, 1H, J = 8.2 e 4.2 Hz, H-8), 3.57 (m, 1H, J = 6.4 Hz, CH), 1.35 (d, 6H, J = 6.4 Hz, 2 CH₃). LC/MS: 276 (M+H). Analisi elementare per (C₁₄H₁₂ClN₃O): C, 61.43; H, 4.42; Cl, 12.95; N, 15.35. Trovato: C, 61.75; H, 4.31; Cl, 13.22; N, 15.68.

7.5.2.4. Etil 2-(5-cloro-2-oxo-1,2-diidropirido[3,2-g]chinossalin-3-il) propanoato (24). Resa 24%. Mp 281–283 °C. ¹H NMR (CDCl₃ +DMSO-d₆): δ

11.75 (s, 1H, NH), 8.83 (d, 1H, J = 4.4 Hz, H-7), 8.31 (d, 1H, J = 8.4 Hz, H-9), 8.22 (s, 1H, H-10), 7.33 (dd, 1H, J = 8.4 e 4.4 Hz, H-8), 4.32 (q, 1H, J = 7.0 Hz, CHCH₃), 4.20 (q, 2H, J = 7.2 Hz, CH₂CH₃), 1.71 (d, 3H, J = 7.0 Hz, CHCH₃), 1.21 (t, 3H, J = 7.2 Hz, CH₃CH₂). LC/MS: 334 (M+H). Analisi elementare per (C₁₆H₁₄ClN₃O₃): C, 57.93; H, 4.25; Cl, 10.69; N, 12.67. Trovato: C, 57.71; H, 4.42; Cl, 10.39; N, 12.34.

7.5.2.5. 3-Benzil-5-cloropirido[3,2-g] chinossalin-2(1H)-one (25). Resa 66%. Mp 239–242 °C. ¹H NMR (DMSO-d₆): δ 11.60 (s, 1H, NH), 8.75 (d, 1H, J = 4.2 Hz, H-7), 8.41 (d, 1H, J = 8.2 Hz, H-9), 7.54 (m, 3H), 7.32 (m, 4H). LC/MS: 324 (M+H). Analisi elementare per (C₁₈H₁₂ClN₃O): C, 67.19; H, 3.76; Cl, 11.02; N, 13.06. Trovato: C, 66.82; H, 3.155; Cl, 11.35; N, 13.42.

7.5.2.6. 5-Cloro-2-isopropilpirido[3,2-g] chinossalin-3(4H)-one (26). Resa 61%. Mp 274–275 °C. ¹H NMR (CDCl₃ +DMSO-d₆): δ 11.49 (s, 1H, NH), 9.04 (d, 1H, J = 4.2 Hz, H-7), 8.44 (d, 1H, J = 8.4 Hz, H-9), 8.35 (s, 1H, H-10), 7.52 (dd, 1H, J = 8.4 e 4.2 Hz, H-8), 3.60 (m, 1H, J = 6.8 Hz, CH), 1.33 (d, 6H, J = 6.8 Hz, 2 CH₃). LC/MS: 276 (M+H). Analisi elementare per (C₁₄H₁₂ClN₃O): C, 61.43; H, 4.42; Cl, 12.95; N, 15.35. Trovato: C, 61.09; H, 4.65; Cl, 13.30; N, 15.04.

7.5.2.7. Etil 2-(5-cloro-3-oxo-3,4-diidropirido[3,2-g]chinossalin-2-il) propanoato (27). Resa 48%. Mp 269–272 °C. ¹H NMR (CDCl₃ +DMSO-d₆): δ 10.86 (s, 1H, NH), 9.14 (d, 1H, J = 4.4 Hz, H-7), 8.57 (d, 1H, J = 8.4 Hz, H-9), 8.50 (s, 1H, H-10), 7.68 (dd, 1H, J = 8.4 e 4.4 Hz, H-8), 4.30 (q, 1H, J = 7.0 Hz, CHCH₃), 4.22 (q, 2H, J = 7.2 Hz, CH₂CH₃), 1.66 (d, 3H, J = 7.0 Hz, CHCH₃), 1.25 (t, 3H, J = 7.2 Hz, CH₃CH₂). LC/MS: 334 (M+H). Analisi elementare per (C₁₆H₁₄ClN₃O₃): C, 57.93; H, 4.25; Cl, 10.69; N, 12.67. Trovato: C, 58.30; H, 4.19; Cl, 10.35; N, 12.91.

7.5.2.8. 5-Cloro-2-fenilpirido[3,2-g] chinossalin -3(4H)-one (28). Resa 10%. Mp >300 °C. ¹H NMR (DMSO-d₆): δ 12.23 (s, 1H, NH), 9.10 (d, 1H, J = 4.0 Hz, H-7), 8.71 (d, 1H, J = 8.4 Hz, H-9), 8.60 (s, 1H, H-10), 8.28 (m, 2H), 7.61 (m, 4H). LC/MS: 310 (M+H). Analisi elementare per (C₁₇H₁₀ClN₃O): C, 66.35; H, 3.28; Cl, 11.52; N, 13.65. Trovato: C, 66.68; H, 3.09; Cl, 11.84; N, 13.37.

7.5.2.9. 5-Cloro-2-etilpirido[3,2-g]chinossalin-3(4H)-one (29). Resa 65%. Mp 269–270 °C. ¹H NMR (DMSO-d₆): δ 9.21 (s, 1H, NH), 9.04 (d, 1H, J = 4.2 Hz, H-7), 8.27 (d, 1H, J = 8.4 Hz, H-9), 8.22 (s, 1H, H-10), 7.43 (dd, 1H, J = 8.4 e 4.2 Hz, H-8), 2.97 (q, 2H, J = 7.2 Hz, CH₂), 1.32 (t, 3H, J = 7.2 Hz, CH₃). LC/MS: 262 (M+H). Analisi elementare per (C₁₃H₁₀ClN₃O): C, 60.12; H, 3.88; Cl, 13.65; N, 16.18. Trovato: C, 60.34; H, 3.73; Cl, 13.69; N, 16.22.

7.5.2.10. 5-Cloro-3-fenilpirido[3,2-g] chinossalin -2(1H)-one (2β). Resa 80%. Mp >300 °C. ¹H NMR (DMSO-d₆): δ 12.76 (s, 1H, NH), 8.97 (d, 1H, J = 4.0 Hz, H-7), 8.46 (m, 3H), 7.62 (m, 5H). LC/MS: 310 (M+H). Analisi elementare per (C₁₇H₁₀ClN₃O): C, 66.35; H, 3.28; Cl, 11.52; N, 13.65. Trovato: C, 66.02; H, 3.10; Cl, 11.19; N, 13.41.

NOTE BIBLIOGRAFICHE

- [1] Placa M.. *Principi di Microbiologia Medica*. VIII ed. ITA, **2000**, Cap. 44-46, 491-544.
- [2] Drews. J. *Science*. **2000**, 287, 1960-4.
- [3] Armstrong G.L., Wasley A., Simard E.P., McQuillan G.M., Kuhnet W.L., Alter M.J. *Annals of internal medicine*. **2006**, 144, 10, 705-14.
- [4] Strode G.K. ed. *Yellow Fever*. New York, McGraw-Hill. **1951**.
- [5] Pugachev K.V., Guirakhoo F., Monath T.P. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2005**, 18, 5, 387–394.
- [6] Thiel H.J., Collett M.S., Gould E.A., Heinz F.X., Houghton M., Meyers G. In: Virus Taxonomy, (C.M. Fauquet, M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, L.A. Ball, Eds.) *VIIIth Report of the ICTV*, **2005**, 979-996.
- [7] Houe, H. *Biological*, **2003**, 31, 137-143.
- [8] Sparsoli F. *Pharmacy*, **1999**, 33-37.
- [9] Di Bisceglie A.M. e Bacon B.R. *I Quaderni delle scienze*, **2000**, 114, 89-95.
- [10] Simmonds P., Bukh J., Combet C., et al. *Hepatology*. **2005**, 42, 962–973.
- [11] Hnatyszyn H.J. *Antivir. Ther.* **2005**, 10, 1–11.
- [12] Alter H. *The American Journal of Medicine*. **1999**, 107, 16-20.
- [13] Lauer G.M., Bruce D., Walker M.D. *The New England Journal of Medicine*. **2001**, 345, 41-52.
- [14] Lavanchy D. *Clin. Microbiol. Infect.* **2011**, 17, 107–15.
- [15] Koff R.S., *Minuti*. **1998**, 5-13.
- [16] IX Workshop SEIEVA (Sistema Epidemiologico Integrato dell'Epatite Virale Acuta), Porretta Terme, 10-12 dicembre **2009**. Atti.
- [17] Higginbottom A., Quinn E.R., Kuo C.C. et al. *J. Virol.* **2000**, 74, 8, 3642–3649.
- [18] Petracca R., Falugi F., Galli G., et al. *J. Virol.* **2000**, 74, 10, 4824–4830.
- [19] Pileri P., Uematsu Y., Campagnoli S., et al. *Science* **1998**, 282, 5390, 938–941.
- [20] Rocha-Perugini V., Montpellier C., Delgrange D., Wychowski C., Helle F., et al. *PLoS One*. **2008**, 2,3(4):e1866.
- [21] Tsukiyama-Kohara K., Iizuka N., Kohara M., Nomoto A. *J. Virol.* **1992**, 66, 3, 1476-83.
- [22] Kolykhalov A.A., Mihalik K., Feinstone S.M., Rice C.M. *J. Virol.* **2000**, 74, 2046-51.

- [23] Yasui K., Wakita T., Tsukiyama-Kohara K., Funahashi S.I., Ichikawa M., Kajita T., Moradpour D., Wands J.R., Kohara M. *J. Virol.* **1998**, 72, 6048-55.
- [24] Chang J., Yang S.H., Cho Y.G., Hwang S.B., Hahn Y.S., Sung Y.C. *J. Virol.* **1998**, 72, 3060-5.
- [25] Chen C.M., You L.R., Hwang L.H., Lee Y.H. *J. Virol.* **1997**, 71, 9417-26.
- [26] Sakai A., Claire M.S., Faulk K., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2003**, 100, 11646–11651.
- [27] Lohmann V., **Körner** F., Herian U., Bartenschlager R. *J. Virol.* **1997**, 71, 8416-28
- [28] Grakoui A., McCourt D.W., Wychowski C., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1993**, 90, 10583–10587.
- [29] Hijikata M., Shimizu Y.K., Kato H., et al. *J. Virol.* **1993**, 67, 1953–1958.
- [30] Lorenz I.C., Marcotrigiano J., Dentzer T., et al. *Nature.* **2006**, 442, 831–835.
- [31] Bartenschlager R., Ahlborn-Laake L., Mous J., Jacobsen H. *J. Virol.* **1993**, 67, 3835-44.
- [32] Lin C., Pragai B.M., Grakoui A., Xu J., Rice C.M. *J. Virol.* **1994**, 68, 8147-57.
- [33] Farci P., Alter H.J., Shimoda A., Govindarajan S., Cheung L.C., Melpolder J.C., Sacher R.A., Shih J.W., Purcell R.H. *N. Engl. J. Med.* **1996**, 335, 631-4.
- [34] Huang L., Hwang J., Sharma S.D., et al. *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 36417–36428.
- [35] Behrens S.E., Tomei L., De Francesco R. *Embo J.* **1996**, 15, 12-22.
- [36] Lohmann V., Overton H., Bartenschlager R. *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 10807-15.
- [37] Ferrari E., Wright-Minogue J., Fang J.W., Baroudy B.M., Lau J.Y., Hong Z. *J. Virol.* **1999**, 73, 1649-54.
- [38] Bartenschlager R., Lohmann V. *J. Gen. Virol.* **2000**, 81, 1631-1648.
- [39] Perelson A.S., Herrmann E., Micol F., et al. *J. Hepatology.* **2005**, 42, 749–754.
- [40] Wong J.B., McQuillan G.M., McHutchison J.G., Poynard T. *Am J Public Health.* **2000**, 90, 1562-9.
- [41] Buti M., San Miguel R., Brosa M., Cabašés J.M., Medina M., Casado M.A., Fosbrook L., Esteban R. *J. Hepatology.* 2005, 42, 639-645.
- [42] Kwo P.Y., Lawitz E.J., McCone J., Schiff E.R., Vierling J.M., Pound D., Davis M.N. et al. *Lancet.* 2010, 376, 705-16.
- [43] Lavanchy D., Purcell R., Hollinger F.B., Howard C., Alberti A., Kew M., Dusheiko G., Alter M., Ayoola E. et al. *J. Vir. Hepat.* **1999**, 6, 35-47.

- [44] Tanji Y., Hijikata M., Satoh S., Kaneko T., Shimotohno K. *J. Virol.* **1995**, 69, 1575–1581.
- [45] Lamarre D., Anderson P.C., Bailey M., Beaulieu P., Bolger G., Bonneau P. et al. *Nature.* **2003**, 426, 186-189.
- [46] Forestier N., Larrey D., Guyader D. *59th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease.* **2008**, San Francisco, CA, USA.
- [47] Susser S., Welsch C., Wang Y., Zettler M., Domingues F.S., Karey U., Hughes E., Ralston R., Tong X., Herrmann E., Zeuzem S., Sarrazin C. *Hepatology.* **2009**, 50, 1709-1718.
- [48] McHutchison J.G., Everson G.T., Gordon S.C., Jacobson I.M., Sulkowski M., Kauffman R., McNair L., Alam J., Muir A.J. *N. Engl. J. Med.* **2009**, 360, 1827-1838.
- [49] Brainard D.M., Petry A., Van Dyck K., et al. *Hepatology.* **2010**, 52, S706.
- [50] Reesink H.W., Fanning G.C., Farha K.A., et al. *Gastroenterol.* **2010**, 138, 913-21.
- [51] Sarrazin C., Zeuzem S. *Gastroenterol.* **2010**, 138, 447-62.
- [52] Briguglio I., Sandra Piras S., Paola Corona P., Carta A., *Int. J. Med. Chem.* **2011**, Article ID 213135.
- [53] Pierra C., Amador A., Benzaria S., Cretton-Scott E., D'Amours M. et al. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 6614-6620.
- [54] Klumpp K., Leveque V., Le Pogam S., Ma H., Jiang W.R., Kang H., Granycome C., et al. *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 3793-3799.
- [55] Stuyver L.J., McBrayer T.R., Tharnish P.M., Clark J., Hollecker L., Lostia S., et al. *Antivir. Chem. Chemother.* **2006**, 17, 79-87.
- [56] Cole P., Castane R., Bolos J. *Drugs of the Future.* **2009**, 34(4), 282–290.
- [57] Qi Hang J., Yang Y., Harris S.F., Leveque V., Whittington H.J., Rajyaguru S., et al. *J. Biol. Chem.* **2009**, 284, 15517-15529.
- [58] Grakoui A., Hanson H.L. Rice C.M. *Hepatology.* **2001**, 33, 489-495.
- [59] Walter E., Keist R., Niederost B., Pult I., Blum H. E. *Hepatology.* **1996**, 24, 1-5.
- [60] Yan R. Q., Su J. J., Huang D. R., Gan Y. C., Yang C., Huang G. H. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology.* **1996**, 122, 283-288.
- [61] Moriya K., Fujie H., Shintani, Y. Yotsuyanagi, H. Tsutsumi, T., Ishibashi K., Matsuura Y., Kimura S., Miyamura T., Koike K. *Nature Medicine.* **1998**, 4, 1065-1067.
- [62] Koike K., Moriya K., Ishibashi K., Matsuura Y., Suzuki T., Saito I., Iino S., Kurokawa K. and Miyamura T. *J. Gen. Vir.* **1995**, 76, 3031-3038.

- [63] Ilan E., Burakova T., Dagan S., Nussbaum O., Lubin I., Eren R., Ben M. O., et al. *Hepatology*. **1999**, 29, 553-562.
- [64] Petersen J., Dandri M., Gupta S., Rogler C. E. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. **1998**, 95, 310-315.
- [65] Moormann R.J.M., van Gennip H.G.P., Miedema G.K.W., Hulst M.M., van Rijn P. A.. *Journal of Virology*. **1996**, 70, 763-770.
- [66] Mendez E., Ruggli N., Collett M.S., Rice C. M. *Journal of Virology*. **1998**, 72, 4737-4745.
- [67] Meyers G., Tautz N., Becher P., Thiel H.J., Kummerer B. M. *Journal of Virology* **1996**, 70, 8606-8613.
- [68] Ruggli N., Tratschin J.D., Mittelholzer C., Hofmann M. *Journal of Virology*. **1996**, 70, 3478-3487.
- [69] Behrens S. E., Grassmann C. W., Thiel H. J., Meyers G., Tautz N. *Journal of Virology*. **1998**, 72, 2364-2372.
- [70] Lohmann V., Körner F., Koch J. O., Herian U., Theilmann L., Bartenschlager R. *Science*. **1999**, 285, 110-113.
- [71] Blight K.J., Kolykhalov A.A., Rice C.M. *Science*. **2000**, 290, 1972-1974.
- [72] Lindenbach B.D., Evans M.J., Syder A.J., Wolk B., Tellinghuiden T.L., Liu C.C., Maruyama T., Hynes R.O., Burton D.R., McKeating J.A., Rice C.M. *Science*. **2005**, 309, 623-626.
- [73] Sanna P., Carta A., Paglietti G. *Heterocycles*. **2000**, 53, 423-432.
- [74] Carta A., Sanna P., Gherardini L., Usai D., Zanetti S. *Il Farmaco*. **2001**, 56, 993-938.
- [75] Carta A., Boatto G., Paglietti G., Poni G., Setzu M.G., Caredda P. *Heterocycles*. **2003**, 60, 833-842.
- [76] Carta A., Loriga M., Paglietti G., Ferrone M., Fermeglia M., Pricl S., Sanna T., Ibba C., La Colla P., Loddo R. *Bioorg. Med. Chem*. **2007**, 15, 1914-1927.
- [77] F. Beilstein , A. Kurbatow. *Ann. Chem*. **1879**,196,214
- [78] Carta, A., Palomba, M., Corona, P. *Heterocycles*. **2006**, 68, 1715.
- [79] Ochoa C.; Rodriguez J. J. *Heterocyclic Chem*. **1997**, 34, 1053.
- [80] Charlton P.T.; Maliphant G.K.; Oxley P.; Peak D.A. *J. Chem. Soc*. **1951**, 485
- [81] Carta A., Loriga G., Piras S., Paglietti G., Ferrone M., Fermeglia M., Pricl S., La Colla P., Secci B., Collu G., Loddo R. *Medicinal Chemistry*. **2006**, 2, 577-589.
- [82] Carta A., Paglietti G. *Arkivoc*. **2004**, v, 66-75.
- [83] Carta A., Sias A., Piras S., Paglietti G. *Heterocycles*, **2008**, 75, 2493-2505.
- [84] Carta, A.; Sanna, P.; Gherardini, L.; Usai, D.; Zanetti, S. *Il Farmaco* **2001**, 56, 933.

- [85] Hall C.B. *N. Engl. J. Med.* **2001**, 344, 1919.
- [86] Falsey A.R., Walsh E.E. *Clin. Microbiol. Rev.* **2000**, 13,371.
- [87] Ljungman P., Ward K.N., Crooks B.N. et al. *Bone Marrow Transplant.* **2001**, 28, 479–484.
- [88] Bukhtiyarova M., Rizzo C.J., Kettner C.A., Korant B.D., Scarnati H.T., King R.W. *Antivir. Chem. Chemother.* **2001**, 12, 367–373.
- [89] Moradpour D., Brass V., Bieck E., Friebe P., Gosert R., Blum H.E., Bartenschlager R., Penin F., Lohmann V. *J. Virol.* **2004**, 78, 13278–13284.
- [90] Joyce C.M., Steitz T.A. *J. Bacteriol.* **1995**, 177, 6321–6329.
- [91] Bressanelli S., Tomei L., Rey F.A., De Francesco R. *J. Virol.* **2002**, 76, 3482-3492.
- [92] Hong Z., Cameron C.E., Walker M.P., Castro C., Yao N., Lau J.Y., Zhong W. *Virology.* 2001, 285, 6–11.
- [93] Le Pogam S., Jiang W., Leveque V., Rajyaguru S., Ma H., Kang H., Jiang S., et al. *Virology.* **2006**, 351, 349-359.
- [94] Di Marco S., Volpari C., Tomei L., Altamura S., et al. *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 29765-29770.
- [95] Biswall B.K., Cherney M.M., Wang M., Chan L., et al. *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 1802-18210.
- [96] Penin F., Brass V., Appel N., Ramboarina S., Montserret R., Ficheux D., Blum H. E., Bartenschlager R., Moradpour D. *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 40835–40843.
- [97] Lai V.C.H., Kao C.C., Ferrari E., Park J., Uss A.S., Wright-Minogue J., Hong Z., Lau J.Y.N. *J. Virol.* **1999**, 73, 10129–10136.
- [98] Choi K.H., Groarke J.M., D. Young, Kuhn R.J., Smith J.L., Pevear D.C., Rossmann M.G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, 101, 13, 4425-4430.
- [99] Paeshuyse J., Leyssen P., Mabery E., Boddeker N., Vrancken R., Froeyen M., Ansari I. H., Dutartre H., Rozenski J. et al. *J. Virol.* **2006**, 80, 149–160.
- [100] (Choi K.H., Gallei H., Becher P., Rossmann M.G. *Structure.* **2006**, 14, 1007.
- [101] Puerstinger G., Paeshuyse J., De Clercq E., Neyts J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17, 390-393.
- [102] Corona P., Piras S., Palomba M., Carta A. *Mini-reviews in Organic Chemistry.* **2008**, 5, 295.
- [103] Perry R.J., Wilson B.D. *J.Org.Chem.* **1993**, 58, 7016-7021.

SOMMARIO

	Pag.
PREMESSA.....	1
1 INTRODUZIONE.....	4
1.1 I VIRUS.....	4
1.2 CICLO REPLICATIVO VIRALE.....	7
1.3 PATOLOGIE VIRALI E LORO IMPORTANZA SOCIALE.....	12
1.4 I FARMACI AD ATTIVITÀ ANTIVIRALE.....	14
2 RNA-VIRUS E OBIETTIVI DELLA TESI.....	16
2.1 L'EPATITE C.....	20
2.2 EPIDEMIOLOGIA.....	22
2.3 L'INFEZIONE	23
2.4 LA TERAPIA.....	27
2.5 POSSIBILI TARGETS MOLECOLARI.....	30
2.6 SISTEMI PER LO STUDIO DELLA REPLICAZIONE VIRALE DI HCV.....	36
3 LA RICERCA.....	43
3.1 PREPARAZIONE DI DERIVATI DI SEMPLIFICAZIONE MOLECOLARE DEL 4-(4-CLORO-3H-IMIDAZO[4,5-g]CHINOLIN-2-IL)BENZONITRILE.....	48
3.2 PREPARAZIONE DI DERIVATI DI SOSTITUZIONE BIOISOSTERICA DEL SISTEMA IMIDAZOLICO: LE TRIAZOLO[4,5-g]CHINOLINE	54
3.3 PREPARAZIONE DI DERIVATI DI ALCHILAZIONE DEL NUCLEO TRIAZOLO[4,5-g] CHINOLIN-1-OSSIDO	57
3.4 PREPARAZIONE DI DERIVATI DEL TRIAZOLO[4,5-g]CHINOLIN-8-OL- N-OSSIDO.....	58
3.5 PREPARAZIONE DI DERIVATI A STRUTTURA PIRIDO[2,3-g] CHINOSSALINICA.....	59
4 VALUTAZIONE BIOLOGICA.....	61
5 MODELLISTICA MOLECOLARE.....	70
6 CONCLUSIONI.....	82
7 PARTE SPERIMENTALE.....	85
NOTE BIBLIOGRAFICHE.....	97